



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Παρουσία ανθεκτικού σε οξυτετρακυκλίνη βακτηριοπλαγκτού στον  
ταμιευτήρα νερού Κάρλα»**

**Λύτρα Χαρίκλεια**  
**Νικολαΐδη Μαριέττα**

**Βόλος, 2021**

**«Παρουσία ανθεκτικού σε οξυτετρακυκλίνη βακτηριοπλαγκτού στον ταμειυτήρα  
νερού Κάρλα»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :**

- 1. Κωνσταντίνος Κορμάς, Καθηγητής, Επιβλέπων**
- 2. Γεώργιος Μιχαήλ, Επίκουρος Καθηγητής, Μέλος**
- 3. Ελένη Γκολομάζου Επίκουρη Καθηγήτρια, Μέλος**

*Αφιερώνεται στις οικογένειες μας.*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μας κύριο Κορμά Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθεια του στη συγγραφή της παρούσας ερευνητικής εργασίας καθώς και για τη γενικότερη άριστη συνεργασία μας. Θα θέλαμε επίσης να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας στην κυρία Παπαδημητρίου Φαίη για την βοήθεια της στην υλοποίηση του εργαστηριακού μέρους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα ερευνητική εργασία διενεργήθηκε με σκοπό την εύρεση βακτηρίων ανθεκτικών στο αντιβιοτικό οξυτετρακυκλίνη με δείγμα από τον ταμιευτήρα της Κάρλας. Για δεκαετίες, τα αντιβιοτικά έχουν συνταγογραφηθεί ευρέως για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών σε ανθρώπους και ζώα. Επιπλέον, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται σε παγκόσμια κλίμακα στα ζώα με σκοπό την αύξηση της παραγωγής κρέατος με την πρόληψη λοιμώξεων και την επίτευξη της μέγιστης ανάπτυξης. Η παγκόσμια κατανάλωση αντιβακτηριακών φαρμάκων αντανάκλαται άμεσα με την παρουσία τους σε διάφορα συστήματα του περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένου του υδάτινου περιβάλλοντος. Υπολογίζεται ότι ετησίως εισάγονται στο περιβάλλον μερικές χιλιάδες τόνοι αντιμικροβιακών συμπεριλαμβανομένων των υποπροϊόντων τους. Τα κτηνιατρικά φάρμακα μπορούν να αποτελέσουν την κύρια πηγή ρύπανσης από αντιμικροβιακά φαρμακευτικά προϊόντα στις γεωργικές περιοχές ή στις λεκάνες απορροής που είναι κυρίαρχη η γεωργική δραστηριότητα. Για την πραγματοποίηση του πειράματος, πάρθηκε δείγμα νερού από τον ταμιευτήρα της Κάρλας. Σε κωνικές φιάλες έλαβε χώρα υγρή καλλιέργεια δείγματος, παρουσία θρεπτικού υλικού, ενώ σε ίδιο αριθμό φιαλών πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια παρουσία δείγματος, θρεπτικού υλικού και του επιλεγμένου αντιβιοτικού της οξυτετρακυκλίνης. Η παραπάνω διαδικασία έγινε πρώτα στην θερμοκρασία των 37°C κι έπειτα στη θερμοκρασία των 15°C. Μετά το πέρας των μετρήσεων δεν βρέθηκε ανθεκτικότητα στην οξυτετρακυκλίνη και στις δυο θερμοκρασίες.

Λέξεις κλειδιά : βακτήρια, αντιβιοτικά, οξυτετρακυκλίνη, ανθεκτικότητα, λίμνη.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>8</b>
1.1 Βακτήρια σε λιμναία οικοσυστήματα.....	8
1.2 Λίμνη Κάρλα.....	9
1.3 Αντιβιοτικά.....	10
1.4 Αντοχή στα αντιβιοτικά.....	10
1.5 Οξυτετρακυκλίνη (OTC).....	11
1.6 Σκοπός της έρευνας.....	12
<b>2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>13</b>
2.1 Δειγματοληψία.....	13
2.2 Παρασκευή θρεπτικού υλικού.....	13
2.3 Προσθήκη αντιβιοτικού.....	14
2.4 Παρακολούθηση καλλιέργειών.....	14
2.5 Κωνική φιάλη με αμπικιλίνη.....	17
2.6 Τάχος αύξησης.....	17
2.7 Διαγράμματα και Στατιστική ανάλυση.....	18
2.8 Ανάλυση διακύμανσης ή ανάλυση διασποράς (ANOVA).....	18
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>20</b>
3.1 Αποτελέσματα καλλιέργειας σε θερμοκρασία 37°C.....	20
3.2 Αποτελέσματα καλλιέργειας σε θερμοκρασία 15°C.....	22
3.3 Στατιστική Ανάλυση.....	23
3.4 Συζήτηση.....	25

<b>4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>30</b>
<b>5.ABSTRACT.....</b>	<b>31</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....</b>	<b>32</b>



## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αντιβιοτικά έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί ευρέως και χρησιμοποιούνται κατά πολύ για ιατρικές θεραπείες, κτηνιατρικές και γεωργικές εργασίες, με αποτέλεσμα την αύξηση της εμφάνισης και την ταχεία εξάπλωση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων (antibiotic resistant bacteria, ARB) και των γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά (antibiotic resistant genes, ARGs) σε κλινικά αλλά και φυσικά περιβάλλοντα (Zhang et al., 2011, Boeckel et al., 2014, Cassini et al., 2018, Klein et al., 2018, Qiao et al., 2018). Πρόσφατα, έχει διαπιστωθεί ότι διάφορα περιβαλλοντικά συστήματα (όπως λίμνες και ποτάμια) λειτουργούν ως δεξαμενές ARGs αλλά γίνονται επίσης και διάδρομοι διασποράς ανθεκτικών παθογόνων μικροοργανισμών, αυξάνοντας τους κινδύνους μετάδοσης αυτών στους ανθρώπους (Marathe et al., 2017, Larsson et al., 2018). Μέχρι τώρα, η αντιμικροβιακή αντίσταση (antimicrobial resistance, AMR) θεωρείται μία από τις μεγαλύτερες απειλές για την παγκόσμια δημόσια υγεία (Laxminarayan et al., 2016) και ο ρόλος του περιβάλλοντος στην AMR έχει καταχωριστεί από το Πρόγραμμα Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Εθνών (United Nations Environmental Program, UNEP) ως το πρώτο από τα έξι αναδυόμενα ζητήματα περιβαλλοντικής ανησυχίας (UNEP, 2017).

Οι λίμνες και τα ποτάμια αποτελούν σημαντικούς υδάτινους πόρους για τον άνθρωπο. Ωστόσο, ολόκληρα τα συστήματα ποταμού-λίμνης φαίνεται να είναι δεξαμενές ARGs / ARB στο περιβάλλον, επειδή επηρεάζονται έντονα από ανθρώπινες δραστηριότητες μέσω της εισροής λυμάτων σ' αυτά που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία (π.χ. νοσοκομεία, κατοικίες, ζωική παραγωγή και φαρμακευτικές βιομηχανίες) (Marti et al., 2014, Yang et al., 2018, Wu et al., 2019, Liang et al., 2020).

### 1.1 Βακτήρια σε λιμναία οικοσυστήματα

Μέχρι σήμερα, έχουν ανιχνευθεί σε γλυκά νερά σε υψηλές αφθονίες δύο από τις τέσσερις ομάδες των  $\beta$ -Proteobacteria (όπως αυτές ορίζονται από τους Glöckner et al., 2000), δηλαδή του κλάδου 1 (επίσης καλούμενου «κλάδος *Rhodofera* sp. BAL47») και του κλάδου 2 (ή «κλάδος *Polynucleobacter necessaries*»). Εκπρόσωποι αυτών των κλάδων έχουν υψηλές αφθονίες σε εύτροφους ταμιευτήρες (Simek et al., 2001) και

αερόβια υδάτινα στρώματα μερομικτικών χουμικών λιμνών (Burket et al., 2003). Άλλα αριθμητικώς σημαντικά Bacteria γλυκών νερών είναι νηματοειδή τα οποία σχετίζονται με το *Haliscomenobacter hydrophila* και απαντώνται σε μεσότροφες λίμνες (Zwart et al., 2002) και Actinobacteria του κλάδου acI (Glöckner et al., 2000, Zwart et al., 2002, Warnecke et al., 2004) τα οποία απαντώνται σε διάφορα λιμναία συστήματα όπως χουμικές (Burket et al., 2003) ή ορεινές λίμνες σε μεγάλο υψόμετρο (Glöckner et al., 2000, Sekar et al., 2003, Warnecke et al., 2005).

