

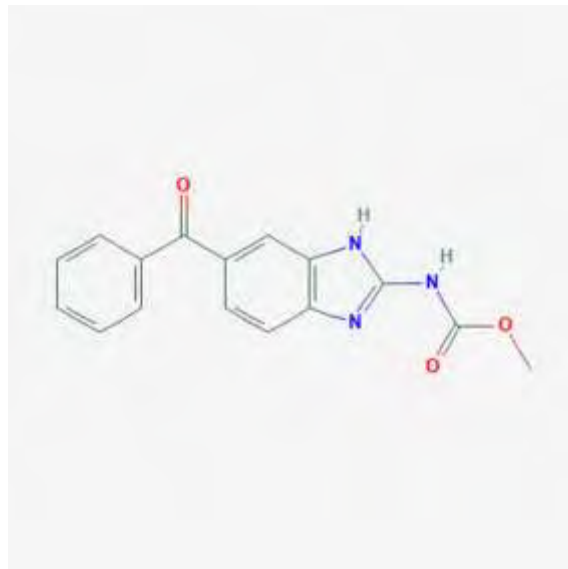


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**"Μελέτη της αποδόμησης και του μεταβολισμού
ανθελμινθικών βενζιμιδαζολικών από μια βακτηριακή
κοινοπραξία που έχει την ικανότητα να αποδομεί το
βενζιμιδαζολικό μυκητοκτόνο thiabendazole"**



ΓΚΟΥΡΟΜΠΙΝΟΣ ΗΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

"Μελέτη της αποδόμησης και του μεταβολισμού ανθελμινθικών βενζιμιδαζολικών από μια βακτηριακή κοινοπραξία που έχει την ικανότητα να αποδομεί το βενζιμιδαζολικό μυκητοκτόνο thiabendazole"

"Study of the degradation and metabolism of anthelmintic benzimidazoles by a bacterial consortium capable of degrading the benzimidazole fungicide thiabendazole."

Υπεύθυνος καθηγητής

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

Τριμελής επιτροπή

- Καρπούζας Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Οιχαλιώτης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Γονιμότητας και Βιολογίας Εδάφους, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ανθελμινθικά αποτελούν ομάδα αντιπαρασιτικών κτηνιατρικών φαρμάκων. Βρίσκουν εφαρμογή σε κτηνοτροφικές μονάδες, κυρίως σε μυρμηκαστικά ζώα, όπως πρόβατα και αίγες και σε σπανιότερες περιπτώσεις στον άνθρωπο. Τα βενζιμιδαζολικά αποτελούν μια από τις πιο σημαντικές ομάδες ανθελμινθικών τα οποία μετά την χορήγηση τους στα ζώα δεν μεταβολίζονται *in vivo* και απεκρίνονται στα κόπρανα και ούρα. Τα τελευταία χρησιμοποιούνται ως κοπριές σε γεωργικά εδάφη με αποτέλεσμα την απελευθέρωση βενζιμιδαζολικών σε γεωργικά εδάφη με κίνδυνο για το περιβάλλον. Κατά συνέπεια απαιτούνται μέθοδοι διαχείρισης των κοπριών πριν την εφαρμογή τους στα εδάφη. Έτσι στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η ικανότητα μιας βακτηριακής κοινοπραξίας που είχε την ικανότητα να αποδομεί το μυκητοκτόνο thiabendazole (TBZ), να αποδομεί τα λοιπά βενζιμιδαζολικά ανθελμινθικά fenbendazole, flubendazole, mebendazole, ricobendazole, albendazole σε υγρές καλλιέργειες όπου οι ανθελμινθικές ουσίες αποτελούσαν την μοναδική πηγή C. Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα αξιολόγησης της αποδομητικής ικανότητας της βακτηριακής κοινοπραξίας. Από το πρώτο πείραμα προέκυψε ότι η βακτηριακή κοινοπραξία ήταν ικανή αποδομεί ταχύτατα μόνο το thiabendazole, ενώ καταγράφηκε και μερική αλλά βραδεία αποδόμηση των albendazole, ricobendazole και fenbendazole. Αντίθετα δεν αποδομήθηκαν τα flubendazole και mebendazole τα οποία όπως και το fenbendazole εμφανίζουν στο μόριο τους αρωματικούς υποκαταστάτες συνδεδεμένους με την βενζολική ομάδα του βενζιμιδαζολικού δακτυλίου, σε αντίθεση με τα albendazole και ricobendazole που εμφανίζουν μια αλειφατική ομάδα συνδεδεμένη με την βενζολική ομάδα του βενζιμιδαζολικού δακτυλίου. Στο δεύτερο πείραμα εξετάστηκε η βελτιστοποίηση της αποδομητικής ικανότητας της βακτηριακής κοινοπραξίας έναντι των albendazole και fenbendazole μέσω της συστηματικής προσθήκης TWEEN 20 για την βέλτιστη διαλυτοποίηση των δυσδιάλυτων ανθελμινθικών ουσιών. Πράγματι η προσθήκη TWEEN 20 βελτίωσε δραματικά την αποδομητική ικανότητα της βακτηριακής κοινοπραξίας έναντι των albendazole και fenbendazole με τις τιμές DT_{50} να εμφανίζουν σημαντική μείωση από τις 67,6 και 224 ημέρες (πρώτο πείραμα) σε 6,7 και 28,3 ημέρες αντίστοιχα. Η αποδόμηση του albendazole οδήγησε στην παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων albendazole sulfoxide και χαμηλότερες ποσότητες albendazole sulfone οι οποίες ήταν σημαντικά υψηλότερες παρουσία της βακτηριακής κοινοπραξίας καταδεικνύοντας των ρόλο των μικροοργανισμών στα συγκεκριμένα μεταβολικά βήματα.

ABSTRACT

Anthelmintics are a group of anti-parasitic veterinary drugs. They find application in livestock units, mainly in ruminant animals, such as sheep and goats, and in rare cases in humans. Benzimidazoles are one of the most important groups of anthelmintics that, after being administered to animals, are not metabolised *in vivo* and are excreted in the faeces and urine. The latter are used as manure in agricultural soils, resulting in the release of benzimidazolates in agricultural soils with a risk to the environment. Therefore, manure management methods are required prior to application to the soil. Thus, in the present study, the ability of a bacterial consortium, which was able to decompose the thiabendazole fungicide (TBZ), to degrade the other benzimidazole anthelmintics of fenbendazole, flubendazole, mebendazole, ricobendazole, albendazole was examined, in liquid cultures where anthelmintics constituted the sole source of C. Two experiments have been carried out to assess the destruction capacity of the bacterial consortium. The first experiment showed that the bacterial consortium was capable of rapidly degrading only thiabendazole, while partial but slow degradation of albendazole, ricobendazole and fenbendazole was also recorded. In contrast, flubendazole and mebendazole have not been degraded which, like fenbendazole, exhibit in their molecule aromatic substituents linked to the benzoyl group of the benzimidazole ring, unlike albendazole and ricobendazole having an aliphatic group attached to the benzoyl group of the benzimidazole ring. In the second experiment, optimization of the bacterial consortium's degradation capacity against albendazole and fenbendazole was examined by the systemic addition of TWEEN 20 to optimally dissolve the sparingly soluble anthelmintic substances. Indeed, the addition of TWEEN 20 dramatically improved the bacterial pool's degradation capacity against albendazole and fenbendazole with DT50 values showing a significant decrease from 67.6 and 224 days (first experiment) to 6.7 and 28.3 days, respectively. The degradation of albendazole resulted in the production of significant amounts of albendazole sulfoxide and lower amounts of albendazole sulfone which were significantly higher in the presence of the bacterial consortium demonstrating the role of microorganisms in these metabolic steps.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο Πρώτο

1. Εισαγωγή
 - 1.1. Περιβαλλοντική Ρύπανση..6
 - 1.2. Ανθελμινθικά.8
 - 1.2.1. Avermectin..10
 - 1.2.2. Βενζιμιδαζολικά..13
 - 1.2.2.1. Thiabendazole(TBZ)..13
 - 1.2.2.2. Fenbendazole..15
 - 1.2.2.3. Flubendazole..15
 - 1.2.2.4. Mebendazole..16
 - 1.2.2.5. Albendazole..18
 - 1.2.2.6. Ricobendazole..19
 - 1.3. Στόχος της πτυχιακής διατριβής...20

Κεφάλαιο Δεύτερο

2. Υλικά και μέθοδοι
 - 2.1. Βακτηριακή Κοινοπραξία..21
 - 2.2. Θρεπτικά Μέσα..21
 - 2.3. Ανάλυση ανθελμινθικών σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης..22
 - 2.3.1. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων ανθελμινθικών ουσιών..22
 - 2.3.2. Εκχύλιση ανθελμινθικών ουσιών..22
 - 2.3.3. Προσδιορισμός των υπολειμμάτων των ανθελμινθικών σε σύστημα HPLC..23
 - 2.4. Μελέτη της αποδόμησης των ανθελμινθικών από την βακτηριακή κοινοπραξία – Πείραμα 1..23
 - 2.5. Μελέτη της αποδόμησης των ανθελμινθικών από την βακτηριακή κοινοπραξία – Πείραμα 2..24
 - 2.6. Υπολογισμός DT50 των ανθελμινθικών φαρμάκων..24

Κεφάλαιο τρίτο

3. Αποτελέσματα
 - 3.1. Πείραμα 1..25
 - 3.2. Πείραμα 2..31

Κεφάλαιο Τέταρτο

4. Συζήτηση..36
5. Βιβλιογραφία..38

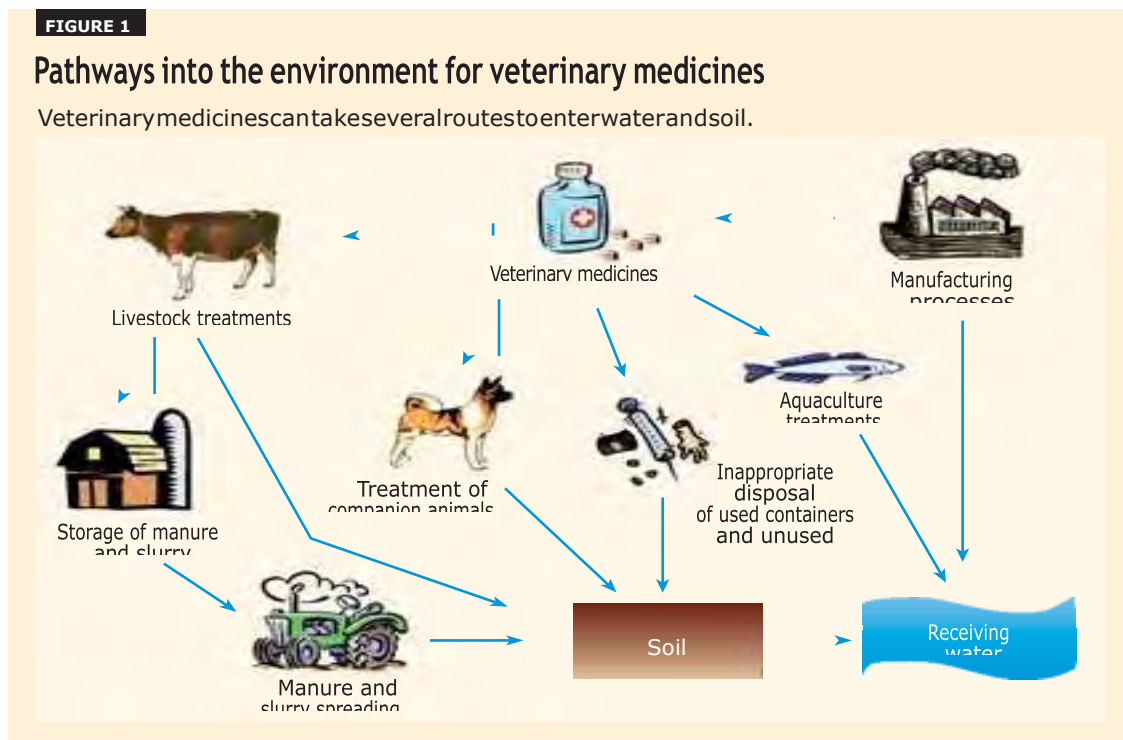
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Περιβαλλοντική Ρύπανση

Στις περισσότερες αναπτυγμένες βιομηχανικά χώρες καταναλώνονται ετησίως τόνοι γεωργικών και κτηνιατρικών φάρμακων για την καταπολέμηση εχθρών και ασθενειών (φυτών και ζώων). Τα φαρμακευτικά προϊόντα όμως, τα οποία παράγονται για να αλληλεπιδράσουν με ζώντες οργανισμούς, μπορούν να έχουν οξεία επίδραση στην πανίδα και την χλωρίδα, αλλά λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων, αυτό δεν θα είναι το μεγαλύτερο πρόβλημα (Jones et al., 2004). Η συνεχής χαμηλή εισροή φαρμάκων μπορεί να προκαλέσει ανεπαίσθητες χρόνιες μεταβολές που είναι δύσκολο να ανιχνευθούν (Daughton and Ternes, 1999), ενώ μια άλλη ανησυχία είναι ότι τα φαρμακευτικά προϊόντα θα υπάρχουν σε μείγματα που προκαλούν απροσδόκητες αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον (Daughton and Ternes, 1999, Jones et al., 2004).

Παρόλα αυτά, μόλις πρόσφατα δόθηκε προσοχή στην μελέτη της περιβαλλοντικής τύχης των κτηνιατρικών φαρμάκων, με μελέτες για τη μετακίνηση τους σε εδαφικές στήλες (Kay et al. 2005a, 2005b, Drillia et al. 2005) καθώς και σε πειράματα πεδίου (Kay et al. 2005c, Kreuzig and Holtge 2005, Kreuzig et al. 2005, Fernandez et al. 2011). Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές αναφορές σχετικά με την εμφάνιση υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων στα λύματα, στα επιφανειακά ύδατα, στα υπόγεια ύδατα και στο έδαφος (Van De Steene et al 2010). Οι ποικίλοι ρύποι του εδάφους, μεταξύ των οποίων και τα κτηνιατρικά φάρμακα, μπορεί να μεταφερθούν στα υδάτινα οικοσυστήματα με την επιφανειακή απορροή και τη στράγγιση του εδάφους. Η μεταφορά αυτή εξαρτάται από τις ιδιότητες του ρύπου, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους αλλά και από περιβαλλοντικές παραμέτρους (Αντωνόπουλος 1999, 2001) όπως οι κλιματικές συνθήκες (π.χ. ύψος και ένταση βροχής, θερμοκρασία).



Σχήμα 1: Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks?, *Environmental Science and Technology*, August 2003

Τα κτηνιατρικά φάρμακα ανεξάρτητα από την οδό της χορήγησης τους (από το στόμα, ενέσιμα, με επίπαση ή ενστάλαξη) απεκκρίνονται από το σώμα του ζώου με τα κόπρανα και τα ούρα, καταλήγοντας στο περιβάλλον. Στην εντατική εκτροφή το μίγμα κοπράνων, ούρων και πιθανόν αχυροστρωμνής (κοπριά) είτε εφαρμόζεται αμέσως στους αγρούς είτε παραμένει για κάποιο χρονικό διάστημα στο χώρο της εκτροφής. Τα κτηνιατρικά φάρμακα που περιέχονται στην κοπριά μπορεί να διασπαστούν κατά το διάστημα της παραμονής τους στην κοπροσωρό. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν λιγοστές δημοσιεύσεις για τη διάσπαση των φαρμάκων στην κοπριά και εντοπίζονται κυρίως στα αντιβιοτικά (Loke et al. 2000, Teeter and Meyerhoff 2003, Kolz et al. 2005). Οι β-λακτάμες και τα μακρολίδια θεωρείται ότι διασπώνται σχετικά γρήγορα στην κοπριά ανεξάρτητα από το είδος του ζώου από όπου προέρχονται, ενώ οι αβερμεκτίνες και οι τετρακυκλίνες δεν διασπώνται τόσο εύκολα (Boxall 2010). Η διάσπαση των κτηνιατρικών φαρμάκων στην κοπριά διαφέρει από αυτή στο έδαφος καθώς οφείλεται περισσότερο στους αναερόβιους μικροοργανισμούς, ενώ στο έδαφος κυριαρχεί συνήθως η αερόβια διάσπαση (Blackwell et al. 2005). Τα κτηνιατρικά φάρμακα είναι δυνατό επίσης να δεσμεύονται στις επιφάνειες των οργανικών και ανόργανων υλικών της κοπριάς και του εδάφους, με αποτέλεσμα να ακινητοποιούνται.

