

## ΣΥΝΟΨΗ

Τα συνθετικά ανθελμινθικά (σΑΕ), χρησιμοποιούνται ευρέως για την πρόληψη και τη θεραπεία των παρασιτώσεων του γαστρεντερικού σωλήνα στα παραγωγικά ζώα, αλλά όπως οι περισσότερες χημικές ουσίες δεν απορροφώνται τελείως από τον οργανισμό με αποτέλεσμα να απεκκρίνονται με τα κόπρανα των ζώων στο περιβάλλον σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται σε επίπεδα  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  έως  $\text{mg Kg}^{-1}$ . Κατά συνέπεια, οι επιβαρυνόμενοι με σΑΕ κοπροσωροί όταν χρησιμοποιούνται ως λίπασμα στην πρωτογενή γεωργική παραγωγή προκαλούν ρύπανση του εδάφους και πιθανά των παρακείμενων φυσικών υδάτινων πόρων, μέσω απορροής. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει τις ανεπιθύμητες επιδράσεις των σΑΕ σε οργανισμούς μη-στόχους που διαβιούν σε βοσκοτόπους, όπως έντομα που σχετίζονται με την αποσύνθεση των κοπράνων και άλλους οργανισμούς που διαβιούν γενικότερα στο έδαφος. Ωστόσο, λίγα είναι μέχρι σήμερα γνωστά σχετικά με την περιβαλλοντική τους τύχη στο έδαφος και την επίδρασή τους στους μικροοργανισμούς του εδάφους. Ως εκ τούτου, κύριος στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σΑΕ, της ομάδας των βενζιμιδαζολικών, όπως το albendazole (ABZ) και της ομάδα των μακροκυκλικών λακτονών όπως τα ivermectin (IVM) και eprinomectin (EPM) και των μικροοργανισμών του εδάφους αλλά και να αξιολογήσει τη χρήση της βιοαποδόμησης ως μέσου μείωσης της περιβαλλοντικής έκθεσης σε αυτά τα σΑΕ. Για την επίτευξη αυτού του στόχου α) αξιολογήσαμε τον ρόλο των μικροοργανισμών του εδάφους στην αποδόμηση αυτών των σΑΕ στο έδαφος, β) διερευνήσαμε την επίδραση των σΑΕ στη λειτουργία & ποικιλότητα των μικροοργανισμών του εδάφους, και την πιθανή εμφάνιση νέων καταβολικών μηχανισμών από μικροοργανισμούς του εδάφους έναντι αυτών των ενώσεων γ) αξιολογήσαμε την ικανότητα των βακτηρίων που αποδομούν βενζιμιδαζολικά σΑΕ ως παράγοντες βιοαποκατάστασης για την απορρύπανση κοπροσωρών και εδάφους, και δ) απομονώσαμε εδαφογενή βακτηριακά στελέχη ικανά να αποδομήσουν το ABZ.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μελέτες σε αποστειρωμένα ή μη εδάφη (μέσω υποκαπνισμού) που συλλέχθηκαν από 12 εκτροφές αιγοπροβάτων με διαφορετικό ιστορικό χορήγησης ABZ, IVM ή EPM σε ζώα. Από κάθε μονάδα, συλλέχθηκαν εδάφη από το εσωτερικό των μονάδων (σειρά Α, υψηλή έκθεση) και από τους παρακείμενους βοσκοτόπους (σειρά Β, χαμηλή έκθεση). Θέσαμε τα ακόλουθα ερωτήματα: (α) Ποιος είναι ο ρόλος των μικροοργανισμών του εδάφους στην αποδόμηση των σΑΕ; (β) Η επανειλημμένη έκθεση των εδαφών στα σΑΕ οδηγεί σε επιταχυνόμενη βιοαποδόμησή τους; (γ) Ποιες φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους επηρεάζουν τη αποδόμηση των σΑΕ; Ο υποκαπνισμός του εδάφους μείωσε σημαντικά την αποδόμηση τόσο του ABZ ( $DT_{50} = 1,9$  vs  $4,33$  ημέρες), όσο και των IVM ( $34,5$  vs  $108,7$  ημέρες) και EPM ( $30$  vs  $121$  ημέρες) υποδηλώνοντας το βασικό ρόλο των μικροοργανισμών του εδάφους στη αποδόμηση αυτών των ενώσεων. Δεν ήταν εμφανής καμία σημαντική επιτάχυνση στην αποδόμηση των σΑΕ σε εδάφη από εκτροφές με ιστορικό χορήγησης ή σε εδάφη από τη σειρά Α έναντι της σειράς Β, γεγονός που υποδηλώνει ότι το επίπεδο προηγούμενης έκθεσης δεν ήταν επαρκές για να προκαλέσει επιταχυνόμενη βιοαποδόμησή των υπό μελέτη σΑΕ. Ο μετασχηματισμός του ABZ στα μεταβολικά του προϊόντα, ABZ-SO και ABZ-SO<sub>2</sub> παρατηρήθηκε τόσο στα υποκαπνισμένα όσο και στα μη υποκαπνισμένα δείγματα εδάφους αναδεικνύοντας το ρόλο τόσο βιοτικών όσο και αβιοτικών διεργασιών στην οξείδωση του ABZ σε σουλφοξείδια και σουλφόνες. Παρατηρήθηκαν σημαντικές θετικές και αρνητικές συσχετίσεις του ολικού οργανικού άνθρακα του εδάφους (TOC) και της αποδόμησης ABZ και IVM, αντίστοιχα. Η προσρόφηση στο έδαφος των σΑΕ αυξήθηκε με τη σειρά IVM > ABZ > EPM. Το TOC συσχετίστηκε επίσης με την αυξημένη προσρόφηση του IVM και του EPM στο έδαφος, αλλά όχι του ABZ, κάτι που υποστηρίζει το εύρημα της αντίθετης επίδρασης του TOC στην αποδόμηση IVM και ABZ.

