

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Πτυχιακή Διατριβή

Μελέτη της αποδόμησης των Eprinomectin ,Ivermectin
και Albendazole σε εδάφη από την Κύπρο με ιστορικό
έκθεσης στα συγκεκριμένα ανθελμινθικά φάρμακα

Χρίστος Χρυσάνθου

Λάρισα 2018

Μελέτη της αποδόμησης των Eprinomectin ,Ivermectin και Albendazole σε εδάφη από την Κύπρο με ιστορικό έκθεσης στα συγκεκριμένα ανθελμινθικά φάρμακα

Study of the degradation of Eprinomectin, Ivermectin and Albendazole in soils from Cyprus with a history of exposure to specific anthelmintic drugs

Υπεύθυνος καθηγητής

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής Επιτροπή :

Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Παναγιώτης Καράς , Υπότροφος Ακαδημαϊκής Εμπειρίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ευχαριστίες

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα για την μεγάλη βοήθεια που μου πρόσφερε αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω σε μια πάρα πολύ σημαντική έρευνα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την συνεχή στήριξη του αλλά και για την καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια της έρευνας .

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την τεράστια στήριξή της για την εμπιστοσύνης της, αλλά και για την μεγάλη βοήθεια που μου παρείχε κατά την διάρκεια όλης της έρευνας .

Επιπλέον ένα τεράστιο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στον Μεταδιδακτορικό ερευνητή Παναγιώτη Καρά για την τεράστια υπομονή αλλά και την στήριξή που μου πρόσφερε σε κάθε βήμα της έρευνας . Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη του αλλά και για την καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια της έρευνας . Θα ήταν παράληψη μου εάν δεν ευχαριστούσα όλα τα παιδιά του ορόφου για την βοήθεια τους αλλά και για την αρμονική και φιλική συνεργασία. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να το προσφέρω στην οικογένεια μου για την συνεχείς στήριξή αλλά και για την ενθάρρυνση που μου παρείχαν κατά την διάρκεια όλης της έρευνας αλλά και σε όλη μου την ζωή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|--|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 7 |
| ABSTRACT | 9 |
| 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 11 |
| 1.1 Κτηνιατρικά Φάρμακα – Περιβαλλοντική τύχη και Συμπεριφορά | 11 |
| 1.2 Μικροβιακή αποδόμηση..... | 17 |
| 1.3 Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση..... | 22 |
| 1.4 ALBENDAZOLE..... | 23 |
| 1.4.1 Περιβαλλοντική τύχη και αποδόμηση του albendazol | 25 |
| 1.5 Ivermectin (ιβερμεκτίνη)..... | 26 |
| 1.5.1 Περιβαλλοντική τύχη και αποικοδόμηση του Ivermectin | 28 |
| 1.6 Eprinomectin (Επρινομεκτίνη) | 29 |
| 1.6.1 Περιβαλλοντική τύχη Eprinomectin | 31 |
| 1.7 Σκοπός του πειράματος | 32 |
| 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 33 |
| 2.1 Δείγματα εδαφών | 33 |
| 2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εδαφών..... | 34 |
| 2.2.1 Προσδιορισμός υγρασίας των εδαφών..... | 34 |
| 2.2.2 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών..... | 35 |
| 2.3 Διαλύτες , χημικά αντιδραστήρια και κτηνιατρικά φάρμακα..... | 36 |
| 2.4 Προσδιορισμός πρότυπης καμπύλης..... | 36 |
| 2.5 Πείραμα αποδόμησης κτηνιατρικών φαρμάκων στα εδάφη | 37 |
| 2.5.1 Περιγραφή του πειράματος..... | 37 |
| 2.5.2 Τα δείγματα εδάφους αποστειρώθηκαν μέσω καπνισμού με χλωροφόρμιο. | 39 |
| 2.6 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων των κτηνιατρικών φαρμάκων στο έδαφος..... | 40 |

| | |
|--|----|
| 2.6.1 Ανάκτηση albendazole, Eprinomectin , ivermectin από το έδαφος | 40 |
| 2.6.2 Εκχύλιση Albendazole και των μεταβολιτών του Albendazole sulfoneκαι Albendazole sulfoxide από το έδαφος | 41 |
| 2.6.3 Εκχύλιση Ivermectin από το έδαφος..... | 41 |
| 2.6.4 Εκχύλιση Eprinomectin από το έδαφος | 41 |
| 2.7 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) ... | 42 |
| 2.8 Επεξεργασία αποτελεσμάτων και υπολογισμός DT50 | 43 |
| 3 Αποτελέσματα | 44 |
| 3.1 Αποδόμηση Eprinomectin..... | 44 |
| 3.2 Αποδόμηση Ivermectin | 48 |
| 3.3 Αποδόμηση και μεταβολισμός του Albendazole στο έδαφος | 50 |
| 4 Συζήτηση –Συμπέρασμα | 56 |
| 4.1 Συζήτηση..... | 56 |
| 4.1.1 Eprinomectin..... | 56 |
| 4.1.2 Ivermectin..... | 57 |
| 4.1.3 Albendazole | 58 |
| 4.2 Τελικά Συμπέρασμα..... | 60 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 61 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αυξανόμενη χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων για την αύξηση των ρυθμών παραγωγής κτηνοτροφικών προϊόντων, έχει οδηγήσει στην αυξανόμενη ρύπανση του περιβάλλοντος. Ο στόχος των περισσότερων ερευνών αλλά και της παρούσας μελέτης είναι η περιβαλλοντική τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων (Albendazole, Ivermectin, Eprinomectin) . Πολλά κτηνιατρικά φάρμακα λόγω της αυξανόμενης χρήσης τους στα ίδια εδάφη έχει παρατηρηθεί αποδόμησης τους από διάφορους μικροοργανισμούς του εδάφους. Σε κάποια φάρμακα έχει παρατηρηθεί μεγάλη αποδόμηση κάποιων κτηνιατρικών φαρμάκων από τους μικροοργανισμούς. Δηλαδή οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα κτηνιατρικά φάρμακα ως πηγή ενέργειας και άνθρακα. Κάποιοι από αυτούς μπορούν να κάνουν επιταχυνόμενη αποδόμηση , δηλαδή να αποδομούν τα κτηνιατρικά φάρμακα σε μικρό χρονικό διάστημα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η περιβαλλοντική τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων Albendazole, Ivermectin, Eprinomectin. Τα συγκεκριμένα κτηνιατρικά φάρμακα ανήκουν στην κατηγορία νηματοδοκτόνων και χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία για την καταπολέμηση των ελμίνθων. Έγινε δειγματοληψία από περιοχές της Κύπρου και συγκεκριμένα από διάφορα χωριά της επαρχίας Πάφου. Πιο συγκεκριμένα έγιναν δειγματοληψίες από την Πελαθουσα, Προδρόμι Ανδρολίκου, Ιστιντσιω. Οι δειγματοληψίες έγιναν από εδάφη που είχαν ιστορικό χρήσης συγκεκριμένα από μονάδες εκτροφής αιγοπροβάτων αλλά έγινε και δειγματοληψία από εδάφη που δεν είχαν έλθει ξανά σε επαφή με τα συγκεκριμένα κτηνιατρικά φάρμακα. Από κάθε περιοχή πάρθηκαν δύο δείγματα τα οποία χωρίστηκαν στην μέση και για την μισή ποσότητα εδάφους από κάθε δείγμα έγινε αποστείρωση με καπνισμό με χλωροφόρμιο έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν όντως γίνεται μικροβιακή αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων. Για την εκτίμηση της υπολειμματικότητας προσδιορίστηκε ο χρόνος ημιζωής των κτηνιατρικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους με την χρήση κινητικών μοντέλων. Όσον αφορά το Ivermectin εμφάνισε χαμηλή ως μέτρια υπολειμματικότητα στα εδάφη που μελετήθηκαν με τιμές DT50 = 11 ως 62 ημέρες. Παρόμοιες τιμές έχουν αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες. Έτσι οι Krogh et al., (2009) μελέτησαν την αποδόμηση του ivermectin σε τρία διαφορετικά εδάφη και

κατέγραψαν τιμές DT50 από 16 ως 36 ημέρες. Αντίστοιχα οι Rath et al., (2016) ανέφεραν ταχεία αποδόμηση του ivermectin σε δύο διαφορετικά εδάφη με τιμές DT50 = 11-15 ημέρες. Μελέτες από τους Liebig et al, (2010) ανέφεραν τιμές DT50 στο έδαφος από 14-56 ημέρες ενώ παρατήρησαν αυξημένη υπολειμματικότητα του ivermectin σε μίγματα εδάφους - κοπριάς με τιμές DT50 = 7-217 ημέρες (Boxall et al., (2002). Στο eprinomectin παρατηρήθηκε μέτρια ως υψηλή υπολειμματικότητα στα εδάφη που μελετήθηκαν με τιμές DT50 από 21.6- 75 ημέρες. Οι τιμές αυτές είναι σχετικά σύμφωνες με τις ελάχιστες προηγούμενες μελέτες που αφορούν την αποδόμηση του eprinomectin στο έδαφος με τιμές DT50 = 38-53 ημέρες (Litskas et al., 2013). Ελάχιστα είναι γνωστά για την αποδόμηση και την υπολειμματικότητα του albendazole στο έδαφος. Οι Wu & Hu (2014) κατέγραψαν γρήγορη αποδόμηση του albendazole στο έδαφος με τιμές DT50 = 5-6.3 ημέρες, παρ' όλα αυτά δεν μέτρησαν του μεταβολίτες του στο έδαφος. Το albendazole μπορεί να οξειδωθεί σε albendazole sulfoxide και albendazole sulfone τα οποία έχουν και αυτά ανθελμινθική δράση. Στην παρούσα μελέτη τα συνολικά δραστικά υπολείμματα του albendazole εμφάνισαν μέτρια ως υψηλή υπολειμματικότητα στα εδάφη από την Μονάδα 3 (31.1 και 101 ημέρες) αλλά υψηλότερη από το έδαφος μάρτυρα όπου παρατηρήθηκε ταχύτατη αποδόμηση αμέσως μετά την εφαρμογή (DT50 < 1 ημέρα) και ακολούθησε μια βραδεία φάση αποδόμησης (DT90>365 ημέρες). Δεν παρατηρήθηκε επιταχυνόμενη αποδόμηση του Albendazole και των μεταβολιτών του σε εδάφη που ιστορικό έκθεσης στο συγκεκριμένο κτηνιατρικό φάρμακο.

ABSTRACT

The increasing use of veterinary medicines to increase the production rate of livestock products has led to increased pollution of the environment. The aim of most studies including the present study is the environmental fate of veterinary medicines (Albendazole, Ivermectin, Eprinomectin). Many veterinary medicines due to their increasing use on the same soil have been observed to be degraded by various soil micro-organisms. Some medications have seen a large degradation of some veterinary medicinal products by micro-organisms. That is, micro-organisms use veterinary medicines as a source of energy and carbon. Some of them can accelerate decontamination, specifically degrading veterinary medicines in a short period of time. In this study the environmental fate of the veterinary medicines albendazole, ivermectin, eprinomectin was studied. These veterinary medicines belong to the category of nematicides and are used in livestock farming to fight helminths. Sampling was carried out from areas of Cyprus, and specifically from various villages in the province of Paphos. Samples were taken by the client, from Prodromi, Androlikou, Istintsio(Kios), Pelathusa. Sampling was carried out on soils that had a history of use specifically from sheep and goat rearing units, but sampling was also carried out on soils that had not been in contact with these veterinary medicines. Two samples were taken from each area and divided into half and half the soil from each sample was sterilized by chloroform fumigation to determine whether microbial degradation of the veterinary medicinal products took place. The half-life of veterinary drugs and their metabolites was determined for the estimation of residuality using motor models. As for Ivermectin, it showed a low to moderate residuality in soils studied with DT50 = 11 to 62 days. Similar values have been reported in previous studies. Thus, Krogh et al., (2009) studied degradation of ivermectin in three different soils and recorded DT50 values from 16 to 36 days. Similarly, Rath et al., (2016) reported rapid degradation of ivermectin in two different soils with DT50 values = 11-15 days. Studies by Liebig et al, (2010) reported soil DT50 values from 14-56 days while observing increased residuality of ivermectin in soil-manure mixtures with DT50 = 7-217 days (Boxall et al., 2002). Eprinomectin was observed moderately as a high residual in soils

studied with DT50 values of 21.6-75 days. These values are relatively consistent with the few previous studies involving the degradation of eprinomectin in the soil with DT50 = 38-53 days (Litskas et al., 2013). Little is known about the degradation and residuality of albendazole f Wu & Hu (2014) recorded rapid degradation of albendazole in the soil with DT50 values = 5-6.3 days, however they did not measure its metabolites in the soil Albendazole can be oxidized to albendazole sulfoxide and albendazole sulfone In the present study the total active residues of albendazole showed moderate to high residuals in the soil from Unit 3 (31.1 and 101 days) but higher than the control soil where rapid degradation was observed immediately after application (DT50 < 1 day) and followed a slow one a degradation phase (DT90> 365 days). No accelerated degradation of albendazole and its metabolites was observed in soils that have a history of exposure to this veterinary medicine.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Κτηνιατρικά Φάρμακα – Περιβαλλοντική τύχη και Συμπεριφορά

Με την συνεχή αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού που στις μέρες μας υπολογίζεται στα 7,6 δισεκατομμύρια και μέχρι το 2050 θα έχει φθάσει τα 9 δισεκατομμύρια έχει δημιουργηθεί η ανάγκη για αύξηση των τροφίμων . Ο κυριότερος τρόπος για να επιτευχθεί η προσπάθεια αυτή, είναι η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων για την βελτίωση των μεθόδων καλλιέργειας αλλά και για την καλύτερη και με λιγότερες απώλειες κτηνοτροφική παραγωγή. Περίπου το 70% των κτηνιατρικών φαρμάκων που παράγονται στις ΗΠΑ (16.000 τόνοι το 2000) προστίθενται σε ζωοτροφές για αύξηση του ρυθμού παραγωγής προϊόντων που προέρχονται από τα ζώα (Dean et al 2010).

Η κτηνοτροφική παραγωγή έχει μεγάλες απώλειες λόγω διάφορων εχθρών (παράσιτα , έντομα , μικροοργανισμούς) που εάν δεν αντιμετωπισθούν άμεσα μπορούν να μειώσουν την παραγωγή σε μεγάλο βαθμό. Έτσι για την προστασία της κτηνοτροφικής παραγωγής γίνεται συνεχής προληπτικός έλεγχος και όπου χρειάζεται έντονη καταπολέμηση των εχθρών και ασθενειών με την χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων. Κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή, την απώθηση ή τη μείωση κάθε παρασίτου καλείται κτηνιατρικό φάρμακο (Λαγός, 2015).

Εάν τα κτηνιατρικά φάρμακα χρησιμοποιηθούν με αμέλεια τότε μπορεί να έχουμε αντίθετα αποτελέσματα. Η χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στα παρασκευάσματα, θα οδηγήσει στην αύξηση της παραγωγής και θα πετύχουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα που είναι η καταπολέμηση, παθογόνων μικροοργανισμών και παρασίτων. Τα θετικά των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι η εύκολη και γρήγορη χρήση τους, κάποια έχουν χαμηλό κόστος και μπορούν να δράσουν άμεσα. Ο στόχος είναι η χρήση χημικών ουσιών με λιγότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις αλλά και αυξημένη δράση και αποτελεσματικότητα.

Τα κτηνιατρικά φάρμακα μπορεί να χρησιμοποιηθούν για προστασία ή για πρόληψη στα ζώα. Χρησιμοποιούνται για την προστασία και την καταπολέμηση παθογόνων οργανισμών στα ζώα .

Τα κτηνιατρικά φάρμακα είναι τα πλέον οικονομικά αποδοτικά μέσα καταπολέμησης επιβλαβών οργανισμών, επιτρέπουν τη διατήρηση των σημερινών αποδόσεων και συμβάλλουν έτσι στην οικονομική βιωσιμότητα. Οι ανησυχίες σχετικά με τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις από την επανειλημμένη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων οδήγησαν στην έρευνα σχετικά με την περιβαλλοντική τύχη αυτών των ουσιών, οι οποίες μπορούν μετακινηθούν από το σημείο εφαρμογής τους στο έδαφος σε άλλα τμήματα του περιβάλλοντος όπως αέρα υπόγεια και επιφανειακά νερά. Πόσο καιρό παραμένει το κτηνιατρικό φάρμακο στο έδαφος εξαρτάται από το πόσο ισχυρά δεσμεύονται από τα συστατικά του εδάφους και πόσο εύκολα αποδομείται. Εξαρτάται επίσης από τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά το χρόνο εφαρμογής, π.χ. το περιεχόμενο σε νερό του εδάφους. Η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων πρέπει να διασφαλίζει τη δημόσια ασφάλεια και την προστασία του περιβάλλοντος όσον αφορά τόσο το ίδιο το χημικό προϊόν όσο και τους ενδεχομένως επιβλαβείς μεταβολίτες του. Η κατανόηση της τύχης των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι απαραίτητη για την ορθολογική λήψη αποφάσεων σχετικά με την εξουσιοδότησή τους (Manuel Arias-Estévez, et al 2008).

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες κτηνιατρικών φαρμάκων ανάλογα με το είδος του παθογόνου που καταπολεμούν, τον τρόπο δράσης τους, την τοξικότητα τους και την χημική δομή τους, σύμφωνα πάντα με τον τρόπο παρασκευής και σύνθεσης τους. Για την επιλογή του κτηνιατρικού φαρμάκου πρέπει να υπάρχει η γνώση για το είδος του παθογόνου που θα αντιμετωπισθεί. Ανάλογα με το παθογόνο τα διάφορα κτηνιατρικά φάρμακα χωρίζονται σε ακαρεοκτόνα, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και νηματωδοκτόνα. Επιπλέον ανάλογα με τον τρόπο που δρουν χωρίζονται σε επαφής (παραμένουν στην επιφάνεια του ζώου) ή σε διασυστημικά (εισέρχονται μέσα στους ζωικούς ιστούς και το αγγειακό τους σύστημα) (Τσοχατζής 2012). Επίσης τα κτηνιατρικά φάρμακα, ανάλογα με τον τρόπο κατασκευής, προέλευσης τους, μπορούν να είναι φυσικής προέλευσης (biopesticides – βιολογικά), δηλαδή προϊόντα δευτερογενούς

μεταβολισμού φυτών, μικροοργανισμών και εντόμων (Ζιώγας και Μάρκογλου, 2007), ή χημικής σύνθεσης στο εργαστήριο, συνθετικές ανόργανες και οργανικές χημικές ενώσεις. Τα κτηνιατρικά Φάρμακα, με βάση τη χημική δομή τους διαχωρίζονται στις πιο κάτω βασικές ομάδες:

- Αζόλες
- Ανιλιδοπυριμιδίνες
- Ανιλινοπυριμιδίνες
- Διθειοκαρβαμικά
- Καρβαμικά
- Νεονικοτινοειδή
- Οργανοχλωριώμενα
- Οργαοφωσφορικά
- Παράγωγα ουρίας
- Πυρεθρινοειδή
- Τριαζίνες
- Φαινυλαμίδια

Κάποια ερωτήματα που έχουν τεθεί από τους επιστήμονες είναι ποιες ουσίες μπορούν να εισέλθουν στο περιβάλλον και με ποιους τρόπους? Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξημένη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων. Το μεγαλύτερο ερώτημα που τίθεται είναι ποια είναι η περιβαλλοντική τύχη αυτών των κτηνιατρικών φαρμάκων? Πολύ λίγα είναι γνωστά για τις επιδράσεις αυτών των ενώσεων και των μεταβολιτών τους. Πρόσφατα, σε παγκόσμιο επίπεδο εντοπίστηκαν χαμηλά επίπεδα κτηνιατρικών φαρμάκων σε εδάφη, επιφανειακά ύδατα και υπόγεια ύδατα (Halling-Sorenson et al. 1998, Pope 2009). Οι

ερευνητές έθεσαν ακόμη ένα ερώτημα σχετικά με τον αντίκτυπο των κτηνιατρικών φαρμάκων στους οργανισμούς στο περιβάλλον και στην ανθρώπινη υγεία (Alistair et al 2003).

