



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

---

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΤΗΝ  
ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΝΑ ΑΠΟΔΟΜΟΥΝ ΤΟ ΑΝΘΕΛΜΙΝΘΙΚΟ  
ΦΑΡΜΑΚΟ ALBENDAZOLE**

---

**Καλλιόπη Ευάγγελος Κουτρούτσιου**  
**Λάρισα, 2022**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Απομόνωση μικροοργανισμών που έχουν την ικανότητα να αποδομούν  
το ανθελμινθικό φάρμακο Albendazole

Isolation of microorganisms capable of degrading the anthelmintic  
drug Albendazole

Επιβλέπων Καθηγητής : Καρούζας Δημήτριος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Επιβλέπων Καθηγητής : Καρούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής  
Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μέλος: Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα  
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μέλος : Βασιλειάδης Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής  
Οικολογίας – Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος προπτυχιακών σπουδών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το θέμα της εργασίας αυτής υποδείχθηκε από τον Καθηγητή και Πρόεδρο του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας κ. Καρπούζα Δημήτριο τον οποίο ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη συνεργασία, την καθοδήγηση, την συνεχή επίβλεψη και την βοήθεια προκειμένου να υλοποιηθεί η παρούσα εργασία.

Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο Διδάκτορα Λαγό Ευστάθιο για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας αλλά και την άριστη συνεργασία καθόλη την συγγραφή και διόρθωση της πτυχιακής μου διατριβής. Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την εξαιρετική επικοινωνία και για συνεργατικό κλίμα που υπήρχε.

Λάρισα 2022

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ανθελμινθικά κτηνιατρικά φάρμακα δρουν ενάντια των ελμίνθων του γαστρεντερικού σωλήνα, οι οποίοι προκαλούν σοβαρές λοιμώξεις στα ζώα με αποτέλεσμα να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της υγείας και της παραγωγικότητας των ζώων παραγωγής. Η συνεχής και αυξανόμενη χρήση των φαρμάκων μπορεί να οδηγήσει σε ρύπανση τόσο των εδαφικών όσο και των υδάτινων οικοσυστημάτων, καθώς λόγω του μειωμένου μεταβολισμού τους στα ζώα, απεκκρίνονται σε μεγάλο βαθμό αρχικά στα κόπρανα των ζώων και τελικά στο περιβάλλον. Έτσι, είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της εφαρμογής ρυπασμένων κορποσωρών για λόγους λίπανσης, οι ουσίες αυτές απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Επομένως, είναι αναγκαία η αναζήτηση εφαρμογών και μεθόδων που θα οδηγήσουν στην μείωση του περιβαλλοντικού τους αποτυπώματος. Μια ενδιαφέρουσα και μη κοστοβόρα προσέγγιση αποτελεί η *in situ* βιοαποδόμηση μέσω βιοεμπλουτισμού. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την προσθήκη ενός εναιωρήματος μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί ως αποδομητές του συγκεκριμένου παράγοντα ρύπανσης σε ένα ρυπασμένο υπόστρωμα.

Στην παρούσα έρευνα, μελετήθηκε το ανθελμινθικό κτηνιατρικό φάρμακο Albendazole το οποίο ανήκει στην χημική κατηγορία των βενζιμιδαζολών. Τα φάρμακα αυτά χρησιμοποιούνται κυρίως στην κτηνοτροφία για την καταπολέμηση των παρασιτικών ελμίνθων. Για τη πραγματοποίηση του πειράματος, έγινε συλλογή κοπράνων από κτηνοτροφικές μονάδες της νήσου Λέσβου στις οποίες γινόταν επαναλαμβανόμενη χορήγηση αυτού του φαρμάκου στα ζώα και επομένως υπήρχε συστηματική απελευθέρωση του στο έδαφος μέσω των κοπράνων.

Η συγκεκριμένη μελέτη είχε ως σκοπό την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνα για την επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση του Albendazole στα εδάφη που είχαν συλλεγεί, με βάση προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος. Για την περαιτέρω διερεύνηση αυτού του στόχου πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες εμπλουτισμού σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα ανάπτυξης (MSM και MSMN), όπου το ανθελμινθικό φάρμακο αποτελούσε τη μοναδική πηγή άνθρακα και αζώτου. Ακολούθησε η απομόνωση των αποικιών που είχαν την ικανότητα να αποδομούν το Albendazole στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης MSMN καθώς στην περίπτωση του MSM δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αποδομητική ικανότητα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση των απομονωμένων αποικιών μέσω ανάλυσης του 16S rRNA γονιδίου. Τέλος από την φυλογενετική ανάλυση, μετά την αλληλούχιση του 16S rRNA προέκυψαν τρεις διακριτές αποικίες, όλες αποτελούμενες από στελέχη του γένους *Acinetobacter*. Οι δύο από αυτές φυλογενετικά συσχετίζονται περισσότερο με το είδος *Acinetobacter Calcoaceticus* και η μία με το *Acinetobacter pittii*. Η πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματος των απομονωθέντων βακτηρίων θα δώσει μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για την ταξινόμηση τους σε επίπεδο είδους. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά για την απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το Albendazole. Περαιτέρω μελέτες θα επικεντρωθούν στον χαρακτηρισμό της μεταβολικής οδού και του γενετικού δικτύου των απομονωμένων στελεχών του γένους *Acinetobacter* καθώς και της ικανότητας τους να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά με την μορφή εμβολίου για τον βιοεμπλουτισμό και την βιοαπορρύπανση κορποσωρών.

## **ABSTRACT**

Anthelmintic veterinary drugs act against helminths of the gastrointestinal tract that cause serious infections in animals, thus playing an important role in maintaining the health and productivity of production animals. The continuous and increasing use of those drugs can lead to the pollution of both terrestrial and aquatic ecosystems, as they are largely excreted initially in the feces of animals, due to their reduced metabolism, and finally in the environment. Thus, either directly or indirectly through the application of contaminated manures for fertilization purposes, these substances are released into the environment. Therefore, it is necessary to search for applications and methods that will lead to the reduction of their environmental footprint. An interesting and inexpensive approach is in situ biodegradation through bioenrichment. This method involves the addition of a suspension of microorganisms that have been isolated and characterized as decomposers of the specific pollutant to a contaminated substrate.

In the present research, the anthelmintic veterinary drug Albendazole was studied which belongs to the chemical class of benzimidazoles. These drugs are mainly used in animal husbandry to combat parasitic helminths. To carry out the experiment, feces were collected from livestock units on the island of Lesbos where this drug was repeatedly administered to the animals and therefore there was a systematic release of it into the soil through the feces.

The purpose of this study was to isolate and characterize microorganisms responsible for the accelerated biodegradation of Albendazole in the collected soils, based on previous studies carried out at the Plant & Environmental Biotechnology Laboratory. To further investigate this objective, enrichment cultures were performed in selective growth media (MSM and MSMN), where the anthelmintic drug in question was the sole source of carbon and nitrogen. This was followed by isolation of colonies capable of degrading Albendazole in the MSMN growth medium as no significant degrading capacity was observed in the case of MSM. This was followed by molecular analysis of the isolated colonies by analysis of the 16S rRNA gene. Finally, from the phylogenetic analysis, after 16S rRNA sequencing, three distinct colonies emerged, all consisting of strains of the genus *Acinetobacter*. Two of them are phylogenetically more closely related to the *Acinetobacter Calcoaceticus* species and one to *Acinetobacter pittii*. Complete genome sequencing of isolated bacteria will provide a clearer picture of their classification at the species level. This particular study is the first report on the isolation of bacteria that degrade Albendazole. Further studies will focus on characterizing the metabolic pathway and genetic network of *Acinetobacter* isolates as well as their ability to be effectively used as a vaccine for bioenrichment and manure bio-depollution.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Κτηνιατρικά φάρμακα.....	9
1.2 Ελμινθες- Παράσιτα γαστρεντερικού.....	10
1.3 Αναγκαιότητα χρήσης κτηνιατρικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση των ελμίνθων.....	11
1.4 Ανθελμινθικά κτηνιατρικά φάρμακα- Βενζιμιδαζόλες.....	14
1.4.1 Βενζιμιδαζόλες-Albendazole.....	14
1.5 Περιβαλλοντική τύχη ανθελμινθικών βενζιμιδαζολικών φαρμάκων.....	17
1.6 Πρόληψη ρύπανσης περιβάλλοντος απο ανθελμινθικά φάρμακα.....	18
1.7 Σκοπός Πειράματος.....	19
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1 Δείγμα εδάφους.....	21
2.2 Κτηνιατρικό φάρμακο και Διαλύτες.....	21
2.3 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης.....	21
2.3.1 Παρασκευή θρεπτικών μέσων ανάπτυξης.....	22
2.3.2 Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB.....	23
2.4 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για το Albendazole.....	24
2.5 Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το Albendazole.....	25
2.5.1 Προεπεξεργασία εδάφους.....	25
2.5.2 Εμπλουτισμός καλλιιεργειών.....	25
2.5.3 Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το Albendazole.....	26
2.6 Μοριακή ταυτοποίηση των απομονωθέντων βακτηρίων.....	28
2.6.1 Απομόνωση DNA.....	28
2.6.2 Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου με την μέθοδο της PCR.....	28
2.6.3 Καθαρισμός των προϊόντων PCR (PCR clean up).....	29
2.6.4 Ένθεση σε πλασμιδιακούς φορείς.....	29
2.6.5 Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα E.coli.....	30
2.6.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και αλληλούχιση.....	31
2.6.7 Ταυτοποίηση απομονωμένων βακτηρίων και φυλογενετική ανάλυση.....	31

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1 Αποδόμηση του ανθελμινθικού φαρμάκου Albendazole στις καλλιέργειες εμπλουτισμού.....	33
3.2 Απομόνωση βακτηρίων με ικανότητα αποδόμησης του Albendazole.....	36
3.3 Διαδικασία ταυτοποίησης βακτηρίων που αποδομούν το Albendazole.....	39
3.3.1. Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα, εξαγωγή πλασμιδιακού DNA και αλληλούχιση.....	39
3.4 Αποτέλεσμα αλληλούχισης και κατασκευή φυλογενετικού δένδρου.....	40
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
4.1 Απομόνωση βακτηρίων με την ικανότητα αποδόμησης του Albendazole.....	42
4.2 Τελικά Συμπεράσματα.....	44
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	45





# 1 . ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Κτηνιατρικά φάρμακα

Πολλά κτηνιατρικά φάρμακα τα τελευταία χρόνια έχουν προκαλέσει αρκετό ενδιαφέρον σε ερευνητικό επίπεδο λόγω της ρύπανσης που προξενούν στο περιβάλλον αλλά και λόγω των επιπτώσεων που έχουν στα ζώα. Κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή, την απώθηση ή τη μείωση κάθε παρασίτου που προσβάλλει τα ζώα καλείται κτηνιατρικό φάρμακο. Η κτηνοτροφία μπορεί να πληγεί από πλήθος προσβολών όπως παράσιτα, έντομα και μικροοργανισμούς. Μερικά κτηνιατρικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση αυτών των παρασίτων χαρακτηρίζονται ως «emerging pollutants» καθώς δεν εμφανίζονται στο περιβάλλον παρα μόνο μετά από ανθρωπογενή δραστηριότητα. Για αυτόν τον λόγο, πολλές βλαβερές επιδράσεις που μπορεί να έχουν σε εδαφικά περιβάλλοντα δεν πρέπει να παραμεληθούν (Horvat et al., 2012). Επίσης, είναι σημαντικό να επιτευχθεί η αύξηση στην χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων ώστε να βελτιωθεί όσο περισσότερο γίνεται η κτηνοτροφική παραγωγή τόσο σε επίπεδο μείωσης απωλειών και μετάδοσης ασθενειών μέσω της τροφικής αλυσίδας, όσο και σε επίπεδο μεγαλύτερης και ποιοτικότερης παραγωγής τροφίμων (Martin, Ward and Martin, 2011).

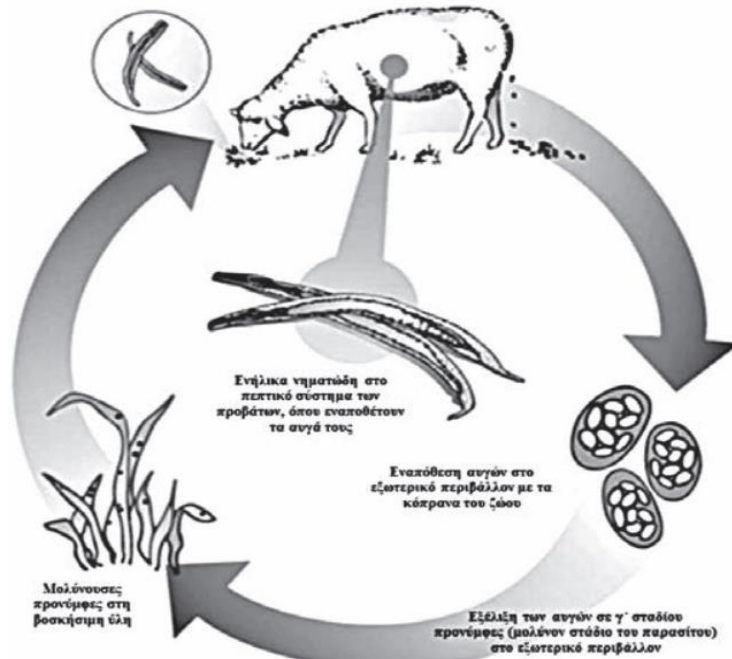
Τα κτηνιατρικά φάρμακα προσφέρουν πολλά οφέλη στις κτηνοτροφικές μονάδες, τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις βασικούς τομείς: κοινωνικό, οικονομικό και περιβαλλοντικό (Cooper and Dobson, 2007). Η αποφυγή σοβαρών λοιμώξεων, τόσο για τον άνθρωπο όσο και στη ζωική παραγωγή, είναι πολύτιμο πλεονέκτημα των κτηνιατρικών φαρμάκων. Πέρα από την ζωική παραγωγή, η αντιμετώπιση πολλών παθογόνων που προσβάλλουν τα ζώα, προστατεύει άμεσα και τους ανθρώπους, δεδομένου ότι τα ζώα μπορεί να μεσολαβήσουν ως ξενιστές για την μετάδοση σοβαρών ασθενειών (Cooper and Dobson, 2007).

## 1.2 Έλμινθες- παράσιτα γαστρεντερικού

Οι έλμινθες είναι μια ποικιλόμορφη ομάδα σκωλήκων που παρασιτούν στο σώμα των ζώων και του ανθρώπου. Η μόλυνση των ζώων με παρασιτικούς σκωλήκες επιφέρει μεγάλη επιβάρυνση για την υγεία των ζώων που τελικά οδηγεί σε μεγάλες απώλειες στην παραγωγικότητα αυτών των ζώων αλλά και σε οικονομικές απώλειες στους κτηνοτρόφους (Dyary, Hiewa, 2016). Με τον όρο ελμινθίαση εννοείται μία παρασιτική μόλυνση ενός ζωικού οργανισμού από έλμινθες ή σκωλήκες, τα οποία είναι ενδοπαράσιτα και ταξινομούνται με βάση τη μορφολογία τους σε δύο μεγάλες ομοταξίες: τους πλατυέλμινθες και τους νηματώδεις σκωλήκες (Riviere and Papich, 2009). Ο έλεγχος της ελμινθίασης εξαρτάται σχεδόν αποκλειστικά από τη χρήση ανθελμινθικών φαρμάκων, λόγω της ευκολίας εφαρμογής και του χαμηλού κόστους θεραπείας, σε σύγκριση με άλλες μεθόδους ελέγχου (Dyary, Hiewa, 2016).

