

Crecimiento de *Trichoderma asperellum* en medio sólido utilizando como única fuente de carbono a los plaguicidas clorpirifos y cipermetrina

MUÑOZ RÍOS, Miguel Angel¹; ROJAS VILLACORTA, Walter Andres²; MALQUI RAMOS, Ingrid Lisset³

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el crecimiento de *Trichoderma asperellum* en medio sólido utilizando como única fuente de carbono a los plaguicidas cipermetrina (piretroide) y clorpirifos (organofosforado). Para este propósito, se realizaron cultivos de *T. asperellum* sobre el medio Agar Mínimo de Sales, los cuales tenían como únicas fuentes de carbono a los plaguicidas cipermetrina (480 ppm) y clorpirifos (250 ppm). Posteriormente los cultivos fueron incubados a 25 °C por 5 días. Finalmente se calcularon las velocidades de crecimiento. El control tuvo como única fuente de carbono a la glucosa. Los resultados muestran que *T. asperellum* puede crecer en ambos medios utilizando a los plaguicidas como una sola fuente de carbono y en cuanto a sus velocidades de crecimiento fueron 2.88 ± 0.05 mm/día (cipermetrina) y 2.74 ± 0.05 mm/día (clorpirifos). En conclusión, *T. asperellum* es capaz de utilizar a los plaguicidas cipermetrina y clorpirifos mediante procesos catabólicos y tiene el potencial de ser usado en biorremediación de plaguicidas de suelos contaminados.

Palabras clave: *Trichoderma asperellum*, Clorpirifos, Cipermetrina

Growth of Trichoderma asperellum in a solid medium using the pesticides chlorpyrifos and cypermethrin as the only source of carbón

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the growth of *Trichoderma asperellum* in a solid medium using the pesticides cypermethrin (pyrethroid) and chlorpyrifos (organophosphate) as the only source of carbon. For this purpose, *T. asperellum* was cultivated on the Minimum Salt Agar medium, which had cypermethrin (480 ppm) and chlorpyrifos (250 ppm) as the only carbon sources. The control had glucose as its only source of carbon. The results showed that *T. asperellum* can grow in both media using pesticides as a single carbon source and its growth rates were 2.88 ± 0.05 mm/day (cypermethrin) and 2.74 ± 0.05 mm/day (chlorpyrifos). In conclusion, *T. asperellum* is capable of using the pesticides cypermethrin and chlorpyrifos through catabolic processes and has the potential to be used in bioremediation of pesticides of contaminated soils.

Keywords: *Trichoderma asperellum*, Chlorpyrifos, Cypermethrin

¹ Universidad César Vallejo. Escuela de Enfermería. ORCID: 0000-0001-7294-4287, mmunozr@ucv.edu.pe

² Universidad César Vallejo. ORCID: 0000-0001-5833-7130, wrojasv@ucv.edu.pe

³ Universidad Nacional de Trujillo. ORCID: 0000-0003-2369-5637, ingrid_pi2013@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La química orgánica ha contribuido al desarrollo de la agricultura mediante el descubrimiento y la síntesis de nuevos plaguicidas, los cuales se usan para prevenir, destruir, mitigar y repeler a diversos tipos de plagas que atacan a los cultivos agrícolas (Kumar et al., 2018; Alavanja, 2009). Por otra parte, la agricultura ha sido el sector económico que más ha contribuido a uno de los mayores problemas que actualmente enfrenta el mundo industrializado, la contaminación ambiental (Tanentzap et al., 2015; Rigas et al., 2007).

Los pesticidas organofosforados son usados en todo el mundo y son de utilidad agrícola y domiciliaria (Singh & Walke, 2006). Estos pesticidas son compuestos orgánicos degradables derivados del ácido fosfórico, fosfónico, fosfínico y tiofosfórico, y frecuentemente se encuentran bajo la forma de ésteres, amidas o tioles, también incluyen derivados alifáticos, fenólicos y heterocíclicos (Kumar et al., 2018; Kanekar et al., 2004). En los mamíferos presentan efectos neurotóxicos debido a su capacidad de suprimir la acetilcolinesterasa (AChE) (Chen et al., 2012).