Όταν τα κτηνιατρικά φάρμακα βρεθούν στο περιβάλλον δύνανται να προκαλέσουν άμεσες και έμμεσες επιπτώσεις σε οργανισμούς μη στόχους και να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα. Η είσοδος των κτηνιατρικών φαρμάκων στα χερσαία οικοσυστήματα γίνεται είτε με τη χρήση της κοπριάς ως λιπάσματος, είτε με την έκπλυση των κτηνιατρικών φαρμάκων από την επιφάνεια του σώματος του ζώου, είτε με την χορήγηση κτηνιατρικού φαρμάκου άμεσα στο ζώο. Τα κτηνιατρικά φάρμακα εισέρχονται στα επιφανειακά ή και στα υπόγεια νερά είτε άμεσα όπως στην περίπτωση της εφαρμογής θεραπευτικής αγωγής σε ιχθυοκαλλιέργειες, είτε έμμεσα με την έκπλυση των εδαφών που έχουν δεχθεί κοπριά (Λίτσικας 2013).

Η περιβαλλοντική τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων στο έδαφος ποικίλει ανάλογα με την χημική φύση του φαρμάκου αλλά και την σύσταση του εδάφους. Με την είσοδο του κτηνιατρικού φαρμάκου στο έδαφος έπεται είτε βιολογική και χημική αποδόμηση, ή προσρόφηση, ή επιφανειακή απορροή, ή έκπλυση είτε πρόσληψη από φυτά ή μικροοργανισμούς. Οι δύο διεργασίες που έχουν κύριο ρόλο στην περιβαλλοντική τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι η αποδόμηση και η προσρόφηση. Έχουν ανιχνευθεί κτηνιατρικά φάρμακα σε λύματα και επιφανειακά νερά. Υπάρχει έλλειψη στοιχείων για την τύχη των ανθελμινθικών κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον. Για πολλά χρόνια εμφανίζονται ευρέως σε επιφανειακά ύδατα αναδυόμενοι ρύποι, συμπεριλαμβανομένων των κτηνιατρικών φαρμάκων (Hongxia et al 2012).

Βιολογική αποδόμηση: Η βιοαποδόμηση είναι η διάσπαση των υλικών κτηνιατρικών φαρμάκων από βακτήρια, μύκητες ή άλλους μικροοργανισμούς. Το οργανικό υλικό μπορεί να αποδομείται αερόβια (με οξυγόνο) ή αναερόβια (χωρίς οξυγόνο). Η αποσύνθεση των βιοαποδομήσιμων ουσιών μπορεί να περιλαμβάνει τόσο βιολογικά όσο και αβιοτικά στάδια. Η βιοαποδομήσιμη ύλη είναι γενικά οργανικό υλικό που παρέχει θρεπτικά συστατικά για μικροοργανισμούς (Vert, et.

al 2012). Στην πράξη, σχεδόν όλες οι χημικές ενώσεις και υλικά υπόκεινται σε διαδικασίες βιοαποδόμησης (Sims and Cripples1999). Με την πρόσληψη των κτηνιατρικών φαρμακευτικών ενώσεων ξεκινούν κάποιες βιοχημικές διεργασίες που μπορεί να είναι η απαλκυλίωση, απαλογόνωση, οξείδωση ή αναγωγή, υδρόλυση και υδροξυλίωση (Λύκας 2009).

Χημική αποδόμηση : Είναι η πλήρης διάσπαση ,αποδόμηση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου με καθαρά χημικές αντιδράσεις και χωρίς τη συμβολή των μικροοργανισμών. Οι σπουδαιότερες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στη χημική αποδόμηση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου είναι οξείδωση, αναγωγή, και υδρόλυση (Γεώργιος-Χαράλαμπος Ε. Κυδωνάκης 2010).

Φωτοαποδόμηση : Η φωτοαποδόμηση είναι η διάσπαση χημικών ουσιών παρουσία φωτός. Συνήθως ο όρος αναφέρεται στη συνδυασμένη δράση του ηλιακού φωτός και του αέρα. Η φωτοαποδόμηση είναι συνήθως οξείδωση και υδρόλυση. Περιλαμβάνει την αποδόμηση χημικών ενώσεων (κτηνιατρικών φαρμάκων) σε όλες τις ζώνες υπεριώδους φωτός. Οι φωτοχημικές αντιδράσεις αρχίζουν με την απορρόφηση ενός φωτονίου, τυπικά στην περιοχή μήκους κύματος 290-700 nm (στην επιφάνεια της Γης). Η ενέργεια ενός απορροφούμενου φωτονίου μεταφέρεται σε ηλεκτρόνια στο μόριο και αλλάζει σύντομα τη διαμόρφωσή τους. Η διεγερμένη κατάσταση αντιπροσωπεύει αυτό που είναι ουσιαστικά ένα νέο μόριο. Συχνά διεγερμένα μόρια κατάστασης δεν είναι κινητικά σταθερά παρουσία O_2 ή H_2O και μπορούν να αποσυντίθενται αυθόρμητα (οξειδωθούν ή να υδρολυθούν). Μερικές φορές τα μόρια αποσυντίθενται για να παράγουν υψηλής ενέργειας, ασταθή θραύσματα που μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια γύρω τους. Οι δύο διεργασίες αναφέρονται συλλογικά ως άμεση φωτοαποδόμηση ή έμμεση φωτοαποδόμηση και οι δύο μηχανισμοί συμβάλλουν στην απομάκρυνση των ρύπων (Burrows et. al 2002).

Προσρόφηση : Ως προσρόφηση του κτηνιατρικού φαρμάκου στο έδαφος ορίζεται ο βαθμός της δέσμευσής του σε αυτό. Δηλαδή η προσρόφηση είναι η προσέλκυση και η συγκράτηση διαφόρων μορίων όπως τα κτηνιατρικά φάρμακα

από την επιφάνεια των κολλοειδών που υπάρχουν στο έδαφος. Τα διάφορα κολλοειδή που υπάρχουν μπορεί να είναι ανόργανες ή οργανικές ουσίες ή άλλα συστατικά που υπάρχουν στο έδαφος. Κάποιες ουσίες προσροφόνται σε διάφορα τμήματα του εδάφους και δεν μένουν εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζει την διαδικασία της προσρόφησης είναι η παρουσία οργανικής ύλης στο έδαφος. Ανάλογα με την ποσότητα αλλά και την μορφή της οργανικής ύλης, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να γίνει ο προσδιορισμός της προσρόφησης των μη ιοντικών κτηνιατρικών φαρμάκων. Η προσρόφηση εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες τόσο του εδάφους όσο και του κτηνιατρικού φαρμάκου. Τα χαρακτηριστικά του εδάφους που επηρεάζουν την προσρόφηση των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι το είδος των ανόργανων κολλοειδών, το pH του εδάφους, η υγρασία και η θερμοκρασία του εδάφους (Λίτσκας 2013, P. M. Huang 1980). Μια από τις σημαντικότερες ιδιότητες των κτηνιατρικών φαρμάκων, που επηρεάζει την μετακίνησή τους, αλλά και την περιβαλλοντική τους τύχη, είναι η υδατοδιαλυτότητά τους. Με την είσοδο του κτηνιατρικού φαρμάκου στο έδαφος, κάποια ποσότητα θα διαλυθεί στο εδαφικό διάλυμα και κάποια ποσότητα θα προσροφηθεί σε διάφορα κολλοειδή του εδάφους. Με την συνεχή ροή νερού λόγω της βροχής ή της άρδευσης, το προσροφημένο στα κολλοειδή κτηνιατρικό φάρμακο, ελευθερώνεται από την επιφάνεια των κολλοειδών και επαναδιαλύεται στο εδαφικό διάλυμα με μια διαδικασία που ονομάζεται εκρόφηση (desorption). Όσο πιο μεγάλη διαλυτότητα έχει ένα φάρμακο, τόσο πιο μικρή είναι η προσρόφηση του και το αντίστροφο. Οι υδρόφοβες ενώσεις, όπως οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες, είναι ελάχιστα υδατοδιαλυτές και έχουν ισχυρή συγγένεια με τα σωματίδια του εδάφους. Ως αποτέλεσμα, η βιοδιαθεσιμότητά τους στους μικροοργανισμούς είναι περιορισμένη (Agata Zdarta OrcID 2018).

Έκπλυση : Είναι η διαδικασία κατά την οποία τα κτηνιατρικά φάρμακα, που βρίσκονται διαλυτοποιημένα στα εδαφικά διαλύματα, μπορεί να εισχωρήσουν σε υπόγεια στρώματα εδαφών και να καταλήξουν σε υπόγεια ύδατα με αποτέλεσμα, να εισέρχονται στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα και κατ' επέκταση στο νερό που καταναλώνει ο άνθρωπος. Ωστόσο, αν θα καταφέρει μια

χημική ουσία να φτάσει στα υπόγεια ύδατα θα εξαρτηθεί όχι μόνο από την κίνησή της μέσω του εδάφους, αλλά και από την υπολειμματικότητα της στο έδαφος. Εάν, για παράδειγμα, ο ρυθμός υποβάθμισης είναι αρκετά γρήγορος. Έχουν ανιχνευθεί ποσότητες κτηνιατρικών φαρμάκων σε υπόγεια ύδατα λόγω έκπλυσης. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία της έκπλυσης είναι οι παράγοντες που σχετίζονται με το έδαφος όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους. Ένα εξίσου σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της έκπλυσης διαδραματίζουν και άλλοι παράγοντες που είναι μη εδαφικοί, όπως οι κλιματολογικές συνθήκες, ο τρόπος εφαρμογής, οι φυσικοχημικές ιδιότητες του κτηνιατρικού φαρμάκου (John W. Hamaker 1975).

Επιφανειακή απορροή : Είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα κτηνιατρικά φάρμακα μετακινούνται στα επιφανειακά ύδατα είτε λόγω αυξημένης βροχόπτωσης είτε λόγω άρδευσης. Μπορεί να προσροφηθούν τα διάφορα κτηνιατρικά φάρμακα σε διάφορα κολλοειδή και να έχουν επιφανειακή απορροή, δηλαδή να μετακινηθούν και να απελευθερωθούν σε άλλα εδάφη, που δεν έχουν έρθει σε επαφή με κτηνιατρικά φάρμακα. Το μέγεθος της επιφανειακής απορροής, εξαρτάται από κλιματικούς και φυσιολογικούς παράγοντες, καθώς επίσης και από την σύσταση των πετρωμάτων, την υδατοδιαλυτότητα του κτηνιατρικού φαρμάκου, την μορφή του σκευάσματος με το οποίο γίνεται η εφαρμογή του, την υπολειματικότητα του κτηνιατρικού φαρμάκου, την προσρόφηση και την πρόσληψη από φυτά. Σε περιπτώσεις που υπάρχουν υψηλές βροχοπτώσεις, κατά τις χειμερινές περιόδους, τότε μειώνεται η απορρόφηση του νερού από το έδαφος, με αποτέλεσμα να δημιουργείται επιφανειακή απορροή και με την βοήθεια του νερού να μετακινούνται τα κτηνιατρικά φάρμακα. Διάφορες έρευνες έχουν ανιχνεύσει μεγάλες ποσότητες φαρμάκων σε διπλανά χωράφια από το χωράφι που έχει έλθει σε επαφή με κάποιο κτηνιατρικό φάρμακο(Weiss et al 2008).

1.2 Μικροβιακή αποδόμηση

Μια από τις σημαντικότερες διαδικασίες απομάκρυνσης ξενοβιοτικών ουσιών από το περιβάλλον είναι η μικροβιακή αποδόμηση ή βιοαποδόμηση. Είναι η

διαδικασία κατά την οποία, οργανικές ενώσεις διασπώνται σε πιο μικρά μόρια με την βοήθεια διάφορων ενζύμων που παράγουν οι μικροοργανισμοί του εδάφους. Διάφοροι μικροοργανισμοί βοηθούν στην απορρύπανση του περιβάλλοντος από διάφορες φαρμακευτικές ή τοξικές ουσίες. Αυτή η διαδικασία της διάσπασης κτηνιατρικών φαρμακευτικών ουσιών ή τοξικών ουσιών σε μη τοξικές ουσίες, ή λιγότερο τοξικές, γίνεται είτε υπό αναερόβιες συνθήκες (απουσία οξυγόνου), είτε υπό αερόβιες συνθήκες (παρουσία οξυγόνου). Ένα μεγάλο ποσοστό των μικροοργανισμών εντοπίζονται στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους που είναι συνήθως εμπλουτισμένα οξυγόνο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αποδόμηση κτηνιατρικών φαρμάκων από διάφορους μικροοργανισμούς μέσω του αερόβιου μεταβολισμού τους. Κάποιοι αερόβιοι μικροοργανισμοί που μπορούν να διασπάσουν ολοκληρωτικά μια φαρμακευτική ή μια τοξική ουσία, παράγουν ως τελικό προϊόν διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Διάφοροι άλλοι μικροοργανισμοί οι οποίοι διασπών πλήρως μια τοξική ή μια κτηνιατρική φαρμακευτική ουσία υπό αναερόβιες συνθήκες, το τελικό τους προϊόν μπορεί να είναι μεθάνιο ή διοξείδιο του θείου. Οι βιολογικές διεργασίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών και στηρίζονται στην εκπληκτική καταβολική ευελιξία των μικροοργανισμών για την αποδόμηση τέτοιων ουσιών (Eduardo Díaz et al 2008).

Για κάποιους μικροοργανισμούς, οι ποσότητες των κτηνιατρικών φαρμάκων που εισέρχονται στα εδάφη είναι τοξικές, με αποτέλεσμα να πεθαίνουν, ενώ για κάποιους άλλους μικροοργανισμούς οι κτηνιατρικές φαρμακευτικές ουσίες που εισέρχονται στο έδαφος, χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειάς αλλά και άνθρακα για την ανάπτυξη και την αύξηση τους. Όπως σε κάθε κύτταρο έτσι και στους μικροοργανισμούς, πραγματοποιούνται δύο κύριες κατηγορίες μεταβολικών αντιδράσεων, ο αναβολισμός και ο καταβολισμός. Ο αναβολισμός, είναι η μεταβολική οδός κατά την οποία δημιουργούνται σύνθετα μόρια για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού από απλά μονομερή με κατανάλωση ενέργειας. Απαιτείται η ύπαρξη πηγής άνθρακα, έτσι ώστε να γίνει η δημιουργία των σύνθετων μορίων που χρειάζεται ο μικροοργανισμός (όπως αζωτούχες βάσεις, δεοξυριβόζη, ριβόζη). Ο καταβολισμός είναι η μεταβολική διαδικασία κατά την οποία σύνθετα μόρια διασπώνται σε απλά μονομερή με ταυτόχρονη

απελευθέρωση ενέργειας. Οι μικροοργανισμοί μπορεί να χρησιμοποιήσουν ως σύνθετα μόρια τα κτηνιατρικά φάρμακα για την διάσπαση τους και την απελευθέρωση ενέργειας που θα χρησιμοποιηθεί για τον αναβολισμό στο κύτταρο, αλλά και για άλλες ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Όπως είναι γνωστό διάφορα κτηνιατρικά φάρμακα χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς και σαν πηγή άνθρακα, αλλά και σαν πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Η οξειδωση διαφόρων κτηνιατρικών φαρμάκων μέσω της οξειδωαναγωγικής αντίδρασης, παρέχει στον μικροοργανισμό ενέργεια. Η κτηνιατρική φαρμακευτική ουσία είναι το αναγωγικό μόριο και κάποιο άλλο μόριο του μεταβολισμού δρα σαν οξειδωτική ένωση, ανάλογα με τον τύπο της διαδικασίας του μεταβολισμού:

Η αερόβια αναπνοή έχει σαν τελικό δέκτη ηλεκτρονίων το οξυγόνο , που μετατρέπεται σε νερό με την προσθήκη 2 ηλεκτρονίων και δυο πρωτονίων (ή σε ελεύθερη ρίζα). Έχουν εντοπισθεί κατηγορίες μικροοργανισμών που ακολουθούν αυτό το είδος μεταβολισμού. Χρησιμοποιούν τοξικές και φαρμακευτικές ουσίες για ενέργεια (ATP, NADH , FADH₂,) και έχουν σαν τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων το οξυγόνο.

Όπως είναι γνωστό υπάρχει ένα μεγάλο ποσοστό μικροοργανισμών που ακολουθούν ένα άλλο είδος μεταβολισμού που είναι η αναερόβια διαδικασία .Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν αυτή την διαδικασία, δεν έχουν σαν τελικό δέκτη ηλεκτρονίων το οξυγόνο αλλά κάποια άλλη ένωση οργανική ή ανόργανη. Κάποιοι από αυτούς τους μικροοργανισμούς έχουν σαν τελικό δέκτη ηλεκτρονίων νιτρικά και θειικά ιόντα. Επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων τον τρισθενή σίδηρο ή το τετρασθενές μαγγάνιο που αποτελούν συστατικά των στερεών σωματιδίων του εδάφους.

Ένας άλλος τύπος μεταβολισμού που μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο σε ισχυρά αναερόβιες συνθήκες είναι η ζύμωση. Κατά τη ζύμωση δεν απαιτείται εξωτερική προσθήκη ενός δέκτη ηλεκτρονίων, διότι το κτηνιατρικό φάρμακο χρησιμοποιείται ταυτόχρονα σαν δότης και σαν δέκτης ηλεκτρονίων.

Η βιοαποδόμηση λαμβάνει χώρα κυρίως με αερόβιους μικροοργανισμούς. Όταν το οξυγόνο εξαντλείται ,αλλά το οξειδωαναγωγικό δυναμικό παραμένει σχετικά

υψηλό, η βιοδιάσπαση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της μεταβολικής δραστηριότητας νιτροαναγωγικών βακτηρίων. Τα οξειδία του σιδήρου του εδάφους μπορούν να δράσουν σαν δέκτες ηλεκτρονίων σε μια ευρεία κλίμακα τιμών οξειδοαναγωγικού δυναμικού, αλλά έχουν σχετικά περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα ανάλογα με την κρυσταλλικότητά τους. Τέλος τα θειοαναγωγικά και τα μεθανογόνα βακτήρια ,είναι δραστικά μόνον κάτω από έντονα αναγωγικές συνθήκες (Κυο, 1999). Οι μικροοργανισμοί εδάφους παίζουν βασικούς ρόλους στην πορεία των θρεπτικών ουσιών, την αποσύνθεση αποβλήτων και καταλοίπων και την αποτοξίνωση των ρυπογόνων ενώσεων στο περιβάλλον. Σημαντικοί μικροοργανισμοί είναι εκείνοι για τους οποίους είναι κατανοητός ένας οικολογικός σημαντικός ρόλος (G. K. Sims 1990).

Οι βιολογικές διεργασίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των μολυσματικών ουσιών και επωφελούνται από την καταβολική ευελιξία των μικροοργανισμών για την αποδόμηση ή τη μετατροπή τέτοιων ενώσεων σε κάποιες άλλες ενώσεις. Διαφορετικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα σε υγρασία, η οργανική ύλη, η δομή του εδάφους και η υφή του εδάφους επηρεάζουν την υποβάθμιση αυτών των κτηνιατρικών φαρμάκων. Επιπλέον, η φύση του κτηνιατρικού φάρμακου, η αρχική συγκέντρωση και ο τύπος της σύνθεσης έχουν επίσης επίδραση στην παραμονή των κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον (Sarfraz Hussain et al 2016). Ένας από τους κυριότερους παράγοντες για να γίνει η βιοαποδόμηση είναι η παρουσία των απαραίτητων μικροοργανισμών που διαθέτουν το μονοπάτι για την διάσπαση των κτηνιατρικών φαρμάκων. Ένας εξίσου σημαντικός παράγοντας είναι η δομή και η σύσταση του εδάφους. Έχει παρατηρηθεί από διάφορες έρευνες ότι η σύσταση του εδάφους μπορεί να μειώσει την λειτουργία και την αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων από τους μικροοργανισμούς. Έχει παρατηρηθεί διάσπαση κτηνιατρικών φαρμάκων και άλλων τοξικών ουσιών, από διάφορες ομάδες μικροοργανισμών, όπως άλγη, μύκητες, βακτήρια, ακτινοβακτήρια και αρχαία. Κάποια κτηνιατρικά φάρμακα και τοξικές ουσίες έχουν βρεθεί να διασπώνται από ένα είδος μικροοργανισμού. Τα τελευταία χρόνια διάφοροι ερευνητές έχουν παρατηρήσει ότι τα περισσότερα κτηνιατρικά φάρμακα και τοξικές ουσίες, αποδομώνται από

ομάδες μικροοργανισμών. Έχουν παρατηρήσει ότι κάποιοι μικροοργανισμοί, διασπούν ένα μέρος ενός κτηνιατρικού φάρμακου ή μιας τοξικής ουσίας, δηλαδή έχουν ένα μέρος του μονοπατιού διάσπασης του κτηνιατρικού φαρμάκου. Η ένωση που έχει μείνει από την διάσπαση την χρησιμοποιεί ένα άλλο είδος μικροοργανισμού, που έχει ένα άλλο είδος μονοπατιού, που μπορεί να διασπάσει ακόμα περισσότερο το κτηνιατρικό φάρμακο ή την τοξική ουσία. Έτσι για την πλήρη διάσπαση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου ή μιας τοξικής ένωσης, μπορεί να συνεργαστούν πολλά είδη μικροοργανισμών (το προϊόν του ενός μικροοργανισμού είναι το αντιδρών για κάποιον άλλο μικροοργανισμό), (Read, 1986).