Ιδιαίτερη περίπτωση αποτελούν τα παρασιτοκτόνα φάρμακα που χορηγούνται με επίπαση ή ενστάλαξη (εφαρμογή σκόνης ή διαλύματος του φαρμάκου) στην επιφάνεια του σώματος των ζώων. Στις εντατικές εκτροφές, τα φάρμακα αυτά καταλήγουν στο περιβάλλον με το ξέπλυμα των ζώων λόγω βροχής ή με την είσοδό τους σε υδατοσυλλογές. Επιπλέον, είναι διαδεδομένη η χρήση των λουτρών αποπαρασιτισμού (στην προβατοτροφία) τα νερά των

οποίων καταλήγουν στο φυσικό περιβάλλον. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα φάρμακα αποτίθενται άμεσα στο έδαφος και στα επιφανειακά νερά με αποτέλεσμα οι αντίστοιχοι οργανισμοί μη-στόχοι να εκτίθενται τοπικά σε υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκων (Halling-Sorenson et al. 1998, Pope 2009). Ως αποτέλεσμα των παραπάνω πρακτικών προκύπτουν υπολείμματα κτηνιατρικών φαρμάκων που προσροφούνται ισχυρά στα συστατικά του εδάφους. Ελάχιστα είναι γνωστά περί της τύχης και των επιπτώσεων που έχουν τα δεσμευμένα υπολείμματα των κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον (Boxall 2010) ενώ η διάσπαση των φαρμάκων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία νέων χημικών ουσιών (μεταβολιτών) στο έδαφος, οι οποίες πιθανόν να είναι περισσότερο ευκίνητες, τοξικές ή και περισσότερο ανθεκτικές σε παραπέρα διάσπαση και πιθανόν προκαλούν μεγαλύτερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις από τις μητρικές φαρμακευτικές ουσίες.

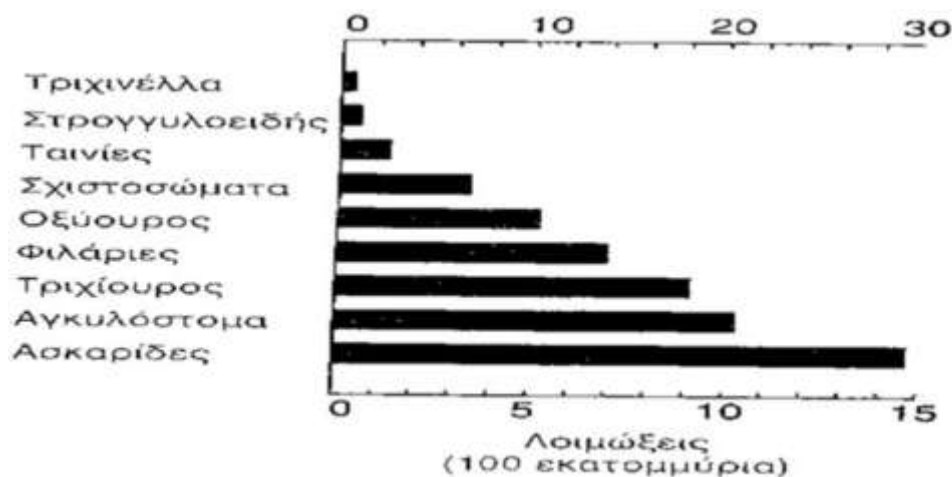
Η έλλειψη συγκριτικών και ποσοτικών στοιχείων σχετικά με τις επιδράσεις των κτηνιατρικών φαρμάκων και συγκεκριμένα της υπολειμματικότητας τους σε απεκκρίματα και ως συνέχεια σε εδάφη, είναι εμφανής. Έτσι, στόχος αυτής της διπλωματικής μελέτης είναι ο προσδιορισμός της αποδόμησης μια συγκεκριμένης ομάδας κτηνιατρικών φαρμάκων με ανθελμινθική δράση, από μια βακτηριακή κοινοπραξία που αποδεδειγμένα αποδομεί το υπολειμματικό μυκητοκτόνο-ανθελμινθικό TBZ. Τα ανθελμινθικά αυτά κτηνιατρικά φάρμακα ανήκουν στην οικογένεια των βενζιμιδαζολών και μελετήθηκαν τα εξής έξι: TBZ, fenbendazole, flubendazole, mebendazole, ricobendazole και albendazole, τα οποία χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στην καταπολέμηση παρασιτικών σκωλήκων (έλμινθες).

1.2. Ανθελμινθικά

Τρεις κυρίως ομάδες ελμίνθων (ή σκωλήκων) μολύνουν τους ανθρώπους: οι νηματώδεις, οι τρηματώδεις και οι κεστώδεις. Τα ανθελμινθικά φάρμακα στοχεύουν στην αναστολή μεταβολικών ή βιοχημικών διεργασιών που υπάρχουν στο παράσιτο αλλά είτε λείπουν από τον ξενιστή είτε έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά από αυτόν. Τα ανθελμινθικά είναι φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία προσβολών από παρασιτικούς σκώληκες όπως πλατυέλμινθες (flatworms) π.χ. τρηματώδης σκώληκες και ταινιοσκώληκες καθώς και ασκαρίδες (round worms). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά ότι 2 δις άνθρωποι προσβάλλονται από παρασιτικές λοιμώξεις από παρασιτικούς σκώληκες. Παρασιτικοί σκώληκες μολύνουν επίσης παραγωγικά ζώα επηρεάζοντας αρνητικά την κτηνοτροφική παραγωγή αλλά και κατοικίδια ζώα. Παρά την σημαντικότητα του προβλήματος, η χρήση κτηνιατρικών ανθελμινθικών φαρμάκων είναι περιορισμένη παγκοσμίως και στηρίζεται σε ένα μικρό αριθμό ουσιών. Η κατάσταση αυτή έχει επιδεινωθεί κατά τα τελευταία έτη από την υψηλή αποτελεσματικότητα του ivermectin (Geary, 2005), η οποία έχει περιορίσει σε σημαντικό βαθμό τις προσπάθειες ανεύρεσης νέων ανθελμινθικών φαρμάκων (Geary et al., 1999). Η κατάσταση αυτή έχει οδηγήσει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στη δράση των ανθελμινθικών φαρμάκων. Τα ανθελμινθικά ευρέως φάσματος είναι αποτελεσματικά έναντι παρασιτικών πλατυελμίνθων και νηματωδών. Εντούτοις, η πλειονότητα των φαρμάκων εμφανίζουν πιο περιορισμένη δράση. Οι νηματώδεις είναι επιμήκεις νηματέλμινθες που έχουν

πλήρες πεπτικό σύστημα, με στόμα και πρωκτό. Προκαλούν λοιμώξεις του εντέρου, καθώς και του αίματος και των ιστών. Η παρακάτω λίστα παρουσιάζει περιληπτικά τις λοιμώξεις που προκαλούν οι νηματώδεις και τις συνήθεις θεραπείες γι' αυτές:

- **Ογκοκέρκωση** (ποταμία τύφλωση): Παρασιτική νόσος των ανθρώπων, που οφείλεται στο νηματοσκώληκα *Onchocerca volvulus*. Άλλα είδη ογκόκερκων είναι : *O. cervicalis*, *O. gibsoni*, *O. lienalis*, που παρασιτούν και άλλα θηλαστικά. Χαρακτηρίζεται από υποδόρια οζίδια, κνηδωτικό δερματικό εξάνθημα και οφθαλμικές βλάβες που συχνά καταλήγουν σε τύφλωση. Μέθοδος θεραπείας: εφαρμογή ivermectin
- **Οξουρίαση ή εντεροβίωση**: προκαλείται από το είδος *Enterobius vermicularis*. Είναι από τους πλέον συνήθεις νηματώδεις σκώληκες και παρασιτεί κυρίως σε παιδιά. Χαρακτηρίζεται από αίσθημα κόπωσης, απώλεια ορέξεως, κνησμό (και λόγω αυτού αϋπνία) και σπανιότερα αλλεργικές διαταραχές, νυκτερινή ενούρηση, ναυτία, κοιλιακοί πόνοι. Μέθοδος θεραπείας: εφαρμογή mebendazole
- **Ασκαριδίαση ή Λέβιθα**: προκαλείται από εντεροσκώληκα του είδους *Ascaris lumbricoides*, ο οποίος ανήκει στην κατηγορία των νηματωδών ελμίνθων. Ο σκώληκας προσβάλλει μόνο τον άνθρωπο και η μόλυνση είναι σοβαρότερη στα παιδιά. Μέτα την κατάποση οι νύμφες αναπτύσσονται στο έντερο προκαλώντας κοιλιακά συμπτώματα, συμπεριλαμβανομένης και της εντερικής απόφραξης. Οι σκώληκες μπορούν να περάσουν στο αίμα και να προσβάλουν τους πνεύμονες. Μέθοδος θεραπείας: Εφαρμογή mebendazole
- **Τριχίνωση**: Προκαλείται από σκώληκες του είδους *Trichinella spiralis* που ζει στο έντερο των περισσότερων ζώων που τρέφονται με κρέας. Μέθοδος θεραπείας: Εφαρμογή TBZ
- **Τριχιουρίαση**: Προκαλείται από το είδος *Trichuris trichiura*. Η λοίμωξη είναι συνήθως ασυμπτωματική όμως μπορούν να προκληθούν κοιλιακοί πόνοι, διάρροια και τυμπανισμός. Μέθοδος θεραπείας: Εφαρμογή albendazole, mebendazole και ivermectin
- **Αγκυλοστομίαση**: βαριά μολυσματική πάθηση του επιθηλίου του λεπτού εντέρου του ανθρώπου που προκαλείται από τον νηματώδη σκώληκα *Ancylostoma duodenale* και *Necator americanus*. Μέθοδος θεραπείας: Εφαρμογή albendazole, mebendazole
- **Στρογγυλοειδίαση**: Προκαλείται από ασκαρίδια του είδους *Strongyloides stercoralis*. Μέθοδος θεραπείας: Εφαρμογή TBZ

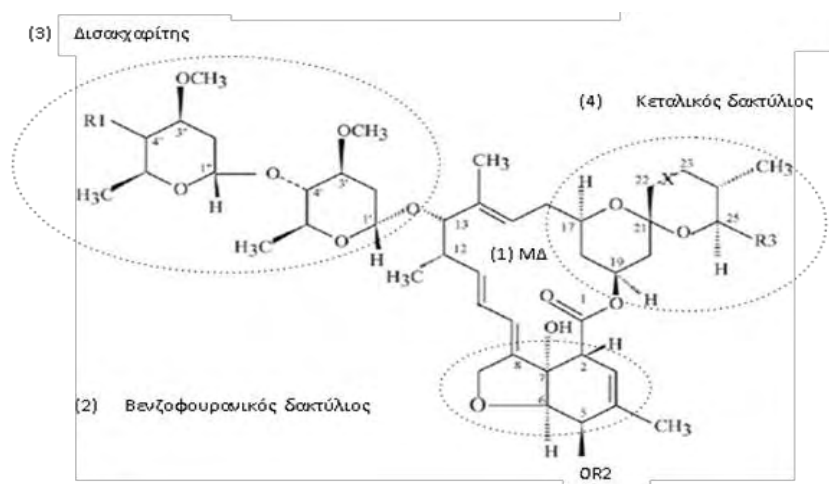


Εικόνα 2: Αριθμός επιβεβαιωμένων λοιμώξεων από τα διάφορα είδη σκωλήκων παγκοσμίως

1.2.1. Avermectin

Οι αβερμεκτίνες είναι μακροκυκλικές λακτόνες που παράγονται με ζύμωση του εδαφικού μικροοργανισμού *Streptomyces avermitilis*. Οι αβερμεκτίνες χαρακτηρίστηκαν ως εξαιρετικά ανθελμινθικά φάρμακα. Δομικά, όλες οι αβερμεκτίνες αποτελούνται από έναν 16-μελή μακροκυκλικό δακτύλιο. Αποδείχθηκαν αρχικά ότι κατέχουν ανθελμινθική δραστηριότητα το 1979 (Burg et al., 1979) και δρουν ως αναστολείς των διαύλων χλωρίου. Οι Arena et al. (1995) έδειξαν στα έντομα ότι η διέγερση των γλουταμικών (ανασταλτικών) διαύλων χλωρίου είναι η πλέον ευαίσθητη θέση στόχου για τις αβερμεκτίνες. Δείχνουν δραστηριότητα έναντι ευρέος φάσματος νηματωδών και παρασιτικών αρθροπόδων κατοικίδιων ζώων σε δόσεις 300 μg/kg ή μικρότερες. Με χορήγηση δια του στόματος ή παρεντερικώς, οι αβερμεκτίνες είναι δραστικές έναντι γαστρεντερικών νηματωδών και πνευμονικών σκουληκιών και σημαντικών εκτοπαρασίτων όπως ψείρες, ακάρεα, κρότωσης και στάδια προνυμφών των μυγών. Έχουν εξαιρετική δραστηριότητα έναντι παρασίτων ανθεκτικών σε υπάρχοντα ανθελμινθικά ή εκτοπαρασιτοκτόνα. Οι αβερμεκτίνες φαίνεται να προκαλούν παράλυση νηματωδών και αρθροπόδων με το άνοιγμα των διαύλων του GABA στη νευρομυϊκή σύναψη ενώ πέραν από ανθελμινθική έχουν και ισχυρή εντομοκτόνο δράση. Στα σπονδυλωτά, οι αβερμεκτίνες δεσμεύονται στον υποδοχέα του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA). Ανοίγουν το κανάλι χλωρίου στον υποδοχέα του GABA ύστερα από την πρόσδεση τους στη θέση αναγνώρισης του GABA (πρωτεΐνη υποδοχέα) και δρουν ως μερικοί αγωνιστές (Abalis et al, 1986). Τα ιόντα χλωρίου ρέουν τότε στον μετασυναπτικό νευρώνα. Αυτή η αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης σε χλώριο μπορεί να καταστήσει ιδιαίτερα υψηλό και αρνητικό το δυναμικό της μεμβράνης, το οποίο έχει επιβραδυντικό αποτέλεσμα στην πυροδότηση των νευρικών παλμών. Υπάρχει επίσης μια αναστρέψιμη δοσοεξαρτώμενη αύξηση της διαπερατότητας των ιόντων χλωρίου παρουσία πολύ μικρών δόσεων αβερμεκτινών. Συγκεκριμένα, το υδρογονωμένο προϊόν της αβερμεκτίνης, 22,23-διυδροαβερμεκτίνης B1 (ιβερμεκτίνη), χρησιμοποιείται ως σημαντικό αντιμικροβιακό φάρμακο στην κτηνιατρική καθώς και για τον έλεγχο της ογκοκρακτάσης, της λεμφικής φιλαριώσεως, της ισχυροειδοειδούς και της ψώρας σε ανθρώπους. Οι

αβερμεκτίνες είναι δισακχαρίτες (ιβερμεκτίνη, δοραμεκτίνη) ή μονοσακχαρίτες (σελαμεκτίνη), ενώ οι μιλπεμυκίνες (οξίμη μιλβεμυκίνης και μοξιδεκτίνη) δεν έχουν υποκαταστάτες σακχάρων.



