



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή διατριβή

**Βιολογικός εμπλουτισμός κοπροσωρών για την
απομάκρυνση βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών
παρασιτοκτόνων**

Αμανατίδου Παρασκευή

Λάρισα 2019

Βιολογικός εμπλουτισμός κοπροσωρών για την απομάκρυνση βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών παρασιτοκτόνων

Bioaugmentation of faeces for the removal of benzimidazole anthelmintic compounds

Υπεύθυνος καθηγητής

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

Τριμελής επιτροπή

- I. Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- II. Παπαδοπούλου Καλλιόπη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
- III. Παπαδοπούλου Ευαγγελία, Διδάσκων στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Δημήτριο Καρπούζα, υπό την επίβλεψη του οποίου πραγματοποιήθηκε η παρούσα πτυχιακή διατριβή, για την πολύ σημαντική βοήθεια και την πολύτιμη καθοδήγηση που μου πρόσφερε στην οργάνωση των πειραμάτων, στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων, στη συγγραφή και στη διόρθωση του κειμένου της πτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Ευστάθιο Λαγό για την ανυπολόγιστη βοήθεια και συμβολή του σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας. Ακόμη, ευχαριστώ και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνεργασία κατά τη διάρκεια της παραμονής μου σ' αυτό.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την συνεχή υποστήριξη κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου στο προπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών.

Πίνακας περιεχομένων

1. Εισαγωγή	7
1.1 Ανθελμινθικά κτηνιατρικά φάρμακα και χρήσεις τους	7
1.2 Κατηγορίες ανθελμινθικών κτηνιατρικών φαρμάκων	7
1.3 Γενικά χαρακτηριστικά βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών φαρμάκων	8
1.4 Thiabendazole	9
1.5 Fenbendazole	10
1.6 Albendazole	11
1.7 Διαδικασίες ελέγχου της περιβαλλοντικής τύχης και συμπεριφοράς των βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών φαρμάκων	13
1.8 Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά του albendazole	15
1.9 Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά του thiabendazole	16
1.10 Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά του fenbendazole	16
1.11 Μέθοδοι πρόληψης της ρύπανσης από τα ανθελμινθικά	17
1.12 Σκοπός του πειράματος.....	18
2. Υλικά και μέθοδοι	19
2.1 Δείγματα κοπριάς.....	19
2.2 Προσδιορισμός υγρασίας δειγμάτων κοπριάς	19
2.3 Προσδιορισμός υδατοχωρητικότητας δειγμάτων κοπριάς	20
2.4 Διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια και ανθελμινθικά φάρμακα.....	21
2.5 Βακτηριακή κοινοπραξία και θρεπτικά μέσα	22
2.6 Έλεγχος ανάπτυξης βακτηρίων με PCR πραγματικού χρόνου (q-PCR) και επιβεβαίωση μέγιστης αποδομητικής ικανότητας του	23
2.7 Υπολογισμοί ποσοτήτων εφαρμογής της βακτηριακής κοινοπραξίας	24
2.8 Απομόνωση βακτηριακής κοινοπραξίας από το θρεπτικό μέσο	25
2.9 Περιγραφή πειράματος βιοεμπλουτισμού	25
2.10 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων ανθελμινθικών φαρμάκων στους κοπροσωρούς	26
2.10.1 Ανάκτηση ανθελμινθικών φαρμάκων από κοπροσωρούς	26
2.10.2 Εκχύλιση thiabendazole από κοπροσωρούς.....	27
2.10.3 Εκχύλιση albendazole, albendazole sulfone, albendazole sulfoxide από κοπροσωρούς.....	27
2.10.4 Εκχύλιση fenbendazole, fenbendazole sulfone από κοπροσωρούς.....	28

2.10.5	Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)	29
2.10.6	Υπολογισμός κινητικών παραμέτρων αποδόμησης	30
3.	Αποτελέσματα	31
3.1	Καταμέτρηση βακτηριακού πληθυσμού για εφαρμογή του στην κοπριά	31
3.2	Αποδόμηση και μεταβολισμός thiabendazole	31
3.3	Αποδόμηση και μεταβολισμός του albendazole	33
3.4	Αποδόμηση και μεταβολισμός του fenbendazole	37
4.	Συζήτηση- συμπεράσματα	40
4.1	Συζήτηση	40
4.2	Συμπεράσματα	42
4.3	Μελλοντικές προσεγγίσεις.....	42
5.	Βιβλιογραφία	43

Περίληψη

Η ανίχνευση υπολειμμάτων ανθελμινθικών βενζιμιδαζολικών παρασιτοκτόνων σε περιβαλλοντικά υποστρώματα έχει οδηγήσει στην αναζήτηση μεθόδων και πρακτικών για την απομάκρυνση τους. Τα βενζιμιδαζολικά παρασιτοκτόνα μετά την χορήγηση τους στα παραγωγικά ζώα δεν μεταβολίζονται επαρκώς από τα ζώα και απεκκρίνονται αυτούσια μέσω των ούρων και των κοπράνων, τα οποία ως κοπριές εφαρμόζονται ως οργανική λίπανση στα αγροτικά εδάφη. Συνεπώς απαιτούνται λύσεις για την απομάκρυνση των συγκεκριμένων ουσιών στο επίπεδο των κοπροσωρών πριν την εφαρμογή αυτών στα γεωργικά εδάφη. Στη συγκεκριμένη μελέτη αξιολογήθηκε ο βιολογικός εμπλουτισμός ως τέτοια μέθοδος. Συγκεκριμένα αξιολογήθηκε η ικανότητα μίας βακτηριακής κοινοπραξίας, που είχε την ικανότητα να αποδομεί το βενζιμιδαζολικό παρασιτοκτόνο thiabendazole, να αποδομεί σε δείγματα κοπροσωρών συγκεντρώσεις τόσο του thiabendazole όσο και των έτερων βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών albendazole και fenbendazole. Έτσι δείγματα κοπροσωρών από αιγοπρόβατα φορτίστηκαν με thiabendazole, albendazole, fenbendazole σε δόσεις 0.5 και 50 $\mu\text{g/g}$ και ακολούθως εμβολιάστηκαν ή όχι με την βακτηριακή κοινοπραξία. Ακολούθως καταγράφηκε η αποδόμηση και ο μεταβολισμός των βενζιμιδαζολικών μυκητοκτόνων σε σύστημα HPLC. Γενικότερα ο βιολογικός εμπλουτισμός κοπροσωρών επιβαρυσμένων με τα βενζιμιδαζολικά thiabendazole, fenbendazole, albendazole οδήγησε σε μερική ή σημαντική επιτάχυνση της αποδόμησης των thiabendazole και albendazole αλλά όχι του fenbendazole. Περαιτέρω μελέτες θα εστιάσουν στην βελτιστοποίηση των πρακτικών βιολογικού εμπλουτισμού ώστε να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα της βακτηριακής κοινοπραξίας.

Abstract

The detection of benzimidazole anthelmintic residues of pesticides in environmental substrates has led to the search for methods and practices for their removal. The benzimidazole pesticides following administration to livestock animals, are not sufficiently metabolized by them and are excreted in the urine and faeces, which as manures are applied as organic fertilizer in agricultural lands. Therefore, it is required to find solutions in order to remove these substances before their application to agricultural soils. In this study, bioaugmentation was evaluated as such. Specifically, the ability of a bacterial consortium capable of degrading the benzimidazole pesticide thiabendazole, to degrade concentrations of thiabendazole and the other benzimidazole anthelmintic albendazole and fenbendazole in faecal samples, was evaluated. Thus, samples of sheep-goat hybrids were loaded with 0.5 and 50 $\mu\text{g/g}$ of thiabendazole, albendazole, fenbendazole, following inoculation or not with the bacterial consortium. The degradation and metabolism of benzimidazole fungicides in an HPLC system was recorded. In general, bioaugmentation of benzimidazole-loaded faeces, resulted in partial or significant acceleration of the degradation of thiabendazole and albendazole but not of fenbendazole. Further studies will focus on optimizing bioaugmentation practices in order to maximize the effectiveness of the bacterial consortium.

1. Εισαγωγή

1.1 Ανθελμινθικά κτηνιατρικά φάρμακα και χρήσεις τους

Ως ανθελμινθικά κτηνιατρικά φάρμακα ορίζονται τα παρασιτοκτόνα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση ελμινθιάσεων στους ζωικούς οργανισμούς (Riviere and Papich, 2009). Ως ελμινθίαση ορίζεται η παρασιτική μόλυνση ενός ζωικού οργανισμού από έλμινθες ή σκώληκες, που είναι ενδοπαράσιτα και ταξινομούνται με βάση τη μορφολογία τους σε δύο μεγάλες ομοταξίες: τους πλατυέλμινθες και τους νηματώδεις σκώληκες (Riviere and Papich, 2009). Στις εκτροφές ζώων είναι συχνές οι μολύνσεις τέτοιου είδους διότι πολλές έλμινθες μεταδίδονται μέσω του εδάφους και έπειτα παρασιτούν στον γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων ενώ άλλες παρασιτούν στα αιμοφόρα αγγεία τους. Οι ελμινθιάσεις έχουν αντίκτυπο στην υγεία και στην παραγωγικότητα των ζώων είτε άμεσα όπως η θνησιμότητα και η μείωση παραγωγικότητας είτε έμμεσα όπως το υψηλό κόστος αποπαρασιτώσεων και η απόρριψη γαλακτοκομικών προϊόντων με κατάλοιπα φαρμάκων. Επίσης, οι έλμινθες προκαλούν λοιμώξεις και στους ανθρώπους όπως οξυκουρίαση, ασκαριδίαση, εχινόκοκκο, σε περιοχές με κακές υγειονομικές συνθήκες, προκαλώντας από ενοχλητικά συμπτώματα μέχρι σοβαρές βλάβες (WHO, 2012).

1.2. Κατηγορίες ανθελμινθικών κτηνιατρικών φαρμάκων

Τα ανθελμινθικά φάρμακα διακρίνονται σε (α) βενζιμιδαζόλες και προ-βενζιμιδαζόλες, (β) ιμιδαζοθειαζόλες και τετραϋδροπυριμιδίνες, (γ) μακροκυκλικές λακτόνες (δ) παράγωγα αμινο-ακετονιτριλίου (Kaminsky et al, 2008a, Sager et al., 2009).

Οι βενζιμιδαζόλες είναι η κύρια και μεγαλύτερη ομάδα ανθελμινθικών για τη αντιμετώπιση ελμίνθων στα ζώα. Διαθέτουν ευρύ φάσμα δράσης και έχουν

υψηλό δείκτη ασφάλειας. Η μεγάλη αποτελεσματικότητα τους στηρίζεται στις ιδιαίτερες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες τους. Οι προβενζιμιδαζόλες αποτελούν πρόδρομες ανενεργές μορφές των βενζιμιδαζολών οι οποίες όταν εισέρχονται σε κάποιον ζωικό οργανισμό ενεργοποιούνται μέσω του μεταβολισμού. Οι ιμιδαζοθειαζόλες και οι τετραϋδροπυριμιδίνες είναι ουσίες που δρουν ως αγωνιστές των νικοτινικών υποδοχέων (Aceves et al., 1970) και προκαλούν νευρομυϊκή παράλυση των παρασίτων (Martin et al., 2005). Οι μακροκυκλικές λακτόνες δρουν στους φαρυγγικούς μυς των παρασίτων παρεμποδίζοντας τη ανάπτυξη τους (Pemberton et al., 2001) και στους μυς του σωματικού τοιχώματος καταστέλλοντας την κίνηση τους. Τα παράγωγα άμινο-ακετονιτριλίου είναι μια νέα ομάδα ανθελμινθικών φαρμάκων που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των ενδοπαρασίτων στα μηρυκαστικά και θανατώνει παράσιτα με πολλαπλή αντοχή (Kaminsky et al., 2008a).

1.3. Γενικά χαρακτηριστικά βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών φαρμάκων

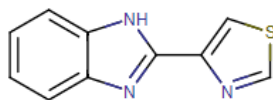
Το πρώτο βενζιμιδαζολικό φάρμακο που ανακαλύφθηκε είναι το thiabendazole το 1961 (McKellar et al., 1990). Από τότε, οι βενζιμιδαζόλες υπόκεινται σε δομικές μετατροπές ώστε να βελτιωθεί το εύρος δράσης τους, η αποτελεσματικότητα και η ασφάλειά τους. Έτσι, με την προσθήκη αλειφατικών ή αρωματικών υποκαταστατών στο μόριο του thiabendazole παρήχθησαν νέα φάρμακα όπως είναι τα: parbendazole, mebendazole, oxibendazole, fenbendazole, oxfendazole, albendazole, ciclo bendazole, flubendazole, luxobendazole, triclabendazole και ricobendazole (Rang et al., 1999). Ο μηχανισμός δράσης τους σχετίζεται με την ακεραιότητα του κυτταρικού σκελετού των παρασίτων. Δεσμεύονται στην β-τουμπουλίνη, η οποία είναι μια δομική πρωτεΐνη των κυττάρων, οδηγώντας σε καταστολή του πολυμερισμού της και άρα στη παρεμπόδιση της δημιουργίας μικροσωληνίσκων μέσα στα κύτταρα του παρασίτου (Robinson et al., 2004). Αυτός ο μηχανισμός επιφέρει

μεταβολικές διαταραχές σε διάφορες λειτουργίες των κυττάρων, όπως είναι η λήψη και αποθήκευση γλυκόζης και αμινοξέων αλλά και η σύνθεση πρωτεϊνών, επάγοντας τον θάνατο των παρασίτων. Καταλήγουν στο περιβάλλον μέσω των ούρων και των κοπράνων των παραγωγικών ζώων και χαρακτηρίζονται από υψηλή υπολειμματικότητα και βραδεία αποδόμηση με αποτέλεσμα να εντοπίζονται τα ίδια αλλά και μεταβολικά προϊόντα τους στο περιβάλλον (Kreuzig, 2007).

