

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ



ΤΣΕΤΣΕΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

**Μελέτη της τοξικότητας ανθελμινθικών φαρμάκων στην
μικροβιακή κοινότητα του εδάφους**

**Study of the toxicity of anthelmintic drugs in the soil
microbial community**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας

Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Βασιλειάδης Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας - Γονιδιωματικής

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 ΚΥΚΛΟΣ ΑΖΩΤΟΥ	9
1.2 Νιτροποίηση.....	11
1.2.1 Μηχανισμός της νιτροποίησης	11
1.2.2 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην νιτροποίηση	12
1.2.2.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB).....	12
1.2.2.2 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)	14
1.2.2.3 Νιτριοποιητικά Βακτήρια (NOB).....	16
1.2.2.4 Αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας (anammox)	16
1.2.2.5 Comammox Βακτήρια	17
1.2.3 Οικονομική και περιβαλλοντική σημασία της νιτροποίησης.....	17
1.3 Ανθελμινθικά φάρμακα -Σημασία και αναγκαιότητα	17
1.3.1 Κατηγορίες ανθελμινθικών φαρμάκων	18
1.3.2 Γενικά χαρακτηριστικά βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών φαρμάκων	18
1.3.2.1 Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά ανθελμινθικών βενζιμιδαζολικών φαρμάκων.....	19
1.3.3 Albendazole.....	21
1.3.3.1 Περιβαλλοντική τύχη του Albendazole.....	22
1.4 Σκοπος.....	23
2.Υλικά και Μέθοδοι	24
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	24
2.1.1 Διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια και γεωργικά φάρμακα.....	25
2.2 Μελέτη της επίδρασης του Albendazole στη λειτουργία των Νιτροποιητικών μικροοργανισμών	25
2.2.1 Μέθοδος εκχύλισης για τον προσδιορισμό των επιπέδων NH_4^+ και NO_3^- στο έδαφος	25
2.2.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των NH_4^+ στο έδαφος	25
Αντιδραστήρια	25
2.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των NO_3^- στο έδαφος	26
Αντιδραστήρια	26
2.2.4 Προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης.....	26
Αντιδραστήρια	27

2.3	Εξαγωγή DNA από το έδαφος.....	28
2.4	Μελέτη της επίδρασης του Albendazole στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών	28
2.4.1	Μελέτη της επίδρασης των ουσιών στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOB.....	28
2.4.2	Μελέτη της επίδρασης των ουσιών στην αφθονία του γονιδίου <i>amoA</i> των AOA.....	29
2.5	Μελέτη της επίδρασης του Albendazole στην αφθονία της ευρύτερης βακτηριακής κοινότητας του εδάφους	31
2.5.1	Μελέτη της επίδρασης του Albendazole στην αφθονία του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων.....	31
2.6	Ποσοτικοποίηση αντιγράφων των εξεταζόμενων γονιδίων.....	32
2.7	Στατιστική ανάλυση	32
3.	Αποτελέσματα	33
3.1	Επίδραση του Albendazole στη λειτουργία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών.....	33
3.1.1	Επίδραση του Albendazole στην συγκέντρωση των NH_4^+ στο έδαφος	33
3.1.2	Επίδραση του Albendazole στη συγκέντρωση των NO_3^- στο έδαφος.....	34
3.1.3	Επίδραση του Albendazole στο ρυθμό της δυνητικής νιτροποίησης	35
3.2	Επίδραση του Albendazole στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών 37	
3.2.1	Επίδραση του Albendazole στην αφθονία των AOB	37
3.2.2	Επίδραση του Albendazole στην αφθονία των AOA	37
3.3	Επίδραση του Albendazole στην αφθονία της ευρύτερης βακτηριακής κοινότητας του εδάφους	38
4	Συζήτηση-Συμπεράσματα	39
4.1	Συζήτηση.....	39
4.2	Συμπεράσματα.....	39
5	Βιβλιογραφία	40

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, που έλαβε μέρος στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα για την καθοδήγηση, επίβλεψη και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωσή της.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Λαγό Ευστάθιο για την αμέριστη βοήθεια, στήριξη και παροχή γνώσεων σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας.

Επιπρόσθετα, ευχαριστώ το προσωπικό του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος για την άψογη συμπεριφορά τους και την προσφορά κάθε είδους βοήθειας όταν χρειάστηκε.

Τέλος, ευχαριστώ την Καθηγήτρια της Βιοτεχνολογίας Φυτών, κ. Καλλιόπη Παπαδοπούλου και τον Επίκουρο Καθηγητή Σωτήριο Βασιλειάδη για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας μέσω της συμμετοχής τους στην τριμελή επιτροπή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ελμινθιάσεις, δηλαδή οι ασθένειες που προκαλούνται από έλμινθες του γαστρεντερικού σωλήνα, αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για την υγεία και την παραγωγικότητα των ζώων παραγωγής. Οι παθολογικές αυτές καταστάσεις καταπολεμούνται τα τελευταία 60 χρόνια κατά κύριο λόγο με τη χορήγηση, στα ζώα, ανθελμινθικών φαρμάκων. Ωστόσο, τα ανθελμινθικά φάρμακα δεν μεταβολίζονται σε σημαντικό βαθμό από το γαστρεντερικό σύστημα των ζώων, με αποτέλεσμα να ανιχνεύονται σε σημαντικά επίπεδα στα κόπρανα και τα ούρα. Κατά συνέπεια τα ανθελμινθικά φάρμακα αναμένεται να απελευθερώνονται, μέσω των απεκκρίσεων των ζώων, αλλά και με την εφαρμογή ρυπασμένων κοπρσωρών, στο έδαφος και από εκεί πιθανών σε άλλα περιβαλλοντικά διαμερίσματα, όπως τα υπόγεια ύδατα και υδάτινα οικοσυστήματα. Μέχρι σήμερα ελάχιστα είναι γνωστά για την επίδραση των ουσιών αυτών στους οργανισμούς αυτών των οικοσυστημάτων και ιδιαίτερα στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Το albendazole είναι ένα ανθελμινθικό φάρμακο που ανήκει στην χημική ομάδα των βενζιμιδαζολών και χρησιμοποιείται ευρέως στην καταπολέμηση των ελμινθιάσεων. Τα κύρια χαρακτηρισμένα μεταβολικά προϊόντα του albendazole είναι το albendazole-sulfoxide (που διαθέτει επίσης ανθελμινθική δράση) και το albendazole-sulfone. Υπολείμματα τόσο του albendazole όσο και των μεταβολιτών του, έχουν εντοπιστεί τόσο σε κοπρσωρούς όσο και στο έδαφος. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η πιθανή τοξικότητα του albendazole στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους εξετάζοντας μεταβολές (i) στην λειτουργία (ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης, συγκέντρωση ανόργανων μορφών αζώτου) και (ii) στην αφθονία λειτουργικών μικροβιακών ομάδων του εδάφους καθώς και (iii) στην αφθονία του συνόλου της βακτηριακής κοινότητας. Οι λειτουργικές ομάδες μικροοργανισμών του εδάφους που μελετήθηκαν είναι τα νιτροδοποιητικά βακτήρια (Ammonia Oxidizing Bacteria, AOB) και αρχαία (Ammonia Oxidizing Archaea, AOA) που διεκπεραιώνουν το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης που αποτελεί τη ρυθμο-καθοριστική διεργασία του κύκλου του αζώτου. Για το σκοπό αυτό, σε δύο επιλεγμένα εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες της νήσου Λέσβου, πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλαμβανόμενες εφαρμογές του albendazole σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης, (i) της αναμενόμενης περιβαλλοντικής συγκέντρωσης σε ρυπασμένα εδάφη ($\times 1$) καθώς και (ii) σε συγκέντρωση δεκαπλάσια αυτής, που αντιπροσωπεύει περίπτωση υψηλής ρύπανσης ($\times 10$). Σε κάθε περίπτωση υπήρχαν δείγματα εδάφους όπου δεν πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του φαρμάκου (δείγματα μάρτυρες). Με βάση τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε πως η παρουσία του albendazole στα δύο εδάφη επηρέασε τόσο τη λειτουργία όσο και την αφθονία των AOB και των AOA και στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων ($\times 1$ και $\times 10$), σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες. Αντίθετα, η αφθονία συνολικά των βακτηρίων του εδάφους δεν φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά σε κανένα από τα δύο εδάφη σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων του φαρμάκου. Επομένως η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη ένδειξη για πιθανές τοξικές επιδράσεις του albendazole στους νιτροδοποιητές μικροοργανισμούς του εδάφους. Επόμενα βήματα θα εστιάσουν στη μελέτη των μεταβολών στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των μελετώμενων εδαφών παρουσία του albendazole (μέσω αλληλούχισης επόμενης γενιάς, NGS), καθώς και περαιτέρω μελέτες της πιθανής τοξικής επίδρασης του albendazole σε νιτροδοποιητές μικροοργανισμούς σε συνθήκες *In vitro*.

Λέξεις κλειδιά: ανθελμινθικά, albendazole, νιτροποίηση, νιτροδοποιητικοί μικροοργανισμοί.

ABSTRACT

Helminthiasis, the disease imposed by helminths of the gastrointestinal tract, constitutes a significant problem in the health and productivity of livestock farming. These parasites controlled through the last 60 years mainly by administration of anthelmintic drugs to the animals. However anthelmintic drugs are not transform to a large extent by the gastrointestinal system of the animals, resulting in their detection at significant levels in feces and urine. Consequently, they could reach the soil directly through the deposited urine and feces of grazing animals, and also through the application of anthelmintic contaminated feces as manure in agricultural soils. Once in soil anthelmintics could be transferred to other environmental compartments like ground water and surface water systems. To date, little is known about the effect of these substances onto the biota of these natural ecosystems and especially on their effects on microorganisms in soil which constitutes their main environmental depot. Albendazole is an anthelmintic drug belonging to the benzimidazole chemical group and is widely used to control helminthiasis. The main characterized metabolites of albendazole are: albendazole-sulfoxide (that also features anthelmintic effect) and albendazole-sulfone. In the current thesis, the potential undesirable effects of albendazole on soil microorganisms was studied. In particular we focused our research on effects of albendazole on (i) specific microbial functioning (through measurements of potential nitrification and inorganic N pools) (ii) the abundance of associated functional microbial groups and (iii) on the abundance of the total bacteria. The soil functional microbial groups that were studied were the Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB) and the Ammonia Oxidizing Archaea (AOA) that process the first stage of nitrification, which is the rate-limiting step in the nitrogen cycle. For this reason, three repeated applications of albendazole were carried out in two selected soils from livestock farms of Lesvos Island. Albendazole was applied at two concentration levels: (i) an concentration of albendazole expected to occur in soil (x1) and (ii) 10-times this concentration (x10), that represents a heavy contaminations scenario. The experimental setup included also samples per soil where no albendazole application was done to serve as control samples. We noted that the presence of albendazole in the two soils affected not only the function but also the abundance of AOB and AOA at both levels of concentration (x1 and x10). On the contrary, we observed no effects on the abundance of the total bacterial community. The current study constitutes the first indication of possible adverse effects of albendazole on soil ammonia-oxidizing microorganisms. Future steps will focus on the effects of anthelmintic compounds on the composition of the soil microbial community using next generation sequencing approaches, and further study the toxicity mechanism of albendazole on ammonia-oxidizing microorganisms using in vitro aproaches.

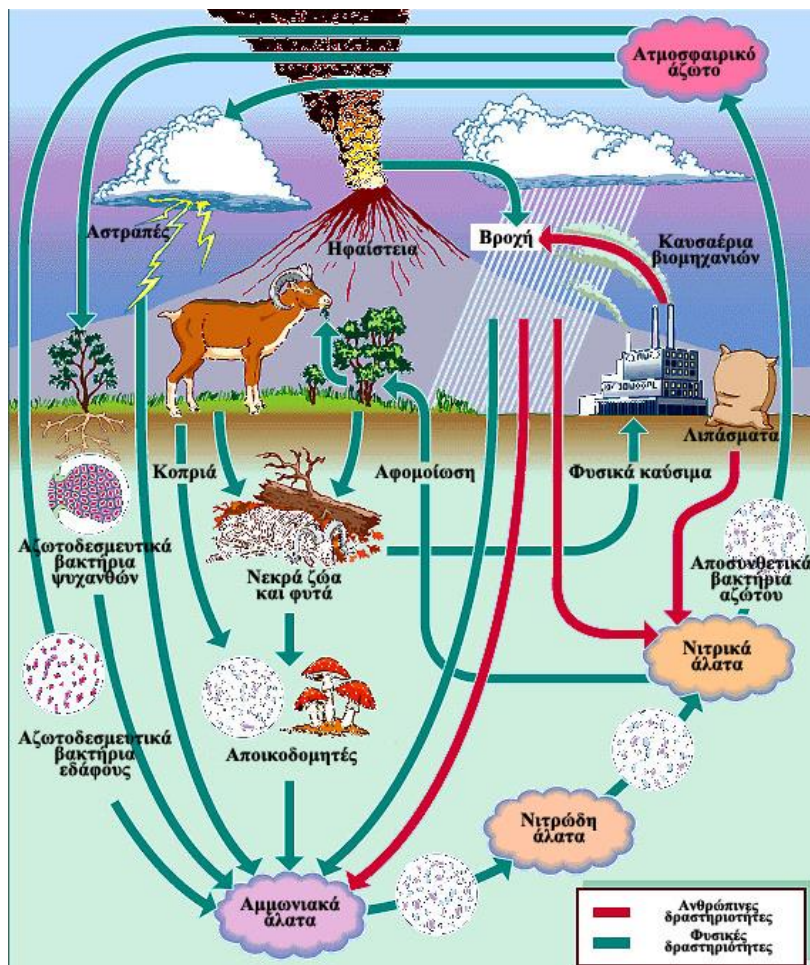
Key words: anthelmintics, albendazole, nitrification, ammonia-oxidizers

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΚΥΚΛΟΣ ΑΖΩΤΟΥ

Το άζωτο είναι ένα βασικό στοιχείο για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και απαιτείται για τη βιοσύνθεση σημαντικών κυτταρικών συστατικών, όπως οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Το ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) είναι το μεγαλύτερο απόθεμα ελεύθερα προσβάσιμου αζώτου (Kuypers et al. 2018). Παρά την αφθονία στην οποία συναντάται το N_2 , η αφομοίωση του από την πλειοψηφία των οργανισμών σε αυτή τη μορφή δεν είναι εφικτή. Έτσι απαιτείται η μετατροπή του σε άλλες αζωτούχες ενώσεις όπως η αμμωνία (NH_3), τα νιτρώδη ιόντα (NO_2^-) και τα νιτρικά ιόντα (NO_3^-) (Bernhard 2010). Ο κύκλος του αζώτου και οι μετατροπές που υφίσταται στο περιβάλλον οφείλονται σε βιοτικές διεργασίες (Εικόνα 1). Οι βιοτικές αυτές διεργασίες περιλαμβάνουν :

- Αζωτοδεύσμευση
- Αμμωνιοποίηση/Ανοργανοποίηση
- Νιτροποίηση
- Απονιτροποίηση



Εικόνα 1. Ο κύκλος το αζώτου.

