



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**Ανάπτυξη δεικτών μικροβιακής αντοχής
σε αντιβιοτικά και ποσοτικοποίηση τους
σε εδάφη ενισχυμένα με κοπριά χοίρων
και αντιβιοτικά**

Νασόπουλος Ιωάννης-Μάριος του Βασιλείου
Λάρισα 2021

Ανάπτυξη δεικτών μικροβιακής αντοχής σε αντιβιοτικά και ποσοτικοποίηση τους σε εδάφη ενισχυμένα με κοπριά χοίρων και αντιβιοτικά

Development of microbial antibiotic resistance markers and quantification of them in soils amplified with pig's manure and antibiotics

Τριμελής Επιτροπή:

Βασιλειάδης Σωτήριος: (Επιβλέπων καθηγητής), Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας – Γονιδιωματικής, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επίκουρο καθηγητή κ. Βασιλειάδη Σωτήριο για την ανάθεση του θέματος αυτής της εργασίας και της επίβλεψης του κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης της. Ακόμη περισσότερο θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του στην οργάνωση των πειραμάτων, στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, στην αντιμετώπιση οποιονδήποτε εμποδίων κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, στην συγγραφή και τη διόρθωση της πτυχιακής εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Καρά Παναγιώτη για τις συμβουλές του, την καθοδήγησή του στα πλαίσια των πειραμάτων, αλλά και της συνεχούς του συμβολής για την αρτιότητα του εργαστηρίου σε αντιδραστήρια και εξοπλισμό. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Καρούζα Δημήτριο που με δέχτηκε στο εργαστήριο του, αλλά και της συμμετοχής του στην τριμελή επιτροπή της παρούσας εργασίας. Ακόμη ένα ευχαριστώ από καρδιάς σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τις συμβουλές τους, τη συνεργασία και το εξαιρετικό κλίμα κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Κατσίβελου Ελένη για την πολύτιμη βοήθειά της και τις κατατοπιστικές συμβουλές της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων της ποσοτικής PCR. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου όπου υπήρξε αρωγός καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη:

Διάφορα αντιβιοτικά και κατάλοιπα αυτών καταλήγουν στο περιβάλλον από ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Η απόρριψη αντιβιοτικών από μονάδες υγείας (Νοσοκομεία, εργοστάσια παραγωγής φαρμάκων κ.α.), η χρήση αντιβιοτικών σε κτηνοτροφικές μονάδες και υδατοκαλλιέργειες είναι μερικές από αυτές τις δραστηριότητες. Συνεπώς δημιουργείται εξελικτική πίεση και λόγω αυτής, της εξελικτική πίεσης δημιουργούνται ανθεκτικά στελέχη. Στα πειράματά μας, επιχειρήσαμε να αναπτύξουμε πρωτόκολλα ανάλυσης γονιδίων ανθεκτικότητας από όσο το δυνατόν περισσότερες από τις κύριες ομάδες αντιβιοτικών σε περιβαλλοντικά δείγματα. Επίσης δοκιμάσαμε τους δείκτες αυτούς σε δείγματα εδάφους φυτοδοχείων που είχαν υποστεί μεταχείριση με τρία διαφορετικά αντιβιοτικά, είτε απ' ευθείας, είτε μέσω ενισχυμένης με αυτά χοιρινής κοπριάς. Τα δείγματα ελήφθησαν κατά το χρόνο εφαρμογής των αντιβιοτικών αλλά και ένα μήνα μετά και δοκιμάστηκαν για τους δείκτες που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς και για τους γονιδιακούς δείκτες: *intI1* (κωδικεύει για την ενσωμάτωση του ενσωματόνιου τάξης 1, δείκτης οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού), *16S rRNA* (κωδικεύει για την μικρή ριβοσωμική υπομονάδα, δείκτης βακτηριακής αφθονίας), *qnrD_(4)-447* (κωδικεύει γονίδια ανθεκτικότητας σε κινολόνες), *dfrA1_1* και *dfrA1_17* (κωδικεύουν γονίδια για την ανθεκτικότητα σε τριμεθοπρίμες) και *erm33_(1)-332* (κωδικεύει γονίδια ανθεκτικότητας σε ερυθρομυκίνη). Για την ανάπτυξη των μεθόδων qPCR για τους δείκτες, μετασχηματίσαμε βακτήρια με τα γονίδια ανθεκτικότητας που εντοπίσαμε σε περιβαλλοντικά δείγματα, απομονώσαμε τα πλασμίδια που και τα στείλαμε για αλληλούχηση για να επιβεβαιώσουμε ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας όντως βρίσκονται στα μετασχηματισμένα βακτήρια. Πετύχαμε την ανάπτυξη μεθόδων για τα γονίδια μικροβιακής αντοχής *tetM_1* (υπεύθυνο για ανθεκτικότητα σε τετρακυκλίνες), *sulI_3* (υπεύθυνο για ανθεκτικότητα σε σουλφοναμίδες) και *cfxa_1* (υπεύθυνο για ανθεκτικότητα σε β-λακτάμες (cefotaxime)), σύμφωνα με τα αποτελέσματα αλληλούχησης των προϊόντων PCR και σύγκρισής τους με βάσεις δεδομένων νουκλεϊκών οξέων του NCBI. Η δοκιμή στα εδάφη των φυτοδοχείων έδειξε ότι υπήρξε απόκριση των δεικτών *tetM_1*, *sulI_3* και *cfxa_1* στα δείγματα εδάφους από τα φυτοδοχεία. Στα δείγματα εδάφους από το πείραμα των “μικροκόσμων”

είχαμε ικανοποιητική απόκριση των εκκινητών *erm33_(1)*-332.

Σημαντικότεροι παράγοντες της παρουσίας των δεικτών ήταν αυτοί της ενσωμάτωσης ή μη της κοπριάς στα υπό δοκιμή εδάφη, καθώς και αυτός του χρόνου (φθίνουσα παρουσία αντιγράφων δεικτών αντοχής σε αντιβιοτικά με τον χρόνο και αύξουσα τιμή του δείκτη βακτηριακής παρουσίας). Συνολικά, οι δείκτες που δοκιμάστηκαν θα αποτελέσουν σημαντική παρακαταθήκη για μελλοντικές εργασίες του εργαστηρίου.

Abstract:

Various antibiotics and residues of them end up due to various manmade activities. The discard of antibiotics from health units (hospital, drug manufacturing factories etc.), the use of antibiotics in livestock and aquacultures are some of these manmade activities. Thus the evolutionary pressure is achieved and with that the rise of resistant bacterial strains. In our experiments we attempted with various primers that detect antibiotic resistant genes (of as many major antibiotic groups as possible) to find as many antibiotic resistant genes in environmental settings as possible. In addition we tested these markers in soil samples from pots that have been treated with three antibiotics either directly or with the use of pig's manure that have been amplified with these three antibiotics. The samples have been taken during the time of the treatment as well as on month later. The former samples have been tested for the markers that have been set up in this thesis as well as the genetic markers: *int11* (responsible for the coding of class I integrin, a horizontal transfer marker), *16S rRNA* (responsible for the coding of 16 S rRNA subunit of ribosome, a marker of bacterial abundance), *qnrD_(4)-447* (responsible for the coding of genes that provide resistance to quinolones), *dfrA1_1* and *dfrA1_1* (responsible for the coding of genes that provide resistance to trimethoprim) and *erm33_(1)-332* (responsible for the coding of genes that provide resistance to erythromycin). For the development of the qPCR methods for our markers we transformed bacteria with those antibiotic resistant genes and then proceeded to the isolation of the recombinant plasmids. After that we sent those plasmids for sequencing in order to confirm that the proper antibiotic resistant gene has been inserted in the plasmid. We were successful in the set-up of methods for the following antibiotic resistant genes: *tetM_1* (responsible for the coding of genes that provide resistance to tetracyclines), *sul1_3* (responsible for the coding of genes that provide resistance to sulphonamides) and *cfxa_1* (responsible for the coding of genes that provide resistance to b-lactams (cefotaxime)), according to the results of the sequencing of the PCR products have been used as samples of the standard curve of the following qPCR of soil DNA samples and the normalisation of the results of the qPCR and their following comparison with NCBI 's nucleic acid databases. The tests in the soil samples from pots showed an adequate response of the markers *tetM_1*, *sul1_3* και *cfxa_1*. In the 'microcosms' experiment only the primer *erm33_(1)-332* had an adequate response to our methods.

According to the tests the most prominent factors determining the presence of the of antibiotic resistance markers were the treatment or not of the samples with manure, as well as time (declining presence of copies of the antibiotic resistance markers in the samples and increasing number of copies of the bacterial presence marker as time passes). All in all, the markers that have been tested will be an important deposit for future experiments in the lab.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	10
1.1. Αντιβιοτικά.....	10
1.2. Γονίδια ανθεκτικότητας	13
1.3. Τεχνικές.....	14
1.3.1. Εκχύλιση DNA.....	15
1.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	16
1.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time /RT-qPCR) 19	19
1.3.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (gel electrophoresis).....	21
1.3.5. Φασματοφωτομέτρηση.....	23
1.3.6. Ένθεση και μετασχηματισμός Βακτηρίων	25
1.4. Στόχοι εργασίας.....	26
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	26
2.1. Υλικά.....	27
2.1.1. Χημικά, Θρεπτικά, Αντιδραστήρια	27
2.1.2.1 Υλικά	27
2.1.2. Πειραματικός σχεδιασμός	27
2.2. Πειραματική Διαδικασία.....	28
2.2.1. Ηλεκτροφόρηση.....	28
2.2.2. Επιλογή εκκινητών.....	29
2.2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης βαθμιαίας θερμοκρασίας (temperature gradient PCR).....	30
2.2.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	31
2.2.5. Καθαρισμός DNA από στήλη αгарόζης (DNA gel extraction).....	33
2.2.6. Ποσοτικοποίηση DNA.....	33
2.2.7. Κλωνοποίηση DNA σε φορέα (ligation)	33
2.2.8. Μετασχηματισμός βακτηρίων (transformation).....	34
2.2.9. Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων και colony PCR.....	34
2.2.10. Απομόνωση πλασμιδίων και ποσοτικοποίηση (Plasmid extraction)	35
2.2.11. Απομόνωση DNA από δείγματα εδάφους.....	35
2.2.12. Ανάλυση qPCR.....	36

2.2.13 Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης πλασμιδίων.....	37
3. Αποτελέσματα.....	38
3.1 Αποτελέσματα qPCR	38
3.2 Αποτελέσματα βιοστατιστικής ανάλυσης αποτελεσμάτων qPCR	40
4. Συζήτηση.....	44
5. Μελλοντική έρευνα.....	45
6. Βιβλιογραφία.....	47
Παράρτημα I	49
Εκκινήτες	49
Παράρτημα II.....	53
Αποτελέσματα gradient PCR	54
Παράρτημα IV.....	60
Αποτελέσματα φασματοφωτομέτρησης:.....	60
Παράρτημα III.....	61
Προϊόντα PCR.....	61
Παράρτημα V.....	64
Αποτελέσματα μετασχηματισμού και colony PCR.....	64
Παράρτημα VI.....	70
Απομόνωση πλασμιδίων	70
Παράρτημα VII	76
Απομόνωση γενετικού υλικού περιβαλλοντικών δειγμάτων	76
Παράρτημα VIII.....	79
Αποτελέσματα BLAST ενθεμάτων.....	79
Παράρτημα IX.....	85
Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων qPCR	85
Παράρτημα X.....	98
Θρεπτικά υλικά	98
Συνθήκες καλλιέργειας	100
Εξοπλισμός.....	100

1. Εισαγωγή

1.1. Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι παράγονται από τους μικροοργανισμούς ή χημικά συντιθέμενα ή ημισυντιθέμενα ανάλογα αυτών των ουσιών. Ένας βασικός τους ρόλος είναι η επίτευξη διακυτταρικής επικοινωνίας μεταξύ βακτηρίων του ίδιου στελέχους ή είδους αλλά και διαφορετικών ειδών (Schlatter and Kinkel 2014). Ωστόσο σε υψηλές συγκεντρώσεις έχει βρεθεί ότι έχουν βακτηριοκτόνες ιδιότητες. Ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες αλλά και τους μηχανισμούς δράσεις τους, διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες/“ ομάδες” αντιβιοτικών. Οι βασικότερες αυτών οι οποίες μπορούν να εντοπιστούν και σε περιβαλλοντικά δείγματα και τις οποίες μελετήσαμε είναι οι εξής: Τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες, MLSB (μακρολίδια, λινκοσαμίδια, στρεπτρογραμίνη Β), βανκομυκίνες, φθοριοκινολόνες, χλωραμφενικόλες και οι β-λακτάμες (κυρίαρχη ομάδα χρήσης αντιβιοτικών παγκοσμίως). Οι μηχανισμοί δράσεις των αντιβιοτικών μπορούν να αφορούν τη λύση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ή των κυτταρικών τοιχωμάτων (λ.χ. βανκομυκίνη) (Patel and Hashmi 2022) αλλά και τη διακοπή σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων (π.χ.φθοριοκινολόνες) (Blondeau 2004) αλλά και άλλων βιοσυνθετικών μονοπατιών (όπως του φολικού οξέος που αποτελεί στόχο τριμεθοπρινών και σουλφανιμιδών) (‘Sulfonamides’ 2012), (He, Liu, and Wang 2021) (Εικόνα 1.). Ωστόσο οι περισσότερες κατηγορίες των αντιβιοτικών έχουν ως μοριακό στόχο τα ριβοσώματα των βακτηρίων και συνεπώς τη διακοπή της βιοσύνθεσης των πρωτεϊνών των βακτηρίων, (Chopra and Roberts 2001).

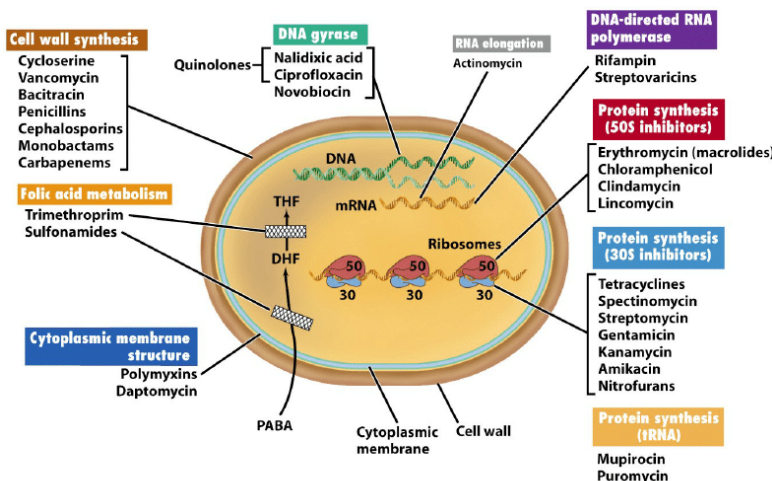


Figure 20-14 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

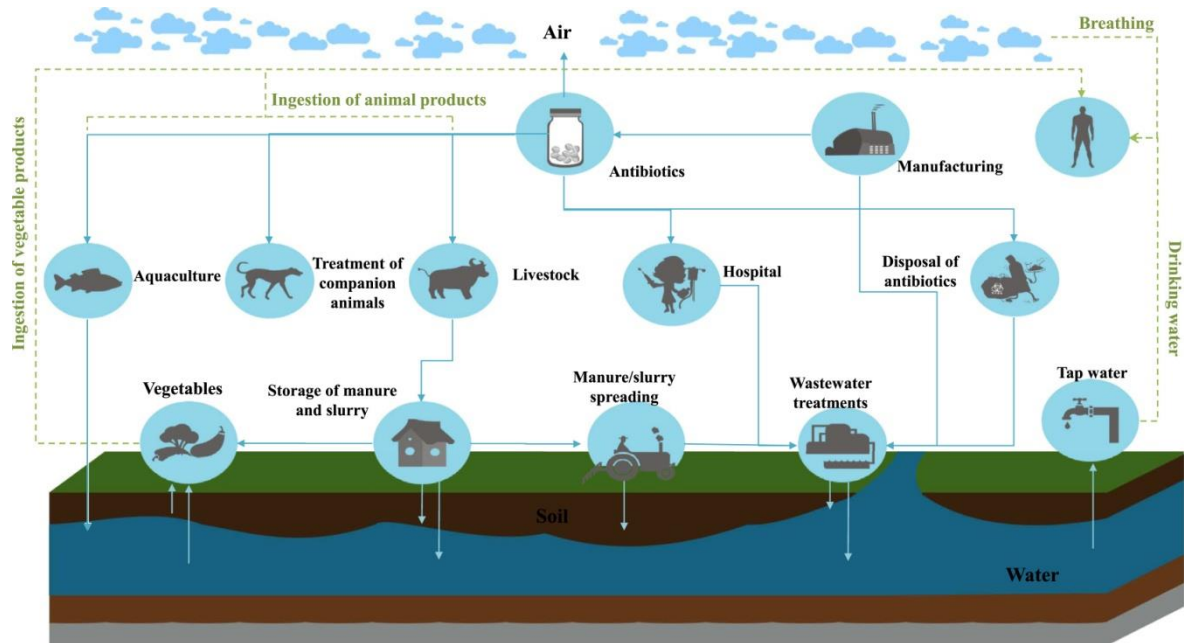
Εικόνα 1. Κατηγορίες αντιβιοτικών και μοριακοί στόχοι αντιβιοτικών. Εικόνα 20-14 Brock biology of microorganism 1/e ©2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται κυρίως ως θεραπευτικοί παράγοντες για διάφορες λοιμώξεις στους ανθρώπους, αλλά και στα ζώα (κατοικίδια και εκτροφής) (Ben et al. 2019). Τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά όμως, τα οποία αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία ασθενειών αλλά και προφύλαξη από αυτές σε ζώα εκτροφής, χρησιμοποιούνται και ως μέσα ανάπτυξης και πάχυνσης των ζώων παρά τις απαγορεύσεις βάσει κοινοτικών κανονισμών και εθνικής νομοθεσίας με αιτιολόγηση προφύλαξης. Ακόμη έχουν εγκριθεί αντιβιοτικά τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες καλλιέργειες φυτών.

Τα αντιβιοτικά ή κατάλοιπα αυτών περνούν στα υδάτινα και τα χερσαία περιβάλλοντα μέσω πολλών οδών όπως: Η απόρριψη υδάτινων λυμάτων αστικών περιοχών και όμβριων υδάτων, λυμάτων από τις διάφορες βιομηχανίες, από την έκπλυση χημικών από το δέρμα των ζώων. Ακόμη μπορούν να εισαχθούν στα υπόγεια ύδατα μέσω αποστράγγισης κοπριάς από κτηνοτροφικές μονάδες. Επιπρόσθετα η χρήση τους στην υδατοκαλλιέργεια για, επίσης, προληπτικούς λόγους ή μέσα πάχυνσης οδηγεί πολλές φορές σε συσσώρευση αντιβιοτικών και συνακόλουθα εκροή σε υδάτινα οικοσυστήματα (Polianciuc et al. 2020).

Στη φυτική παραγωγή τα ομάδες αντιβιοτικών που έχουν λάβει έγκριση (Ben et al. 2019). Ωστόσο η κυριότερη οδός με την οποία εισέρχονται στις καλλιέργειες είναι η επεξεργασία των καλλιεργειών με οργανική λίπανση (κοπριά) που έχει περιέχει αντιβιοτικά. Εισέρχονται με την άρδευση

καλλιεργειών από επεξεργασμένα επιφανειακά νερά που περιέχουν αντιβιοτικά ή όπως έχει αναφερθεί από την απευθείας χορήγηση (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Μονοπάτια εισαγωγής αντιβιοτικών στο έδαφος και στο νερό. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review, Zhang (2019) et.al.

Τα tiamulin και tilmicosin είναι κτηνιατρικά αντιβιοτικά τα οποία χρησιμοποιούνται για την σπανίως σε πτηνοτροφικές μονάδες και βοειδή. Σχετική βιβλιογραφία με την ύπαρξή τους σε περιβαλλοντικά έδειξε την ύπαρξή τους στα κόπρανα χοίρων έπειτα από τη χορήγηση τους σε συγκεντρώσεις 0,55-5,99 µg/g εδάφους και 4,27-749,6 µg/g εδάφους αντίστοιχα (Perruchon et al. 2022). Το sulfomethoxazole είναι αντιβιοτικό που ανήκει στην κατηγορία των σουλφοναμιδών και χορηγείται μαζί με τριμεθοπρίμες εναντίον ενός πλήθους από λοιμώξεις (Heuer et al. 2011). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η μεταχείριση διαφόρων εδαφών με κοπριά που είχαν εφαρμοστεί διάφορες συγκεντρώσεις σουλφοναμιδών οδήγησε σε περίπου 10% των βακτηρίων σε ανθεκτικότητα σε σουλφοναμίδες. Επιπλέον εντοπίστηκε συσχέτιση με την εφαρμογή κοπριάς ενισχυμένης με sulfomethoxazole και της ενεργότητας του ενσωματονίου τάξης I (*IntI1*) (Rauseo et al. 2019). Σύμφωνα με μία άλλη έρευνα η ύπαρξη του sulfomethoxazole αποτελεί αποτελεσματική προϋπόθεση για την πραγματοποίηση οριζόντια γονιδιακής μεταφοράς βάσει πειραμάτων (Vila-

Costa et al. 2017). Ιδιαίτερη αναφορά σε αυτά τα αντιβιοτικά γίνεται επειδή αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα εξελικτικής πίεσης στα πειράματά μας.

1.2. Γονίδια ανθεκτικότητας

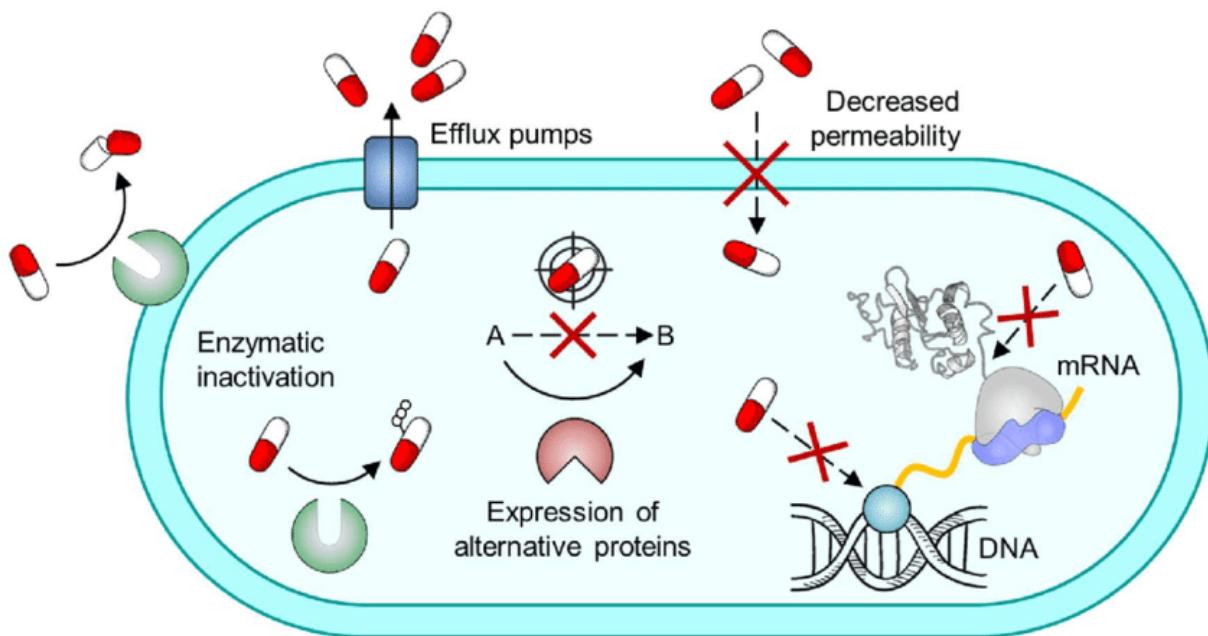
Η γονιδιακή ανθεκτικότητα των βακτηρίων σχετίζεται με όλους τους μηχανισμούς εκείνους με τους οποίους οι μικροοργανισμοί επιβιώνουν της ύπαρξης αντιβιοτικών.

Η μικροβιακή ανθεκτικότητα μπορεί να διακριθεί σε **φυσική (intrinsic/innate)** και σε **επίκτητη (acquired)**. Η **φυσική (intrinsic/innate)** ανθεκτικότητα περιλαμβάνει τους μηχανισμούς που οι μικροοργανισμοί διαθέτουν εκ φύσεως (Zhang and Feng 2016).

Η **επίκτητη (acquired)** ανθεκτικότητα προϋποθέτει την αλλαγή του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών, ώστε να αποκτήσουν νέες ιδιότητες που θα τους προσδώσουν ανθεκτικότητα (van Hoek et al. 2011). Προέρχεται από εξελικτική πίεση είτε από την αλληλεπίδρασή τους με άλλους μικροοργανισμούς είτε σε ανθρωπογενή αίτια. Οι αλλαγές στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών μπορούν να αφορούν τυχαίες χρωμοσωμικές μεταλλάξεις σε κάποια γονίδια που μεταβάλλουν την έκφραση μια πρωτεΐνης (εδραίωση εξελικτικά). Ωστόσο πιο συχνά σχετίζονται οι αλλαγές με απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού από άλλους μικροοργανισμούς (οριζόντια γονιδιακή μεταφορά) και αφορά μία μόνο γενιά και δεν εδραιώνεται συνήθως εξελικτικά λόγω το ότι οφείλεται σε μεταθετά στοιχεία (πλασμίδια, μεταθετόνια, ενσωματόνια, γονιδιακές κασέτες). Τα ενσωματόνια (integrons) ιδιαίτερα διαδραματίζουν το βασικότερο ρόλο στην οριζόντια γονιδιακή μεταφορά και τη διασπορά της ανθεκτικότητας και ιδιαίτερα της τάξης 1 (class 1 integrons) (Quintela-Baluja et al. 2021). Επειδή τα παραπάνω στοιχεία είναι συχνά υπεύθυνα και για την ικανότητα των μικροοργανισμών να μεταβολίζουν ξενοβιοτικές ενώσεις και να αναπτύσσουν αντοχή σε μέταλλα, πολύ συχνά έχουμε το φαινόμενο της απόκτησης ανθεκτικότητας σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά παράλληλα με την ικανότητα μεταβολισμού λόγω συγκληρονόμησης σε οριζόντια μεταθετά στοιχεία (Pal et al. 2015).

Τα βακτήρια δηλαδή διαθέτουν κάποια γονίδια των οποίων την έκφραση μπορούν να μεταβάλλουν για την επιβίωσή τους (Gritsch 2019). Αυτά μπορούν να αφορούν την παραγωγή αντλιών εκροής (outflow channels), τα οποία αποτρέπουν την εισαγωγή των αντιβιοτικών στο εσωτερικό των κυττάρων, αλλά και διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες προσομοιάζουν τους

μοριακούς στόχους των αντιβιοτικών με τις οποίες αλληλεπιδρούν τα αντιβιοτικά, επιτρέποντας στα φυσιολογικά μόρια να παραμείνουν λειτουργικά. Επιπρόσθετα με την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μπορούν οι μικροοργανισμοί να παράγουν περισσότερη ποσότητα του μοριακού στόχου του αντιβιοτικού ή να την ρυθμίσουν κατάλληλα, ώστε να μπορεί όσο το δυνατόν περισσότερη ποσότητα να παραμείνει ενεργή παρά τη δράση του αντιβιοτικού. Τέλος μέσω των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (λ.χ. φωσφορυλίωση, ουβικουϊτίνωση, μεθυλίωση, γλυκοζυλίωση, ακετυλίωση κτλπ.) αλλά και με μείωση της αρχικά παραγόμενης πρωτεΐνης, οι μικροοργανισμοί τροποποιούν την τριτοταγή δομή των στόχων των αντιβιοτικών (δίχως να αλλάζουν τη φυσιολογική τους λειτουργία), προστατεύοντάς τους.



Εικόνα 3. Μηχανισμοί προστασίας των βακτηρίων από αντιβιοτικά. Gritsch, Lukas. (2019). An investigation on antibiotic-free antibacterial materials combining bioresorbable polyesters, chitosan and therapeutic ions. (Gritsch 2019)

1.3. Τεχνικές

Προκειμένου να γίνει η ανάπτυξη μεθόδου πρέπει να προηγηθεί η εκχύλιση DNA από δείγματα που περιέχουν τους δείκτες ενδιαφέροντος, ώστε να χρησιμοποιηθεί στις μετέπειτα πειραματικές διαδικασίες. Το DNA που εκχυλίζεται αποτελεί το εκμαγείο για αντιδράσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) , τόσο βαθμιαίας θερμοκρασίας (temperature gradient PCR) όσο και σταθερής θερμοκρασίας (Papanikolaou et al. 2016a). Στη

συνέχεια τα δείγματα που ενισχύονται ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης (Slater 2009). Ακολουθεί ο καθαρισμός του DNA από την (Wang and Rossman 1994) αγαρόζη και η διαπίστωση ύπαρξής του με τη χρήση φασματοφωτομετρίας (Taillandier and Liquier 1992). Έπειτα μετασχηματίζονται τα βακτήρια με την εισαγωγή των ενισχυομάτων στα πλασμίδια τους (Hanahan 1983), απομονώνονται τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια (Andreou 2013) και στέλνονται για αλληλούχιση. Μετά τα αποτελέσματα της αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε qPCR και στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αυτής.

1.3.1. Εκχύλιση DNA

Αρχικά πραγματοποιείται η εκχύλιση του DNA που χρησιμοποιήθηκε για τις μετέπειτα αναλύσεις. Η διαδικασία με εμπορικά διαθέσιμα kit. Ωστόσο σε κάθε περίπτωση τα βασικά στάδια της διαδικασίας παρέμειναν τα ίδια (Papanikolaou et al. 2016b):

- 1) Αρχικά προηγείται η λύση των μεμβρανών των κυττάρων για την απελευθέρωση του DNA. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με τη χρήση διαλυμάτων που περιέχουν απορρυπαντικά είτε με τη μηχανική λύση των κυττάρων. Το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο απορρυπαντικό είναι το δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)) και δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας. Διασπά τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των πρωτεϊνών, οδηγώντας στην αποδιάταξη της τριτοταγής τους δομής και της λύσης των μεμβρανών.
- 2) Αποικοδόμηση των κυτταρικών πρωτεϊνών μέσω της πρωτεόλυσης τους από ένζυμα. Αδρανοποιούνται αμέσως διάφορες νουκλεάσες, οι οποίες θα μπορούσαν να αποδομήσουν το DNA στη διαδικασία της απομόνωσης. Σε αυτό το στάδιο επίσης δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες για την πρόσδεση του DNA στη στήλη.
- 3) Διαχωρισμός του DNA από τις πρωτεΐνες. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλυμάτων αλάτων υψηλής ιοντικής ισχύος και απόλυτης αιθανόλης (100%) ή με πρόσδεση σε μεμβράνη ιοντοανταλλαγής ή σε μαγνητικά σφαιρίδια. Η

παραπάνω διαδικασία εκμεταλλεύεται την πολικότητα των μακρομορίων και το πώς μπορεί να αλλάζει το φορτίο τους ανάλογα με τις συνθήκες (όξινες , βασικές παρουσία ιόντων κτλπ) , έτσι ώστε να διαχωριστούν οι 2 μεγάλες κατηγορίες των μακρομορίων.

- 4) Καθαρισμός του DNA από υπολείμματα αλάτων με διάλυμα παγωμένης αιθανόλης.
- 5) Ανασύσταση του DNA σε διάλυμα Tris-EDTA (TE). Το TE είναι ασθενώς αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 8-9) που περιέχει EDTA. Το Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) προστατεύει το DNA προσδένοντας σε δισθενή ιόντα, όπως Mg^{+2} ή Ca^{+2} . Τα τελευταία είναι απαραίτητα για τη δράση ενζύμων, όπως οι νουκλεάσες (αποσύνθεση DNA). Εκτός από TE μπορεί να χρησιμοποιηθεί Tris-HCl (pH =8,5) για την ανασύσταση του DNA.

1.3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), αποτελεί μία από τις πιο κοινές μεθόδους της μοριακής βιολογίας (Green and Sambrook 2018). Αποτελεί μια ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης ενός μορίου DNA σε μικρό χρονικό διάστημα *in vitro*. Βασίζεται στην ικανότητα της DNA πολυμεράσης να προσθέτει ένα νουκλεοτίδιο στο ελεύθερο 3'-OH μιας νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Τα βασικά συστατικά μιας τυπικής αντίδρασης PCR είναι: DNA πολυμεράση, εκκινητές, γενετικό υλικό που αναγνωρίζουν οι εκκινητές (DNA εκμαγείο), ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (buffer), Mg^{2+} , δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Τα βασικά στάδια της PCR είναι τρία, τα οποία επαναλαμβάνονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Papanikolaou et al. 2016a) είναι τα εξής (Εικόνα 3.):

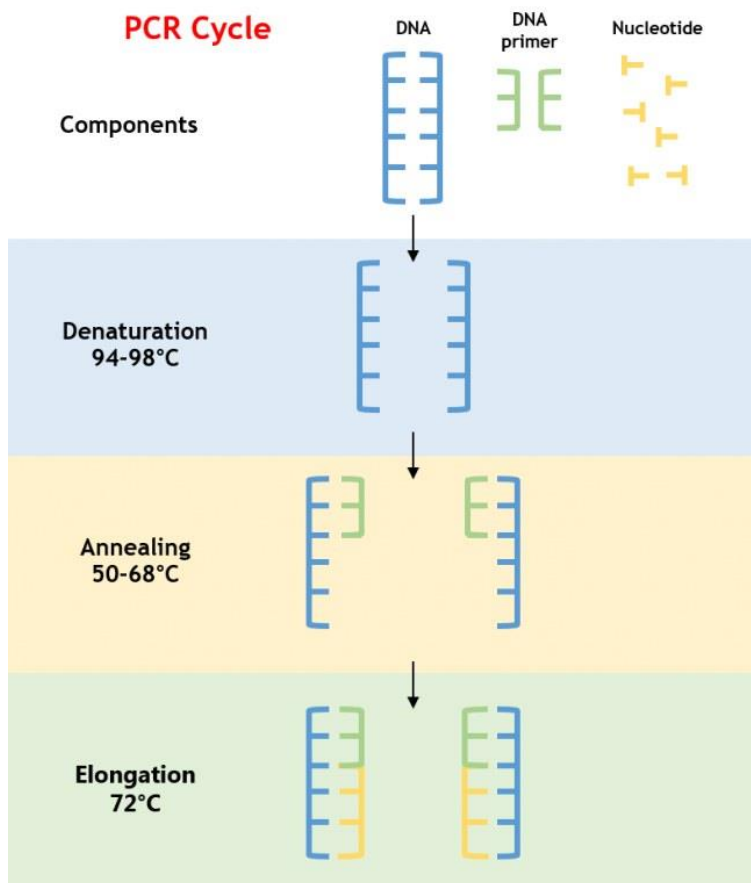
A) **Αποδιάταξη:** Οι 2 κλώνοι του DNA αποδιατάσσονται με τη χρήση θερμικής ενέργειας κατά την άνοδο της θερμοκρασίας. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται σε αυτό το στάδιο είναι 92-95 °C.

B) Υβριδισμός των εκκινητών: Οι εκκινητές σε αυτό το στάδιο υβριδίζουν στην συμπληρωματική αλληλουχία DNA του εκμαγείου. Η θερμοκρασία που πραγματοποιείται αυτό το στάδιο είναι συνήθως 50 με 70 °C, ωστόσο μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη φύση των εκκινητών.

Γ) Επιμόκνηση της αλυσίδας: Η νέα αλυσίδα συντίθεται από τη δράση της DNA πολυμεράσης και της προσθήκης νέων νουκλεοτιδίων σύμφωνα με την συμπληρωματική αλυσίδα. Συνήθως χρησιμοποιείται πολυμεράση απομονωμένη από το αρχαίο *Thermus aquaticus*, ώστε να είναι ανθεκτική σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες. Η θερμοκρασία σε αυτό το στάδιο ποικίλλει και είναι η κατάλληλη για τη δράση της πολυμεράσης, ωστόσο όμως είναι κοντά στους 72 °C.

Όλα τα παραπάνω στάδια πραγματοποιούνται σε θερμικό κυκλοποιητή (Εικόνα 4.). Μια συσκευή που περιέχει μια θερμαινόμενη πλάκα, η οποία αυξομειώνει αυτόματα τη θερμοκρασία ώστε να πραγματοποιηθεί το κάθε στάδιο. Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι μια συσκευή με την οποία μπορούμε να ρυθμίσουμε την επιθυμητή θερμοκρασία, τη διάρκεια κάθε σταδίου και τη διαδοχή τους.

Η βαθμιαία θερμοκρασία PCR (temperature gradient PCR) στηρίζεται στις ίδιες αρχές με την κλασική PCR, ωστόσο η θερμαινόμενη πλάκα που φέρει περιέχει θέσεις αντιστοιχούν σε πολύ περισσότερες θερμοκρασίες του σταδίου του υβριδισμού των εκκινητών και μπορούμε έτσι ρυθμίζοντας ένα επιθυμητό εύρος θερμοκρασιών να δοκιμάσουμε την ικανότητα υβριδοποίησης των εκκινητών σε διάφορες θερμοκρασίες.



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)



Εικόνα 5. Θερμικός κυκλοποιητής.

