ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

<u>ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ</u>

«*IN VITRO* ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΑΝΘΕΛΜΙΝΘΙΚΩΝ ΣΕ ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ»

Τσιτσέλα Αθανασία του Νικολάου

ΛΑΡΙΣΑ 2023

«*In vitro* αξιολόγηση της τοξικότητας επιλεγμένων ανθελμινθικών σε νιτρωδοποιητικά βακτήρια»

«*In vitro* assessment of the toxicity of selected anthelmintics on soil ammonia-oxidizing bacteria»

Επιβλέπων καθηγητής

Δημήτριος Καρπούζας: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1. **Δημήτριος Καρπούζας:** Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.
2. **Ευαγγελία Παπαδοπούλου:** Επίκουρος Καθηγήτρια Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.
3. **Σωτήριος Βασιλειάδης:** Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Καρπούζα Δημήτριο, που με δέχτηκε στο εργαστήριο και ανέλαβε την επίβλεψη της πτυχιακής μου, καθώς και για τη βοήθεια και τη καθοδήγηση κατά τη διάρκεια συγγραφής της. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά την Επικ. Καθηγήτρια του Τμήματος Περιβάλλοντος, ΠΘ, Ευαγγελία Παπαδοπούλου και την Υποψήφια Διδάκτορα Μαρία Κολοβού για την εκπαίδευση, την καθοδήγηση και όλες τις συμβουλές τους σε όλα τα στάδια του πειράματος και συγγραφής της εργασίας. Επίσης ευχαριστώ πολύ, όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια, τις συμβουλές και το ευχάριστο κλίμα κατά τη διάρκεια εκπόνησης του πειραματικού μέρους της εργασίας μου. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, για την ηθική και οικονομική υποστήριξη που μου παρείχαν κατά την διάρκεια της φοίτησης μου στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Περίληψη

Τα ανθελμινθικά φάρμακα χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων που προκαλούνται, από παρασιτικά γαστρεντερικά νηματώδη σε ζώα κτηνοτροφικής παραγωγής. Ο μεταβολισμός των φαρμάκων εντός του ζώου είναι ελάχιστος, με αποτέλεσμα να καταλήγουν στο έδαφος μέσω των απεκκριμάτων τους που χρησιμοποιούνται για την οργανική λίπανση γεωργικών εδαφών. Εκεί αλληλεπιδρούν με ωφέλιμους μικροοργανισμούς του εδάφους, όπως είναι οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί, που έχουν βασικό ρόλο στον κύκλο του αζώτου. Προηγούμενες μελέτες έχουν επισημάνει τις αρνητικές επιδράσεις των ανθελμινθικών φαρμάκων στη λειτουργία και αφθονία νιτρωδοποιητικών στελεχών σε πειράματα εδάφους. Στη παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε *in vitro* πείραμα, με τη χρήση δύο νιτρωδοποιητικών βακτηριακών στελεχών (AOB), που αφθονούν σε εδαφικά περιβάλλοντα (*Nitrosospira multiformis* και *Nitrosomonas ureae*), για την αξιολόγηση της επίδρασης στη λειτουργία τους επιλεγμένων ανθελμινθικών φαρμάκων. Χρησιμοποιήθηκαν φάρμακα της κατηγορίας των βενζιμιδαζολών (albendazole, ricobendazole, fenbendazole) και των μακροκυκλικών λακτονών (eprinomectin, ivermectin). Η επίδραση τους, στην λειτουργία των μικροοργανισμών προσδιορίστηκε, με τη χρήση υγρών καλλιεργειών, με μέτρηση της παραγωγής νιτρωδών ιόντων, σε ένα εύρος συγκέντρωσης των υπό μελέτη φαρμάκων. Επιπλέον μελετήθηκε η σταθερότητα των φαρμάκων στις υγρές καλλιέργειες. Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας διατριβής, τα βενζιμιδαζολικά ανθελμινθικά albendazole, ricobendazole και fenbendazole, και η μακροκυκλική λακτόνη ivermectin, δεν παρεμπόδισαν σημαντικά τη νιτρωδοποιητική λειτουργία των δυο μελετούμενων AOB στελεχών. Αντίθετα το eprinomectin στο στέλεχος *N. ureae* επηρέασε τη νιτρωδοποιητική ικανότητα σε συγκεντρώσεις $\geq$11 μM, ενώ στο στέλεχος *N. multiformis* δεν είχε καμία επίδραση. Η γενικότερη μειωμένη τοξικότητα των συνθετικών ανθελμινθικών στα δύο στελέχη AOB που μελετήθηκαν, με μοναδική εξαίρεση την επίδραση του eprinomectin στο στέλεχος *N. ureae*, θα μπορούσε να συνδεθεί με πιθανά προβλήματα διαλυτότητας και βιοδιαθεσιμότητας τους στις υγρές καλλιέργειες. Όσον αφορά την μελέτη της σταθερότητας και αποδόμησης των ανθελμινθικών στις υγρές καλλιέργειες, δεν παρατηρήθηκε κάποιο γενικευμένο πρότυπο δοσοεξαρτώμενης αποδόμησης των υπό μελέτη φαρμάκων. Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, παρέχουν κάποιες πρώτες ενδείξεις για την τοξικότητα του eprinomectin, σε σχέση με τη λειτουργία του AOB στελέχους *N. ureae*, κάτι το οποίο αναμένεται να διερευνηθεί

περαιτέρω και σε άλλα εδαφογενή στελέχη AOB του γένους *Nitrosomonas*. Επιπλέον, μελλοντικές μελέτες αναμένεται να διερευνήσουν περαιτέρω τη διαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα των επιλεγμένων ανθελμινθικών με τη χρήση του διαλύτη TWEEN 20, καθώς και την πιθανή τοξικότητα του στις υγρές καλλιέργειες νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών (βακτηρίων και αρχαίων).

Λέξεις κλειδιά: Ανθελμινθικά φάρμακα, Νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB), Βενζιμιδαζόλες, Μακροκυκλικές λακτόνες

Abstract

Anthelmintics are used to treat infections caused by parasitic gastrointestinal nematodes in livestock. The metabolism of the drugs inside the animal is minimal, as a result they end up in soil through the use of animal excerta for the manuring of agricultural soils. There they interact with beneficial soil microorganisms, such as nitrifying microorganisms, which play a key role in the nitrogen cycle. Previous studies have highlighted the negative effects of anthelmintic drugs on the function and abundance on nitrifying strains in soil experiments. In this thesis, an *in vitro* experiment was carried out, using two nitrifying strains (AOB), which are abundant in soil environments (*Nitrosospira multiformis* and *Nitrosomonas ureae*), to evaluate the effect on their function of selected anthelmintic drugs. We used drugs from the group of benzimidazoles (albendazole, ricobendazole, fenbendazole) and macrocyclic lactones (eprinomectin, ivermectin). The effect of each compound, on the functioning of microorganisms was determined using liquid cultures, over a range of concentrations by measuring the production of nitrite ions. In addition, the stability of the drugs in liquid cultures was studied. According to the findings of this thesis, the benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole and fenbendazole, and the macrocyclic lactone ivermectin, did not significantly affect the nitrifying function of the two studied AOB strains. On the contrary, eprinomectin affected the nitrifying capacity of the *N. ureae* strain at concentrations ≥11 μM, while it had no effect on the *N. multiformis* strain. The generally reduced toxicity of the synthetic anthelmintics in the two AOB strains, with the sole exception of the effect of eprinomectin on the *N. ureae* strain, could be associated with problems of their solubility and bioavailability in liquid cultures. Regarding the study of stability and degradation of anthelmintics in liquid cultures, no generalized pattern of dose-dependent degradation of the studied drugs was observed. In conclusion, the findings of the present study provide some first indications for the toxicity of eprinomectin, in relation to the function of the AOB strain *N. ureae*, which is expected to be further investigated in other soil AOB strains of the *Nitrosomonas* genus. In addition, future studies are expected to further investigate the solubility and bioavailability of the selected anthelmintics using TWEEN 20 solvent, as well as its potential toxicity in liquid cultures of nitrifying microorganisms (bacteria and archaea).

Key words: Anthelmintics, Ammonia-oxidizing bacteria (AOB), Benzimidazoles, Macrocyclic lactones

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ανθελμινθικά φάρμακα ως περιβαλλοντικοί ρύποι

Η χορήγηση των ανθελμινθικών φαρμάκων αποτελεί κοινή πρακτική για την αντιμετώπιση και τον έλεγχο των γαστρεντερικών παρασιτικών νηματώδων, σε μηρυκαστικά ζώα κτηνοτροφικής παραγωγής (Nixon *et al*., 2020). Στην κτηνοτροφία χρησιμοποιούνται διάφορα σκευάσματα ανθελμινθικών, τα οποία κατηγοριοποιούνται σε ομάδες με βάση τον τρόπο δράσης τους κατά των παρασίτων, και την χημική τους δομή. Μερικές από τις πιο γνωστές ομάδες είναι οι: (α) βενζιμιδαζόλες, (β) μακροκυκλικές λακτόνες, (γ) ιμιδαζοθειαζόλες/ τετραϋδροπυριμιδίνες, (δ) και τα παράγωγα αμινο-ακετονιτριλίου (Horvat *et al*., 2012).

Παρόλες τις ευεργετικές δράσεις τους στην αντιμετώπιση των παρασιτικών λοιμώξεων, μελέτες έχουν εντοπίσει τις αυξανόμενες συνέπειες της αλόγιστης χρήσης των ανθελμινθικών φαρμάκων, καθώς μπορούν να εισέλθουν στο περιβάλλον μέσα από τις απεκκρίσεις των ζώων. Η απέκκριση τους γίνεται μέσω των κοπράνων και των ούρων, όπου το φάρμακο μπορεί να βρίσκεται είτε με τη μορφή της μητρικής δραστικής ένωσης, είτε ως μεταβολίτης (Lagos *et al*., 2021; Ren *et al*., 2022). Μετά την απέκκριση τους, τα φάρμακα έρχονται σε επαφή με οργανισμούς μη στόχους της κοπριάς, του νερού ή του εδάφους. Επίσης η έκθεση των παρασίτων σε μια σειρά από ανθελμινθικά και στους μεταβολίτες τους, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας αλλά και στη μειωμένη αποτελεσματικότητα των εν λόγω φαρμάκων (Horvat *et al*., 2012; Nixon *et al*., 2020).

Ελάχιστα δεδομένα υπάρχουν για την περιβαλλοντική τύχη των ανθελμινθικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους, η οποία εξαρτάται από τον συνδυασμό ποικίλων παραγόντων, που περιλαμβάνουν: (1) τη συχνότητα εφαρμογής τους, (2) τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και (3) την αποδόμηση τους, παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τον ρυθμό απέκκρισης αλλά και εμμονής τους στο περιβάλλον (Horvat *et al*., 2012).

1.1.1. Μακροκυκλικές λακτόνες

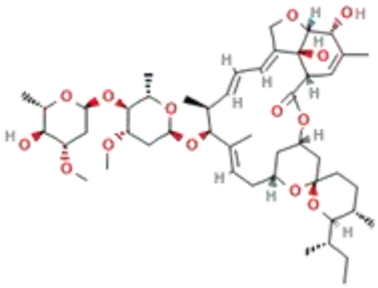
Οι μακροκυκλικές λακτόνες (αβερμεκτίνες), αποτελούν φυσικά προϊόντα του μικροοργανισμού του εδάφους *Streptomyces avermitilis*. Χαρακτηρίζονται από μια 16-μελή κυκλική λακτόνη, συνδεδεμένη με δακτυλίους κετάλης και βενζοφουράνιου. Οι πιο κοινές μακροκυκλικές λακτόνες περιλαμβάνουν τις ενώσεις ivermectin, abamectin, doramectin, eprinomectin, και moxidectin. Οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία λόγω της ισχυρής και ευρείας δράσης τους ενάντια σε παρασιτικούς νηματώδεις. Συγκεκριμένα στοχεύουν περισσότερα από 300 είδη ενδο- και εκτο-παρασίτων με ευρύ φάσμα ξενιστών, ενώ ο τρόπος δράσης βασίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με κανάλια υποδοχείς για ανασταλτικούς νευροδιαβιβαστές, η οποία επηρεάζει την κινητικότητα, διατροφή και αναπαραγωγή των νηματώδων (Geary & Moreno, 2012; Horvat *et al*., 2012; Litskas *et al*., 2013).

Τα ανθελμινθικά αυτής της κατηγορίας χορηγούνται είτε από το στόμα είτε με ενδομυϊκή ένεση, και απεκκρίνονται από τα ζώα, μέσω των κοπράνων και των ούρων σε επίπεδα που κυμαίνονται από 60 έως 90% της χορηγούμενης δόσης τους (Lagos *et al*., 2022). Παρόλο που οι μακροκυκλικές λακτόνες είναι πολύ λιπόφιλες, και ελάχιστα διαλυτές στο νερό, είναι αρκετά διαλυτές στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες, και έχει αποδειχθεί ότι έχουν επιπτώσεις στην αναπαραγωγή, τη βιολογική λειτουργία και την επιβίωση οργανισμών μη στόχων, σε χερσαία και υδρόβια περιβάλλοντα. Μελέτες οικοτοξικότητας σε ασπόνδυλα της κοπριάς έδειξαν ότι οι μακροκυκλικές λακτόνες επηρεάζουν τη θνησιμότητα των ασπόνδυλων προνυμφών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, με τιμές θανατηφόρου συγκέντρωσης 50% (LC_{50}) μικρότερες από 0.036 mg δ.o.kg^{-1} κοπριάς (Horvat *et al*., 2012).

1.1.1.1. Ivermectin

Το ivermectin (IVM) (22,23-διϋδροαβερμεκτίνη B1) είναι ένα ημι-συνθετικό, παράγωγο αβερμεκτίνης που εφαρμόζεται ευρέως από το 1981 ως αντιπαρασιτικός παράγοντας σε ζώα, ψάρια, και στον άνθρωπο. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία και την πρόληψη ενδοπαρασίτων και εκτοπαρασίτων βοοειδών, αλόγων και άλλων ζώων, όπως οι νηματώδεις της γαστρεντερικής και αναπνευστικής οδού, μύγες, κρότωνες, ψείρες και ακάρεα. Επιπλέον, στην Αφρική χορηγείται ετησίως σε τουλάχιστον 18 εκατομμύρια ανθρώπους προληπτικά κατά της τύφλωσης (ογκοκερκίαση) (Sanderson *et al*., 2007; Prasse *et al*., 2009). Δρα μέσω της δέσμευσης του σε προσδετο-εξαρτώμενα κανάλια χλωρίου, ειδικότερα αυτών που αφορούν στην πρόσδεση του γλουταμινικού οξέος (GluCls), προκαλώντας κυρίως παράλυση σε παρασιτικούς νηματώδεις και αρθρόποδα (Geary & Moreno, 2012).

Η απέκκριση του IVM γίνεται κυρίως μέσω των κοπράνων με τη μορφή της μητρικής ένωσης (σε ποσοστό περίπου 45%) η οποία σύμφωνα με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές χαρακτηρίζεται από μέτρια υπολειμματικότητα στην κοπριά και το έδαφος, με αναφερόμενο χρόνο ημιζωής (DT_{50}) από 7 έως 39 ημέρες (Horvat *et al*., 2012; Lagos *et al*., 2022). Μελέτες έχουν δείξει την υψηλή τοξικότητά του IVM σε οργανισμούς μη στόχους του εδάφους και των υδατικών οικοσυστημάτων. Η υψηλότερη οξεία τοξικότητα έχει βρεθεί στα καρκινοειδή *Neomysis integer* (LC_{50} 96h: 70 ng L^{-1}, LC_{50} 48h: 26 ng L^{-1}), *Gammarus sp*. (LC_{50} 96h: 33 ng L^{-1}) και *Daphnia magna* (LC_{50} 48h: 25 ng L^{-1}) (Horvat *et al*., 2012). Επιπλέον, τοξικότητα έχει παρατηρηθεί και στα ασπόνδυλα της κοπριάς, μετά από θεραπεία βοοειδών με IVM (Lagos *et al*., 2022).



Εικόνα 1.1. *Χημική δομή ivermectin (Πηγή:PubChem)*

Πίνακας 1.1. *Φυσικοχημικές ιδιότητες ivermectin (Horvat et al., 2012; Drugbank).*

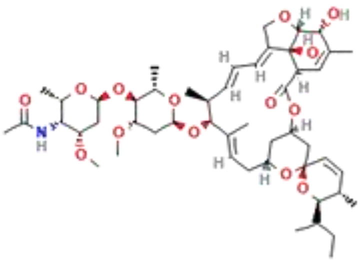
Ivermectin		
Φυσικοχημικές Ιδιότητες	S_w (mg mL^{-1})	0.00614
	$logK_{ow}$	3.22
	pKα	12.47; -3.4
	Molecular weight	875.11

1.1.1.2. Eprinomectin

Το eprinomectin (EPM) [(4΄΄R)-4΄΄-(ακετυλάμινο)-4΄΄-δεοξυ-αβερμεκτίνη B1] είναι ένα ημι-συνθετικό παράγωγο αβερμεκτίνης, το οποίο συντέθηκε μετά από τροποποίηση της χημικής δομής του abamectin, και εισήχθη στην κτηνοτροφία το

1997. Το φάρμακο αυτό χρησιμοποιείται λόγω της υψηλής δραστικότητας που επιδεικνύει ενάντια σε μεγάλο αριθμό ενδο- και εκτο- παρασίτων των βοοειδών. Ένα ακόμα πλεονέκτημα σε σύγκριση με άλλες αβερμεκτίνες, είναι η χαμηλή συγκέντρωση του στο γάλα των βοοειδών (ppb), που επιτρέπει την άμεση κατανάλωση του γάλακτος κατά τη διάρκεια της θεραπείας, χωρίς την ανάγκη εφαρμογής περιόδου αναμονής (Litskas *et al*., 2013; Aksit *et al*., 2016; Litskas *et al*., 2021).

Το EPM δεν μεταβολίζεται εντός του ζώου, και απεκκρίνεται κυρίως με τα κόπρανα σε ποσοστό 85.9% (Litskas *et al*., 2021). Η εναπόθεση του στο έδαφος γίνεται άμεσα από τις απεκκρίσεις των βόσκοντων ζώων και έμμεσα μέσω της εφαρμογής κοπριάς ως λίπασμα στα γεωργικά εδάφη. Πληροφορίες σχετικά με την οικοτοξικότητα αλλά και την περιβαλλοντική τύχη του EPM είναι περιορισμένες. Στο έδαφος, μελέτες έχουν δείξει την υψηλή υπολειμματικότητα του EPM, με αναφερόμενο χρόνο ημιζωής (DT_{50}) από 38 έως 53 ημέρες (Lagos *et al.*, 2022). Επίσης, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία το EPM αποτελεί σοβαρή απειλή για τους υδρόβιους οργανισμούς και τα ασπόνδυλα της κοπριάς, με εκδήλωση τοξικών επιπτώσεων σε επίπεδο ppb (μg L^{-1} ή μg kg^{-1}). Επιπλέον, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι τοξικό και για τους γαιοσκώληκες, τα φυτά, τα ψάρια, τα πτηνά και τα θηλαστικά (Litskas *et al*., 2013).



