



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Καλλιεργήσιμα βακτήρια με ανθεκτικότητα στην οξυτετρακυκλίνη
από την υδάτινη στήλη του ταμιευτήρα της Κάρλας»**

Λιαμάκη Άννα

Σκιά Γεωργία

ΒΟΛΟΣ 2020

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Κωνσταντίνος Κορμάς, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, επιβλέπων
Γεώργιος Μιχαήλ, Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, μέλος
Έρα Καραγιάννη, Επίκουρη Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, μέλος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένας μεγάλος αριθμός μικροβίων αναπτύσσεται σε υδάτινα οικοσυστήματα και ιδιαίτερα σε υδάτινους αποδέκτες γλυκού νερού, όπως λίμνες και ποτάμια, εξαιτίας των συνθηκών που επικρατούν και ευνοούν την αύξησή τους. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η ύπαρξη αντιβιοτικοανθεκτικών βακτηρίων στο νερό του ταμιευτήρα της Κάρλας. Για τον σκοπό αυτό συλλέχθηκε ποσότητα νερού, η οποία χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα, σε μέρος της οποίας προστέθηκε ποσότητα αντιβιοτικού οξυτετρακυκλίνης. Από μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε εργαστήριο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες διαπιστώθηκε πως η χρήση του αντιβιοτικού (OTC), στα δείγματα του νερού που απομονώθηκε, συντέλεσε στην αναστολή της αύξησης των βακτηρίων που υπήρχαν. Οι μετρήσεις έγιναν με την βοήθεια φασματοφωτόμετρου, ενώ η επώαση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στους 37°C και στους 15°C με τη χρήση θρεπτικού υλικού, LB-Medium, το οποίο βοήθησε στην ανάπτυξη των βακτηρίων.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που συλλέχθηκαν έδειξε ότι το αντιβιοτικό οξυτετρακυκλίνης εμπόδισε την αύξηση βακτηρίων στα δείγματα και στην συνέχεια προκάλεσε το θάνατό τους.

Λέξεις κλειδιά: βακτήρια, αντιβιοτικοανθεκτικά, οξυτετρακυκλίνη, θερμοκρασία, λίμνη Κάρλα

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Γενικά	1
1.2. Μικροοργανισμοί σε Λιμναία οικοσυστήματα.....	1
1.3. Αντιβιοτικά.....	2
1.3.1. Ιστορική αναδρομή αντιβιοτικών	2
1.3.2. Ανακάλυψη πενικιλίνης – Μια τυχαία ανακάλυψη.....	3
1.3.3. Μηχανισμός δράσης των αντιβιοτικών	3
1.4. Περιβάλλον και αντιβιοτικά.....	4
1.5. Ανθεκτικότητα βακτηρίων	5
1.6. Λίμνη Κάρλα.....	6
1.7. Σκοπός	7
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	8
2.1 Διεξαγωγή πειράματος	8
2.1.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος	8
2.1.2 Παρακολούθηση καλλιεργειών.....	9
2.2 Τάχος αύξησης	12
2.3 Διεξαγωγή στατιστικής ανάλυσης	13
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΗΤΗΣΗ	15
3.1. Πείραμα 1 ^ο	15
3.2. Πείραμα 2 ^ο	16
3.3. Θερμοκρασία	18
3.4. Θρεπτικό υπόστρωμα λίμνης.....	19
3.5. pH και οξυτετρακυκλίνη	20
3.6. LB-Medium	20
3.7. Στατιστική ανάλυση δεδομένων με τη χρήση της ANOVA	21
3.8. Εντοπισμός αντιβιοτικοανθεκτικών βακτηρίων στον ποταμό Mhlathuze	22
3.8.1. Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	22
3.8.2. Στατιστική ανάλυση	23
3.8.3. Αποτελέσματα.....	23
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	24
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	26
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	29
ABSTRACT.....	30

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ειλικρινείς μας ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρουμε σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κύριο Κωνσταντίνο Κορμά για την πολύτιμη βοήθειά του για τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Ακόμη, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον κυρία Φαίη Παπαδημητρίου για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, όσον αφορά το εργαστηριακό κομμάτι. Τέλος, θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας στην οικογένειά μας για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μας.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Γενικά

Η ευρεία χρήση αντιβιοτικών για την πρόληψη και τη θεραπεία λοιμώξεων σε ανθρώπους και ζώα, προκαλεί μόλυνση του περιβάλλοντος. Τις τελευταίες δεκαετίες μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών έχουν απελευθερωθεί στο περιβάλλον, αλλά λίγα είναι γνωστά για τις επιπτώσεις αυτών των αντιβιοτικών σε μικροοργανισμούς που ζουν σε φυσικά ενδιαιτήματα. (Khachatourians, 1998)

Οι αντιβιοτικές ουσίες και τα ανθεκτικά σε αυτές βακτήρια μπορούν να εισέλθουν στα επιφανειακά και υπόγεια υδάτινα περιβάλλοντα μέσω διαφορετικών οδών, για παράδειγμα μέσω των επεξεργασμένων και ανεπεξέργαστων λυμάτων, από τις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων, όπου παρέχεται ένα ιδανικό περιβάλλον για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας, καθώς τα βακτήρια είναι σε διαρκή επαφή με τις αντιβιοτικές ουσίες και τους ανθεκτικούς μικροοργανισμούς. (Witte, 1998) Επιπλέον, είναι δυνατόν να εισέλθουν στο υδατικό περιβάλλον από τα νοσοκομειακά απόβλητα, από τις εκάστοτε απορρίψεις υδατοκαλλιεργειών, από τις επιφανειακές απορροές, από την χρήση μη ελεγχμένων κτηνοτροφικών παραγώγων (π.χ. κοπριά), καθώς και από τη διήθηση του νερού που προορίζεται για γεωργική χρήση. Ευρήματα δείχνουν πως μετά την είσοδό τους στο περιβάλλον, τα αντιβιοτικά δεν εξαφανίζονται, αλλά είναι παρόντα. (Witte, 1998).

Η είσοδος των αντιβιοτικών στο περιβάλλον επιδρά στα βακτήρια που συναντά και είναι δυνατόν να αλλάξει τη βιοκοινότητά τους (Sukul and Spiteller, 2007). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε στελέχη μικροοργανισμών ιδιαίτερα ανθεκτικών που στην πορεία του χρόνου ενδεχομένως να μην καταπολεμούνται από αντιβιοτικά (BGVV, 1997).

1.2. Μικροοργανισμοί σε Λιμναία οικοσυστήματα

Τα λιμναία οικοσυστήματα αποτελούν ένα τμήμα των υδατικών οικοσυστημάτων. Τα συγκεκριμένα ενδιαιτήματα χαρακτηρίζονται από τις δικές τους ιδιαίτερες συνθήκες. Οι παράγοντες κατά Sigeo (2005) που επιδρούν στην αύξηση των μικροοργανισμών σε αυτά είναι οι παρακάτω: α) τα χαρακτηριστικά της ίδιας της λίμνης, δηλαδή η μορφολογία της (π.χ. το βάθος της, η θολερότητά της και η είσοδος ανόργανων συστατικών), το υδατικό της ισοζύγιο και η αλληλεπίδρασή της με τα γειτονικά της οικοσυστήματα, β) το κλίμα της περιοχής, πιο αναλυτικά η προσπίπτουσα ηλιακή ακτινοβολία, η θερμοκρασία, οι βροχοπτώσεις και γ) η απομόνωσή της από άλλα υδάτινα οικοσυστήματα. Το τελευταίο έχει πολύ σοβαρή επίδραση στην ποικιλότητα της εκάστοτε λίμνης (αριθμός ενδημικών ειδών).

1.3. Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ή πρόληψη βακτηριακών λοιμώξεων. Είναι ουσίες φυσικές, ημισυνθετικές ή συνθετικές, οι οποίες προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού μικροοργανισμών ή/και τη θανάτωσή τους. Τα αντιβιοτικά μπορούν να δράσουν επίσης και σε άλλες κατηγορίες μικροοργανισμών, όπως μύκητες, παράσιτα, αλλά δεν είναι αποτελεσματικά στους ιούς (Martins *et al.*, 2014)

1.3.1. Ιστορική αναδρομή αντιβιοτικών

Απόπειρες για την χρησιμοποίηση ουσιών που προέρχονται από έναν οργανισμό για αναστολή της αύξησης ή θανάτωση άλλων άρχισαν πριν 2.500 περίπου χρόνια, όταν οι Κινέζοι ανακάλυψαν τις θεραπευτικές ιδιότητες της μουχλιασμένης στάλπης της σόγιας και χρησιμοποίησαν αυτή την ουσία για να θεραπεύσουν δοθιήνες, ψευδάνθρακες και παρόμοιες λοιμώξεις. Πολλοί άλλοι πολιτισμοί, συμπεριλαμβανομένων των Αρχαίων Αιγυπτίων και των Αρχαίων Ελλήνων, χρησιμοποιούσαν ήδη μύκητες και φυτά για να θεραπεύσουν μολύνσεις εξαιτίας της παραγωγής των αντιβιοτικών ουσιών από αυτούς τους οργανισμούς. Εκείνη τη στιγμή όμως οι ενώσεις που αναπτύσσουν την αντιβιοτική δράση ήταν άγνωστες. (Madigan *et al.* 2014)

1.3.2. Ανακάλυψη πενικιλίνης – Μια τυχαία ανακάλυψη

Το πρώτο αντιβιοτικό, η πενικιλίνη ανακαλύφθηκε το 1928 από τον Σερ Αλεξάντερ Φλέμινγκ, ο οποίος ήταν ένας Σκωτσέζος βιολόγος και φαρμακολόγος και ασχολήθηκε ερευνητικά με τη Βακτηριολογία, την Ανοσολογία και τη Χημειοθεραπεία. Πήρε το Βραβείο Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής το 1945 μαζί με τους Φλόρεϋ και Τσέιν. Μια άλλη σημαντική ανακάλυψή του είναι αυτή του ενζύμου λυσοζύμης, το 1922.

