



Πανεπιστήμιο  
Ιωαννίνων



Πανεπιστήμιο  
ΕΚΠΑ



Πανεπιστήμιο  
ΑΠΘ



Πανεπιστήμιο  
Πατρών



Πανεπιστήμιο  
Κρήτης



Πανεπιστήμιο  
Κύπρου

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)**

**«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**«Απομόνωση και μερικός χαρακτηρισμός ανθεκτικών  
σε αντιβιοτικά βακτηρίων της λίμνης Παμβώτιδας και  
της λίμνης Τούμπας»**

**ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΒΟΓΓΟΛΗ**

Βιολόγος

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**





Πανεπιστήμιο  
Ιωαννίνων



Πανεπιστήμιο  
ΕΚΠΑ



Πανεπιστήμιο  
ΑΠΘ



Πανεπιστήμιο  
Πατρών



Πανεπιστήμιο  
Κρήτης



Πανεπιστήμιο  
Κύπρου

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)**

**«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**«Απομόνωση και μερικός χαρακτηρισμός ανθεκτικών  
σε αντιβιοτικά βακτηρίων της λίμνης Παμβώτιδας και  
της λίμνης Τούμπας»**

**ΔΕΣΠΟΙΝΑ ΒΟΓΓΟΛΗ**

Βιολόγος

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**



**Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ  
ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**της κ. Δέσποινας Βόγγολη**

Συν – επιβλέποντες: Ιωάννης Σαΐνης, ΕΕΔΠΠ

Σωτήριος Χατζηκακού, Καθηγητής

Θέμα: «Απομόνωση και μερικός χαρακτηρισμός ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων  
της λίμνης Παμβώτιδας και της λίμνης Τούμπας»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την Ε.Δ.Ε.:.....<sup>A</sup>/...-...-.....

1. Σωτήριος Χατζηκακού, Καθηγητής
2. Νικόλαος Κουρκουμέλης, Επίκουρος Καθηγητής
3. Γεώργιος Ψωμάς, Αναπληρωτής Καθηγητής

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις

---

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.  
Καθηγητής \_\_\_\_\_

---

Ο/Η Γραμματέας



Αφιερώνεται στην οικογένειά μου





## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Δ.Π.Μ.Σ. «Ανόργανη Βιολογική Χημεία» και εκπονήθηκε εξ ολοκλήρου στο Διεπιστημονικό Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας, Κέντρο Βιοτρόπεζας Καρκίνου του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Αρχικά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. κ. Ιωάννη Σαΐνη για την καθοδήγηση και την υπομονή του καθ' όλη τη διάρκεια μέχρι και την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, αλλά και για την αμέριστη ψυχολογική υποστήριξη που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Σωτήριο Χατζηκακού που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης αυτής της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας και μαζί με τη Δρ. κ Χριστίνα Μπαντή, προσέφεραν το σύμπλοκο CIPAG και με καθοδήγησαν για το σχεδιασμό των πειραμάτων. Ευχαριστώ επίσης τους Καθηγητές κ. Νικόλαο Κουρκουμέλη και κ. Γεώργιο Ψωμά που επίσης δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμη ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη Δρ. κ. Αναστασία Τούκα και την κ. Δήμητρα Κουμάση για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη εκπόνηση των πειραμάτων, το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και προπάντων για τη φιλία τους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, Γιώργο και Μαίρη, στον αδερφό μου, Αποστόλη, και στο σύντροφό μου, Χρυσόστομο, για την υποστήριξη, σε όλα τα επίπεδα, και την υπομονή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τυχαία ανακάλυψη της πενικιλίνης έφερε επανάσταση στην αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων και καθιέρωσε τη χρήση των αντιβιοτικών στην καθημερινή ιατρική πρακτική. Το διττό αποτέλεσμα αυτής της ευρείας χρήσης των αντιβιοτικών είναι από τη μία η αποτελεσματική αντιμετώπιση των βακτηριακών λοιμώξεων, πολλές από τις οποίες θανατηφόρες, και από την άλλη η ανάπτυξη πολλαπλής ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αντιβιοτικά. Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η διερεύνηση παρουσίας ανθεκτικών σε αντιβιοτικά και σε βαρέα μέταλλα βακτηρίων στη λίμνη Παμβώτιδα και τη λίμνη Τούμπα (Ηπειρος, Ελλάδα), δύο λίμνες που βρίσκονται κοντά στον αστικό ιστό της πόλης των Ιωαννίνων και δέχονται πιέσεις λόγω δραστηριοτήτων όπως η βιομηχανία, η κτηνοτροφία, η γεωργία και η αργυροτεχνία. Επιβεβαιώθηκε η παρουσία βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά αμοξικιλίνη, κλαβουλανικό οξύ και σιπροφλοξασίνη, καθώς και στο σύμπλοκο CIPAG (σιπροφλοξασίνη – άργυρος). Τα ανθεκτικά βακτήρια σε αρσενικό και νικέλιο κατατάσσονται στα είδη *Anabaena* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Prevotella* sp., *Pedobacter* sp. και *Brevundimonas* sp. Τέλος δεν ανιχνεύθηκε κανένα ανθεκτικό βακτήριο στο χρώμιο. Η παρουσία βακτηρίων με πολλαπλή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά σε ένα φυσικό περιβάλλον αποτελεί μεγάλο πρόβλημα για τη δημόσια υγεία, καθώς τα «superbugs» καταπολεμούνται δύσκολα και επιπλέον μπορούν να αποτελέσουν ένα δυνητικό μέσο διάδοσης γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

## ABSTRACT

The accidental discovery of penicillin revolutionized the treatment of bacterial infections and introduced the use of antibiotics in everyday medical practice. The dual effect of this widespread use of antibiotics is on the one hand the effective treatment of bacterial infections, many of which are fatal; on the other hand, many bacteria develop multiple resistance to antibiotics. The purpose of this study was to investigate the presence of antibiotic and heavy metal resistant bacteria in Lake Pamvotis and Lake Toumpa (Epirus, Greece); two lakes located near the city of Ioannina and which are under continuous pressure due to activities such as industry, livestock, agriculture and silversmithing. The presence of bacteria resistant to antibiotics such as amoxicillin, clavulanic acid, and ciprofloxacin, as well as to the CIPAG complex (ciprofloxacin - silver) was confirmed. These bacteria are classified as *Microcystis* sp., *Anabaena* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Prevotella* sp., *Pedobacter* sp. and *Brevundimonas* sp. Arsenic and nickel resistant bacteria are classified as *Anabaena* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Prevotella* sp., *Pedobacter* sp. and *Brevundimonas* sp. Finally, no bacteria resistant to chromium were detected. The presence of bacteria with multiple antibiotic resistance in a natural environment is a major public health problem, as "superbugs" are difficult to control and can also be a potential spreading resource of antibiotic resistance genes.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>15</b>
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	15
1.1.1. ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΗΣ.....	16
1.1.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ .....	16
1.2. ΑΝΤΟΧΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	22
1.2.1. ΠΙΕΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ .....	26
1.2.2. ΦΥΣΙΚΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ .....	27
1.2.3. ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	28
1.2.3.i. Αντοχή λόγω μεταλλάξεων .....	28
1.2.3.ii. Τροποποίηση του αντιβιοτικού .....	30
1.2.3.iii. Μειωμένη διείσδυση αντιβιοτικού και Εκροή .....	31
1.2.3.iv. Αλλαγές των θέσεων στόχου.....	34
1.2.3.v. Απόκριση του κυττάρου στο περιβαλλοντικό στρες μέσω μετατροπής των μεταβολικών οδών.....	35
1.2.3.vi. Μεταφορά γονιδίων.....	36
1.2.3.vii. Μηχανισμοί αντίστασης από τα Πλασμίδια R.....	42
1.2.3.viii. Εξάπλωση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αντιβιοτικά ....	43
1.2.3.ix. Παρούσα κατάσταση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αντιβιοτικά.....	44
1.2.3.x. Παρούσα κατάσταση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αντιβιοτικά στην Ελλάδα.....	45
1.2.3.xi. Επιτάχυνση της εμφάνισης και της διάδοσης της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας .....	46
1.2.3.xii. Παγκόσμιες δράσεις για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.....	47
1.3.ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ .....	48
1.4. ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ.....	49
1.5. ΛΙΜΝΑΙΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ.....	51
1.5.1. Η ΛΙΜΝΗ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑ .....	52
1.5.1.i. Ανίχνευση αντιβιοτικών στη λίμνη Παμβώτιδα .....	52
1.5.2.ii. Ανίχνευση βαρέων μετάλλων στη λίμνη Παμβώτιδα .....	53
1.5.2. Η ΛΙΜΝΗ ΤΟΥΜΠΙΑ .....	53
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>55</b>

<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>56</b>
3.1. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΡΟΥ ΑΠΟ ΤΙΣ ΛΙΜΝΕΣ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑ ΚΑΙ ΤΟΥΜΠΑ .....	56
3.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΦΘΟΝΙΑΣ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ.....	58
3.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	60
3.3.1. ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	60
3.3.2. ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΕ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ.....	62
3.3.3. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ 16S rDNA ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ .....	63
3.3.4. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ .....	63
3.3.5. ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟΙΧΙΣΗΣ ΓΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ.....	64
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>67</b>
4.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ ΤΗΣ ΛΙΜΝΗΣ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΙΜΝΗΣ ΤΟΥΜΠΑΣ ΥΠΟ ΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ.....	67
4.2. ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΑΛΛΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ .....	71
4.3. ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ .....	74
4.4. ΜΕΡΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ .....	75
<b>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>78</b>
5.1. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΗ ΛΙΜΝΗ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑ ΚΑΙ ΤΗ ΛΙΜΝΗ ΤΟΥΜΠΑ .....	79
5.2. ΤΑ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΩΣ ΡΥΠΟΣ ΣΤΗΝ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑ .....	84
5.3. ΤΟ ΠΡΟΒΛΕΜΑ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	84
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>87</b>

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Ο όρος «αντιβιοτικό» αναφέρεται σε μια φυσική ένωση που παράγεται από έναν μικροοργανισμό και προκαλεί το θάνατο ή την αναστολή της ανάπτυξης ενός άλλου μικροοργανισμού.

Οι ιστορικοί της Ιατρικής υποστηρίζουν ότι φυσικά αντιβιοτικά χρησιμοποιούνταν από το 350 – 550 μΧ (Aminov, 2010, Nelson et al. 2010). Ωστόσο, η ευρεία χρήση των αντιβιοτικών ξεκίνησε στις αρχές του 20ου αιώνα μετά την ανακάλυψη του πρώτου αντιβιοτικού από τον Sir Alexander Fleming, την πενικιλίνη. Πρόκειται για μια ανακάλυψη που προέκυψε τυχαία, μετά από παρατήρηση της επίδρασης που φάνηκε να ασκεί ο κοινός ασκομύκητας του γένους *Penicillium* σε καλλιέργεια σταφυλόκοκκου. Η θεραπευτική ιδιότητα της πενικιλίνης αξιολογήθηκε και αναγνωρίστηκε κατά τον Β Παγκόσμιο Πόλεμο, αφού βοήθησε στην αποτελεσματική αντιμετώπιση των βακτηριακών μολύνσεων από σταφυλόκοκκο και στρεπτόκοκκο. Ο ίδιος ο Fleming επισήμανε τους φόβους του για τα αρνητικά επακόλουθα της κατάχρησης των αντιβιοτικών, στο λόγο του κατά την παραλαβή του Βραβείου Νόμπελ το 1945. Δυστυχώς, επαληθεύτηκε αφού σχεδόν αμέσως μετά την εισαγωγή της πενικιλίνης στην ιατρική πράξη, εντοπίστηκαν τα πρώτα ανθεκτικά στελέχη σταφυλόκοκκου. Από τις αρχές της δεκαετίας του 1950 ξεκίνησε η χρήση νέων αντιβιοτικών, όπως η στρεπτομυκίνη και η τετρακυκλίνη. Το 1953 αποτελεί ορόσημο στην ιστορία των αντιβιοτικών καθώς στην Ιαπωνία απομονώθηκε ένα στέλεχος *Shigella* που εμφάνισε πολλαπλή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι πρώτες ενώσεις με αντιμικροβιακή δράση απομονώθηκαν από ζωντανούς οργανισμούς. Πλέον υπάρχουν αντιβιοτικά που περιέχουν συνθετικά συστατικά ή συντίθενται εξ ολοκλήρου χημικά, όπως είναι τα

σουλφοναμίδια. Γενικά, τα περισσότερα αντιβιοτικά είναι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους με υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας και λίγες παρενέργειες κατά τη λήψη τους. (Madigan et al., 2005). Ο όρος που χρησιμοποιείται κατά κόρον για να περιγράψει όλα αυτά τα αντιμικροβιακά φάρμακα είναι το «αντιβιοτικό», ο οποίος κανονικά αναφέρεται σε φυσικές ουσίες, παραγόμενες από βακτήρια ή μύκητες.

Στην καθημερινή ιατρική πρακτική, η χρήση των αντιβιοτικών είναι συχνή και προορίζεται για την αντιμετώπιση τόσο των ήπιων, όσο και των πιο σοβαρών μικροβιακών λοιμώξεων. Αυτή η ευρεία χρήση αντιβιοτικών είχε διττό αποτέλεσμα. Από τη μία, αύξησε το προσδόκιμο ζωής και βοήθησε στην εξάλειψη ορισμένων θανατηφόρων ασθενειών. Από την άλλη, δεδομένου ότι σε πολλές περιπτώσεις δεν ακολουθούνταν το ορθό πρωτόκολλο χρήσης, οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πολλά βακτήρια που μέχρι πρότινος ήταν ευαίσθητα.

### **1.1.1. ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΛΟΙΜΩΞΗΣ**

Οι όροι «μόλυνση» και «λοιμώξη» συχνά συγχέονται μεταξύ τους. Ως «Μόλυνση» χαρακτηρίζεται η παρουσία ενός παθογόνου μικροοργανισμού στην επιφάνεια ενός αντικειμένου ή στο εσωτερικό ενός ζωντανού οργανισμού. Πολλές φορές το παθογόνο καταφέρνει να διαπεράσει τους εξωτερικούς φραγμούς του ξενιστή και να εισέλθει σε αυτόν (Madigan et al. 2005). Αντίθετα, με τον όρο «λοιμώξη» περιγράφεται μια μολυσματική νόσος προκαλούμενη από παθογόνο μικροοργανισμό, με επακόλουθη συνέπεια την αντίδραση φλεγμονής (Madigan et al. 2005).

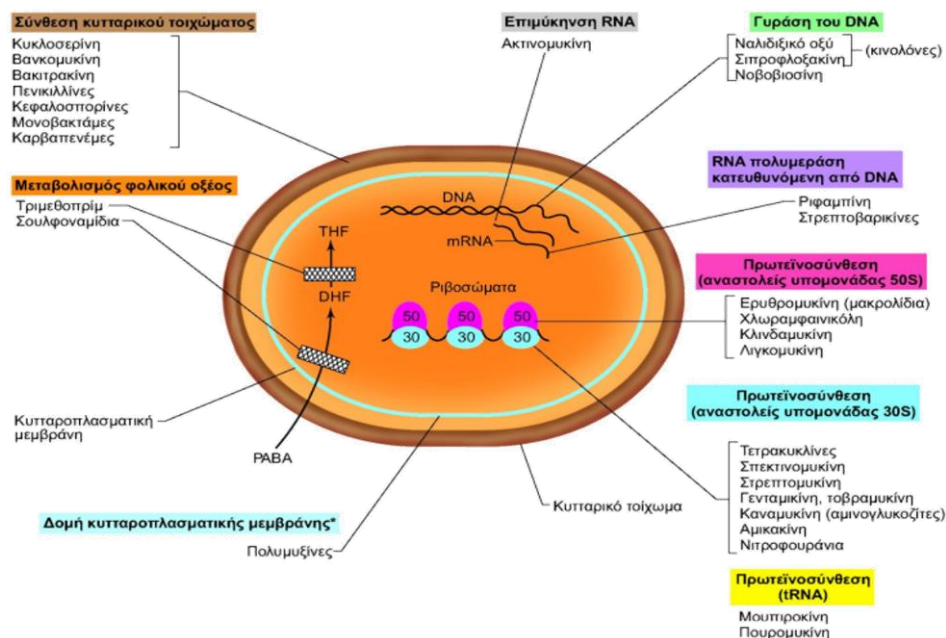
### **1.1.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ**

Μια πρώτη ταξινόμηση των αντιβιοτικών γίνεται με βάση την εστίαση της δράσης τους. Τα αντιβιοτικά περιορισμένου φάσματος στοχεύουν σε ένα συγκεκριμένο τύπο βακτηρίων. Αντίθετα, τα αντιβιοτικά ευρέος φάσματος στοχεύουν σε περισσότερα είδη



και δρουν τόσο κατά των θετικών κατά Gram βακτηρίων [Gram(+)] όσο και κατά των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων [Gram(-)]. Τα Gram(+) βακτήρια συνήθως είναι πιο ευαίσθητα στα αντιβιοτικά συγκριτικά με τα Gram(-) βακτήρια. Βασική θεωρείται και η ομαδοποίηση των αντιβιοτικών με βάση το μηχανισμό δράσης τους. Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί της αντιβιοτικής δράσης είναι:

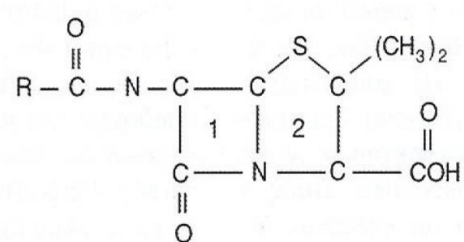
- Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (αντιβιοτικά β – λακτάμης, πολυπεπίδια)
  - Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (Τετρακυκλίνες, Μακρολίδια, Αμινογλυκοσίδια)
  - Αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων (Κινολόνες)
  - Παρεμβολή στη δομή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Πολυμιξίνες)
- (Madigan et al. 2005).



**Εικόνα 1:** Τρόπος δράσης των σημαντικότερων αντιμικροβιακών χημειοθεραπευτικών παραγόντων. THF: τετραϋδροφολικό άλας, DHF: διυδροφολικό άλας. (Πηγή: Βιολογία των Μικροοργανισμών – Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης).

Τέλος, η χημική δομή του κάθε αντιβιοτικού είναι μία ακόμη παράμετρος ομαδοποίησης των αντιβιοτικών ενώσεων στις ακόλουθες κατηγορίες:

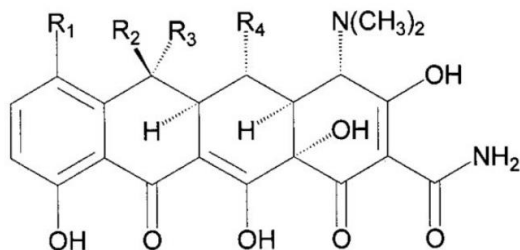
- Β – λακτάμες: πρόκειται για βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση Gram(+) και Gram(-) βακτηρίων και δρουν κατά τη φάση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Τα αντιβιοτικά β – λακτάμης περιέχουν στο μόριο τους έναν β – λακταμικό δακτύλιο, δομή ανάλογη με τις πρωτεΐνες πρόσδεσης της πενικιλίνης (Penicillin binding proteins, PBPs). Η δράση τους έγκειται στη δέσμευση σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, αναστέλλοντας εκλεκτικά τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες οι μονοβακτάμες και οι καρβαπενέμες. Η δράση των β – λακταμικών αντιβιοτικών αναστέλλεται από τις β – λακταμάσες.



**Εικόνα 2:** Απεικόνιση της χημικής δομής της πενικιλίνης G (1: δακτύλιος β – λακτάμης, 2: δακτύλιος θειαζολινίδης, R: C<sub>n</sub>H<sub>2(n+1)</sub>). ((Πηγή: Βιολογία των Μικροοργανισμών – Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης).

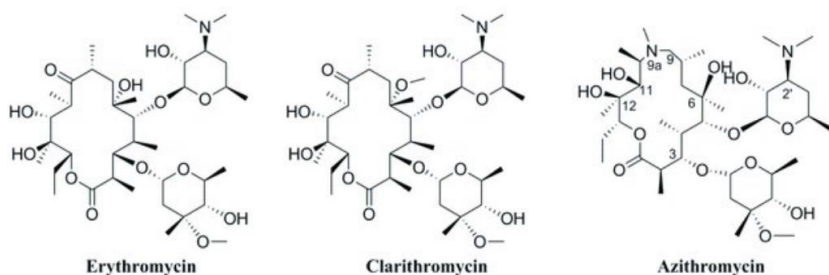
- Τετρακυκλίνες: πρόκειται για τα πρώτα βακτηριοστατικά αντιβιοτικά ευρέος φάσματος που παράχθηκαν από προκαρυώτες. Δρουν αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων, ωστόσο πλέον πολλά βακτήρια είναι ανθεκτικά. Διεσδύουν στο εσωτερικό των κυττάρων και αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων. Συνδέονται στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα των βακτηρίων παρεμποδίζοντας τη σύνδεση του tRNA στο mRNA. Οι τετρακυκλίνες αξιοποιούνται και σε εφαρμογές της κτηνιατρικής,

ενώ σε μερικές χώρες χρησιμοποιούνται ως διατροφικά συμπληρώματα στα ορνιθοτροφεία και τα χοιροτροφεία. Όλα τα αντιβιοτικά αυτού του τύπου περιέχουν την ίδια βασική δομή με τέσσερις δακτυλίους (Yang et al., 2004).



**Εικόνα 3:** Απεικόνιση της χημικής δομής της τετρακυκλίνης όπου R:  $C_nH_{2(n+1)}$ . (Yang et al., 2004).

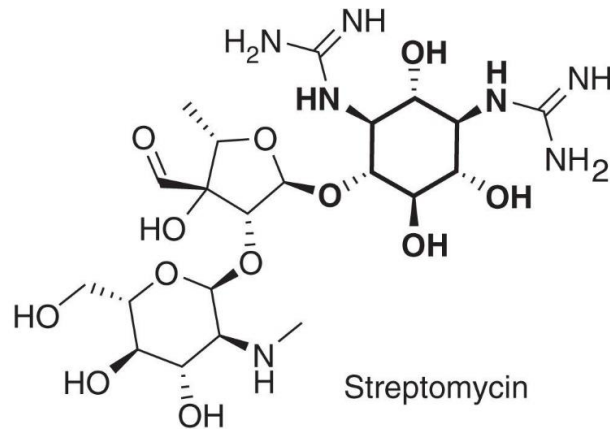
- **Μακρολίδια:** πρόκειται για βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά ευρέος φάσματος, που επίσης παράγονται από προκαρυώτες και δρουν αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, μέσω της σύνδεσης τους στην 50S ριβοσωμική υπομονάδα των βακτηρίων εμποδίζουν την επιμήκυνση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Ο πιο χαρακτηριστικός εκπρόσωπος της ομάδας των μακρολιδίων είναι η ερυθρομυκίνη.



**Εικόνα 4:** Απεικόνιση της χημικής δομής των μακρολιδίων (Wang et al., 2017).

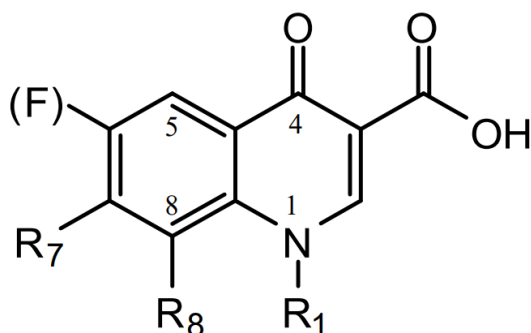
- **Αμινογλυκοζίδες:** πρόκειται για βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά προκαρυωτών (στρεπτομυκίνη, καναμυκίνη) που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση Gram(-) βακτηρίων και δρουν κατά τη φάση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση. Συγκεκριμένα, συνδέονται στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα με αποτέλεσμα τη λανθασμένη ανάγνωση του mRNA

και την αποσύνδεσή του από το ριβόσωμα. Οι αμινογλυκοζίδες αναστέλλονται από τα αμινογλυκοσιδοτροποποιητικά ένζυμα. Οι αμινογλυκοζίδες αποτελούν πλέον εφεδρική λύση στην επιλογή αντιβιοτικού, καθώς έχει βρεθεί πως προκαλούν σοβαρές παρενέργειες και η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών συμβαίνει σχετικά γρήγορα.