## 1.2 Ταμιευτήρας Κάρλα

Η λίμνη Κάρλα αποξηράνθηκε το 1962, επειδή την εποχή εκείνη προκαλούσε πλημμύρες στις πέριξ γεωργικές καλλιέργειες, ενώ ορισμένες βαλτώδεις εκτάσεις γύρω της προκαλούσαν την έντονη παρουσία εντόμων. Βρισκόταν νοτιοανατολικά της Λάρισας, κοντά στις βόρειες πλαγιές του Πηλίου, στα όρια των Νομών Λαρίσης και Μαγνησίας.

Η αποξήρανση της λίμνης Κάρλα άρχισε τέλη Αυγούστου του 1962. Αποδόθηκαν 80.000 στρέμματα καλλιεργήσιμης γης στους αγρότες της Θεσσαλίας. Ωστόσο, διαπιστώθηκε ότι οι επιπτώσεις στο οικοσύστημα της περιοχής ήταν μεγαλύτερες από το όφελος που προσέφερε η αποξήρασή της. Έτσι, σήμερα γίνεται προσπάθεια για αναδημιουργία της λίμνης, που θα έχει μέγεθος 38.000 στρέμματα.

Η αρχική λίμνη είχε μέγεθος 180-195 χιλιάδες στρέμματα και το βάθος της έφτανε τα 4-6 μ. Το Δεκέμβριο του 2010 άρχισε η άντληση νερού από τον ποταμό Πηνειό, ενώ όταν τεθούν σε πλήρη λειτουργία τα πέντε αντλιοστάσια του Πηνειού θα τροφοδοτούν τη λίμνη με 14 κυβικά μέτρα νερού το δευτερόλεπτο. Το έργο αναμένεται να συμβάλλει μεταξύ άλλων στην αντιπλημμυρική προστασία, την αποκατάσταση του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα, την άρδευση 100.000 στρεμμάτων, την ενίσχυση της ύδρευσης της πόλης του Βόλου με 15 εκατ. κυβικά μέτρα νερού ετησίως έως το 50% των αναγκών της πόλης. Μετά την επιτυχή άρδευση ο ταμιευτήρας «εγκαινιάστηκε» τον Οκτώβριο 2018.

### 1.3 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι μια από τις πιο σημαντικές ομάδες φαρμακευτικών προϊόντων (Kümmerer, 2009). Η χρήση αντιβιοτικών για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα επιστημονικά επιτεύγματα του 20ού αιώνα. Εκατομμύρια ζωές έχουν σωθεί από την εισαγωγή των αντιβιοτικών στη γενική ιατρική πρακτική για τη θεραπεία ενός μεγάλου εύρους βακτηριακών λοιμώξεων, καθώς και άλλων ιατρικών διαδικασιών (Marti et al., 2014). Μετά την αρχική χρήση των αντιβιοτικών στην ιατρική, η χρήση αντιβιοτικών για την αύξηση της γεωργικής παραγωγικότητας έχει γίνει μια κοινή πρακτική (Carlet et al., 2011). Σήμερα έχει γίνει σαφές ότι η διάθεση αντιβιοτικών σε φυσικά οικοσυστήματα μπορεί να έχει εκτεταμένες συνέπειες (Baquero et al., 2008).

Τα περισσότερα από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι χημικά παράγωγα μικρών βιοδραστικών μορίων που μπορεί να εκτελούν πολλές λειτουργίες (Taylore et al., 2011). Στη φύση, αυτά τα μόρια πιστεύεται ότι παράγονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Martinez, 2008). Για παράδειγμα, μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε συγκεντρωτικές ανασταλτικές συγκεντρώσεις με ερυθρομυκίνη και ριφαμπικίνη έδειξε ότι αυτή η χαμηλή συγκέντρωση αντιβιοτικών μπορεί να ρυθμίσει όχι μόνο την ανάπτυξη αλλά και τον βακτηριακό μεταβολισμό (Goh et al., 2002). Ως εκ τούτου, αναμένεται ότι τα αντιβιοτικά θα ρυθμίσουν τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις και θα ρυθμίσουν τη δυναμική των μικροβιακών κοινοτήτων (Martinez, 2008).

### 1.4 Αντοχή στα αντιβιοτικά

Η συνεχής αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών προκαλεί την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον. Η απελευθέρωση αντιβιοτικών στο περιβάλλον προκαλεί ανησυχία λόγω της επακόλουθης ανάπτυξης γονιδίων και βακτηρίων με ανθεκτικότητα στη δράση των αντιβιοτικών που οδηγούν στη μειωμένη επίδραση των αντιβιοτικών στην ανθρώπινη και ζωική παθογένεια (Nnadozie et al., 2019).

Τα περιβάλλοντα γλυκού νερού συγκαταλέγονται μεταξύ των φυσικών περιβαλλόντων που είναι επιρρεπή σε πιθανή μόλυνση με αντιβιοτικά που απελευθερώνονται μέσω

διαφορετικών πηγών, όπως απορροές γεωργικών προϊόντων, απορρίψεις λυμάτων και απόνερα από κοντινά αγροκτήματα. Η παρουσία αντιβιοτικών στο περιβάλλον, η υψηλότερη πυκνότητα ενεργών κοινοτήτων βακτηρίων που είναι αυτόχθονες στο γλυκό νερό, δημιουργεί ένα περιβάλλον κατάλληλο για την ανάπτυξη γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά (Pereira et al., 2013, Marti et al., 2014, Chen et al., 2017).

Οι έρευνες σχετικά με τα περιστατικά και τον τύπο της αντοχής στα αντιβιοτικά σε περιβάλλον γλυκού νερού είναι περιορισμένες σε σύγκριση με κλινικές ρυθμίσεις, όπως κοινές ενδείξεις οργανισμών (Enterococci και coliforms), βακτηριακά παθογόνα που προκαλούν λοιμώξεις που είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν στον άνθρωπο (Araújo et al., 2010, Adelowo et al., 2014, Ndlovu et al., 2015, Berendonk et al., 2015, Chen et al., 2017). Η περιορισμένη διερεύνηση αντιβιοτικών σε περιβάλλον γλυκού νερού θα μπορούσε να οφείλεται στο ότι οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών σε αυτά τα περιβάλλοντα υποτίθεται ότι είναι φυσικά χαμηλές σε περιβάλλον γλυκού νερού. Ωστόσο, ακόμη και αν η συγκέντρωση αντιβιοτικών σε περιβάλλον γλυκού νερού είναι χαμηλή, μπορεί να συμβεί η επιλογή ανθεκτικών βακτηρίων (Kümmerer, 2009, Marti et al., 2014).

Οι ταμειυτήρες γλυκού νερού που δέχονται ροές φαρμακευτικών αποβλήτων ή απορροές από γεωργικές καλλιεργήσιμες εκτάσεις μπορούν να μολυνθούν με υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, επιτρέποντας έτσι επιλεκτικά τη διατήρηση και μετέπειτα τη μόνιμη αντοχή στα αντιβιοτικά. Τα αντιβιοτικά, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να επιλέξουν ανθεκτικά βακτήρια στο περιβάλλον (Gullberg et al., 2011, Alm et al., 2014). Η αντίσταση γίνεται μόνιμη σε βακτηριακούς πληθυσμούς υπό ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, ακόμα και όταν η συγκέντρωση αντιβιοτικών είναι χαμηλή ή απουσιάζει για σημαντικό χρονικό διάστημα.

### 1.5 Οξυτετρακυκλίνη (oxytetracycline, OTC)

Τα φάρμακα της κατηγορίας των τετρακυκλινών είναι βακτηριοστατικά αντιμικροβιακά που συνδέονται αντιστρεπτά στο βακτηριακό ριβόσωμα και παρεμβαίνουν στη μετάφραση πρωτεϊνών. Η επικράτηση της αντοχής σε αυτήν την κατηγορία φαρμάκων έχει αυξηθεί σταθερά σε κλινικά απομονωμένα στελέχη τόσο από

ανθρώπους όσο και από ζώα περίπου κατά 0,5% ετησίως από το 1950 έως το 2001. Ωστόσο, ενώ η χρήση τετρακυκλίνης στην ανθρώπινη ιατρική μειώθηκε σταδιακά, αυτή η κατηγορία φαρμάκων παραμένει από τις πιο χρησιμοποιούμενες στην κτηνοτροφία παγκοσμίως (Chopra and Roberts, 2001).

Η οξυτετρακυκλίνη είναι ένα αντιβιοτικό ευρέος φάσματος της κατηγορίας των τετρακυκλινών που επιτελεί αντιβιοτικές λειτουργίες αναστέλλοντας τη σύνθεση πρωτεϊνών σε βακτήρια. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τα βακτήρια εδάφους *Streptomyces rimosus* το 1948, κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το 1949 και τέθηκε σε εμπορική χρήση το 1950. Έχει παράλληλες ιδιότητες με την τετρακυκλίνη, η οποία χρησιμοποιείται συνήθως ως κτηνιατρικό αντιβιοτικό. Ως κτηνιατρικό φάρμακο, η οξυτετρακυκλίνη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων στην κτηνοτροφία και την ιχθυοκαλλιέργεια, στη γεωργία ως φυτοφάρμακο και ως συμπλήρωμα διατροφής για τα ζώα. Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση του ως αντιβιοτικό έχει γίνει λιγότερο συχνή λόγω της αυξημένης αντιβακτηριακής αντοχής μεταξύ των στοχευμένων παθογόνων (Petković et al., 2017).

#### 1.6 Σκοπός της έρευνας

Η παρούσα προπτυχιακή διπλωματική εργασία διενεργήθηκε με σκοπό την πιθανή παρουσία βακτηρίων ανθεκτικών στην οξυτετρακυκλίνη σε θερμοκρασία καλλιέργειας 37°C και 15°C από δείγμα νερού του ταμιευτήρα της λίμνης Κάρλα.

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Δειγματοληψία

Τα δείγματα του νερού στη λίμνη Κάρλα, συλλέχθηκαν σε προ-αποστειρωμένα δοχεία πολυαιθυλενίου όγκου 500 ml. Η συλλογή των δειγμάτων σε κάθε σταθμό έγινε με την τοποθέτηση των δοχείων 10-20 cm κάτω από την επιφάνεια του νερού. Τα δοχεία βυθίζονταν αργά στο νερό, ώστε η επιφάνεια του νερού να διαταράσσεται όσο το δυνατόν λιγότερο.

### 2.2 Παρασκευή θρεπτικού υλικού

Προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία παρασκευής του θρεπτικού υλικού και η μετέπειτα διαδικασία, εξασφαλίζεται η πλήρης αποστείρωση του χώρου εργασίας. Σε πρώτη φάση, ο πάγκος εργασίας ψεκάζεται με αιθυλική αλκοόλη, αραιωμένη με απιονισμένο νερό 70% και σκουπίζεται με απορροφητικό χαρτί κουζίνας. Όλες οι εργασίες γίνονται γύρω από τον λύχνο του Bunsen ώστε να εξασφαλισθούν συνθήκες ασηψίας. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το LB – Medium (Lennox). Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες που αναγράφονται πίσω από τη συσκευασία για την παραγωγή του και προσαρμόστηκαν στην ποσότητα που χρειάζεται για το πείραμα. Συνεπώς, σύμφωνα με τις οδηγίες σε 1L απιονισμένου νερού, προστίθενται 20 g θρεπτικού μέσου. Χρησιμοποιήθηκαν έξι αποστειρωμένες κωνικές φιάλες. Για τις πέντε κωνικές φιάλες, χρειάστηκαν 150 mL απιονισμένου νερού και 3 g θρεπτικού μέσου. Στην έκτη φιάλη προστέθηκαν 200 mL απιονισμένου νερού και 4 g θρεπτικού μέσου. Ζυγίστηκε λοιπόν, σε ζυγό ακριβείας η απαιτούμενη ποσότητα σκόνης θρεπτικού μέσου για την κάθε φιάλη ξεχωριστά. Διαλύθηκαν εν συνεχεία προσεκτικά στις πέντε φιάλες ξεχωριστά τα 3 g θρεπτικού υλικού με τα 150 mL απιονισμένου νερού και στην έκτη τα 4 g θρεπτικού υλικού με τα 200 mL απιονισμένου. Έπειτα, οι έξι φιάλες μεταφέρθηκαν στο αυτόκαυστο RAYPA AES-75 (Εικόνα 1) για αποστείρωση. Τοποθετήθηκε νερό έως τις τρύπες του αυτόκαυστου ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία. Οι φιάλες παρέμειναν εκεί για δέκα πέντε λεπτά στους 121°C. Μετά το πέρας της

διαδικασίας κατέληξαν στο ψυγείο (η θερμοκρασία του κυμαίνεται γύρω στους 3°C) ώστε να πέσει η θερμοκρασία τους στους 45°C.



**Εικόνα 1** ( Αυτόκαυστο RAYPA AES-75).

### 2.3 Προσθήκη αντιβιοτικού

Για το παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως αντιβιοτικό η οξυτετρακυκλίνη (OTC). Ζυγίστηκαν 150 mg αντιβιοτικού σε μορφή σκόνης και διαλύθηκαν σε 1,5 mL απιονισμένου νερού (stock). Αφότου αφαιρέθηκαν οι έξι φιάλες με θρεπτικό υλικό που παρασκευάστηκαν προηγουμένως, προστέθηκαν σε όλες 15 mL εμβολίου. Το εμβόλιο, περιέχει νερό από τον ταμιευτήρα της Κάρλα. Στις τρεις από τις έξι προστίθενται εν συνεχεία 2,8 mL οξυτετρακυκλίνης. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού σε κάθε φιάλη είναι 0,17 mg/mL. Πραγματοποιήθηκε επώαση, σε ανακινούμενο επωαστήριο όλων των φιαλών, ξεχωριστά, για τους 37°C και 15°C.

### 2.4 Παρακολούθηση καλλιιεργειών

Με την χρήση του φασματοφωτόμετρου (pharmaSPEC, UV1700, SHIMADZU) (Εικόνα 2) , υπολογίστηκε η ανάπτυξη μικροοργανισμών στις έξι φιάλες του πειράματος σε συνθήκες θερμοκρασίας 37°C. Σε πρώτη φάση, απολυμάνθηκε ο πάγκος εργασίας ψεκάζοντας με αιθυλική αλκοόλη 70% και απορροφητικό χαρτί κουζίνας. Καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος υπήρξε ανοιχτός ο λύχνος

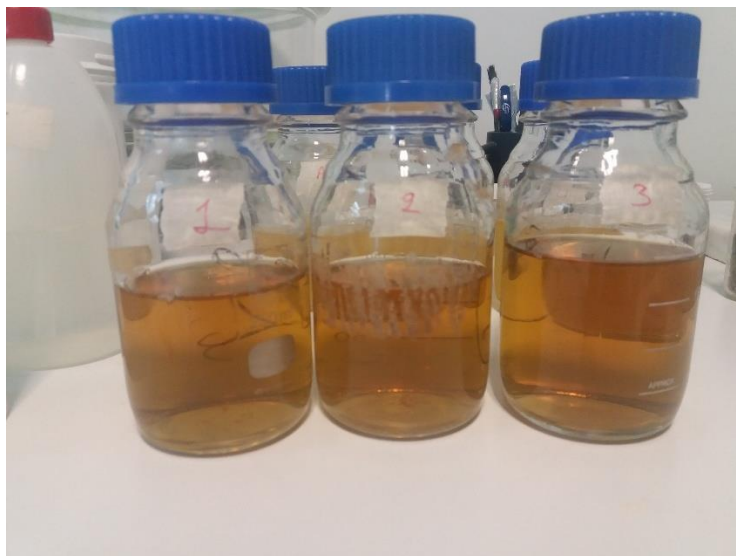
Bunsen, όλες οι εργασίες πραγματοποιήθηκαν γύρω από αυτόν, ώστε να εξασφαλισθούν συνθήκες ασηψίας στον χώρο εργασίας.



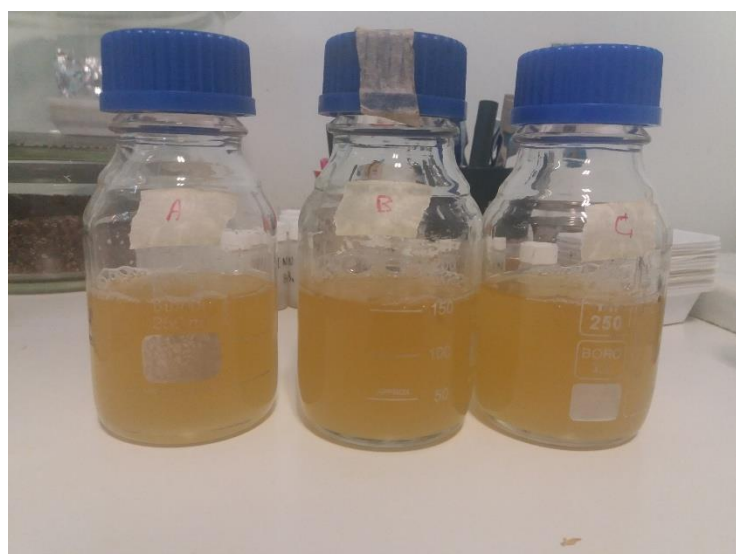
**Εικόνα 2** ( Φασματοφωτόμετρο pharmaSPEC, UV1700, SHIMADZU).

Ξεκινώντας, δίδεται ονομασία σε τρεις από τις συνολικά έξι φιάλες που έχουν λάβει το αντιβιοτικό 1,2 και 3 (Εικόνα 3), ενώ αυτές που δεν έχουν λάβει αντιβιοτικό ονομάζονται Α, Β και C (Εικόνα 4) προς διευκόλυνση των μετρήσεων. Εν συνεχεία, γύρω από τον λύχνο του Bunsen, επιλέγεται η επιθυμητή φιάλη και λαμβάνεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικής πιπέτας η ποσότητα των 3 mL με προσοχή, δίχως να λάβει φυσαλίδες το εσωτερικό του ακροφυσίου που λήφθηκε το δείγμα. Το δείγμα αδειάζεται σε καθαρή κυψελίδα και τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο προς μέτρηση. Μετά την τοποθέτηση της και για κάθε νέα μέτρηση σε κάθε νέα φιάλη επαναλαμβάνεται η ίδια ακριβώς διαδικασία με νέο tip στην πιπέτα για κάθε νέα φορά καθώς και καθαρισμός της κυψελίδας και του μέλους της πιπέτας κάτω από τον ακροφύσιο με αιθανόλη 70% και απορροφητικό χαρτί κουζίνας.





**Εικόνα 3** ( Φιάλες 1,2,3 με αντιβιοτικό μετά από περίοδο επώασης).



**Εικόνα 4** ( Φιάλες A,B,C δίχως αντιβιοτικό μετά από περίοδο επώασης).

Στο φασματοφωτόμετρο, πέραν της κυψελίδας που εμπεριέχει το δείγμα, τοποθετήθηκε και μια κυψελίδα με απιονισμένο νερό η οποία ονομάζεται τυφλό δείγμα.

Το φασματοφωτόμετρο ρυθμίζεται ώστε να μετρήσει την απορρόφηση σε μήκος κύματος 540 nm. Πριν ξεκινήσουν οι μετρήσεις χρειάζονται περίπου 20 min να ζεσταθεί το μηχάνημα (δηλαδή να σταθεροποιηθεί η εκπομπή του φωτός από τις λυχνίες). Χρησιμοποιώντας το τυφλό δείγμα μηδενίζεται το όργανο έτσι ώστε το θρεπτικό να έχει μηδενική απορρόφηση. Κατόπιν, τοποθετείται το δείγμα (καλλιέργεια) του οποίου ο αριθμός βακτηριών ερευνάται. Η λεία πλευρά πρέπει να είναι πάντα κάθετα στο σημείο που διέρχεται η ακτινοβολία και η πτυχωτή παράλληλα. Μόλις

καθοριστούν οι ρυθμίσεις, το μηχάνημα είναι έτοιμο για να ξεκινήσει την καταγραφή του φάσματος απορρόφησης.

Με το κατάλληλο κουμπί ξεκινάει η έναρξη των μετρήσεων απορρόφησης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται και για τα επόμενα δείγματα των δοχείων 2, 3 καθώς επίσης και για τα A,B,C τα οποία δεν έχουν εμβολιαστεί με αντιβιοτικό. Στον (Πίνακα 1) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

Στο παρόν πείραμα, το πιο βασικό είναι η συνεχόμενη παρακολούθηση των καλλιιεργειών ώστε τα αποτελέσματα να είναι όσο το δυνατόν πιο ακριβή. Γι' αυτό και πραγματοποιούνται πολλές και συχνές μετρήσεις στη διάρκεια της ημέρας. Καθώς λάβουν χώρα όλες οι μετρήσεις με επιτυχία, τα δείγματα επιστρέφουν στο επωαστήριο μέχρι την επόμενη μέτρηση. Η ίδια ακριβώς διαδικασία επαναλαμβάνεται και στα δείγματα υπό συνθήκες θερμοκρασίας επώασης 15°C, ενώ τα αποτελέσματα των μετρήσεων δίνονται στον (Πίνακα 2) .

## 2.5 Κωνική φιάλη με αμπικιλίνη

Μετά το πέρας της παραπάνω περιγραφόμενης διαδικασίας, επαναλήφθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία για μια κωνική φιάλη μόνο που αντί για 2,8 mL οξυτετρακυκλίνης (OTC), προστέθηκε η ίδια ποσότητα αμπικιλίνης. Επομένως η συγκέντρωση της αμπικιλίνης για κάθε φιάλη είναι 0,17 mg/mL. Η φιάλη ονομάστηκε με το διακριτικό (AMP). Η επώαση έγινε με ακριβώς τον ίδιο τρόπο με των παραπάνω φιαλών για τους 15°C καθώς και οι μετέπειτα μετρήσεις των οποίων τα αποτελέσματα δίνονται στον (Πίνακα 2).

## 2.6 Τάχος αύξησης

Ο ειδικός συντελεστής (τάχος) αύξησης για κάθε καλλιέργεια εκτιμήθηκε στην εκθετική φάση της καμπύλης αύξησης. Η εξίσωση που εφαρμόστηκε για την εξαγωγή του ειδικού τάχους αύξησης είναι  $\mu = (\ln x_t - \ln x_0) / t$ , που προκύπτει από την λογαριθμοποίηση και επίλυση ως προς  $\mu$  της εξίσωσης  $x_t = x_0 * e^{\mu t}$ , όπου  $x_t$  ο αριθμός των κυττάρων στο πέρας της εκθετικής αύξησης,  $x_0$  ο αριθμός των κυττάρων στην αρχή της εκθετικής αύξησης και  $t$  ο χρόνος διάρκειας της εκθετικής αύξησης. Για την εύρεση του, έγινε αρχικά η χάραξη των διαγραμμάτων της μέσης απορρόφησης προς τον χρόνο επώασης σε ώρες (h) στο πρόγραμμα Microsoft Excel 2007 για τις

θερμοκρασίες 37°C και 15°C όπου και προέκυψαν τα διαγράμματα (Σχήμα 1, Σχήμα 2). Μετά τον εντοπισμό των σημείων που είναι απαραίτητα για την αντικατάσταση στην παραπάνω εξίσωση, γίνεται η επίλυση της με σκοπό την εύρεση του τάχους αύξησης.

## 2.7 Διαγράμματα και Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα JASP ενώ για τα κάτωθι διαγράμματα καθώς και τους πίνακες το πρόγραμμα Microsoft Excel 2007.

## 2.8 Ανάλυση διακύμανσης ή ανάλυση διασποράς (ANOVA)

Η ANOVA χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί η 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:  $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_k \dots$ ,  $H_1$ : όχι όλοι οι 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 ( $F = I/II$ ), (Χάλκος, 2011).

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  $N-k$ .  
(Χάλκος, 2011).

### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 Αποτελέσματα καλλιέργειας σε θερμοκρασία 37°C

Μια γρήγορη τεχνική μέτρησης του πλήθους των μικροοργανισμών, βασίζεται στην αρχή της σκέδασης του φωτός, όταν αυτό προσπίπτει σε ένα δείγμα με αιωρούμενα κύτταρα. Επειδή το μέγεθος των κυττάρων είναι περίπου σταθερό, το ποσό της ακτινοβολίας που σκεδάζεται είναι ανάλογο τη συγκέντρωση των κυττάρων στο δείγμα. Όταν η συγκέντρωση των κυττάρων είναι περίπου δέκα εκατομμύρια κύτταρα ανά mL ( $10^7$ / mL) τότε το δείγμα δείχνει νεφελώδες ή θολό, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις κυττάρων κάνουν το δείγμα περισσότερο αδιαπέραστο από το φώς. Ο βαθμός σκέδασης της ακτινοβολίας, μπορεί να μετρηθεί από φασματοφωτόμετρα και σχετίζεται γραμμικά με την συγκέντρωση των βακτηρίων σε χαμηλές τιμές απορρόφησης. Με τον τρόπο αυτό δύναται να παρακολουθηθεί η ανάπτυξη των βακτηρίων αρκεί αυτά να βρίσκονται σε συγκεντρώσεις τέτοιες που να δίνουν αισθητή θολερότητα στο δείγμα. Η μονάδα οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 600 nm ( $OD_{600} = 1,0$ ) αντιστοιχεί σε  $10^9$  βακτηριακά κύτταρα ανά मिलीलीτρο θρεπτικού υλικού ( $10^9$  κύτταρα / mL).

Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας με τα αριθμητικά αποτελέσματα παρακολούθησης της ανάπτυξης των βακτηρίων για τις έξι φιάλες, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές για την καλλιέργεια με θερμοκρασία επώασης 37°C.

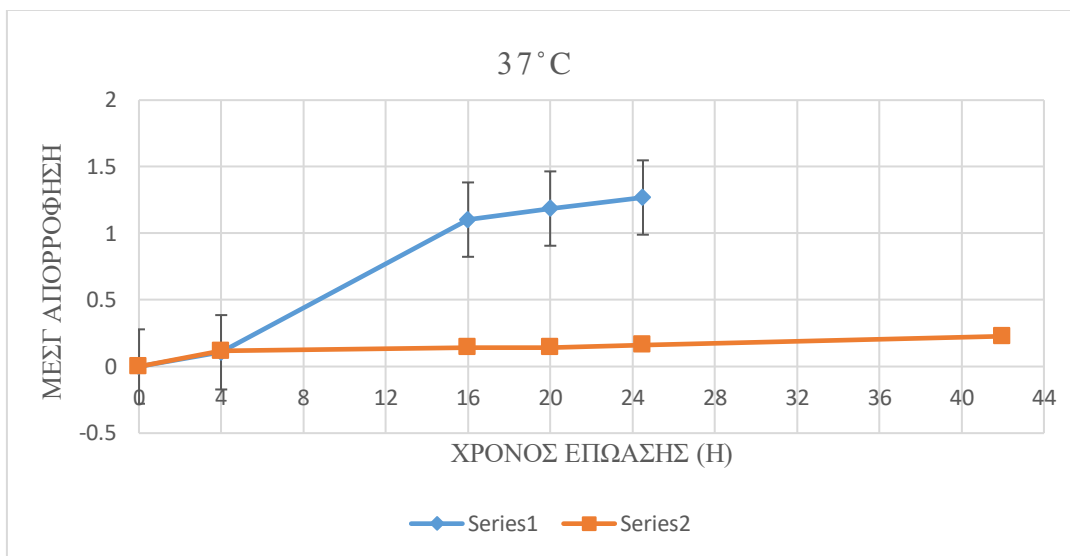
**Πίνακας 1** ( Αριθμητικά αποτελέσματα μετρήσεων φασματοφωτόμετρου σε θερμοκρασία επώασης 37°C).

	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
t <sub>0</sub>	0	0	0	0	0	0	0
t <sub>1</sub>	4	0,110	0,105	0,106	0,112	0,124	0,113
t <sub>2</sub>	16	1,129	1,100	1,080	0,145	0,140	0,141
t <sub>3</sub>	20	1,122	1,327	1,109	0,142	0,146	0,140
t <sub>4</sub>	24,5	1,294	1,394	1,187	0,160	0,166	0,159
t <sub>5</sub>		-	-	-	0,258	0,224	0,200

Το t εκφράζει τις διαφορετικές χρονικές στιγμές που λήφθηκαν οι μετρήσεις και εκφράζεται σε ώρες. Τα A,B,C τις φιάλες καλλιέργειας που δεν περιέχουν αντιβιοτικό,

ενώ τα 1,2,3 τις φιάλες καλλιέργειας που περιέχουν οξυτετρακυκλίνη. Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα ανά περίπου τέσσερις ώρες.

Προκειμένου να ερμηνευθούν τα αριθμητικά αποτελέσματα έγινε η χάραξη καμπύλης που αφορά την μέση απορρόφηση προς τον χρόνο επώασης μετρημένο σε ώρες (h).



**Σχήμα 1** ( Διάγραμμα μέσης απορρόφησης / χρόνο επώασης (h). Η Σειρά 1 αφορά τις φιάλες A,B,C χωρίς OTC, ενώ η Σειρά 2 τις φιάλες 1,2,3 με OTC).

Στο Σχήμα 1 ο κάθετος άξονας y αφορά την μέση απορρόφηση του θρεπτικού μέσου από τα βακτήρια ενώ ο οριζόντιος άξονας χ τον χρόνο επώασης, του οποίου η μονάδα μέτρησης είναι οι ώρες (h).

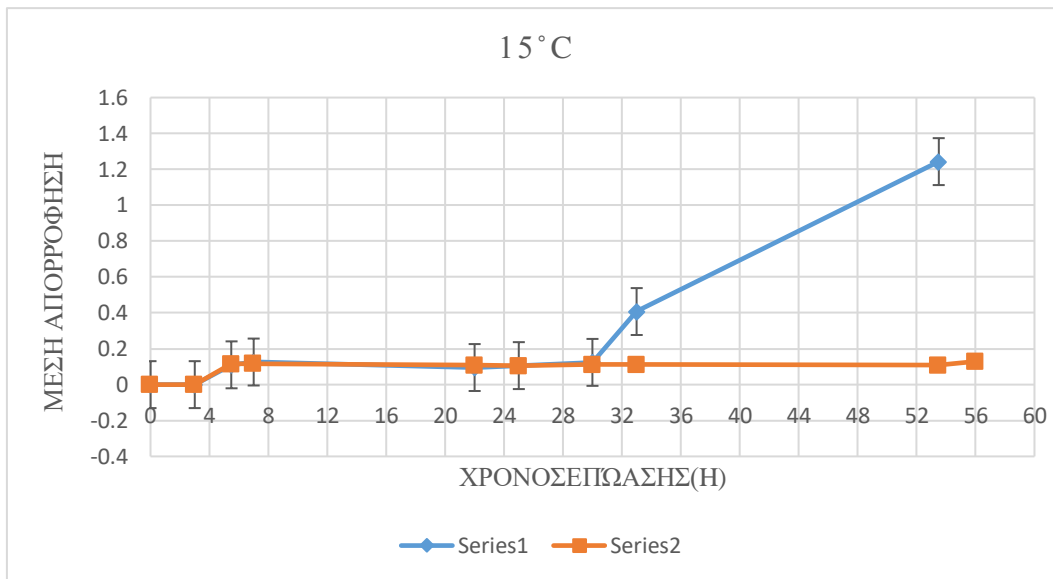
Μετά την χάραξη της παραπάνω γραφικής παράστασης και με εργαλείο τον τύπο που δόθηκε στο υποκεφάλαιο 2.6 βρέθηκε και η τιμή του τάχους αύξησης η οποία είναι  $0,194 h^{-1}$ .

### 3.2 Αποτελέσματα καλλιέργειας σε θερμοκρασία 15°C

**Πίνακας 2** Αριθμητικά αποτελέσματα μετρήσεων φασματοφωτόμετρου σε θερμοκρασία επώασης 15°C

		<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>AMP</b>
t <sub>0</sub>	0	0	0	0	0	0	0	-
t <sub>1</sub>	3	0,113	0,102	0,116	0,119	0,111	0,116	-
t <sub>2</sub>	5,5	0,130	0,125	0,123	0,114	0,122	0,113	-
t <sub>3</sub>	7	0,099	0,091	0,096	0,107	0,108	0,108	-
t <sub>4</sub>	22	0,120	0,099	0,099	0,104	0,103	0,105	-
t <sub>5</sub>	25	0,112	0,141	0,119	0,110	0,112	0,111	-
t <sub>6</sub>	30	0,234	0,576	0,412	0,109	0,111	0,114	0,105
t <sub>7</sub>	33	0,882	1,715	1,132	0,105	0,114	0,108	0,102
t <sub>8</sub>	53,5	2,422	2,436	2,251	0,121	0,121	0,146	0,385

Το t εκφράζει τις διαφορετικές χρονικές στιγμές που λήφθηκαν οι μετρήσεις και εκφράζεται σε ώρες. Τα A,B,C τις φιάλες καλλιέργειας που δεν περιέχουν αντιβιοτικό, ενώ τα 1,2,3 τις φιάλες καλλιέργειας που περιέχουν οξυτετρακυκλίνη. Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα ανά περίπου τρεις ώρες. Η φιάλη με το διακριτικό AMP, αφορά φιάλη που τοποθετήθηκε δοκιμαστικά και περιείχε 150 mL θρεπτικού μέσου, 15 mL εμβολίου (δείγμα νερού από τη λίμνη Κάρλα) καθώς και 2,8 mL αμπικιλίνης.



**Σχήμα 2** (Διάγραμμα μέσης απορρόφησης / χρόνο επώασης (h). Η Σειρά 1 αφορά τις φιάλες A,B,C χωρίς OTC ενώ η Σειρά 2 τις φιάλες 1,2,3 με OTC).

Ο κάθετος άξονας y αφορά την μέση απορρόφηση του θρεπτικού μέσου από τα βακτήρια ενώ ο οριζόντιος άξονας χ τον χρόνο επώασης, του οποίου η μονάδα μέτρησης είναι οι ώρες (h).

Όπως και στην προηγούμενη θερμοκρασία έτσι κι εδώ, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, υπολογίστηκε το τάχος αύξησης για την περίπτωση των 15°C και είναι  $0,031 h^{-1}$ .

### 3.3 Στατιστική Ανάλυση

Με την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης των μέσων όρων των μικροοργανισμών για την περίπτωση καλλιέργειας με θερμοκρασία 37°C εξετάστηκε η μηδενική υπόθεση πως 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  $p < 0,05$ , επομένως 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  $\alpha = 0,05$ , πράγμα το οποίο σημαίνει ότι οι μέσοι δεν είναι ίσοι.



**Πίνακας 3** ( Αποτελέσματα one way ANOVA για περίπτωση θερμοκρασίας 37°C).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Αθροισμα	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				

Εφαρμόζοντας την ανάλυση διακύμανσης των μέσων όρων των μικροοργανισμών για την περίπτωση θερμοκρασίας 15°C 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  $P > 0,05$  πράγμα που δείχνει πως 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 4** (Αποτελέσματα one way ANOVA για περίπτωση θερμοκρασίας 15°C).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Αθροισμα	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				

### 3.4 Συζήτηση

Παρατηρώντας τα αριθμητικά αποτελέσματα των δύο παραπάνω πινάκων (Πίνακας 1, Πίνακας 2) είναι ξεκάθαρο και στις δύο περιπτώσεις θερμοκρασιών επώασης πως οι φιάλες A,B,C συγκριτικά με τις φιάλες 1,2,3, έχουν αριθμητικά μεγαλύτερη αύξηση για την ίδια χρονική στιγμή μέτρησης, για την εκάστοτε μελετώμενη θερμοκρασία. Αυτό αποδεικνύεται περισσότερο εμπειριστατωμένα με την χάραξη των δυο διαγραμμάτων (Σχήμα 1, Σχήμα 2) μέσης απορρόφησης προς τον χρόνο επώασης. Συγκεκριμένα στο Σχήμα 1 που αφορά τους 37°C, η Σειρά 1 η οποία αναπαριστά τις φιάλες A,B,C έχει διάρκεια φάσης εκθετικής αύξησης δώδεκα ώρες, ενώ για τη Σειρά 2 που αναπαριστά τις φιάλες 1,2,3 η διάρκεια φάσης εκθετικής αύξησης έχει διάρκεια τεσσάρων μόλις ωρών. Όσον αφορά το διάγραμμα των 15 °C (Σχήμα 2) η διάρκεια φάσης εκθετικής αύξησης για τη Σειρά 1 και για τις φιάλες A,B,C είναι περίπου είκοσι ώρες ενώ για τις φιάλες 1,2,3 είναι τέσσερις ώρες. Αποδεικνύεται έτσι, πως το αντιβιοτικό που στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι η οξυτετρακυκλίνη έδρασε αποτελεσματικά στην καταστολή ανάπτυξης των βακτηρίων και στις δυο περιπτώσεις θερμοκρασιών που ερευνήθηκαν.

Το παρόν πείραμα διενεργήθηκε σε δύο επιλεγμένες θερμοκρασίες. Η θερμοκρασία των 37°C ενδείκνυται για την ανάπτυξη φυτικών οργανισμών, δηλαδή μεσόφιλων βακτηρίων. Είναι επίσης και οι βαθμοί θερμοκρασίας που επικρατούν τους θερινούς μήνες. Μάλιστα σε σχετική έρευνα διαπιστώθηκε (Sidiropoulos, 2019), πως το *Gram<sup>-</sup> Enterobacter* καθώς και το *Gram<sup>-</sup> Pseudomonas aeruginosa* στους 37°C έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης. Όσον αφορά τη θερμοκρασία των 15°C, είναι περίπου η θερμοκρασία που επικρατεί στον ταμιευτήρα κατά τους χειμερινούς μήνες. Τα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την πρόληψη ή τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων σε ανθρώπους, ζώα και υδατοκαλλιέργειες για δεκαετίες (Liu et al.,2010). Μετά τη χρήση τους, ένα μεγάλο μέρος των αντιβιοτικών απορρίπτεται στο υδάτινο σώμα όπου έγινε η χρήση, είτε στην αρχική είτε στην μετασχηματισμένη τους μορφή και στη συνέχεια παραμένουν σε υδρόβιους οργανισμούς λόγω της υψηλής συχνότητας έκθεσης (Xiong et al., 2015). Μια πρόσφατη έρευνα, έδειξε ότι η παγκόσμια κατανάλωση αντιβιοτικών αυξήθηκε σημαντικά μεταξύ 2000 και 2015 και προέβλεπε περαιτέρω 200% αύξηση έως το 2030 (Klein et al.,2018).

Τα αντιβιοτικά τετρακυκλινών όπως η τετρακυκλίνη (TC), η οξυτετρακυκλίνη (OTC) και η χλωροτετρακυκλίνη (CTC) αποτελούνται από τέσσερις αρωματικούς δακτυλίους με διάφορες λειτουργικές ομάδες ως υποκαταστάτες σε κάθε δακτύλιο. Τα TC, OTC και CTC είναι μια κατηγορία των εξαιρετικά σημαντικών κτηνιατρικών φαρμάκων με ευρύ φάσμα δραστηριότητας κατά *Gram*<sup>+</sup> και *Gram*<sup>-</sup> βακτηρίων (Roberts, 2003). Η παρουσία TC, OTC και CTC έχει ως αποτέλεσμα τη διάδοση των επιπέδων αντοχής στα αντιβιοτικά των μικροβιακών κοινοτήτων στα επιφανειακά ύδατα και αποτελεί ένα από τα αναδυόμενα περιβαλλοντικά προβλήματα (Cheng et al., 2013).

Ένας από τους στόχους της αποξήρανσης της μελετώμενης λίμνης το 1962 ήταν η αξιοποίηση του εδάφους της για αγροτικούς και κτηνοτροφικούς σκοπούς. Όντως και για περίπου τέσσερις δεκαετίες στις εκτάσεις της αποξηραμένης λίμνης γίνονταν αγροτικές και κτηνοτροφικές εργασίες.

Η Κάρλα είναι μια τεχνητή λίμνη, της οποίας οι εισροές έρχονται από τον Πηνειό καθώς και από επιφανειακές απορροές. Ο Πηνειός τις τελευταίες δεκαετίες αποτελεί παράδειγμα ρύπανσης με βασικές ρυπογόνες πηγές την άμεση ή έμμεση διάθεση αστικών υγρών αποβλήτων, την ανεξέλεγκτη χρήση φυτοφαρμάκων και ζιζανιοκτόνων στις καλλιέργειες, τα λύματα των κτηνοτροφικών μονάδων και βεβαίως τα υγρά απόβλητα των βιομηχανιών (τυροκομεία, σφαγεία, επεξεργασία ελαίων και τομάτας). Το καλοκαίρι το πρόβλημα είναι πολύ πιο έντονο, αφενός γιατί το νερό στο ποτάμι είναι πολύ λιγότερο (άρα το ποσοστό της ρύπανσης μεγαλύτερο) και αφετέρου γιατί λειτουργούν περισσότερες εποχικές βιομηχανίες.

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε άνοιξη, πριν δηλαδή την περίοδο έντονης ρύπανσης. Επίσης ο Πηνειός δεν δέχεται εισροές από ιχθυοκαλλιέργειες από τις γύρω περιοχές και κατά συνέπεια δεν δέχεται ιζηματογενείς εισροές από αυτές με οξυτετρακυκλίνη. Τώρα όσον αφορά την κτηνοτροφική καθώς και την ανθρώπινη χρήση της, μελέτη των (Wöhler et al., 2020) αναφέρει πως το κατά κεφαλήν «αποτύπωμα» των φαρμακευτικών προϊόντων που αφήνει ο άνθρωπος μπορεί να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των περισσότερο χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών ουσιών κάθε χώρας. Το τελευταίο μπορεί να εξηγηθεί από τις διαφορές στα πρότυπα κατανάλωσης (Klein et al., 2018, OECD, 2017) και την κάλυψη επεξεργασίας λυμάτων (Oldenkamp et al., 2019). Οι παγκόσμιες τάσεις προβλέπουν αύξηση της φαρμακευτικής χρήσης τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα ζώα. Εάν η επεξεργασία

λυμάτων σε χώρες με αυξημένη κατανάλωση δεν αυξάνεται ούτε βελτιώνεται, το αποτύπωμα χρήσης των ανθρώπινων φαρμακευτικών προϊόντων θα αυξηθεί. Η ίδια παρατήρηση μπορεί να γίνει και για τα κτηνιατρικά φαρμακευτικά προϊόντα εφόσον δεν αλλάξει ή μειωθεί το η χρήσης τους.

Η παραγωγή κρέατος και γαλακτοκομικών προϊόντων είναι σημαντικοί χρήστες νερού, συμβάλλοντας στο ένα τρίτο του παγκόσμιου αποτυπώματος νερού της ανθρωπότητας (Hoekstra, 2020).

Εξαιτίας των εργασιών που λάμβαναν χώρα στην Κάρλα την περίοδο αποξήρανσης της, αντιβιοτικά της κατηγορίας των τετρακυκλινών που χρησιμοποιούνταν εκείνα τα έτη, συμπεριλαμβανομένης και της οξυτετρακυκλίνης που χρησιμοποιείται για ασθένειες των πουλερικών, είναι λογικό να πέρασαν μέσω του εδάφους στην υδάτινη στήλη της.

Εφόσον στην παρούσα ερευνητική εργασία δεν βρέθηκαν βακτήρια ανθεκτικά στην οξυτετρακυκλίνη και έχοντας υπόψιν πως οι εισροές της μελετώμενης τεχνητής λίμνης είναι από τον ποταμό Πηνειό μπορούμε να υποθέσουμε πως οι μικροβιακοί πληθυσμοί δεν ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό αν και η χρήση του είναι ευρεία, εξαιτίας της περιόδου δειγματοληψίας, είτε της απουσίας ιχθυοκαλλιεργειών στις γύρω περιοχές. Όσον αφορά την ανθρώπινη χρήση του συγκεκριμένου αντιβιοτικού, έχει πάψει η συνταγογράφηση της από ειδικούς ιατρούς εδώ και περίπου μια δεκαετία μιας και η εκτεταμένη χρήση της στο παρελθόν, οδήγησε σε ανθεκτικότητα. Εάν και σε κτηνοτροφικές δραστηριότητες η χρήση της είναι αδιάκοπη μέχρι και σήμερα, ίσως η μη εύρεση ανθεκτικότητας στο προκείμενο δείγμα να οφείλεται στην περίοδο δειγματοληψίας που η στάθμη της λίμνης δεν είναι μειωμένη.

Τα στοιχεία από 27 ευρωπαϊκές χώρες, συμπεριλαμβανομένων 25 κρατών μελών της ΕΕ και δύο χωρών του ΕΟΧ (Ισλανδία και Νορβηγία), έδειξαν ότι περίπου το 90% της κατανάλωσης αντιβακτηριακών φαρμακευτικών προϊόντων αναφέρεται στην κατανάλωση εκτός νοσοκομείου (δηλαδή στην κοινότητα) (Felis et al., 2020).

Η εμφάνιση αντιμικροβιακών φαρμακευτικών προϊόντων στο υδάτινο περιβάλλον αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για τους ζωντανούς οργανισμούς που κατοικούν σε αυτό το περιβάλλον. Πρώτα απ' όλα, επειδή τα ΑΡ έχουν σχεδιαστεί για να ασκούν συγκεκριμένες βιολογικές δραστηριότητες και η δράση τους μπορεί να προκαλέσει

άμεση επίδραση (οξεία τοξικότητα) στους οργανισμούς (Loos et al., 2013, Kümmerer, 2009). Δεύτερον, η μακροχρόνια έκθεση των αντιμικροβιακών οργανισμών σε ζωντανούς οργανισμούς, ακόμη και σε υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις μπορεί να σχετίζεται με χρόνια τοξικότητα (Bengtsson Palme and Larsson, 2016).

Ένα από τα κύρια σημεία που οδήγησαν στην «επαναλειτουργία» της λίμνης Κάρλα είναι πως εκτιμάται ότι μπορεί να καλύψει κατά 50% τις ανάγκες του Βόλου σε νερό. Η μικροβιακή αντοχή (AMR) προκαλεί περίπου 700.000 θανάτους ετησίως παγκοσμίως και κάθε χώρα επηρεάζεται ενδεχομένως από αυτό το πρόβλημα. Εάν δεν πραγματοποιηθεί κατάλληλη δράση, ο αριθμός τους θα μπορούσε να αυξηθεί στα 10 εκατομμύρια ετησίως έως το 2050 (O'Neill, 2016).

Η αυξητική τάση της παγκόσμιας κατανάλωσης φαρμακευτικών προϊόντων σε ανθρώπους και ζώα αυξάνει την πιθανότητα αύξησης της παγκόσμιας ρύπανσης των υδάτων από φαρμακευτικά προϊόντα.

Από την άποψη της κατανάλωσης, το αποτύπωμα που σχετίζεται με φαρμακευτικά προϊόντα ενός ατόμου εξαρτάται από την άμεση φαρμακευτική κατανάλωση καθώς και από την κατανάλωση ζωικών προϊόντων. Ένας αναποτελεσματικός τρόπος για τη μείωση της φαρμακευτικής ρύπανσης από τους καταναλωτές περιλαμβάνει συνεπώς την κατανάλωση λιγότερου κρέατος, αυγών και γαλακτοκομικών προϊόντων, το οποίο συνοδεύεται από μια μεγάλη γκάμα άλλων περιβαλλοντικών και υγειονομικών οφελών (Willett et al., 2019).

#### 4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Χάλκος, Γ. (2011). *Στατιστική: Θεωρία, εφαρμογές και χρήση στατιστικών προγραμμάτων σε Η/Υ*. Αθήνα : Εκδόσεις Τυποθητώ.
- Baquero, F., Martí' nez, J., Canto, R.(2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *ScienceDirect. ELSEVIER*. 19:260-265.  
doi:10.1016/j.copbio.2008.05.006
- Begon, M., Howarth, R., Townsend, C.(2015). *Οικολογία*. Αθήνα: Εκδόσεις Utopia.
- Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R.(2003). Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1241-1248. doi: 10.1021/es020158e
- Chopra, I., P. M. Hawkey, and M. Hinton. (1992). Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* 29:245-277. doi: 10.1093/jac/29.3.245
- Chopra, I. and Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics : Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews\**. *American Society for Microbiology*. 11381101. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001
- Felisa, E., Kalka, J., Sochacki, A., Kowalska, K., Bajkacz, S., Harnisz M., Korzeniewska, E.(2020). Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment - occurrence and environmental implications. *European Journal of Pharmacology. ELSEVIER*. 0160-4120. doi : 10.1016/j.ejphar.2019.172813
- Kümmerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 52(2), pp. 317–317. doi: 10.1093/jac/dkg386
- Kümmerer, K.(2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *ELSEVIER*. 435–441. doi. 10.1016/j.chemosphere.2008.12.006
- Madigan, M., Mrtinko, J., Parker, J.(2014). *Βιολογία των μικροοργανισμών Brock* Τόμος Ι. Ηράκλειο : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Madueño, L., Paul C., Junier T., Bayrychenko, Z., Filippidou, S., Beck, K., Greub, G., Bürgmann, H. and Junier, P.(2018). A historical legacy of antibiotic utilization on bacterial seed banks in sediments. *PeerJ*. doi. 10.7717/peerj.4197

Nnadozie, C., Odume, O.(2019). Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistant genes\*. *Environmental Pollution. ELSEVIER*. 113067. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113067

Petković, H., Lukežič, T., Sušković, J.(2017). Biosynthesis of Oxytetracycline by *Streptomyces rimosus* : Past, Present and Future Directions in the Development of Tetracycline Antibiotics. *Food Technology & Biotechnology*. 28559729. doi : 10.17113/ftb.55.01.17.4617

Sukul, P. and Spitteller, 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

Wöhler, L., Niebaum, G., Kroi, M., Hoekstra, A., (2020). The grey water footprint of human and veterinary pharmaceuticals. *Water Research X. ELSEVIER*. 100044. doi: 10.1016/j.wroa.2020.100044

Yuxin, Zhang., Haiyang, Chen., Lijun, Jing., Yanguo, Teng.(2020). Ecotoxicological risk assessment and source apportionment of antibiotics in the waters and sediments of a peri-urban river. *Science of The Total Environment. ELSEVIER*. 139128. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139128

## 5. ABSTRACT

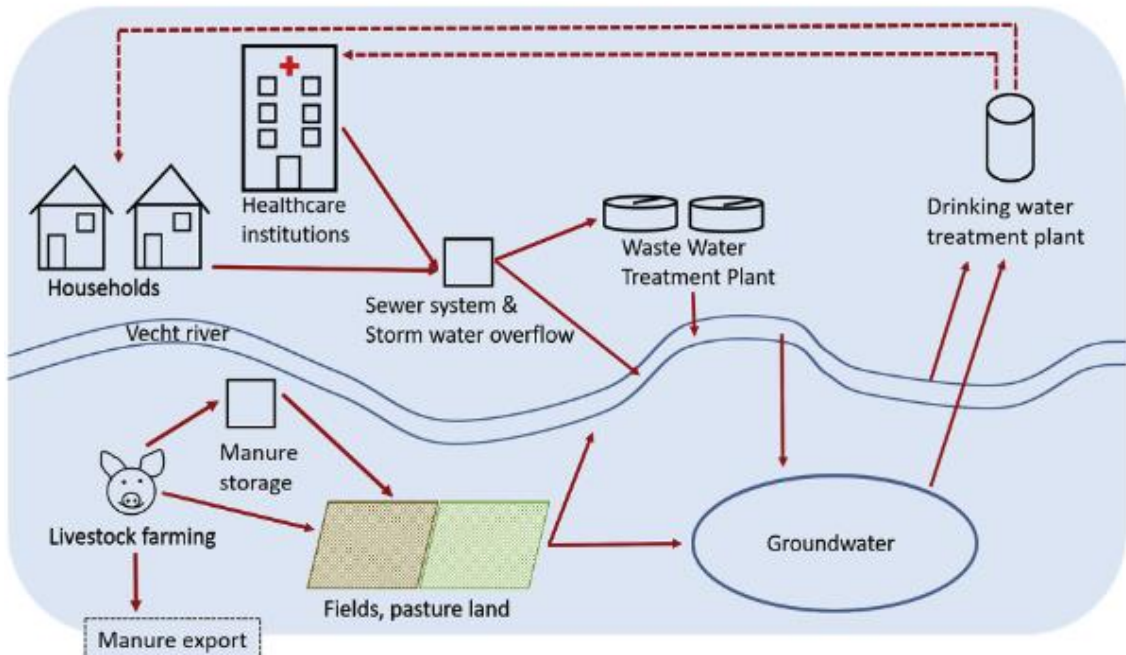
### **TITLE: Occurrence of oxytetracycline-resistant bacterioplankton in the Karla Reservoir, Greece**

The present research was carried out in order to find antibiotic resistant bacteria oxytetracycline with sample from the reservoir of Lake Carla. For decades, antibiotics have been widely prescribed to treat infectious diseases in humans and animals. In addition, antibiotics are used worldwide in animals in order to increase meat production by preventing infections and achieving maximum growth. The global consumption of antibacterial drugs is directly reflected in their presence in various environmental systems, including the aquatic environment. It is estimated that several thousand tons of antimicrobials are introduced into the environment each year along with their by-products. Veterinary medicines can be the main source of antimicrobial contamination in agricultural areas or watersheds where agricultural activity is predominant. To carry out the experiment, a water sample was taken from Carla's reservoir. In conical flasks, liquid sample culture was performed in the presence of nutrient medium, while in the same number of flasks culture was performed in the presence of sample, nutrient medium and the selected oxytetracycline antibiotic. The above procedure was performed first at a temperature of 37 °C and then at a temperature of 15 °C. At the end of the measurements no resistance to oxytetracycline was found for both degrees of temperature.

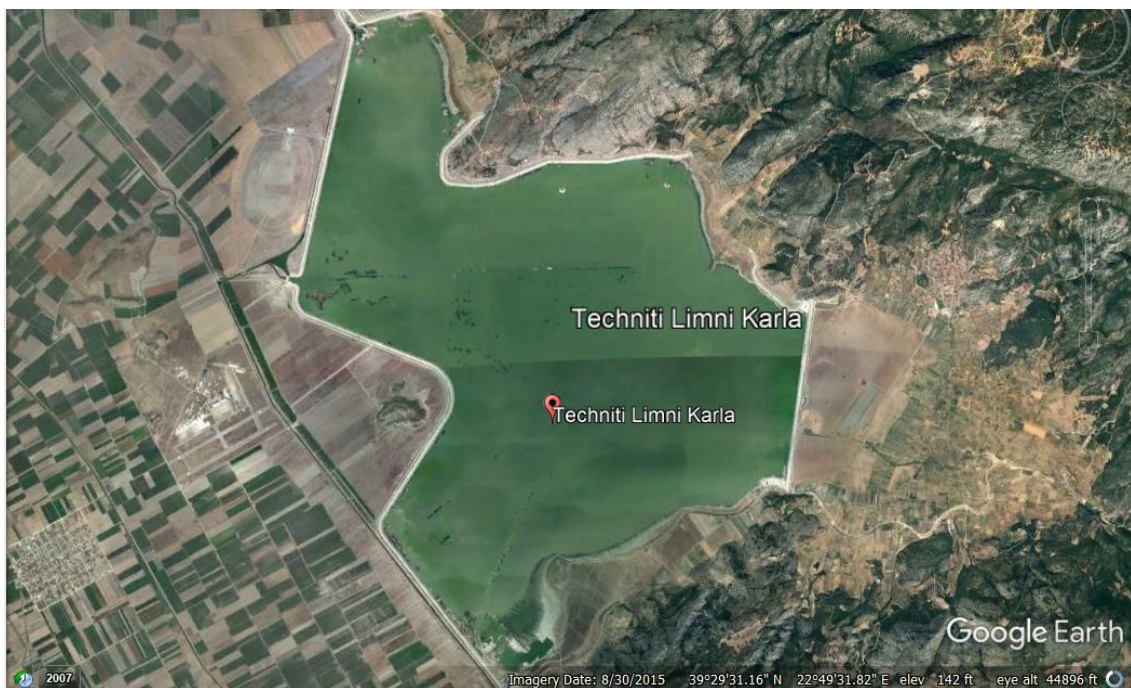
Keywords: bacteria, antibiotics, oxytetracycline, resistance, pond.



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



**Εικόνα I** (Παράδειγμα εισχώρησης των αντιμικροβιακών φαρμάκων στο υδάτινο περιβάλλον, (Wöhler et al., 2020)).



**Εικόνα II** (Κάτοψη της λίμνης Κάρλα από το Google Earth).

