



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Διπλωματική εργασία

***Παρουσία αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον:  
Επίδραση στο αλόφυτο *Juncus acutus* ως προς την  
ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας***

Αβραμίδου Μαρίνα - Χρυσούλα  
Α.Μ.: 2010050008

Εξεταστική επιτροπή

Βενιέρη Δανάη (επιβλέπουσα)  
Καλογεράκης Νικόλαος  
Παρανυχιανάκης Νικόλαος

Χανιά  
Μάρτιος 2017



Στην οικογένειά μου

## ***Ευχαριστίες***

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και στο εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας της σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Η παρούσα εργασία αποτελεί συνέχεια ενός μέρους της διδακτορικής διατριβής της Δρ. Ευδοκίας Συρανίδου, η οποία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας, με επιβλέποντα Καθηγητή τον κ. Νικόλαο Καλογεράκη και στοχεύει στην ποσοτικοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά σε δείγματα γενετικού υλικού, τα οποία ελήφθησαν από ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες.

Θερμές ευχαριστίες, θα ήθελα να εκφράσω στην επίκουρη καθηγήτρια κ. Δανάη Βενιέρη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτής της διπλωματικής εργασίας, καθώς και για την ευκαιρία που μου παρείχε για τη μεθοδική και συστηματική ενασχόληση με θέματα που άπτονται του γνωστικού αντικείμενου της Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας. Η βοήθειά της, το ενδιαφέρον της και οι παρατηρήσεις της, τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους, όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας υπήρξαν για μένα πολύτιμα.

Θέλω να ευχαριστήσω επίσης τον καθηγητή κ. Νικόλαο Καλογεράκη και τον επίκουρο καθηγητή κ. Νικόλαο Παρανυχιανάκη, για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή και για τον χρόνο που διέθεσαν στην αξιολόγηση της εργασίας αυτής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στη μεταδιδάκτορα Δρ. Ευδοκία Συρανίδου για την ευχάριστη συνεργασία που είχαμε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τη βιολόγο (MSc) κ. Ιωσηφίνα Γουνάκη, ΕΤΕΠ του εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, για όλα όσα μου πρόσφερε τους τελευταίους μήνες, την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση της καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήταν παράλειψή μου αν στο σημείο αυτό ξεχνούσα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Αβραάμ και Νίκη, την αδελφή μου Ειρήνη, καθώς και τον φίλο μου Κώστα για όλα όσα μου έχουν προσφέρει, για την υπομονή τους, την κατανόηση τους και την υποστήριξη τους. Τους είμαι ευγνώμων.

## Περίληψη

Η εμφάνιση και εξάπλωση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων έχει χαρακτηριστεί από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (W.H.O.), ως μια από τις τρεις μεγαλύτερες απειλές για την δημόσια υγεία στον 21<sup>ο</sup> αιώνα. Η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις ευρωπαϊκές χώρες με τα υψηλότερα επίπεδα μικροβιακής αντοχής, ενώ είναι πρώτη στη συνολική κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων.

Η υπερβολική κατανάλωση των αντιβιοτικών οφείλεται κυρίως στην έλλειψη ορθής ενημέρωσης και στην εύκολη πρόσβαση σε αυτά. Η κατάχρηση των αντιβιοτικών, η άσκοπη χρήση αντιβιοτικών σε κτηνοτροφικές μονάδες για πρόληψη ασθενειών και η απόρριψη μη χρησιμοποιηθέντων αντιβιοτικών αποτελούν κύριες αιτίες αύξησης των ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον.

Η έξοδος των βιολογικών καθαρισμών αποτελεί κύρια πηγή εισόδου των αντιβιοτικών στο φυσικό περιβάλλον, καθώς τα συστήματα αυτά δεν έχουν αναπτυχθεί για την επεξεργασία τέτοιων χημικών ενώσεων. Η παρουσία τους είναι συνεχής, καθώς διοχετεύονται στο περιβάλλον ασταμάτητα. Εντούτοις, η δραστηριότητα των αντιβιοτικών υποβαθμίζεται μέσω διαφόρων βιολογικών ή φυσικοχημικών διεργασιών, όταν εισέρχονται στο φυσικό περιβάλλον, σε αντίθεση με τα γονίδια ανθεκτικότητας που μεταφέρονται και εξαπλώνονται με μεγάλη ευκολία.

Πολλές μελέτες έχουν επισημάνει την παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών μετά το στάδιο της απολύμανσης, καθιστώντας τα επεξεργασμένα λύματα, φορείς γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Έτσι, τα ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον, τροποποιώντας δυνητικά τα μικροβιακά οικοσυστήματα, μέσω της διάδοσης των γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, σε εγχώριους μικροοργανισμούς.

Η βελτιστοποίηση των διαδικασιών απολύμανσης και διαχείρισης των λυμάτων για την μείωση του ανθεκτικού βακτηριακού φορτίου και της ποσότητας των αντιμικροβιακών παραγόντων στα υγρά απόβλητα, καθώς και μια πολιτική πρόληψης της ανάμιξης ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης βακτηρίων με περιβαλλοντικούς μικροοργανισμούς κρίνονται αναγκαίες.

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας σε τέσσερα διαφορετικά αντιβιοτικά στο υδάτινο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, σε ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες στο αλόφυτο *Juncus acutus*, με την μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (real-time PCR). Τα γονίδια ανθεκτικότητας εξετάστηκαν στα αντιβιοτικά Σουλφαμεθοξαζόλη (Sulfamethoxazole, SMX), η Σiproφλοξασίνη (Ciprofloxacin, CIP), η Τετρακυκλίνη (Tetracycline) και η Αμπικιλίνη

(Ampicillin).

Τα πειραματικά αποτελέσματα συνηγορούν στην ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας σε αρκετές ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες στο αντιβιοτικό Σουλφαμεθοξαζόλη, αποδεικνύοντας την ανάπτυξη γενετικών μηχανισμών ανθεκτικότητας σε περιβαλλοντικά βακτηριακά στελέχη, συνεισφέροντας στην εξάπλωση της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον.

## ***Abstract***

The emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria have been characterized by the World Health Organization (W.H.O.), as one of the three greatest threats to public health in the 21st century. Greece ranks alongside other European nations with the highest levels of microbial resistance and ranks first overall in total consumption of antibiotic agents in Europe.

This excessive consumption of antibiotics is due to lack of awareness and knowledge on this subject, as well as, easy access to these products. Excessive consumption of antibiotics, misguided use of antibiotics in livestock for the prevention of illness, and the discarding of unused antibiotics into the environment are the main causes for the rise of antibacterial resistant bacteria in the environment.

The effluxes of wastewater treatment plants, are a main point of entry for antibiotics into the environment, owing to the fact that these wastewater treatment plants have not been developed for the processing of these chemical compounds. Their presence is constant as they are dispersed continuously into the environment. Nevertheless, the reactivity of antibiotics is degraded due to various physical, chemical, and biological processes as they enter into the natural environment, in contrast to antibiotic resistance genes that disperse and pass on with relative ease.

Many studies have emphasized in the presence of antibiotic-resistance genes and resistant bacterial strains after the disinfection stage of wastewater treatment. As a result, resistant bacterial strains enter the aqueous environment, potentially altering the microbial ecosystems by passing on their antibiotic resistance genes to domestic microorganisms.

The optimization of disinfection processes and wastewater management, for the reduction of bacterial resistance load and quantity of antibiotic agents in wastewater, as well as precautionary policies regarding the mixing of human and animal originated bacteria with environmental microorganisms are deemed necessary.

The purpose of this thesis is the detection and quantification of resistance genes to four

different antibiotics in the aqueous environment. Specifically, in endophytic bacterial communities within the halophyte *Juncus acutus*, utilizing the method of quantitative Polymerase Chain Reaction (real-time PCR). The antibiotic-resistance genes studied, have resistance towards Sulfamethoxazole (SMX), Ciprofloxacin (CIP), Tetracycline, and Ampicillin.

The experimental results determine the existence of bacterial resistance in many endophytic bacterial communities, towards the antibiotic Sulfamethoxazole, demonstrating the development of genetic mechanisms of resistance in environmental bacterial strains. The latter may contribute to the proliferation of antibiotic resistance in the environment.

## **Πίνακας περιεχομένων**

Ευχαριστίες.....	iv
Περίληψη.....	v
Abstract.....	vi
Πίνακας περιεχομένων.....	viii
Ευρετήριο πινάκων.....	x
Ευρετήριο εικόνων.....	xi
Ευρετήριο διαγραμμάτων.....	xii
<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>1</b>
1.1 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.....	2
1.2 Διάδοση της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον.....	3
1.3 Απορρόφηση ρύπων από το φυτό.....	7
1.4 Το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής στην Ελλάδα.....	8
1.5 Γενετικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας.....	10
1.6 Είδη ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.....	11
1.7 Ρύποι - Αντιβιοτικά.....	12
1.7.1 Σiproφλοξασίνη (Ciprofloxacin).....	14
1.7.2 Σουλφαμεθοξαζόλη (Sulfamethoxazole).....	16
1.7.3 Τετρακυκλίνη (Tetracycline).....	17
1.7.4 Αμπικιλίνη (Ampicillin).....	18
1.8 Μέθοδοι ανίχνευσης γονιδίων ανθεκτικότητας.....	19
1.8.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	19
1.8.2 Real - time PCR .....	19
<b>2. Σκοπός.....</b>	<b>22</b>
<b>3. Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>23</b>
3.1 Υλικά.....	23
3.2 Μέθοδοι - Πειραματική διαδικασία.....	25
3.2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού από ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες.....	25
3.2.2 Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.....	25
3.2.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	25

3.2.2.2 Ηλεκτροφόρηση.....	27
3.2.2.3 Απομόνωση γενετικού υλικού από πήκτωμα της αгарόζης.....	28
3.2.3 Κλωνοποίηση (Cloning).....	28
3.2.4 Μετασχηματισμός (Transformation).....	30
3.2.5 Απομόνωση του πλασμιδιακού γενετικού υλικού από αποικίες <i>E.coli</i> .....	30
3.2.6 Έλεγχος ποιότητας και ποσότητας του απομονωμένου γενετικού υλικού.....	30
3.2.7 Real - time PCR.....	31
<b>4. Αποτελέσματα - Συζήτηση.....</b>	<b>32</b>
4.1 Βιο-ενίσχυση των ριζών του αλόφυτο <i>Juncus acutus</i> .....	32
4.2 Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.....	35
4.3 Κλωνοποιημένες αποικίες.....	39
4.4 Έλεγχος ποσότητας και ποιότητας του γενετικού υλικού.....	40
4.5 Αποτελέσματα real - time PCR σε δείγματα ενδοφυτικών κοινοτήτων.....	44
4.6 Αποτελέσματα για το γονίδιο <i>sul1</i> .....	52
<b>5. Συμπεράσματα.....</b>	<b>61</b>
<b>6. Μελλοντικές προτάσεις.....</b>	<b>65</b>
<b>7. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>66</b>
<b>8. Παράρτημα.....</b>	<b>73</b>
8.1 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	73
8.2 Μέθοδος ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.....	81

## ***Ευρετήριο πινάκων***

Πίνακας 1: Κατηγορίες αντιβιοτικών.....	13
Πίνακας 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. ....	26
Πίνακας 3: Διεργασίες που ακολουθήθηκαν για κάθε δείγμα φυτού. ....	33
Πίνακας 4: Έλεγχος οπτικής απορρόφηση του γενετικού υλικού κάθε γονιδίου.....	41
Πίνακας 5: Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.....	52
Πίνακας 6: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο aac(6')-Ib-cr, qnrA, qnrB, qnrC, qnrS... ..	73
Πίνακας 7: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο aac(6')-Ib-cr, qnrA, qnrB, qnrC, qnrS .....	73
Πίνακας 8: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο qnrD.....	74
Πίνακας 9: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο qnrD.....	74
Πίνακας 10: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο sul1 .....	75
Πίνακας 11: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο sul1 .....	75
Πίνακας 12: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο sul2 .....	76
Πίνακας 13: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο sul2 .....	76
Πίνακας 14: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο sul3 .....	77
Πίνακας 15: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο sul3 .....	77
Πίνακας 16: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο tetA, tetM.....	78
Πίνακας 17: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο tetA, tetM.....	78
Πίνακας 18: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο ampC .....	79
Πίνακας 19: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο ampC .....	79
Πίνακας 20: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο blaTEM.....	80
Πίνακας 21: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο blaTEM.....	80
Πίνακας 22: Μίγμα αντίδρασης qPCR για το γονίδιο sul1 .....	81
Πίνακας 23: Πρωτόκολλο qPCR για το γονίδιο sul1 .....	81

Πίνακας 24: Μίγμα αντίδρασης qPCR για το γονίδιο tetA, tetM.....	82
Πίνακας 25: Πρωτόκολλο qPCR για το γονίδιο tetA, tetM.....	82
Πίνακας 26: Μίγμα αντίδρασης qPCR για το γονίδιο ampC .....	83
Πίνακας 27: Πρωτόκολλο qPCR για το γονίδιο ampC .....	83

## **Ευρετήριο εικόνων**

Εικόνα 1: Ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά .....	1
Εικόνα 2: Πορεία των αντιβιοτικών σε διάφορα περιβάλλοντα.....	5
Εικόνα 3: Τρόποι απόκτησης εξωγενούς υλικού. (a) Βακτηριακή σύζευξη, (b) Μεταγωγή δια μέσου βακτηριοφάγου, (c) Μετασχηματισμός με DNA. ....	11
Εικόνα 4: Βασικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά .....	12
Εικόνα 5: Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών .....	14
Εικόνα 6: Χημική δομή της σιπροφλοξασίνης.....	14
Εικόνα 7: Χημική δομή της σουλφαμεθοξαζόλης.....	16
Εικόνα 8: Χημική δομή της τετρακυκλίνης .....	17
Εικόνα 9: Χημική δομή της αμπικιλίνης .....	18
Εικόνα 10: Φάσεις της καμπύλης ενίσχυσης.....	20
Εικόνα 11:Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pCR™2.1-TOPO®. Διακρίνονται τα βασικά χαρακτηριστικά του πλασμιδίου, η θέση έναρξης της αντιγραφής pUC ori, ο υποκινητής lac ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου σύντηξης lacZα, καθώς και τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμυκίνη και αμπικιλίνη (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen by Life technologies, 2014)....	29
Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου sul1 σε βακτηριακά στελέχη απομονωμένα από ενδοφυτικές κοινότητες. Διαδρομές: 1,2 → βακτηριακό στέλεχος γένους <i>Ochrobactrum</i> R53, 3 → DNA ladder (100 bp - Biolabs).....	35
Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου tetA στο βακτηριακό στέλεχος <i>K. pneumoniae</i> NTCT 5056. Διαδρομές: 1 → DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2,3,4,5, → δείγματα με παρουσία του επιθυμητού γονιδίου (318 bp). ....	37

Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1,5%) των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου tetM στο βακτηριακό στέλεχος <i>K. pneumoniae</i> NTCT 5056. Διαδρομές: 1 → DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2,3,4,5, → δείγματα με παρουσία του επιθυμητού γονιδίου (600 bp), 3,4,5 → δείγματα με απουσία του επιθυμητού γονιδίου.....	37
Εικόνα 15 : Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1,5%) των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου ampC στο βακτηριακό στέλεχος <i>K. pneumoniae</i> NTCT 5056. Διαδρομές: 1 → DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2 → δείγμα με απουσία του επιθυμητού γονιδίου, 3,4,5,6 → δείγματα με παρουσία του επιθυμητού γονιδίου (550 bp).....	38
Εικόνα 16: Αποικίες κλωνοποιημένων στελεχών <i>E. coli</i> με το γονίδιο sul1 σε πυκνό διάλυμα (αριστερά) και σε αραιό διάλυμα (δεξιά).....	39
Εικόνα 17: Ανακαλλιέργειες λευκών αποικιών.....	40
Εικόνα 18: Ποσότητα αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο sul1. ....	42
Εικόνα 19: Ποσότητα αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο tetA. ....	42
Εικόνα 20: Ποσότητα αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο tetM.....	42
Εικόνα 21: Ποσότητα αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο ampC.....	43

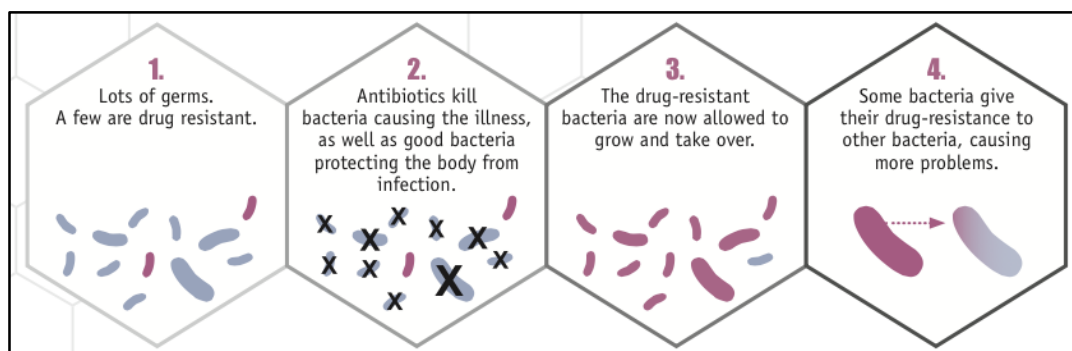
## **Ευρετήριο διαγραμμάτων**

Διάγραμμα 1: Χρήση αντιμικροβιακών εξωνοσοκομειακά στην Ευρωπαϊκή Ένωση κατά το έτος 2012, εκφρασμένη σε ημερήσιες δόσεις ανά 1000 κατοίκους ανά ημέρα (ECDC Surveillance of antimicrobial consumption in Europe) .....	9
Διάγραμμα 2: Καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο sul1. ....	44
Διάγραμμα 3: Πρότυπη καμπύλη δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο sul1. Κλίση: - 2,84 , $R^2$ : 0,986 .....	45
Διάγραμμα 4: Καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο tetA. ....	46
Διάγραμμα 5: Πρότυπη καμπύλη δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο tetA. Κλίση: - 2,56 , $R^2$ : 0,963 .....	47

Διάγραμμα 6: Καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο <i>tetM</i> .....	49
Διάγραμμα 7: Πρότυπη καμπύλη δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο <i>tetM</i> . Κλίση: - 3,66 , $R^2$ : 0,985 .....	49
Διάγραμμα 8: Καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο <i>ampC</i> .....	50
Διάγραμμα 9: Πρότυπη καμπύλη δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο <i>ampC</i> . Κλίση: - 3,296 , $R^2$ : 0,968 .....	51
Διάγραμμα 10: Συγκέντρωση του γονιδίου <i>sul1</i> ανά g ξηρής μάζας ρίζας για ενδοφυτικές κοινότητες που απομονώθηκαν από συστήματα επεξεργασίας που δεν είχαν εμβολιαστεί με βακτηριακά στελέχη.....	53
Διάγραμμα 11: Συγκέντρωση του γονιδίου <i>sul1</i> ανά g ξηρής μάζας ρίζας για ενδοφυτικές κοινότητες που απομονώθηκαν από συστήματα επεξεργασίας που είχαν εμβολιαστεί με βακτηριακά στελέχη του γένους <i>Sphingomonas</i> sp. U33.....	54
Διάγραμμα 12: Συγκέντρωση του γονιδίου <i>sul1</i> ανά g ξηρής μάζας ρίζας για ενδοφυτικές κοινότητες που απομονώθηκαν από συστήματα επεξεργασίας που είχαν εμβολιαστεί με βακτηριακά στελέχη του γένους <i>Bacillus</i> sp. R12.....	55
Διάγραμμα 13: Συγκέντρωση του γονιδίου <i>sul1</i> ανά g ξηρής μάζας ρίζας για ενδοφυτικές κοινότητες που απομονώθηκαν από συστήματα επεξεργασίας που είχαν εμβολιαστεί με βακτηριακά στελέχη του γένους <i>Ochrobactrum</i> sp. R24.....	56
Διάγραμμα 14: Συγκέντρωση του γονιδίου <i>sul1</i> ανά g ξηρής μάζας ρίζας για ενδοφυτικές κοινότητες που απομονώθηκαν από συστήματα επεξεργασίας που είχαν εμβολιαστεί με μίγμα βακτηριακών στελεχών γένους <i>Sphingomonas</i> sp. U33, <i>Bacillus</i> sp. R12 και <i>Ochrobactrum</i> sp. R24 .....	57
Διάγραμμα 15: Συγκέντρωση του γονιδίου <i>sul1</i> ανά g ξηρής μάζας ρίζας για τις 35 βακτηριακές κοινότητες που είχαν θετικό αποτέλεσμα.....	58
Διάγραμμα 16: Συγκέντρωση του γονιδίου <i>sul1</i> ανά g ξηρής μάζας ρίζας για για κάθε μέθοδο επεξεργασίας .....	59

## 1. Εισαγωγή

Τα αντιβιοτικά, από την ανακάλυψη τους πριν από 80 περίπου χρόνια, έχουν σώσει εκατομμύρια ζωές από βακτηριακές λοιμώξεις. Σήμερα όμως, οκτώ δεκαετίες μετά, οι πολύτιμες αυτές για τον άνθρωπο ουσίες χάνουν με συνεχώς αυξανόμενο ρυθμό την αποτελεσματικότητά τους λόγω επίτασης του φαινομένου της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά. Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί φυσιολογικό βιολογικό φαινόμενο, συνέπεια φυσικής επιλογής, κατά την οποία μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν αντοχή σε κάποιο αντιβιοτικό, αποκτούν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι των μικροοργανισμών που δεν είναι ανθεκτικοί στο αντιβιοτικό όταν αυτός ο πληθυσμός εκτεθεί στο αντιβιοτικό αυτό (εικόνα 1). Η ισορροπία του φυσιολογικού αυτού φαινομένου διαταράσσεται σε ανησυχητικό βαθμό από την υπέρμετρη και μη ενδεδειγμένη χρήση αντιβιοτικών που παρατηρείται στις μέρες μας.



Εικόνα 1: Ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά ([http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial\\_resistance](http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial_resistance)).

Αυτό έχει δυσμενέστερες συνέπειες για τη δημόσια υγεία, καθώς οι θεραπευτικές επιλογές ακόμα και για τις κοινές λοιμώξεις έχουν καταστεί πολύ περιορισμένες και σε μερικές περιπτώσεις είναι ανύπαρκτες. 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 δισεκατομμυρίου ευρώ για δαπάνες υγειονομικής περίθαλψης και απώλεια παραγωγικότητας.

Το αντιβιοτικό, με την έννοια με την οποία χρησιμοποιείται συνήθως η λέξη, είναι φάρμακο που καταπολεμά τα βακτήρια. Το αντιμικροβιακό είναι πιο γενικός όρος και περιλαμβάνει οποιοδήποτε φάρμακο καταπολεμά νοσογόνα μικρόβια, είτε αυτά είναι βακτήρια, είτε μύκητες, είτε μικροσκοπικά παράσιτα, πλην των ιών.

## 1.1 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Η ανθεκτικότητα των μικροβίων στα αντιβιοτικά θεωρείται ένα από τα πιο σοβαρά προβλήματα της δημόσιας υγείας. Οι αριθμοί των ανθεκτικών βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά έχει αυξηθεί την τελευταία δεκαετία. Πολλές βακτηριακές λοιμώξεις έχουν γίνει ανθεκτικές στις θεραπείες των πιο συχνά συνταγογραφούμενων αντιβιοτικών. Κάθε φορά που ένα άτομο παίρνει αντιβιοτικά, τα ευαίσθητα βακτήρια σκοτώνονται, αλλά τα ανθεκτικά μικρόβια επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται. Για τα παιδιά η ανησυχία είναι ακόμα μεγαλύτερη, διότι σε αυτά παρατηρούνται τα μεγαλύτερα ποσοστά χρήσης αντιβιοτικών. Η επαναλαμβανόμενη και άσκοπη χρήση των αντιβιοτικών είναι οι κύριες αιτίες αύξησης των ανθεκτικών βακτηρίων. Η κατάχρηση των αντιβιοτικών θέτει σε κίνδυνο τη χρησιμότητα των φαρμάκων που είναι πραγματικά ουσιώδη και χρήσιμα. Η μείωση της αλόγιστης χρήσης των αντιβιοτικών είναι ο καλύτερος τρόπος για την αντιμετώπιση της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας, καθώς η χρήση των αντιβιοτικών προωθεί την αντίσταση των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.

Τα αντιβιοτικά, γνωστά επίσης και ως αντιμικροβιακά φάρμακα, είναι φάρμακα τα οποία καταπολεμούν τις λοιμώξεις που προκαλούνται από βακτήρια. Ο Alexander Fleming ανακάλυψε το πρώτο αντιβιοτικό, την πενικιλίνη, το 1927. Μετά την πρώτη χρήση των αντιβιοτικών τη δεκαετία του 1940, μειώθηκαν δραστικά οι ασθένειες και οι θάνατοι από λοιμώδεις νόσους. Ο όρος "αντιβιοτικό" αναφέρεται σε μια φυσική ένωση που παράγεται από ένα μύκητα ή άλλο μικροοργανισμό, ο οποίος έχει τη δυνατότητα να αδρανοποιεί τα βακτήρια, που προκαλούν τις νόσους. Κάποια αντιβιοτικά μπορεί να περιέχουν συνθετικά συστατικά (δεν παράγονται από μικροοργανισμούς), που επίσης έχουν την δυνατότητα να σκοτώσουν ή να αναστείλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Αν και τα αντιβιοτικά μπορεί να έχουν ωφέλιμα αποτελέσματα, η συχνή χρήση τους συνεισφέρει στο πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά, δηλαδή στην ικανότητα των βακτηρίων και άλλων μικροβίων να αντιστέκονται στη δράση ενός αντιβιοτικού.

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. 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.

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που χορηγούνται για την αντιμετώπιση βακτηριακών και όχι ιογενών λοιμώξεων που προσβάλλουν τον ανθρώπινο οργανισμό. Για

παράδειγμα, δεν είναι αποτελεσματικά στο κοινό κρυολόγημα, στη γρίπη, στη βρογχίτιδα και στην πλειονότητα των ωτίτιδων. Η κατάχρηση αντιβιοτικών οδηγεί στη μείωση της δραστηριότητάς τους, ειδικότερα όταν χορηγούνται άσκοπα. Η χώρα μας κατέχει την πρώτη θέση στην κατανάλωση αντιβιοτικών και σε λοιμώξεις από πολυανθεκτικά βακτήρια. Η αντοχή των μικροβίων στα αντιβιοτικά καθιστά δυσχερή την αντιμετώπιση των λοιμώξεων που οφείλονται σε ανθεκτικά βακτήρια και αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα δημόσιας υγείας σήμερα.

Τα μικρόβια που παρουσιάζουν σήμερα την μεγαλύτερη αντοχή στα αντιβιοτικά είναι τέσσερα. Πρόκειται για το *Klebsiella pneumoniae*, το *Escherichia coli*, το *Pseudomonas aeruginosa* και το *Staphylococcus aureus* (MRSA).

## **1.2 Διάδοση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά στο περιβάλλον**

Οργανισμοί ανθεκτικοί σε αντιβιοτικά, εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον από ανθρώπινες και ζωικές πηγές. Τα βακτήρια αυτά είναι ικανά να διαδώσουν τα γονίδια τους σε εγχώριους μικροοργανισμούς στο φυσικό περιβάλλον. Αντιθέτως, πολλά αντιβιοτικά βιομηχανικής προέλευσης κυκλοφορούν σε υδάτινα περιβάλλοντα, τροποποιώντας δυνητικά τα μικροβιακά οικοσυστήματα (Baquero et al., 2008).

Παθογόνα και δυνητικά παθογόνα, ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης, βακτήρια απελευθερώνονται συνεχώς με τα υγρά απόβλητα στο υδάτινο περιβάλλον. Πολλοί από αυτούς τους οργανισμούς διαθέτουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, ενταγμένα σε γενετικά κινητές πλατφόρμες (π.χ. πλασμίδια, μεταθέτες) έχοντας τη δυνατότητα να διαδοθούν μεταξύ βακτηριακών κοινοτήτων και στελεχών του νερού και του εδάφους (Alonso et al., 2001).

Το περιβάλλον 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 αποτελεί όχι μόνο ένα τρόπο διάδοσης των ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων μεταξύ ανθρώπινων και ζωικών πληθυσμών, καθώς το πόσιμο νερό προέρχεται από το έδαφος, αλλά αποτελεί και μια διαδρομή μέσω της οποίας τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά εισέρχονται στα φυσικά βακτηριακά οικοσυστήματα. Πολλά από αυτά τα γονίδια δεν είναι κατά κύριο λόγο, γονίδια ανθεκτικότητας, αλλά ανήκουν σε ένα κρυφό σύνολο γονιδίων που είναι σε θέση να μετατραπεί σε γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, σε παθογόνα και μη παθογόνα βακτήρια (D'Costa et al., 2006).

Τα αντιβιοτικά είναι από τα πιο σημαντικά φάρμακα για την θεραπευτική αγωγή μολυσματικών ασθενειών, με αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες των ενώσεων αυτών να απελευθερώνονται στα αστικά λύματα λόγω της υπερβολικής κατανάλωσής τους και της απόρριψης των ποσοτήτων που δεν χρησιμοποιήθηκαν (Rodríguez-Mozaz et al., 2010). Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται όχι μόνο στην ιατρική αλλά και για την πρόληψη και ίαση ασθενειών σε ζώα και φυτά, ακόμα και για την επιτάχυνση της ανάπτυξης των ζώων στην κτηνοτροφία (Kümmerer et al., 2009; Zhang et al., 2009). Όλες αυτές οι εφαρμογές έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση τεράστιων ποσοτήτων αντιμικροβιακών παραγόντων σε φυσικά οικοσυστήματα (Martinez et al., 2009). Η εισαγωγή και η προοδευτική συσσώρευση στο περιβάλλον των αντιμικροβιακών παραγόντων, αντιβιοτικών, απορρυπαντικών και απολυμαντικών προϊόντων και των υπολειμμάτων από βιομηχανική ρύπανση συμβάλλουν στην τροποποίηση και εξάπλωση αυτών των ανθεκτικών οργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον (Baquero et al., 2008).