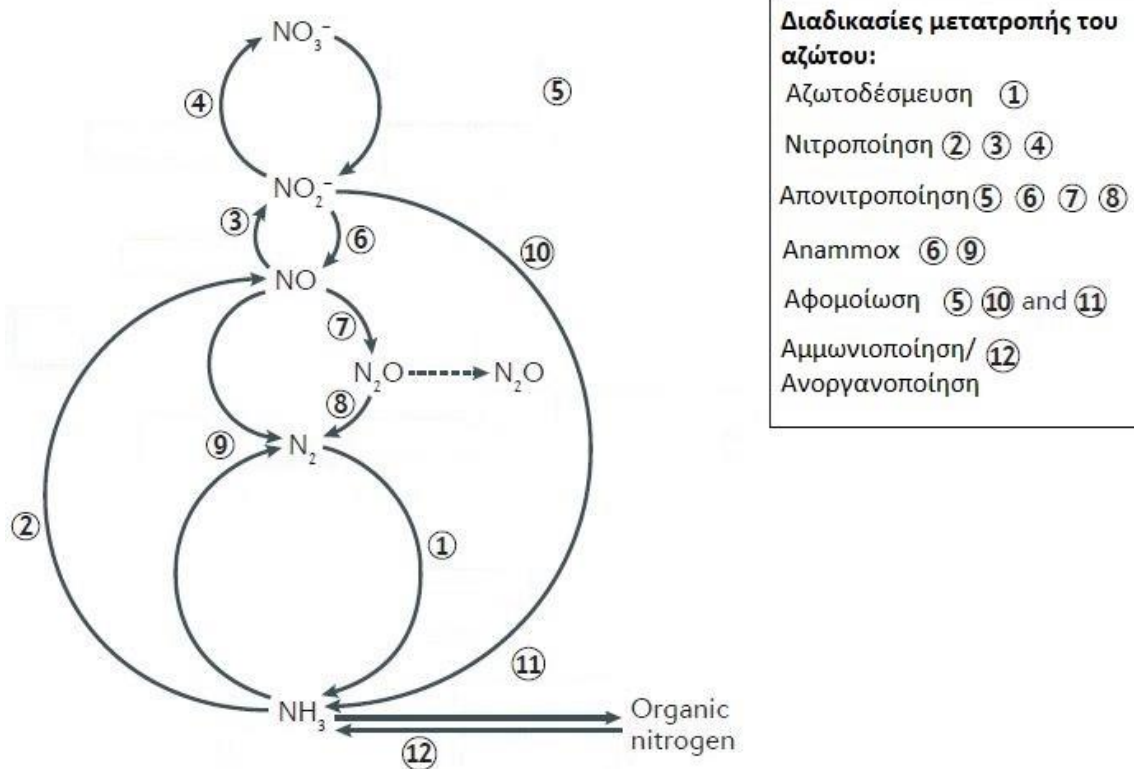
Οι μικροοργανισμοί μπορούν μετατρέψουν τις ενώσεις αζώτου τόσο σε πιο δραστικές και τοξικές μορφές (πχ NO), όσο και σε αδρανείς και αβλαβείς (πχ N₂). Οι μικροβιακοί μετασχηματισμοί του αζώτου απεικονίζονται συχνά ως ένας κύκλος από μία ακολουθία διαφορετικών διαδικασιών. Ο κύκλος του αζώτου συνεπάγεται την αζωτοδέσμευση του αερίου N₂ σε αμμωνία, η οποία αφομοιώνεται σε οργανικό άζωτο. Η αποδόμηση του οργανικού αζώτου απελευθερώνει ένα μόριο αμμωνίας, το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται σε νιτρικά μέσω της νιτροποίησης και μετατρέπεται τελικά ξανά σε αέριο N₂ μέσω της απονιτροποίησης ή μέσω της αναερόβιας οξειδωσης αμμωνίου (Kuypers et al. 2018). (Εικόνα 2)

Η *αζωτοδέσμευση* είναι μία ενεργειακά κοστοβόρα διαδικασία αναγωγής του ατμοσφαιρικού N₂ σε NH₄⁺ και NO₃⁻ και διακρίνεται σε δύο τύπους, την φυσική και την βιολογική. Ο φυσικός τύπος αζωτοδέσμευσης συνεισφέρει μόλις στο 10% της αμμωνίας και των νιτρικών ιόντων που μεταφέρονται στα οικοσυστήματα και η ενέργεια για την ρήξη του τριπλού δεσμού του N₂, παρέχεται από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις (κεραυνούς). Η βιολογική αζωτοδέσμευση συνεισφέρει στο 90% των αζωτούχων ενώσεων και αποτελεί μια εξειδικευμένη διαδικασία που πραγματοποιείται από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι δεσμεύουν το N₂ και το μετατρέπουν σε NH₄⁺ (Bernhard 2010, Kuypers et al., 2018). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να διαβιούν είτε στο έδαφος ή ως φυτικοί συμβιώτες. Η ενέργεια που απαιτείται για την βιολογική αζωτοδέσμευση παρέχεται στους πρώτους από την αναπνοή με την διάσπαση της γλυκόζης και στους δεύτερους από τους υδατάνθρακες που παρέχονται από το φυτό με το οποίο συμβιώνουν (Bernhard 2010). Η ικανότητα των παραπάνω μικροοργανισμών να δεσμεύουν το N₂ οφείλεται στο ενζυμικό σύμπλοκο της νιτρογενάσης (Dixon & Kahn 2004).

Το άζωτο είναι ένα από τα στοιχεία που συναντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στην οργανική ύλη είτε στα περιττώματα των ζώων, είτε σε νεκρούς ιστούς (Rilling et al., 2007). Η *αμμωνιοποίηση* ή *ανοργανοποίηση* είναι η διαδικασία μετατροπής N₂-ομάδων οργανικών ενώσεων σε NH₃ ή NH₄⁺ από οργανισμούς του εδάφους που παράγουν υδρολυτικά ένζυμα όπως ουρεάσες και αμινοπεπτιδάσες (Romillac 2018). Η αμμωνιοποίηση εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, η υγρασία του εδάφους και η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας.

Η *νιτροποίηση* είναι η διαδικασία κατά την οποία η NH₃ μετατρέπεται σε NO₂⁻ και NO₃⁻ και αποτελεί ένα σημαντικό μέρος του κύκλου του αζώτου. Το μεγαλύτερο μέρος της νιτροποίησης πραγματοποιείται αερόβια και αποκλειστικά από προκαρυώτες. Υπάρχουν δύο διακριτά βήματα νιτροποίησης που πραγματοποιούνται από διαφορετικούς τύπους μικροοργανισμών. Το πρώτο βήμα είναι η οξείδωση της NH₃ σε NO₂⁻, μέσω ενός ενδιάμεσου προϊόντος της υδροξυλαμίνης. Το δεύτερο βήμα είναι η οξείδωση των NO₂⁻ σε NO₃⁻. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία του εδάφους και κυρίως το pH και η διαθεσιμότητα των NH₄⁺ επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την διαδικασία της νιτροποίησης (Bernhard 2010).

Η παραγωγή του αερίου N₂ από την μικροβιακή αναγωγή των οξειδίων του αζώτου, που παρήχθησαν κατά την νιτροποίηση, ονομάζεται βιολογική *απονιτροποίηση*. Είναι μια διαδικασία 4 διαδοχικών βημάτων που καταλύονται από διαφορετικές μεταλλοπρωτεΐνες, κατά σειρά αντιδράσεων, γνωστές ως: (i) νιτρική αναγωγή, (ii) νιτρώδη αναγωγή, (iii) αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου, (iv) αναγωγή του υποξειδίου του αζώτου (Norman 1965, Verbaendert et al 2011).



Εικόνα 2. Μικροβιακές μετατροπές αζώτου.

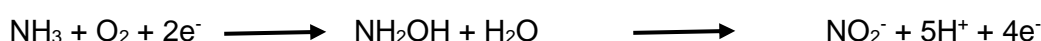
1.2 Νιτροποίηση

1.2.1 Μηχανισμός της νιτροποίησης

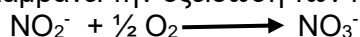
Η *νιτροποίηση* είναι η διαδικασία μετατροπής της NH_3 σε NO_3^- , με αποτέλεσμα την αυξημένη διαθεσιμότητα αζώτου για τα φυτά και την διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους. Αποτελεί το σημαντικότερο βήμα του κύκλου του αζώτου και έχει μεγάλη οικονομική σημασία στην γεωργία και την επεξεργασία λυμάτων (Schleper & Nicol 2010, Kowalchuk & Stephen 2001).

Η νιτροποίηση πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια (Bernhard 2010):

1. Τη νιτροποίηση, που περιλαμβάνει την οξείδωση της NH_3 προς NO_2^- και καθορίζει το ρυθμό της νιτροποίησης:



2. Τη νιτροποίηση, που περιλαμβάνει την οξείδωση των NO_2^- προς NO_3^- :



Η νιτρωδοποίηση πραγματοποιείται σε δύο βήματα. Στο πρώτο βήμα, το ένζυμο μονοοξυγενάση της αμμωνίας (AMO) καταλύει την οξειδωση της NH_3 σε υδροξυλαμίνη (NH_2OH). Η AMO είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, με τρεις πολυπεπτιδικές υπομονάδες (amoA,-B και -C) και παρουσιάζει ομοιότητες μεταξύ των Νιτρωδοποιητικών Βακτηρίων (Ammonia Oxidizing Bacteria, AOB) και Νιτρωδοποιητικών Αρχαίων (Ammonia Oxidizing Archaea, AOA) (Soler-Jofra et al. 2020, Prosser et al. 2019). Στο δεύτερο βήμα, η NH_2OH μετατρέπεται σε NO_2^- από τη δράση του ενζύμου της οξειδοαναγωγής της υδροξυλαμίνης (HAO). Μέχρι πρότινος θεωρούνταν πως η HAO συμμετέχει άμεσα στην οξειδωση της NH_2OH σε NO_2^- , αλλά σύμφωνα με τους Caranto και Lancaster, το προϊόν που παράγεται από την οξειδωση της NH_2OH είναι τελικά το NO (Caranto & Lancaster 2017).

Η νιτρίκοποίηση πραγματοποιείται από μια ξεχωριστή ομάδα προκαρυωτών, γνωστά ως Νιτρίκοποιητικά Βακτήρια (Nitrite Oxidizing Bacteria, NOB). Περιλαμβάνει τη μετατροπή των NO_2^- σε NO_3^- , με την δράση του ενζύμου της νιτρώδους οξειδοαναγωγής (NRX). Το ένζυμο αυτό αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που φέρει τρεις υπομονάδες NxrA, NxrB και NxrC (Daims et al. 2016, Beeckman 2018).

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, μέχρι πρόσφατα η νιτροποίηση θεωρούνταν μια αρθρωτή διαδικασία που πραγματοποιείται σε δύο βήματα, από διακεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες υπέδειξαν την ύπαρξη βακτηρίων του γένους *Nitrospira* που διαθέτουν όλες τις αναγκαίες γενετικές πληροφορίες για την εκτέλεση και των δύο βημάτων της νιτροποίησης καταρρίπτοντας έτσι την θεωρίας της «αρθρωτής νιτροποίησης». Τα βακτήρια αυτά ονομάστηκαν *Comammox* (complete ammonia oxidation bacteria) και εντοπίζονται σε φυσικά και τεχνητά οικοσυστήματα (Daims et al 2015).

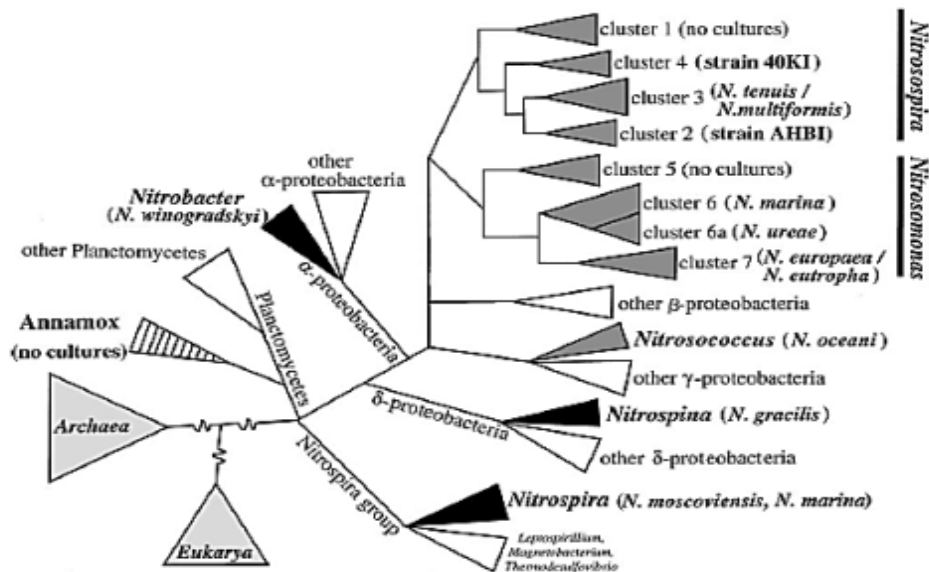
1.2.2 Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην νιτροποίηση

1.2.2.1 Νιτρωδοποιητικά Βακτήρια (AOB)

Όλα τα υποχρεωτικά χημειολιθότροφα νιτροποιητικά βακτήρια έχουν ομαδοποιηθεί στην gram-αρνητική οικογένεια *Nitrobacteraceae* (Watson et al 1989). Τα βακτήρια αυτά ανήκουν στις κλάσεις των β- και γ-πρωτεοβακτηρίων και κατατάσσονται σε τρία γένη, με φυλογενετική ανάλυση που βασίζεται στο 16S rRNA. Τα γένη αυτά ονομάστηκαν *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus* (Hermansson & Lindgren 2001, Schmid et al. 2000, Teske et al. 1994). (Εικόνα 3)

Μερικά από τα χαρακτηριστικά που διαφοροποιούν τα βακτήρια αυτά από τους υπόλοιπες ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην νιτροποίηση, είναι η δομή των μεμβρανών τους, το μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ύπαρξη λιπιδίων συνδεδεμένων με εστερικό δεσμό, που είναι ευάλωτος στην υδρόλυση και η ύπαρξη λιπαρών οξέων ως πλευρικές αλυσίδες στην μεμβράνη τους. Η δομή των μεμβρανών σε κάθε μικροοργανισμό είναι αυτή που καθορίζει την διαπερατότητα του κυττάρου και κατά συνέπεια την ευαισθησία στις ξενοβιοτικές ουσίες (Shen et al. 2013).

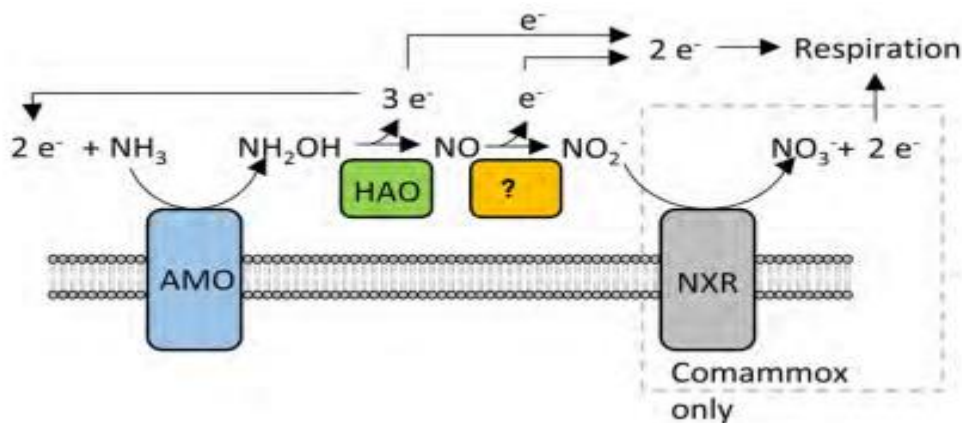
Τα AOB διαθέτουν το κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο για την οξειδωση της αμμωνίας. Μέσω αυτής της οξειδωσης τα AOB προσλαμβάνουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωσή τους. Η παραγόμενη αυτή ενέργεια συμβάλει και στην καθήλωση του CO_2 , που χρησιμοποιείται ως κύρια πηγή άνθρακα, μέσω του κύκλου του Calvin (Kowalchuk & Stephen 2001).



Εικόνα 3. Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε 16S rRNA αλληλουχίες των βακτηρίων που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου. Τα αερόβια νιτρωδοποιητικά βακτήρια παρουσιάζονται με σκούρο γκρι, τα νιτρικοποιητικά βακτήρια με μαύρο και τα αναερόβια βακτήρια με γραμμές (Kowalchuck and Stephen 2001).

Τα AOB συναντώνται σε πολλά χερσαία (αγροτικές περιοχές, λιβάδια και δάση) και υδάτινα οικοσυστήματα. Η αφθονία τους στο έδαφος είναι της τάξης 10^4 - 10^6 κύτταρα AOB ανά γραμμάριο εδάφους. Η αφθονία καθώς και η δραστηριότητα των AOB μπορεί να επηρεαστεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η περιεκτικότητα του εδάφους σε βαρέα μέταλλα, η παρουσία ή όχι φυτών, η συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών και το pH του εδάφους (Gubry-Rangin et al. 2010). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν πως αύξηση του pH του εδάφους οδηγεί σε αύξηση των μεταγράφων του *amoA* γονιδίου των AOB (Nicol et al. 2008). Ένας επιπλέον παράγοντας που φαίνεται πως επιδρά στην παραγωγή των NO_2^- στα AOB είναι η θερμοκρασία. Η παραγωγή των νιτρωδών ιόντων είναι σχετικά υψηλή σε θερμοκρασία 25-30°C, ενώ η συγκέντρωση παραγόμενων νιτρωδών μειώνεται σε θερμοκρασία 10 °C (Tourna et al. 2008).

