

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**Μεταπτυχιακή διατριβή**  
**Π.Μ.Σ. Βιοτεχνολογίας, ποιότητα διατροφής και**  
**περιβάλλοντος**

**« ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ**  
**IVERMECTIN ΣΕ ΕΔΑΦΗ ΑΠΟ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΜΕ Ή**  
**ΧΩΡΙΣ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΧΡΗΣΗΣ IVERMECTIN»**

**Αλεξανδροπούλου Αγγελική**

**Λάρισα, 2019**

**« ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ IVERMECTIN ΣΕ ΕΔΑΦΗ ΑΠΟ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ ΜΕ Ή ΧΩΡΙΣ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΧΡΗΣΗΣ IVERMECTIN »**

**« BIODEGRADATION OF THE VETERINARY ANTHELMINTIC DRUG IVERMECTIN IN  
SOILS FROM LIVESTOCK FARMS IN LESVOS WITH OR WITHOUT HISTORY OF USE OF  
IVERMECTIN»**

## **ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ :**

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

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ :**

- Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα
- Τσίκου Δανιέλα, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Καρπούζα για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενα από την κ.α. Παπαδοπούλου και την κ. Τσίκου, καθώς επίσης και τον Υποψήφιο Διδάκτορα του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος Στάθη Λαγό για τις χρήσιμες συμβουλές του, την καθοδήγησή και υποστήριξη του, καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ .....	3
ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ .....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	6
ABSTRACT .....	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	9
1.1 ΕΚΤΡΟΦΗ ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΩΝ .....	9
1.2 ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΣΤΗΝ ΕΚΤΡΟΦΗ.....	9
1.3 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ .....	14
1.4 ΕΠΙΤΑΧΥΝΟΜΕΝΗ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ .....	17
1.5 IVERMECTIN (ΙΒΕΡΜΕΚΤΙΝΗ).....	18
1.5.1 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΥΧΗ ΚΑΙ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ IVERMECTIN .....	20
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ .....	22
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΔΑΦΩΝ.....	24
2.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΔΑΦΩΝ .....	25
Μάρτυρας.....	26
2.2.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΕΔΑΦΩΝ .....	26
2.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΥΔΑΤΟΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΔΑΦΩΝ .....	27
2.3 ΔΙΑΛΥΤΕΣ, ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ .....	27
2.5 ΠΕΙΡΑΜΑ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ IVERMECTIN ΣΤΑ ΕΔΑΦΗ .....	28
2.5.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	28
2.5.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗΣ ΕΔΑΦΩΝ. ....	29
2.5.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ IVERMECTIN ΑΠΟ ΤΟ ΕΔΑΦΟΣ .....	30
2.5.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC) .....	30
2.8 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ DT50.....	31
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1 ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ IVERMECTIN ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ.....	33
3.2. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥ IVERMECTIN.....	38
3.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΕΔΑΦΩΝ ΚΑΙ DT50	41
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ –ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ.....	42
4.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	42
4.2 ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ .....	43

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται όλο και πιο αυξανόμενη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων με σκοπό την άνοδο του ρυθμού παραγωγής κτηνοτροφικών προϊόντων. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στην όξυνση της περιβαλλοντικής ρύπανσης. Βασικός στόχος πλήθους ερευνών είναι η περιβαλλοντική τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων στο έδαφος. Πολλά κτηνιατρικά φάρμακα λόγω της αυξανόμενης και επαναλαμβανόμενης χρήσης τους στα ίδια εδάφη έχει παρατηρηθεί πως αποδομούνται από ποικιλία μικροοργανισμών του εδάφους. Σε κάποια κτηνιατρικά φάρμακα έχει παρατηρηθεί μεγάλη αποδόμηση από τους μικροοργανισμούς λόγω του γεγονότος ότι οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα κτηνιατρικά φάρμακα ως πηγή ενέργειας και άνθρακα. Κάποιοι από αυτούς έχουν την ικανότητα να αποδομούν τα κτηνιατρικά φάρμακα σε μικρό χρονικό διάστημα κυρίως έπειτα από συστηματική έκθεση του εδάφους σε ένα συγκεκριμένο κτηνιατρικό φάρμακο που οδηγεί σε εξειδίκευση των ενζυμικών συστημάτων αυτών των μικροοργανισμών και κατ'επέκταση στην επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση του φαρμάκου. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε, η περιβαλλοντική τύχη του κτηνιατρικού φαρμάκου Ivermectin. Το συγκεκριμένο κτηνιατρικό φάρμακο ανήκει στην κατηγορία των ανθελμινθικών και χρησιμοποιείται στην κτηνοτροφία για την καταπολέμηση των ελμίνθων του γαστρεντερικού ,βασικού παθογόνου για βοοειδή και αιγοπρόβατα που επηρεάζει σημαντικά την παραγωγικότητα τους.

Για το σκοπό της μελέτης πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από κτηνοτροφικές μονάδες της Λέσβου, νησί με σημαντική παραγωγή αιγοπροβάτων, τόσο από εδάφη με ιστορικό χρήσης έκθεσης στο Ivermectin αλλά και από εδάφη που έχουν εκτεθεί σε άλλα ανθελμινθικά. Επιπλέον δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε και από εδαφός που δεν έχει εκτεθεί σε κανένα κτηνιατρικό φάρμακο (έδαφος μάρτυρας). Προκειμένου να αξιολογηθεί ο ρόλος των μικροοργανισμών του εδάφους μελετήθηκε η αποδόμηση του Ivermectin σε μη αποστειρωμένα όσο και σε αποστειρωμένα δείγματα εδάφους. Για την εκτίμηση της υπολειματικότητας

προσδιορίστηκε ο χρόνος ημιζωής ( $DT_{50}$ ) του ivermectin με την χρήση κατάλληλων κινητικών μοντέλων. Το Ivermectin εμφάνισε μέτρια υπολειμματικότητα στα εδάφη που μελετήθηκαν με τιμές  $DT_{50} = 26-80$  ημέρες που κυμάνθηκαν για τα μη αποστειρωμένα εδάφη 26,08 έως 80,59 και στα αποστειρωμένα 38,25 έως  $> 365$ . Αυτά τα δεδομένα υπογραμίζουν τον ρολο των μικροοργανισμών του εδαφούς στην αποδομήση του Ivermectin. Ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν δίνουν ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία για την εμφάνιση επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης στα εδάφη με ιστορικό έκθεσης στο συγκεκριμένο κτηνιατικό φάρμακο. Περαιτέρω μελέτες υπό ελεγχόμενες συνθήκες θα διερευνήσουν τη δυνατότητα προσαρμογής της μικροβιακής κοινότητας εδαφών με ιστορικό έκθεσης μέσω επαναλαμβανόμενων εφαρμογών και εφαρμογών σύμφωνα με πιο ρεαλιστικές συνθήκες (εφαρμογή μέσω κοπριάς ή κοπράνων).

## ABSTRACT

In recent years there has been an increasing use of veterinary drugs in order to increase the rate of production of livestock products. This has led to an increase in environmental pollution. Due to this fact the main objective of a large number of recent studies is the environmental fate of veterinary drugs in soils. Many veterinary drugs due to their increasing and repeated use on the same soil have been observed to be degraded by a variety of soil microorganisms. In some veterinary medicines, significant degradation from microorganisms has been observed due to the fact that microorganisms use veterinary drugs as a source of energy and carbon. Some of them have the ability to degrade veterinary medicines in a short time mainly following systematic exposure of the soil to a specific veterinary drug leading to the specificity of the enzyme systems of these microorganisms and hence to the accelerated biodegradation of the drug. In this study, the environmental fate of the veterinary medicinal product Ivermectin has been studied. This veterinary drug belongs to the anthelmintics group and is used in livestock farming to fight the gastrointestinal nematodes, a major pathogen for cattle ,sheep and goats, which significantly affects their productivity.

For the purpose of this study, samples were collected from livestock units in Lesvos island, an island with significant sheep and goat production, both from soils with a history of exposure to Ivermectin and from soils exposed to other anthelmintics. In addition sampling was also carried out from soil that has not been exposed to any veterinary medicinal product (control soil). In order to evaluate the role of soil microorganisms, the degradation of Ivermectin in non-sterilized and sterilized soil samples was studied. To estimate the persistence half life time ( $DT_{50}$ ) of ivermectin was calculated with the use of appropriate kinetic models. The Ivermectin showed moderate persistence with values of  $DT_{50}$  between 26-80 days, in non sterilized samples the values were 26,08 until 80,59 and in sterilized soils were 38,25 until > 365. However, the results do not provide strong evidence for the occurrence of enhanced biodegradation in soils with a history of exposure to this particular veterinary drug. Further studies under controlled conditions will investigate the adaptability of the microbial community from soils with history of exposure through repeated applications and applications under more realistic conditions (soil application via manuring or faeces).



## **1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 ΕΚΤΡΟΦΗ ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΩΝ**

Η αιγοπροβατοτροφία (μικρά μηρυκαστικά) αποτελεί παραδοσιακά έναν από τους δυναμικότερους κλάδους στη χώρα μας, συμβάλλοντας κατά 18% περίπου στο συνολικό αγροτικό εισόδημα. Η παραγωγική αυτή κατεύθυνση στηρίχθηκε στους άφθονους φυσικούς πόρους και προσαρμόστηκε στις ιδιαίτερες κλιματολογικές και εδαφολογικές συνθήκες της Ελλάδας. Το κρέας και το γάλα που παίρνουμε απ' τα αιγοπρόβατα είναι δύο βασικές κατηγορίες προϊόντων με μεγάλη οικονομική σημασία και αποτελούν τις κυριότερες πηγές του αγροτικού εισοδήματος των κατοίκων των ορεινών και μειονεκτικών περιοχών.

Η αιγοπροβατοτροφία, με συνολικό ζωικό πληθυσμό 14.000.000, παράγει το 60% και το 24% της εγχώριας παραγωγής γάλακτος και κρέατος αντίστοιχα, προσδιορίζοντας το 59% της ακαθάριστης αξίας της κτηνοτροφικής παραγωγής. Στην Ελλάδα, η αιγοπροβατοτροφία προσφέρεται σαν μια διέξοδος της σύγχρονης αγροτικής οικονομίας, συμμετέχοντας κατά 45% περίπου στη συνολική ακαθάριστη αξία της ζωικής παραγωγής και κατά 15% περίπου στη συνολική αξία όλης της γεωργικής παραγωγής. Για την χώρα μας, ο τομέας αυτός έχει ιδιαίτερη σημασία δεδομένου ότι αξιοποιεί εκτάσεις ορεινές-μειονεκτικές που θα ήταν αδύνατο να αξιοποιηθούν διαφορετικά. ("Ανάπτυξη τομέα αιγοπροβατοτροφίας", Υπουργείο αγροτικής ανάπτυξης και τροφίμων, 2005).

### **1.2 ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΣΤΗΝ ΕΚΤΡΟΦΗ**

Η βόσκηση αποτελεί βασική παράμετρο στην εκτροφή των προβάτων και των αιγών, καθώς καλύπτει μεγάλο μέρος της διατροφής τους και προσδίδει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και υψηλή ποιότητα στα παραγόμενα προϊόντα. Στις εκτροφές αυτές οι παρασιτικές μολύνσεις είναι ιδιαίτερα συχνές και επιδρούν σημαντικά στην υγεία και ευζωία των ζώων, προκαλώντας σημαντικές απώλειες, που οδηγούν στη μείωση της παραγωγής ζωοκομικών προϊόντων και στην υποβάθμιση του ζωικού κεφαλαίου. Οι επιπτώσεις στην υγεία αλλά και την παραγωγικότητα των ζώων που προσβάλλουν είναι τόσο άμεσες (θνησιμότητα, μείωση παραγωγικότητας) όσο και έμμεσες (κόστος αποπαρασιτώσεων και απόρριψη προϊόντων, όπως το

γάλα, λόγω παρουσίας καταλοίπων των φαρμάκων σε αυτά) ("Ανάπτυξη τομέα αιγοπροβατοτροφίας", Υπουργείο αγροτικής ανάπτυξης και τροφίμων, 2005).

Εδώ και πολλά χρόνια η πρόληψη και η αντιμετώπιση των παρασιτώσεων στηρίζεται, ως επί το πλείστον, στη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων τα οποία είναι τα πλέον αποδοτικότερα μέσα καταπολέμησης επιβλαβών οργανισμών ενώ παράλληλα επιτρέπουν τη διατήρηση των σημερινών αποδόσεων. Ωστόσο υπάρχουν έντονοι προβληματισμοί σχετικά με τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις από την επαναλαμβανόμενη χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων. Αυτό φέρει ως αποτέλεσμα την διερεύνηση της περιβαλλοντικής τύχης αυτών των ουσιών, οι οποίες έχουν την ικανότητα μετακίνησης από το σημείο εφαρμογής τους στο έδαφος αλλά και σε άλλα τμήματα του περιβάλλοντος όπως στον αέρα και στα υπόγεια / επιφανειακά νερά.