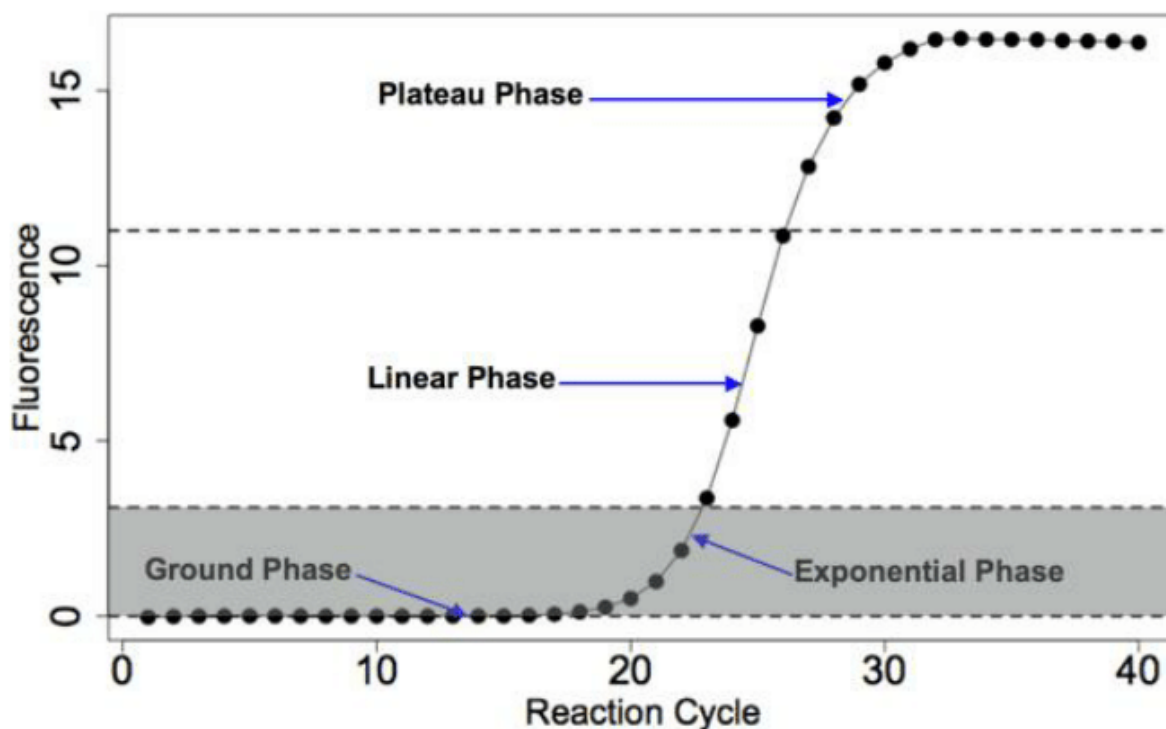
1.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time /RT-qPCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time /RT-qPCR) αποτελεί παραλλαγή και αυτή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και βασίζεται και αυτή στις ίδιες βασικές αρχές και αποτελείται από τα ίδια βασικά στάδια (αποδιάταξη, υβριδισμός, επιμύκηση), ωστόσο η χρήση διαφόρων χρωστικών ή άλλων ουσιών που φθορίζουν κάτω από συγκεκριμένες εντάσεις ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (Arya et al. 2005). Ο φθορισμός αυτός ανιχνεύεται από αισθητήρα, ο οποίος έχει συγκεκριμένη ευαισθησία. Αυτές οι ουσίες προσδένονται όταν το γενετικό υλικό όταν βρίσκεται είτε σε δίκλωνη μορφή ή σε μονόκλωνη μορφή ανάλογα με τις βασικές αρχές λειτουργίας κάθε φθορίζουσας ουσίας. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία είναι η SYBRGREEN. Ακόμη διάφορες εφαρμογές της μεθόδου (όπως ‘η πολυπλεξία’, η ταυτόχρονη ενίσχυση διαφορετικών τμημάτων με τη χρήση διαφορετικών εκκινήτων σε διαφορετικά δείγματα, η χρήση διαφορετικού μήκους τμημάτων ως εκμαγεία κτλπ.) μπορούν να μεταβάλλουν θετικά ή αρνητικά την ικανότητα της μεθόδου για ποσοτικοποίηση (Hawkins and Guest 2017). Η qPCR μπορεί να διαχωριστεί και σε φάσεις επιπλέον ανάλογα με τα στάδια της διαδικασίας που πραγματοποιούνται σε κάθε φάση:

- 1. Εκθετική (exponential):** Σε αυτό το στάδιο παρατηρείται εκθετική αύξηση των μορίων DNA των δειγμάτων, καθώς τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε περίσσεια. Ωστόσο δεν ανιχνεύεται φθορισμός από το δείγμα, διότι η ποσότητα του φθορισμού είναι μικρότερη από την ποσότητα που είναι ικανή να ανιχνευτεί από τον αισθητήρα και αντιστοιχεί σε μικρή συγκέντρωση δείγματος.
- 2. Εκθετική γραμμική (linear):** Αποτελεί συνέχεια της εκθετικής γραμμικής, ωστόσο σε αυτό το στάδιο το δείγμα έφτασε στο CT (Cycle Threshold), δηλαδή τον ‘ κύκλο ‘ της PCR στον οποίο ο φθορισμός που εκπέμπει το δείγμα είναι αρκετός και ανιχνεύεται από τη συσκευή. Η ποσότητα φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας του γενετικού υλικού στην οποία προσδένεται η φθορίζουσα ουσία και ανάλογα με τον αριθμό αυτού του κύκλου εξάγουμε συμπεράσματα σχετικά με την αρχική ποσότητα του δείγματός μας.

3. Φάση "πλατό" (<<Plateau>> phase): Σε αυτή τη φάση είτε λόγω εξάντλησης ενός αντιδραστηρίου, είτε λόγω της συσσώρευσης παραπροϊόντων των (διμερή εκκινητών, μη ειδικά τμήματα ενίσχυσης DNA) είτε ανικανότητα του εκάστοτε μηχανήματος να ανιχνεύσει το φθορισμό (εύρος ικανότητας ανίχνευσης φθορισμού), είτε λόγω συνδυασμού των παραπάνω, έχουμε μια φάση στην οποία δεν μπορεί να ανιχνευτεί η παραπάνω ποσότητα φθορισμού και η περισσότερη ποσότητα του γενετικού υλικού και η μέθοδος βρίσκεται στο ανώτατο όριο ανίχνευσης.

Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο την ενίσχυση ενός τμήματος και την ποσοτικοποίηση σε κάθε κύκλο (Harshitha and Arunraj 2021). Οι πληροφορίες για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων λαμβάνονται με τη μέσω ενός διαγράμματος ενίσχυσης (amplification plot) (Εικόνα 5).



Εικόνα 6. Amplification plot όπου φαίνονται οι διάφορες χαρακτηριστικές φάσεις μιας ποσοτικής PCR. Robert B. Page, Arnold J. Stromberg, "Linear Methods for Analysis and Quality Control of Relative Expression Ratios from Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Experiments", *The Scientific World Journal*, vol. 11, Article ID 485391, 11 pages, 2011.

Για να υπάρξει σωστή ποσοτικοποίηση όμως πρέπει οι μετρήσεις να βασίζονται σε μια τυπική καμπύλη. Αυτή έχει τη μορφή ευθείας σε σύστημα αξόνων ένταση φθορισμού-συγκέντρωση DNA. Κατασκευάζεται με τη χρήση

μιας αρχικής γνωστής συγκέντρωση DNA, σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{αριθμός αντιγράφων} = \frac{\text{Ποσότητα DNA (ng)} \times \text{Αριθμός Avogadro } (6,02 \times 10^{23})}{\text{Μήκος DNA (ένθεμα+φορέας)} \times 660 \text{ (μέση μάζα 1 bp DNA)} \times 10^9}$$

Το 10^9 αποτελεί παράγοντα κανονικοποίησης,

Σύμφωνα με αυτόν τον τύπο υπολογίζεται μια αρχική συγκέντρωση αντιγράφων που αντιστοιχεί σε 10^{10} σχετική συγκέντρωση (υψηλότερη) των δειγμάτων μας και με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (1 τμήμα δείγματος - 9 νερό) φτάνουμε σε σχετική συγκέντρωση 10^0 .

Χρησιμοποιούνται τα δείγματα 10^8 έως 10^0 ως εκμαγεία για αντιδράσεις qPCR και σύμφωνα με το φθορισμό του κάθε δείγματος δημιουργείται η καμπύλη για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

1.3.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (gel electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή είναι μια πολύ κοινή μέθοδος διαχωρισμού τμημάτων DNA με βάση το μέγεθός τους ή το φορτίο τους (Slater 2009). Οι πηκτές (gels) για το διαχωρισμό των διαφόρων τμημάτων DNA κατασκευάζονται από αγαρόζη, ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος έχει τη μορφή ξηρής λευκής πούδρας. Όταν η αγαρόζη θερμανθεί διαλυμένη σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) και αφηθεί να κρυώσει, παράγει μια στερεή πηκτή.

Πριν τοποθετηθούν τα δείγματα DNA, η πηκτή εισάγεται σε ένα δοχείο (*apparatus*) ηλεκτροφόρησης, το οποίο περιέχει ένα ρυθμιστικό διάλυμα απαραίτητο για τη δημιουργία ηλεκτρικού δυναμικού για τη μετακίνηση των δειγμάτων. Το ένα άκρο του *apparatus* έχει ενσωματωμένο ένα αρνητικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο και το άλλο άκρο έχει θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο. Το άκρο της πηκτής το οποίο δεν φέρει τα πηγαδάκια τοποθετείται στην πλευρά του αρνητικού ηλεκτροδίου. Τα δείγματα πριν την εισαγωγή τους στα πηγαδάκια προετοιμάζονται με ένα διάλυμα χρωστικής φόρτωσης (loading dye), το οποίο περιέχει συνήθως γλυκερόλη, EDTA και μια χρωστική. Η γλυκερόλη προσδίδει επιπλέον μάζα στα δείγματα του DNA

για την πιο εύκολη μετακίνησή τους και δημιουργεί ένα στρώμα στον πυθμένα κάθε πηγαδιού.

Το EDTA (αιθυλενοδιαμινο τετραοξικό οξύ, Ethylenediamine tetraacetic acid) συμπλέκεται με δισθενή ιόντα, εξουδετερώνοντας έτσι τις νουκλεάσες τις οποίες χρησιμοποιούν αυτά τα μέταλλα (Slater 2009). Η χρωστική μας επιτρέπει να βλέπουμε την απόσταση που μετακινήθηκαν τα δείγματα στην πηκτή.

Τα δείγματα των νουκλεϊκών οξέων φορτώνονται σε πηγαδάκια στη μία άκρη της πηκτής και ηλεκτρικό ρεύμα εφαρμόζεται μεταξύ των 2 άκρων της, με αποτέλεσμα να έχουμε μετακίνηση των νουκλεϊκών οξέων. Επειδή τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα κινούνται από τον αρνητικό στον θετικό πόλο των ηλεκτροδίων. Για να οπτικοποιήσουμε την κίνηση των νουκλεϊκών οξέων στην πηκτή χρησιμοποιούμε κατά την κατασκευή του gel βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο συνδέεται στα νουκλεϊκά οξέα και φωσφορίζει κάτω από την έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Για να έχουμε μέτρο σύγκρισης του μεγέθους του DNA των διάφορων ζωνών από τα δείγματα σε κάθε πηγαδάκι χρησιμοποιήσαμε έναν μάρτυρα (ladder). Αυτός ο μάρτυρας αποτελεί ένα διάλυμα που περιέχει διάφορα τμήματα DNA σε διάφορα μεγέθη (50 bp-4000 bp) ανάλογα και με τον μάρτυρα) και γλυκερόλη EDTA και κάποια χρωστική για τους λόγους που αναφέραμε. Επιτρέπει λοιπόν την εύρεση των μεγεθών των τμημάτων DNA στα διάφορα δείγματα.

1.3.5 Καθαρισμός νουκλεϊκών οξέων σε στήλη

Στη συνέχεια τα αποτελέσματα της PCR τα οποία διαχωρίστηκαν με τη βοήθεια πηκτής και επιβεβαιώθηκαν ότι αποτελούν τα μεγέθη τα οποία αναμένονται από τη χρήση των εκκινητών, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός των τμημάτων αυτών από το gel αγαρόζης με τη χρήση kit (Moore, Chory, and Ribaudó 2001).

Μετά το κόψιμο του τμήματος του gel που περιέχει το DNA που επιθυμούμε να συλλέξουμε χρησιμοποιούμε αρχικά ένα διάλυμα που περιέχει ένα δείκτη pH. Ο δείκτης pH υπάρχει, ώστε να διασφαλίζεται η άριστη σύνδεση του DNA στο διάλυμα. Η διαλυτοποίηση του DNA στο buffer πραγματοποιείται με θέρμανση της πηκτής αγαρόζης παρουσία ενός διαλύματος, ώστε να

υπάρξει αποδιάταξη των πολυμερών της (Wang and Rossman 1994). Μετά την πλήρη διάλυση της πηκτής, το διάλυμα εισάγεται σε ένα φιαλίδιο με πορώδη μεμβράνη από οξειδίο του πυριτίου. Τα τμήματα του DNA συνδέονται σε αυτές τις πορώδεις μεμβράνες παρουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης αλάτων, τα οποία δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των δύο. Το παραπάνω συμβαίνει κατά τη διάρκεια φυγοκέντρωσης του πρώτου ρυθμιστικού διαλύματος που ήταν υπεύθυνο για τη διαλυτοποίηση του DNA ή ενός άλλου ρυθμιστικού μέσα από τη στήλη (Wang and Rossman 1994).

Όσο το DNA παραμένει συνδεδεμένο στη μεμβράνη, άλλα στοιχεία που μπορεί να συνυπάρχουν, όπως νουκλεοτίδια, πρωτεΐνες, άλατα, εκκινητές, βρωμιούχο αιθίδιο κτλ., τα οποία μειώνουν την καθαρότητα του δείγματος αφαιρούνται με τη φυγοκέντρωση αλκοολούχων διαλυμάτων μέσω της στήλης. Έπειτα από πολλαπλές πλύσεις αφαιρούνται και τα άλατα. Έτσι προετοιμάζεται το DNA για έκλυση. Τελικό στάδιο είναι η έκλυση του DNA. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της φυγοκέντρωσης χαμηλής ιοντικής ισχύος ρυθμιστικών διαλυμάτων (συνήθως pH μεταξύ 8 και 9) από τη στήλη. Αυτά τα διαλύματα διαταράσσουν τους δεσμούς μεταξύ της μεμβράνης και του DNA, επιτρέποντας τη συλλογή ενός καθαρού διαλύματος.

1.3.5. Φασματοφωτομέτρηση

Έπειτα από την απομόνωση ποσότητας DNA, απαραίτητος είναι ο έλεγχος της καθαρότητας των δειγμάτων απομονωμένου DNA. Οι διάφοροι παράγοντες που μειώνουν την καθαρότητα του DNA. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των μακρομορίων να απορροφούν ακτινοβολία συγκεκριμένου κύματος και να ανακλούν ακτινοβολία σε υψηλότερα μήκη κύματος η οποία ανιχνεύεται από ένα ανιχνευτή (Taillandier and Liquier 1992). Η τιμή της ακτινοβολίας που απορροφάται και ανακλάται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των μακρομορίων στο δείγμα. Στην πιο απλή του μορφή αποτελείται από μια πηγή φωτός, ένα πρίσμα το οποίο διαχωρίζει την ακτινοβολία σε διάφορα μήκη κύματος, μια οπή απ'όπου διέρχεται το μήκος κύματος που μας ενδιαφέρει, το δείγμα που βρίσκεται σε ένα δοχείο (κυψελίδα) ή και δίχως αυτό και ένας ανιχνευτής της ακτινοβολίας που εκπέμπεται. Το φώς που παράγεται από μία πηγή κατευθύνεται σε ένα διάλυμα έχοντας μια ισχύ (I_0), το οποίο περιέχει μια ουσία σε ορισμένη

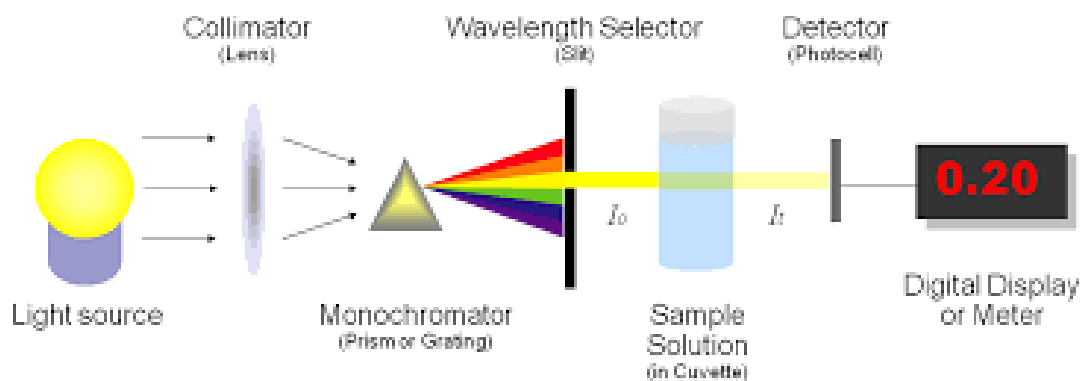
συγκέντρωση . Το υδατικό διάλυμα απορροφά μια ποσότητα αυτής της ποσότητας φωτός και την άλλη την ανακλά με μικρότερη συχνότητα από την I_0 . Τα φωτόμετρα που χρησιμοποιούμε συνήθως στο εργαστήριο είναι φωτόμετρα που παράγουν μήκη κύματος 180-780 nm (ορατή-υπεριώδης) ακτινοβολία. Η συγκέντρωση του δείγματος (C) υπολογίστηκε από το νόμο του Beer-Lambert: $A = \epsilon * C * l$ με τη βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης απορροφήσεων δειγμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις.

Όπου:

- C: η συγκέντρωση
- l: μήκος διαδρομής
- ϵ : συντελεστής μοριακής απορρόφησης

Ποσοτικοποίηση του DNA όμως μπορεί να πραγματοποιηθεί επίσης με τη χρήση διαφόρων χρωστικών οι οποίες προσδένονται στο DNA. Η χρωστική απορροφά συγκεκριμένο μήκος κύματος και με τη βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης μπορούμε να έχουμε αντιστοίχιση απορρόφησης και συγκέντρωσης.

Μήκη κύματος που απορροφούν τα βασικά μακρομόρια είναι 280 nm (πρωτεΐνες) , 260 nm (DNA-RNA) . Τα άλατα απορροφούν στα 230 nm. Ανάλογα την αναλογία συγκεντρώσεων των μορίων που απορροφούν στα παραπάνω μήκη, έχουμε εικόνα για την καθαρότητα των δειγμάτων.



Εικόνα 7. Τυπική διάταξη φασματοφωτόμετρου. Παρά τις παραλλαγές, η βασική μορφή τους φαίνεται στην εικόνα.

1.3.6. Ένθεση και μετασχηματισμός Βακτηρίων

Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων είναι μια πολύ διαδεδομένη μέθοδος της γενετικής μηχανικής, κατά την οποία έχουμε τεχνητή εισαγωγή ενός φορέα κλωνοποίησης (γενετικό υλικό), ο οποίος θα φέρει το επιθυμητό τμήμα του DNA σε δεκτικά βακτήρια. Πραγματοποιούμε μετασχηματισμό βακτηρίων έτσι ώστε άλλες φορές να έχουμε έκφραση ενός επιθυμητού γονιδίου και παραγωγή του προϊόντος του σε μεγάλες ποσότητες, ενώ άλλες φορές ώστε να δημιουργήσουμε πολλά αντίγραφα ενός τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε. Βασικά εργαλεία στο μετασχηματισμό των βακτηρίων είναι τα πλασμίδια ως φορείς (Casali and Preston 2003). Τα πλασμίδια είναι μικρά, κυκλικά μόρια δίκλωνου DNA που απαντούν στην φύση ως επιπλέον εξωχρωμοσωματικό γενετικό υλικό διαφόρων προκαρυωτικών (βακτήρια) αλλά και κατώτερων ευκαρυωτικών (μύκητες) κυττάρων. Το μέγεθός τους ποικίλει από χίλια ως μερικές εκατοντάδες χιλιάδες ζεύγη βάσεων. Περιέχουν πολλές φορές και ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Διαθέτουν θέση αντιγραφής (ori ,origin of replication) και έχουν την ικανότητα αυτόνομου διπλασιασμού. Τα τροποποιημένα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται στις εφαρμογές της μοριακής βιολογίας περιέχουν και θέσεις αναγνώρισης από περιοριστικές νουκλεάσες, έτσι ώστε να επιτευχθεί η κλωνοποίηση του επιθυμητού τμήματος σε αυτά (Hanahan 1983). Ακόμη περιέχουν και γονίδια δείκτες αναφοράς (π.χ. lac-z), τα οποία σε ορισμένες συνθήκες τους προσδίδουν ορισμένα χαρακτηριστικά. Μας επιτρέπουν έτσι να διαχωρίσουμε τα κύτταρα που έλαβαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σε σχέση με αυτά που έλαβαν το μη ανασυνδυασμένο.

Πρίν το μετασχηματισμό πρέπει να προηγηθεί η κλωνοποίηση του επιθυμητού τμήματος DNA στα πλασμίδια και η δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων (Hanahan 1983). Αυτό πραγματοποιείται με το ένζυμο DNA λιγάση. Το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει περιοχές του πλασμιδίου και εισάγει το τμήμα στο πλασμίδιο είτε εάν υπάρχουν συμπληρωματικά είτε “τυφλά” άκρα (blunt). Στη συνέχεια εισάγουμε αυτά τα πλασμίδια στα κύτταρα είτε με “θερμικό σοκ” είτε με ηλεκτροπόρωση με χρήση ρεύματος χαμηλής τάσης (15-30 mV), καθώς δημιουργούνται πόροι στην επιφάνεια της μεμβράνης και τα πλασμίδια εισάγονται στο εσωτερικό των κυττάρων. Έπειτα χρησιμοποιούμε ένα θρεπτικό μέσο που

περιέχει γλυκόζη, ώστε γρήγορα τα κύτταρα να ανακάμψουν από το σοκ που υποβλήθηκαν. Μετά μεταφέρουμε ποσότητα κυττάρων σε τρυβλίο Petri που περιέχει θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani) Agar και αντιβιοτικά. Έτσι καταφέρνουμε να διασφαλίσουμε ότι μόνο τα μετασχηματισμένα βακτήρια θα αναπτυχθούν. Επίσης παρέχει όλα τα υποστρώματα των γονιδίων αναφοράς, ώστε να γίνει διαχωρισμός κυττάρων με βάση το πλασμίδιο που έλαβαν. Αφήνουμε τα κύτταρα overnight σε βέλτιστες συνθήκες να επωαστούν και την επόμενη μέρα επιλέγουμε τα κύτταρα που μας ενδιαφέρουν. Η επιλογή αυτή των κυττάρων γίνεται με τη χρήση αντιβιοτικών, καθώς το πλασμίδιο p-gem T-easy που χρησιμοποιήθηκε προσδίδει ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη. Έτσι τα κύτταρα που δεν έλαβαν το πλασμίδιο πεθαίνουν παρουσία αντιβιοτικού, ενώ τα άλλα επιβιώνουν. Η επιλογή κυττάρων που έλαβαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σε σχέση με αυτά που έλαβαν μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο έγινε με βάση το χρώμα τους. Όσα έλαβαν ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σχημάτισαν άχρωμες αποικίες, ενώ όσα έλαβαν μη ανασυνδυασμένο μπλε αποικίες. Αυτό συμβαίνει, διότι το τμήμα που επιθυμούμε να εισάγουμε, εισάγεται στο εσωτερικό του γονιδίου *β-γαλακτοζιδάση* απενεργοποιώντας το. Έτσι τα βακτήρια που προσλαμβάνουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο δεν έχουν την ικανότητα να μεταβολίσουν το υπόστρωμα lac-z και δεν χρωματίζονται από τα προϊόντα του μεταβολισμού του, ενώ όσα έχουν λάβει μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μεταβολίζουν το υπόστρωμα και χρωματίζονται.

1.4. Στόχοι εργασίας

Ο στόχος της εργασίας είναι η ανάπτυξη μεθόδου για την ταυτοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (τετρακυκλινών, σουλφοναμιδών, β-λακταμών, κεφοταξίμης) από βακτηριακές κοινοπραξίες εδάφους. Η ποσοτικοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά σε εδάφη υπό πίεση κτηνιατρικών αντιβιοτικών (tiamuline, tilmocosin, sulfomethoxazole), είτε απευθείας, είτε μέσω επιφόρτισης ενσωματωμένης κοπριάς.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Υλικά

2.1.1. Χημικά, Θρεπτικά, Αντιδραστήρια

2.1.2.1 Υλικά

1. Ο παρακάτω πίνακας περιγράφει τα χαρακτηριστικά του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα.

Soil	pH	Organic carbon content %	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)
Rodia	7,9	1,37	45,82	36	18,18

Οι πίνακες της σύστασης των θρεπτικών υλικών, οι συνθήκες καλλιέργειας και οι ποσότητες των λοιπών αντιδραστηρίων βρίσκονται στο παράρτημα 10 (**παράρτημα X**)

2.1.2.2. Αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταχείριση των εδαφών

Οι εφαρμογές sulfomethoxazole (SMX), tiamuline (TIA) και tilmicosin (TLM) πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το αναλυτικό πρότυπο SMX (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, purity 99.9%) και τα τεχνικά πρότυπα για το TIA φουμαρικό (Biosynth®Carbosynth, purity >97%) και το TLM (Biosynth®Carbosynth, purity >85%) αντίστοιχα. Τα αναλυτικά πρότυπα του SMX (ίδια με επάνω), του TIA φουμαρικού (Vetranal®Sigma-Aldrich, purity >98%) και του TLM (HPC Standards, purity 92.8%) χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των πρότυπων καμπύλων για την ποσοτικοποίηση των αντιβιοτικών με HPLC-PDA, όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.1.2. Πειραματικός σχεδιασμός

Στο γενικότερο πειραματικό πλαίσιο πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα. Το ένα είχε ως στόχο την ανάπτυξη των μεθόδων qPCR και το δεύτερο την εφαρμογή των μεθόδων σε εδάφη που είχαν μεταχειριστεί με αντιβιοτικά ή με κοπριές που περιείχαν αντιβιοτικά). Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε για το δεύτερο πείραμα είχε διαπιστωθεί από προηγούμενα πειράματα ότι είχε αυξημένη ικανότητα διάσπασης αντιβιοτικών (Perruchon et al., 2022).

Χρησιμοποιήθηκε το χώμα “ροδιά” στα μισά φυτοδοχεία του πειράματος που χαρακτηρίστηκαν. Στα άλλα μισά χρησιμοποιήθηκε χώμα ενισχυμένο με 2% κοπριά στις γλάστρες. Η κοπριά/τα κόπρανα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από ζώα τα οποία διαπιστευμένα δεν ελάμβαναν καθόλου κτηνιατρικά αντιβιοτικά. Αρχικά προσαρμόστηκε η υγρασία του χώματος σε 40% της υδατοχωρητικότητάς του. Το ίδιο συνέβη και για τα χώματα που ενισχύθηκαν με κοπριά. Συνολικά υπήρξαν 8 φυτοδοχεία διαχωρισμένα σε 2 κατηγορίες: “ μάρτυρες” = “ control” και “ δείγματα” = “ samples”. Οι “ μάρτυρες” ήταν 2, ένας που περιείχε μόνο χώμα και ο άλλος χώμα και κοπριά. Αυτά τα φυτοδοχεία δεν περιείχαν καθόλου αντιβιοτικά. Τα φυτοδοχεία που αντιστοιχούσαν στα δείγματα ήταν 6. Στα 3 από αυτά χρησιμοποιήθηκε χώμα μόνο και στα άλλα 3 χώμα και κοπριά. Στα 3 που περιείχαν μόνο χώμα εφαρμόστηκαν απευθείας τα αντιβιοτικά tiamulin (TIA), tilmicosin (TLM) και sulfamethoxazole (SMX) με τελική συγκέντρωση αντιβιοτικών $2,5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ εδάφους. Στα 3 φυτοδοχεία που περιείχαν και κοπριά εφαρμόστηκαν τα αντιβιοτικά πρώτα στην κοπριά και μετά αυτή ενσωματώθηκε στο χώμα. Η τελική συγκέντρωση των αντιβιοτικών είναι ίδια σε αυτά τα φυτοδοχεία με αυτά που περιείχαν μόνο χώμα. Τελική μάζα χώματος ή μάζας χώματος ενισχυμένου με κοπριά σε κάθε γλάστρα ήταν 3,25 g. Ακολούθησαν επαναλαμβανόμενες εφαρμογές αντιβιοτικών απευθείας στα χώματα ή στην κοπριά ανάλογα με το είδος της γλάστρας. Η κάθε εφαρμογή επαναλήφθηκε έπειτα τη συγκομιδή κάθε σποράς (μέχρι τώρα έχουν πραγματοποιηθεί σπορές πατάτας και δύο κύκλοι σπανακιού). Δειγματοληψία πραγματοποιείται 1 φορά το μήνα. Τα χαρακτηριστικά του χώματος φαίνονται στον πίνακα της υποενότητας **2.1.2 Υλικά.**

2.2. Πειραματική Διαδικασία

2.2.1. Ηλεκτροφόρηση

Στη συνέχεια τα αποτελέσματα της gradient PCR ηλεκτροφορήθηκαν. Σε ένα πιατάκι PCR 96 θέσεων φορτώθηκαν 5-10 μl του κάθε δείγματος με 1-2 μl χρωστικής (6X DNA gel loading dye without EDTA ThermoFisherScientific®(Waltham,MA,USA)). Εξαιτίας των μικρών σε μέγεθος αναμενόμενων προϊόντων (100-200 bp) στα περισσότερα προϊόντα των εκκινητών μας της PCR χρησιμοποιήσαμε ηλεκτρικές αγαρόζης 1,5% w/v για μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα. Για να εξακριβώσουμε τα μεγέθη

των προϊόντων χρησιμοποιήθηκαν 3 μl μάρτυρα (Quick-Load®Purple 1kb Plus DNA Ladder (Baltimore, MD, USA)). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 90-100 mV τάσης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα αποτελέσματα των προϊόντων που λάβαμε και ήταν και τα αναμενόμενα ήταν τα εξής: 171 bp για τον εκκινητή *tetM_1*, 105 bp για τον εκκινητή *sulI_3*, 100 bp για τον εκκινητή *tem_1*, 101 bp για τον εκκινητή *cfxa_1*, 95 bp για τον εκκινητή *dfrA1_1*, 173 bp για τον εκκινητή *dfrA1_17*, 239 bp για τον εκκινητή *erm33_(1)-332* και *qnrD-447* 373 bp. Οι πρώτοι τέσσερις εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα των φυτοδοχείων, ενώ οι 4 τελευταίοι αποτέλεσαν τους εκκινητές ενδιαφέροντος στο πείραμα των ‘‘ μικροκόσμων’’.

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για να διερευνηθεί η βέλτιστη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών. Από τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων (ένταση ζωνών και απουσία δευτερευόντων προϊόντων) αντιλαμβανόμαστε ότι οι βέλτιστες θερμοκρασίες υβριδισμού για τον κάθε εκκινητή είναι: 49 °C για τον εκκινητή *tetM_1*, 52 °C για τον *sulI_3*, 46 °C για τον *tem_1*, 54 °C για τον *cfxa_1*, 56 °C για τον *dfrA1_17*, 60 °C για τον *dfrA1_1* και 54 °C για *erm33_(1)-332* και *qnrD_(4)-447*. Οι αντιδράσεις gradient PCR πραγματοποιήθηκαν σε 35 κύκλους. Σύμφωνα με τις βέλτιστες θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών ακολούθησε η διεξαγωγή PCR για ενίσχυση ποσότητας DNA.

2.2.2 Επιλογή εκκινητών

Οι εκκινητές επιλέχθηκαν από μία συλλογή εκκινητών της βασισμένης στην βιβλιογραφία βάσης δεδομένων ARG (Antibiotic Resistance Gene Analyzer), καθώς επίσης και της βάσης δεδομένων LCPDB-ARG (Literature-Based Manually-Curated Database Antibiotic Resistance Genes) η οποία βασίστηκε σε δεδομένα μεταγονιδιωμιατικής. Οι περιεχόμενοι εκκινητές στην βάση δεδομένων ελέγχθηκαν με βάση ενημερωμένα δεδομένα σχετικά για την ειδικότητα (specificity: 80-100 %), την αποτελεσματικότητά τους (efficacy: 80-100%) και το μέγεθος του προϊόντος (100-400 bp) έπειτα από

ενίσχυση τμήματος. Επίσης ελέγχθηκαν για τη συσχέτισή τους με περιβαλλοντικά δείγματα εδάφους και κοπριάς. Αυτά τα χαρακτηριστικά τα επιθυμούμε, διότι θέλουμε να ανιχνεύσουμε όσο το δυνατόν περισσότερο εξειδικευμένα γονίδια ανθεκτικότητας για ορισμένα αντιβιοτικά. Επίσης επειδή θέλουμε να προχωρήσουμε σε κλωνοποίηση των προϊόντων, θα πρέπει να έχουν ορισμένα μεγέθη αυτά, ώστε να μπορούν να κλωνοποιηθούν εύκολα σε πλασμίδια. Προσπαθήσαμε να συμπεριλάβουμε εκκινητές από όλες τις βασικές κατηγορίες αντιβιοτικών. Τα αποτελέσματα της αναζήτησης/δοκιμών φαίνονται στους πίνακες του παραρτήματος (Πίνακας 1. Πίνακας 2., Πίνακας 3.. **παράρτημα I**).

2.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης βαθμιαίας θερμοκρασίας (temperature gradient PCR)

Στη συνέχεια με τα ζεύγη των εκκινητών πραγματοποιήσαμε αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης βαθμιαίας θερμοκρασίας (temperature gradient PCR). Οι συνθήκες των σταδίων της gradient PCR είναι οι εξής: Αρχικά 95 °C για 15'' για να επιτευχθεί η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA και ως τρίτο στάδιο τους 72 °C αρχικά για 30'' και έπειτα για 10 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η επιμήκυνση της αλυσίδας από την πολυμεράση και σε δεύτερη φάση με τον αυξημένο χρόνο να αδρανοποιηθεί η πολυμεράση για να σταματήσει η αντίδραση. Αυτά τα βήματα ίσχυαν για κάθε εκκινητή και αυτό που μεταβλήθηκε ήταν η βαθμίδωση της θερμοκρασίας του βήματος της υβριδοποίησης των εκκινητών. Για τους εκκινητές *tetM_1*, *sul1_3* και *tem_1* ήταν 46 °C-56 °C και για τους εκκινητές *cfxa_1*, *dfrA1_17*, *dfrA1_1*, *erm33_(1)-332* και *qnrD_(4)-447* ήταν 50 °C -60 °C. Η διάρκεια του σταδίου της υβριδοποίησης ήταν 30''. Οι αντιδράσεις gradient PCR πραγματοποιήθηκαν σε 35 κύκλους. Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων για μια αντίδραση 20 μl φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήρια	Όγκος σε μl
H ₂ O	14,52
Tag polymerase buffer	2

dNTP's (10 nM)	0,4
Tag polymerase (5 U/μl)	0,08
Ανάστροφος εκκινιτής (10 μM)	1
Πρόσθιος εκκινιτής (10 μM)	1
DNA δείγμα (εκμαγείο)	1

Πίνακας 4. Πίνακας αντιδραστηρίων για μια αντίδραση gradient PCR 20 μl.

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
dNTP's	0,2 (nM)
Tag polymerase	0,02 (U/μl)
Ανάστροφος εκκινιτής	0,5 (μM)
Πρόσθιος εκκινιτής	0,5 (μM)
DNA δείγμα (εκμαγείο)	0,1 (μM)

Πίνακας 5. Πίνακας τελικών συγκεντρώσεων αντιδραστηρίων αντίδρασης gradient PCR 20 μl

Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων στην αντίδραση gradient PCR φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Τα αποτελέσματα του κάθε εκκινιτή φαίνονται στις εικόνες στο παράρτημα 2 (**παράρτημα II**).

2.2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στη συνέχεια με στόχο να ενισχύσουμε την ποσότητα των τμημάτων που αναγνωρίζουν οι εκκινιτές, ώστε να το απομονώσουμε και να συνεχίσουμε την πειραματική διαδικασία, πραγματοποιήσαμε μία PCR. Οι αντιδράσεις ήταν 50 μl. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και ένας αρνητικός μάρτυρας, ώστε να εξακριβωθεί εάν υπάρχουν τυχόν επιμολύνσεις. Οι θερμοκρασίες των βασικών σταδίων της PCR έμειναν ίδιες σε σχέση με την gradient PCR, ωστόσο η θερμοκρασία υβριδισμού ορίστηκε ως η βέλτιστη, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της gradient. Οι συνθήκες των σταδίων της PCR οι εξής: Αρχικά 95 °C για 15'' για να επιτευχθεί η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA και ως τρίτο στάδιο τους 72 °C αρχικά για 30'' και έπειτα για 10 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η επιμήκυνση της αλυσίδας από την πολυμεράση και σε δεύτερη φάση με τον αυξημένο χρόνο να αδρανοποιηθεί η πολυμεράση για

Αντιδραστήρια	Όγκος σε μl
H_2O	36,3 (σύν 5 μl στο μάρτυρα)
Tag polymerase buffer	5
dNTP's (10 nM)	1
Πρόσθιος primer (10 μM)	2,5
Ανάστροφος primer (10 μM)	2,5
Tag polymerase (5 U/ μl)	0,2
DNA δείγμα (εκμαγείο)	5
BSA (20 mg/ml)	1

να σταματήσει η αντίδραση. Αυτά τα βήματα ίσχυαν για κάθε εκκινήτη και αυτό που μεταβλήθηκε ήταν η θερμοκρασία του βήματος της υβριδοποίησης των εκκινήτων. Οι θερμοκρασίες του σταδίου υβριδισμού για τον κάθε εκκινήτη ορίστηκαν σε: 49 °C για τον εκκινήτη *tetM_1*, 52 °C για τον *sull_3*, 46 °C για τον *tem_1*, 54 °C για τον *cfxa_1*, 56 °C για τον *dfrA1_17*, 60 °C για τον *dfrA1_1* και 54 °C για *erm33_(1)-332* και *qnrD_(4)-447*. Ο χρόνος του σταδίου υβριδοποίησης ορίστηκε σε 30". Ο πίνακας της αντίδρασης PCR για κάθε εκκινήτη φαίνεται παρακάτω:

Πίνακας 6. Πίνακας αντιδραστηρίων μιας PCR όγκου 50 μl .