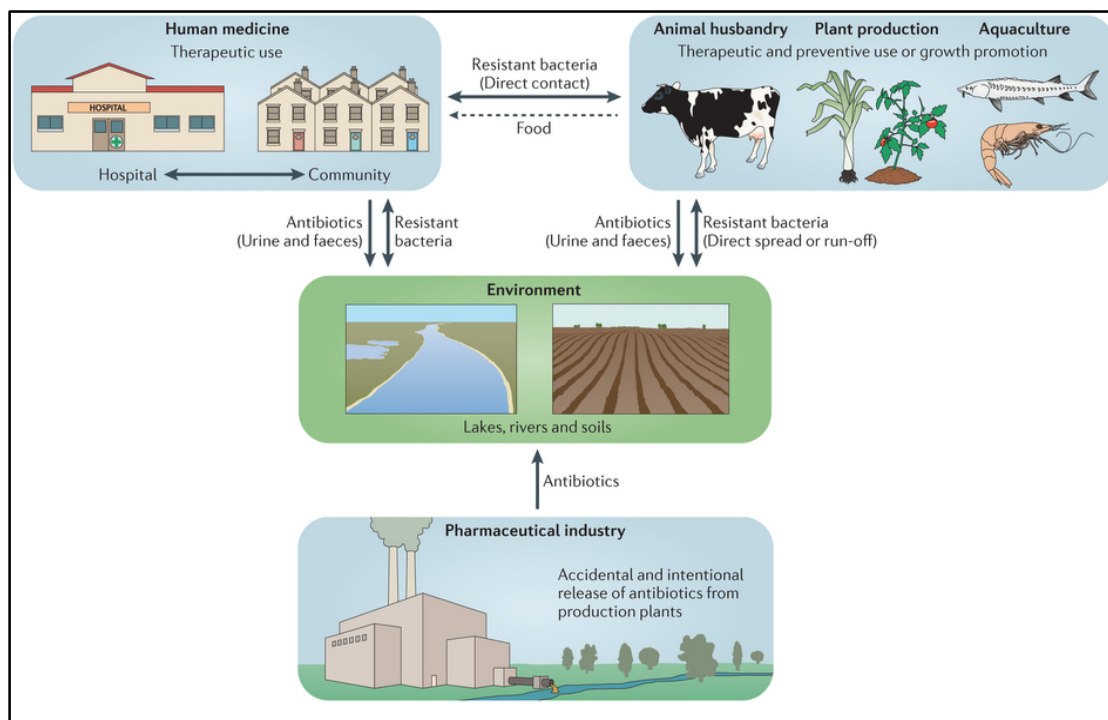
Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά εξελίσσεται στα βακτήρια λόγω της επίδρασης της βιομηχανικής παραγωγής αντιμικροβιακών παραγόντων στις βακτηριακές κοινότητες (Baquero et al., 2008). Οι γενετικοί "αντιδραστήρες" αποτελούν χώρους, όπου η γενετική εξέλιξη λαμβάνει χώρα, διότι υπάρχει υψηλή βιολογική συνδεσιμότητα και γενετική ποικιλομορφία. Πέρα από τις μεταλλάξεις, σημαντικές γενετικές παραλλαγές λαμβάνουν χώρα, μέσω γενετικών "ανταλλαγών" μεταξύ των οργανισμών εντός των κοινοτήτων.

Υπάρχουν τέσσερις γενετικοί αντιδραστήρες στους οποίους η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά εξελίσσεται. Ο κύριος αντιδραστήρας συνίσταται από τους μικροβιακούς οργανισμούς ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης, όπου η προληπτική ή θεραπευτική χρήση αντιβιοτικών καταβάλλουν τις δράσεις τους. Ο δεύτερος αντιδραστήρας περιλαμβάνει τα νοσοκομεία, τις εγκαταστάσεις μακροπρόθεσμης φροντίδας, φάρμες ή οποιοδήποτε άλλο πυκνοκατοικημένο μέρος όπου ευπαθή άτομα εκτίθενται σε βακτηριακή ανταλλαγή. Ο τρίτος αντιδραστήρας αποτελείται από απόβλητα και κάθε είδους βιολογικά υπολείμματα προερχόμενα από τις εγκαταστάσεις της δεύτερης κατηγορίας αντιδραστήρων, για παράδειγμα από βιολογικούς καθαρισμούς, όπου διαφορετικοί βακτηριακοί οργανισμοί έχουν την ευκαιρία να αναμιχθούν και να αντιδράσουν γενετικά. Η τέταρτη κατηγορία αφορά το έδαφος και τα επιφανειακά καθώς και τα υπόγεια υδάτινα περιβάλλοντα, όπου οι βακτηριακοί οργανισμοί που προέρχονται από τους προηγούμενους αντιδραστήρες έρχονται σε επαφή με τους περιβαλλοντικούς οργανισμούς (Baquero et al., 2008).

Ως εκ τούτου, οι αντιβιοτικές ουσίες και τα ανθεκτικά βακτήρια μπορούν να εισέλθουν στα επιφανειακά και υπόγεια υδάτινα περιβάλλοντα μέσω διαφορετικών οδών (εικόνα 2), για παράδειγμα μέσω των επεξεργασμένων και ανεπεξέργαστων λυμάτων από τις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων όπου παρέχεται ένα ιδανικό περιβάλλον για την οριζόντια μεταφορά

γονιδίων ανθεκτικότητας, καθώς τα βακτήρια είναι σε διαρκή επαφή με τις αντιβιοτικές ουσίες και τους ανθεκτικούς μικροοργανισμούς (Marti et al., 2014). Επιπλέον, είναι δυνατόν να εισέλθουν στο υδάτινο περιβάλλον από τα νοσοκομειακά απόβλητα, από τις εκάστοτε απορρίψεις υδατοκαλλιεργειών, από τις επιφανειακές απορροές, από την χρήση μη ελεγχμένων κτηνοτροφικών παραγώγων (π.χ. κοπριά) καθώς και από τη διήθηση του νερού που προορίζεται για γεωργική χρήση (Rodriguez-Mozaz et al., 2015).

Μια επισκόπηση στο οικολογικό μονοπάτι των αντιβιοτικών, δείχνει πως τα αντιβιοτικά φάρμακα εναλλάσσονται μεταξύ διαφορετικών περιβαλλόντων, όπως το ιατρικό περιβάλλον, το γεωργικό περιβάλλον, το περιβάλλον υδατοκαλλιεργειών, το περιβάλλον των φαρμακευτικών βιομηχανιών και το ευρύτερο περιβάλλον. Ένα μεγάλο ποσοστό των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως απελευθερώνεται στο περιβάλλον με μία δραστική μορφή, μέσω των απεκκρίσεων των φαρμάκων στα ούρα και στα κόπρανα. Έτσι, τα αντιβιοτικά ασκούν πίεση επιλογής σε βακτήρια, στους ανθρώπους, στα ζώα και στα φυτά, λόγω της υπερβολικής χρήσης τους.



Εικόνα 2: Πορεία των αντιβιοτικών στο περιβάλλον (Andersson et al., 2014).

Η δραστικότητα των αντιβιοτικών υποβαθμίζεται μέσω διαφόρων βιολογικών (βιοαποικοδόμηση) ή μέσω φυσικοχημικών διεργασιών (προσρόφηση, φωτόλυση, υδρόλυση), όταν εισέρχονται στο φυσικό υδάτινο περιβάλλον, σε αντίθεση με τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που μεταφέρονται ανέπαφα και διαδίδονται χωρίς να είναι εντός κάποιου κυττάρου.

Είναι γνωστό ότι τα αντιβιοτικά αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Kümmerer et al., 2009). Επιπλέον, η υπερβολική χρήση των αντιβιοτικών θέτει σε κίνδυνο την αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών θεραπειών, καθώς οι μολυσματικοί οργανισμοί γίνονται ανθεκτικοί σε περισσότερα αντιβιοτικά (Marti et al., 2014; Pruneau et al., 2011). Η εμφάνιση και εξάπλωση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων έχει χαρακτηριστεί από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ) ως μία από τις τρεις μεγαλύτερες απειλές για την δημόσια υγεία στον 21ο αιώνα (World Health Organization, 1996). Πρωτόκολλα αξιολόγησης των κινδύνων για τα αντιβιοτικά και τα ανθεκτικά βακτήρια στο υδάτινο περιβάλλον, με βάση τα βέλτιστα συστήματα για την ανίχνευση αντιβιοτικών και τη παρακολούθηση της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά μικροβιακής προέλευσης, αρχίζουν να τίθενται υπό συζήτηση (Kim et al., 2007). Μέθοδοι για την μείωση ανθεκτικού βακτηριακού φορτίου στα υγρά απόβλητα, καθώς και τη ποσότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων, οι οποίοι τις περισσότερες φορές προέρχονται από νοσοκομεία και αγροκτήματα, περιλαμβάνονται στη βελτιστοποίηση των διαδικασιών απολύμανσης και διαχείρισης των λυμάτων και κοπριάς (Baquero et al., 2008). Μια πολιτική για την πρόληψη ανάμιξης ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης βακτηρίων με τους περιβαλλοντικούς οργανισμούς κρίνεται αναγκαία (Baquero et al., 2008).

Λόγω της αυξανόμενης ανησυχίας για τη ρύπανση υδάτινων οικοσυστημάτων από αντιβιοτικά, αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί με σκοπό την εκτίμηση της παρουσίας των ουσιών αυτών στις εκροές των βιολογικών καθαρισμών (Costanzo et al, 2005; García-Galán et al., 2011), ενώ άλλες μελέτες έδωσαν προσοχή στα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που απελευθερώνονται στο περιβάλλον και κατά συνέπεια στην εμφάνιση και στο δυναμικό εξάπλωσης της ανθεκτικότητας αυτής (Chen et al., 2013; LaPara et al., 2011; Marti et al., 2013; Munir et al., 2011; Sidrach-Cardona et al., 2014; Zhang et al., 2009).

### 1.3 Απορρόφηση ρύπων από το φυτό

Οργανικοί ρύποι μπορούν να απορροφηθούν από τα φυτά ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τα είδη των φυτών (Garcia-Rodríguez et al., 2014). Πολλές συσχετίσεις έχουν διερευνηθεί μεταξύ της οργανικής ένωσης που απορροφάται από τα διαφορετικά φυτικά διαμερίσματα, ως συνάρτηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της οργανικής ένωσης (Burken et al., 1998). Η πρόσληψη μιας οργανικής ένωσης μπορεί να εκτιμηθεί από τον συντελεστή συγκέντρωσης - ρεύματος διαπνοής (transpiration stream concentration factor, TSCF) επί τον όγκο του νερού που διέπνευσε το φυτό. Γενικά, οι ενώσεις με δεκαδικό λογάριθμο του συντελεστή κατανομής οκτανόλης - νερού,  $\log(K_{ow})$  μεταξύ 0,5 - 3,5 θεωρείται ότι κινούνται γρήγορα διαμέσου των φυτών, έτσι ο χρόνος επαφής των ενώσεων με τους μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας είναι μικρός (Weyens et al., 2009).

Αρχικά, η ένωση απορροφάται μέσω του μεσοκυττάριου πλέγματος, στη συνέχεια κινείται εντός του ριζικού ξυλώματος και μεταφέρεται στο βλαστό και στα φύλλα. Πολλές ενώσεις μπορεί ακόμη και να ακολουθήσουν το ρυθμό διαπνοής, καθώς απορροφώνται από τα φυτά, μεταφέρονται στα φύλλα και στη συνέχεια μέσω της εξατμισοδιαπνοής ελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα (Burken et al., 1998). Ο ρυθμός μετατόπισης προς τα εναέρια τμήματα διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών οργανικών ενώσεων. Ειδικότερα, τα αλόφυτα έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν τις πτητικές οργανικές ενώσεις στην ατμόσφαιρα μέσω των σπογγωδών ιστών, προκαλώντας σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα (Imfeld et al., 2009).

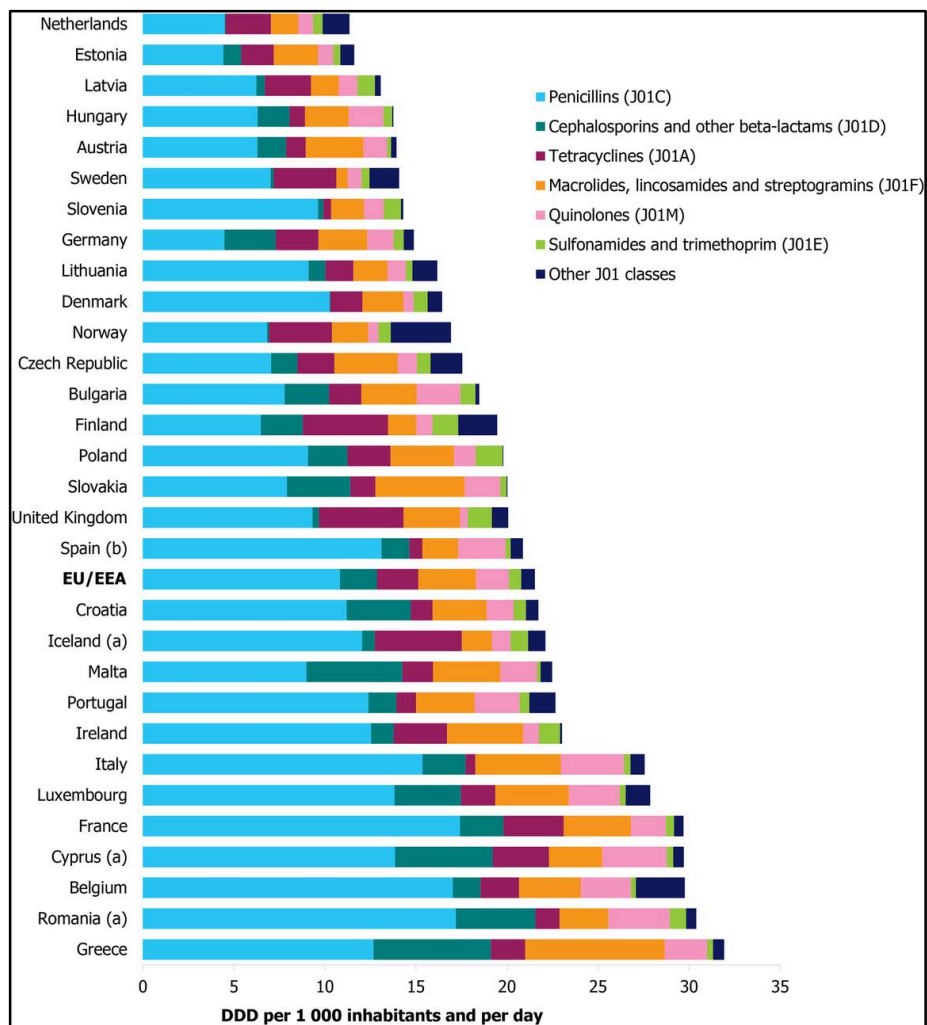
Αρκετές μελέτες υπογραμμίζουν την ικανότητα διαφόρων φυτών να απορροφούν και να μετατοπίζουν αναδυόμενες οργανικές ενώσεις, σε διαφορετικές πειραματικές ρυθμίσεις, για παράδειγμα υδροπονική (Bouldin et al., 2006; Dodgen et al., 2013), πειράματα εδάφους (Hawker et al., 2013), υπό ελεγχόμενες συνθήκες, καθώς και υπό συνθήκες πεδίου (Wu et al., 2015). Οι πληροφορίες σχετικά με την ικανότητα των ειδών του γένους *Juncus* να απορροφά αυτές τις ενώσεις δεν είναι επαρκείς. Η μελέτη (Dordio et al., 2011) στηρίχθηκε στην ικανότητα του φυτού *Typha* sp. να απομακρύνει το φάρμακο καρβαμαζεπίνη (carbamazepine) από το νερό και να το συσσωρεύει στους φυτικούς του ιστούς. Σε μια άλλη μελέτη, η τύχη των 20 πιο συχνά χρησιμοποιημένων φαρμακευτικών προϊόντων και προϊόντων προσωπικής φροντίδας διερευνήθηκε σχετικά με το δυναμικό απορρόφησης και μετατόπισης τους από τα φυτά (Wu et al, 2013). Αποδείχτηκε ότι οι ουδέτερες ενώσεις προσροφήθηκαν στις επιφάνειες του ριζικού συστήματος, ενώ μια υδρόφιλο - ρυθμιζόμενη μεταφορά καθόριζε τη μετατόπιση των ενώσεων αυτών προς τους υπέργειους ιστούς. Οι υδρόφιλες ενώσεις ήταν επιρρεπείς στη μεταφορά τους στα φύλλα, κατά τη διεύθυνση του ρεύματος διαπνοής. Τα επεξεργασμένα λύματα που χρησιμοποιούνται για τη γεωργική άρδευση, για βιοστερεά και για τροποποιήσεις κοπριάς, θέτουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία δεδομένου ότι οι ενώσεις αυτές

μεταφέρονται στα λαχανικά ή σε άλλα φυτά καλλιεργειών, κυρίως μέσω του ρεύματος της διαπνοής (Clarke et al., 2011; Hurtado et al., 2016; Malchi et al., 2014). Ωστόσο, πολλές μελέτες δείχνουν ότι η συγκέντρωση των ενώσεων αυτών στα βρώσιμα προϊόντα είναι αμελητέα (Prosser et al., 2015) ή ότι οι επιπτώσεις της ανθρώπινης έκθεσης σε αυτές χρειάζονται περαιτέρω έρευνα (Wu et al., 2015).

#### **1.4 Το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής στην Ελλάδα**

Η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις ευρωπαϊκές χώρες με τα υψηλότερα επίπεδα μικροβιακής αντοχής, ενώ είναι πρώτη στη συνολική κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων. Αυτό οφείλεται κυρίως στην έλλειψη ενημέρωσης για τη σωστή χρήση των αντιβιοτικών και στην εύκολη πρόσβαση σε αυτά. Η διασπορά στελεχών ανθεκτικών στα περισσότερα αντιβιοτικά ευθύνεται για την αύξηση της νοσηρότητας, την παράταση της διάρκειας νοσηλείας των ασθενών, την αύξηση της θνησιμότητας των νοσηλευμένων ασθενών και την οικονομική επιβάρυνση των Συστημάτων Υγείας. Οι λοιμώξεις από πολυανθεκτικά παθογόνα αποτελούν καθημερινή πραγματικότητα για τα ελληνικά νοσοκομεία και καθιστούν επιτακτική την ανάγκη λήψης και εφαρμογής αποτελεσματικών μέτρων για την πρόληψη και τον έλεγχό τους.

Η συνεχώς καταγραφόμενη αύξηση της μικροβιακής αντοχής οφείλεται στην κατάχρηση των αντιμικροβιακών παραγόντων, ειδικότερα των ευρέος φάσματος αντιβιοτικών. Αναλυτικότερα, σύμφωνα με καταγραφές από το ESDC (European Surveillance of Antimicrobial Consumption), η Ελλάδα είναι η πρώτη χώρα της Ευρώπης με συνολική (και ειδικότερα εξωνοσοκομειακή) κατανάλωση αντιβιοτικών, με σταδιακή αύξηση από το 1997 (25.06 DDD) έως το 2005 (34.73 DDD) (DDD: Καθορισμένη Ημερήσια Δόση ανά 1000 κατοίκους ανά ημέρα). Σύμφωνα με τα πλέον πρόσφατα στοιχεία, η συνολική εξωνοσοκομειακή κατανάλωση αντιμικροβιακών για το έτος 2008 ανήλθε στα επίπεδα του 45 DDD στη χώρα μας, επίπεδα σχεδόν διπλάσια συγκριτικά με το μέσο όρο που καταγράφηκε στις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες, ενώ παρατηρήθηκε μια μείωση στα 32 DDD το 2012, διατηρώντας την πρώτη θέση (διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: Χρήση αντιμικροβιακών εξωνοσοκομειακά στην Ευρωπαϊκή Ένωση κατά το έτος 2012, εκφρασμένη σε ημερήσιες δόσεις ανά 1000 κατοίκους ανά ημέρα (ECDC Surveillance of antimicrobial consumption in Europe).

Από το έτος 2008 σε ευρωπαϊκό επίπεδο, με την καθιέρωση της 18<sup>ης</sup> Νοεμβρίου ως Ημέρας Ευαισθητοποίησης για την Ορθολογική Χρήση των Αντιβιοτικών, πραγματοποιούνται συντονισμένες προσπάθειες στο πλαίσιο εκστρατειών ενημέρωσης, με στόχο την ορθολογική χρήση και τον περιορισμό της υπερκατανάλωσης αντιμικροβιακών παραγόντων. Οι έρευνες, ωστόσο, της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας στον ελληνικό χώρο είναι κυρίως περιορισμένες σε κλινικά στελέχη.

## 1.5 Γενετικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Η μικροβιακή αντοχή είναι η ικανότητα ενός μικροβίου να αντισταθεί στις επιπτώσεις των φαρμάκων που είχαν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως για τη αδρανοποίηση του. Όταν ένας μικροοργανισμός εκτίθεται συνεχώς σε μια υπό-θανατηφόρα δόση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα, αναπτύσσει μηχανισμούς αντοχής σε αυτόν.

Το φαινόμενο της ανθεκτικότητας μπορεί να οφείλεται σε μια ποικιλία παραγόντων, όπως τυχαίες μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου ή από τη μόνιμη ενσωμάτωση μεταθετών γενετικών στοιχείων, που περιέχουν γονίδια ανθεκτικά σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, τα οποία μεταφέρονται ελεύθερα μεταξύ των βακτηρίων ή λόγω φυσικής αντίστασης που αφορά συγκεκριμένους τύπους μικροοργανισμών. Οι μηχανισμοί αντοχής των βακτηρίων στα αντιβιοτικά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τη φυσική ή ενδογενή αντοχή και την επίκτητη αντοχή.

Η ενδογενής αντοχή, οφείλεται σε χρωμοσωμικά γονίδια, ανεξάρτητα της χρήσης αντιμικροβιακών και υπάρχει σε όλα τα στελέχη των μικροβίων. Σε αντίθεση, η επίκτητη ανθεκτικότητα αποτελεί κύριο αίτιο εξάπλωσης της ανθεκτικότητας από ανθρωπογενείς δραστηριότητες στο περιβάλλον. Η επίκτητη αντοχή μπορεί να επιτευχθεί, είτε με σημειακές μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα, οι οποίες είναι τυχαίες και αφορούν το χρωμοσωμικό DNA, είτε με απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού (π.χ. ανθεκτικού γονιδίου) από άλλους μικροοργανισμούς κυρίως μέσω των πλασμιδίων, τα οποία μεταφέρονται με οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Υπάρχουν τρεις τρόποι απόκτησης εξωγενούς υλικού.

### Σύζευξη (conjugation):

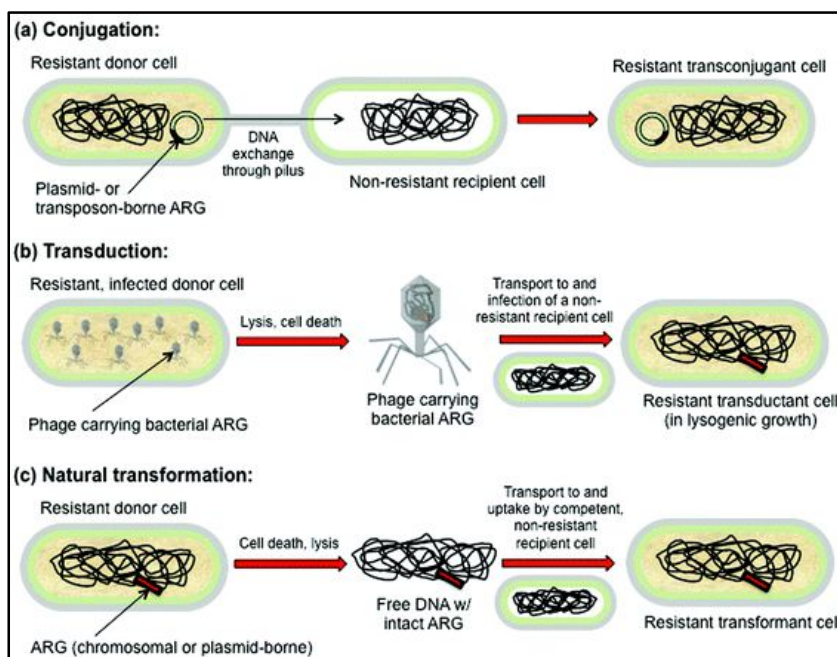
Ο κυριότερος μηχανισμός μεταβίβασης γονιδίων αντοχής στα Gram(-) βακτήρια (εικόνα 3a). Η μεταβίβαση του γενετικού υλικού γίνεται με πλασμίδια, τα οποία φέρουν ένα ή περισσότερα γονίδια αντοχής (πλασμίδια πολλαπλής αντοχής). Στη σύζευξη απαιτείται η άμεση επαφή μεταξύ δύο βακτηρίων, η οποία εξασφαλίζεται με ειδικά ινίδια.

### Μεταγωγή (transduction):

Πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση των ιών, π.χ. όταν ένα βακτήριο προσβάλλεται από έναν βακτηριοφάγο (εικόνα 3b). Κατά την πορεία πολλαπλασιασμού του βακτηριοφάγου στο βακτηριακό κύτταρο μικρά τμήματα του βακτηριακού DNA μπορούν τυχαία να ενσωματωθούν στον ιό. Όταν ο ιός προσβάλλει ένα άλλο βακτήριο, το DNA από το πρώτο ελευθερώνεται στο δεύτερο βακτήριο.

### Μεταμόρφωση ή Μετασχηματισμός (transformation):

Είναι η διαδικασία πρόσληψης από ορισμένα βακτήρια μορίων χρωμοσωμικού DNA, το οποίο έχει προκύψει, έπειτα από τη λύση-αποσύνθεση άλλου βακτηρίου, ελευθερώνοντας το γενετικό του υλικό στο περιβάλλον (εικόνα 3c). Αυτός ο μηχανισμός συνηθίζεται σε Gram (+) βακτήρια.



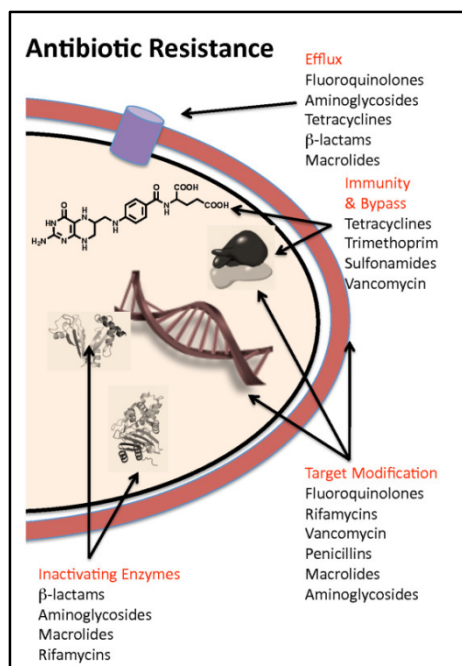
Εικόνα 3: Τρόποι απόκτησης εξωγενούς υλικού. (a) Βακτηριακή σύζευξη, (b) Μεταγωγή δια μέσου βακτηριοφάγου, (c) Μετασχηματισμός με DNA (<http://mrrittner.weebly.com/unit-4-cell-cycle.html>).

## 1.6 Είδη ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά

Οι αλλαγές στο γενετικό υλικό των βακτηρίων οδηγούν σε τροποποιήσεις οι οποίες συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα τους στα αντιβιοτικά. Υπάρχουν πέντε βασικοί μηχανισμοί, με τους οποίους οι μικροοργανισμοί εμφανίζουν αντοχή σε αντιμικροβιακά φάρμακα (εικόνα 4).

Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς είναι η επίτευξη μειωμένης συσσώρευσης του αντιβιοτικού ενδοκυτταρικά. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μείωση της διαπερατότητας και την αυξημένη εκροή (άντληση, efflux pump) του αντιβιοτικού, σε όλη την επιφάνεια του κυττάρου (Li et al., 2007). Ένας άλλος μηχανισμός ανθεκτικότητας αφορά την παραγωγή προστατευτικών πρωτεϊνών, οι οποίες προστατεύουν τα ένζυμα-στόχους των αντιβιοτικών.

Η αδρανοποίηση ή τροποποίηση του αντιβιοτικού είναι ακόμη ένας μηχανισμός ανθεκτικότητας των βακτηρίων. Μεταβολές σε γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα ή πρωτεΐνες-στόχους αποτελούν έναν αποτελεσματικό μηχανισμό ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Οι τροποποιήσεις αυτές, προσφέρουν προστασία στα ένζυμα ή στις πρωτεΐνες, καθώς τα αντιβιοτικά αδυνατούν να τα εμποδίσουν. Η τροποποίηση του τρόπου δράσης των μεταβολικών οδών συμβάλλει επίσης στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Εμφανίζεται μεταξύ στελεχών ορισμένου είδους που χάνουν την ευαισθησία τους σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό.



Εικόνα 4: Βασικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά ([http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial\\_resistance](http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial_resistance)).

## 1.7 Ρύποι – Αντιβιοτικά

Πολλά αντιβιοτικά βρίσκονται στη φύση και συντίθενται από βακτήρια, μύκητες ή ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Υπάρχουν 3 διαφορετικά είδη αντιβιοτικών. Τα φυσικά αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη, με μερικά στελέχη από τα οποία προκύπτουν τα φυσικά αντιβιοτικά να είναι τα *Bacillus* sp., *Penicillium* sp., *Streptomyces* sp. Μερικά είναι ημι-συνθετικά αντιβιοτικά, δηλαδή φυσικά αντιβιοτικά, τα οποία έχουν υποστεί χημική τροποποίηση και μερικά ανήκουν στην κατηγορία των συνθετικών παραγώγων, όπως οι κινολόνες και ανήκουν στην κατηγορία των αναδύμενων οργανικών ρύπων.

