



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«Περιεχόμενο στα κτηνιατρικά αντιβιοτικά sulfamethoxazole, tiamulin και tilmicosin, καθώς και σε γονίδια δείκτες της μικροβιακής αντοχής και οριζόντιας μεταφοράς ιστορικά ρυπασμένων εδαφών με κοπριά χοίρων»

Γκιάκα Χρυσούλα του Ευαγγέλου

Λάρισα, 2024

Περιεχόμενο στα κτηνιατρικά αντιβιοτικά sulfamethoxazole, tiamulin και tilmicosin, καθώς και σε γονίδια δείκτες της μικροβιακής αντοχής και οριζόντιας μεταφοράς ιστορικά ρυπασμένων εδαφών με κοπριά χοίρων.

Content of the veterinary antibiotics sulfamethoxazole, tiamulin and tilmicosin, and microbial resistance and horizontal transfer marker genes of soils with long-term exposure to pig manure.

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Βασιλειάδης Σωτήριος (επιβλέπων καθηγητής): Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας -Γονιδιωματικής , του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Καρπούζας Δημήτριος: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Καράς Παναγιώτης: Μεταδιδακτορικός Ερευνητής Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ πολύ τον κ.Βασιλειάδη για την ανάθεση της πτυχιακής εργασίας, την καθοδήγηση, την βοήθεια στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και την συγγραφή της εργασίας. Ακόμη να ευχαριστήσω την κ. Κατσίβελου για όλη την βοήθεια, καθοδήγηση και εκπαίδευση κατά τη διάρκεια της εκπόνησης του πειραματικού τμήματος της εργασίας. Ευχαριστώ ακόμη τους κ.Καρά και κ.Καρπούζα για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος την οικογένεια μου για την στήριξη.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	
1.1. Αντιβιοτικά	8
1.2. Κατηγορίες αντιβιοτικών	11
1.2.1. Σουλφαμεθοξαζόλη	14
1.2.2. Tilmicosin	15
1.2.3. Tiamulin	16
1.3. Η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία	17
1.3.1. Η τύχη των αντιβιοτικών μετά την χορήγηση	18
1.4. Πρόβλημα αντοχής στα αντιβιοτικά	20
1.4.1. Μηχανισμοί αντοχής	21
1.4.2. Γονίδια αντοχής	24
1.5. Οριζόντια γενετική μεταφορά και διάδοση/ διασπορά αντοχής στα αντιβιοτικά	26
1.5.1. Μηχανισμοί οριζόντιας μεταφοράς	27
1.5.2. Γονίδια δείκτες οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού	29
1.6. Τεχνικές	
1.6.1. Προσδιορισμός υγρασίας και υδατοχωρητικότητας	31
1.6.2. Προσδιορισμός ποιοτικός και ποσοτικός των αντιβιοτικών	
1.6.2.1. Εκχύλιση αντιβιοτικών από την κοπριά	32
1.6.2.2. Εκχύλιση αντιβιοτικών από το έδαφος	35
1.6.2.3. Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης	36
1.6.3. Προσδιορισμός ποσοτικός και ποιοτικός των γονιδίων αντοχής και οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού	
1.6.3.1. Εκχύλιση DNA από δείγματα εδάφους και κοπριάς	38
1.6.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	38
1.7. Στόχος εργασίας	43
2. Σχεδιασμός πειράματος	43
2.1. Δειγματοληψία	46
2.2. Προσδιορισμός ποιοτικός και ποσοτικός των αντιβιοτικών	
2.2.1. Εκχύλιση αντιβιοτικών από την κοπριά	48
2.2.2. Εκχύλιση αντιβιοτικών από το έδαφος	49

2.2.3. Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης	50
2.3. Προσδιορισμός ποσοτικός και ποιοτικός των γονιδίων αντοχής και οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού	
2.3.1. Εκχύλιση DNA από δείγματα εδάφους και κοπριάς	50
2.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	50
2.4. Στατιστική ανάλυση	52
3. Αποτελέσματα	
3.1. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης αντιβιοτικών	52
3.2. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης γονιδίων	
4. Συζήτηση	58
5. Συμπεράσματα και σχόλια	62
6. Μελλοντική Έρευνα	62
7. Βιβλιογραφία	63
8. Βιβλιογραφία Εικόνων	70

Abstract:

The widespread use of antibiotics in livestock farming and agriculture can lead to the dissemination of antibiotic residues and antibiotic resistance to the environment. Systematic manure application (as organic fertilizer) can spread antibiotics and antibiotic resistance genes from manure to soil, to edible crop parts, to surface and underground water and ultimately urban areas. This study aimed to assess the content in three commonly used in swine farming veterinary antibiotics, sulfamethoxazole, tiamulin and tilmicosin during manure stockpiling, as well as the abundance and dispersion of six antibiotic resistance genes: *sulI*, *dfrA*, *tetM*, *TEM*, *cfxA*, *qnrD*. The study also aimed to monitor/track horizontal gene transfer (HGT) events by measuring the abundance of two markers: *intI1* and *korB*. Soil and manure samples were collected from the stockpiling area, the content in antibiotics was quantified by means of HPLC, and the abundance of the genes was quantified by means of qPCR. Lastly, the abundance of the phylogenetic marker *16S rRNA* was also quantified to assess the content in bacteria. Solely tilmicosin was measurable in manure samples at a concentration of $0,227 \mu\text{g g}^{-1}$ ($\pm 0,084$) and minor concentrations in soil. The absolute quantification of the resistance and HGT genes displayed an overall higher abundance in manure and the tendency to disseminate across neighboring soils. The relative abundances indicated *dfrA*, *sulI*, and *intI1* being the best markers for assessing risks according to the survey setup. In conclusion, the results of the study align with the hypothesis that manure handling and applications are important for the spread of antibiotic resistance.

Περίληψη:

Η ευρεία χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και τη γεωργία έχουν ως αποτέλεσμα τη διασπορά κατάλοιπων των αντιβιοτικών και αντιβιοαντοχής στο περιβάλλον. Η συστηματική εφαρμογή κοπριάς ως λίπασμα μπορεί να συμβάλει στη διάχυση γονιδίων αντοχής σε αντιβιοτικά από την κοπριά στις γεωργικές εκτάσεις, στα καλλιεργούμενα προϊόντα προς κατανάλωση, στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα και τελικά στις αστικές περιοχές. Αυτή η εργασία επιδιώκει να εκτιμήσει το περιεχόμενο ιστορικά ρυπασμένων με κοπριά εδαφών μονάδας εκτροφής χοίρων, κατά την εναπόθεση κοπριάς προς χώνεψη, σε 3 ευρέως

χορηγούμενα στην χοιροεκτροφή στην Ευρώπη κτηνιατρικά αντιβιοτικά: τα sulfamethoxazole, tiamulin and tilimicosin. Το περιεχόμενο στα αντιβιοτικά εκτιμήθηκε με τη βοήθεια ανάλυσης HPLC. Η αφθονία γονιδίων αντιβιοαντοχής, οριζόντιας μεταφοράς και ολικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με αντιδρασεις qPCR. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση περιλάμβανε τα γονίδια αντιβιοαντοχής *sulI*, *dfrA*, *tetM*, *TEM*, *cfxA*, *qnrD*, τα γονίδια δείκτες οριζόντιας γενετικής μεταφοράς (HGT) *intI1* and *korB*, καθώς και του φυλογενετικού δείκτη *16S rRNA* ως ένδειξη του απόλυτου μεγέθους βακτηριακού πληθυσμού. Το tilimicosin αποτέλεσε το μόνο ανιχνεύσιμο αντιβιοτικό σε συγκεντρώσεις $0,227 \mu\text{g g}^{-1}$ ($\pm 0,084$) στην κοπριά και μηδαμινές συγκεντρώσεις στα εδαφικά δείγματα. Η ποσοτικοποίηση των γονιδίων αντίστασης έδειξε ολικά υψηλότερη απόλυτη αφθονία στην κοπριά, καθώς και τάση διασποράς στα απολύτως γειτονικά χώματα. Τα γονίδια *dfrA*, *sulI* και *intI1* αποτέλεσαν σχετικά ικανοποιητικούς της δείκτες της παρουσίας και διασποράς της αντιβιοαντοχής κατά την εξέταση της σχετικής αφθονίας τους. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της εργασίας συμβαδίζουν και επιβεβαιώνουν την αρχική θεώρηση ότι οι πρακτικές διαχείρισης και εφαρμογής κοπριάς στα εδάφη συμβάλλουν στην διασπορά της αντιβιοαντοχής στους μικροβιακούς πληθυσμούς.

1.Εισαγωγή

1.1Αντιβιοτικά

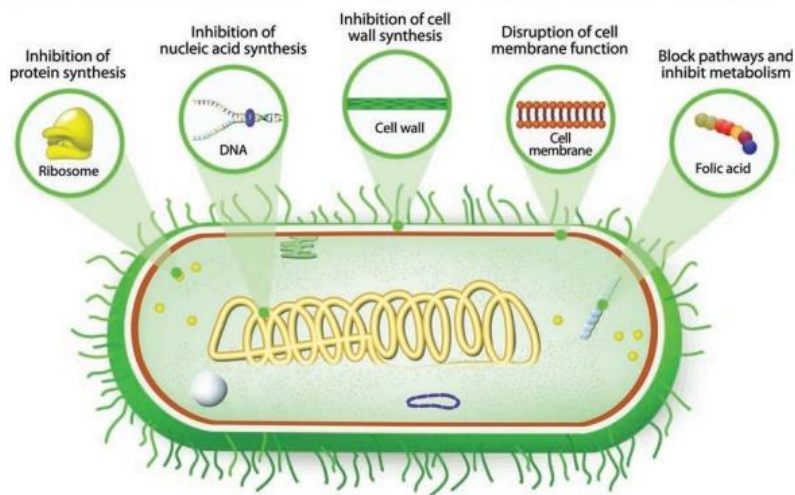
Η ανακάλυψη και η εφαρμογή σε κλινικό επίπεδο των αντιβιοτικών αποτελεί ένα καθοριστικό επίτευγμα της ιατρικής για τον 20^ο αιώνα, επιτρέποντας την ανάπτυξη θεραπειών απέναντι σε μολυσματικές ασθένειες και καθιστώντας δυνατή την ανάπτυξη θεραπειών της σύγχρονης ιατρικής (Hutchings et al., 2019). Η κύρια πηγή άντλησης ουσιών με αντιβιοτική δράση είναι οι μικροβιακές κοινότητες και οι κυριότερες τάξεις αντιβιοτικών που απομονώθηκαν κατά τον 20^ο αιώνα και χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα είναι φυσικής προέλευσης. Ωστόσο ο ρυθμός απομόνωσης νέων αντιβιοτικών ουσιών έχει μειωθεί σημαντικά (Walsh and Wright, 2005). Η ευρεία χορήγηση αντιβιοτικών συνέβαλε σημαντικά στην μείωση του ποσοστού θνησιμότητας από βακτηριακές λοιμώξεις και εξελίχθηκε σε αναπόσπαστο εργαλείο για την προστασία, πρόληψη και θεραπεία από παθογόνους μικροοργανισμούς κατά τη νοσηλεία μεγάλου εύρους παθήσεων.

Με τον όρο αντιβιοτικό αναφερόμαστε σε μόρια χαμηλού μοριακού βάρους τα οποία αναστέλλουν την βακτηριακή ανάπτυξη (Gillings et al.2013). Τα αντιβιοτικά φάρμακα είναι μόρια που απομονώνονται από βακτήρια, μύκητες ή πρώτιστα και φυσιολογικά αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες αυτών. Τα αντιβιοτικά μπορεί να είναι μόρια φυσικής προέλευσης, ημισυνθετικά (δηλαδή τροποποιημένα τεχνητά προκειμένου να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητά τους) ή συνθετικά μόρια με συχνότερη χορήγηση των φυσικών μορίων. Η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών στην καταπολέμηση λοιμώξεων οφείλεται στην εκλεκτική τους τοξικότητα, δηλαδή στην ικανότητά τους να προσβάλλουν ένα εισβάλλον βακτηριακό (προκαρυωτικό) κύτταρο χωρίς να βλάπτουν τα ζωικά (ευκαρυωτικά) κύτταρα του ξενιστή. Η εκλεκτικότητα αυτή οφείλεται στις διαφορές που απαντώνται στους δύο τύπους κυττάρων τόσο στη δομή όσο και στα βιοσυνθετικά μονοπάτια τους. Μερικές από τις βασικές διαφορές μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων είναι:

1. η ύπαρξη διακριτού πυρήνα στα ευκαρυωτικά κύτταρα,
2. η απώλεια δομών οργάνωσης, των οργανιδίων από τα προκαρυωτικά κύτταρα,
3. η απώλεια κυτταρικού τοιχώματος από ευκαρυωτικά κύτταρα
4. η βιοχημεία ενός προκαρυωτικού κυττάρου έχει μεγάλη απόκλιση από αυτήν ενός ευκαρυωτικού.

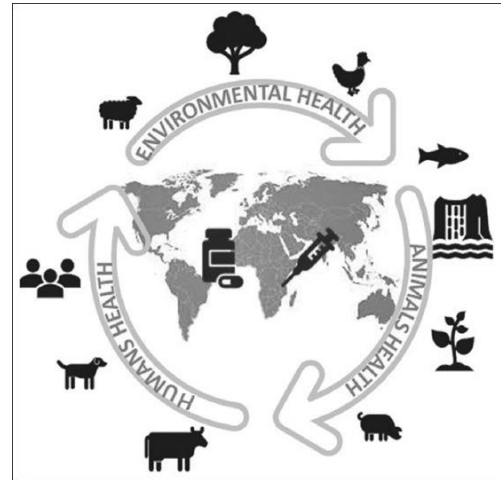
Στις διαφορές αυτές βασίζονται και οι μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών με κύριους: (1) την αναστολή του κυτταρικού μεταβολισμού (αντιμεταβολίτες), αναστέλλοντας μια ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση, (2) την αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου και μεταβολή της διαπερατότητας της, (3) την αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, (4) την διακοπή της πρωτεϊνοσύνθεσης, (5) την αναστολή της αντιγραφής ή μεταγραφής εμποδίζοντας την κυτταρική διαίρεση ή την πρωτεϊνοσύνθεση (Graham L.Patrick, An introduction to medicinal chemistry, 2017).

MECHANISMS OF ANTIBIOTIC ACTION



Εικόνα 1 Οι μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών

Η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών στην αναστολή ανάπτυξης των μικροοργανισμών γρήγορα οδήγησε στην εδραίωση της χρήσης των αντιβιοτικών όχι μόνο στην ιατρική και σε κλινικές πρακτικές, αλλά και στην κτηνιατρική και σε άλλες ανθρώπινες δραστηριότητες όπως η κτηνοτροφία, η γεωργία και οι υδατοκαλλιέργειες. Οι τάξεις αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στις δραστηριότητες αυτές συνήθως ταυτίζονται με τις τάξεις που χορηγούνται στους ανθρώπους και εκτιμάται ότι ο όγκος αντιβιοτικών που εφαρμόζεται στην κτηνοτροφία ξεπερνάει κατά πολύ τον όγκο που χρησιμοποιείται για τους ανθρώπους (Velasquez-Meza, 2022). Η ευρεία και αλόγιστη κατανάλωση αντιβιοτικών συνοδεύτηκε από την ανάπτυξη και διάδοση μικροοργανισμών και παθογόνων μικροοργανισμών ανεκτικών στα αντιβιοτικά, καθιστώντας λοιμώξεις από βακτήρια μη-θεραπεύσιμες. Για την παρακολούθηση και περιορισμό του προβλήματος της αντιμικροβιακής



Εικόνα 2. Σχηματική αναγωγή του προβλήματος της διασποράς αντιβιοαντοχής στις διαστάσεις της ενιαίας υγείας.

αντίστασης στο πλαίσιο της προσέγγισης της Ενιαίας Υγείας (One Health) φορείς όπως ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων συνεργάζονται για την ανάπτυξη στρατηγικών και σχεδίων δράσης που αποσκοπούν στην αντιμετώπιση της αντιμικροβιακής αντίστασης (Schmerold, 2023). Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει προβεί σε θεσμοθέτηση αυστηρών κανόνων γύρω από την χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία, τόσο όσον αφορά την απαγόρευση σκευασμάτων, όσο και τις επιτρεπόμενα όρια δοσολογίας (EMA, 2021).

Η χορήγηση αντιβιοτικών είναι σχεδόν παγιωμένη πρακτική στην κτηνοτροφία. Εξίσου παγιωμένη πρακτική είναι η χρήση των περιττωμάτων των ζώων ως βιολογικό λίπασμα, κοπριά και η εφαρμογή της σε γεωργικά εδάφη και καλλιεργούμενες εκτάσεις. Η εφαρμογή της κοπριάς στα εδάφη και συνεπώς η συστηματική εισαγωγή αντιβιοτικών σε αυτά, μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά από επιπτώσεις στο περιβάλλον και την δημόσια (ενιαία) υγεία (Perruchon, 2022) όπως: (1) Η διατάραξη της σύστασης του αυτόχθονου μικροβιώματος και της οργάνωσης των μικρο-οικοσυστημάτων, (2) η είσοδος τους σε υπόγεια μέσω έκπλυσης/ αποστράγγισης (leaching) ή υπέργεια υδάτινα συστήματα (και τελικά σε πόσιμα νερά), (3) η διασπορά γονιδίων αντοχής σε αντιβιοτικά στις μικροβιακές κοινότητες των εδαφών και τελικά η διασπορά της αντιβιοαντοχής

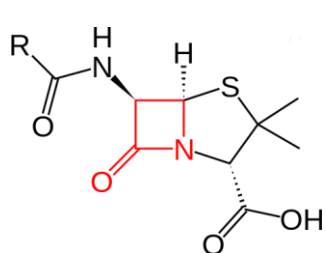
στις κοινότητες των προαστιακών και αστικών περιοχών, (4) η μεταφορά γονιδίων αντοχής που υπάρχουν στα καλλιεργούμενα προϊόντα και ορίζονται προς κατανάλωση και τελικά η έκθεση και διάδοση αυτών σε παθογόνα για τον άνθρωπο βακτήρια που συνοδεύονται με ανεπιθύμητες επιπτώσεις για τον άνθρωπο.

1.2 Κατηγορίες αντιβιοτικών

Ταξινόμηση των αντιβιοτικών φαρμάκων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους βάσει δηλαδή είτε του μηχανισμού δράσης τους, είτε βάσει της δραστικότητάς τους έναντι συγκεκριμένων ειδών μικροοργανισμών ή συχνότερα της δομής τους. Ειδικότερα, κυριότερες κατηγορίες αποτελούν οι β-λακτάμες, οι κινολόνες, οι τετρακυκλίνες, οι αμινογλυκοσίδες, τα μακρολίδια, οι σουλφοναμίδες, οι ριφαμπικίνες κα.

1. Β-λακτάμες

Τα αντιβιοτικά β-λακτάμης δρουν αναστέλλοντας την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Το όνομα τους οφείλουν στον δακτύλιο β-λακτάμης που φέρουν, ο οποίος είναι απαραίτητος για την αντιβακτηριακή τους δράση. Οι β-λακτάμες αναστέλλουν την διασταυρούμενη σύνδεση των πεπτιδικών αλυσίδων του κυτταρικού τοιχώματος μέσω της μη αντιστρεπτής πρόσδεσης τους στο ένζυμο που καταλύει την αντίδραση, μιας πενικιλινο-δεσμευτικής πρωτεΐνης (PBP), της

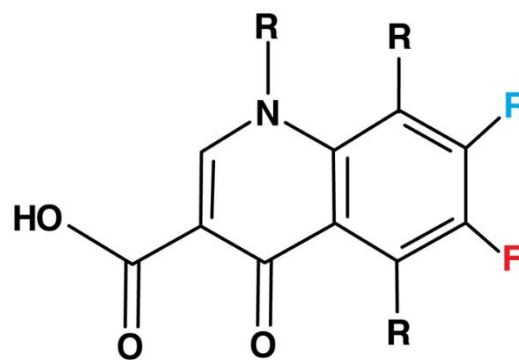


τρανσαπεπτιδάσης. Τα β-λακταμικά αντιβιοτικά περιλαμβάνουν τα πιο διαδεδομένα στις κλινικές εφαρμογές αντιβιοτικά τις πενικιλίνες, καθώς η πενικιλίνη αποτελεί το πρώτο αντιβιοτικό και τις κεφαλοσπορίνες.

Εικόνα 3. Ο τετραμελής β-λακταμικός δακτύλιος.

2. Κινολόνες

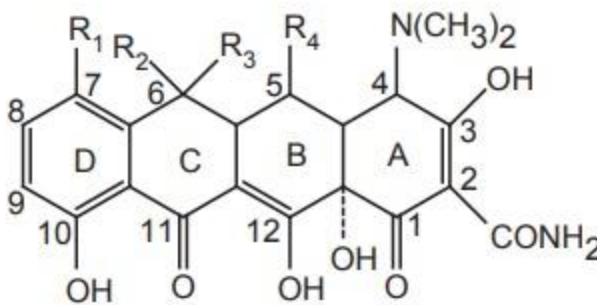
Οι κινολόνες και οι φθοροκινολόνες δρουν αναστέλλοντας την αντιγραφή και την μεταγραφή του DNA του βακτηρίου σταθεροποιώντας το σύμπλοκο που σχηματίζει το DNA με την τοποϊσομεράση. Η τοποϊσομεράση-στόχος διαφέρει στα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια. Η τοποϊσομεράση δημιουργεί σύμπλοκο με μια τοποϊσομεράση IV και μια τοποϊσομεράση II (DNA γυράση), αντίστοιχα. Η πρόσδεση του αντιβιοτικού στην τοποϊσομεράση IV παρεμβαίνει στον διαχωρισμό του προσφάτως διπλασιασμένου DNA και εμποδίζει την μελλοντική αντιγραφή, ενώ πρόσδεση στην DNA γυράση οδηγεί σε χάλαση του υπερελικομένου DNA και διάσπαση του κλώνου. Τα φάρμακα κινολόνης φέρουν ένα παρόμοιο δικυκλικό σύστημα δακτυλίων με έναν πυριδονικό δακτύλιο και ένα καρβοξυλικό οξύ στη θέση 3. Οι φθοροκινολόνες φέρουν και άτομο φθορίου το οποίο αυξάνει σημαντικά την κυτταρική πρόσληψη και την δραστικότητα του μορίου.



Εικόνα 4 Η βασική δομή των φθοροκινολονών

3. Τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες δρουν αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση μέσω της πρόσδεσής τους στην 30S υπομονάδα του ριβοσώματος, η οποία αποτρέπει την πρόσδεση του αμινοακυλο-tRNA και συνεπώς την περαιτέρω επιμήκυνση του πεπτιδίου. Η βασική δομή των τετρακυκλινών αποτελείται από ένα σύστημα δακτυλίων ναφθαλενίου. Το ένα άκρο της δομής είναι υδρόφιλο λόγω της ύπαρξης υδροξυλικών και καρβονυλικών ομάδων, ενώ το άλλο είναι υδρόφοβο. Η ύπαρξη τόσο πολλών πολικών ομάδων



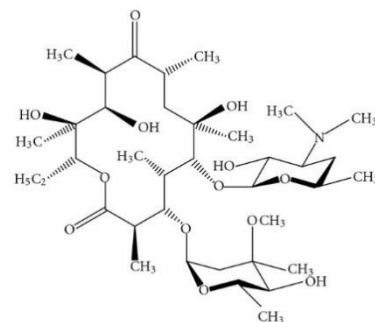
Εικόνα 5. Η βασική δομή της τετρακυκλίνης.

δείχνει ότι η πρόσδεση του αντιβιοτικού στο ριβόσωμα γίνεται με τη βοήθεια εκτεταμένου δικτύου αλληλεπιδράσεων υδρογόνου. Οι τετρακυκλίνες μετά τις β-λακτάμες είναι οι πιο σημαντικές ομάδες στην ιατρική και όπως και για τις β-λακτάμες έχει ανακαλυφθεί πληθώρα αναλόγων ή

έχουν κατασκευαστεί ημισυνθετικές τετρακυκλίνες με στόχο την ενίσχυση της δραστηριότητας των. Οι τετρακυκλίνες χρησιμοποιούνται ευρέως και στην κτηνιατρική και χορηγούνται ευρέως στην χοιροκτηνοτροφία ως συμπληρώματα διατροφής.

4. Μακρολίδια

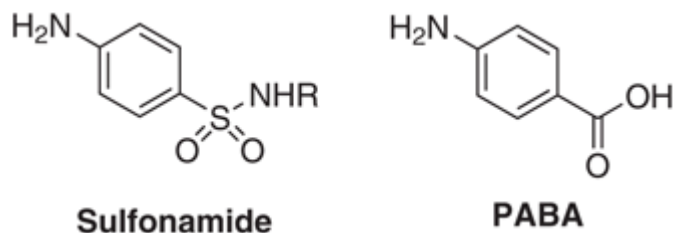
Τα μακρολίδια δρουν διακόπτοντας την πρωτεϊνوسύνθεση, μέσω της πρόσδεσης τους στην 50S ριβοσωμική υπομονάδα του βακτηρίου. Την πρόσδεση επιτυγχάνει μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals με ένα υδρόφοβο τμήμα της σήραγγας εξόδου του ριβοσώματος, τη θέση A, ενώ μια υδροξυλομάδα του αμινοσακχάρου του αντιβιοτικού αλληλεπιδρά με δεσμό υδρογόνου με μια αδενίνη του ριβοσώματος και τελικά εμποδίζει την επιμήκυνση του πεπτιδίου. Η δομή των μακρολιδίων που τους επιτρέπει την πρόσδεση στο ριβόσωμα είναι ένας μακροκυκλικός λακτονικός δακτύλιος συνδεδεμένα με ένα σάκχαρο και ένα αμινοσάκχαρο. Τα μακρολίδια έχουν ευρύ φάσμα δράσης.



Εικόνα 6. Η δομή της ερυθρομικίνης, που φέρει ένα 14 μελή λακτονικό δακτύλιο, και τα σάκχαρα κλαδινόζη και δεσοζαμίνη..