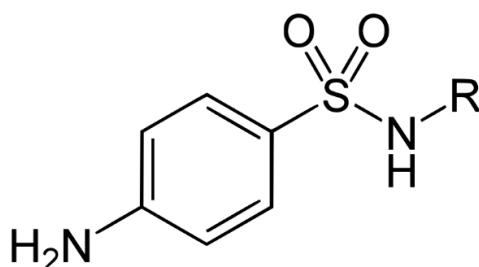
**Εικόνα 5:** Απεικόνιση της χημικής δομής μιας αντιπροσωπευτικής δομής αμινογλυκοζίτη, της στρεπτομυκίνης (Krause et al., 2016).

- Κινολόνες: πρόκειται για συνθετικά βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά φάρμακα που δρουν κατά των Gram(+) και Gram(-) αερόβιων βακτηρίων που προσβάλλουν το ουροποιητικό σύστημα. Οι κινολόνες αναστέλλουν την DNA γυράση, ένα ένζυμο απαραίτητο για την υπέρ - ελίκωση του βακτηριακού DNA κατά τη διαδικασία της αντιγραφής. Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στις κινολόνες εμφανίζεται μέσω της μείωσης της κυτταρικής διαπερατότητας έναντι του μορίου και μέσω μεταλλάξεων στη DNA – γυράση.



**Εικόνα 6:** Απεικόνιση της ελάχιστης δομής μιας κινολόνης, όπου R:  $C_nH_{2(n+1)}$ . (Insuasty et al., 2019).

- Σουλφοναμιδικά φάρμακα: πρόκειται για συνθετικά βακτηριοστατικά φάρμακα που δρουν κατά των Gram(+) και Gram(-) αερόβιων βακτηρίων αποτελώντας ανταγωνιστικούς αναστολείς απαραίτητων μεταβολιτών που συμμετέχουν στη σύνθεση του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, ανταγωνίζονται το p – αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA) και συνδέονται με τη διϋδροπτεροϊκή συνθετάση, αναστέλλοντας τη σύνθεση του φολικού οξέος, πρόδρομης ουσίας των νουκλεϊκών οξέων. Η ανθεκτικότητα στα σουλφοναμίδια μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις που οδηγούν σε μειωμένη κυτταρική διαπερατότητα ή παραγωγή μιας συνθετάσης του φολικού οξέος με μικρότερη συγγένεια στα σουλφοναμίδια. Επίσης αρκετά ανθεκτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν φολικό οξύ εξωγενώς (Madigan et al., 2005).



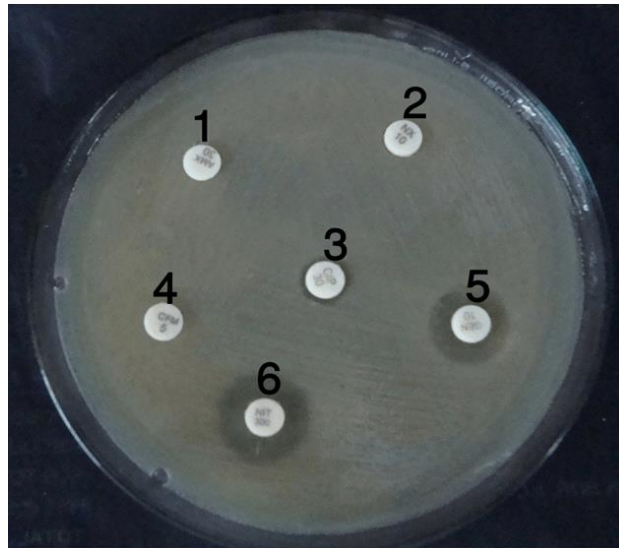
**Εικόνα 7:** Απεικόνιση της γενικής δομής των σουλφοναμιδίων, (<https://www.creative-proteomics.com/products/sulfonamides-125.htm>)

## 1.2. ANTOXH ΣΤΑ ANTIBIOTIKA

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας, σε αντιβιοτικά, στα πιο διαδεδομένα παθογόνα βακτήρια αναγνωρίζεται ως μια σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία που έχει λάβει παγκόσμιες διαστάσεις. Μικροοργανισμοί, ανθεκτικοί σε πολλαπλά αντιβιοτικά, εμφανίζονται πλέον, όχι μόνο σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα, αλλά και εκτός αυτών, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη «δεξαμενών» ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον. Η απόκριση των βακτηρίων στην «επίθεση» του αντιβιοτικού αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα προσαρμογής και εξέλιξης των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, η ανθεκτικότητα είναι η επίκτητη ιδιότητα του βακτηρίου να αντιστέκεται στις επιδράσεις ενός αντιβιοτικού, στο οποίο φυσιολογικά παρουσιάζει ευαισθησία. Η «επιβίωση του πιο ικανού» είναι συνέπεια της τεράστιας γενετικής πλαστικότητας των βακτηρίων, γεγονός που οδηγεί σε προσαρμογή με μεταλλάξεις, πρόσληψη γενετικού υλικού ή αλλοίωση της έκφρασης γονιδίου που προωθεί την ανθεκτικότητα σε όλα σχεδόν τα αντιβιοτικά που είναι διαθέσιμα στην κλινική πρακτική. Έτσι, ακόμη και αν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού βρίσκεται σε θεραπευτικά επίπεδα, η βακτηριακή ανάπτυξη συνεχίζεται κανονικά. Τα ανθεκτικά βακτήρια είναι ικανά είτε να καταστρέψουν το ίδιο το αντιβιοτικό, είτε να εξουδετερώσουν τη δράση του. Τα γονίδια ανθεκτικότητας εντοπίζονται τόσο στο βακτηριακό χρωμόσωμα, όσο και σε πλασμίδια (Munita & Arias, 2015).

Ως εκ τούτου, η κατανόηση της βιοχημικής και γενετικής βάσης της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά είναι πρωταρχικής σημασίας, καθώς κρίνεται απαραίτητη η μείωση της εμφάνισης και της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας, αλλά και η ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών προσεγγίσεων έναντι βακτηρίων με πολλαπλή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.

Η εφαρμογή πρωτοκόλλων που περιλαμβάνουν αντιβιοτικά στην καθημερινή κλινική πρακτική αποτελεί πλέον ρουτίνα, αφού η χορήγησή τους κρίνεται ως απαραίτητη για την πλειονότητα των ιατρικών παρεμβάσεων, ειδικά σε περιπτώσεις ανοσοκατεσταλμένων ασθενών. Δυστυχώς, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μία αξιοσημείωτη αύξηση της μικροβιακής αντοχής σε αντιβιοτικά, ενώ και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας κρούει τον κώδωνα του κινδύνου χαρακτηρίζοντας την αντιμικροβιακή αντοχή ως μία από τις τρεις πιο σημαντικές απειλές του 21ου αιώνα για τη δημόσια υγεία (WHO, 2018). Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από πολύ – ανθεκτικά βακτήρια (MDR, Multi – Drug resistant) συνδέονται με αυξημένη θνησιμότητα σε σύγκριση με εκείνες που προκαλούνται από ευαίσθητα βακτήρια και επιφέρουν σημαντικό οικονομικό βάρος, αφού μόνο για τις ΗΠΑ, το κόστος αντιμετώπισης της αντοχής έχει υπολογιστεί σε πάνω από 20 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως (Sydnor, 2011). Συντηρητικές εκτιμήσεις των Κέντρων Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των ΗΠΑ κάνουν λόγο για 35.000 θανάτους ετησίως, οι οποίοι οφείλονται σε μόλυνση με μικροοργανισμό που παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε ένα τουλάχιστον αντιβιοτικό, ενώ τα ετήσια περιστατικά λοιμώξεων με ανθεκτικά βακτήρια αγγίζουν τα 2,8 εκατομμύρια (CDC, 2019). Επιπλέον, με βάση τις εκτιμήσεις πρόσφατης μελέτης, η αντιμικροβιακή αντοχή αναμένεται να προκαλέσει 300 εκατομμύρια πρόωρους θανάτους ως το 2050 και πλήγμα 100 τρισεκατομμυρίων δολαρίων στην παγκόσμια οικονομία (Review on Antimicrobial Resistance, 2016). Η κατάσταση επιδεινώνεται λόγω της αδυναμίας εύρεσης νέων αντιμικροβιακών ουσιών που θα έχουν αποτέλεσμα, αλλά όχι παρενέργειες.



**Εικόνα 8:** Δοκιμασία ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά του πολυανθεκτικού *E. coli*, σε Mueller Hinton Agar, το οποίο έχει απομονωθεί από δείγμα ούρων (1: Αμοξυκιλίνη, 2: Νορφλοξασίνη, 3: Σιπροφλοξασίνη, 4: Κεφιζίμη, 5: Γενταμυκίνη, 6: Νιτροφουραντίνη).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα πολλαπλής ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά αποτελεί η περίπτωση του βακτηρίου *E. coli*. Στην Εικόνα 8 απεικονίζεται τρυβλίο Mueller Hinton Agar στο οποίο έχει επιστρωθεί πολυανθεκτική καλλιέργεια *E. coli* και ακολουθήθηκε η μέθοδος διάχυσης αντιβιοτικού με εμποτισμένους δίσκους. Παρατηρείται ότι για αρκετά από αυτά τα αντιβιοτικά δεν υπάρχει σαφής ζώνη αναστολής.

Η αντιμικροβιακή αντοχή είναι το αναμενόμενο αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης πολλών οργανισμών με το περιβάλλον τους. Οι περισσότερες αντιμικροβιακές ενώσεις είναι μόρια που παράγονται με φυσικό τρόπο και, ως εκ τούτου, τα συνυπάρχοντα βακτήρια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς κατά της δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών προκειμένου να επιβιώσουν. Ωστόσο, το πρόβλημα την αντιμικροβιακής αντοχής δεν καθορίζεται από τα βακτήρια που φιλοξενούν εγγενή γονίδια ανθεκτικότητας αλλά από βακτήρια που αρχικά ήταν ευαίσθητα σε ένα αντιβιοτικό και η αντιμικροβιακή αντοχή αποτελεί πλέον επίκτητο χαρακτηριστικό. Η ανάπτυξη της επίκτητης ανθεκτικότητας μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μεταλλάξεων στα χρωμοσωμικά γονίδια ή λόγω της



απόκτησης των εν λόγω γονιδίων πιθανώς από εγγενώς ανθεκτικούς οργανισμούς με τους οποίους συνυπάρχουν στο περιβάλλον. Επιπλέον, μία πολύ σημαντική παράμετρος της αντιμικροβιακής αντοχής αποτελεί η πολυπλοκότητα του φαινομένου, καθώς η *in vivo* δραστηριότητα ενός φαρμάκου μπορεί να διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από την *in vitro* δραστηριότητα.

Πρόσφατα, το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των ΗΠΑ (CDC, Centers for Disease Control and Prevention) εξέδωσε αναφορά σχετικά με τα πρόσφατα δεδομένα της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας στις ΗΠΑ. Πριν καν ξεκινήσει κανείς την ανάγνωση της αναφοράς μπορεί να καταλάβει την κρισιμότητα της κατάστασης, αφού είναι αφιερωμένη «στις 48.700 οικογένειες που κάθε χρόνο χάνουν έναν αγαπημένο λόγω της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας, και στους αμέτρητους παρόχους υγειονομικής περίθαλψης, ειδικούς της δημόσιας υγείας, ερευνητές και όλους όσους αγωνίζονται με όσα μέσα έχουν» (CDC, 2019). Σύμφωνα με την παραπάνω έκθεση, κάθε χρόνο περισσότεροι από 2,8 εκατομμύρια άνθρωποι έρχονται αντιμέτωποι με ασθένειες που οφείλονται σε ανθεκτικά βακτήρια, ενώ σημειώνονται περίπου 35.000 θάνατοι το χρόνο. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε σχέση με την αντίστοιχη αναφορά του 2013 ο αριθμός των θανάτων έχει μειωθεί, ωστόσο ο αριθμός των μολύνσεων με ανθεκτικά βακτήρια έχει αυξηθεί κατά 50% (CDC 2013).

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά δεν αφορά μόνο τις ΗΠΑ, αλλά αποτελεί μία παγκόσμια απειλή, όπως επισημαίνει τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των ΗΠΑ και της Ευρώπης. Πρόκειται για ένα πολυδιάστατο και πολύπλοκο πρόβλημα, του οποίου η κυριότερη αιτία θεωρείται ότι είναι η υπερκατανάλωση και η κατάχρηση των αντιβιοτικών (Ventola, 2015). Θα πρέπει λοιπόν, να γίνει απόλυτα κατανοητό ότι η χρήση κάποιου αντιβιοτικού ενδείκνυται μόνο για την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων και όχι σε άλλες καταστάσεις,

όπως είναι για παράδειγμα η εποχική γρίπη και οι ιώσεις. Τα βακτήρια, τα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά ονομάζονται βακτήρια πολλαπλής ανθεκτικότητας (Multidrug Resistant Bacteria, MDR) ή αλλιώς υπερβακτήρια (superbugs). Η ανάπτυξη της πολλαπλής ανθεκτικότητας δικαιολογείται δεδομένου ότι οποιοσδήποτε οργανισμός διαβιεί σε ένα δυναμικό και διαρκώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον οφείλει να προσαρμοστεί προκειμένου να επιβιώσει. Όσον αφορά τα βακτήρια, όταν στο περιβάλλον τους υπάρχει διαρκής παρουσία αντιβιοτικού, ορισμένα στελέχη αναπτύσσουν τουλάχιστον ένα μηχανισμό ανθεκτικότητας, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες επιβίωσης σε σχέση με τα ευαίσθητα στελέχη του πληθυσμού. Αποτέλεσμα αυτής της φυσικής διαδικασίας είναι και η αύξηση του ποσοστού των ανθεκτικών στελεχών στο σύνολο του πληθυσμού.

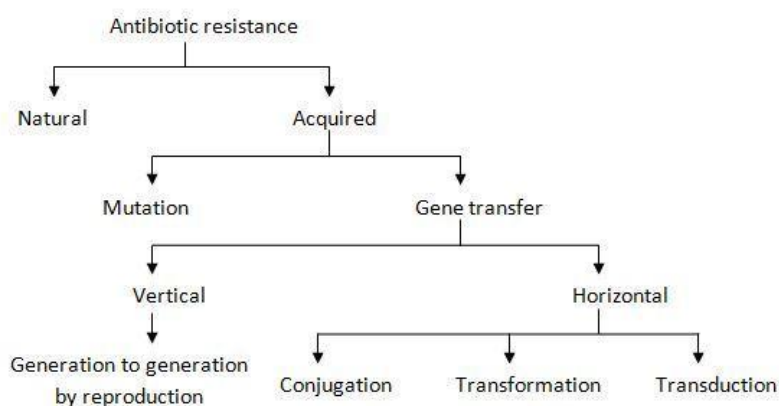
### 1.2.1. ΠΙΕΣΗ ΕΠΙΛΟΓΗΣ

Στην Εικόνα 9 παρουσιάζεται αναλυτικά η διαδικασία επιλογής των ανθεκτικών στελεχών μέσα από ένα μεγάλο πληθυσμό βακτηρίων μετά την έκθεσή τους σε αντιβιοτικό. Ο αριθμός των ευαίσθητων βακτηρίων μηδενίζεται σχεδόν, ενώ τα ανθεκτικά συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα μεταφοράς των γονιδίων ανθεκτικότητας σε ευαίσθητα βακτήρια.



**Εικόνα 9:** Πίεση επιλογής (Πηγή: Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών, cdc.gov)

Η ανθεκτικότητα ενός βακτηρίου έναντι κάποιου αντιβιοτικού μπορεί να αποτελεί είτε φυσικό είτε επίκτητο χαρακτηριστικό. Σύμφωνα με την Εικόνα 10 παρατηρούμε τους τρόπους διάδοσης των γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά μεταξύ των βακτηρίων.



**Εικόνα 10:** Τρόποι διάδοσης των γονιδίων ανθεκτικότητας

### 1.2.2. ΦΥΣΙΚΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ

Ορισμένα βακτήρια διαθέτουν φυσική αντίσταση σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Για παράδειγμα, τα αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση βακτηρίων που δε διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα. Ομοίως, τα περισσότερα Gram(-) βακτήρια είναι ανθεκτικά στα γλυκοπεπτιδικά αντιβιοτικά όπως είναι για παράδειγμα η βανκομυκίνη. Αυτό συμβαίνει επειδή τα μόρια των συγκεκριμένων αντιβιοτικών είναι μεγάλου μοριακού βάρους και δεν είναι δυνατόν να διαπεράσουν τους μικρούς πόρους της εξωτερικής μεμβράνης των Gram(-) βακτηρίων. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι τα βακτήρια που διαθέτουν φυσική ανθεκτικότητα σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό, πρακτικά ποτέ δεν ήταν ευαίσθητα και για αυτό η συγκεκριμένη περίπτωση δεν μπορεί να θεωρηθεί ως φαινόμενο ανάπτυξης ανθεκτικότητας.

### **1.2.3. ΕΠΙΚΤΗΤΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**

Τα βακτήρια διαθέτουν αξιοσημείωτη γενετική πλαστικότητα σε βαθμό που να τους επιτρέπει να ανταποκρίνονται σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών απειλών, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας αντιβιοτικών μορίων που μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο την επιβίωσή τους. Βακτήρια, τα οποία μοιράζονται την ίδια οικολογική θέση με οργανισμούς που παράγουν αντιμικροβιακά φάρμακα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να ανταπεξέλθουν στις επιπτώσεις της επίδρασης του φαρμάκου. Εκτός αυτού, η εγγενής τους αντίσταση παρουσία του αντιβιοτικού, τους επιτρέπει να ευδοκιμήσουν και να κυριαρχήσουν έναντι των άλλων του πληθυσμού που δε διαθέτουν κάποιο γονίδιο ανθεκτικότητας. Τα βακτήρια χρησιμοποιούν δύο κύριες στρατηγικές γενετικής για να προσαρμοστούν στην «επίθεση» των αντιβιοτικών. Πρώτη είναι η επαγωγή μεταλλάξεων κυρίως σε γονίδια που αφορούν το μηχανισμό δράσης της ένωσης. Δεύτερη στρατηγική είναι η απόκτηση ξένου DNA, μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Horizontal Gene Transfer, HGT), το οποίο φέρει γονίδια ανθεκτικότητας σε τουλάχιστον έναν αντιμικροβιακό παράγοντα. Τελικό αποτέλεσμα, με τον έναν ή τον άλλο τρόπο, θα είναι η αλλαγή της σύστασης του πληθυσμού με βάση την ανθεκτικότητά του στο αντιβιοτικό, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω και φαίνεται και στην Εικόνα 9.

#### **1.2.3.i. Αντοχή λόγω μεταλλάξεων**

Οι κληρονομήσιμες αλλαγές των γονιδίων ονομάζονται μεταλλάξεις. Διαφορετικές μεταλλάξεις του ίδιου γονιδίου μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικό τύπο ανθεκτικότητας. Οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε ανθεκτικότητα, αφορούν κυρίως γονίδια που εντοπίζονται σε χρωμόσωμα και όχι σε πλασμίδιο.

Στην περίπτωση των μεταλλάξεων, έστω και ένα βακτηριακό κύτταρο προερχόμενο από ευαίσθητο πληθυσμό είναι ικανό να οδηγήσει σε ανθεκτικό πληθυσμό

αναπτύσσοντας μεταλλάξεις σε γονίδια που επηρεάζουν τη δραστικότητα του αντιβιοτικού. Με την πάροδο των γενεών τα ποσοστά ανθεκτικών και ευαίσθητων θα αλλάζουν, έως ότου τα τελευταία εξαλειφθούν από τον πληθυσμό. Σε πολλές περιπτώσεις, οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντιμικροβιακή αντοχή είναι δαπανηρές για την ομοίωση των κυττάρων και για αυτό το λόγο διατηρούνται μόνο παρουσία του αντιβιοτικού. Γενικά, οι μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντιμικροβιακή αντοχή μεταβάλλουν την αντιβιοτική δράση μέσω των ακόλουθων μηχανισμών:

1. τροποποίηση του αντιβιοτικού – μείωση της συγγένειας για το φάρμακο
2. μείωση της διείσδυσης του αντιβιοτικού ή/και εκροή
3. τροποποίηση στόχου
4. καθολικά προσαρμοσμένη απόκριση του κυττάρου στο περιβαλλοντικό στρες μέσω μετατροπής μεταβολικών οδών

Έτσι, η αντιμικροβιακή αντοχή που προκύπτει λόγω μεταλλάξεων μπορεί να είναι διαφορετική και να ποικίλλει ανάλογα με την πολυπλοκότητα του μηχανισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανθεκτικότητα σε μία κατηγορία αντιβιοτικού μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαφόρων βιοχημικών οδών, αλλά και ότι το ίδιο βακτήριο μπορεί να διαθέτει όχι μόνο έναν, αλλά συνδυασμό αυτών των μηχανισμών αντοχής προκειμένου να ανταπεξέλθει επιτυχώς στην πίεση που του ασκεί ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Άλλωστε είναι μια διαδικασία για την οποία απαιτήθηκαν εκατομμύρια χρόνια εξέλιξης και είναι αναμενόμενη η διαφοροποίηση του μηχανισμού μεταξύ των ειδών.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανθεκτικότητα στις φθοροκινολόνες που μπορεί να επιτευχθεί μέσω τριών διαφορετικών οδών: α) μεταλλάξεις στα γονίδια κωδικοποίησης της DNA γυράσης και της τοποϊσομεράσης IV που αποτελούν τις θέσεις στόχευσης της φθοροκινολόνης, β) υπέρεκφραση των αντλιών εκροής του αντιβιοτικού και γ) προστασία της θέσης στόχου με την πρωτεΐνη Qnr. Έχουν

σημειωθεί περιπτώσεις ταυτόχρονης συνύπαρξης και των τριών μηχανισμών, γεγονός που αυξάνει τα επίπεδα ανθεκτικότητας (Munita & Arias, 2016).

Ωστόσο, η πολυπλοκότητα αυτή δε συναντάται σε όλα τα βακτήρια, έτσι, σε επίπεδο είδους εντοπίζονται διαφορές σχετικά με τον μηχανισμό αντοχής. Για παράδειγμα, η ανθεκτικότητα στις  $\beta$  – λακτάμες στα Gram(-) βακτήρια οφείλεται κυρίως στην παραγωγή  $\beta$  – λακταμασών, ενώ στα Gram(+) βακτήρια οφείλεται κατά κύριο λόγο σε τροποποίηση στόχου και συγκεκριμένα στην τροποποίηση των πρωτεϊνών πρόσδεσης της πενικιλίνης (penicillin – binding proteins, PBPs). Η διαφορά στην ανάπτυξη του μηχανισμού ανθεκτικότητας πιθανώς οφείλεται στις διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ Gram(-) και Gram(+) βακτηρίων και αφορούν τη χημική δομή του κυτταρικού τοιχώματος. Στην περίπτωση των Gram(-) βακτηρίων, η εξωτερική μεμβράνη περιορίζει την είσοδο μορίων στο εσωτερικό του κυττάρου. Προκειμένου μία  $\beta$  – λακτάμη να εισέλθει στο κύτταρο και να φτάσει στην εσωτερική μεμβράνη, όπου βρίσκονται οι PBPs, απαιτείται η παρουσία πορινών. Η μειωμένη εισροή που παρατηρείται στα Gram(-) βακτήρια δίνει πλεονέκτημα χρόνου ώστε να παραχθεί  $\beta$  – λακταμάση σε ικανοποιητική συγκέντρωση και να αντιμετωπιστεί το αντιβιοτικό. Ωστόσο, υπάρχουν και περιπτώσεις παραγωγής  $\beta$  – λακταμασών και από Gram(+) βακτήρια, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το σταφυλόκοκκο (Munita & Arias, 2016).

### **1.2.3.ii. Τροποποίηση του αντιβιοτικού**

Η τροποποίηση του αντιβιοτικού επιτυγχάνεται με την παραγωγή ενζύμων, τα οποία αδρανοποιούν τη δράση του αντιβιοτικού, είτε μειώνοντας τη χημική του συγγένεια με το στόχο προσθέτοντάς του τμήματα, είτε καταστρέφοντάς το.