Η βόσκηση αποτελεί μία σημαντική παράμετρο στην εκτροφή των προβάτων και των αιγών, καθώς καλύπτει μεγάλο μέρος της διατροφής τους και προσδίδει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και υψηλή ποιότητα στα παραγόμενα προϊόντα. Στις εκτροφές αυτές οι παρασιτικές μολύνσεις είναι ιδιαίτερα συχνές καθώς επιδρούν σημαντικά στην υγεία των ζώων και οδηγούν στη μείωση της παραγωγής των προϊόντων. Αυτό γίνεται διότι η βόσκηση συνεπάγεται και κατανάλωση προνυμφών γαστρεντερικών ελμίνθων από τα ζώα. Οι επιπτώσεις στην υγεία αλλά και την παραγωγικότητα των ζώων που προσβάλλουν είναι τόσο άμεσες (θνησιμότητα, μείωση παραγωγικότητας) όσο και έμμεσες (κόστος αποπαρασιτώσεων και απόρριψη προϊόντων), (Σαράτση Κ., 2015).

Ο γαστρεντερικός παρασιτισμός είναι ένας από τις πιο συνηθισμένες λοιμώξεις στα ζώα. Οι επιπτώσεις που έχουν αυτές οι λοιμώξεις στα ζώα εξαρτώνται από την πανίδα των παρασίτων (Mavrot F. et al, 2015). Τα παράσιτα αυτά μολύνουν τα ζώα παραγωγής μέσω της τροφής όταν αυτά βρίσκονται στη διαδικασία της βόσκησης. Η μόλυνση από γαστρεντερικά νηματώδη οδηγεί σε μείωση της παραγωγής και της ποιότητας των ζωοκομικών προϊόντων. Τα κυριότερα νηματώδη που προσβάλλουν τα συγκεκριμένα ζώα παραγωγής είναι αυτά της οικογένειας Trichostrongylidae. Τα παράσιτα αποβάλλονται από το ζώο μέσω κοπράνων στο εξωτερικό περιβάλλον και ελευθερώνουν προνύμφες οι οποίες εξελίσσονται σε προνύμφες 3<sup>ου</sup> σταδίου (L3-μολύνουσες μορφές). Με αυτή τη μορφή προσβάλλουν το ζώο και ενηλιώνονται στον γαστρεντερικό σωλήνα. Με την ενηλικίωση ξεκινάει η διαδικασία παραγωγής αυγών, τα οποία αποβάλλονται στο φυσικό περιβάλλον μέσω των κοπράνων του ζώου ολοκληρώνοντας έτσι τον βιολογικό κύκλο τους (Εικόνα 1), (Σαράτση Κ., 2015).



**Εικόνα 1:** Βιολογικός κύκλος γαστρεντερικών νηματωδών

### 1.3 Αναγκαιότητα χρήσης κτηνιατρικών φαρμάκων για καταπολέμηση των ελμίνθων

Εδώ και πολλά χρόνια η αντιμετώπιση των παρασιτώσεων, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στηρίζεται κυρίως στη χρήση ευρέως φάσματος χημικών ουσιών που είναι τα ανθελμινθικά φάρμακα. Η ταξινόμησή τους σε ομάδες πραγματοποιείται με βάση τη χημική δομή τους, τον τρόπο και το εύρος δράσης τους. Τα ανθελμινθικά φάρμακα διακρίνονται σε βενζιμιδαζόλες και προβενζιμιδαζόλες, ιμιδαζοθειαζόλες και τετραϋδροπυριμιδίνες, μακροκυκλικές λακτόνες και παράγωγα αμινο-ακετονιτριλίου (Sager et al., 2009). Παρακάτω αναφέρονται κάποιες βασικές πληροφορίες για κάθε μία από τις κατηγορίες ανθελμινθικών φαρμάκων:

- Βενζιμιδαζόλες και προ-βενζιμιδαζόλες

Οι βενζιμιδαζόλες αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα ανθελμινθικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία των ενδοπαρασίτων στα ζώα. Κάποια από τα γενικά χαρακτηριστικά τους είναι το ευρύ φάσμα δράσης και ο μεγάλος δείκτης ασφάλειας. (Rang et

al, 1999). Ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των βενζιμιδαζολών είναι: parbendazole, mebendazole, oxibendazole, fenbendazole, oxfendazole, albendazole, ciclo bendazole, flubendazole, luxobendazole και triclabendazole. Οι προ-βενζιμιδαζόλες είναι πρόδρομες ανενεργές μορφές των βενζιμιδαζολών. Οι ουσίες αυτές εισέρχονται στον οργανισμό και μεταβολίζονται σε ενεργές βενζιμιδαζόλες. Για παράδειγμα, η ουσία netobimin θα μετατραπεί σε Albendazole (ABZ) μέσω μίας διεργασίας κυκλοποίησης και οξείδωσης (Rang et al., 1999). Ο μηχανισμός δράσης των βενζιμιδαζολών είναι παρόμοιος σε όλα τα μέλη και οι διαφορές τους εντοπίζονται στην διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα τους μέσα στον οργανισμό (McKellar and Scott 1990, Lanusse and Prichard, 1993).

Οι βενζιμιδαζόλες και οι προ-βενζιμιδαζόλες είναι αποτελεσματικές έναντι των περισσότερων νηματωδών παρασίτων. Μία από τις βενζιμιδαζόλες, το Albendazole, είναι αποτελεσματική κατά των υποβιουσών δ' σταδίου προνυμφών παρασίτων, όπως των *Ostertagia spp.* Η δράση αυτή επιτυγχάνεται μέσω του αυξημένου χρόνου μεταβολισμού τους και της παρατεταμένης παραμονής στους ιστούς του ζώου και αυτό έχει ως συνέπεια να αυξάνεται ο χρόνος επαφής τους με τα παράσιτα και να μεγαλώνει η αποτελεσματικότητά τους. Ειδικότερα για το Albendazole, γνωρίζουμε ότι δρα έναντι όλων των νηματωδών παρασίτων (αναπνευστικών και γαστρεντερικών), τόσο στις ενήλικες όσο και στις προνυμφικές μορφές (Brander et al., 1991).

- Ιμιδαζοθειαζόλες και τετραϋδροπυριμιδίνες

Η κατάταξη τους γίνεται στην ίδια ανθελμινθική κλάση λόγω του παρόμοιου τρόπου δράσης αλλά και λόγω των ομοιοτήτων που παρουσιάζουν στην δομή των μορίων τους. Οι ιμιδαζοθειαζόλες αποτελούνται από τις: tetramizole και levamisole και οι τετραϋδροπυριμιδίνες από τις: morantel, oxantel και pyrantel. Οι ουσίες αυτές είναι αγωνιστές των νικοτινικών υποδοχέων (Aceves et al., 1970) και δρουν προκαλώντας σπαστική μυϊκή παράλυση λόγω της παρατεταμένης ενεργοποίησης των διεγερτικών νικοτινικών υποδοχέων στους μύες του σωματικού τοιχώματος των παρασίτων και τελικά οδηγούν σε νευρομυϊκή παράλυση (Martin et al., 2005).

- Μακροκυκλικές λακτόνες

Οι μακροκυκλικές λακτόνες είναι η πιο σημαντική κατηγορία φαρμάκων που αποσκοπούν στην αντιμετώπιση των γαστρεντερικών νηματωδών. Αποτελούνται από δύο υποομάδες, τις αβερμεκτίνες και τις μιλβεμυκίνες. Στις πρώτες κατατάσσονται τα ivermectin, abamectin, doramectin και eprinomectin, ενώ στις μιλβεμυκίνες περιλαμβάνονται moxidectin, η nemadectin, milbemycin και selamectin, (McKellar and Benchaoui, 1996).

Στον μηχανισμό δράσης τους περιλαμβάνεται η ένωση τους με τους υποδοχείς των διαύλων χλωρίου και την διάνοιξη των διαύλων αυτών στη μετασυναπτική σύνδεση της κυτταρικής μεμβράνης μυϊκών και νευρικών κυττάρων των παρασίτων. Το γεγονός αυτό έχει ως

αποτέλεσμα την μεταβολή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης στα ιόντα χλωρίου και τελικά την υπερπόλωση του κυττάρου. Με την επερχόμενη υπερπόλωση παρεμποδίζεται η έναρξη των δυναμικών δράσης στο παράσιτο επιφέροντας παράλυση και θάνατο (Beech et al., 2010a). Δρούν κυρίως στους φαρυγγικούς μυς εμποδίζοντας την θρέψη των παρασίτων (Pemberton et al. 2001) αλλά και σε μυς του σωματικού τοιχώματος δυσκολεύοντας την κίνηση τους (Kass et al.,1982).

- Παράγωγα άμινο-ακετονιτριλίου (AAD's)

Είναι μία σχετικά νέα ομάδα που προστέθηκε στην κατηγορία των ανθελμινθικών φαρμάκων με το κυριότερο μέλος να αποτελεί το monerantel (Kaminsky et al.2008b). Το φάρμακο αυτό χρησιμοποιείται έναντι στις γαστρεντερικές παρασιτώσεις από νηματώδη και σε μία άλλη έρευνα έχει αναφερθεί η αποτελεσματικότητα του έναντι σε νηματώδη προβάτου (Hosking et al., 2008). Ο στόχος της ουσίας αυτής είναι οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης στα νηματώδη (Rufener et al., 2010a) που επιφέρει εκφύλιση των νευρικών κυττάρων και ασυντόνιστες κινήσεις που προκαλούν τον θάνατο των παρασίτων (Rufener et al., 2010b).

Όλες αυτές οι ενώσεις μπορούν να εμφανιστούν με απέκκριση, είτε αμετάβλητες είτε ως μεταβολίτες, οι οποίοι μπορεί να διατηρήσουν την παρασιτοκτόνο δραστηριότητα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο μεταβολίτης του ανθελμινθικού βρέθηκε να έχει μεγαλύτερη επίδραση από την μητρική ένωση (Horvat et al., 2012). Οι βενιμιδαζόλες που είναι και η κατηγορία που επικεντρωθήκαμε δεν αποικοδομούνται εύκολα στο περιβάλλον με αποτέλεσμα να είναι σημαντική η εκτίμηση της απορρόφησης τους στο περιβάλλον και στην λυματολάσπη έτσι ώστε να προβλεφθεί ο περιβαλλοντικός κίνδυνος που ενέχει η χορήγηση τους στα ζώα.

## 1.4 Ανθελμινθικά κτηνιατρικά φάρμακα- Βενζιμιδαζόλες

Οι βενζιμιδαζόλες είναι η μεγαλύτερη χημική οικογένεια που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ενδοπαρασιτικών ασθενειών σε οικόσιτα ζώα (Horvat et al., 2012). Με τα χρόνια της ενεργούς έρευνας, η βενζιμιδαζόλη είναι πολύ σημαντική λόγω της παρουσίας της σε ένα ευρύ φάσμα βιοδραστικών ενώσεων όπως αντιπαρασιτικά, αντισπασμωδικά, αναλγητικά, αντισταμινικά, αντιέλκη, αντιικά και σε αντιφλεγμονώδεις παράγοντες (Bansal & Silakari, 2012). Οι βενζιμιδαζόλες ως η κύρια και μεγαλύτερη ομάδα ανθελμινθικών για τη αντιμετώπιση ελμίνθων στα ζώα διαθέτουν ευρύ φάσμα δράσης. Η μεγάλη αποτελεσματικότητά τους στηρίζεται στις ιδιαίτερες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητές τους. Οι προβενζιμιδαζόλες αποτελούν πρόδρομες ανενεργές μορφές των βενζιμιδαζολών οι οποίες όταν εισέρχονται σε κάποιον ζωικό οργανισμό ενεργοποιούνται μέσω του μεταβολισμού τους.

Ο μηχανισμός δράσης τους σχετίζεται με την ακεραιότητα του κυτταρικού σκελετού των παρασίτων. Επίσης, προκαλούν μεταβολικές διαταραχές σε λειτουργίες των κυττάρων, όπως η λήψη και αποθήκευση γλυκόζης και αμινοξέων αλλά και η σύνθεση πρωτεϊνών, επάγοντας τον θάνατο των παρασίτων. Οι βενζιμιδαζόλες εναποτίθενται στο περιβάλλον μέσω των ούρων και των κοπράνων των ζώων που βρίσκονται σε κτηνοτροφικές μονάδες και χαρακτηρίζονται από υψηλή υπολειμματικότητα και βραδεία αποδόμηση με αποτέλεσμα να εντοπίζονται ως έχουν στο περιβάλλον αλλά και με την μορφή των μεταβολικών τους προϊόντων (Kreuzig, 2007).

### 1.4.1 Βενζιμιδαζόλες- Albendazole

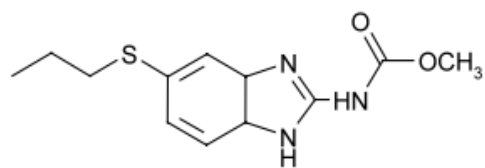
Το Albendazole (methyl 5- (propylthio)-2-benzimidazolecarbamate) είναι ένα συνθετικό βενζιμιδαζολικό ανθελμινθικό φάρμακο με εμπορική ονομασία Albenza (Gyurik et al., 1981). Η εφαρμογή του γίνεται κυρίως σε βοοειδή και αιγοπρόβατα, αλλά και σε γάτες, σκύλους, πτηνά και σε υδατοκαλλιέργειες ψαριών είτε με στοματική χορήγηση είτε σε υγρή μορφή (Gyurik et al., 1981).

Συγκεκριμένα, ο μηχανισμός του Albendazole είναι να επιφέρει εκφυλιστικές αλλοιώσεις στα κύτταρα με σύνδεση σε ευαίσθητες στην κολχικίνη θέσεις της β-τουμπουλίνης, μιας συστατικής κυτταρικής πρωτεΐνης, αναστέλλοντας έτσι τη συναρμολόγησή του στη μικροτουμπουλίνη (Diawara et al., 2013). Η συγκεκριμένη δράση του κατά τα παρασιτικά κύτταρα και όχι στα κύτταρα θηλαστικών αποδίδεται στην προνομιακή δέσμευσή του στην παρασιτική β-τουμπουλίνη. Έτσι, προκύπτει και ο υψηλός δείκτης ασφαλείας, που παρουσιάζουν οι ουσίες της κλάσης αυτής ο οποίος οφείλεται στην επιλεκτική σύνδεσή τους με τη σωληνίνη των παρασίτων και όχι με αυτήν του ξενιστή/θηλαστικού (Gull et al., 1987). Επιπρόσθετα, οδηγεί σε μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης από τον ενήλικα και τις προνυμφικές μορφές των παρασίτων, και τελικά εξαντλεί την αποθήκευση γλυκογόνου. Ως συνέπεια, η παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης μειώνεται λόγω ανεπαρκούς γλυκόζης και οδηγεί στο θάνατο του παρασίτου (Diawara et al., 2013). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, το Albendazole διαταράσσει επίσης παρασιτικές μεταβολικές

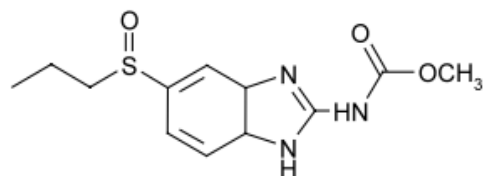
οδούς αναστέλλοντας τα μεταβολικά ένζυμα που εμπλέκονται στον κύκλο του Krebs. Το Albendazole επάγει τα ένζυμα του συστήματος του κυτοχρώματος P450 που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό του και τη σιμετιδίνη, η οποία αναστέλλει το σύστημα του κυτοχρώματος P450 και συνεπώς έχει τη συνολική επίδραση στην αύξηση των επιπέδων του Albendazole sulfoxide δηλαδή του κύριου μεταβολίτη του (P.Venkatesan,1998).

