



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Πτυχιακή Διατριβή

Μελέτη του ρόλου των μικροοργανισμών στο μεταβολισμό και
αποδόμηση του ανθελμινθικού κτηνιατρικού φαρμάκου
albendazole σε εδάφη από
κτηνοτροφικές μονάδες της Λέσβου

Μουτζουρέλλη Χρυσοβαλάντου

ΛΑΡΙΣΑ 2019

Μελέτη του ρόλου των μικροοργανισμών στο
μεταβολισμό και αποδόμηση του
ανθελμινθικού κτηνιατρικού φαρμάκου
albendazole σε εδάφη από
κτηνοτροφικές μονάδες της Λέσβου

Study of the role of microorganisms in
degradation of the veterinary anthelmintic drug,
albendazole in soils from livestock farms from
Lesvos

Υπεύθυνος καθηγητής

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

Τριμελής επιτροπή

- I. Καρπούζας Δημήτριος:Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- II. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
- III. Σμαράγδα Σωτηράκη, Ερευνήτρια Α', ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών

Ευχαριστίες

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα εργασία, που μου έδωσε την δυνατότητα να συμμετάσχω σε μία τέτοια αξιόλογη έρευνα. Η καθοδήγηση, η επίβλεψη και η βοήθειά του σε όλα τα στάδια του πειράματος, από την δειγματοληψία, την οποία και επιμελήθηκε προσωπικώς μέχρι την συγγραφή του κειμένου της πτυχιακής μου διατριβής.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κυρία Σμαράγδα Σωτηράκη, Ερευνήτρια Α στον Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ η οποία, υπό το πρίσμα του κτηνιάτρου, υπέδειξε τις κατάλληλες τοποθεσίες για την δειγματοληψία του πειράματος. Υπήρξε αρωγός στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής, ενώ και η ίδια επιμελήθηκε προσωπικώς την δειγματοληψία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κυρία Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την προθυμία της να προσφέρει οποιαδήποτε καθοδήγηση στην εκπόνηση της παρούσας έρευνας.

Θα ήταν παράλειψη, αν δεν ευχαριστούσα τον Μεταδιδακτορικό ερευνητή Παναγιώτη Καρα για την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια του πειράματος, καθώς και στην συγγραφή του κειμένου της πτυχιακής αυτής διατριβής. Φυσικά, το φιλικό και συνεργατικό κλίμα με όλα τα άτομα του ορόφου ήταν καθοριστικό, γι' αυτό και θα 'θέλα να τα ευχαριστήσω θερμά.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου, για την όλη στήριξη και την ενθάρρυνση, όχι μόνο στην διάρκεια του πειράματος, αλλά και στην πορεία μου ως προπτυχιακή φοιτήτρια.

Πίνακας Περιεχομένων

Υπεύθυνος καθηγητής	4
Τριμελής επιτροπή	4
Ευχαριστίες	5
Κατάλογος εικόνων.....	8
Περίληψη	9
Abstract	10
1.Εισαγωγή	11
1.1Αναγκαιότητα κτηνιατρικών φαρμάκων.....	11
1.2Χρήσεις-Τρόποι Δράσης	11
1.3Κίνδυνοι	12
1.4Τρόποι που εισέρχονται στο περιβάλλον	12
1.5Περιβαλλοντική τύχη κτηνιατρικών φαρμάκων	14
1.5.1. Διεργασίες που ελέγχουν την περιβαλλοντική τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων.....	14
1.5.2Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση	16
1.6Albendazole.....	16
1.6.1 Βιολογική δράση	16
1.6.2 Περιβαλλοντική τύχη	18
1.7Σκοπός του πειράματος	18
2.Υλικά και μέθοδοι.....	20
2.1 Εδάφη	20
Μάρτυρας Ρ	20
ΜάρτυραςΚ	20
Κτηνοτροφική Μονάδα 1	20
Κτηνοτροφική Μονάδα 2	21
Κτηνοτροφική Μονάδα 3	22
Κτηνοτροφική Μονάδα 4	23
Κτηνοτροφική Μονάδα 6	23
Κτηνοτροφική Μονάδα 11	23
Κτηνοτροφική Μονάδα 12	24
2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εδαφών	24
2.2.1 Προσδιορισμός υγρασίας των εδαφών	25

2.2.2 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών.....	26
2.3 Διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια και κτηνιατρικά φάρμακα	26
2.4.Πείραμα αποδόμησης κτηνιατρικών φαρμάκων στα εδάφη	27
2.4.1 Περιγραφή του πειράματος	27
2.4.2 Αποστείρωση εδαφών	29
2.6 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων των κτηνιατρικών φαρμάκων στο έδαφος	30
2.6.1 Εκχύλιση Albendazole και των μεταβολιτών του από το έδαφος.....	30
2.6.2 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	31
2.6.3. Προσδιορισμός πρότυπης καμπύλης.....	31
2.7. Επεξεργασία αποτελεσμάτων και υπολογισμός DT50	32
3.Αποτελέσματα.....	33
3.1 Αποδόμηση και μεταβολισμός του albendazole στο έδαφος-Κινητικές παράμετροι	33
3.2Συσχέτισης μεταξύ φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών και DT50	44
4.Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	49
4.1 Συζήτηση.....	49
4.2 Συμπεράσματα.....	51
5.Βιβλιογραφία	52

Κατάλογος εικόνων

<i>Εικόνα 1: Κύριες οδοί περιβαλλοντικής έκθεσης σε κτηνιατρικά φάρμακα (SilviaDiaz-Cruzetal, 2003).....</i>	<i>133</i>
<i>Εικόνα 2: Χημικός τύπος albendazole</i>	<i>21</i>
<i>Εικόνα 3: Λειμώνας 1Γ.....</i>	<i>2121</i>
<i>Εικόνα 4: Λειμώνας 1Γ.....</i>	<i>22</i>
<i>Εικόνα 5:Περιοχή από την οποία συλλέχθηκε το δείγμα 2B</i>	<i>2222</i>
<i>Εικόνα 6: Λειμώνας 3Α.....</i>	<i>23</i>
<i>Εικόνα 7:3B.....</i>	<i>243</i>
<i>Εικόνα 8 :Σημείο συλλογής δείγματος 11</i>	<i>24</i>
<i>Εικόνα 9: Εφαρμογή του albendazole στο έδαφος και προσαρμογή της υγρασίας των εδαφών στο 40% της υδατοχωρητικότητας</i>	
	<i>288</i>
<i>Εικόνα10: Εφαρμογή κτηνιατρικών φαρμάκων και μεταφορά τους σε πλαστικά σακουλάκια.....</i>	<i>299</i>
<i>Εικόνα 11: Ξηραντήρες που χρησιμοποιήθηκαν για αποστείρωση με χλωροφόρμιο</i>	<i>30</i>

Περίληψη

Τα κτηνιατρικά φάρμακα μεταβολίζονται ελάχιστα εντός των ζώων και συνήθως απεκκρίνονται αυτούσια ή με την μορφή μεταβολικών προϊόντων τους, συνήθως επίσης δραστικών, στα ούρα και στα κόπρανα τα οποία είτε απευθείας είτε με την μορφή κοπριάς καταλήγουν στο έδαφος όπου και μπορούν να δημιουργήσουν περιβαλλοντικά προβλήματα. Η τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων στο έδαφος ελέγχεται από βιοτικές και αβιοτικές διεργασίες χωρίς όμως σήμερα να είναι γνωστές λεπτομέρειες για την επιμέρους συνεισφορά αυτών στην αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων. Ειδικότερα ελάχιστα είναι γνωστά για τον ρόλο των μικροοργανισμών στην μικροβιακή αποδόμηση του ανθελμινθικού albendazole στο έδαφος. Η παρούσα εργασία μελέτησε τις παρακάτω δύο υποθέσεις (α) οι μικροοργανισμοί του εδάφους παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του albendazole στο έδαφος και (β) ότι η συστηματική έκθεση εδαφών από κτηνοτροφικές μονάδες στο albendazole (μέσω των περιττωμάτων των ζώων) οδηγεί σε επιλογή μικροοργανισμών που αποδομούν το συγκεκριμένο φάρμακο οδηγώντας σε επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση του. Για την διερεύνηση των παραπάνω υποθέσεων συλλέχθηκαν εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες (εντός και από παρακείμενους λειμώνες) που χρησιμοποιούσαν albendazole καθώς και από δύο περιοχές χωρίς κτηνοτροφική δραστηριότητα ως μάρτυρες μη έκθεσης σε albendazole. Για την διερεύνηση της πρώτης υπόθεσης μελετήθηκε η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του albendazole σε αποστειρωμένα ή μη αποστειρωμένα δείγματα εδαφών. Γενικότερα παρατηρήθηκε ταχεία αποδόμηση του albendazole στα περισσότερα εδάφη. Ειδικότερα στα μη αποστειρωμένα δείγματα οι τιμές DT_{50} κυμάνθηκαν μεταξύ 0,1-4,2 ημερών. Η αποστείρωση των εδαφών οδήγησε σε μερική επιβράδυνση της αποδόμησης του albendazole στα περισσότερα εδάφη με τιμές $DT_{50} = 0,22-6,9$ ημέρες καταδεικνύοντας τον ρόλο βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών στην αποδόμηση του albendazole στο έδαφος. Σε όλα τα εδάφη, ανεξάρτητα αποστείρωσης ή όχι, το albendazole οξειδώνεται προς albendazole sulfoxide και albendazole sulfone τα οποία εμφανίζουν επίσης ανθελμινθική δράση. Όταν εκτιμήθηκε η υπολειμματικότητα των ολικών δραστικών υπολειμμάτων του albendazole (sum albendazole + sulfoxide + sulfone) παρατηρήθηκε και πάλι επιβράδυνση της αποδόμησης στα αποστειρωμένα εδάφη όπου καταγράφηκαν $DT_{90} > 365$ ημέρες στην πλειοψηφία των εδαφών. Σύγκριση της υπολειμματικότητας του albendazole και των μεταβολικών του προϊόντων μεταξύ των εδαφών με υποτιθέμενη έκθεση στο albendazole (εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες και αντίστοιχους βοσκοτόπους) σε σχέση με τα εδάφη μάρτυρες δεν καταδεικνύουν την εμφάνιση επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης για το albendazole. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην μελέτη της αποδόμησης του albendazole σε εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες όπου δεν χρησιμοποιείται το albendazole ώστε να έχουμε πλήρη εικόνα για την επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση ή όχι του συγκεκριμένου κτηνιατρικού φαρμάκου.

Abstract

Veterinary medicinal drugs are poorly metabolised within the animals and are usually excreted as the same substance or as metabolic products, usually also active. These products end up in the soil, through urine, faeces, or manure, where they can cause environmental problems. The fate of veterinary drugs on the soil is controlled by biotic and abiotic processes, but no details of their contribution to their degradation are known today. In particular, little is known about the role of microorganisms in the microbial degradation of anthelmintic albendazole in the soil. This study looked at the following two issues: (a) Soil microorganisms play an important role in the degradation of albendazole in the soil and (b) long term soil exposure to albendazole through animal excreta leads to selection of microorganisms degrades this drug leading to its enhanced biodegradation. To investigate the above cases, soil from livestock farms (within and around grasslands) that used albendazole and two non-albendazole control fields without history of presence of albendazole were collected. To investigate the first hypothesis, degradation and metabolism of albendazole was studied in samples in presence and absence of microorganisms. In general, rapid degradation of albendazole was observed in most soils. Especially in non-sterile soil samples, the DT_{50} values ranged between 0.1-4.2 days. Soil fumigation with chloroform led to a partial slowing of the degradation of albendazole in most soils with DT_{50} values = 0.22-6.9 days, indicating the role of biotic and abiotic processes in the degradation of albendazole in the soil. In all soils, whether sterilized or not, albendazole is oxidized to albendazole sulfoxide and albendazole sulfone which also exhibit anthelmintic activity. The determination of the persistence of the total residues of albendazole (sum albendazole + sulfoxide + sulfone) in sterile soils, showed once again decreased degradation, where the DT_{90} was higher than 365 days in the majority of soils. The comparison of the persistence between soils with and without long term presence of does not indicate the occurrence of enhanced biodegradation for albendazole. Further studies will focus on the study of degradation of albendazole in soils from livestock farms where albendazole is not used to provide a full picture of the enhanced biodegradation of the veterinary medicinal product concerned or not.

1.Εισαγωγή

1.1Αναγκαιότητα κτηνιατρικών φαρμάκων

Η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων στη ζωική παραγωγή είναι εκτεταμένη, και αποσκοπεί στη βελτίωση της παραγωγής τόσο ποιοτικά, στοχεύοντας στη μείωση απωλειών της και μετάδοσης ασθενειών μέσω της τροφικής αλυσίδας, όσο και ποσοτικά, καλύπτοντας έτσι τις τεράστιες ανάγκες τροφής του συνεχώς αυξανόμενου πληθυσμού του πλανήτη (Cooper et al., 2007, Deanet.al ,2010).

1.2Χρήσεις-Τρόποι Δράσης

Γενικότερα, τα κτηνιατρικά φάρμακα προσφέρουν πολλά οφέλη στις κτηνοτροφικές μονάδες, τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις βασικούς τομείς: κοινωνικό, οικονομικό και περιβαλλοντικό (Cooper et al 2007). Η αποφυγή σοβαρών λοιμώξεων, τόσο για τον άνθρωπο όσο και στη ζωική παραγωγή, είναι βασικό πλεονέκτημα των κτηνιατρικών φαρμάκων. Η αξία τους, δε αυξάνεται, αν συνυπολογιστεί ότι το θερμό κλίμα και οι εκάστοτε συνθήκες (για παράδειγμα ελώδη περιβάλλοντα, με αυξημένη παρουσία κουνουπιών) εντείνουν την προσβολή των κτηνοτροφικών ζώων από λοιμώξεις (Cooper et al., 2007). Η αναγκαιότητά τους, μάλιστα, έχει επισημανθεί και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Cooper et al 2007). Πέρα από την ζωική παραγωγή, η αντιμετώπιση πολλών παθογόνων που προσβάλλουν τα ζώα, προστατεύει άμεσα και τους ανθρώπους, δεδομένου ότι τα ζώα μπορεί να μεσολαβούν ως ξενιστές για την μετάδοση ασθενειών, όπως για παράδειγμα το τρυπανόσωμα (Cooper et al 2007)

Κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή, την απώθηση ή τη μείωση κάθε παρασίτου που προσβάλει τα ζώα καλείται κτηνιατρικό φάρμακο. Η κτηνοτροφία μπορεί να πληγεί από πλήθος προσβολών όπως παράσιτα, έντομα και μικροοργανισμούς. Γενικά τα κτηνιατρικά φάρμακα μπορούν να διαχωριστούν βάσει του σκοπού χορήγησής τους σε θεραπευτικά, (όταν η προσβολή από τον μικροοργανισμό έχει εκδηλωθεί), μετα-θεραπευτικά (προς αντιμετώπισης της προσβολής πριν γίνουν κλινικά αισθητά τα συμπτώματα στα ζώα, προφυλακτικά χορήγηση σε περιόδους έξαρσης) ή υποθεραπευτικά (με στόχο όχι την επιβίωση, αλλά την αύξηση της παραγωγής)(Aarestrupetal.,2005).Έτσι, η χορήγηση

τους γίνεται ουσιαστικά, σε διευρυμένα πλαίσια, εκτός της άμεσης θεραπείας, γεγονός που εξηγεί την συσσώρευσή τους στο περιβάλλον.

