



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση του sulfamethoxazole στην ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής σε αντιβιοτικά μετά από επαναλαμβανόμενες εφαρμογές σε μικρόκοσμους εδάφους

Effect of sulfamethoxazole on the development of antimicrobial resistance to antibiotics after repeated applications in soil microcosms.

Παναγιωτίδου Ευθυμία του Παναγιώτη

Επιβλέπων Καθηγητής: Βασιλειάδης Σωτήριος

ΛΑΡΙΣΑ
ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- 1. Καρπούζας Δημήτριος**
Καθηγητής Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- 2. Βασιλειάδης Σωτήριος**
Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας- Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- 3. Καράς Παναγιώτης**
Μεταδιδακτορικός ερευνητής, Συμβασιούχος Διδάσκοντας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση αυτή της πτυχιακής εργασίας δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την βοήθεια του επιβλέποντα μου, κυρίου Βασιλειάδη Σωτήρη, που ήταν συνεχώς παρών όποτε ήταν απαραίτητο. Σε κάθε συζήτηση μαζί του, πέρα από τις συμβουλές που μου έδωσε για την εργασία μου, μοίραζε απλόχερα τις γνώσεις που έχει.

Δεν γίνεται να μην αναφερθώ στα μέλη της τριμελούς επιτροπής που χωρίς αυτούς δεν θα ήταν εφικτό να ολοκληρωθεί η πτυχιακή μου εργασία, τον κύριο Καρπούζα Δημήτριο και τον κύριο Καρά Παναγιώτη ως αξιότιμους, καθηγητή και συμβασιούχο διδάσκοντα αντίστοιχα, του τμήματος.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Κατσιβελου Ελένη, την υποψήφια διδάκτορα που με την ανεξάντλητη υπομονή της, μου δίδαξε όλες τις απαραίτητες τεχνικές και ήταν δίπλα μου σε κάθε βήμα σε όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που με στήριξε τόσο ψυχολογικά όσο και οικονομικά.

Περίληψη

Η αλληπάλληλη και ευρεία χρήση των αντιβιοτικών στη κτηνοτροφία για την πρόληψη και την αντιμετώπιση ασθενειών των ζώων. Ωστόσο συνήθως ο οργανισμός των ζώων δεν είναι ικανός να απορροφήσει όλη την ποσότητα του αντιβιοτικού που λαμβάνει με αποτέλεσμα πολλές φορές να εναποτίθενται μεταβολίτες ή ακόμη και ολόκληρη η χημική ένωση του αντιβιοτικού μέσω της κοπριάς στο έδαφος. Το έδαφος όμως φέρει μία πολύ μεγάλη γκάμα βακτηρίων που και αυτά με τη σειρά τους διαθέτουν γονίδια ανθεκτικότητας σε διάφορα αντιβιοτικά. Η συνεχής, λοιπόν, χορήγηση αντιβιοτικού στα ζώα και έπειτα η χρήση αυτής της κοπριάς στις καλλιέργειες ως λίπασμα είναι ικανή να οδηγήσει στην ανάπτυξη βακτηρίων ανθεκτικά στο αντιβιοτικό που πολύ εύκολα μπορούν να μεταφερθούν μέσω της τροφικής αλυσίδας σε ζώα και ανθρώπους. Τα βακτήρια αυτά θα είναι πολύ πιο δύσκολο να αντιμετωπιστούν με την χορήγηση αντιβίωσης με αποτέλεσμα να δημιουργούνται πολλά ακόμη προβλήματα με αποκορύφωση την έναρξη υγειονομικής κρίσης. Στη συγκεκριμένη εργασία γίνεται εφαρμογή του αντιβιοτικού sulfamethoxazole που αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων καθώς λειτουργεί ως εμπόδιο σε βασικό βιοσυνθετικό μονοπάτι. Ακόμη, γίνεται χρήση δύο ειδών εδάφους, από τα χωριά Ροδιά και Λιβιάδι, που έχουν και διαφορετικές χημικές ιδιότητες και σύσταση. Τέλος, σκοπός της εργασίας ήταν να διερευνηθεί η αύξηση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων, μέσω της αύξησης των αντιγράφων συγκεκριμένων γονιδίων, στα δύο είδη εδάφους έπειτα από επαναλαμβανόμενες εγχύσεις του αντιβιοτικού. Ένας επιπλέον παράγοντας που μελετήθηκε ήταν ο τρόπος που έγινε η έγχυση του αντιβιοτικού, δηλαδή αν ήταν μέσω κοπριάς χοίρου ή απευθείας στο κάθε έδαφος.

Abstract

The successive and widespread use of antibiotics in animal husbandry for the prevention and treatment of animal diseases. However, usually the organism of animals is not able to absorb the entire amount of antibiotic it receives, resulting in many times metabolites or even the entire chemical compound of the antibiotic being deposited through manure in the soil. Though, the soil carries a very wide range of bacteria that in turn have genes of resistance to various antibiotics. Thus, the continuous administration of antibiotics to animals and then the use of this manure in crops as fertilizer is capable of leading to the development of antibiotic-resistant bacteria that can very easily be transferred through the food chain to animals and humans. These bacteria will be much more difficult to treat with the administration of antibiotics, resulting in many more problems, culminating in the onset of a health crisis. In this assignment, the antibiotic sulfamethoxazole is used, which inhibits the growth of bacteria as it acts as a barrier to a basic biosynthetic pathway. In addition, two types of soil are used, from the villages of Rodia and Livadi, which have different chemical properties and composition. In conclusion, the aim of the project was to investigate the increase of bacterial resistance, through the increase of copies of specific genes, in the two soil species after repeated injections of the antibiotic. An additional factor studied was the way the antibiotic was injected, whether it was through pig manure or directly into each soil.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
1.ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	7
1.1 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	7
1.1.1 Ιστορική Αναδρομή.....	7
1.1.2. Κατηγορίες Αντιβιοτικών.....	8
1.1.3. Αντοχή βακτηρίων στα αντιβιοτικά.....	10
1.1.4. Σουλφαμεθοξαζόλη (<i>Sulfamethoxazole</i> , <i>SMX</i>).....	15
1.1.5. Οδοί διασποράς και ανάπτυξης αντοχής στα κτηνιατρικά αντιβιοτικά	16
1.2. ΓΟΝΙΔΙΟ <i>SUL1</i> , <i>QNRD</i> ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑ-ΔΕΙΚΤΕΣ	17
1.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ	19
1.3.1. Αρχή της μεθόδου Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης- <i>Polymerase chain reaction</i>	19
1.3.2. Κλωνοποίηση γονιδίου σε πλασμιδιακούς φορείς	21
1.3.3. Ποσοτική PCR (<i>qPCR</i>).....	25
1.3.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	28
2. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	30
3.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	30
4.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
4.1. ΕΓΧΥΣΕΙΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ ΣΤΟ ΕΔΑΦΟΣ Η ΣΕ ΚΟΠΡΑΝΑ ΧΟΙΡΟΥ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	32
4.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΔΑΦΟΥΣ	32
4.3. ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ DNA	33
4.4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR ΚΑΙ PCR CLEAN-UP	33
4.5. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ.....	34
4.6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA	35
4.7. ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR (<i>qPCR</i>).....	36
4.8. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	36
4.9. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	36
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
5.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ DNA ΚΑΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ.....	37
5.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR, ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥΣ ΦΟΡΕΙΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ.....	38
5.3. ΠΟΣΟΤΙΚΗ PCR (<i>qPCR</i>).....	38
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ	43
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44
8.1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	44
8.2. ΠΗΓΕΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	46
9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	48
9.1 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΕΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	48

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

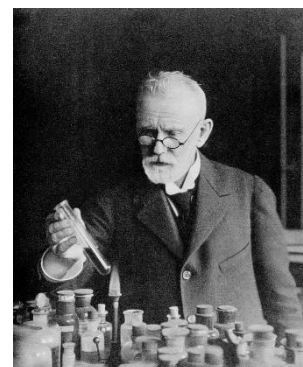
1. Αντιβιοτικά

1.1 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ενώσεις, ικανές να σκοτώνουν τα βακτήρια ή να σταματούν τον πολλαπλασιασμό τους. Η ανακάλυψη τους συνέβαλλε όχι μόνο στην αντιμετώπιση μολύνσεων από βακτήρια αλλά και στην αύξηση του προσδόκιμου της ζωής. Η εισαγωγή τους στην κλινική χρήση οδήγησε στην ανάπτυξη ιατρικών μεθόδων που χωρίς αυτά δεν θα ήταν αδύνατον να διενεργηθούν, όπως για παράδειγμα εγχειρήσεις, μεταμοσχεύσεις οργάνων ακόμη και η αντιμετώπιση κάποιων μορφών καρκίνου. ⁽¹⁾

1.1.1 Ιστορική Αναδρομή

Η ύπαρξη των αντιβιοτικών ήταν κατά κάποιο τρόπο γνωστή από τουλάχιστον 2000 π.Χ. στην αρχαία Ελλάδα, Αίγυπτο, Κίνα και Σερβία. Χρησιμοποιούσαν με μορφή καταπλάσμάτων από μουχλιασμένο ψωμί ή «φαρμακευτικό έδαφος» σε ανοιχτές πληγές για να εμποδίζουν την μόλυνση τους. Αξιοσημείωτο είναι πως, από τότε υπήρχαν διαθέσιμα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούμε ακόμη και σήμερα χωρίς όμως να είναι γνωστά. Η εισαγωγή τους στην σύγχρονη ιατρική άρχισε με την ανακάλυψη του πρώτου συνθετικού αντιβιοτικού. Ο Paul Ehrlich κατά την ενασχόληση του με βαφές- χρώσεις για ιστολογική ανάλυση, παρατήρησε ότι κάποιες από αυτές είναι τοξικές για τα βακτήρια. Το 1909, κατάφερε να παρασκευάσει, μαζί με την ομάδα του, το πρώτο συνθετικό αντιβιοτικό με βάση το αρσενικό, που ήταν ικανό να καταπολεμά το βακτήριο *Treponema pallidum*, το οποίο προκαλεί τη σύφιλη. ⁽¹⁾



Εικόνα 1: Paul Ehrlich (1854- 1915)

Η ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Alexander Fleming, το 1928, αποτέλεσε το μεγαλύτερο βήμα ώστε να καθιερωθεί η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών στην θεραπεία ασθενειών. Κατά την μελέτη των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων της λυσοζύμης, παρατήρησε σε μία παλιά καλλιέργεια του *Staphylococcus aureus*, πως τα βακτήρια σταμάτησαν να αναπτύσσονται κατά την ανάπτυξη μούχλας, έπειτα από επιμόλυνση. Τα τριβλία αυτά είχαν εκτεθεί στον μύκητα *Penicillium notatum*. Ο Fleming κατάφερε να προσδιορίσει τις αντιμικροβιακές ιδιότητες της μούχλας, ανέπτυξε μεθόδους προσδιορισμού της ποσότητας της πενικιλίνης που περιέχονταν στην εκάστοτε καλλιέργεια μύκητα ωστόσο δεν κατάφερε να αποδείξει την θεραπευτική της αξία λόγω της δυσκολίας στην απομόνωση της. Το 1940, η έκδοση ενός άρθρου από μία ομάδα του Πανεπιστημίου της Οξφόρδης, και συγκεκριμένα οι Έρνεστ Τσέιν και Χάουαρντ Φλόρεϋ, συνέβαλλε στην εκχύλιση, στον καθαρισμό και τελικά στην μαζική παραγωγή επαρκών ποσοτήτων για κλινική χρήση. ^(3, 4)



Εικόνα 2: Alexander Fleming (1881-1955)

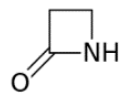
Τα επόμενα 20 χρόνια, αποτελούν την «Χρυσή εποχή» της ανακάλυψης των αντιβιοτικών. Η καλύτερη πηγή νέων αντιβιοτικών ήταν από μικροοργανισμούς που βρίσκονταν στη φύση. Μετά την ανακάλυψη της στρεπτομυκίνης το 1944 από τον *Streptomyces griseus*, που συναντάται στο έδαφος, ξεκίνησε ένα νέο κύμα συνεχούς αναζήτησης αντιβιοτικών από μικροοργανισμούς εδάφους. Έτσι, το 1952, ανακαλύπτεται και η βανκομυκίνη από τον *Streptomyces orientalis* και το 1958 γίνεται διαθέσιμη για την χρήση της σε ασθενείς. ⁽²⁾

Στα μετέπειτα χρόνια, ο ρυθμός ανακάλυψης νέων τάξεων αντιβιοτικών όλο και μειώνεται. Όμως η ανάγκη για την χρήση τους στην ιατρική με την ταυτόχρονη ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής από τα βακτηρίων που καθιστά τα αντιβιοτικά ανεπαρκή στην καταπολέμηση μολύνσεων, οδηγεί τους ερευνητές στην χημική τροποποίηση των ήδη υπάρχοντων αντιβιοτικών, με στόχο να είναι δραστικά. ⁽³⁾

1.1.2. Κατηγορίες Αντιβιοτικών ⁽⁵⁾

Τα αντιβιοτικά μπορούν να κατανεμηθούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με την μοριακή τους δομή, τον τρόπο δράσης τους και το φάσμα της ενεργότητάς τους. Οι πιο κοινές κατηγορίες των αντιβιοτικών, βάση της μοριακής τους δομής, είναι οι παρακάτω:

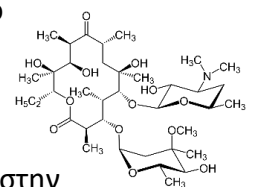
Β- Λακτάμες: Περιλαμβάνουν έναν δακτύλιο, ο οποίος αποτελείται από 3 άτομα άνθρακα (C) και 1 άτομο αζώτου (N) και εμφανίζει μεγάλη δραστικότητα. Οι β-λακτάμες εμποδίζουν την σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και πιο συγκεκριμένα αλληλεπιδρούν με βακτηριακά ένζυμα, πρωτεΐνες που δεσμεύουν πενικιλίνες (Penicillin-Binding Proteins, PBP). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι τρασπεπτιδάσες που συμμετέχουν στην σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος. Τα μέλη της οικογένειας των β-λακταμασών μπορούν να δεσμεύονται στις PBPs και να επεμβαίνουν, στην σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, οδηγώντας στη λύση του κυττάρου και κατά συνέπεια στον θάνατο του βακτηρίου.



Εικόνα 3: Δακτύλιος β-λακταμασών

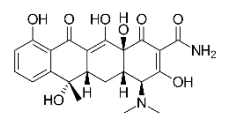
Σε αυτή τη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται οι Πενικιλίνες, οι Κεφαλοσπορίνες, οι Καρβαπενέμες και οι Μονοβακτάμες.

Μακρολίδες: Χαρακτηρίζονται από 14-, 15-, 16- μελές μακροκυκλικό δακτύλιο λακτόζης, στον οποίο είναι συνδεδεμένα δεόξυ-σάκχαρα. Εμφανίζουν μεγαλύτερο φάσμα αντιβιοτικής δραστικότητας από ότι οι πενικιλίνες. Εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων, αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση. Οι μακρολίδες είναι ικανές να προσδεθούν στην μεγάλη βακτηριακή ριβοσωμική υπομονάδα και να αποτρέψουν την προσθήκη αμινοξέος στην αναπτυσσόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα.



Εικόνα 4: Δομή μακροκυκλικού δακτυλίου μακρολιδών

Τετρακυκλίνες: Τα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν τέσσερις δακτυλίους γραμμικά τοποθετημένους και ανάλογα με τις λειτουργικές ιδιότητες της κάθε τετρακυκλίνης, προσδέονται διαφορετικές ομάδες σε αυτόν τον κεντρικό δακτύλιο. Οι τετρακυκλίνες ταξινομούνται περαιτέρω σε

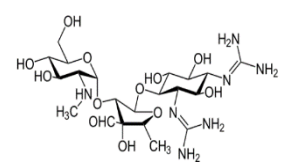


Εικόνα 5: Δομή δακτυλίου τετρακυκλινών

διαφορετικές γενιές ανάλογα με τη μέθοδο σύνθεσης τους. Στην πρώτη γενιά περιλαμβάνονται αυτές οι τετρακυκλίνες που βιοσυντίθενται, στη δεύτερη γενιά αυτές που είναι ημισυνθετικές και στην τρίτη αυτές που είναι πλήρως συνθετικές στο εργαστήριο. Στόχος τους είναι η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα. Όπως και οι μακρολίδες, έτσι και οι τετρακυκλίνες, προσδένονται στο ριβόσωμα και εμποδίζουν την προσθήκη επιπλέον αμινοξέων στην πεπτιδική αλυσίδα. Αναστέλλεται η πρωτεϊνοσύνθεση και το βακτήριο οδηγείται σε θάνατο.

Κινολόνες: Αναστέλλουν την σύνθεση του DNA στοχεύοντας στη DNA γυράση (τοποισομεράση τύπου II) με αποτέλεσμα να μην επιτρέπει την διπλή έλικα του DNA να ξεδιπλωθεί. Δεν μπορεί διενεργηθεί η διαδικασία της αντιγραφής, καθώς συσσωρεύονται πολλαπλά θραύσματα στην έλικα του DNA και οι θηλιές κατά την έναρξη της αντιγραφής δεν μπορούν να ανοίξουν. Το βακτήριο έτσι κατευθύνεται στον θάνατο.

Αμινογλυκοσίδες: Η δομή των αμινογλυκοσιδών χαρακτηρίζεται από 3-αμινο σάκχαρα συνδεδεμένα με γλυκοσιδικούς δεσμούς. Παρατηρήθηκαν πρώτη φορά από ακτινομύκητες του εδάφους. Εμποδίζουν την σύνθεση των πρωτεϊνών με την πρόσδεση τους στο ριβόσωμα. Είναι πολύ αποτελεσματικές έναντι αερόβιων αρνητικών κατά Gram και κάποιων συγκεκριμένων θετικών κατά Gram βακτηρίων.



Εικόνα 6: Δομή αμινογλυκοσιδών

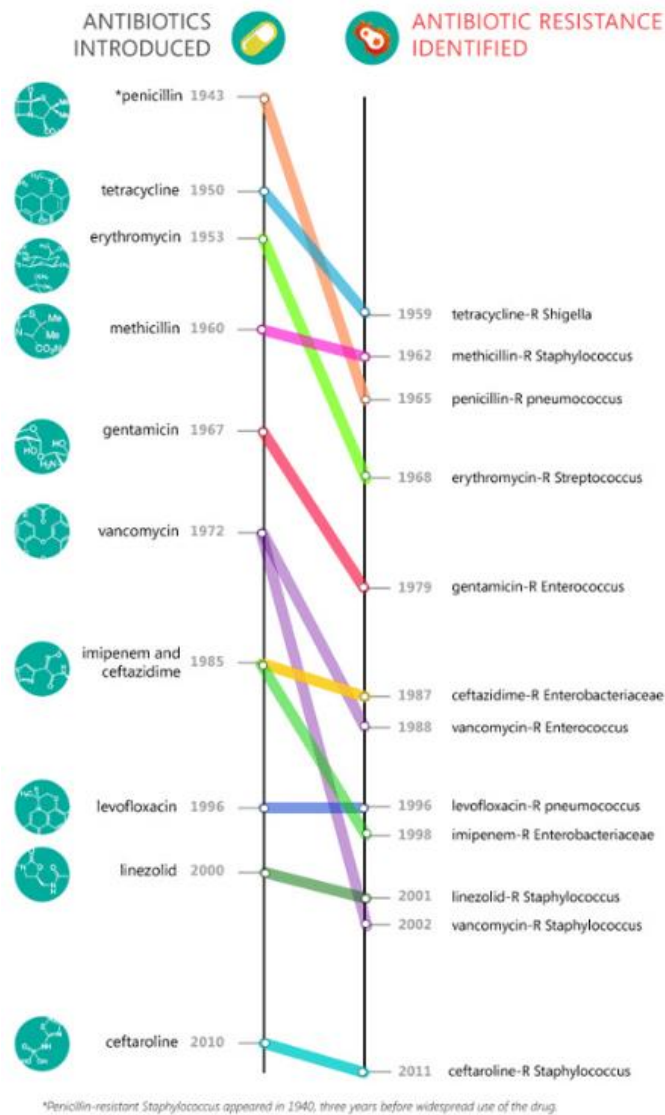
ΡΙφαμπικίνες: Αναστέλλουν την λειτουργία του ενζύμου της πολυμεράσης του RNA, δημιουργώντας σύμπλοκο με αυτή. Έτσι, δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί η σύνθεση του RNA και τελικά η πρωτεϊνοσύνθεση.

