



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Εξέλιξη της αντιβιοαντοχής σε τετρακυκλίνες κατά την ενσωμάτωση
επιφορτισμένης ή μη επιφορτισμένης κοπριάς στο έδαφος**

Πολάσεκ Μάσσα - Μαρία του Ανδρέα

ΛΑΡΙΣΑ, 2024

Εξέλιξη της αντιβιοαντοχής σε τετρακυκλίνες κατά την ενσωμάτωση επιφορτισμένης ή μη επιφορτισμένης κοπριάς στο έδαφος

Evolution of antimicrobial resistance to tetracyclines after integration of fortified or non-fortified manure into soil

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΗΣ (επιβλέπων καθηγητής):**

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας – Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ:**

Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

- **ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΑΡΑΣ:**

Μεταδιδακτορικός ερευνητής Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πτυχιακή αυτή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Βασιλειάδη Σωτήριο για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, καθώς και για την επίβλεψη και καθοδήγηση του κατά την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Καρπούζα Δημήτριο και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή κ. Καρα Παναγιώτη που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή της εργασίας αυτής.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα Βαλμά Μάριο, για την πολύτιμη βοήθεια και την συνεχή υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την συνεργασία, τις συμβουλές και κυρίως τη φιλική τους διάθεση κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Εκτός αυτών, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, για την τεράστια συναισθηματική και οικονομική υποστήριξη των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί μία από τις σημαντικότερες απειλές για τη δημόσια υγεία στον 21^ο αιώνα, με την εξάπλωση γονιδίων ανθεκτικότητας στο περιβάλλον να επιταχύνεται όλο και περισσότερο από ανθρωπογενείς δραστηριότητες, υπογραμμίζοντας την ανάγκη για την εύρεση αποτελεσματικών δεικτών αναλύσεων κινδύνου εξάπλωσης ανθεκτικότητας στο περιβάλλον. Η διαδομένη πρακτική της αξιοποίησης κοπριάς κτηνοτροφικών ζώων, όπως οι χοίροι, ως λίπασμα καλλιεργήσιμων εκτάσεων αποτελεί βασική πηγή έκθεσης εδαφικών μικροβιακών κοινοτήτων σε πληθυσμούς βακτηρίων ανθεκτικών σε πληθώρα αντιβιοτικών όπως η τετρακυκλίνη, ένα δημοφιλές αντιβιοτικό κλινικής και κτηνιατρικής χρήσης. Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η ανάπτυξη qPCR-βασιζόμενης μεθόδου μοριακής επιδημιολογίας για τη μελέτη τριών γονιδίων ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (*tetM*, *tetQ*, *tetW*), καθώς και ο εντοπισμός και η ποσοτικοποίηση τους σε συνολικά 120 δείγματα υπό τη μορφή μικρόκοσμων, που περιλάμβαναν απ' ευθείας μεταχειρίσεις εδάφους με τετρακυκλίνη, ή με κοπριά επιφορτισμένη με τετρακυκλίνη, μαζί με τους αντίστοιχους μάρτυρες. Οι μικρόκοσμοι διατηρήθηκαν για διάστημα 25 ημερών. Παράλληλα, μελετήθηκαν τα γονίδια *intI1* (ως δείκτης φαινομένων οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς) και 16S rRNA κωδικεύον (ως δείκτης βακτηριακής αφθονίας). Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί η qPCR, έγινε έλεγχος των εκκινητών των γονιδίων, δοκιμή εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών ενίσχυσης δύο εξ αυτών (*tetQ*, *tetW*) και κλωνοποίηση ενισχυμένων αντιγράφων τους σε πλασμιδιακούς φορείς, για την απομόνωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, την επιβεβαίωση του ενθέματος (και προϊόντος ενίσχυσης) και τη δημιουργία πρότυπων καμπυλών ποσοτικοποίησης. Τα ποσοτικά αποτελέσματα της qPCR υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση, από την οποία προέκυψε ότι η κοπριά χοίρων που χρησιμοποιήθηκε, οι οποίοι, κατά δήλωση του παραγωγού, δεν λάμβαναν αντιβιοτικά το τελευταίο 10-ήμερο, αυξάνει σημαντικά την σχετική αφθονία των γονιδίων *tetM* και *tetW* στο έδαφος ανεξαρτήτως μεταχείρισης, ενώ η επιρροή της προσθήκης ή μη τετρακυκλίνης είτε στην κοπριά είτε απευθείας στο έδαφος δεν ήταν σημαντική, δείχνοντας έτσι ότι οι μικροοργανισμοί της κοπριάς είναι φορείς αντιβιοαντοχής σε αρκετά υψηλό βαθμό σε σύγκριση με τους εδαφικούς μικροοργανισμούς. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια του πειράματος, οι προερχόμενοι από την κοπριά πληθυσμοί που έφεραν το *tetM* ή το *tetW* πιθανότατα σταδιακά εξαφανίστηκαν και δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις φαινομένων οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς, ενώ το *tetM* παρουσίασε πολύ χαμηλή σχετική αφθονία. Με βάση τα αποτελέσματα μας, από τα γονίδια υπό μελέτη, το *tetW* αποτελεί τον καταλληλότερο δείκτη για αναλύσεις για τον μηχανισμό αντοχής που στηρίζεται στην προστασία των ριβοσωμάτων, ενώ περαιτέρω δείκτες πρέπει να αναζητηθούν για την ανάλυση του συνόλου των μηχανισμών αντιβιοαντοχής στην τετρακυκλίνη.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance poses a major threat to public health in the 21st century, with the dispersal of antimicrobial resistance genes in the environment being increasingly accelerated by anthropogenic activities, highlighting the need for effective indicators to be used in the risk assessment of antibiotic resistance dissemination in the environment. The common practice of using manure from livestock animals like pigs as fertilizer is a major source of exposure of soil microbial communities to populations of bacteria resistant to a variety of antibiotics such as tetracycline, a popular antibiotic for clinical and veterinary use. The aim of this thesis was to setup a qPCR based molecular epidemiology method for the screening of three tetracycline resistance genes (*tetM*, *tetQ*, *tetW*), along with their identification and quantification in a total of 120 samples in the form of microcosms, including direct soil amendments with tetracycline, or with manure fortified with tetracycline, next to the necessary controls. The microcosms were monitored for 25 days. In parallel, *intI1* (a marker of horizontal gene transfer phenomena) and the 16S rRNA coding gene (a marker of bacterial abundance) were also studied. To effectively use qPCR, primer sets of the genes, as well as the optimal amplification conditions for two of them (*tetQ*, *tetW*), were tested, and amplified copies of them were cloned using plasmid vectors. The recombinant plasmids were isolated to validate the inserts (PCR products) and create the qPCR standard quantification curves. The quantitative results from qPCR were then subjected to statistical analysis, which revealed that the manure which was derived from pigs that, according to the producer's declaration, had not received any antibiotics within the last 10 days, significantly increased the relative abundance of *tetM* and *tetW* genes in the soil regardless of treatment, while the influence of the addition (or the lack of addition) of tetracycline either to the manure or directly to the soil was not significant, thus showing that manure microorganisms are carriers of antibiotic resistance to a fairly high degree compared to soil microorganisms.. However, during the experiment, manure-derived populations carrying *tetM* or *tetW* most likely gradually disappeared and no indications of horizontal gene transfer phenomena were observed, while *tetM* showed very low relative abundance. Based on our results, of the genes under study, *tetW* is the most suitable marker for analyses of the mechanism of resistance based on ribosome protection, while further research for additional markers is necessary for the analysis of all tetracycline antibiotic resistance mechanisms.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Αντιβιοτικά.....	8
1.1.1. Ιστορική αναδρομή.....	8
1.1.2. Φυσιολογικός ρόλος αντιβιοτικών.....	10
1.2. Η μικροβιακή αντοχή.....	10
1.2.1. Γονίδια ανθεκτικότητας.....	11
1.2.2. Είδη ανθεκτικότητας.....	11
1.2.3. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας.....	12
1.2.4. Η κατάσταση σήμερα.....	14
1.3. Κατηγοριοποίηση αντιβιοτικών.....	17
1.3.1. Κριτήρια και ομάδες αντιβιοτικών.....	17
1.3.2. Αντιβιοτικά για ανθρώπους και αντιβιοτικά για (...άλλα) ζώα.....	17
1.3.3. Τετρακυκλίνη.....	19
1.4. Η τύχη των αντιβιοτικών στο περιβάλλον.....	21
1.4.1. Είσοδος αντιβιοτικών στο περιβάλλον.....	21
1.4.2. Τα αντιβιοτικά ως περιβαλλοντικοί ρύποι.....	23
1.4.3. Αποικοδόμηση αντιβιοτικών στο περιβάλλον.....	24
1.5. Ολιστική αντιμετώπιση – One Health.....	24
1.6. Μελέτη της αντιβιοαντοχής στο περιβάλλον.....	25
1.6.1. Μέθοδοι καλλιέργειας.....	27
1.6.2. Μοριακές μέθοδοι.....	27
1.6.3. PCR.....	29
1.6.4. qPCR.....	31
1.7. Σκοπός.....	32
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
2.1. Επιλογή εκκινητών.....	33
2.2. PCR.....	33
2.3. Κλωνοποίηση.....	33
2.3.1. Gel extraction και καθαρισμός DNA.....	33
2.3.2. Ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων αδενίνης και αντίδραση λιγάσης.....	34
2.3.3. Μετασχηματισμός.....	35
2.3.4. Επιλογή λευκών αποικιών.....	35
2.3.5. Απομόνωση πλασμιδίων.....	36
2.3.6. Αλληλούχηση.....	36
2.4. Χειρισμός εδαφών: μέτρηση υγρασίας και WHC.....	36
2.5. Πειραματικός σχεδιασμός.....	37
2.6. Εκχύλιση DNA από δείγματα εδάφους.....	38
2.7. qPCR.....	38
2.8. Βιοστατιστική ανάλυση.....	39
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
3.1. Gel ηλεκτροφόρησης από gel extraction.....	40
3.2. Αποτελέσματα Nucleotide BLAST.....	41

3.3. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης qPCR.....	42
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	50
4.1. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	52
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	59
6.1. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I: Εκκινητές.....	59
6.2. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II: Θρεπτικά και δεδομένα κλωνοποίησης.....	60
6.3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III: Χειρισμοί εδαφών.....	64
6.4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV: DNA extraction.....	64
6.5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V: Δεδομένα qPCR.....	67
6.6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI: : Διαγράμματα στατιστικής ανάλυσης.....	86

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Αντιβιοτικά

Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών αποτελεί σταθμό στην σύγχρονη ιστορία, μεταμορφώνοντας άρδην τον τομέα της ιατρικής με την έναρξη της κλινικής χρήσης τους στις αρχές του 20ου αιώνα. Σήμερα αποτελούν μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες κατηγορίες φαρμάκων για ανθρώπινη και ζωική υγεία. Τα αντιβιοτικά είναι ουσίες που παρεμποδίζουν με ειδικό τρόπο, μέσω της καταστροφής των κυττάρων ή της αναστολής της ανάπτυξης, τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων (Kümmerer, 2009). Πρόκειται είτε για φυσικά προϊόντα (Natural Products, NPs) μικροοργανισμών είτε για συνθετικές ενώσεις παρασκευασμένες στο εργαστήριο. Τα NP αντιβιοτικά είναι στην ουσία δευτερογενείς μεταβολίτες, ενώσεις μη απαραίτητες για τη φυσιολογική αύξηση, ανάπτυξη ή αναπαραγωγή του οργανισμού που τις παράγει, οι οποίες ωστόσο ενδέχεται να διαδραματίζουν σημαντικό οικολογικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις του με άλλους οργανισμούς (Tyc et al., 2017).

1.1.1. Ιστορική αναδρομή

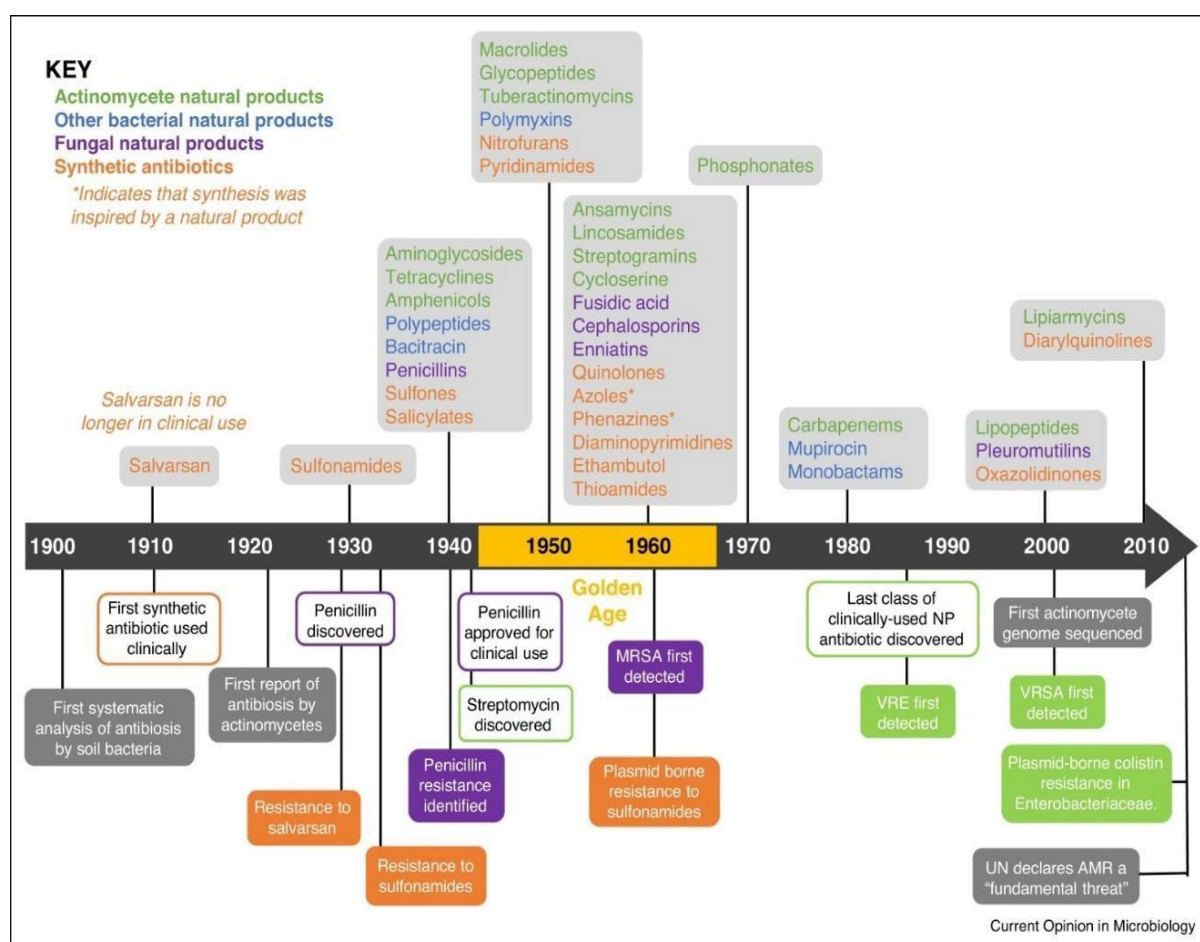
Η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών είναι μία πρακτική που χρησιμοποιείται στην ιατρική εδώ και τουλάχιστον δύο χιλιάδες χρόνια, με την παλαιότερη γνωστή αναφορά σε τέτοιες θεραπείες να χρονολογείται στο 1550 π.Χ. στην Αίγυπτο και ίσως ακόμη παλαιότερα στην Κίνα (Aminov, 2010; Hutchings et al., 2019). Ωστόσο, οι πρώτες ερευνητικές υποθέσεις για την ύπαρξη αντιμικροβιακών ουσιών προερχόμενων από μικροοργανισμούς χρονολογούνται στα τέλη περίπου του 19ου αιώνα (Hutchings et al., 2019), με την πρώτη *in vitro* παρατήρηση αντιβιοτικής δράσης να πραγματοποιείται από τους Louis Pasteur και Robert Koch το 1877, οι οποίοι ερευνούσαν το παθογόνο *Bacillus anthracis* (Manzetti & Ghizi, 2014).

Λίγο αργότερα, το 1910, παρατηρούνται οι πρώτες επιτυχείς προσπάθειες εργαστηριακής ανάπτυξης αντιμολυσματικών φαρμάκων, εμπνευσμένων από βαφές χρησιμοποιούμενες τότε για τη χρώση βακτηρίων, από τους Paul Ehrlich και Gerhard Domagk, οι οποίοι ανέπτυξαν τα φάρμακα Salvarsan και Prontosil αντίστοιχα. Αν και το πρώτο σύντομα αποσύρθηκε, το Prontosil ήταν βασισμένο σε σουλφοναμίδες, οι οποίες αναγνωρίζονται σήμερα ως τα πρώτα πραγματικά αποτελεσματικά, ευρέως φάσματος αντιμικροβιακά φάρμακα σε κλινική χρήση (Hutchings et al., 2019). Παρά την αρχική τους επιτυχία, επισκιάστηκαν σχετικά γρήγορα από την τυχαία ανακάλυψη της πενικιλίνης σε ένα επιμολυσμένο τρυβλίο Petri από τον Alexander Fleming το 1928 (Kumar et al., 2019), η οποία πέρασε στην κλινική χρήση τα τέλη της δεκαετίας του 1930. Η πενικιλίνη ήταν το πρώτο NP αντιβιοτικό που ανακαλύφθηκε, προερχόμενο από μύκητες του γένους *Penicillium* (Kümmerer, 2009; Peterson & Kaur, 2018).

Οι εξελίξεις αυτές οδήγησαν στα τέλη του 1930 στην πρώτη μεγάλη έρευνα για εύρεση μικροβίων που παράγουν αντιβιοτικά από τον Selman Waksman, του οποίου το εκτενές έργο εγκαινίασε την χρυσή εποχή ανακάλυψης αντιβιοτικών (1940-1960) (Aminov, 2010; Peterson & Kaur, 2018; Hutchings et al., 2019). Ο Waksman ανακάλυψε την νεομυκίνη και την στρεπτομυκίνη και ανέδειξε το γένος *Streptomyces* (και γενικότερα την τάξη των *Actinomycetales*) ως εξέχουσα πηγή βιοδραστικών

δευτερογενών μεταβολιτών (Peterson & Kaur, 2018; Hutchings et al., 2019). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι από όλα τα αντιβιοτικά που ανακαλύφθηκαν μεταξύ 1945 και 1978, το 55% προήλθε από το γένος *Streptomyces* (Embley & Stackebrandt, 1994). Έκτοτε, εκατοντάδες αντιβιοτικά έχουν αναπτυχθεί για χημειοθεραπεία, εγκαινιάζοντας μια νέα εποχή για την ιατρική και την κτηνιατρική, γνωστή και ως “αντιβιοτική εποχή” (Aminov, 2010).

Τα αντιβιοτικά έχουν συμβάλει, μεταξύ άλλων, στην αντιμετώπιση ασθενειών (όπως η σύφιλη, η φυματίωση και η χολέρα), στην πραγματοποίηση επιτυχών χειρουργικών επεμβάσεων (όπως η καισαρική τομή), στην ανάπτυξη της κτηνοτροφίας και των υδατοκαλλιεργειών για την κάλυψη των αυξανόμενων αναγκών σε τροφή ενώ πρόσφατα έχουν κεντρίσει το ερευνητικό ενδιαφέρον και ως αντικαρκινικά φάρμακα (Hutchings et al., 2019).



ΕΙΚΟΝΑ 1: Χρονοδιάγραμμα κλινικής χρήσης αντιβιοτικών (πάνω μέρος). Ανάλογα με την προέλευση τους, τα αναγραφόμενα αντιβιοτικά έχουν ξεχωριστό χρώμα (πράσινο: NP ακτινομυκήτων, μπλε: NP άλλων βακτηρίων εκτός ακτινομυκήτων, μοβ: NP μυκήτων, πορτοκαλί: συνθετικά αντιβιοτικά). Στο κάτω μέρος φαίνονται βασικές ημερομηνίες που αφορούν την ανακάλυψη αντιβιοτικών και τη μικροβιακή αντοχή, συμπεριλαμβανομένων των πρώτων αναφορών ανθεκτικών στελεχών: ανθεκτικών στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA), ανθεκτικών στη βανκομυκίνη εντερόκοκκων (VRE), ανθεκτικών στη βανκομυκίνη *S. aureus* (VRSA) και πλασμιδιακά μεταφερόμενης αντοχής στην κολιστίνη σε Enterobacteriaceae (Hutchings et al., 2019).

1.1.2. Φυσιολογικός ρόλος αντιβιοτικών

Ο ακριβής λόγος για τον οποίο οι μικροοργανισμοί, ιδιαίτερα αυτοί του εδάφους (π.χ. *Streptomyces*), παράγουν αντιβιοτικά δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, υπάρχει ωστόσο πληθώρα υποθέσεων (Kumar et al., 2019; Hutchings et al., 2019). Η πιο πιθανή εξ αυτών είναι οι πολλαπλές λειτουργίες των αντιβιοτικών ως μέσα θανάτωσης ανταγωνιστών είτε αμυντικά είτε σε επίπεδο θήρευσης, ως διακυτταρικών μορίων σηματοδότησης μεταξύ συγγενικών ειδών και ως διαμεσολαβητές αλληλεπιδράσεων με ξενιστές όπως τα φυτά και τα έντομα (Hutchings et al., 2019).

Τα περισσότερα από τα αντιβιοτικά που προαναφέρθηκαν, ή συνθετικά παράγωγα αυτών, είναι σε κλινική χρήση ακόμη μέχρι και σήμερα, αλλά η αποτελεσματικότητά τους έχει περιοριστεί σε μεγάλο βαθμό από την ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής, ένα πρόβλημα, που, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια, αποτελεί μία από της σημαντικότερες απειλές για την δημόσια υγεία στη σύγχρονη εποχή. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται τόσο το χρονοδιάγραμμα κλινικής χρήσης πολλών αντιβιοτικών, NP και μη, όσο και οι ημερομηνίες εμφάνισης των σημαντικότερων ανθεκτικών σε αυτά στελεχών.

1.2. Η μικροβιακή αντοχή

Η μικροβιακή αντοχή (AntiMicrobial resistance, AMR) είναι η ικανότητα των βακτηρίων να επιβιώνουν μετά από έκθεση σε καθορισμένη συγκέντρωση αντιβιοτικών (Acar & Röstel, 2001). Αποτελεί ένα διαδεδομένο βιολογικό φαινόμενο, που περιγράφει το πώς οι μικροοργανισμοί που εμφανίζουν αντοχή σε κάποιο αντιβιοτικό επικρατούν σε έναν μικροβιακό πληθυσμό, όταν ο πληθυσμός αυτός εκτεθεί στο εν λόγω αντιβιοτικό. Είναι προϊόν φυσικής επιλογής που συμβαδίζει ανέκαθεν με την ύπαρξη μικροοργανισμών που παράγουν αντιβιοτικά, με την εμφάνιση του να προηγείται της ανθρωπότητας (Perry & Wright, 2016) και με υποθέσεις που την τοποθετούν δεκάδες εκατομμύρια ή και δισεκατομμύρια χρόνια πίσω (Zhuang et al., 2021).

Ωστόσο, η έκταση της μικροβιακής ανθεκτικότητας σήμερα δεν μπορεί παρά να αποδοθεί στον ανθρώπινο παράγοντα. Η ταχεία ανακάλυψη πολλών αντιβιοτικών σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα και η ευρεία βιομηχανική παραγωγή τους οδήγησε στην αλόγιστη χρήση των φαρμάκων αυτών για πολλές δεκαετίες, δημιουργώντας έντονη εξελικτική πίεση η οποία ευνοούσε την όλο και πιο συχνή επικράτηση ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων. Η θετική σχέση μεταξύ της χρήσης αντιβιοτικών και της ανάπτυξης αντοχής έχει ερευνηθεί εκτενώς (Bell et al., 2014). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την σταδιακή αλλά εμφανή ελάττωση της συχνότητας ανακάλυψης νέων NP αντιβιοτικών από τη δεκαετία του 1970 και έπειτα (Peterson & Kaur, 2018; Hutchings et al., 2019) οδήγησε σήμερα στην ύπαρξη πολλαπλών ανθεκτικών στελεχών, για τα οποία δεν υπάρχει καμία αποτελεσματική θεραπεία (Acar & Röstel, 2001). Επί του παρόντος, νέα αντιβιοτικά λαμβάνονται μόνο με χημική σύνθεση ή με χημική τροποποίηση ήδη γνωστών NP αντιβιοτικών (Kovalakova et al., 2020), ενώ έχει καταγραφεί αντοχή για σχεδόν όλα τα αντιβιοτικά που έχουν χρησιμοποιηθεί (Ventola, 2015), καθιστώντας την AMR μία από τις μεγαλύτερες απειλές για την δημόσια υγεία στον 21ο αιώνα (WHO, 2023).

Στην συνέχεια, θα εστιάσουμε στις βιολογικές διεργασίες μέσω των οποίων τα βακτήρια εμφανίζουν ανθεκτικότητα, και πως αυτή εξαπλώνεται όχι μόνο εντός των πληθυσμών, αλλά και μεταξύ διαφορετικών ειδών βακτηρίων.

1.2.1. Γονίδια ανθεκτικότητας

Τα γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (Antibiotic Resistant Genes, ARGs) είναι το γενετικό υπόβαθρο της αντιβιοαντοχής (Acar & Röstel, 2001; Mak, 2014). Η προέλευση τους δεν μπορεί παρά να αποδοθεί στους ίδιους τους μικροοργανισμούς παραγωγούς αντιβιοτικών (Perry & Wright, 2016), οι οποίοι διαθέτουν διαφόρων ειδών “δικλείδες ασφαλείας” προκειμένου να αποφύγουν την τοξική δράση των ίδιων των μεταβολιτών τους. Έχει βρεθεί μάλιστα ότι οι γενετικοί τόποι που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα σε αυτούς τους μικροοργανισμούς τείνουν να ομαδοποιούνται πάντα μαζί με τα γονίδια βιοσύνθεσης αντιβιοτικών, και να υφίστανται μάλιστα κοινή ρύθμιση. Κάθε συστάδα βιοσυνθετικών γονιδίων φέρει έτσι τουλάχιστον ένα γονίδιο αντοχής στο αντίστοιχο αντιβιοτικό (Mak et al., 2014).

Για να γίνει αντιληπτό το πως τα γονίδια αυτά δεν περιορίστηκαν στους παραγωγούς οργανισμούς, αλλά εξαπλώθηκαν και σε άλλα είδη βακτηρίων, πρέπει να εξετάσουμε έναν μηχανισμό πρόσληψης εξωγενούς γενετικού υλικού άκρως σημαντικό για την εξέλιξη των βακτηρίων, ο οποίος είναι γνωστός ως οριζόντια γονιδιακή μεταφορά (Horizontal Gene Transfer, HGT) (Mak et al., 2014; Michaelis & Grohmann, 2023). Η HGT περιλαμβάνει τη μεταφορά DNA από ένα κύτταρο-δότη σε ένα κύτταρο-δέκτη με τρεις τρόπους: μέσω άμεσης επαφής (σύζευξη), μέσω πρόσληψης εξωκυτταρικού γυμνού DNA (μετασχηματισμός) ή μέσω της μεταφοράς DNA με μεσολάβηση βακτηριοφάγων (μεταγωγή) (Michaelis & Grohmann, 2023). Η ιδιότητα της HGT να πραγματοποιείται όχι μόνο εντός του είδους, αλλά και μεταξύ φυλογενετικά διαφορετικών βακτηρίων, δίνει απεριόριστες δυνατότητες εξάπλωσης αντοχής μεταξύ διαφορετικών ενδιαιτημάτων, καθώς οι μικροοργανισμοί αλληλοεπιδρούν με μία τεράστια γονιδιακή δεξαμενή δυνητικά χρήσιμων χαρακτηριστικών. Εκτός αυτού, συμβάλλει στην εμφάνιση στελεχών ανθεκτικών σε πολλά αντιβιοτικά (Multidrug Resistant Bacteria, MRB) (Nikaido, 2009; Perry & Wright, 2016) τα οποία οδηγούν σε σοβαρές (και συχνά θανατηφόρες) λοιμώξεις.

1.2.2. Είδη ανθεκτικότητας

Ωστόσο, οι τρόποι με τους οποίους μπορεί να εμφανιστεί ανθεκτικότητα σε έναν βακτηριακό πληθυσμό δεν περιορίζονται στην HGT, παρά την αποτελεσματικότητα της για την απόκτηση νέων χαρακτηριστικών. Συγκεκριμένα, ανάλογα με τον μηχανισμό με τον οποίο τα βακτήρια αποκτούν την αντοχή τους, η ανθεκτικότητα διακρίνεται σε εγγενή, φαινοτυπική και επίκτητη (Iskandar et al., 2022).

Η εγγενής ανθεκτικότητα βασίζεται σε μηχανισμούς του γονιδιώματος ενός βακτηριακού είδους οι οποίοι είναι ανεξάρτητοι της επιλεκτικής πίεσης των αντιβιοτικών και δεν οφείλονται σε HGT. Πρόκειται για χρωμοσωμικά γονίδια τα οποία προσφέρουν συνήθως χαμηλά επίπεδα αντοχής σε διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών, και έχουν εξελιχθεί συνήθως για διαφορετικό σκοπό (Iskandar et al., 2022). Ένα καλά χαρακτηρισμένο παράδειγμα τέτοιου μηχανισμού είναι η αντλία εκροής AcrAB/TolC του *Escherichia coli*, η οποία χάρη στη χαμηλή της εξειδίκευση μπορεί να απομακρύνει από το κύτταρο

διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών, χρωστικών, απορρυπαντικών και άλλων πιθανά επιβλαβών για αυτό ουσιών (Nikaido, 2009).

Η φαινοτυπική ανθεκτικότητα είναι παροδική, και επιτυγχάνεται με μία σειρά προσαρμογών, όπως η ανάπτυξη σε βιοφιλμ. Οι μικροβιακές κοινότητες των βιοφιλμ παρουσιάζουν μεγάλη αντοχή σε αντιβιοτικά, σε μηχανισμούς του ανοσοποιητικού του ξενιστή καθώς και γενικότερα σε αντίξοες συνθήκες (Iskandar et al., 2022). Επίσης, παρατηρείται σε κάποια είδη “επίμονων” βακτηρίων, τα οποία ενώ δεν διαθέτουν ARGs, μπορούν να αντέξουν σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών μειώνοντας τα επίπεδα του μεταβολισμού τους σε στατικές φάσεις ανάπτυξης (Iskandar et al., 2022).

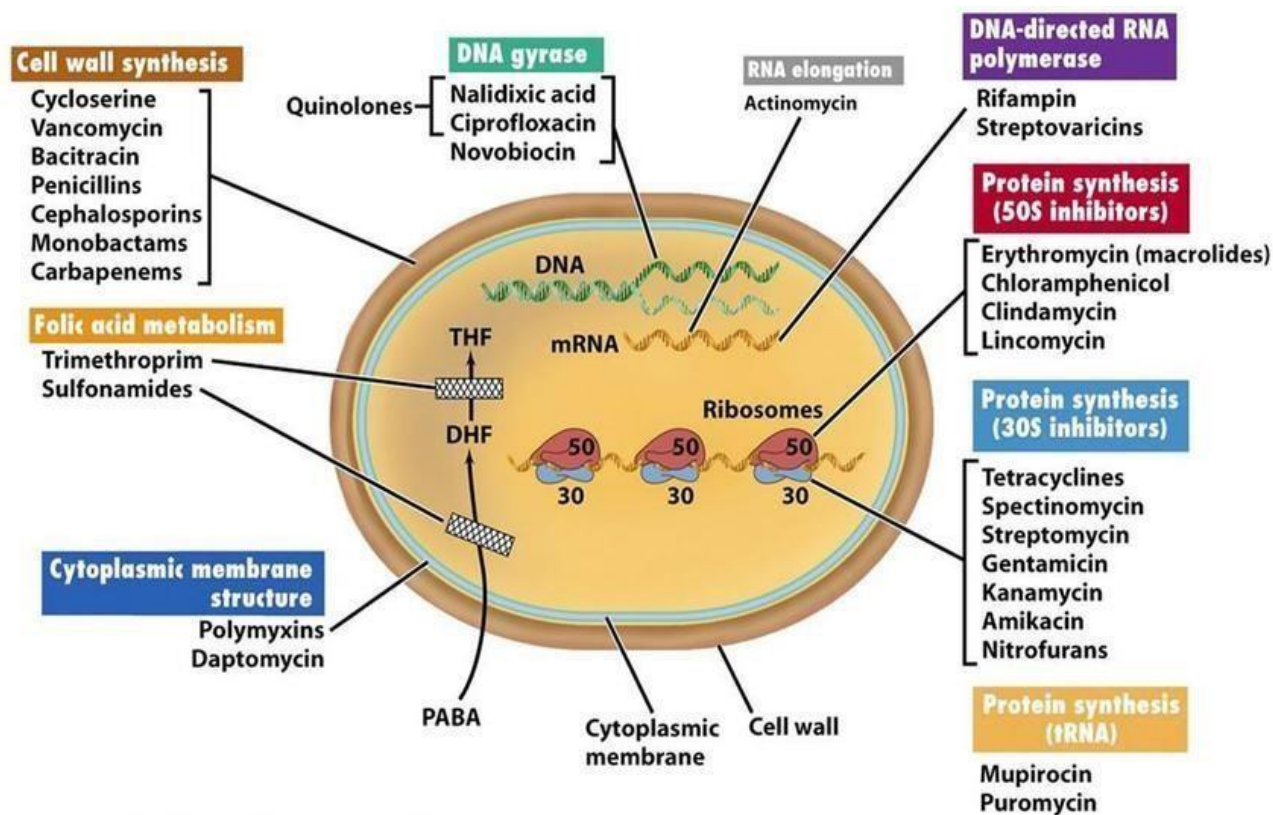
Η επίκτητη αντιβιοαντοχή, τέλος, είναι η ανθεκτικότητα που ένας μικροοργανισμός αποκτά κατά τη διάρκεια της ζωής του με αλλαγή του γενετικού του υλικού, είτε μέσω μεταλλάξεων, οι οποίες εγκαθιδρύονται στον πληθυσμό παρουσία εξελικτικής πίεσης, είτε μέσω HGT μεταθετών στοιχείων, όπως τα πλασμίδια, τα τρανσποζόνια και τα ιντεγκρόνια (Iskandar et al., 2022; Michaelis & Grohmann, 2023). Παραδείγματα αποτελούν οι εξειδικευμένες αντλίες εκροής τετρακυκλίνης TetK και TetL του *Staphylococcus aureus* οι οποίες κωδικοποιούνται από πλασμίδια, έχοντας έτσι αυξημένο αριθμό αντιτύπων και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης εντός των κυττάρων έναντι χρωμοσωμικών γονιδίων. Αυτό το είδος αντοχής είναι αυτό που επηρεάζεται πιο άμεσα από την ανθρώπινη δραστηριότητα, καθιστώντας το την πιο επικίνδυνη πηγή AMR (Peterson & Kaur, 2018)

1.2.3. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Τα αντιβιοτικά συνήθως δρουν μέσω των εξής μηχανισμών: αναστολή της σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος, αναστολή της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων, παρεμπόδιση της λειτουργίας των ριβοσωμάτων και παρεμβολή στον μεταβολισμό του φυλλικού οξέος. (Dowling et al., 2017). Οι στόχοι αυτών των μηχανισμών φαίνονται στην Εικόνα 2. Ως απάντηση στη δράση των αντιβιοτικών, οι μικροοργανισμοί που φέρουν ARGs έχουν αναπτύξει τέσσερεις κυτταρικούς μηχανισμούς με τους οποίους επιτυγχάνεται η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (βλ. Εικόνα 3): Ο περιορισμός της πρόσληψης του αντιβιοτικού, οι τροποποιήσεις του στόχου του αντιβιοτικού, η αδρανοποίηση του αντιβιοτικού και η ενεργητική απομάκρυνση του από τα κύτταρα με αντλίες εκροής (Iskandar et al., 2022).

Ο περιορισμός της πρόσληψης του αντιβιοτικού στηρίζεται στην παρεμπόδιση των μορίων του αντιβιοτικού να εισέλθουν στα κύτταρα, αποτρέποντας τα από το να φτάσουν σε ενδοκυτταρικούς στόχους, ή, κυρίως για Gram(-) βακτήρια, στόχους στην πλασματική μεμβράνη. Μπορεί να γίνει μέσω μείωσης της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος, ή με μεταλλάξεις σε διαμεμβρανικούς διαύλους όπως οι πορίνες, που αξιοποιούνται από υδρόφιλα αντιβιοτικά όπως η βανκομυκίνη (Munita & Arias, 2016).

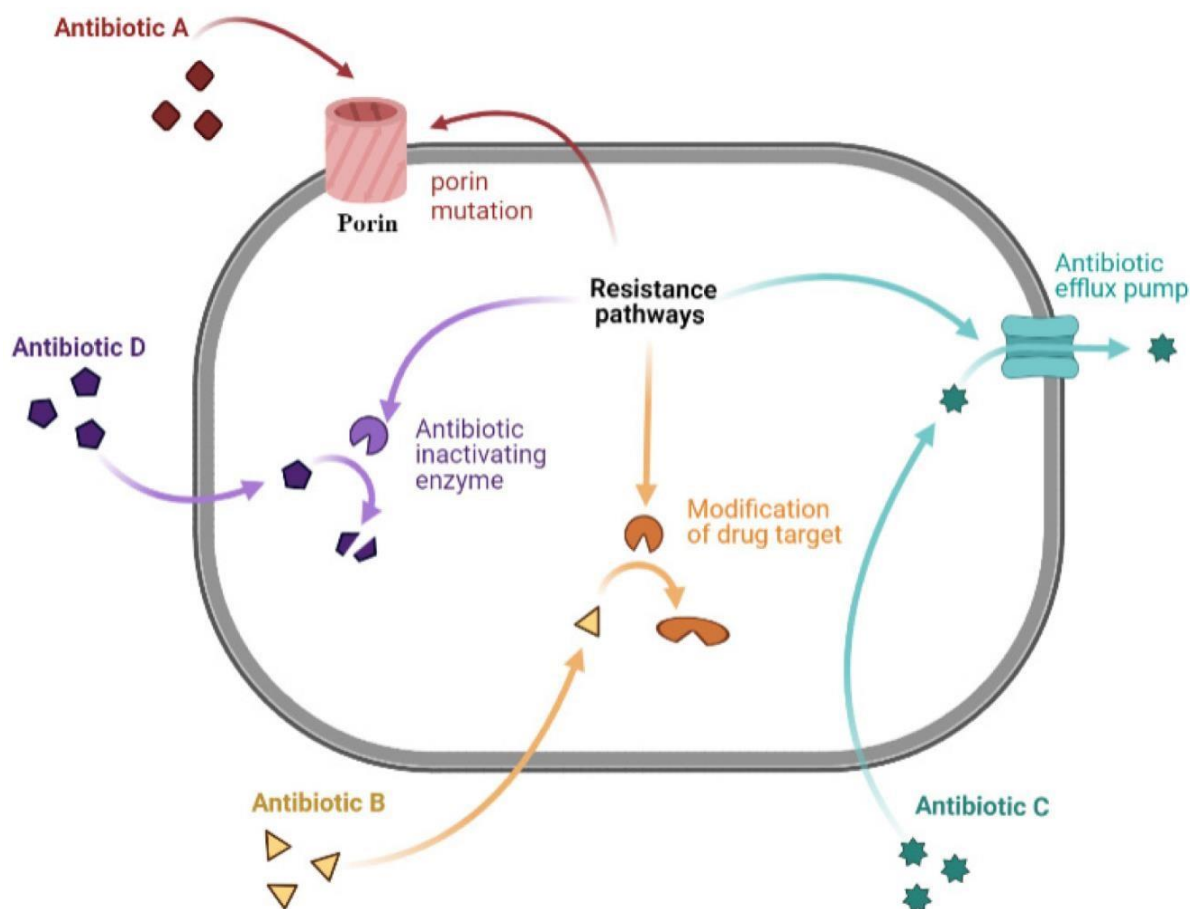
Οι τροποποιήσεις των στόχων των αντιβιοτικών αφορούν δύο μηχανισμούς: την προστασία του στόχου ή την τροποποίηση της θέσης πρόσδεσης του στόχου (Wilson, 2014). Στην πρώτη περίπτωση η δράση του αντιβιοτικού αποτρέπεται πριν φτάσει στην θέση σύνδεσης, ενώ στη δεύτερη δεν προσδένεται στη θέση αυτή λόγω μειωμένης πλέον συγγένειας εξαιτίας της τροποποίησης. Παράδειγμα προστασίας του στόχου είναι η δράση των πρωτεϊνών TetM και TetO, οι οποίες απομακρύνουν το αντιβιοτικό τετρακυκλίνη από τα ριβοσώματα καταναλώνοντας GTP (Munita & Arias, 2016).



ΕΙΚΟΝΑ 2: Τρόποι δράσης αντιβιοτικών. Με διακριτά χρώματα φαίνονται οι στόχοι των αντιβιοτικών: η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (καφέ), ο μεταβολισμός φυλλικού οξέος (πορτοκαλί), η δομή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (μπλε), τα tRNAs (κίτρινο), η 30S υπομονάδα του ριβοσώματος (γαλάζιο), η 50S υπομονάδα του ριβοσώματος (κόκκινο), η RNA πολυμεράση (μωβ), η επιμήκυνση του RNA (γκρι) και η γυράση του DNA (πράσινο) (Madigan & Martinko, 2006; αναπαραγόμενο μέσω των Etebu & Ariekpar, 2016).

Οι αντλίες εκροής ήταν από τους πρώτους μηχανισμούς αντιβιοαντοχής που περιεγράφηκαν (McMurry et al., 1980). Πρόκειται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που μπορούν με ενεργητικό τρόπο να εξάγουν μόρια αντιβιοτικού από το κύτταρο, αποτρέποντας έτσι τις συνέπειες της έκθεσης του κυττάρου σε αυτό. Έχει γίνει περιγραφή πέντε μεγάλων οικογενειών αντλιών (Munita & Arias, 2016), οι οποίες είτε είναι ευρέως φάσματος (όπως αυτές στις οποίες οφείλεται η εγγενής αντοχή) είτε εξειδικευμένες για συγκεκριμένα αντιβιοτικά, όπως οι τετρακυκλίνες και οι μακρολίδες.