Ένα άλλο χαρακτηριστικό του είναι η ελαττωμένη απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα (G Shyam Prasad et al,2009) λόγω χαμηλής υδατοδιαλυτότητας με αποτέλεσμα να μειώνεται η συστηματική διαθεσιμότητα και η αποτελεσματικότητα του (Molina et al., 2007). Το Albendazole αρχικά οξειδώνεται σε Albendazole sulfoxide (ή ricobendazole), το οποίο έχει επίσης ανθελμινθική δραστηριότητα και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ελμινθιάσεων, και στη συνέχεια οξειδώνεται περαιτέρω σε Albendazole sulfone (P.Venkatesan,1998). Ο μεταβολισμός του γίνεται στο ήπαρ σε γρήγορο ρυθμό και έπειτα μετατρέπεται σε albendazole sulfoxide ο οποίος είναι και ο κύριος μεταβολίτης και περαιτέρω σε albendazole sulfone και άλλους οξειδωτικούς μεταβολίτες. Το albendazole sulfoxide εμφανίζει αντιπαρασιτικές ιδιότητες και μπορεί να χορηγηθεί ως ανθελμινθικό φάρμακο (Molina et al., 2007).

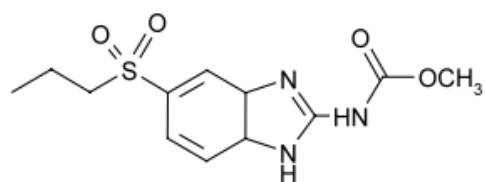
Όσον αναφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες του Albendazole ο χημικός του τύπος είναι  $C_{12}H_{15}N_3O_2S$  και το μοριακό του βάρος 265.34 g/mol. Η μορφή του είναι σε άχρωμους κρυστάλλους και είναι διαλυτό σε διμεθυλοσουλφοξείδιο, ισχυρά οξέα και βάσεις ενώ είναι ελαφρώς διαλυτό σε μεθανόλη, χλωροφόρμιο, οξικό αιθυλεστέρα και ακετονιτρίλιο και τέλος είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό (Jung, 1998).



Albendazole (ABZ)



Albendazole sulphoxide (ASOX)



Albendazole sulphone (ASON)

**Εικόνα 2:** Η μετατροπή του albendazole σε albendazole sulfoxide και albendazole sulfone.



## 1.5 Περιβαλλοντική τύχη των βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών φαρμάκων

Οι βενζιμιδαζόλες μετά τη χορήγησή τους στα ζώα μπορούν να καταλήξουν σε υδάτινα ή εδαφικά οικοσυστήματα και μπορεί να καταναλωθούν από τον άνθρωπο ως κατάλοιπα σε τρόφιμα ζωικής ή φυτικής παραγωγής. Μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία έχουν βρεθεί πολύ λίγες δημοσιεύσεις για τη αποδόμηση των φαρμάκων σε κοπρωσωρούς (Teeter and Meyerhoff, 2003, Kolz et al., 2005). Τα βενζιμιδαζολικά φάρμακα καταλήγουν στην κοπριά των ζώων μετά απο απέκκριση τους και μέσω χρήσης των κοπράνων αυτών ως λίπασμα για την βελτίωση της θρεπτικής κατάστασης των εδαφών, στα ίδια τα εδάφη με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο περιβαλλοντικός κίνδυνος (García-galán et al., 2010). Επίσης, η προσρόφηση των κτηνιατρικών φαρμάκων στην οργανική ουσία και η έκπλυση τους στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα αποτελούν καταλυτικές διεργασίες για την περιβαλλοντική τους τύχη (Wohde et al., 2016).

Ως έκπλυση αναφέρουμε την διεργασία κατά την οποία ένα κτηνιατρικό φάρμακο που έχει διαλυθεί στο έδαφος μπορεί να μετακινηθεί με το νερό προς βαθύτερα στρώματα καταλήγοντας στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα. Ως προσρόφηση ορίζεται η προσέλκυση και η συγκράτηση των μορίων του βενζιμιδαζολικού φαρμάκου από την επιφάνεια των κolloειδών του εδάφους είτε οργανικών είτε ανόργανων. Επηρεάζεται απο παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία αλλά και η ποσότητα της οργανικής ύλης του υπο μελέτη εδάφους.

Μια σημαντική ιδιότητα των βενζιμιδαζολικών φαρμάκων είναι η υδατοδιαλυτότητα του δηλαδή η ικανότητα διαλυτοποίησής τους στο νερό. Η ιδιότητα αυτή καθορίζει την μετακίνησή τους στο περιβάλλον. Ειδικότερα, ένα ποσοστό των βενζιμιδαζολικών φαρμάκων καταλήγει στα κolloειδή σωματίδια του εδάφους λόγω προσρόφησης και ένα άλλο εναποτίθεται στο εδαφικό διάλυμα. Το νερό που εισέρχεται στο έδαφος μέσω της βροχής και της άρδευσης οδηγεί τα βενζιμιδαζολικά φάρμακα να αποδεσμευθούν από τα εδαφικά κolloειδή και να επαναδιαλυτοποιηθούν στο εδαφικό διάλυμα μέσω της εκρόφησης. Όσο πιο πολύ αυξάνεται η υδατοδιαλυτότητα τόσο λιγότερο ισχυρή θα είναι η προσρόφηση (Rao and Hornsby, 2001).

Συγκεκριμένα, υπολείμματα του φαρμάκου Albendazole και των παραγόμενων μεταβολιτών του δηλαδή του albendazole sulfone και albendazole sulfoxide έχουν ανιχνευθεί σε κοπριές, λύματα, υπόγεια και επιφανειακά ύδατα (Van De Steen et al., 2010). Η αυξημένη υδροφοβικότητά του προκαλεί και υψηλές τιμές προσρόφησης σε σχέση με τις υπόλοιπες βενδιμιδαζόλες, επιβεβαιώνοντας τη θετική συσχέτιση προσρόφησης και υδροφοβικότητας (Kim et al, 2011). Αυτή η ισχυρή προσρόφηση μειώνεται σε αυξημένες τιμές pH (Babic et al., 2018). Ορισμένοι παράγοντες που καθορίζουν την προσρόφηση του albendazole στο έδαφος είναι το pH, τα ιχνοστοιχεία, η περιεκτικότητά του εδάφους σε οργανική ουσία αλλά και ο χρόνος ημιζωής του που συνήθως είναι λιγότερο από 6,5 ημέρες (Min and Hu, 2013).

## 1.6 Πρόληψη ρύπανσης απο ανθελμινθικά φάρμακα

Κάποιες περιβαλλοντικές μελέτες επιβεβαιώνουν την εμφάνιση υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων σε κοπροσωρούς, σε λύματα, σε ύδατα και στο έδαφος (Van De Steene et al., 2010). Η ευρεία χρήση των βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών φαρμάκων οδηγεί σε μόλυνση του περιβάλλοντος και μπορεί να έχει επιβλαβείς επιπτώσεις στα μη στοχευόμενα είδη λόγω της άφθονης απέκκρισης της μητρικής ουσίας αλλά και των μεταβολιτών που προέρχονται απο αυτήν (Horvat J. et al, 2012). Υπάρχουν περιορισμένες διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την περιβαλλοντική εμφάνισή τους, ιδιαίτερα στα υπόγεια ύδατα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα να θεωρούνται ως πιθανοί αναδυόμενοι ρύποι που προκαλούν ανησυχία. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τη διερεύνηση της εμφάνισης 40 ανθελμινθικών υπολειμμάτων σε υπόγεια ύδατα το Albendazole και τα παράγωγα του ήταν υπολείμματα που ανιχνεύθηκαν πιο συχνά, καθώς βρέθηκαν στο 8% των υπόγειων υδάτων και στο 28% των επιφανειακών υδάτων (D. Mooney et al, 2021). Για αυτό τον λόγο είναι επιτακτική ανάγκη η εφαρμογή μεθόδων πρόληψης της περιβαλλοντικής ρύπανσης.

Μέσω ορισμένων πειραμάτων σε εδάφη επιβεβαιώθηκε πως η κατεργασία της κοπριάς πριν από την εφαρμογή των κοπροσωρών είναι μια μέθοδος που μειώνει τον περιβαλλοντικό κίνδυνο που προκαλούν τα κτηνιατρικά φάρμακα (Kay et al. 2005a). Αυτή η μείωση του περιβαλλοντικού κινδύνου των στερεών αυτών αποβλήτων επιτυγχάνεται μέσω α) εφαρμογής της κομποστοποίησης (composting) κατά την οποία τα οργανικά συστατικά των απορριμμάτων αποσυντίθενται από μικτούς πληθυσμούς μικροοργανισμών υπό υγρές, θερμές και αερόβιες συνθήκες και β) μέσω αναερόβιας χώνευσης στην οποία η διάσπαση της οργανικής ύλης υπό αναερόβιες συνθήκες οδηγεί σε παραγωγή  $CH_4$ , ως τελικό προϊόν, και πτητικών λιπαρών οξέων, ως ενδιάμεσα προϊόντα, τα οποία μπορούν να συλλεγούν και να χρησιμοποιηθούν για παροχή ενέργειας.

Μέσω της χρήσης φυτών έχει βρεθεί πως μπορεί να επιτευχθεί απομάκρυνση και αποτοξικοποίηση ανθελμινθικών σε βοσκοτόπια και υδάτινα οικοσυστήματα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως καλλιέργειες κυτάρων καλαμιού μπορούν να προσλάβουν και να μεταβολίσουν το ανθελμινθικό φάρμακο albendazole, με τους περισσότερους μεταβολίτες του να είναι βιολογικά αδρανής (Podlipna et al., 2013). Επίσης, σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, δοκιμάστηκε η πρόσληψη και ο μεταβολισμός του Albendazole (ABZ) στην καλαμιά (μονοκότυλο φυτό) και το harebell (είδος ανθοφόρου φυτού). Τα φυτικά κύτταρα μπόρεσαν να προσλάβουν και να βιομετατρέψουν το ABZ σε διάφορους μεταβολίτες. Οι περισσότεροι από τους μεταβολίτες ABZ μπορούν να θεωρηθούν ως προϊόντα απενεργοποίησης, αλλά ορισμένοι από αυτούς παραμένουν βιολογικά ενεργοί (Podlipna, 2022). Ωστόσο, οι μεταβολίτες αυτοί είναι ασταθείς και θα μπορούσαν να μετατραπούν πάλι στο μητρικό ανθελμινθικό. Η διατήρηση των ζώων που βόσκουν σε βοσκότοπο ή η χρήση των περιττωμάτων τους για την λίπανση των κτηνοτροφικών χωραφιών οδηγεί σε ανεπιθύμητη κυκλοφορία των μεταβολιτών ABZ στο περιβάλλον. Ο ενεργός μεταβολίτης Albendazole sulfoxide περνά από τα περιττώματα (ζώων που έχουν υποστεί αγωγή με ABZ) στα κτηνοτροφικά φυτά και από εκεί σε άλλα ζώα. Αυτή η

κυκλοφορία προκαλεί χρόνια μόλυνση του περιβάλλοντος και μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα κατά των ελμινθών. Για αυτό τον λόγο, μετά τη θεραπεία με ανθελμινθικά, τα ζώα δεν πρέπει να βόσκονται σε βοσκοτόπια (ειδικά σε εκείνα με υψηλή οικολογική αξία) μέχρι τη στιγμή που τα φάρμακα δεν υπάρχουν πλέον στον οργανισμό τους (Podlipna, 2022).

Τέλος, ένας ακόμα πολλά υποσχόμενος,πιθανός, τρόπος προστασίας του περιβάλλοντος από τα υπολείμματα ανθελμινθικών είναι ο βιολογικός εμπλουτισμός. Σε αυτόν, γίνεται προσθήκη καλλιεργημένων μικροοργανισμών και ιδιαίτερα βακτηρίων σε υποστρώματα, με σκοπό την αύξηση του ρυθμού αποδόμησης ειδικών ρύπων (Morganwalp, 2015).

## 1.7 Σκοπός Πειράματος

Η απελευθέρωση βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών φαρμάκων ενέχει πιθανό περιβαλλοντικό κίνδυνο που οδηγεί στην ανάγκη για αποτοξικοποίηση α) των ρυπασμένων κοπροσωρών προτού χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα και β) εδαφών με υψηλή σημειακή ρύπανση . Μία προσέγγιση που παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι ο εμπλουτισμός αυτών των υποστρωμάτων με μικροοργανισμούς που διαθέτουν υψηλή ικανότητα αποδόμησης των συγκεκριμένων ενώσεων.

Επομένως, ο βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν , σε συνέχεια των προηγούμενων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος (Σ.Μαστρογιανόπουλος , Πτυχιακή διατριβή , Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (2021), Lagos et al. , 2021) η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός μικροοργανισμών με σημαντική αποδομητική ικανότητα για το συνθετικό ανθελμινθικό albendazole από επιλεγμένο έδαφος από κτηνοτροφική μονάδα της νήσου Λεσβου που παρουσίαζε ταχύτατη αποδόμηση του συγκεκριμένου ανθελμινθικού.



## 2 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Δείγμα εδάφους

Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε με βάση προηγούμενων μελετών για την αποδόμηση συνθετικών ανθελμινθικών φαρμάκων όπου μελετήθηκε και το ABZ, σε δείγματα εδάφους από κτηνοτροφικές μονάδες της νήσου Λέσβου. Οι συγκεκριμένες μελέτες πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος (Lagos et al. , 2021, Σ.Μαστρογιανόπουλος , Πτυχιακή διατριβή , Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας ,2021). Στη συγκεκριμένη μονάδα, με κωδική ονομασία στις προηγούμενες μελέτες ως 1Α, υπήρχε συστηματική χορήγηση του ανθελμινθικού ABZ στα ζώα και σημαντική αναμενόμενη εναπόθεση του φαρμάκου στο έδαφος.

### 2.2 Φάρμακα και Διαλύτες

Για την προετοιμασία των θρεπτικών μέσων αλλά και για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υπολειμάτων του Albendazole στα θρεπτικά μέσα σε σύστημα HPLC-UV, χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη ουσία Albendazole (98% καθαρότητα, Tokyo Chemical Industry® ,Zwijndrecht-Belgium). Για την προσθήκη στα θρεπτικά μέσα παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 5000 μg/ml σε Διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, HPLC GRADE, Sigma Aldrich©). Για να αυξηθεί η διαλυτότητα του ABZ στα υδατικά θρεπτικά μέσα χρησιμοποιήθηκε η επιφανειοδραστική ουσία Tween20 (Sigma Aldrich©). Για τις εκχυλίσεις και την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν Ακετονιτρίλιο (ACN) , νερο και ορθο-φωσφορικό οξύ (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1%), (HPLC grade, Merck Sigma Aldrich©).

### 2.3 Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Στην απομόνωση των βακτηρίων του εδάφους έγινε χρήση των εκλεκτικών θρεπτικών μέσων ανόργανων αλάτων , MSM: mineral salts medium και το θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με άζωτο ,MSMN, με σκοπό το Albendazole να αποτελεί την μοναδική πηγή C και N για το MSM ή C για το MSMN. Επιπλέον, για να διαπιστωθεί η αποδομητική ικανότητα των απομονωμένων αποικιών χρησιμοποιήθηκε και το θρεπτικό μέσο LB (Luria Bertani). Όλες οι προεργασίες πραγματοποιήθηκαν ασηπτικά σε θάλαμο νηματικής ροής και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 25 λεπτά . Η

αποστείρωση των θερμικά ευαίσθητων υδατικών διαλυμάτων που περιείχαν το Albendazole, όπως και άλλων θερμοευαίσθητων διαλυμάτων, απαραίτητων για την παρασκευή των παραπάνω θρεπτικών μέσων, έγινε με την χρήση ειδικών φίλτρων σύριγγας (Q-Max® syringe filters , w/0.22 μm Polyethersulfone (PES) membranes).