Πολυμυξίνες: Προκαλούν καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης αφού μπορούν να δεσμευθούν στο λιπιδικό τμήμα του λιποπολυσακχαριτικού στρώματος της μεμβράνης στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Αφού καταστρέψουν την εξωτερική μεμβράνη, διαπερνούν στο εσωτερικό και αποσυνθέτουν και το εσωτερικό στρώμα της μεμβράνης του βακτηρίου

Σουλφοναμίδες: Οι σουλφοναμίδες είναι συνθετικά χημικά μόρια που περιέχουν ένα γκρουπ σουλφοναμίδης. Είναι αποτελεσματικές έναντι τόσο θετικών κατά Gram όσο και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, αλλά και έναντι κάποιων πρωτόζωων. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι είναι δραστικές και έναντι παραγόντων καρκινικών κυττάρων. Είναι κυρίως βακτηριοστατικοί παράγοντες, δεν εξοντώνουν απευθείας τα βακτήρια. Δρουν ως αναστολείς του μεταβολικού κύκλου του φολλικού οξέος.

1.1.3. Αντοχή βακτηρίων στα αντιβιοτικά

Τα φυσικά αντιβιοτικά προέρχονται κυρίως από βακτήρια του εδάφους και ο ρόλος τους είναι να προσφέρουν στο βακτηριακό κύτταρο πλεονέκτημα κατά την ανάπτυξη και διαβίωση του εμποδίζοντας την ανάπτυξη των γειτονικών του. ⁽⁶⁾ Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά είναι ένα χαρακτηριστικό που αποκτήθηκε κατά την ανάγκη τους να επιβιώσουν όταν εκτίθενται σε αυτά. Τα βακτήρια που έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα, δεν σκοτώνονται και, έτσι, είναι ακόμη πιο δύσκολη η αντιμετώπιση των μολύνσεων από αυτά. Τα βακτήρια αρχίζουν να αποκτούν αντοχή και να αποτελούν μια πραγματική απειλή για την δημόσια υγεία, καθώς από τους ανθρώπους και τα ζώα μεταφέρονται στο περιβάλλον και πάλι σε αυτούς μέσω της τροφικής αλυσίδας. Εκατοντάδες ως και χιλιάδες θάνατοι παγκοσμίως οφείλονται σε βακτήρια ανθεκτικά σε περισσότερα του ενός αντιβιοτικά. Ακόμη έχει αρχίσει να παρατείνεται ο χρόνος βακτηριακών μολύνσεων στους οργανισμούς και υπάρχει ο φόβος να μην εμφανίζουν καμία αποτελεσματικότητα σε βάθος χρόνου οπότε τα βακτήρια και οι μολύνσεις από αυτά να μην είναι αντιμετωπίσιμες. Το αποτέλεσμα θα είναι να αυξάνεται ο χρόνος παραμονής σε νοσοκομεία, υψηλότερο κόστος για την αντιμετώπιση μολύνσεων αλλά και αυξάνεται ο κίνδυνος διενέργειας εγχειρήσεων που αποτελούν επιτεύγματα της ιατρικής επιστήμης, όπως η καισαρική τομή, μεταμόσχευση οργάνων και οι χημειοθεραπείες. Η ιδιότητα των αντιβιοτικών, με την ανακάλυψη τους από τους επιστήμονες, ανέδειξε τα πολλά οφέλη για την υγεία των ανθρώπων, αλλά και των ζώων αφού οδήγησε μέχρι και την παράταση του προσδόκιμου ζωής. ⁽⁷⁾ Ωστόσο με την αλόγιστη χρήση τους ελλοχεύουν αρκετοί κίνδυνοι που οδηγούν στην ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων ακόμη και σε πολλαπλά αντιβιοτικά. Οι αιτίες εμφάνισης της ανθεκτικότητας είναι πολλές. Η υπερβολική χρήση τους, η χορήγηση τους χωρίς να είναι απαραίτητο, η διάρκεια χορήγησης ακόμη και η επιλογή της ουσίας που θα χρησιμοποιηθεί παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη της αντοχής των βακτηρίων. Έχει παρατηρηθεί πολύ συχνά να συνταγογραφούνται αντιβιοτικά ακόμη και για ιογενείς μολύνσεις, που δεν είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν με αυτή την τακτική. Μία ακόμη αιτία είναι η συνεχής χρήση τους στην κτηνοτροφία καθώς συμβάλλουν στην αντιμετώπιση μολύνσεων και στην προώθηση της ανάπτυξης των ζώων, ώστε να βελτιώνεται η υγεία των ζώων και να παράγονται προϊόντα υψηλότερης ποιότητας.



Εικόνα 7: Χρονολόγιο ανακάλυψης αντιβιοτικών και εμφάνισης ανθεκτικότητας

Οι βασικοί τρόποι ανάπτυξης της ανθεκτικότητας είναι η οριζόντια μεταφορά γονιδίων και η δημιουργία μεταλλάξεων.

Τα βακτήρια που εμφανίζουν ανθεκτικότητα συνήθως υφίστανται μεταλλάξεις ή φέρουν κάποιο γονίδιο, του οποίου η παρουσία τα καθιστά ικανά να επιβιώσουν από το αντίστοιχο αντιβιοτικό, ακόμη και σε πιο υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ απουσία αυτού του γονιδίου θανατώνονται. ⁽¹⁷⁾

Οι μεταλλάξεις, συνήθως, λαμβάνουν χώρα σε γονίδια που κωδικεύουν κάποιον στόχο του αντιβιοτικού και θα οδηγήσουν στην επιβίωση του βακτηρίου. ⁽¹¹⁾ Πολλές φορές καταλήγουν τελικά και να αναπτύσσονται μηχανισμοί, που καθιστούν τα βακτήρια λιγότερο ευαίσθητα στα αντιβιοτικά. Τα βακτήρια μέσω των μεταλλάξεων που υφίστανται στο γενετικό τους υλικό δεν εξαλείφονται παρουσία αντιβιοτικού, εντούτοις τα μεταλλαγμένα γονίδια δεν αποτελούν γονίδια ανθεκτικότητας στο αντίστοιχο αντιβιοτικό. ⁽¹¹⁾

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα βακτήρια είναι ικανά να αντιστέκονται στα αντιβιοτικά είναι οι εξής:

- *Απενεργοποίηση του αντιβιοτικού⁽⁹⁾:*
Αποικοδομείται μέσω υδρόλυσης από ένζυμα. Τα ένζυμα μπορούν να δρουν και εξωκυτταρικά, αφού εκκριθούν από το βακτήριο. Έτσι καταστρέφουν το αντιβιοτικό πριν ακόμη αυτό εισέλθει μέσα στο βακτήριο. Ένα κλασικό παράδειγμα αυτού του μηχανισμού είναι η υδρόλυση του δακτυλίου β-λακτάμης από τις β-λακταμάσες, των αντιβιοτικών β-λακτάμης (π.χ. πενικιλίνες)
- *Τροποποίηση του αντιβιοτικού⁽⁸⁾:*
Η δομή του αντιβιοτικού μπορεί να αλλάξει με την προσθήκη χημικής ομάδας. Ως αποτέλεσμα επηρεάζεται η δομή του αντιβιοτικού στο χώρο αλλά και οι χημικές του ιδιότητες, και δεν είναι ικανό το αντιβιοτικό να προσδεθεί στον στόχο του. Οι πιο συχνές τροποποιήσεις είναι η ακετυλίωση, η φωσφορυλίωση και η αδενυλίωση, αλλά υπάρχουν και πιο σπάνιες τροποποιήσεις όπως η μεταφορά ομάδων θειόλης, γλυκοσυλίου ή ριβοσυλίου. Η μεταφορά των ομάδων γίνεται από ένζυμα με λειτουργία μεταφοράσης. Η ποικιλότητα των ομάδων που μπορούν να μεταφέρουν αυτά τα ένζυμα, τα καθιστούν την μεγαλύτερη οικογένεια ενζύμων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.
- *Μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του αντιβιοτικού⁽⁹⁾:*
Όλα τα βακτήρια έχουν στο γονιδίωμα τους γονίδια που κωδικοποιούν αντλίες efflux pumps. Πολλές από αυτές τις αντλίες εκφράζονται ιδιούστατα στο κύτταρο και άλλες επάγονται ή υπερεκφράζονται υπό ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες ή όταν υπάρχει το κατάλληλο υπόστρωμα. Έχει βρεθεί πως εξάγουν από το βακτηριακό κύτταρο ουσίες που είναι τοξικές για αυτό. Έτσι επηρεάζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό την ευαισθησία του βακτηρίου στο αντίστοιχο αντιβιοτικό. Σε περίπτωση μετάλλαξης που οδηγεί σε αυξημένη λειτουργία της αντλίας, παρατηρείται και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό.
- *Περιορισμένη είσοδος του αντιβιοτικού στο βακτήριο^(9, 10):*
Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του αντιβιοτικού μπορεί να μειωθεί εμποδίζοντας την είσοδο του στο κύτταρο. Αυτός ο μηχανισμός έχει παρατηρηθεί κυρίως στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια όπου υπάρχει η εξωτερική μεμβράνη, ενώ τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι λιγότερο ανθεκτικά στα αντιβιοτικά καθώς δεν είναι τόσο ικανά να ελέγχουν την είσοδο μορίων λόγω απουσίας εξωτερικής μεμβράνης. Η εξωτερική αυτή μεμβράνη αποτελεί από μόνης της ένα αποτελεσματικό φραγμό και λειτουργεί ως η πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στην είσοδο διαφόρων μορίων μέσα στο κύτταρο. Όμως, πολλά υδρόφιλα αντιβιοτικά μπορούν να εισέλθουν στο βακτήριο μέσω των πορινών. Οι πορίνες, λοιπόν, αποτελούν κανάλια στην επιφάνεια της μεμβράνης και μπορούν να τις διαπερνούν υδρόφιλα μόρια. Υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι με τους οποίους γίνεται η μείωση της πρόσληψης του αντιβιοτικού μέσω των πορινών. Ο ένας είναι η

μείωση έκφρασης πορινών ή αντικατάσταση τους από πορίνες που σχηματίζουν μικρότερα κανάλια, και ο δεύτερος τρόπος είναι η δημιουργία μεταλλάξεων σε γονίδια που κωδικοποιούν πορίνες και είναι ικανές να οδηγήσουν σε αλλαγή της δομής του καναλιού, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται και η διαπερατότητά του.

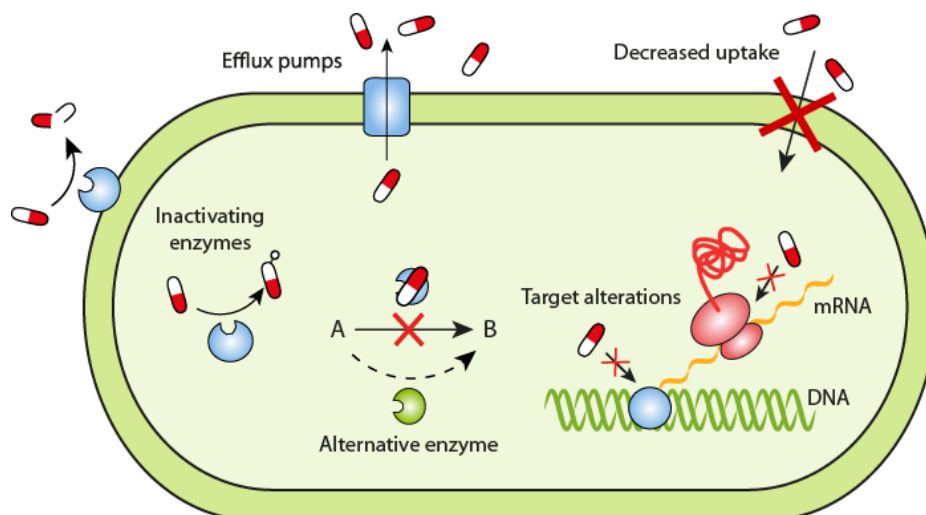
- **Αλλαγές στον στόχο του αντιβιοτικού ^(8,9):**

Οι στόχοι του αντιβιοτικού μπορούν να τροποποιηθούν είτε με κάποια μετάλλαξη στην κωδική αλληλουχία είτε μετά-μεταγραφικά αλλά και μετα-μεταφραστικά με την προσθήκη κάποιας χημικής ομάδας. Η ομάδα που προστίθεται είναι συνήθως κάποια μεθυλομάδα. Για παράδειγμα, αντιβιοτικά τα οποία στοχεύουν στο ριβόσωμα, δεν θα μπορούν να προσδεθούν σε αυτό με τη δημιουργία μετάλλαξης στο ριβόσωμα ή με μεθυλίωση κάποιου κατάλοιπου της ριβοσωμικής υπομονάδας.

Η περίπτωση της δημιουργίας κάποιας μετάλλαξης στην κωδική αλληλουχία του γονιδίου, φαίνεται να είναι ένας αρκετά κοινός μηχανισμός για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας, ειδικά για αντιβιοτικά που δεν υπάρχουν ενζυμικοί μηχανισμοί που να προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αυτά.

- **Παράκαμψη/ Τροποποίηση μεταβολικού μονοπατιού ⁽⁹⁾:**

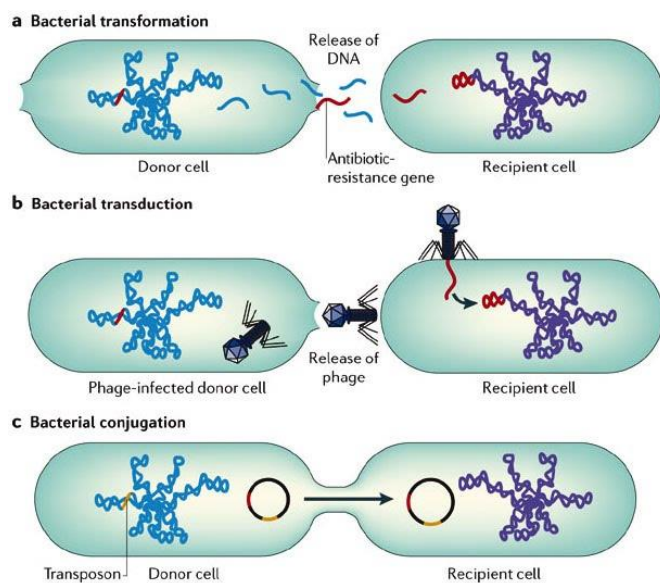
Με σκοπό την αποφυγή της δράσης του αντιβιοτικού στον στόχο του, όταν αυτός είναι κάποιο μόριο μεταβολικού μονοπατιού, αναστέλλεται η υπερπαραγωγή του. Αποτέλεσμα αυτού είναι να μην βρίσκει τον στόχο του το αντιβιοτικό. Το βήμα αυτό που αναστέλλεται, θα πραγματοποιηθεί από κάποιο διαφορετικό ένζυμο που όμως δεν αποτελεί στόχο για το αντιβιοτικό.



Εικόνα 8: Μηχανισμοί ανθεκτικότητας βακτηρίων

Κατά την οριζόντια μεταφορά γονιδίων, μεταφέρεται ολόκληρο το γονίδιο που θα προσδώσει ανθεκτικότητα. Διακρίνονται τρεις τρόποι οριζόντιας μεταφοράς του γενετικού υλικού: ⁽¹⁰⁾

- a. Μετασηματισμός: Γυμνό γενετικό υλικό απελευθερώνεται από το βακτήριο, του οποίου η μεμβράνη έχει «σπάσει» και προσλαμβάνεται από άλλο βακτήριο.
- b. Μεταγωγή: Μεταφορά του γενετικού υλικού με την μεσολάβηση κάποιου φάγου (ιού) και ενσωμάτωση του στο γονιδίωμα του βακτηρίου-δέκτη.
- c. Σύζευξη: Απευθείας μεταφορά γενετικού υλικού με επαφή των βακτηρίων. Σε αυτή την περίπτωση τα πλασμίδια είναι αυτά που συμβάλλουν στην μεταφορά του γενετικού υλικού.



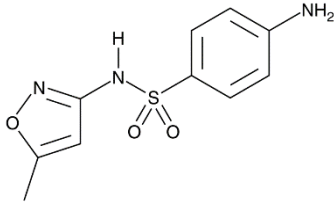
Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Εικόνα 9: Στρατηγικές οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων μεταξύ βακτηρίων

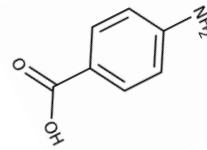
Στην παρούσα εργασία θα εστιάσουμε σε αντιβιοτικά σουλφοναμιδών, και ειδικότερα στη σουλφαμεθοξαζόλη.

1.1.4. Σουλφαμεθοξαζόλη (Sulfamethoxazole, SMX) ^(12,13)

Η σουλφαμεθοξαζόλη (ή όπως ονομάζεται κατά το σύστημα IUPA: 4-amino-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl) benzenesulfonamide, $C_{10}H_{11}N_3O_3S$) είναι ένα αντιβιοτικό σουλφοναμίδης που χορηγείται για την αντιμετώπιση μολύνσεων στην ουροποιητική οδό, στο αναπνευστικό σύστημα αλλά και στη γαστρεντερική οδό. Λόγω της δομικής ομοιότητας με το υποστρώμα, π-αμινοβενζοϊκό οξύ (para-aminobenzoic acid - PABA), η σουλφαμεθοξαζόλη δρα ως ανταγωνιστής του και αναστέλλει την λειτουργία της διυδρο-πτεροϊκής σύνθεσης. Εμποδίζοντας την σύνθεση του διυδροφυλλικού οξέος, προκαλεί βακτηριόσταση.



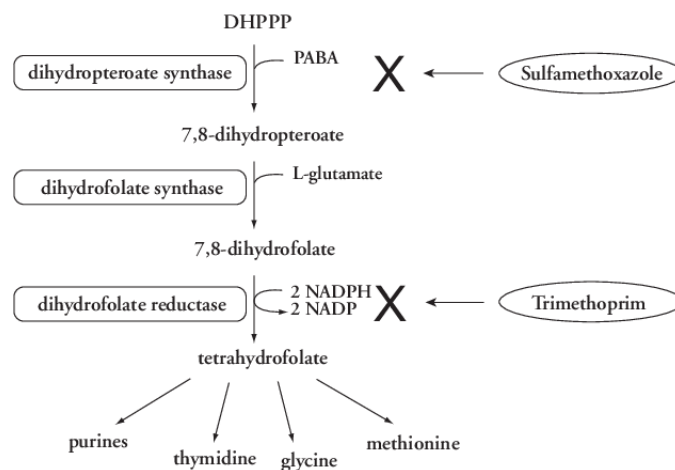
Εικόνα 11: Δομή του αντιβιοτικού σουλφαμεθοξαζόλη



Εικόνα 10: Δομή του υποστρώματος π-αμινοβενζοϊκό οξύ

Τα βακτήρια σε αυτή τη φάση δεν θανατώνονται αλλά δεν μπορούν να αναπτυχθούν καθώς το τετραυδροφυλλικό είναι πρόδρομη ένωση των πουρινών, αλλά και σημαντικών αμινοξέων, που είναι απαραίτητα για την αντιγραφή του DNA, την σύνθεση πρωτεϊνών και τον διπλασιασμό του βακτηρίου.

