



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών

Περιβάλλοντος

Κατεύθυνση: Μηχανικών Περιβάλλοντος

**Έλεγχος βιοαποδόμησης της
A-Cypermethrin από τον *Saccharomyces
cerevisiae***

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Δημήτριος Βασιλειάδης

A.M.: 2011050003

Χανιά, Ιούνιος 2025



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος

Κατεύθυνση: Μηχανικών Περιβάλλοντος

**Έλεγχος βιοαποδόμησης της
A-Cypermethrin από τον *Saccharomyces
cerevisiae***

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Δημήτριος Βασιλειάδης

A.M.: 2011050003

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Καθηγήτρια (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ) Βενιέρη Δανάη

Ομότιμος Καθηγητής Ντουρτόγλου Βασίλειος

Ομότιμος Καθηγητής Καλογεράκης Νικόλαος

Copyright

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτριά μου, κ. Βενιέρη Δανάη για την άψογη συνεργασία μας, αφού μετά από ένα αργό και επίπονο μαραθώνιο αναζήτησης καθηγητή, υπήρξε η μόνη που δέχθηκε το θέμα που ήθελα να ασχοληθώ. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ντουρτόγλου Βασίλειο για την πολύτιμη βοήθειά του στην εύρεση του θέματος που επέλεξα καθώς επίσης και την Κωνσταντίνα Κραββαρίτη για την βοήθεια που μου πρόσφερε στην διεκπεραίωση της πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής Καλογεράκη Νικόλαο και Ντουρτόγλου Βασίλειο για την συμβολή τους.

Στο σημείο αυτό δεν θα μπορούσα να ξεχάσω την οικογένεια μου και την Ελπινιώ, τον Γιώργο, τον Αντώνη, τον Κωστή, τον Κωστάκη, το Θανάση, το Θοδωρή, την Ολιάννα για την στήριξη την υπομονή και την βοήθεια που μου έδωσαν καθ' όλη τη μακρά (μόνο 10 χρόνια) διαδρομή στις σπουδές μου καθώς και στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το Αυτοδιαχειριζόμενο Στέκι του Πολυτεχνείου Κρήτης και όλους του συντρόφους μου εντός και εκτός της ακαδημαϊκής κοινότητας, όπου όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου και της ενήλικης ζωής μου γενικότερα με διαμόρφωσαν σε κοινωνικό και πολιτικό επίπεδο.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της αποικοδομητικής δράσης του κλασικού σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* έναντι της εντομοκτόνου ουσίας A-cypermethrin σε υγρές καλλιέργειες του μύκητα και σε νωπά φρούτα (πορτοκάλια). Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία προκύπτει ότι οι σακχαρομύκητες παρουσιάζουν ενζυμική (εστερική) δράση εναντίον των συνθετικών πυρεθροειδών. Κατά συνέπεια, ο συγκεκριμένος σακχαρομύκητας επιλέχθηκε και αναπτύχθηκε με τη μέθοδο της υγρής καλλιέργειας και τη χρήση της A-cypermethrin ως κύριας πηγής ενέργειας. Στη συνέχεια, απομονώθηκε και χρησιμοποιήθηκε εκ νέου σε μελέτες αποικοδόμησης, με σκοπό τον προσδιορισμό τόσο του εύρους των συγκεντρώσεων της A-cypermethrin στα οποία ο σακχαρομύκητας έχει σημαντική επίδραση αλλά και τον προσδιορισμό/ταυτοποίηση των προϊόντων διάσπασής της. Απώτερος στόχος ήταν ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της A-cypermethrin, αλλά και η σκιαγράφηση του τοξικολογικού προφίλ των προϊόντων διάσπασης. Η τελευταία πραγματοποιήθηκε έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχει επικινδυνότητα για τον τελικό καταναλωτή μέσω της διατροφικής οδού, τόσο από τα υπολείμματα της κύριας δραστικής ουσίας όσο και από τα προϊόντα διάσπασης αυτής. Ο σακχαρομύκητας παρουσίασε ισχυρή ενζυμική δράση διασπώντας την A-cypermethrin ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις έως 100 ppm.

Από τη μελέτη των προϊόντων διάσπασης προέκυψε ότι ο βασικός μεταβολίτης της A-cypermethrin (3-phenoxy-benzaldehyde), ο οποίος παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα, με τη πάροδο του χρόνου δεν ανιχνεύεται ή ανιχνεύεται σε πολύ χαμηλά ποσοστά. Από τη μείωση της συγκεκριμένης ουσίας και της A-cypermethrin προκύπτει ένα επιθυμητό αποτέλεσμα, δεδομένου του χαμηλού επιπέδου τοξικότητας των προϊόντων διάσπασης.

Κατά συνέπεια, ο συγκεκριμένος σακχαρομύκητας θα μπορούσε να ενταχθεί στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής πρότασης, θέτοντας μια ακόμη παράμετρο για τη διερεύνηση και επιλογή των ενζύμων του που διασπούν την A-cypermethrin, αυτή του τοξικολογικού προφίλ των προϊόντων διάσπασης της ουσίας.

Abstract

The current study investigated the biodegradative potential of the conventional yeast *Saccharomyces cerevisiae* against the insecticidal compound A-cypermethrin, both in liquid fungal cultures and on fresh fruit (oranges). According to the international literature, yeasts demonstrate esterase enzymatic activity capable of degrading synthetic pyrethroids. Based on this, *S. cerevisiae* was selected and cultured in liquid medium using A-cypermethrin as the primary energy source.

Following initial cultivation, the yeast was isolated and further applied in degradation studies to determine the concentration range of A-cypermethrin at which the yeast exerts a significant effect, as well as to identify and characterize its degradation products. The ultimate aim was to quantify residual A-cypermethrin and assess the toxicological profile of its breakdown products. This evaluation was essential to determine potential dietary risks to the end consumer, both from the parent compound and its metabolites.

The yeast exhibited strong enzymatic activity, successfully degrading A-cypermethrin even at elevated concentrations (up to 100 ppm).

Analysis of degradation products revealed that the major metabolite, 3-phenoxy-benzaldehyde—known for its high toxicity—was either not detected or detected only at trace levels over time. The observed reduction in both A-cypermethrin and this metabolite indicates a favorable outcome, as the remaining degradation products were found to exhibit low toxicity.

Therefore, this strain of *S. cerevisiae* may be considered within the scope of the current research framework, adding value through the investigation and selection of its enzymatic systems that degrade A-cypermethrin, particularly in terms of the toxicological profile of its degradation byproducts.

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή	11
1.1	Ιστορική ανασκόπηση φυτοφάρμακων.....	11
1.2	Φυτοφάρμακα	13
1.3	Κατηγορίες γεωργικών φαρμάκων	14
1.3.1	Οικογένεια Πυρεθρινοειδών	16
1.3.2	A-cypermethrin	20
1.4	Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων και επιπτώσεις	22
1.5	Βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων	28
1.6	Μικροβιακή Βιοαποδόμηση της A-Cypermethrin	31
1.7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
1.8	Σκοπός της εργασίας	35
2	Πειραματικές Μέθοδοι & Υλικά	36
2.1	Υλικά και Αντιδραστήρια	36
2.2	Θρεπτικά Υλικά	36
2.3	Συσκευές και Όργανα	36
2.4	Στελέχη του μύκητα <i>S. cerevisiae</i>	38
2.5	Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης και συντήρησης του <i>S. cerevisiae</i>	38
2.6	Τεχνικές προετοιμασίας και ανάλυσης	39
2.6.1	Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE).....	39
2.6.2	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC).....	40
2.6.3	Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME).....	42
2.6.4	Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC).....	45
2.6.5	Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography–Mass Spectrometry, GC–MS).....	46
2.7	Δημιουργία υγρών καλλιεργειών	48
2.7.1	Ενεργοποίηση <i>S.cerevisiae</i>	48
2.7.2	Ανάπτυξη <i>S. cerevisiae</i>	48
2.8	Απομόνωση των κυττάρων ζαχαρομύκητα <i>S. cerevisiae</i>	48

2.9	Πρώτο στάδιο εξοικείωσης του ζαχαρομήκητα με την A-cypermethrin.....	49
2.9.1	Υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE) στα buffer διαλύματα με χρήση hexane	50
2.10	Δεύτερο στάδιο εξοικείωσης του ζαχαρομήκητα με την A-cypermethrin.....	51
2.10.1	Προετοιμασία παρασκευάσματος για εφαρμογή σε νωπά φρούτα (πορτοκάλια).....	52
2.10.2	Διαδικασία εκχύλισης πορτοκαλιών	52
2.10.3	Χαρακτηριστικά οργάνου Αέριας Χρωματογραφίας – Φασματομετρίας Μάζας.....	53
2.11	Συνοπτική περιγραφή πειραματικού μέρους	54
2.11.1	Δημιουργία υγρών καλλιιεργειών ζαχαρομήκητα.....	55
2.11.2	Απομόνωση των κυττάρων με φυγοκεντρική και δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων.....	55
2.11.3	Υγρή-υγρή εκχύλιση ρυθμιστικών διαλυμάτων	55
2.11.4	Ανάλυση των δειγμάτων με τη χρήση HPLC	56
2.11.5	Επιλογή των κυττάρων από τα 50 ppm και επαναχρησιμοποίησή τους	56
2.11.6	Δημιουργία νέου buffer διαλύματος.....	56
2.11.7	Υγρή-υγρή εκχύλιση στα νέα διαλύματα buffer	56
2.11.8	Διαχωρισμός κυττάρων με φυγοκέντρωση και συντήρηση των κυττάρων στην κατάψυξη.....	57
2.11.9	Δημιουργία παρασκευάσματος αποτελούμενο από 2% tween 20 και διάλυμα buffer	57
2.11.10	Ψεκασμός με το παρασκεύασμα στα τρία από τα τέσσερα πορτοκάλια.....	57
3	Αποτελέσματα & Συζήτηση.....	59
3.1	Δημιουργία πρότυπης καμπύλης A-cypermethrin.....	61
3.2	Αποδόμηση της A-cypermethrin.....	62
3.3	Χρωματογραφήματα	
3.4	Αποδόμηση ουσίας σε δείγματα πορτοκαλιών.....	67
4	Συμπεράσματα.....	74

5	Μελλοντικές Προτάσεις	75
6	Βιβλιογραφία	76

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1:	Ταξινόμηση των φυταφαρμάκων βάσει των χημικών τους ιδιοτήτων (Προσαρμοσμένο από Akashe et al. 2018)	15
Εικόνα 2:	A. Άνθη <i>Tanacetum cinerariaefolium</i> . B. Χημικές δομές φυσικών πυρεθρινών. Γ. Χημική δομή της αλλεθρίνης (Προσαρμοσμένο από Matsuo 2019).	17
Εικόνα 3:	Ανάπτυξη των πυρεθροειδών σε χρονολογική αναπαράσταση σε δέντρο (Προσαρμοσμένο από Matsuo 2019).	20
Εικόνα 4:	A. Μακροσκοπική φωτογραφία αποικιών του μύκητα <i>S. cerevisiae</i> σε στερεό εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό. B. Εικόνα κυττάρων του μύκητα σε οπτικό μικροσκόπιο.	33
Εικόνα 5:	Αποθηκευμένα στην κατάψυξη κύτταρα μαγιάς από όλα τα στάδια του πειράματος	37
Εικόνα 6:	Απελευθέρωση των αερίων κατά τη διάρκεια της υγρής-υγρής εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction, LLE)	40
Εικόνα 7:	Σχηματική απεικόνιση συσκευής HPLC	41
Εικόνα 8:	Διαδικασία δειγματοληψίας με την SPME	43
Εικόνα 9:	Διάγραμμα αέριου χρωματογράφου (πηγή: Μπακέας, 2008)	45
Εικόνα 10:	Τα βασικά μέρη ενός συστήματος GC-MS(Fengetal, 2019).....	47
Εικόνα 11:	Μεταβολίτες που παράγονται από την βιοαποδόμηση των πυρεθροειδών (Bhatt et al., 2020)	59
Εικόνα 12:	Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής προσέγγισης που ακολουθήθηκε από τους Sundaram et al (2013) για την αποικοδόμηση και αποτοξικοποίηση της Cypermethrin. Προσαρμοσμένο από Sundaram et al (2013).	60
Εικόνα 13:	Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής προσέγγισης που ακολουθήθηκε από τους Birolli et al (2022) για την αποικοδόμηση και αποτοξικοποίηση της Cypermethrin. Προσαρμοσμένο από Birolli et al (2022).	61

Πίνακας Γραφημάτων

Γράφημα 1:	Πρότυπη καμπύλη	61
------------	-----------------------	----

Γράφημα 2: Χρωματογράφημα α-cypermethin 2ppm	65
Γράφημα 3:: Χρωματογράφημα α-cypermethin 10ppm	65
Γράφημα 4:: Χρωματογράφημα α-cypermethin 20ppm	66
Γράφημα 5:: Χρωματογράφημα α-cypermethin 50ppm	66
Γράφημα 6 Χρωματογράφημα GC-MS εκχυλίσματος πορτοκαλιού που εκχυλίστηκε την ίδια μέρα του ψεκασμού (T=0)	69
Γράφημα 7 Χρωματογράφημα GC-MS εκχυλίσματος πορτοκαλιού που εκχυλίστηκε τρεις μέρες μετά το ψεκασμό (T=3 days)	70
Γράφημα 8: Χρωματογράφημα GC-MS εκχυλίσματος πορτοκαλιού που εκχυλίστηκε έξι μέρες μετά το ψεκασμό (T=6 days).....	70
Γράφημα 9: Χρωματογράφημα GC-MS εκχυλίσματος πορτοκαλιού που δεν ψεκάστηκε έξι μέρες μετά το ψεκασμό (T=6 days)	71

1 Εισαγωγή

1.1 Ιστορική ανασκόπηση φυτοφάρμακων

Η γεωργία αποτελεί τη ραχοκοκαλιά του ανθρώπινου πολιτισμού εδώ και χιλιάδες χρόνια, παρέχοντας τροφή, φυτικές ίνες για ένδυση και άλλους πόρους που είναι απαραίτητοι για την επιβίωση και την ανάπτυξη. Αποτελεί το θεμέλιο της ανθρώπινης κοινωνίας και η ανάπτυξη της γεωργίας είναι στενά συνυφασμένη με την εξέλιξη του ανθρώπινου πολιτισμού και της ιστορίας.

Η άνοδος της γεωργίας μπορεί να αναχθεί ήδη από τη νεολιθική εποχή, όταν οι άνθρωποι πέρασαν από το κυνήγι και τη συλλογή καρπών, σε εξημέρωση καλλιεργειών και ζώων. Αυτή η επανάσταση στην ανθρώπινη κοινωνία επέτρεψε μια πιο σταθερή και συνεπή προμήθεια τροφίμων, η οποία με τη σειρά της οδήγησε στην αύξηση του πληθυσμού, στην ανάπτυξη οικισμών και πόλεων και στην εμφάνιση πολύπλοκων κοινωνικών δομών (JARED, 2005).

Καθ' όλη τη διάρκεια της ιστορίας, η γεωργία διαδραμάτισε κρίσιμο ρόλο στη διαμόρφωση του ανθρώπινου πολιτισμού και της κοινωνίας. Οι αρχαίοι πολιτισμοί της Μεσοποταμίας, της Αιγύπτου και της Κίνας, για παράδειγμα, στηρίχθηκαν όλοι σε μεγάλο βαθμό στη γεωργία, η οποία αποτέλεσε τη βάση για τις οικονομίες τους και τους επέτρεψε να υποστηρίξουν μεγάλους πληθυσμούς (JARED, 2005; Thornton, 1996).

Στη σύγχρονη εποχή, η γεωργία παραμένει ζωτικό μέρος της ανθρώπινης κοινωνίας, παρέχοντας τρόφιμα, φυτικές κλωστές και άλλους πόρους για έναν αυξανόμενο παγκόσμιο πληθυσμό. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), υπάρχουν σήμερα περισσότερα από 570 εκατομμύρια αγροκτήματα παγκοσμίως, τα οποία απασχολούν συνολικά πάνω από 1,3 δισεκατομμύρια ανθρώπους και παράγουν πάνω από 4 δισεκατομμύρια μετρικούς τόνους τροφίμων ετησίως (*Movable Feast Ten Millennia Food Globalization | Regional and World History: General Interest | Cambridge University Press*, n.d.).

Ωστόσο, παρά τη σημασία της γεωργίας, ο τομέας αντιμετωπίζει πολλές προκλήσεις, όπως η κλιματική αλλαγή, η υποβάθμιση του εδάφους, η λειψυδρία και η ταχεία αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού. Οι προκλήσεις αυτές έχουν οδηγήσει σε μια ανανεωμένη εστίαση στη βιώσιμη γεωργία, η οποία επιδιώκει να προωθήσει φιλικές

προς το περιβάλλον και κοινωνικά υπεύθυνες γεωργικές πρακτικές που μπορούν να συμβάλουν στην κάλυψη των αναγκών του παρόντος χωρίς να θέτουν σε κίνδυνο την ικανότητα των μελλοντικών γενεών να καλύψουν τις δικές τους ανάγκες (Tilman et al., 2011).

Συνεπώς, γίνεται φανερό πως η γεωργία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανθρώπινη ιστορία, παρέχοντας τη βάση για τις κοινωνίες, τις οικονομίες και τους πολιτισμούς μας. Καθώς προχωράμε προς το μέλλον, θα παραμείνει ένα ουσιαστικό μέρος της ανθρώπινης ζωής, και εναπόκειται σε εμάς να διασφαλίσουμε ότι θα αναπτύξουμε βιώσιμες γεωργικές πρακτικές που θα μπορούν να καλύψουν τις ανάγκες ενός αυξανόμενου παγκόσμιου πληθυσμού, διατηρώντας παράλληλα τον πλανήτη μας για τις μελλοντικές γενιές.

Για τους λόγους αυτούς, οι άνθρωποι ανέπτυξαν μεθόδους βελτιστοποίησης της καλλιέργειας φυτών. Ήδη από το 2000 π.Χ. οι άνθρωποι χρησιμοποιούν φυτοφάρμακα για την προστασία των καλλιεργειών τους. Μία από τις πρώτες καταγεγραμμένες χρήσεις φυτοφαρμάκων στη γεωργία χρονολογείται από την αρχαία Σουμερία πριν από 4.500 χρόνια., όπου οι αγρότες χρησιμοποιούσαν ενώσεις θείου για τον έλεγχο εντόμων και ακάρεων. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν επίσης διάφορες ουσίες, όπως αρσενικό και υδράργυρο, για να προστατεύουν τις καλλιέργειές τους από τα παράσιτα. Στην Κίνα, οι αγρότες χρησιμοποιούσαν έναν συνδυασμό θείου και αρσενικού για τον έλεγχο των παρασίτων ήδη από τον 10ο αιώνα (AL-Ahmadi, 2019).

Στο Ριγκβέδα (Rig Veda), ένα από τα τέσσερα ιερά κανονικά κείμενα (utiruti) του Ινδουισμού, που χρονολογείται 4.000 ετών, αναφέρεται η χρήση δηλητηριωδών φυτών για την καταπολέμηση των εχθρών και ασθενειών των φυτών. Από τον 15ο αιώνα, τοξικές ουσίες όπως το αρσενικό, ο υδράργυρος και ο μόλυβδος χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες για να σκοτώνουν τα παράσιτα. Τον 17ο αιώνα, χρησιμοποιήθηκε η θειϊκή αμμωνία ως φυτοφάρμακο και προερχόταν από φύλλα καπνού. Το 19ο αιώνα παρουσιάστηκαν δύο ακόμα φυτοφάρμακα, το πύρεθρο, που προέρχεται από τα χρυσάνθεμα, και η ροτενόνη, που προέρχεται από τις ρίζες λαχανικών (AL-Ahmadi, 2019).

Μέχρι τη δεκαετία του 1950, κυριαρχούσαν τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα με αρσενικό. Ωστόσο, η χρήση συνθετικών φυτοφαρμάκων δεν διαδόθηκε ευρέως μέχρι τον 20ό αιώνα. Τη δεκαετία του 1930, η ανάπτυξη των οργανοχλωριωμένων

φυτοφαρμάκων, όπως το DDT, έφερε επανάσταση στη γεωργία παρέχοντας εξαιρετικά αποτελεσματικό έλεγχο των παρασίτων. Τα φυτοφάρμακα αυτά χρησιμοποιήθηκαν ευρέως για δεκαετίες, αλλά οι ανησυχίες σχετικά με τις επιπτώσεις τους στο περιβάλλον και την υγεία οδήγησαν τελικά στην απαγόρευσή τους σε πολλές χώρες. Έκτοτε προτιμώνται τα παράγωγα πυρεθρίνης (Pimentel, 2005; Tudi et al., 2021).

1.2 Φυτοφάρμακα

Τα φυτοφάρμακα είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται στον έλεγχο των παρασίτων, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων. Ο όρος φυτοφάρμακα περιλαμβάνει όλα από τα ακόλουθα: ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα (όπως ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων, τερμιτοκτόνα), νηματωδοκτόνα, μαλακιοκτόνα, ιχθυοκτόνα, πτηνοκτόνα, τρωκτικοκτόνα, βακτηριοκτόνα, εντομοαπωθητικά, απωθητικά ζώων, αντιμικροβιακά, μυκητοκτόνα, απολυμαντικά, και αποστειρωτικά (Weiss et al., 2004). Γενικά, ένα φυτοφάρμακο είναι μια χημική ουσία ή βιολογικός παράγοντας (όπως ιός, βακτήριο ή μύκητας) που καταστέλλει, εξουδετερώνει, σκοτώνει ή απλά αποθαρρύνει τα παράσιτα. Τα παράσιτα μπορεί να είναι έντομα, φυτικά παθογόνα, ζιζάνια, μαλάκια, πουλιά, θηλαστικά, ψάρια, νηματώδη (ασκαρίδες), και μικρόβια που φθείρουν την ιδιοκτησία, ενοχλούν, ή είναι φορείς μεταδοτικών ή μη νόσων. Ωστόσο, τα φυτοφάρμακα έχουν και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως πιθανή τοξικότητα για τον άνθρωπο και άλλα είδη (AL-Ahmadi, 2019; Tudi et al., 2021).

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) ως «φυτοφάρμακο» θεωρείται κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή ή τον έλεγχο τυχόν επιβλαβών οργανισμών, όπως φορείς ανθρώπινων ή ζωικών ασθενειών, ανεπιθύμητα είδη φυτών ή ζώων, που είτε είναι βλαπτικά κατά τη διάρκεια ή παρεμβαίνουν στην παραγωγή, την επεξεργασία, την αποθήκευση, τη μεταφορά, ή την πώληση τροφίμων, γεωργικών προϊόντων, ξυλείας και προϊόντων της, ή ζωοτροφές, ή ουσίες που χορηγούνται σε ζώα για την καταπολέμηση εντόμων, αραχνοειδών, ή άλλων παρασίτων εντός ή επί του σώματός τους. Ο όρος περιλαμβάνει τις ουσίες που προορίζονται ως ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών, αποφυλλωτικά, ξηραντικά, ή παράγοντες για το αραίωμα καρπών και προστασία από πρόωρη πτώση του καρπού. Επίσης, περιλαμβάνονται οι ουσίες που

χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες, είτε πριν είτε μετά τη συγκομιδή για να προστατεύσουν τα προϊόντα από αλλοίωση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της μεταφοράς» (*International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*, 2002).

1.3 Κατηγορίες γεωργικών φαρμάκων

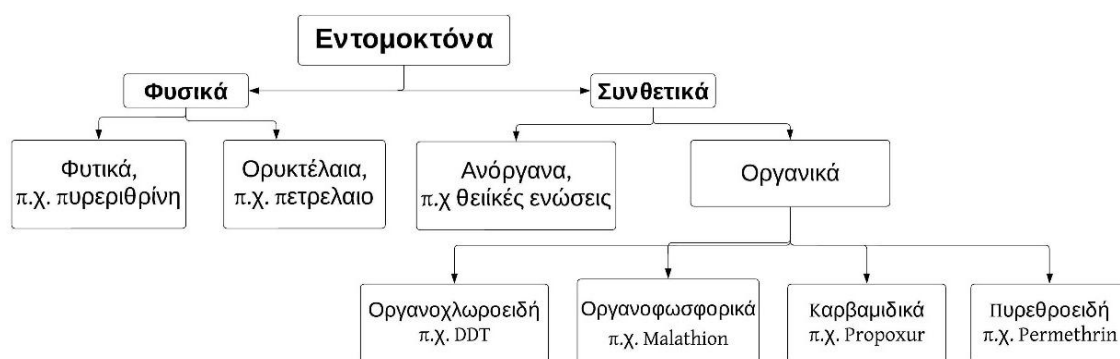
Τα φυτοφάρμακα κατηγοριοποιούνται βάσει του στοχευμένου οργανισμού (π.χ. ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, τρωκτικοκτόνα, και πεντικιλοκτόνα) (Gilden et al., 2010), τη χημική δομή (π. χ., οργανικά, ανόργανα, συνθετικά ή βιολογικά-βιοεντομοκτόνα) ("Educational and Informational Strategies to Reduce Pesticide Risks," 1997), και τη φυσική κατάσταση (π.χ. αέρια (υποκαπνιστικά)) ("Educational and Informational Strategies to Reduce Pesticide Risks," 1997) (Εικόνα 1). Στα βιοεντομοκτόνα περιλαμβάνονται μικροβιακά και βιοχημικά φυτοφάρμακα. Στα φυτικής προέλευσης φυτοφάρμακα, ή "βοτανικά", που αναπτύσσονται ταχέως περιλαμβάνονται τα πυρεθροειδή, τα ροτενοειδή, τα νικοτινοειδή, και μια τέταρτη ομάδα που περιλαμβάνει τη στρυχνίνη και τη σκίλιροσίδη (Akashe et al., 2018).