Οι κύκλοι της PCR που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την περίπτωση ήταν 40. Στη συνέχεια τα προϊόντα της αντίδρασης PCR, προετοιμάστηκαν με τη χρήση ανάλογης ποσότητας χρωστικής (10 μl) και στη συνέχεια φορτώθηκαν σε gel, ώστε να ηλεκτροφορηθούν. Η πυκνότητα των gel και η τάση ήταν η ίδια που χρησιμοποιήθηκε και στην gradient PCR (1,5% w/v και 95 mV αντίστοιχα). Χρησιμοποιήθηκε BSA (Bovine Serum Albumine), ώστε να αυξηθεί η απόδοση της αντίδρασης, καθώς αυτό το μόριο αποτρέπει την αλληλεπίδραση των παρεμποδιστών της πολυμεράσης με το ένζυμο (Kreader 1996). Τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων των προϊόντων της PCR φαίνονται στο παράρτημα 3 (**παράρτημα III**).

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων σε μία αντίδραση PCR.

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
dNTP's	0,08 (nM)
Πρόσθιος primer	0,1 (μM)
Ανάστροφος primer	0,1 (μM)
Tag polymerase	0,04 (U/ μl)
DNA δείγμα	0,2 (μM)

Πίνακας 7. Πίνακας συγκέντρωσης αντιδραστηρίων μιας PCR όγκου 50 μl .

2.2.5 Καθαρισμός DNA από στήλη αγαρόζης (DNA gel extraction)

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν οι πηκτές κάτω από μια λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και έκοψα τις ζώνες που αντιστοιχούσαν στα προϊόντα της PCR των διαφόρων εκκινητών. Το ζύγισμα των φιαλιδίων ήταν απαραίτητο για τον καθαρισμό του DNA, καθώς χρησιμοποιείται σε ορισμένα στάδια ανάλογη ποσότητα αντιδραστηρίων με τη μάζα του gel. Έπειτα τοποθετήθηκαν τα τμήματα του gel στα φιαλίδια. Η απομόνωση και ο καθαρισμός του DNA από τη στήλη έγινε με τη χρήση kit σύμφωνα με τα πρωτόκολλο του kit (NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up). Η διαδικασία αυτή αφορά έναν εκκινητή και επαναλήφθηκε 6 φορές. Το πρωτόκολλο φαίνεται στο παράρτημα 4 (**παράρτημα IV**).

2.2.6 Ποσοτικοποίηση DNA

Έπειτα τον καθαρισμό του DNA χρησιμοποιήθηκε ένα φασματοφωτόμετρο μικροποσοτήτων (nanodrop 2000/2000c). Χρησιμοποιήσαμε το διάλυμα έκλουσης (elution buffer) της διαδικασίας καθαρισμού του DNA ως ‘‘ τυφλό’’ (blank) και στη συνέχεια τοποθετήσαμε 1 ή 2 μl του διαλύματος που περιέχει το DNA. Για να βεβαιωθεί η ύπαρξη DNA στα δείγματα ακόμα περισσότερο προετοιμάστηκαν 5 μl δείγματος με 1 μl χρωστικής και ηλεκτροφορήθηκαν σε ίδιες συνθήκες με αυτές του των παραπάνω ηλεκτροφορήσεων. Αφού διασφαλίστηκε η ύπαρξη των επιθυμητών τμημάτων του DNA και η καθαρότητα αυτών, προχωρήσαμε σε κλωνοποίηση των τμημάτων αυτών σε κατάλληλους φορείς. Οι πίνακες των συγκεντρώσεων των δειγμάτων των ενισχυμάτων του κάθε εκκινητή και τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης αυτών φαίνονται στο παράρτημα 4 (**Παράρτημα IV**).

2.2.7 Κλωνοποίηση DNA σε φορέα (ligation)

Τα δείγματα DNA στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν σε κατάλληλο φορέα. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pGEM®-T Easy (Promega Corporations). Αρχικά σε ένα άδειο φιαλίδιο μικροφυγοκέντρωσης 1,5 ml

προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα της λιγάσης (10X T4 DNA ligase buffer, ThermoFisherScientific, ένζυμο T4 λιγάσης (T4 ligase 5U/μl, ThermoFisherScientific®) και φορέα (pGEM®-T Easy). Στη συνέχεια προστέθηκε ένθεμα και ddH₂O σε τελικό όγκο 10 μl (ή 0,5 μl σε μία άλλη παραλλαγή του πρωτοκόλλου) (ή 25 μl σε μία άλλη παραλλαγή του πρωτοκόλλου), ο οποίος είναι ο βέλτιστος για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ένθεσης στον φορέα, αφού το ρυθμιστικό διάλυμα είναι συμπυκνωμένο 10 φορές του τελικού όγκου. Επωάστηκαν τα ligation mixtures στους 4 °C overnight. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ακολουθήθηκε με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη αναλογία (1/3-3) ενθέματος/φορέα. Οι πίνακες των αντιδράσεων κλωνοποίησης για τον εκάστοτε εκκινητή (**παράρτημα V**).

2.2.8 Μετασχηματισμός βακτηρίων (transformation)

Στη συνέχεια προχωρήσαμε σε μετασχηματισμό βακτηρίων με σκοπό την εισαγωγή των πλασμιδίων, τα οποία περιέχουν τα τμήματα DNA που μας ενδιαφέρουν, και πολλαπλασιασμό τους στα βακτήρια. Αυτός ο πολλαπλασιασμός θα παράξει αντίγραφα των πλασμιδίων και συνεπώς των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν. Με αυτή τη διαδικασία παράγονται πλασμίδια τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως αποθέματα αντιγράφων των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν, αλλά και χρησιμοποιούνται στην κανονικοποίηση των μετρήσεων της qPCR. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων φαίνεται στο παράρτημα 5 (**παράρτημα V**).

2.2.9 Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων και colony PCR

Την επόμενη ημέρα προετοιμάστηκε μείγμα PCR (PCR master mix) για 5 ή 6 αντιδράσεις 20 μl τελικού όγκου και μοιράστηκε αυτή η ποσότητα σε φιαλίδια PCR (PCR tubes). Τα τρυβλία στα οποία μεγάλωσαν οι αποικίες ανοίχτηκαν σε συσκευή καθόδου νηματικής ροής, ώστε να ελαχιστοποιηθεί το ενδεχόμενο επιμόλυνσης. Με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου ακρορυγχίου επιλέξαμε οι αποικίες τις οποίες είχαν

λευκό χρώμα (βακτήρια που έλαβαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο) και αφού βυθίσαμε το ακρορύγγιο στα PCR tubes, το απορρίψαμε σε falcon tubes που περιείχαν 5 ml από θρεπτικό μέσο LB παρουσία αμπικιλίνης σε συγκέντρωση 100 µg/ml. Αυτά τα φιαλίδια αφέθηκαν για επώαση σε επωαστήρα ανάδευσης στους 37 °C overnight. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των αποικιών φαίνονται στο παράρτημα 5 (**Παράρτημα V**).

2.2.10 Απομόνωση πλασμιδίων και ποσοτικοποίηση (Plasmid extraction)

Σε αυτό το στάδιο αρχικά από την κάθε καλλιέργεια μεταφέρουμε 350 µl σε φιαλίδια erpendorf 1,5 ml και προσθέτουμε 350 µl από υδατικό διάλυμα 60% γλυκερόλης (σε τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 30%). Προετοιμάστηκαν, έτσι stock διαλύματα για αποθήκευση στους -80 °C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των καλλιεργειών στα 4000 g, στους 25 °C για 5 λεπτά. Αφού τα κύτταρα έχουν καθιζάνει στον πυθμένα του falcon, αφαιρείται το ακρορύγγιο (δίχως να ακουμπήσει τα κύτταρα, ώστε να μην υπάρξει καταστροφή αυτών) και αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό έως ότου να υπάρχουν περίπου 100 µl στα φιαλίδια. Πραγματοποιήθηκε, στην συνέχεια, επαναδιάλυση των κυττάρων που βρίσκονταν στο πυθμένα (pellet) με ήπια ανάδευση. Μεταφέρονται αυτά τα 100 µl που περιέχουν επαναδιαλυμένα κύτταρα σε νέα erpendorfs. Τα πλασμίδια των κυττάρων, έπειτα απομονώθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit Nucleospin[®]Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Τα πλασμίδια μετά την απομόνωση στάλθηκαν για αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των πλασμιδίων και του πρωτόκολλου απομόνωσής τους φαίνονται στο παράρτημα 6 (**Παράρτημα VI**).

2.2.11 Απομόνωση DNA από δείγματα εδάφους

Γενετικό υλικό απομονώθηκε από μικροβιακές κοινότητες. Τα διάφορα δείγματα που απομονώθηκαν αντιστοιχούσαν σε διαφορετικά φυτοδοχεία και σε διαφορετικές ημέρες δειγματοληψίας. Τα δείγματα ‘‘ μάρτυρες’’ control απομονώθηκαν από χώμα γλαστρών στις οποίες δεν είχαν εφαρμοστεί αντιβιοτικά. Το ένα φυτοδοχείο δεν είχε ενισχυθεί με κοπριά ενώ το άλλο είχε ενισχυθεί με κοπριά στο οποίο όμως δεν είχαν εφαρμοστεί αντιβιοτικά ούτε απευθείας ούτε στα ζώα από τα οποία προήλθε. Επίσης σε 3 φυτοδοχεία χρησιμοποιήθηκε χώμα δίχως προσθήκη κοπριάς με απευθείας εφαρμογή των

αντιβιοτικών που μας ενδιέφεραν (tiamulin (TIA στα ονόματα δειγμάτων), tilmicosin (TLM), sulfomethoxazole (SUL)), στα ονόματα των δειγμάτων μας) ή με εφαρμογή στην κοπριά και ενίσχυση με αυτήν τα χώματα. Χρονικά οι δειγματοληψίες έγιναν την ημέρα εφαρμογής των αντιβιοτικών $t = 0$ (26/4) και 30 ημέρες $t = 30$ μετά (28/05). Στις δειγματοληψίες εφαρμόστηκαν και επαναλήψεις (3 για να είναι δυνατή η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των qPCR των δειγμάτων). Η απομόνωση του DNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit DNeasy®PowerSoil® Pro Kit (Qiagen , Hilden, Germany). Το DNA από τα δείγματα συγκεντρώθηκε έπειτα από την παραπάνω διαδικασία σε φιαλίδια και η ποσότητά του μετρήθηκε με q-bit. Το πρωτόκολλο και τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στον πίνακα του παραρτήματος 8 (**Παράρτημα VIII**).

2.2.12 Ανάλυση qPCR

Για την ανάλυση qPCR αρχικά επιλέχθηκαν τα πλασμίδια των αποικιών , από κάθε ζεύγος εκκινητών, με την μεγαλύτερη συγκέντρωση DNA. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις αυτού του πλασμιδίου (9 μl δις αποστειρωμένου H₂O και 1 μl πλασμιδίου) έως ότου να φτάσουμε σε συγκέντρωση 10⁰, να έχουμε δηλαδή ένα και μόνο αντίγραφο του πλασμιδίου. Η αρχική συγκέντρωση του πλασμιδίου θεωρήθηκε 10⁹ φορές μεγαλύτερη της τελικής συγκέντρωσης. Επίσης δημιουργήθηκαν νέα working solutions των εκκινητών μας με συγκέντρωση 20 mM . Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο καθόδου νηματικής ροής με σκοπό την αποφυγή επιμολύνσεων. Αφού δημιουργήθηκαν οι απαραίτητες αραιώσεις των πλασμιδίων που θα λειτουργήσουν ως δείγματα της πρότυπης καμπύλης για κάθε εκκινητή. Στη συνέχεια προετοιμάστηκε το master mix για τις αντιδράσεις qPCR των δειγμάτων. Η σύσταση του master mix για την πραγματοποίηση της αντίδρασης qPCR για ένα δείγμα φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Αντιδραστήρια	Όγκος σε μl
SYBR Green	5
Πρόσθιος εκκινητής (20 μM)	0,1
Ανάστροφος εκκινητής (20 μM)	0,1
H ₂ O	3.6
BSA (20 mg/ml)	0,2

Πίνακας 17. Πίνακας που αντιστοιχεί σε αντίδραση qPCR ενός δείγματος.

Χρησιμοποιήθηκε BSA (Bovine Serum Albumine), ώστε να αυξηθεί η απόδοση της αντίδρασης, καθώς αυτό το μόριο αποτρέπει την αλληλεπίδραση των παρεμποδιστών της πολυμεράσης με το ένζυμο (Kreader 1996). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι τα 10 µl. Ωστόσο προετοιμάστηκε plate για 96 δείγματα συμπεριλαμβανομένης, της πρότυπης καμπύλης και αρνητικών μαρτύρων. Έτσι προετοιμάστηκε master mix για 105 δείγματα (ώστε να εξασφαλιστεί αρκετή ποσότητα master mix σε περίπτωση λάθους ή ατυχήματος). Πριν την διεξαγωγή της qPCR το PCR plate καλύφθηκε αεροστεγώς με μια προστατευτική μεμβράνη, ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση των δειγμάτων.

Τα αποτελέσματα για τα περιβαλλοντικά δείγματα συλλέχθηκαν από τις qPCR μαζί με τις πρότυπες καμπύλες τους. Ενδεικτικά φαίνονται στο παράρτημα 9 (**Παράρτημα IX**). Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων κάθε qPCR. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν ηλεκτροφόρες 1,5 % w/w. Για την κατασκευή των “μικρού” μεγέθους gel χρησιμοποιήθηκαν 1 gr αγαρόζης και 70 ml TAE, για την κατασκευή των “μεσαίων” μεγέθους gel 1,5 gr αγαρόζης και 100 ml TAE και για την κατασκευή “μεγάλου” μεγέθους χρησιμοποιήθηκαν 2 gr αγαρόζης και 150 ml TAE. Ηλεκτροφορήθηκαν 3 µl από κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα αυτών των ηλεκτροφορήσεων φαίνονται στο παράρτημα 9 (**Παράρτημα IX**).

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 2 φορές (1 φορά για τρεις εκκινητές). Οι qPCR για τους εκκινητές *dfrA1_1*, *qnrD_(4)-447* και *tem_1* στήθηκαν αλλά δεν πραγματοποιήθηκαν για τα δείγματα. Επίσης πραγματοποιήθηκε και qPCR των γονιδίων *16S* (16 S rRNA γονίδιο που αποτελεί δείκτη φυλλογένεσης/βιοποικιλότητας βακτηρίων) και *intI1* (integron class 1) ιντεγκρόνιο κλάσης 1 που διαδραματίζει βασικό ρόλο στην οριζόντια γονιδιακή μεταφορά. Οι qPCR των παραπάνω γονιδίων βοήθησαν στην βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων μας.

2.2.13 Βιοπληροφορική ανάλυση αποτελεσμάτων αλληλούχισης πλασμιδίων.

Η βιοπληροφορική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα UniPro Ugene. Αποτελεί λογισμικό απλής εφαρμογής σχετικά με την απεικόνιση διαφόρων αλληλουχιών, την εξαγωγή αποτελεσμάτων σχετικά με την στοίχιση ακολουθιών, την ομοιότητα διάφορων αλληλουχιών, την

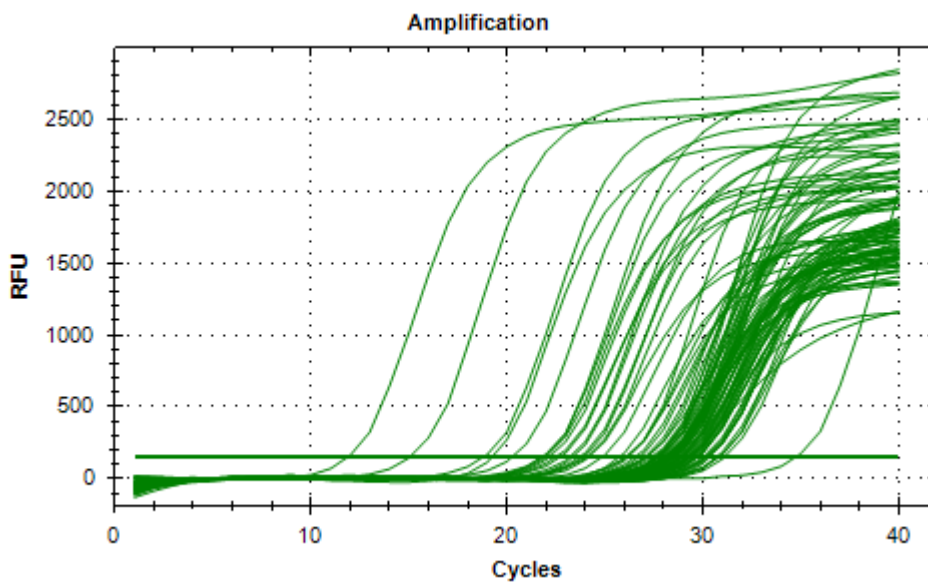
κατασκευή φυλογενετικών δένδρων και άλλες δυνατότητες. Τα αποτελέσματα των αλληλουχιών στάλθηκαν με τη μορφή αρχείου .tif και εισάχθηκαν στο πρόγραμμα. Οι αλληλουχίες απεικονίστηκαν με τη μορφή χρωματογραφήματος μόλις ανοίχτηκε το αρχείο. Αφού εξάγαμε τις αλληλουχίες σε μορφή η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετέπειτα, χρησιμοποιήσαμε την αλληλουχία του φορέα με τον οποίον κάναμε ένθεση σε μορφή FASTA. Με αυτή την αλληλουχία ως οδηγό και επιλέγοντας τις αλληλουχίες των πλασμιδίων από κάθε αποικία και για κάθε εκκινητή, διαχωρίστηκε τα τμήμα που ανήκει αποκλειστικά στον φορέα και η αλληλουχία που μας ενδιαφέρει. Αυτό έγινε επιλέγοντας την ενότητα ‘tools’, ‘sanger data analysis’ και στη συνέχεια την εντολή ‘map reads to reference’. Σαν reference alignment χρησιμοποιήθηκε του p gem η αλληλουχία και επιλέχθηκαν κάθε φορά οι αλληλουχίες των colonies κάθε εκκινητή. Το mapping similarity ορίστηκε για 10 %. Αφού εμφανίστηκε η αλληλουχία που ενισχύθηκε από τους εκκινητές με τα παραπάνω δίχως τον φορέα, την επιλέξαμε και τη χρησιμοποιήσαμε για να πραγματοποιήσουμε nucleotide blast (blastn). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του blast, οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν σε γονίδια ανθεκτικότητας από κάθε κατηγορία των εκκινητών με κάλυψη (coverage) 80% και πάνω ανάλογα με τον εκκινητή και την αποικία και ειδικότητα (identity) 96.7% και άνω. Οπότε επαληθεύθηκε ότι εισήγαμε το σωστό γονίδιο στα πλασμίδια και ότι έχουμε κλώνους βακτηρίων που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε στις αναλύσεις μας. Τα αποτελέσματα για κάθε κλώνο βακτηρίων για κάθε εκκινητή φαίνονται στο παράρτημα 8 (**Παράρτημα VIII**).

3. Αποτελέσματα

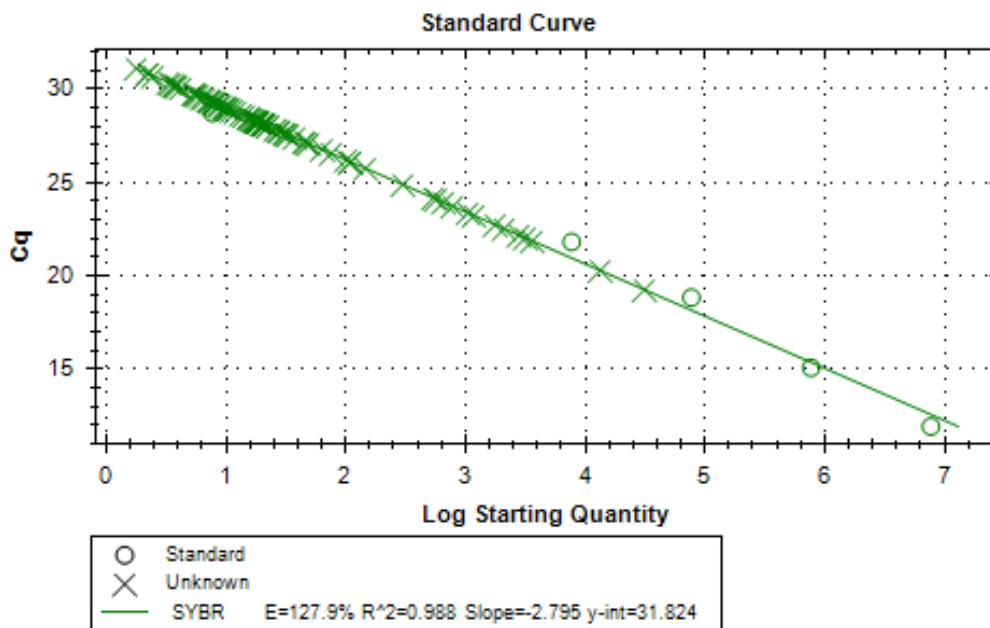
3.1 Αποτελέσματα qPCR

Έπειτα από την πραγματοποίηση των qPCR των δειγμάτων για κάθε εκκινητή ελέγχθηκε το amplification plot και το διάγραμμα της πρότυπης καμπύλης . Πολλές φορές υπήρξαν τροποποιήσεις της καμπύλης (αφαιρέσεις ή προσθήκες διαφορετικών συγκεντρώσεων της πρότυπης καμπύλης) με σκοπό την καλύτερη αποτελεσματικότητα (efficiency) της

καμπύλης. Ως επι των πλείστων για τους διάφορους εκκινητές λάβαμε πρότυπες καμπύλες και amplification plots με ικανοποιητική efficiency. Ενδεικτικά παρουσιάζεται το amplification plot και η πρότυπη καμπύλη των δειγμάτων με εκκινητή που αναγνωρίζει τη κεφοταξίμη και όλα τα υπόλοιπα διαγράμματα να παρουσιάζονται στο παράρτημα 9 (**Παράρτημα ΙΧ**)



Εικόνα 31. Διάγραμμα ενίσχυσης (amplification plot) της q-PCR των δειγμάτων με εκκινητή *cfxa_1*.

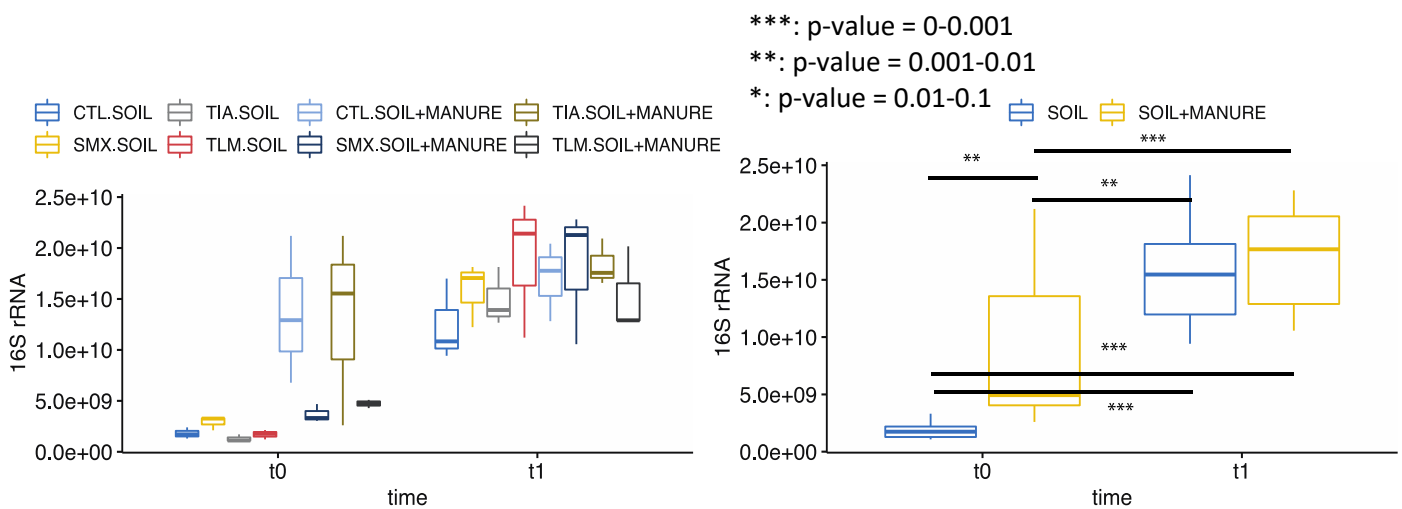


Εικόνα 32. Διάγραμμα πρότυπης καμπύλης (standard curve plot) της q-PCR των δειγμάτων με εκκινητή *cfxa_1*.

3.2 Αποτελέσματα βιοστατιστικής ανάλυσης αποτελεσμάτων qPCR

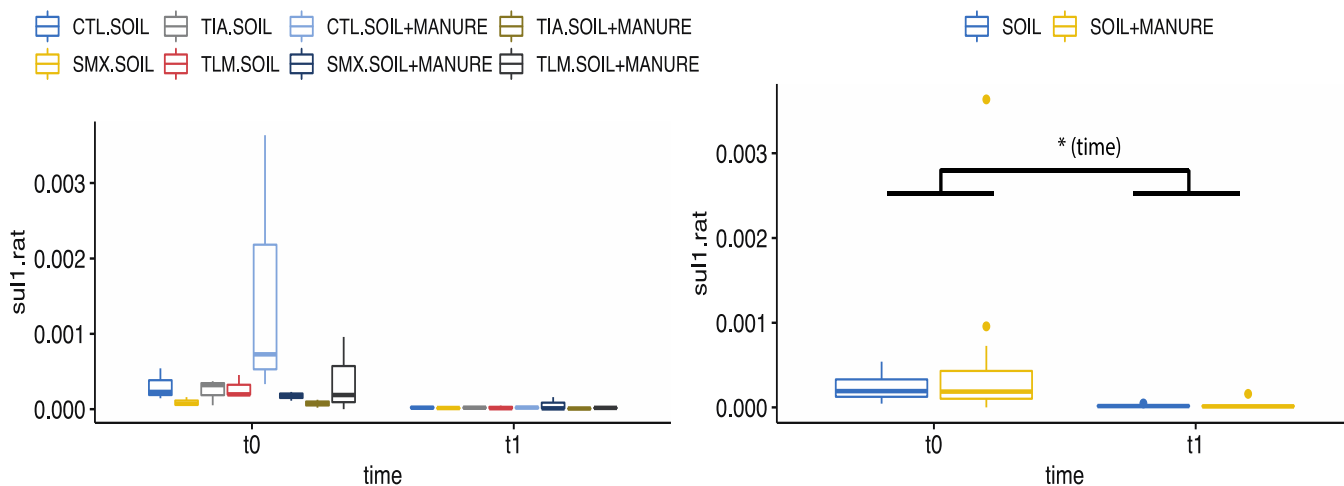
Έπειτα από την πραγματοποίηση της q-PCR ο συνολικός αριθμός των αντιγράφων καταγράφηκε και αφού κανονικοποιήθηκε με σύμφωνα με τον αριθμό των αντιγράφων του *16S rRNA*, ώστε να βρεθούν οι λόγοι των αντιγράφων για κάθε γονίδιο ενδιαφέροντος και να αντιστοιχιστούν τα γονίδια για κάθε βακτήριο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση σύμφωνα με το two way ANOVA μοντέλο. Σε αυτή τη μέθοδο οι μέσοι όροι διαφορετικών δειγμάτων συγκρίνονται σε δύο διαφορετικές συνθήκες (χρόνος και μεταχείριση στην περίπτωση μας), ώστε να έχουμε ένα στατιστικό αποτέλεσμα. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν box-plots των αντιγράφων και των ratios των διαφόρων γονιδίων ανθεκτικότητας, αλλά και του *16 S rRNA* ανάλογα με την μεταχείριση και το χρόνο. Τα αντίγραφα των γονιδίων *sul*, *tetM*, *cfxa* και *Int11* μειώνονται με τον χρόνο, ενώ το γονίδιο *16 S rRNA* πού σχετίζεται με τη βακτηριακή ποικιλότητα αυξάνεται με το χρόνο. Η διαίρεση των αντιγράφων των γονιδίων ανθεκτικότητας με το τα αντίγραφα του γονιδίου *16 S rRNA* που αντιστοιχούν σε κάθε μεταχείριση δίνει το πηλίκο των αντιγράφων ενός γονιδίου

ανθεκτικότητας σε σχέση με το πλήθος των βακτηρίων. Επιτυγχάνεται η αντιστοίχιση, λοιπόν, για κάθε γονιδίου ανθεκτικότητας τα αντίγραφα που αντιστοιχούν σε ένα βακτήριο. Αυτός ο μετασχηματισμός είναι πολύ σημαντικός για να εξάγουμε βιολογικά συμπεράσματα σύμφωνα με τη στατιστική καθώς μπορεί συνολικά τα γονίδια ανθεκτικότητας για ολόκληρη τη βακτηριακή κοινότητα μπορεί να μην μεταβάλλονται, ωστόσο αν έχουμε στατιστικά σημαντική μεταβολή σε επίπεδο κυττάρου των αντιγράφων ανθεκτικότητας για ένα γονίδιο είναι πιο σημαντικό εύρημα σε σχέση με την μεταβολή του απόλυτου αριθμού αντιγράφων. Γίνεται αντιληπτό από τα διαγράμματα, συνεπώς, ότι με την πάροδο του χρόνου αυξάνεται ο αριθμός των βακτηρίων της εδαφικής βακτηριακής κοινότητας και μειώνονται τα αντίγραφα των γονιδίων ανθεκτικότητας και η ανθεκτικότητα των βακτηρίων γενικότερα τόσο απόλυτα όσο και σε επίπεδο κυττάρων.



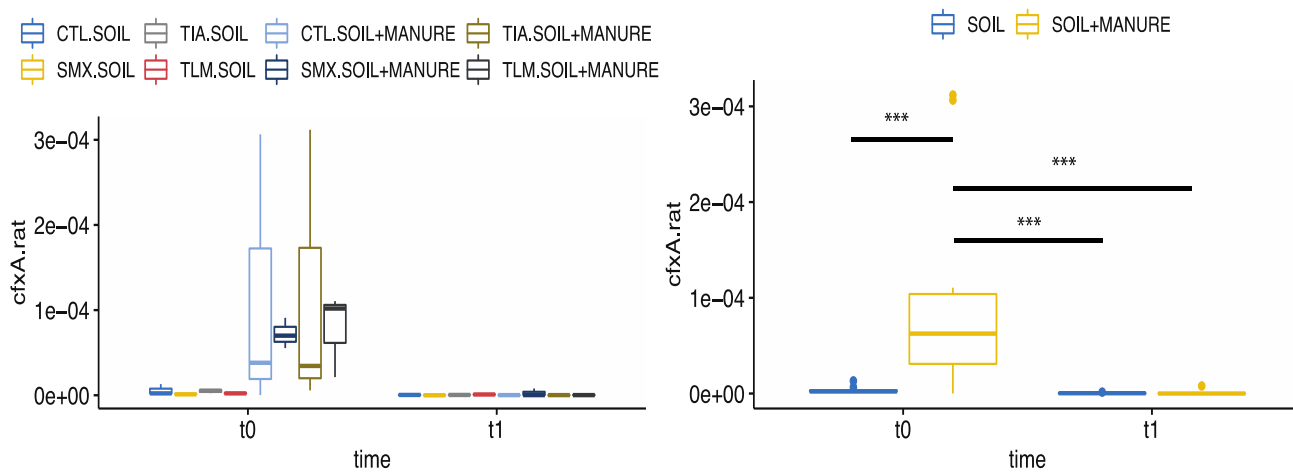
Εικόνα 64. Διαγράμματα βιοστατιστικής ανάλυσης γονιδίου *16 rRNA*

***: p-value = 0-0.001
 **: p-value = 0.001-0.01
 *: p-value = 0.01-0.1



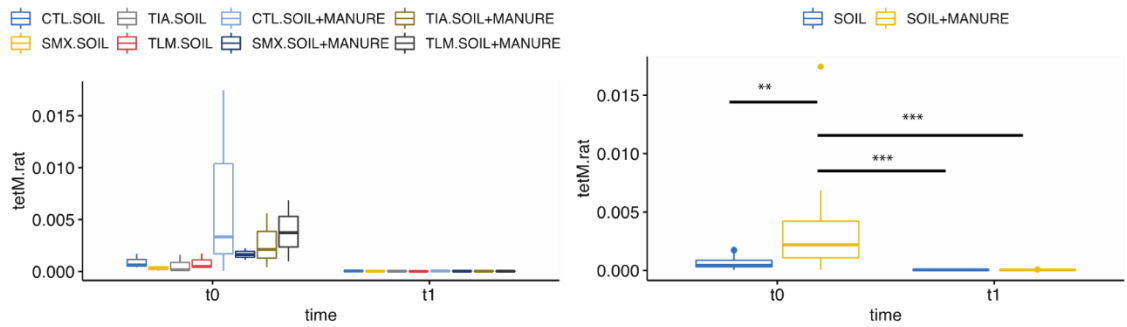
Εικόνα 65. Διαγράμματα βιοστατιστικής ανάλυσης γονιδίου *sul1*

***: p-value = 0-0.001
 **: p-value = 0.001-0.01
 *: p-value = 0.01-0.1



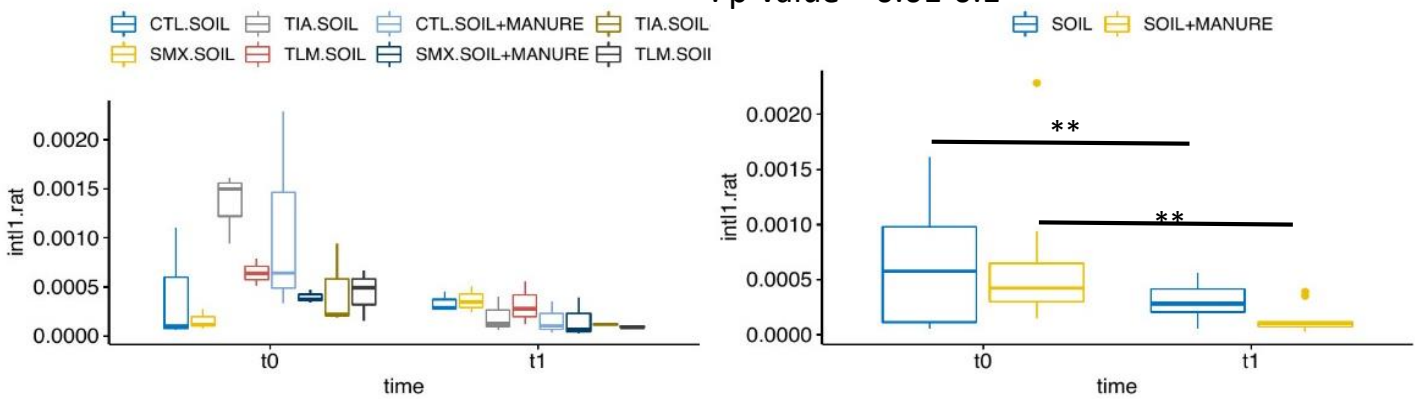
Εικόνα 66. Διαγράμματα βιοστατιστικής ανάλυσης γονιδίου *cfxA*.

***: p-value = 0-0.001
 **: p-value = 0.001-0.01
 *: p-value = 0.01-0.1



Εικόνα 67. Διαγράμματα βιοστατιστικής ανάλυσης γονιδίου *tetM*

***: p-value = 0-0.001
 **: p-value = 0.001-0.01
 *: p-value = 0.01-0.1



Εικόνα 68. Διαγράμματα βιοστατιστικής ανάλυσης γονιδίου *Int11*.