Η σουλφαμεθοξαζόλη είναι αποτελεσματική έναντι τόσο των θετικών κατά Gram βακτηρίων αλλά και των αρνητικών κατά Gram. Χρησιμοποιείται στην κτηνοτροφία για την θεραπεία βακτηριακών μολύνσεων στα ζώα και αποτελεί ένα από τα ευρέως ανιχνεύσιμα αντιβιοτικά στα κτηνοτροφικά απόβλητα ⁽¹⁴⁾



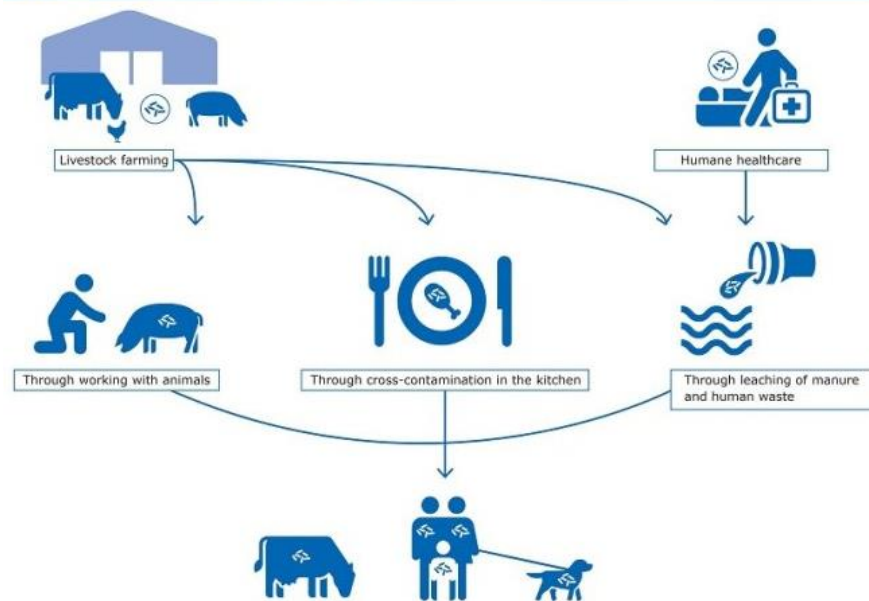
Εικόνα 12: Μονοπάτι βιοσύνθεσης τετραυδροφυλλικού οξέος

1.1.5. Οδοί διασποράς και ανάπτυξης αντοχής στα κτηνιατρικά αντιβιοτικά

Η συνεχής ανάγκη για την αύξηση της παραγωγής κρέατος από τα ζώα και οι συνθήκες στις οποίες αυτά μεγαλώνουν, οδηγούν στην πιο συστηματική χρήση των αντιβιοτικών. Η χορήγηση κτηνιατρικών αντιβιοτικών είναι απαραίτητη σε πολλές περιπτώσεις για την αντιμετώπιση και την πρόληψη ασθενειών. Χρησιμοποιείται ακόμη για την αύξηση του σωματικού τους βάρους αλλά και την βελτίωση στην κατανάλωσης τροφής ⁽¹⁵⁾. Η εκτεταμένη, όμως, χρήση των αντιβιοτικών στα ζώα, συνεπάγεται την εναπόθεση τους στο περιβάλλον. Λόγω της υδροφιλικότητας των αντιβιοτικών και του χαμηλού μεταβολισμού τους μέσα στον οργανισμό των ζώων, το 30 – 90% απεκκρίνονται μέσω των ούρων και των κοπράνων στο περιβάλλον ως παράγωγες ουσίες. ⁽¹⁸⁾ Τα ζωικά αυτά απόβλητα αποτελούν πηγή διασποράς γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που χορηγούνται κάθε φορά. Οι κύριες οδοί μέσω των οποίων γίνεται η διασπορά των γονιδίων ανθεκτικότητας είναι:

- Οι χώροι που ζουν τα ζώα, με στόχο την στέγαση του μεγαλύτερου δυνατού αριθμού, πολλές φορές είναι μικροί με αποτέλεσμα να επικρατεί συνωστισμός και να μην πληρούνται οι κανόνες υγιεινής. Έτσι, η εμφάνιση λοιμώξεων τόσο του αναπνευστικού όσο και του γαστρεντερικού συστήματος είναι πολύ πιο συχνές και η χρήση των αντιβιοτικών για την αντιμετώπισή τους αλλά και για προληπτικούς λόγους ακόμη συχνότερη.
- Η χρήση των κοπράνων των ζώων στη γεωργία είτε απευθείας είτε με την μορφή της κοπριάς. Η εναπόθεση κοπριάς στις καλλιέργειες βοηθά τα φυτά στην ανάπτυξή τους αφού λαμβάνουν θρεπτικά μέσω των κοπράνων αλλά και ενισχύουν τις ιδιότητες του εδάφους. ⁽¹⁹⁾ Τα θρεπτικά που περιέχονται στα κόπρανα προέρχονται από φυτά που προηγουμένως έχουν καταναλωθεί από τα ζώα και έχουν απεκκριθεί στα κόπρανα. Έτσι, επιτελείται η ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών των φυτών. Μαζί με τα θρεπτικά συστατικά περιλαμβάνονται και διάφορες άλλες ουσίες και στοιχεία που δεν είναι ωφέλιμες για τα φυτά και το έδαφος. Η κοπριά, λοιπόν, που προέρχεται από ζώα που τους έχουν δοθεί μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών, περιέχει ιδίως συγκεντρώσεις αντιβιοτικών ή ενεργών μεταβολιτών τους. Είναι δυνατόν, λοιπόν, τα βακτήρια που υπάρχουν στο έδαφος να γίνουν ανθεκτικά σε αντιβιοτικά είτε μέσω της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων από τα ανθεκτικά βακτήρια των κοπράνων είτε σε βάθος χρόνου αφού τους ασκείται εξελικτική πίεση. ⁽¹⁷⁾
- Η αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων και οι εγκαταστάσεις στις οποίες συσκευάζονται τα τρόφιμα. Κυρίως κατά την παραγωγή κρέατος από ζώα, στα οποία γίνεται έντονη χρήση αντιβιοτικών, το αίμα αλλά και ιστοί του ζώου διαθέτουν πολλές φορές γονίδια ανθεκτικότητας τα αντίστοιχα αντιβιοτικά. Ο λάθος τρόπος διαχείρισης των αποβλήτων τέτοιων εγκαταστάσεων, που πολύ συχνά καταλήγουν ακατέργαστα στο περιβάλλον, οδηγεί στην εμφάνιση βακτηρίων ανθεκτικών σε αντιβιοτικά με τους τρόπους που αναφέρθηκαν και προηγουμένως. ⁽¹⁶⁾

Spread of antibiotic resistance



Εικόνα 13: Οδοί διασποράς βακτηριακής ανθεκτικότητας

1.2. Γονίδιο *sul1*, *qnrD* και γονίδια-δείκτες

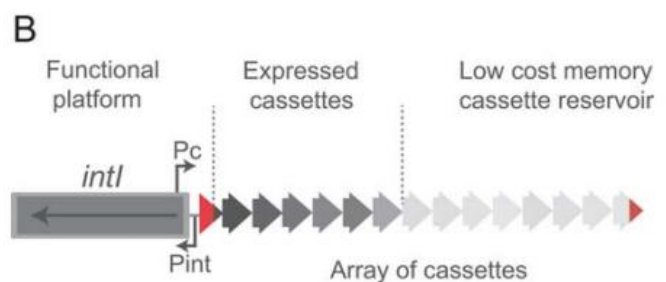
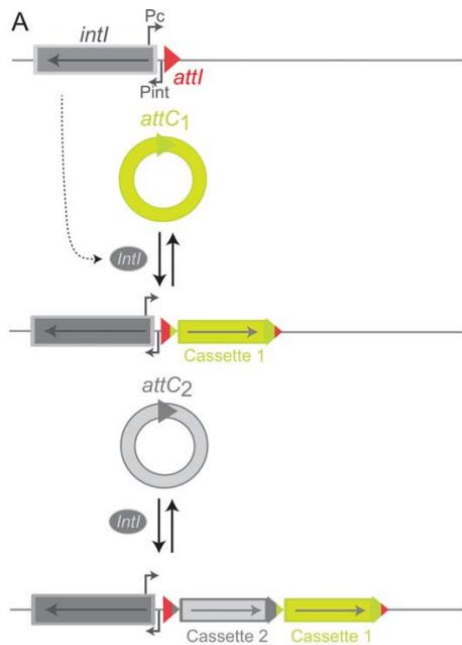
Ένα από τα γονίδια που επικεντρώνεται η παρούσα εργασία, είναι το γονίδιο *sul1*. Έχει μέγεθος 433 ζεύγη βάσεων (bp), ωστόσο με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ενισχύονται μόνο τα 105 bp. Κωδικεύει μια διυδρο-πτεροϊκή συνθάση σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Η συνθάση που παράγεται έχει πολύ χαμηλή συγγένεια με τα αντιβιοτικά σουλφοναμίδης, γι' αυτό και προσδίδει ανθεκτικότητα σε αυτά.

Το γονίδιο *qnrD* είναι και αυτό στο επίκεντρο της εργασίας. Προσδίδει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά κινολόνες, και ειδικότερα στις φθοροκινολόνες (fluoroquinolones), καθώς προστατεύει την γυράση του DNA και την τοποϊσομεράση από την πρόσδεση της κινολόνης.⁽²⁰⁾ Έχει βρεθεί κυρίως σε μικρά πλασμίδια - τα οποία μεσολαβούν στην ανάπτυξη αντοχής στις κινολόνες αλλά και στην διασπορά της- που απομονώθηκαν τόσο από βακτήρια που προκαλούσαν φλεγμονές σε ανθρώπους όσο και από κόπρανα χοίρων.⁽²¹⁾ Ανιχνεύεται βέβαια και σε μεταθετά στοιχεία, όπως κασέτες γονιδίων, που καθιστούν πιο εύκολη την μεταφορά του μεταξύ των βακτηρίων.

Μαζί με αυτά τα γονίδια, χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες, τα γονίδια *int1* και *16s rRNA*.

Το γονίδιο *int1*, αποτελείται από 473 bp και ανήκει στην τάξη 1 ιντεγκρίνης (class 1 integrons). Κωδικεύει μία ρεκομπινάση τυροσίνης, η οποία καταλύει την απομάκρυνση και την εισαγωγή συγκεκριμένων τμημάτων στο γονιδίωμα. Το γονίδιο αυτό σε συνδυασμό με κάποια ακόμη στοιχεία αποτελούν το ιντεγκρόνιο. Το ιντεγκρόνιο δομείται από ένα σταθερό τμήμα και από μία γονιδιακή κασέτα που μπορεί να διαφέρει και έχει την δυνατότητα να μετακινείται. Το σταθερό αυτό τμήμα περιέχει το γονίδιο *int1*, μία θέση ανασυνδυασμού *attI* ανοδικά του γονιδίου και έναν υποκινητή P_c μεταξύ του γονιδίου *int1* και της θέσης ανασυνδυασμού *attI*, υπεύθυνο για την έκφραση των γονιδίων της κασέτας.

Οι γονιδιακές κασέτες είναι κυκλικά στοιχεία που δεν αντιγράφονται και δεν φέρουν υποκινητή για τα γονίδια που περιέχουν. Ακόμη, διαθέτουν μία θέση ανασυνδυασμού *attC* που τους δίνει την δυνατότητα να ενσωματώνονται στο ιντεγκρόνιο. Διαδοχικές ενθέσεις κασετών είναι δυνατόν να λάβουν χώρα, όμως εκφράζονται κυρίως αυτές που είναι πιο



Εικόνα 14: επίπεδα έκφρασης γονιδιακών κασετών ανάλογα με την θέση τους

Εικόνα 15: Μηχανισμός ένθεσης γονιδιακής κασέτας

κοντά στην θέση ένθεσης. Οι κασέτες μπορούν να αποκοπούν τυχαία και να ενσωματωθούν κοντά στην θέση ανασυνδυασμού με αποτέλεσμα να αυξηθεί και η έκφρασή τους.

Το περιεχόμενο αυτών των κασετών είναι πολυποίκιλο και αντανακλά ένα ιστορικό προσαρμογής του βακτηρίου αλλά και μία μικρού μεγέθους μνήμη διαφόρων λειτουργιών του κυττάρου. Με αυτό τον τρόπο τα βακτήρια καθίστανται πιο εύκολα ανθεκτικά σε αντιβιοτικά, αφού τους δίνεται η δυνατότητα να αποθηκεύουν νέα γονίδια στο γονιδίωμα τους και να τα εκφράζουν. ⁽²²⁾ Το γονίδιο *sul1* εμπεριέχεται συνήθως στην κασέτα, γι' αυτό και χρησιμοποιούμε το *intI1* ως γονίδιο-δείκτη.

Το γονίδιο *16s rRNA* έχει μέγεθος 193 bp και κωδικεύει την μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος στα βακτήρια. Είναι ένα πολύ καλά συντηρημένο γονίδιο, καθώς χωρίς αυτό δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί η πρωτεϊνοσύνθεση. Εκφράζεται σε όλους τους βακτηριακούς οργανισμούς, με περισσότερα του ενός αντιγράφου συνήθως, και δεν επηρεάζεται από την οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Παρόλο που είναι παγκοσμίως διαδεδομένο στη βακτηριακή κοινότητα, εμφανίζει και κάποιες περιοχές που εμφανίζουν ποικιλομορφία. Αυτά τα χαρακτηριστικά, το καθιστούν ιδανικό ως γονίδιο-δείκτη κατά φυλογενετικές και στατιστικές αναλύσεις. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων κατά την στατιστική ανάλυση, καθώς είναι ένα ιδιόσυστατο γονίδιο που βρίσκεται σε όλα τα βακτηριακά είδη. ⁽²³⁾

1.3. Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν

Με στόχο να εντοπίσουμε το επιθυμητό γονίδιο στα δείγματα εδάφους και να προχωρήσουμε στην κλωνοποίηση του σε πλασμίδιο, θα πρέπει να γίνει ενίσχυση και απομόνωση μόνο του γονιδίου-στόχου, δηλαδή του γονιδίου *sul1* και του *qnrD*.

1.3.1. Αρχή της μεθόδου Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης-Polymerase chain reaction

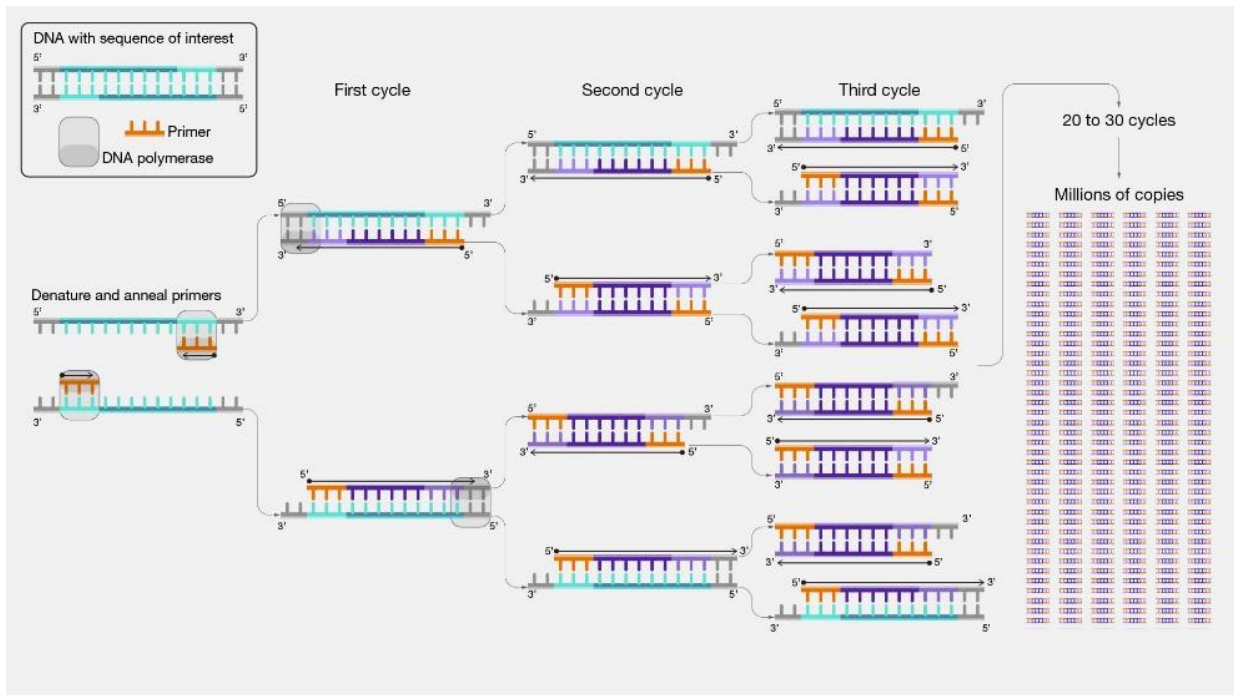
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) είναι μία εργαστηριακή τεχνική με την οποία γίνεται εφικτή η ταχεία *in vitro* παραγωγή εκατομμυρίων αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Το τμήμα που ενισχύθηκε, μπορεί στη συνέχεια να απομονωθεί και να μελετηθεί περαιτέρω. ⁽²⁴⁾

Η αρχή της μεθόδου της PCR, βασίζεται στην λειτουργία της πολυμεράσης του DNA να συνθέτει νέους συμπληρωματικούς κλώνους χρησιμοποιώντας ως καλούπι ένα αρχικό μόριο DNA. Η πολυμεράση του DNA για να ξεκινήσει να αντιγράφει το επιθυμητό τμήμα DNA θα πρέπει να έχουν δεσμευθεί σε αυτό ειδικοί ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές (primers), οι οποίοι έχουν κατασκευαστεί τεχνητά.

Η διαδικασία αυτή αποτελείται από κάποια διακριτά στάδια: ⁽²⁵⁾

- **Αποδιάταξη:** Με αύξηση της θερμοκρασίας (94-96°C), αποδιάσσεται το δίκλωνο μόριο DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως εκμαγείο.
- **Υβριδοποίηση:** Δύο primers προσδένονται σε κάθε αλυσίδα. Η σταθεροποίηση τους πάνω στο DNA-στόχο διασφαλίζεται με την ψύξη του μείγματος (45-65 °C).
- **Επιμήκυνση:** Η πολυμεράση του DNA επιμηκύνει τους primers χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το αρχικό DNA (θερμοκρασία τους 72 °C). Έπειτα από κατάλληλο χρόνο επώασης αυξάνεται πάλι η θερμοκρασία για να αποδιαταχθούν οι κλώνοι του DNA. Έτσι, τελειώνει ο κύκλος της αντίδρασης και με την αύξηση της θερμοκρασίας εκ νέου σηματοδοτείται η έναρξη του επόμενου κύκλου.

Αυτά τα στάδια αποτελούν ένα κύκλο ενίσχυσης. Σε κάθε νέο κύκλο το DNA-στόχος διπλασιάζεται, οδηγώντας έτσι σε εκθετική αύξηση του. Συνήθως εφαρμόζονται 20-30 κύκλοι από τους οποίους προκύπτει ενίσχυση από 10^6 έως 10^9 φορές της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA. ⁽²⁵⁾



Εικόνα 16: Στάδια της διαδικασίας της PCR

Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα σε ειδικά μηχανήματα που ονομάζονται θερμοκυκλοποιητές και ρυθμίζουν αυτόματα την θερμοκρασία κατά τα διάφορα στάδια της PCR. Είναι μία πλήρως εξειδικευμένη διαδικασία που δεν υπάρχει σχεδόν καμία «λανθασμένη πρόσδεση εκκινήτη» με αποτέλεσμα το τελικό προϊόν να είναι πρακτικά ομοιογενές.

Εκτός του δείγματος DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε, μέσα στο μείγμα για να διενεργηθεί η αντίδραση θα πρέπει να εμπεριέχονται και τα εξής συστατικά:

DNA Πολυμεράση: Το ένζυμο που θα συνθέσει τους νέους κλώνους του DNA. Λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας κατά το στάδιο της αποδιάταξης είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται θερμοανθεκτικά ένζυμα. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι η *Taq* πολυμεράση, η οποία απομονώθηκε από το θερμοφιλό βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι σταθερή στους 95°C, *Pfu* πολυμεράση, η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Pyrrococcus furiosus* και είναι σταθερή στους 100°C αλλά εμφανίζει και μεγαλύτερη πιστότητα κατά την διαδικασία της αντιγραφής των κλώνων του DNA. (25)

Ολιγονουκλεοτιδική εκκινήτης (primers) (26) : Μονόκλωνοι, ολιγονουκλεοτιδικοί (15-30 bp) εκκινήτες συμπληρωματικοί ως προς την αλληλουχία-στόχο. Κατασκευάζονται τεχνητά ανάλογα με το DNA-στόχο κάθε φορά. Στο μείγμα εμπεριέχεται τόσο ο forward όσο και ο reverse εκκινήτης, ώστε να μπορεί η DNA πολυμεράση να επεκτείνει το στόχο και προς τις δύο κατευθύνσεις. Θα πρέπει να προστίθενται σε συγκεκριμένη συγκέντρωση στο μείγμα, καθώς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση παρατηρούνται φαινόμενα λανθασμένης σύνδεσης στο DNA και υβριδισμός των primers μεταξύ τους.

Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) ⁽²⁶⁾ : Αποτελούνται από τέσσερα βασικά νουκλεοτίδια- dATP (τριφωσφορική δεοξαδενοσίνη), dTTP (τριφωσφορική θυμιδίνη), dCTP (τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη), dGTP (τριφωσφορική δεοξυγουανιδίνη) - και χρησιμοποιούνται ως τα βασικά δομικά στοιχεία για την σύνθεση των νέων αλυσίδων του DNA. Προστίθενται σε ισομοριακές ποσότητες στο μείγμα με τη τελική συγκέντρωση να είναι συνήθως τα 0,2 mM.

Κατιόντα Mg²⁺: Τα δισθενή ιόντα Mg είναι απαραίτητα για την ενεργότητα της πολυμεράσης αφού λειτουργούν ως συμπαραγόντες του ενζύμου. Συμβάλλουν στην ενσωμάτωση των dNTPs κατά τον πολυμερισμό τους σε αλυσίδες DNA, στον σχηματισμό και την σταθεροποίηση του συμπλόκου primer-DNA στόχου. Ακόμη, καταλύουν τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του 3' άκρου του εκκινήτη και της φωσφορικής ομάδας των dNTPs.

Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer): Δημιουργεί το κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη διενέργεια της αντίδρασης και τη ενεργότητα της πολυμεράσης. Το pH του διαλύματος κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 8.0 και 9.5 και συχνά σταθεροποιείται με την προσθήκη Tris-HCl.

Αλβουμίνη Βόειου ορού (BSA- bovine serum albumin) ⁽²⁷⁾ : Εμποδίζει την πρόσδεση αναστολέων στην πολυμεράση του DNA, που σε άλλη περίπτωση θα εμπόδιζαν να γίνει η αντίδραση, με το να προσδένονται εν τέλη σε αυτό. Είναι απαραίτητο να χρησιμοποιείται σε δείγματα εδάφους, καθώς λόγω της προέλευσής του περιέχουν αρκετούς αναστολείς.

Νερό: Το μέσο αραίωσης όλων των υπόλοιπων συστατικών στις τελικές τους συγκεντρώσεις.

1.3.2. Κλωνοποίηση γονιδίου σε πλασμιδιακούς φορείς ⁽²⁹⁾

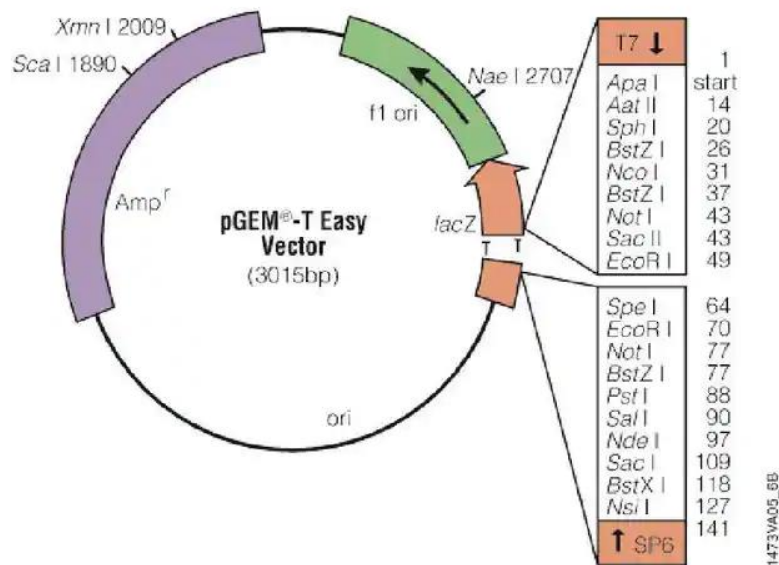
Με τον όρο κλωνοποίηση ορίζεται η εισαγωγή γονιδίου ή συγκεκριμένης αλληλουχίας σε φορέα με σκοπό τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου αυτού, ή της αλληλουχίας αντίστοιχα, σε πολλά αντίγραφα και την μελλοντική χρήση σε διάφορες πειραματικές διαδικασίες. Συνήθως αποτελεί μέρος πειραμάτων, όπως για παράδειγμα τη δημιουργία βιβλιοθηκών, μελέτες έκφρασης γονιδίων κτλ. ⁽²⁸⁾

Προκειμένου να κλωνοποιηθεί ένα γονίδιο ή μία αλληλουχία του DNA, ενσωματώνεται σε έναν φορέα με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα ανασυνδυασμένο μόριο DNA. Ο φορέας θα πρέπει να έχει τις εξής ιδιότητες:

- Ικανός να αναπαραχθεί σε έναν ξενιστή χωρίς να ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό του ξενιστή
- Μπορεί να επιτελεί αυτόνομα από το γονιδίωμα του ξενιστή την διαδικασία της αντιγραφής και να πολλαπλασιάζεται σε πολλά αντίγραφα
- Να φέρει γονίδια που τον καθιστούν ξεχωριστό από κύτταρα που δεν έχουν λάβει τον ανασυνδυασμένο φορέα (γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά)

Έχουν κατασκευαστεί πολλοί φορείς που έχουν αυτές τις ιδιότητες, αλλά ανάλογα με το μέγεθος της αλληλουχίας και τις μοριακές τους ιδιότητες υπάρχουν και διαφορετικά είδη φορέων. Οι κύριοι τύποι φορέων είναι τα πλασμίδια, οι βακτηριοφάγοι, τα κοσμίδια και τα τεχνητά χρωμοσώματα (BACs- Bacterial Artificial chromosomes, YACs- Yeast Artificial Chromosomes). Στην παρούσα εργασία θα επικεντρωθούμε στους πλασμιδιακούς φορείς.

Τα πλασμίδια είναι βακτηριακής προέλευσης, το DNA τους είναι κυκλικό και δίκλωνο και μπορούν να αναπτύσσονται ημι-αυτόνομα σε βακτήρια. Κάθε πλασμίδιο που πρόκειται να γίνει φορέας για κλωνοποίηση, θα πρέπει να διαθέτει μία αλληλουχία έναρξης της αντιγραφής *ori* (origin of replication) ώστε να μπορεί να αντιγράφεται ανεξάρτητα από το γενετικό υλικό του βακτηρίου-ξενιστή και ένα γονίδιο- δείκτη (selectable marker) για να μπορεί να γίνει διαλογή των βακτηρίων που έχουν λάβει το πλασμίδιο, όπως για παράδειγμα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό. Ακόμα θα πρέπει να διαθέτουν αλληλουχίες που να αναγνωρίζονται από ένζυμα περιορισμού, που είναι συγκεντρωμένες σε μία περιοχή που ονομάζεται αλληλουχία πολλαπλών θέσεων κλωνοποίησης ή πολυσυνδέτης.



Εικόνα 17: Χάρτης πλασμιδιακού φορέα pGEM

Συνήθως ο πολυσυνδέτης βρίσκεται ενδιάμεσα σε ένα τμήμα του γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης (*lacZ*). Αν το πλασμίδιο δεν καταλήξει να είναι ανασυνδυασμένο, τότε παράγεται λειτουργική η β-γαλακτοζιδάση ενώ σε αντίθετη περίπτωση το τμήμα που εντίθεται στο πλασμίδιο διακόπτει την αλληλουχία του γονιδίου με αποτέλεσμα η β-γαλακτοζιδάση να μη είναι λειτουργική. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται με την προσθήκη του παράγοντα X-gal, ενός υποστρώματος της β-γαλακτοζιδάσης, στο θρεπτικό υλικό που θα τοποθετηθεί η καλλιέργεια. Τελικά, αν η β-γαλακτοζιδάση που προκύψει είναι πλήρως λειτουργική, θα διασπάσει το X-gal και θα προκύψει προϊόν μπλε χρώματος. Αν όμως δεν είναι λειτουργική δεν θα μπορέσει να διασπάσει το X-gal και δεν θα υπάρξει ένδειξη του μπλε χρώματος.



Εικόνα 18: Τριβλίο με αποικίες βακτηρίων όπου στο θρεπτικό υλικό έχει προστεθεί ο παράγοντας X-gal. Με μπλε χρώμα διαφαίνονται οι αποικίες στις οποίες δεν έχει εισαχθεί το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο ενώ με άσπρο αυτές που υπάρχει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Κατά την διαδικασία της κλωνοποίησης είναι απαραίτητη η χρήση ενζύμων περιορισμού και της λιγάσης του DNA.

Τα ένζυμα περιορισμού ή αλλιώς περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA και διασπών το DNA στο εσωτερικό ή κοντά σε αυτές τις αλληλουχίες. Υπάρχουν τρεις τύποι ενζύμων περιορισμού που διαφέρουν στον τρόπο που τέμνουν το DNA. Έτσι, κάποια κόβουν και τις δύο αλυσίδες του DNA μεταξύ ίδιων ζευγών βάσεων και τα τμήματα που προκύπτουν έχουν λεία άκρα, άλλα κόβουν σε διαφορετικό σημείο την κάθε αλυσίδα δημιουργώντας προεξέχοντα 5' άκρα, ενώ ορισμένα ένζυμα τέμνουν σε διαφορετικά σημεία τις αλυσίδες και προκύπτουν προεξέχοντα 3' άκρα. Με το αντίστοιχο ένζυμο περιορισμού θα πρέπει να τέμνεται ο φορέας αλλά και το τμήμα του DNA που θα εισαχθεί ώστε να έχουν συμπληρωματικά άκρα.

Η ένωση των τετμημένων άκρων θα γίνει με την βοήθεια της λιγάσης του DNA, η οποία έχει ως λειτουργία να καταλύει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού ανάμεσα σε 5' φωσφορική ομάδα και στην 3' υδροξυλομάδα γειτονικών νουκλεοτιδίων που βρίσκονται εκατέρωθεν του τετμημένου τμήματος.

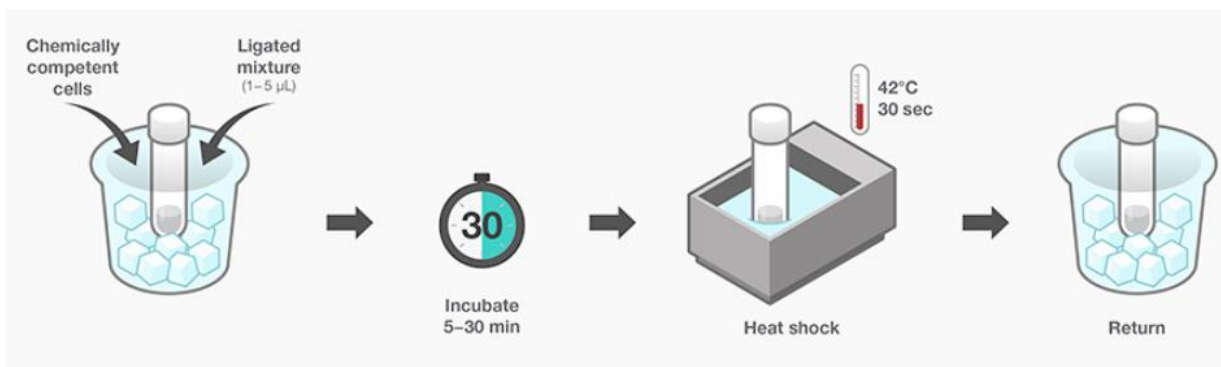
Η πειραματική διαδικασία της κλωνοποίησης απαιτεί τα εξής βήματα:

- Απομόνωση του επιθυμητού γονιδιωματικού DNA που θα εισαχθεί στον φορέα
- Πέψη του γονιδιωματικού DNA και του φορέα κλωνοποίησης με το ίδιο ένζυμο περιορισμού και προσθήκη της λιγάσης του DNA για τη σύνδεση του ενθέματος στον φορέα
- Μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια με τη μέθοδο του χημικού μετασχηματισμού

Ο μετασχηματισμός δίνει στο εκάστοτε βακτήριο την ικανότητα να μπορεί να λάβει εξωγενές γενετικό υλικό στο εσωτερικό του. Το γενετικό υλικό που εισέρχεται στο βακτηριακό κύτταρο θα πρέπει να είναι ανθεκτικό σε ενδονουκλεάσες καθώς σε άλλη περίπτωση θα κατατμηθεί και θα καταστραφεί. Η διαδικασία του μετασχηματισμού παρατηρείται και φυσικά στο περιβάλλον, όπου τα βακτήρια λαμβάνουν γενετικό υλικό από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται, αλλά σε αρκετά σπάνιες περιπτώσεις. Είναι, λοιπόν, απαραίτητο να επιτευχθεί τεχνητά στο εργαστήριο για την είσοδο του ξένου γενετικού υλικού στο βακτήριο.

Τα βακτηριακά κύτταρα που χρησιμοποιούνται κατά το χημικό μετασχηματισμό, έχουν υποστεί επεξεργασία με επώαση σε διάλυμα CaCl_2 . Τα ιόντα Ca^{2+} είναι ικανά να εισαχθούν μέσω καναλιών στην μεμβράνη του κυττάρου και να προκαλέσουν αλλαγή στην διαπερατότητα της.⁽³⁰⁾ Έτσι η μεμβράνη είναι καλύτερα διαπερατή στα πλασμίδια που πρόκειται να εισαχθούν.

Ακόμη, τα βακτηριακά κύτταρα υπόκεινται σε θερμικό σοκ. Ενώ κατά την επεξεργασία με το διάλυμα CaCl_2 βρίσκονται τοποθετημένα σε πάγο, στη συνέχεια επωάζονται στη σχετικά υψηλή θερμοκρασία των 42°C . Η αύξηση αυτή της θερμοκρασίας επιτρέπει την αναδιάταξη των λιπιδίων στην μεμβράνη. Έπειτα, τα κύτταρα επαναφέρονται σε πάγο και η πτώση της θερμοκρασίας οδηγεί στην απώλεια πρωτεϊνών. Με αυτόν τον τρόπο διευρύνονται οι πόροι της μεμβράνης και τα πλασμίδια μπορούν να εισέλθουν ακόμη πιο εύκολα στο εσωτερικό του κυττάρου.⁽³⁰⁾



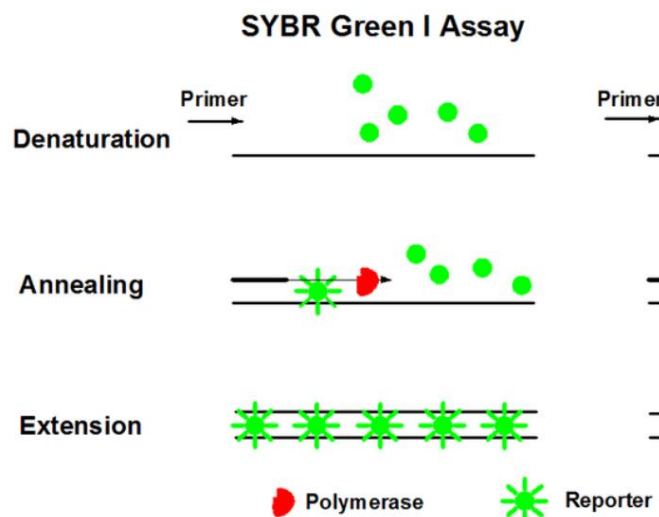
Εικόνα 19: Αναπαράσταση της διαδικασίας του χημικού μετασχηματισμού

1.3.3. Ποσοτική PCR (qPCR) ^(31, 32)

Η ποσοτική PCR, ή ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Quantitative Real Time PCR), βασίζεται στην ίδια αρχή μεθόδου με την κλασική αντίδραση PCR με την διαφορά πως η αντίδραση παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο και μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση της ποσότητας του DNA στο τέλος οποιουδήποτε κύκλου της αντίδρασης. Με αυτή τη μέθοδο είναι δυνατό να προσδιοριστεί ο αριθμός αντιγράφων του DNA-στόχου αφού χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη ως καμπύλη αναφοράς του προς μελέτη γονιδίου. Ακόμη δεν είναι απαραίτητη η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα.

Όπως και κάθε αντίδραση, στο μείγμα της αντίδρασης θα περιλαμβάνει το DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε, την DNA πολυμεράση, εκκινητές, νουκλεοτίδια dNTPs, ρυθμιστικό διάλυμα και στην δική μας περίπτωση και BSA. Στην περίπτωση της qPCR προστίθενται επιπλέον και μία φθορίζουσα χρωστική, ώστε να είναι δυνατή η παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Η χρωστική αυτή έχει την ικανότητα να εκπέμπει φθορισμό σε συγκεκριμένο μήκος κύματος και να προσδένεται επιλεκτικά στο DNA ανάλογα με την ποσότητα του στο δείγμα.

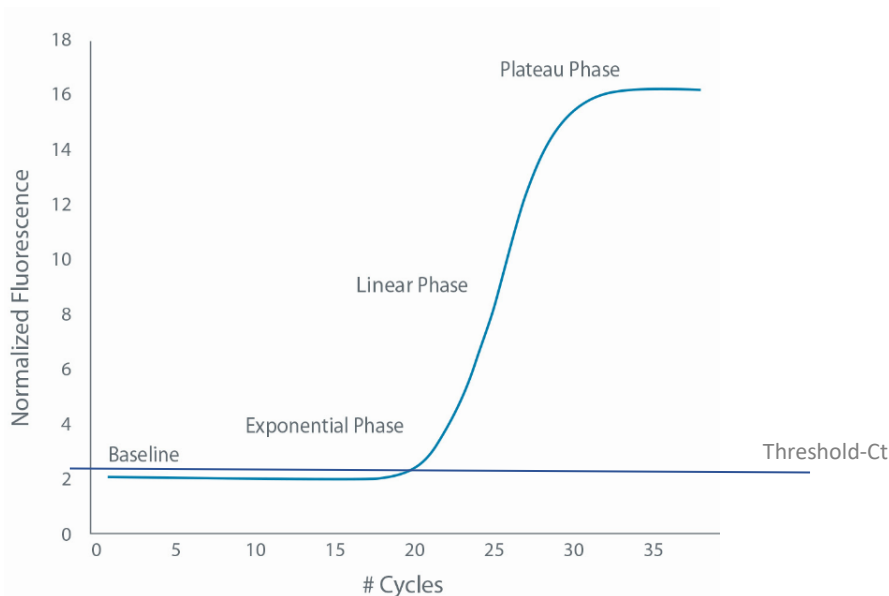
Στη παρούσα φάση θα αναφερθούμε στην φθορίζουσα χρωστική SYBRGREEN γιατί αυτή χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις qPCR που πραγματοποιήθηκαν. Η SYBRGREEN εκπέμπει φθορισμό σε μήκος κύματος 520 nm, δηλαδή στο πράσινο φάσμα φωτός. Η πιο σημαντική ιδιότητα αυτής της χρωστικής είναι η επιλεκτική πρόσδεση μόνο σε δίκλωνο DNA και όχι σε μονόκλωνο. Η δέσμευση της στο δίκλωνο DNA επιτρέπει την αλλαγή της διαμόρφωσης του μορίου της χρωστικής με αποτέλεσμα να αυξάνεται η εκπομπή φθορισμούς μέχρι και 200 φορές περισσότερο, συγκριτικά με τα ελεύθερα μόρια της χρωστικής που βρίσκονται στο διάλυμα.



Εικόνα 20: Λειτουργία της φθορίζουσας χρωστικής SYBRGREEN

Κατά την διάρκεια της αντίδρασης της qPCR διαφαίνονται κάποια στάδια:

- Φάση εκκίνησης (Baseline): Η ποσότητα του δίκλωνου DNA είναι αρκετά μικρή με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται φθορισμός
- Εκθετική Φάση (Exponential Phase): Η ποσότητα του δίκλωνου DNA αυξάνεται εκθετικά. Προς το τέλος αυτής της φάσης, κάθε δίκλωνο DNA διπλασιάζεται και η ανίχνευση του φθορισμού φτάνει στο μέγιστο. Η ποσοτικοποίηση είναι δυνατόν να συμβεί μόνο σε αυτό το στάδιο.
- Γραμμική Φάση (Linear Phase): Εμφανίζεται ενίσχυση σε ένα βαθμό, όμως οφείλεται στα παραπροϊόντα και όχι στο δίκλωνο DNA-στόχο (πχ. Διμερή εκκινητών).
- Φάση επιπέδωσης- πλατώ (Plateau Phase): Το δίκλωνο DNA αντιγράφεται σε πολύ μικρό ρυθμό, καθώς τα αντιδραστήρια έχουν αρχίσει να εξαντλούνται. Δεν παρατηρείται αύξηση στον φθορισμό, γι' αυτό και δημιουργείται ένα πλατώ-ευθεία στο γράφημα.



Εικόνα 21: Οι φάσεις μίας αντίδρασης qPCR

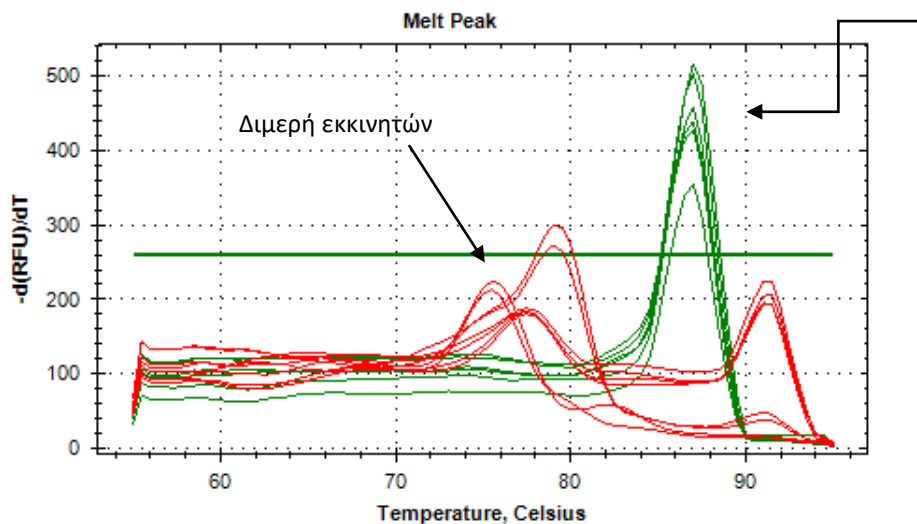
Μπορεί να ορισθεί κάποιο κατώφλι φθορισμού κάτω από το οποίο οι τιμές του φθορισμού δεν είναι στατιστικά σημαντικές και το οποίο συνήθως σηματοδοτεί και την μετάβαση στην εκθετική φάση. Αυτό ορίζεται είτε αυτόματα από το ειδικό λογισμικό του θερμοκυκλοποιητή είτε χειροκίνητα από πιο έμπειρους χρήστες.

Το κατώφλι φθορισμού Ct (cycle threshold) αντιστοιχεί σε αυτόν τον κύκλο της αντίδρασης, κατά τον οποίο η ανίχνευση φθορισμού έχει πλέον στατιστικά σημαντικές τιμές. Είναι ξεχωριστό για κάθε δείγμα αφού διαφέρει η ποσότητα αρχικού DNA. Οι κύκλοι της αντίδρασης που απαιτούνται για να ξεπεραστεί το κατώφλι είναι αντιστρόφως ανάλογοι με την αρχική ποσότητα DNA που περιέχεται στο δείγμα. Ακόμη, με βάση την τιμή Ct είναι δυνατόν να υπολογιστεί και η διαφορά της ποσότητας του DNA δύο δειγμάτων. Αυτό γίνεται αφαιρώντας τους Ct κύκλους τους, δηλαδή εφαρμόζοντας την σχέση:

$$\Delta Q = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct2-Ct1)} \quad (\text{όπου } \Delta Q \text{ η διαφορά της ποσότητας DNA})$$

Στις αντιδράσεις qPCR εκτός από το προϊόν που ενισχύεται πολλές φορές ανιχνεύονται και παραπροϊόντα, όπως διμερή εκκινητών ή τμήματα που έχουν ενισχυθεί από λάθος επειδή οι εκκινητές υβρίδισαν σε εκείνο το σημείο. Αυτά μπορούν να εντοπιστούν βάσει του φθορισμού που εκπέμπουν και να οπτικοποιηθούν στην καμπύλη τήξης (melt curve) των δειγμάτων. Έτσι, καθώς κάθε προϊόν έχει και διαφορετική θερμοκρασία τήξης (T_m) μπορεί να γίνει και ο έλεγχος από την καμπύλη τήξης. Μπορούμε λοιπόν να διακρίνουμε τα προϊόντα-στόχους ($T_m \Rightarrow 80^\circ\text{C}$) από τα διμερή εκκινητών (T_m κυμαίνεται στους $70-75^\circ\text{C}$)

Προϊόντα-στόχοι



Εικόνα 22: Καμπύλη τήξης

Για να γίνει η ποσοτικοποίηση του DNA στα δείγματα κατά την αντίδραση είναι απαραίτητο να υπάρχει και μία πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Η καμπύλη αυτή προκύπτει από διαδοχικές αραιώσεις δειγμάτων, στα οποία όμως είναι ήδη γνωστή η ποσότητα των μορίων του DNA που περιέχουν. Έτσι είναι δυνατό να υπολογιστεί με μεγάλη ακρίβεια και η ποσότητα των αντιγράφων που περιέχονται και στα άγνωστα δείγματα.

Επίσης, κατά το πέρας της αντίδρασης κατασκευάζεται και μία καμπύλη αποτελεσματικότητας της αντίδρασης qPCR. Στον άξονα y τοποθετούνται οι τιμές C_t σε κάθε κύκλο της αντίδρασης ενώ στον άξονα x ο δεκαδικός λογάριθμος γνωστών αραιώσεων DNA. Από αυτό το γράφημα υπολογίζονται τιμές, οι οποίες θα δείξουν κατά πόσο τα αποτελέσματα είναι στατιστικώς σημαντικά και την απόδοση της αντίδρασης. Οι παράμετροι που λαμβάνονται υπόψιν είναι:

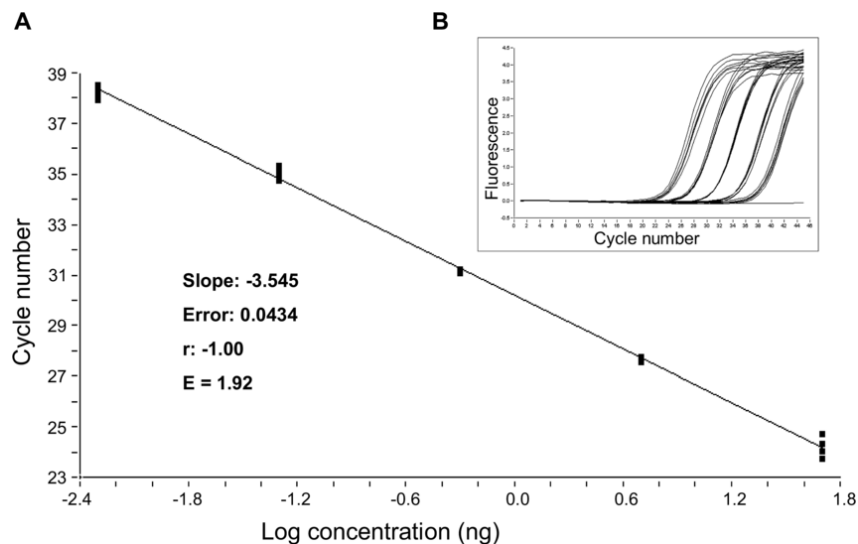
Κλίση της ευθείας (slope): Αποτελεί ένα μέτρο της απόδοσης της αντίδρασης. Τιμές από -3.58 μέχρι και -3.10 είναι αρκετά καλές ως ένδειξη.

Αποτελεσματικότητα (efficiency): Η τιμή αυτή μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την αντίδραση που διενεργήθηκε. Η ιδανική τιμή της θα ήταν 100% , που σε αυτή τη περίπτωση μεταφράζεται ως τον διπλασιασμό όλων των αντιγράφων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης κατά την εκθετική φάση. Σε μία καλή αντίδραση θα πρέπει να κυμαίνεται από $90\% - 110\%$. Υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την αποτελεσματικότητά της αντίδρασης, όπως η περιεκτικότητα σε CG βάσεις και το μήκος του τμήματος που ενισχύεται, η ποιότητα της πολυμεράσης και οι συνθήκες τις αντίδρασης.

Συντελεστής συσχέτισης (Correlation coefficient- R^2): Δείχνει κατά πόσο τα τελικά δεδομένα ταιριάζουν με την καμπύλη που προέκυψε. Ιδανικά η τιμή του R^2 θα ήταν 1 αλλά και η τιμή 0.999 θεωρείται ως μέγιστη.

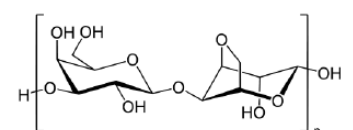


Εικόνα 23: Καμπύλη αποτελεσματικότητας (Efficiency Plot), συσχετίζει την ποσότητα DNA με τους κύκλους της αντίδρασης για τον υπολογισμό της αποτελεσματικότητας

1.3.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ⁽³⁴⁾

Η διεξαγωγή μίας αντίδρασης PCR έχει ως επακόλουθο την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα με στόχο την ανάδειξη της ενίσχυσης του επιθυμητού DNA-στόχου, στην περίπτωση της κλασσικής PCR, και την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, στην περίπτωση της qPCR. Η ηλεκτροφόρηση του δείγματος βασίζεται στον διαχωρισμό των τμημάτων DNA με βάση το μέγεθος τους. Σε πήκτωμα όπου εφαρμόζεται τάση, δημιουργείται ηλεκτρικό πεδίο και τα μόρια DNA κινούνται από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο του πεδίου λόγω του αρνητικού φορτίου που τους προσδίδει η φωσφορική ομάδα, που δομεί την αλυσίδα του DNA. Έτσι, τα μικρότερα τμήματα DNA έχουν μεγαλύτερη κινητικότητα- είναι ,δηλαδή, ικανά να διαχέονται πιο εύκολα και γρήγορα μέσα από τους πόρους της πηκτής- σε αντίθεση με τα μεγαλύτερα, και να εμφανίζονται στα πιο χαμηλά σημεία της πηκτής. Η ισχύς του πεδίου ορίζεται από το μέγεθος της πηκτής ως 10 V/cm

Για την παρασκευή της πηκτής γίνεται χρήση αγαρόζης και του ρυθμιστικού διαλύματος TAE και βρωμιούχου αιθιδίου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση αγαρόζης 1,5% κατά την παρασκευή της πηκτής, η οποία είναι ιδανική για τον διαχωρισμό μικρών τμημάτων DNA με μέγεθος 0,2 έως 0,5 kb. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από ορισμένα είδη κόκκινων φυκιών. Είναι ένα γραμμικό πολυμερές



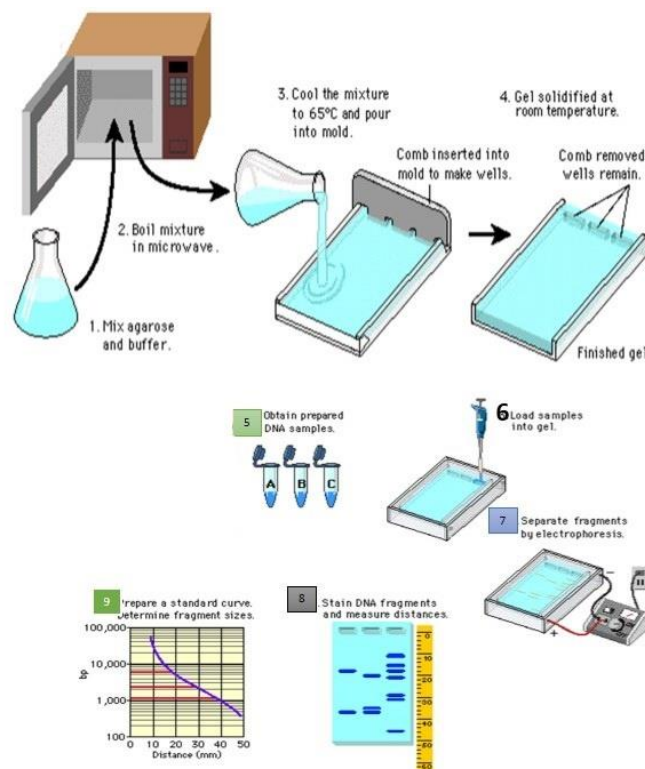
Εικόνα 24: Δομή ενός μορίου αγαρόζης

που αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μόρια β-D-γαλακτόζη και 3,6-άνυδρο-L-γαλακτοπυρανόζη. Σε υψηλές θερμοκρασίες, σε διάλυμα τα μόρια της αγαρόζης βρίσκονται σε τυχαία σπειροειδή διάταξη, ενώ κατά την μείωση της θερμοκρασίας του διαλύματος οι αλυσίδες της αγαρόζης συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου. Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες πραγματοποιείται η ζελατινοποίηση, όπου δημιουργούνται ακόμη περισσότεροι δεσμοί υδρογόνου και η δομή της πηκτής γίνεται σταθερότερη. ⁽³³⁾

Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται συνήθως είναι το TAE (pH ≈ 8.0) που αποτελείται από Tris base, οξικό οξύ και EDTA. Έχει σχετικά χαμηλή ρυθμιστική ικανότητα με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εφαρμοστούν μεγάλες τιμές τάσης.

Το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί να παρεμβαίνει στις βάσεις του δίκλωνου DNA και να καθιστά δυνατή την οπτικοποίηση των τμημάτων DNA καθώς εκπέμπει φθορισμό όταν υποβάλλεται σε φως UV. Προστίθεται στην πηκτή εξ αρχής και προσδίδει το πλεονέκτημα της παρακολούθησης της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης μέχρι το επιθυμητό επίπεδο διαχωρισμού των τμημάτων DNA.

Λίγο πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων στα «πηγαδάκια» της πηκτής, προστίθεται σε αυτά loading buffer. Το loading buffer περιέχει τη βαφή, μπλε της βρωμοφαινόλης και έχει τρεις λειτουργίες: Αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος ώστε να μπορεί να βυθιστεί με μεγαλύτερη ευκολία στο «πηγαδάκι», χρωματίζει το δείγμα με αποτέλεσμα η διαδικασία της τοποθέτησης των δειγμάτων να είναι πιο απλή αφού τα δείγματα είναι ευδιάκριτα, και η βαφή που περιέχει κατευθύνεται προς το ανοδικό σημείο του ηλεκτρικού πεδίου με αρκετά προβλέψιμο ρυθμό. ⁽³⁵⁾



Εικόνα 25: Διαδικασία κατασκευής πηκτής και ηλεκτροφόρησης δειγμάτων DNA

2. Στόχος της εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτης της επίδρασης του αντιβιοτικού sulfamethoxazole στην ανάπτυξη αντοχής των βακτηρίων του εδάφους. Πιο συγκεκριμένα, έγινε ανάλυση σε δείγματα από δύο διαφορετικούς τύπους εδάφους, από τα χωριά Ροδιά και Λιβάδι, πριν την χρήση του αντιβιοτικού και έπειτα από κάθε χορήγηση του ώστε να παρατηρηθεί, αν υπάρχει ή όχι αύξηση της ανθεκτικότητας στη μικροβιακή κοινότητα. Ταυτόχρονα, έγινε έλεγχος κατά πόσο επηρεάζεται η ανάπτυξη της αντοχής των βακτηρίων του εδάφους σε περίπτωση που το αντιβιοτικό χορηγείται είτε απευθείας στο έδαφος είτε έμμεσα, μέσω κοπράνων από χοίρους. Παράλληλα, στα πλαίσια δημιουργίας των απαραίτητων καμπύλων για την ποσοτική PCR, έγινε ανάπτυξη της μεθόδου κλωνοποίησης για το γονίδιο *qnrD*.

3. Πειραματική Διαδικασία

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του sulfamethoxazole στην μικροβιακή κοινότητα του εδάφους ακολουθήθηκαν κάποια συγκεκριμένα βήματα.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά είδη εδαφών από τα χωριά Ροδιά και Λιβάδι. Τα χαρακτηριστικά αυτών των εδαφών φαίνονται στον Πίνακα 1:

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των εδαφών Ροδιά και Λιβάδι που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία

Έδαφος	pH	Περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα (%)	Άμμος (%)	Λάσπη (%)	Πηλός-Άργιλος (%)
Λιβάδι	5.9	2.31	40.82	47.82	11.36
Ροδιά	7.9	1.37	45.82	36.0	18.18

Από προηγούμενα πειράματα ήταν γνωστό πως στο έδαφος Ροδιά, ως πιο αλκαλικό, η αποικοδόμηση του αντιβιοτικού ήταν αρκετά γρήγορη ενώ, αντίθετα, στο έδαφος Λιβάδι, με πιο όξινο pH, η αποικοδόμηση του αντιβιοτικού ήταν αρκετά αργή ή ακόμη μπορεί και να μην συνέβαινε καθόλου.

Στα εδάφη αυτά, λοιπόν, εφαρμοστήκαν επαναλαμβανόμενες δόσεις του αντιβιοτικού με σκοπό να ασκηθεί εξελικτική πίεση στα βακτήρια του εδάφους και να αρχίσουν να αποκτούν αντοχή. Η εφαρμογή του αντιβιοτικού έγινε είτε απευθείας στο έδαφος είτε έμμεσα με την χρήση περιττωμάτων από χοίρους.

Χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό sulfamethoxazole, όπου η συγκέντρωση του υπολογίστηκε σε προηγούμενα πειράματα και είχε τελική τιμή 2,5 mg/g εδάφους. Στη περίπτωση προσθήκης περιττωμάτων, αυτά αποτελούσαν το 2% του δείγματος. Έπειτα, όλα τα δείγματα επωάστηκαν στους 25°C για 25 ημέρες και στην συνέχεια, έγινε δειγματοληψία και επαναχορήγηση αντιβιοτικού. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3

φορές, δηλαδή τελικά εφαρμόστηκαν τρεις κύκλοι χορήγησης του αντιβιοτικού στα δύο εδάφη.

Τα δείγματα λαμβάνονταν σε τριπλέτες και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη μέχρις ότου γίνει και η τελευταία δειγματοληψία. Επόμενο βήμα ήταν η εκχύλιση DNA (DNA extraction) από τα δείγματα εδάφους. Στη διαδικασία εκχύλισης DNA από τα δείγματα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που δίνεται από το αντίστοιχο kit.

Στη συνέχεια μετρήθηκε η ποσότητα του DNA που εκχυλίστηκε από κάθε δείγμα με το μηχάνημα Qubit. Ακόμη, επιτελέστηκαν για κάθε από τα τέσσερα γονίδια ενδιαφέροντος (*sul1*, *qnrD*, *int1*, *16rRNA*), ξεχωριστές αντιδράσεις qPCR με στόχο να γίνει η ποσοτικοποίηση της ποσότητας του DNA των γονιδίων αυτών στα δείγματα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι απαραίτητο να επεξεργαστούν περαιτέρω μέσω στατιστικών αναλύσεων για την βέλτιστη ερμηνεία τους.

Πριν την διεξαγωγή των αντιδράσεων qPCR, είναι απαραίτητη η κλωνοποίηση των γονιδίων που θα μελετηθούν σε πλασμιδιακούς φορείς, με στόχο την δημιουργία υδατικών διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων για την χρήση τους ως πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Οι καμπύλες αναφοράς για τα συγκριμένα γονίδια (*sul1*, *int1*, *16srRNA*) υπήρχαν ήδη στο εργαστήριο, γι' αυτό και η διαδικασία της κλωνοποίησης σε πλασμιδιακούς φορείς έγινε μονάχα για το γονίδιο *qnrD* (ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά κινολονών).