Μια από τις πολυπληθέστερες ομάδες εντομοκτόνων είναι τα οργανοφωσφορικά. Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις περιλαμβάνονται και σε άλλες ομάδες όπως τα χημειοστεριωτικά εντόμων, τα μυκητοκτόνα, τα ακαρεοκτόνα, τα ζιζανιοκτόνα, τα αποφυλλωτικά και τα νηματωδοκτόνα. Τα περισσότερα βρίσκονται σε υγρή μορφή και έχουν χαρακτηριστική ισχυρή οσμή, είναι δηλητήρια που στοχεύουν στο νευρικό σύστημα και δρουν στις χολινεργικές συνάψεις (ακετυλοχολίνη, Ach). Η παρεμβολή των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων στις χολινεργικές συνάψεις του κεντρικού νευρικού συστήματος των εντόμων προκαλεί ακαριαίο θάνατο.

Τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα σε αντίθεση με τα οργανοφωσφορικά, βρίσκονται σε κρυσταλλική μορφή και δεν έχουν ισχυρή οσμή. Τα περισσότερα είναι πολύ τοξικά για τον άνθρωπο και τα ζώα (Akashe et al., 2018).

Μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες γεωργικών φαρμάκων είναι τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα (π.χ. το DDT). Γενικό χαρακτηριστικό τους είναι η σταθερότητα των μορίων τα οποία δεν βιοαποικοδομούνται εύκολα και έχουν την τάση να συσσωρεύονται στο περιβάλλον, λόγω του ότι τα μόρια τους αποτελούνται κυρίως ή αποκλειστικώς από δεσμούς C-C, C-H και C-Cl, οι οποίοι τείνουν να είναι

ανενεργοί υπό συνήθεις περιβαλλοντικές συνθήκες. Το δεύτερο φυσικοχημικό χαρακτηριστικό ιδιαίτερης σημασίας αποτελεί η χαμηλή διαλυτότητά τους στο νερό. Αυτό, σε συνδυασμό με τον ισχυρά λιποφυλικό τους χαρακτήρα υποδηλώνει ότι διαθέτουν συντελεστές λιπών οι οποίοι ευνοούν ιδιαίτερα την συσσώρευση τους στα βιολογικά λίπη. Έτσι τα οργανοχλωριωμένα λιποφυλικά μόρια εισέρχονται περισσότερο ή λιγότερο εύκολα στα σώματα των ζώων και των φυτών και «παγιδεύονται» σ' αυτά (Akashe et al., 2018).



Εικόνα 1: Ταξινόμηση των φυτοφαρμάκων βάσει των χημικών τους ιδιοτήτων (Προσαρμοσμένο από Akashe et al. 2018)

Ένας άλλος τρόπος κατηγοριοποίησης των γεωργικών φαρμάκων, είναι βάσει των οργανισμών που στοχεύουν. Τα εντομοκτόνα, θανατώνουν τα έντομα τα οποία πλήττουν τα φυτά χωρίς να επηρεάζουν τα ίδια. Αυτά, ταξινομούνται σε επαφής και διασυστηματικά. Στα επαφής, το φάρμακο έρχεται σε επαφή με το έντομο και στη συνέχεια εισχωρεί στο εσωτερικό του, ενώ στα διασυστηματικά το φάρμακο ενεργοποιείται μετά από κατάποση (Yadav & Devi, 2017).

Τα παρασιτοκτόνα και μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται εναντίον των παθογόνων φυτών είναι τα ανόργανα μυκητοκτόνα (θείο, χαλκός), τα οργανικά με μη εξειδικευμένη δράση (διθειοκαρβαμιδικά, κινόνες), τα μυκητοκτόνα με εξειδικευμένη δράση (καρβοξαμιδικά, βενζιμιδαζολικά, φαινυλοκαρβαμιδικά) καθώς και νέες ομάδες μυκητοκτόνων (στρομπιλουρίνες, ανιλινοπυριμιδίνες) (Yadav & Devi, 2017). Τα ζιζανιοκτόνα περιλαμβάνουν τις οργανικές ή ανόργανες χημικές ουσίες, οι οποίες όταν ψεκάζονται είτε άμεσα στα φυτά (ζιζανιοκτόνα φυλλώματος), είτε έμμεσα

(ζιζανιοκτόνα εδάφους), παρεμποδίζουν τη φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη των ανεπιθύμητων φυτών σε ένα αγροοικοσύστημα (Yadav & Devi, 2017).

Σήμερα, υπάρχουν στο εμπόριο περισσότερες από 200 δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως ζιζανιοκτόνα, ενώ ακόμα περισσότερες είναι στο στάδιο μελέτης ή την έγκριση της κυκλοφορίας τους. Η ευρεία χρήση των ζιζανιοκτόνων λόγω της άμεσης αποτελεσματικότητας, της ευκολίας χρήσης και της ευρείας δράσης τους, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των αποδόσεων των καλλιεργούμενων φυτών, τη βελτίωση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων και την αύξηση του γεωργικού εισοδήματος. Σε αυτό έχει συντελέσει η καλλιέργεια υψηλής απόδοσης ποικιλιών σε συνδυασμό με τη χρήση λιπασμάτων και άλλων φυτοπροστατευτικών ουσιών. Η μη ορθή όμως και εκτεταμένη χρήση ορισμένων ζιζανιοκτόνων συνέβαλε μεταξύ άλλων στη ρύπανση του περιβάλλοντος (έδαφος, νερό, ατμόσφαιρα) καθώς και στη διατάραξη της οικολογικής ισορροπίας. Οι οικολογικές επιδράσεις των ζιζανιοκτόνων περιλαμβάνουν τοξικές επιπτώσεις σε ωφέλιμους οργανισμούς που δεν είναι στόχοι (μικροοργανισμοί εδάφους, φυτά, αρθρόποδα, μέλισσες, υδρόβιοι οργανισμοί, πτηνά, γαιοσκώληκες). Για αυτό το λόγο, πλέον κυριαρχούν στην αγορά πλήρως τα οργανικά ζιζανιοκτόνα. Η χρήση τους βασίζεται στο γεγονός ότι είναι πολύ περισσότερο τοξικά για ορισμένα είδη φυτών. Έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξάλειψη συγκεκριμένων φυτών χωρίς να επηρεάζουν άλλα (Yadav & Devi, 2017).

Τα νηματωδοκτόνα, χρησιμοποιούνται για την εξόντωση των φυτό-παρασιτικών νηματωδών παρασίτων (π.χ. ισοθιοκυανικό μεθύλιο, νταζομέτ, αβερμεκτίνη). Γενικά έχουν τοξικότητα ευρέως φάσματος, υψηλή πτητικότητα και άλλες ιδιότητες που επιτρέπουν τη μεταφορά τους μέσω του χώματος.

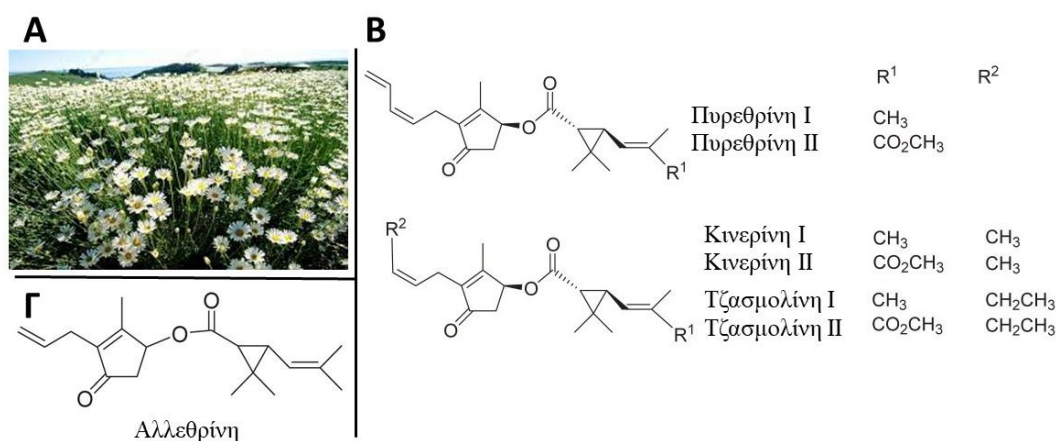
Τα ακαρεοκτόνα είναι γεωργικά φάρμακα που καταπολεμούν τα ακάρεα. Τα ακάρεα ή τετράνυχτοι ή αράχνες ανήκουν στην τάξη των αραχνοειδών. Αρκετά είδη των ακαρέων προσβάλλουν τα φυτά, τα αποθηκευμένα προϊόντα, τα ζώα και τον άνθρωπο (Yadav & Devi, 2017).

1.3.1 Οικογένεια Πυρεθρινοειδών

Η εντομοκτόνος δράση των εκχυλισμάτων πύρεθρου από τα άνθη του φυτού *Tanacetum cinerariaefolium* (Εικόνα 2Α) έχει παρατηρηθεί ήδη από τα τέλη του 19^{ου}

αιώνα από Ιάπωνες φυσιολόγους (Matsuo, 2019). Καθώς, ο φυσικός ρόλος των πυρεθρινών είναι η προστασία του φυτού από έντομα και ζώα θηρευτές, οι πυρεθρίνες συσσωρεύονται σε όλα τα υπέργεια μέρη των φυτών. Τα επίπεδά τους στους ιστούς συσχετίζονται με την παρουσία εκκριτικών αδενικών τριχωμάτων, τα οποία είναι πιο άφθονα στην επιφάνεια των ωοθηκών του *T. cinerariifolium* παρά σε οποιονδήποτε άλλο φυτικό ιστό. Η πυκνότητα των τριχωμάτων και τα επίπεδα πυρεθρίνης αυξάνονται καθώς αναπτύσσονται οι ανθοφόροι βολβοί, φθάνοντας στα μέγιστα επίπεδα τους, στις ώριμες ανθοφόρες κεφαλές του φυτού (Lybrand et al., 2020).

Τα πυρεθροειδή αποτελούν τα κύρια εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τον οικιακό και μετασυλλεκτικό έλεγχο των εντόμων λόγω της χαμηλής τοξικότητάς τους στα θηλαστικά, της ταχείας δράσης τους και της υψηλής αποτελεσματικότητάς τους έναντι ευρέος φάσματος εντόμων, ιδίως κουνουπιών (Matsuo, 2019). Η τοξικότητα των εκχυλισμάτων ανθών πύρεθρου οφείλεται στις περιεχόμενες πυρεθρίνες (εστέρες των αλκοολών από πυρεθρίνες και κινολόνες, με τα οξέα χρυσανθεμικό και πυρεθρικό).



Εικόνα 2: Α. Άνθη *Tanacetum cinerariaefolium*. Β. Χημικές δομές φυσικών πυρεθρινών. Γ. Χημική δομή της αλλεθρίνης (Προσαρμοσμένο από Matsuo 2019).

Το 1924, οι βραβευμένοι με Νόμπελ Staudinger και Ruzicka, δημοσίευσαν την εκτεταμένη έρευνά τους σχετικά με τα δραστικά συστατικά που περιέχονται στα εκχυλίσματα πύρεθρου, τα οποία περιλάμβαναν τους εστέρες των παραγώγων

κυκλοπροπανοκαρβοξυλικού οξέος με υδροξυκυκλοπεντανόνες (Matsuda, 2012). Αν και η δομή της αλκοολικής ομάδας ήταν λανθασμένη, οι δομές των όξινων ομάδων ήταν σωστές. Δεδομένου ότι τα όργανα NMR και IR δεν είχαν ακόμη εφευρεθεί, τα αποτελέσματά τους θα πρέπει να εκτιμηθούν ιδιαίτερα. Οι σωστές δομές, πυρεθρίνες I και II, καθορίστηκαν τελικά το 1944 από τους LaForge και Barthel (LaFORGE & BARTHEL, 2002) όπως φαίνεται στην Εικόνα 2B. Οι ερευνητές αυτοί κατόρθωσαν να απομονώσουν ταυτόχρονα δύο ακόμη σχετικές ενώσεις, τις κινερίνες I και II από τα εκχυλίσματα πύρεθρου.

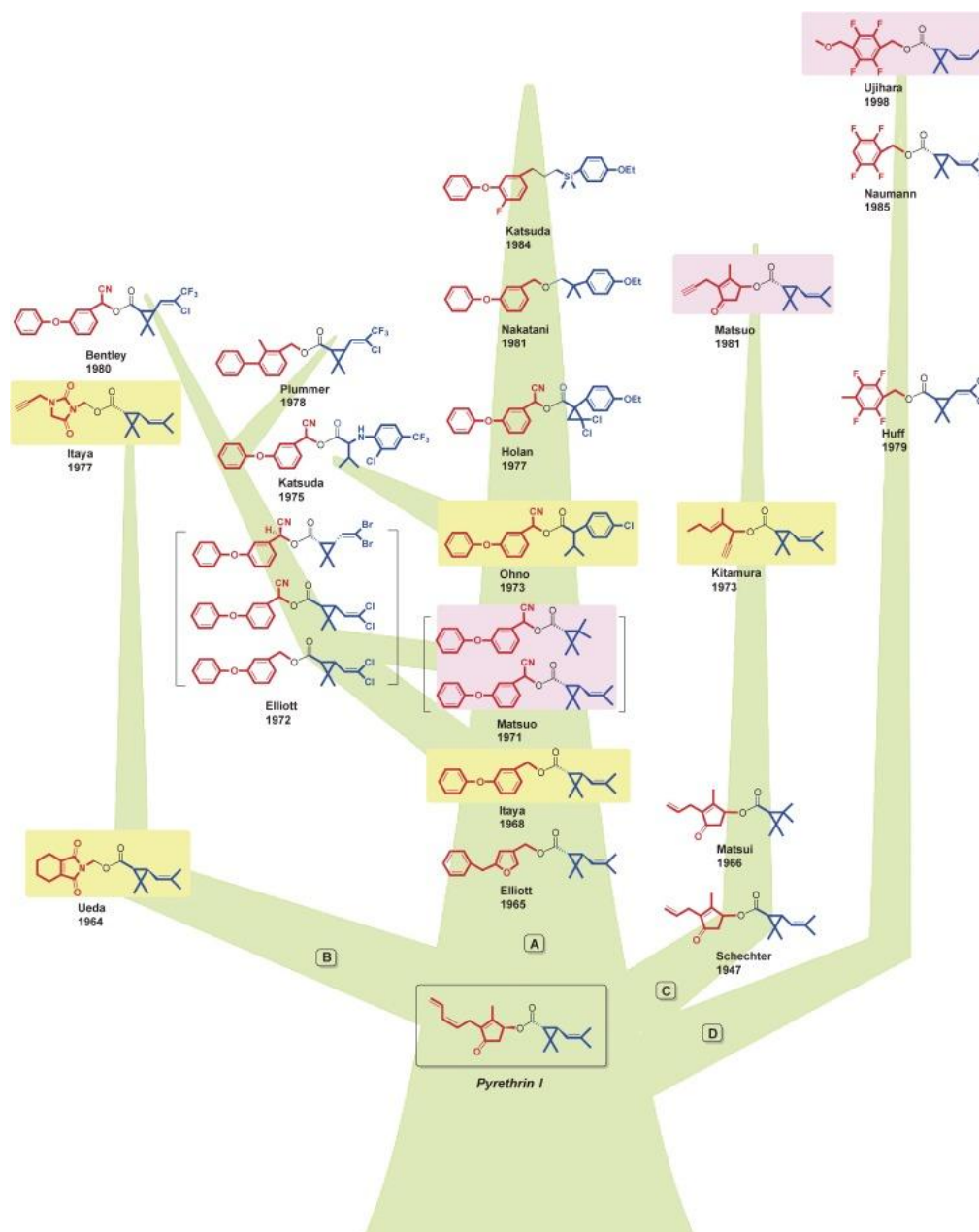
Η απόλυτη διαμόρφωση του όξινου τμήματος της πυρεθρίνης I προσδιορίστηκε από τους Crombie και Harper το 1954 (L, 1954) και λίγο αργότερα, το 1955, αυτή της πυρεθρίνης II προσδιορίστηκε από τους Inouye και Ohno (Inouye et al., 1955). Επιπλέον, το 1958, οι Katsuda και Inouye επιβεβαίωσαν την απόλυτη διαμόρφωση του αλκοολικού τμήματος, της πυρεθρολόνης (Katsuda et al., 1958). Το 1966, ο Godin και οι συνεργάτες του απομόνωσαν δύο ακόμη συγγενικά δευτερεύοντα συστατικά, τις τζασμολίνες I και II (Εικόνα 2B) (Godin et al., 1966).

Στις αρχές του 20ού αιώνα ξεκίνησαν να πραγματοποιούνται μελέτες δομικών τροποποιήσεων των φυσικών πυρεθρινών. Οι Staudinger και Ruzicka ανέφεραν πολλά παράγωγα το 1924, αν και ορισμένα από αυτά τα παράγωγα παρουσίασαν μόνο μικρή εντομοκτόνο δράση, είναι σημαντικό να αναγνωριστεί η διορατικότητα αυτών των ερευνητών όσον αφορά τις φυσικές πυρεθρίνες ως κύρια ένωση, πριν διευκρινιστούν οι δομές των αλκοολικών μερών. Τα τελευταία 90 χρόνια, αρκετές έρευνες επικεντρώθηκαν στις δομικές τροποποιήσεις των φυσικών πυρεθρινών. Το πρώτο πυρεθροειδές, η αλλεθρίνη (Εικόνα 2Γ), ανακαλύφθηκε από τους Schechter και LaForge το 1949 (Schechter et al., 2002).

Η ανακάλυψη της αλλεθρίνης ώθησε την έρευνα προς τη διερεύνηση συνθετικών των αλκοολικών και όξινων τμημάτων των πυρεθροειδών. Οι προσπάθειες αυτές οδήγησαν στην ανάπτυξη πολλών συνθετικών πυρεθροειδών με ποικίλα χαρακτηριστικά, όχι μόνο για την καταπολέμηση των οικιακών εντόμων παρασίτων, αλλά και για γεωργική χρήση. Τα παράγωγα αυτά είναι αξιοσημείωτα πιο ισχυρά, οικονομικά και σταθερά από τις αρχικές φυσικές πυρεθρίνες.

Η ανάπτυξη των εμπορικών πυρεθροειδών φαίνεται στο σχήμα ενός δέντρου που σχηματίζεται με βάση τις δομές τους (Εικόνα 3). Στον κύριο κορμό «Α» αναπαρίσταται, η ανακάλυψη των τμημάτων 3-φαινοξυβενζυλικής αλκοόλης και α-

κυανο-3-φαινοξυβενζυλικής αλκοόλης, οι οποίες απέκτησαν μεγάλη εμπορική αξία ως γεωργικά εντομοκτόνα. Ορισμένα κλαδιά από τον κύριο κορμό αναπαριστούν πυρεθροειδή τύπου διφαινυλαιθέρα, τα οποία εμπορευματοποιήθηκαν για γεωργική χρήση. Τα πυρεθροειδή τύπου N-υδροξυμεθυλίου, τα οποία παρουσιάζουν ισχυρή εντομοαπωθητική δράση, τοποθετούνται στον κορμό Β. Τα πυρεθροειδή τύπου αλλεθρίνης τοποθετούνται στον κορμό Γ. Η πραλεθρίνη, η δομή της οποίας είναι πιο παρόμοια με την πυρεθρίνη Ι, τοποθετείται στο τέλος του κορμού Γ. Ο τέταρτος κορμός Δ περιέχει πυρεθροειδή τύπου τετραφθοροβενζυλίου. Τα πυρεθροειδή που υποδεικνύονται με κίτρινο χρώμα στην εικόνα 3 συντέθηκαν από χημικούς της Sumitomo Chemical.



Εικόνα 3: Ανάπτυξη των πυρεθροειδών σε χρονολογική αναπαράσταση σε δέντρο (Προσαρμοσμένο από Matsuo 2019).

1.3.2 A-cypermethrin

Η A-cypermethrin είναι ένας τύπος συνθετικού πυρεθροειδούς εντομοκτόνου που χρησιμοποιείται συνήθως για τον έλεγχο παρασίτων στη γεωργία και σε κατοικίες. Είναι ένα εξαιρετικά αποτελεσματικό φυτοφάρμακο που είναι γνωστό για την ικανότητά του να σκοτώνει γρήγορα μια ποικιλία εντόμων, συμπεριλαμβανομένων μυρμηγκιών, κατσαρίδων, μυγών, κουνουπιών και κροτώνων.

Η A-cypermethrin παράγεται από τις εξής ουσίες: 3-φαινοξυβενζαλδεΰδη κυανουδρίνη + (1RS) -cis-3- (2,2-διχλωροβινυλο-2,2-διμεθυλοκυκλοπροπανοκαρβοξυλικό οξύ με εστεροποίηση. Έχει μοριακό τύπο $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$ και το μοριακό βάρος της είναι 416,3 g/mol, έχει ιξώδες, κιτρινωπό χρώμα και ημιστέραιη δομή. Χημικά, η A-κυπερμεθρίνη είναι ένα μείγμα δύο στερεοϊσομερών, AS και AR, τα οποία έχουν διαφορετικές εντομοκτόνες ιδιότητες. Η AS-cypermethrin είναι πιο ισχυρή και ταχύτερης δράσης από την AR-κυπερμεθρίνη και, ως εκ τούτου, είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ισομερές στα εμπορικά σκευάσματα του εντομοκτόνου (Bhatt et al., 2020).

Γενικώς, η A-cypermethrin είναι ένα έντονα ενεργό εντομοκτόνο. Επιπρόσθετα, τα συνθετικά πυρεθροειδή είναι εντομοκτόνα που δημιουργούνται για να μιμούνται τις χημικές ιδιότητες του φυσικού πύρεθρου που απαντά στη φύση και προέρχεται από το άνθος του φυτού *Chrysanthemum*. Συχνά τα συνθετικά πυρεθροειδή όπως η συπερμεθρίνη, προτιμώνται, από το πραγματικό πύρεθρο ως δραστικά συστατικά, επειδή προσφέρουν το πρόσθετο πλεονέκτημα να παραμένουν αποτελεσματικά για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους (Soderlund, 1992).

Όπως και άλλα πυρεθροειδή, η A-cypermethrin δρα διαταράσσοντας το νευρικό σύστημα των εντόμων, προκαλώντας παράλυση και θάνατο. Είναι σχετικά ασφαλές για τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά, καθώς έχει χαμηλή τοξικότητα και μεταβολίζεται και αποβάλλεται γρήγορα από τον οργανισμό. Διατίθεται ως γαλακτωματοποιημένο συμπύκνωμα, σκευάσματα εξαιρετικά χαμηλού όγκου, συμπύκνωμα εναιωρήματος και σε μίγματα με άλλα εντομοκτόνα. Το τελικό προϊόν είναι μια κρυσταλλική σκόνη με καλή διαλυτότητα σε ακετόνη, κυκλοεξανόνη και ξυλόλιο, αλλά η διαλυτότητά του στο νερό είναι χαμηλή. Είναι σταθερό υπό όξινες και ουδέτερες συνθήκες. Υπάρχει μεγάλη γκάμα εμπορικών σκευασμάτων που μπορεί κάποιος να συναντήσει την A-cypermethrin, μερικά από αυτά είναι Cynoff EC, Cynoff WP, Cyper TC Termiticide, Cyper WP και συμπυκνώματα φυτοφαρμάκων Demon WP (*Botanical Insecticides in the Twenty-First Century—Fulfilling Their Promise?* | *Annual Review of Entomology*, n.d.).

Η έκθεση του γενικού πληθυσμού στην A-cypermethrin είναι αμελητέα, υπό την προϋπόθεση ότι η χρήση του ακολουθείται από ορθή γεωργική πρακτική. Με καλές πρακτικές εργασίας, μέτρα υγιεινής και προφυλάξεις ασφαλείας, η χρήση της A-cypermethrin είναι απίθανο να προκαλέσει κίνδυνο σε όσους εκτίθενται

επαγγελματικά σε αυτήν. Η εμφάνιση ενοχλήσεων-ερεθισμών στην περιοχή του προσώπου αποτελεί ένδειξη έκθεσης. Υπό αυτές τις συνθήκες, οι πρακτικές εργασίας πρέπει να επανεξεταστούν (Ghazouani et al., 2020).

Η συστηματική χρήση των φυτοφαρμάκων, φυσικά, δεν θα μπορούσε να αφήσει ανεπηρέαστο το ζωικό βασίλειο. Έχει παρατηρηθεί η εμφάνιση συμπτωμάτων που ταυτίζονται με την δηλητηρίαση αλλά και χρόνια προβλήματα έπειτα από έκθεση σε συγκεκριμένα φυτοφάρμακα. Τα συμπτώματα αυτά έχουν κοινές δομικές και μορφολογικές ομοιότητες όσον αφορά τον άνθρωπο και τα λοιπά ζώα κατ'αντιπαράβολή όμως με τον άνθρωπο, επηρεάζεται εντονότερα η βιοποικιλότητα στα διάφορα οικοσυστήματα (*Botanical Insecticides in the Twenty-First Century—Fulfilling Their Promise?* | *Annual Review of Entomology*, n.d.).

Η χρόνια έκθεση των ζώων σε διάφορα φυτοφάρμακα μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από προβλήματα σε διάφορα όργανα και δομικά τους συστήματα, για παράδειγμα στο ενδοκρινικό, στο αναπαραγωγικό ή στο αναπνευστικό. Οι μελέτες δείχνουν ότι τα ζώα που επηρεάζονται περισσότερο είναι κυρίως τα τρωκτικά, τα πτηνά, τα αμφίβια, τα ψάρια, καθώς και τα διάφορα είδη μελισσών. Αυτό συμβαίνει, πιθανότερα, λόγω της αμεσότερης επαφής τους με τα σημεία εφαρμογής των φυτοφαρμάκων, της μικρής σωματικής τους διάπλασης, αλλά και της μεγαλύτερης έμφυτης ικανότητάς τους να συσσωρεύουν φυτοφάρμακα (Ghazouani et al., 2020). Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η A-cypermethrin έχει μέτρια έως υψηλή τοξικότητα στα τρωκτικά. Η οξεία στοματική έκθεση οδηγεί σε κλινικά σημεία που σχετίζονται με τη δραστηριότητα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για τη μακροπρόθεσμη τοξικότητα, πιθανές τερατογενέσεις ή καρκινογενέσεις. Η A-cypermethrin είναι εξαιρετικά τοξική για τα υδρόβια ασπόνδυλα, τα ψάρια και τις μέλισσες (Pascual & Peris, 1992; Stephenson, 1982).