1.3Κίνδυνοι

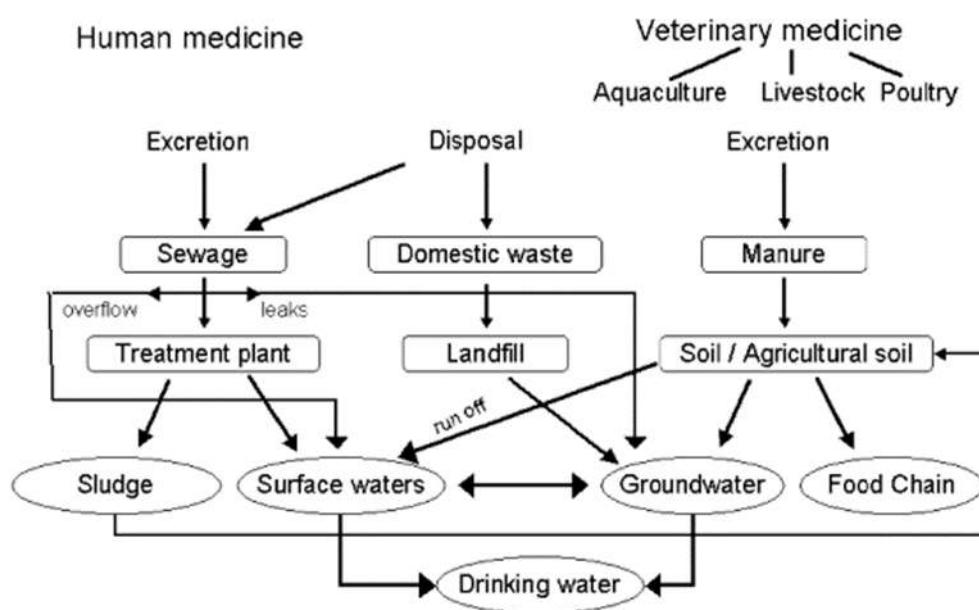
Τα τελευταία χρόνια η υπέρμετρη χορήγηση κτηνιατρικών φαρμάκων, αποτελεί αντικείμενο προβληματισμού, (Martínez-Carballoetal 2007, Kim,etal 2011, Jiet 2012). Υπερεκτιμώντας τα προαναφερθέντα οφέλη των κτηνιατρικών φαρμάκων, γίνεται λόγος για κατάχρηση και όχι απλά χρήση. Μάλιστα, αν και παρατηρείται ένδεια ως προς τα δεδομένα χρήσης των κτηνιατρικών φαρμάκων, η FEDESA (European Federation of Animal Health) υπολογίζει κατά προσέγγιση ότι το έτος 1999 χορηγήθηκαν 4.700 τόνοι κτηνιατρικών φαρμάκων (Martínez-Carballoetal 2007). Η υπερβολή στη χρήση τους ελλοχεύει κινδύνους, εκ των οποίων οι σημαντικότεροι είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών και κατ' επέκταση η αυξανόμενη δόση λόγω της μειωμένης αποτελεσματικότητάς τους(Aarestrup et al., 2005)

Οι προβληματισμοί αυτοί, βασίζονται σε δύο βασικούς άξονες, την περιβαλλοντική τύχη του φαρμάκων (μέσω ποιων οδών μπορούν από τα ζώα να καταλήξουν στο έδαφος ή τον υδροφόρο ορίζοντα) αλλά και τις πιθανές επιδράσεις τους σε άλλους οργανισμούς μη-στόχους(Kolodziejska, M. et al 2010).Η παρουσία των κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον απειλεί με άμεσες και έμμεσες επιπτώσεις οργανισμούς μη στόχους και είναι πιθανό να οδηγήσει σε μεταφορά υπολειμμάτων των κτηνιατρικών φαρμάκων στην τροφική αλυσίδα, αντίστοιχα. Ο προβληματισμός περί περιβαλλοντικής τύχης τους εντείνεται αν ληφθεί υπόψιν το γεγονός ότι μεγάλος αριθμός μεταβολικών προϊόντων των κτηνιατρικών φαρμάκων έχουν, αν όχι ισάξια, αξιοσημείωτη δραστηριότητα (Calamari, etal2003) ή ότι πολλοί μεταβολίτες επανέρχονται στην αρχική δραστηκή τους μορφή (Wohde et al, 2016)

1.4Τρόποι που εισέρχονται στο περιβάλλον

Οι ανησυχίες για τους περιβαλλοντικούς κινδύνους που ελλοχεύει η εκτεταμένη χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι έντονες, καθώς παρόλο που χρησιμοποιούνται εδώ και χρόνια, δεν υπάρχει ανεπτυγμένο σύστημα ελέγχου της περιβαλλοντικής τους τύχης σε εθνικό ή διεθνές επίπεδο (Horvat, et al., 2012). Όσο

πιο συχνή η χορήγηση ενός συγκεκριμένου φαρμάκου, τόσο πιο επιτακτική η ανάγκη για την μελέτη της περιβαλλοντικής του τύχης μετά την απέκκριση του από τα ζώα (Peng et al 2012). Αναμφισβήτητα, κύρια πηγή των κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον είναι η κτηνοτροφία, κυρίως μέσω των χρήσης των κοπράνων τους ως λίπασμα για την βελτίωση της θρεπτικής κατάστασης των εδαφών (Bottoni, et al 2010, Kim, et al 2011, Howard, et al 2011, García-galán, et al 2010, Λίτσικας 2013), χωρίς ωστόσο η είσοδος τους στο περιβάλλον από υδατοκαλλιέργειες ή από απόρριψη μη χρησιμοποιούμενων φαρμάκων να θεωρούνται ήσσονος σημασίας (Boxall et al, 2002). Πολλά κτηνιατρικά φάρμακα έχουν εντοπιστεί στα κόπρανα των υπό θεραπεία ζώων σε ποσοστό έως και 90% της ποσότητας που χορηγήθηκε στο ζώο από το στόμα, σε διάστημα τεσσάρων ημερών (Kreuzig et al 2007). Εξίσου σοβαρό ζήτημα αποτελεί και η ρύπανση των υπόγειων υδάτων. Τα κτηνιατρικά φάρμακα εισέρχονται στα επιφανειακά ή και στα υπόγεια νερά είτε άμεσα όπως στην περίπτωση της εφαρμογής θεραπευτικής αγωγής σε ιχθυοκαλλιέργειες, είτε έμμεσα μέσω έκπλυσης ή επιφανειακής απορροής από τα εδάφη που έχουν δεχθεί εφαρμογή κοπριάς επιβαρυνμένης με κτηνιατρικά φάρμακα (Λίτσικας 2013).



Εικόνα 1: Κύριες οδοί περιβαλλοντικής έκθεσης σε κτηνιατρικά φάρμακα (Diaz-Cruz et al, 2003)

1.5 Περιβαλλοντική τύχη κτηνιατρικών φαρμάκων

1.5.1. Διεργασίες που ελέγχουν την περιβαλλοντική τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων

Η περιβαλλοντική τύχη ενός κτηνιατρικού φαρμάκου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα τον μεταβολισμό που έχει υποστεί κατά τη διάρκεια παραμονής του στο σώμα του ζώου (Halling-Sorensenetal 1997). Επίσης, στην περίπτωση των οργανικών λιπασμάτων (κοπριών) ως τρόπος ελευθέρωσης των κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον, η πιθανή μετατροπή τους εξαρτάται από την θερμοκρασία στην οποία αποθηκεύτηκε ο κοπροσωρός, το ξηρό βάρος τους, την τροφή των ζώων απ' όπου προήλθαν ή και την διαθεσιμότητα δεκτών ηλεκτρονίων. (Wohde Manuel etal,2016). Τα δεδομένα περιπλέκονται ακόμα περισσότερο εάν ληφθούν υπόψη περαιτέρω διεργασίες που εμπλέκονται στην περιβαλλοντική τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων όπως η προσρόφιση των κτηνιατρικών φαρμάκων στην οργανική ουσία (Wohde M. etal 2016) και η έκπλυση τους στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα. Η συμμετοχή αυτών των διεργασιών στην περιβαλλοντική τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων ποικίλει ανάλογα με τη σύσταση του εδάφους και την περιεκτικότητά τους σε οργανικό άνθρακα (Ter Laak et al 2006a, Ter Laak et al 2006b). Ενδέχεται επίσης το φάρμακο να μεταβολιστεί υπό αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες, με ταχύτερες τις πρώτες. Ο μεταβολισμός αυτός ευνοείται από τις υψηλές θερμοκρασίες ενώ γενικά επηρεάζεται από τη σύσταση του εδάφους, το pH και την αφθονία των μικροοργανισμών (Wohde Manuel etal ,2016).

Μια χημική ουσία στο έδαφος μπορεί να μεταβολιστεί με τρεις τρόπους, φωτοχημικά, χημικά ή μικροβιακά (Hamakeretal 1975). Η πρώτη περίπτωση περιγράφει την φωτοαποδόμηση (συνήθως οξειδωση ή υδρόλυση εξ' ου και ο χαρακτηρισμός ως αντίδρασης «ψεύδο-πρώτης» τάξης) με απορρόφηση υπεριώδους φωτός. Συνήθως ο όρος αναφέρεται στη συνδυασμένη δράση του ηλιακού φωτός και του αέρα. Τα αποσυντιθέμενα μόρια παράγουν υψηλής ενέργειας ασταθή θραύσματα, τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια γύρω τους (Burrows et. al 2002). Οι ακριβείς διεργασίες δεν είναι απόλυτα κατανοητές, καθώς επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως την ετερογένεια στη σύσταση του εδάφους και την εισχώρηση της ακτινοβολίας στο έδαφος (Katagi 2004).

Η δεύτερη περίπτωση, αναφέρεται στην αποδόμηση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου με καθαρά χημικές αντιδράσεις και χωρίς τη συμβολή των

μικροοργανισμών. Οι σπουδαιότερες αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στη χημική αποδόμηση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου είναι η οξειδωση, η αναγωγή, και η υδρόλυση (Κυδωνάκης 2010). Το αποτέλεσμα αυτής εξαρτάται από την σύσταση του εδάφους, την παρουσία ιόντων και νερού (Crosby. 1970)

Τέλος, η μικροβιακή αποδόμηση αναφέρεται στο μεταβολισμό μιας ουσίας από τους μικροοργανισμούς, με τελικό προϊόν μια ουσία πλήρως ή μερικώς μεταβολισμένη, με χαμηλότερη τοξικότητα απ' ό,τι η αρχική. Υψηλότερη μικροβιακή δραστηριότητα παρατηρείται στα ανώτερα στρώματα του εδάφους, λόγω αφθονίας θρεπτικών και οξυγόνου. Επίσης, έχει παρατηρηθεί προσαρμογή των μικροοργανισμών με την έκθεσή τους στην εκάστοτε ξеноβιοτική ουσία, με την παραγωγή των ανάλογων ενζύμων για την αποικοδόμησή της. Το παραπάνω εξασφαλίζει τόσο την ακεραιότητα της βιόσφαιρας, όσο και την παραγωγή απαραίτητων για τους μικροοργανισμούς θρεπτικών και ενέργειας (Audus, 1960). Βασική ιδέα είναι η αποικοδόμηση των ουσιών με αντάλλαγμα την παροχή σακχάρων και αζώτου στους μικροοργανισμούς (Burns and Edwards, 1980). Τέτοιες διεργασίες λαμβάνουν χώρα είτε παρουσία είτε απουσία οξυγόνου, με την πρώτη περίπτωση να υπερέχει ως προς την ταχύτητα (Wohde M. et al, 2016).

Σημαντική είναι η παρουσία των μικροοργανισμών στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους, όπου είναι συνήθως εμπλουτισμένα με οξυγόνο. Έτσι, η αποδόμηση των ουσιών γίνεται μέσω του αερόβιου μεταβολισμού τους με τελικό προϊόν της διάσπασης τους σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Αντίστοιχα, από τη διάσπαση μιας τοξικής ουσίας από τους μικροοργανισμούς υπό αναερόβιες συνθήκες, μπορεί να προκύψει τελικά μεθάνιο ή διοξείδιο του θείου (Eduardo Díaz et al 2008). Ωστόσο, γίνεται λόγος και για αποδόμηση ουσιών με τη δράση των μυκήτων, με το μέγιστο αποτέλεσμα να εξαρτάται από την διαθεσιμότητα σιδήρου, αζώτου, φωσφόρου και άλλων ανόργανων (Toretal. 2000). Στις μικροβιακές αυτές διεργασίες, καθοριστικός είναι ο ρόλος της βιοδιαθεσιμότητας του κτηνιατρικού φαρμάκου, δηλαδή της ποσότητας της ουσίας στην οποία έχουν πρόσβαση οι μικροοργανισμοί και βρίσκεται σε διαλυτή μορφή (ParalesR, et al. 2008).

Γενικά, κάθε χημική ουσία ή υλικό υπόκειται σε μικροβιακή αποδόμηση, ωστόσο, οι ρυθμοί με τους οποίους γίνεται καθορίζουν και αν θα γίνει αντιληπτό το φαινόμενο ή όχι (Sims, G.K. 1991). Η πλήρης κατανόηση της μικροβιακής αποδόμησης, αποτελεί πρόκληση, δεδομένου ότι εξαρτάται από πολλούς παράγοντες

οι οποίοι με τη σειρά τους παρουσιάζουν διακυμάνσεις. Ενδεικτικά, όπου υπάρχει βέλτιστη συγκέντρωση C/N/P σε συγκεκριμένη αναλογία έχουμε και καλύτερο μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Παρόμοια, και σε συγκεκριμένο εύρος pH οι μικροοργανισμοί έχουν καλύτερη απόδοση (Cabridenc, 1985).

1.5.2 Επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση

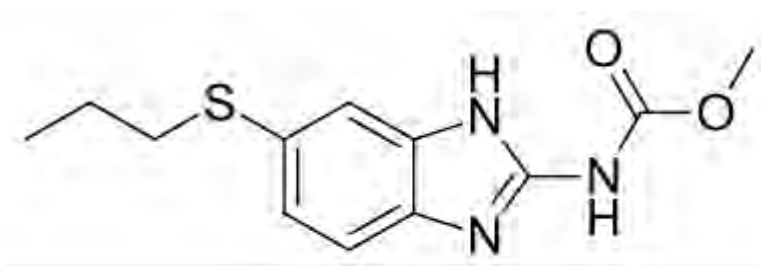
Η επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση χαρακτηρίζεται συνήθως το φαινόμενο που συνδέεται με μια σημαντική αύξηση του ποσοστού της αποδόμησης μιας ουσίας στο έδαφος μετά από προηγούμενη εφαρμογή της ίδιας στον ίδιο αγρό επί σειρά ετών (Arbeli et al 2007). Το φαινόμενο αρχικά μελετήθηκε και επιβεβαιώθηκε η σημαντικότητα του για πλήθος γεωργικών φαρμάκων, (Karpouzas and Singh 2006, Arbeli et al 2007) και πιο πρόσφατα επιβεβαιώθηκε και για τα κτηνιατρικά φάρμακα όπως αντιβιοτικά της ομάδας των σουλφοναμιδίων (Topp et al 2013). Το συγκεκριμένο φαινόμενο παρατηρήθηκε σε αγρούς που δέχονταν συστηματική έκθεση με κτηνιατρικά αντιβιοτικά για διάστημα 10 ετών και οφείλεται στην επιλογή στην ανάπτυξη στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά ως πηγή ενέργειας για την αύξηση και ανάπτυξη τους (Topp et al, 2013). Πέραν των κτηνιατρικών αντιβιοτικών για τα οποία μόλις τώρα αρχίζουμε να κατανοούμε τον ρόλο των μικροοργανισμών στην αποδόμηση τους στο περιβάλλον και ειδικότερα στα γεωργικά εδάφη, ελάχιστα είναι γνωστά για άλλες ομάδες κτηνιατρικών φαρμάκων όπως είναι τα ανθελμινθικά.

1.6 Albendazole

1.6.1 Βιολογική δράση

Το albendazole (Εικόνα 2) υπάγεται στην κατηγορία των ανθελμινθικών κτηνιατρικών φαρμάκων και χημικά ανήκει στην ομάδα των βενζιμιδαζολίων. Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των νηματωδών σκωλήκων που προσβάλλουν τον γαστρεντερικό σωλήνα και το αναπνευστικό σύστημα παραγωγικών ζώων. Θεωρείται επίσης αποτελεσματικό κατά υποβιοτικών-ισοτρόπων προνυμφών των νηματωδών που είναι εγκλωβισμένα στον εντερικό βλεννογόνο. (Pavlovic et al.,

2018). Η μορφή του είναι στερεή και κρυσταλλική, ενώ πρακτικά είναι αδιάλυτο στο νερό (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/albendazole#section=Drug-Classes>). Προς κτηνιατρική χρήση, χορηγείται κυρίως σε βοοειδή και αιγοπρόβατα, αλλά έχει βρει κάποια χρήση και σε γάτες και σκύλους καθώς και σε πτηνά για παρασιτικά μαστίγια και ταινίες. Χρησιμοποιείται επίσης εκτός σήμανσης, για τη θεραπεία ενδοπαρασίτων σε αιγοπρόβατα και χοίρους. Επίσης, έχει βρει χρήση και σε υδατοκαλλιέργειες ψαριών. Χορηγείται από το στόμα είτε μέσω χαπιού, είτε σε υγρή μορφή. Η επιτυχία του ως κτηνιατρικό φάρμακο συνίσταται τόσο ως προς την μικρή αλλά αποτελεσματική του δόση, όσο και στο ευρύ φάσμα νηματωδών που καταπολεμά (Gyuriketal, 1981).