Το 1928 ο Φλέμινγκ ερευνούσε τις ιδιότητες των σταφυλόκοκκων. Είχε ήδη κάποια φήμη από τις προηγούμενες έρευνές του, ως ευφυούς ερευνητή αλλά και απρόσεκτου τεχνικού εργαστηρίου: συχνά ξεχνούσε τις καλλιέργειες μικροοργανισμών πάνω στις οποίες εργαζόταν και γενικώς το εργαστήριο του ήταν συνήθως πολύ ακατάστατο. Αφού επέστρεψε από διακοπές, ο Φλέμινγκ πρόσεξε ότι πολλά από τα τρυβλία Petri μικροβιακών καλλιιεργειών είχαν μολυνθεί από ένα μύκητα (κοινώς, είχαν μουχλιάσει) και τα έριξε σε δοχείο με απορρυπαντικό. Αλλά στη συνέχεια χρειάστηκε να δείξει σε έναν επισκέπτη τι ερευνούσε, κι έτσι ανέσυρε κάποια από τα δισκία που δεν είχαν βυθιστεί στο απορρυπαντικό. Τότε πρόσεξε μία ζώνη γύρω από τη μούχλα που ήταν ελεύθερη (φαινομενικά τουλάχιστον) από βακτήρια. Αυτό θα πρέπει να συνέβαινε αν η μούχλα παρήγαγε κάποια βακτηριοκτόνο ουσία. Ο Φλέμινγκ απομόνωσε ένα δείγμα από τη μούχλα, το ταυτοποίησε σωστά ως μύκητα του γένους *Penicillium* και για τον λόγο αυτό ονόμασε τη νέα ουσία πενικιλίνη. Ο Φλέμινγκ διερεύνησε τη βακτηριοκτόνο δράση της πενικιλίνης σε πολλούς μικροοργανισμούς.

1.3.3. Μηχανισμός δράσης των αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά είναι αντιβακτηριακά φάρμακα που παρεμβάλλονται σε δομές ή λειτουργίες απαραίτητες για την επιβίωση ή αύξηση των βακτηρίων, χωρίς να προκαλούν βλάβες στον ξενιστή. Η δράση τους μπορεί να είναι βακτηριοκτόνος ή βακτηριοστατική, οπότε εμποδίζει την περαιτέρω αύξησή τους. Οι κυριότεροι μηχανισμοί δράσης τους που περιγράφονται είναι οι εξής :

- Αναστέλλουν τη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Αντιβιοτικά με τη συγκεκριμένη δράση είναι οι β-λακτάμες (πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες) και η βανκομυκίνη, οι οποίες αναστέλλουν τη σύνθεση της τρανσπεπτιδάσης. Τον ίδιο μηχανισμό δράσης έχει και η βακιτρακίνη, της οποίας η δράση εστιάζεται στην

αναστολή της μεταφοράς συστατικών από τα κυτταρικά τοιχώματα, μέσω των πρωτεϊνών μεταφορέων (Carro, 2019).

- Καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες, όπως η πολυμυξίνη Β η οποία συμπλέκεται με την κυτταρική μεμβράνη και οδηγεί στην καταστροφή της.
- Αναστέλλουν τη σύνθεση του νουκλεϊνικού οξέος. Αντιβιοτικά με τη συγκεκριμένη δράση είναι οι κινολόνες, όπως το ναλιδιξικό οξύ και η σιπροφλοξακίνη οι οποίες συμπλέκονται με τη DNA – γυράση. πολύ η αζιθρομυκίνη παρεμποδίζει την ανάστροφη αντιγραφή των ρέτρο – ιών (HIV1) (Kwon *et al.*, 2019).
- Παρεμποδίζουν την αντιγπολύ, όπως η ριφαμπικίνη η οποία συμπλέκεται μ– πολύRNA - πολυμεράση (Kwon *et al.*, 2019).
- Αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση (συνήθως τα βακτηριοστατικά αντιβιοτικά). Αντιβιοτικά με συγκεκριμένη δράση είναι οι αμινογλυκοσίδες, όπως η στρεπτομυκίνη και η νεομυκίνη και οι τετρακυκλίνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με την υπομονάδα 30S, η χλωραμφαινικόλη, με σημαντικά τοξικές παρενέργειες, που χρησιμοποιείται μόνο σε περιπτώσεις που δε μπορούν να δράσουν άλλες ουσίες και τα μακρολίδια, όπως η ερυθρομυκίνη, που αλληλεπιδρούν με την υπομονάδα 50S (Bugg and Kerr, 2019).

1.4. Περιβάλλον και αντιβιοτικά

Η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών επιτάχυνε την αντοχή στα αντιβιοτικά στο φυσικό περιβάλλον, ιδιαίτερα στο γλυκό νερό, προκαλώντας δυνητικό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία σε ολόκληρο τον κόσμο (Walsh and Amyes, 2004). Βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά έχουν βρεθεί στα υδρόβια περιβάλλοντα και στο έδαφος. Αντίσταση μπορεί να αναπτυχθεί σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (STP). Στα βιοφίλμ, η βακτηριακή πυκνότητα είναι πολύ υψηλή, τόσο σε αερόβιες όσο και αναερόβιες σηπτικές δεξαμενές STP, σε σωλήνες πόσιμου νερού και στα ιζήματα. Τα βιοφίλμ δεν αποτελούν ταξινομικό εμπόδιο στην οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού (Kummerer, 2003). Προϋπόθεση για άμεση μεταφορά της αντίστασης είναι τα βακτήρια να είναι σε θέση να επιβιώσουν, ή το γενετικό υλικό τους να είναι τουλάχιστον αρκετά σταθερό για μεταφορά στο νέο περιβάλλον π.χ. από το ανθρώπινο σώμα έως τα επιφανειακά ύδατα, το οποίο είναι ψυχρότερο και πολύ φτωχότερο σε θρεπτικά συστατικά. Υπάρχουν ενδείξεις ότι αντοχή στα αντιβιοτικά υπάρχει ήδη στα φυσικά περιβάλλοντα

και ότι μπορεί να υπάρξει ανταλλαγή μεταξύ βακτηρίων για τουλάχιστον μια δεκαετία.(Bugg and Kerr, 2019) Έρευνες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι παθογόνα βακτήρια ζώων, φυτών και ανθρώπων που απομονώθηκαν από διαφορετικά περιβάλλοντα, μεταξύ των οποίων και σταθμοί επεξεργασίας λυμάτων, μοιράζονται μια κοινή ομάδα παραγόντων αντίστασης που μπορούν εύκολα να ανταλλάσσονται. Η μεταφορά καθώς και ο νέος συνδυασμός γονιδίων αντίστασης είναι πιθανότερο να εμφανιστούν σε περιοχές με υψηλή βακτηριακή πυκνότητα, δηλαδή βιο-μεμβράνες. (Yin *et al.*, 2013) Μερικά αποτελέσματα δείχνουν ότι η μεταφορά της αντίστασης και τα ανθεκτικά βακτήρια δεν ευνοούνται σε συγκεντρώσεις αντιβιοτικών τόσο υψηλές όσο εκείνες που βρίσκονται στα αποχετευτικά λύματα των νοσοκομείων ή στα υδρόβια περιβάλλοντα. Μια σημαντική πηγή για το υλικό αντίστασης που βρίσκεται στα νοσοκομειακά λύματα, τα δημοτικά λύματα και τα STP είναι η εισροή βακτηρίων που έχουν ήδη γίνει ανθεκτικά στη χρήση αντιβιοτικών στην ιατρική περίθαλψη. (Guidi *et al.*, 2018) Συνολικά, περισσότερο από το 70% των βακτηρίων δεν είναι ευαίσθητα έναντι τουλάχιστον ενός αντιβιοτικού.(Zhao *et al.*, 2017) Πολλοί παρουσιάζουν πολλά μοτίβα αντίστασης. Το πιο συχνά οι παρατηρούμενες αντιστάσεις διαφέρουν από μελέτη σε μελέτη. Κάποιοι συγγραφείς αναφέρουν μια συσσώρευση πενικιλίνης ως επί το πλείστον αντιστάσεις αμπικιλίνης, ενώ οι οθ-Z. Οι ερευνητές αναφέρουν υψηλές επιδράσεις των αντιστάσεων βακιτρακίνης, τετρακυκλίνης ή ερυθρομυκίνης. Σε πολλές περιπτώσεις ο γενετικός κώδικας αντοχής στα αντιβιοτικά τοποθετείται επί των λεγόμενων R-πλασμιδίων που μπορούν να μεταφερθούν μεταξύ των βακτηριδίων.(Maisak, Tipmongkolsilp and Wongtavatchai, 2011)

