



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**«ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ: ΔΙΑΣΠΟΡΑ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΝΙΑΡΧΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

A.M.: 2009050035

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΒΕΝΙΕΡΗ ΔΑΝΑΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΚΑΛΟΓΕΡΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΧΑΝΙΑ

ΜΑΪΟΣ 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θέλω να ευχαριστήσω αρχικά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Βενιέρη Δανάη για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω μαζί της σε ένα περιβάλλον που προάγει την επιστημονική αναζήτηση και μάθηση, και για την εξαιρετική υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τη βοηθό του εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, κυρία Ιωσηφίνα Γουνάκη, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου έδωσε, καθώς και για τις συμβουλές της, οι οποίες είμαι βέβαιος ότι θα με ακολουθήσουν στη μετέπειτα πορεία μου. Ευχαριστώ τους κυρίους Διαμαντόπουλο Ευάγγελο και Καλογεράκη Νικόλαο, για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή της εργασίας.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την οικονομική και ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Χωρίς τη βοήθειά τους θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση των σπουδών μου, η οποία σηματοδοτείται με την παρούσα έρευνα. Τέλος, ευχαριστώ τους συμφοιτητές του εργαστηρίου για το κλίμα συναδελφικότητας που διατήρησαν κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων.

Εύχομαι ειλικρινά σε όλους τους μελλοντικούς φοιτητές να σταθούν τόσο τυχεροί όσο εγώ.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σταθερή ανάπτυξη της ανησυχίας στην επιστημονική κοινότητα και στο ευρύ κοινό, όσον αφορά την ανάπτυξη ανθεκτικότητας βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Το πρόβλημα αναδείχθηκε με την εμφάνιση πολυανθεκτικών βακτηρίων τα οποία, πλέον, συνιστούν μια νέα μορφή πανδημίας. Συγκεκριμένα, η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις ευρωπαϊκές χώρες με τα υψηλότερα επίπεδα μικροβιακής αντοχής, γεγονός που πιθανότατα συνδέεται με την υψηλή κατανάλωση αντιβιοτικών (ESAC).

Υπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας εντοπίζεται όχι μόνο σε κλινικά στελέχη αλλά και σε περιβαλλοντικά, γεγονός που καταδεικνύει την έκταση του προβλήματος. Η περιβαλλοντική διάσταση του προβλήματος, αφορά την μεταφορά και την εξάπλωση γονιδίων ανθεκτικότητας μέσω της χρήσης και της μεταφοράς αντιβιοτικών στο περιβάλλον. Τα πιο σημαντικά περιβάλλοντα, άμεσα επηρεαζόμενα από την ανθρωπογενή δραστηριότητα, είναι οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και τα εκτροφεία ζώων (Pruden & Arabi 2012).

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν ο έλεγχος της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά περιβαλλοντικών βακτηριακών στελεχών, καθώς και η απομόνωση και ταυτοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας. Η δειγματοληψία έγινε κατά τους μήνες Μάιο, Ιούνιο και Σεπτέμβριο του 2014, από θαλασσινό νερό, είσοδο και έξοδο δύο εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, νερό ιδιωτικών πισινών και μίας πισίνας αθλητικής εγκατάστασης, και από τα κόπρανα ενός ορνιθοτροφείου, στην ευρύτερη περιοχή των Χανίων. Τα στελέχη που απομονώθηκαν ανήκουν στις οικογένειες *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae* και *Enterococcaceae*. Οι αντιβιοτικές ουσίες που εξετάστηκαν είναι: η *Ampicillin* (Penicillins), η *Cefaclor* (2^{ns} γενιάς Cephalosporine), η *Imipenem* (Carbapenems) και η *Tetracycline*. Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών εξετάστηκε βάσει της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την χαρτογράφηση της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών είναι η μικρομέθοδος αραιώσεων σε ζωμό (Broth Microdilution Method), βάσει πρωτοκόλλου CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Ακολούθησε ανίχνευση των σημαντικότερων γονιδίων ανθεκτικότητας στα απομονωμένα στελέχη, μέσω της απομόνωσης του γενετικού υλικού τους και στη συνέχεια μέσω της μεθόδου Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR – Polymerase Chain Reaction), για την απομόνωση γνωστών τμημάτων του γονιδιώματος.

Στην *Ampicillin* εμφανίστηκε η υψηλότερη ανθεκτικότητα, καθώς μόνο το 22.72 % των στελεχών παρουσίασε θνησιμότητα κατά την επίδρασή της. Το δεύτερο υψηλότερο ποσοστό ανθεκτικότητας εμφανίστηκε στην Τετρακυκλίνη (68.18%), όπου τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη ανήκαν στην οικογένεια των εντερόκοκκων. Στην ουσία *Cefaclor*, εμφανίστηκαν μέτρια ποσοστά ανθεκτικότητας (40.9%). Η Ιμιπενέμη αποδείχθηκε ο πιο αποτελεσματικός αντιβιοτικός παράγοντας στην καταπολέμηση των μικροοργανισμών, καθώς όλα τα στελέχη παρουσίασαν τουλάχιστον μέτρια ευαισθησία και πολύ χαμηλές τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης.

Σε πολλά βακτηριακά είδη παρουσιάστηκε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε στελέχη που προέρχονταν από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, γεγονός που υποδεικνύει την προφανή σύνδεση ανάμεσα στην προέλευση των συγκεκριμένων στελεχών από ανθρωπογενείς δραστηριότητες και στην εμφάνιση της ανθεκτικότητας. Το φαινόμενο αυτό συμφωνεί με την θεωρία της μεταφοράς γονιδίων ανθεκτικότητας από ανθρωπογενείς δραστηριότητες στο περιβάλλον μέσα από την μεταφορά των υγρών λυμάτων αλλά και μέσω της χρήσης των αντιβιοτικών στην γεωργία και κτηνοτροφία.

Ωστόσο, υπήρξαν και λίγες περιπτώσεις όπου στελέχη θαλασσινού δείγματος είχαν πολύ μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από στελέχη προερχόμενα από περιβάλλοντα άμεσα επηρεαζόμενα από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Το φαινόμενο αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι η ανθεκτικότητα μπορεί να εμφανιστεί και απουσία αντιβιοτικών ουσιών, καθώς η ανάπτυξη γονιδίων ανθεκτικότητας επηρεάζεται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά πολλές φορές οφείλεται και σε εγγενείς μηχανισμούς των βακτηρίων που συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε σκληρά περιβάλλοντα. Ωστόσο, σίγουρα υποδηλώνεται η επίδραση των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο περιβάλλον.

Εμφανίστηκε πληθώρα γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά β-λακταμών και Τετρακυκλινών. Τα κύρια γονίδια ανθεκτικότητας ήταν το *blaTEM* στις β-λακτάμες και το *TETB* στις Τετρακυκλίνες. Κυρίαρχη ήταν η παρουσία των γονιδίων αυτών σε Ε.Ε.Υ.Α., γεγονός που είναι ανησυχητικό καθώς η επεξεργασία των λυμάτων συχνά δε συντελεί στην καταστροφή των γονιδίων αυτών (Yuan, et al., 2015), με αποτέλεσμα να καταλήγουν στο περιβάλλον.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	Εισαγωγή.....	1
1.1	Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.....	1
1.1.1	Το φαινόμενο στην Ελλάδα.....	1
1.1.2	Διάδοση της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον.....	3
1.1.3	Γενετικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας.....	5
1.2	Αντιβιοτικά.....	6
1.2.1	Αντιβιοτικά β-λακταμης.....	7
1.2.2	Τετρακυκλίνη.....	9
2	Σκοπός.....	10
3	Υλικά και μέθοδοι.....	11
3.1	Υλικά.....	11
3.2	Δειγματοληψία.....	12
3.3	Απομόνωση βακτηριακών στελεχών.....	14
3.4	Ταυτοποίηση μικροοργανισμών.....	16
3.5	Έλεγχος ανθεκτικότητας.....	17
3.6	Απομόνωση γενετικού υλικού.....	20
3.7	Έλεγχος ποσότητας και καθαρότητας DNA.....	21
3.8	Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας.....	22
4	Αποτελέσματα.....	24
4.1	Μικροβιακές αναλύσεις δειγμάτων.....	24
4.2	Ταυτοποίηση μικροοργανισμών.....	24
4.2.1	Συνοπτικές πληροφορίες των απομονωμένων στελεχών.....	26

4.3	Έλεγχος ανθεκτικότητας.....	26
4.3.1	Πολυανθεκτικότητα.....	30
4.3.2	Ampicillin	31
4.3.3	Cefaclor.....	34
4.3.4	Imipenem.....	38
4.3.5	Tetracycline.....	40
4.4	Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας.....	43
4.4.1	Γονίδια ανθεκτικότητας στις β-Λακτάμες	43
4.4.2	Γονίδια ανθεκτικότητας στην Τετρακυκλίνη.....	47
4.5	Ανθεκτικότητα ανά βακτηριακό είδος.....	50
5	Συμπεράσματα	53
6	Παράρτημα	56
6.1	Αποτελέσματα καλλιιεργειών.....	56
6.2	Έλεγχος καθαρότητας γενετικού υλικού	59
6.3	Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης - PCR	61
6.3.1	Χρωμοσωμικό DNA.....	61
6.3.2	Πλασμιδιακό DNA (pDNA)	65
7	Βιβλιογραφία.....	69

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στον ανεπτυγμένο κόσμο για πάνω από 50 χρόνια και αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο της θεραπείας μολυσματικών ασθενειών. Όμως, παράλληλα με την ανακάλυψή τους ήρθε και η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών, ως μια νέα μορφή πανδημίας, καταργεί την δράση των αντιβιοτικών ουσιών καθιστώντας μας ευάλωτους σε λοιμώξεις και μολυσματικές ασθένειες. Για τον λόγο αυτό, την τελευταία δεκαετία παρατηρείται σταθερή ανάπτυξη της ανησυχίας στην επιστημονική κοινότητα και στο ευρύ κοινό όσον αφορά την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων απέναντι στην δράση των αντιβιοτικών.

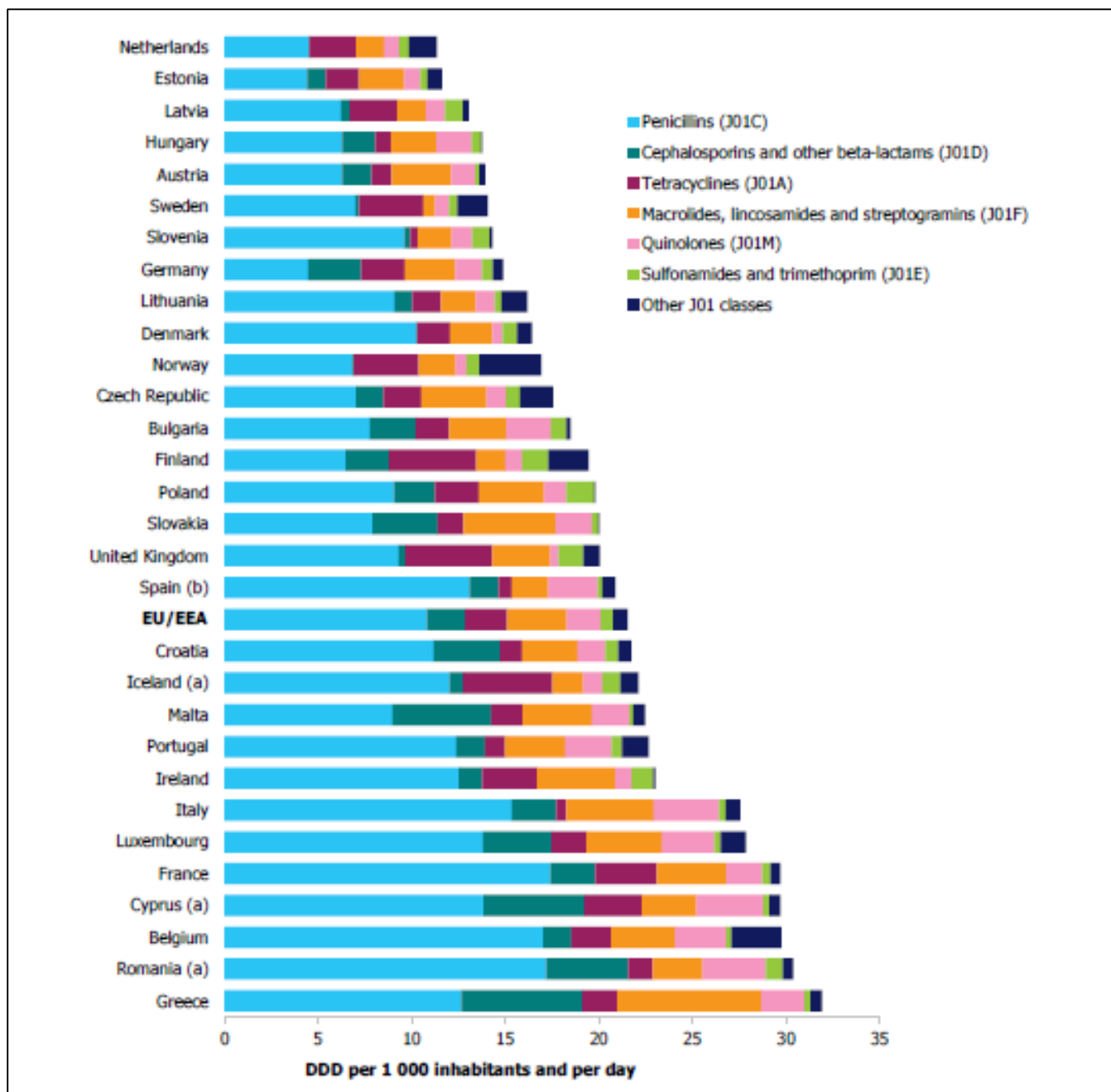
1.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ορίζεται από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO) ως η ανθεκτικότητα ενός μικροοργανισμού σε κάποιον αντιβιοτικό παράγοντα, ο οποίος ήταν αρχικά αποτελεσματικός στην θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τον μικροοργανισμό αυτό. Αυτή η αντοχή των μικροοργανισμών δεν αποτελεί νέο φαινόμενο. Μάλιστα, πολλά από τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά παράγονται από περιβαλλοντικούς μικροοργανισμούς. Όμως τα τελευταία χρόνια υπάρχει εμφάνιση επίκτητης ανθεκτικότητας σε περιβαλλοντικά στελέχη και αύξηση του φαινομένου σε παγκόσμιο επίπεδο, γεγονός που έχει προκαλέσει ανησυχία. Πολλά παθογόνα βακτήρια έχουν επίσης αναπτύξει αντοχή ενάντια σε πολλά αντιβιοτικά (πολυανθεκτικότητα), γεγονός που έχει περιορίσει σημαντικά τις θεραπευτικές επιλογές για λοιμώξεις σε ανθρώπους και ζώα.

1.1.1 ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων εκτιμά ότι η μικροβιακή αντοχή ευθύνεται κάθε χρόνο για 25.000 θανάτους και συνεπάγεται κόστος άνω του 1,5 δισ. ευρώ για δαπάνες υγειονομικής περίθαλψης και απώλεια παραγωγικότητας. Σε εθνικό επίπεδο, η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις ευρωπαϊκές χώρες με την υψηλότερη αντιμικροβιακή αντοχή, ενώ είναι μακράν η πρώτη στη συνολική κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων. Για το γεγονός αυτό οφείλεται αφενός μεν η εύκολη πρόσβαση που έχουν οι Έλληνες στα αντιβιοτικά, αφετέρου δε η έλλειψη ενημέρωσης γύρω από την ορθή χρήση τους.

Αξιόπιστα δεδομένα κατανάλωσης αντιβιοτικών παραγόντων σε εθνικό επίπεδο είναι εξαιρετικής σημασίας για την κατανόηση της επιδημιολογίας της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας, καθώς παρέχουν πληροφορίες για την πίεση της φυσικής επιλογής λόγω της χρήσης αντιβιοτικών. Έχει παρατηρηθεί ότι σε γενικές γραμμές περιβάλλοντα όπως τα νοσοκομειακά, που έχουν υψηλή κατανάλωση αντιβιοτικών, έχουν επίσης και υψηλότερο επίπεδο αντιμικροβιακής αντοχής από περιβάλλοντα με χαμηλότερη κατανάλωση (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την άμεση σχέση μεταξύ της χρήσης αντιβιοτικών και της ανάπτυξης της ανθεκτικότητας.

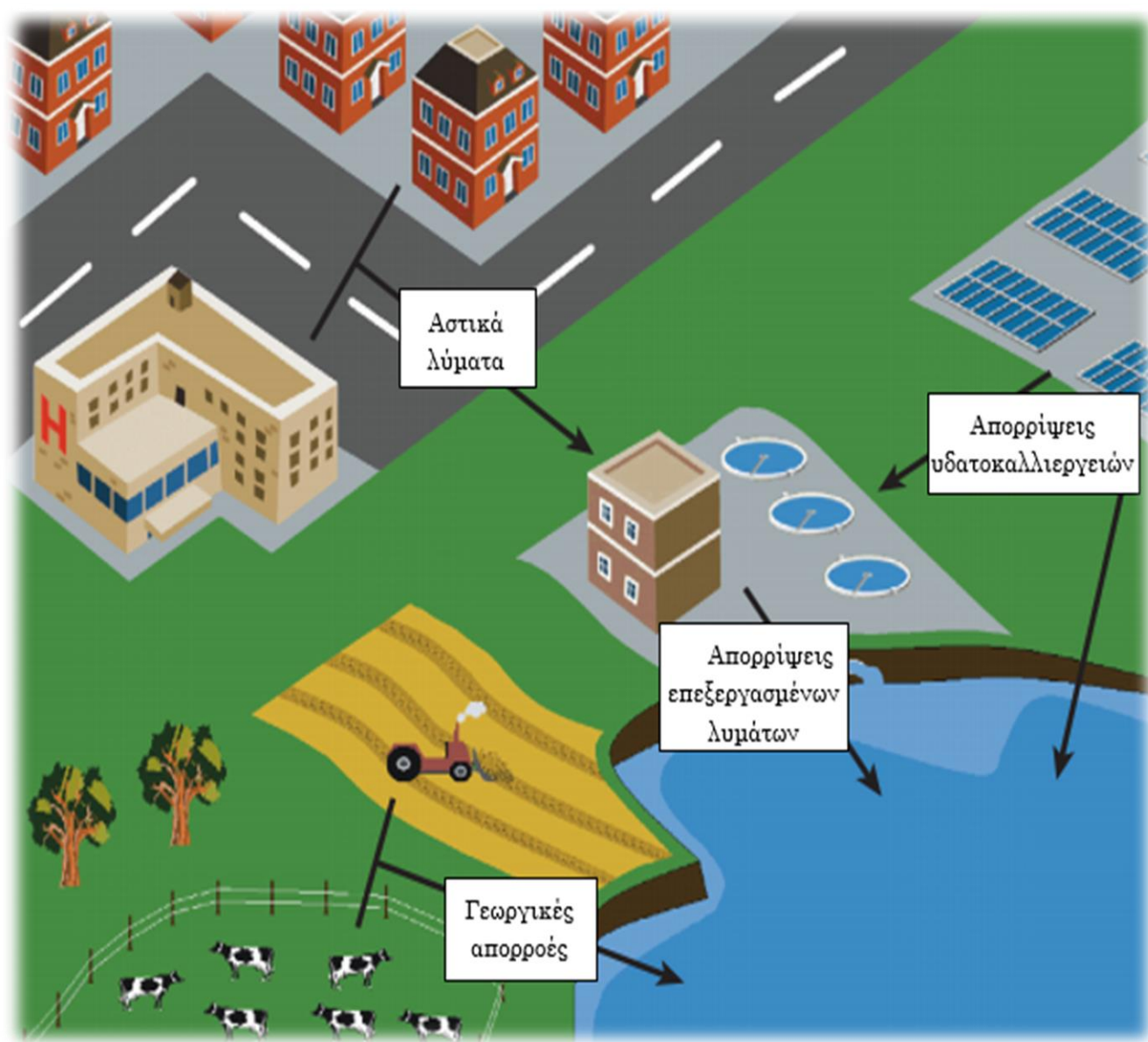


Εικόνα 1. Εξωνοσοκομειακή κατανάλωση αντιβιοτικών στις ευρωπαϊκές χώρες, κατά το έτος 2012 εκφρασμένη σε ημερήσιες δόσεις ανά 100 κατοίκους και ανά ημέρα. Πηγή: ECDC Surveillance of antimicrobial consumption in Europe.

Τα τελευταία χρόνια και με την πίεση της Ευρωπαϊκής Ένωσης έχουν γίνει κινήσεις από κρατικούς φορείς για την ευαισθητοποίηση του κοινού απέναντι στην αντιμικροβιακή αντοχή και για την ορθή χρήση των αντιβιοτικών. Οι έρευνες, ωστόσο, της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας στον ελληνικό χώρο είναι κυρίως περιορισμένες σε κλινικά στελέχη. Η έκταση της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον δεν έχει καταγραφεί σε επαρκή βαθμό, παρά το γεγονός ότι μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην εξάπλωσή της. Προς την κάλυψη αυτής της έλλειψης πληροφοριών κατευθύνεται και η παρούσα έρευνα.

1.1.2 ΔΙΑΔΟΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Παρά το γεγονός ότι η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά αναγνωρίζεται ως μία σημαντική απειλή για την ανθρώπινη υγεία παγκοσμίως, η περιβαλλοντική διάσταση του φαινομένου έχει αγνοηθεί σε αντίστοιχες μελέτες. Το περιβάλλον όμως, και κυρίως τα υδάτινα οικοσυστήματα, μπορούν να προσφέρουν ένα ιδανικό υπόβαθρο για την απόκτηση και τη διάδοση της ανθεκτικότητας, καθώς είναι συχνά και άμεσα επηρεαζόμενα από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Το υδάτινο περιβάλλον δεν αποτελεί μόνο ένα μέσο διάδοσης των ανθεκτικών μικροοργανισμών, αλλά προσφέρει και την κύρια διαδρομή μέσω της οποίας τα γονίδια ανθεκτικότητας εισάγονται σε φυσικά βακτηριακά οικοσυστήματα.



Εικόνα 2. Ανθρωπογενείς δραστηριότητες που συνεισφέρουν στη διασπορά της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον. Πηγή: (Marti, et al., 2014)

Πέραν της βασικής ιατρικής εφαρμογής των αντιβιοτικών, χρησιμοποιούνται επίσης και για την πρόληψη και ίαση ασθενειών σε ζώα και φυτά, ακόμα και για την επιτάχυνση της ανάπτυξης των ζώων στην κτηνοτροφία. Όλες αυτές οι εφαρμογές έχουν ως αποτέλεσμα της απελευθέρωση τεράστιων ποσοτήτων αντιμικροβιακών παραγόντων σε φυσικά οικοσυστήματα (Martinez, 2009). Προφανείς συνέπειες του γεγονότος αυτού είναι αρχικά η φυσική επιλογή ανθεκτικών βακτηριακών πληθυσμών και εν συνεχεία, η εξάπλωση της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον, μέσω της ανταλλαγής γενετικού υλικού.

Οι κύριες δίοδοι μέσω των οποίων αντιβιοτικές ουσίες και ανθεκτικά βακτήρια εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον αφορούν:

- Επεξεργασμένα και ανεπεξέργαστα λύματα
- Νοσοκομειακά απόβλητα
- Απορρίψεις υδατοκαλλιεργειών
- Γεωργικές απορροές

Συγκεκριμένα, οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Ε.Ε.Υ.Α.) θεωρούνται ως οι πιο σημαντικοί φορείς της διάδοσης της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον. Ο πρώτος λόγος είναι ότι αποτελούν αποδέκτες τεράστιων ποσοτήτων αντιμικροβιακών παραγόντων κι έτσι προωθούν τη διαδικασία της φυσικής επιλογής ανθεκτικών βακτηρίων. Ο δεύτερος λόγος είναι ότι οι Ε.Ε.Υ.Α. παρέχουν ένα ιδανικό περιβάλλον (δλδ. υψηλό βακτηριακό φορτίο, υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και θρεπτικών) για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας, καθώς τα βακτήρια είναι σε διαρκή επαφή με αντιβιοτικές ουσίες και ανθεκτικούς μικροοργανισμούς (Marti, et al., 2014).

Τα υδατικά ιζήματα αποτελούν επίσης έναν πολύ σημαντικό φορέα μέσα στον οποίο υπάρχει μεταφορά και συνδυασμός γονιδίων ανθεκτικότητας. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιεργείες και σε άλλες γεωργικές δραστηριότητες μπορούν να καταλήξουν στα ιζήματα λιμνών, θαλασσών και ποταμών, τα οποία παρέχουν ένα υπόστρωμα επιλογής ανθεκτικών βακτηρίων και ανταλλαγής γονιδίων ανθεκτικότητας.

Να σημειωθεί ότι η δραστηριότητα των αντιβιοτικών ουσιών μπορεί να υποβαθμιστεί σημαντικά κατά τη μεταφορά τους στο υδάτινο περιβάλλον, μέσω διαφόρων διαδικασιών. Οι διαδικασίες αυτές μπορούν να αφορούν βιοτικούς παράγοντες, όπως η βιοαποδόμηση που προκαλείται από βακτήρια και μύκητες. Μη βιοτικές διαδικασίες που μπορούν να συμβάλουν στην υποβάθμιση των αντιβιοτικών είναι η προσρόφηση, η υδρόλυση, η φωτόλυση, η οξειδωση και η αναγωγή. Για παράδειγμα έχει αποδειχθεί ότι οι Τετρακυκλίνες είναι ευαίσθητες στην φωτοαποικοδόμηση (Samuelsen 1989), ενώ τα αντιβιοτικά β-λακτάμης υπόκεινται εύκολα σε υδρόλυση (Kummerer, 2012). Τα γονίδια ανθεκτικότητας αντιθέτως, έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να επιβιώσουν σε σκληρά περιβάλλοντα και να μεταφέρονται ακόμη και απουσία των ξενιστών τους.

1.1.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Τα βακτήρια μέσω των γενετικών δυνατοτήτων τους, έχουν επωφεληθεί της υπερχρήσης των αντιβιοτικών αναπτύσσοντας μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μπορεί να διαχωριστεί σε δύο γενικές κατηγορίες:

- **Ενδογενής**

Ενδογενής ή φυσική ανθεκτικότητα είναι η δυνατότητα ενός βακτηριακού είδους να αντιστέκεται στη δραστηριότητα ενός συγκεκριμένου αντιμικροβιακού παράγοντα μέσω των εγγενών δομικών ή λειτουργικών χαρακτηριστικών του, τα οποία επιτρέπουν την ανοχή σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό ή σε μία κλάση αντιβιοτικού.

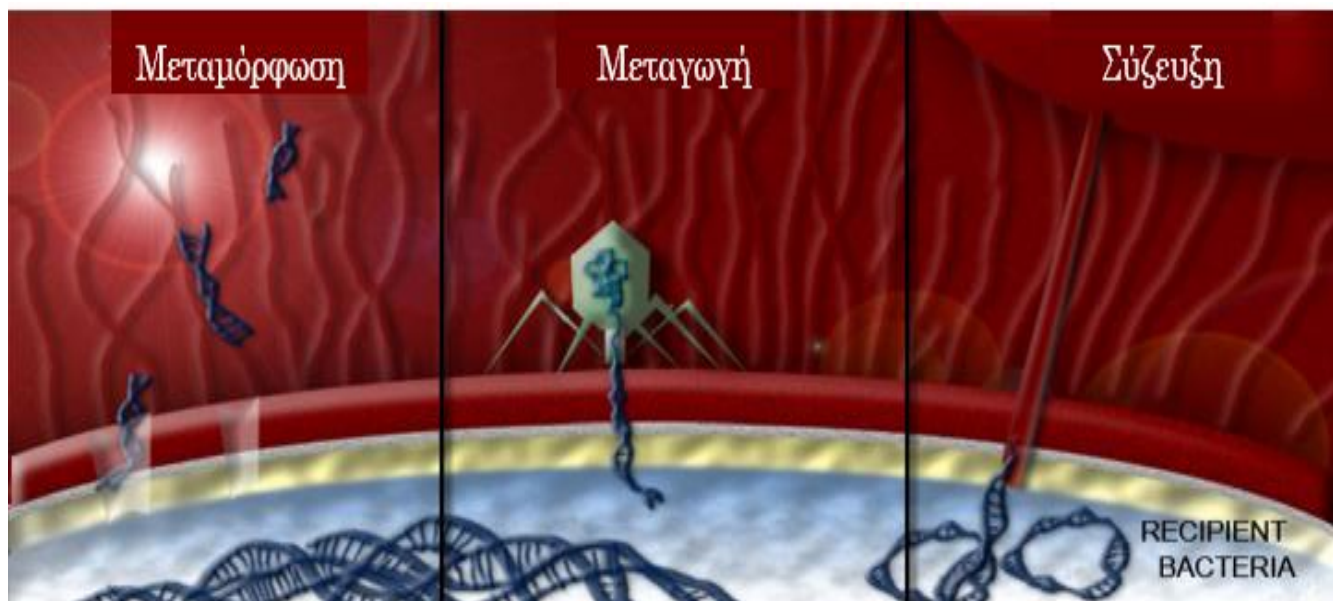
- **Επίκτητη**

Η ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό θεωρείται επίκτητη όταν ένας συγκεκριμένος μικροοργανισμός αποκτά την ικανότητα να αντιστέκεται στην δράση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα, στον οποίο προηγουμένως ήταν ευαίσθητος. Το γεγονός αυτό μπορεί να προκύψει από τη μετάλλαξη των γονιδίων που εμπλέκονται σε φυσιολογικές διαδικασίες και κυτταρικές δομές, από την απόκτηση ξένων γονιδίων ανθεκτικότητας, ή από συνδυασμό των δύο παραπάνω μηχανισμών.