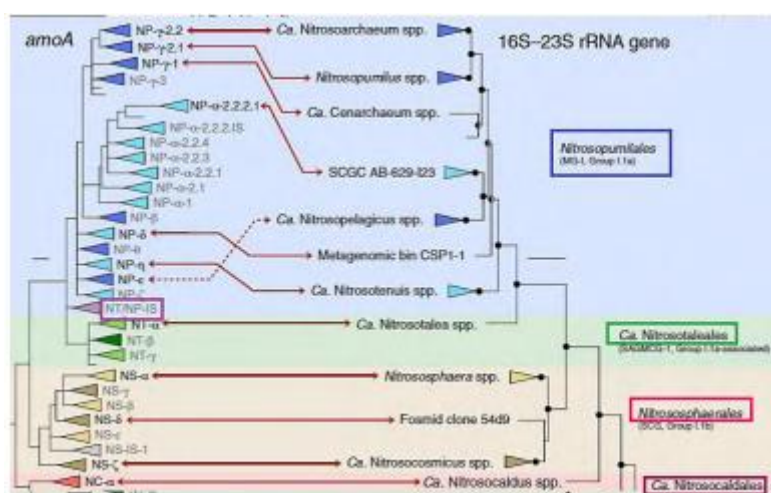
Στο μηχανισμό της οξειδωσης της αμμωνίας από τα AOB (Εικόνα 4), ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα που συμμετέχουν είναι το AMO, καθώς και το μοναδικό ένζυμο της οδού οξειδωσης της αμμωνίας που μοιράζονται και οι τρεις κύριες ομάδες οξειδωτικών μικροοργανισμών της αμμωνίας. Το AMO καταλύει την μετατροπή των NH_4^+ σε NH_2OH και νερό και προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτή η αντίδραση απαιτούνται δύο ηλεκτρόνια. Το δεύτερο ένζυμο που απαιτείται για την οξειδωση της αμμωνίας είναι η περιπλάσματική οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης, που καταλύει την μετατροπή της NH_2OH σε NO με την ταυτόχρονη απελευθέρωση τριών ηλεκτρονίων, δύο εκ των οποίων θα χρησιμοποιηθούν από την AMO. Ο μηχανισμός μετατροπής τους NO σε NO_2^- δεν είναι πλήρως γνωστός (Lehtovirta-Morley 2018, Caranto & Lancaster 2017, Prosser et al. 2019).



Εικόνα 4. Ο μηχανισμός οξείδωσης της αμμωνίας και η ηλεκτρονική ροή στα νιτρωδοποιητικά βακτήρια (Lehtovirta-Morley 2018).

1.2.2.2 Νιτρωδοποιητικά Αρχαία (AOA)

Μια ακόμα ομάδα μικροοργανισμών που διαθέτουν τις γενετικές πληροφορίες για την οξείδωση της αμμωνίας είναι τα νιτρωδοποιητικά αρχαία (AOA). Τα AOA ανήκουν στην συνωμοταξία των Thaumarchaeota που διαχωρίζονται από τις συνωμοταξίες των Crenarchaeota και Euryarchaeota. Μετά από φυλογενετικές αναλύσεις, βασισμένες στο γονίδιο *amoA* και στα γονίδια 16S και 23S rRNA, τα AOA κατατάχθηκαν στην κλάση *Nitrososphaeria*. Τα γένη στα οποία κατατάσσονται τα AOA είναι τα: : *Candidatus Nitrosocaldales*, *Nitrososphaerales*, *Ca. Nitrosotaleales*, *Nitrosopumilales* (Εικόνα 5). Υπάρχει μια επιπλέον ομάδα AOA, η NT/NP-*incertae sedis*, η οποία στα φυλογενετικά δέντρα τοποθετείται κοντά στη ρίζα του γένους *Nitrosopumilales* καθώς ήταν αδύνατη η ταξινόμηση της μαζί με το γένος *Nitrosopumilales* ή με το γένος *Ca. Nitrosotaleales* (Alves et al. 2018).



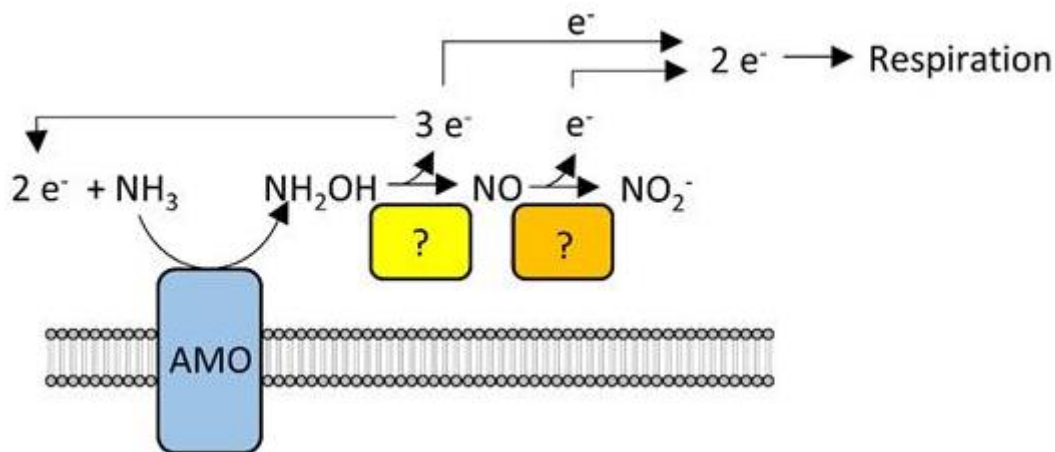
Εικόνα 5. Φυλογενετική ανάλυση AOA μετά από συνδυασμό δεδομένων που προέκυψαν απόφυλογενετικές αναλύσεις βασισμένες στο γονίδιο *amoA* και στα γονίδια 16S και 20S rRNA (Alves et al., 2018).

Το πιο διακριτό χαρακτηριστικό των AOA σε σχέση με τα AOB είναι η λιπιδιακή μεμβράνη. Τα φωσφολιπίδια των AOA φέρουν ισοπρενοειδής πλευρικές αλυσίδες, ανθεκτικές σε οξειδωτικά μέσα, και όχι πλευρικές αλυσίδες λιπαρών οξέων όπως στα AOB, και συνδέονται στον κορμό της γλυκερόλης με αιθερικό δεσμό. Ο αιθερικός δεσμός είναι πιο ανθεκτικός στην υδρόλυση από ότι ο εστερικός δεσμός που συναντάται στα AOB. Η μεμβράνη καθορίζει, όπως και στα AOB τη διαπερατότητα των κυττάρων σε ξενοβιοτικές ουσίες (*Schleper & Nicol 2010, Shen et al. 2013, Pitcher et al. 2010*).

Τα AOA φέρουν γονίδια για την παραγωγή της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (AMO), προκειμένου να οξειδώσουν την αμμωνία και να προσλάβουν την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωσή τους (Εικόνα 6). Ο μεταβολισμός των AOA από πολλές απόψεις είναι παρόμοιος με αυτόν των AOB. Παρόλα αυτά τα AOA χρησιμοποιούν το μονοπάτι του 3-υδροξυπυροπιανικού εστέρα ή τον κύκλο του Krebs για την καθήλωση του άνθρακα και όχι τον κύκλο του Calvin όπως τα AOB (*Walker et al. 2010, Ward et al. 2007*).

Τα AOA, όπως και τα AOB συναντώνται σε πολλά χερσαία οικοσυστήματα όπως αγροτικές περιοχές, λιβάδια, δάση, αλπικά εδάφη, αλλά και σε πολλά θαλάσσια οικοσυστήματα, αποδεικνύοντας πως είναι απαραίτητα για τον κύκλο του αζώτου στους ωκεανούς. Στο έδαφος βρέθηκε να περιέχονται περισσότερα από 10^7 κύτταρα AOA ανά γραμμάριο εδάφους. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αφθονία και τη λειτουργία των AOB στα διάφορα περιβάλλοντα επηρεάζουν στον ίδιο βαθμό και τα AOA (*Gubry-Rangin et al. 2010*). Τα AOA έχουν βρεθεί να συνεισφέρουν περισσότερο στην οξείδωση της αμμωνίας από τα AOB σε εδάφη με όξινο pH (*Li et al 2018*).

Τα AOA φέρουν γονίδια *amoA*, *amoB* και *amoC* ομόλογα με αυτά των AOB, κάτι αντίστοιχο δεν ισχύει για την περίπτωση της HAO που καταλύει την οξείδωση της NH_2OH στα AOB (*Walker et al. 2010*). Παρότι η NH_2OH είναι ενδιάμεσο της οξείδωσης της αμμωνίας στα AOA, το γονιδίωμα τους ωστόσο δεν διαθέτει αναγνωρίσιμα ομόλογα της HAO, υπονοώντας ότι ένα νέο ένζυμο πρέπει να είναι υπεύθυνο για το στάδιο οξείδωσης της NH_2OH (*Lehtovirta-Morley 2018*). Η περαιτέρω οξείδωση της NH_2OH δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως. Το επικρατέστερο μονοπάτι οξείδωσης της NH_2OH , αναφέρει την NH_2OH και το NO ως συνυποστρώματα ενός ενζυμικού συμπλόκου της οξειδοοξειδοκτάσης της υδροξυλαμίνης, που χρησιμοποιεί τον Cu ως συμπάρονο. Με βάση το μονοπάτι αυτό παράγονται δύο μόρια NO_2^- και ελευθερώνονται πέντε e^- , εκ των οποίων τα δύο χρησιμοποιούνται για την οξείδωση της αμμωνίας και τα δύο για την παραγωγή ενέργειας μέσω της αναπνοής. Από τα δύο παραγόμενα NO_2^- , το ένα μετατρέπεται με τη δράση της νιτρώδους οξειδωαναγωγής σε NO για περαιτέρω οξείδωση (*Lehtovirta-Morley 2018*).



Εικόνα 6. Πιθανός μηχανισμός οξειδωσης της αμμωνίας από τα νιτρωδοποιητικά αρχαία (Lehtovirta-Morley 2018).

1.2.2.3 Νιτρικοποιητικά Βακτήρια (NOB)

Τα NOB είναι χημειολιθότροφοι, αυτότροφοι μικροοργανισμοί και καταλύουν το δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης, δηλαδή την οξειδωση των NO_2^- σε NO_3^- . Τα βακτήρια αυτά κατατάσσονται στα γένη *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrotoga*, *Nitrospina*, *Nitrolancea* και *Candidatus Nitromaritima*, και μολονότι εμφανίζουν διαφορές σε δομικό και βιοχημικό επίπεδο έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό το ένζυμο κλειδί για την μετατροπή του NO_2^- σε NO_3^- . Φέρουν τις γενετικές πληροφορίες για την παραγωγή του ενζύμου της νιτρώδους οξειδοαναγωγής (NXR). Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται σε δύο μορφές: στα γένη *Nitrospira*, *Nitrospina* και *Candidatus Nitromaritima* εντοπίζεται στον περιπλασματικό χώρο ενώ στα *Nitrobacter*, *Nitrococcus* και *Nitrolancea* στο κυτταρόπλασμα. Κατά την οξειδωση των NO_2^- σε NO_3^- μεταφέρονται δύο e^- , ανά αντίδραση, στην αναπνευστική αλυσίδα για παραγωγή ενέργειας (Daims et al. 2016, Lückner et al 2010).

1.2.2.4 Αναερόβια οξειδωση της αμμωνίας (anammox)

Τα anammox μπορούν να πραγματοποιούν την οξειδωση της αμμωνίας σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, με τελικό προϊόν το στοιχειακό άζωτο (N_2). Οι μικροοργανισμοί αυτοί ανήκουν στη συνωμοταξία των *Planctomycetales* και κατατάσσονται στα γένη *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindula*, *Ammoxoglobus* και *Jettenia* (Jetten et al. 2015).

Τα βακτήρια αυτά είναι σε θέση να οξειδώνουν το NH_4^+ , χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό τα NO_2^- αντί του O_2 . Στο μονοπάτι της αναερόβιας οξειδωσης του NH_4^+ συμμετέχει το ένζυμο συνθάση της υδραζίνης (HZS) σε σκοπό το σχηματισμό του ενδιάμεσου προϊόντος υδραζίνη. Η υδραζίνη με τη σειρά της μετατρέπεται σε N_2 μέσω της δράσης του ενζύμου HAO (Kuypers et al. 2018, Kartal & Keltjens 2016).

Τα anammox εντοπίζονται ευρέως σε ανοξικά περιβάλλοντα αλλά και σε υδάτινα οικοσυστήματα και ιζήματα. Η ανάπτυξη τους απαιτεί σχέσεις συνεργασίας με τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς (Kuypers et al. 2018, Gao et al. 2018).

1.2.2.5 Comammox Βακτήρια

Η νιτροποίηση θεωρούνταν ως μια αρθρωτή διαδικασία δύο σταδίων που καταλύεται από χημειολιθοαυτότροφους μικροοργανισμούς που οξειδώνουν είτε την αμμωνία είτε τα νιτρώδη. Η θεωρία της “αρθρωτής νιτροποίησης” καταρρίφθηκε το 2015 με την ανακάλυψη ενός πλήρως νιτροποιητικού στελέχους του γένους *Nitrospira*. Το *Candidatus Nitrospira inopinata*, έχει την ικανότητα να εκτελεί και τα δύο στάδια της νιτροποίησης. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ονομάστηκαν Comammox και κατατάσσονται φυλογενετικά στην ομάδα των νιτροποιητικών βακτηρίων (NOB) (*Daims et al 2015*).

Οι γονιδιωματικές αναλύσεις στο στέλεχος *Ca. N. inopinata* απέδειξαν την ύπαρξη των γονιδίων που κωδικοποιούν τις οδούς τόσο για την οξείδωση της αμμωνίας όσο και των νιτρικών. Δηλαδή την ύπαρξη των γονιδίων για την παραγωγή των ενζύμων AMO, HAO και NXR (*Daims et al 2015*).

1.2.3 Οικονομική και περιβαλλοντική σημασία της νιτροποίησης

Η νιτροποίηση αποτελεί σημαντικό και αναπόσπαστο κομμάτι του κύκλου του αζώτου και παρότι συμβάλλει στην διαθεσιμότητα διαφόρων μορφών αζώτου, επιφέρει και αρνητικές συνέπειες στο περιβάλλον.

Η χρήση αζωτούχων λιπασμάτων για εμπλουτισμό του εδάφους και κατά συνέπεια ο αρνητικός αντίκτυπος, της χρήσης αυτών, μειώνεται με την οξείδωση της αμμωνίας μέσω της νιτροποίησης. Η συμβολή της νιτροποίησης στη διατήρηση της γονιμότητας του εδάφους σε υψηλά επίπεδα περιορίζει την ανάγκη χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων υψηλού κόστους που οδηγούν σε συσσώρευση υψηλών ποσοστών αζώτου. Επιπλέον, νιτροποιητικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται στη βιολογική επεξεργασία αγροτικών και βιομηχανικών αποβλήτων, προκειμένου να μειωθεί το υψηλό φορτίο αζώτου στα απόβλητα που προκύπτουν λόγω της εντατικοποίησης της γεωργίας και κτηνοτροφίας (*Schleper & Nicol 2010, Subbarao et al. 2006, Kowalchuk & Stephen 2001*).

Η νιτροποίηση ωστόσο, επιφέρει και αρνητικές συνέπειες στο περιβάλλον. Τα NO_3^- , λόγω του αρνητικού τους φορτίου δεν προσροφώνται στα εδαφικά κolloειδή και διαφεύγουν μέσω της έκπλυσής τους ή της παραγωγής αέριων μορφών αζώτου (N_2O , NO , N_2). Η έκπλυση των νιτρικών ιόντων, μπορεί να οδηγήσει σε ρύπανση των επιφανειακών υδάτων αλλά και του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα (*Di & Cameron 2011*). Παράλληλα, τα παραγόμενα αέρια αζωτούχων ενώσεων, μέσω των αντιδράσεων απονιτροποίησης, όπως το μονοξείδιο του αζώτου και το υποξείδιο του αζώτου, αποτελούν ατμοσφαιρικούς ρύπους. Μέσω της εκπομπής αυτών των ενώσεων στην ατμόσφαιρα εντείνεται το πρόβλημα του φαινομένου του θερμοκηπίου αλλά και της τρύπας του όζοντος (*Zaman et al. 2009, Lehtovirta-Morley et al. 2013*).