Εικόνα 3: Χημική δομή του μορίου των αβερμεκτινών (ΜΔ: Μακροκυκλικός Δακτύλιος)

Πίνακας 1: Φυσικοχημικές ιδιότητες των αβερμεκτινών (πηγή <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/index.html>)

Παράμετρος	Ivermectin	Eprinomectin	Emamectin
Μοριακό βάρος (g/mol)	875	900.1	994.2-1008.3
Kow	1651	-	100000
Υδατοδιαλυτότητα (mg/l)	4	-	24
DT50 φωτόλυση (ημέρες)	<0.5	-	32
DT50 (ημέρες)	112	64	300
Τάση ατμών (mm Hg)	<1,5x10 ⁻⁹	-	3x10 ⁻⁸

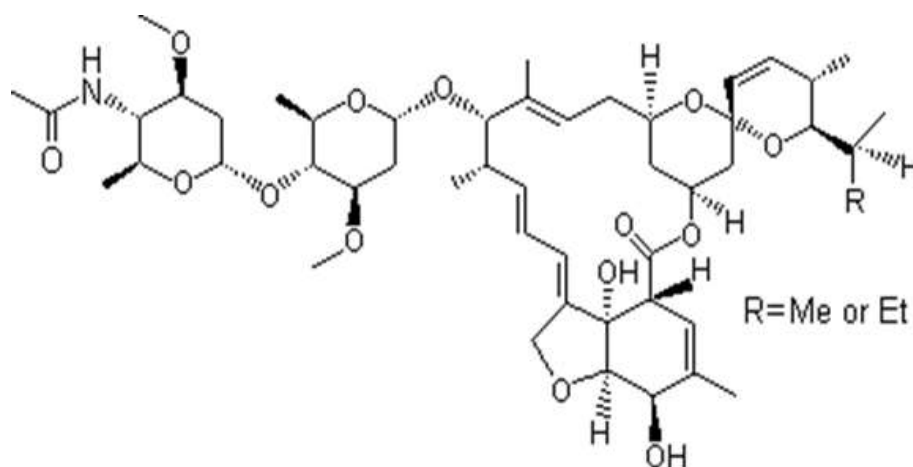
Δεν έχει αναφερθεί ως σήμερα ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός ανθεκτικών παρασίτων σε ανθελμινθικά σε κατοικίδια. Αντιθέτως ανθεκτικότητα έναντι των ανθελμινθικών έχει καταγραφεί συχνά σε ενδοπαράσιτα των μηρυκαστικών, συμπεριλαμβανομένων των αιγοπροβάτων και των βοοειδών. Η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αβερμεκτίνες (ivermectin) και μιλπεμυκίνες (moxidectin) ελαττώνεται με τη χορήγηση του αναστολέα διαύλων ιόντων ασβεστίου verapamil.

Ivermectin: Το ivermectin είναι ένα κτηνιατρικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία πολλών τύπων παρασιτικών προσβολών όπως strongyloidiasis, trichuriasis και lymphatic filariasis . Ανακαλύφθηκε

το 1975 και η χρήση της ξεκίνησε το 1981. Ανήκει στις μακροκυκλικές λακτόνες που προέρχονται από το βακτήριο *Streptomyces avermitilis*. Το ivermectin σκοτώνει δρώντας στο νευρικό σύστημα και τη μυϊκή λειτουργία, ιδιαίτερα με την ενίσχυση της ανασταλτικής νευροδιαβίβασης. Το φάρμακο συνδέεται με τους διαύλους χλωριούχου γλουταμινικού (GluCl_s) στις μεμβράνες των ασπόνδυλων νευρικών και μυϊκών κυττάρων, προκαλώντας αυξημένη διαπερατότητα στα ιόντα χλωρίου, με αποτέλεσμα την κυτταρική υπερπολική πόλωση, ακολουθούμενη από παράλυση και θάνατο (Mehlhorn et al., 2008). Σχετικά με την υπολειμματικότητα του ivermectin, μελέτες πεδίου έδειξαν ότι η κοπριά των ζώων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ivermectin παρουσιάζει μια σημαντικά μειωμένη ποικιλότητα ασπόνδυλων και η κοπριά εμμένει περισσότερο. Ως αποτέλεσμα το ivermectin μεταφέρεται από την κοπριά στο έδαφος. Αυτό αποδείχθηκε από νεώτερες μελέτες όπου οι Nessel et al. (1989) στις ΗΠΑ μέτρησαν συγκεντρώσεις ivermectin 0,1 – 2 μg/kg στο έδαφος (έως 10 cm βάθος) αγελαδοτροφικής μονάδας, 28 ημέρες έπειτα από τη θεραπευτική αγωγή (200 μg/kg Z.B.). Επίσης, οι Boxall et al. (2006b) εντόπισαν, μεταξύ άλλων, ivermectin σε γεωργικά και κτηνοτροφικά εδάφη. Το ivermectin μεταφέρεται κυρίως με την επιφανειακή απορροή (Kay et al. 2005c, Kreuzig et al. 2005, Fernandez et al. 2011).

Eprinomectin: Η eprinomectin (4 "-επι-ακετυλαμινο-4" -δεοξυ-αβερμεκτίνη B1) είναι μια νέα αβερμεκτίνη που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση παρασίτων σε βοοειδή, συμπεριλαμβανομένων και γαλακτοφόρων αγελάδων. Το eprinomectin είναι φάρμακο ευρέος φάσματος και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση: (1) των ασκαριδών του εντέρου π.χ. *Haemonchus placei*, *Ostertagia ostertagi*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus longispicularis*, *Cooperia onchophora*, *Cooperia punctata*, *Cooperia surnabada*, *Nematodirus helvetianus*, *Oesophagostomum radiatum*, *Bunostomum phlebotomum*, *Strongyloides papillosus*, *Trichuris spp.*, (2) των σκωλήκων του πνεύμονα π.χ. *Dictyocaulus viviparus*, (3) των προνυμφών των εντόμων π.χ. *Hypoderma lineatum*, *Hypoderma bovis*, (4) των ψειρών π.χ. *Damalia bovis*, *Linognathus vituli*, *Haematopinus eurysternus*, *Solenopotes capillatus*, (5) των ακάρεων της ψώρας π.χ. *Chorioptes bovis*, *Sarcoptes scabiei* και (6) των εντόμων π.χ. *Haematobia irritans*. Το eprinomectin εμφανίζει μεγάλη χρονική διάρκεια δράσης, εμποδίζοντας την εμφάνιση των ακάρεων της ψώρας έως και 8 εβδομάδες και είναι δραστική κατά των σκωλήκων του πνεύμονα για 21 ημέρες μετά από την εφαρμογή. Η μεγάλη δέσμευσή (>99%) του eprinomectin από τις πρωτεΐνες του αίματος των βοοειδών (EMA 1996) το καθιστά ως ένα από τα αντιπαρασιτικά φάρμακα επιλογής στη θεραπεία των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής. Η συνιστώμενη δόση για τη θεραπεία κατά των νηματωδών και αρθροπόδων παρασίτων στα βοοειδή, για τα οποία προς το παρόν έχει άδεια κυκλοφορίας το φάρμακο, είναι 0,5 mg ΕΠΜ/kg Z.B. Εφαρμόζεται εξωτερικά με ενστάλαξη (pour on) κατά το μήκος της σπονδυλικής στήλης του ζώου. Η θεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί μέχρι και δύο φορές το έτος

π.χ. όταν τα ζώα οδηγούνται στις βοσκές και όταν απομακρύνονται από αυτές. Συνήθως, διπλή θεραπεία εφαρμόζεται στα νεαρότερης ηλικίας ζώα τα οποία θεωρούνται πιο ευαίσθητα στα παράσιτα (Merck 1996).

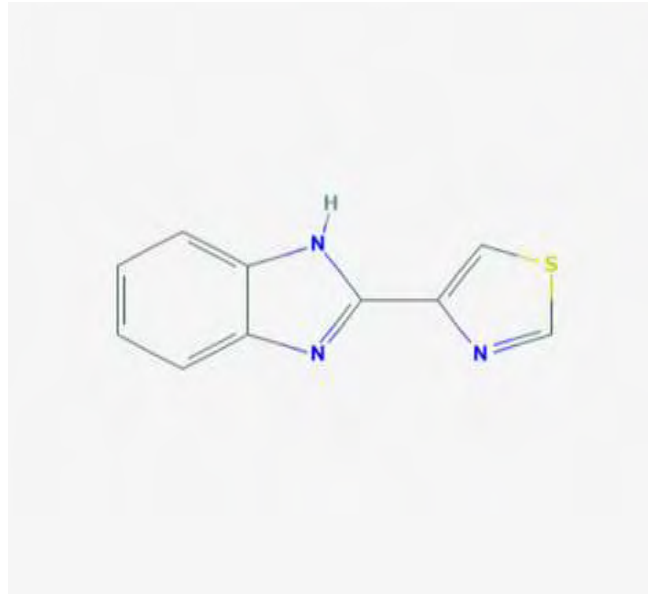


Εικόνα 4: Χημική δομή του eprinomectin (R=C₂H₅ για την B1a και R=CH₃ για την B1b).

1.2.1. Βενζιμιδαζολικά

Είναι τα παράγωγα της βενζιμιδαζόλης που εμφανίζουν μυκητοκτόνο και ανθελμινθική δράση. Το πιο γνωστό μυκητοκτόνο της ομάδας αυτής είναι το benomyl που ανακαλύφθηκε το 1963 από τους Delp και Kloring. Ο πυρήνας βενζιμιδαζολίου είναι μία από τις βιοδραστικές ετεροκυκλικές ενώσεις που παρουσιάζουν μια σειρά βιολογικών δραστηριοτήτων. Συγκεκριμένα, αυτός ο πυρήνας είναι συστατικό της βιταμίνης B12 (O'Neil et al., 2001). Οι φαρμακολογικές δράσεις του τμήματος που περιέχει βενζιμιδαζόλιο έχουν τεκμηριωθεί σε μεγάλο βαθμό (Amari et al., 2002). Τα Albendazole, Mebendazole και Thiabendazole χρησιμοποιούνται ευρέως ως ανθελμινθικά φάρμακα (Kohler, 2001). Η δράση ενάντια στα βακτήρια, τους μύκητες και τους παρασιτικούς έλμινθες οδήγησε στον τρόπο δράσης τους, ο οποίος είχε ως αποτέλεσμα την απόφραξη των μικροσωληνίσκων των παρασιτικών νηματωδών, τρεματωδών και κεστοειδών σκωλήκων (Campbell and Denham, 1983). Τα κυριότερα μέλη της ομάδας των βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών είναι τα παρακάτω:

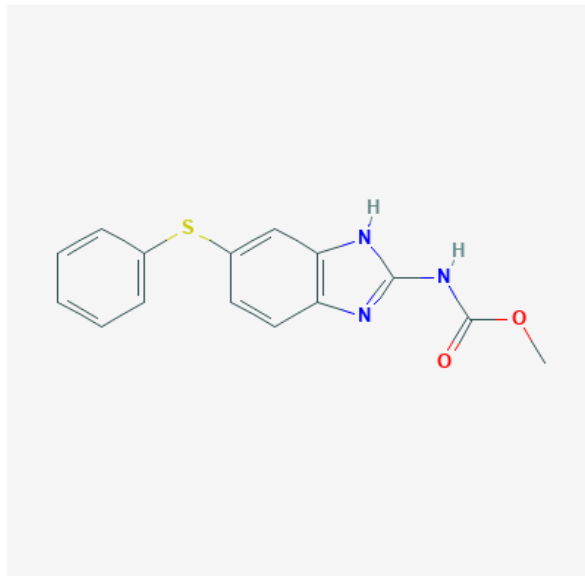
Thiabendazole(TBZ): Το TBZ είναι ένα μυκητοκτόνο και παρασιτοκτόνο φάρμακο που ανήκει στην οικογένεια των βενζιμιδαζολικών. Εισήχθη για πρώτη φορά το 1962. Είναι μια χημική ένωση με μοριακό τύπο C₁₀H₇N₃S, μοριακό βάρος 201,3 g/mol και δομή που φαίνεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Χημική δομή TBZ

Βρίσκει εφαρμογή ως μυκητοκτόνο και παρασιτοκτόνο κυρίως στην βιομηχανία τροφίμων καθώς εφαρμόζεται μετασυλλεκτικά. Συγκεκριμένα εφαρμόζεται σε φρούτα και λαχανικά στα οποία αναπτύσσονται μύκητες ως αποτέλεσμα μακράς μεταφοράς και αποθηκευσής τους. Το TBZ είναι δραστικό έναντι ποικιλίας νηματωδών. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως, το TBZ αναστέλλει την ειδική για το ελμινθικό μιτοχονδριακό ένζυμο φουμαρική αναγωγή, αναστέλλοντας έτσι τον κύκλο του κιτρικού οξέος, τη μιτοχονδριακή αναπνοή και την επακόλουθη παραγωγή του ATP, οδηγώντας τελικά στον θάνατο του έλμινθα. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι το TBZ μπορεί να οδηγήσει στην αναστολή του πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων με δέσμευση στη β-τουμπουλίνη, η οποία είναι αποτελεσματική για την αντιμετώπιση της στρογγυλοειδίασης και των αρχικών σταδίων της τριχίνωσης. Αν και σχεδόν αδιάλυτο στο νερό, το TBZ απορροφάται γρήγορα όταν χορηγείται από το στόμα. Το φάρμακο υδροξυλιώνεται στο ήπαρ και απεκκρίνεται με τα ούρα. Σε όξινα υδατικά διαλύματα πρωτονιόνεται ενώ σχηματίζει και υδατοδιαλυτά σύμπλοκα με διάφορα μέταλλα του εδάφους όπως Cu, Zn, Co και Ni. Η μυκητοκτόνος δράση των συμπλοκών είναι τουλάχιστον ίση με του TBZ. Όταν εκτίθεται σε ηλιακό φως ή φως UV παράγει βενζιμιδαζόλη-2-καρβοξαμίδη και βενζιμιδαζόλη. Η φωτοαποδόμηση του TBZ διεγείρεται ελαφρά από φωτοευαίσθητοποιητές όπως η ριβοφλαβίνη και το ξανθένιο ενώ είναι δεν εμφανίζει μεγάλη κινητικότητα στο έδαφος και απορροφάται έντονα σε πηλώδη εδάφη. Η προσρόφηση του TBZ στα υδρομορφικά αυτά εδάφη καθώς και σε αργιλώδη και ιζηματογενή εδάφη είναι ανάλογη με τις ικανότητες ανταλλαγής κατιόντων (CEC) και τα οργανικά περιεχόμενα των εδαφών. Η αποδόμηση του TBZ στα εδάφη φαίνεται να εξαρτάται από τη θερμοκρασία, καθώς αποδομείται ταχύτερα όσο αυξάνεται η θερμοκρασία και οφείλεται κυρίως στη βιολογική εδαφική δραστηριότητα (Francis A. Gunther, 2012)

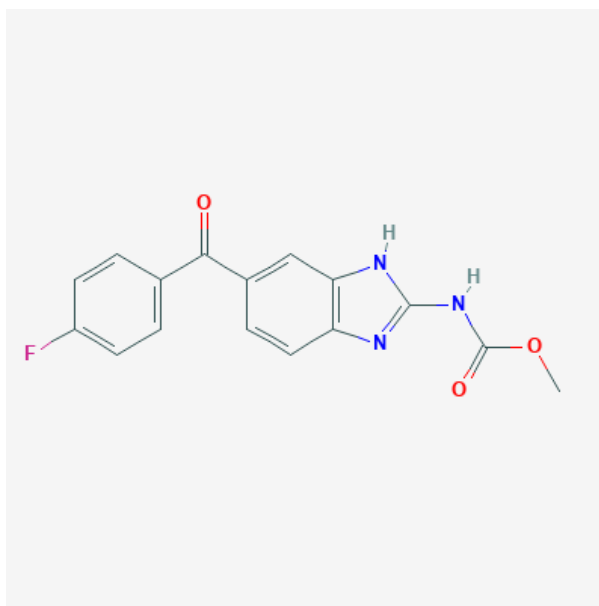
Fenbendazole: Το Fenbendazole είναι ένα ευρέως φάσματος βενζιμιδαζολικό ανθελμινθικό που χρησιμοποιείται κατά των γαστρεντερικών παρασίτων. Είναι μια χημική ένωση με μοριακό τύπο $C_{15}H_{13}N_3OS$ και μοριακό βάρος 299,349 g/mol και δομή που φαίνεται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6: Χημική δομή fenbendazole

Χρησιμοποιείται κατά των γαστρεντερικών παρασίτων όπως: Giardia, ασκαρίδες, αγκυλόστομα, ταινιοσκώληκες του γένους Taenia, Aelurostrongylus, paragonimiasis, strongyles και Strongyloides και δύναται να χορηγηθεί σε πρόβατα, βοοειδή, άλογα κ.α. Η δράση του βασίζεται στο να προκαλέσει την απομείωση του κυτταροσκελετού μέσω της αλληλεπιδράσεως με την β-τουμπουλίνη, η οποία επηρεάζει την κυτταρική δομή και τη μίτωση (Köhler, 2001). Συγκεκριμένα δρουν αναστέλλοντας τη μεσολαβούμενη από μικροσωληνίσκους μεταφορά εκκριτικών κυστιδίων στους απορροφητικούς ιστούς του ελμίνθου με τα απελευθερωμένα πεπτικά ένζυμα να είναι υπεύθυνα για την παρατηρούμενη βλάβη στους ιστούς (Jasmer et al., 2000). Όσων αφορά την υπολλειματικότητα του, παρόλο που αποδομείται στο περιβάλλον η συνεχιζόμενη ελευθέρωση του στο περιβάλλον και η συχνή ανίχνευση του σε περιβαλλοντικά δείγματα το έχει τοποθετήσει μεταξύ των αναδυόμενων οργανικών ρύπων (Puckowski et al, 2017).