Η αδρανοποίηση του αντιβιοτικού αφορά την ενζυμική τροποποίηση του, η οποία έχει ως αποτέλεσμα είτε την αποικοδόμηση του, είτε την αποτροπή της τοξικής δράσης του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ενζύμων που καταστρέφουν το αντιβιοτικό είναι οι β-λακταμάσες, με στόχο αντιβιοτικά όπως οι πενικιλίνες (Iskandar et al., 2022). Σε περίπτωση απλής τροποποίησης του μορίου του αντιβιοτικού, οι πιο συχνές βιοχημικές αντιδράσεις που καταλύονται από τέτοια ένζυμα είναι η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση και η αδενυλίωση (Munita & Arias, 2016). Τα περισσότερα αντιβιοτικά που επηρεάζονται από τις ενζυμικές τροποποιήσεις δρουν αναστέλλοντας την λειτουργία των ριβοσωμάτων (Wilson, 2014).

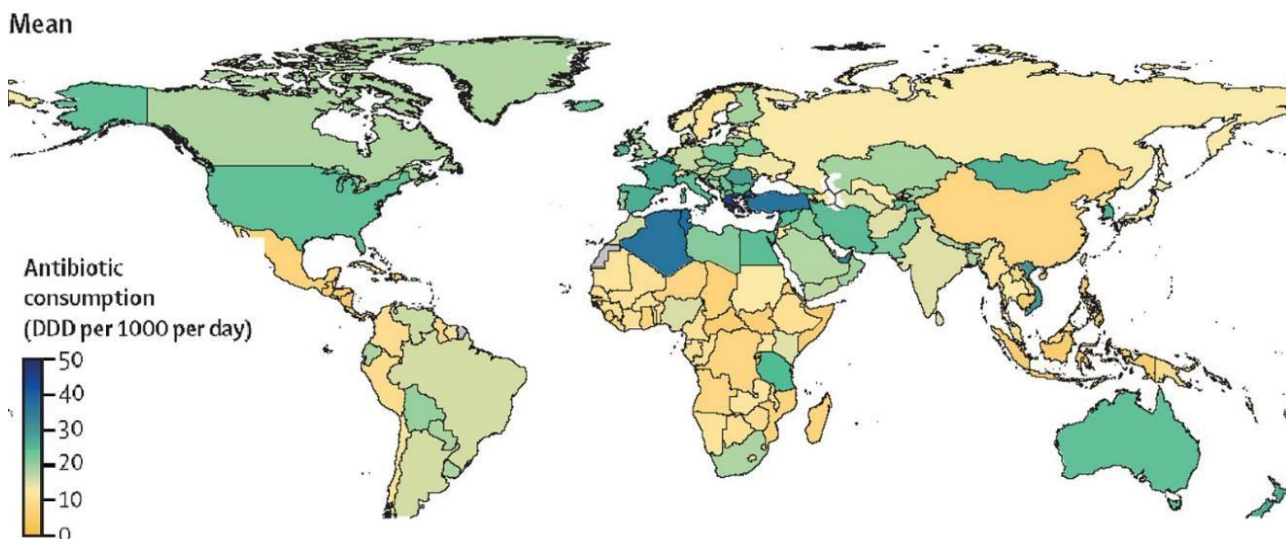


ΕΙΚΟΝΑ 3: Κοινοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Οι μηχανισμοί που διακρίνονται είναι οι εξής: Το αντιβιοτικό A δεν μπορεί να εισέλθει στο κύτταρο λόγω μετάλλαξης σε πορίνη. Το αντιβιοτικό B δεν μπορεί να συνδεθεί στον στόχο του, ο οποίος έχει τροποποιηθεί. Το αντιβιοτικό C εξέρχεται από το κύτταρο μέσω αντλίας εκροής και το αντιβιοτικό D αναστέλλεται ενζυμικά (Iskandar et al., 2022).

1.2.4. Η κατάσταση σήμερα

Κλείνοντας την ενότητα που αφορά την μικροβιακή ανθεκτικότητα, θεωρείται σκόπιμο να παρατεθούν κάποια δεδομένα για την έκταση του προβλήματος σήμερα, καθώς και κάποιες προβλέψεις για το άμεσο μέλλον.

Σύμφωνα με τους Antimicrobial Resistance Collaborators (2022), το 2019 υπήρξαν 4.95 εκατομμύρια θάνατοι σχετιζόμενοι με AMR, με 1.27 εκατομμύρια από αυτούς να είναι επιβεβαιωμένοι ότι οφείλονταν άμεσα σε λοίμωξη από ARB. Επίσης, υπολογίζεται ότι χωρίς δραστικά μέτρα, οι θάνατοι από ARBs θα ξεπεράσουν τον καρκίνο ως η πρώτη αιτία θανάτου στην Ευρώπη (European Commission, 2022). Η Ελλάδα έχει αρνητική πρωτιά ανάμεσα σε χώρες της ΕΕ, έχοντας την υψηλότερη επιβάρυνση από λοιμώξεις που οφείλονται σε ARBs (Barmouni et al., 2023). Παρόλα αυτά, η παγκόσμια κατανάλωση αντιβιοτικών φαίνεται να αυξάνεται, σε ποσοστά της τάξης του 46% για την περίοδο 2000-2018 (Browne et al., 2021). Ενδεικτικά, στην Εικόνα 4 διακρίνεται κατά μέσο όρο η παγκόσμια κατανάλωση αντιβιοτικών το 2018.



ΕΙΚΟΝΑ 4: Μέση παγκόσμια κατανάλωση αντιβιοτικών το 2018 (Browne et al., 2021)

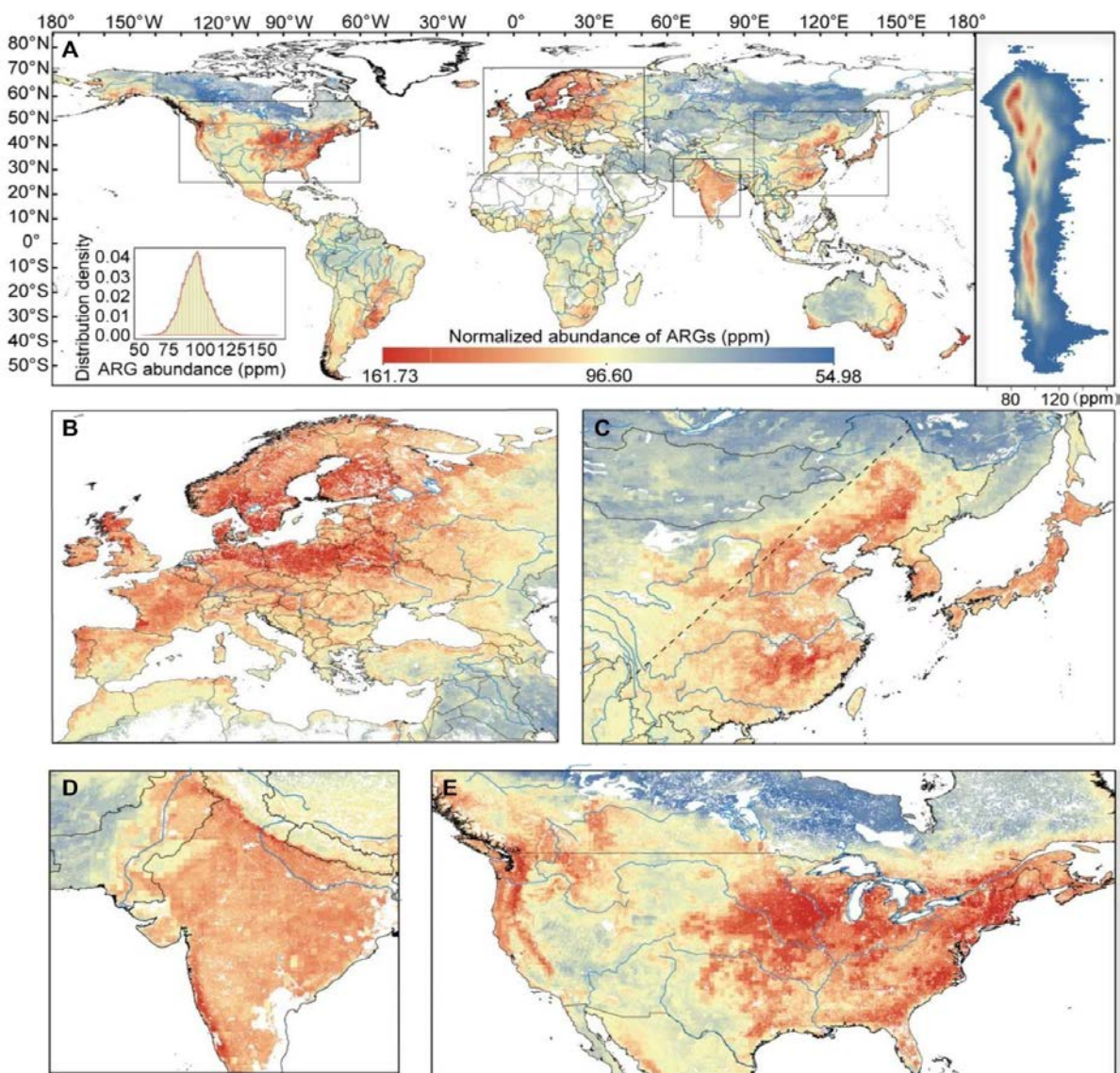
Έξι στελέχη, τα *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* και *Pseudomonas aeruginosa* έχουν αναδειχθεί ότι προκαλούν το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων από AMR, οδηγώντας τον WHO να συντάξει την κατάταξη των "Παθογόνων Προτεραιότητας" το 2017, η οποία περιέχει 12 είδη ARB ή MRB, για τα οποία "αναζητείται άμεσα αντιβιοτική θεραπεία" (WHO, 2017).

Αν και έχουν γίνει κάποια βήματα προς την ευρύτερη αναγνώριση και αντιμετώπιση του προβλήματος, με τη σύσταση το 2015 του Παγκόσμιου Συστήματος Επιτήρησης της Μικροβιακής Αντοχής και της Χρήσης Αντιμικροβιακών Ουσιών (Global Antimicrobial resistance and use Surveillance System, GLASS) (WHO, 2024), η κατάχρηση των αντιβιοτικών δεν φαίνεται να έχει περιοριστεί σε ικανοποιητικό βαθμό.

Πέραν της υπερβολικά συχνής κατανάλωσης τους για προληπτικούς κυρίως λόγους, η οποία είτε οφείλεται σε ανεπαρκή ενημέρωση των πολιτών για την ορθή χρήση τους, είτε σε ανεύθυνες πρακτικές επαγγελματιών Υγείας, τα αντιβιοτικά βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στην κτηνοτροφία και την ιχθυοτροφία όχι μόνο για πρόληψη ή αντιμετώπιση ασθενειών, αλλά και ως παράγοντες αύξησης (Economou & Gousia, 2015). Στις ΗΠΑ μάλιστα το 80% των αντιβιοτικών που αγοράζονται ετησίως προορίζονται για χρήση σε κτηνοτροφικές μονάδες ή σε υδατοκαλλιέργειες (Sazykin et al., 2021), και η χρήση αντιβιοτικών σε αυτούς του κλάδους αναμένεται να αυξηθεί κατά 67% παγκοσμίως μέχρι το 2030 (Van Boeckel et al., 2015). Δεδομένων των απαιτήσεων της παγκόσμιας αγοράς σε ζωική πρωτεΐνη, συνυπολογίζοντας τον παράγοντα του κέρδους, δεν είναι υπερβολή να υποθέσουμε ότι η χρήση των αντιβιοτικών σε κτηνοτροφικές πρακτικές είναι από τις μεγαλύτερες συνιστώσες του προβλήματος της εξάπλωσης της αντιβιοαντοχής. Το πρόβλημα όμως δεν περιορίζεται ούτε σε νοσοκομεία ούτε σε κτηνοτροφικές μονάδες: τα αντιβιοτικά και οι μεταβολίτες τους απορρίπτονται συνεχώς στο φυσικό περιβάλλον (Kumar et al., 2019), γεγονός που αποτελεί θεματολογία επόμενης ενότητας. Ενδεικτικά,

παρατίθενται τα παρακάτω: Η αντίχρεση υψηλών ποσοστών ARGs έχει επιβεβαιωθεί, μεταξύ άλλων, σε επιφανειακά ύδατα, υπόγεια ύδατα, γεωλογικά ιζήματα και υγρότοπους (Mao et al., 2015).

Εκτός αυτών, σύμφωνα με τους Zheng et al. (2022), η ποσότητα ARGs στο έδαφος ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις σε σχέση με μη καλλιεργήσιμες, με τα μεγαλύτερα “hotspots” να αντιστοιχούν στις πιο πυκνοκατοικημένες περιοχές του πλανήτη (NA Ασία, Ευρώπη, Β. Αμερική), όπως φαίνεται στην Εικόνα 5. Η μικροβιακή αντοχή είναι πλέον πρόβλημα τόσο δημόσιας υγείας, όσο και περιβάλλοντος.



ΕΙΚΟΝΑ 5: Παγκόσμιος χάρτης της κανονικοποιημένης αφθονίας των ARGs του εδάφους. (Α) Κανονικοποιημένη αφθονία των ARGs του εδάφους σε όλο τον κόσμο. Το δεξιό υπόμνημα απεικονίζει τη διακύμανση του γεωγραφικού πλάτους της αφθονίας των ARGs σε όλο τον κόσμο, ενώ το αριστερό υπόμνημα περιγράφει το ιστόγραμμα κατανομής της αφθονίας των ARGs. (Β έως Ε) Κανονικοποιημένη αφθονία των ARGs του εδάφους στην Ευρώπη (Β), την Ανατολική Ασία (C), τη Νότια Ασία (D) και τη Βόρεια Αμερική (Ε) (Zheng et al., 2022).

Καταλήγοντας, η ανθρωπογενούς προέλευσης εξελικτική πίεση διαταράσσει σε επικίνδυνο βαθμό ένα φυσικό φαινόμενο το οποίο είναι ικανό να αναιρέσει πολλά από τα επιτεύματα της σύγχρονης ιατρικής, οδηγώντας πλέον στη μετα-αντιβιοτική εποχή. Η ενδεδειγμένη μελέτη της αντιβιοαντοχής αλλά και άμεσες δράσεις για την αντιμετώπιση της είναι πλέον μονόδρομος.

1.3. Κατηγοριοποίηση αντιβιοτικών

Σε αυτή την ενότητα γίνεται αναφορά στις διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών, στα κριτήρια από τα οποία προκύπτουν οι ομάδες αυτές και δίνεται βάση στις τετρακυκλίνες, οι οποίες έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο σε αυτήν την πτυχιακή εργασία.

1.3.1. Κριτήρια και ομάδες αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά μπορούν να ομαδοποιηθούν με βάση πολλά διαφορετικά κριτήρια. Αρχικά, γίνεται διάκριση μεταξύ βακτηριοστατικών και βακτηριοκτόνων αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά με βακτηριοστατική δράση αναστέλλουν παροδικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, η οποία επανεμφανίζεται αν το αντιβιοτικό απομακρυνθεί, ενώ τα βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά προκαλούν κυτταρικό θάνατο (Calderon & Sabundayo, 2007). Επίσης, διακρίνονται τρεις κατηγορίες ανάλογα με την προέλευση του αντιβιοτικού: NP, ημι-συνθετικά ή συνθετικά αντιβιοτικά. Υπάρχουν εκτός αυτών διαφοροποιήσεις που αφορούν καθαρά την κλινική χρήση αντιβιοτικών, όπως ο τρόπος χορήγησης (δια στόματος, υποδόρια ή τοπικά) (Etebu & Ariekpar, 2016). Τα πιο συχνά κριτήρια ωστόσο είναι τα εξής: (α) η χημική δομή, (β) το φάσμα δράσης και (γ) ο μηχανισμός δράσης. Οι μηχανισμοί δράσης έχουν ήδη αναφερθεί στην ενότητα 1.2.3. Με βάση τη χημική δομή διακρίνονται 16 οικογένειες αντιβιοτικών (Zhuang et al., 2021), με τις σημαντικότερες να είναι οι β-λακτάμες, οι μακρολίδες, οι τετρακυκλίνες, οι κινολόνες, οι αμινογλυκοσίδες, οι σουλφοναμίδες, τα γλυκοπεπτίδια και οι οξαζολιδιόνες (Etebu & Ariekpar, 2016). Με βάση το φάσμα δράσης, έχουμε αντιβιοτικά ευρέως φάσματος και αντιβιοτικά στενού φάσματος. Η συντριπτική πλειοψηφία αντιβιοτικών χαρακτηρίζεται από ευρύ φάσμα δράσης, γεγονός που συμβάλλει στην ανάπτυξη AMR λόγω ταυτόχρονης εξελικτικής πίεσης σε διάφορα είδη βακτηρίων εκτός του στόχου για τον οποίο χορηγείται αρχικά το φάρμακο. Λαμβάνοντας υπόψη και την ιδιαίτερα αρνητική επίδραση που έχει η μη εξειδικευμένη δράση τέτοιων αντιβιοτικών στο μικροβίωμα του οργανισμού-ξενιστή, τα αντιβιοτικά στενού φάσματος παρουσιάζουν σαφή προτερήματα, αλλά απαιτούν την ταυτοποίηση του παθογόνου για την αποτελεσματική χορήγηση τους (Melanders et al., 2018).

1.3.2. Αντιβιοτικά για ανθρώπους και αντιβιοτικά για (...άλλα) ζώα

Πέρα από τα κριτήρια που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, υπάρχει επίσης διάκριση μεταξύ των αντιβιοτικών για ανθρώπινη χορήγηση, και αυτών που χρησιμοποιούνται ως κτηνιατρικά φάρμακα. Η κατηγοριοποίηση αυτή προτάθηκε από την ad hoc Ειδική Ομάδα Εμπειρογνομόνων για τις Αντιμικροβιακές Συμβουλές (Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group, AMEG), και έγινε δεκτή από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (ΕΟΦ), στα πλαίσια της ολιστικής αντιμετώπισης της μικροβιακής αντοχής (EMA, 2020). Συγκεκριμένα, προτάθηκαν τέσσερις κατηγορίες με βάση την κλινική σημασία των αντιβιοτικών, προκειμένου να αποφευχθεί η ανάπτυξη AMR από την παράλληλη

χορήγηση τους σε τροφοπαραγωγά ζώα και να διατηρηθεί κατά το δυνατόν η αποτελεσματικότητα τους κατά ανθρώπινων παθογόνων (Schmerold et al., 2023). Η κατηγοριοποίηση της AMEG, όπως και τα αντιβιοτικά που εμπίπτουν σε κάθε κατηγορία, παρουσιάζονται αναλυτικά στην Εικόνα 6.

Κατηγοριοποίηση αντιβιοτικών για κτηνιατρική χρήση (με παραδείγματα ουσιών που έχουν λάβει άδεια κυκλοφορίας για ανθρώπινη ή κτηνιατρική χρήση στην ΕΕ)					
Α	Αμιδιοπενικιλίνες Μεκιλλινάμη πιβμεκιλλινάμη	Καρβαπενέμες μεροπενέμη δοριπενέμη	Φάρμακα που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για τη θεραπεία της φυματίωσης ή άλλων μυκοβακτηριδιακών νόσων ισονιαζίδη εθambutόλη πυραζιναμίδη εθιοναμίδη	Γλυκοπεπίδια βανκομυκίνη	ΑΠΟΦΥΓΗ ΧΡΗΣΗΣ
	Κετολίδες τελιθρομυκίνη	Λιποπεπίδια δαπτομυκίνη		Γλυκυκυκλίνες τιγκεκυκλίνη	
	Μονομπακτάμες αζιτρεονάμη	Οξαζολιδιόνες λινεζολίδη		Παράγωγα φωσφονικού οξέος φωσφομυκίνη	
	ΡΙφαμυκίνες (εκτός της ριφαξιμίνης) ριφαμπικίνη	ΡΙμινοφαιναζίνες κλοφαζιμίνη		Ψευδομοναδικά οξέα μουπιράκίνη	
	Καρβοξυπενικιλίνη και ουρεϊδοπενικιλίνη, περιλαμβανομένων συνδυασμών με αναστολείς β-λακταμάσης πιπερακιλίνη-ταζοβακτάμη	Σουλφόνες δαψόνη		Ουσίες που έλαβαν πρόσφατα άδεια κυκλοφορίας για χρήση σε ανθρώπους μετά τη δημοσίευση της κατηγοριοποίησης της AMEG δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα	
Β	Κεφαλοσπορίνες 3ης και 4ης γενιάς, με εξαίρεση τους συνδυασμούς με αναστολείς β-λακταμάσης κεφοπεραζόνη κεφοβεκίνη κεφκινόνη κεφτιοφούρη	Πολυμυξίνες κολιστίνη πολυμυξίνη Β	Κινολόνες: φθοροκινολόνες και άλλες κινολόνες κινόξακίνη δανοφλοξακίνη διφλοξακίνη ενροφλοξακίνη φλουμεκίνη ιβαφλοξακίνη	Μακρολίδες ερυθρομυκίνη γομιθρομυκίνη ελεανδομυκίνη σπειραμυκίνη τιλδιπιοσίνη τιλμικοσίνη τουλαθρομυκίνη τυλοσίνη τυλβαλοσίνη	ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ
Γ	Αμινογλυκοσίδες (εκτός της σπεκτινομυκίνης) αμικασίνη απραμυκίνη διυδροστρεπτομυκίνη φραμυκετίνη γενταμικίνη καναμυκίνη νεομυκίνη παρομομυκίνη στρεπτομυκίνη τομπραμυκίνη	Αμινοπενικιλίνες, σε συνδυασμό με αναστολείς β-λακταμάσης αμοξικιλίνη + κλαβουλανικό οξύ αμπικιλίνη + σουλμπακτάμη	Αμφιγινικόλες χλωραμφαινικόλη φλορφαινικόλη θειαμφαινικόλη	Ριφαμυκίνες: μόνο ριφαξιμίνη ριφαξιμίνη	ΠΡΟΣΕΚΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
		Κεφαλοσπορίνες 1ης και 2ης γενιάς και κεφαμυκίνες κεφακετρίλη κεφαδροξίλη κεφαλεξίνη κεφαλότιο κεφαλοτίνη κεφαπρίνη κεφαζολίνη	Λινκοσαμίδες κλινδαμυκίνη λινκομυκίνη πιρλιμυκίνη		
Δ	Αμινοπενικιλίνες, χωρίς αναστολείς β-λακταμάσης αμοξικιλίνη αμπικιλίνη μεταμπικιλίνη	Αμινογλυκοσίδες: μόνο σπεκτινομυκίνη σπεκτινομυκίνη	Σουλφοναμίδες, αναστολείς της αναγωγής του διϋδροφυλλικού οξέος και συνδυασμοί φορμωσουλφασιαζόλη φθαλυλοσουλφασιαζόλη σουλφακαταμίδη σουλφαχλωπιριδαζίνη σουλφακασόλη σουλφαδισόλη σουλφαδιμεθοξίνη σουλφαδιμίνη σουλφαδοξίνη σουλφαφουραζόλη σουλφαγουανιδίνη	Τετρακυκλίνες χλωρτετρακυκλίνη δοξυκυκλίνη οξτετρακυκλίνη τετρακυκλίνη	ΣΥΝΕΤΗ ΧΡΗΣΗ
	Τετρακυκλίνες χλωρτετρακυκλίνη δοξυκυκλίνη οξτετρακυκλίνη τετρακυκλίνη	Αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες (πενικιλίνες ανθεκτικές στη β-λακταμάση) κλοξακιλίνη δικλοξακιλίνη ναφκιλίνη οξακιλίνη		Φυσικές πενικιλίνες στενού φάσματος (πενικιλίνες ευαίσθητες στη β-λακταμάση) βενζαθινική πενικιλίνη βενζυλοπενικιλίνη βενζαθινική φαινοξυμεθυλοπενικιλίνη υδροϊωδιούχος πενισθαμάνη	
	Φυσικές πενικιλίνες στενού φάσματος (πενικιλίνες ευαίσθητες στη β-λακταμάση) βενζαθινική πενικιλίνη βενζυλοπενικιλίνη βενζαθινική φαινοξυμεθυλοπενικιλίνη υδροϊωδιούχος πενισθαμάνη	Αντισταφυλοκοκκικές πενικιλίνες (πενικιλίνες ανθεκτικές στη β-λακταμάση) κλοξακιλίνη δικλοξακιλίνη ναφκιλίνη οξακιλίνη		Κυκλικά πολυπεπίδια βακτριπρίνη	
			Νιτροϊμιδαζόλες μετρονιδαζόλη	Παράγωγα νιτροφουρανίου φουραλταδίνη φουραζολιδόνη	

ΕΙΚΟΝΑ 6: Κατηγοριοποίηση των αντιβιοτικών στην ΕΕ, με βάση τις τέσσερις κατηγορίες (Α, Β, Γ, Δ) που προτάθηκαν από την AMEG (EMA, 2020).

Η κατηγορία Α αφορά αντιβιοτικά μη εγκεκριμένα για κτηνιατρική χρήση στην ΕΕ, παρά μόνο υπό εξαιρετικές συνθήκες για μεμονωμένα ζώα συντροφιάς. Η κατηγορία Β περιλαμβάνει αντιβιοτικά ζωτικής σημασίας για την ανθρώπινη ιατρική, η χρήση των οποίων πρέπει να περιορίζεται κατά το

δυνατόν σε τροφοπαραγωγή ζώα. Η κατηγορία C αναφέρεται σε αντιβιοτικά για τα οποία υπάρχουν γενικά εναλλακτικές για ανθρώπινη χορήγηση, αλλά τα οποία θα πρέπει να χορηγούνται μόνο εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμη αποτελεσματική επιλογή από την κατηγορία D. Η κατηγορία D είναι τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ως πρώτη γραμμή θεραπείας στην κτηνιατρική τα οποία εμφανίζουν μικρές πιθανότητες να συμβάλλουν στην εξάπλωση AMR, εφόσον η χρήση τους χαρακτηρίζεται από σύνεση (EMA, 2020; Schmerold et al., 2023).

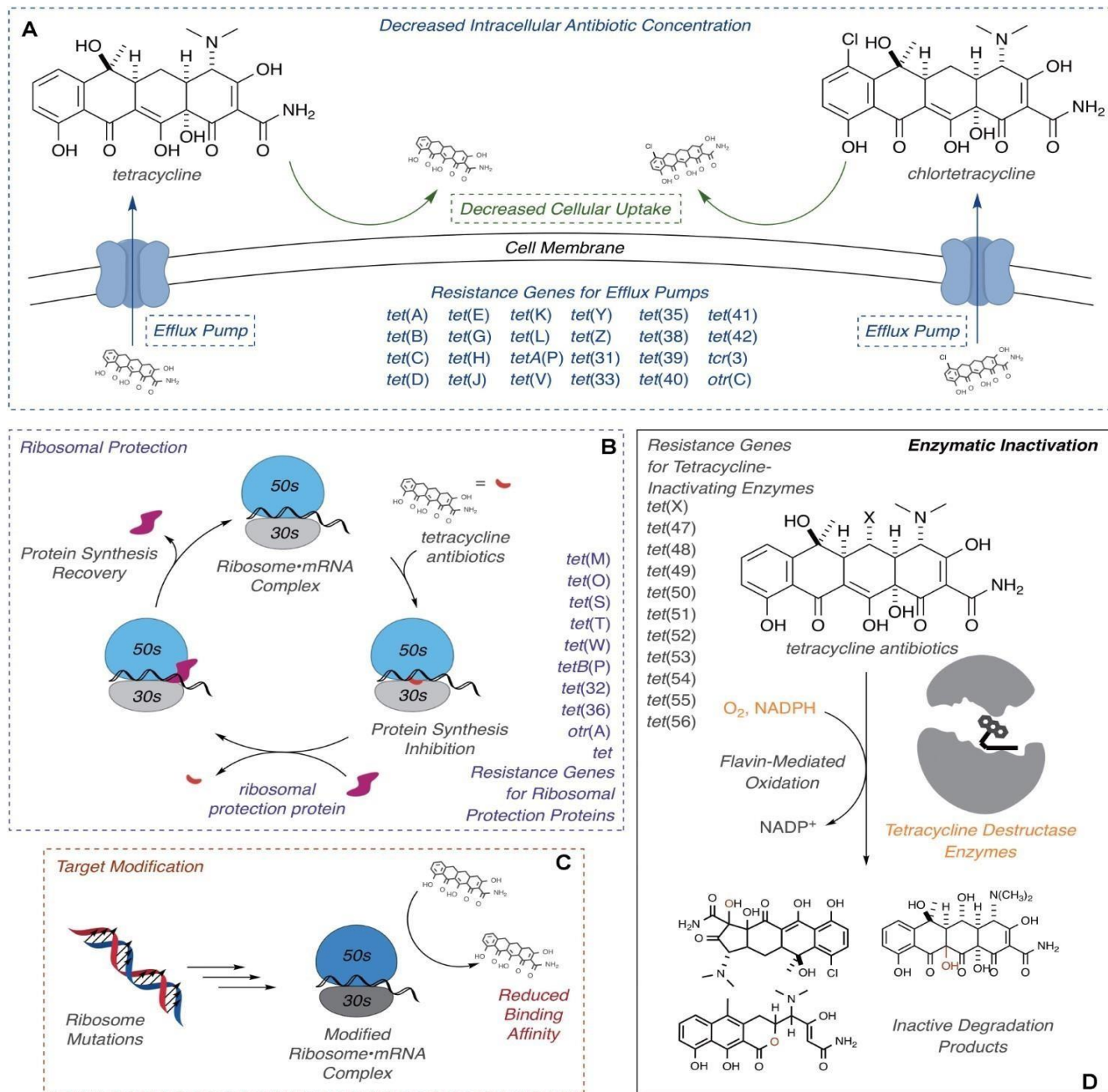
1.3.3. Τετρακυκλίνη

Οι τετρακυκλίνες είναι μία μεγάλη ομάδα αντιβιοτικών των οποίων το ευρύ φάσμα δράσης, η υψηλή καθαρότητα και το χαμηλό κόστος παραγωγής τα ανέδειξαν ως κάποια από τα πιο πολυχρησιμοποιούμενα φάρμακα στον κόσμο (Leichtweis et al., 2022). Ανακαλύφθηκαν το 1940 ως προϊόντα του γένους *Streptomyces* και πέρασαν γρήγορα σε κλινική χρήση τη δεκαετία του 1950 (Hutchings et al., 2019). Το 2020 ήταν τα δεύτερα δημοφιλέστερα σε χρήση αντιβιοτικά παγκοσμίως, και τα πρώτα σε παραγωγή και χορήγηση στην Κίνα (Ahmad et al., 2021).

Η οικογένεια των τετρακυκλινών περιλαμβάνει τα NP αντιβιοτικά χλωροτετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη, δεμεκλοκυκλίνη και τετρακυκλίνη (tetracycline, TC), καθώς και διάφορα ημισυνθετικά παράγωγα τους (π.χ. δοξυκυκλίνη) (Leichtweis et al., 2022). Δομικό χαρακτηριστικό τους είναι το τετρακυκλικό σύστημα δακτυλίων στο οποίο είναι συνδεδεμένοι διάφοροι υδρόξυλο-, μέθυλο-, κέτο- και διμεθυλάμινο- υποκαταστάτες (Ahmad et al., 2021). Πρόκειται για υδατοδιαλυτές ενώσεις υψηλής σταθερότητας (Leichtweis et al., 2022), υψηλές συγκεντρώσεις των οποίων έχουν ανιχνευτεί σε κορπιά εκτρεφόμενων ζώων, σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Waste Water Treatment Plants, WWTPs), στο έδαφος και σε υδάτινα περιβάλλοντα (Zhuang et al., 2021).

Η TC δρα παρεμποδίζοντας την πρωτεϊνσύνθεση σε Gram(+) και Gram(-) βακτήρια καθώς συνδέεται με το 16S rRNA της 30S υπομονάδας του ριβοσώματος, αποτρέποντας τη σύνδεση του με τα αμινοακυλ-tRNAs (Aminov et al., 2001). Χρησιμοποιείται στην καταπολέμηση βακτηρίων και άλλων παθογόνων (π.χ. μυκόπλασμα, νηματώδεις, παρασιτικά πρωτόζωα), στην κτηνοτροφία ως αυξητικό παράγοντας και στην γεωργία ως παράγοντας φυτοπροστασίας (Markley & Wenciewicz, 2018).

Οι πιο συχνοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας στην TC (βλ. Εικόνα 7) είναι οι αντλίες εκροής και οι πρωτεΐνες προστασίας του ριβοσώματος (Ribosome Protection Proteins, RPP), με άλλους λιγότερο συχνούς μηχανισμούς να περιλαμβάνουν μειωμένη διαπερατότητα των κυττάρων, μεταλλάξεις στα ριβοσώματα και ενζυμική αδρανοποίηση του αντιβιοτικού (Makley, 2018). Οι RPPs είναι GTPάσες που παρουσιάζουν ομολογία με παράγοντες επιμήκυνσης, επιτρέποντας τες να συνδεθούν με το ριβόσωμα στην θέση των παραγόντων αυτών και να απομακρύνουν τυχόν μόρια τετρακυκλίνης από τον στόχο τους (Makley & Wenciewicz, 2018). Γονίδια ανθεκτικότητας που κωδικοποιούν αντλίες εκροής (π.χ. *tetA*, *tetC*, *tetG*, *tetK*) ή RPPs (π.χ. *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetW*) έχουν ανιχνευτεί σε πολλά είδη εντερικών παθογόνων, όπως είδη του γένους *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Salmonella* και *Klebsiella* (Zhuang et al., 2021). Επίσης, μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι το μεγαλύτερο μέρος (άνω του 60%) της καταναλισκόμενης TC καταλήγει πρακτικά αναλλοίωτο στο περιβάλλον (Leichtweis et al., 2022), εντείνοντας την εξάπλωση AMR για ένα από τα δημοφιλέστερα αντιμικροβιακά φάρμακα στον κόσμο.



ΕΙΚΟΝΑ 7: Γονίδια και μηχανισμοί ανθεκτικότητας στην TC. A: γονίδια σχετιζόμενα με μειωμένη κυτταρική πρόσληψη και αντλίες εκροής, B: γονίδια σχετιζόμενα με προστασία των ριβωσωμάτων, C: Μηχανισμός τροποποίησης στόχου τετρακυκλίνης, D: Γονίδια που κωδικοποιούν αδρανοποιητικά ένζυμα (Makley & Wenciewicz, 2018).

1.4. Η τύχη των αντιβιοτικών στο περιβάλλον

Το περιβάλλον είναι η μεγαλύτερη πηγή και η πιο σημαντική δεξαμενή μικροβιακής αντοχής (Iskandar et al., 2022). Η συντριπτική πλειοψηφία των γνωστών παραγωγών αντιβιοτικών (και, όπως ήδη αναφέρθηκε, πρωταρχικών πηγών ARGs) είναι, εξάλλου, βακτήρια εδαφικών ενδιαιτημάτων. Το έδαφος ειδικά αποτελεί ένα τεράστιο λίκνο μικροβιακής ποικιλότητας, με μετρήσεις βασισμένες στο DNA να την υπολογίζουν σε περίπου 10^9 με 10^{10} μικροοργανισμούς ανά γραμμάριο εδάφους (το οποίο μπορεί να αντιστοιχεί σε χιλιάδες βακτηριακά είδη) και την πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους να παραμένει άγνωστη (Armalytė et al., 2019).

Προκειμένου να γίνει μία περιγραφή της τεράστιας γονιδιακής δεξαμενής ARGs τα οποία είναι διαθέσιμα στις περιβαλλοντικές μικροβιακές κοινότητες μέσω μηχανισμών όπως η HGT, οι D'Costa et al (2006) εισήγαγαν τον όρο “resistome”, με ορισμό “το σύνολο όλων των ARGs από παθογόνα και μη παθογόνα βακτήρια σε μία μικροβιακή κοινότητα” (Zhuang et al., 2021). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι εκτός του παράγοντα της εκλεκτικής πίεσης (π.χ. λόγω παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών), ένα βακτήριο μπορεί να διατηρεί ARGs στο γονιδίωμα του για τον απλούστατο λόγο του ότι η διατήρησή τους δεν του κοστίζει αρμοστικά (και ως εκ τούτου η εξάλειψή τους δεν ευνοείται από τη φυσική επιλογή) (Bengtsson-Palme et al., 2017).

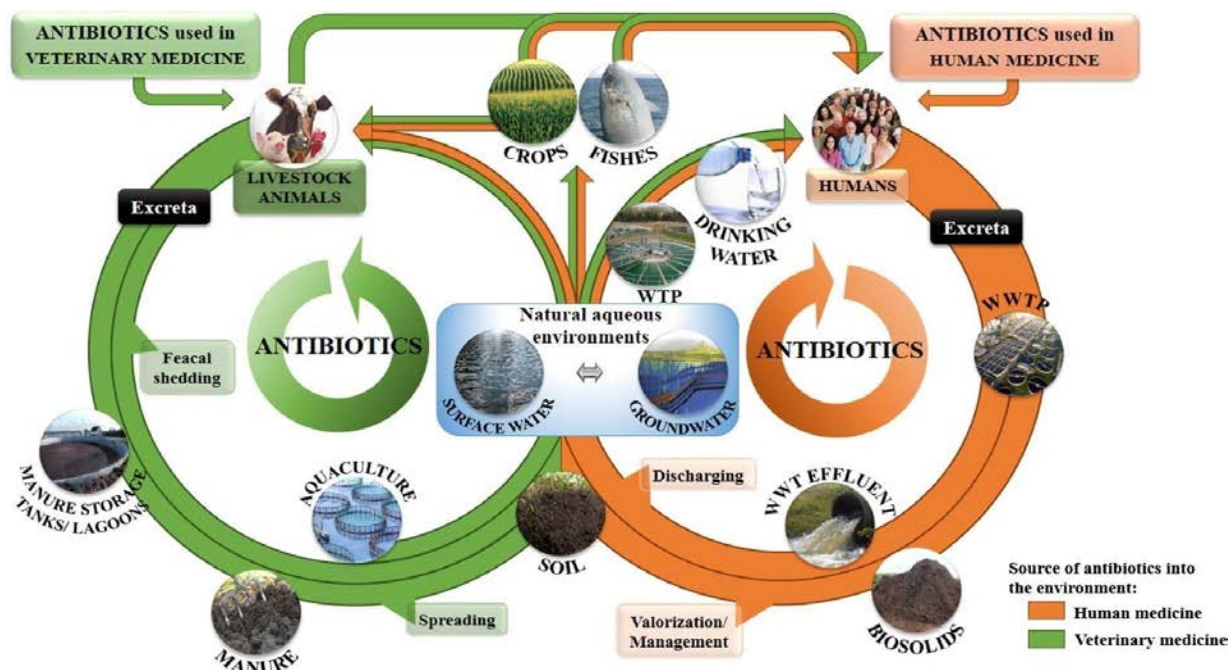
Διάφοροι βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες επιδρούν στην κατανομή του περιβαλλοντικού resistome (Zheng et al., 2022), με αποτέλεσμα τα διαφορετικά ενδιαιτήματα να τείνουν να συγκεντρώνουν εξίσου διαφορετικές ομάδες ARGs (Zhuang et al., 2021). Πέραν όμως της φυσιολογικά εμφανιζόμενης AMR μεταξύ των μικροβιακών κοινοτήτων διαφόρων οικοσυστημάτων, στις προηγούμενες ενότητες έγιναν σύντομες αναφορές σε διάφορους τρόπους με τους οποίους η ανθρώπινη δραστηριότητα αποθέτει υψηλές ποσότητες αντιβιοτικών ή προϊόντων μεταβολισμού τους στο περιβάλλον, γεγονός που ενθαρρύνει την ταχεία εξάπλωση ARGs μεταξύ βακτηρίων. Η εξωγενής είσοδος αντιβιοτικών στο περιβάλλον παρουσιάζεται αναλυτικά στην επόμενη υποενότητα.

1.4.1. Είσοδος αντιβιοτικών στο περιβάλλον

Αντιβιοτικά ευρέως ή στενού φάσματος έχουν ανιχνευτεί σε πλήθος περιβαλλοντικών δειγμάτων ανά τον κόσμο (Kumar et al., 2019). Οι τρόποι με τους οποίους τα αντιβιοτικά καταλήγουν στο περιβάλλον είναι πολλοί, με διαφορετικό επίπεδο συνεισφοράς στην εξάπλωση AMR. Η ρύπανση από αντιβιοτικά ωστόσο δεν επιτυγχάνεται μόνο με απόρριψη των ίδιων των αντιβιοτικών στο περιβάλλον, αλλά και των διάφορων παραπροϊόντων τους. Αν και ένα ιδιαίτερα μεγάλο ποσοστό των χορηγούμενων αντιβιοτικών αποβάλλονται αναλλοίωτα μέσω ούρων και κοπράνων, το υπόλοιπο ποσοστό μεταβολίζεται μερικώς στο πεπτικό σύστημα ανθρώπων και ζώων. Μετά την έξοδο τους από τον οργανισμό υπόκεινται σε περαιτέρω βιοτικές και αβιοτικές τροποποιήσεις, είτε σε εγκαταστάσεις όπως οι Μονάδες Επεξεργασίας Νερού (Water Treatment Plants, WTPs) και οι WWTPs, είτε στο περιβάλλον (Carvalho & Santos, 2015). Τελικά, προκύπτουν παραπροϊόντα με διαφορετικές δομικές και λειτουργικές ιδιότητες σε σχέση με τα αρχικά αντιμικροβιακά μόρια, τα οποία μπορεί να είναι λιγότερο ή περισσότερο βιοδραστικά (ή/και τοξικά) (Carvalho & Santos, 2015), συχνά προκαλώντας προβλήματα στα οικοσυστήματα με τα οποία έρχονται σε επαφή και λειτουργώντας ως παράγοντες πίεσης στις μικροβιακές κοινότητες. Ο κύκλος

ζωής των αντιβιοτικών και των προϊόντων μεταβολισμού τους στο περιβάλλον διαφέρει από ένωση σε ένωση, και είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων (Manzetti & Ghisi, 2014). Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση ξεκινά από τις οδούς εισόδου, οι οποίες φαίνονται στην Εικόνα 8.