Εικόνα 1.2. *Χημική δομή eprinomectin B1a (Πηγή:PubChem)*

Πίνακας 1.2. *Φυσικοχημικές ιδιότητες eprinomectin (Horvat et al., 2012· Drugbank).*

Eprinomectin		
Φυσικοχημικές Ιδιότητες	S_w (mg mL^{-1})	0.00747
	$logK_{ow}$	5.40
	pKα	12.49; -1.3
	Molecular weight	914.14

1.1.2. Βενζιμιδαζόλες

Οι βενζιμιδαζόλες αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές ομάδες ανθελμινθικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία ενδοπαρασιτικών λοιμώξεων από νηματώδεις στην κτηνοτροφία και στα κατοικίδια ζώα. Η ομάδα αυτών των φαρμάκων περιλαμβάνει τις ενώσεις albendazole, fenbendazole, flubendazole, ricobendazole, mebendazole, thiabendazole. Οι ενώσεις αυτής της κατηγορίας δρουν στοχεύοντας την β-τουμπουλίνη των μικροσωληνίσκων των παρασίτων, οδηγώντας σε προοδευτική διαταραχή της κυτταρικής λειτουργίας (Formentini *et al.*, 2005).

Εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητας που έχουν στο νερό, οι βενζιμιδαζόλες χορηγούνται δια του στόματος, με τη μορφή κάψουλας, ή εναιωρήματος. Η απορρόφηση τους από τα ζώα διαφέρει ανάλογα με το σκεύασμα που χρησιμοποιείται, τη δοσολογία, αλλά και το είδος του ζώου. Μετά την εφαρμογή τους, απεκκρίνονται μέσω των κοπράνων σε ποσοστό 75% και μέσω των ούρων σε ποσοστό 14% (Horvat *et al.*, 2012; Lagos *et al.*, 2021).

Οι μελέτες οικοτοξικότητας για τις βενζιμιδαζόλες είναι περιορισμένες, ενώ για τα ψάρια δεν υπάρχουν καθόλου διαθέσιμα δεδομένα τοξικότητας για τα φάρμακα fenbendazole και thiabendazole. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα πλαγκτονικά καρκινοειδή είναι 10 φορές πιο ευαίσθητα στις βενζιμιδαζόλες σε σύγκριση με τα βακτήρια, με αναφερόμενη οξεία τοξικότητα στο *Daphnia magna* σε επίπεδο μg L^{-1} (Venancio *et al.*, 2021). Οι βενζιμιδαζόλες φαίνεται να είναι λιγότερο τοξικές για τα ασπόνδυλα της κοπριάς, αλλά σύμφωνα με τη χημική τους δομή, αυτά τα φάρμακα μπορεί να επηρεάσουν τους μύκητες της κοπριάς. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένες βενζιμιδαζόλες όταν χορηγηθούν σε κτηνοτροφικά ζώα (αιγοπρόβατα), κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να οδηγήσουν σε τερατογένεση (Venkatesan, 1998; Horvat *et al.*, 2012).

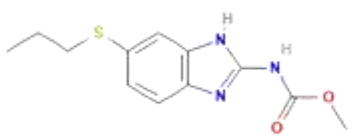
1.1.2.1.Albendazole

Το albendazole (ABZ), είναι μια συνθετική βενζιμιδαζόλη με ανθελμινθική δράση, η οποία εισήχθη στην αγορά το 1982. Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση κυρίως νηματώδων σκωλήκων που προσβάλλουν τον γαστρεντερικό σωλήνα κτηνοτροφικών ζώων, ψαριών, αλλά και οικόσιτων ζώων (Busatto *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2020). Το ABZ χορηγείται και στους ανθρώπους για την καταπολέμηση παρασιτικών έλμινθων σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές (Belew *et al.*, 2021).

Δρα, μέσω δέσμευσης στη β-τουμπουλίνη αναστέλλοντας τον πολυμερισμό και σχηματισμό μικροσωληνίσκων. Επιπλέον, παρεμβαίνει στον φυσιολογικό μεταβολισμό των παρασίτων μειώνοντας τη διαθεσιμότητα της γλυκόζης κατά την ανάπτυξή τους (Gao *et al*., 2013; Pavlovic *et al*., 2018). Το ABZ χορηγείται δια του στόματος, και μεταβολίζεται γρήγορα προς την ένωση albendazole sulfoxide, η οποία αποτελεί μεταβολίτη με ενεργή ανθελμινθική δράση που εν συνεχεία οξειδώνεται στον ανενεργό μεταβολίτη albendazole sulphone (Ren *et al*., 2022).

Το ABZ όπως και οι μεταβολίτες του, απεκκρίνονται κυρίως με τα ούρα και τα κόπρανα (Belew *et al*., 2021· Ren *et al*., 2022). Η εναπόθεση τους στο περιβάλλον μπορεί να γίνει στο έδαφος μέσω των απεκκρίσεων των ζώων ή στο νερό μετά από ανεπαρκή επεξεργασία λυμάτων (Pavlovic *et al*., 2018). Ελάχιστες τοξικές επιδράσεις έχουν αναφερθεί για το ABZ, οι οποίες αφορούν κυρίως την δυνητική εμβρυοτοξική και τερατογόνο δράση του σε βοοειδή (Busatto *et al*., 2018), ψάρια (*Danio renio* ≥ 0.002 mg L^{-1}), καρκινοειδή (*Daphnia magna* ≥ 63 μg L^{-1}) και σακχαρομύκητες (*Saccharomyces cerevisiae* ≥ 20 μg mL^{-1}). Επίσης φαίνεται να μειώνει τη μεταβολική δραστηριότητα σε βακτήρια (*Vibrio fischeri* ≥ 714 μg L^{-1}) (Belew *et al.,* 2021).

Παρότι το ABZ έχει εντοπιστεί στο περιβάλλον, σε δείγματα εδάφους, νερού και κοπριάς, η περιβαλλοντική τύχη του φαρμάκου δεν είναι γνωστή (Pavlovic *et al*., 2018). Τα τελευταία χρόνια, μελέτες εδάφους έχουν αποκαλύψει ότι το ABZ χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή υπολειμματικότητα με τις τιμές DT_{50} σε εργαστηριακές και μελέτες πεδίου να κυμαίνονται από 0.1 έως 4.2 ημέρες και από 4.95 έως 6.3 ημέρες, αντίστοιχα (Lagos *et al*., 2021).



Εικόνα 1.3. *Χημική δομή albendazole (Πηγή:PubChem)*

Πίνακας 1.3. Φυσικοχημικές ιδιότητες albendazole (Horvat et al., 2012; Drugbank).

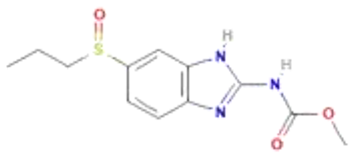
Albendazole		
Φυσικοχημικές Ιδιότητες	S_w (mg mL^{-1})	0.0228
	$logK_{ow}$	3.07
	pKα	9.93; 3.37
	Molecular weight	265.34

1.1.2.2. Ricobendazole

Το ricobendazole (albendazole sulfoxide) (ABZSO), είναι ο κύριος μεταβολίτης του φαρμάκου albendazole, με ανθελμινθική δράση. Το albendazole έχει μια λειτουργική σουλφιδο-ομάδα η οποία είναι ευαίσθητη στην οξείδωση, από την οποία προκύπτει το ricobendazole, το οποίο μπορεί να υποστεί περαιτέρω οξείδωση προς τον χωρίς ανθελμινθική δράση μεταβολίτη albendazole sulfone (Formentini *et al*., 2001; Horvat *et al.*, 2012). Το ABZSO, έχει ισχυρότερη ανθελμινθική δράση από τη μητρική ένωση ABZ, καθώς θεωρείται ουσία με ισχυρότερη ανασταλτική δράση του πολυμερισμού της τουμπουλίνης (Belew *et al.*, 2021). Ως φάρμακο το ricobendazole χρησιμοποιείται στα βοοειδή από το 1995, όπου ξεκίνησε η εφαρμογή του ως υποδόριο σκεύασμα στη Λατινική Αμερική (Formentini *et al*., 2005).

Πρόσφατες εργαστηριακές μελέτες οικοτοξικότητας του ABZ και του μεταβολίτη του ABZSO, αναφέρουν ότι το ABZSO δεν εμφανίζει εμβρυοτοξικότητα ή τερατογόνο δράση σε αντίθεση με τη μητρική του ένωση, στους οργανισμούς *Danio renio*, *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* και *Saccharomyces cerevisiae* (Belew *et al.,* 2021). Αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στη διαφορετική διαθεσιμότητα (λιποφιλικότητα) των ABZ και ABZSO ($logK_{ow}$), η οποία με τη σειρά της θα μπορούσε να επηρεάσει την εμβρυοτοξική δράση των δύο ενώσεων που συνδέονται στους κυτταρικούς μικροσωληνίσκους (Belew *et al*., 2021).

Οι μελέτες σχετικά με την περιβαλλοντική τύχη του ABZSO είναι περιορισμένες, και συνήθως μελετάται σε συνδυασμό με τη μητρική του ένωση καθώς και τον δευτερεύοντα μεταβολίτη albendazole sulfone. Γενικά ως φάρμακο το ABZSO είναι περισσότερο πολικό σε σύγκριση με τη μητρική του ένωση, και ως εκ τούτου εμφανίζει μεγαλύτερη κινητικότητα στο έδαφος (Lagos *et al*., 2021).



Εικόνα 1.4. *Χημική δομή ricobendazole (Πηγή: PubChem)*

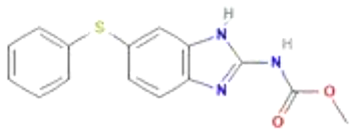
Πίνακας 1.4. *Φυσικοχημικές ιδιότητες ricobendazole (Horvat et al., 2012;Drugbank).*

Ricobendazole		
Φυσικοχημικές Ιδιότητες	S_w mg mL^{-1}	0.901
	$logK_{ow}$	1.2
	pKα	9.8, 3.5
	Molecular weight	281.33

1.1.2.3. Fenbendazole

Το fenbendazole (FBZ), είναι μια συνθετική βενζιμιδαζόλη με ανθελμινθική δράση, η οποία εισήχθη στην αγορά το 1990. Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση γαστρεντερικών και πνευμονικών νηματωδών σκωλήκων σε ζώα κτηνοτροφικής παραγωγής (Oliviera *et al*., 2020). Έχει τρόπο δράσης παρόμοιο με το ABZ, δηλαδή έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στη β-τουμπουλίνη παρεμποδίζοντας τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων και επιπλέον μειώνει τη διαθεσιμότητα της γλυκόζης στα παράσιτα εμποδίζοντας την ανάπτυξη τους (Gronvold *et al*., 2004).

Το FBZ χορηγείται στα ζώα δια του στόματος και απεκκρίνεται, είτε με τη μορφή της μητρικής ένωσης, είτε ως μεταβολίτης με ενεργή (fenbendazole sulfoxide - oxfendazole) ή ανενεργή (fenbendazole sulfone) ανθελμινθική δράση, με τα ούρα και τα κόπρανα (Syslova *et al.*, 2019). Στα βοοειδή σχεδόν το 36% μιας δόσης FBZ απεκκρίνεται αμετάβλητο στα κόπρανα (Gronvold *et al.*, 2004). Το FBZ είναι αρκετά έμμονο, με μελέτες να αναφέρουν την ανίχνευση ποσοστού 80% για 102 ημέρες σε κόπρανα γουρουνιού (Lagos *et al.*, 2021). Στο περιβάλλον το FBZ ανιχνεύεται στο έδαφος αλλά και σε υδάτινα οικοσυστήματα. Η μελέτη της περιβαλλοντικής τύχης του, δείχνει ότι απορροφάται αποτελεσματικά σε εδάφη, ιζήματα και οργανική ύλη και η συμπεριφορά του στο περιβάλλον συνοδεύεται από περιορισμένο μεταβολισμό (Horvat *et al.*, 2012; Puckowski *et al.*, 2017). Αν και η συγκέντρωση που ανιχνεύεται στο περιβάλλον δεν είναι πολύ υψηλή (1 ng L^{-1} - 1 μg L^{-1}), μπορεί να επηρεάσει αρνητικά οργανισμούς μη στόχους. Μελέτες οικοτοξικότητας αναφέρουν τιμές EC_{50} 4 h = 19 μg L^{-1} και EC_{50} 48h = 16.5 μg L^{-1} σε υδάτινους οργανισμούς *Daphnia magna* (Puckowski *et al.*, 2017; Syslova *et al.*, 2019).



Εικόνα 1.5. *Χημική δομή fenbendazole (Πηγή: PubChem)*

Πίνακας 1.5. *Φυσικοχημικές ιδιότητες fenbendazole (Horvat et al. 2012; Drugbank).*

<table>
<tr><th colspan="3">Fenbendazole</th></tr>
<tr><td rowspan="4">Φυσικοχημικές Ιδιότητες</td><td>S_w (mg mL^{-1})</td><td>0.00609</td></tr>
<tr><td>$logK_{ow}$</td><td>1.95</td></tr>
<tr><td>pKα</td><td>9.59; 4.06</td></tr>
<tr><td>Molecular weight</td><td>299.35</td></tr>
</table>

1.2. Οι μικροοργανισμοί του εδάφους και ο ρόλος τους

Οι μικροοργανισμοί αποτελούν σημαντικό μέρος των εδαφικών οικοσυστημάτων καθώς συμμετέχουν σε ευρύ φάσμα λειτουργιών, που περιλαμβάνουν: (1) την απελευθέρωση θρεπτικών ουσιών από μέταλλα και οργανική ύλη με αποτέλεσμα τη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους, (2) το μετριασμό της κλιματικής αλλαγής μέσω της δέσμευσης της περίσσειας άνθρακα (Hemkemeyer *et al.*, 2021), (3) τη συμβολή στον κύκλο των θρεπτικών στοιχείων του εδάφους ειδικότερα του αζώτου και του φωσφόρου, (4) την αποτοξικοποίηση μετάλλων και την αποικοδόμηση φαρμακευτικών ουσιών, (5) την προώθηση της παραγωγικότητας και της ανάπτυξης των φυτών, καθώς και (6) το μετριασμό φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών (Schulze & Mooney, 2012; Jacoby *et al.*, 2017; Fox *et al.*, 2022).

1.3. Συμμετοχή των μικροοργανισμών του εδάφους στο βιογεωχημικό κύκλο του αζώτου

1.3.1. Κύκλος αζώτου

Το άζωτο (N_2) είναι ένα από τα τέσσερα πιο άφθονα κυτταρικά συστατικά και αποτελεί το κύριο στοιχείο των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων όλων των οργανισμών. Επιπλέον, το στοιχειακό άζωτο (N_2) αποτελεί το κυριότερο συστατικό της ατμόσφαιρας απαντώντας στην ατμόσφαιρα σε ποσοστό περίπου 80%, ωστόσο η αέρια αυτή μορφή του αζώτου είναι μη αφομοιώσιμη από την πλειονότητα των οργανισμών. Για να μπορέσει να απορροφηθεί, χρειάζεται να μετατραπεί σε αζωτούχες ενώσεις όπως: (1) η αμμωνία (NH_3) και (2) τα νιτρώδη (NO_2^-) ή (3) νιτρικά (NO_3^-) ιόντα. Οι παραπάνω μετατροπές πραγματοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά από τους μικροοργανισμούς μέσω μιας σειράς αντιδράσεων τεσσάρων σταδίων (Ζίφα *et al.*, 2011; Schulze & Mooney, 2012; Stein & Klotz, 2016), που ονομάζονται συνολικά κύκλος του αζώτου. Τα τέσσερα στάδια του κύκλου του αζώτου είναι:

(1) Αζωτοδέσμευση

Είναι το στάδιο κατά το οποίο ορισμένοι μικροοργανισμοί μετατρέπουν το άζωτο της ατμόσφαιρας σε αμμωνία και νιτρικά ιόντα. Οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί διακρίνονται σε βακτήρια ελεύθερα ζώντα στο έδαφος ή το νερό (κυανοβακτήρια και κυανοφύκη) και σε βακτήρια που συμβιώνουν με φυτά (*Rhizobium* sp. με ψυχανθή φυτά), τα οποία κωδικοποιούν το ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης.

(2) Αμμωνιοποίηση/ Ανοργανοποίηση

Είναι το στάδιο κατά το οποίο ενώσεις του αζώτου που υπάρχουν στο έδαφος ως προϊόντα της μεταβολικής δραστηριότητας ή των απεκκρίσεων των οργανισμών, διασπώνται προς αμμωνία με τη δράση υδρολυτικών ενζύμων των μικροοργανισμών του γένους *Azotobacter*.

(3) Νιτροποίηση

Είναι το στάδιο κατά το οποίο η αμμωνία που βρίσκεται στο έδαφος μετατρέπεται σε νιτρώδη και νιτρικά ιόντα. Πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια, όπου αρχικά η αμμωνία οξειδώνεται από νιτρωδοποιητικά βακτήρια και αρχαία σε νιτρώδη ιόντα (νιτρωδοποίηση), ενώ στη συνέχεια νιτρικοποιητικά βακτήρια μετατρέπουν τα νιτρώδη σε νιτρικά ιόντα (νιτρικοποίηση). Το 2015, η θεωρία της ‘’αρθρωτής νιτροποίησης’’ καταρρίφθηκε με την ανακάλυψη μιας ομάδας βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να επιτελούν και τα δύο στάδια της νιτροποίησης δηλαδή και τη νιτρωδοποίηση και τη νιτρικοποίηση και ονομάστηκαν comammox βακτήρια (Daims *et al*. 2015).

(4) Απονιτροποίηση

Το στάδιο αυτό συνδέεται άμεσα με την νιτροποίηση, καθώς τα νιτρικά ιόντα που παράγονται από την νιτροποίηση, ανάγονται σε στοιχειακό άζωτο, με τη συμμετοχή των μικροοργανισμών, υπό αναερόβιες συνθήκες, το οποίο στη συνέχεια απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα (Ζίφα *et al*., 2011; Stein & Klotz, 2016).