### 2.3.1 Παρασκευή θρεπτικών μέσων MSMN και MSM

Το θρεπτικό μέσο MSMN περιείχε όλα τα θρεπτικά μικροστοιχεία που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών υπό μορφή αλάτων (Mg, Mn, Fe, K, P, Ca, S, N) εκτός από τον C. Αυτό έγινε έτσι ώστε το Albendazole να αποτελεί τη μοναδική πηγή C για τα αναπτυσσόμενα βακτήρια. Το θρεπτικό αυτό μέσο παρασκευάστηκε από τρία πυκνά διαλύματα (stock) ανόργανων αλάτων, τα οποία αναμίχθηκαν σε κατάλληλες αναλογίες ώστε να δώσουν το τελικό MSMN (Πίνακας 1).

Για τα Stock 1 και 2 έγινε διάλυση των συστατικών τους σε 400 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και ακολούθησε αποστείρωση σε κλίβανο στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 25 λεπτά. Το Stock 3 αποστειρώθηκε με διήθηση διαμέσου φίλτρου σύριγγας επειδή ο FeSO<sub>4</sub> είναι θερμοευαίσθητος. Για την δημιουργία 800ml MSMN με Albendazole αναμίχθηκαν 80 ml του Stock 1 σε 624 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και ακολούθησε αποστείρωση σε κλίβανο. Στη συνέχεια, προστέθηκαν ασηπτικά 80 ml Stock 2 και 16 ml Stock 3, όταν το διάλυμα έφτασε την θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου MSM ακολούθηθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με μοναδική διαφορά ότι το Stock 1 (Πίνακας 1) περιείχε NaCl αντί του NH<sub>4</sub>Cl έτσι ώστε το Albendazole να αποτελεί τη μοναδική πηγή τόσο C όσο και N.

Το νέο διάλυμα αποστειρώθηκε σε κλίβανο. Προστέθηκε πυκνό υδατικό διάλυμα Albendazole, συγκέντρωσης 5.000 mg/L σε DMSO (Διμεθυσουλφοξείδιο). Για την παρασκευή του ζυγίστηκαν 10 mg πρότυπης ουσίας Albendazole και προστέθηκαν σε 2 ml DMSO. Έτσι, ώστε η τελική συγκέντρωση στο θρεπτικό να είναι 5 mg/L ενώ παράλληλα η ποσότητα του DMSO να μην υπερβαίνει το 0,1% του τελικού όγκου του διαλύματος. Τέλος προστέθηκε ποσότητα Tween20 προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα του ABZ στο υδατικό διάλυμα. Το Tween20 δεν υπερέβη το 0,05% του συνολικού τελικού όγκου

- ❖ Για την παρασκευή 300 ml στερεού θρεπτικού μέσου MSMN και MSM προστέθηκαν στα 234 ml dH<sub>2</sub>O + 4,5 gr Agar 15gr/L και το διάλυμα αποστειρώθηκε. Έπειτα, υπο ασηπτικές συνθήκες προστέθηκαν 30 ml stock 1, 30 ml stock 2 και 6ml stock 3. Στη συνέχεια, έγινε γρήγορη προσθήκη του Albendazole 0,1% και του Tween20 0,05% και το διάλυμα αναδεύτηκε ελαφρώς. Ακολούθησε η προσθήκη θρεπτικών στα τρυβλία και η επίστρωση των τρυβλίων.

	<b>Συστατικά</b>	<b>g/L</b>
<b>Stock 1</b>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	22,7
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	59,7
	$\text{NH}_4\text{Cl}$	10,0
<b>Stock 2</b>	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,2
<b>Stock 3</b>	$\text{FeSO}_4$	0,25

**Πίνακας 1:** Ποσότητες των Stocks για την παρασκευή των θρεπτικών μέσων MSM,MSMN

### 2.3.2 Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB (Luria Bertani)

Για την παρασκευή 1 L στερεού θρεπτικού μέσου LB προστέθηκαν 3 g LB growth powder (Sigma-Aldrich®) προτού πραγματοποιηθεί η αποστείρωση στους 121°C υπό πίεση 2,1 atm για 25 λεπτά. Για την παρασκευή LB μέσου για τη διαδικασία μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων , προστέθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες 1 mL καρβενικιλίνης απο υδατικό διάλυμα stock (100 mg/ml).

## 2.4 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για το Albendazole

Για την ανάλυση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων του Albendazole, καθώς και των μεταβολιτών του, στις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα HPLC-UV, 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<sup>-1</sup>. Οι συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης περιγράφονται στον Πίνακα 2. Η παραλαβή και επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το συνδεδεμένο λογισμικό LabSolution®.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων του φαρμάκου και των μεταβολιτών του στα δείγματα από τις υγρές καλλιέργειες ήταν απαραίτητη η κατασκευή και η χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για τον λόγο αυτό, παρασκευάστηκε πρότυπο διαλύμα Albendazole 1000 μg/ml σε ακετονιτρίλιο. Ακολούθως, από τα αρχικά πρότυπα διαλύματα με κατάλληλες αραιώσεις προετοιμάστηκε σειρά διαλυμάτων συγκεντρώσεων από 0.01 ως 10 μg/ml σε ακετονιτρίλιο. Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του φαρμάκου ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Ανθελινθικό φάρμακο	Κινητή φάση	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης	Μήκος κύματος(nm)	Χρόνος έκλουσης (min)
Albendazole	ACN : H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	30:70	205	22,7
Albendazole sulfone	ACN : H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	30:70	220	19,3
Albendazole sulfoxide	ACN : H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	30:70	220	8,8

**Πίνακας 2:** Συνθήκες ανάλυσης του ανθελμινθικού φαρμάκου Albendazole στο σύστημα HPLC



## 2.5 Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το Albendazole

### 2.5.1 Προεπεξεργασία του εδάφους

Με σκοπό την ενεργοποίηση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους έτσι ώστε να διευκολυνθεί η απομόνωση αποδομητικών μικροοργανισμών πριν την διαδικασία εμπλουτισμού προηγήθηκε εκ νέου εφαρμογή του Albendazole στο έδαφος. Σε 120 g εδάφους έγινε εφαρμογή υδατικού διαλύματος του Albendazole (40 mg/L) ώστε η τελική συγκέντρωση στο έδαφος να είναι 2 μg/g που αποτελεί και την μέγιστη συνιστώμενη δόση. Όταν η υγρασία προσαρμόστηκε στο 40% της υδατοχωρητικότητας του εδάφους τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους 25°C στο σκοτάδι. Στις σακούλες δημιουργήθηκε οπή ώστε να διατηρηθούν οι αερόβιες συνθήκες. Η δειγματοληψία έγινε αμέσως μετά την εφαρμογή (t0 ημέρες) και μία εβδομάδα μετά (t7 ημέρες). Ακολούθησε η εκχύλιση των υπολειμάτων του Albendazole σύμφωνα με τη μέθοδο εκχύλισης σύμφωνα με την οποία σε 5 gr εδάφους έγινε προσθήκη 10ml ACN. Έπειτα, οι φλάσκες τοποθετήθηκαν υπο συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1h, φυγοκεντρήθηκαν για 15min και το υπερκείμενο συλλέχθηκε μέσω φιλτραρίσματος έτσι ώστε να γίνει ανάλυση τους στο σύστημα HPLC-UV. Την πρώτη εφαρμογή ακολούθησε δεύτερη και τρίτη εφαρμογή με τις ίδιες δειγματοληψίες.

### 2.5.2 Εμπλουτισμός καλλιεργιών

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας «ενεργοποίησης» του εδάφους, 0,75 g εδάφους χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό θρεπτικών μέσων MSM και MSMN + Albendazole (5 mg/L) + Tween20 0,05%. Υπήρχαν τρεις επαναλήψεις για κάθε θρεπτικό μέσο καθώς και από δύο επαναλήψεις για κάθε θρεπτικό μέσο οι οποίες δεν εμβολιάστηκαν και οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (controls). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 25°C υπό ανάδευση 160 στροφών/λεπτό. Πριν τον εμβολιασμό (0 ημέρες) και στη συνέχεια σε καθορισμένους χρόνους συλλέχθηκαν δείγματα (0,5 mL) από όλες τις υγρές καλλιέργειες και αναλύθηκαν ώστε να μελετηθεί η αποδόμηση του Albendazole. Η εκχύλιση των υπολειμάτων του Albendazole πραγματοποιήθηκε με την εξής διαδικασία:

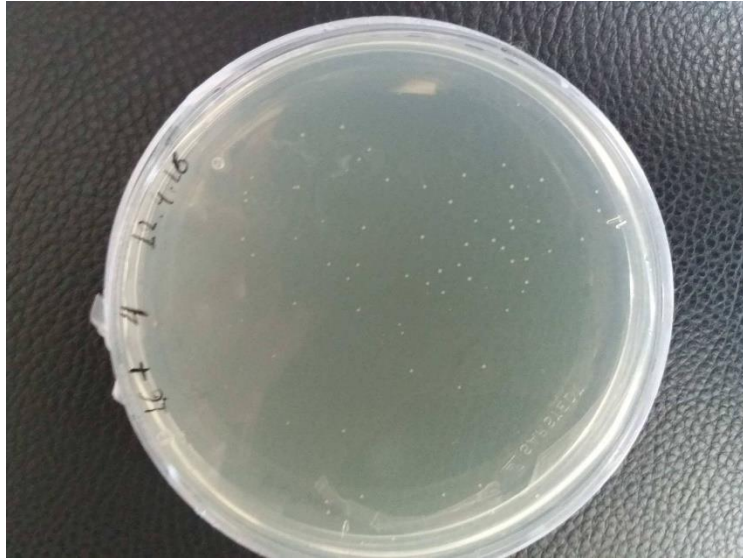
1. 0,5 mL από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωλήνες Eppendorf (1,5 mL)
2. Προστέθηκε ίσος όγκος ACN (0,5 mL) και ακολούθησε ανάδευση σε vortex (30 sec)
3. Ακολούθησε φιλτράρισμα με την χρήση ειδικών φίλτρων σύριγγας (Q-Max® syringe filters, w/0.22 μm Polyethersulfone (PES) membranes) και μεταφορά σε νέους σωλήνες Eppendorf (1,5 mL)
4. Σύντομη ανάδευση σε vortex (5-10 sec)

5. Τα δείγματα στη συνέχεια αναλύθηκαν σε σύστημα HPLC όπως έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω.

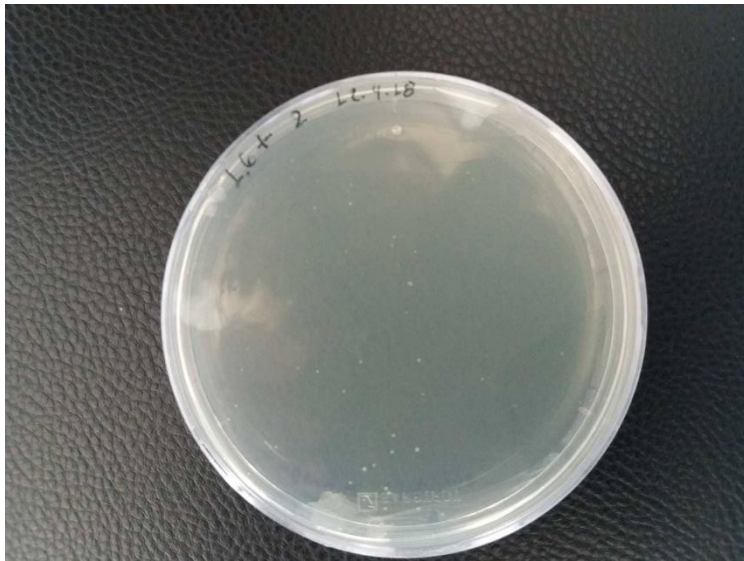
Όταν το ποσοστό αποδόμησης ξεπέρασε το 80% προετοιμάστηκε ο 2<sup>ος</sup> κύκλος ανακαλλιέργειας. Συγκεκριμένα 0,5 mL από τις αρχικές καλλιέργειες μεταφέρθηκε σε νέες φλάσκες με θρεπτικό, Albendazole και Tween20. Η ίδια διαδικασία ανακαλλιέργειας και εμπλουτισμού επαναλήφθηκε συνολικά για τέσσερις κύκλους σε MSMN+Albendazole (5 mg/L) και MSM+Albendazole(5 mg/L). Κατά τους τελευταίους κυκλους ανακαλλιεργειών 0,7 mL από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε σωλήνες erpendorf (1,5 mL) όπου αναμίχθηκαν με αποστειρωμένο διάλυμα γλυκερόλης 50%, αναδεύθηκαν σε vortex (30 sec) και διατηρήθηκαν στους -80 °C για μελλοντική χρήση.

### 2.5.3 Απομόνωση βακτηρίων που αποδομούν το Albendazole

Όταν η αποδόμηση του Albendazole στον τελευταίο κύκλο ανακαλλιέργειας στο θρεπτικό μέσο MSMN και MSM εφτασε περίπου το 70% προετοιμάστηκε μία σειρά διαδοχικών αραιώσεων από  $10^{-1}$  μέχρι  $10^{-6}$ . Στη συνέχεια από τις τρεις μεγαλύτερες αραιώσεις δηλαδή τις  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  και  $10^{-6}$  επιστρώθηκαν 0,2 mL σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό MSM, MSMN+Albendazole (5 mg/L). Τα τρυβλία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για επώαση στους 26°C. Μετά από 3-4 ημέρες αναπτύχθηκε ικανοποιητικός αριθμός αποικιών όπως απεικονίζεται και στις Εικόνες 3,4. Ακολούθησε επιλογή αποικιών, με τη βοήθεια αποστειρωμένων ακίδων υπό ασηπτικές συνθήκες, με βάση δύο κριτήρια τα οποία ήταν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά αλλά και ο καλύτερος διαχωρισμός από παρακείμενες αποικίες ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα απομόνωσης μη αξενικών αποικιών. Τελικά, επιλέχθηκαν συνολικά 12 αποικίες για το MSM και 20 αποικίες για το MSMN οι οποίες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα πλαστικά μπουκάλια των 30 mL με πώμα που περιείχαν 5 ml θρεπτικού μέσου MSM, MSMN+Albendazole. Παράλληλα τοποθετήθηκαν για επώαση 2 δείγματα MSMN+Albendazole και 2 δείγματα MSM+Albendazole που δεν εμβολιάστηκαν με βακτήρια και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης με θερμοκρασία 25°C και υπό ανάδευση 160 στροφών/min. Έπειτα από έναν πρώτο κύκλο καλλιεργειών, όπου δειγματοληψίες (0,5 ml) πραγματοποιήθηκαν 0 (t0) και 7 (t7) ημέρες μετά τον εμβολιασμό επιλέχθηκαν 6 αποικίες για την περίπτωση του MSMN που παρουσίασαν αποδόμηση >60% και 4 αποικίες για το MSM με 2 αποικίες με αποδόμηση >50% για έναν δεύτερο κύκλο καλλιεργειών, με δύο καλλιέργειες ως μάρτυρες για κάθε περίπτωση. Δείγματα θρεπτικού μέσου (0,5 mL) συλλέχθηκαν στις 0 (t0), 6 (t6) και 12(t12) ημέρες. Στην περίπτωση των καλλιεργειών σε MSMN, παρατηρήθηκε αποδόμηση >60% μετά από 12 ημέρες μόνο σε δύο καλλιέργειες οι οποίες και επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Στην περίπτωση των καλλιεργειών σε MSM, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση.



**Εικόνα 3:** Επιλογή αποικιών απο στερεό θρεπτικό MSMN+Albendazole (5 mg/L)



**Εικόνα 4:** Επιλογή αποικιών απο στερεό θρεπτικό MSM +Albendazole (5 mg/L)

## 2.6 Μοριακή ταυτοποίηση των απομονωθέντων βακτηρίων

### 2.6.1 Απομόνωση DNA

Απο τις υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων, που επιλέχθηκαν ως θετικές για την αποδόμηση του Albendazole χρησιμοποιήθηκαν με στόχο την εξαγωγή DNA η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού kit Nucleospin® Tissue (Marcherey–Nagel, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η ποιότητα του εξαγόμενου DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

### 2.6.2 Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου με την μέθοδο της PCR

Στην αντίδραση της PCR ενισχύθηκε το 16S rRNA γονίδιο (1500 bp) με το ζεύγος εκκινητών 8f & 1512r. Οι αλληλουχίες των εκκινητών, τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε παρουσιάζονται στους Πίνακες 3, 4 και 5. Η ποιότητα και το μέγεθος των PCR προϊόντων ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

Εκκινητές	Αλληλουχία	Tm <sup>o</sup> C
8f	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3'	52
1512r	5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA - 3'	52

**Πίνακας 3:** Εκκινητές για την αντίδραση της PCR

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)	Τελική συγκέντρωση
Buffer (10x optimized)	2,5	1x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
dNTPs	0,5	0,2 μM
Forward Primer 8f (20 pmol/L)	0,5	0,2 μM
Reverse Primer 1512r (20 pmol/L)	0,5	0,2 μM
Kapa Taq Polymerase (1 U/μL)	0,1	1 U/25 μL
dd H <sub>2</sub> O	19,9	-
DNA (sample)	1	10-50 ng
total	25	-

**Πίνακας 4:** Απαραίτητα αντιδραστήρια για την αντίδραση της PCR

<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95°C	5 min	
<b>Αποδιάταξη</b>	95°C	1 min	30 κύκλοι
<b>Υβριδοποίηση</b>	55 °C	1 min	
<b>Επιμήκυνση</b>	72 °C	2 min	
<b>Τελική επιμήκυνση</b>	72 °C	10 min	

**Πίνακας 5:** Συνθήκες αντίδρασης της PCR

### 2.6.3 Καθαρισμός των προϊόντων PCR (PCR clean up)

Επιλέχθηκαν 2 αποικίες για να μελετηθούν πιο διεξοδικά. Τα προϊόντα PCR (1500 bp) καθαρίστηκαν με το εμπορικό kit Nucleospin® Gel and PCR clean – up (Marcherey – Nagel, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Με τη διαδικασία του καθαρισμού γίνεται αποτελεσματική απομάκρυνση της περίσσειας εκκινητών, dNTPs, αλάτων, και ενζύμων που παραμένουν με την ολοκλήρωση της PCR.

### 2.6.4 Ένθεση σε πλασμιδιακούς φορείς

Το επόμενο βήμα μετά τον καθαρισμό είναι η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με τη χρήση του Qubit® 2.0 Fluometer. Με βάση τις τιμές απορρόφησης και βάση του τύπου  $[25 \text{ ng φορέα } x \gamma \text{ kb DNA sample} / 3 \text{ kb}] \times (3/1)$ , όπου  $\gamma$  το μέγεθος του προϊόντος της PCR (στην συγκεκριμένη περίπτωση 1,5 kb), υπολογίστηκαν τα  $\mu\text{L}$  DNA που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία ένθεσης σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα pGEM®-T easy (Promega). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση ένθεσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 6. Μετά την ανάμιξη των αντιδραστηρίων τα δείγματα επωάστηκαν στους 4°C για 16 h.

<b>Αντιδραστήρια</b>	<b>Όγκος (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
2x Buffer	5
Πλασμιδιακός φορέας pGEM	0,5
PCR προϊόν	x
T4 λυγάση	1
ddH <sub>2</sub> O	y
Συνολικός Όγκος	10 $\mu\text{L}$

**Πίνακας 6:** Αντιδραστήρια για την διαδικασία της ένθεσης

### 2.6.5 Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα E. Coli

Με την ολοκλήρωση της ένθεσης ακολούθησε ο μετασχηματισμός των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα E.coli (DH5a competent cells, Invitrogen, USA). Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη διαδικασία του μετασχηματισμού ήταν τα εξής:

1. Σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf (1,5 mL) τοποθετήθηκαν 80  $\mu$ L δεκτικών κυττάρων και 4  $\mu$ L ανασυνδυασμένων πλασμιδίων και ανακινήθηκαν ελαφρώς. Στη συνέχεια οι σωλήνες Eppendorf τοποθετήθηκαν για 30 λεπτά στον πάγο.
2. Μετά τα 30 λεπτά παραμονής στον πάγο τα Eppendorfs μεταφέρθηκαν αμέσως για επώαση στους 42°C για 55 sec.
3. Μετά το heatshock τα Eppendorfs μεταφέρθηκαν αμέσως και πάλι στον πάγο για 2 λεπτά.
4. Μετά το πέρας των 2 λεπτών, προστέθηκαν υπό φλόγα 500  $\mu$ L (αποστειρώμενου) LB και στη συνέχεια τα δείγματα επωάστηκαν για 1 ώρα και 30 λεπτά στους 37°C.
5. Στη συνέχεια 250  $\mu$ L από κάθε δείγμα επιστρώθηκαν ασηπτικά, υπό φλόγα, σε τρυβλία με LB+αμπικιλίνη. Ακολούθησε προσθήκη και επιστρώση στα τρυβλία 40  $\mu$ L X GAL (2%) και 8  $\mu$ L IPTG.
6. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 16-20 ώρες



**Εικόνα 5:** Επιβεβαίωση μετασχηματισμού και επιλογή άσπρων αποικιών

## 2.6.6 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA και αλληλούχιση

Στο επόμενο βήμα έγινε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τις αντίστοιχες καλλιέργειες σε LB+αμπικιλίνη. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό kit Nucleospin® Plasmid (Marcherey – Nagel, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Ακολούθησε, μια PCR αντίδραση χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το πλασμιδιακό DNA που εξήχθε. Αυτό έγινε προκειμένου να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ένθεση στον πλασμιδιακό φορέα. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση των δειγμάτων με τη χρήση του Qubit® 2.0 Fluometer, έτσι ώστε να ελεγχθεί αν όλα τα δείγματα προς αλληλούχιση περιείχαν ποσότητα DNA 20-50 ng/μL και έπειτα απεστάλησαν για αλληλούχιση στην εταιρεία CEMIA ([www.cemia.eu](http://www.cemia.eu)). Οι αλληλουχίες αναγνώστηκαν και προς τις δύο κατευθύνσεις (χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητων SP6-T7) ώστε να πάρουμε πλήρη αλληλουχία (1.500 bp) του 16S rRNA γονιδίου.

## 2.6.7 Ταυτοποίηση απομονωμένων βακτηρίων και φυλογενετική ανάλυση

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν συναρμολογήθηκαν ώστε να προκύψει ολόκληρη η αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα **Chromas Pro**®(v. 2.1.10) (CONTIG ASSEMBLY PROGRAM Version 3, Unipro UGENE Online User Manual). Οι αλληλουχίες πλήρους μήκους που προέκυψαν, εισήχθησαν στη βάση δεδομένων *16S rRNA sequences (bacteria and archaea) from the type strain collection* του NCBI και χρησιμοποιώντας το online εργαλείο **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) και ειδικότερα το BLASTn (Standard Nucleotide BLAST). Έπειτα, οι αλληλουχίες μαζί με τις πιο σχετικές (με identity score >97%) αλληλουχίες που προέκυψαν από την ανάλυση με το εργαλείο BLASTn καθώς και τουλάχιστον μια «εξωτερική» αλληλουχία (με ταξινομική απόκλιση σε επίπεδο τουλάχιστον οικογένειας) χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου. Η διαδικασία αυτή έγινε χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Seaview® (Version 5.0.5), ένα περιβάλλον εργασίας μέσω του οποίου είναι δυνατή η ευθυγράμμιση πολλαπλών αλληλουχιών. Πιο συγκεκριμένα, με το πρόγραμμα **Muscle** (Edgar R.C. et al, 2004) πραγματοποιήθηκε η πολλαπλή στοίχιση των επιλεγμένων αλληλουχιών, με το πρόγραμμα **Gblocks v.0.91b** (Castresana, J., 2000) αφαιρέθηκαν μη στοιχισμένα τμήματα και διατηρήθηκαν μόνο υψηλά συντηρημένα τμήματα, ενώ το φυλογενετικό δένδρο κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα **PhyML v3.1** (Guindon S. et al, 2010).





## 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

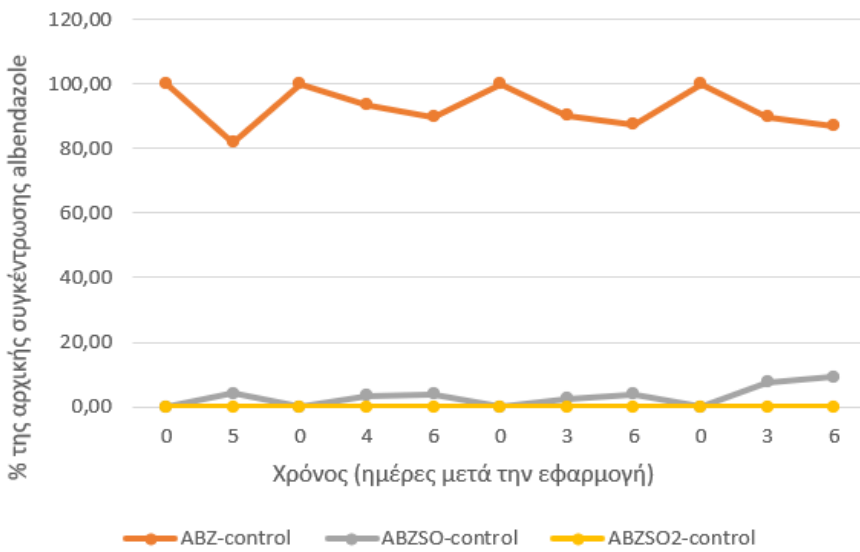
### 3.1 Αποδόμηση του ανθελμινθικού φαρμάκου Albendazole στις καλλιέργειες εμπλουτισμού

Αφού έγινε η ενεργοποίηση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται) μετά απο 3 εφαρμογές με χορήγηση του φαρμάκου Albendazole ακολούθησε η διαδικασία εμπλουτισμού. Στα παρακάτω διαγράμματα (3.1 έως 3.4) παρουσιάζεται η αποδόμηση του Albendazole σε υγρά θρεπτικά μέσα MSM και MSMN σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα θρεπτικά μέσα MSM και MSMN στους διάφορους κύκλους εμπλουτισμού και κατα την διάρκεια των τεσσάρων κύκλων καλλιιεργειών εμπλουτισμού. Απο την 1<sup>η</sup> καλλιέργεια εμπλουτισμού παρατηρείται αποδόμηση του φαρμάκου και στα δύο θρεπτικά, με το MSM να παρουσιάζει λίγο πιο αργή αποδόμηση σε σχέση με το MSMN. Αυτή η πορεία αποδόμησης συνεχίστηκε και για τους επόμενους κύκλους όπως φανερώνεται και απο τα διαγράμματα.

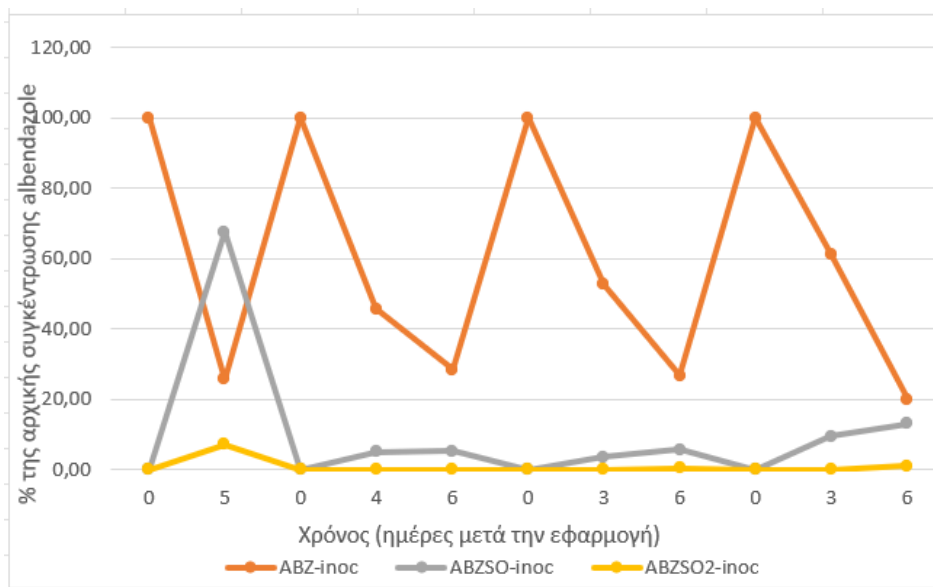
Συγκεκριμένα, στο θρεπτικό μέσο MSM απο τον πρώτο κύκλο εμπλουτισμού παρουσιάζεται αποδόμηση του φαρμάκου στα επίπεδα του 70%. Γενικότερα, φαίνεται ένας σταθερός ρυθμός αποδόμησης σε κάθε κύκλο ανακαλλιέργειας ενώ κατά τον τελευταίο κύκλο παρατηρείται σχετική επιτάχυνση του ρυθμού αποδόμησης, τα επίπεδα της οποίας πλησιάζουν το 80% (Διάγραμμα 3.2).

Όσον αφορά το θρεπτικό MSMN η αποδόμηση του φαρμάκου ήταν πολύ γρήγορη απο τον πρώτο κύκλο και έφτασε το ποσοστό του 80%. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3.4 η αποδόμηση του Albendazole παρουσίασε μια επιτάχυνση στους επόμενους κύκλους και κυρίως κατά τον 3<sup>ο</sup> κυκλο ανακαλλιέργειας. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι κατά τον τελευταίο κύκλο ανακαλλιέργειας παρατηρήθηκε μια σχετική ανάσχεση στην αποδόμηση του φαρμάκου.

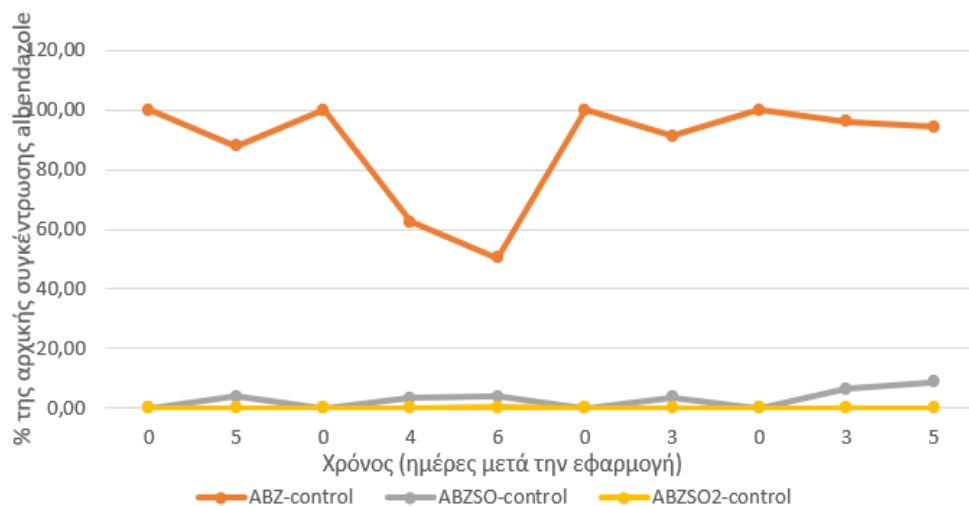
Κατά την πορεία του εμβολιασμού το Albendazole ήταν σταθερό και στα δύο θρεπτικά μέσα όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 3.1 και 3.3 καθώς δεν παρατηρήθηκε σημαντική αποδόμηση στις μη εμβολιασμένες καλλιέργειες (μάρτυρες), εκτός μόνο από τον δεύτερο κύκλο ανακαλλιέργειας στο θρεπτικό μέσο MSMN (Διάγραμμα 3.3).