Η διάρκεια ζωής του φαρμάκου στο εδάφους εξαρτάται από το πόσο ισχυρά δεσμεύεται από τα συστατικά του εδάφους και πόσο εύκολα αποδομείται. Εξαρτάται επίσης από τις περιβαλλοντικές συνθήκες κατά το χρόνο εφαρμογής, π.χ. την συχνότητα και την ένταση της βροχόπτωσης αμέσως μετά την εφαρμογή ή τα επίπεδα υγρασίας στο έδαφος. Σκοπός ωστόσο των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι η διασφάλιση της δημόσιας ασφάλειας και η προστασία του περιβάλλοντος ως προς το ίδιο το χημικό προϊόν όσο και ως προς τους επιβλαβείς μεταβολίτες του. Η κατανόηση της τύχης των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι απαραίτητη για την ορθολογική λήψη αποφάσεων σχετικά με την αδειοδότηση τους (Manuel Arias-Estévez, et al 2008).

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες κτηνιατρικών φαρμάκων ανάλογα με το είδος του παθογόνου ή παρασίτου 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 οργανισμού που θα αντιμετωπισθεί, όπως παθογόνα(πχ. βακτήρια, μύκητες) ή παράσιτα (πχ. τσιμπούρια, έλμινθες).

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξημένη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων χωρίς να είναι απόλυτα γνωστές οι επιδράσεις τους σε οργανισμούς μη-στόχους και

γενικότερα στο περιβάλλον. Πρόσφατα, σε παγκόσμιο επίπεδο εντοπίστηκαν χαμηλά επίπεδα κτηνιατρικών φαρμάκων σε εδάφη, επιφανειακά και υπόγεια ύδατα (Halling-Sorenson et al. 1998, Pope 2009). Ωστόσο υπάρχουν έντονες ανησυχίες σχετικά με το αντίκτυπο των κτηνιατρικών φαρμάκων στους οργανισμούς, στο περιβάλλον και στην ανθρώπινη υγεία (Alistair et al 2003).

Η παρουσία των γεωργικών φαρμάκων στο περιβάλλον προκαλεί άμεσες και έμμεσες επιπτώσεις σε οργανισμούς μη στόχους με ενδεχόμενη συνέπεια να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα. Η είσοδος των κτηνιατρικών φαρμάκων στα χερσαία οικοσυστήματα γίνεται κυρίως μέσω της χρήση της κοπριάς από κτηνοτροφικές μονάδες, που περιέχει κτηνιατρικά φάρμακα καθώς αυτά απεκκρίνονται ως έχουν στα κόπρανα και ούρα των ζώων, ως λίπασμα σε αγροτικά εδάφη.

Η περιβαλλοντική «τύχη» των κτηνιατρικών φαρμάκων στο έδαφος εξαρτάται από την σύσταση του εδάφους και την χημική φύση του φαρμάκου. 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 βασικότερες διεργασίες που παράλληλα έχουν κύριο ρόλο στην περιβαλλοντική τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι η αποδόμηση και η προσρόφηση. Έχουν ανιχνευθεί κτηνιατρικά φάρμακα σε λύματα και επιφανειακά νερά ενώ ταυτόχρονα υπάρχει ένδεια στοιχείων για την διαδρομή των ανθελμινθικών κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον. Για πολλά χρόνια εμφανίζονται ευρέως σε επιφανειακά ύδατα αναδυόμενοι ρύποι, συμπεριλαμβανομένων των κτηνιατρικών φαρμάκων (Hongxia et al 2012). Για μεγαλύτερη κατανόηση δίνονται οι ακόλουθοι ορισμοί:

**Βιολογική αποδόμηση:** Η βιοαποδόμηση είναι η διάσπαση των κτηνιατρικών φαρμάκων από βακτήρια, μύκητες ή άλλους μικροοργανισμούς σε αερόβιες (παρουσία οξυγόνου) ή αναερόβιες συνθήκες (απουσία οξυγόνου). 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 υπόκεινται σε διαδικασίες βιοαποδόμησης (Sims and Cripples 1999). Με την πρόσληψη των κτηνιατρικών φαρμακευτικών ενώσεων ξεκινούν κάποιες βιοχημικές διεργασίες που μπορεί να είναι η απαλκυλίωση, απαλογόνωση, οξειδωση 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 οξειδωση, 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 οξειδωση 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 απορροφημένου 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 (μέσω οξειδωσης ή να υδρόλυσης). 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 ή έμμεση φωτοαποδόμηση και οι δύο μηχανισμοί συμβάλλουν στην απομάκρυνση των ρύπων (Burrows et al., 2002).

Προσρόφηση: Η προσρόφηση είναι η προσέλκυση και η συγκράτηση κτηνιατρικών φαρμάκων στην επιφάνεια των κολλοειδών εδάφους. Τα διάφορα κολλοειδή που υπάρχουν στο έδαφος μπορεί να είναι ανόργανες ή οργανικές ουσίες ή άλλα συστατικά που υπάρχουν στο έδαφος. Κάποιες ουσίες προσροφώνται σε διάφορα επιφάνειες του εδάφους ασθενώς και δεν παραμένουν προσροφημένες για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζει την

διαδικασία της προσρόφησης είναι η παρουσία οργανικής ουσίας στο έδαφος. Ανάλογα με την ποσότητα αλλά και την μορφή της οργανικής ουσίας του εδάφους, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να εκτιμηθεί η ικανότητα και η ένταση 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 περιορισμένη και ασθενής 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 (OrcID A. 2018).

Έκπλυση : Είναι η διαδικασία κατά την οποία τα κτηνιατρικά φάρμακα, που βρίσκονται διαλυτοποιημένα στο εδαφικό διάλυμα, μπορεί να μετακινηθούν σε βαθύτερα στρώματα του εδάφους 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. Επίσης έχουν ανιχνευθεί ποσότητες κτηνιατρικών φαρμάκων σε υπόγεια ύδατα λόγω έκπλυσης. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την διαδικασία της έκπλυσης, σχετίζονται

με το έδαφος όπως οι φυσικοχημικές του ιδιότητες. 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 (I. M. Davies, 2001).

Επιφανειακή απορροή: Είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα κτηνιατρικά φάρμακα μετακινούνται στα επιφανειακά ύδατα είτε λόγω αυξημένης βροχόπτωσης είτε λόγω άρδευσης. Μπορεί τα διάφορα κτηνιατρικά φάρμακα να προσροφηθούν 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 φυσιογραφικούς 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 έντονες βροχοπτώσεις, κατά τις χειμερινές περιόδους, και έχει ξεπεραστεί η ικανότητα του εδάφους να διηθεί το νερό της βροχής, δημιουργείται επιφανειακή απορροή που οδηγεί στην μετακίνηση των κτηνιατρικών φαρμάκων, είτε διαλυτοποιημένα στο νερό είτε προσροφημένα στα εδαφικά κολλοειδή, στα επιφανειακά ύδατα. Διάφορες έρευνες έχουν ανιχνεύσει μεγάλες ποσότητες φαρμάκων σε διπλανά χωράφια από το χωράφι που έχει έλθει σε επαφή με κάποιο κτηνιατρικό φάρμακο (Klaus et al. 2008).

### **1.3 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ**

Η διαδικασία κατά την οποία, οργανικές ενώσεις όπως τα κτηνιατρικά φάρμακα διασπώνται σε πιο μικρά μόρια με την βοήθεια διάφορων ενζύμων που παράγουν οι μικροοργανισμοί του εδάφους, ονομάζεται μικροβιακή αποδόμηση. Στην απορρύπανση του περιβάλλοντος από διάφορες φαρμακευτικές ή τοξικές ουσίες συμβάλλουν ποικίλοι μικροοργανισμοί. Η διάσπαση 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 σε οξυγόνο. 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).

Ποσότητες των κτηνιατρικών φαρμάκων που εισέρχονται στα εδάφη μπορεί να προκαλέσουν θνησιμότητα σε μερίδα μικροοργανισμών, ενώ για κάποιους άλλους μικροοργανισμούς αποτελούν πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη και αύξηση τους. 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 (Χρυσάνθου Χρήστος, 2018). Οι μικροοργανισμοί έχουν τη τάση να χρησιμοποιήσουν ως σύνθετα μόρια τα κτηνιατρικά φάρμακα με σκοπό την διάσπαση τους και την απελευθέρωση ενέργειας η οποία θα χρησιμοποιηθεί για τον αναβολισμό, αλλά και για άλλες ενεργειακές ανάγκες στο κύτταρο. Άλλη μια πηγή ενέργειας για το κύτταρο αποτελεί η οξείδωση διαφόρων κτηνιατρικών φαρμάκων μέσω της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης. Η κτηνιατρική φαρμακευτική ουσία είναι το αναγωγικό μόριο και παράλληλα κάποιο άλλο μόριο του μεταβολισμού δρα σαν οξειδωτική ένωση, ανάλογα με τον τύπο της διαδικασίας του μεταβολισμού.

Οι βιολογικές διεργασίες έχουν σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των ρυπογόνων ουσιών και στηρίζονται στην καταβολική ευελιξία των μικροοργανισμών για την αποδόμηση ή τη μετατροπή τέτοιων ενώσεων. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως το pH, η περιεκτικότητα σε υγρασία, η θερμοκρασία, η δομή και η υφή του εδάφους καθώς και η οργανική ύλη επηρεάζουν την υποβάθμιση αυτών των κτηνιατρικών

φαρμάκων. 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 πραγματοποιηθεί η βιοαποδόμηση είναι η παρουσία των απαραίτητων μικροοργανισμών που διαθέτουν το μεταβολικό μονοπάτι με σκοπό την διάσπαση των κτηνιατρικών φαρμάκων. Ένας επίσης σημαντικός παράγοντας είναι η δομή και η σύσταση του εδάφους. Έρευνες έχουν δείξει ότι η σύσταση του εδάφους μπορεί να μειώσει την λειτουργία και την αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων από τους μικροοργανισμούς (Conder ,1993). Έχει παρατηρηθεί διάσπαση κτηνιατρικών φαρμάκων και άλλων τοξικών ουσιών, από ομάδες μικροοργανισμών, όπως άλγη, μύκητες, βακτήρια, ακτινοβακτήρια και αρχαία (Carletona A. et al., 2006).

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ότι τα περισσότερα κτηνιατρικά φάρμακα και τοξικές ουσίες, αποδομώνται από κοινοπραξίες μικροοργανισμών. Στις περιπτώσεις αυτές κάποιος μικροοργανισμός ξεκινά την αποδόμηση ενός κτηνιατρικού φάρμακου και τα ενδιάμεσα μεταβολικά προϊόντα που παράγονται διασπώνται περαιτέρω από άλλα μέλη της μικροβιακής κοινοπραξίας (Tygrenou, 2009). Έτσι για την πλήρη διάσπαση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου ή μιας τοξικής ένωσης, μπορεί να συνεργαστούν πολλά είδη μικροοργανισμών (Read, 1986).

Έχει παρατηρηθεί ίδιος ρυθμός αποδόμησης κτηνιατρικών φαρμάκων στα επιφανειακά εδάφη με τα βαθύτερα στρώματα. Σε κάποιες μελέτες συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί μεγαλύτερος ρυθμός αποδόμησης στα βαθύτερα στρώματα από ότι στα επιφανειακά (Di et al. 1998). Επίσης, διάφοροι μικροοργανισμοί λόγω της τοξικότητας των κτηνιατρικών φαρμάκων εκκρίνουν εξωκυτταρικά καταβολικά ένζυμα για την διάσπαση των κτηνιατρικών φαρμάκων που είναι προσροφημένα σε εδαφικά κolloειδή (Hammond J.A. et al., 1997). 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). Διάφοροι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν την πλήρη αποδόμηση οργανικών μορίων, για να καλύψουν τις ενεργειακές τους



ανάγκες, αλλά και τις ανάγκες τους ως προς τον άνθρακα. Αυτό φέρει ως αποτέλεσμα την αύξηση και ανάπτυξη της μικροβιακής κοινότητας.