1.3.2. Νιτροποίηση

Η βιολογική οξείδωση της αμμωνίας συμβαίνει σε δύο διακριτά στάδια υπό αερόβιες συνθήκες:

Α. Νιτρωδοποίηση:

1. $NH_3 + O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow NH_2OH + H_2O$

2. $NH_2OH + H_2O \rightarrow HNO_2 + 4H^+ + 4e^-$

3. $2H+ + ½ O2 + 2e^- \rightarrow H_2O$

Σ. $NH_3 + {}_{3/2}\, O_2 \rightarrow NO_2^- + H^+ + H_2O$ $\Delta G^o = -287kJ$

Το (Α) στάδιο αποτελεί το καθοριστικό για την ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης (Ντούγιας *et al.*, 2012). Τα βακτήρια για να πραγματοποιήσουν τα επιμέρους στάδια των αντιδράσεων χρησιμοποιούν ποικιλία ενζυμικών συστημάτων. Η οξείδωση της αμμωνίας ή των αμμωνιακών ιόντων προς υδροξυλαμίνη γίνεται με τη δράση του ενζύμου της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO) από νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB), νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA), και βακτήρια comammox. Επιπλέον, η οξείδωση της υδροξυλαμίνης γίνεται με τη δράση του ενζύμου διυδροξυγενάση της υδροξυλαμίνης (HAO) από βακτήρια AOB και comammox (Heil *et al.*, 2016).

Β. Νιτρικοποίηση:

1. $NO_2^- + \frac{1}{2} O_2 \rightarrow NO_3^-$ $\Delta G^o = -76kJ$

Η διαδικασία της οξείδωσης των νιτρώδων προς νιτρικά γίνεται με τη δράση του ενζύμου, νιτρώδης οξειδοαναγωγάση (NXR) από νιτρικοποιητικά (NOB) και comammox βακτήρια (Heil *et al.*, 2016).

1.3.3. Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

1.3.3.1. Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)

Τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB), είναι υποχρεωτικά χημειολιθοαυτότροφοι μικροοργανισμοί. Είναι βακτήρια αερόβια, αρνητικά κατά Gram, ικανά να οξειδώνουν αμμωνία ως πηγή ενέργειας προς νιτρώδη με ενδιάμεσο βήμα την παραγωγή υδροξυλαμίνης. Συνολικά, έχουν χαρακτηριστεί πέντε γένη AOB τα οποία και ανήκουν στην συνωμοταξία των Πρωτεοβακτηρίων. Συγκεκριμένα, τέσσερα από αυτά ανήκουν στην ομοταξία των β-Πρωτεοβακτηρίων: 1) *Nitrosomonas*, 2) *Nitrosospira*, 3) *Nitrosovibrio* και 4) *Nitrosolobus*, ενώ τα AOB του γένους *Nitrosococcus* ανήκουν στην ομοταξία των γ-Πρωτεοβακτηρίων (Soliman & Eldyasti 2018). Πολλά διαθέτουν ένα ή περισσότερα μαστίγια για να κινούνται, ενώ διαθέτουν και ένα πολύπλοκο σύστημα μεμβρανών στο οποίο βρίσκεται και η AMO (Αγγελής, 2007; Schulze & Mooney, 2012).

Τα AOB απαντώνται σε πολλά περιβάλλοντα, χερσαία και υδατικά. Μερικά από τα είδη που απαντώνται συχνά σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι τα *Nitrosomonas europaea*, *Nitrosospira briensis*, *Nitrosococcus oceanus* και *Nitrosospira multiformis*, (Αγγελής, 2007). Στη φύση, ο ρυθμός ανάπτυξης των AOB ελέγχεται από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, τη θερμοκρασία, και το pH. Τα περισσότερα στελέχη αναπτύσσονται βέλτιστα σε συγκεντρώσεις υποστρώματος αμμωνιακών 1-25 mM, pH μεταξύ 7,5-8 και θερμοκρασία 25-30°C (Schulze & Mooney, 2012).

1.3.3.2. Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)

Τα νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA), είναι χημειολιθοαυτότροφοι μικροοργανισμοί που μπορούν να οξειδώνουν την αμμωνία προς νιτρικά ιόντα. Αρχικά το ένζυμο της AMO, θεωρούνταν ότι υπήρχε μόνο στα AOB. Μεταγονιδιωματικές μελέτες όμως αποκάλυψαν ότι τα αρχαία της συνωμοταξίας *Thaumarchaeota* κατέχουν επίσης γονίδια που ομοιάζουν με αυτά που κωδικοποιούν την AMO (*amoA*), και ευδοκιμούν σε θαλάσσια, και χερσαία οικοσυστήματα (Hayatsu *et al.*, 2008; Stahl & de la Torre, 2012).

Το πρώτο AOA που απομονώθηκε ήταν το *Nitrosopumilus maritimus*, ένας θαλάσσιος μικροοργανισμός στενά συγγενικός με τα θαλάσσια πλαγκτονικά αρχαία (Stahl & de la Torre, 2012). Τα AOA κατατάσσονται φυλογενετικά στην κλάση *Nitrososphaeria* που περιλαμβάνει τα *Nitrosocaldales*, *Nitrososphaerales, Nitrosotaleales* και *Nitrosopumilales*. AOA έχουν απομονωθεί από θαλάσσια, χερσαία, και γεωθερμικά περιβάλλοντα, σε ευρείες συνθήκες pH και θερμοκρασίας (Kim *et al.*, 2021).

Επί του παρόντος λίγα είναι γνωστά για τον μηχανισμό οξείδωσης της αμμωνίας στα αρχαία, καθώς παρότι τα AOA κατέχουν το ένζυμο AMO για την οξείδωση της αμμωνίας προς υδροξυλαμίνη, δεν κατέχουν το ένζυμο HAO για το δεύτερο στάδιο της αντίδρασης, δηλαδή για την οξείδωση της υδροξυλαμίνης προς νιτρώδη ιόντα (You *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2021). Πρόσφατες μελέτες πρωτεομικής έχουν αναδείξει πολυοξειδάσες χαλκού και F420-ένζυμα στα AOA τα οποία θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην οξείδωση της αμμωνίας ή της υδροξυλαμίνης, όπως και μια πιθανή τέταρτη υπομονάδα στην AMO των AOA (Tolar *et al.*, 2017; Hodgskiss *et al.*, 2023). Επιπλέον στοιχεία των τελευταίων χρόνων, καταδεικνύουν ότι το ένζυμο NirK-νιτρώδης οξειδοαναγωγάση, παράγει μονοξείδιο του αζώτου (NO) το οποίο φαίνεται να έχει κεντρικό ρόλο στην περαιτέρω οξείδωση της αμμωνίας στα AOA (Stahl & de la Torre, 2012; Tolar *et al.*, 2017).

1.3.3.3. Comammox

Τα βακτήρια Comammox (complete ammonia oxidation), αποτελούν μικροοργανισμούς του γένους *Nitrosospira* οι οποίοι ανακαλύφθηκαν το 2015, και μπορούν να πραγματοποιούν τη διαδικασία της νιτροποίησης σε ένα μόνο βήμα (Sakoula *et al*., 2021; Huang *et al*., 2022) και απαντώνται σε αφθονία και στο έδαφος αλλά και στα υδάτινα οικοσυστήματα. Τα βακτήρια αυτά βρέθηκε ότι κατέχουν όλα τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την νιτροποίηση, ήτοι AMO, HAO και NXR (Huang *et al*., 2022) και κατατάσσονται στο *Nitrospira* υπογεανολογική γραμμή (sublineage) II. Περαιτέρω φυλογενετικές αναλύσεις βασιζόμενες στο *amoA* γονίδιο, πρότειναν το διαχωρισμό των comammox βακτηρίων σε δύο ομάδες A και B (Sakoula *et al*., 2021).

1.3.3.4. Anammox

Τα βακτήρια anammox είναι αυτότροφοι μικροοργανισμοί που ανήκουν στο φύλο των *Planctomycetes* και μετατρέπουν συνδυαστικά την αμμωνία και τα νιτρώδη ιόντα σε αέριο άζωτο υπό αναερόβιες συνθήκες με τη δράση του ενζύμου διυδροξυγενάση της υδροξυλαμίνης HAO, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

$NH_4 + NO_2^- \rightarrow N_2 + 2H_2O$ (Hayatsu *et al*., 2008)

Τα βακτήρια anammox παίζουν σημαντικό ρόλο στο κύκλο του αζώτου, και συμβάλλουν σημαντικά στην απώλεια του αζώτου από το περιβάλλον του εδάφους. Μοριακές αναλύσεις έχουν αποκαλύψει ότι υπάρχουν σημαντικοί πληθυσμοί βακτηρίων anammox σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων, και σε υδάτινα οικοσυστήματα, όπου εντοπίστηκαν κυρίως τα γένη *Brocadia*, *Scalindua, Kuenenia* (Hayatsu *et al*., 2008), *Anammoxoglobus* και *Jettenia* (Zhao *et al*., 2022).

1.3.3.5. Νιτρικοποιητικά Βακτήρια (NOB)

Τα νιτρικοποιητικά βακτήρια (NOB) είναι χημειολιθοαυτότροφοι μικροοργανισμοί που καταλύουν το δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης, την νιτρικοποίηση όπου οξειδώνονται τα νιτρώδη προς νιτρικά ιόντα, με τη δράση του ενζύμου NXR (Daims *et al*., 2016).

Τα NOB είναι η λιγότερο μελετημένη ομάδα από τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στο κύκλο του αζώτου, καθώς υπήρχε η αντίληψη ότι χαρακτηρίζονται από περιορισμένη ποικιλότητα, αλλά και εξαιτίας της δύσκολης καλλιέργειας τους στο εργαστήριο (Daims et al., 2016; Park *et al*., 2020). Ο ρόλος τους όμως στο κύκλο του αζώτου είναι καθοριστικός, καθώς αποτελούν μικροοργανισμούς που συνδέουν τη δράση ανάμεσα στα βακτήρια AOB αλλά και στους απονιτροποιητικούς μικροοργανισμούς. Γενικά, τα NOB βρίσκονται παντού στο έδαφος, αλλά και σε υδάτινα περιβάλλοντα (υδατοσυλλογές γλυκού και αλμυρού νερού), όπου συμβιώνουν συνήθως με βακτήρια AOB, που τους παρέχουν την πηγή ενέργειας τους (νιτρώδη) (Abeliovich, 2006).

Το γένος *Nitrobacter* ήταν το πρώτο που ανακαλύφθηκε ότι είχε ρόλο κλειδί στο δεύτερο βήμα της διεργασίας της νιτροποίησης. Φυλογενετικά είναι σχετικά περιορισμένες οι ομάδες των βακτηρίων NOB που έχουν καταγραφεί οι οποίες περιλαμβάνουν τα γένη *Nitrobacter* και *Nitrospira* που ευδοκιμούν σε χερσαία περιβάλλοντα, καθώς και τα γένη *Nitrococcus* και *Nitrospina* σε θαλάσσια περιβάλλοντα. Ωστόσο βελτιώσεις στις πρακτικές καλλιέργειας των τελευταίων χρόνων, έχουν επεκτείνει τη γνωστή φυλογενετική ποικιλότητα των NOB με την προσθήκη των *Candidatus* Nitrotoga, *Nitrolancea*, και *Candidatus Nitromaritima* (Daims *et al*., 2016; Park *et al*., 2020).

1.4. Νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί ως μικροβιακοί δείκτες της τοξικότητας ξενοβιοτικών ουσιών

Οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί οι οποίοι καταλύουν το πρώτο βήμα στη διαδικασία της νιτροποίησης, δηλαδή την οξείδωση της αμμωνίας προς υδροξυλαμίνη, έχουν προταθεί ως ιδανικοί βιοδείκτες της τοξικότητας των ξενοβιοτικών ουσιών στο μικροβίωμα του εδάφους, λόγω:

(α) του σημαντικού οικολογικού ρόλου που κατέχουν στο κύκλο του αζώτου,

(β) της γενικότερης ευαισθησίας τους σε βιοτικούς και αβιοτικούς στρεσσογόνους παράγοντες,

(γ) της σημαντικής διαθέσιμης γνώσης σχετικά με τον κύκλο ζωής τους, τη βιοχημεία και τη φυσιολογία τους,

(δ) της διαθεσιμότητας αξιόπιστων και τυποποιημένων εργαλείων και μεθόδων για την μέτρηση της αφθονίας και της δραστηριότητας τους (Wessen & Hallin, 2011; Karpouzas *et al*., 2022; Lagos *et al*., 2023).

1.5. Νιτρωδοποιητικά βακτήρια (AOB) που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

1.5.1. *Nitrosospira multiformis*

Το *Nitrosospira multiformis* είναι ένα χημειολιθοαυτότροφο βακτήριο που χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα και ενέργειας CO_2 και αμμωνία (Watson et al., 1971). Ανήκει στα β-Πρωτεοβακτήρια (Τάξη *Nitrosomonadales*, Οικογένεια *Nitrosomonadaceae*). Απομονώθηκε πρώτη φορά από τους Watson et al., το 1971, από δείγματα εδάφους που ελήφθησαν από διαφορετικά μέρη ανά τον κόσμο, και επαναταξινομήθηκε αργότερα από τους Head et al. το 1993. Αποτελεί μικροοργανισμό αντιπροσωπευτικό του cluster 3 των *Nitrosospira* και κυριαρχεί στους φυσικούς εδαφικούς πληθυσμούς των AOB συνεισφέροντας σημαντικά στη διαδικασία της νιτρωδοποίησης στις αγροτικές καλλιέργειες (Garbeva *et al*., 2007; Shen *et al*., 2013).

1.5.2. *Nitrosomonas ureae*

Το *Nitrosomonas ureae* Nm10, είναι ένα ολιγότροφο αερόβιο νιτρωδοποιητικό βακτήριο, και ανήκει στα β-Πρωτεοβακτήρια (Τάξη *Nitrosomonadales*, Οικογένεια *Nitrosomonadaceae*). Το γένος *Nitrosomonas* συγκαταλέγεται ανάμεσα στα κυρίαρχα γένη των AOB στο έδαφος και το στέλεχος *N. ureae* είναι αντιπροσωπευτικό του cluster 6a των *Nitrosomonas* (Zorz *et al*., 2018). Απομονώθηκε πρώτη φορά στη Σαρδηνία (Ιταλία), από εδαφικό δείγμα. Το *N. ureae* χρησιμοποιεί ως πηγή ενέργειας την αμμωνία, την οποία οξειδώνει προς νιτρώδη ιόντα. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιήσει την ουρία ως εναλλακτική πηγή αζώτου και περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν την καρβοξυλάση της ουρίας (EC 6.3.4.6) (Kozlowski *et al.,* 2016).

1.6. Στόχος

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί τμήμα μια ευρύτερης προσπάθειας της ερευνητικής ομάδας του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος με στόχο την αξιολόγηση της επίδρασης επιλεγμένων συνθετικών ανθελμινθικών στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Στο πλαίσιο αυτό οι νιτρωδοποιητικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιήθηκαν ως κατάλληλοι μικροβιακοί δείκτες της οικοτοξικότητας των συγκεκριμένων φαρμάκων, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους (σημαντικός λειτουργικός ρόλος, ευαισθησία σε ξενοβιοτικές ουσίες, διαθεσιμότητα κατάλληλων ερευνητικών εργαλείων για τη μελέτη τους) που αναλύθηκαν διεξοδικά παραπάνω.

Κύριος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η *in vitro* αξιολόγηση της επίδρασης επιλεγμένων ανθελμινθικών της ομάδας των βενζιμιδαζολικών, όπως το ABZ και της ομάδα των μακροκυκλικών λακτονών όπως τα IVM και EPM στη λειτουργία δυο διακριτών, οικοφυσιολογικά και φυλογενετικά, στελεχών AOB, που αφθονούν σε εδαφικά περιβάλλοντα, όπως τα *Nitrosospira multiformis* και *Nitrosomonas ureae*. Παράλληλα μελετήθηκε η αποδόμηση των μελετούμενων ουσιών στις υγρές καλλιέργειες, προκειμένου να προσδιοριστεί η σταθερότητα τους, σε ασηπτικές, *in vitro* συνθήκες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Τα ανθελμινθικά φάρμακα και το εύρος των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των *in vitro* δοκιμών παρουσιάζονται στο Πίνακα 2.1.

Για κάθε στέλεχος βακτηρίου που μελετήθηκε, παρασκευάστηκε 2 L θρεπτικό μέσο Skinner & Walker (Skinner & Walker, 1961) το οποίο διατηρούνταν σε γυάλινα μπουκάλια Duran (5 L) στους 28^{o}C μια ημέρα πριν τον εμβολιασμό. Αφότου το μέσο έφτασε στην επιθυμητή θερμοκρασία έγινε εμβολιασμός με 1% (o/o) φρέσκιας καλλιέργειας των στελεχών στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Εν συνεχεία, στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, η καλλιέργεια των 2 L διανεμήθηκε σε επιμέρους Duran (100 mL), δημιουργώντας σειρά καλλιεργειών των 30 mL στις οποίες έγινε προσθήκη των επιλεγμένων φαρμάκων. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν τρείς βιολογικές επαναλήψεις. Επειδή τα ανθελμινθικά φάρμακα που μελετήθηκαν έχουν χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, η προσθήκη τους στις καλλιέργειες έγινε σε 0.17% (o/o) dimethyl sulfoxide (DMSO). Αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας των υπό μελέτη φαρμάκων σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις σε DMSO, το οποίο είχε αποστειρωθεί με τη χρήση φίλτρων διήθησης PTFE 0.22 mm. Ως μάρτυρες αναφοράς παρασκευάστηκαν καλλιέργειες με προσθήκη αντίστοιχου με τις μεταχειρίσεις όγκου DMSO.

Πίνακας 2.1: Συγκεντρώσεις των ανθελμινθικών που μελετήθηκαν.

Albendazole	Ricobendazole	Fenbendazole	Eprinomectin	Ivermectin
190 μM (50 mg L^{-1})	178 μM (50 mg L^{-1})	334 μM (100 mg L^{-1})	109 μM (100 mg L^{-1})	57 μM (50 mg L^{-1})
95 μM (25 mg L^{-1})	89 μM (25 mg L^{-1})	84 μM (25 mg L^{-1})	27 μM (25 mg L^{-1})	29 μM (25 mg L^{-1})
19 μM (5 mg L^{-1})	18 μM (5 mg L^{-1})	34 μM (10 mg L^{-1})	11 μM (10 mg L^{-1})	6 μM (5 mg L^{-1})
2 μM (0.5 mg L^{-1})	2 μM (0.5 mg L^{-1})	3.4 μM (1 mg L^{-1})	1.1 μM (1 mg L^{-1})	0.6 μM (0.5 mg L^{-1})

2.2. Καλλιέργεια νιτρωδοποιητικών βακτηρίων *in vitro*

Τα δύο νιτρωδοποιητικά στελέχη που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, *Nitrosospira multiformis*, και *Nitrosomonas ureae* αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες, αερόβια, χωρίς ανακίνηση, σε θρεπτικό μέσο Skinner and Walker (Skinner & Walker, 1961), υπό ασηπτικές συνθήκες. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 28°C στο σκοτάδι. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου αναφέρονται στον Πίνακα 2.2.