Η επίκτητη ανθεκτικότητα αποτελεί και το αίτιο της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας από ανθρωπογενείς δραστηριότητες στο περιβάλλον. Εκφράζει ουσιαστικά την ταχύτερη προσαρμογή των βακτηρίων σε νέα οικοσυστήματα. Η επίκτητη ανθεκτικότητα μπορεί να συμβαίνει είτε λόγω σημειακών μεταλλάξεων του DNA, είτε λόγω απόκτησης εξωγενούς γενετικού υλικού από άλλα βακτήρια (AMRLS, 2011). Οι μεταλλάξεις του DNA συμβαίνουν σπάνια, ως τυχαία συμβάντα, όμως σε περίπτωση εμφάνισής τους εξαπλώνονται πολύ γρήγορα λόγω της ταχύτατης εκθετικής ανάπτυξης των βακτηριακών πληθυσμών. Οι μεταλλάξεις αυτές αφορούν μόνο το χρωμοσωμικό DNA και μεταφέρονται στους απογόνους μέσω κάθετης μεταφοράς γονιδίων.

Η απόκτηση ανθεκτικότητας λόγω απόκτησης εξωγενούς γενετικού υλικού είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει συχνά στο περιβάλλον. Η μεταφορά εξωγενούς γενετικού υλικού που περιέχει γονίδια ανθεκτικότητας γίνεται κυρίως μέσω των πλασμιδίων, τα οποία μεταφέρονται με οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Horizontal Gene Transfer – HGT). Η μεταβίβαση νέων γονιδίων στα βακτήρια μπορεί να γίνει με:

- Μεταμόρφωση (transformation)
- Μεταγωγή (transduction)
- Σύζευξη (conjugation)



Εικόνα 3. Μηχανισμοί μεταβίβασης γονιδίων ανθεκτικότητας στα βακτήρια. Από αριστερά προς δεξιά: 1. *Μεταμόρφωση*: περιλαμβάνει την λήψη μικρών τμημάτων ελεύθερου DNA από φυσικά μεταλλαγμένα βακτήρια που έχουν υποστεί λύση 2. *Μεταγωγή*: περιλαμβάνει την μεταφορά DNA από ένα βακτήριο σε ένα άλλο μέσω ιών βακτηριοφάγων 3. *Σύζευξη*: προαπαντεί την επαφή των κυττάρων και περιλαμβάνει την μεταφορά DNA μέσω ειδικών ινιδίων (συζευκτικά – αυτομεταφερόμενα πλασμίδια). Πηγή: (*Antimicrobial resistance learning site*)

1.2 ANTIBIOTIKA

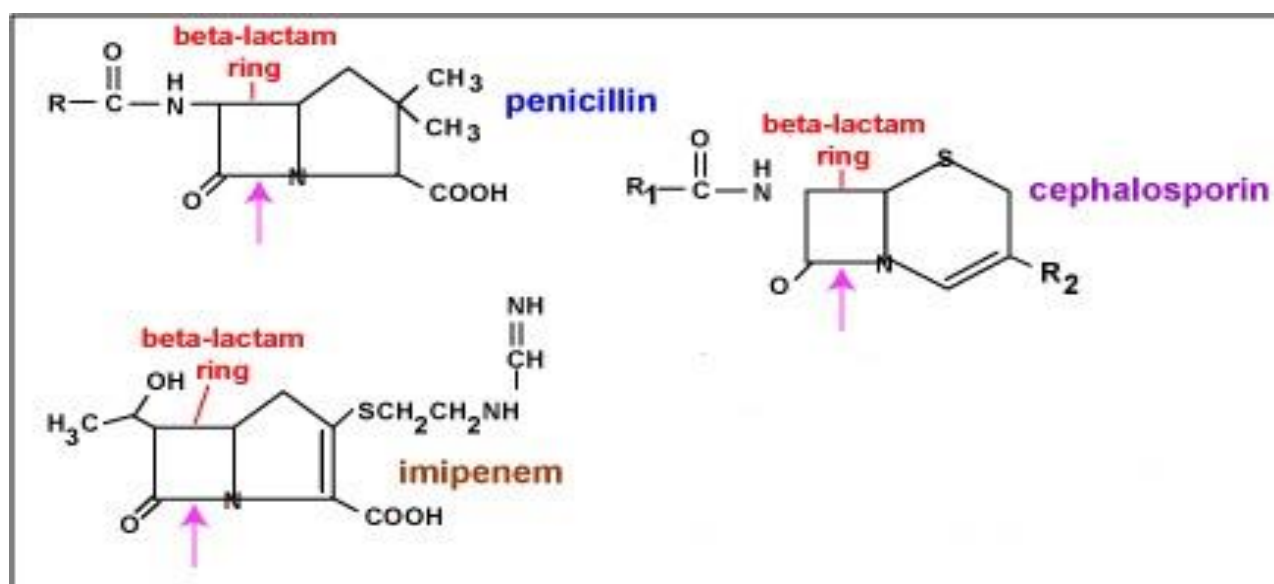
Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν βάσει της δραστηρότητάς τους απέναντι στα βακτήρια που εξετάστηκαν αλλά και βάσει της ευρύτητας χρήσης τους. Επιλέχθηκαν λοιπόν τα εξής αντιβιοτικά:

Πίνακας 1. Χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά.

ANTIBIOTIKO	ΚΛΑΣΗ ANTIBIOTIKOY	
Ampicillin	Αμινοπενικιλίνες	β-Λακτάμες
Cefaclor	Κεφαλοσπορίνες (2 ^{ης} γενιάς)	
Imipenem	Καρμπαπενέμες	
Tetracycline	Τετρακυκλίνες	

1.2.1 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ Β-ΛΑΚΤΑΜΗΣ

Τα αντιβιοτικά β-Λακτάμης αποτελούν μία ευρεία κατηγορία που περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό αντιβιοτικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων και την Πενικιλίνη. Περίπου τα 2/3 των αντιβιοτικών που χορηγούνται σε ανθρώπους εμπίπτουν στην κατηγορία των β-λακταμών και συνεπώς, είναι μακράν η κατηγορία με τη μεγαλύτερη κατανάλωση από τον άνθρωπο. Τα αντιβιοτικά β-Λακτάμης έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό τον δακτύλιο β-Λακτάμης, ο οποίος και ευθύνεται για την αντιβακτηριακή τους δράση. Ο μηχανισμός δράσης αυτής της κατηγορίας, συνίσταται στην αναστολή της σύνθεσης του βακτηριακού τοιχώματος. Συγκεκριμένα, τα αντιβιοτικά αυτά στοχεύουν στην αναστολή του ενζύμου τρανσπεπτιδάση, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος στο τρίτο και τελευταίο στάδιο δημιουργίας του. Συνεπώς η δράση τους αυτών είναι βακτηριοκτόνος και όχι βακτηριοστατική, καθώς επηρεάζει μόνο τα αναπτυσσόμενα κύτταρα και όχι τα ανεπτυγμένα (Lachmayr, et al., 2009).



Εικόνα 4. Χημική δομή των εξεταζόμενων αντιβιοτικών β-λακτάμης.

AMPICILLIN

Η *Ampicillin* είναι ένα αντιβιοτικό το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων από το 1961. Ανήκει στην κατηγορία των πενικιλινών και παρουσιάζει παρόμοια δραστηριότητα με την *Amoxicillin*. Η Αμπικιλίνη κατασκευάστηκε μέσω μίας απλής μεταβολής στη χημική δομή των Πενικιλινών, με σκοπό την ανάπτυξη της δραστηρότητάς τους απέναντι σε Gram αρνητικά βακτήρια. Η μεταβολή αυτή όμως επέφερε και τη μείωση της δραστηρότητας ενάντια σε Gram θετικούς κόκκους. Για τον λόγο αυτό θεωρούνται αντιβιοτικά μετρίου φάσματος.

CEFACLOR

Η Κεφακλόρη, είναι αντιβιοτικό που ανήκει στην κατηγορία των κεφαλοσπορινών 2^{ης} γενιάς. Οι Κεφαλοσπορίνες είναι αντιβιοτικά ευρέος φάσματος που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση πολλών ασθενειών, μεταξύ των οποίων και στη σηψαιμία, στην πνευμονία και στη μηνιγγίτιδα. Είναι δραστική ενάντια σε θετικά αλλά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, όμως παρουσιάζει αυξημένη εκλεκτικότητα ενάντια σε Gram θετικούς κόκκους.

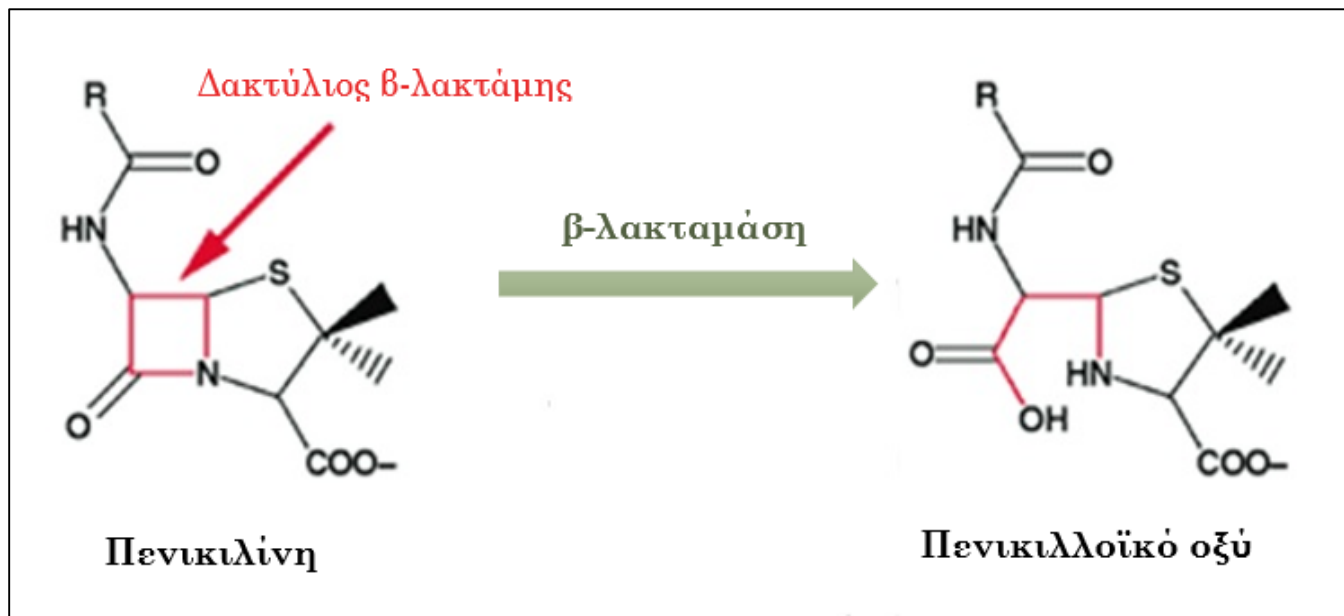
IMIPENEM

Η Ιμιπενέμη, είναι αντιβακτηριακός παράγοντας που ανήκει στην οικογένεια των καρμπαπενεμών (carbapenems). Η βακτηριοκτόνος δράση της Ιμιπενέμης βασίζεται στην αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων, τόσο των θετικών όσο και των αρνητικών κατά Gram. Παρουσιάζει μεγάλη σταθερότητα σε παρουσία β-λακταμάσης, ενός ενζύμου που παράγεται από κάποια βακτήρια το οποίο απενεργοποιεί την δράση των β-λακταμών. Το γεγονός αυτό καθιστά την Ιμιπενέμη, έναν αντιβιοτικό παράγοντα με τεράστια ευρύτητα δραστικότητας.

1.2.1.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά κατηγορίας β-λακτάμης, οφείλεται κυρίως στην παραγωγή του ενζύμου β-λακταμάση, το οποίο υδρολύει τον δακτύλιο της β-λακτάμης και συνεπώς απενεργοποιεί την αντιβιοτική του δράση. Τα βακτήρια που έχουν τη δυνατότητα παραγωγής του συγκεκριμένου ενζύμου μπορούν να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε όλα τα αντιβιοτικά β-λακτάμης, με εξαίρεση τις Καρμπαπενέμες που εμφανίζουν μία σχετική αντοχή απέναντι στη δράση του ενζύμου. Τα γονίδια που ευθύνονται για την κωδικοποίηση της β-λακταμάσης μπορούν να βρίσκονται στο χρωμόσωμα ή σε πλασμίδια. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, πως το πρώτο βακτηριακό στέλεχος που ήταν φορέας πλασμιδιακού γονιδίου παραγωγής β-λακταμάσης, βρέθηκε στην Ελλάδα την δεκαετία του 1960. Το γονίδιο αυτό ονομάστηκε TEM από το όνομα της ασθενούς στην οποία βρέθηκαν τα ανθεκτικά βακτήρια (Τεμονιέρα) (Bradford, 2001).

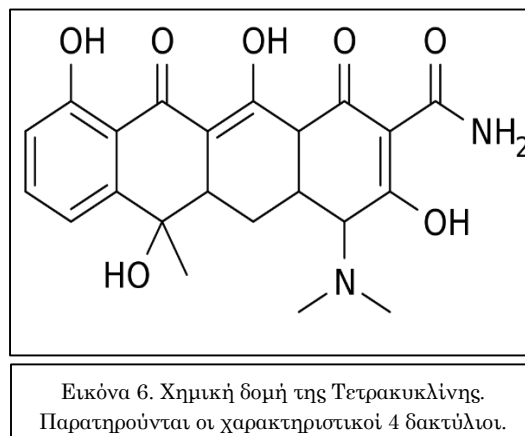
Ο δεύτερος κύριος μηχανισμός απενεργοποίησης της αντιβιοτικής δράσης των αντιβιοτικών β-λακτάμης, είναι η αυξημένη παραγωγή πενικιλινό-δεσμευτικών πρωτεϊνών (Penicillin Binding Proteins – PBPs). Οι πρωτεΐνες αυτές συμβάλλουν στη δημιουργία του εξωτερικού τοιχώματος των κυττάρων, μέσω της παραγωγής πεπτιδογλυκάνης. Οι PBPs, δεσμεύουν αντιβιοτικά β-λακτάμης, καθώς είναι παρόμοιας χημικής δομής με τα τμήματα που διαμορφώνουν την πεπτιδογλυκάνη (Nguyen-Disteche, et al., 1982).



Εικόνα 5. Η β-λακταμάση διασπά έναν δεσμό στον δακτύλιο β-λακτάμης, υδρολύοντας την πενικιλίνη και απενεργοποιώντας το μόριο.

1.2.2 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ

Οι Τετρακυκλίνη ανακαλύφθηκε το 1940 και από τότε χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, παράσιτα, και μία πληθώρα άλλων μικροοργανισμών. Χρησιμοποιείται συστηματικά στην ιατρική αλλά και στην κτηνιατρική, με σκοπό την προώθηση της ανάπτυξης των ζώων. Η ευρύτητα χρήσης της οφείλεται αφενός στο χαμηλό κόστος της και αφετέρου στο μεγάλο φάσμα δραστηριότητάς της. Ο μηχανισμός δράσης της συνίσταται στην αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, μέσω της αναστολής της μετάφρασης. Συγκεκριμένα, η ουσία αυτή προσδένεται στην υποομάδα 30S του ριβοσώματος, αποτρέποντας τη σύνδεση του tRNA στο σύμπλεγμα mRNA-ριβοσώματος.



1.2.2.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η ανθεκτικότητα στην Τετρακυκλίνη είναι ένα φαινόμενο αρκετά σύνηθες. Οφείλεται συχνά στην απόκτηση γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με κινητά πλασμίδια ή τρανσποζόνια, ενώ μικρός αριθμός βακτηρίων αποκτά ανθεκτικότητα στην Τετρακυκλίνη λόγω σημειακών μεταλλάξεων. Τα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιήσουν τρεις μηχανισμούς για να αντισταθούν στη δράση της Τετρακυκλίνης: να μειώσουν την πρόσβαση της τετρακυκλίνης στο ριβόσωμα, να μεταβάλλουν το ριβόσωμα καθιστώντας αδύνατη τη σύνδεση του αντιβιοτικού σε αυτό και να παράγουν ένζυμα απενεργοποίησης της ουσίας (Speer, et al., 1992).

2 ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά στον έλεγχο της ανθεκτικότητας μικροοργανισμών που βρίσκονται σε υδάτινα κυρίως οικοσυστήματα, καθώς και στη διερεύνηση των αιτιών της ύπαρξης ανθεκτικότητας μέσω της απομόνωσης γονιδίων που σχετίζονται με αυτήν. Συγκεκριμένα, οι στόχοι της εργασίας είναι:

- Η απομόνωση βακτηρίων από το υδάτινο κυρίως περιβάλλον και ο έλεγχος της ανθεκτικότητάς τους σε ποικιλία αντιβιοτικών (β-λακτάμες και τετρακυκλίνες).
- Η εύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) για καθένα από τα υπό μελέτη αντιβιοτικά.
- Η σύγκριση της ανθεκτικότητας ανάμεσα σε μικροβιακά στελέχη διαφορετικής προέλευσης.
- Η σύγκριση της ανθεκτικότητας ανάμεσα σε μικροβιακά στελέχη διαφορετικής οικογένειας και είδους.
- Ο έλεγχος της ύπαρξης πολυανθεκτικών στελεχών στα δείγματά μας.
- Η ταυτοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων ανθεκτικότητας.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Φιάλες διήθησης (Whatman).
- Φίλτρα μεμβράνης νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0.45 μm (Whatman).
- Αποστειρωμένα τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm και 6 cm.
- Phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich).
- Πλάκες μικρο-τυτλοποίησης (96 υποδοχών).
- Ταινίες οξειδάσης Bactident Oxidase (Merck).
- Διάλυμα Φαινόλη/Χλωροφόρμιο/Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1), (Sigma_Aldrich).
- Λυσοζύμη - Lysozyme molecular biology grade (Applichem).

ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή διήθησης υπό κενό (PALL Gelman Laboratory).
- Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific Heraeus).
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa).
- Ζυγός ακριβείας (Adventurer OHAUS Balance).
- Φυγόκεντρος Centrifuge 5418R (Eppendorf)
- Μετρητής αποικιών (Stuart).
- Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu).
- Microplate reader (LT-4000).
- Λύχνος Bunsen.

ANTIBIOTIKA

- Ampicillin tryhydrate (Sigma-Aldrich)
- Cefaclor (Sigma-Aldrich)
- Tetracycline (Sigma-Aldrich)
- Imipenem monohydrate (Sigma-Aldrich)

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ

- Nutrient Agar (HiMedia Laboratories)
- M-Endo Agar LES (HiMedia Laboratories)
- Pseudomonas Agar Base (HiMedia Laboratories)
- Slanetz & Bartley Medium (HiMedia Laboratories)
- Bile Esculin Agar (HiMedia Laboratories)
- Nutrient Broth (HiMedia Laboratories)
- Mueller-Hinton Broth (Lab M)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris – EDTA (TE), συγκέντρωσης 50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0, αποστειρωμένο στους 121 °C για 15 min.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Lysozyme lysis buffer, 100mM NaCl, 500 mM Tris, pH 8.0, Lysozyme 30 mg/mL.
- Διάλυμα 10% SDS.
- Διάλυμα πρωτεΐνάσης-k 20 mg/mL

3.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Για την απομόνωση των επιθυμητών βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε σειρά δειγματοληψιών κατά τους μήνες Μάιο, Ιούνιο και Σεπτέμβριο του 2014. Οι δειγματοληψίες έγιναν στην ευρύτερη περιοχή της πόλης των Χανίων και οι πηγές των δειγμάτων ήταν τέσσερις: θαλασσινό νερό, νερό ποτίνας, υγρά απόβλητα και κοπρανώδες υλικό ζωικής προέλευσης. Το θαλασσινό νερό συλλέχθηκε από την ακτή, σε βάθος περίπου 1m. Το νερό ποτίνας συλλέχθηκε από τρεις ιδιωτικές πησίνες ξενοδοχειακών μονάδων και από μία πησίνη αθλητικών εγκαταστάσεων. Τα υγρά απόβλητα, συλλέχθηκαν από την είσοδο (πριν την 1^ο βάρθμια επεξεργασία) και την έξοδο (μετά την 2^ο βάρθμια επεξεργασία) δύο εγκαταστάσεων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων: της Ε.Ε.Υ.Α. Χανίων και της Ε.Ε.Υ.Α. Γερανίου. Το κοπρανώδες υλικό ζωικής προέλευσης συλλέχθηκε από ορνιθοτροφείο. Το υλικό αυτό διανέμεται και χρησιμοποιείται από αγρότες για την λίπανση εδαφών στην αγροτική περιοχή του Ακρωτηρίου.

Η μεταφορά όλων των δειγμάτων έγινε σε συνθήκες συντήρησης της θερμοκρασίας και η ανάλυσή τους γινόταν σε μικρό χρονικό διάστημα ($\leq 24h$) από τη δειγματοληψία για την αποφυγή αλλοίωσης των δειγμάτων. Αποφεύχθηκε επίσης η διεξαγωγή δειγματοληψιών κατά τις βροχερές ημέρες, καθώς και η βροχή είναι ένας παράγοντας που συντελεί στην αλλοίωση των δειγμάτων (Ackerman & Weisberg, 2003).

Πίνακας 2. Περιοχές δειγματοληψιών.

Δείγμα	Τοποθεσία Δειγματοληψίας	Δείγμα	Τοποθεσία Δειγματοληψίας
1	Κουμ Καπί	12	Είσοδος Βιολογικού Χανίων
2	Νέα Χώρα	13	Είσοδος Βιολογικού Χανίων
3	Σούδα	14	Έξοδος Βιολογικού Χανίων
4	Σταυρός	15	Έξοδος Βιολογικού Χανίων
5	Άγιος Ονούφριος	16	Είσοδος Βιολογικού Γερανίου
6	Καλαθάς	17	Είσοδος Βιολογικού Γερανίου
7	Είσοδος ΕΕΥΑ Χανίων	18	Έξοδος Βιολογικού Γερανίου
8	Ιδιωτική ποίνα	19	Έξοδος Βιολογικού Γερανίου
9	Ιδιωτική ποίνα	20	Πλατανιάς
10	Ιδιωτική ποίνα	21	Ορνιθοτροφείο
11	Ποίνα αθλητικής εγκατάστασης	22	Βάταλο

3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν, ελέγχθηκαν για την παρουσία βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Enterococcus* sp, *Pseudomonas* sp και *Enterobacter* sp. Για την απομόνωση των επιθυμητών βακτηριακών στελεχών έγινε αρχικά διήθηση των υγρών δειγμάτων μέσω φίλτρων και στη συνέχεια τοποθέτηση των φίλτρων αυτών σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά, ώστε να γίνει η καλλιέργεια των επιθυμητών ειδών. Οι διηθήσεις έγιναν σε συσκευή διήθησης υπό κενό σε αποστειρωμένες συνθήκες, χρησιμοποιώντας 100 mL υγρού δείγματος κάθε φορά.

Στα δείγματα θαλασσινού νερού έγινε διήθηση χωρίς να προηγηθεί αραιώση. Στην περίπτωση των δειγμάτων προερχόμενων από βιολογικό καθαρισμό, καθώς και των δειγμάτων προερχόμενων από κοπρανώδες υλικό ήταν απαραίτητη η διεξαγωγή αραιώσεων λόγω υψηλού μικροβιακού φορτίου των αρχικών δειγμάτων. Όλες οι αραιώσεις έγιναν χρησιμοποιώντας απιονισμένο αποστειρωμένο νερό. Οι αραιώσεις πραγματοποιούνταν πάντα εφαρμόζοντας τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, για τη μείωση πιθανού σφάλματος.

Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διήθηση ήταν τύπου νιτροκυτταρίνης, διαμέτρου 47 mm και μεγέθους πόρων 0.45 μm . Οι μεμβράνες μετά τη διήθηση τοποθετήθηκαν σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν και τα είδη στα οποία ήταν εκλεκτικά φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Στη συνέχεια έγινε η καλλιέργεια των μικροοργανισμών με βάση το πρωτόκολλο του κάθε δείκτη.

Πίνακας 3. Εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα.

Θρεπτικό Υπόστρωμα	Ανιχνευόμενη ομάδα
mEndo Agar Les	Total Coliforms
Pseudomonas Agar Base	<i>Pseudomonas</i> sp.
Slanetz & Bartley Medium	<i>Enterococci</i>
Bile Esculin Agar	<i>Enterococci</i>

- **Ολικά Κολοβακτηριοειδή – Total Coliforms**

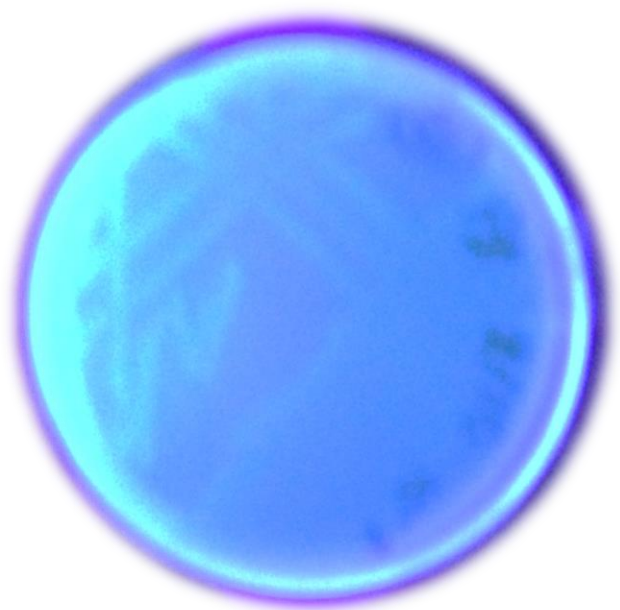
1. Διήθηση 100 mL υγρού δείγματος υπό κενό σε μεμβράνη διήθησης με μέγεθος πόρων 0.45 μm .
2. Μεταφορά της μεμβράνης σε θρεπτικό υπόστρωμα mEndo Agar Les.
3. Επώαση στους 37 °C για 21 \pm 3 ώρες.
4. Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών (αποικίες χρυσοπράσινου χρώματος).

- **Enterococcus sp.**

1. Διήθηση 100 mL υγρού δείγματος υπό κενό σε μεμβράνη διήθησης με μέγεθος πόρων 0.45 μm .
2. Μεταφορά της μεμβράνης σε θρεπτικό υπόστρωμα Slanetz & Bartley Medium.
3. Επώαση στους 37 °C για 48 ± 4 ώρες.
4. Σε περίπτωση εμφάνισης τυπικών αποικιών (καφέ, κόκκινου ή ροζ χρώματος) μεταφορά της μεμβράνης σε υπόστρωμα Bile-Aesculin για την διαφοροποίηση εντερόκκοκκων από στρεπτόκοκκους.
5. Επώαση στους 44 °C για 2 ώρες.
6. Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών (αποικίες που δημιουργούν μαύρο διάχυτο χρώμα στο υπόστρωμα).

- **Pseudomonas sp.**

1. Διήθηση 100 mL υγρού δείγματος υπό κενό σε μεμβράνη διήθησης με μέγεθος πόρων 0.45 μm .
2. Μεταφορά της μεμβράνης σε θρεπτικό υπόστρωμα Pseudomonas Agar Base που περιέχει C-N supplement.
3. Επώαση στους 30 °C για 44 ± 4 ώρες.
4. Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών (μπλε-πράσινου χρώματος).
5. Έλεγχος φθορισμού υπό ακτινοβολία 360 ± 20 nm.



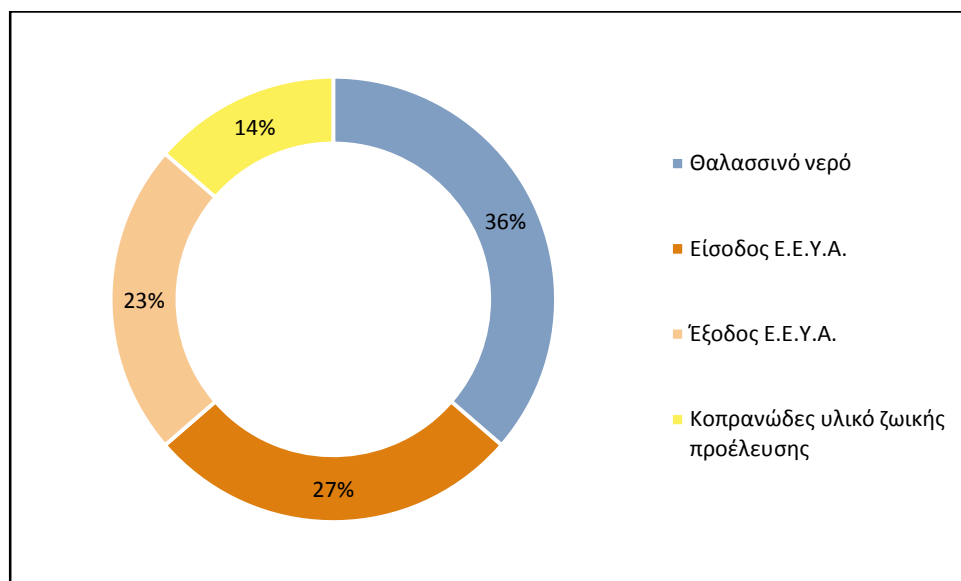
Εικόνα 7. Έλεγχος φθορισμού σε είδος *Pseudomonas cepacia*

Τέλος, έγινε απομόνωση των πλέον ανεπτυγμένων αποικιών και ανακαλλιέργειά τους σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar Base. Οι συνθήκες ανακαλλιέργειας (θερμοκρασία και χρόνος επώασης), ήταν ίδιες με τις συνθήκες των αντίστοιχων καλλιεργειών.

