

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Απομόνωση βακτηριακών στελεχών ανθεκτικών σε
αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σε
ιχθυοκαλλιέργειες**

Παλαιοκώστας Χρήστος

Εξεταστική Επιτροπή

**Επιβλέπων
Κ. Κορμάς
Επικ. Καθ/τής**

**Μέλος
Ι. Γεωργουλάκης
Αν. Καθ/τής**

**Μέλος
Σ. Κλαυδάτος
Αν. Καθ/τής**

ΒΟΛΟΣ 2006



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 6814/1
 Ημερ. Εισ.: 09-01-2009
 Δωρεά: Συγγραφέας
 Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΙΥΠ
2006
ΠΑΛ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Εισαγωγή	3-6
Αντιβιοτικά της ομάδας των τετρακυκλίων	6-7
Χαρακτηριστικά οξυτετρακυκλίνης	7-8
Χρήση Οξυτετρακυκλίνης στις υδατοκαλλιέργειες	8-11
Μηχανισμοί Ανθεκτικότητας	11-13
Μεθοδολογία	14-15
Αποτελέσματα	16-18
Συζήτηση	19-26
Συμπεράσματα	26
Ξένη Βιβλιογραφία	27-32
Ελληνική Βιβλιογραφία	33

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ευρεία χρήση των αντιβιοτικών για την καταπολέμηση ανθρωπίνων ασθενειών καθώς και στην εκτροφή ζωικών οργανισμών είχε ως συνέπεια την αύξηση της εμφάνισης των ανθεκτικών βακτηρίων. Στις εκτροφές ζωικών οργανισμών τα αντιβιοτικά εκτός από μέσα καταπολέμησης βακτηριακών ασθενειών χρησιμοποιούνται και για προφυλακτικούς σκοπούς καθώς και ως μέσα προώθησης της ανάπτυξης. Τα βακτήρια λόγω της μεγάλης γενετικής τους ευελιξίας μπόρεσαν να προσαρμοστούν στις πιέσεις που εξασκούν οι αντιβιοτικές ουσίες. Κινητά γενετικά στοιχεία όπως πλασμίδια, τρανσποσόνια, ιντεγκρόνια και γενετικές κασέτες συνέβαλαν στην ταχεία προσαρμογή των βακτηρίων (Heuer et al 2002). Σημαντικό ρόλο στην προώθηση της ανθεκτικότητας παίζουν και οι μεταλλάξεις. Παρόλο που οι μεταλλάξεις λαμβάνουν χώρα σε χαμηλό ποσοστό, ο υψηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού των βακτηρίων καθώς και το γεγονός ότι είναι απλοειδείς οργανισμοί αυξάνει τη βαρύτητα που παίζουν οι μεταλλάξεις στο φαινόμενο της ανθεκτικότητας. Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας WHO (World Health Organisation) από το 2000 έχει τονίσει ότι η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μπορεί να αποτελέσει σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία παγκοσμίως. Επίσης ο FAO (Food and Agricultural Organisation) αποτρέπει τη χρήση αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες είτε για προφυλακτικούς σκοπούς είτε ως μέσα προώθησης της ανάπτυξης των εκτρεφόμενων οργανισμών.

Ο χαρακτηρισμός ενός βακτηριακού στελέχους ως ανθεκτικού σε κάποιο αντιβιοτικό δεν είναι απόλυτος, καθώς πλήθος ερευνητών έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιήσει πληθώρα ορισμών. Στην ιατρική ένα βακτήριο θεωρείται ως ανθεκτικό όταν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού που απαιτείται ώστε να ανασταλεί η ανάπτυξή του είναι μεγαλύτερη από την μέγιστη συγκέντρωση που μπορεί να επιτευχθεί στον ξενιστή του κατά τη διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής (Coayne et al 2004). Ωστόσο ο όρος ανθεκτικότητα δεν αποτελεί μια απόλυτη και ανεξάρτητη ιδιότητα αλλά μια σχετική και εξαρτώμενη από τις συνθήκες διεξαγωγής του εκάστοτε πειράματος περιγραφή του φαινοτύπου. Το παραπάνω συντελεί στην ύπαρξη σοβαρών προβλημάτων στη διαδικασία σύγκρισης δεδομένων μεταξύ

επιστημονικών εργασιών στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές πειραματικές μέθοδοι (Karetanaki et al 1995).

Οι κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία από ανθεκτικά βακτήρια που προέρχονται από τις υδατοκαλλιέργειες δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Τείνει πάντως να επικρατεί η άποψη ότι οι κίνδυνοι είναι χαμηλοί. Ωστόσο οι Rhodes et al (2000) παρατήρησαν ότι τα περιβάλλοντα νοσοκομείων και υδατοκαλλιεργειών δεν είναι απομονωμένα το ένα από το άλλο, αλλά λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις ανάμεσά τους καθώς πραγματοποιήθηκαν μεταφορές πλασμιδίων από βακτήρια του ενός περιβάλλοντος στο άλλο. Τονίζοντας με αυτό τον τρόπο ότι βακτηριακά στελέχη από υδατοκαλλιέργειες μπορούν να διαδώσουν ανθεκτικότητα και για αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για ανθρώπινη χρήση. Η παραπάνω παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με αυτές των Smith et al (1994). Επιπλέον οι Hatha et al (2005) στη μελέτη τους πάνω στη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών του γένους *Aeromonas* σε διάφορα αντιβιοτικά παρατήρησαν ανθεκτικότητα στην οξυτετρακυκλίνη σε ποσοστό 40% του συνόλου των ανθεκτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν. Το γεγονός αυτό έχει μεγάλη σημασία καθώς βακτήρια του παραπάνω είδους και κυρίως αυτά που προέρχονται από το υδάτινο περιβάλλον έχουν πολλές φορές συσχετιστεί με την πρόκληση γαστρεντερικών ασθενειών σε ανθρώπους. Οι υψηλές συχνότητες μη παθογόνων *E. coli*, από το υδάτινο περιβάλλον, ανθεκτικών σε αντιβιοτικά, που βρήκαν οι Kumar et al (2005) δεν θα πρέπει να θεωρηθούν ακίνδυνες, καθώς τα παραπάνω βακτήρια μπορούν να αποτελέσουν δότες γονιδίων ανθεκτικότητας σε παθογόνα. Στην περίπτωση εκτροφής ψαριών του γλυκού νερού το πρόβλημα της ανθεκτικότητας ίσως να είναι ακόμα πιο σοβαρό, τουλάχιστον για τις αναπτυσσόμενες χώρες, λαμβάνοντας υπόψη ότι μεγάλο ποσοστό του πόσιμου νερού προέρχεται από τα ποτάμια στα οποία και απορρίπτονται τα απόβλητα των μονάδων εκτροφής.

Πρέπει να σημειωθεί πάντως ότι η εξακρίβωση της πηγής προέλευσης των ανθεκτικών βακτηρίων δεν είναι εύκολη καθώς στο υδάτινο περιβάλλον εισέρχονται βακτηριακοί πληθυσμοί διαφόρων προελεύσεων. Στην περίπτωση πάντως που γίνει σωστή επιλογή της εγκατάστασης των κλωβών (ικανοποιητική ισχύς ρευμάτων) μόνο το 1,3% της απελευθερωμένης οξυτετρακυκλίνης θα καταλήξει στα ιζήματα ή σε θαλάσσιους οργανισμούς της κοντινής περιοχής καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό του

αντιβιοτικού θα διασπαρεί σε μεγάλη απόσταση με αποτέλεσμα η συγκέντρωσή του να είναι αμελητέα (Rigos et al 2004).

Οι πλέον κοινοί λόγοι εμφάνισης της ανθεκτικότητας φαίνεται να είναι :

- Μεταλλάξεις σε συχνά απαντώμενα γονίδια, που διευρύνουν τη συχνότητα της ανθεκτικότητας.
- Μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας, που βρίσκονται κυρίως στα πλασμίδια μεταξύ βακτηρίων του ίδιου είδους ή διαφορετικού.
- Φυσική επιλογή λόγω παρουσίας του αντιβιοτικού, με αποτέλεσμα την επικράτηση των ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών (Asagbra et al 2005).

Εκτιμάται ότι το 30% έως και 90% της χορηγούμενης δόσης των περισσότερων αντιβιοτικών σε ανθρώπους και ζώα αποβάλλεται στο περιβάλλον σε ενεργή μορφή μέσω των ούρων. Παρόλη την ευρεία χρήση των αντιβιοτικών για θεραπευτικούς σκοπούς και ως ουσίες αύξησης του ρυθμού ανάπτυξης των εκτρεφόμενων ζώων, λίγη σημασία έχει δοθεί στην ρύπανση που προκαλούν αυτές οι ουσίες. Το παραπάνω φαίνεται περίεργο αν αναλογιστεί κανείς ότι αυτές οι ενώσεις έχουν άμεσες βιολογικές επιπτώσεις στο περιβάλλον ακόμα και στην περίπτωση που αποσυντίθενται σε υψηλούς ρυθμούς (Costanzo et al 2005). Η ευρεία χρήση αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες για τη θεραπεία βακτηριακών μολύνσεων έχει συσχετιστεί με την αύξηση της ανθεκτικότητας ιδιαίτερα στα *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella ictulari*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Pasteurella piscicida* και *Yersinia ruckeri* (DePaola et al 1995). Μερικές από τις αρνητικές επιπτώσεις των αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον είναι οι παρακάτω:

- Ρύπανση του νερού που χρησιμοποιείται για πόση, άρδευση ή λόγους αναψυχής.
- Αύξηση της συχνότητας εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά, προκαλώντας δυσμενείς επιπτώσεις στη θεραπεία ανθρώπων και ζώων.
- Καταστρεπτικές επιπτώσεις σε απαραίτητα για την ισορροπία του οικοσυστήματος, βακτήρια, όπως αυτά που συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου και στην αποσύνθεση της νεκρής οργανικής ύλης (Costanzo et al 2005).