Το θρεπτικό μέσο περιείχε $NH4^{+}$ σε συγκέντρωση 1mM και phenol red ως δείκτη της τιμής του pH. Το pH του θρεπτικού μέσου ρυθμίστηκε σε τιμή περίπου 7.8 με την προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) 5%. Η διατήρηση της τιμής του pH στα παραπάνω επίπεδα διαπιστώνονταν οπτικά από το ελαφρύ ροζ χρώμα που εμφανίζει η υγρή καλλιέργεια. Εξαιτίας της παραγωγής νιτρωδών ιόντων το pH μειωνόταν και η επαναρύθμιση του πραγματοποιούνταν με προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος Na_2CO_3.

Πίνακας 2.2.: Υλικά και συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου Skinner & Walker.

Υλικά	Τελική Συγκέντρωση
$(NH_4)_2SO_4$	66 mg L^{-1}
KH_2PO_4	0.2 g L^{-1}
$CaCl_2\ 2H_2O$	40 mg L^{-1}
$MgSO_4\ 7H_2O$	40 mg L^{-1}
FeNaEDTA	1 ml L^{-1}
Phenol red (0.05%)	1 ml L-1
HEPES Buffer	1 ml L^{-1}
Na_2CO_3	3 ml L^{-1}

2.3. Μελέτη της επίδρασης των ανθελμινθικών στη λειτουργία των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων

Η επίδραση των ανθελμινθικών στη λειτουργία των υπό μελέτη στελεχών AOB ελέγχονταν ανά δώδεκα ώρες για 8 ημέρες, με χρωματομετρική μέτρηση των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων σε πλάκα μικροτιτλοδότησης (96-well plate). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την προσθήκη 100 μL δείγματος από τις καλλιέργειες στο κάθε πηγαδάκι της πλάκας, και στη συνέχεια μετά την προσθήκη 20 μL των αντιδραστηρίων diazotizing (0.5 g sulfanilamide σε 100 mL 2.4 M HCl) και coupling (0.3g N-(1-napthyl)-ethylenediamine HCl σε 100 mL 0.12 M HCl), γινόταν μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm σε microplate reader Varioskan LUX της Thermo-Fisher Scientific. Για τον υπολογισμό των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων από τις καλλιέργειες, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων $NaNO_2$ (0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 μM).

2.4. Μελέτη της σταθερότητας των ανθελμινθικών σε ασηπτικές, in vitro συνθήκες

Η σταθερότητα των ανθελμινθικών στις υγρές καλλιέργειες προσδιορίσθηκε με συλλογή και μέτρηση δειγμάτων κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των καλλιεργειών. Συγκεκριμένα η πρώτη συλλογή έγινε αμέσως μετά την προσθήκη των φαρμάκων, στην αρχή της λογαριθμικής φάσης (ημέρα 3), ενώ η δεύτερη συλλογή έγινε στο τέλος των πειραματικών μετρήσεων δηλαδή στην αρχή της φάσης στασιμότητας (ημέρα 8) που σηματοδοτούσε και το τέλος των πειραματικών μετρήσεων. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης HPLC: SHIMADZU LC-20AD εξοπλισμένο με ανιχνευτή UV/VIS PD, με στήλη SHIMADZU VP-ODs διαστάσεων 150 mm x 4.6 mm και προστήλη SHIMADZU GVP-ODs διαστάσεων 10 mm x 4.6 mm. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20 μL και ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 1 mL min^{-1}. Οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων προσδιορίστηκαν με τη χρήση πρότυπης καμπύλης γνωστής συγκέντρωσης των επιλεγμένων φαρμάκων. Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα μετά από προσθήκη των ανθελμινθικών φαρμάκων σε οργανικούς διαλύτες, ακετονιτρίλιο (ACN) για τα albendazole, ricobendazole, ivermectin, και μεθανόλη (MeOH) για τα fenbendazole και eprinomectin. Το εύρος των συγκεντρώσεων των πρότυπων διαλυμάτων που παρασκευάστηκαν ήταν 0.01-100 mg L^{-1}. Το albendazole και οι μεταβολίτες του (ricobendazole, albendazole sulfone) εντοπίστηκαν στα 205 και 220 nm αντίστοιχα. Η κινητή φάση αποτελούνταν από διάλυμα ακετονιτριλίου/φωσφορικού οξέος (0.1%), σε αναλογία 20:80. Ενώ τα fenbendazole, eprinomectin, και ivermectin, εντοπίστηκαν στα 245 nm, και η κινητή φάση αποτελούνταν, για το fenbendazole από διάλυμα ακετονιτριλίου/φωσφορικού οξέος σε αναλογία 35:65, και για τα eprinomectin/ivermectin από διάλυμα μεθανόλης/νερού σε αναλογία 85:15 και 90:10 αντίστοιχα. Οι συνθήκες της χρωματογραφικής ανάλυσης και οι χρόνοι έκλουσης των ανθελμινθικών φαρμάκων αναφέρονται στο Πίνακα 2.4. Τέλος, πριν την έναρξη του πειράματος, πραγματοποιήθηκε μελέτη ανάκτησης των φαρμάκων, με τη χρήση δύο διαφορετικών θρεπτικών μέσων, ενός όξινου (fresh water medium, pH= 5.2) και ενός βασικού (Skinner & Walker medium, pH= 7.8), σε τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης (εντός του εύρους των υπό μελέτη συγκεντρώσεων), με τρείς τύπους εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες (μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο) 1:2, 1:5, 1:10. Η ανάκτηση όλων των συγκεντρώσεων των φαρμάκων ήταν > 80% (Πίνακας 2.5).

Πίνακας 2.4: Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης των υπό μελέτη ανθελμινθικών φαρμάκων.

Ανθελμινθικά Φάρμακα	**Κινητή φάση**	**Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης**	**Μήκος κύματος (nm)**	**Χρόνος έκλουσης (min)**
Albendazole	ACN:H_3PO_4 (0.1%)	20:80	205	22.7
Albendazole sulfone	ACN:H_3PO_4 (0.1%)	20:80	220	19.3
Ricobendazole	ACN:H_3PO_4 (0.1%)	20:80	220	4.5
Fenbendazole	ACN:H_3PO_4 (0.1%)	35:65	245	9.1
Eprinomectin	MeOH:H_2O	85:15	245	11.3
Ivermectin	MeOH:H_2O	90:10	245	8.5

Πίνακας 2.5: Μέθοδος εκχύλισης των υπό μελέτη ανθελμινθικών φαρμάκων.

Ανθελμινθικά φάρμακα	**Συγκέντρωση**	**Μέθοδος εκχύλισης**
Albendazole	190 μM (50 mg L^{-1})	1:10
	95 μM (25 mg L^{-1})	1:10
	19 μM (5 mg L^{-1})	1:2

	2 μM (0.5 mg L^{-1})	1:2
Ricobendazole	178 μM (50 mg L^{-1})	1:10
	89 μM (25 mg L^{-1})	1:10
	18 μM (5 mg L^{-1})	1:2
	2 μM (0.5 mg L^{-1})	1:2
Fenbendazole	334 μM (100 mg L^{-1})	1:10
	84 μM (25 mg L^{-1})	1:10
	34 μM (10 mg L^{-1})	1:10
	3.4 μM (1 mg L^{-1})	1:10
Eprinomectin	109 μM (100 mg L^{-1})	1:10
	27 μM (25 mg L^{-1})	1:10
	11 μM (10 mg L^{-1})	1:10
	1.1 μM (1 mg L^{-1})	1:2
Ivermectin	57 μM (50 mg L^{-1})	1:10
	29 μM (25 mg L^{-1})	1:10
	6 μM (5 mg L^{-1})	1:10
	0.6 μM (0.5 mg L^{-1})	1:2

2.5. Μελέτη της επίδρασης των ανθελμινθικών eprinomectin και ivermectin στην αφθονία του γονιδίου amoA του νιτρωδοποιητικού βακτηρίου *Nitrosospira multiformis* (qPCR)

Επειδή κατά τη διάρκεια της μελέτης επίδρασης των ανθελμινθικών φαρμάκων στη λειτουργία του στελέχους *N.multiformis*, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παραγωγή νιτρωδών ιόντων στις καλλιέργειες που είχαν προστεθεί τα φάρμακα eprinomectin και ivermectin σε σύγκριση με τον μάρτυρα, διερευνήθηκε παράλληλα η επίδραση τους στην αφθονία του γονιδίου *amoA* του AOB στελέχους σε σύγκριση με τις επαναλήψεις του μάρτυρα με τη χρήση qPCR πραγματικού χρόνου.

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα όγκου 2 mL από τις υγρές καλλιέργειες, τα οποία συλλέχθηκαν στην αρχή της φάσης στασιμότητας (ημέρα 8), από τις βιολογικές επαναλήψεις του μάρτυρα, και από τις επαναλήψεις των δύο μεγαλύτερων συγκεντρώσεων των φαρμάκων eprinomectin (25 και 100 mg L^{-1}) και ivermectin (25 και 50 mg L^{-1}). Η εξαγωγή του DNA από τα δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού κιτ ‘Tissue DNA Extraction kit’ (Macherey-Nagel, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η ποσοτικοποίηση του γονιδίου *amoA*, πραγματοποιήθηκε σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System.

Για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* του AOB *N. multiformis*, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές amoA-1F (5’-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3’) και amoA-2R [(5’-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3’) K = G ή T, S = G ή C] (Rotthauwe *et al*., 1997). Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR ήταν: 95°C για 3 min, και για 40 κύκλους: 95°C για 5 sec, 57°C για 10 sec, και 72 °C για 30 sec. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 10 μL. Τα επιμέρους αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στο Πίνακα 2.6.

Για την ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων των λειτουργικών γονιδίων του *N. multiformis* στα επιμέρους δείγματα, χρησιμοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς με τη χρήση αραιώσεων 10^9-10^1 πυκνού ανασυνδιασμένου πλασμιδίου γνωστής συγκέντρωσης που περιείχε το γονίδιο στόχο. Τέλος, η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης της qPCR ήταν 82.3% με τιμή r^2 0.99.

Πίνακας 2.6. *Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση τμήματος του amoA γονιδίου των AOB.*

Master mix	Όγκος (μL)	Τελική Συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5	1x
amoA-1F (20 pmol μL^{-1})	0.1	0.2μM
amoA-2R (20 pmol μL^{-1})	0.1	0.2μM
BSA (20μg μL^{-1})	0.2	400ng μL^{-1}
ddH_2O	2.6	-
DNA	2	-
Συνολικός όγκος	**10μL**	-

2.6. Στατιστική ανάλυση των δεδομένων και υπολογισμός των τιμών EC_{50}

Τα δεδομένα από τις μετρήσεις παραγωγής νιτρωδών ιόντων υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης δυο παραγόντων (two-way-ANOVA) με τη χρήση του στατιστικού πακέτου IBM SPSS v.29, για την εκτίμηση της επίδρασης της μεταχείρισης, του χρόνου και/ή της αλληλεπίδρασής τους. Στις περιπτώσεις που παρατηρήθηκαν σημαντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο κύριων παραγόντων ($p < 0.05$) χρησιμοποιήθηκε το Tuckey's post-hoc test προκειμένου να ανιχνευθούν σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιμέρους μεταχειρίσεων σε κάθε χρόνο χωριστά.

Τέλος πραγματοποιήθηκε υπολογισμός των τιμών EC_{50}, δηλαδή της μέσης συγκέντρωσης του κάθε ανθελμινθικού φαρμάκου που δύναται να προκαλέσει μείωση της δραστηριότητας (συσσώρευση νιτρωδών) των AOB κατά 50%. Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο δόσης-απόκρισης, με κανονικοποιημένα δεδομένα όπου οι τιμές συγκέντρωσης των νιτρωδών ιόντων διαιρέθηκαν με τη μέση τιμή των τιμών του αντίστοιχου μάρτυρα. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού R και το πακέτο καμπυλών δόσης-απόκρισης v3.0-1. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε μια εμπειρική προσέγγιση μοντελοποίησης για την επιλογή του καλύτερου μοντέλου προσαρμογής σύμφωνα με τους δείκτες καλής προσαρμογής, ακολουθούμενη από το log-logistic μοντέλο τεσσάρων παραμέτρων ως τον καλύτερο συμβιβασμό μεταξύ των δοκιμασμένων μοντέλων για τη σύγκριση τιμών τελικού σημείου (Papadopoulou *et al*., 2020).

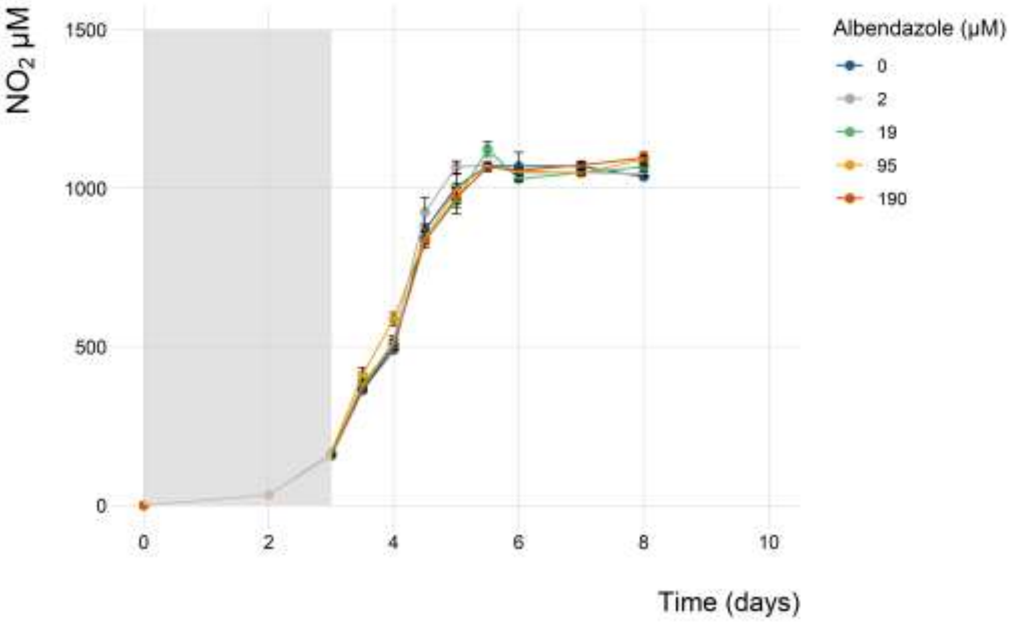
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Επίδραση των ανθελμινθικών στη λειτουργία του νιτρωδοποιητικού βακτηρίου *Nitrosospira multiformis*

Τα αποτελέσματα της επίδρασης των ανθελμινθικών στη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis* παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.1.1 (α, β, γ) και 3.1.2 (α, β, γ), ανά ανθελμινθικό, και ανά κατηγορία ανθελμινθικών συγκεντρωτικά.

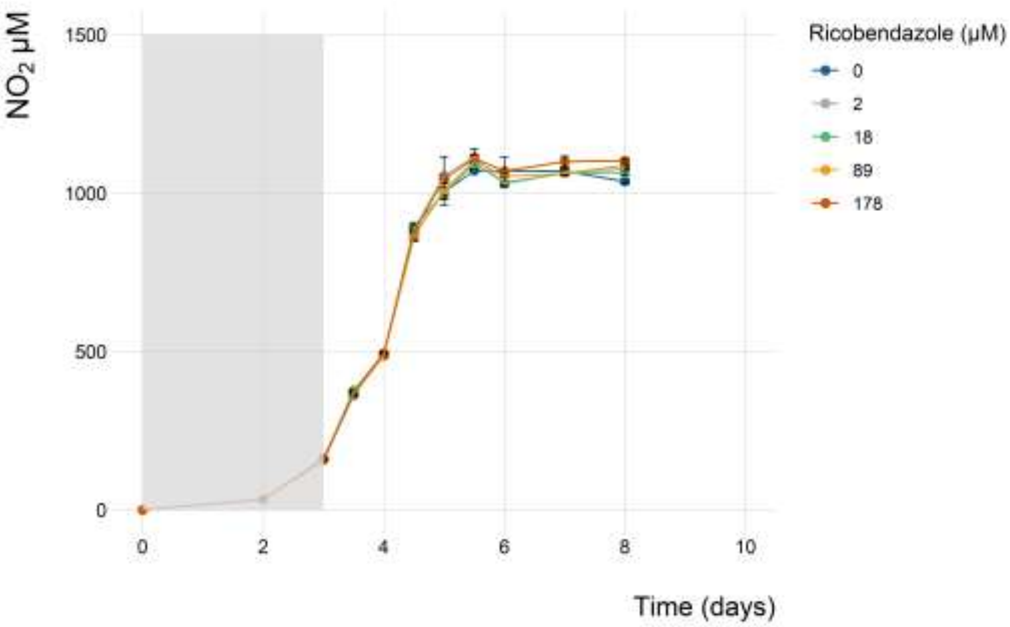
Βενζιμιδαζόλες

α)

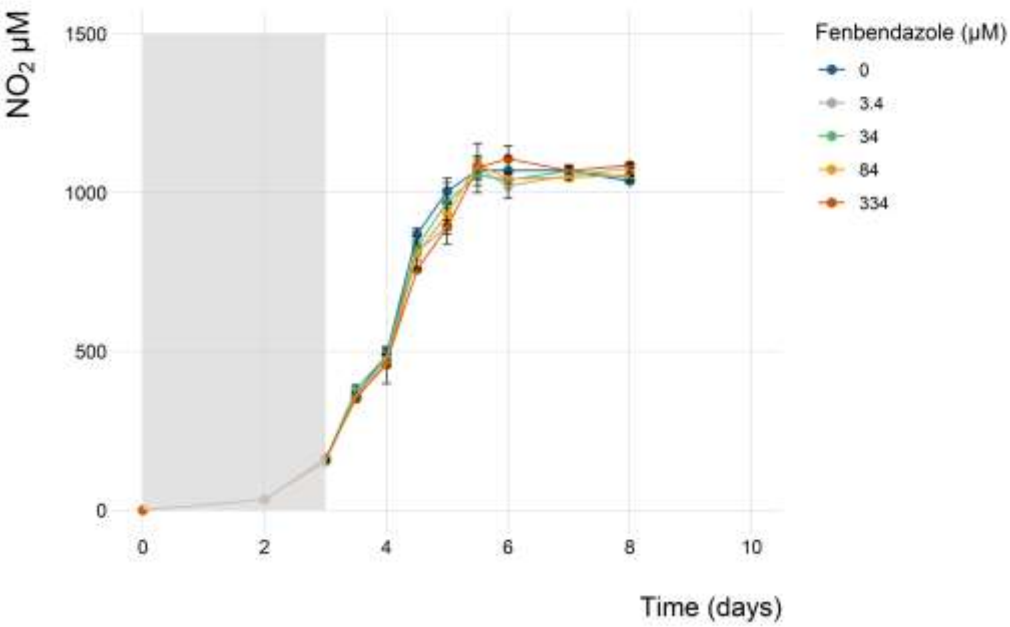


NO_2 μM
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
Time (days)
Albendazole (μM)
0
2
19
95
190