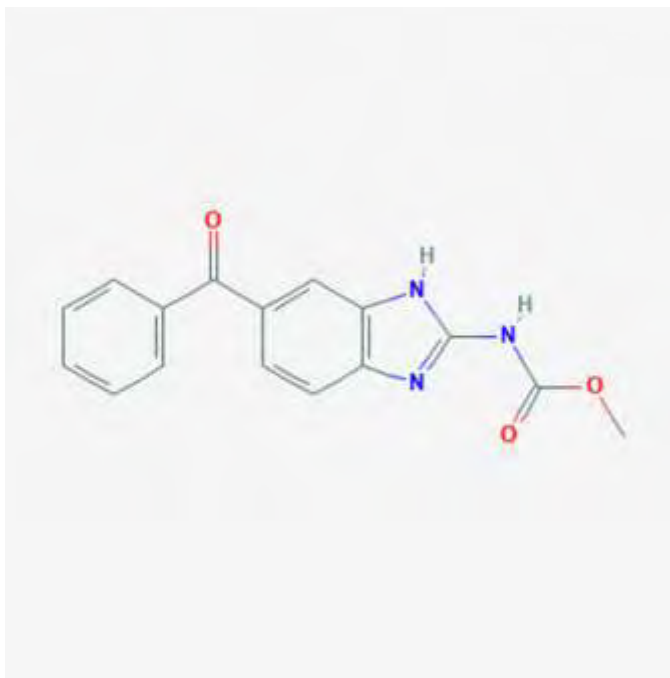
Flubendazole: Το flubendazole είναι ανθελμινθικό βενζιμιδαζολικό φάρμακο που χρησιμοποιείται στην κτηνιατρική για την καταπολέμηση εσωτερικών παρασίτων και σκωλήκων. Είναι μια χημική ένωση με μοριακό τύπο $C_{16}H_{12}FN_3O_3$ και μοριακό βάρος 313.28 g/mol και δομή που φαίνεται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7: Χημική δομή flubendazole

Χρησιμοποιείται κυρίως σε μυρηκαστικά ζώα, χοίρους, κοτόπουλα και γαλοπούλες. Όπως και το σύνολο των βενζιμιδαζολικών, δρα προκαλώντας αναστολή του πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων με δέσμευση στη β-τουμπουλίνη. Υπολείμματά μπορούν να βρεθούν σε διάφορα περιβαλλοντικά τμήματα, συμπεριλαμβανομένων των επιφανειακών και υπογείων υδάτων, εδαφών και ιζημάτων. Όπως και το fenbendazole, υφίσταται αποδόμηση στο περιβάλλον αλλά η σχετικά υψηλής συχνότητας ελευθέρωση του στο περιβάλλον το καθιστά ένα συχνά ανιχνευόμενο περιβαλλοντικό ρύπο, η περιβαλλοντική απόρριψη του είναι σχετικά συνεχής, επομένως. Ελάχιστα είναι γνωστά για την οικοτοξικότητα του flubendazole.

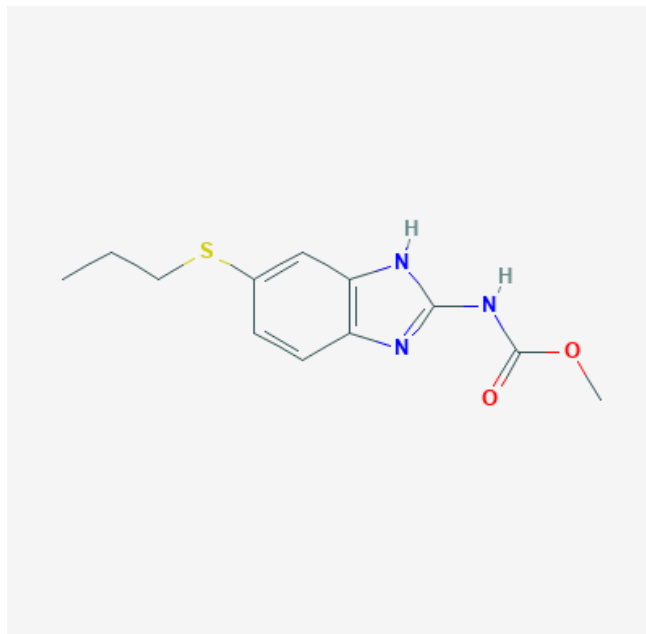
Mebendazole: Το mebendazole τέθηκε πρώτη φορά σε χρήση το 1971 και είναι ένα πολύ αποτελεσματικό ευρέως φάσματος ανθελμινθικό που ενδείκνυται για την αγωγή προσβολής από παρασιτικούς σκώληκες. Είναι μια χημική ένωση με μοριακό τύπο C₁₆H₁₃N₃O₃, μοριακό βάρος 295.298 g/mol και δομή που φαίνεται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8: Χημική δομή mebendazole

Είναι αποτελεσματικό εναντίον ενός ευρέος φάσματος νηματωδών και αποτελεί φάρμακο επιλογής για τη θεραπεία των λοιμώξεων από τριχιούρο (*Trichuris trichiura*), οξύουρο (*Enterobius vermicularis*), νεκάτορα (*Necator americanus*), αγκυλόστομα του δωδεκαδακτύλου (*Ancylostoma duodenale*) και ασκαρίδα (*Ascariasis lumbricoides*). Εμφανίζει αργή δράση, δρα κατά των προνυμφών νηματώδους και των ενηλίκων, ενώ στις περιπτώσεις των σκουληκιών και των μαστιχοειδών, σκοτώνει και τα αυγά. Δρα αναστέλλοντας επιλεκτικά τη σύνθεση των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου μέσω σύνδεσης με τη θέση δέσμευσης κολχικίνης της β-τουμπουλίνης, εμποδίζοντας έτσι τον πολυμερισμό των διμερών τουμπουλίνης στα εντερικά κύτταρα των παρασίτων (Mehlhorn, Heinz, 2001). Η διάσπαση των κυτταροπλασματικών μικροσωληνίσκων οδηγεί στην παρεμπόδιση της πρόσληψης γλυκόζης και άλλων θρεπτικών συστατικών, με αποτέλεσμα τη σταδιακή ακινητοποίηση και τον τελικό θάνατο των ελμινθών (Petri et al, 2011). Λόγω πρόσφατων μελετών και λόγω της χημική του δομής, αναμένεται να είναι ευαίσθητο στην άμεση φωτόλυση από το ηλιακό φως (Horvat et al, 2012). Διαθέτει μια ομάδα καρβαμιδικού που μπορεί να υδρολυθεί για να σχηματίσει ένα αμινο-βενζιμιδαζόλιο, έναν μεταβολίτη ο οποίος είναι πιο τοξικός από το μητρικό φάρμακο, καθώς το OH-mebendazole είναι εμβρυοτοξικό σε αρουραίους (Danaher et al, 2007).

Albendazole: Το Albendazole, επίσης γνωστό ως albendazolium, αναπτύχθηκε το 1975. Είναι ένα ανθελμινθικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία μιας ποικιλίας παρασιτικών προσβολών από σκώληκες και ανήκει στην ομάδα των βενζιμιδαζολών. Είναι μια χημική ένωση με μοριακό τύπο $C_{12}H_{15}N_3O_2S$, μοριακό βάρος 265,333g/mol και δομή που φαίνεται στην Εικόνα 9.

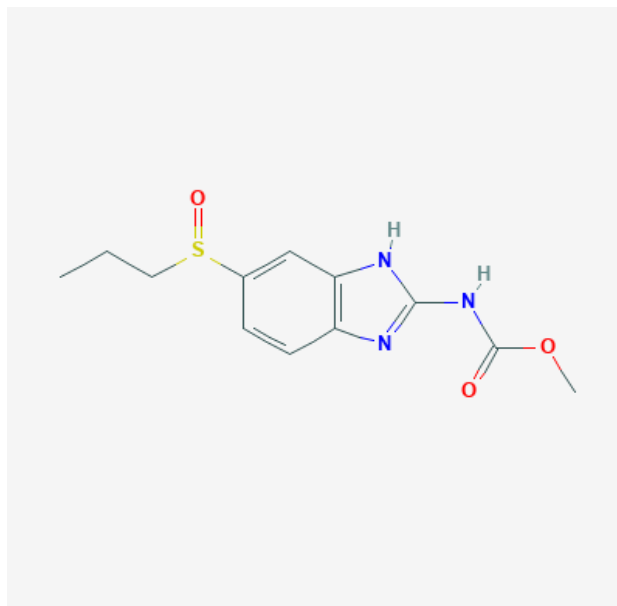


Εικόνα 9: Χημική δομή albendazole

Το albendazole προκαλεί εκφυλιστικές αλλοιώσεις στα εντερικά κύτταρα του σκουληκιού με σύνδεση με την ευαίσθητη στην κολχικίνη θέση της β-τουμπουλίνης, αναστέλλοντας έτσι τον πολυμερισμό ή τη συναρμολόγησή της σε μικροσωληνίσκους (συνδέεται πολύ καλύτερα με την β-τουμπουλίνη των παρασίτων από αυτή των θηλαστικών). Επίσης οδηγεί σε μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης από τα στάδια των προνυμφών και των ενηλίκων των παρασίτων και εξαντλεί τα αποθέματα του γλυκογόνου τους. Το albendazole προλαμβάνει επίσης τον σχηματισμό ινών ατράκτου που απαιτούνται για την κυτταρική διαίρεση, η οποία με τη σειρά της εμποδίζει την παραγωγή και ανάπτυξη των αυγών, ενώ τα υπάρχοντα αυγά δεν εκκολάπτονται (Turner 1987, Georgiev 1997). Η κυτταρική κινητικότητα, η διατήρηση του κυτταρικού σχήματος και η ενδοκυτταρική μεταφορά διαταράσσονται επίσης. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, διαταράσσει τις μεταβολικές οδούς των ελμινθών, αναστέλλοντας ένζυμα όπως η μηλική αφυδρογονάση και η φουμαρική ρεδοουκτάση, με αναστολή της μεταβολικής οδού που οδηγεί σε λιγότερη ενέργεια που παράγεται από τον κύκλο του Krebs (Waller et al 2017). Λόγω της μειωμένης παραγωγής ATP, το παράσιτο ακινητοποιείται και τελικά πεθαίνει. Σχετικά με την συμπεριφορά του albendazole στο περιβάλλον, παρά το γεγονός ότι έχει ανιχνευθεί στο περιβάλλον (νερό, ιζήματα και έδαφος), δεν υπάρχουν πληροφορίες για την τύχη του στο περιβάλλον. Το albendazole μπορεί να καταλήξει στο έδαφος μέσω της απέκκρισης των ζώων ή στο νερό μετά από ανεπαρκή επεξεργασία των λυμάτων από κτηνοτροφικές μονάδες.

Εξακολουθεί να είναι άγνωστο τι συμβαίνει με το albendazole στο έδαφος, το νερό ή το οικοσύστημα των ιζηματικών υδάτων και ποιος μηχανισμός εξάλειψης είναι χειρότερος για το περιβάλλον. Νεότερες έρευνες υποδηλώνουν ότι συγκεκριμένες υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη προσρόφηση του albendazole. Η μελέτη αυτή κατέδειξε ότι η συγγένεια προσρόφησης της albendazole επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες (φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους καθώς και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του albendazole), αλλά επίσης απέδειξε ότι το albendazole προσροφάται στα εδάφη λιγότερο ισχυρότερα από άλλα φαρμακευτικά προϊόντα. Η ικανότητα προσρόφησης του albendazole βρέθηκε να μειώνεται με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης και του χρόνου επαφής. Οι τιμές K_d ήταν οι υψηλότερες στο χαμηλότερο pH που δοκιμάστηκε (pH 5,0), και μειώθηκαν καθώς το pH αυξήθηκε (μέχρι pH 8). Η εξάρτηση από το pH της προσρόφησης οφειλόταν στις καταστάσεις ιονισμού του albendazole, οπότε η μείωση της απορρόφησης συνδέθηκε με την αύξηση του αριθμού των ανιοντικών ειδών του (Pavlovic et al, 2018).

Ricobendazole: Το ricobendazole αποτελεί σουλφοξείδιο του albendazole και ως μεταβολίτης αποτελεί δομικό του ανάλογο και καταπολεμά τα ίδια είδη παρασίτων και σκωληκών. Ονομάζεται και albendazole sulfoxide. Είναι μια χημική ένωση με μοριακό τύπο $C_{12}H_{15}N_3O_3S$, μοριακό βάρος 281.33 g/mol και δομή που φαίνεται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10: Χημική δομή ricobendazole

Έχει παρόμοιους μηχανισμούς δράσης με τα υπόλοιπα ανθελμινθικά της βενζιμιδαζολικής ομάδας και ένω τα μόρια του albendazole μεταβολίζονται εκτεταμένα σε θηλαστικά, λόγω της παρουσίας μιας σουλφιδικής ομάδας ευαίσθητης στην οξειδωση, και ορισμένοι από τους μεταβολίτες είναι ακόμη πιο δραστηριοί από την πατρική ένωση, μελετες

έχουν δείξει ότι το ricobendazole δεν ήταν πιο αποτελεσματικό από το albendazole ενάντια σε συγκεκριμένα εντερικά και παρεντερικά στάδια παρασιτικών σκωληκών (*Trichinella spiralis*) (LopesGarciaetal, 1997).

Στόχος της διπλωματικής διατριβής

Κύριος στόχος της διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετάσει την ικανότητα μίας βακτηριακής κοινοπραξίας που έχει την ικανότητα να αποδομεί το βενζιμιδαζολικό TBZ, να αποδομεί και τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας των βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών όπως fenbendazole, mebendazole, ricobendazole, flubendazole και albendazole.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Βακτηριακή Κοινοπραξία

Η βακτηριακή κοινοπραξία που χρησιμοποιήθηκε στα δυο πειράματα απομονώθηκε από το έδαφος περιοχής απόρριψης αποβλήτων από συσκευαστήριο φρούτων όπου και χρησιμοποιούνταν το TBZ (Perruchon et al., 2017). Η βακτηριακή κοινοπραξία είχε την ικανότητα να αποδομεί το TBZ και να το χρησιμοποιεί ως πηγή C και N. Προηγούμενες πειραματικές δοκιμές από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος έδειξαν ότι η συγκεκριμένη βακτηριακή κοινοπραξία είχε την ικανότητα να αποδομεί ως και 400 μg/g εδάφους φυσικά ρυπασμένου με το μυκητοκτόνο TBZ αποκαθιστώντας χρόνια ρύπανση σε σημείο απόρριψης αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων (Paradopolou et al., 2018). Η κοινοπραξία σταθεροποιήθηκε μετά από παρατεταμένο εμπλουτισμό και τα σημαντικότερα μέλη της ανήκουν σε α- (*Shinella*, *Sphingomonas*), β- (*Methylobacillus*, *Methilibium*, *Hydrogenophaga*) και γ-πρωτεοβακτήρια (*Pseudomonas*, *Hydrocarboniphaga*). Μεταξύ αυτών το *Sphingomonas* αποτέλεσε τον κύριο αποδομητή του TBZ (Perruchon et al., 2017).

2.2. Θρεπτικά Μέσα

Η καλλιέργεια της βακτηριακής κοινοπραξίας πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο MSMN που περιέχει εκτός από C όλα τα απαραίτητα θρεπτικά μακροστοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό μορφή αλάτων (Fe, K, P, Ca, S, N). Το θρεπτικό αυτό μέσο παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα αλάτων (stock) (Πίνακας 2), τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες και έδωσαν το τελικό MSMN όπως έχει περιγραφεί από τους Karpouzas and Walker (2000). Τα Stock 1 και 2 προετοιμάστηκαν με διάλυση των συστατικών τους σε 1 L απεσταγμένο νερό και αποστείρωση σε κλίβανο. Το Stock 3 αποστειρώθηκε με διήθηση διαμέσου φίλτρου σύριγγας. Για την προετοιμασία 500 ml MSMN, 50 ml από το stock 1 διαλύθηκε σε 390 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και το διάλυμα αποστειρώθηκε εκ νέου. Μόλις το διάλυμα έφτασε την θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκαν ασηπτικά 50ml Stock 2 και 10 ml Stock 3. Σε ορισμένες περιπτώσεις κατά την πορεία των πειραμάτων και λόγω της ιδιαίτερα χαμηλής διαλυτότητας των περισσότερων ανθελμινθικών που αξιολογήθηκαν προστέθηκε στο MSMN μικρή ποσότητα TWEEN20. Το TWEEN 20 είναι ένα μη ιονικό απορρυπαντικό που ως γαλακτωματοποιητικός παράγοντας για την παρασκευή σταθερών γαλακτωμάτων ελαίου σε νερό.