Παράλληλα, διερευνήσαμε την πιθανή ικανότητα μιας βακτηριακής κοινοπραξίας που αποικοδομεί το thiabendazole (TBZ) να αποδομεί επίσης άλλα βενζιμιδαζολικά σΑΕ όπως το ABZ και το προϊόν μετασχηματισμού του, albendazole sulfoxide (ονομάζεται επίσης ricobendazole, RBZ), fenbendazole

(FBZ), flubendazole (FLU) και mebendazole (MBZ). Σε προκαταρκτικές δοκιμές σε υγρές καλλιέργειες, η κοινοπραξία ήταν πιο αποτελεσματική στην αποικοδόμηση ενώσεων με μικρότερους υποκαταστάτες του βενζιμιδαζολικού δακτυλίου (TBZ, ABZ, RBZ), παρά βενζιμιδαζόλες με πιο σύνθετους υποκαταστάτες (FBZ, FLU, MBZ). Ως επόμενο βήμα, διερευνήσαμε τη βιοαποδομητική ικανότητα της κοινοπραξίας σε περιττώματα προβάτου στα οποία είχε γίνει εφαρμογή ποσοτήτων TBZ, ABZ και FBZ σε επίπεδα συγκεντρώσεων 5 και 50 mg kg<sup>-1</sup>. Ο εμβολιασμός με την βακτηριακή κοινοπραξία ενίσχυσε την αποδόμηση όλων των ενώσεων, αλλά κυρίως του TBZ, και η αποτελεσματικότητά της βιοενίσχυσης επιταχύνθηκε με τον υποκαπνισμό των κοπράνων και της απουσίας της γηγενούς μικροβιακής κοινότητας. Η γηγενής μικροβιακή κοινότητα συμβάλλει επίσης στην αποικοδόμηση των βενζιμιδαζολικών σΑΕ, όπως υποδηλώνεται από τις σημαντικά χαμηλότερες τιμές DT<sub>50</sub> στα υποκαπνισμένα έναντι στα μη υποκαπνισμένα μη εμβολιασμένα δείγματα κοπρωσρών.

Το τρίτο μέρος αυτής της διατριβής αφορούσε στην διερεύνηση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων, ωφέλιμων ή επιζήμιων, μεταξύ των μελετηθέντων σΑΕ και των μικροοργανισμών του εδάφους. Δύο εδάφη που επιλέχθηκαν από τα εδάφη της αρχικής μελέτης, τα οποία αναγνωρίστηκαν ως «γρήγορα» ή «αργά», αναφορικά με την αποδόμηση των ABZ, IVM και EPM, υποβλήθηκαν σε επαναλαμβανόμενες εφαρμογές σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης (1 ή 2 mg kg<sup>-1</sup> και 10 ή 20 mg kg<sup>-1</sup>). Υποθέσαμε ότι αυτή διαδικασία εφαρμογής των σΑΕ θα οδηγήσει σε ενισχυμένη βιοαποδόμηση στα «γρήγορα» εδάφη και συσσώρευση των υπολειμμάτων των σΑΕ και τοξική επίδραση στην μικροβιακή κοινότητα στα «αργά» εδάφη. Η επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του ABZ είχε ως αποτέλεσμα διαφορετικά μοτίβα μετασηματισμού του σε μεταβολικά προϊόντα στα δύο εδάφη και σαφή επιτάχυνση της αποδόμησης του μόνο στο «γρήγορο» έδαφος. Αντίθετα, υπολείμματα του IVM και του EPM συσσωρεύτηκαν και στα δύο εδάφη χωρίς να παρατηρηθεί η επιτάχυνση της αποδόμησης. Επιπλέον, αξιολογήσαμε τις επιδράσεις των ABZ, IVM και EPM στη δραστηριότητα, την αφθονία και την ποικιλότητα των μικροοργανισμών που οξειδώνουν την αμμωνία (AOMs) καθώς και ευρύτερων μικροβιακών ομάδων (βακτήρια, μύκητες, κρεναρχαία και πρωτιστές). Το ABZ ήταν το μοναδικό σΑΕ που προκάλεσε μια σταθερή μείωση της αφθονίας των μυκήτων και κρεναρχαίων στα εδάφη. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αναστολή της νιτροποίησης και μείωση της αφθονίας των βακτηρίων (AOB) και αρχαίων που οξειδώνουν την αμμωνία (AOA) ύστερα από την εφαρμογή όλων των σΑΕ, ενώ τα βακτήρια *comptox* δεν έδειξαν καμία απόκριση στην παρουσία των σΑΕ στο έδαφος. Μεταταξινομική ανάλυση των διαφόρων μικροβιακών ομάδων στο έδαφος έδειξε δοσοεξαρτώμενες μεταβολές στην ποικιλότητα βακτηρίων, μυκήτων και πρωτίστων ως απόκριση στην εφαρμογή των σΑΕ. Το ABZ παρουσίασε την πιο σταθερή επίδραση στην αφθονία και την ποικιλότητα των περισσότερων μικροβιακών ομάδων που μελετήθηκαν.