3.4 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Κατά την επιλογή των στελεχών που θα οδηγούνταν προς εξέταση, επιδιώχθηκε ένα ευρύ δείγμα, όσον αφορά την προέλευσή τους αλλά και την οικογένεια στην οποία ανήκουν. Έτσι, εξετάστηκαν 9 στελέχη που ανήκουν στην οικογένεια των Enterococcaceae, 7 στελέχη της οικογένειας των Pseudomonadaceae και 6 στελέχη της οικογένειας των Enterobacteriaceae (22 στελέχη συνολικά). Η ποσοστιαία κατανομή της προέλευσης των στελεχών που εξετάστηκαν φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.

Για την κατάταξη των μικροοργανισμών σε συγκεκριμένο γένος και είδος, έγινε χρήση της μεθόδου της βιοχημικής ταυτοποίησης. Πρόκειται για μία φαινοτυπική μέθοδο, κατά την οποία εκμεταλλευόμαστε συγκεκριμένες ιδιότητες των μικροοργανισμών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό τους και την παραγωγή ενζύμων. Η βιοχημική ταυτοποίηση έγινε βάσει του συστήματος API (Analytical Profile Index) και χρησιμοποιήθηκε για την κατάταξη των μικροοργανισμών που ανήκουν στα είδη *Enterobacter* sp και *Pseudomonas* sp.



Σχήμα 1. Ποσοστιαία κατανομή της προέλευσης των εξεταζόμενων βακτηριακών στελεχών.

Κατά την εφαρμογή της μεθόδου, τα εξεταζόμενα στελέχη υπόκεινται αρχικά σε δοκιμή οξειδάσης. Η οξειδάση είναι ένζυμο που καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από χημικές ουσίες στην χρωστική *tetramethyl-p-phenylenediamine*, η οποία είναι δέκτης ηλεκτρονίων και η αναγωγή της συνοδεύεται με την ανάπτυξη ισχυρού ιώδους χρώματος. Τα θετικά στην δοκιμή βακτήρια διαθέτουν το ένζυμο *cytochrome c oxidase* και απαιτείται βιοχημική ταυτοποίηση με το σύστημα API 20NE. Σε περίπτωση αρνητικής αντίδρασης, χρησιμοποιείται το σύστημα API 20E. Για τα στελέχη των εντερόκοκκων δεν κρίθηκε απαραίτητη η βιοχημική ταυτοποίηση καθώς προηγήθηκε ανακαλλιέργειά τους σε θρεπτικό υλικό Bile Esculin Agar. Το υλικό αυτό είναι εκλεκτικό άγαρ που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών του γένους *Enterococci*. Τα μέλη του γένους αυτού έχουν τη δυνατότητα

να υδρολύουν την εσουλίνη σε προϊόντα που αντιδρούν με τον κιτρικό σίδηρο που περιέχεται στο θρεπτικό μέσο, παράγοντας αδιάλυτα άλατα του σιδήρου, τα οποία προκαλούν το μαύρισμα του υλικού. Έτσι σε περίπτωση εμφάνισης μαύρου χρώματος, έχουμε θετική αντίδραση και ο μικροοργανισμός κατατάσσεται στους Εντερόκοκκους.



Εικόνα 8. API 20NE



Εικόνα 9. API 20E

3.5 ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης με μικρο-αραιώσεις σε ζωμό (MIC Broth Microdillution Method). Πρόκειται για μία μικρομέθοδο κατά την οποία εξετάζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Ο λόγος επιλογής της συγκεκριμένης μεθόδου έναντι άλλων είναι το χαμηλό κόστος της και ο μικρός χρόνος διεξαγωγής πειραμάτων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες τιτλοποίησης με 96 βυθίσματα.

Οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

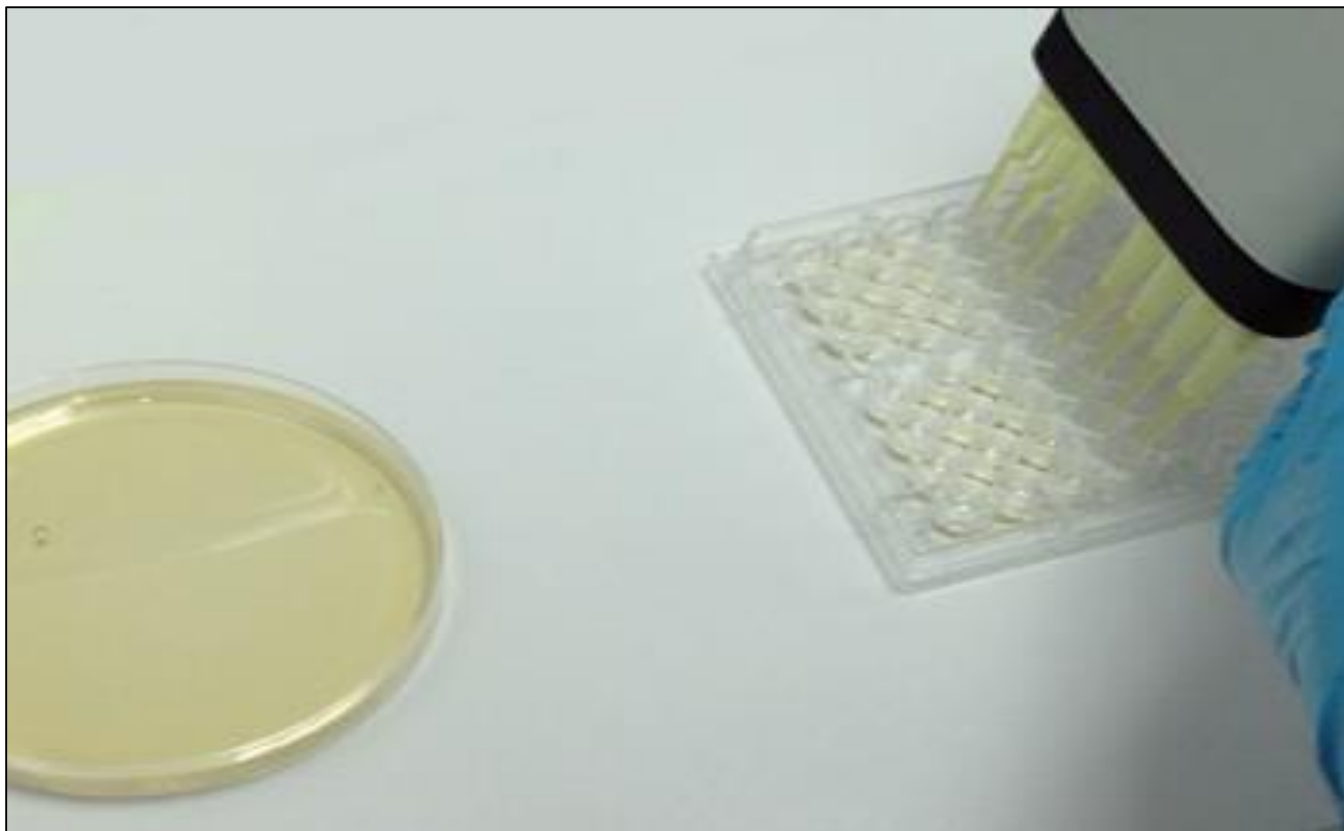
Πίνακας 4. Εύρος συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ευαισθησίας των μικροοργανισμών.

AMPICILLIN [μg/mL]									
100.000	50.000	25.000	12.500	6.250	3.125	1.563	0.781	0.391	0.195
CEFACLOX [μg/mL]									
100.000	50.000	25.000	12.500	6.250	3.125	1.563	0.781	0.391	0.195
TETRACYCLINE [μg/mL]									
32.000	16.000	8.000	4.000	2.000	1.000	0.500	0.250	0.125	0.063
IMIPENEM [μg/mL]									
32.000	16.000	8.000	4.000	2.000	1.000	0.500	0.250	0.125	0.063

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των αντιβιοτικών διαλυμάτων στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά ο κατάλληλος διαλύτης, βάση αντιβιοτικού. Το μητρικό διάλυμα αντιβιοτικού ήταν σε κάθε περίπτωση τουλάχιστον 10 φορές πυκνότερο από την υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση και μετά την παρασκευή του φυλασσόταν σε συνθήκες συντήρησης για την αποφυγή αλλοίωσης. Από το μητρικό διάλυμα και με αραιώση παρασκευάστηκε κάθε φορά το επιθυμητό διάλυμα αντιβιοτικού που θα εξεταζόταν, το οποίο ήταν συγκέντρωσης διπλάσιας από την μέγιστη εξεταζόμενη, καθώς κατά την εφαρμογή της μεθόδου υφίσταται αραιώση 1÷2. Η παρασκευή των αντιβιοτικών έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο.

$$\text{Βάρος αντιβιοτικού (mg)} = \frac{\text{Όγκος διαλύματος (mL)} * \text{Επιθυμητή συγκέντρωση } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right)}{\text{Δραστικότητα αντιβιοτικού } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}}\right)}$$

Να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν, η δραστικότητα ήταν άνω του 99% λόγω υψηλής ποιότητας παραγωγής, που αντιστοιχεί περίπου σε 1000 μg/mL, δηλαδή ο όρος αυτός μπορεί να απαλειφθεί από την εξίσωση.



Εικόνα 10. Μεταφορά θρεπτικού υλικού στα πηγάδια εξέτασης με τη χρήση πολλαπλής πιπέτας..

Για την εφαρμογή της μεθόδου μικροαραιώσεων σε ζωμό, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του οργανισμού CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, January 2012). Βάσει αυτού, αρχικά καλλιεργήθηκε ο κάθε μικροοργανισμός σε μη εκλεκτικό θρεπτικό ζωμό (Mueller-Hinton Broth). Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε όλα τα χρησιμοποιούμενα πηγάδια της πλάκας τιτλοποίησης το ίδιο θρεπτικό υλικό (100μL). Έπειτα, προστέθηκε ίδια ποσότητα αντιβιοτικού στα πηγάδια της πρώτης στήλης, επιτυγχάνοντας έτσι αραιώση $1 \div 2$. Διαμοιράζοντας 100 μL στα επόμενα πηγάδια εξέτασης, επιτυγχάνεται αραιώση $1 \div 2$ κάθε φορά που μεταφέρεται το αντιβιοτικό από στήλη σε στήλη, κι έτσι διαμορφώνονται οι συγκεντρώσεις που φαίνονται στον πίνακα 4. Στην τελευταία στήλη δεν προστίθεται αντιβιοτικό, καθώς επιδιώκουμε την ανάπτυξη του μικροοργανισμού απουσία αντιβιοτικού (control). Τέλος, προστίθενται 5 μL βακτηριακής καλλιέργειας συγκέντρωσης 10^{-5} CFU/mL σε όλα τα πηγάδια εξέτασης, πέραν της τελευταίας σειράς όπου θα έχουμε το τυφλό διάλυμα (blank). Το τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης των πηγαδιών. Σε περίπτωση υψηλής οπτικής απορρόφησης του τυφλού, θεωρείται ότι έχει υπάρξει μόλυνση είτε των πηγαδιών είτε του θρεπτικού υλικού, και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Κάθε πλακέτα τιτλοποίησης χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση δύο μικροοργανισμών (εικόνα 11).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1
D												
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1
G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		1
H	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		

Εικόνα 11. Διάταξη της πλακέτας μικρο τιτλοποίησης. Η στήλη 1 περιλαμβάνει τη μέγιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού η οποία κατανέμεται έως τη στήλη 10 με αραιώση 1+2. Στις σειρές A,B,C και E,F,G εξετάστηκαν οι δύο μικροοργανισμοί, ενώ η σειρά H περιλαμβάνει το τυφλό διάλυμα και η στήλη 12 τα διάλυμα ελέγχου.

Μετά την προετοιμασία της πλακέτας ελέγχου, πραγματοποιήθηκε 24ωρη επώαση των μικροοργανισμών σε ανάλογες θερμοκρασιακές συνθήκες με αυτές της καλλιέργειάς τους. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών ελέγχθηκε σε ειδικό φασματοφωτόμετρο πλακέτας (microplate reader).

3.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Η απομόνωση του γενετικού υλικού των βακτηρίων έγινε με σκοπό την ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδίων ανθεκτικότητας. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του χρωμοσωμικού και του πλασμιδιακού DNA. Το χρωμοσωμικό DNA απομονώθηκε με τη χρήση ενζύμων πρωτεΐνάσης K και λυσοζύμης ενώ το πλασμιδιακό DNA (pDNA) απομονώθηκε με τη χρήση ειδικού KIT (Invisorb® Plasmid Midi Kit).

Παρά το γεγονός ότι η απομόνωση του DNA και του pDNA απαιτούν διαφορετικές διεργασίες, τα δύο πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν, είχαν την ίδια βασική λογική, η οποία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Καλλιέργεια του μικροοργανισμού.
2. Λύση των κυττάρων μέσω της χρήσης χημικών, ενζύμων και μηχανικής ανάδευσης.
3. Καθαρισμός του παραγώγου της λύσης με τη χρήση απορρυπαντικού.
4. Αφαίρεση των πρωτεϊνών με την χρήση του ενζύμου πρωτεΐνάση K.
5. Αφαίρεση του RNA με τη χρήση του ενζύμου RNase.
6. Καθαρισμός του γενετικού υλικού με τη χρήση αιθανόλης.

3.7 ΈΛΕΓΧΟΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ DNA

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της ποσότητας και της καθαρότητας των δειγμάτων. Και οι δύο αυτές παράμετροι μπορούν να προσδιοριστούν μέσω της μέτρησης της απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Έτσι, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ποσότητας και τον έλεγχο της καθαρότητας του DNA και του pDNA είναι η φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης ορατού-υπεριώδους. Η λογική της μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA απορροφά την UV ακτινοβολία ανάλογα με το μήκος κύματος.

Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση του δείγματος DNA σε μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Η οπτική απορρόφηση στα 260 nm επιτρέπει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του γενετικού υλικού. Οπτική απορρόφηση της τάξης της μίας μονάδας αντιστοιχεί σε 50 µg/mL δίκλωνου DNA, 40 µg/mL μονόκλωνου DNA και RNA και σε περίπου 20 µg/mL μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων.

$$1 OD_{260} \text{ unit} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$$

Οι πρωτεΐνες μπορούν επίσης να απορροφήσουν την UV και έτσι μπορούν να ποσοτικοποιηθούν μέσω της ίδιας μεθόδου. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η απορρόφηση στα 280 nm. Οπτική απορρόφηση της τάξης της μίας μονάδας αντιστοιχεί σε 1 mg/mL πρωτεΐνης.

$$1 OD_{280} \text{ unit} = 1 \text{ mg πρωτεΐνης/mL}$$

Βάσει των παραπάνω, ο προσδιορισμός της καθαρότητας του νουκλεϊκού οξέος μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αναλογίας των οπτικών απορροφήσεων στα δύο μήκη κύματος:

$$\text{Καθαρότητα DNA} = \frac{OD_{260}}{OD_{280}}$$

Η τιμή της αναλογίας για υψηλής καθαρότητας DNA είναι 1.8. Στην περίπτωση που υπάρχει επιμόλυνση πρωτεϊνών ή φαινόλης η τιμή αυτή είναι σημαντικά μικρότερη με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατος ο ακριβής προσδιορισμός της ποσότητας του απομονωμένου γενετικού υλικού.

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας του DNA χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$C_{DNA} = OD_{260} * 50 \mu\text{g/mL} * \text{συντελεστής αραίωσης}$$

Τα αποτελέσματα του ελέγχου καθαρότητας του γενετικού υλικού φαίνονται αναλυτικά στο παράρτημα.

3.8 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR), είναι μία μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών του DNA. Με την PCR μία συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, με την προϋπόθεση ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να απομονώσουμε και να πολλαπλασιάσουμε γονίδια σχετικά με την ανθεκτικότητα. Η μέθοδος βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής που ξεκινούν από καθορισμένες θέσεις μιας μήτρας DNA. Κάθε κύκλος της διαδικασίας αποτελείται από τρία στάδια:

- Αποδιάταξη της μήτρας DNA.
- Πρόσδεση των εκκινητών στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες.
- Επιμήκυνση των εκκινητών – σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3'.

Η ανίχνευση των γονιδίων ανθεκτικότητας έγινε μέσω Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Τα γονίδια, οι εκκινητές, το μέγεθος των προϊόντων PCR, καθώς και οι βιβλιογραφικές αναφορές, βάσει των οποίων εκτελέστηκαν τα αντίστοιχα προγράμματα PCR φαίνονται στον πίνακα 1. Αναλυτικά, οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για κάθε γονίδιο, αλλά και οι κύκλοι PCR που εφαρμόστηκαν φαίνονται στο παράρτημα.

Πίνακας 5. Εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας.

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητή (5'→3')	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Βιβλιογραφική αναφορά
tetA	CGATATCACTGATGGCGATG	318	(Tennstedt, et al., 2005)
	TGTCCGACAAGTTGCATGAT		
tetB	TTGGTTAGGGGCAAGTTTGT	659	(Ng, et al., 2001)
	GTAATGGGCCAATAACACCG		
tetM	GTAAATAGTGTTCCTGGAG	600	(Akinbowale, et al., 2006)
	CTAAGATATGGCTCTAACAA		
ampC	TTCTATCAAMACTGGCARCC	550	(Schwartz, et al., 2003)
	CCYTTTTATGTACCCAYGA		
blaTEM	AAAGATGCTGAAGATCA	425	(Speldooren, et al., 1998)
	TTTGGTATGGCTTCATTC		
blaOXA	AAGAAACGCTACTCGCCTGC	478	(Bert, et al., 2002)
	CCACTCAACCCATCCTACCC		
blaPSE	ACCGTATTGAGCCTGATTTA	321	(Bert, et al., 2002)
	ATTGAAGCCTGTGTTTGAGC		

Για την αξιολόγηση των προϊόντων της PCR, εφαρμόστηκε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία αναλυτική μέθοδο για τον διαχωρισμό βιομακρομορίων, όπως το DNA, και βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων μέσα σε ένα υγρό μέσον υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιούνται μοριακοί δείκτες (molecular markers), των οποίων τα μεγέθη είναι γνωστά. Έτσι, μπορούμε να διαπιστώσουμε εάν το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με την προσθήκη της χρωστικής «Βρωμιούχο αιθίδιο» (Ethidium bromide), το οποίο φθορίζει έντονα κάτω από υπεριώδεις ακτίνες UV όταν συγκεντρώνεται στις περιοχές DNA προϊόντων της PCR, εφόσον παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών των βάσεων του δίκλωνου DNA (Hunt, 2006). Το βρωμιούχο αιθίδιο ενσωματώθηκε στην πηκτή αγαρόζης πριν την ηλεκτροφόρηση.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Κατά τις μικροβιακές αναλύσεις των δειγμάτων, όπως ήταν αναμενόμενο, υπήρξε υψηλή ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε περιπτώσεις καλλιέργειας από υγρά λύματα. Στις περιπτώσεις όπου είχαμε τόσο μεγάλη ανάπτυξη ώστε να δυσχεραίνεται η απομόνωση των στελεχών, χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερος λόγος αραίωσης. Στα δείγματα νερού πισίνας, δεν παρουσιάστηκε καμία ανάπτυξη μικροοργανισμών. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανότατα σε υψηλό ποσοστό χλωρίωσης κατά την περίοδο της δειγματοληψίας.

Βακτήρια της οικογένειας *Pseudomonadaceae* αναπτύχθηκαν κυρίως σε δείγματα υγρών αποβλήτων. Τα βακτήρια της κατηγορίας των ολικών κολοβακτηριοειδών και των Εντερόκοκκων ήταν αρκετά κοινά στα δείγματά μας.

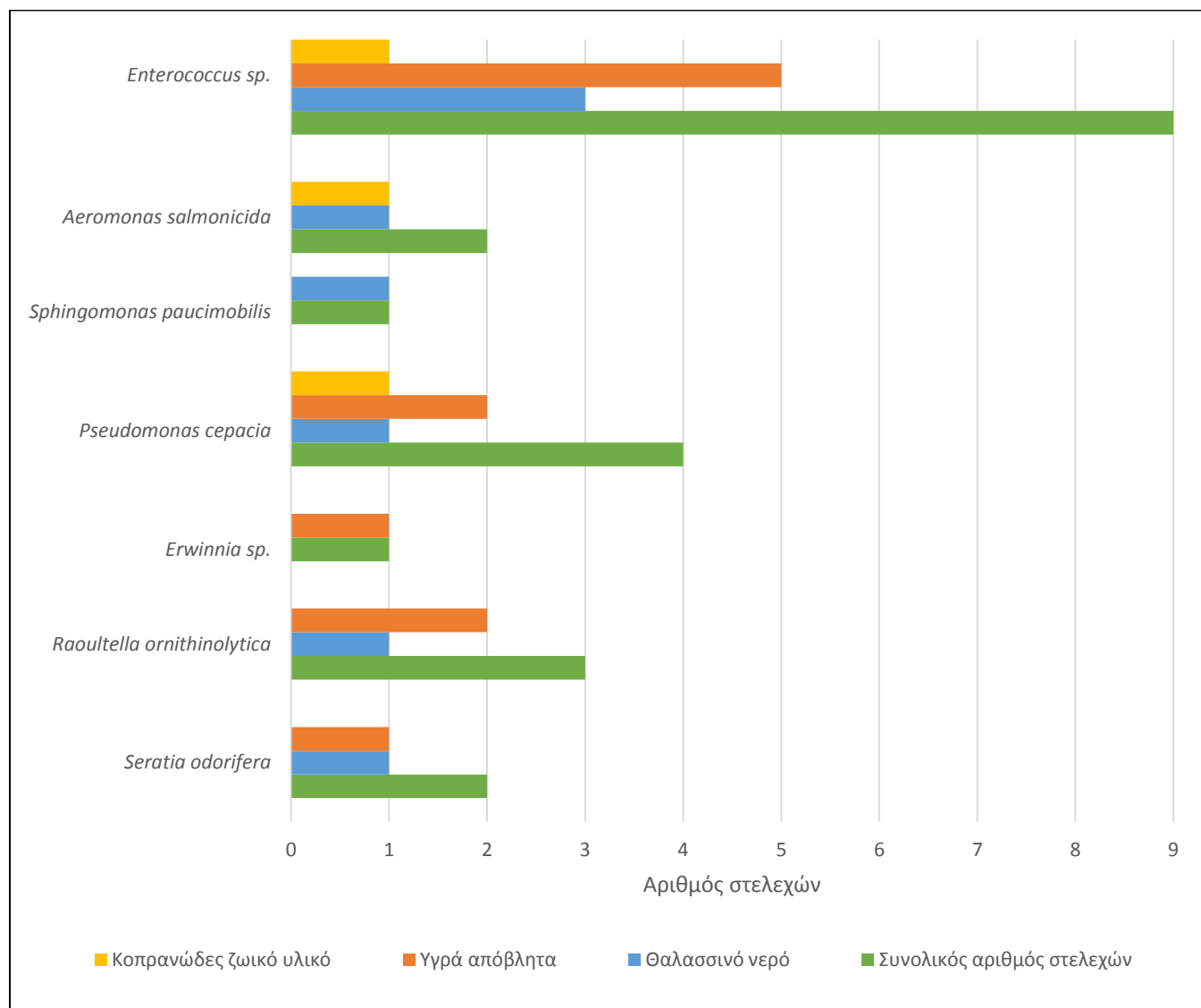
4.2 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Κατά την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με τα συστήματα API 20E και API 20NE ελέγχθηκε η αντίδρασή τους παρουσία συγκεκριμένων ενζύμων και αντιδραστηρίων. Τα αποτελέσματα των αντιδράσεων καταγράφηκαν στη βάση δεδομένων του συστήματος, η οποία μας έδωσε το είδος και το γένος κάθε στελέχους, καθώς και το ποσοστό βεβαιότητας της ταυτοποίησης.

Πίνακας 6. . Αποτελέσματα ταυτοποίησης των μικροοργανισμών με το σύστημα API.

Δείγμα	Προέλευση καλλιέργειας	Αποτέλεσμα	% Ποσοστό Ταυτοποίησης
1	Total Coliforms	<i>Serratia odorifera</i>	99.6
14	Total Coliforms	<i>Serratia odorifera</i>	99.9
7	Total Coliforms	<i>Erwinnia sp.</i>	3
6	Pseudomonas	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	99.2
17	Total Coliforms	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	99.9
19	Total Coliforms	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	99.8
22	Total Coliforms	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	57.8
21	Total Coliforms	<i>Aeromonas salmonicida</i>	98.5
20	Pseudomonas	<i>Aeromonas salmonicida</i>	46.7
7	Pseudomonas	<i>Pseudomonas cepacia</i>	99.9
15	Pseudomonas	<i>Pseudomonas cepacia</i>	99.9
21	Pseudomonas	<i>Pseudomonas cepacia</i>	99.9
5	Total Coliforms	<i>Pseudomonas cepacia</i>	99.3

Παρατηρείται ότι στις πλείστες των περιπτώσεων η βιοχημική ταυτοποίηση έδωσε σαφή αποτελέσματα. Μη επαρκές ποσοστό βεβαιότητας της ταυτοποίησης σημειώθηκε μόνο σε ένα στέλεχος του γένους *Erwinia* sp., το οποίο όμως επιλέξαμε να εξετάσουμε καθώς είναι βέβαιο πως ανήκει στην οικογένεια των Enterobacteriaceae. Η εμφάνιση χαμηλού ποσοστού βεβαιότητας ταυτοποίησης μπορεί να οφείλεται είτε στο περιορισμένο εύρος της βάσης δεδομένων του συστήματος, είτε στο γεγονός ότι πρόκειται για περιβαλλοντικό στέλεχος, γεγονός που καθιστά περίπλοκη την ταυτοποίησή του.



Γράφημα 1. Βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από τα περιβαλλοντικά δείγματα.

4.2.1 ΣΥΝΟΠΤΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

- *Aeromonas salmonicida*: Πρόκειται για ένα αρνητικό κατά Gram, δυνητικά αναερόβιο, παθογόνο βακτήριο που προσβάλλει κυρίως πληθυσμούς υδάτινων οικοσυστημάτων, αλλά και τους ανθρώπους προκαλώντας δοθηνώση.
- *Sphingomonas paucimobilis*: Ονομάζεται και *Pseudomonas paucimobilis*. Αρνητικός κατά Gram βάκιλος που συναντάται συνήθως σε υδάτινα οικοσυστήματα και ρίζες φυτών. Προκαλεί ακίνδυνες συνήθως λοιμώξεις στους ανθρώπους που αντιμετωπίζονται συνήθως με τη χρήση αντιβιοτικών, με ελάχιστα καταγεγραμμένα περιστατικά βακτηριαιμίας και λοιμώξεων της αναπνευστικής οδού.
- *Raoultella ornithinolytica*: Παλαιότερα ονομαζόταν *Klebsiella ornithinolytica*. Είναι αρνητικός κατά Gram αερόβιος βάκιλος. Έχει καταγραφεί ανθεκτικότητά του σε αντιβιοτικά αλλά και βαρέα μέταλλα.
- *Serratia odorifera*: Gram αρνητικά εντεροβακτήρια. Αρκετά κοινά σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα. Έχει καταγραφεί η ανθεκτικότητά τους σε πληθώρα αντιβιοτικών.
- *Pseudomonas cepacia*: Γνωστό και ως *Burkholderia cepacia*. Είναι αρνητικό κατά Gram βακτήριο, αρκετά κοινό στο έδαφος, στο νερό, και σε περιοχές όπου υπάρχει αποσύνθεση φυτικών οργανισμών. Μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού. Παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε πολλά κοινά αντιβιοτικά.
- *Enterococcus* sp.: Οι εντερόκοκκοι είναι ένα μεγάλο γένος Gram θετικών κόκκων. Είναι υπεύθυνοι για ένα μεγάλο εύρος λοιμώξεων και χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την ποιότητα επιφανειακών υδάτων. Έχουν τη δυνατότητα να αναπτύξουν ανθεκτικότητα θεωρητικά σε όλα τα γνωστά αντιβιοτικά (Hollenbeck & Rice, 2012).
- *Erwinnia* sp.: Γένος των εντεροβακτηρίων που περιλαμβάνει Gram αρνητικά βακτήρια, παρόμοια με την *Escherichia coli* και τη *Salmonella*. Είναι παθογόνου για τους φυτικούς οργανισμούς.