Πίνακας 2. Σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου MSMN

	Συστατικά	g/l
Stock 1	KH ₂ PO ₄	22.7
	Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	59.7
	NH ₄ CL	10.0
Stock 2	MgSO ₄ , 7H ₂ O	5.0
	CaCL ₂ , 2H ₂ O	0.1
	MnSO ₄ , 4H ₂ O	0.15
Stock 3	FeSO ₄ , 7H ₂ O	0.46

2.3. Ανάλυση ανθελμινθικών σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

2.3.1. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων ανθελμινθικών ουσιών

Για την παρούσα μελέτη και για την δημιουργία των αρχικών πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ουσίες:

Fenbendazole 98% καθαρότητα (TCI, CAS 43210-67-9)

Flubendazole, 98% καθαρότητα (TCI, CAS 31430-15-6)

Mebendazole, 98% καθαρότητα (TCI, CAS 31431-39-7)

Albendazole 98% καθαρότητα (TCI, CAS 54965-67-8)

Ricobendazole 97% καθαρότητα (SANTA CRUZ BIOTECH. CAS 54029-12-8)

TBZ 99% καθαρότητα (TCI, CAS 148-79-8)

Για κάθε ανθελμινθική ουσία προετοιμάστηκαν κατάλληλα πρότυπα πυκνά διαλύματα συγκέντρωσης από 11300-17000 µg/ml σε DMSO τα οποία αποστειρώθηκαν διαμέσου διήθησης από φίλτρα σύριγγας. Τα πρότυπα αυτά διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία MSMN + fenbendazole, albendazole, flubendazole, mebendazole, ricobendazole και TBZ σε συγκέντρωση 15 µg/ml. Για να επιτύχουμε ομοιογενή διαλυτοποίηση των ανθελμινθικών στο υδατικό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε και μικρή ποσότητα TWEEN20 (0.1%).

Πέραν των παραπάνω προετοιμάστηκαν και ανάλογα διαλύματα για κάθε ανθελμινθική ουσία σε μεθανόλη (συγκέντρωσης 1000 µg/ml). Από τα συγκεκριμένα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις διαλύματα συγκέντρωσης 0.05 ως 10 µg/ml σε μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Σε όλες τις περιπτώσεις η γραμμικότητα της καμπύλης ήταν υψηλή $r^2 > 0.997$. Οι συγκεκριμένες πρότυπες καμπύλες χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων των ανθελμινθικών ουσιών στις υγρές καλλιέργειες της βακτηριακής κοινοπραξίας.

2.3.2. Εκχύλιση ανθελμινθικών ουσιών

Για την εκχύλιση των ουσιών από το θρεπτικό μέσο MSMN αναμιγνύονταν 0.5 ml καλλιέργειας με 1 ml μεθανόλης σε γυάλινο μπουκάλι 2 ml. Το μίγμα αναδεύονταν για 30 sec σε vortex και ακολούθως γινόταν έγχυση σε σύστημα HPLC. Δοκιμές της παραπάνω μεθόδου εκχύλισης σε τρία επίπεδα

συγκέντρωσης (0.05, 1 και 15 mg/L) για κάθε ουσία έδωσαν ανακτήσεις >85% σε όλες τις περιπτώσεις.

2.3.3. Προσδιορισμός των υπολειμμάτων των ανθελμινθικών σε σύστημα HPLC

Για την ανάλυση των ανθελμινθικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση αποτελούμενη από ακετονιτρίλιο (ACN), νερό και φωσφορικό οξύ σε διαφορετικές αναλογίες όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Μοναδική εξαίρεση αποτέλεσε το TBZ αντί φωσφορικού οξέος προστέθηκε 0.5% διαλύματος NH_3 κατόγκο. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε σύστημα HPLC-UV-Vis εξοπλισμένο με στήλη CNH Athena RP C18 150 mm (CNW Technologies, Dusseldorf, Germany). Σε όλες τις περιπτώσεις η ροή της κινητής φάσης ήταν 1 ml/min και ο όγκος έγχυσης για όλα τα δείγματα ήταν 20 μl .

Πίνακας 3. Οι χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση των ανθελμινθικών ουσιών

Ανθελμινθικές ουσίες	Κινητή φάση ACN:H ₂ O+ H ₃ PO ₄ (%) κ.ο	Απορρόφηση (nm)	Χρόνος Κατακράτησης (min)
Flubendazole	50:50+1 σταγόνα H ₃ PO ₄ ανα 100 ml	245	≈3.5
Mebendazole	50:50+1 σταγόναH ₃ PO ₄ ανα 100 ml	245	≈3.2
Fenbendazole & Fenbendazole sulfone	50:50+1 σταγόνα H ₃ PO ₄ ανα 100 ml	210	≈3.4 ≈2.6
Albendazole Albendazole sulfoxide Albendazole sulfone	30:70+1 σταγόνα H ₃ PO ₄ ανα 100 ml	227	≈8.8 ≈2.3 ≈4.3
Ricobendazole	30:70+1 σταγόνα H ₃ PO ₄ ανα 100 ml	227	≈2.3
Thiabendazole(TBZ)	39:60.5+0.5 NH ₃	254	≈3.5

2.4. Μελέτη της αποδόμησης των ανθελμινθικών από την βακτηριακή κοινοπραξία – Πείραμα 1

Για κάθε ανθελμινθική ουσία που αξιολογήθηκε προετοιμάστηκαν 5 φιαλίδια των 10 ml, στα οποία μεταφέρθηκαν 10 ml θρεπτικού μέσου MSMN που περιέχει TWEEN 20 + ανθελμινθικό (15 mg/L). Παράλληλα προετοιμάστηκαν και δύο φιαλίδια όπου τοποθετήθηκε MSMN + ανθελμινθικό (15 mg/L) χωρίς TWEEN. Τα πρώτα τρία φιαλίδια εμβολιάστηκαν με την βακτηριακή κοινοπραξία (0.5 ml από φρέσκια καλλιέργεια στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης) ενώ τα άλλα δύο δέχτηκαν προσθήκη MSMN χωρίς βακτήρια ώστε να μετρήσουμε την αβιοτική αποδόμηση των ανθελμινθικών. Τέλος τα

δύο φιαλίδια που περιείχαν MSMN χωρίς TWEEN 20 δέχτηκαν εμβολιασμό με την βακτηριακή κοινοπραξία. Όλα τα δείγματα στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 27°C με ανάδευση για διάστημα 56 ημερών. Αμέσως μετά τον εμβολιασμό και ανά τακτά χρονικά διαστήματα στην συνέχεια δείγματα 0.5 ml από κάθε καλλιέργεια συλλέγονταν από κάθε καλλιέργεια και χρησιμοποιούνταν για προσδιορισμό της αποδόμησης του κάθε ανθελμινθικού σε σύστημα HPLC όπως έχει ήδη περιγραφεί.

2.5. Μελέτη της αποδόμησης των ανθελμινθικών από την βακτηριακή κοινοπραξία – Πείραμα 2

Στο δεύτερο πείραμα και με βάση τα αποτελέσματα της πρώτης δοκιμής εστίασαμε στην μελέτη της αποδόμησης των ανθελμινθικών ουσιών TBZ, albendazole και fenbendazole όπου από το πρώτο πείραμα διαφάνηκε ότι η βακτηριακή κοινότητα είχε την ικανότητα να τα διασπά σχετικά αποτελεσματικά. Όπως και στο πρώτο πείραμα, για κάθε ανθελμινθική ουσία προετοιμάστηκαν τρία δείγματα MSMN + TWEEN 20 + ανθελμινθικό (15 mg/L) που εμβολιάστηκαν με την βακτηριακή κοινοπραξία και αντίστοιχα δύο δείγματα που δεν εμβολιάστηκαν με βακτήρια και χρησιμοποιήθηκαν ως αβιοτικοί μάρτυρες. Δεδομένης της θετικής επίδρασης της παρουσίας του TWEEN 20 στην βιοαποδόμηση των ανθελμινθικών ουσιών που παρατηρήσαμε στο πρώτο πείραμα, σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας από τις καλλιέργειες γινόταν προσθήκη TWEEN 20 (1%) σε όλες τις εμβολιασμένες καλλιέργειες και σε ένα από τα δείγματα – μάρτυρες. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν όπως παραπάνω και η διάρκεια του πειράματος ήταν 35 ημέρες.

2.6. Υπολογισμός DT_{50} των ανθελμινθικών φαρμάκων

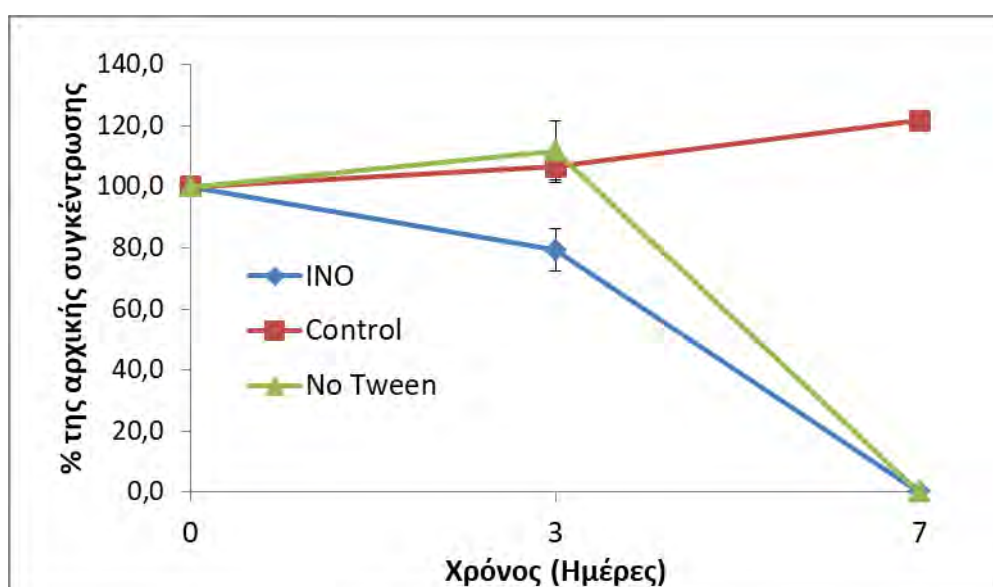
Για όλα τα ανθελμινθικά και στα δύο πειράματα υπολογίστηκαν οι τιμές DT_{50} , και ο ρυθμός αποδόμησης k_{deg} , χρησιμοποιώντας κατάλληλα μοντέλα κινητικής όπως αυτά προτείνονται από το Focus Degradation Kinetics Group (FOCUS 2006). Σε κάθε περίπτωση για κάθε καμπύλη διάσπασης χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα μοντέλα κινητικής: το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης Single First-Order (SFO) και τα διφασικά μοντέλα First Order Multi-Compartment (FOMC), το Hockey-Stick (HS) και το Double First Order in Parallel (DFOP). Για την αξιολόγηση της ακρίβειας με την οποία το κάθε μοντέλο περιγράφει την αποδόμηση των ανθελμινθικών χρησιμοποιήθηκε το τεστ χ^2 (<15%), η οπτική αξιολόγηση και η κατανομή των υπολειμμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

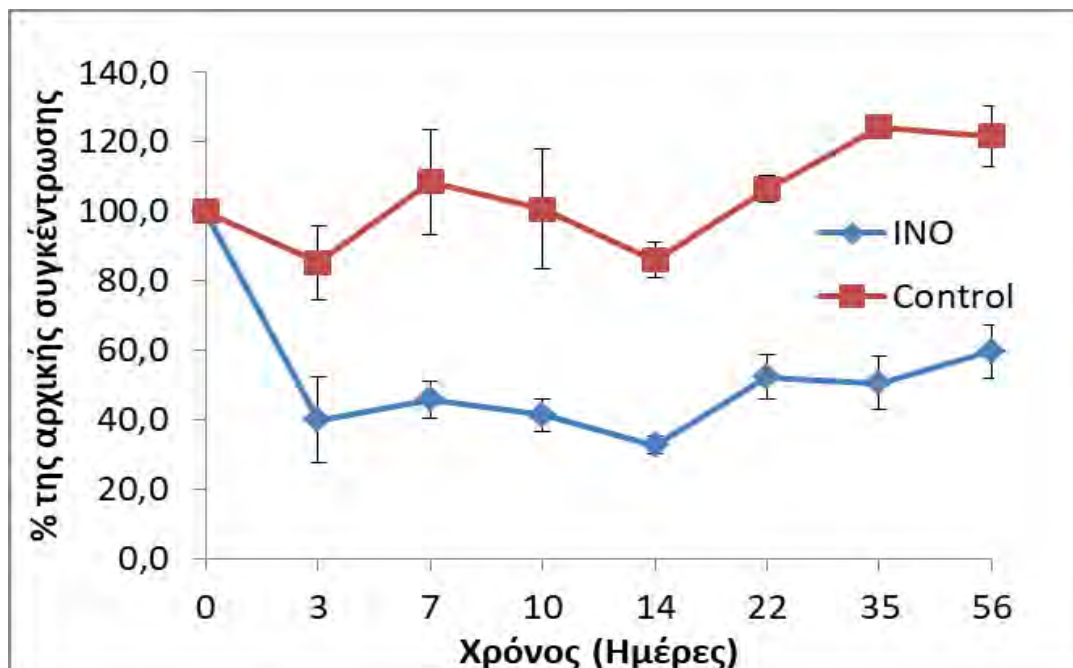
3.1. Πείραμα 1

Thiabendazole(TBZ): Η αποδόμηση του TBZ σε θρεπτικό μέσο MSMN εμβολιασμένο ή μη με την βακτηριακή κοινοπραξία (παρουσία ή απουσία TWEEN) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα Α.1. Όπως φαίνεται και αναμενόταν η βακτηριακή κοινοπραξία διασπά πλήρως το TBZ εντός 7 ημερών, παρουσία ή απουσία TWEEN 20, σε αντίθεση με τα δείγματα που δεν εμβολιάστηκαν με την βακτηριακή κοινοπραξία όπου δεν παρατηρήθηκε καμία αποδόμηση στις 7 ημέρες.



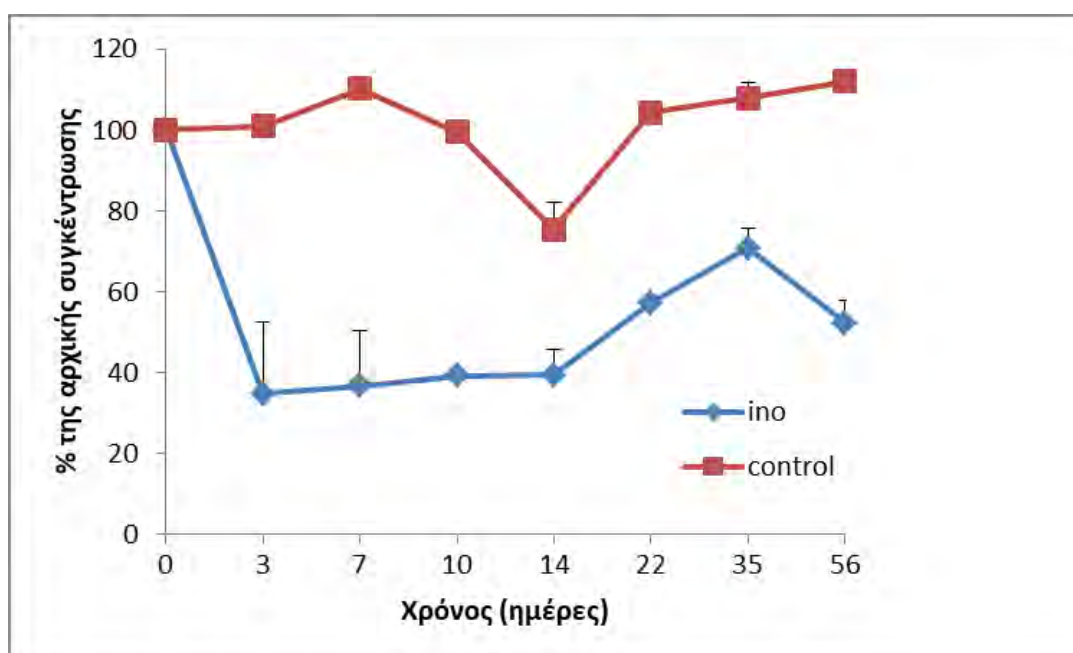
Διάγραμμα Α.1: Η αποδόμηση του TBZ σε θρεπτικό μέσο MSMN που εμβολιάστηκε με την βακτηριακή κοινοπραξία, παρουσία (INO) ή απουσία Tween (No Tween). Παράλληλα παρουσιάζεται η αποδόμηση του ανθελμινθικού σε MSMN χωρίς την βακτηριακή κοινοπραξία (CONTROL). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Fenbendazole: Η αποδόμηση του fenbendazole σε θρεπτικό μέσο MSMN εμβολιασμένο ή μη με την βακτηριακή κοινοπραξία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα Α.2. Γενικότερα παρατηρήθηκε μια αρχική αποδόμηση του fenbendazole από την βακτηριακή κοινοπραξία κατά τις πρώτες 3 ημέρες χωρίς στην συνέχεια να καταγραφεί περαιτέρω διάσπαση του φαρμάκου.. Προσθήκη TWEEN στα εμβολιασμένα δείγματα 22 ημέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην αποδόμηση του fenbendazole.