Στην επιφάνεια του εδάφους και κυρίως στις λεπτές στοιβάδες του εδάφους, έχει παρατηρηθεί ότι αναπτύσσονται μεγάλοι αριθμοί μικροοργανισμών, πολύ περισσότεροι από οπουδήποτε αλλού. Αναπτύσσονται πάνω στις επιφάνειες των κολλοειδών του εδάφους, σχηματίζοντας έτσι τα βιοστρώματα. Τα βιοστρώματα αποτελούνται από χιλιάδες είδη και γένη μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες, άλγη και πρωτόζωα). Η δημιουργία βιοστρωμάτων δίνει πολλά πλεονεκτήματα στους μικροοργανισμούς. Ένα από αυτά, είναι η ανθεκτικότητα σε αντίξοες συνθήκες. Έχει παρατηρηθεί ότι σε περιοχές με υψηλή υγρασία και θερμοκρασία, αυξάνονται οι μικροβιακοί πληθυσμοί και κατ' επέκταση η μικροβιακή αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων. Άρα στα επιφανειακά εδαφικά στρώματα, παρατηρείται αύξηση των μικροοργανισμών λόγω άφθονης τροφής, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων. Αντίθετα στα βαθύτερα στρώματα εδάφους, παρατηρείται μειωμένη τροφή για τους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα να υπάρχει μικρή ανάπτυξη μικροοργανισμών και μικρή αποδόμηση κτηνιατρικών φαρμάκων. Όπως όλοι οι κανόνες έχουν εξαιρέσεις, έτσι και εδώ έχει παρατηρηθεί ίδιος ρυθμός αποδόμησης κτηνιατρικών φαρμάκων στα επιφανειακά εδάφη με τα βαθύτερα στρώματα. Σε κάποιες μελέτες μάλιστα έχει παρατηρηθεί μεγαλύτερος ρυθμός αποδόμησης στα βαθύτερα στρώματα από ότι στα επιφανειακά (Di et al. 1998).

Διάφοροι μικροοργανισμοί λόγω της τοξικότητας των κτηνιατρικών φαρμάκων εκκρίνουν καταβολικά ένζυμα στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου για την

διάσπαση των κτηνιατρικών φαρμάκων. Αφού έλθουν σε επαφή τα ένζυμα με το κτηνιατρικό φάρμακο και γίνει η αντίδραση τότε οι μικροοργανισμοί προσλαμβάνουν τα προϊόντα της διάσπασης για περαιτέρω μεταβολικές διαδικασίες. Υπάρχει δυνατότητα διάσπασης κτηνιατρικών φαρμακευτικών μορίων που είναι προσροφημένα σε εδαφικά κολλοειδή. Διάφοροι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν την πλήρη αποδόμηση οργανικών μορίων, για να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες, αλλά και τις ανάγκες για άνθρακα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μικροβιακή αύξηση και ανάπτυξη. Η μικροβιακή διάσπαση, μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε άμεσα διαμέσου μεταβολικών διεργασιών, όπως ανοργανοποίηση, συµμεταβολισµός, πολυµερισµός, συµπλοκοποίηση και συσσώρευση, είτε έµμεσα μέσα από επιδράσεις της μικροβιακής δραστηριότητας που μεταβάλλουν το pH και ενεργοποιούν νέες οξειδοαναγωγικές διεργασίες (Bollag & Liu 1990, Kookana et al. 1998).

Έχει παρατηρηθεί ότι, διάφοροι μικροοργανισμοί μπορούν να μεταβολίσουν κάποιες τοξικές ουσίες όπως κτηνιατρικά φάρμακα, σε ακόμα πιο τοξικές. Δηλαδή, η ατελής μικροβιακή διάσπαση κάποιων φαρμάκων, έχει σαν αποτέλεσμα, τα προϊόντα του μεταβολισμού που παράγονται να είναι πιο τοξικά από την μητρική ένωση.

1.3 Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση

Η επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση είναι το όνομα που συνήθως δίνεται στο φαινόμενο που συνδέεται με μια σημαντική αύξηση του ποσοστού της αποδόμησης ενός κτηνιατρικού φαρμάκου στο έδαφος μετά από προηγούμενη εφαρμογή του ίδιου κτηνιατρικού φαρμάκου στον ίδιο αγρό επί σειρά ετών (Ziv Arbeli, Cilia L. Fuentes et al 2007). Επίσης παρατηρείται αύξηση αποδόμησης ενός κτηνιατρικού φαρμάκου σε περιοχές που πριν είχε γίνει εφαρμογή ενός κτηνιατρικού φαρμάκου με παρόμοια χημική δομή. Προφανώς προκαλείται από μια προσαρμογή ενός ή περισσότερων ειδών μικροοργανισμών που υπάρχουν για το μεταβολισμό του κτηνιατρικού φαρμάκου. Δηλαδή μπορούν αυτοί οι μικροοργανισμοί να χρησιμοποιούν τα κτηνιατρικά φάρμακα ως πηγή ενέργειας, γενικά οι μικροοργανισμοί θεωρούνται ως οι κύριοι παράγοντες της

επιταχυνόμενης αποδόμησης. Δεδομένου ότι το έδαφος φέρει μεγάλο αριθμό διαφορετικών μικροοργανισμών υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να βρεθούν μικροοργανισμοί που να μπορούν να αποδομούν τα κτηνιατρικά φάρμακα. Η απώλεια της αποτελεσματικότητας των κτηνιατρικών φαρμάκων λόγω της επιταχυνόμενης αποδόμησης θα μπορούσε να επηρεάσει δυσμενώς την χρήση του στην κτηνοτροφία. Δηλαδή μπορεί να γίνεται πολύ γρήγορα η αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων με αποτέλεσμα να μην δρουν και να μην προστατεύουν τα ζώα.

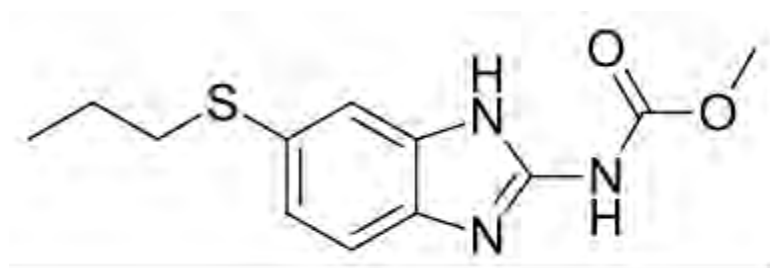
Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την μικροβιακή αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες είναι ο τύπος του εδάφους, η θερμοκρασία, το pH και η κατανομή του φαρμάκου. Η εξειδίκευση των μικροοργανισμών ως προς το είδος του κτηνιατρικού φαρμάκου που θα αποδομήσουν. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση είναι οι συνθήκες βιοδιάσπασης (Shuyan Deng et al 2015).

1.4 ALBENDAZOLE

Το albendazole ανήκει στην κατηγορία των νηματωδοκτόνων και πιο συγκεκριμένα στα βενζιμιδαζόλια (βιολογικές δραστικές ενώσεις), (Εικόνα 1). Είναι μια ένωση η οποία χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των έλμινθων τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο (Pavlovic et al., 2018). Για κτηνιατρική χρήση, το albendazole χρησιμοποιείται κυρίως σε βοοειδή και αιγοπρόβατα, αλλά έχει βρει κάποια χρήση και σε γάτες και σκύλους καθώς και σε πτηνά για παρασιτικά μαστίγια και ταινίες. Χρησιμοποιείται επίσης εκτός σήμανσης, για τη θεραπεία ενδοπαρασίτων σε κατσίκες και χοίρους. Έχει βρει χρήση και σε υδατοκαλλιέργειες ψαριών. Χορηγείται από το στόμα είτε μέσω χαπιού, είτε σε υγρή μορφή.

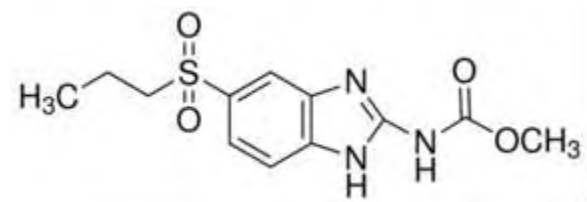
Το albendazole αναστέλλει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων τουμπουλίνης. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε μειωμένη πρόσληψη της γλυκόζης από τις προνύμφες και από τα ενήλικα παράσιτα και εξαντλεί τα αποθέματα γλυκογόνου τους. Λόγω της μειωμένης παραγωγής ενέργειας, το παράσιτο είναι ακινητοποιημένο και τελικά πεθαίνει (Pavlovic et al., 2018). Προκαλεί εκφυλιστικές αλλοιώσεις στα εντερικά κύτταρα του σκουληκιού με σύνδεση στην

β- τουμπουλίνη, αναστέλλοντας έτσι τον πολυμερισμό ή τη συναρμολόγηση της σε μικροσωληνίσκους (δεσμεύει πολύ καλύτερα την β-τουμπουλίνη των παρασίτων από αυτή των θηλαστικών). Επιπλέον δεν δημιουργείται η μιτωτική άτρακτος, με αποτέλεσμα να μην εκκολάπτονται τα αυγά των παρασίτων. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, διαταράσσει τις μεταβολικές οδούς των ελμινθών, αναστέλλοντας τα μεταβολικά ένζυμα όπως η μηλεϊνική αφυδρογονάση και η φουμαρική ρεδοουκτάση, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η μεταβολική οδός του κύκλου του Krebs και να έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του ATP, οδηγώντας το παράσιτο σε ακινητοποίηση και τελικά σε θάνατο. Ανακαλύφθηκε το 1975 από τους Robert J. Gyurik και Vassilios J. Theodorides και ανατέθηκε στη SmithKline Corporation. Καταχωρήθηκε για ανθρώπινη χρήση το 1982.

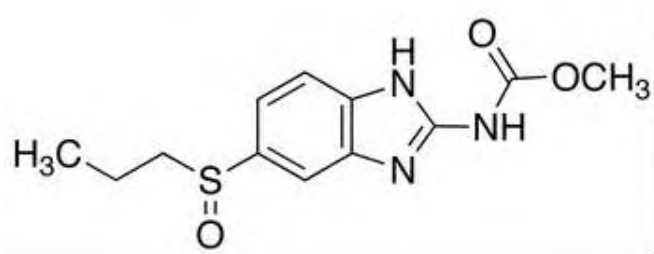


Εικόνα1: Ο χημικός τύπος του albendazole

Το albendazole μπορεί να μεταβολιστεί σε δύο εξίσου ενεργές μορφές, το albendazole sulfoxide και albendazole sulfone (Εικόνες 2 και 3 αντίστοιχα). Οι δύο αυτές ενώσεις χρησιμοποιούνται και αυτές για την καταπολέμηση των ελμινθων.



Εικόνα 2 : Ο χημικός τύπος του albendazole sulfone



Εικόνα 3: Ο χημικός τύπος του albendazole sulfoxide

1.4.1 Περιβαλλοντική τύχη και αποδόμηση του albendazol

Παρά το γεγονός ότι είναι μία ένωση η οποία έχει παραχθεί από το 1975, έχουν διεξαχθεί πολύ λίγες μελέτες για τη περιβαλλοντική τύχη του albendazole. Είναι γνωστό ότι μπορεί να μεταβολιστεί στο περιβάλλον σε albendazole sulfone ή σε albendazole sulfoxide που έχουν την ίδια περιβαλλοντική τοξικότητα. Γενικά όπως και τα περισσότερα βενζιμιδαζολικά εμφανίζουν βραδεία διάσπαση στο έδαφος (Kreuzig – et. Al. 2007). Επίσης κάποια ανθελμινθικά φάρμακα παράγωγα των βενζιμιδαζολίων, έχουν ανιχνευτεί σε αυγά και μυς πουλερικών (Moenickes et al. 2011).

Υπολείμματα του albendazole αλλά και των παραγόμενων μεταβολιτών του έχουν εντοπιστεί σε υπόγεια και επιφανειακά ύδατα σε κοπριές από φάρμες, και σε λύματα (Van De Steen et al. 2010). Έπειτα από την ανίχνευση διαφόρων φαρμάκων στα υπόγεια αλλά και επιφανειακά ύδατα, η Ευρωπαϊκή Ένωση αποφάσισε ότι, για οποιαδήποτε φαρμακευτική ουσία, η οποία χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο για τον άνθρωπο, την γεωργία ή την κτηνοτροφία, πρέπει να γίνεται εκτίμηση περιβαλλοντικού κινδύνου (Van De Steen et all 2010).

Η προσρόφηση του albendazole στο έδαφος εξαρτάται από την αναλογία οργανικής ύλης, pH και ιχνοστοιχείων στο έδαφος (χαλκού, ψευδάργυρου και σίδηρου), αλλά και από τις βροχοπτώσεις. Έχει παρατηρηθεί μεγάλη προσρόφηση. Σε διάφορες επιστημονικές έρευνες έχει παρατηρηθεί μειωμένη αποδόμηση με DT₅₀ 174 ημέρες (Kreuzig et al 2007). Επιπλέον η προσρόφηση μειώνεται σε αυξημένες τιμές pH (Pavlovicetal 2018). Γίνονται διάφορες μελέτες

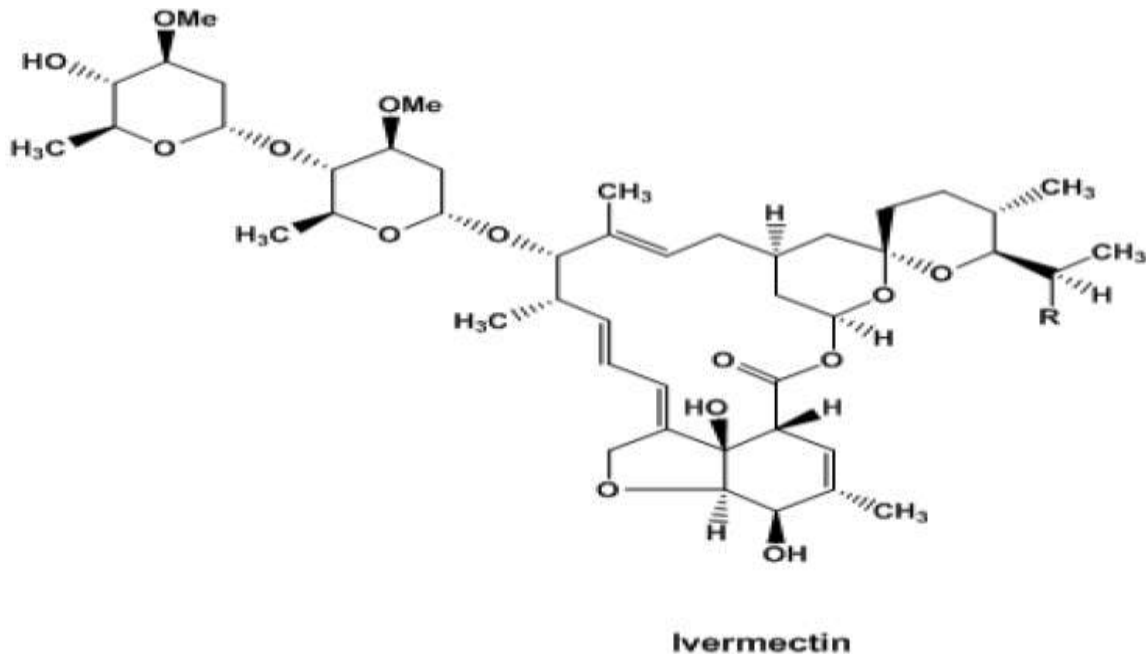
για την επίδραση του στο περιβάλλον και κυρίως σε ασπόνδυλα, για να παρατηρηθεί η επίδρασή του σε αυτούς τους οργανισμούς (Pavlovicetal 2018).

1.5 Ivermectin (ιβερμεκτίνη)

Η Ivermectin αποτελείται από δύο ομόλογα την 22,23-διυδροαβερμεκτίνη B1a, 22,23-διυδροαβερμεκτίνη B1b (Εικόνα 4). Είναι ένα ανθελμινθικό, κτηνιατρικό φάρμακο που χρησιμοποιείται στον άνθρωπο και στην κτηνοτροφία. Η Ivermectin ανακαλύφθηκε το 1975 και τέθηκε σε ιατρική χρήση το 1981. Είναι στον κατάλογο των βασικών φαρμάκων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Ανήκει στην οικογένεια των φαρμάκων της αβερμεκτίνης. Χρησιμοποιείται ως ενέσιμο αλλά και από το στόμα σε υγρή μορφή. Το πρώτο εμπορικό σκεύασμα κυκλοφόρησε το 1981 από την εταιρία Merck και περιείχε Ivermectin (ημισυνθετική αβερμεκτίνη) (Λίτσκας 2013).

Οι αβερμεκτίνες και η Ivermectin, έχουν όμοιο τρόπο δράσης κατά των παρασίτων. Στα σπονδυλωτά, το γ-αμινο-βουτυρικό οξύ (GABA) και η γλυκίνη εμποδίζουν την ηλεκτρική διεγερσιμότητα στα νευρικά κύτταρα (νευρώνες), με την αύξηση της εισροής των ιόντων χλωρίου στο μετασυναπτικό νευρώνα. Στα ασπόνδυλα, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) και το γλουταμινικό οξύ, εμποδίζουν την ηλεκτρική διεγερσιμότητα των νευρώνων με μηχανισμό παρόμοιο με αυτό στα σπονδυλωτά. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την απελευθέρωση του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή (GABA, γλυκίνη ή γλουταμινικό οξύ) από τον προσυναπτικό νευρώνα και την πρόσδεσή του σε μία πρωτεΐνη υποδοχέα του μετασυναπτικού νευρώνα, η οποία εμπεριέχει δίαυλο ιόντων χλωρίου. Όταν ο ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής προσδεθεί στον υποδοχέα, το κανάλι ανοίγει και τα ιόντα χλωρίου ρέουν μέσα στο μετασυναπτικό νευρώνα. Η διαπερατότητα των ιόντων χλωρίου προκαλεί αλλαγή στο δυναμικό της μεμβράνης που ονομάζεται ανασταλτικό μετασυναπτικό δυναμικό, το οποίο δεν επιτρέπει την εκπόλωση της και εκ τούτου την έναρξη ενός δυναμικού ενέργειας στο νευρώνα. Η διαδικασία αυτή αντιστρέφεται με τη δράση της πικροτοξίνης. Η Ivermectin προσδέεται ισχυρά στους υποδοχείς του γλουταμινικού οξέος σε θεραπευτικές δόσεις. Κατά

συνέπεια, οι αβερμεκτίνες, εμποδίζουν την ομαλή μεταβίβαση των νευρικών σημάτων στους ασπόνδυλους και τους σπονδυλωτούς οργανισμούς, με αποτέλεσμα την παράλυση και το θάνατο (Λίτσικας 2013).