El Clorpirifos, [(C₉H₁₁Cl₃NO₃PS) o O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato] es un plaguicida organofosforado clorado, utilizado en todo el mundo desde 1965 para el control de plagas agrícolas y domiciliarias (John & Shaik, 2015; Chishti et al., 2013). Su uso indiscriminado ha llegado a contaminar distintos tipos de ambiente, causando serios problemas de toxicidad ((John & Shaik, 2015). La vida media en el suelo por lo general varía de 10 a 120 días, pero puede llegar de 2 semanas a más de 1 año dependiendo de algunos parámetros físico (tipo de suelo) y químicos (pH, contenido de humedad, carbono orgánico y formulación del plaguicida) (Chen et al., 2012; Maya et al., 2012; Singh et al., 2003). El 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) es uno de los metabolitos primarios en la degradación del clorpirifos, es más persistente (la vida media en el suelo varía de 65 a 360 días) y soluble que la molécula parental, además tiene propiedades antimicrobianas (Singh & Walke, 2006).

En las últimas cuatro décadas, compuestos sintéticos derivados de la piretrina (de origen natural) han sido ampliamente usados en la agricultura, a estos se les conoce como piretroides (Gajendiran & Abraham, 2018). Estos se dividen en dos clases, los de tipo I, los cuales tienen una estructura básica de un éster

de ciclopropano carboxílico, y los de tipo II quienes tienen la misma estructura del tipo I más un grupo ciano (Gajendiran & Abraham, 2018). El uso continuo y excesivo de los piretroides causan muchos problemas ambientales y de salud pública, debido a su toxicidad reproductiva, neurotoxicidad, además de causar alteraciones hormonales (Chen et al., 2011).

La Cipermetrina, [C₂₂H₁₉C₁₂NO₃ o (+/-)-a-ciano-3-fenoxibenzil (+/-)-cis, trans-3(2, 2-diclorovinil)-2, 2-dimetilciclopropano carboxilato], es un potente insecticida de amplio espectro del tipo II (Cycoñ & Piotrowska-Seget, 2014). Se aplica a distintos cultivos agrícolas (cereales, algodón, frutas y vegetales) atacados por coleópteros (*Tribolium confusum*), lepidópteros y otras larvas de insectos plaga, y también se usa en plantas ornamentales para controlar plagas domésticas (cucarachas, pulgas y termitas) (Pankaj et al., 2016; Kaur et al., 2015). La cipermetrina es altamente tóxica para peces e invertebrados acuáticos en concentraciones tan bajas como de 10 µg/L (Lin et al., 2011). Este piretroide es insoluble en agua y con fuerte tendencia a ser adsorbidos por partículas del suelo. La cipermetrina tiene una vida media de 2 a 8 semanas bajo condiciones aeróbicas, pero es más persistente en condiciones anaeróbicas, llegando hasta 53 días (Dubey & Fulekar, 2013).

Los investigadores de todo el mundo han utilizado métodos físicos, químicos y biológicos para remover a los plaguicidas de los ambientes, sin embargo, los métodos biológicos han captado mayor atención, debido a que son económicos y amigables con el ambiente (Maqbool et al., 2016). Dentro de estos métodos destaca la biodegradación como uno de los métodos más estudiados en la biorremediación de plaguicidas, debido a la notable capacidad de los microorganismos para metabolizarlos (Maqbool et al., 2016; Bhagobaty et al., 2006). En la biodegradación de plaguicidas se pueden utilizar bacterias, hongos y enzimas (Javaid et al., 2016).

Hasta la fecha, las bacterias han sido las más estudiadas con respecto a la biodegradación del clorpirifos (Singh et al., 2003; Bhagobaty et al., 2006; Supreeth & Raju, 2017; Singh et al., 2004) y de la cipermetrina (Lin et al., 2011; Dubey & Fulekar, 2013; Zhao et al., 2014). Por otra parte, la biodegradación de plaguicidas mediante hongos es un tema que ha empezado a captar la atención de muchos científicos. Los hongos juegan un rol importante como descomponedores y simbioses en todos los ecosistemas que incluyen el suelo y el

agua, debido a su robusta morfología y su diversa capacidad metabólica, lo cual les permite degradar productos químicos orgánicos ya sea por modificación química o influyendo en la biodisponibilidad del plaguicida (Deshmukh et al., 2016; Harms et al., 2011). La capacidad de los hongos para formar micelio, la baja especificidad de sus enzimas catabólicas y su la utilización de productos químicos orgánicos como sustrato de crecimiento los hacen potenciales candidatos en la biorremediación de plaguicidas (Chen et al., 2012).