5. Σουλφοναμίδια

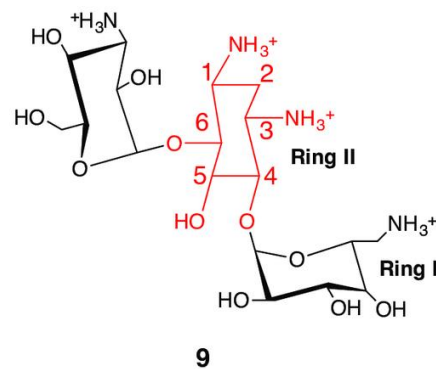
Τα σουλφοναμίδια δρουν ως αντιμεταβολίτες δηλαδή αναστέλλουν τον βακτηριακό μεταβολισμό. Τα σουλφοναμίδια αποτρέπουν την σύνθεση DNA, εμποδίζοντας την σύνθεση των πυριμιδινικών βάσεων των νουκλεικών οξέων, αναστέλλοντας τη δράση της διυδροπτεροϊκής συνθετάσης, ένζυμο που καταλύει τον σχηματισμό του απαραίτητου για τον σχηματισμό των πυριμιδινών συμπράγοντα, τετραϋδροφυλικό οξύ. Τα σουλφοναμίδια δρουν ως ανταγωνιστικοί αναστολείς της συνθετάσης μιμούμενα την ένα από τα φυσιολογικά υποστρώματα της το π-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA). Τα σουλφοναμίδια φέρουν έναν αρωματικό δακτύλιο και μια παρα-αμινομάδα και μια πλευρική ομάδα με αποτέλεσμα να αποτελούν ανάλογα της δομής του PABA.



Εικόνα 7. Η δομή του σουλφαμινιδίου ανάλογη του π-αμινοβενζοϊκού οξέος.

6. Αμινογλυκοσίδες

Οι αμινογλυκοσίδες δρουν κυρίως έναντι Gram-αρνητικών βακτηρίων, διακόπτοντας την πρωτεϊνσύνθεση, αλλά και αλληλεπιδρώντας με την κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου. Οι αμινογλυκοσίδες δεσμεύονται στην 30S ριβοσωμική υπομονάδα και εμποδίζουν την μετακίνηση του ριβοσώματος κατά μήκος του mRNA. Πριν όμως ακόμη φτάσουν στο ριβόσωμα οι αμινογλυκοσίδες αναδιατάσσουν την κυτταρική μεμβράνη και δημιουργούν πόρους για να εισέλθουν, μεταβάλλοντας την διαπερατότητα τους. Περαιτέρω αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης μπορεί να προκληθεί από την προσκόλληση ελλαττωματικών πρωτεϊνών που έχουν παραχθεί μετά την πρόσδεση του αντιβιοτικού στο ριβόσωμα. Οι αμινογλυκοσίδες επιτυγχάνουν την πρόσδεση στο RNA του ριβοσώματος μέσω αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου με τον σακχαροφωσφορικό σκελετό του RNA. Οι αμινογλυκοσίδες χαρακτηρίζονται από μια δομή υδαταανθράκων που περιέχει αμινομάδες. Και συνήθως περιέχουν στον πυρήνα τους έναν δακτύλιο δεοξυστρεπταμίνης.

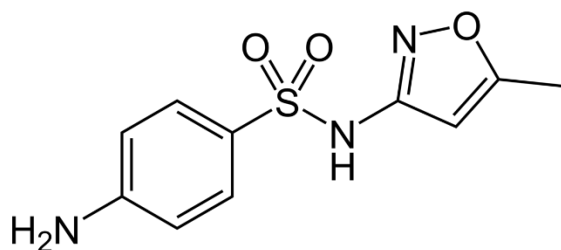


Εικόνα 8. Η δομή της καναμυκίνης. Με κόκκινο φαίνεται ο δακτύλιος της δεοξυστρεπταμίνης.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση 3 αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται ευρέως στην κτηνοτροφία και την κτηνοτροφία χοίρων.

1.2.1 Σουλφαμεθοξαζόλη

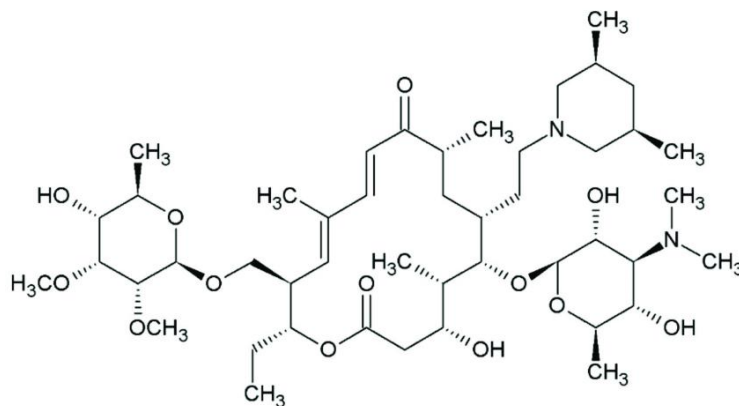
Η σουλφαμεθοξαζόλη ανήκει στην ομάδα των σουλφοναμιδίων και αποτελεί έναν αντιμεταβολίτη, δηλαδή αναστέλλει τον κυτταρικό μεταβολισμό του μικροοργανισμού. Τα σουλφοναμίδια παρεμποδίζουν την σύνθεση του τετραϋδροφυλικού οξέος, ενός συμπαράγοντα απαραίτητου για την σύνθεση των πυριμιδινών και συνεπώς την σύνθεση του DNA. Τα σουλφοναμίδια δρουν ως αναστολείς του ενζύμου διϋδροπτεροϊκή συνθετάση και εμποδίζουν την πρόσδεση του π-αμινοβενζοϊκού οξέος στο ένζυμο και συνεπώς την σύνθεση του τετραϋδροφυλικού. Τη δράση τους οφείλουν στην *πάρα*-αμινομάδα, τον αρωματικό δακτύλιο και την λειτουργική ομάδα που φέρουν τα μόρια. Χορήγηση της σουλφαμεθοξαζόλης γίνεται συνήθως σε συνδυασμό με έναν άλλον αντιμεταβολίτη, την τριμεθοπρίμη σε ένα σκεύασμα που ονομάζεται κοτριμοξαζόλη. Η τριμεθοπρίμη είναι μια διαμινοπυριδινική ένωση και αναστέλλει την δράση της διϋδροφυλικής υδρογονάσης, ένζυμο υπεύθυνο για τη μετατροπή του διϋδροφυλικού σε τετραϋδροφυλικό οξύ. Με την συνεργιστική δράση των δύο ουσιών παρατηρείται διαδοχικός αποκλεισμός του βιοσυνθετικού μονοπατιού και τελικά αντιβιοτική δράση (Graham L.Patrick, An introduction to medicinal chemistry, 2017). Το σκεύασμα χορηγείται σε χοίρους με στόχο την θεραπεία ασθενειών που οφείλονται σε πρωτόζωα όπως λεισμανίαση και τοξοπλάσμωση (Mercer, 2022).



Εικόνα 9. Η δομή της σουλφαμεθοξαζόλης.

1.2.2 Tilmicosin

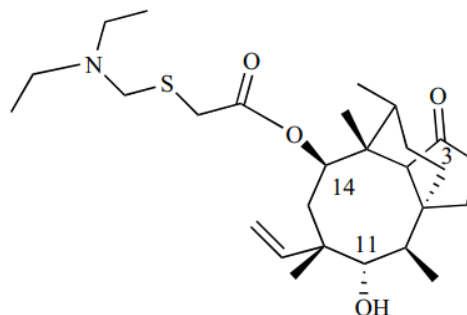
Το tilmicosin ανήκει στην ομάδα των μακρολιδίων και είναι ένας μεταβολίτης με βακτηριοστατική δράση διακόπτοντας την πρωτεϊνσύνθεση. Τα μακρολίδια προσδένονται αντιστρεπτά στην 50S υπομονάδα του ριβοσώματος και αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση. Η δράση του οφείλεται στον 16-μελή μακροκυκλικό λακτονικό δακτύλιο, το σάκχαρο και το αμινοσάκχαρο που είναι προσδεμένα σε αυτόν (Graham L.Patrick, An introduction to medicinal chemistry, 2017). Το tilmicosin είναι ένα αντιβιοτικό ευρέως φάσματος με δράση έναντι Gram-θετικών και Gram-αρνητικών και χορηγείται συχνά στην κτηνοτροφία και την κτηνοτροφία χοίρων για τη θεραπεία και πρόληψη αναπνευστικών λοιμώξεων (Lemli,2018).



Εικόνα 10. Η δομή του tilmicosin.

1.2.3 Tiamulin

Το tiamulin είναι ημισυνθετικό παράγωγο της πλευρομουτυλίνης. Η πλευρομουτυλίνη είναι ένα φυσικό προϊόν που απομονώθηκε από τον μύκητα *Clitopilus scyphoides* και είναι ένα βακτηριοστατικό αντιβιοτικό. Το αντιβιοτικό προσδένεται αντιστρεπτά στην 50S υπομονάδα του βακτηριακού ριβοσώματος και ειδικότερα στο κέντρο της πεπτιδυλοτρανσφοράς του ριβοσώματος χάρη στο καρβονυλικό οξύ της εστερομάδας στην θέση 14, το οποίο δρα ως δέκτης υδρογόνου και οδηγεί στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με ένα κατάλοιπο γουανωσίνης στο 23S rRNA. Η πρόσδεση επάγει την



Εικόνα 11. Η δομή του tiamulin.

μετατόπιση δύο καταλοίπων ουρακίλης και έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρότερη πρόσδεση του αντιβιοτικού και συνεπώς την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Το tiamulin δρα έναντι gram-θετικών βακτηρίων και χρησιμοποιείται ευρέως στην κτηνοτροφία και ειδικά στην χοιροκτηνοτροφία για την πρόληψη και θεραπεία αναπνευστικών και εντερικών λοιμώξεων (van Duijkeren et al., 2014).

1.3 Η χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία

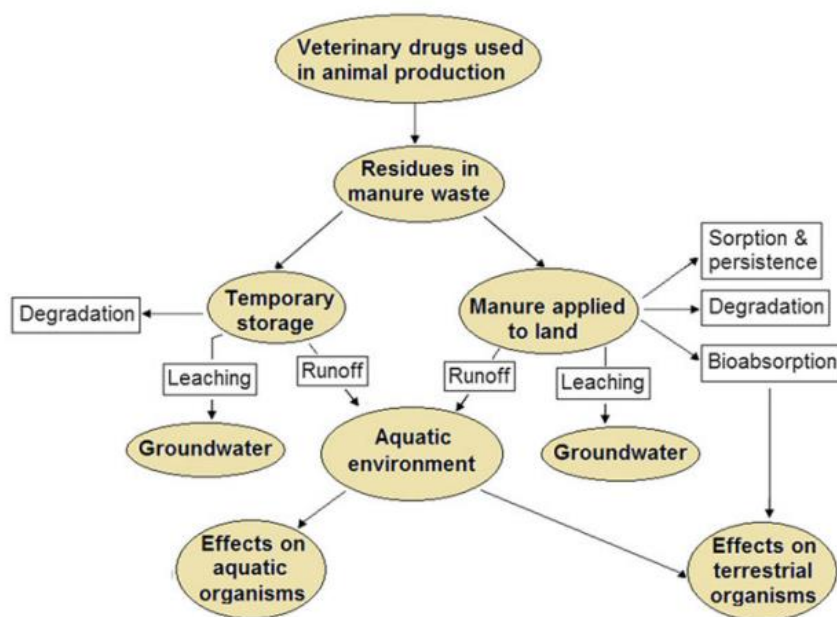
Η επέκταση της χρήσης αντιβιοτικών στην κτηνιατρική και την κτηνοτροφία έγινε πολύ γρήγορα μετά την χρήση αντιβιοτικών φαρμάκων στην ιατρική. Η αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών στην παροχή προστασίας έναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς έχει ως αποτέλεσμα την επέκταση της χρήσης τους εκτός της ιατρικής και στην κτηνοτροφία και την γεωργία. Αν και ορισμένα φαρμακευτικά σκευάσματα σχεδιαστήκαν ειδικά για κτηνιατρική χρήση, τα περισσότερα ταυτίζονται με αυτά που χορηγούνται στον άνθρωπο, ανήκουν στις ίδιες τάξεις και παρουσιάζουν παρόμοια δομή (Cantas, 2013). Αρχικά χορήγηση αντιβιοτικών φαρμακευτικών σκευασμάτων αποσκοπούσε στη θεραπεία ασθενειών και μολύνσεων οικόσιτων ζώων. Η ικανότητα των αντιβιοτικών να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, τα καθιστά ικανά να δρουν και ως αυξητικοί παράγοντες. Τα αντιβιοτικά αναστέλλουν την ανάπτυξη του εντερικού μικροβιώματος καθιστώντας την ενέργεια που θα αξιοποιούσαν για την αύξηση τους διαθέσιμη στον οργανισμό. Συνεπώς αναφέρεται ότι τα αντιβιοτικά αυξάνουν την διαθεσιμότητα των θρεπτικών και βελτιώνουν την κατανάλωση τροφής και τελικά αυξάνουν το βάρος του ζώου. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα η χορήγηση αντιβιοτικών ως συμπληρώματα διατροφής να γίνει συστηματική πρακτική στην κτηνοτροφία (Song et al, 2014). Σήμερα από τη χορήγηση αντιβιοτικών φαρμακευτικών ποσοστό 30% αντιστοιχεί σε θεραπευτική χρήση (Cantas, 2013).

Το 2017 οι πωλήσεις αντιβιοτικών σκευασμάτων για χρήση σε κτηνοτροφία ζώων τροφής εκτιμήθηκε στους 93.039 τόνους και εκτιμήσεις προβλέπουν ότι μέχρι το 2030 οι πωλήσεις θα έχουν ανέλθει σε 104.079 τόνους. Τη σημαντικότερη συμβολή στην αύξηση της κατανάλωσης αντιβιοτικών εμφανίζει η κτηνοτροφία χοίρων με το 45% της αύξησης να αποδίδεται σε αυτήν (Tiseo K., et al., 2020). Η κτηνοτροφία αποτελεί την δραστηριότητα με τη μεγαλύτερη κατανάλωση αντιβιοτικών και συνεπώς την κυριότερη οδό εισαγωγής αντιβιοτικών στο

περιβάλλον συμβάλλοντας σημαντικά στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών και τη διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας σε παθογόνα για τον άνθρωπο βακτήρια.

1.3.1 Η τύχη των αντιβιοτικών μετά την χορήγηση(Song,2014)

Κύριο μονοπάτι εισαγωγής των αντιβιοτικών παραγόντων στο περιβάλλον αποτελούν τα κτηνοτροφικά λύματα. Ανάλογα με το αντιβιοτικό και το είδος ζώου το 10-90% του σκευάσματος εξέρχεται μέσω των ούρων ή των κοπράνων του εκτρεφόμενου ζώου ως ακέραια αρχική ένωση ή ως ενεργός μεταβολίτης της (Song, 2014). Τα λύματα συλλέγονται και φυλάσσονται για κάποιο χρονικό διάστημα με σκοπό τον σχηματισμό κοπριάς που χρησιμοποιείται ως οργανικό λίπασμα. Η κοπριά είναι αποτέλεσμα εναπόθεσης των περιττωμάτων και λυμάτων των εκτρεφόμενων ζώων σε κοπροσωρούς σε ανοιχτό ή συστεγασμένο χώρο για μικρό χρονικό διάστημα, προκειμένου να πραγματοποιηθεί χώνεψη της κοπριάς. Κατά τη χώνεψη κύρια διεργασία είναι η δέσμευση αμμωνίας και φωσφόρου από το μικροβίωμα του εδάφους. Η κοπριά πράγματι αποτελεί καλό οργανικό λίπασμα και είναι πλούσια σε θρεπτικά απαραίτητα για την ανάπτυξη της καλλιέργειας,



Εικόνα 12. Η οδός εισαγωγής αντιβιοτικών στο περιβάλλον μέσω της κοπριάς

ενώ αποτελεί και εύκολο τρόπο διαχείρισης των αποβλήτων. Παράλληλα, όμως είναι πλούσια σε αντιβιοτικά που δεν έχουν μεταβολιστεί πλήρως ή προϊόντα τους μεταβολισμού τους από τα εκτρεφόμενα ζώα (Kumar, 2005). Κατάλοιπα αντιβιοτικών μπορούν επίσης να μετασχηματιστούν

στις μητρικές ενώσεις μετά την εναπόθεση στο χώμα (Jechalke, 2014). Κατά την διάρκεια του χρόνου εναπόθεσης της κοπριάς σε κοπροσωρούς ευνοείται η ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών με αντοχή στον αντιβιοτικό παράγοντα, καθώς και η διάχυση των γονιδίων αντοχής. Αργότερα η κοπριά απορρίπτεται σε καλλιεργούμενες εκτάσεις. Αυτή είναι και η κύρια οδός διασποράς αντιβιοτικών και ανθεκτικών σε αντιβιοτικά μικροοργανισμών στο περιβάλλον.

Τα αντιβιοτικά που εισάγονται στο έδαφος απορροφώνται από το χώμα. Η απορρόφηση είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των αντιβιοτικών ενώσεων με την διαθέσιμη στο έδαφος οργανική ύλη στην οποία προσδένονται με αποτέλεσμα την προσρόφηση και τελικά σταθεροποίηση των ενώσεων στην περιβαλλοντική μήτρα. Το σθένος της πρόσδεσης καθορίζεται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες τόσο της αντιβιοτικής ένωσης όσο και του εκάστοτε εδάφους. Την απορροφητικότητα του εδάφους επηρεάζει η υγρασία, η υδατοχωρητικότητα, η θερμοκρασία και η σύσταση του (Du, 2011). Η αντιβιοτική ένωση μπορεί να έχει τόσο υδρόφοβες όσο και υδρόφιλες ιδιότητες και να είναι θετικά ή αρνητικά φορτισμένες. Οι μηχανισμοί που συμμετέχουν στην πρόσδεση της ένωσης στην ανόργανη ύλη του εδάφους περιλαμβάνουν κυρίως δυνάμεις van der Waals, ηλεκτροστατικές έλξεις, γέφυρες κατιόντων και ανταλλαγή ανιόντων στις οποίες συμμετέχουν οι πολικές ομάδες των αντιβιοτικών ενώσεων (Song, 2014).

Μια αντιβιοτική ένωση μη ισχυρά προσδεδεμένη στην οργανική ύλη του χώματος είναι διαθέσιμη στο μικροβίωμα του εδάφους για βιοαποικοδόμηση, παράλληλα όμως αποτελεί περισσότερο κινητό μόριο, το οποίο μπορεί εύκολα να μεταναστεύσει σε κατώτερα στρώματα του χώματος, ίσως στα υπόγεια ύδατα ή και να παρασυρθεί από απορροές σε επίγεια ύδατα με αποτέλεσμα την περαιτέρω διάδοση του (Du, 2011). Μια αντιβιοτική ένωση ισχυρά προσδεδεμένη στην οργανική ύλη του χώματος σταθεροποιείται και μονιμοποιείται και παύει να είναι διαθέσιμη για βιοαποικοδόμηση χωρίς απαραίτητα να μειώνεται η οικοτοξική της ικανότητα. Και στις δύο περιπτώσεις η αντιβιοτική ένωση ασκεί εξελικτική πίεση για την επικράτηση βακτηριακών στελεχών με αντοχή σε αυτή (Jechalke, 2014). Ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης κάθε αντιβιοτικής ένωσης στο περιβάλλον ποικίλει και εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως το μικροβίωμα του εδάφους, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση της αντιβιοτικής ένωσης, η έκθεση στο φως, η βιοδιαθεσιμότητα οξυγόνου και το pH του εδάφους (Song, 2014). Παρόλα αυτά όλα τα αντιβιοτικά αποικοδομούνται στα γεωργικά εδάφη και έχουν χρόνους ημιζωής μικρότερους από 30 ημέρες. Οι κύριοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των κτηνιατρικών

αντιβιοτικών περιλαμβάνουν ενζυμικές διεργασίες όπως οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση και υδροξυλίωση (μικροβιακή αποικοδόμηση από βακτήρια και μύκητες) και αβιοτικές διεργασίες όπως η υδρόλυση, η οξείδωση και η φωτόλυση. Αντιβιοτικά που ανήκουν στις τάξεις των β-λακταμών, μακρολιδίων και σουλφοναμίδων υδρολύονται εύκολα, ενώ αντιβιοτικά της τάξης των κινολόνων και τετρακυκλινών είναι ευαίσθητα σε φωτόλυση (Song, 2014).

Τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά λόγω της εξασθένισης και βιοαποικοδόμησης τους εμφανίζουν χαμηλές συγκεντρώσεις και συνήθως δεν είναι δυνατή η ανίχνευση τους σε γεωργικά εδάφη μετά από εφαρμογή κοπριάς. Αντίστοιχα οριακά ανιχνεύσιμες είναι οι συγκεντρώσεις τους στα κατώτερα στρώματα του εδάφους και τα υπόγεια ύδατα. Παρόλα αυτά οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών είναι επαρκείς για να επηρεάσουν τις ενδογενείς μικροβιακές κοινότητες των εδαφών. Ειδικότερα τα περισσότερα αντιβιοτικά εμφανίζουν αρκετά χαμηλές EC_{50} (ελάχιστη συγκέντρωση αντιβιοτικής ένωσης στην οποία επηρεάζεται το 50% του μικροβιακού πληθυσμού). Αυτό σημαίνει ότι ακόμη και στις χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να ασκήσουν επιλεκτική πίεση για την ανάπτυξη και εδραίωση ανθεκτικών στελεχών (Song, 2014).

1.4 Το πρόβλημα της αντοχής στα αντιβιοτικά

Όπως αναφέρθηκε τα αντιβιοτικά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες των μικροοργανισμών με φυσιολογικό ρόλο όχι μόνον την προστασία του μικροοργανισμού έναντι θηρευτών και ανταγωνιστικών πληθυσμών του, αλλά και την σηματοδότηση για την διακυτταρική επικοινωνία ενός βακτηριακού πληθυσμού. Παρουσία αντιβιοτικών ποικίλων τάξεων στο κύτταρο οδηγεί σε ρύθμιση και επαγωγή της έκφρασης γονιδίων, που σχετίζονται με φαινότυπους προσαρμογής των βακτηριακών πληθυσμών (σύνθεση μαστιγίων, σχηματισμός αποικίας, βιοφίλμ) (Gillings, 2013 and within Goh, E.-B.,2002; Seshasayee, A. S. N.,2006). Παρουσία των αντιβιοτικών σε σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις οδηγεί σε αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Οι συγκεντρώσεις αυτές, που αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών ουσιών που περιέχονται στα αντιβιοτικά σκευάσματα είναι σημαντικά υψηλότερες από τις συγκεντρώσεις στις οποίες απαντώνται οι ουσίες φυσιολογικά στο περιβάλλον. Μηχανισμοί και γονίδια που συμμετέχουν στον καταβολισμό αντιβιοτικών μεταβολιτών, απαντώνται σχεδόν σε όλους τους μικροοργανισμούς με ικανότητα σύνθεσης των μεταβολιτών και αναφέρεται ως ενδογενής ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Σχηματισμός των μηχανισμών μπορεί να αποδοθεί σε τυχαία εξελικτικά γεγονότα, τροποποιήσεις σε μηχανισμούς ή συστήματα ενός προηγούμενως-

ευαίσθητου βακτηρίου, που το καθιστούν ανεκτικό στην παρουσία αντιβιοτικών παραγόντων, οπότε γίνεται λόγος για επίκτητη ανθεκτικότητα. Η επίκτητη ανθεκτικότητα μπορεί να είναι και αποτέλεσμα συμβάντος οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Κατά την οριζόντια γονιδιακή μεταφορά στο προηγούμενως-ευαίσθητο βακτήριο μεταφέρεται από γειτονικό βακτήριο, μεταθετό στοιχείο που φέρει γονίδιο ανεκτικότητας σε αντιβιοτικό (EMA, 2021). Οι παραπάνω τροποποιήσεις αναφέρονται ως μέσα αντοχής (resistome) του βακτηρίου. Το resistome του βακτηρίου και συνεπώς γονίδια που συμβάλλουν στην αντοχή απέναντι σε αντιβιοτικούς παράγοντες προηγείται της ευρείας κλινικής χρήσης αντιβιοτικών σκευασμάτων και αποτελεί μια σύνθετη και ετερογενή δεξαμενή γονιδίων ανθεκτικότητας (Gillings, 2013).

Η ανθρώπινη δραστηριότητα, δηλαδή η ανεξέλεγκτη χρήση αντιβιοτικών φαρμάκων στην ιατρική και στην κτηνοτροφία εισάγει στο περιβάλλον πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών παραγόντων. Η αφύσικη αφθονία των αντιβιοτικών δρα ως επιλεκτική πίεση για την επιβίωση και εδραίωση μικροβιακών στελεχών με αντοχή στα αντιβιοτικά. Τα στελέχη μπορεί να είναι παθογόνα για τον άνθρωπο μικρόβια, είτε να συμβάλλουν στην περαιτέρω διάχυση του resistome σε παθογόνα (EMA, 2021). Αποτέλεσμα της διάχυσης των γονιδίων αντοχής σε αντιβιοτικά είναι η επικράτηση παθογόνων στελεχών με αντίσταση σε αντιβιοτικό και παθογόνων με αντίσταση σε πληθώρα αντιβιοτικών (multidrug -resistant organisms).