4.3 ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών ορίζεται από το ISO 20776-2:2007 (212, ISO/TC, 2007), με βάση το οποίο οι μικροοργανισμοί κατηγοριοποιούνται ως ανθεκτικοί (Resistant), μετρίως ευαίσθητοι (Intermediate) και ευαίσθητοι (Susceptible):

- **Ευαίσθητοι**: οι μικροοργανισμοί των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μία συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συνδέεται με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας.
- **Μετρίως ευαίσθητοι**: οι μικροοργανισμοί των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μία συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συνδέεται με αμφίβολη θεραπευτική επιτυχία.
- **Ανθεκτικοί**: οι μικροοργανισμοί των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μία συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συνδέεται με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας.

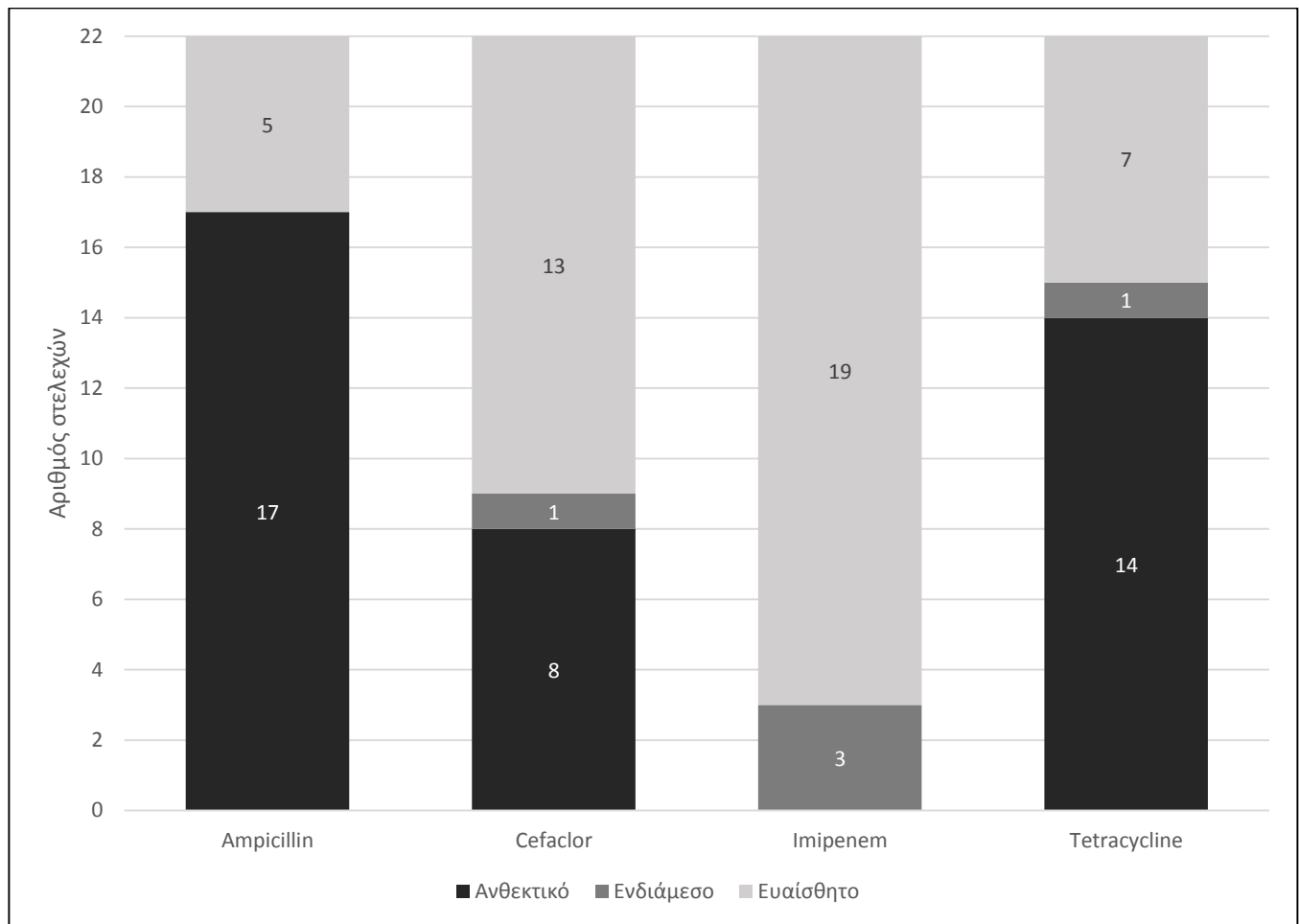
Η ευαισθησία των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά κρίθηκε βάσει των ορίων ανασταλτικής συγκέντρωσης που έχουν οριστεί από οργανισμούς όπως ο *EUCAST* και ο *CLSI*. Τα όρια που αφορούν τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς φαίνονται στον πίνακα 7.

Είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και οι τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσής τους (πίνακας 7), έχουν οριστεί μέσα στο πλαίσιο των κλινικών λειτουργιών τους. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιούνται από κλινικούς ιατρούς ως ένας οδηγός για την αντιμετώπιση ασθενειών, με την ύπαρξη ανθεκτικότητας να αντιστοιχεί σε θεραπευτική αποτυχία. Στην παρούσα εργασία, που αφορά περιβαλλοντικά στελέχη, κρίθηκε σωστότερο να χρησιμοποιηθούν οι βιβλιογραφικές τιμές ανασταλτικής συγκέντρωσης ως ένας αρχικός οδηγός για τον ορισμό της ανθεκτικότητας των στελεχών. Για την τελική κατηγοριοποίησή τους ως προς την ανθεκτικότητα, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων των τιμών ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης μεταξύ των ιδίων των στελεχών. Οι τιμές αυτές δεν απέκλιναν σημαντικά από τις βιβλιογραφικές. Να σημειωθεί επίσης, πως η πραγματική τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης, βρίσκεται πάντα λίγο χαμηλότερα από εκεί που εμφανίζεται. Για παράδειγμα εάν εμφανιστεί αναστολή του μικροοργανισμού κατά 60% σε συγκέντρωση 0.5 $\mu\text{g/mL}$, τότε η MIC_{50} βρίσκεται σε μία συγκέντρωση ανάμεσα στα 0.25 $\mu\text{g/mL}$ και στα 0.5 $\mu\text{g/mL}$.

Βάσει των παραπάνω κρίθηκε η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών και τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα φαίνονται στο γράφημα 2. Όπως παρατηρούμε, εμφανίστηκαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στις αντιβιοτικές ουσίες Ampicillin και Tetracycline, ενώ στην Imipenem τα περισσότερα στελέχη ήταν ευαίσθητα. Στο αντιβιοτικό Ampicillin η πιο ανθεκτική οικογένεια μικροοργανισμών ήταν αυτή των Enterobacteriaceae, στην Tetracycline των Enterococcaceae και στο Cefaclor αυτή των Pseudomonadaceae.

Πίνακας 7. Όρια ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των εξεταζόμενων βακτηρίων στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά.

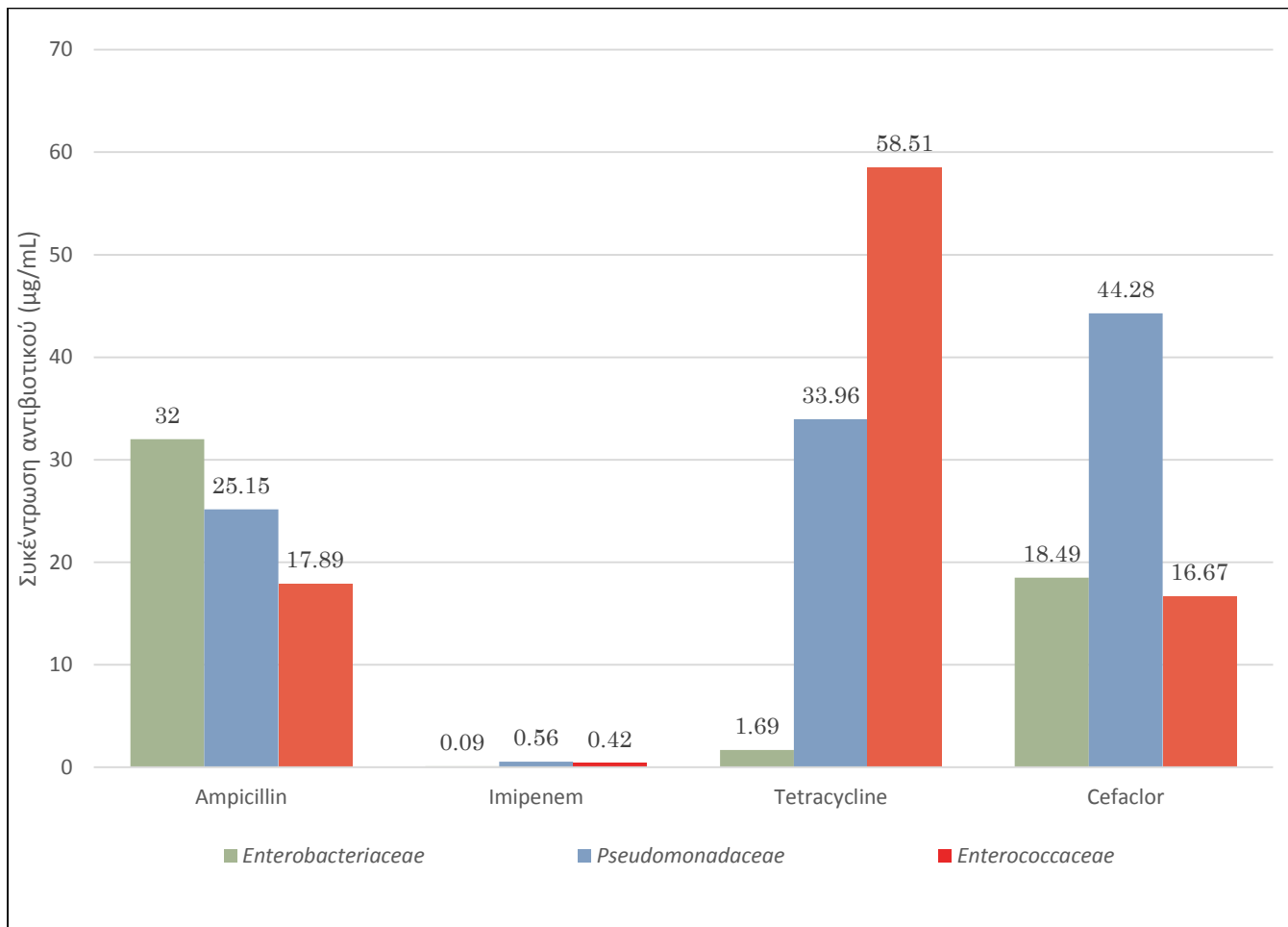
Οικογένεια	Εύρος Ανασταλτικής Συγκέντρωσης MIC (μg/mL)		
	Ευαίσθητος	Μετρίως ευαίσθητος	Ανθεκτικός
	Ampicillin		
<i>Enterobacteriaceae</i>	MIC ≤ 8	-	MIC ≥ 8
<i>Enterococaceae</i>	MIC ≤ 4	4 < MIC < 8	MIC ≥ 8
<i>Pseudomonadaceae</i>	MIC ≤ 4	4 < MIC < 16	MIC ≥ 16
	Cefaclor		
<i>Enterobacteriaceae</i>	MIC ≤ 8	8 < MIC < 32	MIC ≥ 32
<i>Enterococaceae</i>	MIC ≤ 8	8 < MIC < 32	MIC ≥ 32
<i>Pseudomonadaceae</i>	MIC ≤ 8	8 < MIC < 32	MIC ≥ 32
	Tetracycline		
<i>Enterobacteriaceae</i>	MIC ≤ 4	4 < MIC < 16	MIC ≥ 16
<i>Enterococaceae</i>	MIC ≤ 2	2 < MIC < 8	MIC ≥ 8
<i>Pseudomonadaceae</i>	MIC ≤ 4	4 < MIC < 16	MIC ≥ 16
	Imipenem		
<i>Enterobacteriaceae</i>	MIC ≤ 2	2 < MIC < 8	MIC ≥ 8
<i>Enterococaceae</i>	MIC ≤ 2	2 < MIC < 8	MIC ≥ 8
<i>Pseudomonadaceae</i>	MIC ≤ 4	4 < MIC < 8	MIC ≥ 8



Γράφημα 2. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του βαθμού ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε κάθε αντιβιοτικό.

Η αναζήτηση ανθεκτικών μικροοργανισμών μέσω της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης είχε σκοπό αφενός την χαρτογράφηση την ανθεκτικότητας των βακτηριακών πληθυσμών με βάση το είδος και την προέλευσή τους και αφετέρου το να μας δώσει έναν οδηγό για τον εντοπισμό των γονιδίων ανθεκτικότητας στη συνέχεια. Ελέγχθηκε επίσης η διαφοροποίηση της ανθεκτικότητας ανάμεσα σε στελέχη που προέρχονται από ανεπεξέργαστα υγρά λύματα και σε στελέχη που έχουν περάσει το στάδιο της επεξεργασίας των λυμάτων.

Τα στελέχη που προέρχονταν από εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων παρουσίασαν στο σύνολό τους ανθεκτικότητα σε ποσοστό 61,36%, ενώ τα προερχόμενα από θαλασσινό νερό 50% και από κοπρανώδες υλικό ζωικής προέλευσης 33,3%. Η ανεπτυγμένη ανθεκτικότητα σε στελέχη υγρών λυμάτων είναι λογική, καθώς το περιβάλλον των εγκαταστάσεων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων είναι ιδανικό για την ανάπτυξη και τη διάδοση της ανθεκτικότητας μεταξύ μικροοργανισμών, καθώς βρίσκονται σε συνεχή επαφή μεταξύ τους και με άλλες αντιβιοτικές ουσίες (Marti, et al., 2014).



Γράφημα 3. Μέση τιμή ανασταλτικής συγκέντρωσης ανά βακτηριακή οικογένεια και αντιβιοτικό παράγοντα.

4.3.1 ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Ως πολυανθεκτικότητα (Multiple Drug Resistance – MDR), ορίζουμε το φαινόμενο της εμφάνισης ανθεκτικότητας σε πάνω από έναν αντιβιοτικό παράγοντα (Subramani & Vignesh, 2012). Συνολικά, το 77,73% των στελεχών εμφάνισε πολυανθεκτικότητα. Από τα 22 εξεταζόμενα στελέχη, τα 2 (9.09%) παρουσίασαν τουλάχιστον μέτρια ανθεκτικότητα και στα 4 αντιβιοτικά. Πέντε στελέχη (22.73%) ήταν ανθεκτικά σε 3 αντιβιοτικά και εννέα στελέχη (40.91%) ήταν ανθεκτικά σε 2 αντιβιοτικά.

Πολυανθεκτικότητα εμφανίστηκε κυρίως σε βακτήρια των οικογενειών Enterococcaceae και Pseudomonadaceae. Συγκεκριμένα, όλα τα βακτήρια του είδους *Pseudomonas ceracia* και το 88.89% των Εντερόκοκκων ήταν πολυανθεκτικά. Από τα εντεροβακτήρια, μόνο ένα στέλεχος του είδους *Raoultella ornithinolytica* παρουσίασε ανθεκτικότητα και στα 3 αντιβιοτικά.

Ένας δείκτης που μας βοηθάει να κατανοήσουμε τα αποτελέσματα της πολυανθεκτικότητας είναι ο MAR Index (Multiple Antibiotic Resistance Index), ο οποίος ορίζεται ως εξής:

$$MAR\ Index = \frac{\text{Αριθμός αντιβιοτικών στα οποία παρουσιάστηκε αυξημένη ανθεκτικότητα}}{\text{Συνολικός αριθμός αντιβιοτικών που εξετάστηκαν}}$$

Ο MAR Index των πολυανθεκτικών βακτηρίων που εξετάστηκαν κυμαίνεται από 0.5 έως 0.75. Τα στελέχη που προέρχονταν από εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων είχαν μέση τιμή του δείκτη MAR 0.63, ενώ αυτά που προέρχονταν από θαλασσινό νερό 0.56. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την κύρια προέλευση των πολυανθεκτικών αυτών στελεχών από περιβάλλοντα με υψηλό φορτίο αντιβιοτικών παραγόντων, καθώς και την ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας.

Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι το 64.28% των πολυανθεκτικών βακτηρίων προερχόταν από εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ενώ μόνο το 21.43 εξ' αυτών προερχόταν από θαλάσσια οικοσυστήματα. Η πολυανθεκτικότητα λοιπόν ευνοείται σε περιβάλλοντα όπως οι Ε.Ε.Υ.Α., όπου υπάρχει αφενός μεν μεγάλο φορτίο αντιμικροβιακών παραγόντων, αφετέρου δε η ευκαιρία για σύζευξη των μικροοργανισμών και μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας.

Τα βακτήρια με υψηλό δείκτη MAR χαρακτηρίζονται ως άκρως επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία, καθώς μπορεί να είναι φορείς πολλών γονιδίων ανθεκτικότητας και η αντιμετώπισή λοιμώξεων που προκαλούνται από αυτά καθίσταται δύσκολη έως αδύνατη σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Τα βακτήρια με υψηλό δείκτη επικινδυνότητας που εντοπίσαμε ανήκουν στα είδη: *Sphingomonas paucimobilis*, *Raoultella ornithinolytica*, *Pseudomonas cepacia* και *Enterococcus sp.*.

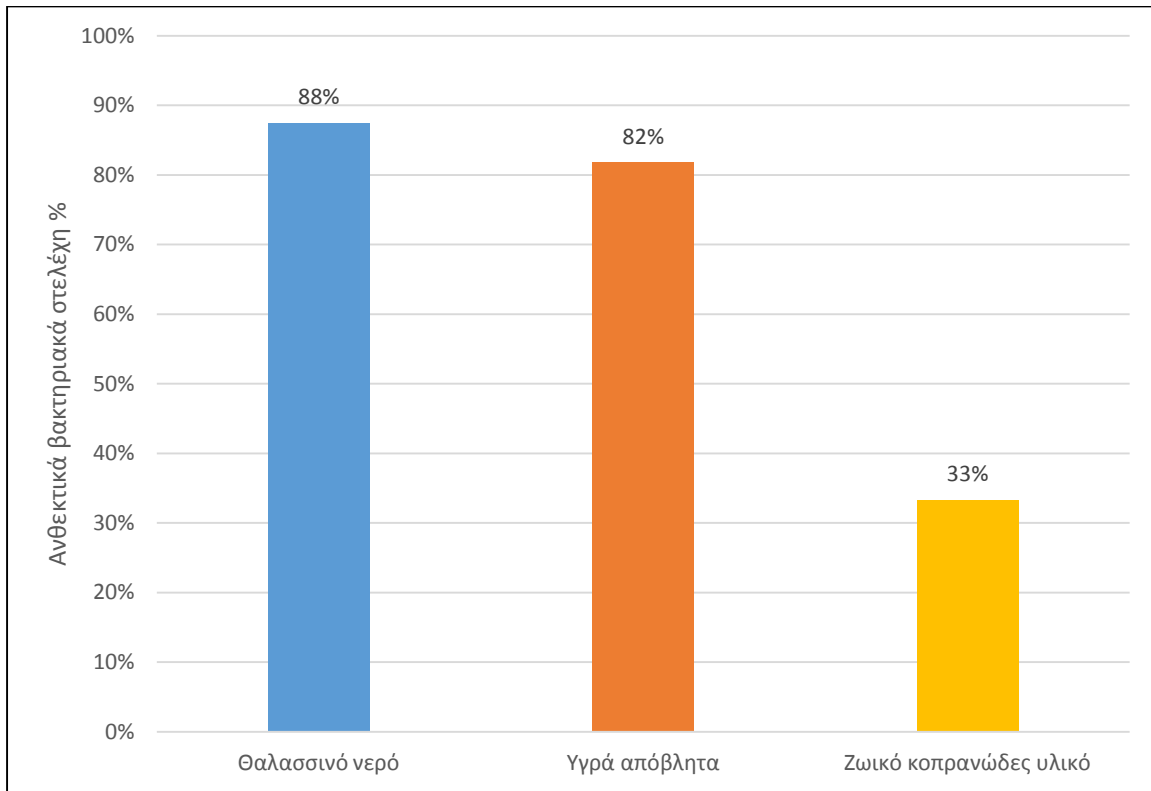
4.3.2 AMPICILLIN

Ανάμεσα στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, στην Ampicillin παρουσιάστηκε η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα. Συγκεκριμένα, το 77.23 % των στελεχών εμφάνισε αυξημένη αντοχή. Οι τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ήταν ιδιαίτερα υψηλές και το 68.18% των στελεχών δεν παρουσίασε θνησιμότητα άνω του 50% σε καμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις.

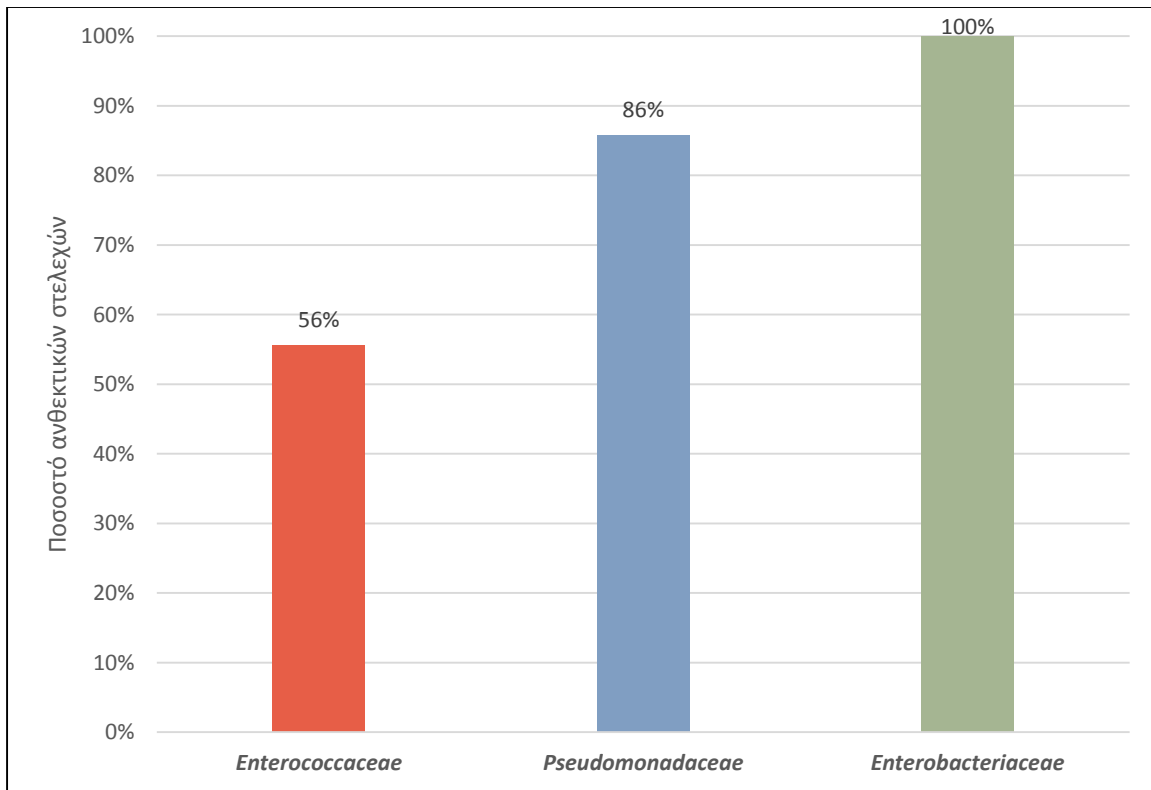
Από τις βακτηριακές οικογένειες που εξετάστηκαν η πλέον ανθεκτική ήταν αυτή των Enterobacteriaceae, της οποίας όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά. Αντιθέτως, οι εντερόκοκκοι εμφάνισαν μεγαλύτερη ευαισθησία από τους άλλους μικροοργανισμούς, παρά το γεγονός ότι το συγκεκριμένο αντιβιοτικό έχει μειωμένη εκλεκτικότητα στο συγκεκριμένο είδος. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την ύπαρξη επίκτητης ανθεκτικότητας σε στελέχη που η Αμπικιλλίνη έχει φυσιολογικά υψηλή δράση.

Όπως παρατηρείται στο γράφημα 7, η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στην Αμπικιλλίνη δε διαφοροποιείται από την είσοδο στην έξοδο των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων. Η μέση τιμή ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης των βακτηρίων της εισόδου είναι 26.71 µg/mL, ενώ της εξόδου 25.65 µg/mL. Συνεπώς, η επεξεργασία των υγρών λυμάτων δε φαίνεται να επηρεάζει ούτε θετικά ούτε αρνητικά την ευαισθησία των μικροοργανισμών στην Αμπικιλλίνη.

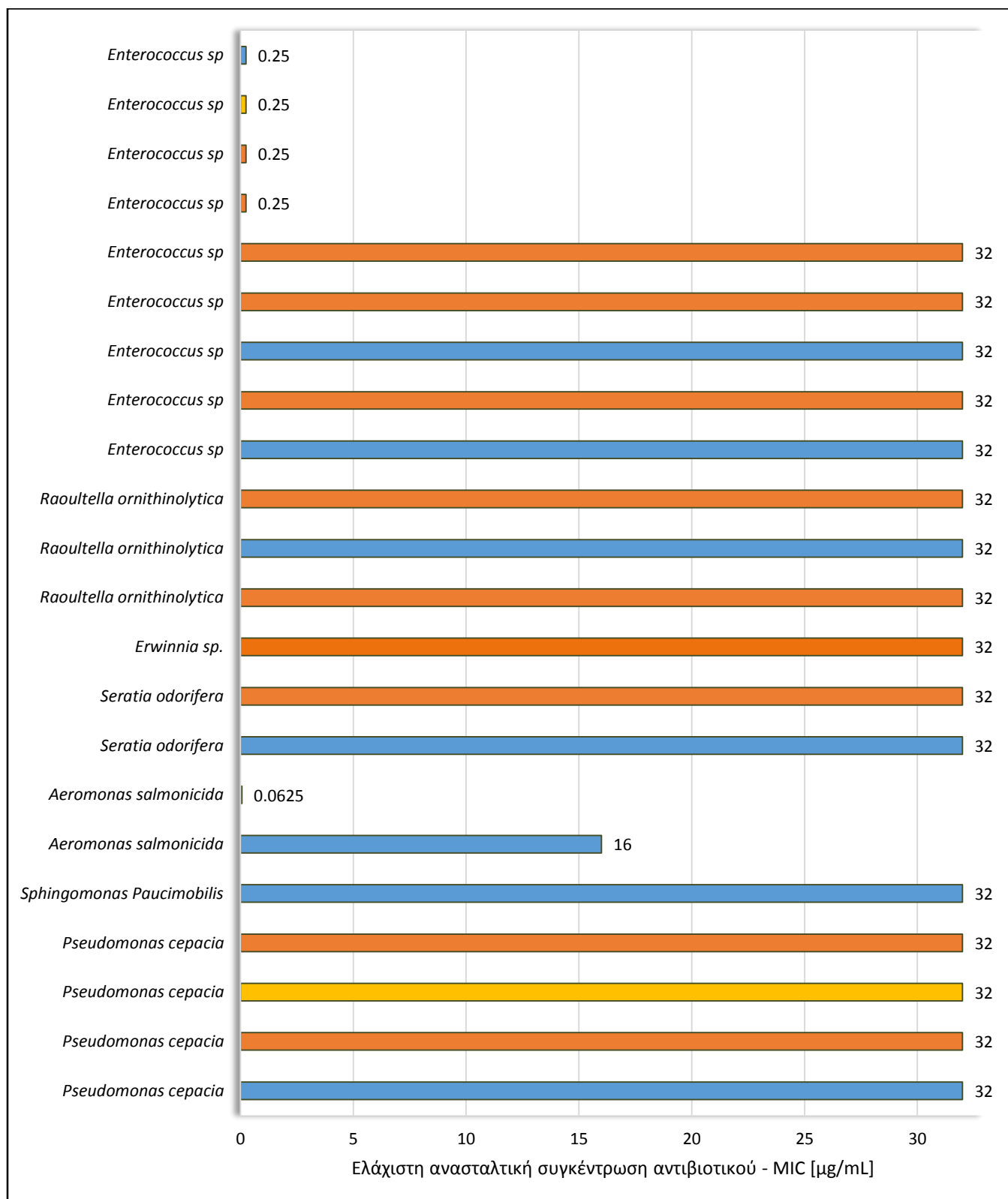
Η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην Αμπικιλλίνη, παρουσιάστηκε σε στελέχη προερχόμενα από θαλάσσια περιβάλλοντα και από εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Η αυξημένη ανθεκτικότητα σε θαλάσσιο περιβάλλον, υποδηλώνει πιθανή ανθρωπογενή δραστηριότητα στο περιβάλλον όπου έγινε η δειγματοληψία.