Γενικά υπολογίζεται ότι η χρήση των αντιβιοτικών στην εκτροφή ζώων είναι 100-1000 μεγαλύτερη από την ποσότητα που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ανθρώπων

(Kumar et al 2005). Στην Νορβηγία για το έτος 1989 η συνολική ποσότητα των χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών στη γεωργία και στις υδατοκαλλιέργειες ήταν περίπου ίση με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την ανθρώπινη θεραπεία από βακτηριακές μολύνσεις (Rhodes et al 2000). Για την πρόβλεψη της επιτυχίας ή μη μιας θεραπευτικής αγωγής ερευνητές προσπάθησαν να χρησιμοποιήσουν τον εμπειρικό κανόνα 4:1 που προέρχεται από την κτηνοτροφία. Δηλαδή η θεραπευτική αγωγή θα είναι πετυχημένη αν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού που επιτυγχάνεται στο αίμα του ζώου είναι η 4 φορές μεγαλύτερη από την μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που απαιτείται για την αναστολή του παθογόνου όπως αυτή πιστοποιείται στο εργαστήριο. Ωστόσο ο παραπάνω κανόνας δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματικός στα ψάρια και ειδικά στα σολομοειδή. Εκτός αυτού, ενώ είναι δυνατή η εξακρίβωση της ευαισθησίας των παθογόνων στελεχών πριν την έναρξη της θεραπείας ο προσδιορισμός με απόλυτη ακρίβεια της μέγιστης συγκέντρωσης του αντιβιοτικού εκ των προτέρων δεν είναι δυνατός (Coyne et al 2004). Η οξυτετρακυκλίνη είναι από τα λίγα αντιβιοτικά που επιτρέπονται, τουλάχιστον για χώρες τις Ευρωπαϊκής Ένωσης, να χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες. Στις περισσότερες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης μόνο 4-5 αντιβιοτικά επιτρέπονται από τη νομοθεσία για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες. Ωστόσο και άλλα αντιβιοτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατόπιν συνταγής κτηνιάτρου.

Αντιβιοτικά της ομάδας των τετρακυκλίνων

Τα *Streptomyces* αποτελούν το μεγαλύτερο παραγωγό αντιβιοτικών ουσιών από όλα τα γένη του μικροβιακού κόσμου. Είναι φυσικοί παραγωγοί των τετρακυκλίνων συμπεριλαμβανομένης και της οξυτετρακυκλίνης. Χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα διάφορα είδη του παραπάνω γένους για την παραγωγή της οξυτετρακυκλίνης σε θερμοκρασίες συνήθως 25-30 °C και με διάφορες φυτικές ουσίες για θρεπτικό υπόστρωμα. Οι τετρακυκλίνες αποτελούνται από τέσσερις εξαμελείς κυκλικούς δακτυλίους (έχει διαπιστωθεί ότι οι εξαμελείς δακτύλιοι πρέπει να αποτελούνται αποκλειστικά από άτομα άνθρακα, για να υπάρξει αντιβακτηριακή δράση) και χρησιμοποιούνται εναντίον πληθώρας βακτηρίων, πρωτόζωων, μυκοπλασμάτων και ρικετσιών. Χρησιμοποιούνται στην ιατρική, στη γεωργία για τον έλεγχο πολλών ασθενειών των φυτών, στις υδατοκαλλιέργειες, στις ζυμώσεις οξέων και στην

αναστολή της αποσύνθεσης οργανικών ουσιών (Asagbra et al 2005). Το κόστος παραγωγής των τετρακυκλίνων μειώνεται λόγω βελτιωμένων μεθόδων που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή τους (Chopra & Roberts 2001). Στον Πίνακα 1 φαίνονται οι εκτιμώμενες ποσότητες των τετρακυκλίνων που χρησιμοποιούνται στις εκτροφές ζώων.

Πίνακας 1: Κατανάλωση τετρακυκλίνων

Πηγή : Chopra & Roberts 2001

Χώρα	Κατανάλωση kg/year
ΗΠΑ	3.488.000
Καναδάς	398.000
Χώρες Ευρωπαϊκής Ένωσης	2.294.000
Αυστραλία	77.619
Νέα Ζηλανδία	2.311

Επίσης, σύμφωνα με τους Asagbra et al (2005) για την παραγωγή τετρακυκλίνων ως καλύτερη πηγή ανόργανου αζώτου θεωρείται το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ενώ χρειάζεται και η προσθήκη NaCl. Το τελευταίο φαίνεται να αποδίδεται στα ανιόντα Cl^- που είναι απαραίτητα στην παραγωγή και άλλων αντιβιοτικών ουσιών.

Χαρακτηριστικά της οξυτετρακυκλίνης

Η οξυτετρακυκλίνη ανακαλύφθηκε το 1948 από προϊόντα του *Streptomyces rimosus*. Είναι από τις παλαιότερες τετρακυκλίνες. Μερικά από τα χαρακτηριστικά της οξυτετρακυκλίνης που την έχουν καταστήσει το πλέον κοινώς χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό στις υδατοκαλλιέργειες είναι τα παρακάτω:

- i) Η οξυτετρακυκλίνη εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση εναντίον πληθώρας μικροοργανισμών
- ii) Δεν παρουσιάζει σημαντική τοξική δράση εναντίον ευκαρυωτικών κυττάρων
- iii) Είναι φθηνή η παρασκευή της.

Μερικά από τα βακτηριακά είδη που προσβάλλουν υδατοκαλλιεργηθέντα είδη και εναντίον των οποίων χρησιμοποιείται η οξυτετρακυκλίνη είναι τα: *Flexibacter columnaris* (Στηλώδης νόσος), *Flexibacter psychrophila* (Νέκρωση των πτερυγίων και της ουράς), *Yersinia ruckeri* (Ερυθροστοματίτιδα), *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella ictaluri*, *Vibrio spp* (Δονακίωση), *Aeromonas salmonicida* (Δοθιήνωση των σολομοειδών), *Streptococcus spp* κ.α. Η οξυτετρακυκλίνη χρησιμοποιείται

επίσης και εναντίων ρικετσιακών νοσημάτων. Οι ρικέτσιες είναι μικροοργανισμοί με πολύ μικρές διαστάσεις (<2μm), είναι Gram αρνητικοί, έχουν κυτταρικό τοίχωμα, πολλαπλασιάζονται όπως τα βακτήρια αλλά σε αντίθεση με αυτά μπορούν να αναπτυχθούν μόνο μέσα σε ζωντανά κύτταρα (Φώτης & Αγγελίδης 2003, Πνευματικάτος 1986). Η οξυτετρακυκλίνη παρουσιάζει δράση και εναντίον παρασίτων όπως *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Leishmania major*, *Trichomonas vaginalis*, and *Toxoplasma gondii* (Chopra & Roberts 2001). Η οξυτετρακυκλίνη αναστέλλει την αύξηση των βακτηρίων προκαλώντας αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (εμπόδιση της μετάφρασης του mRNA), καθώς ενώνεται με την 30S ριβοσωμική υπομονάδα των βακτηριακών 70S ριβοσωμάτων. Το παραπάνω επιτυγχάνεται με διάσπαση των δεσμών κωδικόνιο - αντικωδικόνιο (Nonaka & Suzuki 2002).

Χρήση Οξυτετρακυκλίνης στις υδατοκαλλιέργειες

Στις υδατοκαλλιέργειες η οξυτετρακυκλίνη χορηγείται με τους παρακάτω τρόπους:

- i) Ενσωματωμένη στην τροφή
- ii) Διάλυση στο νερό
- iii) Ενέσιμη μορφή.

Η τελευταία μορφή είναι και η πιο σπάνια. Συνήθως το αντιβιοτικό χορηγείται μέσω της τροφής στην οποία ενσωματώνεται σε δόσεις που ποικίλλουν συνήθως ανάμεσα σε 50-100 mg/kg ψαριού/ ημέρα για 10 ημέρες. Είναι συνήθης πρακτική, πριν τη χορήγηση της οξυτετρακυκλίνης αλλά και άλλων αντιβιοτικών, τα ψάρια να παραμένουν νηστικά για 2 ημέρες. Η παραπάνω πρακτική εφαρμόζεται ώστε να μεγιστοποιηθεί η πείνα των ψαριών κατά τη διάρκεια της θεραπείας αλλά και για να ελαχιστοποιηθεί το stress που προκαλεί η παρουσία του αντιβιοτικού στα ψάρια (Rigos et al 2003). Η χρονική διάρκεια, ενεργότητας της οξυτετρακυκλίνης στο υδάτινο περιβάλλον ποικίλλει έντονα από περιοχή σε περιοχή. Έχουν αναφερθεί υψηλότερες συγκεντρώσεις και 12 ημέρες μετά τη θεραπευτική αγωγή. Για την εξακρίβωση της περιεκτικότητας των δειγμάτων σε οξυτετρακυκλίνη χρησιμοποιείται ο φασματογράφος μάζας HPLC. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι στην πραγματικότητα η μείωση της βιολογικά ενεργούς οξυτετρακυκλίνης στα θαλάσσια ιζήματα είναι πιο γρήγορη από την μείωση που καταγράφεται με τη χρήση του HPLC. Αν ισχύει το

παραπάνω φαίνεται να συνηγορεί στην άποψη ότι η παρουσία του αντιβιοτικού δεν αποτελεί απαραίτητο παράγοντα για την αύξηση της ανθεκτικότητας στα βακτήρια στο υδάτινο περιβάλλον (Karetanaki et al 1995). Η οξυτετρακυκλίνη σύμφωνα με τους Rigos et al (2003) φαίνεται να μεταφέρεται αργά στους μυς της τσιπούρας (*Sparus aurata*) ενώ και η βιοδιαθεσιμότητά της είναι σε χαμηλά επίπεδα (9%). Η βιοδιαθεσιμότητα συγκριτικά για την πέστροφα είναι 30,3% και για το σολομό 24,8%. Επιπλέον η αποβολή του αντιβιοτικού από τους μυς της τσιπούρας διαρκεί μέχρι και 18 ημέρες. Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές ο χρόνος ημίσειας ζωής της οξυτετρακυκλίνης για το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) είναι ο γρηγορότερος που έχει παρατηρηθεί για εκτρεφόμενο είδος ψαριού (12h στους 22 °C) τη στιγμή που σε άλλα εκτρεφόμενα είδη ξεπερνάει και τις 17 ημέρες με αποτέλεσμα να μην χρειάζονται στο λαβράκι μεγάλοι χρόνοι για να μπορεί να διοχετευθεί στην αγορά. Η αποβολή της οξυτετρακυκλίνης για το λαβράκι στους 22 °C είναι 7 φορές γρηγορότερη από ότι στους 13 °C. Η μέγιστη συγκέντρωση, της μέσω τροφής χορηγούμενης οξυτετρακυκλίνης, στο πλάσμα του ψαριού φαίνεται να επιτυγχάνεται μετά από 24 ώρες από την χορήγησή της (Coyne et al 2004). Έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις χορήγησης του αντιβιοτικού μέσω της τροφής σε δόσεις 100-150 mg/kg ψαριού/ημέρα για 10-15 ημέρες εξαιτίας της μικρής απορροφητικότητας του αντιβιοτικού από τα ψάρια (Miranda & Zemelman 2002). Ειδικότερα, για τα γατόψαρα η συχνότερη μέθοδος χρήσης της οξυτετρακυκλίνης είναι μέσω της τροφής σε ποσότητα 50mg/kg ψαριού ανά ημέρα για χρονική περίοδο 10 ημερών. Μετά το πέρας της θεραπευτικής αγωγής σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία απαιτούνται 21 ημέρες ώστε τα ψάρια να μπορούν να πωληθούν (DePaola et al 1995). Στην παραπάνω εργασία βρέθηκαν υψηλές συχνότητες εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων στην οξυτετρακυκλίνη και μάλιστα σε πιθανώς παθογόνα βακτήρια για τα ψάρια, αλλά και για τον άνθρωπο. Πάντως μετά το πέρας της θεραπευτικής αγωγής η συχνότητα των ανθεκτικών βακτηρίων παρουσίασε μείωση και μετά από 21 ημέρες κυμάνθηκε σε ποσοστά όμοια με αυτά πριν τη χορήγηση του αντιβιοτικού.