Τα αντιβιοτικά είναι τα χημικοθεραπευτικά φάρμακα, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ή πρόληψη βακτηριακών λοιμώξεων. Έχουν την δυνατότητα είτε να σκοτώσουν τα βακτήρια (βακτηριολυτικά), είτε να αναστείλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων χωρίς να τα θανατώσουν (βακτηριοστατικά). Τα αντιβιοτικά δεν είναι αποτελεσματικά σε λοιμώξεις που προκαλούνται από ιούς, καθώς οι ιοί προσβάλλουν τα ανθρώπινα κύτταρα, ενσωματώνοντας το γενετικό τους υλικό στο γονιδίωμα αυτών. Μερικές κατηγορίες αντιβιοτικών απεικονίζονται στον πίνακα 1.

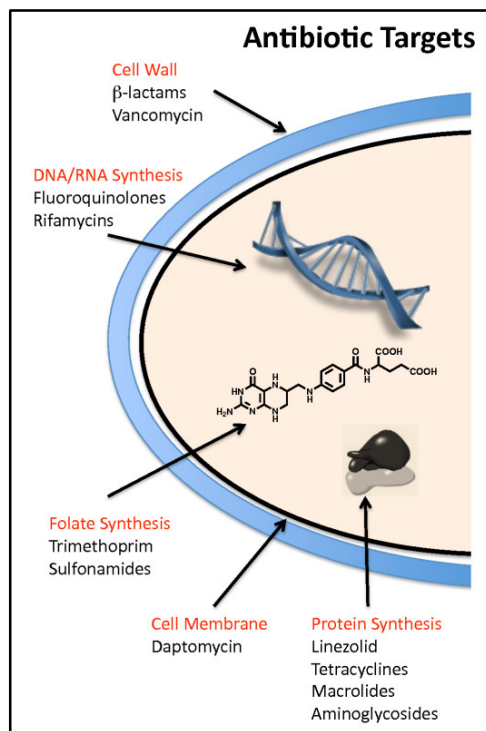
Πίνακας 1: Κατηγορίες αντιβιοτικών

Κατηγορίες αντιβιοτικών	Αντιβιοτικά
β-Λακτάμες	Ampicillin (Pentrexyl), Cefaclor (Ceclor), Latamoxef (Lamoxactam), Cefoxitin (Mefoxil)
Αμινογλυκοσίδες	Streptomycin, Gentamycin (Garamycin), Netilmycin (Netromycin)
Σουλφοναμίδες	Sulphamethoxazole (Septrin, Bactrimel)
Κινολόνες	Norfloxacin (Norocin), Enoxacin, Ciprofloxacin (Ciproxin)
Τετρακυκλίνες	Doxycyclin (Vibramycin), Minocyclin (Minocin)
Μακρολίδια	Erythromycin Stearate, Clarithromycin (Claricid), Lincomycin

Η πορεία των αντιβιοτικών στο περιβάλλον και τα προϊόντα αποδόμησής τους δεν έχουν περιγραφεί επαρκώς (García-Rodríguez et al., 2014). Παρ' όλο που η συγκέντρωσή τους στο περιβάλλον είναι μικρή, έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν τοξικότητα στους οργανισμούς. Η παρουσία τους είναι συνεχής, καθώς διοχετεύονται στο περιβάλλον ασταμάτητα. Η έξοδος των βιολογικών καθαρισμών αποτελεί την κύρια πηγή εισόδου τους στο φυσικό περιβάλλον, καθώς τα συστήματα αυτά δεν έχουν αναπτυχθεί για την επεξεργασία τέτοιων χημικών ενώσεων. Η εξάπλωση των γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά στο περιβάλλον μαζί με τον κίνδυνο έκθεσης του ανθρώπου σε αυτά, εγείρει ανησυχίες για τη δημόσια υγεία (Benotti et al., 2009).

Αυτές οι χημικές ενώσεις ελευθερώνονται στο περιβάλλον μέσω σημειακών ή διάχυτων πηγών, αλλά κυρίως μέσω εκροών των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων (Rizzo et al., 2013). Τέτοιες εγκαταστάσεις δεν έχουν σχεδιαστεί για την αντιμετώπιση των ενώσεων αυτών και οι ελπιδοφόρες προηγμένες τεχνολογίες για την επιτυχή αποδόμηση τους αποφεύγονται λόγω του υψηλού τους κόστους (Avila et al., 2013). Κατά συνέπεια, έχουν εντοπιστεί σημαντικές συγκεντρώσεις σε πολλά μέσα, όπως επιφανειακά ύδατα, υπόγεια ύδατα, θάλασσες, λιπάσματα και κοπριά. Σε γενικές γραμμές, η συγκέντρωσή τους είναι χαμηλότερη στα επιφανειακά ύδατα, σε σύγκριση με τη συγκέντρωση τους στις εκροές των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, ωστόσο έχουν εντοπιστεί σε ποτάμια γλυκού νερού στη Βόρεια Αμερική, Ευρώπη, Ασία και Αυστραλία (Pal et al., 2010). Σε αυτούς τους ταμειυτήρες, οι ξеноβιοτικές ουσίες μπορούν να εξαλειφθούν λόγω βιομετατροπής, φωτόλυσης, ρόφησης, εξαέρωσης και διασποράς ή με συνδυασμό αυτών.

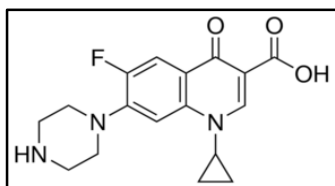
Υπάρχουν πέντε μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών (εικόνα 5). Ο πρώτος μηχανισμός αφορά την αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο είναι μοιραίο για τα βακτήρια. Ένας δεύτερος μηχανισμός δράσης αφορά τα αντιβιοτικά, τα οποία στοχεύουν την αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων κατά την διάρκεια της αντιγραφής, το οποίο επίσης είναι μοιραίο για τα βακτήρια. Μερικά βακτηριοστατικά αντιβιοτικά στοχεύουν στην αναστολή της σύνθεσης του φολικού οξέος, με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων, αλλά όχι την θανάτωσή τους. Ένας άλλος μηχανισμός δράσης είναι η διατάραξη της κυτταρικής μεμβράνης και η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης που πραγματοποιεί από βακτηριοστατικά αντιβιοτικά.



Εικόνα 5: Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών ([http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial\\_resistance](http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial_resistance)).

### 1.7.1 Σιπροφλοξασίνη (Ciprofloxacin)

Η σιπροφλοξασίνη είναι ένα καρβοξυλικό οξύ με μοριακό τύπο  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$  και μοριακό βάρος 331,3 g/mol. Η σιπροφλοξασίνη είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό, δεύτερης



Εικόνα 6: Χημική δομή της σιπροφλοξασίνης (<http://www.sigmaaldrich.com>).

γενιάς φθοριοκινολόνη, η οποία αδρανοποιεί τα ένζυμα DNA γυράση και τοποϊσομεράσης IV, που βοηθούν στη σύνθεση και αντιγραφή του γενετικού υλικού. Ως αποτέλεσμα των δεσμεύσεων αυτών, οι κινολόνες φαίνεται να σταθεροποιούν τα σύμπλοκα των ενζύμων και του γενετικού υλικού, το οποίο με τη σειρά του οδηγεί στην καταστροφή του DNA. Οι κινολόνες ανήκουν στην κατηγορία των βακτηριοκτόνων αντιβιοτικών. Η σιπροφλοξασίνη είναι ένα ευρέως φάσματος αντιβιοτικό και λειτουργεί κατά των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων.

Η σιπροφλοξασίνη είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο κτηνιατρικό και κλινικό αντιβιοτικό και είναι από τις ενώσεις με τη μεγαλύτερη συχνότητα στα λύματα των

εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων στην Ευρώπη (Loos et al., 2013) και στην Αυστραλία (Watkinson et al., 2007). Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού αυτού, είναι συνήθως υψηλότερη στα νοσοκομειακά λύματα σε σχέση με τα υγρά απόβλητα από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων που επεξεργάζονται αστικά λύματα (Varela et al., 2014). Παρ' όλα αυτά, ο αριθμός των γονιδίων ανθεκτικότητας στις φθοριοκινολόνες φάνηκε να αυξάνεται στα λύματα των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, οδηγώντας στην εξάπλωση ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων στα επιφανειακά ύδατα (Rodríguez-Mozaz et al., 2015). Το αντιβιοτικό αυτό δεν επηρεάζεται από τη φυσική εξασθένηση στα επιφανειακά ύδατα ή με υπεριώδη ακτινοβολία (φωτόλυση) σε μηχανικά συστήματα (Pal et al., 2010). Έχει αποδειχθεί ότι η σιπροφλοξασίνη δεν είναι εύκολα βιοαποικοδομήσιμη ένωση και πληροφορίες για τη διάσπασή της από βακτήρια είναι ελάχιστες (Amorim et al., 2013). Η προσρόφσή του στη λάσπη και όχι τόσο η βιοαποικοδόμηση του αποτελεί μηχανισμό απομάκρυνσής του σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Le-Minh et al., 2010). Ως εκ τούτου, το αντιβιοτικό αυτό απελευθερώνεται στο περιβάλλον, κυρίως μέσω της χρήσης βιοστερεών στις γεωργικές εκτάσεις.

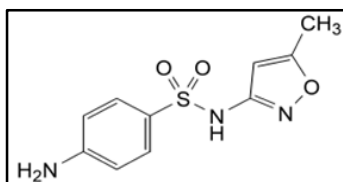
Με την εκτεταμένη χρήση της σιπροφλοξασίνης για τη θεραπεία μικρών λοιμώξεων και εύκολα θεραπεύσιμων, πολλά βακτήρια έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε αυτό το αντιβιοτικό, τα τελευταία χρόνια, αφήνοντάς το σημαντικά λιγότερο αποτελεσματικό από ότι θα ήταν (Vatoroulos et al., 1999). Ένας από τους πιο κοινούς μηχανισμούς με τους οποίους τα βακτήρια αποκτούν αντοχή στις φθοριοκινολόνες είναι από αυθόρμητα εμφανιζόμενες μεταλλάξεις σε χρωμοσωμικά γονίδια που είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση των ενζύμων DNA γυράση και τοποϊσομεράση IV ή και των δύο (Rodríguez-Martínez et al., 2011).

Τα πλασμίδια μπορούν επίσης να παράγουν άμεσα αντίσταση στις κινολόνες. Η πρώτη αναφορά ανθεκτικότητας στις κινολόνες από πλασμιδιακό γονίδιο πραγματοποιήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Αλαμπάμα) το 1998, σε μια κλινική απομόνωση του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae* (Cattoir et al., 2007), το οποίο μπορούσε να μεταφέρει ανθεκτικότητα χαμηλού επιπέδου στις κινολόνες σε βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* και σε άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια (Martínez-Martínez et al., 1998). Το πλασμιδιακό γονίδιο ανθεκτικότητας στις κινολόνες ονομάστηκε "qnr". Το γονίδιο qnr, ωστόσο, εντοπίστηκε σε κλινικά απομονωμένα βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* στη Σαγκάη (Κίνα), μια περιοχή όπου τα δείγματα από τις απομονώσεις έχουν υψηλά επίπεδα αντοχής στη σιπροφλοξασίνη (Wang et al., 2004). Αν και τα πλασμίδια από την Αλαμπάμα και τη Σαγκάη που είχαν το γονίδιο qnr ήταν αρκετά διαφορετικά, το ίδιο το γονίδιο ήταν σχεδόν πανομοιότυπο, με μία μόνο αλλαγή νουκλεοτιδίου που δεν μετέβαλλε την αλληλουχία των αμινοξέων. Σε περαιτέρω έρευνες των κλινικών στελεχών στις Ηνωμένες Πολιτείες, το γονίδιο qnr έχει ανιχνευθεί σε απομονωμένα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* (Rodríguez-Martínez et al., 2003; Wang et al.,

2004) και σε εντεροβακτήρια *E. cloacae* (Robicsek et al., 2005). Έχει εντοπιστεί σε στελέχη από την Αίγυπτο (Wiegand et al., 2004), την Κορέα (Kim et al., 2004) και την Ολλανδία (Raauw et al., 2004). Ως εκ τούτου, το γονίδιο qnr είναι ήδη ευρέως καταναμημένο γεωγραφικά.

### 1.7.2 Σουλφαμεθοξαζόλη (Sulfamethoxazole)

Η σουλφαμεθοξαζόλη είναι ένα σουλφοναμίδιο με μοριακό τύπο  $C_{10}H_{11}N_3O_3S$  και μοριακό βάρος 253,3 g/mol. Είναι ένα βακτηριοστατικό αντιβιοτικό, καθώς αναστέλλει την



Εικόνα 7: Χημική δομή της σουλφαμεθοξαζόλης (Rao et al., 2013).

ανάπτυξη των βακτηρίων. Χρησιμοποιείται σε βακτηριακές λοιμώξεις, όπως λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, βρογχίτιδα και προστατίτιδα και είναι αποτελεσματικό κατά των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων.

Η σουλφαμεθοξαζόλη χρησιμοποιείται κυρίως από τον άνθρωπο και ως εκ τούτου είναι από τις πιο ανιχνεύσιμες φαρμακευτικές ενώσεις σε υπόγειους υδροφορείς (Lapworth et al., 2012). Απεδείχθη ότι έχει τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στα υπόγεια ύδατα, προερχόμενα από τα αστικά κέντρα στην Ισπανία (Jurado et al., 2012). Επίσης ανιχνεύθηκε με υψηλή συχνότητα σε δείγματα υπόγειων υδάτων λόγω της δημοτικής υγειονομικής ταφής στην Κίνα (Peng et al., 2014) και λόγω των λυμάτων από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων στην Ελλάδα (Thomaidi et al., 2015). Η ένωση αυτή αναστέλλει τα δύο στάδια της πορείας σύνθεσης του βακτηριακού φολικού οξέος (folic acid), το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων.

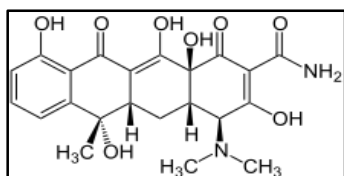
Η ανοχή στις σουλφοναμίδες οφείλεται τόσο σε χρωμοσωμικά όσο και σε πλασμιδιακά γονίδια ανθεκτικότητας. Ο πιο κοινός μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι η παραγωγή τροποποιημένων πρωτεϊνών και συστατικών, τα οποία συμβάλλουν στην σύνθεση του φολικού οξέος, καθιστώντας λιγότερο πιθανή την ένωση του αντιβιοτικού με αυτά. Επίσης, εναλλακτικές οδοί σύνθεσης φολικού οξέος έχουν την δυνατότητα να συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα σε χαμηλό επίπεδο. Η ανθεκτικότητα στις σουλφαμίδες εμφανίζεται σταδιακά και είναι διαδεδομένη σε πολλούς πληθυσμούς ζώων. Το πλασμιδιακό γονίδιο ανθεκτικότητας στις σουλφαμίδες, εντοπισμένο σε εντερικά Gram-αρνητικά βακτήρια, συχνά συνδέεται με ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη και στην τετρακυκλίνη.

Αρκετοί ρυθμοί απομάκρυνσης της σουλφαμεθοξαζόλης παρατηρήθηκαν από διαφορετικά συστήματα. Για παράδειγμα, 52-70% απομάκρυνση καταδείχθηκε σε πιλοτικής

κλίμακας βιοαντιδραστήρες μεμβρανών (MBRs), ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση, ενώ το 90% της συνολικής αφαίρεσης επιτεύχθηκε σε μια συμβατική εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων (Larcher et al., 2012). Ωστόσο άλλες μελέτες έδειξαν περιορισμένη αποικοδόμηση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Benotti et al., 2009), ενώ ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης της μπορεί να αποδοθεί μέσω της βιοαποικοδόμησης.

### 1.7.3 Τετρακυκλίνη (Tetracycline)

Η τετρακυκλίνη είναι ένα καρβοξαμίδιο με μοριακό τύπο  $C_{22}H_{24}N_2O_8$  και μοριακό βάρος 444,4 g/mol. Είναι ένα αντιβιοτικό, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την



Εικόνα 8: Χημική δομή της τετρακυκλίνης (<https://en.wikipedia.org/wiki/Tetracycline>).

θεραπεία αρκετών βακτηριακών λοιμώξεων όπως ακμή, χλαμύδια, σύφιλη, ελονοσία. Το αντιβιοτικό αυτό τέθηκε σε εμπορική χρήση το 1978 (Fischer et al., 2006).

Παρασκευάστηκε αρχικά από βακτήριο γένους *Streptomyces* (American Society of Health - System Pharmacists). Η τετρακυκλίνη έχει ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικής δράσης με βακτηριοστατική δράση ενάντια σε πολλά βακτηριακά γένη,

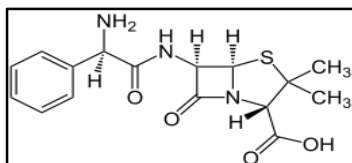
τόσο Gram (+) όσο και Gram (-). Επιβραδύνει την ανάπτυξη των βακτηρίων, σταματώντας την κυτταρική διαίρεση και ανάπτυξη. Χρησιμοποιείται συστηματικά στην ιατρική αλλά και στην κτηνιατρική, με σκοπό την προώθηση της ανάπτυξης των ζώων.

Η τετρακυκλίνη αναστέλλει την σύνθεση πρωτεϊνών, εμποδίζοντας την προσκόλληση των tRNA, τα οποία μεταφέρουν αμινοξέα, στην A-θέση του ριβοσώματος ώστε να ολοκληρωθεί η σύνθεση πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Η δράση του αντιβιοτικού είναι συνήθως ανασταλτική και αναστρέψιμη με τη διακοπή του.

Υπάρχουν τρεις βασικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στη τετρακυκλίνη και οφείλονται συχνά στην απόκτηση γονιδίων, τα οποία βρίσκονται σε κινητά πλασμίδια ή τρανσποζόνια, ενώ μικρός αριθμός βακτηρίων αποκτά ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη λόγω σημειακών μεταλλάξεων (Speer et al., 1992).

### 1.7.4 Αμπικιλίνη (Ampicillin)

Η αμπικιλίνη είναι ένα καρβοξυλικό οξύ με μοριακό τύπο  $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  και μοριακό βάρος 349,4 g/mol. Είναι ένα αντιβιοτικό, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την



Εικόνα 9: Χημική δομή της αμπικιλίνης (<https://en.wikipedia.org/wiki/Ampicillin>).

πρόληψη και θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων από το 1961, όπως λοιμώξεις του αναπνευστικού ή του ουροποιητικού συστήματος, μηνιγγίτιδα, σαλμονέλλωση, και ενδοκαρδίτιδα. Ανήκει στην κατηγορία των πενικιλινών και παρουσιάζει παρόμοια δραστηριότητα με το αντιβιοτικό Amoxicillin. Η Αμπικιλίνη παρασκευάστηκε μέσω μίας απλής μεταβολής στη χημική δομή των πενικιλινών, με σκοπό την ανάπτυξη της

δραστηριότητάς τους απέναντι σε Gram αρνητικά βακτήρια. Η μεταβολή αυτή όμως επέφερε και τη μείωση της δραστηριότητας ενάντια σε Gram θετικούς κόκκους. Για τον λόγο αυτό θεωρούνται αντιβιοτικά μέτριου φάσματος.

Το αντιβιοτικό αυτό λειτουργεί ως ένας μη αναστρέψιμος αναστολέας του ενζύμου τρανσπεπτιδάση (transpeptidase), το οποίο απαιτείται από τα βακτήρια για την δημιουργία του κυτταρικού τοιχώματος (American Society of Health-System pharmacists, 2006). Το ένζυμο αυτό ανήκει στην κατηγορία PBPs (Penicillin Binding Proteins) και συμβάλλει στην σύνδεση των στρωμάτων πεπτιδογλυκάνης. Ως εκ τούτου, τα αντιβιοτικά β-λακτάμης θεωρούνται βακτηριοκτόνα.

Υπάρχουν δύο βασικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στις β-λακτάμες. Ο κύριος μηχανισμός ανθεκτικότητας είναι μέσω παραγωγής ενζύμων, ικανών να απενεργοποιήσουν ή τροποποιήσουν το αντιβιοτικό, πριν να έχει την ευκαιρία να ασκήσει την επίδρασή του στο βακτήριο. Αυτά τα ένζυμα είναι ικανά να υδρολύσουν τα αντιβιοτικά και είναι γνωστά ως β-λακταμάσες (Medeiros, 1984). 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 Τεμονιέρα, το όνομα της ασθενούς στην οποία βρέθηκαν τα ανθεκτικά βακτήρια (Bradford, 2001). Τα γονίδια που ευθύνονται για την κωδικοποίηση και παραγωγή της β-λακταμάσης βρίσκονται είτε στο χρωμοσωμικό είτε στο πλασμιδιακό γονιδίωμα.

Ένας δεύτερος μηχανισμός αφορά συγκεκριμένες αλληλουχίες γονιδίων, οι οποίες κωδικοποιούν και παράγουν τροποποιημένες πενικιλινο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs), οι οποίες συνεχίζουν να διαθέτουν τις ιδιότητες σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης, όμως λόγω της τροποποίησής τους, οι β-λακτάμες αδυνατούν να συνδεθούν ομοιοπολικά με αυτά και να τα αδρανοποιήσουν. Έτσι, η διαδικασία δημιουργίας του κυτταρικού τοιχώματος δεν διακόπτεται από το αντιβιοτικό (Nguyen-Disteché et al., 1982).

## **1.8 Μέθοδοι ανίχνευσης γονιδίων ανθεκτικότητας**

### **1.8.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

Για την ανίχνευση των γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction), που επιτρέπει την επιλεκτική λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση, για εκατομμύρια φορές, συγκεκριμένων αλληλουχιών γενετικού υλικού χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA, χωρίς την μεσολάβηση ζωντανού οργανισμού.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της PCR είναι η γνώση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων στις άκρες του τμήματος του DNA που πρόκειται να αντιγραφεί. Οι αλληλουχίες αυτές χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση δυο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών (primers) που θα αποτελέσουν τα πρωταρχικά τμήματα για το σχηματισμό συμπληρωματικών τμημάτων DNA.

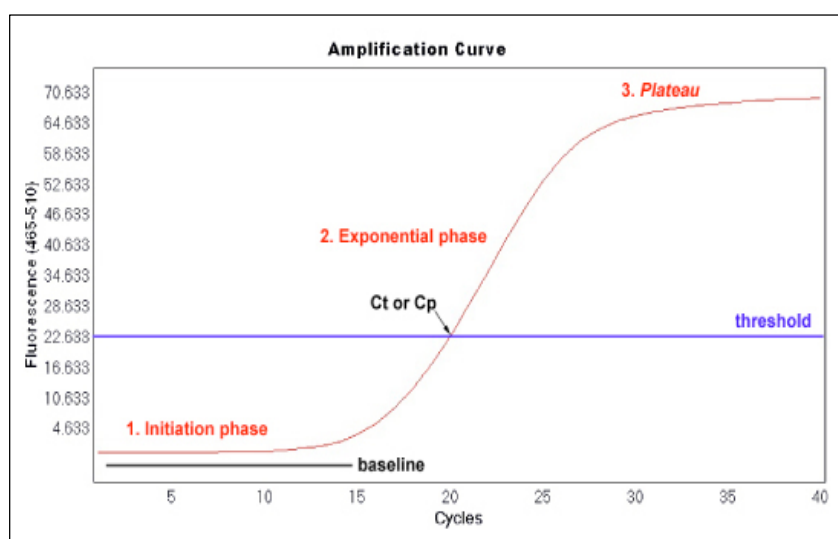
Η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) ενός εκκινητή ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία το 50% του εκκινητή παραμένει προσδεσμένο στην αλληλουχία-στόχο, ενώ το υπόλοιπο 50% έχει αποδεσμευτεί και βρίσκεται σε μονόκλωνη κατάσταση. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η αποφυγή της υβριδοποίησης των εκκινητών σε μη ειδικές θέσεις. Επιπλέον είναι σημαντικό να αποφεύγεται η συμπληρωματικότητα των εκκινητών, τόσο σε ενδομοριακό όσο και σε διαμοριακό επίπεδο, ιδίως στα 3' άκρα τους, καθώς αυτό οδηγεί σε δημιουργία δίκλωνων δευτεροταγών δομών και διμερών των εκκινητών αντίστοιχα, και κατ' επέκταση σε μη επαρκή ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου.

### **1.8.2 Real - time PCR**

Η ποσοτική PCR (Quantitative PCR, qPCR) είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδος, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Στη real-time PCR, η οποία έλαβε χώρα στην παρούσα εργασία, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού μιας ειδικής φθορίζουσας χρωστικής, που ενσωματώνεται στην αλληλουχία που ενισχύεται. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετρίεται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Όλα τα

συστήματα real - time PCR που ανιχνεύουν και αξιολογούν τα προϊόντα της PCR βασίζονται στην ανίχνευση φθορίζουσών χρωστικών και στη συσχέτιση της έντασης του παραγόμενου σήματος φθορισμού με την ποσότητα του προϊόντος της PCR στην αντίδραση.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού (εικόνα 10). Το σημείο κατά το οποίο το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης, ορίζεται ως το «κατώφλι» μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Threshold Cycle ή  $C_T$ ). Κατά την εκθετική φάση (Exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση (Linear phase), κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους.



Εικόνα 10: Φάσεις της καμπύλης ενίσχυσης (Saunders and Lee et al., 2013).

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή  $C_t$  (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή  $C_t$  είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή  $C_t$  τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.

Στην παρούσα εργασία έγινε χρήση μη ειδικών συστημάτων ανίχνευσης. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ειδικού ανιχνευτή (probe). Επιπλέον, συνιστά μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, καθώς σε κάθε μόριο DNA που συντίθεται δεσμεύονται πολλά μόρια χρωστικής, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του προκύπτοντος σήματος.

Αντίθετα, σημαντικό μειονέκτημα της SYBR green αποτελεί το γεγονός ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου. Εντούτοις, υπάρχει τρόπος να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί. Ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών όπως επίσης και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Επιπλέον, η μελέτη των καμπυλών αποδιάταξης (melting curves) μετά το πέρας της αντίδρασης, δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.

Στην ποσοτικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιείται μια πρότυπη καμπύλη (standard curve), η οποία κατασκευάζεται με βάση τις διαδοχικές αραιώσεις δείγματος γενετικού υλικού γνωστής συγκέντρωσης του επιθυμητού γονιδίου. Η καμπύλη αυτή χρησιμοποιείται ως καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης άγνωστων δειγμάτων γενετικού υλικού.

## 2. Σκοπός

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά στην ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε τέσσερα διαφορετικά αντιβιοτικά σε ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες, οι οποίες απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του αλόφυτου *J. acutus*. Το φυτό αυτό χρησιμοποιήθηκε σε προηγούμενη ερευνητική εργασία για τον έλεγχο της απόδοσης της βιοενίσχυσης σε περιβάλλον ρυπασμένο με αντιβιοτικά (τεχνητός υδροβιότοπος) (Syranidou et al., 2016). Συγκεκριμένα εξετάστηκαν γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά Σουλφαμεθοξαζόλη (Sulfamethoxazole, SMX), η Σιπροφλοξασίνη (Ciprofloxacin, CIP), η Τετρακυκλίνη (Tetracycline) και η Αμπικιλίνη (Ampicillin). Οι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι:

- Ανίχνευση και απομόνωση γονιδίων ανθεκτικότητας στις ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες. Στο πλαίσιο αυτό έγινε προσπάθεια ανίχνευσης πολλών και διαφορετικών γονιδίων ανθεκτικότητας (13), βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας.
- Ποσοτικοποίηση των γονιδίων που ανιχνεύθηκαν με τη μέθοδο της real – time PCR.
- Συσχέτιση της ποσότητας/παρουσίας των γονιδίων ανθεκτικότητας με το περιβάλλον όπου είχε αναπτυχθεί το αλόφυτο *J. acutus* (ρύπανση με διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών).

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.1 Υλικά

##### Συσκευές και όργανα

- Ζυγός ακριβείας - OHAUS, Adventurer Balance
- Θάλαμος επώασης - Heraeus, Thermo Scientific
- Φυγόκεντρος - Eppendorf, Centrifuge 5418R
- Φωτόμετρο - Eppendorf, BioPhotometer D30
- Θερμικός κυκλοποιητής PCR - Peqlab, advanced Primus 25
- Θερμικός κυκλοποιητής real - time PCR (qPCR) - Applied Biosystems, step one plus
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης - Peqlab, CS - 300V
- Συσκευή UV ακτινοβολίας - Unitec Cambridge με το λογισμικό UVIbandmap
- Μηχανικός αναδευτήρας (vortex) - J.P. Selecta s.a.
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης - TRADE Raypa

##### Εργαστηριακά υλικά

- Αποστειρωμένα τρυβλία διαμέτρου 9 cm - Petri
- Reaction plates qPCR - Applied Biosystems by Life Technologies

##### Χημικά και θρεπτικά υλικά - διαλύματα

- Αγαρόζη - Sigma
- Βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/mL - Sigma
- Χρωστική gel loading dye blue (6x) - Biolabs
- Δείκτης μοριακού μεγέθους 100 bp (ladder) - Biolabs
- Nutrient Agar - Lab M
- Nutrient Broth - HiMedia Laboratories
- LB (Luria -Bertani) medium and plates
  - Tryptone (1%) - Fluka
  - Yeast extract (0,5%) - Fluka
  - Sodium chloride (1%) - Sigma Aldrich
  - Agar (15g/L) - Fluka
  - Ampicillin (50μg/mL) - Sigma

- x-gal (40mg/mL) – Appli Chem
- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (0,04 M Tris - Acetate, 0,001M EDTA)
  - Tris Base - Research organics
  - Glacial Acetic Acid - Research organics
  - EDTA - Sigma Aldrich

#### Στέλεχη μικροοργανισμών

- Στέλεχος *Klebsiella pneumoniae*: Με σκοπό την δημιουργία standards για την real - time PCR σε γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που αφορούν την τετρακυκλίνη και την αμπικιλίνη χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* NCTC 5056 (Public Health England Culture Collections).
- Βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* DH5α™-T1R (Invitrogen): Χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο στέλεχος κατά την διαδικασία του μετασχηματισμού του ήδη κλωνοποιημένου πλασμιδίου με το επιθυμητό γονίδιο ανθεκτικότητας, ως κύτταρο δέκτης.