1.4 Thiabendazole

Το thiabendazole ((2-(1,3-thiazol-4-yl)-1H-1,3-benzodiazole) χρησιμοποιείται ως μυκητοκτόνο έναντι μυκητιακών προσβολών φρούτων και λαχανικών μετασυλλεκτικά (Robatcher et al., 2012), και ως παρασιτοκτόνο (Gosselin et al., 1984) με την εμπορική ονομασία Mintezol. Συγκεκριμένα, ως παρασιτοκτόνο θανατώνει προνυμφικές και ενήλικες μορφές των νηματωδών παρασίτων όπως το στρογγυλοειδή (*Strongyloides stercoralis*) και οι ασκαρίδες (*Ascaris lumbricoides*, *Toxocaracanis*, *Toxocaracati*) (Delescluse et al., 2011) σε ανθρώπους και σε παραγωγικά ζώα όπως μηρυκαστικά. Επίσης, βρίσκει εφαρμογή στην ιατρική σε περιπτώσεις δηλητηριάσεων από μέταλλα όπως μόλυβδος, υδράργυρος ή αντιμόνιο καθώς λειτουργεί ως χηλικός παράγοντας (Gosselin et al., 1984). Η συνιστώμενη θεραπευτική δόση κυμαίνεται μεταξύ 50-75 mg/kg σωματικού βάρους και δείκτη ασφαλείας 16-27 φορές την θεραπευτική δόση (Brander et al., 1991). Μέχρι σήμερα, ο ακριβής τρόπος δράσης του φαρμάκου στο παράσιτο δεν είναι γνωστός, αλλά πιθανότατα αναστέλλει την μιτοχονδριακή και ειδική για τις έλμινθες φουμαρική ρεδοουκτάση (Imming, 2006). Επιτυγχάνεται μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα σε 1-2 ώρες μετά από στοματική χορήγηση και ακολουθεί ηπατικός μεταβολισμός με χρόνο ημιζωής 8 ώρες. Απεκκρίνεται στους περισσότερους οργανισμούς σε μεγαλύτερο ποσοστό μέσω ούρων από ότι μέσω κοπράνων. Στα ούρα η αποβολή γίνεται κυρίως υπό την μορφή μεταβολιτών (5-hydroxy-thiabendazolesulfate, 5-hydroxy-thiabendazole glucuronide) (Tocco et al., 1966).

Όσο αναφορά τις φυσικοχημικές του ιδιότητες, έχει χημικό τύπο $C_{10}H_7N_3S$ (Εικόνα 1) και μοριακό βάρος 201.249 g/mol. Βρίσκεται σε μορφή λευκών έως καστανόχρωμων κρυστάλλων και διαλύεται σε νερό, ακετόνη, αιθανόλη, χλωροφόρμιο και βενζόλιο (Imming, 2006).



Εικόνα 1: Χημική δομή thiabendazole (Imming, 2006).

1.5 Fenbendazole

Το fenbendazole ((methyl N-[5-(phenylsulfanyl)-1H-1,3-benzodiazol-2-yl] carbamate)) είναι ευρέως φάσματος κτηνιατρικό ανθελμινθικό φάρμακο με την εμπορική ονομασία Anigrazol, Antezole, Panacuró που είναι εγκεκριμένο από τον FDA για χορήγηση σε αιγοπρόβατα, βοοειδή, άλογα, ψάρια, σκύλους, γάτες κουνέλια και φώκιες (Junquera, 2015). Καταπολεμά γαστρεντερικά παράσιτα όπως κεστώδεις έλμινθες (γένος *Taenia*) και κατά κύριο λόγο ενήλικα και προνυμφικά νηματώδη όπως τα *Strongyloides stercoralis* και *Ascarissuum*. Η συνιστώμενη θεραπευτική δόση είναι 3-10 mg/kg σωματικού βάρους με δείκτη ασφαλείας >100 φορές καθιστώντας το πολύ ασφαλές (Brander et al., 1991). Χαρακτηρίζεται από πολύ αργή απορρόφηση από το βλεννογόνο του εντέρου και η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος επιτυγχάνεται 30 ώρες μετά τη στοματική χορήγηση. Όσο αναφορά τον μηχανισμό δράσης του, δεσμεύεται στη τουμπουλίνη των μικροσωληνίσκων επάγοντας την μείωση αποθεμάτων γλυκογόνου. Αυτό οδηγεί στην διαταραχή του ενεργειακού ισοζυγίου των ελμίνθων και επιφέρει την παράλυση και τον θάνατο τους (Robinson, 2004). Η απέκκριση του fenbedazole γίνεται κυρίως μέσω κοπράνων σε όλους τους οργανισμούς υπό την μορφή των μεταβολιτών fenbendazole sulfone και fenbendazole sulfoxide. Λόγω της χαμηλής διαλυτότητας του όμως,

ένα μέρος του fenbendazole δεν μεταβολίζεται καθόλου και απεκκρίνεται ως έχει (Kreuzig, 2007).

Όσο αναφορά τις φυσικοχημικές του ιδιότητες, έχει χημικό τύπο $C_{15}H_{13}N_3O_2S$ (Εικόνα 2) και μοριακή μάζα 299.35 g/mol. Βρίσκεται σε μορφή σκόνης λευκού έως καστανόχρωμου χρώματος. Είναι αδιάλυτο στο νερό, ελαφρώς διαλυτό σε ακετόνη, αιθέρα, μεθανόλη, χλωροφόρμιο και αρκετά διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες όπως το διμεθυλοσουλφοξείδιο (Danaher et al., 2007).



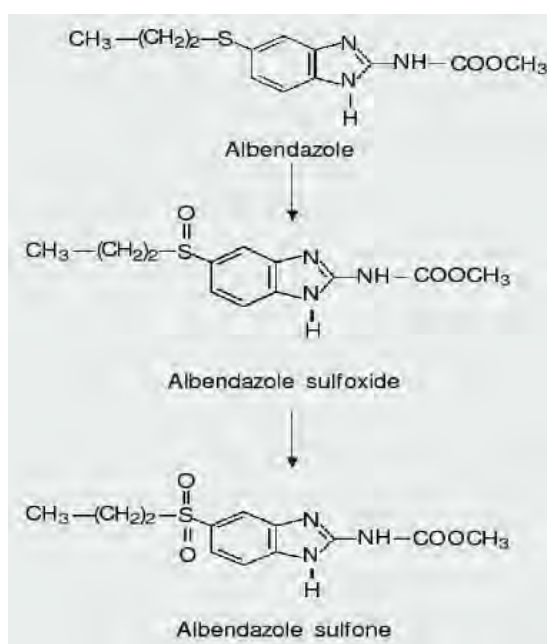
Εικόνα 2: Χημικές δομές fenbendazole (FBZ), fenbendazole sulfoxide (OFZ), fenbendazole sulfone (FBZ-SO₂) και μεταβολισμός τους (Danaher et al., 2007).

1.6 Albendazole

Το albendazole (methyl 5- (propylthio)-2-benzimidazolecarbamate) είναι ευρέως φάσματος, συνθετικό βενζιμιδαζολικό ανθελμινθικό με εμπορική ονομασία Albenza (Gyurik et al., 1981). Χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση νηματωδών σκωλήκων (*Taeniasolium*), που προσβάλλουν το νευρικό σύστημα, και των κεστωδών ελμίνθων (*Echinococcus granulosus*) που προσβάλλει ήπαρ, πνεύμονα και περιτόναιο. Χορηγείται κυρίως σε βοοειδή και αιγοπρόβατα, αλλά και σε γάτες, σκύλους, πτηνά και σε υδατοκαλλιέργειες ψαριών από το στόμα είτε μέσω χαπιού, είτε σε υγρή μορφή (Gyurik et al., 1981). Η συνιστώμενη θεραπευτική δόση είναι 5 έως 7,5 mg/kg σωματικού βάρους με δείκτη

ασφαλείας 7,5-20 φορές μεγαλύτερο της συνιστάμενης δόσης (Brander et al, 1991). Όσο αναφορά τον μηχανισμό δράσης, είναι παρόμοιος με αυτόν του fenbendazole και άρα οδηγεί σε θάνατο των παρασίτων λόγω διαταραχών στο ενεργειακό ισοζύγιο. Χαρακτηρίζεται από χαμηλή απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα λόγω χαμηλής υδατοδιαλυτότητας, οδηγώντας σε μείωση της συστηματικής διαθεσιμότητας και αποτελεσματικότητας του (Molina et al., 2007). Μεταβολίζεται γρήγορα στο ήπαρ σε albendazole sulfoxide, που θεωρείται ο κύριος μεταβολίτης, και περαιτέρω σε albendazole sulfone και άλλους οξειδωτικούς μεταβολίτες, με το πρώτο να εμφανίζει αντιπαρασιτικές ιδιότητες, καθώς χορηγείται ως ανθελμινθικό (Molina et al., 2007).

Όσο αναφορά τις φυσικοχημικές του ιδιότητες, έχει χημικό τύπο $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ και μοριακό βάρος 265.34 g/mol. Βρίσκεται σε μορφή άχρωμων κρυστάλλων και είναι διαλυτό σε διμεθυλοσουλφοξείδιο, ισχυρά οξέα και βάσεις, ενώ είναι ελαφρώς διαλυτό σε μεθανόλη, χλωροφόρμιο, οξικό αιθυλεστέρα και ακετονιτρίλιο. Επίσης, είναι πρακτικά αδιάλυτο στο νερό (Jung, 1998).



Εικόνα 3: Η μετατροπή του albendazole σε albendazole sulfoxide και albendazole sulfone (Jung, 1998).

1.7 Διαδικασίες ελέγχου της περιβαλλοντικής τύχης και συμπεριφοράς των βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών φαρμάκων

Οι βενζιμιδαζόλες μετά τη χορήγησή τους στα ζώα για θεραπευτικούς λόγους, μπορούν να καταλήξουν σε υδάτινα ή εδαφικά οικοσυστήματα, ή να καταναλωθούν από τον άνθρωπο ως κατάλοιπα σε τρόφιμα ζωικής ή φυτικής παραγωγής. Στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα, είναι λιγοστές οι δημοσιεύσεις για τη διάσπαση των φαρμάκων στην κοπριά και εντοπίζονται κυρίως στα αντιβιοτικά (Loke et al., 2000, Teeter and Meyerhoff, 2003, Kolz et al., 2005). Η κύρια πηγή των κτηνιατρικών βενζιμιδαζολικών φαρμάκων στο περιβάλλον είναι η κτηνοτροφία, μέσω των χρήσης των κοπράνων των ζώων ως λίπασμα για την βελτίωση της θρεπτικής κατάστασης των εδαφών (García-galán et al., 2010, Λίτσας, 2013). Έχει παρατηρηθεί πως πολλά κτηνιατρικά φάρμακα έχουν εντοπιστεί στα κόπρανα των ζώων που βρίσκονται υπό θεραπεία σε ποσοστό που φτάνει έως και το 90% της ποσότητας φαρμάκου που χορηγήθηκε στο ζώο από το στόμα (Kreuzig et al., 2007). Μία ακόμα πηγή βενζιμιδαζολικών στο περιβάλλον αποτελούν οι ιχθυοκαλλιέργειες στις οποίες χορηγούνται για τη θεραπεία παρασιτικών νοσημάτων των ιχθύων. Εκεί, μεταβολίζονται από τα ψάρι και ένα μέρος τους απεκκρίνεται στο υδάτινο περιβάλλον, είτε με την αρχική τους μορφή, είτε με τη μορφή μεταβολιτών (De Ruysck, 2003).

Στην περίπτωση οργανικών υποστρωμάτων όπως οι κοπροσωροί, η τύχη των βενζιμιδαζολικών φαρμάκων εξαρτάται από την θερμοκρασία στην οποία αποθηκεύτηκαν, το ξηρό βάρος τους, τη τροφή των ζώων απ' όπου προήλθαν και τη διαθεσιμότητα δεκτών ηλεκτρονίων (Wohde et al., 2016). Επίσης, η προσρόφηση των κτηνιατρικών φαρμάκων στην οργανική ουσία και η έκπλυση τους στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα θεωρούνται καταλυτικές διεργασίες για την περιβαλλοντική τους τύχη (Wohde et al., 2016). Ως έκπλυση ορίζεται η διεργασία κατά την οποία ένα κτηνιατρικό φάρμακο, διαλυτοποιημένο στο εδαφικό διάλυμα, μετακινείται με το νερό προς τα βαθύτερα στρώματα, καταλήγοντας στα υπόγεια υδροφόρα συστήματα. Η διαδικασία αυτή

επηρεάζεται από την φυσικοχημική σύσταση του εδάφους, τις κλιματολογικές συνθήκες, τις καλλιεργητικές πρακτικές και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ανθελμινθικού.

Ως προσρόφηση ορίζεται η προσέλκυση και η συγκράτηση των μορίων του βενζιμιδαζολικού φαρμάκου από την επιφάνεια των κολλοειδών του εδάφους, είτε οργανικών είτε ανόργανων, ή άλλων συστατικών. Οι παράγοντες που την καθορίζουν είναι η περιεκτικότητα του εδάφους σε οργανική ύλη το pH, η υγρασία, θερμοκρασία και το είδος των ανόργανων κολλοειδών του εδάφους (Λύκας, 2009). Μια από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των βενζιμιδαζολικών φαρμάκων όπου καθορίζει τη μετακίνησή και την τύχη τους στο περιβάλλον είναι η υδατοδιαλυτότητα του, δηλαδή η ικανότητα διαλυτοποίησης τους στο νερό. Πιο συγκεκριμένα, ένα μέρος των βενζιμιδαζολικών φαρμάκων καταλήγει στα κολλοειδή σωματίδια του εδάφους λόγω προσρόφησης, ενώ ένα άλλο μέρος έχει ως τελικό αποδέκτη το εδαφικό διάλυμα. Λόγω του νερού που συνεχώς εισέρχεται στο έδαφος μέσω της βροχής και της άρδευσης, τα προσροφημένα βενζιμιδαζολικά φάρμακα απελευθερώνονται από τα εδαφικά κολλοειδή και επαναδιαλυτοποιούνται στο εδαφικό διάλυμα με μια διαδικασία που ονομάζεται εκρόφηση. Γενικά, όσο πιο υψηλή είναι η υδατοδιαλυτότητα, τόσο λιγότερο ισχυρή είναι η προσρόφηση (Rao and Hornsby, 2001).