Εικόνα 2. Ο χημικός τύπος του albendazole

Το albendazole εμποδίζει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων της τουμπουλίνης. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε μειωμένη πρόσληψη της γλυκόζης από τις προνύμφες και από τα ενήλικα παράσιτα και εξαντλεί τα αποθέματα γλυκογόνου τους. Λόγω της μειωμένης παραγωγής ενέργειας, το παράσιτο εν τέλει ακινητοποιείται και πεθαίνει (Pavlovic et al., 2018). Προκαλεί αλλοιώσεις των εντερικών κυττάρων του σκώληκα μέσω σύνδεσης του στην β - τουμπουλίνη, αναστέλλοντας έτσι τον πολυμερισμό ή τη συναρμολόγηση της στους μικροσωληνίσκους. Να σημειωθεί, ότι η ικανότητα δέσμευσής του στην β - τουμπουλίνη των παρασίτων είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με των θηλαστικών, εξού και η περιορισμένη τοξικότητά του στα ζώα. Επιπλέον, η δράση του παρεμποδίζει την δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου, γεγονός που αποτρέπει και την εκκόλαψη των αυγών των παρασίτων. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του, έχουν αναφερθεί διαταραχές στις μεταβολικές οδούς των νηματωδών, αναστέλλοντας τα μεταβολικά ένζυμα όπως η μηλεϊνική αφυδρογονάση και η φουμαρική ρεδοουκτάση, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η μεταβολική οδός του κύκλου του Krebs, έχοντας άμεσες συνέπειες στην παραγωγή ATP, απαραίτητο για την βιωσιμότητά του.

Ανακαλύφθηκε το 1975 από τους Robert J. Gyurik και Vassilios J. Theodorides και ανατέθηκε στη SmithKline Corporation. Καταχωρήθηκε για ανθρώπινη χρήση το 1982.

1.6.2 Περιβαλλοντική τύχη

Το albendazole μεταβολίζεται σε albendazole sulfoxide και albendazole sulfone, όπου το πρώτο, εμφανίζει επίσης αντιπαρασιτικές ιδιότητες, καθώς χορηγείται ως ανθελμινθικό με την ονομασία Ricobendazole. Η απορρόφηση του albendazole από τον γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων είναι χαμηλή, πράγμα που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συστηματικής διαθεσιμότητας και αποτελεσματικότητας μετά την από του στόματος χορήγηση. Αν και διατίθεται και σε ενέσιμη μορφή, στην Ελλάδα χορηγείται κυρίως από στόματος (Gurram et al 2009). Υπολείμματα του albendazole αλλά και των παραγόμενων μεταβολιτών του έχουν εντοπιστεί σε υπόγεια και επιφανειακά ύδατα σε κοπροσωρούς και σε λύματα (Van De Steen et al. 2010). Η προσρόφηση του albendazole στο έδαφος εξαρτάται από την περιεκτικότητά των εδαφών σε οργανική ουσία, το pH και τα ιχνοστοιχεία στο έδαφος (χαλκός, ψευδάργυρος, σίδηρος). Έχει παρατηρηθεί ότι το albendazole εμφανίζει ισχυρή προσρόφηση στο έδαφος, η οποία μπορεί να μειωθεί σε αυξημένες τιμές pH (Pavlovic et al 2018). Συγκριτικά με τις υπόλοιπες βενδιμιδαζόλες ως υδρόφοβο μόριο, έχει από τις μεγαλύτερες τιμές προσρόφησης, επιβεβαιώνοντας τη θετική συσχέτιση προσρόφησης μιας ουσίας και υδροφοβικότητας (Kim et al 2010). Σε προηγούμενα πειράματα έχουν αναφερθεί χρόνοι ημιζωής albendazole μικρότεροι από 6,5 ημέρες (Min & Hu, 2013). Επίσης, έχει αναφερθεί η φωτοχημική του διάσπαση, με την μητρική ένωση να είναι πιο ευαίσθητη στην UV-V ακτινοβολία, ενώ τα albendazole sulfoxide και sulfone στην UV-A (Ljubas et al 2018).

1.7 Σκοπός του πειράματος

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η αποδόμηση του κτηνιατρικού φαρμάκου Albendazole σε εδάφη που συλλέχθηκαν από κτηνοτροφικές μονάδες και αντίστοιχους λειμώνες όπου εκτρέφονται τα αιγοπρόβατα. Η πρώτη υπόθεση που μελετήσαμε ήταν ότι οι μικροοργανισμοί του εδάφους παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του albendazole. Η δεύτερη υπόθεση που μελετήσαμε ήταν ότι εδάφη

που υποθετικά εκτίθενται συστηματικά στο albendazole (εδάφη εντός της κτηνοτροφικής μονάδας καθώς και εδάφη από βοσκοτόπους-λειμώνες που καταλήγουν τα περιττώματα των ζώων που δέχονται εφαρμογές του albendazole) αναμένεται να εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα αποδόμησης του albendazole από την μικροβιακή κοινότητα.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Εδάφη

Η επιλογή της περιοχής και των κτηνοτροφικών μονάδων, έγινε έχοντας υπόψη την έντονη κτηνοτροφική δραστηριότητα στο βόρειο Αιγαίο, άρα και την εκτεταμένη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων. Δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν από κτηνοτροφικές μονάδες από τη Λέσβο, δεδομένου του ιστορικού χρήσης των φαρμάκων που χορηγούνταν στα ζώα (συμπεριλαμβανομένου και του Albendazole).

Τα όργανα της δειγματοληψίας καθαρίζονταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης (70%), μεταξύ συλλογής των διαφόρων εδαφών ώστε να αποφευχθεί επιμόλυνση μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων που συλλέχθηκαν. Δείγματα εδάφους ελήφθησαν από 9 κτηνοτροφικές μονάδες, κυρίως στο βόρειο τμήμα του νησιού. Προέρχονται κυρίως από το ανώτερο τμήμα του εδάφους, σε βάθος μέχρι 20 cm (topsoil). Οι μονάδες αποτελούνταν κυρίως από αιγοπρόβατα, τα οποία μεταχειρίζονταν με Albendazole (χορήγηση με την μορφή χαπιού)ετήσια, όχι απαραίτητα σαν θεραπεία αλλά περιοδικά, όταν οι αντίστοιχες ασθένειες βρίσκονταν σε έξαρση (συνήθως συγκεκριμένες περιόδους). Από κάθε κτηνοτροφική μονάδα συλλέχθηκαν δείγματα από διαφορετικά σημεία που ονομάστηκαν Α, Β και Γ. Δείγματα εδάφους συλλέχθηκαν και από σημεία όπου αναμένεται περιορισμένη έκθεση στο albendazole, δηλαδή περιοχές μακριά από κτηνοτροφικές μονάδες και οι οποίες δεν είχαν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία τουλάχιστον έτη ως βοσκότοποι. και χαρακτηρίστηκαν ως εδάφη MARTYRES. Αναλυτικά τα εδάφη που συλλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν τα παρακάτω:

Μάρτυρας P: Συλλέχθηκε από κήπο εντός του χωριού Παλαιοχώρι

Μάρτυρας K: Συλλέχθηκε από τον κήπο Ξενοδοχείου στην περιοχή Καλλονής

Κτηνοτροφική Μονάδα 1

- **Δείγμα 1B:** Συλλέχθηκε από περιφραγμένο λειμώνα-βοσκοτόπι της της κτηνοτροφικής μονάδας 1. Το σημείο αυτό επιλέχθηκε στοχευμένα ως έδαφος που δέχεται οργανική λίπανση κατά την βοσκή των ζώων, στα οποία και χορηγείται Albendazole.
- **Δείγμα 1Γ:** Συλλέχθηκε από τον περιφραγμένο λειμώνα της κτηνοτροφικής μονάδας όπου βόσκουν και αφοδεύουν τα ζώα της μονάδας



Εικόνα 3: Λειμώνας 1Γ



Εικόνα 4: Λειμώνας 1Γ

Κτηνοτροφική Μονάδα 2

- **Δείγμα 2A:** Συλλέχθηκε από τον περιφραγμένο λειμώνα της μονάδας
- **Δείγμα 2B:** Συλλέχθηκε από σημείο εντός της κτηνοτροφικής μονάδας



Εικόνα 5: Περιοχή από την οποία συλλέχθηκε το δείγμα 2B

Κτηνοτροφική Μονάδα 3

- **Δείγμα 3A:** Συλλέχθηκε από σημείο παραπλεύρως της στάνης και εντός την κτηνοτροφικής μονάδας 3
- **Δείγμα 3B:** Συλλέχθηκε από σημείο εκτός της στάνης και εντός του χώρου που χρησιμοποιείται για την βόσκηση των ζώων



Εικόνα 6: Σημείο συλλογής δείγματος 3A



Εικόνα 7: Σημείο συλλογής δείγματος 3B

Κτηνοτροφική Μονάδα 4

- **Δείγμα 4A:** Συλλέχθηκε από σημείο εντός περιφραγμένου βοσκοτόπου - λειμώνα της κτηνοτροφικής μονάδας
- **Δείγμα 4B:** Συλλέχθηκε από σημείο ακριβώς έξω από την στάνη

Κτηνοτροφική Μονάδα 6

- **Δείγμα 6A:** Συλλέχθηκε από σημείο ακριβώς έξω από την στάνη
- **Δείγμα 6B:** Συλλέχθηκε από σημείο εντός περιφραγμένου βοσκοτόπου - λειμώνα της κτηνοτροφικής μονάδας

Κτηνοτροφική Μονάδα 11

- **Δείγμα 11:** Συλλέχθηκε ένα μόνο δείγμα από σημείο εκτός της στάνης και από περιφραγμένο βοσκότοπο - λειμώνα της μονάδας (composite)



Εικόνα 8: Σημείο συλλογής δείγματος 11

Κτηνοτροφική Μονάδα 12

- **Δείγμα 12:** Συλλέχθηκε ένα μόνο δείγμα από σημείο εκτός της στάνης και από περιφραγμένο βοσκότοπο - λειμώνα της μονάδας (composite)

Συνολικά τα εδάφη που συλλέχθηκαν μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες με βάση την θεωρητικά συστηματική έκθεση τους στο albendazole

- Εδάφη 1B, 2B, 3A, 4B, 6A, 11 και 12 με συστηματική έκθεση σε περιττώματα ζώων και άρα και στο albendazole

- Εδάφη 1Γ, 2Α, 3B, 4Α, 6B που συλλέχθηκαν από περιφραγμένους βοσκοτόπους-λειμώνες των μονάδων και αναμένεται να έχουν λιγότερο συστηματική έκθεση σε περιττώματα ζώων και άρα και στο albendazole

- Εδάφη Μάρτυρες P και K που συλλέχθηκαν από χώρους χωρίς κτηνοτροφικής δραστηριότητα και δεν αναμένεται να έχουν εκτεθεί στο albendazole

2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εδαφών

Τα εδαφικά δείγματα μεταφέρθηκαν άμεσα στο εργαστήριο και ακολούθησε κοσκίνισμα, προκειμένου να ομογενοποιηθούν για τις μετέπειτα πειραματικές διαδικασίες. Περίπου 200g εδάφους χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των βασικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (ολική οργανική ουσία, pH και ολικό

άζωτο) των υπό μελέτη εδαφών . Ο προσδιορισμός της ολικής οργανικής ουσίας , πραγματοποιήθηκε με τον συνδυασμό δύο μεθόδων. Αρχικά οξειδώθηκε το οργανικό φορτίο με τη μέθοδο Whakey Black et al, 1934, ενώ στη συνέχεια , ακολουθούσε καύση στους 550°C για δώδεκα ώρες .Ο προσδιορισμός ολοκληρώθηκε με την μέτρηση του βάρους προ και μετά καύσης. Αντίστοιχα, για τον προσδιορισμό του pH των εδαφών 10 g εδάφους (ξηρό βάρος) ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε κωνική φιάλη των 50 ml. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml απεσταγμένου νερού (αναλογία 1:1) και πραγματοποιήθηκε ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Ακολούθησε μέτρηση σε πεχάμετρο υψηλής ευκρίνειας (HANNA pH 211) με προσαρτημένο ηλεκτρόδιο (METTLER TOLEDO 412). Τέλος, για την μέτρηση του ολικού αζώτου , χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Kjeldahl , η οποία πραγματοποιήθηκε στα εξής τρία στάδια :το δείγμα εδάφους συζεύχθηκε σε ισχυρό θεικό οξύ παρουσία ενός καταλύτη, το οποίο συμβάλλει στη μετατροπή του αζώτου σε ιόντα αμμωνίου. Έπειτα τα ιόντα αμμωνίου μετατράπηκαν σε αέρια αμμωνίας, όπου θερμάνθηκαν και εκλούστηκαν . Η αέρια αμμωνία οδηγήθηκε σε ένα διάλυμα ‘παγίδευσης’ όπου διαλύθηκε και μετατράπηκε πάλι ένα ιόν αμμωνίου . Τελικά η ποσότητα της παγιδευμένης αμμωνίας προσδιορίστηκε με τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα.

2.2.1 Προσδιορισμός υγρασίας των εδαφών

Ο προσδιορισμός της περιεχόμενης υγρασίας των εδαφών βασίστηκε στον προσδιορισμό της απώλειας βάρους δειγμάτων εδάφους ύστερα από ξήρανση τους σε φούρνο. Συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν 5 ± 0.01 g εδάφους, όπου και μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένο δοχείο από αλουμίνιο. Για κάθε δείγμα εδάφους προετοιμάστηκαν τρεις επαναλήψεις και έγινε καταγραφή του βάρους των δειγμάτων. Ακολούθησε ξήρανση σε προθερμασμένο φούρνο (LabLine) στους 105°Cγια 24 ώρες. Τέλος, επαναλήφθηκε ζύγιση των εδαφών με τον προσδιορισμό της υγρασίας να δίνεται από τον τύπο:

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

MC: η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους

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

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

Wcont: το βάρος του δοχείου.