#### Υλικά για την κλωνοποίηση και το μετασχηματισμό

- TOPO TA Cloning kit - Life Technologies

#### Υλικά για την απομόνωση του γενετικού υλικού

- Invisorb® Spin Plant Mini Kit - STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Germany
- Invisorb® Spin Plasmid Mini two Kit - STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Germany
- NucleoSpin gel and PCR clean - up, nucleic and protein purification - Macherey-Nagel

#### Υλικά για PCR - qPCR

- Ρυθμιστικό διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου, MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM) - Biotools
- Ρυθμιστικό διάλυμα buffer PCR (10x) - Biotools
- AmpliTaq DNA πολυμεράσης - Biotools
- dNTPs - Biolabs
- Εκκινητές (primers) για γονίδια ανθεκτικότητας στα επιλεγμένα αντιβιοτικά (πίνακας 2)
- SYBR Green ER Dye - Applied Biosystems by Life Technologies

## 3.2 Μέθοδοι - Πειραματική διαδικασία

### 3.2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού από ενδοφυτικές κοινότητες βακτηρίων

Αρκετά φυτά *J. acutus* συλλέχθηκαν από την κόλπο της Σούδας (Χανιά) και εγκλιματίστηκαν περίπου 2 μήνες στο περιβάλλον του θερμοκηπίου. Έπειτα κάθε φυτό μεταφέρθηκε σε γυάλινα βάζα με μικρού μεγέθους χαλίκια (0,2 - 0,5 cm) ως υπόστρωμα και ποτιζόταν κάθε βδομάδα με 50mL νερό βρύσης. Στη συνέχεια, τα βέλτιστα ενδοφυτικά στελέχη εμβολιάστηκαν στις ρίζες του φυτού και το σύστημα υπέστη διαφορετικά είδη ρύπανσης με ποικίλες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών (Syranidou et al., 2016). Τα βακτηριακά στελέχη της βιο-ενίσχυσης απομονώθηκαν από τις ρίζες και τα φύλλα των αλόφυτων *Juncus acutus* και επιλέχθηκαν βάσει των *in vitro* ικανοτήτων τους να προωθούν την ανάπτυξη των φυτών (Syranidou et al., 2016). Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στα γένη *Sphingomonas* sp. U33, *Bacillus* sp. R12, *Ochrobactrum* sp. R24.

Με σκοπό την απομόνωση του γενετικού υλικού, έπειτα από 21 μέρες, συλλέχθηκαν 0,3g από τις φρέσκες ρίζες του αλόφυτου *J. acutus*, τα οποία βυθίστηκαν σε διάλυμα 70% αιθανόλης για 30 sec και ακολούθως σε διάλυμα 2% υποχλωριώδους νατρίου (NaClO), εμπλουτισμένου με ένα σταγονίδιο Tween 80 ανά 100mL διαλύματος για 10 min. Τα αποστειρωμένα κομμάτια των ριζών του φυτού ξεπλύθηκαν 3 φορές με απεσταγμένο νερό για 1 λεπτό και 100μL από το τελευταίο διάλυμα έκπλυσης, στρώθηκαν γραμμωτά σε τρυβλία (Mergeay et al., 1985). Έπειτα επώσθησαν στους 30°C για 7 μέρες. Η απουσία αποικιών στα τρυβλία επιβεβαίωσε την επιτυχημένη διαδικασία απολύμανσης. Στην συνέχεια τα αποστειρωμένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο για αρκετή ώρα και το ολικό χρωμοσωμικό γενετικό υλικό κάθε κοινότητας απομονώθηκε με την χρήση ειδικού κιτ Invisorb® Spin Plant Mini Kit (STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Germany) (Syranidou et al., 2016).

### 3.2.2 Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

#### 3.2.2.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Για την ενίσχυση των ειδικών αλληλουχιών DNA χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Peqlab (advanced Primus 25). Τα 13 διαφορετικά γονίδια ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά, οι αντίστοιχοι εκκινητές και οι αλληλουχίες τους, οι θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών, το μέγεθος των προϊόντων PCR, καθώς και οι βιβλιογραφικές

αναφορές, απεικονίζονται στον πίνακα 2. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για κάθε γονίδιο, αλλά και τα πρωτόκολλα PCR που ακολουθήθηκαν βρίσκονται στο παράρτημα.

Πίνακας 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Αντιβιοτικά	Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	Εκκινητές	Αλληλουχία εκκινητών (5' - 3')	Θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών (°C)	Μέγεθος προϊόντων (bp)	Βιβλιογραφική αναφορά
Σιπροφλοξασίνη	aac(6')-Ib-cr	aac-F	5'- TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA - 3'	58	482	(Li et al., 2012)
		aac-R	5'- CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT - 3'			
	qnrA	qnrA-F	5'- GAT AAA GTT TTT CAG CAA GAG G - 3'	55	543	(Mao et al., 2015)
		qnrA-R	5'- ATC CAG ATC GGC AAA GGT TA - 3'			
	qnrB	qnrB-F	5'- GCG ACG TTC AGT GGT TCA G - 3'	55	148	(Mao et al., 2015)
		qnrB-R	5'- TGT CCA ACT TAA CGC CTT GTA A - 3'			
	qnrC	qnrC-F	5'- GGG TTG TAC ATT TAT TGA ATC G - 3'	55	307	(Li et al., 2012)
		qnrC-R	5'- CAC CTA CCC ATT TAT TTT CA - 3'			
	qnrD	qnrD-F	5'- AGT GAG TGT TTA GCT CAA GGA G - 3'	57	175	(Mao et al., 2015)
		qnrD-R	5'- CAG TGC CAT TCC AGC GAT T - 3'			
	qnrS	qnrS-F	5'- GTA TAG AGT TCC GTG CGT GTG A - 3'	55	189	(Mao et al., 2015)
		qnrS-R	5'- GGT TCG TTC CTA TCC AGC GAT T - 3'			
Σουλφαμεθοξαζόλη	sul1	sul1-F	5'- CTT CGA TGA GAG CCG GCG GC - 3'	55	417	(Jacobs et al., 2007)
		sul1-R	5'- GCA AGG CGG AAA CCC GCG CC - 3'			
	sul2	sul2-F	5'- GCG CTC AAG GCA GAT GGC ATT - 3'	69	293	(Kern, et al., 2002)
		sul2-R	5'- GCG TTT GAT ACC GGC ACC CGT - 3'			

	sul3	sul3-F	5'- GAG CAA GAT TTT TGG AAT CG - 3'	47	789	(Kõljalg et al., 2009)
		sul3-R	5'- CAT CTG CAG CTA ACC TAG GGC TTT GGA - 3'			
Τετρακυκλίνη	tetA	tetA-F	5'- CGATATCACTGAT GGCG ATG - 3'	55	318	(Tennstedt al., 2005)
		tetA-R	5'- TGTCCGACAAGTT GCAT GAT - 3'			
	tetM	tetM-F	5'- GTTAAATAGTGTT CTTG GAG - 3'	55	600	(Akinbowale et al., 2006)
		tetM-R	5'- CTAAGATATGGCT CTAA CAA - 3'			
Αμικικιλίνη	ampC	ampC-F	5'- TTCTATCAAMACT GGCA RCC - 3'	49	550	(Schwartz et al., 2003)
		ampC-R	5'- CCYTTTATGTAC CCA YGA - 3'			
	blaTEM	blaTEM-F	5'- AAAGATGCTGAAG ATCA - 3'	42	425	(Speldooren, et al., 1998)
		blaTEM-R	5'- TTTGGTATGGCTTC ATTC - 3'			

### 3.2.2.2 Ηλεκτροφόρηση

Τα προϊόντα της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), ηλεκτροφορήθηκαν σε 1,5% πήκτωμα αγαρόζης, ενός πολυσακχαρίτη υψηλού μοριακού βάρους. Εκτός από τα άγνωστα προϊόντα PCR στο πήκτωμα αγαρόζης, προστέθηκαν 5-6μL μοριακού δείκτη (molecular markers ή ladder) (100bp) από την εταιρεία Biolabs, του οποίου τα μεγέθη είναι γνωστά σε ζεύγη βάσεων, με αποτέλεσμα να προσδιορίζεται εύκολα το μέγεθος του γενετικού υλικού. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης οπτικοποιήθηκαν και φωτογραφήθηκαν μέσω της έκθεσης του πηκτώματος αγαρόζης σε UV ακτινοβολία (UVITEC Cambridge), γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό UVIbandmap.

### 3.2.2.3 Απομόνωση γενετικού υλικού από πήκτωμα της αγαρόζης

Εφόσον, εντοπίστηκε ζώνη φωτεινή και καθαρή, η οποία είχε το επιθυμητό μέγεθος ζευγών βάσεων για τους συγκεκριμένους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν και την αλληλουχία του γονιδίου, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση και ο καθαρισμός του γενετικού υλικού από το πήκτωμα αγαρόζης. Η απομόνωση της επιθυμητής ζώνης από το πήκτωμα αγαρόζης έγινε με τη βοήθεια του εμπορικά διαθέσιμου πακέτου NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Nucleic Acid and Protein Purification της εταιρείας Macherey - Nagel, κατόπιν κοπής και παραλαβής του αντίστοιχου τμήματος του πηκτώματος.

### 3.2.3 Κλωνοποίηση (Cloning)

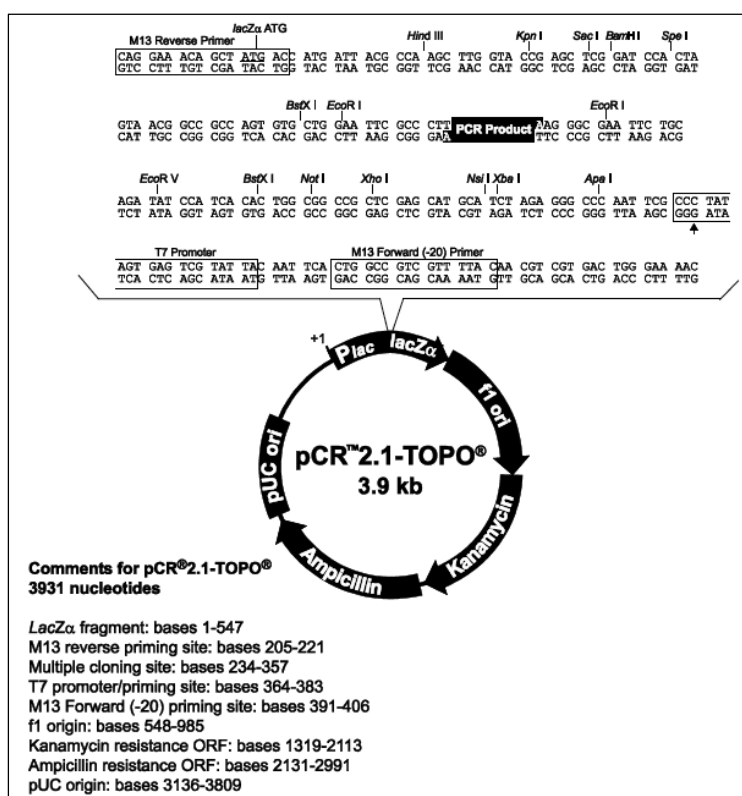
Έπειτα, κρίθηκε αναγκαία η κλωνοποίηση και ο μετασχηματισμός των γονιδίων ανθεκτικότητας σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*, ώστε να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός των γονιδίων με υψηλό βαθμό καθαρότητας, σε αντίθεση με την τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), όπου επιτυγχάνεται πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, με μεγαλύτερη πιθανότητα δημιουργίας παραπροϊόντων, όπως διμερή των εκκινητών.

Για την διαδικασία της κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο κιτ TOPO TA Cloning kit της εταιρείας Life Technologies. Αρχικά αναμίχθηκαν 4μL από το απομονωμένο προϊόν της PCR από το πήκτωμα της αγαρόζης, το οποίο διαθέτει το επιθυμητό γονίδιο. Έπειτα προστέθηκε 1μL από ένα διάλυμα αλάτων που περιείχε 1,2M NaCl και 0,06M MgCl<sub>2</sub>. Στην συνέχεια προστέθηκε 1μL από διάλυμα που περιείχε τα πλασμίδια (TOPO vector).

Στην συνέχεια αναμίχθηκε ήπια το μίγμα της αντίδρασης και αφέθηκε να επωαστεί για πέντε min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα τοποθετήθηκε το μίγμα σε πάγο και πραγματοποιήθηκε η διαδικασία του μετασχηματισμού του κλωνοποιημένου πλασμιδίου σε βακτηριακά στελέχη *E.coli*.

Ο πλασμιδιακός φορέας pCR<sup>TM</sup>2.1-TOPO® (Invitrogen) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην παρούσα μελέτη (εικόνα 11). Στο φορέα αυτό, με μήκος 3809 ζεύγη βάσεων, εντοπίζεται μια περιοχή έναρξης της αντιγραφής (pUC origin), η οποία εξασφαλίζει υψηλά επίπεδα αντιγραφής του πλασμιδίου στα κύτταρα του ξενιστή. Ακόμη περιλαμβάνει ένα γονίδιο σύντηξης *lacZα* και η έκφραση του ρυθμίζεται από

τον υποκινητή *lac*. Επίσης περιλαμβάνει γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμικικιλίνη και καναμυκίνη. Στο πλασμίδιο αυτό μπορούν να εισαχθούν μόνο τμήματα DNA που φέρουν ισοτελή άκρα και η ένθεση της κωδικοποιούσας αλληλουχίας πραγματοποιείται ανάμεσα στο γονίδιο *lacZα*. Ως εκ τούτου η έκφραση της αλληλουχίας *lacZα* διακόπτεται και μόνο τα βακτηριακά κύτταρα που φέρουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια μπορούν να αναπτυχθούν. Με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η επιλογή των στελεχών που φέρουν τις επιθυμητές μεταλλάξεις, καθώς και η δημιουργία χαρτών περιορισμού.



Εικόνα 11: Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pCR™2.1-TOPO®. Διακρίνονται τα βασικά χαρακτηριστικά του πλασμιδίου, η θέση έναρξης της αντιγραφής pUC ori, ο υποκινητής *lac* ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου σύντηξης *lacZα*, καθώς και τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμυκίνη και αμικικιλίνη (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen by Life technologies, 2014).

### 3.2.4 Μετασχηματισμός (Transformation)

Κατά τον μετασχηματισμό προστέθηκαν 2μL από το τελικό μίγμα της κλωνοποίησης, που περιέχει τα ήδη κλωνοποιημένα πλασμίδια, στα φιαλίδια τα οποία περιείχαν τα βακτηριακά κύτταρα (One Shot<sup>®</sup> Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen by Life technologies, 2014). Έπειτα τοποθετήθηκαν στο πάγο για επώαση για 30 min. Στην συνέχεια υπέστη θερμικό σοκ για 30 sec στους 42°C και επανατοποθέτηση στον πάγο, προσθέτοντας 250μL S.O.C. medium. Σκεπάστηκε το κάθε φιαλίδιο και ανακινήθηκε με 200 rpm για 1 h στους 37°C. Εφόσον ολοκληρώθηκε ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων, στρώθηκαν 50μL από το κάθε φιαλίδιο σε προθερμασμένα τρυβλία LB, τα οποία διέθεταν 50μg/mL αμπικιλίνη και 40μL X-gal (40mg/mL) και επώαστηκαν για 12 h στους 37°C. Οι αποικίες με χρώμα άσπρο ή απαλό μπλε υπέστη περαιτέρω ανάλυση, διότι ήταν αυτές με το επιθυμητό γονίδιο.

### 3.2.5 Απομόνωση του πλασμιδιακού γενετικού υλικού από αποικίες *E. coli*

Τα κλωνοποιημένα βακτηριακά στελέχη DH5a-T1 αναπτύχθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό LB-άγαρ παρουσία αντιβιοτικού στους 37°C. Η επώαση είχε διάρκεια 16-24h και στη συνέχεια, ανακαλλιεργήθηκαν 1-2 άσπρες αποικίες για την αποφυγή επιλογής μπλε αποικιών, ενώ την επόμενη μέρα συλλέχθηκαν 2-6 άσπρες αποικίες και καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό LB medium με 50μg/mL ampicillin για 24-48h. Έπειτα απομονώθηκε το πλασμιδιακό γενετικό υλικό με το ειδικό κιτ Invisorb<sup>®</sup> Spin Plasmid Mini two Kit (STRATEC Molecular GmbH, Berlin, Germany).

### 3.2.6 Έλεγχος ποιότητας και ποσότητας του απομονωμένου γενετικού υλικού

Έπειτα από κάθε απομόνωση γενετικού υλικού συνίσταται η φωτομέτρηση του δείγματος σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης ορατού-υπεριώδους (BioPhotometer erppendorf D30), ώστε να ελεγχθεί η ποιότητα και ποσότητα του απομονωμένου γενετικού υλικού, μέσω της απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η φωτομέτρηση των δειγμάτων DNA πραγματοποιήθηκε στα 260nm μήκη κύματος για

τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του γενετικού υλικού στο δείγμα. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 280nm μήκη κύματος για την ανίχνευση πρωτεϊνών που έχουν παραμείνει στο δείγμα. Όσον αφορά την καθαρότητα του γενετικού υλικού στο δείγμα, ο λόγος R της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280nm έχει ως αποδεκτά όρια 1,6 - 1,8. Σε περιβαλλοντικά δείγματα έχει παρατηρηθεί λόγος R γύρω στα 2 που είναι επίσης αποδεκτή τιμή.

Στην συνέχεια, επαναλήφθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για κάθε γονίδιο και κατ' επέκταση η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, για επιβεβαίωση ότι πραγματοποιήθηκε σωστά η κλωνοποίηση και ο μετασχηματισμός των γονιδίων. Έπειτα πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός του γονιδίου από το πήκτωμα αγαρόζης, φωτομετρήθηκε και ακολουθήθηκε η διαδικασία δημιουργίας standards για την real - time PCR.

### **3.2.7 Real - time PCR**

Για την ποσοτικοποίηση των αλληλουχιών DNA χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής real - time PCR (qPCR), Step one plus της εταιρείας Applied Biosystems. Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας real - time PCR απαιτούνται τα standards, τα οποία αποτελούν συγκεκριμένες ποσότητες γονιδίων εκφρασμένες σε αντίγραφα γονιδίων, που χρησιμεύουν στην ποσοτικοποίηση αγνώστων δειγμάτων. Εφόσον ανιχνεύθηκε το επιθυμητό γονίδιο μέσω της PCR και της ηλεκτροφόρησης, πολλαπλασιάστηκε με την διαδικασία κλωνοποίησης - μετασχηματισμού και φωτομετρήθηκε για τον έλεγχο ποσότητας και καθαρότητας του γενετικού υλικού. Έπειτα παρασκευάστηκαν οι αραιώσεις (dilutions) για κάθε γονίδιο ανθεκτικότητας σε κάθε αντιβιοτικό ξεκινώντας από το πυκνό με ποσότητα  $10^{10}$  (αντιγράφων γονιδίων)/μL, σε εύρος από  $10^9$  έως  $10^3$  (αντιγράφων γονιδίων)/μL. Δημιουργήθηκε η πρότυπη καμπύλη για κάθε γονίδιο ανθεκτικότητας (standards curve), προσεγγίζοντας την βέλτιστη κλίση  $-3.3 \pm 10\%$  και την βέλτιστη αποδοτικότητα  $100\% \pm 10\%$ , μέσω της οποίας έγινε η ποσοτικοποίηση αντιγράφων γονιδίων αγνώστων ενδοφυτικών βακτηριακών δειγμάτων, για κάθε γονίδιο ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στην real - time PCR για κάθε γονίδιο, αλλά και τα πρωτόκολλα real - time PCR που ακολουθήθηκαν βρίσκονται στο παράρτημα.

## 4. Αποτελέσματα - Συζήτηση

### 4.1 Βιο-ενίσχυση των ριζών του αλόφυτου *Juncus acutus*

Το γενετικό υλικό των ενδοφυτικών βακτηριακών κοινοτήτων του φυτού *J. acutus*, ελήφθη από την πιλοτική μονάδα που αφορά την μελέτη τεχνικών βιο-ενίσχυσης ούτως ώστε να βελτιστοποιηθεί η διαδικασία της φυτό - εξυγίανσης σε υδροβιότοπο του αλόφυτου *Juncus acutus* (Syranidou et al., 2016). Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην βιο-ενίσχυση, απομονώθηκαν από τις ρίζες και τα φύλλα του αλόφυτου *J. acutus*, το οποίο καλλιεργήθηκε σε πιλοτική μονάδα ρυπασμένη με δισφαινόλη Α (BPA, bisphenol A). Τα στελέχη επιλέχθηκαν με βάση την in vitro ικανότητα υποβοήθησης - ανάπτυξης των φυτών (PGP, plant growth promoting) (Syranidou et al., 2016).

Τα βέλτιστα ενδοφυτικά στελέχη εμβολιάστηκαν στις ρίζες του φυτού και το σύστημα υπέστη διαφορετικά είδη ρύπανσης με ποικίλες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών (σιπροφλοξασίνη και σουλφαμεθοξαζόλη) (Syranidou et al., 2016). Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν αφορούν τα γένη *Sphingomonas* sp. U33, *Bacillus* sp. R12 και *Ochrobactrum* sp. R24.

Για τα δείγματα 1R-10R δεν πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός βακτηριακών στελεχών και δεν ρυπάνθηκαν οι ρίζες του φυτού με αντιβιοτικά. Αυτά τα δείγματα αποτελούν τα δείγματα ελέγχου και καθορισμού της ήδη υπάρχουσας ανθεκτικότητας που μπορεί να έχουν τα ενδοφυτικά βακτήρια. Τα δείγματα 11R-20R δεν βιο-ενισχύθηκαν, αλλά οι ρίζες των φυτών ρυπάνθηκαν με χαμηλή συγκέντρωση αντιβιοτικών. Στα δείγματα 21R-30R δεν υπήρξε βιο-ενίσχυση, αλλά οι ρίζες των φυτών ρυπάνθηκαν με υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικών.

Οι ρίζες των δειγμάτων 31R-40R εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *Sphingomonas* sp. U33, το οποίο απομονώθηκε από τα φύλλα του αλόφυτου *J. acutus* (Syranidou et al., 2016) και ρυπάνθηκαν με χαμηλή συγκέντρωση αντιβιοτικών. Ενώ τα δείγματα 41R-50R εμβολιάστηκαν επίσης με το βακτηριακό στέλεχος *Sphingomonas* sp. U33, αλλά οι ρίζες των φυτών ρυπάνθηκαν με υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικών.

Το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus* sp. R12 εμβολιάστηκε στις ρίζες των δειγμάτων 51R-60R με χαμηλή συγκέντρωση αντιβιοτικών και στις ρίζες των δειγμάτων 61R-70R με υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικών. Το στέλεχος *Bacillus* sp. R12 απομονώθηκε από τις ρίζες του αλόφυτου *J. acutus* (Syranidou et al., 2016).

Για τα δείγματα 71R-80R πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός του βακτηριακού στελέχους *Ochrobactrum* sp. R24, το οποίο απομονώθηκε από τις ρίζες του αλόφυτου *J. acutus* (Syranidou et al., 2016) και ρυπάνθηκαν με χαμηλή συγκέντρωση αντιβιοτικών. Ενώ τα δείγματα 81R-90R εμβολιάστηκαν επίσης με το βακτηριακό στέλεχος *Ochrobactrum* sp. R24, αλλά οι ρίζες των φυτών ρυπάνθηκαν με υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικών.

Στη συνέχεια, οι ρίζες των δειγμάτων 91R-100R εμβολιάστηκαν με ένα μίγμα από τα τρία αυτά βακτηριακά στελέχη και ρυπάνθηκαν με χαμηλή συγκέντρωση αντιβιοτικών. Ενώ τα δείγματα 101R-110R εμβολιάστηκαν επίσης με το ίδιο μίγμα από τα βακτηριακά στελέχη, αλλά οι ρίζες των φυτών ρυπάνθηκαν με υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικών.

Στον πίνακα 3 απεικονίζονται αναλυτικά οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν κατά το πείραμα της βιο-ενίσχυση των ριζών των αλόφυτων *J. acutus*.

Πίνακας 3: Διαργασίες που ακολουθήθηκαν για κάθε δείγμα φυτού.

Δείγματα - Κοινότητες	Βακτηριακά γένη βιο-ενίσχυσης	Συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης (μg/L)	Συγκέντρωση σουλφαμεθοξαζόλης (μg/L)	Ξηρή μάζα ρίζας (g)
1R	-	-	-	0,296
4R	-	-	-	0,240
5R	-	-	-	0,250
9R	-	-	-	0,290
10R	-	-	-	0,290
13R	-	50	250	0,268
14R	-	50	250	0,304
15R	-	50	250	0,253
16R	-	50	250	0,318
20R	-	50	250	0,254
21R	-	100	500	0,298
22R	-	100	500	0,297
27R	-	100	500	0,331
29R	-	100	500	0,253
30R	-	100	500	0,273
31R	<i>Sphingomonas</i> sp.U33	50	250	0,264
35R	<i>Sphingomonas</i> sp.U33	50	250	0,297
37R	<i>Sphingomonas</i> sp.U33	50	250	0,293
39R	<i>Sphingomonas</i> sp.U33	50	250	0,262
40R	<i>Sphingomonas</i> sp.U33	50	250	0,278
42R	<i>Sphingomonas</i> sp.U33	100	500	0,291
43R	<i>Sphingomonas</i> sp.U33	100	500	0,284
44R	<i>Sphingomonas</i> sp.U33	100	500	0,354
46R	<i>Sphingomonas</i> sp.U33	100	500	0,274
48R	<i>Sphingomonas</i> sp.U33	100	500	0,250
50R	<i>Sphingomonas</i> sp.U33	100	500	0,308

51R	<i>Bacillus</i> sp. R12	50	250	0,262
52R	<i>Bacillus</i> sp. R12	50	250	0,252
56R	<i>Bacillus</i> sp. R12	50	250	0,257
58R	<i>Bacillus</i> sp. R12	50	250	0,280
59R	<i>Bacillus</i> sp. R12	50	250	0,268
61R	<i>Bacillus</i> sp. R12	100	500	0,264
63R	<i>Bacillus</i> sp. R12	100	500	0,286
64R	<i>Bacillus</i> sp. R12	100	500	0,268
66R	<i>Bacillus</i> sp. R12	100	500	0,322
68R	<i>Bacillus</i> sp. R12	100	500	0,268
72R	<i>Ochrobactrum</i> sp. R24	50	250	0,303
74R	<i>Ochrobactrum</i> sp. R24	50	250	0,310
75R	<i>Ochrobactrum</i> sp. R24	50	250	0,258
78R	<i>Ochrobactrum</i> sp. R24	50	250	0,308
80R	<i>Ochrobactrum</i> sp. R24	50	250	0,259
82R	<i>Ochrobactrum</i> sp. R24	100	500	0,311
83R	<i>Ochrobactrum</i> sp. R24	100	500	0,269
84R	<i>Ochrobactrum</i> sp. R24	100	500	0,278
86R	<i>Ochrobactrum</i> sp. R24	100	500	0,261
87R	<i>Ochrobactrum</i> sp. R24	100	500	0,259
89R	<i>Ochrobactrum</i> sp. R24	100	500	0,267
92R	μίγμα	50	250	0,256
93R	μίγμα	50	250	0,296
97R	μίγμα	50	250	0,260
98R	μίγμα	50	250	0,276
100R	μίγμα	50	250	0,258
101R	μίγμα	100	500	0,273
102R	μίγμα	100	500	0,292
105R	μίγμα	100	500	0,275
106R	μίγμα	100	500	0,290
107R	μίγμα	100	500	0,292
110R	μίγμα	100	500	0,281

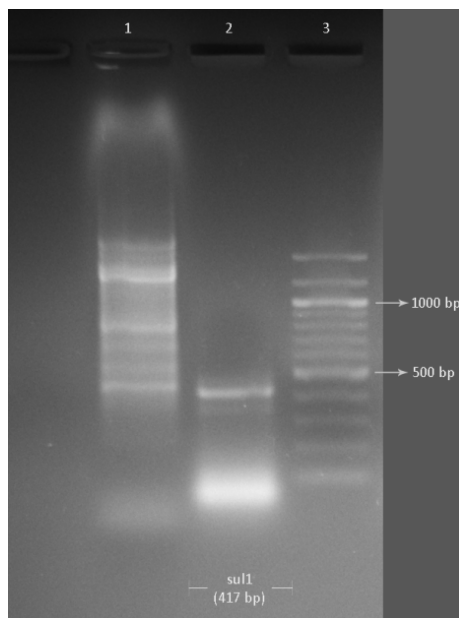
Έπειτα, απομονώθηκε το γενετικό υλικό από τις ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες της ριζόσφαιρας των φυτών και ακολούθησε η διαδικασία ανίχνευσης γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά σιπροφλοξασίνη, σουλφαμεθοξαζόλη καθώς και στην αμπικιλίνη και στην τετρακυκλίνη, παρόλο που δεν ρυπάνθηκαν οι ρίζες με αυτά τα αντιβιοτικά.

## 4.2 Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά

Στην παρούσα εργασία το γενετικό υλικό απομονώθηκε από τις ενδοφυτικές κοινότητες του πίνακα 3. Ακολούθησε η ανίχνευση των επιλεγμένων γονιδίων ανθεκτικότητας (πίνακας 2) και ποσοτικοποίησή τους με την μέθοδο της real - time qPCR.

### Σουλφαμεθοξαζόλη (Sulfamethoxazole)

Για το αντιβιοτικό σουλφαμεθοξαζόλη ανιχνεύθηκε κατευθείαν το γονίδιο ανθεκτικότητας *sul1* σε δείγματα ριζικής κοινότητας. Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει μήκος 417bp (ζεύγη βάσεων) και το μίγμα αντίδρασης PCR καθώς και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε βρίσκεται στο παράρτημα 8.1. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης απεικονίζονται στην εικόνα 12.