1.4 Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων και επιπτώσεις

Η ικανότητα ενός φυτοφαρμάκου να συνεχίζει τη δράση του αμέσως μετά την εφαρμογή του, συναρτější του χρόνου, ονομάζεται υπολειμματική δραστηριότητα. Η υπολειμματική δραστηριότητα ενός φυτοφαρμάκου εξαρτάται από την ευκολία αποικοδόμησής του, τον τρόπο εφαρμογής του, τη χημική του σύνθεση, τον τύπο του

σκευάσματος και τις εδαφοκλιματικές συνθήκες υπό τις οποίες αυτό εφαρμόστηκε (θερμοκρασία, υγρασία, μικροβιακό φορτίο του εδάφους κ.λπ.) (Sabzevari & Hofman, 2022).

Η υπολειμματική δράση κάθε φυτοφαρμάκου είναι ιδιαίτερη καθώς, όσο μεγαλύτερη είναι, τόσο πιο αποτελεσματικό είναι το φυτοφάρμακο στον οργανισμό παράσιτο.

Λόγω της ευρείας χρήσης των γεωργικών φαρμάκων, γενικά, αλλά και της A-cypermethrin, ειδικότερα, είναι σημαντικά τα ζητήματα που εγείρονται από τα υπολείμματα τους, τόσο στους καρπούς όσο και στο περιβάλλον και κυρίως στο έδαφος (Giang et al., 2022). Ως εκ τούτου, καθίσταται αναγκαία η συστηματική πραγματοποίηση δειγματοληψιών (Galani et al., 2018), προκειμένου να διασφαλίζεται αφενός ότι τα γεωργικά προϊόντα που φτάνουν στην κατανάλωση είναι ασφαλή και αφετέρου ότι οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων στα γεωργικά εδάφη δεν υπερβαίνουν τα επιτρεπτά όρια (Sabzevari & Hofman, 2022).

Οι αναλύσεις υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων πρέπει να γίνονται από αναγνωρισμένα εργαστήρια και τα στοιχεία των μετρήσεων πρέπει να είναι διαθέσιμα για οποιονδήποτε έλεγχο ή ζήτηση από τις αρμόδιες αρχές ή όσους έχουν έννομο συμφέρον. Τα ευρήματα των μετρήσεων υπολειμμάτων σχετίζονται πάντοτε με το χρόνο εφαρμογής του φυτοπροστατευτικού προϊόντος, το χρόνο δειγματοληψίας, το αγροτεμάχιο από όπου λήφθηκε το δείγμα και τον παραγωγό. Η διαδικασία και η συχνότητα της δειγματοληψίας για έλεγχο πρέπει να προσδιορίζεται από τον επιβλέποντα στο Σχέδιο Διαχείρισης της Φυτοπροστασίας (Wahab et al., 2022). Η συχνότητα δειγματοληψίας καθορίζεται με βάση την πιθανότητα να βρεθούν υπολείμματα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τα Ανώτατα Όρια Υπολειμμάτων (Maximum Residue Levels) (Hyder et al., 2003; Winter & Jara, 2015).

Το πρόβλημα των υπολειμμάτων έγινε οξύτερο τα τελευταία χρόνια, λόγω της διαρκώς αυξανόμενης χρήσης των γεωργικών φαρμάκων στις καλλιέργειες εξαιτίας των απαιτήσεων του σύγχρονου καταναλωτή. Οι κίνδυνοι από τα υπολείμματα δεν εξαρτώνται συνήθως από τη λεγόμενη οξεία τοξικότητα των γεωργικών φαρμάκων, δηλαδή από το πόσο ισχυρό δηλητήριο για τον άνθρωπο και τα θερμόαιμα είναι το συγκεκριμένο φάρμακο. Οι κίνδυνοι αυτοί έχουν σχέση με άλλες ιδιότητές τους όπως το πόσο μπορούν να παραμείνουν πάνω ή μέσα στο γεωργικό προϊόν ή γενικότερα στο περιβάλλον, το αν συσσωρεύονται μέσα στους ιστούς των διαφόρων οργανισμών (άνθρωποι, ζώα), το αν διασπώνται ή όχι σε τοξικά παράγωγα

(μεταβολίτες) και το αν προκαλούν χρόνιες τοξικολογικές επιδράσεις στον άνθρωπο και τα ζώα (καρκίνος, τερατογενέσεις) (Neme & Satheesh, 2016).

Οι διάφορες χώρες καθώς και η Ευρωπαϊκή Ένωση καθορίζουν ανώτατο όριο επιτρεπόμενων υπολειμμάτων (MRL) στα διάφορα γεωργικά προϊόντα τους για όλα τα γεωργικά φάρμακα που κυκλοφορούν (Sabzevari & Hofman, 2022). Τα όρια αυτά εκφράζονται σε ppm (parts per million) και υπολογίζονται αφού προκαθοριστεί η ημερήσια αποδεκτή δόση (acceptable daily intake, ADI), δηλαδή «η ποσότητα, του φυτοφαρμάκου που μπορεί να λαμβάνεται σε όλη τη ζωή του ανθρώπου χωρίς κανένα εκτιμώμενο κίνδυνο, βάσει των υπάρχουσας γνώσης μέχρι τη δεδομένη χρονική στιγμή (Lu & Kacew, 2002) .

Προκειμένου να διατηρούνται τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων στα γεωργικά προϊόντα κάτω από τα επιτρεπόμενα όρια, για κάθε γεωργικό φάρμακο καθορίζεται αυτό που ονομάζουμε «ελάχιστο χρονικό μεσοδιάστημα από την τελευταία επέμβαση μέχρι τη συγκομιδή». Το χρονικό αυτό διάστημα αναγράφεται υποχρεωτικά για κάθε καλλιέργεια πάνω στην ετικέτα όλων των γεωργικών φαρμάκων και αναφέρεται σε πόσες μέρες πριν τη συγκομιδή θα πρέπει να γίνει ο τελευταίος ψεκασμός με το φάρμακο, ώστε αυτό να προλάβει να διασπαστεί. Το χρονικό αυτό διάστημα εξαρτάται από τις τοπικές καλλιεργητικές συνήθειες και κλιματικές συνθήκες.

Στις οδηγίες του Συμβουλίου των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων που αφορούν στον καθορισμό της ανώτατης περιεκτικότητας φυτοπροστατευτικών προϊόντων, τα υπολείμματα τους αναφέρονται ως κατάλοιπα φυτοφαρμάκων και ορίζονται ως “τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων καθώς και των προϊόντων που προκύπτουν από τον μεταβολισμό, την αποσύνθεση ή την αντίδρασή τους, που βρίσκονται πάνω ή μέσα στα προϊόντα”.

Άμεση επίδραση στην υγεία του ανθρώπου δύναται να έχει η κατανάλωση τροφίμων επιβαρυνμένων με υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων πάνω από τα θεσπισμένα επιτρεπτά όρια. Περισσότερη όμως ανησυχία προκαλεί η μακροχρόνια έκθεση στα παραπάνω τρόφιμα. Τα συμπτώματα αυτών είναι δυνατόν να εκδηλωθούν με την παρέλευση κάποιων χρόνων ή δεκαετιών ή ακόμη και στα παιδιά των καταναλωτών. Συνεπάγεται λοιπόν, ότι ακόμα και τα άτομα που έχουν έμμεση σχέση με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι εκτεθειμένα στους κινδύνους τους. Τα υπολείμματα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ή των μεταβολιτών τους στα

τρόφιμα λοιπόν, αποτελούν μέρος της καθημερινής μας διατροφής. Δύσκολα ανευρίσκονται τρόφιμα χωρίς ανιχνεύσιμα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ενώ συνεχώς αυξάνεται ο αριθμός των δειγμάτων με συγκεντρώσεις υπολειμμάτων πάνω από τα επιτρεπτά όρια.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) τα πυρεθροειδή δεν είναι καρκινογόνα, γονοτοξικά ή τοξικά για στην αναπαραγωγή σε πειραματόζωα. Ενώ τα δεδομένα από ανθρώπους είναι πολύ περιορισμένα, είναι απίθανο τα εν λόγω εντομοκτόνα να συνιστούν κίνδυνο καρκινογένεσης ή αναπαραγωγικής τοξικότητας για τον άνθρωπο. Επί του παρόντος, η χαμηλότερη ADI που συνιστάται από τον ΠΟΥ για πυρεθροειδή που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές δημόσιας υγείας αναφέρονται στον Πίνακα 1 (Butchko & Kotsonis, 1991).

Πίνακας 1: Ημερήσια επιτρεπόμενη πρόσληψη πυρεθρινοειδών εντομοκτόνων, σύμφωνα με τον ΠΟΥ (Butchko & Kotsonis, 1991).

Ενεργή ουσία	ADI (mg/ai/kg bw/day) *
alpha-cypermethrin	0–0.02
bifenthrin	0–0.02
cyfluthrin	0–0.02
deltamethrin	0–0.01
D-phenothrin	0–0.07
etofenprox	0–0.03
permethrin	0–0.05

Οι επιπτώσεις από την χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην ανθρώπινη υγεία είναι δυνατόν να είναι βραχυχρόνιες ή μακροχρόνιες.

Οι άμεσες επιπτώσεις σχετίζονται με δηλητηριάσεις από τη λήψη του ίδιου του σκευάσματος ή του γεωργικού προϊόντος που έχει εκτεθεί σε αυτό και έχει συγκομισθεί πρόσφατα.

Οι χρόνιες επιπτώσεις είναι αυτές που προκύπτουν από την συνεχή εναπόθεση των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, κυρίως μέσω της διατροφής, στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι κυριότερες από αυτές εντοπίζονται στο ενζυμικό, στο ανοσοποιητικό και στην αναπαραγωγικό σύστημα. Τα συμπτώματα που έχουν

παρατηρηθεί σχετίζονται με νευρικές και νευροψυχικές εκδηλώσεις, πόνο στα κάτω άκρα, μυϊκή αδυναμία, σύνδρομο Parkinson, διαταραχές μνήμης και γενετήσιας ορμής, συναισθηματική αστάθεια και άγχος (Ming Ye et al, 2013).

Η χρήση σύγχρονων φυτοφαρμάκων στη γεωργία έχει εδραιωθεί τα τελευταία περίπου 50 χρόνια. Η συμβολή των πρώτων φυτοφαρμάκων στην αποτελεσματική προστασία της φυτικής παραγωγής γέννησε βάσιμες ελπίδες για την οριστική λύση του επισιτιστικού προβλήματος της ανθρωπότητας. Χωρίς τη χρήση των φυτοφαρμάκων, δύσκολα θα μπορούσαν να επιτευχθούν οι σημερινές αποδόσεις, σε οποιαδήποτε μορφή καλλιέργειας. Η εκτεταμένη χρήση φυτοφαρμάκων στη χημική φυτοπροστασία των θερμοκηπίων και των υπαίθριων καλλιεργειών έχει ως συνέπεια την ύπαρξη τοξικών υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα φρούτα και λαχανικά που διατίθενται στο εμπόριο για δημόσια κατανάλωση. Ο αριθμός των γεωργικών φαρμάκων που διατίθενται στους παραγωγούς αυξάνει συνεχώς καθώς παρασκευάζονται διαρκώς νέα προϊόντα που καταπολεμούν συγκεκριμένους παθογόνους μικροοργανισμούς. Κατά το παρελθόν, τα φυτοφάρμακα αντιμετωπιζόντουσαν μόνο από τη θετική τους πλευρά. Καθώς χρησιμοποιούνταν ανακαλύπτονταν και οι σοβαρές αρνητικές ιδιότητες των φυτοφαρμάκων, άμεσες και έμμεσες, επιπτώσεις τους στον άνθρωπο και στο οικοσύστημα. Οι κίνδυνοι που εγκυμονούν, στην έκθεση από αυτά σχετίζονται κυρίως με την οξεία και τη χρόνια τοξικότητα ουσιών τους.

Οι δηλητηριάσεις είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα όσον αφορά τα οξεία προβλήματα της υγείας (acute or immediate health problems). Στην πραγματικότητα, αυτές οι δηλητηριάσεις συμβαίνουν όταν για τυχαίους λόγους, π.χ. απροσεξία ή αμέλεια, ο οργανισμός εκτεθεί απότομα και άμεσα σε υψηλές δόσεις του φυτοφαρμάκου. Υπάρχουν τρεις βασικοί τρόποι με τους οποίους ένα φυτοφάρμακο μπορεί να εισέλθει στον οργανισμό: (α) μέσω της αναπνοής, (β) μέσω της κατάποσης, και (γ) μέσω της επαφής με το δέρμα. Ανάλογα με τον τρόπο εισόδου ενός φυτοφαρμάκου στο σώμα, το πρώτο πράγμα που προκαλείται είναι ο ερεθισμός του αντίστοιχου βλεννογόνου (Ishwar Chandra Yadav et al, 2017).

Τα προβλεπόμενα από το νόμο ανώτατα επιτρεπτά όρια για τα φυτοφάρμακα στα τρόφιμα έχουν καθοριστεί στις περισσότερες χώρες ώστε να προστατευτεί ο καταναλωτής. Σε μια προσπάθεια μελέτης της έκτασης του φαινομένου της αλόγιστης χρήσης επικίνδυνων φυτοπροστατευτικών προϊόντων και των επιπτώσεων που αυτά

επιφέρουν στο περιβάλλον και τον άνθρωπο, πολλές χώρες έχουν αναπτύξει προγράμματα για την καταγραφή των επιπέδων των υπολειμμάτων μόλυνσης σε φρούτα και λαχανικά. Για το σκοπό αυτό χρειάζονται πολυύπολειμματικές (multiresidue) αναλυτικές μέθοδοι με τις οποίες να ταυτοποιούνται και να προσδιορίζονται ποσοτικά όσο το δυνατόν περισσότερα γεωργικά φάρμακα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (trace level determination) στα φρούτα και στα λαχανικά.

Ο προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων πραγματοποιείται συνήθως με χρωματογραφικές τεχνικές και περιλαμβάνει πολλά προκαταρκτικά στάδια όπως τη δειγματοληψία, την εκχύλιση, τον καθαρισμό ή την απομάκρυνση των προσμείξεων. Η εκχύλιση των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων από τα φρούτα και τα λαχανικά δημιουργεί πολύπλοκα μίγματα, που συχνά απαιτούν καθαρισμό του δείγματος και διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος προκειμένου να απομονωθούν τα φυτοφάρμακα που εξετάζονται στη συγκεκριμένη ανάλυση. Ο κόπος, τα αναλώσιμα και ο χρόνος θα μπορούσαν να μειωθούν σημαντικά εάν απλοποιούνταν η προετοιμασία του δείγματος και οι διαδικασίες καθαρισμού.

Σήμερα χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι φυτοφαρμάκων σε διάφορες χώρες για ποικίλους τύπους καλλιεργειών για την πρόληψη των παρασίτων, εντόμων και ζιζανίων. Λόγω της επέκτασης του παγκόσμιου εμπορίου, περισσότερα τρόφιμα τα οποία έχουν υποστεί επεξεργασία με φυτοφάρμακα εισάγονται σε διάφορες χώρες. Αυτές οι παγκόσμιες εμπορικές συναλλαγές αυξάνουν την επέκταση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε πολλές περιοχές του κόσμου και είναι το θέμα που απασχολεί τη δημόσια υγεία. Υπάρχουν ανησυχίες για την ασφάλεια αυτών των εμπορευμάτων λόγω αναφορών για την παρουσία απαγορευμένων αντιμικροβιακών παραγόντων σε εισαγόμενα τρόφιμα και φυτοφαρμάκων στα προϊόντα. Είναι ευρέως γνωστό ότι τα φυτοφάρμακα μπορούν να επηρεάσουν το νευρικό, το ενδοκρινικό, το ανοσοποιητικό και το αναπαραγωγικό συστήματα. Τα βρέφη, τα μικρά παιδιά, οι εγκυμονούσες και οι ηλικιωμένοι είναι οι πιο ευάλωτες ηλικιακές ομάδες στη δηλητηρίαση από φυτοφάρμακα.

Οι ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τους μηχανισμούς μείωσης της επίδρασης των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα. Η μείωση των επιπέδων υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα προκειμένου να μειωθεί η έκθεση και ο κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία αποτελεί στόχο της σύγχρονης γεωργικής χημείας. Μία από τις εναλλακτικές που χρησιμοποιούνται για τη μείωση της επίδρασης των υπολειμμάτων

φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα είναι η κατανάλωση βιολογικών καλλιεργειών σε σχέση με τις μη βιολογικές. Σύμφωνα με τις τυποποιημένες μετα-αναλύσεις που έγιναν από τους Baranski et al. (2014) η συχνότητα εμφάνισης ανιχνεύσιμων υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων ήταν τέσσερις φορές υψηλότερη στις μη βιολογικές καλλιέργειες σε σχέση με τις βιολογικές καλλιέργειες. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η κατανάλωση βιολογικών τροφίμων μπορεί να μειώσει την έκθεση σε υπολείμματα φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα σε σημαντικό βαθμό. Επιπλέον φαίνεται πως οι βιολογικές καλλιέργειες, κατά μέσο όρο, έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών, χαμηλότερες συγκεντρώσεις καδμίου (Cd) και μικρότερες συγκεντρώσεις υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων από τα μη βιολογικά συγκριτικά προϊόντα σε όλες τις περιοχές και τις εποχές παραγωγής.

Η κατανάλωση τροφίμων πλούσια σε αντιοξειδωτικά, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά συνίσταται έντονα τα τελευταία χρόνια. Μια αυξημένη διατροφική πρόσληψη τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά/(πολυ)φαινόλες προστατεύουν από χρόνιες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών ασθένειες, ορισμένες μορφές καρκίνου (π.χ. καρκίνος του προστάτη) και νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Αντίθετα σε φρούτα, λαχανικά και μεταποιημένα τρόφιμα προερχόμενα από συμβατικές καλλιέργειες έχουν βρεθεί σημαντικά υψηλότερες συχνότητες εμφάνισης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων (Barański et al., 2014). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Baranski et al, η συχνότητα εμφάνισης ανιχνεύσιμων υπολειμμάτων στα συμβατικά φρούτα (75%) είναι υψηλότερη από ό,τι στα λαχανικά (32 %).

1.5 Βιοαποδόμηση γεωργικών φαρμάκων

Η ανάγκη για αποτελεσματικές και φιλικές προς το περιβάλλον μεθόδους επεξεργασίας γίνεται προφανής προκειμένου να εξασφαλιστεί η πρόληψη της ρύπανσης του περιβάλλοντος που προκαλείται από απόβλητα γεωργικών φυτοφαρμάκων. Η μικροβιακή βιοαποδόμηση των περιβαλλοντικών ρύπων είναι ένας τομέας αυξανόμενης σημασίας λόγω των τεράστιων δυνατοτήτων του για καθαρισμό του περιβάλλοντος (I.T.A 2007).

Βιοαποδόμηση είναι η διάσπαση της οργανικής ύλης από μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια και μύκητες. Θεωρείται γενικά ότι είναι μια φυσική διαδικασία, γεγονός που

τη διαφοροποιεί από την κομποστοποίηση. Η κομποστοποίηση είναι μια διαδικασία που καθοδηγείται από τον άνθρωπο, κατά την οποία η βιοαποδόμηση λαμβάνει χώρα υπό συγκεκριμένες συνθήκες (Στεργιόπουλος 2022).

Η διαδικασία της βιοαποδόμησης είναι τριπλή: πρώτα ένα αντικείμενο υφίσταται βιολογική φθορά, που είναι η μηχανική αποδυνάμωση της δομής του- στη συνέχεια ακολουθεί η βιοδιάσπαση, που είναι η διάσπαση των υλικών από τους μικροοργανισμούς- και τέλος η αφομοίωση, που είναι η ενσωμάτωση του παλιού υλικού σε νέα κύτταρα

Στην πράξη, σχεδόν όλες οι χημικές ενώσεις και τα υλικά υπόκεινται σε βιοαποδόμηση, με βασικό στοιχείο το χρόνο διάσπασης. Πράγματα όπως τα λαχανικά μπορεί να αποδομηθούν μέσα σε λίγες ημέρες, ενώ το γυαλί και ορισμένα πλαστικά χρειάζονται πολλές χιλιετίες για να αποσυντεθούν. Ένα πρότυπο για τη βιοαποδομησιμότητα που χρησιμοποιείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση είναι ότι πάνω από το 90% του αρχικού υλικού πρέπει να μετατρέπεται σε CO₂, νερό και ανόργανα άλατα με βιολογικές διεργασίες μέσα σε 6 μήνες (Lucas et al., 2008).

Η διαδικασία της βιοαποδόμησης μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια: βιολογική φθορά, βιοκατακερματισμός και αφομοίωση. Η βιολογική φθορά περιγράφεται μερικές φορές ως επιφανειακή υποβάθμιση που τροποποιεί τις μηχανικές, φυσικές και χημικές ιδιότητες του υλικού. Αυτό το στάδιο συμβαίνει όταν το υλικό εκτίθεται σε αβιοτικούς παράγοντες στο εξωτερικό περιβάλλον και επιτρέπει την περαιτέρω υποβάθμιση με την αποδυνάμωση της δομής του υλικού. Ορισμένοι αβιοτικοί παράγοντες που επηρεάζουν αυτές τις αρχικές αλλαγές είναι η συμπίεση (μηχανική), το φως, η θερμοκρασία και οι χημικές ουσίες στο περιβάλλον. Ενώ η βιολογική φθορά εμφανίζεται συνήθως ως το πρώτο στάδιο της βιοαποδόμησης, μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να είναι παράλληλη με τη βιοκαταστροφή. ωστόσο, ο Müller όρισε τη βιολογική φθορά ως την ανεπιθύμητη δράση των ζωντανών οργανισμών στα υλικά, που περιλαμβάνει διαδικασίες όπως η διάσπαση των πέτρινων προσόψεων των κτιρίων, η διάβρωση των μετάλλων από μικροοργανισμούς ή απλώς οι αισθητικές αλλαγές που προκαλούνται στις ανθρωπογενείς κατασκευές από την ανάπτυξη ζωντανών οργανισμών (Müller, 2005).

Ο βιοκατακερματισμός ενός πολυμερούς είναι η λυτική διαδικασία κατά την οποία διασπώνται δεσμοί εντός ενός πολυμερούς, δημιουργώντας στη θέση του ολιγομερή

και μονομερή. Τα βήματα που γίνονται για τον κατακερματισμό αυτών των υλικών διαφέρουν επίσης ανάλογα με την παρουσία οξυγόνου στο σύστημα. Η διάσπαση των υλικών από τους μικροοργανισμούς όταν υπάρχει οξυγόνο είναι αερόβια χώνευση, ενώ η διάσπαση των υλικών όταν δεν υπάρχει οξυγόνο είναι αναερόβια χώνευση. Η κύρια διαφορά μεταξύ αυτών των διεργασιών είναι ότι οι αναερόβιες αντιδράσεις παράγουν μεθάνιο, ενώ οι αερόβιες αντιδράσεις όχι (ωστόσο και οι δύο αντιδράσεις παράγουν διοξείδιο του άνθρακα, νερό, κάποιο είδος υπολείμματος και μια νέα βιομάζα). Επιπλέον, η αερόβια χώνευση συμβαίνει συνήθως ταχύτερα από την αναερόβια χώνευση, ενώ η αναερόβια χώνευση κάνει καλύτερη δουλειά στη μείωση του όγκου και της μάζας του υλικού. Λόγω της ικανότητας της αναερόβιας χώνευσης να μειώνει τον όγκο και τη μάζα των αποβλήτων και να παράγει φυσικό αέριο, η τεχνολογία της αναερόβιας χώνευσης χρησιμοποιείται ευρέως για συστήματα διαχείρισης αποβλήτων και ως πηγή τοπικής, ανανεώσιμης ενέργειας (Lucas et al., 2008).

Στο στάδιο της αφομοίωσης, τα προϊόντα που προκύπτουν από τη βιοδιάσπαση ενσωματώνονται στη συνέχεια στα μικροβιακά κύτταρα. Ορισμένα από τα προϊόντα της διάσπασης μεταφέρονται εύκολα στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω μεμβρανικών φορέων. Ωστόσο, άλλα εξακολουθούν να πρέπει να υποβληθούν σε αντιδράσεις βιομετασχηματισμού για να προκύψουν προϊόντα που μπορούν στη συνέχεια να μεταφερθούν στο εσωτερικό του κυττάρου. Μόλις εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου, τα προϊόντα εισέρχονται σε καταβολικές οδούς που οδηγούν είτε στην παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) είτε σε στοιχεία της δομής των κυττάρων (Lucas et al., 2008).

Στην πράξη, σχεδόν όλες οι χημικές ενώσεις και τα υλικά υπόκεινται σε διαδικασίες βιοαποδόμησης. Η σημασία, ωστόσο, έγκειται στους σχετικούς ρυθμούς αυτών των διεργασιών σε ημέρες, εβδομάδες, χρόνια ή αιώνες. Παράγοντες που καθορίζουν τον ρυθμό με τον οποίο λαμβάνει χώρα αυτή η αποικοδόμηση των οργανικών ενώσεων αποτελούν το φως, το νερό, το οξυγόνο και η θερμοκρασία (Haider et al., 2019). Ο ρυθμός αποικοδόμησης πολλών οργανικών ενώσεων περιορίζεται από τη βιοδιαθεσιμότητά τους, η οποία είναι ο ρυθμός με τον οποίο μια ουσία απορροφάται σε ένα σύστημα ή καθίσταται διαθέσιμη στο σημείο της φυσιολογικής δραστηριότητας, καθώς οι ενώσεις πρέπει να απελευθερωθούν στο διάλυμα προτού οι οργανισμοί μπορέσουν να τις αποικοδομήσουν. Ο ρυθμός βιοαποδόμησης μπορεί

να μετρηθεί με διάφορους τρόπους. Οι δοκιμές αναπνοής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αερόβια μικρόβια. Σε αυτή την περίπτωση, αρχικά τοποθετείται ένα δείγμα στερεών αποβλήτων σε ένα δοχείο με μικροοργανισμούς και χώμα και στη συνέχεια το μείγμα αφήνεται σε έκθεση αέρα. Κατά τη διάρκεια αρκετών ημερών, οι μικροοργανισμοί χωνεύουν το δείγμα λίγο-λίγο και παράγουν διοξείδιο του άνθρακα - η προκύπτουσα ποσότητα CO₂ χρησιμεύει ως δείκτης αποικοδόμησης. Η βιοαποδομησιμότητα μπορεί επίσης να μετρηθεί από τα αναερόβια μικρόβια και την ποσότητα μεθανίου ή κράματος που είναι σε θέση να παράγουν (Stryer, n.d.).