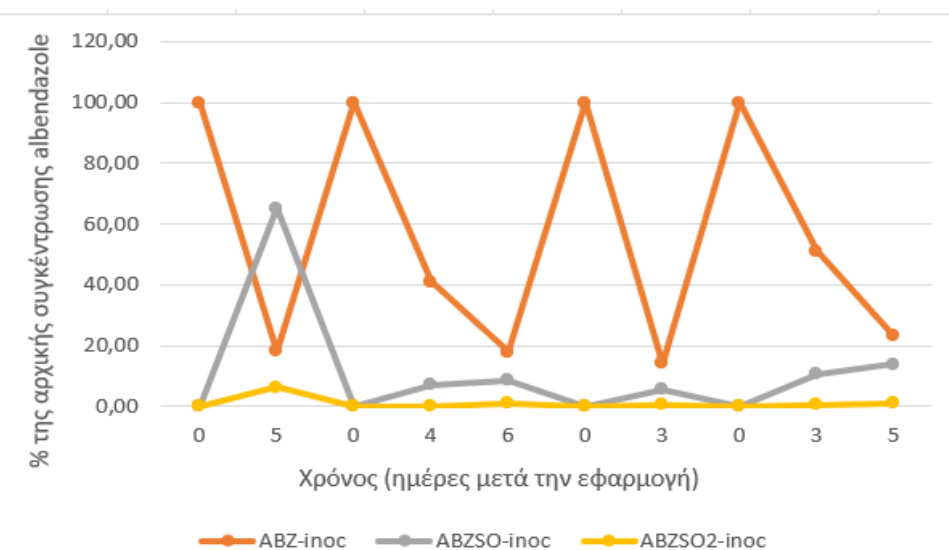
**Διάγραμμα 3.1** Η αποδόμηση του Albendazole στους 4 κύκλους εμπλουτισμού σε μη εμβολιασμένο (μάρτυρας) θρεπτικό μέσο MSM. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.



**Διάγραμμα 3.2** Η αποδόμηση του Albendazole στους 4 κύκλους εμπλουτισμού σε εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο MSM. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.



**Διάγραμμα 3.3** Η αποδόμηση του Albendazole στους 4 κύκλους εμπλουτισμού σε μη εμβολιασμένο (μάρτυρας) θεραπευτικό μέσο MSMN. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.

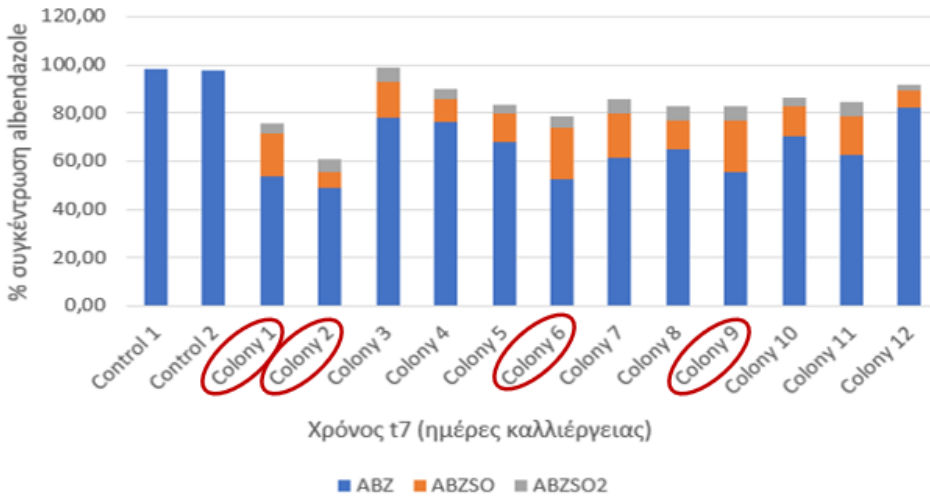


**Διάγραμμα 3.4** Η αποδόμηση του Albendazole στους 4 κύκλους εμπλουτισμού σε εμβολιασμένο θεραπευτικό μέσο MSMN. Κάθε τιμή αντιστοιχεί στο μέσο όρο τριών επαναλήψεων  $\pm$  την τυπική απόκλιση.

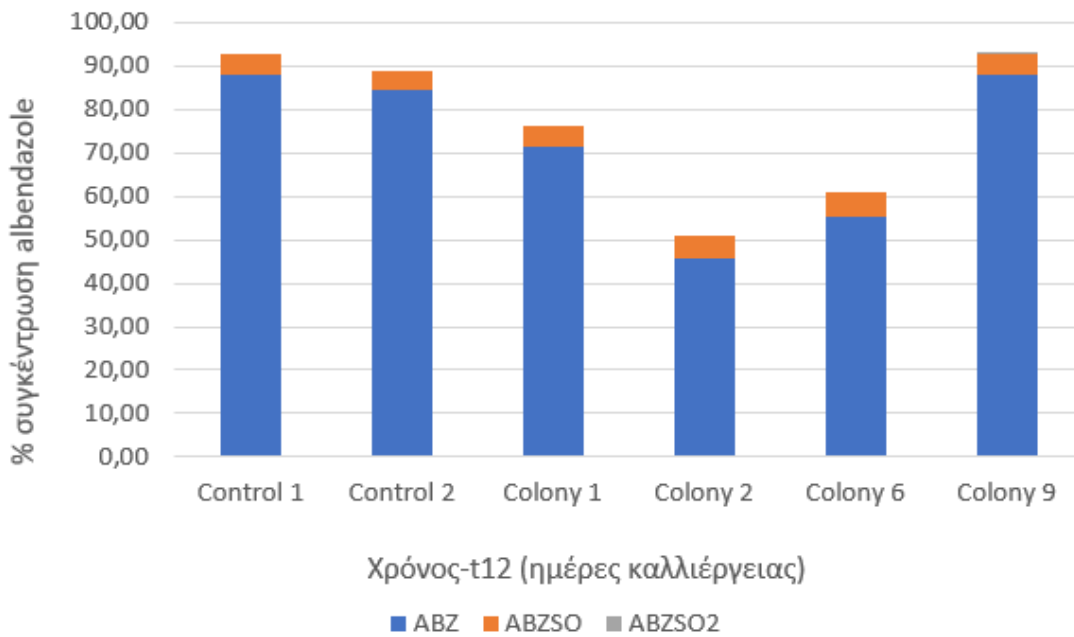
## 3.2 Απομόνωση βακτηρίων με ικανότητα αποδόμησης του Albendazole

Με την ολοκλήρωση του τελευταίου κύκλου ανακαλλιέργειών και για τα δυο θρεπτικά μέσα, από τις υγρές καλλιέργειες μια ποσότητα 900 μl (300 μl από κάθε βιολογική επανάληψη) μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες Eppendorf (1,5 mL) και προετοιμάστηκε σειρά διαδοχικών αραιώσεων ( $10^{-1}$  –  $10^{-6}$ ). Στην συνέχεια από τις τρεις μεγαλύτερες αραιώσεις ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  και  $10^{-6}$ ) επιστρώθηκαν 0,2 mL σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό εμψυτισμένο με ABZ (5 mg/L). Όπως έχει αναφερθεί και στην ενότητα 2.5.3 από τις στερεές καλλιέργειες επιλέχθηκαν αποικίες και εμβολιάστηκαν στα αντίστοιχα υγρά θρεπτικά μέσα όπου και ακολούθησαν δύο κύκλοι ανακαλλιέργειων. Συγκεκριμένα:

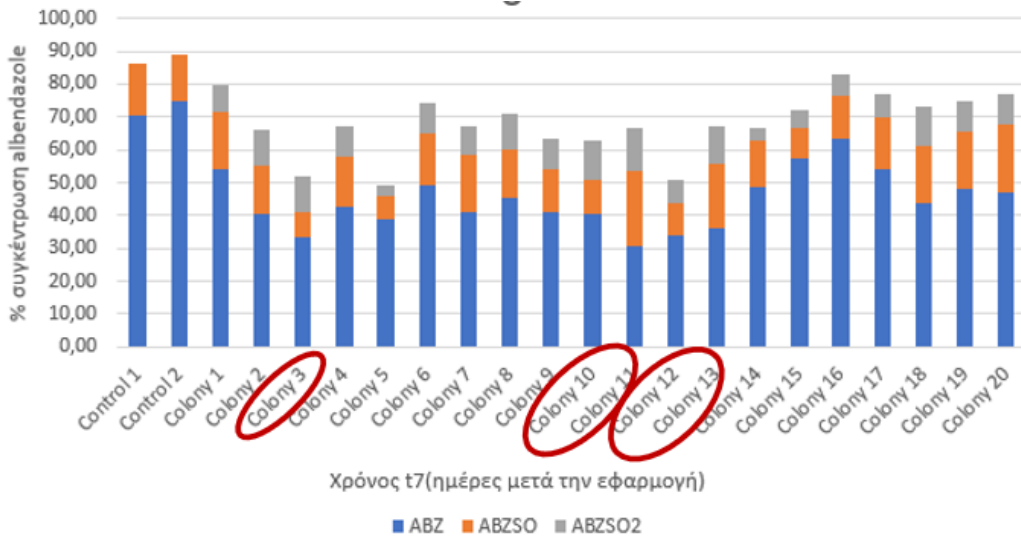
- Από τα τρυβλία με MSM επιλέχθηκαν αρχικά 12 αποικίες για την 1<sup>η</sup> υγρή καλλιέργεια και υπήρχαν κάποιες αποικίες οι οποίες εμφάνιζαν σημαντικά ποσοστά αποδόμησης του φαρμάκου όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.5. Οι αποικίες αυτές ήταν οι Colony 1,2,6,9 και παρουσίασαν ποσοστό αποδόμησης περίπου 50%. Στις επιλεγμένες αποικίες έγινε και 2<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια όπου όμως παρατηρήθηκε μια ανάσχεση στην αποδόμηση, αφού σε καμία από τις επιλεγμένες καλλιέργειες δεν παρατηρήθηκε αποδόμηση >55% μετά από 12 ημέρες καλλιέργειας όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3.6. Για αυτόν τον λόγο, δεν επιλέχθηκε κάποια αποικία από το MSM για περαιτέρω ανάλυση.
- Από τα τρυβλία με MSMN επιλέχθηκαν 20 αποικίες οι οποίες εμβολιάστηκαν αρχικά στην 1<sup>η</sup> υγρή καλλιέργεια. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.7 από τις 20 καλλιέργειες υπήρχαν 5 από αυτές που παρουσίασαν σημαντική αποδόμηση σε σχέση με τις υπόλοιπες και στις οποίες έγινε και 2<sup>η</sup> ανακαλλιέργεια. Στο Διάγραμμα 3.8 παρουσιάζεται η αποδόμηση του Albendazole στις διάφορες καλλιέργειες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ύστερα από 12 ημέρες επώασης και οι αποικίες αυτές ήταν οι Colony 3,10,11,12,13. Από αυτές τις αποικίες οι C3 και C13 παρουσίασαν ένα αξιοσημείωτο μοτίβο αποδόμησης του ABZ περίπου 65% και 75% αντίστοιχα και ήταν αυτές που επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.



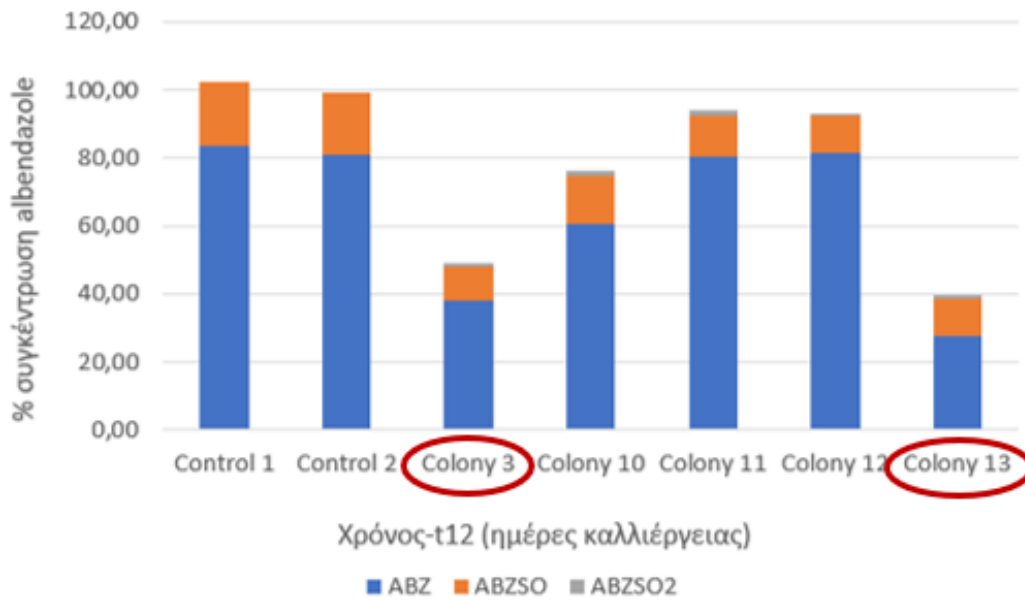
**Διάγραμμα 3.5:** 1<sup>η</sup> υγρή ανακαλλιέργεια μεμονωμένων αποικιών στο θρεπτικό μέσο MSM



**Διάγραμμα 3.6:** 2<sup>η</sup> υγρή ανακαλλιέργεια μεμονωμένων αποικιών στο θρεπτικό μέσο MSM



**Διάγραμμα 3.7:** 1<sup>η</sup> υγρή ανακαλλιέργεια μεμονωμένων αποικιών στο θρεπτικό μέσο MSMN



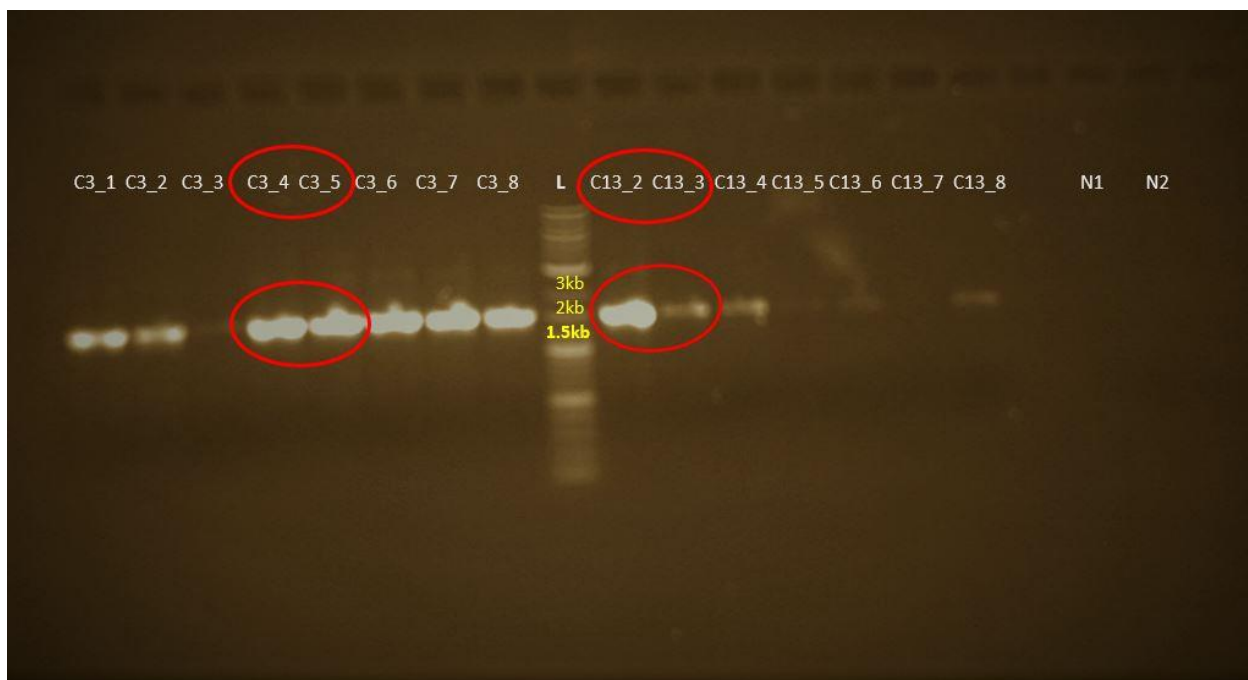
**Διάγραμμα 3.8:** 2<sup>η</sup> υγρή ανακαλλιέργεια μεμονωμένων αποικιών στο θρεπτικό μέσο MSMN

### 3.3 Διαδικασία ταυτοποίησης βακτηρίων που αποδομούν το Al-bendazole

#### 3.3.1 Μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα και εξαγωγή πλασμιδιακού DNA, αλληλούχιση

Από τις αποικίες που επιλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε εξαγωγή DNA και PCR ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου. Ακολούθησε ο καθαρισμός των προϊόντων PCR (1500 bp) για τα δείγματα, η ένθεση τους σε πλασμιδιακό φορέα, ο μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* και η επιλογή των μετασχηματισμένων αποικιών.