4. Συζήτηση

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα αντιλαμβανόμαστε ότι γενικότερα τα αντίγραφα των γονιδίων ανθεκτικότητας συναντώνται κυρίως σε δείγματα που ενισχύθηκαν με κοπριά και είναι ανεξάρτητα σε μεγάλο βαθμό από τις μεταχειρίσεις. Αποτελεί συνεπώς η κοπριά ένα θετικό παράγοντα για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Το γεγονός ότι εντοπίζουμε γονίδια ανθεκτικότητας σε δείγματα που ενισχύθηκαν με κοπριά και όχι σε δείγματα χόματος μπορεί να εξηγηθεί καθώς στα δείγματα του χόματος δεν εφαρμόζονται γενικά αντιβιοτικά και ακόμη όταν εφαρμόζονται, διασπώνται πολύ γρήγορα και συνεπώς δεν ασκούν εξελικτική πίεση για μεγάλο χρονικό διάστημα (Perruchon et al. 2022). Τα βακτήρια του εδάφους, λοιπόν, δεν έχουν υποβληθεί σε έντονη εξελικτική πίεση από τα αντιβιοτικά και γι' αυτόν τον λόγο δεν φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Από την άλλη ο εντοπισμός γονιδίων ανθεκτικότητας στην κοπριά και συνεπώς σε βακτηριακές κοινότητες του πεπτικού σωλήνα των χοίρων (gut microbiome) που προέρχεται από ζώα που δεν τους χορηγούνται αντιβιοτικά (δεδομένου ότι αυτό ισχύει) μπορεί πιθανώς να ερμηνευτεί ως εξής: Τα γονίδια ανθεκτικότητας αυτά διατηρούνται διότι τα ζώα έρχονται σε επαφή με κατάλοιπα αντιβιοτικών από το περιβάλλον τους και υπάρχει εξελικτική πίεση μέσω αυτών (Ben et al. 2019). Το μικροβίωμα του πεπτικού σωλήνα των ανώτερων οργανισμών αποτελεί ένα σύστημα που αποτελείται από μια ποικιλία μικροοργανισμών όπως *Enterococci sp.*, *Firmicutes sp.*, *Actinobacteria sp.* κ.α. το οποίο δέχεται πλήθος μηνυμάτων από τον ξενιστή και ανταποκρίνεται σε αυτά, σε μία κατάσταση συνεξέλιξης και συνεργασίας (Cresci and Bawden 2015). Επίσης τα βακτήρια δημιουργούν δομές όπως βακίλλους, συσσωμάτια ή διάφορες βιοεμεμβράνες (biofilms). Σε αυτές τις συνθήκες πολύ κοντινής γειτνίασης η διασπορά των οριζόντιων μεταθετών στοιχείων (horizontal transfer elements) είναι πολύ συχνή και εύστοχη (Kim et al. 2021). Με αποτέλεσμα να έχουμε διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας στην κοινότητα. Όταν φύγουν από το περιβάλλον του πεπτικού σωλήνα και περάσουν μέσω των κοπράνων στο έδαφος, όπου απουσιάζει αυτή η εξελικτική πίεση, τα βακτήρια χάνουν σταδιακά αυτή την ανθεκτικότητά τους, καθώς είναι πολύ ενεργειακά δαπανηρή η διατήρηση των γονιδίων ανθεκτικότητας (Kim et al. 2021). Τα αντίγραφα των γονιδίων ανθεκτικότητας ανάλογα με το

χρόνο μειώνονται και συνεπώς ο χρόνος αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα. Επιπρόσθετα παρατηρούμε αύξηση αντιγράφων κατηγοριών γονιδίων ανθεκτικότητας ανεξαρτήτως από το είδος του αντιβιοτικού που χρησιμοποιήσαμε (Elshamy et al. 2020). Σε αυτή την περίπτωση ενδέχεται η πιθανότητα συγκληρονόμησης γονιδίων ανθεκτικότητας διαφορετικών κατηγοριών αντιβιοτικών. Ακόμη παρατηρούμε ότι με την πάροδο του χρόνου η μικροβιακή κοινότητα έχει την τάση να αυξάνεται, αφού ανιχνεύουμε περισσότερα αντίγραφα του γονιδίου *16 S rRNA*. Συνεπώς, αντιλαμβανόμαστε ότι παρατηρούνται συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξη των εδαφικών βακτηριακών κοινοτήτων σε καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος και γενικά ανεξάρτητα των μεταχειρίσεων.

5. Μελλοντική έρευνα

Στα πλαίσια των πειραμάτων δεν μπόρεσαν να απαντηθούν όλα τα βιολογικά ερωτήματα τα οποία εμφανίστηκαν από τα αποτελέσματα των πειραμάτων ούτε τα ίδια τα πειράματα έλαβαν όλες τις πιθανές κατευθύνσεις. Συνεπώς αυτές θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενα μελλοντικής έρευνας. Ορισμένα πιθανά αντικείμενα μελλοντικής έρευνας είναι:

- Ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας για το ζεύγος εκκινητών εκκινητή *dfrA1_17*.
- Χρήση των εκκινητών *dfrA1_1*, *qnrD_(4)-447* και *tem_1* για ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε περιβαλλοντικά δείγματα. Μέσω αυτής της διαδικασίας θα ποσοτικοποιηθούν γονίδια ανθεκτικότητας σε τριμεθοπρίμες, κινολόνες και β-λακτάμες σε περιβαλλοντικά δείγματα, έπειτα από εφαρμογή εξελικτικής πίεσης.
- Έλεγχος για ικανότητα συγκληρονόμησης γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και γονιδίων ικανότητας αποτοξικοποίησης μετάλλων ή άλλων οργανικών ρύπων. Μέσω αυτής της διαδικασίας θα γίνουν κατανοητοί οι μηχανισμοί συγκληρονόμησης διαφόρων ιδιοτήτων των μικροοργανισμών και οι επιπτώσεις της στις βακτηριακές κοινοπραξίες.
- Έλεγχος ικανότητας βακτηρίων χρήσης αντιβιοτικών ως θρεπτικών και πηγών άνθρακα, αζώτου ή άλλων οργανικών στοιχείων έπειτα από αποδόμηση. Μέσω αυτής της διαδικασίας θα μελετηθεί η ικανότητα των

μικροοργανισμών τόσο σε ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, αλλά και η ικανότητα χρήση από αυτούς διαφόρων εναλλακτικών πηγών ενέργειας.

- Έλεγχος ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα κτηνιατρικά αντιβιοτικά tiamuline (TIA) και tilmicosine (TLM). Μέσω αυτή της διαδικασίας θα μελετηθεί ο μηχανισμός απόκτησης ανθεκτικότητας σε αυτά τα αντιβιοτικά, καθώς και οι συνθήκες που είναι απαραίτητες για την δημιουργία αυτής της ανθεκτικότητας.

6. Βιβλιογραφία

- Andreou, Lefkothea-Vasiliki. 2013. 'Isolation of Plasmid DNA from Bacteria'. *Methods in Enzymology* 529: 135–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00010-0>.
- Arya, Manit, Iqbal S. Shergill, Magali Williamson, Lyndon Gommersall, Neehar Arya, and Hitendra R. H. Patel. 2005. 'Basic Principles of Real-Time Quantitative PCR'. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 5 (2): 209–19. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>.
- Ben, Yujie, Caixia Fu, Min Hu, Lei Liu, Ming Hung Wong, and Chunmiao Zheng. 2019. 'Human Health Risk Assessment of Antibiotic Resistance Associated with Antibiotic Residues in the Environment: A Review'. *Environmental Research* 169 (February): 483–93. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>.
- Blondeau, Joseph M. 2004. 'Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance'. *Survey of Ophthalmology* 49 (2, Supplement 2): S73–78. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2004.01.005>.
- Casali, Nicola, and Andrew Preston. 2003. *E. Coli Plasmid Vectors: Methods and Applications*. Springer Science & Business Media.
- Chopra, I., and M. Roberts. 2001. 'Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance'. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 65 (2): 232-260 ; second page, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001>.
- Cresci, Gail A., and Emmy Bawden. 2015. 'Gut Microbiome: What We Do and Don't Know'. *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* 30 (6): 734–46. <https://doi.org/10.1177/0884533615609899>.
- Green, Michael R., and Joseph Sambrook. 2018. 'The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR)'. *Cold Spring Harbor Protocols* 2018 (5). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095117>.
- Gritsch, Lukas. 2019. 'An Investigation on Antibiotic-Free Antibacterial Materials Combining Bioresorbable Polyesters, Chitosan and Therapeutic Ions'.
- Hanahan, D. 1983. 'Studies on Transformation of Escherichia Coli with Plasmids'. *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557–80. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8).
- Harshitha, Ravikumar, and Duraipandian Rex Arunraj. 2021. 'Real-Time Quantitative PCR: A Tool for Absolute and Relative Quantification'. *Biochemistry and Molecular Biology Education: A Bimonthly Publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 49 (5): 800–812. <https://doi.org/10.1002/bmb.21552>.
- Hawkins, Steve F. C., and Paul C. Guest. 2017. 'Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR'. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1546: 125–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6730-8_8.

He, Tong, Jing Liu, and Jian Ping Wang. 2021. 'Development of a Dihydropteroate Synthase-Based Fluorescence Polarization Assay for Detection of Sulfonamides and Studying Its Recognition Mechanism'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69 (46): 13953–63. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05674>.

Heuer, Holger, Qodiah Solehati, Ute Zimmerling, Kristina Kleineidam, Michael Schloter, Tanja Müller, Andreas Focks, Sören Thiele-Bruhn, and Kornelia Smalla. 2011. 'Accumulation of Sulfonamide Resistance Genes in Arable Soils Due to Repeated Application of Manure Containing Sulfadiazine'. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (7): 2527. <https://doi.org/10.1128/AEM.02577-10>.

Hoek, Angela H. A. M. van, Dik Mevius, Beatriz Guerra, Peter Mullany, Adam Paul Roberts, and Henk J. M. Aarts. 2011. 'Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview'. *Frontiers in Microbiology* 2 (September): 203. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>.

Kim, Misung, Jaeun Park, Mingyeong Kang, Jihye Yang, and Woojun Park. 2021. 'Gain and Loss of Antibiotic Resistant Genes in Multidrug Resistant Bacteria: One Health Perspective'. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 59 (6): 535–45. <https://doi.org/10.1007/s12275-021-1085-9>.

Kreader, C. A. 1996. 'Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein'. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3): 1102–6. <https://doi.org/10.1128/aem.62.3.1102-1106.1996>.

Moore, D., J. Chory, and R. K. Ribardo. 2001. 'Isolation and Purification of Large DNA Restriction Fragments from Agarose Gels'. *Current Protocols in Immunology* Chapter 10 (May): Unit 10.5. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1005s08>.

Pal, Chandan, Johan Bengtsson-Palme, Erik Kristiansson, and D. G. Joakim Larsson. 2015. 'Co-Occurrence of Resistance Genes to Antibiotics, Biocides and Metals Reveals Novel Insights into Their Co-Selection Potential'. *BMC Genomics* 16 (November): 964. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>.

Papanikolaou, Georgios, Danai Palaiologou, Efthymia Katsareli, Γεώργιος Παπανικολάου, Δανάη Παλαιολόγου, and Ευθυμία Κατσαρέλη. 2016a. 'Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης', January. <http://repository.kallipos.gr/handle/11419/647>.

———. 2016b. 'Απομόνωση DNA', January. <http://repository.kallipos.gr/handle/11419/645>.

Patel, Parth H., and Muhammad F. Hashmi. 2022. 'Macrolides'. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551495/>.

Perruchon, C., E. Katsivelou, P. A. Karas, S. Vassilakis, A. A. Lithourgidis, T. A. Kotsopoulos, S. Sotiraki, S. Vasileiadis, and D. G. Karpouzas. 2022. 'Following the Route of Veterinary Antibiotics Tiamulin and Tilmicosin from Livestock Farms to Agricultural Soils'. *Journal of Hazardous Materials* 429 (January): 128293. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128293>.

Polianciuc, Svetlana Iuliana, Anca Elena Gurzău, Bela Kiss, Maria Georgia Ștefan, and Felicia Loghin. 2020. 'Antibiotics in the Environment: Causes and Consequences'. *Medicine and Pharmacy Reports* 93 (3): 231–40. <https://doi.org/10.15386/mpr-1742>.

Quintela-Baluja, Marcos, Dominic Frigon, M. Abouelnaga, Kelly Jobling, Jesús L. Romalde, Mariano Gomez Lopez, and David W. Graham. 2021. 'Dynamics of Integron Structures across a Wastewater Network - Implications to Resistance Gene Transfer'. *Water Research* 206 (November): 117720. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117720>.

Rauseo, J., A. Barra Caracciolo, N. Ademollo, M. Cardoni, M. Di Lenola, W. Gaze, I. Stanton, et al. 2019. 'Dissipation of the Antibiotic Sulfamethoxazole in a Soil Amended with Anaerobically Digested Cattle Manure'. *Journal of Hazardous Materials* 378 (October): 120769. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120769>.

Schlatter, Daniel C., and Linda L. Kinkel. 2014. 'Antibiotics: Conflict and Communication in Microbial Communities'. *ASM News* 9 (7): 282–88. <https://doi.org/10.1128/microbe.9.282.1>.

Slater, Gary W. 2009. 'DNA Gel Electrophoresis: The Reptation Model(s)'. *Electrophoresis* 30 Suppl 1 (June): S181-187. <https://doi.org/10.1002/elps.200900154>.

'Sulfonamides'. 2012. In *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548382/>.

Taillandier, E., and J. Liquier. 1992. 'Infrared Spectroscopy of DNA'. *Methods in Enzymology* 211: 307–35. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)11018-e](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)11018-e).

Vila-Costa, Maria, Rosalinda Gioia, Jaume Aceña, Sandra Pérez, Emilio O. Casamayor, and Jordi Dachs. 2017. 'Degradation of Sulfonamides as a Microbial Resistance Mechanism'. *Water Research* 115 (May): 309–17. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.007>.

Wang, Z., and T. G. Rossman. 1994. 'Isolation of DNA Fragments from Agarose Gel by Centrifugation'. *Nucleic Acids Research* 22 (14): 2862–63. <https://doi.org/10.1093/nar/22.14.2862>.

Zhang, Gang, and Jie Feng. 2016. 'The Intrinsic Resistance of Bacteria'. *Yi Chuan = Hereditas* 38 (10): 872–80. <https://doi.org/10.16288/j.ycz.16-159>.

Παράρτημα Ι

Εκκινητές

Ομάδα	Εκκινητές/Παραπομπή	Πρόσθιος εκκινητής (5'-3')	Ανάστροφος εκκινητής(5'-3')	Κάλυψη (%)	Εξειδίκευση (%)	Μέγεθος Προϊόντος
Αντιβιοτικών						
Vancomycins	<i>vanB_1</i> (Wang et al. 2014)	TTGTCGGCGAAGTGGATCA	AGCCTTTTTCCGGCTCGTT	83,87	81,25	78 bp

Trimethoprim	<i>dfrA1_1</i> (Wang et al. 2014)	GGAATGGCCCTGATATTCCA	AGTCTTGCGTCCAACCAACAG	97,8	97,6	95bp
Tetracyclines	<i>tetM_1</i> (Koike et al. 2007)	ACAGAAAGCTTATTATATAAC	TGGCGTGTCTATGATGTTTAC	46,51	69,71	171 bp
Sulfonamides	<i>sul1_3</i> (Ross and Topp 2015)	GACTGCAGGCTGGTGGTTAT	GAAGAACCGCACAATCTCGT	90,11	100	105 bp
MLSB	<i>ermB_1</i> (Volokhov et al. 2003)	TAACGACGAACTGGCTAAAAT	ATCTGTGGTATGGCGGTAAG	82,4	99,22	416bp
Fluoroquinolones	<i>qnrB_1</i> (Zhang et al. 2019)	GGMATHGAAATTCGCCACTG	TTYGCBGYCGCCAGTCG	58,99	82,35	264bp
Chlorampheniols	<i>cata1_2</i> (Szczepanowski et al. 2009)	TCAGCTGGATATTACGGCCT	GTTTGCTCATGGAAAACGGT	92,48	87,82	186bp
beta-lactams	<i>tem_1</i> (May et al. 2009)	GCATCTTACGGATGGCATGA	GTCCTCCGATCGTTGTCAGAA	91,64	84,27	100bp
beta-lactams	<i>cfxa_1</i> (Wang et al. 2014)	TCATTCTCGTTCAAGTTTTCAGA	TGCAGCACCAAGAGGAGATGT	67,92	97,3	101bp
beta-lactams	<i>ctxm_2</i> (Wang et al. 2014)	GCGATAACGTGGCGATGAAT	GTCGAGACGGAACGTTTCGT	54,77	99,63	101bp

Οι εκκινητές που πληρούσαν τα χαρακτηριστικά που επιθυμούσαμε ή αποτελούσαν τις καλύτερες επιλογές από κάθε ομάδα αντιβιοτικών φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 1. Αρχικοί εκκινητές που δοκιμάσαμε με τα δείγματα.

Επειδή ορισμένοι εξ' αυτών δεν έδωσαν προϊόντα στα δείγματά μας, χρησιμοποιήσαμε κάποιους που τους αντικατέστησαν και φαίνονται στον επόμενο πίνακα:

Ομάδα αντιβιοτικών	Εκκινητής (όνομα)/ Παραπομπή	Πρόσθιος εκκινητής (5'-3')	Ανάστροφος εκκινητής (3'-5')	Κάλυψη (%)	Εξειδίκευση (%)	Μέγεθος προϊόντος
Vancomycins	<i>vanA_5</i> (Wang et al. 2014)	AAAAGGCTCTGAAAACGCAGTTAT	CGGCCGTTATCTTGTA AAAACAT	42.11	85.71	150 bp
MLSB	<i>ermT_3</i> (Wang et al. 2014)	GTAAAATCCCTAGAGAATACTTTCATCCA	TGAGTGATATTTTGAAGGGTGTCTT	81.82	100	316 bp
Trimethoprim	<i>dfrA17_1</i> (Szczepanowski et al.)	ACCAGATATTCATGGAGCG	CCATTACACCCCTCATCATTCCG	95.32	99.21	173 bp
chloramphenicols	<i>catA_1</i> (Wang et al. 2014)	GGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATT	CACCTTGTGCGCTTGC GTATA	94.02	99.56	101 bp
fluoroquinolones	<i>qnrS_1</i> (Zhang et al. 2019)	GTGAGTAATCGTATGTACTTTTGC	AAACACCTCGACTTAAGTCT	80.55	99.69	169 bp
beta-lactams	<i>ges_2</i> (Szczepanowski et al. 2009)	ACGCACTATTACTGGCAGGG	GTTGAGCACATTGCAAAAACG	65,60	81,33	181 bp
beta-lactams	<i>shv2_1</i> (Wang et al. 2014)	TCCCATGATGAGCACCTTTAAA	TTCGTCACCGGCATCCA	91,29	93,29	108 bp
MLSB	<i>erm33_(1)-332</i>	TCTGCAACGAGCTTTGGGTT	TCAAAGCCTGTCGGAATTGGT	100	100	239 bp
fluoroquinolones	<i>qnrD_(4)-447</i>	ACGACAGGAATAGCTTGAAGG	TCAGCCAAAGACCAATCAAACG	100	100	373 bp

Πίνακας 1. Αντικατάσταση των εκκινητών που δεν έδωσαν αναμενόμενο προϊόν με τα δείγματά μας

Οι εκκινητές που έπειτα από δοκιμές έδωσαν τελικά το αναμενόμενο προϊόν στο πείραμα των χρωματοδοχείων, το έδαφος από το οποίο προήλθε το γενετικό υλικό και οι συνθήκες των PCR φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Ομάδα αντιβιοτικών	Εκκινητής/ Παραπομπή	Πρόσθιος εκκινητής (5'-3')	Ανάστροφος εκκινητής (5'-3')	Κάλυψη (%)	Εξειδίκευση (%)	Μέγεθος προϊόντος	Υπόστρωμα	Συνθήκες PCR/qPCR
Tetracyclines	<i>tetM_1 (Koike et al. 2007)</i>	ACAGAAAG CTTATTATA TAAC	TGGCGTGT CTATGATGT TCAC	46,51	69,71	171 bp	Από περιττώματα αγελάδων κτηνοτροφικών μονάδων/Εδαφος ενισχυμένο με κοπριά από τα ροτς του πειράματος	[95°C (15''), 49°C (30'')] x 40/[95°C (15''), 49°C (30'')] x 35
Sulfonamides	<i>sul1_3 (Ross and Topp 2015)</i>	GACTGCAG GCTGGTGG TTAT	GAAGAACC GCACAATC TCGT	90,11	100	105 bp	Από περιττώματα αγελάδων κτηνοτροφικών μονάδων/Εδαφος ενισχυμένο με κοπριά από τα ροτς του πειράματος	[95°C (15''), 60°C (30'')] x 40/[95°C (15''), 60°C (30'')] x 35
beta-lactams	<i>tem_1 (May et al. 2009)</i>	GCATCTTA CGGATGGC ATGA	GTCCTCCG ATCGTTGTC AGAA	91,64	84,27	100 bp	Έδαφος ενισχυμένο με κοπριά από τα ροτς του πειράματος	[95°C (15''), 46°C (30'')] x 40/[95°C (15''), 46°C (30'')] x 35
beta-lactams	<i>cfxa_1 (Wang et al. 2014)</i>	TCATTCTC GTTCAAGT TTTCAGA	TGCAGCAC CAAGAGGA GATGT	54,77	99,63	101 bp	Έδαφος ενισχυμένο με κοπριά από τα ροτς του πειράματος	[95°C (15''), 54°C (30'')] x 40/[95°C (15''), 60°C (30'')] x 35

Πίνακας 2. Οι εκκινητές που έπειτα από δοκιμές έδωσαν τελικά το αναμενόμενο προϊόν και το ενδιαίτημα από το οποίο προήλθε το γενετικό υλικό

Παράρτημα II



Εικόνα 8 Αγαρόζη και ζυγός ακριβείας.



Εικόνα 9. Πηκτή αγαρόζης με δείγματα για ηλεκτροφόρηση.

Αποτελέσματα gradient PCR

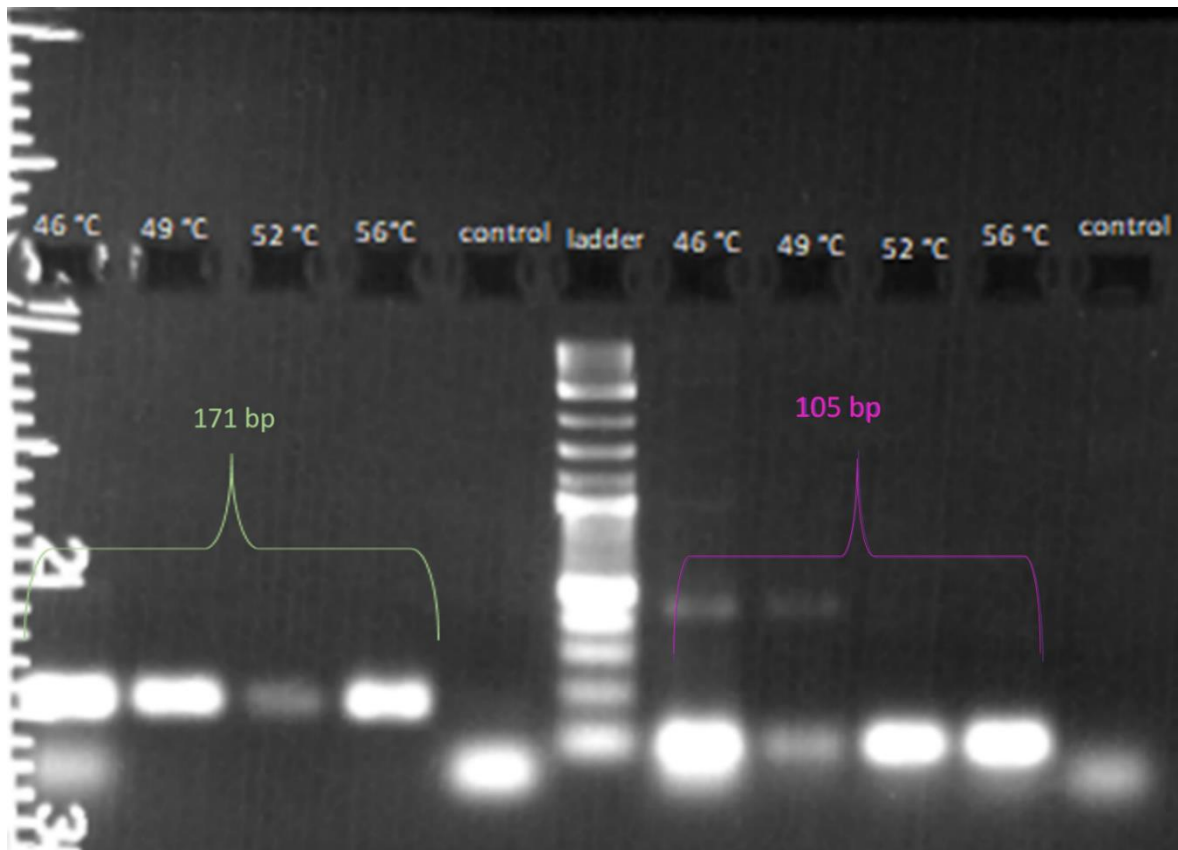
Τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων των προϊόντων της gradient PCR, η κατηγορία του αντιβιοτικού των γονιδίων ανθεκτικότητας, τα ονόματα των εκκινητών, τα μεγέθη των προϊόντων φαίνονται παρακάτω παρακάτω :

Ομάδα αντιβιοτικών: tetracyclines και sulfonamides

Εκκινητές: *tetM_1* και *sulI_3*

Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος : 171 bp για τετρακυκλίνες και 105 bp για σουλφοναμίδες.

Μοριακός στόχος: Συνθάση διυδροπτερικού οξέος (dihydropteroate synthase) στο μονοπάτι του φολικού οξέος για τις σουλφοναμίδες (σύνθεση DNA, μεταβολισμός) και υπομονάδα 30S του ριβοσώματος (πρωτεϊνοσύνθεση) για τετρακυκλίνες.



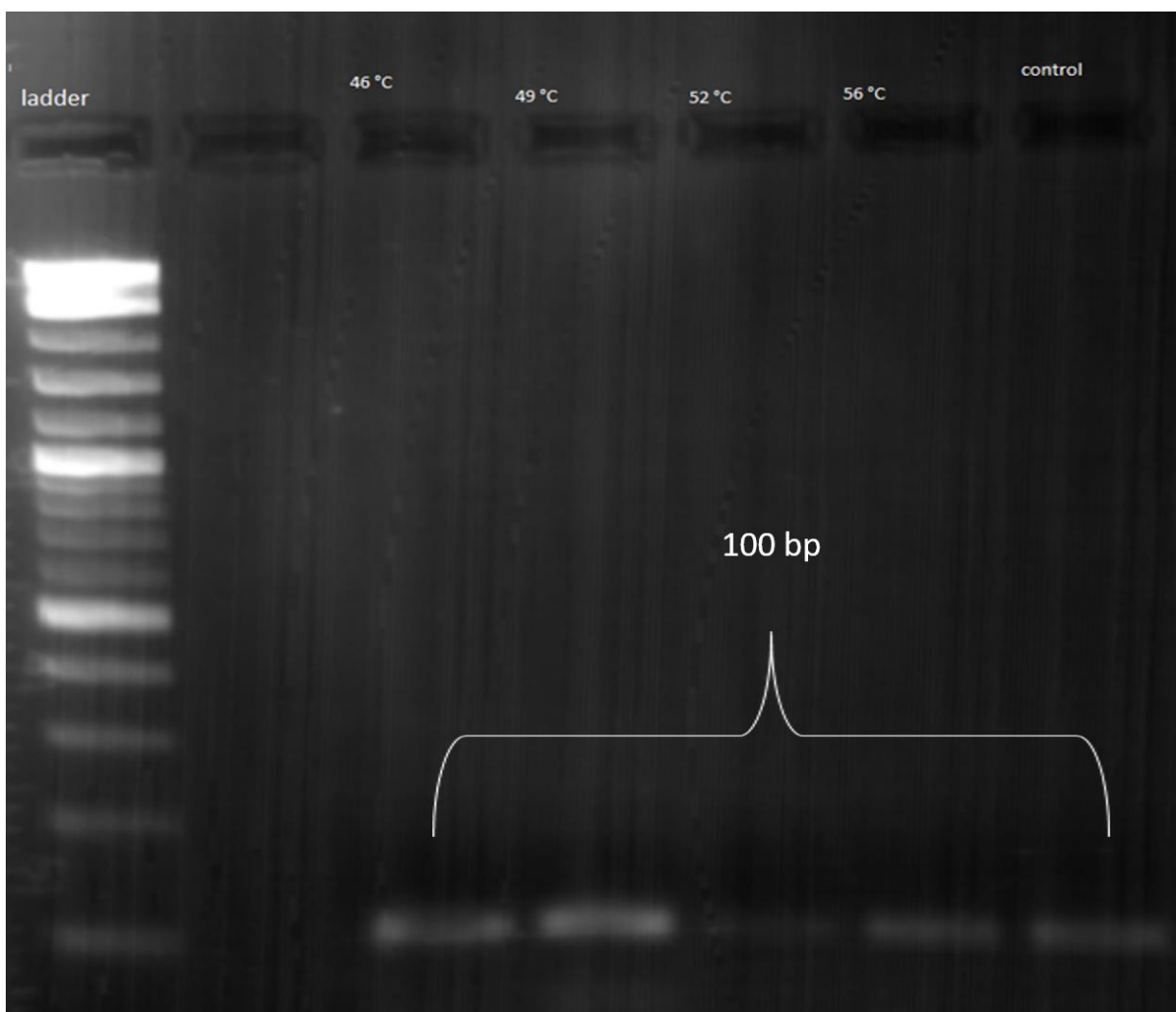
Εικόνα 10. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων gradient PCR tetracyclines και sulfonamides. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών για κάθε δείγμα φαίνεται στην εικόνα πάνω από κάθε πηγαδάκι. Ο αρνητικός μάρτυρας (control) είχε ως θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών την χαμηλότερη.

Ομάδα αντιβιοτικών: b-lactams

Εκκινητές: *tem_1*

Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος: 100 bp

Μοριακός στόχος: δδ-Τρανσπεπτιδάση (DD-transpeptidase), ένζυμο υπεύθυνο για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.



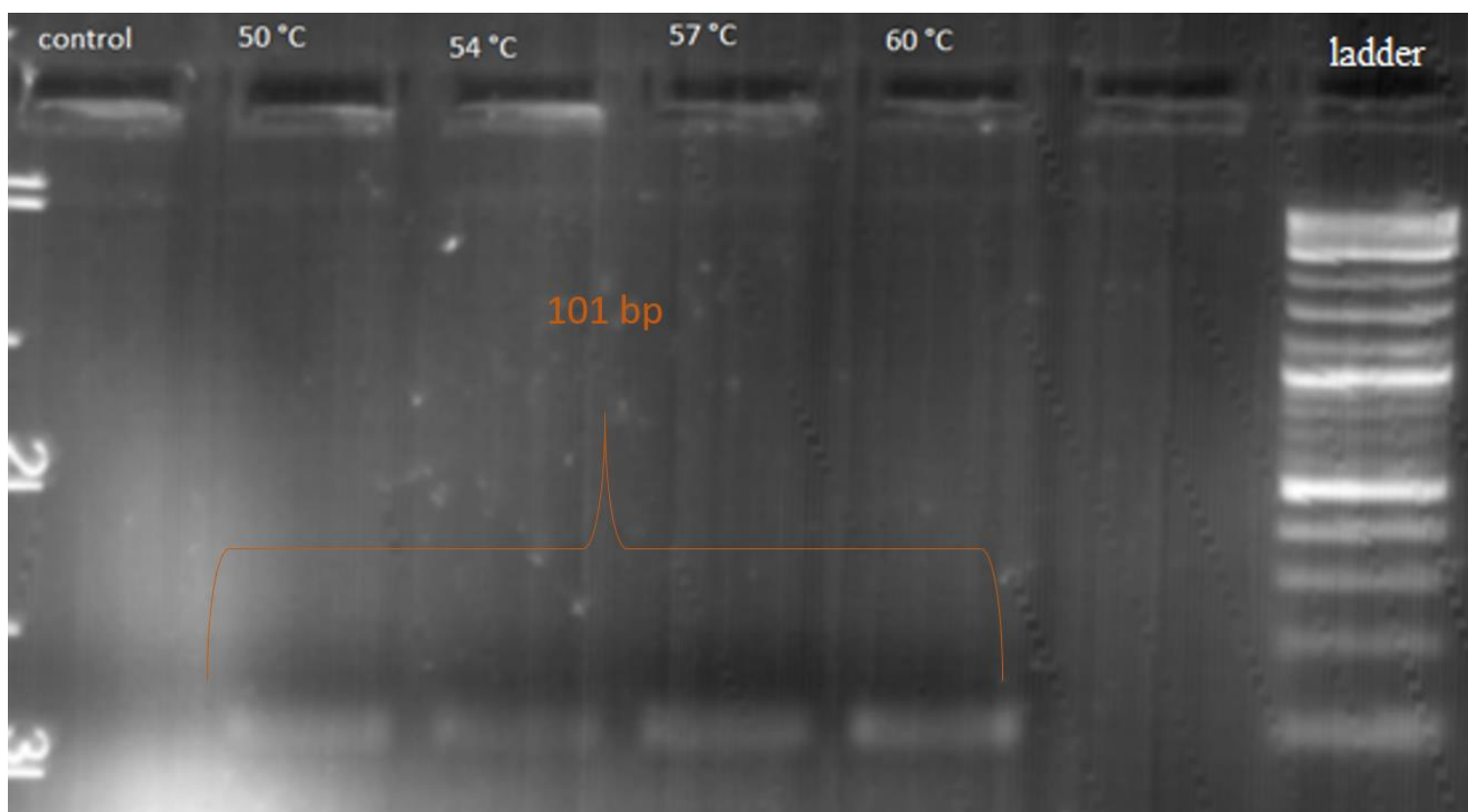
Εικόνα 11. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων gradient PCR b-lactams.. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών για κάθε δείγμα φαίνεται στην εικόνα πάνω από κάθε πηγαδάκι. Ο αρνητικός μάρτυρας (control) είχε ως θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών την χαμηλότερη.

Ομάδα αντιβιοτικών: β -lactams (κεφαλοσπορίνες)

Εκκινητές: *cfxa_1*

Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος: 101 bp

Μοριακός στόχος: δδ- Τρανσπεπτιδάση (DD-transpeptidase), ένζυμο υπεύθυνο για τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.



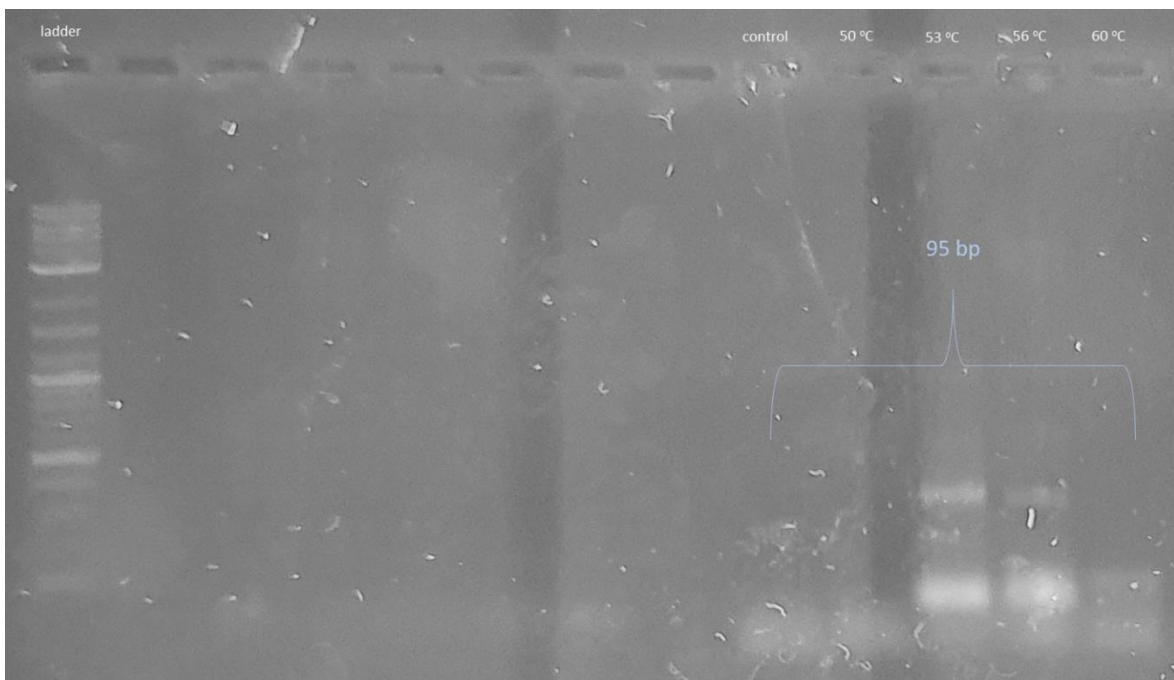
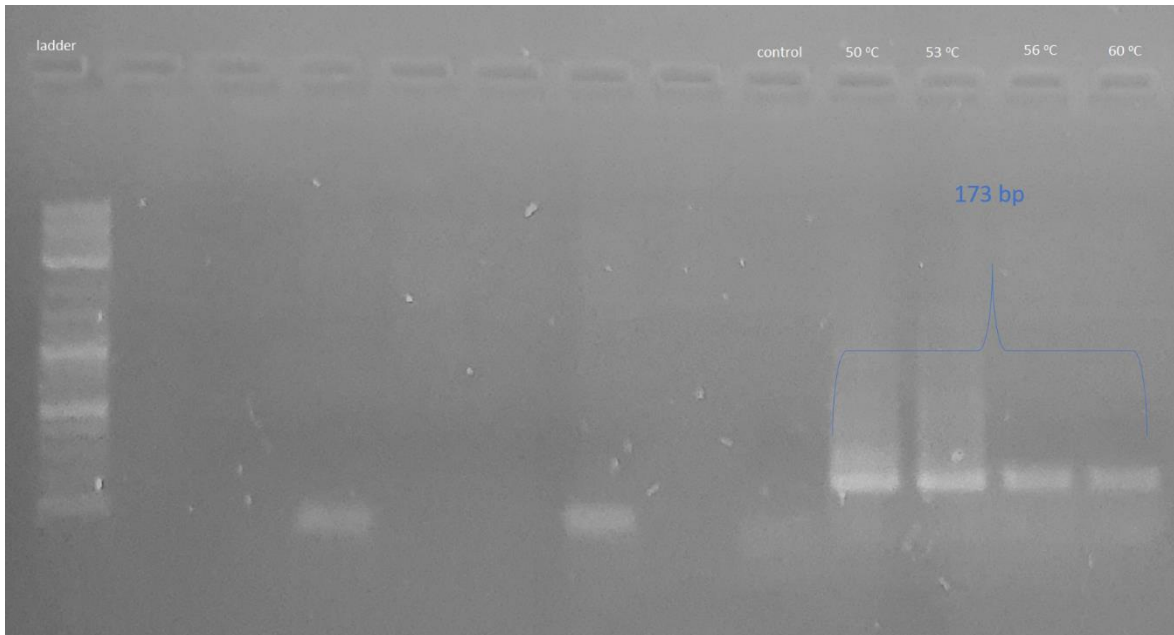
Εικόνα 12. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων gradient PCR cefotaxime μιας κεφαλοσπορίνης τρίτης γενιάς. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών για κάθε δείγμα φαίνεται στην εικόνα πάνω από κάθε πηγαδάκι. Ο αρνητικός μάρτυρας (control) είχε ως θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών την χαμηλότερη

Ομάδα αντιβιοτικών: trimethoprim

Εκκινητές: *dfrA1_1* και *dfrA1_17*

Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος: 95 bp για *dfrA1_1* και 173 bp για *dfrA1_17*

Μοριακός στόχος: ρεδοουκτάση διυδροφολικού (Dihydrofolate reductase) ένζυμο που συμμετέχει στη σύνθεση του φολικού οξέους.