1.3 Ανθελμινθικά φάρμακα -Σημασία και αναγκαιότητα

Τα ανθελμινθικά φάρμακα είναι παρασιτοκτόνα φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση ελμινθιάσεων τόσο σε ζώα όσο και στο άνθρωπο. (*Riviere & Papich 2018*). Ελμινθίαση καλείται η μόλυνση ενός ζωικού οργανισμού από παράσιτα τα οποία ανάλογα με τη μορφολογία τους ανήκουν σε μία από τρεις συνομοταξίες: νηματώδεις, κεστώδεις και τρηματώδεις σκώληκες ή έλμινθες. (*Oscar Barrón-Bravo 2021*) Πολλές ελμινθιάσεις μεταδίδονται μέσω του εδάφους για αυτό και αποτελούν συχνές μολύνσεις σε εκτροφές

ζώνων. Προκαλούν συνέπειες στην υγεία και στην παραγωγικότητα των ζώων, άμεσες όπως θνησιμότητα και μείωση παραγωγής προϊόντων και έμμεσες όπως υψηλό κόστος για αποπαρασίτωση και απόρριψη προϊόντων με κατάλοιπα φαρμάκων. Ακόμα, σε περιοχές με κακές υγειονομικές συνθήκες οι ελμινθιάσεις αποτελούν συχνό πρόβλημα και για τους ανθρώπους. Λοιμώξεις όπως οξυκουρίαση, εχινόκοκκος, και ασκαριδίαση προκαλούν από ενοχλητικά συμπτώματα μέχρι και σοβαρές βλάβες (World Health Organization 2012). Τα ανθελμινθικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ζώα για την αντιμετώπιση των ελμινθιάσεων απεκκρίνονται κυρίως μέσω της κοπριάς και προκαλούν συνέπειες στο περιβάλλον.

1.3.1 Κατηγορίες ανθελμινθικών φαρμάκων

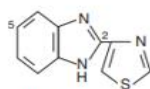
Τα ανθελμινθικά φάρμακα χωρίζονται στις εξής χημικές ομάδες: α) βενζιμιδαζόλες και προ-βενζιμιδαζόλες, β) ιμιδαζοθειαζόλες και τετραϋδροπυριμιδίνες, γ) μακροκυκλικές λακτόνες δ) παράγωγα αμινο-ακετονιτριλίου (*Oscar Barrón-Bravo 2021, Sager 2009*).

Οι βενζιμιδαζόλες (BZD) και προ-βενζιμιδαζόλες (proBZD) χρησιμοποιούνται ευρέως στην κτηνιατρική και την ιατρική. Οι προ-βενζιμιδαζόλες είναι ανενεργές μορφές και μετατρέπονται σε ενεργές βενζιμιδαζόλες εντός του ξενιστή. Αξιοσημείωτη είναι η ασφάλεια και το ευρύ φάσμα των ενώσεων BZD, τα οποία έχουν οδηγήσει στην επιτυχημένη χρήση παγκοσμίως για πάνω από τέσσερις δεκαετίες. (*Riviere and Papich 2018*). Οι ιμιδαζοθειαζόλες και τετραϋδροπυριμιδίνες είναι αγωνιστές των νικοτινικών υποδοχέων (*Aceves et al., 1970*) και προκαλούν νευρομυϊκή παράλυση των παρασίτων (*Martin et al, 2005*). Οι μακροκυκλικές λακτόνες παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των φαρυγγικών μυών και καταστέλλουν την κίνηση των μυών του σωματικού τοιχώματος των παρασίτων (*Pemberton et al., 2001*). Τα παράγωγα αμινο-ακετονιτριλίου είναι νέα ομάδα ανθελμινθικών φαρμάκων που χρησιμοποιείται για αντιμετώπιση ενδοπαρασίτων σε μηρυκαστικά τα οποία έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε προγενέστερα φάρμακα (*Kaminsky et al., 2008*).

1.3.2 Γενικά χαρακτηριστικά βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών φαρμάκων

Από την ανακάλυψη του thiabendazole το 1961 (*Brown et al, 1964*), οι βενζιμιδαζόλες έχουν υποστεί μετατροπές στη δομή τους ώστε να βελτιωθεί το εύρος δράσης τους, η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά τους. Οι διαφορετικές τροποποιήσεις στις θέσεις 2- και 5- του δακτυλίου BZD έχουν δημιουργήσει τα πιο δραστικά ανθελμινθικά φάρμακα. Τέτοιο παράδειγμα αποτελούν τα παράγωγα καρβαμικών μεθυλεστέρων που περιέχουν θείο όπως είναι το albendazole και το fenbendazole, τα οποία παρουσιάζουν υψηλή αποτελεσματικότητα τόσο κατά των νηματωδών του αναπνευστικού όσο και των προνυμφών των περισσότερων νηματωδών της πεπτικής οδού. Ακόμα, με την προσθήκη αλειφατικών ή αρωματικών υποκαταστατών στο μόριο του thiabendazole παρήχθησαν νέα φάρμακα όπως είναι τα: parbendazole, mebendazole, oxibendazole, oxfendazole, albendazole, ciclobandazole, flubendazole, luxobendazole, triclabendazole και ricobendazole (Εικόνα 7) (*Rang et al, 1999*). Τα BZD methylcarbamates χρησιμοποιούνται περισσότερο από όλες τις ενώσεις BZD (*Riviere and Papich, 2018*). Οι περισσότερες από τις ενώσεις BZD είναι λευκές κρυσταλλικές σκόνες, με αρκετά υψηλό σημείο τήξης και είναι αδιάλυτες ή ελαφρώς διαλυτές στο νερό. Η υδατοδιαλυτότητα τους είναι σημαντικά υψηλότερη σε χαμηλές τιμές pH.

BENZIMIDAZOLE THIAZOLYLS

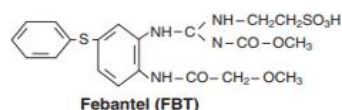


Thiabendazole (TBZ)

PRO-BENZIMIDAZOLES

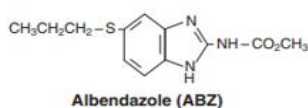


Netobimin (NTB)



Febantel (FBT)

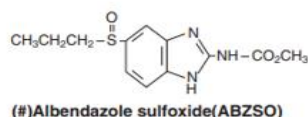
BENZIMIDAZOLE METHYLCARBAMATES



Albendazole (ABZ)



Fenbendazole (FBZ)



(#)Albendazole sulfoxide(ABZSO)



Oxfendazole (OFZ)



Flubendazole (FLBZ)



Mebendazole (MBZ)

Εικόνα 7. Χημική δομή των κύριων βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών (BZD). Οι κύριες θέσεις υποκατάστασης 2- και 5- διακρίνονται στη δομή του thiabendazole (Riviere and Papich 2018)

1.3.2.1 Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά ανθελμινθικών βενζιμιδαζολικών φαρμάκων

Τα ανθελμινθικά βενζιμιδαζολικά φάρμακα μετά τη χορήγησή τους στα ζώα, μπορούν να καταλήξουν σε υδάτινα ή εδαφικά οικοσυστήματα, ή να καταναλωθούν από τον άνθρωπο ως κατάλοιπα σε τρόφιμα ζωικής ή φυτικής παραγωγής. Η διάσπαση τους στους κοπρσωρούς όπου και καταλήγουν δεν έχει μελετηθεί αρκετά, καθώς οι περισσότερες μελέτες αφορούν κτηνιατρικά αντιβιοτικά (Loke et al. 2000, Teeter and Meyerhoff, 2003, Kolz et al., 2005). Η κύρια πηγή εισόδου των βενζιμιδαζολικών φαρμάκων στο περιβάλλον είναι η χρήση των κοπράνων των παραγωγικών ζώων ως λίπασμα για την βελτίωση της θρεπτικής κατάστασης των εδαφών (García-galán et al. 2010, Litskas et al. 2013). Βενζιμιδαζολικά φάρμακα έχουν εντοπιστεί σε κόπρανα ζώων που βρίσκονται υπό θεραπεία, σε ποσοστό που φτάνει έως και το 90% της ποσότητας φαρμάκου που χορηγήθηκε στο ζώο από το στόμα (Kreuzig et al., 2007). Πηγή βενζιμιδαζολικών στο περιβάλλον αποτελούν επίσης και οι ιχθυοκαλλιέργειες στις οποίες συνηθίζεται η χορήγησή τους για τη θεραπεία παρασιτικών νοσημάτων των ιχθύων. Αφού μεταβολιστούν από τα ψάρι, ένα μέρος τους απεκκρίνεται στο υδάτινο περιβάλλον, είτε με την αρχική τους μορφή, είτε με τη μορφή μεταβολιτών τους (De Ruyc, 2003).

Η τύχη των βενζιμιδαζολικών φαρμάκων σε κοπρσωρούς εξαρτάται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία στην οποία αποθηκεύτηκαν, το ξηρό βάρος, η τροφή των ζώων και η διαθεσιμότητα δεκτών ηλεκτρονίων (Wohde et al., 2016). Επίσης, καταλυτικές διεργασίες για την περιβαλλοντική τους τύχη αποτελούν η προσρόφηση των κτηνιατρικών φαρμάκων στην οργανική ουσία και η έκπλυση τους στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα (Wohde et al., 2016). Έκπλυση καλείται η διεργασία κατά την οποία ένα κτηνιατρικό φάρμακο, διαλυτοποιημένο στο εδαφικό διάλυμα, μετακινείται με το νερό προς τα βαθύτερα στρώματα, καταλήγοντας στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα. Αυτή η διεργασία εξαρτάται από την σύσταση του εδάφους, τις κλιματολογικές συνθήκες, τις καλλιεργητικές πρακτικές και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ανθελμινθικού. Προσρόφηση καλείται η προσέλκυση και η συγκράτηση των μορίων του βενζιμιδαζολικού φαρμάκου από την επιφάνεια των κolloειδών του εδάφους, είτε οργανικών είτε ανόργανων, ή άλλων συστατικών. Η προσρόφηση επηρεάζεται από την περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ύλη, το pH, την υγρασία, τη θερμοκρασία και το είδος των ανόργανων κolloειδών του εδάφους (Λύκας, 2009). Σημαντική ιδιότητα των βενζιμιδαζολικών φαρμάκων, καθοριστική για τη μετακίνησή και την τύχη τους στο περιβάλλον, είναι η υδατοδιαλυτότητα τους, δηλαδή η ικανότητα διαλυτοποίησης του στο νερό. Συγκεκριμένα, ένα μέρος των βενζιμιδαζολικών φαρμάκων καταλήγει στα κolloειδή σωματίδια του εδάφους λόγω προσρόφησης, ενώ ένα άλλο μέρος έχει ως τελικό αποδέκτη το εδαφικό διάλυμα. Εκρόφηση είναι η διαδικασία κατά την οποία το νερό που εισέρχεται στο έδαφος μέσω της βροχής και της άρδευσης, απελευθερώνει τα προσροφημένα βενζιμιδαζολικά φάρμακα από τα εδαφικά κolloειδή, και αυτά επαναδιαλυτοποιούνται στο εδαφικό διάλυμα. Γενικά, όσο πιο υψηλή είναι η υδατοδιαλυτότητα, τόσο λιγότερο ισχυρή είναι η προσρόφηση (Rao and Hornsby, 2001).

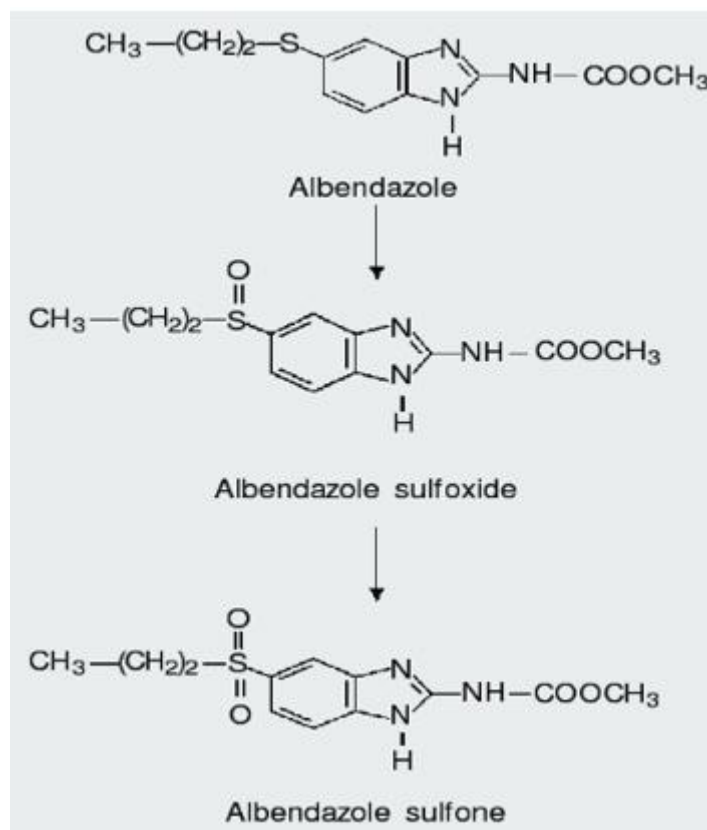
Τρεις είναι οι διαδικασίες μεταβολισμού μιας ουσίας, φωτοχημικά, χημικά ή μικροβιακά (Hamaker et al., 1975). Στη φωτοχημική ανήκει η φωτοαποδόμηση, που περιλαμβάνει την έμμεση ή άμεση διάσπαση των ανθελμινθικών φαρμάκων στην ατμόσφαιρα (έδαφος, φυτά, νερό) λόγω επίδρασης του φωτός, εξαιτίας της απορρόφησης της ηλιακής ενέργειας, με μήκος κύματος (λ) 290 έως 400 nm (Burrows et al., 2002). Οι ακριβείς διεργασίες που συντελούνται επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως ετερογένεια σύστασης εδάφους και εισχώρηση ακτινοβολίας στο έδαφος (Katagi, 2004). Γενικά, τα βενζιμιδαζολικά αποδομούνται εύκολα μέσω φωτοαποδόμησης. Η χημική αποδόμηση, αναφέρεται στην αποδόμηση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου μέσω χημικών αντιδράσεων, όπως είναι η οξειδωση, η αναγωγή, και η υδρόλυση (Κυδωνάκης, 2010) και επηρεάζεται από την σύσταση του εδάφους και από την παρουσία ιόντων και νερού (Crosby 1970). Τρίτη διαδικασία είναι αυτή του μικροβιακού μεταβολισμού, η οποία αφορά τον μεταβολισμό μιας ουσίας από μικροοργανισμούς, μέσω διάσπασης, αποσύνθεσης και αδρανοποίησης του φαρμάκου. Κατά την έκθεση των μικροοργανισμών στις ξενοβιοτικές ουσίες έχει παρατηρηθεί προσαρμογή τους, μέσω της παραγωγής ενζύμων ειδικών για την αποικοδόμησή τους, απαραίτητων θρεπτικών και ενέργειας (Audus, 1960).

Ο μεταβολισμός των φαρμάκων επιτυγχάνεται κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, οι οποίες καθορίζονται από τη σύσταση του εδάφους, το pH και την αφθονία των μικροοργανισμών (Wohde et al., 2016). Στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους γίνεται αποδόμηση των ουσιών μέσω του αερόβιου μεταβολισμού λόγω παρουσίας οξυγόνου, με τελικό προϊόν διάσπασης το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό. Σε περίπτωση μικροβιακής διάσπασης υπό αναερόβιες συνθήκες, προκύπτουν μεθάνιο ή διοξείδιο του θείου ως τελικά προϊόντα (Díaz et al., 2008). Σημαντική είναι η βιοδιαθεσιμότητα του βενζιμιδαζολικού φαρμάκου, δηλαδή η ποσότητα του φαρμάκου που βρίσκεται σε διαλυτή μορφή και στην οποία έχουν πρόσβαση οι μικροοργανισμοί (Parales et al., 2008).

