



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος  
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ –  
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»  
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Αλληλεπιδράσεις αντιβιοτικών κτηνοτροφίας με  
περιβαλλοντικές μικροβιακές κοινότητες**

Σαραντίδου Αποστολία

ΛΑΡΙΣΑ 2022

Αλληλεπιδράσεις αντιβιοτικών κτηνοτροφίας με περιβαλλοντικές  
μικροβιακές κοινότητες.

Livestock antibiotic interactions with environmental microbial  
communities.

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβλέπων Βασιλειάδης Σωτήριος: Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μέλος: Καρπούζας Δημήτριος: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μέλος: Παπαδοπούλου Καλλιόπη: Καθηγήτρια Βιοτεχνολογία Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Βασιλειάδη Σωτήριο και τον καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτρη για την άψογη συνεργασία τους και την καθοδήγησή τους.

Επιπλέον ευχαριστώ πολύ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Ευχαριστώ εγκάρδια την υποψήφια διδάκτορα Κατσίβελου Ελένη, την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Perguchon Chiara και την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Αθανασία Κατσούλα που ήταν οι υπεύθυνές μου στο εργαστήριο για την πολύτιμη βοήθειά τους και για την διάθεσή τους να μου μαθαίνουν καινούρια πράγματα και να λύνουν τις απορίες μου.

Επίσης ευχαριστώ πολύ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που ήταν πάντα πρόθυμα να με βοηθήσουν και να με συμβουλέψουν.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου για την εμπιστοσύνη και την υποστήριξη τους.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	9
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>11</b>
1.1 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	11
1.1.1 ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΔΙΕΘΝΗ ΑΓΟΡΑ.....	12
1.1.1.1 ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΣΕ ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΚΛΙΜΑΚΑ.....	12
1.1.1.2 ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΣΕ ΠΑΝΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ.....	13
1.1.2 ΟΦΕΛΗ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	14
1.1.3 ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	15
1.1.4 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΥΧΗ ΤΩΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ.....	17
1.1.5 TILMICOZIN.....	19
1.1.6 TIAMULIN.....	20
1.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ.....	21
1.2.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ.....	21
1.2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ/ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC).....	22
1.3 ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ.....	23
1.3.1 ΔΥΝΗΤΙΚΗ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	25
1.4 ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	26
<b>2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>27</b>
2.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΪΚΑΝΟΤΗΤΑΣ.....	28
2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ.....	29
2.2.1 ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	29
2.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΔΑΦΟΥΣ.....	29
2.2.2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ.....	30
2.2.2.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	30
2. 3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΚΑ ΣΤΗΝ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	31
2.3.1 ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	31

2.3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	32
2.3.2.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΝΙΤΡΟΔΩΝ ΙΟΝΤΩΝ .....	32
2.3.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ΚΑΙ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ.....	33
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>36</b>
3.1 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑ ΣΤΑ ΕΔΑΦΗ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	36
3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ TIAMULIN ΚΑΙ TILMICOSIN ΣΤΟΥΣ ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ.....	38
3.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΑ ΣΤΟ ΡΥΘΜΟ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	41
3.2.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΑ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΕΔΑΦΗ .....	41
3.2.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΑ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΕΔΑΦΗ.....	42
<b>4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>44</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>46</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I.....</b>	<b>53</b>
ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΗPLC ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ TIA ΚΑΙ TLM ΚΑΤΑ ΤΟΥΣ 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥΣ ΚΥΚΛΟΥΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ	
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II.....</b>	<b>55</b>
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ	
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III.....</b>	<b>57</b>
ΠΟΣΟΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV.....</b>	<b>59</b>
ΠΟΣΟΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υπερβολική χρήση των κτηνιατρικών αντιβιοτικών (ΚΑ) λόγω της ραγδαίας ανάπτυξης της κτηνοτροφικής βιομηχανίας, έχει δημιουργήσει ανησυχίες για την περιβαλλοντική τους τύχη και συμπεριφορά αλλά και για τις επιπτώσεις τους στο περιβάλλον και στη δημόσια υγεία. Τα ΚΑ δεν μεταβολίζονται πλήρως στο σώμα των ζώων με αποτέλεσμα ένα ποσοστό 75-90% απεκκρίνεται μαζί με τα ούρα και τα κόπρανα. Στη συνέχεια διανέμονται στο περιβάλλον μέσω της εφαρμογής κοπριάς σε γεωργικές καλλιέργειες ως οργανικό λίπασμα. Η συστηματική χρήση της κοπριάς έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση των ΚΑ στο έδαφος, επηρεάζοντας την μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, αναστέλλοντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών ευαίσθητους σε αυτά και μέσω της εξελικτικής πίεσης συμβάλλοντας στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών. Ωστόσο, η παραμονή των ΚΑ στο έδαφος και οι τοξικές επιδράσεις τους ποικίλλουν αναλόγως των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους και δεν είναι ακόμη σαφής η αλληλεπίδραση τους με τους βιολογικούς οργανισμούς του εδάφους.

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης είναι να διερευνήσει υπό ρεαλιστικές συνθήκες μέσω της εφαρμογής κοπράνων των χοίρων, την αλληλεπίδραση των ΚΑ με τη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους. Μελετήθηκαν δύο αντιβιοτικά: tiamulin και tilmicosin, λόγω της αυξημένης χρήσης τους στη χοιροτροφεία. Η επίδραση των δύο ΚΑ στην μικροβιακή κοινότητα διερευνήθηκε μέσω του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης (PNR) και του προσδιορισμού των αμμωνιακών ( $\text{NH}_4^+$ ) και νιτρικών ( $\text{NO}_3^-$ ) ιόντων, επιλέχθηκαν 2 εδάφη με διαφορετικό pH όξινο («Λιβάδι») και αλκαλικό («Ροδιά») και διαφορετικό ρυθμό αποδόμησης των ΚΑ. Η εφαρμογή των ΚΑ έγινε με δύο τρόπους, απευθείας στο έδαφος και μέσω των κοπράνων. Πραγματοποιήθηκαν 3 πειραματικοί κύκλοι για κάθε έδαφος των 40 ημερών για το tiamulin και tilmicosin, όπου στο τέλος κάθε κύκλου έγινε εκ νέου εμπλουτισμός ΚΑ. Παράλληλα διερευνήθηκε ο ρυθμός αποικοδόμησης των ΚΑ από την μικροβιακή κοινότητα των δύο εδαφών, μετά τις επαναλαμβανόμενες εφαρμογές ΚΑ κατά τους 3 πειραματικούς κύκλους, ο ποσοτικός προσδιορισμός των ΚΑ πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο ανάλυσης HPLC-DAD σε εκχυλισμένα δείγματα. Οι πιθανοί ρυθμοί νιτροποίησης κατεστάλησαν από το TIA μετά τη δεύτερη εφαρμογή και ενισχύθηκαν με το TLM στην άμεση εφαρμογή και στο έδαφος «Ροδιά» με αλκαλικό pH, ενώ στο όξινο έδαφος «Λιβάδι» οι πιθανοί ρυθμοί νιτροποίησης δεν φαίνεται να επηρεάζονται κατά την άμεση εφαρμογή του και μέσω της κοπριάς.

Τα αποτελέσματά υποδεικνύουν ότι η χορήγηση ΤΙΑ και ΤΛΜ σε χοιροτροφεία και η επακόλουθη χρήση κοπριάς σε γεωργικές καλλιέργειες είναι σχεδόν βέβαιο ότι θα οδηγήσει σε διάχυση υπολειμμάτων ΚΑ στο έδαφος με αδιερεύνητες ακόμη συνέπειες για το περιβάλλοντος και την ανθρώπινη υγεία.

## ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ

Αντιβιοτικά, αποικοδόμηση αντιβιοτικών στο έδαφος, δυνητική νιτροποίηση, επίδραση μικροβιακής κοινότητας



## ABSTRACT

Excessive use of veterinary antibiotics (VAs) due to the rapid growth of the livestock industry, has raised concerns about their environmental fate and behavior but also about their impact on the environment and public health. VAs are not fully metabolized in the animal body resulting in a rate of 75-90% being excreted in the urine and manure. They are then distributed to the environment through the application of manure to agricultural crops as organic fertilizer. Systematic use of manure results in the accumulation of VAs in the soil, affecting the microbial community of the soil, destroying microorganisms sensitive to them and through evolutionary pressure contributing to the development of resistant strains. However, the retention of VAs in the soil and their toxic effects vary depending on their physicochemical characteristics and their interaction with soil biological organisms is not yet clear.

The objectives of the present study are to investigate under realistic conditions through the application of pig manure, the interaction of VA with the soil microbial community. Two antibiotics were studied: tiamulin and tilmicosin, due to their increased use in pig farms. The effect of the two VAs on the microbial community was investigated through the rate of potential nitrification (PNR) and the determination of ammonia ( $\text{NH}_4^+$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) ions, 2 soils with different Ph, acidic ("Livadi") and alkaline ("Rodia"), were selected and different rate of degradation of VAs. The application of VAs was performed in either directly, or through manure. Three experimental cycles of 40 days were performed in each soil for tiamulin and tilmicosin, where at the end of each cycle VAs enrichment was performed again. At the same time, the rate of degradation of VAs by the microbial community of the two soils was investigated, after repeated applications of VA during the 3 experimental cycles, the quantification of VAs was performed by the HPLC-DAD analysis method in extracted samples. The possible nitrification rates were suppressed by the TIA after the second application and were enhanced by TLM in the direct application and in the soil "Rodia" with alkaline pH, while in the acidic soil "Livadi" the possible nitration rates do not seem to be affected during its immediate application and through the manure.

The results indicate that the application of TIA, TLM to pig farms and the subsequent use of manure in agricultural crops is almost certain to lead to the diffusion of VA

residues into the soil with still unexplored consequences for the environment and human health.

## KEYWORDS

Antibiotics, degradation of antibiotics in soil, potential nitrification, microbial community effect

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ANTIBIOTIKA

Η ανακάλυψη και παραγωγή των αντιβιοτικών στις αρχές του εικοστού αιώνα ήταν ένα από τα σημαντικότερα επιτεύγματα στην ιστορία της ιατρικής καθώς βρέθηκαν θεραπείες για πολλές μολυσματικές ασθένειες με αποτέλεσμα την αύξηση της ποιότητας και του προσδόκιμου ζωής των ανθρώπων.

Το 1929 ο Άγγλος ερευνητής Alexander Fleming (1881–1955) παρατήρησε τυχαία την αναστολή της δραστηριότητας μιας αποικίας σταφυλόκοκκου μολυσμένης από πράσινη μούχλα, η οποία παρήγαγε μια ουσία με αντιβακτηριακή δράση, την οποία και ονόμασε πενικιλίνη. Η δημοσίευση αυτής της παρατήρησης αποκαλείται συχνά «η γέννηση της εποχής των αντιβιοτικών» (Fleming 1929). Ο Fleming δεν μπόρεσε να παράγει αξιόλογες ποσότητες ούτε να αποσαφηνίσει τη δομή της πενικιλίνης ωστόσο 10 χρόνια αργότερα Ο Howard Walter Florey (1898-1968) και ο Ernst Boris Chain (1906-1979) διευκρίνισαν τη δομή της το 1939 και τον Μάρτιο του 1940 ο Chain απομόνωσε μικρή ποσότητα της δραστικής ένωσης. Το 1945 απονεμήθηκε το Νόμπελ Φυσιολογίας στους Fleming, Chain and Florey για την ανακάλυψη της πενικιλίνης και τη θεραπευτική της δράση σε διάφορες μολυσματικές ασθένειες (Mohr, 2016)

Το 1947, ο βιοχημικός Selman Abraham Waksman (1888-1973) προσδιόρισε το «αντιβιοτικό» ως εξής: «Ένα αντιβιοτικό είναι μια χημική ουσία, που παράγεται από μικροοργανισμούς, η οποία έχει την ικανότητα να αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών ή να τα καταστρέφει» (Waksman 1947). Ενώ ο Waksman, περιορίστηκε σε ουσίες μικροβιακής προέλευσης, σήμερα το «αντιβιοτικό» έχει πολλαπλές έννοιες και ορίζεται ως οποιαδήποτε αντιμικροβιακή ουσία, ανεξάρτητα εάν είναι φυσικής, ημισυνθετικής ή συνθετικής προέλευσης που αναστέλλει ή σκοτώνει παθογόνα βακτήρια (Bentley & Bennett, 2003)

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ταξινόμησης των αντιβιοτικών όπως, το φάσμα δράσης τους, ο μηχανισμός δράσης τους, η χημική δομή τους, ο οργανισμός από τον οποίο παράγονται ή η πορεία της βιοσύνθεσης τους. Έτσι μπορούν να διαχωριστούν σε αντιβιοτικά «στενού - φάσματος», που στοχεύουν σε συγκεκριμένους τύπους βακτηρίων ή σε αντιβιοτικά ευρέος φάσματος. Επίσης αυτά που καταστρέφουν τα βακτήρια λέγονται βακτηριοκτόνα, ενώ αυτά που αναστέλλουν την ανάπτυξη τους

βακτηριοστατικά. Κάποιοι από τους μηχανισμούς δράσης των αντιβιοτικών είναι η αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, βλάβες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, η αναστολή της σύνθεσης νουκλεϊνικών οξέων (DNA/RNA) και η αναστολή της σύνθεσης απαραίτητων μεταβολιτών. Οι πιο σημαντικές κατηγορίες με βάση την χημική τους δομή είναι οι β-λακτάμες, Κινολόνες, Τετρακυκλίνες, Αμινογλυκοσίδες, Μακρολίδες, Σουλφοναμίδια, Γλυκοπεπτιδία και Οξαζολιδινόνες (XU et al., 2008).

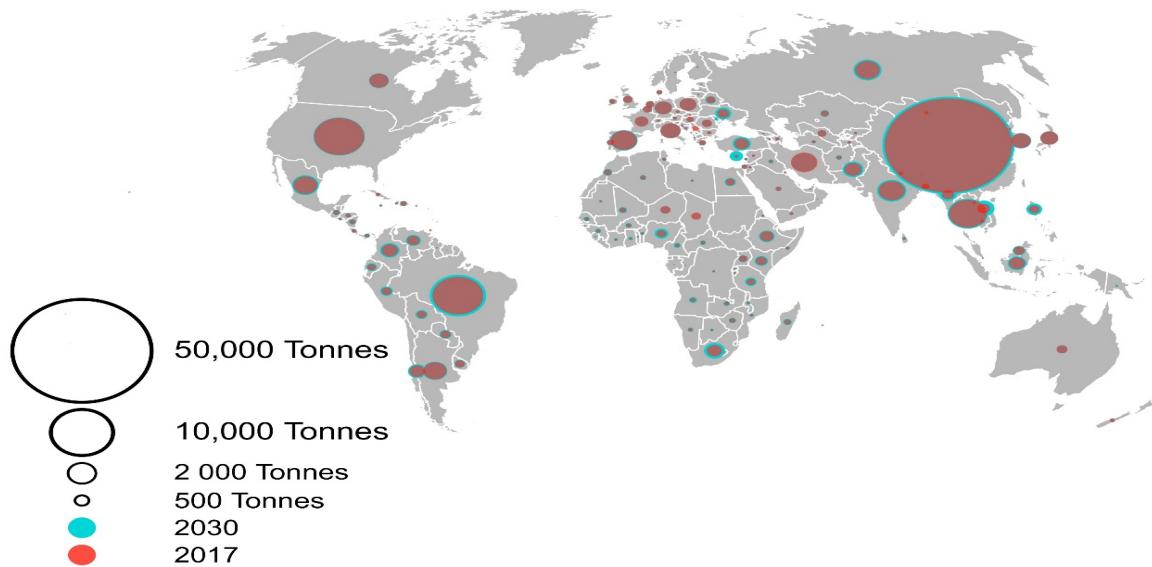
Η ιστορία των κτηνιατρικών αντιβιοτικών ξεκινά με την ανακάλυψη των συνθετικών σουλφοναμιδίων από τον Γερμανό ιατρό Paul Gerhard Domagk (1895–1964) το 1930. Το 1935 κυκλοφόρησε το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο αντιβιοτικό από την γερμανική φαρμακοβιομηχανία της Bayer, με την ονομασία Prontosil, το οποίο δρούσε κατά των θετικών κατά Gram κόκκων (κυρίως του στρεπτόκοκκου) και μείωσε σημαντικά τους θανάτους από πνευμονία, παιδικό πυρετό και μηνιγγίτιδα ενώ στη συνέχεια κυκλοφόρησαν και άλλα σουλφοναμίδια. Το 1938 τα φάρμακα αυτά εισήχθησαν και στη κτηνοτροφία, με την Βρετανία να είναι πρώτη στη χορήγηση των αντιβιοτικών σε ζώα (Kirchhelle, 2018).

### 1.1.1 ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΔΙΕΘΝΗ ΑΓΟΡΑ

#### 1.1.1.1 ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΣΕ ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΚΛΙΜΑΚΑ

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση των κτηνιατρικών αντιβιοτικών αποτελεί μείζον θέμα για την διεθνή επιστημονική κοινότητα καθώς μελέτες έχουν υπολογίσει ότι το 73% όλων των αντιβιοτικών που πωλούνται παγκοσμίως χρησιμοποιούνται σε κτηνοτροφικά ζώα (Van Boeckel et al., 2017).

Ειδικότερα, με βάση την έρευνα των Tiseo et al., το 2017 η Κίνα ήταν ο μεγαλύτερος καταναλωτής κτηνιατρικών αντιβιοτικών, αντιπροσωπεύοντας το 45% της παγκόσμιας χρήσης και προβλέπεται να παραμείνει στην κορυφή έως το 2030 (43%) και ακολούθησαν: Βραζιλία (7,9%), Ηνωμένες Πολιτείες (7,0%), Ταϊλάνδη (4,2%), Ινδία (2,2%), Ιράν (1,9%), Ισπανία (1,9%), Ρωσία (1,8%), Μεξικό (1,7%) και Αργεντινή (1,5%) με την εκτίμηση ότι θα έχουν αυξανόμενη χρήση μέχρι το 2030, με εξαίρεση το Ιράν (Tiseo et al., 2020).



Εικόνα 1 . Κατανάλωση αντιβιοτικών ανά χώρα το 2017 και το 2030. Το μέγεθος των κύκλων αντιστοιχεί στις ποσότητες των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν. Οι σκούροι κόκκινοι κύκλοι αντιστοιχούν στις ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν το 2017 και ο εξωτερικός μπλε δακτύλιος αντιστοιχεί στην προβλεπόμενη αύξηση της κατανάλωσης το 2030 (Tiseo et al., 2020).

Το 2017 είχαν καταναλωθεί παγκοσμίως συνολικά 93.309 τόνοι κτηνιατρικών αντιβιοτικών και έως το 2030 προβλέπεται αύξηση της τάξης των 11% με την συνολική κατανάλωση να φτάνει τους 104.079 τόνους (Tiseo et al., 2020). Από το σύνολο των κτηνοτροφικών ζώων οι χοίροι, τα κοτόπουλα και τα βοοειδή αντιπροσωπεύουν το 93,75%, με τους χοίρους να κατέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό κατανάλωσης αντιβιοτικών (Tiseo et al., 2020).

### 1.1.1.2 ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΣΕ ΠΑΝΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΚΛΙΜΑΚΑ

Παράλληλα, σε πανευρωπαϊκή κλίμακα και σύμφωνα με την τελευταία έκθεση της European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption που δημοσιεύθηκε από τον EMA τον Οκτώβριο του 2020, οι πωλήσεις αντιβιοτικών για χρήση σε ζώα στην Ευρώπη μειώθηκαν περισσότερο από 34% μεταξύ 2011 και 2018. Παρά το θετικό γεγονός η ανησυχία της διεθνούς επιστημονικής κοινότητας παραμένει καθώς η συνολική ποσότητα κατανάλωσης σε 31 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) για το έτος 2018, ξεπέρασε τους 6.500 τόνους κτηνοτροφικών αντιβιοτικών. Η μείωση των πωλήσεων σε ορισμένες χώρες υποδηλώνει την δυνατότητα μείωσης και σε χώρες όπως η Ελλάδα, της οποίας οι συνολικές πωλήσεις έφτασαν τους 113,6 τόνους για το

έτος 2018 με ανοδική πορεία τα τελευταία 4 έτη, κατατάσσοντας την δυστυχώς πρωτοπόρο στην κατανάλωση (ESVAC, 2020).



Εικόνα 2 Ετήσιες πωλήσεις κτηνιατρικών αντιβιοτικών για παραγωγή κτηνοτροφικών ειδών, σε mg/PCU, ανά χώρα, από το 2010 έως το 2018 (ESVAC, 2020).

Από τις συνολικές πωλήσεις κτηνιατρικών αντιβιοτικών στις 31 χώρες το 2018, οι μεγαλύτερες ποσότητες, αντιστοιχούν σε τετρακυκλίνες (30,7 %), πενικιλίνες (28,8%) και σουλφοναμίδες (8,4%). Συνολικά, αυτές οι τρεις κατηγορίες αντιπροσώπευαν το 67,9% των συνολικών πωλήσεων στις 31 χώρες (ESVAC, 2020).

### 1.1.2 ΟΦΕΛΗ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Η συνεχής αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, δημιουργεί ολοένα και μεγαλύτερη ζήτηση σε ζωική πρωτεΐνη χαμηλού κόστους. Στην επίτευξη αυτού του σκοπού καθοριστικό ρόλο έχουν τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά διασφαλίζοντας την υγεία και την καλή διαβίωση των ζώων, αυξάνοντας την διάρκεια και την ποιότητα της ζωής τους (McEwen, 2007).

Τα αντιβιοτικά όμως δεν εφαρμόζονται μόνο για πρόληψη και θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων αλλά και ως παράγοντες που προάγουν την ανάπτυξη στα ζώα (Arikan et al., 2009). Μέσα στη γαστρεντερική οδό όλων των ζώων υπάρχουν φυσιολογικά μη παθογόνα βακτήρια (εντερικό μικροβίωμα) τα οποία παρέχουν προστασία στον ξενιστή τους από παθογόνους μικροοργανισμούς. Υπάρχει μια λεπτή ισορροπία

μεταξύ ωφέλιμων και παθογόνων βακτηρίων όπου παρατηρούνται πολλές συμβιωτικές και ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις. Κάποιες από αυτές είναι: η παραγωγή ουσιών όπως τα πτητικά λιπαρά οξέα, τα οποία αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό παθογόνων βακτηρίων και ο ανταγωνισμός ωφέλιμων και παθογόνων βακτηρίων για θρεπτικά συστατικά. Με βάση τα παραπάνω το εντερικό μικροβίωμα μπορεί να συμβάλει σε μειωμένη ανάπτυξη του ζώου λόγω π.χ. ανταγωνισμού θρεπτικών συστατικών με τα ζώα ή/και παραγωγής τοξικών μεταβολιτών που αυξάνουν την κυκλοφορία του βλεννογόνου του εντέρου (Verstegen & Williams, 2006). Τα αντιβιοτικά λοιπόν, βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα της ανάπτυξης των ζώων μέσω της αναστολής της φυσιολογικής μικροχλωρίδας, οδηγώντας σε αυξημένη χρήση θρεπτικών συστατικών και μείωση του κόστους συντήρησης του γαστρεντερικού συστήματος (Gaskins et al., 2006). Για παράδειγμα σε μια έρευνα των Vervaeke et al. (1979), προτείνεται ότι το 6% της καθαρής ενέργειας στη διατροφή ενός χοίρου θα μπορούσε να χαθεί λόγω της βακτηριακής χρήσης της γλυκόζης στο λεπτό έντερο (Vervaeke et al., 1979). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η χρήση τους να βελτιώνει την αποτελεσματικότητα των ζωοτροφών, επιτρέποντας την παραγωγή της ίδιας ποσότητας κρέατος με μικρότερο αριθμό ζώων. Το γεγονός αυτό επιφέρει οικονομικά οφέλη, τόσο για τους καταναλωτές όσο και για τους παραγωγούς. Η μεγαλύτερη απόδοση έχει και περιβαλλοντικά οφέλη όπως λιγότερες καλλιεργήσιμες εκτάσεις απαραίτητες για την καλλιέργεια ζωοτροφών και μειωμένη παραγωγή κοπριάς (Durso & Cook, 2014).

Παράλληλα τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά συμβάλουν στην διατήρηση της δημόσιας υγείας καθώς η μείωση της συχνότητας των προβλημάτων υγείας των ζώων μειώνει τη μετάδοση λοιμώξεων από τα ζώα στον άνθρωπο (Hays, 1986).

### 1.1.3 ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Από την άλλη πλευρά, είναι ευρέως γνωστό ότι η υπερβολική κατανάλωση των κτηνιατρικών αντιβιοτικών έχει ως αποτέλεσμα την ταχεία ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών με συνέπεια την ανεπαρκή θεραπεία των ζώων αλλά και την συνεχή ανάγκη για παραγωγή νέων αποτελεσματικότερων αντιβιοτικών. Η Ευρωπαϊκή Ένωση με

στόχο την μείωση της κατανάλωσης και τον περιορισμό της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα ΚΑ, απαγόρευσε τη χρήση τους ως παράγοντες αύξησης σωματικού βάρους στα ζώα με τον Κανονισμό (ΕΚ) Νο 1831/2003 από τον Ιανουάριο του 2006. Παρά τα μέτρα πρόληψης που λήφθηκαν από την Ευρωπαϊκή Ένωση, δεν φάνηκε να περιορίστηκαν οι συνέπειες της κατάχρησης των ΚΑ.

Η χορήγηση των ΚΑ γίνεται από το στόμα είτε μέσω πόσιμου νερού είτε μέσω ανάμιξης ζωοτροφών ή παρεντερικών οδών. Στην συνέχεια, αυτά κατανέμονται μεταξύ διαφόρων οργάνων, ιστών και βιολογικών υγρών (Zhang et al., 2016). Μετά την ολοκλήρωση της προβλεπόμενης λειτουργίας τους, ηπατικά μικροσώματα προάγουν τον βιομετασχηματισμό τους και έτσι η δραστηριότητα του φαρμάκου τερματίζεται παράγοντας αδρανείς ή βιολογικά ενεργούς μεταβολίτες (Arikan et al., 2009). Τα υπολείμματα των ΚΑ στο σώμα των ζώων έχουν την δυνατότητα να συσσωρεύονται σε βρώσιμους ιστούς και γάλα, δημιουργώντας πιθανούς κινδύνους για τους καταναλωτές (Zhang et al., 2016). Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις τα ΚΑ απορροφώνται ελάχιστα από το γαστρεντερικό σύστημα των ζώων με αποτέλεσμα ένα υψηλό ποσοστό ΚΑ της τάξης 75-90% να απεκκρίνεται αυτούσιο μέσω των ούρων και των κοπράνων (Sarmah et al., 2006). Ως συνέπεια της υψηλής κατανάλωσης και του ατελούς μεταβολισμού, τα κτηνοτροφικά απόβλητα αναμένεται να περιέχουν υψηλά επίπεδα αντιβιοτικών.

Μια διαδεδομένη πρακτική που χρησιμοποιείται σε πολλές χώρες είναι η απευθείας εφαρμογή της κοπριάς που εμπεριέχει κτηνοτροφικά απόβλητα, ως συμπλήρωμα λιπασμάτων σε γεωργικές καλλιέργειες (Sarmah et al., 2006). Η συστηματική έκθεση του εδάφους με κοπριά έχει ως αποτέλεσμα αρνητικές επιπτώσεις στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, καθώς μέσω της εξελικτικής πίεσης και επιλογής συμβάλλουν στην ανάπτυξη και διατήρηση ανθεκτικών βακτηρίων επηρεάζοντας τη μικροβιακή σύσταση και τις λειτουργίες του εδάφους. Ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών στο έδαφος δημιουργούνται συνθήκες για γενετικές αλλαγές στα βακτηριακά γονιδιώματα και μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και σχετικών κινητών γενετικών στοιχείων, όπως τα πλασμίδια και τα τρανσποζόνια μεταξύ των μικροβιακών πληθυσμών (Doretto et al., 2014);(Berendsen et al., 2018). Πολλές έρευνες αναφέρουν ότι υπολείμματα αντιβιοτικών έχουν εντοπιστεί σε εδάφη, σε ιζήματα, σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα ή ακόμα σε καλλιέργειες φυτών



(Berendsen et al., 2018). Η συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών σε καλλιέργειες τροφίμων μπορεί να εγείρει ανησυχίες για την ανθρώπινη υγεία καθώς μπορεί να αντιπροσωπεύουν μια δεξαμενή γονιδίων αντίστασης που μπορούν να μεταφερθούν στα βακτήρια που αποικίζουν το ανθρώπινο σώμα μέσω της τροφικής αλυσίδας (Du & Liu, 2012).

Έτσι, οι αλληλοεξαρτώμενες ανθρώπινες, ζωικές και περιβαλλοντικές διαστάσεις της αντοχής στα αντιβιοτικά αποτελούν σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία. Η ολοένα και αυξανόμενη κατανάλωσή τους προϋποθέτει τη λήψη μέτρων για τη διατήρηση της αποτελεσματικότητας των υπαρχόντων αντιβιοτικών, διασφαλίζοντας παράλληλα την συνετή χρήση τους (Papadopoulos & Wilmer, 2011).

#### 1.1.4 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΥΧΗ ΤΩΝ ΚΤΗΝΙΑΡΙΚΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Μετά την απελευθέρωσή τους στο έδαφος, τα ΚΑ υποβάλλονται σε διάφορες διεργασίες που καθορίζουν την περιβαλλοντική τους τύχη και συμπεριφορά. Η επιβίωση και η διάδοσή τους στο περιβάλλον είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την προσρόφηση, δηλαδή την ικανότητα δέσμευσής τους από τα συστατικά του εδάφους και τον ρυθμό αποδόμησής τους. Οι παράγοντες αυτοί εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ΚΑ, όπως η δομή, το μέγεθος, το σχήμα, η υδατοδιαλυτότητα τους, η υδροφοβικότητα και η εξειδίκευσή τους, αλλά και από τα χαρακτηριστικά του εδάφους όπως η υφή, η σύσταση, το pH και η περιεκτικότητα σε οργανική ύλη. Επίσης μπορεί να εξαρτώνται από τις κλιματολογικές συνθήκες, π.χ. τα επίπεδα υγρασίας (Broekaert et al., 2011).

Με την είσοδο τους στο έδαφος, υπόκεινται σε διάφορες αβιοτικές ή/και βιοτικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένης της αποδόμησης, της προσρόφησης, της επιφανειακής απορροής, της έκπλυσης και της πρόσληψής τους από μικροοργανισμούς ή φυτά. Μια σημαντική οδός για την αβιοτική αποδόμηση των ΚΑ είναι η υδρόλυση η οποία πραγματοποιείται από χημικές αντιδράσεις χωρίς τη συμβολή μικροοργανισμών. Η φωτοαποδόμηση είναι μια ακόμη σημαντική αβιοτική διαδικασία όπου η διάσπαση των ΚΑ γίνεται με την παρουσία φωτός. Τα ΚΑ μπορεί επίσης να αποικοδομηθούν μέσω αναγωγικού ή οξειδωτικού μετασχηματισμού

ωστόσο, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για αυτές τις διαδικασίες (Jechalke et al., 2014). Η επιφανειακή απορροή και έκπλυση των συσσωρευμένων αντιβιοτικών είναι σημαντικές διεργασίες που εμπλέκονται σε περιβαλλοντικά ζητήματα, οι οποίες μπορεί να προκληθούν κατά την άρδευση και τη βροχόπτωση. Η έκπλυση των αντιβιοτικών σε βαθύτερο έδαφος ή σε υπόγεια ύδατα εξαρτώνται από την ισχύ προσρόφησης των φαρμάκων στο επιφανειακό έδαφος (Du & Liu, 2012). Με την διαδικασία της πρόληψης των φυτών, οι συγκεντρώσεις τους στους φυτικούς ιστούς είναι συνήθως τόσο μικρές που μπορεί να μην αποτελεί σημαντική οδό για την απομάκρυνση των αντιβιοτικών από το έδαφος, ωστόσο, μπορεί να είναι επαρκείς για να προκαλέσουν φυτοτοξικές επιδράσεις στην ανάπτυξη των φυτών (Du & Liu, 2012).

Εκτός από τις αβιοτικές διεργασίες, η μικροβιακή αποικοδόμηση μπορεί να συμβάλει στην εξαφάνιση των ΚΑ από το έδαφος μέσω του μεταβολισμού και του συν-μεταβολισμού. Η εμφάνιση του μεταβολισμού απαιτεί συνήθως υψηλή συγκέντρωση ΚΑ και μόλις γίνει αυτό ορισμένα βακτήρια και μύκητες σε αερόβιες (παρουσία οξυγόνου) ή αναερόβιες συνθήκες (απουσία οξυγόνου) αποικοδομούν τα ΚΑ και τα χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας (καταβολισμός) με αποτέλεσμα την παραγωγή απλούστερων μορίων όπως το CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, ή ενδιάμεσων ενώσεων ώστε να τροφοδοτήσουν την σύνθεση μορίων π.χ. πυροσταφυλικού ή ακεταλδεΐδης (αναβολισμός) (Cycosή et al., 2019). Ο συν-μεταβολισμός είναι η ταυτόχρονη αποικοδόμηση δύο ρύπων, κατά την οποία η αποδόμηση του δεύτερου ρύπου εξαρτάται από την παρουσία του πρώτου, κατά την διάρκεια του οποίου οι μικροοργανισμοί μπορούν να μεταβολίσουν τα ΚΑ παρουσία ενός υποστρώματος ανάπτυξης όπως η γλυκόζη και το οξικό άλας, χωρίς κανένα ενεργειακό όφελος (Wang & Wang, 2018). Ωστόσο, η αποδόμηση τους στο έδαφος μπορεί να είναι ελλιπής και να οδηγήσει στην συγκέντρωση μεταβολιτών με υψηλότερη τοξικότητα από τη μητρική ένωση. Παράλληλα η συσσώρευση μεταβολιτών στο έδαφος, ακόμη κι αν αυτοί δεν είναι βιοενεργοί, ενδέχεται να συμβάλλει στη μετατροπή τους πίσω στη βιοδραστική μητρική τους ένωση (Jechalke et al., 2014).

Δεδομένου ότι πολλοί αβιοτικοί και βιοτικοί παράγοντες επηρεάζουν τον ρυθμό αποδόμησης των ΚΑ, παρατηρείται ότι υπάρχουν διαφορετικοί χρόνοι απομάκρυνσης για διαφορετικά ΚΑ ή ακόμα για το ίδιο ΚΑ σε διαφορετικές συνθήκες. Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τους ρυθμούς αποδόμησης των αντιβιοτικών λαμβάνονται

από τις τιμές του Χρόνου Ημίσειας Ζωής (Dissipation Time  $DT_{50}$ ) που ορίζεται ως ο απαιτούμενος χρόνος μείωσης στο μισό της αρχικής τιμής της συγκέντρωσης ενός ΚΑ στο έδαφος (Cusco et al., 2019) και από τις τιμές του  $DT_{90}$  που είναι ο απαιτούμενος χρόνος μείωσης στο 90% της αρχικής τιμής της συγκέντρωσης.

Άλλος ένας παράγοντας που παίζει ρόλο στην αποδόμηση των ΚΑ είναι η συγκέντρωσή τους στο έδαφος, οι υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών μπορεί να παρατείνουν την εμμονή τους, λόγω της αναστολής της δραστηριότητας των μικροοργανισμών του εδάφους. Ωστόσο, η εφαρμογή μη ρεαλιστικά υψηλών συγκεντρώσεων σε διάφορες μελέτες τείνει να υπερεκτιμά τους χρόνους ημιζωής, κάτι που μπορεί να μην αντικατοπτρίζει ρεαλιστικές καταστάσεις (Pan & Chu, 2016). Επίσης τα αντιβιοτικά μπορεί να συσσωρεύονται στο έδαφος με την πάροδο του χρόνου, όταν οι ρυθμοί εισροής υπερβαίνουν τους ρυθμούς αποδόμησης. Οι Dalkmann et al. έδειξε ότι η sulfomethoxazole και η ciprofloxacin συσσωρεύτηκαν σε εδάφη σε μια περίοδο περίπου 20 ετών κατά τη διάρκεια μακροχρόνιας άρδευσης με ακατέργαστα λύματα (Dalkmann et al., 2012).

### 1.1.5 TILMICOSIN

Το Tilmicosin είναι ένα ημισυνθετικό αντιβιοτικό που ανήκει στην κατηγορία των μακρολίδων και χρησιμοποιείται εκτενώς στην κτηνοτροφία για την θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων της αναπνευστικής οδού (Ziv et al., 1995). Ο μηχανισμός δράσης του είναι η παρεμπόδιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης των ευαίσθητων βακτηρίων καθώς συνδέεται με τις υπομονάδες 50S του ριβοσώματος (Modric et al., 1998). Κάποια από τα βακτήρια που καταπολεμούνται με το tilmicosin και προκαλούν αναπνευστικές λοιμώξεις σε χοίρους είναι τα *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* και *Mannheimia haemolytica* (Naccari et al., 2001). Σε πολλές μελέτες αναφέρεται ότι η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών σχετίζεται με μεταλλάξεις στα γονίδια *rplD* και *rplV*, που κωδικοποιούν τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες L4 και L22, ή στον τομέα II ή V των γονιδίων 23S rRNA (Vester & Douthwaite, 2001);(Gerchman et al., 2011). Σε μια μελέτη που έγινε για την επιμονή των αντιβιοτικών στους κοπρσωρούς κατά την αποθήκευση τους βρέθηκε ότι το tilmicozin παρουσιάζει υψηλή υπολειμματικότητα με  $DT_{90} = 38-346$  ημέρες,



## 1.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

### 1.2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Η ανάπτυξη μίας πλήρως αναλυτικής μεθόδου περιλαμβάνει τη συλλογή, την αποθήκευση και την προετοιμασία των δειγμάτων με την μέθοδο της εκχύλισης, την απομόνωση της αναλυόμενης ένωσης-στόχο, την ταυτοποίηση της και τέλος τον ποσοτικό τους προσδιορισμό με χρωματογραφική ανάλυση για την τελική έκθεση των αποτελεσμάτων (Berrueta et al., 1995).

Η εκχύλιση αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού μίας ή περισσότερων ενώσεων ενός δείγματος με την χρήση ενός κατάλληλου διαλύτη και βασίζεται στην διαφορετική διαλυτότητα των ενώσεων αυτών. Ο στόχος της είναι η απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων παρεμποδιστικών ενώσεων από το δείγμα ώστε να διασφαλιστεί η ακεραιότητα του δείγματος κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης (Berrueta et al., 1995). Η ένωση-στόχος μπορεί να διαχωριστεί από τα παρεμποδιστικά συστατικά εάν υπάρχει μία τουλάχιστον σημαντική διαφορά στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες όπως είναι το μέγεθος, η μάζα, η πυκνότητα (Theodoridis et al., 2015).

Οι τεχνικές εκχύλισης που κυριαρχούν στις αναλυτικές εφαρμογές είναι, η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE), η εκχύλιση στερεού-υγρού (SLE) και η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) (Theodoridis et al., 2015).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκχύλιση στερεού-υγρού (Solid Liquid Extraction-SLE) με την χρήση ακετυλονιτριλίου, ενός επιλεκτικού διαλύτη ο οποίος διαλύει μόνο την ένωση που μας ενδιαφέρει και όχι το υπόστρωμα. Αρχικά προσαρμόζεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε νερό και κατόπιν γίνεται η εφαρμογή του ακετυλονιτριλίου όπου με την βοήθεια της ανάδευσης οι ενώσεις διαλύονται στο υγρό περιβάλλον, μέχρι να παραληφθούν πλήρως. Στην συνέχεια με την χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση του pH, γεγονός που αυξάνει την ανάκτηση των αντιβιοτικών που είναι ευαίσθητα σε οξέα και βάσεις (Lehotay et al., 2005). Με την προσθήκη άλατος χλωριούχου νατρίου NaCl επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των δυο φάσεων ακετυλονιτριλίου και νερού (H. S. Lee & Alfred, 1993). Έπειτα, πραγματοποιείται φυγοκέντριση και στο εκχύλισμα ακετυλονιτριλίου προστίθεται πρωτοταγής δευτεροταγής αμίνη (PSA) για την αφαίρεση διαφόρων πολικών οργανικών οξέων, πολικών χρωστικών, ορισμένων

σακχάρων και λιπαρών οξέων (González-Curbelo et al., 2015). Τέλος το εκχύλισμα υποβάλλεται σε δεύτερη φυγοκέντριση και γίνεται διήθηση του υπερκείμενου υγρού μέσω υδρόφιλης διηθητικής μεμβράνης. Το μείγμα έχει διαφοροποιηθεί από τις παρεμποδιστικές ενώσεις και είναι έτοιμο για περαιτέρω ανάλυση.

### 1.2.2 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ/ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Η Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1960. Σήμερα έχει εξελιχθεί σε απαραίτητο εργαλείο για το σύγχρονο εργαστήριο ανάλυσης για τον διαχωρισμό ουσιών σε μια πληθώρα εφαρμογών (Bélanger et al., 1997).

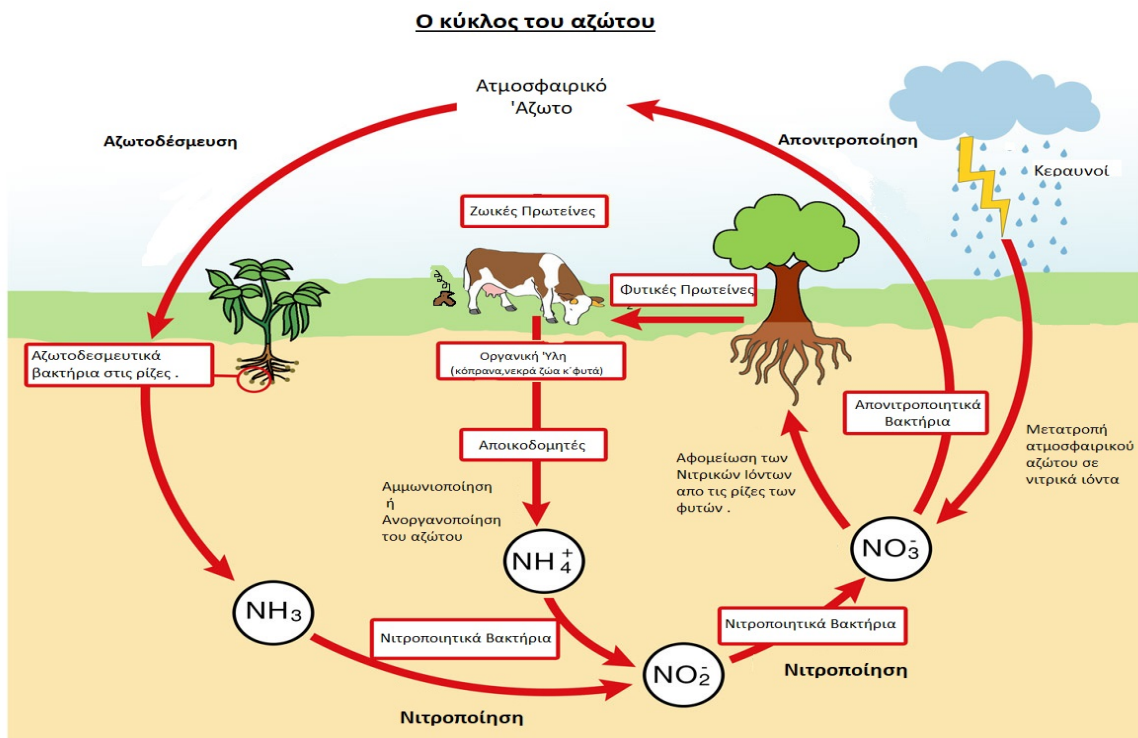
Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός βασίζεται στην κατανομή της ένωσης-στόχου μεταξύ μιας κινητής φάσης (διαλύτης) η οποία ρέει μέσω μιας στατικής φάσης (στήλης). Η φυσικοχημική συγγένεια (ο βαθμός αλληλεπίδρασης) των συστατικών του δείγματος με το υλικό της στήλης καθορίζει τον χρόνο παραμονής τους στη στατική φάση. Συνεπώς, το κάθε συστατικό του δείγματος εκλούεται σε διαφορετικό χρόνο και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός (Dean, 1998). Μια μονάδα ανίχνευσης αναγνωρίζει τις αναλυόμενες ενώσεις μετά την έξοδο από τη στήλη και ένα σύστημα διαχείρισης δεδομένων μετατρέπει και καταγράφει τα σήματα σε ένα χρωματογράφημα. Ένα τέτοιο χρωματογράφημα παρέχει άμεσα τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες, αφού τόσο το εμβαδόν όσο και το ύψος κάθε σήματος είναι ανάλογα με την ποσότητα της αντίστοιχης ουσίας (Meyer, 2010).

Η διαφορά στην χρωματογραφία HPLC η οποία αποτελεί εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας, είναι ότι η κινητή φάση δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιτυγχάνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης και έτσι βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων (Karkalousos et al., 2015). Η οργανολογία της HPLC περιλαμβάνει μία βαλβίδα έγχυσης, μια δεξαμενή διαλυτών, μια αντλία, μια βαλβίδα ψεκασμού, μια στήλη, μια μονάδα ανιχνευτή και μια μονάδα επεξεργασίας δεδομένων (Bélanger et al., 1997). Τα δείγματα που αναλύονται με HPLC βρίσκονται αποκλειστικά σε υγρή μορφή (Karkalousos et al., 2015).

### 1.3 Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Το άζωτο είναι ένα από τα κύρια θρεπτικά συστατικά κρίσιμα για την επιβίωση όλων των ζωντανών οργανισμών καθώς είναι απαραίτητο συστατικό πολλών βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, του DNA και της χλωροφύλλης. Παρότι αποτελεί άφθονο στοιχείο στην ατμόσφαιρα (78%) υπό την μορφή του μοριακού αζώτου ( $N_2$ ), παραμένει μη αξιοποιήσιμο από τους περισσότερους οργανισμούς σε αυτή την κατάσταση. Καθώς το άζωτο υφίσταται μετασχηματισμούς μέσα στο οικοσύστημα, μια ποικιλία μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια, τα αρχαία και οι μύκητες το χρησιμοποιούν για ανάπτυξη και, σε ορισμένες περιπτώσεις, για ενέργεια (Stein & Klotz, 2016). Οι κύριοι μετασχηματισμοί του αζώτου είναι :

- Αζωτοδέσμευση,
- Αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση αζώτου,
- Νιτροποίηση,
- Απονιτροποίηση (Stein & Klotz, 2016).

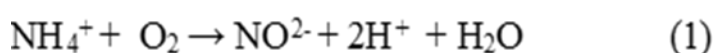


Εικόνα 3 Σημαντικές διεργασίες του κύκλου του αζώτου.

Η αζωτοδέσμευση είναι η διαδικασία της μετατροπής του ατμοσφαιρικού αζώτου (N<sub>2</sub>) σε βιολογικά διαθέσιμο άζωτο. Το μεγαλύτερο μέρος της δέσμευσης αζώτου πραγματοποιείται από προκαρυωτικούς οργανισμούς, που έχουν τις γενετικές πληροφορίες για να συνθέσουν το ένζυμο Νιτρογενάση. Οι οργανισμοί αυτοί είναι αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και κυανοβακτήρια, που είτε ζουν ελεύθερα στο έδαφος, όπως το *Azotobacter*, είτε συμβιωτικά στις ρίζες κάποιων φυτών, όπως το *Rhizobium*. Η διαδικασία αυτή είναι σημαντική διότι εμπλουτίζει το έδαφος σε άζωτο με την μορφή αμμωνίας η οποία στην συνέχεια αφομοιώνεται στην οργανική ύλη (Bernhard, 2010); Stein & Klotz, 2016).

Η αμμωνιοποίηση ή ανοργανοποίηση του αζώτου είναι η διαδικασία απελευθέρωσης αμμωνιακών ιόντων στο έδαφος με την δράση ενζύμων, όπως αμινοπεπτιδάσες, χιτινάσες, που υδρολύουν τις αμμωνιακές οργανικές ενώσεις που παράγονται από τους μικροοργανισμούς του εδάφους (Strock, 2008).

Η νιτροποίηση είναι η διαδικασία που μετατρέπει την αμμωνία ή τα αμμωνιακά ιόντα που βρίσκονται στο έδαφος σε νιτρώδη (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) και στη συνέχεια σε νιτρικά (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) ιόντα και αποτελεί το σημαντικότερο βήμα του κύκλου του N στο περιβάλλον. Το μεγαλύτερο μέρος της νιτροποίησης συμβαίνει αερόβια και πραγματοποιείται αποκλειστικά από προκαρυώτες. Υπάρχουν δύο διαφορετικά στάδια νιτροποίησης που πραγματοποιούνται από διαφορετικούς τύπους μικροοργανισμών.



(1) Το πρώτο στάδιο είναι η οξειδωση της αμμωνίας NH<sub>3</sub> ή NH<sub>4</sub><sup>+</sup> σε νιτρώδη NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Νιτρωδοποίηση), η οποία πραγματοποιείται από λίγους τύπους βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* και *Nitrosococcus* και αρχαία, όπως το *Nitrosopumilus maritimus*, γνωστά ως οξειδωτικά της αμμωνίας. (2) Το δεύτερο στάδιο στη νιτροποίηση είναι η οξειδωση των νιτρωδών (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) σε νιτρικά (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Νιτρικοποίηση). Αυτό το βήμα πραγματοποιείται από μια εντελώς ξεχωριστή ομάδα προκαρυωτικών, γνωστών ως νιτρωδο-οξειδωτικά βακτήρια. Μερικά από τα γένη που



εμπλέκονται στην οξείδωση των νιτρωδών περιλαμβάνουν τα *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus* και *Nitrospina*. Τα νιτρώδη σε μεγάλες συγκεντρώσεις είναι τοξικά για τους οργανισμούς του εδάφους. Η νιτροποίηση καθίσταται υψίστης σημασίας για την πρωτογενή παραγωγικότητα, τον κύκλο των θρεπτικών ουσιών, τη διάθεση των ρύπων και την ποιότητα του νερού (Bernhard, 2010; Van Kessel et al., 2015).

Η απονιτροποίηση είναι η διαδικασία που μετατρέπει τα νιτρικά ιόντα σε αέριο άζωτο. Το αέριο άζωτο ( $N_2$ ) είναι το τελικό προϊόν της απονιτροποίησης, αλλά υπάρχουν και άλλες ενδιάμεσες αέριες μορφές αζώτου, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το υποξείδιο του αζώτου ( $N_2O$ ). Η απονιτροποίηση είναι μια αναερόβια διαδικασία και πραγματοποιείται από μια ομάδα προκαρυωτικών βακτηρίων που περιλαμβάνει τα γένη *Bacillus*, *Paracoccus* και *Pseudomonas* και είναι σημαντική καθώς αφαιρεί σταθερό άζωτο (δηλαδή νιτρικά) από το οικοσύστημα και το επιστρέφει στην ατμόσφαιρα σε βιολογικά αδρανή μορφή ( $N_2$ ) (Wrage et al., 2001; Stein & Klotz, 2016).

### 1.3.1 ΔΥΝΗΤΙΚΗ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η δυνητική νιτροποίηση είναι μια μέθοδος προσδιορισμού του ρυθμού νιτροποίησης στο έδαφος. Τα μικρόβια που εμπλέκονται στην διαδικασία της νιτροποίησης επηρεάζονται εύκολα από περιβαλλοντικούς ρύπους, όπως τα αντιβιοτικά. Έτσι, η νιτροποίηση του εδάφους μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης τοξικότητας των ρύπων. Η νιτροποίηση μετράται με την παρακολούθηση του μεγέθους των δεξαμενών αντιδραστηρίων  $NH_4^+$  τα οποία αναμένεται να μειωθούν ή των προϊόντων  $NO_2^- / NO_3^-$  τα οποία πρόκειται να αυξηθούν υπό με την πάροδο του χρόνου, τα οποία μπορούν να εξαχθούν από το έδαφος και να ποσοτικοποιηθούν χρωματομετρικά. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, το  $NO_3^-$  μπορεί να υποστεί ταχεία αναγωγή σε  $N_2O$  ή  $N_2$  (απονιτροποίηση) καθιστώντας αναξιόπιστες τις μετρήσεις νιτροποίησης. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ένας αναστολέας όπως το χλωρικό νάτριο μπορεί να προστεθεί στο έδαφος για να αποτρέψει την οξείδωση του  $NO_2^-$  σε  $NO_3^-$ . Όταν χρησιμοποιούνται αναστολείς, η μέτρηση ονομάζεται δυνητική νιτροποίηση και προσδιορίζεται από την αύξηση του  $NO_2^-$  με την πάροδο του χρόνου (DeVries & Zhang, 2016). Η αναστολή της νιτροποίησης θεωρείται συχνά η πιο πιθανή επίδραση των αντιβιοτικών. Επιπλέον, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κάποιοι φυσικοχημικοί παράγοντες που

επηρεάζουν τη νιτροποίηση όπως η σύνθεση του εδάφους, η κατάσταση υγρασίας, ο αερισμός, το pH και η θερμοκρασία (Sahrawat, 2008). Ωστόσο, αναμένεται μείωση των πιθανών επιπτώσεων με την πάροδο του χρόνου λόγω της αποδόμησης των ΚΑ και της προσαρμογής των μικροβίων του εδάφους στα ΚΑ με την ανάπτυξη ανθεκτικών πληθυσμών (DeVries & Zhang, 2016).

#### 1.4. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία είχε τους παρακάτω βασικούς στόχους:

1. Να καταγράψει την εμμονή των ΚΑ tilmicosin, tiamulin σε γεωργικά εδάφη μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές τους.
2. Να αναδείξει πιθανές αρνητικές επιδράσεις των ΚΑ στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και ειδικότερα στην διαδικασία της νιτροποίησης.
3. Να βρεθούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ της διάρκειας έκθεσης και της απόκρισης της μικροβιακής κοινότητας στην διαδικασία της νιτροποίησης.

Για να διερευνηθούν τα παραπάνω ερωτήματα πραγματοποιήθηκε πείραμα στο εργαστήριο το οποίο περιγράφεται και παρακάτω.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην διεκπεραίωση του πειράματος συνέβαλε η συνεργασία με την πρότυπη χοιροτροφική μονάδα ΧΟΙΡΟΠΑΛ ΕΠΕ στον Κοσκινά του Παλαμά Καρδίτσας από όπου συλλέχθηκαν μεγάλες ποσότητες κοππροσωρών (6 kg) από χοίρους 28-35 ημερών στους οποίους δεν είχαν χορηγηθεί κτηνιατρικά αντιβιοτικά. Για τη μεταφορά τους στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, τα δείγματα αποθηκευτήκαν προσωρινά σε φορητούς καταψύκτες. Στην συνέχεια, ομογενοποιήθηκαν με το χέρι και φυλάχθηκαν σε καταψύκτες στους -20 °C μέχρι την έναρξη του πειράματος.

Παράλληλα, η επιλογή των εδαφών έγινε με βάση την έρευνα των Perruchon et al., (2022) όπου μελετήθηκε η εμμόνη του TIA και TLM κατά μήκος της διαδρομής τους από τη χορήγηση τους σε χοίρους έως την απέκκριση τους με τα κόπρανα και στην συνέχεια μελετήθηκε η υπολειμματικότητα τους σε τέσσερα γεωργικά εδάφη (Perruchon et al., 2022). Στην παρούσα μελέτη, η υπολειμματικότητα των TIA και TLM και η επίδραση τους στην νιτροποίηση μελετήθηκε σε δύο από αυτά τα γεωργικά εδάφη με τις ονομασίες «Ροδιά» και «Λιβιάδι» τα οποία διαφέρουν στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως, στο pH 7.9 και 5.9, στην περιεκτικότητα σε Οργανικό Άνθρακα (%): 1.37 και 2.31 αντιστοίχως και στον ρυθμό αποικοδόμησης των Κ.Α. με το «Λιβιάδι» να έχει βραδύτερο ρυθμό όπως επισημάνθηκε στην παραπάνω μελέτη. Στα εδάφη έγινε εφαρμογή των δύο ΚΑ είτε απευθείας στο έδαφος είτε μέσω κοπριάς που είχε προηγουμένως δεχτεί εφαρμογή ΚΑ. Ως τελική συγκέντρωση των αντιβιοτικών επιλέχθηκαν τα 2.5 μg/g εδάφους το οποίο προέκυψε βιβλιογραφικά (Xu et al., 2008).

Πιο αναλυτικά, η απευθείας εφαρμογή των ΚΑ στα εδάφη έγινε ως εξής: ζυγίστηκαν 400 g εδάφους και αφού η υγρασία ρυθμίστηκε στο 40 % της υδατοχωρητικότητας του, έγινε ομογενοποίηση του εδάφους. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος ΚΑ 5 ml και ομογενοποιήθηκε εκ νέου. Στις εφαρμογές μέσω περιττωμάτων, ζυγίστηκαν 392 g εδάφους και 8 g περιττωμάτων και αφού η υγρασία τους ρυθμίστηκε στο 40 % της υδατοχωρητικότητας, έγινε εφαρμογή της κατάλληλης ποσότητας των ΚΑ 5 ml πρώτα στα περιττώματα και στη συνέχεια ομογενοποίηση αυτών, δια χειρός με το έδαφος. Η ποσότητα περιττωμάτων που επιλέχθηκε για το πείραμα αποτελεί περίπου το 2 % της τελικής ποσότητας κάθε εφαρμογής και

προέκυψε βιβλιογραφικά (XU et al., 2008). Στο τέλος της ομογενοποίησης, τα δείγματα επώαστηκαν στους 25 °C μέχρι την ημέρα της ανάλυσής τους. Η υγρασία ρυθμιζόταν κάθε εβδομάδα ώστε να παραμένει στο 40 % της υδατοχωρητικότητας του δείγματος.

## 2.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Ζυγίστηκαν περίπου 5 g περιπτωμάτων, το δείγμα αποξηράθηκε σε φούρνο BINDER στους 100 °C για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα το δείγμα ζυγίστηκε ξανά και καταγράφηκε η τιμή.

$$\% \text{Υγρασία} = \frac{\text{wet} - \text{dry}}{\text{dry} - \text{αλουμ.}} * 100$$

Wet: μικτό βάρος (με τον αλουμινένιο αυτοσχέδιο δίσκο ζύγισης) προ ξήρανσης.

Dry: μικτό βάρος (με τον αλουμινένιο αυτοσχέδιο δίσκο ζύγισης) μετά από την ξήρανση.

Αλουμ: το βάρος του αλουμινένιου αυτοσχέδιου δίσκου.

Από τις μετρήσεις της υγρασίας σε 4 δείγματα υπολογίστηκε το επίπεδο υγρασίας στα περιπτώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα 64,9 % με τυπική απόκλιση (standard deviation – SD) = 2.24%.

Για τον προσδιορισμό της υδατοχωρητικότητας αρχικά ζυγίστηκαν 30 g περιπτωμάτων. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη ζυγαριά γυάλινη φλάσκα, το δείγμα τοποθετήθηκε σε γυάλινο χωνί στο οποίο είχε προσαρμοστεί βρεγμένο διηθητικό χαρτί. Ακολούθως, προστέθηκε απιονισμένο νερό 2-4 φορές και κάθε φορά το νερό αφηνόταν μέχρι να περάσει ολόκληρο στη φλάσκα. Μόλις προστέθηκε η τελευταία ποσότητα νερού το χωνί με το δείγμα καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο για να αποτραπεί οποιαδήποτε εξάτμιση και αφέθηκε σε αυτή τη θέση για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα ζυγίστηκε το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το δείγμα.

$$\%WHC = \frac{(gr \text{ δείγματος} - x) + (W2 - W1)}{x} * 100$$

W1: το βάρος του χωνιού, του διηθητικού χαρτιού και του δείγματος την πρώτη μέρα  
W2: το βάρος του χωνιού, του διηθητικού χαρτιού και του δείγματος τη δεύτερη μέρα  
x: αν ζυγιστούν 30 g δείγματος με υγρασία 15 % τότε το x ισούται  $=30/1.15$

Έγιναν 4 επαναλήψεις για τον προσδιορισμό του της ικανότητας συγκράτησης νερού των περιττωμάτων. Ο μέσος όρος τους ήταν 100,2 %.

Αντίστοιχα πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός υγρασίας και υδατοχωρητικότητας σε κάθε έδαφος.

## 2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

### 2.2.1. ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Στα δύο εδάφη που επιλέχθηκαν, «Ροδιά» και «Λιβιάδι», προσδιορίστηκε ποσοτικά η υπολειμματικότητα των δύο ΚΑ, tilmicosin και tiamulin, μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές τους. Στα εδάφη έγινε εφαρμογή των δύο ΚΑ είτε απευθείας στο έδαφος είτε μέσω κοπριάς που είχε προηγουμένως δεχτεί εφαρμογή ΚΑ. Έτσι έχουμε δύο μεταχειρίσεις που έχουν ως εξής: Έδαφος (E+KA) και Έδαφος + εφαρμογή κοπρροσωρών (E-K+KA). Ως τελική συγκέντρωση των αντιβιοτικών επιλέχθηκαν τα 2.5 μg/g εδάφους το οποίο προέκυψε βιβλιογραφικά (Xu et al., 2008). Πραγματοποιήθηκαν 3 πειραματικοί κύκλοι των 50 ημερών για το tiamulin και tilmicosin όπου στο τέλος κάθε κύκλου έγινε εκ νέου εφαρμογή ΚΑ. Η συγκέντρωση των ΚΑ που χρησιμοποιήθηκε για τον εμπλουτισμό στους δύο τελευταίους κύκλους ήταν τα 5 μg/g εδάφους. Για κάθε μεταχείριση καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος πραγματοποιήθηκαν 5 δειγματοληψίες στις ημέρες 0, 5, 10, 25 και 50 ενώ για κάθε ημερομηνία συλλέχθηκαν 3 επαναλήψεις από κάθε μεταχείριση και έδαφος.

### 2.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΔΑΦΟΥΣ

Η ανάλυση των υπολειμμάτων των αντιβιοτικών στα δείγματα βασίστηκε στη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης/απόδοσης (HPLC) , που εφαρμόστηκε σε εκχυλισμένα διαλύματα σύμφωνα με τα παρακάτω.

### 2.2.2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Η εκχύλιση των αντιβιοτικών από τα εδάφη έγινε ακολουθώντας μια από τις μεθόδους που περιγράφονται από τους Lee et al. (2017), με μικρές διαφοροποιήσεις (Y.-J. Lee et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, σε σωληνάριο φυγοκέντρισης Oak Ridge Centrifuge Tube, PPCO 50ml (Nalge Nunc International, Penfield, NY, USA) ζυγίστηκαν 5 g ομογενοποιημένου εδάφους και προστέθηκαν 2,5 ml υπερκάθαρο νερό τύπου Milli-Q (Merk Millipore Burlington, MA, USA). Το μίγμα αναδεύτηκε έντονα για 1 λεπτό χρησιμοποιώντας αναδευτήρα τύπου TX4 Digital IR Vortex Mixer (VELP SCIENTIFICA Srl, Usmate, Italy) σε πλήρη ισχύ και αφέθηκε για 10 λεπτά σε ηρεμία. Στη συνέχεια προστέθηκε το διάλυμα εκχύλισης (η σύσταση του οποίου περιγράφεται παρακάτω) και έγινε ανάδευση 5 λεπτών με vortex σε πλήρη ισχύ. Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 8228 rcf για 5 λεπτά στους 25°C. Συλλέχθηκαν 3ml από το υπερκείμενο υγρό και προστέθηκαν 0,075g primary and secondary amine PSA τύπου Enviro Clean n-2 aminoethyl (United Chemical Technologies, PA, USA). Ακολούθησε ανάδευση 1 λεπτού χρησιμοποιώντας vortex σε πλήρη ισχύ και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε ξανά στις 8.228 rfc για 5 λεπτά στους 25°C. Συλλέχθηκαν 2ml από το υπερκείμενο υγρό το οποίο διηθήθηκε μέσω υδρόφιλου διηθητικού μέσου Syringe Filter 25 mm PTFE Hydrophobic Syringe Filter 0.22 µm with Outer Ring (Labfil Part of ALWSCI Co, Zhejiang RP, China) πριν αναλυθεί σε σύστημα HPLC-DAD.

- Διάλυμα εκχύλισης: 5ml ακετονιτριλίου Acetonitrile (Merk LiChrosolv Reag. Ph Eur, Darmstadt, Germany), 0.05 ml Οξικού Οξέος 99-100% a.r.(Chem-Lab NV, Zedelgem, Belgium) για τα αλκαλικό έδαφος «Ροδιά» και 0.025 ml Οξικού οξέος για τα όξινο έδαφος «Λιβιάδι» και 0.5 gr χλωριούχου νατρίου NaCl Sodium Chloride for analysis, ACS, ISO (PanReac AppliChem ITW Reagents, Darmstadt, Germany)

### 2.2.2.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Η ανάλυση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν έγινε σε όργανο τύπου LC- 20ADHPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) με ανιχνευτή UV/VIS PDA, προστήλη GVP-ODs 4.6 mm by 150 mm, 5 µm, συνδεδεμένες με στήλη RP VP-ODs 4.6 mm x 150 mm, 5µm (Shimadzu, Kyoto, Japan).

**Tiamulin:** Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του tiamulin χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική έκλυση με κινητή φάση μίγματος 60:40 κ.ο. ακετονιτρίλιου: διαλύματος αμμωνίας σε νερό συγκέντρωσης 1.25% (vol/vol) . Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1ml/λεπτό και η ανίχνευση του tiamulin πραγματοποιήθηκε στα 208 nm. Με την χρήση της παραπάνω μεθόδου κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με τον έγχυση πρότυπων διαλυμάτων tiamulin σε ακετονιτρίλιο συγκέντρωσης από 0.2 µg/ml ως 10 µg/ml.

**Tilmicosin:** Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του tilmicosin χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική έκλυση με κινητή φάση μίγματος αναλογίας 35/65 κ.ο. ακετονιτρίλιου και 0.1% (vol/vol) ορθοφωσφορικού οξέος Phosphoric acid puriss. p.a., ACS reagent, reag. ISO, reag. Ph. Eur., ≥85% (SIGMA-ALDRICH, Darmstadt, Germany). Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 0.3 ml / λεπτό και η ανίχνευση του tilmicosin πραγματοποιήθηκε στα 287 nm. Με τη χρήση της παραπάνω μεθόδου κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη με την έγχυση πρότυπων διαλυμάτων tilmicosin στην κινητή φάση της μεθόδου προσδιορισμού συγκέντρωσης από 0.2 µg/ml ως 100 µg/ml.

## 2.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΚΑ ΣΤΗΝ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ

### 2.3.1 ΜΕΤΑΧΕΙΡΙΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε η μελέτη των επιδράσεων των ΚΑ στην νιτροποίηση στα δύο εδάφη , «Ροδιά» και «Λιβιάδι». Στα εδάφη έγινε εφαρμογή των δύο ΚΑ είτε απευθείας στο έδαφος είτε μέσω κοπριάς που είχε προηγουμένως δεχτεί εφαρμογή ΚΑ. Ως τελική συγκέντρωση των αντιβιοτικών επιλέχθηκαν τα 2.5 µg/g εδάφους το οποίο προέκυψε βιβλιογραφικά (Xu et al., 2008). Έτσι έχουμε δύο μεταχειρίσεις που έχουν ως εξής: Έδαφος (E+KA) και Έδαφος + εφαρμογή κοπροσωρών (E-K+KA). Επίσης για κάθε μια μεταχείριση δημιουργήθηκαν και δείγματα ελέγχου χωρίς την εφαρμογή ΚΑ και για τα δύο εδάφη, Έδαφος (E), Έδαφος - εφαρμογή κοπροσωρών (E-K). Πραγματοποιήθηκαν 3 πειραματικοί κύκλοι των 40 ημερών για το tiamulin και tilmicosin όπου στο τέλος κάθε κύκλου έγινε εκ νέου εφαρμογή ΚΑ. Η συγκέντρωση των ΚΑ που χρησιμοποιήθηκε για τον εμπλουτισμό στους δύο τελευταίους κύκλους ήταν τα 5 µg/g εδάφους. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε τις ημέρες 15 και 40 σε κάθε

πειραματικό κύκλο όπου πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός δυνητικής νιτροποίησης και των συγκεντρώσεων των αμμωνιακών ( $\text{NH}_4^+$ ) και νιτρικών ( $\text{NO}_3^-$ ) ιόντων, ενώ για κάθε ημερομηνία συλλέχθηκαν 3 επαναλήψεις από κάθε μεταχείριση και έδαφος.

### 2.3.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

Ο προσδιορισμός του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης στα δύο εδάφη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την μέθοδο της Kandeler (1995), που περιγράφεται ακολούθως. Ζυγίστηκαν 5 g από τα επιμέρους εδαφικά δείγματα και μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 ml και κατόπιν προστέθηκαν 20 ml διαλύματος  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 mM, ως αμμωνιακό υπόστρωμα για τη μετατροπή του σε  $\text{NO}_2^-$  από τους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς και 0.1 ml  $\text{NaClO}_3$  1.5 M ως ανταγωνιστικός αναστολέας της περαιτέρω οξειδωσης των νιτροδών προς νιτρικά ιόντα με σκοπό την τελική συσσώρευση νιτροδών ( $\text{NO}_2^-$ ) αντί νιτρικών ( $\text{NO}_3^-$ ) ιόντων (Lw & EI, 1980) και ακολούθησε ήπια ανάδευση του μίγματος. Για κάθε μεταχείριση, χρησιμοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις, ενώ παράλληλα με τα προς ανάλυση δείγματα παρασκευάζονταν ένα δείγμα για κάθε μεταχείριση που θα χρησίμευε στον υπολογισμό του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης ως μάρτυρας. Τα δείγματα προς ανάλυση τοποθετήθηκαν για επώαση στους 20 °C για 5 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, ενώ οι μάρτυρες αποθηκεύτηκαν για το ίδιο χρονικό διάστημα στους -20 °C, με σκοπό την απενεργοποίηση των ενζύμων και την αναστολή της νιτροποίησης. Μετά το πέρας των 5 ωρών, όλα τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως μετά ακολούθησε προσθήκη 5 ml διαλύματος KCl 2 M για τη δέσμευση των ιόντων  $\text{NH}_4^+$  και  $\text{NO}_3^-$ , σύντομη ανάδευση και διήθηση.

#### 2.3.2.1 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΝΙΤΡΟΔΩΝ ΙΟΝΤΩΝ

Για την φωτομετρική ανάλυση, αναμίχθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα 5 ml από το εκχύλισμα που παραλήφθηκε μετά τη διήθηση, 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.19M) με pH 8.5 και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη υδατικό διάλυμα σουλφαμιναδίου, υδροχλωρικής N-(1-ναφθυλ-)-αιθυλενοδιαμίνης και πυκνού ορθο-φωσφορικού οξέος που αντιδρά με τα  $\text{NO}_2^-$  που έχουν παραχθεί και με την φωτομέτρηση καταδεικνύεται η συγκέντρωσή τους στα διαλύματα.



Ακολούθησε ανάδευση και ομογενοποίηση του μίγματος και παραμονή για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου, για την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στα 520 nm.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων στα εδαφικά δείγματα νιτρωδών ιόντων, χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη δυνητικής νιτροποίησης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα  $\text{NaNO}_2$  διαφορετικών συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα, 0 (μάρτυρας), 2, 4, 8 και 10 ml διαλύματος  $\text{NaNO}_2$  ( $10 \mu\text{mol NO}_2^{-1}\cdot\text{N ml}^{-1}$ ), μεταφέρθηκαν σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml, όπου προστέθηκαν 20 ml διαλύματος  $\text{KCl}$  2 M και ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρις τα 100 ml, με αποσταγμένο νερό. Με τον τρόπο αυτό προέκυψαν διαλύματα συγκεντρώσεων 0, 0.2, 0.4, 0.8 και 1.0  $\mu\text{mol NO}_2^{-1}\cdot\text{N ml}^{-1}$ . Κατόπιν 5 ml από τα παραπάνω πρότυπα διαλύματα (τελικές συγκεντρώσεις 0, 0.1, 0.2, 0.4 και 0.5  $\mu\text{mol NO}_2^{-1}\cdot\text{N ml}^{-1}$ ) αναμίχθηκαν με 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος χλωριούχου αμμωνίου ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.19M) και 2 ml διαλύματος χρωματικού δείκτη (η σύνθεση του οποίου περιγράφεται παρακάτω) και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 520nm (Kandeler, 1995).

- Χρωματικός δείκτης: 2 g σουλφανιλαμίδιο και 0.1 g υδροχλωρική N-(1-ναφθυλ)-αιθυλενο-διαμίνη διαλύθηκαν σε 150 ml αποσταγμένου νερού και ακολούθησε προσθήκη 20 ml πυκνού ορθο-φωσφορικού οξέος και συμπλήρωση του όγκου διαλύματος στα 200 ml με αποσταγμένο νερό

### 2.3.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ $\text{NH}_4^+$ ΚΑΙ $\text{NO}_3^-$ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ

Για την μέτρηση  $\text{NH}_4^+$  και  $\text{NO}_3^-$  στο έδαφος αρχικά έγινε εκχύλιση των δειγμάτων. Ζυγίστηκαν 2 g εδάφους από κάθε μεταχείριση (E+KA, E-K+KA) και τα δείγματα ελέγχου (E, E-K) σε σωληνάρια falcon των 50 ml και προστέθηκαν 20 ml 1 M χλωριούχου καλίου  $\text{KCl}$  (PanReac Applichem, Darmstadt, Germany). Το μείγμα ανακινήθηκε για 30 λεπτά σε περιστροφικό αναδευτήρα και διηθήθηκε μέσω φίλτρου χαρτιού σε σωληνάρια falcon των 15 ml.

**Ποσοτικός προσδιορισμός Νιτρικών:** Για τον χρωματικό προσδιορισμό των νιτρικών  $\text{NO}_3^-$  μετά την εκχύλιση χλωριούχου καλίου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του

χλωριούχου βαναδίου (VCl<sub>3</sub>/Griess) από τους Wanek et al. (2009). Η μέτρηση έγινε χρωματογραφικά με φασματοφωτόμετρο εξοπλισμένο με φωτόμετρο πλάκας μικροπιλοδότησης με πλάκες 96 μικροτίλων. Αρχικά τοποθετήθηκαν 100 μl από τα πρότυπα διαλύματα (συγκεντρώσεων 20 mg N l<sup>-1</sup> έως 0 mg N l<sup>-1</sup>, από δύο φορές). Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν 100 μl από κάθε δείγμα, στην πλάκα μικροπιλοδότησης, και προστέθηκαν 100 μl διαλύματος αντιδραστηρίου βαναδίου (του οποίου η σύνθεση περιγράφεται παρακάτω). Προστέθηκαν 50 μl από κάθε αντιδραστήριο Griess 1 και 2 (η σύνθεση των οποίων περιγράφεται παρακάτω) για τελικό όγκο 300 μl. Κατόπιν η πλάκα μικροπιλοδότησης επωάστηκε στους 37 °C για 60 λεπτά και μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο στα 540 nm. Για τον ποσοτικό υπολογισμό των νιτρικών σχεδιάστηκε μια καμπύλη βαθμονόμησης από τη μετρημένη απορρόφηση έναντι της συγκέντρωσης. Προπαρασκευάστηκε το πρότυπο διάλυμα KNO<sub>3</sub> (1000 mg N l<sup>-1</sup>) (περιγράφεται παρακάτω) και παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων. Πιο συγκεκριμένα, προετοιμάστηκαν 12 σωλήνες, στον πρώτο χρησιμοποιήθηκαν 5 ml KNO<sub>3</sub> (100 mg N l<sup>-1</sup>) και έγινε προσθήκη 5 ml milli-Q νερού και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις 1:2 με τελικές συγκεντρώσεις 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019, 0. Η συγκέντρωση στα αρχικά δείγματα εδάφους δίνεται ανά ξηρή μάζα εδάφους.

- Διάλυμα αντιδραστηρίου βαναδίου (50,9 mM): παρασκευάστηκε διαλύοντας 0.016 g χλωριούχου βαναδίου (III) (Sigma-Aldrich, St. Quentin-Fallavier, France) σε 20 ml 1 M HCl και έγινε διήθηση μέσω διηθητικού χαρτιού.
- Αντιδραστήριο Griess 2 (58 mM σουλφανιλαμίδιο): Διαλύθηκαν 5 g σουλφανιλαμίδης Soulfamide (Sigma-Aldrich, Beijing, China) σε 500 ml 3 M HCl.
- Αντιδραστήριο Griess 1 (0,77 mM): παρασκευάστηκε διαλύοντας 0.1 g διυδροχλωρικής N-ναφθυλαιθυλενοδιαμίνης (N-naphthyl ethylenediamine dihydrochloride ) σε 500 ml απιονισμένου νερού
- Διαλυτικό διάλυμα νιτρικού καλίου (1000 mg N l<sup>-1</sup>): Διαλύθηκαν 3.611 g KNO<sub>3</sub> σε 500 ml milli-Q νερού.

**Ποσοτικός προσδιορισμός Αμμωνιακών:** Για τον χρωματικό προσδιορισμό των αμμωνιακών NH<sub>4</sub> μετά την εκχύλιση χλωριούχου καλίου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος

Kandeler et al. (1995) με ορισμένες τροποποιήσεις. Η μέτρηση έγινε χρωματογραφικά με φασματοφωτόμετρο εξοπλισμένο με φωτόμετρο πλάκας μικροπιλοδότησης με πλάκες 96 μικροτίτλων. Αρχικά τοποθετήθηκαν 600 μl πρότυπα διαλύματα ( $20 \text{ mg N l}^{-1}$  έως  $0 \text{ mg N l}^{-1}$ , από δύο φορές) και 600 μl δειγμάτων σε 1,5 ml erpendorfs και προστέθηκαν 120 μl διαλύματος οξείδωσης και 300 μl color reagent τα οποία περιγράφονται παρακάτω. Τα δείγματα ανακινήθηκαν σε οριζόντιο αναδευτήρα στα 300 rpm για μισή ώρα και μετρήθηκε η ευαισθησία χρώματος στα 660 nm. Για τον ποσοτικό υπολογισμό των αμμωνιακών σχεδιάστηκε μια καμπύλη βαθμονόμησης από τη μετρημένη απορρόφηση έναντι της συγκέντρωσης. Προπαρασκευάστηκε το πρότυπο διάλυμα  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $1000 \text{ mg N l}^{-1}$ ) (περιγράφεται παρακάτω) και παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων. Πιο συγκεκριμένα, προετοιμάστηκαν 12 σωλήνες, στον πρώτο χρησιμοποιήθηκαν 5 ml  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $100 \text{ mg N l}^{-1}$ ) και έγινε προσθήκη 5 ml  $\text{KCl}$  1M και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις 1:2 με τελικές συγκεντρώσεις 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019, 0. Η συγκέντρωση στα αρχικά δείγματα εδάφους δίνεται ανά ξηρή μάζα εδάφους.

- Διάλυμα  $\text{NaOH}$  0.3 M: Διαλύθηκαν 0.6 g  $\text{NaOH}$  σε 50 ml νερό MilliQ.
- Διάλυμα σαλικυλικού νατρίου: Διαλύθηκαν 3.4 g Sodium salicylate puriss. p.a., >99.5%(NT) (Sigma-Aldrich, Beijing, China) και 0.0256 g Sodium nitroprusside dihydrate (Sigma-Aldrich, Spain) σε 20 ml νερό MilliQ.
- Color reagent: Αναμίχθηκαν διάλυμα  $\text{NaOH}$  0,3 M, διάλυμα σαλικυλικού νατρίου και νερό MilliQ σε ποσοστά 1: 1: 1. Η προετοιμασία έγινε αμέσως πριν τη χρήση.
- Διάλυμα οξείδωσης: Διαλύθηκαν 0,02 g Sodium dichloroisocyanurate dihydrate >98.0%(AT) (Sigma-Aldrich, Japan) σε 20 ml νερό MilliQ.
- Πρότυπο διάλυμα stock  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $1000 \text{ mg N l}^{-1}$ ): Διαλύθηκαν 0,382 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  σε 100 ml 1 M  $\text{KCl}$ .

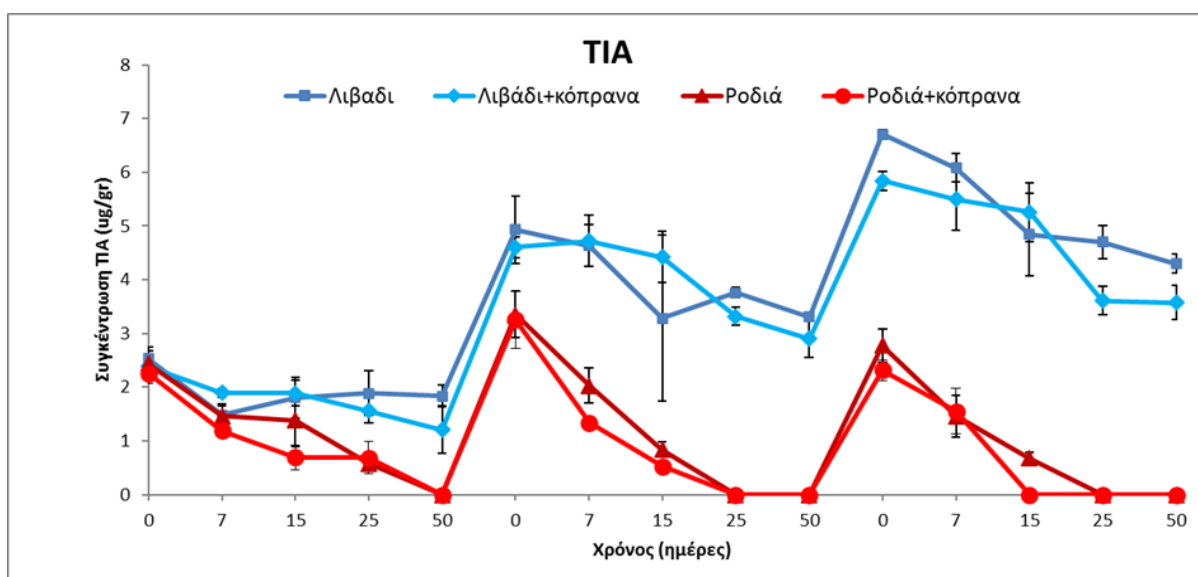
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ελάχιστα είναι γνωστά για την οικοτοξική σχέση των υπολειμμάτων ΚΑ και του εδάφους. Η διαδικασία της νιτροποίησης έχει προταθεί ως πιθανός δείκτης τοξικότητας του εδάφους και επίσης έχει αναγνωριστεί ότι οι μικροοργανισμοί που οξειδώνουν την αμμωνία είναι η πιο ευαίσθητη μικροβιακή ομάδα στην έκθεση από γεωργικές πρακτικές (Karas et al., 2018; Karpouzas et al., 2016). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την επίδραση των tiamulin και tilmicosin στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους και πιο ειδικά σε μία από τις βασικές μικροβιακές λειτουργίες στον κύκλο του αζώτου, την νιτροποίηση. Παρ'όλα αυτά υπάρχουν μελέτες όπου διερευνάτε η επίδραση άλλων αντιβιοτικών σε αυτήν, όπως amoxicillin (Kotzerke et al., 2011), sulfadiazine (Schauss et al., 2009)(Radl et al., 2015)(Liao et al., 2019), oxytetracycline (Cao et al., 2016)(Tang et al., 2020), tetracyclines (Langbehn et al., 2020) κ.α.

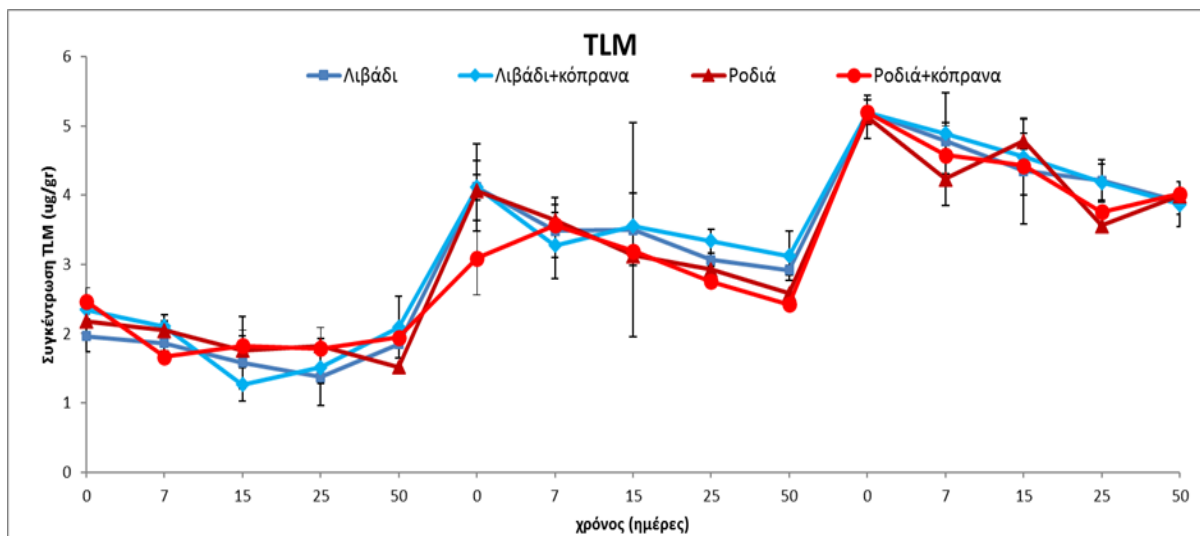
#### 3.1 ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΑ ΣΤΑ ΕΔΑΦΗ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Τα αποτελέσματα της HPLC όπου μελετήθηκε ο ρυθμός αποικοδόμησης του ΤΙΑ και ΤΛΜ επιβεβαιώνουν την μελέτη των Perruchon et al., στην οποία τα δύο ΚΑ εμφανίζουν μέτρια ως υψηλή υπολειμματικότητα στα εδάφη που μελετήθηκαν με παρόμοιους ρυθμούς αποικοδόμησης (Perruchon et al., 2022). Το ταχείας αποικοδόμησης έδαφος «Ροδιά» διέσπασε το ΤΙΑ σε κάθε κύκλο εμπλουτισμού ενώ το βραδείας αποικοδόμησης «Λιβιάδι» φαίνεται να αδρανοποιείται μετά από τον τρίτο κύκλο εφαρμογής ΤΙΑ όπως παρατηρούμε στο Διάγραμμα 7. Από τις μετρήσεις HPLC προκύπτει ότι η μικροβιακή κοινότητα και των δύο εδαφών επηρεάζεται αρνητικά από τις πολλαπλές εφαρμογές του ΤΛΜ, αποικοδομώντας ελάχιστα το αντιβιοτικό και με μεγαλύτερη υπολειμματικότητα στον τρίτο κύκλο εφαρμογής όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 8. Η βασική υπόθεση συσχέτισης της υπολειμματικότητας των ΚΑ στο έδαφος και των αρνητικών επιδράσεων στη δυνητική νιτροποίηση για το έδαφος «Λιβιάδι» με την προσθήκη του ΤΙΑ φαίνεται να επιβεβαιώνεται ενώ για το έδαφος «Ροδιά» με την προσθήκη του ΤΙΑ δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της διάρκειας έκθεσης και της απόκρισης της μικροβιακής κοινότητας. Παρά την πλήρη

αποικοδόμηση του ΤΙΑ φαίνεται ότι η δυνητική νιτροποίηση επηρεάζεται σημαντικά, γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο ότι οι μεταβολίτες του ΤΙΑ είναι εξίσου τοξικοί με την μητρική ένωση και μπορούν να καταστέλλουν τους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς. Σε μία έρευνα οι Vasileiadis et al (2018), παρείχαν ισχυρές ενδείξεις ότι η 3,5-DCA, ο κύριος μεταβολίτης της ιπροδιόνης στο έδαφος, είναι υπεύθυνη για τη σημαντική μείωση της δραστηριότητας των νιτροδοποιητικών βακτηρίων, ως εκ τούτου αποδεικνύουν ότι οι μεταβολίτες των φυτοφαρμάκων θα μπορούσαν να έχουν υψηλότερη εγγενή μικροβιακή τοξικότητα του εδάφους από τις μητρικές τους ενώσεις (Vasileiadis et al., 2018). Για πιο ασφαλή αποτελέσματα θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες όχι μόνο για τις μητρικές ενώσεις των ΚΑ αλλά και για τους κύριους μεταβολίτες τους ώστε να διευκρινισθούν οι επιδράσεις τους στη μικροβιακή κοινότητα του εδάφους.



Διάγραμμα 7: Αποικοδόμηση ΤΙΑ στην πορεία των τριών πειραματικών κύκλων στα εδάφη «Λιβάδι» και «Ροδιά» στις μεταχειρίσεις με ή χωρίς εφαρμογή κοπράνων στα χρονικά σημεία 0, 7, 15, 25, 50. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 8: Αποικοδόμηση TIA στην πορεία των τριών πειραματικών κύκλων στα εδάφη «Λιβιάδι» και «Ροδιά» στις μεταχειρίσεις με ή χωρίς εφαρμογή κοπράνων στα χρονικά σημεία 0, 7, 15, 25, 50. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.

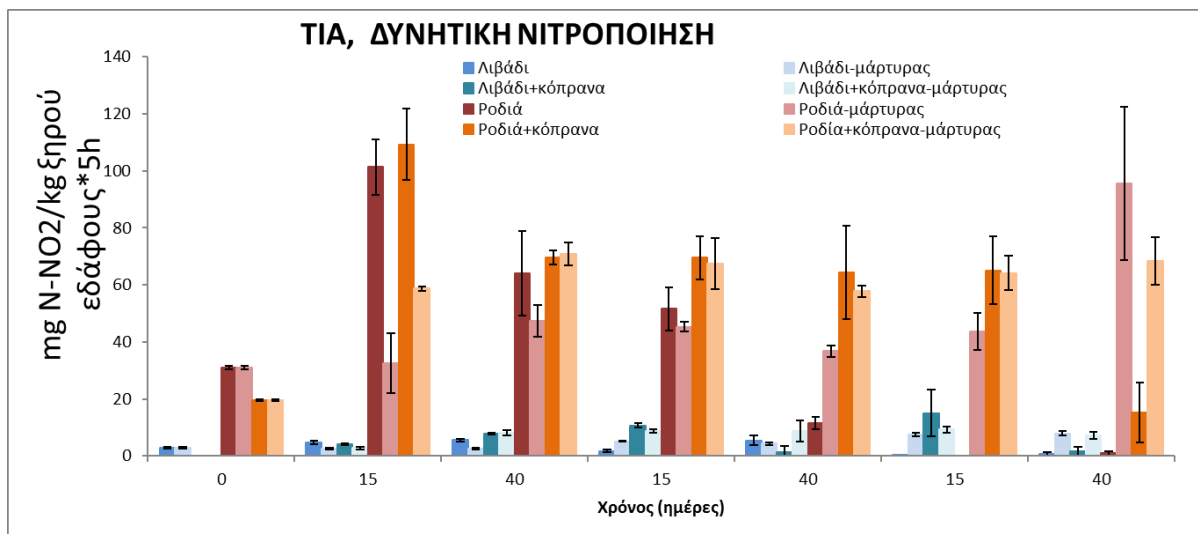
## 3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΤΙΑΜΟΥΛΙΝ ΚΑΙ ΤΙΛΜΙΚΟΣΙΝ ΣΤΟΥΣ ΝΙΤΡΩΔΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΕΔΑΦΟΥΣ

### 3.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΑ ΣΤΟ ΡΥΘΜΟ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

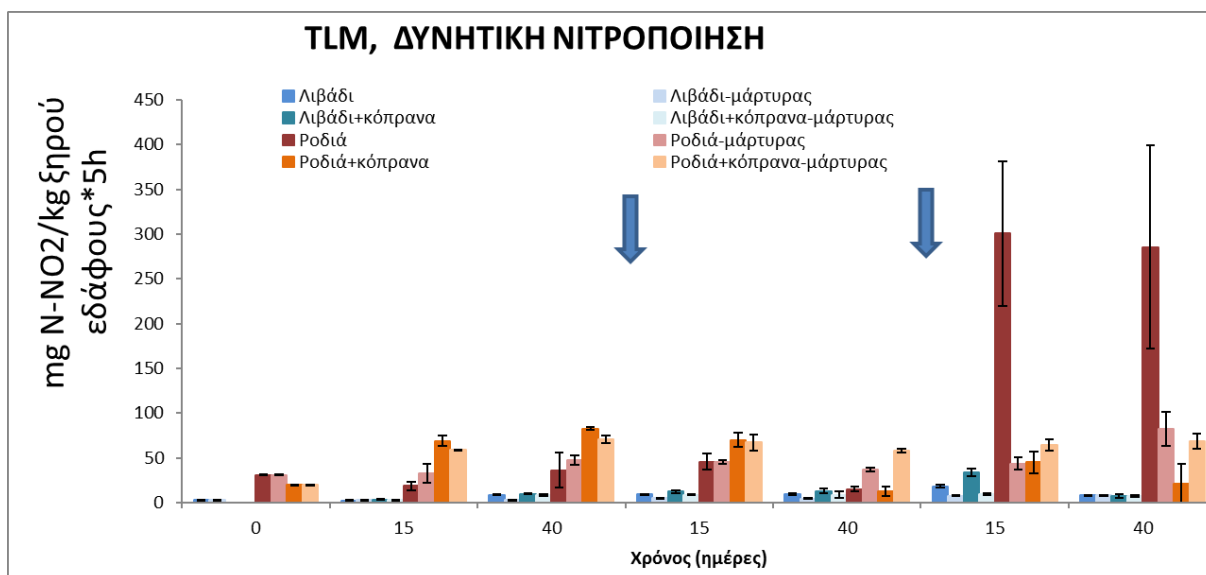
Από την μελέτη των αποτελεσμάτων του αντιβιοτικού TIA, αρχικά κατά τον πρώτο και δεύτερο κύκλο εφαρμογών μέχρι και την 15<sup>η</sup> ημέρα δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στον ρυθμό δυναμικής νιτροποίησης των μεταχειρίσεων στα δύο εδάφη «Λιβιάδι» και «Ροδιά» σε σχέση με τους μάρτυρες. Μετά την 40<sup>η</sup> ημέρα του δεύτερου κύκλου εφαρμογής και στην συνέχεια του τρίτου κύκλου παρατηρείται αναστολή του ρυθμού και στα δύο εδάφη όπως διακρίνεται στο Διάγραμμα 1, γεγονός που υποδηλώνει την τοξικότητά του TIA στους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς. Επιπλέον δεν σημειώνεται σημαντική διαφορά στον ρυθμό δυναμικής νιτροποίησης του TIA με ή χωρίς την προσθήκη κοπράνων παρά την αρχική υπόθεση, όπου λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε οργανική ουσία ευνοούν την προσρόφηση και περιορίζουν την βιοδιαθεσιμότητα των ουσιών αυτών προς αποικοδόμηση, καταστρώντας τους νιτροδοποιητικούς μικροοργανισμούς περισσότερο ευάλωτους στην έκθεση. Όπως για παράδειγμα σε μία έρευνα των Kotzerket et al, οι πιθανοί ρυθμοί νιτροποίησης σε δύο διαφορετικά εδάφη επηρεάστηκαν αρνητικά μετά την

προσθήκη της κοπριάς που περιείχε το αντιβιοτικό αμοξικιλίνη, σε σύγκριση με την εφαρμογή καθαρής κοπριάς (Kotzerke et al., 2011). Επίσης στην μελέτη των Radl et al, η πιθανή δραστηριότητα νιτροποίησης όσο και η αφθονία των οξειδωτικών βακτηρίων της αμμωνίας επηρεάστηκαν σημαντικά από την εφαρμογή κοπριάς που περιέχει σουλφαδιαζίνης σε συγκριση με την άμεση εφαρμογή της (Radl et al., 2015). Σε αντίθεση με το αντιβιοτικό TIA, στα αποτελέσματα του TLM παρατηρείται ενίσχυση της νιτροποίησης στο αλκαλικό έδαφος «Ροδιά» μετά την 15<sup>η</sup> ημέρα του δεύτερου κύκλου εφαρμογής ,ενώ στο όξινο έδαφος «Λιβιάδι» δεν φαίνεται να επηρεάζεται σε σχέση με τους μάρτυρες και στους τρεις κύκλους εφαρμογής όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2. Πρόσφατες μελέτες έχουν παρατηρήσει ότι ορισμένα αντιβιοτικά μπορεί να διεγείρουν τη μικροβιακή δραστηριότητα και να προάγουν την οξείδωση της αμμωνίας στις κατάλληλες συγκεντρώσεις, για παράδειγμα οι Xia et al. (2019), σημείωσαν ότι η χαμηλή συγκέντρωση του KA tetracycline (1 mg/L) ενίσχυσε τον ρυθμό νιτροποίησης σε σύγκριση με υψηλότερες συγκεντρώσεις (Xia et al., 2019). Αυτό το διεγερτικό αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι μια ορισμένη συγκέντρωση αυτών των KA θα μπορούσε να παρέχεται ως πηγές άνθρακα και αζώτου για την ανάπτυξη των νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών (Cao et al., 2016). Από την άλλη πλευρά, οι διεγερτικές επιδράσεις των KA μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση των επιπέδων NO<sub>3</sub><sup>-</sup> στα εδάφη, τα οποία θα μπορούσαν είτε να εκπλυθούν στα υπόγεια ύδατα είτε να απονιτροποιηθούν, δημιουργώντας ανεπιθύμητες περιβαλλοντικές συνέπειες (Cao et al., 2016). Απαιτούνται αντίστοιχες έρευνες σε ένα μεγάλο φάσμα KA και με μεγαλύτερο αριθμό εδαφών ώστε να διευκρινισθούν οι επιπτώσεις τους στη λειτουργία του νιτροδοποιητικών μικροοργανισμών και κατ' επέκταση του οικοσυστήματος που είναι ακόμη άγνωστες. Τέλος, η προσθήκη κοπράνων με το TLM, δεν φαίνεται να επιδρά στο ρυθμό της δυνητικής νιτροποίησης σε σχέση με τους μάρτυρες και στα δύο εδάφη όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2.

Τα αποτελέσματα της δυνητικής νιτροποίησης για τα δύο εδάφη όπου έγινε η εφαρμογή των TIA και TLM στις διάφορες μεταχειρίσεις παρουσιάζονται στα Διάγραμμα 1 και 2.



Διάγραμμα 1: Πιθανές δραστηριότητες νιτροποίησης των δύο εδαφών, «Λιβάδι» και «Ροδιά», στα οποία έγινε εφαρμογή ΤΙΑ είτε απευθείας είτε μέσω κοπράνων σε σύγκριση με τους μεθοδολογικούς μάρτυρες, στα χρονικά σημεία 0, 15 και 40 κάθε πειραματικού κύκλου. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ είναι οι μέσες τιμές τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις.



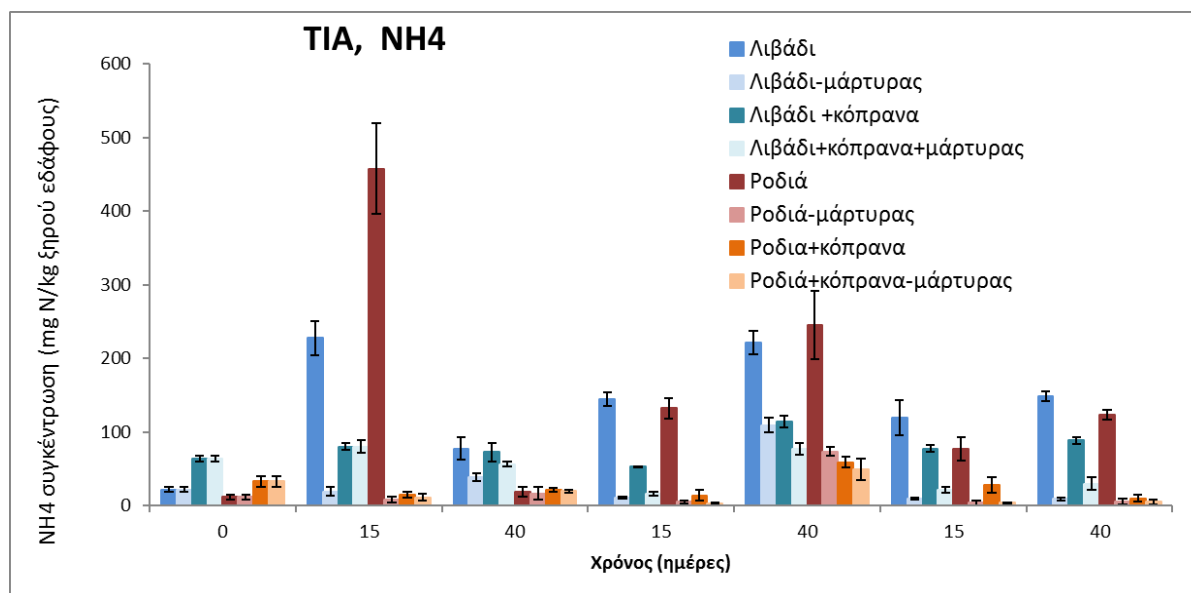
Διάγραμμα 2: Πιθανές δραστηριότητες νιτροποίησης των δύο εδαφών, «Λιβάδι» και «Ροδιά», στα οποία έγινε εφαρμογή ΤΛΜ είτε απευθείας είτε μέσω κοπράνων σε σύγκριση με τους μεθοδολογικούς μάρτυρες, στα χρονικά σημεία 0, 15 και 40 κάθε πειραματικού κύκλου. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ είναι οι μέσες τιμές τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις.



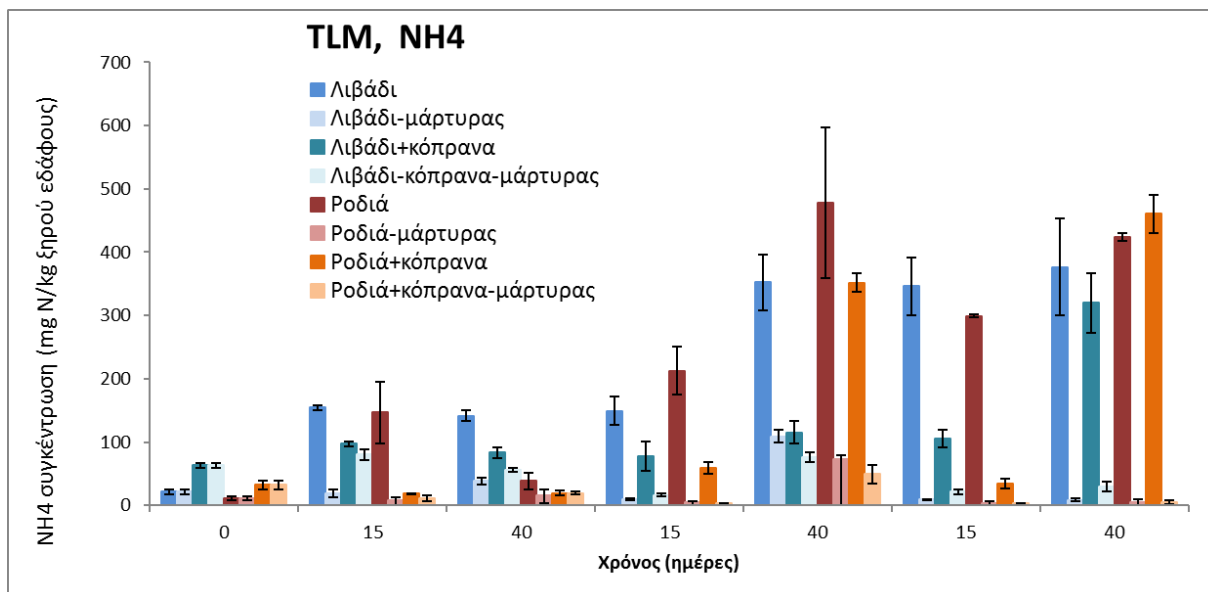
### 3.2.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΑ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΕΔΑΦΗ

Η συγκέντρωση των αμμωνιακών  $\text{NH}_4^+$  είναι αυξημένη και έχει μεγάλη διαφορά σε όλες τις μεταχειρίσεις του ΤΙΑ σε σχέση με τους μάρτυρες από την 15<sup>η</sup> ημέρα του πρώτου κύκλου εφαρμογής, εκτός της μεταχείρισης με την προσθήκη κοπράνων στο αλκαλικό έδαφος «Ροδιά», όπου δεν υπάρχει σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα. Το αποτέλεσμα επαληθεύεται καθώς λόγω της καταστολής του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης με το αντιβιοτικό ΤΙΑ έχουμε καταστολή της οξειδωσης της αμμωνίας άρα και αυξημένη συγκέντρωση όπως διακρίνεται στο Διάγραμμα 3. Αντίστοιχα στα αποτελέσματα για το αντιβιοτικό ΤLM παρατηρείται σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης της  $\text{NH}_4^+$  σε όλες τις μεταχειρίσεις και στα δύο εδάφη σε αντίθεση με τους μάρτυρες γεγονός που παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με τα αποτελέσματα της δυνητικής νιτροποίησης στην μεταχείριση Ροδιά όπου λόγω της διέγερσης της αναμέναμε και χαμηλότερες συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4^+$ .

Στα Διαγράμματα 3 και 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των αμμωνιακών για τα δύο ΚΑ.



Διάγραμμα 3: Συγκέντρωση  $\text{NH}_4^+$  που προσδιορίστηκε στα δύο εδάφη, «Λιβάδι» και «Ροδιά», στα οποία έγινε εφαρμογή ΤΙΑ είτε απευθείας είτε μέσω κοπράνων σε σύγκριση με τους μεθοδολογικούς μάρτυρες, στα χρονικά σημεία 0, 15 και 40 κάθε πειραματικού κύκλου. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ είναι οι μέσες τιμές τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις.

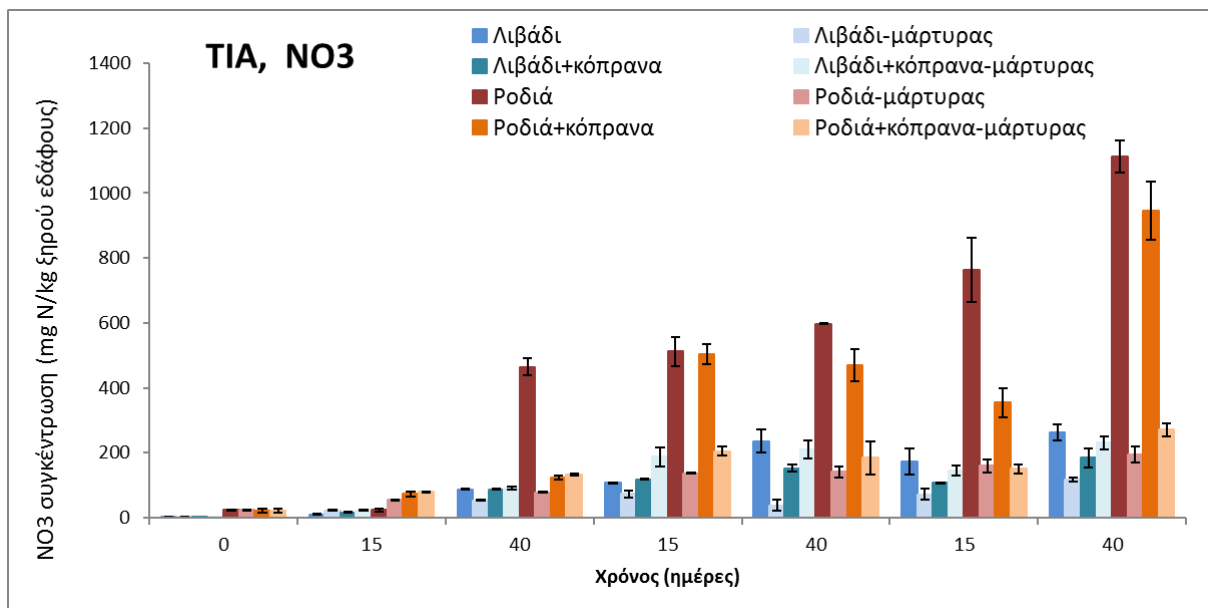


Διάγραμμα 4: Συγκέντρωση  $NH_4^+$  που προσδιορίστηκε στα δύο εδάφη, «Λιβιάδι» και «Ροδιά», στα οποία έγινε εφαρμογή TLM είτε απευθείας είτε μέσω κοπράνων σε σύγκριση με τους μεθοδολογικούς μάρτυρες, στα χρονικά σημεία 0, 15 και 40 κάθε πειραματικού κύκλου. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ είναι οι μέσες τιμές τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις.

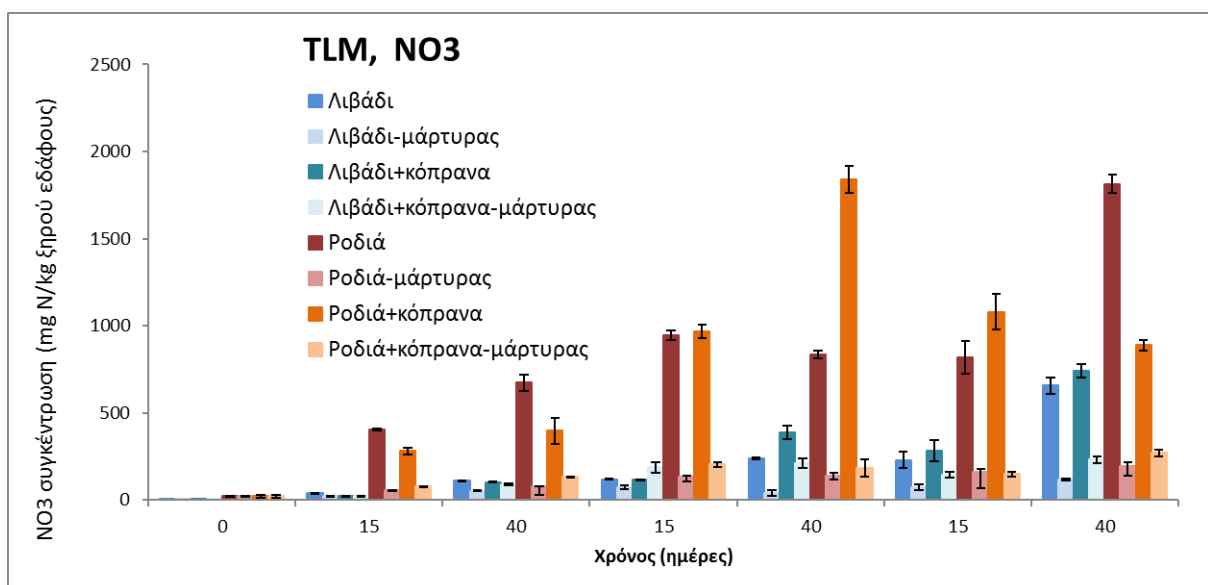
### 3.2.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΑ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΝΙΤΡΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΕΔΑΦΗ

Η συγκέντρωση νιτρικών  $NO_3^-$  για το αντιβιοτικό TIA στο έδαφος «Λιβιάδι» δεν φαίνεται να έχει σημαντική διαφορά σε σχέση με τους μάρτυρες σε όλη την πορεία των πειραματικών κύκλων ενώ στο έδαφος «Ροδιά» αυξάνεται την 15<sup>η</sup> ημέρα του δεύτερου κύκλου εφαρμογής όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 5. Για το αντιβιοτικό TLM παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση προϊόντων νιτρικών  $NO_3^-$  σε όλες τις μεταχειρίσεις και στα δύο εδάφη σε σχέση με τους μάρτυρες όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 6.

Στα Διαγράμματα 5 και 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των νιτρικών για τα δύο ΚΑ.



Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση  $NO_3^-$  που προσδιορίστηκε στα δύο εδάφη, «Λιβιάδι» και «Ροδιά», στα οποία έγινε εφαρμογή TIA είτε απευθείας είτε μέσω κοπράνων σε σύγκριση με τους μεθοδολογικούς μάρτυρες, στα χρονικά σημεία 0, 15 και 40 κάθε πειραματικού κύκλου. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ είναι οι μέσες τιμές τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις.



Διάγραμμα 21: Συγκέντρωση  $NO_3^-$  που προσδιορίστηκε στα δύο εδάφη, «Λιβιάδι» και «Ροδιά», στα οποία έγινε εφαρμογή TLM είτε απευθείας είτε μέσω κοπράνων σε σύγκριση με τους μεθοδολογικούς μάρτυρες, στα χρονικά σημεία 0, 15 και 40 κάθε πειραματικού κύκλου. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται εδώ είναι οι μέσες τιμές τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις.

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα ερευνά μελετήθηκαν τα αντιβιοτικά tiamulin και tilmicosin σε εδάφη με και χωρίς πρόσμιξη κοπράνων από την χοιροτροφική μονάδα ΧΟΙΡΟΠΑΛ ΕΠΕ στον Κοσκινά του Παλαμά Καρδίτσας. Τα αποτελέσματα της έρευνας αξιολογήθηκαν ως προς την αλληλεπίδραση των ΚΑ με την μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, πιο συγκεκριμένα την επίδραση τους στο ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης, και παράλληλα ως προς τον ρυθμό αποικοδόμηση τους στα εδάφη ύστερα από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές των ΚΑ στο έδαφος ώστε να εκτιμηθεί η διάρκεια έκθεσης της μικροβιακής κοινότητας στην εν λόγω ουσία, επιτρέποντας έτσι την καλύτερη κατανόηση της ανθεκτικότητας, της εξάπλωσης και της επίδρασης των ΚΑ.

Στα αποτελέσματα της HPLC μετά τις επαναλαμβανόμενες εφαρμογές των ΚΑ παρατηρήθηκε μια αύξηση της εμμονής τους στο έδαφος η οποία μπορεί να προκύπτει από την αδυναμία της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους να αποικοδομήσει τις υψηλές συγκεντρώσεις των ΚΑ στις οποίες εκτίθεται. Η βασική υπόθεση συσχέτισμου της υπολειμματικότητας των ΚΑ στο έδαφος και των αρνητικών επιδράσεων στη δυνητική νιτροποίηση δεν φαίνεται να επιβεβαιώνεται σε όλες τις μεταχειρήσεις, πάρ' αυτά για πιο σαφή αποτελέσματα θα χρειαστούν περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό εδαφών.

Από την μελέτη των αποτελεσμάτων των δύο ΚΑ παρατηρείται σημαντική διαφορά στον ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης των δύο εδαφών σε σχέση με τους μάρτυρες γεγονός που υποδηλώνει την τοξικότητά και την αρνητική επίδραση τους στις λειτουργίες των νιτροδοποιητικών βακτηρίων. Επιπλέον δεν σημειώθηκε σημαντική διαφορά στον ρυθμό δυνητικής νιτροποίησης των ΤΙΑ και ΤΛΜ με ή χωρίς την προσθήκη κοπράνων. Για περισσότερα ασφαλή συμπεράσματα θα χρειαστούν περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό εδαφών.

Μελλοντικές μελέτες για τα αντιβιοτικά ΤΙΑ και ΤΛΜ, θα μπορούσαν να εστιάσουν σε τέτοια πειράματα μικροκόσμων σε επιλεγμένα εδάφη ώστε να γίνει απομόνωση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών με την ικανότητα να αποικοδομούν τα δύο ΚΑ, και παράλληλα να φέρουν γονιδία ανθεκτικότητας.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματά υποδεικνύουν ότι η χορήγηση ΤΙΑ και ΤΛΜ σε χοιροτροφεία και η επακόλουθη χρήση κοπριάς σε γεωργικές καλλιέργειες είναι σχεδόν βέβαιο ότι θα οδηγήσει σε διάχυση υπολειμμάτων ΚΑ στο έδαφος με αδιερεύνητες ακόμη συνέπειες για το περιβάλλοντος και την ανθρώπινη υγεία.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arikan, O., Mulbry, W., & Rice, C. (2009). Management of antibiotic residues from agricultural sources: use of composting to reduce chlortetracycline residues in beef manure from treated animals. *Journal of Hazardous Materials*, *164*(2–3), 483–489. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2008.08.019>
- Bélanger, J. M. R., Jocelyn Paré, J. R., & Sigouin, M. (1997). Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, *18*(C), 37–59. [https://doi.org/10.1016/S0167-9244\(97\)80011-X](https://doi.org/10.1016/S0167-9244(97)80011-X)
- Bentley, R., & Bennett, J. W. (2003). What Is an Antibiotic? Revisited. *Advances in Applied Microbiology*, *52*, 303–331. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(03\)01012-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(03)01012-8)
- Berendsen, B. J. A., Lahr, J., Nibbeling, C., Jansen, L. J. M., Bongers, I. E. A., Wipfler, E. L., & van de Schans, M. G. M. (2018). The persistence of a broad range of antibiotics during calve, pig and broiler manure storage. *Chemosphere*, *204*, 267–276. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.04.042>
- Bernhard, A. (2010). *The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact | Learn Science at Scitable*. Nature Education Knowledge. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632/>
- Berrueta, L. A., Gallo, / B, & Vicente, / F. (1995). *A Review of Solid Phase Extraction: Basic Principles and New Developments*.
- Broekaert, N., Van Peteghem, C., Daeseleire, E., Sticker, D., & Van Poucke, C. (2011). Development and validation of an UPLC-MS/MS method for the determination of ionophoric and synthetic coccidiostats in vegetables. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* *2011 401:10*, *401*(10), 3335–3344. <https://doi.org/10.1007/S00216-011-5433-1>
- Cao, J., Wang, C., Dou, Z., & Ji, D. (2016). Independent and combined effects of oxytetracycline and antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157:H7 on soil microbial activity and partial nitrification processes. *Soil Biology and Biochemistry*, *98*, 138–147. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2016.03.014>
- Cycoń, M., Mrozik, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Frontiers in Microbiology*, *10*(MAR), 338. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00338/BIBTEX>

- Dalkmann, P., Broszat, M., Siebe, C., Willaschek, E., Sakinc, T., Huebner, J., Amelung, W., Grohmann, E., & Siemens, J. (2012). Accumulation of Pharmaceuticals, Enterococcus, and Resistance Genes in Soils Irrigated with Wastewater for Zero to 100 Years in Central Mexico. *PLOS ONE*, 7(9), e45397.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0045397>
- Dean, J. R. (1998). *Extraction methods for environmental analysis*. 225.
- DeVries, S. L., & Zhang, P. (2016). Antibiotics and the Terrestrial Nitrogen Cycle: A Review. In *Current Pollution Reports* (Vol. 2, Issue 1, pp. 51–67). Springer.  
<https://doi.org/10.1007/s40726-016-0027-3>
- Doretto, K. M., Peruchi, L. M., & Rath, S. (2014). Sorption and desorption of sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline and sulfamethazine antimicrobials in Brazilian soils. *Science of The Total Environment*, 476–477, 406–414.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2014.01.024>
- Du, L., & Liu, W. (2012). Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *INRA and Springer-Verlag*. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0062-9>
- Durso, L. M., & Cook, K. L. (2014). Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks? *Current Opinion in Microbiology*, 19(1), 37–44.  
<https://doi.org/10.1016/J.MIB.2014.05.019>
- ESVAC. (2020). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018*.
- Gaskins, H. R., Collier, C. T., & Anderson, D. B. (2006). ANTIBIOTICS AS GROWTH PROMOTANTS:MODE OF ACTION. <https://doi.org/10.1081/ABIO-120005768>, 13(1), 29–42. <https://doi.org/10.1081/ABIO-120005768>
- Gerchman, I., Levisohn, S., Mikula, I., Manso-Silvan, L., & Lysnyansky, I. (2011). Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from poultry. *Veterinary Research* 2011 42:1, 42(1), 1–9.  
<https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-90>
- González-Curbelo, M., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., González-Salamo, J., Hernández-Borges, J., & Rodríguez-Delgado, M. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169–185.  
<https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2015.04.012>
- Hays, V. W. (1986). *Benefits and Risks of Antibiotics Use in Agriculture*. 74–87.  
<https://doi.org/10.1021/BK-1986-0320.CH007>

- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., & Smalla, K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, 22(9), 536–545.  
<https://doi.org/10.1016/J.TIM.2014.05.005>
- Karas, P. A., Baguelin, C., Pertile, G., Papadopoulou, E. S., Nikolaki, S., Storck, V., Ferrari, F., Trevisan, M., Ferrarini, A., Fornasier, F., Vasileiadis, S., Tsiamis, G., Martin-Laurent, F., & Karpouzas, 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.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.05.073>
- Karkalousos, P., Georgiou, Z., Kroupis, C., Papaioannou, A., Plageras, P., Spiropoulos, V., Tsotsou, G. E., & Foutzoula, C. (2015). *Αποθετήριο Κάλλιπος: Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας*. Εκδόσεις Κάλλιπος. <https://doi.org/http://hdl.handle.net/11419/5382>
- Karpouzas, D. G., Tsiamis, G., Trevisan, M., Ferrari, F., Malandain, C., Sibourg, O., & Martin-Laurent, F. (2016). "LOVE TO HATE" pesticides: felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. *Environmental Science and Pollution Research* 23:18, 23(18), 18947–18951. <https://doi.org/10.1007/S11356-016-7319-4>
- Kandeler, E. (1995) Potential nitrification. In: Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds.), *Methods in Soil Biology*. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 426
- Kirchhelle, C. (2018). Pharming Animals: A Global History of Antibiotics in Food Production (1935–2017). *Palgrave Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1057/S41599-018-0152-2>
- Kotzerke, A., Fulle, M., Sharma, S., Kleineidam, K., Welzl, G., Lamshöft, M., Schloter, M., & Wilke, B. M. (2011). Alterations in total microbial activity and nitrification rates in soil due to amoxicillin-spiked pig manure. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(1), 56–64. <https://doi.org/10.1002/JPLN.200900210>
- Langbehn, R. K., Michels, C., & Soares, H. M. (2020). Tetracyclines lead to ammonium accumulation during nitrification process. <https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1765642>, 55(8), 1021–1031.  
<https://doi.org/10.1080/10934529.2020.1765642>
- Lee, H. S., & Alfred, L. (1993). *Food Chem.* 41.



- Lee, Y.-J., Choi, J.-H., El-Aty, A. M. A., Chung, H. S., Lee, H. S., Kim, S.-W., Rahman, M. M., Park, B.-J., Kim, J.-E., Shin, H.-C., & Shim, J.-H. (2017). Development of a single-run analytical method for the detection of ten multiclass emerging contaminants in agricultural soil using an acetate-buffered QuEChERS method coupled with LC–MS/MS. *Journal of Separation Science*, *40*(2), 415–423. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201600953>
- Lehotay, S. J., Maštovská, K., & Lightfield, A. R. (2005). Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *88*(2), 615–629. <https://doi.org/10.1093/JAOAC/88.2.615>
- Liao, Q., Li, M., Dong, Y., Shao, Y., Liu, X., Hu, X., Li, M., & Liu, A. (2019). Responses difference analysis of soil potential nitrification rates to Cu and sulfadiazine. *Http://Doi.Org/10.1080/26395940.2019.1620132*, *31*(1), 219–225. <https://doi.org/10.1080/26395940.2019.1620132>
- Lw, B., & El, M. (1980). Specific inhibition of nitrite oxidation by chlorate and its use in assessing nitrification in soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, *39*(3), 505–510. <https://doi.org/10.1128/AEM.39.3.505-510.1980>
- McEwen, S. A. (2007). Antibiotic Use in Animal Agriculture: What Have We Learned and Where are We Going? *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10495390600957233*, *17*(2), 239–250. <https://doi.org/10.1080/10495390600957233>
- Meyer, V. R. (2010). *Practical High-Performance Liquid Chromatography FIFTH EDITION*.
- Modric, Webb, & Derendorf. (1998). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tilmicosin in sheep and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *21*(6), 444–452. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2885.1998.00177.X>
- Mohr, K. I. (2016). History of antibiotics research. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *398*, 237–272. [https://doi.org/10.1007/82\\_2016\\_499/FIGURES/15](https://doi.org/10.1007/82_2016_499/FIGURES/15)
- Naccari, F., Pellegrino, M., Calò, M., Licata, P., Giofrè, F., & Carli, S. (2001). Effectiveness and kinetic behaviour of tilmicosin in the treatment of respiratory infections in sheep. *Veterinary Record*, *148*(25), 773–776. <https://doi.org/10.1136/VR.148.25.773>
- Nguyen, X. T. K., Pinyakong, O., & Thayanukul, P. (2019). Bacterial community structures and biodegradation kinetic of Tiamulin antibiotic degrading enriched consortia from swine wastewater. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 2019 *17*:2, *17*(2), 1121–1130. <https://doi.org/10.1007/S40201-019-00426-2>

- Pan, M., & Chu, L. M. (2016). Adsorption and degradation of five selected antibiotics in agricultural soil. *Science of The Total Environment*, 545–546, 48–56.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.12.040>
- Papadopoulos, A., & Wilmer, S. (2011). *One Health: A Primer*.
- Perruchon, C., Katsivelou, E., Karas, P. A., Vassilakis, S., Lithourgidis, A. A., Kotsopoulos, T. A., Sotiraki, S., Vasileiadis, S., & Karpouzias, D. G. (2022). Following the route of veterinary antibiotics tiamulin and tilmicosin from livestock farms to agricultural soils. *Journal of Hazardous Materials*, 429, 128293.  
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2022.128293>
- Poulsen, S. M., Karlsson, M., Johansson, L. B., & Vester, B. (2001). The pleuromutilin drugs tiamulin and valnemulin bind to the RNA at the peptidyl transferase centre on the ribosome. *Molecular Microbiology*, 41(5), 1091–1099. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.2001.02595.X>
- Radl, V., Kindler, R., Welzl, G., Albert, A., Wilke, B. M., Amelung, W., & Schloter, M. (2015). Drying and rewetting events change the response pattern of nitrifiers but not of denitrifiers to the application of manure containing antibiotic in soil. *Applied Soil Ecology*, 95, 99–106. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2015.06.016>
- Sahrawat, K. L. (2008). Factors Affecting Nitrification in Soils.  
<http://dx.doi.org/10.1080/00103620802004235>, 39(9–10), 1436–1446.  
<https://doi.org/10.1080/00103620802004235>
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725–759.  
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.03.026>
- Schauss, K., Focks, A., Heuer, H., Kotzerke, A., Schmitt, H., Thiele-Bruhn, S., Smalla, K., Wilke, B. M., Matthies, M., Amelung, W., Klasmeier, J., & Schloter, M. (2009). Analysis, fate and effects of the antibiotic sulfadiazine in soil ecosystems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(5), 612–618. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2009.02.009>
- Schlünzen, F., Pyetan, E., Fucini, P., Yonath, A., & Harms, J. M. (2004). Inhibition of peptide bond formation by pleuromutilins: the structure of the 50S ribosomal subunit from *Deinococcus radiodurans* in complex with tiamulin. *Molecular Microbiology*, 54(5), 1287–1294. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2004.04346.X>
- Stein, L. Y., & Klotz, M. G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3), R94–R98.

<https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.12.021>

Strock, J. S. (2008). Ammonification. *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set*, 162–165.

<https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00256-1>

Tang, Q., Xia, L., Ti, C., Zhou, W., Fountain, L., Shan, J., & Yan, X. (2020). Oxytetracycline, copper, and zinc effects on nitrification processes and microbial activity in two soil types.

*Food and Energy Security*, 9(4), e248. <https://doi.org/10.1002/FES3.248>

Theodoridis, G., Girousi, S., Zaxariadis, G., Zotou, A., & Samanidou, B. (2015). Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων. In *Βιοαναλυτική χημεία. [ηλεκτρ. βιβλ.]: Vol. Κεφαλαίο 6* (pp. 6.1-6.18). Εκδόσεις Κάλλιπος.

Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T. P., & Van Boeckel, T. P. (2020). *Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030*.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics9120918>

Van Boeckel, T. P., Glennon, E. E., Chen, D., Gilbert, M., Robinson, T. P., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Bonhoeffer, S., & Laxminarayan, R. (2017). Reducing antimicrobial use in food animals. *Science*, 357(6358), 1350–1352.

[https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAO1495/SUPPL\\_FILE/AAO1496-VANBOECKEL-SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAO1495/SUPPL_FILE/AAO1496-VANBOECKEL-SM.PDF)

Van Kessel, M. A. H. J., Speth, D. R., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Op Den Camp, H. J. M., Kartal, B., Jetten, M. S. M., & Lücker, S. (2015). Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* 2015 528:7583, 528(7583), 555–559.

<https://doi.org/10.1038/nature16459>

Vasileiadis, S., Puglisi, E., Papadopoulou, E. S., Pertile, G., Suci, N., Pappolla, R. A., Tourna, M., Karas, P. A., Papadimitriou, F., Kasiotakis, A., Ipsilanti, N., Ferrarini, A., Sulowicz, S., Fornasier, F., Menkissoglu-Spiroudi, U., Nicol, G. W., Trevisan, M., & Karpouzias, D. G. (2018). Blame it on the metabolite: 3,5-dichloroaniline rather than the parent compound is responsible for the decreasing diversity and function of soil microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(22).

[https://doi.org/10.1128/AEM.01536-18/SUPPL\\_FILE/ZAM022188833S1.PDF](https://doi.org/10.1128/AEM.01536-18/SUPPL_FILE/ZAM022188833S1.PDF)

Verstegen, M. W. A., & Williams, B. A. (2006). ALTERNATIVES TO THE USE OF ANTIBIOTICS AS GROWTH PROMOTERS FOR MONOGASTRIC ANIMALS.

<https://doi.org/10.1081/ABIO-120005774>, 13(1), 113–127.

<https://doi.org/10.1081/ABIO-120005774>

Vervaeke, I. J., Decuypere, J. A., Dierick, N. A., & Henderickx, H. K. (1979). Quantitative in

- Vitro Evaluation of the Energy Metabolism Influenced by Virginiamycin and Spiramycin used as Growth Promoters in Pig Nutrition. *Journal of Animal Science*, 49(3), 846–856. <https://doi.org/10.2527/JAS1979.493846X>
- Vester, B., & Douthwaite, S. (2001). Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(1), 1–12. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.1-12.2001>
- Wang, J., & Wang, S. (2018). Microbial degradation of sulfamethoxazole in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 3573–3582. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8845-4>
- Wrage, N., Velthof, G. L., Van Beusichem, M. L., & Oenema, O. (2001). Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12–13), 1723–1732. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00096-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00096-7)
- Xia, H., Wu, Y., Chen, X., Huang, K., & Chen, J. (2019). Effects of antibiotic residuals in dewatered sludge on the behavior of ammonia oxidizers during vermicomposting maturation process. *Chemosphere*, 218, 810–817. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.11.167>
- XU, M. gang, LI, D. chu, LI, J. mei, QIN, D. zhu, Kazuyuki, Y., & Hosen, Y. (2008). Effects of Organic Manure Application with Chemical Fertilizers on Nutrient Absorption and Yield of Rice in Hunan of Southern China. *Agricultural Sciences in China*, 7(10), 1245–1252. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60171-6](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60171-6)
- Zhang, D., Park, J., Kim, K., Cho, S., Jeong, D., Cho, S., Yi, H., Shim, J., Kim, J., Abd El-Aty, A., & Shin, H. (2016). Simultaneous detection of flumethasone, dl-methylephedrine, and 2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine in porcine muscle and pasteurized cow milk using liquid chromatography coupled with triple-quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1012–1013, 8–16. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2016.01.011>
- Ziv, G., SHBM-TOV, M., GLICKMAN, A., WINKLER, M., & SARAN, A. (1995). Tilmicosin antibacterial activity and pharmacokinetics in cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 18(5), 340–345. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2885.1995.TB00601.X>

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΗPLC ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΤΙΑ, ΤLM ΚΑΤΑ ΤΟΥΣ 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥΣ ΚΥΚΛΟΥΣ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ

	χρόνος	Κύκλος 1					Κύκλος 2					Κύκλος 3				
		0	7	15	25	50	0	7	15	25	50	0	7	15	25	50
Λιβάδι	1	2,314	1,299	2,164	1,437	1,604	5,595	4,246	4,199	3,864	3,296	6,804	6,023	5,103	4,845	4,100
	2	2,758	1,487	1,403	2,242	1,900	4,342	4,635	1,498	3,742	3,378	6,680	6,375	5,449	4,909	4,453
	3	2,508	1,652	1,840	1,981	1,999	4,848	5,017	4,156	3,668	3,24	6,643	5,849	3,981	4,353	4,336
Λιβάδι+κόπρανα	1	2,51	1,933	2,100	1,297	1,307	4,806	5,265	3,878	3,125	2,494	5,738	5,705	4,829	3,675	3,659
	2	2,421	1,808	1,623	1,729	0,720	4,577	4,403	4,733	3,418	3,045	5,746	4,840	5,066	3,837	3,851
	3	2,249	1,952	1,933	1,658	1,596	4,431	4,493	4,657	3,415	3,153	6,050	5,957	5,876	3,324	3,217
Ροδιά	1	2,632	1,631	1,743	0,603	0,000	3,624	1,928	0,922	0,000	0,000	2,934	1,342	0,789	0,000	0,000
	2	2,518	1,547	1,586	0,670	0,000	2,861	2,403	0,904	0,000	0,000	2,970	1,901	0,561	0,000	0,000
	3	2,177	1,205	0,826	0,473	0,000	3,576	1,763	0,67	0,000	0	2,421	1,148	0,685	0,000	0,000
Ροδιά+κόπρανα	1	2,046	1,090	0,802	0,918	0,000	2,674	1,356	0,513	0,000	0,000	2,211	1,167	0,000	0,000	0,000
	2	2,326	1,269	0,846	0,347	0,000	3,731	1,327	0,477	0,000	0,000	2,532	2,013	0,000	0,000	0,000
	3	2,41	1,209	0,434	0,798	0,000	3,348	1,327	0,591	0,000	0	2,202	1,477	0,000	0,000	0,000

Πίνακας 1: Μετρήσεις HPLC των τριών επαναλήψεων των μεταχειρίσεων: Λιβάδι, Λιβάδι και κόπρανα, Ροδιά, Ροδιά και κόπρανα για το αντιβιοτικό ΤΙΑ κατά την διάρκεια των τριών πειραματικών κύκλων, όπου στο χρονικό σημείο 0 κάθε κύκλου έγινε επανεμπλουτισμός ΤΙΑ με 5 mg/g.

	χρόνος	Κύκλος 1					Κύκλος 2					Κύκλος 3				
		0	7	15	25	50	0	7	15	25	50	0	7	15	25	50
Λιβάδι	M.O	2,527	1,479	1,802	1,887	1,834	4,928	4,633	3,284	3,758	3,305	6,709	6,082	4,844	4,702	4,296
	SD	0,223	0,177	0,382	0,411	0,206	0,630	0,386	1,547	0,099	0,069	0,084	0,268	0,767	0,304	0,180
Λιβάδι+κόπρανα	M.O	2,393	1,898	1,885	1,561	1,208	4,605	4,720	4,423	3,319	2,897	5,845	5,501	5,257	3,612	3,576
	SD	0,133	0,078	0,242	0,232	0,446	0,189	0,474	0,473	0,168	0,353	0,178	0,586	0,549	0,262	0,325
Ροδιά	M.O	2,442	1,461	1,385	0,582	0,000	3,354	2,031	0,832	0,000	0,000	2,775	1,464	0,678	0,000	0,000
	SD	0,237	0,226	0,490	0,100	0,000	0,427	0,332	0,141	0,000	0,000	0,307	0,391	0,114	0,000	0,000
Ροδιά+κόπρανα	M.O	2,261	1,189	0,694	0,688	0,000	3,251	1,337	0,527	0,000	0,000	2,315	1,552	0,000	0,000	0,000
	SD	0,191	0,091	0,226	0,301	0,000	0,535	0,017	0,058	0,000	0,000	0,188	0,428	0,000	0,000	0,000

Πίνακας 2: Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των τριών επαναλήψεων των μεταχειρίσεων: Λιβάδι, Λιβάδι και κόπρανα, Ροδιά, Ροδιά και κόπρανα για το αντιβιοτικό ΤΙΑ.

	χρόνος	Κύκλος 1					Κύκλος 2					Κύκλος 3				
		0	7	15	25	50	0	7	15	25	50	0	7	15	25	50
Λιβάδι	1	1,994	1,795	1,641	1,399	1,718	3,993	3,481	3,603	2,893	3,052	5,144	5,024	4,311	4,054	4,020
	2	1,918	1,711	1,524	1,310	1,960	4,491	3,627	3,513	3,154	3,047	5,411	4,519	4,302	4,072	3,787
	3	1,991	2,080	1,590	1,405	1,870	3,862	3,344	3,378	3,151	2,661	5,034	4,811	4,431	4,509	3,922
Λιβάδι+κόπρανα	1	3,295	2,475	1,416	1,582	2,310	4,835	3,581	3,887	3,224	2,987	5,151	4,973	4,948	4,280	3,578
	2	1,669	1,838	1,653	1,413	1,754	3,833	3,164	3,322	3,438	3,152	5,149	4,795	4,266	4,182	4,099
	3	2,073	2,000	0,723	1,541	2,219	3,671	3,072	3,448	3,353	3,231	5,294	4,900	4,44	4,097	4,019
Ροδιά	1	2,213	1,987	1,617	1,649	1,522	4,113	3,627	3,142	2,878	2,717	4,959	4,139	4,664	3,931	3,916
	2	2,141	2,170	1,710	1,928	1,487	3,895	3,486	3,113	2,372	2,593	4,860	4,274	4,996	3,635	4,046
	3	2,189	1,985	1,949	1,899	1,541	4,191	3,799	3,136	3,524	2,438	5,569	4,294	4,694	3,113	4,028
Ροδιά+κόπρανα	1	2,752	1,713	2,022	1,713	1,515	4,231	3,728	3,718	2,564	2,705	5,175	4,400	4,648	3,860	3,574
	2	1,926	1,559	1,363	1,915	2,417	1,128	3,517	2,940	3,103	2,497	4,881	4,678	4,324	3,534	4,062
	3	2,729	1,729	2,096	1,726	1,898	3,909	3,456	2,917	2,587	2,061	5,540	4,649	4,306	3,884	4,303

Πίνακας 3: Μετρήσεις HPLC των τριών επαναλήψεων των μεταχειρίσεων: Λιβάδι, Λιβάδι και κόπρανα, Ροδιά, Ροδιά και κόπρανα για το αντιβιοτικό TLM κατά την διάρκεια των τριών πειραματικών κύκλων, όπου στο χρονικό σημείο 0 κάθε κύκλου έγινε επανεμπλουτισμός TLM με 5 mg/g.

	χρόνος	Κύκλος 1					Κύκλος 2					Κύκλος 3				
		0	7	15	25	50	0	7	15	25	50	0	7	15	25	50
Λιβάδι	M.O	1,968	1,862	1,585	1,371	1,849	4,115	3,484	3,498	3,066	2,920	5,196	4,785	4,348	4,212	3,904
	SD	0,043	0,193	0,059	0,053	0,122	0,332	0,142	0,113	0,150	0,224	0,194	0,254	0,072	0,258	0,165
Λιβάδι+κόπρανα	M.O	2,346	2,104	1,264	1,512	2,094	4,113	3,272	3,552	3,338	3,123	5,198	4,889	4,551	4,186	3,866
	SD	0,847	0,331	0,483	0,088	0,298	0,630	0,271	0,297	0,108	0,125	0,083	0,089	0,354	0,092	0,265
Ροδιά	M.O	2,181	2,047	1,759	1,825	1,517	4,066	3,637	3,130	2,925	2,583	5,129	4,236	4,785	3,560	3,994
	SD	0,037	0,106	0,171	0,153	0,027	0,153	0,157	0,015	0,577	0,140	0,384	0,084	0,184	0,414	0,069
Ροδιά+κόπρανα	M.O	2,469	1,667	1,827	1,785	1,943	3,089	3,567	3,192	2,751	2,421	5,199	4,576	4,426	3,759	4,017
	SD	0,470	0,094	0,404	0,113	0,453	1,706	0,143	0,456	0,305	0,329	0,330	0,153	0,192	0,196	0,259

Πίνακας 4: Οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των τριών επαναλήψεων των μεταχειρίσεων: Λιβάδι, Λιβάδι και κόπρανα, Ροδιά, Ροδιά και κόπρανα για το αντιβιοτικό TLM.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΔΥΝΗΤΙΚΗΣ ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

	χρόνος	Κύκλος 1			Κύκλος 2		Κύκλος 3	
		0	15	40	15	40	15	40
Λιβάδι	1	3,072	5,382	6,088	1,514	5,516	0,000	0,197
	2	2,791	4,493	5,481	2,212	7,050	0,236	0,720
	3	2,710	4,255	4,902	1,244	3,851	0,050	1,200
Λιβάδι - μάρτυρας	1	3,072	2,647	2,773	5,037	4,509	7,596	7,759
	2	2,791	2,219	2,854	5,358	4,624	8,078	8,602
	3	2,710	2,776	2,129	5,020	3,863	6,782	7,119
Λιβάδι+κόπρινα	1	0,000	4,418	7,594	10,310	0,000	22,243	2,923
	2	0,000	3,848	8,000	11,503	3,891	16,521	0,000
	3	0,000	4,248	7,935	9,989	0,000	6,311	2,061
Λιβάδι+κόπρινα - μάρτυρας	1	0,000	3,251	8,699	9,173	13,076	9,744	6,017
	2	0,000	2,626	7,144	8,188	5,980	8,000	6,737
	3	0,000	2,348	8,775	8,819	7,016	9,890	8,571
Ροδιά	1	30,402	90,391	65,938	56,623	12,987	0,000	0,000
	2	31,217	108,794	77,850	42,846	12,246	0,000	1,454
	3	31,270	104,945	48,258	55,391	8,944	0,000	1,148
Ροδιά - μάρτυρας	1	30,402	27,271	53,815	47,352	35,695	37,761	68,457
	2	31,217	25,515	43,466	44,859	35,410	42,422	122,216
	3	31,270	44,662	44,814	43,823	39,168	50,573	95,887
Ροδιά+κόπρινα	1	19,280	94,862	72,525	66,121	82,069	78,338	27,458
	2	19,868	115,832	68,428	78,274	49,894	61,925	10,130
	3	19,347	117,182	68,159	64,385	61,113	55,002	8,293
Ροδιά+κόπρινα - μάρτυρας	1	19,280	59,304	66,272	57,063	55,757	67,209	63,715
	2	19,868	58,730	73,657	72,688	59,772	67,962	63,653
	3	19,347	57,885	72,471	72,352	57,693	57,141	78,134

Πίνακας 5: Ποσοτικά αποτελέσματα, των τριών επαναλήψεων κάθε μεταχείρισης, του ρυθμού δυναμικής νιτροποίησης για το αντιβιοτικό ΤΙΑ κατά την διάρκεια των τριών πειραματικών κύκλων.

	χρόνος	Κύκλος 1			Κύκλος 2		Κύκλος 3	
		0	15	40	15	40	15	40
Λιβάδι	M.O	2,858	4,710	5,490	1,656	5,473	0,095	0,706
	SD	0,190	0,594	0,593	0,499	1,600	0,124	0,502
Λιβάδι- μάρτυρας	M.O	2,858	2,547	2,585	5,138	4,332	7,485	7,826
	SD	0,190	0,291	0,398	0,190	0,410	0,655	0,744
Λιβάδι+κόπρινα	M.O	0,000	4,171	7,843	10,601	1,297	15,025	1,661
	SD	0,000	0,293	0,218	0,798	2,247	8,071	1,502
Λιβάδι+κόπρινα - μάρτυρας	M.O	0,000	2,742	8,206	8,727	8,691	9,211	7,108
	SD	0,000	0,462	0,920	0,499	3,833	1,052	1,317
Ροδιά	M.O	30,963	101,377	64,015	51,620	11,392	0,000	0,867
	SD	0,486	9,707	14,889	7,623	2,153	0,000	0,767
Ροδιά - μάρτυρας	M.O	30,963	32,483	47,365	45,345	36,758	43,585	95,520
	SD	0,486	10,584	5,627	1,814	2,093	6,485	26,881
Ροδιά+κόπρινα	M.O	19,498	109,292	69,704	69,594	64,359	65,088	15,294
	SD	0,322	12,515	2,447	7,568	16,331	11,985	10,574
Ροδιά+κόπρινα - μάρτυρας	M.O	19,498	58,640	70,800	67,368	57,741	64,104	68,501
	SD	0,322	0,713	3,966	8,926	2,008	6,042	8,343

Πίνακας 6: Οι μέσες τιμές (M.O) μαζί με τις τυπικές τις τυπικές αποκλίσεις(SD) των ποσοτικών αποτελέσματος του ρυθμού δυναμικής νιτροποίησης για το αντιβιοτικό ΤΙΑ.

	χρόνος	Κύκλος 1			Κύκλος 2		Κύκλος 3	
		0	15	40	15	40	15	40
Λιβάδι	1	3,072	1,371	9,208	9,612	8,721	16,829	8,897
	2	2,791	2,599	8,412	8,329	9,974	17,856	7,562
	3	2,710	1,147	8,298	8,695	10,758	20,094	7,752
Λιβάδι - μάρτυρας	1	3,072	2,647	2,773	5,037	4,509	7,596	7,759
	2	2,791	2,219	2,854	5,358	4,624	8,078	8,602
	3	2,710	2,776	2,129	5,020	3,863	6,782	7,119
Λιβάδι+κόπρανα	1	0,000	3,488	8,921	13,298	15,565	32,963	9,820
	2	0,000	2,979	9,349	10,726	9,797	29,945	7,463
	3	0,000	3,420	10,026	12,443	13,356	38,685	4,891
Λιβάδι+κόπρανα - μάρτυρας	1	0,000	3,251	8,699	9,173	13,076	9,744	6,017
	2	0,000	2,626	7,144	8,188	5,980	8,000	6,737
	3	0,000	2,348	8,775	8,819	7,016	9,890	8,571
Ροδιά	1	30,402	14,845	57,157	55,906	17,315	23,232	15,555
	2	31,217	16,938	32,955	42,409	12,019	243,632	365,784
	3	31,270	23,692	17,971	38,937	16,062	357,685	205,303
Ροδιά - μάρτυρας	1	30,402	27,271	53,815	47,352	35,695	37,761	68,457
	2	31,217	25,515	43,466	44,859	35,410	42,422	122,216
	3	31,270	44,662	44,814	43,823	39,168	50,573	95,887
Ροδιά+κόπρανα	1	19,280	63,829	83,709	62,593	6,740	30,992	348,015
	2	19,868	67,915	80,691	78,442	14,143	52,206	36,422
	3	19,347	74,837	83,063	68,474	17,218	51,368	6,359
Ροδιά+κόπρανα - μάρτυρας	1	19,280	59,304	66,272	57,063	55,757	67,209	63,715
	2	19,868	58,730	73,657	72,688	59,772	67,962	63,653
	3	19,347	57,885	72,471	72,352	57,693	57,141	78,134

Πίνακας 7: Ποσοτικά αποτελέσματα, των τριών επαναλήψεων κάθε μεταχείρισης, του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης για το αντιβιοτικό TLM κατά την διάρκεια των τριών πειραματικών κύκλων.

	χρόνος	Κύκλος 1			Κύκλος 2		Κύκλος 3	
		0	15	40	15	40	15	40
Λιβάδι	M.O	2,858	1,706	8,639	8,879	9,818	18,260	8,070
	SD	0,190	0,782	0,496	0,661	1,028	1,670	0,722
Λιβάδι- μάρτυρας	M.O	2,858	2,547	2,585	5,138	4,332	7,485	7,826
	SD	0,190	0,291	0,398	0,190	0,410	0,655	0,744
Λιβάδι+κόπρανα	M.O	0,000	3,296	9,432	12,156	12,906	33,865	7,391
	SD	0,000	0,276	0,557	1,310	2,910	4,439	2,465
Λιβάδι+κόπρανα - μάρτυρας	M.O	0,000	2,742	8,206	8,727	8,691	9,211	7,108
	SD	0,000	0,462	0,920	0,499	3,833	1,052	1,317
Ροδιά	M.O	30,963	18,491	36,028	45,751	15,132	300,658	285,543
	SD	0,486	4,624	19,773	8,965	2,768	80,647	113,477
Ροδιά - μάρτυρας	M.O	30,963	32,483	47,365	45,345	36,758	43,585	82,172
	SD	0,486	10,584	5,627	1,814	2,093	6,485	19,396
Ροδιά+κόπρανα	M.O	19,498	68,860	82,488	69,836	12,700	44,855	21,390
	SD	0,322	5,565	1,589	8,012	5,386	12,013	21,258
Ροδιά+κόπρανα - μάρτυρας	M.O	19,498	58,640	70,800	67,368	57,741	64,104	68,501
	SD	0,322	0,713	3,966	8,926	2,008	6,042	8,343

Πίνακας 8: Οι μέσες τιμές (M.O) μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις (SD) των ποσοτικών αποτελεσμάτων του ρυθμού δυνητικής νιτροποίησης για το αντιβιοτικό TLM.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

### ΠΟΣΟΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

	χρόνος	Κύκλος 1			Κύκλος 2		Κύκλος 3	
		0	15	40	15	40	15	40
Λιβάδι	1	26,167	217,234	71,795	135,494	210,806	147,167	155,843
	2	19,208	211,211	94,847	154,708	213,443	106,893	143,400
	3	20,198	253,587	65,270	143,573	240,092	104,109	145,793
Λιβάδι-μάρτυρας	1	26,167	16,483	40,333	9,079	115,743	10,456	8,678
	2	19,208	25,636	32,359	10,028	114,425	8,293	11,144
	3	20,198	14,106	43,281	11,949	97,561	8,762	6,211
Λιβάδι+ κόπρινα	1	63,624	80,953	80,300	52,807	108,734	77,624	87,916
	2	67,091	75,518	58,166	52,946	109,289	72,879	83,866
	3	58,828	83,612	79,575	52,599	122,475	81,749	92,849
Λιβάδι+ κόπρινα - μάρτυρας	1	63,624	82,929	59,229	18,223	70,495	22,863	26,918
	2	67,091	69,871	53,382	13,361	73,410	17,431	23,605
	3	58,828	87,541	56,233	16,811	85,486	24,959	38,956
Ροδιά	1	13,780	501,107	11,754	116,045	212,481	64,024	129,331
	2	8,107	261,441	24,291	136,270	297,738	71,274	123,403
	3	12,096	413,922	18,815	143,242	223,862	94,172	116,598
Ροδιά - μάρτυρας	1	13,780	5,578	6,128	7,390	75,931	7,176	7,893
	2	8,107	13,015	21,835	3,433	66,550	2,359	7,235
	3	12,096	6,210	20,106	4,698	77,863	0,910	1,124
Ροδιά+κόπρινα	1	38,730	15,284	23,180	6,562	58,549	15,125	6,082
	2	33,755	10,115	18,040	20,344	51,444	34,357	15,796
	3	25,283	17,365	21,979	14,385	65,861	32,274	7,893
Ροδιά+κόπρινα - μάρτυρας	1	38,730	10,723	18,617	3,939	50,754	3,026	1,399
	2	33,755	16,149	17,752	1,799	34,269	3,709	6,119
	3	25,283	6,607	21,835	3,387	62,412	4,143	6,850

Πίνακας 9: Ποσοτικά αποτελέσματα, των τριών επαναλήψεων κάθε μεταχείρισης, της συγκέντρωσης NH<sub>4</sub><sup>+</sup> για το αντιβιοτικό TIA κατά την διάρκεια των τριών πειραματικών κύκλων.

	χρόνος	Κύκλος 1			Κύκλος 2		Κύκλος 3	
		0	15	40	15	40	15	40
Λιβάδι	M.O	21,858	227,344	77,304	144,592	221,447	119,390	148,345
	SD	3,765	22,926	15,539	9,647	16,201	24,096	6,602
Λιβάδι-μάρτυρας	M.O	21,858	18,742	38,658	10,352	109,243	9,170	8,678
	SD	3,765	6,088	5,651	1,462	10,138	1,138	2,466
Λιβάδι+ κόπρινα	M.O	63,181	80,027	72,681	52,784	113,500	77,418	88,210
	SD	4,149	4,126	12,575	0,175	7,778	4,439	4,498
Λιβάδι+ κόπρινα - μάρτυρας	M.O	63,181	80,114	56,281	16,132	76,464	21,751	29,826
	SD	4,149	9,166	2,924	2,501	7,948	3,885	8,078
Ροδιά	M.O	11,328	457,514	18,287	131,852	244,694	76,490	123,110
	SD	2,914	61,649	6,285	14,126	46,289	15,736	6,372
Ροδιά - μάρτυρας	M.O	11,328	8,268	16,023	5,174	73,448	3,482	5,417
	SD	2,914	4,124	8,613	2,021	6,051	3,280	3,733
Ροδιά+κόπρινα	M.O	32,589	14,255	21,067	13,764	58,618	27,252	9,924
	SD	6,798	3,733	2,689	6,912	7,208	10,554	5,166
Ροδιά+κόπρινα - μάρτυρας	M.O	32,589	11,160	19,401	3,042	49,145	3,626	4,789
	SD	6,798	4,786	2,152	1,111	14,140	0,563	2,959

Πίνακας 10: Οι μέσες τιμές (M.O) μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις (SD) των ποσοτικών αποτελεσμάτων των συγκεντρώσεων NH<sub>4</sub><sup>+</sup> για το αντιβιοτικό TIA.

	χρόνος	Κύκλος 1			Κύκλος 2			Κύκλος 3	
		0	15	40	15	40	15	40	
Λιβάδι	1	26,167	158,188	131,438	136,893	301,844	398,264	384,259	
	2	19,208	149,765	146,081	135,504	379,501	317,279	448,422	
	3	20,198	155,600	147,531	175,991	375,129	322,762	296,903	
Λιβάδι-μάρτυρας	1	26,167	16,483	40,333	9,079	115,743	10,456	8,678	
	2	19,208	25,636	32,359	10,028	114,425	8,293	11,144	
	3	20,198	14,106	43,281	11,949	97,561	8,762	6,211	
Λιβάδι+ κόπρανα	1	63,624	97,259	91,851	53,455	116,993	114,613	275,343	
	2	67,091	101,235	76,337	99,660	97,145	111,779	315,818	
	3	58,828	93,235	81,315	78,201	132,191	89,512	368,662	
Λιβάδι+ κόπρανα - μάρτυρας	1	63,624	82,929	59,229	18,223	70,495	22,863	26,918	
	2	67,091	69,871	53,382	13,361	73,410	17,431	23,605	
	3	58,828	87,541	56,233	16,811	85,486	24,959	38,956	
Ροδιά	1	13,780	93,524	23,859	180,101	387,548	301,657	426,386	
	2	8,107	157,510	44,178	204,122	432,866	299,907	417,494	
	3	12,096	189,690	47,636	254,027	612,899	296,207	428,471	
Ροδιά - μάρτυρας	1	13,780	5,578	6,128	7,390	75,931	7,176	7,893	
	2	8,107	13,015	21,835	3,433	66,550	2,359	7,235	
	3	12,096	6,210	20,106	4,698	77,863	0,910	1,124	
Ροδιά+κόπρανα	1	38,730	18,581	17,320	61,161	348,257	38,524	437,777	
	2	33,755	19,587	16,503	67,811	367,640	38,723	494,362	
	3	25,283	17,856	24,045	48,230	339,842	25,391	449,192	
Ροδιά+κόπρανα - μάρτυρας	1	38,730	10,723	18,617	3,939	50,754	3,026	1,399	
	2	33,755	16,149	17,752	1,799	34,269	3,709	6,119	
	3	25,283	6,607	21,835	3,387	62,412	4,143	6,850	

Πίνακας 11: Ποσοτικά αποτελέσματα, των τριών επαναλήψεων κάθε μεταχείρισης, της συγκέντρωσης  $NH_4^+$  για το αντιβιοτικό TLM κατά την διάρκεια των τριών πειραματικών κύκλων

	χρόνος	Κύκλος 1			Κύκλος 2			Κύκλος 3	
		0	15	40	15	40	15	40	
Λιβάδι	M.O	21,858	154,518	141,683	149,462	352,158	346,101	376,528	
	SD	3,765	4,315	8,902	22,985	43,628	45,257	76,055	
Λιβάδι-μάρτυρας	M.O	21,858	18,742	38,658	10,352	109,243	9,170	8,678	
	SD	3,765	6,088	5,651	1,462	10,138	1,138	2,466	
Λιβάδι+ κόπρανα	M.O	63,181	97,243	83,168	77,105	115,443	105,301	319,941	
	SD	4,149	4,000	7,921	23,122	17,575	13,747	46,796	
Λιβάδι+ κόπρανα - μάρτυρας	M.O	63,181	80,114	56,281	16,132	76,464	21,751	29,826	
	SD	4,149	9,166	2,924	2,501	7,948	3,885	8,078	
Ροδιά	M.O	11,328	146,908	38,558	212,750	477,771	299,257	424,117	
	SD	2,914	48,952	12,846	37,711	119,198	2,782	5,829	
Ροδιά - μάρτυρας	M.O	11,328	8,268	16,023	5,174	73,448	3,482	5,417	
	SD	2,914	4,124	8,613	2,021	6,051	3,280	3,733	
Ροδιά+κόπρανα	M.O	32,589	18,675	19,289	59,067	351,913	34,213	460,444	
	SD	6,798	0,869	4,139	9,957	14,255	7,640	29,923	
Ροδιά+κόπρανα - μάρτυρας	M.O	32,589	11,160	19,401	3,042	49,145	3,626	4,789	
	SD	6,798	4,786	2,152	1,111	14,140	0,563	2,959	

Πίνακας 12: Οι μέσες τιμές (M.O) μαζί με τις τυπικές τις τυπικές αποκλίσεις(SD) των ποσοτικών αποτελεσμάτων των συγκεντρώσεων  $NH_4^+$  για το αντιβιοτικό TLM.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

### ΠΟΣΟΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

	χρόνος	Κύκλος 1			Κύκλος 2			Κύκλος 3	
		0	15	40	15	40	15	40	
Λιβάδι	1	1,977	8,150	90,312	109,142	251,452	212,037	276,758	
	2	3,555	9,677	85,842	106,853	195,437	173,074	275,314	
	3	1,138	12,318	86,658	107,145	261,403	134,140	234,212	
Λιβάδι-μάρτυρας	1	1,977	21,522	101,120	81,947	35,407	90,094	121,420	
	2	3,555	22,879	54,567	62,697	22,677	60,674	111,799	
	3	1,138	24,467	51,627	73,632	55,037	66,767	121,145	
Λιβάδι+ κόπρινα	1	0,722	16,810	88,681	117,311	144,087	107,527	180,565	
	2	0,219	14,307	87,899	118,428	240,337	181,261	215,892	
	3	0,424	16,128	86,865	120,489	160,181	109,103	156,129	
Λιβάδι+ κόπρινα - μάρτυρας	1	0,722	20,718	90,633	186,338	240,736	161,567	253,666	
	2	0,219	23,653	85,144	217,020	194,495	131,090	221,409	
	3	0,424	21,741	95,630	158,043	193,259	144,422	218,063	
Ροδιά	1	25,906	25,081	479,425	546,514	598,475	819,006	1148,442	
	2	25,205	18,991	434,727	460,933	369,219	648,115	2774,462	
	3	25,514	28,562	480,745	527,138	597,071	821,684	1077,746	
Ροδιά - μάρτυρας	1	25,906	55,905	81,389	135,892	151,221	168,164	222,190	
	2	25,205	53,495	77,128	135,412	121,374	174,128	177,949	
	3	25,514	55,305	77,343	137,779	151,584	137,546	181,345	
Ροδιά+κόπρινα	1	25,364	73,812	126,996		453,103	315,125	852,743	
	2	25,218	79,563	127,082	480,876	524,579	343,645	1030,919	
	3	12,966	64,970	115,999	525,939	431,586	403,094	956,570	
Ροδιά+κόπρινα - μάρτυρας	1	25,364	81,758	136,639	199,746	238,087	139,237	266,881	
	2	25,218	78,965	131,328	194,019	179,641	145,920	253,929	
	3	12,966	79,375	133,124	219,611	134,286	165,436	291,272	

Πίνακας 13: Ποσοτικά αποτελέσματα, των τριών επαναλήψεων κάθε μεταχείρισης, της συγκέντρωσης NO<sub>3</sub><sup>-</sup> για το αντιβιοτικό TIA κατά την διάρκεια των τριών πειραματικών κύκλων

	χρόνος	Κύκλος 1			Κύκλος 2			Κύκλος 3	
		0	15	40	15	40	15	40	
Λιβάδι	M.O	2,223	10,048	87,604	107,713	236,098	173,084	262,095	
	SD	1,227	2,109	2,380	1,246	35,563	38,948	24,158	
Λιβάδι-μάρτυρας	M.O	2,223	22,956	53,097	72,758	37,707	72,512	118,121	
	SD	1,227	1,474	2,079	9,654	16,303	15,529	5,477	
Λιβάδι+ κόπρινα	M.O	0,455	15,748	87,815	118,742	152,134	108,315	184,196	
	SD	0,253	1,294	0,911	1,612	11,380	1,114	30,046	
Λιβάδι+ κόπρινα - μάρτυρας	M.O	0,455	22,037	90,469	187,134	209,497	145,693	231,046	
	SD	0,253	1,490	5,245	29,496	27,061	15,278	19,661	
Ροδιά	M.O	25,542	24,211	464,966	511,528	597,773	762,935	1113,094	
	SD	0,351	4,844	26,196	44,875	0,993	99,446	49,990	
Ροδιά - μάρτυρας	M.O	25,542	54,902	78,620	136,361	141,393	159,946	193,828	
	SD	0,351	1,255	2,401	1,251	17,338	19,627	24,621	
Ροδιά+κόπρινα	M.O	21,183	72,782	123,359	503,408	469,756	353,955	946,744	
	SD	7,116	7,351	6,374	31,864	48,682	44,882	89,494	
Ροδιά+κόπρινα - μάρτυρας	M.O	21,183	80,033	133,697	204,459	184,005	150,198	270,694	
	SD	7,116	1,508	2,701	13,431	52,038	13,614	18,962	

Πίνακας 14: Οι μέσες τιμές (M.O) μαζί με τις τυπικές τις τυπικές αποκλίσεις(SD) των ποσοτικών αποτελεσμάτων των συγκεντρώσεων NO<sub>3</sub><sup>-</sup> για το αντιβιοτικό TIA.

	χρόνος	Κύκλος 1			Κύκλος 2			Κύκλος 3	
		0	15	40	15	40	15	40	
Λιβάδι	1	1,977	39,679	111,364	120,625	235,234	216,643	604,433	
	2	3,555	38,284	112,198	116,650	241,632	190,171	688,264	
	3	1,138	38,055	108,476	116,939	150,250	283,290	674,826	
Λιβάδι-μάρτυρας	1	1,977	21,522	101,120	81,947	35,407	90,094	121,420	
	2	3,555	22,879	54,567	62,697	22,677	60,674	111,799	
	3	1,138	24,467	51,627	73,632	55,037	66,767	121,145	
Λιβάδι+ κόπρινα	1	0,722	24,315	102,740	119,533	425,614	226,369	711,728	
	2	0,219	24,876	104,507	116,222	344,712	347,037	767,528	
	3	0,424	23,926	99,358	118,657	394,133	272,275	1513,081	
Λιβάδι+ κόπρινα - μάρτυρας	1	0,722	20,718	90,633	186,338	240,736	161,567	253,666	
	2	0,219	23,653	85,144	217,020	194,495	131,090	221,409	
	3	0,424	21,741	95,630	158,043	193,259	144,422	218,063	
Ροδιά	1	25,906	397,679	622,814	936,222	851,258	922,438	1776,102	
	2	25,205	408,959	676,538	975,667	809,698	785,255	1849,277	
	3	25,514	406,945	718,596	919,970	841,968	785,255	1849,277	
Ροδιά - μάρτυρας	1	25,906	55,905	81,389	135,892	151,221	168,164	222,190	
	2	25,205	53,495	77,128	135,412	121,374	174,128	177,949	
	3	25,514	55,305	77,343	137,779	151,584	137,546	181,345	
Ροδιά+κόπρινα	1	25,364	264,638	348,914	975,036	1011,613	1052,919	858,721	
	2	25,218	300,827	357,817	1003,279	1894,149	993,502	921,340	
	3	12,966	275,783	483,316	925,019	1785,100	1191,451	884,675	
Ροδιά+κόπρινα - μάρτυρας	1	25,364	81,758	136,639	199,746	238,087	139,237	266,881	
	2	25,218	78,965	131,328	194,019	179,641	145,920	253,929	
	3	12,966	79,375	133,124	219,611	134,286	165,436	291,272	

Πίνακας 15: Ποσοτικά αποτελέσματα, των τριών επαναλήψεων κάθε μεταχείρισης, της συγκέντρωσης NO<sub>3</sub><sup>-</sup> για το αντιβιοτικό TLM κατά την διάρκεια των τριών πειραματικών κύκλων

	χρόνος	Κύκλος 1			Κύκλος 2			Κύκλος 3	
		0	15	40	15	40	15	40	
Λιβάδι	M.O	2,223	38,673	110,679	118,072	238,433	230,035	655,841	
	SD	1,227	0,879	1,953	2,216	4,524	47,982	45,025	
Λιβάδι-μάρτυρας	M.O	2,223	22,956	53,097	72,758	37,707	72,512	118,121	
	SD	1,227	1,474	2,079	9,654	16,303	15,529	5,477	
Λιβάδι+ κόπρινα	M.O	0,455	24,372	102,202	118,137	388,153	281,894	739,628	
	SD	0,253	0,477	2,616	1,716	40,781	60,906	39,456	
Λιβάδι+ κόπρινα - μάρτυρας	M.O	0,455	22,037	90,469	187,134	209,497	145,693	231,046	
	SD	0,253	1,490	5,245	29,496	27,061	15,278	19,661	
Ροδιά	M.O	25,542	404,528	672,650	943,953	834,308	817,571	1812,689	
	SD	0,351	6,016	48,009	28,642	21,813	93,019	51,742	
Ροδιά - μάρτυρας	M.O	25,542	54,902	78,620	136,361	141,393	159,946	193,828	
	SD	0,351	1,255	2,401	1,251	17,338	19,627	24,621	
Ροδιά+κόπρινα	M.O	21,183	280,416	396,683	967,778	1839,624	1079,291	888,245	
	SD	7,116	18,534	75,159	39,632	77,109	101,575	31,462	
Ροδιά+κόπρινα - μάρτυρας	M.O	21,183	80,033	133,697	204,459	184,005	150,198	270,694	
	SD	7,116	1,508	2,701	13,431	52,038	13,614	18,962	

Πίνακας 16: Οι μέσες τιμές (M.O) μαζί με τις τυπικές τις τυπικές αποκλίσεις(SD) των ποσοτικών αποτελεσμάτων των συγκεντρώσεων NO<sub>3</sub><sup>-</sup> για το αντιβιοτικό TLM.