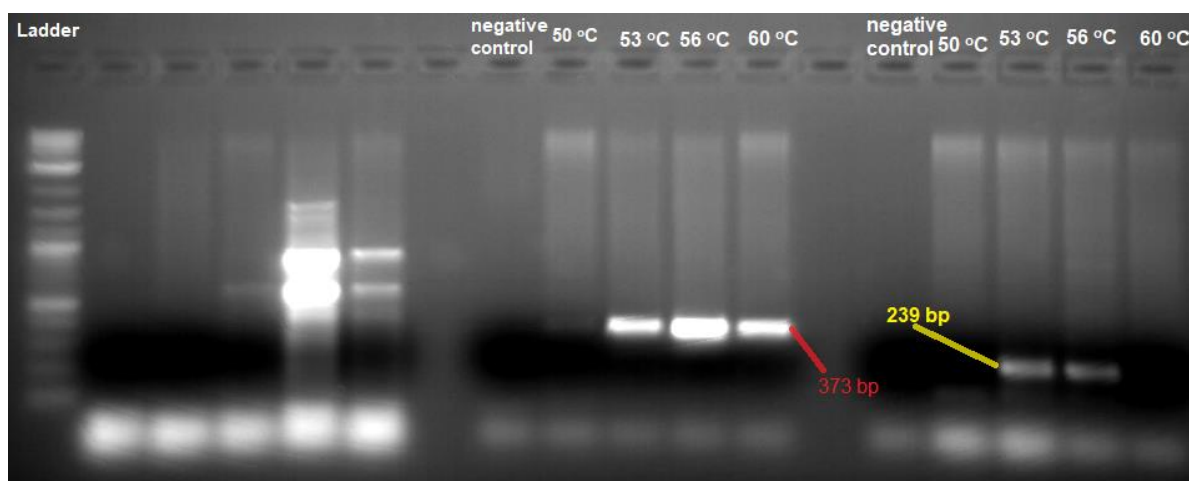
Εικόνες 13.,14. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων gradient PCR trimethoprim. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών για κάθε δείγμα φαίνεται στην εικόνα πάνω από κάθε πηγαδάκι. Ο αρνητικός μάρτυρας (control) είχε ως θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών την χαμηλότερη.

Ομάδα αντιβιοτικών: Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B (MLSB) (erythromycin) και quinolones.

Εκκινητές: *erm33_(1)*-332 και *qnrD_(4)*-447

Αναμενόμενο μέγεθος προϊόντος : 239 bp για τον *erm33_(1)*-332 και 373 bp για τον *qnrD_(4)*-447.

Μοριακός στόχος: Υπομονάδα 50S του ριβοσώματος (πρωτεϊνοσύνθεση) για ερυθριμυκίνη και Γυράση του DNA και Τοποϊσομεράση IV (αντιγραφή DNA-πολλαπλασιασμός κυττάρων) για κινολόνες (Blondeau 2004).



Εικόνες 15. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων gradient PCR ερυθρομυκίνης και φθοροκινολόνης. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών για κάθε δείγμα φαίνεται στην εικόνα πάνω από κάθε πηγαδάκι. Ο αρνητικός μάρτυρας (negative control) είχε ως θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών την χαμηλότερη.

Παράρτημα IV

Αποτελέσματα φασματοφωτομέτρησης:

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των δειγμάτων DNA μετά τον καθαρισμό τους από τη στήλη αγαρόζης :

Sample ID	ID - #	SampleType	Abs260	Abs280	260/280	Concentration(ng/ul)
Tetr	1	dsDNA	0,748	0,432	1,73	37,4
Tem	2	dsDNA	0,286	0,176	1,63	14,3
Tem	3	dsDNA	0,395	0,283	1,39	19,7
Tem	4	dsDNA	0,269	0,172	1,56	13,4

Πίνακας 8. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης προσόντων PCR των εκκινητών *tetM_1* και *tem_1* έπειτα από τον καθαρισμό από στήλη αγαρόζης.

Sample ID	ID - #	SampleType	Abs260	Abs280	260/280	Concentration(ng/ul)
Pur CFXA	1	dsDNA	0,316	0,206	1,53	15,8
Pur CFXA	2	dsDNA	0,248	0,144	1,72	12,4

Πίνακας 9. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης προσόντων PCR του εκκινητή *cfxa_1* έπειτα από τον καθαρισμό από στήλη αγαρόζης.

Sample ID	ID - #	SampleType	Abs260	Abs280	260/280	Concentration(ng/ul)
Sul	1	dsDNA	0,764	0,457	1,67	38,2
Sul	2	dsDNA	0,761	0,438	1,74	38,1
Dfra	3	dsDNA	0,365	0,188	1,95	18,3
Dfra	4	dsDNA	0,314	0,169	1,86	15,7
Dfra	5	dsDNA	0,306	0,186	1,65	15,3

Πίνακας 10. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης προσόντων PCR των εκκινητών *sulI_3* και *dfrA1_1* έπειτα από τον καθαρισμό από στήλη αγαρόζης.

Sample ID	ID - #	Sample Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration(ng/ul)
gnrD	1	dsDNA	0,203	0,116	1,75	10,1
qnrD	2	dsDNA	0,191	0,101	1,88	9,5
erm33	3	dsDNA	0,768	0,435	1,77	38,4
erm33	4	dsDNA	0,766	0,437	1,75	38,3

Πίνακας 11. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης προσόντων PCR των εκκινητών *qnrD_(4)-447* και *erm33_(1)-332* έπειτα από τον καθαρισμό από στήλη αγαρόζης.

Τα βασικά στάδια για την απομόνωση DNA του πρωτοκόλλου του kit (NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up) φαίνονται παρακάτω:

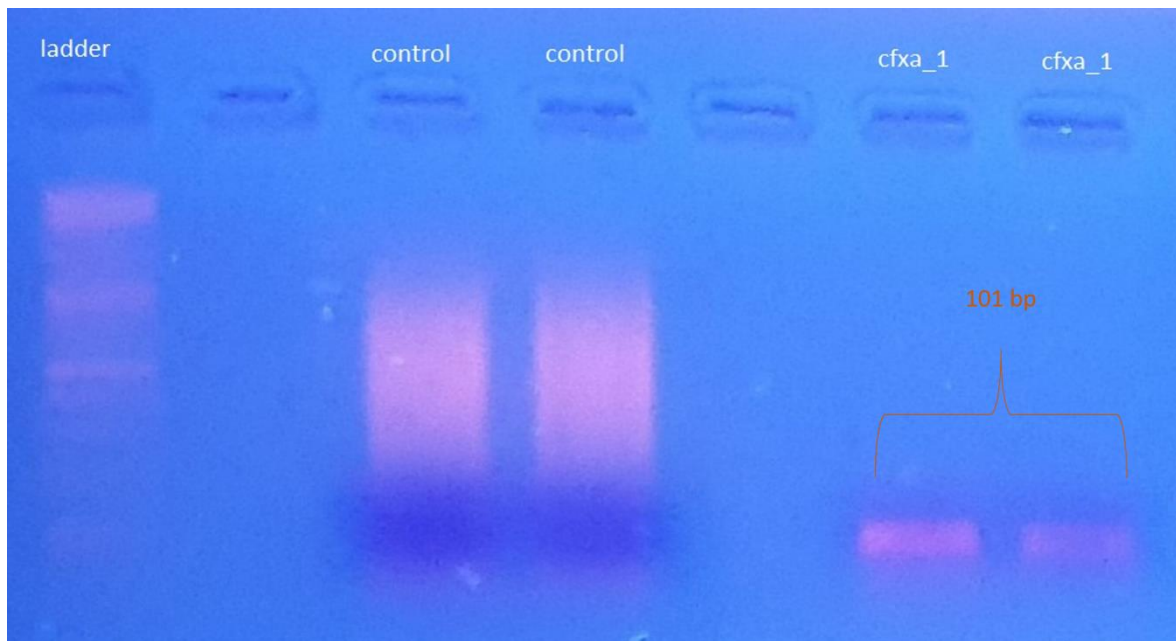
1. Προσθήκη 200 μl διαλύματος NTI (που περιέχει δείκτη για τη διασφάλιση βέλτιστου pH για τη δράση του ενζύμου) ανά 100 mg ηκτης και θέρμανση του φιαλιδίου στους 50 °C για 5-10 λεπτά. Ανά

- 2-3 λεπτά πραγματοποιούνταν ανάδευση σε vortex σε χαμηλές ταχύτητες. Αυτό το στάδιο είναι απαραίτητο για τη διαλυτοποίηση του gel και την απελευθέρωση του DNA στο διάλυμα.
2. Προσθήκη 700 μl διαλύματος NT3 στη στήλη και φυγοκεντρούμε στα 11.000 g για 30 δευτερόλεπτα. Αφαιρούμε μετά το υποκείμενο υγρό και τοποθετούμε ξανά τη στήλη στο δοχείο συλλογής. Πραγματοποιούμε την παραπάνω διαδικασία 2 φορές. Το βήμα αυτό έχει ως στόχο την έκπλυση και ελαχιστοποίηση χροστροπικών αλάτων που θα μπορούσαν να μειώσουν την καθαρότητα.
 3. Έπειτα φυγοκεντρούμε τη μεμβράνη για 1 λεπτό στα 11.000 g. Αυτό το βήμα έχει ως στόχο να στεγνώσουμε τη μεμβράνη και να αφαιρέσουμε οποιαδήποτε ποσότητα διαλύματος NT3 , τυχαίνει να έχει παραμείνει στη μεμβράνη.
 4. Τελικό στάδιο αποτελεί η έκλυση του DNA. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα νέο φιαλίδιο μικροφυγοκέντρωσης (eppendorf tube) 1,5 ml. Προσθέσαμε 20 μl διαλύματος NE και επώασαμε σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C). Μετά φυγοκεντρήσαμε για 1 λεπτό στα 11.000 g. Συλλέξαμε καθαρό το DNA από τη στήλη στο φιαλίδιο eppendorf.

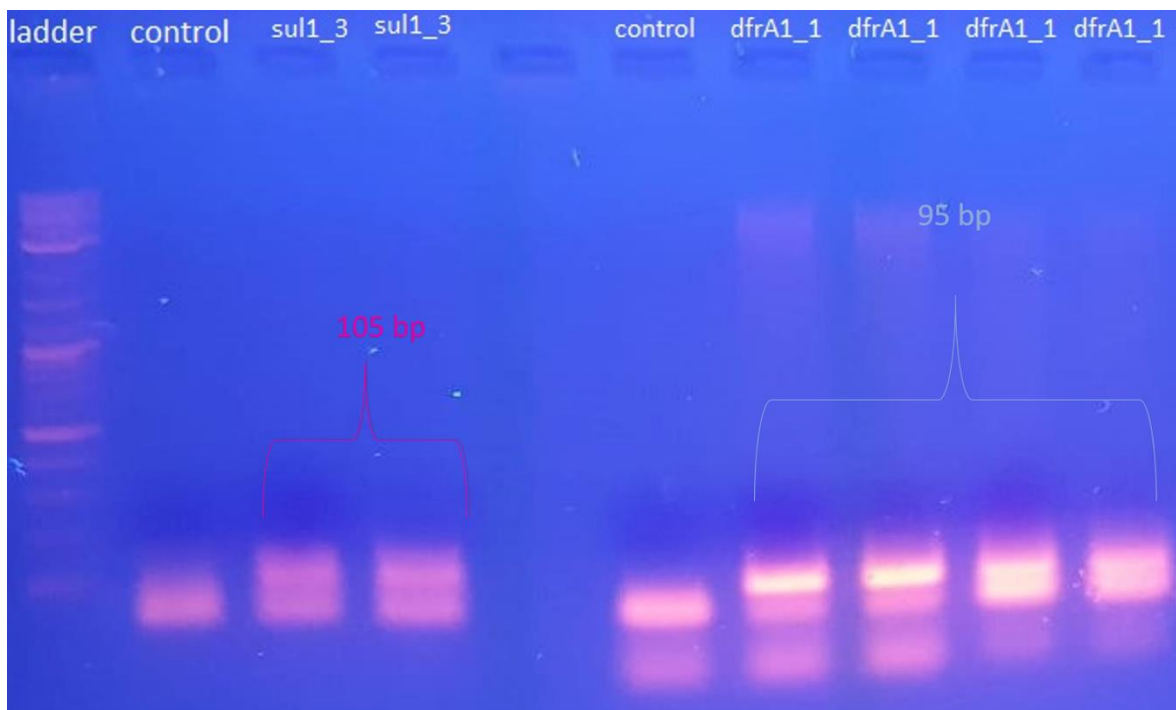
Παράρτημα III

Προϊόντα PCR

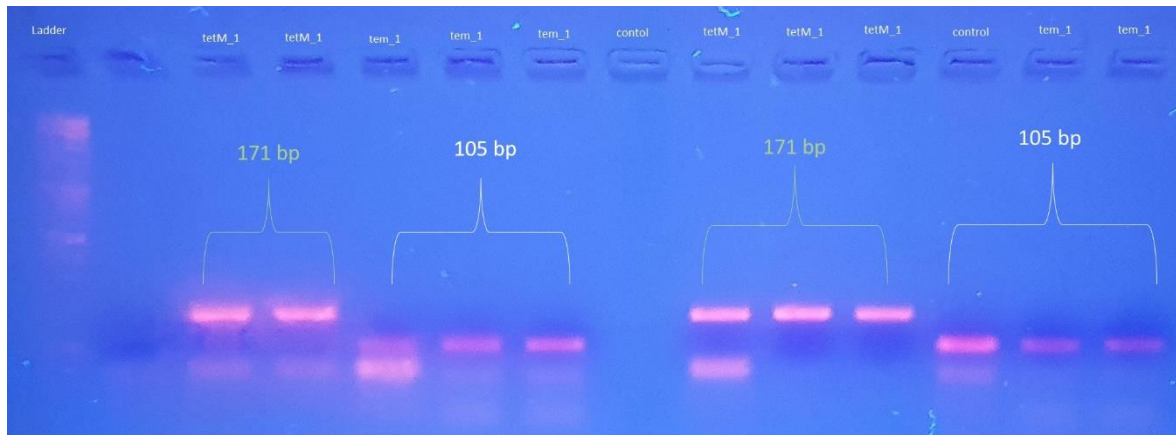
Τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων των προϊόντων της PCR φαίνονται παρακάτω στις παρακάτω εικόνες:



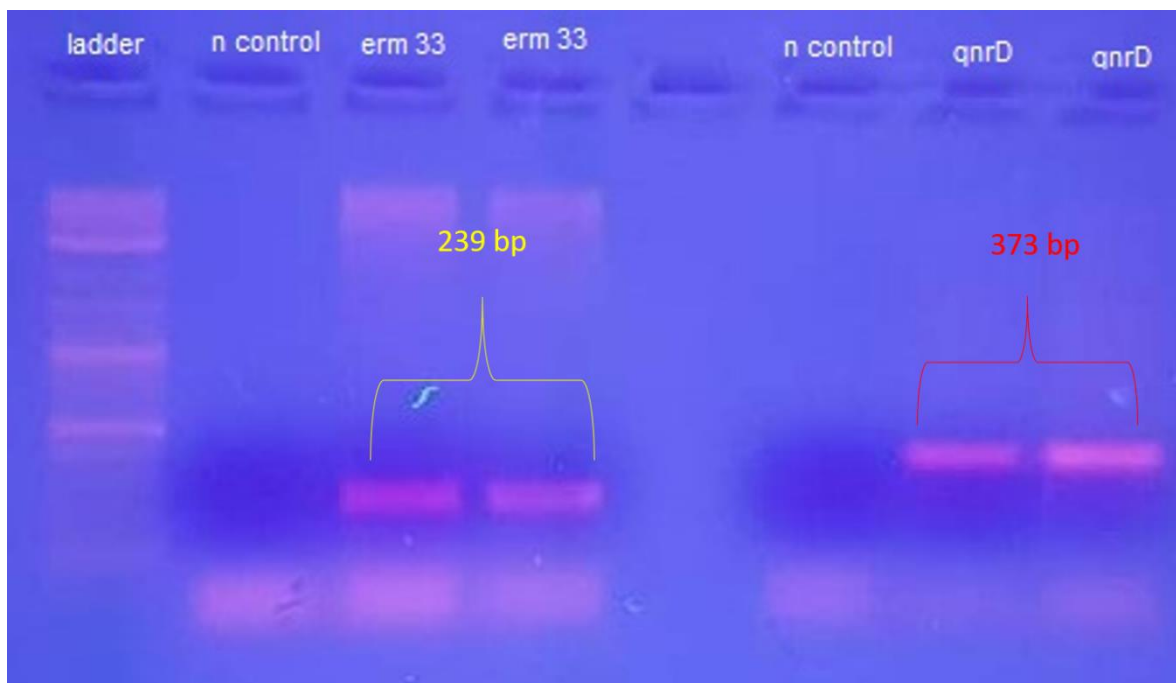
Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση αποτελέσματος PCR. DNA ενισχυμένο από το ζεύγος εκκινητών *cfxa_1*. Ο αρνητικός μάρτυρας (control) είχε ως θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών την χαμηλότερη.



Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων PCR DNA ενισχυμένα από τα ζεύγη εκκινητών *sul1_3* και *dfrA1_1*. Ο αρνητικός μάρτυρας (control) είχε ως θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών την χαμηλότερη.



Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων PCR , τμήματα DNA ενισχυμένα από τα ζεύγη εκκινητών *tetM_1* και *tem_1*. Παρ'όλου που πήραμε μπάντα στον αρνητικό μάρτυρα στις τετρακυκλίνες σε αυτή την ηλεκτροφόρηση , μετέπειτα έλεγχοι των αντιδραστηρίων δεν έδειξαν επιμόλυνση στα αντιδραστήρια. Πιθανότητα αποτέλεσε πρόβλημα στο "φόρτωμα" των δειγμάτων.

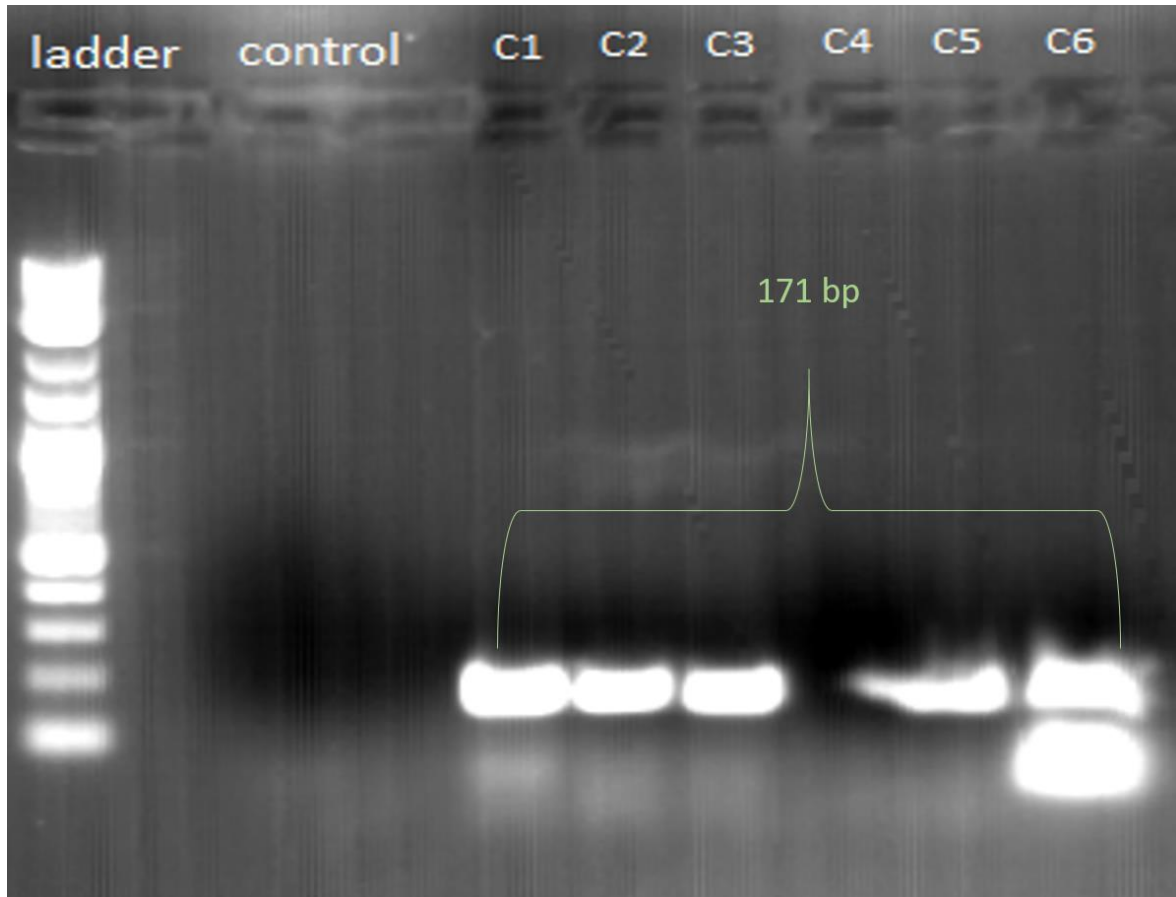


Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση αποτελεσμάτων PCR , τμήματα DNA ενισχυμένα από τα ζεύγη εκκινητών *erm33_(1)-332* και *qnrD_(4)-447*. Ο αρνητικός μάρτυρας (*n control*) είχε ως θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών την χαμηλότερη.

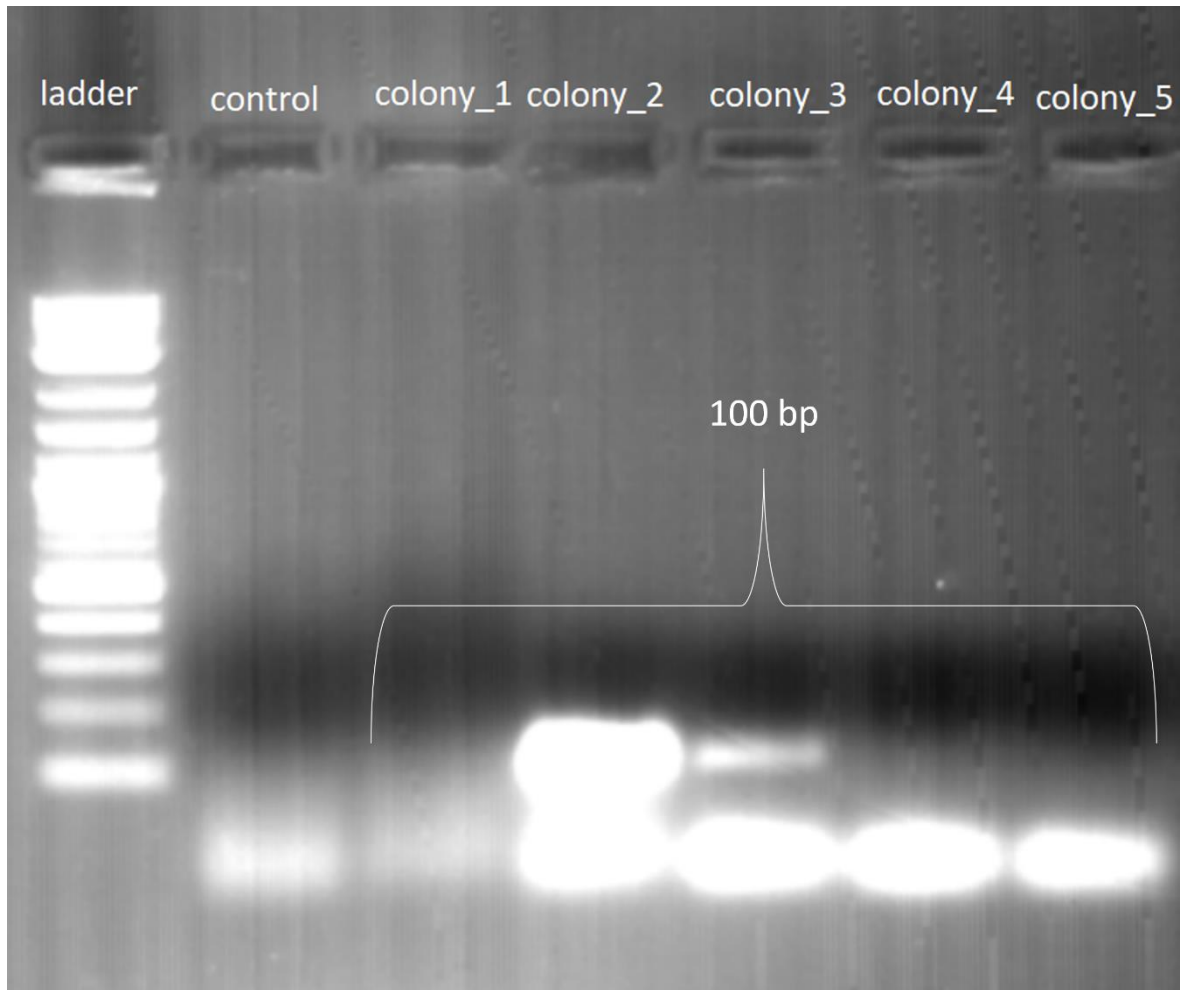
Παράρτημα V

Αποτελέσματα μετασχηματισμού και colony PCR

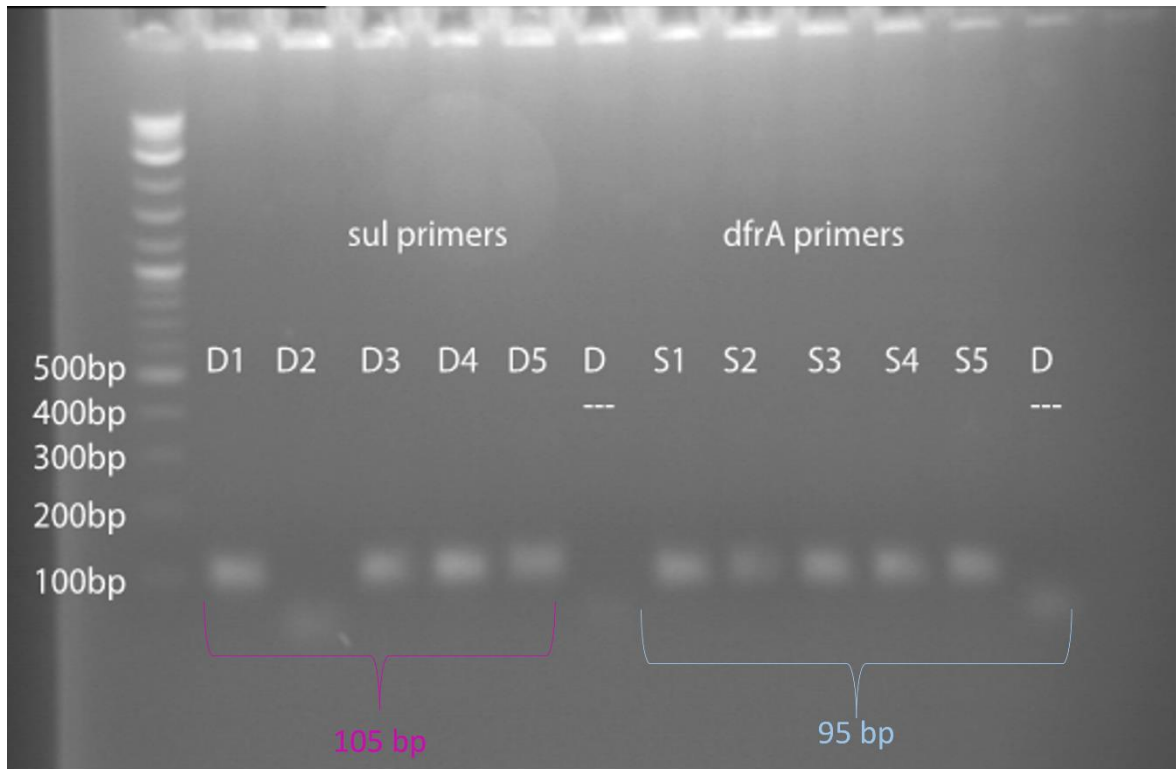
Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται ορισμένα τρυβλία έπειτα από μετασχηματισμό βακτηρίων και τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων των colony PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών που κλωνοποιήθηκε.



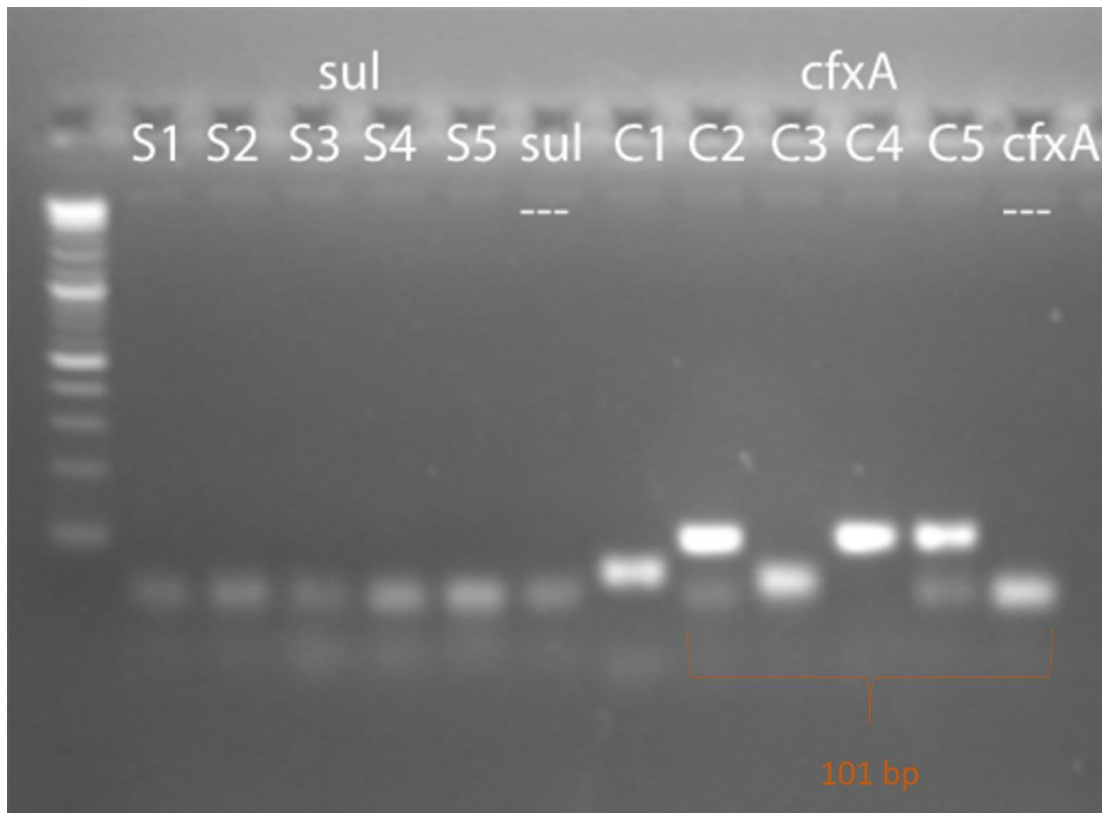
Εικόνα 20. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης colony PCR βακτηρίων μετασχηματισμένων από προϊόν του εκκινητή *tetM_1*. Επάνω από κάθε πηγαδάκι συμβολίζεται οι αριθμός της αποικίας που αντιστοιχεί το προϊόν της colony PCR. Ο αρνητικός μάρτυρας συμβολίζεται με control.



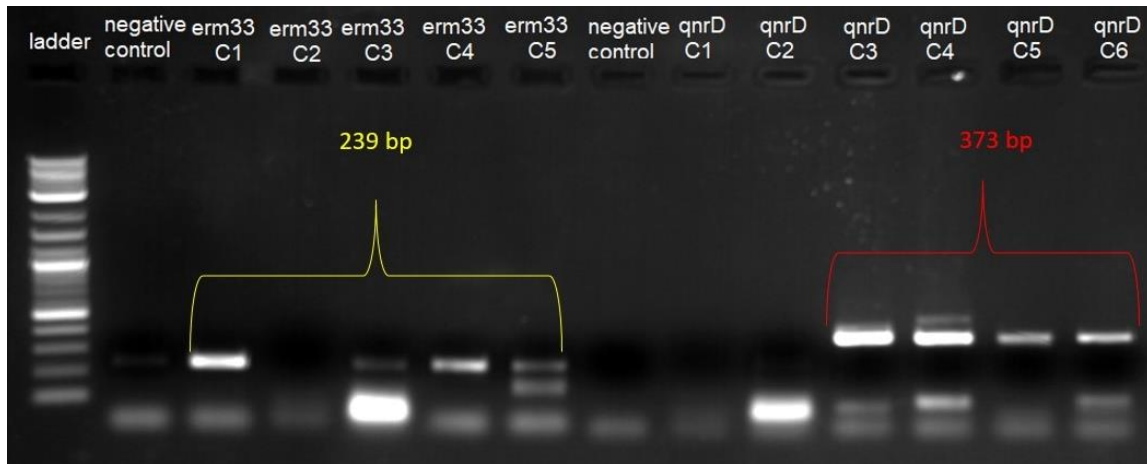
Εικόνα 21. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης colony PCR βακτηρίων μετασχηματισμένων από προϊόν του εκκινητή *tem_1*. Επάνω από κάθε πηγαδάκι συμβολίζεται οι αριθμός της αποικίας που αντιστοιχεί το προϊόν της colony PCR. Ο αρνητικός μάρτυρας συμβολίζεται με control.



Εικόνα 22. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης colony PCR βακτηρίων μετασηματισμένων από προϊόντα των εκκινητών *sul1_3* και *dfrA1_1*. . Επάνω από κάθε πηγαδάκι συμβολίζεται οι αριθμός της αποικίας που αντιστοιχεί το προϊόν της colony PCR. Ο αρνητικός μάρτυρας συμβολίζεται με παύλες.

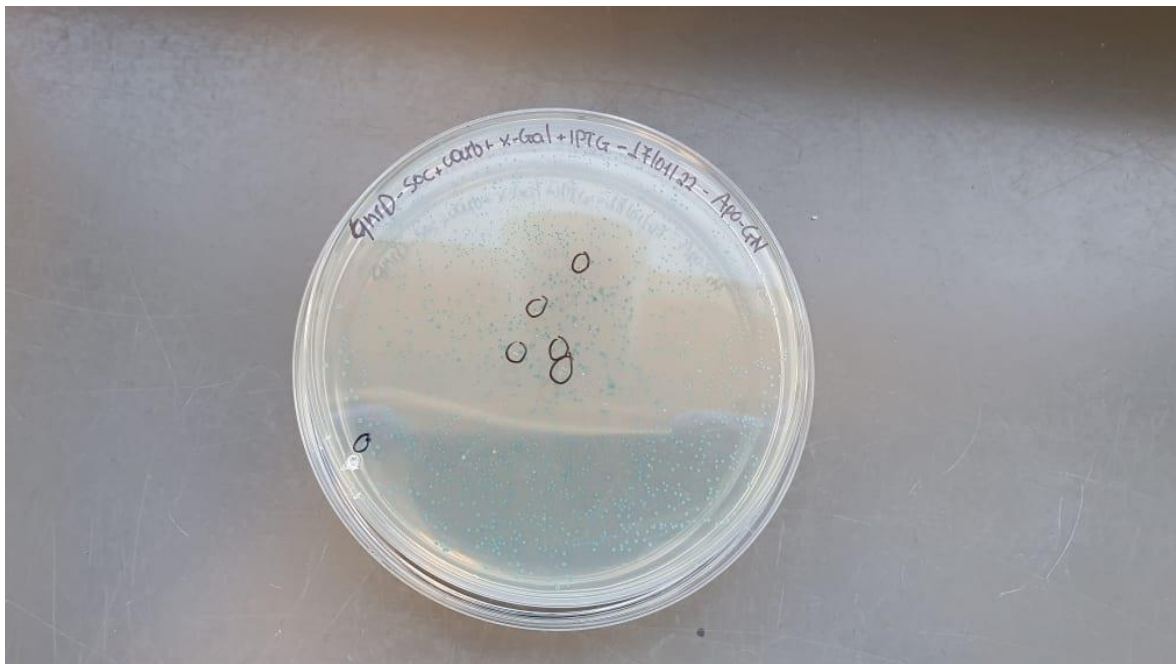


Εικόνα 23. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης colony PCR βακτηρίων μετασηματισμένων από προϊόν του εκκινητή *cfxA_1*. Επάνω από κάθε πηγαδάκι συμβολίζεται οι αριθμός της αποικίας που αντιστοιχεί το προϊόν της colony PCR. Ο αρνητικός μάρτυρας συμβολίζεται με παύλες.



Εικόνα 24. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης colony PCR βακτηρίων μετασχηματισμένων από προϊόντα των εκκινητών *erm33_(1)-332* και *qnrD_(4)-447*. Επάνω από κάθε πηγαδάκι συμβολίζεται οι αριθμός της αποικίας που αντιστοιχεί το προϊόν της colony PCR. Ο αρνητικός μάρτυρας συμβολίζεται με negative control.