Είναι σημαντικό να σημειώνονται οι παράγοντες που επηρεάζουν τα ποσοστά βιοαποδόμησης κατά τη διάρκεια των δοκιμών προϊόντων, ώστε να διασφαλίζεται ότι τα παραγόμενα αποτελέσματα είναι ακριβή και αξιόπιστα. Αρκετά υλικά θα δοκιμαστούν ως βιοαποδομήσιμα υπό βέλτιστες συνθήκες σε ένα εργαστήριο χημικών αναλύσεων, αλλά τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να μην αντικατοπτρίζουν τα αποτελέσματα στον πραγματικό κόσμο, όπου οι παράγοντες είναι πιο μεταβλητοί (Adamcová et al., 2017) Για παράδειγμα, ένα υλικό που μπορεί να έχει δοκιμαστεί ως βιοαποδομήσιμο με υψηλό ρυθμό στο εργαστήριο μπορεί να μην αποδομηθεί με υψηλό ρυθμό σε μια χωματερή, επειδή οι χώροι υγειονομικής ταφής συχνά στερούνται φωτός, νερού και μικροβιακής δραστηριότητας που είναι απαραίτητα για την αποικοδόμηση (Witt et al., 1999). Η ανάπτυξη και η χρήση ακριβών τυποποιημένων μεθόδων δοκιμών μπορεί να βοηθήσει να διασφαλιστεί ότι όλες οι συνθετικές ουσίες που απελευθερώνονται στο περιβάλλον και διατίθενται στο εμπόριο θα βιοδιασπώνται πράγματι στο φυσικό περιβάλλον (Scott & Gilead, 1995).

1.6 Μικροβιακή Βιοαποδόμηση της A-Cypermethrin

Η βιοαποδόμηση των φυτοφαρμάκων, και ιδιαίτερα των πυρεθροειδών, μπορεί να επιτευχθεί μέσω μικροοργανισμών όπως τα βακτήρια και οι μύκητες. Διάφορα γένη μικροβίων, όπως τα *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Klebsiella* και *Aspergillus*, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν υδρολάσες, ένζυμα που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποικοδόμηση των πυρεθροειδών φυτοφαρμάκων (Bhatt et al., 2020; Birolli et al., 2022).

Η πυρεθροειδής υδρολάση έχει συσχετιστεί με την ικανότητα βιοαποδόμησης μικροβιακών και εντομολογικών οργανισμών, ενώ το κυτόχρωμα P450 των εντόμων συμβάλλει επίσης στην αποικοδόμηση αυτών των εντομοκτόνων. Μεταλλάξεις στα γονίδια του κυτοχρώματος P450 (π.χ. *CYP6* στη *Locusta migratoria*) αυξάνουν την ευαισθησία στα πυρεθροειδή (Bhatt et al., 2020).

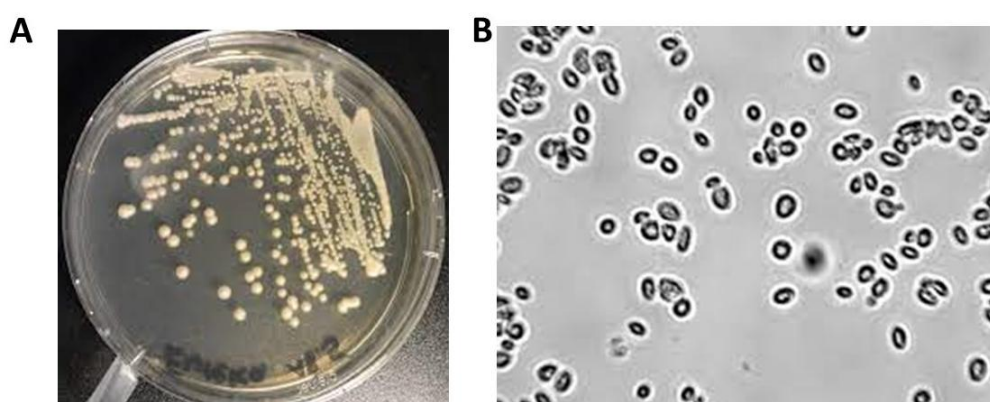
Έρευνες έχουν αποδείξει ότι το βακτηριακό γένος *Bacillus* είναι ικανό να αποικοδομεί και να αποτοξικοποιεί συγκεκριμένα πυρεθροειδή, όπως η *α-Cypermethrin*, παράγοντας μη τοξικά παραπροϊόντα (Sundaram et al., 2013; Birolli et al., 2022). Η πιο πρόσφατη μελέτη των Birolli et al. (2022) ταυτοποίησε 29 χημικές ενώσεις που προκύπτουν από τη βιοαποδόμηση της *Cypermethrin*, προτείνοντας την επιλογή ειδικών βακτηριακών μειγμάτων ως μία αποτελεσματική στρατηγική για τη βιοεξυγίανση των πυρεθροειδών.

1.7 *Saccharomyces cerevisiae*

Η ζωή του ανθρώπου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τους μύκητες ήδη από τα αρχαία χρόνια. Αρχαιολόγοι οι οποίοι διεξήγαν ανασκαφές στην Αίγυπτο ανακάλυψαν μυλόπετρες και φούρνους για ζυμωμένο ψωμί, καθώς και τοιχογραφίες αρτοποιείων και ζυθοποιείων περίπου 4000 ετών. Το 1680, ο Δανός φυσιοδίφης Anton van Leeuwenhoek παρατήρησε πρώτος μικροοργανισμούς αλλά εκείνη την εποχή δεν θεωρούνταν ζώντες οργανισμούς, αλλά σφαιροειδείς δομές. Οι ερευνητές αμφέβαλλαν κατά πόσον οι ζύμες ήταν άλγη ή μύκητες, αλλά το 1837 ο Theodor Schwann τις ταυτοποίησε ως μύκητες (*Saccharomyces Cerevisiae* - an Overview | ScienceDirect Topics, n.d.).

Ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae* ή, κοινώς, ζυμομύκητας χρησιμοποιείται στην οينوποίηση, στην αρτοποιεία και στη ζυθοποιία από την αρχαιότητα. Πιστεύεται ότι απομονώθηκε αρχικά από τον φλοιό των σταφυλιών. Είναι ένας από τους πιο εκτενώς μελετημένους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που χρησιμοποιείται ως μοντέλα στη μοριακή και κυτταρική βιολογία. Είναι ο μικροοργανισμός που θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ο πιο κοινός τύπος ζύμωσης. Τα κύτταρα του *S. cerevisiae* είναι στρογγυλά έως ωοειδή, διαμέτρου 5-10 μm και αναπαράγεται με μια διαδικασία διαίρεσης που είναι γνωστή ως εκβλάστηση (André et al., 1993).

Στα τρόφιμα και ποτά που παράγονται με τη βοήθεια ζυμών επέρχονται διάφορες μεταβολές στις θρεπτικές ουσίες των πρώτων υλών. Η συνολική περιεκτικότητα του τροφίμου σε θερμίδες μειώνεται λόγω της μετατροπής των σακχάρων σε διοξείδιο του άνθρακα και αλκοόλη. Κάθε γραμμάριο ζυμωμένου σακχάρου με θρεπτική αξία σε θερμίδες περίπου 3,86 Kcal μετατρέπεται σε 0,45 g αλκοόλης με θρεπτική αξία 3,1 Kcal. Αυτό σημαίνει ότι σχεδόν 20% των θερμίδων που προέρχονται από τα σάκχαρα της πρώτης ύλης χάνεται. Το ίδιο συμβαίνει και με το άμυλο. Κατά τη ζύμωση των τροφίμων με ζύμες έχουμε ένα “φυσικό” εμπλουτισμό του παραγόμενου τροφίμου με βιταμίνες κυρίως της ομάδας Β .



Εικόνα 4: A. Μακροσκοπική φωτογραφία αποικιών του μύκητα *S. cerevisiae* σε στερεό εμπλουτισμένο θρεπτικό υλικό. B. Εικόνα κυτάρων του μύκητα σε οπτικό μικροσκόπιο.

Οι ζυμομύκητες, όπως και όλοι οι μύκητες, αποτελούν χημειοργανοτρόφους οργανισμούς, χρησιμοποιούν δηλαδή οργανικές ενώσεις ως πηγές ενέργειας και δεν απαιτούν ηλιακό φως για την ανάπτυξή τους. Τα βασικά στοιχεία που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι ο άνθρακας και το άζωτο . Ο άνθρακας αποκτάται, κυρίως, από σάκχαρα εξοζών, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, ή δισακχαρίτες, όπως η σακχαρόζη και η μαλτόζη. Κάποια είδη μπορούν να μεταβολίζουν σάκχαρα πεντοζών, όπως η ριβόζη, αλκοόλες και οργανικά οξέα. Οι ζυμομύκητες μπορούν να διακριθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες ανάλογα με της απαιτήσεις τους σε οξυγόνο. Αν δεν απαιτούν καθόλου οξυγόνο είναι αναερόβιες, αν

απαιτούν υποχρεωτικά οξυγόνο αερόβιες, είτε αν μπορούν να υπάρξουν και στις δυο καταστάσεις ονομάζονται προαιρετικά αερόβιες. Αντιθέτως με τα βακτήρια, κανένα γνωστό είδος ζύμης δεν αναπτύσσεται υποχρεωτικά αναερόβια. Οι περισσότερες ζύμες αναπτύσσονται βέλτιστα σε ουδέτερο ή ελαφρώς όξινο περιβάλλον pH (Eldarov et al., 2016).

Οι ζυμομύκητες αναπτύσσονται σε όξινο pH , εξαιτίας του πλούσιου σε πρωτόνια περιβάλλοντος το οποίο ευνοεί τη δράση της ATP-ασης, με τη βοήθεια της οποίας γίνεται η μεταφορά θρεπτικών συστατικών εντός του κυττάρου. Για την ικανοποιητική ανάπτυξη κυττάρων του *S. cerevisiae* το pH έχει παρατηρηθεί ότι κυμαίνεται μεταξύ 3 – 6 (Pronk et al., 1996).

Η θερμοκρασία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις να την σταματήσουν. Υπάρχει μια περιοχή θερμοκρασιών που μπορούν να αναπτυχθούν οι ζύμες, έξω από τα όρια αυτής της περιοχής μπορεί να προκληθεί κυτταρικός θάνατος. Στον *S. cerevisiae* η μέγιστη θερμοκρασία κυμαίνεται μεταξύ 35-43 °C ενώ η ελάχιστη βρίσκεται γύρω στους 12-15 °C (Parapouli et al., 2020).

Διάφορα είδη ζυμομυκήτων χρησιμοποιούνται για την κατασκευή μιας πληθώρας τροφίμων, η μαγιά αρτοποιίας στην παραγωγή ψωμιού, η μαγιά μπύρας στη ζύμωση της μπύρας, μαγιά για παρασκευή κρασιού και μαγιά για την παραγωγή ξυλιτόλης (Parapouli et al., 2020).

Το σημαντικότερο είδος ζυμομύκητα που χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή και βιομηχανική οينوποίηση είναι ο *S. cerevisiae*. Το γεγονός ότι ο *S. cerevisiae* είναι σε θέση να μετατρέψει τη ζάχαρη σε αιθανόλη και CO_2 μέσω της αλκοολικής ζύμωσης, καθίστανται ως ένας κατεξοχήν μικροοργανισμός καλά προσαρμοσμένος σε αυτή τη διαδικασία. Ο *S. cerevisiae* έχει τη δυνατότητα να παράξει μέχρι και 12-15 αλκοολικούς βαθμούς, ενώ αρχίζει να αντιμετωπίζει πρόβλημα η βιωσιμότητά του από τους 8°C και πάνω. Επίσης η δυνατότητα πολλαπλασιασμού του μπορεί να κλονιστεί πάνω από τους 5 °C, ανάλογα με το στέλεχος (Parapouli et al., 2020).

Ο μύκητας *S. cerevisiae* είναι ένα από τα καλύτερα μοντέλα που χρησιμοποιείται για την κατανόηση της μικροβιακής οικολογίας όπως επίσης και της εξελικτικής γενετικής. Αυτό συμβαίνει αφού ο *S. cerevisiae* είναι ο πιο κοινός μικροοργανισμός στην τεχνολογία των ζυμώσεων και ο πιο μελετημένος όσον αφορά τις ιδιότητες και

τις προοπτικές βελτίωσής του. Η βελτίωση αυτή αφορά την παραγωγή νέων στελεχών με αντοχή σε ακραίες συνθήκες, όπως π.χ. αντοχή σε υψηλούς αλκοολικούς βαθμούς, υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες, δύο ιδιότητες που αποτελούν τεράστια τεχνολογική σημασία (Parapouli et al., 2020).

Ο *S. cerevisiae*, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματικός στην αποικοδόμηση διαφόρων χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων φυτοφαρμάκων και άλλων οργανικών ρύπων. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο συγκεκριμένος ζυμομύκητας μπορεί να τροποποιήσει ή και να διασπάσει ενώσεις όπως τα εντομοκτόνα, αξιοποιώντας ενζυματικούς μηχανισμούς και μεταβολικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται υπό την παρουσία αυτών των ουσιών (Guo et al., 2023; Pritsch et al., 2024). Η ικανότητά του αυτή έχει ενισχύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για τη χρήση του σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης και περιβαλλοντικού καθαρισμού, προσφέροντας μια βιώσιμη και οικολογικά φιλική προσέγγιση στην απομάκρυνση τοξικών ενώσεων από το περιβάλλον (Asemoloye & Marchisio, 2022; Kolvenbach et al., 2014).

1.8 Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα μελέτη εστιάζει στην ικανότητα του μύκητα *S. cerevisiae* να αποικοδομεί το εντομοκτόνο A-cypermethrin μέσω ενζυμικών μηχανισμών. Ο έλεγχος της αποικοδομητικής δράσης του σακχαρομύκητα πραγματοποιήθηκε σε υγρές καλλιέργειες του μικροοργανισμού και σε νωπά φρούτα (πορτοκάλια). Η έρευνα περιλαμβάνει την ανάπτυξη του μύκητα τόσο σε υγρές όσο και σε στερεές καλλιέργειες, καθώς και την προσαρμογή του σε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας, προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητά του να την αποικοδομήσει. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με ελεγχόμενο τρόπο, ώστε ο μύκητας να μετατρέψει το φυτοφάρμακο σε μη τοξικά παράγωγα, γεγονός που επιβεβαιώθηκε από τη σύγκριση με δείγματα ελέγχου. Η αναγνώριση των προϊόντων της διάσπασης της A-cypermethrin αποτελεί βασικό στόχο της εργασίας, καθώς συμβάλλει στην κατανόηση των βιομετασχηματισμών που λαμβάνουν χώρα κατά τη διαδικασία της αποικοδόμησης.

2 Πειραματικές Μέθοδοι & Υλικά

2.1 Υλικά και Αντιδραστήρια

Τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση του πειράματος παρατίθενται ως εξής:

- Φωσφορικό κάλιο K_2PO_4 (Analytical grade) (Sigma-Aldrich)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 (Analytical grade) (Sigma-Aldrich)
- A-cypermethrin 99% καθαρότητα (Analytical grade) (Sigma-Aldrich)
- Ακετονιτρίλιο ACN (HPLC grade) (Sigma-Aldrich)
- Εξάνιο C_6H_{14} (Analytical grade) (Sigma-Aldrich)
- Polysorbate 20 (PEG (20) sorbitan monolaurate, food grade)

Το Polysorbate 20 είναι ένας γαλακτωματοποιητής (emulsifier). Χρησιμοποιείται ευρέως στη παρασκευή καλλυντικών, προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη ανάμιξη μεταξύ υλικών με διαφορετική σύσταση κυρίως ελαίων με νερό χωρίς τη χρήση διαλύτη.

2.2 Θρεπτικά Υλικά

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση του πειράματος παρατίθενται ως εξής:

- Γλυκόζη (Sigma-Aldrich)
- Εκχύλισμα κρέατος (Meat extract, Sigma-Aldrich)
- Χλωριούχο νάτριο NaCl (Sigma-Aldrich)
- *S. cerevisiae* (Μαγιά εμπορίου, L'hirondelle)

2.3 Συσσκευές και Όργανα

Οι συσκευές, τα όργανα και οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση του πειράματος παρατίθενται ως εξής:

- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης

- Εργαστηριακός ζυγός ακριβείας (Kern ALS 220-4)
- Γυάλινα σκεύη (κωνικές φιάλες, διαχωριστικές φιάλες, ογκομετρικές φιάλες, φιαλίδια Eppendorf κ.α.)
- Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης HPLC (Shimadzu LCMS-2020)
- Αέριος χρωματογράφος - φασματομετρία μάζας (GC-MS) (Shimadzu Ultra GCMS QP2010)
- Θάλαμος ελεγχόμενων συνθηκών (incubator)
- Εργαστηριακός απαγωγός (laminar flow cabinet)
- Φυγόκεντρος



Εικόνα 5: Αποθηκευμένα στην κατάψυξη κύτταρα μαγιάς από όλα τα στάδια του πειράματος

2.4 Στελέχη του μύκητα *S. cerevisiae*

Το στέλεχος του *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το φυσικού τύπου στέλεχος του ζυμομύκητα, Σ1278b. Το *S. cerevisiae* Σ1278b είναι ένα από τα σημαντικότερα στελέχη της ζύμης που χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα. Ξεχωρίζει από άλλα στελέχη λόγω της ικανότητάς του να σχηματίζει μακριές αλυσίδες κυττάρων όταν τα θρεπτικά συστατικά είναι περιορισμένα, μια διαδικασία που μοιάζει με αυτή που βλέπουμε σε παθογόνους μύκητες. Αυτή η ικανότητα το καθιστά πολύτιμο για τη μελέτη όπου τα κύτταρα αλλάζουν μορφή και συμπεριφορά σε διαφορετικές συνθήκες. Επιπλέον, το Σ1278b έχει συνεισφέρει στο παρελθόν, ώστε να κατανοήσουμε καλύτερα πώς τα κύτταρα ανιχνεύουν και αντιδρούν σε αλλαγές στο περιβάλλον τους. Συνεπώς, το Σ1278b παραμένει ένα βασικό εργαλείο για την έρευνα στη βιολογία των κυττάρων.

2.5 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης και συντήρησης του *S. cerevisiae*

Η ανάπτυξη των στελεχών πραγματοποιήθηκε σε πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα YPD (Yeast extract-Peptone- Dextrose, 1% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 2% (w/v) πεπτόνη και 2% (w/v) δεξτρόζη), στους 30°C για 16-20 h και υπό σταθερή ανάδευση στις 200 rpm, στις υγρές καλλιέργειες. Στις στερεές καλλιέργειες, προστίθεται άγαρ σε τελική συγκέντρωση 2% (w/v). Η επιλογή μετασχηματισμένων στελεχών, καθώς και οι δοκιμασίες αύξησης παρουσία αμινοξέων ή τοξικών αναλόγων τους πραγματοποιήθηκε σε ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα SD (0,67% (w/v) αζωτούχο υπόστρωμα ζύμης χωρίς αμινοξέα και χωρίς θειικό αμμώνιο (Yeast Nitrogen Base without amino acids without ammonium sulfate, YNB Difco), 2% (w/v) δεξτρόζη, 1X διάλυμα επιλογής και 2% (w/v) άγαρ).

Τα στελέχη του μύκητα *S. cerevisiae* μπορούν να διατηρηθούν για τουλάχιστον πέντε χρόνια σε γλυκερόλη 50% στους -80 °C. Συγκεκριμένα, φρέσκα κύτταρα του μύκητα περισυλλέγονται από ένα τρυβλίο (24-48 h) με πλήρες θρεπτικό, σε σωληνάριο τύπου Eppendorf, το οποίο περιέχει 0,5 mL αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα PBS (βλ. παραπάνω) και προστίθεται ίσος όγκος γλυκερόλης 100%. Ακολουθεί καλή ανάδευση και άμεση αποθήκευση σε θερμοκρασία -80 °C.

2.6 Τεχνικές προετοιμασίας και ανάλυσης

Η παγκόσμια χρήση φυτοφαρμάκων έχει αυξηθεί δραματικά κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών, που συμπίπτει με τις αλλαγές στις γεωργικές πρακτικές και την ολοένα και πιο εντατική γεωργία. Η ευρεία χρήση των φυτοφαρμάκων για γεωργικούς και μη γεωργικούς σκοπούς έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία υπολειμμάτων τους σε διάφορες περιβαλλοντικές μήτρες. Παρά τη μεγάλη τεχνολογική πρόοδο, τα περισσότερα όργανα που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση, χρειάζονται ένα επιπλέον στάδιο, αυτό της προετοιμασίας του δείγματος, αφού δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν τη μήτρα των δειγμάτων απευθείας. Οι αναλυτικές τεχνικές όπως εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης (LLE) και μικροεκχυλίσσεις στερεάς φάσης (SPME) χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την εκχύλιση των φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα.

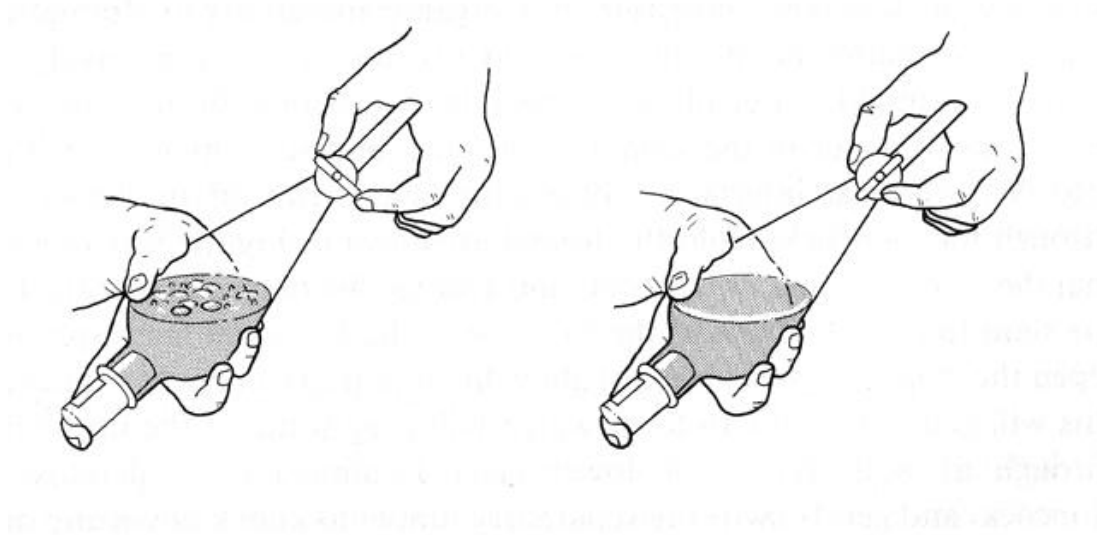
2.6.1 Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

Η εκχύλιση υγρής φάσης (Liquid-Liquid Extraction, LLE) είναι μια κλασσική τεχνική εκχύλισης η οποία χρησιμοποιείται ευρέως και αποτελεί την εκχύλιση ενός διαλύματος ουσιών με την βοήθεια ενός υγρού διαλύτη. Βασίζεται στην κατανομή μιας διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο υγρών που πρακτικά δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους. Οπότε η ουσία κατανέμεται μεταξύ των δύο υγρών φάσεων σε συγκεκριμένη αναλογία και αποκαθίσταται ισορροπία, όταν η ελεύθερη ενέργεια της διαλυμένης ουσίας είναι ίδια και στις δύο φάσεις. Η μια από τις δύο φάσεις ονομάζεται ένα υδατική φάση, ενώ η άλλη οργανική.

Το γεγονός τι είναι μια χρονοβόρα διαδικασία με πολλά στάδια λειτουργίας την καθιστά μια τεχνική εκχύλισης με αρκετά μειονεκτήματα. Προωθεί το σχηματισμό γαλακτωμάτων και χρησιμοποιεί μεγάλο όγκο διαλυτών υψηλής καθαρότητας που αυξάνουν το κόστος και τον κίνδυνο για την υγεία του προσωπικού δημιουργώντας ταυτόχρονα τοξικά εργαστηριακά απόβλητα.

