



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΕΛΜΙΝΘΙΚΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ
EPRINOMECTIN ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ
ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΛΑΦΟΥΣ»

ΔΙΑΜΑΝΤΗ ΛΑΜΠΡΙΝΗ

Λάρισα, 2022



UNIVERSITY OF
THESSALY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

"TOXICITY STUDY OF THE ANTHELMINTIC
DRUG EPRINOMECTIN IN THE SOIL
MICROBIAL COMMUNITY"

DIAMANTI LAMPRINI

Larissa, 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΕΛΜΙΝΘΙΚΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ
EPRINOMECTIN ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ
ΚΟΙΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΛΑΦΟΥΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΗΣ ΣΩΤΗΡΙΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας – Γονιδιωματικής, του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ

Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λάρισα, 2022

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Καρπούζα Δημήτρη για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω σε μια πάρα πολύ σημαντική έρευνα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη συνεχή καθοδήγησή 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 κα. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, τον κ. Καρπούζα Δημήτρη και τον κ. Βασιλειάδη Σωτήρη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο Διδάκτορα του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος Λαγό Στάθη για την υπέροχη συνεργασία που είχαμε, τις χρήσιμες συμβουλές του, την αμέριστη καθοδήγηση και υποστήριξή του που μου προσέφερε σε κάθε βήμα της έρευνας, καθώς και της διεκπεραίωσης της εργασίας αυτής.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για τη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και αγάπη, που συνεχώς μου προσφέρουν.

Περίληψη

Το άζωτο είναι αναμφισβήτητα το πιο σημαντικό θρεπτικό συστατικό στη ρύθμιση της πρωτογενούς παραγωγικότητας και της ποικιλότητας των ειδών τόσο στα υδάτινα όσο και στα χερσαία οικοσυστήματα. Οι μικροβιακές διεργασίες, όπως η δέσμευση αζώτου, η νιτροποίηση και η απονιτροποίηση, αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των μετασχηματισμών του αζώτου και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην τύχη του αζώτου στα οικοσυστήματα. Ωστόσο από τις προαναφερθείσες διεργασίες η νιτροποίηση είναι αυτή που αποτελεί τη ρυθμό-καθοριστική διεργασία του κύκλου του αζώτου και πραγματοποιείται σε δύο στάδια από νιτροδοποιητικά βακτήρια (Ammonia Oxidizing Bacteria: AOB) ή αρχαία (Ammonia Oxidizing Archaea: AOA) (NH_3 προς NO_2^- , «Νιτροδοποίηση») και νιτριοποιητικά βακτήρια (Nitrite Oxidizing Bacteria: NOB) (NO_2^- προς NO_3^- , «Νιτριοποίηση»). Η παρουσία επομένως αυτών των μικροβιακών ομάδων στο έδαφος καθώς και η σωστή λειτουργία τους είναι κομβικής σημασίας. Ωστόσο, ξеноβιοτικές ενώσεις που καταλήγουν στο έδαφος ως αποτέλεσμα της ανθρώπινης δραστηριότητας, όπως είναι τα γεωργικά ή τα κτηνιατρικά φάρμακα, μπορούν να προκαλέσουν φαινόμενα οικοτοξικότητας στους νιτροδοποιητές μικροοργανισμούς επηρεάζοντας έτσι την ισορροπία των εδαφικών οικοσυστημάτων και του κύκλου του αζώτου.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η πιθανή τοξικότητα, στους νιτροδοποιητές μικροοργανισμούς του εδάφους, του κτηνιατρικού φαρμάκου ivermectin (EPM), το οποίο ανήκει στην κατηγορία των ανθελμινθικών και χρησιμοποιείται στην κτηνοτροφία για την καταπολέμηση των ελμίνθων του γαστρεντερικού σωλήνα, κύριων παθογόνων που προκαλούν παρασιτώσεις στα βοοειδή και στα αιγοπρόβατα. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση του EPM σε δύο επιλεγμένα εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες της νήσου Λέσβου, στα οποία εφαρμόστηκε το EPM σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, της αναμενόμενης περιβαλλοντικής συγκέντρωσης σε ρυπασμένα εδάφη (X_1) καθώς και σε συγκέντρωση δεκαπλάσια αυτής που αντιστοιχεί σε περίπτωση υψηλής ρύπανσης (X_{10}) μέσω επαναλαμβανόμενων εφαρμογών. Παράλληλα υπήρχαν και δείγματα εδάφους όπου δεν πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του φαρμάκου (δείγματα μάρτυρες X_0). Εξετάστηκε η επίδρασή του: α) στη λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών μέσω προσδιορισμού των επιπέδων αμμωνιακών, νιτρικών και του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης, β) στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών (AOB, AOA) και γ) στην αφθονία συνολικά των βακτηρίων στο έδαφος μέσω qPCR.

Τα αποτελέσματα της μεταπτυχιακής μελέτης υποδεικνύουν μια αρνητική επίδραση του EPM τόσο στη λειτουργία όσο και στην αφθονία των AOB και AOA και στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων (X_1 και X_{10}) σε σχέση με τα δείγματα μάρτυρες. Με την επίδραση αυτή να εμφανίζει διακυμάνσεις κατά τη χρονική διάρκεια των επαναλαμβανόμενων εφαρμογών. Όσον αφορά την επίδραση του στην αφθονία της συνολικής βακτηριακής κοινότητας των μελετώμενων εδαφών, δεν παρατηρήθηκε να είναι σημαντική. Επόμενες μελέτες θα στοχεύσουν στις μεταβολές στη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας των μελετώμενων εδαφών (μέσω αλληλούχισης επόμενης

γενιάς, NGS) λόγω των επαναλαμβανόμενων εφαρμογών του EPM, όπως και πιο στοχευμένη διερεύνηση της πιθανής τοξικής επίδρασης του συγκεκριμένου ανθελμινθικού φαρμάκου σε νιτροδοποιητικά βακτήρια και αρχαία μέσω in-vitro πειραμάτων.

Abstract

Nitrogen is undoubtedly the most important nutrient in regulating primary productivity and species diversity in both aquatic and terrestrial ecosystems. Microbial processes, such as nitrogen fixation, nitrification and denitrification, account for most of the nitrogen transformations and play a critical role in the fate of nitrogen in ecosystems. However, of the above processes, nitrification is the rate-limiting step of the nitrogen cycle and is carried out in two stages by ammonia oxidizing bacteria (AOB) or archaea (AOA) (NH_3 to NO_3^- , “Nitrification”) and nitrate oxidizing bacteria (NOB) (NO_2^- to NO_3^- , “Nitrification”). The presence of these microbial groups in the soil as well as their proper functioning is therefore crucial. However, xenobiotic compounds that end up in soil as a result of human activity, such as pesticides or veterinary drugs, can be toxic to nitrifying microorganisms, thus affecting the balance of soil ecosystems and the nitrogen cycle.

In the present study, the possible toxicity to soil nitrifying microorganisms of the veterinary drug eprinomectin (EPM) was determined. Specifically, we studied the effect of EPM on two selected soils from livestock units on the island of Lesbos was studied, in which the EPM was applied in concentration levels, the expected environmental concentration in contaminated soils (X_1) as well as a concentration ten times higher (X_{10}). EPM was applied in the two soils three times at 60-days intervals. Soil samples where the drug was not applied (X_0) were also included as controls. We explored the effect EPM: a) on the function of nitrifying microorganisms via measurement of the levels of inorganic N pools (ammonium, nitrate) and potential nitrification, b) on the abundance of AOB and AOA via qPCR, c) on the abundance of total bacteria via qPCR.

The results of the postgraduate study indicated a negative effect of EPM on both the function and the abundance of AOB and AOA at both levels of concentrations (X_1 and X_{10}). On the other hand EPM showed no effect on the abundance of total bacteria. Subsequent studies will focus on the effects of EPM on the composition of the microbial community of the studied soils (via next generation sequencing, NGS) and also on the assessment of the inherent toxicity of EPM and of other anthelmintic drugs on AOB and AOA strains in in-vitro assays.

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract.....	6
<u>Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή.....</u>	<u>9</u>
1.1. Πρόληψη και ασθένειες στην κτηνοτροφία.....	9
1.2. Κτηνιατρικά φάρμακα.....	10
1.2.1. Αντιπαρασιτικά φάρμακα – Ανθελμινθικά.....	10
1.2.2. Μακροκυκλικές λακτόνες – Αβερμεκτίνες.....	11
1.2.3. Κίνδυνοι στη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων.....	13
1.3. Το ivermectin και η περιβαλλοντική τύχη του.....	14
1.3.1. Το ivermectin.....	14
1.3.2. Προσρόφηση και κινητική του ivermectin στο έδαφος.....	17
1.3.3. Αποδόμηση του ivermectin στο έδαφος.....	18
1.3.4. Τοξικότητα του ivermectin σε οργανισμούς μη-στόχους.....	19
1.4. Ο κύκλος του αζώτου.....	19
1.4.1. Καθίλωση του αζώτου.....	21
1.4.2. Νιτροποίηση.....	23
1.4.3. Διαδικασία nitrification.....	25
1.4.4. Απονιτροποίηση.....	26
1.4.5. Αμμωνιοποίηση / Ανοργανοποίηση.....	27
1.4.6. Οικολογικές επιπτώσεις των ανθρώπινων αλλαγών στον κύκλο του αζώτου.....	27
1.5. Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση.....	28
1.6. Σκοπός μελέτης.....	30
<u>Κεφάλαιο 2 Πειραματική διαδικασία.....</u>	<u>31</u>
2.1. Δείγματα εδαφών και πειραματικός σχεδιασμός.....	31
2.2. Μελέτη της επίδρασης του ivermectin στους νιτροποιητικούς μικροοργανισμούς.....	34
2.2.1. Προσδιορισμός αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων στο έδαφος.....	34
2.2.1.α. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης αμμωνιακών ιόντων στο έδαφος.....	35
2.2.1.β. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων στο έδαφος.....	36
2.2.2. Προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης.....	37
2.3. Προσδιορισμός της αφθονίας των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών και των βακτηρίων στο έδαφος.....	39
2.3.1. Εξαγωγή DNA από τα δείγματα εδάφους.....	39
2.3.2. Προσδιορισμός της αφθονίας των AOB σε δείγματα εδάφους μέσω qPCR.....	39
2.3.3. Προσδιορισμός της αφθονίας των AOA σε δείγματα εδάφους μέσω qPCR.....	40

2.3.4. Προσδιορισμός της αφθονίας των βακτηρίων σε δείγματα εδάφους μέσω qPCR.....	41
2.4. Στατιστική ανάλυση.....	42
<u>Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα.....</u>	<u>43</u>
3.1. Επίδραση του erpinomectin στη λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών.....	43
3.1.1. Επίδραση του erpinomectin στα επίπεδα των αμμωνιακών ιόντων στο έδαφος.....	43
3.1.2. Επίδραση του erpinomectin στα επίπεδα των νιτρικών ιόντων στο έδαφος.....	45
3.1.3. Επίδραση του erpinomectin στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης.....	47
3.2. Επίδραση του erpinomectin στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών.....	49
3.2.1. Επίδραση του erpinomectin στην αφθονία των AOB.....	49
3.2.2. Επίδραση του erpinomectin στην αφθονία των AOA.....	51
3.3. Επίδραση του erpinomectin στην αφθονία των ολικών βακτηρίων.....	53
<u>Κεφάλαιο 4 Συζήτηση και συμπεράσματα.....</u>	<u>55</u>
4.1. Συζήτηση.....	55
4.2. Συμπεράσματα και προοπτικές.....	56
Βιβλιογραφία.....	57

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή

1.1. Πρόληψη και ασθένειες στην κτηνοτροφία

Με τη συνεχή αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, που σήμερα υπολογίζεται στα 7,9 δισεκατομμύρια και μέχρι το 2050 θα έχει φτάσει τα 9,7 δισεκατομμύρια, οι ανάγκες για τρόφιμα έχουν πολλαπλασιαστεί. Ένας από τους κύριους τρόπους για να επιτευχθεί η προσπάθεια αυτή, η αύξηση παραγωγής τροφίμων, είναι η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων στην κτηνοτροφία. Τα κτηνιατρικά φάρμακα συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη της ζωικής παραγωγής, τόσο με την αύξηση της ποσοτικής διαθεσιμότητας των τροφίμων όσο και με τη βελτίωση της ποιότητας αυτών των τροφίμων, λόγω της μείωσης της μετάδοσης ασθενειών μέσω της τροφικής αλυσίδας (Martin et al., 2010). Με αυτό τον τρόπο υπάρχει καλύτερη και με λιγότερες απώλειες κτηνοτροφική παραγωγή, αλλά και βελτίωση των μεθόδων εκτροφής των ζώων.

Παγκοσμίως η κτηνοτροφία είναι ένας από τους πιο δυναμικούς παραγωγικούς κλάδους και αποτελεί βασικό κομμάτι της οικονομίας και στην Ελλάδα, μια χώρα με παράδοση στην εκτροφή προβάτων και αιγών. Ο σημαντικότερος λόγος εκτροφής αιγοπροβάτων είναι η παραγωγή γάλακτος με στόχο την παραγωγή τυριών, καθώς και η παραγωγή κρέατος. Ωστόσο, εκτός από τα οικονομικά οφέλη, η ζωική παραγωγή έχει ιδιαίτερη κοινωνική και περιβαλλοντική αξία, συμβάλλοντας αφενός στη διατήρηση του κοινωνικού ιστού στην ύπαιθρο και αφετέρου στην ανάπτυξη περιοχών της χώρας ακατάλληλες για άλλες χρήσεις.

Δυστυχώς, η κτηνοτροφική παραγωγή έχει μεγάλες απώλειες λόγω των διαφόρων εχθρών, όπως παράσιτα, έντομα, παθογόνους μικροοργανισμούς, που αν δεν αντιμετωπιστούν άμεσα μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρή μείωση της παραγωγής. Μερικά από τα κύρια προβλήματα της αιγοπροβατοκτηνοτροφίας στην Ελλάδα είναι: α) οι υποτυπώδεις και συχνά ακατάλληλοι στάβλοι που υποβαθμίζουν την υγεία και την ευημερία των εκτρεφόμενων ζώων και β) η έλλειψη πρωτοκόλλων διαχείρισης της υγείας των ζώων (Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας 2016). Ο συνδυασμός αυτών οδηγεί σε υψηλή θνησιμότητα του ζωικού κεφαλαίου από παρασιτικές ασθένειες. Έμμεσες συνέπειες προκύπτουν λόγω του κόστους αποπαρασίτωσης και της απόρριψης προϊόντων, όπως το γάλα, λόγω της παρουσίας υπολειμμάτων φαρμάκων σε αυτά. Οι έντονες πρακτικές παραγωγής στη σύγχρονη κτηνοτροφία έχουν φέρει στο προσκήνιο νέες ανησυχίες σχετικά με τη διαχείριση των εκτρεφόμενων ζώων και τις αλληλεπιδράσεις τους. Τα ζώα είναι συνήθως σε πολύ στενή επαφή, υπάρχει λιγότερος διαθέσιμος χώρος, επομένως οι πρακτικές πρόληψης ασθενειών είναι πολύ πιο σημαντικές από τη θεραπεία τους.

Η πιο συνηθισμένη ασθένεια στην αιγοπροβατοκτηνοτροφία είναι η παρασίτωση, ο ελληνικός και διεθνής όρος παρασίτωση (parasitosis) χρησιμοποιείται ως ιατρικός όρος, με τον οποίο χαρακτηρίζεται, η μόλυνση που οφείλεται σε παράσιτο. Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί ο κίνδυνος και η αδυναμία ελέγχου των παρασιτικών λοιμώξεων στα πρόβατα και στις αίγες. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται σε

δύο γεγονότα. Το πρώτο σχετίζεται με τις συνεχείς αγοραπωλησίες προβάτων μεταξύ χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, που οδηγεί στην εξάπλωση παρασιτικών ειδών σε νέες τοποθεσίες. Η δεύτερη αιτία θεωρείται ότι είναι η κλιματική αλλαγή που σχετίζεται με την επίδραση της θερμοκρασίας και των βροχοπτώσεων στην επιδημιολογία των παρασιτικών οργανισμών (Taylor 2012). Τα παράσιτα έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται στις αλλαγές του περιβάλλοντός τους μέσω της εξέλιξης, αλλά η κλιματική αλλαγή, εκτός του ότι έχει άμεσο αντίκτυπο στους έλμινθες, μπορεί να δράσει και έμμεσα σε αυτούς. Αυτό μπορεί να συμβεί αλλάζοντας τη διαθεσιμότητα ή τις συνθήκες των ξενιστών τους ή αλλάζοντας τα χαρακτηριστικά της γεωργικής γης που χρησιμοποιείται για την κτηνοτροφία (Morgan et al. 2019).

1.2. Κτηνιατρικά φάρμακα

Ως κτηνιατρικό φάρμακο ορίζεται οποιαδήποτε ουσία ή συνδυασμός ουσιών που φαίνεται να έχει θεραπευτικές ή προφυλακτικές ιδιότητες έναντι ασθενειών των ζώων. Τα περισσότερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία έχουν τρεις συγκεκριμένους σκοπούς: α) να θεραπεύσουν τομές και εκδορές, β) να επιταχύνουν την ανάπτυξη των ζώων και γ) να καταπολεμήσουν τα παράσιτα. Υπάρχουν, λοιπόν, πέντε κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται πιο συχνά:

- Τοπικά αντισηπτικά, βακτηριοκτόνα και μυκητοκτόνα,
- Ιονοφόρα, που επηρεάζουν τη μικροχλωρίδα του στομάχου,
- Ορμόνες και ουσίες που μιμούνται τη δράση των ορμονών για την ενίσχυση της παραγωγής.
- Αντιπαρασιτικά φάρμακα,
- Αντιβιοτικά για τον έλεγχο της εμφάνισης και της εξάπλωσης της νόσου και την πρόωθηση της ανάπτυξης (Animals, Health, and Council 1999).

Για την επιλογή του κατάλληλου κτηνιατρικού φαρμάκου, λοιπόν, πρέπει να υπάρχει γνώση του είδους του παθογόνου που πρέπει να αντιμετωπιστεί, όπως παθογόνα (π.χ. βακτήρια, μύκητες) ή παράσιτα (π.χ. τσιμπούρια, έλμινθες).

1.2.1. Αντιπαρασιτικά φάρμακα - Ανθελμινθικά

Για πολλά χρόνια, η πρόληψη και η θεραπεία των παρασιτώσεων στηρίζεται, ως επί το πλείστον, στη χρήση ανθελμινθικών κτηνιατρικών φαρμάκων που είναι τα πιο αποτελεσματικά, εύκολα στη χρήση, γρήγορα και οικονομικά μέσα ελέγχου των παρασίτων διατηρώντας παράλληλα τις αυξημένες αποδόσεις παραγωγής. Τα αντιπαρασιτικά φάρμακα χωρίζονται σε:

- Ένδοπαρασιτοκτόνα φάρμακα (endocides), που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ενδοπαρασίτων.
- Έκτοπαρασιτοκτόνα φάρμακα (ectocides), για την καταπολέμηση των εξωπαρασίτων και
- Ένδοεκτοπαρασιτοκτόνα φάρμακα (endectocides). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν φάρμακα που έχουν ταυτόχρονα αντιπαρασιτική δράση τόσο για τα

ενδο- όσο και για τα εκτοπαράσιτα.

Τα ανθελμινθικά φάρμακα είναι μια κατηγορία αντιπαρασιτικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ελμίνθων (νηματώδεις, κεστώδεις, τρηματώδεις) που μολύνουν σε μεγάλο βαθμό τα ζώα παραγωγής όπως τα μικρά μηρυκαστικά. Χωρίζονται σε τέσσερις μεγάλες ομάδες με βάση τη χημική τους δομή (Γαλλίδης 2012):

- Βενζιμιδαζόλες και προ-βενζιμιδαζόλες,
- Ιμιδαζοθειαζόλες και τετραϋδροπυριμιδίνες,
- Μακροκυκλικές λακτόνες,
- Παράγωγα αμινο-ακετονιτριλίου.

Τον περασμένο αιώνα ως ανθελμινθικά χρησιμοποιήθηκαν διάφορα χημειοπροστατευτικά έναντι παρασίτων όπως ο θειικός χαλκός, ο μόλυβδος αρσενικού, οι ενώσεις κασσίτερου, η νικοτίνη, η φαινοθειαζίνη που ήταν λιγότερο δραστικά, αλλά και πιο τοξικά για τους υπό θεραπεία οργανισμούς. Ένας από τους κύριους στόχους της έρευνας για την καταπολέμηση των ελμίνθων ήταν η ανακάλυψη νέων ανθελμινθικών φαρμάκων που είναι εξαιρετικά τοξικά για τα παράσιτα και έχουν μικρή έως καθόλου τοξικότητα για τον ξενιστή. Σε αυτό συμβάλλει το γεγονός ότι η αυξημένη τοξικότητα στα παράσιτα οδηγεί στη χορήγηση του φαρμάκου σε πολύ χαμηλότερη δόση από αυτή που χορηγείται από την παλαιότερης γενιάς ανθελμινθικά φάρμακα. (McKellar and Jackson 2004).

Είναι πλέον γνωστό ότι πολλές βιοχημικές διεργασίες και ενζυμικά συστήματα μεσοζωικών παρασίτων που θα μπορούσαν να αποτελέσουν στόχους για ανθελμινθικά φάρμακα είναι κοινά με εκείνα του ξενιστή. Αυτό που απαιτείται στη σύνθεση ενός ιδανικού ανθελμινθικού, είναι να βλάπτει τις βιοχημικές διεργασίες του παρασίτου, οι οποίες δεν είναι κοινές με τον ξενιστή. Σήμερα η δράση των γνωστών ανθελμινθικών βασίζεται σε δύο κύριους μηχανισμούς. Δρουν επηρεάζοντας το νευρο-μυϊκό σύστημα ή τις βιοχημικές αντιδράσεις που εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό του παρασίτου (Μούζουρας 1996).

1.2.2. Μακροκυκλικές λακτόνες-Αβερμεκτίνες

Μεταξύ των πιο σημαντικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα για τη θεραπεία των παρασίτων είναι οι μακροκυκλικές λακτόνες που περιλαμβάνουν ενώσεις που εμπίπτουν σε δύο κατηγορίες, τις αβερμεκτίνες και τις μιλβεμκίνες. Οι πρώτες περιλαμβάνουν τις φαρμακευτικές ενώσεις: doramectin, eprinomectin (EPM), ivermectin, ενώ οι μιλβεμκίνες περιλαμβάνουν τις φαρμακευτικές ενώσεις: milbemycin, moxidectin, selamectin. Χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα και νηματώδη σε πολλά είδη ζώων. Οι αβερμεκτίνες και οι μιλβεμκίνες συνδέονται στενά καθώς αποτελούνται από έναν 16-μελή λακτονικό δακτύλιο. Το ivermectin είναι η πρώτη μακροκυκλική λακτόνη που ανακαλύφθηκε ως ενδο- και εκτο-αντιπαρασιτικό φάρμακο. Η σύνθεσή του είναι ημισυνθετική, ενώ το φυσικό του ανάλογο απομονώθηκε από τον μύκητα *Streptomyces avermitilis*. Εισήχθη στην αγορά το 1981

και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αποτελεσματικό έναντι όλων των παρασίτων έναντι των οποίων έχει δοκιμαστεί μέχρι τώρα, εκτός από τα κεστώδη και τα τρηματώδη. Αν και το ivermectin είναι αποτελεσματικό σε μικρές δόσεις για τον έλεγχο των παρασίτων σε πολλά είδη ζώων, η χρήση του σε γαλακτοπαραγωγά ζώα κατά τις περιόδους παραγωγής γάλακτος δεν συνιστάται, καθώς έχει υψηλή υπολειμματικότητα στο γάλα και εισέρχεται στην τροφική αλυσίδα (Gwaltney-Brant et al. , 2018).

Οι μακροκυκλικές λακτόνες ασκούν τη φαρμακολογική τους δράση μέσω της υψηλής συγγένειας πρόσδεσης που έχουν για τα προσδετοελεγχόμενα κανάλια χλωρίου, ιδιαίτερα αυτά που ελέγχονται από τους νευροδιαβιβαστές GABA και γλουταμινικό. Απαιτούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις για δράσεις που προκαλούνται από το GABA από εκείνες που προκαλούνται από γλουταμινικό (Lanusse et al., 2009). Τα κανάλια που ελέγχονται από το γλουταμινικό είναι μοναδικά για τα ασπόνδυλα. (Trailovic and Nedeljkovic 2011). Η πρόσδεση μακροκυκλικών λακτονών σε προσδετοεξαρτώμενα κανάλια χλωρίου προκαλεί αυξημένη είσοδο χλωρίου μέσω της κυτταρικής μεμβράνης, οδηγώντας σε υπερπόλωση και παράλυση του μυϊκού συστήματος των νηματωδών και των αρθρόποδων. Η παράλυση των μυϊκών κυττάρων του φάρυγγα μειώνει την πρόσληψη τροφής, ενώ η παράλυση των μυών του σώματος εμποδίζει την ικανότητα του παρασίτου να παραμένει στη θέση προτίμησής του πάνω στον ξενιστή, οδηγώντας στο θάνατο των παρασίτων. Επιπλέον, επηρεάζουν τους μύες του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος οδηγώντας σε μείωση της ωοτοκίας (Fellowes et al. 2000). Προσδετοεξαρτώμενα κανάλια που ελέγχονται από το γλουταμινικό και που είναι ευαίσθητα στις μακροκυκλικές λακτόνες βρίσκονται μόνο σε νηματώδεις και αρθρόποδα. Τα κεστώδη και τα τρηματώδη δεν έχουν θέσεις πρόσδεσης για τις μακροκυκλικές λακτόνες, επομένως παραμένουν ανεπηρέαστα από αυτές.