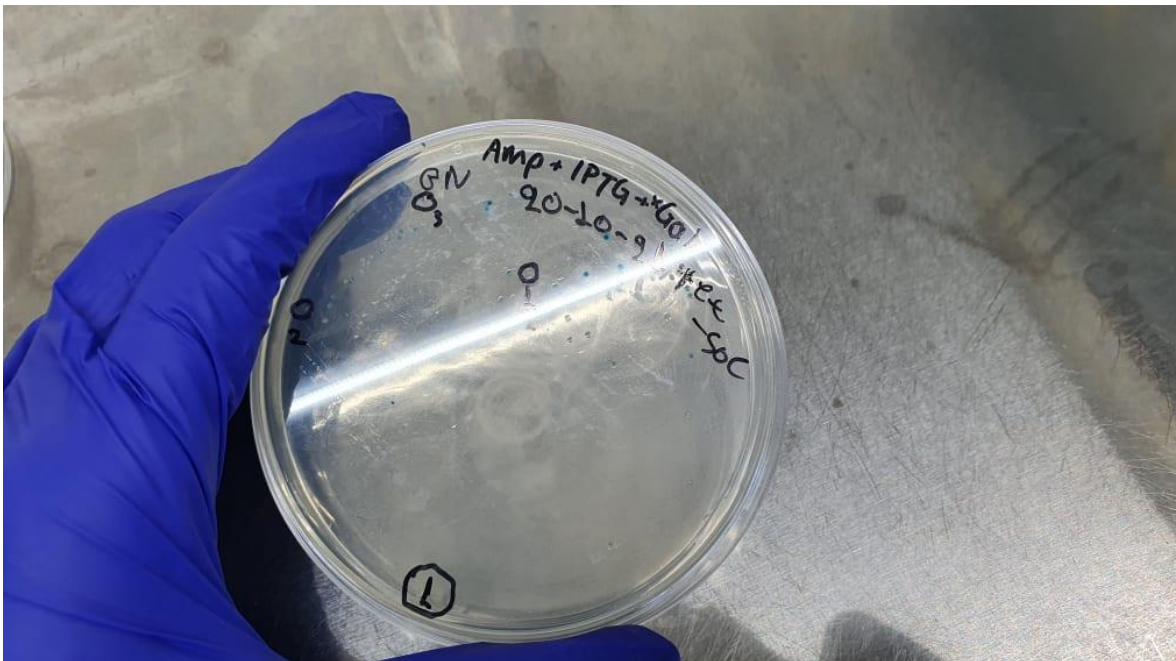
Στη συνέχεια ακολουθούν ορισμένες εικόνες τρυβλίων Petri από καλλιέργειες μετασχηματισμένων βακτηρίων.



Εικόνα 25. Αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων σε τρυβλίο Petri από το προϊόν του ζεύγους εκκινητών *qnrD_(4)-447*.



Εικόνα 26. Αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων σε τρυβλίο Petri από το προϊόν του ζεύγους εκκινητών *erm33_1*-332 .



Εικόνα 27. Αποικίες μετασχηματισμένων βακτηρίων σε τρυβλίο Petri από το προϊόν του ζεύγους εκκινητών *tetM_1*.

Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τα βήματα του παρακάτω πρωτοκόλλου:

1. Αφού φυγοκεντρήθηκαν τα ligation mixtures, ώστε να βρεθούν στον πάτο του φιαλιδίου, προστέθηκαν 2 ml από αυτά τα μείγματα σε ένα νέο φιαλίδιο μικροφυγοκέντρησης 1,5 ml σε πάγο.
2. Στη συνέχεια, αφού αφέθηκαν να ξεπαγώσουν σε πάγο, χρησιμοποιήθηκαν 50 ml δεκτικών κυττάρων DH5a (Invitrogen, ThermoFisherScientific®) και εισάχθηκαν στο προηγούμενο φιαλίδιο. Με ήπιες αναδεύσεις ανακατεύσαμε το περιεχόμενο και επώασαμε για 20 λεπτά.
3. Στη συνέχεια σε ένα heat block που είχε θερμοκρασία 42 °C, θερμάνθηκαν για 45-50 secτα κύτταρα και τα τοποθετήθηκαν απευθείας στον πάγο. Επώαστηκαν για 2 λεπτά. Αυτό το βήμα είναι απαραίτητο για τη δημιουργία πόρων στις μεμβράνες των βακτηρίων για την εισαγωγή των πλασμιδίων στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω "θερμικού σοκ" ("heatshock").
4. Προστέθηκαν στη συνέχεια προσθέσαμε 450 ml θρεπτικού μέσου SOC, μέχρι τελικό όγκο 500 ml. Σε αυτό το βήμα με τη χρήση του θρεπτικού μέσου τα βακτήρια ανακάμπτουν έπειτα από το σοκ του προηγούμενου βήματος
5. Έπειτα σε επωαστήρα ανακίνησης με ταχύτητα περιστροφής 150 rpm και θερμοκρασία 37 °C, επώαστηκαν για 1,5 ώρα με στόχο την αύξηση της βιομάζας των βακτηρίων. Τα φιαλίδια erpendorf τοποθετήθηκαν σε οριζόντια θέση, ώστε να επιτευχθεί επαρκής αερισμός για την ανάπτυξη των βακτηρίων.
6. Έπειτα πραγματοποιήσαμε φυγοκέντρωση στα 4000 g για 1 λεπτό (με σκοπό να μην προκαλέσουμε λύση και καταστροφή των κυττάρων λόγω κεντρομόλου δύναμης) και αναδιαλύσαμε τα κύτταρα σε 100 μιανορρίπτοντας 400 ml υπερκείμενου διαλύματος, με σκοπό να αυξήσουμε την συγκέντρωσή τους.
7. Στη συνέχεια σε θάλαμο καθόδου νηματικής ροής, ώστε να εξασφαλισθούν ασηπτικές συνθήκες και με την παρουσία φλόγας σε τρυβλία που περιείχαν LB-agar (Luria Bertani-agar) σαν θρεπτικό που περιείχε αμπικιλίνη ή καρβανικιλίνη με συγκέντρωση 100 μg/ml προσθέσαμε 10 ml IPTG (0,5 M) και 40 ml x-gal (100 mg/ml) σε κάθε τρυβλίο (20 ml IPTG και 80 ml x-gal συνολικά σε 2 τρυβλία) και στρώσαμε με αυτά τα τρυβλία. Συνακόλουθα από το μείγμα των κυττάρων στρώσαμε 50 μl σε κάθε τρυβλίο (σε 2 τρυβλία). Τα τρυβλία

σφραγιστήκαν με πάραφιλ εντός συσκευής καθόδου νηματικής ροής για να αποτρέψουμε τυχών επιμόλυνσή τους.

8. Επώασαμε σε επωαστήρα στους 37 °C overnight.

Παράρτημα VI

Απομόνωση πλασμιδίων

Σε αυτό το παράρτημα φαίνονται οι πίνακες των μετρήσεων στο nanodrop έπειτα από απομόνωση πλασμιδίων και στη συνέχεια οι ηλεκτροφορήσεις των απομονωμένων πλασμιδίων.

Sample ID	ID - #	Sample Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration (ng/ul)
C1 tetr plasmids	1	dsDNA	1.917	1.112	1.72	95.9
C1 tetr plasmids	2	dsDNA	1.841	1.046	1.76	92.1
C2 tetr plasmids	3	dsDNA	1.601	0.89	1.8	80
C2 tetr plasmids	4	dsDNA	1.547	0.87	1.78	77.3

Sample ID	ID - #	Sample Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration (ng/ul)
Tem C2	1	dsDNA	5.94	3.313	1.79	297
Tem C3	2	dsDNA	6.103	3.431	1.78	305.2
Tet C3	3	dsDNA	2.028	1.216	1.67	101.4
Tet C4	4	dsDNA	1.953	1.098	1.78	97.7
Tet C5	5	dsDNA	1.941	1.085	1.79	97.1
Tet C6	6	dsDNA	2.089	1.167	1.79	104.4

Πίνακας 12., Πίνακα 13 Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης απομονωμένων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από προϊόντα εκκινητών *tetM_1* και *tem_1*. Τα σύμβολα C1-C6 για τετρακυκλίνες και C2,C3 αντιστοιχούν στις αποικίες από τις οποίες απομονώθηκαν πλασμίδια.

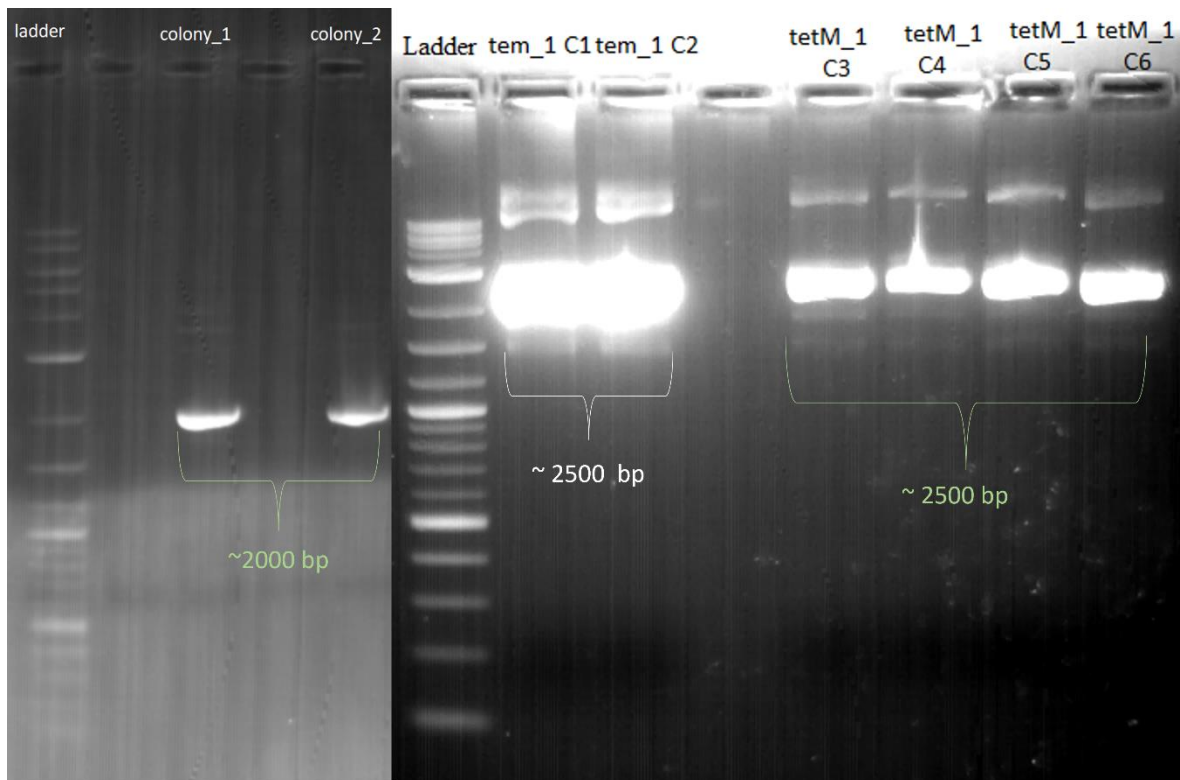
Sample ID	ID - #	Sample Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration (ng/ul)
S1	1	dsDNA	2.081	1.178	1.77	104.1
S2	2	dsDNA	2.685	1.527	1.76	134.3
S3	3	dsDNA	3.035	1.73	1.75	151.8
S4	4	dsDNA	1.404	0.824	1.7	70.2
S5	5	dsDNA	2.219	1.254	1.77	111
C2	6	dsDNA	3.701	2.09	1.77	185.1
C4	7	dsDNA	4.458	2.501	1.78	222.9
C5	8	dsDNA	4.066	2.288	1.78	203.3
D1	9	dsDNA	4.64	2.616	1.77	232
D3	10	dsDNA	5.405	3.017	1.79	270.2
D4	11	dsDNA	5.145	2.887	1.78	257.3
D5	12	dsDNA	5.405	3.02	1.79	270.2

Πίνακας 14. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης απομονωμένων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από προϊόντα εκκινητών. Τα σύμβολα S1-S5 για τριμεθοπρίμες C2,C4,C5 για κεφοταξίμη και D1,D3,D4,D5 για σουλφοναμίδες αντιστοιχούν στις αποικίες από τις οποίες απομονώθηκαν πλασμίδια.

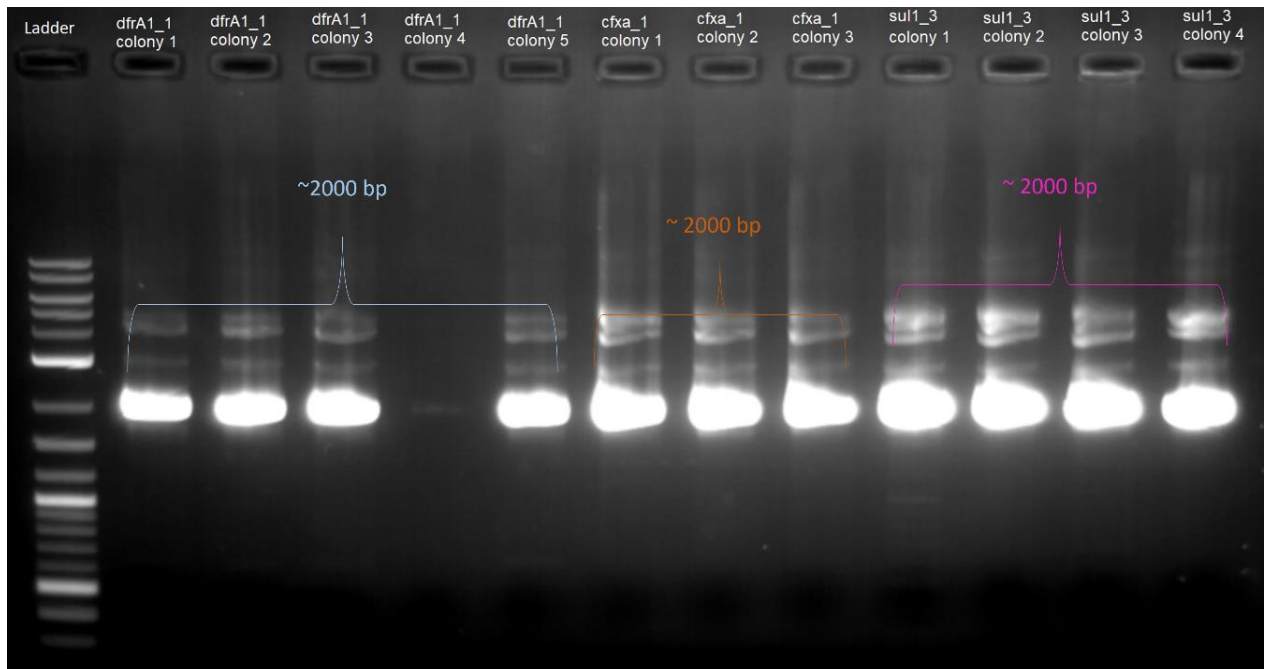
Sample ID	ID - #	Sample Type	Abs260	Abs280	260/280	Concentration (ng/ul)
qnrD_3	1	dsDNA	0.556	0.334	1.66	27.8
qnrD_4	2	dsDNA	0.684	0.417	1.64	34.2
qnrD_5	3	dsDNA	0.915	0.536	1.71	45.8
qnrD_6	4	dsDNA	0.274	0.187	1.47	13.7
erm_1	5	dsDNA	4.531	2.549	1.78	226.6
erm_3	6	dsDNA	0.547	0.319	1.72	27.4
erm_4	7	dsDNA	1.047	0.599	1.75	52.3
erm_5	8	dsDNA	4.526	2.527	1.79	226.3
qnrD_3	9	dsDNA	0.574	0.333	1.72	28.7
erm_4	10	dsDNA	0.533	0.306	1.74	26.6

Πίνακας 15. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης απομονωμένων ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από προϊόντα εκκινητών ερυθρομυκίνης και φθοριοκινολόνης. Στον πίνακα φαίνονται οι διάφορες αποικίες για κάθε ζεύγος εκκινητών από τις οποίες απομονώθηκαν πλασμίδια.

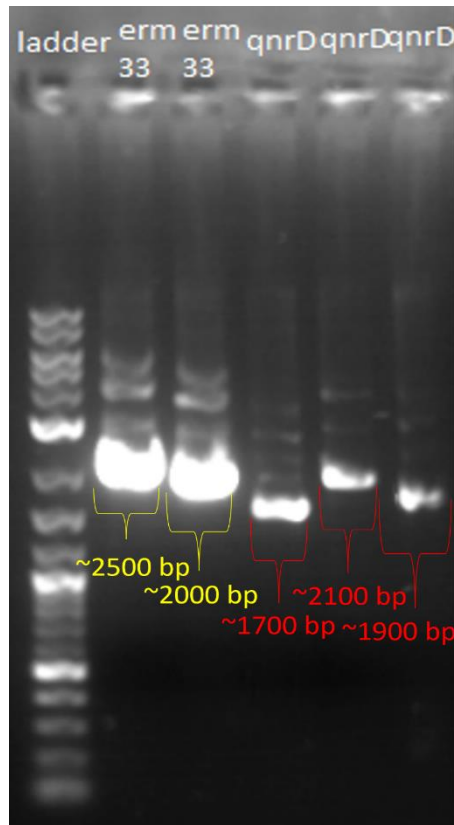
Ακολουθούν οι ηλεκτροφορήσεις των απομονωμένων πλασμιδίων.



Εικόνα 28. Στην εικόνα απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης του απομονωμένου ανασυνδυασμένου πλασμιδίου από το προϊόν των εκκινητών *tetM_1* και *tem_1*. Πάνω από τα “πηγαδάκια” του gel φαίνονται οι αποικίες που αντιστοιχούν τα απομονωμένα πλασμίδια στην εκάστοτε θέση.



Εικόνα 29. Στην εικόνα απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης του απομονωμένου ανασυνδυασμένου πλασμιδίου από το προϊόν των εκκινητών *dfrA1_1*, *cfxa_1* και *sul1_3*. Πάνω από τα “πηγαδάκια” του gel φαίνονται οι αποικίες που αντιστοιχούν τα απομονωμένα πλασμίδια στην εκάστοτε θέση.



Εικόνα 30. Στην εικόνα απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης του απομονωμένου ανασυνδυασμένου πλασμιδίου από το προϊόν των εκκινητών *erm33_(1)*-332 και *qnrD_(4)*-447. Πάνω από τα “πηγαδάκια” του gel φαίνονται οι αποικίες που αντιστοιχούν τα απομονωμένα πλασμίδια στην εκάστοτε θέση.

Τα πλασμίδια των κυττάρων, απομονώθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit Nucleospin® Plasmid, του οποίου τα βήματα φαίνονται παρακάτω:

1. Αρχικά πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 11.000 g για 30 sec και απορρίφθηκε όσο το δυνατόν περισσότερο υπερκείμενο.
2. Προστέθηκαν 250 µl ρυθμιστικού διαλύματος A1 (buffer A1) και με ήπιο πιπετάρισμα και ανάδευση σε χαμηλές ταχύτητες (vortex) επαναδιαλυτοποιήσαμε τα κύτταρα.
3. Προστέθηκαν έπειτα 250 µl ρυθμιστικού διαλύματος A2 (buffer A2) και μετά από απλές αναδεύσεις του σωληνάριου 6-8 φορές, επώασαμε έως 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μέχρι να εμφανιστούν τα λυώματα (lysate) των κυττάρων. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων με

τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος A2 που περιέχει SDS (αποδιάταξη).

4. Στη συνέχεια προστέθηκαν 300 μl ρυθμιστικού διαλύματος A3 (buffer A3) και ανακινήσαμε το φιαλίδιο 6-8 φορές μέχρι να έχουμε πλήρη αποχρωματισμό του διαλύματος. Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο για την καλύτερη απομάκρυνση των κυτταρικών λοιπών κυτταρικών ουσιών έπειτα από τη λύση των κυττάρων και την προετοιμασία των DNA για την πρόσδεσή του στην μεμβράνη πυριτίου (silica membrane). Στη συνέχεια ανακινήθηκε το διάλυμα για 17.000 g για 10 min , έως ότου γίνει διαυγές.
5. Προσθέτουμε έως 700 μl του διαλύματος σε μια στήλη πυριτίου (NucleoSpin® Plasmid/ Plasmid (No Lid)) και φυγοκεντρούμε στα 11.000 g για 1 λεπτό. Σε αυτό το στάδιο πρωτεΐνες , γενωμικό DNA και " κυτταρικά συντρίμια " (cellular debris) περνούν μέσα από την στήλη (NucleoSpin® Plasmid/ Plasmid (No Lid)) ενώ το πλασμιδιακό DNA προσδέεται σε αυτήν. Απορρίψαμε το υγρό από το σωληνάριο και το τοποθετήσαμε ξανά στη στήλη. Επαναλαμβάνεται το στάδιο έως ότου ολοκληρω το διάλυμα περάσει από τη στήλη.
6. Στη συνέχεια στη στήλη προσθέτονται 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW (buffer AW). Απορρίπτουμε το διάλυμα που πέρασε από τη στήλη στο σωληνάριο συλλογής (collection tube). Η προσθήκη του συγκεκριμένου διαλύματος εξουδετερώνει διάφορες νουκλεάσες που πιθανόν θα κατέστρεφαν το DNA μας. Επιπλέον η πλύση με το AW αυξάνει το αναγνωστικό μέγεθος του DNA και γενικότερα βελτιστοποιεί ενζυμικές αντιδράσεις. Έπειτα προσθέτουμε 600 μl ρυθμιστικού διαλύματος A4 (buffer A4). Τοποθετούμε έπειτα τη στήλη σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής (collection tube). Με την προσθήκη αυτού του buffer που περιέχει αιθανόλη διάφορα μόρια όπως άλατα, μεταβολίτες και διαλυτοποιημένα μακρομόρια απομακρύνονται με την χρήση αιθανόλης.

7. Ακολουθεί η “ ξήρανση ” της μεμβράνης με φυγοκέντρησή της στα 11.000 g για 4-5 λεπτά. Την τοποθετούμε σε ένα δοχείο μικροφυγοκέντρησης (erpendorf) 1,5 ml.
8. Προστίθενται 50 µl ρυθμιστικού διαλύματος ΑΕ (buffer ΑΕ) και η στήλη φυγοκεντρείται στα 11.000 g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το buffer ΑΕ (5mM Tris/HCl, pH 8.5) δημιουργεί τις απαραίτητες συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος , ώστε να αποσυνδεθεί από τη στήλη το πλασμίδιο και να εκλουστεί καθαρό στο erpendorf.

Παράρτημα VII

Απομόνωση γενετικού υλικού περιβαλλοντικών δειγμάτων

Σε αυτό το παράρτημα φαίνεται ο πίνακας των μετρήσεων στο Q-bit έπειτα από απομόνωση γενετικού υλικού από περιβαλλοντικά δείγματα.

Name of sample	Concentration (ng/μl)
CTL SOIL A	7
CTL SOIL B	7,68
CTL SOIL C	20,4
CTL SOIL 26/04	1,36
CTL SOIL+MANURE A	15,7
CTL SOIL+MANURE B	18,8
CTL SOIL+MANURE C	22
CTL SOIL+MANURE 26/04	16,4
TLM SOIL A	6,84
TLM SOIL B	9,4
TLM SOIL C	22,2
TLM SOIL 26/04	2,98
TLM MANURE A	17
TLM MANURE B	18,8
TLM MANURE C	49,6
TLM SOIL+MANURE 26/04	0,588
TIA SOIL A	17,1
TIA SOIL B	10,6
TIA SOIL C	14,4
TIA SOIL 26/04	2,96
TIA MANURE A	34,2
TIA MANURE B	28,8
TIA MANURE C	39,4
TIA SOIL+MANURE 26/04	3,98
SMX SOIL A	3,06
SMX SOIL B	11,3
SMX SOIL C	3,86
SMX SOIL 26/04	5,34
SMX MANURE A	6,92
SMX MANURE B	21
SMX MANURE C	2,1
SMX SOIL+MANURE 26/04	1,98

Πίνακας 16. Αποτελέσματα ποσοτικοποίησης γενετικού υλικού απομονωμένου από τις διάφορες γλάστρες του πειράματος.

Οι συντομογραφίες αντιστοιχούν στις εξής συνθήκες/μεταχειρίσεις δειγμάτων:

CTL: control= μάρτυρας, δείγματα που δεν προστέθηκε κανένα αντιβιοτικό.

TIA: tiamulin, δείγματα που μεταχειρίστηκαν με το αντιβιοτικό tiamulin.

TLM: tilmicosin, δείγματα που μεταχειρίστηκαν με το αντιβιοτικό tilmicosin.

SMX: sulfomethoxazole δείγματα που μεταχειρίστηκαν με το αντιβιοτικό sulfomethoxazole.

SOIL: δείγματα που αντιστοιχούν σε γενετικό υλικό μικροοργανισμών μόνο εδάφους.

MANURE/SOIL+MANURE (M, M+S): δείγματα που αντιστοιχούν σε γενετικό υλικό μικροοργανισμών που προέρχονται τόσο από χώμα όσο και από κοπριά με την οποία αυτό ενισχύθηκε.

Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις ημέρες δειγματοληψίας και τα γράμματα A-C στις τριπλέτες από κάθε γλάστρας για να επιτευχθεί ένα πειραματικά αξιόπιστο αποτέλεσμα αποτέλεσμα.

Για την μέτρηση με Q-bit χρησιμοποιήθηκαν 199 μl του buffer του q-bit και 1 μl χρωστικής για τη δημιουργία του master mix. Από αυτό το master mix χρησιμοποιήθηκαν 190 μl και εισάχθηκαν σε 1 eppendorf και 10 μl από κάθε δείγμα.

Χρησιμοποιήθηκαν 199 μl του buffer του q-bit και 1 μl χρωστικής για τη δημιουργία του master mix. Από αυτό το master mix χρησιμοποιήθηκαν 190 μl και εισάχθηκαν σε 1 eppendorf και 10 μl από κάθε δείγμα.

Τα βήματα του πρωτοκόλλου του kit DNeasy®PowerSoil® Pro Kit (Qiagen , Hilden, Germany) φαίνονται παρακάτω:

1. Αρχικά σε ζυγό ακριβείας ζυγίστηκαν κοντά 250 mg (256-257 mg στην περίπτωση αυτού του πειράματος) δείγματος μέσα σε ένα φιαλίδιο eppendorf 1,5 ml. Προστέθηκαν έπειτα 800 μl διαλύματος CD1 και πραγματοποιήθηκε μια ανάδευση (vortex) λίγων δευτερολέπτων για να αναμειχθούν τα συστατικά. Φυγοκεντρήθηκαν οι Power Bead Pro Tubes , ώστε τα beads να καθιζάνουν στον πυθμένα και μεταφέραμε τα την ποσότητα του διαλύματος από τα eppendorfs στους Power Bead Pro Tubes.

2. Τοποθετήθηκαν οι Power Bead Pro Tubes στο μηχάνημα Bead Beater και ανακινήθηκαν δύο φορές για 30 sec σε μέγιστη ταχύτητα.
Απαραίτητο βήμα για τον κατακερματισμό των κυττάρων με μηχανικά μέσα (beads) και την απελευθέρωση του γενετικού υλικού.
3. Στη συνέχεια οι Power Bead Pro Tubes φυγοκεντρήθηκαν σε 15.000 g για 1 min. Διαχωρίστηκε, έτσι, η στερεή (beads, υπολείμματα χρώματος και κοπριάς) από την υγρή φάση του διαλύματος.
4. Το υπερκείμενο (500-600 μl) μεταφέρθηκε σε ένα καθαρό φιαλίδιο μικροφυγοκέντρωσης 2 ml.
5. Προστέθηκαν ,στη συνέχεια, 200 μl διαλύματος CD2 και πραγματοποιήθηκε vortex 5 δευτερολέπτων. Το διάλυμα CD2 έχει ρόλο στην αναστολή των πρωτεασών που θα κατέστρεφαν το DNA.
6. Φυγοκεντρήθηκαν τα φιαλίδια στα 15.000 g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Με αυτή τη φυγοκέντρωση τα “ κυτταρικά συντρίμια” καθιζαίνουν στον πάτο του φιαλιδίου και το DNA παραμένει διαλυτοποιημένο στο υπερκείμενο. Αποφεύγοντας την μεταφορά κυττάρων μεταφέρθηκαν έως 700 μl υπερκείμενου σε καθαρό φιαλίδιο μικροφυγοκέντρωσης 2 ml.
7. Προστέθηκαν , συνακόλουθα, 600 μl διαλύματος CD3 και στα φιαλίδια έγινε vortex 5 δευτερολέπτων. Στάδιο απαραίτητο για τη διαλυτοποίηση των διαφόρων κυτταρικών πρωτεϊνών με τη χρήση SDS που περιέχει το CD3.
8. Στη συνέχεια φορτώνονται 650 μl του διαλύματος σε στήλη (MB Spin Column) και πραγματοποιείται φυγοκέντρωση της στήλης στα 15.000 g για 1 λεπτό. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιείται προσκόλληση του DNA στη στήλη και διήθηση όλων των άλλων κυτταρικών στοιχείων μέσα από τη στήλη. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται έως ότου διηθηθεί όλη η ποσότητα μέσα στην στήλη.
9. Απορρίπτεται το διάλυμα που περνάει από τη στήλη.
10. Προσεκτικά η στήλη τοποθετείται σε νέο φιαλίδιο συλλογή (collection tube) 2 ml.
11. Προσθέτονται 500 μl διαλύματος EA στη στήλη και φυγοκεντρείται στα 15.000 g για 1 λεπτό.
12. Απορρίπτεται το διάλυμα που πέρασε μέσα από τη στήλη και η στήλη τοποθετείται στο ίδιο φιαλίδιο συλλογής 2 ml.
13. Προσθέτονται στη στήλη 500 μl διαλύματος C5 και η στήλη φυγοκεντρείται στα 15.000 g για 1 λεπτό.

14. Απορρίπτεται το φιαλίδιο συλλογής με το διάλυμα που πέρασε από τη στήλη και αυτή τοποθετείται σε ένα νέο φιαλίδιο συλλογής (collection tube) 2 ml.
15. Η στήλη φυγοκεντρείται για 2 λεπτά στα 16.000 g και αφού “ στεγνώσει ” από ποσότητα του διαλύματος C5 που μπορεί να έχει κατακρατήσει, τοποθετείται σε ένα δοχείο έκλουσης (Elution Tube) 1,5 ml.
16. Προσθέτουμε 75 μl από το διάλυμα C6 (ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος) στο κέντρο του φίλτρου της μεμβράνης. Φυγοκεντρείται η στήλη για 1 λεπτό στα 15.000 g. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για την έκλουση του DNA από τη στήλη μέσω της χαμηλής ιοντικής ισχύος του διαλύματος C6, καθώς το DNA απελευθερώνεται από τη στήλη.

Παράρτημα VIII

Αποτελέσματα BLAST ενθεμάτων

Στο παράρτημα αυτό φαίνονται τα αποτελέσματα του BLASTN των ενθεμάτων κάθε αποικίας των εκκινητών.

Ομάδα αντιβιοτικών: tetracyclines

Απουκία: tet 1-6

Αλληλουχία ενθέματος :

ACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATCAGGA
AGCGTGGACAGAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTTAGAA
CGTCAGAGAGGAATTACAATTCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAG
TGGGAAAATACGAAGGTGAACATTCATAGACACGCCA (tet 1)

ACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGA
AGCGTGGACAGAGGTACAACGAAAACGGATAATACGCTTTTAGAA
CGTCAGAGAGGAATTACAATTCAGACGGCGATAACCTCTTTTCAGT
GGGAAAATACGAAGGTGAACATTCATAGACACGCCA (tet 1)

ACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGA
AGCGTGGACAAAGGTACAACGAGGACGGATAATACGCTTTTAGAA
CGTCAGAGAGGAATTACAATTCAGACAGGAATAACCTCTTTTCAG
TGGGAAAATACGAAGGTGAACATTCATAGACACGCCA (tet 3, tet 4 και
tet 5)

ACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGA
AGCGTGGACAGAGGTACAACGAAAACGGATAATACGCTTTTAGAA
CGTCAGAGAGGAATTACAATTCAGACGGCGATAACCTCTTTTCAGT
GGAAAATACTAAGGTGAACATTCATAGACACGCCA (tet 6)

Θέση ένθεσης στο πλασμίδιο: 3089-3259

Γονίδιο ανθεκτικότητας: *Uncultured bacterium partial tet(M) gene for tetracycline resistance protein, clone 144* (tet 1 και tet 2)

Streptococcus suis strain LSS85 tetracycline resistance protein (tetM) gene, complete cds (tet 3, tet 4 και tet 5)

Enterococcus faecalis BM4127 tet(M) gene for tetracycline resistance ribosomal protection protein Tet(M), complete CDS (tet 6)

Κάλυψη (%) / Coverage (%): 97 % (tet 1) , 100 % (tet 2-6)

Ειδικότητα (%) / Identity (%): 99.39 % (tet 1) , 99,42 % (tet 2), 100 % (tet 3-6)

Ομάδα αντιβιοτικών: *b-lactams*

Αποκία: tem 1 και 2

Αλληλουχία ενθέματος :

AGTAAGTTGGCCGCAGTGTATCACTCGAGGTTATGGCAGCACTGC
ATAATTCTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCAATCACTAGTG
AATTCGCGG (tem 1 και tem 2)

Θέση ένθεσης στο πλασμίδιο: 3097-3197

Γονίδιο ανθεκτικότητας: *Uncultured soil bacterium clone M31 beta-lactamase (bla) gene, partial cds* (tem 1 και tem 2)

Κάλυψη (%) / Coverage (%): 81 % (tem 1 και tem 2)

Ειδικότητα (%) / Identity (%): 97,56 % (tem 1 και tem 2)

Ομάδα αντιβιοτικών: *trimethoprim*s

Απουκία: dfrA 1 , dfrA 3 και dfrA 5

Αλληλουχία ενθέματος:

AGTCTTGCGTCCAACCAACAGCCATTGGTTATAGGTAATAGCTTTA
AACAGGAGCTGKTCACCTTTGGCACTCCATGGAATATCAGGGCCA
TTCC (dfrA 1)

AGTCTTGCGTCCAACCAACAGCCATTGGTTATAGGTAATAGCTTTA
AACRGGAGCTGTTACCTTTGGCACTCCATGGAATATCAGGGCCAT
TCC (dfrA 3)

AGTCTTGCGTCCAACCAACAGCCATTGGTTATAGGTAATAGCTTTA
AACAGGAGCTGTTACCTTTGGCACTCCATGGAATATCAGGGCCAT
TCC (dfrA 5)

Θέση ένθεσης στο πλασμίδιο: 3077-3171

Γονίδιο ανθεκτικότητας: *Campylobacter coli strain EGY28 class I
integron dihydrofolate reductase (dfrA1) and hypothetical protein genes,
complete cds* (dfrA 1)

*Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain 5483 class I
integron dihydrofolate reductase (dfrA1) gene, complete cds* (dfrA 3 και dfrA
5)

Κάλυψη (%)/Coverage (%): 100 % (dfrA 1 , dfrA 3 και dfrA 5)

Ειδικότητα(%)/ Identity(%): 98,95 % (dfrA 1 και dfrA 3)

100 % (dfrA 5)

Ομάδα αντιβιοτικών: *b-lactams (cephalosporins)*

Απουκία: cfxa 2 , cfxa 4 και cfxa 5

Αλληλουχία ενθέματος:

TCATTCCTCGTTCAAGTTTTTCAGATAGCTTATACGGAAGAGGAAAT
GTCGGCTGACCATAACAAGGCTTACTCTAACTATACATCTCCTCTT
GGTGCTGCA (cfxa 2)

TCATTCCTCGTTCAAGTTTTTCAGATAGCTTATACGGAAGAGGAAAT
GTCGGCTGACCATAACAAGGCTTGCTCTAACTATACATCTCCTCTT
GGTGCTGCA (cfxa 4)

AGTCTTGCGTCCAACCAACAGCCATTGGTTATAGGTAATAGCTTTA
AACAGGAGCTGTTACCTTTGGCACTCCATGGAATATCAGGGCCAT
TCC (cfxa 5)

Θέση ένθεσης στο πλασμίδιο: 3083-3183

Γονίδιο ανθεκτικότητας: *Uncultured bacterium clone*

*cfxA3_1_NHP_NGR_2017 class A extended-spectrum beta-lactamase
(CfxA3) gene, partial cds* (cfxa 2, cfxa 4 και cfxa 5)

Κάλυψη (%) / Coverage (%): 100 % (cfxa 2, cfxa 4) , 90 % (cfxa 5)

Ειδικότητα (%) / Identity (%): 100 % (cfxa 2) , 99,01 % (cfxa 4) , 96,7 %
(cfxa 5).

Ομάδα αντιβιοτικών: *sulfonamides*

Απουκία: sul 1, sul 3, sul 4, sul 5

Αλληλουχία ενθέματος:

GACTGCAGGCTGGTGGTTATGCACTCAGCGCAGCGGGATGGCATC
GCCACCCGCACCGGTCACCTTCGACCCGAAGACGCGCTCGACGAG
ATTGTGCGGTTCTTC (sul 1, sul 3)

GAAGAACCGCACAAATCTCGTTCGAGCGCGTCTTCGGGTCGAAGGTG
ACCGGTGCGGGTGGCGATGCCATCCCGCTGCGCTGAGTGCATAAC
CACCAGCCTGCAGTC (sul 4)

GACTGCAGGCTGGTGGTTATGCACTCAGCGCAGCGGGATGGCATC
GCCACCCGCACCGGTCACCTTCGACCCGAAGACGCGCTCGACGAG
ATTGTGCGGTTCTTC (sul 5)

Θέση ένθεσης στο πλασμίδιο: 3083-3187

Γονίδιο ανθεκτικότητας: *Acinetobacter baumannii strain Acb82*

sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase (sul1) gene, partial cds (sul 1,
sul 3, sul 4 και sul 5)

Κάλυψη (%)/Coverage (%): 100 % (sul 1, sul 3, sul 4 και sul 5)

Ειδικότητα(%)/ Identity(%): 100 % (sul 1, sul 3, sul 4 και sul 5)

Ομάδα αντιβιοτικών: *Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B (MLS_B)*,
erythromycin

Αποικία: erm

Αλληλουχία ενθέματος:

TCAAAGCCTGTCGGAATTGGTTTTTAGTGAAAAGAACACGATATTC
ACGGTTTACCCACTTATAAACAAAAGATCGATACTTTTTGTAGTCC
TTCTTTGAAATCAATGGTTGATGTCGTTCAAGAACAATCAATACAG
AGTCTACACTTGGCTTAGGATGAAAATATAGTGGTGGTACTTTTTT
GAGCATTTTYATATCCATCTCCACCATTAATAGTAAACCCAAAGCT
CGTTGCAGA

Θέση ένθεσης στο πλασμίδιο: 3078-3316

Γονίδιο ανθεκτικότητας: *Haemophilus influenzae Erm(A)L-1, Erm(A)L-2,*
and ErmA (erm(A)) genes, complete cds

Κάλυψη (%)/Coverage (%): 100 %

Ειδικότητα(%)/ Identity(%): 99,58 %

Τα δείγματα του εκκινητή *qnrD* δεν αλληλουγήθηκαν.

Παράρτημα ΙΧ

Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων qPCR

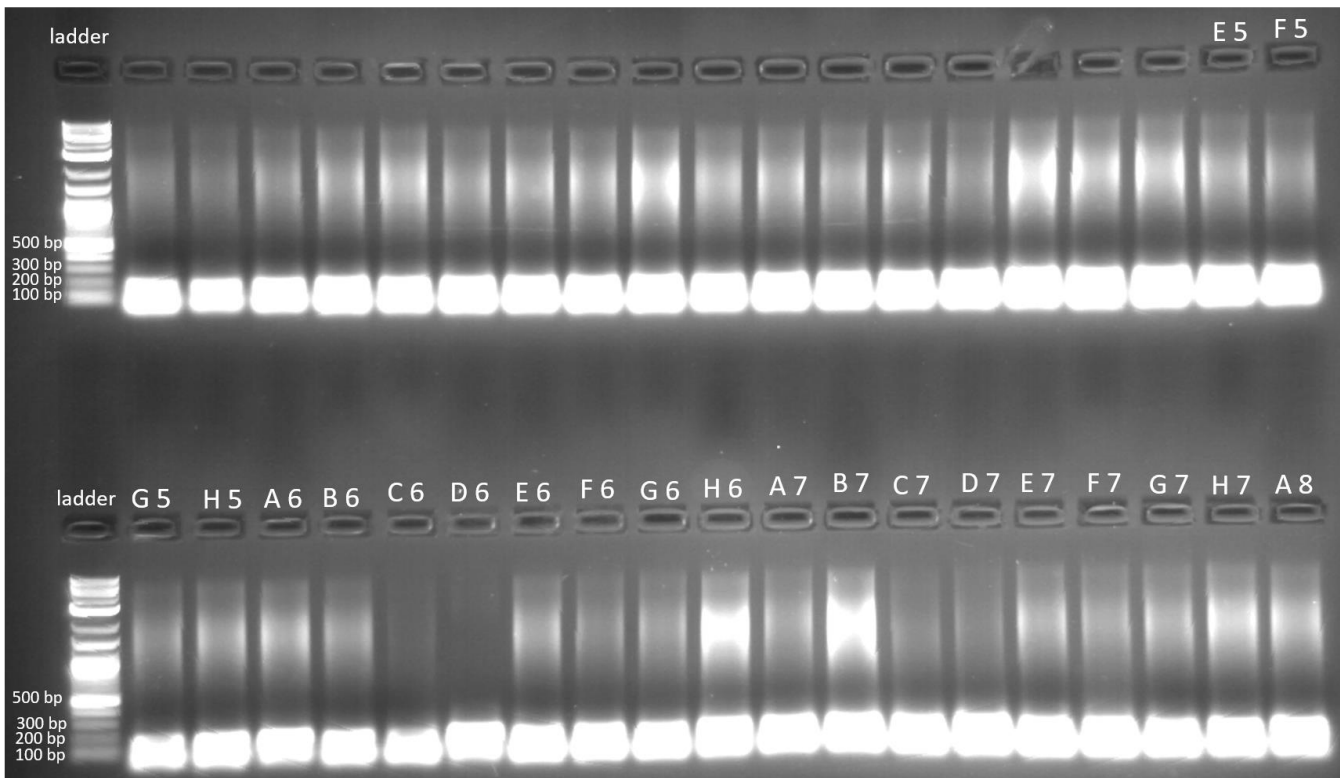
Σε αυτό το παράρτημα φαίνονται τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων των δειγμάτων που απομονώθηκαν από τις γλάστρες. Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα φαίνεται σε ποιο δείγμα αντιστοιχεί η κάθε θέση και σύμφωνα με αυτό αντιστοιχήθηκαν τα δείγματα στις εικόνες της ηλεκτροφόρησης.

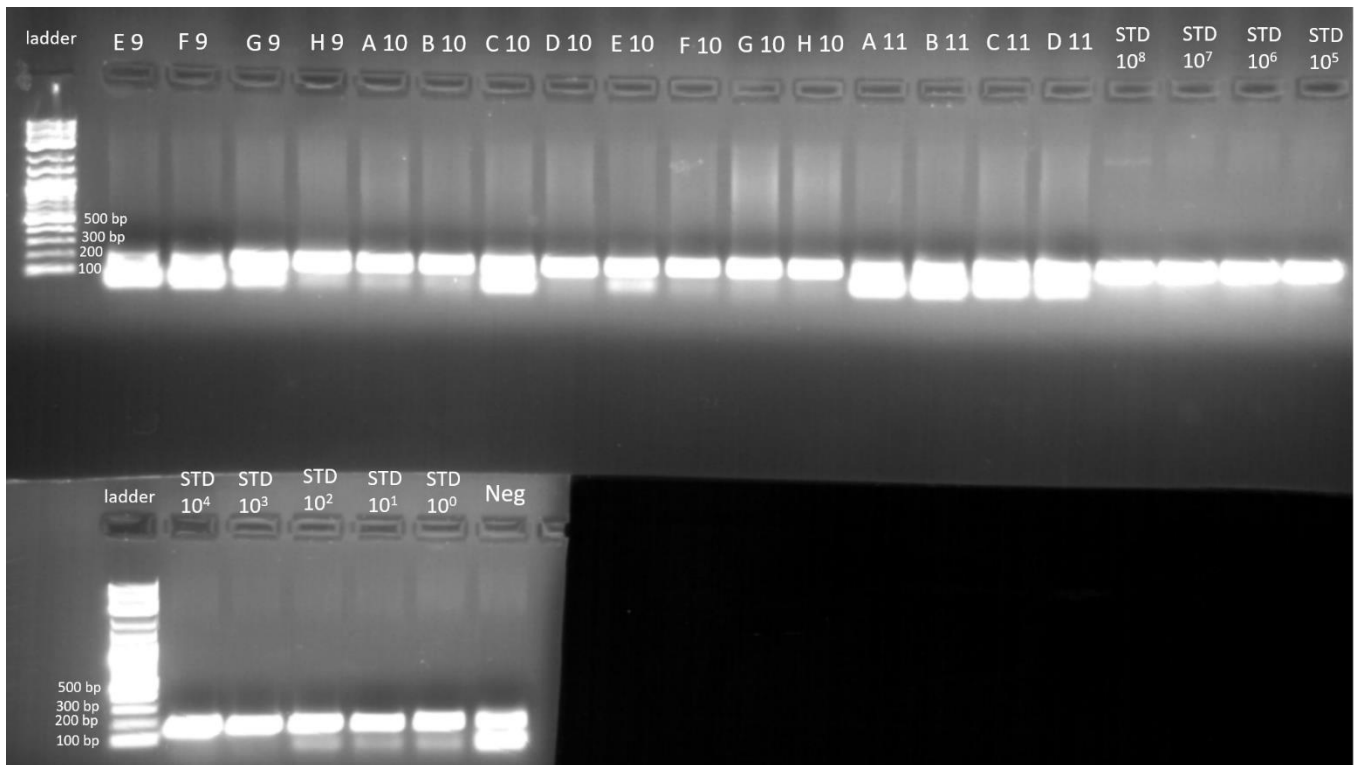
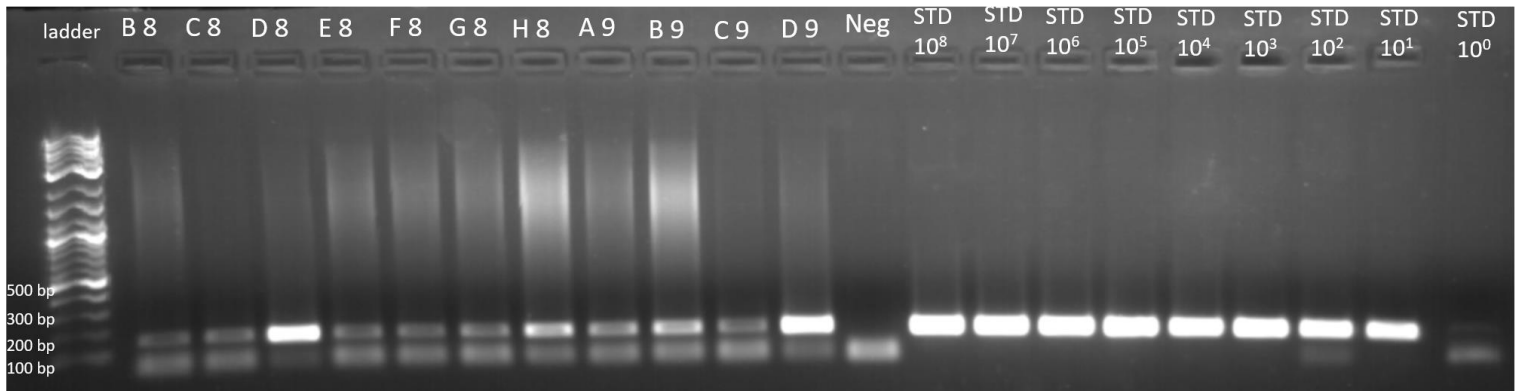
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						CTL M+S B	SMX MAN B	TIA S+M B	TLM MAN B	SMX SOIL B 26/04	TLM SOIL B 26/04	Std 10 ⁴
B						CTL M+S C	SMX MAN C	TIA S+M C	TLM MAN C	SMX SOIL C 26/04	TLM SOIL C 26/04	Std 10 ³
C						CTL SOIL A 26/04	SMX SOIL 26/04	TIA SOIL 26/04 A	TLM SOIL A 26/04	SMX S+M B 26/04	TLM S+M B 26/04	Std 10 ²
D						CTL M+S 26/04	SMX SOIL 26/04	TIA S+M 26/04 A	TLM S+M A 26/04	SMX S+M C 26/04	TLM S+M C 26/04	Std 10 ¹
E					CTL SOIL A	SMX SOIL A	TIA SOIL A	TLM SOIL A	CTL SOIL B 26/04	TIA SOIL B 26/04	Std 10 ⁸	Std 10 ⁰
F					CTL SOIL B	SMX SOIL B	TIA SOIL B	TLM SOIL B	CTL SOIL C 26/04	TIA SOIL C 26/04	Std 10 ⁷	neg
G					CTL SOIL C	SMX SOIL C	TIA SOIL C	TLM SOIL C	CTL S+M B 26/04	TLM S+M B 26/04	Std 10 ⁶	neg
H					CTL M+S A	SMX MAN A	TIA S+M A	TLM MAN A	CTL S+M C 26/04	TLM S+M C 26/04	Std 10 ⁵	neg

Εικόνα 33. Σχεδιάγραμμα ενός qPCR plate όπου φαίνονται οι θέσεις που αντιστοιχούν τα διάφορα δείγματα σε αυτό και το όνομα του δείγματος.

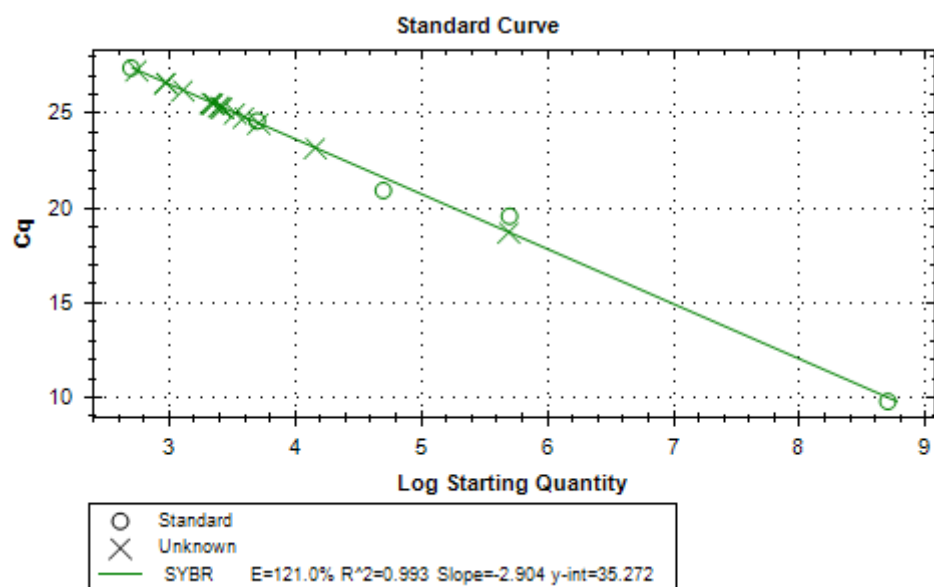
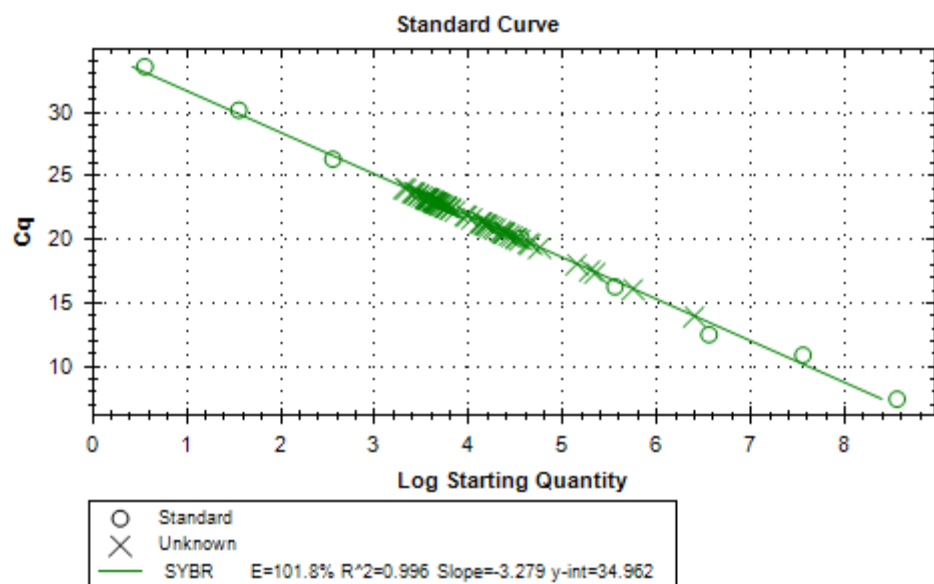
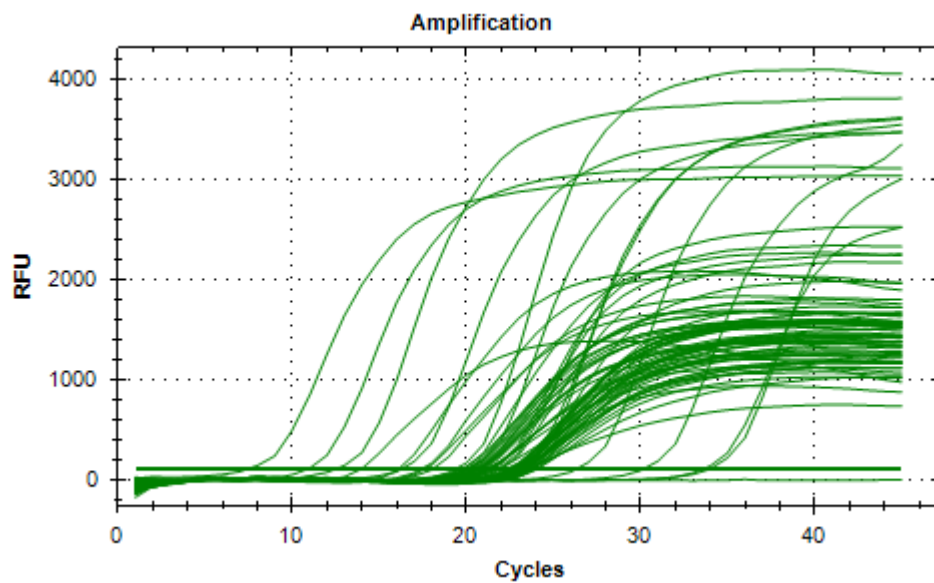
Ακολουθούν οι εικόνες των ηλεκτροφορήσεων για τα δείγματα για κάθε εκκινητή και οι πρότυπες καμπύλες και τα amplification plots.

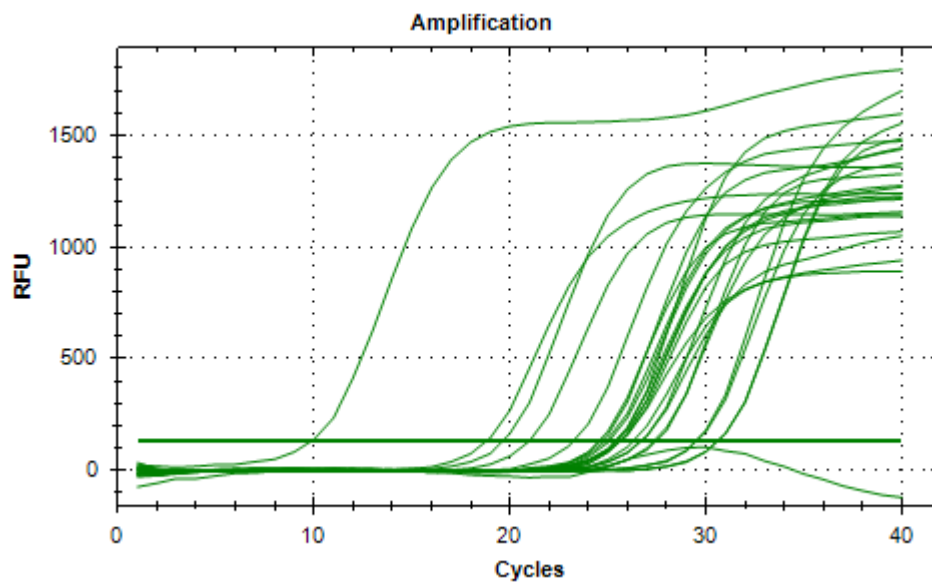
Εκκινητές: tetracyclines





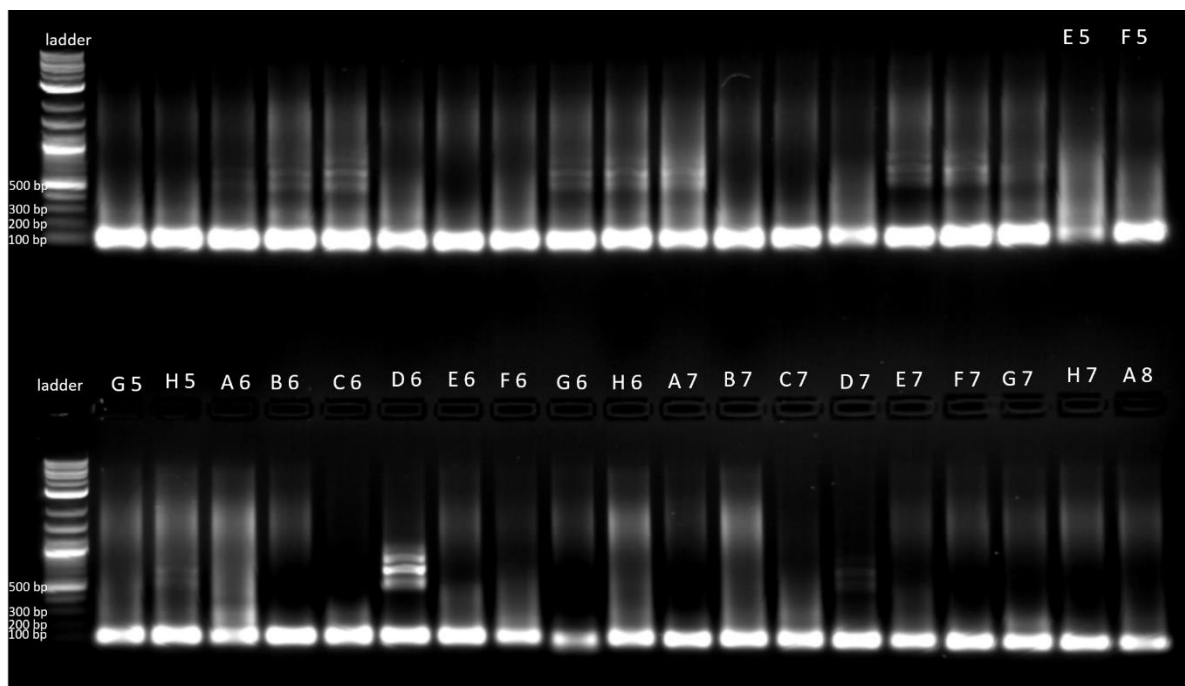
Εικόνα 34.,35,36. Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων των προϊόντων qPCR των δειγμάτων από τις γλάστρες με τον εκκινητή που αναγνωρίζει *tetracyclines*.

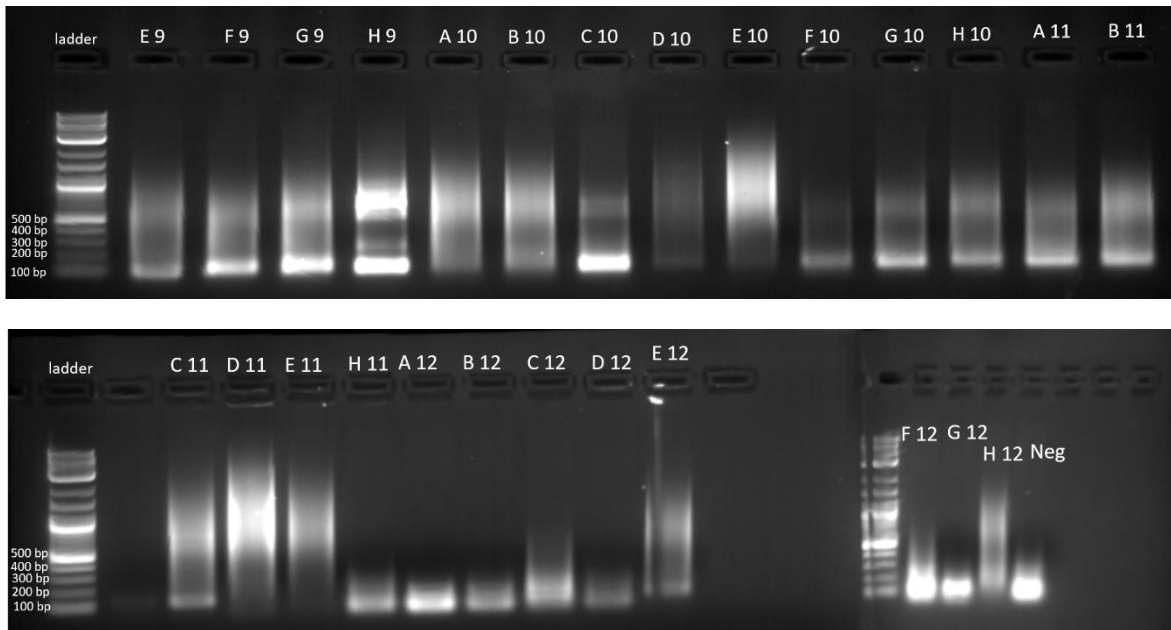




Εικόνες 37.,38.,39.,40. Amplification plots και πρότυπες καμπύλες της qPCR των *tetracyclines*.

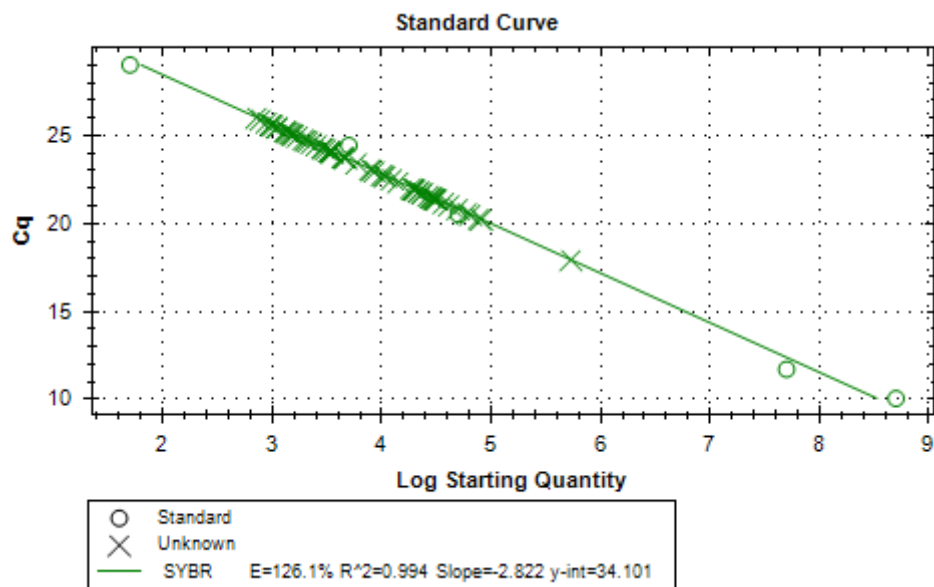
Εκκινητές: *sulfonamides*

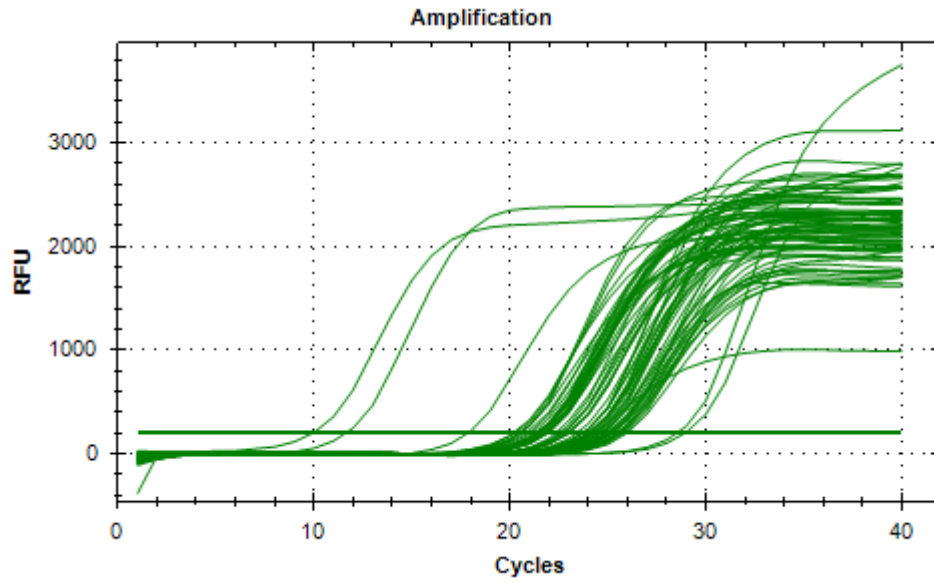




Εικόνα 41.,42.,43. Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων των προϊόντων qPCR των δειγμάτων από τις γλάστρες με τους εκκινητές που αναγνωρίζουν *sulfonamides*.

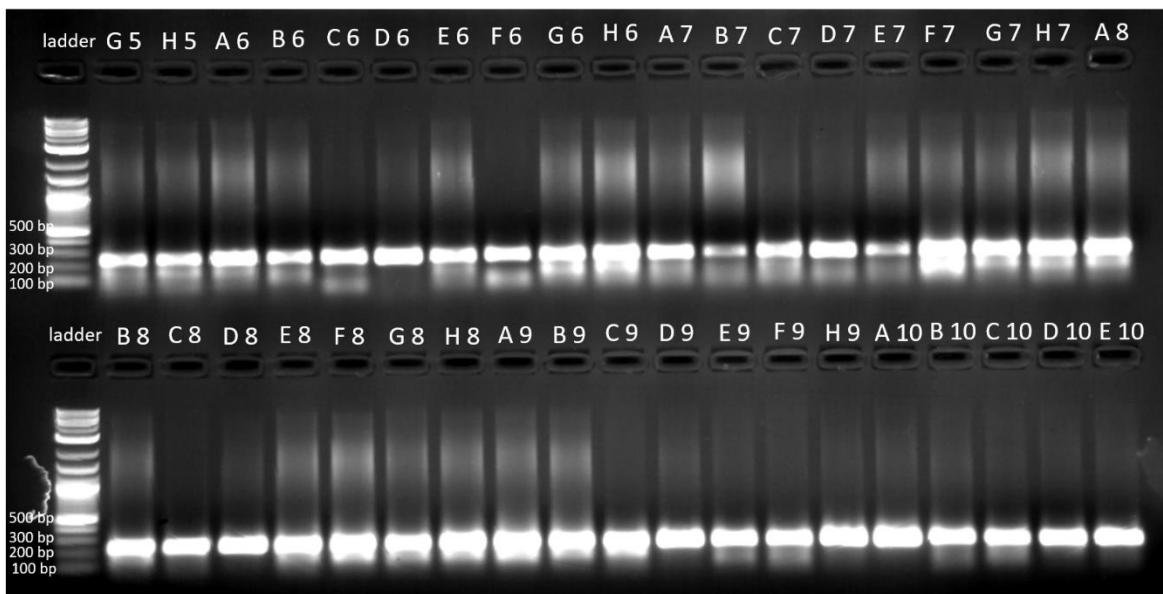
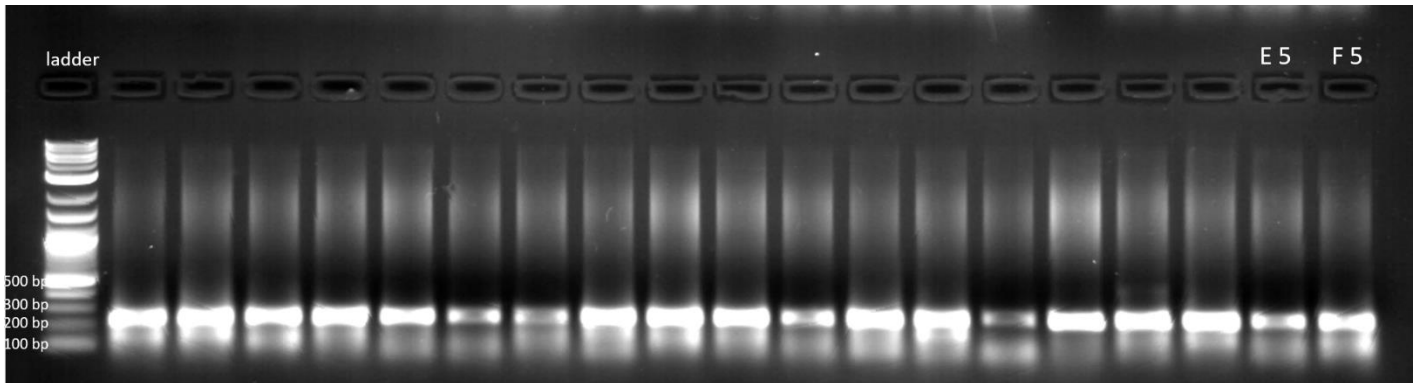
Λόγω λανθασμένων χειρισμών του gel τα δείγματα B8-D9 δεν απεικονίζονται.

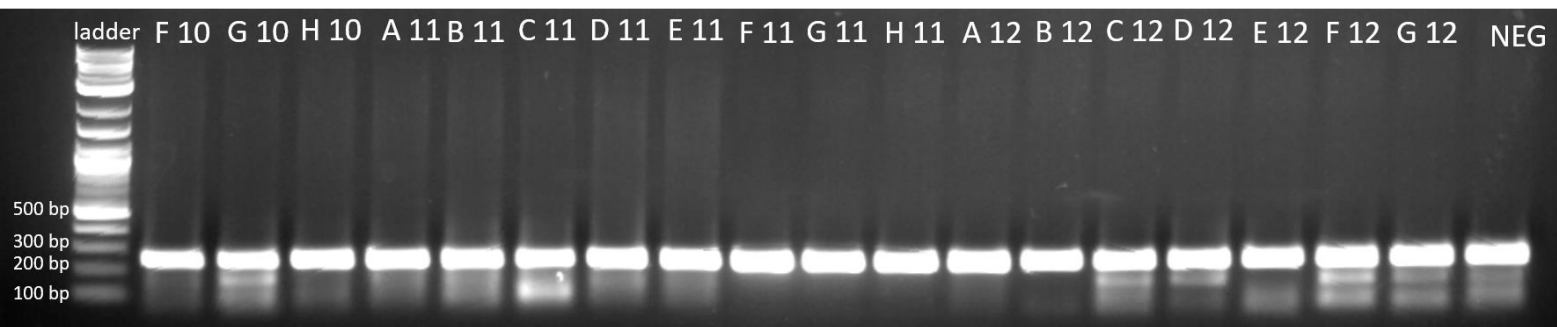




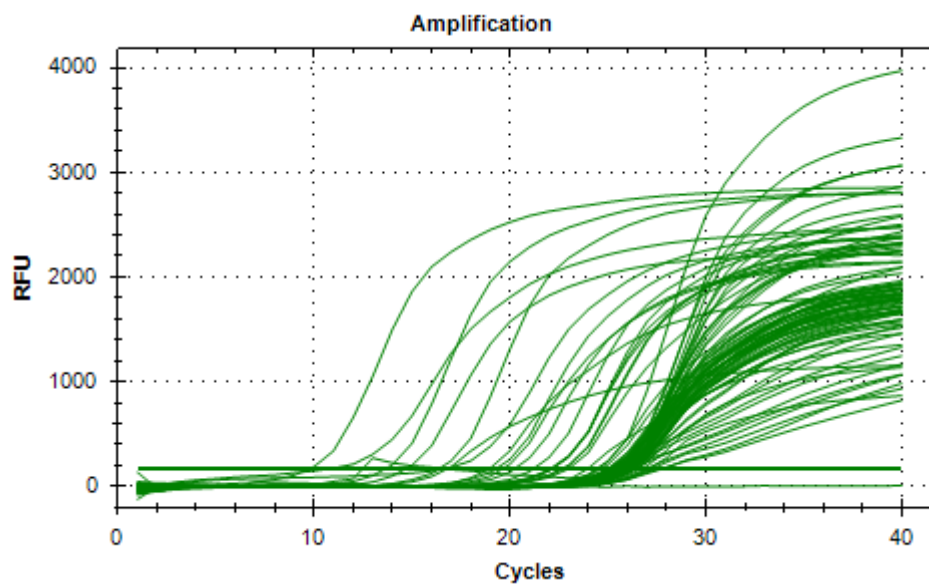
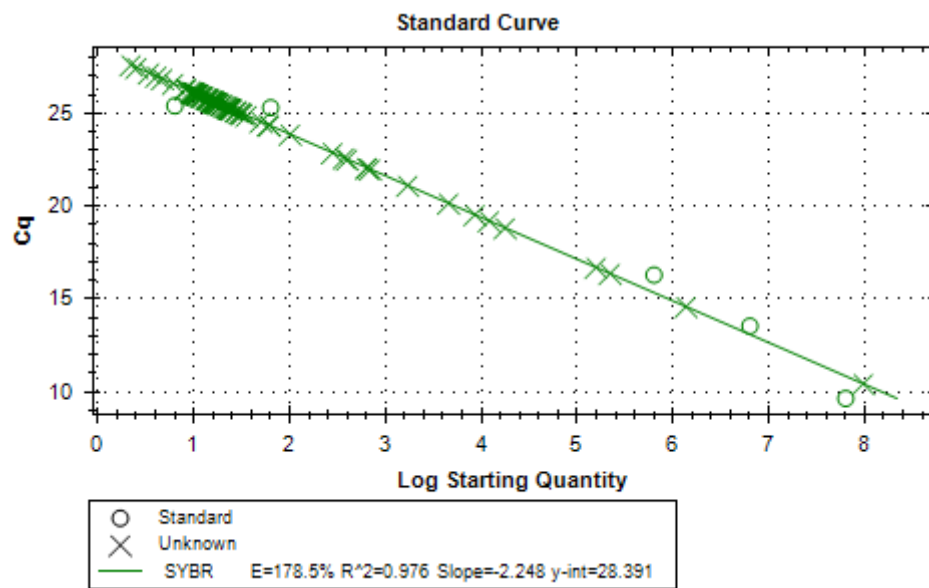
Εικόνας 44.45. Amplification plot και πρότυπη καμπύλη της qPCR των *sulfonamides*.