2.2.2 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών

Οπροσδιορισμός υδατοχωρητικότητας των εδαφών πραγματοποιήθηκε βαρυμετρικά .Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250 ml, στα στόμια των οποίων τοποθετήθηκαν γυάλινα χωνιά εσωτερικά των οποίων τοποθετήθηκε διηθητικό χαρτί (Whatman No1). Το χαρτί διαβρέχτηκε με νερό ,ώστε οποιαδήποτε ποσότητα Ακολούθησε η προσθήκη 10g εδάφους (δύο επαναλήψεις για κάθε δείγμα).Το έδαφος με το διηθητικό χαρτί και το χωνί ζυγίστηκε και το βάρος του καταγράφηκε (W1). Σειρά είχε η εμπότιση των εδαφών με απεσταγμένο νερό, με σκοπό τον κορεσμό σε υγρασία. Για την αποφυγή απώλειας νερού λόγω εξάτμισης, τα χωνιά καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο. Το έδαφος αφέθηκε σε ηρεμία για 12-14 ώρες, ούτως ώστε να απομακρυνθεί στην κωνική φιάλη η περίσσεια του νερού. Το βάρος του χωνιού, με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος καταγράφηκε και μετά την κατάκλιση(W2) Ακολούθως, η υδατοχωρητικότητα προσδιορίστηκε βάσει του τύπου:

$$WHC= (B-X) + (W_2-W_1) / X * 100\%$$

WHC: η υδατοχωρητικότητα του εδάφους

B: το βάρος του εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

X: το ξηρό βάρος εδάφους που προστέθηκε στο χωνίW₁:το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, πριν την κατάκλιση W₂: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, μετά την κατάκλιση

2.3 Διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια και κτηνιατρικά φάρμακα

Ζυγίστηκαν 0,00102 g, albendazole, albendazole sulfoxide και albendazole sulfone από σκευάσματα καθαρότητας 98% , των εταιριών TCI, Santa Cruz Biotechnology και J&K αντιστοίχως. Στη συνέχεια, διαλύθηκαν ξεχωριστά ανά ένωση σε 10 ml μεθανόλη. Για την εφαρμογή στο έδαφος (περίπου 500g), προετοιμάστηκε διάλυμα 1000 mg/L σε μεθανόλη που διαλύθηκε περαιτέρω ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα συγκέντρωσης 30mg/Lτο οποίο και εφαρμόστηκε στο έδαφος. Για τις εκχυλίσεις και την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ACN και νερό HPLCgrade (Merck), ορθο-φωσφορικό οξύ (H₃PO₄ 0,1%),

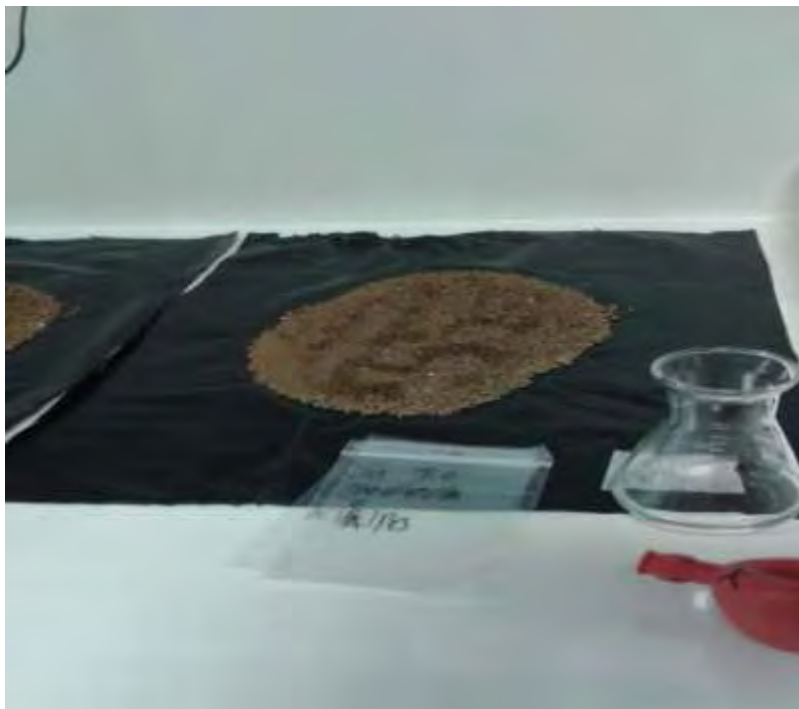
2.4.Πείραμα αποδόμησης κτηνιατρικών φαρμάκων στα εδάφη

2.4.1 Περιγραφή του πειράματος

Καθένα από τα δείγματα εδάφους διαχωρίστηκε σε δύο υποδείγματα (500-1000 g), εκ των οποίων το ένα αποστειρώθηκε μέσω καπνισμού με χλωροφόρμιο, όπως αναλύεται στην παράγραφο 2.4.2. Αμέσως μετά την ολοκλήρωση του καπνισμού των εδαφών όλα τα δείγματα εδάφους, αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα, δέχτηκαν εφαρμογή υδατικού διαλύματος albendazole που οδήγησε σε τελική συγκέντρωση στο έδαφος τα 1mg/Kg. Στην εφαρμογή, και γενικότερα σε όλες τις διαδικασίες, προτεραιότητα είχαν οι μάρτυρες, οι οποίοι όπως προαναφέρθηκε δεν είχαν έρθει ξανά σε επαφή με το albendazole. Μετά την εφαρμογή του albendazole η υγρασία των δειγμάτων ρυθμίστηκε στο 40% της υδατοχωρητικότητας τους, με την προσθήκη ανάλογων ποσοτήτων νερού για το καθένα. Ακολούθως τα δείγματα αναμίχθηκαν ούτως ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή του albendazole στο έδαφος. Τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε υποδείγματα των 10g σε πλαστικά σακουλάκια (14 εδάφη, από 3 επαναλήψεις, από 6 χρόνους) και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο με ομοιόμορφο αερισμό και θερμοκρασία στους 25°C στο σκοτάδι. Οι προς μελέτη χρόνοι δειγματοληψίας ήταν 0,5,10,20,40 και 60 ημέρες μετά την εφαρμογή του albendazole. Στην περίπτωση που η εκχύλιση, δεν γινόταν την ίδια μέρα με την δειγματοληψία, τα δείγματα φυλάσσονταν στους -20°C.



Εικόνα9: Εφαρμογή του albendazole στο έδαφος και προσαρμογή της υγρασίας των εδαφών στο 40% της υδατοχωρητικότητας



Εικόνα 10: Εφαρμογή του albendazole στο έδαφος και μεταφορά τους σε πλαστικά σακουλάκια.

2.4.2 Αποστείρωση εδαφών

Τα εδάφη προς αποστείρωση τοποθετήθηκαν εντός πολλαπλών στρωμάτων γάζας ώστε να επιτρέπουν την διάχυση του χλωροφορμίου στο πορώδες του εδάφους, τα οποία τοποθετήθηκαν σε γυάλινους ξηραντήρες (Εικόνα 10). Συγκεκριμένα, στον πυθμένα του ξηραντήρα προστέθηκαν 200 ml χλωροφόρμιο και ακολούθως απομακρύνθηκε ο αέρας από το εσωτερικό του ξηραντήρα με αντλία κενού. Τα ξηραντήρια διατηρήθηκαν υπό κενό για επτά ημέρες. Με την ολοκλήρωση του πρώτου αυτού σταδίου αποστείρωσης ακολούθησε επώαση των εδαφών για επτά ημέρες στους 25°C, ώστε να αναπτυχθούν μικροοργανισμοί που τυχόν διέφυγαν του πρώτου καπνισμού. Ακολούθως τα εδάφη επαναποστειρώθηκαν με την ίδια διαδικασία με χλωροφόρμιο με στόχο την εξάλειψη των μικροοργανισμών που επιβίωσαν του πρώτου καπνισμού και αναπτύχθηκαν κατά την ενδιάμεση περίοδο επώασης.



Εικόνα 112: Ξηραντήρες που χρησιμοποιήθηκαν για αποστείρωση των εδαφών με χλωροφόρμιο

2.6 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων των κτηνιατρικών φαρμάκων στο έδαφος

2.6.1 Εκχύλιση Albendazole και των μεταβολιτών του από το έδαφος

Για την εκχύλιση του albendazole ζυγίζονταν 5 g εδάφους σε κωνικές φιάλες των 100ml και προστέθηκαν 10 ml ακετονιτρίλιο. Οι κωνικές φιάλες καλύπτονταν με αλουμινένια διαφάνεια και τοποθετούνταν στον οριζόντιο αναδευτήρα για μια ώρα σε ανάδευση στις 200 rpm. Ακολουθούσε η συλλογή του υπερκείμενου σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης και στο εναπομείναν υλικό των κωνικών προστέθηκαν άλλα 10ml ακετονιτρίλιου, όπου και επαναλαμβάνονταν ανάδευση επί μία ώρα. Το δεύτερο υπερκείμενο συλλεγόταν στο ίδιο Teflon. Τέλος, πραγματοποιούνταν φυγοκέντρηση στα 7500 rpm σε θερμοκρασία 20°C για 5 λεπτά. Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο αφαιρούνταν, όπου διηθούνταν με τη βοήθεια σύριγγας μέσω φίλτρου με πόρους 0,45μm. Το διήθημα ήταν έτοιμο για την ανάλυση σε σύστημα HPLC-DAD όπως περιγράφεται παρακάτω.

Προς επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας (ακρίβεια και επαναληψιμότητα) της μεθόδου εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης για το albendazole και τους μεταβολίτες του, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις των 0,05

mg/Kg, 0,5 mg/Kg και 1mg/Kg, σε τυχαίο έδαφος. Για κάθε εφαρμογή ζυγίζονταν κάθε φορά 100 g εδάφους. Οι μέθοδοι κρίθηκαν ικανοί για το παρόν πείραμα, αφού τελικά οι ουσίες ανακτήθηκαν από το 80% της ποσότητας που εφαρμόσαμε.

2.6.2 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για την ανάλυση των εκχυλισμένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα HPLC Μοντέλο της εταιρείας UFLC SHIMADZU με ανιχνευτή φωτοδιόδων και στήλη Athena C18, 120A, (4,6 mm x 150mm, 5μm). Η ροή της κινητής φάσης ήταν 1 ml min⁻¹. Οι συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης περιγράφονται στον Πίνακα 1.

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

Κτηνιατρικά Φάρμακα	Κινητή φάση	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης	Μήκος κύματος (nm)	Χρόνος έκλουσης
Albendazole	ACN: H ₃ PO ₄ (0,1%)	20:80	205	27,5 min
Albendazole sulfoxide	ACN : H ₃ PO ₄ (0,1%)	20:80	220	4,5 min
Albendazole sulfone	ACN : H ₃ PO ₄ (0,1%)	20:80	220	10,1min

2.6.3 Προσδιορισμός πρότυπης καμπύλης

Η ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων του albendazole και των κυρίων μεταβολικών προϊόντων του albendazole sulfoxide και albendazole sulfone πραγματοποιήθηκε μέσω εξωτερικής πρότυπης καμπύλης που προετοιμάστηκε ύστερα από την έγχυση προτύπων διαλυμάτων των ουσιών albendazole , albendazole sulfoxide, albendazole σε μεθανόλη με συγκεντρώσεις 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L, 0,1 mg/L, 0,05 mg/L και 0,01 mg/L σε σύστημα HPLC-PDA.

2.7. Επεξεργασία αποτελεσμάτων και υπολογισμός DT50

Με βάση τις μετρήσεις υπολειμματικότητας του albendazole και των μεταβολικών του προϊόντων στο έδαφος υπολογίστηκαν οι τιμές DT₅₀ χρησιμοποιώντας τα μοντέλα κινητικής που έχουν προταθεί από το FOCUS working group (FOCUS 2006). Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι τιμές DT₅₀ υπολογίστηκαν τόσο για το albendazole όσο και για το σύνολο των δραστικών υπολειμμάτων του albendazole που αποτελούν το άθροισμα των υπολειμμάτων των albendazole, albenazole sulfoxide, albendazole sulfone δεδομένου ότι κυρίως το πρώτο οξειδωμένο παράγωγο του albendazole εμφανίζει υψηλή ανθελμινθική δράση. Για τον υπολογισμό των DT₅₀ χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικά μοντέλα κινητικής: το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Single first order, SFO) και δύο μη γραμμικά μοντέλα κινητικής (Hockey Stick (HS) και Gustafson-Holden (FOMC)), (Πίνακας 2). Το στατιστικό πρόγραμμα R χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των παραμέτρων των εξισώσεων των μοντέλων κινητικής. Γενικότερα, τα διφασικά μοντέλα κινητικής, χρησιμοποιήθηκαν μόνο στις περιπτώσεις στις οποίες το μοντέλο SFO δεν περιέγραφε με ικανοποιητική ακρίβεια ($\chi^2 > 15\%$) την κινητική αποδόμησης των κτηνιατρικών φαρμάκων.

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

Μοντέλο	Μαθηματική εξίσωση	Υπολογισμός Ημιζωής
Single first order (linear) (SFO)	$C = C_0 e^{-kt}$	$t_{1/2} = \ln 2 / K$
Hockey Stick (HS)	$C = C_0 e^{-k_1 t}$ for $t \leq t_b$ $C = C_0 e^{-k_1 t_b} e^{-k_2 (t - t_b)}$ for $t > t_b$	$t_{1/2} = \ln 2 / K_1$ $t_{1/2} = t_b + (\ln 2 - k_1 t_b) / k_2$
FOMC	$C = C_0 (1 + \beta t)^{-\alpha}$	$t_{1/2} = \ln 2 / kP$

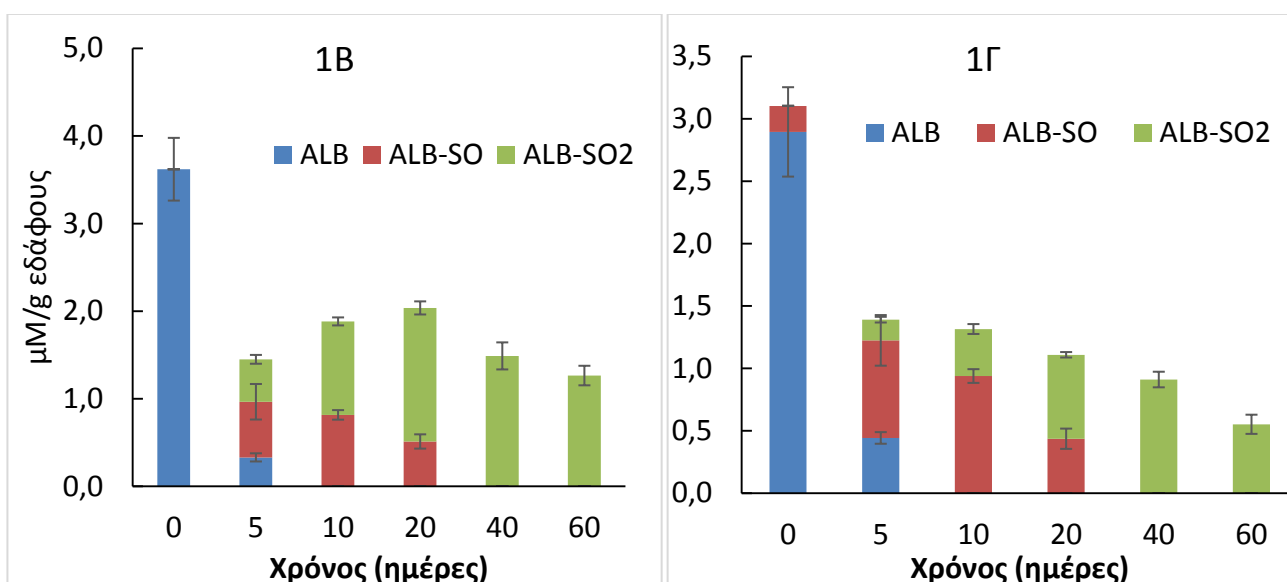
Τα δεδομένα αποδόμησης (DT₅₀) των κτηνιατρικών φαρμάκων που μελετήθηκαν, συσχετίστηκαν (Pearson's correlation test) με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών και την ύπαρξη ή όχι ιστορικού χρήσης του κάθε κτηνιατρικού φαρμάκου, ούτως ώστε να αξιολογηθεί ο ρόλος βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων, στην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

3. Αποτελέσματα

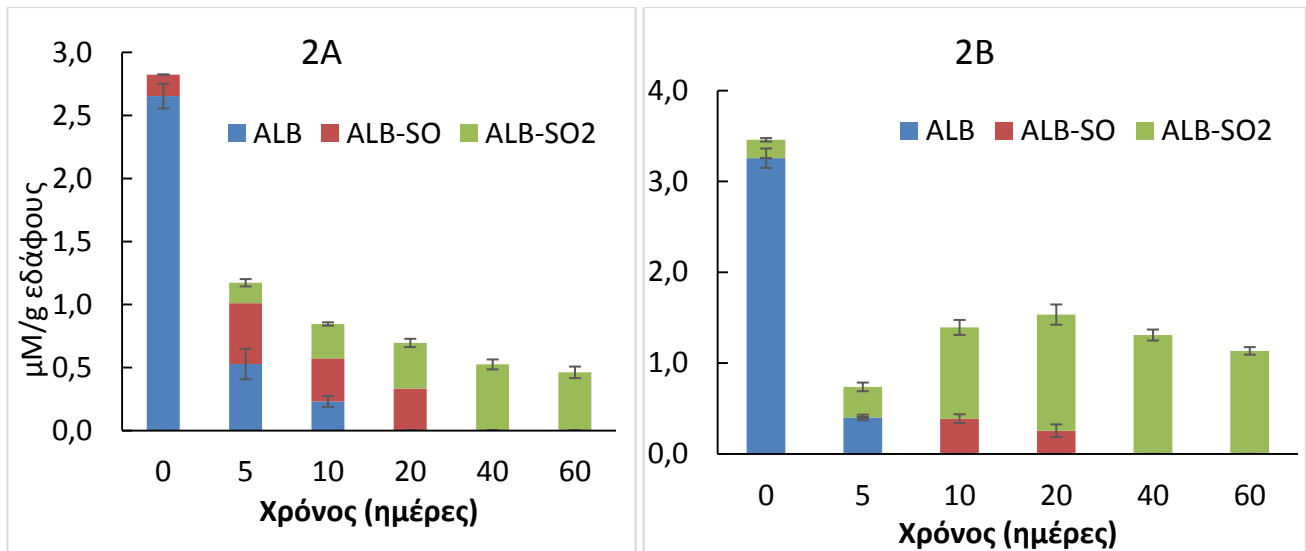
3.1 Αποδόμηση και μεταβολισμός του albendazole στο έδαφος-Κινητικές παράμετροι

Στις παρακάτω παραγράφους παρουσιάζεται η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του κτηνιατρικού φαρμάκου albendazole στα διάφορα δείγματα και ο υπολογισμός του χρόνου ημιζωής του.