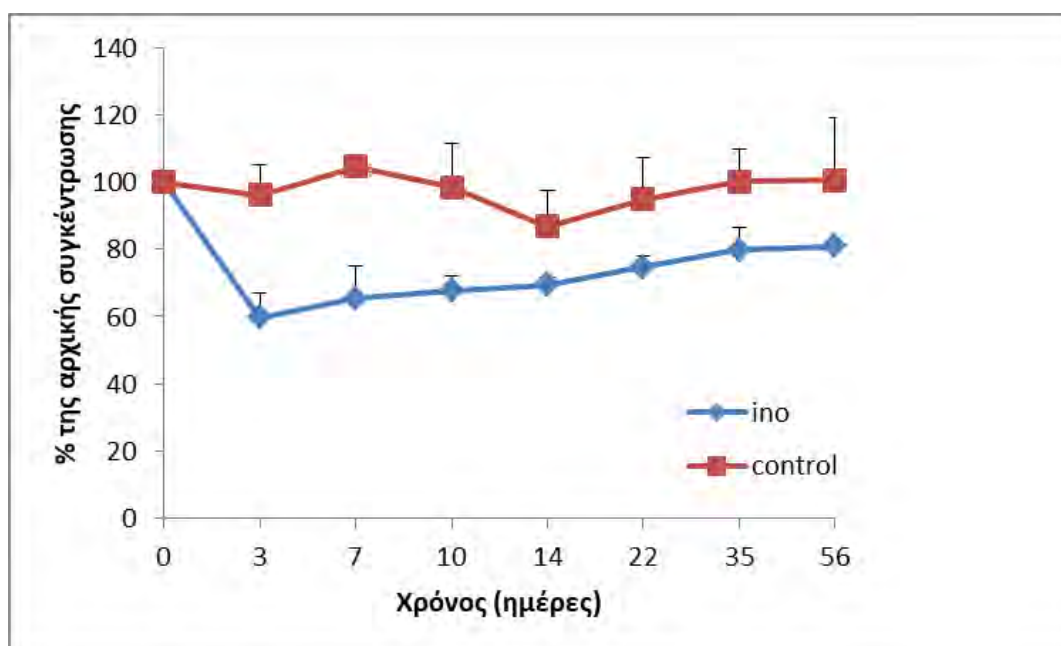
Διάγραμμα A.2: Η αποδόμηση του fenbendazole σε θρεπτικό μέσο MSMN που εμβολιάστηκε με την βακτηριακή κοινοπραξία (INO). Παράλληλα παρουσιάζεται η αποδόμηση του ανθελμινθικού σε MSMN χωρίς την βακτηριακή κοινοπραξία (CONTROL). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Flubendazole: Η αποδόμηση του flubendazole σε θρεπτικό μέσο MSMN εμβολιασμένο ή μη με την βακτηριακή κοινοπραξία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα A.3. Γενικότερα παρατηρήθηκε όπως και με το fenbendazole μια αρχική μείωση της συγκέντρωσης του flubendazole στα εμβολιασμένα δείγματα χωρίς όμως περαιτέρω αποδόμηση κατά τις επόμενες ημέρες της επώασης. Προσθήκη TWEEN στα εμβολιασμένα δείγματα 22 ημέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην αποδόμηση του flubendazole.



Διάγραμμα A.3: Η αποδόμηση του flubendazole σε θρεπτικό μέσο MSMN που εμβολιάστηκε με την βακτηριακή κοινοπραξία (INO). Παράλληλα παρουσιάζεται η αποδόμηση του ανθελμινθικού σε MSMN χωρίς την βακτηριακή κοινοπραξία (CONTROL). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση

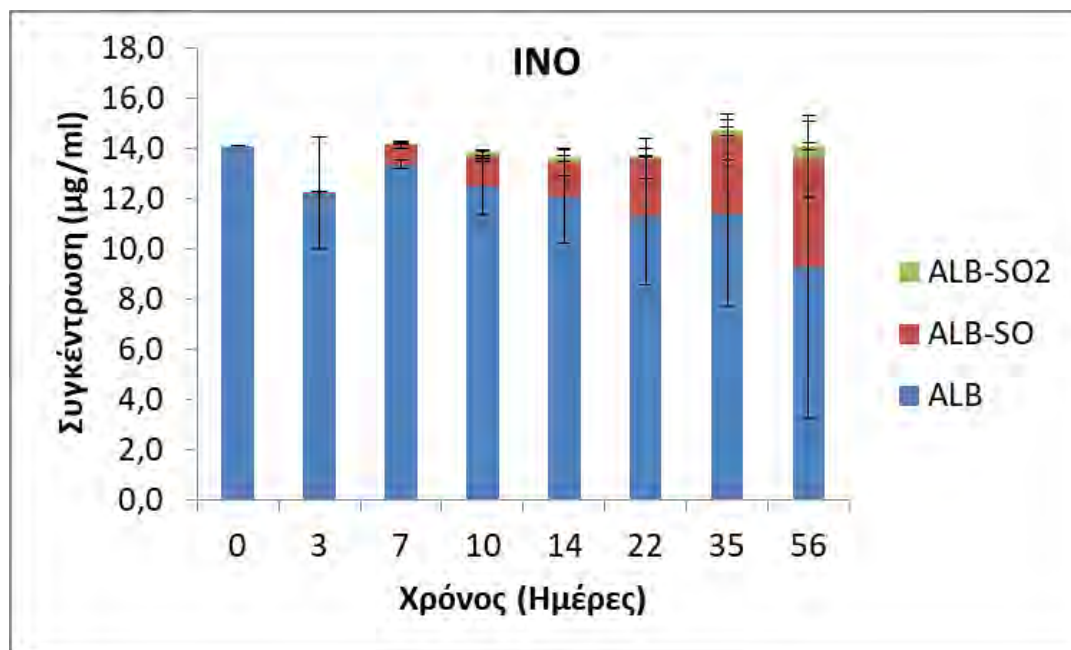
Mebendazole: Η αποδόμηση του mebendazole σε θρεπτικό μέσο MSMN εμβολιασμένο ή μη με την βακτηριακή κοινοπραξία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα A.4. Γενικότερα δεν παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση του flubendazole από την βακτηριακή κοινοπραξία με το μοτίβο αποδόμηση να είναι παρόμοιο με αυτό του μη εμβολιασμένου μάρτυρα. Προσθήκη TWEEN στα εμβολιασμένα δείγματα 22 ημέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στην αποδόμηση του flubendazole.



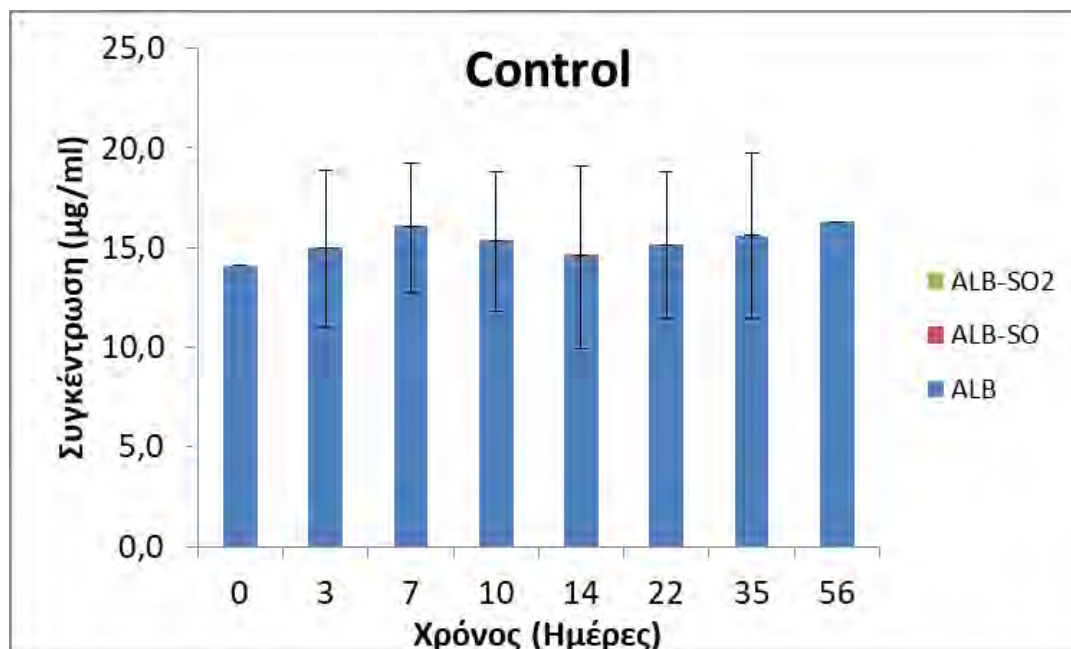
Διάγραμμα A.4: Η αποδόμηση του mebendazole σε θρεπτικό μέσο MSMN που εμβολιάστηκε με την βακτηριακή κοινοπραξία (INO). Παράλληλα παρουσιάζεται η αποδόμηση του ανθελμινθικού σε MSMN χωρίς την βακτηριακή κοινοπραξία (CONTROL). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση

Albendazole: Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του albendazole σε θρεπτικό μέσο MSMN εμβολιασμένο με την βακτηριακή κοινοπραξία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα A.5 ενώ του μη εμβολιασμένου στο διάγραμμα A.6. Η αποδόμηση του albendazole εμφάνισε σημαντική παραλλακτικότητα μεταξύ των επαναλήψεων που είχαν εμβολιαστεί. Έτσι στις πρώτες δύο επαναλήψεις η αποδόμηση ήταν περιορισμένη σε αντίθεση με την τρίτη επανάληψη όπου καταγράφηκε σχεδόν πλήρης αποδόμηση της μητρικής ουσίας εντός των 56 ημερών που διήρκεσε το πείραμα. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση στους μάρτυρες. Η αποδόμηση του albendazole συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό albendazole sulfoxide, κατά κύριο λόγο, και μικρές ποσότητες albendazole sulfone που παρέμειναν στην καλλιέργεια μέχρι την

ολοκλήρωση του πειράματος. Αντίθετα ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις των δύο συγκεκριμένων μεταβολικών προϊόντων ανιχνεύθηκαν στους μάρτυρες.

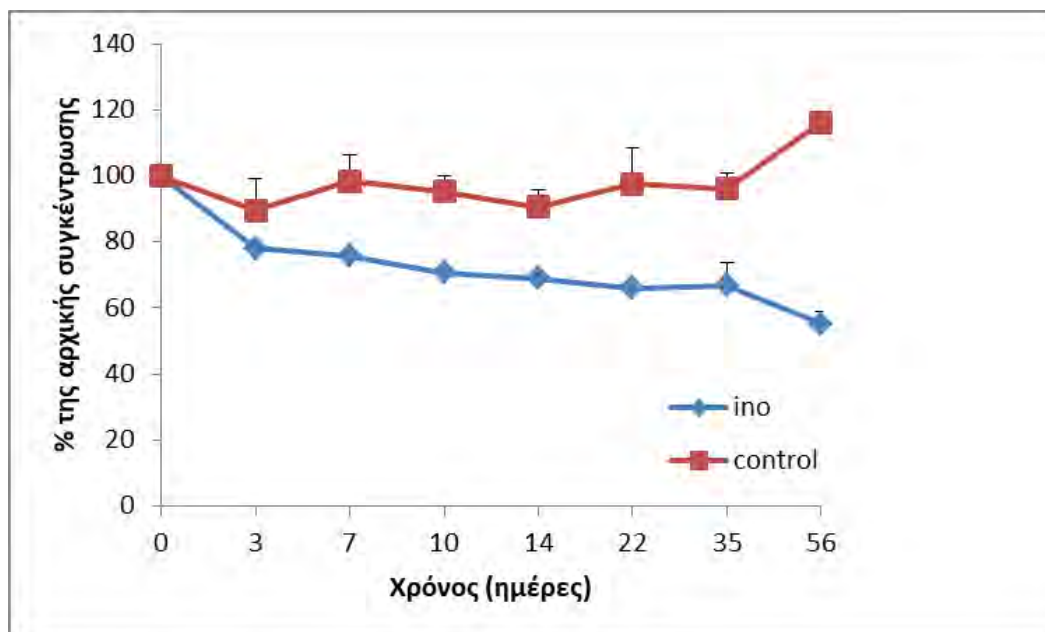


Διάγραμμα A.5: Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του albendazole (ALB) και σχηματισμός των μεταβολιτών του albendazolesulfoxide (ALB-SO) και albendazolesulfone (ALB-SO₂) σε θρεπτικό μέσο MSMN που εμβολιάστηκε με την βακτηριακή κοινότητα (INO). Σε κάθε ημερήσια stacked bar παρουσιάζεται ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα A.6: Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του albendazole (ALB) και ο σχηματισμός των μεταβολιτών του albendazolesulfoxide (ALB-SO) και albendazolesulfone (ALB-SO₂) σε θρεπτικό μέσο MSMN που δεν εμβολιάστηκε με την βακτηριακή κοινότητα (CONTROL). Σε κάθε ημερήσια stacked bar παρουσιάζεται ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση.

Ricobendazole: Η αποδόμηση του ricobendazole σε θρεπτικό μέσο MSMN εμβολιασμένο ή μη με την βακτηριακή κοινοπραξία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα Α.7. Το ricobendazole αποτελεί το albendazole sulfoxide άρα αναμέναμε παρόμοια αποδόμηση. Έτσι παρατηρήθηκε μια βραδεία αποδόμηση του ricobendazole από την βακτηριακή κοινοπραξία σε αντίθεση με τα δείγματα μάρτυρες όπου το ricobendazole ήταν σταθερό.



Διάγραμμα Α.4: Η αποδόμηση του ricobendazole σε θρεπτικό μέσο MSMN που εμβολιάστηκε με την βακτηριακή κοινοπραξία (INO). Παράλληλα παρουσιάζεται η αποδόμηση του ανθελμινθικού σε MSMN χωρίς την βακτηριακή κοινοπραξία (CONTROL). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων + την τυπική απόκλιση

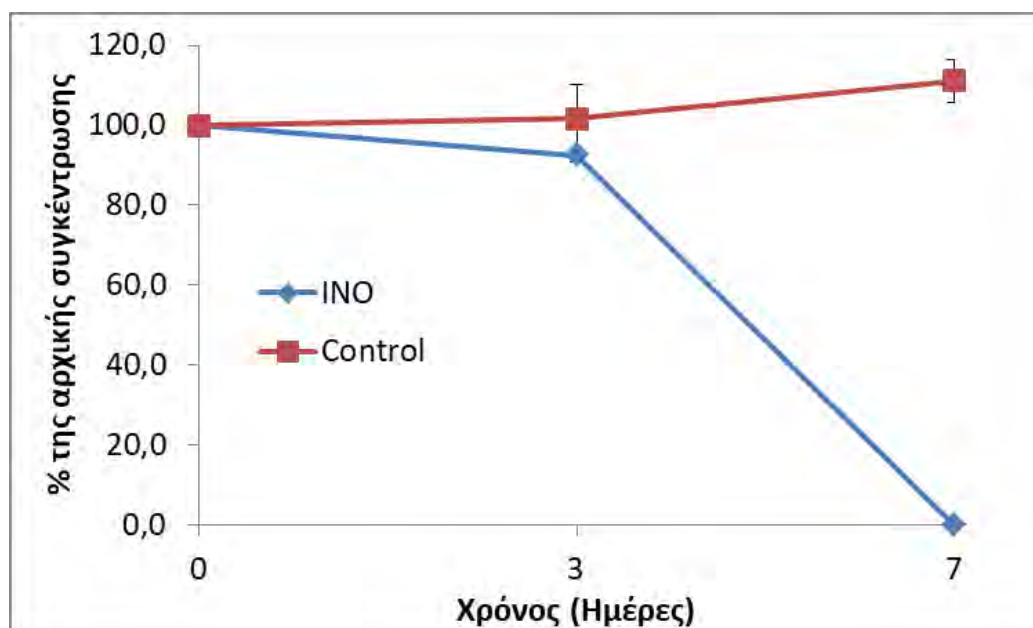
Με βάση τα αποτελέσματα της αποδόμησης των διαφόρων ανθελμινθικών υπολογίστηκαν οι τιμές DT_{50} για το πείραμα 1 και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Όπως και αναμένονταν η βακτηριακή κοινοπραξία ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική στην αποδόμηση του TBZ με τιμή $DT_{50} = 2.9$ ημέρες (>365 ημέρες στο Control). Για τα υπόλοιπα ανθελμινθικά η βακτηριακή κοινοπραξία επιτάχυνε την αποδόμηση των albendazole ($DT_{50} = 67,6$ ημέρες), ricobendazole ($DT_{50} = 69.7$ ημέρες) και ελαφρώς του fenbendazole ($DT_{50} = 224,5$ ημέρες) σε σχέση με τις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες όπου οι τιμές DT_{50} για τις συγκεκριμένες ουσίες ήταν > 365 ημέρες. Αντίθετα η βακτηριακή κοινοπραξία δεν κατάφερε να επιταχύνει την αποδόμηση των mebendazole και flubendazole.

Πίνακας 4. Οι τιμές DT_{50} , K_{deg} , K_1 , K_2 για τα διάφορα ανθελμινθικά που μελετήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες MSMN που εμβολιάστηκαν με την βακτηριακή κοινοπραξία (INO) ή όχι (CONTROL)

Ουσία	Μεταχείριση	Μοντέλο	χ^2 (%)	K_{deg} (d^{-1})	K_1 (d^{-1})	K_2 (d^{-1})	DT_{50} (d)
Albendazole	Control	SFO	4,67	<0,0001			>365
	INO	HS	2,66		0,1354	0,0062	67,6
Fenbendazole	Control	SFO	10,02	<0,0001			>365
	INO	HS	13,27		0,3345	<0,0001	224,5
Flubendazole	Control	SFO	8,55	<0,0001			>365
	INO	HS	19,87		0,333	<0,0001	>365
Mebendazole	Control	SFO	4,35	<0,0001			>365
	INO	SFO	10,30	<0,0001			>365
Ricobendazole	Control	SFO	6,50	<0,0001			>365
	INO	HS	2,41		0,1008	0,0053	69,7
TBZ	Control	SFO	4,79	<0,0001			>365
	INO	SFO	24,49	0,2384			2,9

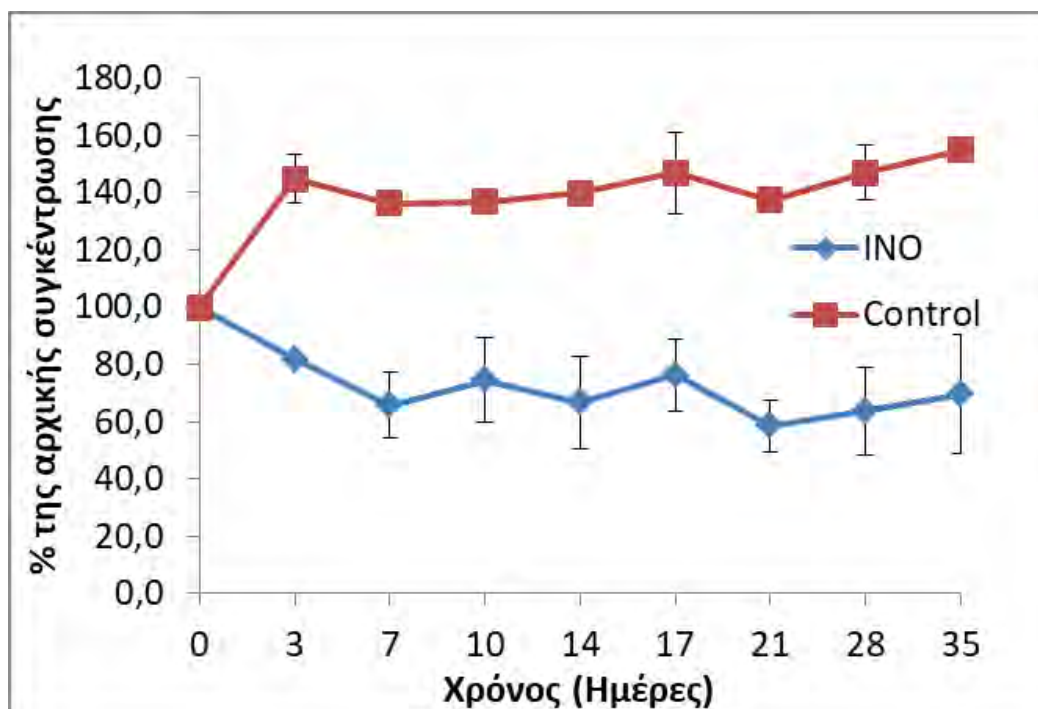
3.2. Πείραμα 2

Thiabendazole(TBZ): Η αποδόμηση του TBZ σε θρεπτικό μέσο MSMN εμβολιασμένο ή μη με την βακτηριακή κοινοπραξία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα Β.1. Όπως και στο Πείραμα 1 η βακτηριακή κοινοπραξία αποδόμησε πλήρως το TBZ εντός 7 ημερών.



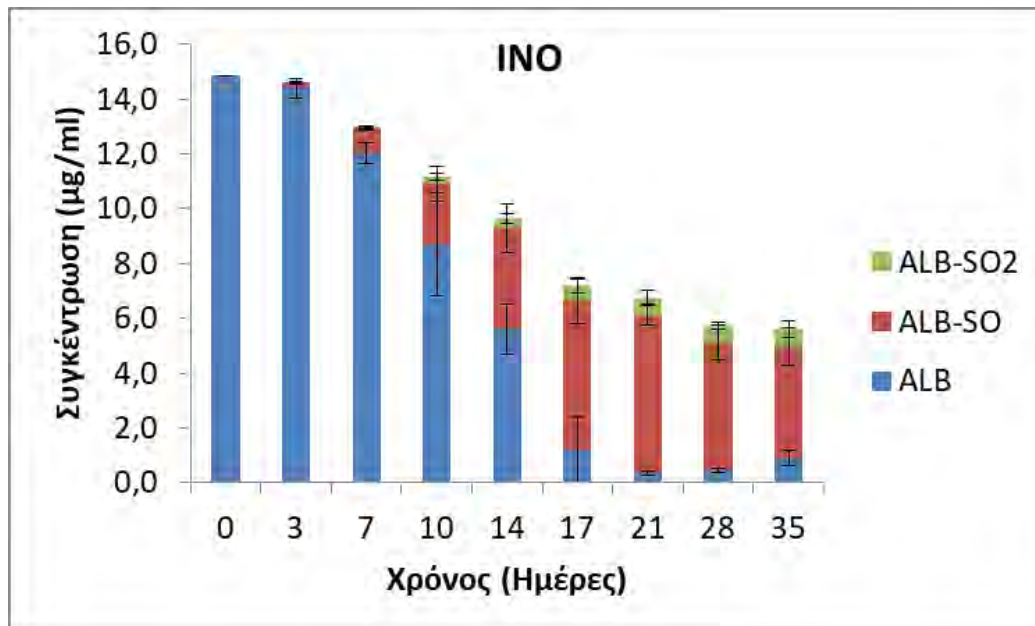
Διάγραμμα Β.1: Η αποδόμηση του TBZ σε θρεπτικό μέσο MSMN που εμβολιάστηκε με την βακτηριακή κοινοπραξία (INO). Παράλληλα παρουσιάζεται η αποδόμηση του ανθελμινθικού σε MSMN χωρίς την βακτηριακή κοινοπραξία (CONTROL). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Fenbendazole: Η αποδόμηση του fenbendazole σε θρεπτικό μέσο MSMN εμβολιασμένο ή μη με την βακτηριακή κοινοπραξία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα Β.2. Το fenbendazole, όπως και στο πρώτο πείραμα, έχει μια αισθητή διάσπαση στην αρχή αλλά στην συνέχεια φαίνεται να παραμένει σε ένα βαθμό σταθερό παρά την συστηματική προσθήκη TWEEN 20 μετά από κάθε καταμέτρηση. Και εδώ παρατηρήθηκε μια παραλλακτικότητα στην αποδόμηση μεταξύ των τριών εμβολιασμένων δειγμάτων, με την αποδόμηση στο δείγμα 3 να είναι αισθητά υψηλότερη των άλλων δύο στις 35 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση του fenbendazole στα δείγματα μάρτυρες.

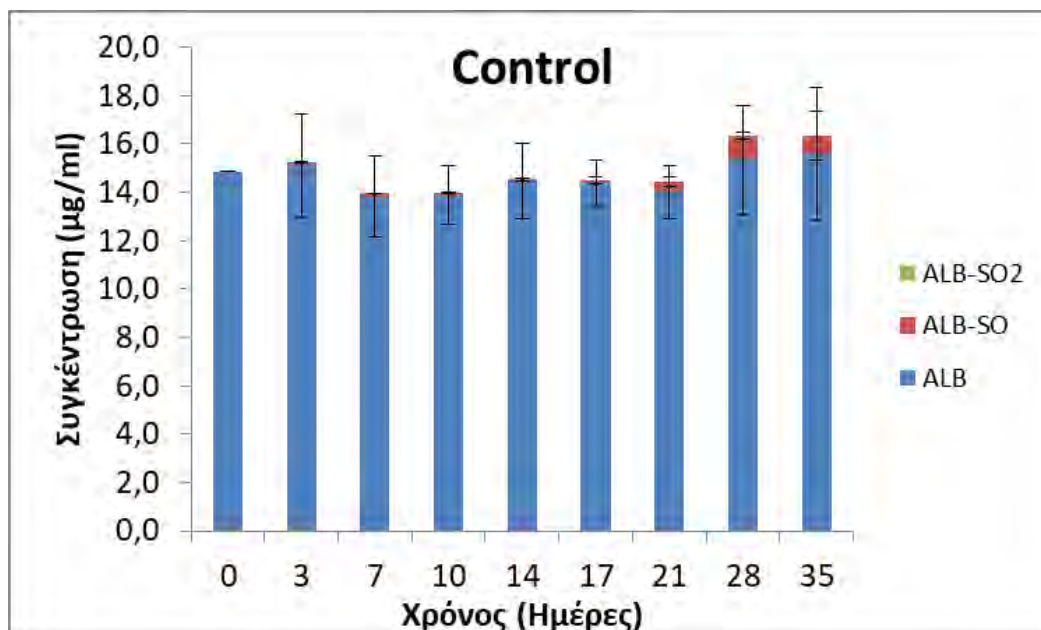


Διάγραμμα Β.2: Η αποδόμηση του fenbendazole σε θρεπτικό μέσο MSMN που εμβολιάστηκε με την βακτηριακή κοινοπραξία (INO). Παράλληλα παρουσιάζεται η αποδόμηση του ανθελμινθικού σε MSMN χωρίς την βακτηριακή κοινοπραξία (CONTROL). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση

Albendazole: Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του albendazole σε θρεπτικό μέσο MSMN εμβολιασμένο ή μη με την βακτηριακή κοινοπραξία παρουσιάζεται στα Διαγράμματα Β.3 και Β.4 αντίστοιχα. Γενικότερα παρατηρήθηκε, σε σχέση με το πρώτο πείραμα, μια σταθερή αποδόμηση του albendazole σε όλα τα εμβολιασμένα δείγματα (χωρίς υψηλή παραλλακτικότητα όπως στο πείραμα 1) που οδήγησε σε σχεδόν πλήρη αποδόμηση του στις 35 ημέρες. Αντίθετα δεν καταγράφηκε αισθητή αποδόμηση στα δείγματα μάρτυρες. Επίσης οι μεταβολίτες του albendazole, albendazole sulfoxide και το albendazole sulfone σχηματίστηκαν σε σημαντικές ποσότητες κατά την διάρκεια του πειράματος με το πρώτο να αποτελεί το κύριο μεταβολικό προϊόν. Αντίθετα στις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες καταγράφηκαν μικρές συγκεντρώσεις του albendazole sulfoxide ενώ δεν ανιχνεύθηκε το albendazole sulfone.



Διάγραμμα Β.3: Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του albendazole (ALB) και ο σχηματισμός των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide(ALB-SO) και albendazole sulfone(ALB-SO2) σε θρεπτικό μέσο MSMN που εμβολιάστηκε με την βακτηριακή κοινοπραξία (INO). Σε κάθε σημείο παρουσιάζεται ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα Β.4: Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του albendazole (ALB) και ο σχηματισμός των μεταβολιτών του albendazole sulfoxide(ALB-SO) και albendazole sulfone(ALB-SO2) σε θρεπτικό μέσο MSMN που δεν εμβολιάστηκε με την βακτηριακή κοινοπραξία (INO). Σε κάθε σημείο παρουσιάζεται ο μέσος όρος 3 επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.

Με βάση τα αποτελέσματα της αποδόμησης των διαφόρων ανθελμινθικών υπολογίστηκαν οι τιμές DT_{50} για το πείραμα 2 και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5. Στο πείραμα 2 και πάλι η βακτηριακή κοινοπραξία ήταν ιδιαίτερα

αποτελεσματική στην αποδόμηση του TBZ με $DT_{50} = 3.1$ ημέρες. Αυτή την φορά όμως η συνεχή προσθήκη TWEEN20 σε όλα τα εμβολιασμένα δείγματα οδήγησε σε σημαντική επιτάχυνση της αποδόμησης του albendazole ($DT_{50} = 6.7$ ημέρες) αλλά και του fenbendazole ($DT_{50} = 28.3$ ημέρες) σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες ($DT_{50} > 365$ ημέρες) αλλά και σε σύγκριση με την αποδόμηση των ίδιων ανθελμινθικών ουσιών στο Πείραμα 1 (67,6 και 224,5 ημέρες αντίστοιχα) όπου δεν χρησιμοποιήθηκε TWEEN 20 στις καλλιέργειες σε όλη την διάρκεια του πειράματος.

Πίνακας 5. Οι τιμές DT_{50} , K_{deg} για τα διάφορα ανθελμινθικά που μελετήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες MSMN που εμβολιάστηκαν με την βακτηριακή κοινοπραξία (INO) ή όχι (CONTROL)

Ουσίες	Μεταχειρίσεις	Μοντέλο	χ^2 (%)	K_{deg} (d^{-1})	K_1 (d^{-1})	K_2 (d^{-1})	DT_{50} (d)
TBZ	Control	SFO	6,542	0,0168			>365
	INO	SFO	24,14	0,2264			3,07
Albendazole	Control	SFO	8,262	0,0018			>365
	INO	SFO	17,42	0,1033			6,71
Fenbendazole	Control	SFO	3,686	<0,0001			>365
	INO	HS	5,816		0,1624	0,0019	28,3

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

4.Συζήτηση

Τα ανθελμινθικά κτηνιατρικά φάρμακα όπως οι βενζιμιδαζόλες μετά την χορήγηση τους σε παραγωγικά ζώα, δεν μεταβολίζονται ιδιαίτερα από αυτά και απεκκρίνονται με τα περιττώματα (ούρα και κόπρανα) (EMEA 1997, Boxall et al., 2003, Figueroa et al., 2004). Πρόσφατες μελέτες ανασκόπησης ανέφεραν την παρουσία υπολειμμάτων flubendazole σε επίπεδα ως 0.06 mg/L σε κοπριά από κτηνοτροφικές μονάδες. Δεδομένης της υπολειμματικότητας των βενζιμιδαζολικών στην κοπριά (Kreuzig et al., 2007), η εφαρμογή αυτών στα εδάφη ως οργανική λίπανση οδηγεί σε ελευθέρωση υπολειμμάτων βενζιμιδαζολικών στα γεωργικά εδάφη με κίνδυνο για το περιβάλλον. Έτσι υπολείμματα του flubendazole εντοπίστηκαν σε δείγματα επιφανειακών υδροφόρων συστημάτων στο Βέλγιο σε επίπεδα ως και 20 ng/L (Van den Steene et al., 2010).

Δεδομένης της υπολειμματικότητας των βενζιμιδαζολικών στις κοπριές (Kreuzig et al., 2007) και στο έδαφος (Kesavan et al., 1976; EE 2013) απαιτείται η ανάπτυξη μεθόδων και στρατηγικών για την απομάκρυνση των βενζιμιδαζολικών ουσιών από το περιβάλλον. Με δεδομένη την ύπαρξη στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας μια βακτηριακής κοινοπραξίας που αποδομεί το υπολειμματικό μυκητοκτόνο-ανθελμινθικό TBZ, μελετήσαμε την υπόθεση ότι η συγκεκριμένη κοινοπραξία θα έχει την ικανότητα να αποδομεί και κάποια από τα βενζιμιδαζολικά ανθελμινθικά με βάση την δομική ομοιότητα των μορίων τους. Προηγούμενες μελέτες από την Perruchon et al., (2017a) είχαν δείξει ότι το είδος της ομάδας που συνδέεται με τον βενζιμιδαζολικό δακτύλιο παίζει καθοριστικό ρόλο στην ικανότητα της βακτηριακής κοινοπραξίας να διασπά βενζιμιδαζολικές ουσίες με ιδανικό υπόστρωμα το TBZ.

Στο πλαίσιο αυτό αξιολογήθηκε η ικανότητα της βακτηριακής κοινοπραξίας να αποδομεί τα βενζιμιδαζολικά ανθελμινθικά TBZ, fenbendazole, flubendazole, mebendazole, ricobendazole, albendazole σε υγρές καλλιέργειες όπου οι ανθελμινθικές ουσίες αποτελούσαν την μοναδική πηγή C. Από το πρώτο πείραμα προέκυψε ότι η βακτηριακή κοινοπραξία ήταν ικανή να επιταχύνει την αποδόμηση του TBZ, που αποτελεί το επιθυμητό υπόστρωμα για την βακτηριακή κοινοπραξία, του albendazole και του ricobendazole που αποτελούν δομικά ανάλογα, και λιγότερο του fenbendazole. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε καμία αποδόμηση στα flubendazole και mebendazole τα οποία όπως και το fenbendazole εμφανίζουν στο μόριο τους αρωματικούς υποκαταστάτες συνδεδεμένους με την βενζολική ομάδα του βενζιμιδαζολικού δακτυλίου, σε αντίθεση με τα albendazole και ricobendazole που εμφανίζουν μια αλειφατική ομάδα συνδεδεμένη με την βενζολική ομάδα του βενζιμιδαζολικού δακτυλίου.

Περαιτέρω μελέτες εξέτασαν την πιθανότητα βελτιστοποίησης της

αποδόμησης των albendazole και fenbendazole από την βακτηριακή κοινοπραξία μέσω της συστηματικής προσθήκης Tween 20 για την βέλτιστη διαλυτοποίηση των δυσδιάλυτων ανθελμινθικών ουσιών. Πράγματι η προσθήκη Tween 20 βελτίωσε δραματικά την αποδομητική ικανότητα της βακτηριακής κοινοπραξίας έναντι των albendazole και fenbendazole με τις τιμές DT_{50} να εμφανίζουν σημαντική μείωση από τις 67,6 και 224 ημέρες σε 6,7 και 28,3 ημέρες αντίστοιχα. Η αποδόμηση του albendazole οδήγησε στην παραγωγή ποσοτήτων albendazole sulfoxide και χαμηλότερες ποσότητες albendazole sulfone οι οποίες ήταν σημαντικά υψηλότερες παρουσία της βακτηριακής κοινοπραξίας καταδεικνύοντας τον ρόλο των μικροοργανισμών στα συγκεκριμένα μεταβολικά βήματα. Η αποδόμηση και του ricobendazole, που είναι το albendazole sulfoxide, από την βακτηριακή κοινοπραξία στο πρώτο πείραμα καταδεικνύει την αποτελεσματική αποδόμηση των συγκεκριμένων ουσιών από την βακτηριακή κοινοπραξία.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι:

- Η βακτηριακή κοινοπραξία που έχει την ικανότητα να αποδομεί το TBZ έχει την ικανότητα να αποδομεί και κάποια από τα βενζιμιδαζολικά ανθελμινθικά που χρησιμοποιούνται σήμερα όπως τα albendazole, ricobendazole και fenbendazole
- Η ικανότητα αποδόμησης των συγκεκριμένων βενζιμιδαζολικών πιθανότατα σχετίζεται με το είδος των υποκαταστατών του βενζολικού δακτυλίου με υψηλότερη αποδόμηση ουσιών που φέρουν μικρού μοριακού βάρους αλειφατικούς υποκαταστάτες συνδεδεμένους με το βενζολικό τμήμα του βενζιμιδαζολικού δακτυλίου.
- Η ικανότητα αποδόμησης της βακτηριακής κοινοπραξίας βελτιώθηκε εντυπωσιακά με την προσθήκη TWEEN20 που είναι πιθανό να σχετίζεται με την βελτιστοποίηση της διαλυτότητας των ανθελμινθικών ουσιών.
- Η βακτηριακή κοινοπραξία που μελετήσαμε έχει την ικανότητα να διασπά και άλλα ανθελμινθικά πέραν του TBZ και έχει την προοπτική να χρησιμοποιηθεί σε στρατηγικές βιολογικού εμπλουτισμού για την απορύπανση επιβαρυσμένων κοπρσωρών πριν την εφαρμογή τους στον αγρό.

Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν

- Στην αξιολόγηση της ικανότητας της βακτηριακής κοινοπραξίας να αποδομεί τα mebendazole, flubendazole παρουσία TWEEN 20
- Στην αξιολόγηση της ικανότητας της βακτηριακής κοινοπραξίας να αποδομεί τα albendazole, fenbendazole, ricobendazole σε κοπριές και εδάφη

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Perruchon, C, Chatzinotas A., Omirou M., Vasileiadis S., Menkissoglou-Spirooudi U., Karpouzas D.G., (2017a) Isolation of a bacterial consortium able to degrade the fungicide thiabendazole: the key role of a *Sphingomonas* phylotype. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101:3881-3893
2. Perruchon C., Pantoleon A., Veroutis D., Gallego-Blanco S., Martin-Laurent F., Liadaki K., Karpouzas D.G., (2017b) Characterization of the biodegradation, bioremediation and detoxification capacity of a bacterial consortium able to degrade the fungicide thiabendazole. *Biodegradation* 28(5-6): 383-394
3. Iyyanki V. Muralikrishna, Valli Manickam, (2017), *Environmental Management Science and Engineering for Industry*, Introduction 1: 1-4
4. Holden-Dye, L. and Walker, R.J. Anthelmintic drugs (November 02, 2007), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.143.1, <http://www.wormbook.org>.
5. Geary, T.G. (2005). Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends Parasitol.* 21, 530–532
6. I.M. Abalis, M.E. Eldefrawi, A.T. Eldefrawi, (1986) Effects of insecticides on GABA-induced chloride influx into rat brain microsacs. *J. Toxicol. Env. Hlth.* 18(1):13-23
7. Greenwood, K., Williams, T., and Geary, T. (2005). Nematode neuropeptide receptors and their development as anthelmintic screens. *Parasitology* 131, 169-177
8. Iyyanki V. Muralikrishna, Valli Manickam, (2017), *Environmental Management Science and Engineering for Industry*, *Environmental Risk* 8: 135-152
9. Lacey, E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol. Today* 6, 112–115
10. Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration, Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 version, 2.0, 2006, p434
11. M. Danaher, H. De Ruyck, S.R.H. Crooks, G. Dowling, M. O’Keeffe, J. Chromatogr., (2007), Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices, *B* 845(1):1-37
12. A.J.M. Horvat, M. Petrovic, S. Babic, D.M. Pavlovic, D. Asperger, S. Pelko, A.D. Mance, M. Kashtelan-Macan, (2012), Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment, *Fate of anthelmintics in the environment*(3): 72-77
13. Francis A. Gunther, (2012), *Residue Reviews: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Breakdown products of TBZ, p154-158
14. Lee, B.H., Clothier, M.F., Dutton, F.E., Nelson, S.J., Johnson, S.S., Thompson, D.P., Geary, T.G., Whaley, H.D., Haber, C.L., Marshall, V.P., Kornis, G.I., McNally, P.L., Ciadella, J.I., Martin, D.G., Bowman, J.W.,

- Baker, C.A., Coscarelli, E.M., Alexander-Bowman, S.J., David, J.P., Zinser, E.W., Wiley, V., Lipton, M.F., and Mauragis, M.A. (2002). Marcfortine and Paraherquamide class of anthelmintics: Discovery of PNU-141962. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 779–793.
15. D.P. Jasmer, C. Yao, A. Rehman, S. Johnson, (2000), Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 105, p. 81-90
 16. Peter Hunt, Shilpa Kapoor, Stephen Doyle, Warwick Grant, (2015), The role of amphid signalling in ivermectin-mediated inhibition of reproduction in parasitic nematodes, *The Nematode Functional Genomics laboratory*, <https://nematodegenetics.wordpress.com/>
 17. Kesavan, R., Van Wambeke, E., Van Assche, C., 1976. The effects of certain factors on the persistence of thiabendazole, 2-(4-thiazolyl) benzimidazole in the soil environment. *Meded. Fak. Landbouwwet.* 41-45
 18. Vassil St. Georgiev, (1997), *Infectious Diseases in Immunocompromised Hosts*, 23.4.2.: 695-697
 19. Derek G. Waller, Tony Sampson, (2017), *Medical Pharmacology and Therapeutics E-Book*, 621-629
 20. Arthur Turner, (1987), *Logan Turner's Diseases of the Nose, Throat and Ear*, Agents active against Helminths 6: 2227-2231
 21. Van de Steene JC., Stove CP., Lambert WE., (2010) A field study on 8 pharmaceuticals and 1 pesticide in Belgium: Removal rates in waste water treatment plants and occurrence in surface water. *Science Total Environment* 408: 3448-3453
 22. Kreuzig R, Blümlein K, Hölting S. 2007 Fate of the benzimidazole antiparasitics flubendazole and fenbendazole in manure and manured soils. *Clean* 35(5):488–94
 23. Figueroa, R.A., Leonard, A., MacKay, A.A., 2004. Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays. *Environ. Sci. Technol.* 38, 476e483
 24. Boxall, A.B.A., Kolpin, D.W., Halling-Sorensen, B., Tolls, J., 2003. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ. Sci. Technol.* 37, 286A–294A.
 25. EMEA, 1997. Flubendazole-Summary Report 2. EMEA/MRL/267/97-FINAL
 26. J S Afr, (1982) The avermectins: A new family of antiparasitic agents., *Vet Assoc. Jun*;53(2):87-90
 27. Stephen W. Page, David B. Church, Jill E. Maddison, Samarasinghe, Vidyamali, (2008), *Small Animal Clinical Pharmacology (Second Edition)*, Antiparasitic drugs 10: 248-260
 28. Alistair B.A. Boxall, Dana W. Kolpin, Bent Halling Sorensen, Johanne Tolls Henkelgaa, (2003), Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks?, *Environmental Science and Technology*, August 2003, 297-294
 29. Turner, M.J. and Schaeffer, (1989), Mode of Action of Ivermectin. In: Campbell, W.C., Ed., *Ivermectin and Abamectin*, Springer-Verlag, New York, 73-88
 30. *Curr.* (2012), *Pharm Biotechnology* 13(6):853-865.
 31. Dragana Mutavdzic Pavlovic, Antonija Glavac, Mihaela Gluhak, Mislav

- Runje, (2018), Sorption of albendazole in sediments and soils: Isotherms and kinetics, *Chemosphere* 193: 635-644
32. Alan Puckowskia,*, Stefan Stolteb, Marta Wagila, Marta Markiewicz, Paulina Łukaszewicz, Piotr Stepnowski, Anna Białk-Bielinska, (2017), Mixture toxicity of flubendazole and fenbendazole to *Daphnia magna*, 575-576
 33. Köhler, (2001), The biochemical basis of anthelmintic action and resistance,
 34. Shoop WL, Egerton JR, Eary CH, Haines HW, Michael BF, Mrozik H, Eskola P, Fisher MH, Slayton L, Ostlind DA, Skelly BJ, Fulton RK, Barth D, Costa S, Gregory LM, Campbell WC, Seward RL, Turner MJ.,(1996) Eprinomectin: a novel avermectin for use as a topical endectocide for cattle, 26(11):1237-42.
 35. Bremner KC, Berrie DA, Hotson IK.,(1983), Persistence of the anthelmintic activity of ivermectin in calves., 113(24):569.
 36. Mehlhorn, Heinz, (2001). Encyclopedic reference of parasitology. 107 tables (2 ed.). Berlin [u.a.]: Springer. p. 259.
 37. Petri WA in Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC,(2011), Ed. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th ed., C42.:1095-1098
 38. Smith and Reynard,(1992), Textbook of Pharmacology, p919
 39. Halling-Sorensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lutzhoft H.C., Jorgensen S.E., 1998. Occurrence, fate and effect of pharmaceutical substances in the environment-a review. *Chemosphere*, 36: 357 - 393.
 40. Boxall A.B.A., 2010. Veterinary medicines in the environment. In Cunningham F., Elliott J., Lees P. (Eds): Comparative and veterinary pharmacology, Springer, Berlin, Germany, p. 291 - 314.
 41. Loke M.L., Ingerslev F., Halling-Sorensen B., Tjornelund J., 2000. Stability of Tylosin A in manure containing systems determined by high performance liquid chromatography. *Chemosphere*, 40: 759 - 765.
 42. Blackwell P., Boxall A., Kay P., Noble H., 2005. Evaluation of a lower tier exposure assessment model for veterinary medicines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2192 - 2201.
 43. O'Neil, M.J., Smith, M., Heckelman, 2001. The Merck Index, 13th ed. Merck & Co Inc., P-1785, 10074
 44. Litskas D. Vasilios, (2013) STUDY OF THE ROUTE OF VETERINARY MEDICINE EPRINOMECTIN (EPRINOMECTIN B1a) IN THE ENVIRONMENT, 8-13
 45. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
 46. Amari, M., Fodili, M., Nedjar-kolli, B., 2002. Reactivity studies on 4-aminopyrones: Access to benzimidazole and benzimidazolone derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* 39, 811
 47. Αντωνόπουλος Β.Ζ., 2001. Ποιότητα και ρύπανση υπόγειων νερών. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα, 344 σελ.
 48. Kohler, P., 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int. J. Parasitol.* 31, 336.
 49. Kay P., Blackwell P., Boxall A., 2005a. Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land. *Chemosphere*, 60: 497 - 507.

50. Campbell, W.C., Denham, D.A., 1983. Chemotherapy. In: Campbell, W.C. (Ed.), *Trichinella and Trichinosis*. *Plenum Press*, p.340.
51. Kay P., Blackwell P., Boxall A., 2005c. Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land. *Chemosphere*, 59: 951 - 959.
52. Kreuzig R., Holtge S., 2005. Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: laboratory experiments and test plot studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24: 771 - 776.
53. Lopez-Garcia ML, Torrado-Duran S, Torrado-Duran J, Martínez-Fernández AR, Bolás-Fernández F., (1997), Albendazole versus ricobendazole (albendazole-sulphoxide) against enteral and parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice, *Int J Parasitol.*(7):781-785.
54. Kreuzig R., Holtge S., Brunnotte J., Berenzen N., Wogram J., Sculz R., 2005. Test-plot studies on runoff of sulfonamides from manured soils after sprinkler irrigation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24: 777 - 781.
55. Fernandez C., Porcel M.A., Alonso A., San Andres M., Tarazona J.V., 2011. Semifield assessment of the runoff potential and environmental risk of the parasiticide drug ivermectin under Mediterranean conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 18: 1194 - 1201.
56. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>
57. Veroutis Dimitrios,(2016), Study of the detoxification of fungicide Thiabendazole by a consortium of proteobacteria,17-20
58. Dana G. Allen, Patricia M. Dowling,Dale A. Smith,Kirby Pasloske, J. Paul Woods, (2004), *Handbook of Veterinary Drugs*, 3rd Edition, part II: Section 5 Antimicrobial, Antiparasitic, and Anthelmintic Agents in Large Animals, p. 289-301
59. Robert I. Krieger, William C. Krieger, (2001), *Handbook of Pesticide Toxicology*, c56 - The Avermectins: Insecticidal and Antiparasitic Agents: 1157, 1163-1164
60. Thiele-Bruhn S. 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—A review. *J Plant Nutr Soil Sci* 166:145–167.