



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ	
Αρ. Πρωτοκ.	12
Ημερομηνία:	13-9-06

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
Εντοπισμός γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά
βακτηρίων από ιχθυοκαλλιέργειες.

Γούγας Ιωάννης

Υπεύθυνος Καθηγητής: Κων/νος Κορμάς

ΒΟΛΟΣ 2006



Εντοπισμός γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά
βακτηρίων από ιχθυοκαλλιέργειες.

Τα μέλη της επιτροπής

Κορμάς Κωνσταντίνος

Οικολογία

Επίκουρος Καθηγητής Π.Θ.

Επιβλέπων

Σταμόπουλος Δημήτριος

Ζωολογία

Καθηγητής Π.Θ.

Μέλος

Εξαδάκτυλος Αθανάσιος

Γενετική

Λέκτορας

Μέλος



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

Αριθ. Εισ.: 6810/1
Ημερ. Εισ.: 09-01-2009
Δωρεά: Συγγραφέας
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΙΥΠ
2006
ΓΟΥ

Αφιερώνεται στους γονείς μου που μου παρείχαν τα μέσα να φέρω εις πέρας τις
σπουδές μου.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Κορμά για την πολύτιμη βοήθειά του κατά την εξέλιξη της έρευνας καθώς και στη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη της επιτροπής Λέκτορα κ. Αθανάσιο Εξαδάκτυλο και Καθηγητή κ. Δημήτριο Σταμόπουλο για την αμέριστη βοήθειά τους, την κατανόηση και συμπαράσταση που μου έδειξαν κατά την πορεία της διατριβής από την αρχή έως το τέλος αυτής

Ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στους συμφοιτητές μου κ. Χρήστο Παλαιοκόστα και κα. Βασιλική Κοντογιάννη για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν κατά την πορεία της παρούσας διατριβής.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους δικούς μου ανθρώπους για τη βοήθεια και την συμπαράσταση που μου προσέφεραν στα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο εντοπισμός γονιδίων ανθεκτικότητας σε βακτήρια από ιχθυοκαλλιέργειες, με την χρήση μοριακών τεχνικών PCR και τη χρησιμοποίηση ειδικών εκκινητών εντοπισμού ανθεκτικών βακτηριακών γονιδίων στην οξυτετρακυκλίνη.

Για το σκοπό αυτό πάρθηκε ίζημα κάτω από ιχθυοκλωβούς λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*) σε βάθος 30 m, από μονάδα στη Μηλίνα του Νομού Μαγνησίας.

Το αποτέλεσμα είναι ότι δεν βρέθηκαν ανθεκτικά βακτηριακά γονίδια στην οξυτετρακυκλίνη.

ABSTRACT

The aim of present work was the localisation of genes of resistibility in bacteria from piscicultures, with the use of molecular techniques PCR and the utilisation of experts of primers localisation of resistance genes in oxytetracycline.

For this aim was taken sediment under bassfish cage's (*Dicentrarchus labrax*) in-depth 30 m, from unit in the Milina of Prefecture Magnesia.

The result is that were not found resistance genes in oxytetracycline.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Αντιβιοτικά της ομάδας των τετρακυκλίνων.	9
1.2 Χαρακτηριστικά της οξυτετρακυκλίνης.	12
1.3 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας.	14
1.4 Μοριακές τεχνικές	17
1.4.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	18
1.4.2 Μέθοδοι και αρχές της Αλυσιδωτής Αντίδρασης	18
1.4.3 Ανάλυση Μεθοδολογίας PCR	21
1.4.4 Ηλεκτροφόρηση	21
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1 Δειγματοληψία	23
2.3 Διαδικασία μετά το πέρας της δειγματοληψίας	23
2.4 Αποτελέσματα	28
3.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	28
4.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	31

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ευρεία χρήση των αντιβιοτικών είτε για καταπολέμηση ανθρωπίνων ασθενειών είτε στην εκτροφή ζωικών οργανισμών είχε ως συνέπεια την αύξηση της εμφάνισης των ανθεκτικών βακτηρίων και κατ'επέκταση των ανθεκτικών γονιδίων. Στις εκτροφές ζωικών οργανισμών τα αντιβιοτικά εκτός από μέσα καταπολέμησης βακτηριακών ασθενειών χρησιμοποιούνται και για προφυλακτικούς σκοπούς καθώς και ως μέσα επιτάχυνσης της ανάπτυξής τους. Τα βακτήρια λόγω της μεγάλης γενετικής τους ευελιξίας μπόρεσαν να προσαρμοστούν στις πιέσεις που εξασκούν οι αντιβιοτικές ουσίες. Κινητά γενετικά στοιχεία όπως πλασμίδια, τρανσποζόνια, ιντεγκρόνια και γενετικές κασέτες συνέβαλαν στην γρήγορη προσαρμογή των βακτηρίων (Heuer et al., 2002). Σημαντικό ρόλο στην προώθηση της ανθεκτικότητας παίζουν και οι μεταλλάξεις. Παρόλο που οι μεταλλάξεις λαμβάνουν χώρα σε χαμηλό ποσοστό, ο υψηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού των βακτηρίων καθώς και το γεγονός ότι είναι απλοειδείς οργανισμοί αυξάνει τη βαρύτητα που παίζουν οι μεταλλάξεις στο φαινόμενο της ανθεκτικότητας. Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (WHO) από το 2000 έχει τονίσει ότι η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά μπορεί να αποτελέσει σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία παγκοσμίως. Επίσης ο FAO αποτρέπει τη χρήση αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες, είτε για προληπτικούς λόγους είτε για επιτάχυνση της ανάπτυξης των εκτρεφόμενων οργανισμών. Ο χαρακτηρισμός ενός βακτηριακού στελέχους ως ανθεκτικού σε κάποιο αντιβιοτικό δεν είναι απόλυτος, καθώς πλήθος ερευνητών έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιήσει πληθώρα ορισμών. Στην ιατρική, ένα βακτήριο θεωρείται ως ανθεκτικό όταν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού που απαιτείται ώστε να ανασταλεί η ανάπτυξή του είναι μεγαλύτερη από την μέγιστη συγκέντρωση που μπορεί να δεχθεί ο ξενιστής του κατά τη διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής (Coyne et al., 2004). Ωστόσο ο όρος ανθεκτικότητα δεν αποτελεί μια απόλυτη και ανεξάρτητη ιδιότητα αλλά μια σχετική και εξαρτώμενη από τις συνθήκες διεξαγωγής του εκάστοτε πειράματος περιγραφής του φαινοτύπου. Το παραπάνω συντελεί στην ύπαρξη σοβαρών προβλημάτων στη διαδικασία σύγκρισης δεδομένων μεταξύ επιστημονικών εργασιών στις οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές πειραματικές μέθοδοι (Karetanaki et al., 1995).

Οι πλέον κοινοί λόγοι εμφάνισης της ανθεκτικότητας φαίνεται να είναι :

- Μεταλλάξεις σε συχνά απαντώμενα γονίδια που διευρύνουν τη συχνότητα της ανθεκτικότητας.

- Μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας που βρίσκονται κυρίως στα πλασμίδια μεταξύ βακτηρίων είτε του ίδιου είδους είτε διαφορετικού.
- Φυσική επιλογή λόγω παρουσίας του αντιβιοτικού, με αποτέλεσμα την επικράτηση των ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών (Asagbra et al., 2005).

Εκτιμάται ότι το 30% έως και 90% της χορηγούμενης δόσης των περισσότερων αντιβιοτικών σε ανθρώπους και ζώα αποβάλλεται στο περιβάλλον σε ενεργή μορφή μέσω των ούρων. Παρόλη την ευρεία χρήση των αντιβιοτικών τόσο για θεραπευτικούς σκοπούς όσο και για την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των εκτρεφόμενων ζώων (για την Αυστραλία >700 t/year), λίγη σημασία έχει δοθεί στην μόλυνση που προκαλούν αυτές οι ουσίες. Το παραπάνω φαίνεται περίεργο αν αναλογιστεί κανείς ότι αυτές οι ενώσεις έχουν άμεσες βιολογικές επιπτώσεις στο περιβάλλον ακόμα και στην περίπτωση που αποσυντίθενται σε υψηλούς ρυθμούς (Costanzo et al., 2005). Η ευρεία χρήση αντιβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες για τη θεραπεία βακτηριακών μολύνσεων έχει συσχετιστεί με την αύξηση της ανθεκτικότητας ιδιαίτερα στα *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella ictulari*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Pasteurella piscicida* και *Yersinia ruckeri* (DePaola et al., 1995). Μερικές από τις αρνητικές επιπτώσεις των αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον είναι οι παρακάτω:

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

Γενικά υπολογίζεται ότι η χρήση των αντιβιοτικών στην εκτροφή ζώων είναι 100-1000 περισσότερη από την ποσότητα που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ανθρώπων (Kumar et al., 2005). Στην Νορβηγία για το έτος 1989 η συνολική ποσότητα των χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών στη γεωργία και στις υδατοκαλλιέργειες ήταν περίπου ίση με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την ανθρώπινη θεραπεία από βακτηριακές μολύνσεις (Rhodes et al., 2000). Ορισμένοι ερευνητές έχουν προσπαθήσει

στη διαδικασία της πρόβλεψης για την επιτυχία ή μη μιας θεραπευτικής αγωγής να χρησιμοποιήσουν τον εμπειρικό κανόνα που προέρχεται από την κτηνοτροφία 4:1. Δηλαδή η θεραπευτική αγωγή θα είναι πετυχημένη αν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού που επιτυγχάνεται στο πλάσμα του ζώου είναι 4 φορές μεγαλύτερη από την μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που απαιτείται για την αναστολή του παθογόνου όπως αυτή πιστοποιείται στο εργαστήριο. Ωστόσο ο παραπάνω κανόνας δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματικός στα ψάρια και ειδικά στα σολομοειδή. Εκτός αυτού ενώ είναι δυνατή η εξακρίβωση της ευαισθησίας των παθογόνων πριν την έναρξη της θεραπείας, ο προσδιορισμός με απόλυτη ακρίβεια της μέγιστης συγκέντρωσης του αντιβιοτικού που πρέπει να χορηγηθεί δεν είναι δυνατός (Coyne et al., 2004).

1.1 Αντιβιοτικά της ομάδας των τετρακυκλινών.

Οι Τετρακυκλίνες ανακαλύφθηκαν την δεκαετία του '40. Ανήκουν στην οικογένεια των αντιβιοτικών τα οποία εμποδίζουν τη βακτηριακή πρωτεϊνική σύνθεση με την παρεμπόδιση της ένωσης του αμινοξέος tRNA στο βακτηριακό ριβόσωμα (Chopra et al., 1992)&(Schnappinger and Hillen,1996). Αποτελούνται από τέσσερις εξαμελείς κυκλικούς δακτυλίους. Εκδηλώνουν την δραστηριότητά τους ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα gram θετικών και gram αρνητικών βακτηρίων, όπως επίσης πρωτόζωων, μυκοπλασμάτων και ρικετσιών. Οι φυσικοί παραγωγοί των τετρακυκλινών συμπεριλαμβανομένης και της οξυτετρακυκλίνης, ανήκουν στο γένος *Streptomyces* και αποτελούν το μεγαλύτερο παραγωγό αντιβιοτικών ουσιών από όλα τα γένη του μικροβιακού κόσμου. Χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα διάφορα είδη του παραπάνω γένους για την παραγωγή της οξυτετρακυκλίνης σε θερμοκρασίες συνήθως 25-30 °C και με διάφορες φυτικές ουσίες για θρεπτικό υπόστρωμα. Το κόστος παραγωγής των τετρακυκλινών μειώνεται χάρις σε βελτιωμένες μεθόδους που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή τους (Chopra & Roberts, 2001). Σύμφωνα με τους Asagbra et al., (2005), για την παραγωγή τετρακυκλινών ως καλύτερης πηγής ανόργανου αζώτου θεωρείται το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ενώ χρειάζεται και η προσθήκη NaCl. Το τελευταίο φαίνεται να αποδίδεται στα ανιόντα Cl^- που είναι απαραίτητα στην παραγωγή και άλλων αντιβιοτικών ουσιών. Τα κύρια μέλη της κατηγορίας των Τετρακυκλινών φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Κύρια μέλη της κατηγορίας των Τετρακυκλινών (από Chopra and Roberts, 2001).

Χημική ονομασία	Κοινή ονομασία	Εμπορική ονομασία	Έτος ανακάλυψης	Παρούσα Κατάσταση	Τρόπος λήψης
7-Chlortetracycline	Χλωροτετρακυκλίνη	Aureomycin	1948	Χρησιμοποιείται	Από του στόματος
5-Hydroxytetracycline	Οξυτετρακυκλίνη	Terramycin	1948	Χρησιμοποιείται	Από του στόματος και Παρεντερικά
Tetracycline	Τετρακυκλίνη	Achromycin	1953	Χρησιμοποιείται	Από του στόματος
6-Demethyl-7-chlortetracycline	Διμεθυλοχλωρατετρακυκλίνη	Declomycin	1957	Χρησιμοποιείται	Από του στόματος
2-N-Pyrrolidinomethyltetracycline	Ρολιτετρακυκλίνη	Reverin	1958	Χρησιμοποιείται	Από του στόματος
2-N-Lysinomethyltetracycline	Λιμεκυκλίνη	Tetralsal	1961	Χρησιμοποιείται	Από του στόματος και Παρεντερικά
N-Methylol-7-chlortetracycline	Κλομοκυκλίνη	Megaclor	1963	Χρησιμοποιείται	Από του στόματος
6-Methylene-5-hydroxytetracycline	Μεθακυκλίνη	Rondomycin	1965	Χρησιμοποιείται	Από του στόματος
6-Deoxy-5-hydroxytetracycline	Δοξυκυκλίνη	Vibramycin	1967	Χρησιμοποιείται	Από του στόματος και Παρεντερικά
7-Dimethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracycline	Μινοκυκλίνη	Minocin	1972	Χρησιμοποιείται	Από του στόματος και Παρεντερικά
9-(<i>t</i> -butylglycylamido) minocycline	Βουτυλογλυκλαμιδομινοκυκλίνη	Tigilicycline	1993	Εισάγεται σταδιακά σε κλινικές δοκιμές	

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες αυτών των ουσιών σε συνδυασμό με την απουσία σημαντικών δυσμενών παρενεργειών, έχουν οδηγήσει στην ευρεία χρήση τους για τη θεραπεία των ανθρωπίνων και ζωικών μολύνσεων. Γι' αυτόν το λόγο χρησιμοποιούνται στην ιατρική στη γεωργία για τον έλεγχο πολλών ασθενειών των φυτών, στις υδατοκαλλιέργειες, στις ζυμώσεις οξέων και στην αναστολή της αποσύνθεσης οργανικών ουσιών (Asagbra et al., 2005). Στον πίνακα 2 φαίνονται οι εκτιμώμενες ποσότητες των τετρακυκλινών που χρησιμοποιούνται στις εκτροφές ζώων.

Πίνακας 2. Εκτιμώμενες ποσότητες των τετρακυκλινών που χρησιμοποιούνται στις εκτροφές ζώων (από Chopra and Roberts, 2001).

Χώρα	Κατανάλωση kg/year
ΗΠΑ	3.488.000
Καναδάς	398.000
Ευρώπη	2.294.000
Αυστραλία	77.619
Νέα Ζηλανδία	2.311

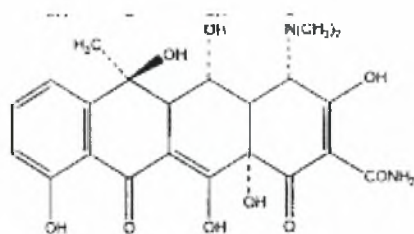
Η ευρεία χρήση των συγκεκριμένων αντιβιοτικών για την πρόληψη ασθενειών τόσο στα ψάρια όσο και στα φυτά, έχει προκαλέσει την εμφάνιση ανθεκτικότητας στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά (Levy, 1984). Παρόλα αυτά, η ανησυχία έχει ενταθεί διότι η ανθεκτικότητα αυτή φαίνεται να αυξάνεται ανάλογα με τις ποσότητες των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται. Δεδομένου ότι οι τετρακυκλίνες έχουν χρησιμοποιηθεί στους ανθρώπους και τα ζώα για περίπου 50 έτη δεν είναι ακόμη απολύτως εξακριβωμένο ότι ως αποτέλεσμα της χρήσης τους έχουν εμφανιστεί παραλλαγές ανθεκτικών βακτηρίων ιδιαίτερα εκείνων που περιέχουν τα γονίδια *tet*.

Προς αποφυγή της πιθανής διόγκωσης της βακτηριακής αντίστασης βρίσκονται υπό εξέταση νέα παράγωγα των τετρακυκλινών, όπως οι γλυκιλ-κυκλίνες, οι δακτυλοκυκλίνες, κ.α για πιθανή εισαγωγή τους ως θεραπευτικών μέσων τα οποία θα παρακάμψουν τους υπάρχοντες μηχανισμούς αντίστασης που δημιουργούν οι τετρακυκλίνες (Tymiak et al., 1993. McMurry & Levy, 2000)

1.2 Χαρακτηριστικά της οξυτετρακυκλίνης.

Η οξυτετρακυκλίνη ανακαλύφθηκε το 1948 από στελέχη του *Streptomyces rimosus* (Chopra et al., 1992). Είναι από τις παλαιότερες τετρακυκλίνες. Μερικά από τα χαρακτηριστικά της οξυτετρακυκλίνης που την έχουν καταστήσει το πλέον κοινώς χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό στις υδατοκαλλιέργειες είναι τα παρακάτω: i) εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση εναντίον ενός ευρέως φάσματος μικροοργανισμών ii) δεν παρουσιάζει σημαντική τοξική δράση εναντίον ευκαρυωτικών κυττάρων iii) είναι φθνή η παρασκευή της. Μερικά από τα βακτηριακά είδη που χρησιμοποιείται η οξυτετρακυκλίνη είναι τα: *Flexibacter columnaris* (Στηλώδης νόσος), *Flexibacter psychrophila* (Νέκρωση των πτερυγίων και της ουράς), *Yersinia ruckeri* (Ερυθροστοματίτιδα), *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella ictaluri*, *Vibrio spp* (Δονακίωση), *Aeromonas salmonicida* (Δοθιήνωση των σολομοειδών), *Streptococcus spp* κ.ά. Η οξυτετρακυκλίνη χρησιμοποιείται επίσης και εναντίον ρικετσιακών νοσημάτων. Οι ρικέτσιες είναι μικροοργανισμοί με πολύ μικρές διαστάσεις (<2μm), είναι Gram αρνητικοί, έχουν κυτταρικό τοίχωμα, πολλαπλασιάζονται όπως τα βακτήρια αλλά μπορούν να αναπτυχθούν μόνο μέσα σε ζωντανά κύτταρα (Πνευματικός, 1986. Φώτης και Αγγελίδης, 2003). Η οξυτετρακυκλίνη παρουσιάζει δράση και εναντίον παρασίτων όπως *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Leishmania major*, *Trichomonas vaginalis*, and *Toxoplasma gondii* (Chopra and Roberts, 2001).

Ο χημικός τύπος της οξυτετρακυκλίνης παρουσιάζεται στην εικόνα 1 (Chopra and Roberts, 2001):



Εικόνα 1. Χημικός τύπος της οξυτετρακυκλίνης

Η οξυτετρακυκλίνη αναστέλλει την αύξηση των βακτηρίων προκαλώντας αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (εμπόδιση της μετάφρασης του mRNA), καθώς

ενώνεται με την 30S ριβοσωμική υπομονάδα των βακτηριακών ριβοσωμάτων. Το παραπάνω επιτυγχάνεται με διάσπαση των δεσμών κωδικόνιο - αντικωδικόνιο (Nonaka and Suzuki, 2002). Η οξυτετρακυκλίνη είναι από τα λίγα αντιβιοτικά που επιτρέπονται, τουλάχιστον για χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, να χρησιμοποιούνται στις υδατοκαλλιέργειες.

Στις περισσότερες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης μόνο 4-5 αντιβιοτικά επιτρέπονται από τη νομοθεσία για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες (συγκεκριμένα αντιβιοτικά της οικογένειας των Σουλφοναμίδων, Β-λακταμών, Τετρακυκλινών και Καινολών). Ωστόσο και άλλα αντιβιοτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατόπιν συνταγής κτηνιάτρου. Για τη Μεγάλη Βρετανία λόγω χάρη επιτρέπονται τα αντιβιοτικά του Πίνακα 3

Πίνακας 3. Αντιβιοτικά που επιτρέπονται στην Μεγάλη Βρετανία (από Alderman & Hastings, 1998).

Κοινή ονομασία	Εμπορική ονομασία	Είδη ψαριών	Δόση (mg Kg ⁻¹ day ⁻¹)*	Περίοδος αποβολής του φαρμάκου από τον οργανισμό του ψαριού (θερμοημέρες)
Οξυτετρακυκλίνη	Aquatet	AS RT	75	400
	Tetraplex	AS	75	400
	Tetraplex Forte	AS, RT, AC	75	AS 500, RT & AC 350
Οξολινικό οξύ	Aqualinic	AS, RT, BC	10-30	500
	Aquanox	AS	10-30	500
		AS		
Σαραφλοξακίνη	Sarafin	AS	10	150
Αμοξυλινικό - τρυδροξύλιο	Aqualic	AS	40-80	50-80
	Clamoxyl	AS	80	30
	Micromox	AS	80	150
	Vetremox	AS	80	40
Τριμαζίνη	Sulfatrim	AS	15-30	400
	Tribissen	AS, RT	15-30	AS 350, RT 500

* Συνηθισμένη διάρκεια θεραπείας 7-10 μέρες.

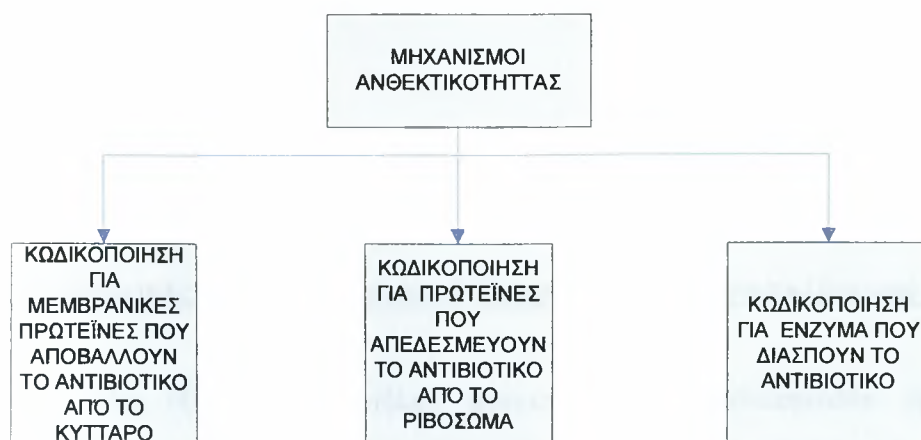
AS: Atlantic salmon, RT: Rainbow trout, AC: Arctic char, BT: Brown trout

Στις υδατοκαλλιέργειες η οξυτετρακυκλίνη χορηγείται με τους παρακάτω τρόπους i) ενσωματωμένη στην τροφή ii) διαλυμένη στο νερό iii) σε ενέσιμη μορφή. Η τελευταία μορφή είναι και η πιο σπάνια. Συνήθως το αντιβιοτικό χορηγείται μέσω της τροφής στην οποία ενσωματώνεται σε δόσεις που ποικίλλουν από 50 έως 100 mg/kg ψαριού/ημέρα για 10 ημέρες. Συνήθης πρακτική πριν τη χορήγηση της οξυτετρακυκλίνης αλλά και άλλων αντιβιοτικών είναι να παραμένουν αυτά νηστικά για 2 ημέρες. Η παραπάνω πρακτική εφαρμόζεται ώστε να μεγιστοποιηθεί η πείνα των ψαριών κατά τη διάρκεια της θεραπείας αλλά και να ελαχιστοποιηθεί το stress που προκαλεί η παρουσία του αντιβιοτικού στα ψάρια (Rigos et al., 2003). Επίσης κατά την χρησιμοποίησή της με τη μορφή λουτρών σε γόνο και νεαρά άτομα πέστροφας χρειάζεται προσοχή ώστε να μην λάβει χώρα υπερβολική έκκριση βλέννας από τα βράγχια. Σε αυτήν την περίπτωση σταματάει η αντιβίωση και τα ψάρια τοποθετούνται σε καθαρό νερό (Roberts and Kenny, 1986).

1.3 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας.

Οι μέχρι σήμερα γνωστοί μηχανισμοί που κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα στην οξυτετρακυκλίνη απεικονίζονται στο διάγραμμα 1.

Διάγραμμα 1. Μηχανισμοί που κωδικοποιούν για ανθεκτικότητα στην οξυτετρακυκλίνη.



Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί γύρω στα 40 διαφορετικά γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες. Στον Πίνακα 4 παρατίθενται τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες και ο μηχανισμός λειτουργίας τους. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει εγγενής διαφορά ανάμεσα στα γονίδια ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (tet) και σε αυτά της οξυτετρακυκλίνης (otr). Ο λόγος που τρία γονίδια ανθεκτικότητας ονομάστηκαν με το πρόθεμα της οξυτετρακυκλίνης ήταν ότι αρχικά απομονώθηκαν από μικροοργανισμούς που παράγουν οξυτετρακυκλίνη με αποτέλεσμα το αρχικό πρόθεμα της ονομασίας του γονιδίου να αντανακλάτε στον οργανισμό που αυτό βρέθηκε αρχικά (Chopra and Roberts, 2001).

Πίνακας 4. Γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στις τετρακυκλίνες και ο μηχανισμός λειτουργίας τους (Από Roberts, 2005).

Κωδικοποίηση για πρωτεΐνες αποβολής του αντιβιοτικού από το κύτταρο (23 γονίδια)	Κωδικοποίηση για πρωτεΐνες που προστατεύουν τα ριβοσώματα (11 γονίδια)	Κωδικοποίηση για ένζυμα που αποικοδομούν το αντιβιοτικό (3 γονίδια)	Άγνωστος μηχανισμός (1 γονίδιο)
tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(H), tet(J), tet(V), tet(Y), tet(Z), tet(30), tet(31), tet(K), tet(L), tetA(P), otr(B), tcr3, tet(33), tet(35), tet(38), tet(39), otr(C)	tet(M), tet(O), tet(W), tet(Q), tet(T), otr(A), tetB(P), tet(32), tet(36)	tet(X), tet(34), tet(37)	tet(U)

Μεμβρανικές πρωτεΐνες που αποβάλλουν την οξυτετρακυκλίνη από το κύτταρο

Το 60% των γονιδίων ανθεκτικότητας κωδικοποιούν πρωτεΐνες που αποβάλλουν το αντιβιοτικό από το κύτταρο μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τη συγκέντρωση της οξυτετρακυκλίνης στο κύτταρο. Τα πιο συχνώς εμφανιζόμενα

γονίδια αυτού του μηχανισμού είναι το tet(L) που απαντάται σε 15 βακτηριακά γένη και το tet(B) σε 25 γένη (Roberts, 2005). Οι παραπάνω πρωτεΐνες αποβάλλουν από το κύτταρο με την κατανάλωση ενέργειας ένα σύμπλοκο τετρακυκλίνης-κατιόντος, ενώ ταυτόχρονα εισέρχεται στο κύτταρο ένα πρωτόνιο. Ο όλος μηχανισμός γίνεται αντίθετα από τη διαβάθμιση συγκέντρωσης. Ο παραπάνω μηχανισμός συναντάται ιδιαίτερα συχνά σε γένη Gram αρνητικών βακτηρίων. Τα παραπάνω βακτήρια έχουν συνήθως τα γονίδια ανθεκτικότητας σε μεγάλου μεγέθους πλασμίδια. Σε αυτά τα πλασμίδια βρίσκονται γονίδια ανθεκτικότητας και για άλλα αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα όπως επίσης και για παθογόνους παράγοντες όπως τοξίνες (Roberts, 2005, Chopra and Roberts, 2001)

Πρωτεΐνες προστασίας των ριβοσωμάτων

Η οξυτετρακυκλίνη ενώνεται με το ριβόσωμα και διαταράσσει την ομαλή του λειτουργία με αποτέλεσμα να σταματά η σύνθεση των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες προστασίας του ριβοσώματος πιστεύεται ότι αλληλεπιδρούν με τη βάση h34 πρωτεΐνης του ριβοσώματος προκαλώντας αλλαγή της στερεοχημικής διάταξης των σημείων του ριβοσώματος στα οποία ενώνεται η οξυτετρακυκλίνη με αποτέλεσμα το αντιβιοτικό να απελευθερώνεται από το ριβόσωμα. Στη συνέχεια το ριβόσωμα μεταπίπτει στην αρχική του κατάσταση και συνεχίζεται η σύνθεση πρωτεϊνών. Δεν είναι γνωστό αν το αποδεσμευμένο αντιβιοτικό μπορεί να ξανασυνδεθεί με το ριβόσωμα. Τα επικρατέστερα γονίδια του εν λόγω μηχανισμού είναι το tet(M) που απαντάται σε 42 γένη βακτηρίων και είναι το πλέον κοινό γονίδιο ανθεκτικότητας και το γονίδιο tet(W) που απαντάται σε 19 γένη (Roberts, 2005). Στην εργασία των Kim et al., (1994) απομονώθηκαν για πρώτη φορά βακτήρια του θαλάσσιου περιβάλλοντος και του εντερικού σωλήνα των ψαριών με τα γονίδια ανθεκτικότητας tet(M) και tet(S).

Ένζυμα αποικοδόμησης του αντιβιοτικού

Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας δεν είναι και τόσο συχνά εμφανιζόμενος. Το γονίδιο tet(X) κωδικοποιεί για μια οξειδορεκτουδάση η οποία αποικοδομεί το αντιβιοτικό παρουσία οξυγόνου και NADPH. Μέχρι στιγμής το παραπάνω γονίδιο

έχει βρεθεί μόνο σε υποχρεωτικώς αναερόβια βακτήρια. Το γονίδιο tet(37) δεν έχει βρεθεί ακόμα σε κάποιο συγκεκριμένο βακτήριο, ενώ το τρίτο γονίδιο του μηχανισμού (tet34) αποικοδομεί το αντιβιοτικό με διαφορετικό τρόπο (Roberts, 2005). Καινούριοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας πιθανόν να ανακαλυφθούν στο προσεχές μέλλον

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια εντοπισμού γονιδίων ανθεκτικότητας σε βακτήρια από ίζημα που βρισκόταν κάτω από ιχθυοκλωβούς.

1.4 Μοριακές Τεχνικές

Με την πρόοδο της επιστήμης και της τεχνολογίας των τελευταίων ετών και κυρίως έπειτα από τη μελέτη και τις περιγραφές των *Watson* και *Crick* για την διπλή ελικοειδή μορφή του μορίου του *DNA*, η οποία οριοθέτησε μια νέα εποχή στην κατανόηση και μελέτη των βιολογικών επιστημών και καθόρισε μια νέα οδό ανάπτυξης και εφαρμογής βιολογικών και μοριακών ανακαλύψεων και επιτευγμάτων, βρεθήκαν νέες γενετικές μοριακές τεχνικές για την μελέτη των γονιδίων και όχι μόνο. Μερικές από αυτές είναι οι εξής:

- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction), *PCR*
- Ισοένζυμα, αλλοένζυμα και πρωτεΐνες
- Τυχαία ενίσχυση πολυμορφικού *DNA* (Random Amplification Of Polymorphic DNA) *RAPD*
- Ανάλυση μιτοχονδριακού *DNA* (Restriction Fragment Length Polymorphism) *RFLPs*
- Συγκριτική ανάλυση ακολουθίας (Single-Strand Conformation Polymorphism) *SSCP*
- Μέθοδος κηλίδων – σημαδιών *DNA* (*Southern Blot*)

Στην συγκεκριμένη εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος της Αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (*PCR*) η οποία αναλύεται παρακάτω.

1.4.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης *PCR* είναι μια γρήγορη και εύκολη μέθοδος δημιουργίας απεριόριστων αντιγράφων οποιουδήποτε τεμαχίου του κυτταρικού μορίου *DNA* (Saiki et al., 1988). Είναι μια από τις επιστημονικές εξελίξεις που αξίζει πραγματικά να χαρακτηριστεί "επαναστατική" και "σημαντική ανακάλυψη."

Η ανάπτυξη της τεχνικής αυτής οδήγησε σε μια έκρηξη νέων τεχνικών στη μοριακή βιολογία καθώς ολοένα και περισσότερες εφαρμογές της μεθόδου δημοσιεύθηκαν και χάρισε στον *Kary Mullis* που την ανέπτυξε το βραβείο Νόμπελ (1993). Η τεχνική αναπτύχθηκε κυρίως μετά την ανακάλυψη της *Taq* πολυμεράσης, μιας πολυμεράσης του γενετικού υλικού, η οποία χρησιμοποιείται από το βακτηρίδιο *Thermus aquaticus* το οποίο ανακαλύφθηκε σε θερμοπηγές. Η πολυμεράση αυτή είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες, έτσι ώστε να ενισχύεται, εκεί όπου άλλες πολυμεράσες του γενετικού υλικού (*DNA*) μετουσιώνονται και καταστρέφονται



1.4.2 Μέθοδοι και αργές της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Υπάρχουν τρία βασικά βήματα εφαρμογής της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης *PCR*, τα οποία επαναλαμβάνονται για 30 – 40 κύκλους. Η διαδικασία αυτή κατά την οποία παρατηρούνται θερμάνσεις και ψύξεις του μίγματος της αντίδρασης σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα γίνεται αυτοματοποιημένα.

Τα βήματα αυτά έχουν ως εξής:

1. Μετουσίωση (*Denaturation*) σε θερμοκρασία 94°C .
2. Προσκόλληση των εκκινητών (*Annealing*) σε θερμοκρασία 55°C . Η θερμοκρασία αυτή είναι ειδική για κάθε ζεύγος εκκινητών. Η παραπάνω θερμοκρασία αναφέρεται στους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την

εργασία και οι οποίοι ειδικεύονται στην ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε βακτήρια.

3. Επιμήκυνση (*Extension*) σε θερμοκρασία 72 °C.

Κατά τη διάρκεια των παραπάνω βημάτων παρατηρούνται: κατά τη *μετουσίωση*, σπάσιμο – λιώσιμο της διπλής έλικας του *DNA* και «άνοιγμα» σε μονόκλωνο μόριο γενετικού υλικού ενώ διακόπτονται όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις. Στο στάδιο της *προσκόλλησης εκκινητών* που πραγματοποιείται στους 54 °C οι εκκινητές αναπηδούν εξαιτίας της κίνησης *Brown*, οι ιοντικοί δεσμοί διαμορφώνονται συνεχώς και με την ένωση των βάσεων μετατρέπονται σε πολύ ισχυρούς δεσμούς μεταξύ του γενετικού μορίου και των εκκινητών οι οποίοι δεν διασπώνται πια. Τέλος στο τρίτο στάδιο της *επιμήκυνσης* παρατηρείται η καλύτερη θερμοκρασία για την δράση της πολυμεράσης και οι εκκινητές ενώνονται με κάποιες βάσεις δημιουργώντας πολύ ισχυρούς ιοντικούς δεσμούς.

Ο πρώτος κύκλος της PCR αποδίδει 4 κλώνους *DNA* (δύο του αρχικού υποστρώματος και δύο αντίγραφα) που αποτελούν πρότυπα καλούπια για τη σύνθεση νέων κλώνων *DNA* - στόχου στον 2^ο κύκλο. Σε κάθε νέο κύκλο οι κλώνοι θα αυξάνονται εκθετικά κατά 2ⁿ όπου n ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης.

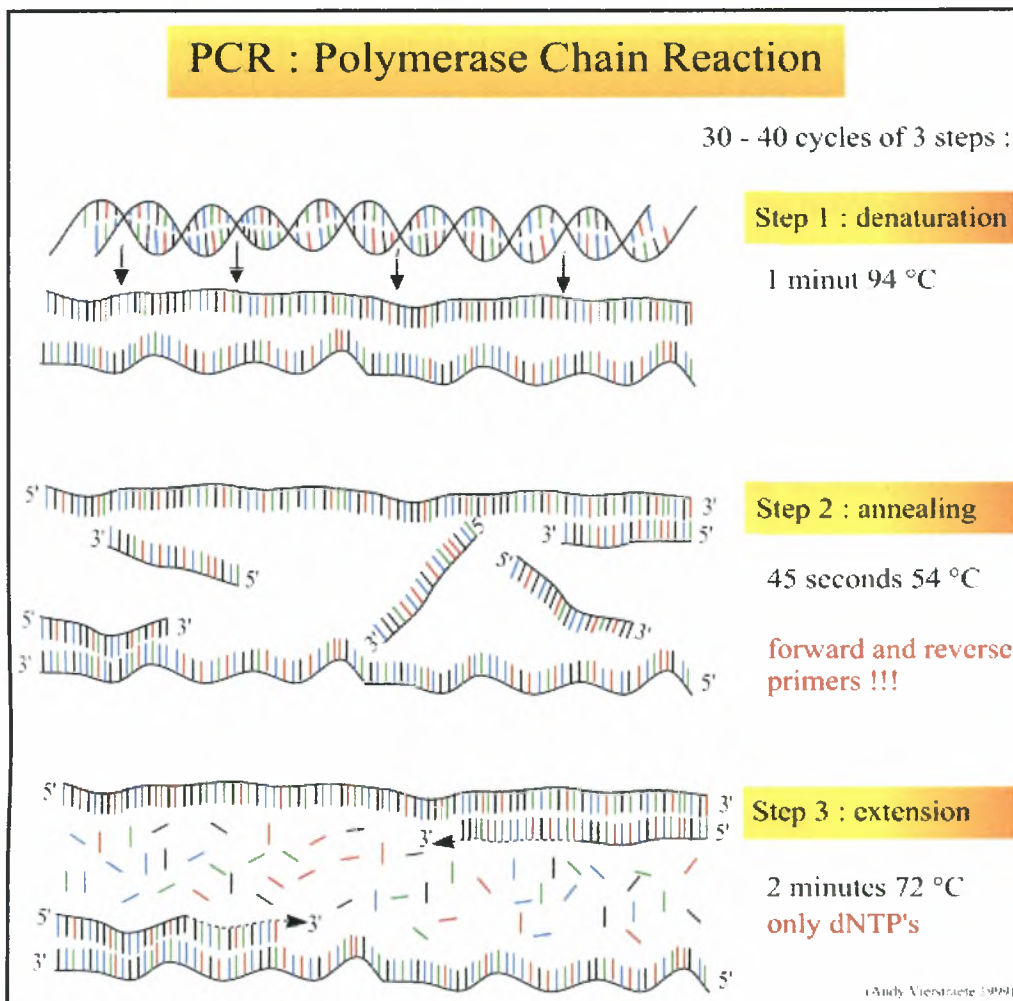
Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα τρία στάδια αποδιάταξης, υβριδισμού και πολυμερισμού. Η αποδιάταξη πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες 92-95°C για 30 περίπου δευτερόλεπτα, ο υβριδισμός σε θερμοκρασία 50-65°C για 1-2 λεπτά, ανάλογα με την περιεκτικότητα των εκκινητών σε A/T, G/C και ο πολυμερισμός στους 70-78° C για 1-2 λεπτά. Οι εναλλαγές στη θερμοκρασία πραγματοποιούνται ταχύτατα με τη χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών, των θερμοκυκλοποιητών (PCR thermal cycler).

Ο σχεδιασμός και η επιλογή των κατάλληλων εκκινητών (primers) γίνεται σύμφωνα με τις σταθερές περιοχές του *DNA*-στόχου. Οι εκκινητές πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή το 5' άκρο τους, να απέχουν μεταξύ τους κατά 50 ζεύγη βάσεων και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως (melting temperature, T_m). Η θερμοκρασία τήξεως δίκλωνου *DNA* είναι συνάρτηση της αλληλουχίας του μορίου, υπολογίζεται όμως και κατά προσέγγιση με βάση την περιεκτικότητα του μορίου σε πουρίνες και πυριμιδίνες σύμφωνα με τον τύπο:

$$T_m = (4 \times \text{αριθμός βάσεων G+C}) + (2 \times \text{αριθμός βάσεων A+T}) \text{ (Νούσια 2006)}$$

Επιθυμητές T_m κυμαίνονται μεταξύ 55-65°C. Όσον αφορά τη θερμοκρασία επαναδιάταξης (T_a), συνήθως, είναι μικρότερη της T_m .

Η PCR ολοκληρώνεται σε 25-40 κύκλους οπότε το τμήμα του DNA στόχου επεκτείνεται κατά 2^n , όπου n ο αριθμός των κύκλων. Αν υποθέσουμε ότι η απόδοση του συστήματος είναι 100% για κάθε κύκλο, τότε μετά από 25 κύκλους παράγονται 2^{25} αντίγραφα, ενώ μετά από 40 κύκλους παράγονται 2^{40} αντίγραφα DNA-στόχου. Ακολουθεί σχηματική απεικόνιση των τριών σταδίων στην εικόνα 2.



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση των τριών σταδίων

1.4.3 Ανάλυση Μεθοδολογίας PCR.

- Βασικό σημείο της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι οι εκκινητές (*primers*). Η ποσότητα των εκκινητών πρέπει να είναι σε περίσσεια γιατί εξαντλούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας. Μέρος της ακολουθίας του αρχικού μορίου *DNA* πρέπει να είναι γνωστό, έτσι ώστε να γίνει επιλογή του κατάλληλου εκκινητή. Υπάρχουν αριστεροί και δεξιοί εκκινητές, έτσι ώστε να μπορούν να ενισχυθούν και οι δύο κλώνοι του γενετικού μορίου *DNA*, το οποίο διασπάται από δίκλωνη αλυσίδα και ανοίγει κατά την διεξαγωγή της διαδικασίας. Η πολυμεράση (*Taq*) χρησιμοποιείται γιατί ρυθμίζει την μετουσίωση της διπλής έλικας του *DNA* χωρίς να χρειάζεται περαιτέρω προσθήκη πολυμεράσης κατά τη διάρκεια και επίσης επιτρέπει το στάδιο της προσκόλησης των εκκινητών να διεξαχθεί σε υψηλότερη θερμοκρασία και έτσι επιτυγχάνεται μεγαλύτερη ακρίβεια της μεθόδου.

Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση των εξής αντιδραστηρίων (Mullis et al., 1987):

- Ειδικής (*Taq*) πολυμεράσης
- Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων που ονομάζονται εκκινητές (*primers*).
- Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων τριφωσφοριδεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (*dNTPs*)
- Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος $MgCl_2$
- Ειδικού ρυθμιστικού διαλύματος για την *Taq* πολυμεράση
- Μικρής ποσότητας *DNA* που παίζει το ρόλο μορίου μήτρας.

Μετά το πέρας της PCR ακολουθεί ηλεκτροφόρηση για να διαχωριστούν τα κλάσματα *DNA* διαφορετικού μεγέθους. Ακολουθεί αναφορά της διαδικασίας.

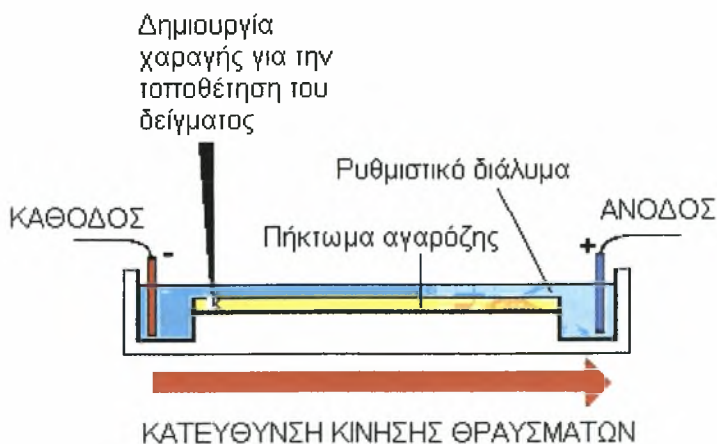
1.4.4 Ηλεκτροφόρηση.

Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να διαχωριστούν μόρια *DNA*, *RNA* καθώς και πρωτεϊνών με κριτήριο το μήκος τους, τη στερεοδιάταξή τους και το ολικό φορτίο τους. Χρησιμοποιείται ιδιαιτέρως στο διαχωρισμό τμημάτων *DNA* που έχουν

προκύψει μετά από επεξεργασία με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Τα δείγματα *DNA* τοποθετούνται σε μια χαραγή που έχει δημιουργηθεί στο ένα άκρο μιας πλάκας από πήκτωμα αγαρόζης και καλύπτονται από ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Με την τοποθέτηση ηλεκτροδίων στα άκρα της πλάκας εξασφαλίζεται η εφαρμογή τάσης μεταξύ τους.

Η τάση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μετακίνηση των διαφόρων κλασμάτων *DNA* προς το θετικό πόλο, καθώς αποτελούνται από νουκλεοτίδια που είναι αρνητικά φορτισμένα (η φωσφορική ομάδα λόγω απόδοσης πρωτονίων φέρει αρνητικό φορτίο). Επειδή όμως η ταχύτητα μετακίνησης ενός κλάσματος εξαρτάται από το μέγεθός του (τα μεγάλα κλάσματα κινούνται αργότερα από τα μικρά) σε μια δεδομένη χρονική στιγμή τα μικρότερα κλάσματα «προπορεύονται» έναντι των μεγαλύτερων κατά την κίνησή τους προς το θετικό πόλο, με αποτέλεσμα να μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους.

Με τη μέθοδο αυτή τα κλάσματα που έχουν προκύψει από την επεξεργασία ενός μορίου *DNA* με μια περιοριστική ενδονουκλεάση διαχωρίζονται με βάση την απόσταση που έχουν διανύσει από την άνοδο. Η σύγκριση μάλιστα της απόστασης που διένυσαν τα κλάσματα που έχουν προκύψει, με την απόσταση που διανύουν κάποια στάνταρ κλάσματα γνωστού μεγέθους, (*DNA Lader*) πληροφορεί για το μέγεθος των πρώτων. Βέβαια για να γίνουν αντιληπτά τα κλάσματα του *DNA* πρέπει να έχουν βαφεί ή επισημανθεί με ραδιενεργό ισότοπο και να έχουν φωτογραφηθεί ή να έχουν επισημανθεί με ένα φθορίζον μόριο που στη συνέχεια εκτίθενται σε υπεριώδες φως. Ακολουθεί σχηματική απεικόνιση συσκευής ηλεκτροφόρησης.(εικόνα 3)



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση ηλεκτροφόρησης

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.

2.1 Δειγματοληψία.

Συλλέχθηκε ιζήμα κάτω από ιχθυοκλωβούς λαυρακιού (*Dicentrarchus labrax*) σε βάθος 30 m, από μονάδα ιχθυοπαραγωγής στη Μηλίνα του Νομού Μαγνησίας (εικόνα 4). Για τη λήψη του ιζήματος χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης Ekman. Επίσης συλλέχθηκε δείγμα επιφανειακού νερού πάνω από το σημείο όπου έγινε η λήψη του ιζήματος. Η θερμοκρασία του νερού την ώρα της δειγματοληψίας ήταν 12,5 0C. Το δείγμα τοποθετήθηκε σε δύο αποστειρωμένα μπουκαλάκια των 50 ml τα οποία μεταφέρθηκαν αμέσως στο εργαστήριο και καταψύχθηκαν στους -240C.



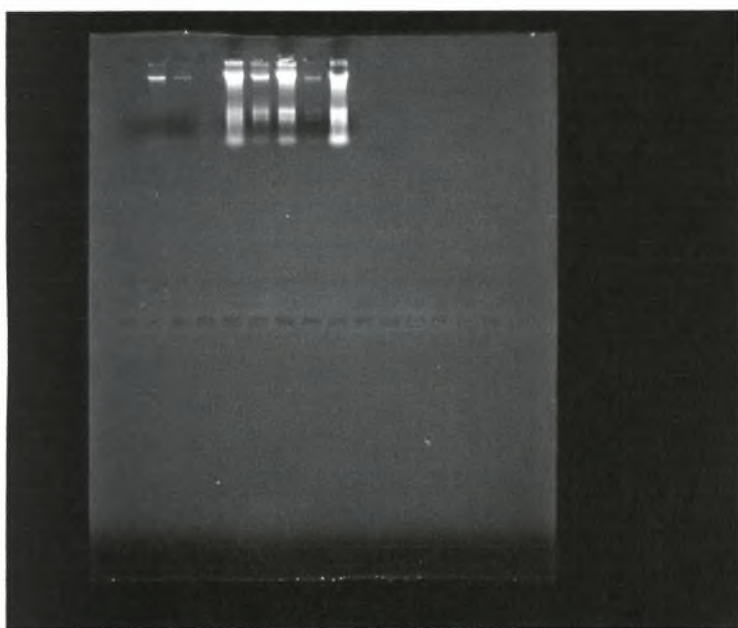
Εικόνα 4 Τοποθεσία υδατοκαλλιέργειας

2.2 Διαδικασία μετά το πέρας της δειγματοληψίας

Αρχικά έγινε απομόνωση του DNA από το ιζήμα ακολουθώντας αυστηρά τα βήματα του πρωτοκόλλου απομόνωσης UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MoBio, USA). Η διαδικασία επαναλήφθηκε όσες φορές χρειάστηκε παρασκευή καινούργιου DNA.

Κατά την 1^η απομόνωση πάρθηκαν 0.838 g ιζήματος. Μετά το πέρας της απομόνωσης παρασκευάστηκαν 40μl DNA από το ίζημα, τα οποία χωρίστηκαν σε 3 PCR eppendorf σε αναλογίες 10 μl, 10 μl και 20 μl αντίστοιχα.

Στην συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% για να διαπιστωθεί εάν η απομόνωση έγινε σωστά. Η εικόνα 5 δείχνει ότι το δείγμα που απομονώθηκε περιέχει DNA

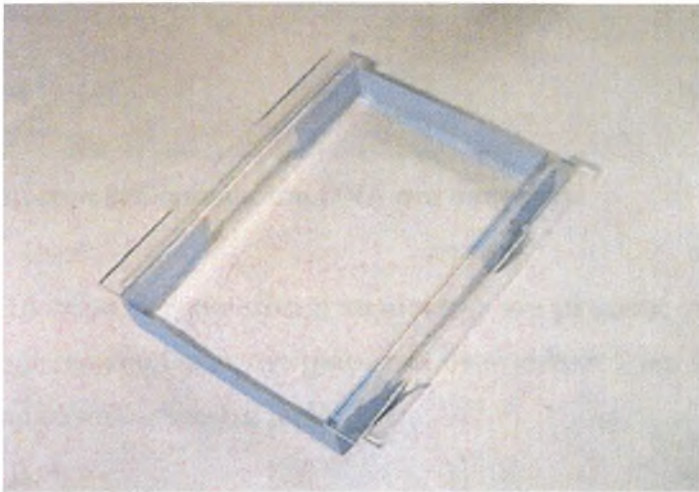


Εικόνα 5. Gel αγαρόζης όπου διαπιστώνεται η ύπαρξη του DNA

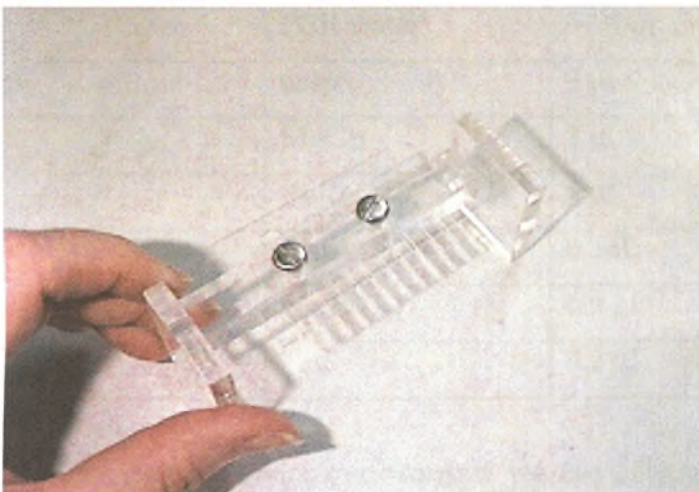
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή της αγαρόζης και της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζεται παρακάτω:

Αρχικά λαμβάνονται 60 ml διαλύματος T.A.E. 1X και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη. Στη συνέχεια ζυγίζονται 0.6 g αγαρόζης και τοποθετούνται στο διάλυμα. Ακολουθεί θέρμανση του μίγματος με συνεχή ανακίνησή του για περίπου 3 min έως ότου το μίγμα γίνει τελείως διάφανο. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται στη συσκευή μορφοποίησης του πηκτώματος (Εικόνα 6) στην οποία έχουν ήδη τοποθετηθεί τα χτένια δημιουργίας υποδοχών ενισχυμένου DNA (πηγάδια) και παραμένει εκεί για τουλάχιστον 20 λεπτά μέχρι να στερεοποιηθεί. (Εικόνα 7) Τα χτένια αφαιρούνται προσεκτικά και η πηκτή είναι έτοιμη για την προσθήκη του DNA στα «πηγάδια» (Εικόνα 8) αφού πρώτα τοποθετηθεί στην συσκευή ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση γινόταν πάντα στα 80 Volt για 45 min. Μετά το πέρας της

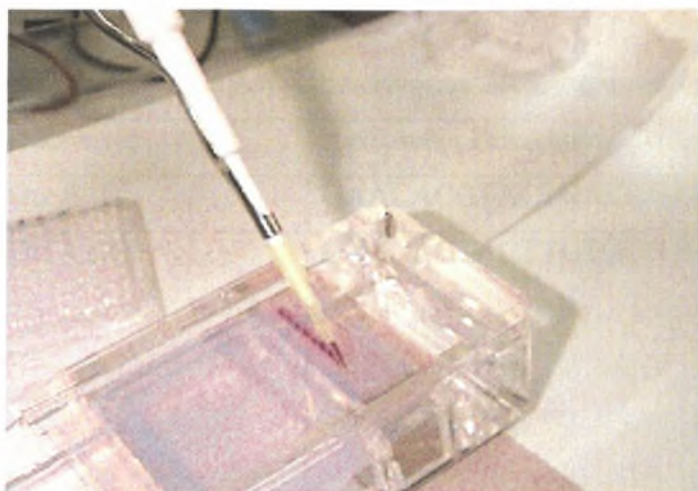
ηλεκτροφόρησης το gel αγαρόζης εμβαπτιζόταν σε διάλυμα βρομιούχου αιθιδίου για 15 min προς χρώση. Στη συνέχεια γινόταν έκπλυση με εμβάπτιση του σε νερό για 5 min και το gel ήταν έτοιμο για φωτογραφία στο υπεριώδες φως. Η ποσότητα DNA που φορτώθηκε στα «πηγάδια» ήταν 4μl DNA extraction και 1μl χρωστική.



Εικόνα 6. Συσκευή μορφοποίησης αγαρόζης



Εικόνα 7. Χτένια δημιουργίας υποδοχών



Εικόνα 8. Φόρτωμα του DNA στα «πηγάδια»

Το επόμενο βήμα είναι η παρασκευή του μίγματος για PCR. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον πίνακα 5 και στις αναλογίες που αναφέρει το πρωτόκολλο του 1μl DNA.

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια και αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR

	<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>Αναλογίες</i>	<i>Χαρακτηρισμοί</i>
	PCR water	34.8 μl	Απεσταγμένο Mill Q
	dntp	5 μl	Συγκέντρωση 100mM
	MgCl ₂	3.μl	Συγκέντρωση 25mM
	Buffer 10x	5.μl	
ΕΚΙΝΝΗΤΕΣ	Otr A (f) ^b	0.5μl	
	Otr A (R) ^c	0.5 μl	
	Taq	0.2 μl	

Οι παραπάνω αναλογίες αντιστοιχούν για ένα δείγμα. Για την κατασκευή μίγματος περισσότερων του ενός δειγμάτων γίνεται αντίστοιχα πολλαπλασιασμός των αντιδραστηρίων επί το αρχικό δείγμα.

Το πρόγραμμα το οποίο χρησιμοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή καθώς και οι εκκινήτες οι οποίοι είναι ειδικοί για τον εντοπισμό γονιδίων ανθεκτικότητας σε βακτήρια στην οξυτετρακυκλίνη αναγράφονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αλληλουχίες εκκινητών και πρόγραμμα PCR.

Εκκινητές	Ακολουθία Εκκινητών 5'-3'	Κύκλοι της ενίσχυσης
Otr A (f) ^b	GAACACGTA CTGACCGAGAAG	4min/94°C, 35 x
Otr A (R) ^c	CAGAAGTAGTTGTGCGTCCG	(1min/94°C, 1min/55°C, 2min/72°C) and 10min/72°C. (Nikolakopoulou et. al., 2005)

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων όπως ακριβώς προαναφέρθηκε. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε αρκετές φορές σε διαφορετικούς κύκλους (40c, 36c, 35c 30c, 25c, 20c)

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε επίσης και με αραιωμένο DNA 10^{-1} , 10^{-2} και 10^{-3} .

Εκτός αυτών, πάρθηκε δείγμα DNA βακτηριακών στελεχών από την εργασία του κ. Παλαιοκώστα, 2006 (Απομόνωση και Καλλιέργεια Βακτηριακών Στελεχών Ανθεκτικών στην Οξυτετρακυκλίνη) τα οποία είναι ανθεκτικά στην οξυτετρακυκλίνη. Συγκεκριμένα τα δείγματα ήταν 32 στα οποία ακολουθήθηκε η προαναφερθείσα διαδικασία της PCR.

Σημείωση: για την αποφυγή πιθανής εξωγενούς μόλυνσης των δειγμάτων προς PCR, η παραλαβή τους γινόταν με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες παρουσία γυμνής φλόγας, οι οποίες και εμβαπτίζονταν στα PCR erpendorf που περιείχαν από 49μl PCR μίγματος το καθένα.

2.3 Αποτελέσματα

Ύστερα από πολλές προσπάθειες διεκπεραίωσης της PCR με δείγματα από το ίζημα δεν κατέστη δυνατός ο εντοπισμός ανθεκτικών γονιδίων σε βακτήρια στην οξυτετρακυκλίνη. Για τον λόγο αυτό πάρθηκαν και δείγματα βακτηριακών στελεχών ανθεκτικά στην οξυτετρακυκλίνη από την εργασία του κ. Χρήστου Παλαιοκόστα, 2006. Αλλά και πάλι η διαδικασία της PCR δεν εντόπισε κανένα ανθεκτικό γονίδιο στην οξυτετρακυκλίνη. Το παραπάνω γεγονός δεν προκαλεί μεγάλη ανησυχία για πιθανότητα λάθους στην διαδικασία που ακολουθήθηκε, διότι με βάση την εργασία της Νικολακοπούλου et al., 2005, από 217 απομονωθέντα βακτηριακά στελέχη μόνο τα 3 έφεραν το ανθεκτικό γονίδιο *otr(A)* στην οξυτετρακυκλίνη, ενώ 13 έφεραν το ανθεκτικό γονίδιο *otr(B)*. *Το παραπάνω αποτελεί ένδειξη ότι ο μηχανισμός ανθεκτικότητας που βασίζεται στην απομάκρυνση του αντιβιοτικού από το κύτταρο μέσω πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης (*otr(B)*) είναι επικρατέστερος του μηχανισμού προστασίας των ριβοσωμάτων (*otr(A)*).* Επίσης πρέπει να ληφθεί υπόψη και η πιθανότητα ότι η συγκέντρωση αυτών των ανθεκτικών γονιδίων στα δείγματα που ελήφθησαν είναι τόσο μικρή που κατέστη αδύνατος ο εντοπισμός τους.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία δεν βρέθηκαν ανθεκτικά γονίδια σε βακτήρια στην οξυτετρακυκλίνη από δείγμα ιζήματος κάτω από ιχθυοκλωβούς. Στην εργασία της Νικολακοπούλου et al., 2005, παρόλο αυτά βρέθηκαν τα ανθεκτικά γονίδια *otr(A)* και *otr(B)* λαμβάνοντας δείγμα νερού από την ίδια ιχθυοπαραγωγική μονάδα. Το παραπάνω γεγονός, αποδεικνύει πιθανότατα τον τρόπο με τον οποίο η συγκεκριμένη μονάδα χρησιμοποιεί το αντιβιοτικό οξυτετρακυκλίνη και έναν από τους λόγους για τους οποίους δεν βρέθηκαν ανθεκτικά γονίδια στην παρούσα εργασία.

Με βάση την εργασία της Νικολακοπούλου et al., 2005, γίνεται κατανοητό ότι το συγκεκριμένο αντιβιοτικό προσθέτωνταν αυτούσιο στο νερό και όχι αναμεμιγμένο στην παρεχόμενη τροφή, με αποτέλεσμα στο ίζημα να μην υπάρχει ή να υπάρχει μικρή ποσότητα αντιβιοτικού τόση ώστε να καθιστά αδύνατο τον εντοπισμό

ανθεκτικών γονιδίων λόγω μικρής συγκέντρωσης. Την παραπάνω γνώμη ενισχύει και η εργασία των Tendecia and Pena (2002) στην οποία το μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικών στην οξυτετρακυκλίνη βακτηρίων βρέθηκαν στο νερό και όχι στο ίζημα. Στην διαπίστωση αυτή υπάρχει κάποια επιφύλαξη, διότι δεν υπάρχουν στοιχεία που να αποδεικνύουν τον τρόπο χρήσης του αντιβιοτικού οξυτετρακυκλίνης από την συγκεκριμένη μονάδα, διότι όπως όλες οι ιχθυοπαραγωγικές μονάδες έτσι και αυτή αρνείται κάθε χρήση τέτοιων ουσιών προς αποφυγή της διαφθοράς του ονόματός της στην καταναλωτική αγορά.

Επίσης σύμφωνα με τους Pathak and Gopal (2004) σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο της ανθεκτικότητας, παίζουν οι φυσικοχημικές ιδιότητες του νερού οι οποίες παρουσιάζουν εποχική μεταβολή. Χάρη στην εποχικότητα των μεταβολών αυτών δημιουργούνται ευτροφικά περιβάλλοντα τα οποία συμβάλουν στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας λόγω των αυξημένων συγκεντρώσεων οργανικού άνθρακα, ο οποίος αυξάνει την δραστηριότητα των βενθικών οργανισμών (Costanzo et al 2005).

Στο ίζημα που πάρθηκε από την συγκεκριμένη ιχθυοπαραγωγική μονάδα δεν έγινε σχετική μελέτη της συγκέντρωσης του οργανικού άνθρακα με αποτέλεσμα να μην μπορεί να λεχθεί με απόλυτη σιγουριά ότι η συγκέντρωσή του αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην εύρεση ανθεκτικών γονιδίων. Παρόλο αυτά δεν μπορεί να αγνοηθεί το παραπάνω γεγονός ως αιτία της απουσίας ανθεκτικών γονιδίων.

Μεγάλη επίδραση στην δραστηριότητα της οξυτετρακυκλίνης και κατ'επέκταση στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε αυτή, ασκούν τα κατιόντα Mg^{+2} και Ca^{+2} του θαλάσσιου νερού. (Pursell 1996). Με βάση την παραπάνω παρατήρηση, ένας άλλος λόγος για την απουσία ανθεκτικών γονιδίων στην οξυτετρακυκλίνη μπορεί να είναι η μεγάλη συγκέντρωση κατιόντων Mg^{+2} και Ca^{+2} στο θαλασσινό νερό που είναι εγκατεστημένη η μονάδα. Ένας εξίσου σημαντικός παράγοντας είναι η παρουσία βαρέων μετάλλων στην θαλάσσια περιοχή εγκατάστασης της μονάδος. Σύμφωνα με τους (Pathak and Gopal 2004, Tendecia and Pena 2002) η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά συχνά συσχετίζεται με την ανθεκτικότητα στα βαρέα μέταλλα με ανάλογο τρόπο. Πιθανότατα όταν έγινε η δειγματοληψία η συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων να κυμαινόταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα με επακόλουθο την χαμηλή ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.

Τέλος, στην πληθώρα των περιπτώσεων φαίνεται να υπάρχει θετική συσχέτιση ανάμεσα στο ποσοστό των ανθεκτικών μικροοργανισμών από τις μονάδες υδατοκαλλιεργειών και στη χρήση αντιβιοτικών (Schmidt et al 2000), ωστόσο

ορισμένοι ερευνητές όπως οι Kerry et al, (1994, 1995a, 1995b, 1996), Kapetanaki et al (1995), Miranda and Zemelman (2002), Tendecia and Pena (2002), φαίνεται να πιστεύουν ότι και άλλοι παράγοντες εκτός της ύπαρξης του αντιβιοτικού στο υδάτινο περιβάλλον μπορούν να επηρεάσουν τη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών βακτηριακών γονιδίων στην οξυτετρακυκλίνη. Στις παραπάνω εργασίες βρέθηκε να υπάρχει μικρή συσχέτιση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις της οξυτετρακυκλίνης που ανιχνεύτηκαν στα υπό εξέταση δείγματα και στη συχνότητα εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων υποδεικνύοντας ότι η παρουσία και μόνο του αντιβιοτικού δεν αποτελεί απαραίτητο παράγοντα εξάπλωσης της ανθεκτικότητας. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Heuer et al (2002) στην εργασία τους πάνω σε ανθεκτικά βακτήρια στη γενταμικίνη (gentamicin). Ειδικότερα σύμφωνα με την εργασία των Kapetanaki et al (1995) ως σημαντικός παράγοντας για την εξάπλωση της ανθεκτικότητας στην οξυτετρακυκλίνη υπήρξε η ποσότητα της χορηγούμενης τροφής.

Ανακεφαλαιώνοντας στην παρούσα εργασία δεν βρέθηκαν ανθεκτικά γονίδια στην οξυτετρακυκλίνη από ίζημα κάτω από ιχθυοκλωβούς. Ωστόσο δεν μπορεί να λεχθεί με βεβαιότητα ότι όντως τα παραπάνω αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν την πραγματικότητα.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Νούσια MN, 2006. Ρυθμός Αύξησης Και Γενετικός Πολυμορφισμός Του Σαργού, *Diplodus Sargus*, Στο Αιγαίο Και Ιόνιο Πέλαγος. Μεταπτυχιακή διατριβή του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών των Τμημάτων Γεωπονίας Ζωικής Παραγωγής και Υδάτινου Περιβάλλοντος και Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος
- Παλαιοκόστας Χ (2006) Απομόνωση Και Καλλιέργεια Βακτηριακών Στελεχών Ανθεκτικών Στην Οξυτετρακυκλίνη. Προπτυχιακή διατριβή του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος
- Πνευματικάτος ΓΗ (1986) Ιχθυοτροφία και Ιχθυοπαθολογία., σελ 359- 399. Εκδόσεις Κυριακίδη.
- Φώτης ΓΔ, Αγγελίδης ΠΓ (2003). Εκτροφή και Παθολογία Ιχθύων. Τόμος Α' σελ 289-328, Εκδ Σύγχρονη Παιδεία.

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Asagbra AE, Sanni AI, Oyewole OB (2005). Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21:107–114.
- Chopra, I., P. M. Hawkey, and M. Hinton. 1992. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* 29:245–277.
- Chopra Ian And Marilyn Roberts.(2001) Tetracycline Antibiotics: Mode Of Action, Applications, Molecular Biology, And Epidemiology Of Bacterial Resistance. Antimicrobial Research Centre and Division of Microbiology, School of Biochemistry & Molecular Biology, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, United Kingdom,1 and Department of Pathobiology, School of Public Health and Community Medicine, University of Washington, Seattle, Washington 98195-7238

- Costanzo Simon D., John Murby , John Bates.(2005) Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin* 51 218–223
- Coyne Rosie, Ole Samuelsen, Oivind Bergha, Kari Andersena, Lisa Pursellb, Inger Dalsgaardc, Peter Smith. (2004) On the validity of setting breakpoint minimum inhibition concentrations at one quarter of the plasma concentration achieved following oral administration of oxytetracycline. *Aquaculture* 239 23–35.
- DePaola, A., and M. C. Roberts.(1995). Class D and E tetracycline resistance determinants in gram-negative catfish pond bacteria. *Mol. Cell. Probes* 9:311–313.
- Depaola Angelo, James T. Peeler, And Gary E. Rodrick (1995). Effect of Oxytetracycline-Medicated Feed on Antibiotic Resistance of Gram-Negative Bacteria in Catfish Ponds. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 2335–2340
- Heuer H., E. Krogerrecklenfort, E.M.H. Wellington, S. Egan, J.D. van Elsas, L. van Overbeek, J.-M. Collard, G. Guillaume, A.D. Karagouni, T.L. Nikolakopoulou, K. Smalla. (2002) Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiology Ecology* 42 289-302.
- Kapetanaki Maria, Joe Kerry, Maw-a Hiney, Catherine O'Brien, Rosie Coyne, Pete Smith (1995). Emergence, in oxytetracycline-free marine mesocosms, of microorganisms capable of colony formation on oxytetracycline-containing media. *Aquaculture* 134, 227-236.
- Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., Cazabon, D., NicGabhainn, S. and Smith, P., (1994). Frequency and distribution of resistance to oxytetracycline in microorganisms isolated from marine fish farm sediments following therapeutic use of oxytetracycline. *Aquaculture*, 123: 43-54.
- Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., NicGabhainn, S., Gilroy, D., Cazabon, D. and Smith, P., 1995a. Fish feed as a source of oxytetracycline resistant bacteria in the sediments under fish farms. *Aquaculture*, 131:101-113.
- Kerry, J., Gilroy, D., Hiney, M., Coyne, R. and Smith, P., (1995b). The effects of harrowing on oxytetracycline resistance in marine sediment microorganisms beneath a salmon farm. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 15:172-174.
- Kerry Joe, Rosie Coyne, Deirdre Gilroy, Maw-a Hiney, Peter Smith. (1996) Spatial distribution of oxytetracycline and elevated frequencies of oxytetracycline

- resistance in sediments beneath a marine salmon farm following oxytetracycline therapy. *Aquaculture* 145 31-39
- Kim, E. H., and T. Aoki. (1994). The transposon-like structure of IS26-tetracycline, and kanamycin resistance determinant derived from transferable R plasmid of fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiol. Immunol.* 38:31–38.
- Kumar H.S., A. Parvathi, I. Karunasagar and I. Karunasagar. (2005) Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical seafood. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21:619–623.
- Levy, S. B. (1984). Resistance to the tetracyclines, p. 191–240. In L. E. Bryan (ed.), *Antimicrobial drug resistance*. Academic Press, Orlando, Fla
- Miranda Claudio D., Raul Zemelman. (2002) Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture* 212 31–47
- Mullis, K. B. and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase – catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology.* 155:335-350.
- Nikolakopoulou Theodora L., Sharon Egan, Leo S. van Overbeek, Gilliane Guillaume, Holger Heuer, Elizabeth M.H. Wellington, Jan Dick van Elsas, Jean-Marc Collard, Kornelia Smalla, Amalia D. Karagouni (2005). PCR Detection of Oxytetracycline Resistance Genes *otr(A)* and *otr(B)* in Tetracycline-Resistant *Streptomyces* Isolates from Diverse Habitats. *Current Microbiology* Vol. 51, pp. 211–216
- Nonaka Lisa and Satoru Suzuki. (2002) New Mg² Dependent Oxytetracycline Resistance Determinant Tet 34 in *Vibrio* Isolates from Marine Fish Intestinal Contents. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, , p. 1550–1552
- Pathak S.P. _ and K. Gopal. (2004) Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. *Environmental Research* 98 100–103
- Pursell, L., Dineen, T., Kerry, J., Vaughan, S. and Smith, P., (1996). The biological significance of breakpoint concentrations of oxytetracycline in media for the examination of marine sediment microflora. *Aquaculture*,145: 21-30.
- Rhodes Glenn, Geert Huys, Jean Swings, Patrick McGann, Maura Hiney, Peter Smith, And Roger W. Pickup (2000). Distribution of Oxytetracycline Resistance Plasmids between *Aeromonads* in Hospital and Aquaculture Environments: Implication of Tn1721 in Dissemination of the Tetracycline Resistance Determinant Tet A. *Applied And Environmental Microbiology* Sept., p. 3883–3890

- Rigos George, Ioannis Nengas, Athanassios E. Tyrpenou, Maria Alexis, Gera M. Troisi. (2003) Pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) after a single dose. *Aquaculture* 221 75–83
- Roberts, M. C., and G. E. Kenny. (1986). Dissemination of the tetM tetracycline resistance determinant to *Ureaplasma urealyticum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:350–352.
- Roberts Marilyn C.. (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 245 195–203
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Highuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K. B. and Erich, H.A. (1988). Primer detected enzymatic amplification of DANN with a thermostable DANN polymerase. *Science.* 239:487-491
- Schmidt Anja S., Morten S. Bruun, Inger Dalsgaard, Karl Pedersen and Jens L. Larsen (2000) Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fish-Pathogenic and Environmental Bacteria Associated with Four Danish Rainbow Trout Farms. *Applied And Environmental Microbiology*, Nov., P. 4908–4915
- Schnappinger, D., and W. Hillen. (1996). Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch. Microbiol.* 165:359–369.
- Tendencia Eleonor A., Leobert D. dela Pena. (2002) Level and percentage recovery of resistance to oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* 213 1 –13
- Tymiak, A. A., C. Aklonis, M. S. Bolgar, A. D. Kahle, D. R. Kirsch, J. O'Sullivan, M. A. Porubcan, P. Principe, W. H. Trejo, H. A. Ax, J. S. Wells, H. H. Andersen, P. V. Devasthale, H. Telikepalli, D. Vander Velde, J.-Y. Zou, and L. A. Mitscher. (1993). Novel tetracycline glycosides active against tetracycline-resistant bacteria. *J. Org. Chem.* 58:535–537



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000097447