#### **1.4 ΕΠΙΤΑΧΥΝΟΜΕΝΗ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ**

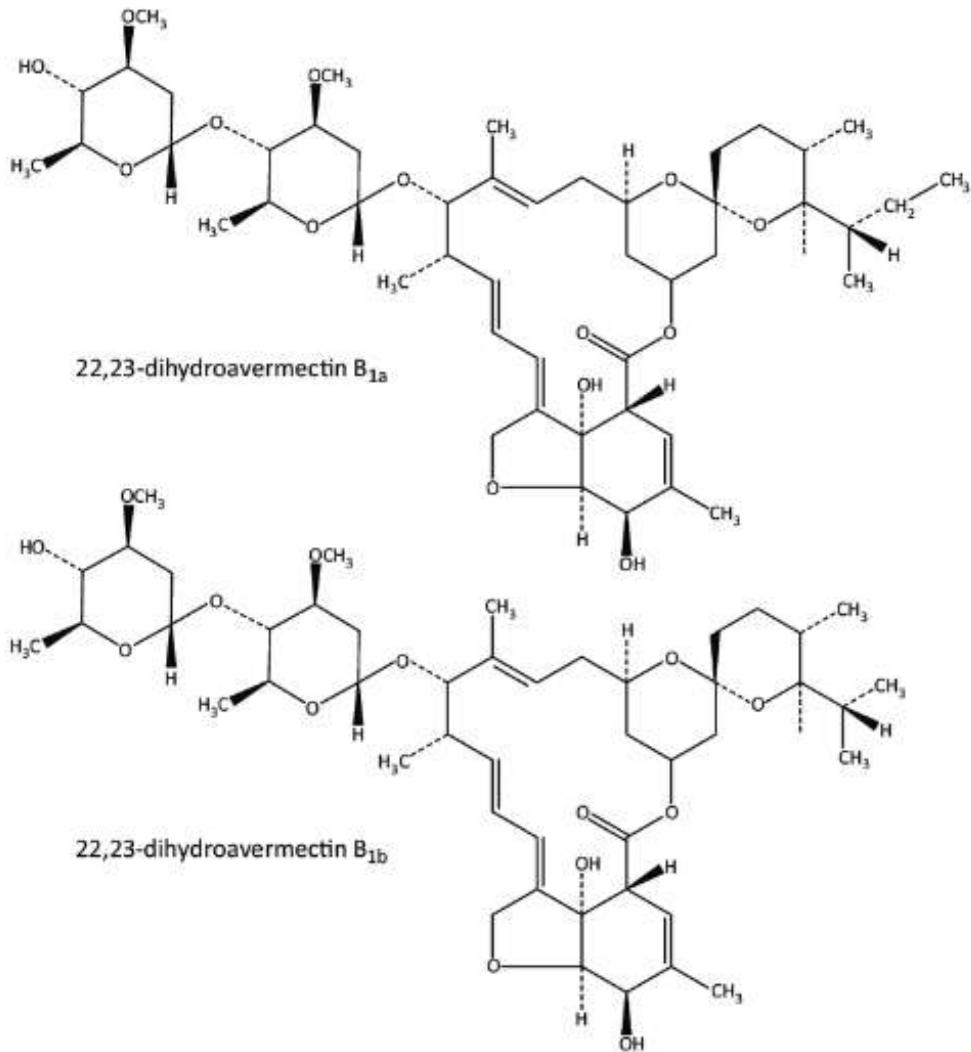
Η επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση χαρακτηρίζεται συνήθως το φαινόμενο που συνδέεται με μια σημαντική αύξηση του ποσοστού της αποδόμησης μιας ουσίας στο έδαφος μετά από προηγούμενη εφαρμογή της ίδιας στον ίδιο αγρό επί σειρά ετών (Arbeli et al 2007). Το φαινόμενο αρχικά μελετήθηκε για πλήθος γεωργικών φαρμάκων, (Kargouzas and Singh 2006, Arbeli et al 2007) και πιο πρόσφατα επιβεβαιώθηκε και για τα κτηνιατρικά φάρμακα όπως αντιβιοτικά της ομάδας των σουλφοναμιδίων (Torp et al 2013). Το συγκεκριμένο φαινόμενο παρατηρήθηκε σε εδάφη που δέχονταν συστηματική έκθεση με κτηνιατρικά αντιβιοτικά για διάστημα πολλών ετών. Πέραν των κτηνιατρικών αντιβιοτικών για τα οποία μόλις τώρα αρχίζουμε να κατανοούμε τον ρόλο των μικροοργανισμών στην αποδόμηση τους στο περιβάλλον, ελάχιστα είναι γνωστά για άλλες ομάδες κτηνιατρικών φαρμάκων όπως είναι τα ανθελμινθικά. Το φαινόμενο της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης οφείλεται στην προσαρμογή των ενζυμικών συστημάτων ενός ή περισσότερων ειδών μικροοργανισμών του εδάφους, για το μεταβολισμό του κτηνιατρικού φαρμάκου. Δηλαδή αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας τα κτηνιατρικά φάρμακα, ενώ ταυτόχρονα οι ίδιοι οι μικροοργανισμοί αποτελούν τους κύριους παράγοντες της επιταχυνόμενης αποδόμησης. Λόγω του γεγονότος ότι στο έδαφος υπάρχει ποικιλομορφία μικροοργανισμών εμφανίζεται αυξημένη πιθανότητα να βρεθούν μικροοργανισμοί που θα διασπούν τα κτηνιατρικά φάρμακα.

Κάποιοι από τους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την μικροβιακή αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων 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).

## 1.5 IVERMECTIN (ΙΒΕΡΜΕΚΤΙΝΗ)

Η Ivermectin είναι ένα πολύ δραστικό ένδο- και έκτο-παρασιτοκτόνο που ανήκει στην ομάδα των μακροκυκλικών λακτονών και συγκεκριμένα στην υποομάδα των αβερμεκτινών. Η ιβερμεκτίνη απομονώνεται με ζύμωση από τον στρεπτομύκητα εδάφους, *Streptomyces avermitilis*. Η αντιπαρασιτική δράση της οφείλεται στην αναστολή μεταβίβασης των νευρικών ώσεων. Συγκεκριμένα η ιβερμεκτίνη διεγείρει την απελευθέρωση του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή βουτυρικό οξύ (GABA) στις προσυναπτικές νευρικές απολήξεις (νηματώδη) ή στις νευρομυικές συνάψεις (στα αρθρόποδα όπως τσιμπούρια, ψύλλοι, ψείρες), που οδηγεί στην παράλυση και το θάνατο των παρασίτων (Turner and Schaeffer, 1989). Η ιβερμεκτίνη αποτελείται από δύο ομόλογα την 22,23-διυδροαβερμεκτίνη B1α, και την 22,23-διυδροαβερμεκτίνη B1b (Εικόνα 1). Είναι ένα ανθελμινθικό φάρμακο, που χρησιμοποιείται στον άνθρωπο και στην κτηνοτροφία. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η ιβερμεκτίνη μεταφέρεται κυρίως με το πλάσμα (80%). Αυτή η κατανομή μεταξύ πλάσματος και αιμοσφαιρίων παραμένει σχετικά σταθερή (Ιωαννίδης Παύλος, 2011).

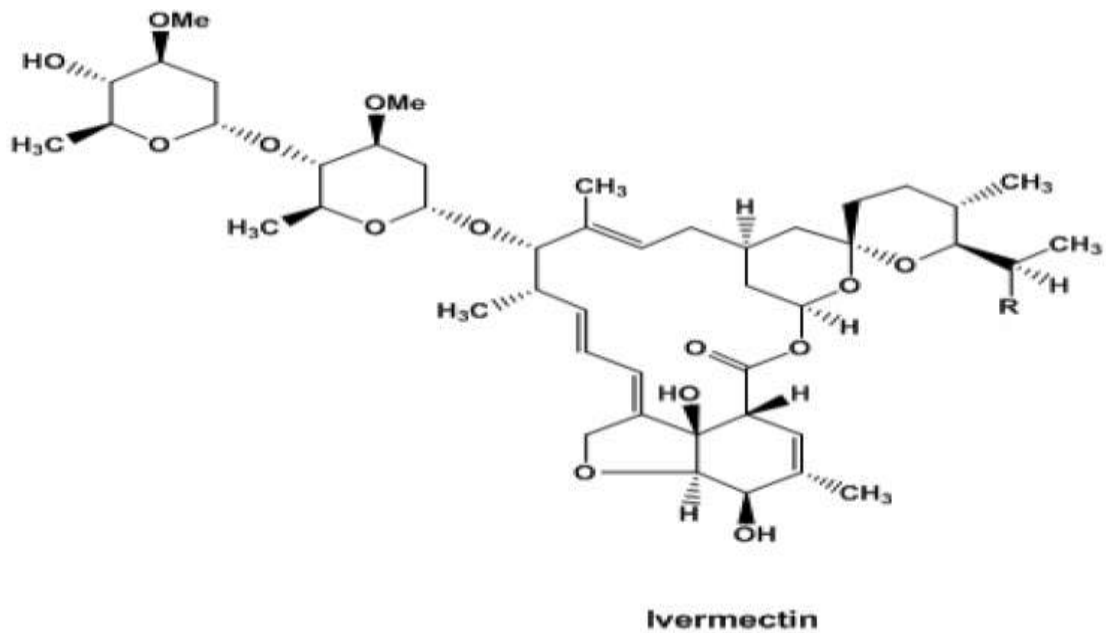
Η Ivermectin ανακαλύφθηκε το 1975 και τέθηκε σε ιατρική χρήση το 1981. Είναι στον κατάλογο των βασικών φαρμάκων του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Χρησιμοποιείται ως ενέσιμο αλλά και από το στόμα σε υγρή μορφή. Το πρώτο εμπορικό σκεύασμα κυκλοφόρησε το 1981 από την εταιρία Merck και περιείχε Ivermectin (ημισυνθετική αβερμεκτίνη) (Λίτσκας 2013). Τέλος, η Ivermectin ήταν το πρώτο ευρέως φάσματος αντιπαρασιτικό φάρμακο κατά των γαστρεντερικών νηματώδων (ενήλικα παράσιτα και προνύμφες τετάρτου σταδίου) όπως *Ostertagia ostertagi*, *Ostertagia lyrata*, *Haemonchus placei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia oncophora* (ενήλικα παράσιτα), *Cooperia punctate* (ενήλικα παράσιτα), *Cooperia pectinata* (ενήλικα παράσιτα), *Bunostomum phlebotomum*, *Oesophagostomum radiatum* κ.α (Crump A., 2017). Επίσης συνέβαλε στην καταπολέμηση και των αρθροπόδων όπως ακάρεα (Campbell et al. 1983).



IUPAC name - 22,23-dihydroavermectin B<sub>1a</sub> + 22,23-dihydroavermectin B<sub>1b</sub>  
 Formula - C<sub>48</sub>H<sub>74</sub>O<sub>14</sub> (22,23-dihydroavermectin B<sub>1a</sub>) + C<sub>47</sub>H<sub>72</sub>O<sub>14</sub> (22,23-dihydroavermectin B<sub>1b</sub>)

Trends in Parasitology

**Εικόνα 2.** « Χημική Δομή Ιβερμεκτίνης. Η ιβερμεκτίνη αποτελείται από ένα μείγμα δύο ομόλογων: 5-O-διμεθυλο-22,23-διυδροαβερμεκτίνη B<sub>1</sub> α και B<sub>1</sub> b σε αναλογία 80:20.»



**Εικόνα 3** « Ο χημικός τύπος του Ivermectin»

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του Ivermectin είναι :

- ✚ Μοριακό βάρος 875 ,1 g/mol
- ✚ Δέσμευση πρωτεΐνης: 93%
- ✚ Υδατοδιαλυτότητα 4 mg/L
- ✚ Φωτόλυση στο νερό < 0,5 ημέρες
- ✚ Χρόνος ημίσειας ζωής στο έδαφος (DT50) 93-240 ημέρες

### 1.5.1 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΥΧΗ ΚΑΙ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ IVERMECTIN

Όλη σχεδόν η ποσότητα της χορηγούμενης Ivermectin απεκκρίνεται χωρίς να μεταβολιστεί από τα ζώα και καταλήγει αμετάβλητη στα κόπρανά τους σύμφωνα με τους Goodman et al. (2006). Επίσης, οι Campbell et al. (1985) εκτίμησαν 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 το 39 – 92% της χορηγούμενης δόσης του Ivermectin απεκκρίνεται μέσω των κοπράνων ενώ παράλληλα ποσοστό μικρότερο του 2% απεκκρίνεται μέσω των ούρων. Επιπρόσθετα τονίζεται πως η Ivermectin βρίσκεται

αμετάβλητη σε ποσοστό 39 – 78% στα κόπρανα. Παρόμοιες μελέτες έδειξαν υπολείμματα Ivermectin στα κόπρανα, 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).