Εικόνα 4 : Ο χημικός τύπος του Ivermectin

Η Ivermectin ήταν το πρώτο ευρέως φάσματος αντιπαρασιτικό φάρμακο κατά των νηματωδών και των αρθροπόδων (Campbell et al. 1983). Έχει ευρεία δράση τόσο κατά των ένδο- όσο και των έξω-παρασίτων.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του Ivermectin είναι :

- Μοριακό βάρος 875
- Υδατοδιαλυτότητα 4 mg/L
- Φωτόλυση στο νερό < 0,5 ημέρες
- Χρόνος ημίσειας ζωής στο έδαφος (DT50) 93-240 ημέρες

1.5.1 Περιβαλλοντική τύχη και αποικοδόμηση του Ivermectin

Οι Goodman et al. (2006) αναφέρουν ότι σχεδόν όλη η ποσότητα της χορηγούμενης Ivermectin απεκκρίνεται χωρίς να μεταβολιστεί από τα ζώα και καταλήγει αμετάβλητη στα κόπρανά τους. Επίσης, οι Campbell et al. (1985) βρήκαν ότι ποσοστό 90% της χορηγούμενης δόσης του Ivermectin βρέθηκε αμετάβλητο στην κοπριά των βοοειδών. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους (Chiou et al. 1990) αναφέρεται ότι ποσοστό 39 – 92% της χορηγούμενης δόσης του Ivermectin απεκκρίνεται μέσω των κοπράνων ενώ ποσοστό μικρότερο του 2% απεκκρίνεται μέσω των ούρων. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι η Ivermectin στα κόπρανα βρίσκεται αμετάβλητη σε ποσοστό 39 – 78%. Άλλες μελέτες έδειξαν υπολείμματα Ivermectin σε τοξικά επίπεδα έως και 34 ημέρες μετά τη θεραπεία (Kruger and Scholtz 1995, Kadiri et al. 1999). Επίσης, μετά από χρησιμοποίηση της Ivermectin στην ιχθυοκαλλιέργεια, εντοπίστηκαν υψηλές συγκεντρώσεις της στα ιζήματα, το νερό αλλά και σε υδρόβιους οργανισμούς (Boxall et al. 2010).

Η Merck (1983) μελέτησε τη μετακίνηση της Ivermectin σε εδαφικές στήλες οι οποίες περιείχαν τρεις τύπους εδαφών (ιλυοπηλώδες, αργιλοπηλώδες και αμμοπηλώδες). Διαπίστωσε ότι η Ivermectin παρέμεινε στα πρώτα 2,5 cm των εδαφικών στηλών μήκους 30 cm, ενώ στο νερό έκπλυσης εντοπίστηκε σε μικρή συγκέντρωση ένας μεταβολίτης, που ήταν περισσότερο πολικός από την Ivermectin. Σε παρόμοιο πείραμα οι Orpel et al. (2004) δεν εντόπισαν την Ivermectin ή κάποιους από τους μεταβολίτες της στο νερό της έκπλυσης εδαφικών στηλών που περιείχαν αμμοπηλώδες έδαφος. Οι Krogh et al. (2008b) μελέτησαν τη διασπορά της Ivermectin μέσω πειραμάτων προσρόφησης και εκρόφησης της σε σύστημα εδάφους/υδατικού διαλύματος (10 g εδάφους/50 mL 0,01 M CaCl₂) και χρησιμοποίησαν για το σκοπό αυτό τρία αμμοπηλώδη εδάφη της Ευρώπης, διαφορετικά ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Ο συντελεστής κατανομής K_d για την προσρόφηση της Ivermectin στα εδάφη αυτά, παρουσίασε εύρος τιμών από 57 έως 396 L/kg, ενώ αντίστοιχα το εύρος των τιμών του K_{oc} ήταν 4x10³ έως 2,58x10⁴. Προέκυψε το συμπέραμα ότι η συγκέντρωση της Ivermectin στο σύστημα εδάφους/υδατικού διαλύματος, είναι καθοριστική για το μέγεθος της προσρόφησης του φαρμάκου στο έδαφος.

Παρατηρήθηκε ότι, με αύξηση της συγκέντρωσης της Ivermectin στο σύστημα, δεν παρατηρήθηκε περεταίρω αύξηση της προσρόφησής της στα στερεά συστατικά του εδάφους (κατάσταση κορεσμού) και επομένως υπήρχε περισσότερη Ivermectin στην υδατική φάση, γεγονός που αυξάνει τις πιθανότητες μετακίνησής της αλλά και έκθεσης των οργανισμών μη στόχων σε αυτή. Βρέθηκε επίσης ότι ποσοστό 2 – 26% της Ivermectin που ήταν προσροφημένη στα στερεά συστατικά του εδάφους, είναι δυνατό να αποδεσμευτεί και να καταλήξει στο υδατικό διάλυμα. Τέλος σε χρωματογραφικά δεδομένα, διαπιστώθηκε ότι στη μετακίνηση της Ivermectin εμπλέκονται και ανόργανα ιόντα του εδάφους π.χ. ασβέστιο.

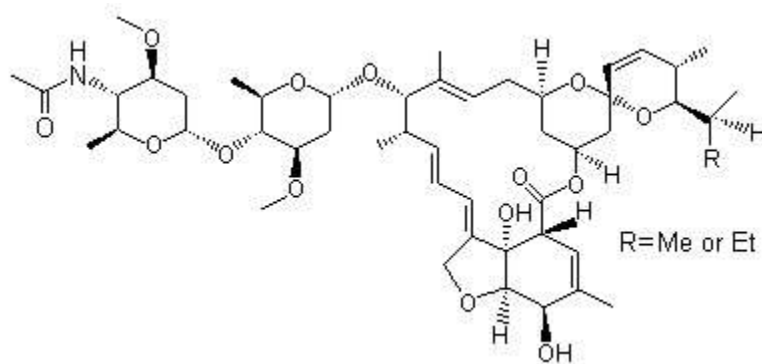
Παρατηρήθηκε ότι η δεν διασπάται εύκολα υπό αναερόβιες συνθήκες. Η Ivermectin επηρέασε τη λειτουργία του οικοσυστήματος των λιμνών στην πειραματική έρευνα (Sanderson et al. 2007). Άμεσες επιπτώσεις παρατηρήθηκαν για τους πλαγκτονικούς οργανισμούς των λιμνών κατά την πρώτη εβδομάδα μετά την είσοδο της Ivermectin σε συγκέντρωση 10 ng/L. Η αφθονία και η ποικιλότητα των ειδών των κλαδόκερων, μειώθηκε σημαντικά όταν η συγκέντρωση της Ivermectin στο νερό ήταν 5 ng/L. Η Ivermectin προκάλεσε χρόνιες επιπτώσεις στην ποικιλότητα των κλαδόκερων και κωπήποδων, ακόμη και όταν η συγκέντρωσή της ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης στο νερό (1 ng/L) και η αντίστοιχη συγκέντρωση στα ιζήματα ήταν περίπου 25 ng/kg υ.β. Οι παραπάνω ερευνητές διαπίστωσαν μακροχρόνιες επιπτώσεις στην ποικιλότητα των εφημερόπτερων ειδών και των κλαδόκερων του είδους Chydorous, έως και 265 ημέρες μετά την είσοδο της Ivermectin στις λίμνες (Sanderson et al. 2007).

Οι Prasse et al. (2009) και οι Krogh et al. (2009) διαπίστωσαν ότι η Ivermectin είναι εξαιρετικά ανθεκτική στη διάσπαση, όταν βρίσκεται στο έδαφος και τα ιζήματα. Οι Liebig et al. (2010) διαπίστωσαν ότι οι επιπτώσεις στο περιβάλλον από τη χρήση της Ivermectin στην κτηνοτροφία, είναι πολύ σοβαρές και έτσι προτείνουν την αναθεώρηση της άδειας κυκλοφορίας τους.

1.6 Eprinomectin (Επρινομεκτίνη)

Η eprinomectin είναι ημισυνθετική μακροκυκλική λακτόνη που αποτελείται από μίγμα δύο ομολόγων, της eprinomectin B1a (90%, M.B.: 914) και της B1b (10%,

M.B.: 900) (Εικόνα 5) και χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση των ένδο- και έκτοπαρασιτώσεων των βοοειδών. Τα χημικά ονόματα των δύο ομολόγων είναι (4''R)-4''ακετυλαμινο-5-O-διμεθυλ-4''-διοξαβερμεκτίνη A1α ή επρινομεκτίνη B1α και (4''R)-4''ακετυλαμινο-5-O-διμεθυλ-25-δι(1μεθυλπροπυλ)-4''-δεοξυ-25-(1-μέθυλ)αβερμεκτίνη A1α ή επρινομεκτίνη B1b (Merck 1996). Τα δύο ομόλογα μπορούν να διαχωριστούν χρωματογραφικά όμως παρουσιάζουν πανομοιότυπη βιοχημική συμπεριφορά και δεν διαχωρίζονται στην πράξη (Jones et al., 1994).



Εικόνα 5 : Eprinomectin

Το eprinomectin είναι ανθελμινθικό νηματωδοκτόνο φάρμακο που ανήκει στην κατηγορία των αβερμεκτινών. Το eprinomectin έχει παρόμοιο τρόπο δράσης και παρόμοια δομή όπως οι υπόλοιπες αβερμεκτίνες, έχουν ίδια αποτελεσματικότητα εναντίον των περισσότερων παρασίτων στα ζώα. Παρόλα αυτά οι όποιες διαφορές στη χημική τους δομή, οδηγούν σε διαφοροποιήσεις στα δοσολογικά σχήματα, στην φαρμακοκινητική τους και στην τοξικότητά τους, που με τη σειρά τους τις διαφοροποιούν ως προς τη δραστηριότητα και την αποτελεσματικότητα (Lanusse et al. 1997). Το eprinomectin είναι κτηνιατρικό φάρμακο ευρέος φάσματος και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση:

1) των ασκαρίδων του εντέρου π.χ. *Haemonchus placei*, *Ostertagia ostertagi*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus longispicularis*, *Cooperia onchophora*, *Cooperia punctata*, *Cooperia surnabada*, *Nematodirus helvetianus*, *Oesophagostomum radiatum*, *Bunostomum phlebotomum*, *Strongyloides papillosus*, *Trichuris* spp.,

2) των σκωλήκων του πνεύμονα π.χ. *Dictiocaulus viviparus*,

- 3) των προνυμφών των εντόμων π.χ. *Hypoderma lineatum*, *Hypoderma bovis*,
- 4) των ψειρών π.χ. *Damalia bovis*, *Linognathus vituli*, *Haematopinus eurysternus*, *Solenopotes capillatus*,
- 5) των ακάρεων της ψώρας π.χ. *Chorioptes bovis*, *Sarcoptes scabiei* και
- 6) των εντόμων π.χ. *Haematobia irritans*

Εφαρμόζεται με ενστάλαξη ή σε ενέσιμη μορφή.

Φυσικοχημικές ιδιότητες του eprinomectin (Merck 1996).

- Πυκνότητα (g/cm³) 1,23 ± 0,04
- Σημείο τήξης (°C) 163 – 166
- Διαλυτότητα στο νερό (mg/mL)
- 0,0035 ± 0,0002
- DT50 έδαφος (22 ± 3 °C) 64 ημέρες
- DT50 νερό 0,21 – 1,29 ημέρες
- DT50 υδρόλυση > 1 χρόνο (σταθερή στην υδρόλυση)

1.6.1 Περιβαλλοντική τύχη Eprinomectin

Οι πληροφορίες σχετικά με την παρουσία και την τύχη του eprinomectin στο περιβάλλον είναι πολύ περιορισμένες. Διάφορες μελέτες έχουν βρει ποσότητες eprinomectin στο περιβάλλον (Merck 1996).

Με βάση τη βιβλιογραφία, είναι περιορισμένος ο αριθμός των δεδομένων για την τοξικότητα του eprinomectin σε οργανισμούς μη στόχους. Το eprinomectin θεωρείται ιδιαίτερα τοξική για τους πλαγκτονικούς οργανισμούς, τα έντομα και τα σκαθάρια της κοπριάς και έχει επίσης τοξική δράση στα βακτήρια και τους μύκητες του εδάφους, στους γαιοσκώληκες, στους φυτικούς οργανισμούς, στα ψάρια, στα πτηνά και στα ανώτερα θηλαστικά (Merck 1996). Οι Lumaret et al. (2005) διαπίστωσαν ότι η παρουσία του eprinomectin στην κοπριά των βοοειδών εμπόδιζε την εξέλιξη της προνύμφης του εντόμου *Neomyia cornicina*.

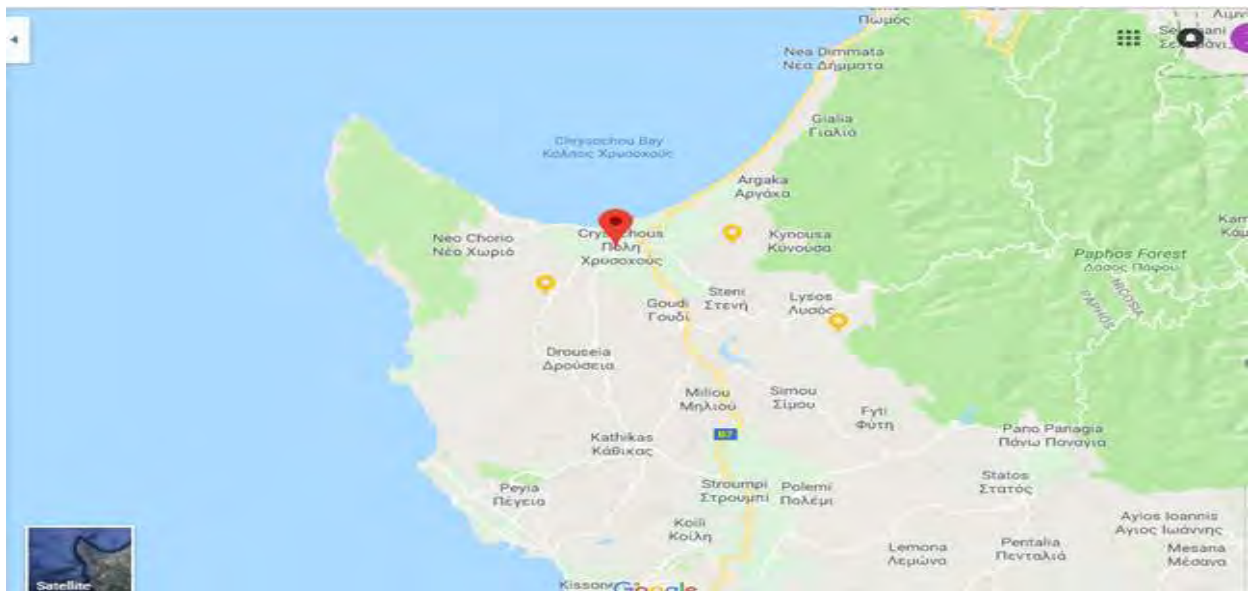
1.7 Σκοπός του πειράματος

Σκοπός αυτής της έρευνας είναι να διερευνηθεί η περιβαλλοντική τύχη και υπολειμματικότητα του eprinomectin, ivermectin και albedazole και των μεταβολιτών σε εδάφη που έχουν εκτεθεί στις συγκεκριμένες, αλλά και σε εδάφη που δεν έχουν εκτεθεί, για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει μικροβιακή διάσπαση αυτών των κτηνιατρικών φαρμάκων. Η υπόθεση που θα μελετήσουμε είναι ότι η συνεχής έκθεση εδαφών στα διάφορα ανθελμινθικά φάρμακα μέσω της απόθεσης ούρων, κοπράνων ή κοπριών επιβαρυσμένων με ανθελμινθικά φάρμακα αναμένεται να οδηγεί στην επιλογή μικροοργανισμών στο έδαφος που να εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα αποδόμησης των συγκεκριμένων φαρμάκων. Γενικότερα θα μελετηθεί ο ρόλος των μικροοργανισμών στην αποδόμηση των παραπάνω ανθελμινθικών.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα εδαφών

Δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από διάφορα χωριά της Πόλης Χρυσοχούς (Εικόνα 6) που είχαν ιστορικό έκθεσης στα κτηνιατρικά φάρμακα ivermectin, ivermectin και albedazole μέσω της απόθεσης κοπριάς ή κοπράνων και ούρων από ζώα που έχουν δεχτεί εφαρμογή των παραπάνω φαρμάκων. Παράλληλα συλλέχθηκαν και από χωράφια που δεν ήρθαν σε επαφή με αυτά τα κτηνιατρικά φάρμακα (μάρτυρες).



Εικόνα 6: Οι περιοχές που έγιναν οι δειγματοληψίες των εδαφών (με κίτρινο αστερίσκο είναι οι περιοχές που έγιναν οι δειγματοληψίες από τις κτηνοτροφικές μονάδες και με κόκκινο σημάδακι οι περιοχές που έγιναν οι δειγματοληψίες για τους μάρτυρες)

Συλλέχθηκε έδαφος από διάφορες κτηνοτροφικές μονάδες με αιγοπρόβατα. Η πρώτη μονάδα βρίσκεται στην περιοχή Ανδρολίκου δίπλα στο χωριό Προδρόμι (ιδιοκτησία Λεωνίδα Λεωνίδου, Μονάδα 1). Από τη συγκεκριμένη μονάδα συλλέχθηκε έδαφος από δύο διαφορετικά σημεία. Το πρώτο έδαφος

συλλέχθηκε μέσα από το μαντρί, που υπήρχαν ζώα που είχαν εμβολιαστεί με Eprinomectin και με ivermectin πριν από μερικούς μήνες. Η δεύτερη συλλογή έγινε από λειμώνες που έβοσκαν τα ζώα της ίδιας κτηνοτροφικής μονάδας.

Η δεύτερη μονάδα από την οποία συλλέχτηκε έδαφος βρίσκεται στο χωριό Ιστιντζιό (Κιός) (ιδιοκτησίας Βασίλη Ευσταθίου, Μονάδα 2). Από την συγκεκριμένη μονάδα πάρθηκαν δείγματα εδάφους, από το μαντρί και από λειμώνα που χρησιμοποιείται για την βόσκηση προβάτων. Οι δύο ιδιοκτήτες έχουν εμβολιάσει τα ζώα με Eprinomectin 20mg/ml και ivermectin 0,8mg/ml και οι δύο κτηνοτρόφοι χορηγούσαν για μεγάλο χρονικό διάστημα ivermectin 0,8mg/ml. Τον τελευταίο χρόνο και οι δύο κτηνοτρόφοι χρησιμοποιούν το Eprinomectin ως ενέσιμο.

Τέλος πραγματοποιήθηκε και τρίτη δειγματοληψία από κτηνοτροφική μονάδα (ιδιοκτησία Ανδρέα Πελοπίδα) στο χωριό Πελαθούσα Μονάδα 3. Εδάφη συλλέχθηκαν από το μαντρί και τον λειμώνα της μονάδας. Στην συγκεκριμένη μονάδα γίνεται μεταχείριση των ζώων με albendazole από το στόμα. Επίσης έγινε συλλογή εδαφών από δύο αγρούς στο χωριό Προδρόμι από το οποίο ήταν και οι δύο μάρτυρες (δηλαδή χωρίς προηγούμενο ιστορικό έκθεσης στα κτηνιατρικά φάρμακα).

2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εδαφών

Έγινε άμεση μεταφορά των εδαφών στο εργαστήριο όπου κοσκινίστηκαν και στην συνέχεια πάρθηκαν δείγματα 50 – 200g, όπου και στάλθηκαν για τον προσδιορισμό της υγρασίας και υδατοχωρητικότητας τους, αλλά και των κυριότερων φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών όπως pH, περιεκτικότητα σε οργανικό C και μηχανική σύσταση.