El uso de hongos filamentosos tiene ventajas en los casos donde la translocación de factores esenciales (nutrientes, agua, el agente químico contaminante, entre otros) son requerido para la transformación o detoxificación de químicos ambientales (Harms et al., 2011). Dentro de los hongos filamentosos destaca el del género *Trichoderma*, es un género habitante del suelo, teleomórfo perteneciente al orden Hypocreales

de la división Ascomycota (Tripathi et al., 2013). Este género es muy diverso genéticamente, y tienen el potencial para ser utilizados en la biorremediación de plaguicidas, debido a que son una excelente fuente de enzimas hidrolíticas (Tripathi et al., 2013).

En los últimos años, junto con el desarrollo agroindustrial de la región La Libertad han aparecido plagas vegetales, los cuales han hecho necesario el uso de distintos métodos de control, como el uso de plaguicidas, los cuales han contaminado el medio ambiente, por lo que se busca métodos para removerlos de él. Dentro estos métodos está el uso de microorganismos, los cuales pueden utilizar a los plaguicidas como una fuente de nutrientes importantes para su crecimiento; por esta razón, el presente trabajo de investigación estuvo orientado a evaluar el crecimiento de *T. asperellum* usando solamente a los plaguicidas Clorpirifos y Cipermetrina como fuentes de carbono.

MATERIAL Y MÉTODOS

Plaguicidas (clorpirifos y cipermetrina)

Se usaron a los plaguicidas Dorsan® y Lepitrin®, cuyos principios activos son el clorpirifos y la cipermetrina, respectivamente. Las concentraciones del clorpirifos (960ppm) y la cipermetrina (500 ppm) se obtuvieron mediante diluciones sucesivas en agua destilada estéril a partir de los productos originales.

Medio de cultivo

Para los ensayos se prepararon Agar Mínimo de Sales. Estos se prepararon en tres matraces, y a uno de ellos se le adicionó glucosa (20 g/L), el cual sería el medio control. Los medios de cultivo fueron esterilizados a 121 °C por 30 minutos. Cuando el medio aun no solidificaba se le adicionó clorpirifos a uno de los matraces y al otro cipermetrina, obteniéndose concentraciones finales de 480 y 250 ppm, respectivamente. Posteriormente, los medios se vertieron en placas de Petri. Se realizaron 5 placas por cada plaguicida, incluyendo el control.

Reactivación del cultivo de *T. asperellum* y obtención del inóculo de esporas

El cultivo de *T. asperellum* fue proveído por el laboratorio de Micología del departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo (Perú). La reactivación del hongo se realizó por puntura en Agar Sabouraud

inclinado (cultivo axénico). Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas, agregando 5 mL de agua destilada estéril al tubo con cultivo axénico y se resuspendió las esporas. Luego, mediante recuento en cámara de Neubauer se estandarizó a 6×10^2 esporas/mL. El inóculo de esporas se preparó a base de la suspensión de esporas obtenidas previamente y las soluciones doble concentradas de cada plaguicida (relación de volumen 1:1) obteniéndose una concentración de 3×10^2 esporas/mL. Además, se preparó una suspensión de esporas control (sin plaguicida).

Siembra e inoculación de cultivos monospóricos

El inóculo de esporas fue sembrado mediante la técnica de siembra por superficie en las placas con los distintos medios de cultivos y se incubaron a 25 °C durante 24 horas. Después del tiempo de incubación, se procedió a revisar las placas mediante un microscopio utilizando el objetivo de 10x con el fin de ubicar las esporas germinadas. Una vez identificada la espора germinada, con ayuda de un bisturí estéril se cortó en bloques pequeños la parte del agar donde se encontraba la espора y fue transferida a los medios de cultivos con plaguicidas preparados previamente. La siembra en el medio control fue realizada de forma directa a partir del cultivo axénico. Los medios se incubaron a 25 °C durante 5 días.