Οι Pathak & Gopal (2004) πιστεύουν ότι σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο της ανθεκτικότητας παίζουν και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του νερού και ότι αυτή παρουσιάζει εποχικές μεταβολές. Είναι συχνή η περίπτωση στην οποία τα πλασμίδια περιέχουν εκτός από τα γονίδια ανθεκτικότητας στην οξυτετετρακυκλίνη και γονίδια ανθεκτικότητας σε άλλα αντιβιοτικά όπως σουλφοναμίδες, ερυθρομυκίνη,

χλωραμφενικόλη και φλουροκινολόνες .Υπάρχουν πλασμίδια τα οποία μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας και σε 10 διαφορετικά αντιβιοτικά. Επίσης έχουν βρεθεί πλασμίδια ,που μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε πέντε διαφορετικά αντιβιοτικά ταυτόχρονα, σε παθογόνα των ψαριών του γλυκού και του θαλάσσιου νερού. Μερικά από αυτά τα παθογόνα είναι τα *Vibrio anguillarum*, *V. Salmonicida*, *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Edwardsiella tarda* και *Yersinia ruckeri* (Miranda and Zemelman 2002a). Σε πολλές περιπτώσεις (συμπεριλαμβανομένης και της ανθεκτικότητας στην οξυτετρακυκλίνη) τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα βρίσκονται στα λεγόμενα R πλασμίδια. Τα παραπάνω πλασμίδια μπορούν να μεταδοθούν μεταξύ βακτηρίων του ίδιου ή και διαφορετικού είδους. Σε υδάτινα συστήματα η μεταφορά των R πλασμιδίων μπορεί να λάβει χώρα σε λιγότερο από ένα λεπτό συντελώντας στην ταχύτατη εξάπλωση της ανθεκτικότητας (Mudryk 2005). Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά συχνά συσχετίζεται και με ανθεκτικότητα στα βαρέα μέταλλα. Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας βρίσκονται και στη δεύτερη περίπτωση στα κινητά γενετικά στοιχεία.(Pathak & Gopal 2004, Tendecia & Pena 2002). Για περιπτώσεις συγκεκριμένων ομάδων βακτηρίων τα οποία δεν δύναται να αλλάξουν γενετικό υλικό με βακτήρια διαφορετικών ειδών, πρωτεύοντα ρόλο στην ταχεία μετάδοση των μηχανισμών ανθεκτικότητας φαίνεται να παίζουν τα ιντεγκρόνια (Michel et al 2005). Τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε οξυτετρακυκλίνη είναι συχνά τμήματα τραπεζοζονίων, τα οποία είναι ικανά να αλλάζουν θέση στο κύτταρο και να εμφανίζουν για αυτό το λόγω αυξημένη κινητικότητα (Schimdt et al 2001).

Οι υπεύθυνοι μηχανισμοί της χρήσης των αντιβιοτικών ως μέσων προώθησης της ανάπτυξης των εκτρεφόμενων ζώων δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Ωστόσο το τελικό αποτέλεσμα είναι ο εκτρεφόμενος οργανισμός να φτάνει στο εμπορεύσιμο βάρος καταναλώνοντας λιγότερη τροφή (Chopra & Roberts 2001). Τα εγκεκριμένα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σε εκτρεφόμενους οργανισμούς για αύξηση της ανάπτυξής τους δεν χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών. Ωστόσο η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά της ίδιας ομάδας ή ακόμα και σε αντιβιοτικά με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Η χρήση αντιβιοτικών για αύξηση της ανάπτυξης των ζώων έχει συσχετιστεί σε πολλές περιπτώσεις σε αύξηση των ποσοστών ανθεκτικότητας, ενώ σε ορισμένες

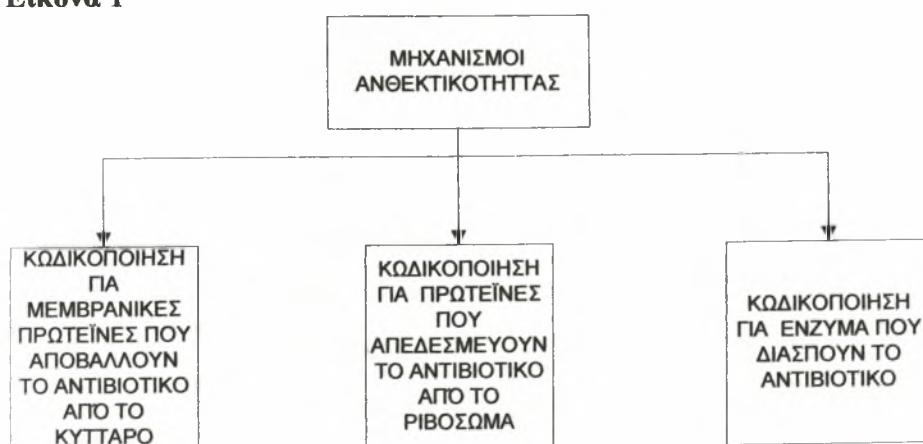
περιπτώσεις έχει συσχετιστεί και με την εμφάνιση ανθεκτικότητας σε παθογόνα για τον άνθρωπο βακτήρια. Το παραπάνω φαινόμενο μπορεί να συμβεί μετά την κατανάλωση ψαριών που περιέχουν ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη ακόμα και αν αυτά δεν είναι επικίνδυνα για τον άνθρωπο καθώς μπορεί να συμβεί μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας σε υποχρεωτικώς ή δυνητικώς παθογόνα που βρίσκονται στο ανθρώπινο σώμα. (Petersen et al 2002).

Δεν υπάρχουν επίσημα στοιχεία για την χώρα μας για την ποσότητα των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες. Στην εργασία των Rigos et al (2004) εκτιμήθηκε ότι ετησίως στη χώρα μας καταλήγουν στο περιβάλλον ποσότητα αντιβιοτικών (οξυτετρακυκλίνη- οξολινικό οξύ) στην εκτροφή τσιπούρας (*Sparus aurata*)-μυτάκι (*Puntazzo puntazzo*) πάνω από 1900 kg. Συνοπτικά για την παραπάνω εκτίμηση οι ερευνητές έλαβαν υπόψη τη μέση χορηγούμενη δόση των αντιβιοτικών, τη μέση απορρόφηση του αντιβιοτικού από τον οργανισμό του ψαριού, τη μέση συχνότητα χρησιμοποίησής τους για την καταπολέμηση ασθενειών και την ετήσια παραγόμενη ποσότητα τσιπούρα-μυτάκι στη χώρα μας.

Μηχανισμοί Ανθεκτικότητας

Οι μέχρι σήμερα γνωστοί μηχανισμοί που κωδικοποιούν για ανθεκτικότητα στην οξυτετρακυκλίνη απεικονίζονται στην Εικόνα 1

Εικόνα 1



Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί κοντά στα 40 διαφορετικά γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες. Στον Πίνακα 2 παρατίθενται τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες και ο μηχανισμός λειτουργίας τους.

Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει εγγενής διαφορά ανάμεσα στα γονίδια ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (tet) και σε αυτά της οξυτετρακυκλίνης (otr). Ο λόγος που τρία γονίδια ανθεκτικότητας ονομάστηκαν με το πρόθεμα της οξυτετρακυκλίνης ήταν ότι αρχικά απομονώθηκαν από μικροοργανισμούς που παράγουν οξυτετρακυκλίνη, με αποτέλεσμα το αρχικό πρόθεμα της ονομασίας του γονιδίου να αντανakλά στον οργανισμό που αυτό βρέθηκε αρχικά (Chopra & Roberts 2001).

Πίνακας 2: Γονίδια ανθεκτικότητας

Πηγή :Roberts 2005

Κωδικοποίηση για πρωτεΐνες αποβολής του αντιβιοτικού από το κύτταρο	Κωδικοποίηση για πρωτεΐνες που προστατεύουν τα ριβοσώματα	Κωδικοποίηση για ένζυμα που αποικοδομούν το αντιβιοτικό	Άγνωστος μηχανισμός
tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(H), tet(J), tet(V), tet(Y), tet(Z), tet(30), tet(31), tet(K), tet(L), tetA(P), otr(B), tcr3, tet(33), tet(35), tet(38), tet(39), otr(C)	tet(M), tet(O), tet(W), tet(Q), tet(T), otr(A), tetB(P), tet(32), tet(36)	tet(X), tet(34), tet(37)	tet(U)

Μεμβρανικές πρωτεΐνες που αποβάλλουν την οξυτετρακυκλίνη από το κύτταρο

Το 60% των γονιδίων ανθεκτικότητας κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που αποβάλλουν το αντιβιοτικό από το κύτταρο μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τη συγκέντρωση της οξυτετρακυκλίνης στο κύτταρο. Τα πιο συχνώς εμφανιζόμενα γονίδια αυτού του μηχανισμού είναι το tet(L) που απαντάται σε 15 βακτηριακά γένη και το tet(B) σε 25 γένη (Roberts 2005). Οι παραπάνω πρωτεΐνες αποβάλλουν από το κύτταρο με την κατανάλωση ενέργειας ένα σύμπλοκο τετρακυκλίνης-κατιόντος ενώ ταυτόχρονα εισέρχεται στο κύτταρο ένα πρωτόνιο. Ο όλος μηχανισμός γίνεται αντίθετα από την διαβάθμιση συγκέντρωσης. Ο παραπάνω μηχανισμός συναντάται ιδιαίτερα συχνά σε γένη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Τα παραπάνω βακτήρια έχουν συνήθως τα γονίδια ανθεκτικότητας σε μεγάλου μεγέθους πλασμίδια. Σε αυτά τα πλασμίδια βρίσκονται γονίδια ανθεκτικότητας και για άλλα αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα και άλλοι παθογόνοι παράγοντες όπως τοξίνες (Roberts 2005, Chopra & Roberts 2001).