2.2.1 Προσδιορισμός υγρασίας των εδαφών

Στον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας, $5 \pm 0.01g$ εδάφους μεταφέρθηκαν σε προ-ζυγισμένο δοχείο από αλουμίνιο και το συνολικό βάρος καταγράφηκε. Έγιναν τρεις επαναλήψεις για κάθε δείγμα εδάφους. Έπειτα τα

δείγματα μεταφέρθηκαν σε προθερμασμένο φούρνο στους 105 °C και εκεί έμειναν για 24 ώρες. Στην συνέχεια έγινε ξανά ζύγισμα στα εδάφη και ο προσδιορισμός της υγρασίας των εδαφών σύμφωνα με τον τύπο:

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

MC: η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους

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

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

W_{cont}: το βάρος του δοχείου

2.2.2 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών

Για να τον προσδιορισμό της υδατοχωρητικότητας των εδαφών, χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250 ml, όπου στα στόμια τους τοποθετήθηκαν χωνιά και μέσα στα χωνιά διηθητικό χαρτί (Whatman No1). Βρέχθηκε το διηθητικό χαρτί με νερό και έπειτα τοποθετήθηκε στο διηθητικό 10gr εδάφους από τα δείγματα. Έπειτα ζυγίστηκε το χωνί με το διηθητικό χαρτί και με το έδαφος. Στην συνέχεια τα 10 gr εδάφους βρέχθηκαν επανειλημμένα με αποσταγμένο νερό προκειμένου να διασφαλιστεί ο κορεσμός του εδάφους. Η ελεύθερη επιφάνεια του χωνιού καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή απώλειας νερού λόγω εξάτμισης. Το έδαφος αφέθηκε σε ηρεμία 12-14 ώρες, ούτως ώστε να στραγγίσει η περίσσεια του νερού. Το βάρος του χωνιού, με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος καταγράφηκε πριν (W1) και μετά (W2) την κατάκλιση. Για κάθε δείγμα εδάφους χρησιμοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις. Ακολούθως, η υδατοχωρητικότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

WWHC: η υδατοχωρητικότητα του εδάφους

B: το βάρος του εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

X: το ξηρό βάρος εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

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

W2: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, μετά την κατάκλιση $HC = (B - X) + (W2 - W1) / X * 100\%$

2.3 Διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια και κτηνιατρικά φάρμακα

Ζυγίστηκε Eprinomectin 0,0010 g, το οποίο διαλύθηκε σε 10 ml ακετονιτρίλιο. Το ίδιο έγινε και με τις υπόλοιπες δύο ενώσεις οι οποίες διαλύθηκαν σε μεθανόλη 10 ml. Για την εφαρμογή στο έδαφος προετοιμάστηκαν διαλύματα Eprinomectin 1000 mg/L σε ακετονιτρίλιο (ACN), ivermectin, 1000 mg/L σε μεθανόλη (MeOH), albendazole 1000 mg/L σε μεθανόλη (MeOH). Μετά από αραιώσεις των τριών κτηνιατρικών φαρμάκων, προετοιμάστηκαν διαλύματα 30mg/L όπου από αυτά έγινε εφαρμογή στο έδαφος (500 g εδάφους).

Για τις εκχυλίσεις και την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν MeOH, ACN και νερό HPLC grade (Merck), ορθο-φωσφορικό οξύ (H₃PO₄ 0,1%), ανυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO₄ 98+%, CHEM-LAB), χλωριούχο νάτριο (NaCl AppliChem 99,5%), sodium citrate-tribasic (C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O, AppliChem 99100%) και PSA (Agilent Technologies).

2.4 Προσδιορισμός πρότυπης καμπύλης

Για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των ουσιών συγκέντρωσης 1000 mg/L σε μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο. Ακολουθώντας με διαδοχικές αραιώσεις 100mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L και 0,01 mg/L. Από αυτές πάρθηκαν δείγματα και αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης των τριών ουσιών.

2.5 Πείραμα αποδόμησης κτηνιατρικών φαρμάκων στα εδάφη

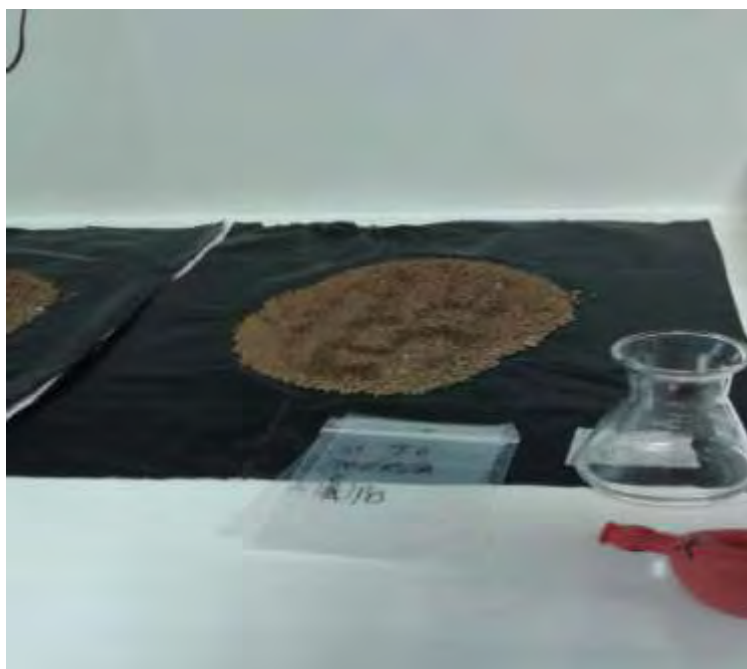
2.5.1 Περιγραφή του πειράματος

Καθένα από τα δείγματα εδάφους που πάρθηκαν από τις Μονάδες 1, 2 και 3 διαχωρίστηκαν σε δύο υποδείγματα (500-1000 g). Το ένα από αυτά αποστειρώθηκε με καπνισμό με χλωροφόρμιο όπως περιγράφεται παρακάτω και το δεύτερο παρέμεινε ως έχει. Με την ολοκλήρωση της αποστείρωσης καθένα από τα δείγματα εδάφους (αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα) από τις Μονάδες 1 και 2 διαχωρίστηκαν σε δύο υποδείγματα. Τα πρώτα υποδείγματα δέχθηκαν εφαρμογή eprinomectin με τελική συγκέντρωση στο έδαφος 1mg/Kg ενώ τα δεύτερα δέχτηκαν εφαρμογή ivermectin με τελική συγκέντρωση στο έδαφος 1mg/Kg. Τα δείγματα από την Μονάδα 3 δέχτηκαν εφαρμογή albendazole με τελική συγκέντρωση στο έδαφος τα 1mg/Kg. Αντίστοιχα πραγματοποιήθηκε εφαρμογή των eprinomectin, ivermectin και albendazole στα εδάφη - μάρτυρες όπως περιγράφηκε για τα δείγματα με ιστορικό έκθεσης.

Αμέσως μετά την εφαρμογή η υγρασία των δειγμάτων προσαρμόστηκε στο 40% της υδατοχωρητικότητας με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων νερού. Ακολούθως τα δείγματα αναμίχθηκαν με το χέρι ώστε να επιταχύνουμε ομοιόμορφη κατανομή των κτηνιατρικών φαρμάκων σε όλο τον όγκο του εδάφους και διαχωρίστηκαν σε υποδείγματα των 10 g (15 δείγματα) τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες με αεροστεγές κλείσιμο και τοποθετήθηκαν σε ψυχώμενο επωαστικό θάλαμο στους 20°C στο σκοτάδι. Στις σακούλες δημιουργήθηκε οπή ώστε να διατηρηθούν οι αερόβιες συνθήκες. Αμέσως μετά την εφαρμογή (t0) και 5(t5), 10(t10), 30(t30), 60(t60) ημέρες αργότερα τρία δείγματα από κάθε έδαφος και μεταχείριση απομακρύνονταν από την επώαση και τοποθετούνταν στους -20°C μέχρι να αναλυθούν για υπολείμματα albendazole, eprinomectin, ivermectin στο έδαφος.



Εικόνα 7 : Εφαρμογή κτηνιατρικών φαρμάκων 1mg/Kg στο έδαφος και προσαρμογή ης υγρασίας των εδαφών στο 40%.



Εικόνα 8: Εφαρμογή κτηνιατρικών φαρμάκων και μεταφορά τους σε πλαστικά σακουλάκια.

2.5.2 Τα δείγματα εδάφους αποστειρώθηκαν μέσω καπνισμού με χλωροφόρμιο.

Τα εδάφη τοποθετήθηκαν εντός μάζας από γάζες σε γυάλινους ξηραντήρες (Εικόνα 11). Στον πυθμένα του ξηραντήρα τοποθετήθηκε χλωροφόρμιο και ο ξηραντήρας έκλεισε αεροστεγώς. Τα εδάφη διατηρήθηκαν υπό κενό εντός του ξηραντήρα για 7 ημέρες και ακολούθως αφού απομακρύνθηκαν τα υπολείμματα χλωροφορμίου, επώαστηκαν για διάστημα 7 ημερών στους 20°C. Με την διαδικασία αυτή επιτρέπουμε την ανάπτυξη τυχών μικροοργανισμών που διέφυγαν τον πρώτο καπνισμό των εδαφών. Ακολούθως τα εδάφη επανατοποθετήθηκαν σε ξηραντήρες με χλωροφόρμιο (CHCl_3) για ακόμη 7 μέρες για εξάλειψη των μικροοργανισμών που επιβίωσαν του πρώτου καπνισμού και αναπτύχθηκαν κατά την ενδιάμεση περίοδο επώασης. Στην συνέχεια στα αποστειρωμένα εδάφη έγινε εφαρμογή των τριών κτηνιατρικών φαρμάκων όπως περιγράφηκε παραπάνω.



Εικόνα 9 : Ξηραντήρες που χρησιμοποιήθηκαν για αποστείρωση με χλωροφόρμιο

2.6 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων των κτηνιατρικών φαρμάκων στο έδαφος

2.6.1 Ανάκτηση albendazole, Eprinomectin , ivermectin από το έδαφος

Για τα κτηνιατρικά φάρμακα που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκαν τεστ ανάκτησης σε τρία επίπεδα 0,05 mg/Kg, 0,5 mg/Kg, 1mg/Kg, σε έδαφος το οποίο δεν έχει έρθει ξανά σε επαφή με αυτά τα κτηνιατρικά φάρμακα. Για κάθε εφαρμογή ζυγίζονταν κάθε φορά 100 g εδάφους. Αυτό έγινε για να δοκιμαστεί η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της κάθε μεθόδου. Για να θεωρηθεί αποδεκτή η μέθοδος εκχύλισης για μια ουσία θα πρέπει να έχουμε ανάκτηση σε όλα τα επίπεδα φόρτισης πάνω από το 80% της ποσότητας που περιμέναμε. Τα τεστ ανάκτησης της μεθόδου επιβεβαίωσαν την ικανότητα της μεθόδου να εκχυλίζει αποτελεσματικά τα υπολείμματα των παραπάνω φαρμάκων με επίπεδα ανάκτησης > 80% σε όλες τις περιπτώσεις.

2.6.2 Εκχύλιση Albendazole και των μεταβολιτών του Albendazole sulfone και Albendazole sulfoxide από το έδαφος

Για την εκχύλιση του albendazole ζυγίστηκαν 5 g εδάφους σε κωνικές των 100ml και προστέθηκαν 10 ml ακετονιτρίλιο. Καλύφθηκαν οι κωνικές με αλουμινένια διαφάνεια και τοποθετήθηκαν για μια ώρα σε ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 300 rpm. Με το τέλος της ανάδευσης έγινε μεταφορά του υπερκείμενου από τις κωνικές σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης Teflon. Προστέθηκαν ακόμη 10ml ακετονιτρίλιο στο υποκείμενο στις κωνικές φιάλες και καλύφθηκαν ξανά με αλουμινένια διαφάνεια και τοποθετήθηκαν για ακόμα μια ώρα ανάδευση. Όταν τελείωσε η ανάδευση προστέθηκε το υπερκείμενο ξανά στα Teflon και έγινε ανάμιξη με το προηγούμενο υπερκείμενο που είχαν οι σωλήνες Teflon. Στην συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στους πλαστικούς σωλήνες Teflon στις 7500 rpm (στροφές) σε θερμοκρασία 20 °C για 5 λεπτά (min). Με το τέλος της φυγοκέντρησης αφαιρέθηκε το υπερκείμενο το οποίο διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου σύριγγας με πόρους 0,45μm. Το διήθημα ακολούθως αναλύθηκε για υπολείμματα albendazole, albendazole sulfoxide και sulfone σε σύστημα HPLC-DAD όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.6.3 Εκχύλιση Ivermectin από το έδαφος

Στην εκχύλιση του Ivermectin ζυγίστηκαν 5 g εδάφους και τοποθετήθηκαν σε κωνικές των 100ml , προστέθηκαν 15 ml μεθανόλη, καλύφθηκαν οι κωνικές με αλουμινένια διαφάνεια και τοποθετήθηκαν για μια ώρα ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 300rpm. Με το τέλος της ανάδευσης έγινε μεταφορά του υπερκείμενου από τις κωνικές στους πλαστικούς σωλήνες Teflon. Έγινε φυγοκέντρηση στους πλαστικούς σωλήνες Teflon στις 7500 rpm (στροφές) σε θερμοκρασία 20 °C για 5 λεπτά (min). Κατόπιν το υπερκείμενο διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου σύριγγας 0,45μm και το διήθημα αναλύθηκε για υπολείμματα ivermectin σε σύστημα HPLC-DAD όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.6.4 Εκχύλιση Eprinomectin από το έδαφος

Η εκχύλιση του Eprinomectin από τα δείγματα εδάφους πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο QUECHERS (Asenio-Ramosetal., 2010). Η μέθοδος QUECHERS περιλαμβάνει δύο επιμέρους στάδια : (1) το στάδιο της

εκχύλισης και (2) το στάδιο καθαρισμού. Στο στάδιο εκχύλισης, 5g εδάφους ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωλήνες Teflon όπου προστέθηκαν 5 ml απιονισμένου νερού που βρισκόταν στους 4°C και ακολούθησε Vortex. Έπειτα προστέθηκαν 10 ml διαλύτη ACN και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε Vortex για 1 min. Στην συνέχεια, προστέθηκε μίγμα αλάτων αποτελούμενο από 4 g άνυδρο $MgSO_4$, 1 g NaCl και 1,5 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2 H_2O$ και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε Vortex για 1 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (min) σε 7500 rpm. Το υπερκείμενο διάλυμα συλλέχθηκε με σύριγγα και τοποθετήθηκε σε γυάλινους σωλήνες. Από τους γυάλινους σωλήνες έγινε μεταφορά 1ml σε σωλήνα erpendorf που περιείχε 150 mg $MgSO_4$ και 25 mg PSA και ακολούθησε ανάδευση σε Vortex για 30 sec. Στην συνέχεια έγινε δεύτερη φυγοκέντρηση για 1 min σε 4000 rpm. Κατόπιν το υπερκείμενο διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου σύριγγας 0,45μm και ακολούθησε χρωματογραφική ανάλυση.

2.7 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για την ανάλυση των εκχυλισμένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα HPLC Μοντέλο της εταιρείας UFLC SHIMADZU με ανιχνευτή φωτοδιόδων και στήλη Athena C18, 120A, (4,6 mm x 150mm, 5μm). Η ροή της κινητής φάσης για τα κτηνιατρικά φάρμακα Albendazole (και των μεταβολιτών του) και Eprinomectin ήταν 1 ml min^{-1} ενώ για το Ivermectin ήταν $1,4 \text{ ml min}^{-1}$. Οι συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης για τα κτηνιατρικά φάρμακα Eprinomectin, Albendazole, Ivermectin περιγράφονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Συνθήκες ανάλυσης των υπό μελέτη κτηνιατρικών φαρμάκων σε σύστημα HPLC

| Κτηνιατρικά φάρμακα | Κινητή φάση | Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης | Μήκος κύματος (nm) | Χρόνος έκλουσης | Ροή ml/min |
|---------------------|-------------------------|---------------------------------|--------------------|-----------------|------------|
| Eprinomectin | MeOH : H ₂ O | 90:10 | 245 | 6,2 min | 1 |

| | | | | | |
|------------------------------|--|-------|-----|----------|-----|
| Albendazole | ACN : H ₃ PO ₄ (0,1%) | 20:80 | 205 | 27,5 min | 1 |
| Albendazole sulfoxide | ACN : H ₃ PO ₄ (0,1%) | 20:80 | 220 | 4,5 min | 1 |
| Albendazole sulfone | ACN : H ₃ PO ₄ (0,1%) | 20:80 | 220 | 10,1min | 1 |
| Ivermectin | MeOH :H ₂ O | 90:10 | 245 | 8,85 min | 1,4 |

2.8 Επεξεργασία αποτελεσμάτων και υπολογισμός DT50

Για τον υπολογισμό του χρόνου ημιζωής (DT50), δηλαδή του χρόνου (σε ημέρες, εβδομάδες ή έτη) που απαιτείται για να διασπασθεί το 50% της αρχικής συγκέντρωσης ενός κτηνιατρικού φαρμάκου, των eprinomectin, ivermectin, albendazole, χρησιμοποιήθηκαν τα μοντέλα κινητικής που έχουν προταθεί από το FOCUS working group (FOCUS 2006). Συγκεκριμένα για τον υπολογισμό των DT50 χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά μοντέλα κινητικής: το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Single first order, SFO) και δύο μη γραμμικά μοντέλα κινητικής (Hockey Stick, και Bi-exponential), (Πίνακας 2). Το στατιστικό πρόγραμμα R χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των παραμέτρων των εξισώσεων των μοντέλων κινητικής και το σχεδιασμό των διαγραμμάτων. Γενικότερα, τα διφασικά μοντέλα κινητικής, χρησιμοποιήθηκαν μόνο στις περιπτώσεις στις οποίες το μοντέλο SFO δεν περιέγραφε με ικανοποιητική ακρίβεια ($\chi^2 > 15\%$) την κινητική αποδόμησης των κτηνιατρικών φαρμάκων.

Πίνακας 2: Οι μαθηματικές εξισώσεις των μοντέλων κινητικής για τη διάσπαση των κτηνιατρικών φαρμάκων και οι εξισώσεις υπολογισμού του χρόνου ημιζωής τους.

| Μοντέλο | Μαθηματική εξίσωση | Υπολογισμός Ημιζωής |
|--|---------------------------------------|-------------------------|
| Single first order (linear) (SFO) | $C = C_0 e^{-kt}$ | $t_{1/2} = \ln 2 / K$ |
| Hockey Stick (HS) | $C = C_0 e^{-k_1 t}$ for $t \leq t_b$ | $t_{1/2} = \ln 2 / K_1$ |

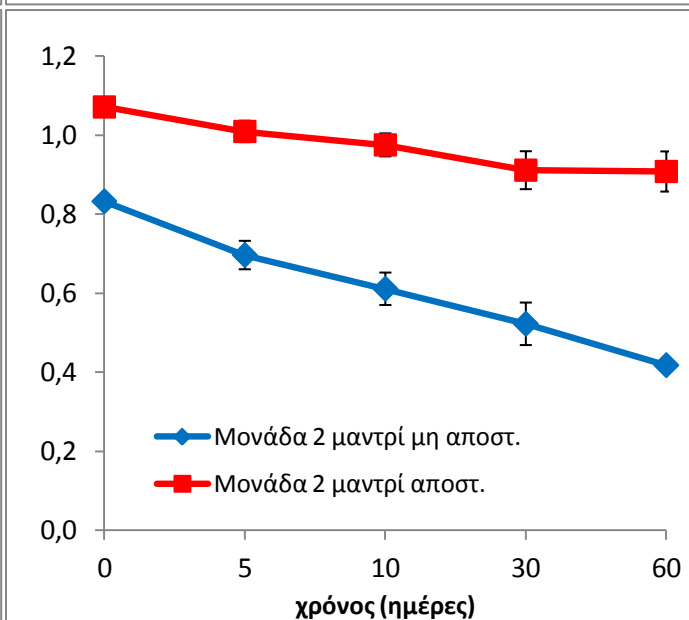
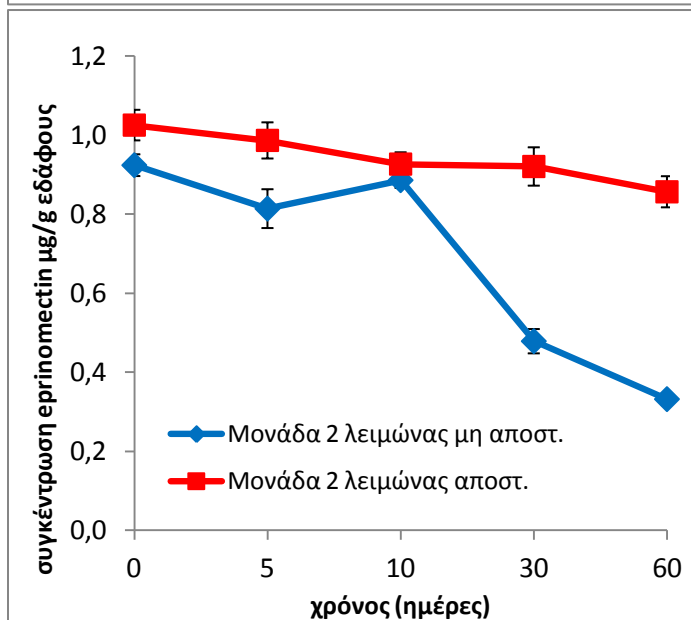
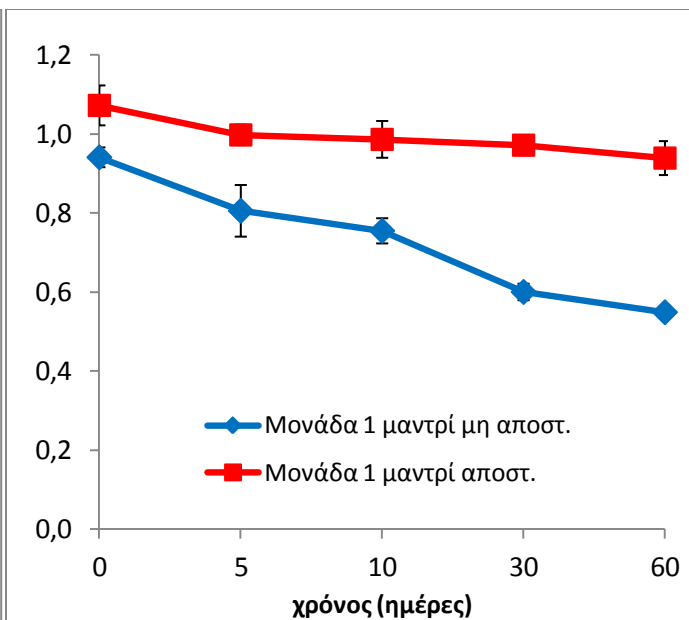
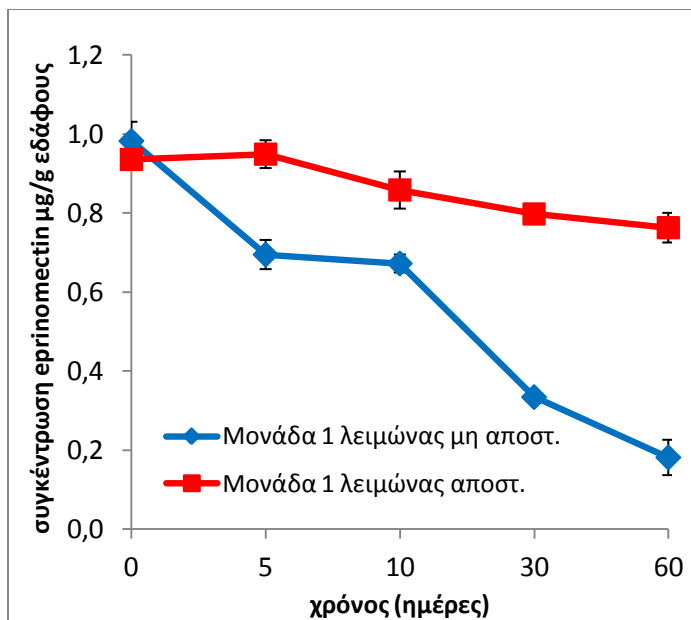
| | | |
|------------------------------|--|---|
| | $C = C_0 e^{-k_1 t} e^{-k_2(t-t_b)}$ for $t > t_b$ | $t_{1/2} = t_b + (\ln 2 - k_1 t_b) / k_2$ |
| Bi-exponential (DFOP) | $C = C_0 (g e^{-k_1 t} + (1-g) e^{-k_2 t})$ | Iterative method |