Ερευνώντας τη κίνηση του Ivermectin σε εδαφικές στήλες με τρεις τύπους εδαφών (ιλοπηλώδες, αργιλοπηλώδες και αμμοπηλώδες), η Merck (1983), διαπίστωσε ότι το 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 το 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 CaCl<sub>2</sub>) και χρησιμοποίησαν για το σκοπό αυτό τρία αμμοπηλώδη εδάφη της Ευρώπης, διαφορετικά ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Ο Kd (συντελεστής κατανομής) για την προσρόφηση της Ivermectin στα εδάφη αυτά, παρουσίασε εύρος τιμών από 57 έως 396 L/kg, ενώ αντίστοιχα το εύρος των τιμών του Koc (συντελεστής κατανομής μεταξύ του οργανικού άνθρακα στο έδαφος και του νερού) ήταν  $4 \times 10^3$  έως  $2,58 \times 10^4$ .

Συμπερασματικά, η συγκέντρωση της Ivermectin στο σύστημα εδάφους/υδατικού διαλύματος, είναι καθοριστική για το μέγεθος της προσρόφησης του φαρμάκου στο έδαφος. Επίσης παρατηρήθηκε ότι, δεν υπήρξε περεταίρω αύξηση της προσρόφησης της Ivermectin στα στερεά συστατικά του εδάφους (κατάσταση κορεσμού) με αύξηση της συγκέντρωσης της στο σύστημα, 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 εκροφηθεί και να καταλήξει στο υδατικό διάλυμα.

Άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι το ανθελμθικό αυτό δεν διασπάται εύκολα υπό αναερόβιες συνθήκες (Carsten Prasse et al., 2009). Το Ivermectin επηρέασε τη λειτουργία του οικοσυστήματος των λιμνών σε πειραματική έρευνα (Sanderson et al. 2007). Υπήρχαν, επιπρόσθετα, άμεσες επιδράσεις 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. Το 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. Διαπιστώθηκαν ακόμη, 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).

Το Ivermectin είναι εξαιρετικά ανθεκτική στη διάσπαση, όταν βρίσκεται στο έδαφος και τα ιζήματα (Prasse et al. 2009, Krogh et al. (2009)). Οι Liebig et al. (2010) έδειξαν ότι οι επιπτώσεις στο περιβάλλον από τη χρήση της Ivermectin στην κτηνοτροφία, είναι πολύ αυξανόμενες και επικίνδυνες προτρέποντας την αναθεώρηση της άδειας κυκλοφορίας τους. Ωστόσο οι πληροφορίες σχετικά με την μικροβιακή αποδόμηση δεν είναι επαρκής, γεγονός που χρίζει περαιτέρω μελέτης.

## 1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους στην αποδόμηση του κτηνιατρικού φαρμάκου Ivermectin. Τα εδάφη που μελετήθηκαν προέρχονταν από κτηνοτροφικές μονάδες της Λέσβου όπου κάποιες από αυτές είχαν ιστορικό χρήσης στο συγκεκριμένο φάρμακο ενώ άλλες όχι. Ειδικότερα αξιολογήθηκαν δύο υποθέσεις

(α) οι μικροοργανισμοί έχουν ενεργό ρόλο στην αποδόμηση του Ivermectin στα εδάφη

(β) πρότερη έκθεση των εδαφών στο Ivermectin αναμένεται να επιταχύνει την αποδόμηση του μέσω πιθανής επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης

Η υπόθεση (α) αξιολογήθηκε μέσω μελέτης της αποδόμησης του Ivermectin σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα δείγματα από όλα τα εδάφη που μελετήθηκαν. Αντίθετα η υπόθεση (β) αξιολογήθηκε μέσω μελέτης της αποδόμησης του Ivermectin (1) σε εδάφη που συλλέχθηκαν απο κτηνοτροφικές μονάδες με ή χωρίς ιστορικό χρήσης Ivermectin και (2) σε εδάφη που συλλέχθηκαν από διαφορετικά σημεία εντός των κτηνοτροφικών μονάδων που αναμένεται να έχουν διαφορετική έκθεση σε Ivermectin (μέσα από τη σάνη vs από το λειμώνα).

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΔΑΦΩΝ

Δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από τη Λέσβο, όπου κάποια από αυτά είχαν ιστορικό εφαρμογής της Ivermectin ενώ άλλα όχι. Τα εδάφη που δεν είχαν ιστορικό χρήσης του κτηνιατρικού φαρμάκου Ivermectin, έχουν επιβαρυνθεί από άλλα ανθελμινθικά όπως τα Albendazole, Eprinomectin και Ferbendazole. Το ιστορικό έκθεσης στο κτηνιατρικό φάρμακο Ivermectin, δημιουργήθηκε μέσω της απόθεσης κοπριάς ή κοπράνων και ούρων από ζώα που έχουν δεχτεί εφαρμογή του παραπάνω φαρμάκου. Παράλληλα συλλέχθηκαν δείγματα και από εδάφη που δεν ήρθαν σε επαφή με αυτά τα κτηνιατρικά φάρμακα, με σκοπό τη χρήση τους ως μάρτυρες. Τα συγκεκριμένα δείγματα (μάρτυρες) πάρθηκαν από σημεία που δεν υπήρχε καμία αγροτική ή κτηνοτροφική δραστηριότητα.



**Εικόνα 4.** « Χάρτης νήσου Λέσβου»

Πιο συγκεκριμένα, όλα τα εδάφη (πέραν των μαρτύρων) συλλέχθηκαν από κτηνοτροφικές μονάδες με αιγοπρόβατα. Η δειγματοληψία σε όλες τις



κτηνοτροφικές μονάδες εκτός από μια πραγματοποιήθηκε από δύο διαφορετικά σημεία. Έτσι ένα δείγμα (δείγματα σειράς A) συλλέχθηκε ακριβώς έξω από τη στάνη που εκτρέφονται τα ζώα (αυξημένη απόθεση κοπράνων άρα αναμένεται αυξημένη έκθεση σε Ivermectin). Το δεύτερο δείγμα συλλέχθηκε από περιφραγμένους λειμώνες της κάθε κτηνοτροφικής μονάδας (απόθεση κοπράνων με χαμηλότερη συχνότητα άρα και χαμηλότερη έκθεση σε Ivermectin). Στον Πίνακα 1 παρατίθεται λίστα με τα σημεία συλλογής για κάθε δείγμα ξεχωριστά.

**Πίνακας 1.** Τα δείγματα εδάφους που μελετήθηκαν και τα σημεία από τα οποία συλλέχθηκαν

<b>Δείγμα</b>	<b>Σημείο συλλογής</b>
3A (ιστορικό χρήσης Ivermectin)	Μαντρί
3B (ιστορικό χρήσης Ivermectin)	Λειμώνας
4A	Μαντρί
4B	Λειμώνας
7B	Λειμώνας (κοινοτικός)
9A (ιστορικό χρήσης Ivermectin)	Μαντρί
9B (ιστορικό χρήσης Ivermectin)	Λειμώνας
10B (ιστορικό χρήσης Ivermectin)	Λειμώνας
11 (ιστορικό χρήσης Ivermectin)	Μαντρί και περιφραγμένος λειμώνας
Μάρτυρας (CP)	Μέσα από το Παλαιοχώρι εντός ενός γκρεμισμένου σπιτιού

## 2.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΔΑΦΩΝ

Έγινε άμεση μεταφορά των εδαφών στο εργαστήριο όπου κοσκινίστηκαν και στην συνέχεια πάρθηκαν δείγματα 100 g, που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της υγρασίας και υδατοχωρητικότητας τους, αλλά και των κυριοτέρων φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών όπως pH, περιεκτικότητα σε ολικό οργανικό C (TOC) και ολικό N (TN), αγωγιμότητα (EC), τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 2. .

**Πίνακας 2.** Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που μελετήθηκαν και συλλέχθηκαν από τις κτηνοτροφικές μονάδες καθώς και σε δείγμα μάρτυρα χωρίς πρότερη έκθεση στο Ivermectin.

Δείγματα	TN (Kg/L)	TOC (Kg/L)	pH	EC (mS/cm)
Μάρτυρας	0,13	9,36	6,5	2,13
3A	2,25	59,29	6,75	1783
3B	0,42	17,78	6,3	1010
4A	0,18	12,94	5,79	322
4B	0,04	12	6,29	768
11	1,07	23	7,02	2,1
7A	0,31	17	5,85	3,8
9A	0,26	6,24	5,8	281
9B	1,13	25	7,01	4,81
10A	0,6	20,4	6,9	933

### 2.2.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΕΔΑΦΩΝ

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  $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$  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

Wcont: το βάρος του δοχείου

### 2.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΥΔΑΤΟΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΔΑΦΩΝ

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 ΔΙΑΛΥΤΕΣ, ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Χρησιμοποιήθηκε το κτηνιατρικό σκεύασμα Noromectin® με δραστική ουσία Ivermectin 1.0% w/v (10 mg in 1 ml). Μετά από αραιώσεις από το διάλυμα συγκέντρωσης 1000 mg/L (Noromectin® 1.0%) προετοιμάστηκε διάλυμα 50 mg/L σε μεθανόλη (MeOH) από το οποίο έγινε εφαρμογή στο έδαφος (400 g εδάφους). Για

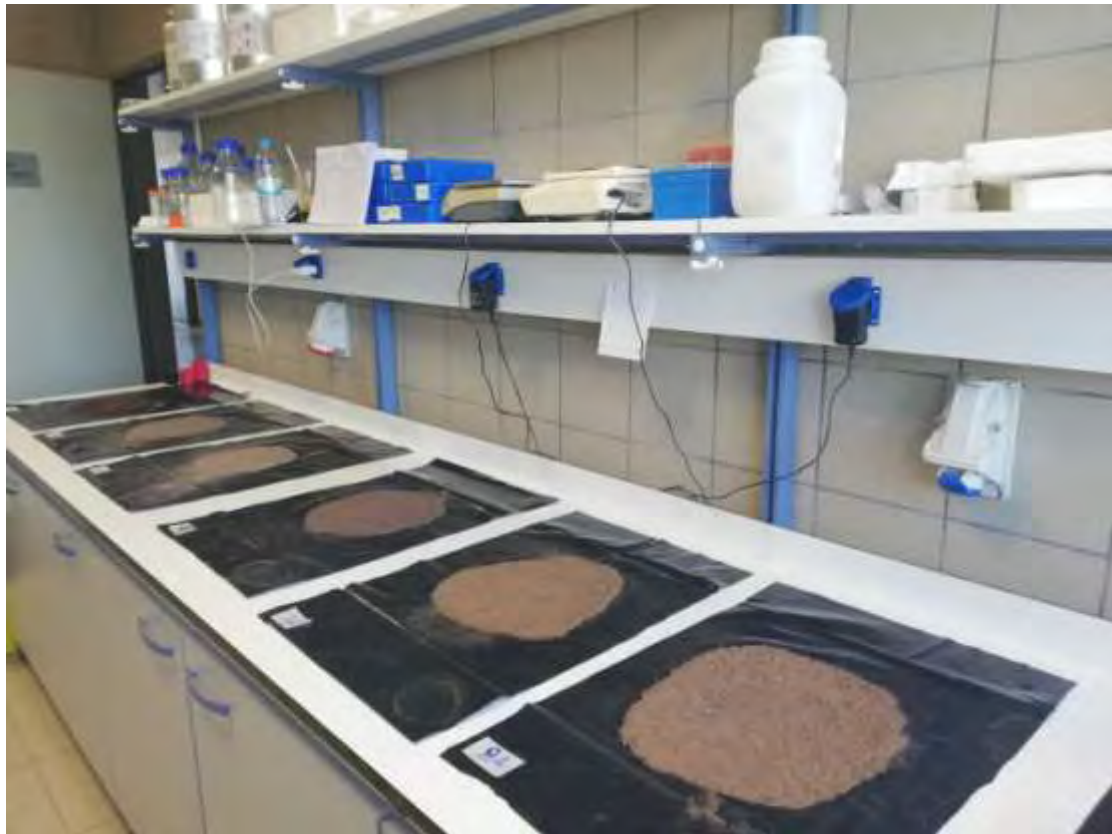
τις εκχυλίσεις και την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν MeOH και H<sub>2</sub>O HPLC grade (Merck).

## 2.5 ΠΕΙΡΑΜΑ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ IVERMECTIN ΣΤΑ ΕΔΑΦΗ

### 2.5.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Καθένα από τα δείγματα εδάφους που πάρθηκαν διαχωρίστηκαν σε δύο υποδείγματα (400 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) δέχτηκαν εφαρμογή της Ivermectin με τελική συγκέντρωση στο έδαφος 1mg/Kg. Αντίστοιχα πραγματοποιήθηκε εφαρμογή, Ivermectin στα εδάφη - μάρτυρες όπως περιγράφηκε για τα δείγματα με ιστορικό έκθεσης σε ανθελμινθικά κτηνιατρικά φάρμακα.

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 15 g, 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 (t<sub>0</sub>) και 7(t<sub>7</sub>), 15(t<sub>15</sub>), 30(t<sub>30</sub>), 60(t<sub>60</sub>) ημέρες αργότερα τρία δείγματα από κάθε έδαφος και μεταχείριση απομακρύνονταν από την επώαση και τοποθετούνταν στους -20°C μέχρι να αναλυθούν για υπολείμματα Ivermectin στο έδαφος.



**Εικόνα 5.** « Εδάφη μετά την εφαρμογή της Ivermectin. »

### **2.5.2 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗΣ ΕΔΑΦΩΝ.**

Τα εδάφη τοποθετήθηκαν εντός μάζας από γάζες σε γυάλινους ξηραντήρες. Στον πυθμένα του ξηραντήρα τοποθετήθηκε χλωροφόρμιο και ο ξηραντήρας σφραγίστηκε 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 τυχόν μικροοργανισμών που διέφυγαν τον πρώτο καπνισμό των εδαφών. Ακολούθως τα εδάφη επανατοποθετήθηκαν σε ξηραντήρες με χλωροφόρμιο (CHCl<sub>3</sub>) 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 Ivermectin όπως περιγράφηκε παραπάνω.



**Εικόνα 6.** «Γυάλινος ξηραντήρας όπου στο πυθμένα του τοποθετήθηκε χλωροφόρμιο και σφραγίστηκε αεροστεγώς. »

### **2.5.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ IVERMECTIN ΑΠΟ ΤΟ ΕΔΑΦΟΣ**

Για την εκχύλιση του Ivermectin από το έδαφος ζυγίστηκαν 5 g εδάφους και τοποθετήθηκαν σε κωνικές των 100ml , προστέθηκαν 15 ml MeOH, 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.

### **2.5.4. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)**

Για την ανάλυση των υπολειμμάτων του Ivermectin στα δείγματα εδάφους 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 ήταν  $1,4 \text{ ml min}^{-1}$ . Οι συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης για το Ivermectin περιγράφονται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 3.** Συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης για το Ivermectin.

Κτηνιατρικά Φάρμακα	Κινητή φάση	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης	Μήκος κύματος (nm)	Χρόνος έκλουσης
Ivermectin	MeOH :H <sub>2</sub> O	90:10	245	8,85 min

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων του Ivermectin στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μέσω πρότυπης καμπύλης που κατασκευάστηκε με έγχυση πρότυπων διαλυμάτων Ivermectin συγκέντρωσης 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.

## 2.8 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ 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, Ivermectin, 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 3). 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 4.** 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
---------	--------------------	---------------------

<b>Single first order (linear) (SFO)</b>	$C = C_0 e^{-kt}$	$t_{1/2} = \ln 2 / K$
<b>Hockey Stick (HS)</b>	$C = C_0 e^{-k_1 t}$ 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 $t > t_b$	$t_{1/2} = t_b + (\ln 2 - k_1 t_b) / k_2$
<b>Bi-exponential (DFOP)</b>	$C = C_0 (g e^{-k_1 t} + (1-g) e^{-k_2 t})$	Iterative method

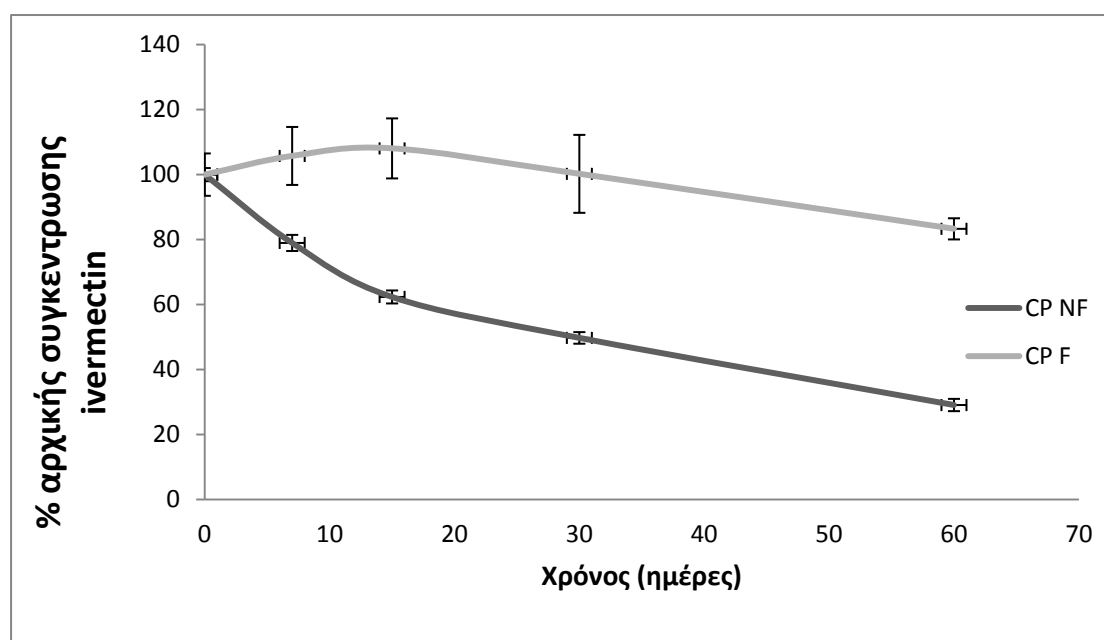
Τα δεδομένα αποδόμησης ( $DT_{50}$ ) των κτηνιατρικών φαρμάκων που μελετήθηκαν συσχετίστηκαν με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών και την ύπαρξη ή όχι ιστορικού χρήσης του κάθε κτηνιατρικού φαρμάκου, ούτως ώστε να αξιολογηθεί ο ρόλος βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων, στην αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων που μελετήθηκαν στο έδαφος.



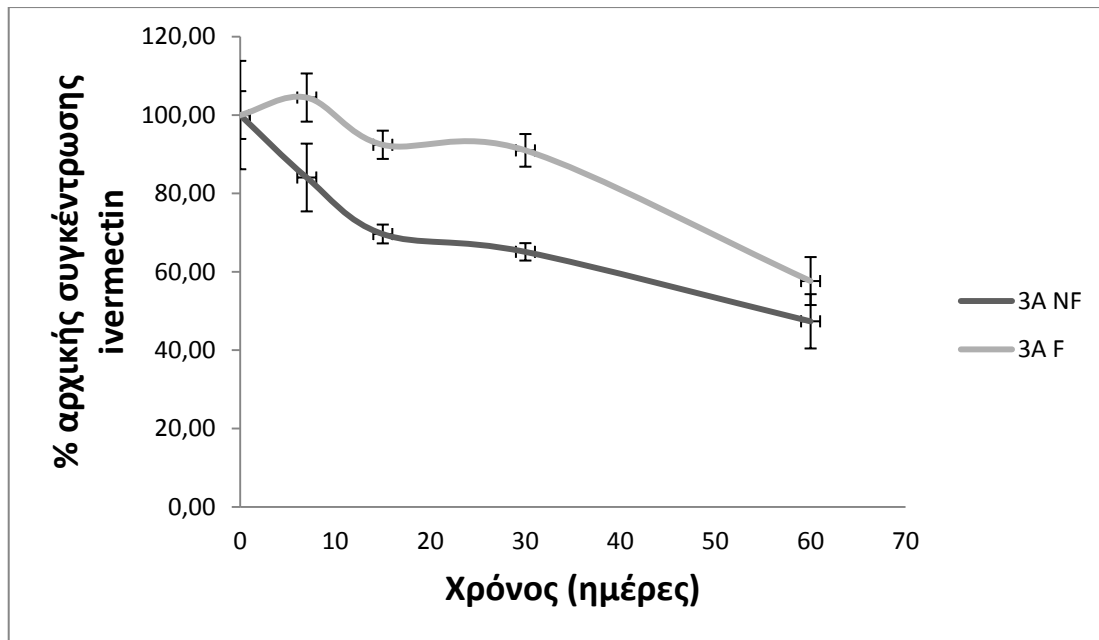
### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΤΟΥ IVERMECTIN ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

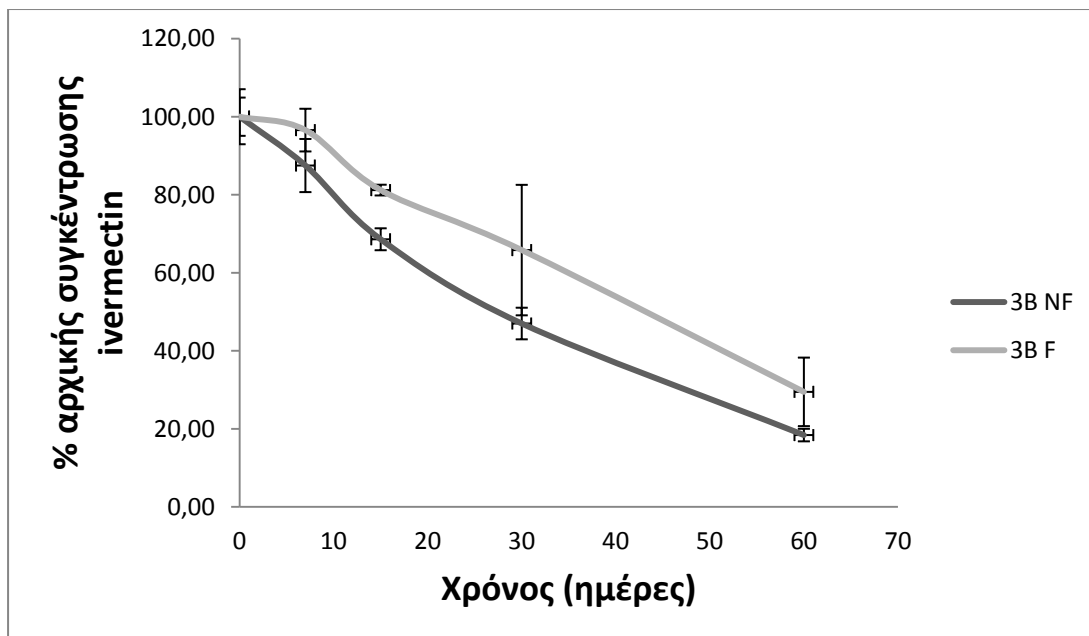
Η αποδόμηση του Ivermectin σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα εδάφη από όλες τις μονάδες εκτροφής αιγοπροβάτων, καθώς και από τα αντίστοιχα εδάφη μάρτυρες παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 1 έως 10. Γενικότερα σε όλα τα εδάφη, συμπεριλαμβανομένου και του μάρτυρα, παρατηρήθηκε μια επιβράδυνση της αποδόμησης του Ivermectin στα αποστειρωμένα σε σύγκριση με τα μη αποστειρωμένα δείγματα. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε το έδαφος 4B όπου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην αποδόμηση του Ivermectin μεταξύ αποστειρωμένων και μη αποστειρωμένων δειγμάτων.



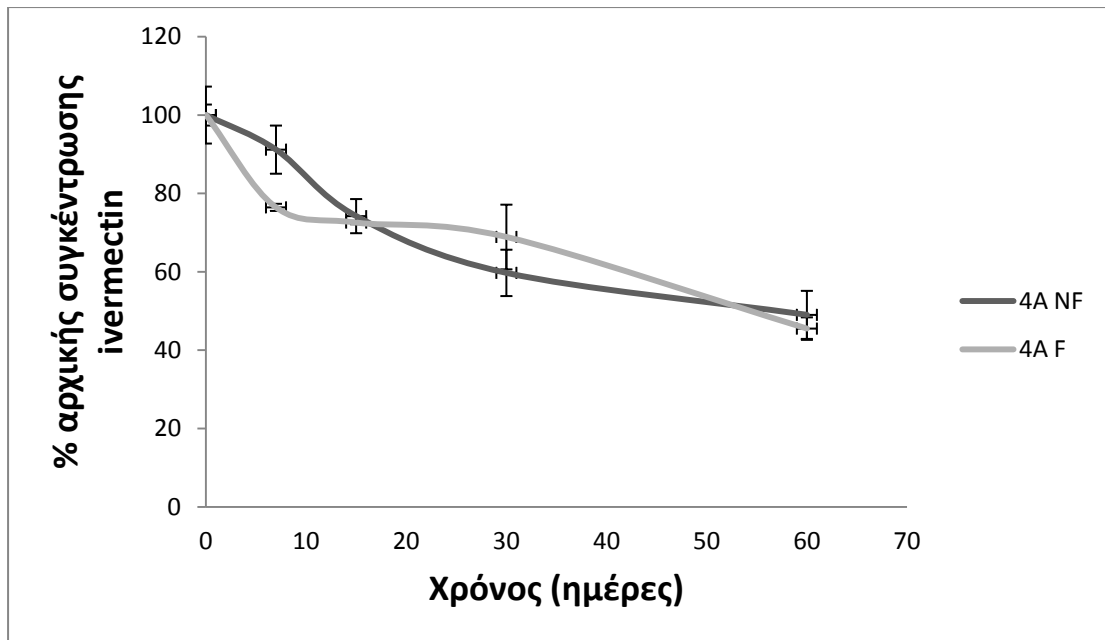
**Διάγραμμα 1.** Αποδόμηση του Ivermectin σε αποστειρωμένα (CP F) και μη αποστειρωμένα (CP NF) δείγματα στο έδαφος Μάρτυρα που συλλέχθηκε από αστική περιοχή της Λέσβου. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.



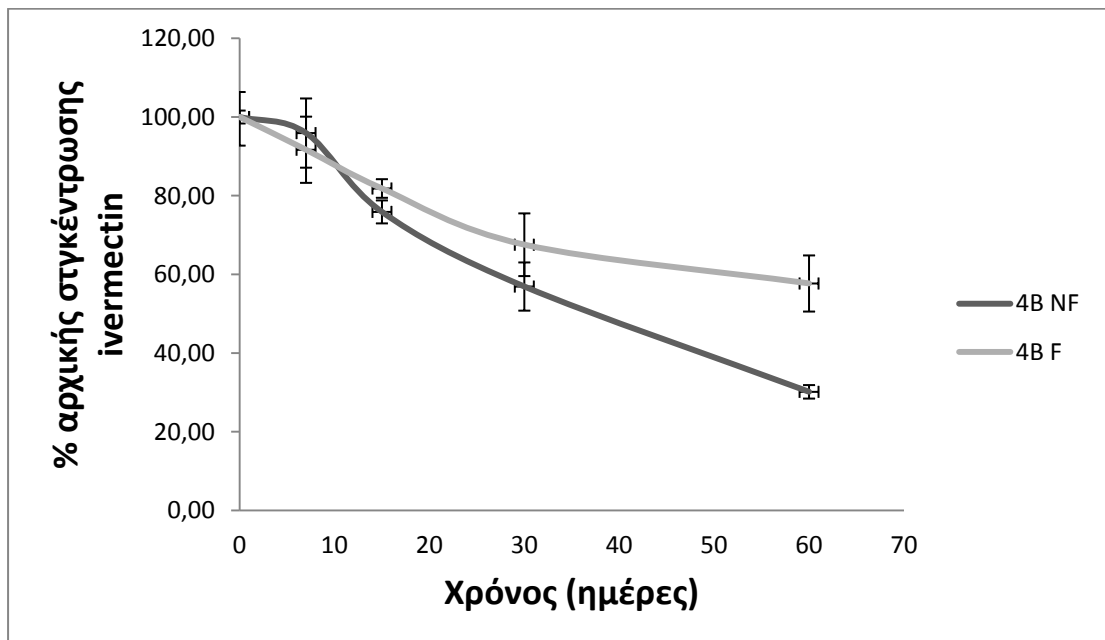
**Διάγραμμα 2.** Αποδόμηση του Ivermectin σε αποστειρωμένα (3A F) και μη αποστειρωμένα (3A NF) δείγματα στο έδαφος 3A που συλλέχθηκε από κτηνοτροφική μονάδα της Λέσβου. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.



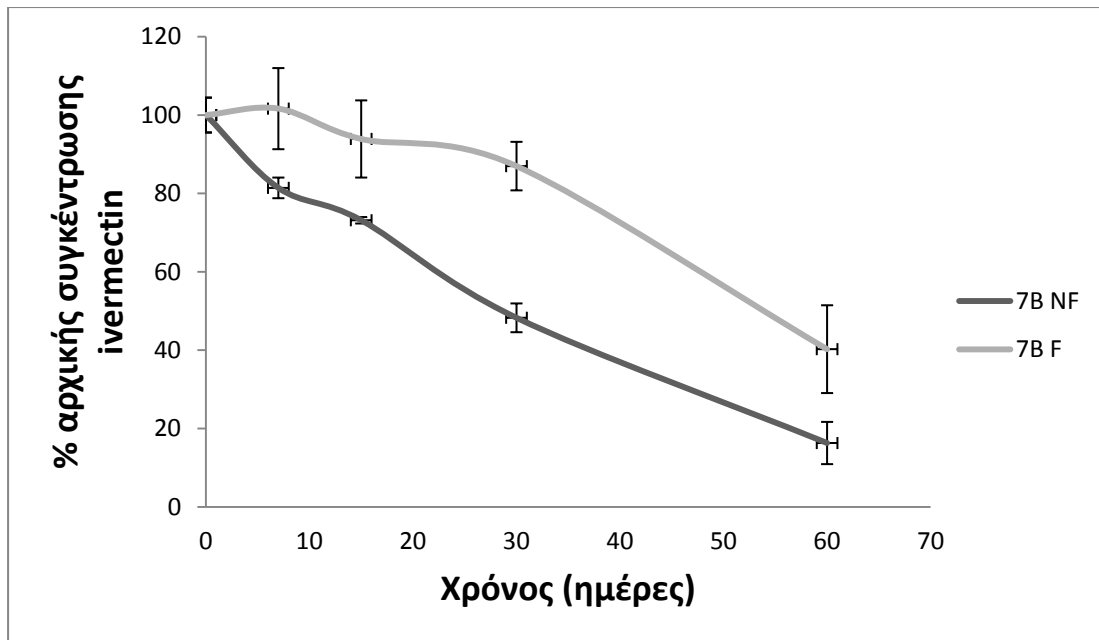
**Διάγραμμα 3.** Η αποδόμηση του Ivermectin σε αποστειρωμένα (3B F) και μη αποστειρωμένα (3B NF) δείγματα εδάφους 3B αντίστοιχα που συλλέχθηκε από κτηνοτροφική μονάδα της Λέσβου. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.



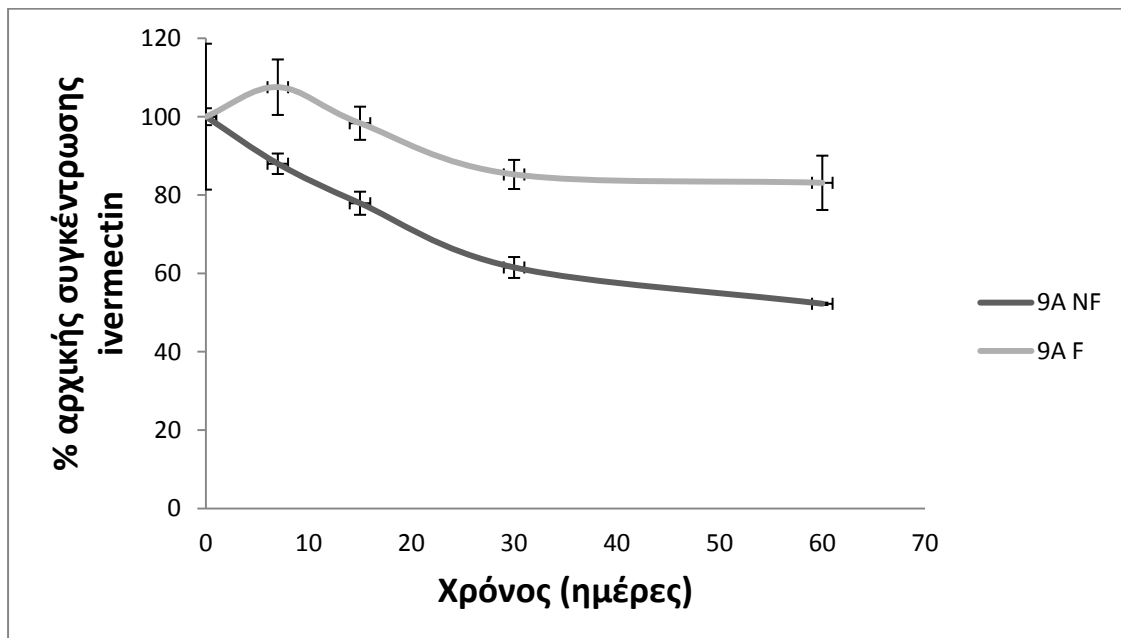
**Διάγραμμα 4.** Αποδόμηση του Ivermectin σε αποστειρωμένα (4A F) και μη αποστειρωμένα (4A NF) δείγματα στο έδαφος 4A που συλλέχθηκε από κτηνοτροφική μονάδα της Λέσβου. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.



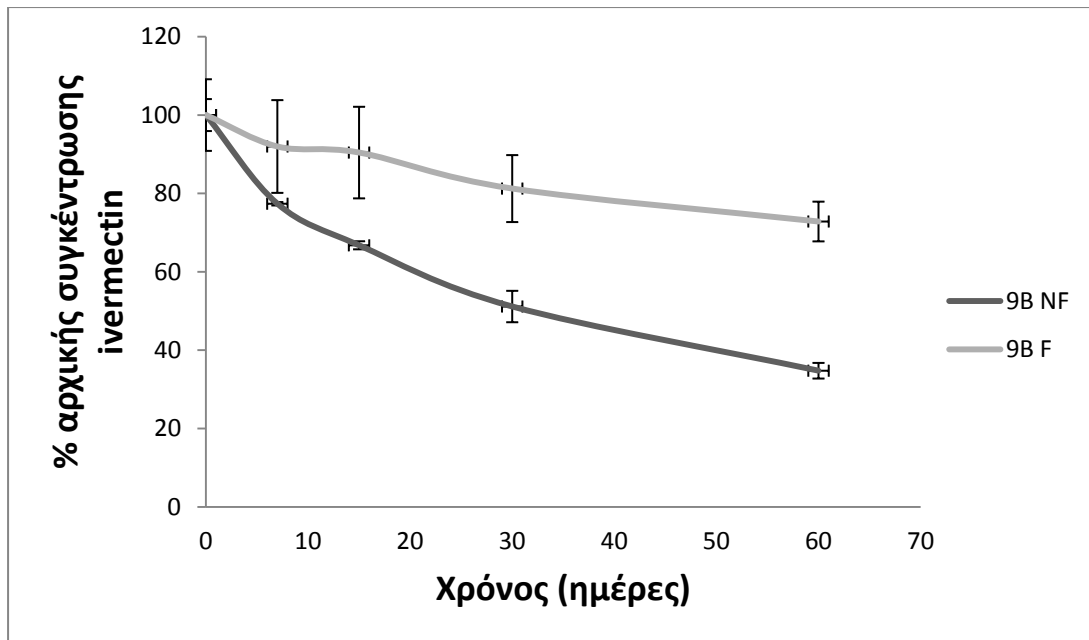
**Διάγραμμα 5.** Αποδόμηση του Ivermectin σε αποστειρωμένα (4B F) και μη αποστειρωμένα (4B NF) δείγματα στο έδαφος 4B που συλλέχθηκε από κτηνοτροφική μονάδα της Λέσβου. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.



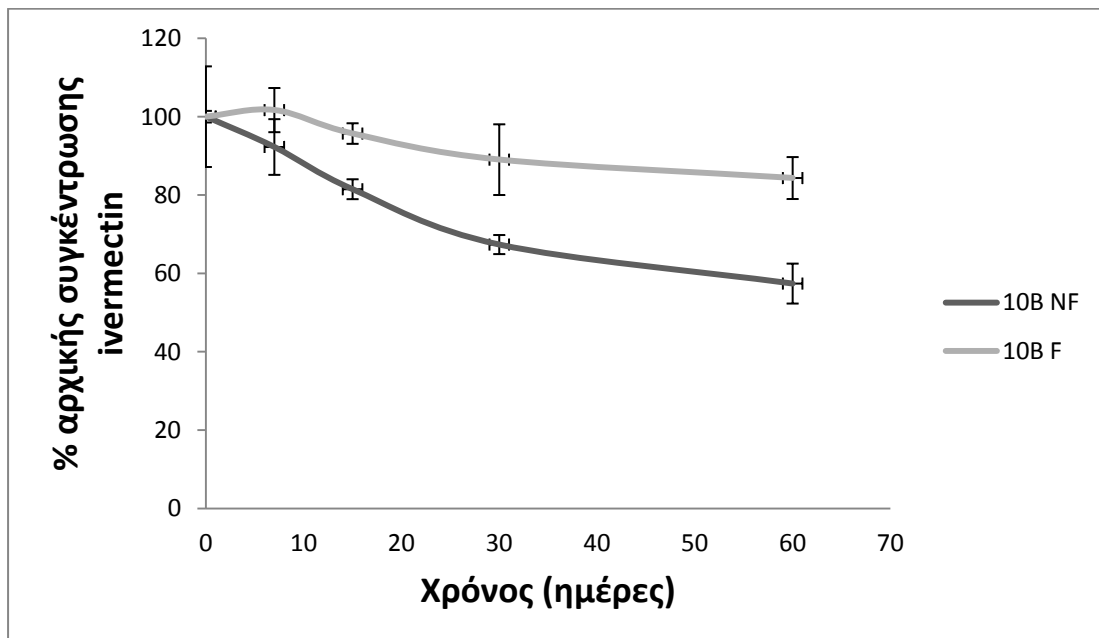
**Διάγραμμα 6.** Αποδόμηση του Ivermectin σε αποστειρωμένα (7B F) και μη αποστειρωμένα (7B NF) δείγματα στο έδαφος 7B που συλλέχθηκε από κτηνοτροφική μονάδα της Λέσβου. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.



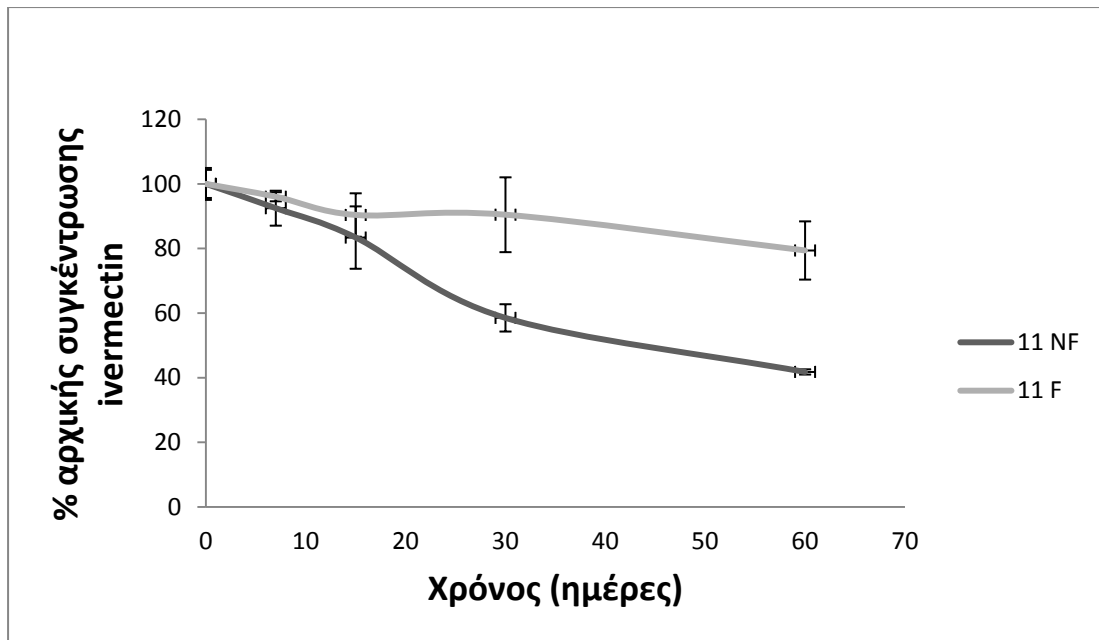
**Διάγραμμα 7.** Αποδόμηση του Ivermectin σε αποστειρωμένα (9A F) και μη αποστειρωμένα (9A NF) δείγματα στο έδαφος 9A που συλλέχθηκε από κτηνοτροφική μονάδα της Λέσβου. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.



**Διάγραμμα 8.** Αποδόμηση του Ivermectin σε αποστειρωμένα (9B F) και μη αποστειρωμένα (9B NF) δείγματα στο έδαφος 9B που συλλέχθηκε από κτηνοτροφική μονάδα της Λέσβου. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.



**Διάγραμμα 9.** Αποδόμηση του Ivermectin σε αποστειρωμένα (10B F) και μη αποστειρωμένα (10B NF) δείγματα στο έδαφος 10B που συλλέχθηκε από κτηνοτροφική μονάδα της Λέσβου. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.



**Διάγραμμα 10.** Αποδόμηση του Ivermectin σε αποστειρωμένα (11 F) και μη αποστειρωμένα (11 NF) δείγματα στο έδαφος 11 που συλλέχθηκε από κτηνοτροφική μονάδα της Λέσβου. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.

### 3.2. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥ IVERMECTIN

Με βάση τα δεδομένα αποδόμησης του Ivermectin στα διάφορα εδάφη υπολογίστηκαν με την χρήση κατάλληλων μοντέλων κινητικής οι τιμές  $DT_{50}$  για το Ivermectin, ως μέτρο εκτίμησης της υπολειμματικότητας του και του ρόλου των μικροοργανισμών στην αποδόμηση του στο έδαφος (Πίνακας 5). Συνολικά παρατηρήθηκε πως οι τιμές  $DT_{50}$  στα αποστειρωμένα εδάφη κυμάνθηκαν από 38,3 (έδαφος 3B) ως >365 ημέρες (έδαφος 10A) με μέση τιμή τις 126,8 ημέρες σημαντικά υψηλότερη ( $p < 0.05$ ), σε σύγκριση με τα μη αποστειρωμένα δείγματα όπου οι τιμές  $DT_{50}$  κυμάνθηκαν από 26,1 (έδαφος 3B) έως 80,6 ημέρες (έδαφος 10A) με μέση τιμή τις 44,2 ημέρες.

Αντίστοιχα οι τιμές  $DT_{50}$  στα εδάφη που συλλέχθηκαν από κτηνοτροφικές μονάδες με ιστορικό χρήσης Ivermectin (3A, 3B κτλ) κυμάνθηκαν από 26,1 ως >365 με μέση τιμή τις 97 ημέρες σε σχέση με τις τιμές  $DT_{50}$  στα εδάφη που συλλέχθηκαν από μονάδες χωρίς ιστορικό χρήσης Ivermectin που κυμάνθηκαν από 26,6 ως 181,5

ημέρες, με μέση τιμή 64,5, σε σχέση με τα αντίστοιχα εδάφη με ιστορικό έκθεσης, χωρίς όμως να παρατηρείται στατιστική σημαντικότητα ( $p>0.05$ ).

Τέλος πραγματοποιήθηκε και σύγκριση μεταξύ των τιμών  $DT_{50}$  που καταγράφηκαν σε δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από σημεία της στάνης με δείγματα που συλλέχθηκαν από αντίστοιχους λειμώνες των ίδιων κτηνοτροφικών μονάδων. Οι τιμές  $DT_{50}$  στα εδάφη που συλλέχθηκαν από τη στάνη (εδάφη 3A, 4A, 9A) κυμάνθηκαν από 51,2 έως 133,1 με μέση τιμή 72,4. Αντίστοιχα οι τιμές  $DT_{50}$  στα εδάφη που συλλέχθηκαν από το λειμώνα (εδάφη 3B, 4B, 7B, 9B, 10B, 11) κυμάνθηκαν από 26,6 έως >365) με μέση τιμή 85,5 χωρίς όμως να παρατηρείται στατιστική σημαντικότητα ( $p>0.05$ ).

Η στατιστική ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με Ανάλυση Διασποράς μιας κατεύθυνσης (One-way ANOVA) με τη βοήθεια του προγράμματος στατιστικών ανλύσεων IBM SPSS® Statistics.

**Πίνακας 5.** Οι παράμετροι κινητικής της αποδόμησης του Ivermectin σε αποστειρωμένα (F) και μη αποστειρωμένα δείγματα (NF) εδάφους που συλλέχθηκαν από τις κτηνοτροφικές μονάδες καθώς και σε δείγμα μάρτυρα χωρίς πρότερη έκθεση στο Ivermectin (CP). Η αποδόμηση των συνολικών τοξικών υπολειμμάτων του Ivermectin στο έδαφος περιγράφηκε ικανοποιητικά από διάφορα μοντέλα κινητικής όπως SFO, καθώς και τα διφασικά μοντέλα HS και FOMC.

## ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΑ ΕΔΑΦΗ

Έδαφος	Μοντέλο Κινητικής	$\chi^2$ (%)	$K_{deg} (d^{-1})$	$t_b (d)$	$\alpha$	$\beta$	DT50
3A	HS	5,2	k1=55,60E-12 k2=0,010	9,77E+00			77,6
3B	SFO	4,83	0,018				38,25
4A	HS	4,46	k1=0,062      k2=0,009	3,317			56,45
4B	FOMC	1,62			0,51	28,26	82,85
7B	SFO	8,1	0,012				55,7
9A	SFO	3,87	0,004				133,1
9B	FOMC	1,2			0,29	30,33	312,8
10B	FOMC	0,72			0,14	11,61	>365
11	SFO	2,18	0,003				202,6
CP	FOMC	4,4			6,28E+06	1,65E+09	181,5

## ΜΗ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΑ ΕΔΑΦΗ

Έδαφος	Μοντέλο Κινητικής	$\chi^2$ (%)	$K_{deg} (d^{-1})$	$t_b (d)$	$\alpha$	$\beta$	DT50
3A	HS	4,11	K1=0,056      K2=0,010	3,04			53,82
3B	SFO	2,37	0,026				26,08
4A	FOMC	2,99			0,63	25,39	51,23
4B	SFO	3,48	0,019				34,74
7B	SFO	4,32	0,026				26,63
9A	FOMC	1,89			0,51	21,26	62,11
9B	SFO	1,7	0,019				36,08
10B	FOMC	1,77			0,52	29,05	80,59
11	SFO	3,12	0,015				44,4
CP	FOMC	2,67			1,04	28,42	26,74



### 3.2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΕΔΑΦΩΝ ΚΑΙ DT50

Η ποικιλομορφία και το μεγάλο εύρος τιμών των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των υπό μελέτη εδαφών, έκρινε αναγκαίο να γίνουν συσχετίσεις μεταξύ των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών και των τιμών DT50 για την εύρεση τυχόν θετικών ή αρνητικών στατιστικών συσχετίσεων μεταξύ των παραγόντων αυτών.

Η στατιστική ανάλυση (Pearson's correlation test) ανάμεσα στις τιμές DT<sub>50</sub> του Ivermectin και του pH των μη αποστειρωμένων εδαφών που μελετήθηκαν έδειξε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ( $P < 0,05$ ) (Πίνακας 6) . Αντίθετα, καμία σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα στις τιμές DT<sub>50</sub> του Ivermectin και στα υπόλοιπα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών, τόσο στα αποστειρωμένα όσο και στα μη αποστειρωμένα δείγματα.

**Πίνακας 6.** Στατιστική ανάλυση ανάμεσα στις τιμές του DT<sub>50</sub> και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά για τα αποστειρωμένα και μη εδάφη.

#### ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΑ ΕΔΑΦΗ

		pH	Οργανικός C	Ολικό N	Ηλεκτρική αγωγιμότητα
DT50	Συντελεστής Συσχέτισης (r)	0,340	-0,050	-0,030	0,180
	Πιθανότητες (P)	0,334	0,900	0,932	0,620

#### ΜΗ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΑ ΕΔΑΦΗ

		pH	Οργανικός C	Ολικό N	Ηλεκτρική αγωγιμότητα
DT50	Συντελεστής Συσχέτισης (r)	0,660	0,370	0,410	0,340
	Πιθανότητες (P)	<b>0,039*</b>	0,297	0,240	0,339

## 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ -ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

### 4.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η αποδόμηση του ανθελμινθικού Ivermectin σε εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες στη Λέσβο, με κάποιες εξ αυτών να έχουν ιστορικό χρήσης Ivermectin. Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής αξιολογήθηκαν δύο κύριες υποθέσεις (α) ότι η μικροβιακή αποδόμηση αποτελεί σημαντική διεργασία αποδόμησης του Ivermectin στα εδάφη και (β) πρότερη έκθεση των εδαφών στο Ivermectin αναμένεται να επιταχύνει την αποδόμηση του μέσω πιθανής επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης.

Το Ivermectin εμφάνισε μέτρια υπολειμματικότητα στα εδάφη που μελετήθηκαν με τιμές  $DT_{50} = 26-80$  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 σημαντική επιβράδυνση της αποδόμησης του στα εδάφη που αποστειρώθηκαν. Η μη πλήρης και καθολική αναστολή της αποδόμησης του Ivermectin στα αποστειρωμένα εδάφη καταδεικνύει ότι πέραν των μικροοργανισμών του εδάφους που συμμετέχουν σε σημαντικό βαθμό στην αποδόμηση του Ivermectin, και οι αβιοτικές διεργασίες αποδόμησης συμμετέχουν σε σημαντικό βαθμό στην απομάκρυνση του Ivermectin από το έδαφος. Η συνεισφορά των δύο αυτών διεργασιών αποδόμησης εμφάνισε παραλλακτικότητα από έδαφος σε έδαφος με τα εδάφη 9A και 11 να αποτελούν παραδείγματα σημαντικότητας συνεισφοράς της βιοαποδόμησης στην διάσπαση του Ivermectin στο έδαφος.

Παρά τον σημαντικό ρόλο των μικροοργανισμών στην αποδόμηση του Ivermectin δεν κατέσται 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. Ύστερα από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά στην αποδόμηση ανάμεσα σε εδάφη από λειμώνες και εδάφη μέσα απο το μαντρί (όπου η επιβάρυνση είναι σημαντικά μεγαλύτερη) καθώς και σε εδάφη με ιστορικό έκθεσης και σε εδάφη χωρίς προηγούμενη έκθεση στο Ivermectin. Ωστόσο παρατηρήθηκε ανάμεσα στις τιμές DT50 του Ivermectin και του pH των μη αποστειρωμένων εδαφών που μελετήθηκαν, στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση ( $P>0,05$ ).

#### 4.2 ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συμπερασματικά από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι :

- Το Ivermectin εμφανίζει μέτρια ως υψηλή υπολειμματικότητα στα εδάφη που μελετήθηκαν και αποδομείται κυρίως μικροβιακά στο έδαφος αν και σε ορισμένα εδάφη οι αβιοτικές διεργασίες συνεισφέρουν επίσης σημαντικά στην αποδόμηση του Ivermectin
- Η υποτιθέμενη συστηματική έκθεση των εδαφών στο συγκεκριμένο ανθελμινθικό μέσω της απόθεσης κοπράνων ή ούρων των ζώων δεν φαίνεται να επιταχύνει την αποδόμηση του στο έδαφος μέσω επιλογής εξειδικευμένων αποδομητικών μικροοργανισμών. Παρόλα αυτά περισσότερες μελέτες θα χρειαστούν, σε μεγαλύτερο αριθμό εδαφών και με πιο λεπτομερές ιστορικό για τα εδάφη ώστε να καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα.
- Επιπροσθέτως δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην αποδόμηση του Ivermectin στους λειμώνες βόσκησης σε σχέση με το εσωτερικό των κτηνοτροφικών μονάδων που λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας σε οργανική ουσία ευνοούν την προσρόφηση και περιορίζουν την βιοδιαθεσιμότητα των ουσιών αυτών προς βιοαποδόμηση. Περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό εδαφών θα χρειαστούν και στην συγκεκριμένη περίπτωση για να μπορούν να υπάρξουν πιο ασφαλή συμπεράσματα.

- Εν κατακλείδι, περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν σε 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 του Ivermectin.

## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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. **ALBIEZ EJ, NEWLAND HS, WHITE AT, KAISER A, GREENE BM, ET AL**, 1988. CHEMOTHERAPY OF ONCHOCERCIASIS WITH HIGH DOSES OF DIETHYL-CARBAMAZINE OR A SINGLE DOSE OF IVERMECTIN: MICROFILARIA LEVELS AND SIDE EFFECTS. *TROPICAL MEDICINE AND PARASITOLOGY* 39: 19–24
3. **ALBIEZ EJ, WALTER G, KAISER A, RANQUE P, NEWLAND HS, ET AL**, 1988. HISTOLOGICAL EXAMINATION OF ONCHOCERCOMATA AFTER THERAPY WITH IVERMECTIN. *TROPICAL MEDICINE AND PARASITOLOGY* 39: 93–99
4. **ALEXANDER C.CAPLETONA, CAROL COURAGEA, PAUL RUMSBYA ,PHILIP HOLMESA, EDWARD STUTTA, ALISTAIR B.A., BOXALLB LEONARD S.LEVYA**, 2006. PRIORITISING VETERINARY MEDICINES ACCORDING TO THEIR POTENTIAL INDIRECT HUMAN EXPOSURE AND TOXICITY PROFILE. *TOXICOLOGY LETTERS*, VOLUME 163, ISSUE 3, 1 JUNE 2006, PAGES 213-223
5. **ALISTAIR B.A. BOXALL, DANA W. KOLPIN, BENT HALLING SORENSEN , JOHANNES TOLLS**, (2003). ARE VETERINARY MEDICINES CAUSING ENVIRONMENTAL RISKS?, *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 286-294
6. **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
7. **BURROWS, H.D., CANLE L., SANTABALLA M., STEENKEN J.A., S.**, 2002. REACTION PATHWAYS AND MECHANISMS OF PHOTODEGRADATION OF PESTICIDES. *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY*, 62:(2), 71-108
8. **CAMPBELL W.C.**, 1985. IVERMECTIN: AN UPDATE. *PARASITOLOGY TODAY*, 1: 10 - 16

9. **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
10. **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
11. **CHIOU R, STUBBS RJ, BAYNE WF**, 1987. DETERMINATION OF IVERMECTIN IN HUMAN PLASMA AND MILK BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY 416: 196–202
12. **CONDER GA, THOMPSON DP, JOHNSON SS**, 1993. DEMONSTRATION OF CO-RESISTANCE OF HAEMONCHUS CONTORTUS TO IVERMECTIN AND MOXIDECTIN.
13. **DI H.J., AYLMOORE 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
14. **EDWARD TOPP , RALPH CHAPMAN, MARION DEVERS LAMRANI, ALAIN HARTMANN, ROMAIN MARTI, FABRICE MARTIN-LAURENT, LYNE SABOURIN, ANDREW SCOTT, AND MARK SUMARAH**, 2012. ACCELERATED BIODEGRADATION OF VETERINARY ANTIBIOTICS IN AGRICULTURAL SOIL FOLLOWING LONG-TERM EXPOSURE, AND ISOLATION OF A SULFAMETHAZINE-DEGRADING MICROBACTERIUM SP, JOURNAL OF ENVIRONMENTAL QUALITY ABSTRACT - ORGANIC COMPOUNDS IN THE ENVIRONMENT, Vol. 42 No. 1, p. 173-178
15. **ETTE EL, THOMAS WOA, ACHUMBA JI**, 1990. IVERMECTIN: A LONG-ACTING MICROFILARICIDAL AGENT. DICP, ANNALS OF PHARMACOTHERAPY 24: 426–433
16. **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
17. **HUGO C. TURNER, MARTIN WALKER, THOMAS S. CHURCHER, MIKE Y. OSEI-ATWENEBOANA, NANA-KWADWO, BIRITWUM ADRIAN HOPKINS, ROGER K.**

- PRICHARD, MARÍA-GLORIA BASÁÑEZ**, 2014. REACHING THE LONDON DECLARATION ON NEGLECTED TROPICAL DISEASES GOALS FOR ONCHOCERCIASIS: AN ECONOMIC EVALUATION OF INCREASING THE FREQUENCY OF IVERMECTIN TREATMENT IN AFRICA, CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, VOLUME 59, ISSUE 7, 1 OCTOBER 2014, PAGES 923–932
18. **I. M. DAVIES G. K. RODGER J. REDSHAW R. M. STAGG**, 2001. TARGETED ENVIRONMENTAL MONITORING FOR THE EFFECTS OF MEDICINES USED TO TREAT SEA-LICE INFESTATION ON FARMED FISH. ICES JOURNAL OF MARINE SCIENCE, VOLUME 58, ISSUE 2, 2001, PAGES 477–485
19. **J.A. HAMMOND, D. FIELDING, S.C. BISHOP**, 1997. PROSPECTS FOR PLANT ANTHELMINTICS IN TROPICAL VETERINARY MEDICINE. VETERINARY RESEARCH COMMUNICATIONS, APRIL 1997, VOLUME 21, ISSUE 3, PP 213-228
20. **JOHN W. HAMAKER**, 1975. THE INTERPRETATION OF SOIL LEACHING EXPERIMENTS. ENVIRONMENTAL DYNAMICS OF PESTICIDES, 6:115-133
21. **KARPOUZAS DG, SINGH BK**, 2006. MICROBIAL DEGRADATION OF ORGANOPHOSPHORUS XENOBIOTICS: METABOLIC PATHWAYS AND MOLECULAR BASIS, ADV MICROB PHYSIOL. 2006;51:119-85
22. **KLAUS WEISS , WALTER SCHÜSSLER, MICHAEL PORZELT**, 2008. SULFAMETHAZINE AND FLUBENDAZOLE IN SEEPAGE WATER AFTER THE SPRINKLING OF MANURED AREAS. CHEMOSPHERE, 72 , 1292–1297
23. **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.
24. **KROGH, K.A., SOEBORG T., BRODIN B., HALLING-SORENSEN B.**, 2008. SORPTION AND MOBILITY OF IVERMECTIN IN DIFFERENT SOILS. JOURNAL OF ENVIRONMENTAL QUALITY, 37: 2202 - 2211
25. **KUO, J.** (1999). PRACTICAL DESIGN CALCULATIONS FOR GROUNDWATER AND SOIL REMEDIATION. LEWIS PUBLISHERS, USA
26. **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

27. **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**
28. **MANUEL ARIAS-ESTÉVEZ , EUGENIOLÓPEZ-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**
29. **MICHEL VERT, YOSHIHARU DOI, KARL-HEINZ HELLWICH, MICHAEL HESS, PHILIP HODGE, PRZEMYSŁAW KUBISA, MARGUERITE RINAUDO, FRANÇOIS SCHUÉ , (2012). TERMINOLOGY FOR BIORELATED POLYMERS AND APPLICATIONS (IUPAC RECOMMENDATIONS 2012). PURE AND APPLIED CHEMISTRY, 84:377–410**
30. **OPPEL, J., G. BROLL, D. LOFFLER, 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**
31. **PRASSE C., LOFFLER D., TERNES T., 2009. ENVIRONMENTAL FATE OF THE ANTHELMINTIC IVERMECTIN IN AN AEROBIC WATER/SEDIMENT SYSTEM. CHEMOSPHERE, 77: 1321 – 1325**
32. **READ D.C., 1986. GREATLY ACCELERATED MICROBIAL DEGRADATION OF ALDICARB IN RETREATED FIELD SOIL, IN FLOODED SOIL AND IN WATER. JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY 80: 156-163**
33. **READ, D., 1986. ACCELERATED MICROBIAL BREAKDOWN OF CARBOFURAN IN SOIL FROM PREVIOUSLY TREATED FIELDS. AGRICULTURE ECOSYSTEMS AND ENVIRONMENT 15:, 51-61**



34. 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
35. SARFRAZHUSSAIN, TARIQ SIDDIQUE, MUHAMMAD SALEEM, MUHAMMAD ARSHAD, AZEEM KHALID, 2009. CHAPTER 5 IMPACT OF PESTICIDES ON SOIL MICROBIAL DIVERSITY, ENZYMES, AND BIOCHEMICAL REACTIONS, ADVANCES IN AGRONOMY, VOLUME 102, 2009, PAGES 159-200
36. SIMS, G. K. AND A.M. CUPPLES, 1999. FACTORS CONTROLLING DEGRADATION OF PESTICIDES IN SOIL. 55:598-601
37. 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
38. ΓΕΩΡΓΙΟΣ-ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Ε. ΚΥΔΩΝΑΚΗΣ, ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, 2010.
39. ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Δ. ΤΣΟΧΑΤΖΗΣ, 2012, ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ.
40. ΖΙΩΓΑΣ Β. ΚΑΙ ΜΑΡΚΟΓΛΟΥ Γ.Α, 2007. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ, ΑΘΗΝΑ
41. ΙΩΑΝΝΙΔΗΣ ΠΑΥΛΟΣ, 2011. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΧΟΡΗΓΟΥΜΕΝΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΕΚΤΡΟΦΕΣ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΕΙΔΩΝ ΨΑΡΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ/ΕΛΛΑΔΑ
42. ΛΙΤΣΚΑΣ Δ. ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ, ΓΕΩΠΟΝΟΣ Μ.ΣC., 2013, ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΤΟΜΕΑΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ, ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
43. ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, 2005. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΜΕΑ ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΟΤΡΟΦΙΑΣ
44. ΧΡΥΣΑΝΘΟΥ ΧΡΗΣΤΟΣ, 2018, ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΩΝ EPRINOMECTIN, IVERMECTIN ΚΑΙ ALBENDAZOLE ΣΕ ΕΔΑΦΗ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΥΠΡΟ ΜΕ ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΑΝΘΕΛΜΙΝΘΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ, ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, Π.Θ.