1.5. Ανθεκτικότητα βακτηρίων

Η αντοχή στα αντιβιοτικά είναι η ικανότητα των βακτηρίων να αντιστέκονται στις επιδράσεις ενός αντιβιοτικού που ήταν προηγουμένως ευαίσθητα. Τα βακτήρια καθίστανται ανθεκτικά στα αντιβιοτικά είτε με γενετικές μεταλλάξεις είτε με την απόκτηση γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά (ARGs). (Mohan Amarasiri, Daisuke Sano, 2019). Τα υδάτινα περιβάλλοντα αναγνωρίζονται ως ένας από τους ταμειυτήρες και τις οδούς μετάδοσης για τη διάδοση της αντοχής στα αντιβιοτικά. Οι διαδικασίες

επεξεργασίας πόσιμο νερού και λυμάτων είναι ανίκανοι να απομακρύνουν πλήρως τα γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά (ARGs). Επομένως, εκτός από το πόσιμο νερό, οι άνθρωποι μπορούν να εκτεθούν στα συγκεκριμένα βακτήρια μέσω δραστηριοτήτων όπως το μπάνιο, υδρόβια αθλήματα, επαγγελματική έκθεση κατά τη διάρκεια της γεωργικής άρδευσης και κατανάλωση τροφίμων που έχουν έρθει σε επαφή με το μολυσμένο νερό.

1.6. Λίμνη Κάρλα

Στα παλιά χρόνια η λίμνη Κάρλα ήταν λίμνη στη Θεσσαλία τριγυρισμένη παντού από βουνά και ήταν σε υψηλότερο υψόμετρο από την επιφάνεια της θάλασσας. Από σεισμούς προκλήθηκε ρήγμα στα σημερινά Τέμπη και χωρίστηκε η Όσσα από τον Όλυμπο, οπότε βρήκε διέξοδο της την θάλασσα ο Πηνειός και η περιοχή αποστραγγίστηκε. Ωστόσο απομένει η λίμνη Νεσσωνίς και Βοιβηίς μικρότερη και πλησιέστερα στα παράλια. Η έκταση που καταλάμβανε η λίμνη δεν ήταν σταθερή αλλά μεταβαλλόταν ανάλογα με της εισροές και εκροές του νερού. Το χειμώνα του 1920-21 εξαιτίας των μεγάλων πλημμύρων του Πηνειού η λίμνη καταλάμβανε μεγαλύτερη έκταση στον αιώνα της, περίπου 180.000 στρέμματα με στάθμη 50 m πάνω από τη θάλασσα. Η κατασκευή αντιπλημμυρικών αναχωμάτων στο δεξιό ανάχωμα του Πηνειού βόρεια της Λάρισας από το 1936-1940 περιόρισε την υπερχειλίση του με το Ασμάκι και κατά συνέπεια την επιφάνεια της λίμνης.(Alamanos *et al.*, 2019) Το μέγιστο βάθος της από 5.5 m που ήταν πριν το 1940 μειώθηκε στα 2 m το 1950 – 51, αν και πλημμύρισε η περιοχή το 1954 – 55. Οι διακυμάνσεις της στάθμης, οι πλημμύρες της περιοχής, δημιουργία περισσότερων γεωργικών εκτάσεων και η μείωση των αλιευμάτων συντέλεσαν στην ολική αποξήρανση της λίμνης το 1962 παρά της σχετικές μελέτες που δεν προέβλεπαν κάτι τέτοιο.(Sidiropoulos *et al.*, 2019) Η σημερινή λίμνη Κάρλα τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει έναν προοδευτικό ευτροφισμό κατά τον οποίο υπάρχουν συχνές ανθίσεις κυανοβακτηρίων κατά κύριο λόγο των ειδών *Anabaenopsis elenkinii*, *Sphaerospermopsis sp.* και *Planktothrix agardhii* (Papadimitriou *et al.*, 2013). Το κλίμα της περιοχής είναι μεσογειακό και η

μέση θερμοκρασία της περιοχής είναι 16-17°C ενώ η ελάχιστη και η μέγιστη τιμή θερμοκρασίας ήταν 7°C και 31,5°C αντίστοιχα.(Mellios *et al.*, 2015).

1.7. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της ύπαρξης αντιβιοτικοανθεκτικών στο νερό του ταμιευτήρα της λίμνης Κάρλας χρησιμοποιώντας το αντιβιοτικό οξυτετρακυκλίνη (OTC), ένα αντιβιοτικό ευρέως φάσματος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Διεξαγωγή πειράματος

2.1.1 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος

Πριν γίνει η παρασκευή εξασφαλίστηκε η πλήρης αποστείρωση του χώρου και του πάγκου με την ακόλουθη διαδικασία: Καθαρισμός και απολύμανση της επιφάνειας εργασίας με χαρτί κουζίνας και οινόπνευμα. Καθ' όλη τη διάρκεια της εκτέλεσης του πειράματος ήταν αναμμένος ο λύχνος Bunsen και όλες οι εργασίες έγιναν κοντά στη φλόγα ώστε να διατηρηθούν συνθήκες ασηψίας.

Διαλέχθηκαν 6 κωνικές φιάλες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειράματος. Οι τρεις από αυτές (*Εικόνα 2*) θα περιέχουν το αντιβιοτικό που θα δημιουργήσουμε ενώ οι υπόλοιπες θα είναι καθαρές από αντιβιοτικό (*Εικόνα 1*).

Διατέθηκε νερό από την λίμνη Κάρλα σε ποσότητα 1000ml και σε αυτή την ποσότητα αντιστοιχούν 20 gr θρεπτικού υλικού LB-Medium, συνεπώς χρειάστηκε τα έξι δοχεία να περιέχουν 150 ml νερού. Βρέθηκε ότι η ποσότητα θρεπτικού υλικού που αντιστοιχεί στα 150 ml είναι 3 gr. Το ένα από τα έξι δείγματα περιείχε 200 ml αντί για 150 ml και επομένως 4 gr θρεπτικού.

Για την παρασκευή του θρεπτικού ζυγίστηκαν οι σκόνες στον ζυγό ακριβείας (τα 3gr θρεπτικού υλικού άγαρ και τα 4gr αντίστοιχα) και έπειτα τοποθετήθηκαν σε κάθε φιάλη αντίστοιχα. Στη συνέχεια προστέθηκε λίγο απεσταγμένο νερό, αναδεύτηκε και έπειτα συμπληρώθηκε έως ότου φτάσει τα 150ml για να μην επηρεαστεί η συγκέντρωση. Έγινε επανάληψη της διαδικασίας για τα 4 επόμενα δοχεία ενώ στο έκτο προστέθηκαν 200ml απεσταγμένου νερού και 4 gr θρεπτικού υλικού. Εφόσον τελείωσε η διαδικασία της δημιουργίας του θρεπτικού υποστρώματος τοποθετήθηκαν όλα τα δοχεία στον κουβά του αυτόκαυστου και προστέθηκε νερό μέχρι τις τρύπες του αυτόκαυστου. Η αποστείρωση έγινε στους 121 °C για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο. Μετά το πέρας της αποστείρωσης τα δοχεία τοποθετήθηκαν στο ψυγείο μέχρι να κατέβει η θερμοκρασία στους 45°C για να μπορεί να προστεθεί το αντιβιοτικό.

Ζυγίστηκαν 150mg οξυτετρακυκλίνης (OTC) και διαλύθηκαν σε 1,5ml απεσταγμένου νερού (stock). Το stock του αντιβιοτικού μεταφέρθηκε στην κατάψυξη.

Πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των θρεπτικών με 15ml από την λίμνη Κάρλα.

Στις 3 από τις 6 κωνικές φιάλες που περιείχαν το θρεπτικό (Εικόνα 2) προστέθηκαν 2,8 ml OTC

Stock είναι 10mg αντιβιοτικού -> x ώστε 0,17mg αντιβιοτικού στα 165ml (νερό λίμνης + θρεπτικό), 2,8ml από το stock Της OTC.

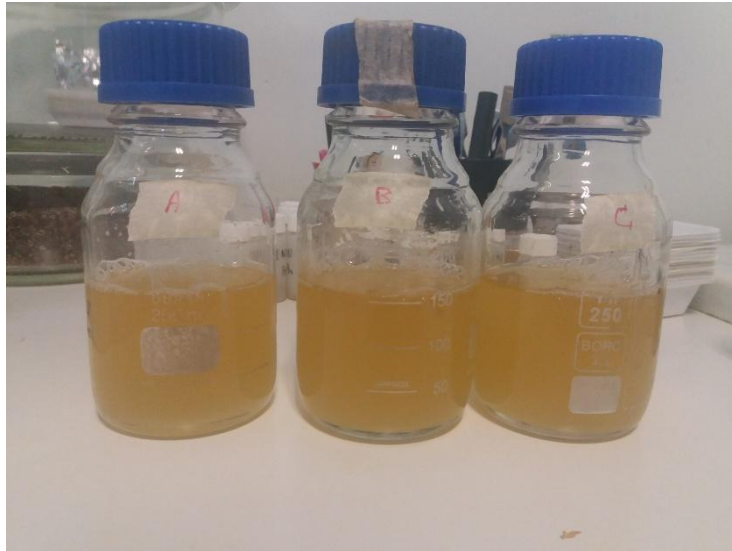
Πραγματοποιήθηκε επώαση, σε ανακινούμενο επωαστήριο όλων των θρεπτικών στους 37°C και στους 15°C αντίστοιχα.

2.1.2 Παρακολούθηση καλλιιεργειών

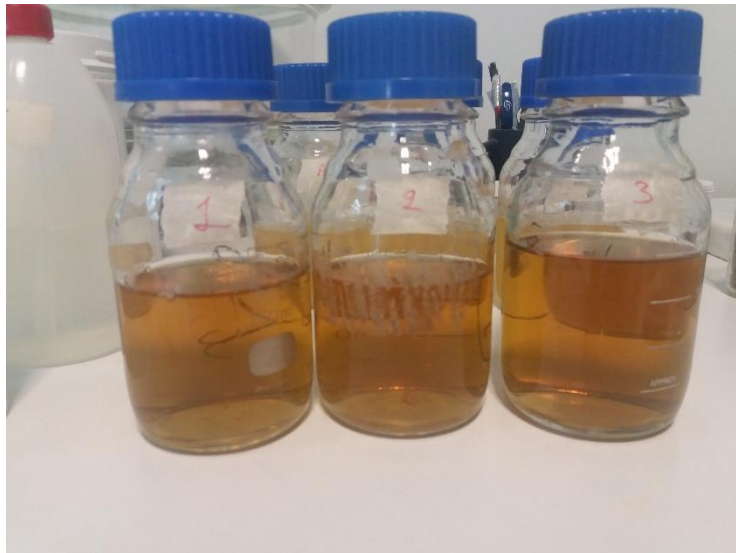
Οι 6 φιάλες μεταφέρονται από το επωαστήριο των 37°C στον πάγκο του εργαστηρίου για να γίνει ο υπολογισμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών, του νερού τις λίμνης Κάρλας, με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου (pharmaSPEC, UV1700, SHIMADZU).

Για να ξεκινήσει η διαδικασία του πειράματος πρέπει να εξασφαλιστούν ασηπτικές συνθήκες στον πάγκο εργασίας έτσι ώστε να μην επιμολυνθούν τα δείγματά μας και τα υπόλοιπα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την διεξαγωγή του πειράματος.

Χρησιμοποιώντας πάντα το λύγχο Bunsen ανοίγουμε πρώτα ένα ένα τα δοχεία τα οποία έχουμε εμβολιάσει με αντιβιοτικό (1,2,3) και με τη βοήθεια μιας πιπέτας και ενός tube, το οποίο πετιέται κάθε φορά που λαμβάνεται δείγμα, ρουφάμε ποσότητα 3 ml η οποία τοποθετείται στην κυψελίδα. Στην συνέχεια η κυψελίδα τοποθετείται μέσα στο φασματοφωτόμετρο, ενώ παράλληλα τοποθετείται και μία κυψελίδα με νερό τυφλό) για να διευκολυνθεί η διαδικασία.



Εικόνα 1 Οι φιάλες χωρίς αντιβιοτικό (A,B,C) ύστερα από κάποιο χρόνο επώασης



Εικόνα 2 Οι φιάλες με αντιβιοτικό (1,2,3) ύστερα από περίοδο επώασης



Εικόνα 3 Διαδικασία του πειράματος

Ρυθμίζουμε το φωτόμετρο να μετρήσει την απορρόφηση σε μήκος κύματος 540nm. Περιμένουμε περίπου 20min να ζεσταθεί το φωτόμετρο (δηλαδή να σταθεροποιηθεί η εκπομπή του φωτός από τις λυχνίες). Χρησιμοποιώντας το τυφλό μηδενίζουμε το όργανο έτσι ώστε το θρεπτικό να έχει μηδενική απορρόφηση. Κατόπιν εισάγουμε το δείγμα (καλλιέργεια) του οποίου τον αριθμό των βακτηριών ψάχνουμε. Οι κυψελίδες πρέπει να είναι καθαρές και τα δείγματα να μην περιέχουν φυσαλίδες. Η λεία πλευρά πρέπει να είναι πάντα κάθετα στο σημείο που διέρχεται η ακτινοβολία και η πτυχωτή παράλληλα. Μόλις καθορισθούν οι ρυθμίσεις, το φωτόμετρο είναι έτοιμο για να ξεκινήσει η καταγραφή του φάσματος απορρόφησης (ABS).

Πατάμε την έναρξη των μετρήσεων απορρόφησης. Επαναλαμβάνουμε την διαδικασία και για τα επόμενα δείγματα των δοχείων 2 και 3 καθώς επίσης και για τα A,B,C τα οποία δεν έχουν εμβολιαστεί με αντιβιοτικό. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων απορρόφησης για τα 6 δείγματα.



Εικόνα 4 Φασματοφωτόμετρο

Είναι αναγκαίο για την αξιοπιστία του πειράματος να γίνουν όσο το δυνατόν περισσότερες μετρήσεις. Συνεπώς μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα έτσι ώστε να ελέγχεται η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών. Μετά το πέρας των μετρήσεων οι φιάλες τοποθετούνται εκ νέου στο επωαστήριο για να χρησιμοποιηθούν ξανά μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, δηλαδή στην επόμενη μέτρηση.

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιείται για όλα τα δείγματα συμπεριλαμβανομένων και αυτών στους 15°C..

2.2 Τάχος αύξησης

Με τον όρο αύξηση ορίζεται κάθε μη αντιστρεπτή μεταβολή στο μέγεθος ενός κυττάρου, ενός οργάνου ή ακόμα και ενός ολόκληρου οργανισμού. Η αύξηση λοιπόν και η διαφοροποίηση αποτελούν αντίστοιχα την ποσοτική και την ποιοτική συνιστώσα της ανάπτυξης.

Για τον υπολογισμό του τάχους αύξησης στην εκθετική φάση και για τα δύο πειράματα χρησιμοποιήθηκε excel με τη βοήθεια του οποίου προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα σύμφωνα με τα διαγράμματα (Διάγραμμα 1, Διάγραμμα 2).

Συγκεκριμένα, για τα δείγματα A,B,C, όπου t_1 για τους 37°C είναι 4h και για t_2 είναι 16h, ενώ για τους 15°C , όπου t_1 είναι 33h και για t_2 είναι 53,5h. Αντίστοιχα, το $x_1=0,107$ και $x_2=1,103$ (*διάγραμμα 1*) για τους 37°C συμβολίζουν την μέση απορρόφηση του θρεπτικού υποστρώματος των δειγμάτων στις αντίστοιχες θερμοκρασίες. Τέλος, τα $x_1= 1,243$ και $x_2= 2,370$ (*διάγραμμα 2*) για τους 15°C , συμβολίζουν την μέση απορρόφηση του θρεπτικού υποστρώματος των δειγμάτων πάλι για τις αντίστοιχες θερμοκρασίες.

Πίνακας 1 Υπολογισμός τάχους αύξησης

Θερμοκρασία	Διάστημα (ώρες)	τύπος	Τάχος αύξησης
37°C	4-16 h	$\text{Ln}x_2-\text{Ln}x_1/t_2-t_1$	0,194
15°C	33-53,5 h	$\text{Ln}x_2-\text{Ln}x_1/t_2-t_1$	0,031

2.3 Διεξαγωγή στατιστικής ανάλυσης

Με την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης των μέσων όρων των μικροοργανισμών για το πείραμα στους 37°C (*Πίνακας 2*) εξετάστηκε η μηδενική υπόθεση ότι οι μέσοι όροι των δειγμάτων A,B,C και 1,2,3 είναι ίσοι. Το αποτέλεσμα της one way ANOVA για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ ήταν $p < 0,05$, συνεπώς η μηδενική υπόθεση απορρίφθηκε.

Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η τιμή $F= 2,932$ είναι μεγαλύτερη από την κριτική τιμή $F=2,621$ και ότι το $P=0,033$ είναι μικρότερο από το $\alpha=0,05$, γεγονός που σημαίνει ότι οι μέσοι δεν είναι ίσοι.

Πίνακας 2 One Way ANOVA για τους 37°C

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
A	5	3,655	0,731	0,387		
B	5	3,926	0,785	0,461		
C	5	3,4137	0,683	0,332		
	1	5	0,559	0,112	0,004	
	2	5	0,576	0,115	0,004	
	3	5	0,553	0,111	0,004	
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	2,913	5	0,583	2,932	0,033	2,621
Μέσα στις ομάδες	4,770	24	0,199			
Σύνολο	7,683	29				

Με την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης των μέσων όρων των μικροοργανισμών για το πείραμα στους 15°C (Πίνακας 3) εξετάστηκε η μηδενική υπόθεση ότι οι μέσοι όροι των δειγμάτων A,B,C και 1,2,3 είναι ίσοι. Το αποτέλεσμα της one way ANOVA για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0,05$ ήταν $P > 0,05$ γεγονός που δείχνει ότι ισχύει η μηδενική υπόθεση.

Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η τιμή $F=1,443$ είναι μικρότερη της κριτικής τιμής $F=2,409$ και ότι το $P=0,226$ είναι μεγαλύτερο του $\alpha=0,05$. Συνεπώς, ισχύει η μηδενική υπόθεση και οι μέσοι όροι είναι ίσοι.

Πίνακας 3 One Way ANOVA για τον 15°C

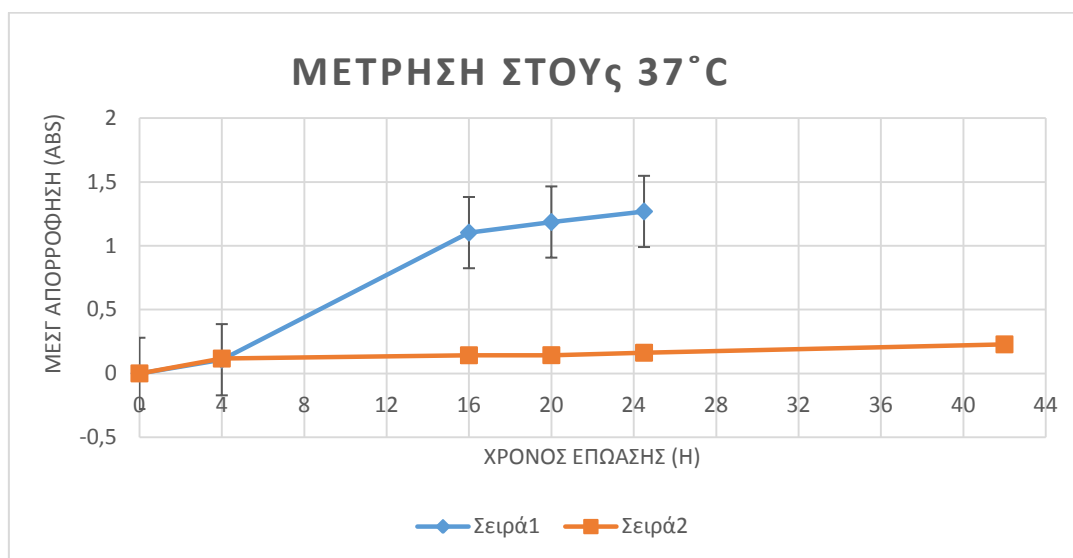
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
A	9	4,112	0,457	0,611		
B	9	5,285	0,587	0,771		
C	9	4,348	0,483	0,560		
	1	9	0,889	0,099	0,001	
	2	9	0,902	0,100	0,001	
	3	9	0,921	0,102	0,002	
ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	2,340	5	0,468	1,443	0,226	2,409
Μέσα στις ομάδες	15,569	48	0,324			
Σύνολο	17,909	53				

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Πείραμα 1^ο

Στο πρώτο πείραμα εξετάστηκε η απορρόφηση θρεπτικού υλικού από βακτήρια, σε νερό λίμνης θερμοκρασίας 37°C, έχοντας προσθέσει αντιβιοτικό OTC στα τρία δοχεία (1,2,3), καθώς και η απορρόφηση θρεπτικού υλικού από βακτήρια μη έχοντας προσθέσει κάποια ποσότητα αντιβιοτικού στα άλλα τρία δοχεία (A,B,C).

Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στις μετρήσεις και αναπαρίστανται στο διάγραμμα 1., οφείλονται καθαρά στην παρουσία και μη του αντιβιοτικού OTC.



Διάγραμμα 1 Απεικονίζει την μέση απορρόφηση του θρεπτικού υποστρώματος των βακτηρίων στους 37°C, με τον χρόνο επώασης. Series 1 χωρίς OTC, Series 2 με OTC

Όσον αφορά τα δείγματα με το αντιβιοτικό (1,2,3) με OTC στην series2 παρατηρείται ότι δεν υπάρχει κάποια ουσιαστική αύξηση κατά την διάρκεια των μετρήσεων της απορρόφησης, λόγω της δράσης της OTC, και η γραμμή βρίσκεται συνεχώς κοντά στο 0. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα υπό αυτές τις συνθήκες θερμοκρασίας, είναι αποτελεσματικό έναντι των βακτηριών που υπάρχουν στην συγκεκριμένη ποσότητα του νερού της λίμνης Κάρλας.

Αντιθέτως, σύμφωνα με την series1 που αναπαριστά τα δείγματα που δεν περιέχουν αντιβιοτικό (A,B,C), παρατηρείται ότι υπάρχουν διαφορετικές φάσεις που δείχνουν ότι υπάρχει αύξηση του πληθυσμού. Κατά την λανθάνουσα φάση, η οποία διαρκεί από την ώρα 0 έως και 4 ώρες μετά, ο πληθυσμός των βακτηρίων παραμένει σχεδόν σταθερός. Αυτό σημαίνει ότι οι μικροοργανισμοί χρειάζονται κάποιο χρονικό διάστημα για να προσαρμοστούν στις καινούργιες συνθήκες και να αρχίσουν να αναπτύσσονται. Η εκθετική φάση όπου διπλασιάζεται ο αριθμός των κυττάρων και όλες οι συνθήκες είναι βέλτιστες, όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση οξυγόνου, η ύπαρξη άφθονων θρεπτικών στο υλικό καλλιέργειας, παρουσιάζεται στο διάστημα από 4 έως και 16 ώρες και το τάχος αύξησης είναι ίσο με $0,194 h^{-1}$. (πίνακας 1)

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται αναλυτικότερα στον πίνακα 4.

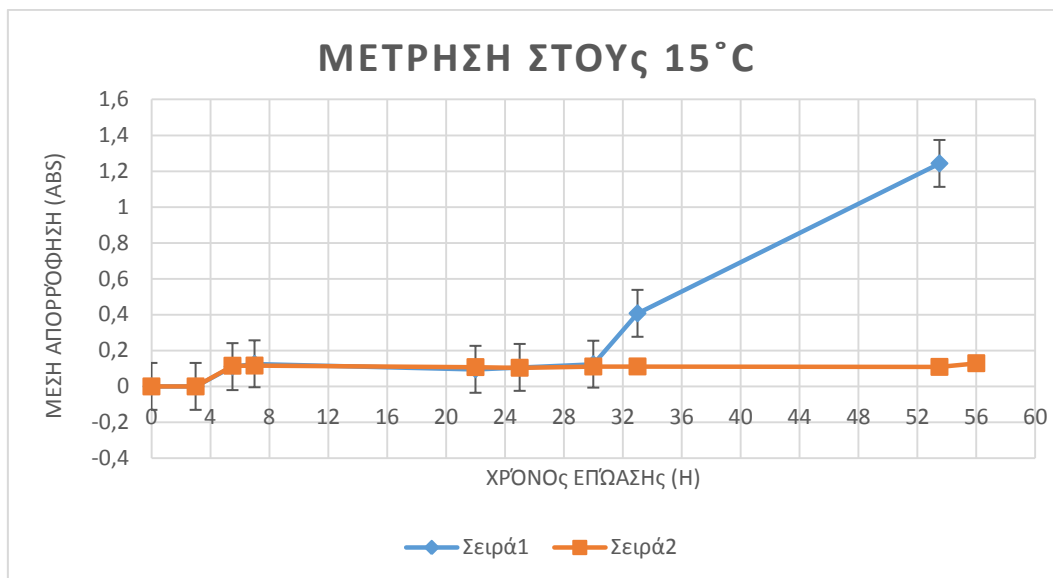
Πίνακας 4 Αποτελέσματα μετρήσεων στους $37^{\circ}C$

		A	B	C	1	2	3
T0=	0	0	0	0	0	0	0
T1=	4	0,11	0,105	0,106	0,112	0,124	0,113
T2=	16	1,129	1,1	1,08	0,145	0,14	0,141
T3=	20	1,122	1,327	1,109	0,142	0,146	0,14
T4=	24,5	1,294	1,394	1,119	0,16	0,166	0,159

3.2. Πείραμα 2^ο

Στο δεύτερο πείραμα εξετάστηκε η απορρόφηση θρεπτικού υλικού από τα βακτήρια στους $15^{\circ}C$, σε τρία δείγματα με αντιβιοτικό (1,2,3) και σε άλλα τρία χωρίς αντιβιοτικό (A,B,C), ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με το πρώτο πείραμα.

Στο διάγραμμα 2 αναπαρίστανται οι διακυμάνσεις των μετρήσεων του δεύτερου πειράματος.



Διάγραμμα 2 Απεικονίζει την μέση απορρόφηση του θρεπτικού υποστρώματος των βακτηρίων στους 15°C, με τον χρόνο επώασης. Series 1 χωρίς OTC, Series 2 με OTC

Παρατηρείται πάλι ότι τα δείγματα που περιέχουν αντιβιοτικό δεν παρουσιάζουν κάποια αύξηση και όλες οι τιμές της απορρόφησης βρίσκονται κοντά στο 0. Αυτό σαφέστατα υποδηλώνει πως και σε αυτή την περίπτωση η δράση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού στους 15°C είναι αποτελεσματική έναντι της ανάπτυξης των βακτηρίων στο νερό της λίμνης.

Στα δείγματα που δεν περιέχουν αντιβιοτικό υπάρχει αύξηση της μέσης απορρόφησης ύστερα από αρκετές ώρες συγκριτικά με το πρώτο πείραμα. Η λανθάνουσα φάση, όπου ο μικροβιακός πληθυσμός ενοφθαλμίζεται στο θρεπτικό μέσο διαρκεί, από την αρχική ώρα 0 που ξεκινά η επώαση, 33 ώρες, ενώ η εκθετική φάση κατά την οποία διπλασιάζεται ο αριθμός των κυττάρων παρουσιάζεται στο διάστημα από 33 έως και 53,5 και το τάχος αύξησης είναι ίσο με $0,031 h^{-1}$. (πίνακας 1)

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται αναλυτικότερα στον πίνακα 5.

Πίνακας 5 Αποτελέσματα μετρήσεων στους 15°C

		A	B	C	1	2	3
T0=	0	0	0	0	0	0	0
T1=	3	0,113	0,102	0,116	0,119	0,111	0,116
T2=	5,5	0,13	0,125	0,123	0,114	0,122	0,113
T3=	7	0,099	0,091	0,096	0,107	0,108	0,108
T4=	22	0,12	0,099	0,099	0,104	0,103	0,105
T5=	25	0,112	0,141	0,119	0,11	0,112	0,111
T6=	30	0,234	0,576	0,412	0,109	0,111	0,114
T7=	33	0,882	1,715	1,132	0,105	0,114	0,108
T8=	53,5	2,422	2,436	2,251	0,121	0,121	0,146

3.3. Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους κύριους, αν όχι ο κυριότερος, από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την αύξηση και την επιβίωση των μικροοργανισμών. Σε πολύ ψυχρά ή πολύ θερμά περιβάλλοντα οι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται, οι χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις του κυττάρου εκτελούνται με ταχύτερους ρυθμούς και η αύξηση επιταχύνεται. Ωστόσο, πάνω από μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, υπάρχει ενδεχόμενο κάποιες πρωτεΐνες να υποστούν σοβαρές, μη αντιστρεπτές αλλοιώσεις. Επομένως, όταν η θερμοκρασία αυξάνεται μέσα σε καθορισμένα όρια, η αύξηση και οι μεταβολικές λειτουργίες επιταχύνονται μέχρι ενός σημείου, στο οποίο αρχίζουν να εκτελούνται αντιδράσεις απενεργοποίησης. Πέρα από αυτό το σημείο οι κυτταρικές λειτουργίες πέφτουν ακαριαία στο μηδέν.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, στην λίμνη Κάρλα, την θερινή περίοδο οι υψηλές θερμοκρασίες που παρατηρούνται (31,5°C για θερινούς μήνες) οδηγούν σε υπέρμετρη αύξηση της χλωρίδας της λίμνης κι αυτό πολλές φορές σε συνδυασμό με την ύπαρξη θρεπτικών αλάτων (φωσφορικών, νιτρικών) μπορεί να οδηγήσει σε ευτροφισμό. Αποτέλεσμα του ευτροφισμού είναι λιγότερο διαλυμένο οξυγόνο, μικρότερη διαφάνεια των νερών, δημιουργία δυσμενών συνθηκών για πολλούς από τους υδρόβιους οργανισμούς και ανάπτυξη θειοβακτηρίων.

Η θερμοκρασία των 37°C που επιλέχθηκε είναι ιδανική για την ανάπτυξη φυτικών οργανισμών της λίμνης και συνεπώς την ανάπτυξη στελεχών βακτηρίων (μεσόφιλων). Συγκεκριμένα, σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε στην Κάρλα σχετικά με τον ευτροφισμό διαπιστώθηκε ότι στους 37°C το *Enterobacter*, Gram-αρνητικό βακτηρίδιο, έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης, όπως επίσης και το Gram-αρνητικό *Pseudomonas aeruginosa*. (Sidiropoulos, 2019).

Τους χειμερινούς μήνες η θερμοκρασία του νερού θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ένας περιοριστικός παράγοντας για την βακτηριακή αύξηση για τιμές μικρότερες των 12°C, όμως για την θερμοκρασία των 15°C υπάρχει αύξηση μικροβιακού φορτίου, αλλά με χαμηλότερο ρυθμό.

3.4. Θρεπτικό υπόστρωμα λίμνης

Η ύπαρξη ποσότητας βακτηριδίων στο νερό που συλλέχθηκε ήταν αναμενόμενη. Η αύξηση της συγκέντρωσης θρεπτικών ουσιών σε λίμνες, κυρίως ενώσεων αζώτου και φωσφόρου, προκαλεί υπερανάπτυξη των αλγών και των ανώτερων μορφών φυτικής ζωής με αποτέλεσμα τη σκίαση του νερού και την παρεμπόδιση της διάδοσης της ηλιακής ακτινοβολίας σε όλο το βάθος του υδάτινου σώματος. Το γεγονός αυτό προκαλεί το θάνατο των φωτοσυνθετικών οργανισμών του πυθμένα και συνεπώς τον εμπλουτισμό του οικοσυστήματος με οργανικές ουσίες λόγω της κατάλυσης της περικυτταρικής τους μεμβράνης. Οι οργανικές ουσίες αποτελούν τροφή για ένα άλλο είδος μικροοργανισμών, των ετεροτροφικών, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της ανάπτυξής τους με ταυτόχρονη κατανάλωση του διαλυμένου οξυγόνου των υδάτων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την παρεμπόδιση της φωτοσύνθεσης, άρα και της ανανέωσης του διαλυμένου οξυγόνου στο οικοσύστημα, προκαλεί αποξυγόνωση του υδάτινου σώματος εξαφανίζοντας τις ανώτερες μη φωτοσυνθετικές μορφές ζωής. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως ευτροφισμός. Ο βασικότερος ίσως παράγοντας αύξησης της συγκέντρωσης των θρεπτικών συστατικών ενός υδάτινου οικοσυστήματος είναι η απόρριψη σε αυτό ανεπεξέργαστων ή ανεπαρκώς επεξεργασμένων λυμάτων ευτροφισμός.

Συνεπώς, η θερμοκρασία είναι ο κύριος λόγος για τον οποίο η απορρόφηση του θρεπτικού υλικού και συγκεκριμένα η εκθετική φάση αύξησης από τους

μικροοργανισμούς, στους 37°C , ξεκινάει αμέσως, ενώ στους 15°C ξεκινάει μετά από περισσότερες ώρες.

3.5. pH και οξυτετρακυκλίνη

Κάθε οργανισμός έχει ένα εύρος pH στο οποίο είναι πιθανή η ανάπτυξή του. Οι περισσότεροι οργανισμοί έχουν εύρος pH για ανάπτυξη 2-3 μονάδες, ενώ τα φυσικά περιβάλλοντα στην πλειοψηφία τους, έχουν τιμές pH μεταξύ 5 και 9, και είναι πολύ συνηθισμένο οι διάφοροι οργανισμοί να έχουν άριστο ρυθμό ανάπτυξης σε αυτό το εύρος. Λίγα μόνο είδη μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές pH μικρότερες από 2 ή μεγαλύτερες από 10.

Η οξυτετρακυκλίνη (OTC) που χρησιμοποιήθηκε ως αντιβιοτικό στα πειράματά μας έχει Ph κοντά στο 5,6 , συνεπώς είναι ευρέως φάσματος φυσικός βακτηριοστατικός παράγοντας και καλύπτει μεγάλο εύρος μικροοργανισμών. Επιπλέον δεν παρουσιάζει σημαντική τοξική δράση εναντίον ευκαρυωτικών κυττάρων και η παρασκευή της είναι σχετικά φθηνή.

Αναστέλλει την αύξηση των βακτηρίων προκαλώντας αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (εμπόδιση της μετάφρασης του mRNA), καθώς ενώνεται με την 30S ριβοσωμική υπομονάδα των βακτηριακών ριβοσωμάτων. Το παραπάνω επιτυγχάνεται με διάσπαση των δεσμών κωδικόνιο - αντικωδικόνιο.

3.6. LB-Medium

Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος, στα δύο πειράματα, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό LB-Medium. Το LB- Medium χρησιμοποιείται ευρέως για την καλλιέργεια βακτηριακών καλλιεργειών, κυρίως επειδή είναι εύκολο να παρασκευαστεί και παρέχει μια ευρεία βάση θρεπτικών ουσιών. Ο ζωμός LB περιέχει, ανά ml, 10 mg τρυπτόνης (ένα μίγμα πεπτιδίων που σχηματίζεται από την πέψη καζεΐνης με το παγκρεατικό ένζυμο, τρυψίνη), 5 mg εκχυλίσματος ζυμομυκήτων (αυτόλυμα κυττάρων ζύμης) και 5 ή 10 mg NaCl.

Δεδομένου ότι μόνο οι βακτηριακές καλλιέργειες σε ισορροπημένη ανάπτυξη έχουν ένα αναπαραγωγικό μέσο μέγεθος κυττάρων και χημική σύνθεση, κανένα από τα συστατικά των υγρών μέσων δεν θα πρέπει να εξαντληθεί κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της καλλιέργειας. Αυτό συμβαίνει με το ζυμό LB.(Sabtu *et al.*, 2011).

3.7. Στατιστική ανάλυση δεδομένων με τη χρήση της ANOVA

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ANOVA για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων του πειράματος. Η ANOVA χρησιμοποιείται για να ελέγξουμε την ισότητα μεταξύ k πληθυσμιακών μέσων $\mu_1, \mu_2, \mu_3 \dots \mu_k$ (για $k > 2$). Η περίπτωση έλεγχου των μέσων k πληθυσμών παίρνει τη μορφή : $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots \mu_k$, H_1 : όχι όλοι πληθυσμιακοί μέσοι ίσοι ($\mu_1 \mu_2 \mu_3 \dots \mu_k$).

Αν η μηδενική υπόθεση είναι αληθής τότε όλες οι διακυμάνσεις στα δεδομένα μπορούν να χαρακτηριστούν καθαρά σε όρους μεταβλητότητας μέσα σε κάθε δείγμα. Αν από την άλλη, οι πληθυσμιακοί μέσοι διαφέρουν, τότε θα υπάρχει κάποια επιπρόσθετη συστηματική μεταβλητότητα στα δείγματα μεταξύ των ομάδων. Αν παρουσιάζεται κάποια μεταβλητότητα μεταξύ των ομάδων, τότε μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι κάθε δείγμα έχει εξαχθεί από διαφορετική κατανομή (η οποία, με δεδομένη την υπόθεση ότι οι πληθυσμοί έχουν ίσες διακυμάνσεις, υποθέτει διαφορετικούς μέσους για κάθε πληθυσμό). Σύμφωνα με τη διαδικασία της ANOVA, πρώτα βρίσκουμε την πληθυσμιακή διακύμανση από τη διακύμανση μεταξύ των δειγματικών μέσων (I), στη συνέχεια βρίσκουμε την πληθυσμιακή διακύμανση από τη διακύμανση του κάθε δείγματος (II), και στο τέλος υπολογίζουμε τον λόγο F από τη διαίρεση των 2 αυτών διακυμάνσεων ($F = I/II$).

Αν η υπολογισμένη τιμή του F είναι υψηλότερη από την κριτική τιμή της κατανομής F , τότε η υπόθεση H_0 απορρίπτεται, γεγονός που σημαίνει ότι οι μέσοι δεν είναι ίσοι. Οι βαθμοί ελευθερίας για τον αριθμητή δίνονται από τον αριθμό των δειγμάτων αφαιρώντας 1 και οι βαθμοί ελευθερίας για τον παρονομαστή για το πλήθος των παρατηρήσεων όλων των δειγμάτων ($N = n_1 + n_2 + \dots + n_k$) αφαιρώντας τον αριθμό των δειγμάτων k . Δηλαδή, οι βαθμοί ελευθερίας του παρονομαστή δίνονται ως $N - k$. (Γεώργιος Εμμ. Χάλκος 2011) Συνεπώς, εφαρμόζοντας ANOVA για τα δείγματα A,B,C

και 1,2,3 για τους 37°C βρέθηκε πως οι μέσοι όροι των δειγμάτων δεν είναι ίσοι μεταξύ τους. Αυτό φαίνεται και από τα αποτελέσματα των μετρήσεων που δείχνουν ότι η μέση απορρόφηση των A,B,C είναι μεγαλύτερη των 1,2,3 εφόσον στα τελευταία δεν υπήρχε ουσιαστική αύξηση εξαιτίας του αντιβιοτικού (OTC).

Η αντίστοιχη εφαρμογή της ANOVA για τα δείγματα A,B,C και 1,2,3 για τους 15°C έδειξε πως οι μέσοι όροι των δειγμάτων είναι ίσοι μεταξύ τους παρόλο που το αντιβιοτικό ήταν αποτελεσματικό και σε αυτήν θερμοκρασία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στους 15°C η αύξηση των μικροοργανισμών στα δείγματα A,B,C (χωρίς αντιβιοτικό) καθυστέρησε λόγω του ότι τα βακτήρια του συγκεκριμένου ταμειυτήρα δεν αναπτύσσονται με τον ίδιο ρυθμό σε αυτήν την θερμοκρασία. Γεγονός που αποδεικνύει και το *τάχος* αύξησης (πίνακας 1).

3.8. Εντοπισμός αντιβιοτικοανθεκτικών βακτηρίων στον ποταμό Mhlathuze

Στη Νότια Αφρική, όπως και σε άλλες αναπτυσσόμενες χώρες, η παροχή πόσιμου νερού συνεχίζει να είναι μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις που αντιμετωπίζει η κυβέρνηση, λόγω της ρύπανσης των επιφανειακών υδάτων. Αυτό το πρόβλημα επιδεινώθηκε από την έλλειψη συστημάτων υγιεινής στις περισσότερες αγροτικές κοινότητες, και αύξησε τον κίνδυνο επιδημιών που μεταδίδονται από το νερό.

Ο ποταμός Mhlathuze υποστηρίζει μια ταχέως αναπτυσσόμενη γεωργική και βιομηχανική κοινότητα και ένα μεγάλο ποσοστό της περιοχής χρησιμοποιεί τον νερό του συγκεκριμένου ποταμού. Για να εντοπιστούν τα στελέχη εκείνα των βακτηριδίων που είναι ανθεκτικά σε ομάδα αντιβιοτικών πραγματοποιήθηκε πείραμα στον συγκεκριμένο ταμειυτήρα.

Δείγματα νερού συλλέχθηκαν δύο εβδομάδες από πέντε τοποθεσίες κατά μήκος της ανατολικής περιοχής του ποταμού Mhlathuze μεταξύ Μαρτίου 2001 και Φεβρουαρίου 2002.

3.8.1. Δοκιμή ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

Τα απομονωμένα μικρόβια ελέγχθηκαν για την ευαισθησία τους σε δεκαπέντε αντιβιοτικά χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διάχυσης δίσκου σε άγαρ Hinton – Mueller. Από αυτά τα μικρόβια εκείνα που έδειξαν αντίσταση σε τρία ή περισσότερα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν για το μοριακό χαρακτηρισμό της αντοχής στα αντιβιοτικά χρησιμοποιώντας PCR για ανίχνευση θραυσμάτων γονιδίων.

3.8.2. Στατιστική ανάλυση

Όλα τα δεδομένα ποσοστού μετασηματίστηκαν πριν από την ανάλυση. Χρησιμοποιήθηκαν ζευγάρια t-test για να εξεταστεί η στατιστική σημασία μεταξύ διαφορετικών γενών εντερικών βακτηρίων. Ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (r) χρησιμοποιήθηκε για να δείξει συσχέτιση μεταξύ των δεδομένων περιβαλλοντικής αντοχής στα αντιβιοτικά.

3.8.3. Αποτελέσματα

Απομονώθηκαν συνολικά 114 εντερικά βακτήρια: *E. coli* (42), *Citrobacter freundii* (27), *Klebsiella spp.* (23), *Enterobacter spp.* (12), *Serratia marcescens* (7) και *Proteus spp.* (3). Η πλειοψηφία (97%) ήταν ανθεκτική σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό, ενώ το 80% ήταν ανθεκτικά σε τουλάχιστον 2. Όλα τα προϊόντα απομόνωσης ήταν ευαίσθητα στη γενταμικίνη και τη σιπροφλοξασίνη. Η αντίσταση ήταν γενικά υψηλή για τα παλαιότερα και πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά, β-λακτάμες (πενικιλίνη 72,6%, αμπικιλίνη 43,6%), κεφαλοσπορίνες (κεφαλοθίνη 26,6%), αμινοκουμαρίνες (νοβοβοκίνη 52,1%) και ανσαμυκίνες (ριφαμπικίνη 67,0%).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας που παρουσιάστηκαν παραπάνω, μπορούμε να πούμε πως οι μετρήσεις των δειγμάτων χωρίς αντιβιοτικό (OTC) στα δείγματα A,B,C στους 37°C έδειξε μία σημαντική αύξηση του βακτηριδιακού πληθυσμού η οποία πραγματοποιήθηκε από την πρώτη μέρα που τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο επωαστήριο. Το ίδιο δεν συνέβη με τα δείγματα A,B,C στους 15°C, καθώς οι μικροοργανισμοί στην συγκεκριμένη θερμοκρασία χρειάστηκαν μεγαλύτερο διάστημα για να αναπτυχθούν. Αυτό δείχνει πως η λίμνη κατά τους θερινούς μήνες που η θερμοκρασία μπορεί να αγγίξει τους 37°C παρουσιάζει ανεπτυγμένο μικροβιακό φορτίο σε σύγκριση με τους χειμερινούς μήνες που οι θερμοκρασίες πέφτουν ακόμη και κάτω από τους 10 °C.

Προσθέτοντας την οξυτετρακυκλίνη στα επόμενα δείγματα 1,2,3 στους 37°C, καθώς και στους 15°C φάνηκε πως τα δείγματα δεν παρουσίαζαν κάποια αύξηση, αφού οι τιμές των μετρήσεων ήταν σε κάθε διάστημα κοντά στο 0.