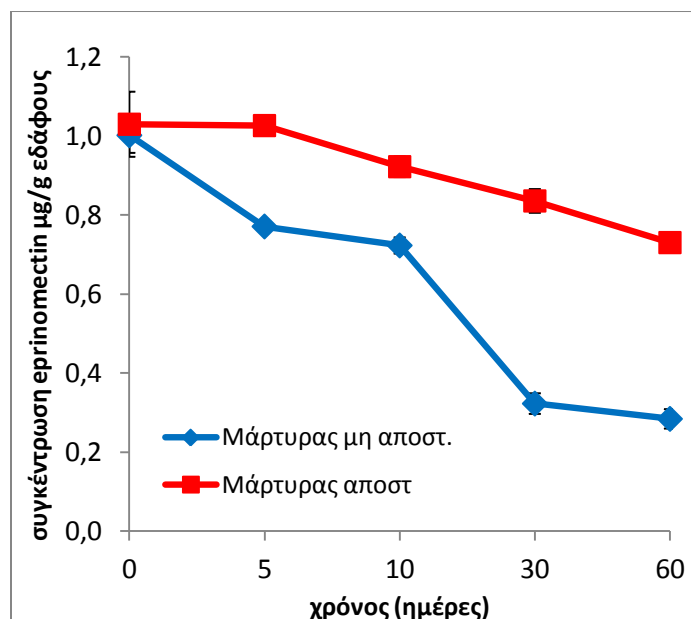
Τα δεδομένα αποδόμησης (DT50) των κτηνιατρικών φαρμάκων που μελετήθηκαν συσχετίστηκαν με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών και την ύπαρξη ή όχι ιστορικού χρήσης του κάθε κτηνιατρικού φαρμάκου, ούτως ώστε να αξιολογηθεί ο ρόλος βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων, στην αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων που μελετήθηκαν στο έδαφος.

3 Αποτελέσματα

3.1 Αποδόμηση Eprinomectin

Αποδόμηση του Eprinomectin σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από τις μονάδες 1 και 2 με ιστορικό χρήσης eprinomectin παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1.





Διάγραμμα 1. Η αποδόμηση του Eprinomectin σε αποστειρωμένα (κόκκινη γραμμή) ή μη αποστειρωμένα (μπλε γραμμή) εδάφη από τις μονάδες 1 και 2. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση

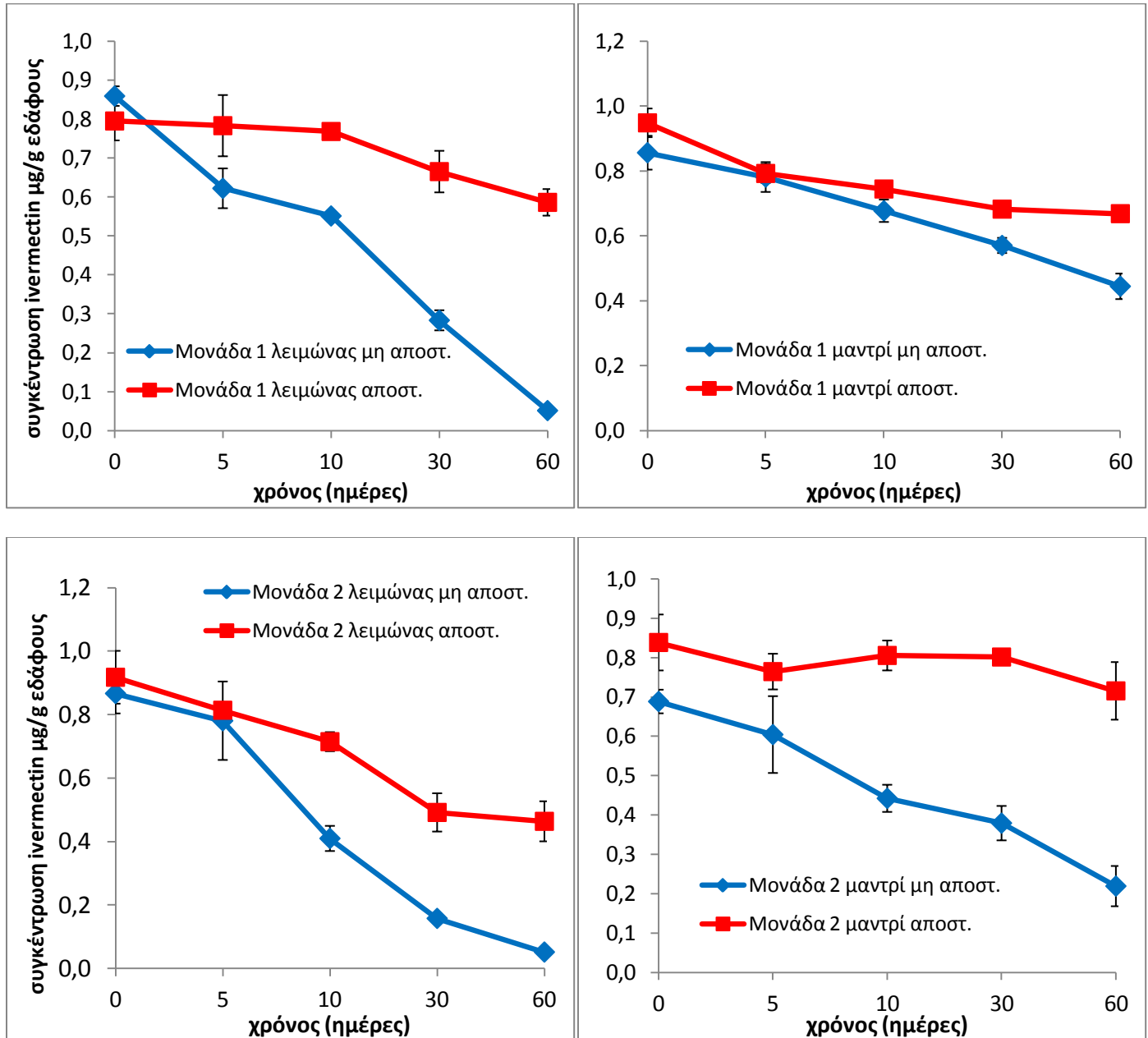
Γενικότερα η αποδόμηση του eprinomectin στα περισσότερα εδάφη, ανεξάρτητα από την εφαρμογή καπνισμού ή όχι, ακολούθησε κινητική πρώτης τάξης με εξαίρεση τα δείγματα εδάφους από το εσωτερικό της μονάδας (μαντρί) 1 και 2. Το eprinomectin εμφάνισε μέτρια υπολειμματικότητα στα μη αποστειρωμένα εδάφη που μελετήθηκαν με τιμές DT_{50} που κυμάνθηκαν από 21 ημέρες στα δείγματα από το λειμών της Μονάδας 1 ως και 73,6 ημέρες στα δείγματα από το μαντρί της ίδιας Μονάδας (Πίνακας 3). Η αποστείρωση του εδάφους οδήγησε σε δραματική επιβράδυνση της αποδόμησης του eprinomectin σε όλα τα εδάφη με τιμές DT_{50} από 116 ημέρες στο μάρτυρα ως >365 ημέρες σε άλλα δείγματα (Πίνακας 3). Επιπλέον ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις ήταν (α) η ταχύτερη αποδόμηση του eprinomectin στα εδάφη που συλλέχθηκαν από τους λειμώνες (μαντρί) (DT_{50} = 21 και 37 ημέρες) σε σχέση με τα εδάφη που συλλέχθηκαν από εντός των κτηνοτροφικών μονάδων (DT_{50} = 74 και 56 ημέρες), (β) η ταχεία αποδόμηση του eprinomectin στο έδαφος-μάρτυρα (DT_{50} = 24,6 ημέρες) σε σχέση με τα περισσότερα από τα εδάφη που συλλέχθηκαν από τις δύο κτηνοτροφικές μονάδες και είχαν εκτεθεί έμμεσα (μέσω κοπράνων και ούρων των ζώων) στο eprinomectin.

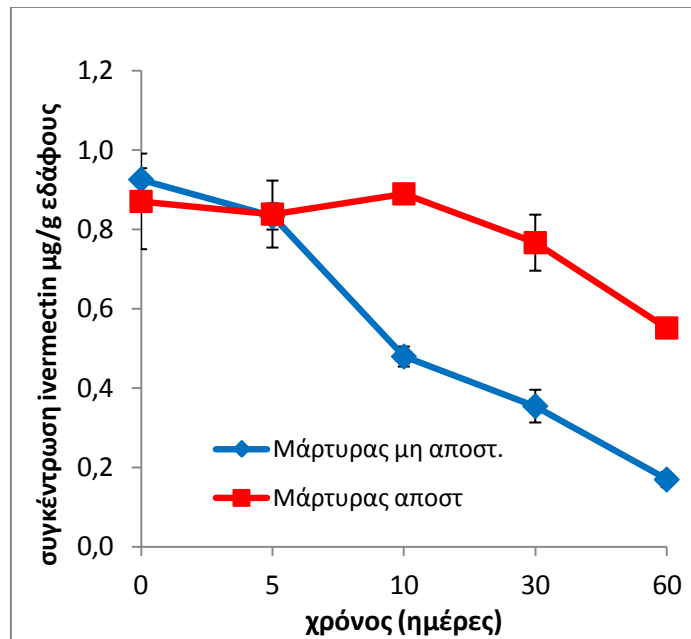
Πίνακας 3. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του eprinomectin σε αποστειρωμένα (fum) και μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από δύο κτηνοτροφικές μονάδες (μαντρί και λειμώνας) καθώς και σε δείγμα μάρτυρα χωρίς πρότερη έκθεση στο eprinomectin. Η αποδόμηση του eprinomectin περιγράφηκε ικανοποιητικά από τα μοντέλα κινητικής SFO (Single first order) και HS (Hockey Stick).

| Εδάφη | Μοντέλο | k (d ⁻¹) | k1 (d ⁻¹) | k2 (d ⁻¹) | t _b (d) | DT50s (d) | χ ² (%) |
|----------------------------------|---------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|-----------|--------------------|
| Μονάδα 1- Λειμώνας | SFO | 0.033 | | | | 21.3 | 7.45 |
| Μονάδα 1- Λειμώνας (fum) | SFO | 0.004 | | | | 186.2 | 2.71 |
| Μονάδα 1 - Μαντρί | HS | | 0.052 | 0.007 | 3.31 | 73.6 | 4.32 |
| Μονάδα 1 - Μαντρί (fum) | HS | | 0.035 | 0.001 | 2.03 | 595.3 | 0.25 |
| Μονάδα 2 - Λειμώνας | SFO | 0.018 | | | | 37.5 | 6.85 |
| Μονάδα 2 - Λειμώνας (fum) | SFO | 0.003 | | | | 262.6 | 2.01 |
| Μονάδα 2- Μαντρί | HS | | 0.058 | 0.009 | 3.57 | 57.5 | 3.51 |
| Μονάδα 2 - Μαντρί (fum) | SFO | 0.003 | | | | 270.6 | 2.59 |
| Μάρτυρας | SFO | 0.028 | | | | 24.5 | 9.07 |
| Μάρτυρας - (fum) | SFO | 0.006 | | | | 116.2 | 2.32 |

3.2 Αποδόμηση Ivermectin

Η αποδόμηση του Ivermectin στα εδάφη από τις κτηνοτροφικές μονάδες 1 και 2 καθώς και από το αντίστοιχο έδαφος μάρτυρα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 2.





Διάγραμμα 2. Η αποδόμηση του ivermectin σε αποστειρωμένα (κόκκινη γραμμή) ή μη αποστειρωμένα (μπλε γραμμή) εδάφη από τις μονάδες 1 και 2. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση

Η αποδόμηση του ivermectin σε όλα τα εδάφη, ανεξάρτητα από την εφαρμογή καπνισμού ή όχι, ακολούθησε κινητική πρώτης τάξης (Πίνακας 4). Το ivermectin εμφάνισε μέτρια υπολειμματικότητα στα μη αποστειρωμένα εδάφη που μελετήθηκαν με τιμές DT_{50} που κυμάνθηκαν από 12 ημέρες στα δείγματα από το λειμών της Μονάδας 2 ως και 62 ημέρες στα δείγματα από το μαντρί της Μονάδας 1 (Πίνακας 4). Η αποστείρωση του εδάφους οδήγησε σε δραματική επιβράδυνση της αποδόμησης του ivermectin σε όλα τα εδάφη με τιμές DT_{50} από 52 ημέρες στο μάρτυρα ως 364 ημέρες σε άλλα δείγματα (Πίνακας 4). Επιπλέον ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις ήταν (α) η ταχύτερη αποδόμηση του ivermectin (όπως και για το erinomectin) στα εδάφη που συλλέχθηκαν από τους λειμώνες (μαντρί) (DT_{50} = 11.6 και 17.2 ημέρες) σε σχέση με τα εδάφη που συλλέχθηκαν από εντός των κτηνοτροφικών μονάδων (DT_{50} = 35.5 και 62.2 ημέρες), (β) η ταχεία αποδόμηση του erinomectin στο έδαφος-μάρτυρα (DT_{50} = 20.1 ημέρες) σε σχέση κάποια από τα εδάφη που συλλέχθηκαν από τις δύο

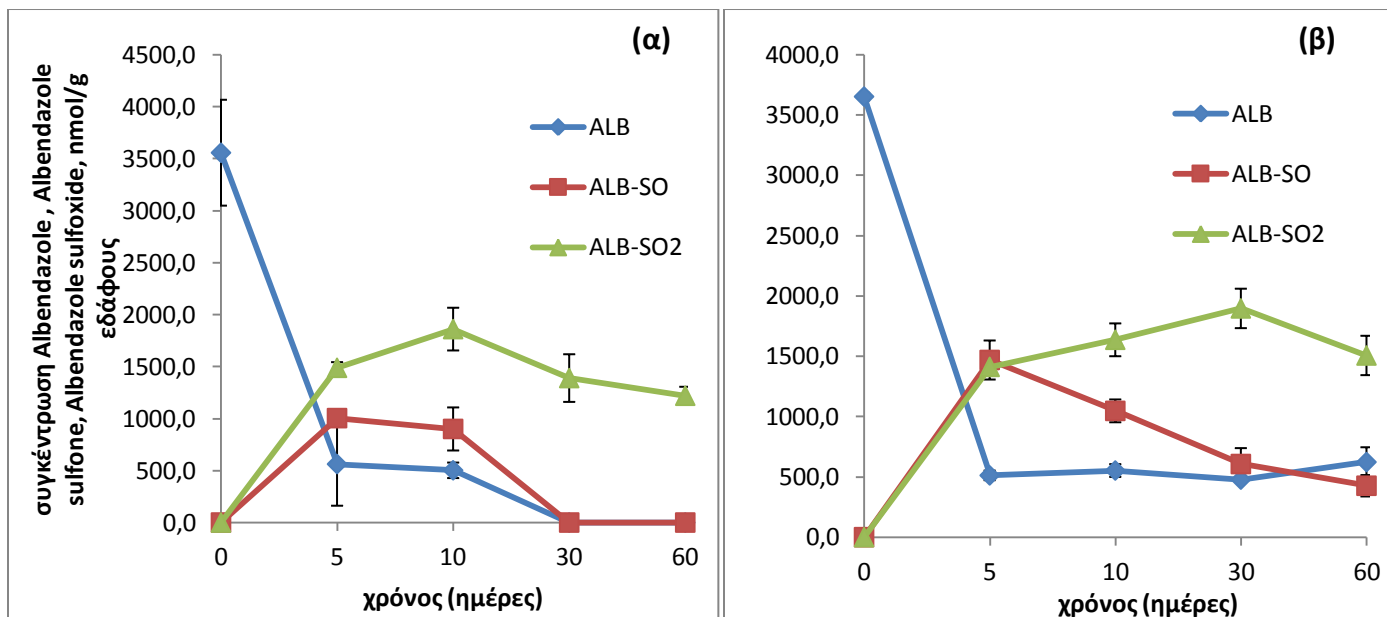
κτηνοτροφικές μονάδες και είχαν εκτεθεί έμμεσα (μέσω κοπράνων και ούρων των ζώων) στο ivermectin.

Πίνακας 4. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του ivermectin σε αποστειρωμένα (fum) και μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από δύο κτηνοτροφικές μονάδες (μαντρί και λειμώνας) καθώς και σε δείγμα μάρτυρα χωρίς πρότερη έκθεση στο ivermectin. Η αποδόμηση του ivermectin περιγράφηκε ικανοποιητικά από το μοντέλο κινητικής SFO (Single first order).