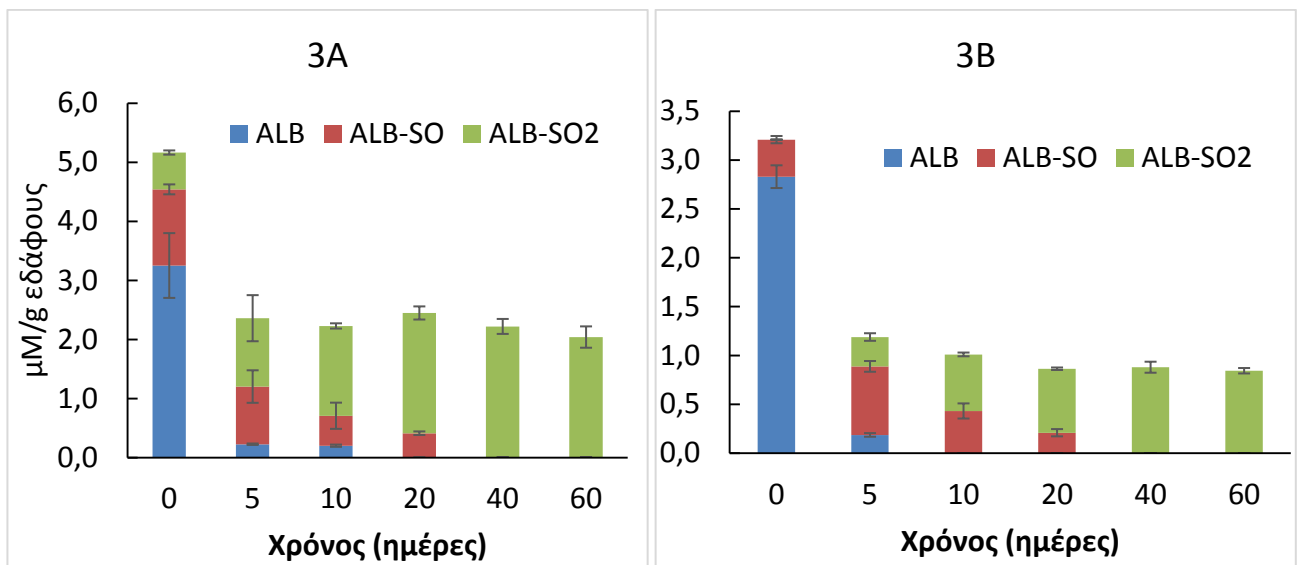
Η αποδόμηση του albendazole σε μη αποστειρωμένα εδάφη από όλες τις μονάδες εκτροφής αιγοπροβάτων, καθώς και από τα αντίστοιχα εδάφη μάρτυρες παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 1 έως 7.



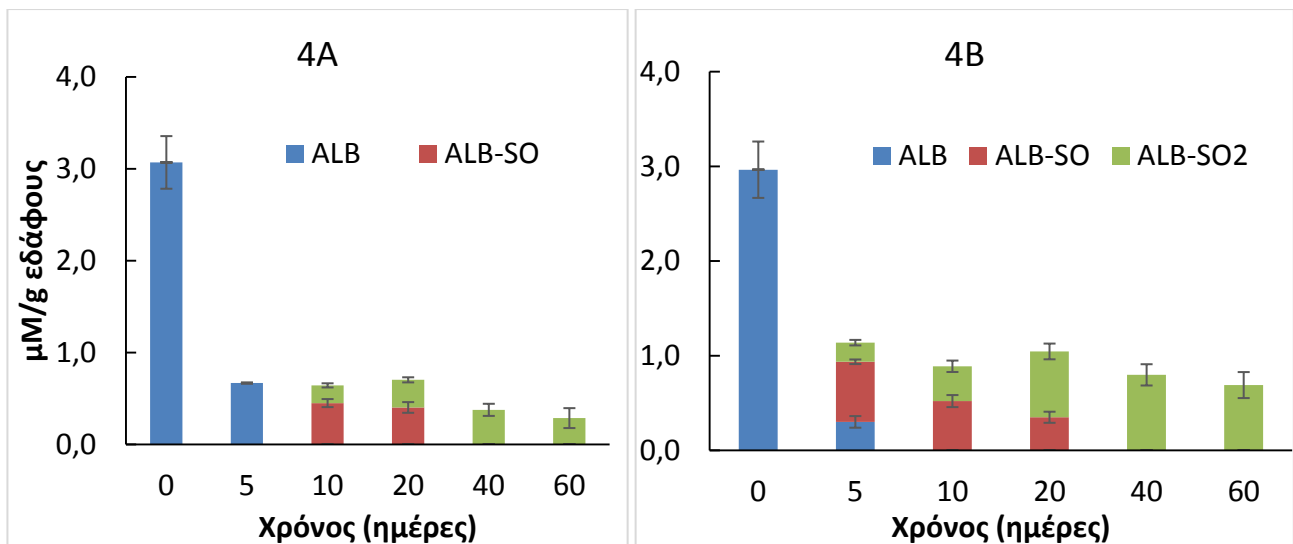
Διάγραμμα 1. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από τα δυο σημεία του λειμώνα της Κτηνοτροφικής Μονάδας 1. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



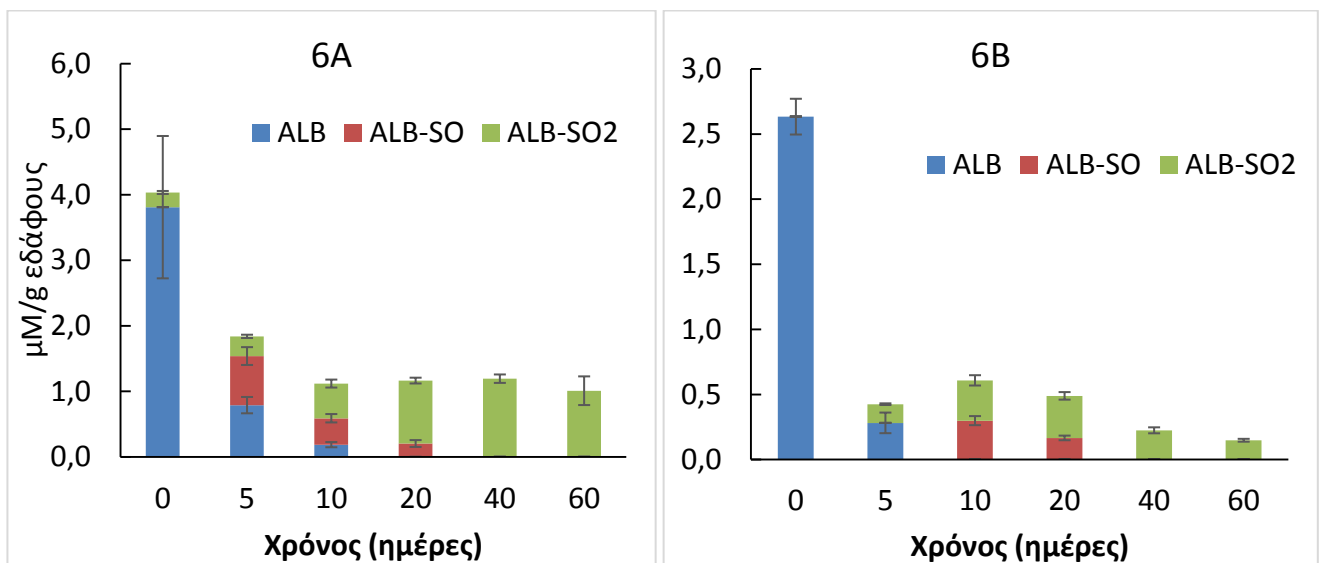
Διάγραμμα 2. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από το λειμώνια (2A) και από το μαντρί (2B) της Κτηνοτροφικής Μονάδας 2. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



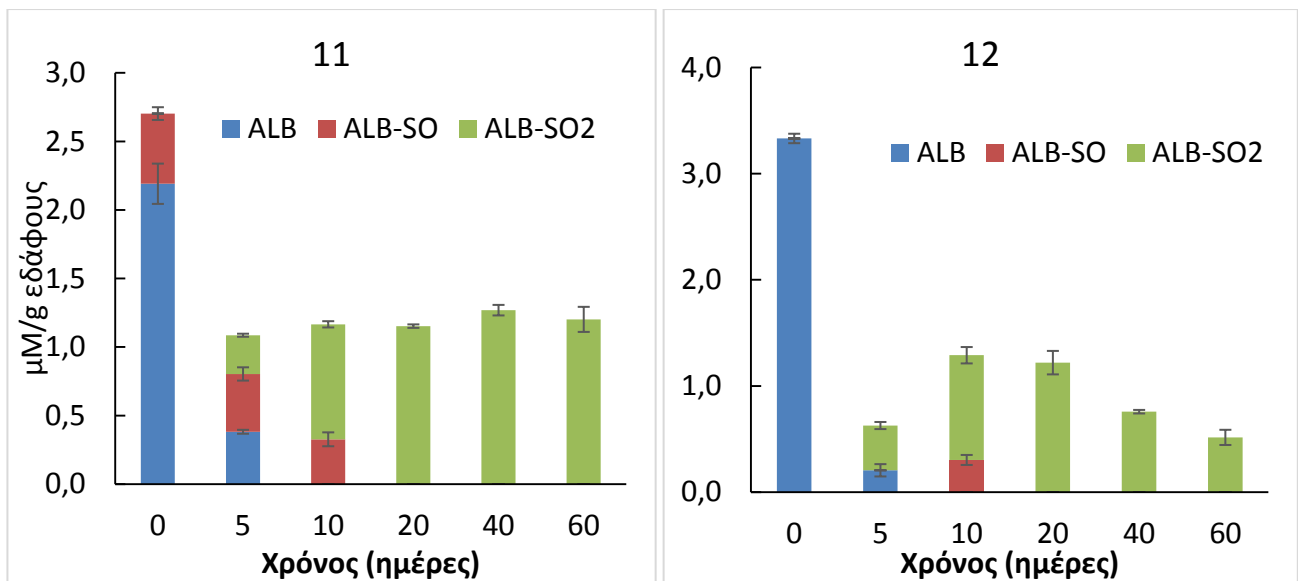
Διάγραμμα 3. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από το μαντρί (3A) και από το λειμώνια (3B) της Κτηνοτροφικής Μονάδας 3. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων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



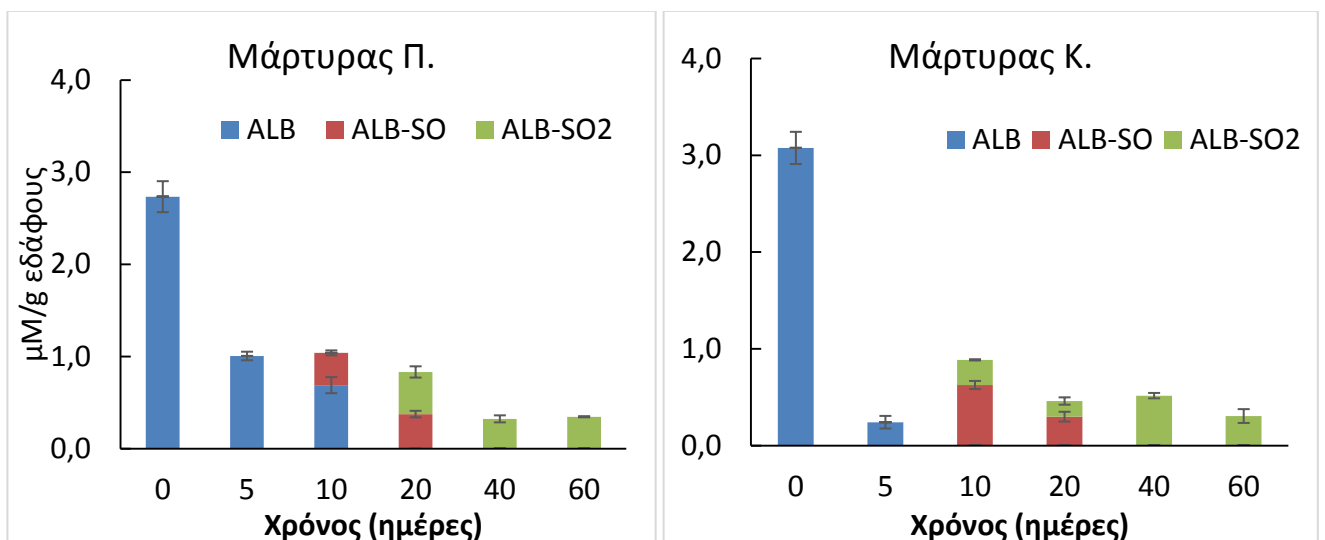
Διάγραμμα 4. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από το λειμώνα (4A) και από το μαντρί (4B) της Κτηνοτροφικής Μονάδας 4. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 5. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από το μαντρί (6A) και από το λειμώνα (6B) της Κτηνοτροφικής Μονάδας 6. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



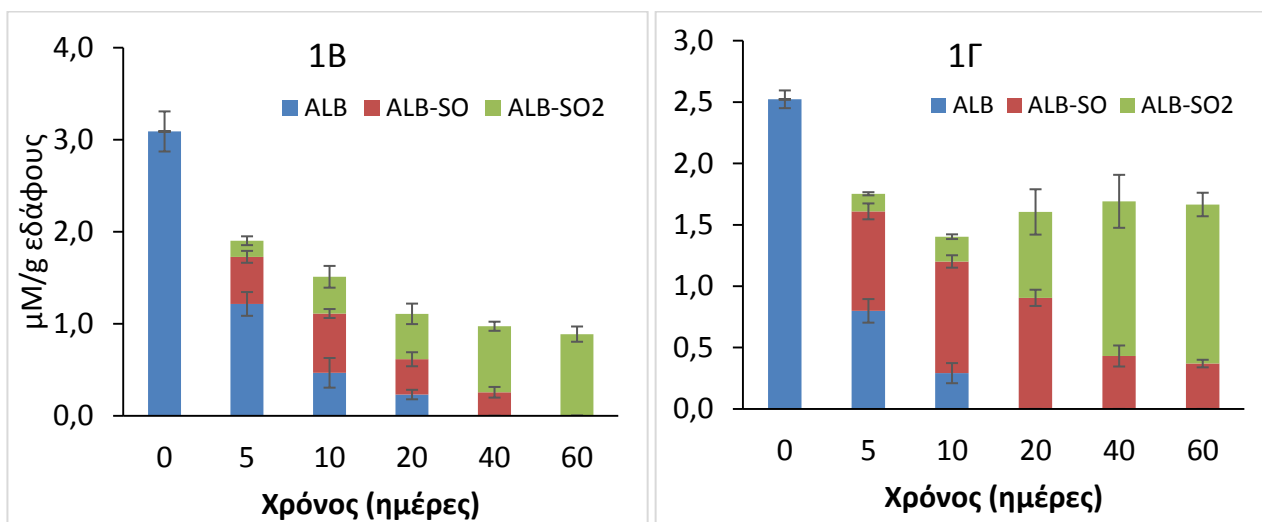
Διάγραμμα 6. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από τα σύνθετα δείγματα 11 και 12 των Κτηνοτροφικών Μονάδων 11 και 12. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



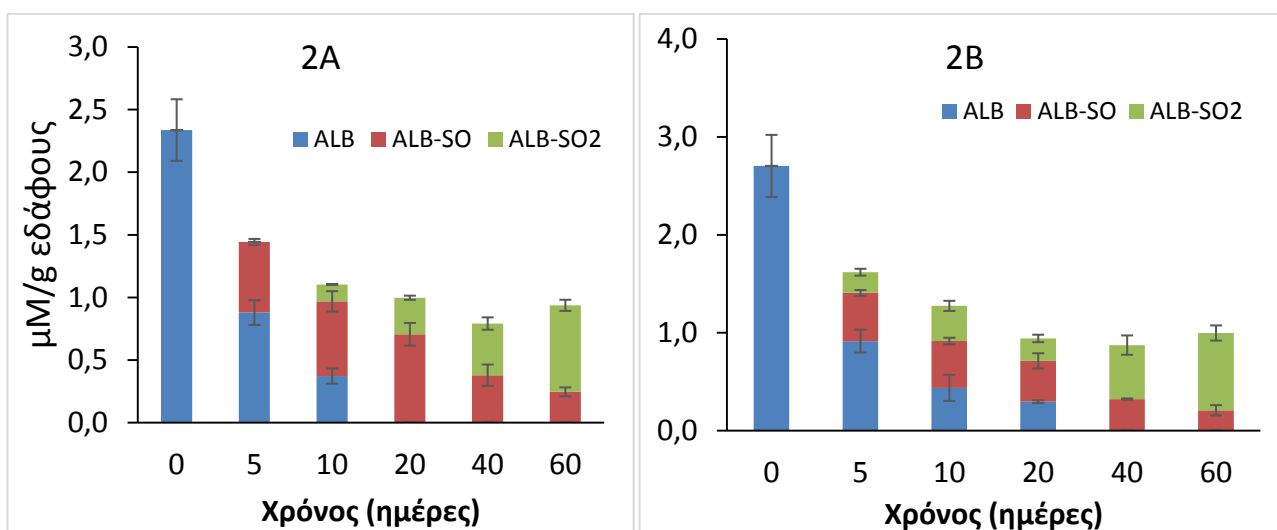
Διάγραμμα 7. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από τον μάρτυρα Π. και μάρτυρα Κ. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.