Πρωτεΐνες προστασίας των ριβοσωμάτων

Η οξυτετρακυκλίνη ενώνεται με το ριβόσωμα και διαταράσσει την ομαλή του λειτουργία με αποτέλεσμα να σταματά η σύνθεση των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες

προστασίας του ριβοσώματος πιστεύεται ότι αλληλεπιδρούν με τη βάση της h34 πρωτεΐνης του ριβοσώματος προκαλώντας αλλαγή της στερεοχημικής διάταξης των σημείων του ριβοσώματος στα οποία ενώνεται η οξυτετρακυκλίνη με αποτέλεσμα το αντιβιοτικό να απελευθερώνεται από το ριβόσωμα. Στη συνέχεια το ριβόσωμα μεταπίπτει στην αρχική του κατάσταση και συνεχίζεται η σύνθεση πρωτεϊνών. Δεν είναι γνωστό αν το αποδεσμευμένο αντιβιοτικό μπορεί να ξανασυνδεθεί με το ριβόσωμα. Τα επικρατέστερα γονίδια του εν λόγω μηχανισμού το tet(M) που απαντάται σε 42 γένη βακτηρίων και είναι το πλέον κοινό γονίδιο ανθεκτικότητας και το γονίδιο tet(W) που απαντάται σε 19 γένη (Roberts 2005). Στην εργασία των Kim et al (2004) απομονώθηκαν για πρώτη φορά βακτήρια του θαλάσσιου περιβάλλοντος και του εντερικού σωλήνα των ψαριών με τα γονίδια ανθεκτικότητας tet(M) και tet(S).

Ένζυμα αποικοδόμησης του αντιβιοτικού

Δεν είναι και τόσο συχνά εμφανιζόμενος μηχανισμός ανθεκτικότητας. Το γονίδιο tet(X) κωδικοποιεί για μια οξειδοαναγωγή η οποία αποικοδομεί το αντιβιοτικό παρουσία οξυγόνου και NADPH. Μέχρι στιγμή το παραπάνω γονίδιο έχει βρεθεί μόνο σε υποχρεωτικώς αναερόβια βακτήρια. Το γονίδιο tet(37) δεν έχει βρεθεί ακόμα σε κάποιο συγκεκριμένο βακτήριο, ενώ το τρίτο γονίδιο του μηχανισμού (tet34) αποικοδομεί το αντιβιοτικό με διαφορετικό τρόπο (Roberts 2005). Καινούριοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας πιθανόν να ανακαλυφθούν στο προσεχές μέλλον. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση και καλλιέργεια ανθεκτικών βακτηρίων από το ίζημα κάτω από ιχθυοκλωβούς.

Μεθοδολογία

A.Πεδίο

Συλλέχθηκε ιζήμα κάτω από ιχθυοκλωβούς λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*) σε βάθος 30 m, από μονάδα στη Μιλήνα του Νομού Μαγνησίας. Για τη λήψη του ιζήματος χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης Ekman. Επίσης πάρθηκε δείγμα επιφανειακού νερού πάνω από το σημείο όπου έγινε η λήψη του ιζήματος. Η θερμοκρασία του νερού την ώρα της δειγματοληψίας ήταν 12,5 °C. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο και μεταφέρθηκαν αμέσως στο εργαστήριο.

B.Εργαστήριο

Για τις καλλιέργειες των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά τρυβλία Petri χωρητικότητας ίσης με 25ml το καθένα. Για τις ανάγκες του πειράματος ετοιμάστηκαν 84 τρυβλία. Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Luria Bertani το οποίο αγοράστηκε σε στερεή μορφή. Πιο συγκεκριμένα τηρήθηκε η αναλογία 40 g/l θρεπτικού σε νερό. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν απεσταγμένο MillQ. Ετοιμάστηκε θρεπτικό για 84 τρυβλία, το θρεπτικό τοποθετήθηκε σε δύο γυάλινες φιάλες έτσι ώστε στο μισό να εισαχθεί η οξυτετρακυκλίνη και αποστειρώθηκε για 20 min σε χύτρα. Η οξυτετρακυκλίνη αγοράστηκε σε στερεή μορφή. Για την παρασκευή ζυγίστηκαν 15 mg οξυτετρακυκλίνης και αναμίχθηκαν με 1,5 ml νερό PCR (νερό που έχει αποστειρωθεί τρεις φορές). Η συγκέντρωση του υγρού stock ήταν 10 mg/ml. Κατόπιν το υγρό stock τοποθετήθηκε αμέσως στο ψυγείο. Μετά το πέρας της αποστείρωσης του θρεπτικού αυτό αφέθηκε να κρυώσει μέχρι τους ~ 45 °C για να μην επηρεαστεί η ενεργότητα του αντιβιοτικού. Η οξυτετρακυκλίνη εισήχθη στη μία φιάλη θρεπτικού, από το υγρό stock, και είχε σαν αποτέλεσμα η συγκέντρωσή της φιάλη (και αντιστοίχως στα τρυβλία όπου αυτό εισάχθηκε) να είναι 10 µg/ml. Το stock οξυτετρακυκλίνης τοποθετήθηκε στην κατάψυξη (-20 °C), καθώς όταν η οξυτετρακυκλίνη βρίσκεται σε υγρή μορφή πρέπει να αποφεύγεται όσο το δυνατόν η έκθεσή της σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για την αποφυγή εξωγενούς μόλυνσης

του θρεπτικού, η εισαγωγή του στα τρυβλία έγινε κοντά σε φλόγα. Κατά την τοποθέτηση του θρεπτικού τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε στήλες των 6 και η εισαγωγή του θρεπτικού έγινε από το τελευταίο προς τα πάνω για να ελαχιστοποιηθούν οι σχηματιζόμενοι υδρατμοί. Με το πέρας της παραπάνω διαδικασίας 42 τρυβλία περιείχαν οξυτετρακυκλίνη σε συγκέντρωση 10 µg/ml και 42 περιείχαν μόνο θρεπτικό. Τα τρυβλία στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για επώαση στους 30 °C για 24 ώρες για να εξακριβωθεί ότι δεν υπήρξε εξωγενής μόλυνση των τρυβλίων. Όλη η παραπάνω διαδικασία έγινε μία μέρα πριν τη δειγματοληψία.

Το θαλασσινό νερό (από Μιλήνα) φιλτραρίστηκε δύο φορές από φίλτρο των 0,22 µm (PFSW, Particle Free Sea Water) και χρησιμοποιήθηκε για τις μετέπειτα αραιώσεις. Το εμβόλιο προήλθε από επιφανειακό ίζημα. Στη συνέχεια έγιναν 7 αραιώσεις του αρχικού δείγματος. Συγκεκριμένα αφού έγινε vortex στο αρχικό ίζημα στη συνέχεια ελήφθησαν 3,5 ml από αυτό και αναμίχθηκαν με 3,5 ml PFSW, στη συνέχεια έγινε vortex. Το παραπάνω θεωρήθηκε ως η 10⁰ αραιώση. Στη συνέχεια 1 ml από το παραπάνω διάλυμα προστέθηκε σε 10 ml PFSW (10⁻¹ αραιώση). Η παραπάνω διαδικασία συνεχίστηκε μέχρι την επίτευξη και της 10⁻⁶ αραιώσης. Στη συνέχεια 90 µl από το εμβόλιο της κάθε αραιώσης επιστρώθηκαν στα τρυβλία. Η επιστροφή έγινε κάτω από φλόγα για την αποφυγή εξωγενούς μόλυνσης. Το εμβόλιο κάθε αραιώσης επιστρώθηκε σε τρία τρυβλία. Στη συνέχεια τα τρυβλία καλύφθηκαν με Para film. Αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν δύο θερμοκρασίες επώασης μία στους 13 °C και μία στους 28 °C. Για αυτό το λόγο η όλη διαδικασία έγινε εις διπλούς έτσι ώστε να υπάρχουν δύο σετ τρυβλίων για τις δύο θερμοκρασίες όπως φαίνεται στον Πίνακα 3. Η παραπάνω μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων αποτελεί συνήθης τεχνική της μικροβιολογίας και έχει ως στόχο την επίτευξη απομόνωσης σπάνιων βακτηριακών στελεχών.