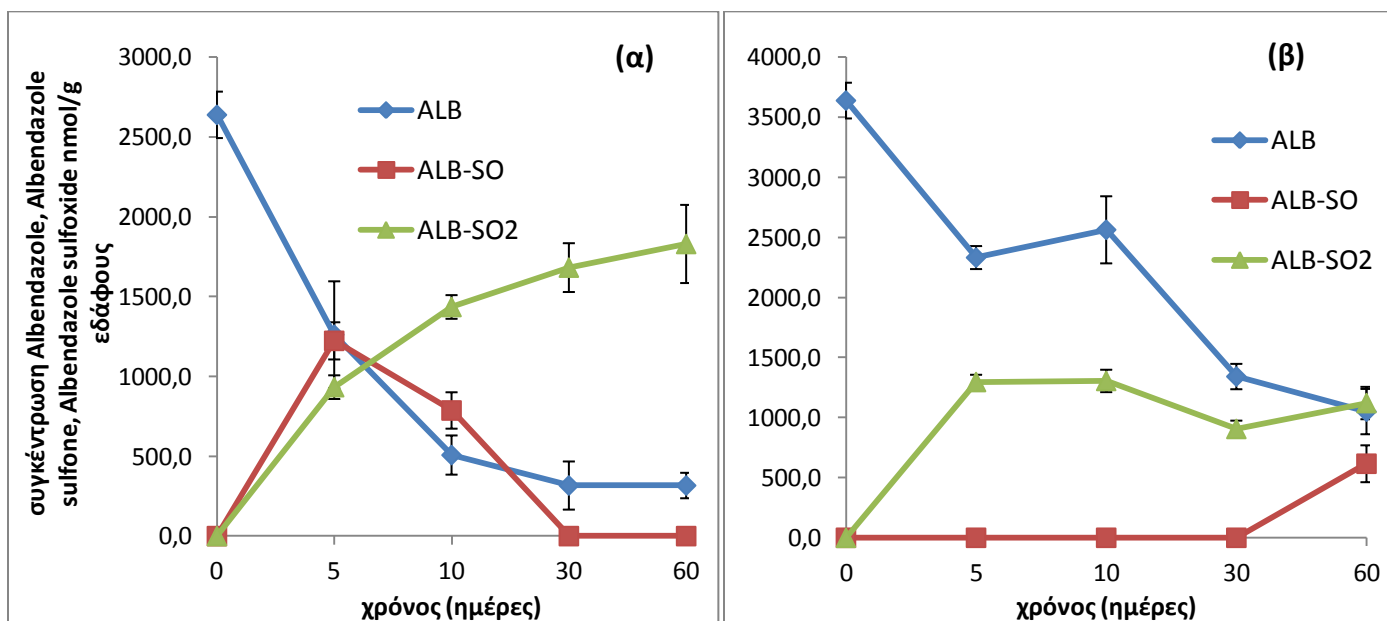
| Εδάφη | K (d ⁻¹) | DT ₅₀ (d) | χ ² (%) |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| Μονάδα 1- Λειμώνας | 0.040 | 17.2 | 5.74 |
| Μονάδα 1- Λειμώνας (fum) | 0.005 | 128.9 | 1.04 |
| Μονάδα 1 - Μαντρί | 0.011 | 62.2 | 3.93 |
| Μονάδα 1 - Μαντρί (fum) | 0.005 | 135.6 | 6.43 |
| Μονάδα 2 - Λειμώνας | 0.060 | 11.6 | 11.7 |
| Μονάδα 2 - Λειμώνας (fum) | 0.013 | 51.7 | 7.1 |
| Μονάδα 2- Μαντρί | 0.020 | 35.5 | 7.98 |
| Μονάδα 2 - Μαντρί (fum) | 0.002 | 364.0 | 2.71 |
| Μάρτυρας | 0.034 | 20.1 | 12.2 |
| Μάρτυρας – (fum) | 0.007 | 96.5 | 3.88 |

3.3 Αποδόμηση και μεταβολισμός του Albendazole στο έδαφος

Αποδόμηση του Albendazole σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα εδάφη από την Μονάδα 3 καθώς και στο αντίστοιχο έδαφος μάρτυρα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 3, 4 και 5 και οι παράμετροι της κινητικής αποδόμησης του δίνονται στον Πίνακα 5.

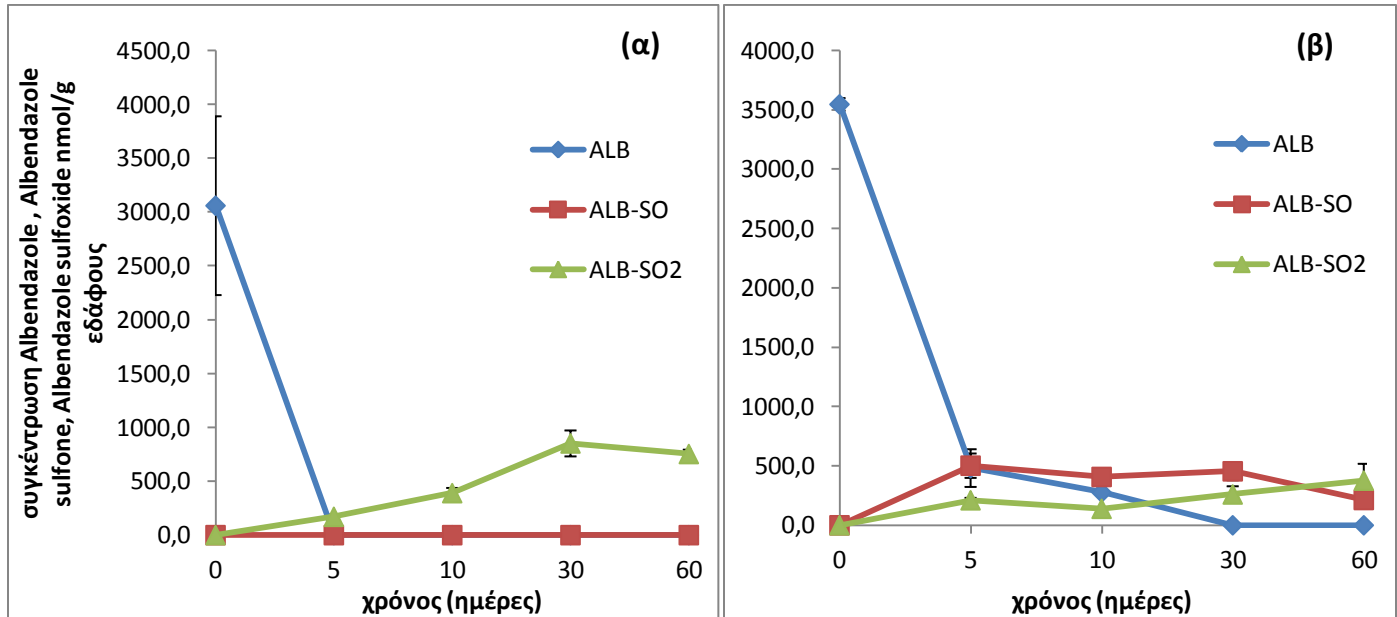


Διάγραμμα 3. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε μη αποστειρωμένα (α) και αποστειρωμένα (β) δείγματα εδάφους από το μαντρί της Κτηνοτροφικής Μονάδας 3. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 4. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO₂) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε μη

αποστειρωμένα (α) και αποστειρωμένα (β) δείγματα εδάφους από το λειμώνα της Κτηνοτροφικής Μονάδας 3. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 5. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε μη αποστειρωμένα (α) και αποστειρωμένα (β) δείγματα εδάφους από το μάρτυρα (χωρίς αναμενόμενη έκθεση σε albendazole). Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Συνολικά το albendazole αποδομήθηκε ταχύτατα σε όλα τα μη αποστειρωμένα εδάφη με τιμές DT₅₀ από κάποιες ώρες (Μαντρί) ως 3,44 ημέρες (Λειμώνας) (Πίνακας 5). Η αποστείρωση του εδάφους οδήγησε σε επιβράδυνση της αποδόμησης του albendazole στα δείγματα από το Μαντρί (DT₅₀ = 17.6 ημέρες) και στο Μάρτυρα (DT₅₀ = 1.8 ημέρες vs 0,5 ημέρες στα μη αποστειρωμένα δείγματα) ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει την αποδόμηση του albendazole στα δείγματα εδάφους από το Λειμώνα της κτηνοτροφικής μονάδας που ήταν ταχύτατη (DT₅₀= 0.3 ημέρες). Η αποδόμηση του albendazole σε όλα τα δείγματα συνοδεύεται από οξείδωση του αρχικά σου albendazole sulfoxide το οποίο στις περισσότερες περιπτώσεις οξειδώνεται περαιτέρω σε albendazole sulfone που

αποτελεί και το κύριο συστατικό των συνολικών τοξικών υπολειμμάτων του albendazole (άθροισμα albendazole + sulfoxide + sulfone) προς το τέλος της επώασης (Διαγράμματα 3, 4 και 5).

Δεδομένης της δραστηριότητας των albendazole sulfoxide και albendazole sulfone πέραν της μητρικής ουσίας υπολογίστηκε η υπολειμματικότητα των συνολικών τοξικών υπολειμμάτων του albendazole (άθροισμα των albendazole, sulfoxide και sulfone) σε κάθε χρονικό σημείο. Το πρότυπο αποδόμησης των συνολικών τοξικών υπολειμμάτων του albendazole περιγράφηκε ικανοποιητικά από το μοντέλο κινητικής SFO στα εδάφη από την κτηνοτροφική μονάδα 3 σε αντίθεση με το έδαφος μάρτυρα όπου το διφασικό μοντέλο DFOP περιέγραψε ικανοποιητικά την αποδόμηση των συνολικών τοξικών υπολειμμάτων του albendazole στο έδαφος. Γενικότερα τα συνολικά τοξικά υπολείμματα του albendazole παρουσίασαν μέτρια ως υψηλή υπολειμματικότητα στα εδάφη που συλλέχθηκαν από το μαντρί ($DT_{50} = 31$ ημέρες) και τον λειμώννα της Μονάδας 3 αντίστοιχα ($DT_{50} = 101,5$ ημέρες) (Πίνακας 6). Αντίθετα παρατηρήθηκε ταχύτατη αποδόμηση των συνολικών τοξικών υπολειμμάτων του albendazole κατά τις πρώτες ημέρες ($DT_{50} = 1$ ημέρα) αλλά υπολείμματα του sulfone παρέμειναν στο έδαφος σε χαμηλά επίπεδα μέχρι τη λήξη της επώασης όπως αντικατοπτρίζεται και στην τιμή $DT_{90} > 365$ ημέρες (Πίνακας 6). Η αποστείρωση του εδάφους επιβράδυνε σημαντικά την αποδόμηση των συνολικών τοξικών υπολειμμάτων του albendazole ιδιαίτερα στα δείγματα εδάφους από το μαντρί καθώς και στο έδαφος μάρτυρα ενώ δεν επηρέασε την αποδόμηση στο έδαφος από τον λειμώννα της μονάδας 3.

Πίνακας 5: Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση του albendazole σε αποστειρωμένα (fum) και μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από μια κτηνοτροφική μονάδα (μαντρί και λειμώνας) καθώς και σε δείγμα μάρτυρα χωρίς πρότερη έκθεση στο albendazole. Η αποδόμηση του albendazole περιγράφηκε ικανοποιητικά από διάφορα μοντέλα κινητικής όπως SFO (Single first order) καθώς και τα διφασικά μοντέλα HS και FOMC.

| Εδάφη | Μοντέλο | k (d^{-1}) | k_1 (d^{-1}) | k_2 (d^{-1}) | t_b (d) | DT50s (d) | χ^2 (%) |
|------------------------|---------|------------------|--------------------|--------------------|-----------|-----------------------|--------------|
| Μονάδα 3- Λειμώνας | HS | | 0,202 | 0,005 | 9,39 | 3,44 | 16,03 |
| Μονάδα 3- Λειμώνας Fum | HS | | 2,595 | 0,001 | 0,724 | 0,27 | 5,41 |
| Μονάδα 3 - Μαντρί | FMOC | | | | | $1,38 \times 10^{-5}$ | 0,01 |
| Μονάδα 3 - Μαντρί Fum | HS | | 0,096 | 0,015 | 5,31 | 17,56 | 12,14 |
| Μάρτυρας | FMOC | | | | | 0,519 | 11,6 |
| Μάρτυρας - Fum | SFO | 0,308 | | | | 1,84 | 9,6 |

Πίνακας 6: Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση των συνολικών τοξικών υπολειμμάτων του albendazole (sum albendazole + albendazole sulfoxide + albendazole + sulfone) σε αποστειρωμένα (fum) και μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από μια κτηνοτροφική μονάδα (μαντρί και λειμώνας) καθώς και σε δείγμα μάρτυρα χωρίς πρότερη έκθεση στο albendazole. Η αποδόμηση των συνολικών τοξικών υπολειμμάτων του albendazole στο έδαφος περιγράφηκε ικανοποιητικά από διάφορα μοντέλα κινητικής όπως SFO (Single first order) και DFOP.

| Εδάφη | Μοντέλο | k (d ⁻¹) | k1 (d ⁻¹) | k2 (d ⁻¹) | DT50s (d) | DT90s (d) | χ ² (%) |
|-------------------------------|---------|----------------------|-----------------------|------------------------|-----------|------------------------|--------------------|
| Μονάδα 3- Λειμώνας | SFO | 0,007 | | | 31,1 | 103.4 | 9,7 |
| Μονάδα 3- Λειμώνας Fum | SFO | 0,007 | | | 123,9 | 411.6 | 1,89 |
| Μονάδα 3 - Μαντρί | SFO | 0,022 | | | 101,5 | 337 | 10,9 |
| Μονάδα 3 - Μαντρί Fum | SFO | 0,006 | | | 98,56 | 327.4 | 10,3 |
| Μάρτυρας | DFOP | | 9,54 | 5,06x10 ⁻¹² | 0,098 | 1,13x10 ⁺¹¹ | 26,8 |
| Μάρτυρας - Fum | DFOP | | 0,387 | 0,005 | 2,68 | 158 | 0,77 |

4 Συζήτηση -Συμπέρασμα

4.1 Συζήτηση

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η αποδόμηση των ανθελμινθικών Albendazole, Eprinomectin, Ivermectin σε εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες στην Κύπρο (Ιστινζό, Πελαθούσα, Ανδρολίκου, Προδρόμι) όπου χρησιμοποιούνται τα συγκεκριμένα κτηνιατρικά φάρμακα. Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αξιολογήθηκε (α) αρχικά η συνεισφορά των μικροοργανισμών στην αποδόμηση των παραπάνω ανθελμινθικών που καταλήγουν στο έδαφος μέσω των κοπράνων και ούρων ζώων που δέχονται μεταχειρίσεις με τα συγκεκριμένα κτηνιατρικά φάρμακα και (β) η υπόθεση ότι η παρατεταμένη έκθεση του εδάφους στα συγκεκριμένα κτηνιατρικά φάρμακα μπορεί να οδηγήσει σε επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση τους.

4.1.1 Eprinomectin

Το eprinomectin εμφάνισε μέτρια ως υψηλή υπολειμματικότητα στα εδάφη που μελετήθηκαν με τιμές DT_{50} από 21.6- 75 ημέρες. Οι τιμές αυτές είναι σχετικά σύμφωνες με τις ελάχιστες προηγούμενες μελέτες που αφορούν την αποδόμηση του eprinomectin στο έδαφος με τιμές $DT_{50} = 38-53$ ημέρες (Litskas et al., 2013). Η δραματική επιβράδυνση της αποδόμησης του eprinomectin σε όλα τα εδάφη ύστερα από την αποστείρωση του εδάφους με καπνισμό με χλωροφόρμιο καταδεικνύει ότι η μικροβιακή αποδόμηση του αποτελεί την βασική διεργασία απομάκρυνσης του από το έδαφος.

Η ταχύτητα αποδόμησης του eprinomectin στα εδάφη που μελετήθηκαν δεν φαίνεται να συσχετίζεται με το πιθανό ιστορικό έκθεσης των εδαφών στο συγκεκριμένο ανθελμινθικό καθώς ο ρυθμός αποδόμησης στο έδαφος μάρτυρα ήταν παρόμοιος (έδαφη Λειμώνας) ή ταχύτερος (εδάφη Μαντρί) σε σχέση με το ρυθμό αποδόμησης στα αντίστοιχα εδάφη από τις μονάδες 1 και 2. Η ταχύτερη αποδόμηση του eprinomectin στο έδαφος μάρτυρα θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω και είναι πιθανό να οφείλεται στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους (pH, περιεκτικότητα σε οργανική ουσία) καθώς αυτά είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την δράση των μικροοργανισμών και την βιοδιαθεσιμότητα των

ουσιών. Οι εδαφολογικές αναλύσεις των εδαφών που μελετήθηκαν βρίσκονται σε εξέλιξη και δεν κατέσται δυνατό να εντοπιστούν συσχετίσεις μεταξύ αυτών και των τιμών DT_{50} του ivermectin. Η απουσία προσαρμογής των μικροοργανισμών στην βιοαποδόμηση του ivermectin (όπως και των υπολοίπων ουσιών που μελετήθηκαν και αναφέρονται παρακάτω) είναι πιθανό να απαιτεί πιο μακροχρόνια και συστηματική έκθεση των εδαφών σε αυτό ή υψηλότερες συγκεντρώσεις έκθεσης σε σχέση με αυτές που περιέχονται στα κόπρανα, ούρα ή κοπριές. Πειράματα μικροκόσμων που θα ακολουθήσουν θα εξετάσουν τις παραπάνω υποθέσεις.

Ένα ακόμη ενδιαφέρον εύρημα ήταν η μεγαλύτερη υπολειμματικότητα του ivermectin στα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από το εσωτερικό της κτηνοτροφικής μονάδας (μαντρί) σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα από τους λειμώνες των ίδιων κτηνοτροφικών μονάδων. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το εύρημα είναι πιθανότατα η υψηλότερη περιεκτικότητα σε οργανική ουσία των συγκεκριμένων εδαφών από το εσωτερικό της κτηνοτροφικής μονάδας σε σχέση με τους λειμώνες. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε οργανική ουσία πιθανότατα οδηγεί σε αυξημένη προσρόφηση του ivermectin στα συγκεκριμένα εδάφη με αποτέλεσμα χαμηλότερη βιοδιαθεσιμότητα αυτού στο εδαφικό διάλυμα για βιοαποδόμηση. Τα αποτελέσματα από τις εδαφολογικές αναλύσεις αναμένεται να επιβεβαιώσουν την παραπάνω υπόθεση. Προηγούμενες μελέτες από τους Litskas et al., (2011) έχουν επιβεβαιώσει την αυξημένη προσρόφηση του ivermectin σε εδάφη με υψηλότερη περιεκτικότητα σε οργανική ουσία.

4.1.2 Ivermectin

Το ivermectin εμφάνισε χαμηλή ως μέτρια υπολειμματικότητα στα εδάφη που μελετήθηκαν με τιμές $DT_{50} = 11$ ως 62 ημέρες. Παρόμοιες τιμές έχουν αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες. Έτσι οι Krogh et al., (2009) μελέτησαν την αποδόμηση του ivermectin σε τρία διαφορετικά εδάφη και κατέγραψαν τιμές DT_{50} από 16 ως 36 ημέρες. Αντίστοιχα οι Rath et al., (2016) ανέφεραν ταχεία αποδόμηση του ivermectin σε δύο διαφορετικά εδάφη με τιμές $DT_{50} = 11-15$ ημέρες. Μελέτες από τους Liebig et al., (2010) ανέφεραν τιμές DT_{50} στο έδαφος

από 14-56 ημέρες ενώ παρατήρησαν αυξημένη υπολειμματικότητα του ivermectin σε μίγματα εδάφους - κοπριάς με τιμές $DT_{50} = 7-217$ ημέρες (Boxall et al., (2002). Η αποδόμηση του ivermectin στα εδάφη που μελετήθηκαν ήταν κατά κύριο λόγο μικροβιακή όπως αποδεικνύεται από την δραστική επιβράδυνση της αποδόμησης του στα εδάφη που αποστειρώθηκαν. Παρά τον σημαντικό ρόλο των μικροοργανισμών στην αποδόμηση του ivermectin δεν κατέστη δυνατό να αποδειχθεί ο ρόλος της πρότερης έκθεσης των εδαφών στο ivermectin στην επιτάχυνση της αποδόμησης του λόγω προσαρμογής των μικροοργανισμών. Αυτό κυρίως οφείλεται στην σχετικά ταχεία αποδόμηση του ivermectin στο έδαφος μάρτυρα. Παρόλαυτα η ταχύτερη αποδόμηση του ivermectin καταγράφηκε στα εδάφη από τους λειμώνες των δύο κτηνοτροφικών μονάδων ενώ αντίθετα η βραδύτερη αποδόμηση καταγράφηκε στα αντίστοιχα εδάφη που συλλέχθηκαν από το εσωτερικό των κτηνοτροφικών μονάδων. Τα τελευταία συνήθως χαρακτηρίζονται από υψηλότερη έκθεση σε ανθελμινθικά αλλά και υψηλότερη περιεκτικότητα σε οργανική ουσία. Η βραδύτερη αποδόμηση του ivermectin στα συγκεκριμένα εδάφη είναι σε απόλυτη συμφωνία με την βραδύτερη αποδόμηση και του eprinomectin στα ίδια εδάφη και πιθανότατα συσχετίζεται με την αυξημένη προσρόφηση του στα συγκεκριμένα εδάφη που οδηγεί σε μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα και άρα μεγαλύτερη υπολειμματικότητα στο έδαφος. Προηγούμενες μελέτες έχουν καταδείξει την ισχυρότερη προσρόφηση του ivermectin σε εδάφη με αυξημένη περιεκτικότητα σε οργανική ουσία (Krogh et al., 2008). Τα αποτελέσματα των εδαφολογικών αναλύσεων των μελετούμενων εδαφών αναμένεται να επιβεβαιώσουν την παραπάνω υπόθεση.