- Χημική τροποποίηση του αντιβιοτικού: Αποτελεί μηχανισμό ανάπτυξης αντιμικροβιακής αντοχής τόσο στα Gram(+), όσο και στα Gram(-) βακτήρια.

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων ο μηχανισμός αυτός αφορά αντιβιοτικά που παρεμβαίνουν στο ριβόσωμα και αναστέλλουν τη πρωτεϊνοσύνθεση (Wilson, 2014). Τα περισσότερα από αυτά τα τροποποιητικά ένζυμα καταλύουν την ακετυλίωση, τη φωσφορυλίωση ή την αδενυλίωση των μορίων του αντιβιοτικού. Τελικό αποτέλεσμα όλων αυτών των αντιδράσεων είναι η μείωση της συγγένειας του αντιβιοτικού με το στόχο του, γεγονός που οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα (Munita & Arias, 2016). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα τροποποίησης αντιβιοτικού αποτελούν τα τροποποιητικά ένζυμα των αμινογλυκοζιτών (Aminoglycoside Modifying Enzymes, AMEs), τα οποία στοχεύουν και τροποποιούν τις υδροξυλικές και αμινομάδες στο μόριο του αμινογλυκοζίτη (Ramírez & Tolmasky, 2010).

- Καταστροφή του αντιβιοτικού: χαρακτηριστικό παράδειγμα καταστροφής των μορίων του αντιβιοτικού αποτελεί η δράση των β – λακταμασών κατά των αμιδικών δεσμών του δακτυλίου β – λακτάμης. Μελέτες για τις β – λακταμάσες έλαβαν χώρα πριν την κυκλοφορία της πενικιλίνης στην αγορά και θεωρείται ότι υπάρχουν εδώ και εκατομμύρια χρόνια (Abraham & Chain, 1940, D'Costa et al., 2011). Η άμεση εμφάνιση των β – λακταμασών μετά την παραγωγή αντιβιοτικών β – λακτάμης νέας γενιάς αποτελεί ίσως την πιο τρανταχτή απόδειξη της ικανότητας των βακτηρίων να εξελίσσονται και να προσαρμόζονται στις πιέσεις που ασκεί ένα αντιβιοτικό στο περιβάλλον τους. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί περισσότερες από 1000 διαφορετικές β – λακταμάσες (Munita & Arias, 2016).

Τα γονίδια κωδικοποίησης β – λακταμασών γενικά ονομάζονται bla και ακολουθεί ως δείκτης η ονομασία του κάθε ενζύμου. Τέτοια γονίδια εντοπίζονται τόσο στο βακτηριακό χρωμόσωμα, όσο και σε κινητά γενετικά

στοιχεία, ενώ η διάδοσή τους διευκολύνεται όταν αποτελούν μέρος ενός ιντεγκρονίου. Τέλος, η έκφραση τους μπορεί να είναι συνεχής ή να επάγεται μόνο παρουσία του αντιβιοτικού. Λόγω του μεγάλου αριθμού των β – λακταμασών, έχουν προταθεί δύο κύρια συστήματα ταξινόμησης σε τέσσερις ομάδες: α) η ταξινόμηση Ambler, η οποία βασίζεται στην αλληλουχία των αμινοξέων (A, B, C και D) (Bush K, 2013) και β) η ταξινόμηση Bush – Jacoby, η οποία τις διαιρεί και σε υποομάδες σύμφωνα με τη βιοχημική τους λειτουργία, βασιζόμενη κυρίως στην εξειδίκευση υποστρώματος (Bush K, & Jacoby GA, 2010). Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι οι δύο παραπάνω ταξινομήσεις δεν αλληλεπικαλύπτονται πλήρως μεταξύ τους.

### **1.2.3.iii. Μειωμένη διείσδυση αντιβιοτικού και Εκκρόη**

- Μειωμένη Διαπερατότητα: η εξωτερική μεμβράνη των ανθεκτικών βακτηρίων καθίσταται λιγότερο διαπερατή προκειμένου να αποτραπεί η είσοδος του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του κυττάρου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανθεκτικότητα μερικών Gram(-) βακτηρίων έναντι αντιβιοτικών βήτα – λακτάμης. Προκειμένου μια αντιβιοτική ένωση να δράσει, απαιτείται η εισαγωγή της στο ενδοκυττάριο περιβάλλον, όπου βρίσκεται ο στόχος της. Θα πρέπει λοιπόν να υπάρχει δυνατότητα διείσδυσης στο κυτταρικό τοίχωμα, ενώ στην περίπτωση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων ο στόχος πολλές φορές βρίσκεται στην εσωτερική κυτταροπλασματική μεμβράνη και το αντιβιοτικό θα πρέπει να διαπεράσει πρώτα τον επιπλέον φραγμό που θέτει η εξωτερική μεμβράνη. Πάραυτα, πολλά βακτηριακά στελέχη έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που περιορίζουν την εισροή ουσιών από το εξωτερικό προς το εσωτερικό του κυττάρου. Η δράση των υδρόφιλων αντιβιοτικών, όπως οι β – λακτάμες, οι τετρακυκλίνες και κάποιες φθοροκινολόνες επηρεάζεται από



μεταβολές στη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης, αφού για τη διέλευσή τους εκμεταλλεύονται την παρουσία πορινών (Pagès et al., 2008). Παράδειγμα της αποτελεσματικότητας της μειωμένης εισροής αντιβιοτικών στα Gram(-) βακτήρια αποτελεί η ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη, η οποία δεν επιτυγχάνει να διαπεράσει την εξωτερική τους μεμβράνη. Ομοίως, η έμφυτη χαμηλή ευαισθησία των *Pseudomonas* και *Acinetobacter baumannii* σε β – λακτάμες μπορεί να εξηγηθεί, τουλάχιστον εν μέρει, από το μειωμένο αριθμό ή το διαφορετικό τύπο πορινών στην εξωτερική τους μεμβράνη (Hancock & Brinkman, 2002).

- Αντλία Εκροής: μετά την είσοδο του αντιβιοτικού στο εσωτερικό ανθεκτικού βακτηρίου ενεργοποιείται η αντλία εκροής και το εκτοξεύει προς το εξωτερικό του κυττάρου. Η πρώτη περιγραφή συστήματος εκροής αντιβιοτικού χρονολογείται στις αρχές του 1980 και αφορά την εκροή τετρακυκλίνης από το κυτταρόπλασμα *E. coli* (McMurry et al., 1980). Τα γονίδια που κωδικοποιούν την έκφραση των αντλιών εκροής εδράζονται τόσο σε κινητά γενετικά στοιχεία (MGEs), όσο και στο χρωμόσωμα (Munita & Arias, 2016). Οι αντλίες εκροής κατατάσσονται σε 5 μεγάλες οικογένειες ανάλογα με τη δομή τους, την πηγή ενέργειας που αξιοποιούν, το εύρος υποστρωμάτων που μπορούν να εξωθήσουν και τον τύπο των βακτηριακών οργανισμών στους οποίους κατανέμονται. Αυτές είναι: η υπεροικογένεια μεγάλων διαμεσολαβητών (major facilitator superfamily, MFS), η μικρή οικογένεια πολλαπλής ανθεκτικότητας (small multidrug resistance family, SMR), η οικογένεια δέσμευσης ATP (ATP – binding cassette family, ABC) και η οικογένεια εξώθησης πολλαπλών φαρμάκων και τοξικών ενώσεων (multidrug and toxic compound extrusion family, MATE) (Piddock, 2006).

#### 1.2.3.iv. Αλλαγές των Θέσεων Στόχου

Η τροποποίηση της θέσης με την οποία αλληλοεπιδρά το αντιβιοτικό είναι ένας μηχανισμός ανθεκτικότητας που συναντάται σε πολλά είδη βακτηρίων και αφορά διαφορετικά είδη αντιβιοτικών.

- Προστασία της θέσης στόχου: Ο μηχανισμός αυτός αποτρέπει την πρόσδεση του αντιβιοτικού στη θέση στόχο του κυττάρου. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες προστασίας του στόχου εντοπίζονται σε κινητά γενετικά στοιχεία και όχι στο βακτηριακό χρωμόσωμα (Munita & Arias, 2016). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν παράγοντες ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, οι οποίοι κατανέμονται ευρέως μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών ειδών και τα γονίδια που τους κωδικοποιούν εδράζονται σε διάφορα πλασμίδια και σε ευρύ φάσμα συζευκτικών τρανσποζονίων (Connell et al., 2003). Σε αρκετές περιπτώσεις ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη παράγεται ο παράγοντας προστασίας TetO, που ανταγωνίζεται με την τετρακυκλίνη για το «χώρο» κοντά στη θέση πρόσδεσης στο ριβόσωμα. Η γεωμετρία του «χώρου» μεταβάλλεται, η τετρακυκλίνη εκτοπίζεται και τελικά είναι δυνατή η εκκίνηση της πρωτεϊνοσύνθεσης (Li et al., 2013).
- Τροποποίηση της θέσης στόχου: η θέση – στόχος του αντιβιοτικού μπορεί να τροποποιηθεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους, το αποτέλεσμα όμως παραμένει το ίδιο κι αυτό είναι η μείωση της χημικής συγγένειας μεταξύ στόχου και αντιβιοτικού.
  1. Σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τη θέση – στόχο. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα σημειακής μετάλλαξης αποτελεί η μετάλλαξη των γονιδίων *gyrA* και *gyrB* που κωδικοποιούν

τις υπομονάδες της DNA γυράσης, με αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα στις φθοροκινολόνες (Hooper, 2002).

2. Ενζυματικές μεταβολές στη θέση πρόσδεσης του αντιβιοτικού. Ως παράδειγμα αυτής της περίπτωσης έχει περιγραφεί εκτενώς είναι η μεθυλίωση της 50S υπομονάδας του ριβοσώματος, γεγονός που προσδίδει ανθεκτικότητα σε μακρολίδια. Τα γονίδια που κωδικοποιούν το συγκεκριμένο ένζυμο ονομάζονται γονίδια *erm* (erythromycin ribosomal methylation) (Leclercq, 2002).
3. Αντικατάσταση της θέσης – στόχου ή παράκαμψη της μεταβολικής οδού. Μέσω αυτού του μηχανισμού παράγονται νέες δομές που επιτελούν παρόμοιες βιοχημικές λειτουργίες με τις αρχικές αλλά δεν αναστέλλονται από το αντιβιοτικό. Παράδειγμα αντικατάστασης αποτελεί η πρόσληψη εξωγενών PBPs από τον *S. aureus*, με αποτέλεσμα την ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη (Munica & Agias, 2016). Η παράκαμψη της μεταβολικής οδού που αναστέλλει το αντιβιοτικό είναι στην ουσία η υπερπαραγωγή της θέσης – στόχου, έτσι, αυτή η δυσαναλογία οδηγεί στην κατανάλωση των μορίων του αντιβιοτικού (Munica & Agias, 2016).

#### **1.2.3.v. Απόκριση του κυττάρου στο περιβαλλοντικό στρες μέσω μετατροπής των μεταβολικών οδών**

Τα βακτήρια αναγκάζονται να ανταγωνίζονται για τα θρεπτικά συστατικά και παράλληλα να επιβιώνουν από τους αντιμικροβιακούς παράγοντες προκειμένου να επικρατήσουν στον πληθυσμό

### 1.2.3.vi. Μεταφορά Γονιδίων

Τα γονίδια ανθεκτικότητας είναι δυνατό να μεταφερθούν από ένα βακτήριο σε ένα άλλο. Η μεταφορά αυτή μπορεί να είναι κάθετη ή οριζόντια.

Η Κάθετη Γονιδιακή Μεταφορά αφορά μεταφορά γονιδίων από το πατρικό στα θυγατρικά κύτταρα. Η διαδικασία αυτή είναι συνηθισμένη κατά τον πολλαπλασιασμό των βακτηριακών κυττάρων και όχι μόνο.

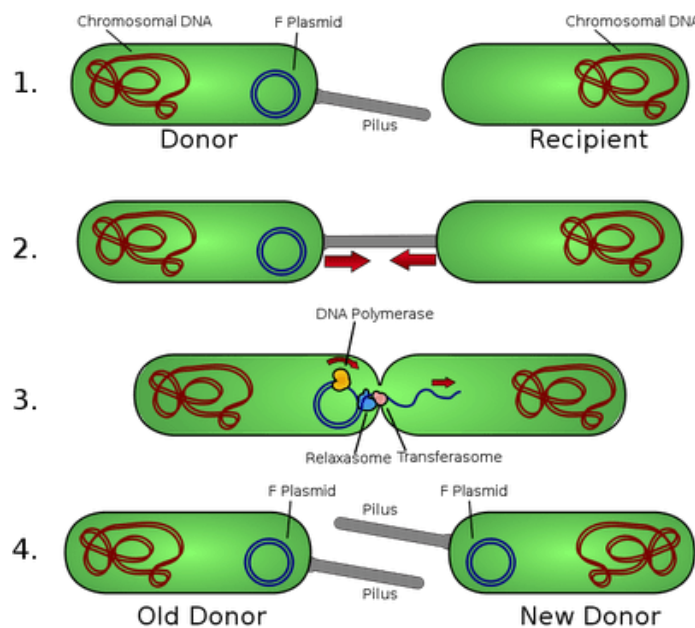
Η απόκτηση ξένου γενετικού υλικού με οριζόντια γονιδιακή μεταφορά (Horizontal Gene Transfer, HGT) είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες προώθησης της εξέλιξης των βακτηρίων και είναι συχνά υπεύθυνη για την ανάπτυξη της αντιμικροβιακής αντοχής. Η HGT μπορεί να λάβει χώρα μεταξύ βακτηρίων του ίδιου ή διαφορετικού είδους, ακόμα και μεταξύ βακτηρίων διαφορετικού γένους. Οι περισσότεροι αντιμικροβιακοί παράγοντες προέρχονται από προϊόντα που βρίσκονται φυσικά στο περιβάλλον και κυρίως στο χώμα. Τα βακτήρια διαβιούν σε περιβάλλον με αυτά τα μόρια περιέχουν γονίδια αντοχής και υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις που υποδηλώνουν ότι το «περιβαλλοντικό ρεσίστωμα» είναι μια παραγωγική πηγή διάδοσης γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά σε παθογόνα στελέχη βακτηρίων που σχετίζονται με την κλινική πρακτική. Ο όρος «ρεσίστωμα» προτάθηκε για να περιγράψει το σύνολο των γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά τόσο των παθογόνων όσο και των μη παθογόνων βακτηρίων (Wright, 2007). Επιπλέον, αυτή η γενετική ανταλλαγή έχει συμβάλει στη διάδοση ανθεκτικότητας σε πολλά συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά.

Τα βακτήρια αποκτούν εξωτερικό γενετικό υλικό μέσω τριών κύριων τρόπων και αυτοί είναι:

- i. Σύζευξη,

- ii. Μετασχηματισμός (ενσωμάτωση γυμνού DNA) και
- iii. Μεταγωγή (διαμεσολάβηση βακτηριοφάγων).

Σύζευξη, είναι η διαδικασία κατά την οποία προκαλείται προσωρινή σύντηξη δύο βακτηριακών κυττάρων και επιτρέπει τη μεταφορά χρωμοσωμικού τμήματος ή πλασμιδίου από το βακτήριο – δότη στο βακτήριο – δέκτη. Το πλασμίδιο ονομάζεται επίσης και παράγοντας γονιμότητας (plasmid F, F: fertility factor) αφού προσδίδει στο δέκτη στα χαρακτηριστικά του δότη. Βακτήρια – δότες του πλασμιδίου F χαρακτηρίζονται ως  $F^+$  ή αρσενικά, ενώ τα βακτήρια – δέκτες χαρακτηρίζονται ως  $F^-$  ή θηλυκά.

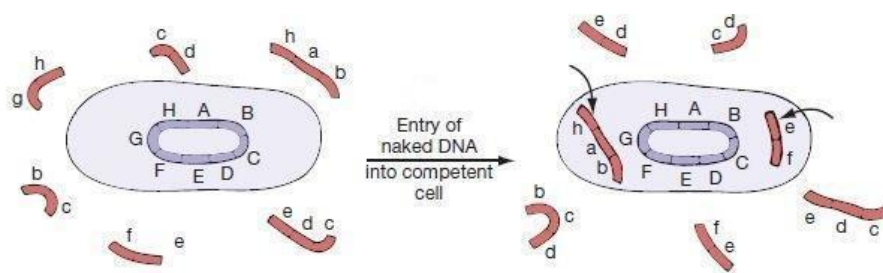


**Εικόνα 11:** Βακτηριακή σύζευξη και μεταφορά πλασμιδίου (Πηγή: <https://microbeonline.com/mechanism-conjugation-bacteria-transfer-f-plasmid/> )

Η διαδικασία της σύζευξης ξεκινάει με μετατροπή της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου προκειμένου να επιτραπεί η διακυτταρική επαφή δότη και δέκτη. Δημιουργείται μία προσωρινή κυτταροπλασματική γέφυρα η οποία λειτουργεί σαν αγωγός μεταφοράς. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς, το βακτήριο – δέκτης

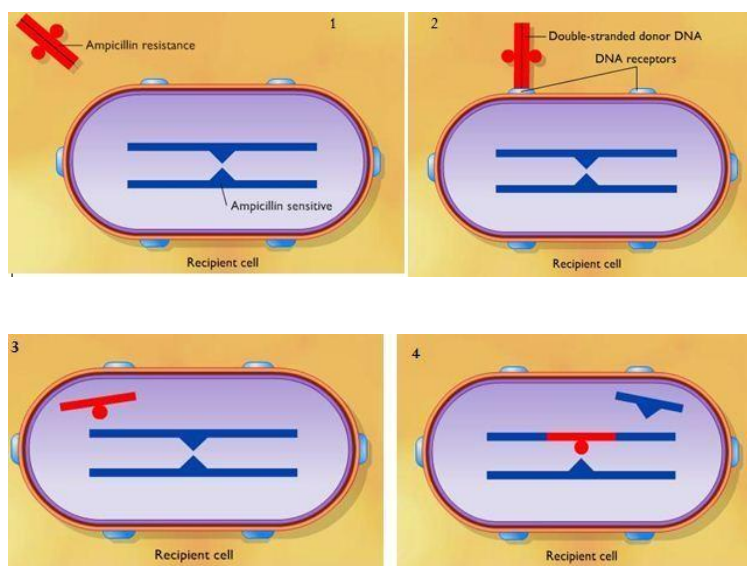
μετατρέπεται και αυτό σε δότης. Η εμφάνιση αντοχής στο νοσοκομειακό περιβάλλον συχνά συνεπάγεται ότι έχει προηγηθεί σύζευξη. Είναι πολύ πιθανή η εμφάνιση υψηλών ποσοστών ανθεκτικότητας λόγω σύζευξης στη γαστρεντερική οδό ασθενών υπό αντιβιοτική αγωγή. Κατά γενικό κανόνα, η σύζευξη χρησιμοποιεί κινητά γενετικά στοιχεία (MGEs) ως οχήματα για να μοιράζονται πολύτιμες γενετικές πληροφορίες, παρόλο που η άμεση μεταφορά από χρωμόσωμα σε χρωμόσωμα έχει επίσης χαρακτηριστεί καλά (Manson JM et al.,2010). Τα σημαντικότερα MGEs είναι τα πλασμίδια και τα τρανσποζόνια, τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη διάδοση της αντιμικροβιακής αντοχής μεταξύ των κλινικών στελεχών.

Μετασχηματισμός, είναι η διαδικασία πρόσληψης γυμνού DNA από το περιβάλλον. Πρόκειται ίσως για τον απλούστερο τύπο HGT, αλλά ελάχιστα κλινικά στελέχη βακτηριακών ειδών είναι σε θέση να ενσωματώσουν φυσικά το γυμνό DNA και να αναπτύξουν αντίσταση. Το ελεύθερο DNA προκύπτει μετά από λύση των βακτηριακών κυττάρων και διάχυση του περιεχομένου τους στο περιβάλλον. Ωστόσο, δυνατότητα πρόσληψης ελεύθερου DNA έχουν μόνο ορισμένα βακτήρια και χαρακτηρίζονται ως επιδεκτικά. Παράδειγμα επιδεκτικών παθογόνων βακτηρίων αποτελούν τα: *Haemophilus* spp, *Streptococcus* spp, *Neisseria* spp.



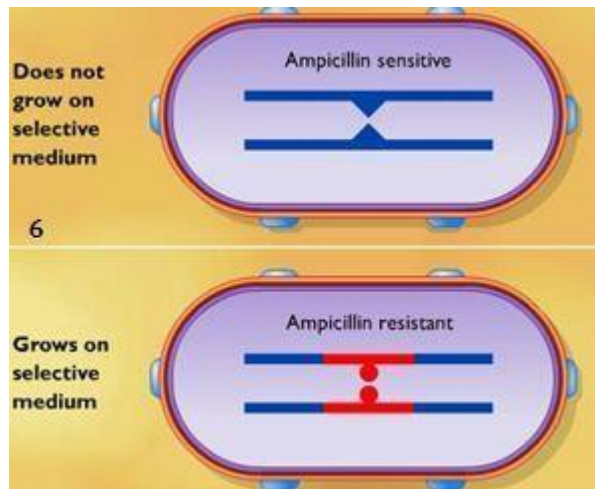
**Εικόνα 12:** πρόσληψη ελεύθερου DNA από κύτταρο – δέκτη. (Πηγή: <https://microbeonline.com/bacterial-transformation-mechanism/>)

Τα επιδεικτικά βακτήρια διαθέτουν στην κυτταροπλασματική τους μεμβράνη υποδοχείς DNA, στους οποίους μπορεί να προσδεθεί το ελεύθερο δίκλωνο DNA που μπορεί να βρίσκεται κοντά στα βακτήρια. Τελικά μόνο ο ένας κλώνος εισέρχεται στο βακτήριο και ανασυνδυάζεται ομόλογα με το βακτηριακό χρωμόσωμα, ενώ ο άλλος αποικοδομείται από νουκλεάσες.



**Εικόνα 13:** Μετασηματισμός βακτηρίου (1-2: πρόσδεση του ελεύθερου DNA στους υποδοχείς του δέκτη, 3: είσοδος στο κύτταρο, 4: ανασυνδυασμός).

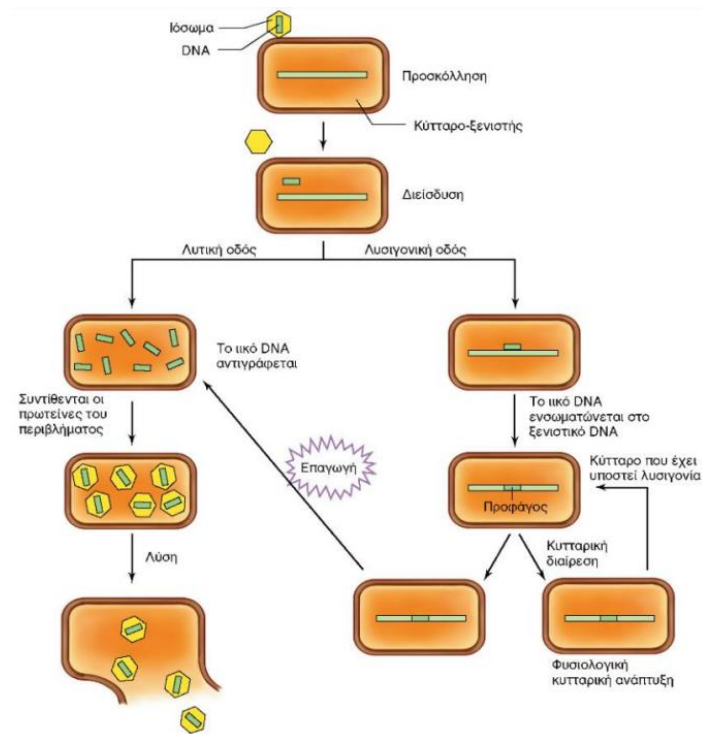
Στο σημείο αυτό επεμβαίνουν οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης και αφαιρείται είτε το τμήμα που εισήλθε είτε το ομόλογο τμήμα του λήπτη. Όπως φαίνεται στο παράδειγμα της Εικόνα 13 μετά την είσοδο του ελεύθερου τμήματος στο κύτταρο πραγματοποιείται ανασυνδυασμός του με το βακτηριακό χρωμόσωμα. Το μετασηματισμένο βακτήριο θα φέρει νέα χαρακτηριστικά που στη περίπτωση μας είναι η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό, και έτσι προκύπτει ένας μεικτός πληθυσμός από ευαίσθητα και ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη. Μετά από ανάπτυξη της καλλιέργειας σε μέσο επιλογής με αντιβιοτικό επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται μόνο τα στελέχη που φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14:** Επιλογή των ανθεκτικών στελεχών μέσω ανάπτυξης σε μέσο που περιέχει το αντιβιοτικό.

Μεταγωγή, είναι η διαδικασία μεταφοράς ελεύθερου DNA μέσω βακτηριοφάγων. Μετά τη διείσδυση του βακτηριοφάγου σε ένα βακτήριο, ακολουθεί η αντιγραφή του ιικού DNA και στη συνέχεια η σύνθεση των πρωτεϊνών του περιβλήματος. Το γενετικό υλικό και οι πρωτεΐνες του βακτηριοφάγου πακετάρονται, το κύτταρο λύεται και απελευθερώνονται οι ώριμοι βακτηριοφάγοι. Σε περίπτωση που το κύτταρο προσβληθεί από έναν ήπιο βακτηριοφάγο ακολουθείται η λυσιγονική οδός. Στην κατάσταση αυτή τα περισσότερα ιικά γονίδια δεν εκφράζονται λόγω μίας ειδικής κατασταλτικής πρωτεΐνης του ίδιου του βακτηριοφάγου, αλλά ενσωματώνονται στο χρωμόσωμα του ξενιστή (μορφή προφάγου) και στη συνέχεια αντιγράφονται και εκφράζονται με αυτό. Σε περίπτωση απενεργοποίησης ή παρεμπόδισης του καταστολέα, ο προφάγος εισέρχεται σε λυτικό κύκλο. Η λυσιγονία έχει οικολογική σημασία καθώς τα περισσότερα βακτήρια στη φύση είναι λυσιγόνα. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα πρόσληψης ενός χρωμοσωμικού τμήματος του βακτηρίου και στη συνέχεια το τμήμα αυτό ενσωματώνεται στο DNA του φάγου. Όταν ο βακτηριοφάγος προσβάλει ένα νέο βακτήριο τότε εγγείι το DNA του σε αυτό, μεταφέροντάς του και το γονίδιο ανθεκτικότητας.



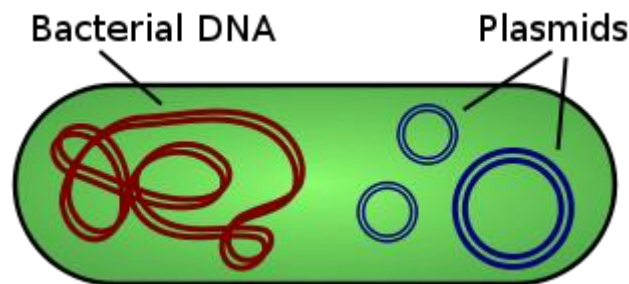


**Εικόνα 15:** Οι συνέπειες της μόλυνσης από έναν ήπιο βακτηριοφάγο. Οι δύο εναλλακτικές οδοί της μόλυνσης είναι είτε η αντιγραφή και απελευθέρωση του ώριμου ιού (λύση) είτε η ενσωμάτωση του ιικού DNA στο ξενιστικό DNA (λυσιγονία). Υπό ορισμένες συνθήκες, μπορεί και το λυσιγονικό κύτταρο να οδηγηθεί στην παραγωγή ώριμων ιών και στη λύση.

Τέλος, αξίζει ιδιαίτερη αναφορά σε έναν ακόμη μηχανισμό που οδηγεί στη συσσώρευση γονιδίων αντιμικροβιακής αντοχής, τα *ιντεγκρόνια* (*integrons*). Τα *integrons* είναι ειδικά συστήματα θέσης ανασυνδυασμού ικανά να στρατολογήσουν ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης υπό τη μορφή κινητών γονιδιακών κασετών. Παρέχουν έναν αποτελεσματικό και απλό μηχανισμό για την προσθήκη νέων γονιδίων σε βακτηριακά χρωμοσώματα, μαζί με τα απαραίτητα στοιχεία ώστε να εξασφαλίσουν την έκφρασή τους (Domingues S et al., 2012). Αυτά τα γονίδια είναι ενσωματωμένα σε μια συγκεκριμένη γενετική δομή που ονομάζεται κασέτα γονιδίου και φέρει ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης χωρίς εκκινήτη μαζί με μια θέση ανασυνδυασμού (*attC*). Οι κασέτες *Integron* ενσωματώνονται στην θέση *attI* της πλατφόρμας *integron* με ανασυνδυασμό θέσης, ο οποίος διαμεσολαβείται από την *ιντεγκράση* (Thomas & Nielsen, 2005).

### 1.2.3.vii. Μηχανισμοί αντίστασης από τα Πλασμίδια R

Τα πλασμίδια είναι δίκλωνα, κυκλικά μόρια DNA ποικίλων μεγεθών, ενώ ποικίλει και ο αριθμός των πλασμιδίων που μπορεί να φέρει ένα βακτήριο. Τα πλασμίδια μαζί με το βακτηριακό χρωμόσωμα συγκροτούν το σύνολο της γενετικής πληροφορίας που διαθέτει το βακτήριο. Ένα βακτήριο μπορεί να περιέχει ένα ή περισσότερα πλασμίδια ανά κύτταρο, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από το βακτηριακό χρωμόσωμα. Μεταξύ των γονιδίων που μπορεί να εμπεριέχονται σε ένα πλασμίδιο, υπάρχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (παράγοντες R) και γονίδια που σχετίζονται με τη μεταφορά γενετικού υλικού από ένα βακτήριο σε άλλο. Επιπλέον, τα πλασμίδια έχουν τη δυνατότητα να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό τόσο μεταξύ τους όσο και με το βακτηριακό χρωμόσωμα, καθώς και να μεταφέρονται από ένα βακτήριο σε άλλο. Τα πλασμίδια αποτελούν πολύτιμο εργαλείο των τεχνικών της Γενετικής Μηχανικής αφού έχουν τη δυνατότητα να μετασχηματίζουν το βακτήριο – δέκτη, προσδίδοντάς του νέες ιδιότητες.



**Εικόνα 16:** Αναπαράσταση βακτηρίου που φέρει τρία πλασμίδια. (Πηγή: User: Spaully on English wikipedia, CC BY-SA 2.5)

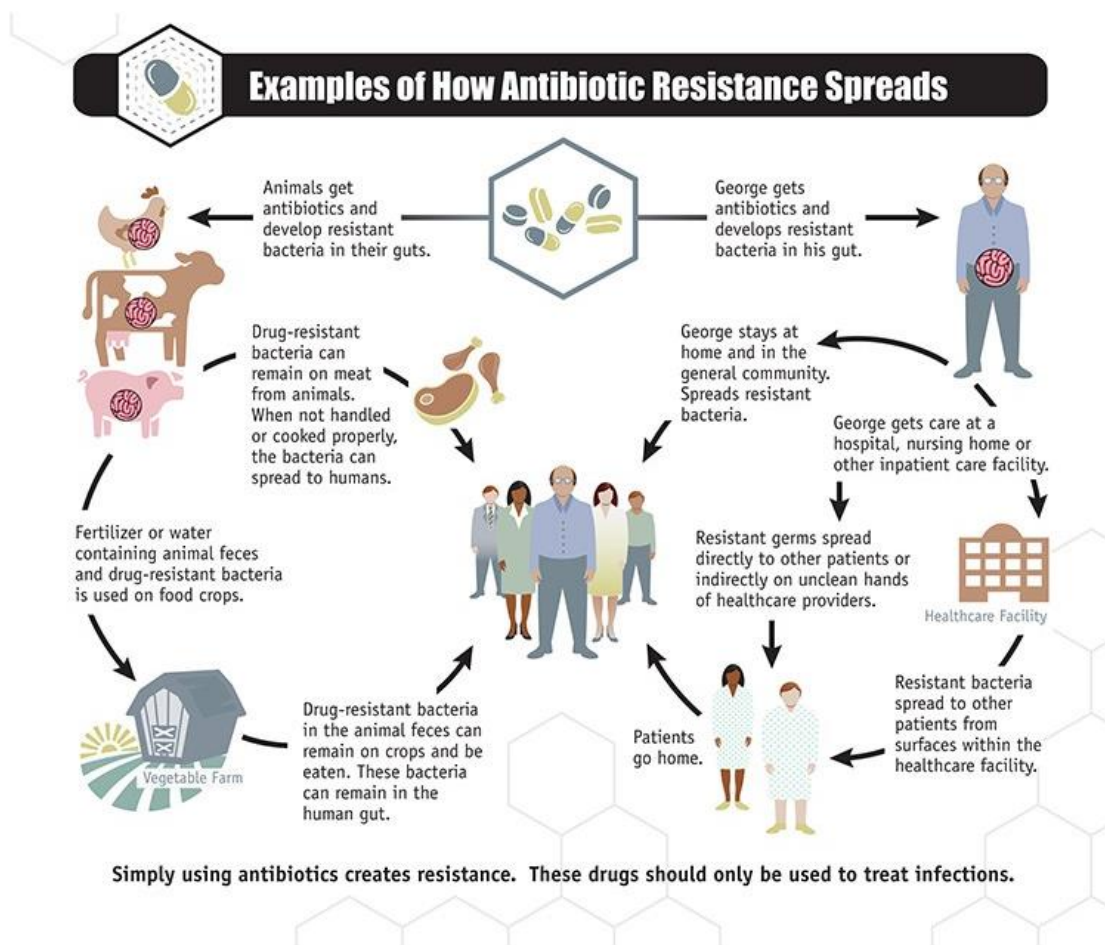
Η ανθεκτικότητα που οφείλεται σε πλασμίδια R, στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι αποτέλεσμα σύνθεσης ενζύμων που εμποδίζουν την πρόσληψη του αντιβιοτικού ή το εξουδετερώνουν τροποποιώντας το χημικά. Επιπλέον αξίζει να αναφερθεί ότι ένα πλασμίδιο μπορεί να περιέχει παραπάνω από ένα γονίδια ανθεκτικότητας κι έτσι να προσδίδει πολλαπλή ανθεκτικότητα σε διαφορετικά αντιβιοτικά.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα πλασμίδια R προηγήθηκαν της χρήσης των αντιβιοτικών στην κλινική πράξη. Η ανίχνευση πλασμιδίων R σε μη παθογόνα Gram(-) βακτήρια του εδάφους υποδεικνύει τα προσαρμοστικά πλεονεκτήματα των βακτηρίων αυτών δεδομένου ότι πολλοί μικροοργανισμοί που παράγουν αντιβιοτικά διαβιούν κι αυτοί στο έδαφος, όπως είναι το *Penicillium* και ο *Streptomyces*. Η εκτεταμένη και ανορθολογική χρήση των αντιβιοτικών στην ιατρική, τη γεωργία και την κτηνοτροφία διαμόρφωσε τις απαιτούμενες συνθήκες για τη διάδοση των πλασμιδίων R, κατά συνέπεια και για τη διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας που έφεραν (Madigan et al., 2005).

#### **1.2.3.viii. Εξάπλωση της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά**

Η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά οφείλεται κυρίως στην κατάχρηση και την κακή χρήση τους. Δυστυχώς, η αδιάκριτη χρήση των αντιβιοτικών και μάλιστα χωρίς ιατρική συνταγογράφηση είναι συχνό φαινόμενο.

Έχει παρατηρηθεί ότι τα αυξημένα ποσοστά ανθεκτικότητας οφείλονται σε λήψη ακατάλληλου τύπου αντιβιοτικού ή ακατάλληλης δόσης και για χρόνο διαφορετικό από τον απαιτούμενο. Δύο ακόμη σημαντικές αιτίες είναι η διακοπή του κύκλου θεραπείας μόλις εξασθενήσουν τα συμπτώματα της θεραπείας και η λήψη αντιβιοτικών για ιογενείς λοιμώξεις. Επιπλέον, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία τόσο για την πρόληψη ασθενειών, όσο και σαν αυξητικοί παράγοντες. Αυτή όμως η παρατεταμένη έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού προωθεί την εξέλιξη της ανθεκτικότητας και μέσω της διατροφής το πρόβλημα επιβαρύνεται καθώς είναι πιθανή η διασπορά ανθεκτικών βακτηρίων και στον άνθρωπο, μεταδίδοντας ασθένειες που είναι δύσκολο να θεραπευτούν.



**Εικόνα 17:** Παραδείγματα εξάπλωσης της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (Πηγή: Centers for Disease Control and Prevention, cdc.gov)

### 1.2.3.ix. Παρούσα κατάσταση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αντιβιοτικά

Η αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα αποτελεί γεγονός για κάθε χώρα. Σε πολλές περιπτώσεις μια λοίμωξη λόγω ανθεκτικού βακτηρίου οδηγεί σε άσχημη κλινική εικόνα και αρκετές φορές στο θάνατο, αφού τα «superbugs» αντιμετωπίζονται πολύ δύσκολα. Επιπλέον, το κόστος της υγειονομικής περίθαλψης για τους ασθενείς με ανθεκτικές λοιμώξεις είναι υψηλότερο από τη μέριμνα για ασθενείς με μη ανθεκτικές λοιμώξεις καθώς απαιτείται μεγαλύτερη σε διάρκεια νοσηλεία, επιπρόσθετες εξετάσεις και τέλος, χορήγηση πιο ακριβών φαρμάκων.

Σύμφωνα με το ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) και τον ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines Agency) κάθε χρόνο 25.000 Ευρωπαίοι πολίτες πεθαίνουν από λοιμώξεις που προκαλούνται από βακτήρια, τα οποία είναι ανθεκτικά σε αντιβιοτικά (<http://www.ecdc.europa.eu/>). Αντίστοιχα στις ΗΠΑ, ο αριθμός ετησίων θανάτων από ανθεκτικά βακτήρια φτάνει τις 35.000 (CDC, 2019).

**Πίνακας 1:** Παραδείγματα αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας.

<b>Βακτήριο</b>	<b>Ασθένεια που προκαλεί</b>	<b>Αντιβιοτικό στο οποίο έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Πνευμονία, λοιμώξεις του κυκλοφορικού συστήματος	Καρβαπενέμες: (>50% των ασθενών)
<i>Escherichia coli</i>	Λοιμώξεις του ουροποιητικού	Φθοροκινολόνες: (>50% των ασθενών)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Γονόρροια	Κεφαλοσπορίνες 3 <sup>ης</sup> γενιάς*
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> )	Δερματίτιδα, Τροφική δηλητηρίαση, Λοιμώξεις των οστών και των αρθρώσεων, Βακτηραιμία	Μεθικιλίνη: (64% πιθανότητα θανάτου, σε σχέση με το μη ανθεκτικό στέλεχος)
<i>Enterobacteriaceae</i>	Συστηματική φλεγμονώδης και αγγειοδιασταλτική απόκριση	Καρβαπενέμες

\* επιβεβαιωμένα περιστατικά ανθεκτικότητας σε 10 χώρες: Αυστραλία, Αυστρία, Καναδάς, Γαλλία, Ιαπωνία, Νορβηγία, Σλοβενία, Νότια Αφρική, Σουηδία και Ηνωμένο Βασίλειο της Μεγάλης Βρετανίας και Βόρεια Ιρλανδία

### **1.2.3.x. Παρούσα κατάσταση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αντιβιοτικά στην Ελλάδα**

Σύμφωνα με Δελτίο Τύπου που εξέδωσε ο Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ, 2019) η ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε αντιβιοτικά αποτελεί τη διαχρονικότερη κρίση στη δημόσια υγεία που βιώνει η χώρα. Ο ετήσιος αριθμός θανάτων που οφείλονται σε λοιμώξεις από βακτήρια ανθεκτικά σε αντιβιοτικά υπολογίζεται σε 1.627.

- Η Ελλάδα βρίσκεται πρώτη, μεταξύ 28 χωρών της Ευρώπης, στην κατανάλωση αντιβιοτικών και στην ανοχή των μικροβίων. Η κατάταξη αυτή οφείλεται κυρίως στην ελλιπή ενημέρωση σχετικά με τα μειονεκτήματα και τους κινδύνους της αλόγιστης και μη σωστής χρήσης των αντιβιοτικών (ECDC, 2016).
- Ένας στους 5 Έλληνες, το 2015, έλαβε αντιβιοτικά χωρίς ιατρική συνταγή (ΕΟΔΥ, 2019).
- Ένας στους 2 Έλληνες άνω των 18 ετών, το 2015, έλαβε αντιβιοτικά (ΕΟΔΥ, 2019).
- Το μεγάλο πρόβλημα στην Ελλάδα είναι τα Gram(-) βακτήρια. Η ανθεκτική *Klebsiella* που προκαλεί πνευμονία είναι ένα τοξικό, παθογόνο βακτήριο και ενδημεί πια μονίμως την τελευταία πενταετία σε όλα τα τριτοβάθμια νοσοκομεία της χώρας – και δεν είναι δυνατόν να την αντιμετωπίσει κανένα αντιβιοτικό, «είναι πολυανθεκτική έως πανανθεκτική!»
- Μελέτη σε 1.936 ουροκαλλιέργειες από διάφορα εργαστήρια της χώρας, δείχνει ότι το κολοβακτηρίδιο *E. coli* ήταν ανθεκτικό κατά 25,8% στην αμοξικιλίνη, κατά 19,2% στην κοτριμοξαζόλη, κατά 14,9% στην κεφαλοθίνη και κατά 10,7% στη ντροφουραντοΐνη.

#### **1.2.3.xi. Επιτάχυνση της εμφάνισης και της διάδοσης της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας**

Με την πάροδο του χρόνου, προκύπτουν γενετικές αλλαγές, οι οποίες αποτελούν μία φυσική διαδικασία. Στην περίπτωση των βακτηρίων, το γεγονός αυτό οδηγεί σε μεταλλάξεις ικανές να προσδώσουν αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα. Ωστόσο, η κακή χρήση αλλά και η κατάχρηση των αντιβιοτικών έχει επιταχύνει κατά πολύ αυτή τη διαδικασία, αφού παγκοσμίως έχει παρατηρηθεί αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών σε

ανθρώπους και κτηνοτροφικά ζώα χωρίς την απαιτούμενη επαγγελματική επίβλεψη. Χαρακτηριστικά παραδείγματα κακής χρήσης αποτελούν η λήψη αντιβίωσης για την αντιμετώπιση ιογενούς λοίμωξης αλλά και η χορήγηση αντιβίωσης είτε ως αυξητικός παράγοντας, είτε για την πρόληψη ασθενειών σε υγιή ζώα.

### **1.2.3.xii. Παγκόσμιες δράσεις για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά**

Ο παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ηγείται πολλών πρωτοβουλιών για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Κάποιες από αυτές παρουσιάζονται παρακάτω.

- Παγκόσμια εβδομάδα ευαισθητοποίησης για τα αντιβιοτικά (World Antibiotic Awareness Week): η εκστρατεία αυτή έχει καθιερωθεί από το 2015 και πραγματοποιείται κάθε Νοέμβριο.
- Παγκόσμιο Σύστημα Παρακολούθησης της Μικροβιακής Ανθεκτικότητας (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System, GLASS): το σύστημα GLASS αποτελεί μια παγκόσμια βάση δεδομένων, όπου συλλέγονται, αναλύονται και ανταλλάσσονται δεδομένα που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των βακτηρίων.
- Παγκόσμια Σύμπραξη για την Έρευνα και Ανάπτυξη των Αντιβιοτικών (Global Antibiotic Research and Development Partnership, GARDP): η κίνηση αυτή είναι μια κοινή πρωτοβουλία του ΠΟΥ και της μη κερδοσκοπικής οργάνωσης «Φάρμακα για ξεχασμένες ασθένειες» (Drugs for Neglected Diseases initiative, DNDi). Έχει ως στόχο την ανάπτυξη νέων θεραπειών μέσω της βελτίωσης των υπαρχόντων αντιβιοτικών.
- Δι – υπηρεσιακή ομάδα συντονισμού για την αντιμικροβιακή αντίσταση (Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance, IACG): η

ομάδα αυτή έχει ως στόχο το συντονισμό μεταξύ των διεθνών οργανισμών για την αποδοτικότερη διασφάλιση της υγείας.

### **1.3. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ**

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά θεωρείται παγκοσμίως μείζων απειλή για την ανθρώπινη υγεία, ωστόσο παρατηρείται ότι πολλές μελέτες που αφορούν το περιβάλλον παραβλέπουν το φαινόμενο. Ιδιαίτερα για τα υδάτινα περιβάλλοντα, πιστεύεται ότι μπορεί να λειτουργήσουν σαν δεξαμενή πηγής και διάδοσης της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Κι αυτό συμβαίνει επειδή επηρεάζονται κατά κόρον από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες (Marti et al., 2014).

Οι υποθέσεις, για την εξάπλωση των γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά είναι δύο (Pruden and Arabi, 2011). Η πρώτη υπόθεση υποδεικνύει ότι ο πληθυσμός των ανθεκτικών στελεχών ενισχύεται λόγω της πίεσης που ασκούν τα αντιβιοτικά στα ευαίσθητα στελέχη, με αποτέλεσμα να αυξάνεται και το ποσοστό των ARGs. Η δεύτερη υπόθεση υποδεικνύει ότι τα ARGs είναι ανθρώπινης και ζωικής προελεύσεως και μεταφέρονται στο υδάτινο περιβάλλον μέσω επεξεργασμένων και μη λυμάτων, νοσοκομειακών αποβλήτων, και κτηνοτροφικών και γεωργικών απορροών.

Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η οριζόντια μεταφορά γονιδίων εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος (Richaume et al., 1989) οπότε είναι αναμενόμενο ότι σαν διαδικασία θα πραγματοποιείται πιο συχνά σε γεωγραφικές περιοχές με υψηλότερη θερμοκρασία (Walsh et al., 2011). Επιπλέον, η αραιώση και η χημική αποδόμηση στην οποία υποβάλλονται τόσο τα ανθεκτικά βακτήρια όσο και τα γονίδια ανθεκτικότητας δεν είναι ικανές συνθήκες πλήρους εξάλειψής τους με αποτέλεσμα την εύκολη διάδοσή τους (Nnadozie & Odume, 2019). Λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός πως εκατοντάδες



εκατομμύρια άνθρωποι δεν έχουν πρόσβαση σε καθαρό νερό γίνεται κατανοητό πως η χρήση και η κατανάλωση μολυσμένου νερού συμβάλλει περαιτέρω στη διάδοση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Η τροφική κατάσταση μιας λίμνης επηρεάζει σε μεγάλο ποσοστό τη διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας. Μια αστική ευτροφική λίμνη με υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων και αντιβιοτικών εμφανίζει σαφώς αυξημένη αφθονία γονιδίων ανθεκτικότητας (Yang et al., 2017).

#### **1.4. ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ**

Η τοξικότητα μιας ουσίας, όπως τα βαρέα μέταλλα, αφορά την ικανότητα της να επηρεάζει τις ζωτικές λειτουργίες ενός βιολογικού συστήματος ή ενός ζωντανού οργανισμού. Η τοξικότητα των μετάλλων στα υδάτινα οικοσυστήματα εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους. Σημαντικός παράγοντας είναι η μορφή και το σθένος στα οποία βρίσκεται το μέταλλο, καθώς οι διαλυτές οργανικές μορφές μπορεί να εισχωρήσουν στους οργανισμούς. Εξίσου σημαντική είναι και η φύση του μεταλλικού ιόντος και οι τάσεις ανταγωνισμού ή συνεργασίας για συμπλοκοποίηση. Φυσικοχημικοί παράγοντες όπως είναι η θερμοκρασία, το φως και το pH μπορούν να επηρεάσουν τις φωτοχημικές μορφές των μετάλλων και συνεπώς τον τρόπο αλληλεπίδρασης τους με τους οργανισμούς.

Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων εξαρτάται επίσης από τη συγκέντρωσή τους στο οικοσύστημα και τη συνεργιστική δράση με άλλα μέταλλα. Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων εξαρτάται από την ικανότητά τους για βιοσυγκέντρωση, βιοσυσσώρευση και βιομεγέθυνση (IUPAC, 2002). Οι τοξικές τους επιδράσεις μπορεί να εκφραστούν ως νευροφυσιολογικές διαταραχές, γενετικές αλλοιώσεις των κυττάρων (μεταλλάξεις), επιδράσεις στην ενζυμική και ορμονική δραστηριότητα, στις βασικές λειτουργίες του

οργανισμού, στην αναπαραγωγή, στην τερατογένεση και στην καρκινογένεση (Kabata-Pendias A. & Pendias H., 2007) Ο κυριότερος μηχανισμός με τον οποίο ασκείται η τοξική δράση των βαρέων μετάλλων είναι η ενζυμική αναστολή με το σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ μεταλλοϊόντων και των ενεργών ομάδων ποικίλων ενζύμων. Τοξικά στοιχεία που εμφανίζονται με τη μορφή ανιόντων, όπως τα αρσενικά, αντιμονιακά, σεληνιακά ή βορικά ιόντα, έχουν την ικανότητα να δράσουν σαν αντιμεταβολίτες αντικαθιστώντας φωσφορικά ή νιτρικά ιόντα.

Υπάρχουν οργανισμοί που έχουν αναπτύξει μηχανισμούς προσαρμογής, ανθεκτικότητας και απομάκρυνσης των βαρέων μετάλλων για την επιβίωση τους σε τοξικά περιβάλλοντα. Στους μηχανισμούς αυτούς ανήκουν:

- αντιδράσεις οξειδοαναγωγής ή υδρόλυσης
- ενσωμάτωση των βαρέων μεταλλικών ιόντων σε μη τοξικές ενώσεις, όπως η δέσμευση του καδμίου στη μεταλλοθειονίνη
- απομόνωση τους σε υποκυτταρικές δομές, όπως τα λυσοσώματα
- σύνδεση των βαρέων μετάλλων με χειλικούς υποκαταστάτες που ευνοούν την απέκκριση (Luoma SN. & Carter JL., 1991).

Συνήθως, υπάρχει μια δυναμική ισορροπία μεταξύ της ποσότητας μετάλλων που προσλαμβάνεται από τους οργανισμούς και αυτή που αποβάλλεται. Λόγω της τοξικής επίδρασης των βαρέων μετάλλων στα υδάτινα οικοσυστήματα έχουν θεσπιστεί νομοθετικά πλαίσια για τις επιτρεπτές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στα ιζήματα τους.

## **1.5. ΛΙΜΝΑΙΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ**

Ο όρος «λίμνη» χρησιμοποιείται για να περιγράψει μία υδάτινη μάζα, η οποία εντοπίζεται σε κοιλότητα της επιφάνειας της γης, δεν έχει άμεση επικοινωνία με τη θάλασσα και περιλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις των οργανισμών που διαβιούν σε αυτή, τόσο μεταξύ τους όσο και με το φυσικό και χημικό περιβάλλον. Ανάλογα με τη γενεσιουργό αιτία, οι λίμνες κατατάσσονται σε: i) τεκτονικές (π.χ. Βαϊκάλη), ii) ηφαιστειακές (π.χ. Crater Lake), iii) Παγετωνικές (π.χ. μεγάλες λίμνες της βόρειας Ευρώπης), iv) Καρστικές (π.χ. Παμβώτιδα) και v) Παράκτιες (π.χ. Άκολη). Επίσης, υπάρχουν και βασικές παράμετροι που προσδιορίζουν τη δομή των λιμναίων οικοσυστημάτων. Τέτοιες είναι: α) η γεωμορφολογία της λίμνης (έκταση, μήκος, βάθος, όγκος νερού, μήκος ακτογραμμής), β) η λεκάνη απορροής, γ) η κατανομή φυσικών και χημικών παραμέτρων (φως, χρώμα, οσμή, θερμοκρασία, ηλεκτρική αγωγιμότητα, διαλυμένο οξυγόνο, βιοχημική αποδόμηση, ενεργός οξύτητα, θρεπτικά στοιχεία, τοξικές ουσίες) και δ) η κατανομή βιολογικών παραμέτρων (οργανισμοί που ζουν στη λίμνη). Τέλος, ανάλογα με την ποιότητα των υδάτων τους, οι λίμνες διακρίνονται σε oligοτροφικές αν εμφανίζουν χαμηλές ποσότητες βιομάζας και μικρές συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών και σε ευτροφικές αν εμφανίζουν μεγάλη παραγωγή βιομάζας (<http://kpe-kastor.kas.sch.gr/limnology/limnology/eisagogi.htm>).

### **1.5.1. Η ΛΙΜΝΗ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑ**

Η λίμνη Παμβώτιδα (39°40'N, 20°53'E) βρίσκεται σε υψόμετρο 470 m, εντοπίζεται στο λεκανοπέδιο των Ιωαννίνων, στους πρόποδες του όρους Μιτσικέλι και περιβάλλεται από τα βουνά της Πίνδου. Η δημιουργία της χρονολογείται στην Πλειο – Πλειστόκαινο εποχή (περίπου 2.588.000 – 11.700 χρόνια πριν) από συνδυασμό διαβρωτικών και τεκτονικών φαινομένων. Το μέσο βάθος της λίμνης είναι 4,3 m, το μέγιστο 9 m και η επιφάνεια της 23 km<sup>2</sup>. Το μέγιστο μήκος είναι περίπου 8 km και το

μέγιστο πλάτος περίπου 5 km. Παλαιότερα, η λίμνη ήταν μεγαλύτερη αλλά στο τέλος του 19<sup>ου</sup> αιώνα το βορειοδυτικό τμήμα της αποξηράθηκε τεχνητά με σκοπό τη γεωργική εκμετάλλευση. Επικοινωνούσε φυσικά με τη γειτονική λίμνη Λαψίστα, η οποία σήμερα αποτελεί πεδιάδα, μέσω των καταβοθρών της περιοχής. Η λίμνη θεωρείται ευτροφική, πολυμεικτική με pH περίπου 7,6. Λόγω των ανέμων παρουσιάζει φαινόμενα ανάδευσης ιζημάτων και αλγών, με αποτέλεσμα να υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των ιζημάτων με τον όγκο του νερού (Touka A. et al., 2018). Η λίμνη Παμβώτιδα έχει αναγνωριστεί παγκοσμίως ως πολύ σημαντική για τη βιοποικιλότητά της και προστατεύεται από το δίκτυο Natura 2000 για τη διαχείριση των φυσικών οικοτόπων άγριας πανίδας και χλωρίδας (European Commission, 1992). Ωστόσο, δεδομένης της εγγύτητάς της με την πόλη των Ιωαννίνων και τα προάστιά της, τις τελευταίες δεκαετίες η Παμβώτιδα δέχεται συνεχείς πιέσεις και εισροές από πολλές πηγές λόγω της αστικής, της γεωργικής και της βιομηχανικής ανάπτυξης της περιοχής (Ioannides K. et al., 2015). Στην παραλίμνια περιοχή εδρεύει μεγάλος αριθμός επιχειρήσεων εστίασης και ψυχαγωγίας, ενώ χρησιμοποιείται και για αθλητικούς σκοπούς (κωπηλασία και water ski) και ψάρεμα με δίχτυα. Επιπλέον, καθημερινά δρομολόγια με караβάκια εξυπηρετούν τη σύνδεση της πόλης με το Νησί της Παμβώτιδας.

#### **1.5.1.i. Ανίχνευση αντιβιοτικών στη λίμνη Παμβώτιδα**

Η βιβλιογραφία που αφορά την ανίχνευση παρουσίας αντιβιοτικών σε λίμνες αποτελεί ένα μικρό μόνο ποσοστό του συνόλου για τα αντιβιοτικά στο περιβάλλον. Τα λίγα αυτά δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι λίμνες που βρίσκονται κοντά στον αστικό ιστό επηρεάζονται από τις ανθρώπινες δραστηριότητες και είναι πιο ευάλωτες στη μόλυνση από φαρμακευτικές ουσίες (Wu et al., 2014). Η Παμβώτιδα φαίνεται να αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα αστικής λίμνης αφού μετρήσεις σε δείγματα

επιφανειακού νερού κατέδειξαν την παρουσία τριών αντιβιοτικών (Σουλφομεθοξαζόλη, Σιπροφλοξασίνη, Ερυθρομυκίνη). Η σουλφομεθοξαζόλη ανιχνεύθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, με υψηλότερη συγκέντρωση την άνοιξη (190 ng/L). Η σιπροφλοξασίνη και η ερυθρομυκίνη ανιχνεύθηκαν στα δείγματα νερού του φθινοπώρου (Νοέμβριος) και του χειμώνα (Φεβρουάριος). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις σημειώθηκαν για τα δείγματα του φθινοπώρου με τιμές 115 ng/L και 137 ng/L, αντίστοιχα (C.I. Nannou et al., 2015). Ειδικά για τη σιπροφλοξασίνη και την ερυθρομυκίνη θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι είναι ευαίσθητα στη χημική αποικοδόμηση (Gros et al., 2012, Nödler et al., 2010), γεγονός που υποδεικνύει ότι οι αρχικές πραγματικές συγκεντρώσεις που καταλήγουν στο περιβάλλον μπορεί να είναι υψηλότερες από τις μετρήσιμες. Ειδικά για το φθινόπωρο και το χειμώνα οι υψηλές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών είναι αναμενόμενες τότε παρατηρείται έξαρση των εποχικών ιώσεων.

#### **1.5.1.ii. Ανίχνευση βαρέων μετάλλων στη λίμνη Παμβώτιδα**

Προηγούμενη εκτίμηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της Παμβώτιδας κατέδειξε μεταξύ άλλων και την παρουσία βαρέων μετάλλων (Touka A. et al., 2018). Το Νικέλιο (Ni) βρέθηκε σε μέγιστη συγκέντρωση 135 mg/kg, το Χρώμιο (Cr) σε μέγιστη συγκέντρωση 83,6 mg/kg και το Αρσενικό (As) σε μέγιστη συγκέντρωση 4,58 mg/kg.

#### **1.5.2. Η ΛΙΜΝΗ ΤΟΥΜΠΑ**

Η λίμνη Τούμπα έχει έκταση περίπου 50 στρεμμάτων και βρίσκεται κοντά στους οικισμούς Άνω Λαψίστα και Περίβλεπτος, σε υψόμετρο 470 m. Σχηματίζεται από τα ύδατα της ομώνυμης πηγής που τροφοδοτεί και την Παμβώτιδα, ενώ η λεκάνη της επικοινωνεί με την υπόγεια λεκάνη του όρους Μιτσικέλι (Sarika-Hatzinikolaou et al.,

2003). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες αναφορές και αυτές επικεντρώνονται κυρίως στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της λίμνης Τούμπας.

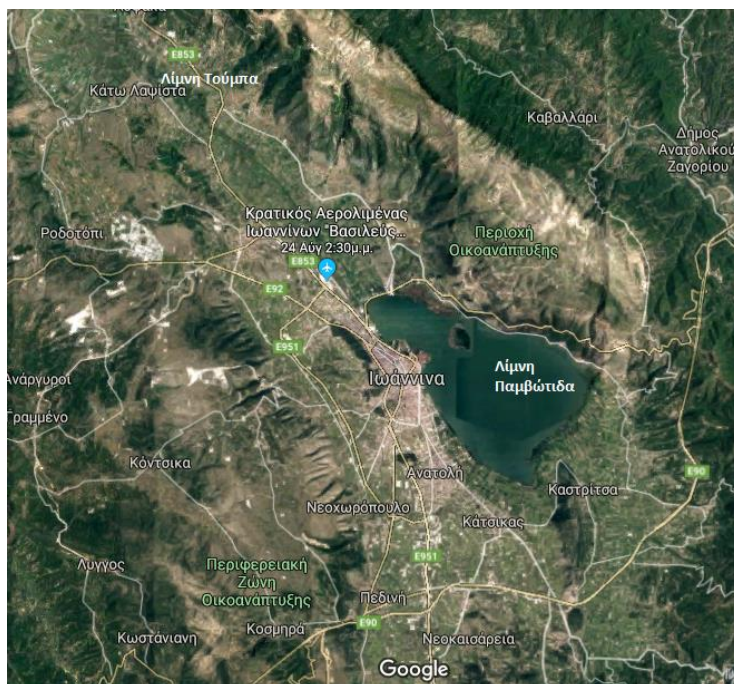
## **2. ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση της πιθανής παρουσίας ανθεκτικών σε αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα βακτηρίων μέσω απομόνωσης και μερικού χαρακτηρισμού. Η συσχέτιση των αποτελεσμάτων με παλαιότερα δεδομένα και η εξακρίβωση εάν κάποιο από αυτά τα βακτήρια είναι παθογόνο.

### 3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1. ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΝΕΡΟΥ ΑΠΟ ΤΙΣ ΛΙΜΝΕΣ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑ ΚΑΙ ΤΟΥΜΠΑ

Η λήψη των δειγμάτων νερού από τις δύο λίμνες πραγματοποιήθηκε την άνοιξη του 2018, την ίδια ημέρα. Η συγκεκριμένη μέρα επιλέχθηκε με βάση τις καιρικές συνθήκες των προηγούμενων ημερών. Κρίθηκε σκόπιμο να αποφευχθεί τυχόν αραίωση του επιφανειακού νερού λόγω βροχόπτωσης, αλλά και νέες εισροές λόγω του αυξημένου όγκου όμβριων υδάτων. Με τη χρήση αποστειρωμένων δοχείων συλλέχθηκε νερό, 5 εκατοστά κάτω από την επιφάνεια. Μέχρι και τη μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο, αποθηκεύτηκαν και διατηρήθηκαν σε ισοθερμική θήκη μεταφοράς.

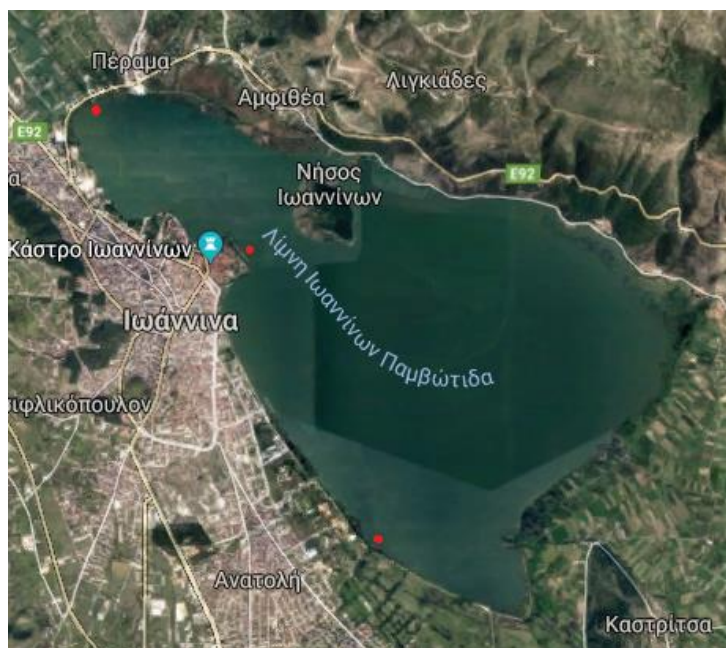


**Εικόνα 18:** Απεικόνιση των λιμνών Παμβώτιδας και Τούμπας.

Από τη λίμνη Παμβώτιδα συλλέχθηκαν δείγματα από τρεις θέσεις, οι οποίες επιλέχθηκαν έτσι ώστε να καλυφθεί κατά το δυνατό το πλήρες μήκος της λίμνης. Η

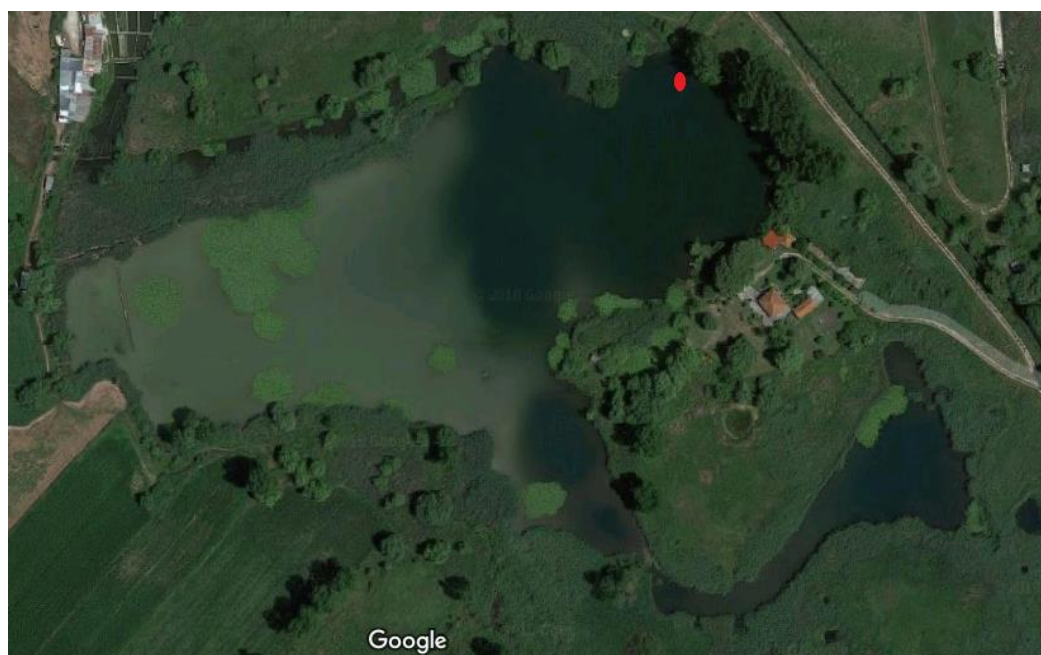


θερμοκρασία των δειγμάτων κατά τη συλλογή κυμαινόταν από 18 έως 19°C.



**Εικόνα 19:** Λίμνη Παμβώτιδα, απεικόνιση των θέσεων δειγματοληψίας.

Από τη λίμνη Τούμπα συλλέχθηκε ένα δείγμα νερού, καθώς η πρόσβαση στις όχθες στην υπόλοιπη περίμετρο είναι περιορισμένη. Η θερμοκρασία του νερού κατά τη συλλογή βρισκόταν στους 19°C.



**Εικόνα 20:** Λίμνη Τούμπα, απεικόνιση της θέσης δειγματοληψίας.

Μετά το τέλος της δειγματοληψίας τα δείγματα επεξεργάστηκαν αμέσως με σκοπό την εκτίμηση της αφθονίας και την ανάπτυξη και απομόνωση ετερότροφων βακτηρίων με επιλογή σε αντιβιοτικά.

### 3.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΦΘΟΝΙΑΣ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ

Η εκτίμηση της αφθονίας ετερότροφων βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με επίστρωση μικρής ποσότητας από το κάθε δείγμα σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο R2A (LABM, UK) και LB. Το R2A χαρακτηρίζεται ως σύνθετο μη επιλεκτικό θρεπτικό μέσο χαμηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά. Το LB χαρακτηρίζεται ως σύνθετο θρεπτικό μέσο υψηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται η αναλυτική σύσταση σε συστατικά των θρεπτικών μέσων R2A και LB. Για την αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων, προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο ναταμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 30 µg/mL (Pedersen, 1992).

**Πίνακας 2:** Σύσταση των θρεπτικών μέσων R2A και LB που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων από τα δείγματα νερού.

	<b>R2A</b>		<b>LB</b>
<b>Θρεπτικό συστατικό</b>	<b>Συγκέντρωση θρεπτικού συστατικού (% w/v)</b>	<b>Θρεπτικό συστατικό</b>	<b>Συγκέντρωση θρεπτικού συστατικού (% w/v)</b>
Yeast extract	0,05	Tryptone	1
Meat Peptone	0,05	Yeast extract	0,5
Casamino acids	0,05	Sodium chloride	1
Starch	0,05	Agar*	1,5
Glucose	0,05		
Sodium pyruvate	0,03		
Dipotassium Hydrogen Phosphate	0,03		
Magnesium sulphate	0,005		
Agar*	1,5		

\* Το άγαρ προστίθεται μόνο στην περίπτωση παρασκευής στερεού θρεπτικού μέσου.

#### Παρασκευή στερεού θρεπτικού R2A

- προσθήκη 0,3 gr R2A (LABM, UK) σε τελικό όγκο 100 mL απεσταγμένου νερού,
- ανάδευση για 10 λεπτά,
- προσθήκη 1,5 gr άγαρ,
- αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά,
- προσθήκη ναταμυκίνης,
- διαμοιρασμός σε τρυβλία και
- αποθήκευση στους 4°C.

#### Παρασκευή στερεού θρεπτικού LB

- προσθήκη 1 gr tryptone (LABM, UK), 0,5 gr yeast extract (LABM, UK) και 1 gr NaCl (LABM, UK), σε τελικό όγκο 100 mL απεσταγμένου νερού,
- ανάδευση για 10 λεπτά,
- προσθήκη 1,5 gr άγαρ,
- αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά,
- προσθήκη ναταμυκίνης,
- διαμοιρασμός σε τρυβλία και
- αποθήκευση στους 4°C.

#### Εμβολιασμός των τρυβλίων με δείγμα νερού

- επίστρωση 100  $\mu$ L δείγματος νερού,

- επώαση των τρυβλίων στους 20°C υπό αερόβιες συνθήκες για 48 ώρες,
- μέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν (Colony Forming Units, CFU) και
- αποθήκευση στους 4°C.

Μετά τη μέτρηση των CFU πραγματοποιήθηκε αναγωγή σε CFU/mL για την εκτίμηση της αφθονίας των βακτηρίων στα δείγματα νερού.

### **3.3. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ ΜΕ ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**

#### **3.3.1. ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την παρουσία αντιβιοτικών στη λίμνη Παμβώτιδα, τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για επιλογή ανθεκτικών βακτηρίων είναι τα εξής: αμοξικιλίνη, σιπροφλοξασίνη, τετρακυκλίνη και καναμυκίνη. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε κλαβουλανικό οξύ, για τα ανθεκτικά βακτήρια σε αμοξικιλίνη και το σύμπλοκο σιπροφλοξασίνη – άργυρος (CIPAG) για τα ανθεκτικά βακτήρια σε σιπροφλοξασίνη (Milionis, et al., 2018).

Παρασκευάστηκαν τρυβλία με τη μέθοδο που περιγράφεται στην ενότητα 3.2, με τη διαφορά ότι πριν το διαμοιρασμό του θρεπτικού υλικού πραγματοποιήθηκε προσθήκη ποσότητας αντιβιοτικού για την επίτευξη επιθυμητής συγκέντρωσης. Η συγκέντρωση του κάθε αντιβιοτικού επιλέχθηκε 1) με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα για τη θεραπευτική συγκέντρωση αντιβιοτικού στο πλάσμα του αίματος (Levison, E. M., & Levison, H. J., 2009; Agwuh, K. N., & MacGowan, A., 2006), για τα αντιβιοτικά αμοξικιλίνη, σιπροφλοξασίνη, τετρακυκλίνη και κλαβουλανικό οξύ και 2) με βάση τις

συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στα in vitro πειράματα, για την καναμυκίνη. Η συγκέντρωση του συμπλόκου CIPAG υπολογίστηκε έτσι ώστε το ποσοστό της σιπροφλοξασίνης στο σύμπλοκο να ισούται με τη συγκέντρωση της σιπροφλοξασίνης στα τρυβλία επιλογής με σιπροφλοξασίνη. Οι τιμές αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3:** Συγκέντρωση αντιβιοτικών για επιλογή ανθεκτικών βακτηρίων από τα δείγματα νερού.

<b>Ουσία</b>	<b>Συγκέντρωση στο τρυβλίο (µg/mL)</b>	<b>Μέγιστη Cπλάσματος (µg/mL)</b>	<b>Συγκέντρωση σε in vitro πειράματα (µg/mL)</b>
<b>Καναμυκίνη</b>	100	20,6	50
<b>Τετρακυκλίνη</b>	10	2 - 5	-
<b>Αμοξικιλίνη</b>	200	8,53 ± 1,97	-
<b>Κλαβουλανικό οξύ</b>	50	2,58 ± 0,67	-
<b>Σιπροφλοξασίνη</b>	10	3 ± 1	-
<b>CIPAG</b>	13	-	-

Εμβολιασμός των τρυβλίων με αντιβιοτικό με δείγμα νερού

- Φυγοκέντρηση 500 µL δείγματος νερού (8.500 rpm),
- επαναιώρηση σε 100 µL υγρού θρεπτικού μέσου και επίστρωση,
- επώαση των τρυβλίων στους 20°C υπό αερόβιες συνθήκες για 48 ώρες,
- μέτρηση CFU,
- αποθήκευση στους 4°C.

Μετά τη μέτρηση των CFU πραγματοποιήθηκε αναγωγή σε CFU/mL για την εκτίμηση της αφθονίας ανθεκτικών βακτηρίων σε αντιβιοτικά στα δείγματα νερού.

Από τα τρυβλία με τα αντιβιοτικά αμοξικιλίνη, καναμυκίνη και σιπροφλοξασίνη επιλέχθηκαν με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως το χρώμα και η υφή, μεμονωμένες αποικίες με σκοπό την ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά επιλογής. Η ανάπτυξη τους έγινε σε υγρό θρεπτικό με συγκέντρωση αντιβιοτικού ανάλογη αυτής του στερεού θρεπτικού. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης (20°C, 200rpm, 24 h) μέρος των ανθεκτικών καλλιεργειών αποθηκεύτηκε στους -80°C, με γλυκερόλη σε συγκέντρωση 20%.

Επιπλέον, κάθε μία από τις παραπάνω ανθεκτικές καλλιέργειες ελέγχθηκαν για ανθεκτικότητα και στα άλλα δύο αντιβιοτικά. Διερευνήθηκε δηλαδή η πιθανότητα εμφάνισης πολλαπλής ανθεκτικότητας.

Τέλος, οι καλλιέργειες που βρέθηκαν ανθεκτικές στην αμοξικιλίνη ελέγχθηκαν για ανθεκτικότητα και στο κλαβουλανικό οξύ, δεδομένου ότι το δεύτερο αποτελεί αναστολέα των β – λακταμασών. Οι καλλιέργειες που βρέθηκαν ανθεκτικές στη σιπροφλοξασίνη, ελέγχθηκαν για ανθεκτικότητα στο σύμπλοκο CIPAG.

### **3.3.2. ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΣΕ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ**

Οι ανθεκτικές σε αντιβιοτικά καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν, όπως αναφέρεται στην ενότητα 3.3.1, ελέγχθηκαν για την πιθανότητα ανθεκτικότητας στα βαρέα μέταλλα As, Ni και Cr. Παρασκευάστηκαν τρυβλία όπως στην ενότητα 3.2, με τη διαφορά ότι πριν το διαμοίρασμό του θρεπτικού στα τρυβλία προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα από τις χημικές ενώσεις ώστε η τελική συγκέντρωση του μετάλλου να ισούται με το όριο TEC

(Threshold Effect Concentration), το όριο δηλαδή πάνω από το οποίο αναμένονται επιδράσεις στους οργανισμούς των ιζημάτων (MacDonald et al., 2000).

### **3.3.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΑΠΟ ΤΙΣ ΕΤΕΡΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ**

Η εκχύλιση του DNA πραγματοποιήθηκε με τη συσκευασία υλικών PowerSoil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA 92010) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή για εκχύλιση από καθαρή υγρή βακτηριακή καλλιέργεια. Το DNA ελέγχθηκε ποιοτικά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,7% w/v και φωτομετρήθηκε για ποσοτικό έλεγχο και έλεγχο καθαρότητας με τη συσκευή NanoDrop® ND-1000. Ο ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος απαιτεί ελάχιστη ποσότητα, το υπόλοιπο δείγμα αποθηκεύεται στους -20°C για μελλοντική χρήση.

### **3.3.4. ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ 16S rDNA ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ**

Η PCR για την ενίσχυση του 16S rDNA των βακτηρίων απαιτεί τη χρήση συγκεκριμένων αντιδραστηρίων, σε κατάλληλες συγκεντρώσεις, προκειμένου να εξασφαλιστούν οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης, η οποία συνήθως πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50 µL (Πίνακας 4).

Χρησιμοποιήθηκαν DNA πολυμεράση και αντιδραστήρια από την εταιρεία KAPA Biosystems (KAPA Taq PCR Kit). Η συγκεκριμένη πολυμεράση προσθέτει στα προϊόντα της PCR και μια ουρά από αδερίνες. Τα προϊόντα PCR που περιέχουν ουρά από αδερίνες μπορούν να κλωνοποιηθούν σε TA πλασμίδια. Ως εκκινητές επιλέχθηκαν οι 341F-GC και 907R, η αλληλουχία του κάθε ενός από αυτούς φαίνεται στον Πίνακα 5. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι 600 ζεύγη βάσεων (Muyzer et al., 1995).

**Πίνακας 4:** Απαιτούμενες συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την PCR

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα	1 x
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM
dNTPs	0.2 mM
341F-GC	0.5 pmol / μL
907R	0.5 pmol / μL
DNA	100 ng / μL
KAPATaq Polymerase	3.75 units / 50 μL

**Πίνακας 5:** Αλληλουχία των εκκινητών για Ενίσχυση του βακτηριακού 16S rDNA με PCR.

Όνομασία εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
<b>341F-GC</b>	5'-40GC-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
<b>907R</b>	5'-CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3'

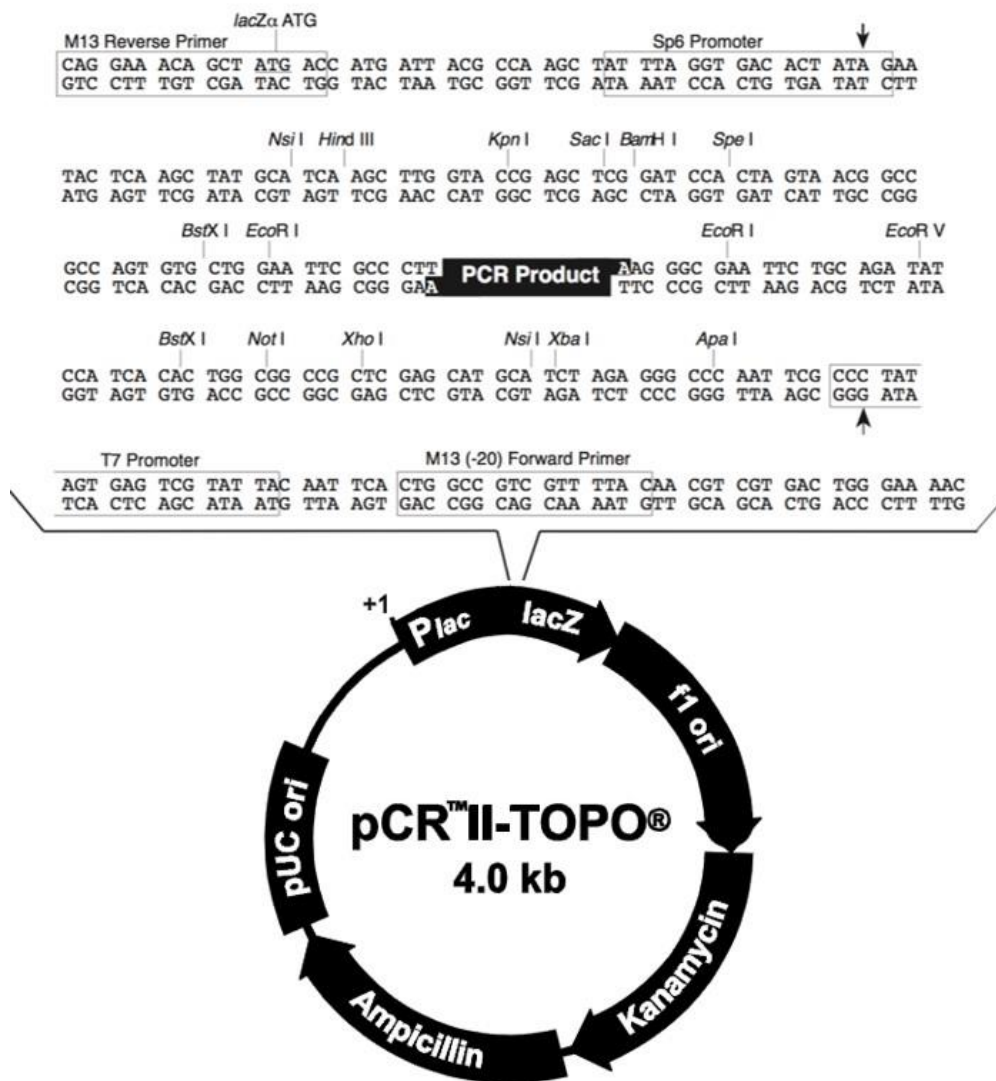
Η επιτυχία της αντίδρασης PCR ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Στη συνέχεια για μεγαλύτερη καθαρότητα των προϊόντων και ειδικά σε περίπτωση που σε κάποιο δείγμα ενισχύθηκαν δύο περιοχές διαφορετικού μεγέθους, πραγματοποιείται ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού του προϊόντος. Ακολουθείται το πρωτόκολλο της συσκευασίας υλικών NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος, τα προϊόντα του καθαρισμού ενισχύονται εκ νέου με PCR, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω.

### **3.3.5. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΘΥΜΗΤΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ DNA ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ**

Τα rDNA που ενισχύθηκαν με την PCR κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς pCR<sup>®</sup>II – TOPO (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen). Η διαδικασία περιλαμβάνει δεσμοποίηση του επιθυμητού τμήματος DNA στον πλασμιδιακό φορέα, μετασχηματισμό επιλεκτικών κυττάρων με μεταφορά του πλασμιδιακού φορέα, επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων και εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA.



Ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας είναι ευθύγραμμος και στο ένα άκρο του έχει μια ουρά θυμινών, η ουρά αυτή αποτελεί πλεονέκτημα για τη διευκόλυνση της διαδικασίας, καθώς τα προϊόντα που προέκυψαν από την PCR διαθέτουν ουρά αδενινών. Επίσης χαρακτηρίζεται ως ενεργός καθώς έχει συνδεδεμένη μια τοποϊσομεράση I. Μεταξύ άλλων διαθέτει αλληλουχίες εκκινητών (M13) για την αλληλούχιση, θέσεις αναγνώρισης από το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, το γονίδιο αναφοράς *lac-Z*, θέση έναρξης της αντιγραφής καθώς και γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και καναμυκίνη (Εικόνα 21).



**Εικόνα 21:** Γονιδιακός χάρτης του πλασμιδίου pCR<sup>®</sup>II - TOPO που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση

Για την ολοκλήρωση της διαδικασίας μετασχηματισμού των επιδεικτικών κυττάρων *E. coli* με μεταφορά του πλασμιδιακού φορέα ακολουθήθηκε πρωτόκολλο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν το αντιβιοτικό καναμυκίνη και ο χρωμογόνος παράγοντας X – Gal ως δείκτες επιλογής των μετασχηματισμένων αποικιών.

Η απομόνωση του πλασμιδίου από τα μετασχηματισμένα κύτταρα πραγματοποιήθηκε με τη συσκευασία υλικών Plasmid DNA Purification Kit (Macherey – Nagel), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πλασμίδιο αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση. Πριν την απομόνωση, αποθηκεύτηκε μέρος της καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων στους -80°C, με γλυκερόλη σε συγκέντρωση 20%. Τέλος, για την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησης, πραγματοποιείται πέψη του πλασμιδιακού φορέα με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI ώστε να εξακριβωθεί εάν το απομονωμένο πλασμίδιο περιέχει την επιθυμητή αλληλουχία.

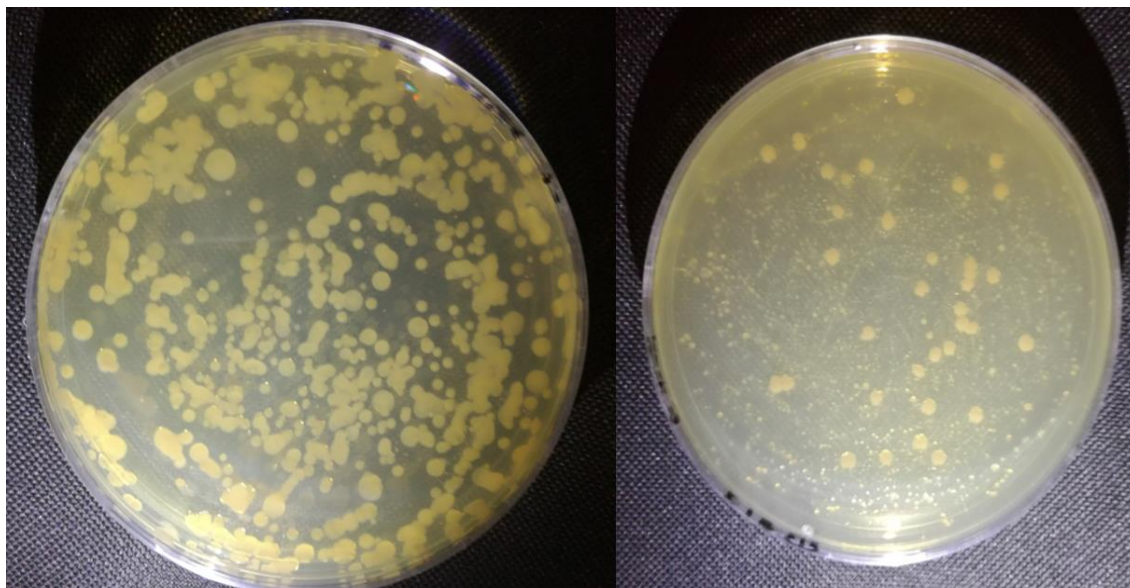
### **3.3.6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟΙΧΙΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ**

Η αλληλούχιση της ένθεσης του πλασμιδιακού φορέα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Sanger, στην εταιρία Eurofins Genomics / VBC Biotech Αυστρίας. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν συγκρίθηκαν με άλλες, ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες με χρήση του αλγόριθμου BLAST (Altschul et al., 1997). Αξιολογήθηκε το ποσοστό ομολογίας ώστε να εξακριβωθεί η μεταξύ τους ομοιότητα. Εάν αυτό το ποσοστό ομοιότητας είναι μεγαλύτερο από 97%, υποδηλώνει ότι η εξεταζόμενη αλληλουχία κατατάσσεται στο ίδιο Είδος με την αλληλουχία αναφοράς. Εάν είναι μικρότερο από 97% και ανάλογα με το εύρος της τιμής, μπορεί να υποδηλώνει την κατάταξη σε νέο Είδος, Γένος, Οικογένεια, Τάξη, Κλάση ή Φύλο, ακόμη και να είναι τελείως άγνωστο.

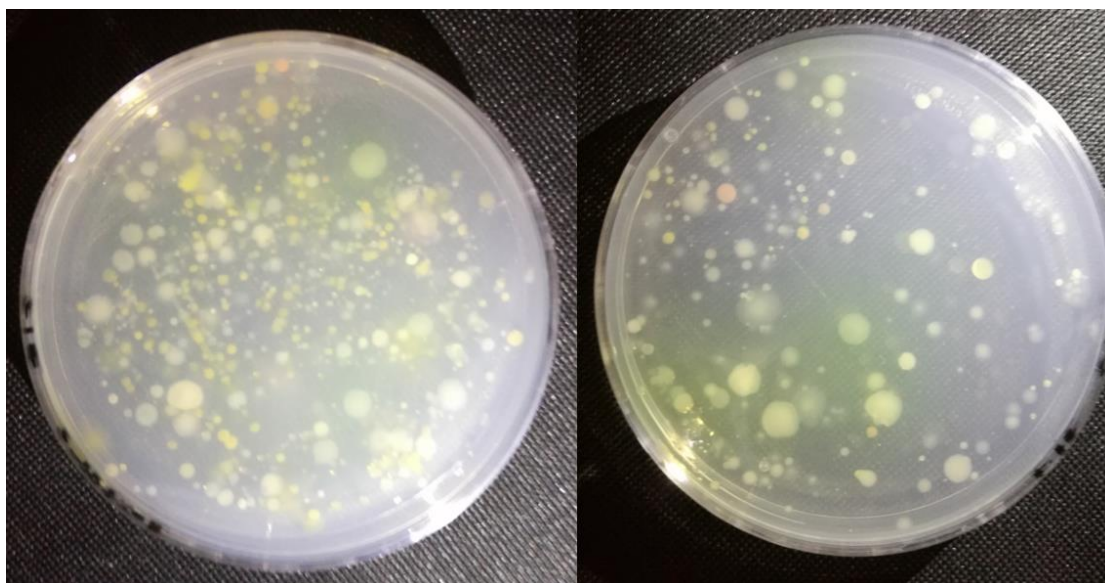
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ ΤΗΣ ΛΙΜΝΗΣ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΙΜΝΗΣ ΤΟΥΜΠΙΑΣ ΥΠΟ ΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Η ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων στα στερεά θρεπτικά μέσα R2A και LB πραγματοποιήθηκε με τη χρήση βασικών αρχών καλλιέργειας βακτηρίων. Μετά την επώαση των τρυβλίων αξιολογήθηκε ο αριθμός όπως και ο ρυθμός ανάπτυξης των αποικιών που αναπτύχθηκαν στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υλικού. Στα τρυβλία με θρεπτικό υλικό R2A οι διαφορετικές αποικίες ήταν πιο ευδιάκριτες, με σαφή όρια κι επίσης παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μορφολογική διαφοροποίηση μεταξύ τους. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκαν καλλιέργειες από τα τρυβλία R2A για περαιτέρω μελέτη και επεξεργασία.



**Εικόνα 22:** Ανάπτυξη αποικιών υπό αερόβιες συνθήκες α) σε στερεό θρεπτικό υλικό LB και β) σε στερεό θρεπτικό υλικό LB με αμπικιλίνη μετά την επίστρωση δείγματος νερού από τη λίμνη Παμβώτιδα.



**Εικόνα 23:** Ανάπτυξη αποικιών υπό αερόβιες συνθήκες α) σε στερεό θρεπτικό υλικό R2A και β) σε στερεό θρεπτικό υλικό R2A με αμικιλίνη μετά την επίστρωση δείγματος νερού από τη λίμνη Παμβώτιδα.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 22 οι αποικίες αναπτύχθηκαν με μεγαλύτερο ρυθμό με αποτέλεσμα τα όρια πολλών διπλανών αποικιών να επικαλύπτονται. Αντίθετα, οι περισσότερες από τις αποικίες που έχουν αναπτυχθεί στα τρυβλία στην Εικόνα 23 έχουν ευδιάκριτα όρια. Επίσης είναι εμφανείς οι μορφολογικές διαφοροποιήσεις, που διακρίνονται σχετικά με το χρώμα και την υφή των αποικιών.

Αναφορικά με τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκε στο κάθε είδος θρεπτικού υλικού ενδεικτικά αναφέρεται ότι στο control LB τρυβλίο για το σημείο Παμβώτιδα 1 αναπτύχθηκαν περίπου 200 αποικίες ενώ στο control R2A τρυβλίο για το ίδιο σημείο καταμετρήθηκε εξαπλάσιος αριθμός αποικιών. Όταν τα νούμερα αυτά ανάχθηκαν σε CFU/mL, η αφθονία των βακτηρίων στα δύο θρεπτικά για το ίδιο δείγμα βρέθηκε να έχει διαφορά μίας τάξης μεγέθους. Αντίστοιχες διαφορές παρατηρήθηκαν για όλες τις θέσεις δειγματοληψίας, με αποτέλεσμα τελικά η αφθονία των βακτηρίων σε CFU/mL κάθε θέσης δειγματοληψίας να διαφέρει από μία έως δύο τάξεις μεγέθους ανάμεσα στα δύο θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν. Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα

δεδομένα που αφορούν την καταμέτρηση των βακτηρίων στα τρυβλία με θρεπτικό μέσο R2A, με ή χωρίς την προσθήκη αντιβιοτικού, για όλες τις θέσεις δειγματοληψίας.

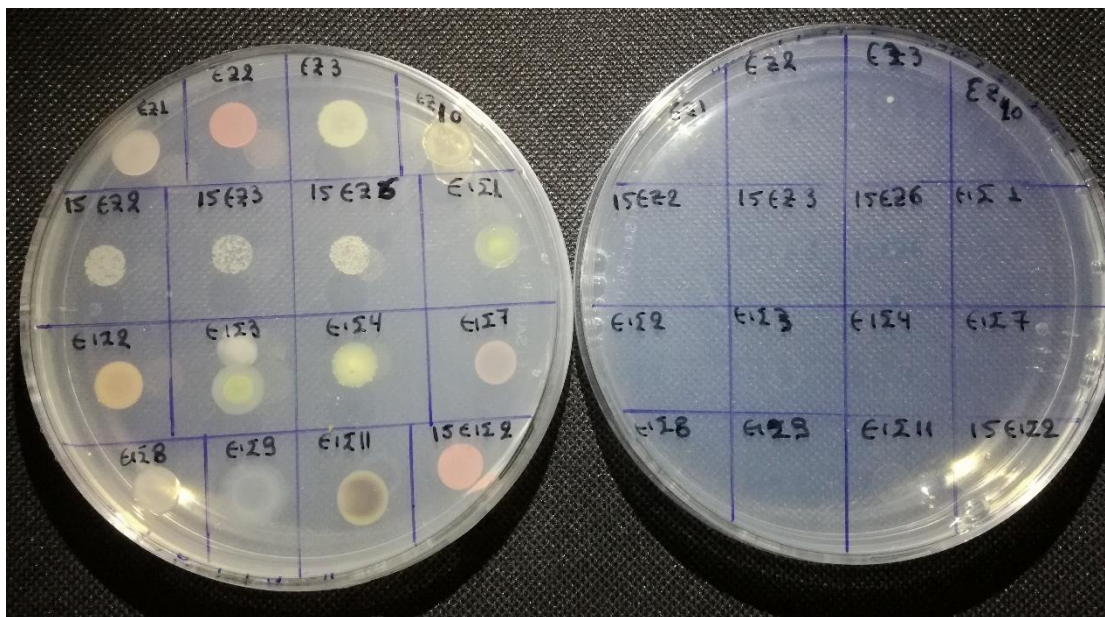
Μετά την αξιολόγηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των αποικιών στα τρυβλία R2A με προσθήκη αντιβιοτικού, επιλέχθηκαν 80 από αυτές για περαιτέρω επεξεργασία και παρασκευάστηκαν 80 υγρές καλλιέργειες με τη μέθοδο που περιγράφεται στην ενότητα 3.ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.

**Πίνακας 6:** Συγκέντρωση βακτηρίων σε R2A στερεό θρεπτικό υλικό και R2A στερεό θρεπτικό υλικό με προσθήκη αντιβιοτικού μετά την επίστρωση νερού από τις λίμνες Παμβώτιδα και Τούμπα.

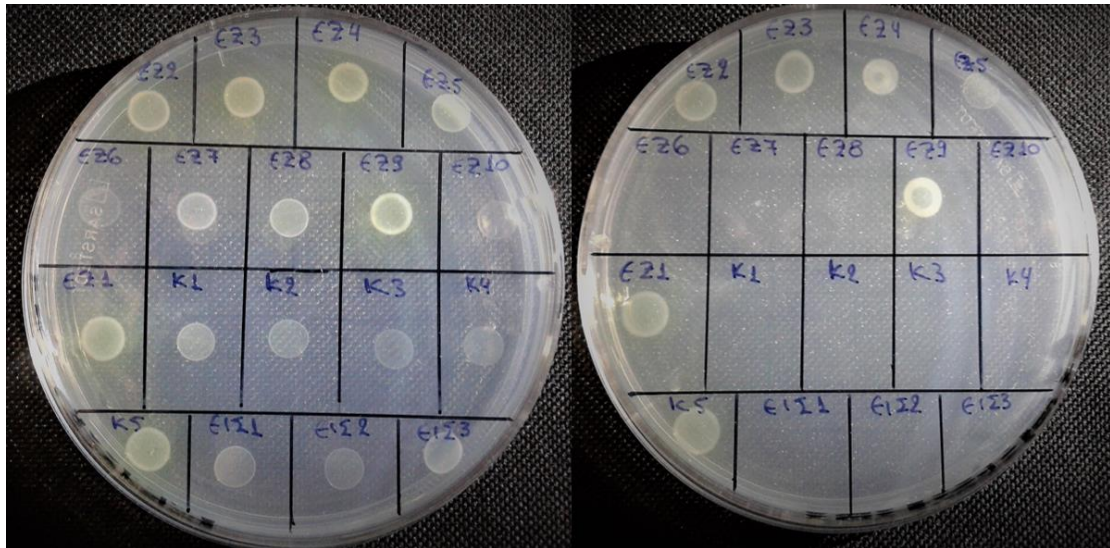
	Παμβώτιδα 1 Είσοδος		Παμβώτιδα 2 Κέντρο		Παμβώτιδα 3 Έξοδος		Τούμπα	
	cfu/mL	Ποσοστό επί του control	cfu/mL	Ποσοστό επί του control	cfu/mL	Ποσοστό επί του control	cfu/mL	Ποσοστό επί του control
<b>control</b>	7,82E+03	100,00%	3,17E+04	100,00%	6,76E+03	100,00%	5,97E+03	100,00%
<b>Ampicillin 150 µg/mL</b>	9,02E+02	11,53%	1,28E+03	4,04%	1,26E+02	1,86%	8,76E+02	14,67%
<b>Ampicillin 200 µg/mL</b>	3,36E+02	4,30%	6,30E+02	1,99%	9,60E+01	1,42%	4,40E+02	7,37%
<b>Amoxicillin 100 µg/mL</b>	2,46E+02	3,15%	5,32E+02	1,68%	1,40E+01	0,21%	1,44E+02	2,41%
<b>Amoxicillin 200 µg/mL</b>	8,00E+01	1,02%	5,48E+02	1,73%	1,48E+01	0,22%	1,84E+02	3,08%
<b>Kanamycin 50 µg/mL</b>	9,36E+02	11,97%	6,68E+02	2,11%	1,20E+01	0,18%	1,92E+02	3,22%
<b>Kanamycin 100 µg/mL</b>	1,76E+02	2,25%	3,00E+01	0,09%	4,20E+00	0,06%	2,40E+01	0,40%
<b>Ciprofloxacin 10 µg/mL</b>	5,40E+01	0,69%	2,20E+01	0,07%	8,00E+01	1,18%	3,60E+01	0,60%
<b>Ciprofloxacin 15 µg/mL</b>	2,00E+01	0,26%	6,00E+00	0,02%	2,40E+01	0,36%	2,20E+01	0,37%
<b>Amoxicillin 100 µg/mL Kanamycin 50µg/mL Ciprofloxacin 10µg/mL</b>	2,00E+00	0,026%	1,00E+00	0,0032%	0	0%	1,00E+00	0,017%

## 4.2. ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΟΛΛΑΠΛΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΑΛΛΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η Εικόνα 24 και η Εικόνα 25 αποτελούν ενδεικτικά και χαρακτηριστικά παραδείγματα για τα αποτελέσματα της δοκιμής ανθεκτικότητας, σε επιπλέον αντιβιοτικά των καλλιεργειών της παρούσας μελέτης.



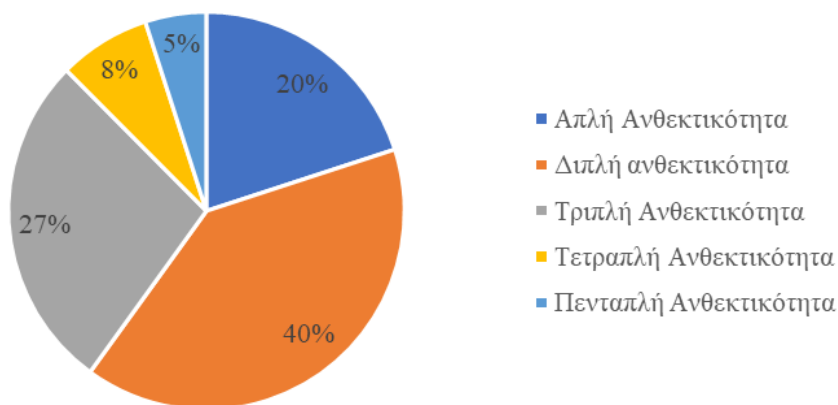
**Εικόνα 24:** Έλεγχος ανθεκτικότητας, στο σύμπλοκο CIPAG, καλλιεργειών ανθεκτικών στη σπυροφλοξασίνη. Αριστερά: Τρυβλίο R2A με προσθήκη σπυροφλοξασίνης, Δεξιά: Τρυβλίο R2A με προσθήκη συμπλόκου CIPAG



**Εικόνα 25** Έλεγχος ανθεκτικότητας, στο κλαβουλανικό οξύ, καλλιεργείων ανθεκτικών στην αμοξικιλίνη. Αριστερά: Τρυβλίο R2A με προσθήκη αμοξικιλίνης, Δεξιά: Τρυβλίο R2A με προσθήκη αμοξικιλίνης και κλαβουλονικού οξέος.

Συγκεντρωτικά, από τις 80 καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν οι 16 φάνηκε να έχουν ανθεκτικότητα σε ένα μόνο αντιβιοτικό μεταξύ της καναμυκίνης, της αμοξικιλίνης και της σιπροφλοξασίνης. Ενώ, οι 64 παρουσίασαν πολλαπλή ανθεκτικότητα με διάφορους συνδυασμούς μεταξύ της καναμυκίνης, της αμοξικιλίνης, του κλαβουλανικού οξέος, της σιπροφλοξασίνης και του CIPAG. Τα αναλυτικά ποσοστά εμφάνισης μονής ή πολλαπλής ανθεκτικότητας παρουσιάζονται στην Εικόνα 26.

Ποσοστά Ανθεκτικότητας Καλλιεργείων



**Εικόνα 26:** Αναπαράσταση των ποσοστών απλής ή πολλαπλής ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά στις 80 καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν από τα δείγματα νερού της λίμνης Παμβώτιδας και της λίμνης Τούμπας.



Με βάση τα αποτελέσματα των δοκιμών πολλαπλής ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που μελετήθηκαν, για τις 80 υγρές καλλιέργειες, και έχοντας ως κριτήριο και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους επιλέχθηκαν 12 από αυτές για περαιτέρω επεξεργασία, ενώ ελέγχθηκε η πιθανότητα ανθεκτικότητας και στην τετρακυκλίνη. Τα αποτελέσματα ανθεκτικότητας των 12 καλλιεργειών παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 7. Το 50% αυτών βρέθηκαν να είναι ανθεκτικά και στα έξι αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ελάχιστη ταυτόχρονη ανθεκτικότητα που παρατηρείται είναι η τετραπλή.

**Πίνακας 7:** Ανθεκτικότητα των καλλιεργειών στα αντιβιοτικά. Με ✓ συμβολίζεται η ανθεκτικότητα, ενώ με X συμβολίζεται η ευαισθησία στο αντιβιοτικό.

Όνομα υγρής καλλιέργειας	αμοξικιλίνη	Καναμικίνη	σιπροφλοξασίνη	κλαβουλονικό οξύ	σύμπλοκο CIPAG	τετρακυκλίνη
FI1	✓	✓	✓	✓	✓	X
FI2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
FI3	✓	✓	✓	✓	✓	✓
FI4	✓	✓	✓	✓	✓	✓
FI5	✓	✓	✓	✓	✓	✓
FO1	✓	✓	✓	X	✓	
FO2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
FO3	✓	✓	✓	✓	X	✓
FO4	✓	✓	✓	✓	X	✓
FO5	✓	✓	✓	✓	X	✓
FO6	✓	✓	✓	✓	✓	✓
FO7	✓	✓	✓	✓	✓	✓

### 4.3. ΔΟΚΙΜΕΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Οι δοκιμές ανθεκτικότητας των καλλιεργειών στα βαρέα μέταλλα έδειξε ότι μόνο η FO4 είναι ανθεκτική στο Αρσενικό, το Νικέλιο και το Χρόμιο. Αντίθετα οι FI5 και FO1 είναι ευαίσθητες και στα τρία μέταλλα. Οι FI1, FI2, FO2 και FO5 είναι ανθεκτικές στην παρουσία ενός τουλάχιστον μετάλλου, ενώ οι υπόλοιπες πέντε καλλιέργειες είναι ανθεκτικές στην παρουσία 2 μετάλλων. Ο Πίνακας 8 παρουσιάζει με λεπτομέρειες την ανθεκτικότητα ή την ευαισθησία της κάθε καλλιέργειας στα βαρέα μέταλλα που χρησιμοποιήθηκαν.

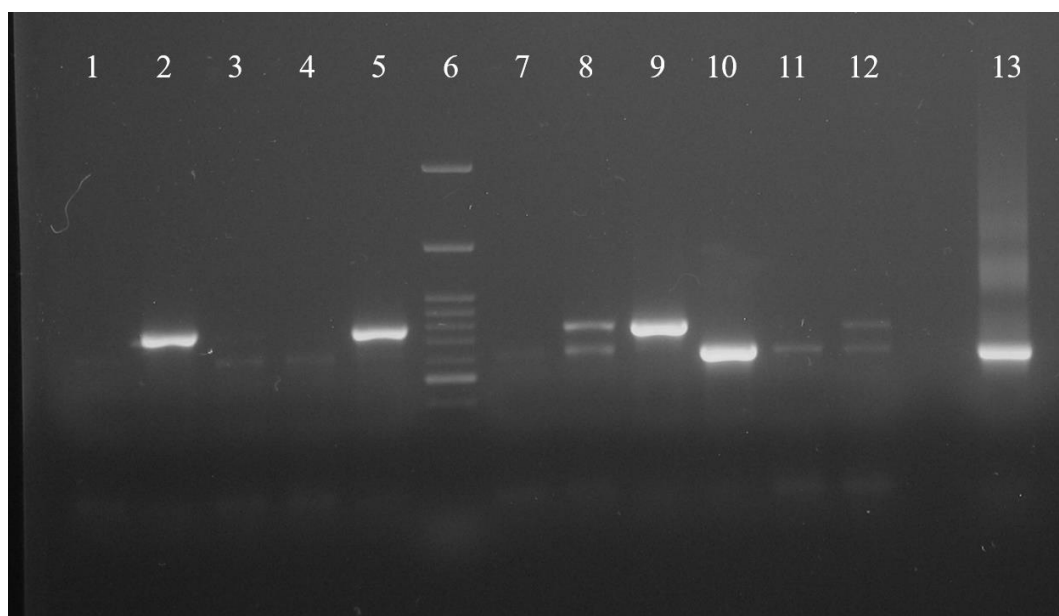
**Πίνακας 8:** Ανθεκτικότητα των καλλιεργειών σε βαρέα μέταλλα. Με ✓ συμβολίζεται η ανθεκτικότητα στην παρουσία βαρέος μετάλλου στο θρεπτικό υλικό, ενώ με X συμβολίζεται η ευαισθησία στην παρουσία βαρέος μετάλλου στο θρεπτικό υλικό.

ΔΕΙΓΜΑ	NaAsO <sub>2</sub> (C <sub>As</sub> :10 µg/kg)	NiCl <sub>2</sub> (C <sub>Ni</sub> : 22,7mg/kg)	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (C <sub>Cr</sub> : 43,4mg/kg)
FI1	✓	X	X
FI2	✓	X	X
FI3	✓	✓	X
FI4	✓	✓	X
FI5	X	X	X
FO1	X	X	X
FO2	X	✓	X
FO3	✓	✓	X
FO4	✓	✓	✓
FO5	X	✓	X
FO6	✓	✓	X
FO7	✓	✓	X

#### 4.4. ΜΕΡΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Τα δείγματα που προέκυψαν από καλλιέργειες βακτηρίων ανθεκτικών σε αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα χαρακτηρίστηκαν μοριακά μέσω ενίσχυσης του 16S rDNA και αλληλούχισης.

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα για τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων της PCR ήταν τα 600 ζεύγη βάσεων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 27, σε κάποια από τα δείγματα, εκτός από το αναμενόμενο προϊόν έχει ενισχυθεί και άλλο ένα τμήμα, μεγέθους 800 ζευγών βάσεων. Για τα δείγματα αυτά ακολουθήθηκε επιπλέον πρωτόκολλο με σκοπό τον καθαρισμό και διαχωρισμό των δύο προϊόντων και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR για το βακτηριακό 16S rDNA, για την κάθε ζώνη ξεχωριστά.



**Εικόνα 27:** Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, για ενίσχυση του 16S βακτηριακού rDNA, σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. [Σειρά φόρτωσης δειγμάτων →1: FI1, 2: FI2, 3: FI3, 4: FI4, 5: FI5, 6:100bp ladder (NIPPON), 7:FO1, 8: FO3, 9: FO4, 10: FO5, 11: FO6, 12: FO7, 13: FO2).

Για τη συνέχιση της πειραματικής διαδικασίας και για την εύκολη αναζήτηση των δεδομένων, τα προϊόντα της PCR ονομάστηκαν όπως και η καλλιέργεια από την οποία προήλθαν. Τα δείγματα με τα διπλά προϊόντα έλαβαν έναν επιπλέον χαρακτήρα, α για το μέγεθος 600bp και β για το μέγεθος 800bp, (π.χ. από την καλλιέργεια FO3 προέκυψαν τα προϊόντα PCR FO3a και FO3b).

Το δείγμα FI1 δεν ενισχύθηκε σε καμία από τις αντιδράσεις PCR που πραγματοποιήθηκαν και για αυτό το λόγο δε συνεχίστηκε η επεξεργασία του. Τα υπόλοιπα 12 προϊόντα PCR επεξεργάστηκαν περαιτέρω με τη μέθοδο κλωνοποίησης σε πλασμιδιακό φορέα και στη συνέχεια στάλθηκαν για αλληλούχιση. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν αντιστοιχήθηκαν μέσω του αλγόριθμου BLASTn με αλληλουχίες ήδη κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων (Altschul, S. F., 1997).

Αρχικά, όλες οι αλληλουχίες αντιστοιχήθηκαν στον αλγόριθμο blast με αλληλουχίες, οι οποίες είναι ήδη κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων για το 16S ριβοσωμικό RNA και προέρχονται από καλλιεργούμενα είδη. Ωστόσο, κάποιες από τις υπό εξέταση αλληλουχίες δε στάθηκε δυνατό να αντιστοιχηθούν με αλληλουχίες αναφοράς σε ποσοστό μεγαλύτερο από 25% και στις περισσότερες περιπτώσεις με μικρό ποσοστό ομολογίας. Για το λόγο αυτό τέθηκαν προς αντιστοίχιση εκ νέου, αυτή τη φορά όμως με αλληλουχίες που είναι γενικά κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων, και μπορεί να αφορούν και είδη που δεν έχουν καλλιεργηθεί in vitro. Η αντιστοίχιση αυτή οδήγησε σε μεγαλύτερα ποσοστά κάλυψης και ομολογίας με την εκάστοτε αλληλουχία αναφοράς.

Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα FI3a, FI4, FO1, FO2, FO3a, FO5, FO6 και FO7a αντιστοιχήθηκαν με βακτήρια που ανήκουν στα είδη *Microcystis* sp., *Anabaena* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Prevotella* sp., *Pedobacter* sp. και *Brevundimonas* sp., ενώ τα

δείγματα FI2, FI3b, FI5, FO3b, FO4 και FO7b αντιστοιχήθηκαν με ζύμες. Τα αναλυτικά δεδομένα που προέκυψαν από τον αλγόριθμο παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

**Πίνακας 9:** Αντιστοίχιση των βακτηριακών 16S rDNA αλληλουχιών από τα δείγματα νερού της λίμνης Παμβώτιδας και της λίμνης Τούμπας, μέσω του αλγόριθμου BLAST με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων (Altschul, S. F., 1997, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Δείγμα	Μήκος αλληλουχίας	Αλληλουχία αναφοράς	Βάση δεδομένων	Κάλυψη αλληλουχίας (%)	E value	Ποσοστό ομοιότητας (%)	Accession number
<b>FI2</b>	779	<i>Papiliotrema fonsecae</i>	Nucleotide collection (nt)	94	0	99,59	KU705462.1
<b>FI3a</b>	601	<i>Brevundimonas albigilva</i>	16S ribosomal RNA	93	0	99,82	NR_148791.1
<b>FI3b</b>	774	<i>Ustilaginoidea virens</i>	Nucleotide collection (nt)	92	0	99,18	MH780737.1
<b>FI4</b>	606	<i>Anabaena cylindrica</i>	16S ribosomal RNA	93	0	95,04	NR_102457.1
<b>FI5</b>	778	<i>Holtermanniella takashimae</i>	Nucleotide collection (nt)	94	0	99,59	NG_061154.1
<b>FO1</b>	601	<i>Microcystis aeruginosa</i>	16S ribosomal RNA	93	0	95,21	NR_074314.1
<b>FO2</b>	628	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	16S ribosomal RNA	93	0	99,15	NR_121739.1
<b>FO3a</b>	619	<i>Prevotella paludivivens</i>	16S ribosomal RNA	93	0	97,58	NR_113122.1
<b>FO3b</b>	780	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Nucleotide collection (nt)	94	0	99,46	NG_062163.1
<b>FO4</b>	778	<i>Debaryomyces psychrosporus</i>	Nucleotide collection (nt)	94	0	99,32	NG_064957.1
<b>FO5</b>	619	<i>Pedobacter roseus</i>	16S ribosomal RNA	93	0	99,31	NR_043555.1
<b>FO6</b>	627	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	16S ribosomal RNA	93	0	99,15	NR_121739.1
<b>FO7a</b>	628	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	16S ribosomal RNA	93	0	98,98	NR_121739.1
<b>FO7b</b>	779	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Nucleotide collection (nt)	94	0	99,45	NG_062163.1

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα φυσικά αντιβιοτικά παράγονται από μικροοργανισμούς, οι οποίοι έχουν ταυτόχρονα ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Τα γονίδια ανθεκτικότητας μπορούν να μεταφέρονται μεταξύ των μικροοργανισμών με γενετική ανταλλαγή. Στο έδαφος εντοπίζονται μη παθογόνα βακτήρια, ανθεκτικά σε αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη, γεγονός που αιτιολογείται από τη συνύπαρξή τους με μύκητες, παραγωγούς αντιβιοτικών όπως ο *Penicillium* και ο *Streptomyces*, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί η μεταφορά με σύζευξη γονιδίου ανθεκτικότητας από *E. coli* σε παθογόνα βακτήρια του εντέρου.

Μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης, ο Fleming επέστησε την προσοχή σχετικά με την κατάχρηση των αντιβιοτικών και τα αρνητικά επακόλουθά της. Πράγματι, λίγες δεκαετίες μετά παρατηρήθηκαν τα πρώτα ανθεκτικά στελέχη. Πλέον, η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά αποτελεί παγκόσμιο φαινόμενο. Η πενικιλίνη είναι αναποτελεσματική για τα περισσότερα βακτήρια πλέον, ενώ για τα ευαίσθητα απαιτείται υψηλή θεραπευτική συγκέντρωση. Η εξάπλωση των γονιδίων ανθεκτικότητας οδήγησε στην παραγωγή ημισυνθετικών παραγώγων της πενικιλίνης, όπως η αμπικιλίνη και η αμοξικιλίνη, τα οποία σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως. Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε αντιβιοτικά, τα ενδονοσοκομειακά στελέχη είναι πιο πιθανό να αποκτήσουν ανθεκτικότητα σε περισσότερα από ένα αντιβιοτικά. Το γεγονός αυτό επιτάσσει την εντατικοποίηση της έρευνας για παραγωγή νεότερων και πιο αποτελεσματικών αντιβιοτικών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ανθεκτικών σε ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά αποτελούν ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη χρυσίζων σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus*, MRSA) και οι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη εντερόκοκκοι (VRE). Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσουν ανθεκτικότητα σε

περισσότερα από ένα αντιβιοτικά αναφέρονται και ως «superbugs». Ως αποτέλεσμα της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας, τα αντιβιοτικά καθίστανται αναποτελεσματικά και οι μολύνσεις παραμένουν αυξάνοντας παράλληλα και τον κίνδυνο εξάπλωσης σε υγιή άτομα.

Η αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα αποτελεί παγκόσμια ανησυχία καθώς νέοι μηχανισμοί αντίστασης αναδύονται και εξαπλώνονται παγκοσμίως, απειλώντας την ικανότητα αντιμετώπισης κοινών μολυσματικών ασθενειών, με αποτέλεσμα παρατεταμένη διάρκεια της ασθένειας, αναπηρία και πολλές φορές θάνατο του ασθενή. Χωρίς αποτελεσματικά αντιμικροβιακά φάρμακα για την πρόληψη και τη θεραπεία λοιμώξεων, ιατρικές διαδικασίες όπως η μεταμόσχευση οργάνων, η χημειοθεραπεία του καρκίνου, η αντιμετώπιση του διαβήτη και χρονοβόρες χειρουργικές επεμβάσεις αποκτούν πολύ υψηλό κίνδυνο. Επιπροσθέτως, η αντιμικροβιακή ανθεκτικότητα αυξάνει το κόστος της υγειονομικής περίθαλψης λόγω παρατεταμένης νοσηλείας και εντατικότερης φροντίδας.

Ανθεκτικά βακτήρια μπορεί να βρεθούν στον άνθρωπο, στα ζώα, στα τρόφιμα αλλά και ελεύθερα στο περιβάλλον. Η εξάπλωσή τους είναι δυνατόν να συμβεί μεταξύ ανθρώπων, μεταξύ ανθρώπων και ζώων συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων ζωικής προέλευσης (και πρόσληψη ελεύθερων από το περιβάλλον). Επιπλέον, την εξάπλωση διευκολύνουν οι ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής κατά τη διάρκεια μιας βακτηριακής λοίμωξης αλλά και η μη τήρηση υγειονομικών κανόνων όσον αφορά τα τρόφιμα.

## **5.1. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΙΣ ΛΙΜΝΕΣ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑ ΚΑΙ ΤΟΥΜΠΙΑ**

Η διαφοροποίηση που παρατηρήθηκε στην ποικιλότητα των βακτηρίων μεταξύ των δύο θρεπτικών υποστρωμάτων, R2A και LB, δικαιολογείται από τη διαφορά στη

σύσταση τους. Αποτελούν και τα δύο ιδανικά μέσα ανάπτυξης ετερότροφων βακτηρίων. Ωστόσο, το LB, ως θρεπτικό μέσο πιο πλούσιας περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά, ευνοεί τα βακτήρια με μικρότερο χρόνο διπλασιασμού, μη δίνοντας ευκαιρία ανάπτυξης στα βακτήρια με πιο αργό ρυθμό. Οι συγκεντρώσεις των βακτηρίων σε κάθε θέση δειγματοληψίας θεωρούνται αναμενόμενες για τα τρυβλία ελέγχου. Εκτός από το φυσικό μικροβίωμα, η λίμνη Παμβώτιδα δέχεται μεγάλο εξωγενές φορτίο λόγω του όγκου των όμβριων υδάτων που καταλήγουν σε αυτή από όλο το λεκανοπέδιο των Ιωαννίνων. Σε μικρή ακτίνα και από τις δύο λίμνες υπάρχουν κτηνοτροφικές και πτηνοτροφικές εγκαταστάσεις, οι οποίες επίσης επιβαρύνουν τα δύο οικοσυστήματα. Οι εισροές των όμβριων υδάτων θα μπορούσαν να δικαιολογούν εν μέρει την πολλαπλή ανθεκτικότητα που διαπιστώθηκε στην πλειονότητα των υγρών καλλιεργειών που αναπτύχθηκαν από τα δείγματα νερού των δύο λιμνών. Τα όμβρια λειτουργούν ως μέσο εμπλουτισμού τόσο με αντιβιοτικά (C.I. Nannou et al., 2015) όσο και με βακτήρια που μπορεί να φέρουν κάποιο γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Ειδικά για την αμπικιλίνη, την πενικιλίνη και την τετρακυκλίνη έχουν βρεθεί ανθεκτικά βακτήρια που καταλαμβάνουν το 65 – 75 % του συνολικού ποσοστού των ανθεκτικών βακτηρίων της λίμνης Gaobeidian (Ανατολικό Πεκίνο, Κίνα) (Pang et al., 2015). Άλλωστε, η φυσική εξέλιξη των βακτηρίων, μέσω του μεγάλου αριθμού τυχαίων μεταλλάξεων, μπορεί να προωθήσει την προσαρμογή τους στις αλλαγές που επιτελούνται στο περιβάλλον τους. Κάποια από όλες αυτές τις μεταλλάξεις θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό.

Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν με βάση τη βιβλιογραφία. Για την καναμυκίνη και την αμπικιλίνη επιλέχθηκαν συγκεντρώσεις με βάση τα πρωτόκολλα *in vitro* πειραμάτων. Για την αμοξικιλίνη, το κλαβουλανικό οξύ, τη σιπροφλοξασίνη και την τετρακυκλίνη επιλέχθηκαν συγκεντρώσεις με βάση τη



μέγιστη αποδεκτή θεραπευτική συγκέντρωση. Η συγκέντρωση του συμπλόκου CIPAG, υπολογίστηκε έτσι ώστε η σιπροφλοξασίνη να αντιστοιχεί επίσης στη μέγιστη αποδεκτή θεραπευτική συγκέντρωση. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με τα μοτίβα πολλαπλής ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που παρατηρήθηκαν στη λίμνη Παμβώτιδα και τη λίμνη Τούμπα, εγείραν την ανησυχία σχετικά με την ταυτοποίηση των καλλιεργειών αυτών, ώστε να διαπιστωθεί εάν πρόκειται για παθογόνα ή δυνητικά παθογόνα στελέχη.

Η ταυτοποίηση των καλλιεργειών οδήγησε στην κατάταξη οχτώ εξ' αυτών στα βακτηριακά είδη *Microcystis* sp., *Anabaena* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Prevotella* sp., *Pedobacter* sp. και *Brevundimonas* sp., οι υπόλοιπες έξι ταυτοποιήθηκαν ως ζύμες. Εξάγεται λοιπόν το συμπέρασμα ότι οι ζύμες αυτές είναι ανθεκτικές στην ναταμυσίνη. Επιπρόσθετα, δύο από αυτές τις ζύμες (*Vishniacozyma* sp., *Ustilaginoidea* sp.) ταυτοποιήθηκαν από τις καλλιέργειες των οποίων τα προϊόντα PCR αποτελούνταν από δύο τμήματα διαφορετικού μεγέθους. Διατυπώνεται λοιπόν η υπόθεση πιθανής συμβιωτικής σχέσης με τα βακτήρια *Prevotella* sp. και *Stenotrophomonas* sp., αντίστοιχα.

Τα *Microcystis* sp. και *Anabaena* sp. ανήκουν στο Φύλο των Κυανοβακτηρίων. Η απόκριση των κυανοβακτηρίων στα αντιβιοτικά εξαρτάται από τον τύπο και τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Τα αντιβιοτικά β – λακτάμης είναι τα πιο αποτελεσματικά όσον αφορά τα κυανοβακτήρια, ωστόσο κάποια είδη χρησιμοποιούν την αμικιλίνη ως πηγή αζώτου. Παρουσία αμοξικιλίνης τα κυανοβακτήρια αδυνατούν να φωτοσυνθέσουν. Η καναμυκίνη εκτός από αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης μπορεί να προκαλέσει κυτταροτοξικότητα με αναγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου. Τα δεδομένα για τη επίδραση των κινολονών είναι σχετικά ελλιπή (Dias et al., 2015). Τα κυανοβακτήρια της μελέτης που βρέθηκαν να έχουν πολλαπλή ανθεκτικότητα είναι ένα

*Microcystis* sp. με ομολογία 95,21% με το *Microcystis aeruginosa* και ένα *Anabaena* sp. με 95,04% με το *Anabaena cylindrica*. Το ποσοστό ομολογίας και για το δύο αυτά στελέχη τα κατατάσσει ως άγνωστα σε επίπεδο γένους (95 – 97%). Το *Microcystis* sp. βρέθηκε ευαίσθητο στο κλαβουλανικό οξύ, ανθεκτικό στα υπόλοιπα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν, δεδομένα που επιβεβαιώνονται και από προηγούμενες μελέτες (Dias et al., 2015; Le Page et al., 2017) και ευαίσθητο στα βαρέα μέταλλα As, Ni και Cr. Το *Anabaena* sp. βρέθηκε ανθεκτικό σε όλα τα αντιβιοτικά της παρούσας εργασίας, ενώ παλαιότερη μελέτη καταδεικνύει ότι η χρόνια έκθεση του σε δραστικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών το καθιστά ανθεκτικό (Le Page et al., 2017), ανθεκτικό στα βαρέα μέταλλα As, Ni και ευαίσθητο στο Cr. Τα δύο αυτά κυανοβακτήρια παράγουν τοξίνες επικίνδυνες για την ανθρώπινη υγεία αλλά δεν αποτελούν άμεσα παθογόνα για τον άνθρωπο. Απομένει να μελετηθεί εάν αποτελούν φορείς διάδοσης γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά μέσω οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η οριζόντια γονιδιακή μεταφορά συμβαίνει συχνά σε οργανισμούς που σχηματίζουν βιοφίλμ (Ren, et al., 2015). Με δεδομένο ότι η λίμνη Παμβώτιδα είναι ευτροφική και το πλήθος των κυανοβακτηρίων τεράστιο, η πιθανότητα οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς σε παθογόνα ή δυνητικά παθογόνα είναι ανησυχητική.

Το *Stenotrophomonas rhizophila* ανήκει στην τάξη των  $\gamma$  – πρωτεοβακτηρίων και είναι ένας Gram(-) βάκιλος. Αποτελεί φυσικό παράγοντα της ριζόσφαιρας και μπορεί να βρεθεί σε όλα τα φυτά. Το *S. rhizophila* παράγει ωσμοπροστατευτικές ουσίες και παρέχει στα φυτά άμυνα από φυτοπαθογόνα βακτήρια και μύκητες (Berg et al., 2010). Δεδομένης της συγγένειας του *S. rhizophila* με το παθογόνο *S. maltophilia*, έχουν εκφραστεί φόβοι για τη συγκομιδή και κατανάλωση φυτών εποικισμένων με το *S. rhizophila*. Οι φόβοι αυτοί προκύπτουν από το γεγονός ότι στα βακτήρια που

σχηματίζουν βιοφίλμ παρατηρείται πιο συχνά οριζόντια γονιδιακή μεταφορά (Ren, et al., 2015; Alavi, et al., 2014). Ως *Stenotrophomonas* sp. χαρακτηρίστηκαν οι καλλιέργειες FO2, FO6 και FO7a, τα οποία είναι ανθεκτικά σε όλα τα αντιβιοτικά στα οποία δοκιμάστηκαν. Τα FO6 και FO7a χαρακτηρίστηκαν ως ανθεκτικά στο As και το Ni, ενώ το FO2 μόνο στο Ni. Απομένει να ελεγχθεί εάν η υπόθεση σχετικά με την οριζόντια γονιδιακή μεταφορά λόγω σχηματισμού βιοφίλμ αληθεύει.

Το *Prevotella paludivivens* είναι Gram(-) και κατατάσσεται στο φύλο των Bacteroidetes. Είναι το πρώτο στέλεχος *Prevotella* που απομονώθηκε από το φυσικό περιβάλλον (Ueki et al., 2007) και για την ανθεκτικότητά του σε αντιβιοτικά δεν υπάρχουν προηγούμενες μελέτες, ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Ως *Prevotella* sp. χαρακτηρίστηκε η καλλιέργεια FO3a και είναι ανθεκτική στην καναμυκίνη, στην αμοξικιλίνη, στο κλαβουλανικό οξύ, στη σιπροφλοξασίνη και στα βαρέα μέταλλα As και Ni. Γενικά το γένος *Prevotella* sp. είναι γνωστό ότι προσβάλλει το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου ως δυνητικά παθογόνο και σε αντίθεση με το *Prevotella paludivivens*, τα υπόλοιπα στελέχη εντοπίζονται μόνο σε θηλαστικά. Μελέτη που διεξήχθη στο Ηνωμένο Βασίλειο έδειξε ότι όλα τα στελέχη *Prevotella* sp. που απομονώθηκαν από ασθενείς με κυστική ίνωση ήταν ανθεκτικά στην αμοξικιλίνη και την τετρακυκλίνη, ενώ το 21% αυτών βρέθηκε ανθεκτικό και στο κλαβουλανικό οξύ (Sherrard et al., 2013).

Το *Pedobacter* sp. θεωρείται ότι ανήκει στην ομάδα των περιβαλλοντικών «superbugs» (Viana et al., 2019). Είναι Gram(-) και είναι πολλαπλά ανθεκτικό σε μια πληθώρα αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στην ιατρική. Ανάμεσα σε αυτά είναι και τα αντιβιοτικά β – λακτάμης, οι αμινογλυκοζίδες και η σιπροφλοξασίνη. Επιπλέον βρέθηκε ότι διαθέτει μηχανισμούς εκροής για διαφορετικά αντιβιοτικά (Ullmann et al., 2020). Ως *Pedobacter* sp. χαρακτηρίστηκε το FO5, το οποίο είναι ανθεκτικό σε όλα τα

αντιβιοτικά της μελέτης εκτός από το σύμπλοκο CIPAG και ανθεκτικό στο Ni. Το *Pedobacter roseus* αλληλουχήθηκε πλήρως αφού απομονώθηκε για πρώτη φορά σε μια υπερτροφική λίμνη στην Πανεπιστημιούπολη του Εθνικού Πανεπιστημίου της Σεούλ, στην Κορέα (Hwang et al., 2006).

Το *Brevundimonas albigilva* είναι ένα Gram(-), αερόβιο α – πρωτεοβακτήριο που απομονώθηκε από δασικό έδαφος στο Πανεπιστήμιο Kyonggi (Suwon, Νότια Κορέα) (Pham et al., 2016). Η καλλιέργεια F13a χαρακτηρίστηκε ως *Brevundimonas* sp. και είναι ανθεκτική σε όλα τα αντιβιοτικά της μελέτης και στα βαρέα μέταλλα As και Ni. Ωστόσο τα πειραματικά δεδομένα αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας δεν μπορούν να επιβεβαιωθούν με ακρίβεια αφού για το συγκεκριμένο στέλεχος δεν υπάρχουν αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα. Αναφορικά με το *Brevundimonas* spp. είναι γνωστό ότι αποτελεί δυνητικά παθογόνο για άτομα με υποκείμενα νοσήματα και εμφανίζει ανθεκτικότητα τόσο στα αντιβιοτικά β – λακτάμης όσο και στις φθοροκινολόνες (Ryan & Pembroke, 2018).

## **5.2. ΤΑ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΩΣ ΡΥΠΟΣ ΣΤΗΝ ΠΑΜΒΩΤΙΔΑ**

Τα βαρέα μέταλλα είναι κοινός ρύπος για τα υδάτινα οικοσυστήματα και ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στις τοξικές επιδράσεις τους στους ζωντανούς οργανισμούς που διαβιούν σε αυτά. Ειδικά τα βαρέα μέταλλα Ni και Cr ξεπερνούν τα ασφαλή όρια που έχουν καθιερωθεί από τη διεθνή κοινότητα, γεγονός που προκαλεί ανησυχία για το τι επιπτώσεις μπορούν να έχουν στους οργανισμούς.

## **5.3. ΤΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ**

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας και τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων της Ευρώπης και των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής κρούουν τον κώδωνα του κινδύνου σχετικά με το φαινόμενο εμφάνισης ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων

και χαρακτηρίζουν την κατάσταση ως κρίσιμη. Το πρόβλημα στην πραγματικότητα είναι διττό. Από τη μία, τα παθογόνα βακτήρια που μέχρι πρότινος αντιμετωπιζόταν εύκολα πλέον έχουν εξελιχθεί σε «*superbugs*» με ανάπτυξη διαφόρων μηχανισμών αντίστασης στα αντιβιοτικά. Από την άλλη, ακόμα και αν ένα βακτήριο δεν είναι παθογόνο μπορεί να μεσολαβήσει στη διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας.

Για την ενημέρωση και την ευαισθητοποίηση σχετικά με την ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει θεσπίσει σε ετήσια βάση την «Παγκόσμια Εβδομάδα Ευαισθητοποίησης για τα Αντιβιοτικά». Για το 2020 θα λάβει χώρα από τις 18 έως τις 24 Νοεμβρίου.



## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940; 146:837.

Agwuh, K. N., & MacGowan, A. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycyclines. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 58(2), 256–265. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl224>

Alavi, P., Starcher, M. R., Thallinger, G. G., Zachow, C., Müller, H., & Berg, G. (2014). *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC genomics*, 15(1), 482. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-482>

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>

Aminov R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 1, 134. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>

Berg, G., Egamberdieva, D., Lugtenberg, B., Hagemann, M. (2010) “Symbiotic Plant-Microbe Interactions: Stress Protection, Plant Growth Promotion, and Biocontrol by *Stenotrophomonas*”, *Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology*", Springer Netherlands, Dordrecht, p. 445-460

Bush K Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54:969–976.

Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant  $\beta$ -lactamases. *Ann N Y Acad Sci*. 2013 Jan.1277:84–90.

Bush K. The ABCD’s of  $\beta$ -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother*. 2013 Aug; 19(4):549–59.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2013.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.

Christina I. Nannou, Christina I. Kosma & Triantafyllos A. Albanis (2015) Occurrence of pharmaceuticals in surface waters: analytical method development and environmental risk assessment, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **95**:13, 1242-1262, DOI: [10.1080/03067319.2015.1085520](https://doi.org/10.1080/03067319.2015.1085520)

Connell, S. R., Tracz, D. M., Nierhaus, K. H., & Taylor, D. E. (2003). Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **47**(12), 3675–3681. <https://doi.org/10.1128/aac.47.12.3675-3681.2003>

D’Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011 Aug 31; **477**(7365): 457–61.

de Barse, M., Bottinelli, L., & Greub, G. (2014). Antibiotic susceptibility of *Estrella lausannensis*, a potential emerging pathogen. *Microbes and infection*, **16**(9), 746–754. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.08.003>

Dias, E., Oliveira, M., Jones-Dias, D., Vasconcelos, V., Ferreira, E., Manageiro, V., & Caniça, M. (2015). Assessing the antibiotic susceptibility of freshwater Cyanobacteria spp. *Frontiers in microbiology*, **6**, 799. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00799>

Domingues S, da Silva GJ, Nielsen KM. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mob Genet Elements*. 2012; **2**(5):211–223. doi:10.4161/mge.22967.

European Center for Disease Control (ECDC) (2016): Ανθεκτικά μικρόβια στην Ελλάδα λόγω κατάχρησης αντιβιοτικών. Eurobarometer Special 445, Antimicrobial Resistance.

European Commission. (1992). Council Directive 92/43/EEC of 21 May 1992 on the conservation of natural habitats and of wild fauna and flora. *Official Journal of the European Communities*. **L206**: 1–50.

Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2012). Fast and comprehensive multi – residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some



of their metabolites in surface and treated waters by ultra – high – performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1248, 104–121. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.084>

Hancock, R. E., & Brinkman, F. S. (2002). Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annual review of microbiology*, 56, 17–38. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160310>

Hooper D. C. (2002). Fluoroquinolone resistance among Gram positive cocci. *The Lancet. Infectious diseases*, 2(9): 530–538. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00369-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00369-9)

Hugo WB and Russel AD (2004). *Pharmaceutical Microbiology*. 7th edn. Blackwell Scientific Publications, UK. pp. 220-232.

Hwang, C. Y., Choi, D. H., & Cho, B. C. (2006). *Pedobacter roseus* sp. nov., isolated from a hypertrophic pond, and emended description of the genus *Pedobacter*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(Pt 8), 1831–1836. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64045-0>

Insuasty, D., Vidal, O., Bernal, A., Marquez, E., Guzman, J., Insuasty, B., Quiroga, J., Svetaz, L., Zacchino, S., Puerto, G., & Abonia, R. (2019). Antimicrobial Activity of Quinoline-Based Hydroxyimidazolium Hybrids. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8(4), 239. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040239>

Ioannides K. et al. (2015). Distribution of heavy metals in sediment cores of Lake Pamvotis (Greece): a pollution and potential risk assessment. *Environ Monit Assess*, 187: 4209.

Kallscheuer, N., Jogler, M., Wiegand, S., Peeters, S. H., Heuer, A., Boedeker, C., Jetten, M., Rohde, M., & Jogler, C. (2019). Three novel *Rubripirellula* species isolated from plastic particles submerged in the Baltic Sea and the estuary of the river Warnow in northern Germany. *Antonie van Leeuwenhoek*, 10.1007/s10482-019-01368-3. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01368-3>

Konkit, M., Kim, J. H., & Kim, W. (2016). *Marimicrobium arenosum* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from sea sand. *International journal*

*of systematic and evolutionary microbiology*, 66(2), 856–861.  
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000803>

Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(6), a027029.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>

Kulichevskaya, Irina S et al. “*Paludisphaera borealis* gen. nov., sp. nov., a hydrolytic planctomycete from northern wetlands, and proposal of *Isosphaeraceae* fam. nov.” *International journal of systematic and evolutionary microbiology* vol. 66,2 (2016): 837-844. doi:10.1099/ijsem.0.000799

Le Page, G., Gunnarsson, L., Snape, J., & Tyler, C. R. (2017). Integrating human and environmental health in antibiotic risk assessment: A critical analysis of protection goals, species sensitivity and antimicrobial resistance. *Environment international*, 109, 155–169. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.09.013>

Leclercq R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34(4): 482–492.  
<https://doi.org/10.1086/324626>

Levison, M. E., & Levison, J. H. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infectious disease clinics of North America*, 23(4), 791–vii.  
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.06.008>

Li, W., Atkinson, G. C., Thakor, N. S., Allas, U., Lu, C. C., Chan, K. Y., Tenson, T., Schulten, K., Wilson, K. S., Hauryliuk, V., & Frank, J. (2013). Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nature communications*, 4: 1477. <https://doi.org/10.1038/ncomms2470>

MacDonald, D. D., Ingersoll, C. G., & Berger, T. A. (2000). Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 39(1), 20–31.  
<https://doi.org/10.1007/s002440010075>

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2005). *Brock Βιολογία των μικροοργανισμών*. Ηράκλειο, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης

Manson JM, Hancock LE, Gilmore MS. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 6; **107(27)**:12269–74.

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. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.001>

McMurry, L., Petrucci, R. E., Jr, & Levy, S. B. (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **77(7)**, 3974–3977. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.7.3974>

Milionis, I., Banti, C. N., Sainis, I., Raptopoulou, C. P., Psycharis, V., Kourkoumelis, N., & Hadjikakou, S. K. (2018). Silver ciprofloxacin (CIPAG): a successful combination of chemically modified antibiotic in inorganic-organic hybrid. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, **23(5)**, 705–723. <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1561-9>

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*, **4(2)**, 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>

Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., & Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of microbiology*, **164(3)**, 165–172. <https://doi.org/10.1007/BF02529967>

Nelson, M. L., Dinardo, A., Hochberg, J., & Armelagos, G. J. (2010). Brief communication: Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350-550 CE. *American journal of physical anthropology*, **143(1)**, 151–154. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21340>

Nnadozie, C. F., & Odume, O. N. (2019). Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, **254(Pt B)**, 113067. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113067>

- Nödler, K., Licha, T., Bester, K., & Sauter, M. (2010). Development of a multi-residue analytical method based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples. *Journal of chromatography*, *A*, *1217*(42), 6511–6521. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.048>
- Pagès, J. M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram (-) negative bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, *6*(12), 893–903. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>
- Pang, Y.-C., Xi, J.-Y., Li, G.-Q., Shi X.-J., Hu, H.-Y. (2015). Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in a lake for the storage of reclaimed water before and after usage as cooling water. *Environ Sci Process Impacts*, *17*, 1182e1189. <https://doi.org/10.1039/C5EM00177C>
- Pedersen J. C. (1992). Natamycin as a fungicide in agar media. *Applied and environmental microbiology*, *58*(3), 1064–1066. <https://doi.org/10.1128/AEM.58.3.1064-1066.1992>
- Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR (2007). *Microbiology*. 5th edn. Tata McGraw-Hill. pp. 531-532.
- Pham, V., Jeong, S., Chung, S., & Kim, J. (2016). *Brevundimonas albigilva* sp. nov., isolated from forest soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *66*(3), 1144–1150. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000848>
- Piddock L. J. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical microbiology reviews*, *19*(2), 382–402. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>
- Pruden, A. and Arabi, M. (2011). Quantifying Anthropogenic Impacts on Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. In *Antimicrobial Resistance in the Environment* (eds P.L. Keen and M.H.M.M. Montforts). doi:[10.1002/9781118156247.ch10](https://doi.org/10.1002/9781118156247.ch10)
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, *13*(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>

Ren, D., Madsen, J. S., Sørensen, S. J., & Burmølle, M. (2015). High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *The ISME journal*, **9(1)**, 81–89. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.96>

Review on Antimicrobial Resistance, tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. (2016), Chaired by Jim O’Neill.

Richaume, A., Angle, J. S., & Sadowsky, M. J. (1989). Influence of soil variables on in situ plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*. *Applied and environmental microbiology*, **55(7)**, 1730–1734. <https://doi.org/10.1128/AEM.55.7.1730-1734.1989>

Ryan, M. P., & Pembroke, J. T. (2018). *Brevundimonas* spp: Emerging global oppo

Sarika-Hatzinikolaou et al., 2003 (*Phytocoenol*, **33**, 1, 93-151, The macrophytic vegetation in seven aquatic ecosystems in Epirus, NW Greece).

Sherrard, L. J., Graham, K. A., McGrath, S. J., McIlreavey, L., Hatch, J., Muhlebach, M. S., Wolfgang, M. C., Gilpin, D. F., Elborn, J. S., Schneiders, T., & Tunney, M. M. (2013). Antibiotic resistance in *Prevotella* species isolated from patients with cystic fibrosis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **68(10)**, 2369–2374. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt191>

Sydnor ER, Perl TM. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jan; **24(1)**:141–73. [PubMed: 21233510].

Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Sep; **3(9)**:711–21. [PubMed: 16138099].

Touka, A., Vareli, K., Igglezou, M., Monokrousos, N., Alivertis, D., Halley, J.M., Hadjikakou, S., Frillingos, S. and Sainis, I. (2018) *Ancient European Lakes: Reservoirs of Hidden Microbial Diversity? The Case of Lake Pamvotis (NW Greece)*. *Open Journal of Ecology*, **8**: 537-578.

Ueki, A., Akasaka, H., Satoh, A., Suzuki, D., & Ueki, K. (2007). *Prevotella paludivivens* sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram (-) negative, hemicellulose-decomposing bacterium isolated from plant residue and rice roots in irrigated rice-field

soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(Pt 8), 1803–1809. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64914-0>

Ullmann, I. F., Nygaard, A. B., Tunsjø, H. S., & Charnock, C. (2020). Whole genome sequencing and antibiotic diffusion assays provide new insight on drug resistance in the genus *Pedobacter*. *FEMS microbiology ecology*, 96(6), fiaa088. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa088>

Ventola, C Lee. “The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats.” *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management* vol. 40,4 (2015): 277-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>

Viana, A. T., Caetano, T., Covas, C., Santos, T., & Mendo, S. (2018). Environmental superbugs: The case study of *Pedobacter* spp. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 241, 1048–1055. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.047>

Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M., & Toleman, M. A. (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet. Infectious diseases*, 11(5), 355–362. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70059-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70059-7)

Wang, C. M., Zhao, F. L., Zhang, L., Chai, X. Y., & Meng, Q. G. (2017). Synthesis and Antibacterial Evaluation of a Series of 11,12-Cyclic Carbonate Azithromycin-3-O-descladinosyl-3-O-carbamoyl Glycosyl Derivatives. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(12), 2146. <https://doi.org/10.3390/molecules22122146>

WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation? Geneva: World Health Organization; 2018. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2014 Jan; **12(1)**: 35–48.

Wright GD (March 2007). "The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity". *Nature Reviews Microbiology*. **5 (3)**: 175–186. doi:10.1038/nrmicro1614

Wu, C., Huang, X., Witter, J. D., Spongberg, A. L., Wang, K., Wang, D., & Liu, J. (2014). Occurrence of pharmaceuticals and personal care products and associated

environmental risks in the central and lower Yangtze river, China. *Ecotoxicology and environmental safety*, **106**, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.029>

Yang, W., Moore, I. F., Koteva, K. P., Bareich, D. C., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2004). TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *The Journal of biological chemistry*, *279*(50), 52346–52352. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409573200>

Yang, Y., Xu, C., Cao, X., Lin, H., & Wang, J. (2017). Antibiotic resistance genes in surface water of eutrophic urban lakes are related to heavy metals, antibiotics, lake morphology and anthropic impact. *Ecotoxicology (London, England)*, **26**(6), 831–840. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1814-3>