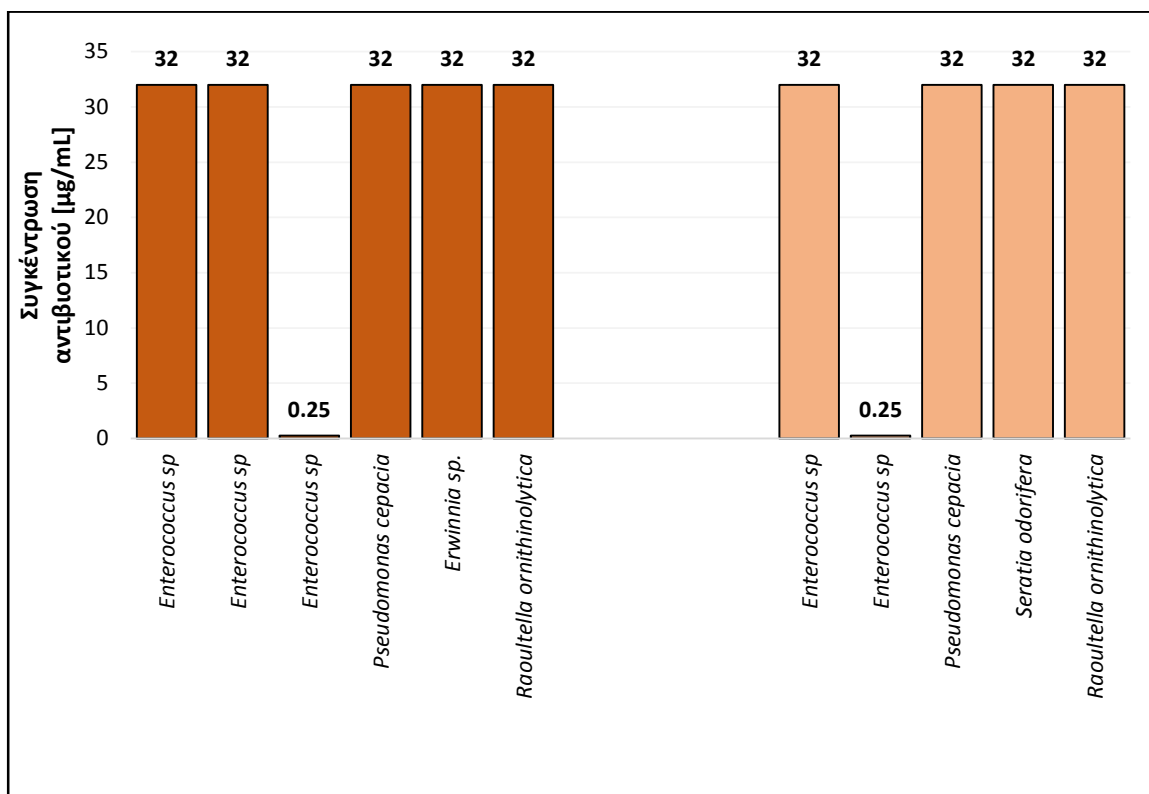
Γράφημα 4. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στην **Ampicillin** επί του συνόλου των στελεχών βάσει προέλευσης.



Γράφημα 5. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στην **Ampicillin** επί του συνόλου κάθε οικογένειας βακτηρίων.



Γράφημα 6. Τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης των μικροοργανισμών στην αντιβιοτική ουσία: **Ampicillin**.
 Τα στελέχη προέρχονται από: 1. Θαλασσινό νερό 2. Υγρά απόβλητα 3. Ζωικό κοπρανώδες υλικό

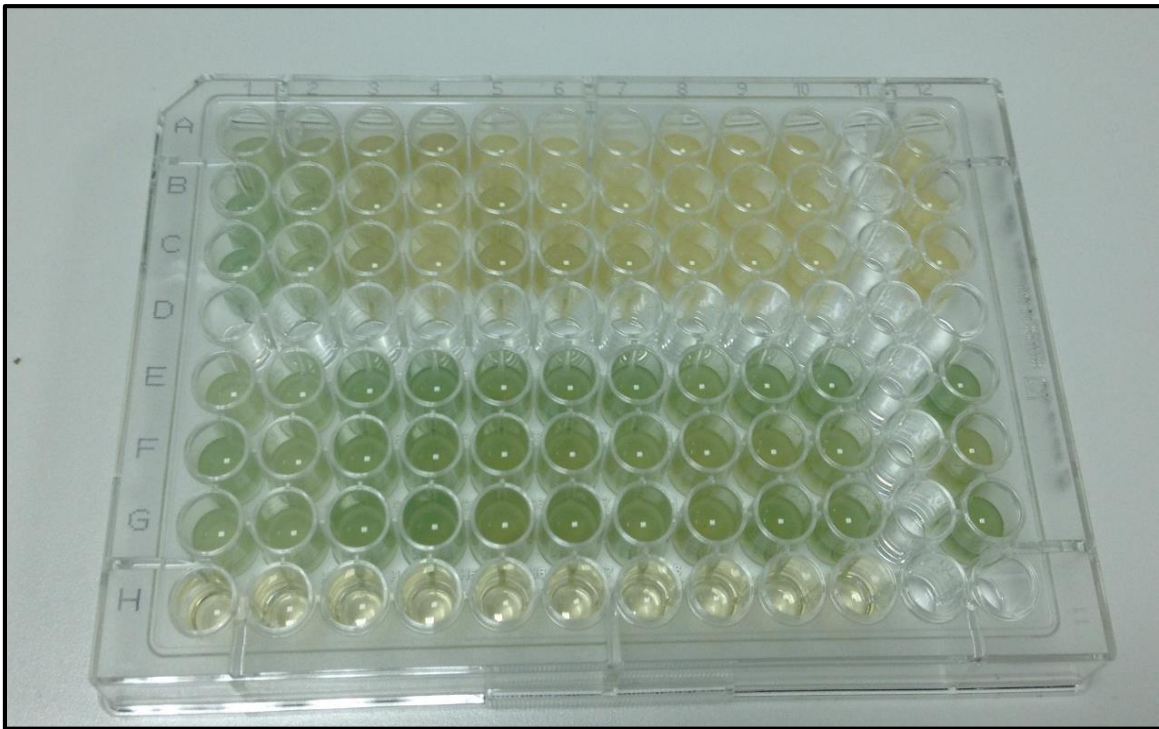


Γράφημα 7. Τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης μικροοργανισμών στην **Ampicillin** προερχόμενων από:

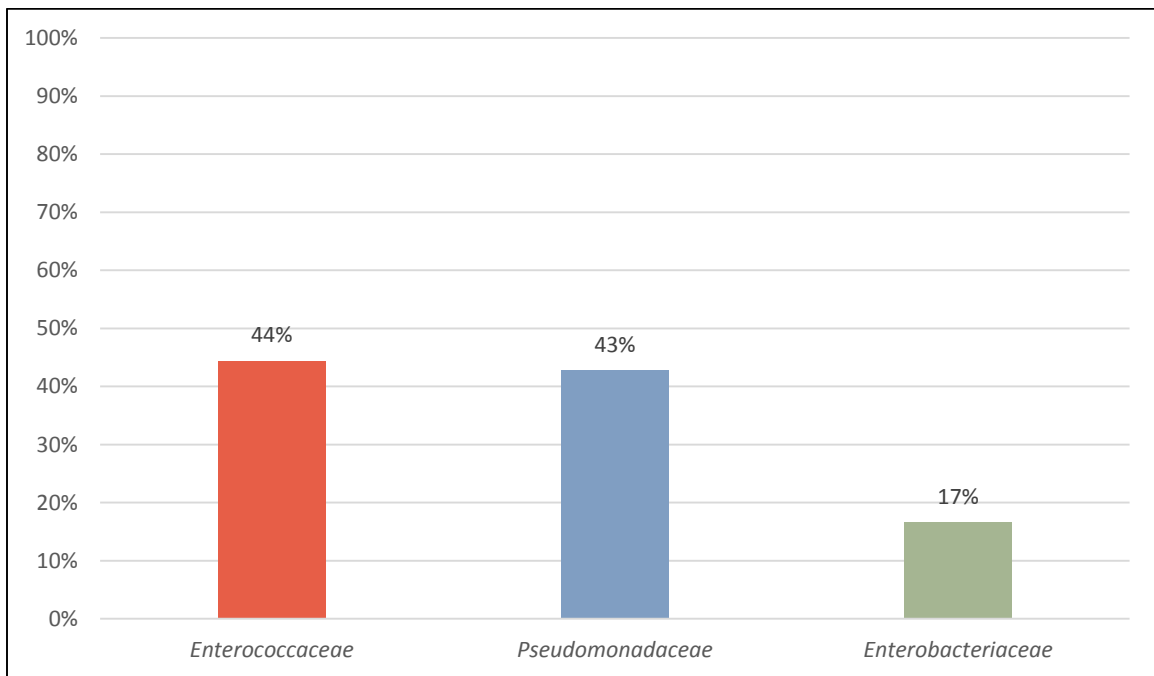
1. Είσοδο Ε.Ε.Υ.Α. 2. Εξοδο Ε.Ε.Υ.Α.

4.3.3 CEFACLOX

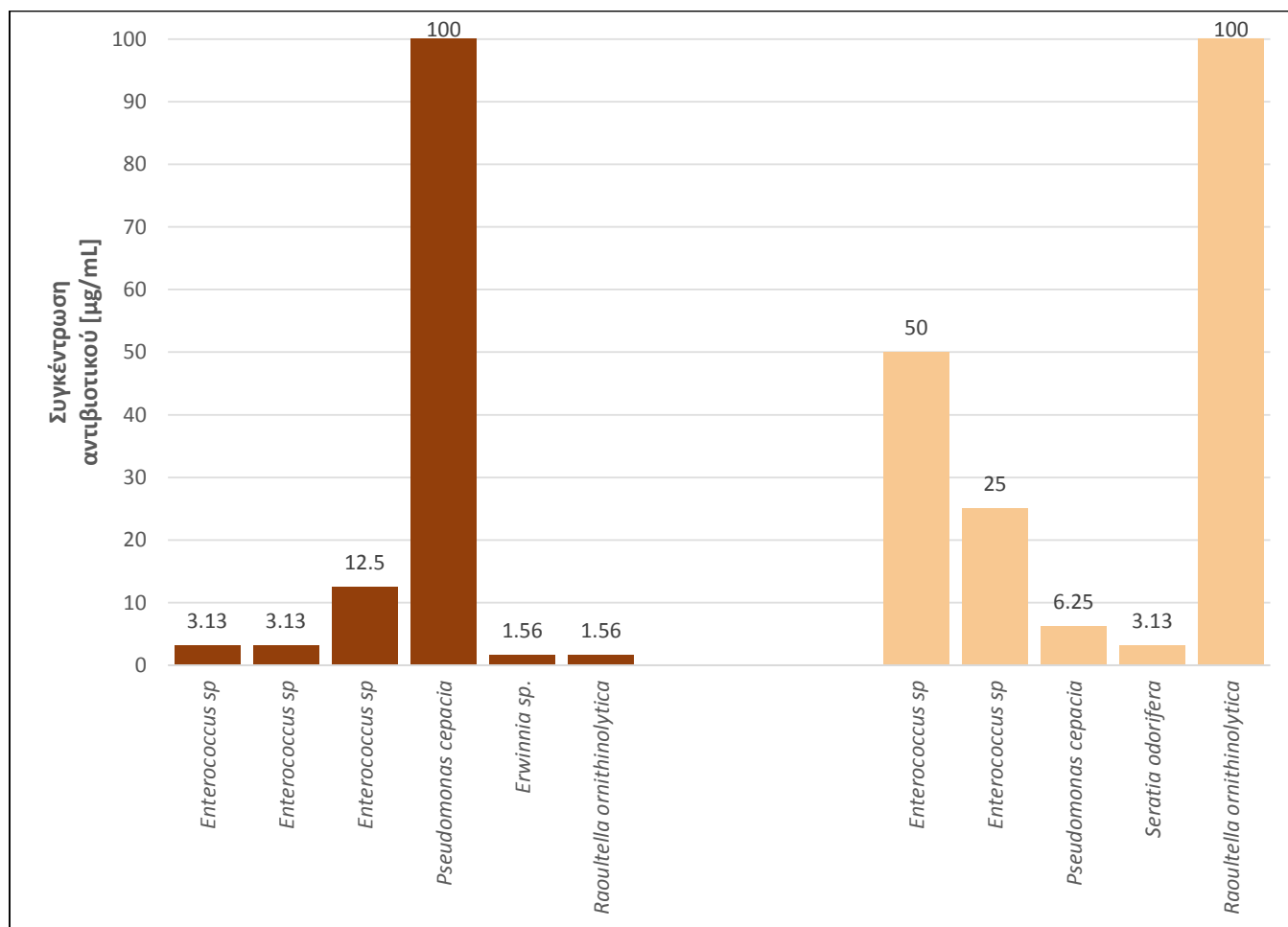
Στην αντιβιοτική ουσία της Κεφακλόρης, εμφανίστηκαν μέτρια ποσοστά ανθεκτικότητας. Το 40.91% των στελεχών παρουσίασε ανθεκτικότητα. Από τα ανθεκτικά στελέχη το 33.33% ανήκε στην οικογένεια των *Pseudomonadaceae*, το 11.11% στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae* και το 55.56% στην οικογένεια των *Enterococcaceae*. Μέτρια δράση του αντιβιοτικού παρουσιάστηκε στα στελέχη των *Enterococcaceae* και *Pseudomonadaceae*. Αντιθέτως, παρουσιάστηκε αυξημένη δράση του αντιβιοτικού στα εντεροβακτήρια, καθώς το 83.33% των στελεχών ήταν ευαίσθητο. Σε τρία στελέχη, όλα της οικογένειας *Pseudomonadaceae*, δεν παρουσιάστηκε αναστολή ούτε στη μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση, δηλαδή τα βακτήρια αυτά παρουσίασαν πλήρη ανθεκτικότητα στη δράση της συγκεκριμένης ουσίας.



Εικόνα 12. Πλακέτα μικροτυλοδότησης για την ανεύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης στα γένη *Aeromonas salmonicida* (άνω) και *Pseudomonas ceracia* (κάτω), κατά την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων Κεφακλόρης. Παρατηρείται ότι καθώς μειώνεται η συγκέντρωση του αντιβιοτικού προς τα δεξιά, αυξάνεται και η θολερότητα του δείγματος, λόγω υψηλότερης ανάπτυξης των βακτηρίων.



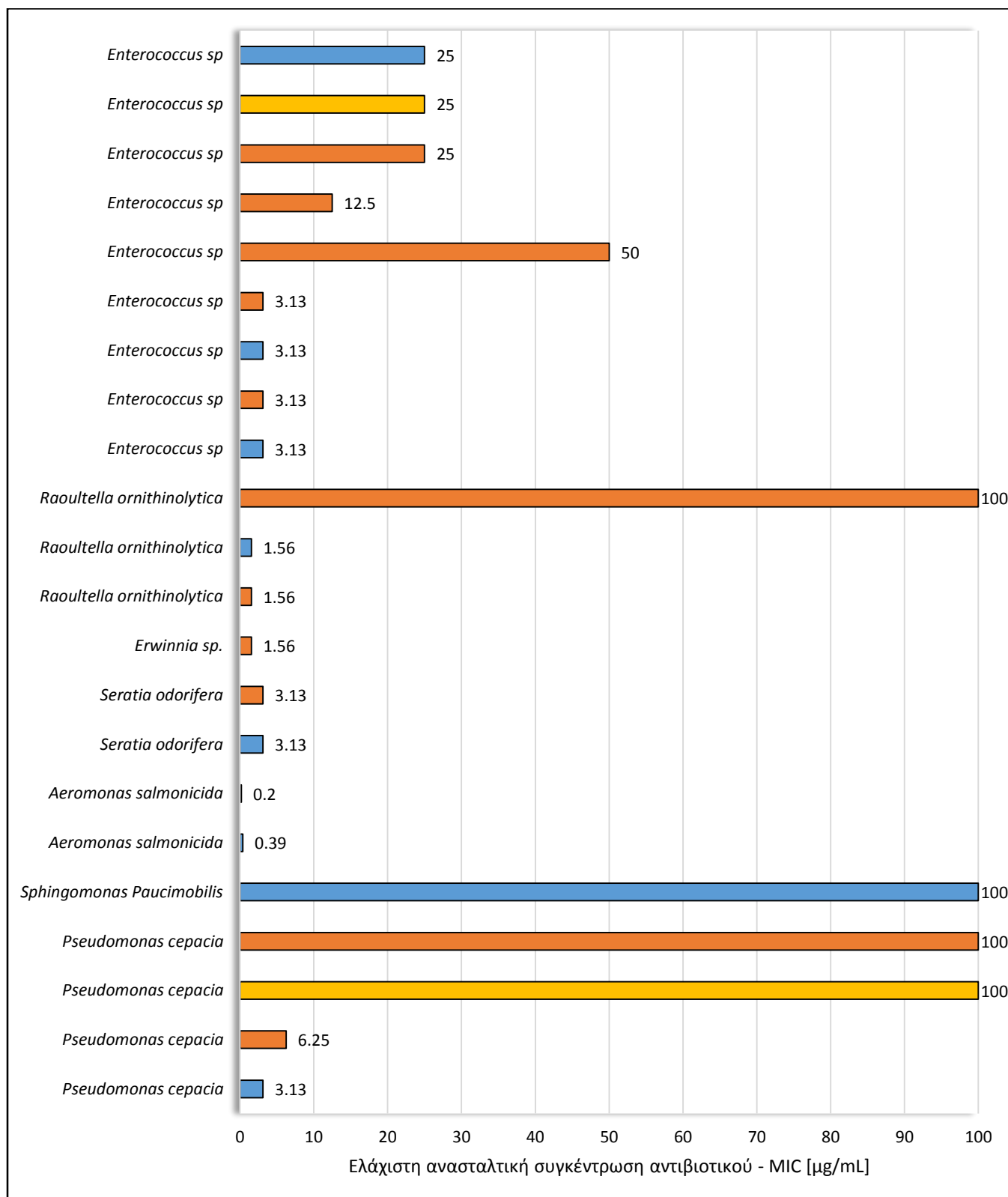
Γράφημα 8. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στο **Cefaclor** επί του συνόλου κάθε οικογένειας βακτηρίων.



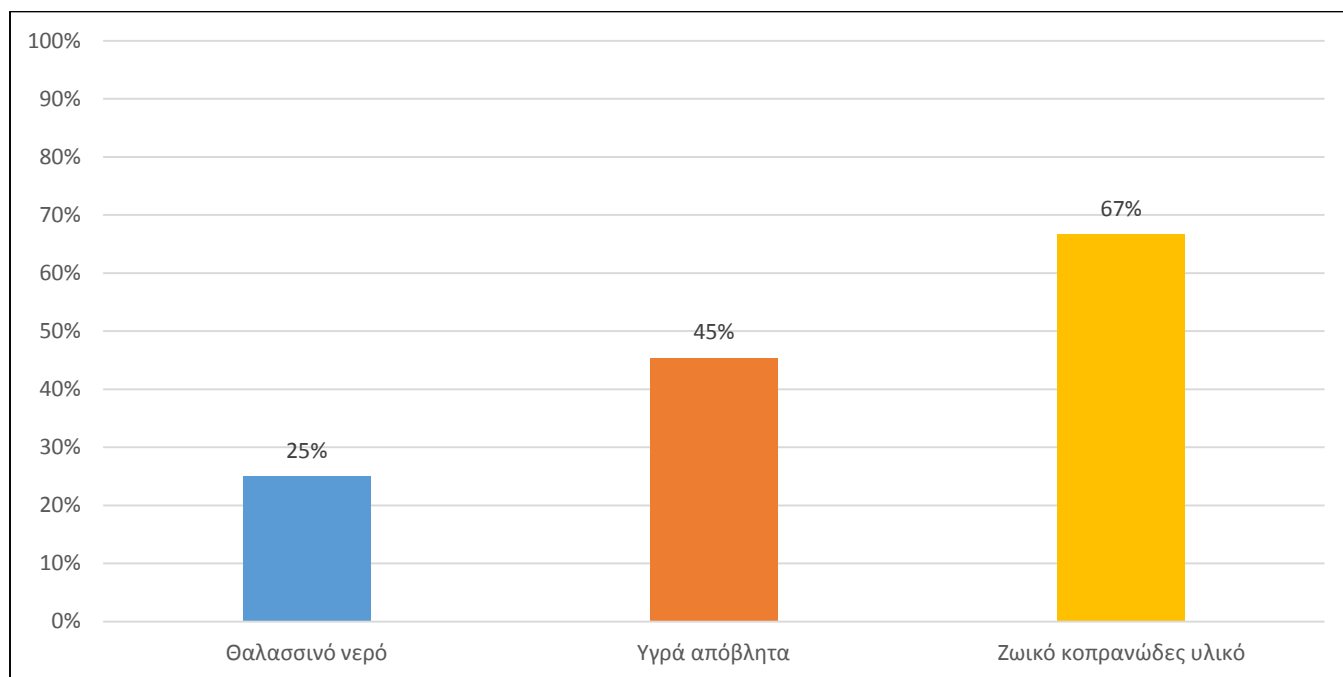
Γράφημα 9. Τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης μικροοργανισμών στο **Cefaclor** προερχόμενων από:
1. Είσοδο E.E.Y.A. 2. Εξοδο E.E.Y.A.

Παρατηρείται ότι οι τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης είναι ελαφρώς υψηλότερες σε στελέχη που προέρχονταν από την έξοδο εγκαταστάσεων επεξεργασίας αποβλήτων συγκριτικά με τα στελέχη που προέρχονταν από την είσοδο. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή της MIC των στελεχών που προέρχονταν από την είσοδο ήταν 20.31 µg/mL, ενώ των στελεχών που προέρχονταν από την έξοδο 36.88 µg/mL. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στη διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας κατά την παραμονή και διέλευση των βακτηρίων σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.

Στο Cefaclor παρουσιάστηκε ανθεκτικότητα κυρίως σε στελέχη που προέρχονταν από υγρά λύματα και από κοπρανώδες υλικό ζωικής προέλευσης, δηλαδή από περιβάλλοντα τα οποία είναι άμεσα επηρεαζόμενα από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες.



Γράφημα 10. Τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης των μικροοργανισμών στην αντιβιοτική ουσία: **Cefaclor**. Τα στελέχη προέρχονται από: 1. Θαλασσινό νερό 2. Υγρά απόβλητα 3. Ζωικό κοπρανώδες υλικό



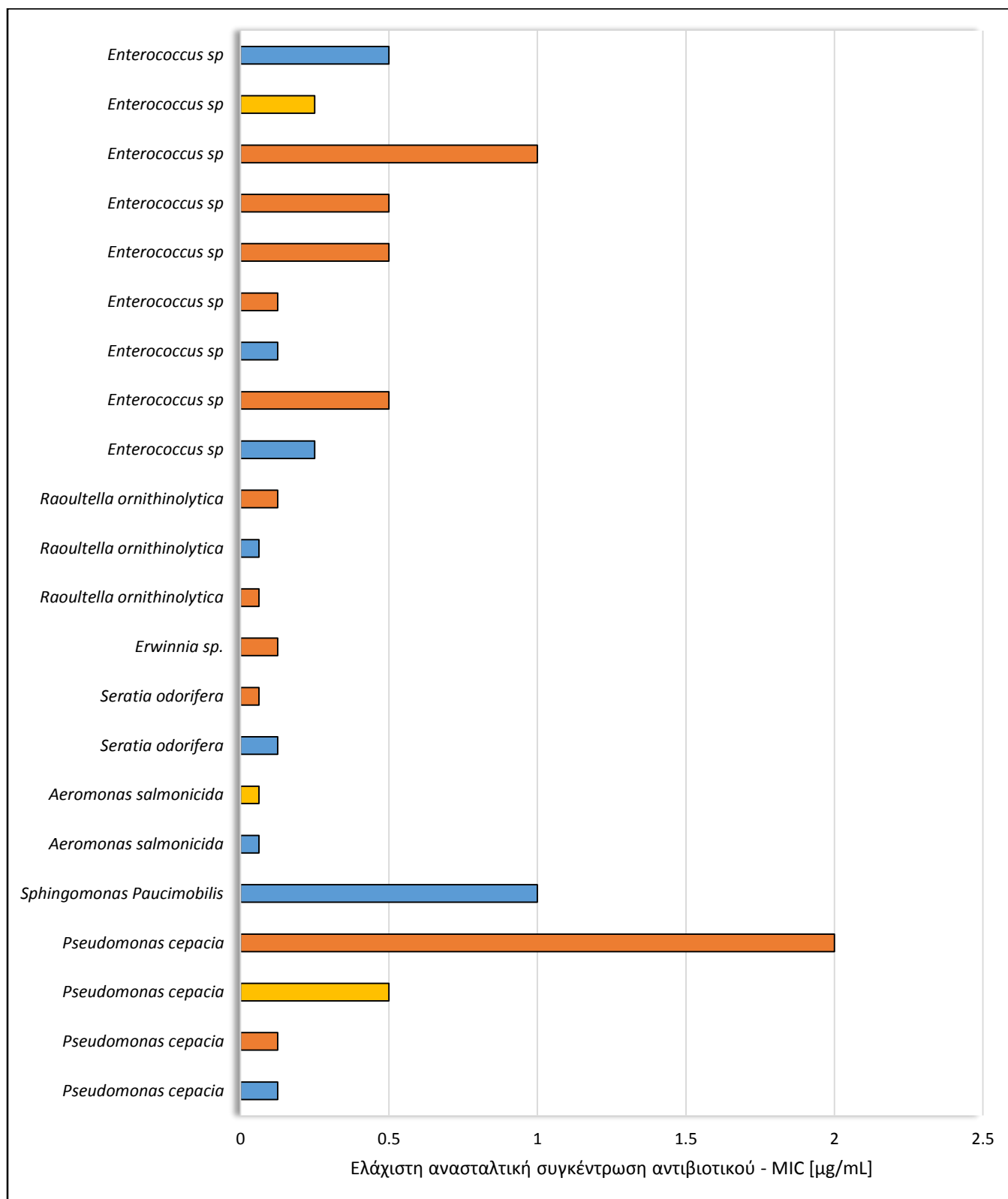
Γράφημα 11. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στο **Cefaclor** επί του συνόλου των στελεχών βάσει προέλευσης.

4.3.4 IMIPENEM

Οι εξεταζόμενοι μικροοργανισμοί εμφάνισαν πολύ υψηλή ευαισθησία στην Ιμιπενέμη. Οι τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ήταν ιδιαίτερα χαμηλές, δεδομένου του εύρους συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε (0.0625 $\mu\text{g/mL}$ – 32 $\mu\text{g/mL}$). Η μέση τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης όλων των μικροοργανισμών ήταν 0.37 $\mu\text{g/mL}$.

Λόγω της υψηλής ευαισθησίας των μικροοργανισμών στην Ιμιπενέμη δε μπορούμε να εξάγουμε σαφή συμπεράσματα σχετικά με την ανθεκτικότητά τους από τον συγκεκριμένο έλεγχο. Παρόλα αυτά θα εξεταστεί η παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας στα τρία στελέχη που εμφάνισαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις MIC: *Enterococcus sp*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas cepacia*.

Η υψηλή δραστηριότητα της Ιμιπενέμης ήταν αναμενόμενη, καθώς αποτελεί ένα από τα αντιβιοτικά με το πλέον ευρύ φάσμα δράσης και η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αυτό είναι σπάνια (CDC, 2010). Οι καρμπαπενέμες παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα απέναντι στη δράση του ενζύμου καρμπαπενεράση, το οποίο στοχεύει στην υδρόλυση της αντιβιοτικής ουσίας. Πέραν τούτου, η υδρόλυση των καρμπαπενεμών συμβαίνει με εξαιρετικά αργούς ρυθμούς *in vitro*. Η ανθεκτικότητα στην Ιμιπενέμη μπορεί να είναι μόνο επίκτητη και συναντάται κυρίως σε βακτήρια του είδους *Pseudomonas sp*. Παρόλα αυτά δεν αναμένουμε να συναντήσουμε γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στην Ιμιπενέμη, λόγω των χαμηλών τιμών της MIC.



Γράφημα 12. Τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης των μικροοργανισμών για την αντιβιοτική ουσία: **Imipenem**.