Πίνακας 3

Θερμοκρασία Επώασης		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	Αριθμός Τρυβλίων
13 °C	Otr-	3	3	3	3	3	3	3	21
	Otr+	3	3	3	3	3	3	3	21
28 °C	Otr-	3	3	3	3	3	3	3	21
	Otr+	3	3	3	3	3	3	3	21

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά την επώαση των τρυβλίων έγινε καταμέτρηση των σχηματισμένων αποικιών. Οι χρόνοι επώασης καθώς ο αριθμός των αποικιών παρουσιάζονται στους Πίνακες 4-7. Οι αποικίες ήταν χρώματος μπέζ, πορτοκαλί ή κόκκινου, είχαν κυκλικό σχήμα και λεία επιφάνεια. Οι πλέον κοινές ήταν οι αποικίες χρώματος μπέζ. Πρόβλημα παρουσιάστηκε από την ανάπτυξη μυκήτων στα τρυβλία από την 3^η ημέρα επώασης και έπειτα. Το παραπάνω φαινόμενο παρατηρήθηκε αποκλειστικά στα τρυβλία που περιείχαν οξυτετρακυκλίνη. Στις 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} και 10^{-5} αραιώσεις απομονώθηκε μεγαλύτερος αριθμός βακτηρίων από τα τρυβλία που επώαστηκαν στους $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ otr- σε σχέση με αυτά που επώαστηκαν στους $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ otr-. Η κατάσταση αντιστράφηκε στις αραιώσεις 10^{-3} και 10^{-4} . Στα τρυβλία που περιείχαν οξυτετρακυκλίνη απομονώθηκε μεγαλύτερος αριθμός αποικιών στους $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ για την 10^0 αραιώση, ενώ στην αραιώση 10^{-1} απομονώθηκε περίπου ο ίδιος αριθμός αποικιών. Στις αραιώσεις 10^{-2} και 10^{-3} βακτήρια αναπτύχθηκαν μόνο στα τρυβλία που επώαστηκαν στους $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνονται στους Πίνακες 4-8 όπου ο αριθμός των αποικιών έχει μετατραπεί σε CFU/ml (Colony Formed Units). Δηλαδή έγινε αναγωγή του αριθμού των αποικιών που σχηματίστηκαν στη χρησιμοποιούμενη ποσότητα θρεπτικού σε ποσότητα θρεπτικού ίσης με 1 ml. Στους 28°C κατέστη δυνατό να καλλιεργηθούν περισσότερες αποικίες (μέγιστη τιμή στην 1^η αραιώση 9×10^4) σε αντίθεση με τους 13°C (μέγιστη τιμή στην 1^η αραιώση $4,1 \times 10^4$). Στις επόμενες αραιώσεις παρατηρήθηκε μείωση των τιμών. Ωστόσο στην 5^η αραιώση στους $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ σημειώθηκε μεγάλη αύξηση. Στους $13\text{ }^{\circ}\text{C}$ η αύξηση ήταν μικρότερη. Παρατηρούμε ότι υπάρχουν μεγάλες αποκλίσεις σε πολλές περιπτώσεις στις τρεις επαναλήψεις της κάθε αραιώσης. Ο λόγος, πιθανόν να είναι ότι κατά την μεταφορά του εμβολίου στα τρυβλία υπήρξε καθίζηση του ιζήματος με αποτέλεσμα να παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στις επαναλήψεις της κάθε αραιώσης. Στην περίπτωση δειγμάτων από ίζημα έχει παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις ανομοιογένεια ως προς τον αριθμό των βακτηρίων που απομονώθηκαν από δείγμα σε δείγμα όπως στην εργασία των Karpetanaki et al (1995).

Πίνακας 4: CFU/ml με αντιβιοτικό 28 °C

	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1η επανάληψη							
CFU/ml	22,2	66,7	0,0	22,2	0,0	0,0	0,0
2η επανάληψη							
CFU/ml	88,9	88,9	22,2	0,0	0,0	0,0	0,0
3η επανάληψη							
CFU/ml	44,4	44,4	0,0	22,2	0,0	0,0	0,0
Μέσος Όρος	51,9	66,7	7,4	14,8	0,0	0,0	0,0
Standard deviation	27,7	18,1	10,5	10,5	0,0	0,0	0,0
Χρόνος Επώασης	90 h	90 h	212 h	212 h	428 h	428 h	428 h

Πίνακας 5: CFU/ml χωρίς αντιβιοτικό 28 °C

	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1η επανάληψη							
CFU/ml	90577,8	15644,4	2888,9	311,1	44311,1	2133,3	0,0
2η επανάληψη							0,0
CFU/ml	104888,9	19666,7	2222,2	222,2	45800,0	1022,2	0,0
3η επανάληψη				0,0			0,0
CFU/ml	76577,8	14400,0	1400,0	244,4	72022,2	355,6	0,0
Μέσος Όρος	90681,5	16570,4	2170,4	259,3	54044,4	1170,4	0,0
Standard deviation	11558,2	2247,6	608,9	37,8	12726,7	733,3	0,0
Χρόνος Επώασης	40 h	40 h	40 h	140 h	140 h	140 h	140 h

Πίνακας 6: CFU/ml με αντιβιοτικό 13 °C

	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1η επανάληψη							
CFU/ml	311,1	66,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2η επανάληψη			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CFU/ml	644,4	44,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3η επανάληψη			0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CFU/ml	444,4	44,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Μέσος Όρος	466,7	51,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Standard deviation	137,0	10,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Πίνακας 7: CFU/ml χωρίς αντιβιοτικό (13 °C)

	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
1η επανάληψη							
CFU/ml	24666,7	10666,7	4866,7	355,6	22,2	177,8	0,0
2η επανάληψη							
CFU/ml	41377,8	8822,2	1600,0	266,7	22,2	155,6	0,0
3η επανάληψη							
CFU/ml	37222,2	11666,7	2688,9	333,3	44,4	133,3	0,0
Μέσος Όρος	34422,2	10385,2	3051,9	318,5	29,6	155,6	0,0
Standard deviation	7103,8	1178,2	1358,1	37,8	10,5	18,1	0,0
Χρόνος Επώασης	90 h	90 h	90 h	115 h	115 h	533 h	533 h

Το ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων παραρροισιάζεται στον Πίνακα 12.

Το ποσοστό των ανθεκτικών βακτηρίων βρέθηκε διαιρώντας τον αριθμό των αποικιών των τρυβλίων που περιείχαν οξυτετρακυκλίνη με τον αριθμό των αποικιών των αντίστοιχων τρυβλίων που δεν περιείχαν το αντιβιοτικό και πολλαπλασιάζοντας στη συνέχεια με το 100.

Πίνακας 8: Συχνότητα (%) εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων

	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
13 °C	1,4	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
28 °C	0,1	0,4	0,3	5,7	0,0	0,0	0,0

Πρέπει να σημειωθεί ότι στους 13⁰ C παρατηρούμε αρχικά υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με τους 28⁰ C, στην επόμενη αραιώση όμως υπάρχει σημαντική πτώση και στην συνέχεια δεν κατέστη δυνατό να απομονωθούν βακτηριακές αποικίες από τις επόμενες αραιώσεις. Αντίθετα στην επώαση των 28⁰ C παρατηρείται αύξηση των ποσοστών με εξαίρεση των 3^η αραιώση όπου υπάρχει μικρή ελάττωση, καταλήγοντας στην 4^η αραιώση στο υψηλότερο ποσοστό ανθεκτικότητας (5,7%) που παρατηρήθηκε στην εργασία. Στις επόμενες αραιώσεις πάλι δεν κατέστη δυνατό να απομονωθούν βακτήρια.

Συζήτηση

Οι μέγιστες συγκεντρώσεις των βακτηρίων που καλλιεργήθηκαν στα τρυβλία έφτασαν ως και 10^5 cfu/ml. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ενώ στα τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό υπήρξαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μεσόφιλων βακτηρίων από ότι ψυχρόφιλων, στα τρυβλία με αντιβιοτικό η κατάσταση αντιστράφηκε με εξαίρεση την 3^η και 4^η αραίωση. Η ύπαρξη ανθεκτικών ψυχρόφιλων βακτηρίων εγκυμονεί περισσότερους κινδύνους για τους εκτρεφόμενους οργανισμούς καθώς πολλά σημαντικά παθογόνα των ψαριών (*Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Clostridium botulinum*) είναι ψυχρόφιλα, επίσης και η θερμοκρασία του νερού έχει συνήθως τιμές που ευνοούν την ανάπτυξη τους (τα ψυχρόφιλα έχουν μέγιστη ανάπτυξη στους 20 °C και ελάχιστη στους 0 °C) συντελώντας στην περαιτέρω διάδοση της ανθεκτικότητας. Από την άλλη πλευρά η ύπαρξη υψηλών ποσοστών ανθεκτικότητας ανάμεσα στα μεσόφιλα βακτήρια εγκυμονεί περισσότερους για τον άνθρωπο καθώς τα παραπάνω διαβιούν σε θερμοκρασίες που βρίσκονται κοντά με τις θερμοκρασίες που διαβιούν ανθρώπινα παθογόνα.. Οι συχνότητες εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων στην παρούσα εργασία ήταν 0,1- 5,7%, τιμές που θεωρούνται χαμηλές σε σχέση με αντίστοιχες τιμές από άλλες εργασίες. Οι Herwig et al (1996) χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό μέσο το Mueller Hinton βρήκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις της τάξης των 10^6 - 10^8 cfu/ml, από δείγματα κάτω από ιχθυοκλωβούς. Τα ποσοστά ανθεκτικότητας πάντως που παρατηρήθηκαν ήταν κοντά σε αυτά της παρούσας εργασίας με τιμές κάτω από 5%. Στην εργασία των Pursell et al (1996) όπου μελετήθηκαν δείγματα ιζημάτων κάτω από ιχθυοκλωβούς στα δείγματα όπου χρησιμοποιήθηκε το Marine Agar τα ποσοστά κυμάνθηκαν από 0,4-2,9% και σε αυτά που χρησιμοποιήθηκε το TSCA (Tryptone Soya Citrate Agar) 0,03-0,21%. Χαμηλές τιμές (1-5%) παρατήρησαν και οι Petersen et al (2002) μελετώντας δείγματα κάτω από ιχθυοκλωβούς πριν την έναρξη της παραγωγής. Ωστόσο με την έναρξη του καινούριου κύκλου παραγωγής τα ποσοστά ανθεκτικότητας έφτασαν πάνω από 90%. Το παραπάνω φαινόμενο πιθανότατα οφείλεται στη φυσική επιλογή που προκάλεσε η παρουσία του αντιβιοτικού. Ανθεκτικά βακτήρια στα ιζήματα κάτω από μονάδες υδατοκαλλιεργειών πιθανόν να