Ως επόμενο βήμα αξιολογήσαμε βιολογικές προσεγγίσεις για την αποτοξικοποίηση κοπρωσρών επιβαρυσμένων με ανθελμινθικά φάρμακα με βασικό στόχο τον περιορισμό της διασποράς τους στο περιβάλλον. Στο πλαίσιο αυτό αξιολογήσαμε την ικανότητα μιας κοινοπραξίας βακτηρίων που αποδομούν το βενζιμιδαζολικό μυκητοκτόνο-ανθελμινθικό thiabendazole να αποδομεί και τα υπόλοιπα βενζιμιδαζολικά ανθελμινθικά albendazole, flubendazole, fenbendazole, mebendazole, ricobendazole. Αρχικές δοκιμές σε υγρές καλλιέργειες έδειξαν ότι η αποδομητική ικανότητα της βακτηριακής κοινοπραξίας περιορίζεται σε δομικά παρόμοια με το thiabendazole ανθελμινθικά όπως το albendazole και λιγότερο το fenbendazole. Περαιτέρω μελέτες σε κοπρωσρούς που εμβολιάστηκαν με την βακτηριακή κοινοπραξία έδειξαν ότι η κοινοπραξία ήταν ικανή να αποδομεί με αυξημένους ρυθμούς τα thiabendazole και albendazole, ιδιαίτερα σε κοπρωσρούς που είχαν αποστειρωθεί καταδεικνύοντας τον ανταγωνιστικό ρόλο που παίζει η γηγενής μικροβιακή κοινότητα στην εδραίωση και δράση εξωγενών μικροβιακών εμβολίων σε κοπρωσρούς. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν την προοπτική χρήσης του βιολογικού εμπλουτισμού για τον περιορισμό της διασποράς

των ανθελμινθικών στα γεωργικά εδάφη και ίσως καταδεικνύει την χρήση πιο εξειδικευμένων μικροοργανισμών στην αποδόμηση των μελετούμενων ανθελμινθικών φαρμάκων.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, στοχεύσαμε να απομονώσουμε εξειδικευμένους μικροοργανισμούς που να αποδομήσουν ταχύτατα το ABZ. Οι καλλιέργειες εμπλουτισμού από έδαφος που εμφάνισε ταχύτατη αποδόμηση του ABZ, οδήγησαν στην απομόνωση δύο βακτηριακών στελεχών ικανών να αποδομούν ταχύτατα το ABZ τα οποία με βάση της αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου τους ταξινομήθηκαν στο γένος *Acinetobacter*.

Συνολικά, τα ευρήματά μας οδηγούν σε αρκετά σημαντικά συμπεράσματα για την περιβαλλοντική τύχη των σΑΕ στα εδάφη και τις αλληλεπιδράσεις τους με τους μικροοργανισμούς του εδάφους. Συνοπτικά, η παρούσα διατριβή ανέδειξε τον σημαντικό ρόλο των μικροοργανισμών του εδάφους στην αποδόμηση των βασικότερων σΑΕ. Παράλληλα έδειξε ότι η έκθεση της εδαφικής μικροβιακής κοινότητας σε συνθετικά σΑΕ αναμένεται να έχει σημαντικές επιδράσεις στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους, τόσο σε επίπεδο ποικιλότητας όσο και σε επίπεδο λειτουργίας, με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα την αρνητική επίδραση όλων των σΑΕ και ειδικότερα του ABZ στην λειτουργία, ποικιλότητα και αφθονία των ΑΟΜ. Τα παραπάνω ευρήματα θα πρέπει να ληφθούν υπόψη σε ένα μελλοντικό ρυθμιστικό πλαίσιο που θα αφορά στην εκτίμηση της επικινδυνότητας των σΑΕ στο περιβάλλον. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η υπόθεση ότι ο βιολογικός εμπλουτισμός θα μπορούσε να αποτελέσει μια πιθανή λύση για την αποκατάσταση κοπροσωρών επιβαρυμένων με βενζιμιδαζολικά σΑΕ.