4.1.3 Albendazole

Ελάχιστα είναι γνωστά για την αποδόμηση και την υπολειμματικότητα του albendazole στο έδαφος. Στη μοναδική εργασία οι Wu & Hu (2014) κατέγραψαν γρήγορη αποδόμηση του albendazole στο έδαφος με τιμές $DT_{50} = 5-6.3$ ημέρες χωρίς όμως να προσδιορίζουν τον σχηματισμό και περαιτέρω αποδόμηση των οξειδωμένων παραγώγων του albendazole στο έδαφος. Σε συμφωνία με τους Wu & Hu (2004) στην παρούσα μελέτη επίσης καταγράφηκε ταχύτατη αποδόμηση του albendazole με τιμές DT_{50} από μερικές ώρες ως 3,4 ημέρες. Η αποδόμηση

του albendazole συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό albendazole sulfoxide το οποίο οξειδώθηκε περαιτέρω σε albendazole sulfone τα οποία αποδομήθηκαν περαιτέρω αλλά όχι πλήρως. Δεδομένου ότι και τα δύο οξειδωμένα παράγωγα του albendazole παρουσιάζουν ανθελμινθική δράση υπολογίστηκε η υπολειμματικότητα των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του albendazole (άθροισμα albendazole + sulfoxide + sulfone). Σε αντίθεση με την μητρική ουσία, τα συνολικά δραστικά υπολείμματα του albendazole εμφάνισαν μέτρια ως υψηλή υπολειμματικότητα στα εδάφη από την Μονάδα 3 (31.1 και 101 ημέρες) αλλά υψηλότερη από το έδαφος μάρτυρα όπου παρατηρήθηκε ταχύτατη αποδόμηση αμέσως μετά την εφαρμογή ($DT_{50} < 1$ ημέρα) και ακολούθησε μια βραδεία φάση αποδόμησης ($DT_{90} > 365$ ημέρες). Από τα παραπάνω αποτελέσματα δεν προκύπτει πιθανή επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση του albendazole σε εδάφη με πρότερη έκθεση στο συγκεκριμένο ανθελμινθικό. Παρόλα αυτά ο αριθμός των εδαφών είναι περιορισμένος και θα πρέπει να ακολουθήσουν περαιτέρω μελέτες τόσο σε άλλα εδάφη καθώς και πειράματα μικροκόσμων με επαναλαμβανόμενες υπό ελεγχόμενες συνθήκες για να επιβεβαιώσουμε την ανθεκτικότητα του albendazole στην επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση.

Αντίθετα με την έλλειψη ενδείξεων εμφάνισης επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης, η αποστείρωση των εδαφών που μελετήθηκαν σε 2 από τις 3 περιπτώσεις οδήγησαν σε σημαντική επιβράδυνση της αποδόμησης του albendazole αλλά και των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν μια πρώτη ένδειξη για τον ρόλο της μικροβιακής αποδόμησης στην απομάκρυνση του albendazole από το έδαφος. Παρόλα αυτά θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω η αποτυχία επιβράδυνσης της αποδόμησης του albendazole στο έδαφος από τον λειμώνα της μονάδας 3 που οφείλεται είτε σε έλλειψη μικροοργανισμών που αποδομούν το συγκεκριμένο ανθελμινθικό και κυριαρχία αβιοτικής αποδόμησης ή αποτυχία της αποστείρωσης. Εδαφολογικές αναλύσεις και περαιτέρω μετρήσεις θα ρίξουν φως στο συγκεκριμένο εύρημα.

4.2 Τελικά Συμπέρασμα

Συμπερασματικά για την παρούσα μελέτη θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι:

- Και τα τρία ανθελμινθικά που μελετήθηκαν αποδομούνται κυρίως μικροβιακά στο έδαφος. Παρόλα αυτά η υποτιθέμενη συστηματική έκθεση των εδαφών στα συγκεκριμένα ανθελμινθικά δεν φαίνεται να επιταχύνει την αποδόμηση τους στο έδαφος μέσω επιλογής εξειδικευμένων αποδομητικών μικροοργανισμών.
- Τα ivermectin και ivermectin εμφανίζουν μέτρια ως υψηλή υπολειμματικότητα στα εδάφη που μελετήθηκαν με την βραδύτερη αποδόμηση να παρατηρείται σε εδάφη από το εσωτερικό των κτηνοτροφικών μονάδων που αναμένεται να έχουν σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε οργανική ουσία και άρα να ευνοούν την προσρόφηση και αντίστοιχα να περιορίζουν την βιοδιαθεσιμότητα των ουσιών αυτών προς βιοαποδόμηση.

Τέλος το albendazole αποδομείται ταχύτατα προς παραγωγή των οξειδωμένων παραγώγων του sulfoxide και sulfone με τα συνολικά τοξικά υπολείμματα του να εμφανίζουν μέτρια ως υψηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος.

Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην ανάδειξη φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών που επηρεάζουν την αποδόμηση των ανθελμινθικών ουσιών που μελετήθηκαν. Παράλληλα θα ακολουθήσουν πειράματα μικροκόσμων σε επιλεγμένα εδάφη ώστε να διαπιστωθεί ή όχι εάν η συστηματική έκθεση των εδαφών και σε τι επίπεδα συγκεντρώσεων μπορεί να οδηγήσει σε επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση τους.

BIBΛIOΓPAΦIA

1. **Agata Zdarta** **OrcID**, **Amanda Pacholak**, **Marta Galikowska**, **Wojciech Smułek**, and **Ewa Kaczorek**(2018). Butylbenzene and tert-Butylbenzene— Sorption on Sand Particles and Biodegradation in the Presence of Plant Natural Surfactants. *Toxins*, 10(9), 338
2. **Alexander M.** (1999), “Biodegradation and Bioremediation”, Second Edition, Ithaca, New York: Academic Press, ISBN 0-12-049861-8.
3. **Alistair B.A. Boxall**, **Dana W. Kolpin**, **Bent Halling Sorensen** , **Johannes Tolls**, (2003). Are VETERINARY MEDICINES Causing Environmental Risks?. *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 286-294
4. **Anderson J.P.E.**, **Nevermann K.** and **Haidt H.**, (1998.) Accelerated microbial degradation of nematicides in soils: Problem and its management. In: *Proceedings of the XII Acorbat Meeting*. Guayaquil, Ecuador, pp 568-57.
5. **Arbeli Z.**, **Fuentes C.L.** (2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions: and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*, 26: 1733-1746.
6. **Asensio- Ramos M**, **Hernandez-Borges**, **Ravelo-Perez LM** and **Rodriguez-Delgado MA**, Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. *Anal Bioanal chem* 396:2307-2319 (2010).
7. **Bollag J.M.** and **Liu S.Y.**, (1990). Biological transformation processes of pesticides, in *Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling*. Soil Science Society of America. 169-261
8. **Boxall ABA**, **Fogg LA**, **Blackwell PA**, **Kay P**, **Pemberton EJ**. 2002. Review of veterinary medicines in the environment. Bristol (UK): Environment Agency. R&D Technical Report P6-012/8TR
9. **Burrows, H.D.**; **Canle L, M.**; **Santaballa, J.A.**; **Steenken, S.**, (2002). Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 62:(2), 71-108
10. **Campbell W.C.**, **Fisher M.H.**, **Stapley E.O.**, **Albers-Schonberg G.**, **Jacob T.A.**, 1983. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science*, 221: 823 - 828.

11. **Campbell W.C.**, 1985. Ivermectin: an update. *Parasitology Today*, 1: 10 - 16.
12. **Chapman, R.A., Harris, C.R.** (1990) Enhanced degradation of insecticides in soils. In: Racke, K.D., Coats, J.R., (Eds) Enhanced biodegradation of pesticides in the environment, American Chemical Society, Washington, DC, pp 82-96.
13. **Chiu S.H.L., Green M.L., Baylis F.P., Eline D., Rosegay A., Meriwether H., Jacob, T.A.**, 1990. Absorption, tissue distribution, and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep and rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 2072 - 2078.
14. **Dean F. Martin, Deanna R. Ward, and Barbara B. Martin**, (2010). AGRICULTURAL PHARMACEUTICALS IN THE ENVIRONMENT: A NEED FOR INVENTIVENESS. *Technology and Innovation*, 12:129-141
15. **Di H.J., Aylmore L.A.G. and Kookana R.S.** (1998). Degradation rates of eight pesticides in surface and subsurface soils under laboratory and field conditions. *Soil Science* 163: 404-411.
16. **Dragana Mutavdzic Pavlovic , Antonija Glavac , Mihaela Gluhak , Mislav Runje**, (2018). Sorption of albendazole in sediments and soils: Isotherms and kinetics. *Chemosphere*, 193 ,635-644
17. **Felsot, A.S.** (1989) Enhanced biodegradation of insecticides in soil: implications for agrosystems. *Annu. Rev. Entomol.* 34, 454-476.
18. **Felsot A.S., Shelton D.R.** (1993). Enhanced biodegradation of soil pesticides: Interactions between physicochemical process and microbial ecology. *SSSA Special Publication* 32: 227-251.
19. **FOCUS** (2006). Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration, Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 version, 2.0, 2006, 434 pp.
20. **G.K. Sims**(1990). Biological Degradation of Soil. *Advances in Soil Science*, 11:289-330
21. **Goodman L.S., Gilman A., Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L.**, 2006. Goodman & Gilman's the pharmacological basics of therapeutics 11th Ed., McGraw & Hill, New York.

22. **HONGXIA LI, MARK W. SUMARAH, and EDWARD TOPP, (2012).**
PERSISTENCE OF THE TRICYCLIC ANTIDEPRESSANT DRUGS
AMITRIPTYLINE AND NORTRIPTYLINE IN AGRICULTURE SOILS. *Environmental
Toxicology and Chemistry*, 32: 3,509-516
23. **Igor Kovalchuk, (2010).** Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon
Contaminants: An Overview. *SAGE-Hindawi Access to Research
Biotechnology Research International*, 13
24. **Jet C. Van De Steene, Christophe P. Stove, Willy E. Lambert, (2010).** A field
study on 8 pharmaceuticals and 1 pesticide in Belgium: Removal rates in
waste water treatment plants and occurrence in surface water. *Science of
the Total Environment* ,408, 3448–3453
25. **John W. Hamaker (1975).** The Interpretation of Soil Leaching Experiments.
Environmental Dynamics of Pesticides, 6:115-133)
26. **Jones T.K., Chu L., Mrozik H.. 1994.** Synthesis and biological activity of
4a,4'' disubstituted avermectins. *Journal of Agricultural and Food
Chemistry*, 42: 1786 - 1790.
27. **Kadiri N., Lumaret J.P., Janati-Idrissi A., 1999.** Macrocyclic lactones: impact
on non-target fauna in pastures. *Annales De La Societe Entomologique De
France*, 35: 222 - 229.
28. **Karpouzas D.G. and Walker A., (2000b).** Aspects of the enhanced
biodegradation and metabolism of ethoprophos in soil. *Pest Management
Science* 540-548
29. **KATRIN INGOLD, PETER BIGLER, WOLFGANG THORMANN, TANIA
CAVALIERO, BRUNO GOTTSTEIN, AND ANDREW HEMPHILL, (1999).**
Efficacies of Albendazole Sulfoxide and Albendazole Sulfone against In
Vitro-Cultivated *Echinococcus multilocularis* Metacestodes.
ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, 43: 1052–1061
30. **Klaus Weiss , Walter Schüssler, Michael Porzelt, (2008).** Sulfamethazine
and flubendazole in seepage water after the sprinkling of manured areas.
Chemosphere, 72 , 1292–1297
31. **Krogh, K.A., Jensen G.G., Schneider M.K., 2009.** Analysis of the dissipation
kinetics of ivermectin at different temperatures and in four different soils.
Chemosphere, 75: 1097 - 1104.

32. **Krogh, K.A., Soeborg T., Brodin B., Halling-Sorenson B.,** 2008b. Sorption and mobility of ivermectin in different soils. *Journal of Environmental Quality*, 37: 2202 - 2211.
33. **Kruger K., Scholtz C.H.,** 1995. The effect of ivermectin on the development and reproduction of the dungbreeding fly *Musca nebulosa* (Diptera, Muscidae). *Agriculture Ecosystems and the Environment*, 53: 13 - 18.
34. **Kuo, J.** (1999). *Practical Design Calculations for Groundwater and Soil remediation*. Lewis Publishers, USA.
35. **Lanusse C., Lifschitz A., Virkel G., Alvarez L., Sanchez S., Sutra J.F., Galtier P., Alvinerie M.,** 1997. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy*, 20: 91 - 99.
36. **Litskas, V.D., Karamanlis, X.N., Batzias, G.C., Kamarianos, A.P.,** 2011. Sorption of the antiparasitic drug eprinomectin in three soils. *Chemosphere* 82, 193–198.
37. **Liebig et al.,** (2010) Environmental risk assessment of ivermectin: a case study. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6, Supplement 1: 567-587
38. **Liebig M., Fernandez A., Gronau E., Boxall A., Brinke M., Carbonell G., Egeler P., Fenner K., Fernandez C., Fink G., Garric J., Halling-Sorensen B., Knacker T., Krogh K., Kuster A., Loffler D., Cots M.A., Pope L., Prasse C., Rombke J., Ronnefahrt I., Schneider M.K., Schweitzer N., Tarazona J.V., Ternes T., Traunsburger W., Wehrhan, Duis K.,** 2010. Environmental risk assessment of ivermectin. A case study. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6: 567 - 587.
39. **Lumaret J.P., Errouissi F., Galtier P., Alvinerie M.,** 2005. Pour on formulation of eprinomectin for cattle: faecal elimination profile and effects on the development of the dung inhabiting diptera *Neomyia circumscripta* (L.) (Muscidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24: 797 - 801.
40. **Manuel Arias-Estévez , Eugenio López-Periago, Elena Martínez-Carballo, Jesús Simal- Gándara, Juan- Carlos Mejuto, Luis García-Río,** (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of

groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 123(4), 247-260

41. **Manuel Wohde , Silvia Berkner , Thomas Junker , Sabine Konradi, Lisa Schwarz and Rolf- Alexander Düring**, (2016). Occurrence and transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in manure: a literature review. Wohde et al. *Environ Sci Eur*, 28:23
42. **Merck**. 1983. Amendment to environmental impact analysis report for ivermectin (ivermectin) injection of cattle. Merck, Rahway, NJ, USA.
http://www.fda.gov/cvm/FOI/128-409_EA.pdf
43. **Merck**, 1996. Ivermectin Eprinex (eprinomectin) pour-on for beef and dairy cattle: environmental assessment. Report NADA 141-079EA. Merck and Company, Rahway, NJ, U.S.A.
44. **Michel Vert, Yoshiharu Doi, Karl-Heinz Hellwich, Michael Hess, Philip Hodge, Przemyslaw Kubisa, Marguerite Rinaudo, François Schué** , (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84:377–410
45. **Oppel, J., G. Broll, D. Löffler, M. Meller, J. Rombke, and T. Ternes**. 2004. Leaching behavior of pharmaceuticals in soil-testing-systems: A part of an environmental risk assessment for groundwater protection. *Science of the Total Environment*, 328: 265 - 273.
46. **Prasse C., Löffler D., Ternes T.**, 2009. Environmental fate of the anthelmintic ivermectin in an aerobic water/sediment system. *Chemosphere*, 77: 1321 – 1325
47. **P. M. Huang**(1980). Adsorption Processes in Soil. *Reactions and Processes*, 2:47-59
48. **Q. A. McKellar & E. W. Scott** ,(1990). The benzimidazole anthelmintic agents - a review. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 13,223-247
49. **Racke K., Coats J.R.** (1988). Comparative degradation of organophosphorus insecticides in soil: Specificity of enhanced microbial degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 193-199
50. **Rath S., et al.** (2016) Fate of ivermectin in the terrestrial and aquatic environment: mobility, degradation, and toxicity towards *Daphnia similis*. *Environmental Science Pollution Research* 23: 5654-5666

51. **Read, D.** (1986). Accelerated microbial breakdown of carbofuran in soil from previously treated fields. *Agriculture Ecosystems and Environment* 15:, 51-61.
52. **Read D.C.** (1986b). Greatly accelerated microbial degradation of Aldicarb in retreated field soil, in flooded soil and in water. *Journal of Economic Entomology* 80: 156-163.
53. **Robert Kreuzig, Katharina Blümlein, Sibylla Hiltge,** (2007). Fate of the Benzimidazole Antiparasitics Flubendazole and Fenbendazole in Manure and Manured Soils. Institute of Ecological Chemistry and Waste Analysis, Braunschweig University of Technology, Braunschweig, Germany, 35 (5), 488 – 494
54. **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*, 85: 229-240
55. **Salahuddin , Mohammad Shaharyar , Avijit Mazumder,** (2012). Benzimidazoles: A biologically active compounds. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S157–S173
56. **Sarfraz Hussain, Carol J. Hartley , Madhura Shettigar , Gunjan Pandey,** (2016). Bacterial biodegradation of neonicotinoid pesticides in soil and water systems. *FEMS Microbiology Letters*, 363,(23),252
57. **Sims, G. K. and A.M. Cupples,** (1999). Factors controlling degradation of pesticides in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31:598-601
58. **SO" REN THIELE-BRUHN,** (2005). MICROBIAL INHIBITION BY PHARMACEUTICAL ANTIBIOTICS IN DIFFERENT SOILS—DOSE-RESPONSE RELATIONS DETERMINED WITH THE IRON(III) REDUCTION TEST. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 4, 869–876
59. **Suett D.L., Fournier J-C., Papadopoulou Mourkidou E., Pussemier L., Smelt J.** (1996). Accelerated degradation : the European dimension. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1741-1748.
60. **Sylvia Moenickes , Sibylla Höltge , Robert Kreuzig , Otto Richter,** (2011). Process dominance analysis for fate modeling of flubendazole and

fenbendazole in liquid manure and manured soil. *Science of the Total Environment*, 410-411 , 226–234

61. **Topp E., Vallaeyts T., Soulas G.**, (1995). Pesticides: Microbial degradation and effects on microorganisms. *Modern soil Microbiology*, pp. 547-575.
62. **Walker A. and Roberts S.J.** (1993). Degradation, biodegradation and enhanced biodegradation. In: *Proceedings IX Symposium Pesticide Chemistry*, Piacenza, Italy, pp: 357-370.
63. **Wu M., Hu J** (2014) Residue Analysis of Albendazole in Watermelon and Soil by Solid Phase Extraction and HPLC. *Analytical Letters* 47(2): 356-366
64. **Yogita Bansal, Om Silakari**,(2012). The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20, 6208–6236
65. **Ziv Arbeli, Cilia L. Fuentes**,(2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*,26, 1733–1746
66. **ΒΙΔΙΑΔΑΚΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ**, Πτυχιακή διατριβή, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, (2015).
67. **Β. Ζιώγας και Γ.Α. Μάρκογλου**, Φαρμακολογία, ΑΘΗΝΑ, 2007.
68. **ΓΑΔ ΜΑΡΙΑ-ΑΝΝΑ**, ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΕΙΡΑΙΩΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΣΤΗΝ «ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΔΙΟΙΚΗΣΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ» ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: «ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»,(2015
69. **Γεώργιος-Χαράλαμπος Ε. Κυδωνάκης**, Πτυχιακή Διατριβή, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, (2010)
70. **Εμμανουήλ Δ. Τσοχατζής** Θεσσαλονίκη 2012
71. **ΛΑΓΟΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ** , Πτυχιακή Διατριβή , ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, (2015).
72. **ΛΙΤΣΚΑΣ Δ. ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΓΕΩΠΟΝΟΣ Μ.Sc.**, ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ, ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ (2013).

73. **Μυτή Δέσποινα**, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας «ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ», (2016).

74. **ΦΛΩΡΑ ΣΠΕΝΤΖΑ**, Πτυχιακή διατριβή, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, (2014).