Το γεγονός αυτό δείχνει πως το συγκεκριμένο αντιβιοτικό (OTC), το οποίο εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση εναντίον ενός ευρέως φάσματος μικροοργανισμών είναι αποτελεσματικό και έναντι των βακτηρίων του νερού την λίμνης Κάρλας.

Οι παράμετροι που προαναφέρθηκαν, όπως η θερμοκρασία, το pH συνέβαλαν στον βαθμό αύξησης των μικροοργανισμών του συγκεκριμένου ταμιευτήρα, όμως όλα δείχνουν ότι δεν παρεμποδίζουν την αύξηση τους όπως συμβαίνει με την οξυτετρακυκλίνη.

Η σύγκριση του ταμιευτήρα της Κάρλας και αυτού του Mhlathuze, δείχνει ότι στο πείραμά μας, δηλαδή στην πρώτη περίπτωση, τα βακτήρια που βρίσκονταν στα

δείγματα του νερού της Κάρλας δεν αντιστάθηκαν στην οξυτετρακυκλίνη η οποία, όμως όπως έχει αναφερθεί είναι βακτηριοστατική έναντι πολλών ειδών βακτηριδίων. Η αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου αντιβιοτικού δείχνει επίσης ότι ο συγκεκριμένος ταμιευτήρας πιθανόν να μην δέχεται σημαντικές ποσότητες λυμάτων και προϊόντων ανθρώπινης προέλευσης (αστικά λύματα, απόβλητα), τα οποία δημιουργούν ανθεκτικά στελέχη βακτηριδίων (ARB) και γονιδίων (ARG).

Αντίθετα, στην αφρικανική λίμνη που πραγματοποιήθηκε το πείραμα τα στελέχη βακτηριδίων τα οποία εντοπίστηκαν και παράλληλα ταχτοποιήθηκαν εμφανίστηκαν ανθεκτικά έναντι διαφόρων αντιβιοτικών που εφαρμόστηκαν στα δείγματα νερού που συλλέχθηκαν. Συγκεκριμένα, τα δείγματα με το μεγαλύτερο ποσοστό αντοχής στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν πάρθηκαν από περιοχές του ποταμού που βρίσκονταν κοντά σε βιομηχανικές περιοχές. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την ύπαρξη ανθεκτικών μικροοργανισμών σε ταμιευτήρες αποδοχής αστικών λυμάτων, βαρέων μετάλλων (γεωργικές δραστηριότητες).

Πολλές φορές ταμιευτήρες γλυκού νερού που είναι εκτεθειμένοι σε υψηλό μικροβιακό φορτίο, είτε λόγω ανθρώπινης είτε λόγω φυσικής προέλευσης, λειτουργούν ως μέσον όχι μόνο επιβίωσής τους, αλλά και ως μέσον εξάπλωσης πολλών μικροοργανισμών. Ωστόσο απαιτούνται συνεχείς έρευνες ώστε να προσδιορίζεται ο βαθμός στον οποίο λαμβάνει χώρα η διάδοση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και να προλαμβάνεται ο κίνδυνος για την υγεία ανθρώπων και ζώων που εξαρτώνται από τη λίμνη για κατανάλωση νερού.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Γεώργιος Εμμ. Χάλκος (2011). Στατιστική: θεωρία, εφαρμογές και χρήσεις στατιστικών προγραμμάτων σε Η/Υ.

Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker (2014). Βιολογία των μικροοργανισμών. Τόμος Ι.

Alamanos, A. *et al.* (2019) ‘Integrated Hydro-Economic Modeling for Sustainable Water Resources Management in Data-Scarce Areas: The Case of Lake Karla Watershed in Greece’, *Water Resources Management*. *Water Resources Management*, 33(8), pp. 2775–2790. doi: 10.1007/s11269-019-02241-8.

Bugg, T. D. H. and Kerr, R. V. (2019) ‘Mechanism of action of nucleoside antibacterial natural product antibiotics’, *Journal of Antibiotics*. Springer US, 72(12), pp. 865–876.

Carro, L. (2019) ‘Recent progress in the development of small-molecule FtsZ inhibitors as chemical tools for the development of novel antibiotics’, *Antibiotics*, 8(4). doi: 10.3390/antibiotics8040217.

Guidi, L. R. *et al.* (2018) ‘Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and rapid LC-MS/MS method’, *Food Chemistry*. Elsevier, 245(October 2017), pp. 1232–1238. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.11.094.

Khachatourians, G. G. (1998) ‘Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria’, *CMAJ*.

Kummerer, K. (2003) ‘Significance of antibiotics in the environment’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(2), pp. 317–317. doi: 10.1093/jac/dkg386.

Kwon, J. Y. *et al.* (2019) ‘Mechanism of action of antimicrobial peptide P5 truncations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*’, *AMB Express*. Springer

Berlin Heidelberg, 9(1). doi: 10.1186/s13568-019-0843-0.

Maisak, H., Tipmongkolsilp, N. and Wongtavatchai, J. (2011) 'Minimum inhibitory concentrations of antimicrobials against clinical *Vibrio* and *Streptococcus* isolated from aquaculture', *Diseases in Asian Aquaculture*, pp. 309–316.

Martins, V. V. *et al.* (2014) 'Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: A human health hazard', *Environmental Science and Pollution Research*. doi: 10.1007/s11356-014-2509-4.

Mellios, N. *et al.* (2015) 'Mathematical modeling of trophic state and nutrient flows of Lake Karla using the PCLake model', *Environmental Processes*, 2, pp. S85–S100. doi: 10.1007/s40710-015-0098-y.

Sabtu, N. H. *et al.* (2011) 'The effect of titanium dioxide to the bacterial growth on lysogeny broth agar', in *IFMBE Proceedings*. doi: 10.1007/978-3-642-21729-6_29.

Sidiropoulos, P. *et al.* (2019) 'Groundwater nitrate contamination integrated modeling for climate and water resources scenarios: The case of Lake Karla over-exploited aquifer', *Water (Switzerland)*, 11(6). doi: 10.3390/w11061201.

Sukul, P. and Spiteller, M. (2007) 'Fluoroquinolone antibiotics in the environment', *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. doi: 10.1007/978-0-387-69163-3_5.

Walsh, F. M. and Amyes, S. G. B. (2004) 'Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens', *Current Opinion in Microbiology*, 7(5), pp. 439–444. doi: 10.1016/j.mib.2004.08.007.

Witte, W. (1998) 'Medical consequences of antibiotics use in agriculture', *Science*. doi: 10.1126/science.279.5353.996.

Yin, Q. *et al.* (2013) 'Occurrence and distribution of antibiotic-resistant bacteria and

transfer of resistance genes in Lake Taihu', *Microbes and Environments*, 28(4), pp. 479–486. doi: 10.1264/jsme2.ME13098.

Zhao, Z. *et al.* (2017) 'Nutrients, heavy metals and microbial communities co-driven distribution of antibiotic resistance genes in adjacent environment of mariculture', *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 220, pp. 909–918. doi: 10.1016/j.envpol.2016.10.075.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Εικόνα 1 Οι φιάλες χωρίς αντιβιοτικό (A,B,C) ύστερα από κάποιο χρόνο επώασης	10
Εικόνα 2 Οι φιάλες με αντιβιοτικό (1,2,3) ύστερα από περίοδο επώασης	10
Εικόνα 3 Διαδικασία του πειράματος.....	11
Εικόνα 4 Φασματοφωτόμετρο.....	12

Διάγραμμα 1 Απεικονίζει την μέση απορρόφηση του θρεπτικού υποστρώματος των βακτηρίων στους 37°C, με τον χρόνο επώασης. Series 1 χωρίς OTC, Series 2 με OTC

Διάγραμμα 2 Απεικονίζει την μέση απορρόφηση του θρεπτικού υποστρώματος των βακτηρίων στους 15°C, με τον χρόνο επώασης. Series 1 χωρίς OTC, Series 2 με OTC

Πίνακας 1 Υπολογισμός τάχους αύξησης.....	13
Πίνακας 2 One Way ANOVA για τους 37C.....	14
Πίνακας 3 One Way ANOVA για του 15C.....	14
Πίνακας 4 Αποτελέσματα μετρήσεων στους 37C.....	16
Πίνακας 5 Αποτελέσματα μετρήσεων στους 15C.....	18

ABSTRACT

A large number of microbes grow in aquatic ecosystems and especially in freshwater aquifers, such as lakes and rivers, due to the conditions that prevail and favor their growth. In the present study, the existence of antibiotic-resistant bacteria in the water of the Carla reservoir was studied. For this purpose a quantity of water was collected, that was used for the experiment, and antibiotic oxytetracycline was added in some samples. Measurements performed in laboratory under specific conditions showed that the use of the antibiotic (OTC) in the isolated water samples contributed to the inhibition of the growth of the bacteria that were present. The measurements were made with the help of a spectrophotometer, while the incubation of the samples was carried out at 37 ° C and 15 ° C using a nutrient medium, LB-Medium, which helped the growth of bacteria. Statistical analysis of the data collected showed that the antibiotic oxytetracycline inhibited the growth of bacteria in the samples and subsequently caused their death.

Key words: bacteria, antibiotic resistant, oxytetracycline, temperature, lake Carla