Η εκχύλιση υγρού - υγρού είναι μία από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των φυτοφαρμάκων σε γεωργικά προϊόντα. Συγκεκριμένα, η τεχνική LLE επιλέχθηκε ως μία από τις καταλληλότερες μέθοδος για την ανάλυση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε καλλιέργειες ζαχαρομύκητα με

τα πλεονεκτήματα του χαμηλού κόστους, χωρίς ειδικές απαιτήσεις οργάνων και την ευκολία διεξαγωγής αποτελεσμάτων. (Frederick F. Cantwell, 1998)



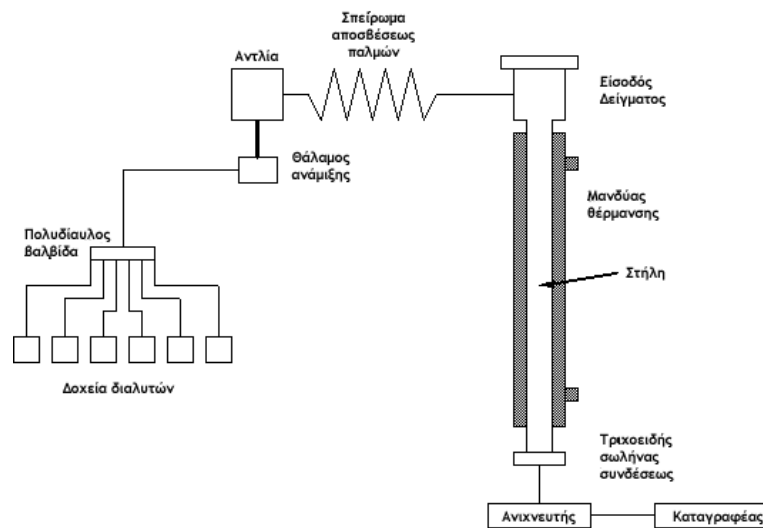
Εικόνα 6: Απελευθέρωση των αερίων κατά τη διάρκεια της υγρής-υγρής εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

2.6.2 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC)

Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελεί επέκταση της κλασικής χρωματογραφίας ανοιχτής στήλης και η ανάπτυξή της οφείλεται στη βελτίωση της τεχνολογίας (χρήση Η/Υ, κατασκευή ανθεκτικών στηλών, χρήση νέων ανιχνευτών) και στις βελτιωμένες δυνατότητες που παρέχει έναντι των άλλων αναλυτικών μεθόδων. Η HPLC είναι η κυριότερη χρωματογραφική τεχνική για την ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων.

Η HPLC χρησιμοποιεί σύγχρονες αναλυτικές στήλες μικρότερης διαμέτρου που περιέχουν κόκκους μεγέθους 3-10 μm . Η προκύπτουσα έτσι, πυκνή συσκευασία της στήλης παράγει μια υψηλή αντίσταση ροής, ώστε η κινητή υγρή φάση να περάσει με

πίεση από την στήλη. Με την HPLC επιτυγχάνονται μικρότεροι χρόνοι και καλύτερης απόδοσης διαχωρισμοί μιγμάτων.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση συσκευής HPLC

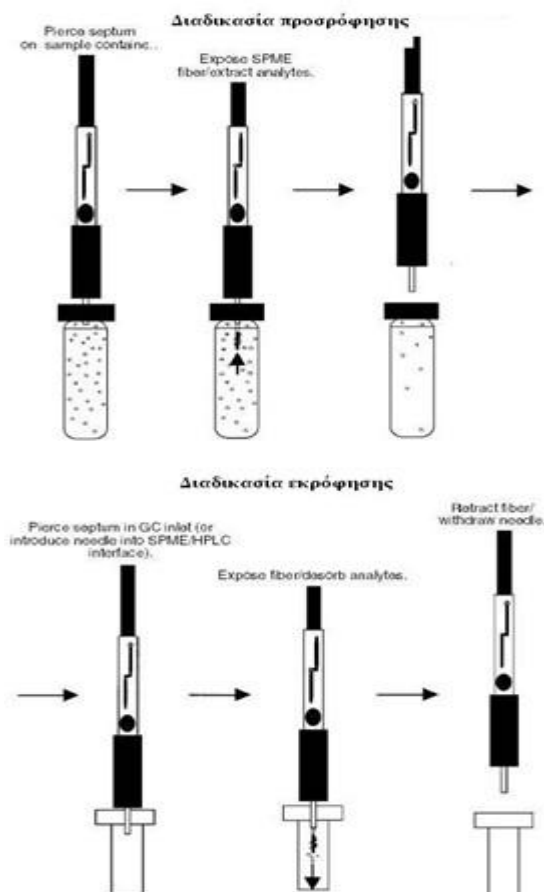
Η συσκευή HPLC αποτελείται από πέντε βασικά τμήματα: το σύστημα παροχής κινητής φάσης, το σύστημα εισαγωγής δείγματος, τη στήλη, τον ανιχνευτή και τον καταγραφέα. Μία τέτοια διάταξη απεικονίζεται στο παραπάνω σχήμα.

Τα βασικά πλεονεκτήματα για την επιλογή της HPLC ως αναλυτικής μεθόδου είναι:

- Η ικανότητα διαχωρισμού και εκλεκτικότητας στον παράλληλο προσδιορισμό περισσότερων δραστικών ουσιών σε ένα σκεύασμα ή στον προσδιορισμό προϊόντων διάσπασης, παράλληλα με τον προσδιορισμό της δραστικής ουσίας (π.χ. έλεγχος καθαρότητας, έλεγχος σταθερότητας). Η ικανότητα διαχωρισμού, των στηλών της HPLC είναι πολύ μεγαλύτερη από τις κοινές ανοιχτές στήλες.
- Η απλή προετοιμασία του δείγματος στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Τα περισσότερα υδατικά ή αλκοολικά υγρά σκευάσματα, μπορούν να αναλυθούν, είτε απευθείας είτε μετά από αραιώση.

- Όπως και σε όλες τις άλλες χρωματογραφικές μεθόδους, έτσι και στη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας, τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από μία ανάλυση, είναι τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά και επομένως μπορεί να προσδιοριστεί, αφενός η ποιότητα, αφετέρου η ποσότητα της δραστικής ουσίας.
- Ο χρόνος ανάλυσης στην HPLC είναι μικρότερος
- Η οργανολογία της HPLC αυτοματοποιείται εύκολα και επομένως είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός ποσοτικών αναλύσεων.
- Η όλη διαδικασία της ανάλυσης εξαρτάται από την οργανολογία και λιγότερο από την ικανότητα του χειριστή-αναλυτή. Η επαναληψιμότητα της διαδικασίας συνεπάγεται ποιοτικότερα αποτελέσματα.
- Είναι δυνατή η ταυτόχρονη διεξαγωγή χρωματογραφικών αναλύσεων
Το μειονέκτημα της HPLC είναι η αναγκαιότητα μεγάλου χρόνου στη ρύθμιση του οργάνου κατά την επεξεργασία διαφόρων δειγμάτων, καθώς επίσης και το μεγάλο κόστος αγοράς του οργάνου και των διαλυτών (Κουππάρης κ.α., 2013)

2.6.3 Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME)



Εικόνα 8: Διαδικασία δειγματοληψίας με την SPME

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) είναι μια τεχνική που αναπτύχθηκε το 1990, χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση φαρμάκων, εντομοκτόνων, αρωματικών και πτητικών ενώσεων σε περιβαλλοντικά δείγματα, τρόφιμα και βιολογικά υποστρώματα.

Στα βασικά βήματα της SPME περιλαμβάνεται αρχικά η προσρόφηση των Φ.Π στο υλικό ενός πολυμερικού υμενίου με τη μορφή ίνας. Στη συνέχεια, είτε εμβαπτίζεται μέσα στο διάλυμα (Direct SPME), είτε κρατείται στον υπερκείμενο χώρο του διαλύματος, οπότε αναφερόμαστε σε μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο (Headspace Solid Phase Microextraction – HS-SPME). Το επόμενο βασικό βήμα είναι η εκρόφηση των ενώσεων, η οποία για ενώσεις που είναι θερμικά σταθερές, γίνεται θερμικά με την εισαγωγή της ίνας απευθείας στον αέριο χρωματογράφο ή διαφορετικά, οι ενώσεις εκλύονται σε ειδικό σύστημα προσαρμοσμένο στον εισαγωγέα του δείγματος σε διάταξη υγρής χρωματογραφίας.

Η SPME συνδυάζεται γενικά με αέρια χρωματογραφία, όταν πρόκειται για προσδιορισμό ημιπτητικών οργανικών ενώσεων σε περιβαλλοντικά ή βιολογικά δείγματα τροφίμων. Μπορεί επίσης να συνδυαστεί με υγρή χρωματογραφία όταν πρόκειται για μη πτητικές και/ή πολικές ενώσεις (Eva de Rijke et al., 2006).

Έτσι η συσκευή της SPME μοιάζει με μια τροποποιημένη σύριγγα η οποία αντί για βελόνα περιέχει μια ενσωματωμένη ίνα με διαφορετικά προσροφητικά υλικά. Το προσροφητικό υλικό συμπεριφέρεται σαν «σφουγγάρι» προ συγκεντρώνοντας έτσι τις προσδιοριζόμενες ενώσεις.

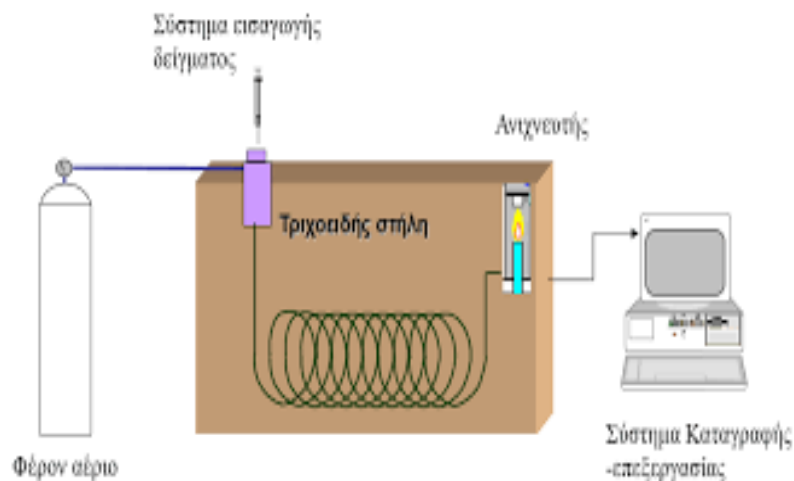
Η SPME είναι μια γρήγορη και εύκολη στη χρήση τεχνική. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της SPME είναι τα εξής :

- Η εκχύλιση πραγματοποιείται χωρίς την χρήση οργανικών διαλυτών
- Υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα
- Απλή συνδεσμολογία
- Χαμηλό κόστος
- Χωρίς προεργασία δείγματος
- Χωρίς βήματα καθαρισμού

Η επιλογή της SPME σχετίζεται άμεσα από την εκλεκτικότητα του υλικού κατασκευής της ίνας. Τα βασικά μειονεκτήματα της SPME σε σχέση με άλλες τεχνικές υπερκείμενης φάσης, είναι η μικρότερη ευαισθησία και η εύκολη θραύση των ινών (Gordon et. al, 2001).

Οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της διεργασίας της εκχύλισης είναι το υλικό (πάχος, πολικότητα) και η διάρκεια ζωής της ίνας, ο χρόνος εκχύλισης, ο ρυθμός ανάδευσης, η φύση του προς εκχύλιση δείγματος (pH, ιοντική ισχύς, περιεχόμενο οργανικού διαλύτη), η θερμοκρασία, η αναπαραγωγικότητα, τα όρια ανίχνευσης και οι συνθήκες εκρόφησης (John R. Dean, 1998).

2.6.4 Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)



Εικόνα 9: Διάγραμμα αέριου χρωματογράφου (πηγή: Μπακέας, 2008)

Η αέρια χρωματογραφία (GC) είναι μια αναλυτική τεχνική για τον διαχωρισμό και την ανίχνευση των συστατικών ενός μείγματος, τόσο για ποιοτική ανάλυση - προσδιορισμό των συστατικών του μείγματος, όσο και για ποσοτική ανάλυση - προσδιορισμό της ποσότητας των συστατικών του μείγματος. Εφαρμόζεται κυρίως σε αναλυτική κλίμακα (ποσότητες δειγμάτων μικρότερες των $10^{-6} \text{g} = 1 \mu\text{g}/\text{συστατικό}$). Τα προς ανάλυση συστατικά, για να επιτευχθεί βέλτιστη ανάλυση, πρέπει να είναι ή να καθίστανται πτητικά, με μοριακό βάρος $<1250 \text{ Da}$ ενώ πρέπει να μεταβαίνουν στην αέρια φάση χωρίς ταυτόχρονη διάσπαση, ώστε να μην καταστρέφονται μέσα στη συσκευή.

Η διάταξη του διαχωρισμού αποτελείται από μία λεπτή (τριχοειδή) χρωματογραφική στήλη, μέσα στην οποία τα συστατικά του μείγματος συγκρατούνται, σε διαφορετικούς βαθμούς, από ένα προσροφητικό υλικό (στάσιμη φάση), ενώ ταυτόχρονα κινούνται παρασυρόμενα από μια αέρια κινητή φάση (φέροντα αέρια: He , N_2 ή H_2). Τα συστατικά του μείγματος εξέρχονται σε διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης και αφού ανιχνευθούν από κατάλληλους ανιχνευτές, ταυτοποιούνται ή/και προσδιορίζονται ποσοτικά. Το αποτέλεσμα ονομάζεται αέριο

χρωματογράφημα και ο ποιοτικός και ο ποσοτικός προσδιορισμός των συστατικών του μείγματος γίνεται μετά από σύγκριση με πρότυπες ουσίες.

Επιπλέον, η αέρια χρωματογραφία είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί και ως μέθοδος απομόνωσης ενός συστατικού ενός μείγματος στην καθαρή μορφή του (Preparative Chromatography).

Τα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας μπορούν να συνοψιστούν όπως αναφέρονται παρακάτω:

- Απαιτεί μικρού μεγέθους δείγματα χωρίς εκτεταμένη προεργασία
- Αποτελεσματική στο διαχωρισμό πολύπλοκων μειγμάτων στα συστατικά τους ($N \sim 1,3 \cdot 10^6$)
- Γρήγορα αποτελέσματα
- Υψηλή ακρίβεια (1-5 % RSD)
- Ευαισθησία ικανή για τον προσδιορισμό πτητικών οργανικών ενώσεων σε χαμηλές συγκεντρώσεις (ppb, ppt)
- Απλή οργανολογία

Στα μειονεκτήματα της μεθόδου αναφέρονται:

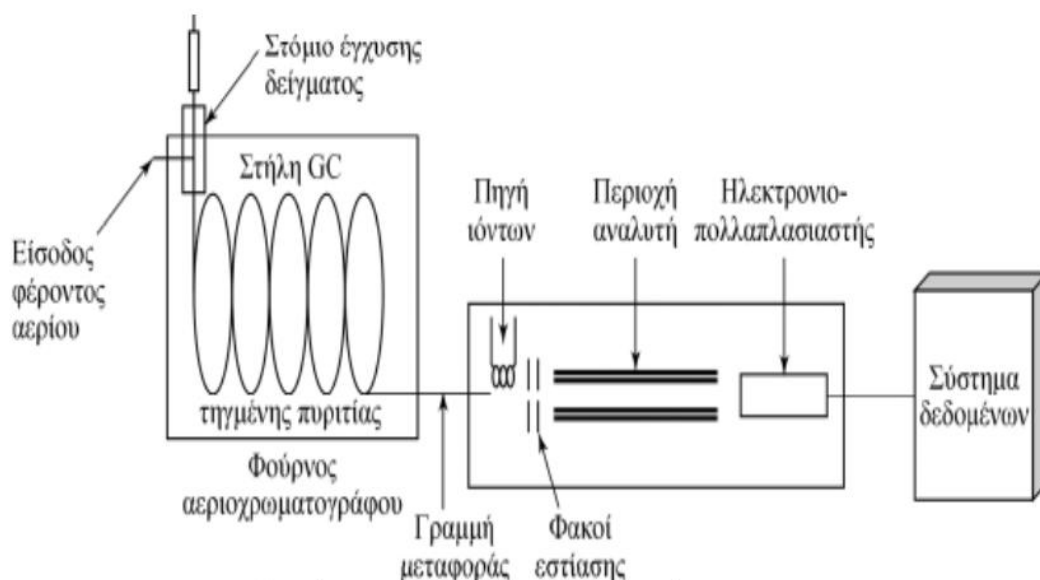
- Ο περιορισμός από την πτητικότητα των ενώσεων
 - η θερμοκρασία της στήλης περιορίζεται $\sim 380^\circ\text{C}$
 - η Ρατμ του αναλυτή $\sim 60 \text{ torr}$ σε αυτή τη θερμοκρασία στήλης
 - οι ενώσεις θα πρέπει να έχουν σ. ζ. $< 500^\circ\text{C}$
- Ακαταλληλότητα για θερμικά ασταθείς ενώσεις
- Απαίτηση σε μερικά δείγματα για εκτεταμένη προκατεργασία.
- Τα δείγματα θα πρέπει να είναι διαλυτά και να μην αντιδρούν με τη στήλη
- Απαίτηση για χρήση φασματοσκοπίας για τον προσδιορισμό της ταυτότητας των ενώσεων

2.6.5 Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography–Mass Spectrometry, GC–MS)

Ένα φασματόμετρο μάζας μπορεί να πολλαπλασιάσει σημαντικά τις δυνατότητες της αέριας χρωματογραφίας εάν χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής των συστατικών που

εξέρχονται από τη στήλη. Το φασματόμετρο μάζας διασπά κάθε συστατικό που εξέρχεται από τη στήλη σε ιόντα, και στη συνέχεια διαχωρίζει τα ιόντα σύμφωνα με τη μάζα και το φορτίο τους. Ο συνδυασμός της αέρια χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών (GC/MS) γίνεται μία ισχυρότατη αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης πολύπλοκων δειγμάτων και χαρακτηρίζεται από εκλεκτικότητα, υψηλή ευαισθησία, ταχύτητα και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου κ.α.

Η περιγραφή της αρχής λειτουργίας της τεχνικής ξεκινάει με το φασματόμετρο μάζας να προκαλεί την διάσπαση κάθε συστατικού που εξέρχεται από τη στήλη σε ιόντα, και στη συνέχεια το διαχωρισμό των ιόντων σύμφωνα με τη μάζα και το φορτίο τους. Εν συνεχεία, η καταγραφή των θραυσμάτων του κάθε συστατικού που εξέρχεται από τη στήλη αποτελεί το λεγόμενο φάσμα μάζας του συστατικού, το οποίο είναι μοναδικό για κάθε συστατικό. Η σύγκριση του φάσματος μάζας κάθε συστατικού, με φάσματα μάζας γνωστών ουσιών επιτρέπει την ταυτοποίηση του συστατικού. Η διαδικασία αυτή σήμερα γίνεται ταχύτατα με ηλεκτρονικούς υπολογιστές που περιέχουν βιβλιοθήκες φασμάτων μάζας σε ηλεκτρονική μορφή. (Πολυσίου Μ. κ. α., 2008)



Εικόνα 10: Τα βασικά μέρη ενός συστήματος GC-MS (Feng et al., 2019)

2.7 Δημιουργία υγρών καλλιιεργειών

2.7.1 Ενεργοποίηση *S. cerevisiae*

Στο στάδιο αυτό δημιουργήθηκε το κατάλληλο περιβάλλον στο οποίο ο *S. cerevisiae* ενεργοποιείται και αρχίζει να αναπτύσσεται. Η κατάλληλη θερμοκρασία, το pH, η ανακίνηση, ο χρόνος παραμονής και το θρεπτικό υπόστρωμα με το οποίο τρέφεται ο *S. cerevisiae* αποτελούν τις συνθήκες ενεργοποίησής του.

Η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος είναι:

- 5 g γλυκόζη
- 1,25 g μαγιά
- 1,25 g εκχύλισμα κρέατος (Meat extract, Sigma-Aldrich)
- 1,25 g NaCl
- 1,25 g K₂HPO₄

Τα παραπάνω υλικά διαλύονται σε 250 mL απιονισμένο νερό μέσα σε κωνικές φιάλες υπό ανάδευση. Οι υγρές καλλιέργειες με τα παραπάνω υλικά τοποθετούνται στον κάθετο κλίβανο ατμού για πλήρη αποστείρωση και παραμένουν 20 min στους 120 °C.

2.7.2 Ανάπτυξη *S. cerevisiae*

Μετά το στάδιο ενεργοποίησης ακολουθεί το στάδιο ανάπτυξης. Στο στάδιο αυτό οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται (σκεπασμένες με αλουμινόχαρτο) μέσα στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (incubator) στους 30 °C και πάνω σε μηχανικό αναδευτήρα (shaker) στις 340 rpm. Ο χρόνος παραμονής εντός του θαλάμου ελεγχόμενων συνθηκών είναι δύο ημέρες (48 h). Αυτή η διαδικασία ακολουθείται κάθε φορά που δημιουργείται υγρή καλλιέργεια στο πείραμα.

2.8 Απομόνωση των κυττάρων ζαχαρομύκητα *S. cerevisiae*

Στο στάδιο αυτό, μετά το πέρας της παραμονής των υγρών καλλιιεργειών στη θερμοκοιτίδα, το περιεχόμενο της κάθε κωνικής φιάλης τοποθετείται ισόποσα σε έξι σωλήνες πολυαιθυλενίου, όσες δηλαδή και οι θέσεις του θαλάμου φυγοκέντρωσης. Έπειτα, η φυγοκέντρωση έγινε στις 6.000 rpm για 3,5 min. Η τεχνική της φυγοκέντρωσης υιοθετείται με σκοπό να διαχωριστούν και στη συνέχεια να

απομονωθούν τα ανεπτυγμένα πλέον κύτταρα του *S. cerevisiae* από το υπόλοιπο διάλυμα. Η διαδικασία ακολουθείται κάθε φορά που απομονώνονται κύτταρα ζαχαρομύκητα *S.cerevisiae* στο πείραμα.

2.9 Πρώτο στάδιο εξοικείωσης του ζαχαρομύκητα με την A-cypermethrin

Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)

Ρυθμιστικό διάλυμα είναι το διάλυμα στο οποίο αν προστεθεί μικρή αλλά υπολογίσιμη ποσότητα ισχυρής βάσης ή ισχυρού οξέος δεν μεταβάλλει το pH του. Η επιλογή να χρησιμοποιηθεί buffer (ρυθμιστικό) διάλυμα, έγινε εξαιτίας αυτής της ιδιότητας που έχει.

Δημιουργία ρυθμιστικών buffer διαλυμάτων

Σε αυτό το κομμάτι του πειράματος, τα ενεργά κύτταρα του *S.cerevisiae* τοποθετήθηκαν μέσα σε buffer (ρυθμιστικό) διάλυμα, με σκοπό να επιτευχθεί η πρώτη φάση εξοικείωσης του *S.cerevisiae* με τη δραστική ουσία A-cypermethrin.

Το διάλυμα buffer (ρυθμιστικό) που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές περιείχε:

- 1,82 gr KH_2PO_4 (Δισόξινο φωσφορικό κάλιο)
- 1,98 gr K_2HPO_4 (Φωσφορικό κάλιο)
- 1 gr glucose (γλυκόζη)
- 1,25 gr yeast (κύτταρα *S.cerevisiae* από τις καλλιέργειες κατόπιν φυγοκέντρωσης)
- A-cypermethrin σε συγκέντρωση 50 ppm

Τα ρυθμιστικά διαλύματα των 250 mL που παρασκευάστηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος παρέμειναν στη θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (incubator) στους 30 °C σε 340 rpm για χρονικό διάστημα πέντε ημερών (5 days). Το χρονικό αυτό διάστημα χρειάστηκε έτσι ώστε να προλάβει ο *S. cerevisiae* να αρχίσει να αποικοδομεί την A-cypermethrin. Με τον όρο εξοικείωση εννοείται η στιγμή κατά την οποία ο ζαχαρομύκητας *S. cerevisiae* αρχίζει να αποικοδομεί την A-cypermethrin διασπώντας τους δεσμούς που την αποτελούν. Η διαδικασία ακολουθήθηκε κάθε φορά που δημιουργήθηκε buffer διάλυμα στο πείραμα.

Buffer διαλύματα με συγκεντρώσεις 2, 10, 20, 50 ppm της A-cypermethrin δημιουργήθηκαν κατά τη διεκπεραίωση του πειράματος. Επιλέχθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση της A-cypermethrin, ως το χείριστο σενάριο στον εντοπισμό των υπολειμμάτων της.

2.9.1 Υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE) στα buffer διαλύματα με χρήση hexane

Στο στάδιο αυτό με την τεχνική της υγρής-υγρής εκχύλισης ανακτήθηκε η A-cypermethrin που υπήρχε μέσα στα buffer διαλύματα με τη προσθήκη εξάνιου (hexane), με σκοπό να αναλυθούν στη συνέχεια τα δείγματα στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Κατά τη διαδικασία της υγρής-υγρής εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction, LLE) τοποθετήθηκαν τα buffer διαλύματα μέσα σε κωνικές φιάλες προσθέτοντας 100 mL εξάνιο (hexane). Αφού έγινε εκτεταμένη ανακίνηση, οι κωνικές φιάλες παρέμειναν σε κάθετη θέση έτσι ώστε να διαχωριστεί το μίγμα σε δύο ευδιάκριτες φάσεις. Η πάνω φάση, δηλαδή η οργανική φάση, αποτελείται από το εξάνιο (hexane) και την A-cypermethrin που έχει δεσμευτεί ενώ η κάτω φάση, δηλαδή η υδατική φάση, αποτελείται από το buffer διάλυμα. Στη συνέχεια, μετά τον πλήρη διαχωρισμό των δύο φάσεων το εξάνιο (hexane) που περιείχε την ανακτημένη A-cypermethrin διατηρείται στην κατάψυξη σε φιαλίδια των 50 mL προς ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Τέλος το buffer διάλυμα που απέμεινε φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 3,5 min με σκοπό το διαχωρισμό των κύτταρων του ζαχαρομύκητα και τη συντήρηση στην κατάψυξη για το δεύτερο στάδιο εξοικείωσής του με την A-cypermethrin. Η διαδικασία ακολουθείται κάθε φορά που εκχυλίζεται buffer διάλυμα στο πείραμα.

2.10 Δεύτερο στάδιο εξοικείωσης του ζαχαρομύκητα με την A-cypermethrin

Στο στάδιο αυτό λαμβάνει χώρα η δεύτερη και τελευταία φάση εξοικείωσης του ζαχαρομύκητα με την A-cypermethrin. Αφού αποψύχθηκαν τα κύτταρα του ζαχαρομύκητα που αποικοδόμησαν την A-cypermethrin από τις πρώτες καλλιέργειες των 50 ppm, δημιουργήθηκαν εκ νέου buffer διαλύματα για την συνέχιση της διαδικασίας εξοικείωσης.

Το διάλυμα buffer (ρυθμιστικό) που χρησιμοποιήθηκε στις δοκιμές περιείχε:

- 1,82 gr KH_2PO_4 (Δισόξινο φωσφορικό κάλιο)
- 1,98 gr K_2HPO_4 (Φωσφορικό κάλιο)
- 1 gr glucose (γλυκόζη)
- 1,25 gr yeast (κύτταρα *S.cerevisiae* εξοικειωμένα σε 50 ppm A-cypermethrin)
- A-cypermethrin σε συγκέντρωση 50 ppm *

Επαναλαμβάνοντας την προηγούμενη διαδικασία τα ρυθμιστικά διαλύματα των 250 mL, παραμένουν στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (incubator) στους 30 °C σε 340 rpm για χρονικό διάστημα πέντε ημερών (5 days). Με την επανάληψη της διαδικασίας επιτυγχάνεται η αύξηση της αποικοδομητικής δυνατότητας του ζαχαρομύκητα με τη δραστική ουσία έτσι ώστε να τρέφεται με αποτέλεσμα να φτάνει σε σημείο να τρέφεται με αυτή, δηλαδή να την αποικοδομεί A-cypermethrin.

Μετά το χρονικό διάστημα των πέντε ημερών (5 days) τα buffer διαλύματα υποβάλλονται ξανά σε εκχύλιση με τη τεχνική της υγρής-υγρής εκχύλισης (Liquid-Liquid Extraction, LLE) με σκοπό την ανάκτηση και πάλι της A-cypermethrin με τη βοήθεια του εξανίου (hexane) και την ανάλυση των δειγμάτων στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Με αυτό τον τρόπο, επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση της A-cypermethrin που έχει διασπαστεί με βάση την αρχική συγκέντρωση που υπήρχε στο buffer διάλυμα. Η διαδικασία ακολουθείται στο πείραμα κάθε φορά που δημιουργείται buffer διάλυμα με ήδη εξοικειωμένα κύτταρα του ζαχαρομύκητα σε συγκέντρωση 50 ppm A-cypermethrin.

Σε αυτό το σημείο, κατά τη διάρκεια του πειράματος δημιουργήθηκαν και άλλα buffer διαλύματα στην ίδια συγκέντρωση των 50 ppm A-cypermethrin, που είτε δεν περιείχαν καθόλου κύτταρα του ζαχαρομύκητα είτε δεν περιείχαν καθόλου ποσότητα από την A-cypermethrin. Αυτό συμβαίνει, για να ελεγχθεί η ανάκτηση-παραλαβή της δραστικής ουσίας από το διάλυμα. Καθώς επίσης και να επιτευχθεί η σύγκριση των δειγμάτων χωρίς A-cypermethrin και με A-cypermethrin.

Επιπλέον δημιουργείται και ένα buffer διάλυμα χωρίς κύτταρα του ζαχαρομύκητα όπου αντί για A-cypermethrin περιείχε τον βασικό μεταβολίτη της δραστικής ουσίας, 3-phenoxybenzaldehyde σε συγκέντρωση 50 ppm. Αυτό έγινε με σκοπό να ελεγχθεί εάν παραλαμβάνεται η ουσία με εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase MicroExtraction, SPME). Επιπλέον, με την παραπάνω διαδικασία ελέγχθηκε και διασφαλίστηκε η μη- διάσπαση της ουσίας στο διάλυμα απουσία του μικροοργανισμού.

2.10.1 Προετοιμασία παρασκευάσματος για εφαρμογή σε νωπά φρούτα (πορτοκάλια)

Σε αυτό το στάδιο του πειράματος 100 mL από το buffer διάλυμα του δεύτερου σταδίου εξοικείωσης του ζαχαρομύκητα με την A-cypermethrin σε συγκέντρωση 50 ppm και αναμιγνύονται με 2 gr Polysorbate 20. Με το παρασκεύασμα εφαρμογής ψεκάζονται στη συνέχεια τα πορτοκάλια που έχουν ήδη ψεκάσει με A-cypermethrin σε συγκέντρωση 50 ppm.

2.10.2 Διαδικασία εκχύλισης πορτοκαλιών

Σε αυτό το στάδιο εμπλουτίσαμε τρία πορτοκάλια με A-cypermethrin σε συγκέντρωση 50ppm και στη συνέχεια τα ψεκάζουμε με το παρασκεύασμα εφαρμογής. Το ένα από τα τρία πορτοκάλια εκχυλίζεται την ίδια μέρα ($t=0$), δηλαδή εκπλύνεται με 50 mL εξάνιο (hexane) με σκοπό να παραληφθεί η A-cypermethrin και ενδεχομένως τα προϊόντα αποικοδόμησής της. Στη συνέχεια το εκχύλισμα αναλύθηκε στην αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (Gas

Chromatography–Mass Spectrometry, GC–MS). Τα υπόλοιπα πορτοκάλια τοποθετούνται στον θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (incubator) στους 30 °C.

Μετά από τρεις μέρες (t=3 days) εξάγεται από τον θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (incubator) ένα ακόμα πορτοκάλι από τα τρία και εκχυλίζεται με 50 mL εξάνιο (hexane). Στη συνέχεια, μετά την εκχύλιση, το εξάνιο συμπυκνώνεται με ροή αζώτου, σε αέρια κατάσταση, μέχρι ξηρού σε όγκο 1 mL. Το συμπύκνωμα που προκύπτει, εισάγεται στην αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography–Mass Spectrometry, GC–MS) για τον εντοπισμό του βασικού μεταβολίτη 3-phenoxybenzaldehyde της A-Cypermethrin.

Έπειτα από διάστημα 6 ημερών η διαδικασία επαναλήφθηκε και για τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις του πειράματος, δηλαδή το πορτοκάλι που δεν έχει ψεκαστεί με το παρασκεύασμα εφαρμογής και το ύστερο πορτοκάλι ψεκασμένο με το παρασκεύασμα εφαρμογής.

2.10.3 Χαρακτηριστικά οργάνου Αέριας Χρωματογραφίας – Φασματομετρίας Μάζας

Το όργανο της Αέριας Χρωματογραφίας - Φασματομετρίας Μάζας ρυθμίστηκε καταλλήλως για να πραγματοποιηθούν οι παρακάτω αναλύσεις με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

Είδος στήλης οργάνου: HP-1 (Agilent J&W)

Χαρακτηριστικά στήλης: Μήκος 20m , Διάμετρος 0.18mm , Πάχος 0.18um

Τρόπος έγχυσης: Ένεση vol 0.2u L (με χειροκίνητη ένεση), Αναλογία διαίρεσης 1/100, εισαγωγή 250 C

Ροή: Φέρον αέριο He, Ροή στήλης 0.45 mL /min

Φούρνος: 70 C για 0 min, ramp 4 C/min to 94 C για 1.5min, ramp 2.5 C/min to 120 °C για 1.0min, ramp 7 C/min to 250 C για 10min

Γραμμή μεταφοράς: Transferline 250 C

Φασματόμετρο μάζας: Πηγή ιόντων 200 C, Εύρος μάζας (m/z) 39 - 400

2.11 Συνοπτική περιγραφή πειραματικού μέρους

Η αναλυτική μεθοδολογία που αναπτύχθηκε βασίστηκε στην εκχύλιση QuEChERS σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία-φασματογραφία μάζας. Η μέθοδος αποτελείται από λίγα στάδια, δεν απαιτεί πολύ χρόνο, χρειάζεται μικρή ποσότητα οργανικών διαλυτών και πληροί τους όρους επικύρωσης που ορίζει η ευρωπαϊκή νομοθεσία για όλα τα σύνθετα υποστρώματα που μελετά (φρούτα, λαχανικά, γαλακτοκομικά, ξηρά προϊόντα, ελαιόλαδο, ολικής διαίτας)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε διαλογή για την ανάδειξη των αποτελεσματικότερων μικροοργανισμών ως προς την αποικοδόμηση της A-Cypermethrin. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία προέκυψε ότι οι ζαχαρομύκητες είναι ικανοί να διασπούν τα πυρεθροειδή κυρίως γεωργικά φάρμακα. Σαν απόρροια αυτού επιλέχθηκε για το πείραμα ο ζυμομύκητας ή *S. cerevisiae* ως ο πλέον οικονομικός και πιο διαδεδομένος στην κατηγορία του.

Το πείραμα χωρίστηκε σε δύο φάσεις. Στην πρώτη επιτεύχθηκε η ενεργοποίηση και ανάπτυξη των κυττάρων του ζυμομύκητα μέσα σε δύο μέρες μέσα από τη δημιουργία υγρών καλλιεργειών του ζυμομύκητα. Έπειτα αφού απομονώθηκαν τα ενεργά κύτταρα με την τεχνική της φυγοκέντρωσης τοποθετήθηκαν μαζί με την δραστική A-cypermethrin μέσα σε buffer διαλύματα με σκοπό να αποικοδομήσουν την δραστική ουσία. Οι μεταχειρίσεις με A-cypermethrin πραγματοποιήθηκαν στα επίπεδα συγκέντρωσης 2ppm, 10ppm, 20 ppm και 50ppm και σε χρονικό διάστημα πέντε ημερών.

Το δεύτερο στάδιο εμπεριείχε τις αναλύσεις των δειγμάτων σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Αφού λοιπόν διαπιστώθηκε μείωση στις συγκεντρώσεις της A-cypermethrin, επιλέχθηκε η υψηλότερη για τη συνέχεια του πειράματος. Σε αυτό το σημείο κρίθηκε αναγκαίο να επαναλάβουμε το πρώτο μέρος για να διαπιστώσουμε αν με αυτή την μέθοδο μπορεί να διασπαστεί και A-cypermethrin σε υψηλότερη συγκέντρωση (100ppm).

Εν συνεχεία, πορτοκάλια πρώτα ψεκάστηκαν με A-cypermethrin σε συγκέντρωση 50 ppm. Επιλέχθηκαν τα 50 ppm ως το δυσμενέστερο από όλα τα σενάρια μιας και εκεί εντοπίστηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση με την μικρότερη ποσοστιαία κατανάλωση. Στη συνέχεια, τρία πορτοκάλια εμπλουτίστηκαν με το παρασκεύασμα

που περιείχε κύτταρα του ζαχαρομήκητα, τα οποία είχαν εκτεθεί δύο φορές στην A-cypermethrin, την ίδια δραστική ουσία με την οποία είχαν προηγουμένως ψεκαστεί τα πορτοκάλια. Καταλήγοντας, έλαβε χώρα η εκχύλιση από την επιφάνεια των πορτοκαλιών μετά από τρεις μέρες όπου το παρασκεύασμα εφαρμογής παρέμεινε στη φλούδα των πορτοκαλιών. Το εκχύλισμα αναλύθηκε με τη βοήθεια αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρία μάζας (GC-MS) και σε αυτό ανιχνεύθηκε η A-cypermethrin καθώς και η 3-phenoxy-benzaldehyde, η οποία είναι ο βασικός μεταβολίτης της A-cypermethrin

2.11.1 Δημιουργία υγρών καλλιεργειών ζαχαρομήκητα

Η διαδικασία ξεκινά με τη δημιουργία υγρών καλλιεργειών ζαχαρομήκητα, όπου τα κύτταρα ζυμομυκήτων τοποθετούνται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών για 48 ώρες. Αυτή η περίοδος επώασης επιτρέπει στα κύτταρα να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν υπό ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, διασφαλίζοντας την υγιή και συνεπή ανάπτυξή τους για τις επόμενες φάσεις του πειράματος.

2.11.2 Απομόνωση των κυττάρων με φυγοκεντρική και δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων

Μετά από 48 ώρες, τα κύτταρα ζαχαρομήκητα απομονώνονται με τη χρήση φυγοκέντρωσης και τοποθετούνται σε ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν A-cypermethrin σε διάφορες συγκεντρώσεις (2, 10, 20, και 50 ppm). Τα διαλύματα τοποθετούνται ξανά σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών για πέντε μέρες, επιτρέποντας τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του ζυμομήκητα με την A-cypermethrin και την αξιολόγηση των επιπτώσεών της σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης.

2.11.3 Υγρή-υγρή εκχύλιση ρυθμιστικών διαλυμάτων

Μετά την πάροδο των πέντε ημερών, πραγματοποιείται υγρή-υγρή εκχύλιση στα ρυθμιστικά διαλύματα για την απομόνωση της A-cypermethrin και των παραγώγων της, χρησιμοποιώντας εξάνιο ως διαλύτη. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει την απομόνωση της A-cypermethrin και των λοιπών παραγώγων της διαδικασίας από τα

διαλύματα σε όλες τις συγκεντρώσεις, καθιστώντας δυνατή την ανάλυση της ποσότητας που έχει απορροφηθεί ή παραμείνει στα διαλύματα.

2.11.4 Ανάλυση των δειγμάτων με τη χρήση HPLC

Τα δείγματα που περιέχουν A-cypermethrin, τα οποία έχουν ληφθεί από την υγρή-υγρή εκχύλιση, αναλύονται με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Αυτή η μέθοδος επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης της A-cypermethrin σε κάθε δείγμα, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα της αποδήμησης και τις επιδράσεις των ζυμομυκήτων στις διάφορες συγκεντρώσεις.

2.11.5 Επιλογή των κυττάρων από τα 50 ppm και επαναχρησιμοποίησή τους

Τα κύτταρα ζυμομύκητα που έχουν εκτεθεί στην A-cypermethrin σε συγκέντρωση 50 ppm επαναχρησιμοποιούνται σε νέες καλλιέργειες. Αυτή η επαναχρησιμοποίηση επιτρέπει τη μελέτη της ανθεκτικότητας και της προσαρμογής των κυττάρων στην A-cypermethrin, καθώς και των μεταβολών που μπορεί να έχουν υποστεί κατά την προηγούμενη έκθεσή τους.

2.11.6 Δημιουργία νέου buffer διαλύματος

Μετά την ανάλυση όλων των δειγμάτων, δημιουργούνται εκ νέου ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιώντας τα επαναχρησιμοποιημένα κύτταρα ζυμομύκητα που είχαν εκτεθεί στην A-cypermethrin σε συγκέντρωση 50 ppm. Αυτά τα νέα διαλύματα επιτρέπουν τη εξέλιξη των πειραμάτων και τη μελέτη της συνέχισης των επιδράσεων της A-cypermethrin στα κύτταρα.

2.11.7 Υγρή-υγρή εκχύλιση στα νέα διαλύματα buffer

Στα νέα ρυθμιστικά διαλύματα πραγματοποιείται και πάλι υγρή-υγρή εκχύλιση για την απομόνωση της A-cypermethrin και των μεταβολιτών της. Αυτή η επαναλαμβανόμενη διαδικασία εξασφαλίζει τη συνέπεια των αποτελεσμάτων και επιτρέπει τη σύγκριση με τα αρχικά διαλύματα για να εκτιμηθεί η μεταβολή της απορρόφησης ή της ανθεκτικότητας των κυττάρων.

2.11.8 Διαχωρισμός κυττάρων με φυγοκέντρηση και συντήρηση των κυττάρων στην κατάψυξη

Τα κύτταρα που έχουν εκτεθεί δύο φορές στην A-cypermethrin σε συγκέντρωση 50 ppm διαχωρίζονται ξανά με φυγοκέντρηση και στη συνέχεια συντηρούνται στην κατάψυξη. Αυτή η διαδικασία διασφαλίζει τη διατήρηση των κυττάρων για μελλοντική χρήση και ανάλυση, επιτρέποντας περαιτέρω μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις της επαναλαμβανόμενης έκθεσης στην A-cypermethrin.

2.11.9 Δημιουργία παρασκευάσματος αποτελούμενο από 2% tween 20 και διάλυμα buffer

Μετά από δύο εβδομάδες, δημιουργείται ένα παρασκεύασμα που περιέχει 2% Tween 20 και ρυθμιστικό διάλυμα καλλιέργειας με 50 ppm A-cypermethrin. Αυτή η παρασκευή προετοιμάζεται για τον ψεκασμό πορτοκαλιών, με στόχο τη μελέτη της επίδρασης του παρασκευάσματος στα φρούτα και τη συμπεριφορά της A-cypermethrin σε φυσικό περιβάλλον.

2.11.10

Ψεκασμός με το παρασκεύασμα στα τρία από τα τέσσερα πορτοκάλια

Τρία από τα τέσσερα πορτοκάλια ψεκάζονται με το παρασκεύασμα που δημιουργήθηκε, ενώ το τέταρτο παραμένει ανεπηρέαστο. Αυτό το βήμα επιτρέπει τη σύγκριση μεταξύ των πορτοκαλιών που έχουν εκτεθεί στην A-cypermethrin και εκείνων που δεν έχουν εκτεθεί, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για την επίδραση του ψεκασμού.

Την ίδια μέρα, ένα από τα τρία ψεκασμένα πορτοκάλια εκχυλίζεται με τη χρήση 50 mL εξάνιο. Αυτή η διαδικασία επιτρέπει την απομόνωση της A-cypermethrin από το φρούτο και την ανάλυση της ποσότητας που απορροφήθηκε ή παραμένει στην επιφάνεια του πορτοκαλιού.

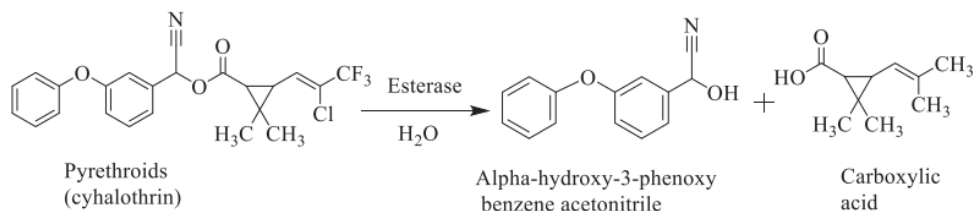
Το εξάνιο που χρησιμοποιήθηκε στην εκχύλιση συμπυκνώνεται με τη χρήση αερίου αζώτου. Αυτή η μέθοδος βοηθά στην συμπύκνωση του διαλύτη μαζί με τα εκχυλίσματα, επιτρέποντας την ακριβή μέτρηση της A-cypermethrin όπως και των παράγωγων που απομονώθηκαν από το πορτοκάλι.

Μετά από τρεις μέρες, εκχυλίζεται το δεύτερο πορτοκάλι από τα τρία με τη βοήθεια 50 mL εξάνιο. Αυτή η εκχύλιση επαναλαμβάνει τη διαδικασία απομόνωσης της A-cypermethrin, επιτρέποντας τη σύγκριση των αποτελεσμάτων σε διαφορετικούς χρόνους έκθεσης.

Μετά από έξι μέρες, εκχυλίζεται το τρίτο πορτοκάλι και το πορτοκάλι που δεν ψεκάστηκε, χρησιμοποιώντας 50 mL εξάνιο. Αυτή η εκχύλιση επιτρέπει τη σύγκριση της A-cypermethrin στα ψεκασμένα και μη ψεκασμένα πορτοκάλια, παρέχοντας ολοκληρωμένη εικόνα για την επίδραση του ψεκασμού αλλά και του μεταβολισμού του *S. cerevisiae*.

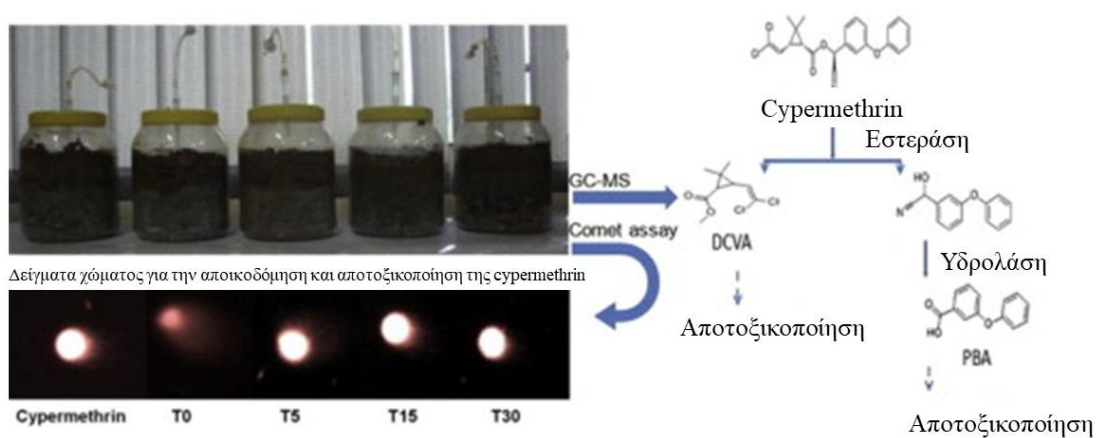
3 Αποτελέσματα & Συζήτηση

Ένας αποτελεσματικός και οικολογικός τρόπος βιοαποδόμησης των φυτοφαρμάκων και τοξικών ουσιών πραγματοποιείται μέσω της χρήσης διάφορων μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, μία πληθώρα ερευνητικών εργασιών έχουν αναφερθεί στην αποδόμηση των πυρεθροειδών από διάφορα μικροβιακά γένη που ανήκουν στα *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Raoultella*, *Klebsiella*, *Brevibacillus*, *Aspergillus*, *Candida* και *Trichoderma*. Αυτά τα μικροβιακά γένη παράγουν υδρολάσες πυρεθροειδών, οι οποίες έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτοξικοποίηση των πυρεθροειδών φυτοφαρμάκων. Οι εστεράσες ανήκουν στην οικογένεια των ενζύμων υδρολάσης και διαδραματίζουν κρίσιμους ρυθμιστικούς ρόλους στην αποικοδόμηση των πυρεθροειδών. Υδρολάσες που διασπούν πυρεθροειδή έχουν αναφερθεί στο παρελθόν από μικρόβια, έντομα, φυτά και ζωικά κύτταρα. Η ενζυμική βιοαποδόμηση αποτελεί μια δυνητικά γρήγορη, ασφαλή και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο, βιοαποικοδόμησης φυτοφαρμάκων. Οι ερευνητές έχουν συνδέσει την παρουσία πυρεθροειδούς υδρολάσης με τη δυνατότητα βιοαποικοδόμησης βακτηρίων και μυκήτων, ενώ τα ανθεκτικά έντομα είναι επίσης γνωστό ότι περιέχουν πυρεθροειδείς υδρολάσες. Το κυτόχρωμα P450 των εντόμων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των πυρεθροειδών εντομοκτόνων και τα χαρακτηριστικά αυτά στα έντομα-φορείς μπορούν να οδηγήσουν σε επιδημίες ασθενειών. Η μετάλλαξη στα γονίδια της κυτοχρωματικής μονοοξυγενάσης P450, CYP6 της *Locusta migratoria* είχε ως αποτέλεσμα αυξημένη ευαισθησία έναντι των πυρεθροειδών (Bhatt et al., 2020).



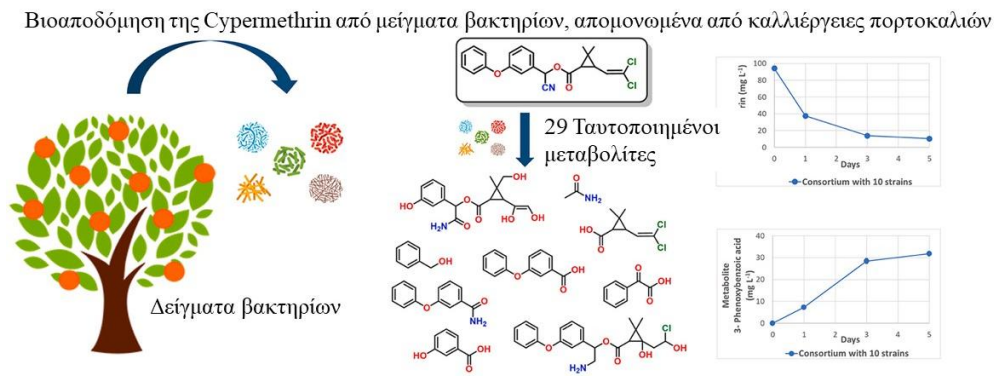
Εικόνα 11: Μεταβολίτες που παράγονται από την βιοαποδόμηση των πυρεθροειδών (Bhatt et al., 2020)

Επιπρόσθετα, οι ερευνητικές εργασίες των Birolli et al (2022) και Sundaram et al (2013) έδειξαν την βιοαποδόμηση της A-Cypermethrin από βακτηριακά στελέχη *Bacillus* sp. (Birolli et al., 2022; Sundaram et al., 2013). Πιο συγκεκριμένα, οι Sundaram et al (2013) έδειξαν ότι το βακτήριο *Bacillus* sp. στέλεχος ISTDS2, που λήφθηκε από δείγματα χώματος, όχι μόνο προκάλεσε την αποικοδόμηση της A-Cypermethrin, αλλά μείωσε και την τοξικότητα της, δημιουργώντας παραπροϊόντα τα οποία ήταν μη τοξικά για ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (Εικόνα 12) (Sundaram et al., 2013).



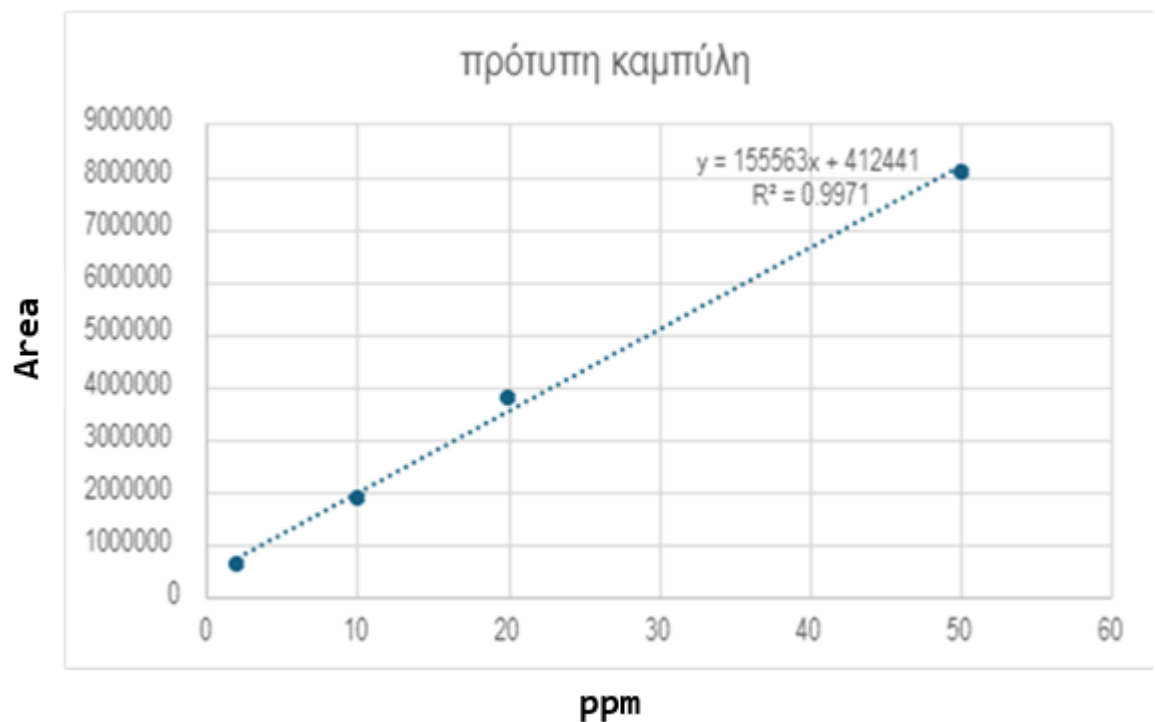
Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής προσέγγισης που ακολουθήθηκε από τους Sundaram et al (2013) για την αποικοδόμηση και αποτοξικοποίηση της Cypermethrin. Προσαρμοσμένο από Sundaram et al (2013).

Άξια ενδιαφέροντος είναι και η, πιο πρόσφατη, εργασία των Birolli et al (2022) η οποία κατέδειξε την αποικοδόμηση της cypermethrin από ένα μείγμα βακτηριακών στελεχών του γένους *Bacillus* sp. και την περαιτέρω μέσω αυτού του βιοαποικοδομητικού μονοπατιού, ταυτοποίηση 29 χημικών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων διαφορετικών νέων παραγώγων αμιδίου και αμίνης (Εικόνα 13). Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής συνολικά διεύρυναν τις γνώσεις σχετικά με την τύχη αυτής της ένωσης στο περιβάλλον, δείχνοντας ότι η επιλογή αποτελεσματικών στελεχών για τη σύνθεση του κατάλληλου μείγματος μικροοργανισμών αποτελεί μια εξαιρετικά ενδιαφέρουσα προσέγγιση για τη βιοεξυγίανση των πυρεθροειδών (Birolli et al., 2022).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής προσέγγισης που ακολουθήθηκε από τους Birolli et al (2022) για την αποικοδόμηση και αποτοξικοποίηση της Cypermethrin. Προσαρμοσμένο από Birolli et al (2022).

3.1 Δημιουργία πρότυπης καμπύλης A-cypermethrin



Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη

Για την ταυτοποίηση των ενώσεων κρίθηκε απαραίτητο η δημιουργία καμπύλης αναφοράς για την A-cypermethrin. Για να δημιουργήσουμε την καμπύλη για τον αέριο χρωματογράφο με φασματογραφία μάζας (GC-MS), ξεκινήσαμε με την προετοιμασία

των πρότυπων διαλυμάτων. Επιλέχθηκε μια σειρά γνωστών συγκεντρώσεων της ένωσης προς αναλύσει, από χαμηλή έως υψηλή, καλύπτοντας το εύρος συγκεντρώσεων που αναμέναμε να βρούμε στο δείγματά μας. Συγκεκριμένα, προετοιμάστηκαν διαλύματα με συγκεντρώσεις 2 ppm, 10 ppm, 20 ppm, και 50 ppm. Αφού ετοιμάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα, εισήχθησαν στον GC-MS, καταγράφοντας τις αποκρίσεις (τα σήματα) για κάθε γνωστή συγκέντρωση. Κρίθηκε απαραίτητο η πραγματοποιήσει πολλαπλών ενέσεων για κάθε συγκέντρωση έτσι ώστε εξασφαλιστεί η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων.

Αφού συλλέχτηκαν τα δεδομένα, κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη, δημιουργώντας ένα διάγραμμα με τις συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων στον άξονα x και τις αποκρίσεις (τα σήματα) στον άξονα y. Χρησιμοποιώντας λογισμικό ανάλυσης δεδομένων, εφαρμόστηκε γραμμική παλινδρόμηση στα δεδομένα για να υπολογιστεί η εξίσωση της ευθείας γραμμής που προσαρμόζεται καλύτερα στα σημεία δεδομένων. Η εξίσωση αυτή έχει τη μορφή $y = mx + b$, όπου y είναι η απόκριση, x είναι η συγκέντρωση, m είναι η κλίση της γραμμής και b είναι η τομή με τον άξονα y. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη που μας επέτρεψε τόσο να ταυτοποιήσουμε την A-cypermethrin όσο και να την ποσοτικοποιήσουμε

3.2 Αποδόμηση της A-cypermethrin

Κατά την πρώτη φάση του πειράματος δημιουργήθηκαν τέσσερα buffer διαλύματα με τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις 2ppm, 10ppm, 20ppm και 50ppm. Με τα παραπάνω διαλύματα έγινε η αποικοδόμηση της A-cypermethrin από τον *S. cerevisiae*. Στο παρακάτω πίνακα εμφανίζονται η κατανάλωση της A-cypermethrin από τον *S. cerevisiae* μετά το πέρας πέντε ημερών.

Πίνακας 2: Ποσοστιαία μείωση της A-cypermethrin σε χρονικό εύρος 5 ημερών

Δείγμα	Αρχική συγκέντρωση A-cypermethrin στο δείγμα	Συγκέντρωση A-cypermethrin μετά από 5 μέρες (5 days)	Μείωση συγκέντρωσης της A-cypermethrin (%)
22/1/19 B 50 ppm	50 ppm	19.2 ppm	61.6 %
22/1/19 A 20 ppm	20 ppm	6.86 ppm	65.7%
22/1/19 B 10 ppm	10ppm	3.8 ppm	62%
21/1/19 A 2 ppm	2 ppm	0.73 ppm	63.5%

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στον πίνακα δείχνουν την αρχική και τελική συγκέντρωση της A-cypermethrin σε διάφορα δείγματα μετά από πέντε ημέρες, καθώς και το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης. Παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση της A-cypermethrin μειώθηκε σημαντικά σε όλα τα δείγματα. Το δείγμα με αρχική συγκέντρωση 50 ppm παρουσίασε μείωση κατά 61,6%, ενώ το δείγμα με αρχική συγκέντρωση 20 ppm παρουσίασε ελαφρώς μεγαλύτερη μείωση κατά 65,7%. Παρόμοια, τα δείγματα με χαμηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις, 10 ppm και 2 ppm, παρουσίασαν μειώσεις 62% και 63,5% αντίστοιχα. Αυτές οι μειώσεις υποδεικνύουν μια σχετική συνέπεια στην αποδόμηση της A-cypermethrin, ανεξαρτήτως της αρχικής συγκέντρωσης.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δείχνει ότι η A-cypermethrin υπόκειται σε σημαντική αποδόμηση κατά τη διάρκεια των πέντε ημερών, με τα ποσοστά μείωσης να κυμαίνονται μεταξύ 61,6% και 65,7%. Αυτή η σταθερή μείωση υποδηλώνει ότι ο μηχανισμός αποδόμησης είναι αποτελεσματικός και δρα με σχετικά σταθερό τρόπο, ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση του εντομοκτόνου. Η μεγαλύτερη ποσοστιαία μείωση της A-cypermethrin σε δείγματα με χαμηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις πιθανότατα αποδίδεται σε διαφοροποιήσεις στη φυσιολογία και το μεταβολισμό του *S. cerevisiae*. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ο μύκητας ενδέχεται να έχει αυξημένη ικανότητα πρόσληψης και αποδόμησης της ουσίας, καθώς το εντομοκτόνο δεν φτάνει σε επίπεδα τοξικότητας που θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά τη βιολογική του δραστηριότητα. Επιπλέον, οι μηχανισμοί απορρόφησης πιθανώς εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος, με αποτέλεσμα σε

υψηλότερες συγκεντρώσεις να παρατηρείται κορεσμός των μεταφορέων ή ενζυμική αναστολή.

Ο *S. cerevisiae* διαθέτει ένα δυναμικό σύστημα μεταβολικών μονοπατιών, το οποίο του επιτρέπει να προσαρμόζεται σε περιβαλλοντικές πιέσεις και να αξιοποιεί ξένες ενώσεις μέσω ενζυμικών μηχανισμών αποικοδόμησης. Η παρουσία ενζύμων όπως εστεράσες και οξειδάσες μπορεί να διευκολύνει τη μετατροπή της A-cypermethrin σε λιγότερο τοξικά ενδιάμεσα προϊόντα, όπως το 3-phenoxybenzaldehyde (3-PBA). Αυτός ο μεταβολίτης έχει ήδη αναφερθεί ως βασικό προϊόν αποικοδόμησης των πυρεθροειδών από διάφορους μικροοργανισμούς, γεγονός που ενισχύει τη θέση του ζυμομύκητα ως υποσχόμενου παράγοντα βιοεξυγίανσης.

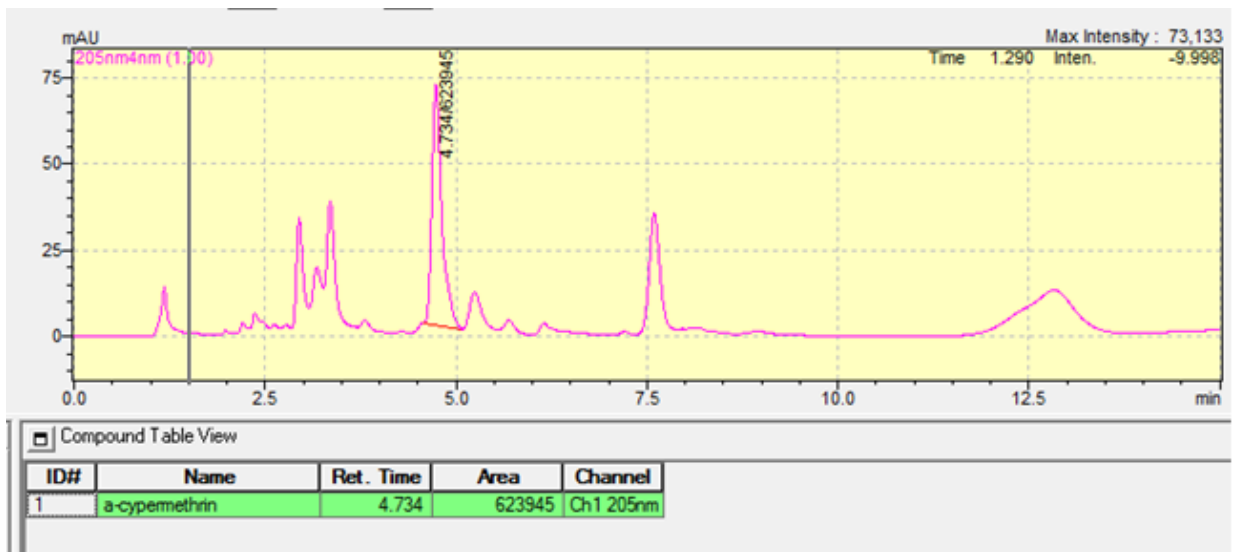
Συνολικά, τα πειραματικά δεδομένα ενισχύουν την άποψη ότι ο *S. cerevisiae* μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την αποδόμηση της A-cypermethrin μέσω βιολογικών μηχανισμών, προσφέροντας μια βιώσιμη και φιλική προς το περιβάλλον λύση για την απομάκρυνση πυρεθροειδών φυτοφαρμάκων από το περιβάλλον. Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν αυτή τη διαδικασία θα μπορούσε να συμβάλει στην ανάπτυξη προηγμένων βιοτεχνολογικών εφαρμογών για τη διαχείριση της ρύπανσης που προέρχεται από συνθετικά εντομοκτόνα.

3.3 Χρωματογραφήματα

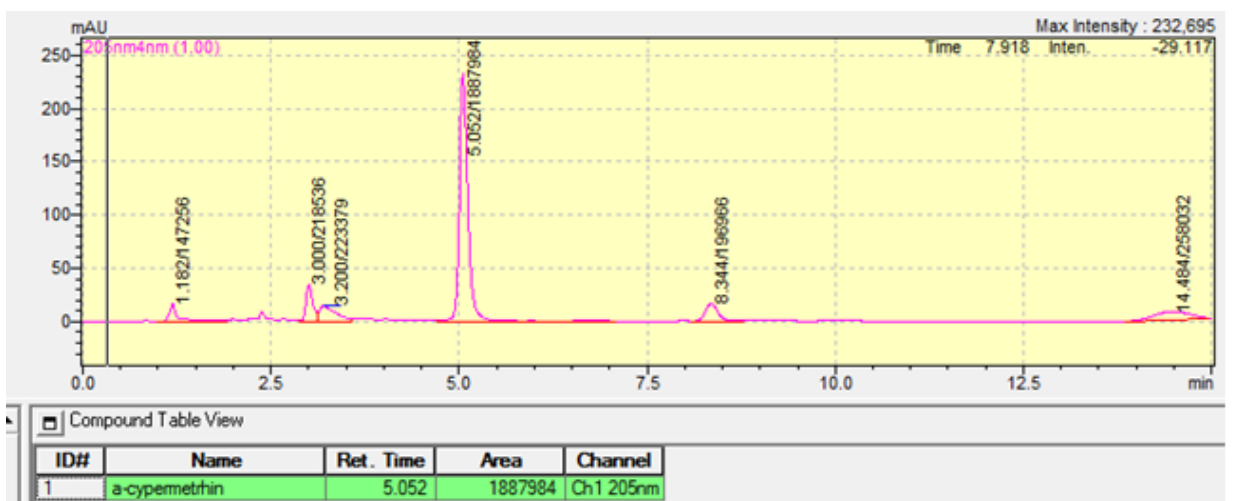
Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ποσοτικοποίησης της a-cypermethrin, πραγματοποιήθηκαν τέσσερις αναλύσεις με τη χρήση χρωματογραφημάτων από σύστημα GC-MS (Αέρια Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μαζών). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 2 ppm, 10 ppm, 20 ppm και 50 ppm, καλύπτοντας ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων, ώστε να εξασφαλιστεί η ακρίβεια και η αξιοπιστία της καμπύλης. Τα χρωματογραφήματα έδειξαν ξεκάθαρες κορυφές στην ίδια περιοχή χρόνου κατακράτησης, επιβεβαιώνοντας την παρουσία της a-cypermethrin και την επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Τα σήματα που καταγράφηκαν από το GC-MS για κάθε συγκέντρωση αναλύθηκαν και τα εμβαδά των κορυφών καταγράφηκαν, επιτρέποντας την κατασκευή γραμμικής πρότυπης καμπύλης με άξονες το εμβαδό της κορυφής έναντι της συγκέντρωσης. Η

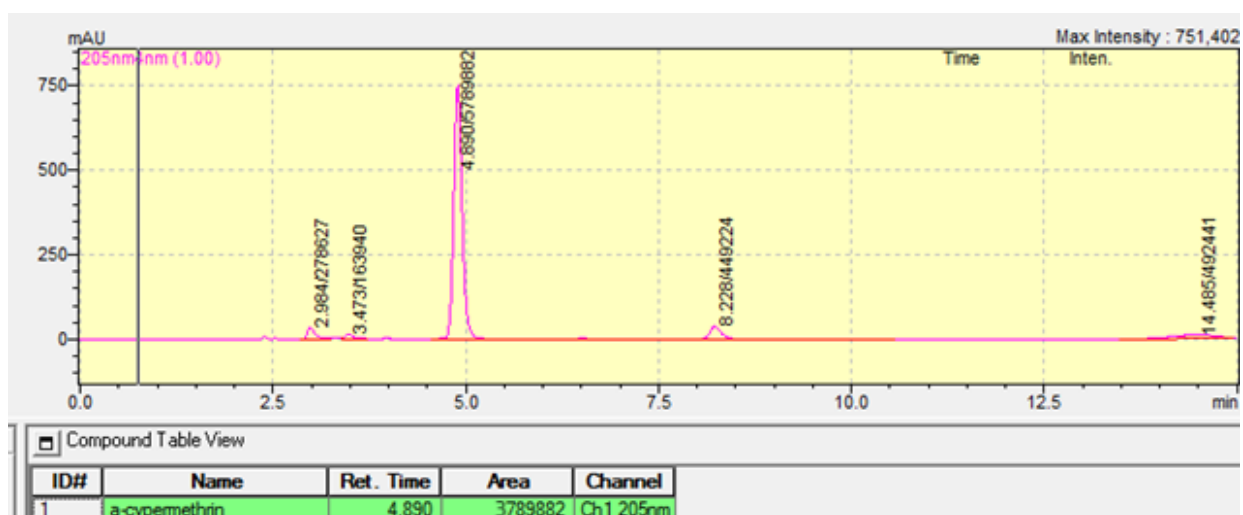
καμπύλη αυτή αποτέλεσε το εργαλείο αναφοράς για την ποσοτική εκτίμηση της α -cypermethrin σε δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης.



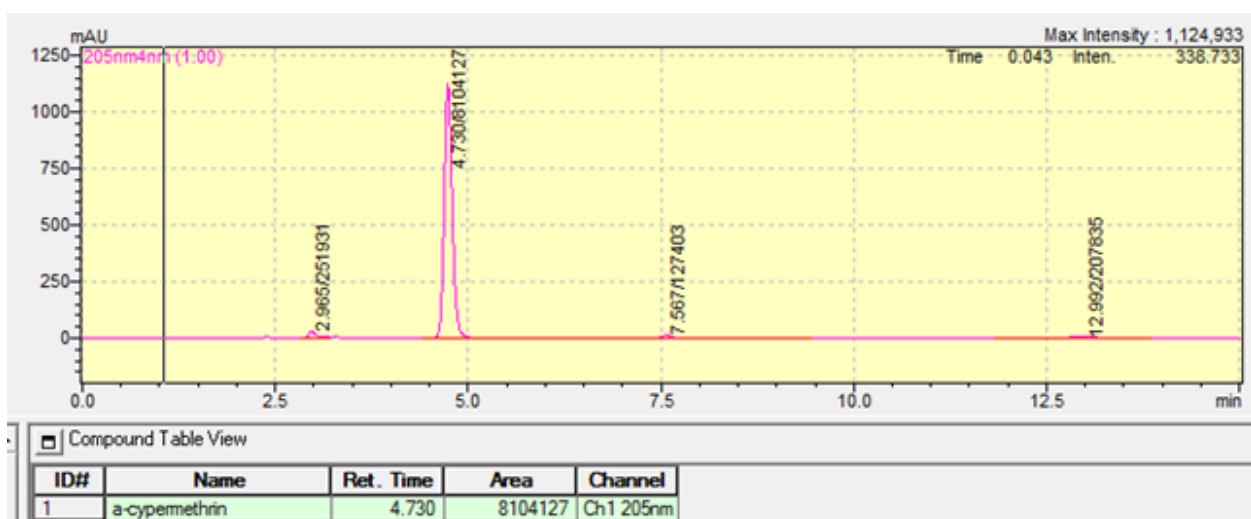
Γράφημα 2: Χρωματογράφημα α -cypermethin 2ppm



Γράφημα 3: Χρωματογράφημα α -cypermethin 10ppm



Γράφημα 4: Χρωματογράφημα A-cypermethin 20ppm



Γράφημα 5: Χρωματογράφημα α-cypermethin 50ppm

3.4 Αποδόμηση ουσίας σε δείγματα πορτοκαλιών

Αφού λοιπόν πραγματοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς και εκχυλίστηκαν από τη φλούδα των πορτοκαλιών οι ουσίες, ελέγχθηκε η μείωση της A cypermethrin και ταυτοποιήθηκαν τα παράγωγά της. Η διαδικασία περιλάμβανε την ανάλυση και των δειγμάτων από την φλούδα του πορτοκαλιού για την κατανόηση των χημικών ενώσεων και διεργασιών που έλαβαν χώρα. Με τη χρήση αναλυτικών μεθόδων, και συγκεκριμένα GC-MS εντοπίστηκαν οι ουσίες που παρήχθησαν από την αποικοδόμηση της A cypermethrin,. Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης έδωσαν σημαντικές πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα των φυσικών ζυμών στην αποδόμηση και εξουδετέρωση της συγκεκριμένης χημικής ουσίας, συμβάλλοντας έτσι στην περαιτέρω κατανόηση των δυνατοτήτων χρήσης τους σε βιολογικές εφαρμογές.

Στη συνέχεια, θα αναλυθούν τα χρωματογραφήματα με χρονική σειρά. Σε αυτό το στάδιο η διαδικασία περιλαμβάνει την προσεκτική εξέταση των δεδομένων που προκύπτουν από τα χρωματογραφήματα, με στόχο την παρακολούθηση των αλλαγών που συμβαίνουν στις χημικές ουσίες κατά τη διάρκεια του χρόνου. Με την ανάλυση αυτή, θα μπορέσουμε να κατανοήσουμε καλύτερα τη δυναμική των ουσιών και την επίδρασή τους σε διάφορες φάσεις της διαδικασίας. Η χρονική σειρά των χρωματογραφημάτων παρέχει κρίσιμες πληροφορίες για την εξέλιξη των αντιδράσεων και την ταυτοποίηση των παραγώγων που προκύπτουν. Με αυτόν τον τρόπο, αποκτάται μια πλήρη εικόνα της συμπεριφοράς των ουσιών και των αλλαγών που υφίστανται σε συνάρτηση με τον χρόνο, επιτρέποντάς μας να βγάλουμε ακριβή και αξιόπιστα συμπεράσματα για την πορεία και την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας.

Τα χρωματογράφημα που παρουσιάζονται έχουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά που θα αναλυθούν έτσι ώστε να είναι πιο κατανοητά. Μπορούν να γίνουν αρκετές σημαντικές παρατηρήσεις σε αυτά τα χρωματογράφηματα:

1. Σταθερότητα Βασικής Γραμμής:

- Η βασική γραμμή του χρωματογραφήματος είναι σχετικά σταθερή, με μικρές διακυμάνσεις. Αυτή η σταθερότητα υποδηλώνει συνεπή απόκριση του ανιχνευτή και ελάχιστο θόρυβο κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

2. Κύριες Κορυφές:

- Υπάρχουν αρκετές εμφανείς κορυφές σε διάφορους χρόνους κατακράτησης, συγκεκριμένα γύρω στα 27.5, 31.5, 36.5 και 40-45 min. Η ψηλότερη κορυφή εμφανίζεται περίπου στα 44.60 min, η οποία είναι και A Cypermethrin.
- Κάθε μια από αυτές τις κορυφές αντιπροσωπεύει μια διαφορετική ένωση που υπάρχει στο δείγμα. Η επιφάνεια κάτω από κάθε κορυφή είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντίστοιχης ένωσης.

3. Ταυτοποίηση της Cypermethrin:

- Η κορυφή στα 44.60 min είναι ειδικά σημειωμένη ως Cypermethrin. Αυτό υποδηλώνει ότι η Cypermethrin διαχωρίστηκε και ανιχνεύθηκε επιτυχώς στον χρόνο κατακράτησης της.

4. Άλλες Ενώσεις:

- Κορυφές σε προγενέστερους χρόνους κατακράτησης, όπως αυτές γύρω στα 21 με 30 min, αντιπροσωπεύουν μικρότερα μόρια και ενώσεις που εκλύονται νωρίτερα από τη χρωματογραφική στήλη.
- Οι κορυφές γύρω στα 37.5 με 41 min αντιπροσωπεύουν ενδιάμεσες ενώσεις ή άλλα παράγωγα.

5. Σχήμα και Ανάλυση Κορυφών:

- Οι κορυφές είναι γενικά καλά διαχωρισμένες, με διακριτές αποστάσεις μεταξύ τους. Αυτό υποδηλώνει καλή χρωματογραφική απόδοση και αποτελεσματικό διαχωρισμό των ενώσεων.

6. Ποσοτική Ανάλυση:

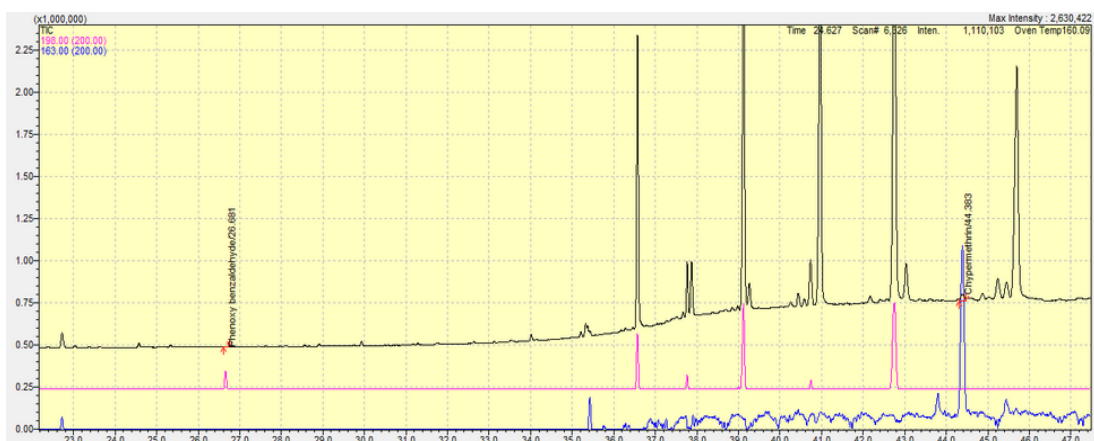
- ## 7. Αναλυτικές Συνθήκες:

- Συμπερασματικά, από τα χρωματογράφηματα διαχωρίζονται και ταυτοποιούνται αποτελεσματικά διάφορες ενώσεις στο δείγμα, με ιδιαίτερη έμφαση στην Cypermethrin. Η λεπτομερής ανάλυση των κορυφών παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη συγκέντρωση και την καθαρότητα των ενώσεων, οι οποίες είναι κρίσιμες για περαιτέρω ποιοτικές και ποσοτικές αξιολογήσεις.