οφείλονται στη χρήση των αντιβιοτικών για τη θεραπεία βακτηριακών ασθενειών των ψαριών. Σε θαλάσσιες εκτροφές ψαριών η μη καταναλωθείσες pellets θα κατακαθίσουν στα ιζήματα κάτω από τους κλωβούς ή σε μικρή απόσταση λόγω των ρευμάτων ή ακόμα και λόγω των κινήσεων των ψαριών με αποτέλεσμα να έχουμε συσσώρευση του αντιβιοτικού στο παραπάνω περιβάλλον. Μέσω των ελαφρύτερων περιττωμάτων ή μισοφαγωμένων pellets το αντιβιοτικό θα διασπαρθεί σε ευρύτερη περιοχή ανάλογα με τα επικρατώντα ρεύματα. Η τύχη πάντως του παραπάνω υλικού δεν έχει αποσαφηνιστεί (Kerry et al 1996a). Έχουν αναφερθεί υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών κάτω από κλωβούς που μπορούν να προκαλέσουν αναστολή της ανάπτυξης βακτηρίων στα παραπάνω περιβάλλοντα. Το γεγονός ότι η έκθεση σε αντιβιοτικά είναι κυρίως τοπική φαίνεται επίσης να είναι μεγάλης σημασίας, ενώ σημαντικό είναι και το γεγονός ότι οι αντιβιοτικές ουσίες εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον χωρίς να γίνεται να υποστούν κάποια μορφή επεξεργασίας που θα τις απενεργοποιούσε. Γενικά μπορεί να λεχθεί ότι τα ανθεκτικά βακτήρια των ιζημάτων μιας περιοχής ίσως να αποτελούν τον πιο ευαίσθητο δείκτη για την εξακρίβωση προηγούμενης χρήσης αντιβιοτικών στην εν λόγω περιοχή (Graslund et al 2003). Στην εργασία των Tendecia & Pena (2002) μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικών στην οξυτετρακυκλίνη βακτηρίων απομονώθηκαν από το νερό σε σχέση με το ιζημα. Ο Mudryk (2005) στην εξέταση δειγμάτων από ιζήματα βρήκε υψηλότερες συχνότητες ανθεκτικών βακτηρίων στις τετρακυκλίνες που προήλθαν από στρώματα βάθους 5-10 cm. Για τη μελέτη του φαινομένου της ανθεκτικότητας μερικοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει μικρόκοσμους στους οποίους προσπαθούν όσο είναι δυνατόν να αναπαραστήσουν τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε μοντέλα μικρόκοσμων που στόχο έχουν τη μελέτη της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη είναι και αυτός του φαινομένου της θήρευσης. Υπάρχουν υδάτινα περιβάλλοντα στα οποία οι φυσικοί θηρευτές των βακτηρίων παίζουν σημαντικό ρόλο στο εν λόγω οικοσύστημα με αποτέλεσμα να επηρεάζουν και την εμφάνιση των ανθεκτικών βακτηρίων. Άρα για να είναι έγκυρα τα συμπεράσματα που προκύπτουν από ένα πειραματικό μοντέλο μικρόκοσμου ο παραπάνω παράγοντας πρέπει να συνυπολογιστεί (Kerry et al 1996b).

Οι Tendecia & Pena (2002) αναφέρουν τιμές ανθεκτικότητας μεταξύ 11-78% μετά από αναλύσεις δειγμάτων νερού που προέρχονταν από εκτροφές γαρίδας στις

Φιλιπίνες. Οι Pathak & Gopal (2005) βρήκαν τιμές πάνω από 20% από δείγματα που προέρχονταν από εκτρεφόμενα γατόψαρα στην Ινδία, επίσης ο αριθμός των σχηματισμένων αποικιών (ανθεκτικών και μη) κυμάνθηκε από $1,23 \cdot 10^4$ - $2,24 \cdot 10^4$ cfu/ml τιμές χαμηλότερες από αυτές της παρούσας εργασίας. Ο Mudryk (2005) σε αναλύσεις δειγμάτων από το ιζήμα της λίμνης Gardno στην Πολωνία αναφέρει τιμές ανθεκτικών βακτηρίων πάνω από 80%. Οι Kerry et al (1996b) χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό μέσο το Marine Agar και με συγκέντρωση οξυτετρακυκλίνης 25 μg/ml βρήκαν ακόμα και πάνω από 90% ποσοστά ανθεκτικότητας, από δείγματα θαλάσσιου ιζήματος και τροφής ψαριών. Οι Chelossi et al (2003) παρατήρησαν πυκνότητες καλλιεργούμενων βακτηρίων της τάξης των 10^{10} cfu/ml και ποσοστά ανθεκτικότητας πάνω από 20% από δείγματα ιζημάτων κάτω από ιχθυοκλωβούς. Οι Schimdt et al (2000) παρατήρησαν ποσοστά ανθεκτικότητας σε παθογόνα ψαριών της τάξης του 5%. Στην εργασία των Nonaka & Suzuki (2002) τα ποσοστά ανθεκτικότητας κυμάνθηκαν πολύ υψηλότερα από 56-91%. Τα δείγματα προήλθαν από εκτρεφόμενα ψάρια του είδους *Seriola quinqueradiata*.

Η παραδοσιακή μέθοδος καλλιέργειας βακτηρίων σε θρεπτικά μέσα με ή χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού έχει εκ φύσης σημαντικά μειονεκτήματα, όπως η δυνατότητα καλλιέργειας ενός μικρού ποσοστού μικροοργανισμών. Επίσης η επιλογή του εκάστοτε θρεπτικού μέσου καθώς και των συνθηκών επώασης παίζουν καθοριστικό ρόλο (Herwig et al 1997). Για την καλλιέργεια σε τρυβλία, ανθεκτικών βακτηρίων βασικό ρόλο παίζει το θρεπτικό υπόστρωμα καθώς η σύστασή του θα καθορίσει τα είδη βακτηρίων που θα αναπτυχθούν, κάνοντας με αυτό τον τρόπο αδύνατη τη σύγκριση εργασιών που έχουν χρησιμοποιήσει διαφορετικά θρεπτικά μέσα.. Ειδικότερα η χρήση οποιουδήποτε θρεπτικού μέσου θα επιτρέψει την ανάπτυξη ενός μικρού υποπληθυσμού της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, επιπλέον η χρήση διαφορετικών θρεπτικών θα οδηγήσει στην καλλιέργεια βακτηρίων διαφορετικού τύπου και θα επηρεάσει τη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα οι Pursell et al (1996) συγκρίνοντας τα θρεπτικά μέσα TSCA (Tryptone Soya Citrate Agar) και Marine Agar για δείγματα από ιζήματα που πάρθηκαν κάτω από ιχθυοκλωβούς με ίδιες συγκεντρώσεις οξυτετρακυκλίνης (25 μg/ml) και επώαση στις ίδιες συνθήκες διαπίστωσαν αρκετά υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικών βακτηρίων στο δεύτερο θρεπτικό μέσο. Το παραπάνω πάντως δεν αποκλείει την περίπτωση ότι για δείγματα διαφορετικής περιοχής να παρατηρηθεί το αντίθετο φαινόμενο. Η

κατάσταση γίνεται ακόμη πιο πολύπλοκη στην περίπτωση δειγμάτων από το θαλάσσιο περιβάλλον από ότι στα γλυκά νερά, λόγω της απαραίτητης προσθήκης δισθενών κατιόντων όπως Mg^{+2} και Ca^{+2} στο θρεπτικό μέσο για την απομόνωση των βακτηρίων. Τα κατιόντα Mg^{+2} και Ca^{+2} σχηματίζουν σύμπλοκα με την οξυτετρακυκλίνη μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την βιολογική ενεργότητά της. Το παραπάνω οφείλεται στην ιδιότητα της να σχηματίζει σύμπλοκες ενώσεις με δισθενή και τρισθενή κατιόντα. Η παραπάνω ιδιότητα είναι ισχύει για όλες τις υδρόφιλες τετρακυκλίνες στις οποίες ανήκει η οξυτετρακυκλίνη. Για τον παραπάνω λόγω οι Herwig et al (1997) προτείνουν ότι η σύνθεση μιας λιπόφιλης τετρακυκλίνης θα ήταν περισσότερο κατάλληλη για το θαλάσσιο περιβάλλον. Παρουσία 10mM $MgCl_2$ σε θρεπτικό μέσο με 100 μg οξυτετρακυκλίνη έφερε τον ίδιο ρυθμό ανάπτυξης ,για στέλεχος του γένους *Vibrio*, με καλλιέργεια στο ίδιο θρεπτικό μέσο απουσία αντιβιοτικού (Nonaka & Suzuki 2002). Ωστόσο η οξυτετρακυκλίνη είναι πολύ διαλυτή στο νερό. Δεν αποκλείεται εφόσον υπάρχει κάποια ροή νερού και στο ίζημα η δεσμευμένη με κατιόντα οξυτετρακυκλίνη του ιζήματος να απελευθερωθεί και να ξανααποκτήσει ενεργή μορφή (Tendecia & Pena 2002). Πιστεύεται επίσης ότι η βιολογική ενεργότητα της οξυτετρακυκλίνης δεν εξαρτάται μόνο από την αλληλεπίδραση του αντιβιοτικού με το εκάστοτε θρεπτικό μέσο αλλά και από τον υπό μελέτη μικροοργανισμό. Επίσης υπάρχουν ενδείξεις ότι η μείωση στην ικανότητα των αντιβιοτικών να θανατώνουν τα βακτήρια είναι μεγαλύτερη από τη μείωση στην αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων που προκαλούν τα αντιβιοτικά (Pursell 1996). Λόγω των παραπάνω είναι σημαντικός σε κάθε εργασία ο προσδιορισμός της πραγματικής ποσότητας του αντιβιοτικού που είναι σε ενεργή μορφή. Συγκεκριμένα για το θρεπτικό μέσο TSCA (Tryptone Soya Citrate Agar) + 70% θαλασσινό νερό υπάρχουν ενδείξεις ότι ενσωμάτωση οξυτετρακυκλίνης ίσης με 25 $\mu g/ml$ αντιστοιχεί σε ενεργή μορφή της τάξης των 5 $\mu g/ml$ (Kerry et al 1996). Πάντως ο παραπάνω προσδιορισμός είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος έως και αδύνατος και ξεφεύγει από τους στόχους της παρούσας εργασίας. Άρα τα χαμηλά ποσοστά ανθεκτικότητας που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία πιθανόν να μην αντικατοπτρίζουν την πραγματικότητα καθώς το θρεπτικό Luria Bertani ίσως να μην ήταν το καταλληλότερο για την καλλιέργειά τους. Το παραπάνω θρεπτικό έχει χρησιμοποιηθεί στην εργασία των Nikolakopoulou et al (2004), ωστόσο η συγκεκριμένη εργασία μελετούσε βακτήρια από το νερό και δεν παρουσιάζονται

ποσοστά ανθεκτικότητας μια και ως στόχο είχε τη μελέτη συγκεκριμένων γονιδίων ανθεκτικότητας.

Στην εργασία των Karpetanaki et al (1995) οι συγκεντρώσεις των απομονωθέντων βακτηρίων (7×10^4 cfu/ml) καθώς και τα ποσοστά ανθεκτικότητας είχαν τιμές αντίστοιχες με της παρούσας εργασίας (0,2%). Το παραπάνω ποσοστό πάντως με την προσθήκη αποστειρωμένης τροφής ψαριών και έπειτα από επώαση έφτασε το 34%. Στην πληθώρα των περιπτώσεων φαίνεται να υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στο ποσοστό των ανθεκτικών μικροοργανισμών ,από τις μονάδες υδατοκαλλιεργειών, και στη χρήση αντιβιοτικών (Schmidt et al 2000) ,ωστόσο ορισμένοι ερευνητές (Kerry et al,1994,1995,1996, Karpetanaki et al 1995, Miranda & Zemelman 2002, Tendecia & Pena 2002) φαίνεται να πιστεύουν ότι και άλλοι παράγοντες ,εκτός της ύπαρξης του αντιβιοτικού στο υδάτινο περιβάλλον, μπορούν να επηρεάσουν τη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών στην οξυτετρακυκλίνη. Στις παραπάνω εργασίες βρέθηκε να υπάρχει μικρή συσχέτιση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις της οξυτετρακυκλίνης που ανιχνεύτηκαν στα υπό εξέταση δείγματα και στη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων υποδεικνύοντας ότι η παρουσία και μόνο του αντιβιοτικού δεν αποτελεί απαραίτητο παράγοντα εξάπλωσης της ανθεκτικότητας. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Heuer et al (2002) στην εργασία τους πάνω σε ανθεκτικά βακτήρια στη γενταμικίνη (gentamicin). Ειδικότερα στην εργασία των Karpetanaki et al (1995) ως σημαντικός παράγοντας για την εξάπλωση της ανθεκτικότητας στην οξυτετρακυκλίνη υπήρξε η ποσότητα της χορηγούμενης τροφής.. Ο παραπάνω παράγοντας ίσως να εξηγεί την αιτία εμφάνισης υψηλών συχνοτήτων ανθεκτικότητας , σε συγκεκριμένο ιχθυοτροφείο ακόμα και μετά από 550 από το πέρας της θεραπευτικής αγωγής. Η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας ευνοείται περισσότερο σε ευτροφικά περιβάλλοντα λόγω των αυξημένων συγκεντρώσεων οργανικού άνθρακα που αυξάνει τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών (Costanzo et al 2005). Επίσης σημαντικό ρόλο παίζει ο ρυθμός αποικοδόμησης του αντιβιοτικού από μικροοργανισμούς, η διάχυση του φωτός και η θερμοκρασία.. Επιπλέον Ορισμένοι ερευνητές φαίνεται να πιστεύουν ότι η ανθεκτικότητα των βακτηρίων εξαρτάται από την ταξινομική τους θέση περισσότερο από την προέλευσή τους, καθώς βακτήρια συγκεκριμένων ταξινομικών ομάδων έχουν παρόμοιες γενετικές πληροφορίες που κωδικοποιούν για ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (Mudryk 2002).

Σε μελέτες εξομοίωσης για καλύτερη κατανόηση των διεργασιών που εμφανίζονται σε ιζήματα κάτω από μονάδες εκτροφής σολομών παρατηρήθηκε ότι για τις τυπικά χρησιμοποιούμενες δόσεις αντιβιοτικών i) υπήρξε συσσώρευση υπολειμμάτων αντιβιοτικών στα ιζήματα ii) σημαντική αύξηση του ποσοστού των βακτηρίων, που απομονώθηκαν από τα ιζήματα, με ανθεκτικότητα στα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά iii) εμφάνιση ανθεκτικότητας και σε αντιβιοτικά τα οποία δεν έχουν χρησιμοποιηθεί iv) τα ιζήματα μπορούν να αποτελέσουν μέσο προώθησης μικροοργανισμών ανθεκτικών σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά για εβδομάδες ή και μήνες ύστερα από την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας (Herwig & Gray 1997). Οι περισσότερες μελέτες πάνω σε ανθρώπινα παθογόνα ανθεκτικών στις τετρακυκλίνες χρησιμοποίησαν συγκεντρώσεις αντιβιοτικών της τάξης των 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, ωστόσο και οι εργασίες στις οποίες όπως και η παρούσα χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση αντιβιοτικού ίση με 10 $\mu\text{g/ml}$ είναι αρκετά συχνές. Ορισμένοι ερευνητές στην προσπάθεια τους να εξαλείψουν τον ανασταλτικό ρόλο που παίζουν τα κατιόντα Mg^{+2} και Ca^{+2} του θαλάσσιου νερού στην ενεργότητα της οξυτετρακυκλίνης χρησιμοποίησαν συγκεντρώσεις της τάξης των 100 $\mu\text{g/ml}$ (Pursell 1996). Τα βακτήρια τα οποία μπορούν να σχηματίσουν αποικίες σε θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο περιέχει αντιβιοτικό μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες:

1. Βακτήρια τα οποία διαθέτουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Στην περίπτωση των τετρακυκλίνων αυτά βρίσκονται κυρίως στα πλασμίδια.
2. Βακτήρια τα οποία από τη φύση τους είναι ανθεκτικά στα εν λόγω αντιβιοτικά πχ *Pseudomonas aeruginosa*. Συνήθως σχετίζεται με αδιαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος ή της κυτταρικής μεμβράνης στο αντιβιοτικό.
3. Βακτήρια τα οποία χάρις σε αλλαγές στις ιδιότητες των μεμβρανών τους μπορούν να εμφανίσουν ποικίλους φαινότυπους χαμηλής ανθεκτικότητας στις τετρακυκλίνες (Mudryk 2005)..

Η πιθανότητα τα ανθεκτικά βακτήρια του υδάτινου περιβάλλοντος να επιδράσουν αρνητικά στη χρήση αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες εξαρτάται από την ικανότητά τους να μεταδώσουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε παθογόνα των ψαριών. Την παραπάνω ικανότητα φαίνεται να έχουν μόνο τα βακτήρια που

διαθέτουν γονίδια ανθεκτικότητας. Τα βακτήρια της τρίτης κατηγορίας διαδραματίζουν ρόλο μόνο στην περίπτωση όπου οι ειδικές αλλαγές στις κυτταρικές μεμβράνες εμφανιστούν εξαρχής στα παθογόνα βακτήρια (Pursell et al 1996). Η ανθεκτικότητα στην οξυτετρακυκλίνη, οφείλεται όπως έχει αναφερθεί, σε γονίδια που βρίσκονται κυρίως στα πλασμίδια. Η μελέτη της ανθεκτικότητας στα αυτόχθονα βακτήρια μιας περιοχής συμβάλει στην ερμηνεία για την διατήρηση και μεταφορά της ανθεκτικότητας σε άλλα βακτήρια συμπεριλαμβανομένων και πιθανών παθογόνων καθώς και στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που κωδικοποιούν τα γονίδια ανθεκτικότητας (Miranda & Zemelman 2002).

Πλήθος εργασιών σχετικών με τη χρήση της οξυτετρακυκλίνης στις ιχθυοκαλλιέργειες έχουν αναφέρει ποικίλλες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού κάτω από τα ιζήματα των κλωβών. Αν και οι περισσότερες αναφέρουν συγκεντρώσεις γύρω στα $10 \mu\text{g/g}^{-1}$, έχουν αναφερθεί και πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της τάξης των $180\text{-}285 \mu\text{g/g}^{-1}$. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της οξυτετρακυκλίνης σε ιζήματα κάτω από ιχθυοκλωβούς ποικίλλει. Έχουν αναφερθεί τιμές από 9 έως 419 ημέρες (Alderman & Hastings 1998). Η φύση των ιζημάτων και τα επικρατούντα ρεύματα κάθε περιοχής φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παραμονή του αντιβιοτικού στο περιβάλλον. Λίγα στοιχεία φαίνονται να υπάρχουν για το εύρος της περιοχής που επηρεάζεται από την παρουσία του αντιβιοτικού (Kerry et al 1996). Στη βιβλιογραφία αναφέρονται ρυθμοί ιζηματοποίησης ,κάτω από κλωβούς με σολομό ,από λιγότερο του 1 μέχρι πάνω από $180 \text{ g C m}^{-2}\text{day}^{-1}$ (Herwig & Gray 1997). Οι Chelossi et al (2003) παρατήρησαν υψηλές συχνότητες εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων σε 7 διαφορετικά αντιβιοτικά ,ανάμεσα στα οποία ήταν και η οξυτετρακυκλίνη, από ιζήματα κάτω από ιχθυοκλωβούς ,αλλά και από την ευρύτερη περιοχή που χρησιμοποιήθηκε ως σημείο ελέγχου των περιβαλλοντικών επιπτώσεων από τις υδατοκαλλιέργειες. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι οι υδατοκαλλιέργειες ίσως να συνδράμουν σε μεγαλύτερο βαθμό, από ότι αρχικά φαινόταν, στην εξάπλωση των ανθεκτικών στελεχών. Επίσης αναφέρουν ότι τα υψηλά ποσοστά ανθεκτικών στελεχών ίσως να συσχετίζονται στην με την παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών από βακτήρια του γένους *Bacillus* που έχουν απομονωθεί από δείγματα ιζημάτων από περιοχές γύρω από ιχθυοκλωβούς. Αυτή η αντιμικροβιακή πίεση μπορεί να εξηγήσει την επιλογή που ασκείται στα παραπάνω περιβάλλοντα και την επικράτηση των ανθεκτικών βακτηρίων. Επιπλέον η συσσώρευση, λόγω των υδατοκαλλιεργειών,

οργανικής ύλης στα ανώτερα στρώματα του ιζήματος μπορεί να επηρεάσει τους ρυθμούς αύξησης των βακτηρίων και να συνεισφέρει στην προώθηση της ανθεκτικότητας. Το ποσοστό των βακτηρίων που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά ,για δείγμα ιζήματος από μονάδες ιχθυοκαλλιεργειών, πιθανόν να αποτελεί έναν αρκετά ευαίσθητο δείκτη για το αν έχουν χρησιμοποιηθεί αντιβιοτικά στο εν λόγω περιβάλλον. Η ακρίβεια του εν λόγω δείκτη φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά σε περίπτωση που υπάρχουν διαθέσιμα δείγματα ιζημάτων της ευρύτερης περιοχής μελέτης τα οποία όμως δεν υπόκεινται στην άμεση επίδραση των μονάδων (Herwig & Gray 1997).