Οι μακροκυκλικές λακτόνες δεν έχουν τοξική επίδραση στα θηλαστικά καθώς δεν μπορούν να περάσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να βρεθούν στον εγκέφαλο. Τα ελεγχόμενα από το GABA κανάλια χλωρίου βρίσκονται μόνο στο ΚΝΣ των θηλαστικών, από το οποίο οι μακροκυκλικές λακτόνες αποκλείονται από τη δράση μιας p-γλυκοπρωτεΐνης ως αντλίας εκροής. Ωστόσο, όταν ο p-γλυκοπρωτεϊνικός μεταφορέας είναι υπερφορτωμένος, για παράδειγμα λόγω υπερβολικής δόσης, ή ελαττωματικός, ή η δράση του αναστέλλεται από άλλο φάρμακο, η είσοδος μακροκυκλικών λακτονών θα οδηγήσει σε τοξική δηλητηρίαση του θηλαστικού (Gwaltney-Brant et al., 2018).

Επομένως, ως κατηγορία, οι μακροκυκλικές λακτόνες θεωρούνται ασφαλείς εάν χρησιμοποιούνται σε κατάλληλες δόσεις και στα κατάλληλα είδη. Τοξική δηλητηρίαση μπορεί να συμβεί σε περίπτωση υπερδοσολογίας (Merola and Eubig 2012) Οι μακροκυκλικές λακτόνες ως αντιπαρασιτικά φάρμακα μπορούν να χορηγηθούν με ένεση, τοπικά ή από το στόμα. Τείνουν να παρουσιάζουν μεγάλους χρόνους παραμονής στους ιστούς και στο πλάσμα κυρίως λόγω της σχετικά αργής απορρόφησής τους, της υψηλής διασποράς τους στους ιστούς, του χαμηλού ποσοστού μεταβολισμού και του χαμηλού ποσοστού απόρριψης (Lanusse et al., 2009a).

Τα χαρακτηριστικά των μακροκυκλικών λακτονών που επηρεάζουν αυτές τις κινητικές ιδιότητες περιλαμβάνουν:

- την ισχυρή προσρόφηση στη γαστρεντερική μεμβράνη,
- την εκτεταμένη ανταλλαγή μεταξύ πλάσματος και ιστών,
- το σχετικά υψηλό βαθμό λιποφιλικότητας και
- την εκτεταμένη εντεροηπατική ανακύκλωση (Canga et al. 2007).

Αν και οι μακροκυκλικές λακτόνες μεταβολίζονται σε κάποιο βαθμό, το 95% μιας δόσης απεκκρίνεται αμετάβλητο στα κόπρανα (Lanusse et al., 2009a).

1.2.3. Κίνδυνοι στη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων

Η χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων συμβάλλει στην οικονομική βιωσιμότητα της κτηνοτροφικής παραγωγής. Ωστόσο, η χρήση τους πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες στα σκευάσματα, ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα, διαφορετικά μπορεί να έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα. Τα οφέλη των κτηνιατρικών φαρμάκων, σε συνδυασμό με το σχετικά χαμηλό κόστος τους, αλλά και την εύκολη πρόσβασή τους έχουν οδηγήσει στην ευρεία χρήση τους σε μεγάλες ποσότητες στη σύγχρονη βιομηχανοποιημένη κτηνοτροφία (Animals, Health, and Council 1999). Υπολογίζεται ότι το 2004, 6.051 τόνοι δραστικών ουσιών καταναλώθηκαν για χρήση στην κτηνοτροφία από χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, συμπεριλαμβανομένων 5.393 τόνων αντιβιοτικών και 194 τόνων αντιπαρασιτικών φαρμάκων (Margalida et al. 2014). Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων δημοσίευσε μια έκθεση που εκτιμά ότι η ποσότητα των αντιβιοτικών που πωλούνται για χρήση στην κτηνοτροφία στις Ηνωμένες Πολιτείες είναι σχεδόν 14.500 τόνοι κάθε χρόνο και αυξάνεται (FDA, 2010).

Η αυξημένη και επαναλαμβανόμενη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων, χωρίς να είναι πλήρως γνωστές οι επιπτώσεις τους σε οργανισμούς μη στόχους και στο περιβάλλον γενικότερα έχουν προκαλέσει ανησυχίες και προβληματισμούς μεταξύ των επιστημόνων σχετικά με τον αντίκτυπο των κτηνιατρικών φαρμάκων στη δημόσια υγεία και στο περιβάλλον (Alistair et al. 2003). Ένα σημαντικό μέρος της ανησυχίας είναι ότι η υπερβολική χρήση φαρμάκων έχει οδηγήσει σε φαινόμενα ανθεκτικότητας των οργανισμών-στόχων σε αυτά. Τόσο η ανθεκτικότητα στα ανθελμινθικά όσο και η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά έχουν παρατηρηθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι ανθεκτικοί οργανισμοί μπορούν επίσης να έχουν άμεσο αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία, καθώς μπορούν να φτάσουν σε αυτούς μέσω της τροφικής αλυσίδας (Sangster et al. 2018, Cheng et al. 2019). Προκειμένου να μειωθεί η ανθεκτικότητα, προτείνεται η διατήρηση κοινών πρωτοκόλλων και συστημάτων διαχείρισης ταυτόχρονα, που θα προβλέπουν τη στοχευμένη χρήση φαρμάκων. Ειδικά στην περίπτωση των αντιβιοτικών, ήδη γίνονται προσπάθειες περιορισμού της χρήσης τους ως ενισχυτών ανάπτυξης, καθώς αυτό θα συμβάλει στη μείωση της εξελικτικής πίεσης που ασκείται στα βακτήρια για την ανάπτυξη μηχανισμών ανοχής και ως εκ τούτου θα καθυστερήσει το αποτέλεσμα ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Aarestrup, et al. 2005).

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μια εντατική προσπάθεια αξιολόγησης των περιβαλλοντικών επιπτώσεων των κτηνιατρικών φαρμάκων. Η έρευνα διεξάγεται προς δύο βασικές κατευθύνσεις: α) να κατανοήσουμε όλους τους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην περιβαλλοντική τύχη των φαρμάκων, δηλαδή τη διασπορά τους στο έδαφος και τον υδροφόρο ορίζοντα. Η ανάπτυξη κατάλληλων νέων αναλυτικών μεθόδων συνέβαλε καθοριστικά στη μέτρηση των επιπέδων ουσιών που μπορεί να μην ήταν μετρήσιμες με παλαιότερες μεθόδους αλλά συνεχίζουν να υπάρχουν σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από αυτές που προβλέπονται σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως νερό, λύματα, έδαφος και ίζημα (Snow et al. 2017), β) η κατανόηση του περιβαλλοντικού κινδύνου των κτηνιατρικών φαρμάκων αποτελείται από μελέτες για την τοξικότητά τους, σε όλα τα τροφικά επίπεδα του οικοσυστήματος από μικροοργανισμούς έως φυτά και άλλους οργανισμούς μη-στόχους. (Van den Brink et al. 2005; Kołodziejaska et al. 2013; Oaks et al. 2004; Bártíková et al., 2016).

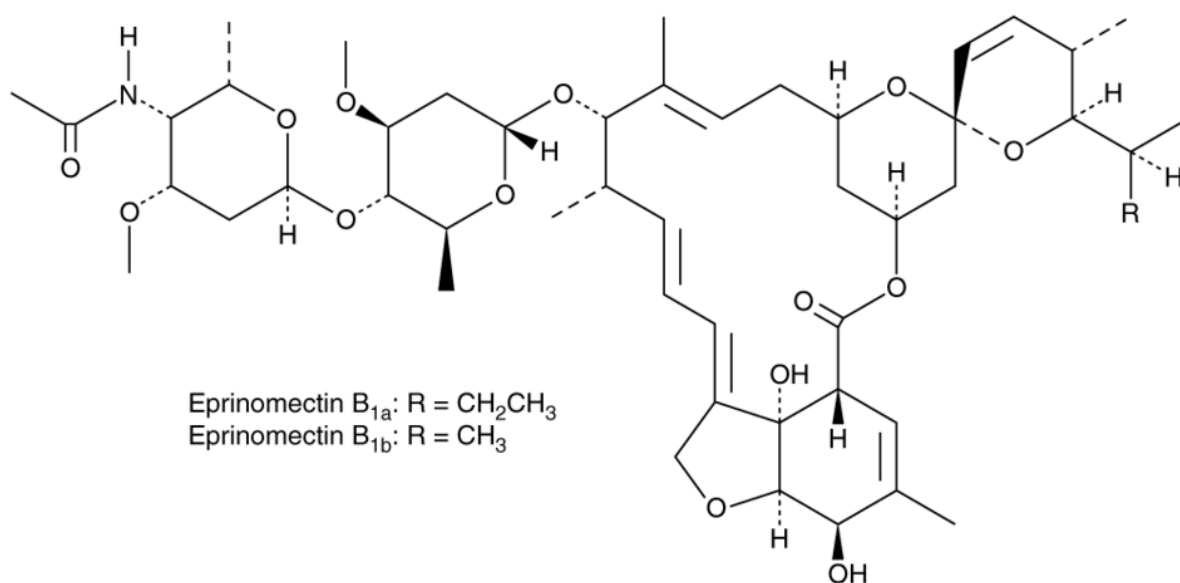
Στο πλαίσιο αυτό έχουν ενταθεί οι μελέτες διερεύνησης της περιβαλλοντικής τύχης αυτών των ουσιών, οι οποίες έχουν την ικανότητα να μετακινούνται από τα ζώα στα εδάφη μέσω των κοπράνων και ούρων (εφαρμογή κοπριάς ή εναπόθεση περιττωμάτων σε λειμώνες βόσκησης) και στην συνέχεια σε άλλα περιβαλλοντικά διαμερίσματα, όπως τα επιφανειακά και τα υπόγεια ύδατα. Στα τελευταία έχουν ανιχνευτεί τα τελευταία έτη, χαμηλά επίπεδα κτηνιατρικών φαρμάκων (Halling-Sorenson et al. 1998, Pope 2009). Άρα πλέον ο στόχος είναι η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων που, εκτός από αυξημένη δράση και αποτελεσματικότητα, διασφαλίζουν τη δημόσια ασφάλεια και την προστασία του περιβάλλοντος τόσο όσον αφορά τις ίδιες τις χημικές ουσίες όσο και τους δυνητικά επιβλαβείς μεταβολίτες τους. Η κατανόηση της τύχης των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι απαραίτητη για την ορθολογική λήψη αποφάσεων σχετικά με την έγκρισή τους (Manuel Arias-Estévez, et al 2008).

1.3. Το eprinomectin και η περιβαλλοντική τύχη του

1.3.1. Το eprinomectin

Το eprinomectin (EPM) είναι μια ημισυνθετική μακροκυκλική λακτόνη, μέλος της οικογένειας των αβερμεκτινών. Η δομή του EPM αποτελείται από έναν 16-μελή μακροκυκλικό δακτύλιο, ομάδα σπироκετάλης, βενζοφουρανικό δακτύλιο και έναν τροποποιημένο δισακχαρίτη που συνδέεται με έναν γλυκοζυτικό δεσμό (Awasthi et al. 2012). Η χημική ονομασία του EPM είναι 4"-deoxy-4"-epiacetyl-amino-avermectin B1 και αποτελείται από ένα μείγμα δύο ομολόγων συστατικών, του B1a (όχι λιγότερο από 90%, M.B.: 914) και του B1b (όχι περισσότερο από 10%, M.B.: 900), τα οποία διαφέρουν μόνο λόγω μίας ομάδας μεθυλενίου στο C₂₅ (Pronk and Schefferlie 1998; Alvinerie et al. 1999). Τα χημικά ονόματα των δύο ομολόγων είναι (4''R)-4''ακετυλαμινο-5-O-διμεθυλ-4''-διοξυαβερμεκτίνη A1a ή EPM B1a και (4''R)-4''ακετυλαμινο-5-O-διμεθυλ-25-δι(1μεθυλπροπυλ)-4''-δεοξυ-25- (1-μέθυλ)αβερμεκτίνη A1a ή EPM B1b (Merck 1996). Τα δύο ομόλογα μπορούν να διαχωριστούν χρωματογραφικά αλλά παρουσιάζουν την ίδια βιοχημική συμπεριφορά και δεν

διαχωρίζονται στην πράξη (Jones et al. 1994). Ουσιαστικά το EPM προέρχεται από το avermectin B1 με την προσθήκη ενός αμινοσακχαρίτη στον άνθρακα C₄ (Cvetovich et al. 1994). Έχει παρόμοια χημική δομή με το ivermectin και το abamectin, με τη διαφορά ότι ένα υδροξύλιο στο C₄ έχει αντικατασταθεί από μια ομάδα ακετυλαμίνης. Επίσης, στο EPM και abamectin υπάρχει διπλός δεσμός μεταξύ των C₂₂ και C₂₃, κάτι που δεν υπάρχει στο ivermectin (Danaher et al. 2006). Έτσι, το ivermectin και abamectin έχουν τρεις περιοχές με ασθενή οξέα, ενώ το EPM έχει δύο ασθενή οξέα και μια ομάδα ακετυλαμίνης. Αυτό μπορεί να επηρεάσει διαφορετικά το EPM όσον αφορά την κινητικότητα του στο έδαφος και την προσρόφησή του σε αυτό.



Εικόνα 1.: Η χημική δομή του EPM.

Το EPM έχει παρόμοιο τρόπο δράσης και δομή με άλλες αβερμεκτίνες, έχοντας την ίδια αποτελεσματικότητα έναντι των περισσότερων παρασίτων στα ζώα και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ενδο- και εκτοπαρασιτώσεων. Η ένωση δεν διασχίζει εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό των θηλαστικών (Wolstenholme 2012). Οι στόχοι του EPM αποτελούνται από ένα ευρύ φάσμα παρασίτων μερικά από τα οποία είναι:

- Οι ασκαρίδες του εντέρου (*Haemonchus placei*, *Ostertagia ostertagi*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus longispicularis*, *Cooperia onchophora*, *Cooperia punctata*, *Cooperia surnabada*, *Nematodirus helvetianus*, *Oesophagostomum radiatum*, *Bunostomum phlebotomum*, *Strongyloides papillosus*, *Trichuris spp.*).
- Οι σκόληκες του πνεύμονα (*Dictiocaulus viviparus*).
- Οι προνύμφες των εντόμων (*Hypoderma lineatum*, *Hypoderma bovis*).
- Οι ψείρες (*Damalia bovis*, *Linognathus vituli*, *Haematopinus eurysternus*, *Solenopotes capillatus*) (Holste 1997).
- Τα ακάρεα της ψώρας (*Chorioptes bovis*, *Sarcoptes scabiei*).
- Τα έντομα (*Haematobia irritans*) (Shoop et al. 1996).

Αν και οι αβερμεκτίνες έχουν παρόμοια δράση, τυχόν διαφορές στη χημική τους δομή οδηγούν σε διαφορές στα δοσολογικά σχήματα, τη φαρμακοκινητική και την τοξικότητά τους, που με τη σειρά τους τις διαφοροποιούν σε δραστηριότητα και αποτελεσματικότητα (Lanusse et al. 1997). Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο το EPM εισήχθη στην αγορά, καθώς χαρακτηρίζεται από πολύ χαμηλή τιμή του λόγου συγκέντρωσής του στο ζωικό γάλα, ενώ ταυτόχρονα είναι πολύ αποτελεσματικό (Shoop et al. 1996; Alvinerie et al. 1999).

Ο χρόνος κατακράτησης στο γάλα μετά τη χορήγηση του EPM στις θηλάζουσες αγελάδες είναι μηδενικός λόγω της πολύ αργής μεταφοράς του σε αντίθεση με άλλες αβερμεκτίνες (Mason et al. 2012). Ο τρόπος εφαρμογής είναι κυρίως με ενστάλαξη κατά μήκος της σπονδυλικής στήλης του ζώου αλλά εφαρμόζεται και σε ενέσιμη μορφή. Οι συνιστώμενες δόσεις είναι 0,5 mg δ.ο./kg σωματικού βάρους για τις αγελάδες (Lanusse et al. 1997) και 1 mg/kg στα πρόβατα και στις αίγες (Scheuerle et al., 2009). Μόλις το EPM απορροφηθεί, ο μεταβολισμός του γίνεται κυρίως μέσω της χολής με σχεδόν πλήρη απέκκριση του μέσω των κοπράνων (Aksit et al. 2016). Έχει παρατηρηθεί ότι το 89,5% της δόσης απεκκρίνεται αμετάβλητο στα κόπρανα αγελάδας, ενώ ένας πολικός μεταβολίτης του ανιχνεύθηκε επίσης στα κόπρανα σε ποσοστό 7,4% της μητρικής ένωσης (Merck 1996). Στα κόπρανα των βοοειδών το EPM μπορεί να απεκκριθεί σε 0,8-13,6 ημέρες μετά την υποδόρια χορήγηση του και σε 1-20 ημέρες μετά από την τοπική χορήγηση. Η υποδόρια χορήγηση έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη απέκκριση του φαρμάκου μέσω των κοπράνων σε σχέση με την τοπική χορήγηση, 1,1889 και 0,3115 mg την ημέρα ανά kg ζώου αντίστοιχα (Aksit et al. 2016).

Ειδικά λόγω του τρόπου χρήσης του, το EPM είναι πολύ πιο πιθανό να βρεθεί στο περιβάλλον σε μεγάλες ποσότητες από τα ανθελμινθικά φάρμακα που χορηγούνται κυρίως από το στόμα. Ακόμη και αν μικρότερη ποσότητα απεκκρίνεται με τα κόπρανα μέσω τοπικής χορήγησης, υπάρχει πολύ μεγαλύτερη πιθανότητα το φάρμακο να ξεπλυθεί απευθείας από το σώμα του ζώου με νερό. Ωστόσο, τα δεδομένα για την περιβαλλοντική του τύχη είναι σχετικά περιορισμένα, καθώς το φάρμακο χρησιμοποιείται μόνο από το 1997 στις ΗΠΑ και αργότερα σε ορισμένες χώρες της Ε.Ε. Όπως όλες οι αβερμεκτίνες, το EPM χαρακτηρίζεται ως υδρόφοβο μόριο, υψηλού μοριακού βάρους, που προσροφάται στο έδαφος, είναι αδιάλυτο στο νερό, όπου φωτολύεται σχετικά γρήγορα, ενώ στο έδαφος ο χρόνος ημιζωής της μπορεί να είναι μεγαλύτερος από 60 ημέρες, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν (Merck 1996). Ωστόσο, το EPM είναι πιο υδρόφιλο από το τα ivermectin και το abamectin (Holste et al. 1997; Wells 1998) και αυτό μπορεί να το διαφοροποιεί ως προς τη συμπεριφορά του. Τα χαρακτηριστικά του φαρμάκου που μπορεί να ελέγξουν την περιβαλλοντική του τύχη συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1.: Φυσικοχημικές παράμετροι του EPM. Τα στοιχεία προέρχονται από τη μελέτη της Merck 1996 (Καβουνίδης 2014).

Παράμετρος	Μέση τιμή	Συνθήκες προσδιορισμού
pKa	Καμία τιμή σε pH 3 – 10	Υδατικό διάλυμα μεθανόλης 50%
Τάση ατμών (pascal)	$0,533 \pm 0,133 \times 10^{-3}$	$22,5 \pm 0,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Πυκνότητα (g/cm ³)	$1,23 \pm 0,04$	$22 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Σημείο τήξης (°C)	163 – 166	Θερμιδομετρία
Απορρόφηση UV (nm)	244	Υδατικό διάλυμα ακετονιτρίλιου 50%
Διαλυτότητα στο νερό (mg/mL)	$0,0035 \pm 0,0002$	pH $7,3 \pm 0,1$ στους $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Log(οκτανόλης/φωσφορικό διάλυμα pH 6,8)	$5,4 \pm 0,3$	HPLC-UV
Koc	>3000 (3231 – 9208)	1 g έδαφος / 5 g 0,01 M CaCl ₂ σε τρία αμερικάνικα εδάφη
DT ₅₀ έδαφος ($22 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$)	64 ημέρες ¹	Τρία εδάφη, ραδιοσήμανση
DT ₅₀ νερό	0,21 – 1,29 ημέρες	Δοκιμαστικοί σωλήνες, διαυγές υδατικό διάλυμα 1% ακετονιτρίλιο, άφθονη ηλιακή ακτινοβολία
DT ₅₀ υδρόλυση	> 1 χρόνο (σταθερή στην υδρόλυση)	Υδατικά διαλύματα pH 5 – 9, 25°C χωρίς φως

1.3.2. Προσρόφηση και κινητική του eprinomectin στο έδαφος

Όπως αναφέρθηκε, οι αβερμεκτίνες θεωρούνται πολύ δυσκίνητες στο έδαφος (Litskas et al. 2011). Η ιοντική και η λιποφιλική σύνδεσή τους με το έδαφος έχει βρεθεί ότι είναι κρίσιμη για την προσρόφηση του ivermectin. Επίσης μειωμένη προσρόφηση στο έδαφος έχει παρατηρηθεί όταν το κατιονικό φορτίο στο διάλυμα (Ca²⁺) αυξάνεται (Krogh et al. 2008). Επίσης δεδομένα από το LC-MS δείχνουν ότι το ivermectin σχηματίζει σύμπλοκα με NH₄⁺ και Na⁺ (Oppel et al. 2004). Αυτά τα δεδομένα επιβεβαιώνονται και από τον Litskas (2011) για το EPM. Σε αυτή τη μελέτη, προσδιορίστηκε η προσρόφηση και η εκρόφηση του EPM σε τρία διαφορετικά εδάφη. Οι σταθερές προσρόφησης K_d για εδάφη διαφορετικών συστάσεων υποδεικνύουν ότι το EPM προσροφάται καλύτερα σε αργιλώδη εδάφη με τα μεταλλικά στοιχεία αυτών των εδαφών να παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσρόφησης του. Στα αργιλώδη εδάφη υπάρχει κάποιου είδους μη αναστρέψιμη δέσμευση του φαρμάκου με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος του να μην επιστρέφει στην υδατική φάση. Παρατηρήθηκε ότι η προσρόφηση σχετίζεται κυρίως με την ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων του εδάφους (CEC) και την περιεκτικότητά του σε Fe⁺⁺ και Cu⁺⁺. Συμπερασματικά, τόσο οι ομάδες ασθενούς οξέος όσο και η ακετυλομάδα μπορεί να εμπλέκονται σε αυτή την ανταλλαγή και κατά συνέπεια την προσρόφηση του φαρμάκου (Litskas et al. 2011).

Στην επόμενη μελέτη του Litskas (2016), στα ίδια εδάφη προστέθηκε διάλυμα που περιείχε EPM και παρατηρήθηκε ότι η προσρόφησή του έφτασε σε ισορροπία στις 48 ώρες. Η μεγαλύτερη προσρόφηση σε αυτή την περίπτωση σημειώθηκε στα αργιλώδη εδάφη με υψηλότερη περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα και μεγαλύτερη ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ποσότητα του EPM που προσροφάται εξαρτάται από τον τύπο του εδάφους (Litskas et al. 2016). Αυτά τα αποτελέσματα, σε συνδυασμό με τα άλλα, δείχνουν ότι η προσρόφηση των αβερμεκτινών είναι ταχεία στην αρχή και γίνεται πιο αργή καθώς πλησιάζει στην ισορροπία (Gu et al. 2009). Στο έδαφος εξαρτάται από την περιεκτικότητα του φαρμάκου στο υδατικό διάλυμα και εμφανίζεται λόγω της υδροφοβικότητας των αβερμεκτινών και της διαθεσιμότητας θέσεων δέσμησης στην επιφάνεια του εδάφους, όπως η άργιλος και η οργανική ύλη. Οι περιοχές που είναι διαθέσιμες για δέσμηση φαρμάκων καταλαμβάνονται γρήγορα και οι υπόλοιπες είναι πιο δύσκολο να καταληφθούν (Gu et al. 2009). Η προσρόφηση σε έδαφος με ουδέτερο pH ελέγχεται κυρίως από τον μηχανισμό της χημειοπροσρόφησης στον οποίο λαμβάνει χώρα μια χημική αντίδραση μεταξύ της επιφάνειας του εδάφους και του φαρμάκου μέσω των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεών τους. Ένας δεύτερος μηχανισμός λαμβάνει χώρα, αυτός της ενδοσωματικής διάχυσης, ωστόσο δεν είναι τόσο σημαντικός. Η ποσότητα του φαρμάκου που παραμένει στο εδαφικό διάλυμα είναι πιο πιθανό να μετακινηθεί σε βαθύτερα εδαφικά στρώματα και να καταλήξει στα υπόγεια ύδατα (Litskas et al. 2016).