Εκκινητές: *erythromycin*



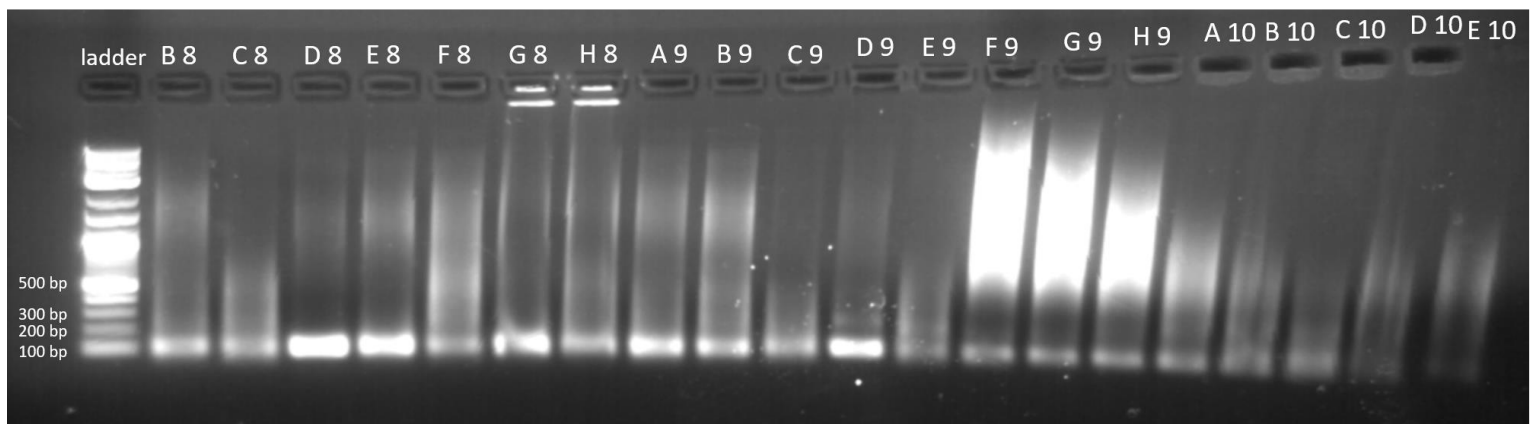
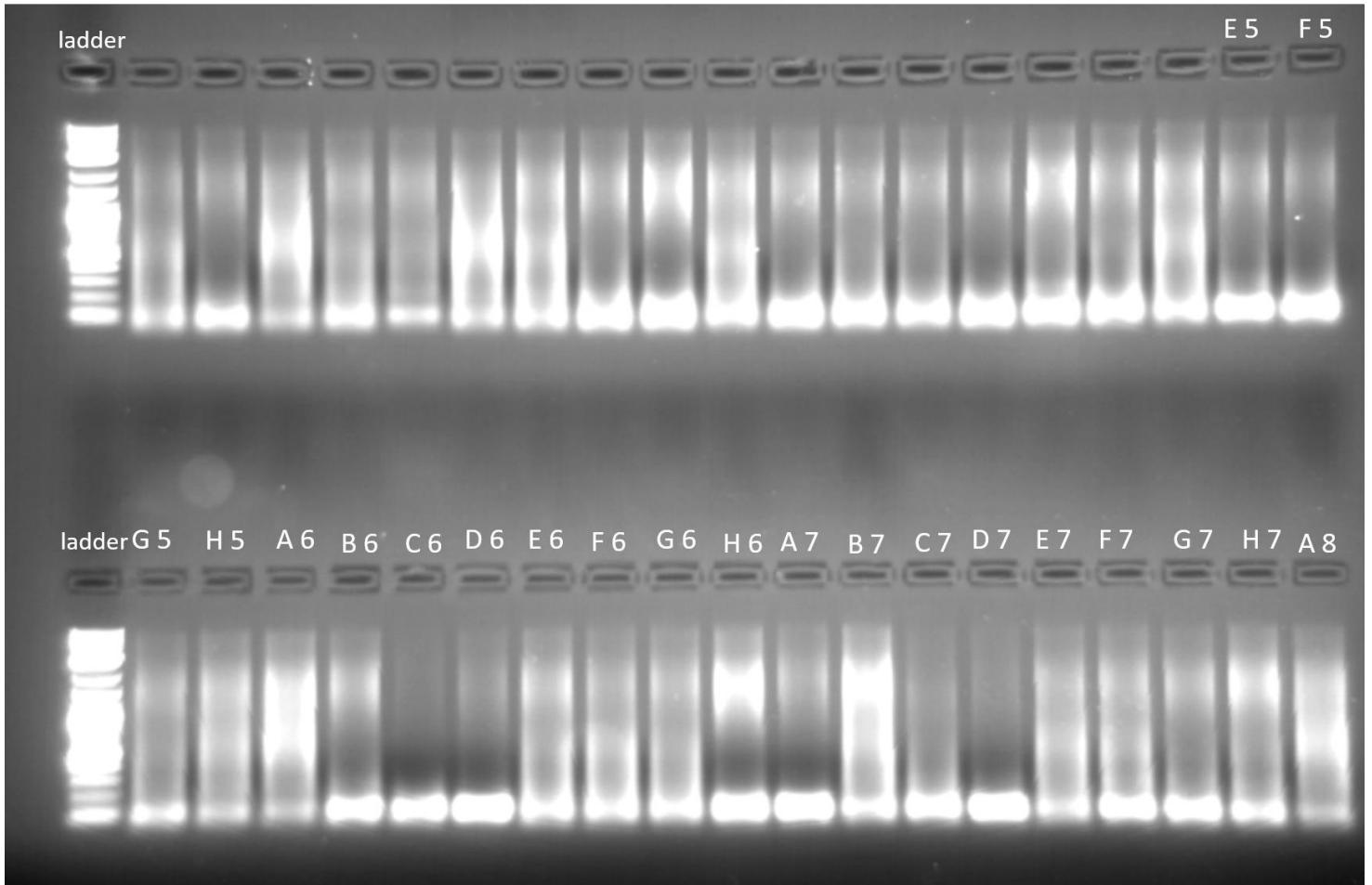


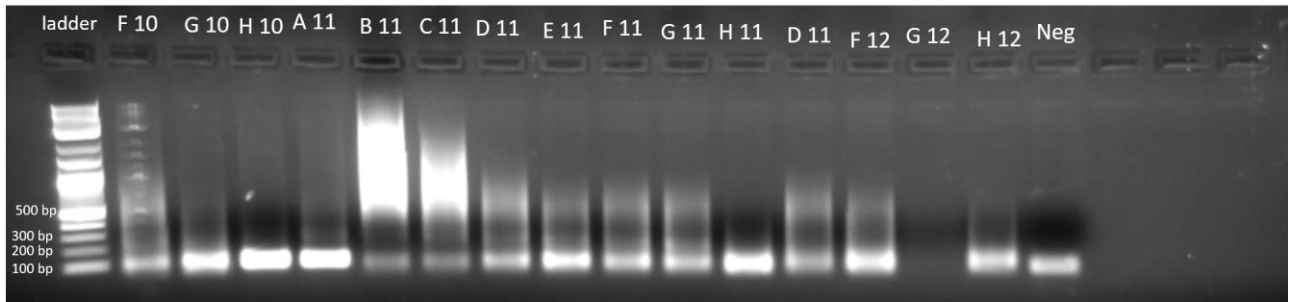
Εικόνα 46..47. Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων των προϊόντων qPCR των δειγμάτων από τις γλάστρες με τους εκκινητές που αναγνωρίζουν *erythromycin*.



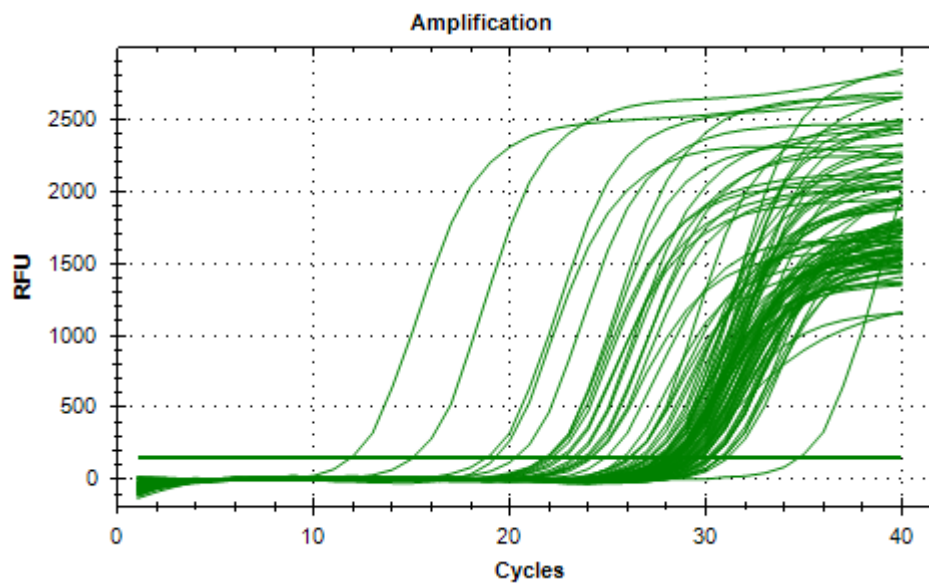
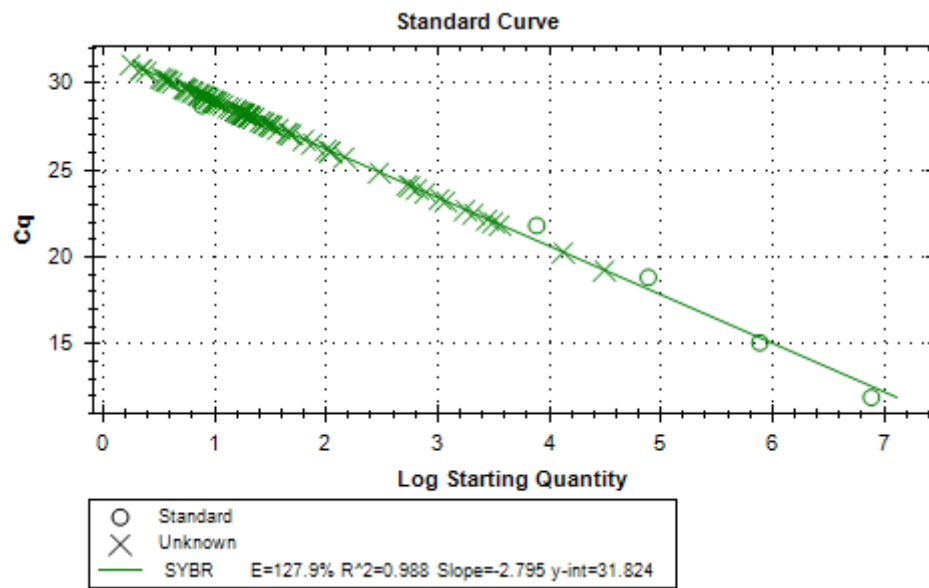
Εικόνες 48..49. Amplification plot και πρότυπη καμπύλη της qPCR *erythromycin*.

Εκκινητές: cefotaxime



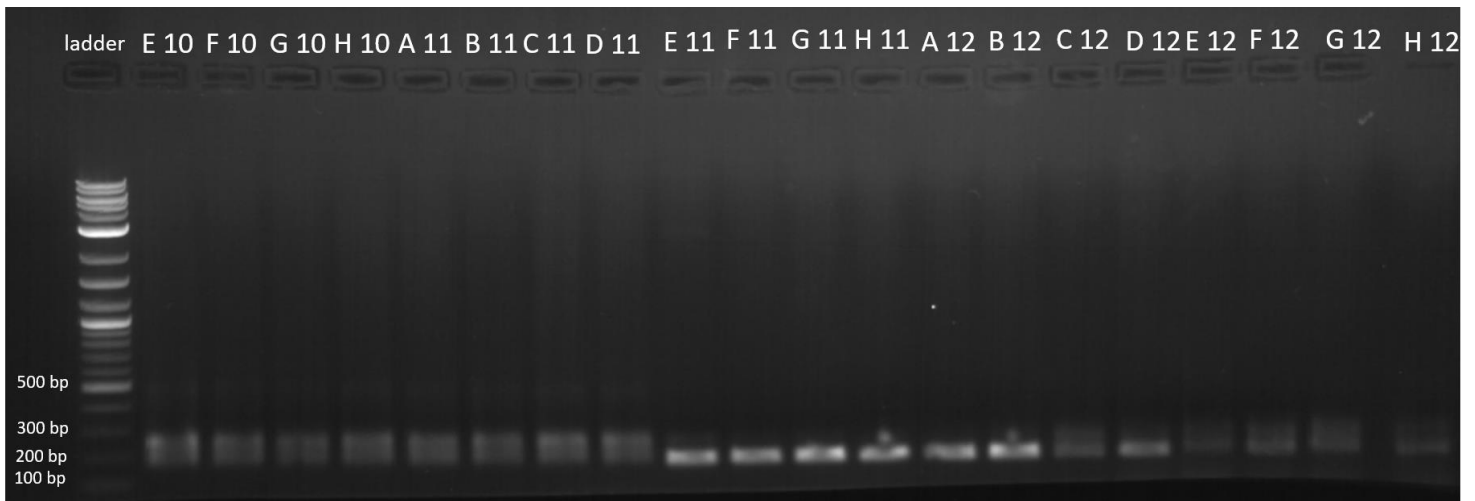
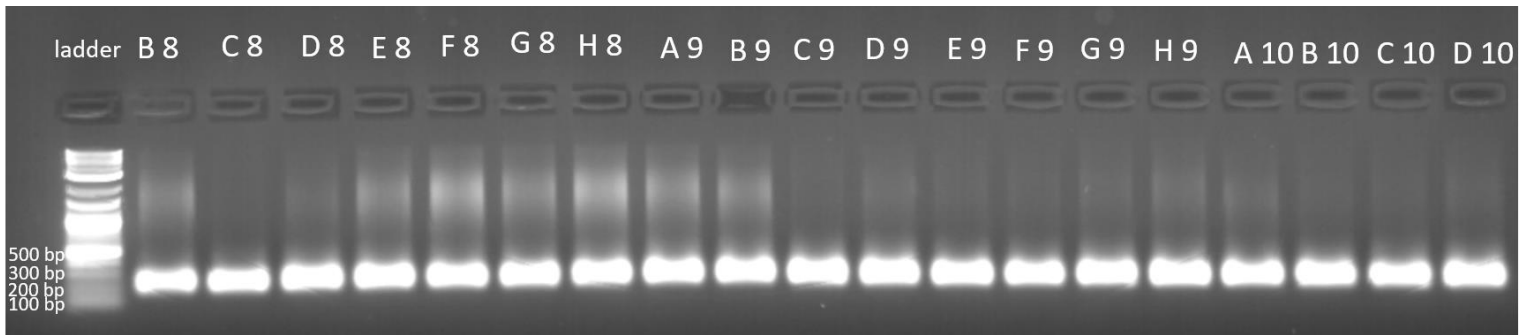
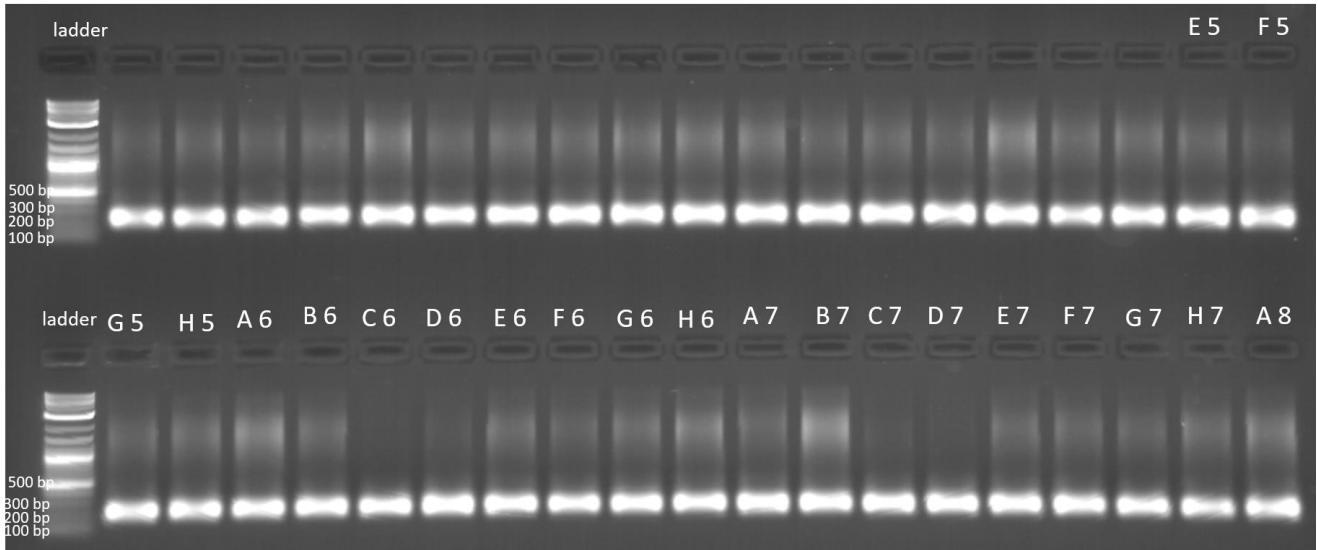


Εικόνα 50..51..52. Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων των προϊόντων qPCR των δειγμάτων από τις γλάστρες με τον εκκινητή που αναγνωρίζει *cefotaxime*.

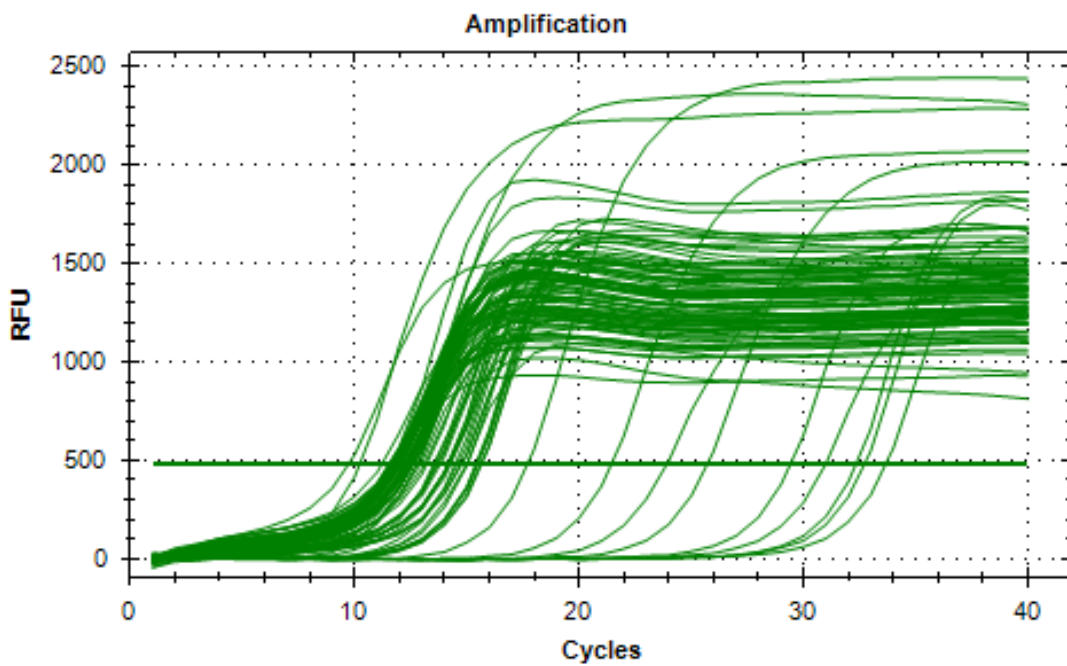
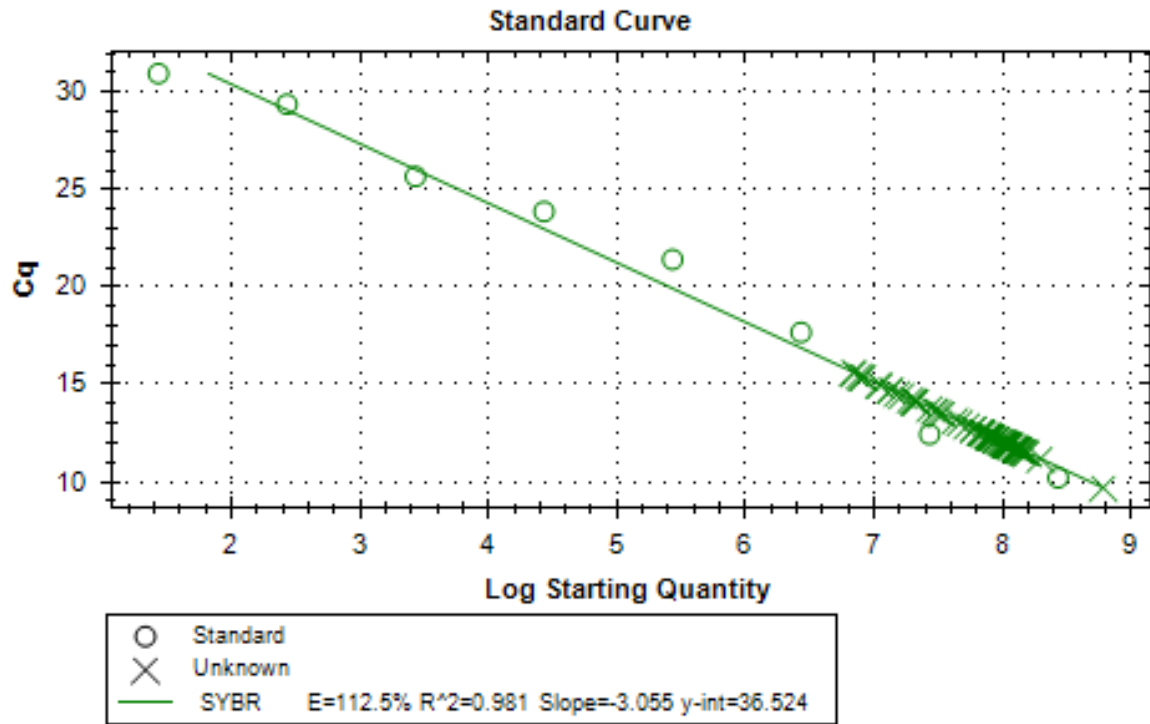


Εικόνες 53..54. Amplification plot και πρότυπη καμπύλη της qPCR *cefotaxime*.

Εκκινητές: 16S rRNA

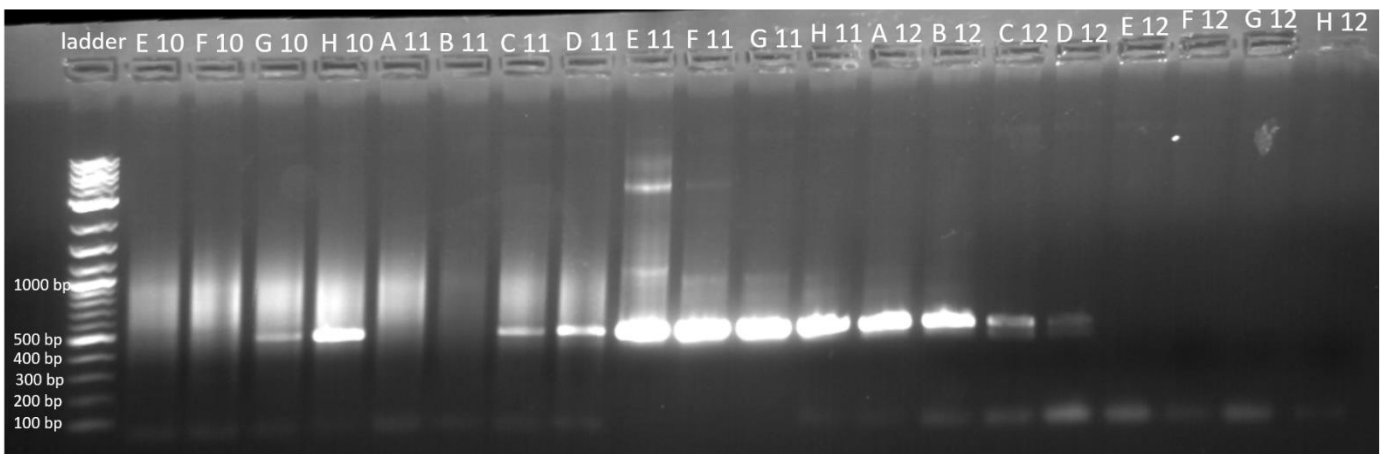
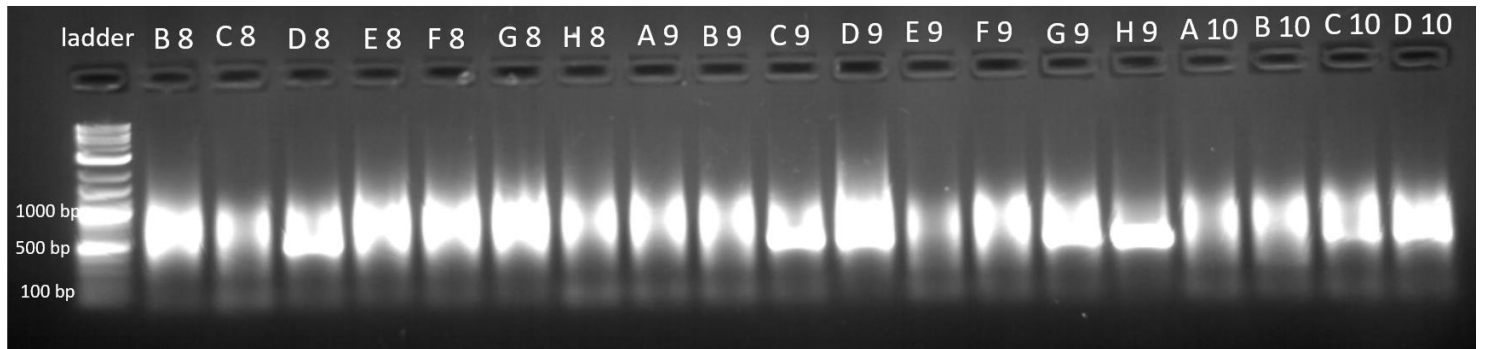
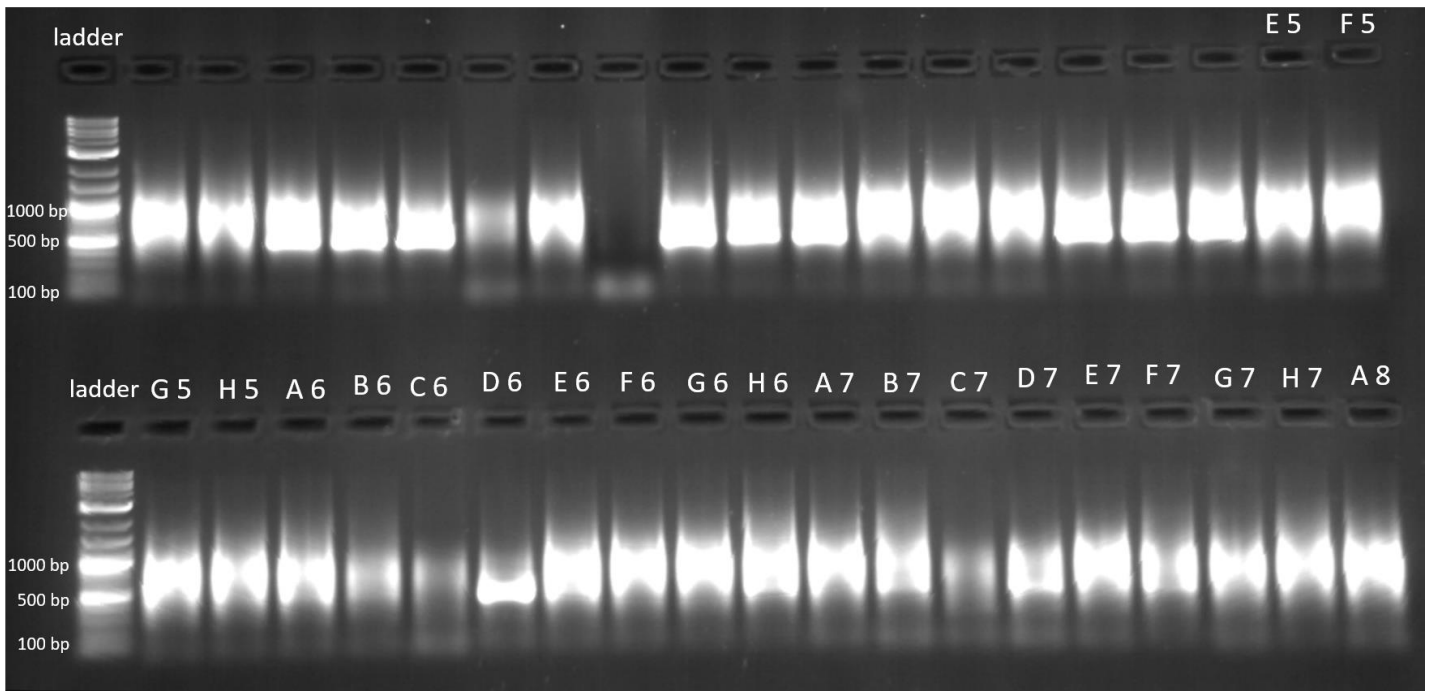


Εικόνα 55.,56.,57. Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων των προϊόντων qPCR των δειγμάτων από τις γλάστρες με τον εκκινητή που αναγνωρίζει 16S rRNA βακτηρίων.

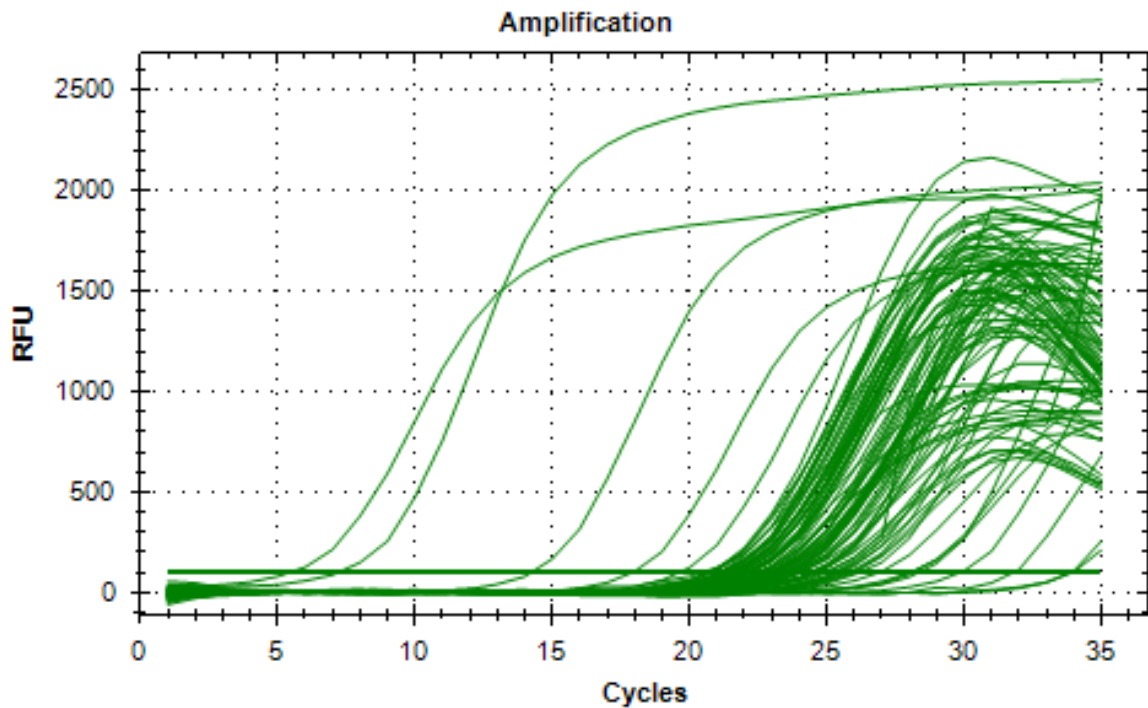
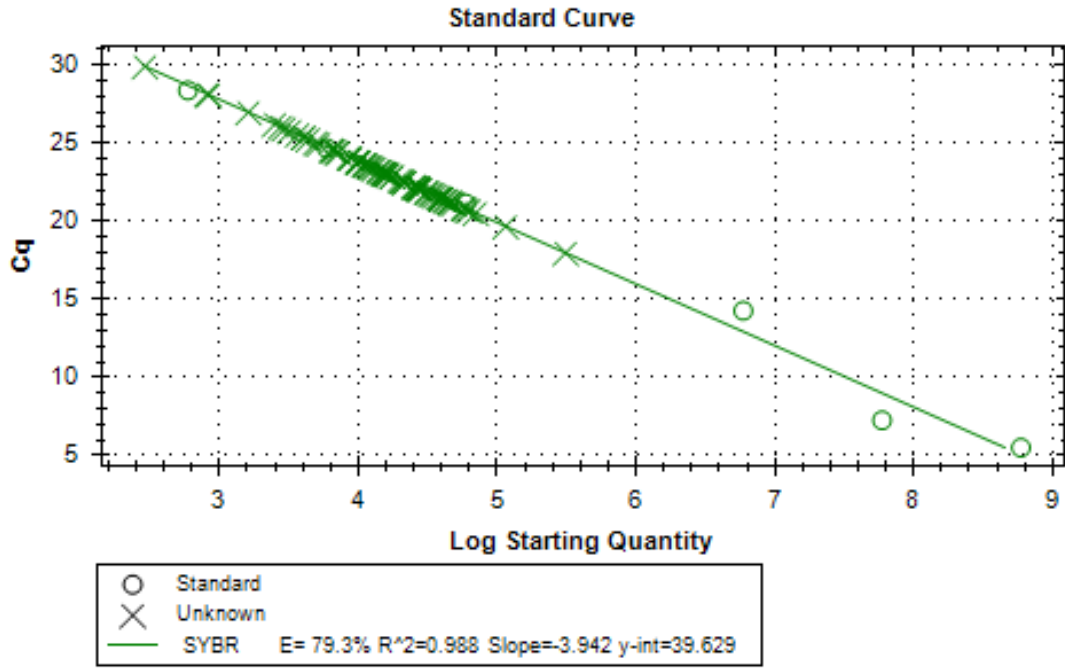


Εικόνες 58.,59. Amplification plot και πρότυπη καμπύλη της qPCR του γονιδίου *16S rRNA*.

Εκκινητές: *Int11*



Εικόνα 60.,61.,62. Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων των προϊόντων qPCR των δειγμάτων από τις γλάστρες με τον εκκινητή που αναγνωρίζει το ιντεγκρόνιο *Int11*.



Εικόνες 63.,64. Amplification plot και πρότυπη καμπύλη της qPCR του γονιδίου *In11*.

Παράρτημα X

Θρεπτικά υλικά

Σε αυτό το παράρτημα απεικονίζονται οι πίνακες της σύστασης των θρεπτικών μέσων και τα λοιπά αντιδραστήρια:

LB 500 ml	
Bacto-tryptone	5 gr
Bacto yeast extract	2,5 gr
Nacl	2,5 gr

LB 500 ml	
Bacto-tryptone	5 gr
Bacto yeast extract	2,5 gr
Nacl	2,5 gr

LB "SOC" 250 ml	
Bacto-tryptone	3 gr
Bacto yeast extract	1 gr
Nacl	1 gr
D-Glucose	1.8 gr

Πίνακες 18.,19.20. Σύσταση θρεπτικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα..

Τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 500 ml υγρής καλλιέργειας Luria-Bertani (LB-broth) και 200 ml υγρής καλλιέργειας Luria-Bertani (LB-broth) με προσθήκη D-γλυκόζης. Χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό των βακτηρίων. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης 500 ml

LB-agar για την κατασκευή στερεών θρεπτικών υλικών σε τρυβλία Petri. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά οι εξής ποσότητες από τα συστατικά των θρεπτικών:

- 12 gr bacterial tryptone
- 6 gr bacto-yeast extract
- 6 gr NaCl
- 1,8 gr D-glucose
- 1.2 L ddH₂O.

Συνθήκες καλλιέργειας

Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (37 °C) και σε συνθήκες παρουσίας οξυγόνου στην περίπτωση της υγρή καλλιέργειας σε ανακινούμενος επωαστήρας. Στην περίπτωση των στερεών θρεπτικών καλλιεργειών τα πιατάκια έκλεισαν αεροστεγώς με παραφίλμ για αποφυγή οποιασδήποτε επιμόλυνσης.

Εξοπλισμός

1. Συσκευή μικροφυγοκέντρωσης (microcentrifuge apparatus)
2. Ζυγός ακριβείας
3. Θερμικός κυκλοποιητής με κεφαλή για εκτέλεση PCR και gradient PCR (thermal cycler)
4. Συσκευές ηλεκτροφόρησης (gel box)
5. Εκμαγεία για πηκτές και “ χτενάκια” (gel molds and combs)
6. Συσκευή φυγοκέντρωσης (Eppendorf Centrifuge 5804 R)
7. Συσκευή καθόδου νηματικής ροής (laminar flow booth)
8. Υδατόλουτρο (waterbath)
9. Ανακινούμενος επωαστήρας (shaking incubator)
10. Επωαστήρας (incubator)
11. Συσκευή qPCR (qPCR device)

Αντιδραστήρια

Ποσότητες των αντιδραστηρίων που φαίνονται παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν για τις ενζυμικές αντιδράσεις και τις αντιδράσεις λύσης του πειράματος.

- 166 μl Tag DNA polymerase buffer (KAPABIOSYSTEMS, Wilmington, MA, USA)
- 6,65 μl KAPA Tag polymerase (KAPABIOSYSTEMS, Wilmington MA, USA)
- 33,2 μl dNTPs (10 nM)
- 83 μl πρόσθιου εκκινητή (10 μM) κάθε ζεύγους εκκινητών
- 83 μl ανάστροφου εκκινητή (10 μM) κάθε ζεύγους εκκινητών
- 63 μl πρόσθιου εκκινητής (20 μM) κάθε ζεύγους εκκινητών
- 63 μl ανάστροφου εκκινητής (20 μM) κάθε ζεύγους εκκινητών
- 147 μl BSA (BSA, Molecular Biology Grade #B900S, New England BioLabs[®], Hertfordshire, Uk)
- 3150 μl SYBR Green
- 1400 μl διαλύματος NTI NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany)
- 4900 μl διαλύματος NT3 NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany)
- 140 μl διαλύματος NE NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany)
- 25,6 ml διαλύματος CD1 DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit, (Qiagen, Hilden, Germany)
- 6,4 ml διαλύματος CD2 DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit, (Qiagen, Hilden, Germany)
- 19,2 ml διαλύματος CD3 DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit, (Qiagen, Hilden, Germany)
- 16 ml διαλύματος EA DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit, (Qiagen, Hilden, Germany)
- 16 ml διαλύματος C5 DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit, (Qiagen, Hilden, Germany)
- 2,4 ml διαλύματος EA DNeasy[®] PowerSoil[®] Pro Kit, (Qiagen, Hilden, Germany)
- 3500 μl ddH₂O ultrapure MilliQ water (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA).