



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Διατριβή

Μελέτη της εμφανισης επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης του συνθετικού ανθελμινθικού Albendazole ύστερα από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές του σε επιλεγμένα εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες της Λέσβου

**Μαστρογιαννόπουλος Σπυρίδων
του Γεωργίου**

ΛΑΡΙΣΑ 2021

Μελέτη της εμφάνισης επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης του συνθετικού ανθελμινθικού Albendazole ύστερα από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές του σε επιλεγμένα εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες της Λέσβου

Study of the enhanced biodegradation of the synthetic anthelmintic Albendazole after its repeated applications in selected soils from livestock units of Lesvos

Υπεύθυνος καθηγητής

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

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

Καράς Παναγιώτης, Συμβασιούχος ΠΔ 407 του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Πίνακας Περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΑ ΧΡΗΣΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	9
1.2 ΧΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	9
1.3 ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	10
1.4 ΚΥΡΙΕΣ ΟΔΟΙ ΕΙΣΟΔΟΥ ΤΩΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	11
1.5 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΥΧΗ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	12
1.5.1 ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥΝ ΤΗΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΥΧΗ ΤΩΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	12
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ.....	14
1.5.2 ΕΠΙΤΑΧΥΝΟΜΕΝΗ ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ	14
1.5.3 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ - ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΘΕΛΜΙΝΘΙΚΩΝ.....	15
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΒΕΝΖΙΜΙΔΑΖΟΛΩΝ	17
1.6 ALBENDAZOLE	21
1.6.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	21
1.6.2 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΥΧΗ.....	22
1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΔΑΦΩΝ	24
2.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΔΑΦΩΝ.....	25
2.2.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΕΔΑΦΩΝ.....	26
2.2.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΥΔΑΤΟΧΩΡΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΔΑΦΩΝ	26
2.3 ΔΙΑΛΥΤΕΣ, ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ.....	27
2.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥ ALBENDAZOLE ΣΤΑ ΕΔΑΦΗ	27
2.5 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΤΟΥ ALBENDAZOLE ΚΑΙ ΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΤΟΥ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ	29
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ALBENDAZOLE ΑΠΟ ΤΟ ΕΔΑΦΟΣ	29
2.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)	30
2.6.1 ΑΡΧΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	30
2.6.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ HPLC ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ UFLC SHIMADZU.....	31
2.7 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ DT50	32
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	33
3.1 ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΑΒΖ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ 1Α.....	33
3.2 ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΑΒΖ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ 7Β	34
3.3 ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΤΟΥ ALBENDAZOLE ΣΤΑ ΕΔΑΦΗ	35
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	39

Περίληψη

Τα περισσότερα κτηνιατρικά φάρμακα που χορηγούνται στα παραγωγικά ζώα, όπως τα ανθελμινθικά, δεν μεταβολίζονται σε σημαντικό βαθμό από το γαστρεντερικό σύστημα των ζώων με αποτέλεσμα η παρουσία τους στα μεταβολικά παράγωγα των ζώων, δηλαδή κόπρανα και ούρα να είναι σημαντική, έως και 80-90% της χορηγούμενης δόσης στην περίπτωση ανθελμινθικών φαρμάκων όπως οι βενδιμιδαζολες και οι μακροκυκλικές. Έτσι τα κτηνιατρικά φάρμακα είτε άμεσα μέσω των εκκρίσεων των ζώων είτε έμμεσα μέσω εφαρμογής κοπριάς καταλήγουν στο έδαφος ρυπαίνοντας το. Ωστόσο λίγα είναι μέχρι στιγμής γνωστά για τις διεργασίες που ελέγχουν την τύχη των περισσότερων κτηνιατρικών φαρμάκων στο έδαφος και ιδιαίτερα όσον αφορά τη συνεισφορά των μικροοργανισμών του εδάφους στην αποδόμησή τους. Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η αποδόμηση του ανθελμινθικού κτηνιατρικού φαρμάκου Albendazole (ABZ) καθώς και των χαρακτηρισμένων μεταβολικών του προϊόντων, Albendazole Sulfoxide (ABZSO) και Albendazole Sulfone (ABZSO₂), σε δυο επιλεγμένα εδάφη από κτηνιατρικές μονάδες της νήσου Λέσβου και σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων (x1 και x10 των εκτιμώμενων περιβαλλοντικών επιπέδων σε ρυπασμένα εδάφη). Η βασική υπόθεση που εξετάστηκε ήταν ότι μετά από τρεις επαναλαμβανόμενες εφαρμογές του ABZ στα εδάφη θα έχουμε πιθανά είτε την εμφάνιση του φαινομένου της επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης του κτηνιατρικού φαρμάκου και των μεταβολιτών του είτε συσσώρευση λόγω πιθανής οικοτοξικότητας. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ένα έδαφος, από προηγούμενες μελέτες αποδόμησης του Albendazole που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας φυτών & Περιβάλλοντος, που παρουσίαζε ταχύτερη αποδόμηση της μητρικής ένωσης και των οξειδωμένων μεταβολιτών της (έδαφος 1A) όπου αναμένονταν να παρατηρηθεί επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση καθώς και ένα έδαφος (7B) όπου η αποδόμηση ήταν βραδύτερη οπότε αναμένονταν συσσώρευση του Albendazole και των μεταβολιτών του έπειτα από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης φαίνεται να επιβεβαιώνουν την άνωθεν υπόθεση καθώς στην περίπτωση του εδάφους 1A οι τιμές DT₅₀ όσον αφορά το ABZ υπολογίστηκαν μεταξύ 1^{ης} και 3^{ης} εφαρμογής από 3.2 σε 0.87 ημέρες όσον αφορά τα δείγματα όπου έγινε εφαρμογή του ABZ με στόχο τελική συγκέντρωση x1. Αντίστοιχα στα δείγματα όπου έγινε εφαρμογή του ABZ με

στόχο τελική συγκέντρωση **x10** οι τιμές DT₅₀ μετατοπίστηκαν από 15.3 σε 5.6 ημέρες. Αντίθετα στην περίπτωση του εδάφους 7B παρατηρήθηκε επιβράδυνση της αποδόμησης του ABZ στα δείγματα εδάφους όπου έγινε εφαρμογή με στόχο τελική συγκέντρωση x10 με τιμές DT₅₀ ανάμεσα σε 1^η και 3^η εφαρμογή 5,3 και 20,5 ημέρες αντίστοιχα. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε όσον αφορά την υπολειμματικότητα των ολικών δραστικών υπολειμμάτων του Albendazole (άθροισμα ABZ, ABZSO και ABZSO₂) με αυξημένη συσσώρευση τους στην περίπτωση του εδάφους 7B , και στα δύο επίπεδα εφαρμοζόμενης συγκέντρωσης του κτηνιατρικού φαρμάκου. Επιπλέον στην περίπτωση του εδάφους 7B ανιχνεύεται κατά κύριο λόγο το μεταβολικό προϊόν του Albendazole , ABZSO που παρουσιάζει επίσης ανθελμινθική δράση. Από την άλλη στο έδαφος 1A μετά το πέρας των τριών εφαρμογών παρατηρήθηκε συσσώρευση κατά κύριο λόγο του ABZSO₂ , προϊόντων της περαιτέρω οξείδωσης του ABZSO.

Abstract

Most veterinary medicines administered to productive animals, such as anthelmintic animals, are not metabolised to a significant extent by the gastrointestinal system of animals, so that their presence in the metabolic derivatives of animals, i.e. feces and urine, is significant, up to 80-90% of the dose administered in the case of anthelmintic drugs such as bendimischoles and macrocyclic drugs. Thus, veterinary medicines are injected into thee directly through the secretions of animals or indirectly through the application of manure they end up in the soil polluting it However little is so far known about the processes that control the fate of most veterinary drugs in the soil and especially with regard to the contribution of soil microorganisms to their deconstruction. In the present thesis, the degradation of the anthelmintic veterinary drug Albendazole (ABZ) as well as its characterized metabolic products, Albendazole Sulfoxide (ABZSO)and (Albendazole Sulfone (ABZSO₂),in two selected territories (from the medical units on the island of and at two levels of concentrations(x1 and x10 of the estimated environmental levels in polluted soils). The basic hypothesis examined was that after three repeated applications of ABZ in soils we will probably have either the occurrence of the phenomenon of accelerated biodegradation of the veterinary medicine and its metabolites or accumulation due to possible ecotoxicity. For this reason, a soil was chosen from previous studies of degradation of Albendazole that have been carried out in the Plant & Environmental Biotechnology Laboratory, which showed a faster degradation of the parent compound and its oxidized metabolites (soil 1A) where accelerated bioegradation was expected to occur as well as a soil (7B) where degradation was slower so accumulation of Albendazole and its metabolites were expected after repeated applications. The results are expected Results of this study appear to confirm the above hypothesis as in the case of land 1A the Dt values of ₅₀ for ABZ were calculated between 1^{and} 3th application from 3.2 to 0.87 days for samples where the ABZ was applied with a view to a final concentration **x1**.in the samples where the ABZ was applied with a target of final concentration **x10**, the DT₅₀ values were shifted from 15.3 to 5.6 days. Onthe other hand, in the case of soil 7B, a slowdown in the degradation of abz was observed in the soil samples where application was carried out with a target concentration of x10 with DT values of50 and 3; the application of 5,3 and 20,5 days respectively. A similar picture was observed with regard to the residuality of the total active residues of Albendazole (sum of ABS,

ABZSO and ABZSO₂) with increased accumulation in the case of soil 7B , at both levels of applied concentration of the veterinary medicinal product. In addition, in the case of soil 7B, the metabolic product of Albendazole , ABZSO, which also has an anthelmintic effect, is mainly detected. On the other hand, in soil 1A, at the end of the three applications, accumulation was observed mainly due to ABZSO₂ , products of further oxidation of ABZSO.

1 Εισαγωγή

1.1 Αναγκαιότητα κτηνιατρικών φαρμάκων

Τα κτηνιατρικά φάρμακα πλέον έχουν γίνει απαραίτητα λόγω της ολοένα αυξανόμενης ζήτησης τροφής στον πλανήτη. Οι κύριοι λόγοι χρήσης των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι η αποφυγή ασθενειών, η μείωση της εξάπλωσης μεταξύ των ζώων, η αύξηση της παραγωγής και η βελτίωση της ποιότητας των προϊόντων. (Cooper et al., 2007, Deanet.al, 2010)

1.2 Τρόποι χρήσεις-κατηγορίες κτηνιατρικών φαρμάκων

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

Οι κυριότεροι κίνδυνοι για την υγεία και την παραγωγικότητα των ζώων παραγωγής αυτή στιγμή είναι η προσβολή από έντομα, μικροοργανισμούς και έλμινθες. Οι έλμινθες είναι παρασιτικοί σκώληκες ή τρηματώδεις σκώληκες. Οι νηματώδεις σκώληκες των εντέρων, που προσβάλλουν κυρίως παιδιά, είναι τα πιο συνηθισμένα παράσιτα στη Νότια Αμερική και αποτελούν ίσως τον πιο συχνό μολυσματικό παράγοντα για παραγωγικά ζώα των οποίων η εκτροφή είναι συνδεδεμένη με εξωτερική βόσκηση. Επίσης, άλλοι έλμινθες είναι τα νηματόζωα και οι πλατυέλμινθες. Οτιδήποτε εφαρμόζεται για την καταπολέμηση αυτών των λοιμώξεων ονομάζεται κτηνοτροφικό φάρμακο. Τα φάρμακα αυτά μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες θεραπευτικά και μετά-θεραπευτικά. Τα θεραπευτικά

φάρμακα χορηγούνται μετά την προσβολή από τον μικροοργανισμό, τον έλμινθα ή το έντομο και τα μετά-θεραπευτικά χορηγούνται προς αντιμετώπιση της προσβολής πριν γίνουν εμφανισιακά τα προβλήματα η κλινικά αισθητά. Έτσι η χορήγηση τους γίνεται συχνά και εξηγεί τις ποσότητες των φαρμάκων στο περιβάλλον.

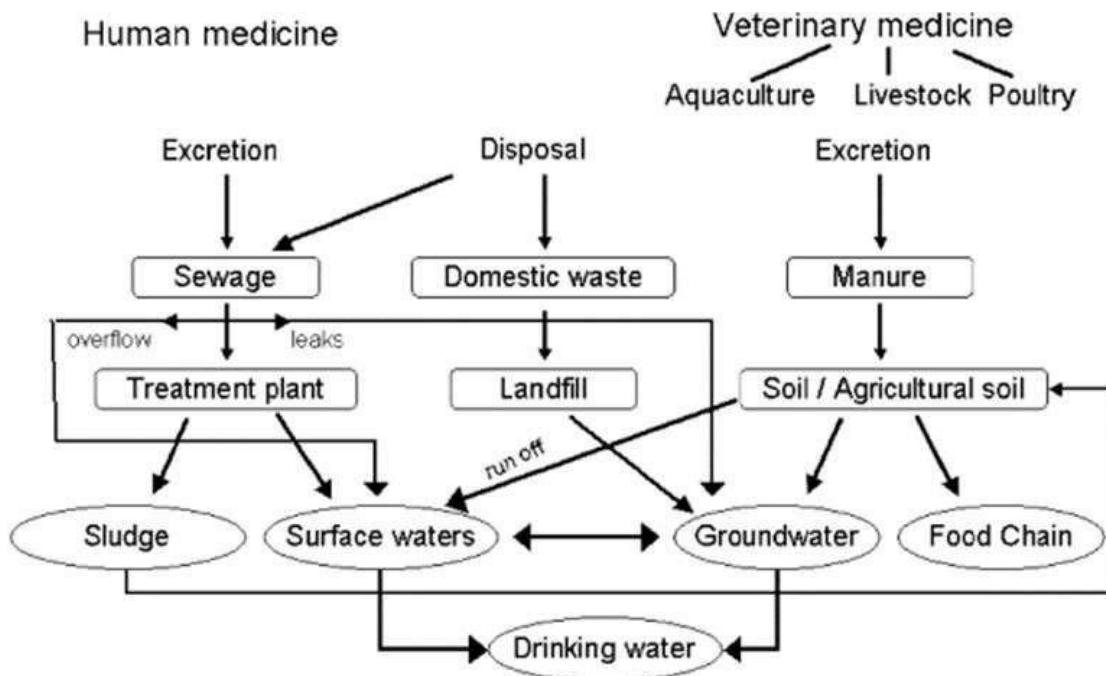
1.3 Κίνδυνοι από τη χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων

Η FEDESA (European Federation of Animal Health) υπολογίζει το 1999 χορηγήθηκαν περίπου 4700 τόνοι κτηνιατρικών φαρμάκων. αυτή είναι η υπέρμετρη χορήγηση που γίνεται πλέον από κτηνιατρικά φάρμακα και αποτελεί μεγάλο αντικείμενο προβληματισμού για το περιβάλλον (Martínez-Carballoetal 2007) . Τα οφέλη που αναφέραμε παραπάνω μπορεί να βοηθούν την κτηνοτροφία , την ανάπτυξη των ζώων , την μείωση των ασθενειών μεταξύ τους αλλά πολλές φορές δημιουργεί πολλά προβλήματα περιβαλλοντικά δηλαδή στα εδάφη αφήνουν υπολείμματα που μπορεί να δημιουργήσουν τοξικότητα μετά από κάποια χρόνια. Επίσης η υπερβολική χρήση των φαρμάκων μπορεί να προσδέσει στους μικροοργανισμούς του εδάφους ανθεκτικότητα προς αυτά και να έχουν μειωμένη αποτελεσματικότητα. (Aarestrup et al., 2005)

Οι προβληματισμοί αυτοί, βασίζονται σε δύο βασικούς άξονες, την περιβαλλοντική τύχη του φαρμάκων (μέσω ποιων οδών μπορούν από τα ζώα να καταλήξουν στο έδαφος ή τον υδροφόρο ορίζοντα) αλλά και τις πιθανές επιδράσεις τους σε άλλους οργανισμούς μη-στόχους (Kolodziejaska, M. et al 2010). Η παρουσία των κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον απειλεί με άμεσες και έμμεσες επιπτώσεις οργανισμούς μη στόχους και είναι πιθανό να οδηγήσει σε μεταφορά υπολειμμάτων των κτηνιατρικών φαρμάκων στην τροφική αλυσίδα, αντίστοιχα. Ο προβληματισμός περί περιβαλλοντικής τύχης τους εντείνεται αν ληφθεί υπόψιν το γεγονός ότι μεγάλος αριθμός μεταβολικών προϊόντων των κτηνιατρικών φαρμάκων έχουν, αν όχι ισάξια, αξιοσημείωτη δραστηριότητα (Calamari, et al 2003) ή ότι πολλοί μεταβολίτες επανέρχονται στην αρχική δραστηκή τους μορφή (Wohde et al, 2016).

1.4 Κυρίες οδοί εισόδου των κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον

Οι κύριες μορφές εισαγωγής των κτηνιατρικών φαρμάκων στο έδαφος είναι μέσω των κοπράνων μετά την μετατροπή τους σε λιπάσματα ή από υδατοκαλλιέργειες ή από αχρησιμοποίητα φάρμακα. Αυτό δημιουργεί προβλήματα και ανησυχίες σε διεθνές και εθνικό περιβάλλον γιατί η εκτεταμένη χρήση των φαρμάκων είναι ανεξέλεγκτη και με το πέρασμα των χρόνων μπορεί να γίνει συσσώρευση στα εδάφη (Bottoni. et al 2010, Kim. et al 2011, Howard. et al 2011, García-galán. et al 2010, Λίτσας 2013). Κτηνιατρικά φάρμακα έχουν εντοπιστεί στα κόπρανα των υπό θεραπεία ζώων σε ποσοστό έως και 90% της ποσότητας που χορηγήθηκε στο ζώο από το στόμα, σε διάστημα τεσσάρων ημερών (Kreuzig et al 2007). Εξίσου σοβαρό ζήτημα αποτελεί και η ρύπανση των υπόγειων υδάτων. Τα κτηνιατρικά φάρμακα εισέρχονται στα επιφανειακά ή και στα υπόγεια νερά είτε άμεσα όπως στην περίπτωση της εφαρμογής θεραπευτικής αγωγής σε ιχθυοκαλλιέργειες, είτε έμμεσα μέσω έκπλυσης ή επιφανειακής απορροής από τα εδάφη που έχουν δεχθεί εφαρμογή κοπριάς επιβαρυμένης με κτηνιατρικά φάρμακα (Λίτσας 2013).



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

1.5 Περιβαλλοντική τύχη κτηνιατρικών φαρμάκων

1.5.1 Διεργασίες που ελέγχουν την περιβαλλοντική τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων

Η περιβαλλοντική τύχη των κτηνιατρικών φαρμάκων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Οι κύριοι παράγοντες είναι η προσρόφηση των κτηνιατρικών φαρμάκων στην οργανική ουσία, ανάλογα με το μεταβολισμό στο έδαφος είτε αναερόβιος είτε αερόβιος με τον δεύτερο να είναι ταχύτερος όπου παίζει σημαντικό ρόλο η θερμοκρασία, η σύσταση του εδάφους και οι μικροβιακές κοινότητες οι οποίες ευνοούν ή υπομονεύουν την ταχύτητα αποδόμησης του φαρμάκου και η προσρόφηση στην οργανική ουσία και η έκπλυση τους στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα. Επίσης μεγάλο ρόλο παίζει και οι διεργασίες μεταβολισμού που έχουν υποστεί τα κτηνιατρικά φάρμακα στο σώμα των ζώων δηλαδή την μετατροπή τους σε κόπρανα ή λιπάσματά.

Χημική αποδόμηση

Χημική αποδόμηση: Είναι η διάσπαση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου αποκλειστικά με χημικές αντιδράσεις παρουσία (αερόβιες συνθήκες) ή απουσία (αναερόβιες συνθήκες) οξυγόνου. Τέτοιες αντιδράσεις είναι υδρόλυση και οξειδοαναγωγή. Καθοριστικός παράγοντας είναι το pH και η διαθεσιμότητα του κτηνιατρικού φαρμάκου στο περιβάλλον (νερό, έδαφος, υπέδαφος)(Δ.Θ. Λύκας, 2009).

Φωτοαποδόμηση – Φωτόλυση

Φωτοαποδόμηση – Φωτόλυση: Είναι η έμμεση ή άμεση διάσπαση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου στην ατμόσφαιρα (έδαφος, νερό ή στα φυτά) από τη δράση του φωτός, εξαιτίας απορρόφησης ηλιακής ενέργειας, μήκους κύματος (λ) από 290 έως 400 nm (Δ.Θ. Λύκας, 2009).

Προσρόφηση

Προσρόφηση: Είναι η προσέλκυση και η συγκράτηση των μορίων του κτηνιατρικού φαρμάκου από την επιφάνεια των κολλοειδών του εδάφους (ανόργανων ή οργανικών) ή άλλων συστατικών. Παίζει θεμελιώδη ρόλο στη δυναμική μεταφορά, την εμμόνη, τη μετατροπή και τη βιοσυσσώρευση των κτηνιατρικών φαρμάκων (De Jonge et al, 1996). Η προσρόφηση εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε οργανική ύλη του εδάφους (Coquet, 2003). Η μοριακή φύση της οργανικής ύλης του εδάφους έχει αποδειχθεί ότι είναι το κλειδί για τον προσδιορισμό προσρόφησης μη ιοντικών κτηνιατρικών φαρμάκων (Ahmad et al, 2006). Άλλοι Παράγοντες που επηρεάζουν την προσρόφηση των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι το είδος των ανόργανων κολλοειδών, το pH του εδάφους, η υγρασία και η θερμοκρασία του εδάφους (Δ.Θ. Λύκας, 2009). Η πιο σημαντική ιδιότητα ενός κτηνιατρικού φαρμάκου που επηρεάζει τη μετακίνησή του και καθορίζει κατά κάποιον τρόπο την τύχη του στο περιβάλλον είναι η υδατοδιαλυτότητα του. Όταν ένα κτηνιατρικό φάρμακο βρεθεί στο έδαφος ένα μέρος αυτού θα προσροφηθεί στα κολλοειδή σωματίδια του εδάφους μέσω της προσρόφησης (absorption) και ένα μέρος θα διαλυθεί στο εδαφικό διάλυμα του εδάφους. Καθώς όλο και περισσότερο νερό εισέρχεται στο έδαφος μέσω της βροχής ή της άρδευσης, το προσροφημένο στα κολλοειδή του εδάφους κτηνιατρικό φάρμακο ελευθερώνεται από την επιφάνεια των εδαφικών κολλοειδών και επαναδιαλύεται στο εδαφικό διάλυμα με μια διαδικασία που ονομάζεται εκρόφηση (desorption). Η διαλυτότητα ενός κτηνιατρικού φαρμάκου και η προσρόφηση του στο έδαφος σχετίζονται αντιστρόφως, δηλαδή υψηλή υδατοδιαλυτότητα οδηγεί σε χαμηλότερη προσρόφηση (Rao and Hornsby, 2001).

Έκπλυση

Έκπλυση (Leaching): Η έκπλυση είναι η διεργασία εκείνη κατά την οποία ένα κτηνιατρικό φάρμακο, το οποίο βρίσκεται διαλυτοποιημένο στο εδαφικό διάλυμα, μπορεί να μετακινηθεί με το νερό προς τα βαθύτερα στρώματα και να καταλήξει στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα. Παράγοντες που επηρεάζουν την έκπλυση σχετίζονται κυρίως με το έδαφος (π.χ. φυσικοχημική σύσταση εδάφους, φυσικοχημικές ιδιότητες εδάφους) αλλά και μη εδαφικούς παράγοντες (π.χ. κλιματολογικές συνθήκες, τρόπος εφαρμογής, καλλιεργητικές πρακτικές, φυσικοχημικές ιδιότητες κτηνιατρικού φαρμάκου)

Επιφανειακή απορροή

Επιφανειακή απορροή (Run-off): Τα κτηνιατρικά φάρμακα, που εφαρμόζονται στα φυτά ή στο έδαφος με την κοπριά ή τα κόπρανα των ζώων, μπορούν να μετακινηθούν επιφανειακά με το νερό της άρδευσης ή της βροχής και η διαδικασία αυτή ονομάζεται επιφανειακή απορροή. Σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την πιθανότητα επιφανειακής απορροής είναι η δυνατότητα προσρόφησης των κτηνιατρικών φαρμάκων στα εδαφικά κολλοειδή. Παράγοντες που επηρεάζουν την επιφανειακή απορροή είναι: η υδατοδιαλυτότητα του κτηνιατρικού φαρμάκου, η υπολειμματικότητα του κτηνιατρικού φαρμάκου, η προσρόφηση, η κλίση του εδάφους και οι καιρικές συνθήκες (Δ.Θ. Λύκας, 2009). Για παράδειγμα ισχυρές βροχοπτώσεις με ύψος που ξεπερνά την απορροφητική ικανότητα του εδάφους οδηγούν σε επιφανειακή απορροή του νερού και έτσι ευνοούν και την επιφανειακή απορροή υπολειμμάτων των κτηνιατρικών φαρμάκων που βρίσκονται στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους.

Βιολογική Αποδόμηση

Οι βιολογικές εργασίες λαμβάνουν χώρα στο νερό και στο έδαφος από μικροοργανισμούς, που χρησιμοποιούν τα βιοαποικοδομήσιμα υλικά (οργανικά και ανόργανα) ως πηγή τροφής και ενέργειας: μεταβολίζουν τις διαλυμένες στο έδαφος ουσίες σε μεταβολικά προϊόντα τα οποία στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιήσουν. Αυτές οι διεργασίες είναι που θα διαμορφώνουν τους όρους του ισοζυγίου μάζας (ή: της εξίσωσης συνέχειας ή του μοντέλου μεταφοράς μάζας) που θα καταστρώνεται, μόλις γίνει η επιλογή του συστήματος (ή του υποσυστήματος) καθώς και της ουσίας της οποίας η τύχη θα μελετηθεί.

1.5.2 Επιταχυνόμενη Βιοαποδόμηση

Συνήθως σε περιόδους πριν από την αποδόμηση πολλών οργανικών ενώσεων παρατηρείται μία μηδενική απομάκρυνση της χημικής ουσίας που αποδημείται. Αυτή είναι μία περίοδος εγκλιματισμού ή προσαρμογής των εδαφικών μικροοργανισμών στην δομή της ουσίας και ονομάζεται φάση υστέρησης (lag phase).

Σε αυτή τη φάση οι μικροοργανισμοί του εδάφους, παρατηρείται να αναπτύσσουν ενζυμικά συστήματα κατάλληλα για την αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων έτσι με το πέρασμα του χρόνου τα κτηνιατρικά φάρμακα χάνουν την αποτελεσματικότητά τους. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση και εμφανίζεται και έχει μελετηθεί εκτενώς κυρίως για κτηνιατρικά φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται συνέχεια στο ίδιο έδαφος με την μορφή κοπριάς ή κοπράνων για μεγάλο ή μικρό χρονικό διάστημα και είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης μεταξύ κτηνιατρικών φαρμάκων και μικροοργανισμών. Συνήθως το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται όταν μια μικροβιακή κοινότητα μπορεί να χρησιμοποιήσει το κτηνιατρικό φάρμακο σαν πηγή των συστατικών που χρειάζεται για την αύξηση και την ανάπτυξη του. Αυτό το φαινόμενο αποδόμησης ουσιών από μικροβιακές κοινότητες απαιτεί να υπάρχουν συγκεκριμένες προϋποθέσεις : Α) μια αύξηση στη δραστηριότητα αποδόμησης ενός περιορισμένου αριθμού μικροοργανισμών λόγω, της εκλεκτικής έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν καταβολικά ένζυμα, Β) μια αύξηση στον αριθμό των βιοαποδομητών λόγω, της μικροβιακής αύξησης Γ) τη μετακίνηση άλλων ικανών μικροοργανισμών εξαιτίας της αποδόμησης στην περιοχή της εφαρμογής και Δ) τη εξελικτική εμφάνιση νέων καταβολικών ενζύμων για τη χρήση της χημικής ουσίας ως πηγή ενέργειας. Κύριο ρόλο στην επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση παίζουν τα βακτήρια ενώ οι μύκητες έχουν περιορισμένη συμμετοχή στη διαδικασία. Το φαινόμενο αυτό αρχικά είχε θεωρηθεί ως ένα πλεονέκτημα των μικροβιακών κοινοτήτων για την μείωση των υπολειμμάτων των κτηνιατρικών φαρμάκων στα εδάφη και στην συνέχεια στην μετακίνησή τους στα υπόγεια ρεύματα . Όταν η χημική ουσία έχει χημική δομή που ευνοεί την αύξηση των μικροβιακών κοινοτήτων αυξάνεται και το ποσοστό αποδόμησης. Συνήθως φάρμακα με απλές χημικές δομές που χαρακτηρίζονται από υψηλή διαλυτότητα και χαμηλή ικανότητα προσρόφησης ή παρόμοια χαρακτηριστικά με τις ανάγκες της κοινότητας μπορούν εύκολα να υποστηρίξουν τη μικροβιακή αύξηση και εμφανίζουν πιο γρήγορα επιταχυνόμενη μικροβιακή αποδόμηση. Επίσης σημαντικούς παραμέτρους αποτελούν το pH, η οργανική ουσία και η διαθεσιμότητα σε θρεπτικά του εδάφους για την αύξηση της βιοαποδόμησης και η μεταβολή σε μία από τις παραμέτρους μπορεί να επηρεάσει το ρυθμό της αποδόμησης. (Lagos, 2018)

1.5.3 Κατηγορίες - τρόπος δράσης ανθελμινθικών

Τα ανθελμινθικά φάρμακα αποτελούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες κτηνιατρικών φαρμάκων για την καταπολέμηση των νηματωδών του γαστρεντερικού σωλήνα σε παραγωγικά ζώα καθώς και σε οικόσιτα ζώα. Χωρίζονται σε τρεις μεγάλες ομάδες (Sager et al., 2009):

A) Βενζιμιδαζόλες και προ-βενζιμιδαζόλες,

B) Ιμιδαζοθειαζόλες και τετραϋδροπυριμιδίνες και

Γ) Μακροκυκλικές λακτόνες.

Σχετικά πρόσφατα, έχουν ξεκινήσει να χρησιμοποιούνται ως ανθελμινθικά ευρέως φάσματος ενώσεις που αποτελούν παράγωγα του Αμινο-Ακετονιτριλίου (Amino-acetonitrile derivatives, AAD's) (Kaminsky et al., 2008a).

A) Βενζιμιδαζόλες και προ-βενζιμιδαζόλες

Οι βενζιμιδαζόλες αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα ανθελμινθικών για τη θεραπεία των ενδοπαρασίτων στα ζώα. Γενικά, χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα δράσης και σχετικά μεγάλο δείκτη ασφάλειας. Η υψηλή τους αποτελεσματικότητα στηρίζεται στις φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. Οι βενζιμιδαζόλες, αν και παρουσιάζουν μικρή τοξικότητα για τα θηλαστικά, πρέπει να αποφεύγονται στα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης διότι είναι δυνατό να προκαλέσουν εμβρυοτοξικότητα και τερατογένεση.

Όλα τα μέλη της ομάδας των βενζιμιδαζολών έχουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης και οι διαφορές που παρουσιάζουν όσον αφορά στην αποτελεσματικότητά τους κατά των διαφόρων γενών παρασίτων οφείλονται κυρίως στη διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα τους μέσα στον οργανισμό (McKellar and Scott 1990, Lanusse and Prichard, 1993). Ο τρόπος δράσης τους, περιληπτικά, σχετίζεται με την ακεραιότητα του κυτταρικού σκελετού των παρασίτων. Οι βενζιμιδαζόλες ενώνονται με την ελεύθερη β-σωληνίνη των παρασίτων, μια δομική πρωτεΐνη των κυττάρων, και παρεμποδίζουν τον πολυμερισμό της και συνεπώς τη δημιουργία των μικροσωληναρίων μέσα στα κύτταρα του παρασίτου (Lacey, 1990, Robinson et al., 2004). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μεταβολικές διαταραχές σε κυτταρικές λειτουργίες όπως στη λήψη και αποθήκευση γλυκόζης και αμινοξέων και στη σύνθεση πρωτεϊνών στα παράσιτα που οδηγούν στη θανάτωσή τους (Rang et al., 1999, Gardner and Hill, 2001).

Ο υψηλός δείκτης ασφαλείας, που παρουσιάζουν οι ουσίες της κλάσης αυτής, οφείλεται στην επιλεκτική σύνδεσή τους με τη σωληνίνη των παρασίτων και όχι με

αυτήν του ξενιστή/θηλαστικού (Gull et al., 1987). Η επιλεκτική αυτή δράση δεν είναι απόλυτη, αφού υπάρχει η πιθανότητα, αν και πολύ μικρή, να προκληθούν τοξικά φαινόμενα κατά την εμβρυογένεση και στον οργανισμό του ξενιστή (Navarro et al., 1999, Yoshimura, 2003).

Χορήγηση βενζιμιδαζολών

Οι φαρμακοτεχνικές μορφές που κυρίως χρησιμοποιούνται για την χορήγησή τους στα μικρά μηρυκαστικά, επειδή οι περισσότερες βενζιμιδαζόλες είναι δυσδιάλυτες στο νερό, είναι ο βώλος, η πάστα, το δισκίο, το εναιώρημα και η σκόνη για την παραγωγή υδατικού διαλύματος. Η ταχύτητα και ο βαθμός απορρόφησης ενός ανθελμινθικού φαρμάκου, όταν χορηγείται από το στόμα, εξαρτάται από το είδος του ζώου, τη δόση, την φαρμακοτεχνική μορφή, τη διαλυτότητα, το βαθμό πλήρωσης του γαστρεντερικού σωλήνα κατά την αγωγή και το σχηματισμό της οισοφαγικής αύλακας (Moreno et al., 2004, Alvarez et al., 2010). Η οισοφαγική αύλακα είναι ένας μυϊκός σχηματισμός του κατώτερου τμήματος του οισοφάγου που, όταν σχηματίζεται, οδηγεί το περιεχόμενο του κατευθείαν στο ήνυστρο και όχι στη μεγάλη κοιλία. Μυϊκές πτυχές του κεκρυφάλου και της μεγάλης κοιλίας ενώνονται και σχηματίζουν μια αύλακα που κάτω από προϋποθέσεις (όπως ο θηλασμός κ.α) οι πτυχές της κλείνουν και σχηματίζουν ένα σωλήνα που οδηγεί στο ήνυστρο. Σχηματίζεται αντανακλαστικά κατά τον θηλασμό ώστε να οδηγεί το γάλα στο ήνυστρο και να αποφεύγονται οι ζυμώσεις από τους μικροοργανισμούς της μεγάλης κοιλίας. Εκτός από το θηλασμό, τόσο η πρωτεΐνη του γάλακτος όσο και η δίψα προκαλούν επίσης το σχηματισμό της αύλακας αυτής (Mikhail et al., 1988).

Το πλεονέκτημα αυτής της φαρμακοτεχνικής μορφής είναι η συνεχής και επαναλαμβανόμενη λήψη ανθελμινθικού από το ζώο, γεγονός που βελτιώνει σημαντικά την αποτελεσματικότητά του. Η συνεχής και επαναλαμβανόμενη λήψη ανθελμινθικού επιτυγχάνεται και με την προσθήκη στο σιτηρέσιο προμείγματος βενζιμιδαζόλης με τη μορφή σκόνης ή συμπέκτων. Ωστόσο, ο παραπάνω τρόπος χορήγησης ανθελμινθικού, όπως και η πλάκα λείξεως, υστερούν στο γεγονός ότι δεν εξασφαλίζουν πάντοτε την επαρκή λήψη του ανθελμινθικού φαρμάκου από όλα τα ζώα της εκτροφής. Όσον αφορά την οξφαινδαζόλη, υπάρχει ένας νέος τρόπος χορήγησής της με απευθείας διοχέτευσή της στη μεγάλη κοιλία με ειδικό

δοσομετρικό πιστόλι, ενώ η νετοβιμίνη πλέον μπορεί να χορηγηθεί και παρεντερικά με τη μορφή διαλυτού άλατος (Brander et al., 1991).

Τέλος, χρησιμοποιούνται ειδικές συσκευές που χορηγούνται στα ζώα από το στόμα και μπορούν να παραμένουν στον κεκρύφαλο με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν σταδιακά το ανθελμινθικό φάρμακο (intraruminal/sustain devices) (Mc Dougall, 1992). Εύρος δράσης: Οι βενζιμιδαζόλες και οι προ-βενζιμιδαζόλες είναι πολύ αποτελεσματικές κατά των περισσοτέρων νηματωδών παρασίτων των κατοικίδιων ζώων. Ορισμένες από αυτές χρησιμοποιούνται επιπλέον για την καταπολέμηση κεστωδών ή και τρηματωδών παρασίτων. Οι πιο σύγχρονες βενζιμιδαζόλες, όπως για παράδειγμα η αλβενδαζόλη, είναι αποτελεσματικές κατά των υποβιουσών δ' σταδίου προνυμφών παρασίτων, όπως των *Ostertagia* spp. Η δράση αυτή οφείλεται στις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. Εξαιτίας του αυξημένου χρόνου μεταβολισμού τους και της παρατεταμένης παραμονής τους στους ιστούς του ζώου, αυξάνεται ο χρόνος επαφής τους με τα παράσιτα και συνεπώς μεγαλώνει και η αποτελεσματικότητά τους. Επισημαίνεται όμως, ότι ταυτόχρονα θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στο χρόνο αναμονής, όταν πρόκειται για τη λήψη γάλακτος ή τη σφαγή του ζώου για ανθρώπινη κατανάλωση (Brander et al., 1991).

B) Ιμιδαζοθειαζόλες και τετραϋδροπυριμιδίνες.

Στις ιμιδαζοθειαζόλες ανήκουν η τετραμιζόλη (tetramizole) και η λεβαμιζόλη (levamisole) και στις τετραϋδροπυριμιδίνες η μοραντέλη (morantel), η οξαντέλη (oxantel) και η πυραντέλη (pyrantel). Η ιμιδαζοθειαζόλες και οι τετραϋδροπυριμιδίνες κατατάσσονται στην ίδια ανθελμινθική κλάση γιατί παρουσιάζουν παρόμοιο τρόπο δράσης. Οι ουσίες των παραπάνω ομάδων παρουσιάζουν ομοιότητες τόσο στη δομή του μορίου τους όσο και στο σημείο στόχου όπου ασκούν τη δράση τους στους μυς των νηματωδών παρασίτων (Atchison et al., 1992). Πρόκειται για ουσίες αγωνιστές των νικοτινικών υποδοχέων (Aceves et al., 1970, Aubry et al., 1970) οι οποίες προκαλούν σπαστική μυϊκή παράλυση εξαιτίας της παρατεταμένης ενεργοποίησης των διεγερτικών νικοτινικών υποδοχέων στους μυς του σωματικού τοιχώματος των παρασίτων. Η παρατεταμένη μυϊκή σύσπαση οδηγεί τελικά σε νευρομυϊκή παράλυση των παρασίτων (Martin et al., 2005). Περαιτέρω φαρμακολογικές έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα παράσιτα έχουν τρεις τύπους νικοτινικών υποδοχέων: τον N-τύπο που επιλεκτικά ενεργοποιείται από τη νικοτίνη, τον B-τύπο που επιλεκτικά ενεργοποιείται από το βεφήνιο και τον L-τύπο που

επιλεκτικά ενεργοποιείται από τη λεβαμιζόλη και σχετίζεται τόσο με τον τρόπο δράσης της όσο και με την ανοχή των παρασίτων σε αυτή (Martin et al., 2005, Qian et al., 2006).

Η ανακάλυψη της τετραμιζόλης αποτέλεσε σταθμό στην ιστορία της παρασιτολογίας επειδή ήταν το πρώτο υδατοδιαλυτό ανθελμινθικό με μεγάλη αποτελεσματικότητα έναντι όλων των γαστρεντερικών και αναπνευστικών στρογγυλοειδών παρασίτων. Η υδατοδιαλυτότητά της έδινε το πλεονέκτημα της χρησιμοποίησης της σε ενέσιμη μορφή. Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι η τετραμιζόλη αποτελούνταν από δύο ενεργά ισομερή. Το L-ισομερές, τη λεβαμιζόλη, στην οποία οφείλονταν οι ανθελμινθικές ιδιότητες της τετραμιζόλης και στο D-ισομερές, τη δεξαμιζόλη, με μικρή ανθελμινθική δραστηριότητα. Σήμερα, η τετραμιζόλη έχει αποσυρθεί και έχει αντικατασταθεί παγκοσμίως από τη λεβαμιζόλη (Lewis et al., 1980).

Γ) Μακροκυκλικές λακτόνες.

Οι μακροκυκλικές λακτόνες ίσως αποτελούν τα σημαντικότερα φάρμακα παγκοσμίως για την καταπολέμηση των γαστρεντερικών νηματωδών στα μηρυκαστικά. Περιλαμβάνουν δύο υποομάδες, τις αβερμεκτίνες και τις μιλβεμυκίνες. Στις πρώτες κατατάσσονται η ιβερμεκτίνη (ivermectin), η αβαμεκτίνη (abamectin), η δοραμεκτίνη (doramectin) και η επρινομεκτίνη (eprinomectin), ενώ στις μιλβεμυκίνες περιλαμβάνονται η μοξιδεκτίνη (moxidectin), η νεμαδεκτίνη (nemadectin), η μιλβεμυκίνη (milbemycin) και η σελαμεκτίνη (selamectin). Οι αβερμεκτίνες και οι μιλβεμυκίνες παρουσιάζουν στενή χημική συγγένεια αφού αποτελούνται από 16-μελή λακτονικό δακτύλιο. Η ιβερμεκτίνη και η μοξιδεκτίνη αποτελούν τους κυριότερους εκπροσώπους των υποομάδων τους. Η ιβερμεκτίνη αποτελεί προϊόν ζύμωσης του μικροοργανισμού *Streptomyces avermitilis*, ενώ η μοξιδεκτίνη είναι ημισυνθετικό παράγωγο της νεμαδεκτίνης, προϊόν ζύμωσης του μικροοργανισμού *Streptomyces cyaneogriseus subspecies noncyanogenus*. Οι ουσίες αυτές είναι πολύ δραστικές και μπορούν να θανατώσουν ένδο- και έξωπαράσιτα σε δόσεις ιδιαίτερα χαμηλές (McKellar and Benchaoui, 1996).

Ο κύριος μηχανισμός δράσης των μακροκυκλικών λακτονών είναι η ένωσή τους με τους υποδοχείς των διαύλων χλωρίου και επακόλουθη διάνοιξη των διαύλων αυτών στη μετασυναπτική σύνδεση της κυτταρικής μεμβράνης μυϊκών και νευρικών κυττάρων των παρασίτων. Η ένωση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την σταδιακή αλλά

μόνιμη διάνοιξη των διαύλων. Έτσι με τη μεταβολή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης στα ιόντα χλωρίου και την απρόσκοπτη ροή τους στο κύτταρο επέρχεται υπερπόλωση του κυττάρου. Η υπερπόλωση αυτή παρεμποδίζει την έναρξη των δυναμικών δράσης στο παράσιτο προκαλώντας χαλαρή παράλυση και θάνατο (Beech et al., 2010a). Η δράση των μακροκυκλικών λακτονών εκδηλώνεται κυρίως στους φαρυγγικούς μυς των παρασίτων παρεμποδίζοντας τη θρέψη τους (Pemberton et al. 2001), τη ρύθμιση της υδροστατικής πίεσης και τις απεκκρίσεις (Brownlee et al., 1997). Ταυτόχρονα επιδρούν και στους μυς του σωματικού τοιχώματος παρεμποδίζοντας την κίνηση των παρασίτων (Kass et al., 1982). Η επίδραση στους φαρυγγικούς μυς και η παρεμπόδιση της θρέψης επιτυγχάνεται με πολύ μικρές συγκεντρώσεις της τάξης των 0,1nM, ενώ η παράλυση του σώματος απαιτεί συγκεντρώσεις 100πλάσιες της παραπάνω (Geary et al., 1993). Έχουν βρεθεί στα νηματώδη διαφορετικά είδη διαύλων χλωρίου. Κάθε είδος σχετίζεται με διαφορετική χημική ουσία (Beech et al., 2010b) . Τέτοιες ουσίες είναι η ακετυλοχολίνη (Bokisch and Waker, 1986), το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (Holden-Dye and Waker, 1990), η ισταμίνη (Zheng et al., 2002), η γλυκίνη (Shan et al., 2001) και το γλουταμινικό οξύ (Cully et al., 1994). Η παραλυτική δράση των μακροκυκλικών λακτονών οφείλεται στο γεγονός πως πρωταρχικός του στόχος είναι οι διάυλοι χλωρίου που συνδέονται με το γλουταμινικό οξύ προκαλώντας την παράλυση του φάρυγγα.

Δευτερεύων στόχος τους φαίνεται να είναι οι διάυλοι που συνδέονται με το γ-αμινοβουτυρικό οξύ και που σχετίζονται με την παράλυση των μυών του σώματος των παρασίτων (Beech et al., 2010a). Τα θηλαστικά δεν έχουν διαύλους χλωρίου που να συνδέονται με το γλουταμινικό οξύ στα μυϊκά και τα νευρικά τους κύτταρα και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι μακροκυκλικές λακτόνες παρουσιάζουν μικρό τροπισμό προς τους άλλους διαύλους των θηλαστικών, οι λακτόνες έχουν πολύ μικρή επίδραση σε αυτά. Επίσης ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός του κεντρικού νευρικού συστήματος προστατεύει τους διαύλους του γ-αμινοβουτυρικού οξέος από την επίδραση των φαρμάκων αυτών. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες μακροκυκλικές λακτόνες στα μικρά μηρυκαστικά είναι η ιβερμεκτίνη από τις αβερμεκτίνες και η μοξιδεκτίνη από τις μιλβεμυκίνες (Rang et al., 1999).

Δ) Παράγωγα άμινο-ακετονιτριλίου (AAD's) Αποτελούν τη νέα ομάδα ανθελμινθικών φαρμάκων (Kaminsky et al., 2008a) που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των ενδοπαρασίτων στα μηρυκαστικά.

Κυριότερος εκπρόσωπος της ομάδας αυτής είναι η μονεπαντέλη (monepantel) (Kaminsky et al.2008b) που χρησιμοποιείται στα πρόβατα για αντιπαρασιτική θεραπεία από το στόμα (Zolnix[®], Novartis Animal Health Inc). Η αποτελεσματικότητα της μονεπαντέλης ενάντια σε δ' σταδίου και ενήλικα γαστρεντερικά νηματώδη του προβάτου έχει αποδειχθεί και έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές (Hosking et al., 2008, 2009, Kaminsky et al., 2009, Sager et al., 2009).

1.6 Albendazole

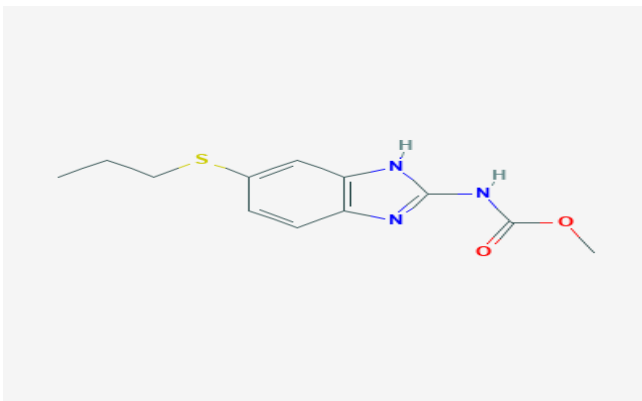
1.6.1 Βιολογική δράση

Το κτηνιατρικό ανθελμινθικό φάρμακο Albendazole (ABZ) είναι ένα συνθετικό ανθελμινθικό παράγωγο, με ευρύ φάσμα, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των βενζιμιδαζολών. Το ABZ μεταβολίζεται περαιτέρω σε Albendazole Sulphoxide (ABZSO) (Εικόνα 3) και σε έναν λιγότερο ενεργό μεταβολίτη το Albendazole Sulphone (ABZSO₂) (Εικόνα 3). Η χορήγηση του γίνεται από του στόματος μέσω ενός δισκίου επικαλυμμένου με υμένιο. Η χρήση του γίνεται κυρίως εναντίον των νηματωδών σκωλήκων που προσβάλλουν το γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων παραγωγής. Τα ζώα χορήγησης του φαρμάκου είναι κυρίως βοοειδή και αιγοπρόβατα και δευτερεύοντως σε σκύλους, γάτες και πτηνά για παρασιτικά μαστίγια και ταινίες, ενώ μικρότερη χρησιμοποίηση έχει βρει σε υδατοκαλλιέργειες ψαριών. Η χορήγηση του γίνεται είτε σε μορφή χαπιού μέσω του στόματος, είτε σε υγρή μορφή. Στοχεύει σε ένα ευρύ φάσμα νηματωδών, ενώ η δόση χορήγησης είναι σχετικά μικρή αλλά αποτελεσματική (Gyurik, Chow and Zaber, 1981).

Η δράση του ABZ έγκειται στο ότι παρεμβαίνει στην αναπαραγωγή και επιβίωση των ελμίνθων μέσω παρεμπόδισης του σχηματισμού μικροσωληνίσκων από την τουμπουλίνη. Αυτό το γεγονός, έχει ως αποτέλεσμα την εξασθενημένη πρόσληψη γλυκόζης, την επακόλουθη εξάντληση των αποθεμάτων γλυκογόνου με τελικό αποτέλεσμα το να οδηγούνται τα νηματώδη σε θάνατο (Mutavdžić Pavić et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα το ABZ συνδέεται στη β-τουμπουλίνη με συνέπεια να αναστέλλεται ο πολυμερισμός ή η συναρμολόγησή της στους μικροσωληνίσκους. Η ικανότητα δέσμευσής του φαρμάκου στη β-τουμπουλίνη των παρασίτων είναι πιο μεγάλη σε σύγκριση με την ικανότητα δέσμευσης της στη β-τουμπουλίνη των θηλαστικών και γι αυτό υπάρχει περιορισμένη τοξικότητα στα ζώα. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να αναστείλλει μεταβολικά ένζυμα (μηλεϊνική αφυδρογονάση

και φουμαρική ρεδουκτάση) διαταράσσοντας κατ'αυτό τον τρόπο τον κύκλο του Krebs, με άμεση συνέπεια στην παραγωγή ATP. Το φάρμακο μπορεί να καταλήξει στο έδαφος μέσω απεκρίσεων των ζώων ή στο νερό μέσω κακού χειρισμού των αποβλήτων (Mutavdžić Pavlović *et al.*, 2018).

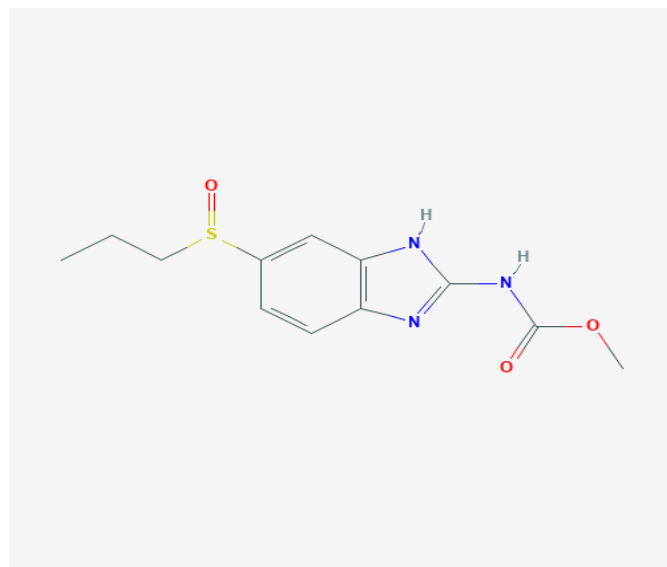
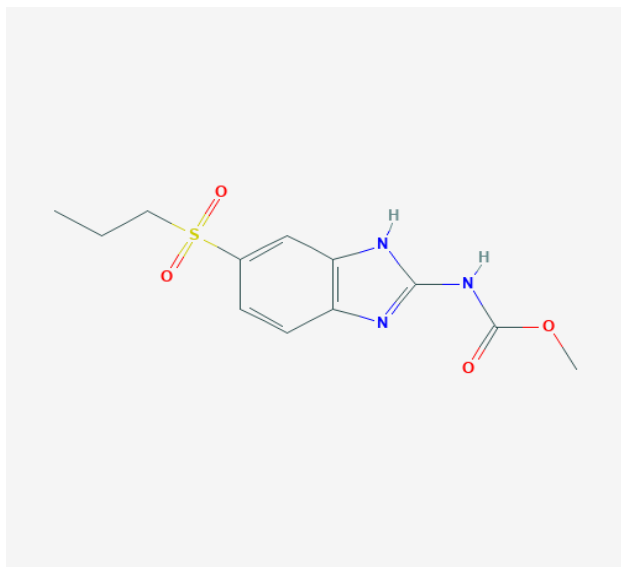
Το Albendazole ανακαλύφθηκε το 1975 από τους Robert J. Gyurik και Vassilios J. Theodorides και ανατέθηκε στη SmithKline Corporation, ενώ καταχωρήθηκε για ανθρώπινη χρήση το 1982.



Εικόνα 2: Ο χημικός τύπος του κτηνιατρικού φαρμάκου Albendazole

1.6.2 Περιβαλλοντική Τύχη

Το μεταβολικά προϊόντα των Albendazole είναι το Albendazole Sulfoxide και το Sulfone. Το φάρμακο μπορεί να χορηγηθεί με δύο μορφές είτε από το στόμα είτε με ενέσιμη μορφή, στην Ελλάδα ο προτιμότερος τρόπος είναι η χορήγηση από το στόμα. Η απορρόφηση και η αποδόμηση του Albendazole στα εδάφη εξαρτάται από την οργανική ουσία, το pH και τα ιχνοστοιχεία του εδάφους. Τα υπολείμματα του φαρμάκου έχουν βρεθεί σε υπόγεια νερά και σε εδάφη που έχει χορηγηθεί το φάρμακο. Έχει παρατηρηθεί ότι το Albendazole εμφανίζει ισχυρή προσρόφηση στο έδαφος, η οποία μπορεί να μειωθεί σε αυξημένες τιμές pH (Pavlovic *et al* 2018). Συγκριτικά με τις υπόλοιπες βενζιμιδαζόλες ως υδροφοβο μόριο, έχει από τις μεγαλύτερες τιμές προσρόφησης, επιβεβαιώνοντας τη θετική συσχέτιση προσρόφησης μιας ουσίας και υδροφοβικότητας (Kim *et al* 2010). Σε προηγούμενα πειράματα έχουν αναφερθεί χρόνοι ημιζωής Albendazole μικρότεροι από 6,5 ημέρες (Min&Hu, 2013). Επίσης, έχει αναφερθεί η φωτοχημική του διάσπαση, με την μητρική ένωση να είναι πιο ευαίσθητη στην UV-V ακτινοβολία, ενώ τα Albendazole Sulfoxide και Albendazole Sulfone στην UV-A (Ljubas *et al* 2018).



Εικόνα 3: Οι χημικές δομές των Albendazole sulfoxide και Albendazole sulfone, αριστερά και δεξιά, αντίστοιχα

1.7 Σκοπός του πειράματος

Η έντονη και παρατεταμένη έκθεση ενός εδάφους σε περιβαλλοντικούς ρύπους όπως είναι τα κτηνιατρικά φάρμακα είναι πιθανόν να οδηγήσει είτε σε προσαρμογή των μικροοργανισμών του εδάφους και αυξημένη βιολογική αποδόμηση του ρύπου είτε σε φαινόμενα οικοτοξικότητας λόγω συσσώρευσης του ρύπου στο έδαφος. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής διατριβής ήταν να μελετηθεί η πιθανότητα εμφάνισης επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης του Albendazole σε επιλεγμένα εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες της Λέσβου, έπειτα από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές του ανθελμινθικού κτηνιατρικού φαρμάκου σε δύο επίπεδα τελικής συγκέντρωσης στα εδάφη, x1 και x10 των εκτιμώμενων περιβαλλοντικών επιπέδων σε ρυπασμένα εδάφη

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Δείγματα εδαφών

Τα εδάφη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή διατριβή προέρχονται από κτηνοτροφικές μονάδες της νήσου Λέσβου. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν δύο εδάφη, το έδαφος 1Α και το έδαφος 7Β, με βάση τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης αποδόμησης του Albendazole σε συνολικά 12 εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες της Λέσβου (Πίνακας 1). Η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος (1^η ετήσια έκθεση προόδου υπ. Διδάκτορα Ευστάθιο Λαγού, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες των αναφερόμενων εδαφών. Τα εδάφη που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκαν με βάση το μοτίβο αποδόμησης του ABZ και των μεταβολικών του προϊόντων.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα μελέτης αποδόμησης του Albendazole σε εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες της Λέσβου.

Έδαφος	Συντεταγμένες	Δείγμα Εδάφους	Σημείο Συλλογής	Ιστορικό Χρήσης
1	39°16'21.4"N 26°15'55.7"E	1Α	Εντός Κτηνοτροφικής Μονάδας	Eprinomectin/Albendazole
2	39°10'35.5"N 26°08'11.8"E	7Β	Λειμώνας (κοινοτικός)	Fenbendazole

Πίνακας 2. Φυσικοχημικές ιδιότητες των εδαφών από τις κτηνοτροφικές μονάδες της νήσου Λέσβου

Δείγμα εδάφους	Συνολικό Άζωτο (%)	Συνολικός Οργανικός Άνθρ (%)	pH	Ηλεκτρική Αγωγιμότητα (mmhos cm ⁻¹)
1Α	0.28	6.0	7.84	2.0
7Β	0.31	8.5	5.85	3.8

Συγκεκριμένα επιλέχθηκε το έδαφος 1Α που παρουσίαζε ταχύτερο ρυθμό αποικοδόμησης, με βάση τις τιμές DT₅₀ και DT₉₀, και το έδαφος 7Β που παρουσίαζε αργό ρυθμό αποικοδόμησης, με βάση τις ίδιες τιμές.



Εικόνα 4 : Έδαφος 1A



Εικόνα 5 : Έδαφος 7B

2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εδαφών.

Τα εδάφη αφού μεταφέρθηκαν άμεσα στο εργαστήριο κοσκινίστηκαν και στην συνέχεια υποδείγματα των 50-200 g χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της υγρασίας και υδατοχωρητικότητας τους αλλά και των κυριότερων φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών όπως pH, περιεκτικότητα σε οργανικό C και μηχανική σύσταση.

2.2.1 Προσδιορισμός της υγρασίας των εδαφών

Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας, $5 \pm 0.01\text{g}$ εδάφους μεταφέρθηκαν σε προ-ζυγισμένο δοχείο από αλουμίνιο και το συνολικό βάρος καταγράφηκε. Για κάθε δείγμα εδάφους χρησιμοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Αμέσως μετά, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε προθερμασμένο φούρνο (LabLine) στους 105°C , όπου και παρέμειναν για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα δείγματα επαναζυγίστηκαν και προσδιορίστηκε η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{MC} = [(W_1 - W_2) * 100\%] / (W_2 - W_{\text{cont}})$$

MC: η περιεχόμενη υγρασία του εδάφους

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

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

Wcont: το βάρος του δοχείου.

2.2.2 Προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας των εδαφών

Ο προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας έγινε βαρομετρικά. Συγκεκριμένα, 20g εδάφους ζυγίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε χωνί εντός του οποίου είχε προηγουμένως τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί (Whatman No1). Στη συνέχεια το έδαφος διαβρέχτηκε επανειλημμένα με αποσταγμένο νερό προκειμένου να διασφαλιστεί ο κορεσμός του. Η ελεύθερη επιφάνεια του χωνιού καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή απώλειας νερού λόγω εξάτμισης. Το έδαφος αφέθηκε σε ηρεμία 12-14 ώρες ώστε να στραγγίσει η περίσσεια του νερού. Το βάρος του χωνιού, με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος καταγράφηκε πριν (W_1) και μετά (W_2) την κατάκλιση. Για κάθε δείγμα εδάφους χρησιμοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις. Ακολούθως, η υδατοχωρητικότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

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

WHC: η υδατοχωρητικότητα του εδάφους

B: το βάρος του εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

X: το ξηρό βάρος εδάφους που προστέθηκε στο χωνί

W₁: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, πριν την κατάκλιση

W₂: το βάρος του χωνιού με το διηθητικό χαρτί και το έδαφος, μετά την κατάκλιση

2.3 Διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια και κτηνιατρικά φάρμακα

Πρότυπη ουσία Albendazole καθαρότητας 98% (Santa Cruz Biotechnology©) χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή διαλυμάτων του φαρμάκου σε μεθανόλη (HPLC Grade, Sigma Aldrich©) συγκέντρωσης 700 και 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Τα συγκεκριμένα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή του ABZ στο έδαφος με στόχο τελική συγκέντρωση 20 και 2 $\mu\text{g}/\text{g}$ αντιστοίχα. Η πρότυπη ουσία albndazole όπως και οι πρότυπες ουσίες Albendazole Sulfoxide (καθαρότητας 98%, της εταιρίας Tokyo Chemica Industry©) και Albendazole Sulfone (καθαρότητας 97%, Santa Cruz Biotechnology©) χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης προκειμένου να κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη .. Για τις εκχυλίσεις και την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ACN και νερό HPLC Grade (sigma Aldrich) . Ακετονιτρίλιο χρησιμοποιήθηκε επίσης και για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων που περιέχουν το μίγμα Albendazole, Albendazole Sulfone και Albendazole Sulfoxide .

2.4 Περιγραφή του πειράματος αποδόμησης του Albendazole στα εδάφη

Αφού, όπως περιεγράφηκε στις παραγράφους 2.2.1 και 2.2.2, υπολογίσθηκε η υγρασία και η υδατοχωρητικότητα (WHC) των εδαφών και προσέθηκε ποσότητα dH_2O έτσι ώστε να ρυθμισθεί η υγρασία στο 40% της WHC στη συνέχεια το Albendazole εφαρμόσθηκε στα εδάφη σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης

1. x_1 = που αντιστοιχεί σε επίπεδα συγκέντρωσης που αναμένουμε σε γεωργικά εδάφη
2. x_{10} = που αντιστοιχεί σε συγκεντρώσεις 10 φορές άνω της περιβαλλοντικής και εμφανίζεται σε περιπτώσεις εκτεταμένης ρύπανσης



Εικόνα 6 : Εφαρμογή Albendazole στο έδαφος και προσαρμογή τις υγρασίες των εδαφών στο 40 % υδατοχωρητικότητας.

Θα υπάρχουν 3 επαναλαμβανόμενες εφαρμογές ανθελμινθικού σε δείγματα εδάφους ανά διαστήματα 40 ημερών. Μετά από κάθε εφαρμογή πραγματοποιήθηκε συλλογή δειγμάτων σε χρόνους: 0, 3, 6, 20, 40 Σε κάθε χρονικό σημείο θα υπάρχουν 3 επαναλήψεις. Έτσι, η συνολική ποσότητα του εδάφους θα χωριστεί σε 15 υποδείγματα (που ονομάζονται *microcosms*) που περιέχονται σε πλαστικές σακούλες. Έτσι, για 2 επίπεδα συγκέντρωσης και 3 επαναλαμβανόμενες εφαρμογές: 15 υποδείγματα για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης και στη συνέχεια αυτά για κάθε εφαρμογή άρα 90 μικρόκοσμοι για 1 έδαφος, έτσι 180 μικρόκοσμοι για 2 εδάφη για να γίνει ανάλυση διάχυσης (ανάλυση καταλοίπων στο σύστημα HPLC-UV) ενώ ανα επτά ημέρες πραγματοποιούνται προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού έτσι ώστε να διατηρείται η υγρασία στα επιθυμητά επίπεδα.

2.5 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων του Albendazole και των οξειδωμένων παραγώγων του στο έδαφος

Εκχύλιση Albendazole από το έδαφος

Για την εκχύλιση του Albendazole ζυγίζονταν 5 g εδάφους σε κωνικές φιάλες των 100ml και προστέθηκαν 10 ml ακετονιτρίλιο. Οι κωνικές φιάλες καλύπτονταν με αλουμινένια διαφάνεια και τοποθετούνταν στον οριζόντιο αναδευτήρα για μια ώρα σε ανάδευση στις 200 rpm. Ακολουθούσε η συλλογή του υπερκείμενου σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης και στο εναπομείναν υλικό των κωνικών προστέθηκαν άλλα 10ml ακετονιτρίλιου, όπου και επαναλαμβάνονταν ανάδευση επί μία ώρα. Το δεύτερο υπερκείμενο συλλεγόταν στο ίδιο Teflon. Τέλος, πραγματοποιούνταν φυγοκέντρηση στα 7500 rpm σε θερμοκρασία 20°C για 5 λεπτά . Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο αφαιρούνταν, όπου διηθούνταν με τη βοήθεια σύριγγας μέσω φίλτρου με πόρους 0,45μm. Το διήθημα ήταν έτοιμο για την ανάλυση σε σύστημα HPLC- DAD όπως περιγράφεται παρακάτω. Προς επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας (ακρίβεια και επαναληψιμότητα) της μεθόδου εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης για το Albendazole και τους μεταβολίτες του, σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις των 0,05 mg/Kg, 0,5 mg/Kg και 1mg/Kg, σε δείγμα έδαφος. Για κάθε εφαρμογή ζυγίζονταν κάθε φορά 50 g εδάφους. Οι μέθοδοι κρίθηκαν ικανοί για το παρόν πείραμα, αφού όλες οι ουσίες ανακτήθηκαν από το 80% της ποσότητας που εφαρμόσαμε.

2.6 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

2.6.1 Αρχή και οργανολογία της μεθόδου

Η χρωματογραφία υψηλής πίεσης ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, άρα ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται στη κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Στην HPLC μπορούν να συμπεριληφθούν και να εφαρμοστούν όλα τα είδη που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, με την κατάλληλη χρήση υλικού πληρώσεως της στήλης και του διαλύτη έκλουσης.

Οργανολογία Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης

Ένα σύστημα HPLC περιλαμβάνει:

- Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών
- Αντλία (σταθερής ροής ,σταθερής πίεσης)
- Μονάδα εισαγωγής δείγματος (βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, αυτόματος δειγματολήπτης)
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτή (ορατού-υπεριώδους, Φθορισμομετρικοί , Σκεδασμού φωτός κλπ)
- Καταγραφικό

Στην αναλυτική στήλη γίνεται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, ενώ η προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου της στήλης γίνεται με την αντλία. Η διεργασία του χρωματογραφικού διαχωρισμού αρχίζει με την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη.

2.6.2 Μέθοδος ανάλυσης HPLC στο σύστημα UFLC SHIMADZU

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

Πίνακας 3: Συνθήκες ανάλυσης των υπό μελέτη κτηνιατρικών φαρμάκων σε σύστημα HPLC

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

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων του Albendazole και των οξειδωμένων μεταβολικών παραγώγων του (Albendazole Sulfone και Albendazole Sulfoxide) στα δείγματα εδάφους ήταν απαραίτητη η κατασκευή και η χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για το λόγο αυτό, παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας τις πρότυπες ουσίες Albendazole (98% καθαρότητα), Albendazole Sulfone (98% καθαρότητα) και Albendazole Sulfoxide (97% καθαρότητα) διάλυμα συγκέντρωσης 1000 μg ml⁻¹, για τις τρεις ουσίες, σε ACN. Ακολουθώντας, από τα αρχικά πρότυπο διάλυμα με κατάλληλες αραιώσεις προετοιμάστηκε σειρά διαλυμάτων συγκεντρώσεων από 0.01 ως 10 μg ml⁻¹ σε ακετονιτρίλιο .

Το εμβαδόν της κορυφής που προέκυψε από την έγχυση καθενός από τα πρότυπα διαλύματα συσχετίστηκε με την συγκέντρωση του Albendazole και των οξειδωμένων μεταβολικών παραγώγων του ώστε να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

2.7 Επεξεργασία αποτελεσμάτων και υπολογισμός DT50

Για τον υπολογισμό του χρόνου ημιζωής (DT50) του Albendazole χρησιμοποιήθηκαν τα μοντέλα κινητικής που έχουν προταθεί από το FOCUS working group (FOCUS 2006). Συγκεκριμένα για τον υπολογισμό των DT50 χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικά μοντέλα κινητικής: το μοντέλο κινητικής πρώτης τάξης (Single first order, SFO) και δύο μη γραμμικά μοντέλα κινητικής (Hockey Stick, και Bi-exponential) (Πίνακας 10). Το στατιστικό πρόγραμμα R χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των παραμέτρων των εξισώσεων των μοντέλων κινητικής και το σχεδιασμό των διαγραμμάτων. Γενικότερα, τα διφασικά μοντέλα κινητικής χρησιμοποιήθηκαν μόνο στις περιπτώσεις στις οποίες το μοντέλο SFO δεν περιέγραφε με ικανοποιητική ακρίβεια ($\chi^2 > 15\%$) την κινητική αποδόμησης του φαρμάκου.

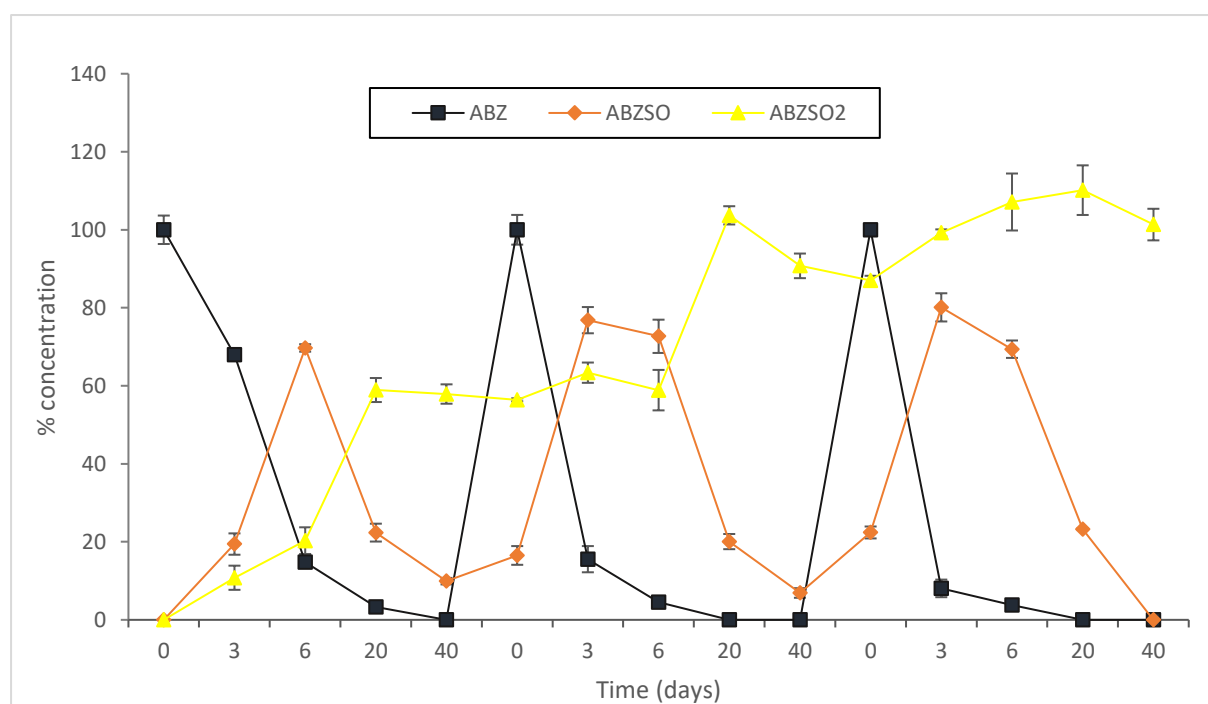
Πίνακας 4: Οι μαθηματικές εξισώσεις των μοντέλων κινητικής για τη διάσπαση των κτινιατρικών φαρμάκων και οι εξισώσεις υπολογισμού του χρόνου ημιζωής τους.

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

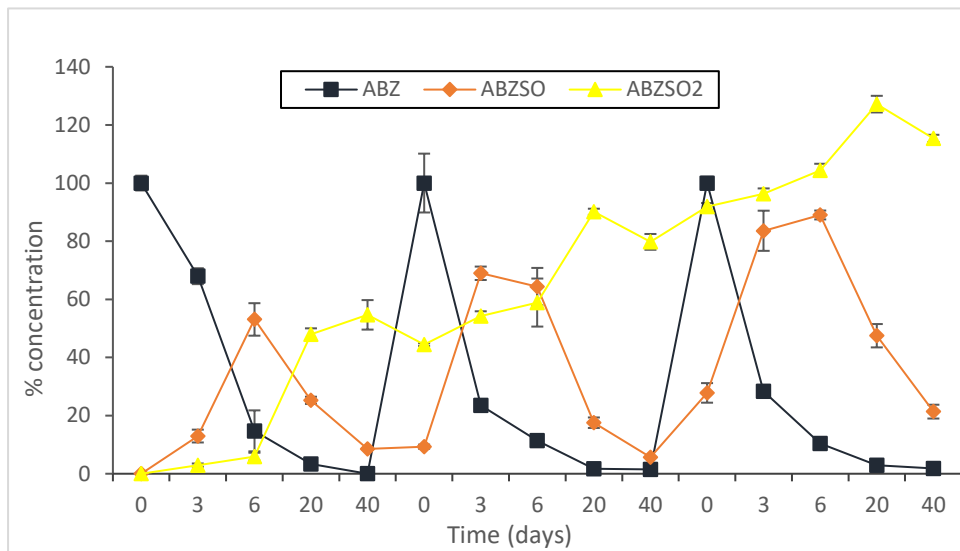
3.1 Αποτελέσματα

3.1.1 Αποδόμηση ABZ στο έδαφος 1A

Στα διαγράμματα 3.1.1 και 3.1.2 παρουσιάζεται η αποδόμηση Albendazole καθώς των οξειδωμένων μεταβολιτών του Albendazole sulfone και Albendazole sulfoxide στο έδαφος 1A στα δύο επίπεδα συγκέντρωσης (x1 και x10) που εφαρμόστηκε.



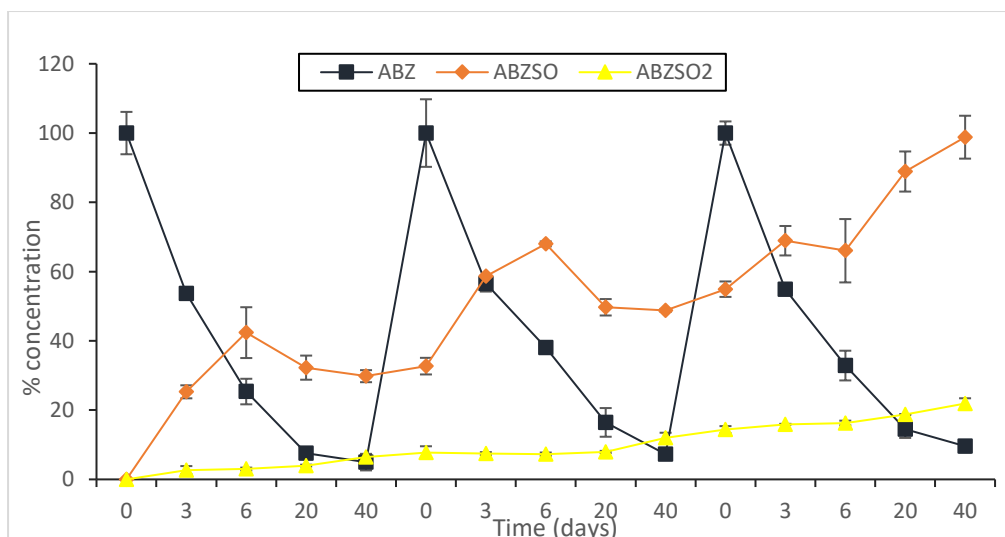
Διάγραμμα 3.1.1 . Αποδόμηση του Albendazole (ABZ) και των μεταβολιτών του Albendazole Sulfoxide (ABZSO) και Albendazole Sulfone (ABZSO2) στο έδαφος 1A όπου πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του ABZ με στόχο τελική συγκέντρωση στο έδαφος 2 $\mu\text{g/g}$ (x1). Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων συν την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.1.2 . Αποδόμηση του Albendazole (ABZ) και των μεταβολιτών του Albendazole Sulfoxide (ABZSO) και Albendazole Sulfone (ABZSO₂) στο έδαφος 1A όπου πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του ABZ με στόχο τελική συγκέντρωση στο έδαφος 20 μg/g (x10). Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων συν την τυπική απόκλιση.

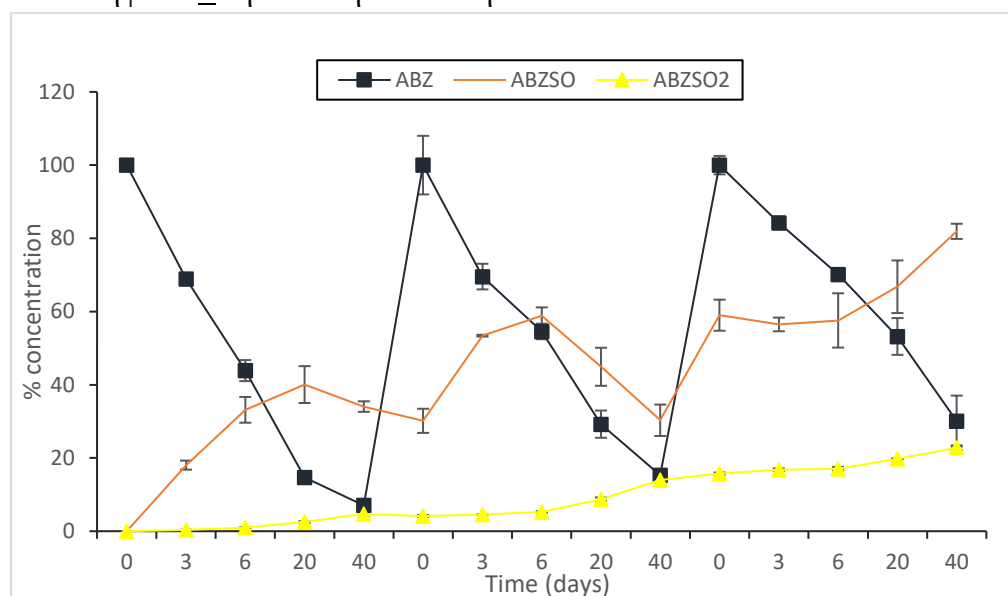
3.2 Αποδόμηση ABZ στο έδαφος 7B

Στα διαγράμματα 3.1.3 και 3.1.4 παρουσιάζεται η αποδόμηση ABZ καθώς των οξειδωμένων μεταβολιτών του ABZSO και ABZSO₂ στο έδαφος 7B στα δύο επίπεδα συγκέντρωσης (x1 και x10) που εφαρμόστηκε.



Διάγραμμα 3.1.3 . Αποδόμηση του Albendazole (ABZ) και των μεταβολιτών του Albendazole Sulfoxide (ABZSO) και Albendazole Sulfone (ABZSO₂) στο έδαφος 7B όπου πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του ABZ με στόχο τελική συγκέντρωση στο

έδαφος 2 $\mu\text{g/g}$ ($\times 1$). Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 3.1.4 . Αποδόμηση του Albendazole (ABZ) και των μεταβολιτών του Albendazole Sulfoxide (ABZSO) και Albendazole Sulfone (ABZSO₂) στο έδαφος 7B όπου πραγματοποιήθηκε εφαρμογή του ABZ με στόχο τελική συγκέντρωση στο έδαφος 20 $\mu\text{g/g}$ ($\times 10$). Κάθε σημείο για κάθε ουσία είναι ο μέσος όρος τριών επαναλήψεων \pm την τυπική απόκλιση..

3.2 Κινητικές παράμετροι αποδόμησης του albendazole στα εδάφη

Πίνακας 5 Στον πίνακα παρουσιάζονται οι κινητικοί παράμετροι και οι τιμές DT₅₀, DT₉₀ του Albendazole σε συγκεντρώσεις X1, X10 και στα δύο εδάφη 1A και 7B.

1η Εφαρμογή							
Έδαφος	Κινητικό Μοντέλο	Kdeg(ημέρες ⁻¹)	α (k1)	β (k2)	DT50(ημέρες)	DT90(ημέρες)	X2 (%)
1A x1 δόση	SFO	2,16E-01			3.2	10.6	9.01
1A x10 δόση	SFO	1,50E-01			4.6	15.3	9.59
7B x1 δόση	FOMC		2,19E+00	8,09E+00	3.1	15.1	6.8
7B x10 δόση	FOMC		2,09E+00	1,34E+00	5.27	26.96	3.66
2η Εφαρμογή							
1A x1 δόση	SFO	6,07E-01			1.14	3.79	2.97
1A x10 δόση	SFO	4,49E-01			1.54	5.13	7.33
7B x1 δόση	FOMC		1,07E+00	4,21E+00	3.83	31.93	1.48
7B x10 δόση	FOMC		8,84E-01	6,12E+00	7.28	52.81	1.68
3η Εφαρμογή							
1A x1 δόση	SFO	8,18E-01			0.84	2.81	4.19
1A x10 δόση	SFO	4,08E-01			1.7	5.6	4.98
7B x1 δόση	DFOP		2,71E-01	1,76E-02	3.45	38.2	1.10
7B x10 δόση	DFOP		3,59E-01	2,38E-02	20.46	88.01	3.35

Πίνακας 6 Στον πίνακα παρουσιάζονται οι κινητικοί παράμετροι και οι τιμές DT₅₀, DT₉₀ των οξειδωμένων μεταβολιτών του Albendazole σε συγκεντρώσεις X1, X10 και στα δύο εδάφη 1A και 7B.

1η Εφαρμογή							
Έδαφος	Κινητικό Μοντέλο	Kdeg(ημέρες-1)	α (k1)	β (k2)	DT50(ημέρες)	DT90(ημέρες)	X2 (%)
1A x1 δόση	SFO	1,02E-02			68.31	226.9	3.35
1A x10 δόση	SFO	1,14E-02			60.79	201.9	2.57
7B x1 δόση	SFO	2,72E-02			25.49	84.67	9.5
7B x10 δόση	SFO	2,09E-02			33.11	110	5.05
2η Εφαρμογή							
1A x1 δόση	SFO	1,27E-02			54.53	181.1	1.54
1A x10 δόση	SFO	1,47E-02			47.08	156.4	1.89
7B x1 δόση	SFO	2,10E-02			32.95	109.5	6.67
7B x10 δόση	SFO	2,16E-02			32.06	106.5	1.88
3η Εφαρμογή							
1A x1 δόση	SFO	1,88E-02			36.89	122.6	2.61
1A x10 δόση	SFO	1,11E-02			52.46	167.5	0.85
7B x1 δόση		4,25E-03			162.9	>365	10.09
7B x10 δόση		5,49E-03			126.3	>365	4.51

Με βάση την εικόνα στα διαγράμματα 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4 και τις τιμές DT₅₀ και DT₉₀ παρατηρούμε ότι στο έδαφος 1A η αποδόμηση του Albendazole κατά τις συνεχόμενες εφαρμογές φαίνεται να επιταχύνεται, και στα δύο επιπέδα συγκεντώσεων του φαρμάκου στο έδαφος με τον χρόνο ημιζωής του φαρμάκου να μεταβάλλεται από τις 3,2 στις 0,84 ημέρες στο πέρας της τρίτης εφαρμογής στην περίπτωση της χαμηλότερης δόσης (x1) και από 4,7 στις 1,7 ημέρες στην περίπτωση της μεγαλύτερης δόσης (x10). Στην περίπτωση του εδάφους 7B από την άλλη δεν παρατηρείται κάποια επιτάχυνση στην αποδόμηση. Μάλιστα στην περίπτωση όπου είχαμε εφαρμογή του Albendazole στο έδαφος με στόχο τελική συγκέντρωση 20 µg/g (x10) φαίνεται να υπάρχει επιβράδυνση στην αποδόμηση με τις τιμές DT₅₀ να κυμαίνονται από 5,27 ημέρες κατά την πρώτη εφαρμογή έως τις 20,46 ημέρες μετά το πέρας της τρίτης εφαρμογής. Αντίστοιχη εικόνα παρατηρείται και στις τιμές DT₅₀ στην περίπτωση των συνολικών δραστικών υπολειμάτων του

Albendazole καθώς παρατηρείται μία σταδιακή μείωση του χρόνου ημιζωής δηλαδή τα δύο επιπεδα συγκεντρώσεων στο έδαφος, x1 x10 είναι 68.31 και 60.79 ημέρες αντίστοιχα αλλά η τιμή είναι αρκετά μειωμένη κατά την 3^η εφαρμογή, με 36.89 και 52.46 ημέρες αντίστοιχα. Αυτή η μείωση είναι πιο ξεκάθαρη στα δείγματα εδάφους όπου είχαμε εφαρμογή του Albendazole με στόχο τελική συγκέντρωση x1 (2 μg/g εδάφους). Ωστόσο, στο έδαφος 7B παρατηρούμε ότι η αποδόμηση του φαρμάκου εφαρμογή με την εφαρμογή επιβραδύνεται. Καθως κατά την πρώτη εφαρμογή ο χρόνος ημιζωής του Albendazole για τα δύο επιπεδα συγκεντρώσεων στο έδαφος, x1 και x10, είναι 25,49 και 33,11 ημέρες αντίστοιχα αλλά είναι σχεδόν πενταπλάσιος κατά την 3^η εφαρμογή, με 162,9 και 126,3 ημέρες αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, τα δύο εδάφη παρουσιάζουν διαφορετικά μοτίβα αποδόμησης του φαρμάκου. Δηλαδή, στο έδαφος 1^A παρατηρείται κατά κύριο λόγο οξείδωση του του Albendazole σε Albendazole Sulfoxide και αυτό με τη σειρά οξειδώνεται περαιτέρω σε Albendazole Sulfone το οποίο συσσωρεύεται στο έδαφος, ενώ στο έδαφος 7B παρατηρείται συσσώρευση του Albendazole Sulfoxide το οποίο εμφανίζει περιορισμένη περαιτέρω οξείδωση σε Albendazole Sulfone .

4 Συζήτηση

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής διατριβής ήταν να μελετηθεί η πιθανότητα εμφάνισης επιταχυνόμενης βιοαποδόμησης του Albendazole σε επιλεγμένα εδάφη από κτηνοτροφικές μονάδες της Λέσβου, έπειτα από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές του ανθελμινθικού κτηνιατρικού φαρμάκου σε δύο επίπεδα τελικής συγκέντρωσης στα εδάφη, x1 και x10 των εκτιμώμενων περιβαλλοντικών επιπέδων σε ρυπασμένα εδάφη. Τα εδάφη που μελετήθηκαν με βάση τα αποτελέσματα παρουσιάζουν όπως προαναφέρθηκε στα αποτελέσματα διαφορετικά μοτίβα αποδόμησης του Albendazole. Στο έδαφος 1A φαίνεται να συμβαίνει επιταχυνόμενη βιοαποδόμηση και κατά κύριο λόγο εμφάνιση του Albendazole Sulfoxide το οποίο γρήγορα οξειδώνεται περαιτέρω σε albendazole Sulfone ενώ στο έδαφος 7B παρατηρήθηκε επιβράδυνση της αποδόμησης με ταυτόχρονη συσσώρευση του Albendazole Sulfoxide. Αυτά τα διαφορετικά μοτίβα πιθανόν να

οφείλονται σε διαφορές στο pH μεταξύ των δύο εδαφών το έδαφος 1A είναι ένα αλκαλικό έδαφος με pH 7,84 ενώ το έδαφος 7B είναι περισσότερο όξινο με pH 5,84, Πίνακας 2. Σχετικά με την σύσταση του εδάφους και το pH, λόγω της υδροφοβικότητάς του το Albendazole και τα μεταβολικά προϊόντα του εμφανίζουν υψηλές τιμές προσρόφησης σε σχέση με τις υπόλοιπες βενδιμιδαζόλες, επιβεβαιώνοντας τη θετική συσχέτιση προσρόφησης και υδροφοβικότητας (Kim et al, 2010). Αυτή η ισχυρή προσρόφηση μπορεί να μειωθεί σε αυξημένες τιμές pH (Babic et al., 2018).. Γενικά, οι παράγοντες που καθορίζουν την προσρόφηση του Albendazole στο έδαφος είναι το pH του εδάφους, τα ιχνοστοιχεία του εδάφους όπως χαλκός, ψευδάργυρος, σίδηρος και η περιεκτικότητά του εδάφους σε οργανική ουσία. Επιπλέον το pH του εδάφους μπορεί να επιρεάσει τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας. Σχετικά με τις μικροβιακές κοινότητες των εδαφών που μελετήθηκαν, στην περίπτωση του 1A φαίνεται να υπάρχει μια προσαρμογή της μικροβιακής κοινότητας και ενδείξεις επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης του Albendazole ενώ στο 7B πιθανόν οι δεν φαίνεται να παρατηρείται μια τέτοια προσαρμογή. Η συσσώρευση επιπλέον του Albendazole Sulfoxide, το οποίο αποτελεί δραστικό μεταβολίτη με επίσης ανθελμινθική δράση, και τα χαμηλά επίπεδα του Albendazole sulfoxide, σε αντίθεση με την εικόνα που παρατηρείται στο έδαφος 1A πιθανά να σχετίζεται με τη διαφορετική απόκριση της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους και του ρόλου της στην αποδόμηση και περαιτέρω μεταβολισμό του Albendazole.. Ωστόσο πρέπει να γίνουν περεταίρω μελέτες των μικροβιακών κοινοτήτων σε αυτά τα εδάφη προκειμένου να δοθεί μια καλύτερη εικόνα στα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης. Συγκεκριμένα σε μοριακό επίπεδο θα πρέπει να μελετηθούν μεταβολές στην τη σύσταση των μικροβιακών κοινοτήτων μέσω τεχνικών αλληλουχισής DNA νέας γενιάς καθώς και τεχνικές αλυσιδωτης αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR) για την μελέτη της μεταβολής στην αφθονία και στη δραστηριότητα α)συγκεκριμένων λειτουργικών μικροβιακών ομάδων, όπως τα νιτροδωποποιητικά βακτήρια και αρχαία, όπου αποτελούν δείκτες οικοτοξικότητας μιας ουσίας στους μικροοργανισμούς ενός εδάφους καθώς και β)του συνολικού πληθυσμού βακτηρίων και μυκήτων σε αυτά τα εδάφη.

Βιβλιογραφία

- Ahmad, R., Nelson, P.N., Kookana, R.S., 2006. The molecular composition of soil organic matter as determined by ¹³C NMR and elemental analyses and correlation with pesticide sorption. *Eur. J. Soil Sci.* 57,883–893.
- Alvarez, L., Entrocasso, C., Lifschitz, A., Manazza, J., Ceballos, L., Borda, B., Lanusse, C., 2010. Albendazole failure to control resistant nematodes in lambs: lack of effect of fasting-induced improvement on drug absorption. *Journal of Parasitology*, 96, 1204-1210.
- 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 /s1 1356-018-2935-9
- Beech, R.N, Levitt, N., Cambos, M., Zhou, S., Forrester, S.G., 2010a. Association of ion-channel genotype and macrocyclic lactone sensitivity traits in *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 17,174-180.
- Beech, R.N, Wolstenholme, A.J., Neveu, C., Dent, J.A., 2010b. Nematode parasite genes: what's in a name? *Trends in Parasitology*, 26, 334-340.
- Bogan, J.A., Marriner, S.E., Galbraith, E.A., 1982. Pharmacokinetics of levamisole in sheep. *Research in Veterinary Science*, 32, 124-126.
- Bokisch, A.J., Waker, R.J., 1986. The action of Avermectin(MK 936) on identified central neurones from *Helix* and its interaction with acetylcholine and gamma-aminobutyric acid(GABA) responses. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C :Pharmacology*, 84,119-125.
- Bottoni, P., Caroli, S., Caracciolo, A.B., 2010 Pharmaceuticals as priority water contaminants. *Toxicol. Environ. Chem.* , 92(3) 549-565. im, K-R., Owens, G.; Kwon, S-I., So, K-H.; Lee, D-B., Ok, Y.S.,

2011 Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water Air Soil Poll.*, 214, 163- 174

- Brander, G.C., Pugh, D.M., Bywater, R.J., Jenkins, W.L., 1991. *Veterinary applied pharmacology and therapeutics*, Bailliere Tindall, 5th edition.
- Brownlee, D.J.A., Holden-Dye, L., Walker, R.J., 1997. Actions of the anthelmintic ivermectin on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*. *Parasitology*, 115, 553-561.
- Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R. , 2003, Strategic survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 1241-1248
- Coquet, Y., 2003. Sorption of pesticide atrazine, isoproturon, and metamitron in the Vadose Zone. *Vadose Zone J.* 2, 40–51
- Cully, D.F., Vassilatis, D.K., Liu, K.K., Paress, P.S., Van der Ploeg, L.H., Schaeffer, J.M., Arena, J.P., 1994. Cloning of an avermectin sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 371, 707-711.
- Davor Ljubas, Mirta Čizmić, Katarina Vrbat, Draženka Stipaničev, Siniša Repec, Lidija Ćurković, and Sandra Babić ,2018, Albendazole Degradation Possibilities by UV-Based Advanced Oxidation Processes, *International Journal of Photoenergy*, Volume 2018, Article ID 6181747, 6 pages
- De Jonge, R.J., Breure, A.M., van Andel, JG, 1996. Reversibility of adsorption of aromatic compounds onto powdered activated carbon (PAC). *Water Res.* 30 (4), 883–892.
- Dragana Mutavdzic Pavlovic , Antonija Glavac, Mihaela Gluhak, Mislav Runje, (2018), Sorption of Albendazole in sediments and soils: Isotherms and kinetics, *Chemosphere* 193: 635-644
- E.Lagos ,2018. Απομόνωση βακτηρίων που διασπούν το οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο fosthiazate
- Frank M. Aarestrup , 2005 , *Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal*, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2005, 96, 271–281.
- García, J.J., Diez, M.J., Sierra, M., Terán, M.T., 1994. Bioavailability of levamisole administered by subcutaneous and oral routes in

- rabbits. *Journal of Veterinary Parasitology and Therapeutics*, 17, 135-140.
- Gardner, T.B., Hill, D.R., 2001. Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology*, 14, 114-128.
 - Geary, T.G., Sims, S.M., Thomas, E.M., Vanover, L., Davis, J.P., Winterrowd, C.A., Klein, R.D., Ho, N.F.H., Thompson, D.P., 1993. *Haemonchus contortus*: Ivermectin-Induced Paralysis of the Pharynx. *Experimental Parasitology*, 77, Issue 1, 88-96.
 - Gull, K., Dawson, P.J., Davis, C., Byard, E.H., 1987. Protein/ligand interactions in anthelmintic chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, 15, 59-60.
 - Gyurik, R. J., Chow, A. W. and Zaber, B. (1981) 'Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats, and mice', *Drug Metabolism and Disposition*.
 - Hertzberg, H., Durgjai, B., Kohler, L., Eckert, J., 1994. Prophylaxis of bovine trichostrongylidosis in the alpine region: effect of pasture contamination on
 - Holden-Dye, L., Walker, R.J., 1990. Avermectin and avermectin derivatives are antagonists at the 4-aminobutyric acid (GABA) receptor on the somatic muscle cells of *Ascaris*; is this the site of anthelmintic action? *Parasitology*, 101, 265-271.
 - Hosking, B.C., Dobson, D.P., Stein, P.A., Kaminsky, R., Bapst, B., Mosimann, D., Mason, P.C., Seewald, W., Strehlau, G., Sager, H., 2009. Dose confirmation studies for monepantel, an amino-acetonitrile derivative, against fourth stage gastro-intestinal nematode larvae infecting sheep. *Veterinary Parasitology*, 160, 251-257.
 - Howard, P.H.; Muir, D.C.G., 2011, Identifying new persistent and Bioaccumulative Organics Among Chemical in Commerce II: Pharmaceuticals. *Environ. Sci. Technol.*, 2011, 45, 6938-6946
 - Hyo-Jung Kim a,b, Dong Soo Lee a , Jung-Hwan Kwon b,c, 2010, Sorption of Benzimidazole Anthelmintics to Dissolved Organic Matter Surrogates and Sewage Sludge, *Chemosphere* 80(3):256-62

- Imperiale, F., Lifschitz, A., Sallovitz, J., Virkel, G., Lanusse, C., 2004. Comparative depletion of ivermectin and moxidectin milk residues in dairy sheep after oral and subcutaneous administration. *Journal of Dairy Research*, 71, 427-433.
- infections in calves receiving a morantel sustained-release trilaminar bolus in mid-July. *Veterinary Parasitology*, 53, 91-100.
- Jerry Cooper, Hans Dobson 2007, The benefits of pesticides to mankind and the environment, 2007, *Crop Protection* 26 , 1337–1348
- Kaminsky R., Mosimann, D., Sager, H., Stein, P., Hosking, B., 2009. Determination of the effective dose rate for monepantel (AAD 1566) against adult gastro-intestinal nematodes in sheep. *International Journal for Parasitology*, 39, 443-446.
- 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., 2008b. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*, 452, 176-180.
- Kaminsky, R., Gauvry, N., Schorderet Weber, S., Skripsky, T., Bouvier, J., Wenger, A., Schroeder, F., Desaulles, Y., Hotz, R., T., Hosking, B.C., Pautrat, F., Wieland-Berghausen, S., Ducray, P., 2008a. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitology Research*, 103, 931-939.
- Kass, I.S., Larsen, D.A., Wang, C.C., Stretton, A.O.W., 1982. *Ascaris suum*: Differential effects of Avermectin B1a on the intact animal and neuromuscular strip preparations. *Experimental Parasitology*, 54, 166-174.
- Kolodziejska, M.; Maszkowska, J.; Bialk-Bielska, A.; Steudte, S.; Kumirska, J.; Stepnowski, P.; Stolte, S. , 2013, Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. *Chemosphere* 92, 1253-1259
- Kreuzig Robert , Katharina Blümlein, Sibylla Hltge, (2007). Fate of the Benzimidazole Antiparasitics Flubendazole and Fenbendazole

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

- Lacey, E., 1990. Mode of actions of benzimidazoles. *Parasitology Today*, 6, 112-115.
- Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficiency of ruminant anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 49, 123-158.
- Lewis, J.A., Wu, C.H., Berg, H., Levine J.H., 1980. The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 95, 905-928.
- 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, 71-84.
- Martínez-Carballo, E.; González-Barreiro, C.; Scharf, S.; Gans, O., 2007, Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environ. Poll.*, 148, 570-579
- Mavrogianni, V.S., Papadopoulos, E., Fragkou, I.A., Gougoulis, D.A., Valasi, I., Orfanou, D.C., Ptochos, S., Gallidis, E., Fthenakis, G.C., 2011. Administration of a long-acting antiparasitic to pre-pubertal ewe-lambs in Greece results in earlier reproductive activity and improved reproductive performance. *Veterinary Parasitology*, 177, 139-144.
- McDougall, S., 1992, Controlled release anthelmintic treatment of milking goats. *Australian Veterinary Journal*, 69, 64-65.
- McKellar, Q.A, Benchaoui, H.A., 1996. Avermectins and milbemycins. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 19; 331-51.
- McKellar, Q.A., Scott, E.W., 1990. The benzimidazole anthelmintic agents- a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13, 223-247.

- Mikhail, M., Brugère, H., Le Bars, H., Colvin, H.W. Jr., 1988. Stimulated oesophageal groove closure in adult goats. *American journal of Veterinary Research*, 49, 1713-1715.
- Moreno, L., Echevarria, F., Muñoz, F., Alvarez, L., Sanchez Bruni, S., Lanusse, C., 2004. Dose-dependent activity of Albendazole against benzimidazole-resistant nematodes in sheep: relationship between pharmacokinetics and efficacy. *Experimental Parasitology*, 106, 150-157.
- Mulcahy, G., Quinn, P.J., 1986. A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 9, 119-139.
- Mutavdžić Pavlović, D. *et al.* (2018) 'Sorption of albendazole in sediments and soils: Isotherms and kinetics', *Chemosphere*, 193, pp. 635–644. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.11.025.
- Navarro, M., Canut, L., Carretero, A., Cristofol, C., Pérez-Aparicio, F.J., Arboix, M., Ruberte, J., 1999. Developmental toxicity in rat fetuses exposed to the benzimidazole netobimin. *Reproductive Toxicology*, 13, 295-302.
- Naylor, P.H., Hadden, J.W., 2003. T-cell targeted immune enhancement yields effective T-cell adjuvants. *International Immunopharmacology*, 3, 1205-1215.
- 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 delineates the role of the subunit GluCl-alpha2 in the function of native receptor. *Molecular Pharmacology*, 59, 1037-1043.
- Qian, H., Martin, R.J., Robertson, A.P., 2006. Pharmacology of N-, L- and B-subtypes of nematode nAChR resolved at the single-channel level in *Ascaris suum*. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 20, 2606-2608.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 1999. *Pharmacology*, 4th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Ranjan, S., Search, R., Szewczyk, E., Amodie, D., Pollet, R., Rugg, D., 2010. Evaluation of the persistent activity of moxidectin (10%) long-acting (LA) injectable formulation against *Dictyocaulus*

viviparus, *Haemonchus placei*, *Trichostrongylus axei* and *Oesophagostomum radiatum* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, 167, 50-54.

- Rao PSC and Hornsby AG, 2001. Behavior of pesticides in Soil and Water. Institute of food and Agricultural Science, University of Florida. Florida. U.S.A
- Robinson, M.W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L., Fairweather, I.A., 2004. Possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *Journal of Molecular Graphics*, 23, 275-284.
- 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 gastrointestinal nematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, 159, 49-54.
- Shan, Q., Haddrill, J.L., Lynch, J.W., 2001. Ivermectin, an unconventional agonist of the glycine receptor chloride channel. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 12556-12564.
- Wohde Manuel, Silvia Berkner , Thomas Junker , Sabine Konradi , Lisa Schwarz and Rolf-Alexander Düring, 2016, Occurrence and transformation of veterinary pharmaceuticals and biocides in manure: a literature review ,*Environ Sci Eur*. 2016; 28(1): 23.
- Wu Min & Jiye Hu, 2013, Residue Analysis of Albendazole in Watermelon and Soil by Solid Phase Extraction and HPLC , *Journal Analytical Letters* ,Volume 47, 2014 - Issue 2, Pages 356-366
- Yoshimura, H., 2003. Effect of oral dosing vehicles on the developmental toxicity of flubendazole in rats. *Reproductive Toxicology*, 17, 377-385.
- Zheng, Y., Hirschberg, B., Yuan, J., Wang, A.P., Hunt, D.C., Ludemer, S.W., Schmatz, D.M., Cully, D.F., 2002. Identification of two novel *Drosophila melanogaster* histamine-gated chloride channel subunits expressed in the eye. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 2000-2005.

- Δ.Θ. Λύκας, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (2009)
- Λιτσκάς Δ. Βασίλειος Γεωπόνος M.Sc., Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης Κτηνιατρική Σχολή Τομέας Ζωικής Παραγωγής, Ιχθυολογίας, Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος (2013).