Εικόνα 12: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1,5%) των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *sul1* σε βακτηριακά στελέχη απομονωμένα από ενδοφυτικές κοινότητες. Διαδρομές: 1,2 → βακτηριακό στέλεχος γένους *Ochrobactrum* R53, 3 → DNA ladder (100 bp - Biolabs)

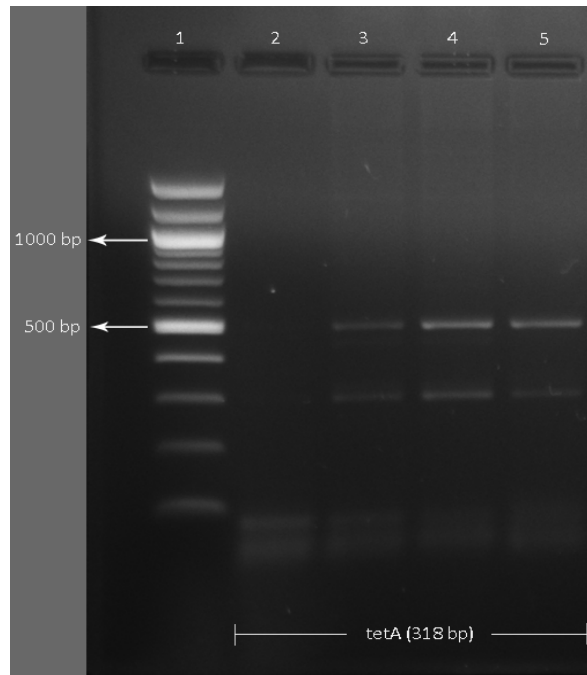
Στην διαδρομή 1, υπάρχει το επιθυμητό γονίδιο *sul1*, όμως δεν έχει τόσο καθαρή εικόνα όσο στη διαδρομή 2. Για την κατασκευή των standards για την real - time PCR, επιλέχθηκε η διαδρομή 2, αφού κλωνοποιήθηκε το γονίδιο σε πλασμιδιακό γενετικό υλικό και μετασχηματίστηκε σε βακτηριακό στέλεχος *E. coli*. Επιπλέον, εξετάστηκαν και τα γονίδια *sul2* και *sul3* για την σουλφαμεθοξαζόλη σε 10 διαφορετικές ενδοφυτικές κοινότητες για το κάθε γονίδιο χωρίς θετικά αποτελέσματα.

#### Σιπροφλοξασίνη (Ciprofloxacin)

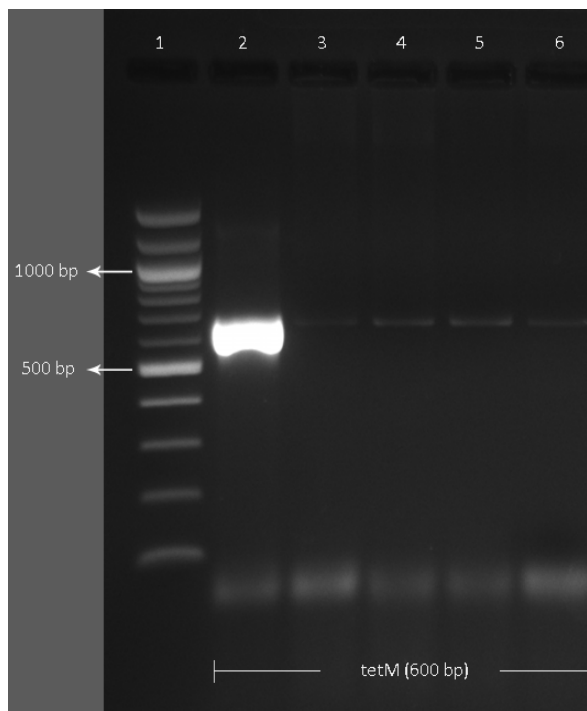
Για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό πραγματοποιήθηκαν αρκετές δοκιμές για 6 διαφορετικά γονίδια ανθεκτικότητας στις κινολόνες, με κανένα θετικό αποτέλεσμα. Δοκιμάστηκαν διαφορετικά πρωτόκολλα με διαφορετικές συγκεντρώσεις στο μίγμα αντίδρασης όμως ήταν αδύνατο να ανιχνευθεί γονίδιο ανθεκτικότητας για την σιπροφλοξασίνη. Δοκιμάστηκαν 30 διαφορετικές ενδοφυτικές κοινότητες για το γονίδιο *aac(6')-Ib-cr* και 10 διαφορετικές ενδοφυτικές κοινότητες για καθένα από τα υπόλοιπα γονίδια (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*). Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 80 δοκιμές για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Παρατίθενται το μίγμα αντίδρασης PCR καθώς και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στο παράρτημα 8.1 για κάθε αλληλουχία γονιδίου.

#### Τετρακυκλίνη (Tetracycline)

Στην συνέχεια ανιχνεύθηκαν γονίδια ανθεκτικότητας, *tetA* και *tetM*, για το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη σε δείγματα γενετικού υλικού από το βακτηριακό στέλεχος *K. pneumoniae* NTCT 5056. Το γονίδιο ανθεκτικότητας *tetA* έχει μήκος 318bp (ζεύγη βάσεων), ενώ το γονίδιο ανθεκτικότητας *tetM* έχει μήκος 600bp. Τα πρωτόκολλα και τα μίγματα αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται στο παράρτημα 8.1. Και τα δύο γονίδια ανθεκτικότητας εντοπίστηκαν και απομονώθηκαν με επιτυχία (εικόνες 13 και 14).



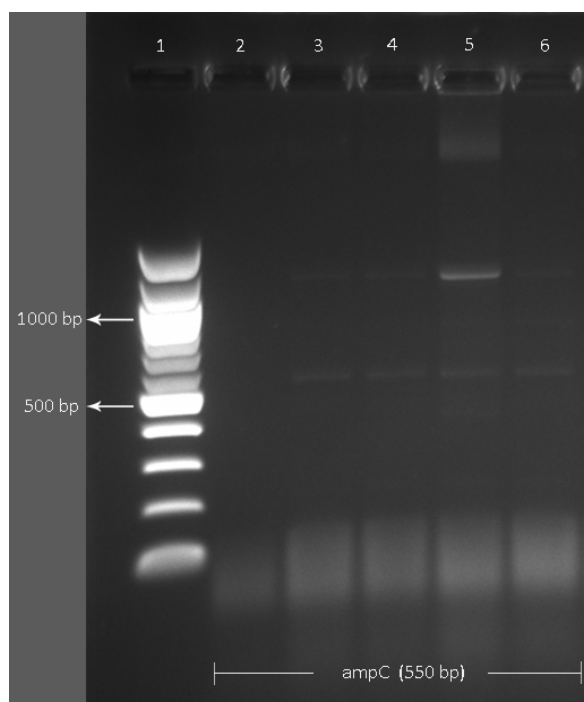
Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *tetA* στο βακτηριακό στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* NTCT 5056. Διαδρομές: 1 → DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2 → δείγμα με απουσία του επιθυμητού γονιδίου, 3,4,5, → δείγματα με παρουσία του επιθυμητού γονιδίου (318 bp).



Εικόνα 14: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *tetM* στο βακτηριακό στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* NTCT 5056. Διαδρομές: 1 → DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2 → δείγμα με παρουσία του επιθυμητού γονιδίου (600 bp), 3,4,5,6 → δείγματα με απουσία του επιθυμητού γονιδίου.

### Αμπικιλίνη (Ampicillin)

Ανιχνεύθηκε γονίδιο ανθεκτικότητας, *ampC*, στην αμπικιλίνη σε δείγματα γενετικού υλικού από βακτηριακό στέλεχος *K. pneumoniae* NTCT 5056 (εικόνα 15). Το συγκεκριμένο γονίδιο ανθεκτικότητας έχει μήκος 550bp. Τα πρωτόκολλα και τα μίγματα αντίδρασης που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται στο παράρτημα 8.1. Επιπλέον, εξετάστηκε το γονίδιο ανθεκτικότητας *blaTEM* για την αμπικιλίνη σε 10 διαφορετικές ενδοφυτικές κοινότητες χωρίς θετικά αποτελέσματα.



Εικόνα 15 : Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1,5%) των προϊόντων της PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *ampC* στο βακτηριακό στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* NTCT 5056. Διαδρομές: 1 → DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2 → δείγμα με απουσία του επιθυμητού γονιδίου, 3,4,5,6 → δείγματα με παρουσία του επιθυμητού γονιδίου (550 bp).

### Συνοπτικά:

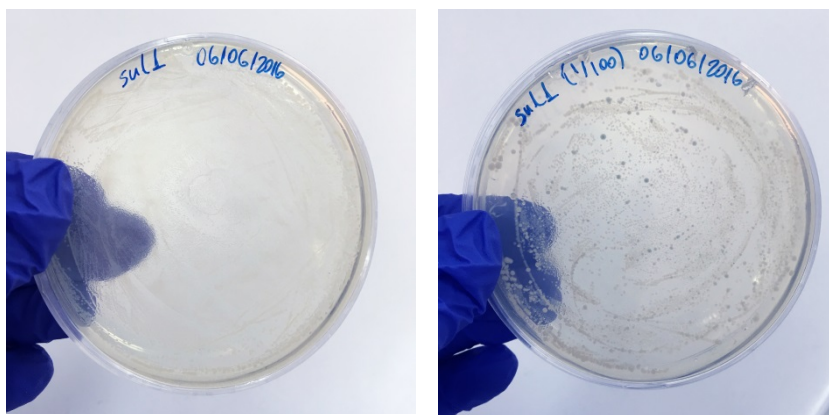
Το γονίδιο ανθεκτικότητας *sul1* για την σουλφαμεθοξαζόλη ανιχνεύθηκε, απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε, ώστε να ενισχυθεί η ποσότητα του για περαιτέρω ανάλυση. Γονίδιο ανθεκτικότητας για την σιπροφλοξασίνη δεν ανιχνεύθηκε. Εξετάστηκαν 6 διαφορετικά γονίδια (*aac(6')-lb-cr*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*) γι' αυτό το αντιβιοτικό σε αρκετά δείγματα ενδοφυτικών κοινοτήτων του φυτού, καθώς και στο βακτηριακό στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* NTCT 5056, με σκοπό την δημιουργία των standards για την real - time PCR,

όμως δεν ανιχνεύθηκε κανένα από τα 6 γονίδια, οπότε δεν πραγματοποιήθηκε ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράση για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Τα γονίδια ανθεκτικότητας για την τετρακυκλίνη (tetA, tetM) και την αμπικιλίνη (ampC) δεν ανιχνεύθηκαν σε ενδοφυτικές κοινότητες, αλλά στο βακτηριακό στέλεχος *K. pneumoniae* NTCT 5056, όπου εντοπίστηκαν, απομονώθηκαν και δημιουργήθηκαν τα standards για κάθε γονίδιο.

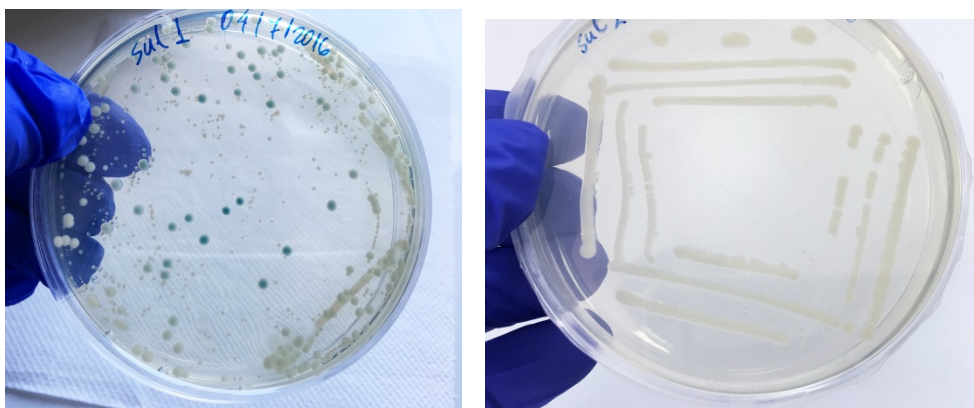
#### 4.3 Κλωνοποιημένες αποικίες

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα απομονωμένα γονίδια ανθεκτικότητας υπέστη κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό γενετικό υλικό και μετασχηματισμό σε βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli* DH5α™-T1R, με σκοπό την ενίσχυσή τους. Στην εικόνα 16 παρατηρούνται οι αποικίες σε πυκνό και αραιό (1/100 dilution) διάλυμα για το γονίδιο ανθεκτικότητας sul1.



Εικόνα 16: Αποικίες κλωνοποιημένων στελεχών *E. coli* με το γονίδιο sul1 σε πυκνό διάλυμα (αριστερά) και σε αραιό διάλυμα (δεξιά).

Στο αραιό διάλυμα, παρατηρούνται μερικές μπλε αποικίες, οι οποίες δηλώνουν ότι είτε δεν έχει ενσωματωθεί το επιθυμητό γονίδιο στο πλασμίδιο είτε ότι έχει πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση αλλά όχι με το επιθυμητό γονίδιο. Για ασφάλεια, συνίσταται η ανακαλλιέργεια λευκών αποικιών, η οποία απεικονίζεται στην εικόνα 17.



Εικόνα 17: Ανακαλλιέργειες λευκών αποικιών.

Στην συνέχεια, συλλέχθηκαν 1-2 αποικίες για απομόνωση πλασμιδιακού γενετικού υλικού. Έπειτα, από κάθε απομόνωση γενετικού υλικού συνίσταται έλεγχος της ποιότητας και ποσότητας του γενετικού υλικού.

#### 4.4 Έλεγχος ποσότητας και ποιότητας του γενετικού υλικού

Η φωτομέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης ορατού - υπεριώδους (BioPhotometer eppendorf D30), ώστε να ελεγχθεί η ποιότητα και ποσότητα του απομονωμένου γενετικού υλικού για τα γονίδια *sul1*, *tetA*, *tetM* και *ampC* από τα κλωνοποιημένα στελέχη *E. coli*.

Στον πίνακα 3 απεικονίζεται η συγκέντρωση του εκάστοτε γονιδίου στο διάλυμα καθώς και ο λόγος απορρόφησης R, ο οποίος υποδηλώνει την καθαρότητα του γενετικού υλικού στο διάλυμα. Η τιμή της αναλογίας για υψηλής καθαρότητας γενετικό υλικό είναι 1,8. Συνεπώς, τα απομονωμένα γονίδια βρίσκονται σε υψηλή ποσότητα και ποιότητα στα διαλύματα.

Πίνακας 4: Έλεγχος οπτικής απορρόφηση του γενετικού υλικού κάθε γονιδίου.

Γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά	Συγκέντρωση γενετικού υλικού (ng/μL)	Λόγος απορρόφησης R	Μέγεθος προϊόντων (bp)
sul1	758,5	1,79	417
tetA	687,5	1,76	318
tetM	583,8	1,74	600
ampC	407,3	1,72	550

Σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις, υπολογίζεται η ποσότητα των αντιγράφων γονιδίων που υπάρχει ανά 1μL. Έτσι δημιουργούνται τα standards και πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση των γονιδίων σε άγνωστα δείγματα γενετικού υλικού μέσω της real - time PCR. Ο υπολογισμός των αντιγράφων γονιδίων για κάθε γονίδιο έγινε μέσω μιας ηλεκτρονικής πλατφόρμας σχεδιασμένης από τον Andrew Staroscik (URI Genomics and Sequencing Center, Calculator for determining the number of copies of a template, <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>), η οποία βασίζεται στην εξής εξίσωση:

$$\text{number of copies} = \frac{\text{amount}(ng) \cdot 6,022 \cdot 10^{23} \left( \frac{\text{number}}{\text{mole}} \right)}{\text{length}(bp) \cdot 10^9 \left( \frac{ng}{g} \right) \cdot 650 \left( \frac{g}{\text{mole of bp}} \right)}$$

Τα αποτελέσματα για κάθε γονίδιο απεικονίζονται στις εικόνες 18, 19, 20 και 21.

#### Σουλφαμεθοξαζόλη (sul1)

Για ποσότητα γονιδίου 758,5ng ανά 1μL και γνωρίζοντας ότι το μήκος του γονιδίου sul1, που είναι 417bp, υπολογίζεται ότι η ποσότητα των αντιγράφων γονιδίων που υπάρχει ανά 1μL δείγματος είναι  $1,69 \cdot 10^{12}$ .

enter amount of DNA (ng): 758.5

enter length of template (bp): 417

Calculate number of copies!

number of copies : 1.69 x10<sup>12</sup>

Εικόνα 18: Ποσότητα αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *sul1*.

### Τετρακυκλίνη (*tetA*)

Για ποσότητα γονιδίου 687,5ng ανά 1μL και γνωρίζοντας ότι το μήκος του γονιδίου *tetA*, που είναι 318bp, υπολογίζεται ότι η ποσότητα των αντιγράφων γονιδίων που υπάρχει ανά 1μL είναι  $2 \cdot 10^{12}$ .

enter amount of DNA (ng): 687.5

enter length of template (bp): 318

Calculate number of copies!

number of copies : 2 x10<sup>12</sup>

Εικόνα 19: Ποσότητα αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetA*.

### Τετρακυκλίνη (*tetM*)

Για ποσότητα γονιδίου 583,8ng ανά 1μL και γνωρίζοντας ότι το μήκος του γονιδίου *tetM*, που είναι 600bp, υπολογίζεται ότι η ποσότητα των αντιγράφων γονιδίων που υπάρχει ανά 1μL είναι  $9,01 \cdot 10^{11}$ .

enter amount of DNA (ng): 583.8

enter length of template (bp): 600

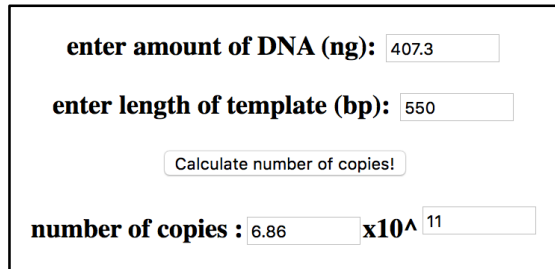
Calculate number of copies!

number of copies : 9.01 x10<sup>11</sup>

Εικόνα 20: Ποσότητα αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetM*.

### Αμπικιλίνη (ampC)

Για ποσότητα γονιδίου 407,3ng ανά 1μL και γνωρίζοντας ότι το μήκος του γονιδίου ampC, που είναι 550bp, υπολογίζεται ότι η ποσότητα των αντιγράφων γονιδίων που υπάρχει ανά 1μL είναι  $6,86 \cdot 10^{11}$ .



enter amount of DNA (ng): 407.3

enter length of template (bp): 550

Calculate number of copies!

number of copies : 6.86 x10<sup>11</sup>

Εικόνα 21: Ποσότητα αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο ampC.

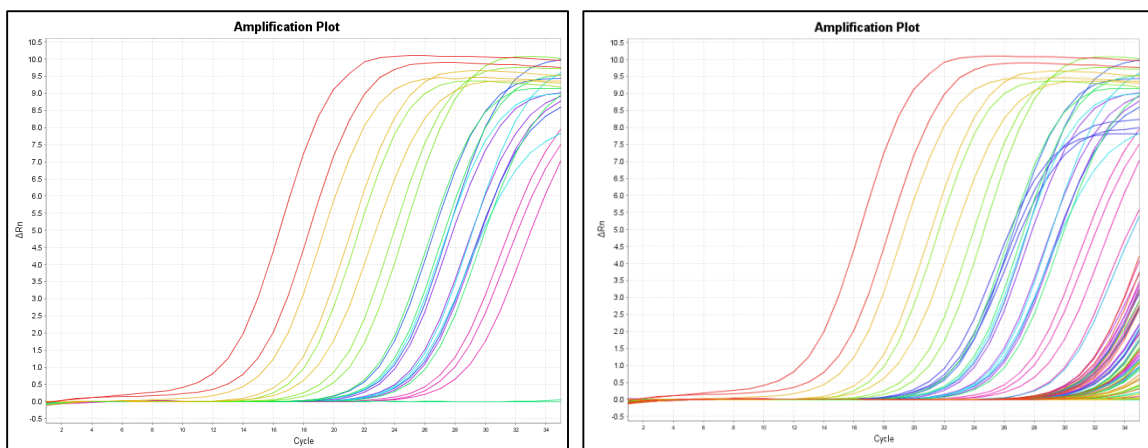
Έπειτα, παρασκευάστηκαν οι διαδοχικές αραιώσεις ποσότητας αντιγράφων γονιδίων με εύρος από  $10^9$  έως  $10^3$  αντιγράφων γονιδίων ανά 1μL για κάθε γονίδιο, με σκοπό την δημιουργία των standards.

#### 4.5 Αποτελέσματα real - time PCR σε δείγματα ενδοφυτικών κοινοτήτων

Η ποσοτικοποίηση αγνώστων δειγμάτων γενετικού υλικού απομακρυσμένου από ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες της ρίζας φυτών *J. acutus* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις καμπύλες ενίσχυσης και τις πρότυπες καμπύλες για κάθε γονίδιο, με δείγματα γενετικού υλικού γνωστής ποσότητας αντιγράφων γονιδίων. Ο θερμικός κυκλοποιητής real - time PCR που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρείας Applied Biosystems (Step One Plus) με το λογισμικό Step One Software (Version 2.0, 2007 by Applied Biosystem).

##### Σουλφαμεθοξαζόλη (*sul1*)

Υπήρχαν αρκετές δυσκολίες με το συγκεκριμένο γονίδιο και πραγματοποιήθηκαν αρκετές προσπάθειες για την βελτίωση των πρότυπων καμπυλών. Οι παρακάτω καμπύλες ήταν οι πιο ικανοποιητικές ώστε να συνεχιστεί το πείραμα για το συγκεκριμένο γονίδιο. Στο διάγραμμα 2 (αριστερά) απεικονίζεται η καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων γνωστής ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *sul1*, η οποία κατασκευάστηκε με βάση τις διαδοχικές αραιώσεις δειγμάτων γενετικού υλικού γνωστής ποσότητας αντιγράφων γονιδίων. Στο διάγραμμα 2 (δεξιά), απεικονίζεται η καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων άγνωστης ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *sul1*, για 47 ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες.



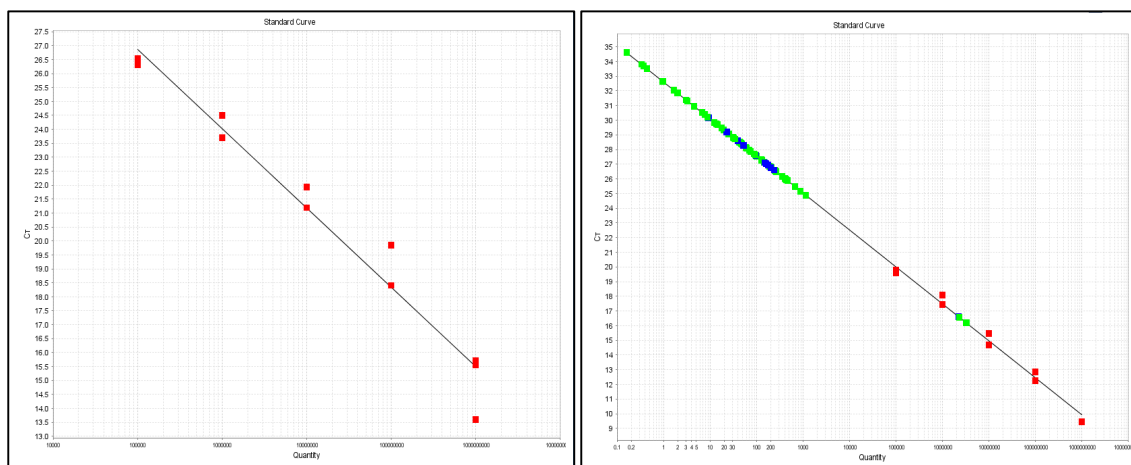
Διάγραμμα 2: Καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *sul1*.

Όσον αφορά την καμπύλη ενίσχυσης για τα standards (διάγραμμα 2, αριστερά), παρατηρούνται ευδιάκριτα οι τέσσερις φάσεις της καμπύλης ενίσχυσης, ενώ οι πράσινες ευθείες γραμμές με τιμή φθορισμού μηδέν αφορούν τα δείγματα χωρίς προσθήκη γενετικού υλικού παρά μόνο υπερκάθαρου νερού και master mix. Τα διαφορετικά χρώματα καμπυλών

αντιστοιχούν σε διαφορετικές αραιώσεις του γενετικού υλικού, με τα δείγματα με την μεγαλύτερη ποσότητα DNA να ανιχνεύονται σε μικρότερους κύκλους αντίδρασης. Οι κόκκινες καμπύλες αφορούν τα δείγματα με ποσότητα γενετικού υλικού  $10^9$  αντιγράφων γονιδίων, ενώ οι ροζ καμπύλες αντιπροσωπεύουν τα δείγματα με ποσότητα γενετικού υλικού  $10^3$  αντιγράφων γονιδίων.

Στην καμπύλη ενίσχυσης αγνώστων δειγμάτων (διάγραμμα 2, δεξιά), παρατηρούνται ορατές αλλαγές σε σύγκριση με την αντίστοιχη καμπύλη των standards. Έχουν προστεθεί αρκετές καμπύλες αγνώστων δειγμάτων κυρίως μετά τον κύκλο 28, υποδηλώνοντας ότι υπάρχει το γονίδιο αλλά σε χαμηλότερη ποσότητα από  $10^3$  αντιγράφων γονιδίων, που είναι και η τελευταία αραιώση. Παρ' όλα αυτά, παρατηρείται και μια τριάδα καμπυλών (σκούρο μπλε), η οποία ξεκινάει από τον κύκλο 20 και αφορά άγνωστο δείγμα με σημαντική ποσότητα αντιγράφων γονιδίων.

Στο διάγραμμα 3 (αριστερά) απεικονίζεται η πρότυπη καμπύλη δειγμάτων γνωστής ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *sulI*. Η καμπύλη αυτή χρησιμοποιήθηκε ως καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό άγνωστων δειγμάτων, ο οποίος απεικονίζεται στο διάγραμμα 3 (δεξιά).



Διάγραμμα 3: Πρότυπη καμπύλη δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *sulI*. Κλίση: -2,84,  $R^2$ : 0,986

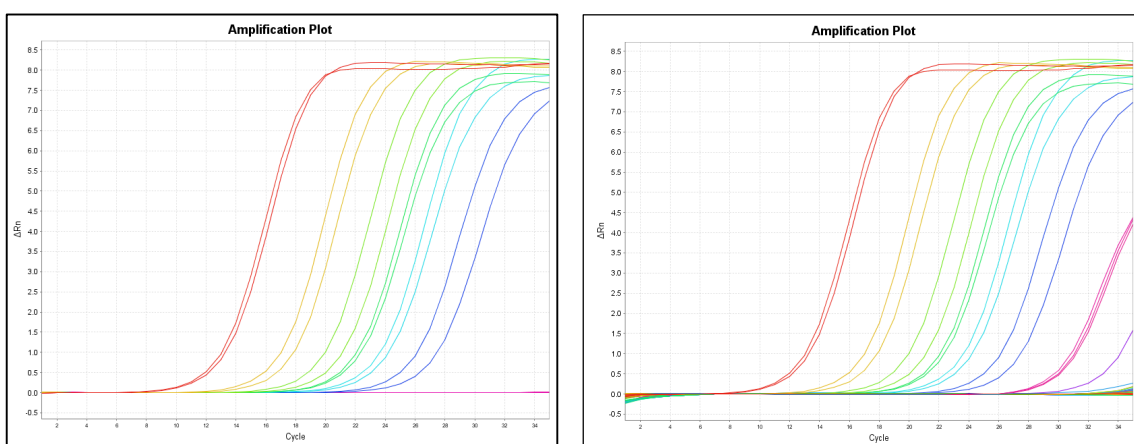
Η πρότυπη καμπύλη των γνωστών δειγμάτων (διάγραμμα 3, αριστερά) για το γονίδιο *sulI* είναι ικανοποιητική με περιθώρια βελτίωσης. Η κλίση της ευθείας δεν είναι αρκετά απότομη, με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα που την θέλουν στο  $-3,3 \pm 10\%$ , η επαναληψιμότητα  $R^2$  θα μπορούσε να αυξηθεί λίγο παραπάνω. Όμως το πείραμα συνεχίστηκε με βάση τις καμπύλες αυτές λόγω έλλειψης χρόνου.

Σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη των standards, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της επιθυμητής αλληλουχίας για το γονίδιο *sulI*, για 32 από τα 47 δείγματα που εξετάστηκαν. Στο διάγραμμα 3 (δεξιά), τα κόκκινα σημάδια αφορούν τα δείγματα

γνωστών ποσοτήτων αντιγράφων γονιδίων, τα οποία ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερες ποσότητες και σε μικρότερους κύκλους ( $C_T$ ). Τα υπόλοιπα σημάδια αντιπροσωπεύουν τα άγνωστα δείγματα, τα οποία ανιχνεύθηκαν με μικρότερες ποσότητες γενετικού υλικού και συνεπώς σε μεγαλύτερους κύκλους της αντίδρασης. Εντούτοις, υπήρξαν 3 δείγματα τα οποία ανιχνεύθηκαν σε αρκετή ποσότητα στους κύκλους 16 και 17.

#### Τετρακυκλίνη (*tetA*)

Το γονίδιο ανθεκτικότητας *tetA* για την τετρακυκλίνη εντοπίστηκε και απομονώθηκε από το βακτηριακό στέλεχος *K. pneumoniae* NCTC 5056. Στο διάγραμμα 4 (αριστερά), απεικονίζεται η καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων γνωστής ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetA*. Στο διάγραμμα 4 (δεξιά), απεικονίζεται η καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων άγνωστης ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetA*. Συγκεκριμένα για το γονίδιο *tetA*, εξετάστηκαν 24 ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες και μόνο σε 2 δείγματα ανιχνεύθηκε ποσότητα γενετικού υλικού.