1.4.1 Μηχανισμοί αντίστασης στα αντιβιοτικά

Οι κύριοι μηχανισμοί αντοχής έναντι ουσιών με αντιβιοτική δράση που έχουν αναπτύξει οι βακτηριακοί πληθυσμοί είναι οι παρακάτω:

1. Μειωμένη διαπερατότητα:

Αφορά κυρίως Gram-αρνητικά βακτήρια γιατί φέρουν μια εξωτερική μεμβράνη λιποπολυσακχαριτών γύρω από το κυτταρικό τους τοίχωμα (η οποία απουσιάζει από τα Gram-θετικά, τα οποία φέρουν ένα πιο παχύ κυτταρικό τοίχωμα και συνιστά τη βασική διαφορά τους) και αποτελεί κυρίως ενδογενή μηχανισμό αντίστασης (Brock, Biology of microorganisms, 2015). Στην επιφάνεια της μεμβράνης λιποπολυσακχαριτών εντοπίζονται πρωτεΐνες-κανάλια, οι πορίνες. Οι πορίνες λειτουργούν ως πόροι επιτρέποντας την είσοδο νερού και θρεπτικών συστατικών ενδοκυτταρικά. Τα κανάλια αυτά είναι διαπερατά μόνο από μικρά και υδρόφιλα μόρια και λειτουργούν ως επιπλέον φραγμός για την πρόσβαση ξеноβιοτικών ουσιών πέραν από το κυτταρικό τοίχωμα και την εξωτερική μεμβράνη (Reygaert, 2018). Αντοχή σε αντιβιοτικό

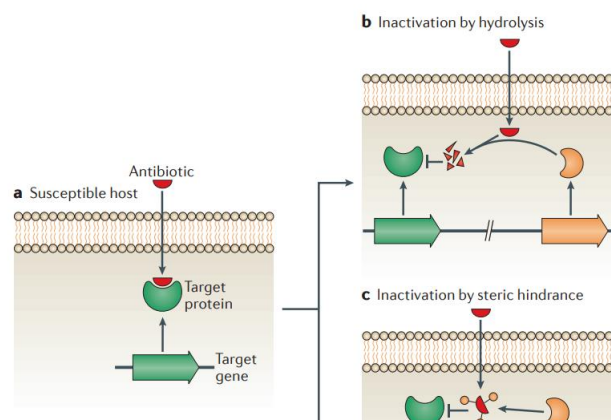
παράγοντα με τη βοήθεια μεταλλάξεων των πορινών μπορεί να επιτευχθεί είτε με μείωση της συγκέντρωσης τους στην μεμβράνη και συνεπώς μείωση των δίοδων έλευσης, είτε με αύξηση της εκλεκτικότητας της διαπερατότητας τους. Και στις δύο περιπτώσεις η συγκέντρωση του παράγοντα ενδοκυτταρικά είναι ανεπαρκής για να επιτελέσει τη δράση του (Kumar, 2005).

2. Τροποποίηση στόχου (Reygaert, 2018):

Η τροποποίηση στόχου ως μηχανισμός αντίστασης είναι κυρίως ενδογενής, αλλά υπάρχουν και αρκετά διαδεδομένες περιπτώσεις, όπου είναι αποτέλεσμα επίκτητης αντοχής. Τα αντιβιοτικά καταφέρνουν να παρεμβαίνουν στη φυσιολογική λειτουργία του βακτηρίου, αλληλεπιδρώντας με συγκεκριμένα δομικά συστατικά του κυττάρου. Η συγγένεια για αυτά τα συστατικά καθορίζεται από τη δομή τόσο του αντιβιοτικού, όσο και του συστατικού-στόχου. Μικρές τροποποιήσεις στην δομή του στόχου, προϊόντα μεταλλάξεων μπορούν να μειώσουν σε σημαντικό βαθμό τη συγγένεια του αντιβιοτικού για αυτό, με αποτέλεσμα να μειώνεται ή να χάνεται ολοκληρωτικά η ικανότητα πρόσδεσης σε αυτό και συνεπώς η ικανότητα του αντιβιοτικού να παρεμβαίνει στην λειτουργία του συστατικού.

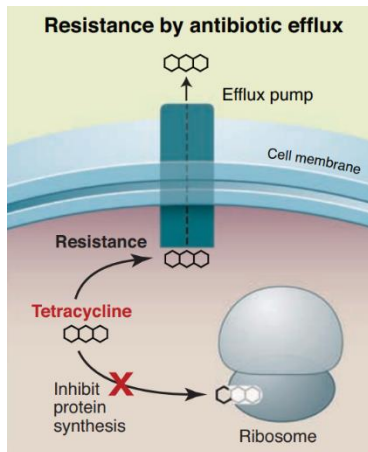
3. Αδρανοποίηση αντιβιοτικού:

Η αδρανοποίηση της αντιβιοτικής ένωσης μπορεί να είναι μηχανισμός ενδογενής ή και επίκτητος και είναι συνήθως αποτέλεσμα δράσης ενός άλλου ενζύμου. Η αδρανοποίηση επιτυγχάνεται είτε αποικοδομώντας την ένωση, είτε τροποποιώντας την δομή της. Η αποικοδόμηση επιτυγχάνεται μέσω υδρόλυσης (Reygaert, 2018). Κυριότερος και πιο διαδεδομένος εκπρόσωπος ενζύμων με υδρολυτική δράση είναι η β-λακταμάση, η οποία υδρολύει τον λακταμικό δακτύλιο της πενικιλίνης και άλλων β-λακταμών. Η τροποποίηση των αντιβιοτικών ενώσεων επιτυγχάνεται μέσω αντίδρασης προσθήκης κάποιας πλευρικής ομάδας στην ένωση. Και στις δύο περιπτώσεις το αποτέλεσμα είναι η αλλαγή της δομής της αντιβιοτικής ένωσης και η αδυναμία της να προσδεθεί στο μόριο-στόχο της και να δράσει (Blair, Webber, 2014).



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών αδρανοποίησης αντιβιοτικών.

4. Ανάπτυξη ανθεκτικής βιοχημικής οδού



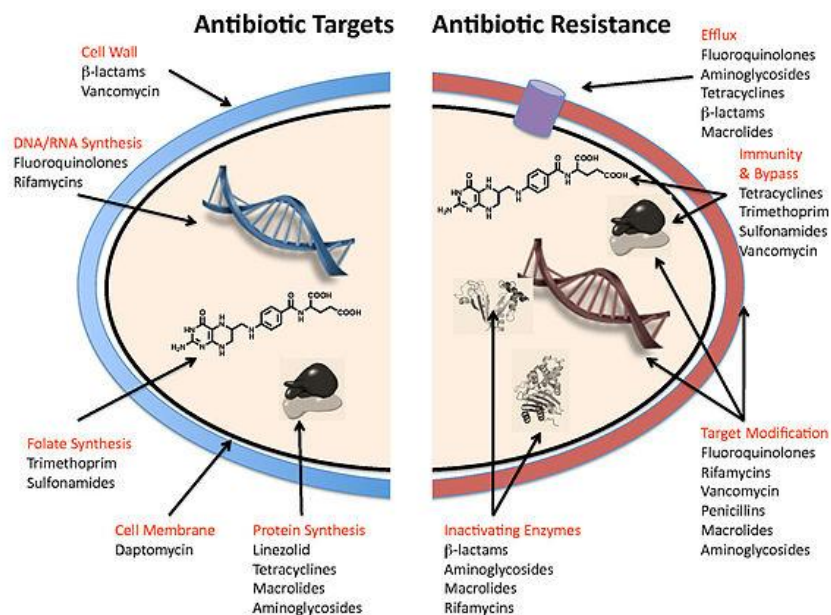
Εικόνα 14. Μηχανισμός αντίστασης στην τετρακυκλίνη, αποτρέποντας την πρόσδεση του αντιβιοτικού στο ριβόσωμα.

Και η ανάπτυξη ανθεκτικού βιοχημικού μονοπατιού αποτελεί ενδογενή μηχανισμό και συνήθως κωδικοποιείται στη χρωμοσωμική περιοχή του βακτηρίου (Brock, Biology of microorganisms, 2015). Όπως και κατά την τροποποίηση του μορίου-στόχου, η αντίσταση επιτυγχάνεται μέσω της τροποποίησης του ενζύμου που συμμετέχει στο μονοπάτι και αποτελεί το μόριο-στόχο. Η δράση του αντιβιοτικού πάλι οφείλεται στην ικανότητα πρόσδεσης του στο στόχο, αυτή τη φορά όμως την ικανότητά του οφείλει στο ότι έχει δομή παρεμφερή με το φυσιολογικό υποστρώμα του ενζύμου, και έτσι δρα ανταγωνιστικά. Συνεπώς η τροποποίηση στη δομή του ενζύμου-στόχου θα πρέπει να εντοπίζεται σε θέση κοντά ή στο ίδιο το ενεργό του κέντρο με τρόπο

που να αποτρέπει την πρόσδεση του αντιβιοτικού αλλά όχι του φυσιολογικού του υποστρώματος (Reygaert ,2018).

5. Εκροή (ώθηση εκτός κυττάρου)

Αφορά και gram-θετικά, αλλά κυρίως gram-αρνητικά βακτήρια και αποτελεί ενδογενή μηχανισμό αντίστασης. Η χρήση αντλιών-εκροής αποτελεί βασικό μηχανισμό για την απομάκρυνση ξενοβιοτικών ουσιών από το εσωτερικό ενός κυττάρου (Blair ,2014). Όλα τα βακτήρια κωδικοποιούν αντλίες εκροής, των οποίων η έκφραση είναι είτε ιδιοσύστατη είτε επαγόμενη από περιβαλλοντικά σήματα όπως η αύξηση της συγκέντρωσης της ουσίας. Τα βακτήρια επίσης συνήθως κωδικοποιούν οικογένειες αντλιών που εμφανίζουν συγγένεια για διαφορετικά υποστρώματα ή αξιοποιούν διαφορετικές πηγές ενέργειας (Reygaert ,2018). Οι κυριότερες οικογένειες που σχετίζονται με την απομάκρυνση αντιβιοτικών είναι πέντε: οι ABC (κασέτα πρόσδεσης ATP, ATP-binding cassette), οι RND (resistance nodulation-division), οι SMR (small multidrug resistance), οι MATE και οι MFS αντλίες εκροής. Οι αντλίες δεσμεύουν το αντιβιοτικό και το προωθούν εκτός του κυττάρου, με αποτέλεσμα να απομακρύνεται από το μόριο-στόχο του ή η συγκέντρωσή του να είναι ανεπαρκής για να έχει αντιβιοτική δράση (Blair ,2014).



Εικόνα 15. Μηχανισμοί δράσης αντιβιοτικών και βακτηριακή αντίσταση στη δράση τους.

1.4.2 Γονίδια αντοχής

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός μιας σειράς γονιδίων ανθεκτικότητας σχετιζόμενα με τα πιο ευρέως κλινικά χορηγούμενα αντιβιοτικά. Τα οποία απαντώνται σε μεγάλη αφθονία σε ποικίλα περιβάλλοντα. Ειδικότερα, αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται αρκετά στην κτηνοτροφία και για τα οποία η αντιβιοαντοχή αποτελεί μια από τις συχνά απαντώμενες στους μικροοργανισμούς είναι οι σουλφοναμίδες, οι β -λακτάμες, οι τετρακυκλίνες και γονίδια που σχετίζονται με την αντοχή σε αυτά *sul1*, *tem* (Medeiros, 1997, Salverda ML, 2010) και *tet* (Lima, 2020) αντίστοιχα. Επιλέχθηκε ακόμη γονίδιο ανθεκτικότητας στην τριμεθοπρίμη, το *dfrA* λόγω της σύνδεσης της χορήγησης του με τη χορήγηση σουλφοναμίδης (Mercer, 2022). Πραγματοποιείται ακόμη ποσοτικοποίηση του *cfxA*, γονιδίου που σχετίζεται με αντοχή σε ένα από τα πιο συχνά χορηγούμενα αντιβιοτικά, την κεφαλοσπορίνη 3^{ης} γενιάς (Sydenham TV, 2015, Arumugham, 2023). Τέλος, στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος βρέθηκε και το γονίδιο *qnrD*, το οποίο αν και σχετίζεται με την ανθεκτικότητα σε σπάνια κλινικά χορηγούμενη φθοροκινολόνη, είναι αρκετά επίμονη στα εδάφη (Van-Anh Thai et al., 2023).

1. cfxA

Το cfxA είναι ένα γονίδιο ανθεκτικότητας για αντιβιοτικά β-λακτάμης στα gram-αρνητικά βακτήρια. Το γονίδιο απομονώθηκε από αναερόβια βακτήρια του γένους *Bacteroides spp.* και η γενετική του πληροφορία περιέχεται και μεταφέρεται κυρίως με τη βοήθεια τρανσποζονίου Tn4555 (Ferreira, 2007). Το προϊόν του γονιδίου αποτελείται από 321 αμινοξέα και είναι ένα ένζυμο με δράση β-λακταμάσης (Parker AC, 1993)

2. qnrD

Το qnrD ανήκει στην οικογένεια των qnr γονιδίων και είναι γονίδιο αντίστασης στις κινολόνες (Hernandez, 2011). Το qnrD απομονώθηκε από πλασμίδιο από παθογόνο βακτήριο *Salmonella enterica*. Το γονίδιο κωδικοποιεί μια επαναλαμβανόμενη πρωτεΐνη πενταπεπτιδίου (Pentapeptide Repeat Protein, PRP), η οποία αποτελείται από 214 αμινοξέα (Cavaco LM, 2009). Οι PRPs προσδένονται στις τοποϊσομεράσες (τοποϊσομεράση IV και DNA γυράση) και τις προστατεύει από τη δράση φθοροκινολόνων, επιτρέποντας την φυσιολογική αντιγραφή και μεταγραφή του γονιδίου (Hernandez, 2011).

3. sul1 (Sko:ld, 2000)

Το sul1 είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα γονίδια αντίστασης στις σουλφοναμίδες. Το γονίδιο εντοπίζεται σε gram-αρνητικά βακτήρια και περιέχεται σε ιντεγκρόνια τάξης 1 μέσα σε πλασμίδια. (Συχνά στο ιντεγκρόνιο περιέχονται και άλλα γονίδια αντίστασης για διαφορετικούς αντιβιοτικούς παράγοντες). Το γονίδιο κωδικοποιεί μια διϋδροπτεροϊκή συνθετάση που δεν επιτρέπει την πρόσδεση του αναστεολέα, αντιβιοτικού, αλλά καταφέρει και διατηρεί υψηλή συγγένεια για την πρόσδεση του φυσιολογικού υποστρώματος. Έτσι το ένζυμο μπορεί να καταλύσει φυσιολογικά την αντίδραση και να παραχθεί φυλλικό οξύ.

4. TEM (Bajpai T., 2017)

Το γονίδιο TEM κωδικοποιείται από gram-αρνητικά βακτήρια και προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι αντιβιοτικών β-λακτάμης. Ειδικότερα το προϊόν του γονιδίου είναι μια β-λακταμάση ευρείου φάσματος (Extended spectrum beta-lactamase, ESBL), δηλαδή το ένζυμο που κωδικοποιεί μπορεί να υδρολύσει τον λακταμικό κύκλο πολλών διαφορετικών οικογενειών β-λακταμών, όπως είναι οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες και μονοβακτάμες.

5. tet (M)

Το tet(M) ανήκει στην ομάδα γονιδίων αντίστασης στην τετρακυκλίνη. Τα γονίδια αντίστασης tet στην τετρακυκλίνη εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια και κωδικοποιούν αντλίες-εκροής ή πρωτεΐνες που σχετίζονται με την προστασία του ριβοσώματος από τετρακυκλίνη. Το tet(M) είναι πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη ριβοσωμική προστασία. Το γονίδιο κωδικοποιείται από νουκλεοτιδική αλληλουχία μήκους 1917 ζευγών βάσεων, το οποίο περιέχεται και μεταβιβάζεται στο τρανσποζόνιο Tn1545(Martin P., 1986). Πρόκειται για κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που εμφανίζει ομολογία για τα τους παράγοντες επιμήκυνσης EF-G(Elongation Factor-G) και EF-Tu(Elongation Factor Tu) στο αμινοτελικό άκρο, το οποίο αποτελεί και θέση πρόσδεσης του GTP(Chopra, Roberts, 2001). Το tet(M) προσδένεται στην ριβοσωμική υπομονάδα παρουσία τετρακυκλίνης και με αντίδραση καταλύομενη από GTP επιτρέπει την απομάκρυνση του αντιβιοτικού και την πρόσδεση του αμινοακυλο-tRNA, οπότε και την μετάφραση των πρωτεϊνών του βακτηρίου (Burdett 1996).

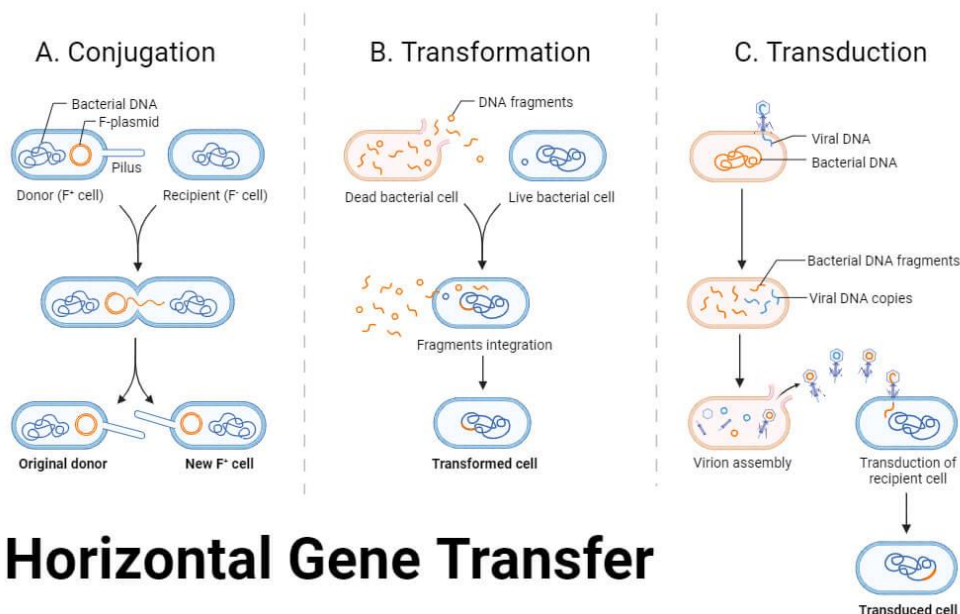
6. dfrA

Το dfrA είναι γονίδιο αντίστασης στην τριμεθοπρίμη. Το γονίδιο απομονώθηκε από πλασμίδιο της οικογένειας pSK1 από πολυανθεκτικό βακτηριακό στέλεχος *S.aureus* (Lyon, 1986). Το προϊόν του γονιδίου είναι μια τροποποιημένη διϋδροφολική αναγωγή, η οποία δεν εμφανίζει συγγένεια για την τριμεθοπρίμη(Franz-Josef Schmitz, Ad C Fluit,Chapter 131 - Mechanisms of antibacterial resistance,Infectious Diseases (Third Edition),Pages 1308-1322,)

1.5 Οριζόντια γενετική μεταφορά και διάδοση/διασπορά αντίστασης στα αντιβιοτικά.

Η κυριότερη ιδιότητα των προκαρυωτικών οργανισμών που καθιστά δυνατή την διασπορά της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας είναι η οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού. Οι οργανισμοί έχουν την δυνατότητα να προσλαμβάνουν γονίδια ή συστοιχίες γονιδίων από άλλους μικροοργανισμούς ανεξαρτήτως είδους και συνεπώς να αποκτούν επίκτητα τις νέες ιδιότητες και χαρακτηριστικά που κωδικοποιούν, επιτρέποντας την επιβίωση και προσαρμογή τους σε νέα ή μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα (Gillings, 2013). Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν μια σειρά από κινητά (μεταθετά) στοιχεία DNA όπως είναι τα: (1) Πλασμίδια , (2) Τρανσποζόνια, (3) γενωμικές νησίδες (genomic islands), (4) ιντεγκρόνια-ενσωματόνια, (5) αλληλουχίες ένθεσης (IS). Αυτά τα στοιχεία παρέχουν στους μικροοργανισμούς την δυνατότητα να ανταλλάσσουν μεταξύ τους γενετική πληροφορία ακόμη και αν ανήκουν σε διαφορετικά είδη (Aarestrup et al.,2008). Η

μεταφορά DNA ανάμεσα σε βακτηριακά κύτταρα πραγματοποιείται μέσω τριών μηχανισμών (Αγγελής, Μικροβιολογία& μικροβιακή τεχνολογία, 2017):



Horizontal Gene Transfer

Εικόνα 16. Διάγραμμα που περιγράφει τους βασικούς μηχανισμούς οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς στους προκαρυώτες.

1. Μετασχηματισμός (transformation):

Ο μετασχηματισμός προϋποθέτει την ύπαρξη ενός μορίου DNA και ενός κυττάρου επιδεκτικού σε μετασχηματισμό. Το μόριο DNA συνήθως έχει προέλθει από λύση βακτηριακού κυττάρου-δότη, ο οποίος ανήκει σε συγγενικό είδος με το βακτήριο-δέκτη. Το βακτήριο-δέκτης είναι επιδεκτικό σε μεταμόρφωση (competent) διαθέτει δηλαδή θέσεις και πρωτεΐνες αναγνώρισης του μορίου DNA στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενώ δεν ανιχνεύεται και δράση DNAάσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Mell JC, et al., 2014).

2. Μεταγωγή (transduction):

Η μεταγωγή αφορά τη μεταφορά γενετικού υλικού από έναν μικροοργανισμό σε έναν άλλον με τη βοήθεια βακτηριοφάγου ιού, ο οποίος λειτουργεί ως φορέας του μορίου DNA (Daubin, 2016). Προσβολή βακτηρίου από βακτηριοφάγο ιό συνεπάγεται πολλαπλασιασμό του ιού εντός του κυττάρου και λύση του κυττάρου και απελευθέρωση των νέων ιών ικανών να μολύνουν βακτήρια. Κατά τον σχηματισμό των νέων ιών είναι δυνατό να συμπεριληφθεί στο πρωτεϊνικό περίβλημα(καψίδιο) του φάγου βακτηριακό DNA, το οποίο θα μεταφερθεί μαζί με τον ιό στο

βακτήριο που θα μολύνει. Όταν το τμήμα DNA συσκευάζεται στο καψίδιο με τυχαίο τρόπο, η μεταγωγή χαρακτηρίζεται γενικευμένη. Όταν της μεταγωγής προηγείται ενσωμάτωση του φαγικού DNA στο χρωμόσωμα του βακτηρίου, μεταφέρονται στο καψίδιο μόνο κομμάτια DNA γειτονικά της θέσης πρόσδεσης. Η μεταγωγή αυτή χαρακτηρίζεται εξειδικευμένη και μεταφέρονται μόνο ορισμένα τμήματα DNA από το βακτήριο-δότη στο βακτήριο-δέκτη. Το βακτήριο που μολύνεται από τον βακτηριοφάγο αποτελεί το βακτήριο-δέκτη και ενσωματώνει το υικό και βακτηριακό DNA και ανασυνδυάζεται (Αγγελής, 2017).

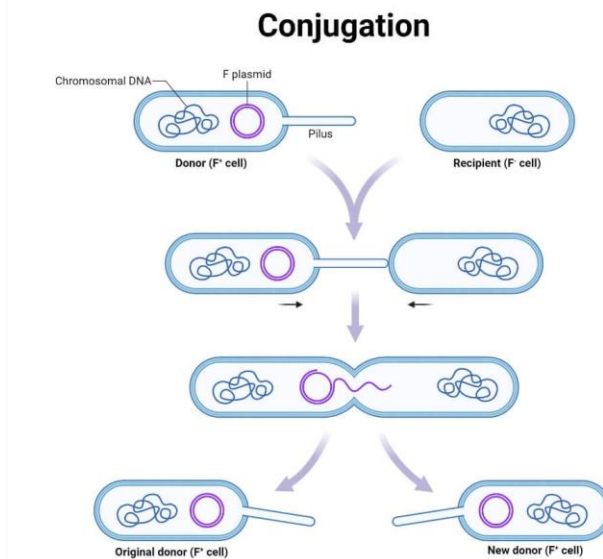
3. Σύζευξη (conjunction):

Η σύζευξη αφορά τη μεταφορά γενετικού υλικού από έναν μικροοργανισμό σε έναν άλλον μέσω της φυσικής επαφής των δύο μικροοργανισμών. Σύζευξη μπορεί να επιτευχθεί με τη βοήθεια πλασμιδίων. Η διαδικασία προϋποθέτει την ύπαρξη ενός κυττάρου-δότη που φέρει συζευτικό πλασμίδιο και ένα κύτταρο-δέκτη που δεν φέρει το πλασμίδιο και έρχεται σε φυσική επαφή με το κύτταρο-δότη (Αγγελής, 2017). Το συζευτικό πλασμίδιο συναντάται ανεξάρτητα μέσα στο βακτήριο αλλά και ενσωματωμένο στο χρωμόσωμα του βακτηρίου, οπότε το στέλεχος χαρακτηρίζεται υψηλής συχνότητας ανασυνδυασμού (high frequency recombination strain). Το συζευτικό πλασμίδιο φέρει το γονίδιο *traA* που κωδικοποιούν τα συζευτικά ινίδια (σμήριγγες-pilli) και τον μηχανισμό της μεταφοράς του από τον ένα μικροοργανισμό στον μικροοργανισμό-δέκτη και μια αλληλουχία *oriT*, η οποία αποτελεί τη θέση έναρξης της αντιγραφής για τη μεταφορά του DNA (Virolle, 2020). Πλασμίδια που φέρουν *oriT* και όχι πληροφορία για την αυτό-μεταφορά τους αλλά συναντώνται μέσα σε μικροοργανισμό που φέρει άλλα πλασμίδια που τη φέρουν, μπορούν και αυτά να μεταφέρουν γενετική πληροφορία (Αγγελής, 2017). Ο μηχανισμός μεταφοράς στα gram-αρνητικά βακτήρια ονομάζεται κυλιόμενος διπλασιασμός κυκλικού DNA (rolling circle DNA replication) και αφορά την αποκοπή του ενός κλώνου του πλασμιδίου και την εκτόπιση του προς τα συζευτικά ινίδια με την συνδρομή πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από γονίδια της οικογένειας *tra*. Ο κλώνος που απομένει λειτουργεί σαν εκμαγείο για την σύνθεση του συμπληρωματικού και την αποκατάσταση του πλασμιδίου. Ο αποκομμένος κλώνος μεταφέρεται μέσω των ινιδίων στο βακτήριο-δέκτη και αποτελεί εκμαγείο για την σύνθεση συμπληρωματικού

κλώνου, οπότε τελικά προκύπτει νέο ακέραιο πλασμίδιο (Virolle, 2020). Με τον μηχανισμό της σύζευξης μπορεί να μεταφερθεί τμήμα είτε ολόκληρη η πληροφορία του πλασμιδίου. Τα πλασμίδια μπορεί να φέρουν ευρεία γκάμα γονιδίων που προσδίδουν που προσδίδουν κάποιο προσόν στον μικροοργανισμό όπως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (κατηγορία R πλασμιδίων) ή την σύνθεση ή τον καταβολισμό τοξικών παραγόντων (Bahl, 2009).