β)



γ)



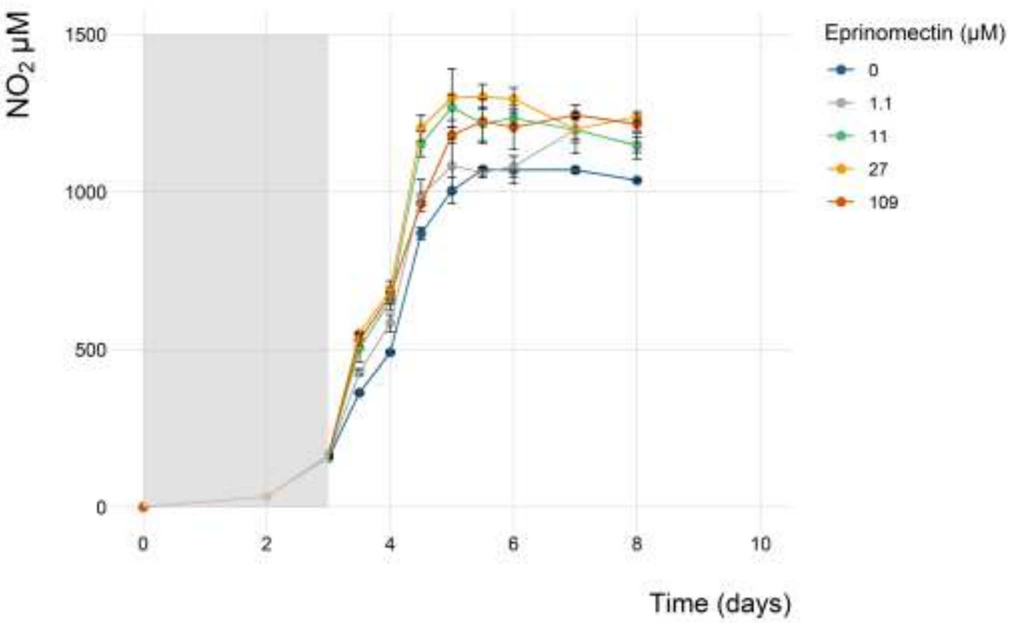
Διάγραμμα 3.1.1. *Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων των βενζιμιδαζολικών (α) albendazole, (β) ricobendazole και (γ) fenbendazole στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του N. multiformis. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Το γκρι πλαίσιο καταδεικνύει το χρόνο στον οποίο τα φάρμακα προστέθηκαν στην υγρή καλλιέργεια.*

Τα βενζιμιδαζολικά ανθελμινθικά albendazole και fenbendazole δεν επηρέασαν τη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*, σε σύγκριση με τον μάρτυρα (DMSO), στο εύρος των μελετούμενων συγκεντρώσεων (έως

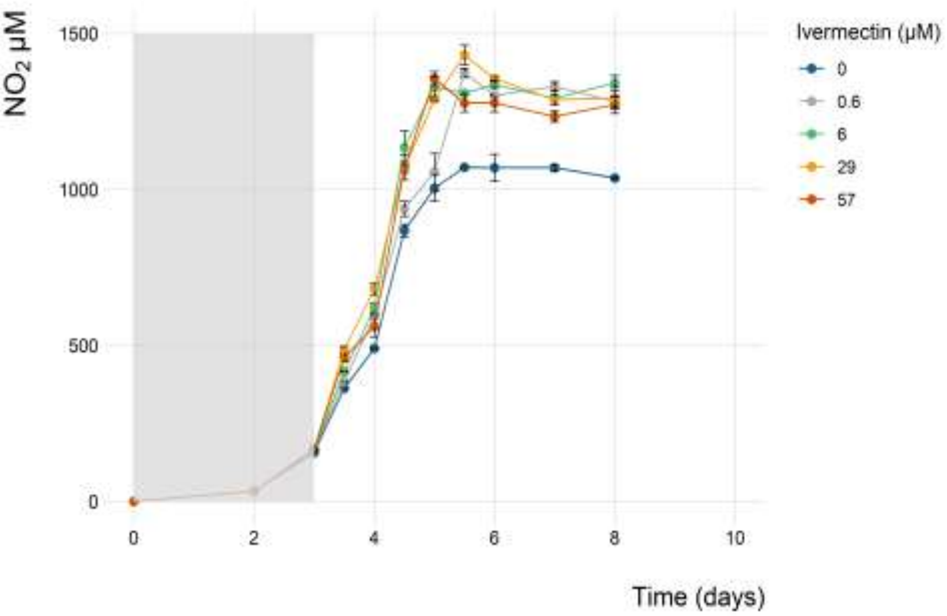
190 μM και 334 μM για albendazole και fenbendazole, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 3.1.1 α και γ). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και για τον κύριο μεταβολίτη του albendazole, ricobendazole, ο οποίος δεν φάνηκε να επηρεάζει τη παραγωγή νιτρωδών ιόντων από το *N.multiformis* ακόμα και στην υψηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε (178 μM) (Διάγραμμα 3.1.1 β).

Μακροκυκλικές Λακτόνες

α)



β)



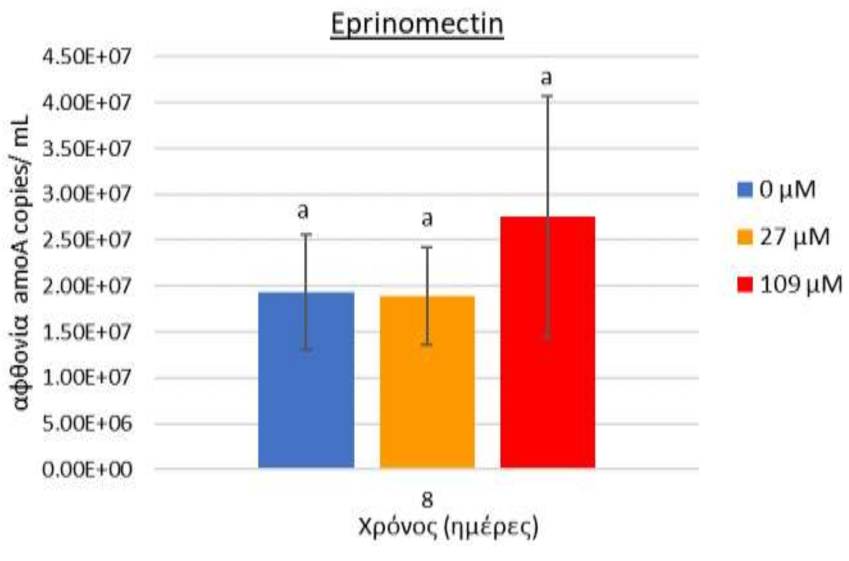
Διάγραμμα 3.1.2. *Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων μακροκυκλικών λακτονών (α) eprinomectin και (β) ivermectin στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων*

στις υγρές καλλιέργειες του N. multiformis. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Το γκρι πλαίσιο καταδεικνύει το χρόνο στον οποίο τα φάρμακα προστέθηκαν στην υγρή καλλιέργεια.

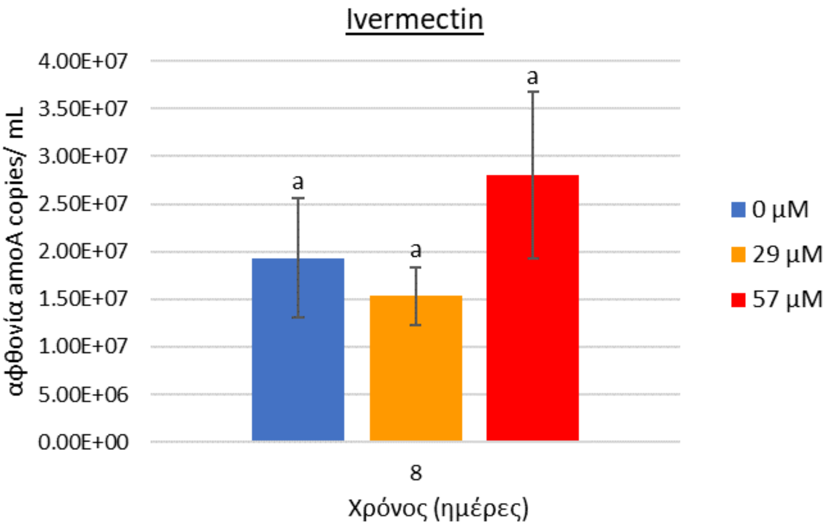
Οι μακροκυκλικές λακτόνες eprinomectin και ivermectin, δεν προκάλεσαν σημαντική μείωση της παραγωγής των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis*, ακόμα και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 109 μM και 57 μM, που δοκιμάστηκαν, αντίστοιχα. Αντίθετα, και τα δύο ανθελμινθικά φαίνεται να προκάλεσαν αύξηση στη παραγωγή των νιτρωδών ιόντων σε σύγκριση με τον μάρτυρα (DMSO). Αναλυτικότερα στη περίπτωση του eprinomectin δεν παρατηρήθηκε συγκεκριμένο πρότυπο στην αύξηση της παραγωγής νιτρωδών ιόντων ανάλογα με την συγκέντρωση του φαρμάκου. Σε ορισμένες δειγματοληψίες η αύξηση ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Διάγραμμα 3.1.2 α). Επιπλέον στις καλλιέργειες όπου εφαρμόστηκε το ivermectin, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p < 0.05$) στη παραγωγή νιτρωδών ιόντων σε σύγκριση με το μάρτυρα, σε όλες τις συγκεντρώσεις του φαρμάκου από την 5η έως και την 8η ημέρα των βιοδοκιμών (Διάγραμμα 3.1.2 β).

3.2. Επίδραση των eprinomectin και ivermectin στην αφθονία του γονιδίου amoA του νιτρωδοποιητικού βακτηρίου *Nitrosospira multiformis*

α)



β)



Διάγραμμα 3.2.1. *Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων των μακροκυκλικών λακτονών eprinomectin (α) και ivermectin (β) στην αύξηση του AOB στελέχους N.multiformis μέσω μέτρησης της αφθονίας του γονιδίου amoA. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές (p < 0 ,05) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.*

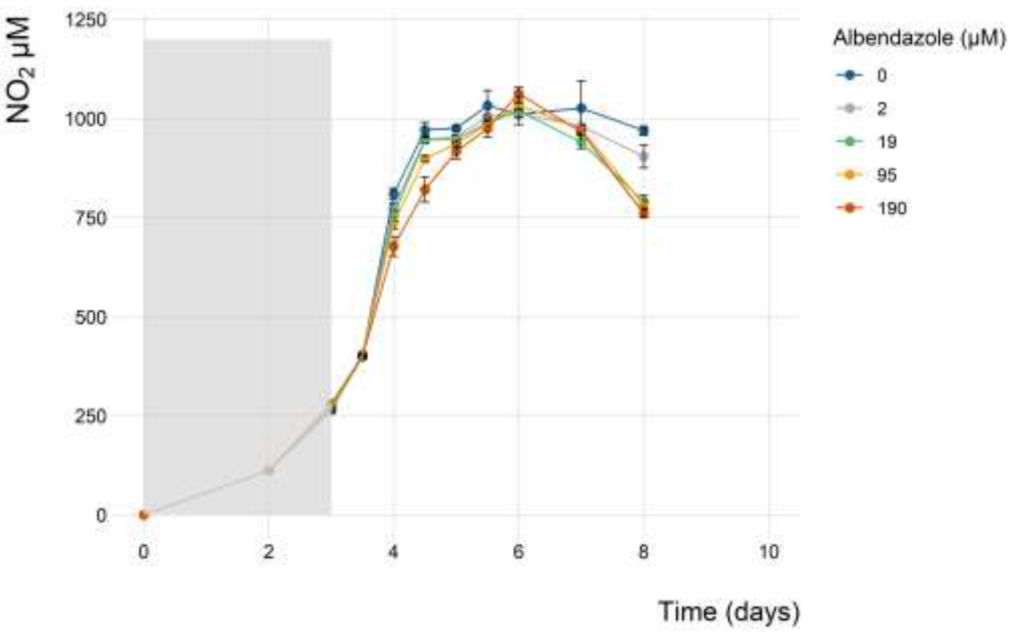
Σε συγκεντρώσεις ≥ 27 μΜ και ≥ 57 μΜ τα eprinomectin και ivermectin, αντίστοιχα, δεν επηρέασαν σημαντικά ($p > 0.05$) την αύξηση του στελέχους *N. multiformis* σε σύγκριση με τον μάρτυρα DMSO (Διάγραμμα 3.2.1).

3.3. Επίδραση των ανθελμινθικών στη λειτουργία του νιτρωδοποιητικού βακτηρίου *Nitrosomonas ureae*

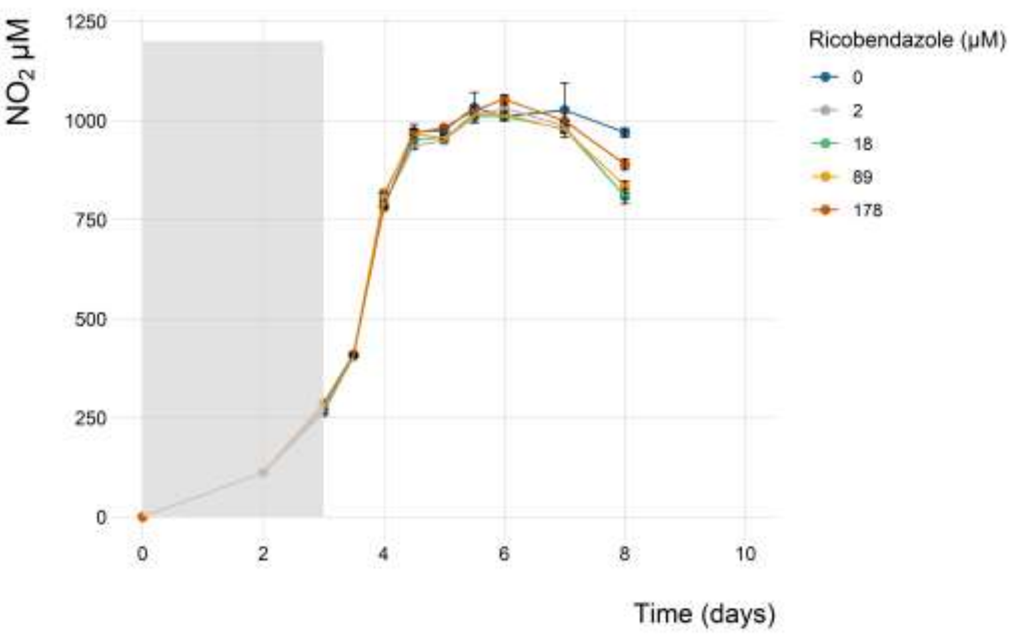
Τα αποτελέσματα της επίδρασης των ανθελμινθικών στη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. ureae* παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3.3.1 (α, β, γ) και 3.3.2 (α, β, γ), ανά ανθελμινθικό και ανά κατηγορία ανθελμινθικών συγκεντρωτικά.

Βενζιμιδαζόλες

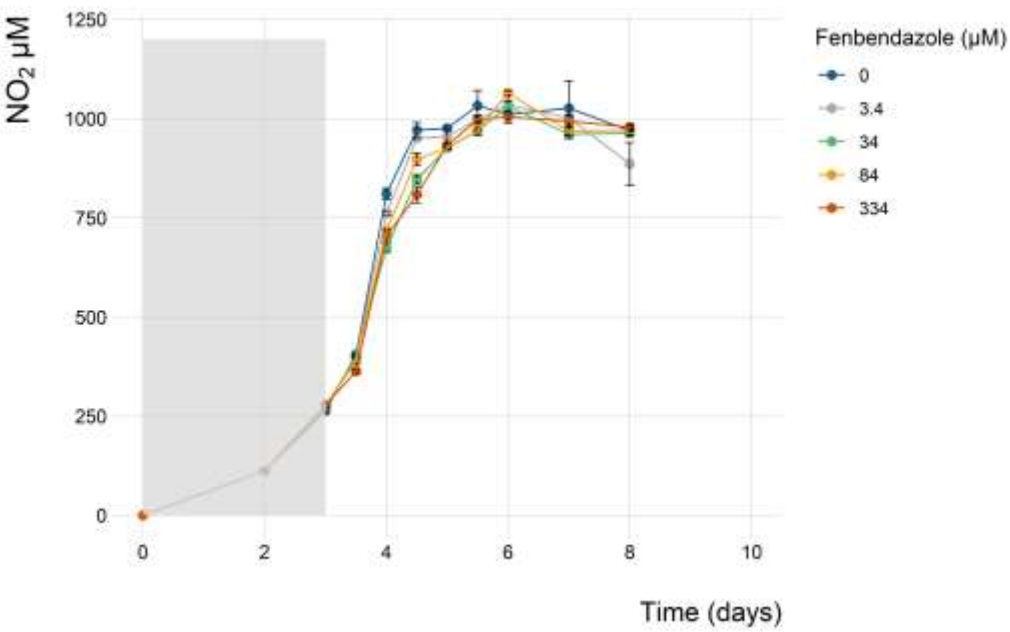
α)


NO2 µM
1250
1000
750
500
250
0
0
2
4
6
8
10
Time (days)
Albendazole (µM)
0
2
19
95
190

β)


NO2 µM
1250
1000
750
500
250
0
0
2
4
6
8
10
Time (days)
Ricobendazole (µM)
0
2
18
89
178

γ)

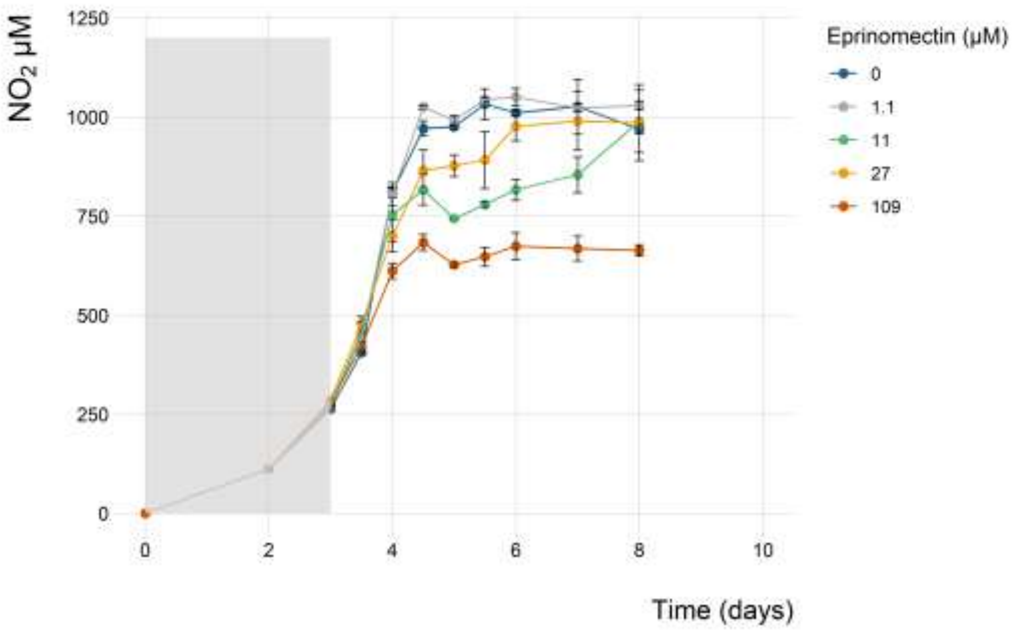


Διάγραμμα 3.3.1. *Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων βενζιμιδαζολών (α) albendazole (β) ricobendazole (γ) fenbendazole στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του N. ureae. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Το γκρι πλαίσιο καταδεικνύει το χρόνο στον οποίο τα φάρμακα προστέθηκαν στην υγρή καλλιέργεια.*