Συμπεράσματα

Ανακεφαλαιώνοντας, στην παρούσα εργασία βρέθηκαν χαμηλές συχνότητες εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων στην οξυτετρακυκλίνη από ίζημα κάτω από ιχθυοκλωβούς. Η σύγκριση των σχηματισμένων αποικιών των τρυβλίων που περιείχαν αντιβιοτικό με αυτά που δεν περιείχαν φανερώνει ότι δεν υπήρχε σημαντική απώλεια της ενεργότητας του αντιβιοτικού από το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε. Ωστόσο δεν μπορεί να λεχθεί με βεβαιότητα ότι τα παραπάνω αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν την πραγματικότητα και ότι δεν έχει χρησιμοποιηθεί η οξυτετρακυκλίνη στο συγκεκριμένο ιχθυοτροφείο, καθώς δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για την καταλληλότητα του θρεπτικού Luria Bertani στην καλλιέργεια ανθεκτικών στην οξυτετρακυκλίνη βακτηρίων, αλλά και γενικά, όπως αναφέρθηκε, η μέθοδος της καλλιέργειας σε θρεπτικά μέσα έχει σημαντικούς περιορισμούς.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alderman, D.J &. Hastings, T.S. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. *International Journal of Food Science and Technology*, **33**, 139-155 (1998)

Asagbra, A.E., Sanni, A.I.& Oyewole, O.B. Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **21**, 107–114 (2005).

Chelossi, E., Vezzulli, L., Milano, A., Branzonic, M., Fabiano, M., Riccardia, G & Banat, I. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture*, **219**, 83–97 (2003).

Chopra, I.& Roberts, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **65**, 232–260 (2001).

Costanzo, S.D., Murby, J.& Bates, J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*, **51**, 218–223 (2005).

Coyne, P., Samuelsen, O., Bergha, O., Andersena, K., Pursell, L., Dalsgaard, I.& r Smith, P. On the validity of setting breakpoint minimum inhibition concentrations at one quarter of the plasma concentration achieved following oral administration of ortetracycline. *Aquaculture*, **239**, 23–35 (2004).

Dalsgaard, I.& Madsen, L. Bacterial pathogens in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), reared at Danish freshwater farms. *Journal of Fish Diseases*, **23**, 199–209 (2000).

Depaola, A., Peeler, J.T. & Rodrick, G. Effect of Oxytetracycline-Medicated Feed on Antibiotic Resistance of Gram-Negative Bacteria in Catfish Ponds. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 2335-2340 (1995).

Graslund, S., Holmstrom, K., Wahlstrom, A. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. *Marine Pollution Bulletin*, **46**, 81–90 (2003).

Hathaa, M., Vivekanandhan, A.A., Joicea, G.& Christol J. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, **98**, 131– 134 (2005).

Herwig, R.P., Gray, J.P.& Weston, D.P. Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound, Washington. *Aquaculture*, **149**, 263-283 (1997).

Herwig, R.P.& Gray, J.P. Microbial response to antibacterial treatment in marine microcosms. *Aquaculture*, **152**, 139-154 (1997).

Heuer, H., Krogerrecklenfort, E., Wellington, E.M.H, Egan, S., Elsas, J.D., Overbeek, L., Collard, J.M., Guillaume, G., Karagouni, A.D., Nikolakopoulou, T.L.& Smalla K. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiology Ecology*, **42**, 289-302 (2002).

Holmstrom, K., Graslund, S., Wahlstrom, A., Pongshompoo, S., Bengtsson, B.E. & Kautsky, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. *International Journal of Food Science and Technology*, **38**, 255–266 (2003).

Kapetanaki, M., Kerry, J., Hiney, M., O'Brien, C., Coyne, R.& Smith, S. Emergence, in otrtetracycline-free marine mesocosms, of microorganisms capable of colony formation on otrtetracycline-containing media. *Aquaculture*, **134** , 227-236 (1995).

Kawanishi, M., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Kijima, M., Takahashi, T., Suzuki, S.& Tamura, Y. Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. *Letters in Applied Microbiology*, **40**, 322–328 (2005).

Kerry, J., Coyne, R., Gilroy, D., Hiney, M. & Smith, P. Spatial distribution of oirtetracycline and elevated frequencies of oirtetracycline resistance in sediments beneath a marine salmon farm following oirtetracycline therapy. *Aquaculture*, **145**, 31-39 (1996a).

Kerry, J., Slattery, M., Vaughan, S. & Smith, P. The importance of bacterial multiplication in the selection, by oirtetracycline-HCl, of oirtetracycline-resistant bacteria in marine sediment microcosms. *Aquaculture*, **144**, 103-119 (1996b).

Kim, S.R., Nonaka, L. & Suzuki, S. Occurrence of tetracycline resistance genes tet(M) and tet(S) in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters*, **237**, 147-156 (2004).

Kumar, H.S., Parvathi, A., Karunasagar I. & Karunasagar, I. Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical seafood. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **21**, 619-623 (2005).

Kummerer, K. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **54**, 311-320 (2004).

Lalumera, G.M., Calamari, D., Galli, P., Castiglioni, S., Crosa, G. & Fanelli, R. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere*, **54**, 661-668 (2004).

Michel, C., Matte-Tailliez, O., Kerouault, B. & Bernardet, J.F. Resistance pattern and assessment of phenicol agents minimum inhibitory concentration in multiple drug resistant *Chryseobacterium* isolates from fish and aquatic habitats. *Journal of Applied Microbiology*, **99**, 323-332 (2005).

Miranda, C.D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S. & Roberts, M.C. Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Bacteria from Chilean Salmon Farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**, 883-888 (2003).

Miranda, C.D.& Zemelman, R. Bacterial resistance to oirtetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture*, **212**, 31–47 (2002a).

Miranda, C.D., Zemelman, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *The Science of the Total Environment*, **293**, 207–218 (2002b).

Mudryk, Z.J. Occurrence and distribution antibiotic resistance of heterotrophic bacteria isolated from a marine beach. *Marine Pollution Bulletin*, **50**, 80–86 (2005).

Mudryk, Z.,J. Antibiotic Resistance among Bacteria Inhabiting Surface and Subsurface Water Layers in Estuarine Lake Gardno. *Polish Journal of Environmental Studies*, **11**, 401-406 (2002).

Nikolakopoulou, T.L., Egan, S., Overbeek, L.S., Guillaume, G., Heuer, H., Wellington, E.M.H., Elsas, J.D., Collard, J.M., Smalla, K., Karagouni, A.D .PCR Detection of Oirtetracycline Resistance Genes otr(A) and otr(B) in Tetracycline-Resistant Streptomycete Isolates from Diverse Habitats. *Current Microbiology*, **51**, 211–216 (2005).

Nonaka, L.& Suzuki, S. New Mg² Dependent Oirtetracycline Resistance Determinant Tet 34 in *Vibrio* Isolates from Marine Fish Intestinal Contents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**, 1550–1552 (2002).

Overbeek, L.S., Wellington, E.M.H., Smalla, S.E.K., Heuer, H., Collard, J.M., Guillaume, G., Karagouni, A.D., Nikolakopoulou, T.L.& Elsas, J.D. Prevalence of streptomycin-resistance genes in bacterial populations in European habitats. *FEMS Microbiology Ecology*, **42**, 277-288 (2002).

Pathak, S.B & Gopal, K. Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. *Environmental Research*, **98**, 100–103 (2005).

Petersen, A.& Dalsgaard, A. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas* spp. and *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. *Aquaculture*, **219**, 71–82 (2003).

Petersen, A., Andersen, J.S., Kaewmak, T., Somsiri, T.& Dalsgaard, A. Impact of Integrated Fish Farming on Antimicrobial Resistance in a Pond Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 6036–6042 (2002).

Pursell, L., Dineen, T., Kerry, J., Vaughan, S.& Smith, P. The biological significance of breakpoint concentrations of oirtetracycline in media for the examination of marine sediment microflora. *Aquaculture*, **145**, 21-30 (1996).

Rhodes, G., Huys, G., Swings, J., McGann, P., Hiney, M., Smith, P.& Pickup, R.W. Distribution of Oirtetracycline Resistance Plasmids between *Aeromonads* in Hospital and Aquaculture Environments: Implication of Tn1721 in Dissemination of the Tetracycline Resistance Determinant Tet A. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 3883–3890 (2000).

Rigos, G., Nengas, I., Alexis, M.& Troisi, G.M. Potential drug (oirtetracycline and oxolinic acid) pollution from Mediterranean sparid fish farms. *Aquatic Toxicology*, **69**, 281–288 (2004).

Rigos, G., Nengas, I., Tyrpenou, A.E., Alexis, M.& Troisi, G.M. Pharmacokinetics and bioavailability of oirtetracycline in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) after a single dose. *Aquaculture*, **221**, 75–83 (2003).

Rigos, G., Alexis, M., Andriopoulou, A.& Nengas, I. Pharmacokinetics and tissue distribution of oirtetracycline in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, at two water temperatures. *Aquaculture*, **210**, 59–67 (2002).

Roberts, M.C. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, **245**, 195–203 (2005).

Saha, D.& Pal, J. In vitro antibiotic susceptibility of bacteria isolated from EUS-affected fishes in India. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 311–316 (2002).

Sayah, R.S., Kaneene, J.B., Johnson Y.& Miller, R.A. Patterns of Antimicrobial Resistance Observed in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Domestic- and Wild-Animal Fecal Samples, Human Septage, and Surface Water. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 1394–1404 (2005).

Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I.& Larsen, J.L. Incidence, Distribution, and Spread of Tetracycline Resistance Determinants and Integron-Associated Antibiotic Resistance Genes among Motile Aeromonads from a Fish Farming Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, Dec.. 5675–5682 (2001).

Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K.& Larsen, J.L. Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fish-Pathogenic and Environmental Bacteria Associated with Four Danish Rainbow Trout Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 4908–4915 (2000).

Smith, M.S., Yang, R.K., Knapp, C.W., Niu, Y., Peak, N., Hanfelt, M.M., Galland, J.C.& Graham, D.W. Quantification of Tetracycline Resistance Genes in Feedlot Lagoons by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 7372–7377 (2004).

Tendencia, L.E.& Pena, L.D. Level and percentage recovery of resistance to tetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*, **213**, 1–13 (2002).

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Φώτης, Γ.& Αγγελίδης, Π.Γ. Εκτροφή και Παθολογία Ιχθύων. Τόμος Α΄ σελ 289-328, Εκδ Σύγχρονη Παιδεία 2003.

Πνευματικάτος, Γ.Η. Ιχθυοτροφία και Ιχθυοπαθολογία., σελ 359- 399. Εκδόσεις Κυριακίδη 1986.