Η κύρια πηγή εισόδου αντιβιοτικών ανθρώπινης χρήσης στο περιβάλλον είναι οι εκροές των WWTPs (Carvalho & Santos, 2015; Lee et al., 2017a). Τα αστικά λύματα, πέραν των εισροών των μεγάλων πόλεων, φέρουν τεράστιες ποσότητες αντιβιοτικών που προέρχονται βιομηχανίες παραγωγής φαρμακευτικών προϊόντων (Manzetti & Ghizi, 2014).



ΕΙΚΟΝΑ 8: Αναμενόμενες περιβαλλοντικές οδοί αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται σε ανθρώπους και σε ζώα. Με πορτοκαλί φαίνεται η οδός των αντιβιοτικών για ανθρώπους στο περιβάλλον, ενώ με πράσινο φαίνεται αντίστοιχα των κτηνιατρικών αντιβιοτικών. (Carvalho and Santos, 2015)

Τα νοσοκομειακά λύματα, επίσης, τα οποία είναι επιβαρυνμένα, μεταξύ άλλων, με φαρμακευτικές ενώσεις, διαγνωστικούς δείκτες και διαφόρων ειδών απολυμαντικά, συνήθως δεν λαμβάνουν την απαραίτητη επεξεργασία για την επαρκή απομάκρυνση των ενώσεων αυτών, προτού οι εκροές τους καταλήξουν στο δημόσιο δίκτυο αποχέτευσης (Santos et al., 2013). Στις Ευρωπαϊκές χώρες, τα νοσοκομειακά λύματα ευθύνονται για το 5-20% των αντιβιοτικών που ανιχνεύονται σε λύματα (Kümmerer, 2009). Το πρόβλημα εντείνεται περαιτέρω από την πρακτική της ανακύκλωσης επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων, η οποία γίνεται όλο και πιο συχνή εξαιτίας της αυξανόμενης παγκόσμιας ζήτησης νερού (Carvalho & Santos, 2015). Στην ΕΕ, οι εκροές χρησιμοποιούνται επί το πλείστον για άρδευση και αναπλήρωση των υπόγειων υδάτων μετά από περιόδους ξηρασίας, μια πρακτική ιδιαίτερα διαδεδομένη σε χώρες της Μεσογείου (MED-EUWI, 2007). Αν και η διαχείριση του νερού είναι ένα εξίσου σημαντικό πρόβλημα, η εφαρμογή μη επαρκώς επεξεργασμένων εκροών σε καλλιεργήσιμες εκτάσεις βοηθά στην εξάπλωση AMR στο έδαφος, και από κει σε επιφανειακούς ή υπόγειους υδάτινους αποδέκτες.

Τα κτηνιατρικής προέλευσης αντιβιοτικά, από την άλλη, έχουν ως κύρια πηγή στο περιβάλλον την πρακτική της οργανικής λίπανσης, της χρήσης δηλαδή κοπριάς τροφοπαραγωγικών ζώων προκειμένου να προωθηθεί η ανάπτυξη και η αποδοτικότητα των καλλιεργειών (Spielmeyer, 2018). Η κοπριά πολλών ειδών ζώων έχει βρεθεί πως περιέχει μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών και υψηλά ποσοστά ARGs, κυρίως για τετρακυκλίνες και σουλφοναμίδες (Lee et al., 2017b; Spielmeyer, 2018). Τα αντιβιοτικά που υπάρχουν στην κοπριά μπορούν να περάσουν απευθείας στο έδαφος, να μεταφερθούν μέσω επιφανειακών απορροών σε υδάτινους αποδέκτες, να προκαλέσουν ρύπανση των υπόγειων υδάτων ή να περάσουν στην τροφική αλυσίδα (Calvalhos & Santos, 2015).

Άλλες αξιοσημείωτες πηγές αντιβιοτικών είναι οι υδατοκαλλιέργειες (Calvalhos & Santos, 2015; Kovalakova et al., 2020) και τα οργανικά στερεά απόβλητα (Organic Solid Waste, OSW) (Lee et al., 2017b). Όπως και στην κτηνοτροφία, αντιμικροβιακές ενώσεις χρησιμοποιούνται στην ιχθυοτροφία τόσο ως θεραπευτικοί παράγοντες για την πρόληψη και αντιμετώπιση ασθενειών όσο και ως μέσα αύξησης της παραγωγής (Kovalakova et al., 2020). Γενικά στα σπονδυλωτά, ξενοβιοτικές ουσίες όπως τα αντιβιοτικά δεν μεταβολίζονται επαρκώς (Manzetti & Ghizi, 2014), με αποτέλεσμα η πλειοψηφία τους να καταλήγει από τις υδατοκαλλιέργειες απευθείας σε υδάτινα οικοσυστήματα (Calvalhos & Santos, 2015). Όσον αφορά τα OSW, αποτελούνται κυρίως από κοπριά που δεν βρίσκει εφαρμογή στη γεωργία, απόβλητα τροφίμων και λυματολάσπη από WWTPs (Lee et al., 2017b). Αν και εκ των συστατικών αυτών το πιο επιβαρυνμένο με αντιβιοτικά είναι η κοπριά, στη λυματολάσπη η ποσότητα ανιχνευμένων ARGs ήταν 10^2 έως 10^3 φορές υψηλότερη σε σχέση με τις εκροές WWTPs (Lee et al., 2017b).

1.4.2. Τα αντιβιοτικά ως περιβαλλοντικοί ρύποι

Σε γενικές γραμμές, ο κύκλος ζωής των αντιβιοτικών είναι ένας κύκλος μερικής βιομετατροπής και βιοσυσσώρευσης, που συνήθως καταλήγει σε σταδιακή απόθεση στο έδαφος και στα υπόγεια ύδατα (Manzetti & Ghizi, 2014). Μετά την είσοδο τους στο έδαφος ή σε υδάτινους αποδέκτες με όλους τους τρόπους που συζητήθηκαν παραπάνω, τα αντιβιοτικά μπορούν να απορροφηθούν από ζώα που προορίζονται για τροφή ή να περάσουν απευθείας στο πόσιμο νερό, έχοντας σοβαρές πιθανές επιπτώσεις για την ανθρώπινη υγεία μετά την συνεχή, μακροπρόθεσμη έκθεση σε μικρές συγκεντρώσεις ξενοβιοτικών στην τροφή και στο νερό (Calvalhos & Santos, 2015). Εξάλλου, η διαρκής αλλά μετριασμένη αυτή έκθεση αποτελεί ιδανικές συνθήκες επιλογής για την ανάπτυξη ARBs και MRBs.

Εκτός αυτού, τα αντιβιοτικά είναι περιβαλλοντικοί ρύποι, προκαλώντας πληθώρα προβλημάτων στα οικοσυστήματα στα οποία καταλήγουν. Εφόσον η συντριπτική πλειοψηφία των αντιβιοτικών δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα, πολλοί μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για την ομαλή λειτουργία των οικοσυστημάτων, όπως πρωτογενείς παραγωγοί και αποικοδομητές, αποτελούν στόχους, διαταράσσοντας έτσι τις ισορροπίες μεταξύ μικροβιακών κοινοτήτων απαραίτητων για την διατήρηση των βιότοπων (Calvalhos & Santos, 2015). Η έκταση αυτών των επιπτώσεων δεν είναι δυνατόν να προβλεφθεί, καθώς είναι εξατομικευμένη ανάλογα με τις βιοτικές και αβιοτικές παραμέτρους που επικρατούν ανά ενδιαίτημα, ή, στην περίπτωση του εδάφους, ανά μικροπεριβάλλον. Επίσης, αντιβιοτικά στο έδαφος ή σε πόσιμο νερό μπορούν να απορροφηθούν από άγρια ζώα ή ψάρια και να βιοσυσσωρευτούν στα ανώτερα τροφικά επίπεδα, προκαλώντας θάνατο ειδών υπό εξαφάνιση

(Kovalakova et al., 2020) και περαιτέρω εξάπλωση AMR στη φύση. Μεταξύ των πιο ευάλωτων οικοσυστημάτων στην εναπόθεση αντιβιοτικών συγκαταλέγονται τα εδάφη πλησίον εκτάσεων γης ή πόλεων και τα κλειστά υδάτινα οικοσυστήματα, όπως οι υδροβιότοποι λιμνών (Manzetti & Ghizi, 2014).

Πρέπει να τονιστεί ότι η πλειοψηφία ερευνών που αφορούν την τοξική επίδραση των αντιβιοτικών στο περιβάλλον αφορούν συνήθως μεμονωμένες ενώσεις (Manzetti & Ghizi, 2014; Calvalhos & Santos, 2015), ενώ ως επί το πλείστον η είσοδος των αντιβιοτικών και των παραπροϊόντων τους γίνεται σε μείγματα, τα οποία περιλαμβάνουν και άλλους ανθρωπογενείς ρύπους, η συνεργιστική δράση των οποίων παραμένει άγνωστη (Calvalhos & Santos, 2015).

1.4.3. Αποικοδόμηση αντιβιοτικών στο περιβάλλον

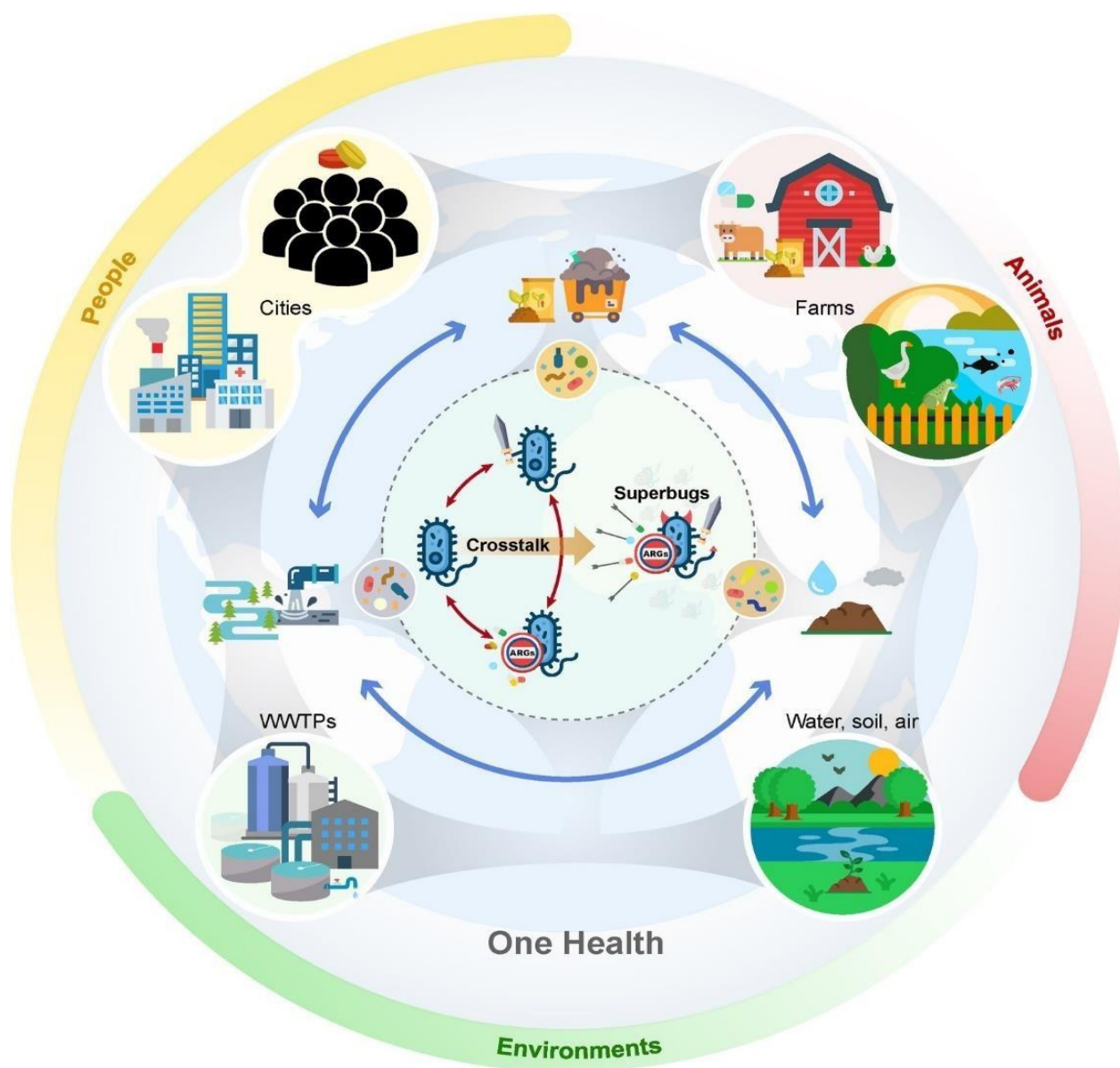
Κλείνοντας τον κύκλο ζωής των αντιβιοτικών στο περιβάλλον, η υποενότητα αυτή πραγματεύεται επιγραμματικά τρόπους με τους οποίους αντιβιοτικά εξέρχονται από τα διάφορα οικοσυστήματα μέσω αβιοτικής και βιολογικής αποικοδόμησης. Τα αντιβιοτικά είναι τοξικοί και υπολειμματικοί ρύποι (Calvalhos & Santos, 2015). Ωστόσο, αποικοδομούνται σταδιακά στο περιβάλλον μέσω διεργασιών όπως αντιδράσεις προσρόφησης, υδρόλυσης, φωτόλυσης, και οξειδαναγωγής (Kumar et al., 2019). Η αποτελεσματικότητα τέτοιων διεργασιών εξαρτάται από το είδος του αντιβιοτικού (ή των μεταβολιτών του) καθώς και από τυχόν αλληλεπιδράσεις του με άλλα μόρια ή ιόντα (Zhuang et al., 2021). Για παράδειγμα, η τετρακυκλίνη, μόριο ιδιαίτερα ευαίσθητο στην επίδραση του φωτός (Kumar et al., 2019), σχηματίζει ανθεκτικά στην αποικοδόμηση σύμπλοκα με Ca^{2+} και άλλα κατιόντα (Ahmad et al., 2021). Επίσης, τα αντιβιοτικά μπορούν να υποστούν βιοαποικοδόμηση από μικροοργανισμούς που διαθέτουν το κατάλληλο ενζυμικό δυναμικό (Kumar et al., 2019). Η διαδικασία μπορεί είτε να οδηγεί σε πλήρη ανοργανοποίηση είτε σε ενδιάμεσους μεταβολίτες, και είναι δυνατόν να επιτυγχάνεται αρθρωτά από διάφορα μέλη της μικροβιακής κοινότητας. Η ικανότητα βιοαποικοδόμησης όμως έχει συνδεθεί με την παρουσία ARGs σε αυτά τα είδη, με κάποιες εξαιρέσεις (Kumar et al., 2019). Σε κάθε περίπτωση, ο ρυθμός αποικοδόμησης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον δεν είναι ικανός να αναχαιτίσει τις επιπτώσεις της απόθεσης σε αυτό των ποσοτήτων αντιβιοτικών που παρατηρούνται σήμερα, και συνεπώς της εξάπλωσης AMR.

1.5. Ολιστική αντιμετώπιση - One Health

Προκειμένου να σχεδιαστεί ένα αποτελεσματικό πλάνο για την καταπολέμηση της αντιβιοαντοχής, είναι απαραίτητη μία προσέγγιση που θα άπτεται του συνόλου των εκφάνσεων του προβλήματος, και θα κινητοποιεί τόσο τη δημόσια υγεία όσο και τις επιστήμες της κτηνιατρικής και της περιβαλλοντικής επιδημιολογίας.

Το “One Health” είναι η προσέγγιση, και τα τελευταία χρόνια, το κίνημα, που αναγνωρίζει ότι η υγεία των ανθρώπων, των ζώων και των οικοσυστημάτων συνδέονται άρρηκτα μεταξύ τους (βλ. Εικόνα 9) (Lerner & Berg, 2015) Προϋποθέτει την συνεργασία πολλαπλών τομέων, κλάδων και κοινοτήτων, σε διαφορετικά επίπεδα της κοινωνίας, για την πρόληψη, την πρόβλεψη, την ανίχνευση και την αντιμετώπιση παγκόσμιων απειλών για την υγεία. Έχει υιοθετηθεί από τον WHO και την ΕΕ, μεταξύ άλλων, για την διαχείριση της ασφάλειας τροφίμων και νερού, την αντιμετώπιση των ζωνοόσων, και, κυρίως, για την καταπολέμηση της AMR (WHO, 2022). Στα πλαίσια του One Health λειτουργεί το

GLASS, η AMEG, και άλλοι φορείς υπεύθυνοι για την παρακολούθηση της AMR με στόχο την μείωση (και ιδανικά αποτροπή) της εξάπλωσης των ARGs στο περιβάλλον, και, ως εκ τούτου, της εμφάνισης MRBs (Zhuang et al., 2021).



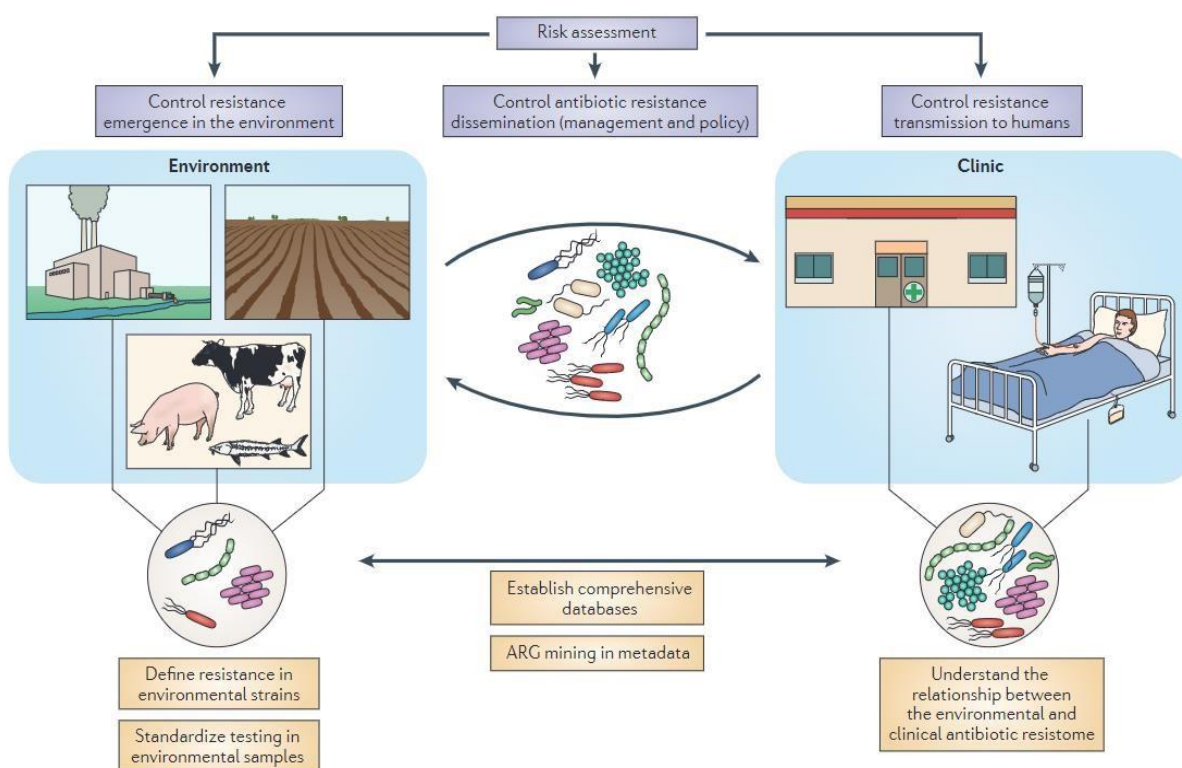
ΕΙΚΟΝΑ 9: Διασυνδεσιμότητα των ARGs σε έξι σημαντικούς βιότοπους (αγροκτήματα, πόλεις, WTPs, νερό, έδαφος και αέρας) στο πλαίσιο του One Health μεταξύ ανθρώπων, ζώων και περιβάλλοντος (Zhuang et al., 2021).

1.6. Μελέτη της αντιβιοαντοχής στο περιβάλλον

Με άξονα τον κομβικό ρόλο του περιβάλλοντος στην ανάπτυξη και εξάπλωση της AMR, και την έλλειψη δεδομένων γύρω από τους μηχανισμούς μέσω των οποίων ο ρόλος αυτός επιτυγχάνεται

(Berendonk et al., 2015; Liguori et al., 2022), η μελέτη της ανθεκτικότητας σε περιβαλλοντικά δείγματα πρέπει να αποτελεί πρωταρχικό στόχο της ολιστικής αντιμετώπισης της αντιβιοαντοχής. Ωστόσο, η έμφαση στην περιβαλλοντική επιδημιολογία στα πλαίσια του One Health είναι σχετικά πρόσφατη και καλείται να καλύψει μεγάλα γνωστικά κενά για ένα ιδιαίτερα επιτακτικό ζήτημα, με αποτέλεσμα να αντιμετωπίζει προβλήματα που αφορούν την τυποποίηση και σύγκριση αποτελεσμάτων, την έλλειψη εκτενών βάσεων δεδομένων αλλά και προβλήματα που προκύπτουν από τη φύση των περιβαλλοντικών δειγμάτων αυτή καθ' αυτή (Berendonk et al., 2015; Yin et al., 2023).

Γενικά, η περιβαλλοντική μελέτη της αντιβιοαντοχής αποσκοπεί στην κατανόηση τριών βασικών διαδικασιών: την εμφάνιση της αντοχής στο περιβάλλον, την εξάπλωση της αντοχής στο περιβάλλον και την μεταφορά αυτής της αντοχής σε ανθρώπινα παθογόνα (βλ. Εικόνα 10) (Berendonk et al., 2015). Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές προσεγγίσεις: η χρήση μεθόδων που βασίζονται σε καλλιέργειες και οι μοριακές τεχνικές (Rizzo et al., 2013), με την κάθε μία να χαρακτηρίζεται από διάφορα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.



ΕΙΚΟΝΑ 10: Στόχοι των αναλύσεων κινδύνου της AMR στο περιβάλλον. Με μοβ φαίνονται οι τρεις βασικοί στόχοι: έλεγχος εμφάνισης αντοχής στο περιβάλλον, έλεγχος εξάπλωσης αντοχής στο περιβάλλον και έλεγχος μετάδοσης αντοχής σε ανθρώπινα παθογόνα. Με κίτρινο διακρίνονται οι τρόποι επίτευξης κάθε στόχου: ορισμός αντοχής για περιβαλλοντικά στελέχη και τυποποίηση δοκιμών σε περιβαλλοντικά δείγματα για τον πρώτο στόχο, δημιουργία βάσεων δεδομένων και εύρεση ARGs σε metadata για τον δεύτερο και κατανόηση της σχέσης μεταξύ του περιβαλλοντικού και κλινικού resistome για τον τρίτο. (Berendonk et al, 2015)

1.6.1. Μέθοδοι καλλιέργειας

Οι καλλιεργητικές μέθοδοι ήταν πρώτες οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της αντιβιοαντοχής (Rizzo et al., 2013; Berendonk et al., 2015) και ως εκ τούτου χαίρουν υψηλού ποσοστού τυποποίησης για τον προσδιορισμό των κλινικών επιπέδων αντοχής (Rizzo et al., 2013; Liguori et al., 2022). Αναφέρονται και ως “συμβατικές” μέθοδοι (Yin et al., 2023). Η αρχή τους βασίζεται στην ικανότητα των ανθεκτικών βακτηρίων να αναπτύσσονται σε εκλεκτικά θρεπτικά μέσα που περιέχουν ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά σε συγκέντρωση που προσεγγίζει την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) (Rizzo et al., 2013; Berendonk et al., 2015), μία ιδιότητα που στερούνται οι μη ανθεκτικοί μικροοργανισμοί. Η MIC είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αντιβακτηριακού παράγοντα, εκφρασμένη σε mg/L ή µg/mL, η οποία, σε ελεγχόμενες *in vitro* συνθήκες, εμποδίζει πλήρως την ορατή ανάπτυξη του υπό εξέταση μικροοργανισμού (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021). Γενικά, οι καλλιεργητικές τεχνικές είναι διαδεδομένες στην κλινική και κτηνιατρική μικροβιολογία (Rizzo et al., 2013), με πολυάριθμα πρωτόκολλα να έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση της AMR και σε περιβαλλοντικά δείγματα. Έχουν αξιοποιηθεί, λόγω χάριν, για την παρακολούθηση της εξάπλωσης AMR τα γένη *Escherichia* και *Enterococcus* σε υδάτινα περιβάλλοντα (Liguori et al., 2022).

Οι καλλιεργητικές μέθοδοι παρουσιάζουν πολλά θετικά: πρώτον, εξ ορισμού οι μικροοργανισμοί που απομονώνονται είναι βιώσιμοι, και μπορούν μετά την ανάκτηση τους να υποβληθούν σε περαιτέρω ανάλυση (Liguori et al., 2022). Για παράδειγμα, τα απομονωμένα από καλλιέργειες βακτήρια μπορούν να ταυτοποιηθούν μέσω αλληλούχισης και φυλογενετικής ανάλυσης και να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό πρότυπων αντοχής (Rizzo et al., 2013). Δεύτερον, η εκτενής τυποποίηση τους επιτρέπει την σχετικά εύκολη σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών ερευνών (Rizzo et al., 2013) κάνοντας τες πρόσφορες τεχνικές για αναλύσεις κινδύνου άμεσα σχετιζόμενου με την ανθρώπινη υγεία (Liguori et al., 2022). Ωστόσο, πρόκειται για μεθόδους δαπανηρές και χρονοβόρες (Rizzo et al., 2013), καθιστώντας τες μη ιδανικές για αναλύσεις ρουτίνας. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα τους όμως έγκειται στο γεγονός ότι ένα μεγάλο ποσοστό των μικροοργανισμών περιβαλλοντικών δειγμάτων δεν είναι καλλιεργήσιμοι (Rizzo et al., 2013; Berendonk et al., 2015; Liguori et al., 2022; Yin et al., 2023). Ενώ οι συνθήκες για την ανάπτυξη και την απομόνωση ανθρώπινων ή ζωικών παθογόνων είναι σε ικανοποιητικό βαθμό γνωστές, δεν ισχύει το ίδιο και για τα πολυάριθμα είδη βακτηρίων που απαρτίζουν τα περιβαλλοντικά οικοσυστήματα, τα οποία παραμένουν ικανά, χάρη στην HGT, να συμβάλλουν στην εξάπλωση της AMR και στην δημιουργία MRB. Επίσης, πολλά βακτήρια αναπτύσσονται τόσο αργά σε καλλιεργητικά μέσα, ώστε πρακτικά θεωρούνται ακατάλληλα για τέτοιες αναλύσεις (Rizzo et al., 2013). Έτσι, οι συμβατικές μέθοδοι υστερούν στο να προσφέρουν μία ολοκληρωμένη εικόνα της περιβαλλοντικής βακτηριακής ποικιλότητας, αλλά βρίσκουν ευρεία εφαρμογή χάρη στις ικανότητες τους να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη φυλογένεση των ARB, τον φαινότυπο ανθεκτικότητας και τη δυνατότητα μεταφοράς καθοριστικών παραγόντων ανθεκτικότητας (Yin et al., 2023).

1.6.2. Μοριακές μέθοδοι

Στον αντίποδα των καλλιεργητικών μεθόδων αναπτύχθηκαν οι μη καλλιεργητικές, ή μοριακές, μέθοδοι βασισμένες σε νουκλεϊκά οξέα (Yin et al., 2023). Η μοριακή προσέγγιση είναι ένα ανερχόμενο και

ιδιαίτερα δημοφιλές σύνολο μεθόδων ικανό να παρακάμψει τις αδυναμίες των καλλιιεργειών και να συμπληρώσει το πολύπλευρο “παζλ” της AMR στο περιβάλλον. Τέτοιες μέθοδοι αποσκοπούν στην ανίχνευση ARGs ή γενετικών στοιχείων που συμβάλλουν στην HGT σε απομονωμένα βακτήρια ή μικροβιακές κοινότητες, βασιζόμενες στην επικρατούσα υπόθεση ότι η ύπαρξη τέτοιων γονιδίων στον πληθυσμό αποτελεί ισχυρότατη ένδειξη ανθεκτικότητας (Rizzo et al., 2013). Εφόσον η ανάλυση στοχεύει γενετικό υλικό απομονωμένο απευθείας από περιβαλλοντικό δείγμα, δεν προκύπτει το πρόβλημα της μη-καλλιιεργησιμότητας πολλών εδαφικών μικροοργανισμών, επιτρέποντας έτσι την λήψη μίας πολύ πιο αντιπροσωπευτικής εικόνας της μικροβιακής ποικιλότητας σε σχέση με αυτή που παρέχουν οι συμβατικές μέθοδοι (Rizzo et al., 2013; Berendonk et al., 2015; Liguori et al., 2022; Yin et al., 2023).

Το σημαντικότερο μειονέκτημα των μοριακών μεθόδων είναι η δυσκολία σύγκρισης αποτελεσμάτων, κυρίως λόγω έλλειψης αποτελεσματικής τυποποίησης των τεχνικών και χρήση ποικίλων τρόπων έκφρασης της ανθεκτικότητας (Rizzo et al., 2013; Berendonk et al., 2015; Yin et al., 2023). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι υπάρχουν οχτώ διαφορετικές μονάδες μέτρησης AMR σε χρήση στη διεθνή βιβλιογραφία, κάθε μία με διαφορετική χρησιμότητα και ελλείμματα (Yin et al., 2023).

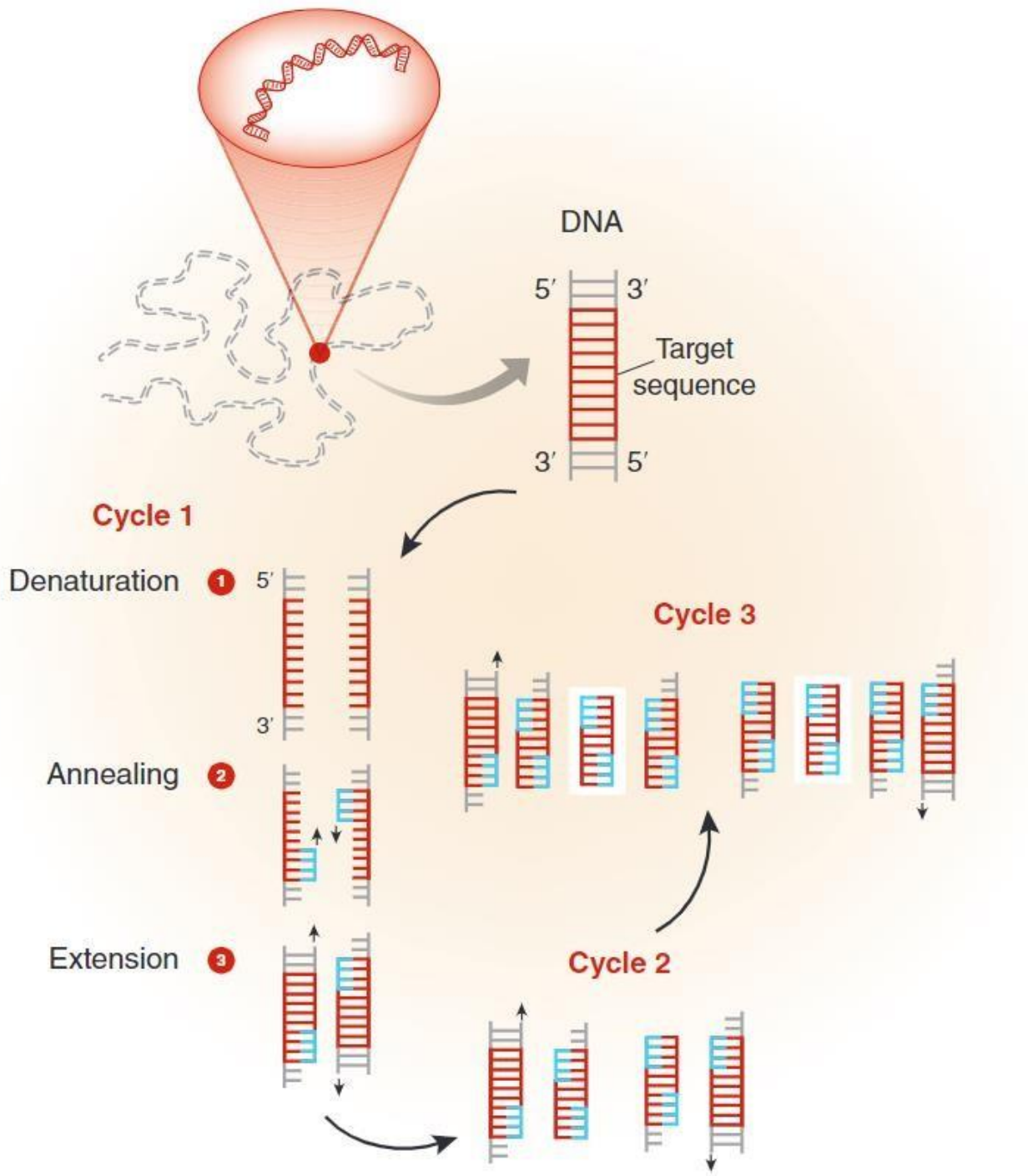
Σήμερα, οι μοριακές μέθοδοι περιλαμβάνουν δύο βασικές τεχνολογίες: την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, γνωστή και ως ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) και την αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing, NGS) (Rizzo et al., 2013; Berendonk et al., 2015; Liguori et al., 2022; Yin et al., 2023). Η qPCR επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση αλληλουχιών-στόχων (π.χ. ARGs) στο επιθυμητό δείγμα με τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών, και έχει βρει ευρεία εφαρμογή σε περιβαλλοντικές μελέτες από τις αρχές του 21ου αιώνα χάρη στην ευαισθησία και την αποτελεσματικότητά της (Liguori et al., 2022; Yin et al., 2023). Ωστόσο, πολλές φορές προκύπτουν προβλήματα στην ανάλυση εξαιτίας υψηλών συγκεντρώσεων παρεμποδιστών, που αφθονούν συνήθως σε εδαφικά δείγματα (Berendonk et al., 2015). Οι μεταγενεωμικές μελέτες, μεταξύ των οποίων η NGS, έγιναν ευρέως προσβάσιμες μετά το 2009 (Liguori et al., 2022) κάνοντας τες την πιο πρόσφατη προσθήκη στα εργαλεία που είναι διαθέσιμα για την εκτίμηση της αντιβιοαντοχής στο περιβάλλον. Η NGS άνοιξε το δρόμο στην λειτουργική ανάλυση της AMR, επιτρέποντας όχι μόνο την ποσοτικοποίηση των ARGs στον πληθυσμό αλλά και εκτενή έλεγχο της έκφρασης τους (Rizzo et al., 2013; Liguori et al., 2022). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί για ανακάλυψη νέων ARGs (Yin et al., 2023) και υπερτερεί έναντι της qPCR στο ότι δεν απαιτεί την *a priori* επιλογή γονιδίων στόχων για τα οποία επιπροσθέτως απαιτούνται οι κατάλληλοι εκκινητές (Rizzo et al., 2013; Liguori et al., 2022; Yin et al., 2023). Ωστόσο, παραμένει μέχρι στιγμής λιγότερο ευαίσθητη από την qPCR (Yin et al., 2023) και, παρά τις δυνατότητες της, αντιμετωπίζει σοβαρά προβλήματα τυποποίησης (Rizzo et al., 2013; Berendonk et al., 2015; Liguori et al., 2022; Yin et al., 2023). Στην παρούσα πτυχιακή το πειραματικό κομμάτι στηρίζεται στην τεχνική της qPCR, η οποία αποτελεί το θέμα επόμενης υποενότητας. Προκειμένου να γίνει κατανοητή η αρχή της, πρώτα πραγματοποιείται μία εισαγωγή στην τεχνική στην οποία βασίζεται και της οποίας αποτελεί επέκταση: την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

1.6.3. PCR

Η PCR είναι μία από τις σημαντικότερες μοριακές τεχνικές που ανακαλύφθηκαν (Smith & Osborn, 2009; Garibyan & Avashia, 2013; Kralik & Ricchi, 2017). Πρόκειται για μία ευαίσθητη ενζυμική τεχνική η οποία επιτρέπει την ταχεία ενίσχυση μίας αλληλουχίας DNA-στόχου, αποδίδοντας έως και δισεκατομμύρια αντίγραφα της αλληλουχίας αυτής από μία ελάχιστη αρχική ποσότητα δείγματος (Garibyan & Avashia, 2013). Ως ένδειξη της επιτυχίας της, σημειώνεται ότι η βασική μορφή της παραμένει αναλλοίωτη από το 1985 (Kralik & Ricchi, 2017). Η αντίδραση απαιτεί πέντε βασικά συστατικά: το DNA εκμαγείο, ένα ζεύγος εκκινητών, δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxyNucleotide TriPhosphates dNTPs), δισθενή ιόντα (συνήθως Mg^{2+}) και την DNA πολυμεράση (Garibyan & Avashia, 2013; Kralik & Ricchi, 2017).

Αρχικά, για την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από το δείγμα, απαιτείται ένα ζεύγος εκκινητών, το οποίο θα “οριοθετεί” το τμήμα DNA προς ενίσχυση. Οι εκκινητές είναι μικρές ακολουθίες DNA με καθορισμένη αλληλουχία συμπληρωματική με την αλληλουχία-στόχο (Garibyan & Avashia, 2013). Η επιλογή των κατάλληλων εκκινητών αποτελεί το καθοριστικότερο βήμα της PCR (Smith & Osborn, 2009; Kralik & Ricchi, 2017). Οι εκκινητές αποτελούν το σημείο επιμήκυνσης από όπου η DNA πολυμεράση, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τα dNTPs, θα συνθέσει το προϊόν της PCR, το οποίο αποτελεί κλώνο της αλληλουχίας στόχου (Garibyan & Avashia, 2013).

Έτσι, η PCR αποτελείται από τρία διακριτά βήματα, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά σε κύκλους έως ότου έχουμε επαρκή ποσότητα αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας στόχου. Τα τρία βήματα είναι η αποδιάταξη, η υβριδοποίηση και η επιμήκυνση (Smith & Osborn, 2009; Garibyan & Avashia, 2013; Kralik & Ricchi, 2017). Κατά την αποδιάταξη, το διάλυμα της αντίδρασης θερμαίνεται σε θερμοκρασία ανώτερη του σημείου τήξης των δύο αλυσίδων του DNA-στόχου, προκαλώντας τον διαχωρισμό της διπλής έλικας. Κατά την υβριδοποίηση, η θερμοκρασία χαμηλώνει προκειμένου να επιτραπεί η υβριδοποίηση των δύο εκκινητών στις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA-στόχου χάρη στην συμπληρωματικότητα τους. Σε αυτό το σημείο, αν οι εκκινητές παρουσιάζουν μεγάλη συμπληρωματικότητα μεταξύ τους ή η αλληλουχία στόχος απουσιάζει από το δείγμα εμφανίζονται διμερή εκκινητών (Smith & Osborn, 2009; Kralik & Ricchi, 2017). Τέλος, κατά την επιμήκυνση, η θερμοκρασία ανεβαίνει και πάλι σε επίπεδα ιδανικά για τη δράση της DNA πολυμεράσης, η οποία δημιουργεί ένα νέο αντίγραφο της αλληλουχίας στόχου. Στο πέρας κάθε κύκλου έχουμε διπλασιασμό των προϊόντων της PCR (βλ. Εικόνα 11) (Garibyan & Avashia, 2013). Ο αριθμός των κύκλων και οι ακριβείς θερμοκρασίες για κάθε βήμα εξαρτώνται από την αλληλουχία του DNA-στόχου. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε μηχανήματα γνωστά ως θερμικούς κυκλοποιητές, ικανά να εναλλάσσουν με ακρίβεια τις διάφορες απαιτούμενες θερμοκρασίες κάθε βήματος (Garibyan & Avashia, 2013). Προκειμένου η αντίδραση να είναι επιτυχής, απαιτείται ένα ένζυμο ικανό να αντέξει τις υψηλές θερμοκρασίες χωρίς να χάνει την καταλυτική του ικανότητα. Το ένζυμο αυτό, του οποίου η κρίσιμη απομόνωση επέτρεψε στην ανάπτυξη της PCR, είναι μία DNA πολυμεράση προερχόμενη από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, γνωστή και ως Taq πολυμεράση (Kralik & Ricchi, 2017), η οποία απαιτεί για τη δράση της ως συμπαραγόντες ιόντα μαγνησίου (Garibyan & Avashia, 2013).



ΕΙΚΟΝΑ 11: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης PCR. Διακρίνεται η αλληλουχία στόχος, τα τρία βήματα της αντίδρασης αναλυτικά στον πρώτο κύκλο (1: αποδιάταξη, 2: υβριδοποίηση και 3: επιμήκυνση) και ενδεικτικά ο αριθμός των νέων κλώνων στον δεύτερο και τον τρίτο κύκλο (Garibyan & Avashia, 2013).