Κατά την διαδικασία της κλωνοποίησης είναι απαραίτητο να γίνει πρώτα μία αντίδραση PCR, ώστε να γίνει έλεγχος ύπαρξης του επιθυμητού γονιδίου που θα εισαχθεί σε φορείς και πολλαπλασιασμός του. Ακόμη, διεξάγετε καθαρισμός του τελικού προϊόντος της αντίδρασης PCR για την απομάκρυνση αλάτων και ενζύμων που πιθανών να λειτουργούν ως παρεμποδιστές στα επόμενα στάδια της κλωνοποίησης. Η διαδικασία PCR- clean up γίνεται με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου που παρέχετε από το αντίστοιχο kit. Επόμενο βήμα είναι η μέτρηση της συγκέντρωσης του καθαρού προϊόντος που προέκυψε με το μηχάνημα Qubit. Στη συνέχεια ξεκινά η διαδικασία της πέψης των πλασμιδίων για την ενσωμάτωση του επιθυμητού γονιδίου. Έπειτα από ολονύκτια επώαση ακολουθεί ο μετασχηματισμός των πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα *E.coli* με την μέθοδο του θερμικού σοκ. Η καλλιέργεια των βακτηρίων μετά τον μετασχηματισμό επιστρώνεται σε τριβλία όπου στο θρεπτικό υλικό προστίθεται και ο X-gal, ώστε κατά την ανάπτυξη αποικιών να είναι δυνατή η επιλογή αυτών με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Με το κατάλληλο kit απομονώνεται το πλασμιδιακό DNA από τα βακτήρια που φέρουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και γίνεται μία τελευταία αντίδραση PCR για την επιβεβαίωση πως η κλωνοποίηση ήταν επιτυχημένη. Τα δείγματα με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, τελικά, στέλνονται προς αλληλούχηση με σκοπό να γίνει ένας τελευταίος έλεγχος για την κλωνοποίηση που διενεργήθηκε.

4.Υλικά και Μέθοδοι

4.1. Εγχύσεις αντιβιοτικού στο έδαφος ή σε κόπρανα χοίρου και δειγματοληψία

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε το αντιβιοτικό σουλφαμεθοξαζόλη και ειδικότερα το εμπορικό σκεύασμα, Sulfamethoxazole-Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, ΗΠΑ, καθαρότητα 99,9%. Τα κόπρανα χοίρων παραλήφθηκαν από τοπική φάρμα όπου στα ζώα δεν χορηγούνται κτηνιατρικά αντιβιοτικά. Η πρώτη δειγματοληψία έγινε αμέσως μετά την πρώτη εφαρμογή του αντιβιοτικού στο κάθε έδαφος και σε κάθε διαφορετική κατάσταση. Οι επόμενες δειγματοληψίες (2^η και 3^η) είναι την χρονική στιγμή πριν την επόμενη έγχυση αντιβιοτικού και σε χρονικό διάστημα 25 ημερών.

4.2. Εκχύλιση DNA από δείγματα εδάφους

Η απομόνωση γενετικού υλικού έγινε από 0,25 g εδάφους κάθε δείγματος και με το κιτ DNeasy Powersoil Pro Kit, Qiagen σύμφωνα με το πρωτόκολλο που παρέχεται από τον κατασκευαστή. Στα Powerbread Pro Tubes προστίθεται τα 250 mg του δείγματος και 800 µl διαλύματος CD1. Εφαρμόζεται έντονο vortex για 30s και έπειτα φυγοκέντρηση σε 15,000 g για 1 min. Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε Microcentrifuge Tube (περίπου 500-600 µl) και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 200 µl από το διάλυμα CD2 και vortex για 5s. Τα δείγματα τοποθετούνται για φυγοκέντρηση σε 15,000 g για 1 min και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα 700 µl από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε νέο Microcentrifuge Tube και προστίθενται 600 µl από το διάλυμα CD3 και vortex για 5s. Τα 650 µl από το Microcentrifuge Tube μεταφέρονται σε MB Spin Column και οδηγούνται προς φυγοκέντρηση σε 15,000 g για 1 min. Απορρίπτεται το διήθημα και επανατοποθετούνται για φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Η στήλη (column) μεταφέρεται προσεκτικά σε καθαρό Collection Tube και 500 µl του διαλύματος EA εισάγονται σε αυτή. Επόμενο βήμα είναι η φυγοκέντρηση τους σε 15,000 g για 1 min. Το διηθημένο υγρό απορρίπτεται και προστίθενται 500 µl του διαλύματος C5. Άλλη μία φορά φυγοκέντρηση σε 15,000 g για 1 min και η στήλη τοποθετείται σε νέο Collection Tube. Εφαρμόζεται φυγοκέντρηση σε 16,000 g για 2 min και η στήλη μεταφέρεται σε καθαρό Elution Tube. Τέλος, προστίθενται 100 µl από το διάλυμα C6 στο κέντρο της μεμβράνης, επωάζονται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται για 1 min σε 15,000 g. Αφαιρείται η στήλη και πλέον το DNA είναι έτοιμο για επόμενες πειραματικές διαδικασίες.

Πίνακας 2: Λειτουργίες των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκχύλιση του DNA

Διαλύματα	Λειτουργίες
CD1	Περιέχει SDS και ουσίες που είναι απαραίτητα για την λύση των κυττάρων. Το SDS καταστρέφει τα λιπαρά οξέα και λιπίδια της μεμβράνης.
CD2	Κατακρήμνιση οργανικών και μη ουσιών -εκτός του DNA- συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών και υπολειμμάτων του κυττάρου.
CD3	Κατακρήμνιση οργανικών και μη ουσιών -εκτός του DNA- συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών και υπολειμμάτων του κυττάρου.
EA	Υψηλή συγκέντρωση σε άλατα, επιτρέπει στο DNA να προσδεθεί στην MB Spin Column και να απομακρυνθούν οργανικά και μη οργανικά μόρια.
C5	Διάλυμα έκλουσης με βάση την αιθανόλη, αφαιρεί άλατα και άλλα στοιχεία χωρίς να επηρεάζει το προσδεμένο DNA
C6	Βοηθά στην απελευθέρωση του DNA από την μεμβράνη.

4.3. Μέτρηση ποσότητας DNA

Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο από το Qubit Assays, Invitrogen και μετρήθηκε με το Qubit 2.0 Fluorometer. Τα δείγματα προς μέτρηση είναι 84, ακόμη 2 για τα standards from kit και επιπλέον 4 σε περίπτωση σφάλματος. Ανάμειξη 90 μl Qubit reagent και 17.910 μl Qubit Buffer για την δημιουργία του Qubit working solution . Σε νέα assay tubes προστίθενται 1 μl του δείγματος προς μέτρηση και 199 μl Qubit working solution, ενώ στην περίπτωση των standards from kit προστίθενται 10 μl από το κάθε ένα και 190 μl. Όλα τα assay tubes αναδεύονται με vortex για 2-3 s και επάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min. Στη συνέχεια τοποθετούνται στο Qubit 2.0 fluorometer για την μέτρηση.

4.4. Αντίδραση PCR και PCR clean-up

Πρώτα έγινε μία αντίδραση PCR για το γονίδιο *qnrD*. Το mix της αντίδρασης περιείχε 0,4 μl BSA, 2,5 μl buffer, 0,5 μl dNTPs, 0,5 μl forward primer, 0,5 μl reverse primer, 0,1 μl Kapa Taq, 19,5 μl ddH₂O και 1 μl από το δείγμα. Σε συνθήκες 95°C για 5 min, 57°C για 1 min, 72°C για 1 min με διάρκεια 30 κύκλους και 72°C για 10 min.

Στο προϊόν της PCR εφαρμόστηκε PCR-clean up για την απομάκρυνση αλάτων και ενζύμων με το kit PCR clean up Gel extraction, Macherey-Nagel, Takata Bio USA, Inc. και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που δίνεται από τον κατασκευαστή. Προστίθεται νερό ώστε να φτάσει ο τελικός όγκος τα 100 μl και αναμειγνύεται με το buffer NT1 σε αναλογία 1:2. Σε ένα Collection Tube τοποθετείται NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column και εισάγεται 700 μl του αραιωμένου δείγματος. Γίνεται φυγοκέντρηση για 30s σε 11,000 x g και το διήθημα απορρίπτεται. Εισάγεται ακόμη όσο από το δείγμα απέμεινε, φυγοκεντρείται και απορρίπτεται πάλι το διήθημα. Προστίθενται 700 μl από το buffer NT3 και τοποθετούνται τα δείγματα για φυγοκέντρηση για 30s σε 11,000 x g. Απορρίπτεται το διήθημα και επαναλαμβάνεται το ίδιο βήμα.

Εφαρμόζεται άλλη μία φυγοκέντρηση για 1 min σε 11,000 x g ώστε να αφαιρεθεί όσο από το buffer είχε απομείνει. Η στήλη NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column τοποθετείται σε νέο microcentrifuge tube και προστίθεται 30 µl Buffer NE. Επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min και γίνεται μία τελευταία φυγοκέντρηση για 1 min σε 11,000 x g.

Πίνακας 3: Λειτουργίες των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την διαδικασία του καθαρισμού προϊόντος της PCR

Ρυθμιστικά Διαλύματα	Λειτουργίες
NT1	Περιέχει χαοτροπικά άλατα- διευκολύνει την πρόσδεση του DNA στην μεμβράνη της στήλης
NT3	Περιέχει αιθανόλη, απομάκρυνση παρεμποδιστών
NE	Μικρή περιεκτικότητα σε άλατα, ιδανικό για την έκπλυση του DNA (5 mM Tris/HCl, pH 8.5)

4.5. Κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς

Για την κλωνοποίηση του DNA σε πλασμίδια χρησιμοποιείται ο φορέας p-GEM-T. Κατά την αντίδραση της σύνδεσης (ligation) σε κάθε δείγμα προστίθεται 5 µl 2X Rapid Ligation Buffer - T4 DNA Ligase, 1 µl pGEM-T vector (50 ng), 1 µl T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl), ddH₂O και προϊόν PCR όπου οι ποσότητες δεν είναι προκαθορισμένες αλλά ορίζονται ανάλογα με την ποσότητα DNA κάθε δείγματος και, τελικά, ο όγκος της αντίδρασης να είναι συνολικά 10 µl. Τα δείγματα επωάζονται όλο το βράδυ στους 4°C.

Η ποσότητα του προϊόντος PCR υπολογίζεται με την σχέση:

$$\frac{ng \text{ του φορέα } \times kb \text{ της αλληλουχίας που θα εισαχθεί}}{kb \text{ του φορέα}} \times \frac{3}{1} = ng \text{ του δείγματος που απαιτείται}$$

Για τον μετασηματισμό χρησιμοποιούνται δεκτικά κύτταρα E.Coli (DH5A cells). Σε αποστειρωμένο Eppendorf τοποθετούνται 50 µl δεκτικών κυττάρων και 1,25 µl από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και ανακινούνται ελαφρώς. Αφήνονται για 30 min στον πάγο και αμέσως μεταφέρονται για επώαση στους 42°C για 55 s. Επανατοποθετούνται στον πάγο για ακόμη 2 min. Έπειτα σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon προστέθηκαν υπό φλόγα 1000 µl αποστειρωμένου θρεπτικού LB και όλο το δείγμα και οι καλλιέργειες επώαστηκαν υπό ανάδευση για 1h και 30 min στους 37°C. Στη συνέχεια σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής και υπό φλόγα επιστρώθηκαν 250 µl από τις καλλιέργειες σε τριβλία με LB και αμπικιλίνη. Ακόμη, επιστρώθηκαν 40 µl X-Gal (2%) και 8 µl IPTG. Τα τριβλία επώαστηκαν για 20 h στους 37°C. Επόμενο βήμα είναι η επιλογή, σε ασηπτικές συνθήκες, των άσπρων αποικιών και ανάμειξη με 5ml LB. Οι καλλιέργειες τοποθετούνται για επώαση στους 37°C υπό ανάδευση για 16-20 h.

4.6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Με τη βοήθεια του κιτ Plasmid DNA Purification, Macherey-Nagel, Clontech Laboratories, Inc. έγινε η απομόνωση από τα βακτήρια E. Coli. Από τις καλλιέργειες λαμβάνετε 1 ml και φυγοκεντρείται για 30 s σε 11,000 x g. Απορρίπτεται το υπερκείμενο προσεκτικά και προστίθενται 250 μl από το Buffer A1. Αναδεύεται ελαφρά με vortex έως ότου διαλυθεί το πέλλετ και προστίθενται 250 μl από το Buffer A2. Προσεκτικά αναδεύεται με ανακίνηση του tube 6-8 φορές. Στη συνέχεια επώζεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Εισάγονται ακόμη 300 μl του Buffer A3 και αναδεύεται ελαφρώς με ανακίνηση του tube 6-8 φορές μέχρι να αποχρωματιστεί το δείγμα. Εφαρμόζεται φυγοκέντρηση για 5 min σε 11,000 x g και επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά ώστε το υπερκείμενο να είναι διαυγές. Τοποθετείται το NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid) Column σε καθαρό Collection Tube και μεταφέρεται το υπερκείμενο. Γίνεται φυγοκέντρηση για 1 min σε 11,000 x g και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται ώστε να φυγοκεντρηθεί όλο το υπερκείμενο. Προστίθενται 500 μl του Buffer AW, το οποίο έχει προθερμαθεί στους 50°C, και εφαρμόζεται άλλη μια φυγοκέντρηση για 1 min σε 11,000 x g. Εγχέονται ακόμη 600 μl του Buffer A4 και φυγοκεντρείται για 1 min σε 11,000 x g. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται φυγοκέντρηση για 2 min σε 11,000 x g. Αφαιρείται το Collection Tube και το NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid) Column τοποθετείται σε ένα microcentrifuge tube. Προστίθενται 50 μl από το Buffer AE. Τα δείγματα αφήνονται για επώαση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, επιτελείται φυγοκέντρηση για 1 min σε 11,000 x g.

Πίνακας 4: Λειτουργίες των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση του γενετικού υλικού από πλασμιδιακούς φορείς

Ρυθμιστικά Διαλύματα	Λειτουργίες
A1	Επαναδιαλυτοποίηση των βακτηρίων από την φυγοκέντρηση
A2	Περιέχει SDS και προκαλεί αλκαλική λύση των κυττάρων E.Coli
A3	Εξουδετερώνει ό,τι προέκυψε από τη λύση των κυττάρων και δημιουργεί τις κατάλληλες συνθήκες για την πρόσδεση του DNA στην μεμβράνη της στήλης
AW	Αυξάνει το βάθος της ανάγνωσης κατά την αλληλούχηση, σε δείγματα με υψηλά επίπεδα νουκλεασών.
A4	Περιέχει αιθανόλη-Απομακρύνει άλατα, μεταβολίτες και διαλυτά μακρομόρια
AE	Μικρή περιεκτικότητα σε άλατα, ιδανικό για την έκπλυση του DNA

4.7. Ποσοτική PCR (qPCR)

Διενεργήθηκαν 4 διαφορετικές αντιδράσεις εφαρμόζοντας το ίδιο πρωτόκολλο αλλά διαφορετικές συνθήκες για το κάθε γονίδιο. Σε όλα τα γονίδια το mix της αντίδρασης περιείχε 5 μl Subrgreen, 0,2 μl BSA, 0,1 μl forward primer, 0,1 μl reverse primer και 3,6 μl H₂O και κάθε φορά προσαρμοζόταν στις ποσότητες που χρειαζόνταν. Για τα γονίδια *sul1* και *qnrD* οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 95°C για 3 min, 95°C για 15s και 60°C για 30s με διάρκεια 40 κύκλους. Το γονίδιο *intl1* απαιτούσε 95°C για 3 min, 95°C για 30s, 62°C για 30s και 72°C για 1 min με διάρκεια 35 κύκλους. Για το γονίδιο *16s* οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν 95°C για 3 min, 95°C για 15s και 62°C για 20s με διάρκεια 40 κύκλους. Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν:

Πίνακας 5: Αλληλουχίες των εκκινητών των γονιδίων

Γονίδιο	Forward Primer (5'- 3')	Reverse Primer (5'- 3')	Amplicon size (bp)
<i>sul1</i>	GACTGCAGGCTGGTGGTTAT	GAAGAACCGCACAATCTCGT	105
<i>qnrD</i>	ACGACAGGAATAGCTTGGGAAGG	TCAGCCAAAGACCAATCAAACG	373
16s rRNA	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG (Eub338)	ATTACCGCGGCTGCTGG (Eub518)	200
<i>intl1</i>	ACATGCGTGTAATCATCGTCG (HS464F)	CTGGATTCGATCACGGCACG (HS463aR)	200

4.8. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά το πέρας κάθε αντίδρασης, διενεργείται ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Για την δημιουργία των πηκτών χρησιμοποιήθηκε AgaPure Agarose LE (Standard Agarose), Canvax και ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1x). Η συγκέντρωση του τελικού διαλύματος πηκτής σε αγαρόζη ήταν 1,5%. Οι πηκτές ηλεκτροφορήθηκαν στα 100 V και 110 V αντίστοιχα, ανάλογα με το μέγεθος τους.

4.9. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του RStudio, δηλαδή με τη βοήθεια του λογισμικού R 4.2.0. Αρχικά επιτελέστηκε η ανάλυση ANOVA με σκοπό να εξακριβωθεί αν τα αποτελέσματα των qPCR είναι στατιστικώς σημαντικά. Αφού έγινε η ανάλυση ANOVA και τα αποτελέσματα ήταν στατιστικώς σημαντικά, διενεργήθηκε και το Tukey's honestly significant differences (HSD) τεστ, σύμφωνα με το οποίο μπορεί να βρεθούν μέσες τιμές που διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, και στη συνέχεια δημιουργήθηκε ένα γράφημα barplot για την απεικόνιση των διαφορών μεταξύ των αντιγράφων του γονιδίου *sul1*, *qnrD* και του *intl1*, και των εκάστοτε μεταχειρίσεων.

5. Αποτελέσματα

5.1. Εκχύλιση DNA και μέτρησης ποσότητας

Έπειτα από τη δειγματοληψία έγινε εκχύλιση του γενετικού υλικού που βρίσκεται στα δείγματα έδαφος. Επόμενο βήμα, όπως προαναφέρθηκε, ήταν η μέτρηση της ποσότητας που εκχυλίστηκε και τα αποτελέσματα φαίνονται στους Πίνακες 6 και 7:

Όλες οι ποσότητες είναι εκφρασμένες σε ng/μl.

T0: απευθείας με την πρώτη έγχυση αντιβιοτικού

C1,T25: Πρώτος κύκλος χορήγησης αντιβιοτικού με χρονική διαφορά 25 ημερών

C2,T25: Δεύτερος κύκλος χορήγησης αντιβιοτικού με χρονική διαφορά 25 ημερών

C3,T25: Τρίτος κύκλος χορήγησης αντιβιοτικού με χρονική διαφορά 25 ημερών

L: Έδαφος Λιβιάδι

L+M: Έδαφος Λιβάνη με προσθήκη κοπράνων

R: Έδαφος Ροδιά

R+M: Έδαφος Ροδιά με προσθήκη κοπράνων

Πίνακας 6: Ποσότητα του DNA που εκχυλίστηκε από δείγματα μάρτυρα

CONTROL	T0	C1, T25	C2, T25	C3, T25
L1	6,58	12,5	11,6	6,4
L2	11,7	13,2	12	7,54
L3	7,88	13	8,24	7,16
L+M1	37,6	28,6	18,6	15,2
L+M2	23	30	18,5	14,4
L+M3	15,6	23,6	28,6	11,7
R1	71,4	63,8	63,4	89,2
R2	57,4	67	48,6	85,2
R3	72,6	75,8	72,6	77,4
R+M1	71,6	85,8	88,6	73,4
R+M2	58	70,8	75,2	98,4
R+M3	73,2	90,8	115	85

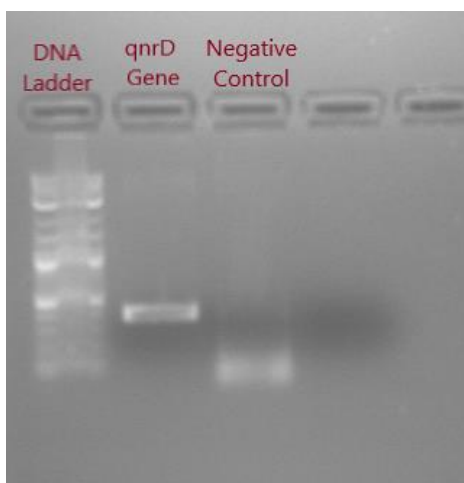
Πίνακας 7: Ποσότητα του DNA που εκχυλίστηκε από δείγματα που είχε χορηγηθεί και αντιβιοτικό

SULFAMETHOXAZOLE	C1, T25	C2, T25	C3, T25
L1	18,4	25,6	8,42
L2	21,6	32,6	3,9
L3	20,2	36,2	4,38
L+M1	28,4	45,8	34
L+M2	21,4	48,6	35
L+M3	25,8	29,4	13,6
R1	80,2	54,8	52
R2	65,8	83,2	48,6
R3	65,4	54	44,6
R+M1	108	130	89
R+M2	88,2	80,6	51
R+M3	89	101	76,6

5.2. Αντίδραση PCR, κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς και αλληλούχηση

Αφού εκτελέστηκε η αντίδραση PCR, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πηκτή για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων της αντίδρασης. Παρακάτω απεικονίζεται το δείγμα για το οποίο διεξάχθηκε η αντίδραση. Μετά την διαδικασία της κλωνοποίησης, η καλλιέργεια επιστρώθηκε σε τριβίο για την ανάπτυξη αποικιών και την μετέπειτα επιλογή των επιθυμητών από αυτές. Στην εικόνα φαίνονται οι αποικίες των ανασυνδυασμένων βακτηρίων με λευκό χρώμα και των μη ανασυνδυασμένων με μπλε χρώμα.

Το γενετικό υλικό που απομονώθηκε από τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια στάλθηκε στη συνέχεια για αλληλούχηση ωστόσο τα αποτελέσματα δεν έχουν παραληφθεί ακόμη.



Εικόνα 26: Ηλεκτροφόρηση δείγματος μετά από αντίδραση PCR



Εικόνα 27: Αποικίες βακτηρίων με ανασυνδυασμένα και μη βακτήρια

5.3. Ποσοτική PCR (qPCR)

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπυλών με διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, απαραίτητες για την επίτευξη μιας αντίδρασης qPCR. Παρατηρώντας την τιμή του R^2 , διαπιστώνεται πως οι καμπύλες που δημιουργήθηκαν ήταν αρκετά επιτυχημένες και ικανές να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την αντίδραση qPCR. Οι καμπύλες των γονιδίων παρατίθενται παρακάτω:

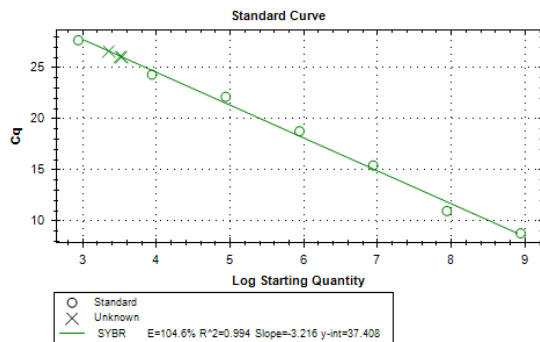


Figure 1: Καμπύλη γονιδίου *sul1*

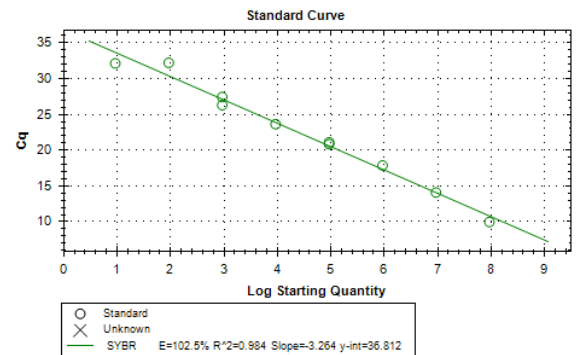


Figure 2: Καμπύλη γονιδίου *qnrD*

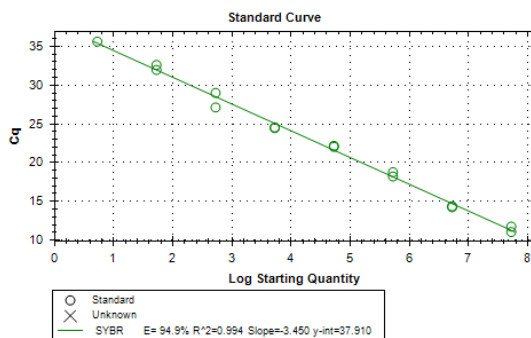


Figure 3: Καμπύλη γονιδίου *int1*

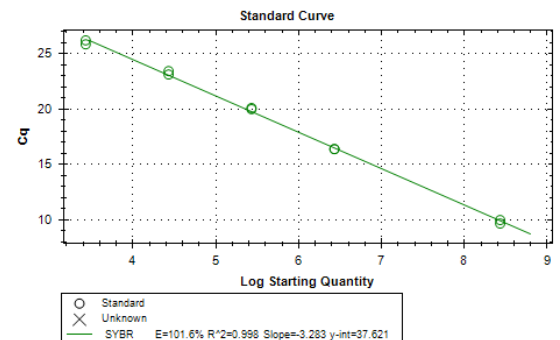


Figure 4: Καμπύλη γονιδίου *16SrRNA*

Στη συνέχεια τα αποτελέσματα των αντιδράσεων κανονικοποιήθηκαν ως προς το γονίδιο *16SrRNA* καθώς είναι ένα γονίδιο με ιδιόσυστατη λειτουργία και βρίσκεται σε όλα τα βακτηριακά είδη, και τελικά πραγματοποιήθηκε η ανάλυση ANOVA.

Η ανάλυση ANOVA είχε τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στον πίνακα:

Έδαφος Ροδιά:

Πίνακας 8: Αποτελέσματα της ανάλυσης ANOVA για τα δείγματα του εδάφους Ροδιά

<i>sul1/16SrRNA</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
<i>sul1-combined</i>	3	0.003958	0.0013194	2.951	0.0474 *
Residuals	32	0.014309	0.0004472		

<i>qnrD/16SrRNA</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
<i>sul1-combined</i>	3	7.810e-10	2.603e-10	3.84	0.0187 *
Residuals	32	2.169e-09	6.779e-11		

<i>int1/16SrRNA</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
<i>sul1-combined</i>	3	0.0002557	8.522e-05	1.751	0.176
Residuals	32	0.0015578	4.868e-05		

Signifi. Codes: 0, 0.001 '***' 0.001, 0.01 '**' 0.01, 0.05 '*' 0.05, 0.1 '.'

Έδαφος Λιβάδι:

Πίνακας 9: Αποτελέσματα της ανάλυσης ANOVA για τα δείγματα από το έδαφος Λιβάδι

<i>sul1/16SrRNA</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
<i>sul1-combined</i>	3	0.00487	0.001624	1.239	0.312
Residuals	32	0.04195	0.001311		

<i>qnrD/16SrRNA</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
<i>sul1-combined</i>	3	3.010e-08	1.003e-08	1.383	0.266
Residuals	32	2.322e-07	7.255e-09		

<i>int1/16SrRNA</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
<i>sul1-combined</i>	3	0.0004924	1.641e-04	3.476	0.0272*
Residuals	32	0.0015108	4.721e-05		

Signifi. Codes: 0, 0.001 '***' 0.001, 0.01 '**' 0.01, 0.05 '*' 0.05, 0.1 '.'

Επόμενο βήμα ήταν η διενέργεια του Tukey's honestly significant differences (HSD) τεστ από το οποίο και κατασκευάστηκαν τα ραβδογράμματα για την παρατήρηση των διαφορών μεταξύ των μεταχειρίσεων και της γονιδιακής έκφρασης.

Λόγω τις χαμηλής στατιστικής σημαντικότητας των αποτελεσμάτων ανά των κύκλων εφαρμογής, δόθηκε έμφαση στον τρόπο εφαρμογής του αντιβιοτικού (άμεσα στο έδαφος ή μέσω της κοπριάς).

Παρακάτω φαίνονται τα ραβδογράμματα του γονιδίου *sul1*, *qnrD* και του *intl1* ως προς το 16S rRNA γονίδιο αντίστοιχα, με την στατιστική σημαντικότητα να επισημαίνεται με τα γράμματα a,b,c και d.

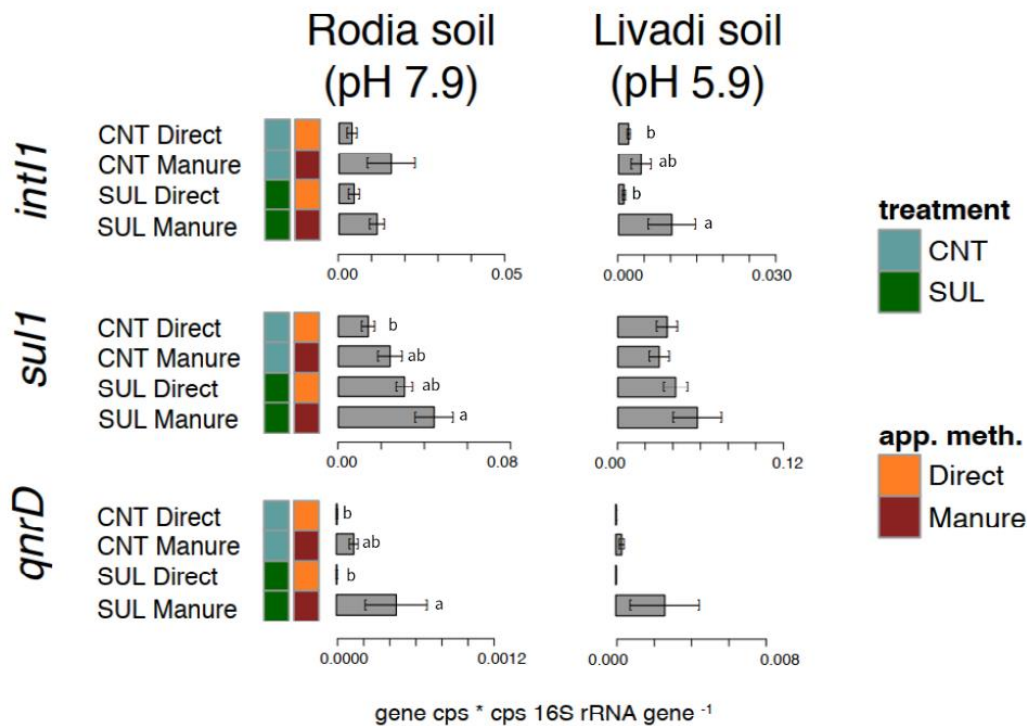


Figure 5: Ραβδογράμματα που δείχνουν τις διαφορές στην σχετική αφθονία κάθε γονιδίου ως προς τα ολικά αντίγραφα του 16S rRNA γονιδίου ανάλογα με το έδαφος, τη μεταχείριση και τον τρόπο χορήγησης του αντιβιοτικού sulfamethoxazole. Το *p*-value είναι για το γονίδιο *intl1*: 0,176 (Rodia) και 0,0272 (Livadi), για το γονίδιο *sul1*: 0,0474 (Rodia) και 0,312 (Livadi) και για το γονίδιο *qnrD*: 0,0187 (Rodia) και 0,266 (Livadi). Τα γράμματα που φαίνονται στα ραβδογράμματα καταδεικνύουν τις ομάδες σημαντικότητας των διαφορών ($\alpha \leq 0.05$).

6. Συζήτηση

Το έδαφος έχει μία αρκετά περίπλοκη δομή με οργανικές ενώσεις και πάρα πολλά είδη ζωντανών οργανισμών όπως μύκητες, αρθρόποδα, σκουλήκια, βακτήρια και διάφορους άλλους ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς. Τα βακτήρια όμως αποτελούν το πιο σημαντικό κομμάτι του οικοσυστήματος του εδάφους.⁽³⁶⁾ Πολλά από αυτά χρησιμεύουν ως αποικοδομητές και άλλα βοηθούν στην δέσμευση του αζώτου από το ριζικό σύστημα των φυτών ενώ πολλά αποτελούν τροφή για πρώτιστα.⁽³⁶⁾

Ένας μεγάλος αριθμός των βακτηρίων του εδάφους προέρχονται από την χλωρίδα του εντέρου των ζώων σε περιπτώσεις οργανικής λίπανσης προερχόμενης από κοπριά.⁽⁴⁴⁾ Η χρήση κοπριάς από τα ζώα αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της γεωργίας για την πιο αποτελεσματική ανάπτυξη των φυτών στις καλλιέργειες.⁽⁴⁴⁾ Η κοπριά όμως που εφαρμόζεται στο έδαφος μπορεί να προέρχεται από ζώα στα οποία είτε έχουν χορηγηθεί αντιβιοτικά στο παρελθόν είτε βρίσκονται σε στάδιο που λαμβάνουν συχνότερες δόσεις αντιβιοτικών.⁽⁴¹⁾ Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε κοπριά που προήλθε από χοίρους που δεν έχουν λάβει αντιβιοτικά κατά το διάστημα της μεταχείρισης, με αποτέλεσμα ακόμη και τα βακτήρια της χλωρίδας του εντέρου των ζώων να μην έχουν έρθει προηγουμένως ή να

έχουν ελάχιστη προηγούμενη έκθεση σε σουλφαμεθοξαζόλη. Ωστόσο, παρατηρείται ότι με την προσθήκη κοπριάς στο έδαφος Ροδιά, ο αριθμός αντιγράφων των γονιδίων *sul1* και *qnrD* είναι αυξημένος ακόμη και στην περίπτωση του μάρτυρα (control). Η αύξηση αυτή που υποδηλώνει και τον πολλαπλασιασμό βακτηρίων με γονίδια ανθεκτικότητας, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ακόμη και σε ζώα που δεν λαμβάνουν αντιβιοτικά κάποια γονίδια ανθεκτικότητας είναι παρόντα ούτως ή άλλως στην χλωρίδα του εντέρου του ζώου. ⁽⁴⁰⁾ Τα γονίδια ανθεκτικότητας αυτά, μπορούν να μεταφερθούν δηλαδή με την μεταφορά των πλασμιδίων από τα βακτήρια του γαστρεντερικού συστήματος του ζώου σε βακτήρια που αποικίζουν στο έδαφος. ⁽⁴¹⁾ Σε αρκετές μελέτες, μάλιστα, βρέθηκε ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας συσχετίζονται περισσότερο με την εφαρμογή κοπριάς στο έδαφος παρά με την παρουσία κάποιου αντιβιοτικού

Όταν στο έδαφος Ροδιά προστέθηκε απευθείας το αντιβιοτικό φαίνεται ο αριθμός των αντιγράφων να είναι διπλάσιος από ότι στον μάρτυρα στην περίπτωση του γονιδίου *sul1*. Αυτό σημαίνει πως στο έδαφος υπάρχουν βακτήρια που φέρουν το συγκεκριμένο γονίδιο ανθεκτικότητας και πως στην περίπτωση που προστίθεται αντιβιοτικό, τα βακτήρια αυτά είναι ικανά να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν. Όπως αναφέρουν και οι Rauser J. et al. ⁽⁴²⁾ όπου προστίθεται σουλφαμεθοξαζόλη, όχι μόνο αυξήθηκαν τα βακτήρια που φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας αλλά και αυτό αποτέλεσε ένα ερέθισμα ώστε να εγκαθιδρυθούν και κάποιοι πληθυσμοί βακτηρίων που μπορούν να αποικοδομούν το αντιβιοτικό. ⁽⁴²⁾ Η παρουσία, δηλαδή, των γονιδίων ανθεκτικότητας δρα ως συμπληρωματικός παράγοντας της διάσπασης και αποικοδόμησης του αντιβιοτικού. Ενδεχομένως για αυτό στο έδαφος Λιβιάδι δεν διαφαίνεται κάποια αύξηση των αντιγράφων των γονιδίων, αφού το αντιβιοτικό στο συγκεκριμένο έδαφος αποικοδομείται με πολύ αργό ρυθμό. Αντίθετα, παρατηρώντας τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου *qnrD* δεν φαίνεται κάποια διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και της περίπτωσης που εφαρμόζεται το αντιβιοτικό απευθείας στο έδαφος. Είναι λογικό να μην παρατηρείται κάποια διαφορά αφού το συγκεκριμένο γονίδιο δεν προσδίδει ανθεκτικότητα στη σουλφαμεθοξαζόλη, συνεπώς και τα βακτήρια που φέρουν το *qnrD* και όχι το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας για τη σουλφαμεθοξαζόλη, δεν πολλαπλασιάζονται περαιτέρω.

Στην περίπτωση όμως που το αντιβιοτικό προστίθεται μέσω της κοπριάς, ο αριθμός αντιγράφων και των δυο γονιδίων, *sul1* και *qnrD*, βρέθηκε ακόμη πιο αυξημένος. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι με την προσθήκη κοπριάς στο έδαφος επηρεάζεται η αφθονία και η ποικιλία των γονιδίων ανθεκτικότητας που βρίσκονται στο έδαφος. Στα πειράματα τους οι Heuer et al. ⁽³⁸⁾ που χορήγησαν ένα διαφορετικό αντιβιοτικό σουλφοναμίδης και παρατηρήθηκε εξίσου αύξηση των γονιδίων ανθεκτικότητας και των γονιδίων μεταθετών στοιχείων. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και από τους Cheng et al. ⁽³⁹⁾ όπου έπειτα από την χορήγηση σουλφαμεθοξαζόλης μειώθηκε η ποικιλία των βακτηρίων στο έδαφος αλλά αυξήθηκαν σημαντικά τα αντίγραφα του γονιδίου *sul1* ενώ στα αντίγραφα των γονιδίων ανθεκτικότητας σε κινολόνες *qnrD* δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά. Παρόλα αυτά, η αυξημένη τιμή των αντιγράφων του γονιδίου *qnrD* οφείλεται, κυρίως, στη μεταφορά του από τα βακτήρια που περιέχονται στην κοπριά του ζώου και όχι τόσο στην ικανότητα των βακτηρίων φέρουν αυτό το γονίδιο να αναπτυχθούν παρουσία του αντιβιοτικού. Θεωρητικά, θα μπορούσε να παρατηρηθεί και αύξηση στον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *int1* καθώς πολύ συχνά το γονίδιο *sul1* βρίσκεται συνδεδεμένο

με την γονιδιακή κασέτα που συναντάται το *intl1* και μπορεί να επιτευχθεί οριζόντια μεταφορά. Ειδικά στην περίπτωση που ασκείται και εξελικτική πίεση μέσω των επαναλαμβανόμενων εγχύσεων του αντιβιοτικού και τα βακτήρια θα πρέπει να προσαρμοστούν για να μπορέσουν να πολλαπλασιαστούν.

Η βακτηριακή κοινότητα του εδάφους επηρεάζεται άμεσα από τη σύσταση και το pH του εδάφους καθώς και από τις εξωτερικές συνθήκες που επικρατούν.⁽⁴⁵⁾ Η σουλφαμεθοξαζόλη είναι ένα ιόν με αποτέλεσμα σε διαφορετικές τιμές pH να έχει και διαφορετική συμπεριφορά. Ωστόσο τόσο το pH από το έδαφος Λιβιάδι όσο και από το έδαφος Ροδιά έχουν τιμές στις οποίες το αντιβιοτικό εμφανίζεται με την ίδια ανιονική μορφή.⁽⁴³⁾ Το έδαφος από το Λιβιάδι που χρησιμοποιήθηκε στη μία περίπτωση έχει λίγο πιο όξινο pH και ήταν ήδη γνωστό ότι σε αυτή την τιμή του pH, το αντιβιοτικό αποικοδομείται με πιο αργό ρυθμό συγκριτικά με το έδαφος Ροδιά στους αρχικούς κύκλους εφαρμογής τουλάχιστον (Katsivelou et al.; Unpublished data). Τα αποτελέσματα από το έδαφος αυτό, εκτός του γονιδίου *intl1*, δεν ήταν στατιστικώς σημαντικά. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο pH του, καθώς επηρεάζεται η σύσταση της μικροβιακής κοινότητας με αποτέλεσμα είτε να μπορούν να αναπτύσσονται διαφορετικά βακτηριακά είδη που ίσως να μην έχουν ακόμη αποκτήσει το απαραίτητο προς επιβίωση γονίδιο ανθεκτικότητας στη σουλφαμεθοξαζόλη⁽⁴³⁾, είτε το χαμηλότερο pH σε συνδυασμό με την πιο αργή αποικοδόμηση του αντιβιοτικού πιθανώς να έδρασαν κατασταλτικά ως προς την ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών για να υπάρχει στατιστικά σημαντικό δείγμα. Σύμφωνα και με τους Wang R. et al.⁽³⁷⁾ σε πιο όξινα pH μειώνεται η διαθεσιμότητα του άνθρακα με αποτέλεσμα να μπορούν λιγότερα είδη βακτηρίων να ευδοκιμήσουν. Η τιμή του pH λειτουργεί και σαν ένα περιβαλλοντικό φίλτρο αφού μέσω του στρες που ασκείται (χαμηλότερο pH) στα βακτηριακά κύτταρα ρυθμίζει κατά κάποιο τρόπο τα είδη των βακτηρίων που θα αναπτυχθούν στην κοινότητα του εδάφους.⁽³⁷⁾ Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρούνται στο έδαφος από το χωριό Ροδιά, όπου η τιμή του pH καθιστά το έδαφος πιο αλκαλικό και φαίνεται να υπάρχει μεγαλύτερη αφθονία αντιγράφων των γονιδίων *sul1* και *qnrD*, που υποδηλώνει πως τα βακτήρια είχαν την δυνατότητα να πολλαπλασιαστούν.

7. Συμπερασματικά Σχόλια

Σκοπός της εργασίας ήταν να διερευνηθεί η αύξηση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα δύο είδη εδάφους έπειτα από επαναλαμβανόμενες εγχύσεις του αντιβιοτικού και ο τρόπος που έγινε η έγχυση του αντιβιοτικού, δηλαδή αν ήταν μέσω κοπριάς χοίρου ή απευθείας στο κάθε έδαφος. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν πως η εφαρμογή κοπριάς είτε παρουσία είτε απουσία του αντιβιοτικού σουλφαμεθοξαζόλη, οδήγησε στην αύξηση των αντιγράφων των γονιδίων λόγω και της αύξησης του βακτηριακού πληθυσμού στο έδαφος που πιθανώς προέρχεται από το γαστρεντερικό σύστημα των χοίρων. Επίσης παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του γονιδίου ανθεκτικότητας στην σουλφαμεθοξαζόλη όταν στο έδαφος είχε προηγουμένως εφαρμοστεί το αντιβιοτικό με οποιοδήποτε από τους δύο τρόπους.

8. Βιβλιογραφία

8.1. Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Matthew I Hutchings, Andrew W Truman, Barrie Wilkinson, Antibiotics: past, present and future, *Current Opinion in Microbiology*, Volume 51, 2019, Pages 72-80, ISSN 1369-5274, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
2. Gould, K. (2016). Antibiotics: from prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), 572–575. doi:10.1093/jac/dkv48
3. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol.* 2010;1:134. Published 2010 Dec 8. doi:10.3389/fmicb.2010.00134
4. Zaffiri L, Gardner J, Toledo-Pereyra LH. History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *J Invest Surg.* 2012 Apr;25(2):67-77. doi: 10.3109/08941939.2012.664099.
5. Etebu, Ebimieowei, and Ibemologi Arikekpar. "Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives." *Int J Appl Microbiol Biotechnol Res* 4.2016 (2016): 90-101.
6. Gullberg, E. (2014). Selection of Resistance at very low Antibiotic Concentrations.
7. Ventola C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 40(4), 277–283.
8. Wanda C Reygaert. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria[J]. *AIMS Microbiology*, 2018, 4(3): 482-501. Doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482
9. Baylay, A.J., Piddock, L.J. and Webber, M.A. (2019). Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance – Part I. In *Bacterial Resistance to Antibiotics – From Molecules to Man* (eds B.B. Bonev and N.M. Brown). <https://doi.org/10.1002/9781119593522.ch1>
10. Munita, Jose M, and Cesar A Arias. "Mechanisms of Antibiotic Resistance." *Microbiology spectrum* vol. 4,2 (2016): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
11. Jose L. Martinez, General principles of antibiotic resistance in bacteria, *Drug Discovery Today: Technologies*, Volume 11, 2014, Pages 33-39, <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
12. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01015>
13. <https://www.merckvetmanual.com/pharmacology/antibacterial-agents/sulfonamides-and-sulfonamide-combinations?redirectid=1442?ruleredirectid=30>
14. Yiqi Wu, Qinxue Wen, Zhiqiang Chen, Qiqi Fu, Huanyu Bao, Response of antibiotic resistance to the co-exposure of sulfamethoxazole and copper during swine manure composting, *Science of The Total Environment*, Volume 805, 2022
15. C. Perruchon, E. Katsivelou, P.A. Karas, S. Vassilakis, A.A. Lithourgidis, T.A. Kotsopoulos, S. Sotiraki, S. Vasileiadis, D.G. Karpouzas, Following the route of veterinary antibiotics tiamulin and tilmicosin from livestock farms to agricultural soils, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 429, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128293>.
16. Botelho, R. G., Monteiro, S. H., & Tornisielo, V. L. (2015). Veterinary Antibiotics in the Environment. *Emerging Pollutants in the Environment - Current and Further Implications*. doi:10.5772/60847
17. Hashmi, M. Z. (Ed.). (2020). Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes. *Emerging Contaminants and Associated Treatment Technologies*. doi:10.1007/978-3-030-40422-2
18. Xu, M., Li, H., Li, S., Li, C., Li, J., & Ma, Y. (2020). The presence of tetracyclines and sulfonamides in swine feeds and feces: dependence on the antibiotic type and swine growth stages. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-020-10266-5

19. Choudhary, M. (1996). REVIEW OF THE USE OF SWINE MANURE IN CROP PRODUCTION: EFFECTS ON YIELD AND COMPOSITION AND ON SOIL AND WATER QUALITY. *Waste Management & Research*, 14(6), 581–595. doi:10.1006/wmre.1996.0056
20. Guillard, T., Grillon, A., de Champs, C., Cartier, C., Madoux, J., Berçot, B., ... Cambau, E. (2014). Mobile Insertion Cassette Elements Found in Small Non-Transmissible Plasmids in Proteae May Explain *qnrD* Mobilization. *PLoS ONE*, 9(2), e87801.
21. Kocsis, B., Szmolka, A., Szabo, O., Gulyas, D., Kristóf, K., Göcző, I., & Szabo, D. (2018). Ciprofloxacin Promoted *qnrD* Expression and Phylogenetic Analysis of *qnrD* Harboring Plasmids. *Microbial Drug Resistance*. doi:10.1089/mdr.2018.0245
22. Antonio Escudero, José; Mazel, Didier; Nivina, Aleksandra; Loot, Céline (2015). "ASMscience, The Integron: Adaptation On Demand". *Microbiology Spectrum*. 3 (2): MDNA3–0019–2014. doi:10.1128/microbiolspec.mdna3-0019-2014. PMID 26104695
23. Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Oct;17(4):840-62, table of contents. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004. PMID: 15489351; PMCID: PMC523561.
24. "Polymerase Chain Reaction (PCR)". National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine.
25. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), Βιολογία των Μικροοργανισμών, Brock, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ. 364-5.
26. Ehtisham, Mohammad & Wani, Firdous & Wani, Iram & Kaur, Prabhjot & Nissar, Sheeba. (2016). Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics. *Indian Journal of Contemporary Dentistry*. 4. 30-35. 10.5958/2320-5962.2016.00030.9.
27. Farell EM, Alexandre G. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Res Notes*. 2012 May 24;5:257. doi: 10.1186/1756-0500-5-257. PMID: 22624992; PMCID: PMC3466135.
28. Pashley, C., & Kendall, S. (n.d.). Cloning in Plasmid Vectors. *E. Coli Plasmid Vectors*, 121–136. doi:10.1385/1-59259-409-3:121
29. Russel J. Peter, *iGenetics*, Pearson- Benjaming Cummings, pg 667-682
30. Asif, A., Mohsin, H., Tanvir, R., & Rehman, Y. (2017). Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02169
31. D. Rodríguez-Lázaro, M. Hernández, IDENTIFICATION METHODS | Real-Time PCR, Editor(s): Carl A. Batt, Mary Lou Tortorello, *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Academic Press, 2014, Pages 344-350, doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00437-7
32. Real time PCR handbook, lifetechnologies, <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
33. Stellwagen NC. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*. 2009 Jun;30 Suppl 1(Suppl 1):S188-95. doi: 10.1002/elps.200900052. PMID: 19517510; PMCID: PMC2757927.
34. Voytas, D. (2001). Agarose Gel Electrophoresis. *Current Protocols in Immunology*. doi:10.1002/0471142735.im1004s02
35. Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(1), pdb.top100388. doi:10.1101/pdb.top100388
36. Armalytė, J., Skerniškytė, J., Bakienė, E., Krasauskas, R., Šiugždinienė, R., Kareivienė, V., ... Ružauskas, M. (2019). Microbial Diversity and Antimicrobial Resistance Profile in Microbiota

- From Soils of Conventional and Organic Farming Systems. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00892
37. Rui Wang, Hongchun Zhang, Liguang Sun, Gaofu Qi, Shu Chen & Xiuyun Zhao, Microbial community composition is related to soil biological and chemical properties and bacterial wilt outbreak, *Nature*, 2017, doi:10.1038/s41598-017-00472-6
 38. Heuer, H., & Smalla, K. (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology*, 9(3), 657–666. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x
 39. Sulfamethoxazole affects the microbial composition and antibiotic resistance gene abundance in soil and accumulates in lettuce, Shoutao Cheng, Mingming Shi, Lijun Xing, Xuming Wang, Haoze Gao, Yanmei Sun, *Environmental Science and Pollution Research* (2020) 27:29257–29265
 40. Udikovic-Kolic, N., Wichmann, F., Broderick, N. A., & Handelsman, J. (2014). Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(42), 15202–15207. doi:10.1073/pnas.1409836111
 41. Hu, H.-W., Han, X.-M., Shi, X.-Z., Wang, J.-T., Han, L.-L., Chen, D., & He, J.-Z. (2015). Temporal changes of antibiotic-resistance genes and bacterial communities in two contrasting soils treated with cattle manure. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(2), fiv169. doi:10.1093/femsec/fiv169
 42. Rauseo, J., Barra Caracciolo, A., Ademollo, N., Cardoni, M., Di Lenola, M., Gaze, W. H., ... Patrolecco, L. (2019). Dissipation of the antibiotic sulfamethoxazole in a soil amended with anaerobically digested cattle manure. *Journal of Hazardous Materials*, 378, 120769. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.120769
 43. Microbial degradation of sulfamethoxazole in the environment Jianlong Wang & Shizong Wang, 2018, *Applied Microbiology and Biotechnology* <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8845-4>
 44. Lima, T., Domingues, S., & Da Silva, G. J. (2020). Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. *Veterinary Sciences*, 7(3), 110. doi:10.3390/vetsci7030110
 45. Fierer, N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat Rev Microbiol* 15, 579–590 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>

8.2. Πηγές εικόνων

Εικόνα 7: Graham CJ. *The global threat of antibiotic resistance: what can be done?* *Journal of Global Health Reports*. 2017;1:e2017002. doi:10.29392/joghr.1.e2017002

Εικόνα 8: Gullberg, E. (2014). *Selection of Resistance at very low Antibiotic Concentrations*.

Εικόνα 9: Furuya, E., Lowy, F. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol* 4, 36–45 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1325>

Εικόνα 11: Matos, Olga & Esteves, Francisco. (2010). Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite* (Paris, France). 17. 219-32. 10.1051/parasite/2010173219.

Εικόνα 14-15: Antonio Escudero, José; Mazel, Didier; Nivina, Aleksandra; Loot, Céline (2015). "ASMscience, The Integron: Adaptation On Demand". *Microbiology Spectrum*. 3 (2): MDNA3–0019–2014. doi:10.1128/microbiolspec.mdna3-0019-2014. PMID 26104695

Εικόνα 13: <https://www.wur.nl/en/research-results/research-institutes/bioveterinary-research/in-the-spotlight/antibiotic-resistance.htm>

Εικόνα 16: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>

Εικόνα 17: <https://www.fishersci.com/shop/products/promega-pgem-t-pgem-t-easy-vector-systems-4/p-127641>

Εικόνα 18: <https://www.thermofisher.com/gr/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/bacterial-transformation-workflow.html>

Εικόνα 19: Cao, Yiqi & Luo, Yu-Feng & Dong, Guihua & Chen, Bing & Zhang, Baiyu. (2020). Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation. *Molecules*. 25. 706. 10.3390/molecules25030706.

Εικόνα 20: <https://www.biocompare.com/Bench-Tips/343854-qPCR-Checklist-Steps-to-Better-Results/>

Εικόνα 23: Leal, Isabel & Allen, Eric & Humble, Leland & Green, Margaret & Rott, Michael. (2008). Application of Conventional PCR and Real-Time PCR Diagnostic Methods for Detection of the PineWood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Wood Samples from Lodgepole Pine. 10.1007/978-1-4020-8455-3_17.

Εικόνα 25: Gel electrophoresis: Introduction, Types, and Their application, <https://universe84a.com/collection/gel-electrophoresis/>

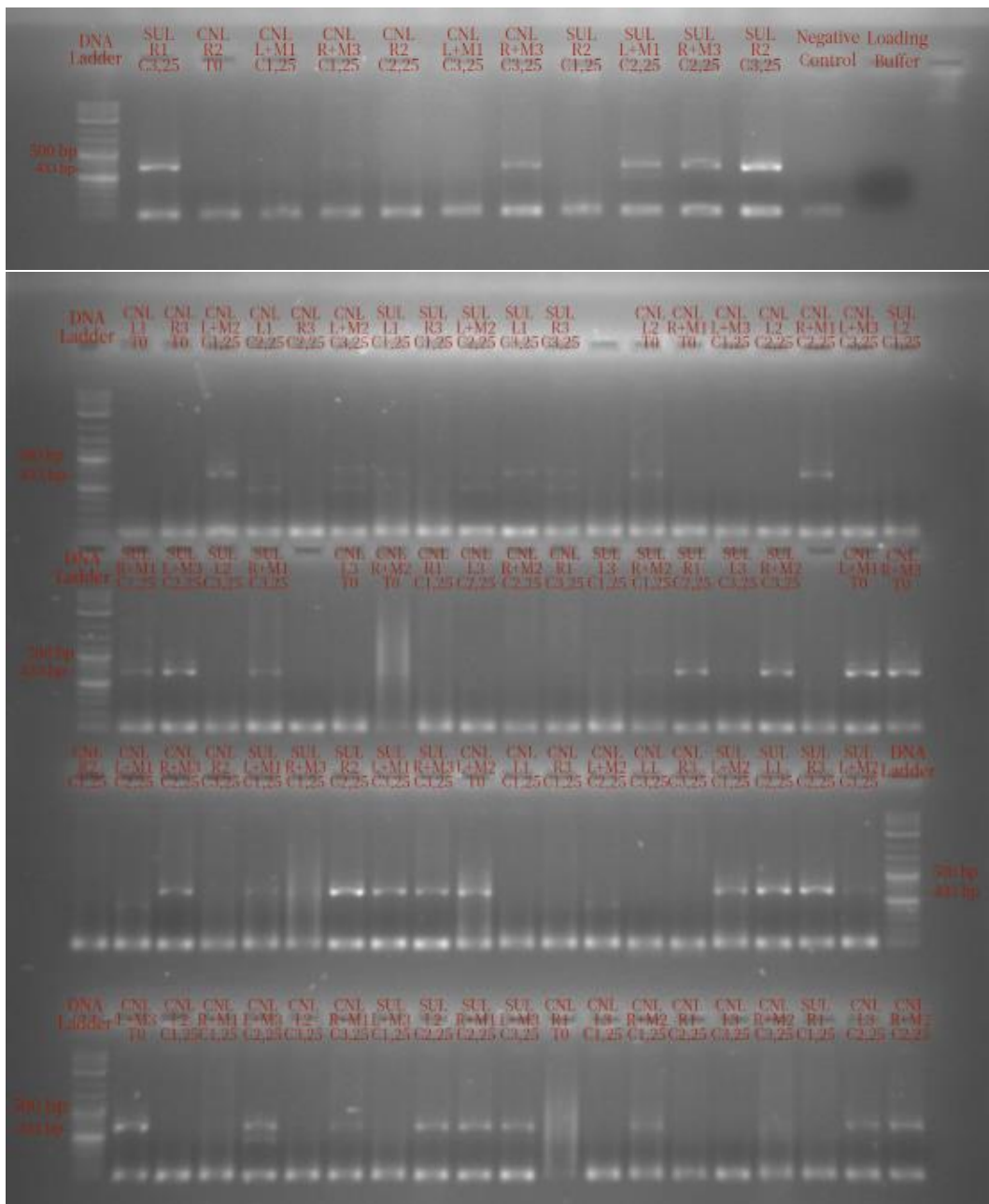
9. Παράρτημα

9.1 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτές αгарόζης

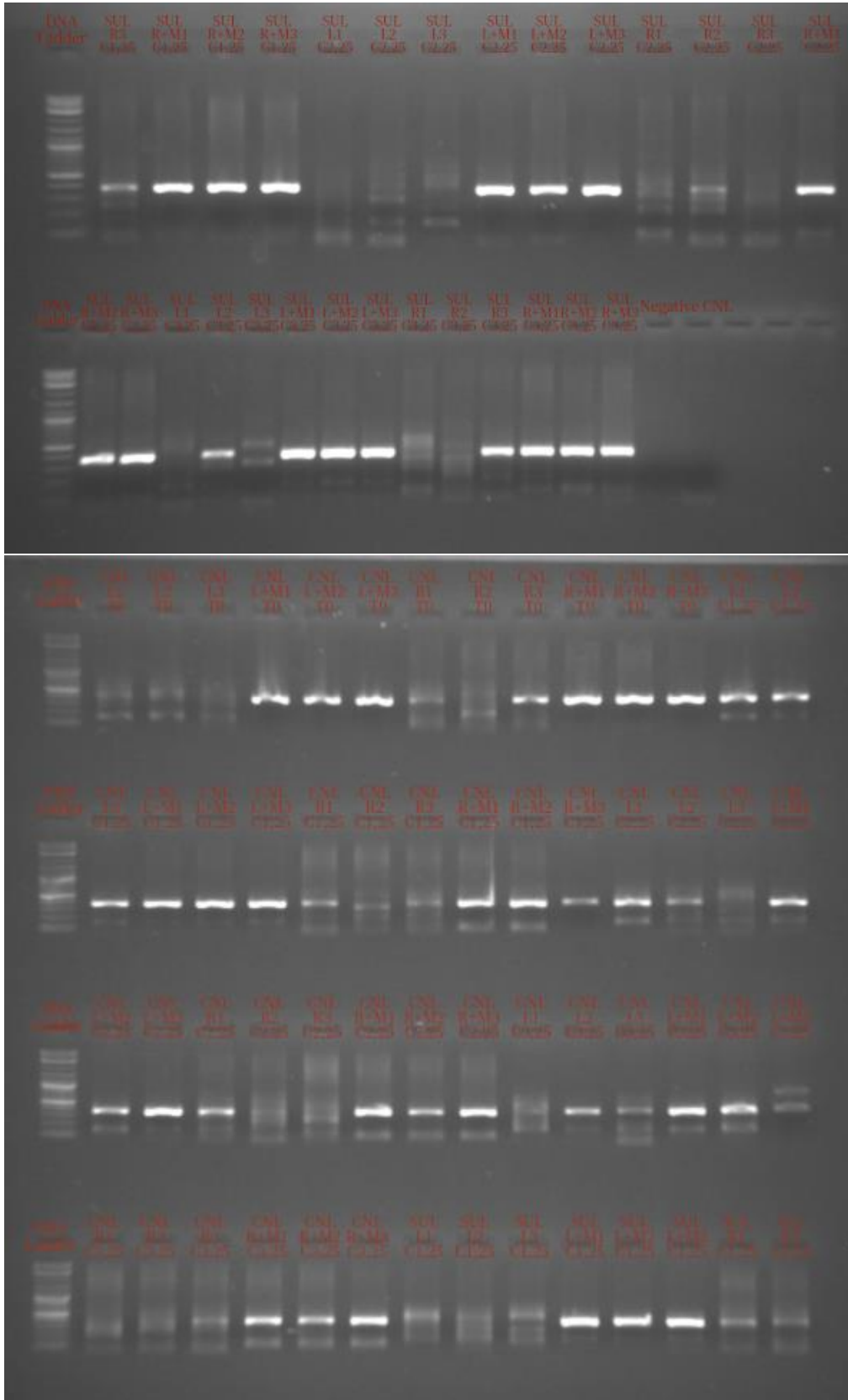
Μετά το πέρας της αντίδρασης qPCR, τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν ώστε να γίνει μία επιπλέον επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Παρακάτω παρατίθενται φωτογραφίες από τις πηκτές με το κάθε γονίδιο για το οποίο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση qPCR, μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.

sul1



qnrD



int1