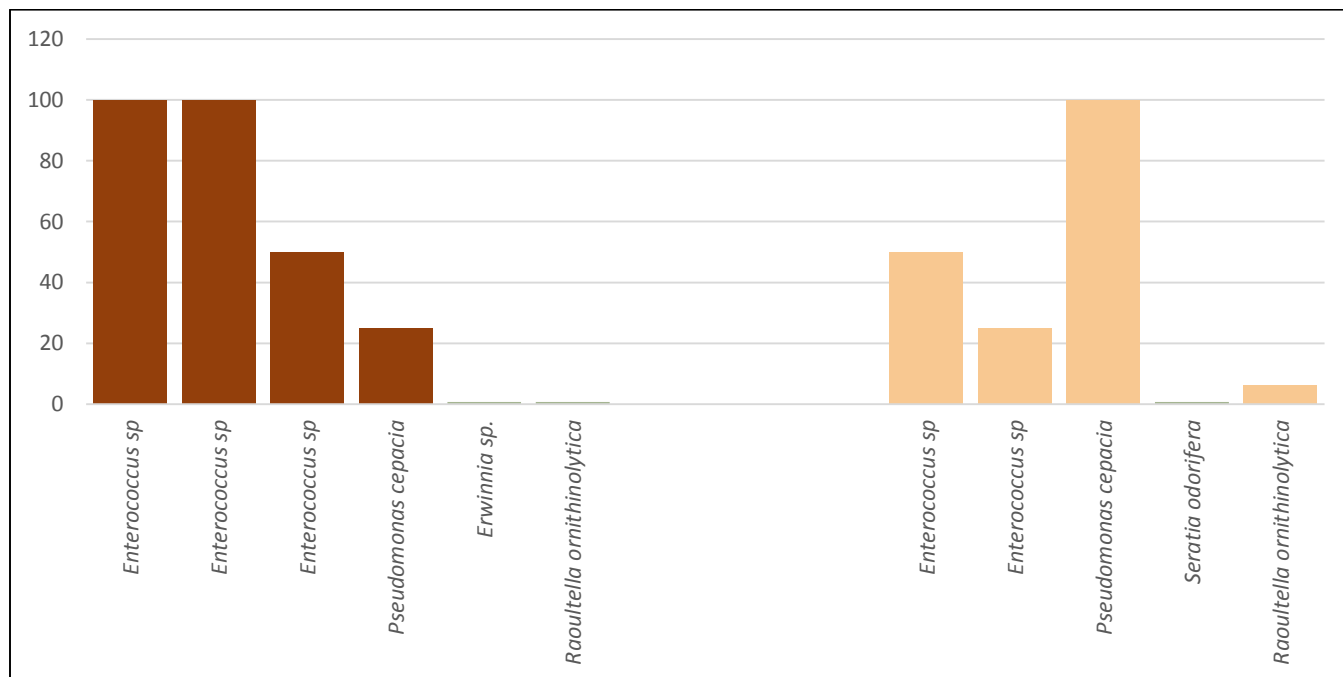
Τα στελέχη προέρχονται από: 1. ■ Θαλασσινό νερό 2. ■ Υγρά απόβλητα 3. ■ Ζωικό κοπρανώδες υλικό

4.3.5 TETRACYCLINE

Στην Τετρακυκλίνη εμφανίστηκαν σχετικά υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας (68.18%), η οποία εντοπίστηκε κυρίως σε στελέχη που προέρχονταν από υγρά λύματα και από ζωικό κοπρανώδες υλικό. Τα βακτήρια που προέρχονταν από ανεπεξέργαστα λύματα εμφάνισαν υψηλότερες τιμές MIC από αυτά που προέρχονταν από επεξεργασμένα λύματα. Το φαινόμενο αυτό έχει καταγραφεί και σε άλλες παρόμοιες μελέτες και μπορεί να συνδέεται με την καταστροφή και απομάκρυνση των μικροοργανισμών που είναι ανθεκτικοί στην Τετρακυκλίνη κατά την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων (Novo & Manaia, 2006).

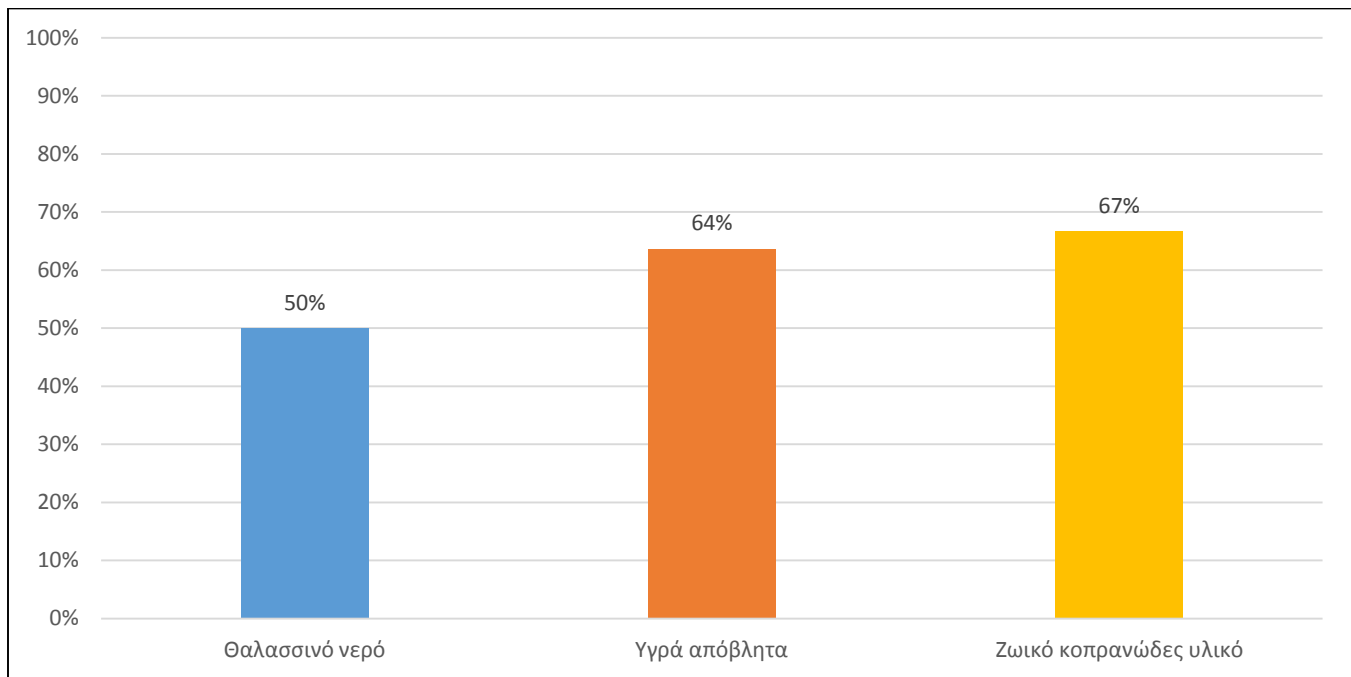
Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, πως το 89% των εντερόκοκκων παρουσίασε υψηλές τιμές ανασταλτικής συγκέντρωσης. Η υψηλή ανθεκτικότητα των εντερόκοκκων στην Τετρακυκλίνη είναι αρκετά σύνηθες φαινόμενο, γεγονός που τους καθιστά φορείς γονιδίων ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό (Wilcks, et al., 2005). Η οικογένεια των *Pseudomonadaceae* εμφάνισε επίσης πολύ υψηλό ποσοστό αντοχής, που υποδηλώνει την πιθανή ύπαρξη των υπευθύνων γονιδίων. Τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* παρουσίασαν όλα ευαισθησία στην Τετρακυκλίνη.

Η Τετρακυκλίνη αποτελεί αντιβιοτικό ευρέος φάσματος, γεγονός που σημαίνει ότι η ανθεκτικότητα που εμφανίστηκε είναι στις περισσότερες περιπτώσεις επίκτητη. Επίσης, η ανθεκτικότητα στην Τετρακυκλίνη είναι πολύ συχνά αποτέλεσμα απόκτησης νέου εξωγενούς γενετικού υλικού (Chopra & Roberts, 2001). Επομένως, αναμένουμε να εντοπίσουμε αρκετά γονίδια σχετικά με την ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Τα στελέχη στα οποία θα αναζητήσουμε γονίδια ανθεκτικότητας, είναι 1 *Enterobacteriaceae*, 6 *Pseudomonadaceae* και 8 *Enterococcaceae*.

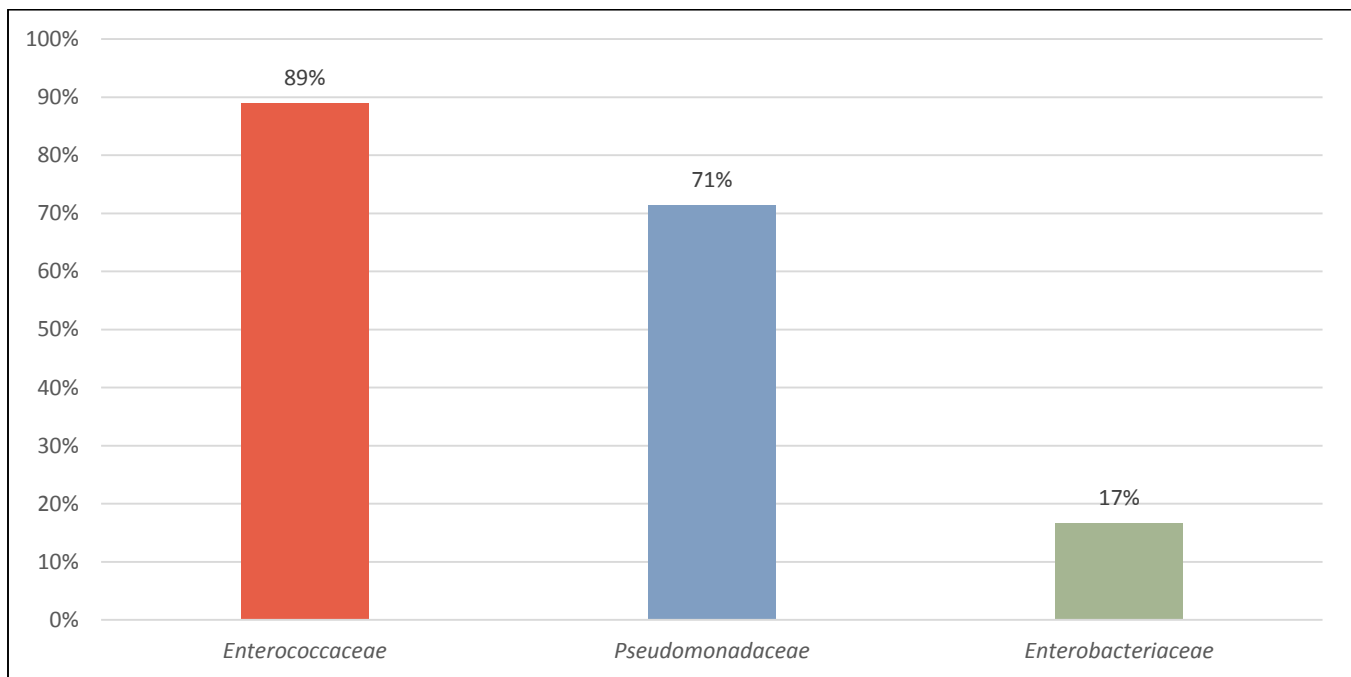


Γράφημα 13. Τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης μικροοργανισμών στην **Tetracycline** προερχόμενων από:

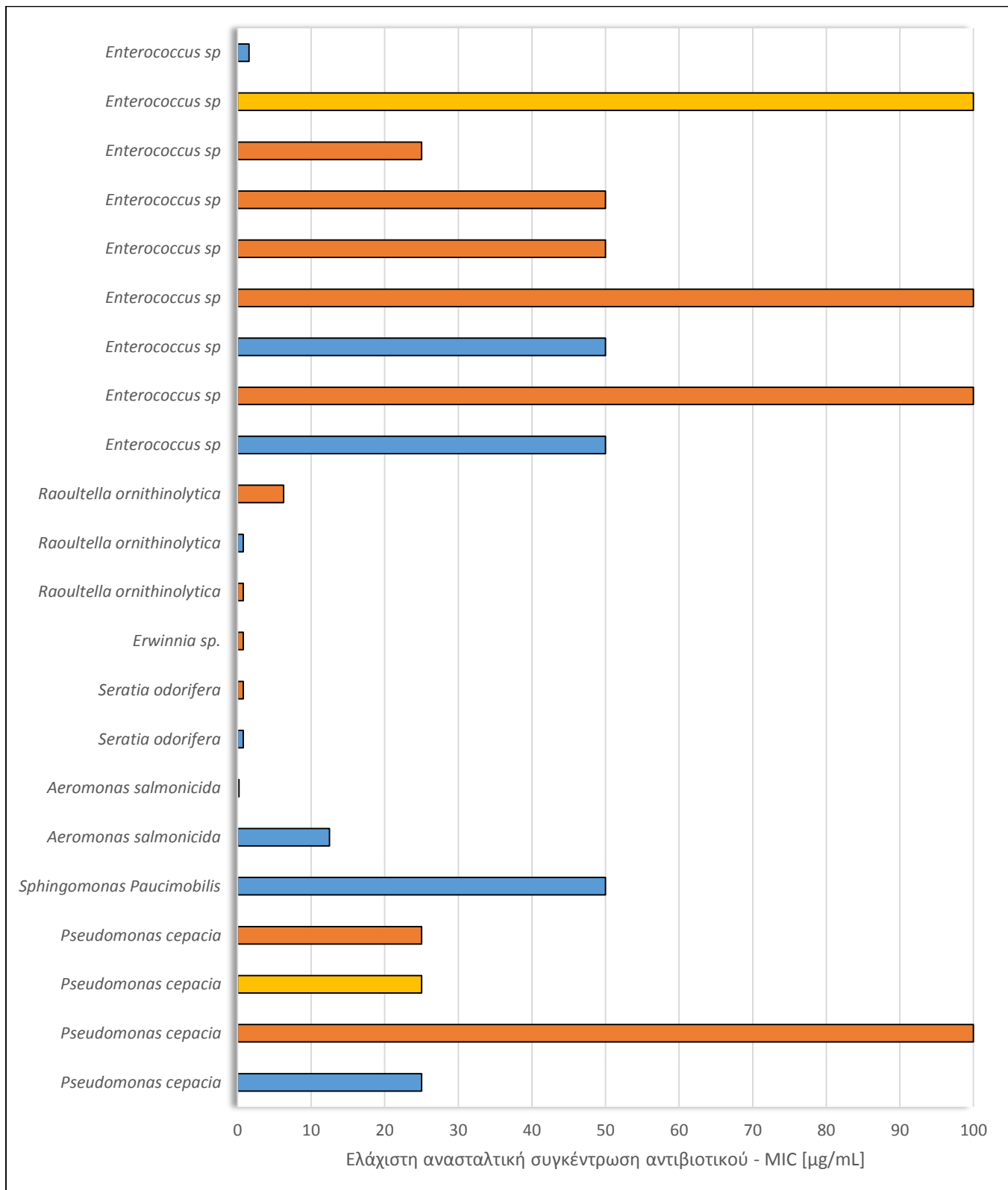
1. Είσοδο Ε.Ε.Υ.Α. 2. Έξοδο Ε.Ε.Υ.Α.



Γράφημα 14. . Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στην ***Tetracycline*** επί του συνόλου των στελεχών βάσει προέλευσης.



Γράφημα 15. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στην ***Tetracycline*** επί του συνόλου κάθε οικογένειας βακτηρίων.



Γράφημα 16. Τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης των μικροοργανισμών για την αντιβιοτική ουσία: **Tetracycline**.

Τα στελέχη προέρχονται από: 1. ■ Θαλασσινό νερό 2. ■ Υγρά απόβλητα 3. ■ Ζωικό κοπρανώδες υλικό

4.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Ο εντοπισμός των γονιδίων που ευθύνονται για την αντιμικροβιακή αντοχή επιδιώχθηκε στα στελέχη που εμφάνισαν υψηλές τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης κατά τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών. Για την ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας στα υπό μελέτη αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε αρχικά απομόνωση DNA με χρήση ενζύμων proteinase-K και lysozyme καθώς και με το Invisorb® Plasmid Midi Kit (Strattec Molecular). Η ανίχνευση των γονιδίων ανθεκτικότητας έγινε μέσω Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).

4.4.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΙΣ Β-ΛΑΚΤΑΜΕΣ

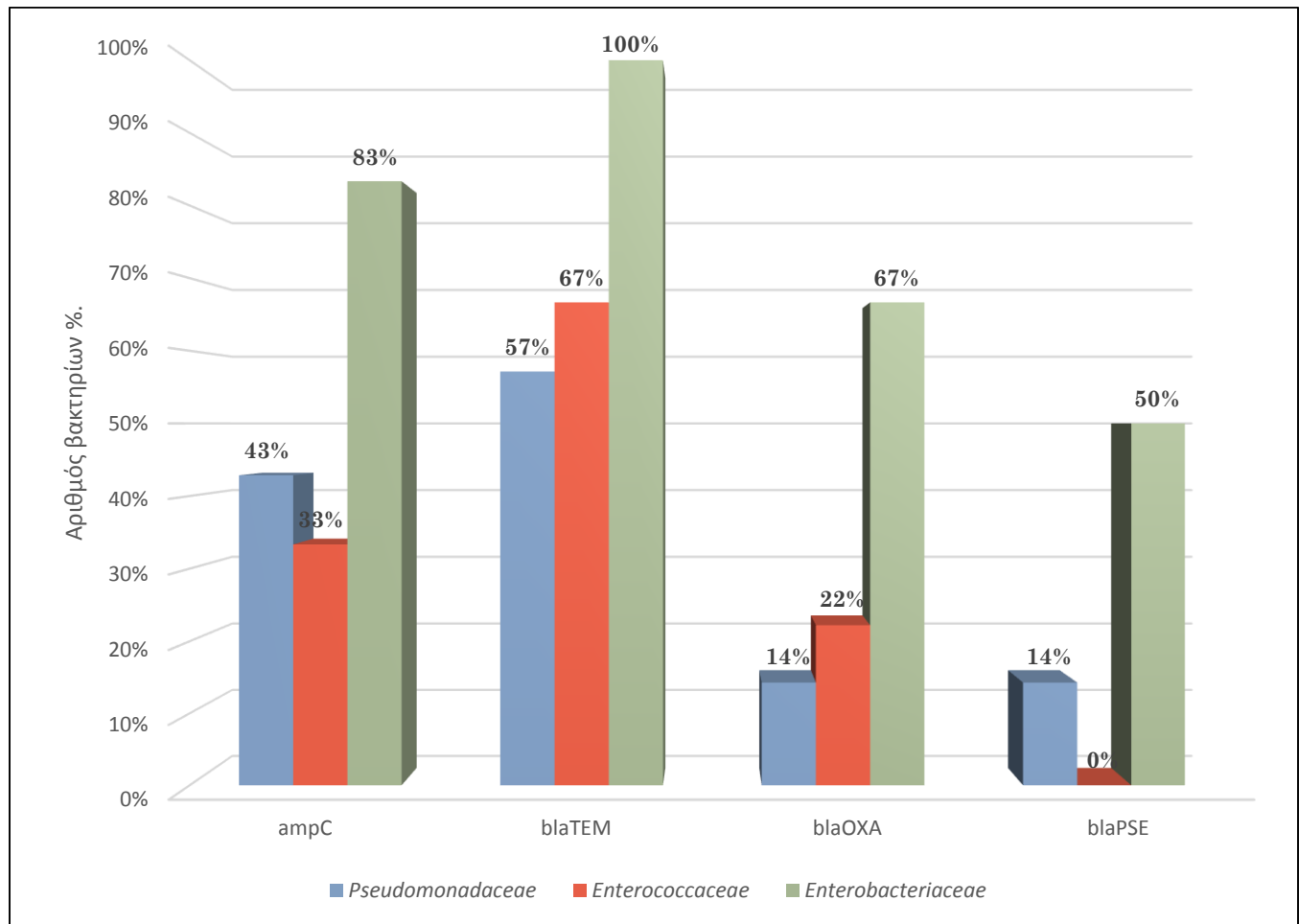
Αναζητήσαμε τα εξής πλέον κοινά γονίδια ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών ενάντια στα αντιβιοτικά που ανήκουν στην κατηγορία των β-Λακταμών (Ampicillin, Cefaclor, Imipenem):

- blaPSE
- blaOXA
- blaTEM
- ampC

Εξετάστηκαν συνολικά 19 στελέχη ως προς την παρουσία των παραπάνω γονιδίων. Από αυτά, τα 17 (89.47%) έφεραν τουλάχιστον ένα από τα εξεταζόμενα γονίδια ανθεκτικότητας. Συγκεκριμένα, 16 στελέχη έφεραν το γονίδιο ανθεκτικότητας bla(TEM), 11 στελέχη έφεραν το γονίδιο ampC, 7 στελέχη το γονίδιο bla(OXA) και 4 στελέχη το γονίδιο bla(PSE).

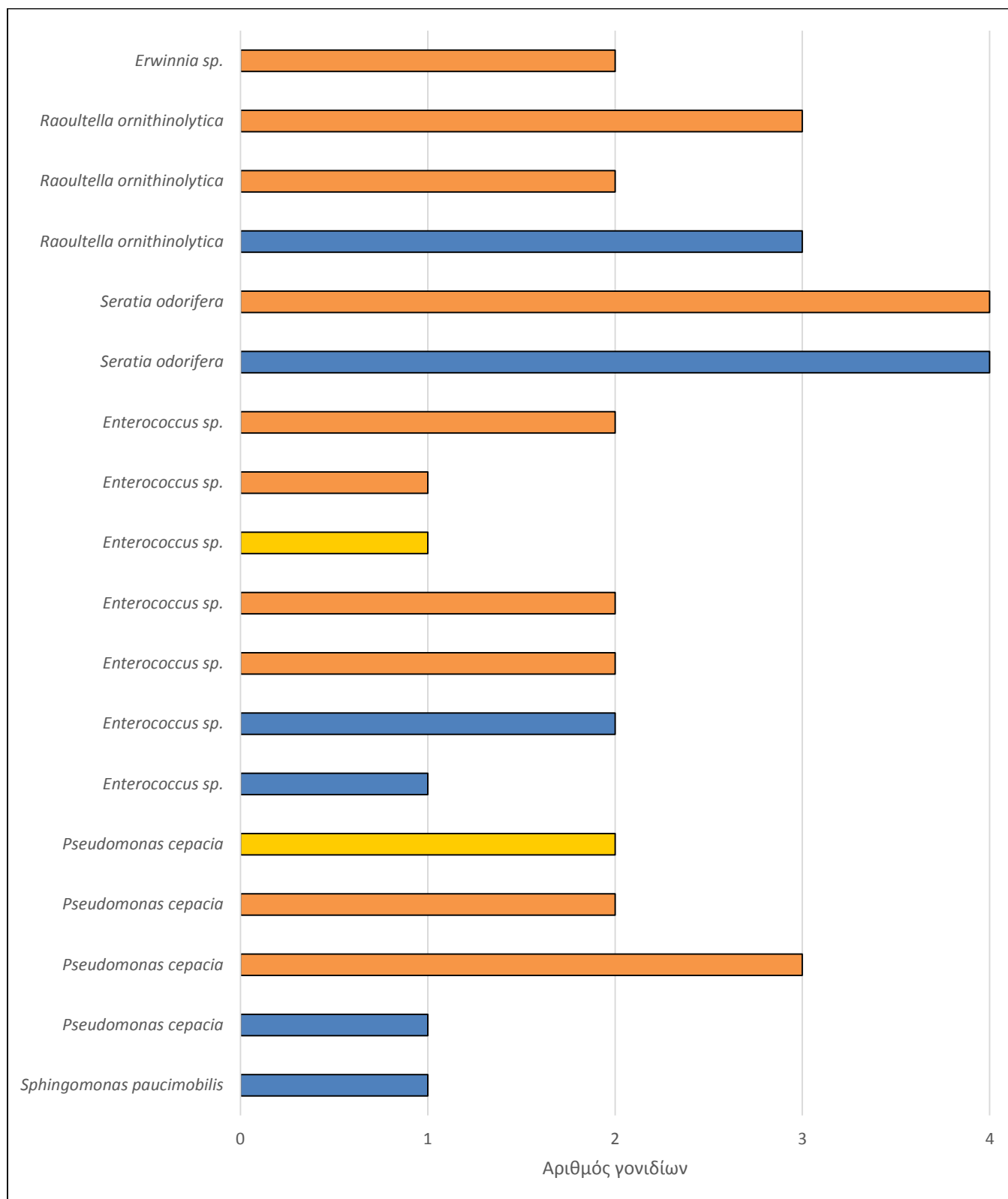
Η ευρύτατη παρουσία του γονιδίου bla(TEM) ήταν αναμενόμενη, καθώς οι TEM β-λακταμάσες αποτελούν την πιο κοινή κατηγορία του ενζύμου β-λακταμάση, που ευθύνεται σε κυρίαρχο βαθμό για την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά όπως οι πενικιλίνες (Lachmayr, et al., 2009). Τα γονίδια της κατηγορίας TEM είναι κωδικοποιημένα σε πλασμίδια και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ευρέος φάσματος λακταμασών (extended-spectrum β-lactamase - ESBL), που σημαίνει ότι τα βακτήρια που φέρουν το συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε όλα τα αντιβιοτικά β-λακταμών, πέραν των καρμπαπενεμών (Paterson & Bonomo, 2005). Η παρουσία του συγκεκριμένου γονιδίου εξηγεί και την υψηλή ανθεκτικότητα που εμφανίστηκε στην Αμπικιλλίνη κατά τον έλεγχο της ευαισθησίας των μικροοργανισμών. Δεύτερο σε συχνότητα εμφάνισης ήρθε το γονίδιο ampC, το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ενζύμων κεφαλοσπορινάσης (cephalosporinase), που προσδίδουν αντοχή ενάντια σε πολλές κεφαλοσπορίνες και πενικιλίνες. Το γονίδιο ampC ανακαλύφθηκε αρχικά σε στελέχη *Escherichia coli* και είναι αρκετά κοινό ανάμεσα σε εντεροβακτηριακά είδη (Jacoby, 2009). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε στην παρούσα μελέτη, καθώς το 83% των εντεροβακτηρίων έφεραν το συγκεκριμένο γονίδιο. Το γονίδιο bla(OXA) είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των Οξακιλλινασών, που είναι κατηγορίας D β-λακταμάσες. Το γονίδιο αυτό προσδίδει αντοχή κυρίως ενάντια σε Καρμπαπενέμες, όπως η Ιμipενέμη. Παρά την ύπαρξη του γονιδίου αυτού σε 7 στελέχη, δεν εμφανίστηκε ανθεκτικότητα στην Ιμipενέμη, που σημαίνει ότι η ουσία αυτή διατηρεί υψηλή σταθερότητα ενάντια στη δράση των ενζύμων που παράγονται από τα βακτήρια. Εντούτοις, η ύπαρξη των γονιδίων αυτών σε περιβαλλοντικά στελέχη ενέχει κινδύνους, καθώς μπορούν να εξαπλώσουν ανθεκτικότητα ενάντια σε μία από τις πλέον αξιόπιστες κατηγορίες αντιβιοτικών (Santillana, et al., 2007). Το γονίδιο bla(PSE), ευθύνεται για την ανθεκτικότητα σε

αρκετά αντιβιοτικά β-λακταμών μέσω της παραγωγής καρμπενικιλινασών και παρά το γεγονός ότι εμφανίζεται κυρίως σε ψευδομονάδες (εξ' ου και το όνομά του γονιδίου), στα αποτελέσματά μας εμφανίστηκε στο 50% των *Enterobacteriaceae*. Αυτό δείχνει το πώς ένα γονίδιο μπορεί να μεταφερθεί από ένα βακτηριακό είδος στο οποίο παράγεται αρχικά, σε ένα άλλο μέσω της μεταφοράς εξωγενούς γενετικού υλικού.



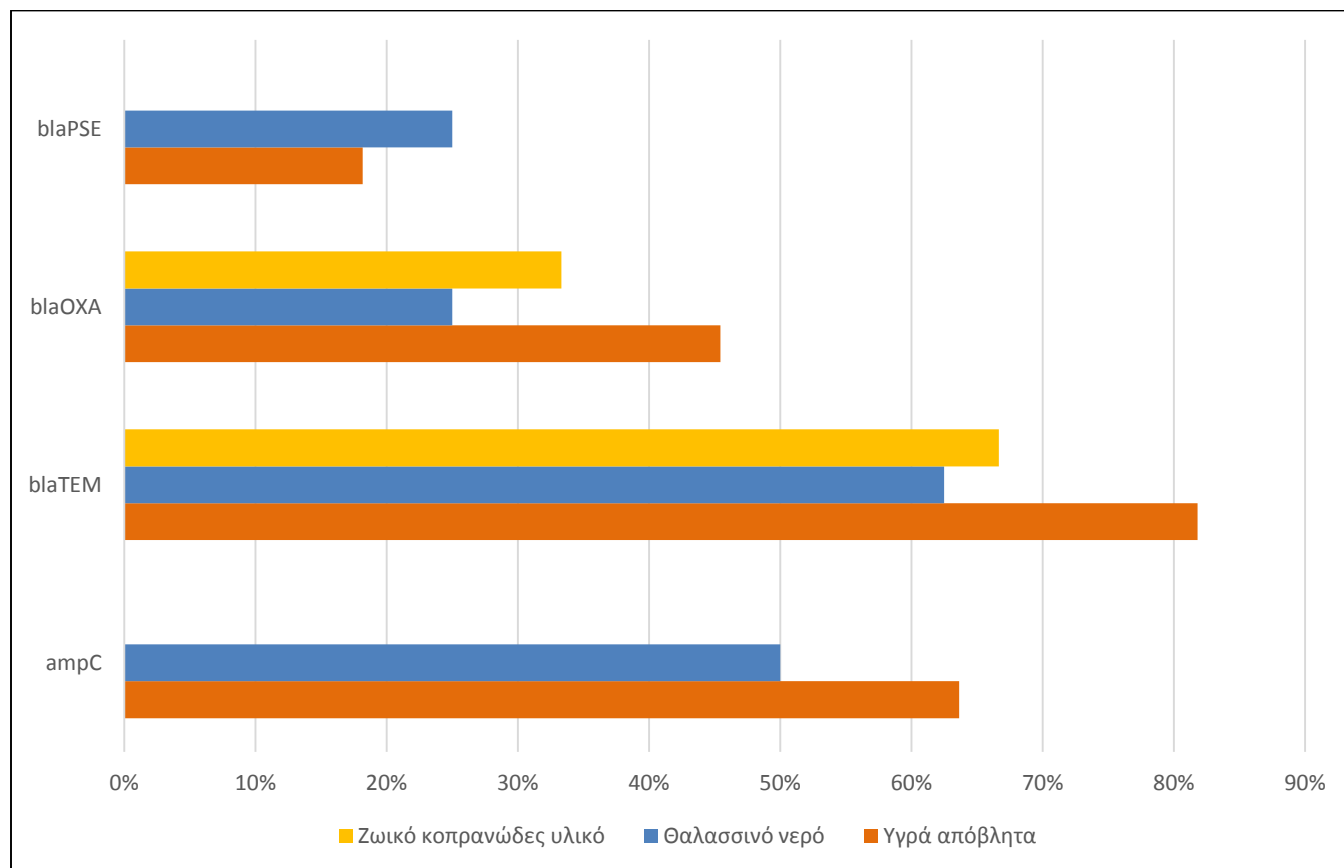
Γράφημα 17. Συχνότητα εμφάνισης γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά β-λακτάμης στα απομονωμένα βακτηριακά στελέχη.