1.6.3. qPCR

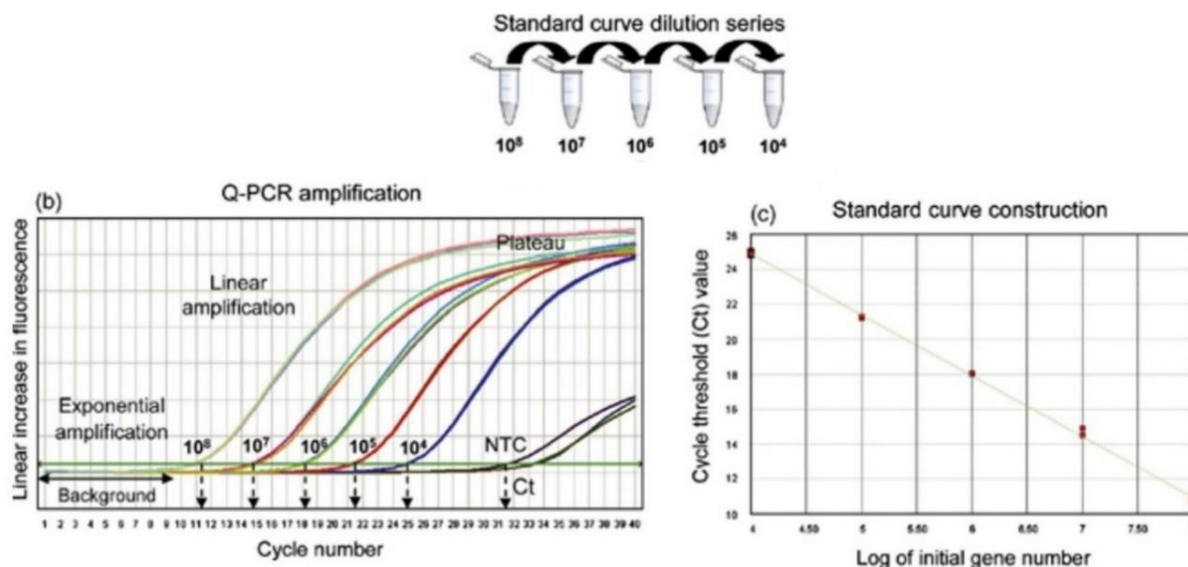
Η qPCR, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί μία από τις κυριότερες και πιο αξιόπιστες σύγχρονες μεθόδους για την ανίχνευση ARGs στο περιβάλλον (Rizzo et al, 2013; Berendonk et al, 2015; Liguori et al, 2022), ξεχωρίζοντας για την ευαισθησία και την υψηλή επαναληψιμότητα της (Smith & Osborn, 2009). Αποτελεί μία εξελιγμένη μορφή της βασικής PCR, η οποία περιλαμβάνει την παρακολούθηση της ενίσχυσης του DNA σε πραγματικό χρόνο με τη χρήση φθορισμού (Kralik & Ricchi, 2017). Η ποσότητα φθορισμού που μετριέται είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας ενισχυμένου DNA στο διάλυμα της αντίδρασης (Smith & Osborn, 2009; Kralik & Ricchi, 2017) και η μέτρηση της πραγματοποιείται ανά κύκλο στην εκθετική φάση της ενίσχυσης, όπου έχουμε διπλασιασμό των προϊόντων σε κάθε κύκλο (Kralik & Ricchi, 2017). Στη συνέχεια, καθώς τα συστατικά της qPCR αρχίζουν να εξαντλούνται, η ενίσχυση περνά στην γραμμική φάση και τέλος στην φάση κορεσμού, όπου σταματά (Smith & Osborn, 2009). Οι τρεις αυτές φάσεις αποτελούν την καμπύλη ενίσχυσης (Smith & Osborn, 2009). Τα συστήματα φθορισμού που χρησιμοποιούνται στην qPCR είναι δύο: η χρωστική SYBR-GREEN και οι ανιχνευτές *Taqman* (Smith & Osborn, 2009). Στη παρούσα πτυχιακή θα χρησιμοποιηθεί η δοκιμή SYBR-GREEN, η οποία αναλύεται εκτενώς παρακάτω.

Η SYBR-GREEN είναι μία χρωστική της οποίας η παρεμβολή μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του δίκλωνου DNA παράγει φθορισμό (Smith & Osborn, 2009). Έτσι, ο φθορισμός που παρατηρείται είναι ανάλογος της ποσότητας δίκλωνου DNA στο δείγμα. Τονίζεται πως σε περίπτωση που μόρια της SYBR-GREEN δεν συνδεθούν με δίκλωνο DNA δεν υπάρχει φθορισμός. Η δοκιμή SYBR-GREEN είναι απλή και εύχρηστη, απαιτεί όμως ιδιαίτερη προσοχή καθώς η χρωστική δεν έχει εξειδίκευση και συνδέεται τόσο στο προϊόν-στόχο όσο και σε μη ειδικά παραπροϊόντα (Smith & Osborn, 2009; Kralik & Ricchi, 2017).

Προκειμένου να διαπιστωθεί ότι η αντίδραση ήταν επιτυχής, και ο φθορισμός που ανιχνεύεται έχει προέλευση την αλληλουχία-στόχο, η qPCR συνδυάζεται μετά το πέρας της με μία ανάλυση καμπύλης τήξης (Smith & Osborn, 2009; Kralik & Ricchi, 2017). Στην ανάλυση αυτή, το δείγμα υποβάλλεται σε μία σειρά διαδοχικών υψηλών θερμοκρασιών με αποτέλεσμα το DNA σταδιακά να αποδιατάσσεται και, εφόσον η σύνδεση με τη SYBR-GREEN πλέον δεν υφίσταται, ο φθορισμός να μειώνεται (Smith and Osborn, 2009). Η θερμοκρασία στην οποία επιτυγχάνεται 50% αποδιάταξη του δείγματος είναι χαρακτηριστική για κάθε προϊόν και μπορεί να επιβεβαιώσει την ύπαρξη της αλληλουχίας-στόχου καθώς και άλλων παραπροϊόντων, όπως διμερή εκκινητών, στο διάλυμα της αντίδρασης (Smith and Osborn, 2009).

Πώς όμως επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση του παραγόμενου DNA; Στην αρχή της αντίδρασης, όπου η ποσότητα DNA είναι χαμηλή, δεν υπάρχει ανιχνεύσιμος φθορισμός, εκτός από τον λεγόμενο “θόρυβο” (background noise) (Smith and Osborn, 2009). Το σημείο όπου η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σε επίπεδο ανώτερο του κατωφλιού ανίχνευσης και είναι δυνατόν να διακριθεί από τον θόρυβο ονομάζεται κύκλος ποσοτικοποίησης (quantification Cycle, C_q) ή κύκλος κατωφλιού (threshold Cycle, C_t) και είναι ανάλογος του αρχικού αριθμού μορίων DNA-εκμαγείου στο δείγμα (Kralik and Ricchi, 2017). Με βάση το C_q είναι δυνατός ο υπολογισμός της απόλυτης ποσότητας του προϊόντος με την αξιοποίηση μιας καμπύλης βαθμονόμησης (“πρότυπη καμπύλη”) κατασκευασμένης από διαδοχικές αραιώσεις, συνήθως δεκαδικές, πρότυπων δειγμάτων των οποίων η συγκέντρωση ή ο αριθμός αντιγράφων είναι γνωστός

(Smith and Osborn, 2009; Kralik and Ricchi, 2017). Ενδεικτικά βήματα της ανάλυσης της qPCR φαίνονται στην Εικόνα 12.



ΕΙΚΟΝΑ 12: Ενίσχυση μέσω qPCR πρότυπων δειγμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις για κατασκευή πρότυπης καμπύλης για την ποσοτικοποίηση άγνωστων περιβαλλοντικών δειγμάτων. Διακρίνονται οι διαδοχικές αραιώσεις (από 10^8 έως 10^4) και τα εξής διαγράμματα: (b) Γραμμικό διάγραμμα όπου διακρίνονται οι τρεις φάσεις της ενίσχυσης για τις αραιώσεις και το NTC και (c) απλή γραμμική παράσταση των τιμών C_t συναρτήσει του λογαρίθμου του αρχικού αριθμού γονιδίου προς ενίσχυση.

1.7. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εύρεση βασιζόμενων στην qPCR δεικτών ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη για αξιοποίηση σε μελέτες περιβαλλοντικής επιδημιολογίας, μέσω εντοπισμού και ποσοτικοποίησης βακτηριακών γονιδίων ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη σε δείγματα εδάφους στα οποία είχε προστεθεί αντιβιοτικό ή είχε πραγματοποιηθεί ενσωμάτωση επιφορτισμένης με τετρακυκλίνη κοπριάς. Προκειμένου να γίνει αυτό προηγήθηκε η ανάπτυξη μεθόδου qPCR για δύο γονίδια ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (*tetQ* και *tetW*) ενώ επίσης μελετήθηκαν τα γονίδια *tetM*, *intI1* και το βακτηριακό ριβοσωμικό 16S rRNA.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Επιλογή εκκινητών

Η επιλογή των εκκινητών έγινε σύμφωνα με τη βάση δεδομένων LCPDb-ARG (<http://lcpdb.ddlemb.com/>) (Gorecki et al, 2019). Το Παράρτημα I περιλαμβάνει την λίστα των επιλεγμένων εκκινητών και τις αντίστοιχες αλληλουχίες τους.

2.2. PCR

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη των γονιδίων ανθεκτικότητας στα δείγματα εδάφους χρησιμοποιήθηκε PCR. Τα αντιδραστήρια καθώς και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τις αντιδράσεις παρατίθενται στον Πίνακα 1. Για κάθε είδος εκκινητών χρησιμοποιήθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας (Negative Control, NC). Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση κάθε γονιδίου, καθώς και οι αντίστοιχες παραπομπές, φαίνονται στο Παράρτημα I. Στη συνέχεια, για την εξακρίβωση της επιτυχίας ενίσχυσης, τα αποτελέσματα κάθε PCR οπτικοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1,5% w/v σε TAE, όπου η χρώση του DNA έγινε με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Αντίδραση PCR

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
DNA εκμαγείο	2 (0.1-20ng)
KAPA Taq buffer (10x)	2 (1x)
Forward primer (10μM)	0,8 (0.4μM)
Reverse primer (10μM)	0,8 (0.4μM)
dNTPs (10mM)	0,4 (0.2mM)
KAPA Taq polymerase	0,08
BSA (10mg/ml)	0,8
ddH ₂ O	13,12
Σύνολο	20

2.3. Κλωνοποίηση

2.3.1. Gel extraction και καθαρισμός DNA

Εφόσον διαπιστώθηκε μέσω της PCR η ύπαρξη των γονιδίων ενδιαφέροντος στα δείγματα εδάφους, ακολούθησε μια νέα αντίδραση PCR με τελικό όγκο 40μL και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της (ομοίως 1,5% w/v αгарόζης σε TAE), με σκοπό να γίνει gel extraction και απομόνωση του ενισχυμένου DNA. Το gel extraction έγινε με χρήση του NucleoSpin® Gel and PCR clean-up kit (Takara Bio), ενώ η καθαρότητα του απομονωμένου DNA μετρήθηκε με Nanodrop (Παράρτημα II).

2.3.2. Ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων αδενοσίνης και αντίδραση λιγάσης

Προκειμένου να αυξηθούν οι πιθανότητες επιτυχούς ένθεσης των γονιδίων σε πλασμιδιακούς φορείς, πραγματοποιήθηκε αντίδραση ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων αδενοσίνης (A-tailing), η οποία φαίνεται στον Πίνακα 2. Η αντίδραση επωάστηκε στους 72 °C για 30 min.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Αντίδραση A-tailing

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
προϊόν PCR	7
KAPA Taq buffer (10x)	1
dATPs	0,2
KAPA Taq polymerase	1
ddH ₂ O	0,8
Σύνολο	10

Επόμενο βήμα αποτελεί ο υπολογισμός της ποσότητας που απαιτείται ανά γονίδιο για την αντίδραση της T4 DNA λιγάσης (ligation). Η ποσότητα ενθέματος για κάθε γονίδιο υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$\text{ποσότητα ενθέματος (ng)} = \text{ποσότητα φορέα (ng)} \times \frac{\text{μέγεθος ενθέματος (kb)}}{\text{μέγεθος φορέα (kb)}} \times \text{μοριακή αναλογία}$$

όπου η ποσότητα φορέα είναι σε κάθε περίπτωση 50 ng, το μέγεθος του φορέα είναι 3 kb, ενώ η μοριακή αναλογία και το μέγεθος ενθέματος εξαρτώνται από κάθε γονίδιο (Παράρτημα II).

Στη συνέχεια, ακολούθησε η ένθεση του απομονωμένου DNA σε φορέα κλωνοποίησης pGEM-T Easy, η οποία πραγματοποιήθηκε μέσω ligation. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 3, και βασίζονται στο πρωτόκολλο pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega Corporations). Η αντίδραση επωάστηκε στους 4 °C overnight (O/N).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Αντίδραση ligation

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
2X Rapid Ligation Buffer	5
pGEM-T Easy	1
T4 DNA ligase	1
προϊόν PCR (+ ddH ₂ O)*	3
Σύνολο	10

* Οι ποσότητες από το προϊόν της PCR που προστίθεται διαφέρουν ανά γονίδιο ώστε να επιτευχθεί η υπολογισμένη ποσότητα ενθέματος που απαιτείται στην αντίδραση λιγάσης. Σε κάθε περίπτωση ο τελικός όγκος των 10 μL συμπληρώθηκε με ddH₂O (Παράρτημα II).

2.3.3. Μετασχηματισμός

Την επόμενη μέρα προστέθηκαν υπό φλόγα 4μL του ligation mix σε erpendorf που περιείχε 100μL δεκτικών στο μετασχηματισμών κυττάρων *E. coli* (DH5a), και ακολούθησε επώαση σε πάγο για 30 min. Ο μετασχηματισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε μέσω heat shock, με τοποθέτηση του erpendorf σε heatblock προθερμασμένου στους 42 °C για 50 sec. Ακολούθησε και πάλι σύντομη επώαση σε πάγο για 4 min και προσθήκη υπό φλόγα 400 μL LB medium (Παράρτημα II). Τα κύτταρα αφέθηκαν να ανακάμψουν και να πολλαπλασιαστούν με επώαση στους 37 °C για 1,5 h στα 150 rpm. Μετά το πέρας της επώασης, έγινε φυγοκέντριση για 1 min στα 4000 g.

Τα υπόλοιπα βήματα του πρωτοκόλλου πραγματοποιήθηκαν στο σύνολο τους υπό φλόγα προς αποφυγή καθοδικής ροής αέρα και κινδύνου επιμόλυνσης. Αρχικά, αφαιρέθηκαν από το erpendorf 400 μL υπερκειμένου, και το ίζημα που δημιουργήθηκε από τα μετασχηματισμένα κύτταρα κατά την φυγοκέντριση επαναδιαλύθηκε με πιπετάρισμα στα εναπομείναντα 100 μL LB medium για την επίτευξη υψηλότερης συγκέντρωσης κυττάρων. Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν τρυβλία που περιείχαν LB agar (Παράρτημα II), όπου προστέθηκαν 10 μl IPTG and 50 μl X-gal τα οποία απλώθηκαν ομοιογενώς σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Στο τέλος, 80 μL μετασχηματισμένων κυττάρων επιστρώθηκαν στο τρυβλίο, το οποίο σφραγίστηκε με parafilm και αφέθηκε στους 37 °C O/N.

2.3.4. Επιλογή λευκών αποικιών

Μετά την ανάπτυξη αποικιών στα τρυβλία, προετοιμάστηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες με 5 mL LB medium, στα οποία προστέθηκαν 5 μL καρβενικιλίνης. Συνολικά επιλέχθηκαν 3-4 μετασχηματισμένες αποικίες λευκού χρώματος από το τρυβλίο και κάθε μία εισάχθηκε σε ένα falcon με σκοπό την δημιουργία ξεχωριστών υγρών καλλιιεργειών. Η όλη διαδικασία έγινε υπό φλόγα. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε colony PCR (Πίνακας 4) για κάθε λευκή αποικία, και ηλεκτροφόρηση (ομοίως 1,5% w/v αгарόζη σε TAE) των προϊόντων για την εξακρίβωση ύπαρξης των γονιδίων. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C O/N στα 150 rpm.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Αντίδραση colony PCR

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
DNA εκμαγείο	2 (0.1-20ng)
KAPA Taq buffer (10x)	2 (1x)
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,8 (0.4μM)
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0,8 (0.4μM)
dNTPs (10mM)	0,4 (0.2mM)
KAPA Taq polymerase	0,08
ddH ₂ O	13,92
Σύνολο	20

2.3.5. Απομόνωση πλασμιδίων

Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των πλασμιδίων από τις υγρές καλλιέργειες των λευκών αποικιών με χρήση του Nucleospin®Plasmid kit (Macherey-Nagel). Η καθαρότητα των απομονωμένων πλασμιδίων μετρήθηκε με Nanodrop (Παράρτημα II). Η διαδικασία της κλωνοποίησης επαναλήφθηκε ξεχωριστά για κάθε ένα από τα γονίδια μελέτης. Ο υπολογισμός των αντιγράφων πλασμιδίων έγινε με βάση τον τύπο:

$$\text{αντίγραφα πλασμιδίων} = \frac{6,02 \times 10^{23} \text{ αντίγραφα}^{-1} \times \text{ποσότητα DNA} \left(\frac{\text{g}}{\mu\text{L}} \right)}{\text{μήκος DNA (bp)} \times 660 \text{ g} \times \text{mol}^{-1} \times \text{bp}^{-1}}$$

όπου η ποσότητα DNA είναι η τιμή συγκέντρωσης που μετρήθηκε στο Nanodrop εκφρασμένη σε g/μL και μήκος DNA το μήκος του ανασυνδυασμένου φορέα, δηλαδή το μήκος του φορέα (3000 bp) συν το μήκος κάθε γονιδίου (Παράρτημα II).

2.3.6. Αλληλούχηση

Προκειμένου να διαπιστωθεί πως τα ενθέματα που χρησιμοποιήθηκαν στην κλωνοποίηση και απομονώθηκαν από τις λευκές αποικίες αντιστοιχούν στα αναμενόμενα γονίδια έγινε αλληλούχηση των πλασμιδίων κατά Sanger από την Eurofins Genomics και μετέπειτα ταυτοποίηση των αλληλουχιών μέσω του NCBI Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.4. Χειρισμός εδαφών: μέτρηση υγρασίας και WHC

Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την εργασία προήλθε από τον προαύλιο χώρο του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (Λάρισα) και οι ιδιότητες του ήταν γνωστές από προηγούμενες μελέτες των Perruchon et al. (2022). Επίσης, η κοπριά προήλθε από χοίρους οι οποίοι δεν είχαν λάβει κτηνιατρικά αντιβιοτικά.

Σε πρώτο στάδιο, μετρήθηκε η υγρασία του εδάφους, χρησιμοποιώντας 3 επαναλήψεις (δείγματα) των περίπου 5 g. Τα δείγματα ζυγίστηκαν πάνω σε κομμάτια αλουμινόχαρτου των οποίων το βάρος ήταν επίσης γνωστό. Στη συνέχεια, τα τρία αυτά δείγματα τοποθετήθηκαν στους 105 °C και αφέθηκαν εκεί Ο/Ν. Την επόμενη μέρα επαναλήφθηκε το ζύγισμα, και από την νέα τιμή για κάθε δείγμα αφαιρέθηκε το βάρος του αλουμινόχαρτου. Η υγρασία κάθε δείγματος (Moisture Content, MC) υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$MC = \frac{W_1 - W_2}{W_1}$$

όπου W1: βάρος δείγματος πριν την επώαση και W2: βάρος δείγματος μετά την επώαση. Στο τέλος υπολογίστηκε ο μέσος όρος MC των τριών επαναλήψεων. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για την κοπριά, όπου χρησιμοποιήθηκε μόνο μία επανάληψη.

Σε δεύτερο στάδιο μετρήθηκε η υδατοχωρητικότητα του εδάφους (Water Holding Capacity, WHC). Τρία δείγματα εδάφους των 20 g τοποθετήθηκαν έναστο σε χωνί με χαρτί φιλτραρίσματος πάνω από τριγωνικές φιάλες, και το σύστημα ζυγίστηκε ως σύνολο. Στη συνέχεια, προστέθηκε νερό αργά μέχρι να καλυφθεί

το επίπεδο του εδάφους, και η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου το νερό αποστραγγίζονταν με αργό ρυθμό από το έδαφος. Το σύστημα αφέθηκε Ο/Ν ώστε το έδαφος να κορεστεί και να μην υπάρχει τελικά παρατηρήσιμη απώλεια νερού από το δείγμα. Το σύστημα ζυγίστηκε και μετά την προσθήκη νερού και η WHC μετρήθηκε με βάση τον τύπο:

$$WHC(\%) = \frac{(B - X) + (W_2 - W_1)}{X} \times 100$$

όπου B: βάρος νωπού εδάφους, X: βάρος ξηρού εδάφους, W₁: βάρος συστήματος πριν την προσθήκη νερού και W₂: βάρος συστήματος μετά την προσθήκη νερού. Το ξηρό βάρος (X) υπολογίστηκε με βάση τον τύπο της MC, και τελικά υπολογίστηκε ο μέσος όρος WHC των τριών δειγμάτων. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ενότητας αυτής φαίνονται στο Παράρτημα ΙΙΙ.

2.5. Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός αφορούσε συνολικά 8 μεταχειρίσεις, εκ των οποίων 4 για το έδαφος (με προστιθέμενη ή μη κοπριά) και 4 για την σκέτη κοπριά:

Έδαφος:

- SW_NO: έδαφος με νερό, χωρίς αντιβιοτικό
- SW_TC: έδαφος με νερό, με τετρακυκλίνη
- SM_NO: έδαφος με κοπριά, χωρίς αντιβιοτικό
- SM_TC: έδαφος με κοπριά, με τετρακυκλίνη

Κοπριά:

- MB_NO: κοπριά πριν την επώαση, χωρίς αντιβιοτικό
- MB_TC: κοπριά πριν την επώαση, με τετρακυκλίνη
- MA_NO: κοπριά μετά την επώαση, χωρίς αντιβιοτικό
- MB_TC: κοπριά μετά την επώαση, με τετρακυκλίνη

Για τις 4 μεταχειρίσεις του εδάφους είχαμε συνολικά 5 διακριτά time points (0 ώρες, 12 ώρες, 24 ώρες, 4 ημέρες και 25 ημέρες), με 5 βιολογικές επαναλήψεις για το καθένα, καταλήγοντας με 100 μικρόκοσμους (100 δείγματα). Για την κοπριά, οι 4 μεταχειρίσεις διακρίνονται σε δείγματα κοπριάς πριν την επώαση (MB, 2 μεταχειρίσεις) και δείγματα κοπριάς μετά από επώαση 37 °C για 48 ώρες (MA, 2 μεταχειρίσεις), από τις οποίες ποσότητα κρατήθηκε σε 4 κοπρόκοσμους, για τη δημιουργία 5 βιολογικών επαναλήψεων για κάθε μεταχείριση (20 δείγματα).

Το πρωτόκολλο δημιουργίας των μικρόκοσμων ήταν το εξής: Αρχικά, ζυγίστηκε περίπου 1 kg εδάφους, το οποίο τοποθετήθηκε σε σακούλες, ώστε κάθε μία από αυτές να αντιστοιχεί σε μία μεταχείριση. Οι μετρήσεις για την τετρακυκλίνη (TC) έγιναν με σκοπό να καταλήγουν τελικά 2,5 mg αντιβιοτικού ανά kg εδάφους. Έτσι, διαλύθηκαν 25 mg τετρακυκλίνης σε 10 mL ddH₂O (συγκέντρωση 2500 mg/L ή 2,5 mg/mL) για τη δημιουργία διαλύματος TC. Επίσης, θέλαμε σε κάθε περίπτωση η υγρασία του εδάφους να αντιστοιχεί στο 30% του WHC. Για να επιτευχθεί αυτό, στις μεταχειρίσεις SW_NO και SW_TC, οι

οποίες αποτελούσαν το control για το έδαφος, έγινε προσθήκη 119 mL νερού και 119 mL νερού με τετρακυκλίνη (21mg/mL, 118mL νερό + 1 mL διαλύματος TC) σε 1 kg εδάφους, αντίστοιχα.

Για τις SM_NO και SM_TC, η κοπριά αποτελούσε το 2 % w/w του εδάφους, δηλαδή προστέθηκαν 20 g κοπριάς σε 1 kg εδάφους. Η τιμή αυτή αντιστοιχεί σε 25 t κοπριάς * ha⁻¹, η οποία σύμφωνα με τους Köninger et al. (2021) θεωρείται η μέγιστη ποσότητα κοπριάς χοίρων που είναι δυνατόν να εισαχθεί στο έδαφος χωρίς να υπάρχει κίνδυνος για την εδαφική υγεία, δεδομένου της πιθανής υψηλής περιεκτικότητας της κοπριάς σε βαρέα μέταλλα. Για τη μεταχείριση SM_TC, προκειμένου να καταλήξει η ίδια ποσότητα τετρακυκλίνης στο έδαφος (2,5 mg/kg), προστέθηκαν 4,5 mL διαλύματος TC σε 90 g κοπριάς (MB_TC), για την επίτευξη συγκέντρωσης 125 mg/kg. Η ποσότητα αυτή επώαστηκε στους 37 °C για 48 ώρες (MA_TC), και τελικά προστέθηκαν 20 g επιφορτισμένης κοπριάς σε 1 kg εδάφους (SM_TC). Τα δείγματα των MB_TC και MA_TC ομοίως είχαν συγκέντρωση τετρακυκλίνης 125 mg/kg. Για τη μεταχείριση SM_NO προστέθηκαν 4,5mL νερού σε 90 g κοπριά (μη επιφορτισμένη, MB_NO), η οποία επώαστηκε στους 37 °C για 48 ώρες (MA_NO) και τελικά, 20 g μη επιφορτισμένης κοπριάς προστέθηκαν σε 1kg εδάφους. Η υγρασία του εδάφους για κάθε μεταχείριση ρυθμίστηκε πάλι στο 30% του WHC, με την προσθήκη 119 mL νερού.

Μετά την δημιουργία των μεταχειρίσεων ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και τελικά, το 1 kg αρχικής ποσότητας εδάφους χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των μικρόκοσμων, οι οποίοι αποτελούνταν από σακουλάκια που περιείχαν 30 g δείγματος το καθένα, και στα οποία είχαν ανοιχθεί δύο τρύπες για επαρκή αερισμό. Η υγρασία ρυθμιζόταν τακτικά με την προσθήκη νερού, για τη διατήρηση της υγρασίας στο 30% του WHC.

2.6. Εκχύλιση DNA από δείγματα εδάφους

Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες των 250 mg σε 120 δείγματα συνολικά (σύμφωνα με την ενότητα 2.5), όπου πραγματοποιήθηκε εκχύλιση DNA με το DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen). Η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA μετρήθηκε με Qubit (Παράρτημα IV). Στη συνέχεια, το απομονωμένο DNA όλων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία αραιώσεων ώστε να επιτευχθούν τελικές συγκεντρώσεις 5 ng/μL και 0,5 ng/μL.

2.7. qPCR

Η αντίδραση της qPCR φαίνεται στον Πίνακα 4. Πριν την ποσοτικοποίηση των γονιδίων στα δείγματα εδάφους, πραγματοποιήθηκαν qPCR για τις πρότυπες καμπύλες των γονιδίων. Οι πρότυπες καμπύλες βασίζονται σε αραιώσεις των πλασμιδίων που δημιουργήθηκαν και απομονώθηκαν μέσω της κλωνοποίησης και συγκεκριμένα σε δεκαδικές αραιώσεις του εύρους 10³ έως 10⁹. Για κάθε καμπύλη είχαμε 2 τεχνικές επαναλήψεις. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν qPCR των 120 δειγμάτων για κάθε ένα από τα γονίδια (συνθήκες όμοιες με της αντίστοιχες της PCR, Παράρτημα I), με 2 NTCs για κάθε αντίδραση. Για τα *tetM*, *tetQ*, *tetW* και *intI1* χρησιμοποιήθηκαν οι αραιώσεις των 5 ng/μL, ενώ για το 16S rRNA γονίδιο οι αραιώσεις των 0,5 ng/μL. Τα προϊόντα των αντιδράσεων ηλεκτροφορήθηκαν (1,5% w/v αгарόζη σε TAE) (Παράρτημα V).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Αντίδραση qPCR

Αντιδραστήρια	Όγκος (μL)
DNA εκμαγείο	1 (0.1 ή 5 ng)
SYBR Mix (2x)	5 (1x)
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0.2 (0.2μM)
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0.2 (0.2μM)
BSA (10mg/ml)	0.4 (0.4mg/mL)
ddH ₂ O	3.2
Σύνολο	10

2.8. Βιοστατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της qPCR των δειγμάτων υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση διακύμανσης (ANalysis Of VAriance, ANOVA) ενός (one-way ANOVA) και δύο παραγόντων (two-way ANOVA). Στην one-way ANOVA χρησιμοποιήθηκε Turkey's post hoc ανάλυση, ενώ σε περίπτωση που οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή ANOVA δεν πληρούνταν τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με μη-παραμετρική δοκιμή Kruskal-Wallis ακολουθούμενη από Wilcoxon post-hoc. Στην two-way ANOVA έγιναν συγκρίσεις ως προς την εφαρμογή τετρακυκλίνης, ξεχωριστά στα εδάφη με ή χωρίς κοπριά, για λογαριθμημένα δεδομένα (log) ή πηλίκια των αντιγράφων των γονιδίων προς τα αντίγραφα του 16S rRNA γονιδίου (ratios), και συγκρίσεις μεταξύ εδαφών που έλαβαν κοπριά και εδαφών που δεν έλαβαν κοπριά ανεξαρτήτως από την εφαρμογή ή μη αντιβιοτικού, επίσης για δεδομένα log και ratios.

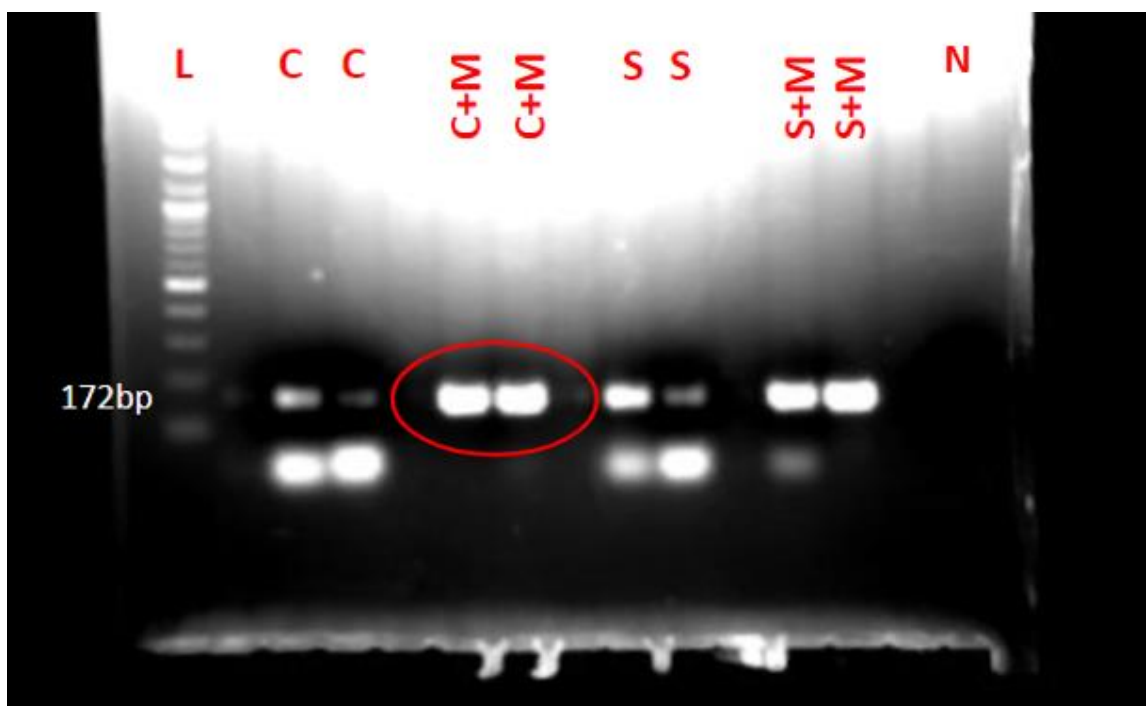
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Gel ηλεκτροφόρησης από gel extraction

Η δοκιμή του συνόλου των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR ήταν επιτυχής καθώς σε κάθε περίπτωση είχαμε εμφάνιση στην ηλεκτροφόρηση της ζώνης επιθυμητού μεγέθους (169bp για το *tetQ*, 172bp για το *tetW*, 171bp για το *tetM*, 473bp για το *intI1* και 193bp για το 16S rRNA γονίδιο). Ενδεικτικά, παρατίθενται τα gel ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκαν για το gel extraction των γονιδίων *tetQ* και *tetW*. Οι εικόνες από την ηλεκτροφόρηση των υπόλοιπων γονιδίων παρατίθενται στο Παράρτημα ΙΙΙ.



ΕΙΚΟΝΑ 13: Gel ηλεκτροφόρησης *tetQ*. Με κόκκινο κύκλο φαίνεται το σημείο από όπου έγινε gel extraction. Οι συντομογραφίες αναφέρονται σε παλαιότερα δείγματα τα οποία αξιοποιήθηκαν για τη δοκιμή των εκκινητών. C: control, σκέτο έδαφος, C + M: έδαφος με κοπριά, S: έδαφος με αντιβιοτικό σουλφομεθοξαζόλη (sulfomethoxazole, SMX), S + M: έδαφος με κοπριά στην οποία έχει εφαρμοστεί SMX, L: 1kb plus Ladder, N: αρνητικός μάρτυρας.



ΕΙΚΟΝΑ 14: Gel ηλεκτροφόρησης *tetW*. Με κόκκινο κύκλο φαίνεται το σημείο από όπου έγινε gel extraction. Οι συντομογραφίες αναφέρονται σε παλαιότερα δείγματα τα οποία αξιοποιήθηκαν για τη δοκιμή των εκκινητών. C: control, σκέτο έδαφος, C + M: έδαφος με κοπριά, S: έδαφος με αντιβιοτικό σουλφομεθοξαζόλη (sulfomethoxazole, SMX), S + M: έδαφος με κοπριά στην οποία έχει εφαρμοστεί SMX, L: 1kb plus Ladder, N: αρνητικός μάρτυρας.

3.2. Αποτελέσματα Nucleotide BLAST

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Αποτελέσματα NCBI Nucleotide BLAST πλασμιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για δημιουργία πρότυπων καμπυλών

Αποτέλεσμα	Επιστημονική ονομασία	Max score	Total score	Query cover	E-value	Per. Identity	Acc. len	Accession
<i>intI1</i> (475 bp)								
Klebsiella pneumoniae strain 5RS1 plasmid unnamed3, complete sequence, gene = " <i>intI1</i> "	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	876	876	99%	0.0	100%	210089	CP158198.1
<i>tetM</i> (173 bp)								
Streptococcus suis strain LSS85 tetracycline resistance gene <i>tetM</i> , complete cds	<i>Streptococcus suis</i>	316	316	98%	1e-81	100%	1920	MT383667.1

<i>tetQ</i> (169 bp)								
Uncultured bacterium clone <i>tet(Q)_1_NHP_NGR_2017</i> tetracycline resistance ribosomal protection protein <i>Tet(Q) (tet(Q))</i> gene, partial cds	Uncultured bacterium	309	309	98%	2e-79	100%	1924	MT050498.1
<i>tetW</i> (174 bp)								
<i>Trueperella pyogenes</i> strain jx18 chromosome, complete genome, gene = “ <i>tetW</i> ”	<i>Trueperella pyogenes</i>	320	320	99%	8e-83	100%	2415007	CP050810.1

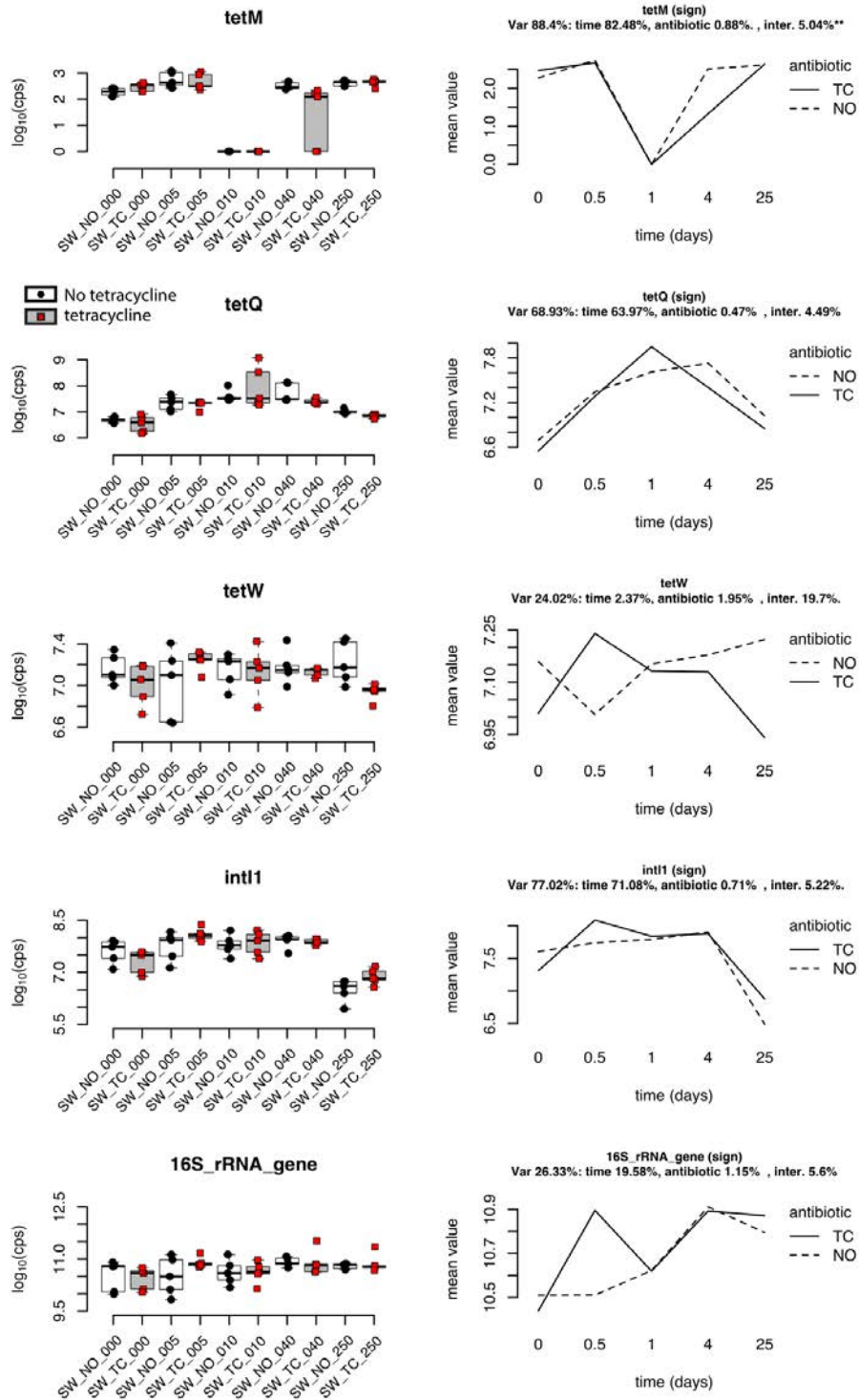
3.3. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης δεδομένων qPCR

Όσον αφορά την one-way ANOVA (Παράρτημα VI) για τις λογαριθμιμένες τιμές των αντιγράφων κάθε γονιδίου (Εικόνα 67), παρατηρείται μία εμφανής διαφορά στην αφθονία του συνόλου των γονιδίων στα δείγματα σκέτης κοπριάς (MB, MA) σε σχέση με τις μεταχειρίσεις εδάφους (SW, SM), γεγονός αναμενόμενο αν αναλογιστεί κανείς πως το μικροβιακό φορτίο στην κοπριά ήταν αυξημένο. Σε γενικές γραμμές, επίσης, παρατηρείται αυξημένη παρουσία των γονιδίων στις μεταχειρίσεις SM, με εξαίρεση το γονίδιο *tetM*, όπου δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα SM και SW δείγματα ανεξαρτήτως χρόνου. Για τα τρία *tet* γονίδια, το αφθονότερο φαίνεται να είναι το *tetW*, ακολουθούμενο από το *tetQ* και, με εμφανή διαφορά, το *tetM*. Και στην περίπτωση των πηλίκων (Εικόνα 68) παρατηρείται παρόμοια υψηλή αφθονία στα δείγματα MB και MA, με εξαίρεση το *intI1*, όπου οι μεγαλύτερες τιμές καταγράφονταν σε δείγματα SW/SM. Από τα τρία *tet* γονίδια, το πηλίκιο του *tetW* είναι το υψηλότερο εκ των παρατηρούμενων στις MB και MA, και σε κάθε SM μεταχείριση έχουμε σημαντική μείωση του πηλίκου μετά την πάροδο της 1 μέρας. Παρόμοια τάση μείωσης σε μικρότερη ένταση διακρίνεται και στα *tetQ*, *tetM*. Σημειωτέον ότι για όλα τα γονίδια, τόσο η απόλυτη όσο και η σχετική αφθονία των δειγμάτων SW είναι εμφανέστατα μικρότερη.