1.3.3. Αποδόμηση του *epinomectin* στο έδαφος

Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι αβερμεκτίνες μπορεί να είναι ασταθείς υπό διάφορες συνθήκες, αλλά αυτά τα δεδομένα μπορεί να διαφέρουν όταν βρίσκονται στο έδαφος. Σε όξινες συνθήκες, έχει παρατηρηθεί αφαίρεση της πλευρικής αλυσίδας καρβοξυλίου στον άνθρακα C₄ των αβερμεκτινών με αποτέλεσμα το σχηματισμό αγλυκόνης. Τα προϊόντα που προέρχονται από αβερμεκτίνες με υπόλειμμα μονοσακχαρίτη ή αγλυκόνης θεωρούνται προϊόντα αποδόμησης και είναι πολύ λιγότερο ή καθόλου δραστικά έναντι των παρασίτων (Awasthi et al. 2012a). Σχηματισμός αγλυκόνης παρατηρείται και στην περίπτωση του EPM (Awasthi et al. 2012b). Οι αβερμεκτίνες είναι επιρρεπείς σε οξείδωση στις θέσεις C₂-C₈. Τέλος, είναι ευαίσθητες στη φωτόλυση σε μήκη κύματος κυρίως κάτω των 280 nm, όπου μπορεί να συμβεί ισομερισμός των διπλών δεσμών στις θέσεις 8.9 και 10.11 που οδηγεί σε διαφορετικά μη αναγνωρισμένα προϊόντα (Awasthi et al. 2012a).

Οι αβερμεκτίνες θεωρούνται γενικά ότι είναι μέτρια έως πολύ υπολειμματικές στα εδάφη. Σχετικά με το EPM μπορούμε να αντλήσουμε δεδομένα από τη μελέτη των Litskas et al (2013). Μετά από 120 ημέρες σε αερόβιες συνθήκες το 21%, 7,6% και 11,6% της συνολικής ποσότητας του EPM παρέμεινε ανιχνεύσιμο στα τρία εδάφη. Σε αποστειρωμένα εδάφη η αποδόμηση ήταν μόνο 5% υποδηλώνοντας τη σημασία των μικροοργανισμών στην αποδόμηση του EPM. Στην κοπριά, το 56% της αρχικής ποσότητας ανιχνεύθηκε μετά από 90 ημέρες και δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω αποδόμηση μετά από αυτό το σημείο. Τα DT₅₀ για τα τρία εδάφη ήταν 53, 30 και 38 ημέρες αντίστοιχα. Με αυτά τα αποτελέσματα το EPM μπορεί να θεωρηθεί μέτρια

υπολειμματικό. Ωστόσο, τα εργαστηριακά αποτελέσματα μπορεί να είναι διαφορετικά από εκείνα σε συνθήκες πεδίου, όπου η βιοαποδόμηση φαίνεται να είναι ακόμη πιο αργή. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι μπορούν να διατηρηθούν στο εργαστήριο ιδανικές συνθήκες για τους μικροοργανισμούς. Η χαμηλή αποδόμηση του EPM στην κοπριά μπορεί να οδηγήσει σε διπλασιασμό της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο έδαφος στο οποίο μια σταθερή ποσότητα του απορρίπτεται εντός τριών ετών, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Δεν εντοπίστηκαν μεταβολίτες για το EPM, ωστόσο υπήρχαν κάποιες ενδείξεις για την παρουσία μεταβολίτη στο έδαφος και την κοπριά μετά από 90 ημέρες (Litskas et al. 2013). Η φωτοαποδόμηση δεν λήφθηκε υπόψη σε αυτή τη μελέτη, καθώς τα δείγματα προστατεύονταν από το φως, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη συνολική αποδόμηση σε συνθήκες πεδίου. Γενικά, τα DT₅₀ για όλες τις αβερμεκτίνες είναι πιθανό να είναι χαμηλότερα όταν βρίσκονται σε εδάφη εκτεθειμένα σε υπεριώδη ακτινοβολία (Halley et al., 1989).

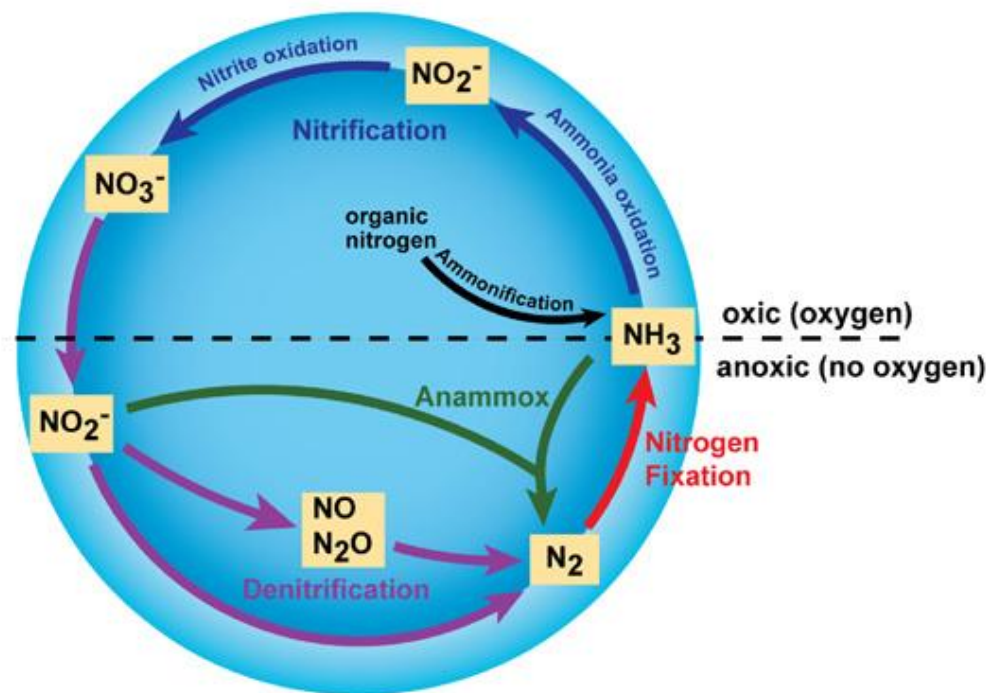
1.3.4. Τοξικότητα του eprinomectin σε οργανισμούς μη-στόχους

Το EPM, όπως και άλλες μακροκυκλικές λακτόνες, είναι πιθανό να προκαλέσει τοξικές επιδράσεις σε οργανισμούς μη-στόχους όταν βρίσκεται στο περιβάλλον. Τα αποτελέσματα είναι συχνά αντιφατικά. Οι Lumaret et al. (2005) διαπίστωσαν ότι η παρουσία EPM στην κοπριά βοοειδών εμπόδιζε την ανάπτυξη των προνυμφών του εντόμου *Neomyia cornicina*. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι οι τοξικές του επιδράσεις στους γεωσκώληκες παρατηρούνται μόνο σε πολύ υψηλότερα επίπεδα από ό,τι συνήθως βρίσκονται σε φυσικές συνθήκες (Halley et al. 2005). Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν δείξει υψηλή τοξικότητα στα κοπρόφαγα σκαθάρια όπως το *Onthophagus lenzii* ή το σπάνιο είδος *Copris ochus* (Ishikawa και Iwasa 2019). Φαίνεται επίσης να έχει τοξικές επιδράσεις σε είδη των οικογενειών *Hydrophilidae*, *Ptiliidae* και *Staphylinidae* (Nieman et al. 2018). Προκαλεί επίσης θνησιμότητα στα κολλέμβολα του εδάφους (Serafini et al. 2019). Τέλος, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να έχει τοξική επίδραση σε υδρόβιους οργανισμούς, όπως τα ψάρια, επηρεάζοντας τη λειτουργία του νευρικού τους συστήματος. Για παράδειγμα, το ψάρι *R. quelea* παρουσιάζει ασυνήθιστη συμπεριφορά μετά από έκθεση σε EPM, ενώ υψηλά επίπεδα NO παρατηρούνται σε ορισμένους ιστούς ψαριών που είναι δείκτης οξειδωτικού στρες (Serafini et al. 2020). Πέραν των παραπάνω δεν γνωρίζουμε τίποτα για τις πιθανές επιδράσεις του EPM όπως και των άλλων ανθελμινθικών φαρμάκων στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.

1.4. Ο κύκλος του αζώτου

Το άζωτο είναι ένα από τα κύρια θρεπτικά συστατικά κρίσιμα για την επιβίωση όλων των ζωντανών οργανισμών. Είναι απαραίτητο συστατικό πολλών βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, του DNA και της χλωροφύλλης. Αν και το άζωτο είναι σε αφθονία στην ατμόσφαιρα ως αέριο αζώτου (N₂), είναι σε μεγάλο βαθμό μη διαθέσιμο με αυτή τη μορφή στους περισσότερους οργανισμούς, καθιστώντας το

άζωτο σπάνιο πόρο και συχνά περιορίζοντας την πρωτογενή παραγωγικότητα σε πολλά οικοσυστήματα. Μόνο όταν το άζωτο μετατραπεί από αέριο άζωτο σε αμμωνία (NH_3), γίνεται διαθέσιμο σε πρωτογενείς παραγωγούς, όπως τα φυτά. Εκτός από το N_2 και το NH_3 , το άζωτο υπάρχει σε πολλές διαφορετικές μορφές, συμπεριλαμβανομένων τόσο ανόργανων (π.χ. αμμωνία, νιτρικά) όσο και οργανικών (π.χ. αμινοξέα και νουκλεϊκά οξέα). Έτσι, το άζωτο υφίσταται πολλούς διαφορετικούς μετασχηματισμούς στο οικοσύστημα, αλλάζει από τη μια μορφή στην άλλη καθώς οι οργανισμοί το χρησιμοποιούν για ανάπτυξη και, σε ορισμένες περιπτώσεις, ενέργεια. Οι κύριοι μετασχηματισμοί του αζώτου είναι η δέσμευση αζώτου, η νιτροποίηση, η απονιτροποίηση, η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας (anammox διεργασία) και η αμμωνοποίηση. Ο μετασχηματισμός του αζώτου στις πολλές καταστάσεις οξείδωσής του είναι το κλειδί για την παραγωγικότητα στη βιόσφαιρα και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις δραστηριότητες μιας ποικιλίας μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια, τα αρχαία και οι μύκητες.



Εικόνα 2: Οι κύριοι μετασχηματισμοί στον κύκλο του αζώτου όπου συμμετέχουν μικροοργανισμοί (© 2010 Nature Education).

Από τα μέσα της δεκαετίας του 1900, οι άνθρωποι ασκούν διαρκώς αυξανόμενη πίεση στον παγκόσμιο κύκλο του αζώτου. Οι ανθρώπινες δραστηριότητες, όπως η παραγωγή λιπασμάτων και η καύση ορυκτών καυσίμων, έχουν αλλάξει σημαντικά την ποσότητα του σταθερού αζώτου στα οικοσυστήματα της Γης. Στην πραγματικότητα, ορισμένοι προβλέπουν ότι μέχρι το 2030, η ποσότητα αζώτου που καθορίζεται από τις ανθρώπινες

δραστηριότητες θα υπερβαίνει αυτή που καθορίζεται από τις μικροβιακές διεργασίες (Vitousek 1997). Οι αυξήσεις στο διαθέσιμο άζωτο μπορούν να αλλάξουν τα οικοσυστήματα αυξάνοντας την πρωτογενή παραγωγικότητα και επηρεάζοντας την αποθήκευση άνθρακα (Galloway et al. 1994). Λόγω της σημασίας του αζώτου σε όλα τα οικοσυστήματα και των σημαντικών επιπτώσεων από τις ανθρώπινες δραστηριότητες, το άζωτο και οι μετασχηματισμοί του έχουν λάβει μεγάλη προσοχή από τους οικολόγους.

1.4.1. Καθήλωση του αζώτου

Το αέριο άζωτο (N₂) αποτελεί σχεδόν το 80% της ατμόσφαιρας της Γης, ωστόσο το άζωτο είναι συχνά το στοιχείο που περιορίζει την πρωτογενή παραγωγή σε πολλά οικοσυστήματα. Γιατί είναι έτσι; Επειδή τα φυτά και τα ζώα δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν αέριο άζωτο σε αυτή τη μορφή. Για να είναι διαθέσιμο το άζωτο για την παραγωγή πρωτεϊνών, DNA και άλλων βιολογικά σημαντικών ενώσεων, πρέπει πρώτα να μετατραπεί σε διαφορετική χημική μορφή. Η διαδικασία μετατροπής του N₂ σε βιολογικά διαθέσιμο άζωτο ονομάζεται αζωτοδέσμευση. Το αέριο N₂ είναι μια πολύ σταθερή ένωση λόγω της ισχύος του τριπλού δεσμού μεταξύ των ατόμων αζώτου και απαιτεί μεγάλη ποσότητα ενέργειας για να σπάσει αυτός ο δεσμός. Η όλη διαδικασία απαιτεί οκτώ ηλεκτρόνια και τουλάχιστον δεκαέξι μόρια ATP. Ως αποτέλεσμα, μόνο μια επιλεγμένη ομάδα προκαρυωτών είναι σε θέση να πραγματοποιήσει αυτήν την ενεργειακά απαιτητική διαδικασία. Αν και το μεγαλύτερο μέρος της δέσμευσης αζώτου πραγματοποιείται από προκαρυώτες, μέρος του αζώτου μπορεί να σταθεροποιηθεί αβιοτικά με κεραυνό ή ορισμένες βιομηχανικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της καύσης ορυκτών καυσίμων.



Εικόνα 3: Χημική αντίδραση δέσμευσης αζώτου (© 2010 Nature Education).

Μερικοί μικροοργανισμοί που δεσμεύουν το άζωτο ζουν ελεύθερα, ενώ άλλοι είναι συμβιωτικοί δεσμευτές αζώτου, οι οποίοι απαιτούν στενή σύνδεση με έναν ξενιστή για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία. Οι περισσότερες συμβιωτικές σχέσεις εμφανίζουν εξειδίκευση μεταξύ των δύο μερών και εμφανίζουν πολύπλοκους μηχανισμούς ελέγχου της συμβίωσης. Για παράδειγμα, τα εκκρίματα ριζών από τα ψυχανθή (π.χ. μπιζέλια, τριφύλλι, σόγια) χρησιμεύουν ως σήμα σε βακτήρια του γένους *Rhizobium*, για την είσοδο τους στο φυτό και τη δημιουργία οργανιδίων για τη δέσμευση του αερίου αζώτου. Αυτό το σήμα προσελκύει τα βακτήρια στις ρίζες και στη συνέχεια

εμφανίζεται μια πολύ περίπλοκη σειρά γεγονότων για την έναρξη της πρόσληψης των βακτηρίων στη ρίζα και την ενεργοποίηση της διαδικασίας δέσμευσης αζώτου στα οζίδια (φυμάτια) που σχηματίζονται στις ρίζες.



Εικόνα 4: Φυμάτια δέσμευσης αζώτου σε ρίζα τριφυλλίου (© 2010 Nature Education).

Μερικά από αυτά τα βακτήρια είναι αερόβια, άλλα είναι αναερόβια. Μερικά είναι φωτοτροφικά, άλλα είναι χημειοτροφικά (δηλαδή, χρησιμοποιούν χημικές ουσίες ως πηγή ενέργειας αντί για φως). Αν και υπάρχει μεγάλη φυσιολογική και φυλογενετική ποικιλομορφία μεταξύ των μικροοργανισμών που πραγματοποιούν δέσμευση αζώτου, όλοι έχουν ένα παρόμοιο σύμπλεγμα ενζύμων που ονομάζεται νιτρογενάση που λειτουργεί ως καταλύτης για την αναγωγή του N_2 σε NH_3 (αμμωνία), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γενετικός δείκτης για τον προσδιορισμό του δυναμικού για δέσμευση αζώτου. Ένα από τα χαρακτηριστικά της νιτρογενάσης είναι ότι το σύμπλεγμα ενζύμων είναι πολύ ευαίσθητο στο οξυγόνο και απενεργοποιείται παρουσία του. Αυτό παρουσιάζει ένα ενδιαφέρον δίλημμα για τους αερόβιους αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς και ιδιαίτερα για τους αερόβιους αζωτοδεσμευτικούς μικροοργανισμούς που είναι επίσης φωτοσυνθετικοί αφού παράγουν στην πραγματικότητα οξυγόνο. Με την πάροδο του χρόνου, οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί έχουν εξελίξει διαφορετικούς τρόπους για να προστατεύουν τη νιτρογενάση τους από το οξυγόνο. Για παράδειγμα, ορισμένα κυανοβακτήρια έχουν δομές που ονομάζονται ετεροκύστεις που παρέχουν ένα περιβάλλον χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο για το ένζυμο και χρησιμεύει ως το σημείο όπου συμβαίνει όλη η δέσμευση αζώτου σε αυτούς τους οργανισμούς. Άλλοι φωτοσυνθετικοί αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί δεσμεύουν το άζωτο μόνο τη νύχτα όταν τα φωτοσυστήματα τους είναι αδρανείς και δεν παράγουν οξυγόνο.

Τα γονίδια που κωδικοποιούν τη νιτρογενάση έχουν ανιχνευθεί παγκοσμίως σε πολλά αερόβια ενδιαιτήματα, όπως ωκεανοί, λίμνες, εδάφη, καθώς και σε ενδιαιτήματα που μπορεί να είναι αναερόβια ή μικροαερόφιλα, όπως έντερα τερμιτών, ιζήματα, υπεραλατώδεις λίμνες, μικροβιακά στρώματα, πλαγκτονικά καρκινοειδή (Zehr et al. 2003). Η ευρεία κατανομή αυτών των γονιδίων υποδηλώνει ότι οι οργανισμοί που

δεσμεύουν το άζωτο εμφανίζουν δράση σε ένα πολύ ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως θα μπορούσε να αναμένεται για μια διαδικασία που είναι κρίσιμη για την επιβίωση όλης της ζωής στη Γη.

Πίνακας 2: Αντιπροσωπευτικοί προκαρυώτες που είναι γνωστό ότι πραγματοποιούν αζωτοδέσμευση (© 2010 Nature Education).

Genus	Phylogenetic Affiliation	Lifestyle
<i>Nostoc, Anabaena</i>	Bacteria (Cyanobacteria)	free-living, aerobic, phototrophic
<i>Pseudomonas, Azotobacter, Methylomonas</i>	Bacteria	free-living, aerobic, chemoorganotrophic
<i>Alcaligenes, Thiobacillus</i>	Bacteria	free-living, aerobic, chemolithotrophic
<i>Methanosarcina, Methanococcus</i>	Archaea	free-living, anaerobic, chemolithotrophic
<i>Chromatium, Chlorobium</i>	Bacteria	free-living, anaerobic, phototrophic
<i>Desulfovibrio, Clostridium</i>	Bacteria	free-living, anaerobic, chemoorganotrophic
<i>Rhizobium, Frankia</i>	Bacteria	symbiotic, aerobic, chemoorganotrophic

1.4.2. Νιτροποίηση

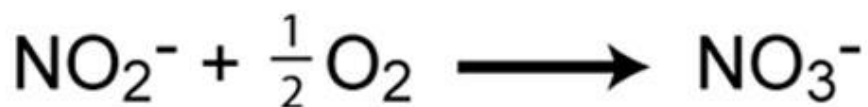
Η νιτροποίηση είναι η διαδικασία που μετατρέπει την αμμωνία σε νιτρώδες και στη συνέχεια σε νιτρικό άζωτο και είναι ένα άλλο σημαντικό βήμα στον παγκόσμιο κύκλο αζώτου. Η νιτροποίηση είναι αερόβια διεργασία και πραγματοποιείται αποκλειστικά από προκαρυώτες. Υπάρχουν δύο διαφορετικά στάδια νιτροποίησης που πραγματοποιούνται από διαφορετικούς τύπους μικροοργανισμών. Το πρώτο βήμα είναι η οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη ιόντα, η οποία πραγματοποιείται από μικρόβια γνωστά ως οξειδωτές της αμμωνίας ή νιτρωδοποιητικά βακτήρια. Τα αερόβια νιτρωδοποιητικά βακτήρια μετατρέπουν την αμμωνία σε νιτρώδη μέσω της ενδιάμεσης υδροξυλαμίνης, μια διαδικασία που απαιτεί δύο διαφορετικά ένζυμα, τη μονοοξυγενάση της αμμωνίας και την οξειδοοδουκτάση της υδροξυλαμίνης. Η διαδικασία παράγει μικρή ποσότητα ενέργειας σε σχέση με πολλούς άλλους τύπους μεταβολισμού. Ως αποτέλεσμα, τα νιτρωδοποιητικά βακτήρια είναι γνωστό ότι αυξάνονται πολύ αργά. Επιπλέον, τα αερόβια νιτρωδοποιητικά βακτήρια είναι επίσης αυτότροφα, χρησιμοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα για να παράγουν οργανικό άνθρακα, όπως και οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, αλλά χρησιμοποιούν αμμωνία ως πηγή ενέργειας αντί για φως.



Εικόνα 5: Χημικές αντιδράσεις οξείδωσης αμμωνίας που πραγματοποιούνται από βακτήρια. Η πρώτη αντίδραση μετατρέπει την αμμωνία στο ενδιάμεσο, την υδροξυλαμίνη, και καταλύεται από το ένζυμο αμμωνία μονοοξυγενάση. Η δεύτερη αντίδραση μετατρέπει την υδροξυλαμίνη σε νιτρώδες άλας και καταλύεται από το ένζυμο υδροξυλαμίνη οξειδοοξειδοκτάση (© 2010 Nature Education).

Σε αντίθεση με τη δέσμευση αζώτου που πραγματοποιείται από πολλά διαφορετικά είδη μικροβίων, η οξείδωση της αμμωνίας είναι λιγότερο ευρέως κατανοημένη μεταξύ των προκαρυωτών. Παλιότερα, πιστευόταν ότι όλη η οξείδωση της αμμωνίας γινόταν από λίγους μόνο τύπους βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* και *Nitrosococcus*. Ωστόσο, το 2005 ανακαλύφθηκαν Αρχαία που θα μπορούσαν επίσης να οξειδώσουν την αμμωνία (Koenneke et al. 2005). Από την ανακάλυψή τους, τα αρχαία νιτροδοποιητικά βακτήρια έχουν συχνά βρεθεί ότι υπερτερούν αριθμητικά από τα βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία σε πολλούς βιότοπους. Τα τελευταία χρόνια, τα αρχαία νιτροδοποιητικά βακτήρια έχουν βρεθεί σε αφθονία σε ωκεανούς, εδάφη και αλμυρά έλη, υποδηλώνοντας έναν σημαντικό ρόλο στον κύκλο του αζώτου. Πλέον υπάρχουν δώδεκα τέτοιοι μικροοργανισμοί, αρχαία νιτροδοποιητικά βακτήρια, που έχουν αναπτυχθεί σε καθαρή καλλιέργεια και μάλιστα αρκετοί από εδάφη.

Το δεύτερο βήμα στη νιτροποίηση είναι η οξείδωση των νιτρωδών (NO_2^-) σε νιτρικά (NO_3^-). Αυτό το βήμα πραγματοποιείται από μια εντελώς ξεχωριστή ομάδα προκαρυωτικών μικροοργανισμών, γνωστών ως οξειδωτές των νιτρωδών ή νιτρικοποιητικά βακτήρια. Μερικά από τα γένη που εμπλέκονται στην οξείδωση των νιτρωδών περιλαμβάνουν τα *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus* και *Nitrospina*. Παρόμοια με την οξείδωση της αμμωνίας, η ενέργεια που παράγεται από την οξείδωση των νιτρωδών σε νιτρικά είναι μικρή, και επομένως οι αποδόσεις ανάπτυξης των βακτηρίων που συμμετέχουν στη διεργασία είναι πολύ χαμηλές. Στην πραγματικότητα, τα νιτροδοποιητικά και τα νιτρικοποιητικά βακτήρια πρέπει να οξειδώσουν πολλά μόρια αμμωνίας ή νιτρωδών για να καθηλώσουν ένα μόνο μόριο CO_2 . Για πλήρη νιτροποίηση, πρέπει να συμβεί τόσο η οξείδωση της αμμωνίας όσο η οξείδωση των νιτρωδών.