Σύζευξη μπορεί να πραγματοποιηθεί και με τη βοήθεια τρανσποζονίων (Grohmann, 2003). Τα τρανσποζόνια αποτελούν και αυτά μεταθετά στοιχεία DNA. Πρόκειται για αλληλουχίες που φέρουν πληροφορία για την κωδικοποίηση της αυτό-μεταφοράς τους είτε ενδοκυτταρικά, είτε από έναν μικροοργανισμό σε έναν άλλον (Muñoz-López M, García-Pérez, 2010). Τρανσποζόνια συναντώνται τόσο ενσωματωμένα στο χρωμόσωμα του βακτηρίου, όσο και σε αλληλουχίες πλασμιδίων ή φάγων. Το τρανσποζόνιο αποτελεί ένας αριθμός μερικών δεκάδων γονιδίων (1-25), τα οποία παρεμβάλλονται μεταξύ δύο επαναλαμβανόμενων αναστροφών αλληλουχιών. Οι αλληλουχίες αυτές οριοθετούν το τρανσποζόνιο, το οποίο διαθέτει ένζυμα υπεύθυνα για τη μετάθεση του, όπως η τρανσποζάση η οποία καταλύει το σπάσιμο και τη συρραφή της αλληλουχίας του τρανσποζονίου και πρόσθετα γονίδια όπως αντοχής σε αντιβιοτικά. Ωστόσο τα τρανσποζόνια δεν διαθέτουν εξειδίκευση στόχου και η ένθεση τους πραγματοποιείται με τυχαίο τρόπο (Muñoz-López M, García-Pérez, 2010).

Η σύζευξη είναι ο μηχανισμός τον οποίο αξιοποιούν τα περισσότερα μεταθετά στοιχεία για να επιτύχουν την διάδοση του γονιδιακού υλικού (Virolle, 2020).



Εικόνα 17. Διάγραμμα που περιγράφει τον μηχανισμό της σύζευξης.

1.5.2 Γονίδια-δείκτες οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού.

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η ανίχνευση γονιδίων αντίστασης στα αντιβιοτικά στους βακτηριακούς πληθυσμούς των δειγμάτων συσχετίζεται με γεγονός οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς ή είναι αποτέλεσμα κάθετης μεταφοράς ή μετάλλαξης, πραγματοποιείται και ανίχνευση γονιδίων ως δείκτες συμβάντος οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Πρόκειται για γονίδια μεταθετών στοιχείων που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας και απαντώνται σε αφθονία στα περιβάλλοντα.

IntI1:

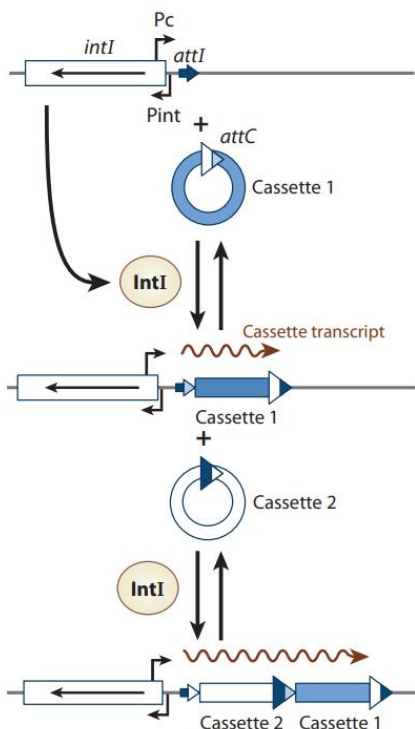
Το *intI1* είναι ένα από τα τρία βασικά γονίδια του ιντεγκρόνιου τάξης 1. Τα βασικά δομικά συστατικά ενός ιντεγκρόνιου τάξης 1 είναι:

1. Μια ιντεγκράση, μια ρεκομπινάση τυροσίνης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *intI1*. Η ιντεγκράση καταλύει την αποκοπή και ενσωμάτωση των γονιδιακών κασέτων.
2. Μια ειδική θέση ανασυνδυασμού, η *attI*.
3. Ένας ειδικός για την έκφραση των γονιδίων της κασέτας υποκινητής *Pc*, ο οποίος εντοπίζεται κόντα στο *intI1* ή στην *attI* (Cambray et al., 2010).

Τα ιντεγκρόνια είναι μεταθετά στοιχεία που έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν ανασυνδυασμό σε εξειδικευμένες θέσεις στόχους και με αυτό τον τρόπο να αναγνωρίζουν, να μεταφέρουν και να ενσωματώνουν γονιδιακές κασέτες (μικρά συνήθως κυκλικά μεταθετά στοιχεία DNA, συνήθως αποτελούνται από ένα ή δύο γονίδια) μεταξύ των μικροβιακών πληθυσμών. Αρχική προέλευση των ιντεγκρόνιων τάξης 1 φαίνεται να είναι το κεντρικό χρωμόσωμα των β-πρωτεοβακτηρίων (Dominigues et al., 2012). Ωστόσο πλέον αποτελούν ένα από τα πιο άφθονα μεταθετά γενετικά στοιχεία και απαντώνται ενσωματωμένα τόσο σε βακτηριακά χρωμοσώματα gram-αρνητικών βακτηρίων όσο και σε αλληλουχίες πλασμιδίων και τρανσποζονίων gram-θετικών και αρνητικών βακτηρίων, σε πληθώρα περιβαλλόντων. Τα

ιντεγκρόνια τάξης 1 φαίνεται να παίζουν κεντρικό ρόλο στη διάχυση γονιδιακών κασσετών που περιέχουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, καθώς εντοπίζονται στην πλειονότητα παθογόνων ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων (Stokes, Gillings et al.,2008).

Η έντονα συντηρημένη αλληλουχία του *intI1* , η άμεση σύνδεση του με γονίδια που σχετίζονται



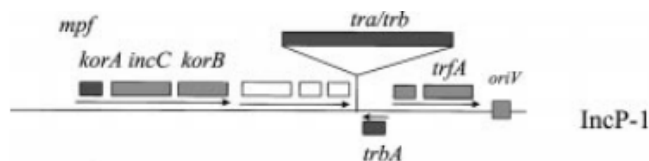
Εικόνα 18. Τα δομικά συστατικά και ο μηχανισμός ένθεσης γονιδιακής κασσετας του ιντεγκρονίου.

με αντίσταση σε αντιβιοτικά, καθώς και η αφθονία στην οποία συναντάται στα διαφορετικά περιβάλλοντα και διαφορετικούς οργανισμούς το έχουν αναδείξει σε κατάλληλο δείκτη συμβάντος γονιδιακής μεταφοράς λόγω εκλεκτικής πίεσης (Gillings et al., 2015).

KorB:

Το *KorB* αποτελεί δομικό γονίδιο της περιοχής κεντρικού ελέγχου των πλασμιδίων του γκρουπ IncP-1, πλασμίδιο που έχει συνδεθεί με τη μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα και θεωρείται ένας από τους βασικούς οργανισμούς φορείς(vectors) που συμβάλλουν στη διάσπορά ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το *KorB* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη KorB, η οποία αποτελείται

από 358 αμινοξέα και σχηματίζει διμερή ή πολυμερή (Kostelidou, 2000). Η KorB και η IncC, με την οποία αλληλεπιδρά και συμβάλλουν στην ρύθμιση της διχοτόμησης του πλασμιδίου. Η KorB δρα και ως ρυθμιστικό στοιχείο της έκφρασης γονιδίων του πλασμιδίου μέσω της πρόσδεσης σε χειριστή σε 12 περιοχές του πλασμιδιακού γονιδιώματος, καταστέλλοντας την έκφραση (Kostelidou,2000). Το γονίδιο λόγω του ρόλου του στην επιβίωση και διατήρηση του πλασμιδίου και της ανάγκης της πρωτεΐνης να διαμορφώνει διμερή και να προσδένεται σε περιοχές του DNA, αποτελεί υψηλά συντηρημένο γονίδιο και συνεπώς κατάλληλο γονιδίο-δείκτη γεγονότος οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς (Werner, 2023).



Εικόνα 19. Ενδεικτική απεικόνιση της οργάνωσης της κεντρικής περιοχής ελέγχου του IncP-1.

Φυλογενετικός δείκτης 16S rRNA:

Το γονίδιο 16S rRNA κωδικοποιεί τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα και έχει μήκος περίπου 1.500 ζευγών βάσεων. Το γονίδιο περιέχει συγχρόνως πολύ καλά συντηρημένες περιοχές, μεταβλητές και υπερμεταβλητές περιοχές. Το γονίδιο έχει αρκετές περιοχές υψηλής μεταβλητότητας που επιτρέπουν τη χρήση του ως φυλογενετικό δείκτη για την ανάδειξη στενών σχέσεων μεταξύ των ειδών (Αγγελής, 2017). Οι μεγάλες σε μήκος και σε υψηλό βαθμό συντηρημένες αλληλουχίες του αποδίδονται στη σημασία του προϊόντος του γονιδίου για την κυτταρική λειτουργία, καθώς συμμετέχει στην πρωτεϊνοσύνθεση (Clarridge, 2004). Η υψηλή συντήρηση, η παρουσία του σε όλα τα βακτήρια και αρχαία επιτρέπουν τη χρήση του για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τις δοκιμασίες ποσοτικοποίησης των γονιδίων.

1.6 Τεχνικές

1.6.1 Προσδιορισμός υγρασίας και υδατοχωρητικότητας.

Ο προσδιορισμός της υγρασίας των εδαφών έγινε με ξήρανση. Ο υπολογισμός της υγρασίας γίνεται με έμμεσο τρόπο, εκφράζοντας την ποσοστιαία απώλεια βάρους του εδάφους μετά από την ξήρανση του σε κλίβανο. Η μέθοδος βασίζεται στην απομάκρυνση της υγρασίας και στην παραδοχή ότι η απώλεια βάρους οφείλεται στην απομάκρυνση της υγρασίας.

Ο προσδιορισμός της υδατοχωρητικότητας έγινε με προσαρμογή της μεθόδου των Grau-Hamms. Η μέθοδος βασίζεται στην χρήση χάρτινου φίλτρου διήθησης και την παραδοχή ότι τα γραμμάρια του νερού ισούνται με मिलίλιτρα. Ο υπολογισμός της υδατοχωρητικότητας γίνεται πάλι με έμμεσο τρόπο, εκφράζοντας την ποσοστιαία απώλεια βάρους του δείγματος μετά από πλύση και 24ωρη διήθηση του, λαμβάνοντας υπόψιν την υγρασία του δείγματος πριν την πλύση.

1.6.2. Προσδιορισμός ποιοτικός και ποσοτικός των αντιβιοτικών

1.6.2.1 Εκχύλιση των αντιβιοτικών από την κοπριά

Η εκχύλιση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μιας ή περισσότερων χημικών ενώσεων από ένα πιο σύνθετο μείγμα. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην διαφορετική διαλυτότητα των συστατικών του μείγματος χάρη στις διαφορετικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες (Kokoszka, 2021). Η εκχύλιση αποτελεί βήμα προεργασίας ενός δείγματος πριν αυτό υποβληθεί σε αναλυτικές τεχνικές, όπως είναι η υγρή χρωματογραφία ή η φασματοσκοπία μάζας και αποσκοπεί στην απομόνωση και τον καθαρισμό της επιθυμητής ένωσης από τα λοιπά συστατικά του δείγματος που μπορεί να δράσουν ως παρεμποδιστικοί παράγοντες και να επηρεάσουν την απόδοση της αναλυτικής μεθόδου (Huang, 2013). Δείγματα που προέρχονται από περιβαλλοντική μήτρα χαρακτηρίζονται από μεγάλη ετερογένεια και πολυπλοκότητα. Συνεπώς η εκχύλιση αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της επεξεργασίας του δείγματος πριν την ανάλυση του και η ανάπτυξη της κατάλληλης μεθόδου έχει μεγάλη σημασία και μπορεί να αποτελείται από πολλά στάδια.

Τα αντιβιοτικά εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και συνεπώς ποικίλει και ο βαθμός προσρόφησης τους στο χώμα (Song, 2014). Σε σύγκριση με άλλους περιβαλλοντικούς ρύπους τα αντιβιοτικά είναι υδρόφιλες ενώσεις, ωστόσο ο διαχωρισμός τους από τα υπόλοιπα συστατικά της περιβαλλοντικής μήτρας δεν μπορεί να γίνει μόνο βάσει πολικότητας. Τα αντιβιοτικά είναι έντονα πολικά μόρια και φέρουν περισσότερες από μια πολικές λειτουργικές ομάδες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τα χώματα με δυνάμεις ηλεκτροστατικές, δεσμούς υδρογόνου, ακόμη και ιοντικούς δεσμούς. Το φορτίο των ομάδων και συνεπώς το σθένος και το πλήθος των αλληλεπιδράσεων σχετίζεται με το pH του χώματος, όπως επίσης και με τη σύσταση του (K"ummeier, 2009). Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε διαφορετικό πρωτόκολλο για την εκχύλιση των αντιβιοτικών από τα δείγματα χώματος και κοπριάς.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την εκχύλιση των αντιβιοτικών από τα δείγματα της κοπριάς προτάθηκε από τους Wang και συνεργάτες και περιλαμβάνει τεχνικές εκχύλισης υγρού-υγρού (Liquid- liquid extraction, LLE), λουτρό σε υπερήχων (ultrasonic bath) και εκχύλισης στερεάς φάσης (solid-phase extraction, SPE) (Wang, 2020). Η LLE προκειμένου να πετύχει την πλήρη εκχύλιση των αντιβιοτικών στην πολική οργανική φάση απαιτεί μεγάλη συγκέντρωση οργανικού διαλύτη και είναι αρκετά χρονοβόρα διαδικασία (Kokoszka, 2021). Για τον λόγο αυτό πραγματοποιείται σε συνδυασμό με βοηθούμενη με υπέρηχους εκχύλιση (Ultrasonic-Assisted Extraction, UAS) και ακολουθείται από διπλή SPE ως βήμα καθαρισμού.

Εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE):

Κατά την LLE χρησιμοποιούνται δύο μη αναμειγνύμενες φάσεις, με σκοπό τη μετάβαση των αναλυτών από τη μία φάση στην άλλη. Για την εκχύλιση των αντιβιοτικών ενώσεων, το δείγμα διαλυτοποιείται σε νερό για τον διαχωρισμό των συστατικών της μήτρας και τελικά τα αντιβιοτικά εκχυλίζονται στη μη αναμειγνύμενη οργανική φάση (Ferguson, 2022). Την οργανική φάση αποτελούν οι οργανικοί διαλύτες μεθανόλη και ακετόνη. Στο διάλυμα εκχύλισης περιέχονται ακόμη με σκοπό την υποβοήθηση αποτελεσματικότερης εκχύλισης: EDTA, χλωριούχο νάτριο και υδροξείδιο του αμμωνίου. Το EDTA (απομάκρυνση παρεμποδιστικών μεταλλικών ιόντων) και το χλωριούχο νάτριο εξασφαλίζουν τον διαχωρισμό των συστατικών της μήτρας και την πλήρη διαλυματοποίηση τους στην υδατική φάση (Li et al, 2020). Το υδροξείδιο του αμμωνίου δρα ως ρυθμιστικό εξασφαλίζοντας ελαφρώς όξινο περιβάλλον για την σταθεροποίηση των ενώσεων των αντιβιοτικών και την ενθάρρυνση της διαλυματοποίησης τους στην οργανική φάση.

Βοηθούμενη με υπερήχους εκχύλιση(UAS):

Το δείγμα αναδεύεται και υποβάλλεται σε λουτρό υπερήχων με στόχο την επιτάχυνση και την καλύτερη δυνατή εκχύλιση των αντιβιοτικών στους διαλύτες από την κοπριά. Κατά το λουτρό υπερήχων το μείγμα εκτίθεται σε υπερηχητικά κύματα, τα οποία παράγονται σε συχνότητες 20kHz – 10MHz. Τα κύματα επάγουν τον σχηματισμό φυσαλίδων στο δείγμα και τελικά τη σχάση αυτών. Οι δυνάμεις που απελευθερώνονται από την ανάδευση και τη σχάση των φυσαλίδων επιτρέπουν την λύση και τον κατακερματισμό κυττάρων και συστατικών του μείγματος και τελικά την αποτελεσματικότερη εκχύλιση των αντιβιοτικών ενώσεων από την μήτρα (Carreira, 2021).

Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE):

Το υπερκείμενο συλλέγεται και υποβάλλεται σε εκχύλιση στερεάς φάσης προκειμένου να καθαριστεί. Κατά την SPE η εκχύλιση του αναλύτη επιτυγχάνεται πάλι μέσω της μετάβασης του μεταξύ δύο φάσεων. Αυτή τη φορά η μία φάση είναι κινητή και η άλλη στέρεη. Η κινητή φάση είναι ο πολικός διαλύτης και η στερεή φάση είναι το προσροφητικό υλικό, το οποίο περιέχεται σε μικροστήλη (μικροφυσίγγιο) και η σύσταση του αποτελείται συνήθως κυρίως από πυρίτιο ή πολυμερή (Badaway, 2022).

Συνοπτικά τα στάδια μιας εκχύλισης στερεάς φάσης κανονικής φάσης είναι: i) ενεργοποίηση των στηλών με τον οργανικό διαλύτη, ii) φορτώνεται το δείγμα στη στήλη με το προσροφητικό για το

οποίο εμφανίζει υψηλή συγγένεια ο αναλύτης σε αντίθεση με τα υπόλοιπα συστατικά, οπότε συγκρατείται, iii) έκπλυση με οργανικούς διαλύτες και νερό για την περαιτέρω απομάκρυνση παρεμποδιστικών ουσιών που έχουν κατακρατηθεί, iv) έκλουση αναλύτη με κατάλληλο διαλύτη (Badaway, 2022).

Η SPE απαιτεί μια διάταξη manifold για την παροχή κενού αέρος σε πολλαπλά φυσίγγια στην οποία προσαρμόζονται τα φυσίγγια και σωλήνες συλλογής των κλασμάτων. Πριν την έκλουση προηγείται ενεργοποίηση των στηλών με μεθανόλη και νερό. Η έκλουση πραγματοποιείται με τη χρήση των οργανικών διαλυτών μεθανόλη και ακετονιτρίλιο και διαλύματος οξικού οξέος για την διατήρηση του pH, σε κενό αέρος για την επιτάχυνση της ροής. Η έκλουση πραγματοποιείται δύο φορές και το προϊόν τίθεται υπό κενό περιστροφικό εξατμιστή με σκοπό την απομάκρυνση των διαλυτών που είναι πολύ πτητικές ενώσεις και ανεπιθύμητων ενώσεων που έχουν απομείνει και την παραλαβή διαλύματος με υψηλή συγκέντρωση των επιθυμητών ενώσεων. Τελικό βήμα είναι η συλλογή των πυκνών σε αντιβιοτικά διαλυμάτων και η επανασύστασή τους σε ακετονοτρίλιο και νερό προκειμένου να διηθηθούν από υδρόφοβο φίλτρο για την απομάκρυνση και των τελευταίων πολικών παρεμποδιστικών ενώσεων, προτού αναλυθούν με υγρή χρωματογραφία (Wang, 2020).

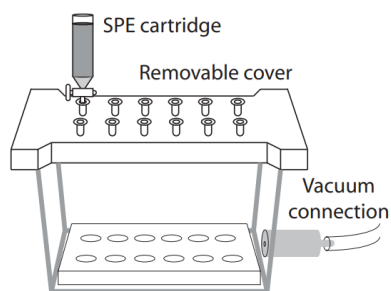


Figure 2.9 SPE cartridge on a multiport vacuum manifold.

Εικόνα 20. Ενδεικτική διάταξη manifold για την παροχή κενού αέρος σε πολλαπλά φυσίγγια.

1.6.2.2 Εκχύλιση των αντιβιοτικών από το έδαφος

QuEChERS:

Για την εκχύλιση αντιβιοτικών από περιβαλλοντικά δείγματα χώματος η μέθοδος που εφαρμόστηκε, προτάθηκε από τον Lee και συνεργάτες (2017) και αποτελεί μια δοκιμασία

QuEChERS (a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method). Η QuEChERS βασίζεται στην τεχνολογία της διασκορπιστικής εκχύλισης στερεάς φάσης (dispersive solid phase extraction, d-SPE) και χρησιμοποιείται για την εκχύλιση αντιβιοτικών όλων των τάξεων από περιβαλλοντικά δείγματα (Li, 2020).

Συνοπτικά τα στάδια της μεθόδου QuEChERS είναι: i) διαλυματοποίηση του δείγματος σε ακετονιτρίλιο για τον διαχωρισμό των συστατικών της μήτρας, ii) αύξηση αλατότητας με προσθήκη θειικού μαγνησίου και χλωριούχου νατρίου για την απομάκρυνση πρωτεϊνών και καλύτερο διαχωρισμό, iii) καθαρισμός και εκχύλιση αναλύτη με d-SPE (Li, et al 2020).

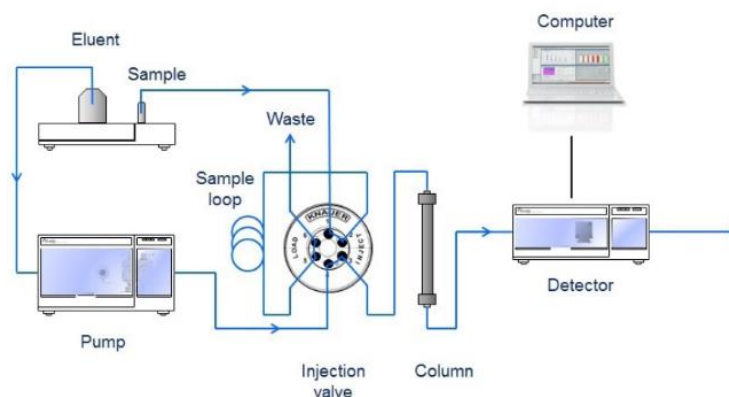
Τα βασικά στάδια για της d-SPE είναι: i) υποβολή του δείγματος σε φυγοκέντρηση ή λουτρό υπερήχων, ii) προσθήκη προσροφητικού υλικού, iii) καθαρισμός και έκλουση αναλύτη με εκχύλιση στερεάς φάσης (Li et al., 2020).

Προκειμένου να πετύχουν την εκχύλιση αντιβιοτικών ο Lee και συνεργάτες προσάρμοσαν τη μέθοδο παραλείποντας την προσθήκη θειικού μαγνησίου, γιατί επηρεάζει τη σταθερότητα των αντιβιοτικών ενώσεων. Αντίθετα, πρόσθεσε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος για την μείωση του pH και τελικά τον αποτελεσματικότερο διαχωρισμό και την σταθεροποίηση των αντιβιοτικών (Lee et al., 2016). Το προσροφητικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση διασποράς είναι πρωτοταγής δευτεροταγής αμίνη (PSA) για τον περαιτέρω διαχωρισμό των αντιβιοτικών από πολικές ενώσεις όπως λιπαρά οξέα, στερόλες, οργανικά οξέα και άλλων παρεμποδιστικών ενώσεων από το εδαφικό δείγμα. Το υπερκείμενο διηθείται μέσα από υδρόφοβο φίλτρο σε μικροστήλη και το εκχύλισμα είναι απαλλαγμένο από παρεμποδιστικές ενώσεις και έτοιμο να αναλυθεί με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης.

1.6.2.3. Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (Skoog, 2007).

Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των επιπέδων των αντιβιοτικών στα δείγματα εδάφους και κοπριάς έγινε με τη βοήθεια της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι μια αυτοματοποιημένη υγρή χρωματογραφία στήλης. Η υγροχρωματογραφία στήλης είναι μια μέθοδος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μιας επιθυμητής ένωσης και βασίζεται διαχωρισμό της ένωσης με τη βοήθεια μιας στατικής φάσης (στήλης) και μιας κινητής φάσης, η οποία διαπερνά την στατική φάση. Ο διαχωρισμός βασίζεται στις διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων ενός δείγματος όπως είναι το μέγεθος, το

μοριακό βάρος, η πολικότητα και το φορτίο. Οι ιδιότητες αυτές καθορίζουν την αλληλεπίδραση των συστατικών με την στατική φάση και συνεπώς τον διαφορετικό χρόνο έκλουσης αυτών από την στήλη, καθιστώντας δυνατή την ταυτοποίησή τους. Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης η έκλυση πραγματοποιείται με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης, καθιστώντας δυνατή την ταχύτερη ροή και την υψηλότερη απόδοση χάρη στη χρήση μικρότερων διαχωριστικών σωματιδίων στην στατική φάση. Πέρα από αντλίες η HPLC έχει ανιχνευτή με αποτέλεσμα να προκύπτει χρωματογράφημα που φέρει πληροφορία και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ένωσης. Για να το πετύχει αυτό ένα σύστημα HPLC αποτελείται από την αντλία, φιάλες αποθήκευσης διαλυτών, βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, βαλβίδα έγχυσης, την στήλη, τον ανιχνευτή και μονάδα καταγραφής δεδομένων.



Εικόνα 21. Σχηματική απεικόνιση ενός συστήματος HPLC .

Για την ανάλυση του tilmicosin, που ανήκει στην οικογένεια των μακρολιδίων, χρησιμοποιήθηκε κινητή φάση, ισοκρατικής έκλυσης, δηλαδή σταθερής σύστασης διαλύτη. Η κινητή φάση αποτελούταν από τον πολικό οργανικό διαλύτη ακετονιτρίλιο, νερό και ορθοφωσφορικό οξύ για την ρύθμιση του pH για την σταθεροποίηση της ένωσης του αντιβιοτικού (T. Itoh and H. Yamada, 2000). Για την ανάλυση του sulfamethoxazole, που είναι ένα σουλφοναμίδιο, χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική έκλυση κινητής φάσης με σύσταση μεθανόλη και νερό. Για την ανάλυση του tiamulin, παράγωγο πλευρομυτιλίνης, χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική έκλυση κινητής φάσης με σύσταση τον οργανικό πολικό διαλύτη ακετονιτρίλιο και ρυθμιστικό διάλυμα αμμωνίας.