Lectura de los resultados y cálculo de la

velocidad de crecimiento (VC)

El crecimiento radial promedio (mm) de la colonia fúngica se obtuvo a partir de los diámetros promedios medidos cada día, desde el segundo hasta el séptimo día post siembra. Este procedimiento se realizó tanto en las placas con los plaguicidas como el control. Con los radios promedios se calculó la velocidad de crecimiento de *T. asperellum* y se expresaron en milímetros por día (mm/día). La VC se calculó de la siguiente manera:

$$VC = \frac{\sum x \sum y - n \sum xy}{(\sum x)^2 - n \sum x^2}$$

Donde:

VC= velocidad de crecimiento
y = longitud radial de la colonia fúngica (mm)
x = tiempo de crecimiento del hongo en días
n = número de repeticiones

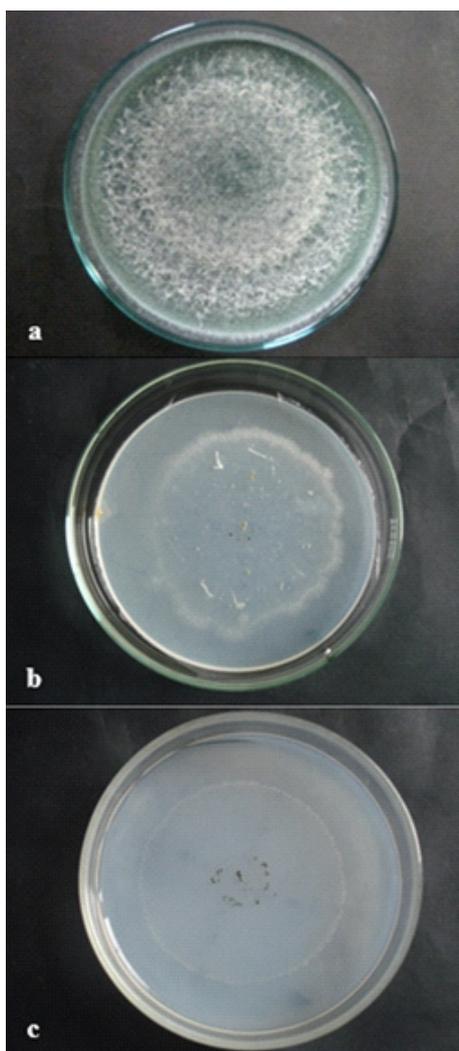
Análisis Estadístico

Los datos (velocidades de crecimiento) que se obtuvieron se analizaron mediante ANOVA utilizando el *Software* SPSS versión 20.0, usando el modelo lineal general y a una prueba de comparación de medias (Tukey).

RESULTADOS

T. asperellum creció en los medios que tienen como única fuente de carbono a la cipermetrina y el clorpirifos, además de la glucosa (control), figura 1.

Figura 1. Crecimiento de *T. asperellum* en Agar Mínimo de Sales con plaguicidas como única fuente de carbono



Nota. Se puede observar el crecimiento de *T. asperellum* en agar mínimo de sales usando como única fuente de carbono a la glucosa (placa control, a) Cipermetrina (b) y el Clorpirifos (c). Esta imagen se tomó al día 5 de crecimiento incubado a 25°C.

Tabla 1. Velocidad de crecimiento (mm/día) y tipo de degradación de *T. asperellum* utilizando como única fuente de carbono a dos plaguicidas

Fuente de carbono	VC (mm/día)*	Tipo de degradación
clorpirifos	2.74 ± 0.05 ^a	catabólica
cipermetrina	2.88 ± 0.05 ^a	catabólica
Glucosa (control)	10.77 ± 0.05 ^b	catabólica

Nota *Valore de la media ± error estándar para cinco replicas.

^{a,b}Valores en la misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

DISCUSIÓN

Los hongos al igual que otros microorganismos necesitan de los macroelementos para formar las biomoléculas, necesarias para su desarrollo y crecimiento. Cuando los macroelementos son captados, a partir de una amplia variedad de compuestos orgánicos, así como de plaguicidas (Gadd, 2004), da como resultado el crecimiento del microorganismo, tal como se observa en la figura 1. *T. asperellum* creció utilizando a las únicas fuentes de carbono y de energía presentes en el medio, los plaguicidas cipermetrina y clorpirifos. Esto indicaría que hubo una síntesis de biomoléculas a partir de los macroelementos tomados del medio y de los plaguicidas, lo cual concuerda con Omar (1998) quien demostró que *T. harzianum* puede utilizar al fósforo y el azufre del clorpirifos para su crecimiento, del mismo modo Singh et al. (2004) reportó que *Enterobacter* cepa B-14 utilizó al clorpirifos como una sola fuente de carbono y de fósforo. Por otra parte, el crecimiento del hongo indicaría que tiene la maquinaria enzimática necesaria para metabolizar a estos plaguicidas.

En muchos estudios se han reportado las dos formas de biodegradación del clorpirifos y la cipermetrina, las cuales son mediante catabolismo y cometabolismo (Singh & Walker, 2006; Chishti et al., 2013; Cycoń & Piotrowska-Seget, 2016). En la tabla 1 se muestra el tipo de proceso que usa *T. asperellum* para degradar a ambos plaguicidas. Estos procesos fueron mediante catabolismo, puesto que fueron las únicas fuentes de carbono y energía en el medio. Para que ocurra el cometabolismo, en el medio debe de estar presente otra fuente de carbono como los azúcares (glucosa, sacarosa, etc.).

La mayoría de estudios que se han realizado con respecto a la degradación de la cipermetrina son con bacterias, donde destacan las especies del

género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Cycoń & Piotrowska-Seget, 2016; Pankaj et al., 2016; Dubey & Fulekar, 2013; Zhao et al., 2013). Por otra parte, son pocos los hongos que se han aislado y que pueden utilizar a la cipermetrina como única fuente de carbono, entre ellos podemos mencionar a *Fusarium oxysporum* cepa 8-11P y *Fusarium* sp. cepa zzz1124 (Kaur et al., 2015), *Aspergillus niger* cepa ZD11 (Liang et al., 2005) y *A. niger* cepa YAT (Deng et al., 2015) el cual degradó a la β -cipermetrina. Hasta la fecha, solo se ha reportado a la especie *T. viridae* cepa 5-2 como degradadora del piretroide Ciflutrina mediante cometabolismo (Cycoń, M., & Piotrowska-Seget, 2016), y no se han reportado otras especies de *Trichoderma* que degraden a la cipermetrina. Sin embargo, en el presente estudio observamos que *T. asperellum* tuvo la capacidad de crecer utilizando a la cipermetrina como única fuente de carbono y energía, tal como se observa en la figura 1b.

El crecimiento de *T. asperellum* indica que hubo un proceso de metabolismo de la cipermetrina. Los estudios indican que este proceso se inicia con la hidrólisis del enlace éster mediante la carboxiesterasa, resultando en dos subproductos, el 3-(2, 2-dicloro etenil)-2,2-dimetil-ciclopropanocarboxilato (o ácido permétrico) y el α -ciano-3-fenoxibenzil alcohol (o α -hidroxi-3-fenoxibenzenoacetónitrilo) (Pankaj et al., 2016; Deng et al., 2015). Este último metabolito es muy inestable, y mediante una reacción espontánea se convierte a 3-fenoxibenzaldehído, el cual mediante la deshidrogenasa se convierte en ácido 3-fenoxibenzoico (3-PBA) (Deng et al., 2015). Este último metabolito puede ser degradado mediante dos formas: (1) directamente a ácido protocatecoico y fenol, o (2) puede ser modificado a ácido 3-hidroxi 5-fenoxibenzoico mediante la acción de una hidrolasa, con la cual se escinde el enlace éter y se producen metabolitos como el

fenol y el ácido gálico. El fenol producido en ambas formas es convertido mediante la hidrolasa a catecol. Por último, el catecol, los ácidos protocatecoico y gálico son convertidos a cadenas lineales de ácido de olefina, el cual es oxidado a dióxido de carbono (Deng et al., 2015). Este modelo de metabolismo de la cipermetrina fue propuesto para *A. niger* cepa YAT, el cual fue utilizada para tratar de explicar la posible utilización de la cipermetrina por *T. asperellum* (Deng et al., 2015).

La figura 1c muestra el crecimiento de *T. asperellum* en el medio que contenía clorpirifos como única fuente de carbono. La degradación de este plaguicida ha sido ampliamente estudiada. Se han aislado y caracterizado muchas cepas, en su mayoría de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* y *Pseudomonas* (Kumar et al., 2018; John & Shaik; 2015; Chishti et al., 2013). Mientras que hay poca cantidad de especies fúngicas capaces de degradar al clorpirifos (Bhagobaty, 2006). Entre ellos podemos mencionar a *A. niger* (Omar, 1998; Mukherjee & Gopal, 1996), *A. terreus*, *A. tamarii*, *Penicillium* sp., *T. harzianum* (Omar, 1998), *Cladosporium cladosporioides* cepa Hu-01 (Lin et al., 2011), entre otros. Esta última cepa fue capaz de degradar completamente al clorpirifos. *T. asperellum* no ha sido reportada con anterioridad, pero si se han reportado a *T. viride* y *T. harzianum* como degradadores de este organofosforado clorado (Mukherjee & Gopal, 1996; Omar, 1998).

Con respecto a la ruta metabólica del clorpirifos, la degradación se inicia con la actividad de la hidrolasa de organofosforados (OPH, por sus siglas en inglés) (Richins et al., 1997), la cual rompe el enlace P-O del fosfotriéster resultando en dos metabolitos, el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) y dietilfosfato (DETP) (Singh & Walker, 2006; John & Shaik, 2015; Chishti et al., 2013). En menor cantidad pueden aparecer otros metabolitos como: desetil clorpirifos, clorpirifos oxon, destil clorpirifos oxon y el 3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina (TMP) (John & Shaik, 2015; Chishti et al., 2013). El TCP puede ser degradado a TMP, y posteriormente a dióxido de carbono, a través del ciclo de Krebs (Chowdhury et al., 2008). El DETP puede ser degradado a etanol y

ácido fosofrotioico (Singh & Walker, 2006; John & Shaik, 2015).

En la tabla N° 1 se muestra que existe diferencia significativa entre las velocidades de crecimiento de *T. asperellum* cuando crece utilizando como única fuente de carbono a la glucosa (control) y a los plaguicidas ($P < 0.05$). Esto puede deberse a que la glucosa es una molécula simple (monosacárido) en comparación con las estructuras complejas de los plaguicidas, los cuales requieren de la secreción de enzimas para transformarlos en subproductos degradables. Otra razón es la presencia de transportadores de glucosa presentes en las membranas de la hifa del hongo, lo cual facilitaría la captación de la glucosa y su metabolismo. En el medio de cultivo que contenía a la cipermetrina como única fuente de carbono fue donde *T. asperellum* mostró una mayor velocidad de crecimiento (2.88 ± 0.05 mm/día) que cuando crecía en el medio con clorpirifos (2.74 ± 0.05 mm/día). Sin embargo, no se observa diferencia significativa entre estas dos velocidades de crecimiento. Por otro lado, esta diferencia en los valores de la velocidad de crecimiento puede ser explicado debido a la estructura química y a los grupos funcionales que presentan cada plaguicida (Deng et al., 2015; Aislabie & Lloyd-Jones, 1995). La cipermetrina es un análogo a las piretrinas naturales, por consiguiente, en el ambiente hay microorganismos con las enzimas necesarias para degradarlas (Huang et al., 2018). Sin embargo, en el caso del clorpirifos, es un compuesto sintético que no tiene análogos en la naturaleza, además de poseer tres moléculas de cloro, puesto que los agroquímicos con más sustituyentes de cloro en su estructura pueden afectar su recalcitrancia y su resistencia a su degradación microbiana (Aislabie & Lloyd-Jones, 1995; Chowdhury et al., 2008).

En conclusión, *T. asperellum* puede crecer a partir de la degradación de plaguicidas del tipo piretroide y organofosforado clorado como la cipermetrina y el clorpirifos respectivamente. Además, estos plaguicidas pueden ser usados como únicas fuentes de carbono. Esta notable característica le confiere el potencial para ser aplicados como biorremediadores en suelos donde se aplican estos plaguicidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aislable, J., & Lloyd-Jones, G. (1995). A review of bacterial-degradation of pesticides. *Soil Research*, 33(6), 925-942. doi.org/10.1071/SR9950925
- Alavanja M. C. (2009). Introduction: pesticides use and exposure extensive worldwide. *Reviews on environmental health*, 24(4), 303-309. doi:10.1515/revh.2009.24.4.303
- Bhagobaty, R. K., Joshi, S. R., & Malik, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorous pesticide: chlorpyrifos (mini-review). *Internet J Microbiol*, 4(1), 1-6. <http://ispub.com/IJMB/4/1/7764>
- Chen, S., Hu, Q., Hu, M., Luo, J., Weng, Q., & Lai, K. (2011). Isolation and characterization of a fungus able to degrade pyrethroids and 3-phenoxybenzaldehyde. *Bioresource technology*, 102(17), 8110-8116. doi:10.1016/j.biortech.2011.06.055
- Chen, S., Liu, C., Peng, C., Liu, H., Hu, M., & Zhong, G. (2012). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a new fungal strain *Cladosporium cladosporioides* Hu-01. *PloS one*, 7(10), e47205. doi:10.1371/journal.pone.0047205
- Chishti, Z., Hussain, S., Arshad, K. R., Khalid, A., & Arshad, M. (2013). Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. *Journal of environmental management*, 114, 372-380. doi:10.1016/j.jenvman.2012.10.032
- Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M., & Sanyal, N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian journal of microbiology*, 48(1), 114-127. doi:10.1007/s12088-008-0011-8
- Cycoń, M., & Piotrowska-Seget, Z. (2016). Pyrethroid-Degrading Microorganisms and Their Potential for the Bioremediation of Contaminated Soils: A Review. *Frontiers in microbiology*, 7, 1463. doi:10.3389/fmicb.2016.01463
- Deng, W., Lin, D., Yao, K., Yuan, H., Wang, Z., Li, J., ... Liu, S. (2015). Characterization of a novel β -cypermethrin-degrading *Aspergillus niger* YAT strain and the biochemical degradation pathway of β -cypermethrin. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(19), 8187-8198. doi:10.1007/s00253-015-6690-2
- Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., & Purohit, H. J. (2016). Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. *Indian journal of microbiology*, 56(3), 247-264. doi:10.1007/s12088-016-0584-6. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6>
- Dubey, K. K., & Fulekar, M. H. (2013). Investigation of potential rhizospheric isolate for cypermethrin degradation. *3 Biotech*, 3(1), 33-43. doi:10.1007/s13205-012-0067-3
- Gadd, G. M. (2004). Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist*, 18(2), 60-70. [https://doi.org/10.1017/S0269-915X\(04\)00202-2](https://doi.org/10.1017/S0269-915X(04)00202-2)
- Gajendiran, A., & Abraham, J. (2018). An overview of pyrethroid insecticides. *Frontiers in Biology*, 13(2), 79-90. doi.org/10.1007/s11515-018-1489-z
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature reviews. Microbiology*, 9(3), 177-192. doi:10.1038/nrmicro2519.
- Huang, Y., Xiao, L., Li, F., Xiao, M., Lin, D., Long, X., & Wu, Z. (2018). Microbial Degradation of Pesticide Residues and an Emphasis on the Degradation of Cypermethrin and 3-phenoxy Benzoic Acid: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(9), 2313. doi:10.3390/molecules23092313
- Javaid, M. K., Ashiq, M., & Tahir, M. (2016). Potential of Biological Agents in Decontamination of Agricultural Soil. *Scientifica*, 2016, 1598325. doi:10.1155/2016/1598325
- John, E. M., & Shaik, J. M. (2015). Chlorpyrifos: pollution and remediation. *Environmental chemistry letters*, 13(3), 269-291. doi.org/10.1007/s10311-015-0513-7
- Kanekar, P. P., Bhadbhade, B. J., Deshpande, N. M., & Sarnaik, S. S. (2004). Biodegradation of organophosphorus pesticides. *Proceedings-Indian National Science Academy Part B*, 70(1), 57-70.
- Kaur, P., Sharma, A., & Parihar, L. (2015). In vitro study of mycoremediation of cypermethrin-contaminated soils in different regions of Punjab. *Annals of microbiology*, 65(4), 1949-1959. doi.org/10.1007/s13213-015-1033-1

- Kumar, S., Kaushik, G., Dar, M. A., Nimesh, S., Lopez-Chuken, U. J., & Villarreal-Chiu, J. F. (2018). Microbial degradation of organophosphate pesticides: a review. *Pedosphere*, 28(2), 190-208. doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60017-7
- Liang, W. Q., Wang, Z. Y., Li, H., Wu, P. C., Hu, J. M., Luo, N., ... Liu, Y. H. (2005). Purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase from *Aspergillus niger* ZD11. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(19), 7415-7420. doi:10.1021/jf051460k
- Lin, Q. S., Chen, S. H., Hu, M. Y., Haq, M. 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. doi.org/10.1007/BF03326194
- Maqbool, Z., Hussain, S., Imran, M., Mahmood, F., Shahzad, T., Ahmed, Z., ... Muzammil, S. (2016). Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: a critical review. *Environmental science and pollution research international*, 23(17), 16904-16925. doi:10.1007/s11356-016-7003-8
- Maya, K., Upadhyay, S. N., Singh, R. S., & Dubey, S. K. (2012). Degradation kinetics of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) by fungal communities. *Bioresource technology*, 126, 216-223. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.003
- Mukherjee, I., & Gopal, M. (1996). Degradation of chlorpyrifos by two soil fungi *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 57(1-4), 145-151. doi.org/10.1080/02772249609358383
- Omar S. A. (1998). Availability of phosphorus and sulfur of insecticide origin by fungi. *Biodegradation*, 9(5), 327-336. doi:10.1023/a:1008310909262
- Pankaj, Sharma, A., Gangola, S., Khati, 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. doi:10.1007/s13205-016-0372-3
- Richins, R. D., Kaneva, I., Mulchandani, A., & Chen, W. (1997). Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Nature biotechnology*, 15(10), 984-987. doi:10.1038/nbt1097-984
- Rigas, F., Papadopoulou, K., Dritsa, V., & Doulia, D. (2007). Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing the fungus *Ganoderma australe* via response surface methodology. *Journal of hazardous materials*, 140(1-2), 325-332. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.09.035
- Singh, B. K., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS microbiology reviews*, 30(3), 428-471. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x
- Singh, B. K., Walker, A., Morgan, J. A., & Wright, D. J. (2003). Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 69(9), 5198-5206. doi:10.1128/aem.69.9.5198-5206.2003
- Singh, B. K., Walker, A., Morgan, J. A., & Wright, D. J. (2004). Biodegradation of chlorpyrifos by enterobacter strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Applied and environmental microbiology*, 70(8), 4855-4863. doi:10.1128/AEM.70.8.4855-4863.2004
- Supreeth, M., & Raju, N. S. (2017). Biotransformation of chlorpyrifos and endosulfan by bacteria and fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(15), 5961-5971. doi:10.1007/s00253-017-8401-7
- Tanentzap, A. J., Lamb, A., Walker, S., & Farmer, A. (2015). Resolving Conflicts between Agriculture and the Natural Environment. *PLoS biology*, 13(9), e1002242. doi:10.1371/journal.pbio.1002242
- Tripathi, P., Singh, P., Mishra, A., Chauhan, P., Dwivedi, S., Bais, R., & Tripathi, R. (2013). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15(4), 541-550.
- 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. doi:10.1139/cjm-2012-0580