Χρωματογράφημα GC-MS εκχυλίσματος πορτοκαλιού που εκχυλίστηκε την ίδια μέρα του ψεκασμού (T=0)



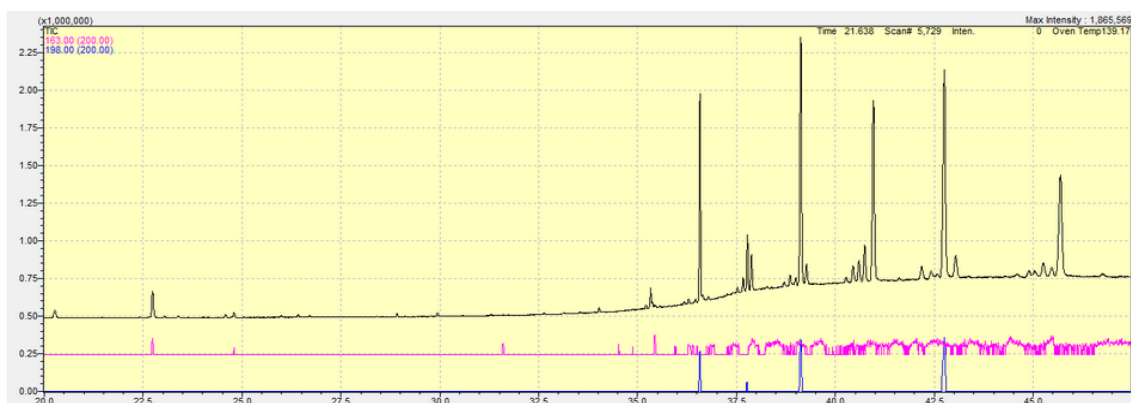
Γράφημα 6 Χρωματογράφημα GC-MS εκχυλίσματος πορτοκαλιού που εκχυλίστηκε την ίδια μέρα του ψεκασμού (T=0)



Γράφημα 7 Χρωματογράφημα GC-MS εκχυλίσματος πορτοκαλιού που εκχυλίστηκε τρεις μέρες μετά το ψεκασμό (T=3 days)



Γράφημα 8: Χρωματογράφημα GC-MS εκχυλίσματος πορτοκαλιού που εκχυλίστηκε έξι μέρες μετά το ψεκασμό (T=6 days)



Γράφημα 9: Χρωματογράφημα GC-MS εκχυλίσματος πορτοκαλιού που δεν ψεκάστηκε έξι μέρες μετά το ψεκασμό (T=6 days)

Στο Γράφημα 1 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα από το πορτοκάλι που εκχυλίστηκε την ίδια μέρα που πραγματοποιήθηκε ο ψεκασμός. Παρατηρείται η A-cypermethrin και ο βασικός μεταβολίτης της 3-phenoxybenzaldehyde. Συγκρίνοντας το Γράφημα 1 με το Γράφημα 2 και το Γράφημα 3, παρατηρούμε σταδιακή μείωση της A-cypermethrin και του μεταβολίτη της, 3-phenoxybenzaldehyde. Στο Γράφημα 4 παρατηρούμε τις ουσίες που εκχυλίζονται από τη φλούδα του πορτοκαλιού κάτι που κρίθηκε απαραίτητο έτσι ώστε να μπορέσουμε να διαχωρίσουμε την A-cypermethrin και τους μεταβολίτες της.

Συγκεκριμένα στο Γράφημα 1 παρατηρείται η υψηλότερη συγκέντρωση της A-cypermethrin, ένα φαινόμενο αναμενόμενο μιας και ο *S. cerevisiae* είχε ελάχιστο χρόνο να την αποικοδομήσει. Παρ' όλα αυτά, παρά τον ελάχιστο χρόνο που μεσολάβησε μεταξύ του ψεκασμού και της εκχύλισης στο χρωματογράφημα εμφανίζεται και η 3-phenoxybenzaldehyde. Η ύπαρξη της τελευταίας μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο ήδη εξοικειωμένος *S. cerevisiae* ξεκινάει να μεταβολίζει την A-cypermethrin μόλις έρθει σε επαφή μαζί της.

Στο Γράφημα 2 παρατηρούμε επίσης την ύπαρξη της A-cypermethrin και της 3-phenoxybenzaldehyde. Η A-cypermethrin εμφανίζει μείωση σε σχέση με το Γράφημα 1 ενώ η 3-phenoxybenzaldehyde εμφανίζει αύξηση. Παρατηρώντας τα δύο γραφήματα αντιλαμβανόμαστε ότι ο *S. cerevisiae* καταναλώνει την A-cypermethrin με αποτέλεσμα την μείωσή της αλλά και την αύξηση του μεταβολίτη της.

Στο Γράφημα 3 παρατηρούμε την περαιτέρω μείωση της A-cypermethrin, αλλά αντίθετα στο αποτέλεσμα που αναμέναμε η 3-phenoxybenzaldehyde δεν εμφανίζεται

στο χρωματογράφημα. Η μείωση της A-cypermethrin συνεχίζει να συμβαίνει λόγω της κατανάλωσής της από τον *S. cerevisiae*. Η μείωση μέχρι την εξαφάνιση της 3-phenoxybenzaldehyde συμβαίνει είτε λόγω της διάσπασής της μέσω χημικών αντιδράσεων είτε λόγω του μεταβολισμού της από τον *S. cerevisiae*.

Τέλος στο Γράφημα 4 παρατηρούμε το χρωματογράφημα την εκχύλισης του πορτοκαλιού που δεν ψεκάστηκε. Όπως ήταν αναμενόμενο δεν παρατηρείται ούτε A-cypermethrin ούτε 3-phenoxybenzaldehyde. Παρ' όλα αυτά μας είναι απαραίτητο έτσι ώστε να έχουμε μια πιο ξεκάθαρη εικόνα σε σχέση με τα προϊόντα που παράγονται από τις διεργασίες του *S. cerevisiae*.

Ο 3-phenoxybenzaldehyde (3-PBA) αποτελεί έναν σημαντικό μεταβολίτη της αποικοδόμησης των πυρεθροειδών εντομοκτόνων και έχει αναδειχθεί ως ουσία με ενδιαφέρουσες ιδιότητες στο περιβάλλον. Μελέτες έχουν δείξει ότι το 3-PBA μπορεί να χρησιμεύσει ως ενδιάμεσο προϊόν σε βιολογικές διεργασίες αποδόμησης, συμβάλλοντας στη φυσική απορρύπανση του εδάφους και των υδάτων (Zhang et al., 2019). Επιπλέον, η παρουσία του μπορεί να ενεργοποιήσει συγκεκριμένους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και *Bacillus*, που έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το 3-PBA σε ακόμα πιο φιλικές προς το περιβάλλον ενώσεις μέσω φυσικών βιοαποικοδομητικών μηχανισμών (Guerrero et al., 2023).

Στον φυτικό κόσμο, η αλληλεπίδραση με το 3-PBA έχει συσχετιστεί με την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών, γεγονός που υποδηλώνει μια πιθανή θετική επίδραση στην ανθεκτικότητα των φυτών απέναντι σε περιβαλλοντικούς στρες παράγοντες (Cycon et al., 2016). Παράλληλα, η σταδιακή διάσπαση του 3-PBA συμβάλλει στη μείωση της παραμονής πυρεθροειδών στο περιβάλλον, γεγονός που διευκολύνει τη φυσική αναγέννηση οικοσυστημάτων που έχουν εκτεθεί σε συνθετικά εντομοκτόνα (Yao et al., 2023).

Συνολικά, η παρουσία του 3-phenoxybenzaldehyde στο περιβάλλον δεν συνεπάγεται μόνο τη διάσπαση των πυρεθροειδών αλλά μπορεί να λειτουργήσει και ως δείκτης ενεργών βιολογικών διεργασιών αποδόμησης, ενισχύοντας την κατανόηση των μηχανισμών φυσικής βιοαποκατάστασης. Η ικανότητα των μικροοργανισμών να το μετατρέπουν σε ακόμα πιο απλές και αβλαβείς ενώσεις καθιστά το 3-PBA ένα

χρήσιμο στοιχείο στη διαδικασία της περιβαλλοντικής εξυγίανσης, επιβεβαιώνοντας τον ρόλο της φύσης στην εξισορρόπηση και ανακύκλωση οργανικών ουσιών (Zhang et al., 2019).

Η παρούσα διπλωματική εργασία επισημαίνει τη δυνατότητα αξιοποίησης του *S. cerevisiae* ως μέσου βιοαποικοδόμησης των πυρεθροειδών, προσφέροντας μια οικολογική προσέγγιση στη διαχείριση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων. Η ανθεκτικότητα του μύκητα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου, σε συνδυασμό με την ικανότητά του να μετατρέπει την τοξική ουσία σε λιγότερο επιβλαβή προϊόντα, τον καθιστά έναν υποσχόμενο βιολογικό παράγοντα για την αποτοξικοποίηση μολυσμένων περιβαλλόντων. Επιπλέον, η μελέτη της βιοχημικής πορείας της αποικοδόμησης μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καινοτόμων βιοτεχνολογικών εφαρμογών για τη βελτίωση των μεθόδων περιβαλλοντικής απορρύπανσης, με ιδιαίτερη έμφαση στα πυρεθροειδή φυτοφάρμακα.

4 Συμπεράσματα

Η A-cypermethrin είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πυρεθροειδές εντομοκτόνο, γνωστό για τη σταθερότητα και την τοξικότητά του. Ωστόσο, η παρουσία υπολειμμάτων της σε τρόφιμα και περιβαλλοντικά δείγματα έχει εγείρει ανησυχίες σχετικά με τις επιπτώσεις της στην υγεία του ανθρώπου. Ο μικροοργανισμός *S. cerevisiae*, λόγω των βιομεταβολικών του ικανοτήτων, μελετήθηκε ως παράγοντας βιοαποικοδόμησης της A-cypermethrin, στο πλαίσιο της αναζήτησης φυσικών και αποτελεσματικών μεθόδων για τον περιορισμό της τοξικότητας των γεωργικών προϊόντων. Μέσω της χρονολογικής παρακολούθησης των επιπέδων της δραστικής ουσίας και του βασικού μεταβολίτη της, 3-phenoxybenzaldehyde, επιχειρήθηκε να αποτιμηθεί ο βαθμός αποδόμησης και η ενδεχόμενη μείωση της επικινδυνότητας των υπολειμμάτων.

- Παρατηρήθηκε **μείωση της συγκέντρωσης της A-cypermethrin με την πάροδο του χρόνου**, ένδειξη αποικοδόμησης από τον *S. cerevisiae*.
- Ο κύριος μεταβολίτης **3-phenoxybenzaldehyde** **αυξήθηκε αρχικά**, επιβεβαιώνοντας τη βιομετατροπή της A-cypermethrin.
- Από την **3η έως την 6η ημέρα ο μεταβολίτης δεν ανιχνεύτηκε**, πιθανόν λόγω περαιτέρω αποδόμησης ή συγκέντρωσης κάτω από το όριο ανίχνευσης.
- Ο *S. cerevisiae* αναδεικνύεται ως **υποσχόμενος μικροοργανισμός για βιοαποκατάσταση** περιβαλλοντικών ή αγροτικών δειγμάτων με υπολείμματα εντομοκτόνων.
- Η μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων χαρακτηρίζεται ως **απλή, αποδοτική και χαμηλού κόστους**, χωρίς την ανάγκη για εξειδικευμένο εξοπλισμό.

5 Μελλοντικές Προτάσεις

Η παρούσα μελέτη δείχνοντας από τη πειραματική διαδικασία ότι ο *S. Cerevisiae* δύναται να αποικοδομήσει την A-cypermethrin παράγοντας άλλες ουσίες, δίνει το χώρο για περαιτέρω μελέτη. Επιπλέον θα μπορούσε μελλοντικά να δοθεί περισσότερη έμφαση στα ποσοτικά δεδομένα της μείωσης της A-cypermethrin και της παρουσίας του βασικού μεταβολίτη της, 3-phenoxybenzaldehyde. Επίσης τα προϊόντα διάσπασης της A-cypermethrin καθώς και ο ακριβής προσδιορισμός τους είναι δύο παράμετροι που θα κάνουν τη μελέτη αυτή πιο ολοκληρωμένη στο μέλλον. Ένα ακόμα στοιχείο που πρέπει να σημειωθεί σε αυτό το σημείο, είναι η σχετικά πρόσφατη και μεταγενέστερη της παρούσας μελέτης κατάργηση της A-cypermethrin, ως φυτοπροστατευτικής ουσίας, σύμφωνα με τον εκτελεστικό κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2019/1690 και άρθρο 1. Ωστόσο, η παρούσα εργασία δίνει έναυσμα για τη διεξαγωγή περαιτέρω μελετών αποδόμησης άλλων πυρεθροειδών αλλά και άλλων ομάδων φυτοπροστατευτικών ουσιών από σακχαρομύκητες.

6 Βιβλιογραφία

1. Adamcová, D., Radziemska, M., Fronczyk, J., Zloch, J., & Vaverková, M. D. (2017). Research of the biodegradability of degradable/biodegradable plastic material in various types of environments. *Scientific Review Engineering and Environmental Sciences*, 2017(vol.26(1)), Article 26(1). <https://doi.org/10.22630/PNIKS.2017.26.1.01>
2. Akashe, M. M., Pawade, U. V., & Nikam, A. V. (2018). CLASSIFICATION OF PESTICIDES: A REVIEW. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 9(4), 144–150. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.094131>
3. AL-Ahmadi, M. S. (2019). Pesticides, Anthropogenic Activities, and the Health of Our Environment Safety. In *Pesticides—Use and Misuse and Their Impact in the Environment*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84161>
4. Barański, M., Srednicka-Tober, D., Volakakis, N., Seal, C., Sanderson, R., Stewart, G. B., Benbrook, C., Biavati, B., Markellou, E., Giotis, C., Gromadzka-Ostrowska, J., Rembiałkowska, E., Skwarło-Sońta, K., Tahvonen, R., Janovská, D., Niggli, U., Nicot, P., & Leifert, C. (2014). Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: A systematic literature review and meta-analyses. *The British Journal of Nutrition*, 112(5), 794–811. <https://doi.org/10.1017/S0007114514001366>
5. 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. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020223>
6. Birolli, W. G., da Silva, B. F., & Rodrigues Filho, E. (2022). Biodegradation of the pyrethroid cypermethrin by bacterial consortia collected from orange crops.

- Environmental Research*, 215, 114388.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114388>
7. *Botanical Insecticides in the Twenty-First Century—Fulfilling Their Promise?* | *Annual Review of Entomology*. (n.d.). Retrieved March 6, 2023, from https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-011019-025010?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
 8. Butchko, H. H., & Kotsonis, F. N. (1991). Acceptable daily intake vs actual intake: The aspartame example. *Journal of the American College of Nutrition*, 10(3), 258–266.
<https://doi.org/10.1080/07315724.1991.10718153>
 9. Cycoń M, Piotrowska-Seget Z. Pyrethroid-Degrading Microorganisms and Their Potential for the Bioremediation of Contaminated Soils: A Review. *Front Microbiol*. 2016 Sep 15;7:1463. doi: 10.3389/fmicb.2016.01463. PMID: 27695449; PMCID: PMC5023672.
 10. Educational and Informational Strategies to Reduce Pesticide Risks. (1997). *Preventive Medicine*, 26(2), 191–200. <https://doi.org/10.1006/pmed.1996.0122>
 11. Eldarov, M. A., Kishkovskaia, S. A., Tanaschuk, T. N., & Mardanov, A. V. (2016). Genomics and Biochemistry of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast Strains. *Biochemistry. Biokhimiia*, 81(13), 1650–1668.
<https://doi.org/10.1134/S0006297916130046>
 12. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides, (2002).
<https://web.archive.org/web/20130404190746/http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPP/Pesticid/Code/Download/code.pdf>
 13. Galani, J. H. Y., Houbraken, M., Wumbei, A., Djeugap, J. F., Fotio, D., & Spanoghe, P. (2018). Evaluation of 99 Pesticide Residues in Major Agricultural Products from the Western Highlands Zone of Cameroon Using QuEChERS Method Extraction and

- LC-MS/MS and GC-ECD Analyses. *Foods*, 7(11), Article 11.
<https://doi.org/10.3390/foods7110184>
14. Ghazouani, L., Feriani, A., Mufti, A., Tir, M., Baaziz, I., Mansour, H. B., & Mnafigui, K. (2020). Toxic effect of alpha cypermethrin, an environmental pollutant, on myocardial tissue in male wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(6), 5709–5717. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05336-2>
 15. Giang, C. N. D., Le, D. B. C., Nguyen, V. H., Hoang, T. L., Tran, T. V. T., Huynh, T. P. L., & Nguyen, T. Q. T. (2022). Assessment of pesticide use and pesticide residues in vegetables from two provinces in Central Vietnam. *PLOS ONE*, 17(6), e0269789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269789>
 16. Gilden, R. C., Huffling, K., & Sattler, B. (2010). Pesticides and Health Risks. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 39(1), 103–110. <https://doi.org/10.1111/j.1552-6909.2009.01092.x>
 17. Godin, P. J., Sleeman, R. J., Snarey, M., & Thain, E. M. (1966). The jasmolins, new insecticidally active constituents of *Chrysanthemum cinerariaefolium* VIS. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 0, 332–334. <https://doi.org/10.1039/J39660000332>
 18. Guerrero Ramírez JR, Ibarra Muñoz LA, Balagurusamy N, Frías Ramírez JE, Alfaro Hernández L, Carrillo Campos J. Microbiology and Biochemistry of Pesticides Biodegradation. *Int J Mol Sci*. 2023 Nov 4;24(21):15969. doi: 10.3390/ijms242115969. PMID: 37958952; PMCID: PMC10649977.
 19. Haider, T. P., Völker, C., Kramm, J., Landfester, K., & Wurm, F. R. (2019). Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(1), 50–62. <https://doi.org/10.1002/anie.201805766>
 20. Hyder, K., Travis, K. Z., Welsh, Z. K., & Pate, I. (2003). Maximum Residue Levels: Fact or Fiction? *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 9(3), 721–740. <https://doi.org/10.1080/713609964>

21. Inouye, Y., Takeshita, Y., & Ohno, M. (1955). Studies on Synthetic Pyrethroids: Part V. Synthesis of Geometrical Isomers of Chrysanthemum Dicarboxylic Acid. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 19(3), 193–199.
<https://doi.org/10.1080/03758397.1955.10857288>
22. JARED, D. (2005). *GUNS, GERMS, AND STEEL*.
23. Katsuda, Y., Chikamoto, T., & Inouye, Y. (1958). The Absolute Configuration of Naturally Derived Pyrethrolone and Cinerolone. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 22(6), 427–428. <https://doi.org/10.1080/03758397.1958.10857510>
24. L, C. (1954). The chrysanthemumcarboxylic acids. IV. The configurations of the chrysanthemic acids. *J. Chem. Soc.*, 470.
<https://cir.nii.ac.jp/crid/1574231874572440704>
25. LaFORGE, F. B., & BARTHEL, W. F. (2002, May 1). *CONSTITUENTS OF PYRETHRUM FLOWERS. XVI. HETEROGENEOUS NATURE OF PYRETHROLONE* (world). ACS Publications; American Chemical Society.
<https://doi.org/10.1021/jo01185a006>
26. Lin, Q. S., Chen, S. H., Hu, M. Y., Haq, M. R. U., Yang, L., & Li, H. (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>
27. Lu, F. C., & Kacew, S. (2002). *Lu's Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs and Risk Assessment, Fourth Edition*. CRC Press.
28. Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., & Nava-Saucedo, J.-E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. *Chemosphere*, 73(4), 429–442.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.064>
29. Lybrand, D. B., Xu, H., Last, R. L., & Pichersky, E. (2020). HOW PLANTS SYNTHESIZE PYRETHRINS – SAFE AND BIODEGRADABLE INSECTICIDES.

- Trends in Plant Science*, 25(12), 1240–1251.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.06.012>
30. Matsuda, K. (2012). Pyrethrin Biosynthesis and Its Regulation in *Chrysanthemum cinerariaefolium*. In N. Matsuo & T. Mori (Eds.), *Pyrethroids: From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide* (pp. 73–81). Springer.
https://doi.org/10.1007/128_2011_271
 31. Matsuo, N. (2019). Discovery and development of pyrethroid insecticides. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 95(7), 378–400. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.027>
 32. *Movable feast ten millennia food globalization | Regional and world history: General interest | Cambridge University Press*. (n.d.). Retrieved February 28, 2023, from <https://www.cambridge.org/gr/academic/subjects/history/regional-and-world-history-general-interest/movable-feast-ten-millennia-food-globalization?format=HB&isbn=9780521793537>
 33. Müller, R.-J. (2005). Biodegradability of Polymers: Regulations and Methods for Testing. In *Biopolymers Online*. John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/10.1002/3527600035.bpola012>
 34. Neme, K., & Satheesh, N. (2016). *Review on Pesticide Residue in Plant Food Products: Health Impacts and Mechanisms to Reduce the Residue Levels in Food*.
 35. 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), 45.
<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0372-3>
 36. Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.-S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(1), 1–31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>

37. Pascual, J. A., & Peris, S. J. (1992). Effects of forest spraying with two application rates of cypermethrin on food supply and on breeding success of the blue tit (*Parus caeruleus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11(9), 1271–1280. <https://doi.org/10.1002/etc.5620110907>
38. Pimentel, D. (2005). 'Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States.' *Environment, Development and Sustainability*, 7(2), 229–252. <https://doi.org/10.1007/s10668-005-7314-2>
39. Pronk, J. T., Yde Steensma, H., & Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 12(16), 1607–1633. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0061\(199612\)12:16<1607::aid-yea70>3.0.co;2-4](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0061(199612)12:16<1607::aid-yea70>3.0.co;2-4)
40. Sabzevari, S., & Hofman, J. (2022). A worldwide review of currently used pesticides' monitoring in agricultural soils. *Science of The Total Environment*, 812, 152344. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152344>
41. *Saccharomyces cerevisiae—An overview | ScienceDirect Topics*. (n.d.). Retrieved April 16, 2023, from <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/saccharomyces-cerevisiae>
42. Schechter, M. S., Green, N., & LaForge, F. B. (2002, May 1). *Constituents of Pyrethrum Flowers. XXIII. Cinerolone and the Synthesis of Related Cyclopentenolones* (world) [Research-article]. ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ja01177a065>
43. Scott, G., & Gilead, D. (Eds.). (1995). *Degradable Polymers*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-0571-2>
44. Soderlund, D. M. (1992). Metabolic considerations in pyrethroid design. *Xenobiotica*, 22(9–10), 1185–1194. <https://doi.org/10.3109/00498259209051872>
45. Stephenson, R. R. (1982). Aquatic toxicology of cypermethrin. I. Acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests. *Aquatic Toxicology*, 2(3), 175–185. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(82\)90014-5](https://doi.org/10.1016/0166-445X(82)90014-5)

46. Sundaram, S., Das, M. T., & Thakur, I. S. (2013). Biodegradation of cypermethrin by *Bacillus* sp. In soil microcosm and in-vitro toxicity evaluation on human cell line. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77, 39–44.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.11.008>
47. Tang, Y., Long, X., Wu, M., Yang, S., Gao, N., Xu, B., & Dutta, S. (2020). Bibliometric review of research trends on disinfection by-products in drinking water during 1975–2018. *Separation and Purification Technology*, 241, 116741.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.116741>
48. Thornton, P. (1996). The emergence of agriculture: Bruce D. Smith. Scientific American Library, distributed by W. H. Freeman & Co. Ltd, New York and Oxford, 1995. 231 pp. Price: [pound sign]19.95, US\$ 32.95 (hardback). ISBN 0 7167 5055 4. *Agricultural Systems*, 51(4), 496–497.
49. Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., & Befort, B. L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20260–20264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>
50. Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., & Phung, D. T. (2021). Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>
51. Wahab, S., Muzammil, K., Nasir, N., Khan, M. S., Ahmad, M. F., Khalid, M., Ahmad, W., Dawria, A., Reddy, L. K. V., & Busayli, A. M. (2022). Advancement and New Trends in Analysis of Pesticide Residues in Food: A Comprehensive Review. *Plants*, 11(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/plants11091106>
52. Weiss, B., Amler, S., & Amler, R. W. (2004). Pesticides. *Pediatrics*, 113(4 Suppl), 1030–1036.

53. Winter, C. K., & Jara, E. A. (2015). Pesticide food safety standards as companions to tolerances and maximum residue limits. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(11), 2358–2364. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61117-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61117-0)
54. Witt, U., Yamamoto, M., Seeliger, U., Müller, R.-J., & Warzelhan, V. (1999). Biodegradable Polymeric Materials—Not the Origin but the Chemical Structure Determines Biodegradability. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(10), 1438–1442. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990517\)38:10<1438::AID-ANIE1438>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990517)38:10<1438::AID-ANIE1438>3.0.CO;2-U)
55. Yadav, I., & Devi, N. (2017). *Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment* (pp. 140–158).
56. Yaohua Huang, Shao-Fang Chen, Wen-Juan Chen, Xixian Zhu, Sandhya Mishra, Pankaj Bhatt, Shaohua Chen,
57. Efficient biodegradation of multiple pyrethroid pesticides by *Rhodococcus pyridinivorans* strain Y6 and its degradation mechanism,
58. Chemical Engineering Journal, Volume 469, 2023, 143863, ISSN 1385-8947, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.143863>.
59. Zhang, Z., Yuan, Y., Liu, Q., & Yin, H. (2019). Plant nitrogen acquisition from inorganic and organic sources via root and mycelia pathways in ectomycorrhizal alpine forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 136, 107517. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.06.013>
60. Zhao, H., Geng, Y., Chen, L., Tao, K., & Hou, T. (2013). Biodegradation of cypermethrin by a novel *Catellibacterium* sp. Strain CC-5 isolated from contaminated soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(5), 311–317. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0580>