Η αποδόμηση του albendazole σε αποστειρωμένα εδάφη από όλες τις μονάδες εκτροφής αιγοπροβάτων, καθώς και από τα αντίστοιχα εδάφη μάρτυρες

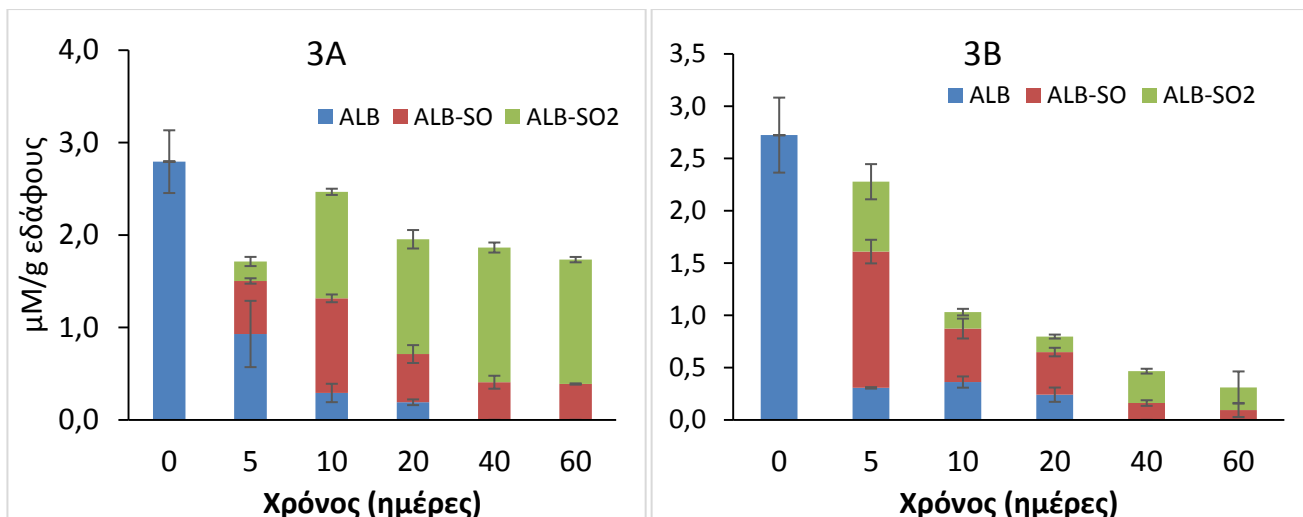
παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 8 έως 14. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι παράμετροι κινητικής αποδόμησης του albendazole στα μη αποστειρωμένα εδάφη.



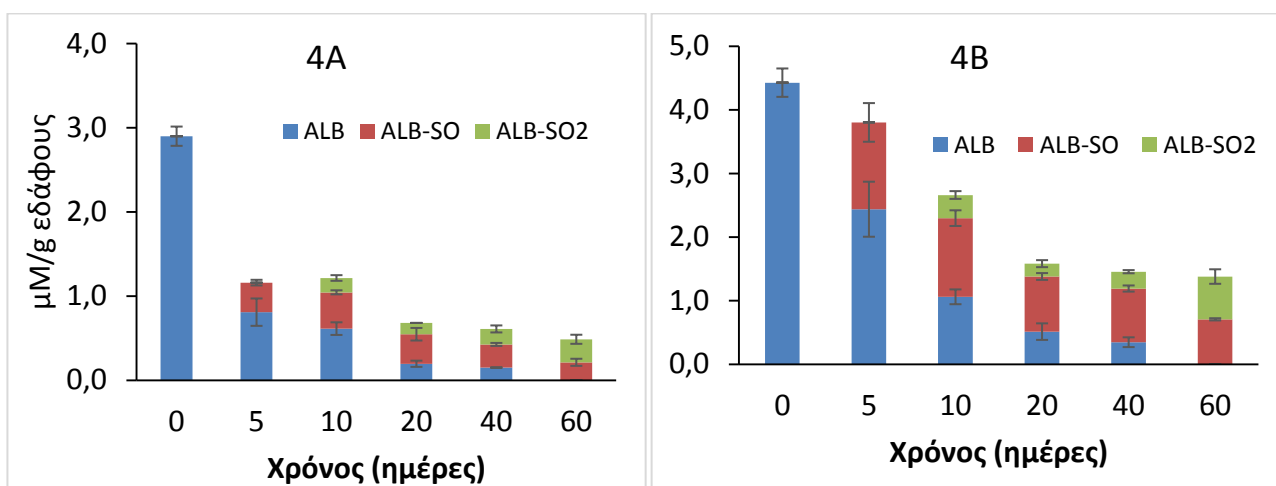
Διάγραμμα 8. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από τα δυο σημεία του λειμώνα της Κτηνοτροφικής Μονάδας 1. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



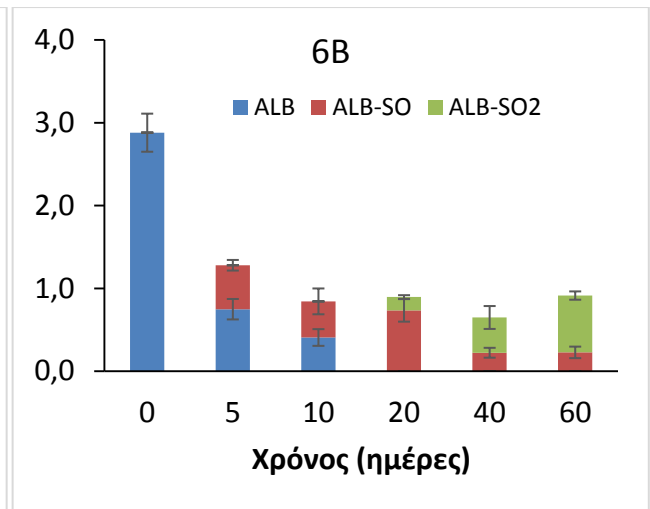
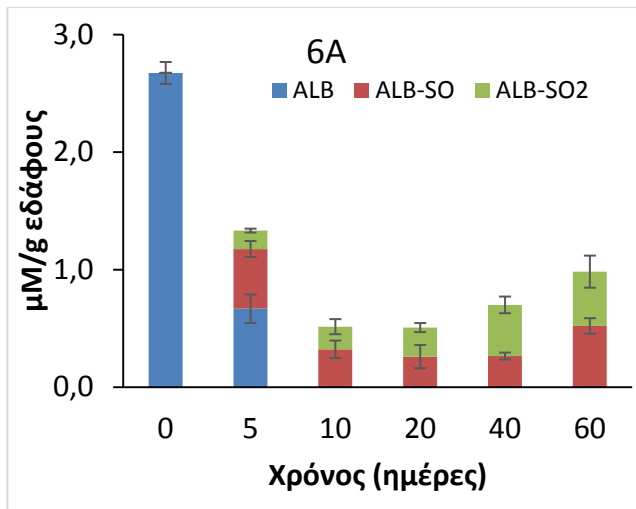
Διάγραμμα 9. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από το λειμώνα (2A) και από το μαντρί (2B) της Κτηνοτροφικής Μονάδας 2. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



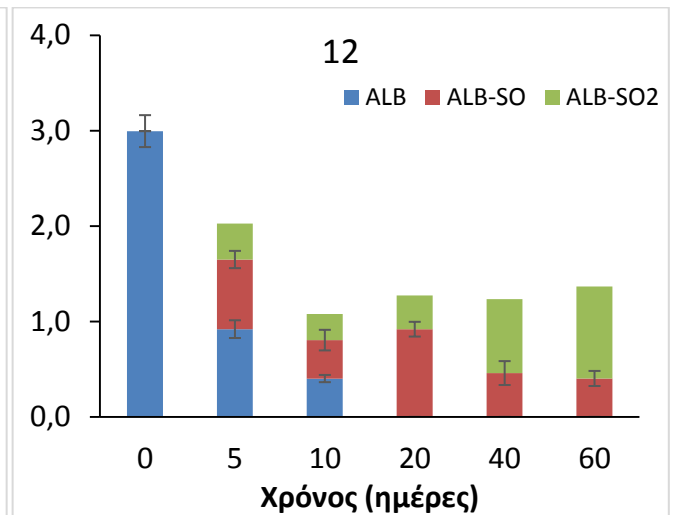
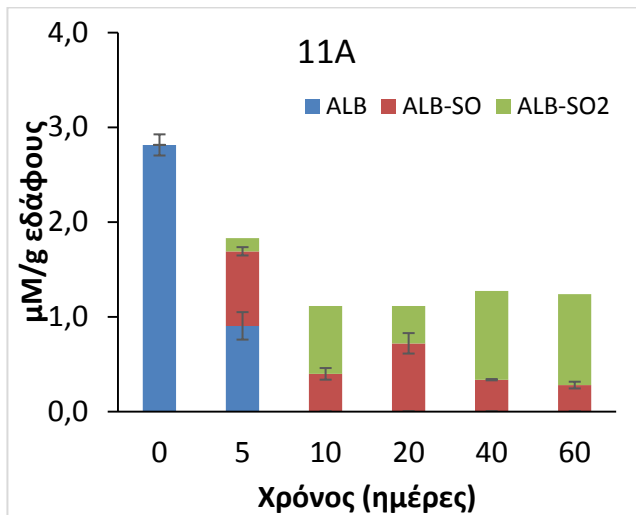
Διάγραμμα 10. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από το μαντρί (3A) και από το λειμών (3B) της Κτηνοτροφικής Μονάδας 3. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



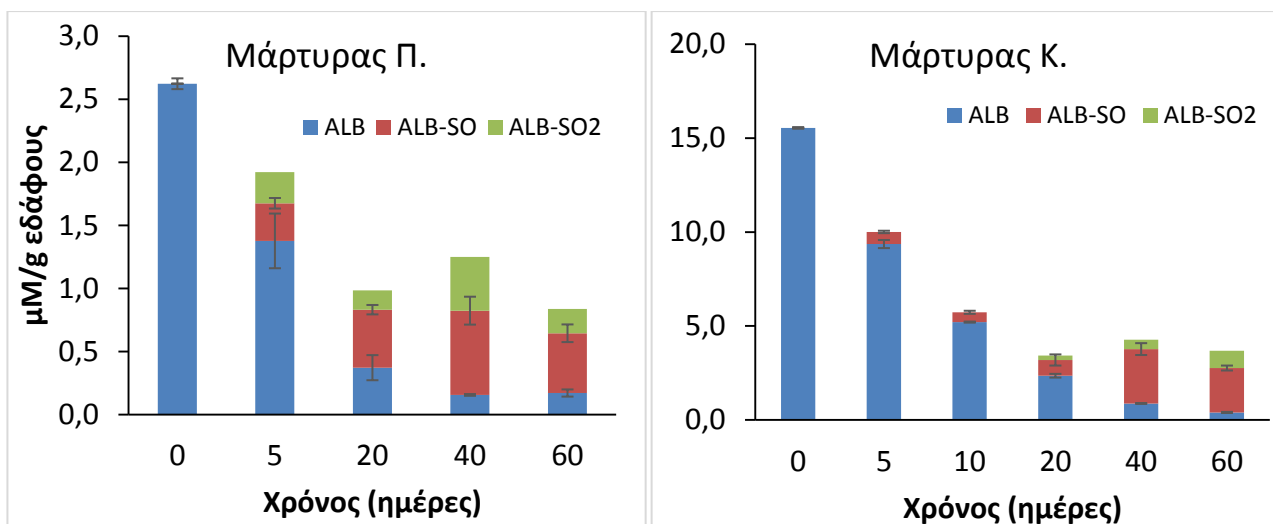
Διάγραμμα 11. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από το λειμών (4A) και από το μαντρί (4B) της Κτηνοτροφικής Μονάδας 4. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 12. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από το μαντρί (6A) και από το λειμών (6B) της Κτηνοτροφικής Μονάδας 6. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 13. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από τα σύνθετα δείγματα 11 και 12 των Κτηνοτροφικών Μονάδων 11 και 12. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 14. Αποδόμηση του albendazole (ALB) και των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide (ALB-SO) και albendazole sulfone (ALB-SO₂) σε αποστειρωμένα δείγματα εδάφους από τον μάρτυρα Π. και μάρτυρα Κ. Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων ± την τυπική απόκλιση.

Πίνακας 3. Κινητικές παράμετροι αποδόμησης του albendazole σε αποστειρωμένα και μη δείγματα εδάφους.

Εδαφικό δείγμα	Μοντέλο	$K_{deg}(d^{-1})$	α	β	$DT_{50}(d)$	$DT_{90}(d)$	$\chi^2(%)$
1B	SFO	0,203			1,7	5,5	6,8
1BFUM	SFO	0,118			3,8	12,5	6,7
1Γ	SFO	0,188			1,9	6,3	5,3
1Γ FUM	SFO	0,067			3,6	11,1	6,3
2A	SFO	0,220			2,3	7,5	7,4
2AFUM	SFO	0,111			3,6	12,0	3,6
2B	FMOC		$2,5 \cdot 10^{18}$	$6,85 \cdot 10^8$	1,9	6,3	8,6
2BFUM	SFO	0,129			3,6	11,8	13,2
3A	FMOC		0,599	0,046	0,1	2,1	7,9
3AFUM	SFO	0,048			3,4	11,4	9,2
3B	SFO	0,330			1,2	4,0	1,4

3BFUM	FOMC		0,499 9	0,07 2	0,22	7,2	12,8
4A	SFO	0,266			2,2	7,4	7,9
4AFUM	FOMC		1,12	2,57	2,2	17,5	7,8
4B	SFO	0,291			1,5	5,1	2,3
4BFUM	SFO	0,071			5,2	17,2	10,5
6A	SFO	0,207			2,2	7,3	1,0
6AFUM	SFO	0,226			2,3	7,7	9,7
6B	SFO	0,365			1,6	5,2	2,6
6BFUM	SFO	0,167			2,9	9,7	10,1
11	SFO	0,124			2,2	7,2	8,7
11 FUM	SFO	0,149			2,7	8,9	14,4
12	SFO	0,299			1,5	4,9	6,7
12FUM	SFO	0,125			3,2	10,8	6,1
Μάρτυρας Κ.	SFO	0,132			4,2	13,8	12,8
Μάρτυρας Κ FUM	SFO	0,082			5,7	18,9	11,5
Μάρτυρας Π.	SFO	0,400			1,5	4,8	3,3
Μάρτυρας Π FUM	SFO	0,085			7,0	23,2	5,7

Γενικά σε όλα τα μη αποστειρωμένα δείγματα της παρούσας μελέτης η αποδόμηση του albendazole ήταν ταχύτερη με τιμές των DT_{50} να φτάνουν από μερικές ώρες μέχρι και λίγες ημέρες μετά την εφαρμογή του (0,1 έως 4,2 ημέρες) αντίστοιχα (Πίνακας 3). Στα περισσότερα δείγματα του πειράματος δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα ALB μετά από τις 5 ημέρες εκτός από τις περιπτώσεις των δειγμάτων 6A, 3A, 2A και του μάρτυρα Π. που δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα του μετά τις 10 ημέρες. Το πρότυπο μεταβολισμού του ALB σε όλα τα δείγματα εδάφους ήταν παρόμοιο, με την αποδόμηση του να συνοδεύεται από οξείδωσή του αρχικά σε albendazole sulfoxide, το οποίο στις περισσότερες περιπτώσεις οξειδώνεται περαιτέρω σε albendazole sulfone, που αποτελεί και το κύριο συστατικό των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του ALB προς το τέλος της επώασης (Διαγράμματα 1 έως 7).