Παρατηρώντας την παρουσία των γονιδίων ανθεκτικότητας στα βακτηριακά στελέχη, γίνεται σαφές ότι οι κύριοι φορείς τους είναι στελέχη που ανήκουν στην οικογένεια των Εντεροβακτηρίων. Μάλιστα, όλα τα Εντεροβακτήρια έφεραν πάνω από 2 γονίδια ανθεκτικότητας στις β-λακτάμες. Τα 2 στελέχη του είδους *Serratia odorifera* έφεραν όλα τα εξεταζόμενα γονίδια ανθεκτικότητας, παρά το γεγονός ότι βάσει των τιμών MIC εμφάνισαν ανθεκτικότητα μόνο στην Αμπικιλλίνη. Γενικά όμως, φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης πολυανθεκτικότητας στις β-λακτάμες και της ύπαρξης πολλαπλών γονιδίων ανθεκτικότητας στις β-λακτάμες, καθώς το 60% των πολυανθεκτικών βακτηρίων είχαν πάνω από ένα γονίδιο ανθεκτικότητας.



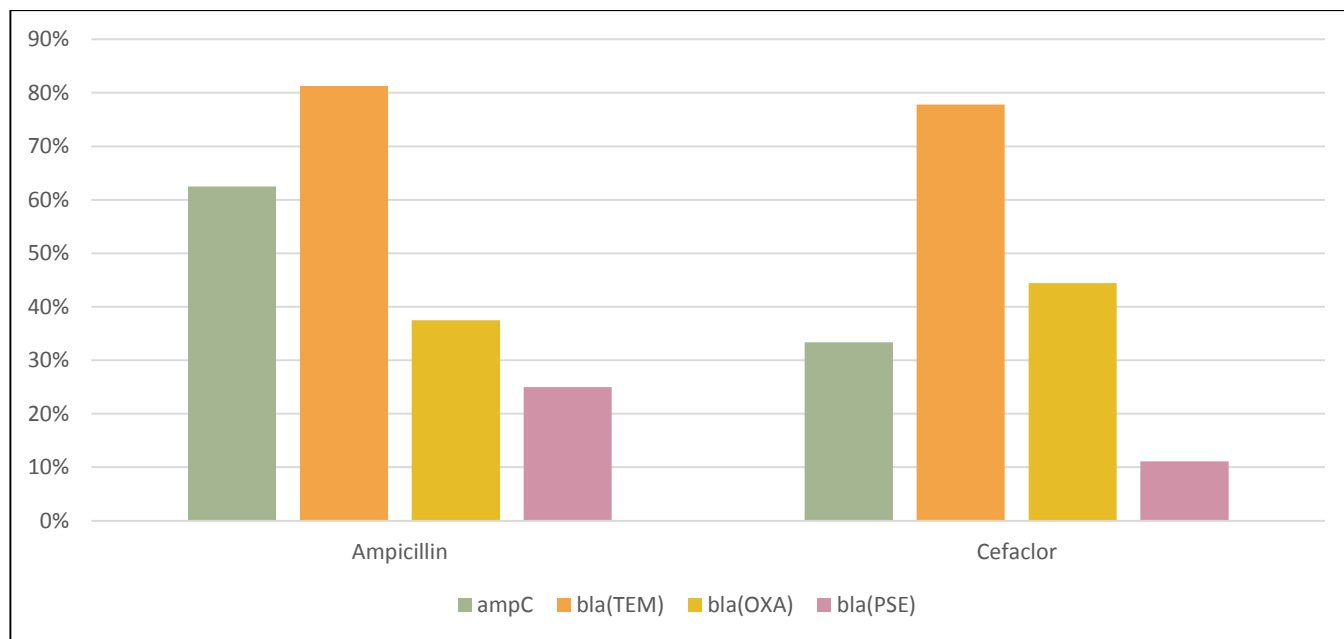
Γράφημα 18. Πλήθος γονιδίων ανθεκτικότητας στις β-λακτάμες που εμφανίστηκαν ανά γένος και είδος βακτηριακού στελέχους. Τα στελέχη προέρχονται από: 1. ■ Θαλασσινό νερό 2. ■ Υγρά απόβλητα 3. ■ Ζωικό κοπρανώδες υλικό

Μελετώντας την παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας βάσει της προέλευσης των μικροοργανισμών, παρατηρούμε ότι οι κύριοι φορείς των γονιδίων αυτών είναι τα στελέχη που προέρχονται από εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς παρουσιάστηκε και αυξημένη ανθεκτικότητα στα συγκεκριμένα βακτήρια κατά των έλεγχος της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης. Η παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων ενέχει σοβαρούς περιβαλλοντικούς κινδύνους. Η τριτοβάθμια επεξεργασία των λυμάτων και η απολύμανσή τους, που στις περιπτώσεις που μελετάμε συνίσταται στην χλωρίωση πριν τη διάθεση και απόρριψη, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να μειώσει το μικροβιακό φορτίο σε επαρκή βαθμό, ανεξάρτητα της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών. Ωστόσο, όσον αφορά τον έλεγχο και την καταστροφή των γονιδίων ανθεκτικότητας, η επεξεργασία λυμάτων με χλωρίωση έχει αποδειχθεί ανεπαρκής (Yuan, et al., 2015). Γονίδια που κωδικοποιούν τη μικροβιακή αντοχή μπορούν να επιβιώσουν της χλωρίωσης και να διατηρούν τη δραστηριότητά τους, ακόμα και εν απουσία των ξενιστών τους (Zhu, 2006). Δεδομένων των προαναφερθέντων, τα γονίδια ανθεκτικότητας στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων μπορούν να χαρακτηριστούν ως μολυσματικό φορτίο, το οποίο απαιτεί περαιτέρω μελέτη.



Γράφημα 19. Συχνότητα εμφάνισης γονιδίων ανθεκτικότητας, με βάση την προέλευση των στελεχών.

Τα βακτήρια που ήταν φορείς των συγκεκριμένων γονιδίων ανθεκτικότητας, παρουσίασαν ως επί τω πλείστων αυξημένες τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης σε σχέση με τους άλλους μικροοργανισμούς. Στο γράφημα 22 φαίνεται το ποσοστό εμφάνισης του κάθε γονιδίου στους ανθεκτικούς μικροοργανισμούς στα αντιβιοτικά β-λακτάμης Ampicillin και Cefaclor. Το γράφημα αυτό μας δίνει μια εικόνα για το ποια γονίδια μπορεί να ευθύνονται για την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα στελέχη. Παρατηρείται ότι το γονίδιο bla(TEM) εμφανίστηκε σε μεγάλο βαθμό από κοινού και στα δύο αντιβιοτικά, ενώ σε μικρότερο βαθμό ευθύνεται για την ανθεκτικότητα το γονίδιο bla(PSE), πιθανότατα γιατί συναντάται κυρίως σε βακτήρια των *Pseudomonadaceae*.



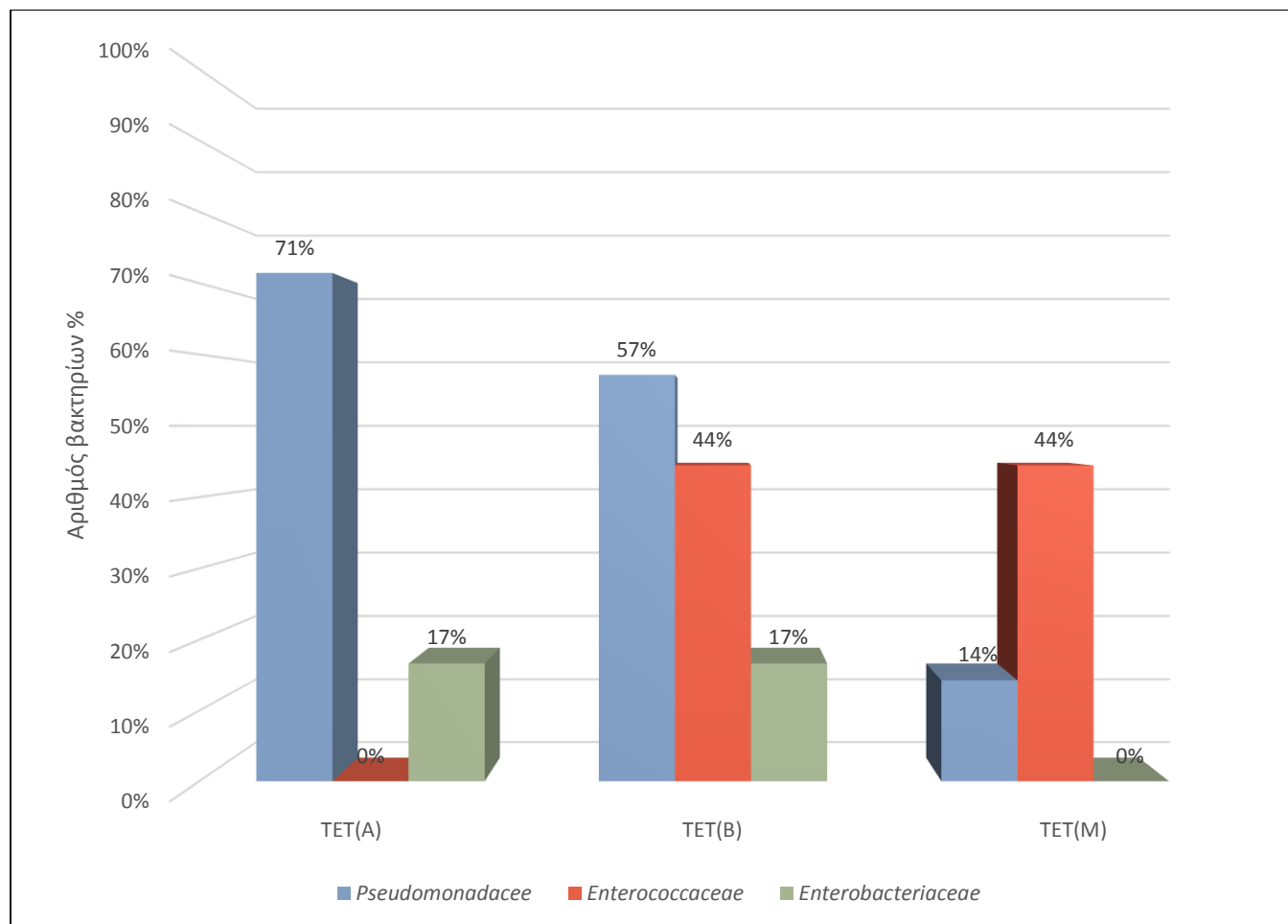
Γράφημα 20. Συχνότητα εμφάνισης κάθε γονιδίου ανθεκτικότητας, για τους μικροοργανισμούς που παρουσίασαν αντοχή ενάντια στην Αμπικιλλίνη και στην Κεφακλόρη.

4.4.2 ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ

Η ανθεκτικότητα στην Τετρακυκλίνη είναι ένα συχνό φαινόμενο, το οποίο οφείλεται κυρίως στην απόκτηση γονιδίων ανθεκτικότητας. Στη μοριακή βιολογία χρησιμοποιούνται αρκετά γονίδια που προσδιορίζουν την ανθεκτικότητα στην Τετρακυκλίνη. Αυτά τα γονίδια φέρουν το χαρακτηριστικό όνομα *tet* και μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 30 είδη (Sköld, 2011). Τα πιο συχνά συναντώμενα είναι τα TETA, TETB και TETM, τα οποία και επιλέξαμε να εξετάσουμε στην συγκεκριμένη εργασία.

Τα γονίδια TETA και TETB είναι παρόμοιας ούστασης και ανήκουν στην ίδια κατηγορία. Παρέχουν στον φορέα τους ανθεκτικότητα στις Τετρακυκλίνες μέσω της εκροής του αντιβιοτικού από το κύτταρο (tetracycline efflux). Συναντώνται συχνά σε εντεροβακτήρια και σε είδη αερομονάδας και βρίσκονται αποκλειστικά σε πλασμίδια. Το γονίδιο TETM προσδίδει διαφορετικό μηχανισμό ανθεκτικότητας.

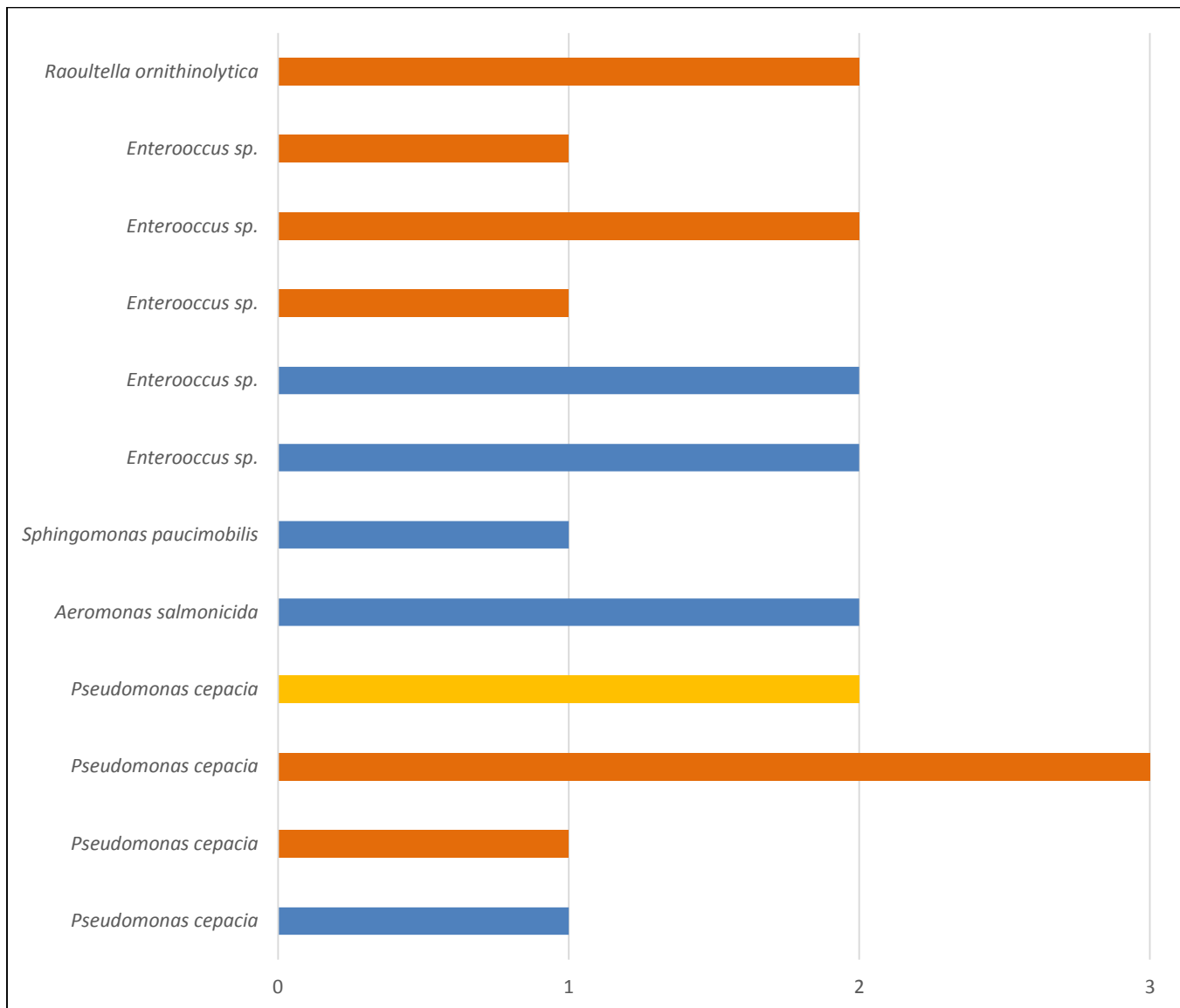
Λειτουργεί μέσω της προστασίας του ριβοσώματος από τη δράση της τετρακυκλίνης. Εντοπίζεται και σε πλασμιδιακό και σε χρωμοσωμικό DNA, και ενώ αρχικά παρουσιαζόταν μόνο σε gram θετικούς κόκκους, πλέον υπάρχει και Gram αρνητικά βακτήρια (Speer, et al., 1992).



Γράφημα 21. Συχνότητα εμφάνισης γονιδίων ανθεκτικότητας στην Τετρακυκλίνη στα απομονωμένα βακτηριακά στελέχη.

Η παρουσία των παραπάνω γονιδίων εξετάστηκε συνολικά σε 15 στελέχη – τα στελέχη στα οποία παρουσιάστηκε ανθεκτικότητα κατά τον έλεγχο ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης. Το 80% εξ' αυτών (12 στελέχη) έφερε τουλάχιστον ένα από τα γονίδια. Συγκεκριμένα, 9 στελέχη έφεραν το γονίδιο TETB, 6 στελέχη έφεραν το γονίδιο TETA και 5 στελέχη έφεραν το γονίδιο TETM.

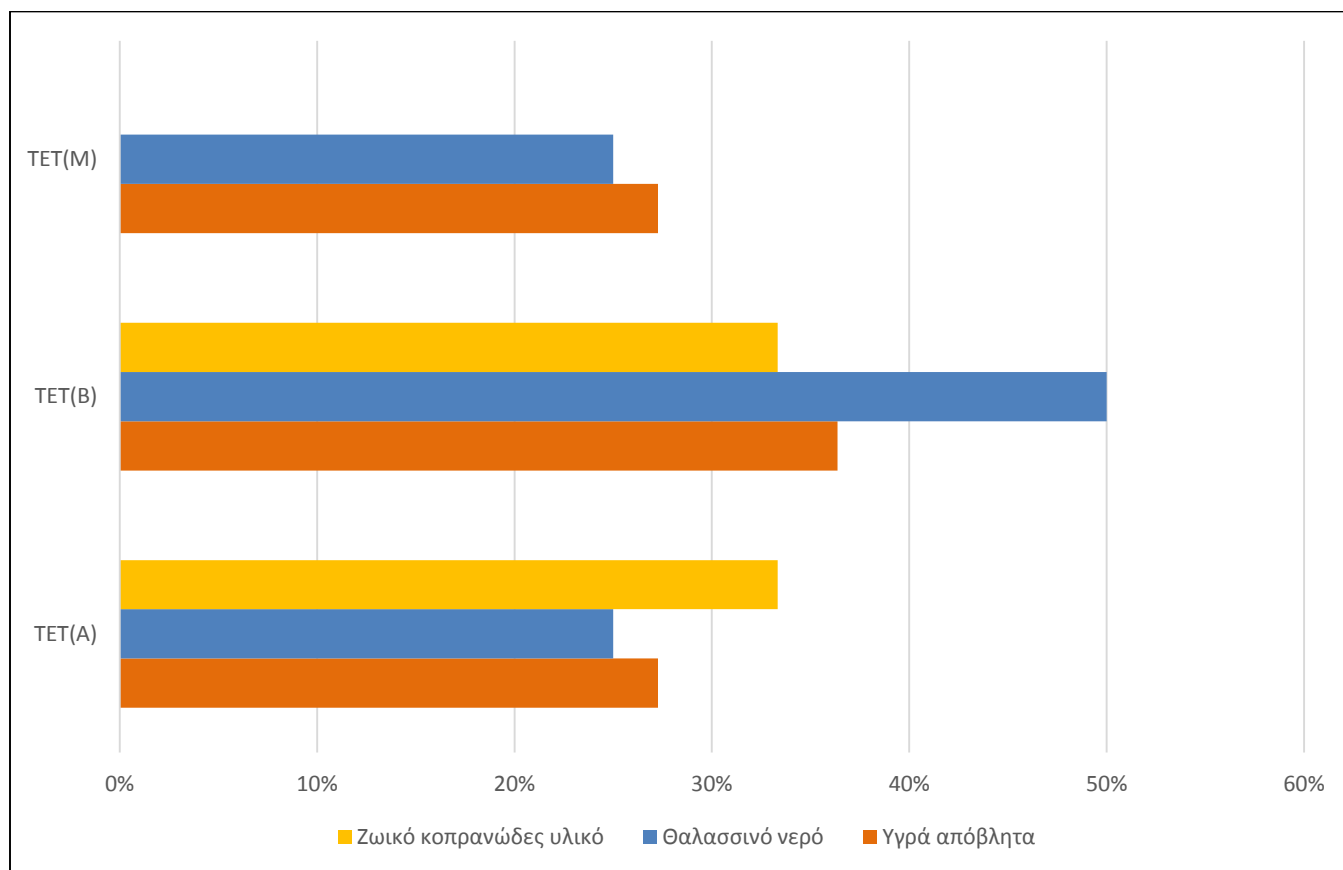
Η παρουσία γονιδίων *tet* εντοπίστηκε κυρίως σε μέλη των οικογενειών *Pseudomonadaceae* και *Enterococcaceae*. Εντούτοις, το 100% των εντεροβακτηριακών στελεχών που παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη έφεραν τα γονίδια TETA και TETB, που όπως προαναφέρθηκε, είναι αρκετά κοινά μεταξύ εντεροβακτηρίων. Αναμενόμενη ήταν επίσης η παρουσία του γονιδίου TETM στους εντερόκοκκους σε υψηλότερο ποσοστό από τα άλλα βακτήρια, καθώς το γονίδιο αυτό προέρχεται από Gram θετικούς κόκκους.



Γράφημα 22. Πλήθος γονιδίων ανθεκτικότητας στην Τετρακυκλίνη που εμφανίστηκαν ανά γένος και είδος βακτηριακού στελέχους. Τα στελέχη προέρχονται από: 1. Θαλασσινό νερό 2. Υγρά απόβλητα 3. Ζωικό κοπρανώδες υλικό

Από τα στελέχη που έφεραν γονίδια ανθεκτικότητας στην Τετρακυκλίνη, παρατηρείται ότι μόνο ένα βακτήριο του είδους *Pseudomonas cepacia* έφερε και τα 3 εξεταζόμενα γονίδια. Το 50% των στελεχών έφερε 2 από τα 3 γονίδια (TETA-TETB ή TETB-TETM).

Όσον αφορά την προέλευση των μικροοργανισμών που ήταν φορείς γονιδίων *tet*, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διακυμάνσεις. Ελαφρώς επικρατέστερη ήταν μόνο η παρουσία του γονιδίου TETB σε στελέχη που προέρχονταν από θαλάσσια οικοσυστήματα.



Γράφημα 23. Συχνότητα εμφάνισης γονιδίων ανθεκτικότητας με βάση την προέλευση των στελεχών.

4.5 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΑΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΕΙΔΟΣ

Η μελέτη της ανθεκτικότητας σε κάθε είδος που εξετάστηκε είναι σημαντική, καθώς μπορεί να μας δώσει κάποιες εξηγήσεις σχετικά με την προέλευσή της.

Serratia odorifera

Τα εντεροβακτήρια του είδους αυτού κατά τον έλεγχο ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην Αμπικιλίνη, η οποία δεν επέφερε επαρκή θνησιμότητα σε καμία εξεταζόμενη συγκέντρωση. Η παρουσία γονιδίων λοιπόν, εξετάστηκε μόνο για τα γονίδια παραγωγής β-λακταμασών. Τα 2 βακτήρια του συγκεκριμένου είδους, έφεραν όλα τα εξεταζόμενα γονίδια αντοχής στις β-λακτάμες. Η ανθεκτικότητα του συγκεκριμένου βακτηρίου έχει καταγραφεί και σε παρόμοια μελέτη των Stock et al. και αποδείχθηκε ότι οφείλεται κυρίως σε εγγενείς μηχανισμούς. Ωστόσο, η παρουσία γονιδίων β-λακτάμης σε είδη Σεράτιας, βρίσκεται κυρίως σε πλασμίδια, γεγονός που καθιστά εύκολη τη μεταβίbasή τους σε άλλα βακτήρια.

Raoultella ornithinolytica

Από τα βακτήρια του είδους αυτού, το 33.33% παρουσίασε ανθεκτικότητα στην Τετρακυκλίνη και στην Κεφακλόρη, ενώ όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στην Αμπικιλλίνη. Τα βακτήρια που ήταν ανθεκτικά στην Τετρακυκλίνη έφεραν τα γονίδια ανθεκτικότητας TETA και TETB. Για την ανθεκτικότητα στην Αμπικιλλίνη και στην Κεφακλόρη, οφειλόταν σε μεγάλο βαθμό η παρουσία γονιδίων παραγωγής β-λακταμασών και κυρίως τα γονίδια blaTEM (παρουσιάστηκε στο 100% των στελεχών), blaOXA και ampC (παρουσιάστηκαν στο 67% των στελεχών). Γονίδια β-λακταμάσης σε βακτήρια του είδους αυτού έχουν βρεθεί σε αντίστοιχη μελέτη και έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζονται κυρίως σε πλασμίδια (Walckenaer, et al., 2004).

Aeromonas salmonicida

Από το συγκεκριμένο είδος ελέγχθηκαν 2 βακτηριακά στελέχη. Από αυτά, το ένα μόνο εμφάνισε ανθεκτικότητα στην Αμπικιλλίνη και μέτρια ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη. Το στέλεχος αυτό προερχόταν από θαλάσσιο περιβάλλον. Στον έλεγχο για την παρουσία γονιδίων δεν βρέθηκε γονίδιο που να ευθύνεται για την παραγωγή β-λακταμασών ενώ βρέθηκαν 2 γονίδια υπεύθυνα για την ανθεκτικότητα στις Τετρακυκλίνες (TETA και TETB). Η παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο είδος και σε περιβαλλοντικά στελέχη έχει αποδειχθεί και σε παλαιότερες μελέτες και είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η μεταβολή της θερμοκρασίας μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την αύξηση της ανθεκτικότητας (Walsh, et al., 1997) (Kim, et al., 2011). Συγκεκριμένα, στις ιδανικές συνθήκες θερμοκρασίας (30 °C), στις οποίες και εξετάστηκαν τα στελέχη στην παρούσα εργασία, εμφανίζονται τα υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας.

Sphingomonas paucimobilis

Από το είδος αυτό απομονώθηκε ένα στέλεχος από θαλασσινό νερό. Το στέλεχος αυτό παρουσίασε πολυανθεκτικότητα, καθώς ήταν ανθεκτικό στην Αμπικιλλίνη στην Κεφακλόρη και στην Τετρακυκλίνη. Παρά το γεγονός της εμφάνισης πολυανθεκτικότητας, το στέλεχος αυτό έφερε σχετικά μικρό αριθμό γονιδίων ανθεκτικότητας. Συγκεκριμένα, έφερε το γονίδιο TETB και το γονίδιο blaTEM. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η ύπαρξη μικρού αριθμού γονιδίων δε συνεπάγεται και περιορισμένο βαθμό ανθεκτικότητας.

Pseudomonas cepacia

Απομονώθηκαν και μελετήθηκαν 4 βακτηριακά στελέχη του είδους αυτού, τα 3 από εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων και το 1 από θαλασσινό νερό. Στα μέλη του είδους αυτού παρουσιάστηκε αυξημένη πολυανθεκτικότητα. Το 50% των στελεχών ήταν ανθεκτικό σε 3 από τα 4 εξεταζόμενα αντιβιοτικά. Η ανθεκτικότητα του είδους αυτού είναι αρκετά συνηθισμένη, ιδιαίτερα σε β-λακτάμες, και πολλές φορές οφείλεται σε εγγενείς μηχανισμούς, γεγονός που καθιστά την θεραπεία λοιμώξεων

που προκαλούνται από αυτό αρκετά δύσκολη (Laurent, et al., 2009). Το 67% των στελεχών του συγκεκριμένου είδους έφεραν τα γονίδια παραγωγής β-λακταμασών ampC και blaTEM, ενώ όλα τα στελέχη έφεραν το γονίδιο TETA.

Erwinnia sp.

Κατά την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών παρουσιάστηκε ένα στέλεχος που ανήκει στη συγκεκριμένη κατηγορία, με χαμηλό όμως ποσοστό βεβαιότητας ταυτοποίησης. Το στέλεχος αυτό εμφάνισε ανθεκτικότητα μόνο στην δράση της Αμπικιλλίνης κι έτσι ελέγχθηκε η παρουσία γονιδίων παραγωγής β-λακταμάσης σε αυτό. Βρέθηκαν τα γονίδια ampC και blaTEM.

Enetococcus sp.

Στο γένος των Εντερόκοκκων ανήκε το 40.9% των εξεταζόμενων στελεχών. Από αυτά, όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά σε ένα τουλάχιστον αντιβιοτικό, ενώ το 88.89% εμφάνισε πολυανθεκτικότητα. Όσον αφορά τα σχετικά με την ανθεκτικότητα στις β-λακτάμες γονίδια, τα κύρια γονίδια που εμφανίστηκαν ήταν το blaTEM (66.67%) και το ampC (33.33%). Τα γονίδια ανθεκτικότητας στην Τετρακυκλίνη, στην οποία το 88.89% εμφάνισε ανοχή, ήταν το TETB σε ποσοστό 50% και το TETM σε ποσοστό 50% επίσης.

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανθεκτικότητα των βακτηριακών στελεχών ήταν αρκετά κοινή στα δείγματα που εξετάστηκαν. Τα δύο αντιβιοτικά στα οποία παρουσιάστηκε υψηλότερη ανθεκτικότητα ήταν η Αμπικιλλίνη και η Τετρακυκλίνη. Και τα δύο αυτά αντιβιοτικά, έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό τις τελευταίες δεκαετίες. Η Τετρακυκλίνη συγκεκριμένα, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ιατρική αλλά και στην κτηνοτροφία για την προώθηση της ανάπτυξης κατά την αναπαραγωγή, καθώς και στις ιχθυοκαλλιέργειες. Αντιθέτως παρουσιάστηκε αυξημένη ευαισθησία των μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά νεότερων γενεών, όπως η Ιμιπενέμη. Συνεπώς, παρατηρήθηκε άμεση σχέση ανάμεσα στη συχνότητα χρήσης αντιβιοτικών παραγόντων από ανθρώπους και στην εμφάνιση της ανθεκτικότητας. Το φαινόμενο αυτό δικαιολογείται και από την υψηλή κατανάλωση αντιβιοτικών στον ελλαδικό χώρο.

Ανάμεσα σε στελέχη του ίδιου είδους εμφανίστηκε συχνά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε στελέχη προερχόμενα από υγρά απόβλητα, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα που προέρχονταν από θαλασσινό νερό ή ζωικό κοπρανώδες υλικό. Το φαινόμενο αυτό συμφωνεί με την θεωρία της μεταφοράς ανθεκτικών μικροοργανισμών και γονιδίων ανθεκτικότητας από ανθρωπογενείς δραστηριότητες στο περιβάλλον, μέσω των υγρών λυμάτων αλλά και της χρήσης των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και στη γεωργία. Ωστόσο, υπήρξαν και λίγες περιπτώσεις όπου στελέχη θαλασσινού δείγματος είχαν πολύ μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από στελέχη προερχόμενα από ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται, αφενός γιατί αντιβιοτικές ουσίες υπάρχουν εξ' ορισμού στη φύση και ορισμένοι μικροοργανισμοί αναπτύσσουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας για την επιβίωσή τους σε σκληρά περιβάλλοντα. Συγκεκριμένα, συχνά συναντώνται β-λακτάμες σε εδαφικούς βακτηριακούς πληθυσμούς, ενώ είναι σπάνια η εμφάνιση τετρακυκλινών στη φύση. Αφετέρου, η ύπαρξη ανθεκτικότητας και γονιδίων που σχετίζονται με αυτήν στο περιβάλλον, μπορεί να υποδεικνύει την μεταβολή των υδάτινων οικοσυστημάτων από την ανθρώπινη δράση. Ο εντοπισμός γονιδίων ανθεκτικότητας σε επιφανειακά & θαλάσσια ύδατα έχει αναδείξει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ ανθεκτικότητας των βακτηρίων και παρουσίας κυρίως αστικών λυμάτων. Ωστόσο, η ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας στο περιβάλλον δε θα πρέπει να συνδέεται άμεσα με την επιρροή της ανθρώπινης δραστηριότητας και να λαμβάνεται ως δείκτης ρύπανσης. Για τη διεξαγωγή τέτοιου συμπεράσματος, απαιτείται περαιτέρω πληροφόρηση σχετικά με την προέλευση και τις διαδρομές μέσω των οποίων τα ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη απέκτησαν την ανθεκτικότητα και κατέληξαν στο περιβάλλον.

Γενικά, το γεγονός της ανάπτυξης ή όχι της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων είναι ακόμα υπό συζήτηση. Δεν έχουν ακόμα εδραιωθεί οι σύνδεσμοι μεταξύ της παρουσίας αντιβιοτικών σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων και την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων, καθώς η μεταβίβαση της ανθεκτικότητας σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο αυτές που έχουν βρεθεί σε διάφορες μελέτες στο περιβάλλον. Ωστόσο, βάσει αναφορών τις οποίες επιβεβαιώνει

και η παρούσα εργασία, τα λύματα ή ακόμα και αυτά που έχουν υποστεί επεξεργασία περιέχουν υψηλότερες αναλογίες διαφόρων ανθεκτικών βακτηριακών πληθυσμών σε σχέση με τα αντίστοιχα ποσοστά που περιέχονται σε επιφανειακά ή θαλασσινά ύδατα (Bouki, et al., 2013). Σύμφωνα με αυτές τις μελέτες οι συνθήκες στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων είναι ευνοϊκές για τον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών βακτηρίων, ο οποίος με τη σειρά του μπορεί να μεταφέρει γονίδια ανθεκτικότητας σε ευαίσθητα βακτήρια. Παράδειγμα τέτοιας έρευνας είναι των (Watkinson, et al., 2007), σύμφωνα με την οποία τα ποσοστά πολυανθεκτικών βακτηρίων ήταν σημαντικά υψηλότερα από τα αναμενόμενα σε περιοχές πλησίον εγκαταστάσεων επεξεργασίας αποβλήτων. Οι (Munir, et al., 2011) ανέφεραν υψηλές συγκεντρώσεις βακτηρίων ανθεκτικών σε τετρακυκλίνη και σουλφοναμίδη και των αντίστοιχων γονιδίων σε ακατέργαστα λύματα πέντε σταθμών στην Αμερική. Αυτές οι συγκεντρώσεις μειώθηκαν αρκετές τάξεις μεγέθους στην εκροή, ενώ παράλληλα, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν συγκρίνοντας λύματα πριν και μετά το στάδιο της απολύμανσης. Οι (Schlüter, et al., 2007) κατόπιν δοκιμών σε πληθώρα βακτηρίων και αντιβιοτικών κατέληξαν ότι οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων αποτελούν δεξαμενές για ποικίλα στοιχεία αντίστασης σε αντιβιοτικά. Σύμφωνα με τους τελευταίους η υψηλή πυκνότητα μικροβίων και η ποικιλότητα στα βιοφίλμ και στην ενεργό ιλύ μπορούν να διευκολύνουν τη γενετική ανταλλαγή σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.

Πολυανθεκτικά βακτήρια εμφανίστηκαν κυρίως σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, γεγονός που έχει παρατηρηθεί και σε παρόμοιες έρευνες. Συνεπώς, η ύπαρξη ανθεκτικότητας σε πολλούς αντιβιοτικούς παράγοντες είναι λογικό να συνδέεται με την παρουσία ανθρωπογενούς δραστηριότητας. Παρά το γεγονός ότι η ύπαρξη πολλών γονιδίων μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας και ιδιαίτερα της πολυανθεκτικότητας, η παρούσα έρευνα αποδεικνύει ότι δεν υπάρχει απαραίτητα αντιστοιχισμός ανάμεσα στην ύπαρξη πολλαπλών γονιδίων ανθεκτικότητας και στην πολυανθεκτικότητα. Υπήρξαν περιπτώσεις όπου πολυανθεκτικά βακτήρια έφεραν μόνο ένα γονίδιο, αλλά και οι αντίστροφες περιπτώσεις, όπου βακτήρια που έφεραν ακόμα και όλα τα εξεταζόμενα γονίδια εμφάνισαν ανθεκτικότητα μόνο σε έναν αντιμικροβιακό παράγοντα. Βέβαια υπάρχει πάντα η πιθανότητα ύπαρξης άλλων γονιδίων σχετικών με την ανθεκτικότητα, η παρουσία των οποίων δεν εξετάστηκε.

Η ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας στα στελέχη που εμφάνισαν αντιμικροβιακή αντοχή, αποδεικνύει την ανάπτυξη γενετικών μηχανισμών ανθεκτικότητας στα βακτηριακά στελέχη. Η κύρια παρουσία δε των γονιδίων που βρέθηκαν σε πλασμιδιακά τμήματα του γενετικού υλικού, καθιστά τη μεταφορά τους μέσω ανταλλαγής γενετικού υλικού πιο εύκολη. Συνεπώς, βακτήρια που φέρουν τα εξεταζόμενα γονίδια μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στο φαινόμενο εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον. Δεδομένου ότι τα γονίδια που ανιχνεύτηκαν εντοπίζονται κυρίως σε πλασμιδιακά τμήματα του γενετικού υλικού, η ύπαρξη τους σε τόσο ψηλά ποσοστά καθίσταται ιδιαίτερα επικίνδυνη για την εξάπλωση της ανθεκτικότητας. Σε αντίθεση με τα ανθεκτικά βακτήρια

τα οποία μπορεί να καταστραφούν κατά την επεξεργασία των λυμάτων, τα γονίδια ανθεκτικότητας παρουσιάζουν αντίσταση στις μεθόδους απολύμανσης. Τέλος, η ανθεκτικότητα στελεχών στα οποία δεν ανιχνεύτηκε κάποιο από τα εξεταζόμενα γονίδια, μπορεί να οφείλεται στην παρουσία κάποιου άλλου γονιδίου που δεν εξετάστηκε στην παρούσα έρευνα.

6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Πίνακας 8. Αριθμός αποικιών του είδους *Enterococcus* sp., μετά την καλλιέργειά των δειγμάτων σε Bile Esculin Agar. (*TNTC = Too Numerous To Count).

Δείγμα	Προέλευση Δείγματος	<i>Enterococcus</i> sp. Πλήθος αποικιών	<i>Enterococcus</i> sp. CFU/mL
1	Θαλασσινό νερό	24	0.24
2	Θαλασσινό νερό	2	0.02
3	Θαλασσινό νερό	0	0
4	Θαλασσινό νερό	0	0
5	Θαλασσινό νερό	10	0.1
6	Θαλασσινό νερό	23	0.23
7	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
8	Νερό ποίνας	0	0
9	Νερό ποίνας	0	0
10	Νερό ποίνας	0	0
11	Νερό ποίνας	0	0
12	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	200	10000
13	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	184	18400
14	Έξοδος Ε.Ε.Υ.Α.	9	9
15	Έξοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
16	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
17	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	147	14700
18	Έξοδος Ε.Ε.Υ.Α.	198	198
19	Έξοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
20	Θαλασσινό νερό	0	0
21	Κοπρανώδες υλικό ορνιθοτροφείου	32	3.2
22	Θαλασσινό νερό	3	0.03

Πίνακας 9. Αριθμός αποικιών των ολικών κολοβακτηριοειδών μετά την καλλιέργειά των δειγμάτων σε mEndo Agar Les.

Δείγμα	Προέλευση Δείγματος	Ολικά Κολοβακτηριοειδή (Πλήθος αποικιών)	Ολικά Κολοβακτηριοειδή CFU/mL
1	Θαλασσινό νερό	5	0.05
2	Θαλασσινό νερό	0	0
3	Θαλασσινό νερό	41	0.41
4	Θαλασσινό νερό	1	0.01
5	Θαλασσινό νερό	7	0.07
6	Θαλασσινό νερό	11	0.11
7	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
8	Νερό ποίνας	0	0
9	Νερό ποίνας	0	0
10	Νερό ποίνας	0	0
11	Νερό ποίνας	0	0
12	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
13	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	140	14000
14	Έξοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
15	Έξοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
16	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
17	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
18	Έξοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
19	Έξοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
20	Θαλασσινό νερό	0	0
21	Κοπρανώδες υλικό ορνιθοτροφείου	6	0.6
22	Θαλασσινό νερό	12	0.12

Πίνακας 10. Αριθμός αποικιών του είδους *Pseudomonas* sp., μετά την καλλιέργεια των δειγμάτων σε *Pseudomonas* Agar Base.

Δείγμα	Προέλευση Δείγματος	<i>Pseudomonas</i> sp. (Πλήθος αποικιών)	<i>Pseudomonas</i> sp. CFU/mL
1	Θαλασσινό νερό	0	0
2	Θαλασσινό νερό	0	0
3	Θαλασσινό νερό	0	0
4	Θαλασσινό νερό	0	0
5	Θαλασσινό νερό	1	0.01
6	Θαλασσινό νερό	1	0.01
7	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	20	2000
8	Νερό ποίνας	0	0
9	Νερό ποίνας	0	0
10	Νερό ποίνας	0	0
11	Νερό ποίνας	0	0
12	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
13	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
14	Έξοδος Ε.Ε.Υ.Α.	1	1
15	Έξοδος Ε.Ε.Υ.Α.	11	0.11
16	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
17	Είσοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
18	Έξοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
19	Έξοδος Ε.Ε.Υ.Α.	TNTC	TNTC
20	Θαλασσινό νερό	5	0.05
21	Κοπρανώδες υλικό ορνιθοτροφείου	0	0
22	Θαλασσινό νερό	0	0

6.2 ΈΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Πίνακας 11. Έλεγχος οπτικής απορρόφησης στα δείγματα χρωμοσωμικού DNA

Δείγμα	OD 260 nm	OD 280 nm	R	DNA Concentration (μg/mL)
13' Enterococcus sp.	0.1623	0.08956	1.81219	1623
14' Enterococcus sp.	0.03496	0.02021	1.72984	349.6
17' Enterococcus sp.	0.93479	0.65835	1.41990	9347.9
18' Enterococcus sp.	0.27199	0.18939	1.43614	2719.9
7' Enterococcus sp.	0.31364	0.17224	1.82095	3136.4
Γ' Enterococcus sp.	0.05599	0.02502	2.23781	559.9
2' Enterococcus sp.	0.23288	0.14824	1.57097	2328.8
6' Enterococcus sp.	0.2687	0.18864	1.42441	2687
21' Enterococcus sp.	0.15816	0.07586	2.08489	1581.6
5' Pseudomonas cepacia	0.132265	0.05663	2.33560	1322.65
21' Pseudomonas cepacia	0.22781	0.13401	1.69995	2278.1
15' Pseudomonas cepacia	0.21155	0.13492	1.56797	2115.5
7' Pseudomonas cepacia	0.18958	0.11314	1.67562	1895.8
1' Seratia odorifera	0.32668	0.18345	1.78076	3266.8
14' Seratia odorifera	0.17887	0.11125	1.60782	1788.7
6' Sphingomonas paucimobilis	0.17795	0.09815	1.81304	1779.5
Γ' Raoultella ornithinolytica	0.31364	0.17224	1.82095	3136.4
19' Raoultella ornithinolytica	0.28819	0.16373	1.76015	2881.9
17' Raoultella ornithinolytica	0.13635	0.08622	1.58142	1363.5
7' Erwinia sp.	0.28916	0.14722	1.96414	2891.6
20' Aeromonas salmonicida	0.3156	0.20137	1.56726	3156
21' Aeromonas salmonicida	0.06585	0.0195	3.37692	658.5

Πίνακας 12. Έλεγχος οπτικής απορρόφησης στα δείγματα πλασμιδιακού DNA (pDNA).

Δείγμα	OD 260 nm	OD 280 nm	R	pDNA Concentration (µg/mL)
13' Enterococcus sp.	0.04625	0.01097	4.21604	370
14' Enterococcus sp.	0.0555	0.02135	2.59953	444
17' Enterococcus sp.	0.0404	0.00569	7.10018	323.2
18' Enterococcus sp.	0.04022	0.01695	2.37286	321.76
7' Enterococcus sp.	0.04782	0.02108	2.26850	382.56
Γ' Enterococcus sp.	0.05696	0.02776	2.05187	455.68
2' Enterococcus sp.	0.02456	0.0366	0.67104	196.48
6' Enterococcus sp.	0.02348	0.00701	3.34950	187.84
21' Enterococcus sp.	0.04557	0.01577	2.88966	364.56
5' Pseudomonas cepacia	0.01901	0.00691	2.75109	152.08
21' Pseudomonas cepacia	0.06093	0.02798	2.17763	487.44
15' Pseudomonas cepacia	0.03468	0.08183	0.42381	277.44
7' Pseudomonas cepacia	0.07043	0.03252	2.16574	563.44
1' Seratia odorifera	0.05579	0.01361	4.09919	446.32
14' Seratia odorifera	0.0688	0.04183	1.64475	550.4
6' Sphingomonas paucimobilis	0.07074	0.03902	1.81292	565.92
Γ' Raoultella ornithinolytica	0.0391	0.00737	5.30529	312.8
19' Raoultella ornithinolytica	0.05213	0.02033	2.56419	417.04
17' Raoultella ornithinolytica	0.08518	0.05759	1.47908	681.44
7' Erwinia sp.	0.08503	0.05432	1.56535	680.24
20' Aeromonas salmonicida	0.03599	0.0083	4.33614	287.92
21' Aeromonas salmonicida	0.0303	0.00935	3.24064	242.4

6.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ - PCR

6.3.1 ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟ DNA

tetA – tetB - tetM

Όγκος αντίδρασης: 40 μ L.

Πίνακας 13. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την αναζήτηση των γονιδίων TETA, TETB και TETM.

Μίγμα PCR	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	4mM
dNTPs	0.3mM
Primer F	0.25 μ M
Primer R	0.25 μ M
Taq	2U
DNA	0.4 μ g

Πίνακας 14. Κύκλοι αντίδρασης PCR για την αναζήτηση των γονιδίων TETA, TETB και TETM.

94 °C	5 min	30 κύκλοι
94 °C	1 min	
55 °C	1 min	
72 °C	5 min	
72 °C	5 min	

ampC

Όγκος αντίδρασης: 40 μL .

Πίνακας 15. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την αναζήτηση του γονιδίου ampC.

Μίγμα PCR	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	4mM
dNTPs	0.3mM
Primer F	0.3 μM
Primer R	0.3 μM
Taq	2U
DNA	0.5 μg

Πίνακας 16. Κύκλοι αντίδρασης PCR για την αναζήτηση του γονιδίου ampC.

94 °C	5 min	35 κύκλοι
94 °C	30 sec	
49 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	

blaPSE - blaOXA

Όγκος αντίδρασης 40 μ L.

Πίνακας 17. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την αναζήτηση των γονιδίων blaPSE και blaOXA.

Μίγμα PCR	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	1.5mM
dNTPs	0.4mM
Primer F	0.5 μ M
Primer R	0.5 μ M
Taq	2U
DNA	0.5 μ g

Πίνακας 18. Κύκλοι αντίδρασης PCR για την αναζήτηση των γονιδίων blaPSE και blaOXA.

94 °C	5 min	35 κύκλοι
94 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

blaTEM

Όγκος αντίδρασης 40 μ L.

Πίνακας 19. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την αναζήτηση του γονιδίου blaTEM.

Μίγμα PCR	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	1.5mM
dNTPs	0.4mM
Primer F	0.5 μ M
Primer R	0.5 μ M
Taq	2U
DNA	0.5 μ g

Πίνακας 20. Κύκλοι αντίδρασης PCR για την αναζήτηση του γονιδίου blaTEM.

94 °C	5 min	35 κύκλοι
94 °C	30 sec	
42 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

6.3.2 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ DNA (pDNA)

tetA – tetB – tetM

Όγκος αντίδρασης 40 μ L.

Πίνακας 21. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την αναζήτηση των γονιδίων TETA, TETB και TETM.

Μίγμα PCR	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	4mM
dNTPs	0.3mM
Primer F	0.25 μ M
Primer R	0.25 μ M
Taq	2U
DNA	0.6 μ g

Πίνακας 22. Κύκλοι αντίδρασης PCR για την αναζήτηση των γονιδίων TETA, TETB και TETM.

94 °C	5 min	30 κύκλοι
94 °C	1 min	
55 °C	1 min	
72 °C	5 min	
72 °C	5 min	

ampC

Όγκος αντίδρασης 40 μ L.

Πίνακας 23. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την αναζήτηση του γονιδίου ampC.

Μίγμα PCR	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	4mM
dNTPs	0.3mM
Primer F	0.3 μ M
Primer R	0.3 μ M
Taq	2U
DNA	0.6 μ g

Πίνακας 24. Κύκλοι αντίδρασης PCR για την αναζήτηση του γονιδίου ampC.

94 °C	5 min	35 κύκλοι
94 °C	30 sec	
49 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	

blaPSE - blaOXA

Όγκος αντίδρασης 40 μ L.

Πίνακας 25. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την αναζήτηση των γονιδίων blaPSE και blaOXA.

Μίγμα PCR	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	1.5mM
dNTPs	0.4mM
Primer F	0.5 μ M
Primer R	0.5 μ M
Taq	2U
DNA	0.6 μ g

Πίνακας 26. Κύκλοι αντίδρασης PCR για την αναζήτηση των γονιδίων blaPSE και blaOXA.

94 °C	5 min	35 κύκλοι
94 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

blaTEM

Όγκος αντίδρασης 40 μ L.

Πίνακας 27. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την αναζήτηση του γονιδίου blaTEM.

Μίγμα PCR	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	1.5mM
dNTPs	0.4mM
Primer F	0.5 μ M
Primer R	0.5 μ M
Taq	2U
DNA	0.6 μ g

Πίνακας 28. Κύκλοι αντίδρασης PCR για την αναζήτηση του γονιδίου ampC.

94 °C	5 min	35 κύκλοι
94 °C	30 sec	
42 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1]. 212, ISO/TC, 2007. *ISO 20776-2:2007*. [Ηλεκτρονικό]
Available at: <https://www.iso.org>
[Πρόσβαση 1 08 2015].
- [2]. Ackerman, D. & Weisberg, S. B., 2003. Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay beaches. *Journal of Water and Health*, pp. 85-89.
- [3]. Akinbowale, O., Peng, H. & Barton, M., 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia.. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), pp. 1103-1113.
- [4]. AMRLS, 2011. *Antimicrobial Resistance Learning Site*. [Ηλεκτρονικό]
Available at: <http://amrls.cvm.msu.edu>
[Πρόσβαση 05 04 2015].
- [5]. Anon., n.d. *Antimicrobial resistance learning site*. [Ηλεκτρονικό]
Available at: <http://amrls.cvm.msu.edu/>
[Πρόσβαση 4 2015].
- [6]. Bert, F., Branger, C. & Lambert-Zechivsky, N., 2002. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism.. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy*, 50(1), pp. 11-18.
- [7]. Bouki, C., Venieri, D. & Diamadopoulos, E., 2013. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review.. *Ecotoxicology and environmental safety*, 91(1), pp. 1-9.
- [8]. Bradford, P. A., 2001. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), pp. 933-951.
- [9]. CDC, 2010. *Laboratory Detection of Imipenem or Meropenem Resistance in Gram-negative Organisms*. [Ηλεκτρονικό]
Available at: www.cdc.gov
[Πρόσβαση 09 05 2010].
- [10]. Chopra, I. & Roberts, M., 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), pp. 232-260.
- [11]. Clinical and Laboratory Standards Institute, January 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard*. 9th επιμ. s.l.:CLSI.
- [12]. European Centre for Disease Prevention and Control, 2012. *Surveillance of antimicrobial consumption in Europe*. Stockholm: ECDC.

- [13]. Hollenbeck, B. L. & Rice, L. B., 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, 3(5), pp. 421-529.
- [14]. Hunt, M., 2006. *Real time PCR tutorial*, South Carolina: s.n.
- [15]. Jacoby, G. J., 2009. AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), pp. 161-182.
- [16]. Kim, J. και συν., 2011. Molecular characterization of tetracycline- and quinolone-resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea.. *Journal of Veterinary Science*, 12(1), pp. 41-48.
- [17]. Kummerer, K., 2012. Antibiotics in the aquatic environment. Στο: P. L. Keen & M. H. Montforts, επιμ. *Antimicrobial resistance in the environment*. New Jersey: Wiley, p. 330.
- [18]. Lachmayr, K. L. και συν., 2009. Quantifying Nonspecific TEM β -Lactamase (blaTEM) Genes in a Wastewater Stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), pp. 203-211.
- [19]. Laurent, P., Rodriguez-Martinez, J.-M., Plesiat, P. & Nordmann, P., 2009. Naturally Occurring Class A β -Lactamases from the Burkholderia cepacia Complex. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(3), pp. 876-882.
- [20]. Marti, E., Variatza, E. & Balcazar, J. L., 2014. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 22(1), pp. 36-41.
- [21]. Martinez, J. L., 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157(11), pp. 2893-2902.
- [22]. Munir, M., Wong, K. & Xagorarakis, I., 2011. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan.. *Water research*, 45(2), pp. 681-693.
- [23]. Ng, L., Martin, I., Alfa, M. & Mulvey, M., 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes.. *Molecular and Cellular Probes*, 15(4), pp. 209-215.
- [24]. Nguyen-Disteche, M., Leyh-Bouille, M. & Ghuysen, J. M., 1982. Isolation of the membrane-bound 26 000-Mr penicillin-binding protein of *Streptomyces* strain K15 in the form of a penicillin-sensitive D-alanyl-D-alanine-cleaving transpeptidase.. *Biochem J.*, 207(1), pp. 109-115.
- [25]. Novo, A. & Manaia, C. M., 2006. *Factors influencing antibiotic resistance burden in municipal wastewater treatment plants*, Porto, Portugal: s.n.
- [26]. Paterson, D. L. & Bonomo, R. A., 2005. Extended spectrum β -lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), pp. 657-686.
- [27]. Pruden, A. and Arabi, M. (2011) Quantifying Anthropogenic Impacts on Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance, in *Antimicrobial Resistance in the Environment* (eds P. L. Keen and M. H. M. M. Montforts), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
doi: 10.1002/9781118156247.ch10

- [28]. Qing-Bin, Y., Mei-Ting, G. & Jian, Y., 2015. Fate of Antibiotic Resistant Bacteria and Genes during Wastewater Chlorination: Implication for Antibiotic Resistance Control. *PLOS one*, 10(3).
- [29]. Santillana, E., Beceiro, A., Bou, G. & Romero, A., 2007. Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis. *PNAS U.S.A*, 104(13), pp. 5354-5359.
- [30]. Schlüter, A., Szczepanowski, R., Pühler, A. & Top, E., 2007. Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool.. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), pp. 449-477.
- [31]. Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B. & Obst, U., 2003. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms.. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(3), pp. 325-335.
- [32]. Seyfried, E. και ουβ., 2010. Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with varying use of oxytetracycline.. *Microbial ecology*, 59(4), pp. 799-807.
- [33]. Sköld, O., 2011. *Antibiotics and antibiotic resistance*. Uppsala: John Wiley & Sons.
- [34]. Speer, B. S., Shoemaker, N. B. & Salyers, A. A., 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance.. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(4), pp. 387-389.
- [35]. Speldooren, V., Heym, B., Labia, R. & Nicolas-Chanoine, M., 1998. Discriminatory detection of inhibitor-resistant beta-lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR.. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(4), pp. 879-884.
- [36]. Subramani, S. & Vignesh, S., 2012. MAR Index Study and MDR Character Analysis of a few Golden Staph Isolates. *Asian journal of pharmacy and life sciences*, Τόμος 2, pp. 151-154.
- [37]. Tennstedt, T. και ουβ., 2005. Sequence of the 68,869 bp IncP-1alpha plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements.. *Plasmid*, 53(3), pp. 218-238.
- [38]. Walckenaer, E. και ουβ., 2004. Genetic and Biochemical Characterization of the Chromosomal Class A β -Lactamases of *Raoultella* (formerly *Klebsiella*) *planticola* and *Raoultella ornithinolytica*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(1), pp. 305-312.
- [39]. Walsh, T. και ουβ., 1997. Distribution and expression of beta-lactamase genes among *Aeromonas* spp.. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40(2), pp. 171-178.
- [40]. Watkinson, A. και ουβ., 2007. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system.. *Applied and Environmental Microbiology*, Τόμος 73, pp. 5667-5670.
- [41]. Wilcks, A., Andersen, S. R. & Licht, T. R., 2005. Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from raw food. *FEMS Microbiology Letters*, Τόμος 243, pp. 15-19.

- [42]. Yuan, Q.-B., Guo, M.-T. & Yang, J., 2015. Fate of Antibiotic Resistant Bacteria and Genes during Wastewater Chlorination: Implication for Antibiotic Resistance Control. *PPLoS One*, 10(3).
- [43]. Zhu, B., 2006. Degradation of plasmid and plant DNA in water microcosms monitored by natural transformation and real-time polymerase chain reaction. *Water research*, 40(17), pp. 3231-3238.
- [44]. Λαζανάκη, Β., 2010. *Η χρήση της Real Time PCR για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων στελεχών βακτηρίου (escherichia coli)*. Ηράκλειο: Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής.
- [45]. Σπυρίδων, Σ., Νοέμβριος 2011. *Έλεγχος απολύμανσης νερού και λυμάτων με χρήση φωτοκατάλυσης και φωτοηλεκτροκατάλυσης*. Χανιά: Πολυτεχνείο Κρήτης, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος.
- [46]. Στυλιανοπούλου, Η., n.d. *Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)*, s.l.: Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Ανάπτυξης και Μοριακής Νευρολογίας.