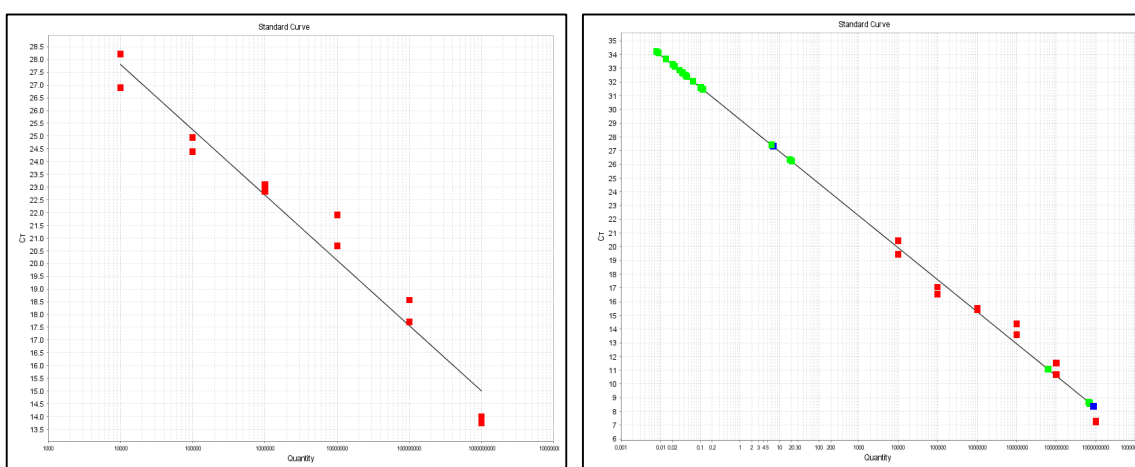
Διάγραμμα 4: Καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetA*.

Οι καμπύλες ενίσχυσης των γνωστών δειγμάτων (διάγραμμα 4, αριστερά) για το συγκεκριμένο γονίδιο είναι ιδιαίτερα καλές, με ορατές όλες τις φάσεις της διαδικασίας ενίσχυσης της επιθυμητής αλληλουχίας. Οι διαδοχικές αραιώσεις είναι ευδιάκριτες. Τα διαφορετικά χρώματα καμπυλών αντιστοιχούν σε διαφορετικές αραιώσεις του γενετικού υλικού, με τα δείγματα με την μεγαλύτερη ποσότητα DNA να ανιχνεύονται σε μικρότερους κύκλους. Οι κόκκινες καμπύλες αφορούν τα δείγματα με ποσότητα γενετικού υλικού  $10^9$  αντιγράφων γονιδίων, ενώ οι μπλε καμπύλες αντιπροσωπεύουν τα δείγματα με ποσότητα

γενετικού υλικού  $10^4$  αντιγράφων γονιδίων. Οι ροζ γραμμές με τιμή φθορισμού μηδέν αφορούν τα πηγαδάκια χωρίς προσθήκη γενετικού υλικού παρά μόνο υπερκάθαρου νερού και master mix.

Στην καμπύλη ενίσχυσης αγνώστων δειγμάτων (διάγραμμα 4, δεξιά) παρατηρούνται μερικές καμπύλες παραπάνω, σε σύγκριση με την αντίστοιχη καμπύλη γνωστών δειγμάτων. Έχουν προστεθεί οι ροζ καμπύλες αγνώστων δειγμάτων στον κύκλο 28, που υποδηλώνουν ότι υπάρχει το γονίδιο αλλά σε χαμηλότερη ποσότητα από  $10^4$  που είναι και η τελευταία αραιώση. Επίσης, παρατηρείται και μια μωβ καμπύλη στον κύκλο 30, που αντιστοιχεί σε άγνωστο δείγμα. Όμως τα περισσότερα δείγματα είχαν καμπύλες, οι οποίες είχαν φθορισμό μηδέν, υποδηλώνοντας απουσία επιθυμητής αλληλουχίας γονιδίου στα περισσότερα εξεταζόμενα δείγματα.

Στο διάγραμμα 5 (αριστερά) απεικονίζεται η πρότυπη καμπύλη δειγμάτων γνωστής ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetA*, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως καμπύλη αναφοράς για τον ποσοτικό προσδιορισμό άγνωστων δειγμάτων. Στο διάγραμμα 5 (δεξιά) απεικονίζεται η πρότυπη καμπύλη δειγμάτων άγνωστης ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetA*.



Διάγραμμα 5: Πρότυπη καμπύλη δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetA*. Κλίση: - 2,56 ,  $R^2$ : 0,963

Η πρότυπη καμπύλη των γνωστών δειγμάτων (διάγραμμα 5, αριστερά) για το γονίδιο *tetA* είναι ικανοποιητική με περιθώρια βελτίωσης. Η κλίση της ευθείας δεν είναι αρκετά απότομη, με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα που την θέλουν στο  $-3,3 \pm 10\%$  και η επαναληψιμότητα  $R^2$  είναι καλή αλλά όχι η βέλτιστη. Παρ' όλα αυτά, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση των αγνώστων δειγμάτων (διάγραμμα 5, δεξιά).

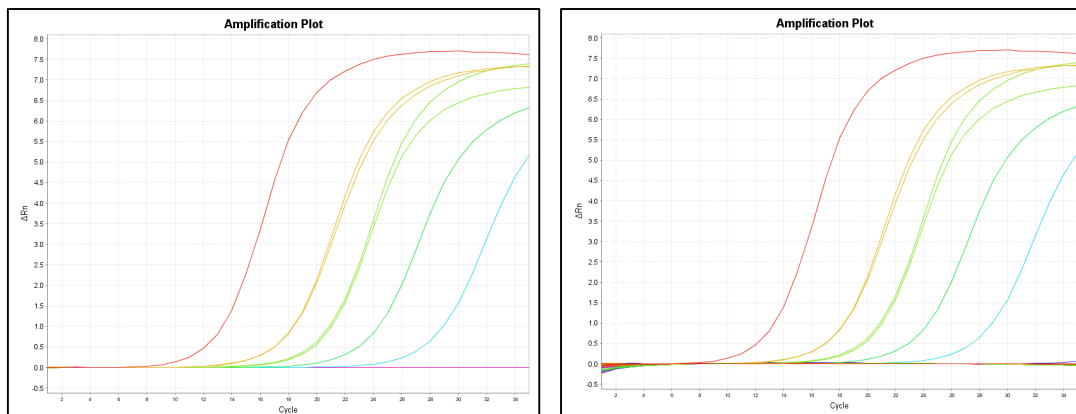
Σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη των standards, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της επιθυμητής αλληλουχίας για το γονίδιο *tetA*, για μερικά δείγματα. Στο

διάγραμμα 5 (δεξιά), τα κόκκινα σημάδια αφορούν τα δείγματα γνωστών ποσοτήτων αντιγράφων γονιδίων, τα οποία ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερες ποσότητες και σε μικρότερους κύκλους (C<sub>T</sub>). Τα υπόλοιπα σημάδια αντιπροσωπεύουν τα άγνωστα δείγματα, που τα περισσότερα ανιχνεύθηκαν σε πολύ χαμηλές ποσότητες γενετικού υλικού και απορρίφθηκαν. Παρ' όλ' αυτά, υπήρξαν 2 δείγματα τα οποία ανιχνεύθηκαν σε αρκετή ποσότητα αντιγράφων γονιδίων.

Παρατηρώντας όμως την καμπύλη αποδιάταξης αποκλείστηκαν και τα 2 δείγματα που είχαν θετικό αποτέλεσμα. Στην καμπύλη αυτή παρέχεται η δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας - στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών, με βάση την διαφορετικότητα στη μορφή της καμπύλης. Έτσι ενώ όλες σχεδόν οι καμπύλες είχαν περίπου την ίδια μορφή και ίδια κορυφή, πράγμα που υποδηλώνει ότι η ενίσχυση μέσω της PCR έγινε στην επιθυμητή αλληλουχία χωρίς την παραγωγή παραπροϊόντων για εκείνα τα δείγματα. Παρατηρήθηκαν και μερικές καμπύλες των γνωστών δειγμάτων, που στην καμπύλη ενίσχυσης είχαν μια σημαντική καμπύλη φθορισμού, είχαν διαφορετική μορφή καμπύλης αποδιάταξης, αποδεικνύοντας ότι δεν αντιστοιχούν στο επιθυμητό γονίδιο *tetA*. Συνεπώς, ενώ υπήρχαν καμπύλες φθορισμού και μέσω την πρότυπης καμπύλης έγινε η ποσοτικοποίηση για τα δυο δείγματα, εν τέλει αφορούσαν διαφορετικό γονίδιο από το *tetA*.

#### Τετρακυκλίνη (*tetM*)

Το γονίδιο ανθεκτικότητας *tetM* αφορά επίσης το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη, εντοπίστηκε και απομονώθηκε από το βακτηριακό στέλεχος *K. pneumoniae* NCTC 5056. Στο διάγραμμα 6 (αριστερά) απεικονίζεται η καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων γνωστής ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetM*. Για το συγκεκριμένο γονίδιο εξετάστηκαν 24 ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες, όμως σε κανένα δείγμα δεν ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη αλληλουχία του γονιδίου *tetM*. Στο διάγραμμα 6 (δεξιά), απεικονίζεται η καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων άγνωστης ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetM*.

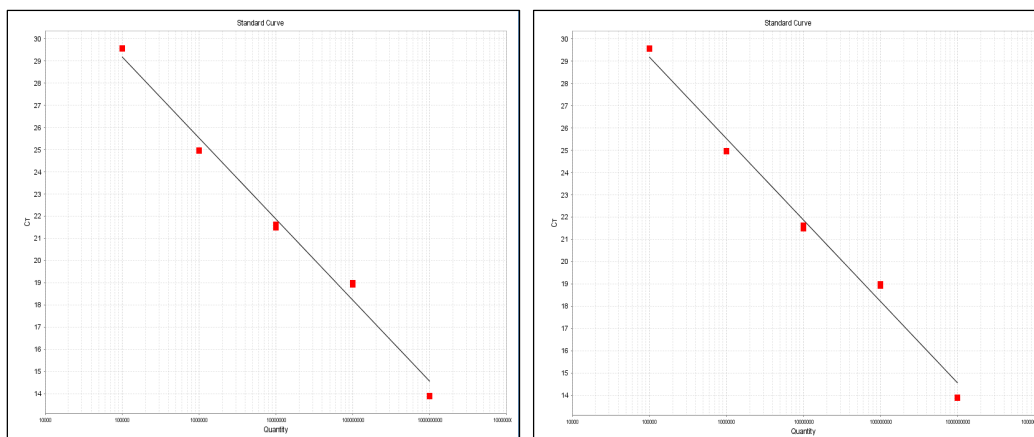


Διάγραμμα 6: Καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetM*.

Οι καμπύλες ενίσχυσης των γνωστών δειγμάτων (διάγραμμα 6, αριστερά) για το συγκεκριμένο γονίδιο είναι ιδιαίτερα καλές. Οι τέσσερις φάσεις της διαδικασίας ενίσχυσης είναι ευδιάκριτες για κάθε δείγμα. Τα διαφορετικά χρώματα καμπυλών αντιστοιχούν σε διαφορετικές αραιώσεις του γενετικού υλικού, με τα δείγματα με την μεγαλύτερη ποσότητα DNA να ανιχνεύονται σε μικρότερους κύκλους. Οι κόκκινες καμπύλες αφορούν τα δείγματα με ποσότητα γενετικού υλικού  $10^9$  αντιγράφων γονιδίων, ενώ οι μπλε καμπύλες αντιπροσωπεύουν τα δείγματα με ποσότητα γενετικού υλικού  $10^5$  αντιγράφων γονιδίων. Οι ροζ γραμμές με τιμή φθορισμού μηδέν αφορούν τα δείγματα χωρίς προσθήκη γενετικού υλικού παρά μόνο υπερκείμερο νερό και master mix.

Στο διάγραμμα 6 (δεξιά) οι μόνες καμπύλες που παρατηρούνται είναι αυτές των γνωστών δειγμάτων, ενώ και τα 24 άγνωστα δείγματα έχουν φθορισμό μηδέν, υποδηλώνοντας ότι δεν ανιχνεύθηκε το συγκεκριμένο γονίδιο στις βακτηριακές κοινότητες.

Η πρότυπη καμπύλη δειγμάτων γνωστής ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetM*, βάσει της οποίας έγινε η ποσοτικοποίηση των άγνωστων δειγμάτων, απεικονίζεται στο διάγραμμα 7 (αριστερά).

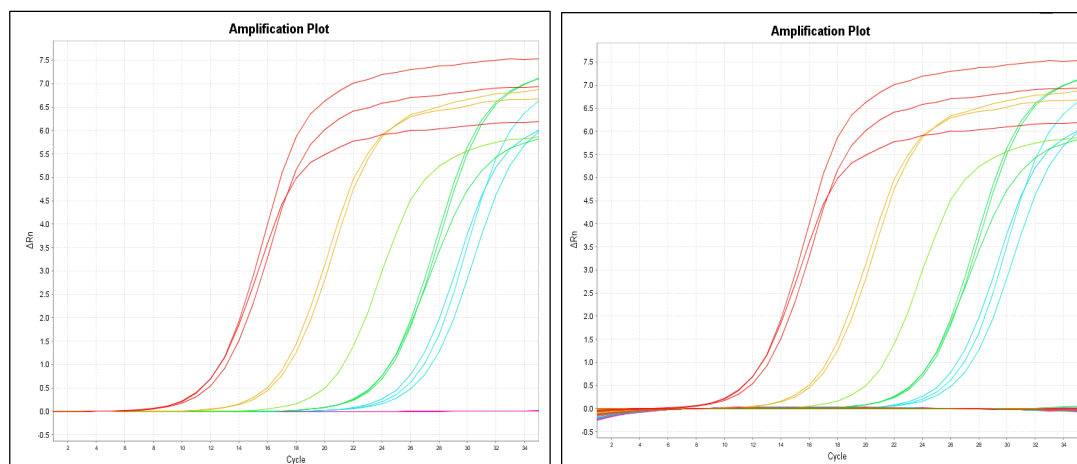


Διάγραμμα 7: Πρότυπη καμπύλη δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *tetM*. Κλίση: - 3,66 ,  $R^2$ : 0,985.

Η πρότυπη καμπύλη των γνωστών δειγμάτων (διάγραμμα 7, αριστερά) για το γονίδιο *tetM* είναι ικανοποιητική. Η κλίση της ευθείας είναι αρκετά απότομη, με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα που την θέλουν στο  $-3,3 \pm 10\%$  και θα μπορούσε να μειωθεί λίγο. Η επαναληψιμότητα  $R^2$  είναι αρκετά καλή με τιμή 0,985.

### Αμπικιλίνη (*ampC*)

Το γονίδιο ανθεκτικότητας *ampC* για το αντιβιοτικό αμπικιλίνη είναι ένα ακόμη γονίδιο που εντοπίστηκε και απομονώθηκε από το βακτηριακό στέλεχος *K. pneumoniae* NCTC 5056. Στο διάγραμμα 8 (αριστερά) απεικονίζεται η καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων γνωστής ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *ampC*. Για το συγκεκριμένο γονίδιο εξετάστηκαν, επίσης 24 ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες, όμως σε κανένα άγνωστο δείγμα δεν ανιχνεύθηκε η συγκεκριμένη αλληλουχία του γονιδίου *ampC*. Στο διάγραμμα 8 (δεξιά) απεικονίζεται η καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων άγνωστης ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *ampC*.

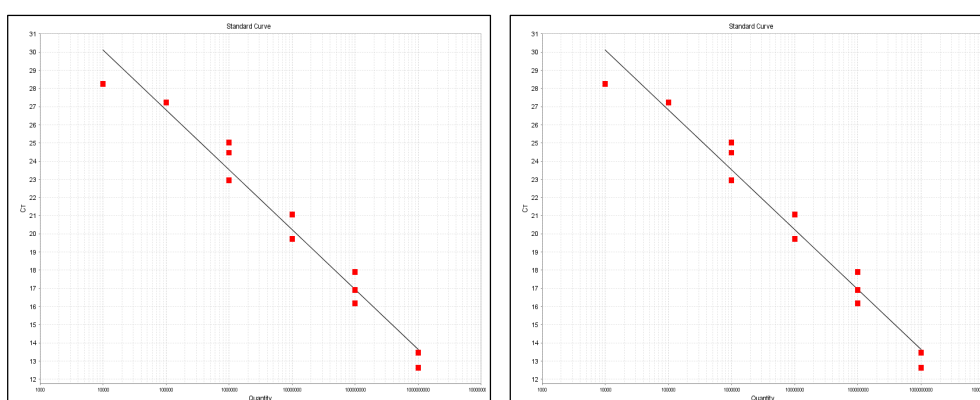


Διάγραμμα 8: Καμπύλη ενίσχυσης δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *ampC*.

Οι καμπύλες ενίσχυσης των γνωστών δειγμάτων (διάγραμμα 8, αριστερά) για το συγκεκριμένο γονίδιο είναι ιδιαίτερα καλές, με ορατές και τις τέσσερις φάσεις της διαδικασίας ενίσχυσης της επιθυμητής αλληλουχίας. Οι διαδοχικές αραιώσεις είναι ευδιάκριτες, αν και οι φάσεις κορεσμού στις κόκκινες καμπύλες θα μπορούσαν να είναι πιο κοντά η μια στην άλλη. Τα διαφορετικά χρώματα καμπυλών αντιστοιχούν σε διαφορετικές αραιώσεις του γενετικού υλικού, με τα δείγματα με την μεγαλύτερη ποσότητα DNA να ανιχνεύονται σε μικρότερους κύκλους. Οι κόκκινες καμπύλες αφορούν τα δείγματα με ποσότητα γενετικού υλικού  $10^9$  αντιγράφων γονιδίων, ενώ οι μπλε καμπύλες αντιπροσωπεύουν τα δείγματα με ποσότητα

γενετικού υλικού  $10^5$  αντιγράφων γονιδίων. Οι ροζ γραμμές με τιμή φθορισμού μηδέν αφορούν τα πηγαδάκια χωρίς προσθήκη γενετικού υλικού παρά μόνο υπερκάθαρου νερού και master mix. Στο διάγραμμα 8 (δεξιά) οι μόνες καμπύλες που παρατηρούνται είναι αυτές των γνωστών δειγμάτων, ενώ και τα 24 άγνωστα δείγματα έχουν φθορισμό μηδέν, υποδηλώνοντας ότι δεν ανιχνεύθηκε το συγκεκριμένο γονίδιο στις βακτηριακές κοινότητες.

Στο διάγραμμα 9 (αριστερά) απεικονίζεται η πρότυπη καμπύλη δειγμάτων άγνωστης ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *ampC*, ενώ στο διάγραμμα 9 (δεξιά), απεικονίζεται η πρότυπη καμπύλη δειγμάτων άγνωστης ποσότητας αντιγράφων γονιδίων για το συγκεκριμένο γονίδιο.



Διάγραμμα 9: Πρότυπη καμπύλη δειγμάτων γνωστής ποσότητας (αριστερά) αντιγράφων γονιδίων και άγνωστης ποσότητας (δεξιά) αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *ampC*.  
Κλίση: - 3,296 ,  $R^2$ : 0,968

Τα χαρακτηριστικά της πρότυπης καμπύλης (διάγραμμα 9, αριστερά) για το γονίδιο *ampC* ήταν εντός των βιβλιογραφικών ορίων. Η κλίση της ευθείας είχε την βέλτιστη τιμή - 3,296 και η επαναληψιμότητα  $R^2$  είναι αρκετά καλή με την τιμή 0,968 και με περιθώρια βελτίωσης. Η πρότυπη καμπύλη άγνωστων δειγμάτων (διάγραμμα 9, δεξιά) είναι ίδια με την πρότυπη καμπύλη γνωστών δειγμάτων, διότι δεν ανιχνεύθηκαν επιπλέον δείγματα ώστε να την επηρεάσουν.

Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκε μόνο για το αντιβιοτικό σουλφαμεθοξαζόλη στο γονίδιο *sul1* (πίνακας 5).

Πίνακας 5: Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Αντιβιοτικά	Γονίδια ανθεκτικότητας	Ανίχνευση γονιδίων
Σιπροφλοξασίνη	aac(6')-Ib-cr	-
	qnrA	-
	qnrB	-
	qnrC	-
	qnrD	-
	qnrS	-
Σουλφαμεθοξαζόλη	<b>sul1</b>	+
	sul2	-
	sul3	-
Τετρακυκλίνη	tetA	-
	tetM	-
Β-λακτάμες	ampC	-
	blaTEM	-

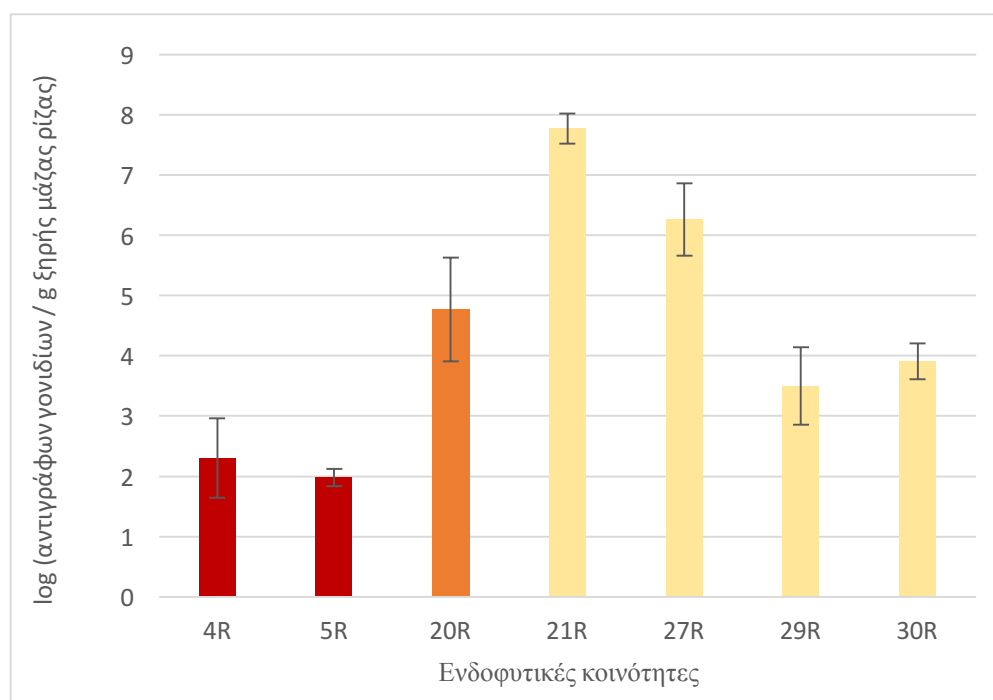
Επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μόνο για το γονίδιο sul1, στο οποίο ανιχνεύθηκε γενετικό υλικό. Υπήρχε ποσοτικοποίηση σε δύο άγνωστα δείγματα για το γονίδιο tetA, όμως από την καμπύλη αποδιάταξης, προέκυψε ότι αφορούσαν διαφορετικές αλληλουχίες από την επιθυμητή. Τα γονίδια tetM, ampC δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα από τα άγνωστα δείγματα.

Κανένα γονίδιο ανθεκτικότητας για την σιπροφλοξασίνη δεν ανιχνεύθηκε (aac(6')-Ib-cr, qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS), ώστε να δημιουργηθούν τα standards και να πραγματοποιηθεί η real-time PCR σε άγνωστες ενδοφυτικές κοινότητες. Το ίδιο συνέβη και για τα γονίδια ανθεκτικότητας sul2 και sul3 για την σουλφαμεθοξαζόλη και για το γονίδιο ανθεκτικότητας blaTEM για την αμπικιλίνη.

#### 4.6 Αποτελέσματα για το γονίδιο sul1

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση των αντιγράφων γονιδίων για το γονίδιο *sul1* για τις 47 εξεταζόμενες ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες, προέκυψαν τα παρακάτω ιστογράμματα, όπου 35 βακτηριακές κοινότητες που είχαν θετικό αποτέλεσμα (75%).

Στο διάγραμμα 10 απεικονίζεται η συγκέντρωση του γονιδίου ανθεκτικότητας *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας, για τις ενδοφυτικές κοινότητες που προέρχονταν από συστήματα που δεν είχαν εμβολιαστεί με βακτηριακά στελέχη.

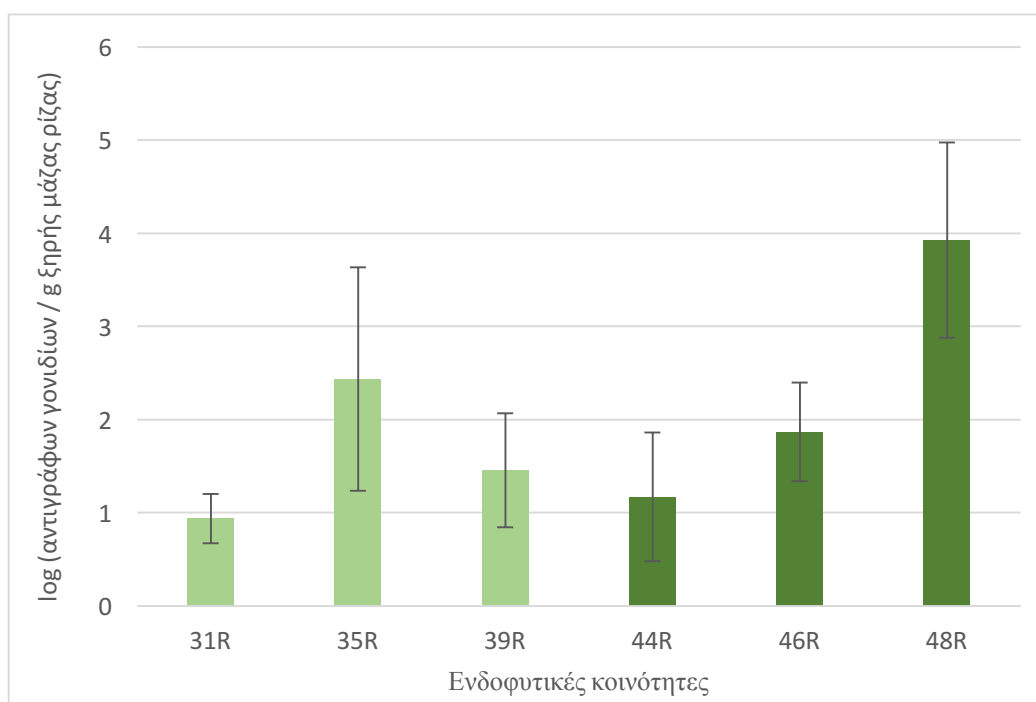


Διάγραμμα 10: Συγκέντρωση του γονιδίου *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας για ενδοφυτικές κοινότητες που απομονώθηκαν από συστήματα επεξεργασίας που δεν είχαν εμβολιαστεί με βακτηριακά στελέχη.

Στο διάγραμμα 10 οι ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες 4R και 5R αφορούν τις κοινότητες ελέγχου, στις οποίες η ριζόσφαιρα των φυτών δεν βιοενισχύθηκε με βακτηριακά στελέχη και δεν ήρθαν σε επαφή οι ρίζες των φυτών με τα αντιβιοτικά (σιπροφλοξασίνη και σουλφαμεθοξαζόλη). Παρ' όλ' αυτά ανιχνεύθηκε το γονίδιο ανθεκτικότητας *sul1* στην σουλφαμεθοξαζόλη. Η ποσότητα των αντιγράφων γονιδίων ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μη εμβολιασμένες κοινότητες (20R - 30R). Όμως, η συγκέντρωση ήταν αρκετή, ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό σουλφαμεθοξαζόλη στο φυσικό περιβάλλον.

Η συγκέντρωση του γονιδίου ανθεκτικότητας *sul1* αυξήθηκε αισθητά όταν η ριζόσφαιρα εκτέθηκε στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό σε χαμηλή συγκέντρωση αντιβιοτικού 250μg/L (κοινότητα 20R), ενώ η συγκέντρωση του γονιδίου *sul1* αυξήθηκε σημαντικά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού (500μg/L) (κοινότητες 21R και 27R). Η αύξηση της ποσότητας των αντιγράφων γονιδίων πραγματοποιήθηκε παρουσία του αντιβιοτικού, διότι τα στελέχη που κατείχαν το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ανέπτυξαν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα υπέρ των βακτηριακών στελεχών που δεν είχαν το γονίδιο ανθεκτικότητας, με αποτέλεσμα να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη τα οποία αδρανοποιήθηκαν από το αντιβιοτικό.

Στο διάγραμμα 11 απεικονίζεται η συγκέντρωση του γονιδίου *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας, για τις ενδοφυτικές κοινότητες οι οποίες προέρχονταν από συστήματα που εμβολιάστηκαν με βακτηριακά στελέχη του γένους *Sphingomonas* sp. U33, παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικών (31R-39R) και υψηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικών (44R-48R).

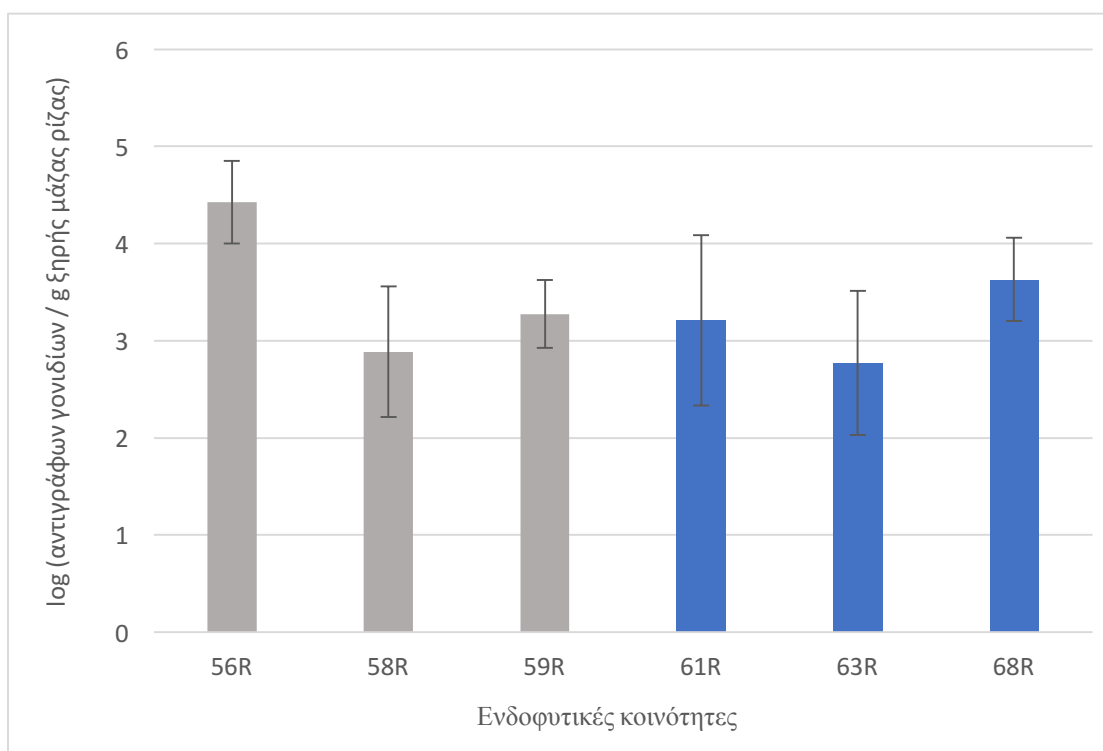


Διάγραμμα 11: Συγκέντρωση του γονιδίου *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας για ενδοφυτικές κοινότητες που απομονώθηκαν από συστήματα επεξεργασίας που είχαν εμβολιαστεί με βακτηριακά στελέχη του γένους *Sphingomonas* sp. U33.

Οι ενδοφυτικές κοινότητες 31R, 35R και 39R, οι οποίες απομονώθηκαν από ρίζες φυτών που βιοενισχύθηκαν με βακτηριακά στελέχη του γένους *Sphingomonas* sp. U33 και εκτέθηκαν σε χαμηλή συγκέντρωση αντιβιοτικού, 250μg/L, παρουσιάζουν σημαντική ποσότητα αντιγράφων γονιδίου ανθεκτικότητας *sul1* στη σουλφαμεθοξαζόλη. Όμως η

διαφορά είναι αισθητή στην ενδοφυτική κοινότητα 48R, η οποία απομονώθηκε από ρίζα φυτού που ήρθε σε επαφή με υψηλή συγκέντρωση του αντιβιοτικού 500μg/L. Παρατηρείται όμως ότι σε μερικές βακτηριακές κοινότητες που είχαν εκτεθεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού (44R και 46R), ανιχνεύθηκαν περίπου ίδιες συγκεντρώσεις αντιγράφων γονιδίων ανθεκτικότητας, κάτι που υποδηλώνει ότι για την συγκεκριμένη βιοενίσχυση δεν έπαιξε σημαντικό ρόλο η συγκέντρωση του αντιβιοτικού, στο οποίο εκτέθηκαν οι ρίζες των φυτών.

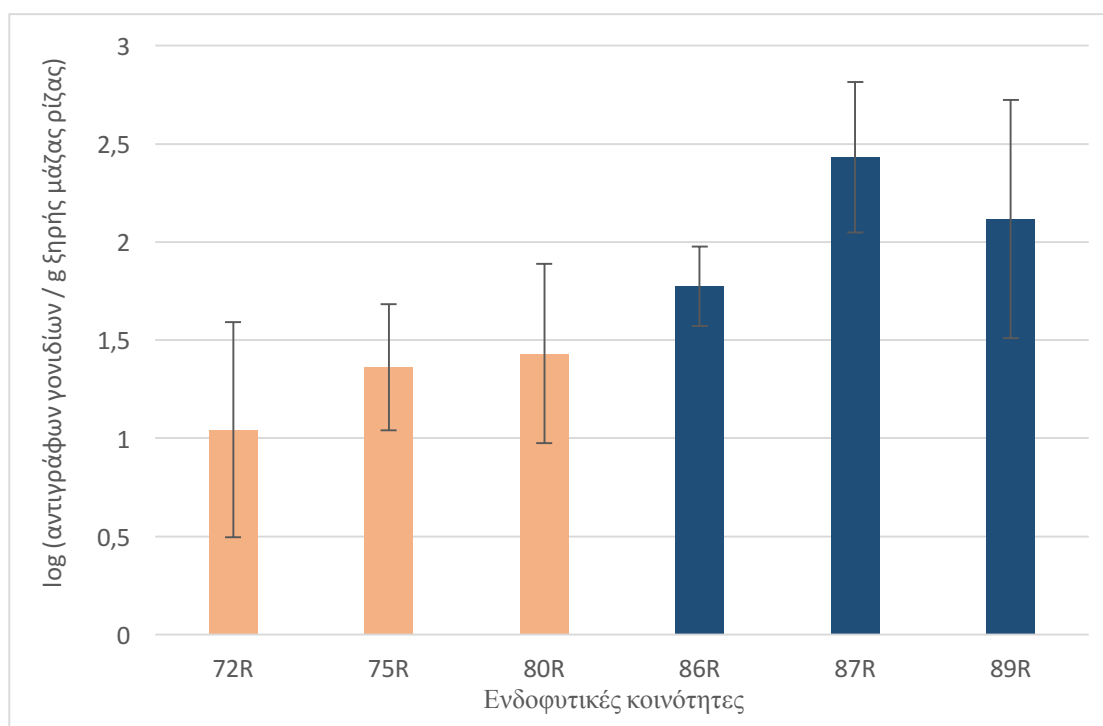
Στο διάγραμμα 12 απεικονίζονται η συγκέντρωση του γονιδίου *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας, για τις ενδοφυτικές κοινότητες οι οποίες προέρχονταν από συστήματα που εμβολιάστηκαν με βακτηριακά στελέχη του γένους *Bacillus* sp. R12, παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικών (56R-58R) και υψηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικών (61R-68R).



Διάγραμμα 12: Συγκέντρωση του γονιδίου *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας για ενδοφυτικές κοινότητες που απομονώθηκαν από συστήματα επεξεργασίας που είχαν εμβολιαστεί με βακτηριακά στελέχη του γένους *Bacillus* sp. R12.

Κατά τον εμβολιασμό με βακτηριακά στελέχη γένους *Bacillus* sp. R12 παρατηρείται ότι ανεξάρτητα την συγκέντρωση του αντιβιοτικού στην ριζόσφαιρα, υπάρχει μια αξιόλογη συγκέντρωση γονιδίου ανθεκτικότητας *sul1* στη σουλφαμεθοξαζόλη. Στην συγκεκριμένη βιοενίσχυση η βακτηριακή κοινότητα 56R, η οποία απομονώθηκε από τη ρίζα του φυτού που είχε εκτεθεί σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, ανιχνεύθηκε με υψηλότερη συγκέντρωση γονιδίου *sul1*, έναντι των κοινοτήτων 61R-68R που είχαν υποστεί μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού.

Στο διάγραμμα 13 απεικονίζονται η συγκέντρωση του γονιδίου *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας, για τις ενδοφυτικές κοινότητες οι οποίες προέρχονταν από συστήματα που εμβολιάστηκαν με βακτηριακά στελέχη του γένους *Ochrobactrum* sp. R24, παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικών, 250μg/L (72R-80R) και υψηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικών, 500μg/L (86R-89R).

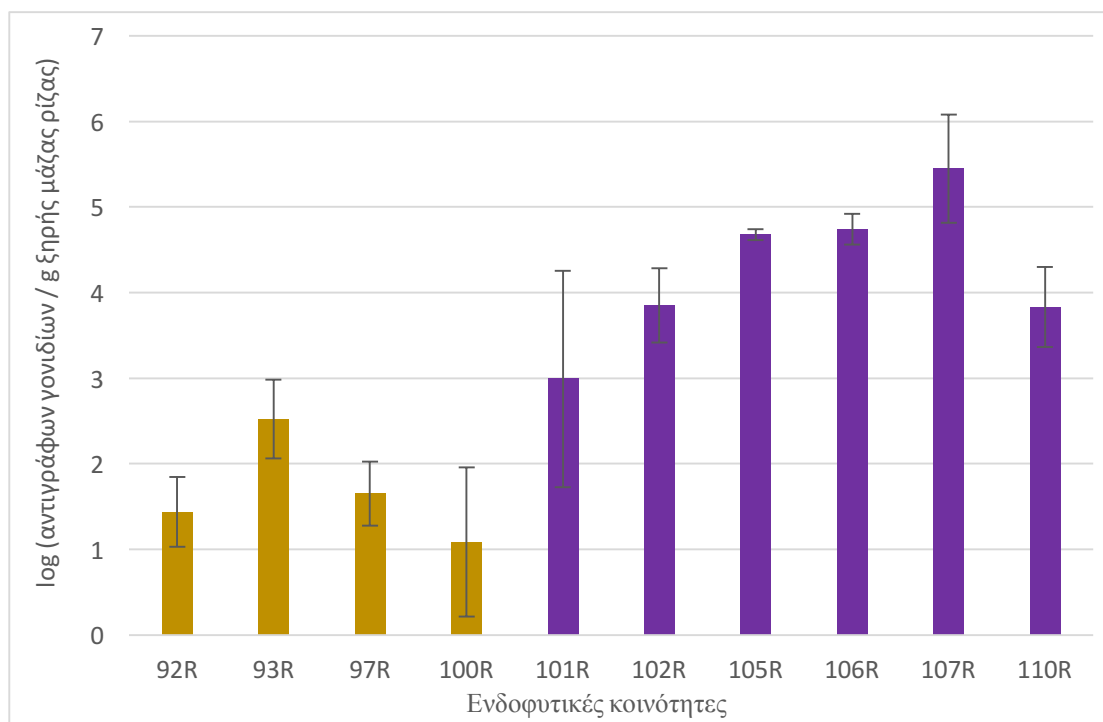


Διάγραμμα 13: Συγκέντρωση του γονιδίου *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας για ενδοφυτικές κοινότητες που απομονώθηκαν από συστήματα επεξεργασίας που είχαν εμβολιαστεί με βακτηριακά στελέχη του γένους *Ochrobactrum* sp. R24.

Κατά τον εμβολιασμό με βακτηριακά στελέχη γένους *Ochrobactrum* sp. R24, παρατηρείται ότι οι βακτηριακές κοινότητες οι οποίες είχαν απομονωθεί από ρίζες που είχαν εκτεθεί σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού (72R, 75R και 80R), ανιχνεύθηκαν με χαμηλότερες συγκεντρώσεις γονιδίου *sul1*, έναντι των κοινοτήτων 87R-89R που είχαν υποστεί μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Η υψηλή ποσότητα αντιβιοτικού βοήθησε τα στελέχη που κατείχαν το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό να αναπτύξουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα υπέρ των βακτηριακών στελεχών που δεν είχαν το γονίδιο ανθεκτικότητας, με αποτέλεσμα να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα βακτηριακά στελέχη τα οποία αδρανοποιήθηκαν από το αντιβιοτικό.

Στο διάγραμμα 14 απεικονίζονται η συγκέντρωση του γονιδίου *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας, για τις ενδοφυτικές κοινότητες οι οποίες προέρχονταν από συστήματα που εμβολιάστηκαν με ένα μίγμα βακτηριακών στελεχών γένους *Sphingomonas* sp. U33, *Bacillus*

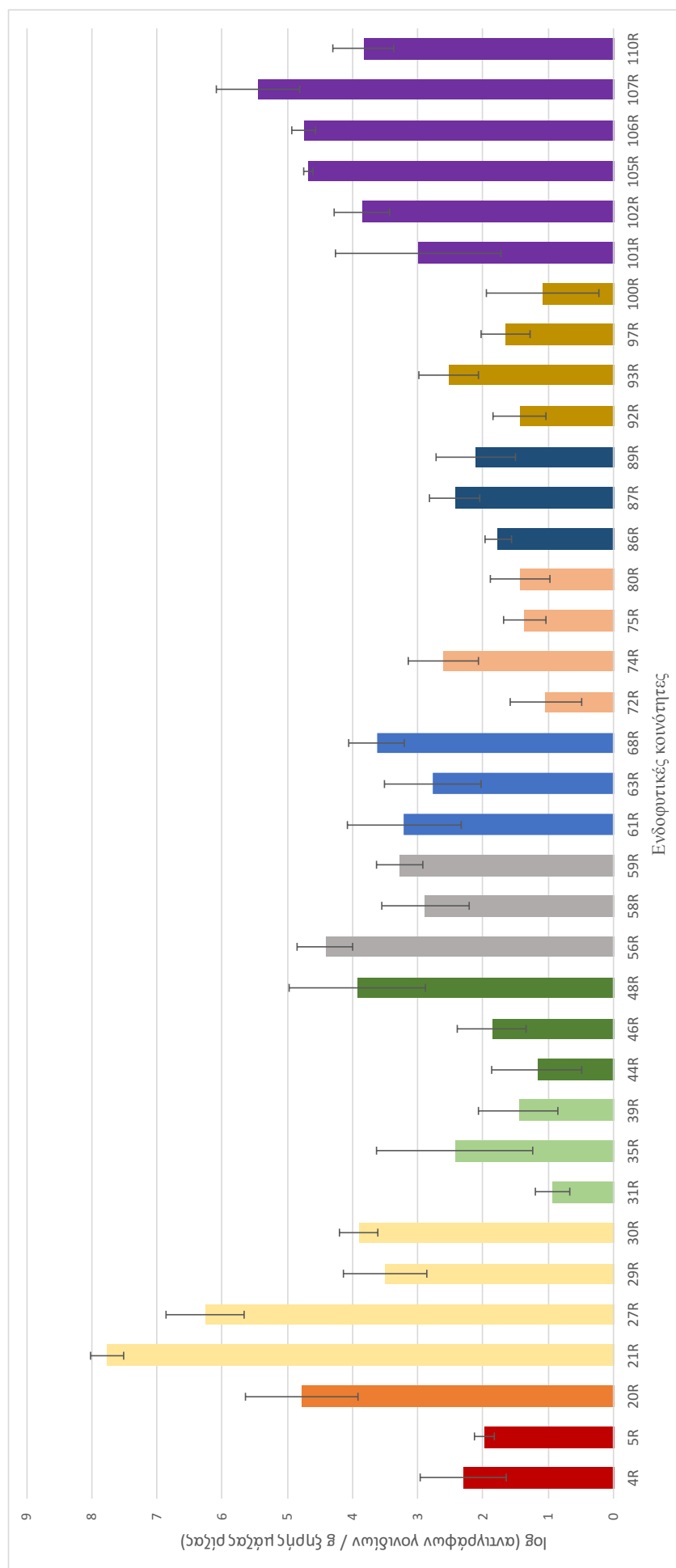
sp. R12 και *Ochrobactrum* sp. R24, παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικών (92R-100R) και υψηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικών (101R-110R).



Διάγραμμα 14: Συγκέντρωση του γονιδίου *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας για ενδοφυτικές κοινότητες που απομονώθηκαν από συστήματα επεξεργασίας που είχαν εμβολιαστεί με μίγμα βακτηριακών στελεχών γένους *Sphingomonas* sp. U33, *Bacillus* sp. R12 και *Ochrobactrum* sp. R24.

Οι ενδοφυτικές κοινότητες 92R – 100R οι οποίες απομονώθηκαν από ρίζες που βιοενισχύθηκαν με ένα μίγμα βακτηριακών στελεχών γένους *Sphingomonas* sp. U33, *Bacillus* sp. R12 και *Ochrobactrum* sp. R24, εκτέθηκαν σε χαμηλή συγκέντρωση αντιβιοτικού, 250μg/L, παρουσιάζουν σημαντική συγκέντρωση γονιδίου ανθεκτικότητας *sul1* στη σουλφαμεθοξαζόλη. Όμως η διαφορά είναι αισθητή στις ενδοφυτικές κοινότητες 101R - 110R, στις οποίες οι ρίζες των φυτών ήρθαν σε επαφή με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού, 500μg/L. Παρατηρείται λοιπόν ότι στις βακτηριακές κοινότητες, όπου οι ρίζες των φυτών είχαν εκτεθεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού ανιχνεύθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες αντιγράφων γονιδίου *sul1*, λόγω του ανταγωνιστικού πλεονεκτήματος που ανέπτυξαν τα βακτηριακά στελέχη που κατείχαν το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό, έναντι των βακτηρίων που δεν είχαν το γονίδιο ανθεκτικότητας.

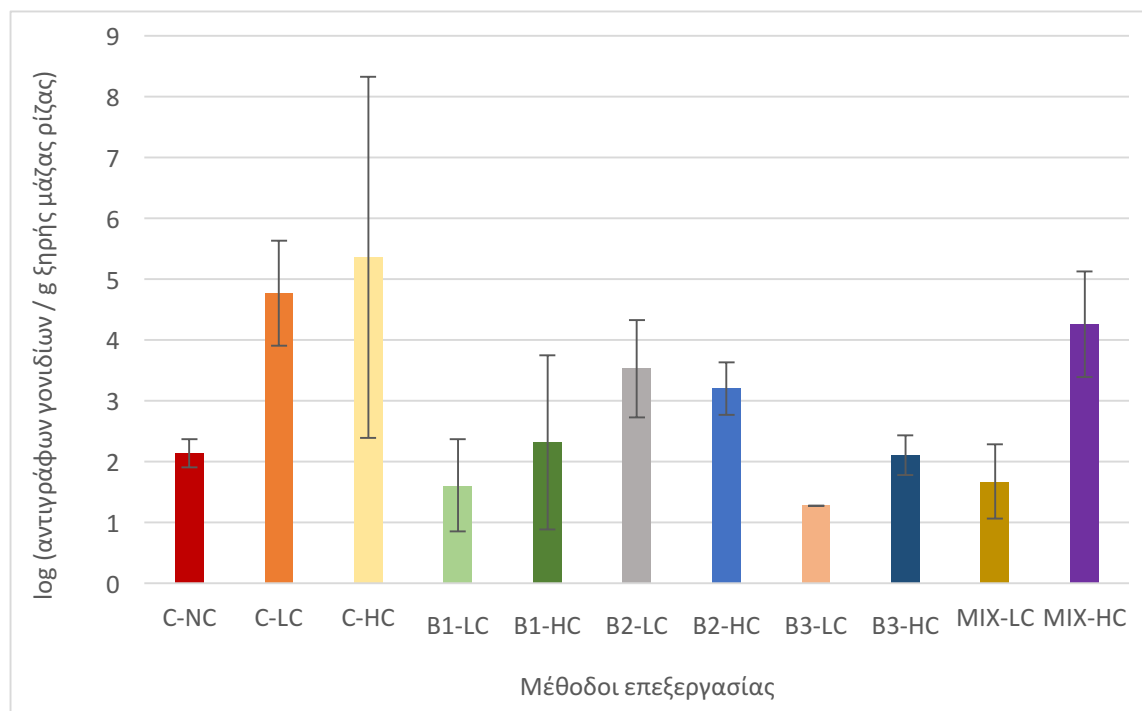
Έπειτα κατασκευάστηκε το συνολικό ιστόγραμμα της συγκέντρωσης του γονιδίου *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας, για τις 35 βακτηριακές κοινότητες που είχαν θετικό αποτέλεσμα (διάγραμμα 15).



Διάγραμμα 15: Συγκέντρωση του γονιδίου sul1 ανά g ξηρής μάζας ρίζας για τις 35 βακτηριακές κοινότητες που είχαν θετικό αποτέλεσμα.

Με βάση το συνολικό ιστόγραμμα (διάγραμμα 15) παρατηρείται ότι ακόμη και στα δείγματα ενδοφυτικών κοινοτήτων, τα οποία απομονώθηκαν από ρίζες φυτών που δεν είχαν εμβολιαστεί και δεν ήρθαν σε επαφή οι ρίζες των φυτών με αντιβιοτικό (4R και 5R), ανιχνεύθηκε ικανοποιητική συγκέντρωση γονιδίου ανθεκτικότητας *sul1* στην σουλφαμεθοξαζόλη. Αυτό υποδηλώνει ότι η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και συγκεκριμένα στην σουλφαμεθοξαζόλη έχει εξαπλωθεί και στο φυσικό περιβάλλον, με κίνδυνο την περαιτέρω εξάπλωση της. Επίσης, παρατηρείται ότι στα δείγματα με την υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικού, 21R-30R (μη εμβολιασμένα), 46R-48R (εμβολιασμένα με *Sphingomonas* sp. U33), 86R-89R (εμβολιασμένα με *Ochrobactrum* sp. R24), 101R-110R (εμβολιασμένα με μικτή καλλιέργεια), ανιχνεύονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γονιδίου *sul1*. Αυτό υποδηλώνει ότι η υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικού βοηθάει τα στελέχη με γονίδια ανθεκτικότητας στην σουλφαμεθοξαζόλη να αποκτήσουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι των στελεχών που δεν έχουν γονίδιο ανθεκτικότητας στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό με εξαίρεση τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με *Bacillus* sp. R12 (56R) όπου και στην χαμηλότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού εντοπίστηκε μεγάλη ποσότητα των αντιγράφων γονιδίων.

Στην συνέχεια, κατασκευάστηκε ένα ιστόγραμμα της συγκέντρωσης του γονιδίου *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας, για κάθε μέθοδο επεξεργασίας της ριζόσφαιρας (διάγραμμα 16).



Διάγραμμα 16: Συγκέντρωση του γονιδίου *sul1* ανά g ξηρής μάζας ρίζας για για κάθε μέθοδο επεξεργασίας.

Στο διάγραμμα 16 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις του γονιδίου ανθεκτικότητας *sul1* για κάθε μέθοδο επεξεργασίας της ριζόσφαιρας των φυτών *J. acutus*. Οι μέθοδοι επεξεργασίας αφορούν την έλλειψη βιοενίσχυσης (C), τη βιοενίσχυση με βακτηριακά στελέχη γένους *Sphingomonas* sp. U33 (B1), τη βιοενίσχυση με βακτηριακά στελέχη γένους *Bacillus* sp. R12 (B2), τη βιοενίσχυση με βακτηριακά στελέχη γένους *Ochrobactrum* sp. R24 (B3) και τη βιοενίσχυση με μίγμα βακτηριακών στελεχών (MIX), απουσία αντιβιοτικών (NC), παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικών (LC) και παρουσία υψηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικών (HC). Οι ενδοφυτικές κοινότητες οι οποίες απομονώθηκαν από τις ρίζες φυτών που δεν είχαν υποστεί καμία επεξεργασία (C-NC) και δεν είχαν έρθει σε επαφή με αντιβιοτικό, ανιχνεύθηκαν με σημαντική συγκέντρωση γονιδίου, ενώ τα δείγματα που είχαν έρθει σε επαφή με χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικού, C-LC και C-HC αντίστοιχα, ανιχνεύθηκαν με μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιγράφων γονιδίου ανθεκτικότητας *sul1* για τη σουλφαμεθοξάζολη. Οι ενδοφυτικές κοινότητες που προέρχονταν από συστήματα που εμβολιάστηκαν με βακτηριακό στέλεχος γένους *Sphingomonas* sp. U33 (B1-HC), ανιχνεύθηκαν με μεγαλύτερη συγκέντρωση γονιδίου σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, σε αντίθεση με αυτά που ήρθαν σε επαφή με χαμηλότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού (B1-LC). Παρόμοια συμπεριφορά εμφάνισαν και τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με *Ochrobactrum* sp. R24 (B3-LC, B3-HC) και με μικτή καλλιέργεια (MIX-LC, MIX-HC). Όμως, για τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με *Bacillus* sp. R12 η διαφορά στην ποσότητα αντιγράφων γονιδίου *sul1* δεν ήταν αρκετά μεγάλη (B2-LC, B2-HC).

## 5. Συμπεράσματα

Πρόσφατη μελέτη διερεύνησε τις δυνατότητες των ενδογενών ενδοφυτικών βακτηρίων, με σκοπό την βελτίωση της απόδοσης του αλόφυτου *J. acutus*, να επεξεργαστεί ρυπασμένο νερό με φαρμακευτικές ενώσεις, όπως αντιβιοτικά (Syranidou et al., 2016). Η ευεργετική επίδραση της βιο-ενίσχυσης με επιλεγμένα ενδοφυτικά βακτήρια, ήταν περισσότερο εμφανής, στην περίπτωση υψηλής ρύπανσης του ριζικού συστήματος των αλόφυτων *J. acutus*. Τα περισσότερα από τα εμβολιασμένα φυτά (ειδικότερα εκείνα που εμβολιάστηκαν με μικτή καλλιέργεια των τριών στελεχών (*Sphingomonas* sp. U33, *Bacillus* sp. R12 και *Ochrobactrum* sp. R24) απομάκρυναν υψηλότερα ποσοστά αντιβιοτικών (Σουλφαμεθοξαζόλη, Σιπροφλοξασίνη) από την υγρή φάση σε συντομότερο χρόνο σε σύγκριση με τα μη εμβολιασμένα φυτά.

Η βιο-ενίσχυση πραγματοποιήθηκε με 4 διαφορετικούς τρόπους. Με τον πρώτο εμβολιασμό τοποθετήθηκαν μόνο βακτηριακά στελέχη *Sphingomonas* sp. U33, με το δεύτερο είδος εμβολιασμού τοποθετήθηκαν μόνο βακτηριακά στελέχη *Bacillus* sp. R12, με το τρίτο είδος εμβολιασμού τοποθετήθηκαν μόνο βακτηριακά στελέχη *Ochrobactrum* sp. R24 και το τέταρτο και τελευταίο είδος εμβολιασμού αποτελούσε ένα μίγμα των παραπάνω τριών βακτηριακών στελεχών.

Όταν το αλόφυτο *J. acutus* εκτέθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, η προσαρμοσμένη μικτή καλλιέργεια βελτίωσε την απόδοση των φυτών, ώστε να μειωθεί η συγκέντρωση των αναδύομενων οργανικών ρύπων στο νερό. Η σύνθεση της ενδοφυτικής ριζικής κοινότητας άλλαξε για να αντεπεξέλθει στα αυξημένα επίπεδα ρύπων, ενώ τα βακτήρια που εμβολιαστήκαν δεν μετέβαλαν την δομή των ήδη υπαρχόντων κοινοτήτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συνεργατική σχέση μεταξύ των ενδοφυτικών βακτηρίων και του αλόφυτου *J. acutus*, βελτίωσαν την συνολική απόδοση του φυτού να επεξεργαστεί με επιτυχία το ρυπασμένο νερό σε λιγότερο από 20 μέρες, στην πιλοτική μονάδα υγροβιότοπου αποτελούμενη από αλόφυτα *J. acutus*.

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλότερες από το μέσο όρο των συγκεντρώσεων σε τυπικά απόβλητα, συμπεραίνεται ότι το αλόφυτο *J. acutus* με την βοήθεια μικτών καλλιεργειών μερικών ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών από το ριζικό σύστημα και τα φύλλα, αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική λύση για τη θεραπεία φαρμακευτικών ρύπων όπως τα αντιβιοτικά.

Όμως το βασικό ερώτημα είναι πού οφείλεται η κατανάλωση των αντιβιοτικών. Υπάρχουν δύο πιθανές απαντήσεις. Είτε η κατανάλωση των αντιβιοτικών πραγματοποιείται από τα ενδοφυτικά βακτήρια, τα οποία διαθέτουν γονίδια ανθεκτικότητας στα συγκεκριμένα

αντιβιοτικά. Με αυτό το τρόπο, επιβιώνουν και χρησιμοποιούν τα αντιβιοτικά ως πηγή οργανικού φορτίου. Είτε η κατανάλωση των αντιβιοτικών γίνεται από το ίδιο το φυτό, χωρίς την συνεισφορά των βακτηρίων. Το φυτό απορροφάει τις χημικές αυτές ουσίες και τις αποθηκεύει σε ειδικά οργανίδια, τα χυμοτόπια, ώστε να προστατευτεί από την τοξικότητά τους. Η παρούσα εργασία έχει σκοπό την απάντηση του ερωτήματος αυτού, μέσω της ανίχνευσης γονιδίων ανθεκτικότητας στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά, που χρησιμοποιήθηκαν, σε ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες.

### Σουλφαμεθοξαζόλη

Η αύξηση της βιο-ποικιλότητας στο ριζικό σύστημα των φυτών είχε άμεσα θετικά αποτελέσματα. Η ικανότητα των φυτών να μειώσουν την συγκέντρωση της σουλφαμεθοξαζόλης στο νερό, συσχετίζεται με την επίδραση του εμβολιασμού σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού (0,25 mg/L). Τα φυτά που δεν είχαν βιο-ενισχυθεί, μείωσαν το αντιβιοτικό κατά 72,4% από το νερό σε 14 ημέρες, ενώ όλα τα εμβολιασμένα φυτά απομάκρυναν περισσότερο από το 90% του αντιβιοτικού. Ενώ μετά από 21 ημέρες η συγκέντρωση του αντιβιοτικού ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης σε όλα τα δείγματα νερού των εμβολιασμένων ή μη φυτών. Αξιοσημείωτο είναι ότι στα φυτά που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus* sp. R12, η συγκέντρωση του αντιβιοτικού ήταν κάτω του ανιχνεύσιμου ορίου στις 14 ημέρες.

Για υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικού, η αρχική συγκέντρωση της σουλφαμεθοξαζόλης έγινε διπλάσια (0,5 mg/L). Την 14<sup>η</sup> ημέρα, όλα τα φυτά ανεξαρτήτως εμβολιασμού είχαν περίπου 90% απομάκρυνση του αντιβιοτικού από το νερό, ενώ στην 21<sup>η</sup> ημέρα, τα εμβολιασμένα φυτά παρουσίασαν μεγαλύτερη απομάκρυνση του αντιβιοτικού σε σχέση με τα μη εμβολιασμένα φυτά, με εξαίρεση τα φυτά που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus* sp. R12, όπου η μείωση ήταν παρόμοια με τα μη εμβολιασμένα. Συμπερασματικά, τα εμβολιασμένα φυτά απέδωσαν καλύτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, εκτός από τον εμβολιασμό με το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus* sp. R12, που απέδωσε καλύτερα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Επίσης, τα μη εμβολιασμένα φυτά απέδωσαν καλά και στις 2 περιπτώσεις, με γρηγορότερη απόδοση στην περίπτωση με την υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από την ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας, επιβεβαιώνεται ότι η κατανάλωση της σουλφαμεθοξαζόλης πραγματοποιείται από τα ενδοφυτικά βακτήρια. Εντοπίστηκαν σημαντικές συγκεντρώσεις γονιδίου ανθεκτικότητας *sul1*

σε 35 από 47 ενδοφυτικές κοινότητες που εξετάστηκαν (74,5%). Η ποσότητα αντιγράφων γονιδίων που παρατηρήθηκε στα δείγματα που είχαν υποστεί υψηλής συγκέντρωσης ρύπανση ήταν μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα δείγματα που είχαν υποστεί χαμηλότερη συγκέντρωση ρύπου. Αυτό υποδηλώνει ότι με την μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιβιοτικού, τα βακτήρια τα οποία κατείχαν το γονίδιο ανθεκτικότητας στην σουλφαμεθοξαζόλη είχαν το ανταγωνιστικό πλεονέκτημα υπέρ των βακτηρίων που δεν είχαν το γονίδιο ανθεκτικότητας με αποτέλεσμα να μπορούν να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται. Γι' αυτό και η ποσότητα των αντιγράφων γονιδίων στα δείγματα με την υψηλή συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη, με εξαίρεση τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus* sp. R12, όπου μεγαλύτερη ποσότητα αντιγράφων γονιδίων είχε στην χαμηλότερη συγκέντρωση.

Την μεγαλύτερη ποσότητα αντιγράφων γονιδίων την είχαν τα μη εμβολιασμένα δείγματα με χαμηλή αλλά και υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικού, πράγμα που υποδηλώνει ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά υπάρχουν στο υδάτινο περιβάλλον, με υψηλό κίνδυνο εξάπλωσης. Η ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας σε μη εμβολιασμένα δείγματα χωρίς παρουσία αντιβιοτικού αποδεικνύει την ανάπτυξη γενετικών μηχανισμών ανθεκτικότητας στα περιβαλλοντικά βακτηριακά στελέχη, συνεισφέροντας στη εξάπλωση της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον.

#### Σιπροφλοξασίνη

Παρόλο που το συγκεκριμένο αντιβιοτικό απομακρύνθηκε από αρκετά φυτά βιο-ενισχυμένα ή μη στη πιλοτική μονάδα υδροβιότοπου με αλόφυτα *J. acutus* (Syranidou et al., 2016), δεν ανιχνεύθηκε κανένα γονίδιο ανθεκτικότητας για αυτό το αντιβιοτικό. Το αποτέλεσμα αυτό δεν μπορεί να είναι οριστικό καθώς δεν ανιχνεύθηκε μέσω της απλής PCR σε τυχαία δείγματα. Τα δείγματα που εξετάστηκαν για αυτό το γονίδιο ήταν 30 για το γονίδιο *aac(6')-Ib-cr* και 10 για καθένα από τα υπόλοιπα 5 γονίδια (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*). Συνολικά έγιναν 80 δόκιμες χωρίς θετικό αποτέλεσμα, όμως αυτό δεν υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει το γονίδιο, καθώς οι δοκιμές έγιναν μέσω της απλής PCR, η οποία δεν είναι τόσο ακριβής, όσο η *real - time* PCR. Δεν πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στην *real - time* PCR, διότι δεν υπήρχε δυνατότητα κατασκευής των πρότυπων καμπυλών για την ποσοτικοποίηση αγνώστων δειγμάτων.

Υπάρχει μεγάλη πιθανότητα ύπαρξης γονιδίων ανθεκτικότητας γι' αυτό το αντιβιοτικό, καθώς στη μελέτη (Syranidou et al., 2016) τα ποσοστά απομάκρυνσης της σιπροφλοξασίνης από το νερό κυμαίνονταν από 34-79%, ανάλογα τον τύπο βιο-ενίσχυσης και την συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Το ότι ήταν αδύνατο να εντοπιστούν γονίδια σε 80 ενδοφυτικές κοινότητες,

ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι οι ποσότητες το γονιδίων είναι πολύ μικρές και θα ήταν ανιχνεύσιμες μόνο με την διαδικασία της real -time PCR. Χαμηλή ποσότητα γονιδίου μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι παρ' όλο που υπάρχουν βακτήρια με το γονίδιο ανθεκτικότητας, η συγκέντρωση της σιπροφλοξασίνης δεν ήταν αρκετά υψηλή (μέγιστη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε 0,12 mg/L), ώστε τα στελέχη να αποκτήσουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι αυτών που δεν έχουν το γονίδιο.

Το να μην υπάρχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στις ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες είναι ένα ενδεχόμενο, που πρέπει να ληφθεί υπόψη, καθώς η κατανάλωση της σιπροφλοξασίνης, μπορεί να μη γίνεται από τις ενδοφυτικές κοινότητες, αλλά από το ίδιο το φυτό. Το αλόφυτο *J. acutus* θα μπορούσε να είναι αυτό που απομακρύνει το αντιβιοτικό από το νερό, καθώς η μέγιστη συγκέντρωση του δεν είναι και τόσο υψηλή, όσο της σουλφαμεθοξαζόλης. Το φυτό, καθώς απορροφάει το αντιβιοτικό ενδοφυτικά, το αποθηκεύει σε ειδικά οργάνδια, τα χυμοτόπια, για να αποφύγει την τοξικότητα των χημικών αυτών ενώσεων ή συσσωρεύει το αντιβιοτικό στους φυτικούς του ιστούς. Όμως, εφόσον δεν ολοκληρώθηκε η ανίχνευση των γονιδίων μέσω μιας ακριβούς μεθόδου (real - time PCR), δεν γίνεται να υπάρχουν συμπεράσματα, παρά μόνο υποθέσεις γι' αυτό το αντιβιοτικό.

#### Τετρακυκλίνη - Αμπικιλίνη

Τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά δεν εξετάστηκαν στο αρχικό πείραμα (Syranidou et al., 2016). Τα αποτελέσματα βγήκαν αρνητικά σε 24 διαφορετικές ενδοφυτικές βακτηριακές κοινότητες για κάθε εξεταζόμενο γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (tetA και tetM), μέσω της μεθόδου real - time PCR, καθώς και σε 24 δείγματα για τη αμπικιλίνη (ampC). Παρ' όλα αυτά, η απουσία γονιδίων για τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ύπαρξης κάποιου άλλου γονιδίου ανθεκτικότητας για την τετρακυκλίνη και την αμπικιλίνη που δεν εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία.

## 6. Μελλοντικές προτάσεις

Για μια ολοκληρωμένη εικόνα θα ήταν προτιμότερο να εξεταστούν περαιτέρω τα παρακάτω.

- Δοκιμή άλλων γονιδίων ανθεκτικότητας για τα αντιβιοτικά σιπροφλοξασίνη, τετρακυκλίνη και αμπικιλίνη.
- Επανάληψη πειράματος στην πιλοτική μονάδα με αυξημένη συγκέντρωση σιπροφλοξασίνης.
- Επανάληψη πειράματος στην πιλοτική μονάδα με προσθήκη και άλλων αντιβιοτικών.
- Δοκιμή ανίχνευσης γονιδίων ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη σε απομονωμένα βακτηριακά στελέχη, εκτός του φυτού, για την δημιουργία πρότυπων καμπυλών.
- Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά σε πλασμιδιακό και χρωμοσωμικό γενετικό υλικό ξεχωριστά.

## 7. Βιβλιογραφία

- Akinbowale, O. L., Peng, H., & Barton, M. D. (2006). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 1103–1113. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02812.x>
- Alonso, A., Sánchez, P., & Martínez, J. L. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 3(1), 1–9. <http://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00161.x>
- Amorim CL, Moreira IS, Maia AS, Tiritan ME, C. P. (2013). Biodegradation of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin as single and mixed substrates by *Labrys portucalensis* F11. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 3181–3190.
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(7), 465–78. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3270>
- Avila, C., Reyes, C., Bayona, J. M., & García, J. (2013). Emerging organic contaminant removal depending on primary treatment and operational strategy in horizontal subsurface flow constructed wetlands: Influence of redox. *Water Research*, 47(1), 315–325. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.005>
- Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–265. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
- Benotti, M. J., & Brownawell, B. J. (2009). Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. *Environmental Pollution*, 157(3), 994–1002. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.10.009>
- Bouldin, J. L., Farris, J. L., Moore, M. T., Smith, S., & Cooper, C. M. (2006). Hydroponic uptake of atrazine and lambda-cyhalothrin in *Juncus effusus* and *Ludwigia peploides*. *Chemosphere*, 65(6), 1049–1057. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.031>
- Bradford, P. (2001). Extended spectrum betalactamase in the 21 century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. *Clinical Microbiol Rev*, 14(4), 933–951. <http://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933>
- Burken, J. G., & Schnoor, J. L. (1998). Predictive relationships for uptake of organic contaminants by hybrid poplar trees. *Environmental Science and Technology*, 32(21), 3379–3385. <http://doi.org/10.1021/es9706817>
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C. J., & Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(2), 394–397. <http://doi.org/10.1093/jac/dkm204>
- Chen, H., & Zhang, M. (2013). Occurrence and removal of antibiotic resistance genes in municipal wastewater and rural domestic sewage treatment systems in eastern China. *Environment International*, 55, 9–14. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2013.01.019>
- Clarke, B. O., & Smith, S. R. (2011). Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International*, 37(1), 226–247. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2010.06.004>
- Costanzo, S. D., Murby, J., & Bates, J. (2005). Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*, 51(1–4), 218–223. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.10.038>
- D’Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, W. G. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311(5759), 374–377.
- Dodgen, L. K., Li, J., Parker, D., & Gan, J. J. (2013). Uptake and accumulation of four PPCP/EDCs in two leafy vegetables. *Environmental Pollution*, 182, 150–156. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.038>
- Dordio, A. V., Belo, M., Martins Teixeira, D., Palace Carvalho, A. J., Dias, C. M. B., Picó,

- Y., & Pinto, A. P. (2011). Evaluation of carbamazepine uptake and metabolism by *Typha* spp., a plant with potential use in phytotreatment. *Bioresource Technology*, 102(17), 7827–7834. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.050>
- García-Galán, M. J., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2011). Occurrence of sulfonamide residues along the Ebro river basin. Removal in wastewater treatment plants and environmental impact assessment. *Environment International*, 37(2), 462–473. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2010.11.011>
- García-Rodríguez A, Matamoros V, Fontàs C, S. V. (2014). The ability of biologically based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants-a review. *Environ Sci Pollut Res Int*, 21, 11708–11728.
- Hawker, D. W., Cropp, R., & Boonsaner, M. (2013). Uptake of zwitterionic antibiotics by rice (*Oryza sativa* L.) in contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 263, 458–466. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.066>
- Hurtado, C., Domínguez, C., Pérez-Babace, L., Cañameras, N., Comas, J., & Bayona, J. M. (2016). Estimate of uptake and translocation of emerging organic contaminants from irrigation water concentration in lettuce grown under controlled conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 305, 139–148. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.11.039>
- Imfeld, G., Braeckevelt, M., Kusch, P., & Richnow, H. H. (2009). Monitoring and assessing processes of organic chemicals removal in constructed wetlands. *Chemosphere*, 74(3), 349–362. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.062>
- Jacobs, L., & Chenia, H. Y. (2007). Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *International Journal of Food Microbiology*, 114(3), 295–306. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.030>
- Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., López de Alda, M., Pujades, E., & Barceló, D. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Science of the Total Environment*, 440, 82–94. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.029>
- Kern, M. B., Klemmensen, T., Frimodt-Møller, N., & Espersen, F. (2002). Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(4), 513–516. <http://doi.org/10.1093/jac/dkf164>
- Kim, S., & Aga, D. S. (2007). Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 10(8), 559–573. <http://doi.org/10.1080/15287390600975137>
- Kim SH, Kwak Y, Lee M, Kim N, Jeong J, K. Y. (2004). Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *E. coli* from Korea. *American Society for Microbiology*, 119.
- Kõljalg, S., Truusalu, K., Vainumäe, I., Stsepetova, J., Sepp, E., & Mikelsaar, M. (2009). Persistence of *Escherichia coli* clones and phenotypic and genotypic antibiotic resistance in recurrent urinary tract infections in childhood. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), 99–105. <http://doi.org/10.1128/JCM.01419-08>
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. *Chemosphere*, 75(4), 435–441. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.006>
- LaPara T.M., Burch T.R., McNamara P.J., Tan D.T., Y. M. & E. J. J. (2011). Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-Superior Harbor. *Environmental Science and Technology*, 45(22), 9543–9549.
- Lapworth, D. J., Baran, N., Stuart, M. E., & Ward, R. S. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, 163, 287–303. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.034>
- Larcher, S., & Yargeau, V. (2012). Biodegradation of sulfamethoxazole: Current knowledge and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2), 309–318. <http://doi.org/10.1007/s00253-012-4326-3>

- Le-Minh, N., Khan, S. J., Drewes, J. E., & Stuetz, R. M. (2010). Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water Research*, 44(15), 4295–4323. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.020>
- Leung H.W., Minh T.B., Murphy M.B., Lam J.C.W., So M.K., Martin M., L. P. K. & R. B. J. (2012). Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. *Environmental International*, 42, 1–9.
- Li, J., Wang, T., Shao, B., Shen, J., Wang, S., & Wu, Y. (2012). Plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic residues in wastewater and soil adjacent to swine feedlots: Potential transfer to agricultural lands. *Environmental Health Perspectives*, 120(8), 1144–1149. <http://doi.org/10.1289/ehp.1104776>
- Li, X., & Nikaido, H. (2007). *Efflux-mediated drug resistance in bacteria*. *Drugs* (Vol. 69). <http://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000.Efflux-Mediated>
- Loos, R., Carvalho, R., António, D. C., Comero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., ... Gawlik, B. M. (2013). EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Research*, 47(17), 6475–6487. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.024>
- Malchi, T., Maor, Y., Tadmor, G., Shenker, M., & Chefetz, B. (2014). Irrigation of root vegetables with treated wastewater: Evaluating uptake of pharmaceuticals and the associated human health risks. *Environmental Science and Technology*, 48(16), 9325–9333. <http://doi.org/10.1021/es5017894>
- Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., ... Alvarez, P. J. J. (2015). Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 85, 458–466. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.010>
- Marti, E., & Balcázar, J. L. (2013). Real-time PCR assays for quantification of qnr genes in environmental water samples and chicken feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1743–1745. <http://doi.org/10.1128/AEM.03409-12>
- Marti, E., Variatza, E., & Balcazar, J. L. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 22(1), 36–41. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.001>
- Martínez-Martínez L., P. A. & J. G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*, 351(9105), 797–799.
- Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157(11), 2893–2902. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.051>
- Medeiros, A. (1984). Beta-Lactamases. *British Medical Bulletin*, 40(1), 18–27.
- Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P., & Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology*, 162(1), 328–334.
- 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), 681–693. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.033>
- Nguyen-Disteche M., L.-B. M. & G. J. M. (1982). Isolation of the membrane-bound 26000-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), 109–115.
- Paauw A, Fluit AC, Verhoef J, L.-V. M. (2004). A major outbreak with plasmid-mediated, qnr encoded, quinolone resistance. *American Society for Microbiology*, 125.
- Pal, A., Gin, K. Y. H., Lin, A. Y. C., & Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment*, 408(24), 6062–6069. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.026>
- Peng, X., Ou, W., Wang, C., Wang, Z., Huang, Q., Jin, J., & Tan, J. (2014). Occurrence and ecological potential of pharmaceuticals and personal care products in groundwater and reservoirs in the vicinity of municipal landfills in China. *Science of the Total Environment*, 490, 889–898. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.068>

- Prosser, R. S., & Sibley, P. K. (2015). Human health risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in plant tissue due to biosolids and manure amendments, and wastewater irrigation. *Environment International*, 75, 223–233. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.020>
- Pruneau, M., Mitchell, G., Moisan, H., Dumont-Blanchette, É., Jacob, C. L., & Malouin, F. (2011). Transcriptional analysis of antibiotic resistance and virulence genes in multiresistant hospital-acquired MRSA. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 63(1), 54–64. <http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00830.x>
- Rao, J. Srinivasa, vejendla.ravikumar, Ravali Nacham, Varnalatha Kachakayala, K. . (2013). Rapid UPLC method for simultaneous estimation of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical dosage forms. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 3(2), 1746–1751.
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., ... Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment*, 447, 345–360. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>
- Robicsek, A., Sahm, D. F., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Hooper, C., Robicsek, A., ... Hooper, D. C. (2005). Broader Distribution of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 3001–3003. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.7.3001>
- Rodríguez-Martínez, J. M., Pascual, A., García, I., & Martínez-Martínez, L. (2003). Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type  $\beta$ -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 703–706. <http://doi.org/10.1093/jac/dkg388>
- Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, P. Á. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance: An update. *J Infect Chemother*, 17, 149–182.
- Rodríguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Martí, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., ... Balcázar, J. L. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234–242. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- Rodríguez-Mozaz, S., & Weinberg, H. S. (2010). Meeting report: pharmaceuticals in water-an interdisciplinary approach to a public health challenge. *Environmental Health Perspectives*, 118(7), 1016–1020. <http://doi.org/10.1289/ehp.0901532>
- 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. *Microbiology Ecology*, 43(3), 325–335. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x/full>
- Sidrach-Cardona, R., Hijosa-Valsero, M., Martí, E., Balcázar, J. L., & Becares, E. (2014). Prevalence of antibiotic-resistant fecal bacteria in a river impacted by both an antibiotic production plant and urban treated discharges. *Science of the Total Environment*, 488–489(1), 220–227. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.100>
- Speer, B. S., Shoemaker, N. B., & Salyers, A. A. (1992). Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(4), 387–99. <http://doi.org/10.1128/CMR.5.4.387>. Updated
- Speldooren, V., Heym, B., Labia, R., & Nicolas-Chanoine, M. H. (1998). Discriminatory detection of inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(4), 879–884.
- Syranidou, E., Christofilopoulos, S., Gkavrou, G., Thijs, S., Weyens, N., Vangronsveld, J., & Kalogerakis, N. (2016). Exploitation of endophytic bacteria to enhance the phytoremediation potential of the wetland helophyte *Juncus acutus*. *Frontiers in Microbiology*, 7(July), 1–15. <http://doi.org/10.3389/fnana.2016.00015>
- Syranidou, E., Christofilopoulos, S., Politi, M., Weyens, N., Venieri, D., Vangronsveld, J., & Kalogerakis, N. (2016). Bisphenol-A removal by the halophyte *Juncus acutus* in a

- phytoremediation pilot: Characterization and potential role of the endophytic community. *Journal of Hazardous Materials*, 323, 350–358.  
<http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.034>
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Krahm, I., Pühler, A., & Schlüter, A. (2005). Sequence of the 68,869 bp IncP-1α plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid*, 53(3), 218–238. <http://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.09.004>
- Thomaidi, V. S., Stasinakis, A. S., Borova, V. L., & Thomaidis, N. S. (2015). Is there a risk for the aquatic environment due to the existence of emerging organic contaminants in treated domestic wastewater? Greece as a case-study. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 740–747. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.023>
- Varela, A. R., André, S., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2014). Insights into the relationship between antimicrobial residues and bacterial populations in a hospital-urban wastewater treatment plant system. *Water Research*, 54, 327–336.  
<http://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.003>
- Vatopoulos, A. C., Kalapothaki, V., Legakis, N. J., Antoniadis, G., Arhondidou, E., Chatzipanagiotou, S., ... Legakis, N. J. (1999). Bacterial resistance to ciprofloxacin in Greece: Results from the national electronic surveillance system. *Emerging Infectious Diseases*, 5(3), 471–476. <http://doi.org/10.3201/eid0503.990325>
- Wang, M., Sahm, D. F., Jacoby, G. a, & Hooper, D. C. (2004). Emerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated with the qnr Gene in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in the United States Emerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated with the qnr Gene in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isola. *Society*, 48(4), 1295–1299. <http://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1295>
- Watkinson, A. J., Murby, E. J., & Costanzo, S. D. (2007). Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Research*, 41(18), 4164–4176.  
<http://doi.org/10.1016/j.watres.2007.04.005>
- Weyens, N., Taghavi, S., Barac, T., van der Lelie, D., Boulet, J., Artois, T., ... Vangronsveld, J. (2009). Bacteria associated with oak and ash on a TCE-contaminated site: Characterization of isolates with potential to avoid evapotranspiration of TCE. *Environmental Science and Pollution Research*, 16(7), 830–843.  
<http://doi.org/10.1007/s11356-009-0154-0>
- Wiegand I, Khalaf N, Al-Agamy MHM, W. B. (2004). First detection of the transferable quinolone resistance determinant in clinical *Providencia stuartii* strains in Egypt. *Clin Microbiol Infect*, 10(3), 64.
- Wu, H., Zhang, J., Ngo, H. H., Guo, W., Hu, Z., Liang, S., ... Liu, H. (2015). A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation. *Bioresource Technology*, 175, 594–601. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.068>
- Wu, X., Ernst, F., Conkle, J. L., & Gan, J. (2013). Comparative uptake and translocation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by common vegetables. *Environment International*, 60, 15–22. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.015>
- Zhang X.X., Z. T. & F. H. H. P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), 397–414.

#### Ελληνική βιβλιογραφία:

- Αρσένη Αντιγόνη, Κλινική Μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων.
- Λαζανάκη, Β., 2010. Η χρήση της Real Time PCR για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων στελεχών βακτηρίου (*E. coli*). Ηράκλειο: Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής.
- Λεγάκης Νίκος Ι., Περόγαμβρος Τάσος Η., Αντιβιοτικά.
- Λεκανίδου Ρ., Τσιτήλου Σ., Ροδάκης Γ., Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία. Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Λεμπέση Ευαγγελία, Μηχανισμοί αντοχής των Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων στα β-λακταμικά αντιβιοτικά. ΕΣΥ Μικροβιολογικό Εργαστήριο Νοσοκομείο Παιδών Αθηνών «Π. & Α. Κυριακού».
- Στυλιανοπούλου, Η., Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction), Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας Ανάπτυξης και Μοριακής Νευρολογίας
- Τσώλη Θεοδώρα, 2011. Όμηροι των υπερβακτηρίων.

#### Βιβλία:

- Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC (2011) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th ed., Chapter 53. McGraw-Hill, New York.
- Jacoby G.A. & Bush K. (2005). Lactam resistance in the 21st century, p.570. In D. G. White, M. N. Alekshun, and P. F. McDermott (ed.), Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B. Levy. ASM Press, Washington, DC.
- Fischer, Janos; Ganellin, C. Robin (2006). Analogue-based Drug Discovery. John Wiley & Sons. pp. 489.
- Nick A. Saunders and Martin A. Lee (2013). Real - time PCR Advanced Technologies and Applications, ISBN 978-1-908230-22-5, Caister Academic Press
- Brown T (2006). Gene cloning and DNA analysis: an introduction. Cambridge, MA: Blackwell Pub. ISBN 978-1-4051-1121-8.
- Kenneth Todar, Antimicrobial Agents in the Treatment of Infectious Disease. Online Textbook of Bacteriology. 2012. [http://textbookofbacteriology.net/antimicrobial\\_4.htm](http://textbookofbacteriology.net/antimicrobial_4.htm)

#### Ιστοσελίδες:

- <http://www.keelpno.gr>
- <https://en.wikipedia.org/wiki/Ampicillin>
- ECDC Surveillance of antimicrobial consumption in Europe
- <http://mrrittner.weebly.com/unit-4-cell-cycle.html>
- [http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial\\_resistance](http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial_resistance)
- [http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial\\_resistance](http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial_resistance)
- The American Society of Health-System Pharmacists
- <https://en.wikipedia.org/wiki/Tetracycline>
- Antimicrobial resistance learning site (AMRLS), 2011
- World Health Organization, 1996. The world health report. Geneva, Switzerland.

## 8. Παράρτημα

### 8.1 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Γονίδια aac(6')-lb-cr, qnrA, qnrB, qnrC, qnrS

Πίνακας 6: Μίγμα αντίδρασης PCR για τα γονίδια aac(6')-lb-cr, qnrA, qnrB, qnrC, qnrS.

Υλικά	Συγκέντρωση στο μίγμα αντίδρασης
PCR mix (10x)	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,25 mM
F-primer (10 μM)	0,2 μM
R-primer (10 μM)	0,2 μM
Taq polymerase (5 units/μl)	2 units
DNA	2 μL

Πίνακας 7: Πρωτόκολλο PCR για τα γονίδια aac(6')-lb-cr, qnrA, qnrB, qnrC, qnrS.

94 °C	5 min	35 cycles
94 °C	1 min	
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
stored at 8 °C		

## Γονίδιο qnrD

Πίνακας 8: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο qnrD.

Υλικά	Συγκέντρωση στο μίγμα αντίδρασης
PCR buffer (10x)	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,2 mM
F-primer (10 μM)	0,2 μM
R-primer (10 μM)	0,2 μM
Taq polymerase (5 units/μl)	2 units
DNA	2 μL

Πίνακας 9: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο qnrD.

94 °C	5 min	35 cycles
94 °C	1 min	
57 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
stored at 8 °C		

## Γονίδιο sul1

Πίνακας 10: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο sul1.

Υλικά	Συγκέντρωση στο μίγμα αντίδρασης
PCR buffer (10x)	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,2 mM
F-primer (10 μM)	1,5 μM
R-primer (10 μM)	1,5 μM
Taq polymerase (5 units/μl)	2 units
DNA	2 μL

Πίνακας 11: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο sul1.

95 °C	5 min	
94 °C	30 sec	35 cycles
55 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	
stored at 8 °C		

## Γονίδιο sul2

Πίνακας 12: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο sul2.

Υλικά	Συγκέντρωση στο μίγμα αντίδρασης
PCR buffer (10x)	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,2 mM
F-primer (10 μM)	1,5 μM
R-primer (10 μM)	1,5 μM
Taq polymerase (5 units/μl)	2 units
DNA	2 μL

Πίνακας 13: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο sul2.

95 °C	5 min	35 cycles
94 °C	30 sec	
69 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	
stored at 8 °C		

### Γονίδιο sul3

Πίνακας 14: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο sul3.

Υλικά	Συγκέντρωση στο μίγμα αντίδρασης
PCR buffer (10x)	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,2 mM
F-primer (10 μM)	1,5 μM
R-primer (10 μM)	1,5 μM
Taq polymerase (5 units/μl)	2 units
DNA	2 μL

Πίνακας 15: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο sul3.

95 °C	5 min	35 cycles
94 °C	30 sec	
49 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	10 min	
stored at 8 °C		

### Γονίδιο tetA, tetM

Πίνακας 16: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο tetA, tetM

Υλικά	Συγκέντρωση στο μίγμα αντίδρασης
PCR buffer (10x)	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	4 mM
dNTPs (10 mM)	0,3 mM
F-primer (10 μM)	0,25 μM
R-primer (10 μM)	0,25 μM
Taq polymerase (5 units/μl)	2 units
DNA	2 μL

Πίνακας 17: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο tetA, tetM.

94 °C	5 min	
94 °C	1 min	35 cycles
55 °C	1 min	
72 °C	5 min	
72 °C	5 min	
stored at 8 °C		

## Γονίδιο ampC

Πίνακας 18: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο ampC.

Υλικά	Συγκέντρωση στο μίγμα αντίδρασης
PCR buffer (10x)	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	4 mM
dNTPs (10 mM)	0,3 mM
F-primer (10 μM)	0,3 μM
R-primer (10 μM)	0,3 μM
Taq polymerase (5 units/μl)	2 units
DNA	2 μL

Πίνακας 19: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο ampC.

94 °C	5 min	35 cycles
94 °C	30 sec	
49 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	
stored at 8 °C		

## Γονίδιο blaTEM

Πίνακας 20: Μίγμα αντίδρασης PCR για το γονίδιο blaTEM.

Υλικά	Συγκέντρωση στο μίγμα αντίδρασης
PCR buffer (10x)	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,4 mM
F-primer (10 μM)	0,5 μM
R-primer (10 μM)	0,5 μM
Taq polymerase (5 units/μl)	2 units
DNA	2 μL

Πίνακας 21: Πρωτόκολλο PCR για το γονίδιο blaTEM.

94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	35 cycles
42 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	
stored at 8 °C		

## 8.2 Μέθοδος ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

### Γονίδιο sul1

Πίνακας 22: Μίγμα αντίδρασης qPCR για το γονίδιο sul1.

Υλικά	Συγκέντρωση στο μίγμα αντίδρασης
SYBR Green (2x)	1x
F-primer (10 μM)	200nm
R-primer (10 μM)	200nm
DNA	2 μL
Τελικός όγκος αντίδρασης	20 μL

Πίνακας 23: Πρωτόκολλο qPCR για το γονίδιο sul1.

95 °C	5 min	
94 °C	30 sec	35 cycles
55 °C	1 min	
72 °C	2 min	
95 °C	15 sec	Melt curve stage
65 °C	1 min	
95 °C	15sec	

Γονίδιο *tetA*, *tetM*

Πίνακας 24: Μίγμα αντίδρασης qPCR για το γονίδιο *tetA*.

Υλικά	Συγκέντρωση στο μίγμα αντίδρασης
SYBR Green (2x)	1x
F-primer (10 μM)	200nm
R-primer (10 μM)	200nm
DNA	2 μL
Τελικός όγκος αντίδρασης	20 μL

Πίνακας 25: Πρωτόκολλο qPCR για το γονίδιο *tetA*, *tetM*

94 °C	5 min	
94 °C	1 min	35 cycles
55 °C	1 min	
72 °C	5 min	
95 °C	15 sec	Melt curve stage
65 °C	1 min	
95 °C	15sec	

Γονίδιο ampC

Πίνακας 26: Μίγμα αντίδρασης qPCR για το γονίδιο ampC.

Υλικά	Συγκέντρωση στο μίγμα αντίδρασης
SYBR Green (2x)	1x
F-primer (10 μM)	200nm
R-primer (10 μM)	200nm
DNA	2 μL
Τελικός όγκος αντίδρασης	20 μL

Πίνακας 27: Πρωτόκολλο qPCR για το γονίδιο ampC.

94 °C	5 min	35 cycles
94 °C	30 sec	
49 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
95 °C	15 sec	Melt curve stage
65 °C	1 min	
95 °C	15sec	