Το albendazole ,αντίστοιχα, στα αποστειρωμένα εδάφη εμφάνισε σχετικά χαμηλή υπολειμματικότητα με την αποστείρωση των εδαφών να οδηγεί βέβαια στις

περισσότερες περιπτώσεις σε επιβράδυνση της αποδόμησης και μεγαλύτερες τιμές DT_{50s} . Το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (SFO) ήταν αυτό που περιέγραψε ικανοποιητικά τα αποτελέσματα της αποδόμησης του ALB στις περισσότερες των περιπτώσεων, με τις τιμές των DT_{50s} να κυμαίνονται από 0,2 (Εδαφος 3B) έως και 6,9 ημέρες (Εδαφος Μάρτυρας Κ.) (Πίνακας 3). Σε αντίθεση με τα μη αποστειρωμένα δείγματα, υπολείμματα του albendazole ανιχνεύτηκαν στα εδάφη και μετά τις 10 πρώτες ημέρες από την εφαρμογή του (Δείγματα από μονάδες 2, 3 και 4, Διαγράμματα 9, 10 και 11, αντίστοιχα), ενώ στα δείγματα εδάφους των μαρτύρων υπολείμματα του ανιχνεύτηκαν μέχρι το τέλος της επώασης (Διάγραμμα 14). Τέλος, το μεταβολικό πρότυπο του albendazole ήταν παρόμοιο με αυτό που καταγράφηκε στα μη αποστειρωμένα δείγματα, με τη μόνη διαφορά ότι τα οξειδωμένα παράγωγα του albendazole (albendazole sulfoxide και albendazole sulfone) αποτελούσαν το συνολικό φορτίο των δραστικών υπολειμμάτων στο τέλος της επώασης (Διαγράμματα 8-14).

Δεδομένης της δραστηριότητας των albendazole sulfoxide και albendazole sulfone υπολογίστηκε και η υπολειμματικότητα των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του albendazole (άθροισμα των albendazole, albendazolesulfoxide και albendazolesulfone). Το πρότυπο αποδόμησης των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του albendazole περιεγράφηκε ικανοποιητικά από το διφασικό μοντέλο κινητικής HS σε όλα τα εδάφη (αποστειρωμένα ή μη) από όλες τις κτηνοτροφικές μονάδες, με εξαίρεση τα αποστειρωμένα δείγματα 1B και 2B όπου το διφασικό μοντέλο FOMC περιέγραψε ικανοποιητικά την αποδόμηση των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του albendazole. Γενικότερα, τα συνολικά δραστικά υπολείμματα του albendazole παρουσίασαν χαμηλή υπολειμματικότητα στα μη αποστειρωμένα εδάφη με τις τιμές DT_{50} να κυμαίνονται από 1,6 (Μάρτυρας Κ.) έως 4,5 (1B) ημέρες (Πίνακας 3). Η αποστείρωση των εδαφών επιβράδυνε την αποδόμηση σε όλα τα εδάφη με τις τιμές DT_{50} να κυμαίνονται μεταξύ 3,8 ως και >365 ημέρες (Πίνακας 3). Δεδομένης του διφασικού προτύπου αποδόμησης των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων που καταγράφηκε σε όλα τα δείγματα εδάφους που μελετήθηκαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποκτά και η μελέτη των τιμών DT_{90} που στα αποστειρωμένα εδάφη ξεπέρασε τις 365 ημέρες σε όλα τα εδάφη εκτός των εδαφών 3A και 4B που ήταν μεταξύ 61,6 και 78,3 ημέρες (Πίνακας 3). Αντίστοιχα οι τιμές DT_{90} στα μη αποστειρωμένα δείγματα κυμάνθηκε από 41.1 ως και 224.3 ημέρες με

εξαιρέση τα εδάφη 1B, 2B, 3A, 6A και 11 που πλησίασε και ξεπέρασε τις 365 ημέρες.

Πίνακας 4. Οι παράμετροι κινητικής για την αποδόμηση των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του albendazole (albendazole + albendazole sulfoxide + albendazole + sulfone) σε αποστειρωμένα (FUM) και μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους που συλλέχθηκαν από τις κτηνοτροφικές μονάδες καθώς και σε δείγμα μάρτυρα χωρίς πρότερη έκθεση στο albendazole (MARTYΡΕΣ).

Εδαφικό δείγμα	Μοντέλο	DT ₅₀ (d)	DT ₉₀ (d)	χ ² (%)
1B	HS	4,5	337,9	11,2
1B -FUM	FOMC	9,4	>365	2,9
1Γ	HS	4,3	105,4	3,1
1Γ – FUM	HS	>365	>365	6,2
2A – Λειμώνας	HS	3,9	92,3	2,2
2A – Λειμώνας – FUM	HS	7,2	362,4	5,4
2B – Μαντρί	HS	1,8	>365	15,7
2B – Μαντρί – FUM	FOMC	8,6	>365	6,7
3A – Μαντρί	HS	4,5	>365	3,0
3A – Μαντρί – FUM	HS	140,3	>365	10,9
3B – Λειμώνας	HS	2,4	224,3	5,5
3B – Λειμώνας – FUM	HS	8,8	61,6	14,9
4A – Λειμώνας	HS	2,1	60,8	6,5
4A – Λειμώνας – FUM	HS	3,8	78,3	9,1
4B – Μαντρί	HS	3,6	199,5	5,1
4B – Μαντρί – FUM	HS	13,7	>365	5,1
6A – Μαντρί	HS	4,4	>365	2,8
6A – Μαντρί – FUM	HS	4,9	>365	14,1
6B – Λειμώνας	HS	1,8	41,5	10,6
6B – Λειμώνας – FUM	HS	4,3	>365	6,9
11 – Λειμώνας	HS	2,3	>365	3,8
11 – Λειμώνας – FUM	HS	8,0	>365	3,7
12 – Λειμώνας	HS	2,2	137,4	19,2
12 – Λειμώνας – FUM	HS	7,9	>365	5,8
Μάρτυρας Κ.	HS	1,6	97,5	21,6
Μάρτυρας Κ.- FUM	HS	7,2	>365	4,3
Μάρτυρας Π.	HS	3,7	61,4	8,0
Μάρτυρας Π. - FUM	HS	9,6	>365	8,2

3.2 Συσχέτισης μεταξύ φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των εδαφών και DT₅₀

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των εδαφών που συλλέχθηκαν από τις κτηνοτροφικές μονάδες της Λέσβου και οι αναλύσεις έγιναν στο Εργαστήριο της Εδαφολογίας και Γεωργικής Χημείας, του Τμήματος Αξιοποίησης Φυσικών Πόρων και Γεωργικής Μηχανικής, του Γεωπονικού πανεπιστημίου Αθηνών.

Πίνακας 5. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων από τις κτηνοτροφικές μονάδες της Λέσβου

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΟΛΙΚΟ ΑΖΩΤΟ (%)	ΟΛΙΚΗ ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΟΥΣΙΑ (%)	pH	Ηλεκτρική αγωγιμότητα (mS/cm)
Μάρτυρας Π.	0,13	9,4	6,50	2,1
Μάρτυρας Κ.	0,09	3,1	8,37	599,0
1B	0,28	12,0	7,84	2,0
1Γ	0,19	7,0	6,56	526,0
2A	0,19	17,2	5,85	185,0
2B	0,54	20,2	6,55	3,7
3A	2,25	59,3	6,75	1783,0
3B	0,42	17,8	6,30	1010,0
4A	0,18	12,9	5,79	322,0
4B	0,04	12,0	6,29	768,0
6A	0,32	12,5	6,77	551,0
6B	0,19	7,4	6,13	288,0
11	1,07	23,0	7,02	2,1
12	1,42	29,5	7,93	2,9

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

Η στατιστική ανάλυση (Pearson's correlation test) ανάμεσα στην τιμή DT₅₀ των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του albendazole (sum albendazole + albendazole sulfoxide + albendazole + sulfone) και στα φυσικοχημικά

χαρακτηριστικά των μη αποστειρωμένων εδαφών που μελετήθηκαν δεν έδειξε κάποια στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ($P > 0,05$) (Πίνακας 6) όπως επίσης και το ίδιο παρατηρήθηκε και για την περίπτωση των αποστειρωμένων δειγμάτων εδάφους ($P > 0,05$) (Πίνακας 7).

Πίνακας 6 Συσχετίσεις (Pearson's Correlation Test) μεταξύ DT50 των συνολικών τοξικών υπολειμμάτων του albendazole (sum albendazole + albendazole sulfoxide + albendazole + sulfone) και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των μη αποστειρωμένων εδαφών που μελετήθηκαν και συλλέχθηκαν από τις κτηνοτροφικές μονάδες καθώς και σε δείγμα μάρτυρα χωρίς πρότερη έκθεση στο albendazole

		Ολικό N	Οργανικός C	pH	Ηλ. Αγωγ.
DT ₅₀	Συντελεστής	0,09	0,21	-0,10	0,29
	Συσχέτισης (r)				
	Πιθανότητες (P)	0,754	0,468	0,739	0,313

Πίνακας 7. Συσχετίσεις (Pearson's Correlation Test) μεταξύ DT₅₀ των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του albendazole (sum albendazole + albendazole sulfoxide + albendazole + sulfone) και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των αποστειρωμένων εδαφών, που μελετήθηκαν και συλλέχθηκαν από τις κτηνοτροφικές μονάδες καθώς και σε δείγμα μάρτυρα χωρίς πρότερη έκθεση στο albendazole

		Ολικό N	Οργανικός C	pH	Ηλ. Αγωγ.
DT ₅₀	Συντελεστής	-0,15	-0,21	-0,07	0,05
	Συσχέτισης (r)				
	Πιθανότητες (P)	0,607	0,462	0,802	0,856

Συγκρίθηκαν οι τιμές DT₅₀ και DT₉₀, μεταξύ των δύο ομάδων συνολικά (Πίνακας 8), οι οποίες περιλαμβάνουν τα αποστειρωμένα και τα μη αποστειρωμένα εδάφη. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Ομοίως, συγκρίθηκαν και οι αντίστοιχες τιμές για τα ολικά τοξικά κατάλοιπα του albendazole (albendazole + albendazole sulfoxide + albendazole sulfone), όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. (Πίνακας 9)

Πίνακας 8. Στατιστική διαφορά μεταξύ DT_{50} και DT_{90} του albendazole στις δύο κατηγορίες εδαφικών δειγμάτων (αποστειρωμένων και μη εδαφών) .

Ομάδες εδαφικών δειγμάτων	Στατιστική διαφορά DT_{50}	Στατιστική διαφορά DT_{90}
Μη αποστειρωμένα (Παρουσία μικροοργανισμών)	0,002	0
Αποστειρωμένα (Απουσία μικροοργανισμών)		

Πίνακας 9. . Στατιστική διαφορά μεταξύ DT_{50} και DT_{90} των ολικών καταλοίπων του albendazole (albendazole + albendazole sulfoxide + albendazole sulfone) στις δύο κατηγορίες εδαφικών δειγμάτων (αποστειρωμένων και μη εδαφών) .

Ομάδες εδαφικών δειγμάτων	Στατιστική διαφορά DT_{50}	Στατιστική διαφορά DT_{90}
Μη αποστειρωμένα εδάφη (Παρουσία μικροοργανισμών)	0,33	0,32
Αποστειρωμένα εδάφη (Απουσία μικροοργανισμών)		

Συγκρίνοντας ,επίσης, τις τιμές DT_{50} και DT_{90} για το albendazole ,στις ομάδες εδαφικών δειγμάτων βάσει συστηματικής έκθεσης στο albendazole (όπως αναφέρεται στο εδάφιο 2.1) γίνεται αντιληπτό ότι δεν παρατηρείται σημαντική στατιστική διαφορά (Πίνακας 10) . Το παραπάνω ισχύει τόσο για το albendazole, όσο και για τα ολικά τοξικά κατάλοιπα τού (albendazole + albendazole sulfoxide + albendazole sulfone) (Πίνακας 11) .

Πίνακας 10. Στατιστική διαφορά) μεταξύ DT_{50} του *albendazole* στα μη αποστειρωμένα εδάφη ,με ομαδοποίηση με βάση την περισσότερη προς την λιγότερη συστημακή έκθεσή τους σε *albendazole*

Ομάδες εδαφικών Στατιστική διαφορά DT_{50} Στατιστική διαφορά DT_{90}
δειγμάτων

Εδάφη από μαντρί 1B,2B,3A,4B,6A,11,12 (Συστημακή έκθεση σε <i>albendazole</i>)	0,84	0,90
Εδάφη από λειμώνια 1Γ, 2A, 3B, 4A, 6B (Λιγότερο συστημακή έκθεση σε <i>albendazole</i>)		
Εδάφη από λειμώνια 1Γ, 2A, 3B, 4A, 6B (Λιγότερο συστημακή έκθεση σε <i>albendazole</i>)	0,37	0,30
Εδάφη Μάρτυρες P,K (Θεωρητικά καμία πρότερη επαφή με <i>albendazole</i>)		
Εδάφη από μαντρί 1B,2B,3A,4B,6A,11,12 (Συστημακή έκθεση σε <i>albendazole</i>)	0,19	0,18
Εδάφη Μάρτυρες P,K (Θεωρητικά καμία πρότερη επαφή με <i>albendazole</i>)		

Πίνακας 11. . Στατιστική διαφορά DT_{50} και DT_{90} των ολικών καταλοίπων του *albendazole* (*albendazole* + *albendazole sulfoxide* + *albendazole sulfone*) στα μη αποστειρωμένα εδάφη ,με ομαδοποίηση με βάσει την περισσότερη προς την λιγότερη συστημακή έκθεσή τους σε *albendazole*.

Ομάδες εδαφικών Στατιστική διαφορά DT_{50} Στατιστική διαφορά DT_{90}
δειγμάτων

Εδάφη από μαντρί 1B,2B,3A,4B,6A,11,12 (Συστημακή έκθεση σε <i>albendazole</i>)	0,82	0,80
Εδάφη από λειμώνια 1Γ, 2A, 3B, 4A, 6B (Λιγότερο συστημακή έκθεση σε <i>albendazole</i>)		
Εδάφη από λειμώνια 1Γ, 2A, 3B, 4A, 6B (Λιγότερο συστημακή έκθεση σε <i>albendazole</i>)	0,96	0,99
Εδάφη Μάρτυρες P,K (Θεωρητικά καμία πρότερη επαφή με <i>albendazole</i>)		
Εδάφη από μαντρί 1B,2B,3A,4B,6A,11,12 (Συστημακή έκθεση σε <i>albendazole</i>)	0,76	0,81
Εδάφη Μάρτυρες P,K (Θεωρητικά καμία πρότερη επαφή με <i>albendazole</i>)		

4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

4.1 Συζήτηση

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου των μικροοργανισμών του εδάφους στην αποδόμηση του κτηνιατρικού φαρμάκου albendazole. Η χορήγηση του συγκεκριμένου φαρμάκου είναι ιδιαίτερα εντατική στις κτηνοτροφικές μονάδες του νησιού της Λέσβου. Αυτό αναμένεται να οδηγεί στην συστηματική έκθεση των εδαφών είτε μέσα από την κτηνοτροφική μονάδα, είτε από παρακείμενους βοσκοτόπους-λειμώνες στο συγκεκριμένο κτηνιατρικό φάρμακο. Δεδομένου ότι στο νησί της Λέσβου υπάρχει περιορισμένος αριθμός εντατικών γεωργικών εκμεταλλεύσεων όπου θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν οι κοπριές από τις τοπικές κτηνοτροφικές μονάδες (που αναμένεται να είναι φορτισμένες με albendazole), εστίασαμε την προσοχή μας σε εδάφη από σημεία εντός της κτηνοτροφικής μονάδας (σημεία με υψηλή έκθεση σε περιττώματα ζώων και άρα στο albendazole) και σε εδάφη από περιφραγμένους λειμώνες που χρησιμοποιούνται για την βόσκηση των προβάτων (σημεία με χαμηλότερη έκθεση σε περιττώματα ζώων και άρα στο albendazole).