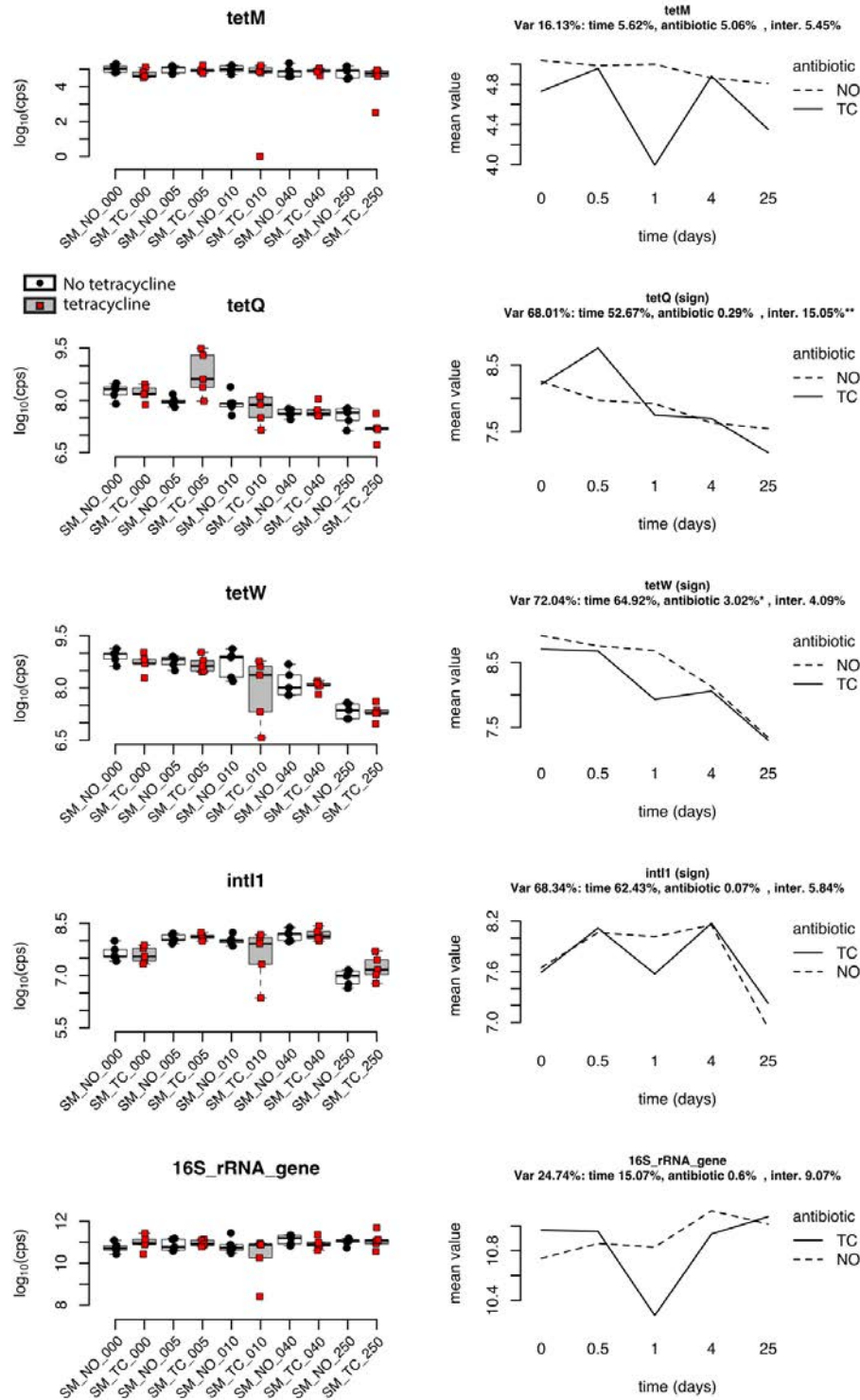
Όσον αφορά την two way ANOVA (Εικόνες 15-20), πραγματοποιήθηκε για τη διευκρίνιση της συμβολής κάθε παράγοντα στις παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις, πρώτα εστιάζοντας στην επίδραση της προσθήκης ή μη αντιβιοτικού (TC/NO) και στη συνέχεια στην επίδραση της προσθήκης ή μη κοπριάς (SM/SW). Για τον παράγοντα εφαρμογής αντιβιοτικού (antibiotic) (Εικόνες 15-18), η ανάλυση υπέδειξε ότι δεν επηρεάζει με στατιστικά σημαντικό τρόπο είτε την απόλυτη είτε την σχετική αφθονία των γονιδίων, με εξαίρεση τα πηλικά του *tetW* στις μεταχειρίσεις SM (Εικόνα 18), όπου έδειξε ότι ο παράγοντας αντιβιοτικό συμπίπτει με το 5.78% της παρατηρούμενης διακύμανσης ($P \leq 0.05$). Ο παράγοντας χρόνος (time) δεν ήταν σημαντικός σε καμία περίπτωση, όπως και η αλληλεπίδραση των παραγόντων (inter.), με πάλι μία μοναδική περίπτωση όπου η αλληλεπίδραση συμπίπτει με το 15.05% της παρατηρούμενης διακύμανσης των λογαριθμιμένων αντιγράφων *tetQ* σε δείγματα SM ($P \leq 0.01$) (Εικόνα 16). Αντίθετα, η εφαρμογή κοπριάς (treat) ήταν στατιστικά σημαντικός παράγοντας για όλα την απόλυτη αφθονία όλων των *tet* γονιδίων (Εικόνα 19), συμπίπτοντας με το 68.64%, το 28.49% και το 57.49% της

παρατηρούμενης διακύμανσης για τα *tetM*, *tetQ* και *tetW* αντίστοιχα ($P \leq 0.001$). Επιπλέον, η αλληλεπίδραση των παραγόντων κοπριάς και χρόνου συμπίπτει με το 6.8%, το 24,4% και το 12,53% της παρατηρούμενης διακύμανσης για τα *tetM*, *tetQ* και *tetW* αντίστοιχα ($P \leq 0.001$), ενώ ο παράγοντας χρόνος από μόνος του δεν ήταν σημαντικός. Όσον αφορά το *intI1* και το 16S rRNA γονίδιο τα αποτελέσματα στην απόλυτη αφθονία φαίνονται πολύ πιο μετριασμένα, αν και ο παράγοντας κοπριά φαίνεται να συμπίπτει με το 3,55% ($P \leq 0.01$) και το 4,27% ($P \leq 0.05$) της παρατηρούμενης διακύμανσης αντίστοιχα.

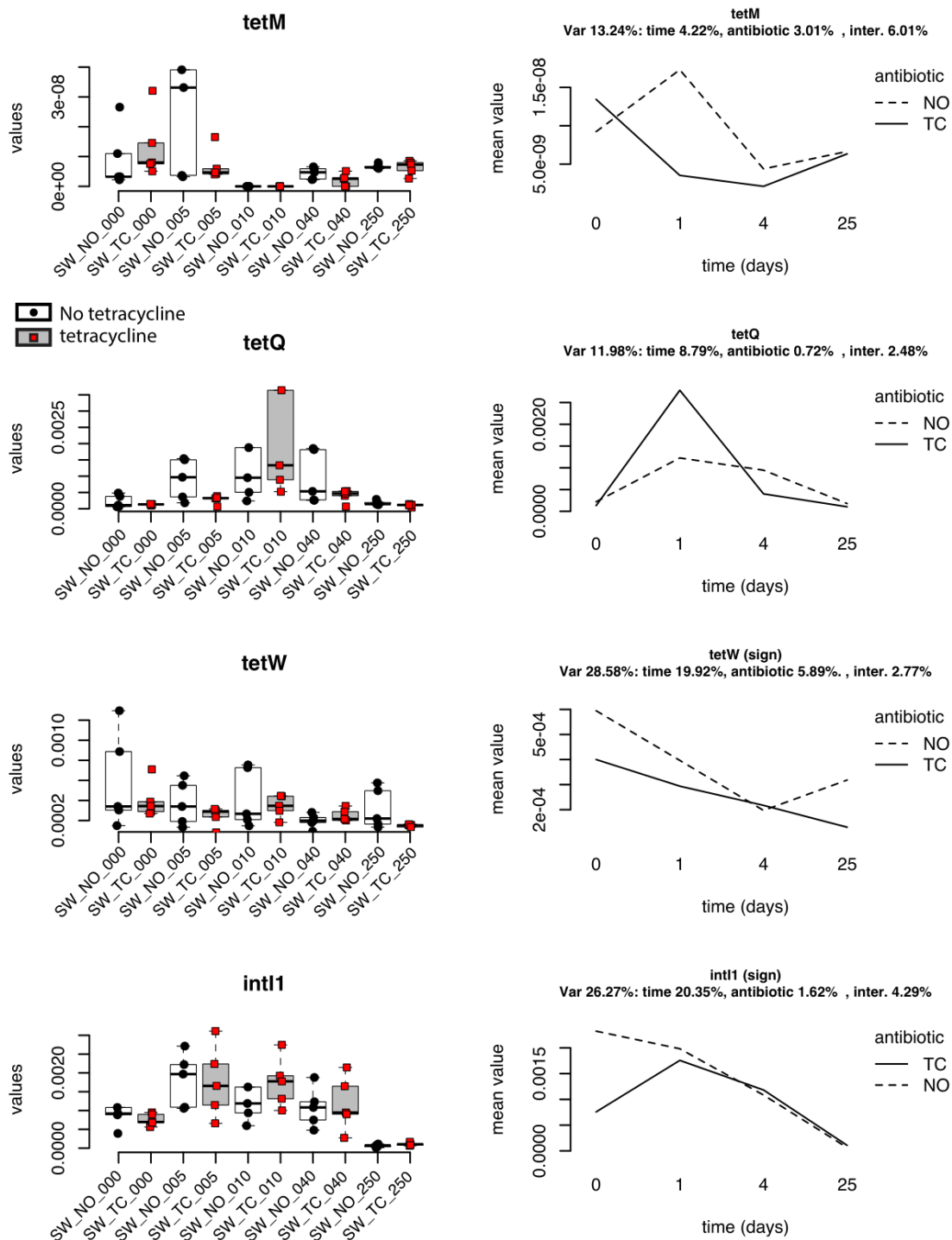
Εστιάζοντας ωστόσο στα πηλικά (Εικόνα 20), είναι εμφανές πως για το *intI1*, κανένας από τους παράγοντες υπό εξέταση δεν είναι στατιστικά σημαντικός και το πηλίκο μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του πειραματικού χρόνου. Για το *tetQ* επίσης δεν αναδείχθηκε κάποιος σημαντικός παράγοντας αν και παρατηρείται τάση αρχικής διαφοροποίησης των μεταχειρίσεων στο διάγραμμα αλληλεπίδρασης. Για το γονίδιο *tetM*, ο παράγοντας κοπριά βρέθηκε πως ήταν στατιστικά σημαντικός ($P \leq 0.001$) και συμπίπτει με το 31.2% της παρατηρούμενης διακύμανσης, ενώ ο παράγοντας χρόνος ή η αλληλεπίδραση των παραγόντων δεν ήταν σημαντικοί. Οι διαφορές εξαιτίας της μεταχείρισης με ή χωρίς κοπριά φαίνεται να επιμένουν σε όλο το χρονικό διάστημα. Για το γονίδιο *tetW*, ο παράγοντας κοπριά καθώς και η αλληλεπίδραση των παραγόντων κοπριάς και χρόνου ήταν στατιστικά σημαντικοί, συμπίπτοντας με το 23.88% και το 13.89% της παρατηρούμενης διακύμανσης αντίστοιχα ($P \leq 0.001$ και στις δύο περιπτώσεις). Ο παράγοντας χρόνος από μόνος του δεν ήταν σημαντικός. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα αλληλεπίδρασης, οι διαφορές λόγω της μεταχείρισης φαίνεται να είναι σημαντικές στην αρχή του πειράματος αλλά όχι προς το τέλος του, με τις δύο γραμμές να συγκλίνουν και τελικά να ταυτίζονται στις 25 ημέρες.



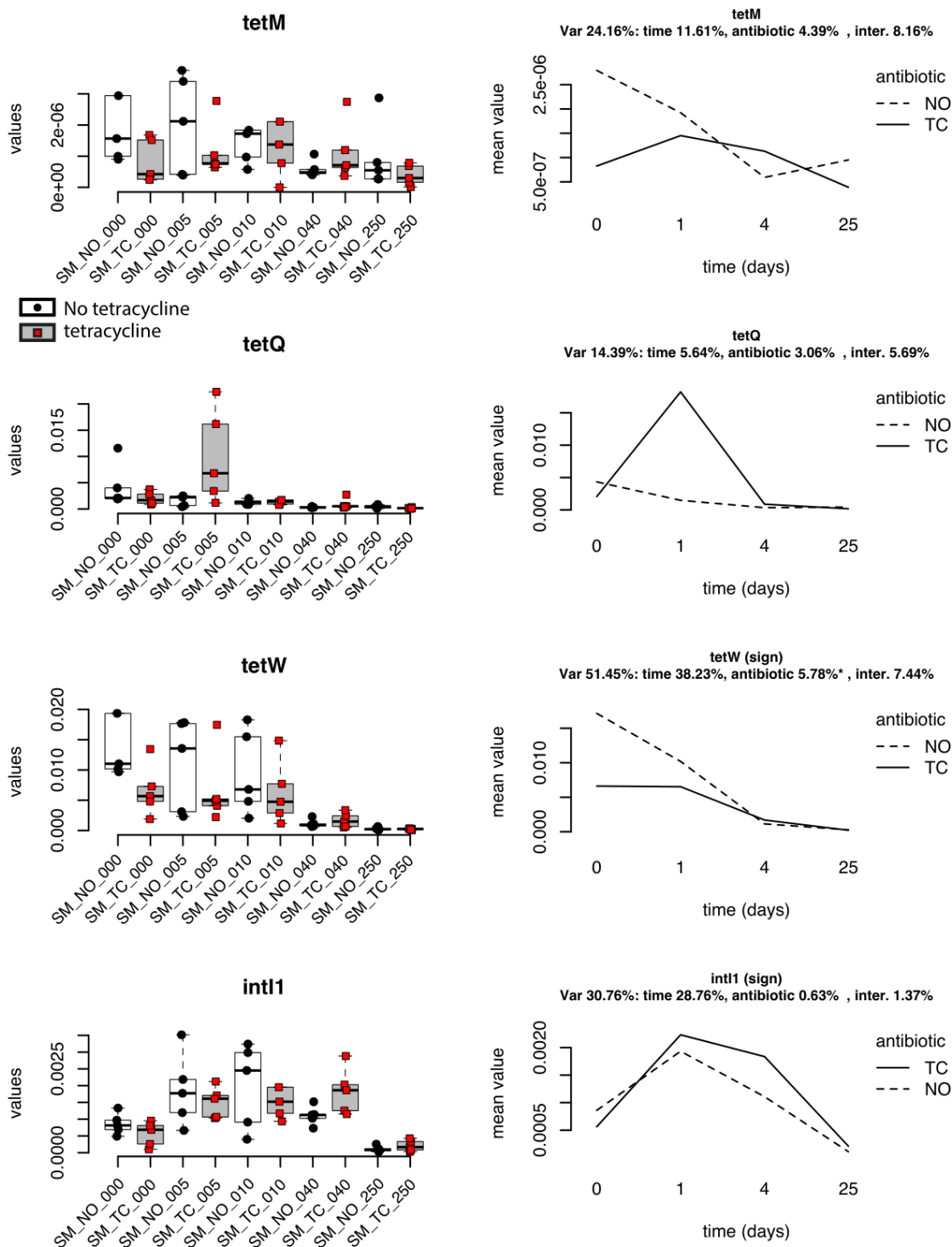
ΕΙΚΟΝΑ 15: Θηκογράμματα (αριστερά) και διαγράμματα αλληλεπίδρασης (δεξιά) για τα διάφορα γονίδια σε απόλυτες τιμές αντιγράφων μετασχηματισμένες λογαριθμικά (log) για τις ομάδες δειγμάτων SW σε βάθος του πειραματικού χρόνου. Τα αποτελέσματα της two-way ANOVA, ήτοι η διακύμανση που περιγράφεται από κάθε παράγοντα αλλά και από την αλληλεπίδρασή των παραγόντων στο μοντέλο παρατίθενται πάνω από κάθε διάγραμμα γονιδίου ενώ η στατιστική σημαντικότητα του κάθε παράγοντα του μοντέλου δηλώνεται με αστερίσκους (* για $P \leq 0.05$, ** για $P \leq 0.01$, *** για $P \leq 0.001$).



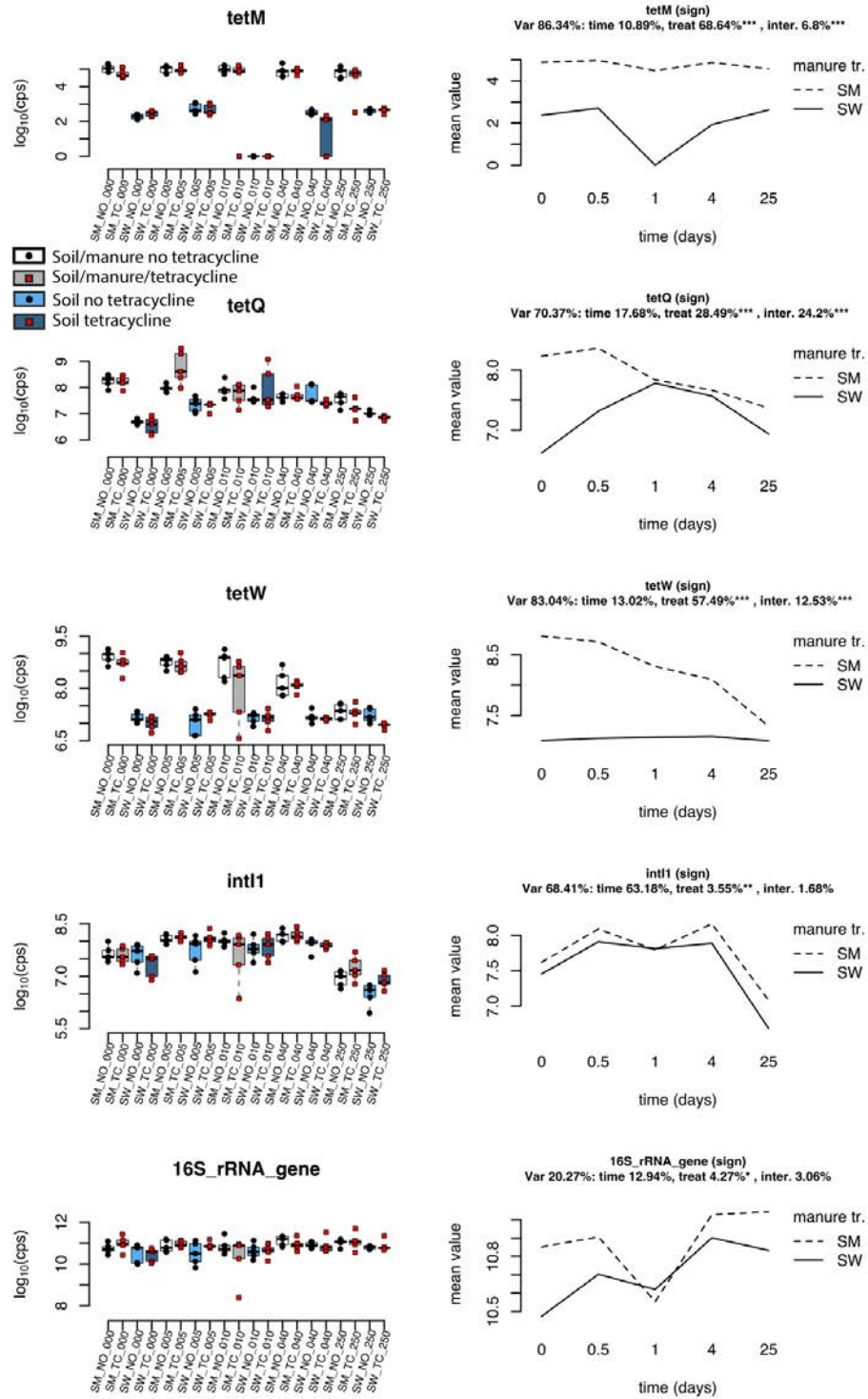
ΕΙΚΟΝΑ 16: Θηκογράμματα (αριστερά) και διαγράμματα αλληλεπίδρασης (δεξιά) για τα διάφορα γονίδια σε απόλυτες τιμές αντιγράφων μετασχηματισμένες λογαριθμικά (log) για τις ομάδες δειγμάτων SM σε βάθος του πειραματικού χρόνου. Τα αποτελέσματα της two-way ANOVA, ήτοι η διακύμανση που περιγράφεται από κάθε παράγοντα αλλά και από την αλληλεπίδρασή των παραγόντων στο μοντέλο παρατίθενται πάνω από κάθε διάγραμμα γονιδίου ενώ η στατιστική σημαντικότητα του κάθε παράγοντα του μοντέλου δηλώνεται με αστερίσκους (* για $P \leq 0.05$, ** για $P \leq 0.01$, *** για $P \leq 0.001$).



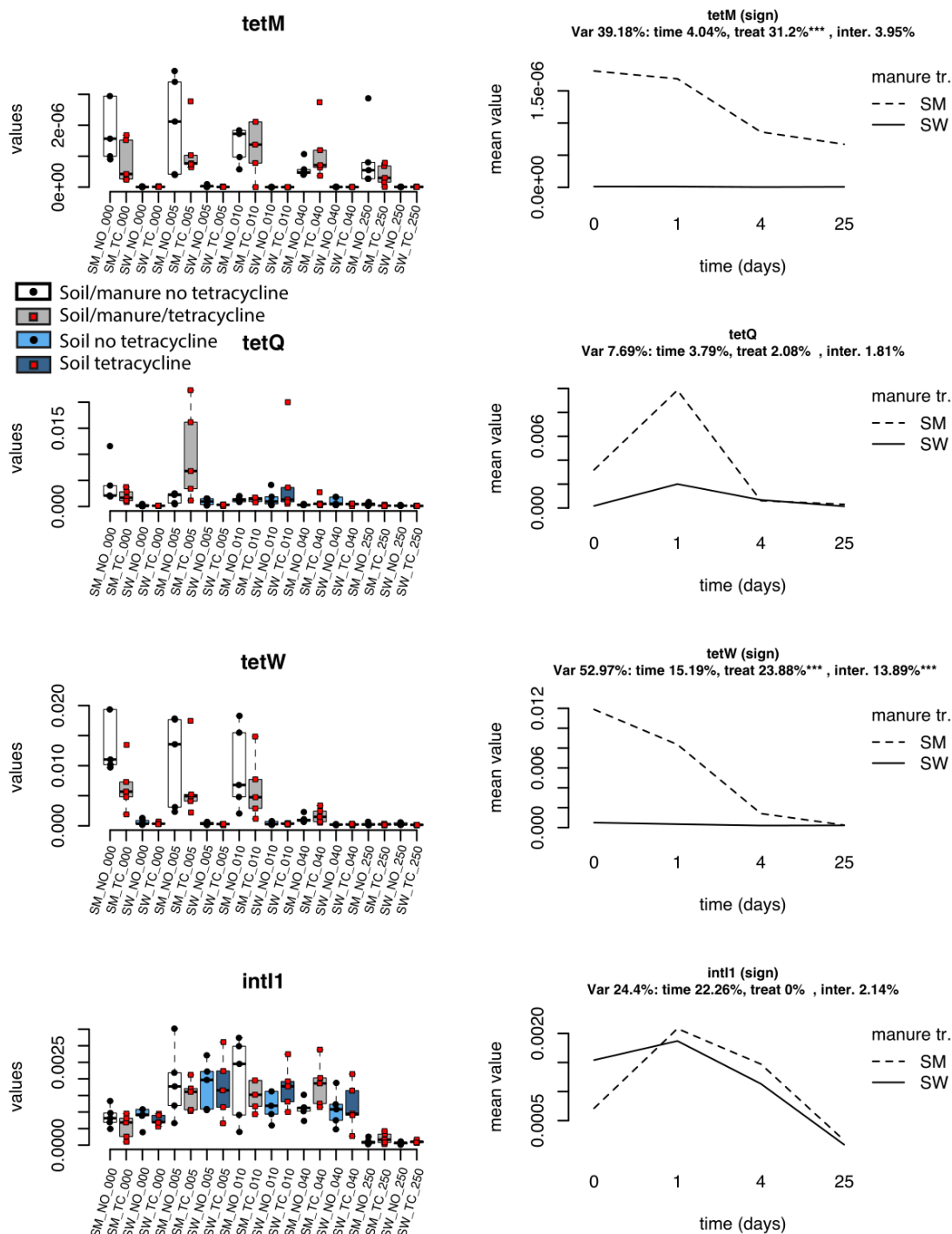
ΕΙΚΟΝΑ 17: Θηκογράμματα (αριστερά) και διαγράμματα αλληλεπίδρασης (δεξιά) για τα πηλίκια των αντιγράφων των διαφόρων γονιδίων ως προς το 16S rRNA γονίδιο (ratios) για τις ομάδες δειγμάτων SW σε βάθος του πειραματικού χρόνου. Τα αποτελέσματα της two-way ANOVA, ήτοι η διακύμανση που περιγράφεται από κάθε παράγοντα αλλά και από την αλληλεπίδρασή των παραγόντων στο μοντέλο παρατίθενται πάνω από κάθε διάγραμμα γονιδίου ενώ η στατιστική σημαντικότητα του κάθε παράγοντα του μοντέλου δηλώνεται με αστερίσκους (* για $P \leq 0.05$, ** για $P \leq 0.01$, *** για $P \leq 0.001$).



ΕΙΚΟΝΑ 18: Θηκογράμματα (αριστερά) και διαγράμματα αλληλεπίδρασης (δεξιά) για τα πηλικά των αντιγράφων των διαφόρων γονιδίων ως προς το 16S rRNA γονίδιο (ratios) για τις ομάδες δειγμάτων SM σε βάθος του πειραματικού χρόνου. Τα αποτελέσματα της two-way ANOVA, ήτοι η διακύμανση που περιγράφεται από κάθε παράγοντα αλλά και από την αλληλεπίδρασή των παραγόντων στο μοντέλο παρατίθενται πάνω από κάθε διάγραμμα γονιδίου ενώ η στατιστική σημαντικότητα του κάθε παράγοντα του μοντέλου δηλώνεται με αστερίσκους (* για $P \leq 0.05$, ** για $P \leq 0.01$, *** για $P \leq 0.001$).



ΕΙΚΟΝΑ 19: Θηκογράμματα (αριστερά) και διαγράμματα αλληλεπίδρασης (δεξιά) για τα διάφορα γονίδια σε απόλυτες τιμές αντιγράφων μετασχηματισμένες λογαριθμικά (log) σε βάθος του πειραματικού χρόνου που προέκυψαν από two-way ANOVA σύγκρισης εφαρμογής ή μη κοπριάς (treat). Η διακύμανση που περιγράφεται από κάθε παράγοντα αλλά και από την αλληλεπίδρασή των παραγόντων στο μοντέλο παρατίθενται πάνω από κάθε διάγραμμα γονιδίου ενώ η στατιστική σημαντικότητα του κάθε παράγοντα του μοντέλου δηλώνεται με αστερίσκους (* για $P \leq 0.05$, ** για $P \leq 0.01$, *** για $P \leq 0.001$).



EIKONA 20: Θηκογράμματα (αριστερά) και διαγράμματα αλληλεπίδρασης (δεξιά) για τα πηλικά των αντιγράφων των διαφόρων γονιδίων ως προς το 16S rRNA γονίδιο (ratios) σε βάθος του πειραματικού χρόνου που προέκυψαν από two-way ANOVA σύγκρισης εφαρμογής ή μη κοπριάς (treat). Η διακύμανση που περιγράφεται από κάθε παράγοντα αλλά και από την αλληλεπίδρασή των παραγόντων στο μοντέλο παρατίθενται πάνω από κάθε διάγραμμα γονιδίου ενώ η στατιστική σημαντικότητα του κάθε παράγοντα του μοντέλου δηλώνεται με αστερίσκους (* για $P \leq 0.05$, ** για $P \leq 0.01$, *** για $P \leq 0.001$).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι πλέον σαφές πως η μικροβιακή αντοχή αποτελεί μείζον σύγχρονο ζήτημα που έχει απασχολήσει πληθώρα διεπιστημονικών τομέων, με την περιβαλλοντική μικροβιολογία να αναδεικνύεται ως κρίσιμος συνδετικός κρίκος για την αντιμετώπιση της στα πλαίσια του One Health. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η AMR αναπτύσσεται στο περιβάλλον είναι ποικίλοι και ως επί το πλείστον αχαρτογράφητοι, ωστόσο πλήθος ερευνών έχει εστιάσει στην εφαρμογή κοπριάς τροφοπαγωγών ζώων όπως οι χοίροι (Agersø & Sandvang, 2005; Binh et al., 2008; Heuer et al., 2011; Zhu et al., 2013; Jechalke et al. 2014; Van Gompel et al., 2019) ως μια κομβική οδό εισαγωγής υπολειμμάτων αντιβιοτικών, ARGs, ARBs, ή ακόμη και MRBs στο έδαφος. Η τετρακυκλίνη είναι από ένα από τα δημοφιλέστερα αντιβιοτικά τόσο για κτηνοτροφική όσο και για κλινική χρήση και έχει ανιχνευτεί σε ποικιλία υποστρωμάτων (Zhuang et al., 2021), μεταξύ των οποίων σε υψηλές ποσότητες σε κοπριά χοίρων (Spielmeyer, 2018).

Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μέσω qPCR πέντε συνολικά γονιδίων (*tetM*, *tetW*, *tetQ*, *intI1* και 16S rRNA γονιδίου) σε εδάφη στα οποία εφαρμόζονταν επιφορτισμένη ή μη κοπριά, εκ των οποίων τρία αποτελούν γονίδια ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη που κωδικοποιούν RPPs (*tetM*, *tetW*, *tetQ*). Η επιλογή των συγκεκριμένων γονιδίων προς ανάλυση βασίστηκε σε σειρά προηγούμενων ερευνών. Οι Van Gompel et al. (2019) ταυτοποίησαν το *tetQ* και δευτερευόντως το *tetW* ως τα δύο πιο άφθονα ARGs σχετιζόμενα με αντοχή στην τετρακυκλίνη που ανιχνεύτηκαν με μεταγενωμικές μεθόδους σε 176 συμβατικές χοιροτροφικές μονάδες σε συνολικά 9 Ευρωπαϊκές χώρες (Βέλγιο, Βουλγαρία, Δανία, Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία, Ολλανδία, Πολωνία και Ισπανία). Επίσης, υψηλά επίπεδα *tetM* ανιχνεύτηκαν με PCR από τους Armalytè et al. (2019) σε συμβατικές και οργανικές φάρμες στη Λιθουανία, οι οποίοι επιπλέον υπέθεσαν πως το *tetW* προέρχεται από το έδαφος, καθιστώντας το ενδεχόμενο χρήσιμο δείκτη εδάφους. Επιπροσθέτως, το *tetM* έχει προταθεί σαν δείκτης συνύπαρξης άλλων τύπων ARGs (Li et al, 2015). Το *intI1*, που κωδικοποιεί την ιντεγκράση τάξης 1, είναι κομβικό στοιχείο των ιντεγκρονίων, βακτηριακών δηλαδή γενετικών στοιχείων τα οποία επιτρέπουν την απόκτηση και έκφραση γονιδίων ενσωματωμένων σε γονιδιακές κασέτες (Stokes & Hall, 1989). Ιντεγκρόνια που φέρουν γενετικές κασέτες σχετιζόμενες με αντιβιοαντοχή έχουν αναφερθεί εκτενώς ως τμήματα μεταθετών στοιχείων (Mobile Gene Elements (MGEs) (Stalder et al., 2012), με το *intI1* να προτείνεται ως δείκτης φαινομένων HGT (Kyselková et al., 2015). Συσχέτιση και πιθανή συμμεταφορά ιντεγκρονίων και γονιδίων ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη έχει επίσης αναφερθεί (Agersø & Sandvang, 2005).

Προκειμένου να αναπτυχθεί η μέθοδος της qPCR, απαραίτητη ήταν η ανίχνευση, απομόνωση και κλωνοποίηση των υπό μελέτη γονιδίων. Αρχικά, η δοκιμή των επιλεγμένων εκκινητών με PCR ήταν επιτυχής, καθώς λάβαμε κατά την ηλεκτροφόρηση ζώνη ίση με το μέγεθος του γονιδίου στόχου σε κάθε περίπτωση (Εικόνες 13, 14, 21 και 22). Επίσης, μέσω αλληλούχησης εξακριβώθηκε πως τα πλασμίδια που δημιουργήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν μετέπειτα για τις πρότυπες καμπύλες της qPCR έφεραν το επιθυμητό ένθεμα (Πίνακας 6). Στη συνέχεια ακολούθησε η qPCR των συνολικά 120 δειγμάτων και ο έλεγχος των αποτελεσμάτων μέσω ηλεκτροφόρησης. Όσον αφορά την ηλεκτροφόρηση του γονιδίου *tetM*, συγκεκριμένος αριθμός ορισμένων δειγμάτων διαπιστώθηκε πως περιείχε μη ειδικούς στόχους και έτσι οι τιμές αυτές δεν χρησιμοποιήθηκαν στη στατιστική ανάλυση. Επιπλέον, για το γονίδιο *tetW*, αν και σε κάθε περίπτωση λήφθηκε η επιθυμητή ζώνη, υπήρχε σταθερή παρουσία, κυρίως στα δείγματα SW,

παραπροϊόντων τα οποία υπονομεύουν την αξιοπιστία των παρατηρούμενων τάσεων και δείχνουν πως οι συνθήκες ενίσχυσης του γονιδίου για την qPCR απαιτούν βελτιστοποίηση (βλέπε Παράρτημα V).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της qPCR με τη χρήση ANOVA ενός (one-way) ή δύο παραγόντων (two-way). Η ανάλυση σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε για λογαριθμιμένες τιμές των αντιγράφων των γονιδίων ανά γραμμάριο ξηρού εδάφους και για πηλικά των αντιγράφων αυτών προς τα αντίστοιχα αντίγραφα του 16S rRNA γονιδίου, το οποίο είναι δείκτης βακτηριακής αφθονίας. Στην πρώτη περίπτωση σκοπός είναι η εύρεση ή μη στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ της απόλυτης αφθονίας των διαφόρων γονιδίων δεικτών στα δείγματα μας, ενώ στη δεύτερη περίπτωση παρέχεται η σχετική αφθονία, η οποία παρέχει περαιτέρω ερμηνεία των αποτελεσμάτων: αυξημένη τιμή του πηλίκου αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων προς την αφθονία του φυλογενετικού δείκτη 16S rRNA γονιδίου με την πάροδο του πειραματικού χρόνου υποδηλώνει πως είτε επικρατούν οι πληθυσμοί που φέρουν τα γονίδια αυτά είτε, σε περίπτωση που το γονίδιο μεταφέρεται μέσω HGT, η ανθεκτικότητα πιθανότατα εξαπλώνεται στον μικροβιακό πληθυσμό. Από την άλλη, εφόσον το πηλίκο μειώνεται, οι πληθυσμοί που φέρουν τα γονίδια αυτά σταδιακά εξαφανίζονται.

Συνολικά, παρατηρήσαμε μία αυξημένη αφθονία όλων των γονιδίων δεικτών στα δείγματα της κοπριάς και των εδαφών που έλαβαν κοπριά, ενώ δεν παρατηρήσαμε κάποια διαφοροποίηση που να αποδίδεται στην μία και μοναδική εφαρμογή αντιβιοτικών (είτε απ' ευθείας ή μέσω κοπριάς) (Εικόνες 15-20). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ως προς την εφαρμογή της κοπριάς ήταν προφανείς για όλα τα *tet* τόσο στην περίπτωση που αναλύθηκαν οι απόλυτες αφθονίες (Εικόνα 19), όσο και οι σχετικές ως προς το 16S rRNA γονίδιο (Εικόνα 20). Το *tetW* ήταν ο πλέον άφθονος από τους δείκτες και με μεγάλες διαφορές μεταξύ μεταχειρίσεων. Οι χαμηλές τιμές απόλυτης ή σχετικής αφθονίας γονιδίων ανθεκτικότητας που παρατηρήθηκαν σε δείγματα εδαφους χωρίς την εφαρμογή κοπριάς (SW) εξηγούνται από το γεγονός πως στο έδαφος από όπου έγινε η δειγματοληψία δεν εφαρμόζονται αντιβιοτικά σε συχνότητα ή ποσότητα ικανή να προωθήσει την εμφάνιση ή/και εξάπλωση AMR. Από την άλλη, η ισχυρή παρουσία και των τριών *tet* γονιδίων στη σκέτη κοπριά (MB, MA) είναι ιδιαίτερα ανησυχητική, καθώς αν ισχύει η διαβεβαίωση μη χορήγησης κτηνιατρικών αντιβιοτικών στα συγκεκριμένα ζώα, υπάρχουν άλλες οδοί μέσω των οποίων ασκείται εξελικτική πίεση ικανή να διατηρεί τα γονίδια αυτά στο εντερικό μικροβίωμα των χοίρων. Έχουν παρατηρηθεί παρόμοια φαινόμενα ανίχνευσης ARGs (μεταξύ των οποίων τα *tetQ* και *tetW*) σε κοπριά αγελάδων οι οποίες επίσης δεν λάμβαναν αντιβιοτικά, με την εφαρμογή της κοπριάς αυτής να αυξάνει την αφθονία των γονιδίων αυτών στο έδαφος και να επιτρέπει την επικράτηση σε αυτό πληθυσμών που φέρουν το *tetW* έως και 3 εβδομάδες μετά την εφαρμογή κοπριάς (Kyselková et al., 2015).

Συνεπώς, στα δείγματα υπό μελέτη η εφαρμογή της κοπριάς εκθέτει τις κοινότητες του εδάφους σε ανθεκτικούς μικροβιακούς πληθυσμούς οι οποίοι όμως φαίνεται να μην υπερισχύουν και τελικά να εξαφανίζονται, όπως καταδεικνύεται από την σταδιακή μείωση του πηλίκου των *tetM* και *tetW* στο διάστημα των 25 ημερών. Επίσης, δεν φαίνεται να υπάρχουν έντονα φαινόμενα HGT στο χρονικό διάστημα αυτό. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε αντιδιαστολή με την υπόθεση των Armalyte et al. (2019) πως το *tetW* είναι προερχόμενο από το έδαφος, αφού σε αυτή την περίπτωση είναι το αφθονότερο *tet* γονίδιο στην κοπριά, και είναι σαφής η τάση μείωσης των πληθυσμών που το φέρουν στις 25 ημέρες. Επίσης, η εφαρμογή κοπριάς επέφερε στατιστικά σημαντική αύξηση της αφθονίας του *tetM*, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε από τους Katsivelou et al. (2023), αλλά είχε βρεθεί σε προηγούμενες έρευνες (Agersø

& Sandvang, 2005; Ruuskanen et al., 2016) σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες. Η θετική επίδραση συνεχούς, αλλά όχι μοναδιαίας, εφαρμογής τετρακυκλίνης στην εξάπλωση ARGs έχει επίσης μελετηθεί (Schwaiger et al., 2009).

Αξιολογώντας την πιθανή χρησιμότητα των γονιδίων που μελετήθηκαν ως δείκτες αναλύσεων κινδύνου εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη μέσω της εφαρμογής κοπριάς, εκ των τριών *tet* γονιδίων, μόνο για τα *tetM* και *tetW* παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις με βάση τη μεταχείριση (SM/SW). Παρόλο που οι πληθυσμοί που φέρουν το γονίδιο *tetM* φαίνονται περισσότερο επίμονοι σε σχέση με αυτούς που φέρουν το γονίδιο *tetW* κατά την πάροδο του πειραματικού χρόνου, οι υπερβολικά χαμηλές τιμές απόλυτης και κυρίως σχετικής αφθονίας που παρουσίασε το *tetM* το καθιστούν μη ιδανικό δείκτη. Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, το *tetW* προτείνεται ως ο πιο αξιόπιστος δείκτης, αν και όπως ήδη υπογραμμίστηκε οι συνθήκες ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκαν επιφέρουν βελτιστοποίηση ώστε να ελαχιστοποιηθεί η εμφάνιση παραπροϊόντων.

4.1. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Για την αποσαφήνιση, τέλος, των πολυάριθμων παραμέτρων που σχετίζονται με την μελέτη της AMR απαιτείται εκτενής περαιτέρω έρευνα. Η συγκεκριμένη εργασία μπορεί να αποτελέσει έναυσμα για μια σειρά άλλων μελετών: βελτιστοποίηση των συνθηκών ενίσχυσης του *tetW*, ανάλυση της ποικιλότητας του μικροβιώματος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, μελέτη της επίδρασης επαναλαμβανόμενης εφαρμογής τετρακυκλίνης, είτε απευθείας στο έδαφος είτε μέσω επιφορτισμένης κοπριάς, στην αφθονία των γονιδίων-δεικτών, μελέτη της επίδρασης εφαρμογής άλλων πιθανών εστιών ARGs (π.χ. εισροών/εκροών λυμάτων) στο έδαφος, ανάπτυξη ανάλογων περιβαλλοντικών μεθόδων ανίχνευσης περισσότερων γονιδίων ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη ή σε άλλα αντιβιοτικά και μελέτη της αλληλεπίδρασης γονιδίων ανθεκτικότητας και δεικτών HGT. Τέτοιες έρευνες θα επιτρέψουν τη λήψη περισσότερων πληροφοριών ώστε να ξετυλιχτεί το κουβάρι της μικροβιακής αντοχής.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acar, J., & Röstel, B. (2001). Antimicrobial resistance: an overview. *Revista Científica Y Técnica - Oficina Internacional De Epizootias/Scientific and Technical Review - International Office of Epizootics/Revue Scientifique Et Technique - Office International Des Épizooties*, 20(3), 797–810. <https://doi.org/10.20506/rst.20.3.1309>
- Agersø, Y., & Sandvang, D. (2005). Class 1 Integrons and Tetracycline Resistance Genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. Isolated from Pigsties and Manured Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 7941–7947. <https://doi.org/10.1128/aem.71.12.7941-7947.2005>
- Ahmad, F., Zhu, D., & Sun, J. (2021). Environmental fate of tetracycline antibiotics: degradation pathway mechanisms, challenges, and perspectives. *Environmental Sciences Europe*, 33(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00505-y>
- Aminov, R., Garrigues-Jeanjean, N., & Mackie, R. I. (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 22–32. <https://doi.org/10.1128/aem.67.1.22-32.2001>
- Aminov, R. (2010). A Brief history of the Antibiotic Era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. <https://doi.org/10.1136/ebrnurs-2022-103540>
- Armalytė, J., Skerniškytė, J., Bakienė, E., Krasauskas, R., Šiugždinienė, R., Kareivienė, V., Kerzienė, S., Klimienė, I., Sužiedėlienė, E., & Ružauskas, M. (2019). Microbial diversity and antimicrobial resistance profile in microbiota from soils of conventional and organic farming systems. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00892>
- Barmpouni, M., Gordon, J., Miller, R., Dennis, J., Grammelis, V., Rousakis, A., Souliotis, K., Poulakou, G., Daikos, G. L., & Taie, A. (2023). Clinical and Economic Value of Reducing Antimicrobial Resistance in the Management of Hospital-Acquired Infections with Limited Treatment Options in Greece. *Infectious Diseases and Therapy*, 12(7), 1891–1905. <https://doi.org/10.1007/s40121-023-00837-7>
- Bell, B., Schellevis, F. G., Stobberingh, E. E., Goossens, H., & Pringle, M. (2014). A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infectious Diseases*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-13>
- Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., & Larsson, D. G. J. (2017). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(1). <https://doi.org/10.1093/femsre/fux053>
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(5), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>

- Binh, C. T. T., Heuer, H., Kaupenjohann, M., & Smalla, K. (2008). Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 25–37. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00526.x>
- Browne, A. J., Chipeta, M. G., Haines–Woodhouse, G., Kumaran, E. a. P., Hamadani, B. H. K., Zaraa, S., Henry, N. J., Deshpande, A., Reiner, R. C., Day, N., López, A. D., Dunachie, S., Moore, C. E., Stergachis, A., Hay, S. I., & Dolecek, C. (2021). Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *The Lancet, Planetary Health*, 5(12), e893–e904. [https://doi.org/10.1016/s2542-5196\(21\)00280-1](https://doi.org/10.1016/s2542-5196(21)00280-1)
- Calderón C.B., Sabundayo B.P. (2007) Antimicrobial susceptibility testing protocols. In *CRC Press eBooks*. <https://doi.org/10.1201/9781420014495>
- Carvalho, I., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736–757. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>
- D’Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., & Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311(5759), 374–377. <https://doi.org/10.1126/science.1120800>
- Dowling, A. M., O’Dwyer, J., & Adley, C. (2017). Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance. https://www.researchgate.net/publication/317381477_Antibiotics_Mode_of_action_and_mechanisms_of_resistance
- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 49. <https://doi.org/10.2147/idr.s55778>
- Embley, T. M., & Stackebrandt, E. (1994). THE MOLECULAR PHYLOGENY AND SYSTEMATICS OF THE ACTINOMYCETES. *Annual Review of Microbiology*, 48(1), 257–289. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.001353>
- Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*, 4, 90-101.
- European Commission, EC (2021) A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). Source: https://health.ec.europa.eu/publications/european-one-health-action-plan-against-antimicrobial-resistance-amr_en
- European Commission (2022) Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, 2021 data. https://health.ec.europa.eu/publications/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2021-data_en/
- European Medicines Agency, EMA (2020) Categorization of antibiotics used in animals promotes responsible use to protect public and animal health. <https://www.ema.europa.eu/en/news/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-and-animal-health/>
- Gariyban, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gorecki, A., Decewicz, P., Dziurzynski, M., Janeczko, A., Drewniak, L., & Dziewit, L. (2019). Literature-based, manually curated database of PCR primers for the detection of antibiotic resistance genes in various environments. *Water Research*, 161, 211-221. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.009>

- Heuer, H., Schmitt, H., & Smalla, K. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.009>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019a). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Iskandar, K., Murugaiyan, J., Halat, D. H., Hage, S. E., Chibabhai, V., Adukkadukkam, S., Roques, C., Molinier, L., Salameh, P., & Van Dongen, M. (2022). Antibiotic discovery and Resistance: The Chase and the Race. *Antibiotics*, 11(2), 182. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020182>
- Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., & Smalla, K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, 22(9), 536–545. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>
- 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. *The Science of the Total Environment*, 893, 164817. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164817>
- Köninger, J., Lugato, E., Panagos, P., Kochupillai, M., Orgiazzi, A., & Briones, M. J. I. (2021). Manure management and soil biodiversity: Towards more sustainable food systems in the EU. *Agricultural Systems*, 194, 103251. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2021.103251>
- Kovalakova, P., Cizmas, L., McDonald, T. J., Maršálek, B., Feng, M., & Sharma, V. K. (2020). Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. *Chemosphere*, 251, 126351. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351>
- Kowalska-Krochmal B., Dudek-Wicher R. (2021) The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*. 10(2):165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Kumar, M., Jaiswal, S., Sodhi, K. K., Shree, P., Singh, D. K., Agrawal, P. K., & Shukla, P. (2019). Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. *Environment International*, 124, 448–461. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.065>
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*, 75(4), 417–434. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
- Kyselková, M., Kotrbová, L., Gamonsiri Bhumibhamon, Chroňáková, A., Jiří Jirout, Naděžda Vrchotová, Schmitt, H., & Elhottová, D. (2015). Tetracycline resistance genes persist in soil amended with cattle feces independently from chlortetracycline selection pressure. *Soil Biology & Biochemistry*, 81, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.11.018>
- Lee, J., Jeon, J. H., Shin, J., Jang, H. M., Kim, S., Song, M. S., & Kim, Y. M. (2017a) Quantitative and qualitative changes in antibiotic resistance genes after passing through treatment processes in municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 605–606, 906–914. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.250>

- Lee, J., Shin, S. G., Jang, H. M., Kim, Y. B., Lee, J., & Kim, Y. M. (2017b). Characterization of antibiotic resistance genes in representative organic solid wastes: Food waste- recycling wastewater, manure, and sewage sludge. *Science of the Total Environment*, 579, 1692–1698. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.187>
- Leichtweis, J., Vieira, Y., Welter, N., Silvestri, S., Dotto, G. L., & Carissimi, É. (2022). A review of the occurrence, disposal, determination, toxicity and remediation technologies of the tetracycline antibiotic. *Process Safety and Environmental Protection/Transactions of the Institution of Chemical Engineer*, 160, 25–40. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.01.085>
- Lerner, H., & Berg, C. (2015). The concept of health in One Health and some practical implications for research and education: what is One Health? *Infection Ecology & Epidemiology*, 5(1), 25300. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.25300>
- Li, B., Yang, Y., Ma, L., Ju, F., Guo, F., Tiedje, J. M., & Zhang, T. (2015). Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *The ISME Journal*, 9(11), 2490–2502. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.59>
- Liguori, K., Keenum, I., Davis, B. C., Calarco, J., Milligan, E., Harwood, V. J., & Pruden, A. (2022). Antimicrobial Resistance Monitoring of Water Environments: A framework for Standardized methods and quality control. *Environmental Science & Technology*, 56(13), 9149–9160. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08918>
- Mak, S., Xu, Y., & Nodwell, J. R. (2014). The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria. *Molecular Microbiology*, 93(3), 391–402. <https://doi.org/10.1111/mmi.12689>
- Manzetti, S., & Ghisi, R. (2014). The environmental release and fate of antibiotics. *Marine Pollution Bulletin*, 79(1–2), 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.005>
- Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., Hou, J., Mu, Q., & Alvarez, P. J. J. (2015). Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 85, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.010>
- Markley, J. L., & Wencewicz, T. A. (2018). Tetracycline-Inactivating enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01058>
- McMurry, L. M., Petrucci, R., & 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>
- Mediterranean EUWI Wastewater Reuse Working Group (2007) Mediterranean Wastewater Reuse Report. Source: <https://docest.com/mediterranean-wastewater-reuse-report>
- Melander, R. J., Zurawski, D. V., & Melander, C. (2018). Narrow-spectrum antibacterial agents. *MedChemComm*, 9(1), 12–21. <https://doi.org/10.1039/c7md00528h>
- Michaelis, C., & Grohmann, E. (2023). Horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in biofilms. *Antibiotics*, 12(2), 328. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020328>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. In *ASM Press eBooks* (pp. 481–511). <https://doi.org/10.1128/9781555819286.ch17>

- Nikaido, H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 119–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>
- 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>
- Perry, J., Wagglechner, N., & Wright, G. D. (2016). The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), a025197. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025197>
- Peterson, E. A., & Kaur, P. (2018b). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
- Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy M.C., Michael I., Fatta- Kassinos D. (2013) Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment*, 447, 345–360
- Ruuskanen, M., Muurinen, J., Meierjohan, A., Pärnänen, K., Tamminen, M., Lyra, C., Kronberg, L., & Virta, M. (2016). Fertilizing with Animal Manure Disseminates Antibiotic Resistance Genes to the Farm Environment. *Journal of Environment Quality*, 45(2), 488. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.05.0250>
- Santos, L. H., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., & Montenegro, M. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, 461–462, 302–316. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077>
- Sazykin, I. C., Khmelevtsova, L., Seliverstova, E. Y., & Sazykina, M. A. (2021). Effect of antibiotics used in animal husbandry on the distribution of bacterial drug resistance (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 57(1), 20–30. <https://doi.org/10.1134/s0003683821010166>
- Schmerold, I., Van Geijlswijk, I. M., & Gehring, R. (2023). European regulations on the use of antibiotics in veterinary medicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 189, 106473. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106473>
- Schwaiger, K., Harms, K., Hölzel, C., Meyer, K., Karl, M., & Bauer, J. (2009). Tetracycline in liquid manure selects for co-occurrence of the resistance genes tet(M) and tet(L) in *Enterococcus faecalis*. *Veterinary Microbiology*, 139(3-4), 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.005>
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology/FEMS Microbiology, Ecology*, 67(1), 6–20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>
- Spielmeyer, A. (2018). Occurrence and fate of antibiotics in manure during manure treatments: A short review. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 9, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.06.004>
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., & Ploy, M.-C. (2012). Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>

- Stokes, H. W., & Hall, R. M. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology*, 3(12), 1669–1683. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00153.x>
- Tyc, O., Cui, S., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2017b). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends in Microbiology*, 25(4), 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>
- Van Boeckel, T., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. B., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Van Gompel, L., Luiken, R. E. C., Sarrazin, S., Munk, P., Knudsen, B. E., Hansen, R. B., Bossers, A., Aarestrup, F. M., Dewulf, J., Wagenaar, J. A., Mevius, D. J., Schmitt, H., Heederik, D. J. J., Dorado-García, A., & Smit, L. A. M. (2019). The antimicrobial resistome in relation to antimicrobial use and biosecurity in pig farming, a metagenome-wide association study in nine European countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(4), 865–876. <https://doi.org/10.1093/jac/dky518>
- Ventola C.L. (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*, 40(4), 277-83. PMID: 25859123; PMCID: PMC4378521
- Wilson, D. N. (2013). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>
- World Health Organization: WHO (2017) Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>
- World Health Organization (2022) One health. Source: <https://www.who.int/health-topics/one-health/>
- World Health Organization: WHO. (2023, November 21). Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Yin, X., Chen, X., Jiang, X., Yang, Y., Li, B., Shum, M. H., Lam, T. T. Y., Leung, G. M., Rose, J., Sanchez-Cid, C., Vogel, T. M., Walsh, F., Berendonk, T. U., Midega, J., Uchea, C., Frigon, D., Wright, G. D., Bezuidenhout, C., Picão, R. C., Zhang, T. (2023). Toward a universal unit for quantification of antibiotic resistance genes in environmental samples. *Environmental Science & Technology*, 57(26), 9713–9721. <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c00159>
- Zheng, D., Yin, G., Liu, M., Hou, L., Yang, Y., Van Boeckel, T. P., Zheng, Y., & Li, Y. (2022). Global biogeography and projection of soil antibiotic resistance genes. *Science Advances*, 8(46). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq8015>
- Zhu, Y.-G., Johnson, T. A., Su, J.-Q., Qiao, M., Guo, G.-X., Stedtfeld, R. D., Hashsham, S. A., & Tiedje, J. M. (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), 3435–3440. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>
- Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B. A., & Leung, K.Y. (2021). Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*, 285, 117402. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

6.1. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I: Εκκινητές

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Λίστα εκκινητών

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'-3')*	Στόχος	Μήκος στόχου (bp)
338f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	<i>Βακτηριακή V3 περιοχή του γονιδίου 16S rRNA</i>	193
518r	ATTACCGCGGCTGCTGG		
HS463aF	CTGGATTTCGATCACGGCACG	<i>Intl1</i>	473
HS464R	ACATGCGTGTAATCATCGTCG		
tetM_1	ACAGAAAGCTTATTATATAAC	<i>tetM</i>	171
	TGGCGTGTCTATGATGTTTAC		
tetQ	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG	<i>tetQ</i>	169
	CGGAGTGTCAATGATATTGCA		
tetW	GTCGAAAAAGGGACAACGAG	<i>tetW</i>	172
	CTAAAACAGCCAAAGAGCGG		

* Για κάθε ζεύγος εκκινητών, η πρώτη αλληλουχία της δεύτερης στήλης αντιστοιχεί στον πρόσθιο εκκινητή, ενώ η δεύτερη στον ανάστροφο εκκινητή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Συνθήκες PCR/qPCR για κάθε ζεύγος εκκινητών

Εκκινητές	Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή	Παραπομπή
338f 518r	95°C για 5 min ή 3 min, 95°C για 15 s, 62°C για 20 s, 72°C για 30 s (35 cycles) 72°C για 2 min ή 65-95 °C για 5 sec	Muyzer et al., 1993
HS463aF HS464R	95°C για 5 min ή 3 min 95°C για 30 s, 62°C για 30 s, 72°C για 60 s (40 κύκλοι) 72°C για 2 min 65-95 °C για 5 sec	Hardwick et al., 2008
tetM_1	95°C για 5 min ή 3 min 95°C για 5 s, 49°C για 30 s (45 κύκλοι) 72°C για 2 min ή 65-95 °C για 5 sec	Koike et al., 2007
tetQ	95°C για 5 min ή 3 min 95°C για 10 s, 63°C για 30 s (40 κύκλοι) 72°C για 2 min ή 65-95 °C για 5 sec	Huang et al., 2017
tetW	95°C για 5 min ή 3 min 95°C για 10 s, 60°C για 20 s, 72°C για 10 s (35 cycles) 72°C για 2 min ή 65-95 °C για 5 sec	Szczepanowski et al., 2009 (με τροποποιήσεις)

6.2. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II: Θρεπτικά και δεδομένα κλωνοποίησης

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: LB medium

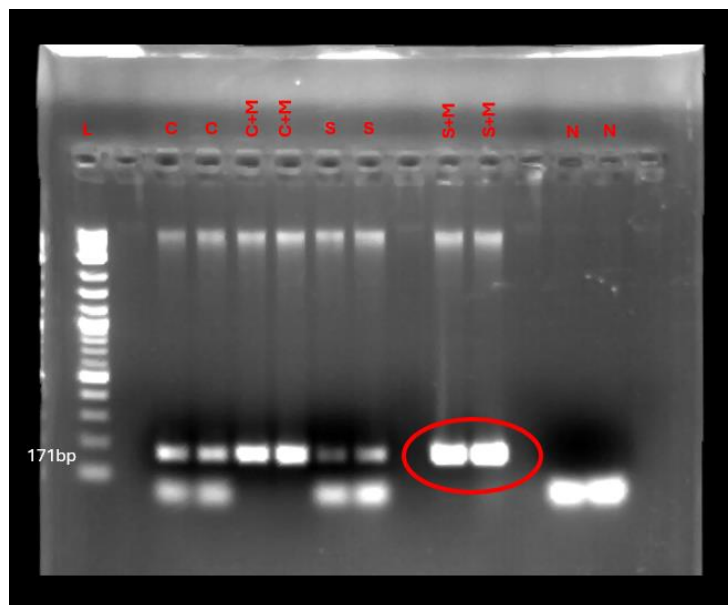
LB medium (50 ml)	
Tryptone	0.5 gr
Yeast extract	0.25 gr
NaCl	0.5 gr

Σημείωση: Απαιτείται αποστείρωση του θρεπτικού μετά την παρασκευή του.

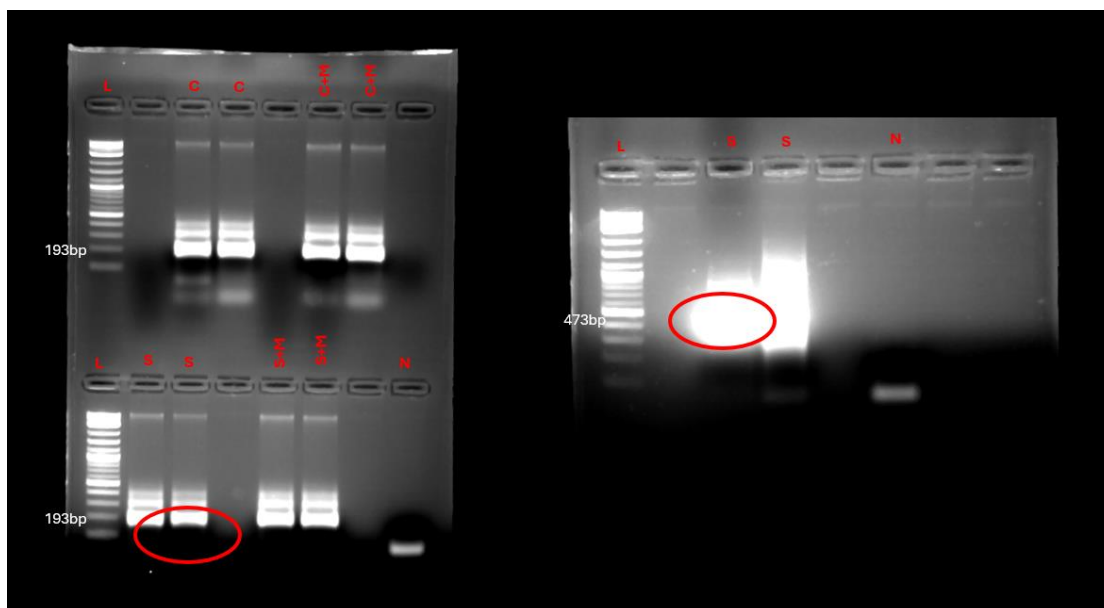
ΠΙΝΑΚΑΣ 10: LB agar

LB agar (200 mL)	
Tryptone	2 gr
Yeast extract	1 gr
NaCl	2 gr
Agar (bacteriological)	3 gr
Carbenicillin	200 µL

Σημείωση: Η καρβενικιλίνη προστίθεται μετά το πέρας της αποστείρωσης και αφού η θερμοκρασία του άγαρ έχει μειωθεί.



ΕΙΚΟΝΑ 21: Gel ηλεκτροφόρησης *tetM*. Με κόκκινο κύκλο φαίνεται το σημείο από όπου έγινε gel extraction. Οι συντομογραφίες αναφέρονται σε παλαιότερα δείγματα τα οποία αξιοποιήθηκαν για τη δοκιμή των εκκινητών. C: control, σκέτο έδαφος, C + M: έδαφος με κοπριά, S: έδαφος με αντιβιοτικό σουλφομεθοξαζόλη (sulfomethoxazole, SMX), S + M: έδαφος με κοπριά στην οποία έχει εφαρμοστεί SMX, L: 1kb plus Ladder, N: αρνητικός μάρτυρας.



ΕΙΚΟΝΑ 22: Gel ηλεκτροφόρησης 16S rRNA (αριστερά) και *intI1* (δεξιά). Με κόκκινο κύκλο φαίνεται το σημείο από όπου έγινε gel extraction. Οι συντομογραφίες αναφέρονται σε παλαιότερα δείγματα τα οποία αξιοποιήθηκαν για τη δοκιμή των εκκινητών. C: control, σκέτο έδαφος, C + M: έδαφος με κοπριά, S: έδαφος με αντιβιοτικό σουλφομεθοξαζόλη (sulfomethoxazole, SMX), S + M: έδαφος με κοπριά στην οποία έχει εφαρμοστεί SMX, L: 1kb plus Ladder, N: αρνητικός μάρτυρας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Αποτελέσματα Nanodrop από gel extraction

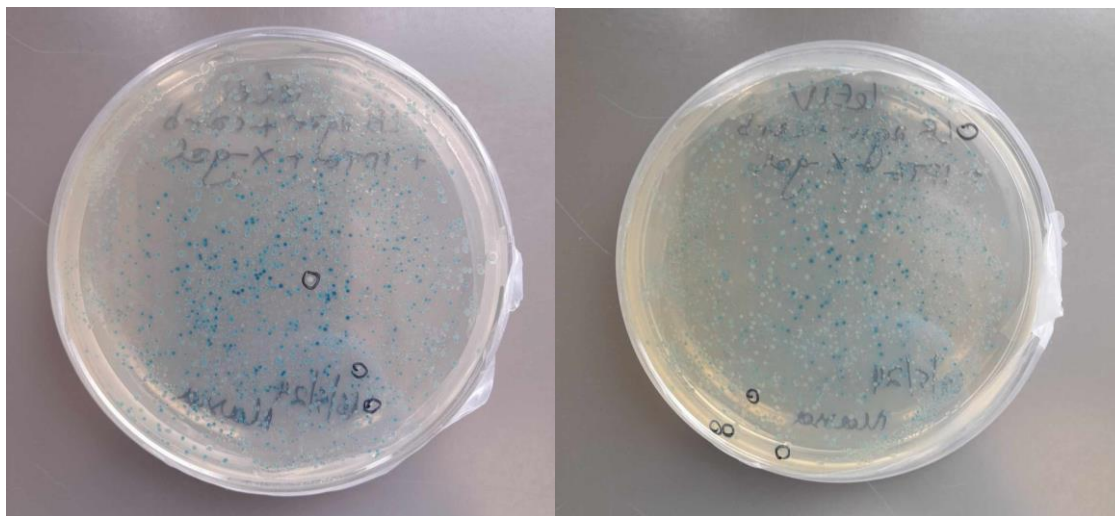
Γονίδιο	A260/A280	ng/μL
tetM	1,85	15,5
tetQ	1,87	31,3
tetW	1,87	49,5
intI1	1,80	48,5
16S	1,73	29,1

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: Υπολογισμοί ποσότητας ενθέματος για κάθε γονίδιο

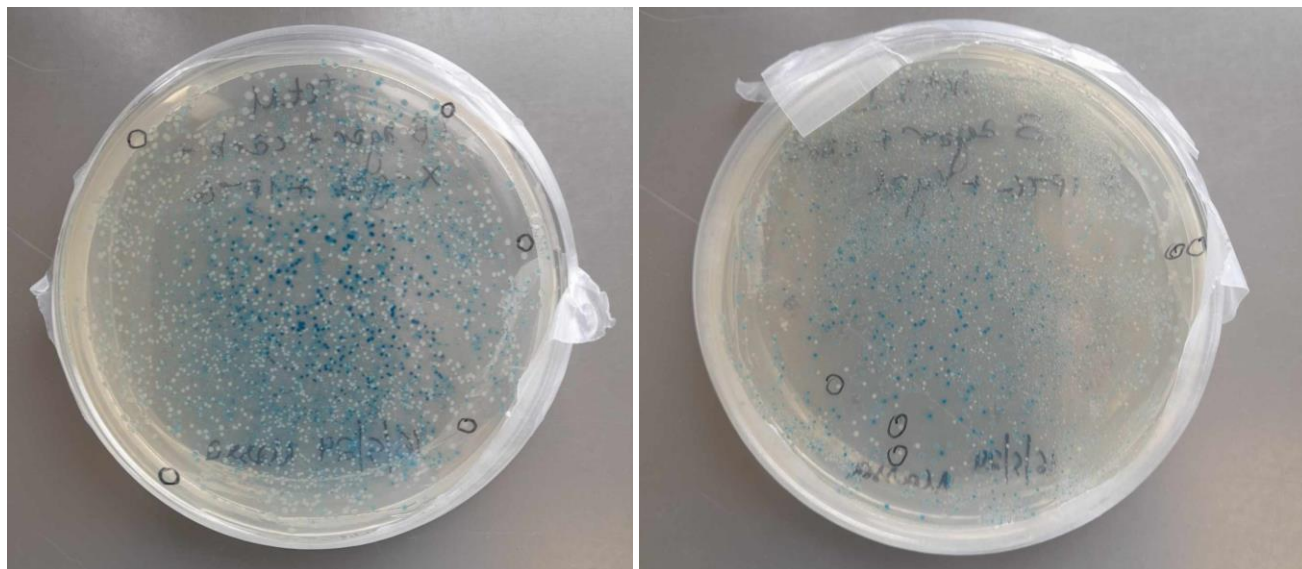
Γονίδιο	Ποσότητα φορέα (ng)	Μέγεθος φορέα (kb)	Μέγεθος ενθέματος (kb)	Μοριακή αναλογία	Ποσότητα ενθέματος (ng)
tetM	50	3	0.171	8	22.8
tetQ	50	3	0.169	8	22.5
tetW	50	3	0.172	8	22.9
intI1	50	3	0.473	6	47.3
16S	50	3	0.193	8	25.7

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Ποσότητες προϊόντος PCR και ddH₂O για την αντίδραση του ligation ανά γονίδιο

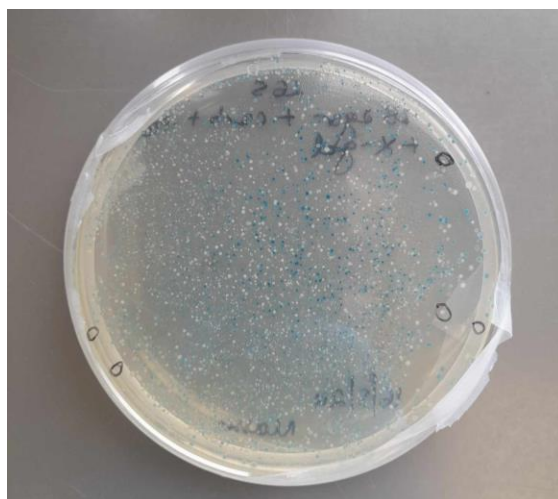
Γονίδιο	Προϊόν PCR (μL)	ddH ₂ O (μL)
tetM	2,1	0,9
tetQ	1,0	2,0
tetW	2,3	0,7
intI1	1,4	1,6
16S	1,3	1,7



Εικόνα 23: Τρυβλίο LB agar + carbenicillin + IPTG + X-gal για τα *tetQ* (αριστερά) και *tetW* (δεξιά). Κυκλωμένες φαίνονται οι επιλεγμένες λευκές αποικίες.



Εικόνα 24: Τρυβλίο LB agar + carbenicillin + IPTG + X-gal για τα *tetM* (αριστερά) και *intI1* (δεξιά). Κυκλωμένες φαίνονται οι επιλεγμένες λευκές αποικίες.



Εικόνα 25: Τρυβλίο LB agar + carbenicillin + IPTG + X-gal για τα 16S rRNA γονίδιο. Κυκλωμένες φαίνονται οι επιλεγμένες λευκές αποικίες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 14: Αποτελέσματα Nanodrop από plasmid extraction

Γονίδιο	Αποικία	A260/A280	ng/μL	Αντίγραφα πλασμιδίων
16S	1	1,72	166,9	$4,76 \cdot 10^{10}$
	2	1,80	613,9	$1,75 \cdot 10^{11}$
	3	1,80	408,7	$1,16 \cdot 10^{11}$
	4	1,80	155,6	$4,44 \cdot 10^{10}$
<i>tetQ</i>	1	1,78	1038,8	$2,99 \cdot 10^{11}$
	2	1,81	1037,6	$2,98 \cdot 10^{11}$
	3	1,81	91,6	$2,64 \cdot 10^{10}$
	4	1,81	745,2	$2,14 \cdot 10^{11}$
<i>tetW</i>	1	1,78	173,0	$4,97 \cdot 10^{10}$
	2	1,79	916,2	$2,63 \cdot 10^{11}$
	3	1,79	121,9	$3,50 \cdot 10^{10}$
	4	1,80	966,5	$2,77 \cdot 10^{11}$
<i>intI1</i>	1	1,80	270,8	$7,11 \cdot 10^{10}$
	2	1,80	508,8	$1,33 \cdot 10^{11}$
	3	1,80	840,9	$2,20 \cdot 10^{11}$
	4	1,80	391,6	$1,02 \cdot 10^{11}$
<i>tetM</i>	1	1,81	375,9	$1,08 \cdot 10^{11}$
	2	1,80	428,5	$1,23 \cdot 10^{11}$
	3	1,80	352,2	$1,01 \cdot 10^{10}$

6.3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ: Χειρισμοί εδαφών

ΠΙΝΑΚΑΣ 15: Ιδιότητες εδάφους (Perruchon et al., 2022)

Έδαφος	pH	Περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (%)	Άμμος (%)	Ιλύς (%)	Πηλός (%)
Πανεπιστημίου	8.8	0.60	37.64	26.0	36.36

ΠΙΝΑΚΑΣ 16: Μέτρηση υγρασίας εδάφους και κοπριάς

Επανάληψη	Αλουμινόχαρτο (gr)	W ₁ (gr) [χωρίς αλουμινόχαρτο]	W ₂ (gr)	W ₂ - αλουμινόχαρτο (gr)	MC (%)
Έδαφος					
A	0.21	5	4.95	4.74	5.20
B	0.23	4.97	4.71	4.48	9.86
C	0.27	4.99	4.7	4.43	11.22
Μέσος όρος MC (%): 8.76					
Κοπριά					
A	0.19	5	1.47	1.28	74.40

ΠΙΝΑΚΑΣ 17: Μέτρηση WHC εδάφους

Επανάληψη	B (gr)	X (gr)	W ₁ (gr)	W ₂ (gr)	WHC (%)
A	20	18.96	199.6	213.88	76.36
B	20	18.028	188.8	201.76	73.86
C	20	18.248	185.9	199.04	73.76
Μέσος όρος WHC (%): 74.66					
30% WHC: 22.40					

6.4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV: DNA extraction

ΠΙΝΑΚΑΣ 18: Μετρήσεις Qubit για DNA δειγμάτων εδάφους

Αριθμός δείγματος	ID δείγματος	Συγκέντρωση Qubit (ng/μL)
001	001_01SW_NO_000_000_1	50.2
002	002_01SW_NO_000_000_2	25.2
003	003_01SW_NO_000_000_3	45.7
004	004_01SW_NO_000_000_4	38.5
005	005_01SW_NO_000_000_5	38.8
006	006_01SW_NO_000_005_1	33.7
007	007_01SW_NO_000_005_2	35.6
008	008_01SW_NO_000_005_3	13.9

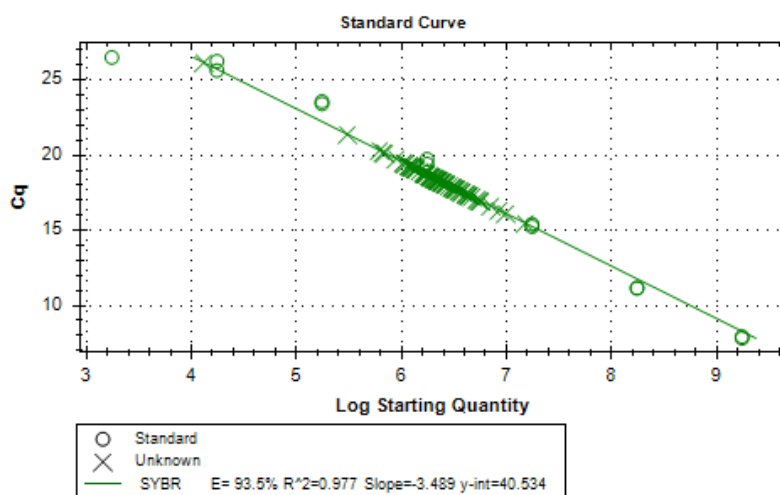
009	009_01SW_NO_000_005_4	16
010	010_01SW_NO_000_005_5	40.9
011	011_01SW_NO_000_010_1	26.9
012	012_01SW_NO_000_010_2	19.5
013	013_01SW_NO_000_010_3	49.2
014	014_01SW_NO_000_010_4	36.5
015	015_01SW_NO_000_010_5	40.1
016	016_01SW_NO_000_040_1	26.2
017	017_01SW_NO_000_040_2	34.7
018	018_01SW_NO_000_040_3	31.7
019	019_01SW_NO_000_040_4	26.8
020	020_01SW_NO_000_040_5	34.1
021	021_01SW_NO_000_250_1	47.8
022	022_01SW_NO_000_250_2	38.4
023	023_01SW_NO_000_250_3	32.1
024	024_01SW_NO_000_250_4	35.5
025	025_01SW_NO_000_250_5	33.8
026	026_01SW_TC_025_000_1	17.3
027	027_01SW_TC_025_000_2	42
028	028_01SW_TC_025_000_3	16.7
029	029_01SW_TC_025_000_4	46.7
030	030_01SW_TC_025_000_5	42.3
031	031_01SW_TC_025_005_1	39.1
032	032_01SW_TC_025_005_2	36.7
033	033_01SW_TC_025_005_3	32.2
034	034_01SW_TC_025_005_4	36.3
035	035_01SW_TC_025_005_5	35.4
036	036_01SW_TC_025_010_1	37.1
037	037_01SW_TC_025_010_2	15.7
038	038_01SW_TC_025_010_3	56.3
039	039_01SW_TC_025_010_4	46.3
040	040_01SW_TC_025_010_5	30.4
041	041_01SW_TC_025_040_1	29.3
042	042_01SW_TC_025_040_2	25.9
043	043_01SW_TC_025_040_3	34.4
044	044_01SW_TC_025_040_4	30.1
045	045_01SW_TC_025_040_5	26.5
046	046_01SW_TC_025_250_1	35.1
047	047_01SW_TC_025_250_2	34.4
048	048_01SW_TC_025_250_3	34.3
049	049_01SW_TC_025_250_4	32.3

050	050_01SW_TC_025_250_5	26.1
341	341_06MB_NO_000_000_1	31.4
342	342_06MB_NO_000_000_2	27.7
343	343_06MB_NO_000_000_3	34.3
344	344_06MB_NO_000_000_4	49.2
345	345_06MB_NO_000_000_5	27.1
346	346_06MB_TC_025_000_1	27
347	347_06MB_TC_025_000_2	25
348	348_06MB_TC_025_000_3	23.2
349	349_06MB_TC_025_000_4	25.2
350	350_06MB_TC_025_000_5	23.3
361	361_07MA_NO_000_000_1	27.8
362	362_07MA_NO_000_000_2	29.4
363	363_07MA_NO_000_000_3	31.2
364	364_07MA_NO_000_000_4	39.7
365	365_07MA_NO_000_000_5	26
366	366_07MA_TC_025_000_1	26.3
367	367_07MA_TC_025_000_2	28.2
368	368_07MA_TC_025_000_3	27.1
369	369_07MA_TC_025_000_4	27
370	370_07MA_TC_025_000_5	33.2
381	381_08SM_NO_000_000_1	40.2
382	382_08SM_NO_000_000_2	40.4
383	383_08SM_NO_000_000_3	30.2
384	384_08SM_NO_000_000_4	42.5
385	385_08SM_NO_000_000_5	30.5
386	386_08SM_NO_000_005_1	38.8
387	387_08SM_NO_000_005_2	40.3
388	388_08SM_NO_000_005_3	32.5
389	389_08SM_NO_000_005_4	40.5
390	390_08SM_NO_000_005_5	38.3
391	391_08SM_NO_000_010_1	33.1
392	392_08SM_NO_000_010_2	31.6
393	393_08SM_NO_000_010_3	42.3
394	394_08SM_NO_000_010_4	34
395	395_08SM_NO_000_010_5	25.7
396	396_08SM_NO_000_040_1	48.6
397	397_08SM_NO_000_040_2	49.9
398	398_08SM_NO_000_040_3	31.7
399	399_08SM_NO_000_040_4	45.1
400	400_08SM_NO_000_040_5	37.4

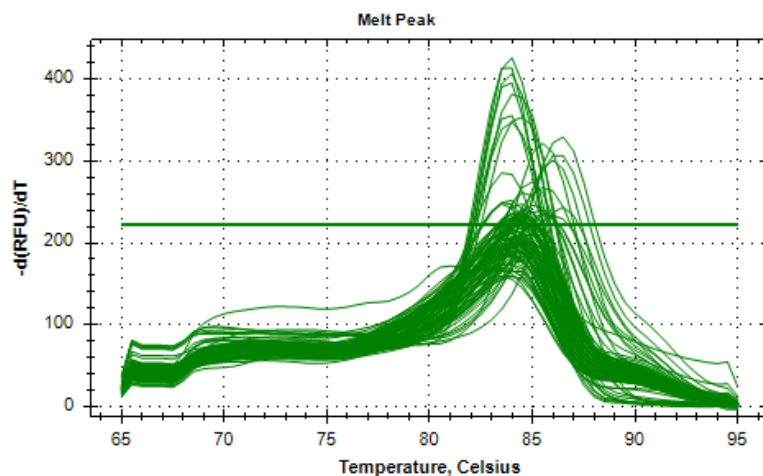
401	401_08SM_NO_000_250_1	39.4
402	402_08SM_NO_000_250_2	46.5
403	403_08SM_NO_000_250_3	52.1
404	404_08SM_NO_000_250_4	52.2
405	405_08SM_NO_000_250_5	11.4
406	406_08SM_TC_025_000_1	46.3
407	407_08SM_TC_025_000_2	60.1
408	408_08SM_TC_025_000_3	38.1
409	409_08SM_TC_025_000_4	53.7
410	410_08SM_TC_025_000_5	25.5
411	411_08SM_TC_025_005_1	38.1
412	412_08SM_TC_025_005_2	32
413	413_08SM_TC_025_005_3	37.5
414	414_08SM_TC_025_005_4	34.4
415	415_08SM_TC_025_005_5	41.5
416	416_08SM_TC_025_010_1	36
417	417_08SM_TC_025_010_2	32
418	418_08SM_TC_025_010_3	11.9
419	419_08SM_TC_025_010_4	36.3
420	420_08SM_TC_025_010_5	31.6
421	421_08SM_TC_025_040_1	40.5
422	422_08SM_TC_025_040_2	49.8
423	423_08SM_TC_025_040_3	44.5
424	424_08SM_TC_025_040_4	39.8
425	425_08SM_TC_025_040_5	43.7
426	426_08SM_TC_025_250_1	20.8
427	427_08SM_TC_025_250_2	52.5
428	428_08SM_TC_025_250_3	39.4
429	429_08SM_TC_025_250_4	73.6
430	430_08SM_TC_025_250_5	37

6.5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V: Δεδομένα qPCR

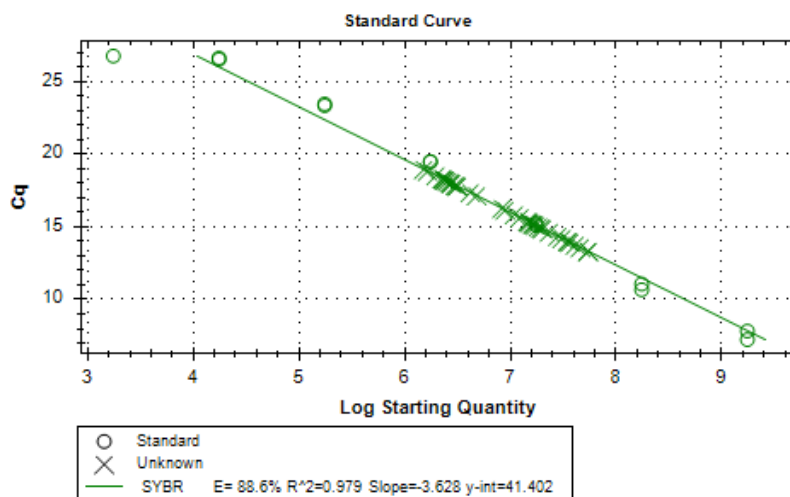
Κατά την αντίδραση της qPCR, τα δείγματα χωρίστηκαν σε δύο πιάτα: Το «πιάτο 1» περιλάμβανε τα δείγματα όλων των μεταχειρίσεων SW και SM για τα time points 0 ώρες, 12 ώρες, 24 ώρες και 4 μέρες (001-005, 026-030, 381-385, 406-410, 006-010, 031-035, 386-390, 411-415, 011-015, 036-040, 391-395, 416-420, 016-020.041-045, 396-400, 421-425). Το «πιάτο 2» περιλάμβανε τα δείγματα όλων των μεταχειρίσεων SW και SM για το time point 25 μέρες, και το σύνολο των μεταχειρίσεων MB και MA (021-025, 046-050, 401-405, 426-430, 341-350, 361-370). Αυτό το παράρτημα περιλαμβάνει τις πρότυπες καμπύλες, το melt curve και τα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων για κάθε γονίδιο. Στα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης, «NTC» είναι οι αρνητικοί μάρτυρες, «STD» είναι οι αραιώσεις της πρότυπης καμπύλης και τα νούμερα των δειγμάτων είναι τα ίδια που χρησιμοποιούνται στον Πίνακα 18.



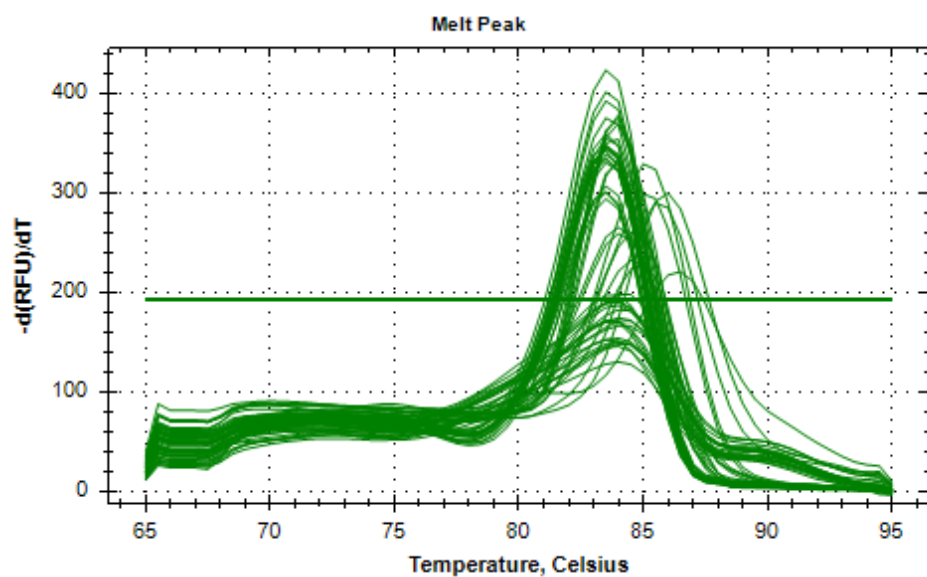
EIKONA 26: Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων (πίατο 1) για το γονίδιο 16S.



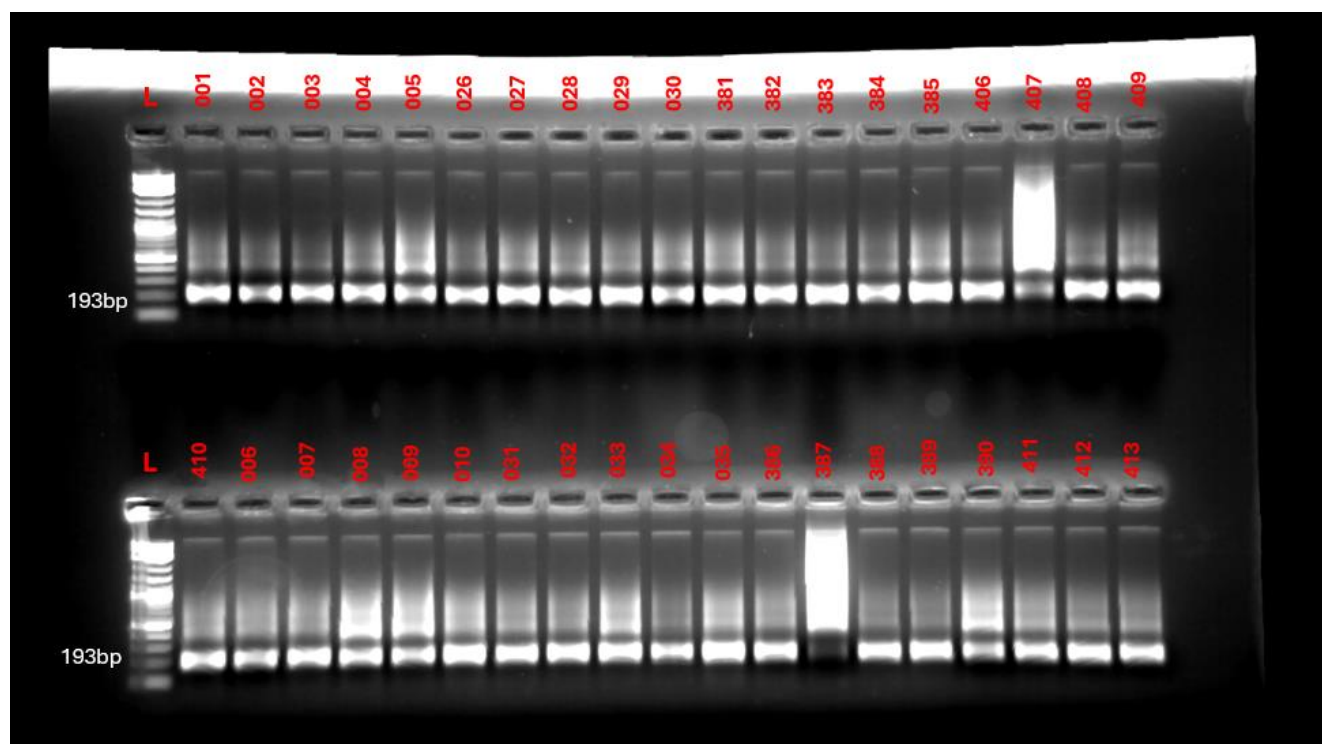
EIKONA 27: Melt curve των δειγμάτων (πίατο 1) για το γονίδιο 16S.



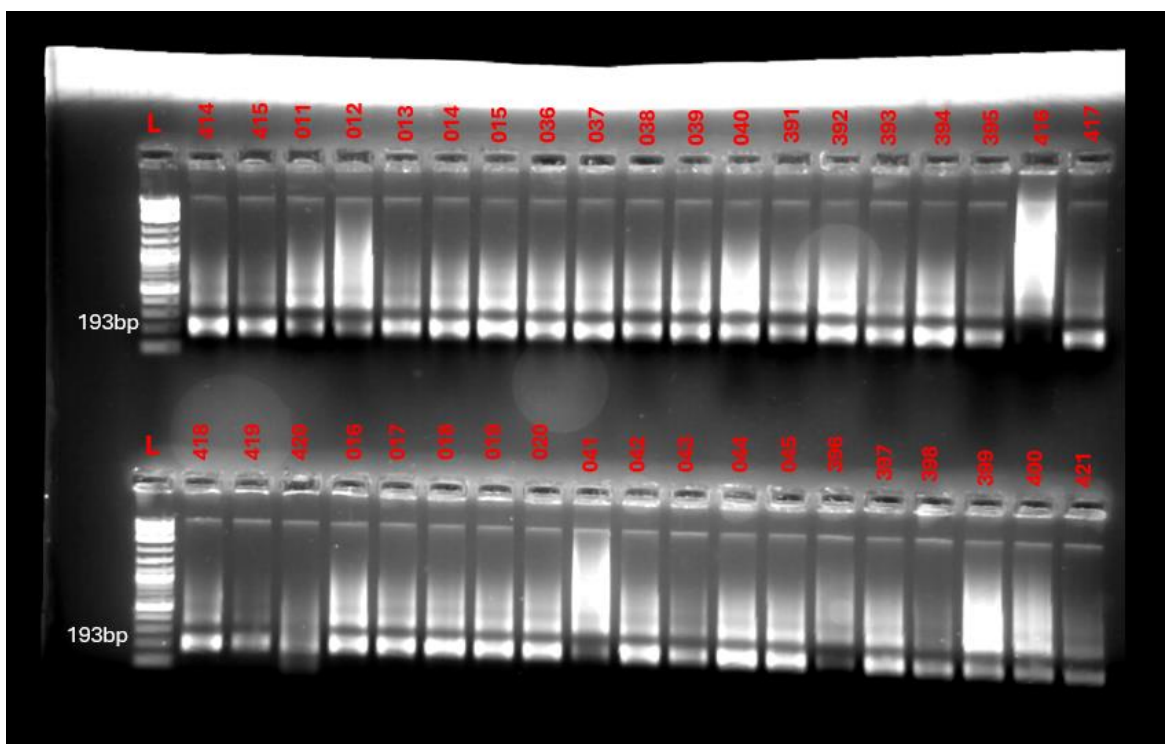
EIKONA 28: Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων (πίατο 2) για το γονίδιο 16S.



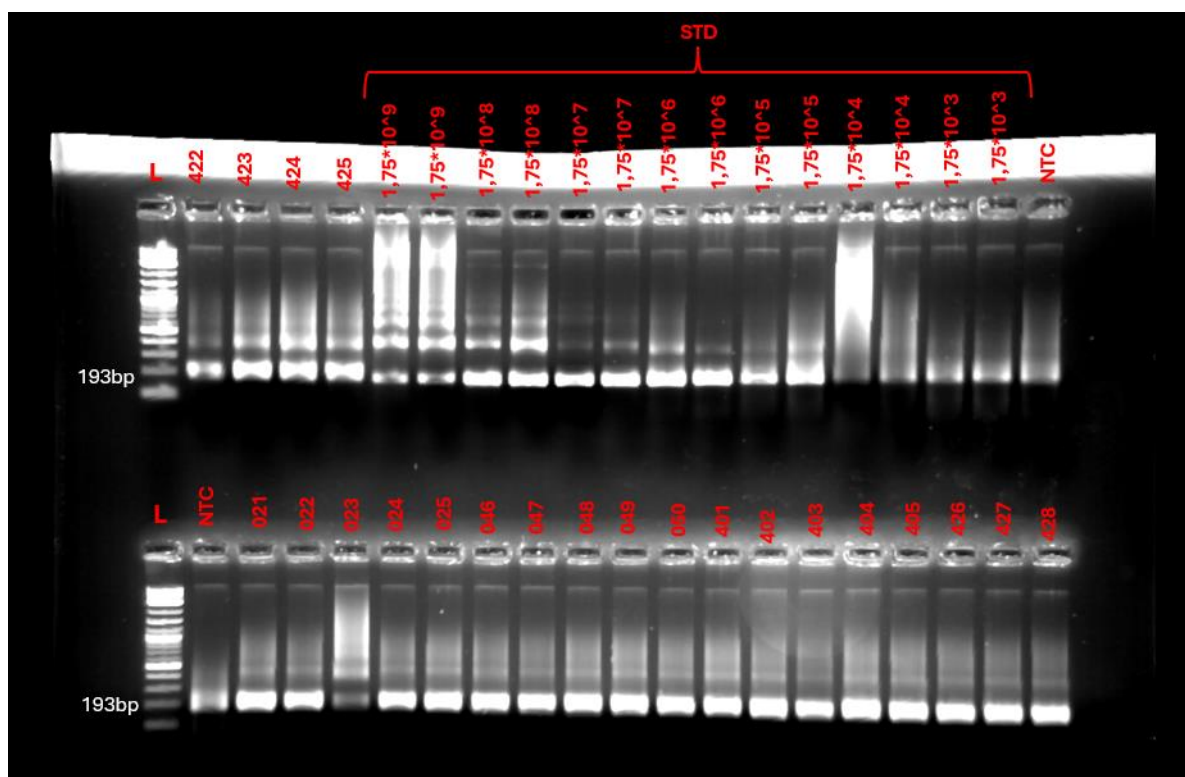
ΕΙΚΟΝΑ 29: Melt curve των δειγμάτων (πίατο 2) για το γονίδιο 16S.



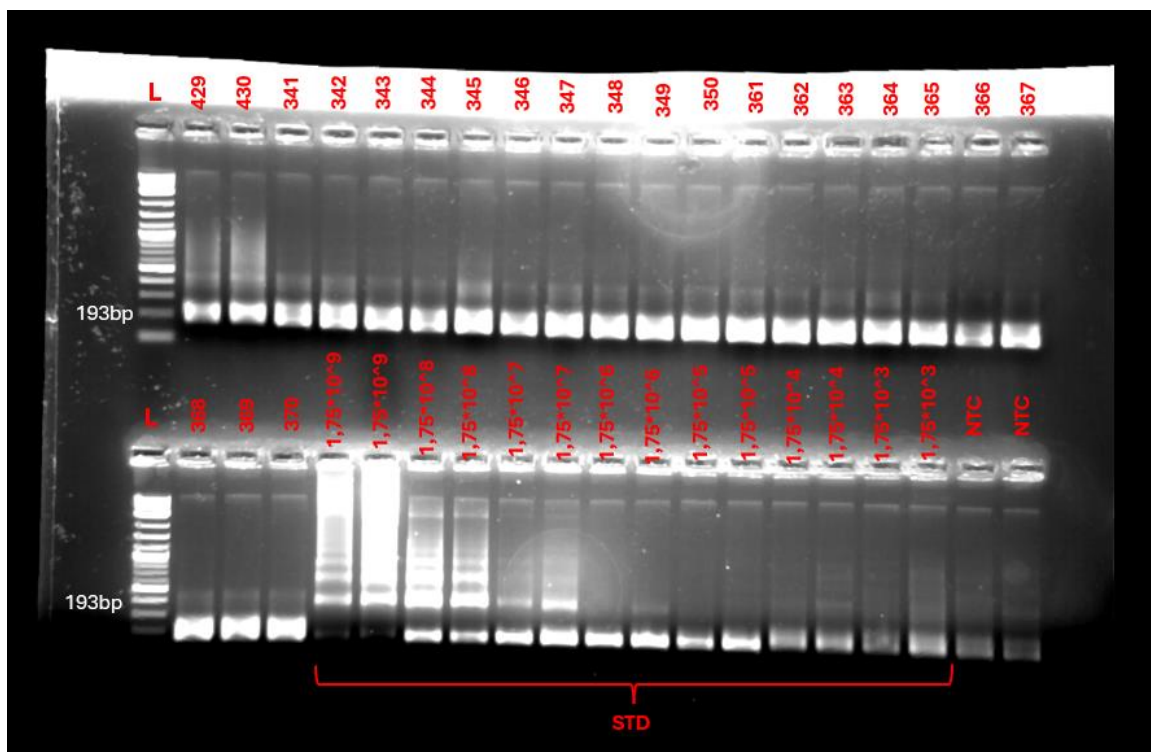
ΕΙΚΟΝΑ 30: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο 16S, μέρος 1^ο.



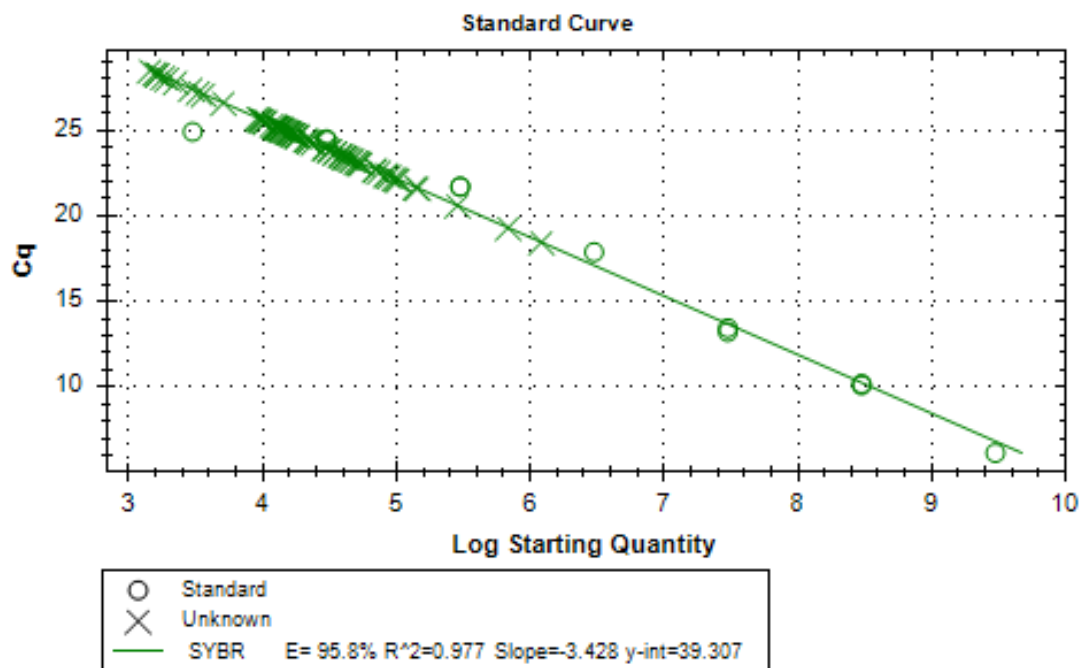
ΕΙΚΟΝΑ 31: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο 16S, μέρος 2°.



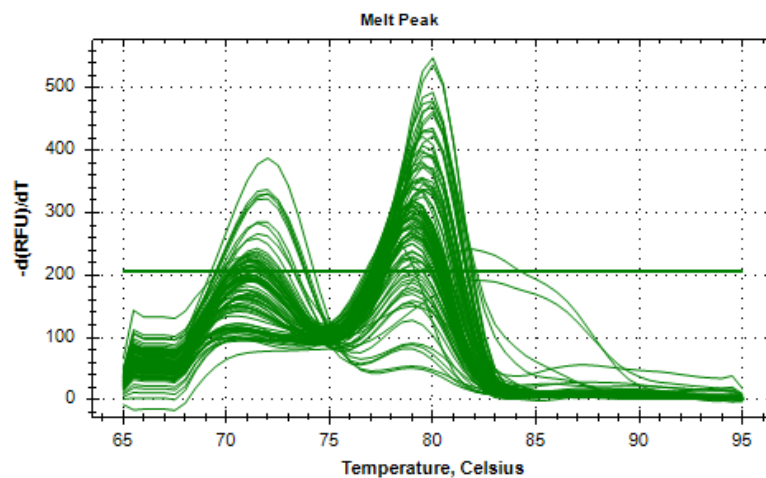
ΕΙΚΟΝΑ 32: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο 16S, μέρος 3°.



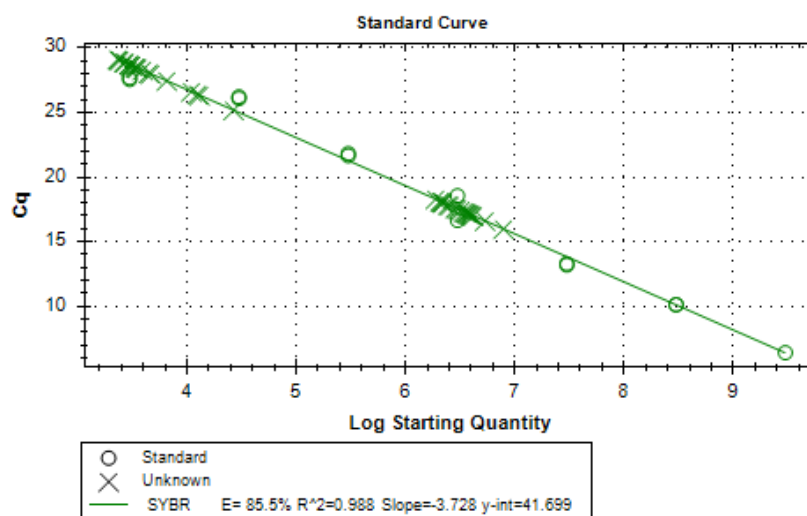
EIKONA 33: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο 16S, μέρος 4°.



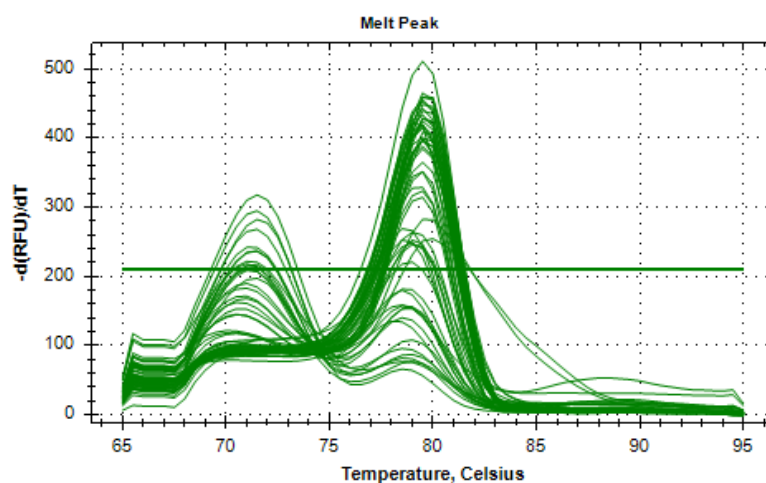
EIKONA 34: Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων (πίατο 1) για το γονίδιο *tetQ*.



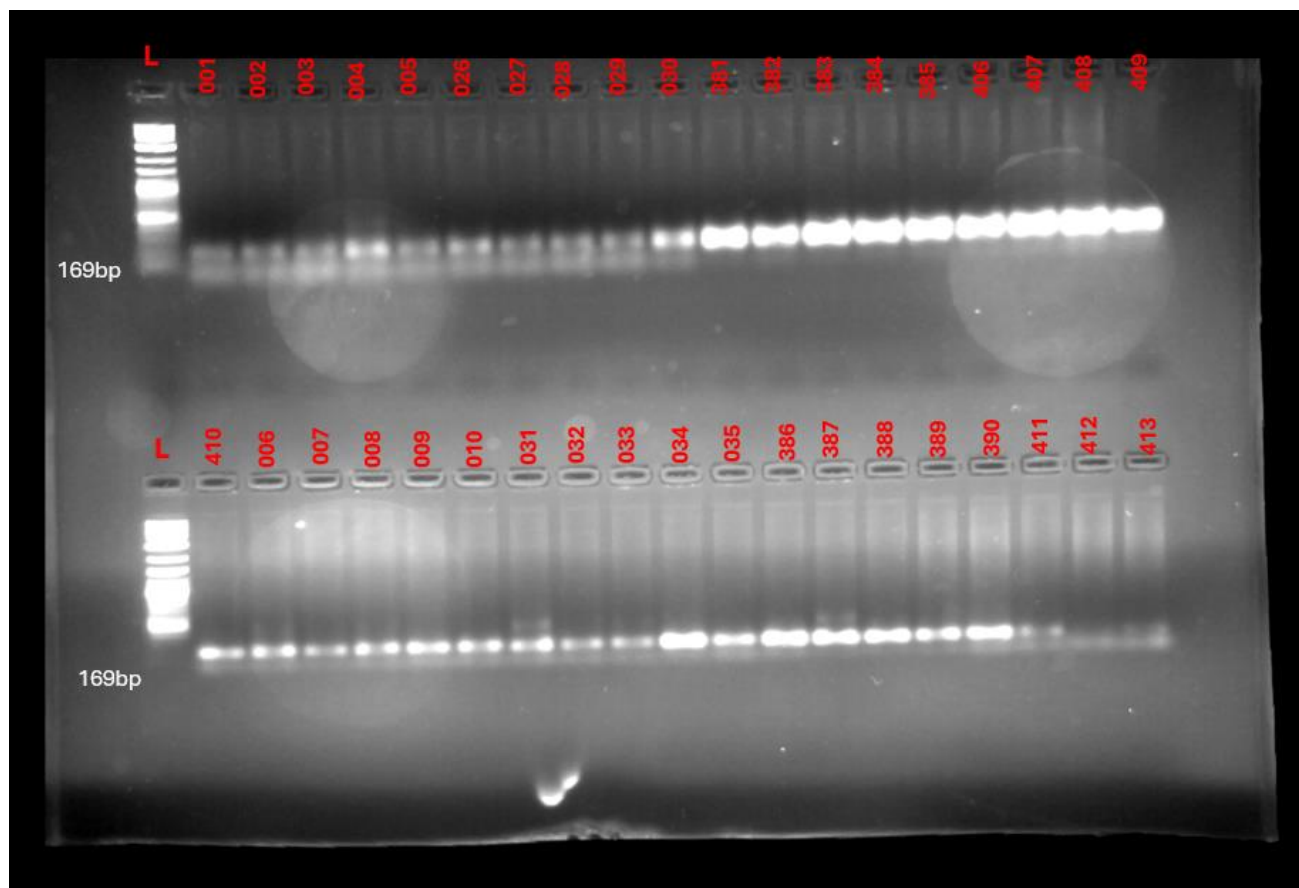
ΕΙΚΟΝΑ 35: Melt curve των δειγμάτων (πιάτο 1) για το γονίδιο *tetQ*.



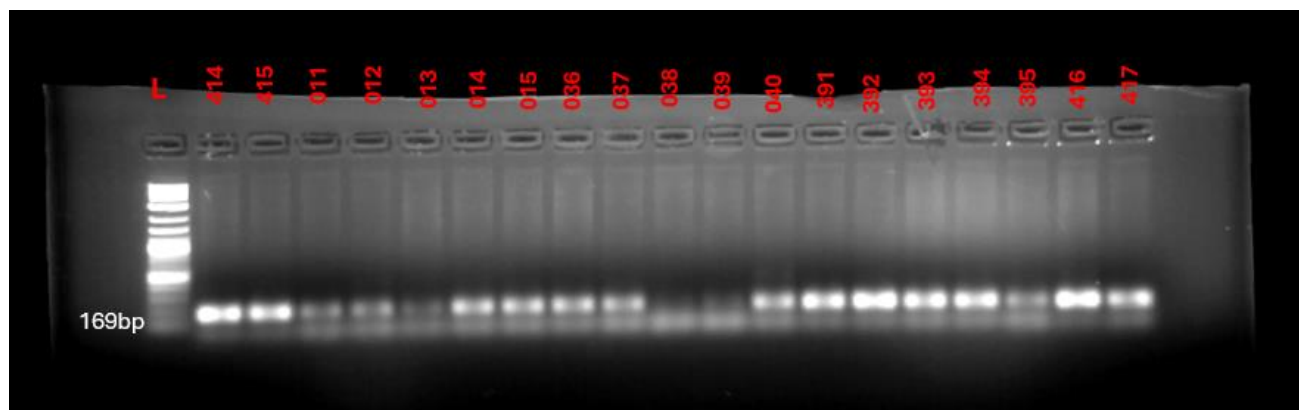
ΕΙΚΟΝΑ 36: Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων (πιάτο 2) για το γονίδιο *tetQ*.



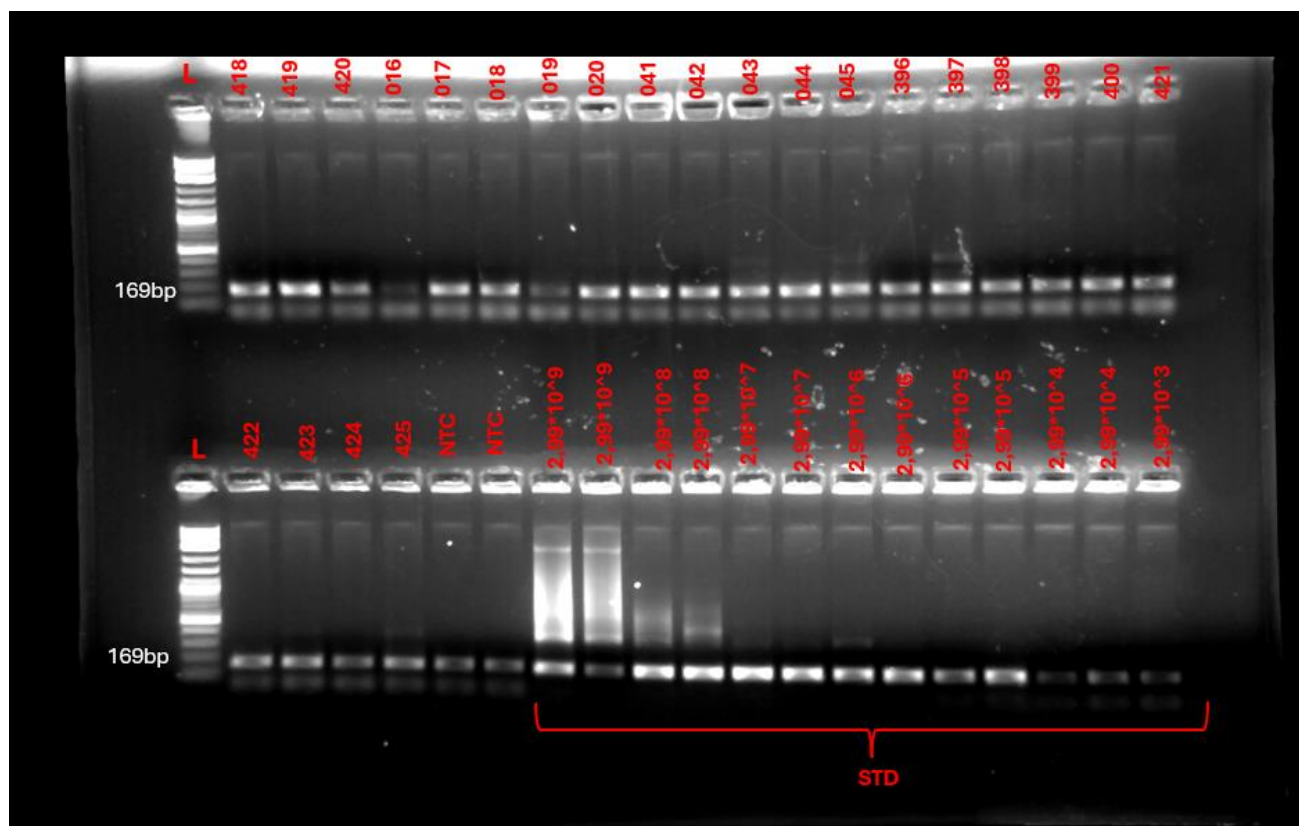
ΕΙΚΟΝΑ 37: Melt curve των δειγμάτων (πιάτο 2) για το γονίδιο *tetQ*.



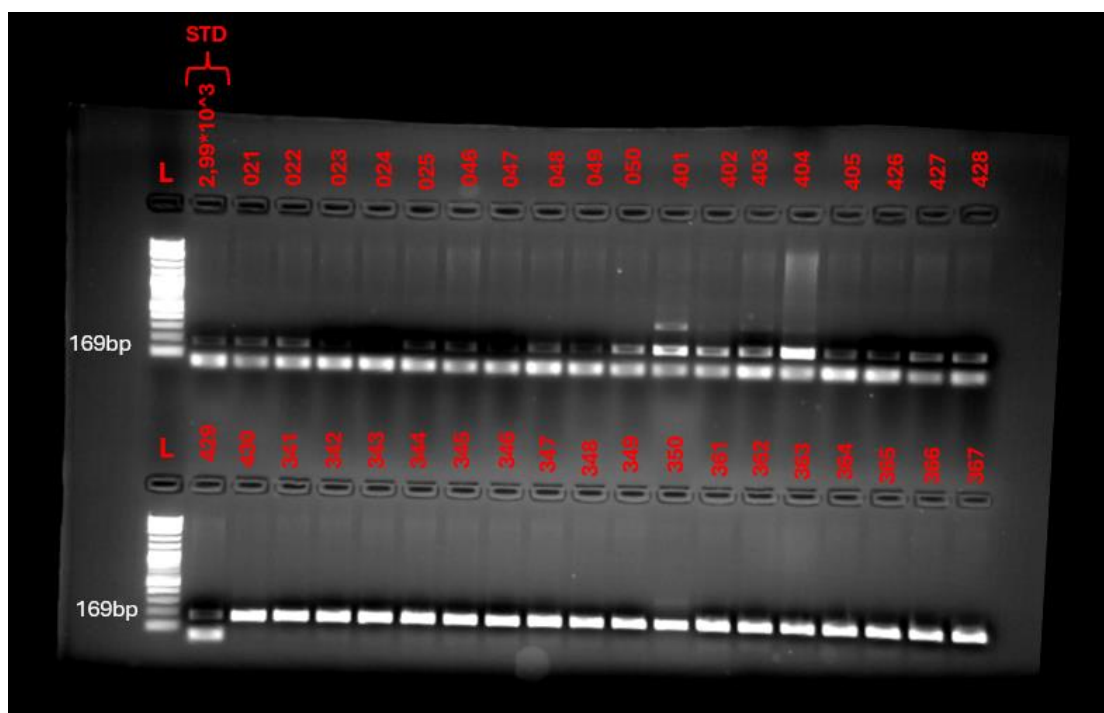
ΕΙΚΟΝΑ 38: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *tetQ*, μέρος 1^ο.



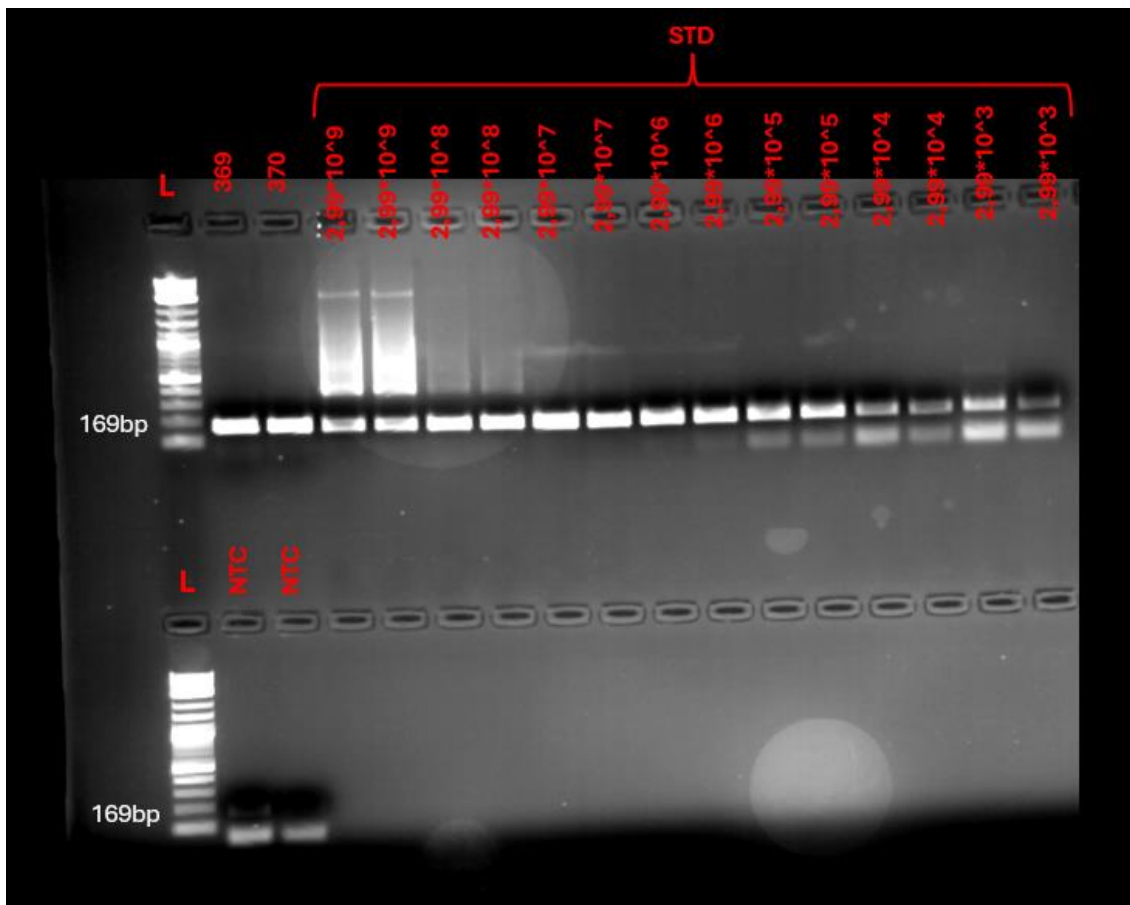
ΕΙΚΟΝΑ 39: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *tetQ*, μέρος 2^ο.



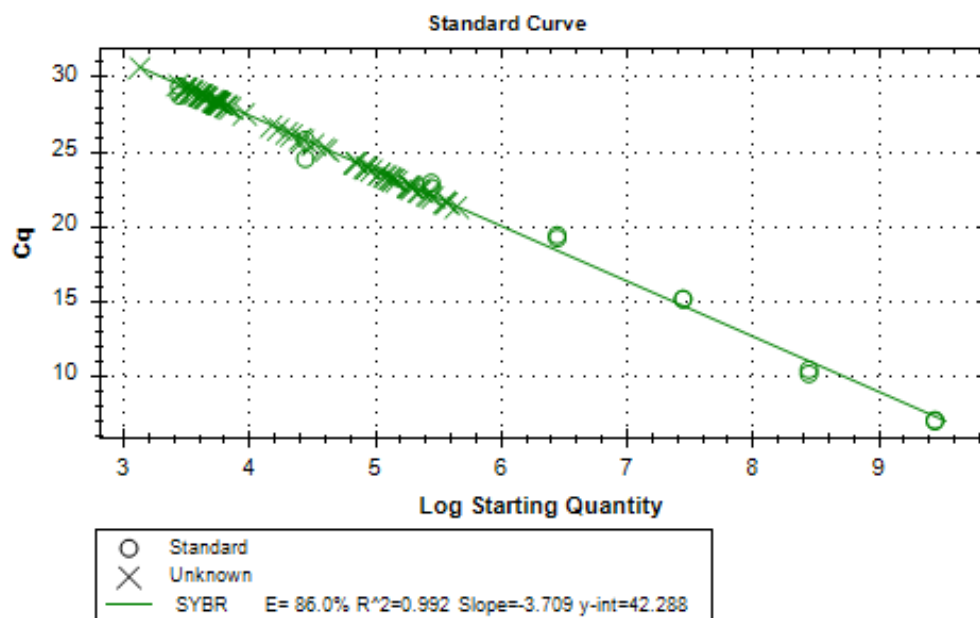
EIKONA 40: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *tetQ*, μέρος 3^ο.



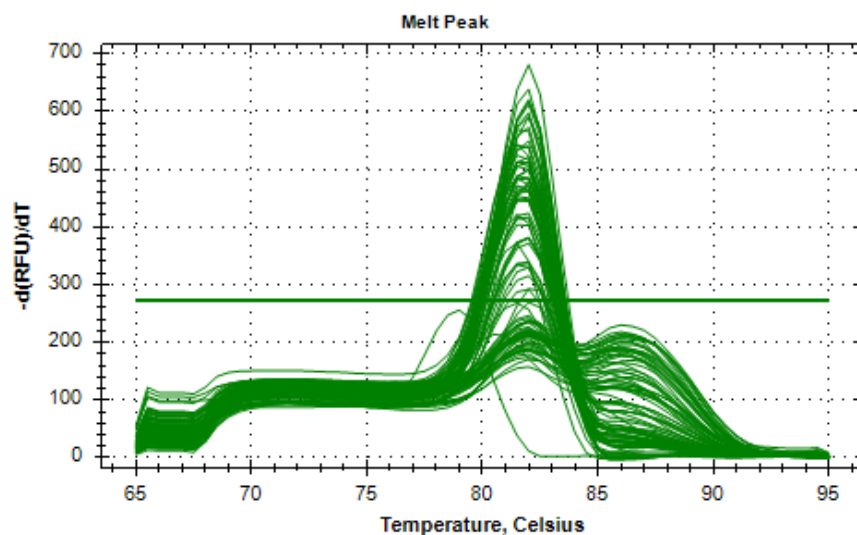
EIKONA 41: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *tetQ*, μέρος 4^ο.



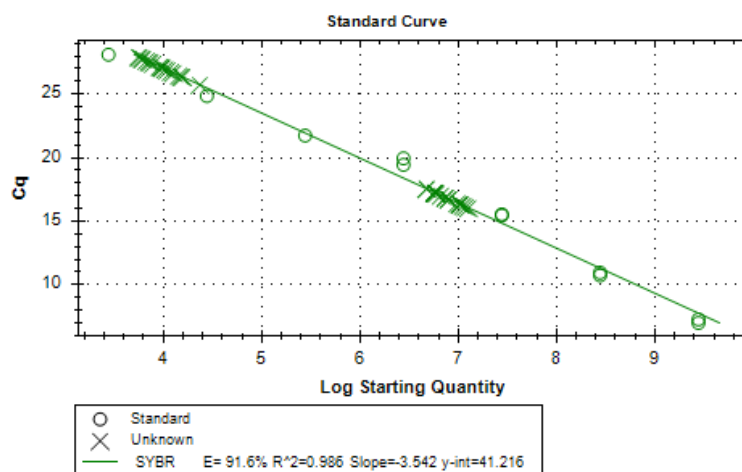
ΕΙΚΟΝΑ 42: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *tetQ*, μέρος 5°.



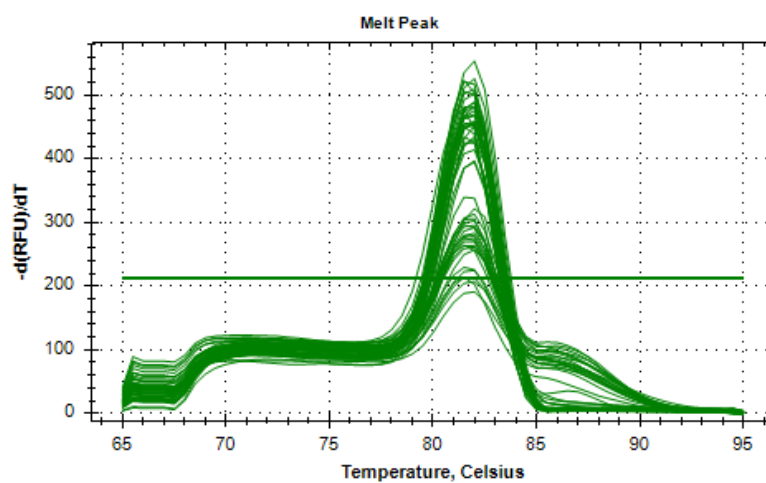
ΕΙΚΟΝΑ 43: Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων (πίατο 1) για το γονίδιο *tetW*.



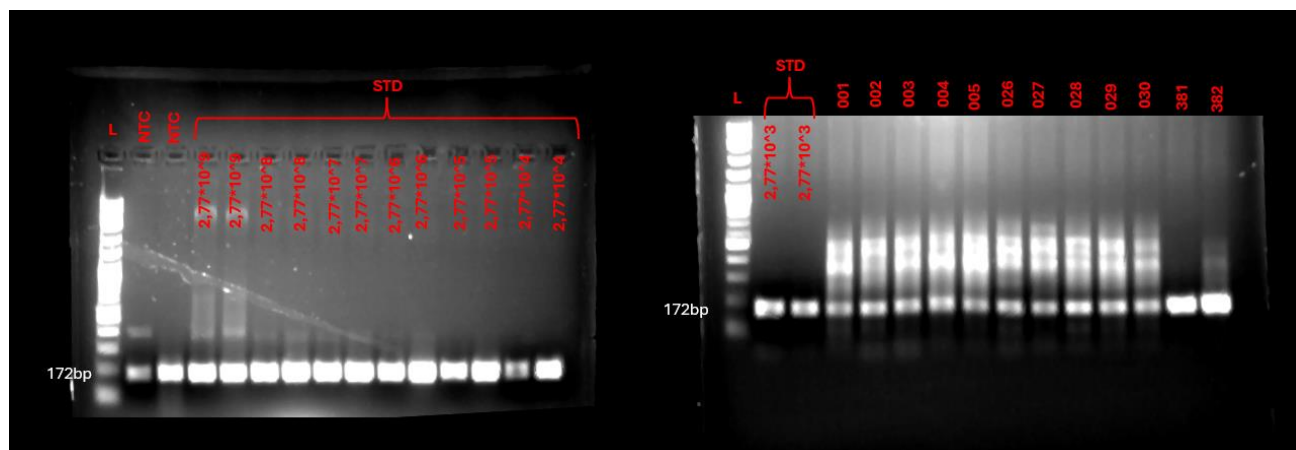
ΕΙΚΟΝΑ 44: Melt curve των δειγμάτων (πιάτο 1) για το γονίδιο *tetW*.



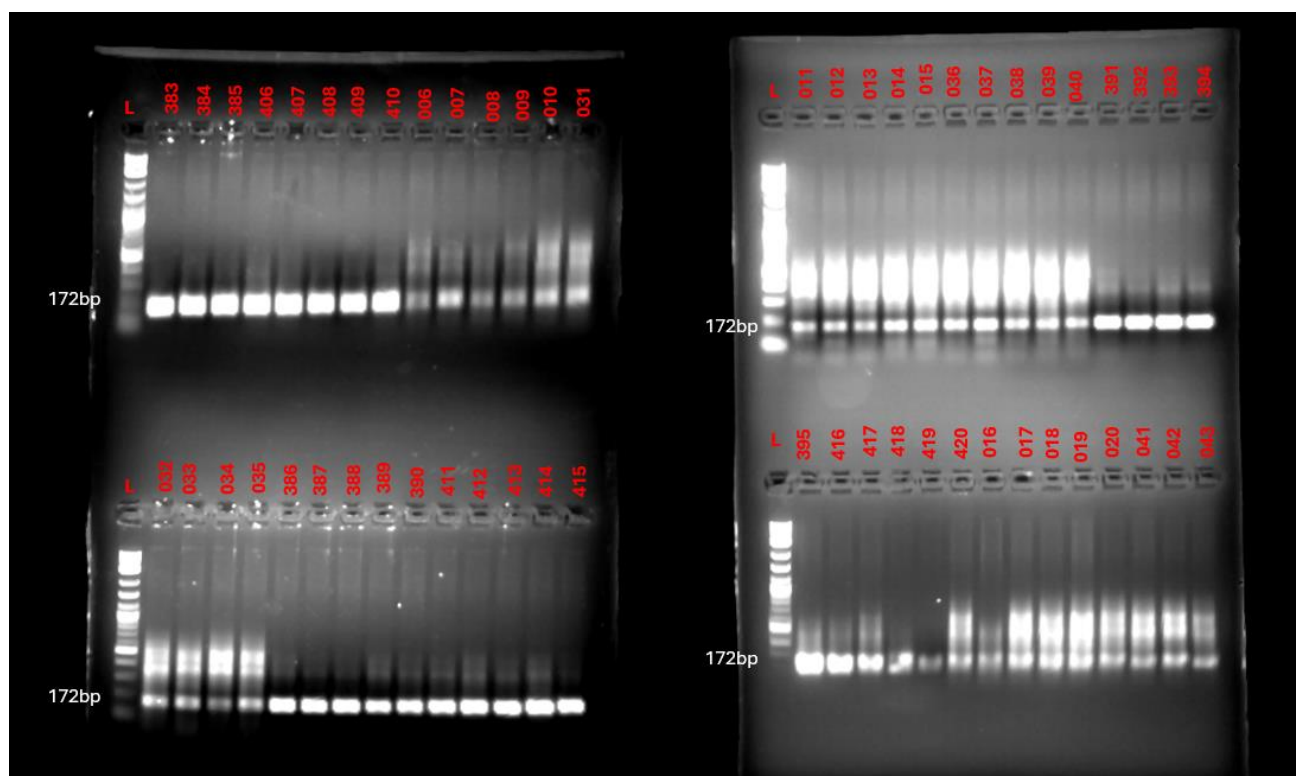
ΕΙΚΟΝΑ 45: Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων (πιάτο 2) για το γονίδιο *tetW*.



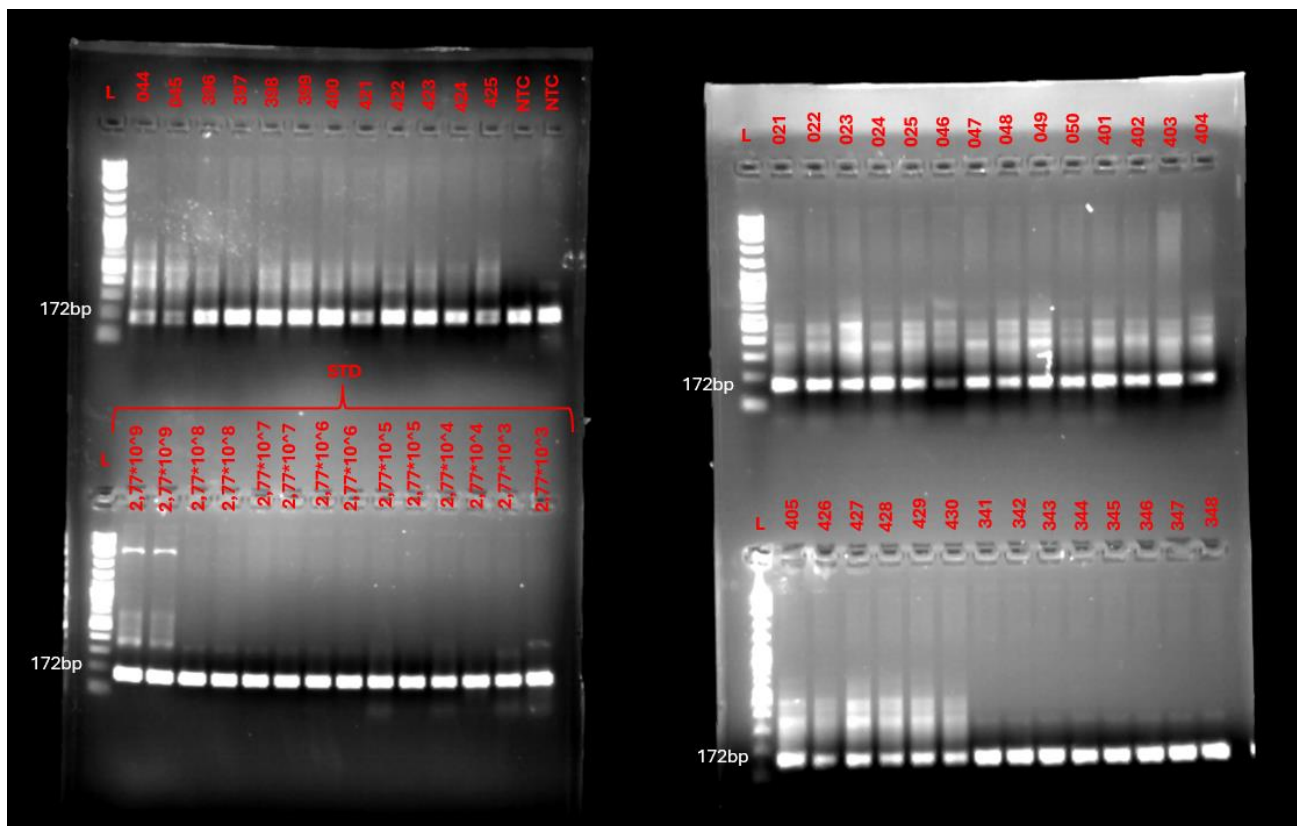
ΕΙΚΟΝΑ 46: Melt curve των δειγμάτων (πιάτο 2) για το γονίδιο *tetW*.



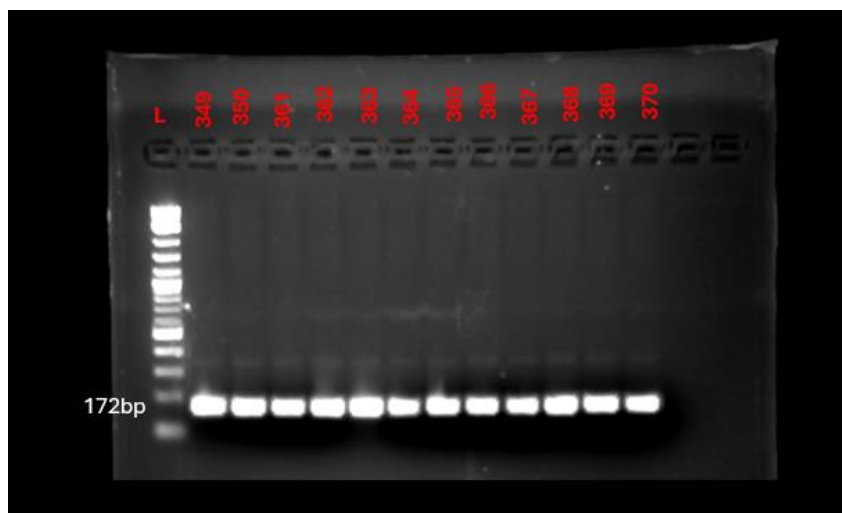
ΕΙΚΟΝΑ 47: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *tetW*, μέρος 1°.



ΕΙΚΟΝΑ 48: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *tetW*, μέρος 2°.

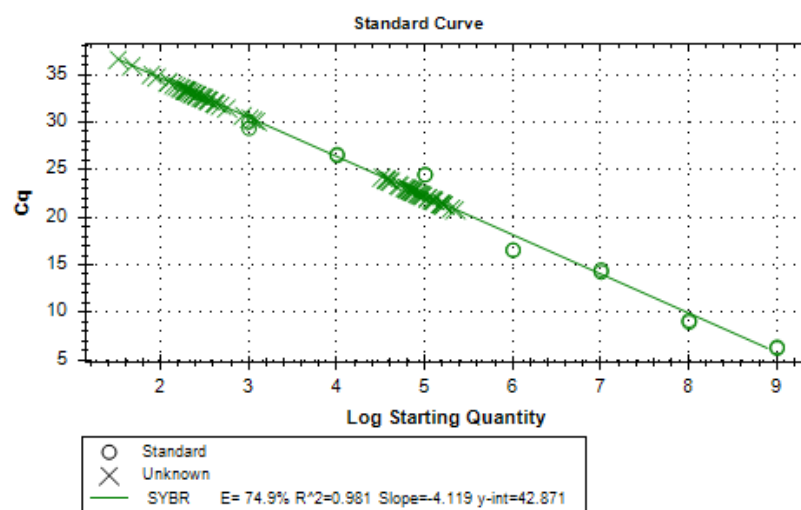


ΕΙΚΟΝΑ 49: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *tetW*, μέρος 3^ο.

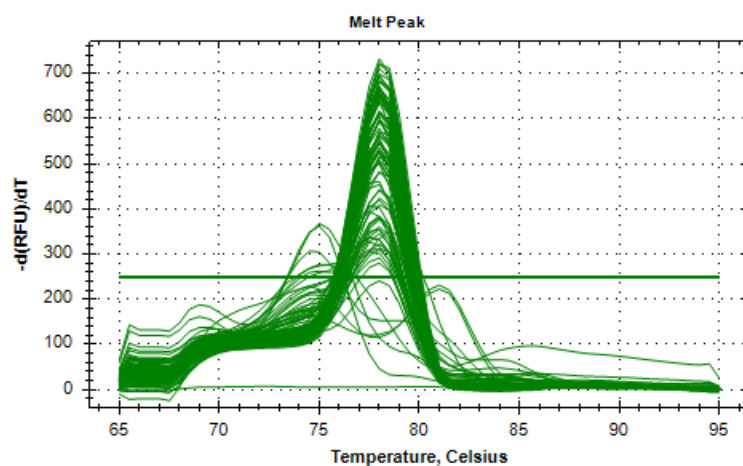


EIKONA 50: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *tetW*, μέρος 4^ο.

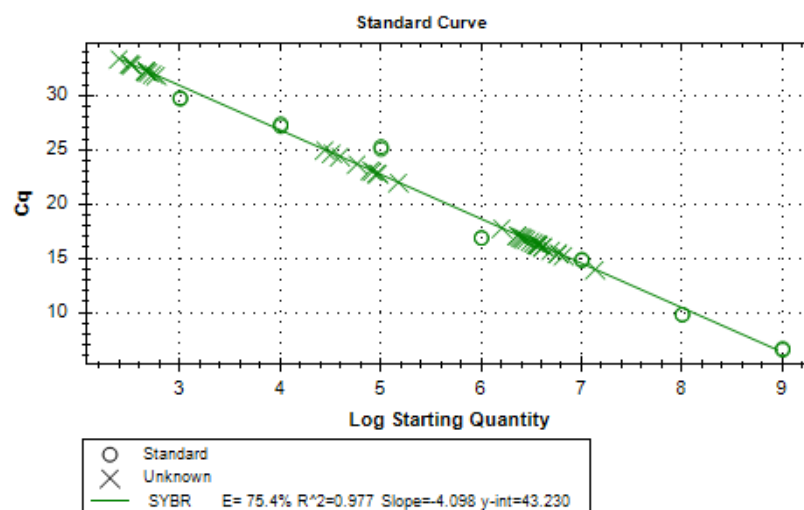
Σημείωση: Στο σύνολο των δειγμάτων SW (βλέπε Πίνακα 18) εκτός από την επιθυμητή ζώνη των 172bp για το *tetW* φαίνεται να έχουμε σταθερή παρουσία παρόμοιων παραπροϊόντων (Εικόνες 47-49). Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στην στατιστική ανάλυση, αλλά οι συνθήκες ενίσχυσης του *tetW* για την qPCR απαιτούν βελτιστοποίηση.



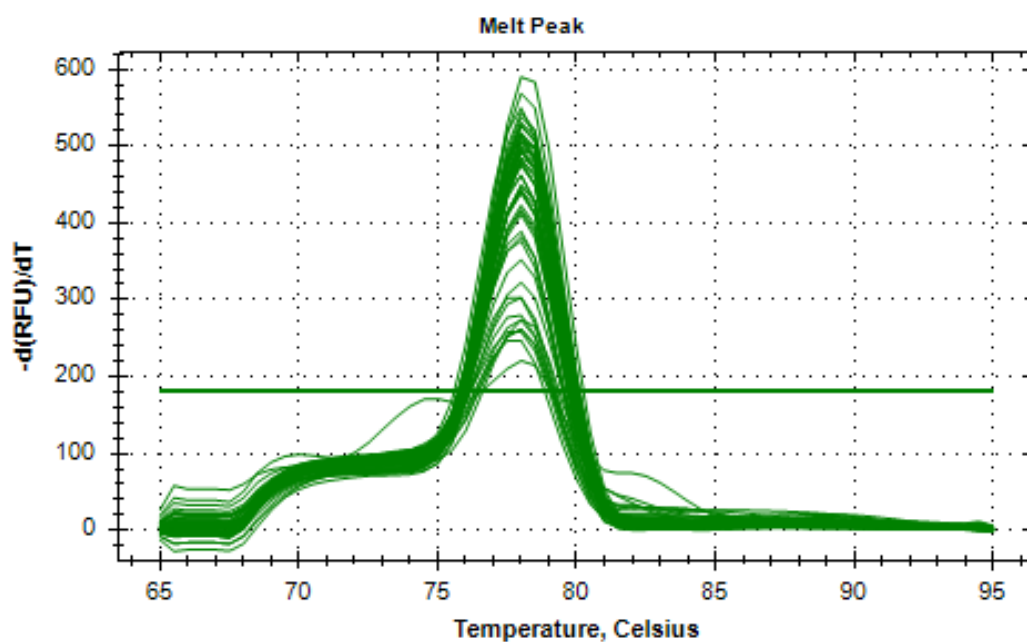
ΕΙΚΟΝΑ 51: Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων (πίατο 1) για το γονίδιο *tetM*.



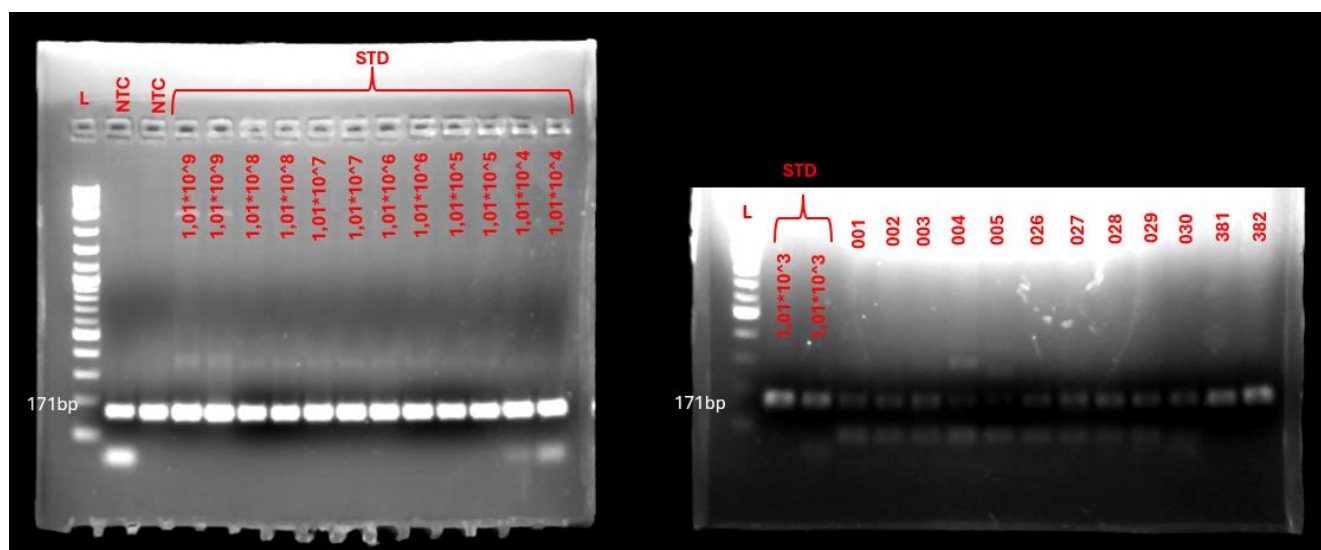
ΕΙΚΟΝΑ 52: Melt curve των δειγμάτων (πίατο 1) για το γονίδιο *tetM*.



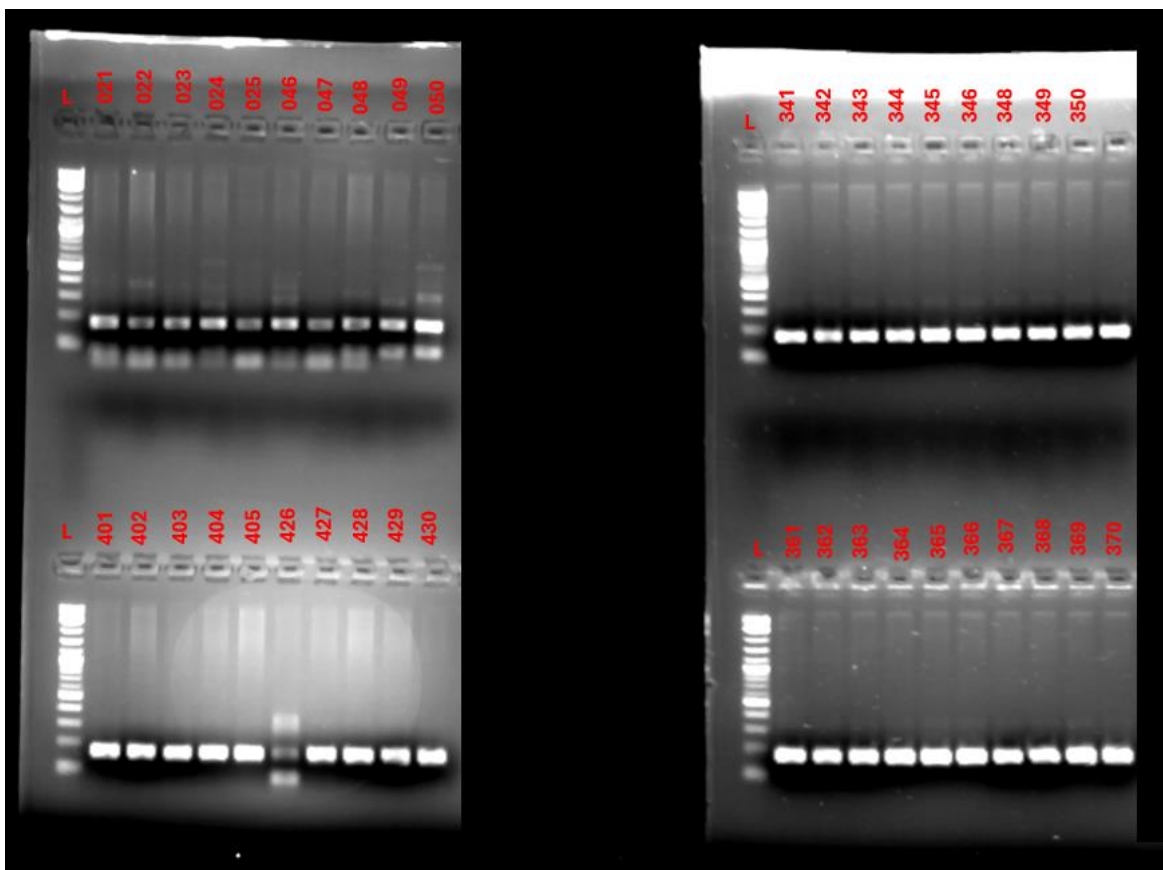
ΕΙΚΟΝΑ 53: Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων (πίατο 2) για το γονίδιο *tetM*.



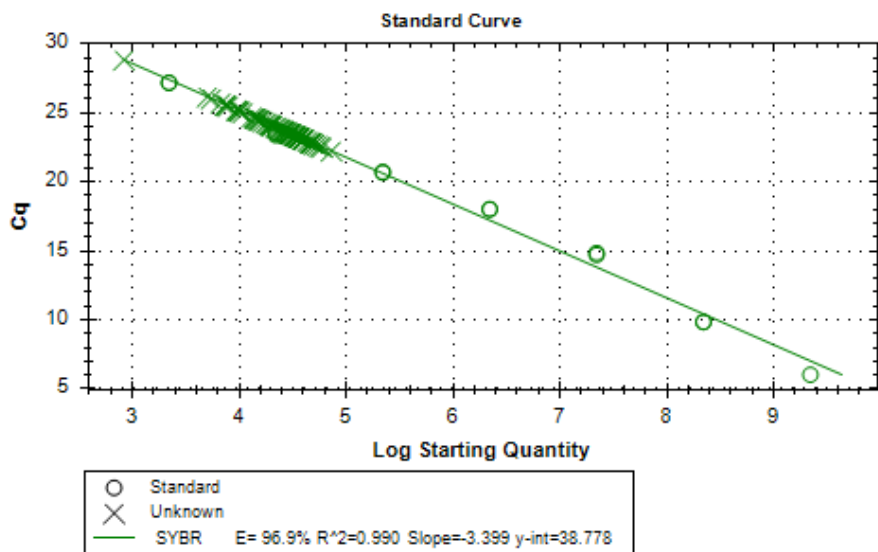
ΕΙΚΟΝΑ 54: Melt curve των δειγμάτων (πίατο 2) για το γονίδιο *tetM*.



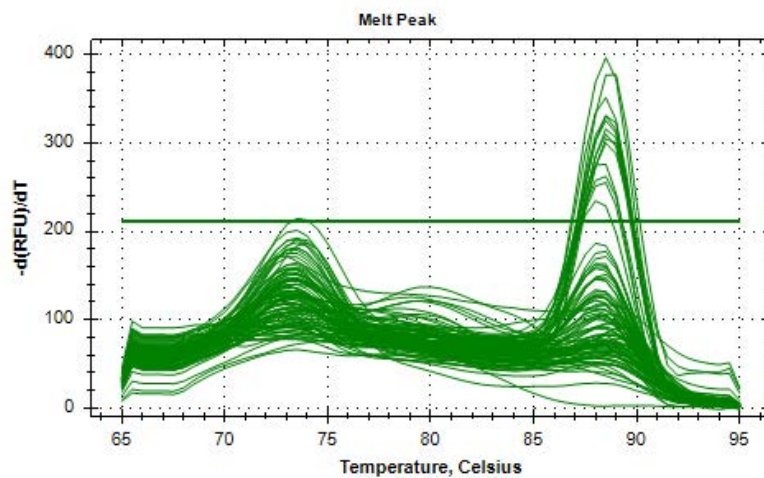
ΕΙΚΟΝΑ 55: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *tetM*, μέρος 1°.



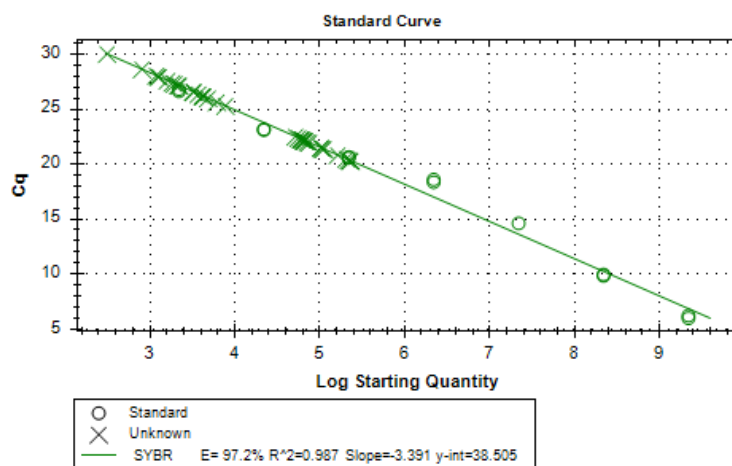
ΕΙΚΟΝΑ 58: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *tetM*, μέρος 4°.



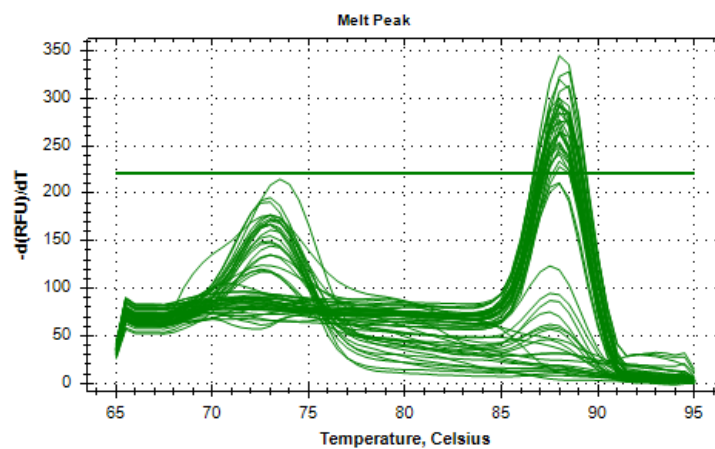
ΕΙΚΟΝΑ 59: Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων (πίατο 1) για το γονίδιο *intII*.



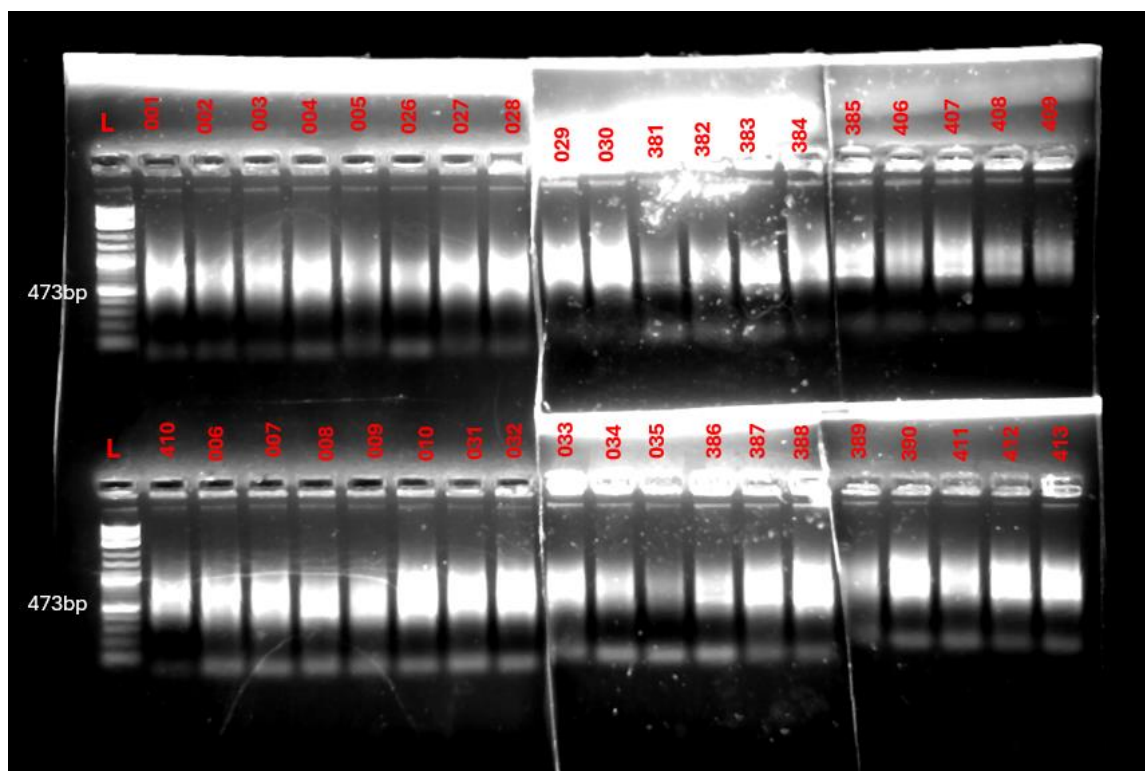
ΕΙΚΟΝΑ 60: Melt curve των δειγμάτων (πιάτο 1) για το γονίδιο *intI1*.



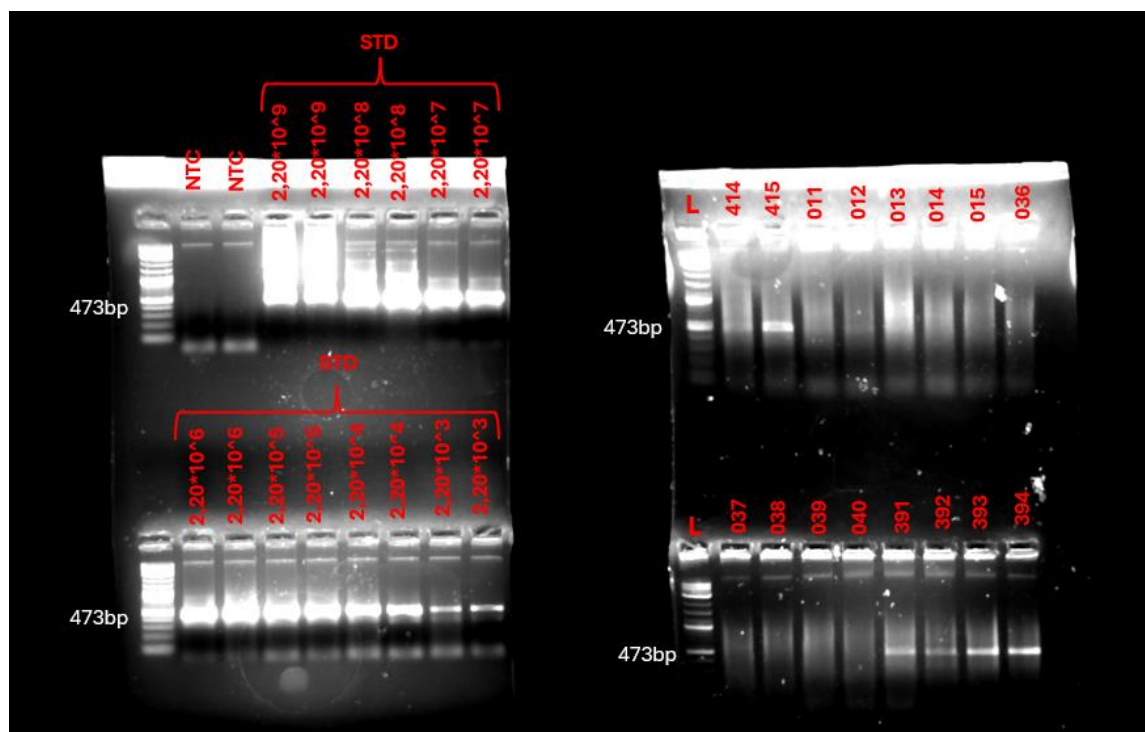
ΕΙΚΟΝΑ 61: Πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων (πιάτο 2) για το γονίδιο *intI1*.



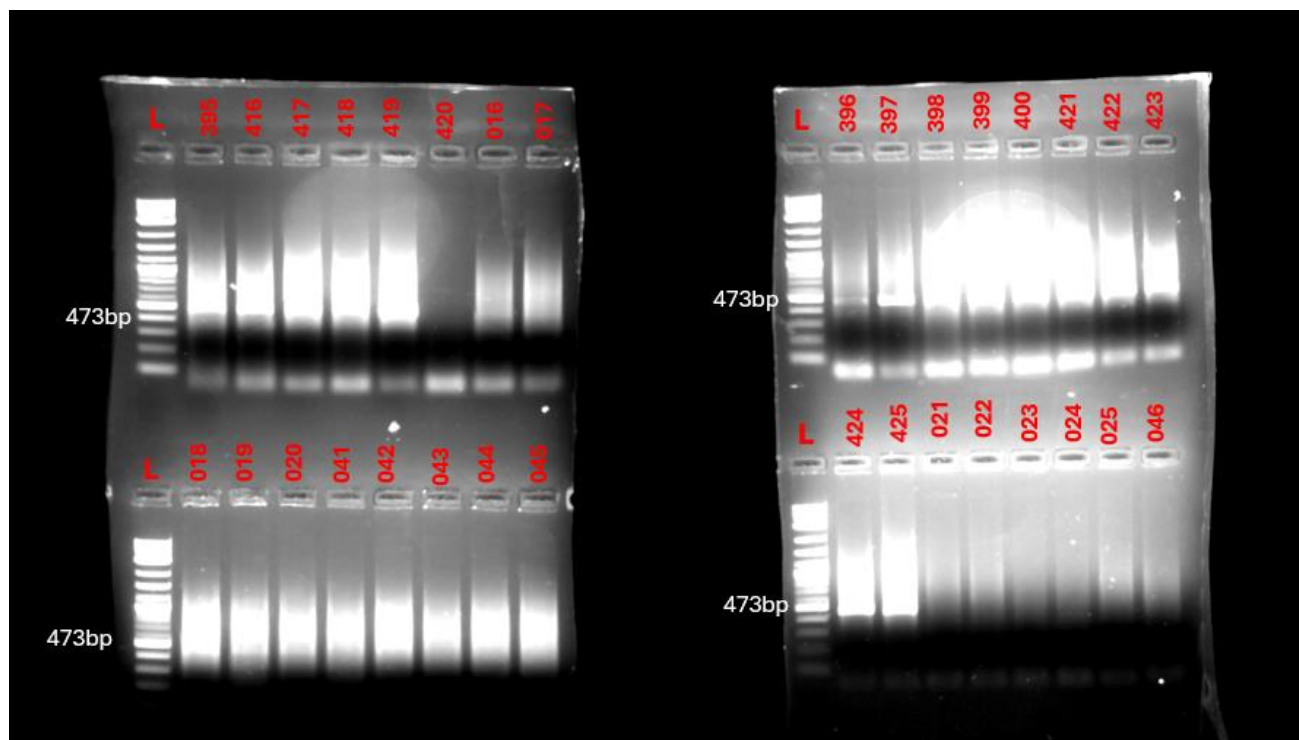
ΕΙΚΟΝΑ 62: Melt curve των δειγμάτων (πιάτο 2) για το γονίδιο *intI1*.



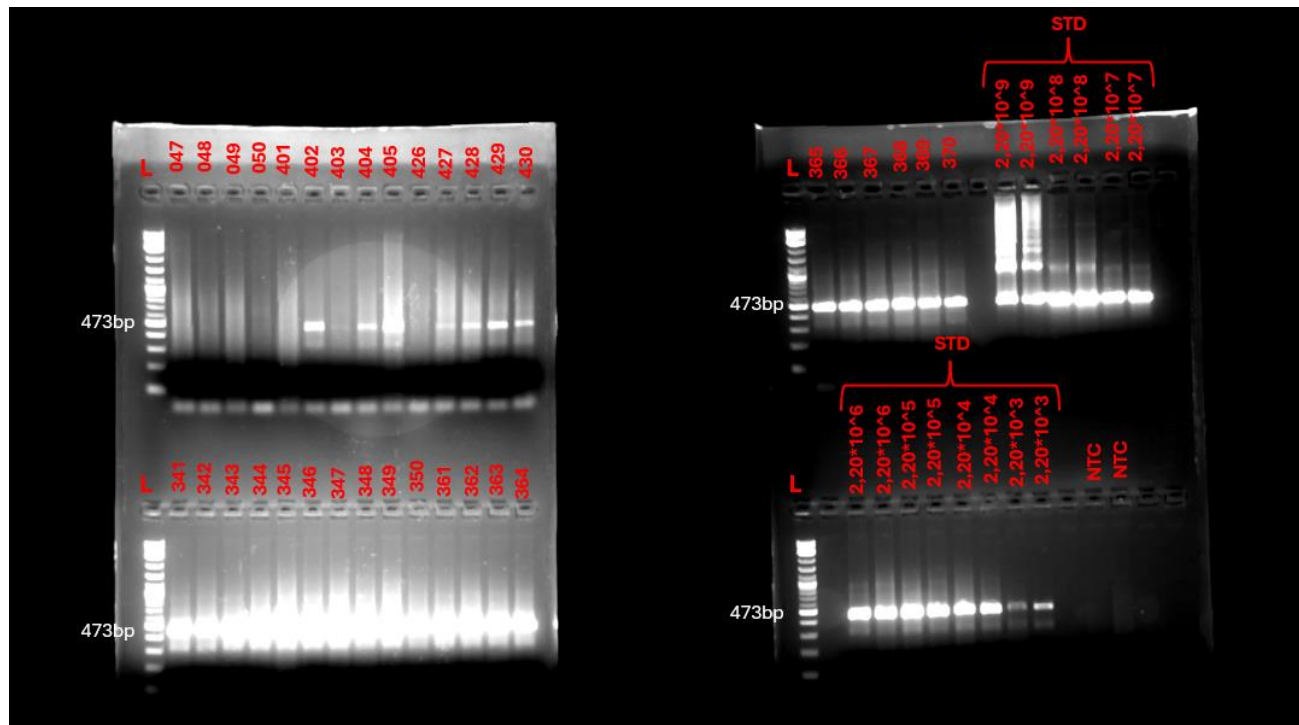
EIKONA 63: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *intII*, μέρος 1°.



EIKONA 64: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *intII*, μέρος 2°.

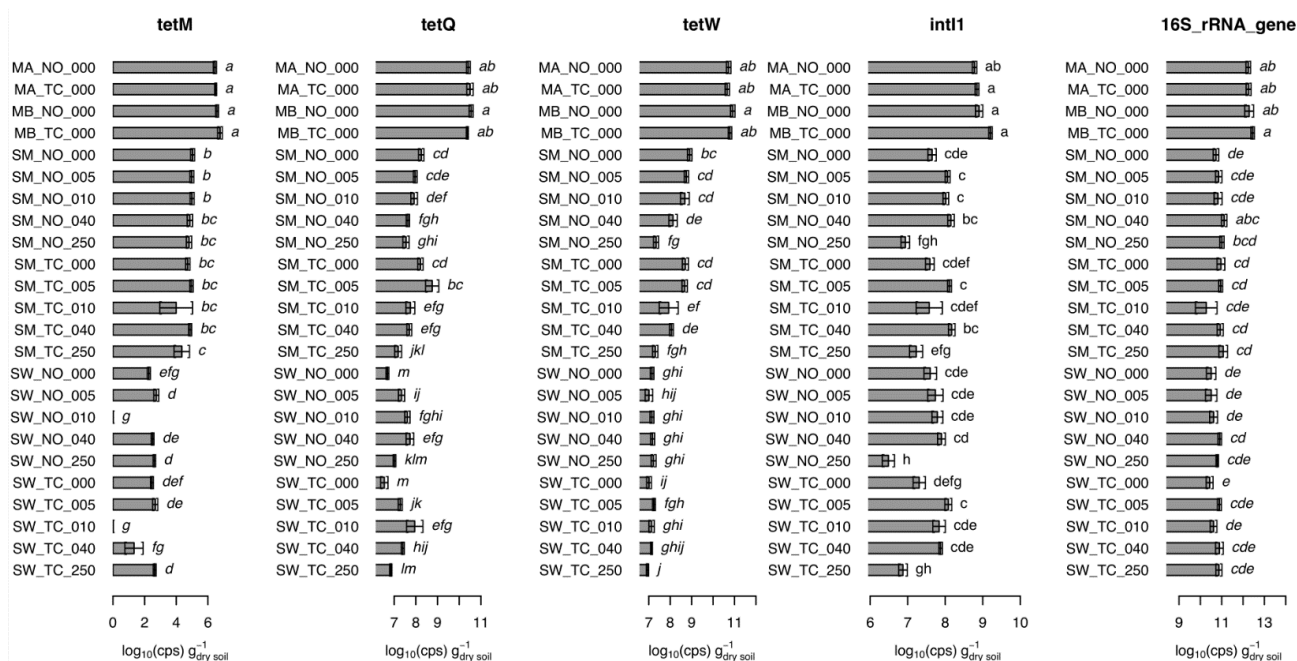


ΕΙΚΟΝΑ 65: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *intII*, μέρος 3°.

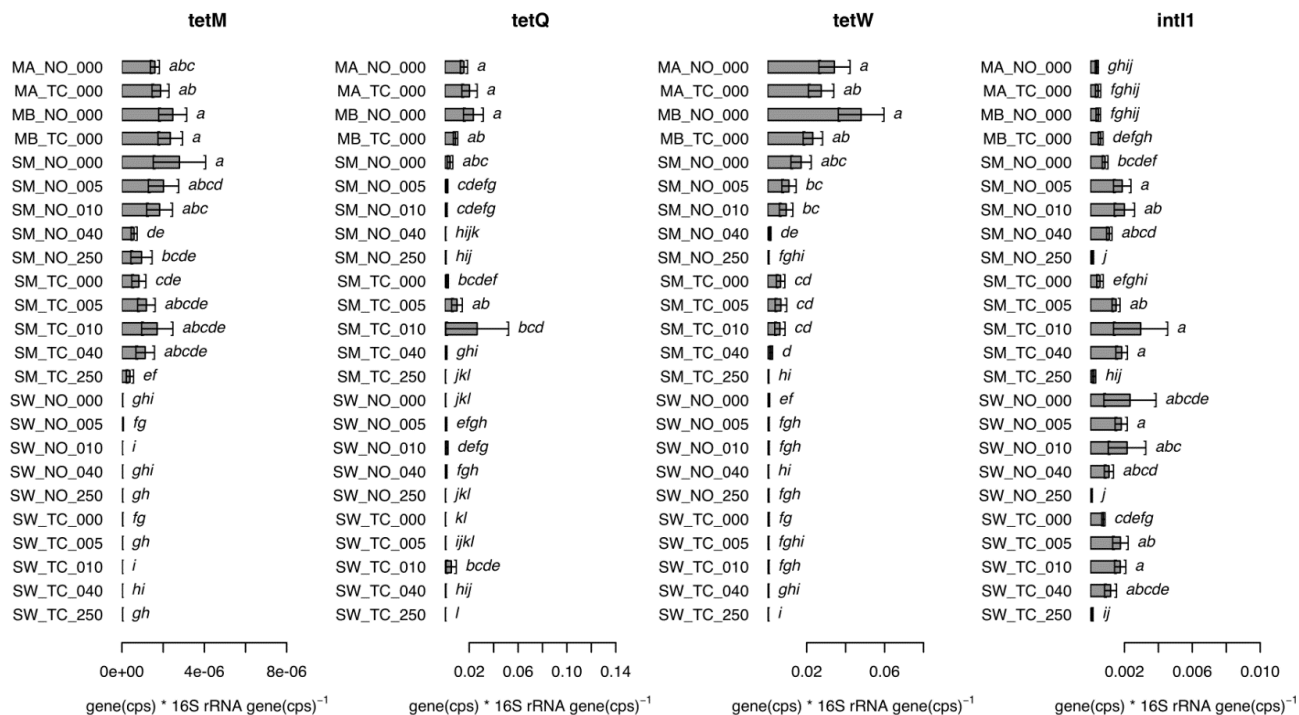


ΕΙΚΟΝΑ 66: Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων qPCR δειγμάτων για το γονίδιο *intII*, μέρος 4°.

6.6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI: Διαγράμματα στατιστικής ανάλυσης



ΕΙΚΟΝΑ 67: Ραβδογράμματα από one-way ANOVA, όπου συγκρίνονται όλες οι ομάδες των δειγμάτων μεταξύ τους σε απόλυτες τιμές μετασχηματισμένες λογαριθμικά (log).



ΕΙΚΟΝΑ 68: Ραβδογράμματα από one-way ANOVA όπου συγκρίνονται τα πηλίκια των αντιγράφων των γονιδίων (ratios) όλων των ομάδων δειγμάτων.