Εικόνα 6: Χημική αντίδραση οξειδωσης νιτρωδών (© 2011 Nature Education).

Τα νιτρωδοποιητικά και νιτρικοποιητικά βακτήρια είναι παρόντα σε αερόβια περιβάλλοντα. Έχουν μελετηθεί εκτενώς σε φυσικά περιβάλλοντα όπως εδάφη, εκβολές ποταμών, λίμνες και περιβάλλοντα ανοιχτού ωκεανού. Ωστόσο, τα νιτρωδοποιητικά και νιτρικοποιητικά βακτήρια διαδραματίζουν επίσης πολύ σημαντικό ρόλο στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων αφαιρώντας δυνητικά επιβλαβή επίπεδα αμμωνίου που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη ρύπανση των υδάτων υποδοχής. Πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στον τρόπο διατήρησης σταθερών πληθυσμών αυτών των σημαντικών μικροβίων σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Επιπλέον, τα νιτρωδοποιητικά και νιτρικοποιητικά βακτήρια βοηθούν στη διατήρηση υγιών ενυδρείων διευκολύνοντας την απομάκρυνση του δυνητικά τοξικού αμμωνίου που εκκρίνεται στα ούρα των ψαριών (Bernhard, 2010).

1.4.3. Διαδικασία *anamnox*

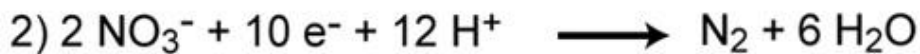
Παραδοσιακά, όλη η νιτροποίηση πιστευόταν ότι πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες, αλλά ανακαλύφθηκε ένας νέος τύπος οξειδωσης αμμωνίας που λαμβάνει χώρα υπό ανοξικές συνθήκες (Strous et al. 1999). Η διαδικασία *anamnox* (αναερόβια οξειδωση αμμωνίας) πραγματοποιείται από προκαρυώτες που ανήκουν σε βακτήρια του φύλου *Planctomycetes*. Το πρώτο περιγραφόμενο βακτήριο *anamnox* ήταν το *Brocadia anammoxidans*. Τα βακτήρια *Anammox* οξειδώνουν την αμμωνία χρησιμοποιώντας νιτρώδη ως δέκτη ηλεκτρονίων για την παραγωγή αερίου αζώτου. Τα βακτήρια *Anammox* ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά σε ανοξικούς βιοαντιδραστήρες μονάδων επεξεργασίας λυμάτων, αλλά έκτοτε έχουν βρεθεί σε μια ποικιλία υδάτινων συστημάτων, συμπεριλαμβανομένων των ζωνών χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο του ωκεανού, των παράκτιων ιζημάτων και των εκβολών ποταμών και των λιμνών. Σε ορισμένες περιοχές του ωκεανού, η διαδικασία *anamnox* θεωρείται υπεύθυνη για σημαντική απώλεια αζώτου (Kuypers et al. 2005). Ωστόσο, οι Ward et al. (2009) υποστηρίζουν ότι η απονιτροποίηση και όχι η διαδικασία *anamnox* είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες απώλειες αζώτου σε άλλες περιοχές. Είτε η διαδικασία *anamnox* είτε η απονιτροποίηση ευθύνονται για τις περισσότερες απώλειες αζώτου στον ωκεανό, είναι σαφές ότι η διαδικασία *anamnox* αντιπροσωπεύει μια σημαντική διαδικασία στον παγκόσμιο κύκλο αζώτου.



Εικόνα 7: Χημική αντίδραση αναερόβιας οξείδωσης αμμωνίας (anammox) (© 2010 Nature Education).

1.4.4. Απονιτροποίηση

Η απονιτροποίηση είναι η διαδικασία που μετατρέπει τα νιτρικά σε αέριο άζωτο, αφαιρώντας έτσι το βιοδιαθέσιμο άζωτο και το επιστρέφει στην ατμόσφαιρα. Το αέριο διάζωτο (N_2) είναι το τελικό προϊόν της απονιτροποίησης, αλλά υπάρχουν και άλλες ενδιάμεσες αέριες μορφές αζώτου. Ορισμένα από αυτά τα αέρια, όπως το υποξείδιο του αζώτου (N_2O), θεωρούνται αέρια του θερμοκηπίου, που αντιδρούν με το όζον και συμβάλλουν στην ατμοσφαιρική ρύπανση.



Εικόνα 8: Αντιδράσεις που εμπλέκονται στην απονιτροποίηση. Η πρώτη αντίδραση αντιπροσωπεύει τα στάδια αναγωγής νιτρικών σε αέριο αζώτου. Η δεύτερη αντίδραση αντιπροσωπεύει την πλήρη αντίδραση οξειδοαναγωγής της απονιτροποίησης (© 2010 Nature Education).

Σε αντίθεση με τη νιτροποίηση, η απονιτροποίηση είναι μια αναερόβια διαδικασία, που εμφανίζεται κυρίως σε εδάφη και ιζήματα και ανοξικές ζώνες σε λίμνες και ωκεανούς. Παρόμοια με τη δέσμευση αζώτου, η απονιτροποίηση πραγματοποιείται από μια διαφορετική ομάδα προκαρυωτικών και υπάρχουν ενδείξεις ότι ορισμένοι ευκαρυώτες είναι επίσης ικανοί για απονιτροποίηση (Risgaard-Petersen et al. 2006). Τα περισσότερα απονιτροποιητικά βακτήρια ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Paracoccus* και *Pseudomonas*. Οι απονιτροποιητές είναι χημειοργανότροφοι μικροοργανισμοί και επομένως πρέπει επίσης να τροφοδοτούνται με κάποια μορφή οργανικού άνθρακα.

Η απονιτροποίηση είναι σημαντική καθώς αφαιρεί σταθερό άζωτο (δηλαδή νιτρικά) από το οικοσύστημα και το επιστρέφει στην ατμόσφαιρα σε βιολογικά αδρανή μορφή (N_2). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στη γεωργία όπου η απώλεια νιτρικών αλάτων

στα λιπάσματα είναι επιζήμια και δαπανηρή. Ωστόσο, η απονιτροποίηση στην επεξεργασία λυμάτων διαδραματίζει πολύ ευεργετικό ρόλο αφαιρώντας ανεπιθύμητα νιτρικά από τα απόβλητα λυμάτων, μειώνοντας έτσι τις πιθανότητες το νερό που απορρίπτεται από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων να προκαλέσει ανεπιθύμητες συνέπειες, όπως άνθηση φυκιών.

1.4.5. Αμμωνιοποίηση / Ανοργανοποίηση

Όταν ένας οργανισμός εκκρίνει απόβλητα ή πεθαίνει, το άζωτο στους ιστούς του έχει τη μορφή οργανικού αζώτου, όπως για παράδειγμα τα αμινοξέα και το DNA. Διάφοροι μύκητες και προκαρυώτες στη συνέχεια αποσυνθέτουν τον ιστό και απελευθερώνουν ανόργανο άζωτο πίσω στο οικοσύστημα ως αμμωνία στη διαδικασία που είναι γνωστή ως αμμωνιοποίηση ή αλλιώς ανοργανοποίηση. Η αμμωνία στη συνέχεια γίνεται διαθέσιμη για πρόσληψη από φυτά και άλλους μικροοργανισμούς για ανάπτυξη.

1.4.6. Οικολογικές επιπτώσεις των ανθρώπινων αλλαγών στον κύκλο του αζώτου

Πολλές ανθρώπινες δραστηριότητες έχουν σημαντικό αντίκτυπο στον κύκλο του αζώτου. Η καύση ορυκτών καυσίμων, η εφαρμογή λιπασμάτων με βάση το άζωτο και άλλες δραστηριότητες μπορούν να αυξήσουν δραματικά την ποσότητα του βιολογικά διαθέσιμου αζώτου σε ένα οικοσύστημα. Και επειδή η διαθεσιμότητα αζώτου συχνά περιορίζει την πρωτογενή παραγωγικότητα πολλών οικοσυστημάτων, μεγάλες αλλαγές στη διαθεσιμότητα αζώτου μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρή αλλαγή του κύκλου του αζώτου τόσο στα υδάτινα όσο και στα χερσαία οικοσυστήματα. Η βιομηχανική δέσμευση αζώτου έχει αυξηθεί εκθετικά από τη δεκαετία του 1940 και η ανθρώπινη δραστηριότητα έχει διπλασιάσει την ποσότητα της παγκόσμιας δέσμευσης αζώτου (Vitousek et al. 1997).

Στα χερσαία οικοσυστήματα, η προσθήκη αζώτου μπορεί να οδηγήσει σε ανισορροπία θρεπτικών στοιχείων στα δέντρα, αλλαγές στην υγεία των δασών και μείωση της βιοποικιλότητας. Με την αυξημένη διαθεσιμότητα του αζώτου, συχνά υπάρχει μια αλλαγή στην αποθήκευση άνθρακα, επηρεάζοντας έτσι περισσότερες διεργασίες και όχι μόνο τον κύκλο του αζώτου. Στα γεωργικά εδάφη, τα λιπάσματα χρησιμοποιούνται εκτενώς για την αύξηση της φυτικής παραγωγής, αλλά το αχρησιμοποίητο άζωτο, συνήθως με τη μορφή νιτρικών, μπορεί να ξεπλυθεί από το έδαφος, να εισέλθει σε ρυάκια και ποτάμια και τελικά να μπει στο πόσιμο νερό. Η διαδικασία παραγωγής συνθετικών λιπασμάτων για χρήση στη γεωργία προκαλώντας την αντίδραση του N_2 με το H_2 , γνωστή ως διαδικασία Haber-Bosch, έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες. Στην πραγματικότητα, σχεδόν το 80% του αζώτου που βρίσκεται στους ανθρώπινους ιστούς προέρχεται από τη διαδικασία Haber-Bosch (Howarth 2008).

Μεγάλο μέρος του αζώτου που εφαρμόζεται σε γεωργικές και αστικές περιοχές εισέρχεται τελικά σε ποτάμια και παράκτια συστήματα. Στα παράκτια θαλάσσια συστήματα, οι αυξήσεις του αζώτου μπορεί συχνά να οδηγήσουν σε ανοξία (χωρίς οξυγόνο) ή υποξία (χαμηλό οξυγόνο), αλλοιωμένη βιοποικιλότητα, αλλαγές στη δομή του ιστού των τροφίμων και γενική υποβάθμιση των οικοτόπων. Μια κοινή συνέπεια

του αυξημένου αζώτου είναι η αύξηση των επιβλαβών ανθοφόρων φυκιών (Howarth 2008). Οι τοξικές ανθοφορίες ορισμένων τύπων φυκιών (blooms) έχουν συσχετιστεί με υψηλή θνησιμότητα ψαριών και οστρακοειδών σε ορισμένες περιοχές. Ακόμη και χωρίς τέτοιες οικονομικά καταστροφικές επιπτώσεις, η προσθήκη αζώτου μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη βιοποικιλότητα και στη σύνθεση των ειδών που μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στη συνολική λειτουργία του οικοσυστήματος. Κάποιοι μάλιστα έχουν προτείνει ότι οι αλλαγές στον κύκλο του αζώτου μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένο κίνδυνο παρασιτικών και μολυσματικών ασθενειών μεταξύ των ανθρώπων και της άγριας ζωής (Johnson et al. 2010). Επιπλέον, η αύξηση του αζώτου στα υδάτινα συστήματα μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη οξίνιση του πόσιμου νερού.

1.5. Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη νιτροποίηση

Η οξείδωση της αμμωνίας, η μετατροπή της αμμωνίας σε υδροξυλαμίνη, είναι το πρώτο βήμα της νιτροποίησης (Martens-Habbena et al., 2009), που χρησιμοποιείται ως καταλύτης από μικροοργανισμούς που οξειδώνουν την αμμωνία (AOMs), συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων (AOB) και των αρχαίων (AOA) (Nunes-Alves, 2016). Από την ανακάλυψη των AOA (Könneke et al., 2005), έχουν υπάρξει αρκετές μελέτες που έχει ερευνηθεί η συμβολή των AOA και AOB στην οξείδωση της αμμωνίας και τις οικολογικές θέσεις των AOA και AOB.

Εκτεταμένη έρευνα αποκάλυψε ότι τα AOA είναι ευρέως καταναμημένα σε χερσαία περιβάλλοντα και είναι αριθμητικά κυρίαρχα των AOB στα χερσαία οικοσυστήματα (Leininger et al., 2006; Nicol et al., 2008; Kelly et al., 2011; Stahl and de la Torre 2012; Meng et al., 2017). Θεωρείται ότι η αμμωνία, το pH και οι πηγές άνθρακα είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες που καθορίζουν τις ξεχωριστές οικοθέσεις των AOA και AOB (Schleper, 2010; Hatzenpichler, 2012; Zhahnina et al., 2012; Xu et al., 2017). Μεταξύ αυτών των παραγόντων, το pH ήταν ένας ισχυρός καθοριστικός παράγοντας για τις ξεχωριστές οικοθέσεις των AOA και AOB. Οι μελέτες έχουν αποκάλυψε ότι τα AOB κυριαρχούν στη μικροβιακή οξείδωση της αμμωνίας σε ουδέτερα προς αλκαλικά εδάφη (Jia and Conrad, 2009), ενώ τα AOA παίζουν σημαντικό ρόλο στα όξινα εδάφη (Huang et al., 2011; Zhang et al., 2012). Ωστόσο, οι Zhang et al. (2010) διαπίστωσαν ότι τα AOA επίσης καταλύουν την οξείδωση αμμωνίας σε ουδέτερο έδαφος με χαμηλή συγκέντρωση αμμωνίας που προέρχεται από ανοργανοποίηση. Μια μεγάλης κλίμακας μελέτη διαπίστωσε ότι η διακύμανση της ποικιλότητας των AOA και AOB και η σύσταση των διαφορετικών εδαφών συσχετίστηκε ισχυρά με το pH του εδάφους και την αναλογία της αφθονίας των AOA προς AOB που μειώθηκε με την αύξηση του pH (Hu et al., 2013). Σε μια άλλη μελέτη επίσης παρατηρήθηκε απότομη αύξηση στην αναλογία της αφθονίας των AOA/AOB σε pH<4 (Yao et al., 2011). Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα AOA μπορεί να έχουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι των AOB σε όξινα εδάφη. Ωστόσο, μόνο λίγες ομάδες AOA φαίνεται να είναι προσαρμοσμένες σε όξινο έδαφος, κυρίως τα γένη *Nitrosotalea* (pH 4-5,5) και στα υπόλοιπα εδάφη τα γένη *Nitrosphaera* (pH 6-9), και οι αλλαγές στον πληθυσμό των AOA στα εδάφη με διαφορετικό pH συσχετίστηκαν κυρίως με τέτοιες ομάδες (Gubry-Rangin et al., 2017; Ying et al., 2017). Επιπλέον, η αφθονία των AOA είναι

χαμηλότερη σε όξινα εδάφη και μεγαλύτερη σε εδάφη με pH 6-8 (Gubry-Rangin et al., 2011).

Ένας σημαντικός λόγος για τον οποίο το pH είναι σημαντικός παράγοντας στον διαχωρισμό οικοθέσεων των AOA και AOB είναι ότι το pH επηρεάζει το διαθεσιμότητα της αμμωνίας (NH_3), το υπόστρωμα της οξειδωσης της αμμωνίας, το οποίο συμβάλλει στην διάκριση των οικοθέσεων των AOA και AOB στο έδαφος (Verhamme et al., 2011). Οι συνθήκες χαμηλού pH μειώνουν τη διαθεσιμότητα του NH_3 , ευνοώντας έτσι τον πληθυσμό των AOA, που προτιμούν χαμηλότερη συγκέντρωση NH_3 από τον πληθυσμό των AOB (Hatzenpichler, 2012; Zhahnina et al., 2012). Αυτό υποστηρίχθηκε από παρατηρήσεις ότι τα AOB ανταποκρίνονται πιο έντονα στην προσθήκη αζώτου από τα AOA (Carey et al., 2016; Ouyang et al., 2016; Xiang et al., 2017). Η προσθήκη αζώτου αύξησε τον ρυθμό της ανάπτυξης των AOB, αλλά μείωσε τον ρυθμό ανάπτυξης των AOA (Ying et al., 2017), και η αζωτούχα λίπανση αύξησε την αφθονία και την ποικιλότητα των AOB αλλά όχι των AOA (Rudisill et al., 2016; Segal et al., 2016 al., 2017; Xiang et al., 2017).

Αν και μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι τα AOA κυριαρχούν στην οξείδωση της αμμωνίας στα όξινα εδάφη (Gubry-Rangin et al., 2010; Huang et al., 2011), ορισμένα AOB έχουν επίσης απομονωθεί από όξινο έδαφος (Hayatsu et al., 2017) και ορισμένες ομάδες AOB φαινόταν καλά προσαρμοσμένες στα όξινα εδάφη (De Boer et al., 1991; Hu et al., 2013), υποδεικνύοντας τη δυνατότητα για οξείδωση της αμμωνίας των AOB σε όξινο έδαφος. Έτσι, η αντίδραση των AOA και των AOB στο pH του εδάφους δεν έχει ακόμη διευθετηθεί.

Εκτός από το pH, ο οργανικός άνθρακας θεωρείται ότι είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τον πληθυσμό των AOA. Προηγούμενες μελέτες διαπίστωσαν ότι ένα μεγαλύτερο μέγεθος του πληθυσμού των AOA θα μπορούσε να μην σχετίζονται με την οξείδωση της αμμωνίας. Για παράδειγμα, η αφθονία των AOA αυξήθηκε ακόμη και όταν η διαδικασία της νιτροποίησης είχε πλήρως ανασταλεί από την ακετυλίνη, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα AOA μπορεί να είναι ικανά για ετερότροφη δραστηριότητα (Prosser και Nicol, 2008; Jia και Conrad, 2009). Οι Liu et al. (2018) αποκάλυψαν ότι η μακροχρόνια εφαρμογή κοπριάς αύξησε την αφθονία των AOA σε ορισμένα εδάφη. Οι Wessén et al. (2010) διαπίστωσαν ότι η αφθονία των AOA σχετιζόταν θετικά με την προσθήκη ασταθούς οργανικού άνθρακα. Αυτά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ορισμένα AOA μπορεί να είναι μικτότροφα ή ετερότροφα που χρησιμοποιούν οργανικό άνθρακα, ωστόσο σχετικά πρόσφατες μελέτες μέσω γονιδιωματικής ανάλυσης και αναλύσεων καλλιέργειας έχουν αποκαλύψει ότι είδη AOA που απομονώθηκαν από θαλάσσια και χερσαία ενδιαιτήματα είναι αυστηρά αυτότροφα σε καθαρή καλλιέργεια (Kerou et al., 2016; Kim et al., 2016; Rice et al., 2016). Μία εναλλακτική εξήγηση είναι ότι ορισμένες οργανικές ενώσεις, όπως τα ακετο οξέα, η διμεθυλοθειουρία και η καταλάση, θα μπορούσαν να ενισχύσουν την ανάπτυξη των AOA με την αποτοξίνωση του H_2O_2 , το οποίο είναι ανασταλτικό για την ανάπτυξη των AOA (Kim et al., 2016).

1.6. Σκοπός μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της πιθανής οικοτοξικότητας του συνθετικού ανθελμινθικού φαρμάκου EPM στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, μέσω επαναλαμβανόμενων εφαρμογών του σε επιλεγμένα δείγματα εδαφών από κτηνοτροφικές μονάδες της νήσου Λέσβου. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν: α) η επίδραση του EPM στη λειτουργία και αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών και β) η επίδραση στην αφθονία του συνόλου της βακτηριακής κοινότητας.

Κεφάλαιο 2 Πειραματική διαδικασία

2.1. Δείγματα εδαφών και πειραματικός σχεδιασμός

Τα δείγματα εδάφους (με κωδικές ονομασίες 6A και 11) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν από προηγούμενη μελέτη αποδόμησης ανθελμινθικών κτηνιατρικών φαρμάκων στην οποία συλλέχθηκαν είκοσι ένα δείγματα εδάφους από κτηνοτροφικές μονάδες αιγοπροβάτων της νήσου Λέσβου (Lagos et al, 2022). Στον Πίνακα 3 παρατίθενται όλα τα δείγματα εδάφους που χρησιμοποιήθηκαν στην προηγούμενη μελέτη, τα σημεία συλλογής τους, καθώς και το ιστορικό χορήγησης στα ζώα. Όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, για τις περισσότερες κτηνοτροφικές μονάδες, λήφθηκαν δείγματα εδάφους από δύο διαφορετικά σημεία, μέσα στη μονάδα και από την περιοχή του λειμώνα βόσκησης. Αυτά τα δύο σημεία διαφέρουν ως προς την έκθεσή τους στα κτηνιατρικά φάρμακα. Πιο συγκεκριμένα στα δείγματα της σειράς A που συλλέχθηκαν από σημεία εντός της κτηνοτροφικής μονάδας όπου εκτρέφονται τα ζώα, βρέθηκε αυξημένη έκθεση στα φάρμακα λόγω αυξημένης εναπόθεσης κοπράνων και ούρων. Αντίθετα, στα δείγματα της σειράς B που συλλέχθηκαν από περιφραγμένους βοσκότοπους/λειμώνας που έβοσκαν τα ζώα της ίδιας κτηνοτροφικής μονάδας, βρέθηκε μικρότερη έκθεση στα φάρμακα λόγω της χαμηλότερης συχνότητας εναπόθεσης κοπράνων και ούρων από τα ζώα σε αυτό το έδαφος.

Πίνακα 3: Τα δείγματα εδάφους 6A και 11 που χρησιμοποιήθηκαν, τα σημεία συλλογής τους, καθώς και το ιστορικό χορήγησης ανθελμινθικών φαρμάκων στα ζώα.

Δείγμα εδάφους	Σημείο συλλογής	Ιστορικό χρήσης
1A	Εντός κτηνοτροφικής μονάδας	EPM / Albendazole
1B	Περιφραγμένος λειμώνας	EPM / Albendazole
2A	Εντός κτηνοτροφικής μονάδας	EPM / Albendazole
2B	Περιφραγμένος λειμώνας	EPM/ Albendazole
3A	Εντός κτηνοτροφικής μονάδας	Ivermectin / Albendazole
3B	Περιφραγμένος λειμώνας	Ivermectin / Albendazole
4A	Εντός κτηνοτροφικής μονάδας	Moxidectin / Albendazole
4B	Περιφραγμένος λειμώνας	Moxidectin / Albendazole
5	Εντός κτηνοτροφικής μονάδας (δεν υπήρχε περιφραγμένος λειμώνας)	Moxidectin
6A	Εντός κτηνοτροφικής μονάδας	Moxidectin / Albendazole
6B	Περιφραγμένος λειμώνας	Moxidectin / Albendazole
7A	Εντός κτηνοτροφικής μονάδας	Fenbendazole
7B	Λειμώνας (κοινοτικός)	Fenbendazole

Δείγμα εδάφους	Σημείο συλλογής	Ιστορικό χρήσης
8A	Εντός κτηνοτροφικής μονάδας	Ivermectin
8B	Λειμώνας (κοινοτικός)	Ivermectin
9A	Εντός κτηνοτροφικής μονάδας	Ivermectin
9B	Λειμώνας	Ivermectin
10A	Εντός κτηνοτροφικής μονάδας	Ivermectin
10B	Λειμώνας	Ivermectin
11	Εντός κτηνοτροφικής μονάδας και περιφραγμένος λειμώνας (μικτό δείγμα)	Ivermectin / Albendazole
12	Εντός κτηνοτροφικής μονάδας και περιφραγμένος λειμώνας (μικτό δείγμα)	Moxidectin / Albendazole

Από αυτά τα δείγματα εδάφους επιλέχθηκε ένα που παρουσιάζει γρήγορο ρυθμό βιοαποδόμησης, με βάση τις τιμές DT₅₀ και DT₉₀, καθώς και ένα που παρουσιάζει αργό ρυθμό βιοαποδόμησης με βάση τις ίδιες τιμές. DT₅₀ μιας τοξικολογικά δραστικής ουσίας, όπως ένα κτηνιατρικό φαρμακευτικό προϊόν, ορίζεται ως ο χρόνος σε ημέρες που απαιτείται ώστε η συγκέντρωση αυτής της ουσίας σε ένα υπόστρωμα, όπως για παράδειγμα έδαφος, νερό ή ίζημα, να διασπαστεί στο 50% της αρχικής συγκέντρωσης. Όσον αφορά, λοιπόν, το EPM επιλέχθηκε το δείγμα εδάφους 6A με γρήγορο ρυθμό αποδόμησης και το δείγμα εδάφους 11 με αργό ρυθμό αποδόμησης.

Τα δείγματα εδάφους 6A και 11, πριν γίνει η εφαρμογή του EPM, επώαστηκαν στους 4°C και μετρήθηκε:

- Η περιεκτικότητα σε υγρασία
- Η υδατοχωρητικότητα

Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε προκειμένου να ρυθμιστεί η υγρασία των συγκεκριμένων δειγμάτων στο 40% της υδατοχωρητικότητάς τους με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού.

Στη συνέχεια, για τα δείγματα εδάφους 6A και 11 έγινε η εφαρμογή με το κτηνιατρικό φάρμακο EPM:

1. σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης:

- **X₀**: αντιπροσωπεύει εδάφη χωρίς προσθήκη EPM (μάρτυρας 0 mg/kg).
- **X₁**: αντιπροσωπεύει εδάφη που δέχτηκαν μια «ρεαλιστική» περιβαλλοντική συγκέντρωση των υπό μελέτη ανθελμινθικών φαρμάκων, βάσει της πρόσφατης βιβλιογραφίας και των πειραματικών αποτελεσμάτων της μελέτης των υπολειμμάτων των τριών ανθελμινθικών φαρμάκων στα περιττώματα μικρών μηρυκαστικών, όπως πρόβατα και αίγες (1 mg/kg).
- **X₁₀**: αντιπροσωπεύει εδάφη με δέκα φορές περισσότερη συγκέντρωση από τη X₁, αποτελεί το σενάριο υψηλής έκθεσης (10 mg/kg).

2. σε τρία στάδια:

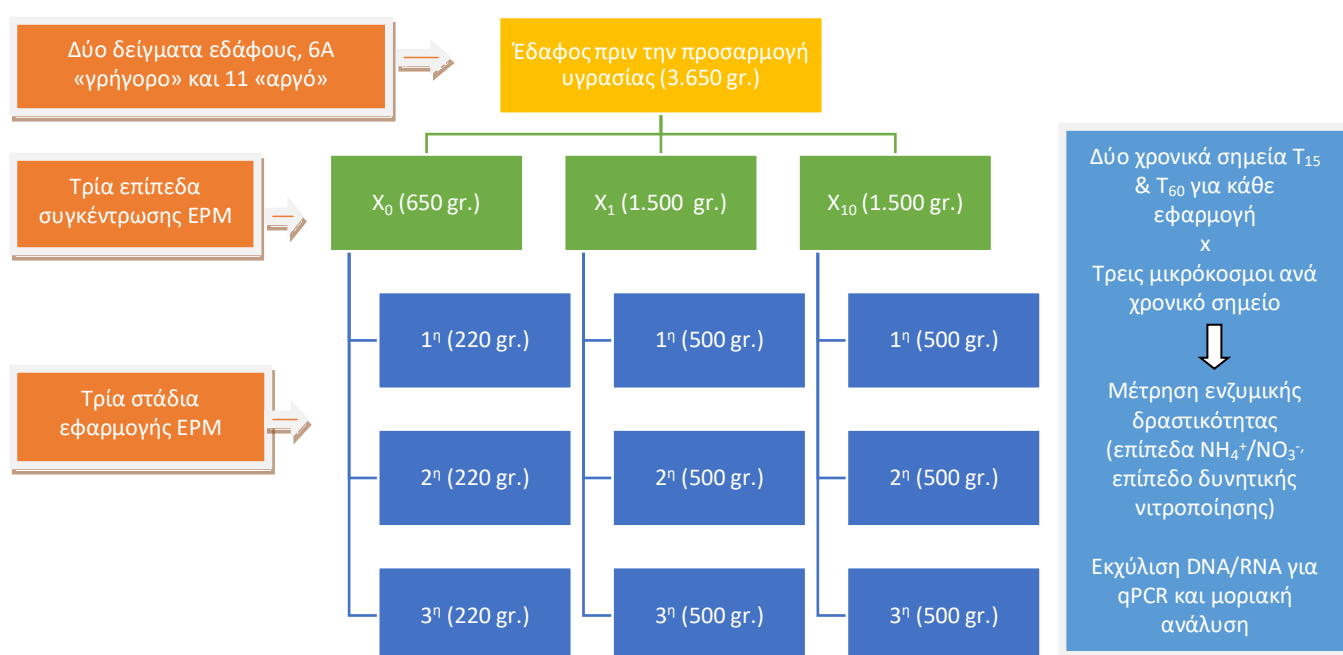
- **1^η εφαρμογή**: αμέσως μετά την προσαρμογή της υγρασίας (0 μέρες),
- **2^η εφαρμογή**: εξήντα ημέρες μετά (60 μέρες) και
- **3^η εφαρμογή**: εκατόν είκοσι ημέρες μετά (120 μέρες).

Πριν την πρώτη και την τρίτη εφαρμογή σε όλες τις μεταχειρίσεις (X₀, X₁ και X₁₀), πραγματοποιήθηκε προσθήκη πηγής αζώτου, μέσω υδατικού διαλύματος (NH₄)₂SO₄ 0,4M (αντιστοιχώντας σε συγκέντρωση 154mg N kg⁻¹ ξηρού εδάφους) και επώασης των μεταχειρίσεων για 24 ώρες. Μετά την κάθε εφαρμογή, τα δείγματα αναμίχθηκαν με το χέρι για να επιταχυνθεί η ομοιόμορφη κατανομή του κτηνιατρικού φαρμάκου σε όλο τον όγκο του εδάφους. Ακολούθως, τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε υποδείγματα των 15 g, τα οποία τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια (μικρόκοσμοι) με αεροστεγές κλείσιμο και τοποθετήθηκαν σε ψυχώμενο επωαστικό θάλαμο στους 20°C στο σκοτάδι. Στα πλαστικά σακουλάκια δημιουργήθηκε οπή, ώστε να διατηρηθούν οι αερόβιες συνθήκες. Τρεις μικρόκοσμοι για κάθε συγκέντρωση από κάθε έδαφος/εφαρμογή αφαιρέθηκαν από την επώαση και τοποθετήθηκαν στους -20°C στα εξής χρονικά διαστήματα:

- Για τη μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας κατά την 1^η εφαρμογή: **0, 7, 15** και **60** ημέρες μετά την εφαρμογή, ενώ για τη 2^η και την 3^η εφαρμογή: **7, 15** και **60** ημέρες μετά την εφαρμογή.
- Για τις μοριακές αναλύσεις: **15** και **60** ημέρες μετά από κάθε εφαρμογή.

Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν είναι:

- Προσδιορισμός συγκέντρωσης $\text{NH}_4^+ / \text{NO}_3^-$.
- Προσδιορισμός ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης.
- Προσδιορισμός αφθονίας νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών, όπως:
 - Νιτροδοποιητικά βακτήρια (Ammonia Oxidizing Bacteria, AOB) και νιτροδοποιητικά αρχαία (Ammonia Oxidizing Archaea AOA) μέσω ενίσχυσης του γονιδίου *amoA*.
 - Ολικά βακτήρια μέσω ενίσχυσης του γονιδίου *16SrRNA*.



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διαδικασίας που πραγματοποιήθηκε.

2.2. Μελέτη της επίδρασης του *epirinomectin* στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς

2.2.1. Προσδιορισμός αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων στο έδαφος

Για το σκοπό αυτό 2 g από κάθε δείγμα εδάφους ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε falcon των 50 ml όπου προστέθηκαν 20 ml KCl 1M και ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα για 30 λεπτά. Το εκχύλισμα διηθήθηκε μέσω φίλτρου Whatman 42 σε falcon των 15 ml και αποθηκεύτηκε στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$ έως ότου πραγματοποιηθεί περαιτέρω ανάλυση.

2.2.1.a. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης αμμωνιακών ιόντων στο έδαφος

Ο προσδιορισμός των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) στα δείγματα εδάφους έγινε χρωματομετρικά σε εκχυλίσματα χλωριούχου καλίου, σύμφωνα με τροποποίηση της μεθόδου Kandeler E. (1995). Το αμμώνιο οξειδώνεται σε χλωροαμίνη από το διχλωροϊσοκυανουρικό οξύ του νατρίου και στη συνέχεια σχηματίζει μια πράσινη ινδοφαινόλη παρουσία φαινολικών ενώσεων σε ένα αλκαλικό μέσο. Η απορρόφηση μετράται φωτομετρικά στα 660 nm.

Υλικά & Αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο εξοπλισμένο με κυβέτα 1 cm ή φωτόμετρο πλάκας μικροτιτλοδότησης με 96 πλάκες μικροτιτλοδότησης
- Οριζόντιος αναδευτήρας
- Eppendorfs των 2 ml και 1 ml.
- Πρότυπο διάλυμα αζώτου αμμωνίου (1000 mg N l^{-1}): Διάλυση 0,382 g NH_4Cl (Merck© #1.01145) σε 100 ml KCl 1 M (Merck© #1.04936) ή νερό MilliQ. Το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στους 4 °C για αρκετό χρονικό διάστημα.
- Πρότυπα διαλύματα εργασίας με άζωτο αμμωνίου: Αραίωση 2 ml αρχικού προτύπου διαλύματος αμμωνίου σε 100 ml KCl 1 M ή νερό MilliQ (20 mg l^{-1}). Ετοιμασία δέκα φιαλιδίων των 2 ml με 1 ml KCl 1 M ή νερό MilliQ, δύο φορές ώστε να εκτελεστεί αραίωση 1:2. Οι συγκεντρώσεις είναι από 5 mg l^{-1} έως $0,0195 \text{ mg l}^{-1}$.
- Διάλυμα NaOH 0,3 M: Αραίωση 785 μl υδροξειδίου του νατρίου 50% (J. T. Baker© #7067) σε 50 ml νερού MilliQ.
- Διάλυμα σαλικυλικού νατρίου: Διάλυση 8,5 g σαλικυλικού νατρίου (Fluka© #71945) και 63,9 mg διένυδρου νιτροπρωσσικού νατρίου (Fluka© #6541) σε 50 ml νερού MilliQ. Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται φρέσκο κάθε μέρα.
- Αντιδραστήριο χρώματος: Ανάμειξη διαλύματος NaOH 0,3 M, διαλύματος σαλικυλικού νατρίου και νερού MilliQ σε αναλογία 1:1:1 (o/o/o). Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση.
- Διάλυμα οξείδωσης: Διάλυση 0,1 g διένυδρου άλατος νατρίου διχλωροϊσοκυανουρικού οξέος (Merck© #1.10888) σε 100 ml νερού MilliQ. Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται φρέσκο κάθε μέρα.

Πειραματική διαδικασία

Σε eppendorf των 1,5 ml τοποθετούνται με πιπέτα με τη σειρά 600 μl προτύπων διαλυμάτων (5 mg N l^{-1} έως $0,0195 \text{ mg N l}^{-1}$, δύο φορές) και 600 μl δειγμάτων και προστίθεται 300 μl αντιδραστηρίου χρώματος και 120 μl διαλύματος οξείδωσης. Γίνεται ανακίνηση των δειγμάτων σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 300 rpm για μισή ώρα. Στη συνέχεια, 300 μl από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε πλάκα μικροτιτλοδότησης (96-well plate) και μετρήθηκαν με το EnSpire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer)

στα 660 nm. Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης με τις συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων εργασίας αζώτου αμμωνίου που κυμαίνονται μεταξύ 0,0195 και 5 mg I⁻¹. Για τον υπολογισμό λοιπόν, σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη από τη μετρούμενη απορρόφηση σε σχέση με τη συγκέντρωση και εκτελείται μια γραμμική παλινδρόμηση. Γίνεται ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων του δείγματος και του τυφλού και αφαιρείται η μέση τιμή του τυφλού από τις τιμές δείγματος για να δοθεί η διορθωμένη συγκέντρωση διαλύματος δείγματος. Η συγκέντρωση στα αρχικά δείγματα εδάφους είναι γραμμάρια εδάφους ξηρό βάρος.

2.2.1.β. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων στο έδαφος

Ο προσδιορισμός των νιτρικών ιόντων (NO₃⁻) έγινε χρωματογραφικά μέσω εκχύλισης χλωριούχου καλίου με τη μέθοδο χλωριούχου βαναδίου (VCl₃/Griess), σύμφωνα με τους Miranda et al. 2001. Μετά την εκχύλιση με χλωριούχο κάλιο (KCl) το νιτρικό (NO₃⁻) ανάγεται σε νιτρώδες (NO₂⁻) με ένα όξινο διάλυμα χλωριούχου βαναδίου (III) (VCl₃) και η συγκέντρωση νιτρώδων προσδιορίζεται με άμεση σύζευξη με την αντίδραση Griess. Η απορρόφηση προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 540 nm.

Αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο εξοπλισμένο με φωτόμετρο πλάκας μικροτιτλοδότησης με 96 πλάκες μικροτιτλοδότησης.
- Οριζόντιος αναδευτήρας.
- Eppendorfs των 2 ml.
- Διάλυμα νιτρικού καλίου (1000 mg N L⁻¹): Διάλυση 3,611 g KNO₃ (Merck© #5063) σε 500 ml νερού MilliQ. Το διάλυμα μπορεί να διατηρηθεί για αρκετούς μήνες στους 4 °C.
- Πρότυπα διαλύματα: Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων φρέσκα καθημερινά από αρχικό διάλυμα KNO₃ (1000 mg N L⁻¹), οι συγκεντρώσεις είναι από 5 έως 0,02 mg N L⁻¹ με αραιώση 1:2.
- Διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (3 M): Παρασκευή 1 L διαλύματος HCl 3 M αραιώνοντας 295 ml HCl 32% (10,17 M) (Merck© #100319) σε νερό MilliQ.
- Διάλυμα αντιδραστηρίου βαναδίου (50,9 mM): Διάλυση 400 mg χλωριούχου βαναδίου (III) (Sigma-Aldrich© #20827) σε 50 ml HCl 1 M και διήθηση μέσω διηθητικού χαρτιού Whatman για να αφαιρεθεί η περίσσεια κρούσεων. Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάζεται φρέσκο καθημερινά.
- Αντιδραστήριο Griess 1 (0,77 mM): Διάλυση 50 mg διυδροχλωρικής N-ναφθυλαιθυλενοδιαμίνης (Roth© #4342.1) σε 250 ml απιονισμένου νερού. Το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στο σκοτάδι στους 4 °C για αρκετούς μήνες.
- Αντιδραστήριο Griess 2 (58 mM σουλφανιλαμίδη): Διάλυση 5 g σουλφανιλαμίδης (Sigma-Aldrich© #S9251) σε 500 ml HCl 3 M. Το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί στο σκοτάδι στους 4 °C για αρκετούς μήνες.

Πειραματική διαδικασία

Στην πλάκα μικροτιτλοδότησης μεταφέρθηκαν με πιπέτα με τη σειρά 100 μl από κάθε δείγμα, 100 μl από τα πρότυπα διαλύματα και 100 μl από το τυφλό (εκχυλιστικό), ακολούθως προστέθηκαν 100 μl διαλύματος αντιδραστήριου βαναδίου. Αμέσως μετά προστέθηκαν 50 μl από κάθε αντιδραστήριο Griess 1 και Griess 2, ώστε να έχουμε τελικό όγκο 300 μl. Τα αντιδραστήρια Griess μπορούν επίσης να αναμιχθούν σε ίσους όγκους (100 μl) απευθείας πριν από την προσθήκη στα πηγαδάκια. Γίνεται επώαση του τρυβλίου στους 37 °C για μία ώρα και μετά μετρήθηκαν με το EnSpire® Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) στα 540 nm. Η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στη δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης με τις συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων που κυμαίνονται μεταξύ 5 έως 0,02 mg N L⁻¹. Για τον υπολογισμό λοιπόν, σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη από τη μετρούμενη απορρόφηση σε σχέση με τη συγκέντρωση και εκτελείται μια γραμμική παλινδρόμηση. Γίνεται ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων του δείγματος και του τυφλού και αφαιρείται η μέση τιμή του τυφλού από τις τιμές δείγματος για να δοθεί η διορθωμένη συγκέντρωση διαλύματος δείγματος. Η συγκέντρωση στα αρχικά δείγματα εδάφους είναι γραμμάρια εδάφους ξηρό βάρος.

2.2.2. Προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης

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

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα (NH₄)₂SO₄ 10mM (stock): 1,3214g (NH₄)₂SO₄ διαλύθηκαν σε 1 L dH₂O.
- Διάλυμα (NH₄)₂SO₄ 1mM: παρασκευάστηκε με αραιώση 100 ml διαλύματος (NH₄)₂SO₄ 10 mM σε dH₂O, σε τελικό όγκο 1L.
- Διάλυμα NaClO₃ 1,5M: 15,97 g NaClO₃ διαλύθηκαν σε 100 ml dH₂O.
- Διάλυμα KCl 2M: 149,12 g KCl διαλύθηκαν σε 1 L dH₂O.
- Ρυθμιστικό διάλυμα NH₄Cl 0,19M, pH 8,5: 10,163 g NH₄Cl διαλύθηκαν σε 1 L dH₂O και το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 8,5.
- Χρωματικός δείκτης: 2 g sulfanilamide και 0,1 g N-naphthyl ethylene diamine dihydrochloride διαλύθηκαν σε 150 ml dH₂O και ακολούθησε προσθήκη 20 ml πυκνού φωσφορικού οξέως και συμπλήρωση του όγκου του διαλύματος έως τα 200 ml με dH₂O.
- Πυκνό διάλυμα NaNO₂ (1000 μg NO₂⁻N ml⁻¹): 4,926 g NaNO₂ διαλύθηκαν σε 1 L dH₂O.

- Διάλυμα εργασίας NaNO_2 ($10 \mu\text{g NO}_2^- \text{N ml}^{-1}$): προέκυψε με αραιώση 5 ml του πυκνού διαλύματος NaNO_2 με dH_2O , σε τελικό όγκο 500 ml.

Πειραματική διαδικασία

Από τα επιμέρους εδαφικά δείγματα ζυγίστηκαν 5 g και μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 ml και κατόπιν προστέθηκαν 20 ml διαλύματος $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 mM. Έπειτα προστέθηκε 0,1 ml NaClO_3 1,5 M, που δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας της περαιτέρω οξείδωσης των νιτρωδών. Για κάθε μεταχείριση, χρησιμοποιήθηκαν τρεις 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 πέντε 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 το πέρας των πέντε ωρών, όλα τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά ακολούθησε προσθήκη 5 ml διαλύματος KCl 2 M, σύντομη ανάδευση και διήθηση. Για την φωτομετρική ανάλυση, αναμίχθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 5 ml από το εκχύλισμα που παραλήφθηκε μετά την διήθηση, 3 ml ρυθμιστικό διάλυμα NH_4Cl και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη που αντιδρά με τα NO_2^- . Ακολούθησε σύντομη ανάδευση για ομογενοποίηση του μίγματος και επώαση για δεκαπέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος. Έπειτα 300 μl από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε 96-wellplate και πραγματοποιήθηκε μέτρηση με τη βοήθεια του EnSpire© Multimode Plate Reader (PerkinElmer), στα 520 nm.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων στα εδαφικά δείγματα, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη δυνητικής νιτροποίησης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα NaNO_2 διαφορετικών συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, 0/ 2/ 4/ 8/ 10 ml διαλύματος NaNO_2 ($10 \mu\text{g NO}_2^- \text{N ml}^{-1}$), μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml, όπου προστέθηκαν 20 ml διαλύματος KCl 2 M και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 100 ml 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 5 ml από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα αναμίχθηκαν με 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος NH_4Cl 0,19 M και 2 ml 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. Προσδιορισμός της αφθονίας των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών και των βακτηρίων στο έδαφος

2.3.1. Εξαγωγή DNA από τα δείγματα εδάφους

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

Στη συνέχεια, προκειμένου να προσδιοριστεί η αφθονία του γονιδίου *amoA* των AOB και AOA, καθώς και των ολικών βακτηρίων μέσω του γονιδίου *16S rRNA*, πραγματοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) σε σύστημα BIORAD CFX Connect Real Time PCR System.

2.3.2. Προσδιορισμός της αφθονίας των AOB σε δείγματα εδάφους μέσω qPCR

Οι εκκινητές *amoA-1F* και *amoA-2R* χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOB (Rotthauwe et al., 1997). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

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

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 μ l, με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν και τις συνθήκες θερμοκυκλοποίησης της αντίδρασης qPCR να παρατίθενται αντίστοιχα στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 3: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση μέρους του γονιδίου *amoA* των AOB.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μ l	1x
Εκκινητής <i>amoA-1F</i> (20 pmol/ μ l)	0,1 μ l	0,2 μ M
Εκκινητής <i>amoA-2R</i> (20 pmol/ μ l)	0,1 μ l	0,2 μ M
BSA (10 μ g/ μ l)	0,2 μ l	200 ng μ l ⁻¹
DNA	2 μ l	-
ddH ₂ O	2,6 μ l	-
Συνολικός όγκος	10 μ l	-

Πίνακας 4: Οι συνθήκες θερμοκυκλοποίησης της ποσοτικής αντίδρασης qPCR του γονιδίου *amoA* των AOB.

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

2.3.3. Προσδιορισμός της αφθονίας των AOA σε δείγματα εδάφους μέσω qPCR

Οι εκκινητές *Arch-amoAF* και *Arch-amoAR* χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *amoA* των AOA (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 10 ml, με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν και τις συνθήκες θερμοκυκλοποίησης της αντίδρασης qPCR να παρατίθενται αντίστοιχα στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση μέρους του γονιδίου *amoA* των AOA.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
ΚΑΡΑ SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μl	1x
Εκκινητής <i>Arch-amoAF</i> (20 pmol/μl)	0,1 μl	0,2 μM
Εκκινητής <i>Arch-amoAR</i> (20 pmol/μl)	0,1 μl	0,2 μM
BSA (10 μg/μl)	0,2 μl	200 ng μl ⁻¹
DNA	2 μl	-
ddH ₂ O	2,6 μl	-
Συνολικός όγκος	10 μl	-

Πίνακας 6: Οι συνθήκες θερμοκυκλοποίησης της ποσοτικής αντίδρασης qPCR του γονιδίου *amoA* των AOA.

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

2.3.4. Προσδιορισμός της αφθονίας των βακτηρίων σε δείγματα εδάφους μέσω qPCR

Προκειμένου να εκτιμηθεί η επίδραση του EPM στην αφθονία ομάδων μικροοργανισμών εκτός στόχου δράσης, πραγματοποιήθηκε qPCR στα δείγματα DNA ($1\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) που εκχυλίστηκαν από τα δείγματα εδάφους. Οι μικροοργανισμοί που της ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας του εδάφους, των οποίων η αφθονία μελετήθηκε ήταν τα βακτήρια. Οι εκκινητές Eub 338 και Eub 518 χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου *16SrRNA* των βακτηρίων (Fierer et al., 2005). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- **Eub 338:** 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'
- **Eub 518:** 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης qPCR ήταν 10 ml, με τα επιμέρους συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν και τις συνθήκες θερμοκυκλοποίησης της αντίδρασης qPCR να παρατίθενται αντίστοιχα στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR για την ενίσχυση μέρους του γονιδίου *16SrRNA* των βακτηρίων.

Αντιδραστήρια	Όγκος	Τελική συγκέντρωση
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	5 μl	1x
Εκκινητής Eub 338 (20 pmol/ μl)	0,1 μl	0,2 μM
Εκκινητής Eub 518 (20 pmol/ μl)	0,1 μl	0,2 μM
BSA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	0,2 μl	200 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$
DNA	2 μl	-
ddH ₂ O	2,6 μl	-
Συνολικός όγκος	10 μl	-

Πίνακας 8: Οι συνθήκες θερμοκυκλοποίησης της ποσοτικής αντίδρασης qPCR του γονιδίου *16SrRNA* των βακτηρίων

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

2.4. Στατιστική ανάλυση

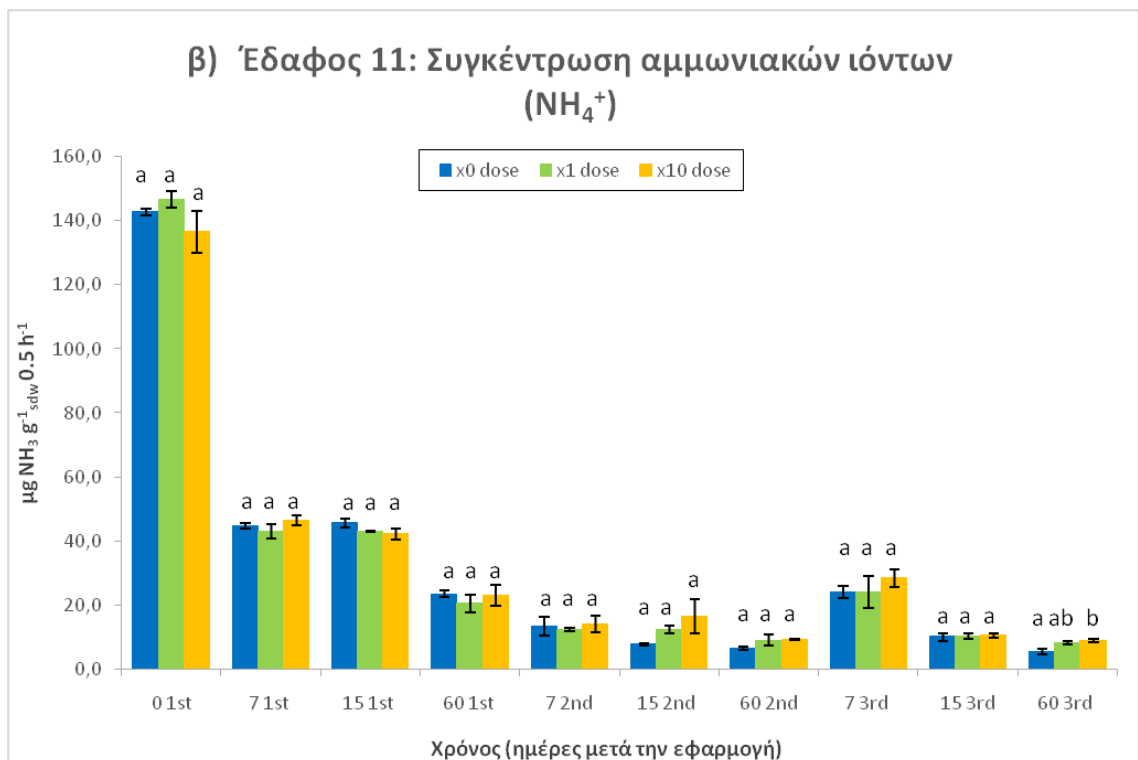
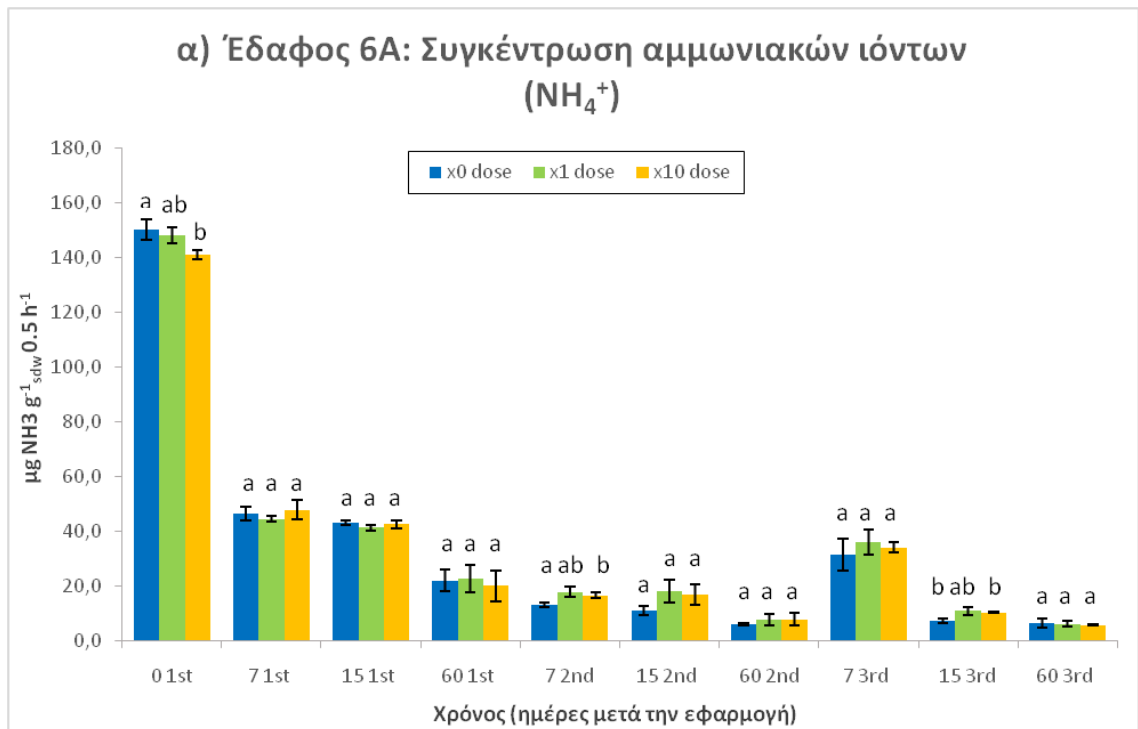
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Rstudio με γλώσσα προγραμματισμού R (RCoreTeam 2018, <https://www.R-project.org/> και έκδοση 3.5.0). Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο Agricolae (v1.3-5; FelipedeMendiburu, 2021) και πραγματοποιήθηκαν οι στατιστικές αναλύσεις Oneway Anova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

Κεφάλαιο 3 Αποτελέσματα

3.1. Επίδραση του ivermectin στη λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών

3.1.1. Επίδραση του ivermectin στα επίπεδα αμμωνιακών ιόντων στο έδαφος

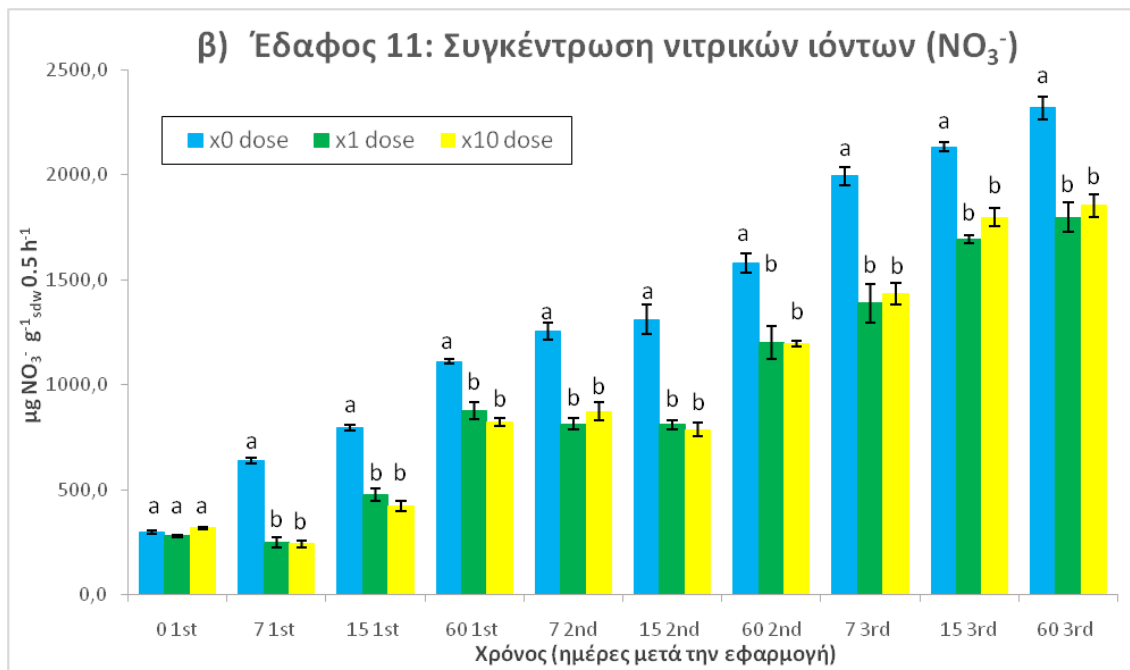
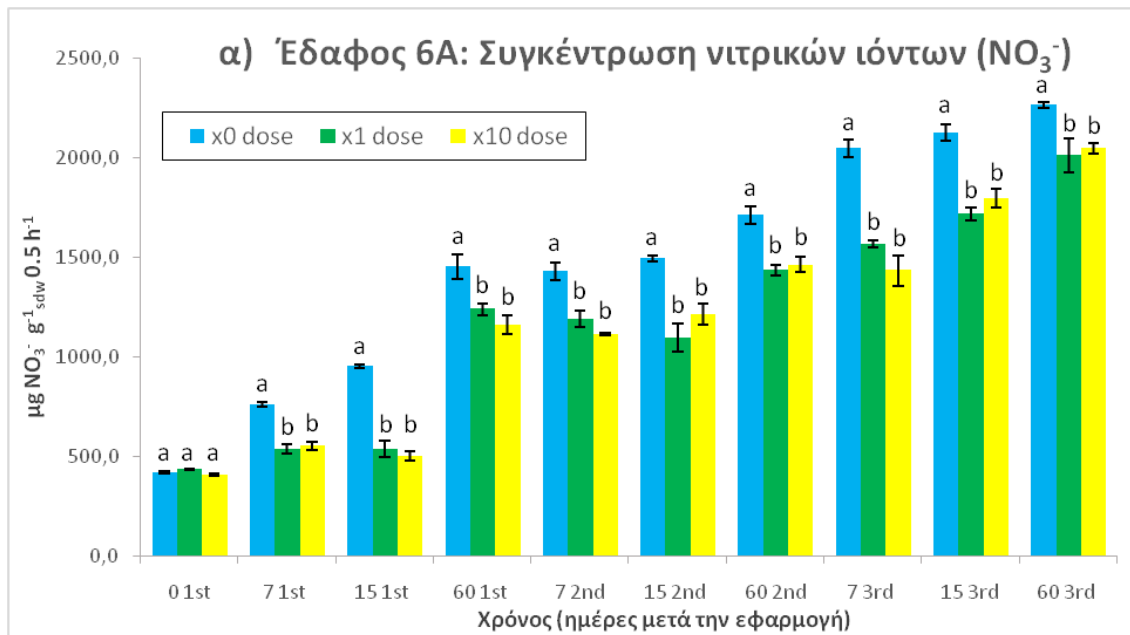
Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της επίδρασης του EPM στη συγκέντρωση των επιπέδων των αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+) στα δείγματα εδάφους 6A και 11 παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 1α και 1β αντίστοιχα. Και στα δύο εδάφη και σε όλες τις μεταχειρίσεις (X_0 , X_1 και X_{10}) παρατηρείται μεγάλη μείωση στη συγκέντρωση του NH_4^+ με την πάροδο του χρόνου αμέσως μετά την πρώτη εφαρμογή του EPM, με εξαίρεση μια μικρή αύξηση στην T_7 της 3^{ης} εφαρμογής. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στον εμπλουτισμό των δειγμάτων εδάφους με πηγή αζώτου, που πραγματοποιήθηκε πριν την 1^η και την 3^η εφαρμογή. Τόσο στο έδαφος 6A, όσο και στο έδαφος 11, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) στη μείωση των επιπέδων NH_4^+ ανάμεσα στις μεταχειρίσεις όπου είχαμε εφαρμογή του EPM (X_1 και X_{10}) σε σχέση με τον μάρτυρα (X_0), με εξαίρεση για το έδαφος 6A αμέσως μετά την 1^η εφαρμογή, στις 7 ημέρες μετά την 2^η εφαρμογή και στις 15 ημέρες μετά την 3^η εφαρμογή σε σχέση με το μάρτυρα και για τα δύο επίπεδα συγκέντρωσης EPM. Ενώ για το έδαφος 11, στις 60 ημέρες μετά την 3^η εφαρμογή, παρατηρήθηκε μια ελάχιστη αύξηση του NH_4^+ και στις δύο μεταχειρίσεις όπου είχαμε εφαρμογή του EPM σε σχέση με το μάρτυρα.



Διάγραμμα 1: Επίδραση του EPM στη συγκέντρωση των αμμωνιακών ιόντων (NH₄⁺) στα εδάφη α) 6A και β) 11. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.1.2. Επίδραση του eprinomectin στα επίπεδα των νιτρικών ιόντων στο έδαφος

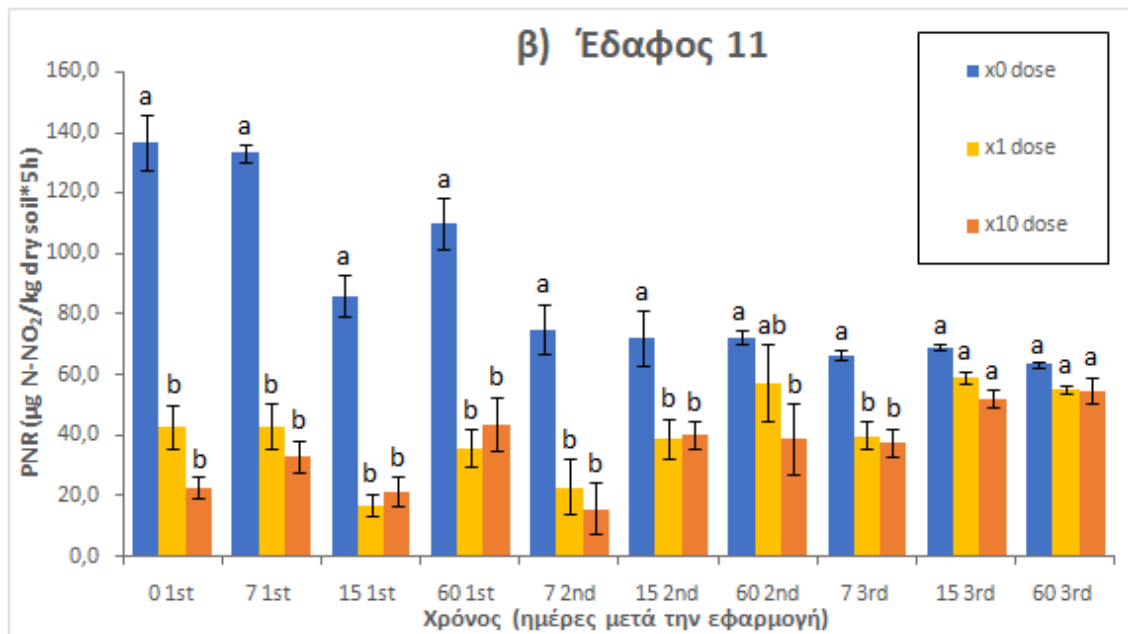
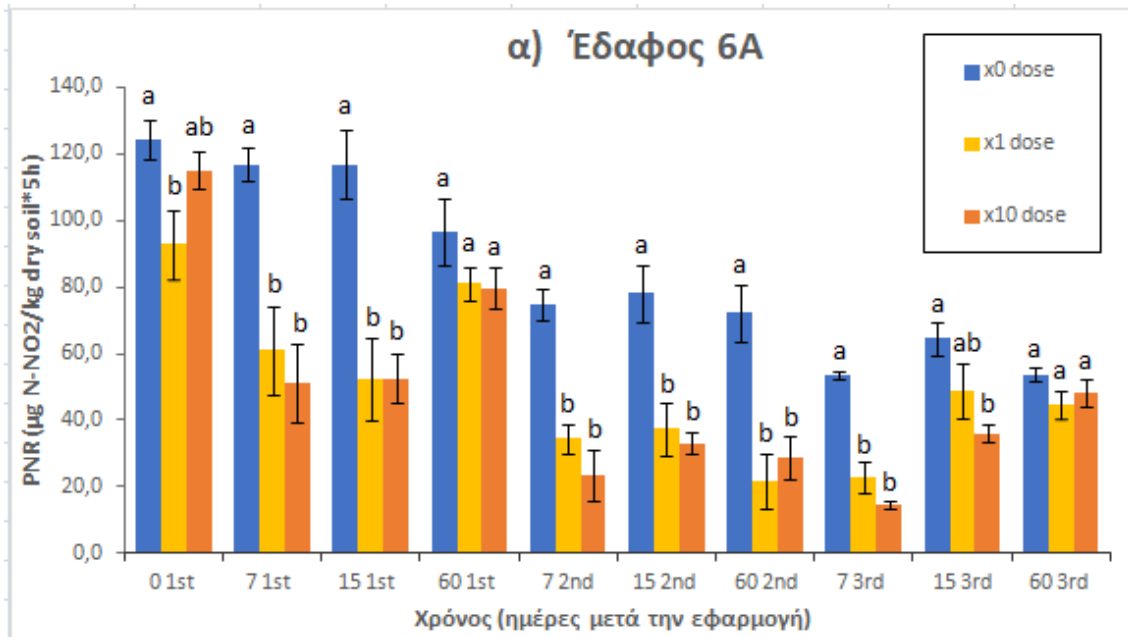
Στα Διαγράμματα 2α και 2β παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του EPM στα επίπεδα συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων (NO_3^-) στα δείγματα εδάφους 6Α και 11 αντίστοιχα. Και στα δύο εδάφη παρατηρείται σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του NO_3^- με την πάροδο των εφαρμογών, αλλά αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης, στο σύνολο σχεδόν των χρόνων δειγματοληψίας είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερη ($p < 0,05$) στις μεταχειρίσεις όπου είχαμε εφαρμογή του EPM (και για τα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων) σε σχέση με τον μάρτυρα. Και στα δύο εδάφη καταγράφηκε σχεδόν σε όλη την διάρκεια του πειράματος μια σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση των νιτρικών στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή EPM σε σχέση με τον μάρτυρα.



Διάγραμμα 2: Επίδραση του EPM στη συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων (NO_3^-) στα εδάφη α) 6A και β) 11. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.1.3. Επίδραση του *epinomectin* στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση της επίδρασης των εξεταζόμενων συγκεντρώσεων εφαρμογής του EPM στο ρυθμό της δυνητικής νιτροποίησης στα δείγματα εδάφους 6A και 11 παρατίθενται στα Διαγράμματα 3α και 3β αντίστοιχα. Τόσο στο έδαφος 6A όσο και έδαφος 11 παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στο ρυθμό της δυνητικής νιτροποίησης από την πρώτη εφαρμογή του EPM, σε όλες τις μεταχειρίσεις όπου πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή του ανθελμινθικού φαρμάκου σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Και στα δύο εδάφη τα επίπεδα των NO_2^- ανάμεσα στο μάρτυρα και στις μεταχειρίσεις X_1 και X_{10} φαίνεται να εξισορροπούνται κατά τη διάρκεια της 3^{ης} εφαρμογής και ιδιαίτερα μετά το πέρας των 60 ημερών και στα δύο εδάφη. Πιο συγκεκριμένα, στο έδαφος 6A παρατηρείται σημαντική διαφορά στα επίπεδα σε όλα σχεδόν τα χρονικά σημεία δειγματοληψίας εκτός από το τέλος της πρώτης εφαρμογής αλλά και της τρίτης όπως προαναφέρθηκε. Στην περίπτωση του εδάφους 11 υπάρχει μια παραπλήσια εικόνα στα επίπεδα των NO_2^- ανάμεσα στις διαφορετικές μεταχειρίσεις με την επίδραση της συγκέντρωσης εφαρμογής του EPM να είναι πιο έντονη και ξεκάθαρη κατά τις πρώτες δύο εφαρμογές με εξαίρεση το τέλος της δεύτερης εφαρμογής, και για τα δύο επίπεδα συγκέντρωσης. Κατά την 3^η εφαρμογή τα επίπεδα του ρυθμού νιτροποίησης ανάμεσα στον μάρτυρα και στις μεταχειρίσεις X_1 και X_{10} εξισορροπούνται μετά τις 15 ημέρες και μέχρι το τέλος της εφαρμογής. Τέλος, και στα δύο εδάφη παρατηρείται μια μείωση στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης και στο έδαφος μάρτυρα με την πάροδο του χρόνου.

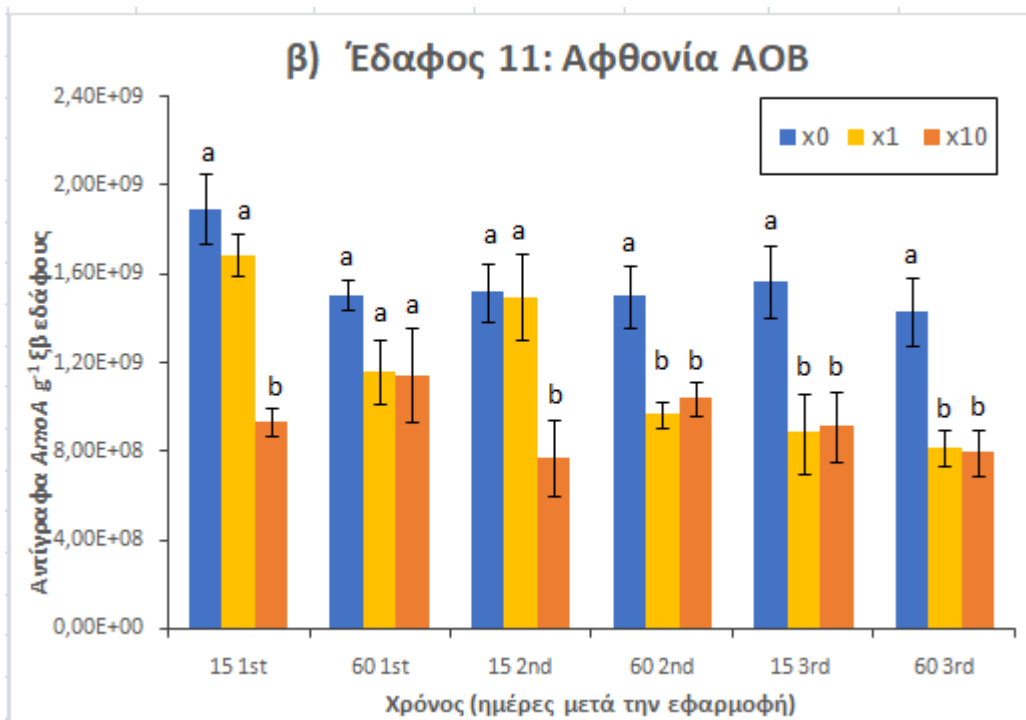
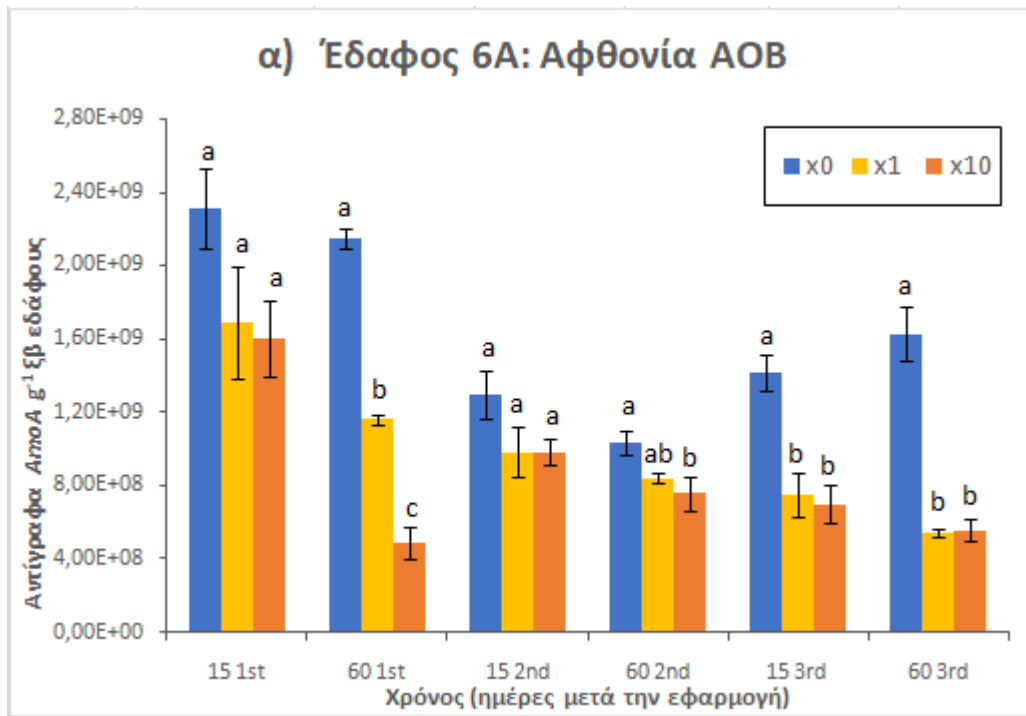


Διάγραμμα 3: Επίδραση του EPM στο ρυθμό της δυννητικής νιτροποίησης στα εδάφη α) 6A και β) 11. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.2. Επίδραση του eprinomectin στην αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών

3.2.1. Επίδραση του eprinomectin στην αφθονία των AOB

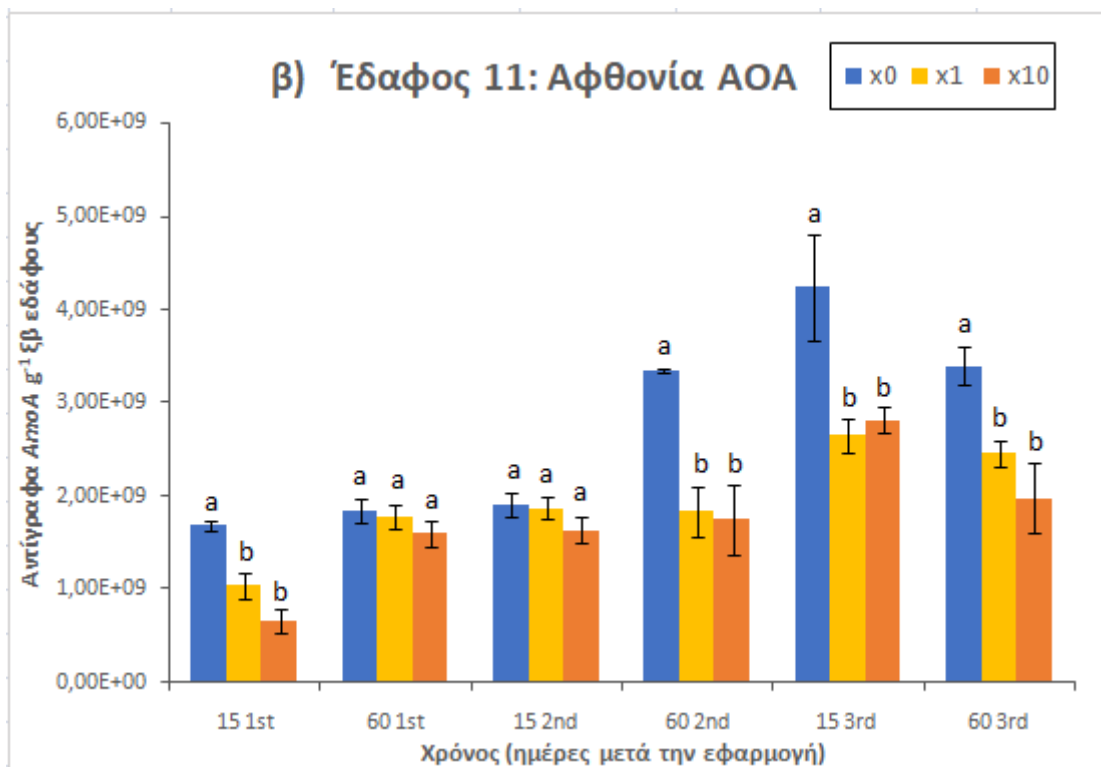
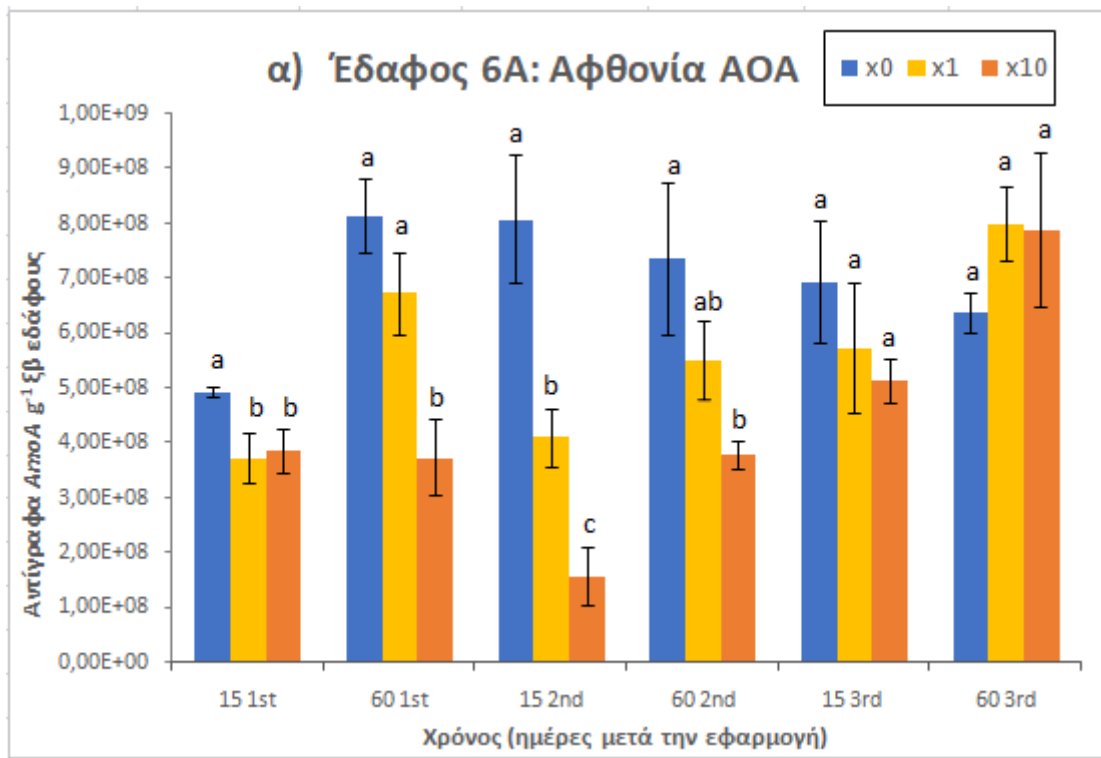
Τα αποτελέσματα της επίδρασης των συγκεντρώσεων εφαρμογής EPM στην αφθονία των νιτροδοποιητικών βακτηρίων, απεικονίζονται στα παρακάτω Διαγράμματα 4α και 4β αντίστοιχα για τα εδάφη 6A και 11. Στο έδαφος 6A παρατηρήθηκε πολύ σημαντική μείωση της αφθονίας κατά την 1^η εφαρμογή στο χρονικό σημείο T₆₀, και ακόμα πιο σημαντική μείωση στην συγκέντρωση X₁₀ σε σύγκριση με το μάρτυρα. Στη 2^η εφαρμογή οι διαφορές στην αφθονία των AOB ανάμεσα στις μεταχειρίσεις X₁ και X₁₀ είναι λιγότερο έντονες, ενώ κατά την 3^η εφαρμογή παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση σε σύγκριση με το μάρτυρα και στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων σε όλους τους χρόνους δειγματοληψίας. Στο έδαφος 11 παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση στην αφθονία σε σχέση με το μάρτυρα όσον αφορά τη μεταχείριση X₁₀ σε όλους σχεδόν τους χρόνους δειγματοληψίας, εκτός την ημέρα 60 της 1^{ης} εφαρμογής. Αντίθετα όσον αφορά το επίπεδο συγκέντρωσης X₁, σημαντικά στατιστικές διαφορές, όσον αφορά την αφθονία των AOB και σε σχέση πάντα με τον μάρτυρα, παρατηρήθηκαν μόνο μετά από τις 60 ημέρες από τη 2^η εφαρμογή μέχρι και το τέλος της μελέτης.



Διάγραμμα 4: Επίδραση του EPM στην αφθονία των ΑΟΒ στα εδάφη α) 6Α και β) 11. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.2.2. Επίδραση του *epirinomectin* στην αφθονία των ΑΟΑ

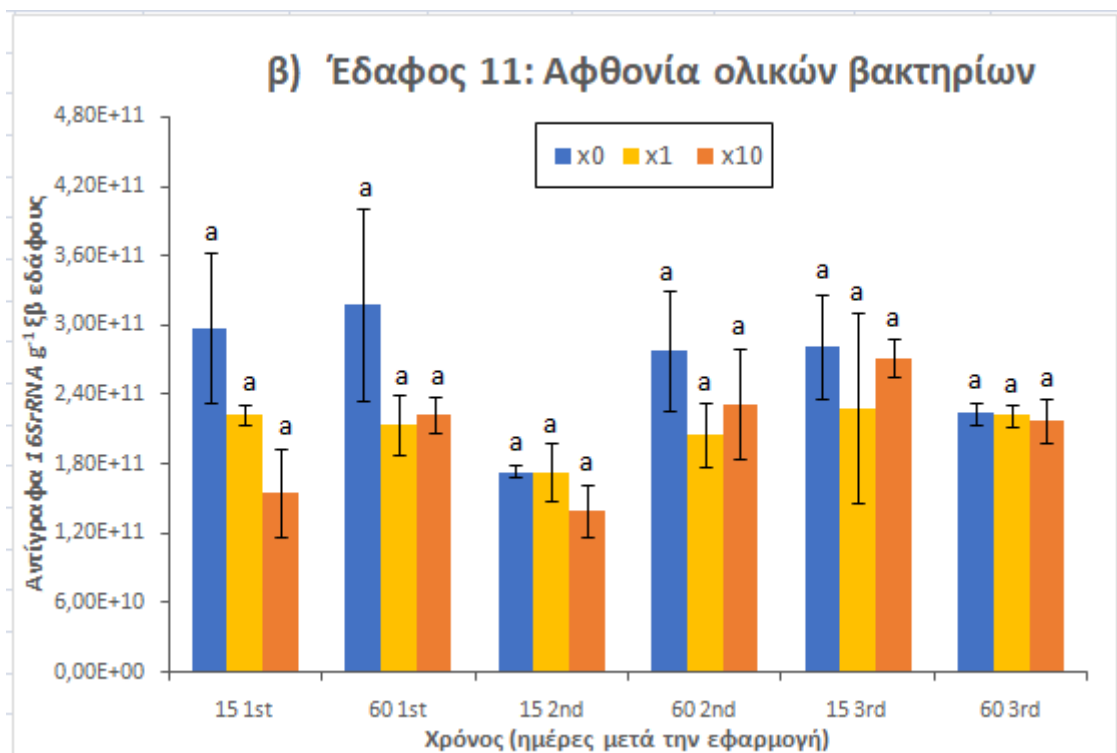
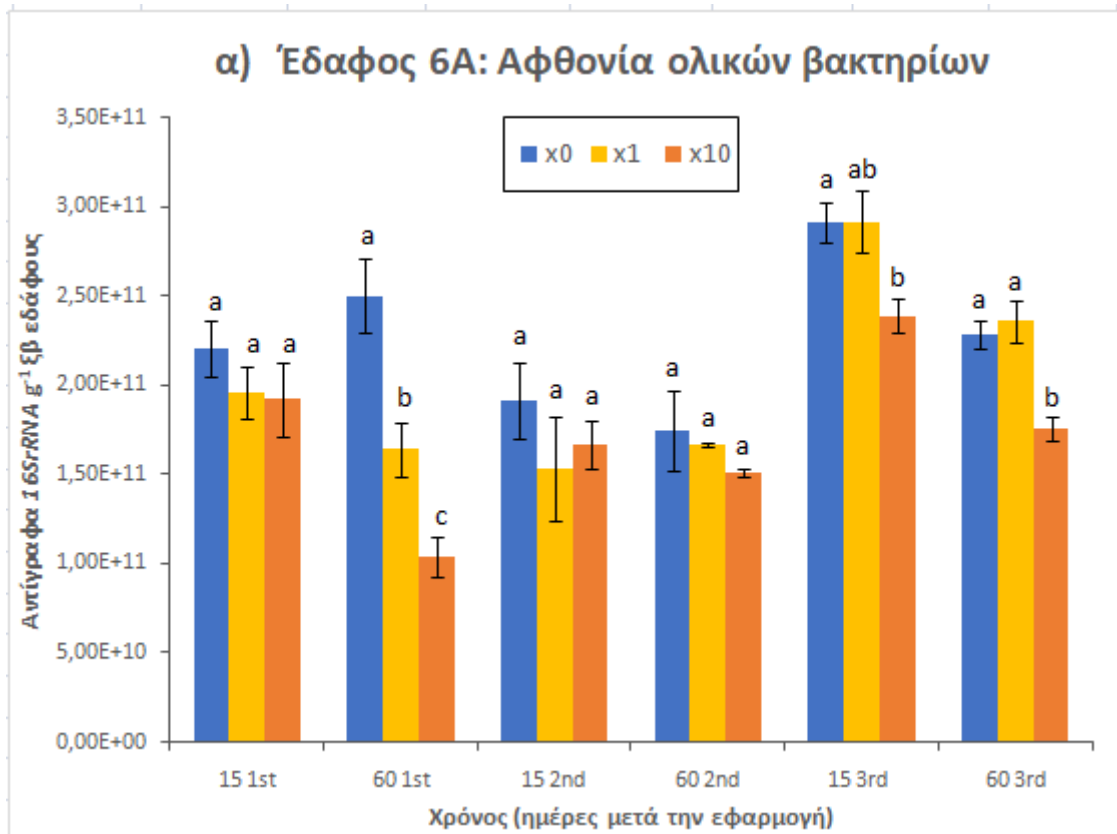
Στην περίπτωση των ΑΟΑ παρατηρούνται δύο διαφορετικά μοτίβα στα μελετώμενα εδάφη, όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 5α και 5β αντίστοιχα για τα εδάφη 6Α και 11. Από τη μία στο έδαφος 6Α παρατηρήθηκε μια σημαντική διαφορά στην αφθονία ανάμεσα στον μάρτυρα και τις μεταχειρίσεις όπου πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του EPM, με την αφθονία του *amoA* να είναι σημαντικά χαμηλότερη στις δύο μεταχειρίσεις και ιδιαίτερα στο επίπεδο συγκέντρωσης X_{10} . Αυτό το μοτίβο παρατηρήθηκε μέχρι και το τέλος της 2ης εφαρμογής. Κατά την 3^η εφαρμογή όμως οι διαφορές αυτές εξισορροπούνται με αποτέλεσμα να μην υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Στο έδαφος 11 από την άλλη παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση της αφθονίας των ΑΟΑ στις μεταχειρίσεις X_1 και X_{10} σε σχέση με τον μάρτυρα από τις 60 ημέρες της 2^{ης} εφαρμογής και μέχρι την ολοκλήρωση της μελέτης. Αντίθετα, με εξαίρεση την ημέρα 0 της 1^{ης} δειγματοληψίας, παρατηρείται ότι αρχικά δεν υπάρχουν ουσιαστικές μεταβολές στην αφθονία των ΑΟΑ ανάμεσα στις μεταχειρίσεις όπου εφαρμόστηκε το EPM και το έδαφος μάρτυρα.



Διάγραμμα 5: Επίδραση του EPM στην αφθονία των ΑΟΑ στα εδάφη α) 6A και β) 11. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τοπικά σφάλματα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

3.3. Επίδραση του ivermectin στην αφθονία των ολικών βακτηρίων

Στα Διαγράμματα 6α και 6β απεικονίζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης του EPM στη συνολική αφθονία των βακτηρίων στα εδάφη 6Α και 11 αντίστοιχα. Γενικότερα, και στα δύο εδάφη η παρουσία του EPM δε φαίνεται να επηρέασε την αφθονία των ολικών βακτηρίων. Εξαιρέσεις αποτέλεσαν η σημαντική μείωση στην αφθονία των ΑΟΑ ύστερα από την 1^η εφαρμογή στο χρονικό σημείο T₆₀ για τις συγκεντρώσεις X₁ και X₁₀. Στην περίπτωση της συγκέντρωσης X₁₀ στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε επίσης τόσο στις 15 ημέρες όσο και στις 60 ημέρες κατά την 3^η εφαρμογή. Όσον αφορά τη μεταχείριση X₁ πέρα από τις 60 ημέρες της 1^{ης} εφαρμογής δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στην αφθονία των βακτηρίων σε σχέση με το μάρτυρα. Στην περίπτωση του εδάφους 11, σε όλες τις μεταχειρίσεις που εξετάστηκαν παρουσία του EPM δεν επηρεάστηκε στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) η αφθονία των συνολικών βακτηρίων σε σχέση με το μάρτυρα.



Διάγραμμα 6: Επίδραση του EPM στην αφθονία των βακτηρίων στα εδάφη α) 6A και β) 11. Οι ράβδοι σφάλματος αντιπροσωπεύουν τυπικά σφάλματα μεταξύ των τριών βιολογικών επαναλήψεων. Διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στον ίδιο χρόνο.

Κεφάλαιο 4 Συζήτηση και συμπεράσματα

4.1. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη έρχεται να ρίξει φώς σε ένα πεδίο όπου μέχρι σήμερα υπάρχουν λίγα δεδομένα. Δηλαδή, στην αξιολόγηση της τοξικότητας των αβερμεκτινών στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Συγκεκριμένα του συνθετικού ανθελμινθικού φαρμάκου epinomectin (EPM), σε σχέση με την α) λειτουργία και β) την αφθονία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών αλλά και γ) την αφθονία του συνόλου της βακτηριακής κοινότητας σε δύο επιλεγμένα εδάφη.

Σε επίπεδο μελέτης της λειτουργίας εξετάστηκαν οι μεταβολές των επιπέδων των αμμωνιακών (NH_4^+) και νιτρικών (NO_3^-) ιόντων, καθώς επίσης και της δυνητικής νιτροποίησης, ανάμεσα στις διαφορετικές μεταχειρίσεις με την πάροδο του χρόνου. Η φωτομετρική ανάλυση και η μεταβολή των επιπέδων των αμμωνιακών, νιτρικών και νιτρικών ιόντων μπορεί να δώσει μία έμμεση εικόνα για τα επίπεδα της νιτροποίησης στο έδαφος.

Τα επίπεδα των NH_4^+ και για τα δύο εδάφη που μελετήθηκαν μειώθηκαν με το πέρας της πειραματικής διαδικασίας για όλες τις μεταχειρίσεις κάτι που είναι σύμφωνο με την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Di & Cameron, 2011, H., O'Callaghan et al. 2010, Liu et al. 2017, T., Li et al 2008.). Τα αποτελέσματα της μεταβολής των επιπέδων των NH_4^+ έρχονται σε συμφωνία με τη μεταβολή των επιπέδων των NO_3^- . Σχετικά με την επίδραση του EPM στα επίπεδα των NO_3^- , παρατηρήθηκε μια συστηματική μείωση της συγκέντρωσης τους στις μεταχειρίσεις X_1 και X_{10} , παρέχοντας την πρώτη απόδειξη για περιορισμό της νιτροποίησης και της λειτουργίας των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών παρουσία του EPM.

Ο ρυθμός δυνητικής νιτροποίησης παρουσίασε στατιστικά σημαντική και άμεση μείωση και στα δύο εδάφη παρουσία και των δύο συγκεντρώσεων του EPM. Ωστόσο την τελευταία μέρα δειγματοληψίας στο έδαφος 6A παρατηρήθηκε μία εξισορρόπηση του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης μεταξύ των μεταχειρίσεων X_1 και X_{10} και του μάρτυρα (Papadopoulou et al. 2015). Η ίδια εικόνα παρατηρήθηκε και στο έδαφος 11 στις δύο τελευταίες ημέρες δειγματοληψίας. Αυτές οι παρατηρήσεις πιθανά δείχνουν μια προσαρμογή των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών στην όποια τοξική επίδραση του EPM, ιδιαίτερα στο έδαφος 11. Τα παραπάνω αποτελέσματα της δυνητικής νιτροποίησης σε συνδυασμό με τη σημαντική μείωση των επιπέδων νιτρικών στα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή EPM καταδεικνύουν την αρνητική επίδραση του ανθελμινθικού φαρμάκου στη λειτουργία των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών, κάτι που αναφέρεται για πρώτη φορά.

Παράλληλα, μελετήθηκε η επίδραση του EPM στην αφθονία των AOB και των AOA, καθώς αποτελούν, μαζί με άλλες λειτουργικές μικροβιακές ομάδες, δείκτες τοξικότητας διαφόρων ξενοβιοτικών ουσιών στο έδαφος (Papadopoulou et al. 2015, Karas et al. 2018, Vasileiadis et al. 2018). Η εφαρμογή του EPM οδήγησε συστηματικά σε σημαντική μείωση της αφθονίας των AOB και των AOA και στα δύο εδάφη με την

επίδραση στα AOB να είναι πιο έντονη και σε όλη τη διάρκεια της μελέτης. Ενδιαφέρον, επίσης, παρουσίασε το γεγονός ότι στην περίπτωση των AOA, στο έδαφος 6A έχουμε μία πιο άμεση επίδραση στην αφθονία τους στις μεταχειρίσεις X₁ και X₁₀ σε σχέση με τον μάρτυρα με τα επίπεδα τους να εξισορροπούνται με την πάροδο του χρόνου και κατά την 3^η εφαρμογή. Διαφορετική εικόνα παρατηρείται στο έδαφος 11 όπου φαίνεται πως η πιθανή επίδραση του EPM εμφανίζεται στο τέλος της 2^{ης} εφαρμογής. Αυτή η εικόνα πιθανά να σχετίζεται με διαφορές της σύστασης τόσο της κοινότητας των AOA όσο και της ευρύτερης μικροβιακής κοινότητας στα δύο εδάφη. Σε αντίθεση με την αφθονία των AOB και των AOA, δεν παρατηρήθηκε ξεκάθαρη τοξική επίδραση του EPM στο συνολικό πληθυσμό των βακτηρίων.

4.2. Συμπεράσματα και προοπτικές

Εν κατακλείδι, με βάση τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αναδεικνύονται κάποιες πρώτες εμφανείς ενδείξεις για την τοξικότητα των ανθελμινθικών φαρμάκων, όπως το EPM, σε σχέση με τη λειτουργία και την αφθονία συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων του εδάφους, με σημαντικό ρόλο στη λειτουργία γεωχημικών κύκλων καθώς και στη λειτουργία του εδαφικού οικοσυστήματος. Η τοξικότητα του EPM εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση που εφαρμόζεται και τη συχνότητα εφαρμογής του, όσο πιθανώς και από τα χαρακτηριστικά του εδάφους και τη συνολική σύσταση της μικροβιακής κοινότητας, όσον αφορά τουλάχιστον τη δράση των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών. Η εφαρμογή του EPM επηρέασε την αφθονία των λειτουργικών μικροβιακών ομάδων που σχετίζονται με τη νιτροποίηση και που εμπλέκονται σε μεταγενέστερα στάδια του κύκλου αζώτου, χωρίς ωστόσο να επηρέασε συστηματικά, είτε θετικά είτε αρνητικά, την αφθονία της συνολικής βακτηριακής κοινότητας του εδάφους. Κάτι το οποίο είναι εν μέρει αναμενόμενο, καθώς οι νιτροδοποιητές μικροοργανισμοί είναι περισσότερο ευαίσθητοι στην παρουσία διάφορων ξενοβιοτικών ουσιών στο έδαφος.

Ωστόσο, πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες, μέσω qPCR, για την εξέταση της επίδρασης του EPM τόσο στην αφθονία άλλων μικροβιακών ομάδων όπως τα συνολικά αρχαία, οι συνολικοί μύκητες, όσο και στην αφθονία των συνολικών πρωτόζωων. Με αυτό τον τρόπο θα μπορέσει να διαμορφωθεί και μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για το είδος αυτής της τοξικής επίδρασης (άμεσης ή έμμεσης). Επιπλέον, σε μελλοντικό στάδιο, μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για την επίδραση του EPM στη μικροβιακή κοινότητα των εδαφών, θα δώσουν μελέτες μέσω αλληλούχισης νέας γενιάς όπου θα εξετασθούν πιθανές μεταβολές στην ποικιλότητα και στη σύσταση των διάφορων μικροβιακών ομάδων μικροοργανισμών του εδάφους. Καθώς, επίσης, και *in-vitro* πειράματα σε υγρές καλλιέργειες νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών, με προσθήκη του EPM για να αξιολογηθεί περαιτέρω και με πιο άμεσο τρόπο η ενδεχόμενη τοξική επίδραση του συγκεκριμένου ανθελμινθικού φαρμάκου.

- Aarestrup, Frank M. 2005. “Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin.” *Basic Clinical Pharmacology Toxicology* 96 (4): 271–81. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto960401.x>.
- Aksit, D., O. Korkut, E. Aksoz, and C. Gokbulut, 2016, “Plasma Disposition and Faecal Excretion of EPM Following Topical and Subcutaneous Administration in Non-Lactating Dairy Cattle”, *New Zealand Veterinary Journal* 64 (4): 207–11. <https://doi.org/10.1080/00480169.2016.1146172>.
- Alistair, B.A. Boxall, Dana W. Kolpin, Bent Halling Sorensen, Johannes Tolls, 2003, “Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks?”, *Environmental Science & Technology*, 286-294.
- Alvinerie, M., J.F. Sutra, P. Galtier, and C. Mage, 1999, “Pharmacokinetics of EPM in Plasma and Milk Following Topical Administration to Lactating Dairy Cattle.” *Research in Veterinary Science* 67 (3): 229–32. <https://doi.org/10.1053/rvsc.1999.0312>.
- Animals Committee on Drug Use in Food, Panel on Animal Health, and National Research Council, 1999, “Use of Drugs in Food Animals: Benefits and Risks”, Washington: National Academies Press. <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3375853>.
- Awasthi, Atul, Majid Razzak, Raida Al-Kassas, David R. Greenwood, Joanne Harvey, and Sanjay Garg, 2012b, “Separation and Identification of Degradation Products in EPM Formulation Using LC, LTQ FT-MS, H/D Exchange, and NMR”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 63: 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.12.030>.
- Awasthi, Atul, Majid Razzak, Raida Al-Kassas, Joanne Harvey, and Sanjay Garg, 2012a, “An Overview on Chemical Derivatization and Stability Aspects of Selected Avermectin Derivatives”, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 60 (8): 931–44. <https://doi.org/10.1248/cpb.c12-00258>.
- Bártíková, Hana, Radka Podlipná, and Lenka Skálová, 2016, “Veterinary Drugs in the Environment and Their Toxicity to Plants”, *Chemosphere* 144 (February): 2290–2301. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.137>.
- Bernhard, A., 2010, “The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact”, *Nature Education Knowledge* 3(10):25.
- Canga, Aranzazu Gonzalez, Ana Sahagun, M Jose Diez, Nelida Fernandez, Matilde Sierra, and Juan J Garcia, 2007, “Bioavailability of a Commercial Formulation of Ivermectin after Subcutaneous Administration to Sheep” 68 (1): 6.
- Carey, C.J., Dove, N.C., Beman, J.M., Hart, S.C., Aronson, E.L., 2016, “Meta-analysis reveals ammonia-oxidizing bacteria respond more strongly to nitrogen addition than ammonia-oxidizing archaea. Soil”, *Biology & Biochemistry* 99, 158–166.

- Cheng, Guyue, Jianan Ning, Saeed Ahmed, Junhong Huang, Rizwan Ullah, Boyu An., Haihong Hao, et al, 2019, “Selection and Dissemination of Antimicrobial Resistance in Agri-Food Production”, *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 8 (1): 158. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0623-2>.
- Cvetovich, Raymond J., Dennis H. Kelly, Lisa M. DiMichele, Richard F. Shuman, and Edward J. J. Grabowski, 1994, “Syntheses of 4’-Epi-Amino-4’-Deoxyavermectins B1”, *The Journal of Organic Chemistry* 59 (25): 7704–8. <https://doi.org/10.1021/jo00104a028>.
- Danaher, Martin, Laurence C. Howells, Steven R.H. Crooks, Vesna Cerkvencik-Flajs, and Michael O’Keeffe, 2006, “Review of Methodology for the Determination of Macrocyclic Lactone Residues in Biological Matrices”, *Journal of Chromatography B* 844 (2): 175–203. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.035>.
- De Boer, W., Gunnewiek, P.J.A.K., Veenhuis, M., Bock, E., Laanbroek, H.J., 1991, “Nitrification at low pH by aggregated chemolithotrophic bacteria”, *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3600–3604.
- 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.
- FDA, Dec. 9, 2010, 2009, “Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals”.
- Fellowes, R. A., A. G. Maule, R. J. Martin, T. G. Geary, D. P. Thompson, M. J. Kimber, N. J. Marks, and D. W. Halton, 2000, “Classical Neurotransmitters in the Ovicaptor of *Ascaris Suum*: Localization and Modulation of Muscle Activity”, *Parasitology* 121 (3): 325–36. <https://doi.org/10.1017/S0031182099006290>.
- 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. <https://doi:10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005>
- 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 and sediments of the ocean”, *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14683-14688.
- Galloway, J. N. et al., 1994, “Year 2020: Consequences of population growth and development on deposition of oxidized nitrogen”, *Ambio* 23, 120–123.
- Gu, Wei, Chang-jiao Sun, Qi Liu, and Hai-xin Cui, 2009, “Adsorption of Avermectins on Activated Carbon: Equilibrium, Kinetics, and UV-Shielding”, *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 19: s845–50. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(10\)60163-X](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(10)60163-X).
- Gubry-Rangin, C., Hai, B., Quince, C., Engel, M., Thomson, B.C., James, P., Schloter, M., Griffiths, R.I., Prosser, J.I., Nicol, G.W., 2011, “Niche

- specialization of terrestrial archaeal ammonia oxidizers”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 21206.
- 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, 566–574.
 - Gubry-Rangin, C., Novotnik, B., Mandič-Mulec, I., Nicol, G.W., Prosser, J.I., 2017, “Temperature responses of soil ammonia-oxidising archaea depend on pH”, *Soil Biology and Biochemistry* 106, 61–68.
 - Gwaltney-Brant, Sharon M., Camille DeClementi, and Ramesh C. Gupta, 2018, “Macrocyclic Lactone Endectocides”, In *Veterinary Toxicology*, 539–50. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00043-X>.
 - Halley, B. A., R. J. Nessel, and A. Y. H. Lu, 1989, “Environmental Aspects of Ivermectin Usage in Livestock: General Considerations”, In *Ivermectin and Abamectin*, edited by William C. Campbell, 162–72. New York, NY: Springer New York, https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3626-9_11.
 - Halley, Bruce A., Renate Winter, Stephen Yoon, S.E. Marley, and Steffen Rehbein, 2005, “The Environmental Safety of Eprinomectin to Earthworms”, *Veterinary Parasitology* 128 (1–2): 109–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.007>.
 - Halley, Bruce A., Robert J. Nessel, Anthony Y.H. Lu, and Raffaele A. Roncalli, 1989c, “The Environmental Safety of Ivermectin: An Overview”, *Chemosphere* 18 (7–8): 1565–72, [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(89\)90046-5](https://doi.org/10.1016/0045-6535(89)90046-5).
 - Halley, Bruce A., Theodore A. Jacob, and Anthony Y.H. Lu, 1989, “The Environmental Impact of the Use of Ivermectin: Environmental Effects and Fate”, *Chemosphere* 18 (7–8): 1543–63, [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(89\)90045-3](https://doi.org/10.1016/0045-6535(89)90045-3).
 - Halling-Sørensen, B., S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhøft, and S.E. Jørgensen, 1998, “Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment- A Review”, *Chemosphere* 36 (2): 357–93. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00354-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00354-8).
 - Hatzenpichler, R., 2012, “Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea”, *Applied and Environmental Microbiology* 78, 7501–7510.
 - Hayatsu, M., Tago, K., Uchiyama, I., Toyoda, A., Wang, Y., Shimomura, Y., Okubo, T., Kurisu, F., Hirono, Y., Nonaka, K., Akiyama, H., Itoh, T., Takami, H., 2017. An acid-tolerant ammonia-oxidizing γ -proteobacterium from soil. *ISME Journal* 11, 1130–1141.
 - Holste, J.E., L.L. Smith, J.A. Hair, J.L. Lancaster, J.E. Lloyd, W.K. Langholff, R.A. Barrick, and J.S. Eagleson, 1997, “EPM: A Novel Avermectin for Control of Lice in All Classes of Cattle”, *Veterinary Parasitology* 73 (1–2): 153–61. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00063-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00063-0).
 - Howarth, R. W., 2008, “Coastal nitrogen pollution: a review of sources and trends globally and regionally”, *Harmful Algae* 8, 14–20.

- Hu, H.W., Zhang, L.M., Dai, Y., Di, H.J., He, J.Z., 2013, “pH-dependent distribution of soil ammonia oxidizers across a large geographical scale as revealed by high-throughput pyrosequencing”, *Journal of Soils and Sediments* 13, 1439–1449.
- Huang, R., Wu, Y., Zhang, J., Zhong, W., Jia, Z., Cai, Z., 2011, “Nitrification activity and putative ammonia-oxidizing archaea in acidic red soils”, *Journal of Soils and Sediments* 12, 420–428.
- Ishikawa, I., and M. Iwasa, 2019, “Effects of EPM on the Survival, Reproduction and Feeding Activity of the Dung Beetles, *Onthophagus Lenzii* Harold, and Rare Species, *Copris Ochus Motschulsky* (Coleoptera: Scarabaeidae)”, *Bulletin of Entomological Research* 109 (2): 191–98. <https://doi.org/10.1017/S0007485318000317>.
- Jia, Z., Conrad, R., 2009, “Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil”, *Environmental Microbiology* 11, 1658–1671.
- Johnson, P. T. J. et al., 2010, “Linking environmental nutrient enrichment and disease emergence in humans and wildlife”, *Ecological Applications* 20, 16–29.
- Jones, Todd K., Lin Chu, Helmut Mrozik, Lyndia Slayton, Bryan Rafalko, Mary Lee Goldmann, Wesley L. Shoop, Gaye Margiatto, and Michael H. Fisher, 1994, “Synthesis and Biological Activity of 4a,4"-Disubstituted Avermectins”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (8): 1786–90. <https://doi.org/10.1021/jf00044a041>.
- Kandeler, E., 1995, “Potential nitrification”, In: Schinner, F., Ohlinger, 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.
- Kelly, J.J., Policht, K., Grancharova, T., Hundal, L.S., 2011, “Distinct responses in ammonia-oxidizing archaea and bacteria after addition of biosolids to an agricultural soil”, *Applied and Environmental Microbiology* 77, 6551–6558.
- Kerou, M., Offre, P., Valledor, L., Abby, S.S., Melcher, M., Nagler, M., Weckwerth, W., Schleper, C., 2016, “Proteomics and comparative genomics of *Nitrososphaera viennensis* reveal the core genome and adaptations of archaeal ammonia oxidizers”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E7937–E7946.
- Kim, J.G., Park, S.J., Sinninghe Damsté, J.S., Schouten, S., Rijpstra, W.I.C., Jung, M.Y., Kim, S.J., Gwak, J.H., Hong, H., Si, O.J., Lee, S., Madsen, E.L., Rhee, S.K., 2016, “Hydrogen peroxide detoxification is a key mechanism for growth of ammonia-oxidizing archaea”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 7888–7893.

- Kołodziejska, Marta, Joanna Maszkowska, Anna Białk-Bielińska, Stephanie Steudte, Jolanta Kumirska, Piotr Stepnowski, and Stefan Stolte, 2013, “Aquatic Toxicity of Four Veterinary Drugs Commonly Applied in Fish Farming and Animal Husbandry”, *Chemosphere* 92 (9): 1253–59. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.057>.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A., 2005, “Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon”, *Nature* 437, 543–546.
- Krogh, K.A., Soeborg T., Brodin B., Halling-Sorenson B., 2008, “Sorption and mobility of ivermectin in different soils”, *Journal of Environmental Quality*, 37: 2202 - 2211.
- Kuypers, M. M. M. et al., 2005, “Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 6478–6483.
- Lagos S., Moutzourelis C., Spiropoulou I., Alexandropoulou A., Karas P.A., Saratsis A., Sotiraki S., Karpouza D.G., 2022, “Biodegradation of anthelmintics in soils: does prior exposure of soils to anthelmintics accelerate their dissipation?”, *Environmental Science and Pollution Research*, <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19964-8>.
- Lanusse, C., A. Lifschitz, and F.A. Imperiale, 2009, “Macrocyclic Lactones: Endectocides Compounds” *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1119–44.
- Lanusse, C., A. Lifschitz, G. Virkel, L. Alvarez, S. Sánchez, J. F. Sutra, P. Galtier, and M. Alvinerie, 1997, “Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy*, 20: 91 - 99.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C., 2006, “Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils”, *Nature* 442, 806–809.
- 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.
- Litskas, V.D., G.C. Batzias, C.G. Paraskevas, A. Pavlatou-Ve, and X.N. Karamanlis, 2016, “Mobility of Pharmaceutical Compounds in the Terrestrial Environment: Adsorption Kinetics of the Macrocyclic Lactone EPM in Soils”, *Chemosphere* 144 (February): 1201–6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.100>.
- Litskas, V.D., X.N. Karamanlis, G.C. Batzias, and A.P. Kamarianos, 2011, “Sorption of the Antiparasitic Drug EPM in Three Soils”, *Chemosphere* 82 (2): 193–98. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.024>.
- Litskas, V.D., X.N. Karamanlis, G.C. Batzias, and S.E. Tsiouris, 2013, “Are the Parasiticidal Avermectins Resistant to Dissipation in the Environment? The

- Case of EPM”, *Environment International* 60 (October): 48–55.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.017>.
- Liu, H., Li, J., Zhao, Y., Xie, K., Tang, X., Wang, S., Li, Z., Liao, Y., Xu, J., Di, H., Li, Y., 2018, “Ammonia oxidizers and nitrite-oxidizing bacteria respond differently to long-term manure application in four paddy soils of south of China”, *Science of the Total Environment* 633, 641–648.
 - 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.
<https://doi:10.1371/journal.pone.0176305>.
 - Lumaret J.P., Errouissi F., Galtier P., Alvinerie M., 2005, “Pour on formulation of EPM for cattle: faecal elimination profile and effects on the development of the dung inhabiting diptera *Neomyia cirnicina* (L.) (Muscidae)”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24: 797 - 801.
 - Manuel Arias-Estévez, Eugenio López-Periago, Elena Martínez-Carballo, Jesús Simal- Gándara, Juan- Carlos Mejuto, Luis García-Río, 2008, “The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment*”, 123(4), 247-260.
 - Margalida, A., G. Bogliani, C. G. R. Bowden, J. A. Donazar, F. Genero, M. Gilbert, W. B. Karesh, et al, 2014, “One Health Approach to Use of Veterinary Pharmaceuticals”, *Science* 346 (6215): 1296–98.
<https://doi.org/10.1126/science.1260260>.
 - Martens-Habbena, W., Berube, P.M., Urakawa, H., de la Torre, J.R., Stahl, D.A., 2009, “Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria”, *Nature* 461, 976–979.
 - Martin, Dean F., Deanna R. Ward, and Barbara B. Martin, 2010, “Agricultural Pharmaceuticals in the Environment: A Need for Inventiveness”, *Technology & Innovation* 12 (2): 129–41.
<https://doi.org/10.3727/194982410X12858510212287>.
 - Mason, W.A., W.E. Pomroy, K.E. Lawrence, and I. Scott, 2012, “The Effect of Repeated, Four-Weekly EPM Treatment on Milk Production in Pasture-Based, Seasonally-Calving Dairy Cattle”, *Veterinary Parasitology* 189 (2–4): 250–59.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.003>.
 - McKellar, Quintin A., and Frank Jackson, 2004, “Veterinary Anthelmintics: Old and New”, *Trends in Parasitology* 20 (10): 456–61.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.002>.
 - Meng, H., Katayama, Y., Gu, J.D., 2017, “More wide occurrence and dominance of ammonia-oxidizing archaea than bacteria at three Angkor sandstone temples of Bayon, Phnom Krom and Wat Athvea in Cambodia”, *International Biodeterioration & Biodegradation* 117, 78–88.
 - Merck, 1996, “Ivomec Eprinex (EPM) pour-on for beef and dairy cattle: environmental assessment”, Report NADA 141-079EA. Merck and Company, Rahway, NJ, U.S.A.

- Merola, Valentina M., and Paul A. Eubig, 2012, “Toxicology of Avermectins and Milbemycins (Macrocyclic Lactones) and the Role of P-Glycoprotein in Dogs and Cats”, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 42 (2): 313–33. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.12.005>.
- 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. <https://doi:10.1006/niox.2000.0319>
- Morgan, Eric R., Nor-Azlina A. Aziz, Alexandra Blanchard, Johannes Charlier, Claude Charvet, Edwin Claerebout, Peter Geldhof, et al., 2019, “100 Questions in Livestock Helminthology Research”, *Trends in Parasitology* 35 (1): 52–71. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.10.006>.
- 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”, *Environmental Microbiology* 10, 2966–2978.
- Nieman, Christine C., Kevin D. Floate, Rolf-Alexander Düring, Andre P. Heinrich, Daniel K. Young, and Daniel M. Schaefer, 2018, “Eprinomectin from a Sustained Release Formulation Adversely Affected Dung Breeding Insects”, Edited by Gadi V.P. Reddy. *PLOS ONE* 13 (8): e0201074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201074>.
- Nunes-Alves, C., 2016, “Microbial ecology: Do it yourself nitrification”, *Nature Reviews Microbiology* 14, 61–61.
- 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 Biol Biochem* 42:1425-1436.
- Oaks, J. Lindsay, Martin Gilbert, Munir Z. Virani, Richard T. Watson, Carol U. Meteyer, Bruce A. Rideout, H. L. Shivaprasad, et al., 2004, “Diclofenac Residues as the Cause of Vulture Population Decline in Pakistan”, *Nature* 427 (6975): 630–33. <https://doi.org/10.1038/nature02317>.
- Oppel, J, Gabriele Broll, Dirk Löffler, Michael Meller, J Römbke, and Thomas Ternes, 2004, “Leaching Behaviour of Pharmaceuticals in Soil-Testing-Systems: A Part of an Environmental Risk Assessment for Groundwater Protection”, *The Science of the Total Environment* 328: 265–73. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.02.004>.
- Ouyang, Y., Norton, J.M., Stark, J.M., Reeve, J.R., Habteselassie, M. Y., 2016, “Ammonia-oxidizing bacteria are more responsive than archaea to nitrogen source in an agricultural soil”, *Soil Biology & Biochemistry* 96, 4–15.
- 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.

- Pope, Louise Jay, 2009, “Fate and Effects of Parasiticides in the Pasture Environment”, The University of York Environment.
- Pronk, M.E.J, and G.J. Schefferlie, 1998, “EPM. In: Toxicological Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food”, In Toxicological Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food, 3–22, WHO Food Additives Series, No 41. Geneva: World Health Organization. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v041je02.htm>.
- Prosser, J.I., Nicol, G.W., 2008, “Relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment”, Environmental Microbiology 10, 2931–2941.
- Rice, M.C., Norton, J.M., Valois, F., Bollmann, A., Bottomley, P.J., Klotz, M.G., Laanbroek, H.J., Suwa, Y., Stein, L.Y., Sayavedra-Soto, L., Woyke, T., Shapiro, N., Goodwin, L.A., Huntemann, M., Clum, A., Pillay, M., Kyrpides, N., Varghese, N., Mikhailova, N., Markowitz, V., Palaniappan, K., Ivanova, N., Stamatis, D., Reddy, T.B.K., Ngan, C.Y., Daum, C., 2016, “Complete genome of *Nitrosospira briensis* C-128, an ammonia-oxidizing bacterium from agricultural soil”, Standards in Genomic Sciences 11, 46.
- Risgaard-Petersen, N. et al., 2006, “Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer”, Nature 443, 93–96.
- 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.
- Rudisill, M.A., Turco, R.F., Hoagland, L.A., 2016, “Fertility practices and rhizosphere effects alter ammonia oxidizer community structure and potential nitrification activity in pepper production soils”, Applied Soil Ecology 99, 70–77.
- Sangster, Nicholas C., Ann Cowling, and Robert G. Woodgate, 2018, “Ten Events That Defined Anthelmintic Resistance Research”, Trends in Parasitology 34 (7): 553–63. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.05.001>.
- Scheuerle, Miriam, Monia Mahling, and Kurt Pfister, 2009, “Anthelmintic Resistance of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants in Switzerland and Southern Germany”, Wiener Klinische Wochenschrift 121 Suppl 3: 46–49. <https://doi.org/10.1007/s00508-009-1235-2>.
- Schleper, C., 2010, “Ammonia oxidation: different niches for bacteria and archaea”, ISME Journal 4, 1092–1094.
- Segal, L.M., Miller, D.N., McGhee, R.P., Loecke, T.D., Cook, K.L., Shapiro, C.A., Drijber, R.A., 2017, “Bacterial and archaeal ammonia oxidizers respond differently to long-term tillage and fertilizer management at a continuous maize site”, Soil & Tillage Research 168, 110–117.
- Serafini, Suélen, Carine de Freitas Souza, Matheus Dellaméa Baldissera, Bernardo Baldisserotto, and Aleksandro Schafer Da Silva, 2020, “Nitric Oxide Levels in Brain, Liver, and Gills of Silver Catfish (*Rhamdia quelen*) Exposed to

- the Antiparasitic EPM”, *Fish Physiology and Biochemistry* 46 (5): 1867–72. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00836-2>.
- Serafini, Suélen, Carine de Freitas Souza, Matheus Dellaméa Baldissera, Bernardo Baldisserotto, Julia Corá Segat, Dilmar Baretta, Renato Zanella, and Aleksandro Schafer da Silva, 2019, “Fish Exposed to Water Contaminated with EPM Show Inhibition of the Activities of AChE and Na⁺/K⁺-ATPase in the Brain, and Changes in Natural Behavior.” *Chemosphere* 223: 124–30. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.026>.
 - Shoop, W.L., J.R. Egerton, C.H. Eary, H.W. Haines, B.F. Michael, H. Mrozik, P. Eskola, et al, 1996, “Eprinomectin: A Novel Avermectin for Use as a Topical Endectocide for Cattle”, *International Journal for Parasitology* 26 (11): 1237–42. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(96\)00123-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)00123-3).
 - Snow, Daniel D., David A. Cassada, Megan L. Larsen, Noelle A. Mware, Xu Li, Matteo D’Alessio, Yun Zhang, and J. Brett Sallach, 2017, “Detection, Occurrence and Fate of Emerging Contaminants in Agricultural Environments”, *Water Environment Research* 89 (10): 897–920. <https://doi.org/10.2175/106143017X15023776270160>.
 - Stahl, D.A., de la Torre, J.R., 2012, “Physiology and diversity of ammonia-oxidizing archaea”, *Annual Review of Microbiology* 66, 83–101.
 - Strous, M. et al., 1999, “Missing lithotroph identified as new planctomycete”, *Nature* 400, 446–449.
 - Taylor, M.A, 2012, “Emerging Parasitic Diseases of Sheep”, *Veterinary Parasitology* 189 (1): 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.027>.
 - Trailovic, Sasa M, and Jelena Trailovic Nedeljkovic, 2011, “Central and Peripheral Neurotoxic Effects of Ivermectin in Rats”, *Journal of Veterinary Medical Science* 73 (5): 591–99. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0424>.
 - Van den Brink, Paul J., José V. Tarazona, Keith R. Solomon, Thomas Knacker, Nico W. Van den Brink, Theo C. M. Brock, and J. P. (Hans) Hoogland, 2005, “The Use of Terrestrial and Aquatic Microcosms and Mesocosms for the Ecological Risk Assessment of Veterinary Medicinal Products”, *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (4): 820–29. <https://doi.org/10.1897/04-268R.1>.
 - Vasileiadis, S., Puglisi, E., Papadopoulou, E. S., Pertile, G., Suciú, N., Pappolla, R. A., Karpouzas, 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*.
 - Verhamme, D.T., Prosser, J.I., Nicol, G.W., 2011, “Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms”, *ISME Journal* 5, 1067–1071.
 - Vitousek, P. M. et al., 1997, “Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences”, *Ecological Applications* 7, 737–750.
 - Ward, B. B. et al., 2009, “Denitrification as the dominant nitrogen loss process in the Arabian Sea”, *Nature* 460, 78–81.

- Wells, R.J., 1998, “EPM”, In FAO Food and Nutrition Paper (Eds), 31–47, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Meeting. Rome: FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Wessén, E., Nyberg, K., Jansson, J.K., Hallin, S., 2010, “Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidizers to soil organic and fertilizer amendments under long-term management”, *Applied Soil Ecology* 45, 193–200.
- Wolstenholme, Adrian J., 2012, “Glutamate-Gated Chloride Channels”, *Journal of Biological Chemistry* 287 (48): 40232–38. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.406280>.
- Xiang, X., He, D., He, J.S., Myrold, D.D., Chu, H., 2017, “Ammonia-oxidizing bacteria rather than archaea respond to short-term urea amendment in an alpine grassland”, *Soil Biology & Biochemistry* 107, 218–225.
- Xu, X., Liu, X., Li, Y., Ran, Y., Liu, Y., Zhang, Q., Li, Z., He, Y., Xu, J., Di, H., 2017, “High temperatures inhibited the growth of soil bacteria and archaea but not that of fungi and altered nitrous oxide production mechanisms from different nitrogen sources in an acidic soil”, *Soil Biology & Biochemistry* 107, 168–179.
- Yao, H., Gao, Y., Nicol, G.W., Campbell, C.D., Prosser, J.I., Zhang, L., Han, W., Singh, B.K., 2011, “Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils”, *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4618–4625.
- Ying, J., Li, X., Wang, N., Lan, Z., He, J., Bai, Y., 2017, “Contrasting effects of nitrogen forms and soil pH on ammonia oxidizing microorganisms and their responses to long-term nitrogen fertilization in a typical steppe ecosystem”, *Soil Biology & Biochemistry* 107, 10–18.
- Zehr, J. P. et al., 2003, “Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison”, *Environmental Microbiology* 5, 539–554.
- Zhahnina, K., de Quadros, P.D., Camargo, F.A., Triplett, E.W., 2012, “Drivers of archaeal ammonia-oxidizing communities in soil”, *Frontiers in Microbiology* 3, 210.
- Zhang, L.M., Hu, H.W., Shen, J.P., He, J.Z., 2012, “Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils”, *ISME Journal* 6, 1032–1045.
- Zhang, L.M., Offre, P.R., He, J.Z., Verhamme, D.T., Nicol, G.W., Prosser, J.I., 2010, “Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 17240–17245.
- Γαλλίδης, Ελευθέριος Μ., 2012, «Αξιολόγηση της Εφαρμογής Επιλεγμένων Ατομικών Ανθελμινθικών Αγωγών για την Καταπολέμηση των Γαστρεντερικών Νηματωδών Παρασίτων των Μικρών Μηρυκαστικών», Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας, 2016, «Περιγραφή Στρατηγικών Δράσεων ΕΤΑΚ στην Ζωική Παραγωγή για τα έτη 2016-2017».

- Καβουνίδης, Κωνσταντίνος Α., 2014, «Επιπτώσεις από τη Χρήση της Κτηνιατρικής Φαρμακευτικής Ουσίας Επρινομεκτίνη (EPM B1a) σε Οργανισμούς του Εδάφους», Θεσσαλονίκη: Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Μούζουρας, Σάββας Γ., 1996, «Κτηνιατρική Φαρμακολογία», Αθήνα.