1.6.3 Προσδιορισμός ποιοτικός και ποσοτικός γονιδίων αντοχής και οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού

1.6.3.1 Εκχύλιση DNA από δείγματα εδάφους και κοπριάς

Η απομόνωση και καθαρισμός του DNA από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος είναι απαραίτητα για τις τεχνικές ανάλυσής του (Zielinska, 2017). Η απομόνωση βασίζεται στο αρνητικό φορτίο των νουκλεϊκών οξέων. Η μέθοδος προϋποθέτει την λύση των κυττάρων με τη βοήθεια ενός αποδιατακτικού παράγοντα και την αδρανοποίηση των ενδογενών νουκλεασών με τη χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων. Στη συνέχεια καθίσταται δυνατή η απομόνωση και καθαρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες και άλλα συστατικά του δείγματος και τελικά ακολουθεί επανασύσταση του DNA με ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA (Probe R, 2003). Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τυποποιημένη μέθοδο απομόνωσης γενετικού υλικού από περιβαλλοντικά δείγματα με τη βοήθεια εμπορικού kit. Το kit που χρησιμοποιήθηκε πραγματοποιεί την απομόνωση του γενετικού υλικού με τη βοήθεια στηλών που φέρουν μεμβράνη πυριτίου. Το δείγμα και το λυτικό μείγμα προστίθενται στη στήλη και φυγοκεντρούνται, οπότε το DNA προσδένεται στη στήλη. Πραγματοποιούνται 2 διαδοχικές πλύσεις και το DNA συλλέγεται μέσω έκλουσης.

1.6.3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Daymond J., 2013)

Η τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) ή αλλιώς ποσοτική PCR (quantative PCR, qPCR) επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση DNA και βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) . Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια δοκιμασία που οδηγεί στην ενίσχυση, δηλαδή τον σχηματισμό πολλαπλών αντιγράφων (αμπλικονίων) ενός τμήματος DNA-στόχου και βασίζεται στη δράση ενός ενζύμου, μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης και τη χρήση ενός θερμικού κυκλοποιητή. Η qPCR επιτρέπει την ανίχνευση και ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων των αμπλικονίων, καθώς πραγματοποιείται η ενίσχυση με τη βοήθεια μιας φθορίζουσας χρωστικής σε πραγματικό χρόνο.

Η qPCR αποτελεί μια δοκιμασία PCR και στηρίζεται στις ίδιες βασικές αρχές και περιλαμβάνει τα ίδια βασικά βήματα με την PCR. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της πολυμεράσης να επιμηκύνει την αλυσίδα μιας ολιγονουκλεοτιδικής αλληλουχίας- εκκινήτη χρησιμοποιώντας ένα γονίδιο-στόχο ως εκμαγείο. Οι εκκινήτες είναι τεχνητές δίκλωνες ολιγονουκλεοτιδικές

συμπληρωματικές προς την αλληλουχία του γονιδίου-στόχου αλληλουχίες που πλαισιώνουν το τμήμα του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί και εμφανίζουν μεγάλη εξειδίκευση. Η πρόσδεση των εκκινητών καθίσταται δυνατή λόγω της αποδιάταξης των κλώνων του DNA, μετά από υψηλή θέρμανση. Η εφαρμογή της θέρμανσης χωρίς μετουσίωση του ενζύμου της πολυμεράσης οφείλεται στην χρήση πολυμερασών από θερμοφίλους και υπερθερμοφίλους οργανισμούς με πρώτη και πιο διαδεδομένη την πολυμεράση *Taq*, η οποία απομονώθηκε από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Για την εξασφάλιση των κατάλληλων συνθηκών και συνεπώς τη βέλτιστη δράση του ενζύμου μια αντίδραση qPCR περιλαμβάνει τα παρακάτω αντιδραστήρια:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα
2. Νουκλεοτίδια
3. Εκκινητές (πρόσθιος και ανανάστροφος)
4. DNA πολυμεράση
5. Ιόντα Mg^{2+}
6. Νερό για την αραιώση των συστατικών
7. SYBRGREEN χρωστική

Η SYBRGREEN αποτελεί το πρόσθετο συστατικό της αφού όλα τα υπόλοιπα είναι απαραίτητα και στη συμβατική PCR. Η SYBRGREEN, μια φθορίζουσα χρωστική είναι το στοιχείο που επιτρέπει την παρακολούθηση της αντίδρασης και βασίζεται στις ικανότητες της για επιλεκτική πρόσδεση σε δίκλωνο DNA και την ικανότητα της να φθορίζει σε μήκος κύματος 522nm. Η χρωστική εμφανίζει χαμηλή συγγένεια για μονόκλωνο DNA και πολύ υψηλή για δίκλωνο στο οποίο συμπλέκεται και αλλάζει η στερεοδιαμόρφωση της με αποτέλεσμα την αύξηση εκπομπής φθορισμού έως και 200x σε σύγκριση με την αδέσμευτη χρωστική.

Η δοκιμασία πολυμεράσης περιλαμβάνει τέσσερα κυρίως βήματα:

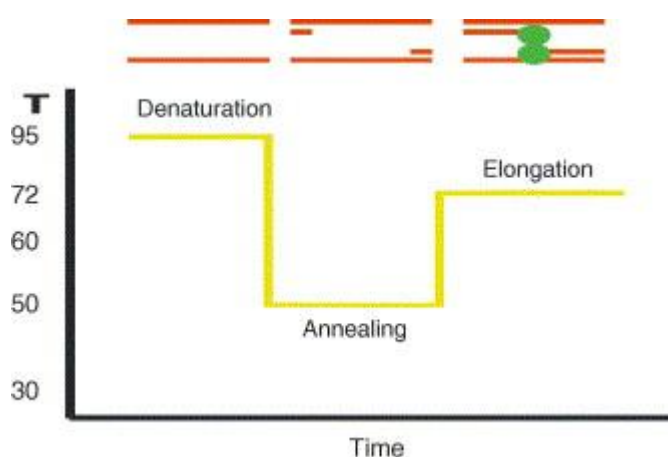
- 1) Αρχικά εφαρμόζεται πολύ υψηλή θερμοκρασία (βέλτιστη για δράση *Taq* 95° C) στον θερμοκυκλοποιητή για την αποδιάταξη του DNA.
- 2) Αφού πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη προστίθεται περίσσεια του ζεύγους των εκκινητών και το μείγμα ψύχεται (45-65°C) προκειμένου να υβριδίσουν οι εκκινητές τις συμπληρωματικές αλληλουχίες των αποδιαταγμένων μονόκλωνων αλυσίδων του DNA-στόχου.

3) Η DNA πολυμεράση επιμηκώνει τους προσδεμένους εκκινητές χρησιμοποιώντας το DNA-στόχο ως εκμαγείο (72°C).

4) Η SYBR Green, η οποία προσδένεται μόνο σε δίκλινα μόρια DNA, προσδένεται στους νεοσυντιθέμενους κλώνους καθώς σχηματίζονται από την πολυμεράση και το σήμα που καταγράφεται από τον ανιχνευτή ενσωματωμένο στον θερμοκυκλοποιητή είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των αμπλικονίων που προκύπτουν στο δείγμα(Kubista et al, 2006).

5) Μετά από κατάλληλο χρόνο επώασης προκαλείται εκ νέου αποδιάταξη των νεοσυντιθέμενων κλώνων, με το γονίδιο-στόχος να υπάρχει πλέον σε διπλάσια ποσότητα και να έχει ολοκληρωθεί τους κύκλος αντιγραφής.

Η αντίδραση πραγματοποιείται για 35-40 κύκλους και στο τέλος κάθε κύκλου γίνεται καταγραφή του σήματος από τον ανιχνευτή.



Εικόνα 22. Διαγραμμα πορείας αντίδρασης PCR

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης ενός γονιδίου στο αρχικό δείγμα επιτυγχάνεται με τη βοήθεια δύο διαμμάτων της καμπύλης ενίσχυσης, η οποία είναι απεικόνιση των μετρήσεων φθορισμού σε κάθε κύκλο και μιας πρότυπης καμπύλης η οποία απεικονίζει την απόδοση των αντιδράσεων πολυμεράσης σε κάθε κύκλο.

Καμπύλη ενίσχυσης

1. Επιπέδωση:

Αφορά του πρώτους κύκλους της αντίδρασης(1-16). Σε αυτή την φάση έχουν πραγματοποιηθεί λίγοι κύκλοι αντιγραφής και συνεπώς η συγκέντρωση δίκλωνου DNA είναι πολύ μικρή και έτσι το σήμα που λαμβάνεται από τον φθορισμό της SYBRGREEN είναι κάτω από τα όρια ανίχνευσης. Η εκθετική φάση ξεκινάει όταν ξεπεραστεί ένα κατώφλι φθορισμού, το οποίο καθιστά το σήμα φθορισμού ανιχνεύσιμο. Αφορά τους κύκλους 16-22 της αντίδρασης. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από εκθετική αύξηση της συγκέντρωσης των αμπλικονίων και έχει μικρή διάρκεια λόγω της απότομης αύξησης των μορίων DNA σε σύγκριση με την συγκέντρωση ενζύμου.

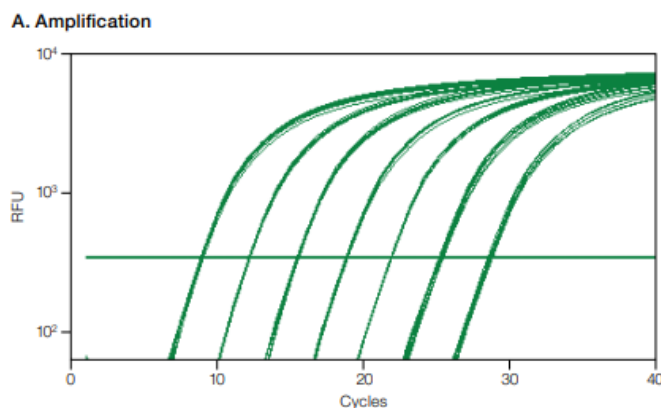
2. Γραμμική φάση

Αφορά τους κύκλους 22-28. Σε αυτή την φάση συνεχίζει να παρατηρείται αύξηση φθορισμού, αλλά με λιγότερο εκθετικό τρόπο, δηλαδή η πολυμεράση δεν δεσμεύεται από όλα τα υποστρώματα.

3. Φάση πλατώ (επιπέδωσης/ασυμπτώτου)

Αφορά τους κύκλους 28-465. Σε αυτή τη φορά παρατηρείται εκ νέου επιπέδωση της καμπύλης αυτή τη φορά στα υψηλότερα επίπεδα φθορισμού. Αυτή η εκ νέου επιπέδωση μπορεί να αποδοθεί σε εξάντληση κάποιου αντιδραστηρίου, φθορά του ενζύμου της πολυμεράσης, κορεσμό της συγκέντρωσης των προϊόντων και συνεπώς κορεσμό της ανιχνευτικής ικανότητας φθορισμού.

Το κατώφλι φθορισμού (Cycles threshold, Ct) ορίζεται πληροφορικά από το μηχάνημα του θερμοκυκλοποιητή ή από τον χειριστή του μηχανήματος και είναι η κατώτατη ανιχνεύσιμη τιμή φθορισμού. Ο ορισμός του Ct συμβάλλει στην αποφυγή ανίχνευσης σημάτων που οφείλονται σε θόρυβο, όπως είναι τα αρχικά δίκλωνα μόρια που περιέχονται στο δείγμα ή άστοχες υβριδίσεις των εκκινητών είτε μεταξύ τους είτε με αλληλουχίες που δεν ήταν στόχος. Ο αριθμός κύκλων που απαιτείται σε ένα δείγμα για να υπερβεί αυτή την τιμή σχετίζεται με την αρχική ποσότητα DNA που περιέχεται σε αυτόν.



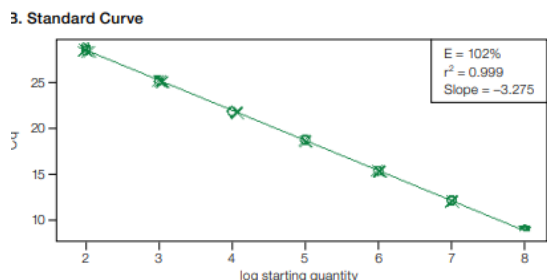
Εικόνα 23. Ενδεικτικό διάγραμμα καμπύλης ενίσχυσης δείγματος μετά το πέρας των κύκλων των αντιδράσεων.

Καμπύλη απόδοσης

Η καμπύλη απόδοσης είναι απαραίτητη για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό της αρχικής συγκέντρωσης του γονιδίου. Η καμπύλη απόδοσης προσδιορίζει την απόδοση της αντίδρασης της πολυμεράσης σε κάθε κύκλο. Θεωρητικά στο τέλος κάθε κύκλου μετά από δράση πολυμεράσης έχουμε διπλασιασμό της ποσότητας του γονιδίου και η συγκέντρωση αυξάνεται με εκθετικό τρόπο. Στην πραγματικότητα η συγκέντρωση των αμπλικονίων τείνει να αυξάνει με εκθετικό τρόπο, καθώς η απόδοση της αντίδρασης μπορεί να επηρεάζεται από παράγοντες όπως το μήκος του ενισχυόμενου DNA, η περιεκτικότητα της σε G-C, τον άστοχο υβριδισμό των εκκινητών κ.α. Η καμπύλη απόδοσης αποσκοπεί στον πειραματικό προσδιορισμό της απόδοσης της αντίδρασης και στηρίζεται στην κατασκευή πρότυπης καμπύλης με την χρήση διαδοχικών αραιώσεων πρότυπου δείγματος DNA γνωστής συγκέντρωσης. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, η οποία έχει τη μορφή γραμμικής παλινδρόμησης συσχετίζουμε τις τιμές Ct κάθε κύκλου που προέκυψαν από την καμπύλη ενίσχυσης (εξαρτημένη μεταβλητή) με τους δεκαδικούς λογαρίθμους των γνωστών συγκεντρώσεων των διαδοχικών αραιώσεων του DNA (ανεξάρτητη μεταβλητή). Στη συνέχεια προσδιορίζεται η κλίση της παλινδρόμησης. Η απόδοση της ενίσχυσης περιγράφεται από την εξίσωση: $E = 10^{(-1/κλίση)} - 1$.

Πέραν της απόδοσης της πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται και ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 της παλινδρόμησης, δηλαδή της πρότυπης καμπύλης. Ο συντελεστής R^2 χρησιμοποιείται ως μέτρο αξιολόγησης της καμπύλης και αξιολογεί την ικανότητα της καμπύλης που έχουμε εκτιμήσει να ερμηνεύει την μεταβλητότητα των τιμών της εξαρτημένης μεταβλητής, δηλαδή κατά πόσο τα

δεδομένα εφαρμόζουν και μπορούν να προβλεφθούν από την καμπύλη, οπότε και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA είναι ακριβής (2015, Bio-Rad Laboratories).



Εικόνα 24. Ενδεικτικό διάγραμμα μιας πρότυπης καμπύλης.

1.7 Στόχος εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη ιστορικά ρυπασμένων με κτηνιατρικά αντιβιοτικά εδαφών, λόγω της εναπόθεσης κορποσωρών χοιροτροφικής μονάδας, ως προς το περιεχόμενο σε αντιβιοτικά και σχετικούς και γενικούς μικροβιακούς δείκτες αντιβιοαντοχής και οριζόντιας μεταφοράς. Προκειμένου να πετύχουμε το στόχο μας αναλύσαμε κοπριά από την κορποσωρό, αλλά και έδαφος σε σημείο έκπλυσης (κάτω από την κοπριά), απορροής (πλησίον της κοπριάς κανάλι), όπως και σε σημείο μάρτυρα (σε μεγάλη απόσταση από την κοπριά και χωρίς προηγούμενη έκθεση). Τα αντιβιοτικά που αναλύθηκαν ήταν τα sulfamethoxazole, tiamulin και tilmicosin, ενώ επίσης αναλύσαμε γονίδια δείκτες μικροβιακής αντοχής και οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς.

2. Σχεδιασμός πειράματος

Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία εδάφους και κοπριάς από κορποσωρό στον οποίο γινόταν η εναπόθεση των περιττωμάτων από χοιροτροφική μονάδα στην περιοχή των Αγ. Αναργύρων, Λάρισα. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις για κάθε θέση κατ'τον Πίνακα 1.

Ταμπέλα Περιγραφή τοποθεσίας
(tag)

0M	Κοπριά από την κοπροσωρό
0S	Χώμα που αναδείχθηκε (5-15 εκ), ακριβώς κάτω της κοπροσωρού.
4S	Topsoil στο πρανές του καναλιού (απομακρύνθηκε το επιφανειακό έδαφος και λήφθηκαν δείγματα 5-15 εκ βάθους).
100S	Λήψη μάρτυρα από μεγάλη απόσταση από το αρχικό σημείο δειγματοληψίας της κοπριάς, αλλά στο ίδιο αγροτεμάχιο.

Πίνακας 1.

Μετά την δειγματοληψία παραγματοποιήθηκαν μετρήσεις υγρασίας και υδατοχωρητικότητας ενδεικτικά σε 4 δείγματα κοπριάς και 4 δείγματα εδάφους.

Ο προσδιορισμός του περιεχομένου στα αντιβιοτικά sulfamethoxazole, tilmicosin, tiamulin έγινε με τη βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC Shimadzu LC-20ADHPLC) με ανιχνευτή UV/VIS PDA, Προστήλη Shimadzu GVP-ODs 4.6mm by 150mm, 5μm, συνδεδεμένη σε στήλη RP Shimadzu VP-ODs 4.6mm x 150mm, 5μm. Της HPLC προηγήθηκε εκχύλιση των αντιβιοτικών από τα εδάφη. Η εκχύλιση από την κοπριά έγινε από 1g δείγματος για κάθε επανάληψη σύμφωνα με πρωτόκολλο που προτάθηκε από τους Wang *et al.*(2020). Η εκχύλιση από τα εδάφη έγινε από 5g δείγματος για κάθε επανάληψη σύμφωνα με πρωτόκολλο που προτάθηκε από τους Lee *et al.*(2017). Τα πρωτόκολλα εφαρμόστηκαν με τροποποιήσεις που αναπτύχθηκαν σε προηγούμενο πείραμα στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος.

Ο προσδιορισμός του περιεχομένου σε γονίδια αντοχής και γονίδια δείκτες έγινε με τη βοήθεια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε θερμοκυκλοποιητή της BioRad. Τόσο τα πλασμίδια, οι εκκινητές, αλλά και οι διαδοχικές αραιώσεις για τις πρότυπες καμπύλες είχαν κατασκευαστεί στο εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Περιβάλλοντος σε προηγούμενο πείραμα. Το ίδιο ισχύει για τα πρωτόκολλα που φορτώθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή. Αντίδραση qPCR πραγματοποιήθηκε για κάθε γονίδιο ξεχωριστά σε όλα τα δείγματα και όλες τις

επαναλήψεις. Της qPCR προηγήθηκε εκχύλιση DNA από τα δείγματα. Η εκχύλιση ήταν ίδια για κοπριά και χώμα και έγινε από 250 mg δείγματος με τη χρήση του DNeasy Powersoil Pro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Συνοπτικά, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των παρακάτω γονιδίων:

Γκρουπ	Γονίδιο	Λειτουργία
γονίδια αντοχής	<i>dfrA</i>	Αντοχή σε τριμεθοπρίμες
	<i>sulI</i>	Αντοχή σε σουλφοναμίδια
	<i>cfxA</i>	Αντοχή σε β-λακτάμες
	<i>tem</i>	Αντοχή σε β-λακτάμες
	<i>qnrD</i>	Αντοχή σε κινολόνες
	<i>tetM</i>	Αντοχή σε τετρακυκλίνες
μεταθετά στοιχεία- γονίδια δείκτες	<i>intI1</i>	Ιντεγκράση του ιντεγκρόνιου τάξης 1
	<i>korB</i>	IncP incompatibility πλασμίδια
φυλογενετικός δείκτης	<i>16S r RNA</i>	Κανονικοποίηση της συγκέντρωσης βακτηρίων

Πίνακας 2. Τα γονίδια που ποσοτικοποιήθηκαν.

Την qPCR ακολούθησε στατιστική επεξεργασία για την εξαγωγή γραφημάτων.

2.1 Δειγματοληψία

Σκοπός της μελέτης είναι η ανίχνευση των επιπέδων των πραγματικών επιπέδων των ΚΑ tiamulin, sulfamethoxazole, tilmicosin, αλλά και των επιπέδων γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα έναντι των αντιβιοτικών και γονιδίων που σχετίζονται με την οριζόντια μεταφορά γονιδίων σε κοπριά χοίρων και εδάφη χρόνια εκτεθειμένα σε κοπριά χοίρων. Για να επιτευχθεί αυτό κατόπιν συνεργασίας με χοιροτροφική μονάδα, έγινε δειγματοληψία εδάφους και κοπριάς από κοπροσωρό στον οποίο γίνεται η εναπόθεση και αποθήκευση των περιττωμάτων προτού γίνει η χρήση τους ως κοπριά σε γεωργικά εδάφη. Αρχικός σχεδιασμός ήταν η λήψη μεταβατικών δειγμάτων, αναφορικά με το χρόνο εναπόθεσης τους στον κοπροσωρό. Η κοπριά είχε απορριφθεί σε μεγάλη έκταση (η μορφή της έτεινε περισσότερο σε slurry). Λόγω της μεγάλης εξάπλωσης και της υψηλής βλάστησης (κυρίως άγριας) ήταν δύσκολο να βρεθούν μεταβατικά δείγματα, οπότε

λήφθηκαν τα «μεταβατικά» δείγματα από το πρανές του αυλακιού ποτίσματος (όπου είχαν ελάχιστα ίχνη κοπριάς λόγω της κλίσης του εδάφους). Σε δοκιμή λήψης μάρτυρα από το διπλανό αγροτεμάχιο (δεξιά του αυλακιού στην παρακάτω φωτογραφία), υπήρχε εμφανής προσθήκη κοπριάς, οπότε έγινε λήψη των δειγμάτων του μάρτυρα από μεγάλη απόσταση από το αρχικό σημείο δειγματοληψίας της κοπριάς αλλά στο ίδιο αγροτεμάχιο και μετά από τα λεγόμενα του παραγωγού.



Εικόνα 25. Εικόνα από το Google Earth της έκτασης της χοιροτροφικής μονάδας και γύρω από αυτήν. Με κίτρινη πινέζα σημειώνονται τα σημεία από τα οποία λήφθηκε έδαφος, όπου (1) κοπροσωρός, (2) πρανές καναλιού, απορροές, (3) μάρτυρας.

Από κάθε θέση συλλέχθηκαν με τη βοήθεια φτυαριού χειρός τρεις επαναλήψεις οι οποίες απορρίφθηκαν σε πλαστικά σακουλάκια των 300-1000 γραμμαρίων και αποθηκεύτηκαν για την μεταφορά τους στο εργαστήριο σε φορητούς καταψύκτες, όπου και αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτες στους -20°C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυσή τους.

2.1.2. Προσδιορισμός υγρασίας και υδατοχωρητικότητας.

Προσδιορισμός υγρασίας: Κομμάτι αλουμινόχαρτο ζυγίστηκε πάνω σε ζυγαριά και έγινε καταγραφή της τιμής. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν 5 γραμμάρια δείγματος μαζί με το αλουμινόχαρτο και έγινε καταγραφή της τιμής. Το δείγμα αποξηράνθηκε σε φούρνο BINDER στους 100 °C για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα το δείγμα ζυγίστηκε ξανά και έγινε καταγραφή της τιμής. Το ποσοστό της υγρασίας υπολογίστηκε με βοήθεια του τύπου: $\%Υγρασία = \frac{wet-dry}{dry-alum.} \times 100$,όπου

wet= βάρος δείγματος με αλουμινόχαρτο πριν την ξήρανση,

dry= βάρος δείγματος με αλουμινόχαρτο μετά την ξήρανση,

alum= βάρος κομματιού αλουμινόχαρτου.

Μετρήσεις υγρασίας πραγματοποιήθηκαν ενδεικτικά σε 4 δείγματα κοπριάς και 4 δείγματα εδάφους από τα οποία προέκυψε μέση τιμή και τυπική απόκλιση για κάθε τύπο δείγματος.

Προσδιορισμός υδατοχωρητικότητας: Ζυγίστηκαν 20 γραμμάρια δείγματος και έγινε καταγραφή της τιμής. Ζυγίστηκε γυάλινη κωνική φιάλη και μηδενίστηκε η ζυγαριά. Κατόπιν τοποθετήθηκε σε γυάλινο χωνί στο οποίο είχε εφαρμοστεί βρεγμένο διηθητικό χαρτί το δείγμα. Το χωνί τοποθετήθηκε στη φιάλη, ζυγίστηκε και καταγράφηκε η τιμή. Στη συνέχεια προστέθηκε απιονισμένο νερό 2-3 φορές, αφήνοντας κάθε φορά το νερό να περάσει ολόκληρο στη φιάλη. Μετά την τελευταία προσθήκη νερού, το χωνί καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο, προκειμένου να αποτραπεί οποιαδήποτε εξάτμιση και η διάταξη αφέθηκε σε αυτή τη θέση για 24 ώρες. Με το πέρας των 24 ωρών η φιάλη ζυγίστηκε και μηδενίστηκε. Το χωνί με το διηθητικό και το δείγμα τοποθετήθηκε στη φιάλη, ζυγίστηκε και έγινε καταγραφή της τιμής. Η υδατοχωρητικότητα εκφράστηκε σε ποσοστό με τη βοήθεια του τύπου:

$$\%WHC = \frac{(g \text{ δείγματος} - x) + (W2 - W1)}{x} \times 100 \quad , \text{ όπου}$$

W1= βάρος δείγματος την πρώτη μέρα,

W2= βάρος δείγματος την επόμενη μέρα,

x= αν ζυγιστούν 20 γραμμάρια δείγματος με υγρασία 30% τότε $x = \frac{20}{1.30}$,βάρος νερού στο δείγμα πριν την μεταχείριση

Μετρήσεις υδατοχωρητικότητας πραγματοποιήθηκαν ενδεικτικά σε 4 δείγματα κοπριάς και 4 δείγματα εδάφους, από τα οποία προέκυψε μέση τιμή και τυπική απόκλιση για κάθε τύπο δείγματος ξεχωριστά.

2.2 Προσδιορισμός επιπέδων tiamulin, tilmicosin, sulfomethoxazole

2.2.1 Εκχύλιση των αντιβιοτικών από την κοπριά.

Η μέθοδος εκχύλισης των tiamulin, tilmicosin, και sulfamethoxazole από τα δείγματα της κοπριάς βασίστηκε σε μέθοδο που περιγράφηκε από τους Wang et al., (2020), με τροποποιήσεις που αναπτύχθηκαν σε προηγούμενο πείραμα στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος.

Προετοιμάστηκε υγρό εκχύλισης με σύσταση: μείγμα H₂O:μεθανόλης:ακετόνης (Chem-Lab NV Acetone a.r.), 50:25:25, v/v/v, με περιεκτικότητα 25mM EDTA (PanReac AppliChem ITW Reagents, 5EDTA Disodium Salt 2-hydrate for molecular biology), 0.6M NaCl (PanReac AppliChem ITW Reagents, Sodium Chloride for analysis, ACS, ISO) και 2% υδροξείδιο του αμμωνίου (Chem-Lab NV, Ammonia 25 weight % solution a.r.). Σε σωληνάριο φυγοκέντρισης (Nalge Nunc International, Oak Ridge Centrifuge Tube, PPCO 50ml) ζυγίστηκε ένα γραμμάριο κοπριάς και προστέθηκαν 10 ml από το υγρό εκχύλισης που προετοιμάστηκε. Το μείγμα αναδεύτηκε έντονα με τη βοήθεια Vortex (VELP SCIENTIFICA TX4 Digital IR Vortex Mixer) για 1 λεπτό και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε εκχύλιση σε λουτρό υπερήχων (Elma S30 Elmasonic) για 15 λεπτά. Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 10.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και υποβλήθηκε σε δεύτερη εκχύλιση. Το υπερκείμενο που συλλέχθηκε από τη δεύτερη εκχύλιση διηθήθηκε από μικροστήλη εκχύλισης στερεάς φάσης (CNW Technologies, Poly-Sery HLB Cartridge 200mg, 6 ml). Αφού ενεργοποιήθηκε το φυσίγγιο της μικροστήλης με 5ml μεθανόλης (Merk LiChrosolv Reag. Ph Eur Methanol) και 6 ml υπερκάθαρο νερό (Millpore, Direct-Q3 with Pump), φορτώθηκε στη μικροστήλη το δείγμα και ακολούθησε πλύση με 6ml υπερκάθαρο νερό και αφέθηκε να στεγνώσει με τη βοήθεια κενού αέρος για 3 λεπτά. Η έκλουση των αντιβιοτικών πραγματοποιήθηκε με προσθήκη μείγματος μεθανόλης:ακετονιτριλίου (Merk LiChrosolv Reag. Ph Eur Acetonitrile), 9:1, v/v με 0.2% φορμικό οξύ (VWR Chemicals, AnalR NORMAPUR, Formic Acid 99-100%) και ξανά προσθήκη μείγματος μεθανόλης:ακετονιτριλίου, 9:1, v/v με 0.2% φορμικό οξύ με τη χρήση κενού αέρος. Το προϊόν της έκλουσης τέθηκε υπό κενό περιστροφικό εξατμιστή (RE300, BARWORLD SCIENTIFIC LIMITED STONE,

STRAFFORDSHIRE, ST15, OSA, UK) και εξατμίστηκε μέχρι τελικού όγκου 0.2ml. Ακολούθησε επανασύσταση του δείγματος σε διάλυμα υπερκάθαρου-νερού:ακετονιτριλίου, 1:1, μέχρι τελικού όγκου 1ml. Το τελικό διάλυμα διηθήθηκε με τη βοήθεια φίλτρου σύριγγας 0.5μm (Labfil Part of ALWSCI, Syringe Filter 25mm PTFE Hydrophilic Syringe Filter 0.22μm with Outer Ring) με σκοπό να ακολουθήσει ανάλυση του μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης.

2.2.2 Εκχύλιση αντιβιοτικών από το έδαφος

Η μέθοδος εκχύλισης των tiamulin, sulfamethoxazole και tilmicosin από τα δείγματα εδάφους βασίστηκε στη μέθοδο που περιγράφηκε από τους Lee et al.(2017).

Σε σωληνάριο φυγοκέντρισης (Nalge Nunc Interational, Oak- Ridge Centrifuge Tube, PPCO 50ml) ζυγίστηκαν 5 γραμμάρια εδάφους και προστέθηκαν 2,5 ml υπερκάθαρου νερού και αφού το μείγμα αναδεύτηκε έντονα με τη βοήθεια vortex για 1 λεπτό αφέθηκε για 10 λεπτά να ισορροπηθεί. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5ml ακετονιτρίλιο, 0.05ml φορμικό οξύ και 0.5 γραμμάρια χλωριούχου νατρίου και αφού το μείγμα αναδεύτηκε έντονα με τη βοήθεια vortex για 5 λεπτά φυγοκεντρήθηκε στα 4000 rpm για 5 λεπτά στους 25°C. Συλλέχθηκαν 3ml υπερκείμενου και σε αυτά προστέθηκαν 0.075γραμμάρια PSA (primary and secondary PSA τύπου Enviro Clean n-2-aminoethyl, United Chemical Technologies, PA,USA) . Το δείγμα αναδεύτηκε έντονα με τη χρήση vortex και φυγοκεντρήθηκε στις 5000 στροφές για 5 λεπτά στους 25°C. Συλλέχθηκαν 2ml από το υπερκείμενο και διηθήθηκαν με τη βοήθεια φίλτρου σύριγγας (Labfil Part of ALWSCI, Syringe Filter 25mm PTFE Hydrophilic Syringe Filter 0.22μm with Outer Ring), προκειμένου να ακολουθήσει ανάλυση χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

2.2.3 Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης.

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC Shimadzu LC-20ADHPLC) με ανιχνευτή UV/VIS PDA, Προστήλη Shimadzu GVP-ODs 4.6mm by 150mm, 5μm, συνδεδεμένη σε στήλη RP Shimadzu VP-ODs 4.6mm x 150mm, 5μm.

Tilmicosin: Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του tilmicosin χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική έκλυση με κινητή φάση μείγματος αναλογίας 35/65 κ.ο. ακετονιτριλίου και 0.1% v/v ορθοφωσφορικού οξέος (SIGMA-ALDRICH Phosphoric acid puriss. p.a., ACS reagent, reag.

ISO, reag. Ph. Eur., $\geq 85\%$). Ο ρυθμός ροής της κινητικής φάσης ήταν 0.3ml/min και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 287nm.

Sulfamethoxazole: Για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση του sulfamethoxazole χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική έκλουση με κινητή φάση μείγματος μεθανόλης: υπερκάθαρου νερού, 40:60, v/v.

Tiamulin: Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του tiamulin χρησιμοποιήθηκε ισοκρατική έκλουση με κινητή φάση μείγματος 60:40 κ.ο. ακετονιτριλίου: διαλύματος αμμωνίας σε νερό συγκέντρωσης 1.25% v/v. Ο ρυθμός ροής της κινητικής φάσης ήταν 1ml/min και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 208nm.

2.3 Προσδιορισμός επιπέδων γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και γονιδίων που σχετίζονται με την οριζόντια μεταφορά γονιδίων

2.3.1 Εκχύλιση DNA από το έδαφος

Η εκχύλιση του DNA έγινε με χρήση 250 mg δείγματος σύμφωνα με το DNeasy Powersoil Pro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), προκειμένου να ακολουθήσει ποσοτικοποίηση των γονιδίων αντοχής με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

2.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς με qPCR

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT- qPCR) πραγματοποιήθηκε για το γονίδιο αναφοράς 16S RNA, για τα γονίδια δείκτες οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς KoriB και Int11 και των γονιδίων μικροβιακής αντοχής σε αντιβιοτικά sul1, cfxA, tetM, qnrD, tem και dfrA. Στα δείγματα που προέκυψαν από την εκχύλιση πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις και για την αντίδραση πολυμεράσης αξιοποιήθηκε αραιώση DNA 5ng/μl, εκτός της αντίδρασης του φυλλογενετικού δείκτη 16S RNA που αξιοποιήθηκε αραιώση 1ng/μl. Η ανάλυση qPCR έγινε με τη χρήση του kit KAPA SYBR FAST (KAPA Biosystems Wilmington, MA, USA) και πρότυπες καμπύλες κάθε γονιδίου κατασκευάστηκαν μέσω διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων πλασμιδίων με συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 10^8 έως 10^1 . Τόσο τα πλασμίδια, οι εκκινητές, αλλά και οι διαδοχικές αραιώσεις για τις πρότυπες καμπύλες είχαν κατασκευαστεί στο εργαστήριο Βιοχημείας Φυτών και Περιβάλλοντος σε προηγούμενο πείραμα. Πριν την χρήση τους έγιναν

test για την διασφάλιση της αξιοπιστίας τους. Η αντίδραση κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10μl με σύσταση που φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
SYBRGREEN	5
BSA	0.2
Πρόσθιος εκκινητής	0.1
Ανάστροφος εκκινητής	0.1
H ₂ O	3.6

Πίνακας 3. Η σύσταση του τελικού μίγματος αντίδρασης για κάθε γονίδιο.

Η αντίδραση για το KorB είχε τελικό όγκο 10μl και σύσταση:

Αντιδραστήρια	Όγκος (μl)
SYBRGREEN	5
BSA	0.2
Πρόσθιος εκκινητής 1	0.2
Ανάστροφος εκκινητής 1	0.2
H ₂ O	3.1
Πρόσθιος εκκινητής 2	0.1
Ανάστροφος εκκινητής 2	0.1
Εκκινητής Rd	0.1

Πίνακας 4. Η σύσταση του τελικού μίγματος αντίδρασης για το γονίδιο KorB.

Για κάθε γονίδιο προετοιμάστηκε plate που έφερε τα δείγματα για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, τα περιβαλλοντικά δείγματα και αρνητικά controls, αφού προηγήθηκε προετοιμασία master mix.

Οι εκκινητές επιλέχθηκαν από τη συλλογή εκκινητών που βασίζεται στη βιβλιογραφία, τη βάση δεδομένων ARGA (Wei et al., 2019), και αξιολογήθηκαν με βάση την ευαισθησία και την εξειδίκευσή τους σε σύγχρονες βάσεις δεδομένων αλληλουχιών. Οι εκκινητές που σημείωσαν υψηλή βαθμολογία αξιολογήθηκαν για την προτεραιότητα του στόχου τους, σύμφωνα με το σύστημα κατάταξης που παρουσιάστηκε στο προδημοσίευμα των (Zhang et al., 2019): I) κινητικοί μεταξύ ανθρωπίνων παθογόνων· II) κινητικοί μεταξύ μη παθογόνων· III) μη κινητικοί μεταξύ

εμπλουτισμένων μικροοργανισμών σε περιβάλλοντα που επηρεάζονται από τον άνθρωπο· IV) μη κινητικοί και μη ανταποκρινόμενοι σε ανθρωπογενή δραστηριότητα. Οι εκκινητές ελέγχθηκαν επίσης για τη σχετικότητά τους με περιβάλλοντα εδάφους/κοπριάς και συνοψίζονται στον Πίνακα 5.

primers	Πρόσθιος εκκινητής (5'-3')	Ανάστροφος εκκινητής (5'-3')	Συνθήκες θερμοκυκλοποιητή	Reference
tetM_1	ACAGAAAGCTTATTATATAAC	TGGCGTGTCTATGATGTTC AC	95°C for 5 s, 49°C for 30 s (45 cycles) 95°C for 15 s, 60°C for 60 s	(Koike et al. 2007)
dfrA1_1	GGAATGGCCCTGATATTCCA	AGTCTTGCCTCCAACCAAC AG	95°C for 15 s, 60°C for 20 s (40 cycles) 95°C for 15 s, 60°C for 60 s	(Wang et al. 2014)
sul1_3	GACTGCAGGCTGGTGGTTAT	GAAGAACCGCACAAATCTCG T	95°C for 15 s, 60°C for 20 s (40 cycles) 95°C for 15 s, 60°C for 60 s	(Ross and Topp 2015)
tem_1	GCATCTTACGGATGGCATGA	GTCCTCCGATCGTTGTCAG AA	95°C for 15 s, 60°C for 20 s (40 cycles) 95°C for 15 s, 60°C for 60 s	(May et al. 2009)
cfxA_1	TCATTCCTCGTTCAAGTTTTC AGA	TGCAGCACCAAGAGGAGA TGT	95°C for 15 s, 60°C for 20 s (40 cycles) 95°C for 15 s, 60°C for 60 s	(Wang et al. 2014)
qnrD_1	ACGACAGGAATAGCTTGGAA GG	TCAGCCAAAGACCAATCAA ACG	95°C for 15 s, 60°C for 20 s (40 cycles) 95°C for 15 s, 60°C for 60 s	(Tan et al., 2018)
korB	F TCATCGACAACGACTAC AACG	R TTCTTCTTGCCCTTC GCCAG	95°C for 15 s , 54°C for 15 s, 60°C for 60 s	(Jechalke et al., 2013)
	Fz TCGTGGATAACGACTAC AACG	Rge TTYTTCYTGCCCTTG GCCAG		
		Rd TTCTTGACTCCCTTC GCCAG		
intI1	CTGGATTTCGATCACGGCACG	ACATGCGTGTAATCATCG TCG	95°C for 30 s, 62°C for 30 s, 72°C for 60 s (40 cycles) 95°C for 15 s, 60°C for 60 s	(Hardwick et al., 2008)
16S	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	ATTACCGCGGCTGCTGG	95°C for 15 s, 62°C for 20 s, 72°C for 30 s (35 cycles) 95°C for 15 s, 60°C for 1 min	(Muyzer et al., 1993)

Πίνακας 5. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι συνθήκες του θερμοκυκλοποιητή για κάθε αντίδραση.

2.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του περιβάλλοντος υπολογιστικού φύλλου Excel και του λογισμικού R έκδοσης 4. 2. 0 με τη βοήθεια ολοκληρωμένου περιβάλλοντος RStudio. Κανονικοποίηση των τιμών έκφρασης των γονιδίων των δειγμάτων με βάση την παρουσία των αντιγράφων του *16S rRNA* πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του υπολογιστικού φύλλου Excel. Η διαχείριση των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια του πακέτου agricolae (version 1.3-7), που περιέχει εργαλεία για τη στατιστική ανάλυση πειραματικών σχεδίων εφαρμοσμένα σε γεωργικά εδάφη. Τα δεδομένα υποβλήθηκαν (σε τεστ παραμετρικότητας και στη συνέχεια) σε ανάλυση διακύμανσης (analysis of variance, ANOVA) με παράγοντες τα «μεταβατικά» δείγματα. Στα αποτελέσματα της ANOVA εφαρμόστηκε post-hoc έλεγχος με το Tukey's HSD test (Tukey's Honest Significant Difference test) για τον υπολογισμό διαστημάτων εμπιστοσύνης στις διαφορές των μέσων τιμών. Για τα γονίδια των οποίων τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν παραμετρική κατανομή, οι αναλύσεις βασίστηκαν στις μη-παραμετρικές ανάλογες τους δοκιμές Kruskal-Wallis και δοκιμές αθροισμάτων Wilcoxon. Τα δεδομένα παραστήθηκαν γραφικά με barplot.

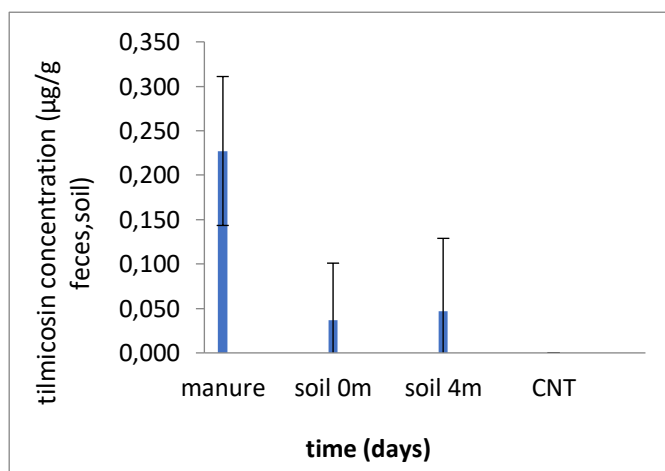
3.Αποτελέσματα

3.1. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης αντιβιοτικών

Από την ποσοτικοποίηση με HPLC ανιχνεύτηκε παρουσία μόνο του αντιβιοτικού tilmicosin, σε χαμηλές συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν μεταξύ 0,158-0,204 μg/gr στα δείγματα που προερχόντουσαν από την κοπριά και 0,111μg/gr σε δείγμα που προερχόταν από χώμα που αναδείχθηκε μετά από μετακίνηση της κοπριάς.

			HPLC	όγκος επαναδιάλυσης (ml)	ουσία μg/ml	ουσία μg/gr manure/soil	υγρασία %	ug/gr DW	M.O.	SD	
Manure	TLM	A	0,129	0,500	0,065	0,065	68,310	0,204	0,227	0,084	manure
	TLM	B	0,203	0,500	0,102	0,102	68,310	0,320			
	TLM	C	0,100	0,500	0,050	0,050	68,310	0,158			
Soil 0m	TLM	A	0,087	1,000	0,087	0,087	21,570	0,111	0,037	0,064	soil 0m
	TLM	B	0,000	1,000	0,000	0,000	21,570	0,000			
	TLM	C	0,000	1,000	0,000	0,000	21,570	0,000			
Soil 4m	TLM	A	0,111	1,000	0,111	0,111	21,570	0,142	0,047	0,082	soil 4m
	TLM	B	0,000	1,000	0,000	0,000	21,570	0,000			
	TLM	C	0,000	1,000	0,000	0,000	21,570	0,000			
Soil 100m CNT	TLM	A	0,000	1,000	0,000	0,000	21,570	0,000	0,000	0,000	CNT
	TLM	B	0,000	1,000	0,000	0,000	21,570	0,000			
	TLM	C	0,000	1,000	0,000	0,000	21,570	0,000			

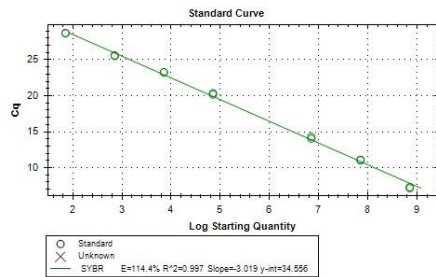
Πίνακας 6.Αναλυτικά οι τιμές της συγκέντρωσης του tilimicosin.



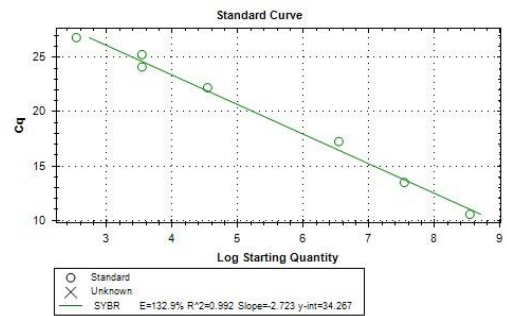
Πίνακας 7.Ραβδόγραμμα των ανιχνευόμενων συγκεντρώσεων του tilimicosin. Οι ράβδοι απεικονίζουν την μέση συγκέντρωση του αντιβιοτικού, ενώ οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν τις τυπικές αποκλίσεις.

3.2 Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης γονιδίων

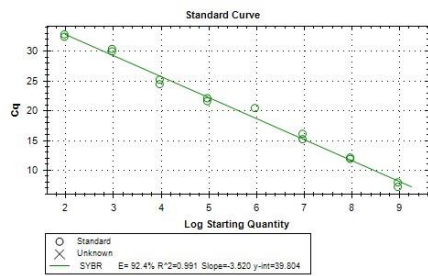
Από τις αντιδράσεις της qPCR για τα γονιδία αντοχής προέκυψαν οι πρότυπες καμπύλες, που παρατίθενται στη συνέχεια και αξιοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της αφθονίας των γονιδίων.



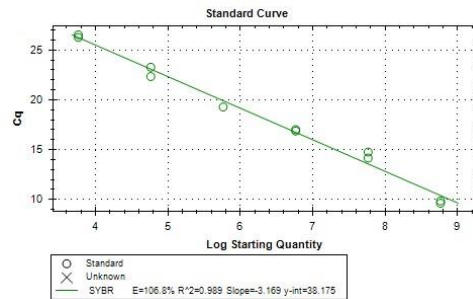
Πίνακας 8. Πρότυπη καμπύλη για το *cfxA*.



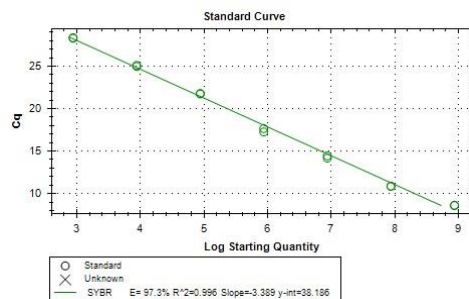
Πίνακας 9. Πρότυπη καμπύλη 16S rRNA gene.



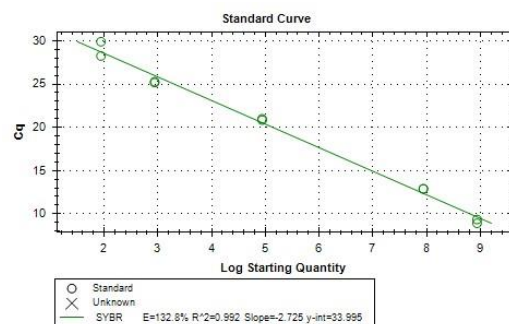
Πίνακας 11. Πρότυπη καμπύλη για το *qnrD*.



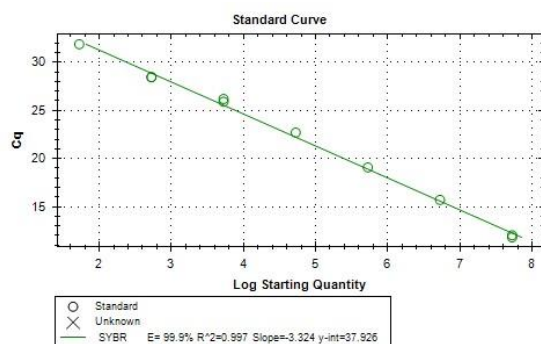
Πίνακας 10. Πρότυπη καμπύλη για το *dfpA*



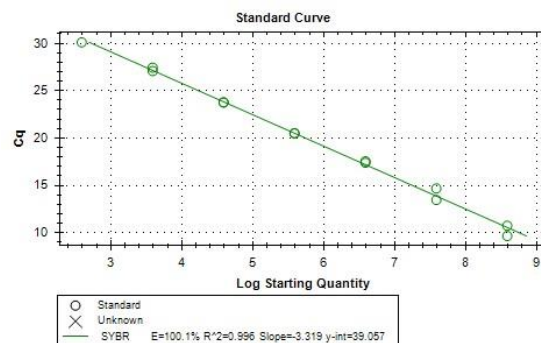
Πίνακας 12. Πρότυπη καμπύλη για το *tet*.



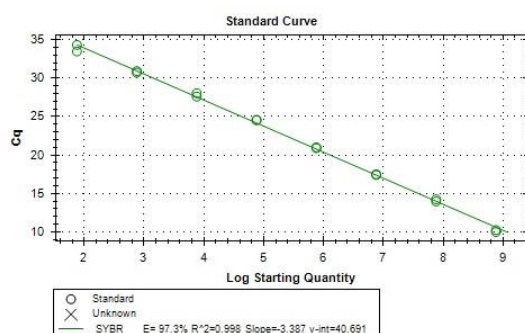
Πίνακας 13. Πρότυπη καμπύλη για το *sul*.



Πίνακας 15. Πρότυπη καμπύλη για το *IntI1*



Πίνακας 14. Πρότυπη καμπύλη για το *tetM*.

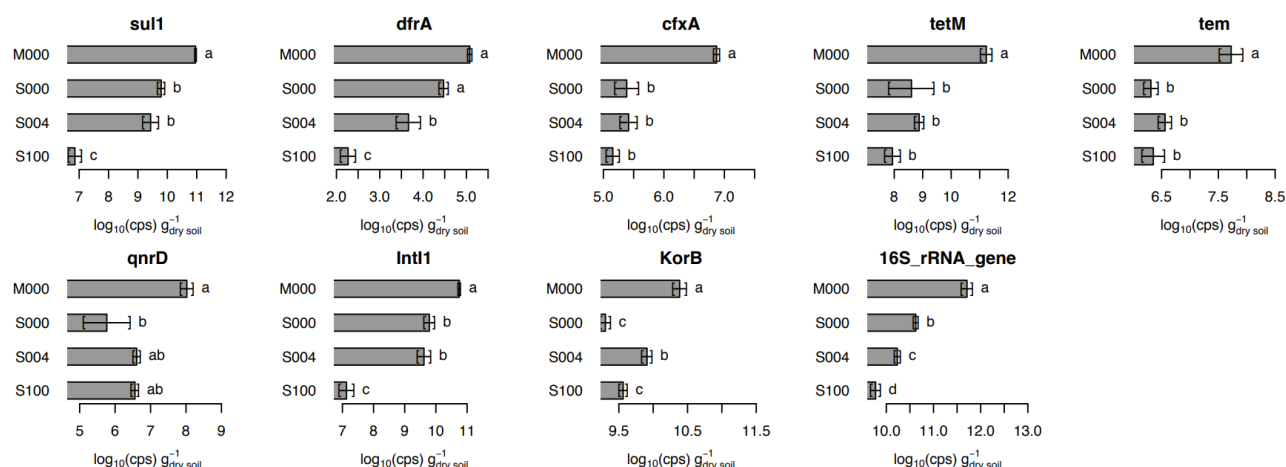


Πίνακας 16. Πρότυπη καμπύλη για το *KorB*.

Οι αναλύσεις των γονιδίων βασίστηκαν στις δοκιμές ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και *post hoc* σύγκρισης ανά ζεύγη Tukey's για την εκτίμηση των στατιστικά σημαντικών διαφορών. Για τα γονίδια των οποίων τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν παραμετρική κατανομή, οι αναλύσεις βασίστηκαν στις μη-παραμετρικές ανάλογες τους δοκιμές Kruskal-Wallis και δοκιμές αθροισμάτων Wilcoxon. Η παραμετρικότητα των δεδομένων εκτιμήθηκε με τη μέθοδο ελέγχων των Shapiro-Wilk. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με δύο τρόπους:

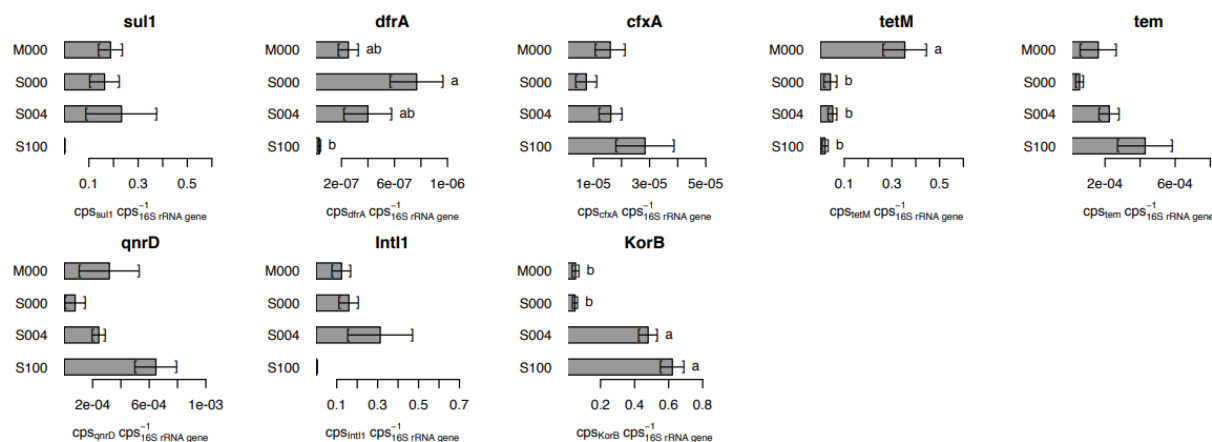
- Με τις απόλυτες αφθονίες των γονιδίων,
- Με τις σχετικές προς το 16S rRNA γονίδιο αφθονίες τους.

Κατά την σύγκριση των διαφορών των απόλυτων μέσων τιμών, καθολικά σε όλα τα γονίδια φαίνεται η αφθονία να υπερτερεί σαφώς στα δείγματα της κοπριάς (Πίνακας 17). Αυξημένη είναι επίσης σε όλα τα γονίδια η αφθονία στα δείγματα που συλλέχθηκαν από το πρανές του καναλιού (απορροές). Καθολικά επίσης φαίνεται η μικρότερη αφθονία να συναντάται στα δείγματα που συλλέχθηκαν από το έδαφος που αναδείχθηκε μετά από την απομάκρυνση της κοπριάς. Τέλος όλα τα γονίδια ανιχνεύονται και στον μάρτυρα.



Πίνακας 17. Ραβδογράμματα των απόλυτων αφθονιών των γονιδίων που αναλύθηκαν. Οι ράβδοι απεικονίζουν τις μέσες αφθονίες των γονιδίων ενώ οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν τις τυπικές αποκλίσεις. Τα γράμματα, όπου υπάρχουν, αποδίδουν τις ομάδες στατιστικής σημαντικότητας, όπως προέκυψαν από τις δοκιμές ANOVA και της *post hoc* σύγκρισης ανά ζεύγη Tukey's, ή των παραμετρικών τους ανάλογων (Kruskal-Wallis και Wilcoxon αθροισ) εφ' όσον οι προϋποθέσεις των παραμετρικών δοκιμών δεν πληρούνταν. Για όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκε το κατώφλι $\alpha = 0.05$.

Κατά την σύγκριση των σχετικών ως προς το *16S rRNA* αφθονιών των γονιδίων παρατηρήθηκαν διαφορετικά μοτίβα από αυτά των απολύτων αφθονιών που περιγράφονται παραπάνω (Πίνακας 18). Συμφωνία στην κατανομή εμφανίζουν το *sul1* με το *int11* σημειώνοντας τάση μέγιστης σχετικής αφθονίας στις απορροές και ελάχιστη σχετική αφθονία στον μάρτυρα. Το *dfrA*, είχε μέγιστη σχετική αφθονία στο έδαφος κάτω από την κοπροσωρό ενώ σημαντικά χαμηλότερη σχετική αφθονία παρατηρήθηκε στον μάρτυρα. Τα *cfxA*, *tem* και *qnrD* έδειξαν παρόμοιες τάσεις με ελάττωση από την κοπροσωρό προς το έδαφος κάτω της και αύξηση προς το δείγμα απορροής και τον μάρτυρα, χωρίς όμως να υπάρχουν σημαντικές διαφορές σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση. Το γονίδιο δείκτης *korB*, απαντάται σε μέγιστες σχετικές αφθονίες στις απορροές και τον μάρτυρα. Το γονίδιο ανθεκτικότητας *tetM* εμφανίζει μέγιστη σχετική αφθονία στην κοπριά.



Πίνακας 18. Ραβδογράμματα των σχετικών ως προς το 16S rRNA γονιδίων των γονιδίων που αναλύθηκαν. Οι ράβδοι απεικονίζουν τις μέσες σχετικές αφθονίες των γονιδίων ενώ οι γραμμές σφάλματος απεικονίζουν τις τυπικές αποκλείσεις. Τα γράμματα, όπου υπάρχουν, αποδίδουν τις ομάδες στατιστικής σημαντικότητας, όπως προέκυψαν από τις δοκιμές ANOVA και της *post hoc* σύγκρισης ανά ζεύγη Tukey's, ή των παραμετρικών τους ανάλυσεων (Kruskal-Wallis και Wilcoxon αθροισ) εφ' όσον οι προϋποθέσεις των παραμετρικών δοκιμών δεν πληρούνταν. Για όλες τις δοκιμές χρησιμοποιήθηκε το κατώφλι α 0.05.

4. Συζήτηση

Οι ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών στις κοπροσωρούς, στις κοπριές και στα γεωργικά εδάφη εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, οι οποίοι σχετίζονται με το είδος του αντιβιοτικού, τις φυσικοχημικές του ιδιότητες, τον τρόπο χορήγησης και μεταβολισμού από το εκτρεφόμενο ζώο, καθώς και από το έδαφος, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και την μικροβιακή κοινότητα του (Cycon, 2019). Η ποσοτικοποίηση των αντιβιοτικών στην παρούσα εργασία έγινε σε εδάφη χρόνια εκτεθειμένα σε κοπριά χοίρων, ωστόσο δεν ήταν γνωστά τα αντιβιοτικά σκευάσματα που χορηγούσε η κτηνοτροφική μονάδα. Επιλέχθηκε να γίνει ανίχνευση τριών αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται ευρέως στην κτηνοτροφία και ανήκουν σε τάξεις που σημειώσει υψηλότερες πωλήσεις στην Ευρώπη (EMA,2022). Η μελέτη της διάδοσης της αντοχής στα αντιβιοτικά έγινε με την ποσοτικοποίηση γονιδίων δεικτών αντιμικροβιακής αντοχής. Τα γονίδια των β-λακταμασών *sul1*, *tem* επιλέχθηκαν λόγω της συσχέτισης τους με αντοχή σε αντιβιοτικά που χορηγούνται σε μεγαλύτερη αφθονία, τις β-λακτάμες και η αντοχή σε αυτά είναι από τις πιο διαδεδομένες (Medeiros, 1997, Salverda ML, 2010). Το γονίδιο της β-λακταμάσης *cfxA* επιλέχθηκε ως δείκτης διασποράς αντοχής μιας τάξης από τις πιο συχνά συνταγογραφούμενες κεφαλοσπορίνες 3^{ης} γενιάς (Sydenham TV, 2015, Arumugham, 2023), ενώ το *dfrA* λόγω της

συνήθους συνταγογράφησης της τριμεθοπρίμης σε συνδυασμό με τα σουλφοναμίδια (Mercer, 2022). Το *qnrD* επιλέχθηκε ως δείκτης διασποράς αντοχής ενός σπανιότερα χορηγούμενων αντιβιοτικών, με μεγάλη επιμονή στα περιβάλλοντα (Van-Anh Thai et al., 2023). Τέλος, το *tetM* επιλέχθηκε λόγω της συσχέτισης του με αντοχή σε ένα από τα δημοφιλέστερα κτηνιατρικά αντιβιοτικά, τις τετρακυκλίνες (Lima, 2020). Επιπλέον στοχεύθηκαν δύο από τους αντιπροσωπευτικότερους δείκτες συμβάντος οριζόντιας μεταφοράς μεταθετών στοιχείων που σχετίζονται με την διάδοση αντιβιοαντοχής (*korB* και *intI1*). Τέλος το 16S rRNA ποσοτικοποιήθηκε προκειμένου να ως δείκτης μεγέθους του βακτηριακού πληθυσμού. Η δειγματοληψία έγινε από τον υπαίθριο χώρο εναπόθεσης της κοπριάς (δείγμα κοπριάς και δείγμα εδάφους κάτω από την κοπριά), από σημείο πιθανής απορροής σε κανάλι πλησίον και από έδαφος μάρτυρα εκτός του χώρου προσωρινής εναπόθεσης κοπριάς.

Το sulfamethoxazole απαντάται στη βιβλιογραφία να εμφανίζει χρόνο ημιζωής με μέσο όρο τις 10 μέρες (Jechalke, 2014; Cycon, 2019; Archundia, 2021) σε μη αποστειρωμένο χώμα και αερόβιες συνθήκες. Τα σουλφοναμίδια έχουν την ικανότητα να προσδένονται γερά στα σωματίδια του χώματος και να σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε βιοαποικοδόμηση (Archundia, 2021). Το tiamulin σε προηγούμενες μελέτες φαίνεται να είναι αρκετά επίμονο και έχει καταγράψει χρόνους ημιζωής μεγάλου εύρους από 16-62 έως και 101 ημέρες (Schlusener, 2006; Massacessi, 2024). Σε προηγούμενη μελέτη σε εδάφη της Θεσσαλίας το tiamulin εμφάνισε χρόνο ημιζωής μικρότερο από το tilmicosin και συγκεκριμένα 5.9-35.9 ημέρες (Perruchon, 2022). Στην ίδια μελέτη, για το tilmicosin καταγράφηκε μεγαλύτερος χρόνος ημιζωής 23,5-49.8 ημέρες και φάνηκε να εμμένει περισσότερο στα εδάφη. Σε πρόσφατη επόμενη μελέτη σε εδάφη της Θεσσαλίας διαπιστώθηκε επιτάχυνση της βιοαποικοδόμησης του tiamulin μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές του αντιβιοτικού. Επαναλαμβανόμενη εφαρμογή του tilmicosin δεν οδήγησε σε επιτάχυνση της βιοαποικοδόμησης του, επαληθεύοντας την υψηλή εμμονή του στα εδάφη (Katsivelou E., 2023). Στην ίδια μελέτη, για το tilmicosin καταγράφηκε μεγαλύτερος χρόνος ημιζωής 23,5-49.8 ημέρες και φάνηκε να εμμένει περισσότερο στα εδάφη. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν και επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα των αναλυτικών δοκιμών του δικού μας πειράματος κατά το οποίο έγινε ανίχνευση μόνο του μακρολιδίου. Μέγιστη συγκέντρωση ανιχνεύτηκε στην κοπριά, όπως ήταν αναμενόμενο, δεδομένης και της χαμηλής ή καθόλου κινητικότητας των tilmicosin (υψηλή τιμή συντελεστή διαχωρισμού εδάφους νερού – K_{oc} – που φτάνει τα 2800 και συνεπάγεται χαμηλή κινητικότητα) και tiamulin (πολύ υψηλή τιμή

Κοκ που φτάνει τα 36000 και συνεπάγεται καθόλου κινητικότητα), ενώ το sulfamethoxazole, ενώ είναι κινητοποιήσιμο μετασχηματίζεται σχετικά γρήγορα (οι τιμές Κοκ ανακτήθηκαν από την βάση δεδομένων PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> - 27/06/2024 και χαρακτηρίστηκαν σύμφωνα με την ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας <https://www.fao.org/4/X2570E/X2570E06.htm> - 27/06/2024).

Η διάδοση των γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή σε αντιβιοτικά σε πολλές μελέτες φαίνεται να μην σχετίζεται απαραίτητα με την παρουσία ή όχι ενός αντιβιοτικού προερχόμενου από ανθρώπινη παρέμβαση στο έδαφος, καθώς αρκετά αντιβιοτικά αποικοδομούνται γρήγορα και εν τέλει δεν ασκούν επαρκή εξελικτική πίεση (Cycon, 2021). Αντίθετα φαίνεται να σχετίζεται με το μικροβιακό φορτίο που προέρχεται από την εφαρμογή της κοπριάς ως λίπασμα. Η κοπριά διαθέτει όχι μόνο προϊόντα μεταβολισμού των αντιβιοτικών από τους χοίρους, αλλά και αφθονία μικροοργανισμών του εντέρου των χοίρων, οι οποίοι λόγω της μακράς έκθεσής τους στα αντιβιοτικά και τα προϊόντα μεταβολισμού τους συχνά αναπτύσσουν αντιβιοαντοχή. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των απόλυτων συγκεντρώσεων των γονιδίων αντοχής στο παρόν πείραμα, αποκάλυψε μέγιστες συγκεντρώσεις στα δείγματα της κοπριάς, όπως ήταν αναμενόμενο. Η ανίχνευση γονιδίων αντοχής και στα εδαφικά δείγματα κάτω από την κοπριά και στις απορροές, θα μπορούσε να μαρτυρά και να επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση της εργασίας για τη διάδοση γονιδίων αντιβιοαντοχής από την κοπριά και την μικροβιακή κοινότητα του εντέρου των εκτρεφόμενων ζώων στους μικροβιακούς πληθυσμούς των γεωργικών εδαφών. Άμεσα θετική συσχέτιση της εφαρμογής κοπριάς χοίρων μετά από αντιβιοτική θεραπεία σε γεωργικά εδάφη με την αφθονία αντιβιοαντοχής και τρανσποζασών παρατήρησε και ο Zhu και συνεργάτες (2013) σε χοιροτροφικές μονάδες στην Κίνα, ενώ αντίστοιχη καταγράφηκε στο πείραμα των Macedo και συνεργάτες (2020), κατά την μελέτη της αποικοδόμησης των αντιβιοτικών και γονιδίων αντιβιοαντοχής σε γεωργικές εκτάσεις της Ολλανδίας.

Ο προσδιορισμός των σχετικών αφθονιών των γονιδίων αντοχής/οριζόντιας-μεταφοράς, ως επί τω πλείστον, δεν έδειξε ταύτιση με τις απόλυτες αφθονίες. Τα γονίδια που αναλύθηκαν παρουσίασαν συγκεκριμένες τάσεις σχετικής αφθονίας κατά ομάδες. Ειδικότερα, το *tetM* εμφάνισε τη μέγιστη σχετική αφθονία στα δείγματα της κοπριάς, όμως δεν παρατηρήθηκε υψηλή σχετική αφθονία του γονιδίου στα δείγματα των υπόλοιπων εδαφών. Οι τετρακυκλίνες αποτελούν μια από τις πιο διαδεδομένες τάξεις αντιβιοτικών, με εφαρμογή κυρίως στην κτηνοτροφία τόσο

για θεραπευτικούς και προληπτικούς σκοπούς, όσο και ως αυξητικοί παράγοντες (Smith, et al. 2004). Η αντοχή στην τετρακυκλίνη, λόγω της εκτεταμένης και χρόνιας χορήγησης της φαίνεται να είναι αρκετά καθιερωμένη μεταξύ των βακτηρίων (Massacessi, 2024) και αυτό αποτυπώνεται στην υψηλή αφθονία γονιδίων που σχετίζονται με αντοχή σε αυτήν που μετρήθηκε στην κοπριά, δηλαδή στο εντερικό μικροβίωμα των χοίρων. Ωστόσο η ένωση της τετρακυκλίνης είναι αρκετά υδατοδιαλυτή και ευαίσθητη σε υδρόλυση (Kummerer, 2009; B. Halling-Sørensen, 2000), το οποίο συνεπάγεται σύντομη παραμονή στα γεωργικά εδάφη και τελικά όχι επαρκή παράγοντα εξελικτικής πίεσης και ερμηνεύει την χαμηλή αφθονία που μετρήθηκε στα δείγματα της παρούσας εργασίας.

Μεγάλη αφθονία και συχνότητα στα περιβάλλοντα εμφανίζουν και τα γονίδια ανθεκτικότητας στα σουλφοναμίδια, καθώς και τα σουλφοναμίδια είναι μια τάξη αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνταν ευρέως στην ιατρική και την κτηνιατρική (Pallares-Vega et al., 2019). Πράγματι ανιχνεύεται σταθερή αφθονία του γονιδίου στα διαφορετικά εδάφη, ενώ μέγιστη στις απορροές. Οι σχετικές αφθονίες του *sulI*, φαίνεται να συμβαδίζουν με τις αφθονίες του γονιδίου που σχετίζεται με την αντοχή σε τριμεθοπρίμες, *dfrA*. Η χορήγηση της τριμεθοπρίμης πραγματοποιείται συνήθως με τη μορφή κοτριοξαζόλης, δηλαδή μαζί με το σουλφοναμίδιο, sulfamethoxazole και η αντιβιοτική δράση βασίζεται στην συνεργιστική δράση των ενώσεων. Η συχνή έκθεση των μικροοργανισμών στα δύο αντιβιοτικά ταυτόχρονα μπορεί να έχει οδηγήσει σε συνκληρονόμηση των δύο γονιδίων ανθεκτικότητας. Οι σχετικές αφθονίες του *sulI* εμφανίζουν σχεδόν απόλυτη ταύτιση με τις σχετικές αφθονίες του γονιδίου του ιντεγκρονίου *intI1*. Το ιντεγκρόνιο τάξης 1 αποτελεί ίσως το πιο άφθονο μεταθετό στοιχείο ειδικά σε κλινικά και ανθρώπινης δραστηριότητας περιβάλλοντα και το πιο συνδεδεμένο με τη διασπορά αντιβιοτικής αντοχής (Gillings, 2015). Το ιντεγκρόνιο τάξης 1 αποτελεί τον κύριο φορέα διάδοσης του *sulI* και το δεύτερο απαντάται πάντα ενσωματωμένο στο πρώτο (Pallares- Vega, 2019; de los Santos, 2021). Η συσχέτιση του *sulI* με το *intI1* επιβεβαιώνεται και σε αυτή την εργασία, αν και το γονίδιο της ιντεγκράσης ανιχνεύτηκε σε ελαφρώς χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Το δεύτερο γονίδιο-δείκτης που ποσοτικοποιήθηκε σε αυτή την εργασία είναι το *korB*. Το *korB* είναι γονίδιο των incompatibility P πλασμιδίων. Τα πλασμίδια της κλάσης αυτής έχουν την ικανότητα να μεταφέρονται με μεγάλη αποτελεσματικότητα σε πολύ μεγάλο εύρος ξενιστών και να διασπείρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή σε βαρέα μέταλλα ή και μονοπάτια

μεταβολισμού ενώσεων (Jechalke, 2013). Μέγιστη αφθονία του δείκτη μετράται στην κοπριά και μέγιστη σχετική προς το 16S rRNA μετρήθηκε στις απορροές και τον μάρτυρα. Η μέγιστη απόλυτη αφθονία στην κοπριά επιτρέπει τη συσχέτιση με γονίδια αντοχής σε αντιβιοτικά, τα οποία εισάγονται σε μέγιστες αφθονίες στην κοπριά από το μικροβίωμα του εντέρου των χοίρων. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε άμεση συσχέτιση των σχετικών αφθονιών του δείκτη, με κάποιο από τα γονίδια ανθεκτικότητας που στοχεύσαμε. Αυτό ίσως σχετίζεται με το γεγονός ότι το μεγαλύτερο μέρος του μικροβιακού πληθυσμού των κοπράνων των χοίρων ανήκει σε ταξινομικές ομάδες των *Firmicutes* (>70-75%) και *Bacteroidetes* (~10-15%) (Gresse et al 2019) που δεν είναι συνήθεις φορείς των *incP* πλασμιδίων (Shintani et al 2014) ή και αν ακόμη φιλοξενήσουν *incP* πλασμίδια δεν τα διατηρούν (Shoemaker and Salyers 1987). Επομένως, μία αυξημένη διασπορά βακτηρίων των ταξινομικών ομάδων αυτών στην κοπροσωρό και ακριβώς κάτω της θα μπορεί να εξηγήσει την πιθανή σχετική ελάττωση του *korB* ως προς το 16S rRNA γονίδιο. Επίσης δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του *korB* με το γονίδιο *intI1*. Συσχέτιση των δύο είχε παρατηρηθεί σε προηγούμενη μελέτη (Jechalke, Schreiter, 2013), εικάζοντας τη συμβολή του εύρους ξενιστών του *incP* πλασμιδίου με την διάδοση του κλινικά σχετικού ιντεγκρονίου τάξης 1. Παρόλα αυτά η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την αποτίμηση αυτής της συσχέτισης βασίστηκε στη σύλληψη των *incP* πλασμιδίων, πράγμα που αποκλείει τη μελέτη πληθυσμών που δε σχετίζονται με μη ξενιστές των *incP* πλασμιδίων.

Οι σχετικές αφθονίες των γονιδίων αντοχής σε β-λακτάμες *cfxA* και *tem* φάνηκε να ακολουθούν παρόμοια τάση. Οι β-λακτάμες είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τάξεις αντιβιοτικών και είναι δυνατό να απαντώνται στο μικροβίωμα του εντέρου των χοίρων βακτήρια που φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν β-λακτάμασες (Lima T, 2020). Η σχετική αφθονία του γονιδίου αντιβιοαντοχής στις β-λακτάμες φαίνεται να αυξάνεται με την προσθήκη της κοπριάς, όμως παρουσιάζει πτωτική τάση από την κοπριά προς το έδαφος από κάτω της. Αυξημένες συγκεντρώσεις σημειώθηκαν εκ νέου στα δείγματα της απορροής και μέγιστη στον μάρτυρα. Η κοπριά των χοίρων είναι πιθανό να λειτουργεί ως δεξαμενή για το γονίδιο ESBL και τη διάδοση αυτού (Lima, 2020). Η διάδοση του γονιδίου έχει συσχετιστεί με το πλασμίδιο *incN* (Binh, 2008). Τα πλασμίδια αυτά φαίνεται να ενσωματώνουν και άλλα γονίδια αντιβιοαντοχής σε β-λακτάμες και να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διασπορά γονιδίων που κωδικοποιούν β-λακταμάσες (Moodley A, 2009). Το γονίδιο *cfxA*, το οποίο επίσης εμφανίζει δράση β-λακταμάσης έναντι κεφαλοσπορίνης 3ης γενιάς (Sydenham TV, 2015) σημειώνει αύξηση της αφθονίας του μετά από

την προσθήκη κοπριάς, η οποία όμως επίσης ελαττώνεται από την κοπριά προς το έδαφος από κάτω της. Όπως και για το *tem* παρατηρήθηκε αύξηση της αφθονίας στις απορροές και μέγιστη αφθονία στον μάρτυρα, σε συνολικά όμως χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τη λακταμάση ευρείου φάσματος. Η κατανομή που ακολουθούν οι σχετικές προς το 16S rRNA αφθονίες των δύο β-λακταμασών δεν επιτρέπουν την χρήση τους ως δείκτες της επίδρασης της κοπριάς στα εδάφη. Οι διαφορές των τάσεων υποδεικνύουν ότι μπορεί να υπάρχει διαφορετική επίδραση ή προσαρμογή των βακτηρίων στις συνθήκες που επικρατούν στο έδαφος, ή αλληλεπίδραση αυτών με τους αυτόχθονες μικροοργανισμούς του εδάφους. Η αυξημένη αφθονία που συναντάται στον μάρτυρα για τα δύο γονίδια, μπορεί να μαρτυρά την επιβίωση στελεχών με αντιβιοαντοχή, λόγω της χρόνιας ρύπανσης των εδαφών με αντιβιοτικούς παράγοντες.

Την ίδια τάση κατανομής με τις β-λακταμάσες ακολουθεί και το *qnrD*, το γονίδιο που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στις φθοροκινολόνες. Η σχετική προς το 16S rRNA αφθονία του γονιδίου είναι αυξημένη στην κοπριά και ελαττώνεται προς το έδαφος κάτω από αυτήν, ενώ μέγιστη αφθονία στον μάρτυρα. Οι φθοροκινολόνες ανήκουν στα λιγότερο συχνά χορηγούμενα αντιβιοτικά, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και ως αυξητικοί παράγοντες στην κτηνοτροφία χοίρων. Το *qnrD* είναι γονίδιο ανθεκτικότητας στις φθοροκινολόνες συσχετισμένο κυρίως με τον άνθρωπο και ζώα συντροφιάς (Zhou et al, 2010). Η χορήγηση του είναι περισσότερο σπάνια τόσο σε κλινικά περιστατικά, όσο και στην κτηνοτροφία. Παρά την σπανιότερη χορήγηση τους, οι φθοροκινολόνες εμφανίζουν μέτρια ως υψηλή επιμονή στα εδάφη, καθιστώντας δυνατή τη συσσώρευση τους στα περιβάλλοντα και την άσκηση επαρκούς εξελικτική πίεση στους μικροβιακούς πληθυσμούς του εδάφους (Van-Anh Thai et al., 2023). Πράγματι, ανιχνεύονται γονίδια που σχετίζονται με την αντοχή σε φθοροκινολόνες σε μέγιστη αφθονία στην κοπριά, αλλά και τις απορροές και τον μάρτυρα. Συσχέτιση της διασποράς του *qnrD* σε γεωργικά εδάφη και της χοιροτροφίας εντοπίστηκε και σε μελέτη των Juan Li και συνεργάτες (2012).

5. Συμπερασματικά σχόλια

Από τα αποτελέσματα της εργασίας φάνηκε ότι προσθήκη κοπριάς, οδηγεί πράγματι σε αύξηση του περιεχομένου αυτής σε μικροοργανισμούς και γονίδια αντιβιοαντοχής σύμφωνα με τις απόλυτες αφθονίες των γονιδίων που αναλύθηκαν. Ακόμη, φάνηκε η συγκέντρωση των γονιδίων αντιβιοαντοχής να είναι πράγματι αυξημένη στα εδάφη γύρω από την κοπριά σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ παρατηρήθηκε συσχέτιση της σχετικής αφθονίας (προς το 16S rRNA γονίδιο) του

γονιδίου δείκτη οριζόντιας μεταφοράς *intI1* με αυτήν των γονιδίων αντιβιοαντοχής *sul1* και *dfpA* από την κοπριά στα γειτονικά εδάφη. Τέλος, φάνηκε η ανίχνευση κάποιων γονιδίων αντίστασης σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα εδάφη, παρά την κοπριά, μπορεί να μαρτυρά την διάδοση και επιβίωση ανθεκτικών στελεχών λόγω της χρόνιας έκθεσης των εδαφών σε αντιβιοτικά. Τα ευρήματά μας έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση των αντιβιοτικών και των μικροοργανισμών των κοπροσωρών με τους μικροοργανισμούς του εδάφους μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορετικά αποτελέσματα ως προς τη σχετική αφθονία των γονιδίων αντιβιοαντοχής και οριζόντιας μεταφοράς. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη σχετική τους αφθονία και την επιρροή της κοπριάς μεταξύ των δειγμάτων που αναλύθηκαν: (i) τα *tetM* (αντιβιοαντοχή σε τετρακυκλίνες) και *dfpA* (αντιβιοαντοχή σε τριμεθοπριμες) έδειξαν ξεκάθαρα χαρακτηριστικά δεικτών επίδρασης των αποβλήτων της χοιροτροφικής μονάδας, ενώ (ii) τα *sul1* (αντιβιοαντοχή σε σουλφοναμίδες) και *intI1* (ιντεγκράση ιντεγκρονίου 1, δείκτης οριζόντιας μεταφοράς) έδειξαν χαρακτηριστικά δεικτών αλλά η διασπορά των τιμών περιόρισε την ικανότητα ερμηνείας τους σε επίπεδα τάσης, τέλος (iii) το *korB* ως δείκτης διασποράς των *incP* πλασμιδίων που έχουν εύρος ξενιστών που εμπίπτουν σε συγκριμένες ομάδες των Gram – μικροοργανισμών ίσως να μην ενδείκνυται ως δείκτης σχετικής αφθονίας για αποτιμήσεις κινδύνου σε περιπτώσεις όπως αυτή της ατόφιας κοπριάς που πιθανότατα να κατακλύζονται από ταξινομικές ομάδες που δε φιλοξενούν τους ξενιστές των *incP*.

6. Μελλοντική Έρευνά

Τα πειράματα και τα ευρήματα της παρούσας εργασίας αποτελούν τη βάση για περαιτέρω πειραματική διερεύνηση της επίδρασης των αντιβιοτικών και της διάδοσης γονιδίων αντιβιοαντοχής στα γεωργικά εδάφη και την μικροβιακή κοινότητα των εδαφών. Μελέτες που θα αποσκοπούν στην εμβάθυνση της κατανόησης των μηχανισμών των επιδράσεων και αλληλεπιδράσεων τους, μπορούν να αποτελέσουν τα αντικείμενα μελλοντικής έρευνας. Μελλοντικές μελέτες μπορούν να εστιάσουν στην:

1. Μεταταξινομική ανάλυση των δειγμάτων της εργασίας προκειμένου να δοκιμαστούν οι εικασίες που αφορούν τη σύσταση και τη σημασία του *korB* στα εν λόγω περιβάλλοντα.
2. Διερεύνηση της επίδρασης των αντιβιοτικών στην αφθονία και ποικιλότητα των μελών της μικροβιακής κοινότητας που συμμετέχουν σε διαδικασίες οικολογικής σημασίας ευαίσθητες σε περιβαλλοντικές μεταβολές όπως είναι η δέσμευση του αζώτου (νιτροποίηση)

3. Μεταγονιδιωματικές αναλύσεις με σκοπό την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που σχετίζονται με την αντιβιοαντοχή και τον προσδιορισμό του ρόλου τους στην διατήρηση και διάδοση της αντιβιοαντοχής.

Βιβλιογραφία

1. Hutchings, M.I., Truman, A.W. and Wilkinson, B. (2019) ‘Antibiotics: Past, present and future’, *Current Opinion in Microbiology*, 51, pp. 72–80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008.
2. Walsh and Wright (2005) ‘Introduction: antibiotic resistance’, *Chemical Reviews*, 105(2), pp. 391–394. doi:10.1021/cr030100y.
3. Gillings MR. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Front Microbiol.* 2013 Jan 22;4:4. doi: 10.3389/fmicb.2013.00004. PMID: 23386843; PMCID: PMC3560386.
4. Graham L.Patrick, An introduction to medicinal chemistry, κεφ. 19 «Αντιβακτηριακά φάρμακα» pp.541-603, 2017
5. Mercer A. Melissa (2022), ‘Sulfonamides and Sulfonamide Combinations Use in Animals’, MSD Veterinary Manual
6. Lemli, B. *et al.* (2018) ‘Noncovalent interaction of Tilmicosin with bovine serum albumin’, *Molecules*, 23(8), p. 1915. doi:10.3390/molecules23081915.
7. van Duijkeren E., *et al.* Pleuromutilins: use in food-producing animals in the European Union, development of resistance and impact on human and animal health. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Aug;69(8):2022-31. doi: 10.1093/jac/dku123. Epub 2014 May 3. PMID: 24793902.
8. Song, W. and Guo, M. (2014) ‘Residual Veterinary Pharmaceuticals in animal manures and their environmental behaviors in soils’, *Applied Manure and Nutrient Chemistry for Sustainable Agriculture and Environment*, pp. 23–52. doi:10.1007/978-94-017-8807-6_2.

9. Du, L., & Liu, W. (2011). *Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. Agronomy for Sustainable Development*, 32(2), 309–327. doi:10.1007/s13593-011-0062-9
10. Tiseo K, Huber L, Gilbert M, Robinson TP, Van Boeckel TP. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. *Antibiotics* (Basel). 2020 Dec 17;9(12):918. doi: 10.3390/antibiotics9120918. PMID: 33348801; PMCID: PMC7766021.
11. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018 Jun 26;4(3):482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482. PMID: 31294229; PMCID: PMC6604941.
12. Madigan T. M, 'Brock Biology of Microorganisms', Fourteenth Edition, κεφ. 27 «Διαγνωστική μικροβιολογία», pp.939-944, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2020.
13. Blair JM, Richmond GE, Piddock LJ. 'Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance' . *Future Microbiol.* 2014;9:1165–1177.
14. Kumar A, Schweizer HP. 'Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake' . *Adv Drug Deliver Rev.* 2015;57:1486–1513.
15. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2014). *Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. doi:10.1038/nrmicro3380 .
16. Parker AC, Smith CJ. Genetic and biochemical analysis of a novel Ambler class A beta-lactamase responsible for cefoxitin resistance in *Bacteroides* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 May;37(5):1028-36. doi: 10.1128/AAC.37.5.1028. PMID: 8517690; PMCID: PMC187887.
17. Ferreira LQ, Avelar KE, Vieira JM, de Paula GR, Colombo AP, Domingues RM, Ferreira MC. Association between the *cfxA* gene and transposon Tn4555 in *Bacteroides distasonis* strains and other *Bacteroides* species. *Curr Microbiol.* 2007 May;54(5):348-53. doi: 10.1007/s00284-006-0411-0. Epub 2007 May 5. PMID: 17486409.
18. Hernández A, Sánchez MB, Martínez JL. Quinolone resistance: much more than predicted. *Front Microbiol.* 2011 Feb 11;2:22. doi: 10.3389/fmicb.2011.00022. PMID: 21687414; PMCID: PMC3109427.
19. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans*

- strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Feb;53(2):603-8. doi: 10.1128/AAC.00997-08. Epub 2008 Nov 24. PMID: 19029321; PMCID: PMC2630628.
20. Sköld, O. (2000). *Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. Drug Resistance Updates, 3(3), 155–160.* doi:10.1054/drup.2000.0146
 21. Bajpai T, Pandey M, Varma M, Bhatambare GS. Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna J Med.* 2017 Jan-Mar;7(1):12-16. doi: 10.4103/2231-0770.197508. PMID: 28182026; PMCID: PMC5255976.
 22. Martin P, Trieu-Cuot P, Courvalin P. Nucleotide sequence of the tetM tetracycline resistance determinant of the streptococcal conjugative shuttle transposon Tn1545. *Nucleic Acids Res.* 1986 Sep 11;14(17):7047-58. doi: 10.1093/nar/14.17.7047. PMID: 3020504; PMCID: PMC311716.
 23. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001 Jun;65(2):232-60 ; second page, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001. PMID: 11381101; PMCID: PMC99026.
 24. Burdett V. Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. *J Bacteriol.* 1996 Jun;178(11):3246-51. doi: 10.1128/jb.178.11.3246-3251.1996. PMID: 8655505; PMCID: PMC178077.
 25. Lyon, B.R., Tennent, J.M., May, J.W., and Skurray, R.A. (1986) Trimethoprim resistance encoded on a *Staphylococcus aureus* gentamicin resistance plasmid; cloning and transposon mutagenesis. *FEMS Microbiol Lett* 33; 189-192.
 26. Franz-Josef Schmitz, Ad C Fluit, Chapter 131 - Mechanisms of antibacterial resistance, *Infectious Diseases (Third Edition)*, Pages 1308-1322
 27. Aarestrup, F.M., Wegener, H.C. and Collignon, P. (2008) ‘Resistance in bacteria of the food chain: Epidemiology and control strategies’, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 6(5), pp. 733–750. doi:10.1586/14787210.6.5.733.
 28. Αγγελής, Μικροβιολογία& μικροβιακή τεχνολογία, κεφ.» 2017, εκδ. Unibooks
 29. Mell JC, Redfield RJ. Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity. *J Bacteriol.* 2014 Apr;196(8):1471-83. doi: 10.1128/JB.01293-13. Epub 2014 Jan 31. PMID: 24488316; PMCID: PMC3993363.

30. Daubin V, Szöllősi GJ. Horizontal Gene Transfer and the History of Life. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016 Apr 1;8(4):a018036. doi: 10.1101/cshperspect.a018036. PMID: 26801681; PMCID: PMC4817804.
31. Virolle C, Goldlust K, Djermoun S, Bigot S, Lesterlin C. Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. Genes (Basel). 2020 Oct 22;11(11):1239. doi: 10.3390/genes11111239. PMID: 33105635; PMCID: PMC7690428.
32. Grohmann E, Muth G, Espinosa M. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2003 Jun;67(2):277-301, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.67.2.277-301.2003. PMID: 12794193; PMCID: PMC156469.
33. Muñoz-López M, García-Pérez JL. DNA transposons: nature and applications in genomics. Curr Genomics. 2010 Apr;11(2):115-28. doi: 10.2174/138920210790886871. PMID: 20885819; PMCID: PMC2874221.
34. Cambray, G., Guerout, A.-M. and Mazel, D. (2010) 'Integrans', *Annual Review of Genetics*, 44(1), pp. 141–166. doi:10.1146/annurev-genet-102209-163504.
35. Domingues S, da Silva GJ, Nielsen KM. Integrans: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. Mob Genet Elements. 2012 Sep 1;2(5):211-223. doi: 10.4161/mge.22967. PMID: 23550063; PMCID: PMC3575428.
36. Gillings, M., Gaze, W., Pruden, A. *et al.* Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J* 9, 1269–1279 (2015). <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>
37. Skoog, Αρχές ενόργανης Χημείας, 6^η έκδοση, 2007, κεφ. 28 «Υδροχρωματογραφία», pp. 938-945.
38. Zielińska S, Radkowski P, Blendowska A, Ludwig-Gałęzowska A, Łoś JM, Łoś M. The choice of the DNA extraction method may influence the outcome of the soil microbial community structure analysis. Microbiologyopen. 2017 Aug;6(4):e00453. doi: 10.1002/mbo3.453. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28217901; PMCID: PMC5552907.
39. Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T. M., & Simonet, P. (2003). Extraction of DNA from soil. European Journal of Soil Biology, 39(4), 183–190. doi:10.1016/s1164-5563(03)00033-5

40. Stokes, H.W. and Gillings, M.R. (2011) ‘Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into gram-negative pathogens’, *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), pp. 790–819. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x. Bahl, M. I., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2009). *Persistence Mechanisms of Conjugative Plasmids. Methods in Molecular Biology*, 73–102. doi:10.1007/978-1-60327-853-9_5
41. Jechalke S, Dealtry S, Smalla K, Heuer H. 2013. Quantification of IncP-1 Plasmid Prevalence in Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* 79: <https://doi.org/10.1128/AEM.03728-12>
42. Kostelidou, K. and Thomas, C.M. (2000a) ‘The hierarchy of Korb binding at its 12 binding sites on the broad-host-range plasmid RK2 and modulation of this binding by INCC1 protein 1 edited by J. Karn’, *Journal of Molecular Biology*, 295(3), pp. 411–422. doi:10.1006/jmbi.1999.3359.
43. Werner KA, Feyen L, Hübner T, Brüggemann N, Prost K, Grohmann E. Fate of Horizontal-Gene-Transfer Markers and Beta-Lactamase Genes during Thermophilic Composting of Human Excreta. *Microorganisms*. 2023; 11(2):308.
44. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Oct;17(4):840-62, table of contents. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004. PMID: 15489351; PMCID: PMC523561.
45. Itoh, T. and Yamada, H. (2000) ‘Antibiotics | liquid chromatography’, *Encyclopedia of Separation Science*, pp. 2067–2077. doi:10.1016/b0-12-226770-2/01441-1.
46. Huang, Y., Cheng, M., Li, W., Wu, L., Chen, Y., Luo, Y., ... Zhang, H. (2013). Simultaneous extraction of four classes of antibiotics in soil, manure and sewage sludge and analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the isotope-labelled internal standard method. *Analytical Methods*, 5(15), 3721. doi:10.1039/c3ay40220g
47. Kümmerer, K., (2009) ‘Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I’ *Chemosphere*, 75(4), 417–434 .
48. Jessica S. Dymond, Chapter Twenty Three – ‘*Explanatory Chapter: Quantitative PCR*’, Editor(s): Jon Lorsch, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Volume 529, 2013, Pages 279-289.

49. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. 2010 Apr;50(4):S1-5. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005. PMID: 20215014.
50. Wang, Yingyu *et al.* (2020) ‘Association of florfenicol residues with the abundance of oxazolidinone resistance genes in livestock manures’, *Journal of Hazardous Materials*, 399, p. 123059. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.123059.
51. Ferguson P.,(2022),Chapter 8 - '*Application of SFC for the characterization of formulated drug products*', Separation Science and Technology,Academic Press,Vol.14,Pages 221-255.
52. Li, S., Zhang, Q., Chen, M., Zhang, X., & Liu, P. (2020). *Determination of veterinary drug residues in food of animal origin: Sample preparation methods and analytical techniques. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1–24. doi:10.1080/10826076.2020.1798247
53. Carreira-Casais A, Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Aug 30;18(17):9153. doi: 10.3390/ijerph18179153. PMID: 34501743; PMCID: PMC8431298.
54. Badawy, M.E.I., El-Nouby, M.A.M., Kimani, P.K. *et al.* A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. *ANAL. SCI.* **38**, 1457–1487 (2022). <https://doi.org/10.1007/s44211-022-00190-8>
55. C.Perruchon, E.Katsivelou, P.A.Karas, S.Vassilakis, A.A.Lithourgidis, T.A.Kotsopoulos, S. Sotiraki, S. Vasileiadis, D.G. Karpouzas, (2022) ‘Following the route of veterinary antibiotics tiamulin and tilmicosin from livestock farms to agricultural soils’, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 429, 128293,ISSN 0304-3894.
56. Katsivelou E, Perruchon C, Karas PA, Sarantidou A, Pappa E, Katsoula A, Ligda P, Sotiraki S, Martin-Laurent F, Vasileiadis S, Karpouzas DG. Accelerated dissipation, soil microbial toxicity and dispersal of antimicrobial resistance in soils repeatedly exposed to tiamulin, tilmicosin and sulfamethoxazole. *Sci Total Environ*. 2023 Oct 1;893:164817. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.164817. Epub 2023 Jun 16. PMID: 37329912.

57. Cycoń Mariusz , Mrozik Agnieszka , Piotrowska-Seget Zofia, (2019), ‘Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity’, *Frontiers in Microbiology*, vol.10, DOI:10.3389/fmicb.2019.00338 , ISSN 1664-302X
58. European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2022. 'Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2022' (EMA/299538/2023).
59. Medeiros, A. A. (1997). Evolution and Dissemination of β -Lactamases Accelerated by Generations of β -Lactam Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 24(Supplement_1), S19–S45. doi:10.1093/clinids/24.supplement_1.s19
60. Lima T, Domingues S, Da Silva GJ. Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. *Veterinary Sciences*. 2020; 7(3):110. <https://doi.org/10.3390/vetsci7030110>
61. Archundia, D., Martins, J. M. F., Lehenbre, F., Morel, M.-C., & Duwig, C. (2021). Sulfamethoxazole biodegradation and impacts on soil microbial communities in a Bolivian arid high altitude catchment. *Chemosphere*, 284, 131335. doi:10.1016/j.chemosphere.2021
62. Schlüsener, M. P., Von Arb, M. A., and Bester, K. (2006). Elimination of macrolides, tiamulin, and salinomycin during manure storage. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 21–28. doi: 10.1007/s00244-004-0240-8
63. Smith MS, Yang RK, Knapp CW, Niu Y, Peak N, Hanfelt MM, Galland JC, Graham DW. Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot lagoons by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Dec;70(12):7372-7. doi: 10.1128/AEM.70.12.7372-7377.2004. PMID: 15574938; PMCID: PMC535139.
64. Massaccesi, L.; Albini, E.; Massacci, F.R.; Giusepponi, D.; Paoletti, F.; Sdogati, S.; Morena, F.; Agnelli, A.; Leccese, A.; Magistrali, C.F.; et al. Impact of Soil Fertilization with Pig Slurry on Antibiotic Residues and Resistance Genes: A Longitudinal Study. *Antibiotics* 2024, 13, 486. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13060486>
65. Eliana de los Santos, Magela Laviña, María Eloísa Poey, ‘Strict relationship between class 1 integrons and resistance to sulfamethoxazole in *Escherichia coli*’, *Microbial Pathogenesis*, Volume 161, Part A, 2021, 105206, ISSN 0882-4010, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105206>.

66. B. Halling-Sørensen, 'Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming', *Chemosphere*, 40 (2000), pp. 731-739
67. Gonçalo Macedo, Lucia Hernandez-Leal, Peter van der Maas, Dick Heederik, Dik Mevius, Heike Schmitt, (2020)'The impact of manure and soil texture on antimicrobial resistance gene levels in farmlands and adjacent ditches', *Science of The Total Environment*, Volume 737, 2020, 139563, ISSN 0048-9697
68. Li J, Wang T, Shao B, Shen J, Wang S, Wu Y. Plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic residues in wastewater and soil adjacent to swine feedlots: potential transfer to agricultural lands. *Environ Health Perspect.* 2012 Aug;120(8):1144-9. doi: 10.1289/ehp.1104776. Epub 2012 May 8. PMID: 22569244; PMCID: PMC3440090.
69. Rebeca Pallares-Vega, Hetty Blaak, Rozemarijn van der Plaats, Ana M. de Roda Husman, Lucia Hernandez Leal, Mark C.M. van Loosdrecht, David G. Weissbrodt, Heike Schmitt, 'Determinants of presence and removal of antibiotic resistance genes during WWTP treatment: A cross-sectional study', *Water Research*, Volume 161, 2019, Pages 319-328, ISSN 0043-1354, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.100>.
70. Jechalke S, Schreiter S, Wolters B, Dealtry S, Heuer H, Smalla K. Widespread dissemination of class 1 integron components in soils and related ecosystems as revealed by cultivation-independent analysis. *Front Microbiol.* 2014 Jan 17;4:420. doi: 10.3389/fmicb.2013.00420. PMID: 24478761; PMCID: PMC3894453.
71. Salverda ML, De Visser JA, Barlow M. Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol Rev.* 2010 Nov;34(6):1015-36. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x. PMID: 20412308.
72. Gresse R, Chaucheyras Durand F, Dunière L, Blanquet-Diot S, Forano E (2019). Microbiota Composition and Functional Profiling Throughout the Gastrointestinal Tract of Commercial Weaning Piglets. *Microorganisms* 7, 343
73. Shintani M, Matsui K, Inoue J-i, Hosoyama A, Ohji S, Yamazoe A, Nojiri H, Kimbara K, Ohkuma M (2014). Single-Cell Analyses Revealed Transfer Ranges of IncP-1, IncP-7, and IncP-9 Plasmids in a Soil Bacterial Community. *Appl Environ Microbiol* 80, 138-145
74. Shoemaker NB, Salyers AA (1987). Facilitated transfer of IncP beta R751 derivatives from the chromosome of *Bacteroides uniformis* to *Escherichia coli* recipients by a conjugative *Bacteroides* tetracycline resistance element. *J Bacteriol* 169, 3160-3167

75. IncNChu Thi Thanh Binh, Holger Heuer, Martin Kaupenjohann, Kornelia Smalla, Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids, FEMS Microbiology Ecology, Volume 66, Issue 1, October 2008, Pages 25–37, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00526.x>
76. Sydenham TV, Sóki J, Hasman H, Wang M, Justesen US; ESGAI (ESCMID Study Group on Anaerobic Infections). Identification of antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant clinical *Bacteroides fragilis* isolates by whole genome shotgun sequencing. Anaerobe. 2015 Feb;31:59-64. doi: 10.1016/j.anaerobe.2014.10.009. Epub 2014 Nov 11. PMID: 25464141.
77. Van-Anh Thai, Van Dien Dang, Nguyen Thi Thuy, Bidhan Pandit, Thi-Kim-Quyen Vo, Akhil Pradiprao Khedulkar, ‘Fluoroquinolones: Fate, effects on the environment and selected removal methods’, Journal of Cleaner Production, Vol. 418, 2023, 137762, ISSN 0959-6526.

Βιβλιογραφία εικόνων:

1. <https://www.studyread.com/antibiotics-definition-function-mechanism/>
2. Velazquez-Meza ME, Galarde-López M, Carrillo-Quiróz B, Alpuche-Aranda CM. Antimicrobial resistance: One Health approach. Vet World. 2022 Mar;15(3):743-749. doi: 10.14202/vetworld.2022.743-749. Epub 2022 Mar 28. PMID: 35497962; PMCID: PMC9047147.
3. Jü, CC BY-SA 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>>, via Wikimedia Commons, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Penicillines_General_Formula_V1.svg
4. Maślińska, Maria. (2013). Immune system as a new therapeutic target for antibiotics. Advances in Bioscience and Biotechnology. 2013. 91-101. 10.4236/abb.2013.44A013.
5. <https://www.pharmacy180.com/article/sar-of-tetracyclines-2386/>
6. Steel, Helen & Theron, Annette & Cockeran, Riana & Anderson, Ronald & Feldman, Charles. (2012). Pathogen- and Host-Directed Anti-Inflammatory Activities of Macrolide Antibiotics. Mediators of inflammation. 2012. 584262. 10.1155/2012/584262

7. . Rahimifard, Mahshid & Ziarani, Ghodsi & Badiei, Alireza & Yazdian, Fatemeh. (2017). Synthesis of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS) with Multifunctional Sulfonamide Groups Through Click Chemistry. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 27. 1037–1044. 10.1007/s10904-017-0552-6.
8. Parnell, Alice. (2016). Mechanistic and structural analysis of the enzymes polyphosphate kinase and exopolyphosphatase from biothreat agents.
9. Mali, Audumbar & Jadhav, Santosh & Hake, Gorakhnath & Tamboli, Ashpak. (2015). Estimation of Trimethoprim and Sulphamethoxazole in Pharmaceutical Dosage Forms by Q-Absorption Ratio Method. 2015. 1-4.
10. Lemli, Beata & Derdák, Diána & Laczay, Péter & Kovács, Dorottya & Kunsági-Máté, Sándor. (2018). Noncovalent Interaction of Tilmicosin with Bovine Serum Albumin. *Molecules*. 23. 1915. 10.3390/molecules23081915.
11. Hu C, Zou Y. Mutilins derivatives: from veterinary to human-used antibiotics. *Mini Rev Med Chem*. 2009 Oct;9(12):1397-406. doi: 10.2174/138955709789957387. PMID: 19929813.
12. Song, W. and Guo, M. (2014) ‘Residual Veterinary Pharmaceuticals in animal manures and their environmental behaviors in soils’, *Applied Manure and Nutrient Chemistry for Sustainable Agriculture and Environment*, pp. 23–52. doi:10.1007/978-94-017-8807-6_2.
13. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42–51. doi:10.103
14. Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*. 2009 Aug 28;325(5944):1089-93. doi: 10.1126/science.1176667. PMID: 19713519; PMCID: PMC2802854.
15. Wright, G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology*, 8(1), 123.
16. <https://microbenotes.com/horizontal-gene-transfer-prokaryotes-eukaryotes/>
17. <https://microbenotes.com/horizontal-gene-transfer-prokaryotes-eukaryotes/>
18. Cambray, G., Guerout, A.-M. and Mazel, D. (2010) ‘Integrins’, *Annual Review of Genetics*, 44(1), pp. 141–166. doi:10.1146/annurev-genet-102209-163504.

19. Thomas, C. M. (2002). Paradigms of plasmid organization. *Molecular Microbiology*, 37(3), 485–491. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02006.x
20. Nunes, V. L. N., & Mulvaney, R. L. (2020). Rapid Saturation–Diffusion Method to Determine Cation- and Anion-Exchange Capacities in Soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 52(1), 76–91.
21. <https://www.knauer.net/en/Systems-Solutions/Analytical-HPLC-UHPLC/HPLC-Basics--principles-and-parameters>
22. Mikael Kubista, José Manuel Andrade, Martin Bengtsson, Amin Forootan, Jiri Jonák, Kristina Lind, Radek Sindelka, Robert Sjöback, Björn Sjögreen, Linda Strömbom, Anders Ståhlberg, Neven Zoric,
23. The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 27, Issues 2–3, 2006, Pages 95-125, ISSN 0098-2997, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>.
24. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. 2010 Apr;50(4):S1-5. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005. PMID: 20215014.
25. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*. 2010 Apr;50(4):S1-5. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005. PMID: 20215014.
26. Google Earth