Στην Εικόνα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR που πραγματοποιήθηκε για να επιβεβαιώσει την επιτυχή ένθεση στους πλασμιδιακούς φορείς των επιλεγμένων αποικιών *E. coli*. Η ανίχνευση του ενθέματος βρίσκεται στις 1,5 kb. Επιλέχθηκαν να σταλούν για αλληλούχιση οι κλώνοι C3\_4, C3\_5, C13\_2 και C13\_3 στους οποίους παρατηρείται αρκετά σημαντική ενίσχυση. Επίσης, οι μάρτυρες N1 και N2 δεν παρουσίασαν κάποιο σήμα οπότε συμπεραίνουμε πως δεν υπήρχε επιμόλυνση κατά την διάρκεια διεξαγωγής της διαδικασίας PCR.



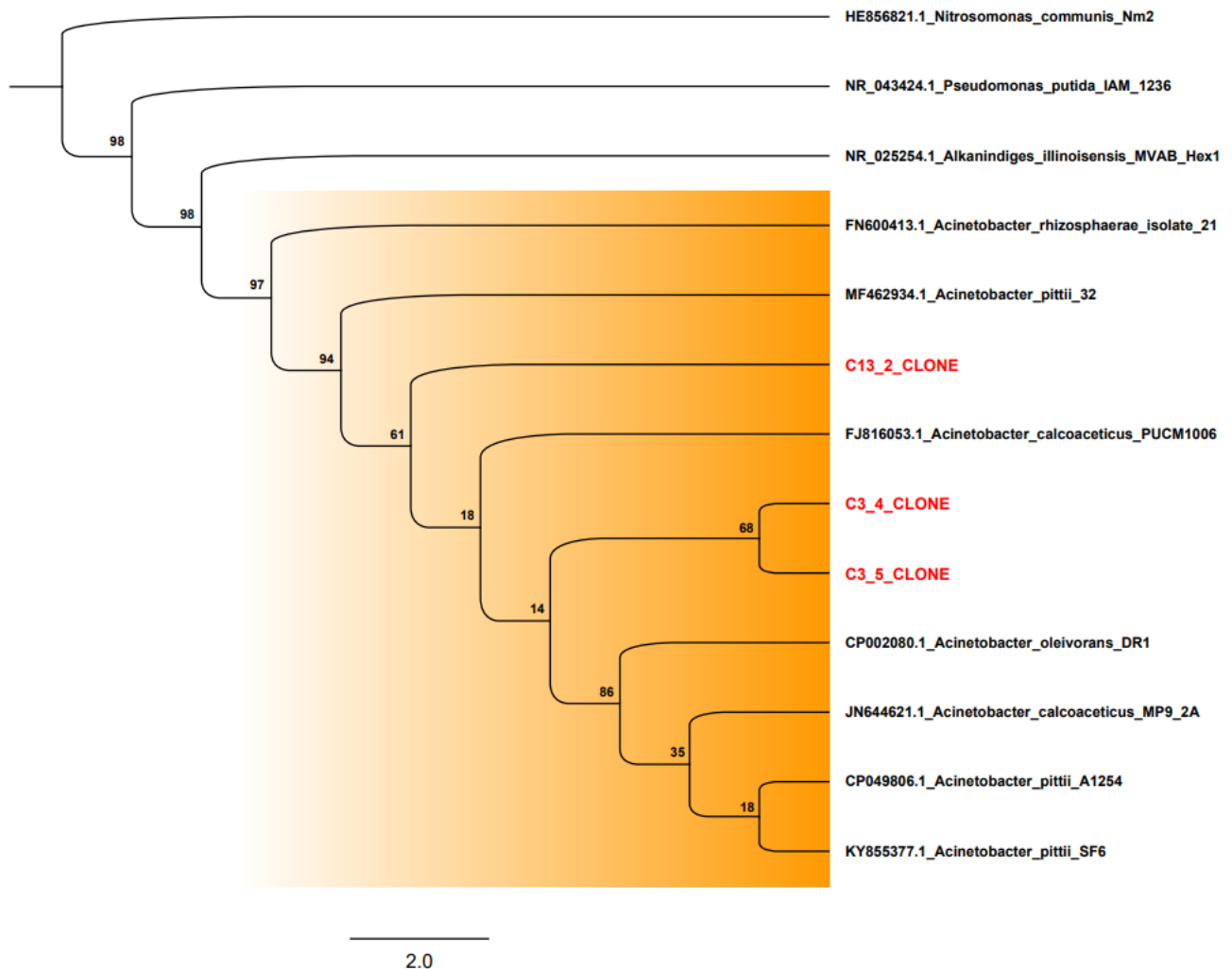
**Εικόνα 6:** Επιβεβαίωση μετασχηματισμού με την μέθοδο PCR- ένθεμα 1,5kb

### 3.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης και κατασκευή φυλογενετικού δένδρου

Στα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχιση έγινε πλήρης ανάγνωση και συναρμολόγηση του 16S rRNA γονιδίου για τους κλώνους C13-2, C3-4, C3-5. Χρησιμοποιώντας το Online εργαλείο BLASTn στη συνέχεια προέκυψε για όλους τους κλώνους υψηλή ομολογία με αλληλουχίες που ανήκουν σε βακτήρια του γένους *Acinetobacter*. Οι κλώνοι C3-4, C3-5 παρουσίασαν υψηλότερη ομολογία με στελέχη του είδους *Acinetobacter\_Calcoaceticus* (98%). Ωστόσο, για τον κλώνο της καλλιέργειας C13 προέκυψε υψηλότερη ομολογία με στελέχη του είδους *Acinetobacter\_pitti* (98%).

Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιήθηκε κατασκευή φυλογενετικού δένδρου χρησιμοποιώντας αντιπροσωπευτικές αλληλουχίες που είχαν το υψηλότερο σκόρ αντιστοίχισης με τις μελετούμενες αλληλουχίες και ανήκαν όλες σε στελέχη του γένους *Acinetobacter*. Παράλληλα, επιλέχθηκε και μια «εξωτερική» αλληλουχία (με ταξινομική απόκλιση σε επίπεδο οικογένειας, σειράς και κλάσης) για τους κλώνους C3-4, C3-5 και C13-2. Το φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται στην Εικόνα 7 όπου σύμφωνα και με τα αποτελέσματα του BLAST οι κλώνοι C3-4 και C3-5 ομαδοποιούνται περισσότερο με στελέχη του είδους *Acinetobacter\_Calcoaceticus* και *Acinetobacter\_Oleivorans* ενώ ο κλώνος C13-2 βρίσκεται φυλογενετικά πιο κοντά με στελέχη του *Acinetobacter\_pitti* αλλά και του *Acinetobacter\_Calcoaceticus*. Ωστόσο, όπως φαίνεται και από τις χαμηλές τιμές bootstrap σε ορισμένους κλάδους του φυλογενετικού δέντρου, δεν είναι δυνατόν να προκύψει μια ασφαλής φυλογενετική ταυτοποίηση των συναρμολογημένων αλληλουχιών σε επίπεδο είδους.





**Εικόνα 7:** Φυλογενετικό δέντρο που δείχνει τη γενετική σχέση των υπό μελέτη βακτηρίων που χαρακτηρίστηκαν στην παρούσα μελέτη. Το δέντρο κατασκευάστηκε με το πρόγραμμα PhyML v3.1 με χρήση του εξελικτικού μοντέλου general time reversible (GTR) με  $\gamma$  κατανομή ετερογένειας των ρυθμών εξέλιξης για τις διάφορες θέσεις, ενώ η ανάλυση bootstrap ορίστηκε στις 1000 δοκιμές. Η μπάρα κλίμακας αντιπροσωπεύει μια εξελικτική απόσταση ( $k_{nuc}$ ) 2,0. Οι αλληλουχίες των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται με έντονη κόκκινη γραμματοσειρά.

## 4 Συζήτηση

### 4.1 Απομόνωση βακτηρίων που έχουν την ικανότητα να αποδομούν το ανθελμινθικό φάρμακο *Albendazole*

Τα ανθελμινθικά φάρμακα είναι μία κατηγορία φαρμακευτικών ουσιών τα οποία χορηγούνται στα ζώα με σκοπό την αντιμετώπιση των ελμίνθων και έχουν καταστεί ως ρύποι για το περιβάλλον καθώς ανιχνεύονται σε διάφορα οικοσυστήματα επιφέροντας κινδύνους τοξικότητας σε οργανισμούς μη στόχους (μέχρι στιγμής κυρίως κοπροσφαγικά έντομα και πλαγκτονικούς οργανισμούς υδρόβιων οικοσυστημάτων). Αυτό το γεγονός καθιστά απαραίτητη την εύρεση και εφαρμογή μεθόδων έτσι ώστε να είναι δυνατή η πλήρης απομάκρυνση των υπολειμμάτων του φαρμάκου από τους κοπροσωρούς, οι οποίοι συνιστούν την κύρια πηγή μεταφοράς των φαρμάκων στο περιβάλλον (Hyo-Jung Kim et al, 2010).

Στην συγκεκριμένη μελέτη έγινε απομόνωση μικροοργανισμών, μέσω της μεθόδου των εμπλουτισμένων καλλιεργειών σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα, συγκεκριμένα δύο βακτηριακών καλλιεργειών που είχαν την ικανότητα να αποδομούν το ανθελμινθικό φάρμακο *Albendazole*. Γενικά, στις καλλιέργειες αυτές παρουσιάστηκε ένα μοτίβο όπου η αποδόμηση ήταν πιο γρήγορη στο υγρό θρεπτικό MSMN, όπου παρέχονταν και πηγή άζωτου, (έως και 75%) σε σύγκριση με το MSM, που το ABZ ήταν πηγή και άνθρακα και άζωτου, όπου η αποδόμηση ήταν πιο αργή και λιγότερη από 55%. Για αυτόν τον λόγο οι αποικίες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν περαιτέρω προερχόταν από καλλιέργειες σε MSMN και δεν επιλέχθηκε καμία αποικία από καλλιέργειες σε MSM. Ένας λόγος που πιθανότατα παρατηρήθηκε αυτό το μοτίβο σχετίζεται με τον μηχανισμό της διάσπασης και συγκεκριμένα λόγω της ανικανότητας των βακτηρίων να διασπούν τον βενζιμιδαζολικό δακτύλιο που περιέχει άζωτο. Για αυτό, στο MSMN όπου το άζωτο ήταν διαθέσιμο από το θρεπτικό παρατηρήθηκε ότι υπήρχε η ικανότητα διάσπασης και οι βακτηριακές καλλιέργειες που απομονώθηκαν, έχοντας τα μεγαλύτερα και πιο σταθερά επίπεδα αποδόμησης, ήταν οι Colony\_3 (C\_3) και Colony\_13 (C\_13).

Έπειτα, ακολούθησε η μοριακή ανάλυση των αποικιών που απομονώθηκαν και συγκεκριμένα μέσω της ενίσχυσης του 16S rRNA γονιδίου, τον μετασχηματισμό σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* και την αλληλούχιση των κλώνων C3\_4, C3\_5, C13\_2 και C13\_3. Η πλήρης ανάλυση και συναρμολόγηση του 16S rRNA γονιδίου έγινε για τους κλώνους C13-2, C3-4, C3-5. Με την φυλογενετική ανάλυση προέκυψε για αυτούς τους 3 κλώνους υψηλή ομολογία με αλληλουχίες που ανήκουν σε βακτήρια του γένους *Acinetobacter*. Γενικά, τα βακτήρια *Acinetobacter* ανήκουν στα γ-Proteobacteria και στην τάξη Pseudomonadales, ένα γένος αρνητικών κατά Gram και αυστηρά αερόβιων βακτηρίων. Τα είδη *Acinetobacter* επικρατούν σε φυσικά περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των εδαφών και των υδάτινων οικοσυστημάτων (Jung, J., & Park, W, 2015). Επίσης, είναι γνωστά ως αποδομητές αρωματικών ενώσεων και τα ευέλικτα μεταβολικά χαρακτηριστικά επιτρέπουν στα είδη αυτού του γένους να καταβολίζουν ένα ευρύ φάσμα φυσικών ενώσεων, υποδηλώνοντας ενεργή συμμετοχή στον κύκλο των θρεπτικών συστατικών

του οικοσυστήματος (Jung, J., & Park, W, 2015). Σε μία παρόμοια έρευνα που είχε ως σκοπό την απομάκρυνση τοξικών ουσιών από συγκεκριμένα εδάφη, εφαρμόστηκε η μικροβιακή βιοαποκατάσταση ως ένα οικονομικά αποδοτικό εργαλείο για την αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών στο οικοσύστημα και την απομάκρυνση της ουσίας cyprodinil από αυτό. Βρέθηκε πως μέλη του γένους *Acinetobacter* μπορεί να έχουν σημαντικές επιδράσεις στην αποτοξίνωση και την βιοαποκατάσταση της ουσίας cyprodinil και των αναλόγων πυριμιδίνης (X. Chen et al,2018). Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί πως μέλη του γένους *Acinetobacter* (σε συνδυασμό με το *Pseudomonas*) αντιπροσωπεύουν τις κύριες βακτηριακές κοινότητες που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των σουλφαναμιδών (SAs) στην λυματολάσπη (Yang, C. W et al.,2016).

Σε αυτή την μελέτη, μετά την αλληλούχιση των κλώνων αλλά και την φυλογενετική ανάλυση διαπιστώθηκε πως οι κλώνοι C3-4 και C3-5 ομαδοποιούνται περισσότερο με στελέχη του είδους *Acinetobacter\_Calcoaceticus* και *Acinetobacter\_Oleivorans* ενώ ο κλώνος C13-2 βρίσκεται φυλογενετικά πιο κοντά με στελέχη του *Acinetobacter\_pitti* και *Acinetobacter\_Calcoaceticus*. Το *Acinetobacter\_Calcoaceticus* που δείχνει να είναι πιο κοντά και με τους τρεις κλώνους είναι ένα Gram-αρνητικό ευβακτήριο που είναι ικανό να μεταναστεύει μέσω της κινητικότητας των συσπάσεων και επίσης παρουσιάζει υψηλή συχνότητα φυσικού μετασχηματισμού (R. Palmen et al,1997). Σε μία άλλη μελέτη, διερευνήθηκε ο μηχανισμός αντοχής στον χαλκό (Cu) και η δυνατότητα βιοαποκατάστασης μέσω ενός στελέχους *Acinetobacter calcoaceticus KW3* που απομονώθηκε από λυματολάσπη ορυχείου Cu και έδειξε ότι το *Acinetobacter calcoaceticus* ήταν ικανό να το αποτοξικοποιεί (Kang, W. et al.,2020). Τα δύο βακτηριακά στελέχη *Acinetobacter\_Calcoaceticus* και *Acinetobacter\_Oleivorans* έχουν ανιχνευθεί και από άλλη έρευνα που έγινε στο *Zea mays* και η οποία εφάρμοσε καλλιέργειες εμπλουτισμού για την απομόνωση βακτηρίων ικανών να χρησιμοποιούν το fipronil ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας έτσι ώστε να αποτελέσουν πολλά υποσχόμενα στελέχη στη βιοαποκατάσταση εδαφών μολυσμένων με fipronil (Uniyal, S. et al.,2016). Το *Acinetobacter\_pitti* έχει βρεθεί στην βιβλιογραφία ως ικανό βακτήριο για απομάκρυνση των ουσιών όπως αμμωνία-άζωτο, ορθοφωσφορικού και διαλυτού ολικού φωσφόρου από οικιακά λύματα (Russel M. et al.,2020).

Όπως παρουσιάζεται σε αυτήν την έρευνα τα βακτήρια του γένους *Acinetobacter* είναι ικανά να αποτοξικοποιούν εδάφη με επαναλαμβανόμενη έκθεση στο ανθελμινθικό φάρμακο Albendazole κάτι το οποίο δεν ήταν γνωστό μέχρι τώρα καθώς δεν είχαν ανιχνευθεί βακτήρια που να αποδομούν το Albendazole.

## 4.2 Τελικά Συμπεράσματα

Στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής απομονώθηκαν από εδάφος με ιστορικό χρήσης Albendazole, δύο βακτηριακά στελέχη που είχαν την ικανότητα να αποδομούν το συγκεκριμένο βενζιμιδαζολικό φάρμακο και να το χρησιμοποιούν σαν πηγή άνθρακα. Τα δύο αυτά βακτήρια ταυτοποιήθηκαν μέσω αλληλούχισης του 16S rRNA γονιδίου του ως μέλη του γένους *Acinetobacter*. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν:

- Στο χαρακτηρισμό του μεταβολικού μονοπατιού του Albendazole
- Στην ανάδειξη του γενετικού μηχανισμού διάσπασης του συγκεκριμένου φαρμάκου από τα απομονωθέντα βακτήρια.
- Στην εφαρμογή των απομονωθέντων βακτηρίων ως φορείς για την βιολογική αποκατάσταση επιβαρυσμένων, με υπολείμματα Albendazole, κοπροσωρών.

## Βιβλιογραφία

- Aceves, J., Erlj, D., & Martínez-Marañón, R. (1970). The mechanism of the paralyzing action of tetramisole on *Ascaris* somatic muscle. *British journal of pharmacology*, 38(3), 602–607. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1970.tb10601.x>
- Babić, S., Pavlović, D.M., Biošić, M., Ašperger, D., Škorić, I., Runje, M. (2018). Fate of febantel in the aquatic environment-the role of abiotic elimination processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(29), 28917-28927. doi:10.1007/s11356-018-2935-9
- Bansal, Y., & Silakari, O. (2012). The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorganic&MedicinalChemistry*, 20(21),6208-6236. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.09.013>
- Beech, R., Levitt, N., Cambos, M., Zhou, S., & Forrester, S. G. (2010). Association of ion-channel genotype and macrocyclic lactone sensitivity traits in *Haemonchus contortus*. *Molecular and biochemical parasitology*, 171(2), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.02.004>
- Brander, G.C., Pugh, D.M., Bywater, R.J., Jenkins, W.L., 1991. *Veterinary applied pharmacology and therapeutics*, Bailliere Tindall, 5th edition
- Castresana J., Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 17, Issue 4, April 2000, Pages 540–552, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>
- Cooper, J. and Dobson, H. (2007) The Benefits of Pesticides to Mankind and the Environment. *Crop Protection*, 26, 1337-1348. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2007.03.022>
- Dayan A. D. (2003). Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta tropica*, 86(2-3), 141–159. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(03\)00031-7](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(03)00031-7)
- Diawara, A., Halpenny, C., Churcher, T., Mwandawiro, C., Kihara, J., & Kaplan, R. et al. (2013). Association between Response to Albendazole Treatment and  $\beta$ -Tubulin Genotype Frequencies in Soil-transmitted Helminths. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 7(5), e2247. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002247>
- Dyary, Hiewa. (2016). Veterinary anthelmintics and anthelmintic drug resistance. 181. 191-206. <https://doi.org/10.17656/jzs.10463>
- Edgar, R.C. (2004), MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113 . <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>
- García-Galán, M. J., Garrido, T., Fraile, J., Ginebreda, A., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2011). Application of fully automated online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry for the determination of sulfonamides

and their acetylated metabolites in groundwater. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399(2), 795–806. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4367-3>

- Gull, K., Dawson, P.J., Davis, C., Byard, E.H., 1987. Protein/ligand interactions in anthelmintic chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, 15, 59-60
- Guindon S., Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, Olivier Gascuel, 2010 New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0, *Systematic Biology*, Volume 59, Issue 3, Pages 307–321, <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
- Gyurik, R. J., Chow, A. W., Zaber, B., Brunner, E. L., Miller, J. A., Villani, A. J., Petka, L. A., & Parish, R. C. (1981). Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats and mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 9(6), 503–508
- Horvat A., S. Babić, D.M. Pavlović, D. Ašperger, S. Pelko, M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, A.D. Mance, Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 31, 2012, Pages 61-84, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.023>.
- Hosking, B. C., Stein, P. A., Mosimann, D., Seewald, W., Strehlau, G., & Kaminsky, R. (2008). Dose determination studies for monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against fourth stage gastro-intestinal nematode larvae infecting sheep. *Veterinary parasitology*, 157(1-2), 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.014>
- Hyo-Jung Kim, Dong Soo Lee, Jung-Hwan Kwon, Sorption of benzimidazole anthelmintics to dissolved organic matter surrogates and sewage sludge, *Chemosphere*, Volume 80, Issue 3, 2010, Pages 256-262, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.02>
- Jung, H., Medina, L., García, L., Fuentes, I., & Moreno-Esparza, R. (1998). Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulphoxide. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 50(1), 43–48. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1998.tb03303.x>
- Jung, J., & Park, W. (2015). Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(6), 2533–2548. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6439-y>
- Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., Weber, S. S., Wenger, A., Wieland-Berghausen, S., Goebel, T., Gauvry, N., Pautrat, F., Skripsky, T., Froelich, O., Komoin-Oka, C., Westlund, B., Sluder, A., & Mäser, P. (2008). A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, 452(7184), 176–180. <https://doi.org/10.1038/nature06722>
- Kang, W., Zheng, J., Bao, J., Wang, Z., Zheng, Y., He, J. Z., & Hu, H. W. (2020). Characterization of the copper resistance mechanism and bioremediation potential of an Acinetobacter calcoaceticus strain isolated from copper mine sludge. *Environmental science and pollution research international*, 27(8), 7922–7933. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07303-3>

- Kass I.S., David A. Larsen, Ching C. Wang, Antony O.W. Stretton, 1982, Ascaris suum: Differential effects of Avermectin B1a on the intact animal and neuromuscular strip preparations, *Experimental Parasitology*, Volume 54, Issue 2, Pages 166-174, ISSN 0014-4894, [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(82\)90123-0](https://doi.org/10.1016/0014-4894(82)90123-0).
- Kay, P., Blackwell, P. A., & Boxall, A. B. (2005). Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land. *Chemosphere*, 60(4), 497–507. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.028>
- Kim, K.R., Owens, G., Kwon, S.I., So, K.H., Lee, D.B. and Ok, Y.S. (2011) Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water, Air and Soil Pollution*, 214, 163-174. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-010-0412-2>
- Kolz, A. C., Ong, S. K., & Moorman, T. B. (2005). Sorption of tylosin onto swine manure. *Chemosphere*, 60(2), 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.094>
- Kreuzig, R., Blümlein, K., Sibylla Höltge, S. (2007). Fate of the Benzimidazole Antiparasitics Flubendazole and Fenbendazole in Manure and Manured Soils. *Clean Soil Air Water*, 488-494. <https://doi.org/10.1002/clen.200720023>
- Lagos, S., Moutzourelis, C., Spiropoulou, I. et al. Biodegradation of anthelmintics in soils: does prior exposure of soils to anthelmintics accelerate their dissipation?. *Environ Sci Pollut Res* 29, 62404–62422 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19964-8>
- Lanusse, C. E., & Prichard, R. K. (1993). Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Veterinary parasitology*, 49(2-4), 123–158. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90115-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90115-4)
- Martin, D. F., Ward, D. R. and Martin, B. B. (2011) 'AGRICULTURAL PHARMACEUTICALS IN THE ENVIRONMENT: A NEED FOR INVENTIVENESS', *Technology & Innovation*. doi: 10.3727/194982410x12858510212287
- Martin, R. J., Verma, S., Levandoski, M., Clark, C. L., Qian, H., Stewart, M., & Robertson, A. P. (2005). Drug resistance and neurotransmitter receptors of nematodes: recent studies on the mode of action of levamisole. *Parasitology*, 131 Suppl, S71–S84. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008668>
- Mavrot, F., Hertzberg, H. & Torgerson, P. Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. *Parasites Vectors* 8, 557 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1164-z>
- McKellar, Q. A., & Scott, E. W. (1990). The benzimidazole anthelmintic agents--a review. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 13(3), 223–247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1990.tb00773.x>
- McKellar, Q. A., & Benchaoui, H. A. (1996). Avermectins and milbemycins. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 19(5), 331–351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1996.tb00062.x>
- Molina, A. J., Merino, G., Prieto, J. G., Real, R., Mendoza, G., & Alvarez, A. I. (2007). Absorption and metabolism of albendazole after intestinal ischemia/reperfusion. *European*

journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, 31(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.01.00>

- Min Wu & Jiye Hu (2014) Residue Analysis of Albendazole in Watermelon and Soil by Solid Phase Extraction and HPLC, Analytical Letters, 47:2, 356-366, DOI: 10.1080/00032719.2013.832276
- Mooney D., K.G. Richards, M. Danaher, J. Grant, L. Gill, P.-E. Mellander, C.E. Coxon, An analysis of the spatio-temporal occurrence of anthelmintic veterinary drug residues in groundwater, Science of The Total Environment, Volume 769, 2021, 144804, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144804>
- Morganwalp, D. (2015) Scientists Discover Analog for Extraterrestrial Life in Idaho Hot Spring. Ανακτήθηκε 19/09/2019 από <https://toxics.usgs.gov/highlights/archaea.html>
- Pemberton, D. J., Franks, C. J., Walker, R. J., & Holden-Dye, L. (2001). Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl-alpha2 in the function of the native receptor. Molecular pharmacology, 59(5), 1037–1043. <https://doi.org/10.1124/mol.59.5.1037>
- Podlipná R. (2022). Benzimidazoles and Plants: Uptake, Transformation and Effect. Toxics, 10(3), 135. <https://doi.org/10.3390/toxics10030135>
- Podlipná, R., Skálová, L., Seidlová, H., Szotáková, B., Kubíček, V., Stuchlíková, L., Jirásko, R., Vaněk, T., & Vokřál, I. (2013). Biotransformation of benzimidazole anthelmintics in reed (*Phragmites australis*) as a potential tool for their detoxification in environment. Bioresource technology, 144, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.105>
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 1999. Pharmacology, 4th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh
- Rao, P.S.C., Hornsby, A.G., (2001). Behavior of pesticides in Soil and Water. Institute of food and Agricultural Science, University of Florida. Florida. U.S.A
- Riviere, J.E., Papich, M.G. (2009). Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 9th Edition, Wiley-Blackwell, Hoboken, 1431-1437.
- Ronald Palmen, Klaas J Hellingwerf, Uptake and processing of DNA by *Acinetobacter calcoaceticus* – areview1Presented at the Workshop on 'Type-4 pili – biogenesis, adhesins, protein export and DNA import', Schloss Ringberg, Germany, 26–29 November 1995.1, Gene, Volume 192, Issue 1, 1997, Pages 179-190, ISSN 0378-1119, [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00042-5)
- Rufener, L., Baur, R., Beech, R., Sigel, E., (2015). Monepantel irreversibly binds to and opens *Haemonchus contortus* MPTL-1 and *Caenorhabditis elegans* ACR-20 receptors. Molecular pharmacology, 87(1), 96–102. <https://doi.org/10.1124/mol.114.095653>



- Rufener, L., Keiser, J., Kaminsky, R., Mäser, P., & Nilsson, D. (2010). Phylogenomics of ligand-gated ion channels predicts monepantel effect. *PLoS pathogens*, 6(9), e1001091. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001091>
- Russel, M., Meixue, Q., Alam, M. A., Lifen, L., Daroch, M., Blaszcak-Boxe, C., & Kumar Gupta, G. (2020). Investigating the potentiality of *Scenedesmus obliquus* and *Acinetobacter pittii* partnership system and their effects on nutrients removal from synthetic domestic wastewater. *Bioresource technology*, 299, 122571. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122571>
- Sager, H., Hosking, B., Bapst, B., Stein, P., Vanhoff, K., & Kaminsky, R. (2009). Efficacy of the amino-acetonitrile derivative, monepantel, against experimental and natural adult stage gastro-intestinal nematode infections in sheep. *Veterinary parasitology*, 159(1), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.006>
- Shyam Prasad, G., Girisham, S., & Reddy, S. M. (2010). Microbial transformation of albendazole. *Indian journal of experimental biology*, 48(4), 415–420.
- Teeter, J. S., & Meyerhoff, R. D. (2003). Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environmental research*, 93(1), 45–51. [https://doi.org/10.1016/s0013-9351\(02\)00086-5](https://doi.org/10.1016/s0013-9351(02)00086-5)
- Uniyal, S., Paliwal, R., Verma, M., Sharma, R. K., & Rai, J. P. (2016). Isolation and Characterization of Fipronil Degrading *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter oleivorans* from Rhizospheric Zone of *Zea mays*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 96(6), 833–838. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1795-6>
- Van De Steene, J. C., Stove, C. P., & Lambert, W. E. (2010). A field study on 8 pharmaceuticals and 1 pesticide in Belgium: removal rates in waste water treatment plants and occurrence in surface water. *The Science of the total environment*, 408(16), 3448–3453. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.037>
- Venkatesan P. (1998). Albendazole. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 41(2), 145–147. <https://doi.org/10.1093/jac/41.2.145>
- Wohde, M., Berkner, S., Junker, T., Konradi, S., Schwarz, L., & Düring, R. A. (2016). Occurrence and transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in manure: a literature review. *Environmental sciences Europe*, 28(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0091-8>
- Xiaoxin Chen, Sheng He, Xiaolu Liu, Jiye Hu, Biobegradation and metabolic mechanism of cyprodinil by strain *Acinetobacter* sp. from a contaminated-agricultural soil in China, *Eco-toxicology and Environmental Safety*, Volume 159, 2018, Pages 190-197, ISSN 0147-6513, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.047>
- Yang, C. W., Hsiao, W. C., & Chang, B. V. (2016). Biodegradation of sulfonamide antibiotics in sludge. *Chemosphere*, 150, 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.064>

- Σ.Μαστρογιανόπουλος , Πτυχιακή διατριβή , Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας , Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (2021)
- Σαράτση Κ. (2016). 'In vitro μελέτη ανθελμινθικής δράσης φυτικών ειδών, έναντι στα γαστρεντερικά παράσιτα των προβάτων',Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Γεωπονίας, Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος, Τμήμα Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος