



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Βιοτεχνολογία – Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Χαρακτηρισμός της ικανότητας ενός βακτηριακού στελέχους
Sphingomonas να χρησιμοποιεί το κτηνιατρικό αντιβιοτικό tiamulin ως
πηγή άνθρακα»

Νίκη Ταγκαλίδου

ΛΑΡΙΣΑ, 2024

«Χαρακτηρισμός της ικανότητας ενός βακτηριακού στελέχους *Sphingomonas* να χρησιμοποιεί το κτηνιατρικό αντιβιοτικό tiamulin ως πηγή άνθρακα.»

“Characterization of the ability of a *Sphingomonas* bacterial strain to use the veterinary antibiotic tiamulin as a carbon source.”

Επιβλέπων καθηγητής:

- ο Βασιλειάδης Σωτήριος

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- ο Βασιλειάδης Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ο Καρπούζας Δημήτριος, Καθηγητής, Πρόεδρος Τμήματος Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- ο Δρ. Παναγιώτης Καράς, Μεταδιδακτορικός Ερευνητής Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Η αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού καθιστά αναγκαία την ταυτόχρονη αύξηση της παραγωγής των τροφίμων. Όσον αφορά το κομμάτι της κτηνοτροφίας, ένας βασικός τρόπος που χρησιμοποιείται για την επίτευξη του παραπάνω στόχου είναι η χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων. Ωστόσο, τα χορηγούμενα αντιβιοτικά διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό σε αμετάβλητη μορφή και εξέρχονται από τον οργανισμό των ζώων μέσω ούρων και κοπράνων. Η λανθασμένη και υπερβολική χορήγησή τους και η διασπορά τους μέσω λανθασμένης γεωργικής πράξης, έχει οδηγήσει σε φαινόμενα ανάπτυξης αντιβιοαντοχής, με επιπτώσεις στο περιβάλλον και τη δημόσια υγεία. Το κτηνιατρικό αντιβιοτικό (ΚΑ) tiamulin είναι ένα ημισυνθετικό αντιβιοτικό της οικογένειας των πλευρομουτιλινών που χρησιμοποιείται ευρέως στην κτηνοτροφία, με την κυριότερη εφαρμογή της να είναι η καταπολέμηση του βακτηρίου *Brachyspira hyodysenteriae* που ευθύνεται για την εμφάνιση της δυσεντερίας στους χοίρους. Πρόκειται για μία ουσία με επίμονη παρουσία στην κοπριά με αυξημένο χρόνο ημιζώης, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα πιθανή να καταλήξει στα γεωργικά εδάφη όταν αυτή η κοπριά χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα.

Η παρούσα μελέτη είχε σκοπό να χαρακτηριστεί το εύρος και τις βέλτιστες συνθήκες για την αποικοδόμηση του ΚΑ tiamulin από βακτηριακό στέλεχος που είχε απομονωθεί στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών & Περιβάλλοντος. Ειδικότερα, εξετάστηκε η αποικοδομητική του ικανότητα σε ένα εύρος συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού, σε ένα εύρος τιμών pH και σε ένα εύρος θερμοκρασιών. Η διερεύνηση της διάσπασης έγινε σε υγρές καλλιέργειες εμπλουτισμού σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα MSM όπου το αντιβιοτικό ήταν πηγή άνθρακα και αζώτου. Η μέτρηση της εναπομένουσας συγκέντρωσης του ΚΑ πραγματοποιήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η διάσπαση του ΚΑ φάνηκε ότι επηρεάζεται από την αρχική της συγκέντρωση, το pH του υποστρώματος και τη θερμοκρασία επώασης, με το βακτηριακό στέλεχος να αποικοδομεί εντελώς το αντιβιοτικό όταν αυτό είχε συγκέντρωση έως 100 mg/L σε διάστημα 3 ημερών με τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης να είναι οι 25 °C και το pH 6.5 με 7.5. Συνολικά, οι προσπάθειές μας ανέδειξαν έναν μικροοργανισμό ικανό βιοαπορρόπησης του tiamulin σε ευρύ φάσμα συνθηκών.

Λέξεις κλειδιά: κτηνιατρικά φάρμακα, tiamulin, βιοαποδόμηση

Abstract

The growth of the world's population makes it necessary to increase food production at the same time. As far as livestock farming concerned, one of the main ways for achieving this is through the use of veterinary medicines. However, veterinary antibiotics administered are largely retained in an unchanged form and are eliminated from the animal's body through urine and feces. Their overuse and misuse next to the subsequent deposition of antibiotic rich manures in receiving agricultural environments have led to the dispersal of antibiotic resistance, with consequences for environment and the human health. Tiamulin is a semi-synthetic antibiotic of the pleuromutilin family widely used in animal husbandry, its main application being the control of the bacterium *Brachyspira hyodysenteriae* responsible for the occurrence of dysentery in pigs. It is a persistent substance in manure with an increased half-life, which makes it particularly likely to end up in agricultural soils when this manure is used as fertiliser.

The present study aimed to characterize the range and optimal conditions for the degradation of tiamulin by a bacterial strain isolated from isolated in a previous study by the Plant & Environmental Biotechnology Laboratory. More specifically, its degradation capacity was examined over a range of antibiotic concentrations, a range of pH values and a range of temperatures. The degradation was investigated in liquid enrichment cultures grown on selective MSM nutrient substrate where the antibiotic acted as a source of carbon and nitrogen. Measurement of the residual concentration of tiamulin was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). The degradation of tiamulin was shown to be affected by its initial concentration, substrate pH and incubation temperature, with the bacterial strain completely degrading the antibiotic when it was concentrated up to 100 mg/L over a 3-day period with optimal growth conditions being 25 °C and pH 6.5 to 7.5. Overall, our efforts suggest a microorganism capable of the biodegradation of tiamulin at a broad range of conditions.

Key words: veterinary drugs, tiamulin, biodegradation

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	2
Abstract	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
1.1 Αντιβιοτικά.....	5
1.2 Κτηνιατρικά φάρμακα.....	5
1.3 Προβλήματα αντιβιοαντοχής	7
1.4 Οδοί εισόδου κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον.....	9
1.5 Περιβαλλοντική τύχη αντιβιοτικών	11
15.1 Προσρόφιση.....	11
1.5.2 Έκπλυση.....	12
1.5.3 Απορροή.....	12
1.5.4 Αποικοδόμηση.....	12
1.5.5 Μικροβιακή αποικοδόμηση	13
1.6 Πλευρομουτιλίνες.....	14
1.6.1 Χαρακτηριστικά και εφαρμογές πλευρομουτιλινών	14
1.6.2 Tiamulin	14
1.6.3 Χημική δομή και δράση του KA tiamulin.....	15
1.6.4 Απορρόφιση-Κατανομή του KA tiamulin	16
1.6.5 Αλληλεπίδραση του KA tiamulin με άλλες φαρμακευτικές ουσίες	18
1.6.6. Τύχη του tiamulin στο περιβάλλον.....	18
1.7 Σκοπός της παρούσας μελέτης	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	20
2.2 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος Minimum Salt Medium (MSM)	21
2.4 Ανάλυση σε σύστημα HPLC-PDA.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	23
3.1 Μελέτη αποικοδομητικής ικανότητας του ΤΙΑ από το βακτήριο παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού	23
3.2 Μελέτη αποικοδομητικής ικανότητας του ΤΙΑ από το βακτήριο σε ένα εύρος pH	25
3.3 Μελέτη αποικοδομητικής ικανότητας του ΤΙΑ από το βακτήριο σε ένα εύρος θερμοκρασιών.....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	27
4.1 Συζήτηση.....	27
4.2 Συμπερασματικά σχόλια - Μελλοντική έρευνα	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	31

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι ομάδα βιοδραστικών μορίων με βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνα δράση (Kohanski et al., 2010). Σε μεγάλο ποσοστό τους τα αντιβιοτικά, ειδικά οι πρώτες ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντιβιοτική τους δράση, είναι φυσικής προέλευσης (από βακτήρια και μύκητες). Παρόλα αυτά σήμερα, χρησιμοποιούνται και ημισυνθετικά και πλήρως συνθετικά αντιβιοτικά (Khmaissa et al., 2024). Η θεραπεία λοιμώξεων με χρήση αντιβιοτικών βασίζεται στις διαφορές μεταξύ των μικροοργανισμών και των ευκαρυωτικών κυττάρων, ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι τα αντιβιοτικά μπορούν να αλληλοεπιδρούν με τις μεμβράνες, οδηγώντας σε ενεργοποίηση μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης σε προκαρυωτικά αλλά και σε ευκαρυωτικά κύτταρα (Dalhoff, 2021). Οι μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών περιλαμβάνουν την αναστολή της σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος, αναστολή λειτουργίας ριβοσώματος, αναστολή σύνθεσης νουκλεϊκού οξέος, αναστολή του μεταβολισμού του φολικού οξέος και την αναστολή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης (Karoor et al., 2017). Παράλληλα όμως με την δραστηριότητα των αντιβιοτικών, αναπτύσσεται και η αντιβιοαντοχή που εντείνεται με το πέρασμα του χρόνου λόγω της αλόγιστης χρήσης των αντιβιοτικών ουσιών και της διασποράς τους στο περιβάλλον όπως περιγράφεται στη συνέχεια του κειμένου. Σε τέτοιες περιπτώσεις έχει αποδειχθεί ότι η συνδυασμένη χρήση ορισμένων αντιβιοτικών με διαφορετικούς τρόπους δράσης μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη αποτελεσματικότητα (Singh & Yeh, 2017). Παρόλο που το μεγαλύτερο ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας κατά την ανάπτυξη αντιβιοτικών δραστικών ουσιών περιστρέφεται γύρω από την ανθρώπινη υγεία, ισάξιο ή και μεγαλύτερο ποσοστό κατανάλωσης αντιβιοτικών παγκοσμίως αφορά την κτηνοτροφία (Pokharel et al., 2020). Τα φαινόμενα αντιβιοαντοχής λόγω της χρήσης απαραίτητων, μεν, κτηνιατρικών αντιβιοτικών όπως εξηγείται στη συνέχεια, είναι πιο εντατικά σε σχέση με αυτά της ανθρώπινης αντιβιοαντοχής, όπως αναλύεται παρακάτω.

1.2 Κτηνιατρικά φάρμακα

Με την σταδιακή αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού, ο οποίος αυτήν τη στιγμή εκτιμάται στα 7,9 δισεκατομμύρια και αναμένεται να φτάσει τα 9,7 δισεκατομμύρια έως το 2050, η ανάγκη για τρόφιμα έχει πολλαπλασιαστεί. Ένας κύριος τρόπος επίτευξης αυτού του στόχου,

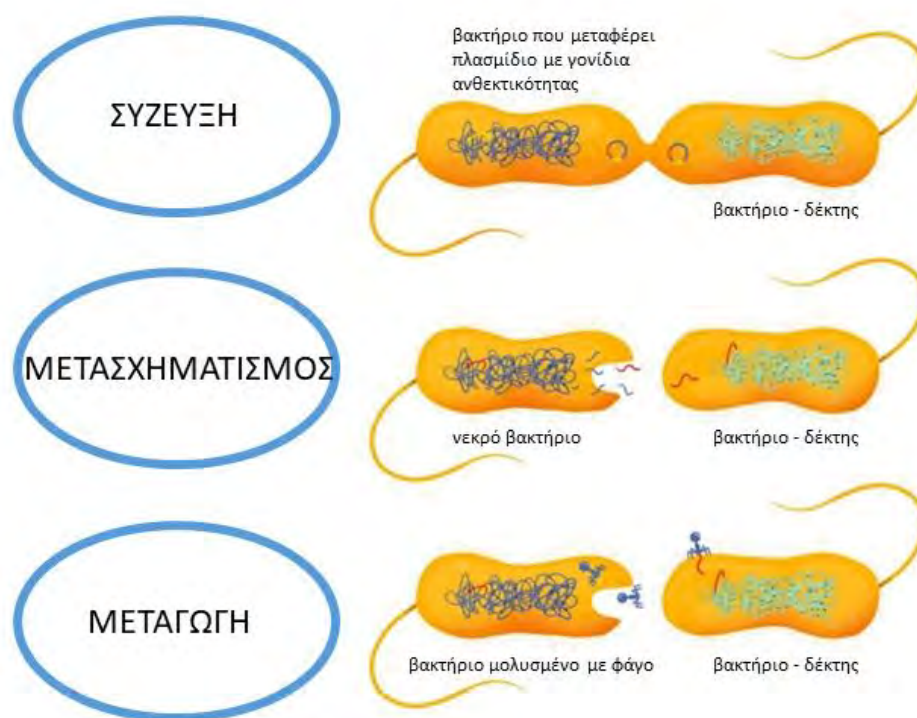
δηλαδή της αύξησης της παραγωγής τροφίμων, είναι η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων στην κτηνοτροφία. Τα κτηνιατρικά φάρμακα συνεισφέρουν σημαντικά στην ανάπτυξη της ζωικής παραγωγής, αυξάνοντας τόσο την ποσότητα των διαθέσιμων τροφίμων όσο και την ποιότητα αυτών, μειώνοντας τη μετάδοση ασθενειών μέσω της τροφικής αλυσίδας. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση αναφέρονται ως «κτηνιατρικά φάρμακα» όλες οι φαρμακολογικά δραστικές ουσίες και τα εμβόλια που χρησιμοποιούνται, είτε σε ζώα συντροφιάς είτε σε παραγωγικά ζώα, χωρίς να έχουν απαραίτητα θεραπευτική δράση (Woodward, 2008). Ειδικότερα, σύμφωνα με το Άρθρο 4 του Κανονισμού (ΕΕ) 2019/6, κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών, η οποία χαρακτηρίζεται ως προϊόν με θεραπευτικές ή προληπτικές έναντι νόσων των ζώων, ή κάθε ουσία ή συνδυασμός ουσιών η οποία δύναται να χρησιμοποιηθεί ή να χορηγηθεί σε ζώα με στόχο την αποκατάσταση, βελτίωση ή τροποποίηση φυσιολογικών λειτουργιών με την άσκηση φαρμακολογικής, ανοσολογικής ή μεταβολικής δράσης, είτε για λόγους ιατρικής διάγνωσης ή ευθανασίας ζώων, ονομάζεται κτηνιατρικό φάρμακο. Με βάση την προέλευση τους, τα αντιβιοτικά φάρμακα διακρίνονται σε φυσικά, ημισυνθετικά και συνθετικά παράγωγα (Gould, 2016). Τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά (ΚΑ) είναι σχεδιασμένα έτσι ώστε να έχουν βιολογική δράση ακόμα και όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Bártíková et al., 2016). Τα αντιβιοτικά στα παραγωγικά ζώα χρησιμοποιούνται για θεραπεία, μεταφύλαξη, προφύλαξη-πρόληψη, και για αυξητική δράση. Ως θεραπεία ορίζεται ως η χορήγηση αντιβιοτικών σε ένα ζώο (ατομική θεραπεία) ή σε μια ομάδα ζώων (ομαδική θεραπεία), που εμφανίζει κλινικά συμπτώματα νόσου, δηλαδή ένα εμφανές βακτηριακό νόσημα. Σκοπός αυτής της θεραπείας είναι να περιοριστεί η πρόοδος της νόσου στα ζώα που πάσχουν, προκειμένου να αποφευχθεί η μειωμένη απόδοση τους. Η έννοια της μεταφύλαξης αναφέρεται στη χρήση αντιβιοτικών σε μια ομάδα ζώων κατά την περίοδο όπου μόνο ορισμένα από αυτά εμφανίζουν συμπτώματα νόσου, αναμένοντας ότι στο μέλλον και άλλα μέλη της ομάδας μπορεί να προσβληθούν. Η προφύλαξη-πρόληψη αφορά τη χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων σε υγιή ζώα που εκτίθενται σε πιθανό κίνδυνο, χωρίς ωστόσο να έχει εκδηλωθεί κάποιο νόσημα και χωρίς να έχει ταυτοποιηθεί ο υπεύθυνος αιτιολογικός παράγοντας (Schwarz et al., 2001). Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται καλύτερη και πιο αποδοτική κτηνοτροφική παραγωγή, συνοδευόμενη από βελτιωμένες μεθόδους εκτροφής των ζώων. Παρόλο που οι μηχανισμοί της λειτουργίας των αντιβιοτικών ως αυξητικοί παράγοντες δεν είναι πλήρως κατανοητοί, εικάζεται ότι η αύξηση προάγεται μέσω: (i) του ελέγχου των παθογόνων, (ii) της ελάττωσης του πλήρους καταβολισμού των απαραίτητων θρεπτικών από την εντερική μικροχλωρίδα, (iii) πιθανών έμμεσων επιδράσεων στην φυσιολογία/μορφολογία του εντερικού επιθηλίου (Butaye et al., 2003, Plata et al., 2003). Παρά τις ευεργετικές ιδιότητες των ΚΑ, δεδομένου του κινδύνου της

διασποράς της αντιβιοαντοχής και στα πλαίσια του σχεδίου δράσης της «Μίας Υγείας» της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η χρήση τους ως αυξητικούς παράγοντες έχει απαγορευθεί από το 2006 και μετά με την εφαρμογή του κανονισμού 1831/2003/EC (προς αντικατάσταση της οδηγίας 70/524/EEC). Στο ίδιο πνεύμα ακολούθησαν και οι ΗΠΑ και Κίνα το 2017 και το 2020 αντίστοιχα (Prescott, 2017, Kirchhelle, 2018, Wen et al., 2020). Επίσης, τόσο η προφύλαξη όσο και η μεταφύλαξη υπόκεινται πλέον σε αυστηρούς κανονιστικούς περιορισμούς (απαγορεύεται η ομαδική προφύλαξη, ενώ η μεταφύλαξη πρέπει να είναι επαρκώς τεκμηριωμένη) μετά την είσοδο σε ισχύ του τελευταίου κανονιστικού πλαισίου (28^η Ιανουαρίου 2022, είσοδος σε ισχύ του κανονισμού EU 2019/6 περί κτηνιατρικών φαρμάκων και κατάργηση της οδηγίας 2001/82 EC).

1.3 Προβλήματα αντιβιοαντοχής

Σύμφωνα και με τα παραπάνω, η αλόγιστη χρήση και η κατάχρηση αντιβιοτικών τόσο στις ανθρώπινες όσο και στις κτηνιατρικές πρακτικές έχουν οδηγήσει στη διασπορά αντιβιοτικών, γονιδίων αντιβιοαντοχής και ανθεκτικών παθογόνων μικροοργανισμών σε περιβάλλοντα που σχετίζονται με τις ανθρώπινες δραστηριότητες και την ανθρώπινη υγεία (Checcucci et al., 2020; Meyer et al., 2013). Επομένως υπάρχει αυξημένη πιθανότητα τα παθογόνα που προσβάλλουν τον άνθρωπο να αποκτήσουν ανθεκτικότητα και, συνεπώς, φόβος για μελλοντική μειωμένη αποτελεσματικότητα των υφιστάμενων θεραπειών, ή ακόμη και για αδυναμία πραγματοποίησης ιατρικών πράξεων όπως π.χ. εγχειρήσεων (που η πραγματοποίησή τους δε δύναται χωρίς τη χρήση αντιβιοτικών) (Martinez, 2009). Τα αντιβιοτικά μπορούν επίσης να επηρεάσουν την αφθονία των μικροοργανισμών του εδάφους, τη συνολική μικροβιακή δραστηριότητα, τη δραστηριότητα των ενζύμων και την ανοργανοποίηση του άνθρακα και την ανακύκλωση του αζώτου (Cycoń et al., 2019). Έχουν επίσης αναφερθεί οι επιπτώσεις των αντιβιοτικών στη λειτουργική, δομική και γενετική ποικιλομορφία των μικροοργανισμών του εδάφους (Furuya & Lowy, 2006). Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μπορεί να διαχωριστεί σε δύο γενικές κατηγορίες, στην ενδογενή αντοχή και στην επίκτητη. Η ενδογενής αντοχή είναι μια φυσική ικανότητα ενός βακτηριακού είδους, που καθιστά ορισμένα αντιβιοτικά λιγότερο αποτελεσματικά, και είναι παρούσα σε όλα ή σχεδόν όλα τα μέλη του είδους. Ορισμένα γονίδια που σχετίζονται με την ενδογενή αντοχή έχουν εξελιχθεί για να προστατεύουν από αντιβακτηριακές ενώσεις, ενώ άλλα, ουσιώδη για την ανάπτυξη και την επιθετικότητα των βακτηρίων, μπορεί επίσης να συμβάλλουν σε αυτήν τη φυσική αντοχή (Poulton & Rock, 2022). Η επίκτητη ανθεκτικότητα μπορεί να προκύψει από μετάλλαξη γονιδίων που συμμετέχουν σε φυσιολογικές διαδικασίες και κυτταρικές δομές. Επιπλέον,

μπορεί να προκληθεί από την ενσωμάτωση ξένων γονιδίων που παρέχουν ανθεκτικότητα, ή από τον συνδυασμό των παραπάνω μηχανισμών (Martinez, 2009). Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων που σχετίζεται με τη χρήση αντιβιοτικών παραγόντων ανήκει στην επίκτητη και εμφανίζεται σε ορισμένα στελέχη ενός είδους βακτηρίων (Henriques Normark & Normark, 2002). Στα βακτήρια αυτά είτε πραγματοποιείται οριζόντια γονιδιακή μεταφορά (horizontal gene transfer, HGT), η οποία περιλαμβάνει εισαγωγή γονιδίων ανθεκτικότητας ως τμήμα ενός κινητού στοιχείου DNA (Mobile Genetic Elements, MGEs) όπως πλασμίδια και τρανσποζόνια (Εικόνα 1), είτε επάγονται τυχαίες μεταλλάξεις στο βακτηριακό γονιδίωμα (κάθετη μεταβίβαση) (Munita & Arias, 2016). Η HGT είναι όχι μόνο ένας τρόπος εξάπλωσης των ανθεκτικών βακτηρίων, αλλά και μια πιθανή οδός μεταφοράς γονιδίων ανθεκτικότητας σε συμβιωτικά και παθογόνα βακτήρια του ανθρώπου (Chen et al., 2021). Ο μεγάλος αριθμός γονιδίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά (Antibiotic-Resistance Genes, ARGs) και η αυξημένη κινητικότητά τους, είναι από τους λόγους που συμβάλλουν στην εμφάνιση πολυανθεκτικών βακτηρίων (Jechalke et al., 2014). Ακόμη και πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών στο έδαφος δημιουργούν συνθήκες για γενετικές αλλαγές στα βακτηριακά γονιδιώματα και για μεταφορά ARGs και MGEs (Cycoń et al., 2019). Ένας ακόμα παράγοντας που συμβάλλει στη ανθεκτικότητα βακτηριακών πληθυσμών στα αντιβιοτικά, είναι η ύπαρξη βαρέων μετάλλων στις κοπριές. Οι μηχανισμοί αντίστασης των βακτηρίων στις επιδράσεις των μετάλλων και των αντιβιοτικών μπορούν να εμφανίζουν ορισμένα κοινά δομικά και λειτουργικά συστήματα. Έχει βρεθεί ότι τα βακτήρια που φέρουν γονίδια αντίστασης σε μέταλλα φέρουν επίσης ARGs σε μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με βακτήρια τα οποία δεν διαθέτουν τα γονίδια αντίστασης σε μέταλλα (Singer et al., 2016a). Η μεταφορά ανθεκτικών βακτηρίων από τα ζώα και τα φυτά προς τους ανθρώπους γίνεται μέσω της τροφικής αλυσίδας, μέσω άμεσης ή έμμεσης επαφής με κτηνοτροφικές μονάδες και κτηνοτροφικά ζώα, με γεωργικά εδάφη και υδατοκαλλιέργειες στα οποία έχουν αποτεθεί κοπριές (Cantas et al., 2013).



Εικόνα 1: Κύριοι μηχανισμοί της HGT στα βακτήρια. Η σύζευξη είναι η μεταφορά πλασμιδιακού DNA από δότη σε παραλήπτη μέσω άμεσης επαφής μεταξύ κυττάρων. Ο μετασχηματισμός συμβαίνει όταν γυμνό DNA από το περιβάλλον απορροφάται από το βακτήριο-δέκτη. Στη μεταγωγή, τα γονίδια μεταφέρονται από ένα βακτήριο-δότη σε ένα βακτήριο-δέκτη μέσω βακτηριοφάγων (φάγοι). Προσαρμογή από Furuya & Lowy, 2006.

1.4 Οδοί εισόδου κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον

Η συνεχής εναπόθεσή των ΚΑ στο περιβάλλον και οι πιθανές αρνητικές επιπτώσεις τους όπως προαναφέρθηκαν προκαλούν μεγάλη ανησυχία (Kemper, 2008). Η κυριότερη οδός εισόδου των κτηνιατρικών αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι μέσω των διαδικασιών παραγωγής των φαρμάκων, μέσω απευθείας ζωικών απεκκρίσεων, τη διασπορά κοπριάς αυτών των απεκκρίσεων ως λίπασμα, με την απευθείας απόρριψη λυμάτων από τις κτηνοτροφικές εγκαταστάσεις ή μέσω έκπλυσης ή επιφανειακής απορροής εδαφών στα οποία έχει γίνει εφαρμογή κοπριάς επιφορτισμένη με κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων (Obimakinde et al., 2017). Έτσι, γίνεται ο εντοπισμός τους στο έδαφος, εν συνεχεία η εισχώρησή τους στο υδάτινο οικοσύστημα και μετέπειτα στο φυτικό σύστημα (Pan & Chu, 2017) (Σχήμα 1). Με βάση τις

φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες και του γεγονότος ότι παρουσιάζουν ελάχιστη απορρόφηση από τον οργανισμό των ζώων, το μεγαλύτερο μέρος των χορηγούμενων αντιβιοτικών απεκκρίνεται αμετάβλητο, ενώ συχνά μπορούν να εντοπιστούν ελαφρώς μετασχηματισμένα ή συζευγμένα με πολικά μόρια (Jechalke et al., 2014; Kemper, 2008). Στην κοπριά, οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών μπορεί να είναι πολύ σταθερές ή ακόμη και να αυξάνονται λόγω του μετασχηματισμού των μεταβολιτών πίσω στη μητρική ένωση (Jechalke et al., 2014). Έχει βρεθεί ότι η παρουσία των αντιβιοτικών σε ζωικά περιττώματα μπορεί να ποικίλλει από συγκεντρώσεις $\mu\text{g/kg}$ έως g/kg (Berendsen et al., 2018). Οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων αντιβιοτικών στην κοπριά, την ιλύ λυμάτων, τα βιοστερεά και το έδαφος παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις και εξαρτώνται από τον τύπο του φαρμάκου, τον μεταβολισμό του φαρμάκου στα ζώα, τη διάρκεια της θεραπείας και τον χρόνο δειγματοληψίας σε σχέση με την περίοδο θεραπείας (Cycón et al., 2019). Η παραμονή των αντιβιοτικών στο έδαφος παρουσιάζεται πιο επίμονη σε εδάφη με αυξημένο οργανικό περιεχόμενο και όταν οι θερμοκρασίες του εδάφους είναι χαμηλές, όπως συμβαίνει στα βαθύτερα στρώματα (Singer et al., 2016b). Μόλις εισέλθουν στο περιβάλλον, τα υπολείμματα αντιβιοτικών μπορεί να προκαλέσουν ζημιές στους βιότοπους σε όλα τα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας, καθώς επίσης και στην ανθρώπινη υγεία. Αυτό συμβαίνει μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων και νερού, της συμβολής στην αύξηση του ανθεκτικού βακτηριακού πληθυσμού, καθώς και της διατήρησης της επιλεκτικής πίεσης που προκαλεί την ανάπτυξη ή/και την εξάπλωση της ανθεκτικότητας σε διάφορα οικοσυστήματα του περιβάλλοντος (Akbari et al., 2021). Αναφορικά με την πρόσληψη των αντιβιοτικών από τα φυτά, αυτή παραμένει σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ωστόσο είναι ικανές να προκαλέσουν την εμφάνιση φυτοτοξικότητας κατά την ανάπτυξη του φυτού (Jechalke et al., 2014).

έδαφος εξαρτάται σημαντικά από το βαθμό ιονισμού της κάθε ουσίας. Οι τιμές pKa των φαρμάκων και το pH του εδάφους καθορίζουν τον βαθμό ιονισμού τους, με αποτέλεσμα τα φάρμακα να παραμένουν στο έδαφος είτε ως ουδέτερα είτε ως ιονισμένα μόρια (Tolls, 2001).

1.5.2 Έκπλυση

Η έκπλυση αναφέρεται στη μετακίνηση μιας ουσίας από την επιφάνεια του εδάφους προς τα βαθύτερα στρώματα και τα υπόγεια νερά με τη ροή του νερού. Συνήθως, η έκπλυση είναι κατακόρυφη, ακολουθώντας τη ροή του νερού μετά από άρδευση ή βροχόπτωση. Αυτή η σύνθετη διαδικασία εξαρτάται συγχρόνως από πολλές παραμέτρους, όπως οι καιρικές συνθήκες (βροχόπτωση και θερμοκρασία), τα χαρακτηριστικά του εδάφους (μέγεθος σωματιδίων, οργανική ουσία) και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ουσίας (πίεση ατμών, υδατοδιαλυτότητα) (Geyikci, 2011).

1.5.3 Απορροή

Η επιφανειακή ροή αναφέρεται στο πλεονάζον νερό που κυλά στην επιφάνεια του εδάφους, όταν ο ρυθμός της βροχόπτωσης υπερβαίνει το ρυθμό που το νερό απορροφάται από το έδαφος. Αυτή η ροή, μαζί με την διαδικασία έκπλυσης, αποτελούν τους βασικούς τρόπους μεταφοράς διαλυμένων ουσιών προς το νερό. Η επίπτωση της υπερβολικής απορροής μιας ουσίας καθορίζεται από έναν συνδυασμό ποικίλων παραγόντων, όπως το κλίμα, η τοπογραφία, χημικά χαρακτηριστικά, καθώς επίσης και από τις καλλιέργειες και τις πρακτικές διαχείρισής τους (Huber et al., 2000).

1.5.4 Αποικοδόμηση

Στο εδαφικό περιβάλλον, τα αντιβιοτικά μπορεί να υπόκεινται σε διάφορες αβιοτικές και/ή βιοτικές διεργασίες, όπως είναι η μετατροπή/αποικοδόμηση. Η υδρόλυση θεωρείται γενικά μια από τις πιο σημαντικές οδούς για την αβιοτική αποικοδόμηση των αντιβιοτικών. Η ταχύτητα της εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία το pH, αλλά και την παρουσία διαλυμένης οργανικής ύλης, μετάλλων. Η διαδικασία της φωτοαποικοδόμησης συμβάλλει στην αποικοδόμηση των αντιβιοτικών που διασπείρονται στην επιφάνεια του εδάφους κατά την εφαρμογή κοπριάς σε γεωργικές εκτάσεις. Η απορρόφηση της ακτινοβολία του ήλιου μπορεί να οδηγήσει στη φωτόλυση του αντιβιοτικού. Η άμεση φωτόλυση περιλαμβάνει απευθείας απορρόφηση φωτός από το αντιβιοτικό. Η έμμεση φωτόλυση και ξεκινάει με την απορρόφηση φωτός από κάποιο άλλο συστατικό του διαλύματος, το οποίο στην πορεία αντιδρά με τα μόρια του ρύπου (Cysco et al., 2019). Ωστόσο, η σημασία της στην αποικοδόμηση περιορίζεται στα επιφανειακά στρώματα, λόγω της κακής διείσδυσης του φωτός στο έδαφος (Jechalke et al.,

2014). Διαφορετικές ομάδες αυτών των φαρμακευτικών ουσιών διαφέρουν ως προς τους ρυθμούς αποδόμησής τους στα εδάφη, όπως αποδεικνύεται από το μεγάλο εύρος του χρόνου ημίσειας ζωής τους, δηλαδή από το χρονικό διάστημα στο οποίο η συγκέντρωση της ουσίας μειώνεται κατά 50%, στο έδαφος (Cycoń et al., 2019).

1.5.5 Μικροβιακή αποικοδόμηση

Ο κεντρικός ρόλος των μικροοργανισμών στην αποικοδόμηση ή τον μετασχηματισμό των αντιβιοτικών στο έδαφος έχει επιβεβαιωθεί από τα αποτελέσματα πολλών μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένα και μη αποστειρωμένα εδάφη. Αυτό προκύπτει από πειράματα όπου οι τιμές ημιζωής (DT₅₀) των αντιβιοτικών ήταν πολύ χαμηλότερες σε εδάφη με λειτουργικούς αυτόχθονες μικροοργανισμούς σε σύγκριση με εκείνες που ελήφθησαν από αποστειρωμένες ποσότητες των εδαφών αυτών (Cycoń et al., 2019). Η χρησιμοποίηση μικροοργανισμών και των αντίστοιχων ενζύμων τους για την απομάκρυνση των ρύπων αποτελεί αποτελεσματική, ασφαλή, και οικονομικά αποδοτική μέθοδο, η οποία χαρακτηρίζεται ως βιολογική απομάκρυνση ή βιοαποικοδόμηση. Κατά τη διαδικασία αυτή, οι μικροοργανισμοί μεταβάλλουν τις επιλεγμένες ουσίες, καθιστώντας τα απόβλητα λιγότερο επιβλαβή (Nasrollahi et al., 2022). Οι μικροοργανισμοί διασπών οργανική ύλη και ξενοβιοτικές ουσίες μέσω και παράγουν προϊόντα τα οποία χρησιμοποιούνται από άλλους οργανισμούς ως πηγή θρεπτικών (Barra Caracciolo et al., 2015). Η διάσπαση μπορεί να γίνει υπό αερόβιες (παρουσία οξυγόνου) και υπό αναερόβιες συνθήκες (απουσία οξυγόνου) και προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διάσπαση είναι απαραίτητο να διαθέτουν οι μικροοργανισμοί το κατάλληλο μεταβολικό μονοπάτι. Εκτός από την ύπαρξη ή μη των παραπάνω συνθηκών, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη, και ως εκ τούτου την αποικοδόμηση των υπολειμμάτων των αντιβιοτικών, είναι η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH και η περιεκτικότητα του εκάστοτε υποστρώματος σε οργανική ουσία. Επιπλέον παράμετροι που επηρεάζουν την εμφάνιση και την ένταση της διαδικασίας της βιοαποικοδόμησης είναι η χημική σύσταση και η συγκέντρωση της υπολειμματικής ουσίας (Chowdhury et al., 2008). Έτσι, είναι δυνατόν να παρατηρηθεί το φαινόμενο της επιταχυνόμενης μικροβιακής αποδόμησης, το οποίο περιγράφει την αύξηση του ρυθμού καταστροφής μιας ουσίας στο έδαφος, που παρατηρείται μετά από επαναλαμβανόμενη μακροχρόνια έκθεση (Torpp et al., 2013). Μελέτες σαν προαναφερθείσα, οδήγησαν στην απομόνωση μικροοργανισμών με ικανότητα αντιβιοτροφισμού (antibiotrophy), όπου στελέχη των *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Labrys* κ.α. έδειξαν την ικανότητα να καταβολίζουν αντιβιοτικά της κατηγορίας των σουλφοναμιδών και

να τα χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα, έναν μηχανισμό ανεξαρτήτο αυτού της αντιβιοαντοχής (Martin-Laurent et al., 2019, Billet et al., 2021). Στελέχη με τέτοια χαρακτηριστικά με μη παθογόνο ή ευκαιριακή παθογόνο δράση, θα μπορούσαν να αποτελέσουν εργαλεία βιοαπορρύπανσης σε διάφορα περιβάλλοντα προκειμένου να ελαττωθεί η εξελικτική πίεση των αντιβιοτικών σε αυτά τα περιβάλλοντα και να διασφαλιστεί η δημόσια υγεία (Billet et al., 2021).

1.6 Πλευρομουτιλίνες

1.6.1 Χαρακτηριστικά και εφαρμογές πλευρομουτιλινών

Το πρώτο αντιβιοτικό αυτής της κατηγορίας απομονώθηκε από το μύκητα *Pleurotus mutilus* (σήμερα *Clitophilus scyphoides*) τη δεκαετία του '50. Τα ημισυνθετικά παράγωγα tiamulin και valnemulin, εισήχθησαν στην κτηνιατρική το 1979 και το 1999, αντίστοιχα. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ενδιαφέρον για περαιτέρω ανάπτυξη αυτής της κατηγορίας αντιβιοτικών για ανθρώπινη χρήση, το οποίο έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη δύο παραγώγων, reptamulin και lefamulin. Η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε άλλες σημαντικές κατηγορίες αντιβιοτικών δεν επηρεάζει τη δράση των πλευρομουτιλινών. Οι πλευρομουτιλίνες εμφανίζουν χαμηλή συχνότητα εμφάνισης αυθόρμητων μεταλλάξεων και εμφάνισης ανθεκτικότητας, ωστόσο έχουν εντοπιστεί ανθεκτικά στελέχη κι αυτό επισύρει την ανάγκη για παρακολούθηση και ρύθμιση της χορήγησής τους (Paukner & Riedl, 2017). Η δράση των πλευρομουτιλινών αφορά την αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, κατά των θετικών κατά Gram βακτηρίων, όπως οι στρεπτόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι, των αναερόβιων βακτηρίων και των μυκοπλασμάτων-χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες στην κτηνιατρική για τον έλεγχο των αναπνευστικών και εντερικών λοιμώξεων σε διάφορα είδη ζώων, ιδίως στους χοίρους και σε μικρότερο βαθμό στα πουλερικά και στα κουνέλια (Van Duijkeren et al., 2014).

1.6.2 Tiamulin

Το KA tiamulin (TIA) είναι ένα ημισυνθετικό αντιβιοτικό που ανήκει στην κατηγορία των πλευρομουτιλινών. Η κτηνιατρική του χρήση ξεκίνησε το 1979 θεραπεία πνευμονικών και εντερικών μολύνσεων σε χοίρους και πουλερικά (Paukner & Riedl, 2017). Το αντιβιοτικό αυτό έχει εγκριθεί μόνο για χρήση στην κτηνιατρική σύμφωνα με τις εκθέσεις του Οργανισμού Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (ΕΟΦ) (Sartini et al., 2023). Έχει δράση εναντίον βακτηρίων του γένους *Mycoplasma* spp., ορισμένων θετικών

κατά Gram βακτηρίων, όπως σε στρεπτόκοκκους και σταφυλόκοκκους, και σε υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια (Krasucka et al., 2010). Η κυριότερη εφαρμογή του αντιβιοτικού είναι για την αντιμετώπιση της δυσεντερίας σε χοίρους που προκαλείται από το βακτήριο *Brachyspira hyodysenteriae* (Card et al., 2018). Άλλες ασθένειες για τις οποίες χορηγείται το αντιβιοτικό στους χοίρους, είναι η κολίτιδα που οφείλεται στο βακτήριο *Brachyspira pilosicoli*, της ειλεΐτιδας (*Lawsonia intracellularis*), και της ενζωοτικής πνευμονίας (*Mycoplasma hyopneumoniae*) (Lekagul et al., 2023). Το KA χορηγείται αποτελεσματικά και στα πουλερικά για την αντιμετώπιση λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος που οφείλονται σε βακτήρια του γένους *Mycoplasma* spp., καθώς και για την αντιμετώπιση εντερικών παθήσεων που οφείλονται σε βακτήρια του γένους *Brachyspira* (Islam et al., 2009). Επίσης, είναι αποτελεσματική εναντίον μυκοπλασμών σε χήνες και πάπιες (Elazab et al., 2020). Παρόλο που παρουσιάζει ορισμένα μικρά οφέλη στη βελτίωση της απόδοσης σε υγιή ζώα, η κυρίως χρήση του είναι έναντι μολύνσεων ως θεραπευτικό αντιβιοτικό (Islam et al., 2009).

1.6.3 Χημική δομή και δράση του KA tiamulin

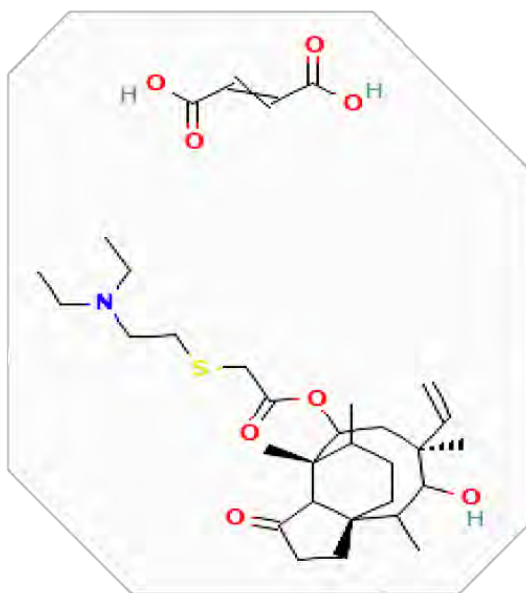
Το KA tiamulin (Εικόνα 2) είναι βακτηριοστατικό αντιβιοτικό και δρα σε επίπεδο ριβοσωμάτων αναστέλλοντας τη δράση της πεπτιδυλο-τρανσφεράσης. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει ισχυρή συγγένεια με το 23S ριβοσωμικό RNA (rRNA) που υπάρχει στη 50S ριβοσωμική υπομονάδα των βακτηρίων εμποδίζοντας τη δημιουργία του πεπτιδικού δεσμού κατά το στάδιο της έναρξης της μετάφρασης, με αποτέλεσμα να αναστέλλει τη σύνθεση πρωτεϊνών (Krasucka et al., 2010). Σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να εμφανίσει βακτηριοκτόνο δράση έναντι των ευαίσθητων μικροοργανισμών (Sartini et al., 2023). Το πλευρικό τμήμα διαιθυλ-αμινο-αιθυλο-θειο-ακετυλίου προσδίδει υδροφοβικές ιδιότητες, ενώ το ημι-φουμαρικό τμήμα παρέχει ένα σταθερό άλας με βελτιωμένη υδατοδιαλυτότητα (Ciucă et al., 2023). Η αντίσταση στο TIA σχετίζεται με γενετικές μεταλλάξεις στο 23S rRNA και στο γονίδι rplC που κωδικοποιεί τη ριβοσωμική πρωτεΐνη L3 (Van Duijkeren et al., 2014). Οι μεταλλάξεις στο 23S rRNA συμβαίνουν στο κέντρο πεπτιδυλοτρανσφεράσης του ριβοσώματος και γύρω από αυτό. Το κέντρο πεπτιδυλοτρανσφεράσης είναι μια κρίσιμη περιοχή του ριβοσώματος όπου σχηματίζονται πεπτιδικοί δεσμοί κατά τη σύνθεση πρωτεϊνών. Μεταλλάξεις στο σημείο αυτό έχουν παρατηρηθεί στους οργανισμούς *Escherichia coli*, *Brachyspira* spp., *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, και *Mycoplasma gallisepticum* (Killeavy et al. 2020). Περιπτώσεις ανάπτυξης ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Brachyspira hyodysenteriae* που έχουν καταγραφεί στην Ευρώπη, προκαλούν ιδιαίτερη

CCN(CC)CCCCSCC(=O)O[C@H]1[C@H](C)[C@H](C)[C@@H](C)[C@H](C)[C@@H](C)[C@H](C)[C@H]1C(=O)O

1.6.4 Απορρόφηση-Κατανομή του ΚΑ tiamulin

16

μεταβολιτών που μπορούν να υδρολυθούν σε 8-α-υδροξυμουτιλίνη. Η παρουσία υπολειμμάτων στον ζωικό ιστό ενδέχεται να επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, προκαλώντας αλλεργικές αντιδράσεις και προβλήματα στους καταναλωτές (Ciucă et al., 2023). Όταν χορηγείται σε πουλερικά για θεραπευτικούς σκοπούς, η απορρόφηση είναι γρήγορη, η ουσία μεταβολίζεται στο ήπαρ και αποβάλλεται εντελώς από το σώμα σε διάστημα 72 ωρών (Islam et al., 2009). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη της απέκκρισης του ΤΙΑ στα κόπρανα χοίρων όταν χορηγείται μέσω της τροφής και μέσω του νερού, βρέθηκε ότι ο τρόπος χορήγησης δεν επηρεάζει τα επίπεδα συγκέντρωσης του. Ωστόσο, κατά την περίοδο στέρησης, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του αντιβιοτικού στα κόπρανα ήταν μειωμένη σε σχέση με την περίοδο κανονικής χορήγησης μέσω της τροφής, ενώ παρουσιάστηκε αύξησή της συγκέντρωσής του σε σχέση με την περίοδο κανονικής χορήγησης με νερό. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να σχετίζεται με τη διαφορετική κατανομή του στους ζωικούς ιστούς. Επιπλέον, αυτή η συσχέτιση υποστηρίζεται από ευρήματα από προηγούμενες μελέτες που έχουν διερευνήσει την επίδραση διαφορετικών μεθόδων χορήγησης στις συγκεντρώσεις των ΚΑ σε όργανα ζώων (Perruchon et al., 2022). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού σε μύες και στο συκώτι των χοίρων, μετά από χορήγηση 5 ημερών, βρέθηκε ότι πέφτει κάτω από την τιμή MRL σε 5 και σε 6 ημέρες, η οποία αυτή τιμή καθορίζεται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) (Maria et al., 2008, Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 37/2010). Το ανώτατο όριο υπολειμμάτων (Maximum Residue Limit, MRL), είναι η υψηλότερη συγκέντρωση ενός μολυσματικού μεταβολίτη που προκύπτει από την χρήση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου που μπορεί να είναι νόμιμα επιτρέπεται ή αναγνωρίζεται ως αποδεκτό μέσα ή πάνω σε ένα τρόφιμο (Fanning et al., 2014). Σύμφωνα με μια έρευνα που περιλάμβανε τη χορήγηση του αντιβιοτικού σε χοίρους, κουνέλια, κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής και γαλοπούλες για 7 ημέρες, καθώς και ανάλυση για τον εντοπισμό υπολειμμάτων του στους ιστούς τους (μύες και συκώτι), προτείνεται ότι ο ελάχιστος χρόνος που πρέπει να περάσει μεταξύ της χορήγησης του αντιβιοτικού και της παραγωγής τροφίμων από αυτά τα ζώα είναι 5 ημέρες για χοίρους, κουνέλια και γαλοπούλες, 3 ημέρες για κοτόπουλα κρεατοπαραγωγής και 0 ημέρες για αυγά. Αυτές οι προτάσεις βασίζονται στις κατευθυντήριες γραμμές της ΕΕ (Ciucă et al., 2023, Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 37/2010).



Εικόνα 3. Χημική δομή του όξινου φουμαρικού tiamulin (Ciucă et al., 2023).

1.6.5 Αλληλεπίδραση του KA tiamulin με άλλες φαρμακευτικές ουσίες

Υπάρχει έντονη αλληλεπίδραση, μέχρι και θανατηφόρα, με τα ιονοφόρα αντικοκκιδιακά μονενσίνη, ναρασίνη και σαλινομυκίνη, όταν το TIA χρησιμοποιείται σε θεραπευτικά επίπεδα (Islam et al., 2009; Szucs et al., 2004). Ωστόσο, αυτή η αλληλεπίδραση εξαρτάται από τη δοσολογία, καθώς οι χαμηλές δόσεις δεν φαίνεται να έχουν επίδραση. Θεωρείται ότι προκαλείται από τον προτιμησιακό μεταβολισμό του TIA στο ήπαρ με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του ιονοφόρου που οδηγεί σε κλινικά σημεία υπερδοσολογίας. Το TIA εμφανίζει μια ηπιότερη αλληλεπίδραση, όπως προσωρινή καταστολή της ανάπτυξης, με τη μαδουραμικίνη και τη σεμντουραμικίνη, αλλά είναι συμβατή με τη λασαλοκίδη (Islam et al., 2009).

1.6.6. Τύχη του tiamulin στο περιβάλλον

Το KA tiamulin είναι μια ουσία που είναι πολύ ανθεκτική στο περιβάλλον. Σε μελέτη συνολικής διάρκειας 120 ημερών που πραγματοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του χρόνου ημιζωής της ουσίας (DT_{50}) σε αερόβιες συνθήκες αρχικής συγκέντρωσης 2000μg/kg σε

γεωργικό έδαφος, βρέθηκε ότι είναι 16 μέρες. Στη συνέχεια, η αποικοδόμηση συνεχίστηκε έως τις 62 μέρες, και για το υπόλοιπο χρονικό διάστημα του πειράματος η συγκέντρωση παρέμεινε σταθερή (Schlüsener & Bester, 2006). Σε μία άλλη μελέτη διάρκειας 180 ημερών που πραγματοποιήθηκε σε δεξαμενές υγρής κοπριάς σε αναερόβιες συνθήκες, δεν παρατηρήθηκε καθόλου διάσπαση του αντιβιοτικού, ακόμη και μετά την πάροδο των παραπάνω ημερών (Schlüsener et al., 2006). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε βακτηριακές κοινοπραξίες προερχόμενες από εγκαταστάσεις μονάδων εκτροφής χοίρων, βρέθηκε ότι τα βακτηριακά γένη *Achromobacter*, *Delftia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, και *Stenotrophomonas* ενδεχομένως να σχετίζονται με την αερόβια αποικοδόμηση του TIA (X. T. K. Nguyen et al., 2019). Σε άλλη περίπτωση, μελετήθηκε η αποικοδόμηση του TIA, σε συγκέντρωση 10 mg/L, από μύκητες που απομονώθηκαν από εγκαταστάσεις μονάδων εκτροφής χοίρων στις οποίες χρησιμοποιούσαν το αντιβιοτικό για πολύ καιρό. Οι απομονωθέντες μύκητες των γενών *Lasioidiplodia sp.*, *Verticillium sp.*, και ο μύκητας *Trametes versicolor* βρέθηκαν να είναι οι πιο αποτελεσματικοί στην απομάκρυνση του TIA, με ποσοστό αποικοδόμησής του άνω του 85%. Η ταυτόχρονη αυξημένη έκφραση του ενζύμου υπεροξειδάση του μαγγανίου υποδεικνύει την πιθανότητα του να κατέχει το ένζυμο αυτό καίριο ρόλο στην αποικοδόμηση του αντιβιοτικού (T. K. X. Nguyen et al., 2017). Σε μια εργαστηριακή μελέτη για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του οξονισμού και του συνδυασμού οξονισμού-υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) στην ενίσχυση της βιοδιασπασιμότητας, διαπιστώθηκε ότι ο οξονισμός είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την αποτοξίνωση των υδάτων και της ιλύς που είναι επιφορτισμένα με TIA (Žgajnar Gotvajn et al., 2022).

1.7 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Το κτηνιατρικό αντιβιοτικό tiamulin έχει εξέχουσα σημασία και εντεταμένη χρήση στην κτηνοτροφία και είναι αρκετά έμμοно στο περιβάλλον, χαρακτηριστικά που εντείνουν τις ανησυχίες για δημιουργία αντιβιοαντοχής και, σε βάθος χρόνου, απώλειας ευεργετικής του δράσης έναντι σε παθογόνα. Προηγουμένως απομονώθηκε μικροοργανισμός από εδάφη που υπέστησαν πολλαπλές διαδοχικές εφαρμογές με tiamulin (Katsivelou et al., 2023). Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο χαρακτηρισμός του εύρους και των βέλτιστων συνθηκών αποικοδόμησης του KA tiamulin από το βακτηριακό στέλεχος που απομονώθηκε και παρουσίασε ικανότητα αποδόμησης του αντιβιοτικού. Το βακτήριο απομονώθηκε στο εργαστήριο και ταυτοποιήθηκε από τη μεταδιδάκτορα Chiara Perruchon. Από την ανάλυση

της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA βρέθηκε ότι το προϊόν απομόνωσης έφερε την υψηλότερη ομολογία με ένα βακτήριο *Sphingomonas laterariae*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Στο πλαίσιο του στόχου μας για χαρακτηρισμό του εύρους και των βέλτιστων συνθηκών αποικοδόμησης του ΚΑ tiamulin από το βακτηριακό στέλεχος, εξετάσαμε την ικανότητα του βακτηρίου να αποδομεί το TIA σε ένα εύρος συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού, σε ένα εύρος τιμών pH και σε ένα εύρος θερμοκρασιών. Ειδικότερα:

- Εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 100 mg/L του αντιβιοτικού σε υπόστρωμα με pH 6.5, το οποίο ρυθμίστηκε πριν την αποστείρωση του υποστρώματος MSM, από stock TIA 10500 µg/mL. Για την εξέταση των υψηλότερων συγκεντρώσεων 250, 500, 750, 1000 mg/L, το stock TIA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 44000 µg/mL.
- Εξετάστηκε η διάσπαση σε υποστρώματα με pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, και 9, με συγκέντρωση 10 mg/L, από stock TIA 10500 µg/mL.
- Εξετάστηκε η διάσπαση σε θερμοκρασίες 4 °C, 16 °C, 25 °C, και 37 °C, με συγκέντρωση 10 mg/L από stock TIA 10500 µg/mL, και pH υποστρώματος 6.5, το οποίο ρυθμίστηκε πριν την αποστείρωση του υποστρώματος MSM.

Για κάθε συνθήκη που εξετάστηκε, υπήρχαν 4 επαναλήψεις εμβολιασμένες με το βακτήριο και 2 αβιοτικούς μάρτυρες (controls). Στους μάρτυρες υπήρχε μόνο υπόστρωμα και TIA, ώστε να ελέγχεται η ενδεχόμενη διάσπαση του αντιβιοτικού χωρίς να έχει γίνει προσθήκη του μικροοργανισμού. Την ημέρα παρασκευής των δειγμάτων (T0), πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία για μέτρηση της υπάρχουσας συγκέντρωσης των μαρτύρων με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC), ώστε να γίνει η παρακολούθηση της όποιας μείωσης της συγκέντρωσης εμφανιζόταν. Όταν εμφανιζόταν να υπάρχει πλήρης αποικοδόμηση του TIA για κάποια από τις παραπάνω συνθήκες, τότε σε αυτή δεν πραγματοποιούνταν επόμενη μέτρηση. Όλα τα φιαλίδια των υγρών καλλιιεργειών επώαστηκαν σε επωαστήρες ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας με σύστημα ανάδευσης. Για όλα τα πειράματα η επώαση έγινε στα 180 rpm. Για τα πειράματα όπου εξετάστηκε η επιρροή των διαφορετικών συγκεντρώσεων του TIA και του διαφορετικού pH του υποστρώματος, η επώαση έγινε στους 26°C, ενώ για τα πειράματα με τις διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης αυτές υποδεικνύονται

από τις αντίστοιχες τιμές. Πάντα διατηρούσαμε υγρή καλλιέργεια με αραίωση 1:20 από την προηγούμενη καλλιέργεια που εμφάνιζε πλήρης αποικιοδόμηση.

2.2 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος Minimum Salt Medium (MSM)

Η καλλιέργεια του απομονωμένου βακτηρίου έλαβε χώρα σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα αλάτων MSM. Εν προκειμένω, προετοιμάστηκαν τέσσερα πυκνά διαλύματα: Stock 1, Stock 2, και Stock 3 (Πίνακας 1). Το Stock 1 και το Stock 2 διαλύθηκαν το καθένα σε 1L απεσταγμένο νερό. Το κάθε μίγμα αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121°C. Το Stock 3 αποστειρώθηκε μέσω διηθήσεως από ειδικά φίλτρα λόγω θερμοευαισθησίας του FeSO₄. Για την προετοιμασία 1L MSM, 100 mL του Stock 1 αναμείχθηκαν με 780 mL αποστειρωμένου και απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια, το διάλυμα αυτό αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο. Όταν το διάλυμα έφθασε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστέθηκαν σε αυτό 100 mL από το Stock 2 και 20 mL από το Stock 3 υπό ασηπτικές συνθήκες. Στο MSM έγινε και η προσθήκη casamino acids 0,00015 g /mL. Το αντιβιοτικό ήταν πηγή άνθρακα και αζώτου για το βακτήριο. Για την παρασκευή των πειραματικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε εμπορικό σκεύασμα φουμαρικής TIA (Biosynth® Carbosynth, Staad, Switzerland – purity >97 %). Το αντιβιοτικό διαλύθηκε σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο).

Πίνακας 1: Συστατικά στοιχεία θρεπτικού υποστρώματος MSM

	Συστατικά	g/L
Stock 1	KH_2PO_4	22,7
	$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	59,7
	NaCl	10,0
Stock 2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,15
Stock 3	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,46

2.3 Εκχύλιση των υπολειμμάτων του TIA

Για την εκχύλιση των υπολειμμάτων του TIA από την υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου γινόταν παραλαβή ποσότητας της καλλιέργειας και ανάμειξη της με μεθανόλη (HPLC grade, Sigma Aldrich©) υπό ασηπτικές συνθήκες προκειμένου να εμπίπτει στην καμπύλη αναφοράς. Τα δείγματα φυγοκεντρούνταν σε ταχύτητα 13300 rpm για 1 λεπτό. Το εκχύλισμα αυτό χρησιμοποιούνταν για έγχυση στην HPLC.

2.4 Ανάλυση σε σύστημα HPLC-PDA

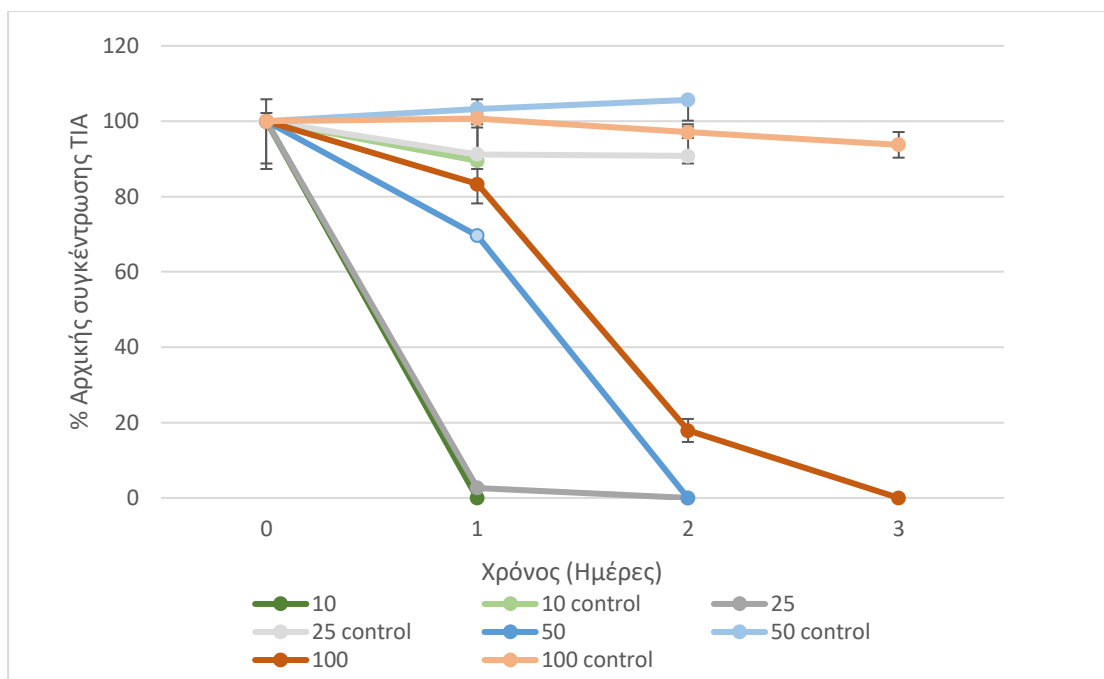
Η συγκέντρωση του ΤΙΑ προσδιορίστηκε σε σύστημα Prominence Modular HPLC-PDA (ανιχνευτής σειράς φωτοδιόδων) (Shimadzu, Kyoto, Japan), το οποίο ήταν εφοδιασμένο με στήλη CNH Athena RP C18–150 mm column (CNW Technologies, Düsseldorf, Germany). Το ΤΙΑ εκλούστηκε με τη χρήση κινητής φάσης 88/15 ακετονιτρίλιο (ACN)/δισ-απεσταγμένο νερό (v/v) και 0,25% αμμωνία (NH₄), με ρυθμό ροής 1 mL/min. Ο όγκος έγχυσης ήταν 20μL, ο χρόνος έκλουσης ήταν 6 λεπτά και η απορρόφηση έγινε σε 208nm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό LabSolutions, με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Το εμβαδόν της κορυφής συνδέθηκε με τον όγκο της αντίστοιχης αναλυτικής ουσίας, προκειμένου να δημιουργηθεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για τη δημιουργία των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος από τις τέσσερις επαναλήψεις και ο μέσος όρος των δύο controls. Υπολογίστηκε επίσης η τυπική απόκλιση για τις τέσσερις επαναλήψεις και τους δύο αβιοτικούς μάρτυρες (controls).

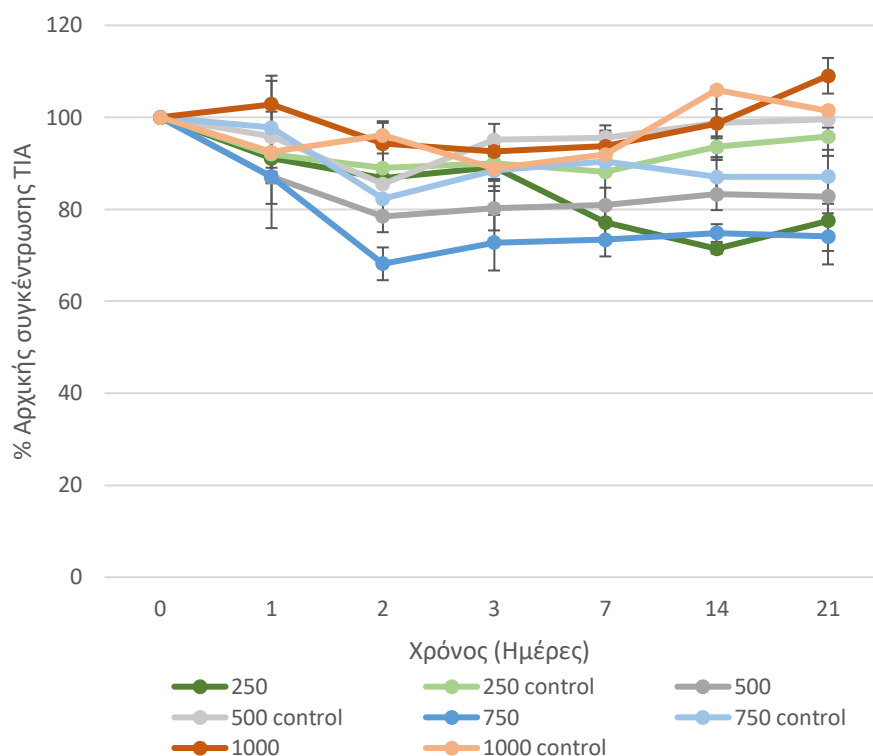
3.1 Μελέτη αποικοδομητικής ικανότητας του ΤΙΑ από το βακτήριο παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού

Μελετώντας την διάσπαση του αντιβιοτικού όταν αυτό βρισκόταν σε οι συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 100 mg/L, παρατηρήθηκε ότι για συγκέντρωση 10 mg/L, όλη η ποσότητα διασπάται μέσα σε μία ημέρα. Στις συγκεντρώσεις 25 mg/L και 50 mg/L, η ποσότητα διασπάται σε δύο ημέρες, ενώ για συγκέντρωση 100 mg/L, η ολική διάσπαση ολοκληρώνεται στις 3 ημέρες.



Διάγραμμα 1: Αποικοδόμηση του ΤΙΑ σε υγρή καλλιέργεια MSM και ΤΙΑ συγκεντρώσεων 10, 25, 50, 100 mg/L που εμβολιάστηκε με το βακτηριακό στέλεχος και στον αβιοτικό μάρτυρα (control).

Μελετώντας την διάσπαση του αντιβιοτικού όταν αυτό βρισκόταν σε οι συγκεντρώσεις 250, 500, 750, 1000 mg/L, παρατηρήθηκε ότι κατά την πειραματική διάρκεια των 21 ημερών δεν υπήρξε ολοκληρωτική αποικοδόμηση του αντιβιοτικού. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού παρουσίασε μια μείωση έως την 14^η ημέρα όταν η αρχική του συγκέντρωση ήταν 250 mg/L κι έπειτα έμεινε σταθερή έως την 21^η ημέρα, ενώ όταν η αρχική συγκέντρωση ήταν 500 mg/L παρουσιάστηκε μείωση έως την 3^η ημέρα, ενώ παρέμεινε σταθερή έως την 21^η.

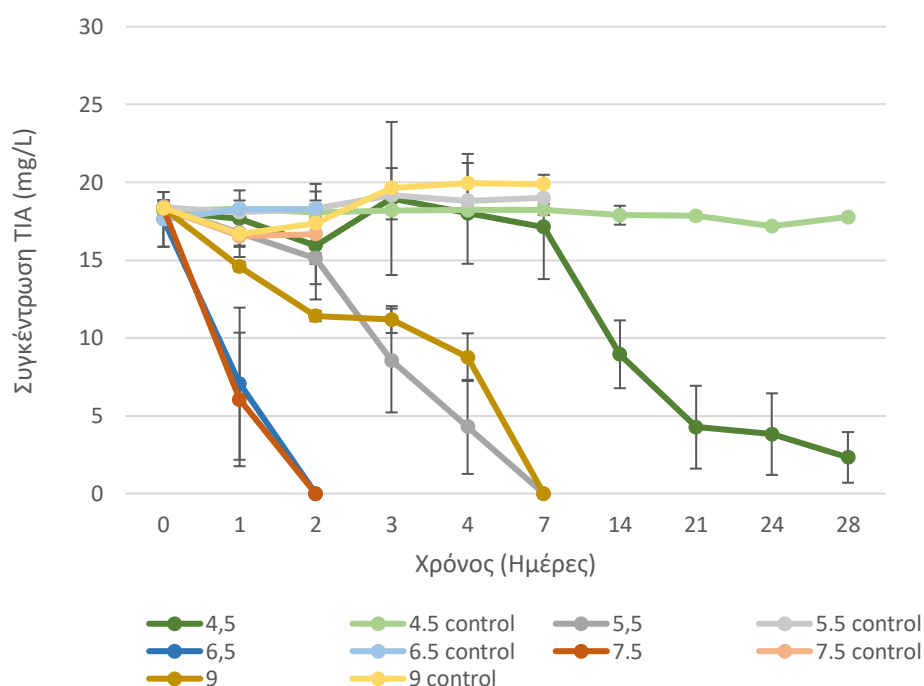


Διάγραμμα 2: Αποικοδόμηση του ΤΙΑ σε υγρή καλλιέργεια MSM και ΤΙΑ συγκεντρώσεων 250, 500, 750, 1000 mg/L που εμβολιάστηκε με το βακτηριακό στέλεχος και στον αβιοτικό μάρτυρα (control).

3.2 Μελέτη αποικοδομητικής ικανότητας του ΤΙΑ από το βακτήριο σε ένα εύρος pH

Η πειραματική διάρκεια της μελέτης της αποικοδομητικής ικανότητας του βακτηρίου όταν αναπτύσσεται σε ένα εύρος pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.5, και 9) ήταν 28 ημέρες, με λήψη δείγματος για μέτρηση της συγκέντρωσης την ημέρα παρασκευής των δειγμάτων (T0), από την 1^η έως την 4^η ημέρα, κι έπειτα την 7^η, 14^η, 21^η, 24^η, και 28^η ημέρα. Μελετώντας τη διάσπαση του αντιβιοτικού όταν το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης του βακτηρίου έχει pH 6.5 και 7.5, παρατηρήθηκε πλήρης αποικοδόμηση του αντιβιοτικού έως την 2^η μέρα επώασης. Με pH υποστρώματος 4.5, άρχισε να μειώνεται η συγκέντρωση του αντιβιοτικού την 14^η ημέρα παρατήρησης και συνεχίστηκε έως την 28^η ημέρα, χωρίς όμως να σημειωθεί ολοκληρωτική αποικοδόμηση του αντιβιοτικού. Σχετικά με το pH υποστρώματος 5.5, παρατηρήθηκε ραγδαία μείωση μεταξύ 2^{ης} και 3^{ης} ημέρας και η οποία συνεχίστηκε έως την 7^η ημέρα όπου και παρατηρήθηκε η πλήρης αποικοδόμηση του ΤΙΑ. Για το pH 9, σημειώθηκε μείωση της

συγκέντρωσης του αντιβιοτικού έως την 4^η ημέρα και την 7^η ημέρα παρατηρήθηκε η πλήρης αποικοδόμησή του.

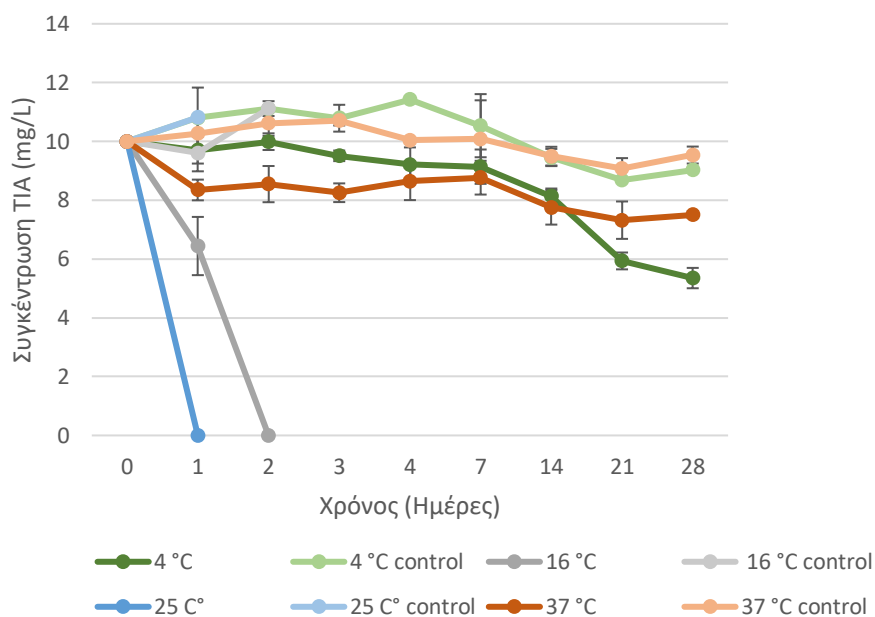


Διάγραμμα 3: Αποικοδόμηση του TIA σε υγρή καλλιέργεια MSM και TIA σε εύρος pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 9) που εμβολιάστηκε με το βακτηριακό στέλεχος και στον αβιοτικό μάρτυρα (control).

3.3 Μελέτη αποικοδομητικής ικανότητας του TIA από το βακτήριο σε ένα εύρος θερμοκρασιών

Η πειραματική διάρκεια της μελέτης της αποικοδομητικής ικανότητας του βακτηρίου όταν αναπτύσσεται σε ένα εύρος θερμοκρασιών (4 °C, 16 °C, 25 °C, 37 °C) ήταν 28 ημέρες, με λήψη δείγματος για μέτρηση της συγκέντρωσης την ημέρα παρασκευής των δειγμάτων (T0), από την 1^η έως την 4^η ημέρα, κι έπειτα την 7^η, 14^η, 21^η, και 28^η ημέρα. Σε θερμοκρασία επώασης 4 °C, παρατηρήθηκε μικρή μείωση της αρχικής συγκέντρωσης έως την 14^η ημέρα παρατήρησης και στη συνέχεια μια περαιτέρω μείωση την 21^η ημέρα κι έπειτα παρέμεινε σταθερή. Στη θερμοκρασία των 16 °C, η διάσπαση του αντιβιοτικού ξεκίνησε από την 1^η ημέρα και η πλήρης διάσπασή του ολοκληρώθηκε την 2^η ημέρα. Σε θερμοκρασία 25 °C, σημειώθηκε πλήρης αποικοδόμηση του TIA από την 1^η ημέρα. Αυτό συμφωνεί και με το

πείραμα που μελετήθηκαν οι διάφορες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού, καθώς η παρούσα συνθήκη είναι η ίδια με την συνθήκη μελέτης της συγκέντρωσης 10mg/L. Για τη θερμοκρασία των 37 °C, παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση της συγκέντρωσης κι έπειτα παρέμεινε σταθερή μέχρι την 14^η ημέρα όπου και πάλι εμφανίστηκε μια πολύ μικρή μείωση.



Διάγραμμα 4: Αποικοδόμηση του TIA σε υγρή καλλιέργεια MSM και TIA σε εύρος θερμοκρασιών επώασης (4 °C, 16 °C, 25 °C, 37 °C) που εμβολιάστηκε με το βακτηριακό στέλεχος και στον αβιοτικό μάρτυρα (control).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Συζήτηση

Τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά αποτελούν μέσα εξελικτικής πίεσης προς ανάπτυξη αντιβιοαντοχής σε γεωργικά περιβάλλοντα με πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον και τη δημόσια υγεία. Στα πλαίσια μίας επιτυχημένης στρατηγικής βιοαπορρύπανσης αντιβιοτικών μέσω βιοεμπλουτισμού, είναι επιθυμητή η χρήση μη παθογόνων μικροοργανισμών με ικανότητα χρήσης των αντιβιοτικών ως πηγή ενέργειας και άνθρακα, σε αντίστιξη με τους μηχανισμούς αντιβιοαντοχής (Torr et al., 2013, Martin-Laurent et al., 2019, Billet et al., 2021). Με αυτήν την προοπτική, στην παρούσα μελέτη χαρακτηρίσαμε την ικανότητα ενός βακτηρίου να αναπτύσσεται σε θρεπτικό διάλυμα που περιείχε το αντιβιοτικό

tiamulin (με εντατική χρήση στη χοιροτροφία) ως μοναδική πηγή άνθρακα. Μελετήθηκε η επίδραση της παρουσία του αντιβιοτικού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, των διαφορετικών θερμοκρασιών επώασης του βακτηρίου, και του διαφορετικού pH του μέσου ανάπτυξης του βακτηρίου.

Στην περίπτωση του tiamulin έχουν καταγραφεί δύο προηγούμενες προσπάθειες βιοαπορρύπανσης προερχόμενες από το ίδιο εργαστήριο. Η πρώτη αφορούσε την απομόνωση μύκητων *Lasiodiplodia sp.*, *Verticillium sp.*, και *Trametes versicolor* από χοιροτροφικές μονάδες, που έδειξαν αποικοδόμηση του ΤΙΑ (σε συγκεντρώση χαμηλότερη των 0.09 mg L⁻¹ (όριο ανίχνευσης) σε διάστημα 12 ημερών χρησιμοποιώντας γενικής στόχευσης ένζυμα όπως οι υπεροξειδάσες (T. K. X. Nguyen et al., 2017). Σε αντίθεση με αυτήν την εργασία η βακτηριακή απομόνωση του εργαστηρίου μας οδήγησε σε μικροοργανισμό με ικανότητα βιοδιάσπασης σε πολύ συντομότερο χρονικό διάστημα, ιδανικά με πιο εξειδικευμένο μηχανισμό μετασχηματισμού/διάσπασης του tiamulin. Στην περίπτωση της παρουσίας του αντιβιοτικού σε εύρος συγκεντρώσεων στο μέσο ανάπτυξης του βακτηρίου, παρατηρήθηκε ότι στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού (10 mg/L), παρατηρήθηκε πλήρης διάσπαση εντός μιας ημέρας. Καθώς η συγκέντρωση αυξάνεται, ο χρόνος που απαιτείται για την πλήρη διάσπαση αυξάνεται, με την ολοκλήρωσή της να συμβαίνει σε 2 ημέρες για 25 και 50 mg/L και σε 3 ημέρες για 100 mg/L. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (250, 500, 750, 1000 mg/L) δεν παρατηρήθηκε πλήρης αποικοδόμηση κατά τη διάρκεια των 21 ημερών του πειράματος. Σε άλλη εργασία, οι Nguyen et al. (2019), εμπλούτισαν μία μικροβιακή κοινοπραξία από λυματολάσπη χοιρινής κοπριάς, που ως εμβόλιο σε επέδειξε ικανότητα ταχύτερης διάσπασης σε MSMN (περίπου σε 16 ώρες) σε σύγκριση με τα δικά μας αποτελέσματα, σε συνθήκες ουδέτερου pH και σε θερμοκρασία δωματίου σε σκότος. Η κοινοπραξία αποτελούνταν κατά κύριο λόγο από *Achromobacter*, *Delftia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, και *Stenotrophomonas*. Παρόλα αυτά, δεν κατάφεραν να απομονώσουν κάποιον μικροοργανισμό για περαιτέρω μελέτες, ενώ η εικασία για τη σύσταση της κοινοπραξίας βασίστηκε στη σχετική αφθονία των μικροοργανισμών (> 5% σχετικής αφθονίας η κάθε ταξινομική ομάδα) κατά την ανάλυση αλληλούχησης υψηλής απόδοσης των προϊόντων PCR, χωρίς περαιτέρω στοιχεία για την ταξινόμηση σε επίπεδο στελέχους και τον αριθμό των γενοτύπων εντός του κάθε γένους. Επιπλέον, το αρχικό εμβόλιο υπήρξε αρκετά πυκνό, φτάνοντας τη συγκέντρωση των 10⁸ κυττάρων ανά ml κατά τους υπολογισμούς της ομάδας.

Παρά τα πιθανά πλεονεκτήματά τους, ένα μειονέκτημα της χρήσης μικροβιακών κοινοπραξιών σε διεργασίες γενικότερα (όπως βιοαπορρύπανση) είναι η απαιτητική διαδικασία πρόγνωσης

(ακόμη και στην περίπτωση μικρών κοινοπραξιών) της συμπεριφοράς τους σε διαφορετικές συνθήκες (Duncker et al., 2021). Στην παρούσα εργασία προβήκαμε σε δοκιμή των φυσιολογικών ορίων του απομονωμένου μικροοργανισμού κατά τη διάσπαση 10 ή και περισσότερων mg L⁻¹ tiamulin. Κατά τη μελέτη της αποικοδομητικής ικανότητας του βακτηρίου σε διάφορα επίπεδα pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.5, και 9) του θρεπτικού υποστρώματος, τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ικανότητα αποικοδόμησης του βακτηρίου και η διάσπαση του αντιβιοτικού επηρεάζονται σημαντικά από το pH του θρεπτικού υποστρώματος, με διαφορετικά πρότυπα συμπεριφοράς ανάλογα με την οξύτητα ή τη βασικότητα του περιβάλλοντος, αλλά, παρόλα αυτά, ο μικροοργανισμός επέδειξε σχετικά μεγάλο εύρος ικανοποιητικής απόδοσης (pH από 5.5 ως 9). Σε θρεπτικά υποστρώματα με pH 6.5 και 7.5, παρατηρήθηκε πλήρης και ταχύτερη αποικοδόμηση του αντιβιοτικού (έως τη 2^η ημέρα). Το υπόστρωμα με pH 4.5 αποτέλεσε το μοναδικό στο οποίο δεν παρατηρήθηκε πλήρης αποικοδόμηση της ΤΙΑ για τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας (28 ημέρες). Τέλος, τα αποτελέσματα της μελέτης της αποικοδομητικής ικανότητας του βακτηρίου σε διάφορες θερμοκρασίες (4 °C, 16 °C, 25 °C, 37 °C) έδειξαν ότι, οι διάφορες θερμοκρασίες επηρεάζουν διαφορετικά την ικανότητα αποικοδόμησης του βακτηρίου για το ΤΙΑ, με τις χαμηλότερες θερμοκρασίες να επιβραδύνουν τη διαδικασία. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ταχύτερη και πλήρη ολοκλήρωση της διαδικασίας είναι οι 25 °C, ενώ στους 16 °C η αποικοδόμηση ήταν επίσης ευνοϊκή και ολοκληρώθηκε έως τη 2^η ημέρα. Συνοπτικά, το βακτηριακό στέλεχος κατάφερε να αποικοδομήσει εντελώς το αντιβιοτικό όταν αυτό είχε συγκέντρωση έως 100 mg/L σε διάστημα 3 ημερών με τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης να είναι οι 25 °C και το pH 6.5 με 7.5. Τέτοια χαρακτηριστικά αναδεικνύουν τον μικροοργανισμό σε αποτελεσματικότερο βιοαπορρυπαντή.

4.2 Συμπερασματικά σχόλια - Μελλοντική έρευνα

Η εφαρμογή επιφορτισμένης με υπολείμματα αντιβιοτικών κοπριάς στα εδάφη είναι ένας από τους κύριους τρόπους εισαγωγής του στο φυσικό περιβάλλον (Obimakinde et al., 2017), και ότι η παραμονή του ΤΙΑ στα περιττώματα των κτηνοτροφικών ζώων και στην κοπριά εμφανίζεται επίμονη (Berendsen et al., 2018; Perruchon et al., 2022; Schlüsener et al., 2006; Schlüsener & Bester, 2006). Η εναπόθεση τέτοιου φορτίου στις εδαφικές εκτάσεις και η διασπορά του μπορεί να επιβαρύνει το φυσικό περιβάλλον καθώς και την ευημερία των ανθρώπων και των ζώων με τρόπους που δεν έχουν διερευνηθεί διεξοδικά (Perruchon et al.,

2022). Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, γίνεται φανερό ότι το απομονωθέν βακτηριακό στέλεχος φέρει την ικανότητα να διασπάει το ΚΑ tiamulin σε μεγάλο εύρος συνθηκών. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι επιθυμητά για τη βιοαπορρύπανση και καθιστούν τον μικροοργανισμό αυτόν ελκυστικό για σχετικές εφαρμογές. Επομένως, η κατεργασία της κοπριάς με την παρουσία του βακτηριακού στελέχους θα μπορούσε να μειώσει το υπολειμματικό φορτίο και επομένως να μειωθεί η διασπορά του αντιβιοτικού στο περιβάλλον.

Σε συνέχεια της παρούσης εργασίας, προτείνεται η περεταίρω διερεύνηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στον μετασχηματισμό/διάσπαση του tiamulin από τον απομονωθέν μικροοργανισμό. Μία τέτοια διερεύνηση, θα μπορούσε να περιλαμβάνει τη γονιδιωματική ανάλυση του μικροοργανισμού σε συνδυασμό με τη μεταγραφική και μεταβολομική ανάλυσή του. Τέτοιου είδους αναλύσεις ήδη λαμβάνουν χώρα στο εργαστήριο απομόνωσής του ενώ, επιπρόσθετα, ενδιαφέρουσα θα ήταν η ανάλυση της απόδοσης του μικροοργανισμού σε ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών *in situ*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akbari, M. Z., Xu, Y., Lu, Z., & Peng, L. (2021). Review of antibiotics treatment by advance oxidation processes. In *Environmental Advances* (Vol. 5). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100111>
- Barra Caracciolo, A., Topp, E., & Grenni, P. (2015). Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 106, pp. 25–36). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.040>
- Berendsen, B. J. A., Lahr, J., Nibbeling, C., Jansen, L. J. M., Bongers, I. E. A., Wipfler, E. L., & van de Schans, M. G. M. (2018). The persistence of a broad range of antibiotics during calve, pig and broiler manure storage. *Chemosphere*, 204, 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.042>
- Billet, L., Pesce, S., Rouard, N., Spor, A., Paris, L., Lereboure, M., Mounier, A., Besse-Hoggan, P., Martin-Laurent, F., & Devers-Lamrani, M. (2021). Antibiotrophy: Key Function for Antibiotic-Resistant Bacteria to Colonize Soils-Case of Sulfamethazine-Degrading *Microbacterium* sp. C448. *Frontiers in microbiology*, 12, 643087. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643087>
- Cantas, L., Shah, S. Q. A., Cavaco, L. M., Manaia, C. M., Walsh, F., Popowska, M., Garelick, H., Bürgmann, H., & Sørum, H. (2013). A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 4(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00096>
- Card, R. M., Stubberfield, E., Rogers, J., Nunez-Garcia, J., Ellis, R. J., AbuOun, M., Strugnell, B., Teale, C., Williamson, S., & Anjum, M. F. (2018). Identification of a new antimicrobial resistance gene provides fresh insights into pleuromutilin resistance in *Brachyspira hyodysenteriae*, aetiological agent of swine dysentery. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01183>
- Checcucci, A., Trevisi, P., Luise, D., Modesto, M., Blasioli, S., Braschi, I., & Mattarelli, P. (2020). Exploring the Animal Waste Resistome: The Spread of Antimicrobial Resistance Genes Through the Use of Livestock Manure. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01416>

- Chen, J., Wang, T., Zhang, K., Luo, H., Chen, W., Mo, Y., & Wei, Z. (2021). The fate of antibiotic resistance genes (ARGs) and mobile genetic elements (MGEs) from livestock wastewater (dominated by quinolone antibiotics) treated by microbial fuel cell (MFC). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 218. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112267>
- Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M., & Sanyal, N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. In *Indian J. Microbiol* (Vol. 48).
- Ciucă, V. C., Rusănescu, C. O., & Safta, V. V. (2023). Analysis of Transfer of Tiamulin to Animal Tissue after Oral Administration: An Important Factor for Ensuring Food Safety and Environmental Protection. *Pharmaceuticals*, 16(3). <https://doi.org/10.3390/ph16030387>
- Cycoń, M., Mrozik, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>
- Dalhoff, A. (2021). Selective toxicity of antibacterial agents—still a valid concept or do we miss chances and ignore risks? In *Infection* (Vol. 49, Issue 1, pp. 29–56). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01536-y>
- Duncker, K. E., Holmes, Z. A., & You, L. (2021). Engineered microbial consortia: strategies and applications. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01699-9>
- Elazab, S. T., Elshater, N. S., Hashem, Y. H., Park, S. C., & Hsu, W. H. (2020). Tissue Residues and Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Tiamulin Against *Mycoplasma anatis* in Ducks. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.603950>
- Fanning, S., Wang, J., & Leonard, N. (2014). Veterinary Drugs Residues: Antibacterials. In *Encyclopedia of Food Safety* (Vol. 3, pp. 39–44). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00242-0>
- Furuya, E. Y., & Lowy, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 4, Issue 1, pp. 36–45). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1325>

- Geyikci, F. (2011). Pesticides and Their Movement Surface Water and Ground Water. In *InTech*. <https://doi.org/10.5772/17301>
- Huber, A., Bach, M., & Frede, H. G. (2000). Pollution of surface waters with pesticides in Germany: modeling non-point source inputs. In *Ecosystems and Environment* (Vol. 80).
- Islam, K. M. S., Klein, U., & Burch, D. G. S. (2009). The activity and compatibility of the antibiotic tiamulin with other drugs in poultry medicine - A review. In *Poultry Science* (Vol. 88, Issue 11, pp. 2353–2359). Poultry Science Association. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00257>
- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., & Smalla, K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. In *Trends in Microbiology* (Vol. 22, Issue 9, pp. 536–545). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. In *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* (Vol. 33, Issue 3, pp. 300–305). Medknow Publications. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- Katsivelou, E., Perruchon, C., Karas, P. A., Sarantidou, A., Pappa, E., Katsoula, A., Ligda, P., Sotiraki, S., Martin-Laurent, F., Vasileiadis, S., & Karpouzas, D. G. (2023). Accelerated dissipation, soil microbial toxicity and dispersal of antimicrobial resistance in soils repeatedly exposed to tiamulin, tilmicosin and sulfamethoxazole. *Science of the Total Environment*, 893. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164817>
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. In *Ecological Indicators* (Vol. 8, Issue 1, pp. 1–13). <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>
- Khmaissa, M., Zouari-Mechichi, H., Sciara, G., Record, E., & Mechichi, T. (2024). Pollution from livestock farming antibiotics an emerging environmental and human health concern: A review. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 13, 100410. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2024.100410>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 6, pp. 423–435). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>
- Krasucka, D., Mitura, A., Cybulski, W., Kos, K., & Pietro-, W. (2010). TIAMULIN HYDROGEN FUMARATE ñ VETERINARY USES AND HPLC METHOD OF

DETERMINATION IN PREMIXES AND MEDICATED FEEDING STUFFS. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*, 67(6), 682–685.

- Lekagul, A., Kirivan, S., Tansakul, N., Krisanaphan, C., Srinha, J., Laoprasert, T., Kaewkhankhaeng, W., & Tangcharoensathien, V. (2023). Antimicrobial consumption in food-producing animals in Thailand between 2017 and 2019: The analysis of national importation and production data. *PLoS ONE*, 18(4 April). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283819>
- Liu, Y., Cao, C., Song, Y., Zhou, S., Yang, Y., Xu, N., Yang, Q., Dong, J., & Ai, X. (2021). Pharmacokinetics, bioavailability, and tissue disposal profiles of Tiamulin fumarate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following oral and intravenous administrations. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 44(4), 590–602. <https://doi.org/10.1111/jvp.12957>
- Maria, C., Trifan, V., Paraschiv, G., & Crivineanu, D. (2008). TIAMULIN RESIDUE DEPLETION IN PORK AND PIG LIVER. In *Veterinary Medicine* (Vol. 65, Issue 1).
- Martin-Laurent, F., Topp, E., Billet, L., Batisson, I., Malandain, C., Besse-Hoggan, P., Morin, S., Artigas, J., Bonnineau, C., Kergoat, L., Devers-Lamrani, M., & Pesce, S. (2019). Environmental risk assessment of antibiotics in agroecosystems: ecotoxicological effects on aquatic microbial communities and dissemination of antimicrobial resistances and antibiotic biodegradation potential along the soil-water continuum. *Environmental science and pollution research international*, 26(18), 18930–18937. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05122-0>
- Martinez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. In *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 276, Issue 1667, pp. 2521–2530). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0320>
- Meyer, E., Gastmeier, P., Deja, M., & Schwab, F. (2013). Antibiotic consumption and resistance: Data from Europe and Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.04.004>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Nasrollahi, N., Vatanpour, V., & Khataee, A. (2022). Removal of antibiotics from wastewaters by membrane technology: Limitations, successes, and future

improvements. In *Science of the Total Environment* (Vol. 838). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156010>

- National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 656958, Tiamulin
- Nguyen, T. K. X., Thayanukul, P., Pinyakong, O., & Suttinun, O. (2017). Tiamulin removal by wood-rot fungi isolated from swine farms and role of ligninolytic enzymes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 116, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.010>
- Nguyen, X. T. K., Pinyakong, O., & Thayanukul, P. (2019). Bacterial community structures and biodegradation kinetic of Tiamulin antibiotic degrading enriched consortia from swine wastewater. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 17(2), 1121–1130. <https://doi.org/10.1007/s40201-019-00426-2>
- Obimakinde, S., Fatoki, O., Opeolu, B., & Olatunji, O. (2017). Veterinary pharmaceuticals in aqueous systems and associated effects: an update. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(4), 3274–3297. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7757-z>
- OECD. (2000). *Test no. 106: Adsorption -- desorption using a batch equilibrium method*. OECD.
- Pan, M., & Chu, L. M. (2017). Leaching behavior of veterinary antibiotics in animal manure-applied soils. *Science of the Total Environment*, 579, 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.072>
- Paukner, S., & Riedl, R. (2017). Pleuromutilins: Potent drugs for resistant bugs-mode of action and resistance. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* (Vol. 7, Issue 1). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027110>
- Perruchon, C., Katsivelou, E., Karas, P. A., Vassilakis, S., Lithourgidis, A. A., Kotsopoulos, T. A., Sotiraki, S., Vasileiadis, S., & Karpouzas, D. G. (2022). Following the route of veterinary antibiotics tiamulin and tilmicosin from livestock farms to agricultural soils. *Journal of Hazardous Materials*, 429. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128293>
- Poulton, N. C., & Rock, J. M. (2022). Unraveling the mechanisms of intrinsic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.997283>

- Sartini, I., Vercelli, C., Lebkowska-Wieruszewska, B., Lisowski, A., Fadel, C., Poapolathep, A., Dessì, F., & Giorgi, M. (2023). Pharmacokinetics and antibacterial activity of tiamulin after single and multiple oral administrations in geese. *Veterinary and Animal Science*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100317>
- Schlüsener, M. P., & Bester, K. (2006). Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environmental Pollution*, 143(3), 565–571. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.049>
- Schlüsener, M. P., Von Arb, M. A., & Bester, K. (2006). Elimination of macrolides, tiamulin, and salinomycin during manure storage. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(1), 21–28. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0240-8>
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., & Walsh, T. R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 17). <http://www.fedesa.be/eng/PublicSite/xtra/>
- Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V., & Hart, A. (2016a). Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01728>
- Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V., & Hart, A. (2016b). Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01728>
- Singh, N., & Yeh, P. J. (2017). Suppressive drug combinations and their potential to combat antibiotic resistance. *Journal of Antibiotics*, 70(11), 1033–1042. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.102>
- Szucs, G., Tamási, V., Laczay, P., & Monostory, K. (2004). Biochemical background of toxic interaction between tiamulin and monensin. *Chemico-Biological Interactions*, 147(2), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2003.12.003>
- Tolls, J. (2001). Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. In *Environmental Science and Technology* (Vol. 35, Issue 17, pp. 3397–3406). <https://doi.org/10.1021/es0003021>
- Topp, E., Chapman, R., Devers-Lamrani, M., Hartmann, A., Marti, R., Martin-Laurent, F., Sabourin, L., Scott, A., & Sumarah, M. (2013). Accelerated Biodegradation of

Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-degrading Microbacterium sp. . *Journal of Environmental Quality*, 42(1), 173–178. <https://doi.org/10.2134/jeq2012.0162>

- Van Duijkeren, E., Greko, C., Pringle, M., Baptiste, K. E., Catry, B., Jukes, H., Moreno, M. A., Pomba, M. C. M. F., Pyörälä, S., Rantala, M., Ružauskas, M., Sanders, P., Teale, C., Threlfall, E. J., Torren-Edo, J., & Törneke, K. (2014). Pleuromutilins: Use in food-producing animals in the European Union, development of resistance and impact on human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(8), 2022–2031. <https://doi.org/10.1093/jac/dku123>
- Žgajnar Gotvajn, A., Derco, J., Vrabelj, M., & Kassai, A. (2022). Improvement of biotreatability of environmentally persistent antibiotic Tiamulin by O₃ and O₃/H₂O₂ oxidation processes. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 43(15), 2319–2328. <https://doi.org/10.1080/09593330.2021.1876776>
- Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 2019/6 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 11ης Δεκεμβρίου 2018 για τα κτηνιατρικά φάρμακα και για την κατάργηση της οδηγίας 2001/82/ΕΚ.
- Κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 37/2010 της Επιτροπής της 22ας Δεκεμβρίου 2009 σχετικά με φαρμακολογικώς δραστικές ουσίες και την ταξινόμησή τους όσον αφορά τα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.