Μια χημική ουσία στο έδαφος μπορεί να μεταβολιστεί με τρεις τρόπους, φωτοχημικά, χημικά ή μικροβιακά (Hamaker et al., 1975). Ο πρώτος τρόπος περιλαμβάνει την φωτοαποδόμηση, που περιλαμβάνει την έμμεση ή άμεση διάσπαση των κτηνιατρικών φαρμάκων στην ατμόσφαιρα (έδαφος, φυτά, νερό) λόγω επίδρασης του φωτός, εξαιτίας της απορρόφησης της ηλιακής ενέργειας, με μήκος κύματος (λ) 290 έως 400 nm (Burrows et al., 2002). Οι ακριβείς διεργασίες που λαμβάνουν χώρα δεν είναι πλήρως κατανοητές καθώς επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως ετερογένεια σύστασης εδάφους και εισχώρηση ακτινοβολίας στο έδαφος (Katagi, 2004). Οι βενζιμιδαζόλες γενικά φωτοαποδομούνται εύκολα. Η χημική αποδόμηση, αναφέρεται στην αποδόμηση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου μέσω χημικών αντιδράσεων, όπως είναι η οξειδωση, η αναγωγή, και η υδρόλυση (Κυδωνάκης, 2010) και εξαρτάται

από την σύσταση του εδάφους και από την παρουσία ιόντων και νερού (Crosby 1970). Ο τρίτος τρόπος περιλαμβάνει την βιολογική ή ειδικότερα μικροβιακή αποδόμηση, η οποία αφορά τον μεταβολισμό μιας ουσίας από μικροοργανισμούς, επάγοντας διάσπαση, αποσύνθεση και αδρανοποίηση του βενζιμιδαζολικού φαρμάκου. Κατά την έκθεση των μικροοργανισμών στις ξενοβιοτικές ουσίες έχει παρατηρηθεί προσαρμογή τους, μέσω της παραγωγής ενζύμων ειδικών για την αποικοδόμησή τους, απαραίτητων θρεπτικών και ενέργειας (Audus, 1960). Ο μεταβολισμός των φαρμάκων επιτυγχάνεται κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, οι οποίες καθορίζονται από τη σύσταση του εδάφους, το pH και την αφθονία των μικροοργανισμών (Wohde et al., 2016). Στα επιφανειακά στρώματα του εδάφους λόγω παρουσίας οξυγόνου γίνεται αποδόμηση των ουσιών μέσω του αερόβιου μεταβολισμού, με τελικό προϊόν διάσπασης το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό. Σε περίπτωση διάσπασης μιας τοξικής ουσίας από τους μικροοργανισμούς υπό αναερόβιες συνθήκες, προκύπτουν μεθάνιο ή διοξείδιο του θείου ως τελικά προϊόντα (Díaz et al., 2008). Σημαντικό ρόλο παίζει η βιοδιαθεσιμότητα του βενζιμιδαζολικού φαρμάκου, δηλαδή η ποσότητα του φαρμάκου στην οποία έχουν πρόσβαση οι μικροοργανισμοί και βρίσκεται σε διαλυτή μορφή (Parales et al., 2008).

1.8 Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά του albendazole

Το albendazole καταλήγει στο περιβάλλον μέσω των ούρων και των κοπράνων των ζώων, με την πρώτη οδό να είναι συχνότερη. Υπολείμματα του φαρμάκου και των παραγόμενων μεταβολιτών του albendazole sulfone και albendazole sulfoxide έχουν ανιχνευθεί σε κοπριές, σε λύματα, σε υπόγεια και επιφανειακά ύδατα (Van De Steen et al., 2010). Λόγω της υδροφοβικότητάς του εμφανίζει 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. Ο χρόνος ημιζωής του είναι μικρότερος από 6,5 ημέρες (Min and Hu, 2013).

1.9 Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά του thiabendazole

Το thiabendazole είναι μη βιοδιασπώμενο και χαρακτηρίζεται από ισχυρή προσρόφηση στα κolloειδή και χαμηλή κινητικότητα στο έδαφος (Omirou et al., 2012). Ο χρόνος ημιζωής του είναι 833-1100 ημέρες σε καλλιεργημένες εκτάσεις και σε 1093-1440 σε εκτάσεις με αγρανάπαυση (USEPA, 2002). Παρουσιάζει μειωμένη υπολειμματικότητα στο νερό με χρόνο ημιζωής 1.6-2.3 ημέρες αλλά έχει παρατηρηθεί πως δεν υδρολύεται σε τιμές pH από 4 ως 9. Είναι ευαίσθητο σε φωτόλυση στο νερό σε pH 5 (USEPA, 2002).

1.10 Περιβαλλοντική τύχη και συμπεριφορά του fenbendazole

Κύρια οδός απέκκρισης του fenbendazole είναι τα κόπρανα των παραγωγικών ζώων (Pope et al., 2009). Έχει χαμηλή κινητικότητα στο έδαφος και συνεπώς δεν αποτελεί σημαντικό ρύπο των υπογείων υδροφόρων συστημάτων. Έχει χρόνο ημιζωής 54 ημέρες με την αποδόμηση του στο έδαφος να είναι κυρίως μικροβιακή (Kreuzig et al, 2007). Στους κοπρωσωρούς έχει αποδειχθεί ότι μεταβολίζεται στον πρωτογενή μεταβολίτη του fenbendazole sulfoxide ο οποίος μπορεί να μεταβολιστεί περαιτέρω σε fenbendazole sulfone (Moenickes et al, 2011). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι βρίσκονταν πάνω από έξι μήνες, σε διαλυτή μορφή στα ζωικά απόβλητα και σε έδαφος που είχε δεχτεί λίπανση με τα συγκεκριμένα ζωικά απόβλητα (Kreuzig, 2007).

1.11 Μέθοδοι πρόληψης της ρύπανσης από τα ανθελμινθικά

Περιβαλλοντικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την εμφάνιση υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων σε κοπριές, σε λύματα, σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα και σε έδαφος (Van De Steene et al., 2010), τα οποία έχουν οδηγήσει σε περιβαλλοντικές μεταβολές που είναι δύσκολο να ανιχνευθούν (Daughton and Ternes, 1999), είτε μόνα τους είτε σε μίγματα (Daughton and Ternes, 1999, Jones et al., 2004). Μέχρι σήμερα, έχει επιβεβαιωθεί πως τα υπολείμματα ανθελμινθικών φαρμάκων σε κοπριές επάγουν επιπτώσεις στην πανίδα του εδάφους, επιδρώντας σε οργανισμούς που δεν είναι στόχοι τους (Mougin et al., 2003). Συνεπώς κρίθηκε αναγκαία η εφαρμογή μεθόδων πρόληψης περιβαλλοντικής ρύπανσης.

Μέσω πειραμάτων εδαφικών στηλών επιβεβαιώθηκε πως η κατεργασία του εδάφους πριν από την εφαρμογή της κοπριάς είναι μια μέθοδος που μειώνει τον περιβαλλοντικό κίνδυνο που προκαλούν τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά (Kay et al. 2005a, 2005b). Ακόμα, πειράματα πεδίου έδειξαν πως μειώνουν την συγκέντρωση των κτηνιατρικών φαρμάκων στην κοπριά (Kreuzig and Holtge 2005, Kreuzig et al. 2005).

Μέσω της χρήσης φυτών έχει βρεθεί πως μπορεί να επιτευχθεί απομάκρυνση και αποτοξικοποίηση ανθελμινθικών σε βοσκοτόπια και υδατικά οικοσυστήματα. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε πως καλλιέργειες κυτάρων καλαμιού μπορούν να προσλάβουν και να μεταβολίσουν τα ανθελμινθικά albendazole και flubendazole, με τους περισσότερους μεταβολίτες τους να είναι βιολογικά αδρανής (Podlipna et al., 2013). Επίσης, μέσω σπόρων μουστάρδας θα μπορούσε να επιτευχθεί η αποτοξικοποίηση του albendazole και των μεταβολιτών του, καθώς βρέθηκε πως δεν επιδρούν στην βλάστηση τους (Prchal et al, 2016).

Ένας ακόμη πιθανός τρόπος προστασίας του περιβάλλοντος από τα υπολείμματα ανθελμινθικών είναι ο βιολογικός εμπλουτισμός. Ουσιαστικά, είναι η πρακτική της προσθήκης καλλιεργημένων μικροοργανισμών και

ιδιαίτερα βακτηρίων ή αρχαίων σε υποστρώματα, με σκοπό την αύξηση του ρυθμού αποδόμησης ειδικών ρύπων (Morganwalp, 2015). Μέχρι τώρα έχουν γίνει μελέτες πάνω στο βιολογικό εμπλουτισμό εδαφών για την απομάκρυνση γεωργικών φαρμάκων που ανήκουν στις ομάδες των τριαζινών, οργανοφωσφορικών, οργανοχλωριομένων και πυρεθροειδών (Cycon et al., 2017).

Επίσης, έχει γίνει μελέτη της αποδόμησης του βενζιμιδαζολικού μυκητοκτόνου carbendazim σε εδαφικό υπόστρωμα, από βακτηριακό στέλεχος του είδους *Rhodococcus jialingiae*. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερο ρυθμό αποδόμησης φαρμάκου σε σχέση με τα εδάφη-μάρτυρες, είτε ήταν αποστειρωμένα είτε μη αποστειρωμένα (Wang et al, 2010). Συνεπώς, ο βιοεμπλουτισμός αποτελεί έναν επιτυχημένο τρόπο αποτοξικοποίησης των εδαφικών υποστρωμάτων και θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε κοπροσωρούς για τον ίδιο σκοπό.

1.12 Σκοπός του πειράματος

Ο περιβαλλοντικός κίνδυνος που ενέχουν τα βενζιμιδαζολικά ανθελμινθικά φάρμακα οδηγεί στην ανάγκη για αποτοξικοποίηση των ρυπασμένων υποστρωμάτων (κοπροσωρών και εδαφών). Ένας τρόπος για να γίνει αυτό είναι μέσω του εμπλουτισμού των υποστρωμάτων με μικροοργανισμούς που διαθέτουν υψηλή ικανότητα αποδόμησης των συγκεκριμένων ενώσεων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να ελεγχθεί η ικανότητα βιολογικού εμπλουτισμού κοπροσωρών με τη χρήση βακτηριακής κοινοπραξίας, χαρακτηρισμένης ως αποδομητή του thiabendazole (Perruchon et al., 2017) για την απομάκρυνση των βενζιμιδαζολικών ανθελμινθικών παρασιτοκτόνων thiabendazole, albendazole, fenbendazole. Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (μεταπτυχιακή διατριβή Η. Γκουρομπίνος) έδειξαν ότι η βακτηριακή κοινοπραξία είχε την ικανότητα να αποδομεί πέραν του

thiabendazole και τα βενζιμιδαζολικά παρασιτοκτόνα albendazole και fenbendazole αν και με χαμηλότερους ρυθμούς αποδόμησης. Με βάση τα παραπάνω η πρώτη υπόθεση που μελετήθηκε είναι εάν η συγκεκριμένη κοινοπραξία έχει την ικανότητα αποδόμησης και απομάκρυνσης του thiabendazole από κοπροσωρούς αιγοπροβάτων. Η δεύτερη υπόθεση που μελετήθηκε ήταν εάν η ίδια βακτηριακή κοινοπραξία έχει την ικανότητα να απομακρύνει αποτελεσματικά από κοπροσωρούς τα επίσης βενζιμιδαζολικά albendazole και fenbendazole. Σε όλες τις περιπτώσεις μελετήθηκε η αποδόμηση των κτηνιατρικών φαρμάκων σε εμβολιασμένους και μη εμβολιασμένους κοπροσωρούς ενώ παράλληλα προσδιορίστηκαν και τα κύρια μεταβολικά προϊόντα των albendazole και fenbendazole.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Δείγματα κοπριάς

Κοπροσωροί αιγοπροβάτων συλλέχθηκαν από το Ινστιτούτο Βιομηχανικών & Κτηνοτροφικών Φυτών Λάρισας ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ, συνολικού βάρους 3,6 kg. Στα αιγοπρόβατα δεν είχαν χορηγηθεί τα υπό μελέτη ανθελμινθικά φάρμακα ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα αυτών στους κοπροσωρούς που μελετήθηκαν. Οι κοπροσωροί αρχικά αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό χώρο με θερμοκρασία 4°C μέχρι την χρήση τους εντός 1 εβδομάδας.

2.2 Προσδιορισμός υγρασίας δειγμάτων κοπριάς

Για τον προσδιορισμό της περιεχόμενης υγρασίας των κοπροσωρών προσδιορίστηκε η απώλεια βάρους δειγμάτων κοπριάς έπειτα από ξήρανση τους σε φούρνο. Συγκεκριμένα, ζυγίστηκαν $5 \pm 0.01g$ εδάφους και μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένο δοχείο από αλουμίνιο. Για κάθε δείγμα,

προετοιμάστηκαν τρεις επαναλήψεις και έγινε καταγραφή του βάρους των δειγμάτων. Ακολούθησε ξήρανση σε προθερμασμένο φούρνο (LabLine) στους 105°C για 24 ώρες. Τέλος, επαναλήφθηκε ζύγιση των εδαφών με τον προσδιορισμό της υγρασίας να δίνεται από τον τύπο:

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

όπου 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.