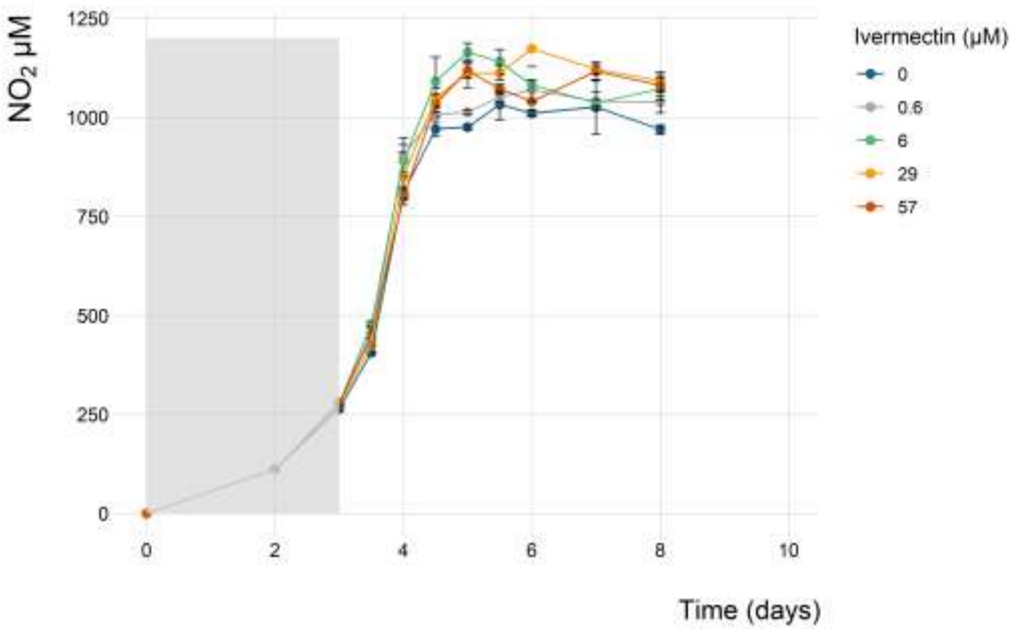
Το albendazole σε συγκεντρώσεις έως και 190 μM ελάχιστα επηρέασε τη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. ureae*, σε σύγκριση με τον μάρτυρα (DMSO) (Διάγραμμα 3.3.1α). Πιο αναλυτικά, στις αρχικές δειγματοληψίες των ημερών 4 και 5, υπήρξε μια δοσοεξαρτώμενη μείωση της παραγωγής των νιτρωδών ιόντων η οποία ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) σε σύγκριση με τον μάρτυρα για τις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν, 84 και 334 μM. Στη συνέχεια των δειγματοληψιών ωστόσο, παρατηρήθηκε ανάκαμψη και εξισορρόπηση στην παραγωγή νιτρωδών ιόντων μεταξύ των αντίστοιχων μεταχειρίσεων και του μάρτυρα. Σε αντιστοιχία με το albendazole, ο μεταβολίτης του ricobendazole, δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή νιτρωδών ιόντων από το *N.ureae* μετά την εφαρμογή του στις υγρές καλλιέργειες σε συγκεντρώσεις έως 178 μM καθ’ όλη τη διάρκεια των βιοδοκιμών (Διάγραμμα 3.3.1 β). Παρόμοια με του albendazole ήταν και τα αποτελέσματα του fenbendazole, όπου ενώ στις αρχικές δειγματοληψίες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p <0.05$) μείωση στη παραγωγή νιτρωδών ιόντων σε σύγκριση με τον μάρτυρα (δειγματοληψίες ημερών 4 και 5) σε συγκεντρώσεις ≥ 34 μΜ, στις επόμενες δειγματοληψίες, παρατηρήθηκε ανάκαμψη στα επίπεδα συσσώρευσης νιτρωδών ιόντων (Διάγραμμα 3.3.1 γ).

Μακροκυκλικές Λακτόνες

α)



β)



Διάγραμμα 3.3.2 *Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων μακροκυκλικών λακτονών (α) eprinomectin και (β) ivermectin στη συσσώρευση των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του N. ureae. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό*

σφάλμα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Το γκρι πλαίσιο καταδεικνύει το χρόνο στον οποίο τα φάρμακα προστέθηκαν στην υγρή καλλιέργεια.

Το eprinomectin προκάλεσε σημαντική μείωση ($p < 0.05$) της παραγωγής των νιτρωδών ιόντων στις υγρές καλλιέργειες του *N. ureae*, στις συγκεντρώσεις των 11μΜ και 109 μΜ σε σύγκριση με τον μάρτυρα DMSO. Αναλυτικότερα, στη συγκέντρωση 11 μΜ παρατηρήθηκε προσωρινή σημαντική μείωση ($p < 0.05$) της συσσώρευσης των νιτρωδών ιόντων στις δειγματοληψίες των ημερών 4.5-6, ενώ στις δειγματοληψίες των ημερών 7 και 8, η διαφορά στη παραγωγή νιτρωδών ιόντων ήταν μη σημαντική σε σύγκριση με τον μάρτυρα DMSO. Αντίθετα, στη συγκέντρωση 27 μΜ δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη παραγωγή νιτρωδών ιόντων σε σύγκριση με τον μάρτυρα σε όλη τη διάρκεια των δειγματοληψιών. Τέλος, στη μέγιστη συγκέντρωση που μελετήθηκε (109 μΜ), εμφανίσθηκε σημαντική μείωση στην παραγωγή νιτρωδών ιόντων σε σύγκριση με τον μάρτυρα DMSO καθ' όλη τη διάρκεια των βιοδοκιμών (Διάγραμμα 3.3.2 α). Αντίθετα ήταν τα αποτελέσματα για το ivermectin το οποίο δεν προκάλεσε σημαντική μείωση στην παραγωγή νιτρωδών ιόντων από το AOB στέλεχος *N.ureae* στο εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν (έως και 57 μΜ) (Διάγραμμα 3.3.2 β).

Συγκεντρωτικά οι μέσες τιμές EC_{50} (μΜ) για τα ανθελμινθικά και τα AOB στελέχη που μελετήθηκαν δίνονται στον Πίνακα 3.3.

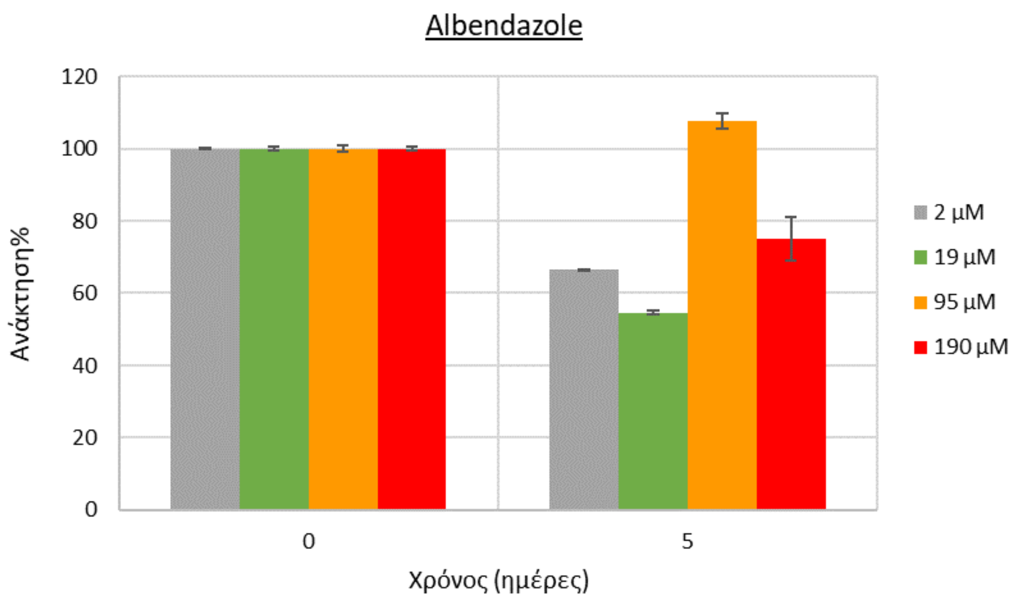
Πίνακας 3.3. *Μέσες τιμές EC_{50} (μΜ) για τα ανθελμινθικά φάρμακα που μελετήθηκαν. Τα τυπικά σφάλματα των μέσων όρων των τιμών αναφέρονται σε παρένθεση. Ο αστερίσκος καταδεικνύει τη μέγιστη συγκέντρωση που μελετήθηκε και υποδηλώνει τις περιπτώσεις όπου δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός των EC_{50} τιμών από τη στατιστική ανάλυση.*

	Ανθελμινθικό Φάρμακο	***Nitrosospira multiformis***	***Nitrosomonas ureae***
Βενζιμιδαζόλες	**Albendazole**	>190*	>190*
	Ricobendazole	>178*	>178*
	Fenbendazole	>334*	>334*
Μακροκυκλικές Λακτόνες	**Eprinomectin**	>109*	9.72 (± 0.22)
	Ivermectin	>57*	>57*

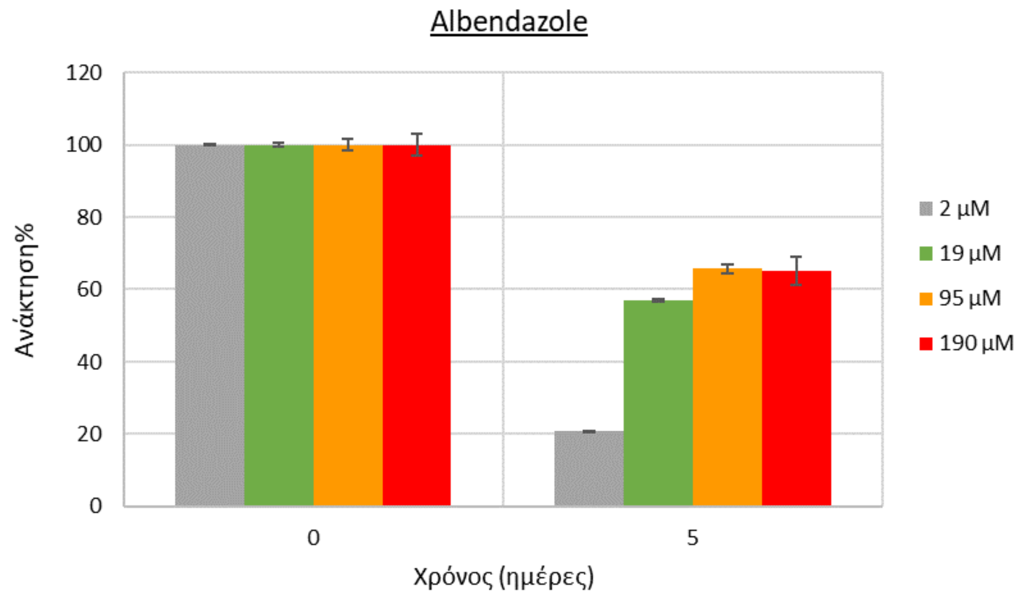
3.4. Σταθερότητα των ανθελμινθικών στις υγρές καλλιέργειες των στελεχών AOB

Στα Διαγράμματα 3.4.1-3.4.5, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της HPLC ανάλυσης σχετικά με την μελέτη της αποδόμησης των επιλεγμένων ανθελμινθικών, που πραγματοποιήθηκε για την παρακολούθηση της σταθερότητας τους στις υγρές καλλιέργειες των υπό μελέτη στελεχών AOB.

α)



β)

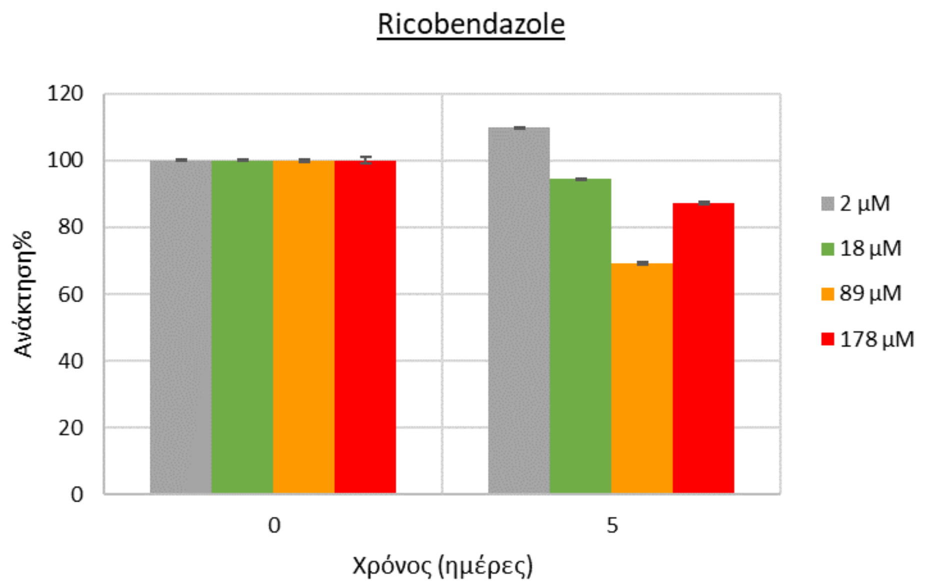


Διάγραμμα 3.4.1. *Αποδόμηση του albendazole στις υγρές καλλιέργειες των AOB N.multiformis (α) και N.ureae (β). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων.*

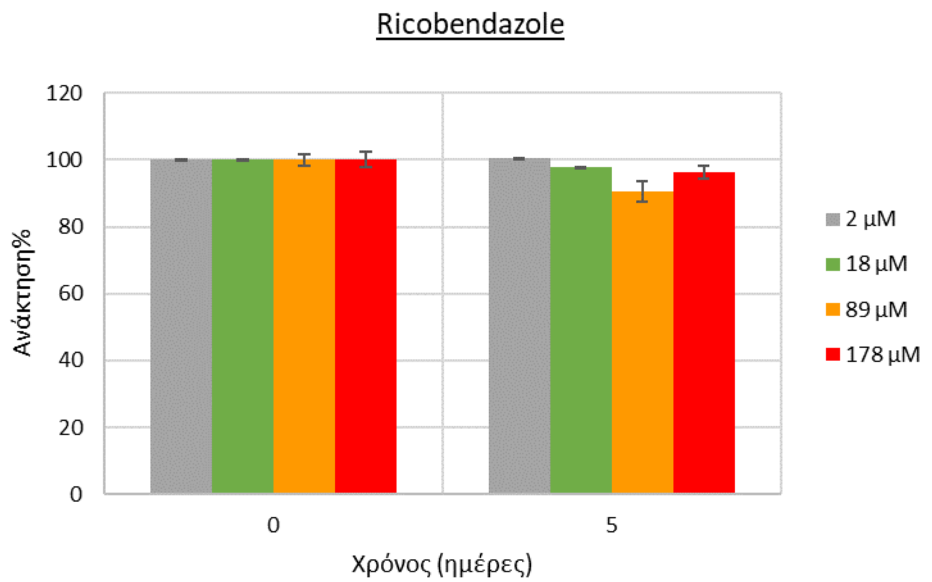
Η ανάκτηση του albendazole, από τις υγρές καλλιέργειες του στελέχους *N. multiformis* στις υπό μελέτη συγκεντρώσεις, κυμάνθηκε από 54 έως 107%, 5 ημέρες μετά την προσθήκη του στις καλλιέργειες (Διάγραμμα 3.4.1α). Συγκεκριμένα στις συγκεντρώσεις 2 και 19 μM παρατηρήθηκε αποδόμηση 33.6% και 45.3% αντίστοιχα, ενώ για την συγκέντρωση 95 μM δεν παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση. Τέλος στη συγκέντρωση των 190 μM παρατηρήθηκε περίπου 25% αποδόμηση.

Ελαφρώς διαφοροποιημένο εμφανίστηκε το μοτίβο αποδόμησης του albendazole, στις υγρές καλλιέργειες του *N. ureae*, με την ανάκτηση του να κυμαίνεται από 20 έως 75%, 5 ημέρες μετά την προσθήκη στις καλλιέργειες. Συγκεκριμένα, σημαντική αποδόμηση παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις 2 και 19 μM με τιμές 79.2 και 43%, αντίστοιχα, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά αποδόμησης για τις συγκεντρώσεις των 95 και 190 μM ήταν 34.3 και 34.8%, αντίστοιχα (Διάγραμμα 3.4.1β).

α)



β)

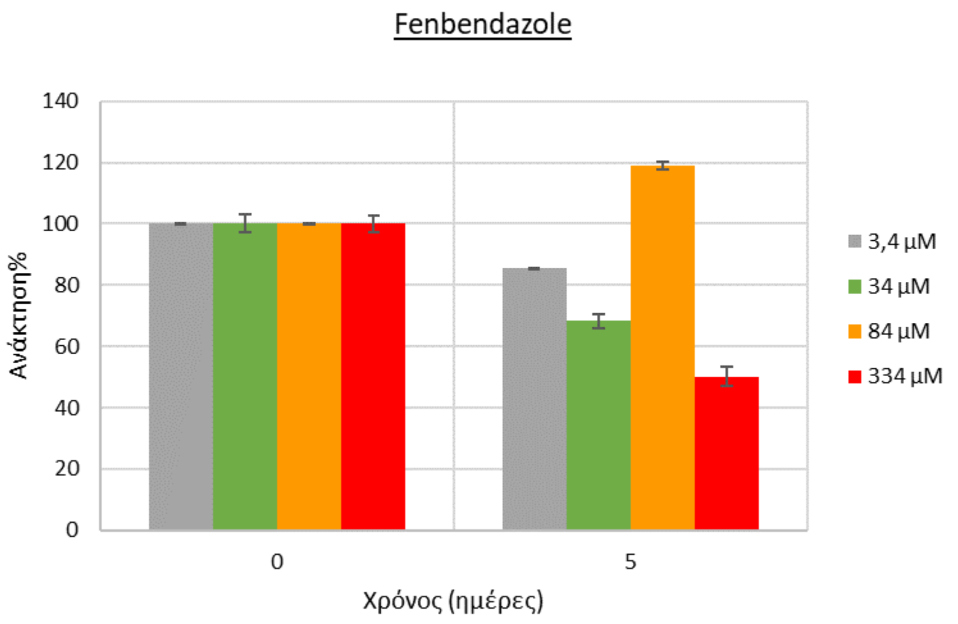


Διάγραμμα 3.4.2. *Αποδόμηση του ricobendazole στις υγρές καλλιέργειες των AOB N.multiformis (α) και N.ureae (β). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων.*

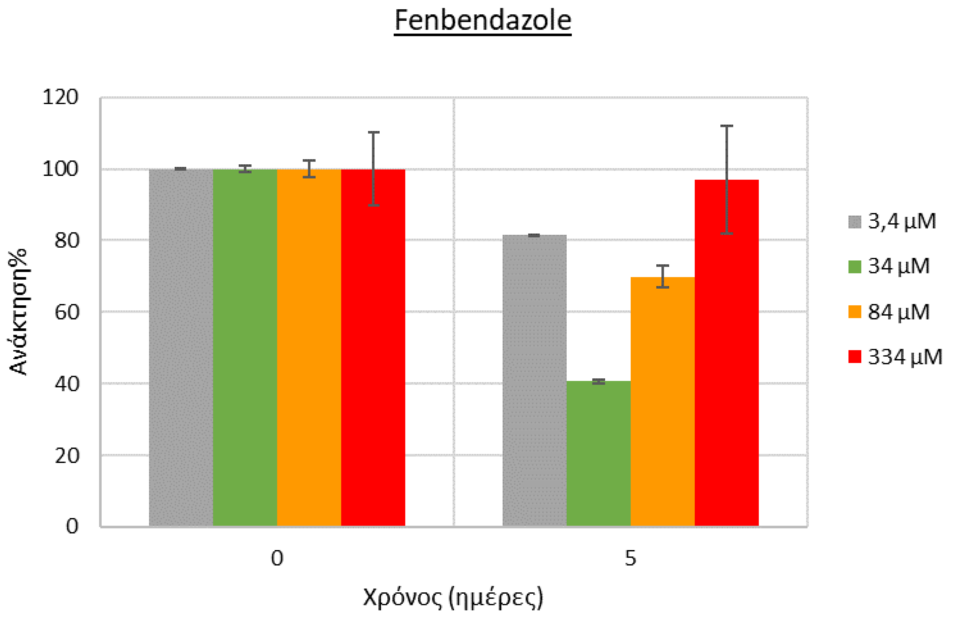
Η ανάκτηση του ricobendazole από τις υγρές καλλιέργειες του *N. multiformis* και *N. ureae*, 5 ημέρες μετά την προσθήκη του στις καλλιέργειες κυμάνθηκε μεταξύ 69-109% και 90-100%, αντίστοιχα. Αναλυτικότερα, στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 2 μM και 18 μM δεν παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση του ricobendazole στις καλλιέργειες και των δυο στελεχών AOB, ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των 89 και 178 μM μεγαλύτερη αποδόμηση παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες του *N.*

multiformis (31 και 12.6%, αντίστοιχα) συγκριτικά με τις αντίστοιχες για το *N. ureae* (9 και 3.7%, αντίστοιχα) (Διάγραμμα 3.4.2).

α)



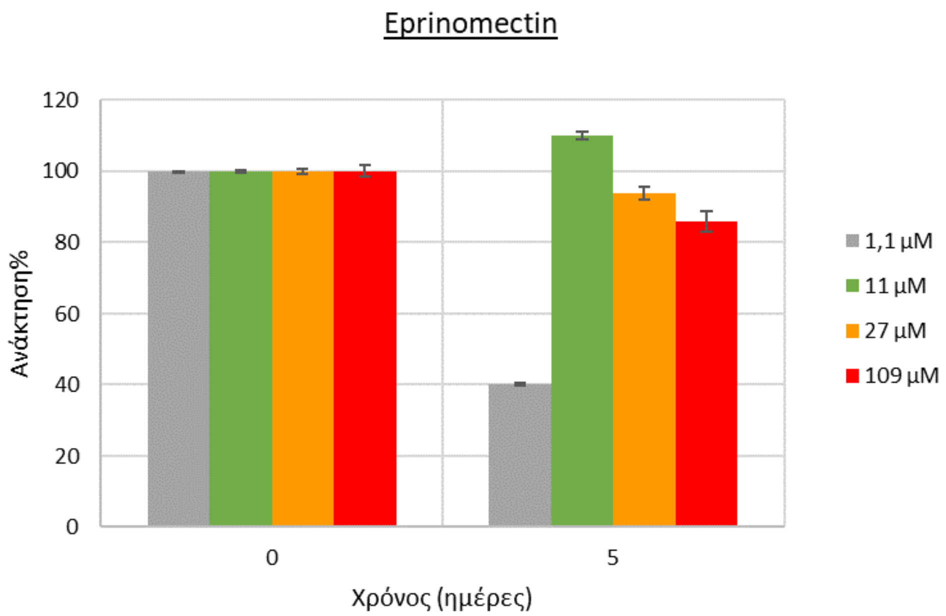
β)



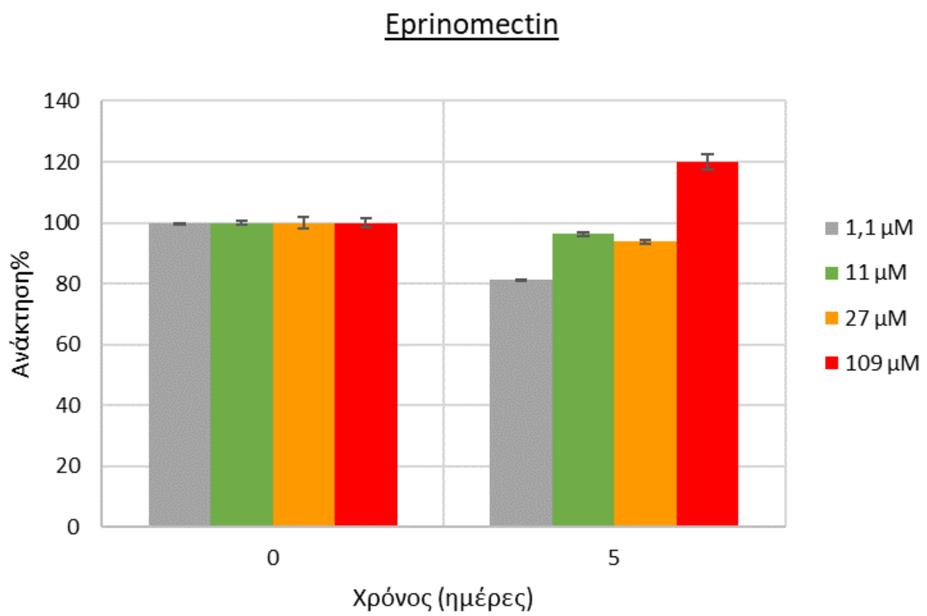
Διάγραμμα 3.4.3. *Αποδόμηση του fenbendazole στις υγρές καλλιέργειες των AOB N.multiformis (α) και N.ureae (β). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων.*

Η ανάκτηση του fenbendazole από τις υγρές καλλιέργειες των *N. multiformis* και *N. ureae* κυμάνθηκε μεταξύ 50-119% και 40-97%, αντίστοιχα, 5 ημέρες μετά την προσθήκη του στις υγρές καλλιέργειες των AOB στελεχών. Αναλυτικότερα, στη συγκέντρωση 3.4 μM παρατηρήθηκε σχετικά χαμηλή αποδόμηση (14.55% και 18%) ενώ για την συγκέντρωση των 34 μM σημειώθηκε σημαντική αποδόμηση, 31.6%. και 49%, στις καλλιέργειες των *N. multiformis* και *N. ureae,* αντίστοιχα. Τέλος στη συγκέντρωση 84μM, παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση μόνο στις καλλιέργειες του *N. ureae* (30%), ενώ αντίστοιχα στη συγκέντρωση και 334 μM παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση μόνο στις καλλιέργειες του *N. multiformis* (50%) (Διάγραμμα 3.4.3).

α)



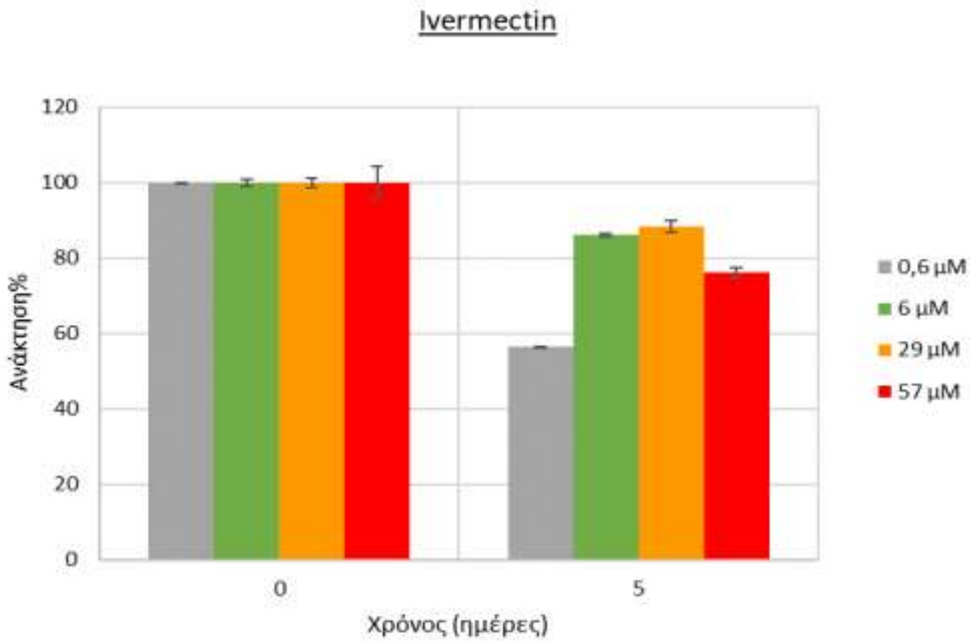
β)



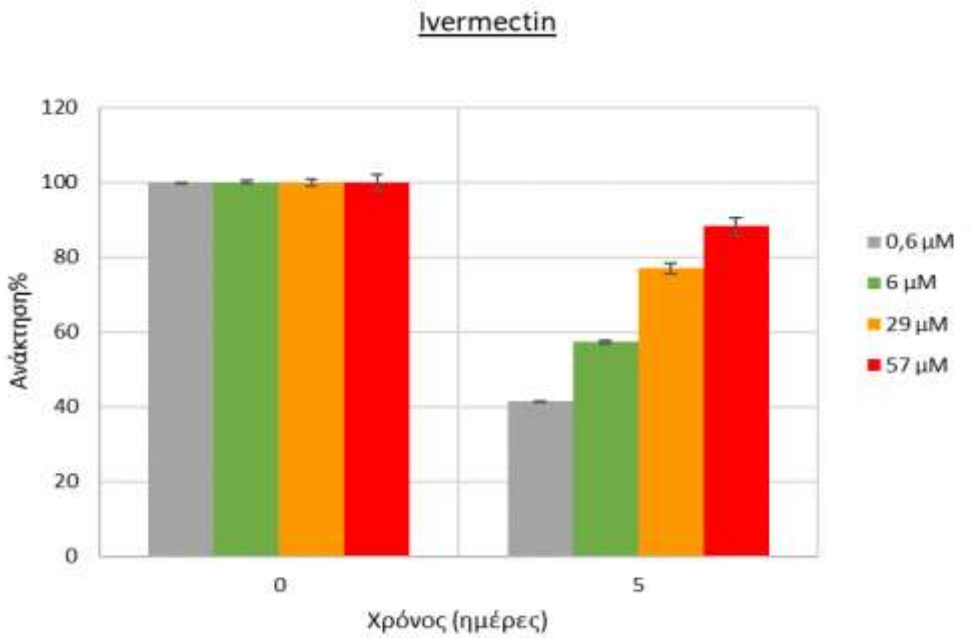
Διάγραμμα 3.4.4. *Αποδόμηση του eprinomectin στις υγρές καλλιέργειες των AOB N. multiformis (α) και N. ureae (β). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων.*

Αντίθετα, το eprinomectin δεν αποδομήθηκε σημαντικά στις υγρές καλλιέργειες και των δυο AOB στελεχών, με τις συγκεντρώσεις του να παραμένουν σχετικά σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Εξαίρεση αποτέλεσε η χαμηλότερη συγκέντρωση του 1.1 μM όπου σημειώθηκαν τα μεγαλύτερα ποσοστά αποδόμησης, 59.8 και 18.5%, στις υγρές καλλιέργειες των *N. multiformis* και *N. ureae,* αντίστοιχα (Διάγραμμα 3.4.4).

α)



β)



Διάγραμμα 3.4.5. *Αποδόμηση του ivermectin στις υγρές καλλιέργειες των AOB N. multiformis (α) και N. ureae (β). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων.*

Τέλος, η αποδόμηση του ivermectin στις υγρές καλλιέργειες των *N. multiformis* και *N. ureae* κυμάνθηκε μεταξύ 11.4 - 43.5% και 11.6 – 58.6 %, αντίστοιχα, με τα υψηλότερα ποσοστά αποδόμησης να παρατηρούνται στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (0.6 και 6 μΜ) (Διάγραμμα 3.4.5).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η τοξικότητα των συνθετικών ανθελμινθικών της ομάδας των βενζιμιδαζολών, albendazole, ricobendazole, και fenbendazole, και της ομάδας των μακροκυκλικών λακτονών, eprinomectin και ivermectin, στη λειτουργία επιλεγμένων στελεχών AOB σε *in vitro* δοκιμές. Η επίδραση των επιλεγμένων ανθελμινθικών στη νιτρωδοποιητική λειτουργία των AOB αξιολογήθηκε μέσω μέτρησης των παραγόμενων NO_2^- στις υγρές καλλιέργειες. Παράλληλα μελετήθηκε η αποδόμηση τους με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) προκειμένου να προσδιοριστεί η σταθερότητα τους στις υγρές καλλιέργειες των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων. Αξίζει να σημειωθεί πως η παρούσα μελέτη αποτελεί βιβλιογραφικά την πρώτη προσπάθεια *in vitro* διερεύνησης της τοξικότητας των συνθετικών ανθελμινθικών στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους. Οι *in vitro* δοκιμές μπορούν (1) να παρέχουν μια αξιόπιστη εκτίμηση της εγγενούς τοξικότητας μιας ένωσης στους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς, (2) να αναδείξουν πιθανές διαφορές στην τοξικότητα μιας χημικής ουσίας στις διαφορετικές μικροβιακές ομάδες που επιτελούν τη διεργασία της νιτρωδοποίησης (π.χ. AOB έναντι AOA) και (3) αποτελούν ένα πολύτιμο πειραματικό εργαλείο για τη διερεύνηση των μηχανισμών τοξικότητας.

Σύμφωνα με τα ευρήματα μας, τα βενζιμιδαζολικά ανθελμινθικά albendazole, ricobendazole και fenbendazole, δεν παρεμπόδισαν σημαντικά τη νιτρωδοποιητική λειτουργία των δυο μελετούμενων AOB στελεχών, *Nitrosospira multiformis* και *Nitrosomonas ureae*. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν πιθανώς τη χαμηλή εγγενή ευαισθησία των AOB στα υπό μελέτη ανθελμινθικά. Σε προηγούμενες μελέτες μικροκόσμων εδάφους, της ομάδας του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, παρατηρήθηκε ότι τόσο το albendazole, όσο και οι μεταβολίτες του albendazole sulfoxide (ricobendazole) και albendazole sulfone είχαν ισχυρή ανασταλτική δράση στη λειτουργία και την αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών όταν εφαρμόστηκαν σε συγκεντρώσεις 2 και 20 mg kg^{-1} ξ.β. εδάφους, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας (Λαγός, 2023; Lagos *et al.*, 2023). Σε αντίθεση ο Thiele-Bruhn (2005), δεν παρατήρησε σημαντική επίδραση του fenbendazole σε μικροοργανισμούς του εδάφους, σε δόσεις 5800 and 3300 μmol kg^{-1} ξ.β. εδάφους. Ωστόσο, ανάλογες συγκρίσεις μεταξύ *in vitro* βιοδοκιμών και εδαφικών μικροκόσμων θα πρέπει να γίνονται με ιδιαίτερη προσοχή καθώς τα αποτελέσματα τους ενδέχεται να αποκλίνουν σημαντικά λόγω της μειωμένης διάχυσης ή της υψηλότερης αποδόμησης των χημικών ουσιών στο έδαφος.

Όσον αφορά τα ανθελμινθικά φάρμακα eprinomectin και ivermectin, στη περίπτωση του *Nitrosospira multiformis* παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συσσώρευση NO_2^- σε σύγκριση με τον μάρτυρα, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε χημική αντίδραση του φαρμάκου με το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τις υγρές καλλιέργειες (SW), το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με $(NH_4)_2SO_4$. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται επιπλέον και από τα αποτελέσματα της μελέτης της αφθονίας του γονιδίου *amoA*, όπου δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αύξηση του AOB στελέχους μεταξύ των καλλιεργειών που είχαν δεχθεί εφαρμογή των ανθελμινθικών σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα του ivermectin για το στέλεχος *Nitrosomonas ureae*, όπου υπήρχε επίσης υψηλότερη συσσώρευση NO_2^- σε σύγκριση με τον μάρτυρα, αν και στη πλειονότητα των μετρήσεων δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Προηγούμενες μελέτες, όπως αυτή των Konopka *et al.* (2015), όπου αξιολογήθηκε η επίδραση σε βακτήρια AOB, είτε αποκλειστικά του ivermectin ή ως συνδυασμός τριών φαρμάκων (ivermectin, monensin sodium salt,, zinc bacitracin), σε συγκέντρωση 10 mg kg^{-1} ξ.β. εδάφους, έδειξαν ότι ο ρυθμός της νιτροποίησης έμεινε ανεπηρέαστος ή αυξήθηκε σε σύγκριση με το μάρτυρα. Αντίθετα με το ivermectin, το eprinomectin μείωσε σημαντικά την παραγωγή NO_2^- σε σύγκριση με τον μάρτυρα στο στέλεχος *N. ureae*, σε συγκεντρώσεις ≥11 μM, κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες των Lagos *et al.* (2023) στις οποίες παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών εδάφους, σε συγκέντρωση eprinomectin 10 mg kg^{-1} ξ.β. εδάφους. Η διαφορετική ευαισθησία ανάμεσα στα δύο στελέχη AOB σε σχέση με το eprinomectin, πιθανώς αναδεικνύει διαφορές στη φυσιολογία τους. Αναλύσεις συγκριτικής γονιδιωματικής και πρωτεομικής των στελεχών *N. multiformis* και *N. ureae* έχουν δείξει ότι τα δύο στελέχη εκφράζουν διαφορετικού τύπου πρωτεΐνες απόκκρισης σε συνθήκες καταπόνησης (stress response proteins). Πρωτεΐνες δισμουτάσης του υπεροξειδίου εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στο *N. multiformis* σε σύγκριση με το *N. ureae*, όπως και αναγωγάσες αλκυλουπεροξειδίου, που ενδέχεται να οδηγούν σε διαφορετική απόκκριση σε καταπονήσεις που προκαλούνται από το φάρμακο (Zorz *et al.*, 2018).

Η γενικότερη μειωμένη επίδραση των συνθετικών ανθελμινθικών στα δύο στελέχη AOB που μελετήθηκαν, με μοναδική εξαίρεση την επίδραση του eprinomectin στο στέλεχος *N. ureae*, θα μπορούσε να αναδεικνύει πιθανά προβλήματα διαλυτότητας και βιοδιαθεσιμότητας τους στις υγρές καλλιέργειες, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις εφαρμογής τους σε υψηλές συγκεντρώσεις. Βιβλιογραφικές αναφορές επισημαίνουν τη χαμηλή υδατοδιαλυτότητα των μακροκυκλικών λακτονών, με τιμές για το ivermectin 4 mg L^{-1} (Fent, 2014) και το eprinomectin 3.5 mg L^{-1} (Lagos *et al.*, 2022). Επίσης για τα βενζιμιδαζολικά ανθελμινθικά όπως το albendazole και fenbendazole αναφέρεται χαμηλή υδατοδιαλυτότητα 41 mg L^{-1} και 0.9 mg L^{-1} αντίστοιχα. Ενώ ο μεταβολίτης του albendazole, ricobendazole έχει υδατοδιαλυτότητα 62 mg L^{-1} (Lagos *et al.*, 2021).

Τέλος, όσον αφορά την μελέτη της σταθερότητας και αποδόμησης των ανθελμινθικών στις υγρές καλλιέργειες, δεν παρατηρήθηκε κάποιο γενικευμένο πρότυπο δοσοεξαρτώμενης αποδόμησης των υπό μελέτη φαρμάκων. Υψηλότερη ωστόσο σταθερότητα των μελετούμενων ουσιών παρατηρήθηκε στις υγρές καλλιέργειες για τις υψηλές συγκεντρώσεις τους. Συνολικά παρατηρήθηκαν παρόμοια μοτίβα αποδόμησης των επιλεγμένων ανθελμινθικών στις καλλιέργειες των δύο στελεχών AOB. Ορισμένες ωστόσο σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των υγρών καλλιεργειών των στελεχών *N. multiformis*, και *N. ureae* ως προς το πρότυπο της αποδόμησης τους, εμφάνισαν οι βενζιμιδαζόλες, albendazole και fenbendazole. Δεδομένου ότι τα δύο αυτά στελέχη καλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό μέσο (Skinner and Walker medium; κοινή σύσταση και pH), η παρατηρούμενη διακύμανση θα μπορούσε να οφείλεται στην αλληλεπίδραση των ενώσεων με το κάθε βακτήριο. Μια ακόμα εξήγηση των παρατηρούμενων διακυμάνσεων θα μπορούσε να είναι η ιδιαίτερα χαμηλή υδατοδιαλυτότητα των φαρμάκων στις υγρές καλλιέργειες, παρότι χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το DMSO, το οποίο έχει δοκιμασθεί σε πειράματα τοξικότητας ανθελμινθικών και σε άλλους οργανισμούς μοντέλα όπως τα *Daphnia magna* (Oh *et al.*, 2006; Puckowski *et al.*, 2017) και σε νηματώδεις όπως ο *Pristionchus maupasi* (Gronvold *et al.*, 2004). Σε προηγούμενες μελέτες του ο Λαγός Ε. (2023), προκειμένου να αυξήσει τη διαλυτότητα και να ενισχύσει τη βιοδιαθεσιμότητα αυτών των ουσιών σε αξενικές καλλιέργειες βακτηρίων ικανών να αποδομούν τις βενζιμιδαζόλες, χρησιμοποίησε το TWEEN 20 ως ενδιάμεσο διαλύτη, το οποίο είναι ένα μη ιονικό απορρυπαντικό που δρα ως γαλακτωματοποιητικός παράγοντας. Σε μελλοντικά πειράματα αναμένεται να διερευνηθεί εάν η χρήση αυτής της ουσίας θα βελτιώσει τη διαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα των συνθετικών ανθελμινθικών στις υγρές καλλιέργειες νιτρωδοποιητικών στελεχών.

4.2. Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποτελούν μια πρώτη προσπάθεια για την *in vitro* μελέτη των πιθανών τοξικών επιδράσεων των ξενοβιοτικών ανθελμινθικών φαρμάκων, στη λειτουργία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους. Με βάση τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, παρέχονται κάποιες πρώτες ενδείξεις για την τοξικότητα του eprinomectin, σε σχέση με τη λειτουργία του AOB στελέχους *Nitrosomonas ureae*, κάτι το οποίο αναμένεται να διερευνηθεί περαιτέρω και σε άλλα εδαφογενή στελέχη AOB του γένους *Nitrosomonas (π.χ. N. communis)*. Επιπλέον, μελλοντικές μελέτες αναμένεται να διερευνήσουν περαιτέρω τη διαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα των επιλεγμένων ανθελμινθικών με τη χρήση του διαλύτη TWEEN 20, καθώς και την πιθανή τοξικότητα του στις υγρές καλλιέργειες νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών (βακτηρίων και αρχαίων).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abeliovich, A. (2006). The nitrite-oxidizing bacteria. *The prokaryotes*, *5*, 861-872.

Αγγελής, Γ. (2007). Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία. *Εκδόσεις UNIBOOKS*, Αθήνα.

Aksit, D., Korkut, O., Aksoz, E., Gokbulut, C. (2016). Plasma disposition and faecal excretion of eprinomectin following topical and subcutaneous administration in non-lactating dairy cattle. *New Zealand Veterinary Journal*, Vol 64 (4): 207–211 pp.

Belew, S., Suleman, S., Wynendaele, E., Duchateau, L., & De Spiegeleer, B. (2021). Environmental risk assessment of the anthelmintic albendazole in Eastern Africa, based on a systematic review. *Environmental pollution*, *269*, 116106.

Busatto, Z., de França, W. G., Cyrino, J. E. P., & Paschoal, J. A. R. (2018). Assessment of elimination profile of albendazole residues in fish. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *35*(1), 77-85.

Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., et al. (2015). Complete nitrification by Nitrospira bacteria. *Nature*, 528 (7583): 504–9. https://doi.org/10.1038/nature16461.

Daims, H., Lücker, S., & Wagner, M. (2016). A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria. *Trends in microbiology*, *24*(9), 699-712.

Fent, G.M. (2014). Avermectin. *Avian Ecotoxicology*, vol 1, 192–194,

Formentini, E. A., Mestorino, O. N., Marino, E. L., & Errecalde, J. O. (2001). Pharmacokinetics of ricobendazole in calves. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, *24*(3), 199-202.

Formentini, E. A., Mestorino, N., & Errecalde, J. O. (2005). Pharmacokinetics of ricobendazole after its intravenous, intraruminal and subcutaneous administration in sheep. *Veterinary research communications*, *29*, 595-608.

Fox, A., Widmer, F., & Lüscher, A. (2022). Soil microbial community structures are shaped by agricultural systems revealing little temporal variation. *Environmental Research*, *214*, 113915.

Gao, Y., Sun, X., Gu, X., & Sun, Z. (2013). Gene expression responses in different regions of Eisenia fetida with antiparasitic albendazole exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, *89*, 239-244.

Garbeva, P., Baggs, E. M., & Prosser, J. I. (2007). Phylogeny of nitrite reductase (nirK) and nitric oxide reductase (norB) genes from Nitrosospira species isolated from soil. *FEMS microbiology letters*, *266*(1), 83-89.

Geary, T.G., & Moreno, Y. (2012). Macrocyclic Lactone Anthelmintics: Spectrum of Activity and Mechanism of Action. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, Vol 13: 866-872 pp.

Grønvold, J., Svendsen, T. S., Kraglund, H. O., Bresciani, J., & Monrad, J. (2004). Effect of the antiparasitic drugs fenbendazole and ivermectin on the soil nematode Pristionchus maupasi. *Veterinary parasitology*, *124*(1-2), 91-99.

Hayatsu, M., Tago, K., & Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, *54*(1), 33-45.

Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J., & Saunders, J. R. (1993). The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Microbiology*, 139(6), 1147-1153.

Heil, J., Vereecken, H., & Brüggemann, N. (2016). A review of chemical reactions of nitrification intermediates and their role in nitrogen cycling and nitrogen trace gas formation in soil. *European journal of soil Science*, *67*(1), 23-39.

Hemkemeyer, M., Schwalb, S. A., Heinze, S., Joergensen, R. G., & Wichern, F. (2021). Functions of elements in soil microorganisms. *Microbiological Research*, *252*, 126832.

Hodgskiss, L. H., Melcher, M., Kerou, M., Chen, W., Ponce-Toledo, R. I., Savvides, S. N., ... & Schleper, C. (2023). Unexpected complexity of the ammonia monooxygenase in archaea. *The ISME Journal*, 17(4), 588-599.

Horvat, A.J.M., Petrovic, M., Babic, S., Pavlovic, D.M., Asperger, D., Pelko, S., Mance, A.D., Kastelan-Makan, M. (2012). Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 31.

Huang, T., Xia, J., Liu, T., Su, Z., Guan, Y., Guo, J., ... & Zheng, M. (2022). Comammox Nitrospira Bacteria Are Dominant Ammonia Oxidizers in Mainstream Nitrification Bioreactors Emended with Sponge Carriers. *Environmental Science & Technology*, *56*(17), 12584-12591.

Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. *Frontiers in plant science*, *8*, 1617.

Karpouzas, D. G., Vryzas, Z., & Martin-Laurent, F. (2022). Pesticide soil microbial toxicity: setting the scene for a new pesticide risk assessment for soil microorganisms (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*.

Kim, J. G., Gazi, K. S., Awala, S. I., Jung, M. Y., & Rhee, S. K. (2021). Ammonia-oxidizing archaea in biological interactions. *Journal of Microbiology*, *59*, 298-310.

Konopka, M., Henry, H. A., Marti, R., & Topp, E. (2015). Multi-year and short-term responses of soil ammonia-oxidizing prokaryotes to zinc bacitracin, monensin, and ivermectin, singly or in combination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(3), 618-625.

Lagos, E. (2023). *The role of soil microogranisms in the mitigation of the environmental deterioration imposed by the use and dispersal of anthelminthic veterinary drugs* (Doctoral dissertation, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος).

Lagos, S., Moutzoureli, C., Spiropoulou, I., Alexandropoulou, A., Karas, P.A., Saratsis, A., Smaragda Sotiraki, S., Karpouzas, D.G. (2022). Biodegradation of anthelmintics in soils: does prior exposure of soils to anthelmintics accelerate their dissipation?. *Environmental Science and Pollution Research*, Vol 29: 62404-62422 pp.

Lagos, S., Perruchon, C., Tsikriki A., Gourombinos E., Vasileiadis S., Sotiraki, S., Karpouzas., D.G. (2021). Bioaugmentation of animal feces as a mean to mitigate environmental contamination with anthelmintic benzimidazoles. *Journal of Hazardous Materials*, Vol 419: 126439 pp.

Lagos, S., Tsetsekos, G., Mastrogianopoulos, S., Tyligada, M., Diamanti, L., Vasileiadis, S., ... & Karpouzas, D. G. (2023). Interactions of anthelmintic veterinary drugs with the soil microbiota: Toxicity or enhanced biodegradation?. *Environmental Pollution,* 334, 122135.

Litskas, V.D., Karamanlis, X.N., Batzias, G.C., Tsiouris, S.E. (2013). Are the parasiticidal avermectins resistant to dissipation in the environment? The case of eprinomectin. *Environment International*, Vol 60: 48-55 pp.

Litskas, V.D., Paraskevas, C.G., Karamanlis, X.N., Batzias, G.C. (2021). Assessing the mobility of veterinary drugs with column experiments using different soils and under controlled flow conditions. *Chemosphere*, Vol 277, 130329.

Lin, Y., Ong, Y. C., Keller, S., Karges, J., Bouchene, R., Manoury, E., ... & Gasser, G. (2020). Synthesis, characterization and antiparasitic activity of organometallic derivatives of the anthelmintic drug albendazole. *Dalton transactions*, *49*(20), 6616-6626.

Nixon, S., Welz, C., Woods, D.J., Costa-Junior, L., Zamanian, M., Martin, R.J. (2020). Where are all the anthelmintics? Challenges and opportunities on the path to new anthelmintics. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, Vol 14: 8-16 pp.

Ντούγιας, ΣΠ., Αϊβαζίδης Α. & Μελίδης Π.(2012). Περιβαλλοντική Μικροβιολογία. *Εκδόσεις ΈΜΒΡΥΟ*.

Oh, S. J., Park, J., Lee, M. J., Park, S. Y., Lee, J. H., & Choi, K. (2006). Ecological hazard assessment of major veterinary benzimidazoles: acute and chronic toxicities to aquatic microbes and invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(8), 2221-2226.

Papadopoulou, E. S., Bachtsevani, E., Lampronikou, E., Adamou, E., Katsaouni, A., Vasileiadis, S., ... & Karpouzas, D. G. (2020). Comparison of novel and established nitrification inhibitors relevant to agriculture on soil ammonia-and nitrite-oxidizing isolates. *Frontiers in Microbiology*, 11, 581283.

Pavlović, D. M., Glavač, A., Gluhak, M., & Runje, M. (2018). Sorption of albendazole in sediments and soils: Isotherms and kinetics. *Chemosphere*, *193*, 635-644.

Park, S. J., Andrei, A. Ş., Bulzu, P. A., Kavagutti, V. S., Ghai, R., & Mosier, A. C. (2020). Expanded diversity and metabolic versatility of marine nitrite-oxidizing bacteria revealed by cultivation-and genomics-based approaches. *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(22), e01667-20.

Puckowski, A., Stolte, S., Wagil, M., Markiewicz, M., Łukaszewicz, P., Stepnowski, P., & Białk-Bielińska, A. (2017). Mixture toxicity of flubendazole and fenbendazole to Daphnia magna. *International journal of hygiene and environmental health*, *220*(3), 575-582.

Prasse, C., Loffler, D., Ternes, T.A. (2009). Environmental fate of the anthelmintic ivermectin in an aerobic sediment/water system. *Chemosphere*, Vol 77: 1321–1325 pp.

Ren, J.F., Hou, F.J, Bowatte, S. (2022). Anthelmintic drug albendazole treated sheep urination influences soil nitrogen transformations and nitrous oxide emissions from grasslands. *Applied Ecology and Environmental Research*, Vol 20(5): 4221-4235 pp.

Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., & Liesack, W. (1997). The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and environmental microbiology*, *63*(12), 4704-4712.

Sakoula, D., Koch, H., Frank, J., Jetten, M. S., van Kessel, M. A., & Lücker, S. (2021). Enrichment and physiological characterization of a novel comammox Nitrospira indicates ammonium inhibition of complete nitrification. *The ISME journal*, *15*(4), 1010-1024.

Sanderson, H., Laird, B., Pope, L., Brain, R., Wilson, C., Johnson, D., Bryning, G., Peregrine, A.S., Boxall, A., Solomon, K. (2007). Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms. *Aquatic Toxicology*, Vol 85: 229–240 pp.

Schulze, E. D., & Mooney, H. A. (Eds.). (2012). *Biodiversity and ecosystem function*. Springer Science & Business Media.Skinner, F. A., and Walker, N. (1961). Growth of Nitrosomonas europaea in batch and continuous culture. *Arch.Mikrobiol*. 38, 339–349. doi: 10.1007/bf00408008

Soliman, M., & Eldyasti, A. (2018). Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): opportunities and applications a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology,* 17(2), 285-321.

Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, *26*(3), R94-R98.

Syslová, E., Landa, P., Stuchlíková, L. R., Matoušková, P., Skálová, L., Szotáková, B., ... & Podlipná, R. (2019). Metabolism of the anthelmintic drug fenbendazole in Arabidopsis thaliana and its effect on transcriptome and proteome. *Chemosphere*, *218*, 662-669.

Thiele-Bruhn, S. (2005). Microbial inhibition by pharmaceutical antibiotics in different soils—dose-response relations determined with the iron (III) reduction test. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(4), 869-876.

Tolar, B. B., Herrmann, J., Bargar, J. R., van den Bedem, H., Wakatsuki, S., & Francis, C. A. (2017). Integrated structural biology and molecular ecology of N-cycling enzymes from ammonia-oxidizing archaea. *Environmental microbiology reports*, *9*(5), 484-491.

You, J., Das, A., Dolan, E. M., & Hu, Z. (2009). Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water research*, *43*(7), 1801-1809.

Venancio, W. A. L., Rodrigues-Silva, C., Spina, M., Diniz, V., & Guimarães, J. R. (2021). Degradation of benzimidazoles by photoperoxidation: metabolites detection and ecotoxicity assessment using Raphidocelis subcapitata microalgae and Vibrio fischeri. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*, 23742-23752.

Venkatesan, P. (1998). Albendazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 145–147.

Watson, S. W., Graham, L. B., Remsen, C. C., & Valois, F. W. (1971). A lobular, ammonia-oxidizing bacterium, Nitrosolobus multiformis nov. gen. nov. sp. *Archiv für Mikrobiologie*, 76, 183-203.

Wessén, E., & Hallin, S. (2011). Abundance of archaeal and bacterial ammonia oxidizers–possible bioindicator for soil monitoring. *Ecological Indicators*, *11*(6), 1696-1698.

Wrage, N., Velthof, G. L., Oenema, O., & Laanbroek, H. J. (2004). Acetylene and oxygen as inhibitors of nitrous oxide production in Nitrosomonas europaea and Nitrosospira briensis: a cautionary tale. *FEMS Microbiology Ecology*, *47*(1), 13-18.

Zhao, R., Biddle, J. F., & Jørgensen, S. L. (2022). Introducing Candidatus Bathyanammoxibiaceae, a family of bacteria with the anammox potential present in both marine and terrestrial environments. *ISME Communications*, *2*(1), 42.

Ζίφα, Α., Μαμούρης, Ζ., & Μούτου, Κ. (2008). Βιολογία. *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας*.

Zorz, J. K., Kozlowski, J. A., Stein, L. Y., Strous, M., & Kleiner, M. (2018). Comparative proteomics of three species of ammonia-oxidizing bacteria. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 938.