Αρχικά μελετήσαμε την υπόθεση ότι οι μικροοργανισμοί του εδάφους παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση του albendazole στο έδαφος. Για την διερεύνηση αυτής της υπόθεσης μελετήσαμε την αποδόμηση και τον μεταβολισμό του albendazole σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα δείγματα εδάφους. Γενικά, στα μη αποστειρωμένα δείγματα καταγράφηκαν DT_{50} που κυμαίνονταν από μερικές ως 4,2 ημέρες. Οι παραπάνω τιμές είναι σε συμφωνία με την μελέτη των Wu&Hu (2004), που αναφέρουν τιμές DT_{50} για το albendazole που κυμαίνονταν από μερικές ώρες ως 3,4 ημέρες. Η αποστείρωση των εδαφών οδήγησε σε μερική επιβράδυνση της αποδόμησης του albendazole στα περισσότερα εδάφη κάτι που δείχνει για πρώτη φορά ότι η αποδόμηση του albendazole στα εδάφη εξαρτάται τόσο από βιοτικές όσο και αβιοτικές διεργασίες. Η αποδόμηση του albendazole συνδυάστηκε με την ανίχνευση υπολειμμάτων του οξειδωμένου μεταβολίτη του albendazole sulfoxide, το οποίο στη συνέχεια οξειδώθηκε περαιτέρω σε albendazole sulfone, αλλά δεν

αποδομήθηκε πλήρως και στις δύο περιπτώσεις αποστειρωμένων ή μη εδαφών, ενώ στην περίπτωση των αποστειρωμένων εδαφών δεν οξειδώθηκε πλήρως και ο μεταβολίτης albendazole sulfoxide. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω δεδομένου ότι οι μεταβολίτες του albendazole, και κυρίως, το albendazole sulfoxide εμφανίζει παρόμοια δράση με την μητρική ουσία, υπολογίστηκε η υπολειμματικότητα των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του albendazole (άθροισμα albendazole + sulfoxide + sulfone) στα αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα εδάφη. Παρόλο την δεδομένη τοξικότητα των μεταβολιτών του albendazole, καμία βιβλιογραφική αναφορά δεν εστιάζει στην υπολειμματικότητά τους. Η αποστείρωση οδήγησε και πάλι σε επιβράδυνση (και όχι πλήρη ανάσχεση) της αποδόμησης των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του albendazole στα περισσότερα εδάφη που μελετήθηκαν αποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο των βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών στην αποδόμηση του albendazole και των μεταβολιτών του στο έδαφος. Ο ρόλος των μικροοργανισμών στην αποδόμηση του albendazole προήλθε και από την σύγκριση των DT_{50} και DT_{90} , μεταξύ του συνόλου αποστειρωμένων και μη εδαφών. Η σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο αυτών ομάδων, υποδεικνύει ότι η αποδόμηση του albendazole συνδέεται άμεσα με τη δράση των μικροοργανισμών του εδάφους, κάτι που αναφέρεται πρώτη φορά, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

Ακολούθως η παρούσα μελέτη εξέτασε την υπόθεση ότι η συστηματική έκθεση εδαφών στο albendazole είναι πιθανό να οδηγεί σε επιλογή μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να το αποδομούν ταχύτατα οδηγώντας σε επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση του, κάτι που έχει μελετηθεί και επιβεβαιωθεί για κτηνιατρικά φάρμακα στο έδαφος, αλλά όχι για το albendazole (Topp et al 2013). Στο πλαίσιο αυτής της υπόθεσης μελετήθηκε η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του albendazole σε εδάφη που συλλέχθηκαν από το εσωτερικό κτηνοτροφικών μονάδων που χρησιμοποιούσαν συστηματικά το albendazole (ως εδάφη που αναμένεται να έχουν με υψηλό ποσοστό έκθεση στο albendazole) καθώς από τους αντίστοιχους βοσκοτόπους-λειμώνες των ιδίων κτηνοτροφικών μονάδων (ως εδάφη με λιγότερο συστηματική, αλλά κάποια, έκθεση στο albendazole). Από τα αποτελέσματα δεν προέκυψε επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση του albendazole και των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του στα εδάφη που συλλέχθηκαν από τις διάφορες κτηνοτροφικές μονάδες. Αντίθετα παρατηρήθηκε μια ταχεία αποδόμηση στα

περισσότερα εδάφη και κυρίως στα εδάφη MARTYRES που δεν είχαν θεωρητικά εκτεθεί στο albendazole κατά τα τελευταία έτη. Με βάση λοιπόν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν μπορούμε να επιβεβαιώσουμε την αρχική μας υπόθεση. Περαιτέρω μελέτες σε περισσότερα εδάφη με ιστορικό έκθεσή τους στο albendazole, αλλά επίσης και σε εδάφη από άλλες κτηνοτροφικές μονάδες χωρίς πρότερη έκθεσή τους στο εν λόγω κτηνοτροφικό φάρμακο θα οδηγήσουν σε πιο ασφαλή συμπεράσματα για την ικανότητα να μικροοργανισμών του εδάφους να προσαρμόζονται στην αποδόμηση του albendazole.

4.2 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Το albendazole παρουσιάζει χαμηλή υπολειμματικότητα στο έδαφος και μεταβολίζεται ταχύτατα στα οξειδωμένα παράγωγα του albendazole sulfoxide και sulfone που αποτέλεσαν τα κύρια μέρη των συνολικών τοξικών υπολειμμάτων του albendazole με το πέρας της επώασης
- Η αποδόμηση του albendazole στα εδάφη που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκε τόσο με αβιοτικές όσο και βιοτικές διεργασίες ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του εδάφους και DT_{50}
- Δεν παρατηρήθηκε επιταχυνόμενη αποδόμηση του albendazole σε εδάφη με πιθανή συστηματική έκθεση στο συγκεκριμένο κτηνιατρικό φάρμακο. Περαιτέρω μελέτες σε εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες που δεν χρησιμοποιούν το albendazole θα διασαφηνίσει την πιθανότητα επιλογής μικροοργανισμών στο έδαφος ικανών να αποδομούν ταχύτατα το albendazole και/ή τα οξειδωμένα παράγωγα του.

5.Βιβλιογραφία

- Arbeli Ziv, Cilia L. Fuentes,(2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*,26, 1733–1746
- Audus, L. J., 1960, Microbiological breakdown of herbicides in soils, in: *Herbicides in the Soil*, pp. 1–19, Blackwell, Oxford.
- ΒΙΔΙΑΔΑΚΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ, Πτυχιακή διατριβή, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, (2015).
- Bártíková Hana , Radka Podlipná , Lenka Skálováa ,2015,Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants ,*Chemosphere* 144:2290-2301
- Bottoni, P., Caroli, S., Caracciolo, A.B., 2010 Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicol. Environ. Chem.* , 92(3) 549-565.
- Boxall A.B.A., Fogg L., Blackwell PA, Kay P, Pemberton EJ.2002. Review of veterinary medicines in the environment. Bristol (UK): Environment Agency. R&D Technical Report P6-012/8TR
- Burns, R.G. and J.A. Edwards, 1980. Pesticide breakdown by soil enzymes. *Pest. Sci.*, 11: 506-512.
- Burrows, H.D., Canle L, M., Santaballa, J.A., Steenken, S., (2002). Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*,62:(2),71-108
- Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R. , 2003, Strategic survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 1241-1248
- Catherine Morel-Chevillet, Nisha R. Parekh, Dominique Pautrel and Jean-Claude Fournier,1996, Cross Enhancement of Carbofuran Biodegradation in Soil Samples Previously Treated With Carbamate Pesticides, *Soil Biology and Biochemistry*,Volume 28, Issue 12, Pages 1767-1776
- Celiz, M.D., Tso, J., Aga, D.S., 2009, Pharmaceutical Metabolites in the Environment: Analytical Challenges and Ecological Risks. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 2473-2484

- Crosby, D.G. 1970. The non-biological degradation of pesticides in soil. In Pesticides in the Soil. Intern. Symp., Michigan State University. p. 86.
- Davor Ljubas, Mirta Čizmić, Katarina Vrbat, Draženka Stipaničev, Siniša Repec, Lidija Čurković, and Sandra Babić ,2018, Albendazole Degradation Possibilities by UV-Based Advanced Oxidation Processes, International Journal of Photoenergy, Volume 2018, Article ID 6181747, 6 pages
- Eduardo Diaz , 2008, Microbial Biodegradation Genomics and Molecular Madrid: Caister Academic Press
- Fisher, P.M.J.; Scott, R. Evaluating and controlling pharmaceutical emissions from dairy farms: a critical first step in developing a preventative management approach. J. Cleaner Product., 2008, 16, 1437-1446.
- Frank M. Aarestrup , 2005 , Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2005, 96, 271–281.
- Gyurik R. J. ,A. W. Chow, B. Zaber, E. L. Brunner, J. A. Miller, A. J. Villani, L. A. Petka, R. C. Parish, 1981, Metabolism of Albendazole in Cattle, Sheep, Rats and Mice, Metabolism And Disposition, Vol 9 , No6
- G.S. Prasad, S. Girisham, S.M. Reddy, (2009) Studies on microbial transformation of albendazole by soil fungi, Indian J. Exp. Biol. 8 425–429
- Halling-Sorensen j , S. Nors Nielsen, P. F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Liitzhofl and S.E. Jorgensen, 1998 Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment- A Review B. Chemosphere. ,36(2):357-93.
- Hamaker John W. (1975). The Interpretation of Soil Leaching Experiments. Environmental Dynamics of Pesticides,6:115-133)
- Horvat, A.J.M., Petrovi , M., Balbi , S. Pavlovi , D.M.; A perger, D.; Pelko, S.; Mance, A.D.; Katan-Macan, M.,2012, Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. Trends Anal. Chem , 31, 61-84.
- Howard, P.H.; Muir, D.C.G., 2011, Identifying new persistent and Bioaccumulative Organics Among Chemical in Commerce II: Pharmaceuticals. Environ. Sci. Technol., 2011, 45, 6938-6946

- Hyo-Jung Kim a,b, Dong Soo Lee a , Jung-Hwan Kwon b,c, 2010, Sorption of Benzimidazole Anthelmintics to Dissolved Organic Matter Surrogates and Sewage Sludge, *Chemosphere* 80(3):256-62
- Jerry Cooper, Hans Dobson 2007, The benefits of pesticides to mankind and the environment, 2007, *Crop Protection* 26 , 1337–1348
- Ji, K.; Kim, S.; Han, S.; Seo, J.; Lee, S.; Park, Y.; Choi, K.; Kho, Y-L.; Kim, P-G.; Park, J.; Choi, K, 2012, Risk assessment of chlortetracycline, oxytetracycline, sulfamethazine, sulfathiazole, and erythromycin in aquatic environment: are the current environmental concentrations safe?, *Ecotoxicology*. 2012 Oct;21(7):2031-50
- Κυδωνάκης Γεώργιος-Χαράλαμπος Ε., Πτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, (2010)
- Kaczala, and Shlomo E. Blum, 2016, The Occurrence of Veterinary Pharmaceuticals in the Environment t : A Review, 12(3): 169–182.
- Karpouzas, D.G. and Singh, B.K. (2006), Microbial degradation of organophosphorus xenobiotics: metabolic pathways and molecular basis. *Advances in Microbial Physiology* 51: 119-186
- Katagi T. (2004) Photodegradation of Pesticides on Plant and Soil Surfaces. In: Ware G.W. (eds) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Continuation of Residue Reviews, vol 182. Springer
- Kim, K-R., Owens, G.; Kwon, S-I., So, K-H.; Lee, D-B., Ok, Y.S., 2011 Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water Air Soil Poll.*, 214, 163- 174
- Klaus Weiss , Walter Schüssler, Michael Porzelt,(2008). Sulfamethazine and flubendazole in seepage water after the sprinkling of manured areas. *Chemosphere*, 72 , 1292–1297
- Kolodziejaska, M.; Maszkowska, J.; Bialk-Bieli ska, A.; Steudte, S.; Kumirska, J.; Stepnowski, P.; Stolte, S. , 2013, Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. *Chemosphere*92, 1253-1259
- Kreuzig Robert , Katharina Blümlein, Sibylla Hltge, (2007). Fate of the Benzimidazole Antiparasitics Flubendazole and Fenbendazole in Manure and

Manured Soils. Institute of Ecological Chemistry and Waste Analysis, Braunschweig University of Technology, Braunschweig, Germany, 35 (5), 488 – 494

- ΛΑΓΟΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ , Πτυχιακή Διατριβή , ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, (2015).
- Λιτσκάς Δ. Βασίλειος Γεωπόνος M.Sc., Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης Κτηνιατρική Σχολή Τομέας Ζωικής Παραγωγής, Ιχθυολογίας, Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος (2013).
- Lapworth, D.J.; Baran, N.; Stuart, M.E.; Ward, R.S., 2012, Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate, and occurrence. *Environ. Poll.*, 163, 287-303
- M. Silvia Diaz-Cruz, Maria J. Lopez de Alda, Damia Barcelo, 2003, Principal routes of environmental exposure to drugs consumed in human and veterinary medicine, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, No. 6
- Martínez-Carballo, E.; González-Barreiro, C.; Scharf, S.; Gans, O., 2007, Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environ. Poll.*, 148, 570-579
- Parales RE, et al. (2008). "Bioavailability, Chemotaxis, and Transport of Organic Pollutants". *Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-17-2.
- Peng, X.; Huang, Q.; Zhang, K.; Yu, Y.; Wang, Z.; Wang, C. Distribution, behavior, and fate of azole antifungals during mechanical, biological, and chemical treatments in sewage treatment plants in China. *Sci. Total Environ.*, 2012, 426, 311-317
- R. Pal , K. Chakrabarti , A. Chakraborty and A. Chowdhury ,2006, Degradation and Effects of Pesticides on Soil Microbiological Parameters-A Review, *International Journal of Agricultural Research*| Volume: 1 | Issue: 3 | Page No.: 240-258
- Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D. et al. (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal* 1: 283-290.

- Schulz, J.; Ruddat, I.; Hartung, J.; Hamscher, G.; Kemper, N.; Ewers, C. 2015, Antimicrobial-resistant *Escherichia coli* survived in dust samples more than 20 years. *Front. Microbiol.* 7, 866.
- Shyam Prasad Gurram; Narasimha Rao Kollu; Girisham Sivadevuni; Madhusudan Reddy Solipuram,,2009, Biotransformation of Albendazole by *Cunninghamella blakesleeana*:Influence of Incubation Time, Media, Vitamins and Solvents, *Iranian Journal of Biotechnology*, Article 2, Volume 7, Issue 4, Autumn 2009, Page 205-215
- Sims G.K., Radosevich M., He X.T., Traina S.J. (1991) The Effects of Sorption on the Bioavailability of Pesticides. In: Betts W.B. (eds) *Biodegradation*. Springer Series in Applied Biology, pp 119-137
- Ter Laak TL, Gebbink WA, Tolls J (2006a) Estimation of sorption coefficients of veterinary medicines from soil properties. *Environ Toxicol Chem* 25:933–941
- Ter Laak TL, Gebbink WA, Tolls J (2006b) The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin and oxytetracycline to soil. *Environ Toxicol Chem* 25:904–911
- Topp Edward, Ralph Chapman, Marion Devers-Lamrani, Alain Hartmann, Romain Marti, Fabrice MartinLaurent, Lyne Sabourin, Andrew Scott, and Mark Sumarah, 2012)^[k1], Accelerated Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-degrading Microbacterium sp. *Journal of Environmental Quality Abstract - Organic Compounds in the Environment*, Vol. 42 No. 1, p. 173-178
- Tor, J., C. Xu, J. M. Stucki, M. Wander, G. K. Sims. 2000. Trifluralin degradation under micro-biologically induced nitrate and Fe(III) reducing conditions. *Chapter 32 Env. Sci. Tech.* 34:3148-3152.
- Torsvik V, Goksøyr J, Daae FL (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 56:782–787
- Wohde Manuel, Silvia Berkner , Thomas Junker , Sabine Konradi , Lisa Schwarz and Rolf-Alexander Düring, 2016, Occurrence and transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in manure: a literature review , *Environ Sci Eur.* 2016; 28(1): 23.

- Wu Min & Jiye Hu, 2013, Residue Analysis of Albendazole in Watermelon and Soil by Solid Phase Extraction and HPLC , Journal Analytical Letters ,Volume 47, 2014 - Issue 2, Pages 356-366
- Ziv Arbeli, Cilia L. Fuentes,(2007). Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. Crop Protection,26, 1733–1746
- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/albendazole#section=Drug-Classes>