2.3 Προσδιορισμός υδατοχωρητικότητας δειγμάτων κοπριάς

Για να τον προσδιορισμό της υδατοχωρητικότητας των δειγμάτων κοπριάς, χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250 ml, στα στόμια των οποίων τοποθετήθηκαν χωνιά και μέσα στα χωνιά διηθητικό χαρτί (Whatman No1). Το διηθητικό χαρτί βρέχθηκε με νερό και έπειτα τοποθετήθηκαν 10 g κοπριάς από τα δείγματα. Ζυγίστηκε το χωνί με το διηθητικό χαρτί και με την κοπριά. Στην συνέχεια τα 10 g κοπριάς διαβράχθηκαν με αποσταγμένο νερό για να διασφαλιστεί ο υγρασιακός κορεσμός της κοπριάς. Η ελεύθερη επιφάνεια του χωνιού καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή απώλειας νερού λόγω εξάτμισης. Η κοπριά αφέθηκε σε ηρεμία για 4-10 ώρες, ούτως ώστε να στραγγίσει η περίσσεια του νερού. Το βάρος του χωνιού, με το διηθητικό χαρτί και την κοπριά καταγράφηκε πριν (W1) και μετά (W2) την κατάκλιση. Χρησιμοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις. Ακολούθως, η υδατοχωρητικότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$WC = (B - X) + (W2 - W1) / X * 100\%$$

όπου B: το βάρος της κοπριάς που προστέθηκε στο χωνί,

X: το ξηρό βάρος κοπριάς που προστέθηκε στο χωνί,

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

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

2.4 Διαλύτες, χημικά αντιδραστήρια και ανθελμινθικά φάρμακα

Για τον παρόν πείραμα και για την δημιουργία των αρχικών πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ουσίες:

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

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

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

Προετοιμάστηκαν αρχικά διαλύματα 10000 µg/ml σε μεθανόλη. Για το πείραμα βιοεμπλουτισμού, προετοιμάστηκαν διαλύματα 500 mg/L για κάθε ουσία σε μεθανόλη που διαλύθηκε περαιτέρω ώστε να παρασκευαστούν διαλύματα συγκέντρωσης 50 mg/L. Με βάση τις συγκεντρώσεις των αρχικών διαλυμάτων ανθελμινθικών που είχαν παρασκευαστεί, υπολογίστηκαν κατάλληλες ποσότητες φαρμάκων ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση φαρμάκου στην κοπριά 0.5 mg/kg και 50 mg/kg. Για τις εκχυλίσεις και την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, νερό HPLC grade (Merck), ορθο-φωσφορικό οξύ (H₃PO₄ 0,1%) και αμμώνιο (NH₃ 0,21%).

2.5 Βακτηριακή κοινοπραξία και θρεπτικά μέσα

Η βακτηριακή κοινοπραξία (consortium) που χρησιμοποιήθηκε για τον βιοεμπλουτισμό των κοπροσωρών απομονώθηκε από έδαφος σε περιοχή απόρριψης αποβλήτων από συσκευαστήριο φρούτων όπου χρησιμοποιούνταν το thiabendazole (Perruchon et al. 2017). Η συγκεκριμένη βακτηριακή κοινοπραξία είναι ικανή να αποδομεί το thiabendazole και να το χρησιμοποιεί ως πηγή θρεπτικών συστατικών όπως άνθρακα και άζωτο, σε pH 4.5-7.5 και θερμοκρασίες 15-37°C. Μελέτες έδειξαν ότι μπορεί να επάγει την αποδόμηση ως και 400 µg/g εδάφους το οποίο είναι φυσικά ρυπασμένο με thiabendazole οδηγώντας σε αποκατάσταση χρόνιας ρύπανσης στην περιοχή απόρριψης αποβλήτων από συσκευαστήρια φρούτων (Paradourouli et al., 2018). Κύρια μέλη της κοινοπραξίας ανήκουν σε α- (*Shinella*, *Sphingomonas*), β- (*Methylobacillus*, *Methilibium*, *Hydrogenophaga*) και γ-πρωτεοβακτήρια (*Pseudomonas*, *Hydrocarboniphaga*), με κύριο αποδομητή στέλεχος του γένους *Sphingomonas* (Perruchon et al., 2017).

Η κοινοπραξία καλλιεργούνται συστηματικά σε MSMN, το οποίο είναι εκλεκτικό θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων όπου το thiabendazole αποτελούσε την μοναδική πηγή άνθρακα. Για την παρασκευή του θρεπτικού μέσου παρασκευάστηκαν τα εξής τρία αποστειρωμένα διαλύματα αλάτων:

- Stock 1: KH_2PO_4 6,81g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17,91g, 3g NaCl
- Stock 2: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,045g,
- Stock 3: $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,023g

Για τα Stock 1 και 2 έγινε διάλυση των συστατικών τους σε 300 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και ακολούθησε αποστείρωση σε κλίβανο. Το Stock 3 αποστειρώθηκε με διήθηση διαμέσου φίλτρου σύριγγας. Για την δημιουργία 500ml MSMN με thiabendazole, αναμίχθηκαν 50 ml του Stock 1 σε 390 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και ακολούθησε αποστείρωση σε κλίβανο. Στη συνέχεια, προστέθηκαν ασηπτικά 50 ml Stock 2 και 10 ml Stock 3,

όταν το διάλυμα έφτασε την θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το νέο διάλυμα αποστειρώθηκε σε κλίβανο. Προστέθηκαν 600 μl πυκνού υδατικού διαλύματος thiabendazole, συγκέντρωσης 46,5 mg/L σε DMSO (Dimethylsulfoxide). Για την παρασκευή του ζυγίστηκαν 41,6 mg αναλυτικό πρότυπο της ουσίας thiabendazole και προστέθηκαν 3ml DMSO.

2.6 Έλεγχος ανάπτυξης βακτηρίων με PCR πραγματικού χρόνου (q-PCR) και επιβεβαίωση μέγιστης αποδομητικής ικανότητας του

Η αρχική βακτηριακή καλλιέργεια ανακαλλιεργούνταν περίπου ανά 72 ώρες σε MSMN + thiabendazole ώστε να μεγιστοποιηθεί η αποδομητική ικανότητα της κοινοπραξίας μέχρι την εφαρμογή της στην κοπριά. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σε χρόνο 0, 24, 48, 72 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν 4ml για εξαγωγή DNA και q-PCR ώστε να γίνει έλεγχος της ανάπτυξης των βακτηρίων.

Ο πληθυσμός των βακτηρίων της κοινοπραξίας μετρήθηκε με PCR πραγματικού χρόνου (q-PCR). Έγινε συλλογή 4ml από κάθε φιάσκα από την υγρή καλλιέργεια, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου για παραλαβή της βακτηριακής βιομάζας. Ακολούθησε εξαγωγή DNA με την χρήση του εμπορικού kit PureLink Genomic DNA® (Invitrogen) με βάση το πρωτόκολλο του παρασκευαστή. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,7% για να ελεγχθεί η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε. Στη συνέχεια, έγινε ακριβής ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του DNA των δειγμάτων μέσω του φθορισμομέτρου Qubit®, ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρίας.

Ακολούθησε q-PCR σε σύστημα BIORAD για την εκτίμηση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού και του πληθυσμού του κύριου αποδομητή *Sphingomonas* sp. Χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση ποσότητα 1 μl από δείγματα DNA. Οι θερμοκυκλοποιητικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 95°C για 3 λεπτά, 35 κύκλοι με 95°C για 15 δευτερόλεπτα και 60°C για 20 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε αποδιάταξη με βαθμιαία αύξηση της θερμοκρασίας από 60-95°C, ανά 0,5°C και μέτρηση για 0,05sec σε κάθε μια από τις ενδιάμεσες

θερμοκρασίες. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις q-PCR για το βακτηριακού στελέχους *Sphingomonas* είναι: SYBR FAST 5μl, ColCf (20 pmol/μl) 0,1μl, ColCr(20 pmol/μl) 0,1 μl, ddH₂O 3,8μl. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις q-PCR για το ολικό βακτηριακό DNA είναι: SYBR FAST 5μl, Eub338f(20 pmol/μl) 0,1μl, Eub518r(20 pmol/μl) 0,1 μl, ddH₂O 3,8μl. Οι ειδικοί εκκινητές ColCf: 5'-ATAACTAGCTGTCCGGGCA-3' και ColCr: 5'-TCCATCTCTGGAAACCATAC-3' του βακτηριακού στελέχους *Sphingomonas* που χρησιμοποιήθηκαν είχαν σχεδιαστεί με βάση την αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου του (Perruchon et al. 2015). Οι γενικοί εκκινητές Eub338f και Eub518r χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της αφθονίας των ολικών βακτηρίων (Fierer et al. 2005). Ο προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου 16S rRNA πραγματοποιήθηκε με καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν με την ανάλυση σειρά διαλυμάτων πλασμιδίων γνωστής αρχικής συγκέντρωσης που περιείχε ως ένθεμα το γονίδιο 16S rRNA. Χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις 10⁸ έως 10⁰ αντίγραφα του γονιδίου 16SrRNA του *Sphingomonas* και του 16SrDNA των ολικών βακτηρίων.

2.7 Υπολογισμοί ποσοτήτων εφαρμογής της βακτηριακής κοινοπραξίας

Υπολογίστηκαν 6,5*10⁵ αντίγραφα του γονιδίου 16S rRNA του *Sphingomonas*/μl καλλιέργειας μέσω q-PCR. Χρειάστηκαν 6,5*10⁶ κύτταρα καλλιέργειας άρα 30 μl βακτηριακής καλλιέργειας αντιστοιχεί σε 1 γραμμάριο κοπριάς. Όταν ο βακτηριακός πληθυσμός βρέθηκε σε εκθετική φάση ανάπτυξης στις 72 h επώασης απομακρύνθηκαν 9 ml βακτηριακής καλλιέργειας και χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των κοπροσωρών όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.8 Απομόνωση βακτηριακής κοινοπραξίας από το θρεπτικό μέσο

Εφόσον επιβεβαιώθηκε πως η μέγιστη αποδομητική ικανότητα της βακτηριακής κοινοπραξίας μετά τις 48 ώρες, 60 ml καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη η οποία επώαστηκε στους 25°C στις 160 rpm σε αναδευόμενο επωαστικό θάλαμο. Στις 48 ώρες επώασης ακολούθησε απομόνωση της βακτηριακής κοινοπραξίας από το θρεπτικό μέσο. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των 60 ml καλλιέργειας με θρεπτικό μέσο για 10 λεπτά σε 7000 rpm, απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε απιονισμένο νερό όπου χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 600g κοπριάς. Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε κάτω από ασηπτικές συνθήκες.

2.9 Περιγραφή πειράματος βιοεμπλουτισμού

Για κάθε φάρμακο εφαρμόστηκαν 4 μεταχειρίσεις: (1) κοπριά εμπλουτισμένη με βακτηριακή κοινοπραξία και εφαρμοζόμενη συγκέντρωση του ανθελμινθικού 0,5 mg/kg, (2) κοπριά εμπλουτισμένη με βακτηριακή κοινοπραξία και εφαρμοζόμενη συγκέντρωση του ανθελμινθικού 50 mg/kg, (3) κοπριά χωρίς εμπλουτισμό και εφαρμοζόμενη συγκέντρωση του ανθελμινθικού 0,5 mg/kg, (4) κοπριά χωρίς εμπλουτισμό και εφαρμοζόμενη συγκέντρωση του ανθελμινθικού 50 mg/kg.

Οι μεταχειρίσεις χωρίς τον εμβολιασμό βακτηριακής κοινοπραξίας χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες. Για τα thiabendazole και fenbendazole, ζυγίστηκαν 540 g κοπριάς, 150 g ανά μεταχείριση. Για το albendazole, ζυγίστηκαν 720 g και χρησιμοποιήθηκαν 180 gr ανά μεταχείριση. Ακολούθησε εφαρμογή των κατάλληλων ποσοτήτων των φαρμάκων στα γραμμάρια κοπριάς ανά μεταχείριση για να επιτευχθεί συγκέντρωση ανθελμινθικών 0.5 και 50 mg/kg. Τα δείγματα αναμίχθηκαν με το χέρι για να επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή των ανθελμινθικών φαρμάκων σε όλη την κοπριά. Ακολούθησε

εφαρμογή της βακτηριακής κοινοπραξίας σε κατάλληλες ποσότητες και ανάμιξη μέσω χεριών για ομοιόμορφη κατανομή της. Η υγρασία των δειγμάτων προσαρμόστηκε στο 40% της υδατοχωρητικότητας με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων απιονισμένου νερού.

Τα δείγματα στην συνέχεια διαχωρίστηκαν σε υποδείγματα των 15 g. Τοποθετήθηκαν σε πλαστικές σακούλες με αεροστεγές κλείσιμο και διανοίχθηκαν οπές για την διατήρηση αερόβιων συνθηκών. Δειγματοληψίες έγιναν στις 0, 3, 6, 10, 25 και 40 ημέρες. Για κάθε ημέρα δειγματοληψίας αντιστοιχούν 3 επαναλήψεις δείγματος κοπριάς. Σε κάθε ημέρα δειγματοληψίας τα δείγματα απομακρύνονταν από την επώαση και τοποθετούνταν στους -20°C μέχρι να εκχυλιστούν για τον εντοπισμό υπολειμμάτων των υπό μελέτη βενζιμιδαζολικών φαρμάκων.

2.10 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων ανθελμινθικών φαρμάκων στους κοπροσωρούς

2.10.1. Ανάκτηση ανθελμινθικών φαρμάκων από κοπροσωρούς

Πραγματοποιήθηκαν τεστ ανάκτησης για τα albendazole, fenbendazole, thiabendazole σε επίπεδα συγκεντρώσεων 0.05 mg/kg, 0.5 mg/kg και 1mg/kg, σε δείγματα κοπροσωρών που δεν είχε υπολείμματα των φαρμάκων αυτών για να δοκιμαστεί η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της κάθε μεθόδου εκχύλισης. Για κάθε εφαρμογή ζυγίζονταν κάθε φορά 50 g κοπροσωρών. Αποδεκτή μέθοδος θεωρείται αυτή που επιτυγχάνει ανάκτηση σε όλα τα επίπεδα φόρτισης πάνω από 80-90% της ποσότητας που εφαρμόστηκε. Τα τεστ ανάκτησης των δύο μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν επιβεβαίωσαν την ικανότητα τους να εκχυλίζουν υπολείμματα των παραπάνω φαρμάκων και των μεταβολιτών τους με επίπεδα ανάκτησης > 80%

2.10.2. Εκχύλιση thiabendazole από κοπρωσώρους

Ζυγίστηκαν 5 g κοπριάς από κάθε επανάληψη δείγματος για τις 4 μεταχειρίσεις. Τοποθετήθηκαν σε Falcon των 50 ml και προστέθηκαν 10 ml μεθανόλης σε κάθε ένα από αυτά. Ακολούθησε ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 300 rpm για 1 ώρα. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 7.500 rpm για 5 λεπτά και συλλογή του υπερκειμένου σε μπουκάλια γυάλινα των 20 ml. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλη μία φορά και ακολούθησε διήθηση του υπερκειμένου διαμέσου φίλτρου σύριγγας με πόρους 0,45 μm σε HPLC vials. Το διήθημα αναλύθηκε για υπολείμματα thiabendazole σε σύστημα HPLC-UV όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.10.3. Εκχύλιση albendazole, albendazole sulfone, albendazole sulfoxide από κοπρωσώρους

Για την εκχύλιση του albendazole και του albendazole sulfone εφαρμόστηκε η μέθοδος εκχύλισης Quechers. Ζυγίστηκαν 5 g κοπριάς και μεταφέρθηκαν σε σωλήνες φυγοκέντρησης Teflon. Προστέθηκαν 5 ml δις-απιονισμένου νερού (HPLC grade) και 10 ml ακετονιτριλίου (ACN). Στη συνέχεια, έγινε έντονη ανάδευση με Vortex για 1 λεπτό. Ακολούθησε προσθήκη του πρώτου μίγματος αλάτων που περιείχε 4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl και 1,5 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ και έγινε ανάδευση με Vortex για 1 λεπτό. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση στις 7.500 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Συλλέχθηκε 1,5 ml υπερκειμένου σε σωλήνες Eppendorf των 1,5 ml και έγινε προσθήκη του δεύτερου μίγματος αλάτων που περιείχε 0,225 g $MgSO_4$ και 0,0375 g PSA. Έγινε ανάδευση με Vortex για 30 δευτερόλεπτα, φυγοκέντρηση στις 4.400 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και διήθηση του υπερκειμένου διαμέσου φίλτρου σύριγγας με πόρους 0,45 μm σε HPLC vials. Το διήθημα αναλύθηκε για υπολείμματα thiabendazole σε σύστημα HPLC-UV όπως περιγράφεται παρακάτω.

Για την εκχύλιση του albendazole sulfoxide, ζυγίστηκαν 5 g σε κωνικές φιάλες των 100 ml και προστέθηκαν 10 ml ακετονιτριλίου. Στη συνέχεια, καλύφθηκαν με

αλουμινένια διαφάνεια και τοποθετήθηκαν για ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 300 rpm για 1 ώρα. Με το τέλος της ανάδευσης, έγινε συλλογή του υπερκείμενου σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης Teflon. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλη μία φορά. Στην συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στους πλαστικούς σωλήνες Teflon στις 7500 rpm σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά (min). Έπειτα, συλλέχθηκε το υπερκείμενο όπου και διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου σύριγγας με πόρους 0,45 μm. Το διήθημα ακολούθως αναλύθηκε για υπολείμματα albendazole, albendazole sulfoxide και sulfone σε σύστημα HPLC-UV όπως περιγράφεται παρακάτω.

Για την εκχύλιση του albendazole sulfoxide, ζυγίστηκαν 5 g κοπριάς σε κωνικές φιάλες των 100 ml και προστέθηκαν 10 ml ακετονιτρίλιο. Στη συνέχεια, καλύφθηκαν με αλουμινένια διαφάνεια και τοποθετήθηκαν για ανάδευση σε οριζόντιο αναδευτήρα στις 300 rpm για 1 ώρα. Με το τέλος της ανάδευσης, έγινε συλλογή του υπερκείμενου σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης Teflon. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλη μία φορά. Στην συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στους πλαστικούς σωλήνες Teflon στις 7500 rpm (στροφές) σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά (min). Έπειτα, συλλέχθηκε το υπερκείμενο όπου και διηθήθηκε διαμέσου φίλτρου σύριγγας με πόρους 0,45 μm. Το διήθημα ακολούθως αναλύθηκε για υπολείμματα albendazole, albendazolesulfoxide και sulfone σε σύστημα HPLC-UV όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.10.4 Εκχύλιση fenbendazole, fenbendazole sulfone από κοπροσωρούς

Για την εκχύλιση των fenbendazole, fenbendazolesulfone εφαρμόστηκε η μέθοδος εκχύλισης Quechers, όπως περιγράφηκε στο 2.10.3.

2.10.5 Μέθοδος ανάλυσης υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για την ανάλυση των εκχυλισμένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε 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 για τα ανθελμινθικά φάρμακα ήταν 1 ml min^{-1} . Οι συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης τους περιγράφονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Συνθήκες ανάλυσης των ανθελμινθικών φαρμάκων σε σύστημα HPLC

Ανθελμινθικά Φάρμακα	Κινητή φάση	Αναλογία διαλυτών κινητής φάσης	Μήκος κύματος (nm)	Χρόνος έκλουσης (σε λεπτά)
Thiabendazole	ACN:NH ₃ (0,21%)	25:75	210	7,6
Albendazole	ACN:H ₃ PO ₄ (0,1%)	15:85 σε 30:70 (Gradient)	205	22,7
Albendazole sulfone	ACN:H ₃ PO ₄ (0,1%)	15:85 σε 30:70 (Gradient)	220	19,3
Albendazole sulfoxide	ACN:H ₃ PO ₄ (0,1%)	15:85 σε 30:70 (Gradient)	220	8,8
Fenbendazole	ACN:H ₃ PO ₄ (0,1%)	35:65	245	10,2
Fenbendazole sulfone	ACN:H ₃ PO ₄ (0,1%)	35:65	245	6

Η ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων των ανθελμινθικών φαρμάκων και των μεταβολιτών τους έγινε μέσω εξωτερικής πρότυπης καμπύλης που προετοιμάστηκε μετά από την έγχυση προτύπων διαλυμάτων των ουσιών σε μεθανόλη με συγκεντρώσεις 10 mg/L, 5 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L, 0,1

mg/L, 0,05 mg/L και 0,01 mg/L σε σύστημα HPLC-UV. Για δείγματα κοπριάς με συγκεντρώσεις φαρμάκων 50 mg/kg πραγματοποιήθηκε 1:100 αραιώση με μεθανόλη για το thiabendazole και με ακετονιτρίλιο για τα υπόλοιπα φάρμακα, έτσι ώστε να βρίσκονται εντός των ορίων των πρότυπων καμπυλών.

2.10.6 Υπολογισμός κινητικών παραμέτρων αποδόμησης

Ο υπολογισμός του χρόνου ημιζωής (DT_{50}), δηλαδή του χρόνου (σε ημέρες, εβδομάδες ή έτη) που απαιτείται για να διασπασθεί το 50% της αρχικής συγκέντρωσης ενός κτηνιατρικού φαρμάκου, έγινε μέσω των μοντέλων κινητικής που έχουν προταθεί από την ομάδα εργασίας FOCUS (FOCUS 2006). Συγκεκριμένα για τον υπολογισμό των DT_{50} 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 2). Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα R για τον υπολογισμό των παραμέτρων των εξισώσεων των μοντέλων κινητικής και το σχεδιασμό των διαγραμμάτων. Τα διφασικά μοντέλα κινητικής, χρησιμοποιήθηκαν μόνο στις περιπτώσεις όπου το μοντέλο SFO δεν περιέγραφε με ικανοποιητική ακρίβεια ($\chi^2 > 15\%$) την κινητική αποδόμησης των κτηνιατρικών φαρμάκων.

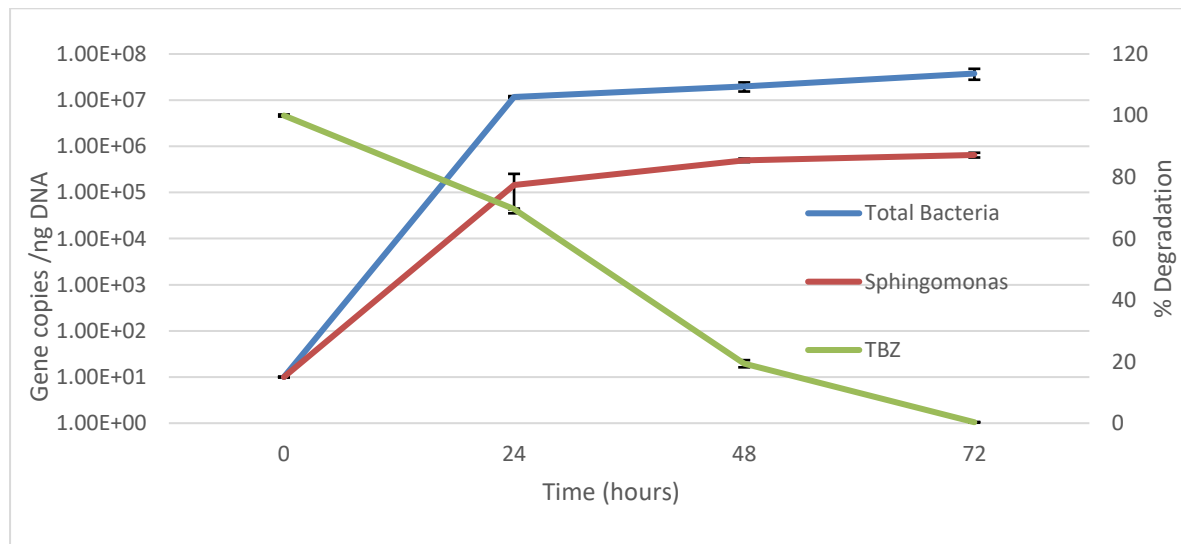
Πίνακας 2: Οι μαθηματικές εξισώσεις των μοντέλων κινητικής για τη διάσπαση των κτηνιατρικών φαρμάκων και οι εξισώσεις υπολογισμού του χρόνου ημιζωής τους.

Μοντέλο	Μαθηματική εξίσωση	Υπολογισμός Ημιζωής
Single first order (linear) (SFO)	$C = C_0e^{-kt}$	$t_{1/2} = \ln 2/K$
Hockey Stick (HS) for $t \leq t_b$	$C = C_0e^{-K_1t}$	$t_{1/2} = \ln 2/K_1$
	$C = C_0e^{-k_1t}e^{-k_2(t-t_b)}$ for $t > t_b$	$t_{1/2} = t_b + (\ln 2 - k_1t_b)/k_2$
Bi-exponential (DFOP)	$C = C_0(ge^{-k_1t} + (1-g)e^{-k_2t})$	Iterative method

3. Αποτελέσματα

3.1 Καταμέτρηση βακτηριακού πληθυσμού για εφαρμογή του στην κοπριά

Για να μπορέσει η βακτηριακή κοινοπραξία να εφαρμοστεί στην κοπριά, πρέπει ο βακτηριακός πληθυσμός να έχει την μέγιστη αποδομητική του ικανότητα, ευρισκόμενος στην εκθετική φάση ανάπτυξης, έχοντας αποδομήσει περίπου το 50-60% του thiabendazole στην υγρή καλλιέργεια. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1 με βάση τα αποτελέσματα της q-PCR, αυτό εντοπίζεται στις 48 ώρες μετά από την ανακαλλιέργεια.

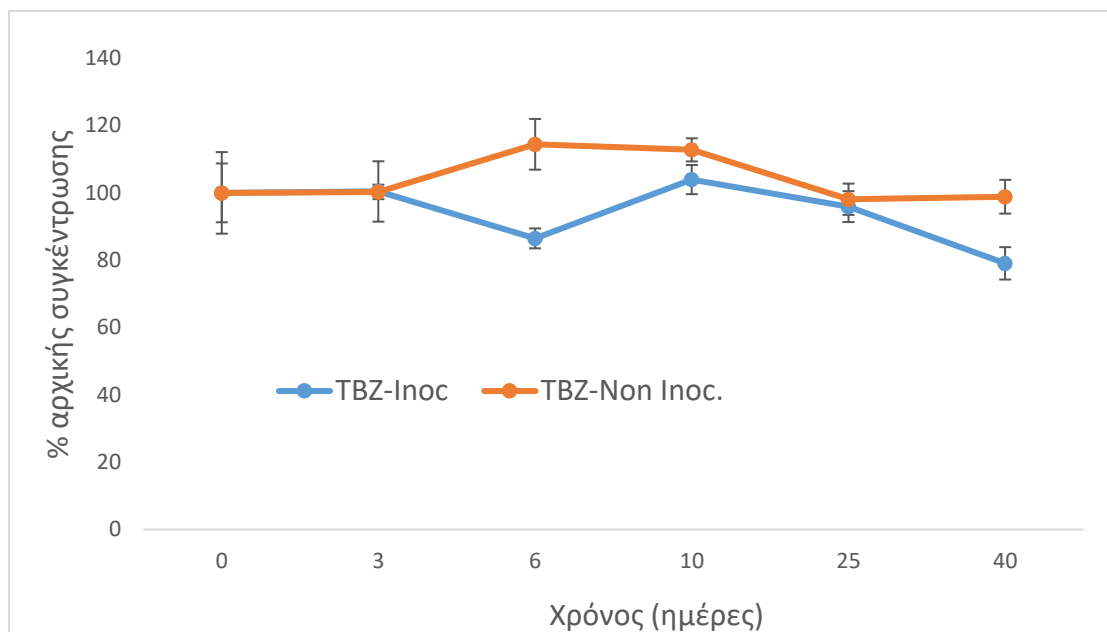


Διάγραμμα 1: Η αποδόμηση του thiabendazole (TBZ, πράσινη γραμμή) και οι μεταβολές του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου 16S rRNA του Sphingomonas και του συνόλου των βακτηρίων της κοινοπραξίας.

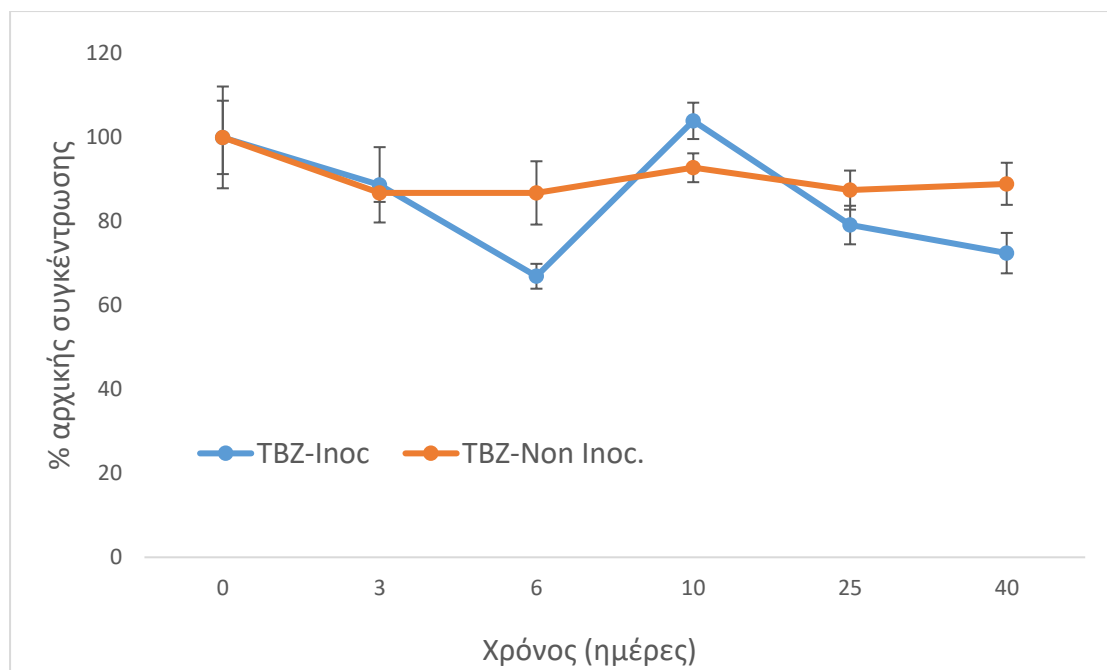
3.2 Αποδόμηση και μεταβολισμός thiabendazole

Στα Διαγράμματα 2 και 3 απεικονίζονται τα ποσοστά αποικοδόμησης του thiabendazole σε κοπροσωρούς που περιείχαν το ανθελμινθικό σε συγκεντρώσεις 50 μg/g και 0.5 μg/g αντίστοιχα και εμβολιάστηκαν ή δεν

εμβολιάστηκαν με την μικροβιακή κοινοπραξία. Γενικότερα και για τα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων του thiabendazole καταγράφηκαν περιορισμένες διαφορές στην αποδόμηση του thiabendazole μεταξύ εμβολιασμένων και μη εμβολιασμένων κοπροσωρών με ελαφρώς μικρότερες τιμές DT₅₀ να καταγράφονται στους εμβολιασμένους κοπροσωρούς (Πίνακας 3). Ειδικότερα οι τιμές DT₅₀ για το thiabendazole στις μη εμβολιασμένες μεταχειρίσεις ήταν > 365 ημέρες ενώ στις αντίστοιχες εμβολιασμένες κυμάνθηκαν από 170.8 ως 183.3 ημέρες στα επίπεδα 0.5 και 50 mg/kg thiabendazole αντίστοιχα. Παρόλα αυτά η αποδόμηση του thiabendazole και στις εμβολιασμένες μεταχειρίσεις δεν ολοκληρώθηκε και έφτασε σε επίπεδα από 20-30%.



Διάγραμμα 2: Η αποδόμηση του thiabendazole σε κοπροσωρούς που φορτίστηκαν με 50 µg/g thiabendazole και ακολούθως εμβολιάστηκαν (inoc) ή όχι (non inoc) με την βακτηριακή κοινοπραξία.



Διάγραμμα 3: Η αποδόμηση του thiabendazole σε κοπροσωρούς που φορτίστηκαν με 0.5 μg/g thiabendazole και ακολούθως εμβολιάστηκαν (inoc) ή όχι (non inoc) με την βακτηριακή κοινοπραξία

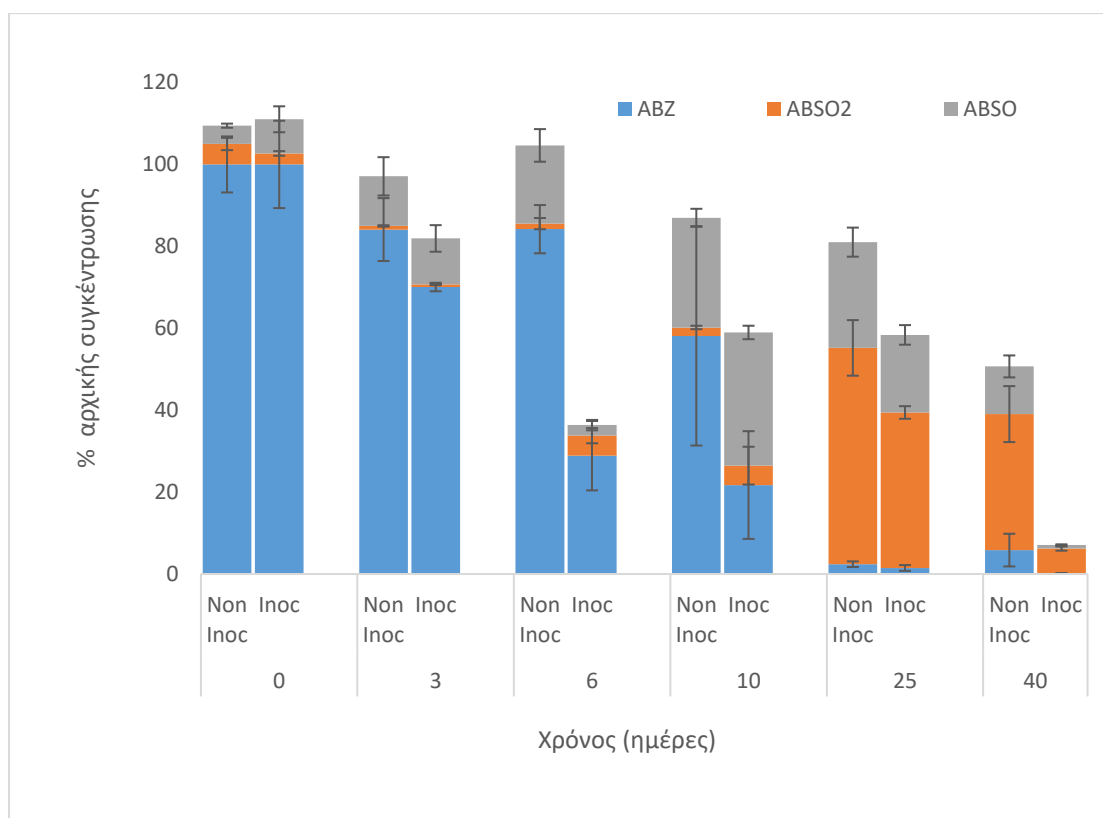
Πίνακας 5: Κινητικοί παράμετροι για την αποδόμηση του thiabendazole στις μεταχειρίσεις κοπριάς

Μεταχειρίσεις	Μοντέλο	K_{deg} (days ⁻¹)	DT ₅₀ (days)	DT _{90s} (days)	χ^2 (%)
Μη εμβολιασμένη (50 μg/g)	SFO	0,004469	255,1	>365	6,39
Εμβολιασμένη (50 μg/g)	SFO	0,00378	183,3	>365	8,56
Μη εμβολιασμένη (0.5 μg/g)	SFO	0,00163	>365	>365	5,67
Εμβολιασμένη (0.5 μg/g)	SFO	0,00406	170,8	>365	4,22

3.3 Αποδόμηση και μεταβολισμός του albendazole

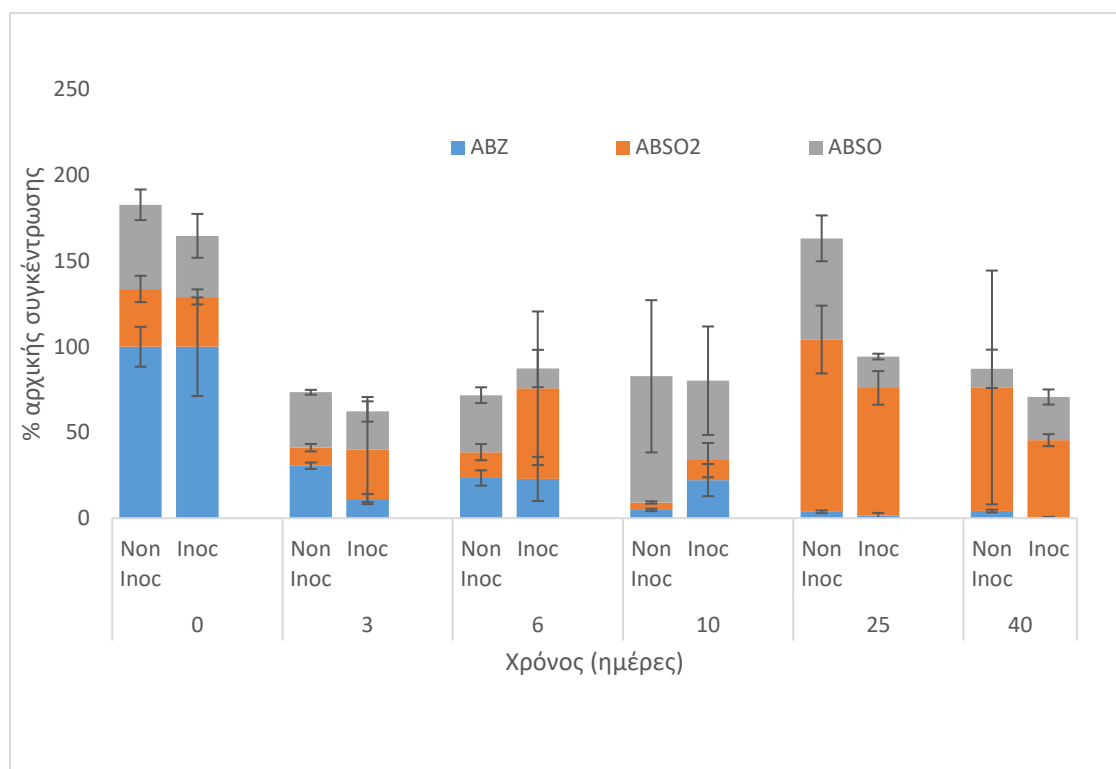
Στο Διάγραμμα 4 απεικονίζεται η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του albendazole σε albendazole sulfoxide και albendazole sulfone σε κοπριές φορτισμένες με 50 mg/kg albendazole οι οποίες εμβολιάστηκαν ή όχι με την βακτηριακή κοινοπραξία. Γενικότερα παρατηρήθηκε μετατροπή του albendazole

στις οξειδωμένες μορφές του albendazole sulfoxide και albendazole sulfone η οποία ολοκληρώθηκε ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό το κοπροσωρού ή όχι στις 25 ημέρες. Γενικότερα αν εστιάσουμε στη μητρική ουσία καταγράφηκε μια ταχύτερη αποδόμηση του albendazole στα εμβολιασμένα σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα εδάφη με DT₅₀ 4.6 και 10.3 ημέρες αντίστοιχα (Πίνακας 4). Αναφορικά με τα μεταβολικά προϊόντα που ανιχνεύθηκαν παρατηρήθηκαν διαφορετικά πρότυπα στις δύο μεταχειρίσεις καθώς στα εμβολιασμένα δείγματα αποδομήθηκε πλήρως το albendazole sulfoxide ενώ παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά αποδόμησης και του albendazole sulfone. Αντίθετα με την ολοκλήρωση του πειράματος στα μη εμβολιασμένα δείγματα εντοπίστηκαν τόσο η μητρική ουσία όσο και τα δύο οξειδωμένα παράγωγα του με το albendazole sulfoxide να κυριαρχεί (Διάγραμμα 4).



Διάγραμμα 4: Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του albendazole σε albendazole sulfoxide (ALBSO) και albendazole sulfone (ALBSO₂) σε κοπροσωρούς που είχαν φορτιστεί με 50 μg/g albendazole και εμβολιάστηκαν (inoc) ή δεν εμβολιάστηκαν (Non Inoc) με την βακτηριακή κοινοπραξία.

Στο Διάγραμμα 5 απεικονίζεται η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του albendazole σε albendazole sulfoxide και albendazole sulfone σε κοπροσωρούς φορτισμένους με 0.5 mg/kg albendazole οι οποίοι εμβολιάστηκαν ή όχι με την βακτηριακή κοινοπραξία. Γενικότερα παρατηρήθηκε μεταβολισμός της μητρικής ουσίας σε albendazole sulfoxide, το οποίο εμφάνισε τις υψηλότερες τιμές του στις 10 ημέρες, και ακολούθως σε albendazole sulfone το οποίο εμφάνισε τις υψηλότερες τιμές του στις 25 και 40 ημέρες. Η αποδόμηση της μητρικής ουσίας ήταν ταχύτερη ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό ή όχι με την βακτηριακή κοινοπραξία με τιμές DT₅₀ 2.3 και 4.6 ημέρες στα εμβολιασμένα και μη εμβολιασμένα δείγματα κοπροσωρών (Πίνακας 4).



Διάγραμμα 5: Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του albendazole σε albendazole sulfoxide (ALBSO) και albendazole sulfone (ALBSO2) σε κοπροσωρούς που είχαν φορτιστεί με 50 μg/g albendazole και εμβολιάστηκαν (inoc) ή δεν εμβολιάστηκαν (Non Inoc) με την βακτηριακή κοινοπραξία.

Πίνακας 4: Κινητικοί παράμετροι για την αποδόμηση του albendazole στις τέσσερις μεταχειρίσεις.

Μεταχειρίσεις	Μοντέλο	K_{deg} (days ⁻¹)	DT ₅₀ (days)	DT ₉₀ (days)	χ^2 (%)
Μη εμβολιασμένη (50 µg/g)	SFO	0,0674	10,3	34,2	1,36
Εμβολιασμένη (50 µg/g)	SFO	0,1499	4,64	15,4	1,36
Μη εμβολιασμένη (0.5 µg/g)	SFO	0,3199	3,16	9,19	4,46
Εμβολιασμένη (0.5 µg/g)	SFO	0,5197	2,34	5,40	3,75

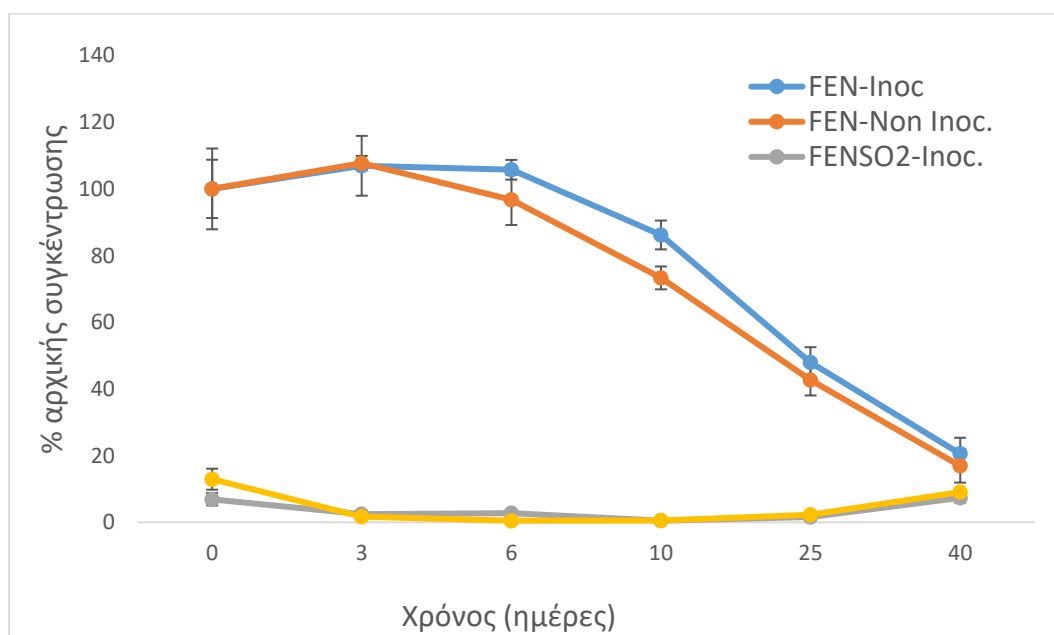
Με δεδομένο ότι τόσο το albendazole sulfoxide όσο και το albendazole sulfone εμφανίζουν ανθελμινθική δράση πραγματοποιήσαμε και υπολογισμό DT₅₀ για τα συνολικά δραστικά υπολείμματα του albendazole που αποτελούν το άθροισμα των albendazole, albendazole sulfoxide, albendazole sulfone σε κάθε χρονικό σημείο (Πίνακας 5). Συνολικά παρατηρήθηκαν χαμηλότερες τιμές DT₅₀ στα εμβολιασμένα δείγματα κοπροσωρών (27.2-100.2 ημέρες) σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα δείγματα (51.0 ως >365 ημέρες).

Πίνακας 5: Κινητικοί παράμετροι συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του albendazole

Μεταχειρίσεις	Μοντέλο	K_{deg} (days ⁻¹)	DT ₅₀ (days)	DT ₉₀ (days)	χ^2 (%)
Μη εμβολιασμένη (50 µg/g)	SFO	0,0136	51,0	169,5	4,58
Εμβολιασμένη (50 µg/g)	SFO	0,0400	27,2	77,1	2,89
Μη εμβολιασμένη (0.5 µg/g)	SFO	7,04E-12	>365	>365	27,5
Εμβολιασμένη (0.5 µg/g)	SFO	0,0069	100,2	332,8	17,7

3.4 Αποδόμηση και μεταβολισμός του fenbendazole

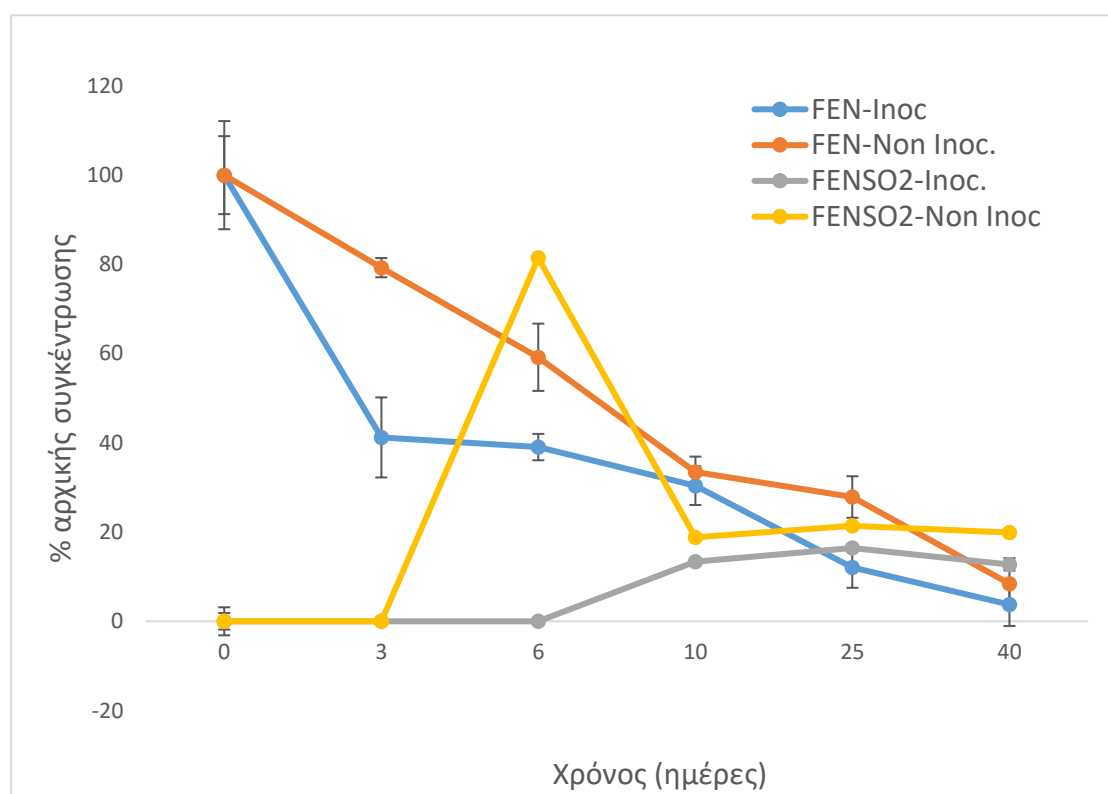
Στο Διάγραμμα 6 απεικονίζεται η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του fenbendazole σε fenbendazole sulfone σε κοπριές φορτισμένες με 50 $\mu\text{g/g}$ fenbendazole οι οποίες εμβολιάστηκαν ή όχι με την βακτηριακή κοινοπραξία. Γενικότερα παρατηρήθηκε αποδόμηση του fenbendazole στις 40 ημέρες που ήταν η διάρκεια του πειράματος τόσο στα εμβολιασμένα όσο και στα μη εμβολιασμένα δείγματα κοπροσωρών. Αντίστοιχα οι τιμές DT_{50} στα εμβολιασμένα και μη εμβολιασμένα δείγματα κοπροσωρών ήταν 22 και 17.2 ημέρες αντίστοιχα (Πίνακας 6). Η αποδόμηση του fenbendazole στα δείγματα που φορτίστηκαν με 50 $\mu\text{g/g}$ μητρικής ουσίας συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό χαμηλών συγκεντρώσεων του fenbendazole sulfone το οποίο ανιχνεύθηκε στους κοπροσωρούς ως και τις 40 ημέρες (Διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6: Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του fenbendazole σε fenbendazole sulfone ($FENSO_2$) σε κοπροσωρούς που είχαν φορτιστεί με 50 $\mu\text{g/g}$ fenbendazole και εμβολιάστηκαν (inoc) ή δεν εμβολιάστηκαν (Non Inoc) με την βακτηριακή κοινοπραξία.

Στο Διάγραμμα 7 απεικονίζεται η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του fenbendazole σε fenbendazole sulfone σε κοπριές φορτισμένες με 0.5 mg/kg fenbendazole οι

οποιες εμβολιάστηκαν ή όχι με την βακτηριακή κοινοπραξία. Γενικότερα παρατηρήθηκε ταχύτερη αποδόμηση του fenbendazole στα εμβολιασμένα δείγματα (DT50 = 2.9 ημέρες) σε σχέση με τα αντίστοιχα μη εμβολιασμένα δείγματα (DT50 = 6.7 ημέρες). Η αποδόμηση του fenbendazole και στις δύο περιπτώσεις συνοδεύτηκε από τον σχηματισμό fenbendazole sulfone με τις υψηλότερες τιμές να ανιχνεύονται στα μη εμβολιασμένα δείγματα 6 ημέρες μετά την εφαρμογή της μητρικής ουσίας. Αντίθετα το fenbendazole sulfone σχηματίστηκε με βραδύτερους ρυθμούς και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στα εμβολιασμένα δείγματα.



Διάγραμμα 7: Η αποδόμηση και ο μεταβολισμός του fenbendazole σε fenbendazole sulfone (FENSO2) σε κοπροσωρούς που είχαν φορτιστεί με 0.5 μg/g fenbendazole και εμβολιάστηκαν (inoc) ή δεν εμβολιάστηκαν (Non Inoc) με την βακτηριακή κοινοπραξία

Πίνακας 6: Κινητικοί παράμετροι για την αποδόμηση του fenbendazole στους κοπροσωρούς

Μεταχειρίσεις	Μοντέλο	K_{deg} (days ⁻¹)	DT ₅₀ (days)	DT ₉₀ (days)	χ^2 (%)
Μη εμβολιασμένη (50 μg/g)	SFO	0,0403	17,2	57,2	7,10
Εμβολιασμένη (50 μg/g)	SFO	0,0315	22,0	73,0	5,92
Μη εμβολιασμένη (0.5 μg/g)	SFO	0,1042	6,65	22,1	5,67
Εμβολιασμένη (0.5 μg/g)	SFO	0,3618	2,91	7,36	8,79

Δεδομένης της ανθελμινθικής δράσης του fenbendazole sulfone προσδιορίστηκαν οι τιμές DT₅₀ και τα συνολικά δραστικά υπολείμματα του fenbendazole που αποτελούν το άθροισμα των fenbendazole, fenbendazole sulfone. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 7, παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές DT₅₀ στους κοπροσωρούς που φορτίστηκαν με την υψηλή συγκέντρωση fenbendazole (50 μg/g) σε σχέση με την χαμηλότερη συγκέντρωση (0.5 μg/g) ανεξάρτητα από τον εμβολιασμό ή όχι με την βακτηριακή κοινοπραξία. Από την άλλη μεριά δεν παρατηρήθηκε σταθερό πρότυπο επίδρασης του εμβολιασμού στη αποδόμηση των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του fenbendazole. Έτσι στα δείγματα που φορτίστηκαν με υψηλές συγκεντρώσεις fenbendazole δεν παρατηρήθηκε επιτάχυνση της αποδόμησης των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων ύστερα από τον εμβολιασμό με την βακτηριακή κοινοπραξία (DT50 = 22.9 ημέρες) σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα δείγματα (DT50 = 17.5 ημέρες). Αντίθετα στα δείγματα που φορτίστηκαν με χαμηλές συγκεντρώσεις fenbendazole παρατηρήθηκε επιτάχυνση της αποδόμησης των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων ύστερα από τον εμβολιασμό με τη βακτηριακή κοινοπραξία (DT50 = 2.2 ημέρες) σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα δείγματα (DT50 = 7.1 ημέρες).

Πίνακας 7: Κινητικοί παράμετροι συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του fenbendazole

Μεταχειρίσεις	Μοντέλο	K_{deg} (days ⁻¹)	DT ₅₀ (days)	DT ₉₀ (days)	x ² (%)
Μη εμβολιασμένη (50 µg/g)	SFO	0,0397	17,5	58,1	5,11
Εμβολιασμένη (50 µg/g)	SFO	0,0303	22,9	76,0	6,43
Μη εμβολιασμένη (0.5 µg/g)	SFO	0,0405	7,1	56,8	7,45
Εμβολιασμένη (0.5 µg/g)	SFO	0,3128	2,2	48,3	9,61

4. Συζήτηση- συμπεράσματα

4.1 Συζήτηση

Φαρμακευτικές ουσίες που χορηγούνται σε παραγωγικά ζώα όπως τα ανθελμινθικά έχουν δημιουργήσει μια νέα τάξη ρύπων που αποτελεί κίνδυνο για το περιβάλλον (Huber et al., 2012). Συνεπώς είναι απαραίτητη η εύρεση μεθόδων για την πλήρη απομάκρυνση των υπολειμμάτων τους από το κύριο μέσο μεταφοράς τους στο περιβάλλον, την κοπριά.

Μέχρι τώρα λίγες μελέτες έχουν γίνει πάνω στην απομάκρυνση των βενζιμιδαζολικών από περιβαλλοντικά υποστρώματα (Wang et al., 2010). Η αποικοδόμησή τους μέσω της χρήσης φυτών είναι ένας τρόπος που πρόσφατα άρχισε να μελετάται σε έδαφος αλλά ακόμα όχι σε υπόστρωμα κοπριάς. Το ίδιο συμβαίνει με την απομάκρυνση των ανθελμινθικών μέσω του βιοεμπλουτισμού, που είναι ως τώρα ένα πεδίο για το οποίο δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες.

Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος, η βακτηριακή κοινοπραξία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη εμφάνισε ικανότητα να αποδομεί το thiabendazole όταν αυτή εμβολιάστηκε σε κοπροσωρούς χωρίς όμως να επιφέρει πλήρη απομάκρυνση του thiabendazole εντός των 40 ημερών που διήρκησε το πείραμα. Αντίθετα σε προηγούμενες μελέτες η ίδια βακτηριακή

κοινοπραξία εφαρμοζόμενη, στα ίδια επίπεδα εμβολίου, σε εδάφη ρυπασμένα με thiabendazole κατάφερε να αποδομήσει πλήρως και αποτελεσματικά ως και 400 μg/g του παρασιτοκτόνου (Paradourou et al., 2018). Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο του υποστρώματος στην επιτυχία του μικροβιακού εμπλουτισμού. Η κοπριά είναι ένα υπόστρωμα με πολύ μεγάλο οργανικό φορτίο όπου περιέχει πλήθος μικροοργανισμών. Γενικά, η επιτυχία του βιοεμπλουτισμού μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, όπως από τις άγνωστες αλληλεπιδράσεις που έχει η βακτηριακή κοινοπραξία με τους ενδογενείς βακτηριακούς πληθυσμούς της κοπριάς, το pH, την θερμοκρασία, την συγκέντρωση των εισαχθέντων φαρμάκων, το υψηλό οργανικό φορτίο, η υγρασία και η μείωση του πληθυσμού της βακτηριακής κοινοπραξίας (Cycon, 2017). Οι σημαντικότεροι παράγοντες φαίνεται να είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδογενών και εμβολιασμένων μικροοργανισμών, όπως είναι ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά και η ικανότητα των εμβολιαζόμενων βακτηριακών πληθυσμών να επιβιώσουν στο περιβάλλον που εισάγονται (Cycon, 2017). Συνεπώς, είναι αναγκαία η διεξαγωγή μελετών πάνω στην επίδραση που έχει η ενδογενής μικροβιακή κοινότητα της κοπριάς στο "εισαγόμενο" βιοεμβόλιο.

Αναφορικά με το albendazole, εμβολιασμός των κοπροσωρών με την βακτηριακή κοινοπραξία οδήγησε σε επιτάχυνση της αποδόμησης και του μεταβολισμού του συγκεκριμένου παρασιτοκτόνου αλλά και των οξειδωμένων παραγώγων του albendazole sulfoxide και sulfone που εμφανίζουν επίσης ανθελμινθική δράση. Από την άλλη μεριά δεν παρατηρήθηκε συστηματική επιτάχυνση της αποδόμησης του fenbendazole και των συνολικών δραστικών υπολειμμάτων του στους κοπροσωρούς κατά την εφαρμογή του βιολογικού εμπλουτισμού.

4.2 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη προκύπτει πως ο βιολογικός εμπλουτισμός κοπρωσών επιβαρυσμένων με τα βενζιμιδαζολικά thiabendazole, fenbendazole, albendazole με βακτηριακή κοινοπραξία που έχει την ικανότητα να αποδομεί το thiabendazole οδήγησε σε μερική ή σημαντική επιτάχυνση της αποδόμησης των thiabendazole και albendazole αλλά όχι του fenbendazole. Συνεπώς, για την χρήση της βακτηριακής κοινοπραξίας ως μέσο αποτοξικοποίησης περιβαλλοντικών υποστρωμάτων από τα εν λόγω κτηνιατρικά φάρμακα είναι αναγκαίο να γίνουν περαιτέρω μελέτες.

4.3 Μελλοντικές προσεγγίσεις

Με βάση τα προαναφερθέντα συμπεράσματα μελλοντικές ερευνητικές προσεγγίσεις θα εστιάσουν: 1) στην μελέτη του βιοεμπλουτισμού αποστειρωμένων δειγμάτων κοπριάς με την εν λόγω βακτηριακή κοινοπραξία για να διαπιστωθεί εάν οι αλληλεπιδράσεις της με άλλα βακτήρια αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την αποικοδόμηση των προαναφερθέντων ανθελμινθικών, 2) στην μελέτη του βιοεμπλουτισμού μίγματος κοπριάς και εδάφους με την εν λόγω βακτηριακή κοινοπραξία για την αποδοτικότερη αποικοδόμηση των thiabendazole, albendazole, fenbendazole.

5. Βιβλιογραφία

- Aceves, J., Erlij, D., Martínez-Marañón, R. (1970). The mechanism of the paralysing action of tetramisole on *Ascaris* somatic muscle. *British Journal of Pharmacology*, 38(3), 602-607. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1970.tb10601.x
- Audus, L. J. (1960). Microbiological breakdown of herbicides in soils, in: *Herbicides in the Soil*, pp. 1–19, Blackwell, Oxford.
- 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
- Boxall, A., Sherratt, T., Pudner, V., Pope, L. (2007). A screening level index for assessing the impacts of veterinary medicines on dung flies. *Environmental Science & Technology*, 41(7), 630-5. DOI: 10.1021/es0618705
- Burrows, H.D., Canle, L., Santaballa, J.A., Steenken, S., (2002). Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 62(2), 71-108.
- Brander, G.C., Pugh, D.M., Bywater, R.J., Jenkins, W.L. (1991), *Veterinary applied pharmacology and therapeutic*, Bailliere Tindall, 5th edition
- Crosby, D.G. (1970). The non-biological degradation of pesticides in soil. In *Pesticides in the Soil*. Intern. Symp., Michigan State University. p. 86
- Cycon, M., Mrozikb, A., Piotrowska-Seget, P. (2017). Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere*, 172, 52-71. [https:// dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.129](https://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.129)
- Danaher, M., De Ruyck, H., Crooks, S.R., Dowling, G., O'Keeffe, M. (2007). Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices. *Journal of Chromatology B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 845(1), 1-37. DOI: 10.1016/j.jchromb .2006.07. 046
- Daughton, C.G, Ternes, T.A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment:agents of subtle change?. *Environmental Health Perspectives*, 107(6),907-38
- Delescluse, C., Ledirac, N., Li, R., Piechocki, M.P., Hines, R.N., Gidrol, X., Rahmani, R. (2001). Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress,

and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. *Biochemical Pharmacology*, 61(4), 399-407. DOI: 10.1016/s0006-2952(00)00562-1

De Ruyck, H., Development of confirmatory methods and disposition of some veterinary drugs in food. Ph.D. Theses.

Diaz, E. (2008). *Microbial Biodegradation Genomics and Molecular* Madrid: Caister Academic Press.

García-galán, M.J., Garrido, T., Fraile, J., Ginebreda, A., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D. (2010). 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. doi: 10.1007/s00216-010-4367-3

Gosselin, R.B., Smith, R.P., Hodge, H.C. (1984). *Clinical Toxicity of Commercial Products* (5th ed.), Williams & Wilkins, Baltimore/London.

Gyurik, R.J., Chow, A.W., Zaber, B., ..., Villani, A.J., Petka, L.A., Parish, R.C. (1981). Metabolism of albendazole in cattle, sheep, rats and mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 9(6), 503-8.

Hamaker, J.W. (1975). The Interpretation of Soil Leaching Experiments. *Environmental Dynamics of Pesticides*, 6, 115-133

Imming, P., Sinning, C., Meyer, A. (2006). Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(10), 821-34. DOI: 10.1038/nrd2132

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. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(1),43-8. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1998.tb03303.x

Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., ..., Westlund, B., Sluder, A., Mäser, P. (2008). A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes, *Nature*, 452, 176–180. DOI: 10.1038/nature06722

Katagi, T., (2004). Photodegradation of Pesticides on Plant and Soil Surfaces. In: Ware G.W. (eds) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Continuation of Residue Reviews, vol 182. Springer

Kay, P., Blackwell, P., Boxall A. (2005a). Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land. *Chemosphere*, 60, 497 - 507.

Kim, K-R., Owens, G., Kwon, S-I., So, K-H., Lee, D-B., Ok, Y.S. (2011). Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water, Air, & Soil Pollution*, 214, 163- 174.

Kolz, A.C., Ong, S.K., Moorman, T.B. (2005) Sorption of tylosin onto swine manure. *Chemosphere*, 60(2):284-9. DOI: 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>

Kreuzig R., Holtge S. (2005). Investigations on the fate of sulfadiazine in manured soil: laboratory experiments and test plot studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 771 - 776.

Litskas, V.D., Karamanlis, X.N., Batzias, G.C., Tsiouris, S.E. (2013). Are the parasiticidal avermectins resistant to dissipation in the environment? The case of eprinomectin. *Environment International*, 60, 48-55. doi: 10.1016/j.envint.2013.07.017

Loke, P., MacDonald, A.S., Robb, A., Maizels, R.M., Allen, J.E. (2000). Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact. *European Journal of Immunology*, 30(9), 2669-78. DOI:10.1002/1521-4141(200009)30:9<2669::AID IMMU 2669 >3.0. CO;2-1

Martin, D., Bertasi, F., Colangelo, M.,, Satta, P., Thompson, Ceccherelli, V. (2005). Ecological impact of coastal defence structures on sediment and mobile fauna: Evaluating and forecasting consequences of unavoidable modifications of native habitats. *Coastal Engineering*, 52 (10-11), 1027-1051. <https://doi.org/10.1016/j.coastaleng.2005.09.006>

McKellar, Q.A., Scott, E. W. (1990). The benzimidazole anthelmintic agents-a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13, 223-247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1990.tb00773.x>

Min, W., Hu, J. (2013). Residue Analysis of Albendazole in Watermelon and Soil by Solid Phase Extraction and HPLC. *Journal Analytical Letters*, 47(2), 356-366.

Moenickes, S., Höltge, S., Kreuzig, R., Richter, O. (2011). Process dominance analysis for fate modeling of flubendazole and fenbendazole in liquid manure

and manured soil. *Science of the Total Environment*, 410-411, 226-34. doi: 10.1016/j.scitotenv

Molina, A.J., Merino, G., Prieto, J.G., Real, R., Mendoza, G., Alvarez, Al. (2007). Absorption and metabolism of albendazole after intestinal ischemia/reperfusion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(1),16-24. DOI: 10. 1016/ j.ejps. 2007.01.008

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>

Omirou, M., Dalias, P., Costa, C., Papastefanou, C., Dados, A., Ehaliotis, C., Karpouzas, D.G. (2012). Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: laboratory, column and field studies *Environmental Pollution*, 166, 31-9. doi: 10.1016/j.envpol.2012.03.001.

Papadopoulou, E., Genitsaris, S., Omirou, M., Perruchon, C., Stamatopoulou, A., Ioannides, I., Karpouzas, D. (2018). *Environmental Pollution*, 233,16-25. doi: 10.1016/ j.envpol.2017.10.021.

Parales, R.E., Ju, K., Rollefson, J., Ditty, J. (2008). Bioavailability, Chemotaxis, and Transport of Organic Pollutants. *Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-17-2

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, 1037–1043. DOI: 10.1124/mol.59.5.1037

Perruchon, C., Pantoleon, A., Veroutis, D., Gallego-Blanco, S., Martin-Laurent, F., Liadaki, K., Karpouzas, D.G. (2017). Characterization of the biodegradation, bioremediation and detoxification capacity of a bacterial consortium able to degrade the fungicide thiabendazole. *Biodegradation*, 28 (5-6), 383-394. DOI: 10.1007/s10532-017-9803-z

Prchal, L., Podlipná, R., Lamka, J., Dědková, T., Skálová, L., Vokřál, I., Lecová, L., Vaněk, T., Szotáková, B. (2016) Albendazole in environment: faecal concentrations in lambs and impact on lower development stages of helminths and seed germination. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(13), 13015-22. doi: 10.1007/s11356-016-6472-0

- Podlipná, R., Skálová, L., Seidlová, H., ..., 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, 214-224. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.06.105
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. (1999). Pharmacology, 4th Edition, Churchill.
- 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.
- Robatscher, P., Eisenstecken, D., Sacco, F., Pöhl, H., Berger, J., Zanella, A., Oberhuber, M. (2012). Diphenylamine residues in apples caused by contamination in fruit storage facilities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(9):2205-11. doi: 10.1021/jf204477c
- Robinson, M.W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L., Fairweather, I.A., 2004. Possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed.
- 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 doi:10.1016/j.vetpar.2008.10.006.
- Teeter, J.S., Meyerhoff, R.D. (2003). Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environmental Research*, 93(1), 45-51. DOI: 10.1016/s0013-9351(02)00086-5
- Tocco, D.J., Rosenblum, C., Martin, C.M., Robinson, H.J. (1966) Absorption, metabolism, and excretion of thiabendazole in man and laboratory animals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 9(1),31-9. DOI:10.1016/0041-008x(66)90027-5.
- United States Environmental Protection Agency, (2002).
- Van De Steene, J.C., Stove, C.P., Lambert, Willy 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. *Science of the Total Environment*, 408, 3448–3453.
- Wang, Z., Wang, Y., Gong, F., Zhang, J., Hong, Q., Li, S. (2010). Biodegradation of carbendazim by a novel actinobacterium *Rhodococcus jialingiae* djl-6-2. *Chemosphere*, 81(5), 639-44. doi: 10.1016/j.chemosphere.

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.

World Health Statistics. (2012). Retrieved 14/09/2019 from [https:// apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44844/9789241564441_eng.pdf;jsessionid=D488EB97A06E58DF869A5F64393ADB25?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44844/9789241564441_eng.pdf;jsessionid=D488EB97A06E58DF869A5F64393ADB25?sequence=1)

Κυδωνάκης, Γ. (2010). Πτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

Λύκας, Δ.Θ., Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (2009)