1.3.3 Albendazole

Το albendazole είναι βενζιμιδαζολικό ανθελμινθικό φάρμακο, ευρέως φάσματος με εμπορική ονομασία Albenza (Gyurik et al., 1981). Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση νηματωδών σκωλήκων που προσβάλλουν το γαστρεντερικό σύστημα και κεστωδών ελμίνθων που προσβάλλουν κυρίως το ήπαρ και τους πνεύμονες. Κατά κύριο λόγο χορηγείται σε αιγοπρόβατα και βοειδή, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις χορηγείται και σε γάτες, σκύλους, πτηνά και ψάρια (Gyurik et al., 1981). Η χορήγηση γίνεται από το στόμα σε υγρή μορφή ή σε χάπι. Η συνιστάμενη θεραπευτική δόση είναι 5 έως 7,5 mg/kg σωματικού βάρους με δείκτη ασφαλείας 7,5-20 φορές μεγαλύτερο της συνιστάμενης δόσης (Brander et al, 1991). Η μικρή και αποτελεσματική του δόση και το ευρύ φάσμα νηματωδών που καταπολεμεί, το καθιστούν ως ένα πολύ επιτυχημένο κτηνιατρικό φάρμακο (Gyurik et al., 1981).

Ο μηχανισμός δράσης του βασίζεται στη δέσμευση του στην τουμπουλίνη των μικροσωληνίσκων. Αυτό οδηγεί σε μειωμένη πρόσληψη της γλυκόζης από τα παράσιτα και τις προνύμφες τους, εξαντλώντας τα αποθέματα γλυκογόνου τους. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στη διαταραχή του ενεργειακού ισοζυγίου των παρασίτων και προκαλεί την παράλυση και τη θανάτωση τους (Pavlovic et al 2018). Το albendazole μεταβολίζεται κυρίως σε albendazole sulfoxide, που είναι ο κύριος μεταβολίτης του, σε albendazole sulfone και σε άλλους οξειδωτικούς μεταβολίτες. Το albendazole sulfoxide εμφανίζει επίσης αντιπαρασιτικές ιδιότητες, καθώς χορηγείται ως ανθελμινθικό με την ονομασία Ricobendazole (Gurram et al 2009). Ο χημικός τύπος του albendazole είναι $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ και έχει μοριακό βάρος 265.34 g/mol. Βρίσκεται σε μορφή άχρωμων κρυστάλλων και είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό. Ωστόσο, είναι διαλυτό σε διμεθυλοσουλφοξείδιο, ισχυρά οξέα και βάσεις, ενώ παρουσιάζει μικρότερη διαλυτότητα σε μεθανόλη, χλωροφόρμιο, οξικό αιθυλεστέρα και ακετονιτρίλιο (Jung, 1998).



Εικόνα 8. Η μετατροπή του albendazole σε albendazole sulfoxide και albendazole sulfone (Jung, 1998).

1.3.3.1 Περιβαλλοντική τύχη του Albendazole

Το albendazole ενώ χορηγείται συχνότερα δια του στόματος, έχει χαμηλή απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων. Αυτό σημαίνει πως πρώτον, η συστηματική του διαθεσιμότητα και αποτελεσματικότητα είναι μειωμένη και δεύτερον, πως ένα μεγάλο μέρος του καταλήγει στο έδαφος μέσω των ούρων και των κοπράνων των ζώων (Gurram et al. 2009). Υπολείματα του albendazole και των μεταβολιτών του έχουν βρεθεί σε λύματα, κοπρσωρούς, επιφανειακά και υπόγεια ύδατα (Van De Steen et al. 2010). Ως υδρόφοβο μόριο, το albendazole έχει υψηλές τιμές προσρόφησης σε σχέση με τις υπόλοιπες βενζιμιδαζόλες επιβεβαιώνοντας τη θετική συσχέτιση προσρόφησης και υδροφοβικότητας (Kim et al. 2010). Ακόμα, η προσρόφηση του albendazole στο έδαφος εξαρτάται από την περιεκτικότητα του σε οργανική ουσία, σε ιχνοστοιχεία όπως χαλκός, ψευδάργυρος, σίδηρος και από τα επίπεδα του pH. Η ισχυρή προσρόφηση του albendazole στο έδαφος μπορεί να μειωθεί σε αυξημένες τιμές pH (Pavlovic et al, 2018). Ο χρόνος ημιζωής του φτάνει έως τις 6,5 ημέρες (Min and Hu, 2013). Η φωτοχημική διάσπαση του albendazole είναι πιο ευαίσθητη στην UV-V ακτινοβολία, ενώ των μεταβολιτών του στη UV-A. (Ljubas et al. 2018).

1.4 Σκοπος

Κύριος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η αξιολόγηση της πιθανής τοξικότητας του albendazole στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, σε πειράματα μικροκόσμων επιλεγμένων εδαφών. Στα πλαίσια του σκοπού αυτού τέθηκαν οι εξής επιμέρους στόχοι:

- Η μελέτη της επίδρασης του albendazole στην λειτουργία και αφθονία νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών
- Και η μελέτη της επίδρασης του albendazole στην αφθονία του συνόλου της βακτηριακής κοινότητας.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα διατριβή διερευνήσαμε την επίδραση του συνθετικού ανθελμινθικού Albendazole στους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς του εδάφους αλλά και στο σύνολο της βακτηριακής κοινότητας. Τα εδάφη επιλέχθηκαν με βάση προηγούμενη μελέτη της αποδόμησης συνθετικών ανθελμινθικών φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένου και του Albendazole, σε δείγματα εδάφους από κτηνοτροφικές μονάδες της νήσου Λέσβου (Πίνακας 1, 1η ετήσια έκθεση προόδου υπ. Διδάκτορα Ευστάθιο Λαγού, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας).

Δείγμα εδάφους	Σημείο συλλογής	Ιστορικό χρήσης
1A	Εντός Κτηνοτροφικής Μονάδας	EPRINOMECTIN/ALBENDAZOLE
7B	Λειμώνας (κοινοτικός)	FENBENDAZOLE

Πίνακας 1. Δείγματα εδαφών που επιλέχθηκαν, για την παρούσα μελέτη, από κτηνοτροφικές μονάδες της νήσου Λέσβου.

Από τα παραπάνω εδάφη επιλέχθηκαν, ένα που παρουσιάζει γρήγορο ρυθμό αποικοδόμησης του Albendazole, το **1A** (με βάση τις τιμές DT_{50} και DT_{90} της προαναφερθείσας μελέτης) και ένα που παρουσιάζει αργό ρυθμό αποδόμησης, το **7B**.

- DT_{50}/DT_{90} : είναι ο χρόνος που απαιτείται για να μειωθεί η συγκέντρωση μιας ένωσης σε ένα υπόστρωμα στο 50/90%, αντίστοιχα, της αρχικής συγκέντρωσης.

Πριν την εφαρμογή του Albendazole τα εδάφη επωάστηκαν στους 4°C και στη συνέχεια προσδιορίστηκαν η υγρασία (MC) και η υδατοχωρητικότητα των εδαφών (WHC), με σκοπό να προσαρμοστεί η υγρασία των εδαφών στο 40% της WHC (προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα ddH_2O).

Το Albendazole εφαρμόστηκε στα εδάφη σε 3 διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων, x0: δείγματα εδάφους που δεν δέχτηκαν εφαρμογή Albendazole (λειτουργεί ως μάρτυρας), x1: δείγματα εδάφους που δέχτηκαν εφαρμογή Albendazole και x10: αντιπροσωπεύει την 10 φορές υψηλότερη δόση, ως σενάριο υψηλής έκθεσης.

Πραγματοποιήσαμε 3 εφαρμογές του Albendazole στα δείγματα εδάφους. Μετά την 1^η εφαρμογή (ημέρα 0) ακολούθησε η 2^η εφαρμογή, 40 μέρες αργότερα και η 3^η εφαρμογή 80 μέρες αργότερα. Μετά από κάθε εφαρμογή συλλέχθηκαν τρία δείγματα εδάφους (40g) από κάθε μεταχείριση στις: 0, 3, 6, 40 μέρες. Πριν την πρώτη και την τρίτη εφαρμογή του albendazole σε όλες τις μεταχειρίσεις (x0, x1 και x10), πραγματοποιήθηκε προσθήκη πηγής αζώτου, μέσω εφαρμογής υδατικού διαλύματος $(NH_4)_2SO_4$ 0,4M (αντιστοιχώντας σε συγκέντρωση $154mg\ N\ kg^{-1}$ ξηρού εδάφους) και επώασης των μεταχειρίσεων για 24 ώρες.

Για την μελέτη της επίδρασης του Albendazole:

- στη λειτουργία και την αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών του εδάφους (συγκέντρωση NH_4^+ / NO_3^- , ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης και αφθονία του αποA γονιδίου των AOB και AOA),
- στην αφθονία ομάδων μικροοργανισμών της ευρύτερης βακτηριακής κοινότητας (αφθονία του 16s rRNA γονιδίου των βακτηρίων),

πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες για τη μελέτη των ενζυμικών δραστηριοτήτων στα εξής χρονικά σημεία, για την 1^η εφαρμογή: 0, 3, 6 και 40 μέρες μετά την εφαρμογή, για τη 2^η εφαρμογή: 3, 6 και 40 μέρες μετά την εφαρμογή και για την 3^η εφαρμογή: 3, 6 και 40 μέρες μετά την εφαρμογή. Αντίστοιχα, για τις μοριακές αναλύσεις δείγματα συλλέχθηκαν στα εξής χρονικά σημεία: για την 1^η εφαρμογή: 0, 6 και 40 μέρες μετά την εφαρμογή, για τη 2^η εφαρμογή: 6 και 40 μέρες μετά την εφαρμογή, και για την 3^η εφαρμογή: 6 και 40 μέρες μετά την εφαρμογή

2.1.1 Διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια και γεωργικά φάρμακα

Πρότυπη ουσία Albendazole καθαρότητας 98% (Santa Cruz Biotechnology©) χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή διαλυμάτων του φαρμάκου σε μεθανόλη (HPLC Grade, Sigma Aldrich©) συγκέντρωσης 700 και 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Τα συγκεκριμένα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή του ABZ στο έδαφος με στόχο τελική συγκέντρωση 20 και 2 $\mu\text{g}/\text{g}$ αντιστοίχα.

2.2 Μελέτη της επίδρασης του Albendazole στη λειτουργία των Νιτροποιητικών μικροοργανισμών

2.2.1 Μέθοδος εκχύλισης για τον προσδιορισμό των επιπέδων NH_4^+ και NO_3^- στο έδαφος

2g εδάφους ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε falcon των 50ml όπου και προστέθηκαν 20ml KCl 1M και στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα για 30 λεπτά. Το εκχύλισμα που προέκυψε διηθήθηκε από διηθητικό χαρτί Whatman 42 σε falcon των 15ml και αποθηκεύτηκε στους -20°C .

2.2.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των NH_4^+ στο έδαφος

Ο προσδιορισμός των NH_4^+ στα εδαφικά δείγματα πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά σύμφωνα με τη μέθοδο της Kandeler (1995). Το αμμώνιο οξειδώνεται σε χλωροαμίνη από το sodium dichloroisocyanuric acid και στην συνέχεια σχηματίζει μια πράσινη ινδοφαινόλη, παρουσία φαινολικών ενώσεων σε αλκαλικό περιβάλλον. Η απορρόφηση μετράται φωτομετρικά στα 660nm.

Αντιδραστήρια

- **Διάλυμα NaOH 0,3M:** 11,97g NaOH διαλύθηκαν σε 1000ml ddH₂O.

- **Διάλυμα Οξειδωσης:** 0,1g dichloroisocyanuric acid sodium salt dihydrate διαλύθηκαν σε 100ml ddH₂O.
- **Sodium Salicylate:** 8,5g sodium salicylate και 63,9mg sodium nitroprusside dihydrate διαλύθηκαν σε 50ml ddH₂O.
- **Χρωματικός δείκτης:** ανάμιξη διαλύματος NaOH 0,3M, sodium salicylate και ddH₂O με αναλογία 1:1:1.

600ml εκχυλίσματος μεταφέρθηκαν σε erpendorfs των 1,5ml και κατόπιν προστέθηκαν 120ml διαλύματος οξειδωσης και 300ml χρωματικού δείκτη. Κατόπιν ακολούθησε ήπια ανάδευση των δειγμάτων για 30 λεπτά σε οριζόντιο αναδευτήρα στα 300rpm. Έπειτα 300ml από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε 96-well plate και πραγματοποιήθηκε μέτρηση με τη βοήθεια του EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer), στα 660nm. Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στην δημιουργία πρότυπης καμπύλης με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 0,0195mg/L και 20mg/L NH₄Cl-N. 1

2.2.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των NO₃⁻ στο έδαφος

Ο Προσδιορισμός των NO₃⁻ στα εδαφικά δείγματα πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά μέσω σύζευξης με το αντιδραστήριο Griess, σύμφωνα με τους Miranda et al. (2001). Μετά την εκχύλιση με KCl, τα νιτρικά (NO₃⁻) μετατρέπονται σε νιτρώδη (NO₂⁻) από το διάλυμα χλωριούχου βαναδίου (VCl₃). Τα NO₂⁻ προσδιορίζονται, από την απευθείας σύζευξη με το αντιδραστήριο Griess, φωτομετρικά στα 540nm.

Αντιδραστήρια

- **Διάλυμα Χλωριούχου Βαναδίου 50,9mM:** 400mg χλωριούχου βαναδίου διαλύθηκαν σε 50ml 1M HCl και ακολούθησε φιλτράρισμα με τη βοήθεια φίλτρου Whatman.
- **Αντιδραστήριο Griess1 0,77mM:** 50g N-naphthylethylenediamine dihydrochloride διαλύθηκαν σε 250ml dH₂O.
- **Αντιδραστήριο Griess2 58mM:** 5g sulfanilamide διαλύθηκαν σε 500ml 3M HCl.

100ml δείγματος και 100ml διαλύματος χλωριούχου βαναδίου 50,9mM μεταφέρθηκαν σε 96-well plate. Αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε προσθήκη 100ml αντιδραστηρίου Griess (ανάμιξη Griess1 και Griess2 σε αναλογία 1:1). Στη συνέχεια, ακολούθησε επώαση στους 37°C για 60 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μέτρηση με τη βοήθεια του EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer®), στα 540nm. Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στη δημιουργία πρότυπης καμπύλης με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 0,02mg/L και 5mg/L KNO₃-N.

2.2.4 Προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης

Ο προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης στο έδαφος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο Kandeler (1995). Χρησιμοποιώντας θειικό αμμώνιο ως υπόστρωμα για τους νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς, το έδαφος επωάζεται για 5 ώρες στους 25°C. Τα νιτρώδη που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της επώασης εκχυλίζονται με KCl και προσδιορίζονται φωτομετρικά στα 520nm. Για την παρεμπόδιση της περαιτέρω οξειδωσης των νιτρωδών προς νιτρικά ιόντα προστίθεται NaClO₃.

Αντιδραστήρια

- **Διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10mM (stock):** 1,3214g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ διαλύθηκαν σε 1L dH_2O .
- **Διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1mM:** παρασκευάστηκε με αραιώση 100ml διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10mM σε dH_2O , σε τελικό όγκο 1L.
- **Διάλυμα NaClO_3 1,5M:** 15,97g NaClO_3 διαλύθηκαν σε 100ml dH_2O .
- **Διάλυμα KCl 2M:** 149,12g KCl διαλύθηκαν σε 1L dH_2O .
- **Ρυθμιστικό διάλυμα NH_4Cl 0,19M, pH 8,5:** 10,163g NH_4Cl διαλύθηκαν σε 1L dH_2O και το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 8,5.
- **Χρωματικός δείκτης:** 2g sulfanilamide και 0,1g N-naphthylethylenediamine dihydrochloride διαλύθηκαν σε 150ml dH_2O και ακολούθησε προσθήκη 20ml πυκνού φωσφορικού οξέως και συμπλήρωση του όγκου του διαλύματος έως τα 200ml με dH_2O .
- **Πυκνό διάλυμα NaNO_2 (1000 $\mu\text{g NO}_2^- \text{N ml}^{-1}$):** 4,926g NaNO_2 διαλύθηκαν σε 1L dH_2O .
- **Διάλυμα εργασίας NaNO_2 (10 $\mu\text{g NO}_2^- \text{N ml}^{-1}$):** προέκυψε με αραιώση 5ml του πυκνού διαλύματος NaNO_2 με dH_2O , σε τελικό όγκο 500ml.

5g από τα επιμέρους εδαφικά δείγματα ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100ml και κατόπιν προστέθηκαν 20ml διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1mM. Έπειτα προστέθηκε 0,1ml NaClO_3 1,5M, που δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας της περαιτέρω οξειδωτικής των νιτρωδών. Για κάθε μεταχείριση, χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις, ενώ παράλληλα με τα προς ανάλυση δείγματα παρασκευάστηκε ένα δείγμα για κάθε μεταχείριση που χρησιμοποιήθηκε στον υπολογισμό του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης ως μάρτυρας αναφοράς. Τα δείγματα προς ανάλυση τοποθετήθηκαν για επώαση στους 20°C για 5 ώρες, υπό συνεχή ανάδευση, ενώ τα δείγματα μάρτυρες αποθηκεύτηκαν για το ίδιο χρονικό διάστημα στους -20 °C, με σκοπό την απενεργοποίηση των ενζύμων και την αναστολή της νιτρωδοποίησης.

Μετά την επώαση των 5 ωρών, όλα τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ακολούθησε προσθήκη 5ml διαλύματος KCl 2M, σύντομη ανάδευση και διήθηση. Για την φωτομετρική ανάλυση, αναμίχθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 5ml από το εκχύλισμα που παραλήφθηκε μετά την διήθηση, 3ml ρυθμιστικό διάλυμα NH_4Cl και 2ml διαλύματος χρωματικού δείκτη που αντιδρά με τα NO_2^- . Ακολούθησε σύντομη ανάδευση για ομογενοποίηση του μίγματος και επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος. Έπειτα 300μl από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε 96-well plate και πραγματοποιήθηκε μέτρηση με τη βοήθεια του EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer), στα 520nm.

Χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη δυνητικής νιτροποίησης για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων NO_2^- στα εδαφικά δείγματα. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα NaNO_2 διαφορετικών συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, 0/ 2/ 4/ 8/ 10ml διαλύματος NaNO_2 (10 $\mu\text{g NO}_2^- \text{-N ml}^{-1}$), μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100ml, όπου προστέθηκαν 20ml διαλύματος KCl 2M και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 100ml με dH_2O . Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν διαλύματα συγκεντρώσεων 0/ 0,2/ 0,4/ 0,8/ 1,0 $\mu\text{g NO}_2^- \text{-N ml}^{-1}$. Κατόπιν 5ml από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα αναμίχθηκαν με 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος NH_4Cl 0,19M και 2ml διαλύματος χρωματικού δείκτη. Οι τελικές συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων ήταν 0/ 0,1/ 0,2/ 0,4/ 0,5 $\mu\text{g NO}_2^- \text{-N ml}^{-1}$.

2.3 Εξαγωγή DNA από το έδαφος

Η εξαγωγή του DNA από τα εδαφικά δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού kit DNeasy PowerSoil Pro kit(Qiagen®, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.4 Μελέτη της επίδρασης του Albendazole στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση του albendazole στην αφθονία των AOB και AOA στο έδαφος, πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) στα δείγματα DNA που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδάφους των επιμέρους μεταχειρίσεων στους χρόνους 6 και 40 ημέρες μετά την εφαρμογή του Albendazole. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις με ddH₂O με σκοπό τα δείγματα να έχουν τελική συγκέντρωση 1ng/μl Για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *amoA* των AOB και AOA πραγματοποιήθηκε qPCR σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System.

2.4.1 Μελέτη της επίδρασης των ουσιών στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB

Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOB χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές *amoA*-1F και *amoA*-2R (Rotthauwe *et al.*, 1998). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- *amoA*-1F: 5'-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3'
- *amoA*-2R: 5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10μL, με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOB

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5μL	1x
Εκκινητής <i>amoA</i>-1F (20 pmol/μl)	0,1μL	0,2μM
Εκκινητής <i>amoA</i>-2R (20 pmol/μl)	0,1μL	0,2μM
BSA (20μg/μl)	0,2μL	400ng/μL

DNA	2μL	2ng
ddH₂O	2,6μL	-
Συνολικός Όγκος	10μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *amoA* των AOB

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κυκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	3min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	5sec	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση	57°C	10sec	
Επιμήκυνση	72°C	30sec	
Καμπύλη Αποδιάταξης	95°C	1min	
	65°C - 95°C	0,5°C για 5sec	

2.4.2 Μελέτη της επίδρασης των ουσιών στην αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOA

Για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Arch-*amoAF* και Arch-*amoAR* (Francis et al., 2005). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Arch-*amoAF*: 5'- STAATGGTCTGGCTTAGACG-3'
- Arch-*amoAR*: 5'-GCGGCCATCCATCTGTATGT-3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10μL, με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση του *amoA* γονιδίου των AOA

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5μL	1x
Εκκινητής Arch-<i>amoA</i>F (20 pmol/μl)	0,1μL	0,2μM
Εκκινητής Arch-<i>amoA</i>R (20 pmol/μl)	0,1μL	0,2μM
BSA (20μg/μl)	0,2μL	400ng/μL
DNA	2μL	2ng
ddH₂O	2,6μL	-
Συνολικός Όγκος	10μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του γονιδίου *amoA* των AOA

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κυκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	3min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	5sec	45 κύκλοι
Υβριδοποίηση	53°C	10sec	
Επιμήκυνση	72°C	30sec	
Καμπύλη Αποδιάταξης	95°C	1min	
	65°C - 95°C	0,5°C για 5sec	

2.5 Μελέτη της επίδρασης του Albendazole στην αφθονία της ευρύτερης βακτηριακής κοινότητας του εδάφους

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση του albendazole στην αφθονία της ευρύτερης βακτηριακής κοινότητας του εδάφους, πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) στα δείγματα DNA (συγκέντρωσης 1ng/μl) που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδάφους των επιμέρους μεταχειρίσεων στους χρόνους 6 και 40 ημέρες μετά την εφαρμογή του Albendazole. Για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου 16S rRNA πραγματοποιήθηκε qPCR σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System.

2.5.1 Μελέτη της επίδρασης του Albendazole στην αφθονία του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων

Για την ενίσχυση του 16S rRNA των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Eub 338 και Eub 518 (Fierer -2005). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Eub 338: 5'- ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG -3'
- Eub 518: 5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10μL, με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν να φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση του 16SrRNA γονιδίου των βακτηρίων

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική Συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5μL	1x
Εκκινητής Eub 338 (20 pmol/μl)	0,1μL	0,2μM
Εκκινητής Eub 518 (20 pmol/μl)	0,1μL	0,2μM
BSA (20μg/μl)	0,2μL	400ng/μL
DNA	2μL	2ng
ddH2O	2,6μL	-
Συνολικός Όγκος	10μL	-

Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της αντίδρασης qPCR παρατίθενται στον πίνακα 7.

Πίνακας 5. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες της ποσοτικής αντίδρασης PCR του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων

	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κυκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95°C	3min	1 κύκλος
Αποδιάταξη	95°C	15sec	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση	60°C	20sec	
Επιμήκυνση	72°C	10sec	
Καμπύλη Αποδιάταξης	95°C	1min	
	65°C - 95°C	0,5°C για 5sec	

2.6 Ποσοτικοποίηση αντιγράφων των εξεταζόμενων γονιδίων

Για την απόλυτη ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων των λειτουργικών γονιδίων των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στα επιμέρους δείγματα, κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς, με την χρήση αραιώσεων (10^7 - 10^0 αντίγραφα) ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γνωστής συγκέντρωσης που περιείχαν ως ένθεμα το εκάστοτε γονίδιο-στόχο.

2.7 Στατιστική ανάλυση

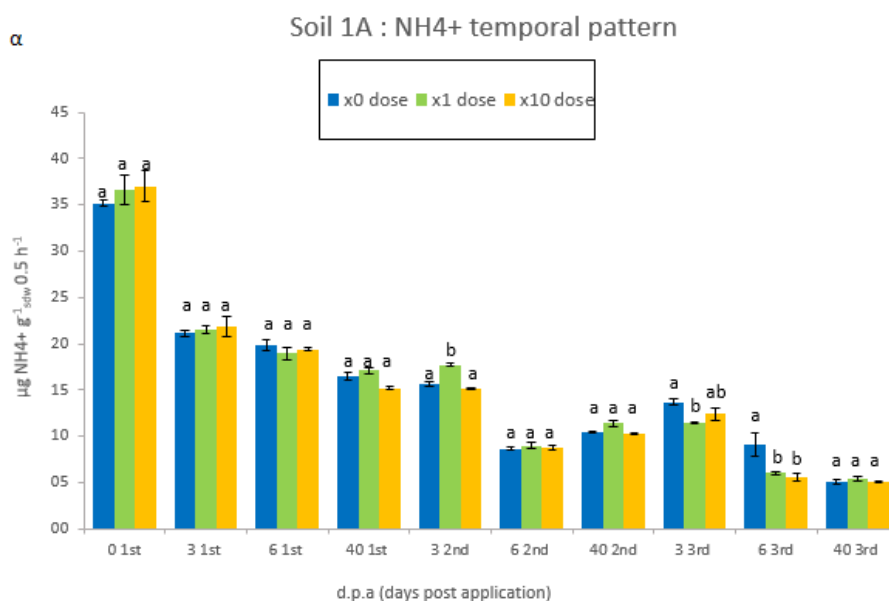
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Rstudio με γλώσσα προγραμματισμού R (R Core Team 2018, <https://www.R-project.org/>), έκδοση 3.5.0). Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο Agricolae (v1.3-5; Felipe de Mendiburu, 2021) και πραγματοποιήθηκαν οι στατιστικές αναλύσεις One way Anova (παραμετρική ανάλυση) και Kruskal-Wallis (μη παραμετρική ανάλυση).

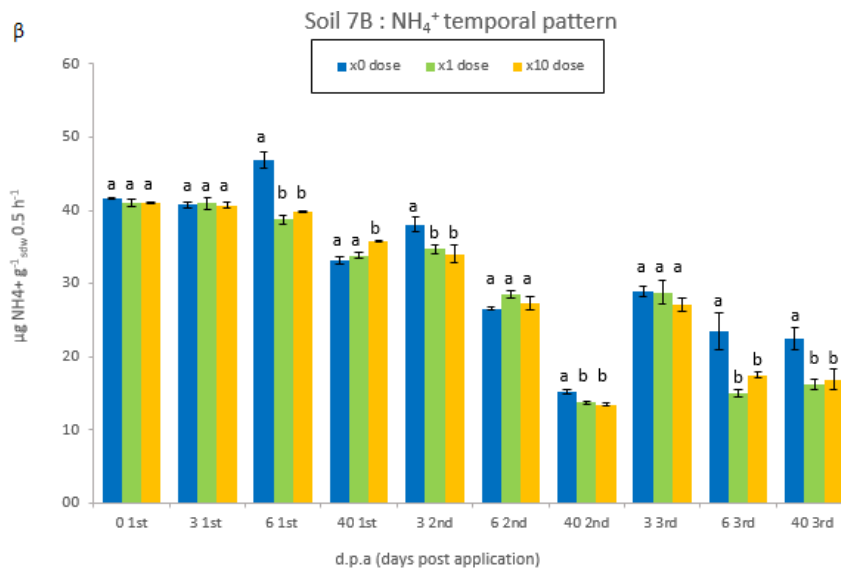
3. Αποτελέσματα

3.1 Επίδραση του Albendazole στη λειτουργία των νιτροποιητικών μικροοργανισμών

3.1.1 Επίδραση του Albendazole στην συγκέντρωση των NH_4^+ στο έδαφος

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της επίδρασης του Albendazole στη συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+), για τα εδάφη 1A και 7B παρουσιάζονται στα διαγράμματα 1α και 1β, αντίστοιχα. Και στα δύο εδάφη παρατηρούνται σχετικά παρόμοια αρχικά επίπεδα στην συγκέντρωση των NH_4^+ , με τα επίπεδά τους να μειώνονται με το πέρασμα των δειγματοληψιών. Μια παροδική αύξηση παρατηρήθηκε και στα δύο εδάφη μετά την τρίτη εφαρμογή του albendazole, λόγω του εμπλουτισμού με διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Η μείωση των επιπέδων των NH_4^+ , παρατηρήθηκε πιο έντονα στο έδαφος 1A σε σχέση με το έδαφος 7B. Τέλος και στα δύο εδάφη, πέρα από κάποια χρονικά σημεία δειγματοληψίας, δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στη μεταβολή των επιπέδων των NH_4^+ ανάμεσα στα δείγματα μάρτυρες και τις μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκε το albendazole.

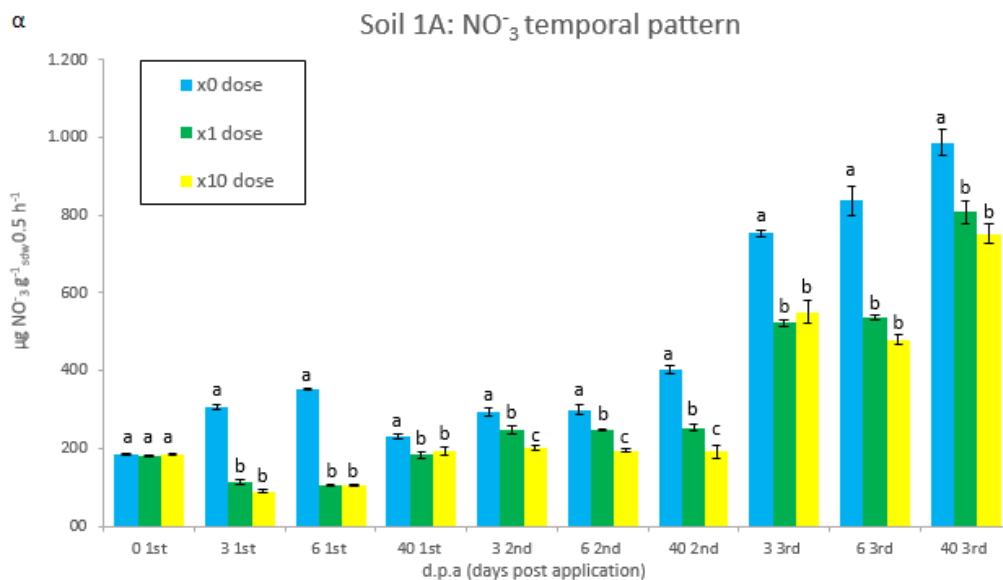


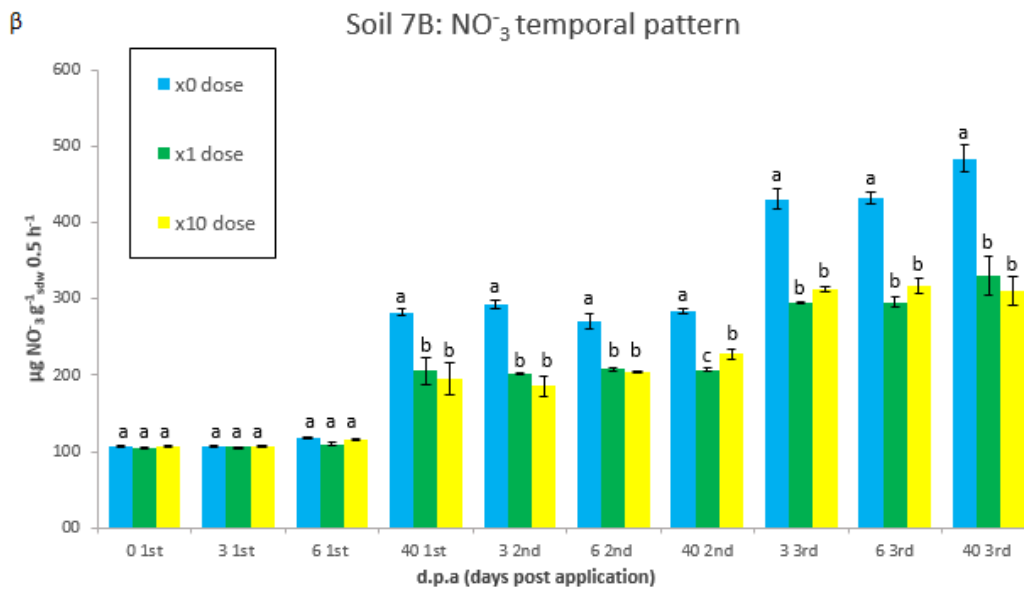


Διάγραμμα 1. Επίδραση του Albendazole στη συγκέντρωση των NH₄⁺ στο έδαφος 1^A (α) και στο 7B (β). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.1.2 Επίδραση του Albendazole στη συγκέντρωση των NO₃⁻ στο έδαφος

Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του Albendazole στη συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων (NO₃⁻) στο έδαφος 1A και 7B (Διάγραμμα 2α και 2β, αντίστοιχα). Και στα δύο εδάφη παρατηρούνται αύξηση των επιπέδων των NO₃⁻ με το πέρασμα των δειγματοληψιών. Μια παροδική μείωση παρατηρήθηκε στο έδαφος 1A την 3^η και την 6^η μέρα μετά την 1^η εφαρμογή. Τέλος, και στα δύο εδάφη παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των NO₃⁻ ανάμεσα στα δείγματα μάρτυρες και τις μεταχειρίσεις x1 και x10 σχεδόν σε όλα τα χρονικά σημεία δειγματοληψίας.

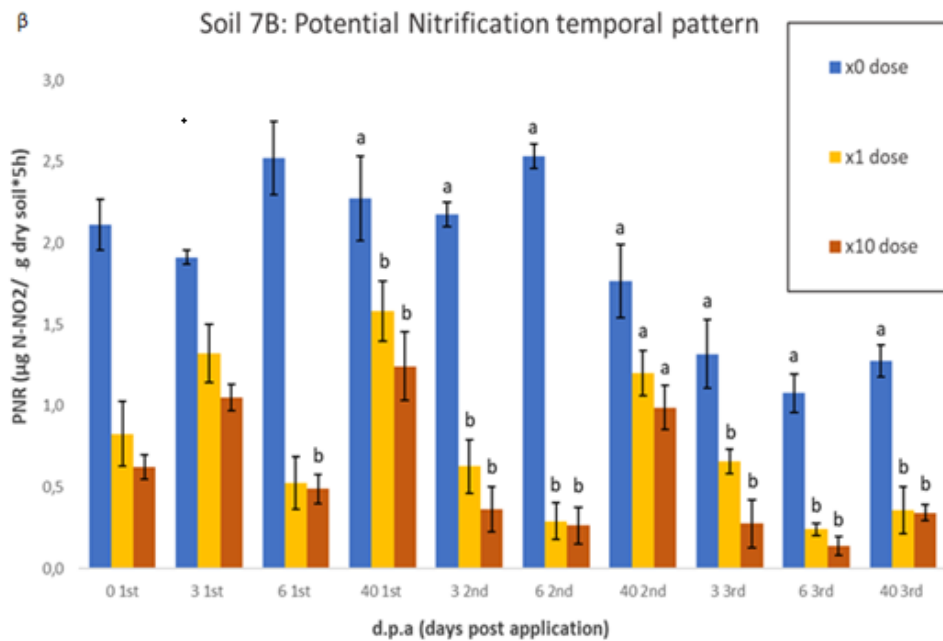
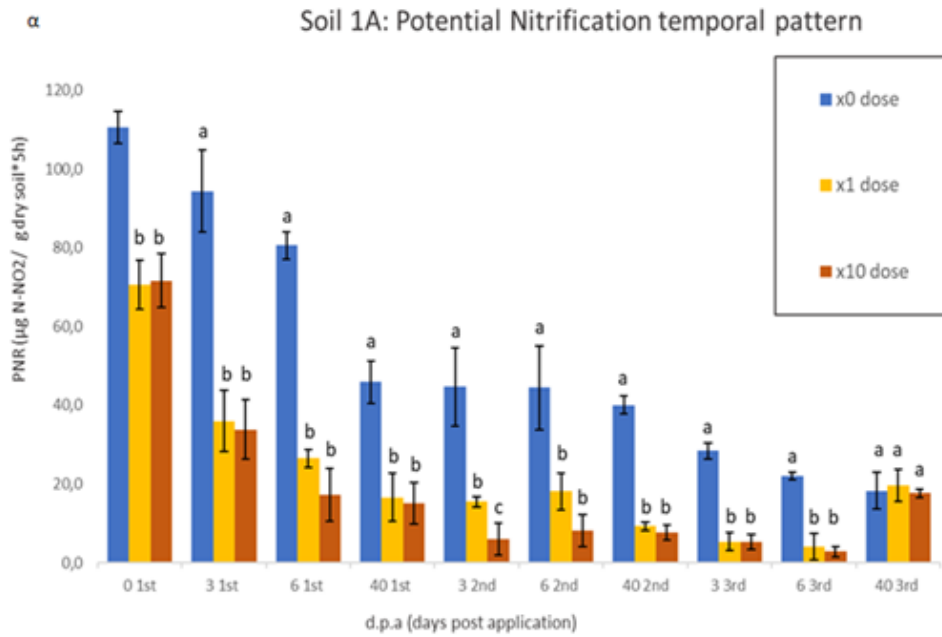




Διάγραμμα 2. Επίδραση του Albendazole στη συγκέντρωση των NO₃⁻ στο έδαφος 1^A (α) και στο 7B (β). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.1.3 Επίδραση του Albendazole στο ρυθμό της δυνητικής νιτροποίησης

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της επίδρασης του albendazole στο ρυθμό της δυνητικής νιτροποίησης στα εδάφη 1A και 7B παρατίθενται στα Διαγράμματα 3α και 3β, αντίστοιχα. Και στα δύο εδάφη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική και άμεση μείωση στο ρυθμό της δυνητικής νιτροποίησης από την πρώτη εφαρμογή του albendazole, σε όλες τις μεταχειρίσεις, όπου εφαρμόστηκε το albendazole, συγκριτικά με τον μάρτυρα. Συγκεκριμένα στο έδαφος 1A παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα NO₂⁻ ανάμεσα στον μάρτυρα και τις μεταχειρίσεις x1 και x10 σε όλα σχεδόν τα χρονικά σημεία δειγματοληψίας. Εξάιρεση αποτελεί η 40^η μέρα της τρίτης εφαρμογής όπου ο ρυθμός της δυνητικής νιτροποίησης παρουσιάζει παρόμοιο επίπεδο σε όλες τις μεταχειρίσεις. Επιπλέον, στο έδαφος 1A παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης και στο έδαφος μάρτυρα σε σχέση με τον χρόνο (Διάγραμμα 3α). Στην περίπτωση του εδάφους 7B παρατηρήθηκε μια παρόμοια εικόνα στα επίπεδα των NO₂⁻ ανάμεσα στις διαφορετικές μεταχειρίσεις, με την επίδραση του albendazole να είναι πιο έντονη τις πρώτες ημέρες κάθε εφαρμογής, και για τα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, και να παραμένει σημαντική μέχρι το τέλος της 3^{ης} εφαρμογής (Διάγραμμα 3β).

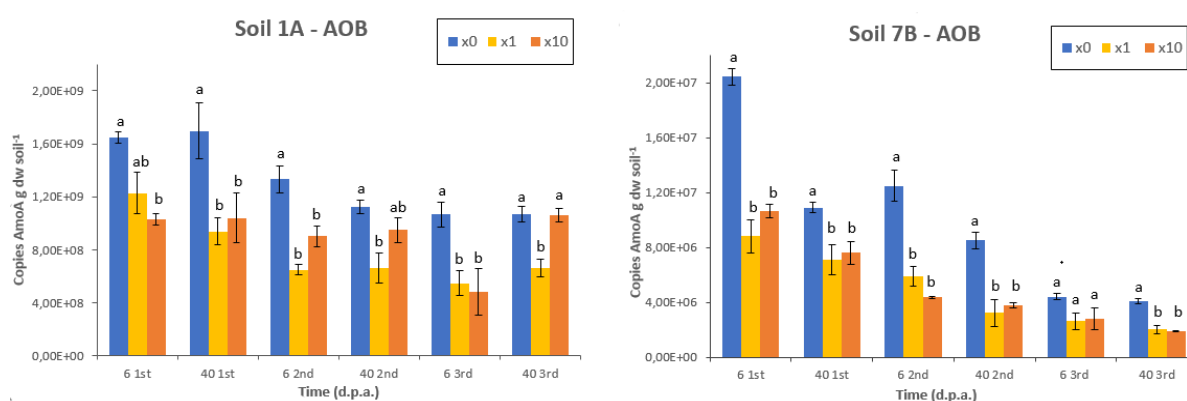


Διάγραμμα 3. Επίδραση του Albendazole στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης ($\mu\text{g NO}_2/\text{g ξβ εδάφους 5H}$) στο έδαφος 1A (α) και στο 7B (β). Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.2 Επίδραση του Albendazole στην αφθονία των νιτρωδοποιητικών μικροοργανισμών

3.2.1 Επίδραση του Albendazole στην αφθονία των AOB

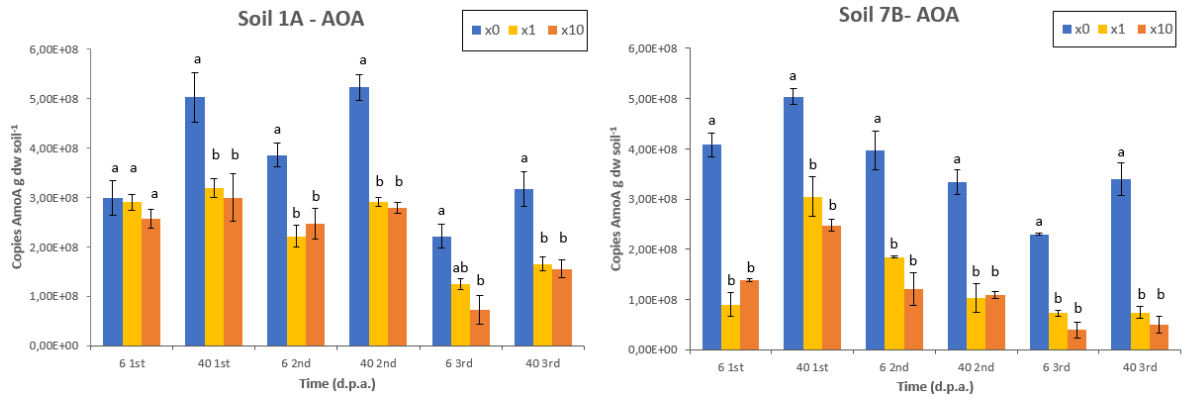
Τα αποτελέσματα της επίδρασης του Albendazole στην αφθονία των AOB, απεικονίζονται στο Διάγραμμα 4. Και στα δύο εδάφη παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση ($p < 0,05$) της αφθονίας των AOB στις μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκε albendazole και στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων ($x1$ και $x10$), σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Εξάιρεση αποτελεί στο έδαφος 1A η 40^η μέρα της 2^{ης} και 3^{ης} εφαρμογής όπου στην μεταχείριση $x10$ η αφθονία των AOB είναι παρόμοια με αυτή στο έδαφος μάρτυρα. Στην περίπτωση του εδάφους 7B παρατηρήθηκε μια πιο έντονη απόκλιση ανάμεσα στον μάρτυρα και στις μεταχειρίσεις $x1$ και $x10$ κυρίως στις πρώτες δύο εφαρμογές του albendazole.



Διάγραμμα 4. Επίδραση του Albendazole στην αφθονία του amoA γονιδίου των νιτρωδοποιητικών βακτηρίων στο έδαφος 1A και στο 7B. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.2.2 Επίδραση του Albendazole στην αφθονία των AOA

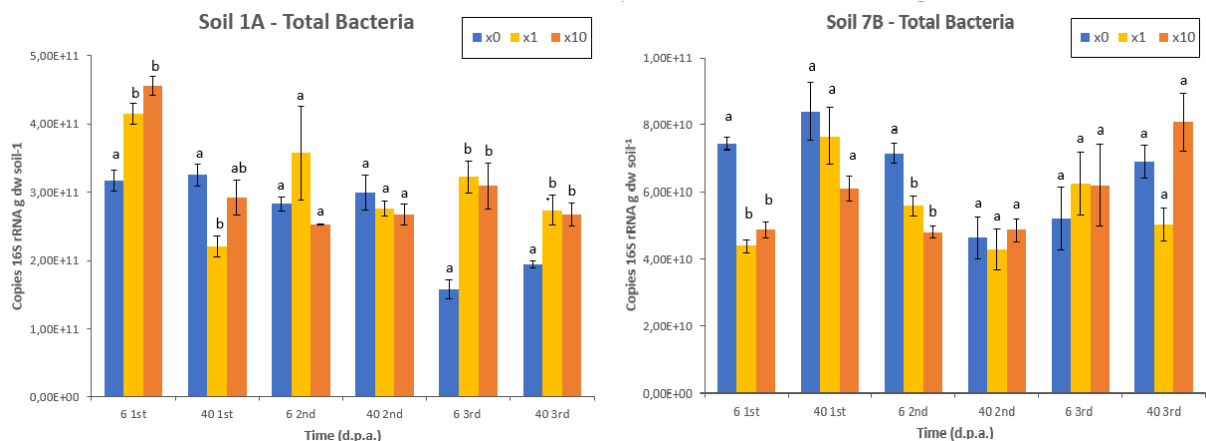
Τα αποτελέσματα της επίδρασης του Albendazole στην αφθονία των AOA, παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 5. Όπως και στην περίπτωση των AOB, παρατηρήθηκε και στα δύο εδάφη στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) μείωση της αφθονίας των AOA, στις μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκε το albendazole, και στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, σε σύγκριση με τα δείγματα μάρτυρες, σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, τόσο κατά τη διάρκεια του πειράματος όσο και σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η διαφορά αυτή παρατηρήθηκε πιο έντονα στην περίπτωση του εδάφους 7B.



Διάγραμμα 5. Επίδραση του Albendazole στην αφθονία του *amoA* γονιδίου των νιτρωδοποιητικών αρχαίων στο έδαφος 1A και στο 7B. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.3 Επίδραση του Albendazole στην αφθονία της ευρύτερης βακτηριακής κοινότητας του εδάφους

Στο Διάγραμμα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την επίδραση του Albendazole στην αφθονία της ευρύτερης βακτηριακής κοινότητας του εδάφους στα εδάφη 1A και 7B. Σε αντίθεση με τα AOB και τα AOA, δεν καταγράφηκε μια ξεκάθαρη αρνητική επίδραση του albendazole στον συνολικό πληθυσμό των βακτηρίων, και στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του εδάφους 1A παρατηρήθηκε την 6^η και 40^η ημέρα της τρίτης εφαρμογής μια στατιστικά σημαντική αύξηση της βακτηριακής αφθονίας στις μεταχειρίσεις x1 και x10, σε σχέση με τον μάρτυρα.



Διάγραμμα 6. Επίδραση του Albendazole στην αφθονία του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων στο έδαφος 1A και στο 7B. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

4 Συζήτηση-Συμπεράσματα

4.1 Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη αποτελεί από τις πρώτες μελέτες για την αξιολόγηση της τοξικότητας των βενζιμιδαζολών, και συγκεκριμένα του Albendazole, σε σχέση με την (i) λειτουργία και (ii) την αφθονία των νιτροδωποιοτικών μικροοργανισμών αλλά και (iii) την αφθονία του συνόλου της βακτηριακής κοινότητας του εδάφους.

Τα επίπεδα των NH_4^+ και για τα δύο εδάφη μειώθηκαν με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας για όλες τις μεταχειρίσεις με εξαίρεση παροδικές αυξήσεις των επιπέδων των NH_4^+ που οφείλονται σε εμπλουτισμό των εδαφών με διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Τα αποτελέσματα της μεταβολής των NH_4^+ συμφωνούν με την μεταβολή των επιπέδων των NO_3^- , παρότι η αύξηση των επιπέδων των NO_3^- για τις μεταχειρίσεις x1 και x10 είναι εμφανώς επηρεασμένη από την παρουσία του albendazole. Αντίστοιχες μελέτες για επίδραση ξενοβιοτικών ουσιών στη λειτουργία των νιτροδωποιοτικών ομάδων πραγματοποιήθηκαν από τους Di & Cameron, 2011, τους Li et al., 2008 και τους O'Callaghan et al., 2010, οι οποίοι εξέτασαν τις μεταβολές στα επίπεδα των NH_4^+ και NO_3^- .

Ο ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης παρουσίασε στατιστικά σημαντική και άμεση μείωση και για στα δύο εδάφη και για τα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων του albendazole. Ωστόσο την τελευταία μέρα δειγματοληψίας στο έδαφος 1A παρατηρήθηκε παρόμοια επίπεδα του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης μεταξύ των μεταχειρίσεων x1 και x10 και του μάρτυρα.

Ο ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης, η αφθονία των AOB και των AOA, μελετήθηκαν ως δείκτες τοξικότητας διαφόρων ξενοβιοτικών ουσιών στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους (Paradopolou et al. 2015 Karas et al. 2018, Vasileiadis et al. 2018). Τα αποτελέσματα παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση της αφθονίας των AOB και των AOA με το έδαφος 7B να παρουσιάζει πιο έντονα την επίδραση του φαρμάκου.

Σε αντίθεση με την αφθονία των AOB και των AOA, δεν παρατηρήθηκε ξεκάθαρη τοξική επίδραση του albendazole στον συνολικό πληθυσμό των βακτηρίων. Αξιοσημείωτη είναι η αύξηση που παρατηρείται στο έδαφος 1A την 6^η και 40^η ημέρα της τρίτης εφαρμογής, σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Το αποτέλεσμα αυτό για το έδαφος 1A συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας, όπου ο φοιτητής Σπυρίδων Μαστρογιαννόπουλος στα πλαίσια της πτυχιακής του διατριβής μελέτησε την πιθανότητα εμφάνισης επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης του albendazole στα εδάφη 1A και 7B, έπειτα από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές του albendazole, με το έδαφος 1A να φαίνεται να παρουσιάζει προσαρμογή της μικροβιακής κοινότητας και ενδείξεις επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης του φαρμάκου.

4.2 Συμπεράσματα

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αποτελούν μια πρώτη ένδειξη για πιθανές τοξικές επιδράσεις ξενοβιοτικών ανθελμινθικών φαρμάκων, όπως το Albendazole, στη λειτουργία και την αφθονία των νιτροδωποιοτικών μικροοργανισμών του εδάφους. Περαιτέρω μελέτες αναμένεται να μελετήσουν την επίδραση του Albendazole στην αφθονία άλλων μικροβιακών ομάδων όπως των αρχαίων (total Archaea), των μυκήτων (total fungi), αλλά και στην ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους, με την χρήση μεθόδων αλληλούχισης νέας γενεάς. Τέλος θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί σε in vitro πειράματα ο μηχανισμός τοξικότητας του albendazole έναντι των νιτροδωποιοτικών βακτηρίων και αρχαίων.

5 Βιβλιογραφία

Aceves, J., Erlij, D., Martínez-Marañón, R. (1970). *The mechanism of the paralysing action of tetramisole on Ascaris somatic muscle. British Journal of Pharmacology*, 38(3), 602-607.

Alves, R.J.E, Minh, B.Q., von Haeseler, U., Schleper, C. (2018) *Unifying the global phylogeny and environmental distribution of ammonia-oxidising archaea based on amoA genes. Nat Commun* 9:1517.

Audus, L. J. (1960). *Microbiological breakdown of herbicides in soils, in: Herbicides in the Soil*, pp. 1–19, Blackwell, Oxford.

Beeckman, F., Motte, H., & Beeckman, T. (2018). *Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation. Current Opinion in Biotechnology*, 50, 166–173.

Bernhard, A., (2010) *The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. Nature Education Knowledge*, 3:25.

Brander, G.C., Pugh, D.M., Bywater, R.J., Jenkins, W.L. (1991), *Veterinary applied pharmacology and therapeutic*, Bailliere Tindall, 5th edition.

Brown H, Matzuk A, Ilves I, Peterson L, Harris S, Sarett L, Egerton J, Yakstis J, Campbell W, Cuckler A. (1964). *Antiparasitic drugs IV. 2-(4' -thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. J Am Chem Soc.* 83, 1764–1765.

Burrows, H.D., Canle, L., 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.

Caranto, J.D., Lancaster, K.M. (2017). *Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase.*

Crosby, D.G. (1970). *The non-biological degradation of pesticides in soil. In Pesticides in the Soil. Intern. Symp., Michigan State University.*

Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M. (2015) Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528: 504-509.

Daims, H., Lückner, S., Wagner, M. (2016) A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends Microbiol* 24:699-712.

De Ruyck, H., (2003) *Development of confirmatory methods and disposition of some veterinary drugs in food. Ph.D. Theses.*

Di, H. J. and Cameron, K. C. (2011) Inhibition of ammonium oxidation by a liquid formulation of 3,4-Dimethyl pyrazole phosphate (DMPP) compared with a dicyandiamide (DCD) solution in six New Zealand grazed grassland soils. *J Soil Sediment* 11: 1032–1039.

Diaz, E. (2008). *Microbial Biodegradation Genomics and Molecular* Madrid: Caister Academic Press.

Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 621–631.

Dragana Mutavdzic Pavlovic, Antonija Glavac, Mihaela Gluhak, Mislav Runje, 2018, Sorption of albendazole in sediments and soils: Isotherms and kinetics, *Chemosphere* 193 (2018), 635-644.

Fierer, N., Jackson, J.A., Vilgalys, R., Jackson, R.B. (2005) Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Appl Environ Microbiol* 71: 4117–4120.

Francis, C.A., Roberts, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., Oakley, B.B. (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water column sand sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14683–14688.

Gao, D., Wang, X., Liang, H., Wei, Q., Dou, Y., Li, L. (2018) Anaerobic ammonia oxidizing bacteria: ecological distribution, metabolism, and microbial interactions. *Front Environ Sci Eng* 12:1–15.

García-galán, M.J., Garrido, T., Fraile, J., Ginebreda, A., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D. (2010). Application of fully automated online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the determination of sulfonamides and their acetylated metabolites in groundwater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(2), 795-806.

Gubry-Rangin, C., Nicol, G. W., & Prosser, J. I. (2010). Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(3), 566–574.

Gyurik, R.J., Chow, A.W., Zaber, B., ..., Villani, A.J., Petka, L.A., Parish, R.C. (1981). Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats and mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 9(6), 503-8.

Hamaker, J.W. (1975). The Interpretation of Soil Leaching Experiments. *Environmental Dynamics of Pesticides*, 6, 115-133.

Hermansson A, Lindgren P-E. 2001. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria in arable soil by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:972–76

Hyo-Jung Kim a,b, Dong Soo Lee a , Jung-Hwan Kwon b,c, 2010, Sorption of Benzimidazole Anthelmintics to Dissolved Organic Matter Surrogates and Sewage Sludge, *Chemosphere* 80(3):256-62.

Jetten, M. S. M., Op den Camp, H. J. M., Kuenen, J. G., & Strous, M. (2015). "Candidatus Brocadiaceae" fam. nov. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–10.

Jung, H., Medina, L., García, L., Fuentes, I., Moreno-Esparza, R. (1998). Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulphoxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(1),43-8.

Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., ..., Westlund, B., Sluder, A., Mäser, P. (2008). A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes, *Nature*, 452, 176–180.

Kandeler, E. (1995) Potential nitrification. In: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds.), *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 426.

Karas, P. A., Baguelin, C., Pertile, G., Papadopoulou, E. S., Nikolaki, S., Storck, V., ... Karpouzias, D. G. (2018). Assessment of the impact of three pesticides on microbial dynamics and functions in a lab-to-field experimental approach. *Science of The Total Environment*, 637-638, 636–646.

Kartal, B., & Keltjens, J. T. (2016). Anammox Biochemistry: a Tale of Heme c Proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(12).

Katagi, T., (2004). Photodegradation of Pesticides on Plant and Soil Surfaces. In: Ware G.W. (eds) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Continuation of Residue Reviews*, vol 182. Springer

Kolz, A.C., Ong, S.K., Moorman, T.B. (2005) Sorption of tylosin onto swine manure. *Chemosphere*, 60(2):284-9.

Kowalchuk, G. A., & Stephen, J. R. (2001). Ammonia-Oxidizing Bacteria: A Model for Molecular Microbial Ecology. *Annual Review of Microbiology*, 55(1), 485–529.

Kreuzig, R., Blümlein, K., Sibylla Höltge, S. (2007). Fate of the Benzimidazole Antiparasitics Flubendazole and Fenbendazole in Manure and Manured Soils. *Clean Soil Air Water*, 488-494.

Kuypers, Marcel M. M.; Marchant, Hannah K.; Kartal, Boran (2018). *The microbial nitrogen-cycling network. Nature Reviews Microbiology.*

Lacey E. (1990). *Mode of action of benzimidazoles. Parasitol Today.* 6, 112–115.

Lehtovirta-Morley, L.E. (2018) *Ammonia oxidation: Ecology, physiology, biochemistry and why they must all come together. FEMS Microbiol Lett* 365:142-147.

Lehtovirta-Morley, L.E., Verhamme, D.T., Nicol, G.W., Prosser, J.I. (2013) *Effect of nitrification inhibitors on the growth and activity of Nitrosotalea devanaterra in culture and soil. Soil Biol Biochem* 62:129-133.

Li, H., Chen, Y., Liang, X., Lian, Y., Li, W. (2008) *Mineral-nitrogen leaching and ammonia volatilization from a rice-rapeseed system as affected by 3,4-dimethylpyrazole phosphate. J Environ Qual* 38(5):2131-7.

Li, Y., Chapman, S., J., Nicol, G., W, Yao, H. (2018) *Nitrification and nitrifiers in acidic soils. Soil Biol Biochem* 116: 290–301.

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

Liu, T., Liang, Y., Chu, G. (2017) *Nitrapyrin addition mitigates nitrous oxide emissions and raises nitrogen use efficiency in plastic-film-mulched drip-fertigated cotton field. PLoS One* 12: e0176305.

Loke, P., MacDonald, A.S., Robb, A., Maizels, R.M., Allen, J.E. (2000). *Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact. European Journal of Immunology,* 30(9), 2669-78.

Lücker, S. et al. (2010) *A Nitrospira metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 13479–13484.

Martin, D., Bertasi, F., Colangelo, M.,, Satta, P., Thompson, Ceccherelli, V. (2005). *Ecological impact of coastal defence structures on sediment and mobile fauna: Evaluating and forecasting consequences of unavoidable modifications of native habitats. Coastal Engineering,* 52 (10-11), 1027-1051.

Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A. (2001) *A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide.* 5:62-71.

Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., Prosser, J.I. (2008) *The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. Environ Microbiol* 10:2966–2978.

Norman, A. G., & Frederick, L. R. (1965). *Microbial Populations by Direct Microscopy*. Agronomy Monograph.

O'Callaghan, M., Gerard, E.M., Carter, P.E., Lardner, R., Sarathchandra, U., Burch, G., Ghani, A., Bell, N. (2010) Effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on microbial communities in a pasture soil amended with bovine urine. *Soil BiolBiochem* 42:1425-1436.

Oscar Barrón-Bravo, Ismael Montiel-Maya, Ana Cruz-Avalos, Fidel Avila-Ramos, Jaime Molina Ochoa and César Angel-Sahagún 2021. *Entomopathogenic Nematodes: Biological Model of Studies with Anthelmintics*.

Papadopoulou, E. S., Tsachidou, B., Sułowicz, S., Menkissoglu-Spiroudi, U., & Karpouzas, D. G. (2015). Land Spreading of Wastewaters from the Fruit-Packaging Industry and Potential Effects on Soil Microbes: Effects of the Antioxidant Ethoxyquin and Its Metabolites on Ammonia Oxidizers. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 747–755.

Pemberton, D.J., Franks, C.J., Walker, R.J., Holden-Dye, L. (2001). Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl- α 2 in the function of the native receptor. *Molecular Pharmacology*, 59, 1037–1043.

Pitcher, A., Rychlik, N., Hopmans, E.C. Spieck, E., Irene, W., Rijpstra, C., Ossebaar, J., Schouten, S., Wagner, M., Sinninghe Damsté J.S. (2010) Crenarchaeol dominates the membrane lipids of *Candidatus Nitrososphaera gargensis*, a thermophilic Group I. 1b Archaeon. *ISME J* 4: 542–552.

Prosser, J. I., Hink, L., Gubry-Rangin, C., & Nicol, G. W. (2019). Nitrous oxide production by ammonia oxidisers: Physiological diversity, niche differentiation and potential mitigation strategies. *Global Change Biology*.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. (1999). *Pharmacology*, 4th Edition, Churchill.

Rao, P.S.C., Hornsby, A.G., (2001). *Behavior of pesticides in Soil and Water*. Institute of food and Agricultural Science, University of Florida. Florida. U.S.A.

Rillig, M.C., Caldwell, B.A., Wosten, H.A.B., Sollins, P. (2007) Role of proteins in soil carbon and Nitrogen storage: controls on persistence. *Biogeochemistry* 85:25-44.

Riviere, J.E., Papich, M.G. (2018). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10th Edition, Wiley-Blackwell, Hoboken 1035-1037.

Romillac, N. (2018). Ammonification. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences.

Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63:4704–4712.

Sager, H., Hosking, B., Bapst, B., Stein, P., Vanhoff, K., Kaminsky, R. (2009). Efficacy of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, against experimental and natural adult stage gastrointestinal nematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, 159, 49–54

Schleper, C., & Nicol, G. W. (2010). Ammonia-Oxidising Archaea – Physiology, Ecology and Evolution. *Advances in Microbial Physiology*, 1–41.

Schmid M, Twachtmann U, Klein M, Strous M, Juretschko S, et al. 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonia oxidation. *Syst. Appl. Microbiol.* 23:93–106

Shen, T.L., Stieglmeier, M., Dai, J.L., Urich, T., Schleper, C. (2013) Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrospira multiformis* to nitrification inhibitors. *FEMS Microbiol Lett* 344: 121–129.

Shyam Prasad Gurram; Narasimha Rao Kollu; Girisham Sivadevuni; Madhusudan Reddy Solipuram, 2009, Biotransformation of Albendazole by *Cunninghamella blakesleeana*: Influence of Incubation Time, Media, Vitamins and Solvents, *Iranian Journal of Biotechnology*, Article 2, Volume 7, Issue 4, Autumn 2009, Page 205-215.

Soler-Jofra, A., Perez, J., C.M van Losdrecht, M. (2020). Hydroxylamine and the nitrogen cycle: A review.

Subbarao, G.V., Ito, O., Sahrawat, K.L., Berry, W.L., Nakahara, K., Ishikawa, T., et al. (2006) Scope and Strategies for Regulation of Nitrification in Agricultural Systems - Challenges and Opportunities. *Crit Rev Plant Sci* 25:303–335.

Teeter, J.S., Meyerhoff, R.D. (2003). Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environmental Research*, 93(1), 45-51.

Teske A, Elm E, Regan JM, Toze S, Rittmann BE, Stahl DA. 1994. Evolutionary relationships among ammonia and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol.* 176:6623–30

Tourna, M., Freitag, T.E., Nicol, G.W., Prosser, J.I. (2008) Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms. *Environ Microbiol.* 10:1357-64.

Van De Steene, J.C., Stove, C.P., Lambert, Willy E. (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.

Shyam Prasad Gurram; Narasimha Rao Kollu; Girisham Sivadevuni; Madhusudan Reddy Solipuram, 2009, Biotransformation of Albendazole by *Cunninghamella blakesleeana*: Influence of Incubation Time, Media, Vitamins and Solvents, *Iranian Journal of Biotechnology*, Article 2, Volume 7, Issue 4, Autumn 2009, Page 205-215.

Vasileiadis, S., Puglisi, E., Papadopoulou, E. S., Pertile, G., Suci, N., Pappolla, R. A., ... Karpouzias, D. G. (2018). Blame it on the metabolite: 3,5-dichloroaniline rather than the parent

compound is responsible for decreasing diversity and function of soil microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*.

Verbaendert, I., De Vos, P., Boon, N., & Heylen, K. (2011). Denitrification in Gram-positive bacteria: an underexplored trait. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), 254-258.

Walker, C.B., De La Torre, J.R., Klotz, M.G., et al. (2010). *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:8818–8823.

Ward, B.B., Capone, D.G., Zehr, J.P., 2007. What's new in the nitrogen cycle? *Oceanography* 20, 101–109.

Watson SW, Bock E, Harms H, Koops H-P, Hooper AB. 1989. Nitrifying bacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Microbiology*, ed. JT Staley, MP Bryant, N Pfennig, JG Holt, 3:1808–34.

Wohde, M., Berkner, S., Junker, T., Konradi, S., Schwarz, L., Düring, R.A. (2016) Occurrence and transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in manure: a literature review. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 23.

World Health Organisation (2012) *Soil-transmitted helminthiases: eliminating soil-transmitted helminthiases as a public health problem in children: progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020*.

Wu Min & Jiye Hu, 2013, *Residue Analysis of Albendazole in Watermelon and Soil by Solid Phase Extraction and HPLC*, *Journal Analytical Letters*, Volume 47, 2014 - Issue 2, Pages 356-366.

Zaman, M., Saggat, S., Blennerhassett, J.D., Singh, J. (2009) Effect of urease and nitrification inhibitors on N transformation, gaseous emissions of ammonia and nitrous oxide, pasture yield and N uptake in grazed pasture system. *Soil Biol Biochem* 41: 1270-1280.

Κυδωνάκης, Γ. (2010). Πτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος