



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ: ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ**  
**ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ**  
**ΠΟΡΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

---

**Καλλιεργούμενα βακτηριακά στελέχη από το**  
**υποθαλάσσιο ηφαίστειο Κολούμπο:**  
**Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, βαρέα μέταλλα**  
**και υψηλή οξύτητα**

---

**Γαβριηλίδου Ασημένια**

Ηράκλειο, 2016



**UNIVERSITY OF CRETE**  
**DEPARTMENT OF BIOLOGY**  
**POST GRADUATE STUDIES PROGRAM**  
**ENVIRONMENTAL BIOLOGY: MANAGEMENT**  
**OF TERRESTRIAL AND MARINE BIOLOGICAL**  
**RESOURCE**

**Master (MSc) Thesis**

---

**Cultivated bacterial strains from the submarine  
volcano Kolumbo: Resistance to antibiotics,  
heavy metals and high acidity**

---

**Gavriilidou Asimena**

Heraklion, 2016

## Εξεταστική επιτροπή

### Επιβλέπουσα καθηγήτρια

Κεντούρη Μαρουδιώ (Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

### Μέλη εξεταστικής επιτροπής

Κωτούλας Γεώργιος (Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ)

Καθάριος Παντελής (Ερευνητής Γ', Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ)

### Ομάδα εργασίας

Μανδαλάκης Μανώλης (Ερευνητής, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ)

Πολυμενάκου Παρασκευή (Ερευνήτρια, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ)

Νομικού Παρασκευή (Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Γεωγραφίας και Κλιματολογίας, Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών)

Χρηστάκης Χρήστος (Υποψήφιος Διδάκτορας, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ)

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Περιβαλλοντική Βιολογία: Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων» του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Το πειραματικό μέρος της εργασίας διεξήχθη στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Χημείας και Βιοανάλυσης στο ΙΘΑΒΒΥΚ του ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ, υπό την επίβλεψη του Δρ. Μανόλη Μανδαλάκη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια μου κα. Κεντούρη Μαρουδιώ που δέχτηκε να επιβλέψει την μεταπτυχιακή μου εργασία και τους κ. Καθάριο Παντελή και κ. Κωτούλα Γεώργιο που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή, για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα. Πολυμενάκου Παρασκευή και στον Χρηστάκη Χρήστο για την άψογη συνεργασία τους, το χρόνο που αφιέρωσαν για την εκπαίδευση μου κατά τη διάρκεια του rotation και την παραχώρηση των δειγμάτων για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά όλους μου τους φίλους και φίλες που είναι κοντά μου και τους υπόλοιπους που, παρά την απόσταση που πλέον μεσολαβεί, είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένεια μου που όλα αυτά τα χρόνια με στηρίζει με κάθε δυνατό τρόπο και χωρίς αυτούς δε θα είχα τη δυνατότητα να συνεχίσω τις σπουδές μου και να ακολουθήσω τα όνειρα μου.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στον κ. Μανδαλάκη Μανόλη που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το αντικείμενο που ήθελα, πίστεψε σε μένα και, παρά τις δυσκολίες και τα εμπόδια, καταφέραμε να ολοκληρώσουμε την παρούσα εργασία. Τον ευχαριστώ για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε και όλα όσα έμαθα δίπλα του, είτε στο εργαστήριο είτε από τις συζητήσεις μας, θεωρώ ότι αποτελούν πλέον ανεκτίμητα εφόδια για τη συνέχιση της ακαδημαϊκής μου πορείας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. Ακραία περιβάλλοντα-Υδροθερμικές πηγές.....	10
1.2. Το υποθαλάσσιο ηφαίστειο Κολούμπο.....	11
1.2.1. Γεωγραφική Τοποθεσία και Μορφολογία.....	11
1.2.2. Περιγραφή υδροθερμικού πεδίου.....	13
Φυσικοχημικές συνθήκες.....	13
Βιολογικές κοινότητες.....	14
1.3. Το φαινόμενο της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών.....	15
Μικροβιακή ανθεκτικότητα στις υδροθερμικές πηγές.....	15
1.3.1. Ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα.....	16
1.3.2. Πολύανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα και αντιβιοτικά.....	16
1.3.3. Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.....	17
1.3.4. Ανθεκτικότητα σε ακραίες τιμές pH.....	20
1.4. Εφαρμογές ανθεκτικών μικροοργανισμών.....	22
1.5. Προσέγγιση θέματος-Σκοπός εργασίας.....	23
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1. Δειγματοληψία.....	26
2.2. Βακτηριακά Στελέχη.....	26
2.2.1. Απομόνωση στελεχών.....	26
2.2.2. Απομόνωση και ενίσχυση του DNA.....	28
2.2.3. Αλληλούχιση προϊόντων PCR.....	29
2.2.4. Επεξεργασία Αλληλουχιών.....	29
2.3. Μέθοδος Μικροαραιώσεων.....	29
2.3.1. Εξοπλισμός.....	30
2.3.2. Αντιμικροβιακοί Παράγοντες.....	31
2.3.2.1 Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων.....	31
2.3.3. Ενοφθάλμισμα Βακτηρίων (Inoculum).....	34
2.4. Πειραματικός Σχεδιασμός.....	35
2.5. Πειραματική Διαδικασία.....	36
2.6. Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....	38

2.6.1. Προσδιορισμός MIC50 .....	38
2.6.2. Στατιστική Ανάλυση .....	41
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
3.1. Βακτηριακά Στελέχη .....	43
3.1.1. Αποτελέσματα εύρεσης ομόλογων αλληλουχιών.....	43
3.1.2. Ιδιαιτερότητες βακτηριακών στελεχών .....	45
3.2. Ανθεκτικότητα βακτηρίων σε αντιβιοτικά σε σχέση με το βάθος.....	47
3.3. Ανθεκτικότητα βακτηρίων σε βαρέα μέταλλα και απόβλητα ελαιολιβερίου σε σχέση με το βάθος .....	49
3.4. Ανθεκτικότητα βακτηρίων σε υψηλή οξύτητα σε σχέση με το βάθος.....	52
3.5. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίων στους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες σε σχέση με το βάθος .....	53
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	60
4.1. Συζήτηση .....	61
4.2. Σύνοψη και Προοπτικές μελέτης .....	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	69

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρότι τα ακραία περιβάλλοντα της Ελλάδας παρουσιάζουν ιδιαίτερο οικολογικό ενδιαφέρον λόγω της δυναμικότητας και της υψηλής βιοποικιλότητας τους, παραμένουν ανεξερεύνητα και ανεπαρκώς μελετημένα. Οι ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν, εμποδίζουν τη διαβίωση των ανώτερων οργανισμών στα συγκεκριμένα συστήματα. Ωστόσο, οι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να προσαρμόζονται υπό τις επικρατούσες αντίξοες συνθήκες και αναμένεται να αναπτύσσουν ιδιαίτερα φαινοτυπικά ή γενωτυπικά χαρακτηριστικά που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα. Επιπλέον, υπάρχουν υποψίες ότι η διαδικασία προσαρμογής μπορεί να οδηγήσει τους μικροοργανισμούς στην ανάπτυξη πολυανθεκτικότητας ως προς διαφορετικούς τύπους χημικής/φυσικής καταπόνησης. Η υπόθεση αυτή εξετάζεται στην παρούσα εργασία, η οποία διερευνά την ανθεκτικότητα των καλλιεργούμενων βακτηρίων που απομονώθηκαν από την στήλη του νερού στο υδροθερμικό πεδίο του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο στην περιοχή της Σαντορίνης. Η συγκεκριμένη περιοχή είναι γνωστή για την εκπομπή υδροθερμικών ρευστών με υψηλές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub>, υψηλή οξύτητα και έντονη εναπόθεση βαρέων μετάλλων. Ελέγχθηκαν συνολικά 54 βακτηριακά στελέχη από τρία διαφορετικά γένη για την ανθεκτικότητα τους σε 4 βαρέα μέταλλα, 6 αντιβιοτικά, σε ένα εύρος pH από 3.6 μέχρι 9.7 καθώς και σε υγρά απόβλητα ελαιουργείων με υψηλή περιεκτικότητα τοξικών πολυφαινολικών ενώσεων. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην παρακολούθηση της βακτηριακής ανάπτυξης με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης εφαρμόζοντας διαδοχικές αραιώσεις του προς εξέταση αντιμικροβιακού παράγοντα σε μικροπλάκες 384-βοθρίων. Προσδιορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα που αναστέλλει το 50% της ανάπτυξης των μικροοργανισμών (MIC50) και πραγματοποιήθηκε σύγκριση των τιμών για τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από τα διαφορετικά βάθη της στήλης του νερού. Τα στελέχη από τα βαθύτερα στρώματα είχαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο αρσενικό, σε όλα τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και σε υψηλότερη οξύτητα σε σχέση με τα στελέχη από τα επιφανειακά νερά. Επίσης, τα βακτήρια από τα βαθύτερα στρώματα κατάφεραν να αναπτυχθούν σε μεγαλύτερο ποσοστό σε 50%, 25% και 12.5% v/v κατσίγαρου σε σχέση με τα επιφανειακά στελέχη. Για πρώτη φορά παρατηρήθηκε ότι η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά συσχετίζεται άμεσα με την αντίστοιχη ανθεκτικότητα τους στην υψηλή οξύτητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ιδιαιτερότητες του περιβάλλοντος του Κολούμπο έχουν αντίκτυπο στους μικροοργανισμούς που το αποικίζουν. Το γεγονός αυτό το καθιστά ένα εξαιρετικό «φυσικό υποθαλάσσιο εργαστήριο» για τη διερεύνηση σημαντικών οικολογικών ερωτημάτων και για τη μελέτη διαφόρων φαινομένων, όπως το φαινόμενο της οξίνισης των ωκεανών.

## ABSTRACT

The extreme environments of Greece are dynamic and highly diverse showing great ecological interest. However, they still remain unexplored and inadequately studied. The extreme environmental conditions prevent the living of higher organisms. Nevertheless, microorganisms are capable of adjusting in hostile conditions and they are expected to develop unique characteristics conferring resistance. Moreover, this adaptation is suspected to induce the multiresistance of microorganisms against different types of chemical/physical stress. This hypothesis is examined in this study. We investigated the resistance of cultivated bacteria isolated from the water column above the hydrothermal vent field of the submarine volcano Kolumbo of Santorini. This region is unique because of the discharge of CO<sub>2</sub>-rich hydrothermal fluids, the high acidity within the crater and the rich metal deposits. 54 bacterial strains belonging to three different genera were examined for their resistance to 4 heavy metals, 6 antibiotics, a pH range (from 3.6 to 9.7) and olive oil mill waste with high content of toxic polyphenolic compounds. The applied method is based on monitoring the bacterial growth by measuring the optical density of bacterial subcultures containing serial dilutions of the studied antimicrobial agent in 384-well microplates. We compared the antimicrobial resistance of the bacteria isolated from different depths of the water column, according to the minimum concentration that inhibits 50% of the bacterial growth (MIC<sub>50</sub>). The bacterial strains from the deeper layer of the water column showed higher resistance to arsenic, antibiotics and lower pH values compared with the bacteria from shallower waters. Furthermore, a higher percentage of the strains from the deeper waters managed to grow in 50%, 25% and 12.5% v/v of olive oil mill waste in relation to the shallower strains. To our knowledge, this is the first report of correlation between antibiotic and high acidity resistance. The results support the fact that Kolumbo's unique environment has a great impact on its microbial inhabitants. Therefore, Kolumbo serves as an excellent "underwater natural laboratory" for the investigation of important ecological questions and different phenomena, such as the ocean acidification.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1. Ακραία περιβάλλοντα-Υδροθερμικές πηγές

Γενικά, ως «ακραία» χαρακτηρίζονται τα περιβάλλοντα στα οποία επικρατούν μη-φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας, pH, πίεσης, υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, μετάλλων, διάφορων διαλυτών, ή χαρακτηρίζονται από ξηρασία ή υπερβολική έκθεση σε ακτινοβολίες (Canganella and Wiegel, 2011). Χαρακτηριστικά παραδείγματα ακραίων περιβαλλόντων αποτελούν οι θερμές χερσαίες πηγές, οι υπεραλμυρές λίμνες, οι έρημοι, τα μονίμως παγωμένα εδάφη, οι περιοχές εξόρυξης και οι υδροθερμικές πηγές (Rothschild and Mancinelli, 2001). Παρά τις αφιλόξενες συνθήκες, έχει βρεθεί ότι πληθώρα μικροοργανισμών επιβιώνουν και αναπτύσσονται σε αυτά τα περιβάλλοντα. Αυτοί οι οργανισμοί, γνωστοί ως «ακραιόφιλοι», ανήκουν κατά πλειοψηφία στο μικροβιακό κόσμο (Βακτήρια, Αρχαία, ευκαρυώτες) (Rothschild and Mancinelli, 2001).

Στο θαλάσσιο περιβάλλον βρίσκεται ένα από τα πιο δυναμικά οικοσυστήματα της Γης από άποψη φυσικοχημείας και βιολογίας, αυτό των υδροθερμικών πηγών. Οι υδροθερμικές πηγές θεωρούνται ως σημεία διεπαφής της βαθιάς θάλασσας και του ανώτερου μανδύα της γης. Σε αυτές τις περιοχές, το θαλασσινό νερό διεισδύει μέσα από ρωγμές και σχισμές του ωκεάνιου φλοιού και θερμαίνεται από το μάγμα. Το καυτό νερό μετασχηματίζεται χημικά, λόγω των αλληλεπιδράσεων με τα πετρώματα και τα ηφαιστειακά αέρια, και μετατρέπεται σε υδροθερμικό ρευστό. Τελικά, η απορροή των καυτών υδροθερμικών ρευστών στον ωκεανό προκαλεί το σχηματισμό της υδροθερμικής πηγής (Holden *et al.*, 2012).

Τα υδροθερμικά ρευστά που εξέρχονται στον ωκεανό είναι ανοξικά, ανηγμένα, όξινα (με pH από 2 έως 4) και εμπλουτισμένα σε διοξείδιο του άνθρακα, πυρίτιο, υδρόθειο, μεθάνιο, σίδηρο, ψευδάργυρο, χαλκό και άλλα μεταβατικά μέταλλα (Von Damm, 1995; Fisher *et al.*, 2007). Η ανάμιξη των καυτών υδροθερμικών ρευστών με το ψυχρό θαλασσινό νερό προκαλεί την κατακρήμνιση των διαλυμένων αυτών μετάλλων και τον σχηματισμό των υδροθερμικών καμινάδων, που φέρουν εναποθέσεις μετάλλων πλούσιων σε σουλφίδια σιδήρου, χαλκού και ψευδαργύρου (Fisher *et al.*, 2007).

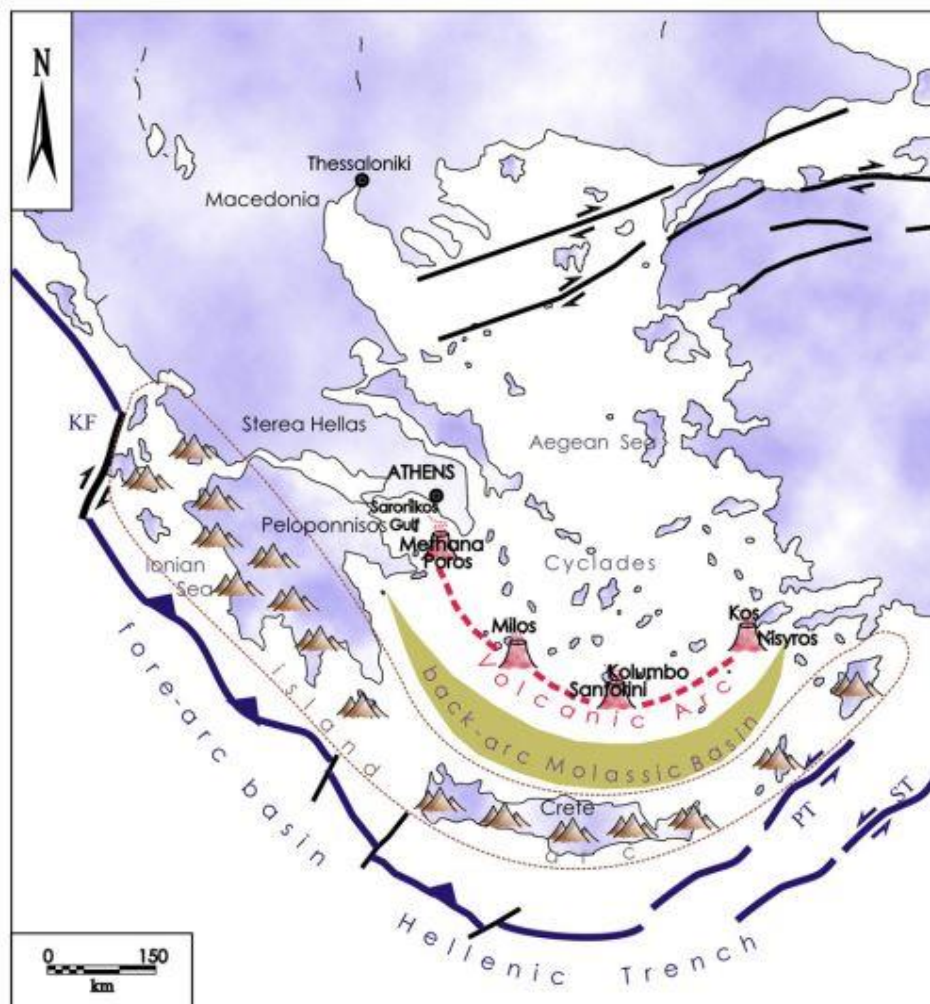
Οι απότομες φυσικοχημικές διαβαθμίσεις που επικρατούν σε διάφορα σημεία της περιοχής των υδροθερμικών πηγών, δημιουργούν μια μεγάλη ποικιλία μικροπεριβαλλόντων για την αποίκιση μικροοργανισμών (Fisher *et al.*, 2007). Οι εξαιρετικά ποικίλες μικροβιακές κοινότητες των υδροθερμικών πηγών αποτελούνται από ψυχρόφιλους, μεσόφιλους, θερμόφιλους και υπερθερμόφιλους, χημειολιθοαυτότροφους ή ετερότροφους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται χάρη στην αφθονία ανόργανων θρεπτικών και οργανικών πηγών ενέργειας ή άνθρακα (Takai *et al.*, 2006). Αυτοί οι οργανισμοί υπάρχουν ως ελεύθερες μορφές ζωής εντός των εκλυόμενων υδροθερμικών ρευστών, εντός των αναμειγμένων με το θαλασσινό νερό ρευστών και ως μικροβιακά στρώματα στα ιζήματα. Επίσης,

απαντώνται με τη μορφή βιοφίλμ στην επιφάνεια ασπόνδυλων, καθώς και ως υποχρεωτικοί συμβιώτες ασπόνδυλων (Karl, 1995; Jeanthon, 2000; Takai *et al.*, 2006).

## 1.2. Το υποθαλάσσιο ηφαιστειο Κολούμπο

### 1.2.1. Γεωγραφική Τοποθεσία και Μορφολογία

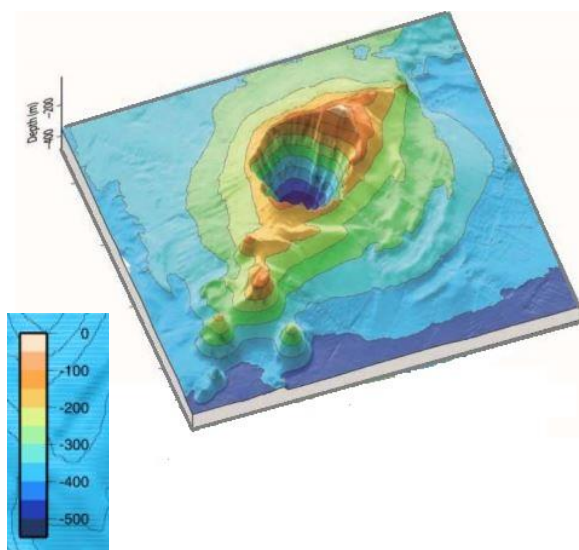
Το Ελληνικό Ηφαιστειακό Τόξο εκτείνεται βόρεια του Ελληνικού Νησιωτικού Τόξου στην περιοχή των Κυκλάδων (Εικόνα 1.1.) και είναι αποτέλεσμα της καταβύθισης του βόρειου τμήματος του ωκεάνιου φλοιού της Αφρικανικής τεκτονικής πλάκας κάτω από το νότιο άκρο της Ευρασιατικής ηπείρου (McKenzie, 1972; Le Pichon and Angelier, 1979). Αποτελείται από τέσσερα ηφαιστειακά πεδία: των Μεθάνων-Πόρου, της Μήλου, της Σαντορίνης και της Νισύρου (Sakellariou *et al.*, 2010; Nomikou *et al.*, 2012) (Εικόνα 1.1.).



Εικόνα 1.1. Σύγχρονο γεωδυναμικό πρότυπο της Ελλάδος. Απεικονίζεται το Ελληνικό Ηφαιστειακό τόξο που εκτείνεται παράλληλα με το Ελληνικό Νησιωτικό τόξο Πελοποννήσου-Κρήτης και την Ελληνική Τάφρο (Nomikou *et al.*, 2012).

Σύμφωνα με τους Nomikou *et al.* (2012), το ηφαιστειογενές νησί της Σαντορίνης αντιπροσωπεύει σήμερα το πιο ενεργό ηφαιστειακό πεδίο του Ελληνικού Ηφαιστειακού Τόξου. Λίγα χιλιόμετρα βορειοανατολικά της Σαντορίνης εκτείνεται μια μικρή, επιμήκης λεκάνη (η Άνυδρος Λεκάνη) στον πυθμένα της οποίας βρίσκονται περισσότεροι από 20 ηφαιστειακοί κώνοι διαφόρων μεγεθών, με μεγαλύτερο εξ' αυτών το υποθαλάσσιο ηφαίστειο Κολούμπο (Sigurdsson *et al.*, 2006; Sakellariou *et al.*, 2010; Carey *et al.*, 2011; Nomikou *et al.*, 2012; Nomikou, Papanikolaou, *et al.*, 2013).

Το υποθαλάσσιο ηφαίστειο Κολούμπο έχει διάμετρο περίπου 3 km και ο επίπεδος πυθμένας του βρίσκεται στα 504 m βάθος. Ο κρατήρας του έχει κυκλικό σχήμα με διάμετρο 2 km και δημιουργήθηκε από την κατάρρευση ενός ηφαιστειακού κώνου αντίστοιχου μεγέθους (Nomikou, 2004). Σύμφωνα με ιστορικές αναφορές, αποτελεί μια δραματική απόδειξη πρόσφατης ηφαιστειακής δραστηριότητας, καθώς το 1690 μ.Χ. η έκρηξη του προκάλεσε το θάνατο σε 70 κατοίκους της Σαντορίνης (Fouque, 1879). Το χείλος του κρατήρα φτάνει περίπου στα 150 m από την επιφάνεια της θάλασσας και σε συνδυασμό με τις απότομες κάθετες εσωτερικές κατωφέρειες του, ο κρατήρας καθίσταται τελείως κλειστός από όλες τις πλευρές (Nomikou, 2004; Nomikou *et al.*, 2012; Nomikou, Papanikolaou, *et al.*, 2013) (Εικόνα 1.2.).



Εικόνα 1.2. 3-D βαθυμετρική απεικόνιση του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο που δείχνει το σχήμα του κρατήρα και τις απότομες κατωφέρειες του (Nomikou *et al.*, 2013; Rizzo *et al.*, 2016).

### 1.2.2. Περιγραφή υδροθερμικού πεδίου

Το υδροθερμικό πεδίο του Κολούμπο εκτείνεται στο βόρειο τμήμα του πυθμένα του κρατήρα και είναι ανεπαρκώς μελετημένο λόγω της πρόσφατης ανακάλυψής του, μόλις το 2006, κατά τη διάρκεια μιας αποστολής με υποβρύχιο τηλεχειριζόμενο όχημα (ROV) (Sigurdsson *et al.*, 2006). Πιο πρόσφατες υποθαλάσσιες έρευνες, το 2010 και 2011, επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του εκτενούς υδροθερμικού πεδίου σε βάθος 495 και 500m, το οποίο χαρακτηρίζεται από έντονη υδροθερμική δραστηριότητα στο κεντρικό του τμήμα και λιγότερο ενεργές καμινάδες στο βόρειο τμήμα του πυθμένα (Sigurdsson *et al.*, 2006; Carey *et al.*, 2011; Kiliyas *et al.*, 2013). Οι καμινάδες αποτελούνται από θειούχα-θειικά δομικά στοιχεία και σχηματίζουν κάθετες σπειροειδείς δομές, πυραμίδες ή απλά υψώματα (Sigurdsson *et al.*, 2006; Kiliyas *et al.*, 2013). Κύρια χημικά στοιχεία των δομών αυτών είναι ο Fe, S, Ba, Si, Pb, Zn και το Sr, ενώ καταγράφηκαν ασυνήθιστα υψηλές συγκεντρώσεις σε Tl και Sb που δεν έχουν ξαναβρεθεί σε αντίστοιχες εναποθέσεις γεωλογικών υδροθερμικών δομών (Kiliyas *et al.*, 2013).

#### Φυσικοχημικές συνθήκες

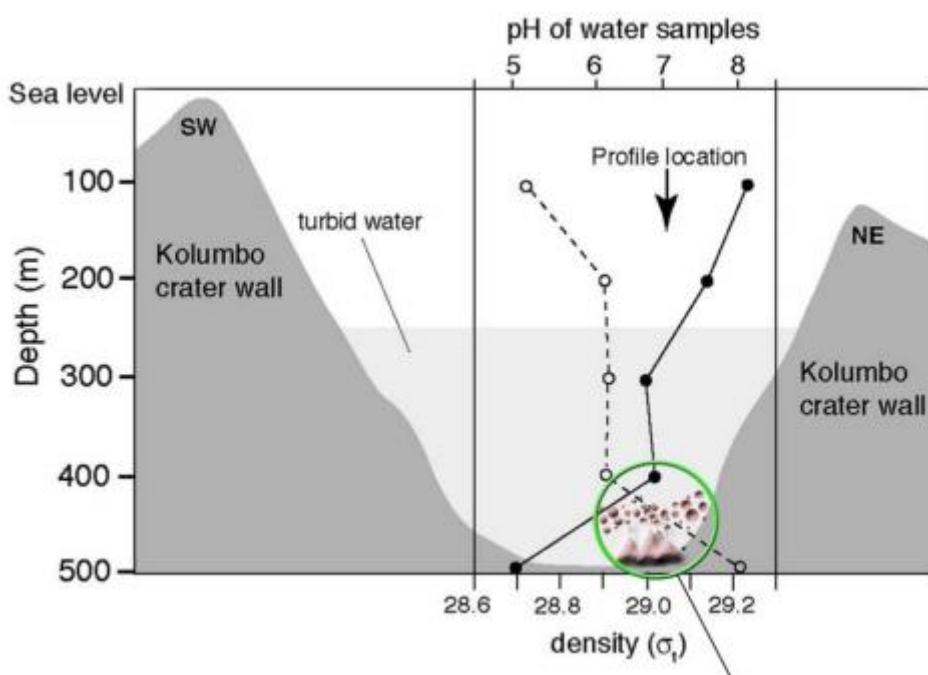
Όπως αναφέρεται σε προηγούμενες μελέτες, το συγκεκριμένο υδροθερμικό πεδίο παρουσιάζει ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό που το καθιστά μοναδικό σε σχέση με άλλα παρόμοια περιβάλλοντα και είναι η έκλυση υδροθερμικών ρευστών υψηλής θερμοκρασίας (μέχρι και 220 °C) μαζί με την απελευθέρωση φυσαλίδων αερίου (Sigurdsson *et al.*, 2006; Carey *et al.*, 2011; Kiliyas *et al.*, 2013) (Εικόνα 1.3.).



Εικόνα 1.3. Απελευθέρωση φυσαλίδων αερίου και υδροθερμικών ρευστών από ενεργή καμινάδα του υδροθερμικού πεδίου του Κολούμπο. Η λήψη της φωτογραφίας έγινε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος SeaBiotech από την ομάδα του ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ.



Το αέριο αυτό αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από καθαρό CO<sub>2</sub> (>99%) και σε μικρότερο ποσοστό από CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>. Μετά την έκλυση του αερίου, το CO<sub>2</sub> διαλυτοποιείται και δεσμεύεται από το θαλασσινό νερό, με αποτέλεσμα την τοπική αύξηση της πυκνότητας του. Επιπλέον, η κλειστή μορφολογία του κρατήρα ευνοεί τη δημιουργία ενός είδους «στρωμάτωσης» που δεν επηρεάζεται από τις διεργασίες κάθετης ανάμιξης. Η δέσμευση του CO<sub>2</sub> σε συνδυασμό με την στρωματοποίηση της στήλης του νερού σε βάθος 250 με 400 m περίπου, οδηγούν στη συσσώρευση όξινου θαλασσινού νερού (με τιμή pH περίπου 5.0) στον πυθμένα του κρατήρα (Carey *et al.*, 2013) (Εικόνα 1.4.).



Εικόνα 1.4. Κάθετο προφίλ pH (μαύρες κουκκίδες) και πυκνότητας (λευκές κουκκίδες) του θαλασσινού νερού πάνω από το υδροθερμικό πεδίο που βρίσκεται εντός κρατήρα του Κολούμπο. Με γκρι σκίαση απεικονίζεται η στρωματοποίηση του νερού κάτω από τα 250 m (Carey *et al.*, 2013).

### Βιολογικές κοινότητες

Σε αντίθεση με άλλα παρόμοια ακραία θαλάσσια περιβάλλοντα, το υδροθερμικό πεδίο του Κολούμπο στερείται μακροπανίδας, όπως ψάρια, μύδια, γαρίδες, σωληνοειδή κλπ. Η απουσία αυτή μπορεί να σχετίζεται με τις όξινες συνθήκες που επικρατούν γενικότερα στον πυθμένα ή με την απομονωμένη φύση του κρατήρα. Η βιολογική κοινότητα που αφθονεί, αποτελείται από βακτήρια και αρχαία, τα οποία καλύπτουν το μεγαλύτερο τμήμα του εξωτερικού των καμινάδων και εκτείνονται στο ίζημα που τις περιβάλλει (Carey *et al.*, 2013; Kiliyas *et al.*, 2013). Ο πυθμένας του κρατήρα καλύπτεται, σε μια έκταση περίπου 7km<sup>2</sup>, από πορτοκαλί-καφέ μικροβιακά στρώματα πάχους μερικών εκατοστών, εμπλουτισμένα σε Fe, ενώ η στήλη του νερού στον κρατήρα, σε βάθος μεγαλύτερο από 250 m, είναι θολή, λόγω

της αφθονίας των βακτηριακών νηματίων και άλλων αιωρούμενων σωματιδίων (Sigurdsson *et al.*, 2006; Carey *et al.*, 2013; Kiliyas *et al.*, 2013). Οι μικροβιακές κοινότητες από δείγματα καμινάδων και δείγματα του περιβάλλοντος ιζήματος παρουσίασαν υψηλή βιοποικιλότητα, γεγονός που χαρακτηρίζει τη δυναμική φύση αυτών των ενδιαιτημάτων, με κυρίαρχη ομάδα τα Πρωτεοβακτήρια (Kiliyas *et al.*, 2013).

### 1.3. Το φαινόμενο της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών

Το φαινόμενο της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε διάφορους τοξικούς παράγοντες και κυρίως στα αντιβιοτικά απασχολεί ιδιαίτερα την επιστημονική κοινότητα τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς η εξάπλωση του αποτελεί μείζονα απειλή για τη δημόσια υγεία (Baker-Austin *et al.*, 2006; Wright, 2010). Για το λόγο αυτό, μέχρι πρόσφατα, η πλειοψηφία των ερευνών επικεντρωνόταν στη μελέτη βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (antibiotic-resistant bacteria) από κλινικά περιβάλλοντα (Alonso *et al.*, 2000), απόβλητα βιομηχανικών εγκαταστάσεων (Stepanauskas *et al.*, 2005), γεωργικών μονάδων και υδατοκαλλιεργειών (Seiler and Berendonk, 2012). Λίγα είναι γνωστά για την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών που απαντώνται στα φυσικά περιβάλλοντα, τα οποία δεν επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από ανθρωπογενείς δραστηριότητες (De Souza *et al.*, 2006; Dib *et al.*, 2008; Bartoloni *et al.*, 2009; Farias *et al.*, 2015). Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα έχει μετατοπιστεί, καθώς έχει επικρατήσει η άποψη ότι το φυσικό περιβάλλον αποτελεί μια τεράστια δεξαμενή ανθεκτικών μικροοργανισμών που περιλαμβάνουν γονίδια-ανθεκτικότητας, τα οποία ενδεχομένως έχουν την ικανότητα μεταφοράς μέσω πλασμιδίων σε παθογόνα για τον άνθρωπο είδη (Alonso *et al.*, 2001; Summers, 2002; Stepanauskas *et al.*, 2006; Wright, 2010; Hatosy and Martiny, 2015).

#### Μικροβιακή ανθεκτικότητα στις υδροθερμικές πηγές

Σε ένα φυσικό σύστημα όπως αυτό των υδροθερμικών πηγών, όπου επικρατούν ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, θεωρείται αναμενόμενη η ύπαρξη ανθεκτικών μικροοργανισμών (Vetriani *et al.*, 2005). Οι μικροοργανισμοί που απαντώνται στις υδροθερμικές πηγές, υπόκεινται σε φυσικοχημικές καταπονήσεις που περιλαμβάνουν υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες, υψηλή αλατότητα, μεγάλες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, καθώς και ακραίες τιμές pH (Priour, 1997; Synnes, 2007). Η ανάπτυξη ιδιαίτερων μηχανισμών προσαρμογής, τους παρέχει την ικανότητα να επιβιώνουν και να αφθονούν υπό τις εκάστοτε περιβαλλοντικές πιέσεις (Dib *et al.*, 2008; Canganella and Wiegell, 2011).

### 1.3.1. Ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα

Στις υδροθερμικές πηγές, οι μικροοργανισμοί εκτίθενται κατά φυσικό και συνεχή τρόπο στα μεταλλικά στοιχεία, τα οποία απελευθερώνονται μέσω των υδροθερμικών ρευστών που εκλύονται από το εσωτερικό της γης. Όταν τα θερμά, πλούσια σε μεταλλικά στοιχεία υδροθερμικά ρευστά αναμιγνύονται με το κρύο, οξυγονωμένο θαλασσινό νερό, οι οργανισμοί που ζουν εκεί αντιμετωπίζουν μια μικροχωρική «διαβάθμιση» τοξικότητας (Llanos *et al.*, 2000; Luther *et al.*, 2001; Vetriani *et al.*, 2005). Έχει αποδειχθεί ότι, εκτός από το βιολογικό της στόχο, η τοξικότητα των μετάλλων εξαρτάται άμεσα και από τη διαθεσιμότητα του μετάλλου στο περιβάλλον, η οποία ελέγχεται από τη θερμοκρασία, το pH, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, τις ανόργανες και οργανικές χηλικές ενώσεις που απαντώνται (Gadd and Griffiths, 1978).

Είναι γνωστό ότι οι μικροοργανισμοί έχουν υιοθετήσει ποικίλες στρατηγικές για να διαχειρίζονται και να αποφεύγουν την τοξικότητα των μεταλλικών ιόντων (Gadd and Griffiths, 1978; Llanos *et al.*, 2000; Holden and Adams, 2003). Παρουσία τοξικών μετάλλων, μπορούν να επιβιώσουν μέσω εγγενών ιδιοτήτων τους που σχετίζονται με τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος, την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών που ευνοούν την προσκόλληση ιόντων στην επιφάνεια του κυττάρου και την απουσία συστημάτων μεταφοράς, όπως είναι οι ειδικές αντλίες εκροής. Εναλλακτικά, οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας έχουν χρωμοσωματική ή εξωχρωμοσωματική (πλασμιδιακή) προέλευση και περιλαμβάνουν την αποτοξίνωση μέσω ειδικών συστημάτων εκροής, τη δέσμευση των ιόντων από ειδικούς παράγοντες, την τροποποίηση των μεμβρανικών συστημάτων μεταφοράς και τον ενζυμικό μετασχηματισμό σε λιγότερο τοξικά ή λιγότερο διαθέσιμα είδη μεταλλικών ιόντων (Gadd and Griffiths, 1978; Bruins *et al.*, 2000; Llanos *et al.*, 2000; Holden and Adams, 2003) (Πίνακας 1.1.).

Πίνακας 1.1. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας μικροοργανισμών σε βαρέα μέταλλα.

Εγγενείς μηχανισμοί	Επίκτητοι μηχανισμοί
Μη-διαπερατό κυτταρικό τοίχωμα	Αποτοξίνωση με ειδικά συστήματα εκροής
Παραγωγή εξωπολυσακχαριτών	Δέσμευση ιόντων από ειδικούς δεσμευτικούς παράγοντες
Απουσία συστημάτων μεταφοράς	Τροποποίηση συστημάτων μεταφοράς Ενζυμικός μετασχηματισμός μετάλλων

### 1.3.2. Πολύανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα και αντιβιοτικά

Τις τελευταίες δεκαετίες, πολλές μελέτες αναφέρουν την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στην ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα και αντιβιοτικά, τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά απομονωθέντα στελέχη (Allen *et al.*, 1977;



Calomiris, 1984; Alonso *et al.*, 2000; Pathak and Gopal, 2005; El-Sayed, 2016). Η συσχέτιση αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι πολλαπλά γονίδια που είναι υπεύθυνα για δύο ή περισσότερους τύπους ανθεκτικότητας μπορεί να βρίσκονται στο ίδιο μεταθετό γενετικό στοιχείο (πλασμίδιο, τρανσποζόνιο ή ιντεγκρόνιο), φαινόμενο γνωστό και ως συνανθεκτικότητα (co-resistance) (Summers, 2002; Chapman, 2003; Baker-Austin *et al.*, 2006). Εναλλακτικά, υπεύθυνη μπορεί να είναι η διασταυρούμενη ανθεκτικότητα (cross-resistance), δηλαδή το φαινόμενο κατά το οποίο το κύτταρο ενεργοποιεί το ίδιο μονοπάτι ή μηχανισμό για την αντιμετώπιση δύο ή περισσότερων διαφορετικών αντιμικροβιακών παραγόντων (Chapman, 2003). Ως μηχανισμός ανθεκτικότητας, τόσο έναντι των βαρέων μετάλλων όσο και των αντιβιοτικών, έχει αναφερθεί, επίσης, ο σχηματισμός βιοφίλμ από τα βακτήρια (Baker-Austin *et al.*, 2006).

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, η έκθεση των μικροβιακών συναθροίσεων στον έναν τοξικό παράγοντα μπορεί να επιφέρει την εξελικτική επιλογή βακτηρίων με ανθεκτικότητα σε πολλαπλούς, χημικά μη-σχετικούς τοξικούς παράγοντες. Η συγκεκριμένη διαδικασία παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς η δημιουργία πολυανθεκτικών βακτηρίων μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις τόσο στο περιβάλλον όσο και στην ανθρώπινη υγεία (Baker-Austin *et al.*, 2006; Sterpanauskas *et al.*, 2006). Η ανησυχία αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι πρόσφατα έχουν αναφερθεί περιπτώσεις μικροοργανισμών από ακραία περιβάλλοντα με ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα, αλλά και ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά που, παραδόξως, δεν απαντώνται στο περιβάλλον από το οποίο αυτοί απομονώθηκαν (De Souza *et al.*, 2006; Dib *et al.*, 2008; Farias *et al.*, 2015).

### 1.3.3. Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

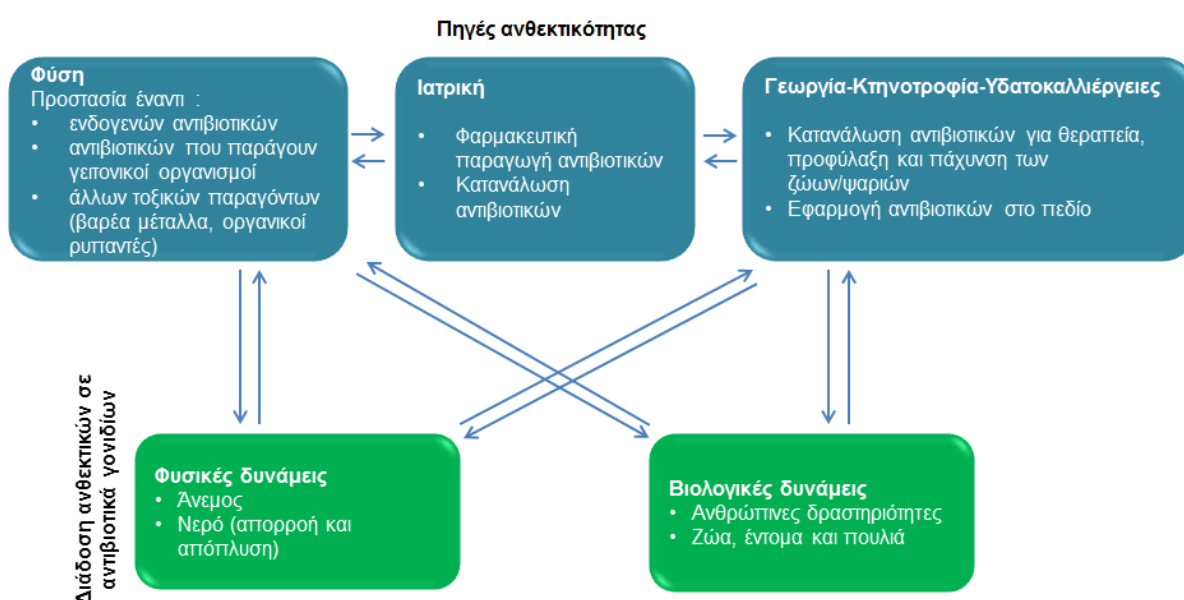
Οι πρώτες ενώσεις με αντιμικροβιακή δράση που ανακαλύφθηκαν στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα είχαν φυσική προέλευση και ο όρος «αντιβιοτικό» χρησιμοποιούταν για να περιγράψει μια χημική ένωση που παράγεται από έναν μικροοργανισμό και παρεμποδίζει την ανάπτυξη κάποιου άλλου. Με την πάροδο του χρόνου, ο ορισμός αυτός επεκτάθηκε ώστε να περιλαμβάνει τα συνθετικά και ημισυνθετικά προϊόντα. Πλέον, με μια ευρύτερη έννοια, ως αντιβιοτικό ορίζεται ένας χημειοθεραπευτικός παράγοντας που παρεμποδίζει ή καταλύει την ανάπτυξη μικροοργανισμών, όπως βακτηρίων, μυκήτων ή πρωτόζωων (Kümmerer, 2009).

Υπάρχουν τέσσερις βασικοί μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών εναντίον των μικροοργανισμών: 1. παρέμβαση στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, 2. αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, 3. παρέμβαση στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και 4. αναστολή μεταβολικών μονοπατιών (Neu, 1992; Thakur *et al.*, 2008). Σύμφωνα με αυτούς τους μηχανισμούς δράσης, γίνεται κατάταξη των αντιβιοτικών σε ομάδες (Πίνακας 1.2.).

Πίνακας 1.2. . Κατάταξη των αντιμικροβιακών παραγόντων ανάλογα με το μηχανισμό δράσης (τροποποιήθηκε από Neu, 1992; Thakur *et al.*, 2008).

Μηχανισμός Δράσης	Αντιμικροβιακός παράγοντας
Αναστολή σύνθεσης ή καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος	β-Λακτάμες: πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, καρβαπενέμες, μονοβακτάμες
Αναστολή πρωτεϊνικής σύνθεσης	Μακρολίδια, χλωραμφενικόλη, Αμινογλυκοσιδία, Τετρακυκλίνες
Αναστολή σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων	Φλουοροκινολόνες, ριφαμπίνη
Αναστολή μεταβολικού μονοπατιού	Σουλφοναμίδες, ανάλογα φολικού οξέος
Διατάραξη δομής βακτηριακής μεμβράνης	Πολυμυξίνες, δαπτομυκίνη

Από την ανακάλυψη της Πενικιλίνης κι έπειτα, έχουν παρασκευαστεί εκατομμύρια τόνοι αντιβιοτικών που προορίζονται για ανθρώπινο όφελος, όπως η θεραπεία ασθενών ή για τη βιομηχανία παραγωγής τροφίμων. Μετά τη χρήση τους, τα αντιβιοτικά καταλήγουν στο περιβάλλον και διασπείρονται ευρέως, με αποτέλεσμα τη συνεχή πίεση προς τους πληθυσμούς των μικροβίων και τη δημιουργία ολοένα ανθεκτικότερων στελεχών σε όλα τα περιβάλλοντα (Allen *et al.*, 2010; Davies and Davies, 2010) (Εικόνα 1.5.).



Εικόνα 1.5. Πηγές και μετακίνηση γονιδίων αντιβιοτικής ανθεκτικότητας στο περιβάλλον. Τα γονίδια ανθεκτικότητας υπάρχουν στη φύση εξαιτίας διάφορων επιλεκτικών πιέσεων. Ο άνθρωπος ασκεί επιπρόσθετη επιλεκτική πίεση με την υπέρμετρη χρήση και κατανάλωση αντιβιοτικών σε διάφορους τομείς. Φυσικές και βιολογικές διεργασίες προκαλούν την ευρεία διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας ανάμεσα στα διάφορα περιβάλλοντα (τροποποιήθηκε από Allen *et al.*, 2010).

Όσον αφορά στο θαλάσσιο περιβάλλον, η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά μπορεί να προκύψει στις παράκτιες περιοχές όπου οι απορροές από χερσαίες πηγές μεταφέρουν κατηγορίες ανθεκτικών βακτηρίων που τυπικά δεν απαντώνται στο θαλάσσιο περιβάλλον. Επίσης, οι απορροές που σχετίζονται με την ανθρωπογενή κατανάλωση αντιβιοτικών ασκούν πίεση προς τα γηγενή στο θαλάσσιο περιβάλλον βακτήρια και τα καθιστούν ανθεκτικά (Hatosy and Martiny, 2015).

Ωστόσο, η εμφάνιση των αντιβιοτικών στο φυσικό περιβάλλον δεν οφείλεται αποκλειστικά στην αλόγιστη και κακή χρήση τους από τον άνθρωπο (Allen *et al.*, 2010), αλλά μπορεί να προκύψει ως φαινοτυπική και γενοτυπική απόκριση σε ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών της φυσικής μικροβιακής κοινότητας (Farias *et al.*, 2015; Hatosy and Martiny, 2015). Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν την ύπαρξη ανθεκτικών σε αντιβιοτικά μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από ακραία φυσικά περιβάλλοντα, όπως βαθιά χερσαία υποστρώματα (Brown and Balkwill, 2009), απομονωμένους υγροτόπους σε μεγάλο υψόμετρο (Dib *et al.*, 2008) και υδροθερμικές πηγές (Xu *et al.*, 2007; Farias *et al.*, 2015). Τα περιβάλλοντα αυτά θεωρούνται ανεπηρέαστα από τις ανθρώπινες δραστηριότητες, όμως οι στρεσογόνες συνθήκες που επικρατούν, εντείνουν τα φαινόμενα ανταγωνισμού ανάμεσα στους μικροοργανισμούς (Farias *et al.*, 2015).

Ένα βακτήριο μπορεί να παράγει ένα αντιβιοτικό για να σκοτώσει ή να παρεμποδίσει τα γειτονικά βακτήρια, με σκοπό την απόκτηση οικολογικού πλεονεκτήματος. Για την επιτυχία αυτής της στρατηγικής, τα βακτήρια που παράγουν αντιβιοτικά έχουν αποκτήσει μηχανισμούς ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που παράγουν, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς σε άλλα βακτήρια μέσω διάφορων μεταθετών γενετικών στοιχείων (Thakur *et al.*, 2008). Ανεξάρτητα από τον τρόπο απόκτησης της ανθεκτικότητας, οι βιολογικοί μηχανισμοί αντιμετώπισης των αντιβιοτικών περιλαμβάνουν την καταστροφή, το μετασχηματισμό, την αποβολή του αντιβιοτικού στο εξωτερικό του κυττάρου με ειδικές αντλίες εκροής ή την τροποποίηση του υποδοχέα στον οποίο προσδένεται το εκάστοτε αντιβιοτικό (Neu, 1992; Thakur *et al.*, 2008).

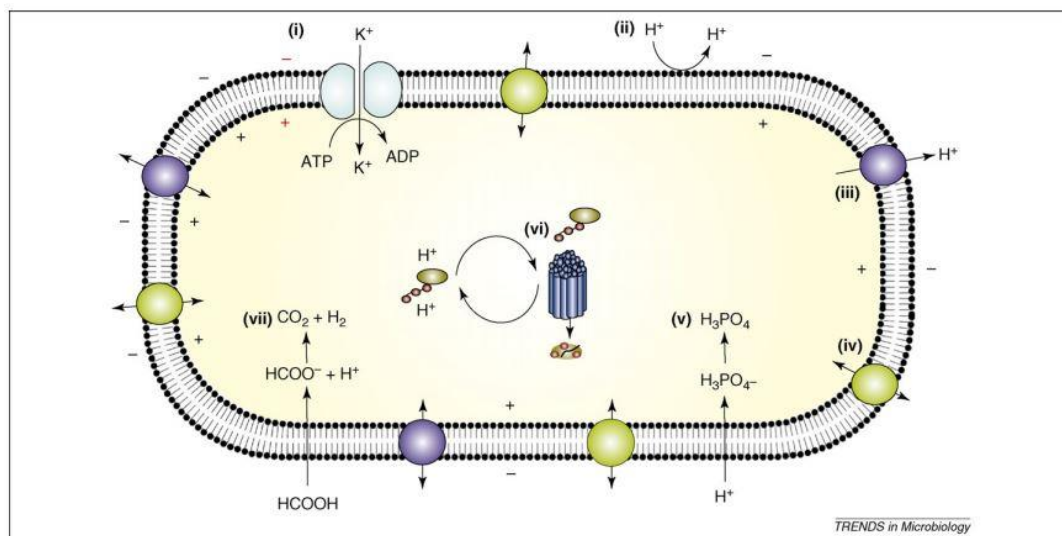
Εκτός από το μικροβιακό ανταγωνισμό, η παρουσία αντιβιοτικής ανθεκτικότητας σε «παρθένα» περιβάλλοντα στηρίζει, επίσης, την υπόθεση ότι η ανθεκτικότητα αποτελεί ένα αρχέγονο γενετικό φαινόμενο που προϋπήρχε της ανακάλυψης των αντιβιοτικών (Bhullar *et al.*, 2012). Μελέτες έχουν δείξει ότι γονίδια ανθεκτικότητας υπήρχαν σε βακτήρια που δεν παράγουν αντιβιοτικά, πριν ακόμα από την ευρεία διάδοση της χρήσης των αντιβιοτικών από τον άνθρωπο (Smith, 1967; Hughes and Datta, 1983; Houndt and Ochman, 2000). Επομένως, οι παράγοντες που καθορίζουν την αντιβιοτική ανθεκτικότητα προϋπήρχαν στη φύση και η γενετική ανταλλαγή

τους απλώς συνέβαλλε στη ταχεία εξάπλωση της ανθεκτικότητας στα παθογόνα βακτήρια (Allen *et al.*, 2010).

#### 1.3.4. Ανθεκτικότητα σε ακραίες τιμές pH

Στο περιβάλλον των υδροθερμικών πηγών, το pH του θαλασσινού νερού αναμένεται να αγγίζει ακραίες χαμηλές τιμές, κι αυτό οφείλεται στην επαφή των πλούσιων σε CO<sub>2</sub> υδροθερμικών ρευστών με το νερό του πυθμένα. Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η αλλαγή στη χημεία του θαλασσινού νερού μπορεί να επηρεάσει τη βενθική βιοκοινότητα (Yanagawa *et al.*, 2012), ωστόσο οι επιπτώσεις που επιφέρει στους μικροοργανισμούς παραμένουν ασαφείς.

Οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν ακραία όξινα περιβάλλοντα, όπως οι υδροθερμικές πηγές, ονομάζονται «οξύφιλοι» και αναπτύσσονται σε ένα βέλτιστο pH μικρότερο του 3. Όπως και οι ουδετερόφιλοι, έτσι και οι οξύφιλοι μικροοργανισμοί για να μπορέσουν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν θα πρέπει να έχουν την ικανότητα διατήρησης του ενδοκυτταρικού τους pH κοντά στο 7. Για τη διατήρηση της ομοιόστασης του pH, έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς που αφορούν τόσο στη δομή του κυττάρου, όσο και στις βιοχημικές τους δραστηριότητες (Baker-Austin and Dopson, 2007; Krulwich *et al.*, 2011; Dhakar and Pandey, 2016) (Εικόνα 1.6.).



Εικόνα 1.6. Μηχανισμοί που σχετίζονται με την ομοιόσταση του pH στους οξύφιλους μικροοργανισμούς. i) Ανεστραμμένο μεμβρανικό δυναμικό για μερική εκτροπή της εισροής πρωτονίων, ii) Ιδιαίτερα αδιαπέραστη μεμβράνη που καθυστερεί την εισροή πρωτονίων στο κυτταρόπλασμα, iii) Ενεργός μεταφορά πρωτονίων από ειδικές πρωτεΐνες-μεταφορείς για τη διατήρηση της διαβάθμισης του pH, iv) Μεγαλύτερο ποσοστό δευτερογενών μεταφορέων σε σχέση με τα ουδετερόφιλα, με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση ενέργειας, v) Ένζυμα και/ή χημικές ενώσεις ικανές για τη δέσμευση και απομόνωση των πρωτονίων, vi) Μεγαλύτερο ποσοστό συστημάτων επιδιόρθωσης του DNA και των πρωτεϊνών από τα ουδετερόφιλα και vii) Αποικοδόμηση οργανικών οξέων που δρουν ως αποσυζευκτές πρωτονίων (Baker-Austin and Dopson, 2007).



Spencer *et al.*, 2008; Fabricius *et al.*, 2011; Raulf *et al.*, 2015). Λόγω της σημειακής εκπομπής CO<sub>2</sub>, η ευρύτερη περιοχή που περιβάλλει τις υδροθερμικές πηγές παρουσιάζει μια έντονη, φυσική διαβάθμιση διαλελυμένου CO<sub>2</sub> που μπορεί να μιμηθεί τις πιθανές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub>, όπως έχουν προβλεφθεί για το μέλλον των ωκεανών. Τα συστήματα αυτά αντιπροσωπεύουν ιδανικές τοποθεσίες («φυσικά εργαστήρια») για τη *in situ* διερεύνηση των πιθανών μακροπρόθεσμων επιπτώσεων της οξίνισης του ωκεανού στη θαλάσσια ζωή (Hall-Spencer *et al.*, 2008; Raulf *et al.*, 2015).

#### 1.4. Εφαρμογές ανθεκτικών μικροοργανισμών

Πέρα από το οικολογικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί των ακραίων περιβαλλόντων, βρίσκουν ευρεία εφαρμογή και στο βιοτεχνολογικό τομέα, ως βιοκαταλύτες. Στη βιομηχανία, χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή ανανεώσιμων πόρων, όπως απόβλητα και παραπροϊόντα, σε αβλαβή χημικά, βιοπολυμερή, βιοϋλικά και βιοκαύσιμα. Ο ιατρικός τομέας εκμεταλλεύεται τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς για την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων, ενώ η περιβαλλοντική βιοτεχνολογία τους εφαρμόζει στην βιοαποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών (Raddadi *et al.*, 2015).

Οι τεχνολογίες βιοαποκατάστασης αξιοποιούν τη μεταβολική δραστηριότητα που διαθέτουν οι μικροοργανισμοί για να αποικοδομούν, να μετασχηματίζουν ή να συσσωρεύουν τοξικές ενώσεις, όπως υδρογονάνθρακες, ετεροκυκλικές ενώσεις, φαρμακευτικές ουσίες, ραδιονουκλίδια και τοξικά μέταλλα (Karigar and Rao, 2011; Dash *et al.*, 2013). Η επιτυχία της *in situ* βιοαποκατάστασης εξασφαλίζεται από τη χρήση μικροοργανισμών ικανών να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων ρυπαντών, περιορισμένων θρεπτικών, οξυγόνου και ακραίων τιμών pH που μπορεί να επικρατούν σε ένα ρυπασμένο περιβάλλον (Margesin and Schinner, 2001; Dash *et al.*, 2013). Οι μικροοργανισμοί των ακραίων περιβαλλόντων έχουν προσαρμοστεί και αφθονούν σε τέτοιου είδους συνθήκες, με αποτέλεσμα να καθίστανται ιδανικοί υποψήφιοι για την φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο της βιοαποκατάστασης (Margesin and Schinner, 2001; Morozkina *et al.*, 2010).

Ένα παράδειγμα εφαρμογής της βιοαποκατάστασης που απασχολεί ιδιαίτερα τη Μεσόγειο και την Ελλάδα, και για το οποίο δεν έχει βρεθεί αποτελεσματική τεχνολογία, είναι η διαχείριση των υγρών αποβλήτων της παραγωγής ελαιολάδου (γνωστό και ως «κατσίγαρος»). Το πρόβλημα της διαχείρισης εγείρεται από το υψηλό οργανικό φορτίο (με χημικά απαιτούμενο οξυγόνο-COD περίπου δυο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερο από τα αστικά λύματα) και την περίπλοκη χημική σύσταση του υγρού που το καθιστούν ανθεκτικό στην αποικοδόμηση (McNamara *et al.*, 2008; Morillo *et al.*, 2009). Έχει όξινο pH που κυμαίνεται από 4 μέχρι 6 και το οργανικό του μέρος περιλαμβάνει



μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών, λιπιδίων και πολυσακχαριτών. Επίσης, το υγρό αυτό περιέχει υψηλά επίπεδα φυτοτοξικών και αντιμικροβιακών ουσιών (Carasso *et al.*, 1995; Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996), όπως είναι οι φαινόλες. Έχει βρεθεί ότι το φαινολικό φορτίο του «κατσίγαρου» φέρει περισσότερες από 30 διαφορετικές φαινολικές ενώσεις, οι συγκεντρώσεις και οι τύποι των οποίων διαφέρουν εξαιρετικά (McNamara *et al.*, 2008). Λόγω της αστάθειας τους, οι φαινόλες του «κατσίγαρου» έχουν την τάση, κατά την αποθήκευση, να πολυμερίζονται σε συμπυκνωμένα, υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή που είναι δύσκολο να αποικοδομηθούν (Morillo *et al.*, 2009).

Πολλοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν φαινολικές και άλλες αρωματικές ενώσεις ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας. Εκλεκτό παράδειγμα αποτελούν οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* (Margesin *et al.*, 2004; Loh and Cao, 2008). Απαντώνται σε όλα τα περιβάλλοντα και έχουν την ικανότητα μεταβολισμού μεγάλου εύρους οργανικών ενώσεων, με μερικά είδη ικανά να χρησιμοποιούν περισσότερες από 100 διαφορετικές πηγές άνθρακα και ενέργειας. Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* είναι γνωστά για την ικανότητα τους να εκμεταλλεύονται τοξικές οργανικές ενώσεις, όπως αλειφατικούς και αρωματικούς υδρογονάνθρακες (Timmis, 2002). Εκτός από τη συμμετοχή αυτών των βακτηρίων στην αερόβια βιοαποικοδόμηση του «κατσίγαρου» για τη μείωση του φαινολικού του φορτίου, έχει προταθεί η περαιτέρω αξιοποίηση των ιδιοτήτων τους. Για παράδειγμα, η χρήση του «κατσίγαρου» ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιοπολυμερών (Ribera *et al.*, 2001) και βιοτασιενεργών ουσιών (Mercadé *et al.*, 1993) από βακτήρια του γένους *Pseudomonas*.

### **1.5. Προσέγγιση θέματος-Σκοπός εργασίας**

Η μελέτη που αφορά στα ακραία περιβάλλοντα της Ελλάδας παραμένει περιορισμένη. Το υποθαλάσσιο ηφαίστειο Κολούμπο της Σαντορίνης αποτελεί αδιαμφισβήτητα ένα άκρως ενδιαφέρον περιβάλλον. Η παρουσία ενεργών υδροθερμικών πηγών στον πυθμένα και η κλειστή μορφολογία του κρατήρα, σε συνδυασμό με τη στρωματοποίηση του νερού, την έντονη εναπόθεση βαρέων μετάλλων, την απουσία μακροπανίδας και την υψηλή οξύτητα καθιστούν τον πυθμένα του ηφαιστείου ένα περιβάλλον ιδιαίτερα ακραίο, το οποίο διαφέρει από το επιφανειακό.

Τα παραπάνω δεδομένα οδήγησαν στην ανάπτυξη ορισμένων ερωτημάτων. Ένα ερώτημα ήταν αν τα βακτήρια που βρίσκονται στη στήλη του νερού κοντά στον πυθμένα, και υπόκεινται άμεσα στις στρεσογόνες συνθήκες, έχουν αποκτήσει κάποια ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα και υψηλή οξύτητα, η οποία διαφέρει από τα βακτήρια που βρίσκονται στα επιφανειακά νερά. Στη συνέχεια, η άποψη ότι η ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα μπορεί να προσδώσει ανθεκτικότητα και σε άλλους τοξικούς παράγοντες, μας οδήγησε

στη μελέτη της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αντιβιοτικά. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι πολύ πρόσφατα βρέθηκε από τους Farias *et al.* (2015) η ύπαρξη ανθεκτικότητας σε βαρέα μέταλλα και σε αντιβιοτικά, σε βακτήρια που απομονώθηκαν από υδροθερμικές πηγές. Επομένως, εξετάστηκε αν τα στελέχη που απαντώνται στον πυθμένα και επιβιώνουν υπό αντίξοες συνθήκες (οξύτητας και βαρέων μετάλλων), έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα και σε αντιβιοτικά. Τέλος, η πλειοψηφία των απομονωθέντων στελεχών ανήκε στο γένος *Pseudomonas*, τα είδη του οποίου φημίζονται για την ικανότητα τους να αποικοδομούν πολυφαινολικές ενώσεις. Η βιοαποικοδόμηση των ενώσεων αυτών στα πλαίσια της διαχείρισης των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων («κατσίγαρος») αποτελεί μείζον πρόβλημα στην Κρήτη και, γενικότερα, στην Ελλάδα και στη Μεσόγειο. Αυτό οδήγησε στον προκαταρκτικό έλεγχο της ικανότητας αυτών των στελεχών να αναπτύσσονται υπό την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων «κατσίγαρο». Ο εντοπισμός των ανθεκτικότερων στελεχών και ο προσδιορισμός της ικανότητας τους όχι μόνο να αντέχουν παρουσία του συγκεκριμένου αποβλήτου, αλλά και να το αποικοδομούν, θα αποτελέσουν τη βάση για μελλοντική έρευνα.

Συνεπώς, στόχος της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της ανθεκτικότητας των καλλιεργούμενων βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη στήλη του νερού στο υδροθερμικό πεδίο του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο της Σαντορίνης.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

## ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

---

## 2.1. Δειγματοληψία

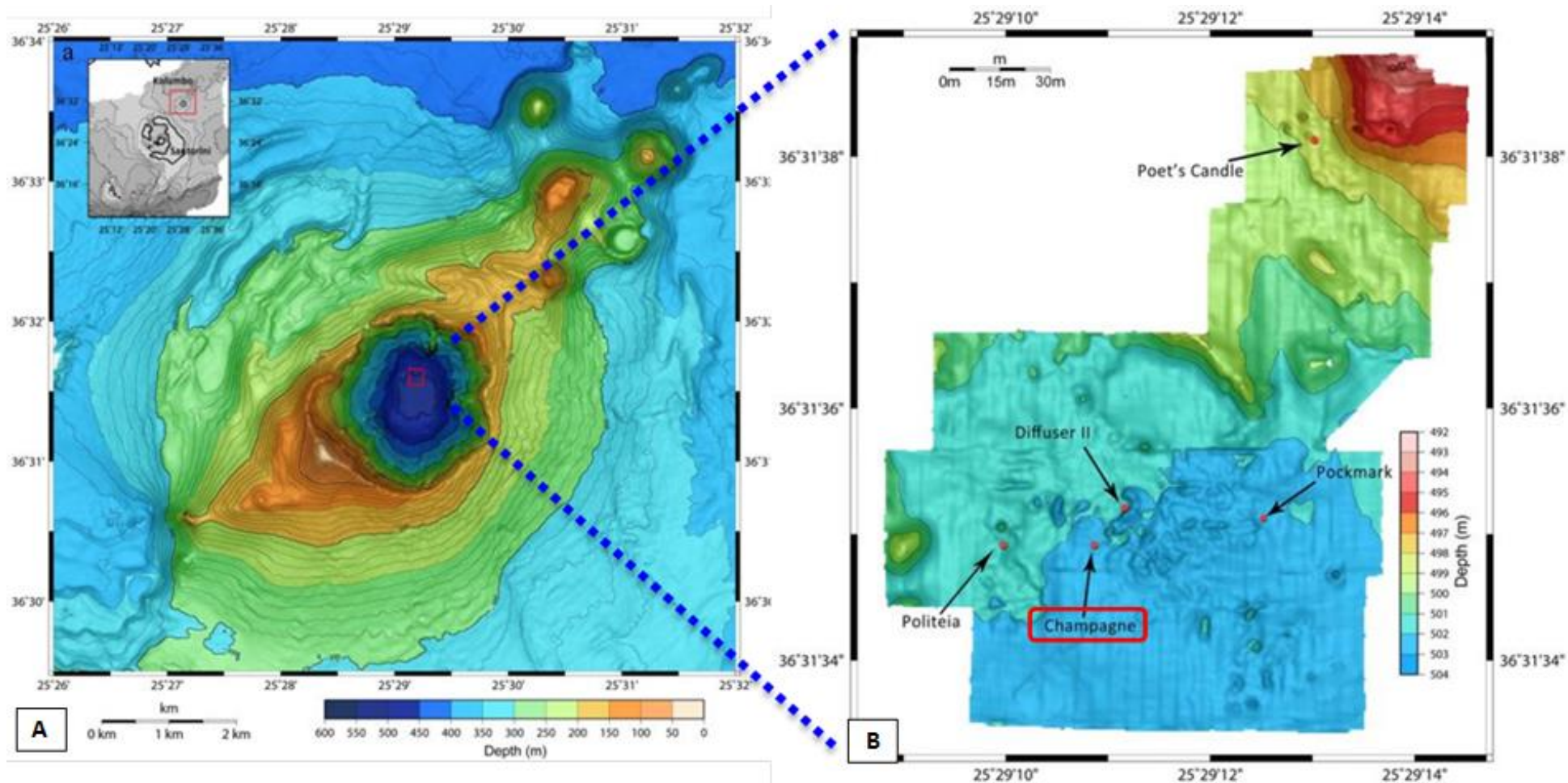
Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος SeaBiotech από το Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (ΙΘΑΒΒΥΚ) του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ). Συγκεκριμένα, η αποστολή *4Biotech* διεξήχθη τον Ιούνιο του 2014 με το Ε/Σ «Αιγαίο» και με επικεφαλής τη Δρ. Παρασκευή Πολυμενάκου. Συλλέχθηκαν δείγματα νερού από διαφορετικά βάθη (5 έως 500 μέτρα) πάνω από την ενεργή υδροθερμική πηγή “Champagne”, η οποία βρίσκεται εντός του κρατήρα του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο (Εικόνα 2.1.). Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε με δυο ρίψεις φιαλών Niskin των 5 και 10 λίτρων. Από τα επιφανειακά στρώματα νερού η συλλογή έγινε από 5 έως 90 m βάθος και από τα βαθύτερα στρώματα από 430 έως 495 m βάθος (Πίνακας 3.1.). Από κάθε βάθος συλλέχθηκαν 4 επαναληπτικά δείγματα (replicates) νερού. Τα δύο επαναληπτικά δείγματα (50 mL το καθένα) τοποθετήθηκαν χωρίς να φιλτραριστούν σε αποστειρωμένα φιαλίδια. Τα άλλα δύο επαναληπτικά δείγματα (1.5 L το καθένα) φιλτραρίστηκαν με τη χρήση αντλίας κενού και φίλτρων από ίνες υάλου (GFF). Για την αποφυγή καταπόνησης των συλλεχθέντων μικροοργανισμών λόγω αποξήρανσης, το κάθε φίλτρο τοποθετήθηκε ξεχωριστά σε αποστειρωμένο φιαλίδιο το οποίο περιείχε νερό από το αντίστοιχο δείγμα. Τα φίλτρα νερού και τα δείγματα νερού αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 8°C.

## 2.2. Βακτηριακά Στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν σε συνεργασία με τον υποψήφιο διδάκτορα Χρηστάκη Χρήστο στο ΙΘΑΒΒΥΚ.

### 2.2.1. Απομόνωση στελεχών

Μετά τη δειγματοληψία, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο. Αρχικά, έγινε ανάδευση των αφιλτράριστων δειγμάτων νερού και επαναιώρηση των σωματιδίων που συλλέχθηκαν στα φίλτρα. Στη συνέχεια, 0.1 mL από το κάθε επαναληπτικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό τρυβλίων petri που περιείχαν στερεό θρεπτικό υλικό Marine Agar (MA) (Difco 2216) και Marine Agar αραιωμένο στη διπλάσια ποσότητα νερού (MA ½). Για κάθε δείγμα νερού και κάθε φίλτρο εμβολιάστηκαν 3 τρυβλία με MA και 3 τρυβλία με MA ½. Μετά την ανάπτυξη των αποικιών έγινε διαλογή του κάθε στελέχους με διαδοχικές καλλιέργειες μέχρι την απομόνωση του σε μοναδιαία καλλιέργεια. Τα στελέχη απομονώθηκαν με βάση το φαινότυπο των αποικιών (μέγεθος, διάμετρος, χρώμα, υφή, αδρότητα), το χρόνο ανάπτυξης τους και το προτιμώμενο θρεπτικό μέσο (MA ή MA ½). Από όλα τα δείγματα απομονώθηκαν συνολικά 219 στελέχη, τα οποία αποθηκεύτηκαν σε πρότυπα διαλύματα γλυκερόλης στους -80 °C.



Εικόνα 2.1. Α. Βαθυμετρικός χάρτης του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο. Με το κόκκινο πλαίσιο υποδεικνύεται η τοποθεσία του ενεργού υδροθερμικού πεδίου στο βόρειο τμήμα του κρατήρα. Β. Βαθυμετρικός χάρτης του υδροθερμικού πεδίου του Κολούμπο. Οι τοποθεσίες των υδροθερμικών πηγών απεικονίζονται με κόκκινες τελείες. Σε κόκκινο πλαίσιο φαίνεται η υδροθερμική πηγή “Champagne”, πάνω από την οποία λήφθηκαν τα δείγματα της παρούσας εργασίας (Kiliyas *et al.*, 2013; Oulas *et al.*, 2015).

### 2.2.2. Απομόνωση και ενίσχυση του DNA

Για κάθε βακτηριακό στέλεχος έγινε απομόνωση του γενωμικού DNA από κύτταρα καλλιέργειας με τη μέθοδο του θερμικού σοκ (heatshock). Αρχικά, για τη διάρρηξη των κυττάρων γινόταν φυγοκέντρηση ορισμένης ποσότητας της υγρής καλλιέργειας (0.5 mL) για 10 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα. Το υπερκείμενο αφαιρούταν προσεκτικά με πιπέττα, ώστε να παραμείνει η πελέτα των κυττάρων στον πυθμένα του σωλήνα φυγοκέντρησης. Ακολουθούσε προσθήκη 30  $\mu$ L απεσταγμένου νερού και ανάδευση, με σκοπό τη διαλυτοποίηση της πελέτας. Στη συνέχεια, τοποθετούνταν στον θερμοαναδευτήρα (thermoshaker) για 10 λεπτά στους 98°C για τη λύση των κυτταρικών μεμβρανών και την απελευθέρωση του DNA. Έπειτα από φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα, γινόταν λήψη του υπερκείμενου το οποίο περιείχε το DNA σε καθαρή μορφή, καθώς τα κυτταρικά υπολείμματα είχαν καθιζάνει. Η εκτίμηση της ποιότητας και της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε γινόταν στο ειδικό φωτόμετρο *Nanodrop<sup>TM</sup> 2000 (Thermo Scientific)*.

Η ενίσχυση του βακτηριακού γονιδίου 16S rRNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction; PCR). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι καθολικοί βακτηριακοί εκκινητές 27f (5'-AGRGTTCGATCMTGGCTCAG-3') και 1492r (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Hogg and Lehane, 1999). Κάθε δείγμα είχε τελικό όγκο 20  $\mu$ L και αποτελούταν από 2  $\mu$ L απομονωμένου DNA, 11.1  $\mu$ L απεσταγμένου νερού, 2  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος (10x PCR Buffer, *Sigma-Aldrich*), 1  $\mu$ L από κάθε εκκινητή, 2  $\mu$ L τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων, 0.8  $\mu$ L διάλυμα  $MgCl_2$  και 0.1  $\mu$ L *Taq* DNA πολυμεράσης. Η PCR γινόταν στο θερμοκυκλοποιητή *T100<sup>TM</sup> (BIO-RAD)*. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα περιλάμβανε έναν κύκλο για 3 λεπτά σε θερμοκρασία 94 °C για την αρχική μετουσίωση και 35 κύκλους για 1 λεπτό στους 94 °C για τη θερμική αποδιάταξη του DNA, 1 λεπτό στους 50 °C για την προσκόλληση των εκκινητών και 3 λεπτά στους 72 °C για την έναρξη της αντιγραφής. Έπειτα, η τελική επέκταση της αλυσίδας του DNA από την πολυμεράση γινόταν σε έναν κύκλο των 7 λεπτών στους 72 °C και η σύνθεση του DNA ολοκληρωνόταν με πτώση της θερμοκρασίας στους 4 °C.

Για τον έλεγχο της ενίσχυσης των γονιδιακών περιοχών-στόχων ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση των παραγόμενων προϊόντων PCR σε πηκτική αгарόζης που περιείχε την χρωστική ουσία βρωμιούχο αιθίδιο για τη φθορισμομετρική ανίχνευση των προϊόντων. Η τάση της ηλεκτροφόρησης που εφαρμόστηκε ήταν 90 V/cm και η χρονική διάρκεια ήταν 40 λεπτά. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθούσε φωτογράφιση της πηκτικής αгарόζης υπό υπεριώδη ακτινοβολία για τον έλεγχο της παρουσίας ζώνης συγκεκριμένου μεγέθους (1465 bp), η οποία αντιστοιχούσε στο αναμενόμενο μέγεθος του γονιδίου 16S rRNA.

### 2.2.3. Αλληλούχιση προϊόντων PCR

Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR έγινε με τη μέθοδο Sanger (Sanger *et al.*, 1977) και αφορούσε 219 κλώνους που αντιστοιχούσαν σε διαφορετικές λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (Operational Taxonomic Units-OTUs). Το συγκεκριμένο στάδιο πραγματοποιήθηκε σε ένα σύστημα αυτόματης αλληλούχισης *ABI3730XI* (Applied Biosystems), χρησιμοποιώντας τον πρόσθιο εκκινητή 27f (Weisburg *et al.*, 1991) και το *BigDye v.3.2. Terminator kit* (Applied Biosystems).

### 2.2.4. Επεξεργασία Αλληλουχιών

Η ποιότητα των χρωματογραφήματων ελέγχθηκε μέσω του λογισμικού *Chromas Lite v2.1*, όπου αφαιρέθηκε τυχόν «θόρυβος» και διορθώθηκαν αμφίβολα διαβάσματα νουκλεοτιδίων. Σε περιπτώσεις έντονης αλληλεπικάλυψης των κορυφών, η ποιότητα του χρωματογραφήματος βελτιωνόταν μέσω του εργαλείου *PeakTrace™* (<https://www.nucleics.com/peaktrace-sequencing/>) και γινόταν επανέλεγχος ώστε να προσδιοριστεί αν πρόκειται για χιμαιρικές αλληλουχίες ή αποτυχημένο διάβασμα της αλληλουχίας. Το τελικό αποτέλεσμα της επεξεργασίας ήταν η καταγραφή υψηλής ποιότητας αλληλουχιών μήκους 400-700 ζευγών βάσεων. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τις αλληλουχίες που έχουν καταχωρηθεί στη βάση δεδομένων GenBank (NCBI) χρησιμοποιώντας το βασικό εργαλείο ευθυγράμμισης BLAST (Altschul *et al.*, 1997) για την εύρεση στενά συγγενικών βακτηριακών ειδών με βάση την ομοιότητα της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA. Βάσει του μέγιστου σκορ ταυτοποίησης (maximum identity score) επιλέγονταν οι 5 πρώτες αλληλουχίες, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε βακτηριακά είδη ίδιας ονομασίας για την πλειοψηφία των υπό εξέταση στελεχών. Όταν οι 5 πρώτες αλληλουχίες διέφεραν, η ταυτοποίηση γινόταν σε επίπεδο γένους.

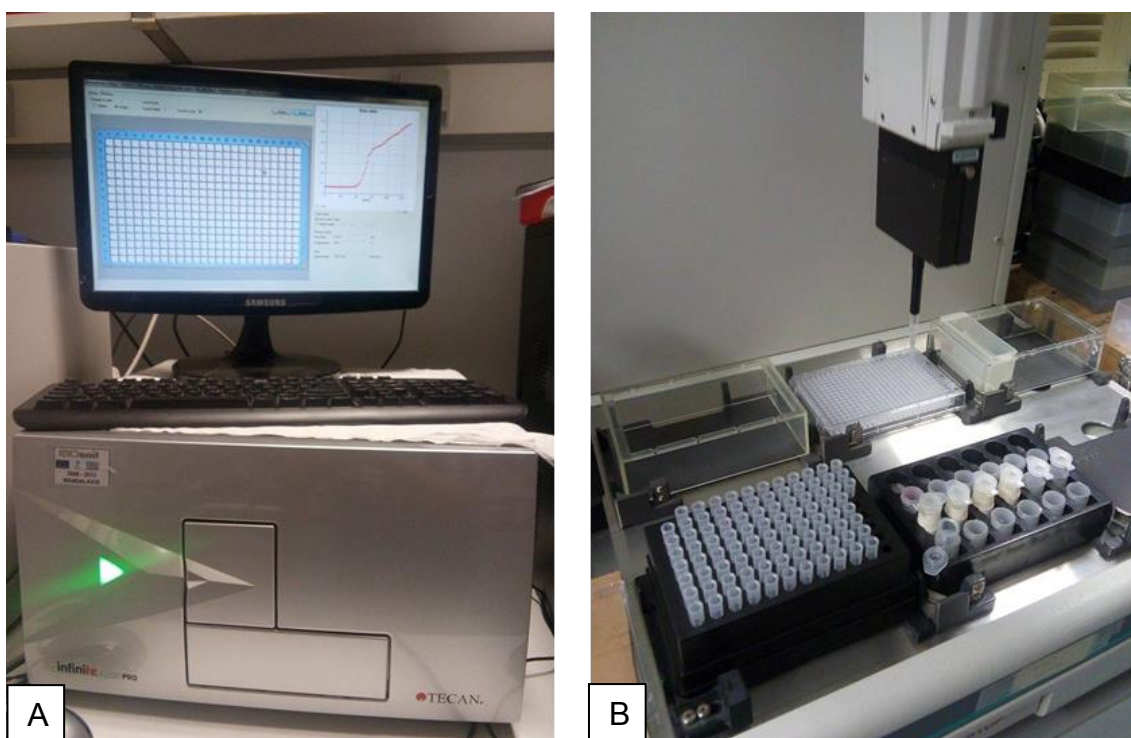
## 2.3. Μέθοδος Μικροαραιώσεων

Η ανθεκτικότητα των βακτηριακών στελεχών ελέγχθηκε με τη μέθοδο μικροαραιώσεων σε υγρό θρεπτικό μέσο. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση πλακών μικροτιτλοδότησης και περιλαμβάνει τη δημιουργία αλληπάλληλων μικροαραιώσεων (συνήθως δέκα 1:1 διαδοχικές αραιώσεις) ενός αντιμικροβιακού παράγοντα σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης και τον εμβολιασμό κάθε μικροδιαλύματος με καθορισμένο αριθμό βακτηριακών κυττάρων. Η παρουσία θολερότητας μετά την επώαση υποδεικνύει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Στόχος είναι ο προσδιορισμός της ελάχιστης συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού παράγοντα που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού υπό καθορισμένες συνθήκες (Minimum Inhibitory Concentration-MIC) (Wiegand *et al.*, 2008).



### 2.3.1. Εξοπλισμός

Η προετοιμασία των διαλυμάτων εργασίας (*Working Solutions*) και οι διαδοχικές αραιώσεις στη μικροπλάκα πραγματοποιούνται από το ρομποτικό σύστημα *Biomek 2000* (*Beckman Coulter*) (Εικόνα 2.2.). Το συγκεκριμένο σύστημα παρέχει εργαλεία πιπετταρίσματος που μπορούν να μεταφέρουν υγρά από 1  $\mu\text{L}$  έως 1 mL με εξαιρετικά υψηλή ακρίβεια. Η ειδική τεχνολογία αισθητήρων που διαθέτει, του επιτρέπει να ανιχνεύει επακριβώς τα επίπεδα των υγρών, ακόμα και όταν πρόκειται για όγκους μερικών μικρόλιτρων.



Εικόνα 2.2. Α. Ειδικό φωτόμετρο για μικροπλάκες (*Infinite F200PRO*, *TECAN*), Β. Επιφάνεια εργασίας του ρομποτικού συστήματος *Biomek 2000* (*Beckman Coulter*). Απεικονίζονται οι θήκες με τα tips, τα ειδικά φιαλίδια αρχικών αραιώσεων, η μικροπλάκα, καθώς και ο βραχίονας με την πιπέττα.

Το ρομποτικό σύστημα λειτουργεί μέσω του λογισμικού *BioWorks*, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα δημιουργίας και επεξεργασίας διάφορων μεθόδων για τη μεταφορά υγρών. Ορισμένες από τις δυνατότητες του είναι ο ορισμός του εργαστηριακού εξοπλισμού που θα χρησιμοποιηθεί (μικροπλάκες, πιπέττες, φιαλίδια) και οι θέσεις που θα τοποθετηθεί, η μεταφορά συγκεκριμένων όγκων κατά σειρά, κατά στήλη ή με συγκεκριμένο πρότυπο, η δυνατότητα ανάμιξης, ο ορισμός του ύψους και του ρυθμού αναρρόφησης του υγρού και άλλα.

Η συνεχής παρακολούθηση της βακτηριακής ανάπτυξης και η λήψη των τιμών οπτικής απορρόφησης πραγματοποιούνται για 22 έως 23 ώρες χρησιμοποιώντας το ειδικό φωτόμετρο μικροπλακών *Infinite F200 PRO* (*TECAN*) (Εικόνα 2.2.). Οι συνθήκες υπό τις οποίες γίνονταν οι μετρήσεις

(θερμοκρασία και χρόνος επώασης, διάστημα μεταξύ των διαδοχικών μετρήσεων, μήκος κύματος μέτρησης, διάρκεια ανακίνησης της μικροπλάκας, κλπ) καθορίζονταν από τον χειριστή και περιγράφονται λεπτομερώς στις ακόλουθες ενότητες. Μέσω του λογισμικού *Magellan™* του ειδικού φωτομέτρου δίνεται η δυνατότητα δημιουργίας αυτόματων μεθόδων μέτρησης, καθώς και ανάλυσης των τελικών αποτελεσμάτων. Στην παρούσα εργασία, το λογισμικό χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των κινητικών δεδομένων βακτηριακής ανάπτυξης που συλλέχθηκαν για κάθε μια μικροκαλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε.

## 2.3.2. Αντιμικροβιακοί Παράγοντες

### 2.3.2.1 Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων

#### Αντιβιοτικά

Για την παρούσα μελέτη της αντιβιοτικής ανθεκτικότητας των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών επιλέχθηκαν έξι αντιβιοτικά που αντιπροσωπεύουν έξι από τις πιο βασικές κατηγορίες αντιβακτηριακών ουσιών συστηματικής χρήσης (J01), σύμφωνα με το διεθνές σύστημα κατάταξης ανατομικών θεραπευτικών χημικών ουσιών (Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification system- <http://www.whocc.no/> ). Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Αμπικικιλίνη (Πενικιλίνες-J01C), η Ερυθρομυκίνη (Μακρολίδια-J01FA), η Σιπροφλοξασίνη (Κινολόνες- J01M), η Κεφουροξίμη-Na (Κεφαλοσπορίνες-J01DC), η Τετρακυκλίνη-HCl (Τετρακυκλίνες-J01A) και η Χλωραμφενικόλη (Αμφενικόλες-J01B).

Για την παρασκευή των αρχικών πρότυπων διαλυμάτων (Stock Solutions) συγκεκριμένης συγκέντρωσης, χρησιμοποιήθηκε βαθμονομημένη ζυγαριά ακριβείας με την οποία ζυγίστηκε ορισμένη ποσότητα από το κάθε αντιβιοτικό, το οποίο ήταν διαθέσιμο σε καθαρή μορφή (καθαρότητα >95%). Η συγκέντρωση των διαλυμάτων έπρεπε να είναι τουλάχιστον 10 φορές υψηλότερη από τη μέγιστη συγκέντρωση που επρόκειτο να ελεγχθεί (Wiegand *et al.*, 2008). Η επιλογή των μέγιστων συγκεντρώσεων βασίστηκε σε αποτελέσματα αντίστοιχων μελετών και σε διάφορες προκαταρκτικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, με σκοπό το εύρος των διαδοχικών αραιώσεων που θα εφαρμοστεί να περιλαμβάνει την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα. Το κάθε αντιβιοτικό αραιώθηκε σε συγκεκριμένο διαλύτη, ο οποίος καθορίστηκε από τις οδηγίες προηγούμενης μελέτης-επιθεώρησης (Andrews, 2001; CLSI, 2009). Ορισμένα πρότυπα διαλύματα αραιώθηκαν σε διμεθυλφορμαμίδιο (DMSO) ή αιθανόλη, αλλά οι αραιώσεις στη μικροπλάκα πραγματοποιήθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε η συγκέντρωση του DMSO/αιθανόλης στις μικροκαλλιέργειες να είναι χαμηλότερη του 4% (Πίνακας 2.1.). Για την αποφυγή τυχόν επιμόλυνσης, φωτοδιάσπασης, θερμικής αλλοίωσης και εξάτμισης του διαλύτη κατά τη

διάρκεια των πειραμάτων, τα αρχικά πρότυπα διαλύματα διανεμήθηκαν σε πολλαπλά φιαλίδια των 200  $\mu\text{L}$ , αποθηκεύτηκαν στους  $-26^{\circ}\text{C}$  και ένα από τα φιαλίδια χρησιμοποιούταν κάθε φορά για τη διεξαγωγή ενός πειράματος.

Πίνακας 2.1. Αναλυτικές πληροφορίες για την προετοιμασία των stock διαλυμάτων των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν.

Αντιβιοτικό	Καθαρότητα (mg/g)	Όγκος αρχικού διαλύματος (ml)	Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος ( $\mu\text{g/ml}$ )	Μέγιστη συγκέντρωση στο βοθρίο ( $\mu\text{g/ml}$ )	Διαλύτης
Αμπικιλίνη	98.25	10	4942	140	Phosphate $\text{pH}=7.4$ , 75mM
Ερυθρομυκίνη	100.0	10	10310	160	Ethanol 50%
Σιπροφλοξασίνη	100.0	25	960	2	DMSO 50%
Κεφουροξίμη-Na	100.0	10	9620	600	$\text{H}_2\text{O}$
Τετρακυκλίνη-HCl	95.0	25	1611	50	$\text{H}_2\text{O}$
Χλωραμφενικόλη	100.0	25	3860	60	Ethanol 50%

### Βαρέα Μέταλλα

Για τη μελέτη της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα βαρέα μέταλλα επιλέχθηκαν το αρσενικό ( $\text{As}^{3+}$ ), το αντιμόνιο ( $\text{Sb}^{3+}$ ), το στρόντιο ( $\text{Sr}^{3+}$ ) και ο υδράργυρος ( $\text{Hg}^{2+}$ ) και χρησιμοποιήθηκαν με τη μορφή των παρακάτω αλάτων:  $\text{NaAsO}_2$ ,  $\text{SrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$  και  $\text{HgCl}_2$  (Πίνακας 2.2.). Η επιλογή των συγκεκριμένων μετάλλων βασίστηκε σε μετρήσεις που έχουν γίνει σε δείγματα της καμινάδας “Champagne” του Κολούμπο, πάνω από την οποία συλλέχθηκαν τα υπό μελέτη στελέχη. Οι συγκεντρώσεις αυτές σε στερεά δείγματα καμινάδας κυμαίνονταν για το As από 1200 έως 20000 ppm, για το Sb από 1390 έως 20000, για το Sr 43.4 έως 3890 και για τον Hg από 73 έως 661 ppm (Christakis *et al.*, 2016). Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι συγκεκριμένες μετρήσεις σχετικά με τις πραγματικές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στη στήλη του νερού δεν ήταν διαθέσιμες.

Πίνακας 2.2. Πληροφορίες για τις ενώσεις των βαρέων μετάλλων και τις συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Βαρέα Μέταλλα	Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος σε ppm	Συγκέντρωση αρχικού διαλύματος σε mM
$\text{NaAsO}_2$	4000	30.8 ( $\text{As}^{3+}$ )
$\text{SrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10000	37.5 ( $\text{Sr}^{3+}$ )
$\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$	10000	29.9 ( $\text{Sb}^{3+}$ )
$\text{HgCl}_2$	4000	14.7 ( $\text{Hg}^{2+}$ )



## Απόβλητα Ελαιοτριβείου

Για τη μελέτη της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αρωματικές ενώσεις, χρησιμοποιήθηκε αντιπροσωπευτικό δείγμα από υγρά απόβλητα παραγωγής ελαιολάδου (γνωστό και ως «κασίγαρος»). Το υγρό αυτό αποστειρώθηκε (120 °C για 20 λεπτά), εξουδετερώθηκε η οξύτητα του με την προσθήκη NaOH (τελικό pH ίσο με 7.0) και φυλάχθηκε σε σκοτεινή φιάλη στους 3 °C για την αποφυγή περαιτέρω οξειδωσης. Το συγκεκριμένο υγρό χρησιμοποιήθηκε χωρίς αραιώση ως διάλυμα εργασίας (Working Solution) και εφαρμόστηκε στις μικροκαλλιέργειες για την πραγματοποίηση αλληπάλληλων αραιώσεων.

### «Διαβάθμιση» pH

Για τη μελέτη της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στην οξύτητα του θαλασσινού νερού, επιλέχθηκε να δημιουργηθούν υδατικά διαλύματα με pH που θα κυμαίνονταν μεταξύ 3.6 και 9.7. Για τη δημιουργία της συγκεκριμένης «διαβάθμισης» του pH χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύματα υδροχλωρικού οξέος (5 και 50 mM, HCl) και δύο διαλύματα καυστικού νατρίου (7 και 60 mM, NaOH), τα οποία αραιώνονταν με συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού μέσου για την επίτευξη συγκεκριμένης τιμής pH.

Αρχικά, έγινε προσθήκη διαφορετικών όγκων των διαλυμάτων οξέος ή βάσης σε συγκεκριμένη ποσότητα υγρού θρεπτικού και καταγραφή του pH, με σκοπό την κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης που να περιγράφει τη τελική τιμή του pH στο διάλυμα σε σχέση με τον όγκο του προστιθέμενου διαλύματος οξέος ή βάσεως. Χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις από τις αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης προσδιορίστηκε ο όγκος του οξέος ή της βάσης που απαιτείται να προστεθεί στο βοθρίο ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό pH για τη δημιουργία της διαβάθμισης (Πίνακας 2.3.).

Πίνακας 2.3. Ποσότητες διαλυμάτων οξέος ή βάσης που προστίθενται στο κάθε βοθρίο για τη δημιουργία της διαβάθμισης του pH.

<b>Τύπος και Συγκέντρωση διαλύματος</b>	<b>Όγκος διαλύματος (μl)</b>	<b>Όγκος θρεπτικού μέσου (μl)</b>	<b>pH στο βοθρίο</b>
HCl (50mM)	45.51	4.50	3.60
HCl (50mM)	31.15	18.85	4.05
HCl (50mM)	19.54	30.46	4.69
HCl (50mM)	10.68	39.32	5.57
HCl (5mM)	45.61	4.39	6.38
HCl (5mM)	11.91	38.09	6.72
NaOH (7mM)	10.58	39.42	7.01
NaOH (7mM)	44.88	5.12	7.37
NaOH (60mM)	12.09	37.91	7.94
NaOH (60mM)	21.81	28.19	8.53
NaOH (60mM)	34.38	15.62	9.02
NaOH (60mM)	49.80	0.20	9.68

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε ανάμιξη των υπολογιζόμενων ποσοτήτων οξέος, βάσης και θρεπτικού (χωρίς προσθήκη βακτηρίων) χρησιμοποιώντας το ρομποτικό σύστημα και το ακριβές pH σε κάθε βοθρίο της «διαβάθμισης» προσδιορίστηκε με πεχάμετρο ακριβείας.

### 2.3.3. Ενοφθάλμισμα Βακτηρίων (Inoculum)

Αρχικά, γινόταν αναβίωση των βακτηριακών στελεχών με επίστρωση 5  $\mu\text{L}$  του πρότυπου διαλύματος γλυκερόλης των απομονωθέντων βακτηρίων σε τρυβλία με Luria-Bertani (LB) άγαρ 1.5% και με τη χρήση αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου. Ακολουθούσε επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 24 με 48 ώρες. Μετά την επώαση των καλλιιεργειών, γινόταν παρατήρηση των αποικιών στο οπτικό μικροσκόπιο και καταγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των αποικιών (σχήμα, μέγεθος, επιφάνεια, ανύψωση, χρώμα-διαφάνεια).

Για κάθε στέλεχος, επιλέγονταν 3 με 5 μοναδιαίες αποικίες που παρουσίαζαν τα ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά και μεταφέρονταν με αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο από τα τρυβλία άγαρ σε γυάλινο σωλήνα που περιείχε περίπου 4 mL LB Broth (L3022, Sigma-Aldrich). Το συγκεκριμένο θρεπτικό παρασκευαζόταν σε διπλάσια συγκέντρωση (2X), λόγω της 1:1 αραίωσης που υφίσταται στη μικροπλάκα από την προσθήκη ίσης ποσότητας από τον εκάστοτε αντιμικροβιακό παράγοντα (αντιβιοτικά, βαρέα μέταλλα ή κατσίγαρος). Μετά από ελαφριά ανάδευση στο vortex ώστε να διαλυθούν οι αποικίες, ακολουθούσε επώαση των υγρών καλλιιεργειών για 2 έως 6 ώρες σε επωαστικό θάλαμο (37 °C υπό ανάδευση στις 140 στροφές/λεπτό).

Κατά τη διάρκεια της επώασης γινόταν συχνή παρακολούθηση (ανά 1 ώρα) μέχρι η υγρή καλλιέργεια να παρουσιάσει ορατή θολερότητα (ίση ή μεγαλύτερη από 0.5 μονάδες της κλίμακας McFarland). Ο έλεγχος της θολερότητας γινόταν με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 560nm στο ειδικό φωτόμετρο για μικροπλάκες (*Infinite F200 PRO, TECAN*). Αν η οπτική απορρόφηση ξεπερνούσε το 0.1, ακολουθούσε ρύθμιση της θολερότητας της καλλιέργειας έτσι ώστε να αντιστοιχεί σε 0.5 McFarland με την προσθήκη αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού. Μετά την προσαρμογή, το ενοφθάλμισμα των βακτηρίων είχε συγκέντρωση  $10^7$  ως  $10^8$  cfu/mL και χρησιμοποιούνταν εντός 30 λεπτών για τον εμβολιασμό των μικροκαλλιιεργειών, έτσι ώστε να αποφευχθεί σημαντική αλλαγή στη συγκέντρωση των κυττάρων.

## 2.4. Πειραματικός Σχεδιασμός

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αντιμικροβιακούς παράγοντες βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Wiegand *et al.*, 2008. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε μικροπλάκες 384-βοθρίων με χωρητικότητα βοθρίου 100  $\mu$ L. Οι δοκιμές ανθεκτικότητας για κάθε βακτηριακό στέλεχος πραγματοποιούνταν με δύο διαδοχικά πειράματα που περιλάμβαναν 2 ως 3 επαναλήψεις για κάθε αντιμικροβιακό παράγοντα. Στην πρώτη δοκιμή ελεγχόταν η ανθεκτικότητα δυο βακτηριακών στελεχών σε έξι διαφορετικά αντιβιοτικά. Στη δεύτερη δοκιμή ελεγχόταν η ανθεκτικότητα δυο βακτηριακών στελεχών σε τέσσερα βαρέα μέταλλα, σε απόβλητα ελαιοτριβείου και σε διαβάθμιση pH (θρεπτικό μέσο με pH από 3.6 ως 9.7). Στον πίνακα 2.4. παρουσιάζονται αναλυτικές πληροφορίες σχετικά με τους αντιμικροβιακούς παράγοντες που μελετήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των δύο διαφορετικών δοκιμών.

Πίνακας 2.4. Εύρος συγκεντρώσεων στο βοθρίο και επαναλήψεις των προς εξέταση αντιμικροβιακών παραγόντων.

<b>Αντιμικροβιακοί παράγοντες</b>			
<b>Αντιβιοτικά <sup>α</sup></b>	<b>Μέγιστη συγκέντρωση στο βοθρίο</b>	<b>Ελάχιστη συγκέντρωση στο βοθρίο</b>	<b>Επαναλήψεις (replicates)</b>
Αμπικιλίνη	140	0.137	3
Ερυθρομυκίνη	160	0.313	3
Σιπροφλοξασίνη	2	0.004	3
Κεφουροξίμη-Na	600	1.172	3
Τετρακυκλίνη-HCl	50	0.049	2
Χλωραμφενικόλη	60	0.117	2
<b>Βαρέα Μέταλλα <sup>β</sup></b>			
Αρσενικό	15.4	0.03	3
Στρόντιο	18.75	0.04	3
Αντιμόνιο	14.97	0.03	3
Υδράργυρος	7.37	0.01	3
<b>Απόβλητα Ελαιοτριβείου <sup>γ</sup></b>			
	50	0.1	2
<b>Διαβάθμιση pH</b>			
	<b>Μέγιστο pH</b>	<b>Ελάχιστο pH</b>	<b>Επαναλήψεις (replicates)</b>
	9.7	3.6	3

α: η συγκέντρωση των αντιβιοτικών ήταν σε  $\mu$ g/ml, β: η συγκέντρωση των βαρέων μετάλλων ήταν σε mM, γ: ως μονάδα μέτρησης του κασιόγαρου χρησιμοποιήθηκε η % κατ' όγκο συγκέντρωση στο βοθρίο. Η χρήση της συγκεκριμένης μονάδας ήταν απαραίτητη επειδή ο κασιόγαρος ήταν σε υγρή μορφή και αποτελεί μίγμα πολλών διαφορετικών ενώσεων και όχι μιας συγκεκριμένης ουσίας σε καθαρή μορφή.

Για κάθε αντιμικροβιακό παράγοντα ελέγχονταν 10 διαφορετικές συγκεντρώσεις (δηλαδή 10 διαδοχικές αραιώσεις 1:1), με εξαίρεση την Αμπικιλίνη και την Τετρακυκλίνη για τις οποίες πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον αραιώση. Για κάθε στέλεχος, μια στήλη της μικροπλάκας περιλάμβανε μικροκαλλιέργειες για τον έλεγχο της αποστείρωσης του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιούταν στα πειράματα (sterility control) και μια δεύτερη στήλη περιλάμβανε μικροκαλλιέργειες για τον θετικό έλεγχο της ανάπτυξης του βακτηρίου, υπό την απουσία αντιμικροβιακού παράγοντα (growth control) (Εικόνα 2.3.).

1#Strain 1												2#Strain 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	SC	X	X/2	X/4	X/8	X/16	X/32	X/64	X/128	X/256	X/512	GC	X	X/2	X/4	X/8	X/16	X/32	X/64	X/128	X/256	X/512	GC	SC
B	SC	X	X/2	X/4	X/8	X/16	X/32	X/64	X/128	X/256	X/512	GC	X	X/2	X/4	X/8	X/16	X/32	X/64	X/128	X/256	X/512	GC	SC
C	SC	X	X/2	X/4	X/8	X/16	X/32	X/64	X/128	X/256	X/512	GC	X	X/2	X/4	X/8	X/16	X/32	X/64	X/128	X/256	X/512	GC	SC
D	SC	Y	Y/2	Y/4	Y/8	Y/16	Y/32	Y/64	Y/128	Y/256	Y/512	GC	Y	Y/2	Y/4	Y/8	Y/16	Y/32	Y/64	Y/128	Y/256	Y/512	GC	SC
E	SC	Y	Y/2	Y/4	Y/8	Y/16	Y/32	Y/64	Y/128	Y/256	Y/512	GC	Y	Y/2	Y/4	Y/8	Y/16	Y/32	Y/64	Y/128	Y/256	Y/512	GC	SC
F	SC	Y	Y/2	Y/4	Y/8	Y/16	Y/32	Y/64	Y/128	Y/256	Y/512	GC	Y	Y/2	Y/4	Y/8	Y/16	Y/32	Y/64	Y/128	Y/256	Y/512	GC	SC
G	SC	Z	Z/2	Z/4	Z/8	Z/16	Z/32	Z/64	Z/128	Z/256	Z/512	GC	Z	Z/2	Z/4	Z/8	Z/16	Z/32	Z/64	Z/128	Z/256	Z/512	GC	SC
H	SC	Z	Z/2	Z/4	Z/8	Z/16	Z/32	Z/64	Z/128	Z/256	Z/512	GC	Z	Z/2	Z/4	Z/8	Z/16	Z/32	Z/64	Z/128	Z/256	Z/512	GC	SC
I	SC	Z	Z/2	Z/4	Z/8	Z/16	Z/32	Z/64	Z/128	Z/256	Z/512	GC	Z	Z/2	Z/4	Z/8	Z/16	Z/32	Z/64	Z/128	Z/256	Z/512	GC	SC
J	SC	W	W/2	W/4	W/8	W/16	W/32	W/64	W/128	W/256	W/512	GC	W	W/2	W/4	W/8	W/16	W/32	W/64	W/128	W/256	W/512	GC	SC
K	SC	W	W/2	W/4	W/8	W/16	W/32	W/64	W/128	W/256	W/512	GC	W	W/2	W/4	W/8	W/16	W/32	W/64	W/128	W/256	W/512	GC	SC
L	SC	W	W/2	W/4	W/8	W/16	W/32	W/64	W/128	W/256	W/512	GC	W	W/2	W/4	W/8	W/16	W/32	W/64	W/128	W/256	W/512	GC	SC
M	SC	E	E/2	E/4	E/8	E/16	E/32	E/64	E/128	E/256	E/512	GC	E	E/2	E/4	E/8	E/16	E/32	E/64	E/128	E/256	E/512	GC	SC
N	SC	E	E/2	E/4	E/8	E/16	E/32	E/64	E/128	E/256	E/512	GC	E	E/2	E/4	E/8	E/16	E/32	E/64	E/128	E/256	E/512	GC	SC
O	SC	F	F/2	F/4	F/8	F/16	F/32	F/64	F/128	F/256	F/512	GC	F	F/2	F/4	F/8	F/16	F/32	F/64	F/128	F/256	F/512	GC	SC
P	SC	F	F/2	F/4	F/8	F/16	F/32	F/64	F/128	F/256	F/512	GC	F	F/2	F/4	F/8	F/16	F/32	F/64	F/128	F/256	F/512	GC	SC

Εικόνα 2.3. Αναπαράσταση του τρόπου φόρτωσης της μικροπλάκας. Παρουσιάζονται οι περιοχές διαδοχικών αραιώσεων των αντιμικροβιακών παραγόντων για το Στέλεχος #1 (Σειρές A-P και στήλες 1-12) και το Στέλεχος #2 (Σειρές A-P και στήλες 13-24). Οι συγκεντρώσεις των αντιμικροβιακών παραγόντων υποδιπλασιάζονται από τα αριστερά προς τα δεξιά. Οι στήλες 1 και 24 αντιστοιχούν στα Sterility Control (SC), ενώ οι στήλες 12 και 23 αντιστοιχούν στα Growth Control (GC). Με X, Y, Z, W, E, F συμβολίζονται οι διαφορετικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες που ελέγχονταν σε κάθε πείραμα.

## 2.5. Πειραματική Διαδικασία

Η φόρτωση της μικροπλάκας, η προετοιμασία των διαλυμάτων εργασίας (working solutions) και οι διαδοχικές αραιώσεις πραγματοποιούνταν από το ρομποτικό σύστημα *Biomek 2000* (*Beckman Coulter*).

Αρχικά, η μικροπλάκα με το ειδικό καπάκι αποστειρωνόταν στους 60°C για 30 λεπτά. Μέχρι τη χρησιμοποίησή της, η μικροπλάκα παρέμενε σκεπασμένη με το καπάκι για την αποφυγή επιμόλυνσης της από αερομεταφερόμενα σωματίδια και μικροοργανισμούς. Η διαδικασία φόρτωσης της μικροπλάκας ξεκινούσε με την προσθήκη 50 μL αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού σε όλα τα βοθρία.

Πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων ελέγχου της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, πραγματοποιούνταν απόψυξη των αρχικών διαλυμάτων, τα οποία θα χρησιμοποιούνταν για την προετοιμασία των διαλυμάτων εργασίας. Τα διαλύματα εργασίας προετοιμάζονταν σε φιαλίδια errendorf με την ανάμιξη συγκεκριμένου όγκου του αρχικού διαλύματος με συγκεκριμένο όγκο αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού με τη χρήση του ρομποτικού συστήματος. Η αναλογία των όγκων ανάμιξης ήταν τέτοια ώστε η συγκέντρωση του αντιβιοτικού στα διαλύματα εργασίας να είναι τετραπλάσια από τη μέγιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στα βοθρία (Πίνακας 2.5.). Στη συνέχεια, 50 μL από κάθε διάλυμα εργασίας τοποθετούνταν στο πρώτο βοθρίο κάθε σειράς και πραγματοποιούνταν οι διαδοχικές αραιώσεις 1:1.

Πίνακας 2.5. Πληροφορίες για την παρασκευή των διαλυμάτων εργασίας κάθε αντιβιοτικού για τον έλεγχο των αντίστοιχων μέγιστων συγκεντρώσεων στο βοθρίο.

Αντιβιοτικά	Όγκος αρχικού διαλύματος (mL)	Όγκος H <sub>2</sub> O(mL)	Συγκέντρωση διαλύματος εργασίας (μg/mL)	Μέγιστη συγκέντρωση στο βοθρίο (μg/mL)
Αμπικιλίνη	0.046	0.353	560	140
Ερυθρομυκίνη	0.025	0.374	640	160
Σιπροφλοξασίνη	0.013	1.547	8	2
Κεφουροξίμη-Na	0.099	0.300	2400	600
Τετρακυκλίνη-HCl	0.050	0.349	200	50
Χλωραμφενικόλη	0.025	0.375	240	60

Στο τεστ των βαρέων μετάλλων και των αποβλήτων ελαιοτριβείου, δεν απαιτούνταν η προετοιμασία διαλυμάτων εργασίας καθώς οι συγκεντρώσεις των stock διαλυμάτων ήταν οι διπλάσιες από τις μέγιστες συγκεντρώσεις που επρόκειτο να εξεταστούν. Με αυτό τον τρόπο, τοποθετούνταν κατευθείαν 50 μL από το αρχικό διάλυμα στο πρώτο βοθρίο (το οποίο δεν περιείχε νερό) και ακολουθούσαν οι διαδοχικές αραιώσεις. Για τη διαβάθμιση του pH, τοποθετούνταν σε κάθε βοθρίο οι απαραίτητες ποσότητες οξέος (HCl) ή βάσης (NaOH) και αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού (Πίνακας 2.3.) με σκοπό την επίτευξη του επιθυμητού pH.

Και στα δύο τεστ, παράλληλα με την πραγματοποίηση των διαδοχικών αραιώσεων, γινόταν η προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος των βακτηρίων. Μόλις οι υγρές καλλιέργειες παρουσίαζαν ορατή θολερότητα, ακολουθούσε

φωτομέτρηση και προσαρμογή της θολερότητας τους στα  $10^7$  με  $10^8$  cfu/mL (0.5 McFarland), όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Στη συνέχεια, γινόταν περαιτέρω αραίωση 1:100 του εναιωρήματος των βακτηρίων σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο (0.1 mL εναιωρήματος σε 9.9 mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου). Στη συνέχεια, 50  $\mu$ L από το αραιωμένο ενοφθάλμισμα καθενός από τα δύο βακτηριακά στελέχη τοποθετούνταν από το ρομποτικό σύστημα στα αντίστοιχα βοθρία της μικροπλάκας (Εικόνα 2.3.), έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων σε κάθε βοθρίο να είναι  $5 \times 10^5$  cfu/mL. Για τις στήλες που αντιστοιχούσαν στα sterility controls πραγματοποιούνταν προσθήκη 50  $\mu$ L αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου αντί ενοφθαλμίσματος. Μετά την ολοκλήρωση της φόρτωσης, η μικροπλάκα τοποθετούνταν (χωρίς το καπάκι) στο ειδικό φωτόμετρο και ακολουθούσε επώαση της για 22 με 23 ώρες στους 37 °C. Κατά τη διάρκεια της επώασης, πραγματοποιούνταν 66 ως 69 κύκλοι αυτόματων μετρήσεων οπτικής απορρόφησης στα 560 nm (μία μέτρηση σε όλα τα βοθρία κάθε 20 λεπτά) με ενδιάμεση ανακίνηση της μικροπλάκας για επίτευξη ομογενοποίησης και καλύτερης οξυγόνωσης της καλλιέργειας.

## 2.6. Ανάλυση Αποτελεσμάτων

### 2.6.1. Προσδιορισμός MIC50

#### Θεωρητικό Υπόβαθρο

Ως MIC50 (Minimum Inhibitory Concentration-50% Inhibition) ορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα που παρεμποδίζει το 50% της ορατής βακτηριακής ανάπτυξης. Για τον προσδιορισμό της MIC50 χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή του μη-γραμμικού μοντέλου Gompertz που προτείνουν οι Lambert and Pearson (2000) ( Εξίσωση 1).

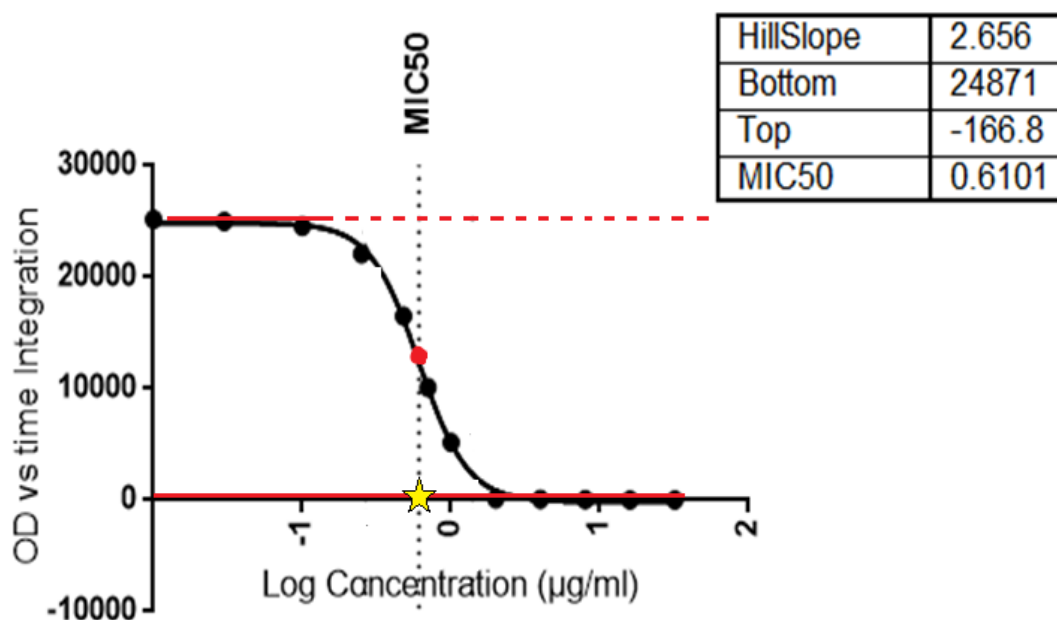
$$y = A + Ce^{-e^{B(x-M)}}$$

Το μοντέλο αυτό συσχετίζει το εμβαδόν της περιοχής κάτω από την καμπύλη οπτικής απορρόφησης-χρόνου ( $y$ ) με το λογάριθμο της συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού παράγοντα ( $x$ ). Η γραφική παράσταση της εξίσωσης (1) είναι μια χαρακτηριστική σιγμοειδής καμπύλη (Εικόνα 2.6.).

Στη συνάρτηση (1),  $A$  είναι η τιμή της κάτω ασύμπτωτης (Bottom),  $B$  είναι η παράμετρος που περιγράφει την κλίση της ευθείας (Slope),  $C$  είναι η απόσταση ανάμεσα στην επάνω και στην κάτω ασύμπτωτη και  $M$  είναι ο λογάριθμος της συγκέντρωσης στο σημείο τομής της καμπύλης με την κάτω ασύμπτωτη (Lambert and Pearson, 2000). Η τιμή της MIC50 προσδιορίζεται



ως ο αντίστροφος λογάριθμος του σημείου τομής πάνω στον άξονα x από το οποίο διέρχεται κάθετη ευθεία που τέμνει την καμπύλη Gompertz στο μέσο της απόστασης ανάμεσα στην επάνω και στην κάτω ασύμπτωτη.



Εικόνα 2.6. Διάγραμμα εμβαδού περιοχής που καθορίζεται από την καμπύλη οπτικής απορρόφησης-χρόνου (OD vs Time Integration) ως προς το λογάριθμο της συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού παράγοντα (Log Concentration- σε µg/mL). Οι κόκκινες γραμμές είναι οι ασύμπτωτες ευθείες του επάνω και του κάτω πλατό της καμπύλης. Με κόκκινη τελεία σημειώνεται το μέσο της απόστασης των δύο πλατό από όπου διέρχεται η κάθετη ευθεία που τέμνει τον άξονα x. Με αστέρι σημειώνεται η τιμή MIC50. Στον ενσωματωμένο πίνακα φαίνονται η κλίση της καμπύλης, οι τιμές της επάνω και της κάτω ασύμπτωτης, καθώς και η υπολογιζόμενη τιμή MIC50.

### Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων από το λογισμικό *Magellan*<sup>TM</sup> γινόταν με τη μορφή excel. Το αρχείο περιλάμβανε τις μετρήσεις της οπτικής απορρόφησης για κάθε βοθρίο και για κάθε κύκλο μέτρησης, καθώς και τις αντίστοιχες τιμές μετά από αφαίρεση του σήματος υποβάθρου (baseline subtraction). Επίσης, το λογισμικό του φωτομέτρου είχε τη δυνατότητα αυτόματης ολοκλήρωσης της επιφάνειας κάτω από την καμπύλη οπτικής απορρόφησης-χρόνου, εφαρμόζοντας τον κανόνα του τραπεζοειδούς και παρείχε τις τιμές των ολοκληρωμάτων για κάθε ένα από τα 384 βοθρία. Με αυτό τον τρόπο, το τελικό αποτέλεσμα για κάθε καμπύλη ανάπτυξης ήταν μια τιμή εμβαδού που αντιπροσώπευε τη συνολική ανάπτυξη των βακτηρίων υπό συγκεκριμένη συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα κατά τη διάρκεια της επώασης (Εικόνα 2.7.).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Well positions									
2	Raw data									
3		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
4	0s	0.0588	0.0585	0.0661	0.0633	0.0576	0.0591	0.0628	0.0598	0.0571
5	1209s	0.0583	0.0594	0.066	0.0632	0.0569	0.0584	0.065	0.0592	0.0569
6	2418s	0.0572	0.0593	0.0651	0.0617	0.0567	0.0581	0.0646	0.0599	0.0574
7	3625s	0.0575	0.0589	0.0653	0.0617	0.0561	0.058	0.0641	0.0594	0.0569
8	4767s	0.0573	0.0586	0.0641	0.0601	0.0557	0.0573	0.0651	0.0599	0.0565
9	5970s	0.0574	0.0594	0.0646	0.0608	0.0561	0.0575	0.065	0.06	0.0572
10	7170s	0.0583	0.0585	0.064	0.0613	0.0559	0.0577	0.0657	0.0611	0.0585
137		0	0	0	0.000567	0.00113	0.000767	0.157	0.436	0.59
138		0	0	0	0	0.00103	0	0.161	0.443	0.601
139	Baseline subtraction	0.0001	0	0.000167	0.000167	0.00193	0.00127	0.167	0.457	0.609
140	Dilution factors	1	2	4	8	16	32	64	128	256
141	Area OD*sec	1.33	7.66	0.645	2.78	22.3	13	5020	16500	21300
142										
143										
144	Date of measurement: 2016-04-07/Time of measurement: 15:23:02									
145	Antibacterial Kinetic assay_384 well_No SC_Abs20min_Shaking3min.mt									
146	560nm									

Εικόνα 2.7. Παράδειγμα εξαγωγής αποτελεσμάτων από το λογισμικό Magellan™. Απεικονίζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονται από κάθε μικροκαλλιέργεια σε κάθε κύκλο μέτρησης, οι τιμές μετά το baseline subtraction, οι παράγοντες αραιώσης και οι τιμές του εμβαδού της περιοχής κάτω από την καμπύλη οπτικής απορρόφησης-χρόνου που αντιστοιχούν σε κάθε αραιώση του αντιμικροβιακού παράγοντα.

Για τον υπολογισμό της MIC50 χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό *Graphpad Prism 6*, όπου έγινε η προσαρμογή του παραλλαγμένου μοντέλου Gompertz βάσει της διαδικασίας που αναπτύχθηκε παραπάνω. Εισάγοντας τα δεδομένα (τις τιμές του εμβαδού κάτω από την καμπύλη και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του αντιμικροβιακού παράγοντα), το λογισμικό εφαρμόζει την εξίσωση και προσδιόριζε αυτόματα τη τιμή MIC50.

Πρέπει να αναφερθεί ότι, σε ορισμένες περιπτώσεις, ο αντιμικροβιακός παράγοντας προκαλούσε αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που εφαρμοζόταν στη μέθοδο. Εκεί, ως MIC50 ορίστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση του εκάστοτε αντιμικροβιακού παράγοντα που χρησιμοποιούταν. Σε άλλες περιπτώσεις, τα βακτήρια κατάφεραν να αναπτυχθούν σε όλες τις εφαρμοσμένες συγκεντρώσεις, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η παρατήρηση της αναστολής της ανάπτυξης. Σε αυτήν την περίπτωση ως MIC50 θεωρούνταν η μέγιστη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα που εφαρμόστηκε.



### 2.6.2. Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα στατιστικά προγράμματα IBM SPSS Statistics 22 και XLSTAT 2016. Αρχικά, στο SPSS ελεγχόταν η κατανομή των δεδομένων ως προς την κανονικότητα και την διασπορά, με παρατήρηση των θηκογραμμάτων (boxplots) και εφαρμογή των τεστ κανονικότητας (Kolmogorov-Smirnov και Shapiro-Wilk Test) και ομοιογένειας διασπορών (Levene's Test). Σε περίπτωση που η κατανομή των δεδομένων απέχει από την κανονική, πραγματοποιούταν μετασχηματισμός των τιμών σε λογαρίθμους και επανέλεγχος. Αν το σχήμα της κατανομής δε βελτιωνόταν και δεν υπήρχε ομοιογένεια διασπορών, εφαρμόζονταν μη-παραμετρικά τεστ (Mann-Whitney Test, Spearman's Rank Correlation). Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis-PCA) πραγματοποιήθηκε στο XLSTAT 2016.

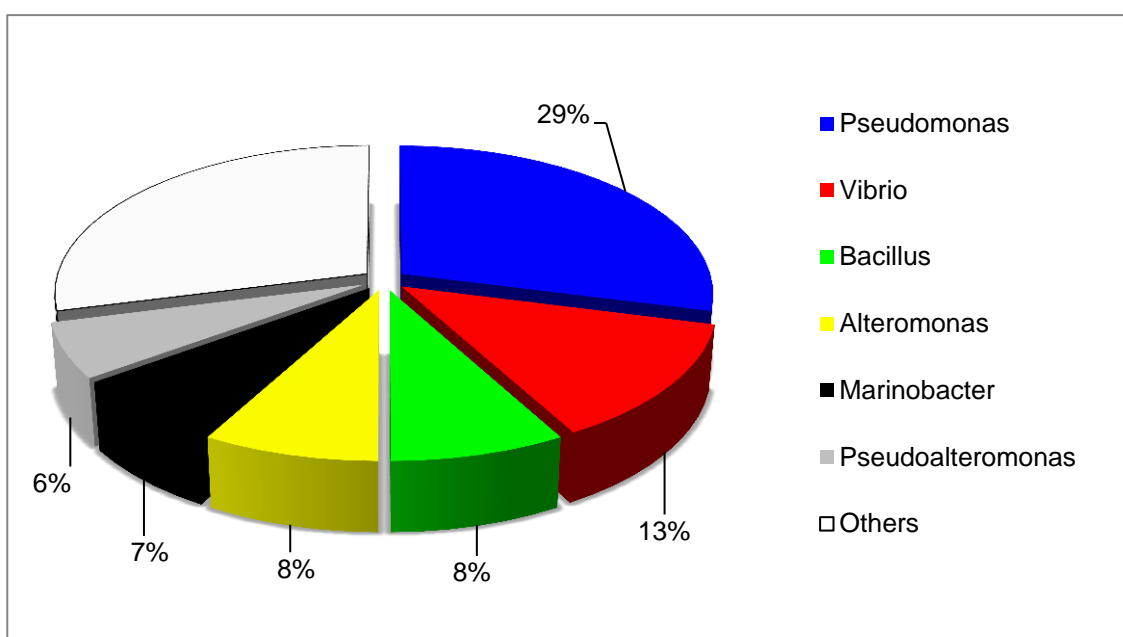
# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

### 3.1. Βακτηριακά Στελέχη

#### 3.1.1. Αποτελέσματα εύρεσης ομόλογων αλληλουχιών

Από τα 219 απομονωθέντα στελέχη που αλληλουχήθηκαν, ταυτοποιήθηκαν συνολικά τα 116. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για την εύρεση ομόλογων αλληλουχιών, βάσει του μέγιστου σκορ ταυτοποίησης, έδειξαν ότι η πλειοψηφία των υπό μελέτη βακτηρίων ανήκαν στο γένος *Pseudomonas*. Τα υπόλοιπα στελέχη ήταν αντιπρόσωποι του γένους *Vibrio*, *Bacillus* και *Alteromonas*. Με μικρότερα ποσοστά αντιπροσώπων παρουσιάστηκαν τα γένη *Marinobacter* και *Pseudoalteromonas*. Τέλος, υπήρχαν και βακτηριακά γένη που είχαν από έναν αντιπρόσωπο (Εικόνα 3.1.).



Εικόνα 3.1. Ποσοστιαία κατανομή σε επίπεδο γένους των απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών από τη στήλη του νερού.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ανθεκτικότητα 54 βακτηριακών στελεχών από διαφορετικά βάθη της στήλης του νερού, από τα οποία 35 ανήκαν στο γένος *Pseudomonas*, 10 στο γένος *Vibrio* και 9 στο γένος *Bacillus*. Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά τα στοιχεία των στελεχών όπως προέκυψαν από την ταυτοποίηση και την απομόνωση τους από τα διαφορετικά βάθη.

Πίνακας 3.1. Πληροφορίες για τα υπό εξέταση βακτηριακά στελέχη. Απεικονίζονται ο κωδικός που αντιστοιχεί στο κάθε στέλεχος, το φύλο, το γένος ή το είδος και το βάθος (σε μέτρα) από το οποίο απομονώθηκε.

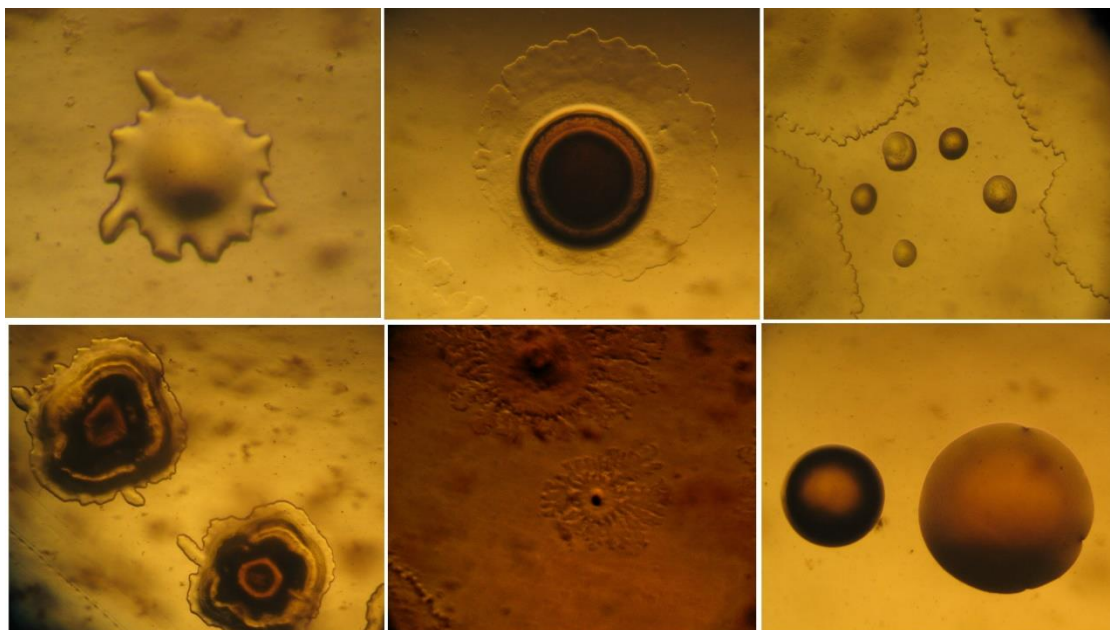
Κωδικός στελέχους	Φύλο*	Γένος/Είδος*	Βάθος (m)
<b>c1.1.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	5
<b>c1.10.a.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5
<b>c1.2.</b>	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	5
<b>c2.2.1.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	20
<b>c2.10.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. MT-1 16S rRNA gene	20
<b>M2.4.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	20
<b>c2.3.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	20
<b>c2.10.1.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	20
<b>c2.9.2.a</b>	Firmicutes	<i>Bacillus aerophilus</i>	20
<b>c2.9.2.b</b>	Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp.	20
<b>M3.1.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	45
<b>c3.4.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. 40M1 FL01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	45
<b>c3.1.2.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	45
<b>c11.3.</b>	Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp.	45
<b>c3.3.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio harveyi</i>	45
<b>c4.2.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i> partial 16S rRNA gene, strain PE	60
<b>c5.3.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. 40M1 FL01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90
<b>c5.7.1.b.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. H-143 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90
<b>c5.4.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	90
<b>c5.6.</b>	Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp.	90
<b>c5.7.1.a.</b>	Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp.	90
<b>c5.7.2.</b>	Firmicutes	<i>Bacillus aquimaris</i>	90
<b>c6.5.</b>	Gammaproteobacteria	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone HA_99	430
<b>M3.1.4.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	430
<b>M2.1.3.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio harveyi</i>	430
<b>M2.1.5.</b>	Firmicutes	<i>Bacillus horneckiae</i>	430
<b>M3.1.5.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio</i>	430
<b>M2.3.7.b.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	495
<b>M2.3.7.a.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	495
<b>M2.3.3.a.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	495
<b>M2.3.8.b.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	495
<b>M25.6.2.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	495
<b>M25.9.1.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	495

<b>M25.9.2.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	495
<b>M25.6.1.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	495
<b>M2.3.8.a.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	495
<b>M25.7.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas balearica</i>	495
<b>M25.9.10.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas balearica</i>	495
<b>M25.9.12.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas balearica</i>	495
<b>M25.9.4.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	495
<b>M3.3.2.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp. TM11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	495
<b>c8.6.a.</b>	Gammaproteobacteria	Uncultured Pseudomonadaceae bacterium clone Cat013B_F03 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	495
<b>c8.6.b.</b>	Gammaproteobacteria	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone OTU1 patient3	495
<b>c9.4.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	495
<b>M25.9.15.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	495
<b>c9.5.2.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	495
<b>c9.6.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio splendidus</i> strain W676 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	495
<b>M2.3.6.b.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio fischeri</i>	495
<b>M25.6.11.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio</i>	495
<b>M25.6.17.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio</i>	495
<b>M25.6.5.2.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio</i> sp.	495
<b>M25.8.</b>	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio</i> sp.	495
<b>M25.9.1.2.a</b>	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio</i> sp.	495
<b>M25.9.11.</b>	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	495

\*Σύμφωνα με την ομολογία αλληλουχιών του 16S rRNA (GenBank NCBI).

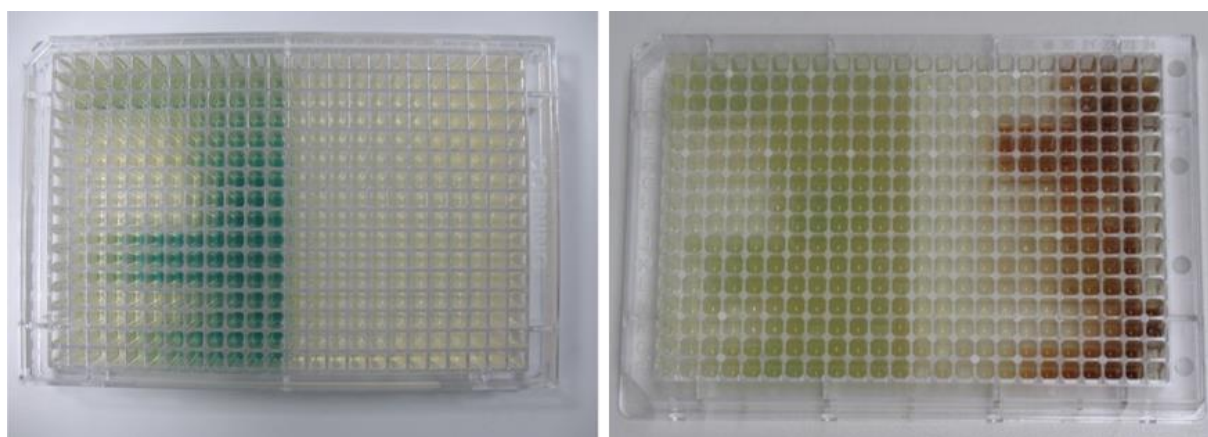
### 3.1.2. Ιδιαιτερότητες βακτηριακών στελεχών

Η παρατήρηση των αποικιών στο οπτικό στερεοσκόπιο αποκάλυψε την ύπαρξη έντονης μορφολογικής ποικιλομορφίας, κυρίως μεταξύ των στελεχών του γένους *Pseudomonas*. Ως προς το σχήμα και το μέγεθος παρουσίαζαν κυκλικό, ακανόνιστο ή νηματοειδές σχήμα και μεγέθη που κυμαίνονταν από μικροσκοπικές αποικίες (με τη μορφή κουκκίδας) μέχρι μεσαία μεγέθη. Ανιχνεύθηκαν διαφορές ως προς την επιφάνεια και την ανύψωση της αποικίας («πλάγια όψη») όπου παρατηρήθηκαν λείες, τραχιές ή γυαλιστερές επιφάνειες και ελαφρά ανυψωμένες ή κυρτές αποικίες. Ακόμα, υπήρχαν διαφανείς, ημιδιαφανείς και αδιαφανείς αποικίες σε χρώματα που κάλυπταν κυρίως τις αποχρώσεις του μπεζ και του γκρι. Πολλά από τα στελέχη χαρακτηρίζονταν από την παραγωγή χρωστικών στο άγαρ, χρώματος καφέ ή σκούρου κόκκινου (Εικόνα 3.2.).



Εικόνα 3.2. Φωτογραφίες διαφορετικών μορφολογικά αποικιών των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* από την παρατήρηση των καλλιεργειών στο οπτικό μικροσκόπιο.

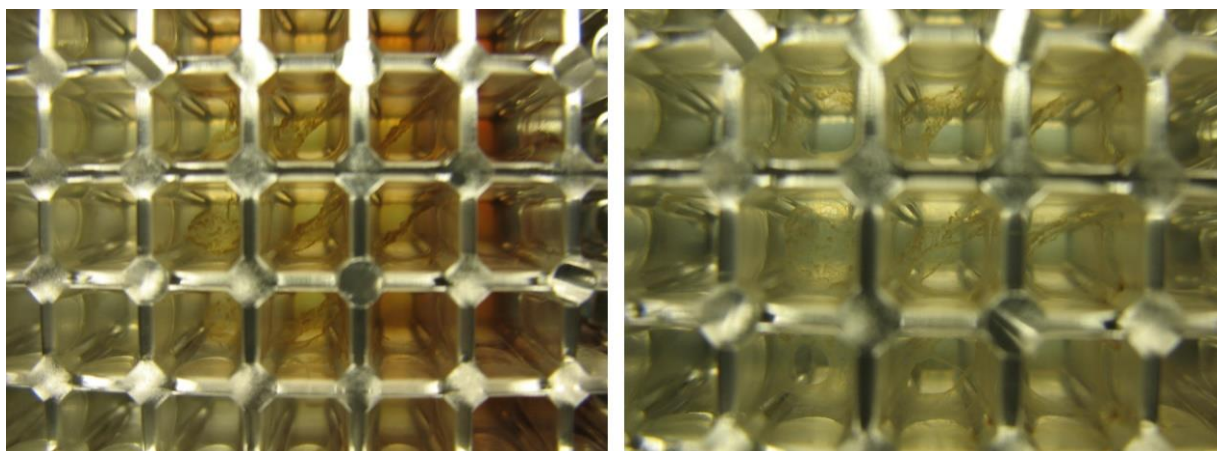
Σχετικά με τη συμπεριφορά των βακτηρίων κατά την επώαση τους στη μικροπλάκα, ορισμένα στελέχη (κυρίως του γένους *Vibrio*) δεν παρουσίασαν ανάπτυξη, παρόλο που αναπτύσσονταν κανονικά στην υγρή καλλιέργεια. Αξιοσημείωτο είναι ότι πολλά στελέχη που δεν παρήγαγαν κάποια χρωστική στο άγαρ, εμφάνισαν παραγωγή μπλε-πράσινης χρωστικής κατά την επώαση τους στη μικροπλάκα (Εικόνα 3.3.). Παράλληλα, παρατηρήθηκε η παραγωγή μιας έντονα φρουτώδους οσμής.



Εικόνα 3.3. Φωτογραφίες από μικροπλάκες μετά την επώαση στο φωτόμετρο. Χαρακτηριστική είναι η παραγωγή χρωστικών από τα διαφορετικά στελέχη. Η διαβάθμιση του χρώματος υποδεικνύει το βαθμό το οποίο περιλαμβάνει την κατάλληλη συγκέντρωση του παράγοντα που αναστέλλει την ανάπτυξη του βακτηρίου.



Τέλος, εκτός από την παραγωγή χρωστικών στη μικροπλάκα, δύο στελέχη που ανήκαν στο είδος *Pseudomonas stutzeri* σχημάτιζαν βιοφίλμ στο εσωτερικό των βοθρίων (Εικόνα 3.4.).



Εικόνα 3.4. Φωτογραφίες από το εσωτερικό των βοθρίων της μικροπλάκας. Φαίνεται ο σχηματισμός του βιοφίλμ από στελέχη του είδους *Pseudomonas stutzeri*.

### 3.2. Ανθεκτικότητα βακτηρίων σε αντιβιοτικά σε σχέση με το βάθος

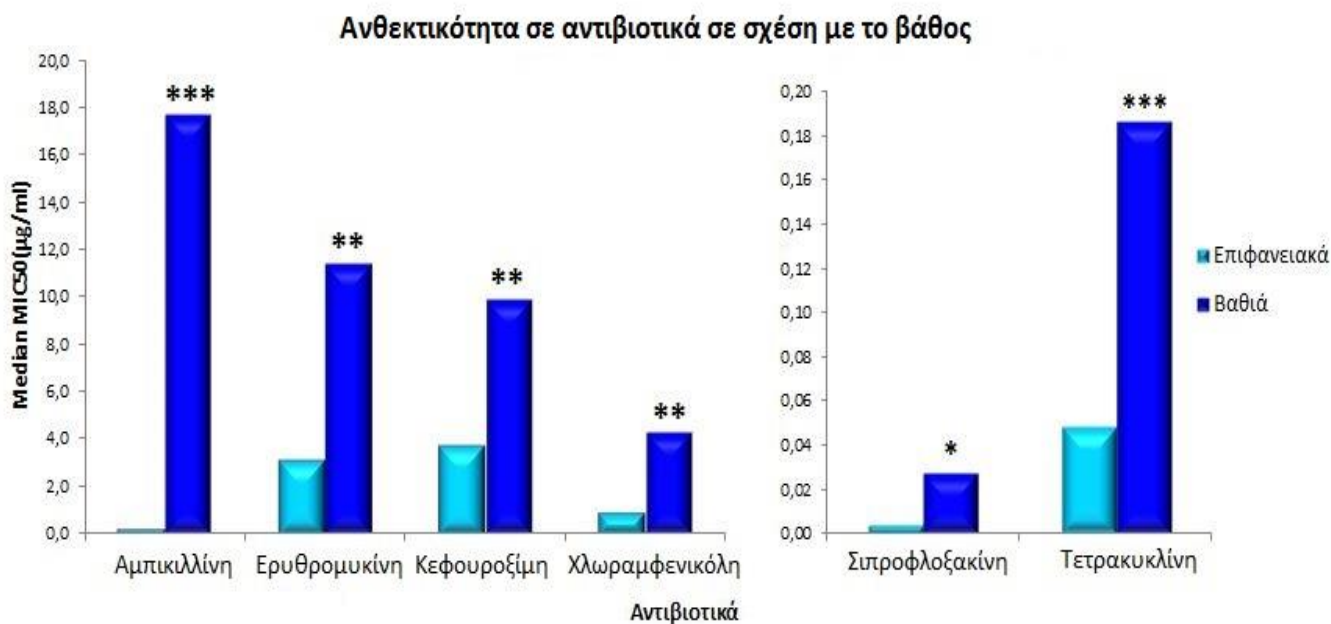
Τα αποτελέσματα αναφέρονται στην ανθεκτικότητα σε 6 διαφορετικά αντιβιοτικά για 15 βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από τα επιφανειακά νερά της στήλης (5 έως 90 μέτρα) πάνω από το υδροθερμικό πεδίο και 26 στελέχη από τα βαθιά νερά (430 έως 495 μέτρα) κοντά στον πυθμένα του υποθαλάσσιου ηφαιστείου.

Τα δεδομένα παρουσίασαν ομοιογένεια διασπορών αλλά μη-κανονική κατανομή, λόγω της έντονης ασυμμετρίας τους. Για την ορθότερη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η διάμεσος, καθώς, σε σχέση με την αριθμητική μέση τιμή, περιγράφει καλύτερα την κεντρική τάση του συνόλου των μετρήσεων όταν αυτό χαρακτηρίζεται από ασυμμετρία. Πρέπει να σημειωθεί ότι δυο βακτηριακά στελέχη των επιφανειακών νερών, λόγω του σχηματισμού βιοφίλμ στα βοθρία της μικροπλάκας, παρουσίασαν ακραίες τιμές MIC<sub>50</sub> και εμφανίζονταν ως παράτυπα σημεία (outliers), με αποτέλεσμα να μη ληφθούν υπόψη κατά τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Η αρχική υπόθεση ήταν ότι τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από τα βαθιά νερά, δηλαδή κοντά στις υδροθερμικές πηγές, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με αυτά των επιφανειακών νερών. Για

τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης έγινε σύγκριση των διάμεσων τιμών της MIC50 του κάθε αντιβιοτικού για τα διάφορα καλλιεργούμενα στελέχη που απομονώθηκαν από τα διαφορετικά βάθη.

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης επιβεβαίωσαν την αρχική υπόθεση, καθώς τα στελέχη από τα βαθιά νερά παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές MIC50, άρα μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με τα επιφανειακά στελέχη. Οι διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές και για τα 6 αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 3.5.)



Εικόνα 3.5. Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά των βακτηριακών στελεχών από τα διαφορετικά βάθη της στήλης του νερού πάνω από το υδροθερμικό πεδίο του Κολούμπο. Λόγω της μη κανονικότητας και της έντονης ασυμμετρίας της κατανομής, χρησιμοποιήθηκαν οι διάμεσες τιμές MIC50. Με αστερίσκο παρουσιάζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (Mann-Whitney U Test, \*σημαντικό με  $p \leq 0.05$ , \*\*σημαντικό με  $p \leq 0.01$ , \*\*\*σημαντικό με  $p \leq 0.001$ ).

Η ίδια υπόθεση ελέγχθηκε ξεχωριστά για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, τα οποία και αποτελούσαν την πλειοψηφία των στελεχών που αναλύθηκαν. Παρομοίως παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (με  $p < 0.01$ ) στην ανθεκτικότητα των στελεχών από τα διαφορετικά βάθη για όλα τα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν. Επίσης, βρέθηκε ότι οι τιμές MIC50 των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* που απομονώθηκαν από τα βαθιά νερά ήταν στατιστικά υψηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες του συνόλου των βακτηρίων. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.2., για την Αμπικιλλίνη η διάμεσος τιμή MIC50 των στελεχών *Pseudomonas* ήταν 76.5 (µg/mL), ενώ για το σύνολο των βακτηρίων ήταν 17.7 (µg/mL). Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρήθηκε για την Κεφουροξίμη, όπου τα στελέχη *Pseudomonas* είχαν τιμή MIC50 περίπου 125 (µg/mL) σε σχέση με το σύνολο των βακτηρίων που παρουσίασε MIC50 περίπου 10 (µg/mL) (Πίνακας 3.2.).

Πίνακας 3.2. Διάμεσες τιμές MIC50 (μg/mL) που προσδιορίστηκαν από τον έλεγχο του συνόλου των βακτηριακών στελεχών ως προς τα διάφορα αντιβιοτικά, καθώς και οι αντίστοιχες τιμές για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, τα οποία απομονώθηκαν από τα διαφορετικά βάθη της στήλης του νερού. Με κόκκινο φαίνονται οι τιμές MIC50 των στελεχών *Pseudomonas*, οι οποίες ήταν στατιστικά υψηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες του συνόλου των βακτηρίων.

Median MIC50 (μg/mL)	Επιφανειακά (5-90m)		Βαθιά (430-495m)	
	Σύνολο Βακτηρίων	<i>Pseudomonas</i>	Σύνολο Βακτηρίων	<i>Pseudomonas</i>
Αμπικιλλίνη	0.13	0.13	17.70	<b>76.5</b>
Ερυθρομυκίνη	3.01	3.39	11.46	<b>15.1</b>
Σιπροφλοξακίνη	0.004	0.004	0.03	0.03
Κεφουροξίμη	3.66	3.36	9.89	<b>125.2</b>
Τετρακυκλίνη	0.05	0.05	0.19	<b>0.7</b>
Χλωραμφενικόλη	0.82	0.57	4.31	<b>5.8</b>

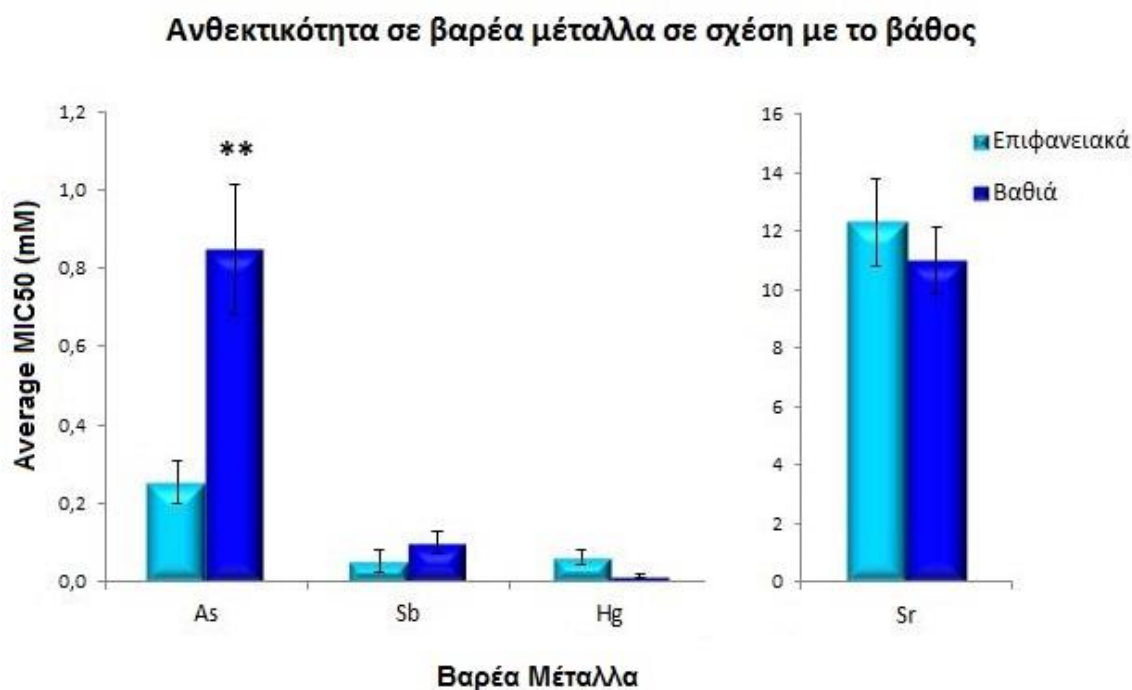
### 3.3. Ανθεκτικότητα βακτηρίων σε βαρέα μέταλλα και απόβλητα ελαιοτριβείου σε σχέση με το βάθος

#### Βαρέα Μέταλλα

Τα αποτελέσματα αφορούν στην ανθεκτικότητα 16 βακτηριακών στελεχών από τα επιφανειακά νερά και 29 βακτηριακών στελεχών από τα βαθύτερα στρώματα, παρουσία 4 βαρέων μετάλλων και αποβλήτων ελαιοτριβείου. Τα δεδομένα παρουσίασαν κανονική κατανομή και ομοιογένεια διασπορών, επομένως για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η αριθμητική μέση τιμή.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα (Εικόνα 3.6.), τα στελέχη από τα βαθιά νερά μπορούσαν να αναπτυχθούν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αρσενικού και αντιμονίου σε σχέση με τα στελέχη από τα επιφανειακά νερά, τα οποία ήταν πιο ανθεκτικά στον υδράργυρο και στο στρόντιο. Παρόλα αυτά η σύγκριση των μέσων τιμών MIC50 των βαρέων μετάλλων για το σύνολο των βακτηρίων από τα διαφορετικά βάθη έδειξε ότι η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ( $p < 0.01$ ) μόνο στην περίπτωση του  $As^{3+}$ , με τα βακτήρια από τα βαθιά νερά να είναι πιο ανθεκτικά. Για τα υπόλοιπα βαρέα μέταλλα, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά. Ο έλεγχος της ίδιας υπόθεσης μόνο για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έδειξε ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα.

Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων έναντι των υπό μελέτη βακτηρίων ακολουθούσε την παρακάτω σειρά:  $Hg^{2+} > Sb^{3+} > As^{3+} > Sr^{3+}$ . Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις  $Sr^{3+}$  (~10 mM), σε σχέση με τα υπόλοιπα βαρέα μέταλλα ( $As^{3+}$ : ~1 mM,  $Sb^{3+}$ : ~0.1 mM,  $Hg^{2+}$ : ~0.01 mM) (Εικόνα 3.6.).



Εικόνα 3.6. Ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα (Μέση  $MIC_{50} \pm$  Τυπικό Σφάλμα) των βακτηρίων από διαφορετικά βάθη της στήλης νερού στο υδροθερμικό πεδίο του Κολούμπο. Λόγω της κανονικής και συμμετρικής κατανομής των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκαν οι αριθμητικές μέσες τιμές. Με αστερίσκο συμβολίζεται η στατιστικά σημαντική διαφορά (t-test,  $**p < 0.01$ ).

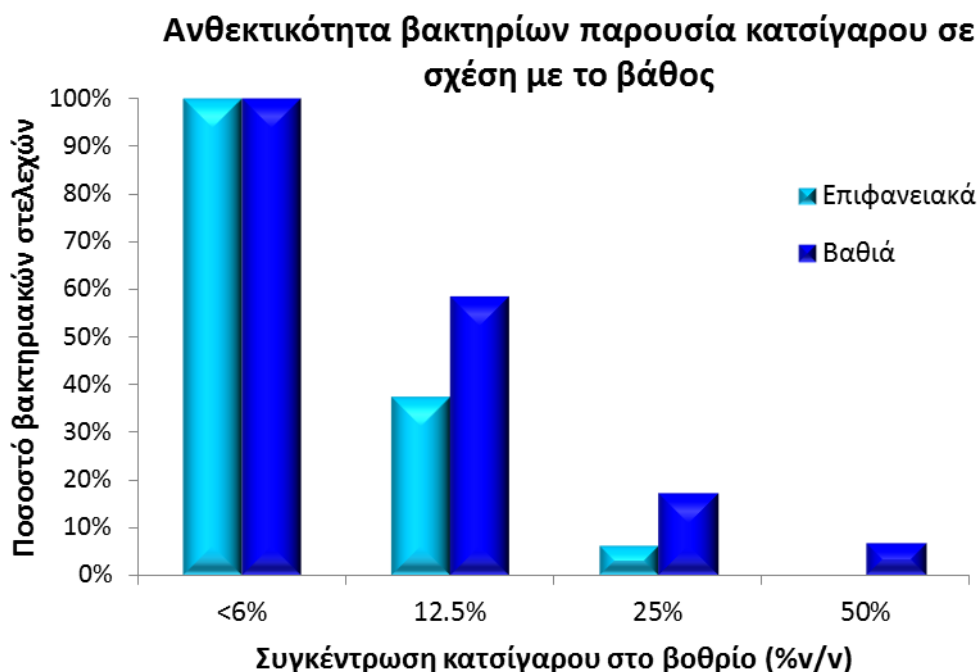
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.3.), απεικονίζονται οι μέγιστες και οι ελάχιστες τιμές  $MIC_{50}$  των βακτηρίων της στήλης του νερού για όλα τα βαρέα μέταλλα που εξετάστηκαν. Παρατηρείται ότι οι μέγιστες τιμές  $MIC_{50}$  για όλα τα βαρέα μέταλλα, εκτός του υδραργύρου, ήταν μεγαλύτερες για τα βακτηριακά στελέχη από τα βαθύτερα στρώματα της στήλης του νερού σε σχέση με αυτά που απομονώθηκαν από τα πιο επιφανειακά στρώματα.

Πίνακας 3.3. Εύρος τιμών  $MIC_{50}$  (mM) του συνόλου των βακτηρίων από τα διαφορετικά βάθη της στήλης του νερού για βαρέα μέταλλα που ελέγχθηκαν.

Εύρος τιμών $MIC_{50}$ (mM)	$As^{3+}$	$Sb^{3+}$	$Sr^{3+}$	$Hg^{2+}$
Επιφανειακά (5-90 m)	0.04-0.72	0.001-0.44	2.85-18.75	0.003-0.24
Βαθιά (430-495 m)	0.06-3.01	0.001-0.68	2.83-28.89	0.002-0.11

## Απόβλητα Ελαιοτριβείου

Όσον αφορά στην ανθεκτικότητα των βακτηριακών στελεχών παρουσία αποβλήτων ελαιοτριβείου, παρατηρήθηκε ότι το 7% των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα βαθύτερα στρώματα της στήλης του νερού κατάφερε να αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 50% κατ' όγκο κασίγαρο (% v/v). Αντίθετα, κανένα από τα στελέχη των επιφανειακών νερών δεν παρουσίασε ανάπτυξη σε αυτή την υψηλή συγκέντρωση κασίγαρου. Σε 25% v/v κασίγαρο, αναπτύχθηκε τριπλάσιο ποσοστό βακτηριακών στελεχών από τα βαθιά νερά σε σύγκριση με τα βακτήρια από την επιφάνεια της στήλης του νερού. Τέλος, σε 12.5% v/v κασίγαρο, το ποσοστό των βακτηρίων από τα βαθιά νερά που παρουσίασε ανάπτυξη ήταν σχεδόν διπλάσιο από το αντίστοιχο των επιφανειακών στελεχών (Εικόνα 3.7.).

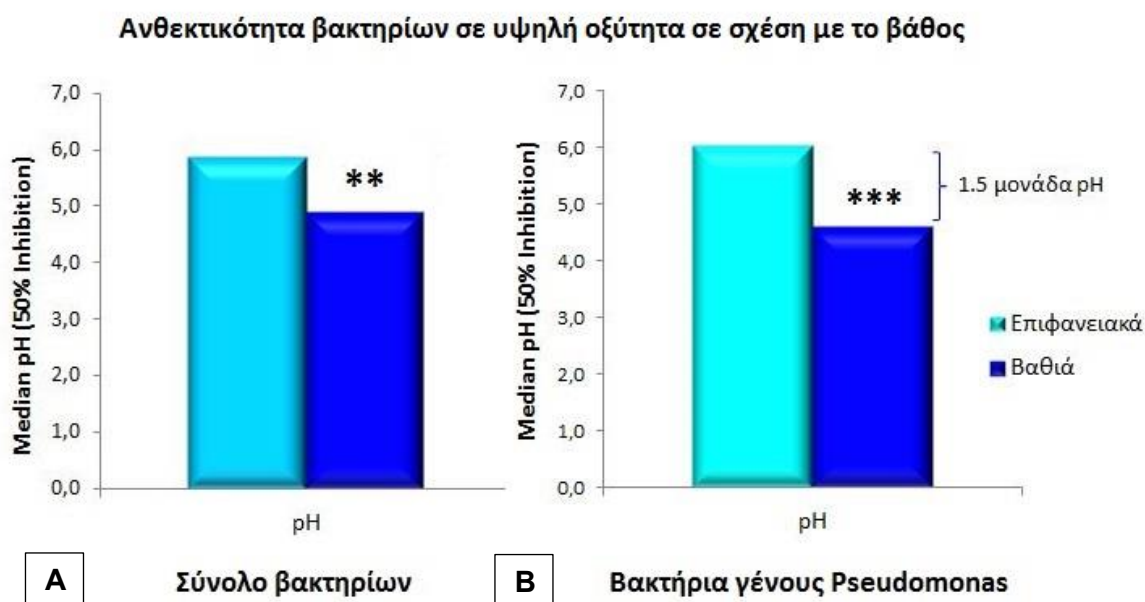


Εικόνα 3.7. Αθροιστική ποσοστιαία κατανομή των βακτηριακών στελεχών από τα διαφορετικά βάθη της στήλης του νερού στο υδροθερμικό πεδίο του Κολούμπο, που παρουσιάζουν ανάπτυξη παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων (%v/v) κασίγαρου.

### 3.4. Ανθεκτικότητα βακτηρίων σε υψηλή οξύτητα σε σχέση με το βάθος

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε υψηλή οξύτητα προσδιορίστηκε η τιμή του pH που αναστέλλει το 50% της βακτηριακής ανάπτυξης. Τα δεδομένα παρουσίασαν ομοιογένεια διασπορών αλλά μη-κανονική κατανομή λόγω έντονης ασυμμετρίας, επομένως για τις απαραίτητες συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκαν οι διάμεσες τιμές του pH, αντί των μέσων τιμών.

Η σύγκριση των διάμεσων τιμών του pH που αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων κατά το ήμισυ έδειξε ότι τόσο για το σύνολο των βακτηρίων, όσο και για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* ξεχωριστά, τα στελέχη των βαθιών νερών είναι πιο ανθεκτικά σε υψηλή οξύτητα σε σχέση με τα επιφανειακά στελέχη.



Εικόνα 3.7. Ανθεκτικότητα σε υψηλή οξύτητα των βακτηριακών στελεχών από τα διαφορετικά βάθη της στήλης του νερού πάνω από το υδροθερμικό πεδίο του Κολούμπο. Το γράφημα Α αναφέρεται στο σύνολο των βακτηρίων και το γράφημα Β στα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Λόγω της μη-κανονικότητας και της έντονης ασυμμετρίας της κατανομής των δεδομένων, χρησιμοποιήθηκαν οι διάμεσες τιμές του pH που αναστέλλει το 50% της βακτηριακής ανάπτυξης. Με αστερίσκο συμβολίζονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές (Mann-Whitney U Test, \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ ).

Πιο συγκεκριμένα, η διάμεση τιμή του pH που προκαλούσε την αναστολή της ανάπτυξης του συνόλου των βακτηρίων από τα επιφανειακά νερά ήταν ίση με 5.85, ενώ η αντίστοιχη τιμή για τα στελέχη από τα βαθιά νερά ήταν αρκετά χαμηλότερη και ίση με 4.87. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα καταδεικνύουν διαφοροποίηση των στελεχών από τα επιφανειακά και βαθύτερα στρώματα της στήλης του νερού ως προς τη δυνατότητα ανάπτυξης τους σε χαμηλό pH.



Αυτή η διαφορά ισούται σχεδόν με μια ολόκληρη μονάδα της πεχαμετρικής κλίμακας, ενώ βρέθηκε ότι είναι στατιστικά σημαντική με p-value πολύ μικρότερο του 0.01 (Πίνακας 3.4.).

Ο αντίστοιχος έλεγχος για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* αποκάλυψε ότι τα στελέχη από τα βαθιά νερά επιβιώνουν σε πολύ χαμηλότερο pH (διάμεσο pH=4.59) σε σχέση με τα επιφανειακά στελέχη (διάμεσο pH=6.05). Εδώ η διαφορά στην ανθεκτικότητα ως προς το βάθος φτάνει τη 1.5 μονάδα της πεχαμετρικής κλίμακας και αποδείχθηκε ως εξαιρετικά στατιστικά σημαντική με p-value πολύ μικρότερο του 0.0001.

Πίνακας 3.4. Διάμεσες τιμές του pH που αναστέλλει το 50% της ανάπτυξης για το σύνολο των βακτηρίων και για τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* από τα διαφορετικά βάθη της στήλης του νερού πάνω από το υδροθερμικό πεδίο του Κολούμπο. Απεικονίζονται τα p-values που προέκυψαν από τη σύγκριση των διάμεσων τιμών με το Mann-Whitney U Test.

Median pH (50% αναστολή ανάπτυξης)	Επιφανειακά (5-90m)	Βαθιά (430-495m)	Διαφορά pH ως προς το βάθος	p-value (Mann-Whitney U Test)
Σύνολο βακτηρίων	5.85	4.87	<b>0.98</b>	<b>0.002</b>
Βακτήρια γένους <i>Pseudomonas</i>	6.05	4.59	<b>1.5</b>	<b>4.65E-07</b>

### 3.5. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίων στους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες σε σχέση με το βάθος

Για τη σύνοψη και τη συσχέτιση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες (αντιβιοτικά, βαρέα μέταλλα, υψηλή οξύτητα, απόβλητα ελαιολιβείου) ως προς το βάθος από το οποίο απομονώθηκαν, εφαρμόστηκε ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών και συγκεκριμένα, ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis-PCA). Η ανάλυση βασίστηκε στη συσχέτιση κατά Spearman, καθώς είναι λιγότερο ευαίσθητη σε ακραίες τιμές, σε σχέση με την πιο κοινά εφαρμοσμένη συσχέτιση κατά Pearson.

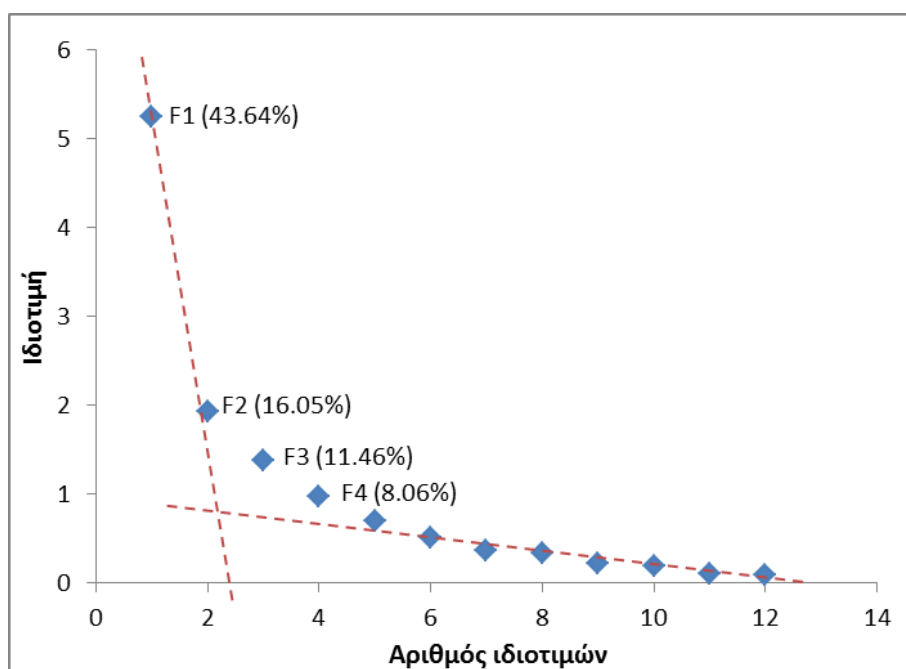
Τα αποτελέσματα της συσχέτισης των τιμών MIC50 για τους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5. Η ισχύς της συσχέτισης καθορίζεται από τον συντελεστή συσχέτισης  $r$ , ο οποίος λαμβάνει τιμές από -1 έως 1. Ως ισχυρές συσχετίσεις ορίστηκαν εκείνες με συντελεστή μεγαλύτερο ή ίσο του 0.5, ενώ μέτριες εκείνες με τιμή συντελεστή από 0.3 ως 0.5. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.5., η ανθεκτικότητα παρουσίασε ισχυρές

θετικές συσχετίσεις μεταξύ όλων των αντιβιοτικών, με εξαίρεση την ανθεκτικότητα στη Σιπροφλοξακίνη που παρουσίασε μέτρια συσχέτιση με την ανθεκτικότητα στην Ερυθρομυκίνη και Κεφουροξίμη. Όσον αφορά στα βαρέα μέταλλα, βρέθηκε μέτρια θετική συσχέτιση ανάμεσα στην ανθεκτικότητα σε Αντιμόνιο και Αρσενικό, και στην ανθεκτικότητα σε Αντιμόνιο και Στρόντιο. Η ανθεκτικότητα σε Αρσενικό και Στρόντιο δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Η ανθεκτικότητα σε Υδράργυρο εμφάνισε μέτρια θετική συσχέτιση με την υψηλή οξύτητα και μέτρια αρνητική συσχέτιση με την ανθεκτικότητα σε Αρσενικό. Αρνητικές συσχετίσεις σημειώθηκαν ανάμεσα στην ανθεκτικότητα σε χαμηλό pH και σε όλα τα αντιβιοτικά. Οι συσχετίσεις αυτές ήταν ισχυρές για όλα τα αντιβιοτικά, εκτός από την Σιπροφλοξακίνη και την Κεφουροξίμη, όπου ήταν μέτριες. Η ανθεκτικότητα στον κατσίγαρο φάνηκε να συσχετίζεται θετικά σε μέτριο βαθμό με όλα τα αντιβιοτικά, εκτός της Ερυθρομυκίνης, και αρνητικά με την ανθεκτικότητα σε Υδράργυρο και υψηλή οξύτητα.

Πίνακας 3.5. Πίνακας κατά ζεύγη συσχετίσεων των αρχικών μεταβλητών (κατά Spearman). Οι διπλότυπες συσχετίσεις δεν απεικονίζονται. Οι τιμές με έντονα κόκκινο χρώμα αποτελούν τις στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ( $p \leq 0.05$ ).

Μεταβλητές	Αμπικιλλίνη	Ερυθρομυκίνη	Σιπροφλοξασίνη	Κεφουροξίμη	Τετρακυκλίνη	Χλωραμφενικόλη	As	Sb	Sr	Hg	pH	OOMW
Αμπικιλλίνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ερυθρομυκίνη	<b>0,734</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Σιπροφλοξασίνη	<b>0,634</b>	<b>0,473</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Κεφουροξίμη	<b>0,671</b>	<b>0,643</b>	<b>0,494</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Τετρακυκλίνη	<b>0,823</b>	<b>0,848</b>	<b>0,578</b>	<b>0,624</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
Χλωραμφενικόλη	<b>0,735</b>	<b>0,631</b>	<b>0,753</b>	<b>0,679</b>	<b>0,704</b>	-	-	-	-	-	-	-
As	0,076	0,047	0,060	0,146	0,077	-0,106	-	-	-	-	-	-
Sb	-0,009	0,086	-0,086	0,141	-0,013	-0,187	<b>0,380</b>	-	-	-	-	-
Sr	-0,014	-0,138	0,212	0,055	-0,213	-0,048	0,229	<b>0,385</b>	-	-	-	-
Hg	-0,270	-0,032	-0,299	-0,262	-0,035	-0,299	<b>-0,383</b>	-0,067	-0,220	-	-	-
pH	<b>-0,615</b>	<b>-0,532</b>	<b>-0,335</b>	<b>-0,440</b>	<b>-0,584</b>	<b>-0,568</b>	-0,145	-0,154	-0,100	<b>0,317</b>	-	-
OOMW	<b>0,463</b>	0,249	<b>0,440</b>	<b>0,390</b>	<b>0,411</b>	<b>0,590</b>	0,096	-0,188	-0,104	<b>-0,524</b>	<b>-0,556</b>	-

Στη συνέχεια, οι παραπάνω συσχετίσεις αναλύθηκαν σε κύριες συνιστώσες με τον υπολογισμό των ιδιοτιμών και την κατασκευή του κρημνογραφήματος. Από το κρημνογράφημα (Εικόνα 3.8.) παρατηρείται ότι ο σχηματισμός «αγκώνα» περιλαμβάνει τις 4 πρώτες συνιστώσες, οι οποίες εμφανίζουν συνολικό ποσοστό επεξήγησης 79.2%. Ωστόσο, οι δύο πρώτες συνιστώσες F1 και F2 εξηγούν ήδη ένα αξιόλογο ποσοστό της παρατηρούμενης μεταβλητότητας της τάξης του 59.7%. Επομένως, βάσει του κρημνογραφήματος και του ποσοστού μεταβλητότητας, οι συνιστώσες που επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση ήταν οι F1 και F2.



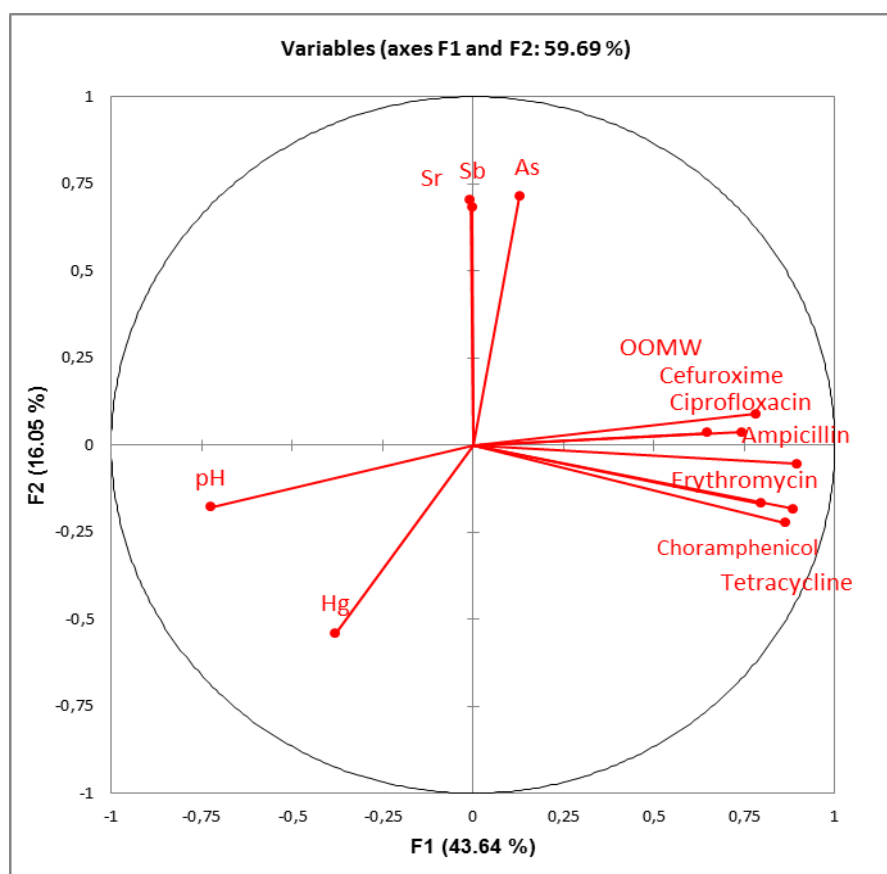
Εικόνα 3.8. Κρημογράφημα των ιδιοτιμών. Οι διακεκομμένες γραμμές απεικονίζουν το σχηματισμό του «αγκώνα». Οι F1, F2, F3, F4 είναι οι τέσσερις πρώτες συνιστώσες που περιλαμβάνονται στον «αγκώνα». Σε παρενθέσεις αναγράφονται τα ποσοστά μεταβλητότητας που εξηγεί η κάθε συνιστώσα.

Η συσχέτιση ανάμεσα στις μεταβλητές και στις συνιστώσες (Πίνακας 3.7.) έδειξε ότι οι μεταβλητές της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, σε υψηλή οξύτητα και σε απόβλητα ελαιοτριβείου συσχετίζονταν ισχυρότερα με την πρώτη συνιστώσα. Τα βαρέα μέταλλα ήταν υπεύθυνα για τη δημιουργία της δεύτερης συνιστώσας, με εξαίρεση τον Υδράργυρο που εμφάνισε μέτρια συσχέτιση με τη δεύτερη και τρίτη συνιστώσα.

Πίνακας 3.7. Μήτρα συντελεστών συσχέτισης (παραγοντικών φορτίων) των μεταβλητών με τις κύριες συνιστώσες. Με έντονα κόκκινο χρώμα τα μεγαλύτερα κατά απόλυτη τιμή παραγοντικά φορτία των μεταβλητών στην F1 και F2.

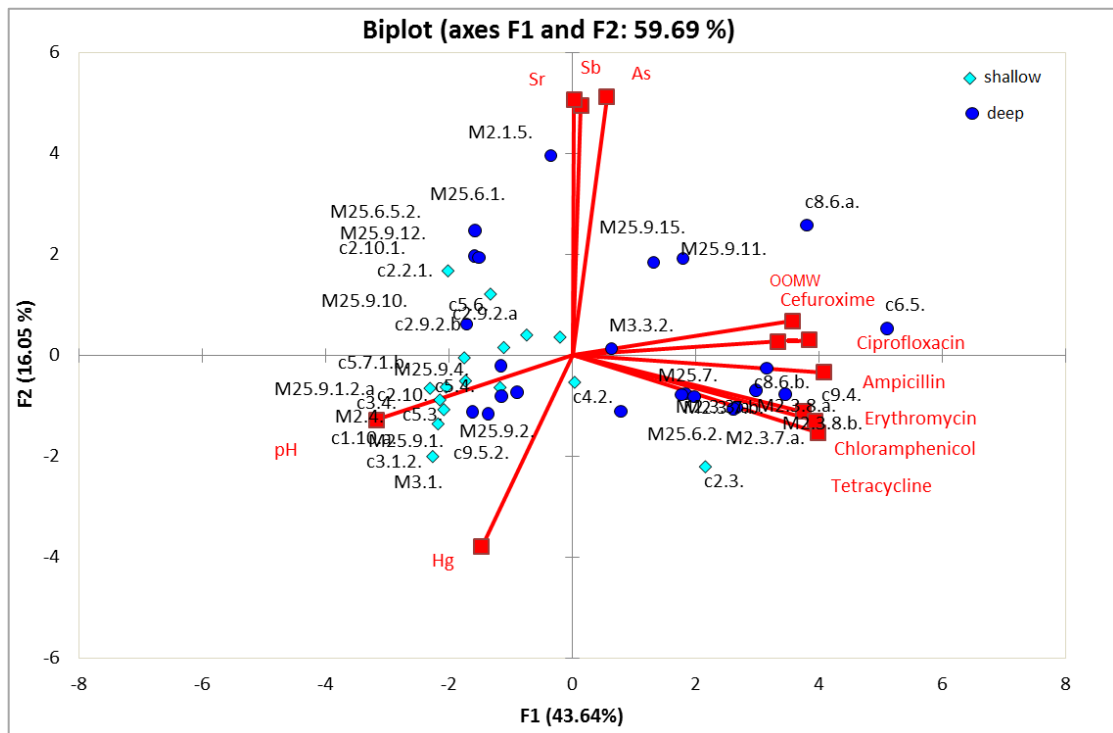
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Αμπικιλίνη	<b>0,897</b>	-0,054	0,114	0,023	0,027	-0,067	-0,136	-0,136
Ερυθρομυκίνη	<b>0,795</b>	-0,168	0,433	-0,093	0,044	-0,014	-0,119	-0,131
Σιπροφλοξασίνη	<b>0,742</b>	0,036	-0,139	0,463	0,275	-0,172	0,271	-0,078
Κεφουροξίμη	<b>0,781</b>	0,089	0,180	0,041	0,140	0,471	-0,126	0,281
Τετρακυκλίνη	<b>0,865</b>	-0,224	0,293	-0,133	0,071	-0,166	0,045	-0,024
Χλωραμφενικόλη	<b>0,886</b>	-0,183	-0,153	0,207	-0,003	0,086	0,066	0,028
As	0,129	<b>0,716</b>	0,055	-0,424	0,432	-0,253	-0,026	0,169
Sb	-0,002	<b>0,684</b>	0,553	-0,079	-0,206	0,208	0,337	-0,138
Sr	-0,007	<b>0,705</b>	0,047	0,627	-0,146	-0,134	-0,174	0,125
Hg	-0,379	<b>-0,541</b>	0,600	0,126	-0,075	-0,201	0,150	0,336
pH	<b>-0,725</b>	-0,178	0,003	0,198	0,544	0,213	0,113	-0,049
OOMW	<b>0,647</b>	0,035	-0,585	-0,216	-0,188	0,014	0,244	0,202

Λαμβάνοντας υπόψη μόνο τις δύο πρώτες συνιστώσες από τη μήτρα των παραγοντικών φορτίων με τις κύριες συνιστώσες (Πίνακας 3.7.), και παρατηρώντας τη διάταξη των μεταβλητών στο παρακάτω γράφημα (Εικόνα 3.9.), προέκυψαν τρεις ομάδες «κοντινών» μεταβλητών: η μία αποτελούταν από την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και κασίγαρο, η άλλη από την ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα εκτός του υδραργύρου, και μια τρίτη ομάδα που περιλάμβανε την ανθεκτικότητα σε υδράργυρο και χαμηλό pH. Οι μεταβλητές της ανθεκτικότητας στα διαφορετικά αντιβιοτικά παρουσίασαν υψηλές θετικές συσχετίσεις μεταξύ τους και με τον πρώτο άξονα. Η ανθεκτικότητα σε υψηλή οξύτητα φάνηκε ότι συσχετίζεται αρνητικά με την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Οι μεταβλητές της ανθεκτικότητας σε βαρέα μέταλλα (εκτός του υδραργύρου) και σε αντιβιοτικά και υψηλή οξύτητα ήταν ανεξάρτητες μεταξύ τους, καθώς τα διανύσματα τους σχημάτιζαν γωνία 90°. Η θέση του διανύσματος της μεταβλητής της ανθεκτικότητας σε υδράργυρο (περίπου 45° κλίση σε σχέση με τους δύο κάθετους άξονες), υποδεικνύει ότι δεν αντιπροσωπεύτηκε τόσο καλά στην ανάλυση, όσο οι υπόλοιπες μεταβλητές.



Εικόνα 3.9. Γράφημα των δύο κύριων συνιστωσών F1 και F2 με βάση τα παραγοντικά φορτία των μεταβλητών. Όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος των διανυσμάτων τόσο σημαντικότερη είναι η συγκεκριμένη μεταβλητή.

Αν συνδυαστούν οι τιμές ανθεκτικότητας των δειγμάτων με τα παραγοντικά φορτία των μεταβλητών για τις δύο πρώτες συνιστώσες προκύπτει το παρακάτω γράφημα (Εικόνα 3.10.).



Εικόνα 3.10. Γράφημα βακτηριακών στελεχών (με τη μορφή σημείων) και μεταβλητών ανθεκτικότητας στους διάφορους παράγοντες (με τη μορφή διανυσμάτων). Με μπλε κουκίδες απεικονίζονται τα βακτηριακά στελέχη από τα βαθιά νερά και με γαλάζιους ρόμβους τα βακτηριακά στελέχη από τα επιφανειακά νερά. Διανύσματα που σχηματίζουν μικρότερες γωνίες υποδεικνύουν ισχυρότερες σχέσεις, ενώ κάθετα μεταξύ τους διανύσματα αντιστοιχούν σε ασθενέστερες σχέσεις.

Παρατηρώντας το γράφημα (Εικόνα 3.10.), φαίνεται ότι υπάρχει διαχωρισμός των βακτηρίων από τα βαθιά και τα επιφανειακά στρώματα της στήλης του νερού, κυρίως ως προς την πρώτη συνιστώσα F1. Αυτό υποδεικνύει ότι τα βακτηριακά στελέχη από τα βαθιά νερά έχουν σχετικά υψηλότερη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, στις χαμηλές τιμές pH και στην ικανότητα ανάπτυξης παρουσία κατσίγαρου, σε σχέση με τα στελέχη από τα επιφανειακά στρώματα. Όσον αφορά στην ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα, δεν υπάρχει σαφής διαχωρισμός σε σχέση με το βάθος, καθώς όλα παρουσίασαν μειωμένη ανθεκτικότητα στα βαρέα μέταλλα, με εξαίρεση ορισμένα μεμονωμένα βακτήρια από τα βαθιά στρώματα (π.χ. τα M2.1.5., M25.6.1., M25.9.15., c8.6.a κ.ά.). Ως προς τον Υδράργυρο, όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα, ανεξαρτήτου βάθους.

Πίνακας 3.8. Αναλυτικές πληροφορίες των πιο ανθεκτικών και πιο ευαίσθητων βακτηριακών στελεχών της παρούσας μελέτης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCA και των τιμών MIC50 που προσδιορίστηκαν. Απεικονίζεται ο κωδικός του στελέχους, το γένος ή το είδος βάσει της ομολογίας των αλληλουχιών του 16S rRNA (GenBank NCBI), το βάθος από το οποίο απομονώθηκαν, οι τιμές MIC50 για τα αντιβιοτικά και τα βαρέα μέταλλα, το pH που αναστέλλει το 50% της ανάπτυξης και η μέγιστη κατ' όγκο συγκέντρωση (% v/v) του κασιόγαρου (OOMW) στην οποία αναπτύχθηκαν.

	Στελέχη	Γένος/Είδος	Βάθος (m)	Αντιβιοτικά*						Βαρέα Μέταλλα*				pH	OOMW
				AMP	ER	CPR	CEF	TET	CHL	As	Sb	Sr	Hg		
Ανθεκτικά	c2.3.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	20	106.2	19.1	0.05	209.2	1.9	8.8	0.7	0.04	11.5	0.2	4.8	12.5%
	c6.5.	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone HA_99	430	140	26.2	0.12	566.5	2.1	9.5	0.8	0.08	18.1	0.004	4.6	12.5%
	c8.6.a.	Uncultured Pseudomonadaceae bacterium clone Cat013B_F03 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	495	245.6	24.4	0.06	286.6	1.5	6.5	0.6	0.68	18.8	0.01	4.2	12.5%
	M25.9.11.	<i>Bacillus</i>	495	63.9	90.7	0.02	0.3	0.2	0.6	1.6	0.3	18.8	0.01	4.2	50%
	M25.9.15.	<i>Pseudomonas</i> sp.	495	113.3	10.6	0.03	168.4	0.8	3.6	2.7	0.2	8.1	0.005	4.6	25%
Ευαίσθητα	c1.10.a.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5	0.1	3.8	0.004	3.4	0.05	0.5	0.1	0.010	2.8	0.040	6.3	6.25%
	M2.4.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	20	0.1	1.4	0.001	0.9	0.05	0.2	0.1	0.037	5.5	0.027	6.0	6.25%
	c2.10.1.	<i>Pseudomonas</i> sp.	20	0.1	0.2	0.004	0.5	0.05	0.4	0.1	0.445	18.6	0.031	5.9	3.13%
	M3.1.	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	45	0.1	9.1	0.003	3.4	0.06	0.8	0.1	0.030	5.6	0.162	6.1	6.25%
	c5.3.	<i>Pseudomonas</i> sp. 40M1 FL01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90	0.3	1.4	0.004	3.0	0.05	0.9	0.2	0.004	7.4	0.003	6.2	12.5%

\*AMP- Αμπικικιλίνη, ER- Ερυθρομυκίνη, CPR- Σιπροφλοξασίνη, CEF- Κεφουροξίμη, TET- Τετρακυκλίνη, CHL- Χλωραμφενικόλη, As- Αρσενικό, Sb- Αντιμόνιο, Sr- Στρόντιο, Hg- Υδράργυρος



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCA (Εικόνα 3.10.) και τις τιμές MIC που προσδιορίστηκαν, στον πίνακα 3.8. απεικονίζονται τα πιο ανθεκτικά και πιο ευαίσθητα στελέχη στους αντιμικροβιακούς παράγοντες που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Το πιο ανθεκτικό βακτηριακό στέλεχος ήταν το c8.6.a. το οποίο άνηκε στην οικογένεια *Pseudomonadaceae* και απομονώθηκε από βάθος 495 m. Παρουσίασε υψηλότερες τιμές MIC<sub>50</sub> για όλα τα αντιβιοτικά και τα βαρέα μέταλλα που μελετήθηκαν σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη, καθώς και ικανότητα ανάπτυξης σε αρκετά όξινο pH (pH 4.2) και υψηλή συγκέντρωση κασιίγαρου (12.5% v/v) (Πίνακας 3.8.). Επίσης, ξεχώρισε η περίπτωση του βακτηριακού στελέχους c2.3. που απομονώθηκε από τα επιφανειακά στρώματα νερού και άνηκε στο είδος *Pseudomonas stutzeri*. Το συγκεκριμένο στέλεχος χαρακτηρίστηκε από το σχηματισμό βιοφίλμ κατά τη διάρκεια της επώασης του και παρουσίασε υψηλότερη ανθεκτικότητα σε όλους τους παράγοντες σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη των επιφανειακών στελεχών (Πίνακας 3.8). Τέλος, παρατηρείται ότι το σύνολο των πιο ευαίσθητων βακτηριακών στελεχών απομονώθηκαν από τα επιφανειακά στρώματα της στήλης του νερού. Όλα παρουσίασαν πολύ χαμηλότερες τιμές MIC<sub>50</sub> σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια και αναπτύσσονταν σε υψηλότερες τιμές pH και μικρότερες συγκεντρώσεις κασιίγαρου (Πίνακας 3.8.).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

## 4.1. Συζήτηση

Τα ακραία περιβάλλοντα κυριαρχούνται από μικροοργανισμούς με εξαιρετικά φαινοτυπικά και γενωτυπικά χαρακτηριστικά. Τα βακτήρια που αποικίζουν αυτά τα περιβάλλοντα αναγκάζονται να αναπτύξουν αποτελεσματικούς μηχανισμούς και στρατηγικές για να επιβιώσουν και να αναπυχθούν υπό τις αντίξοες επικρατούσες συνθήκες. Το υδροθερμικό πεδίο του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο της Σαντορίνης αποτελεί ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον ακραίο περιβάλλον της Ελλάδας με μοναδικές ιδιότητες, που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και παραμένει ανεπαρκώς μελετημένο. Υπάρχουν ορισμένες αναφορές σχετικά με την γεωμορφολογία του (Sigurdsson *et al.*, 2006; Kiliias *et al.*, 2013) και τη γεωχημεία του (Carey *et al.*, 2013; Christopoulou *et al.*, 2016; Rizzo *et al.*, 2016). Ωστόσο, όσον αφορά στις μικροβιακές κοινότητες που αποικίζουν την περιοχή του υδροθερμικού πεδίου, οι μελέτες είναι περιορισμένες και αναφέρονται στην μικροβιακή ποικιλότητα αυτών των κοινοτήτων (Kiliias *et al.*, 2013; Bourboulis *et al.*, 2015; Oulas *et al.*, 2015). Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια διερεύνησης της ανθεκτικότητας βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη στήλη του νερού πάνω από το υδροθερμικό πεδίο του Κολούμπο, έναντι διαφόρων αντιμικροβιακών παραγόντων.

Συνολικά, απομονώθηκαν 219 στελέχη από διαφορετικά βάθη της στήλης του νερού, από τα οποία 116 ταυτοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν ότι το 85% των απομονωθέντων στελεχών ανήκαν στο φύλο Πρωτεοβακτήρια, σε συμφωνία με τους Kiliias *et al.* (2013). Πιο συγκεκριμένα, τα περισσότερα βακτηριακά στελέχη αντιπροσώπευαν το γένος *Pseudomonas*. Τα βακτήρια αυτά είναι γνωστά για την έντονη μεταβολική τους δραστηριότητα, καθώς διαθέτουν την ικανότητα αποικοδόμησης ξενοβιοτικών ουσιών και αξιοποίησης τοξικών οργανικών ενώσεων, όπως είναι οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Επίσης, εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε απολυμαντικά, απορρυπαντικά, βαρέα μέταλλα, αντιβιοτικά και οργανικούς διαλύτες (Timmis, 2002). Στα πλαίσια της εργασίας, ελέγχθηκαν για την ανθεκτικότητα τους όλοι οι αντιπρόσωποι του γένους *Pseudomonas* και ορισμένα στελέχη που ανήκαν στο γένος *Vibrio* και *Bacillus*.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μικροαραιώσεων που επιτρέπει τον προσδιορισμό της ελάχιστης συγκέντρωσης του αντιμικροβιακού παράγοντα που αναστέλλει το 50% της βακτηριακής ανάπτυξης (MIC<sub>50</sub>). Πρέπει να αναφερθεί ότι ελάχιστες μελέτες έχουν προσδιορίσει τιμές MIC για περιβαλλοντικά δείγματα και σε αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές μέθοδοι. Επίσης, τα δεδομένα που αφορούν στον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας περιβαλλοντικά απομονωθέντων βακτηρίων προέρχονται από μελέτες που αναφέρονται σε διαφορετικά είδη βακτηρίων και έχουν χρησιμοποιήσει διάφορους τύπους θρεπτικών μέσων και περιόδους επώασης (Dib *et al.*, 2008; Allen *et al.*, 2010). Όλα τα παραπάνω

καθιστούν δύσκολη τη σύγκριση με αντίστοιχες μελέτες ανθεκτικότητας που πραγματοποιήθηκαν σε άλλου τύπου περιβάλλοντα.

Στην παρούσα εργασία, αρχικά εξετάστηκε η ανθεκτικότητα σε 4 βαρέα μέταλλα (αρσενικό-As, αντιμόνιο-Sb, στρόντιο-Sr και υδράργυρο-Hg) που απαντώνται στην περιοχή του υδροθερμικού πεδίου του Κολούμπο. Βρέθηκε ότι τα βακτήρια από τα διαφορετικά βάθη της στήλης του νερού παρουσίασαν ανθεκτικότητα στα υπό μελέτη μέταλλα με την ακόλουθη σειρά:  $Sr^{3+} > As^{3+} > Sb^{3+} > Hg^{2+}$ . Οι μέσες τιμές MIC50 (Εικόνα 3.6.) που προσδιορίστηκαν για το στρόντιο στα στελέχη από τα επιφανειακά και τα βαθιά στρώματα της στήλης του νερού ήταν παρόμοιες με αντίστοιχες τιμές που καταγράφηκαν σε γλυκά ύδατα με έντονη βιομηχανική και γεωργική ρύπανση (12 mM και 11 mM έναντι 9.45 mM) (Ozer *et al.*, 2013). Για το αρσενικό και το αντιμόνιο, οι μέσες τιμές MIC50 (0.8 mM και 0.1 mM για τα στελέχη από τα βαθιά) (Εικόνα 3.6.) ήταν πιο κοντά σε αυτές των Farias *et al.* (2015), οι οποίοι αναφέρουν ως «ανθεκτικά», στελέχη των υδροθερμικών πηγών που αναπτύχθηκαν σε συγκέντρωση As ίση με 1 mM και Sb ίση με 0.5 mM. Πρέπει να αναφερθεί ότι υπήρχαν 9 βακτηριακά στελέχη από τα βαθιά νερά που παρουσίασαν τιμές MIC50 για το αρσενικό μεγαλύτερες του 1 mM που έφταναν μέχρι και τα 3 mM (Πίνακας 3.3.). Ωστόσο, οι τιμές αυτές παραμένουν πολύ μικρότερες σε σύγκριση με αντίστοιχες που αναφέρονται σε μελέτες ρυπασμένων περιοχών (για το As 0.8 mM έναντι 23 mM και για το Sb 0.1 mM έναντι 6.61 mM) (Cai *et al.*, 2009; Ozer *et al.*, 2013). Η μέση τιμή MIC50 για τον Hg στα επιφανειακά στελέχη ήταν 0.06 mM, σε συμφωνία με τους Vetriani *et al.* (2005) που αναφέρονται σε υψηλή ανθεκτικότητα και προσαρμογή στον υδράργυρο στελεχών του γένους *Pseudomonas* από υδροθερμικές πηγές, που παρουσίασαν τιμή MIC ίση με 0.075 mM. Συγκριτικά με τιμές MIC για τον Hg σε στελέχη *Pseudomonas* από περιοχές που υφίστανται ρύπανση με βαρέα μέταλλα, η μέγιστη τιμή που προσδιορίστηκε στην παρούσα εργασία (Πίνακας 3.3.) είναι πολύ μικρότερη (0.24 mM έναντι 2.31 mM) (Ozer *et al.*, 2013).

Προηγούμενη μελέτη που αφορούσε στην ανθεκτικότητα βακτηρίων από υδροθερμικές πηγές, έχει δείξει ότι τα στελέχη που βρίσκονταν πιο κοντά στην υδροθερμική πηγή ήταν πιο ανθεκτικά στον υδράργυρο, υποστηρίζοντας ότι έχουν προσαρμοστεί και επιβιώνουν, παρουσία τοξικών μετάλλων (Vetriani *et al.*, 2005). Ωστόσο, η πραγματική συγκέντρωση των διαλελυμένων βαρέων μετάλλων καθώς και η τοξική επιβάρυνση που προκαλούν στους θαλάσσιους μικροοργανισμούς πλησίον των υδροθερμικών πηγών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό και η συγκέντρωση άλλων στοιχείων που ελέγχουν την διαθεσιμότητα του μετάλλου στο περιβάλλον (Gadd and Griffiths, 1978). Στην παρούσα μελέτη, η υπόθεση ότι τα βακτήρια από τα βαθύτερα στρώματα της στήλης του νερού κοντά στην υδροθερμική πηγή παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με τα στελέχη των ρηχότερων νερών, επιβεβαιώθηκε

μόνο για το αρσενικό (Εικόνα 3.6.). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων στον κρατήρα του Κολούμπο έχουν μετρηθεί μόνο στις στερεές εναποθέσεις των υδροθερμικών πηγών (Christakis *et al.*, 2016), ενώ δεν υπάρχουν διαθέσιμες μετρήσεις σχετικά με τις πραγματικές συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στα ύδατα της συγκεκριμένης περιοχής. Συνεπώς, είναι πολύ πιθανό να μην υπάρχει σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις των μετάλλων μεταξύ των επιφανειακών και των βαθύτερων στρωμάτων νερού της περιοχής. Αν ισχύει κάτι τέτοιο, τότε τα βακτήρια στα βαθύτερα στρώματα νερού δε θα πρέπει να υπόκεινται σε σημαντικά μεγαλύτερη καταπόνηση από βαρέα μέταλλα σε σχέση με τα επιφανειακά νερά. Επομένως, δε θα υπάρχει φυσική αιτία επιλογής στελεχών που να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα ως προς το συγκεκριμένο αντιμικροβιακό παράγοντα. Ακόμα, μπορεί το περιεχόμενο των υδροθερμικών ρευστών και των εναποθέσεων των καμινάδων σε μέταλλα να μην απαντάται σε τοξικές μορφές στην περιοχή (Llanos *et al.*, 2000). Οι Edgcomb *et al.* (2004) αναφέρουν ότι η τοξικότητα των μεταλλικών ιόντων σε μικροοργανισμούς από υδροθερμικές πηγές μειωνόταν με την προσθήκη θειούχων ενώσεων, καθώς σχημάτιζαν μεταξύ τους διαλυτά και αδιάλυτα σύμπλοκα. Μελλοντικές μελέτες που θα διερευνούν τα επίπεδα συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων, καθώς και τις χημικές δομές με τις οποίες υφίστανται στα ύδατα του υποθαλάσσιου ηφαιστίου Κολούμπο, θα συμβάλουν σημαντικά έτσι ώστε να δοθεί μια πιο εμπειριστατωμένη εξήγηση σχετικά με την απουσία διαφοροποίησης των βακτηρίων στην στήλη του νερού ως προς την πολυμεταλλική ανθεκτικότητά τους.

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες μελέτες καταδεικνύουν ότι η ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα μπορεί να δράσει ως επιλεκτικός παράγοντας και να προσδώσει στους μικροοργανισμούς ανθεκτικότητα έναντι άλλων επιβαρυντικών παραγόντων, όπως είναι τα αντιβιοτικά (Baker-Austin, Wright, Stepanauskas, and McArthur, 2006; Stepanauskas *et al.*, 2006). Οι περισσότερες μελέτες αφορούν σε περιβάλλοντα που υφίστανται πιέσεις από ρυπογόνους παράγοντες (Stepanauskas *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2006). Ωστόσο, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά είναι διαδεδομένη στο περιβάλλον, ακόμα και απουσία ανθρωπογενούς χρήσης αντιβιοτικών (De Souza *et al.*, 2006; Dib *et al.*, 2008; Farias *et al.*, 2015). Οι Farias *et al.* (2015) έδειξαν πολύ πρόσφατα ότι βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από υδροθερμικές πηγές της βαθιάς θάλασσας και ήταν ανθεκτικά σε As και Sb, είχαν επίσης υψηλή ανθεκτικότητα σε 12 διαφορετικά, εμπορικά διαθέσιμα αντιβιοτικά. Τα αποτελέσματα του ελέγχου της ανθεκτικότητας των βακτηρίων από τις υδροθερμικές πηγές του Κολούμπο έδειξαν ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα βαθύτερα στρώματα της στήλης του νερού είχαν στατιστικά υψηλότερη ανθεκτικότητα και στα 6 αντιβιοτικά που μελετήθηκαν σε σχέση με τα επιφανειακά στελέχη (Εικόνα 3.5.). Το γεγονός αυτό στηρίζει την άποψη ότι σε ένα στρεσογόνο περιβάλλον

όπως οι περιοχές πλησίον των υδροθερμικών πηγών, οι μικροοργανισμοί τείνουν να αποκτήσουν γενικότερους μηχανισμούς αντιμετώπισης των φυσικοχημικών καταπονήσεων. Είναι πιθανό ότι ο ανταγωνισμός για πόρους κοντά στις υδροθερμικές πηγές παίζει επιπλέον ρόλο στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων ως προς αντιβιοτικούς παράγοντες. Αυτός ο ανταγωνισμός μπορεί να εμφανιστεί μέσω διάφορων αμυντικών προσαρμογών, όπως είναι η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών για τον εκτοπισμό τροφικών ανταγωνιστών (Farias *et al.*, 2015). Στην περίπτωση του υδροθερμικού πεδίου του Κολούμπο, η γνώμη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι πρόσφατα απομονώθηκαν στελέχη βακτηρίων που παρουσίασαν έντονη αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Μάλιστα, τα πιο βιοδραστικά στελέχη σχετίζονταν με τα γένη *Pseudomonas* και *Bacillus* (Bourbouli *et al.*, 2015). Τα στελέχη που επιτυγχάνουν να επικρατήσουν σε ένα ενδιαίτημα παράγοντας μεταβολίτες με αντιμικροβιακή δράση, θα έχουν εκ των πραγμάτων αποκτήσει σχετικά υψηλότερη ανθεκτικότητα έναντι των συγκεκριμένων αντιβιοτικών ουσιών.

Συγκριτικά με αντίστοιχη μελέτη σε διαφορετικού γένους βακτήρια από υδροθερμικές πηγές, οι τιμές MIC που παρουσίασαν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* για την Αμπικιλίνη (76.5 µg/mL έναντι 20 µg/mL) και την Κεφουροξίμη (125.2 έναντι 40 µg/mL) ήταν πολύ μεγαλύτερες. Αντίθετα, για την Χλωραμφενικόλη (5.8 µg/mL έναντι 20 µg/mL) και την Τετρακυκλίνη (0.7 µg/mL έναντι 12 µg/mL) οι τιμές ήταν μικρότερες, ενώ για την Ερυθρομυκίνη σχεδόν ίδιες (περίπου 15 µg/mL) (Farias *et al.*, 2015) (Πίνακας 3.2.). Ωστόσο, οι τιμές MIC που προσδιορίστηκαν στην παρούσα εργασία ήταν πολύ μικρότερες, σε σχέση με στελέχη από κλινικά περιβάλλοντα. Για παράδειγμα, σε στελέχη του γένους *Pseudomonas* από ασθενείς που νοσηλεύονταν, οι τιμές MIC για την Τετρακυκλίνη ήταν 200 µg/mL, για την Χλωραμφενικόλη ήταν 1000 µg/mL, ενώ για την Αμπικιλίνη ήταν 10000 µg/mL (Molina *et al.*, 2014).

Μία από τις ιδιαιτερότητες του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο είναι η συσσώρευση όξινου θαλασσινού νερού στον πυθμένα του. Οι Carey *et al.* (2013) έδειξαν ότι η απελευθέρωση CO<sub>2</sub> και η επακόλουθη διαλυτοποίηση του στο θαλασσινό νερό έχουν ως αποτέλεσμα τοπικές μειώσεις του pH στον πυθμένα. Το φαινόμενο αυτό επηρεάζει τη βιοκοινότητα, καθώς απουσιάζουν μακροπανιδικοί οργανισμοί που τυπικά αποικίζουν τις υδροθερμικές πηγές (Carey *et al.*, 2013; Kiliias *et al.*, 2013). Ωστόσο, η επίδραση της μείωσης του pH στους μικροοργανισμούς που κυριαρχούν στην περιοχή, παραμένει άγνωστη. Μια πρώτη προσπάθεια πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, όπου διερευνήθηκε η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στην υψηλή οξύτητα. Βρέθηκε ότι τα βακτήρια που απομονώθηκαν πάνω από την υδροθερμική πηγή παρουσίασαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε υψηλή οξύτητα, από τα στελέχη των επιφανειακών στρωμάτων. Η διαφορά στην



ανθεκτικότητα για το σύνολο των βακτηρίων προσέγγιζε τη 1 πεχαμετρική μονάδα, ενώ για τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* έφτανε τη 1.5 μονάδα της πεχαμετρικής κλίμακας. Το γεγονός αυτό φαίνεται να είναι σε συμφωνία με την παρουσία διαβάθμισης του pH κατά μήκος της στήλης του νερού και τη συσσώρευση όξινου θαλασσινού νερού στον πυθμένα του κρατήρα του Κολούμπο (Carey *et al.*, 2013) (Εικόνα 1.4). Το σύνολο των βακτηρίων, όσο και τα στελέχη *Pseudomonas* ξεχωριστά, που απομονώθηκαν από βάθη 430 έως 495 m, μπορούσαν να αναπτυχθούν σε pH 4.9 και 4.6, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι τιμές αυτές είναι σε συμφωνία με τις τιμές pH (~5.0) που έχουν καταγραφεί παλαιότερα στον πυθμένα του ηφαιστείου σε βάθος 500 m (Carey *et al.*, 2013). Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι το υποθαλάσσιο ηφαιστειο Κολούμπο που εκτίθεται μέσω φυσικών διεργασιών σε υψηλές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> και ακραίες τιμές pH, αποτελεί ένα ιδανικό φυσικό εργαστήριο για τη μελέτη του φαινομένου της οξίνισης των ωκεανών (Nomikou *et al.*, 2012; Brewer, 2013; Carey *et al.*, 2013).

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε υγρά απόβλητα ελαιολιβείου («κατσίγαρος») πραγματοποιήθηκε με αφορμή την χρήση μικροοργανισμών από ακραία περιβάλλοντα σε διάφορες τεχνολογίες βιοαποκατάστασης (Margesin and Schinner, 2001; Morozkina *et al.*, 2010). Το όξινο pH και το υψηλό φαινολικό φορτίο του κατσίγαρου, το καθιστούν ανθεκτικό στην αποικοδόμηση (McNamara *et al.*, 2008; Morillo *et al.*, 2009). Η πλειοψηφία των στελεχών που απομονώθηκαν από το υποθαλάσσιο ηφαιστειο Κολούμπο ανήκαν στο γένος *Pseudomonas*. Τα βακτήρια αυτά είναι γνωστά για την ικανότητα βιοαποικοδόμησης πολυφαινολικών ουσιών (Timmis, 2002). Ο De Felice *et al.* (1997) κατάφερε με τη χρήση βακτηρίων *Pseudomonas putida* να μειώσει το φαινολικό φορτίο του κατσίγαρου και, σε συνδυασμό με τη χρήση ενός ζυμομύκητα, να μειώσει το χημικό οργανικό φορτίο κατά 93%. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε προκαταρκτικός έλεγχος της ανθεκτικότητας των απομονωθέντων βακτηρίων υπό την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης κατσίγαρου. Βρέθηκε ότι το 17% των βακτηρίων από τα βαθιά νερά μπορούσε να επιβιώσει και να αναπτυχθεί υπό την παρουσία 25% ως 50% κατ' όγκο κατσίγαρου, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα επιφανειακά στελέχη ήταν μόλις 6%, αντίστοιχα. Γενικότερα, όλα τα βακτηριακά στελέχη κατάφεραν να αναπτυχθούν παρουσία 6.25% v/v κατσίγαρου (Εικόνα 3.7.). Η παρατήρηση ανάπτυξης των μικροοργανισμών παρουσία φαινολικών ενώσεων μπορεί να θεωρηθεί ως ένδειξη βιοαποικοδόμησης τους (Margesin *et al.*, 2004). Ωστόσο, απαιτούνται επιπλέον μελέτες για να διευκρινιστεί αν τα στελέχη από τα βαθύτερα στρώματα του Κολούμπο είναι ικανά να βιοαποικοδομούν φαινολικές ενώσεις ή αν απλά είναι ανθεκτικά σε αυτές.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του προφίλ της ανθεκτικότητας των υπό μελέτη βακτηρίων για τους διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες σε σχέση

με το βάθος (Εικόνα 3.10.). Τα αποτελέσματα της PCA ενίσχυσαν τους στατιστικούς ελέγχους και επιβεβαίωσαν ότι τα στελέχη από τα βαθύτερα στρώματα της στήλης του νερού είχαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και χαμηλές τιμές pH σε σχέση με τα στελέχη από τα επιφανειακά στρώματα. Αυτό φαίνεται από το διαχωρισμό των στελεχών από τα βαθιά και τα επιφανειακά στρώματα ως προς την πρώτη συνιστώσα F1 που καθορίζεται κυρίως από την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και στην υψηλή οξύτητα (Εικόνα 3.10.). Το πιο ανθεκτικό στέλεχος απομονώθηκε από τα βαθιά νερά, ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonadaceae* και παρουσίασε υψηλότερη ανθεκτικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη στα αντιβιοτικά (MIC50 Αμπικιλίνη: 245.6, Ερυθρομυκίνη: 24.4, Σιπροφλοξασίνη: 0.06, Κεφουροξίμη: 286.6, Τετρακυκλίνη: 1.5, Χλωραμφενικόλη: 6.5), σε 3 από τα 4 βαρέα μέταλλα (MIC50 As: 0.6, Sb: 0.68, Sr: 18.8, Hg: 0.01) και αναπτύχθηκε σε υψηλή οξύτητα (pH 4.2) και 12.5% κατ' όγκο συγκέντρωση κατσίγαρου (Πίνακας 3.8). Αξίζει να σημειωθεί ότι δύο στελέχη *Pseudomonas stutzeri* τα οποία απομονώθηκαν από τα επιφανειακά στρώματα της στήλης του νερού παρουσίασαν πολύ υψηλότερη ανθεκτικότητα στους αντιμικροβιακούς παράγοντες σε σχέση με τα υπόλοιπα επιφανειακά στελέχη και αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι σχημάτισαν βιοφίλμ κατά την επώαση τους (Εικόνα 3.4.). Το ένα από αυτά κατατάχθηκε στα 5 πιο ανθεκτικά στελέχη (Πίνακας 3.8.) από το σύνολο των υπό μελέτη βακτηρίων.

Ακόμα, η ανάλυση έδειξε την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στην ανθεκτικότητα όλων των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 3.5.). Αντίστοιχη μελέτη σε περιβαλλοντικά δείγματα από ρυπασμένες περιοχές αναφέρει στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις στην ανθεκτικότητα ορισμένων αντιβιοτικών (Ερυθρομυκίνη με Αμπικιλίνη, με Χλωραμφενικόλη και με Τετρακυκλίνη και Χλωραμφενικόλη με Τετρακυκλίνη). Η ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στην ανθεκτικότητα διαφορετικών αντιβιοτικών μπορεί να υποδεικνύει πιθανή σύνδεση μεταξύ των γονιδίων ανθεκτικότητας για αντιβιοτικά από διαφορετικές τάξεις (Moskot *et al.*, 2012).

Όσον αφορά στη διερεύνηση του φαινομένου της πολυανθεκτικότητας, η σύγκριση της κατανομής του προφίλ της ανθεκτικότητας σε βαρέα μέταλλα και της κατανομής του αντίστοιχου προφίλ σε αντιβιοτικά (Εικόνα 3.9.) έδειξε την απουσία συσχέτισης ανάμεσα στην ανθεκτικότητα αυτών των δύο αντιμικροβιακών παραγόντων. Τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τους Deredjian *et al.* (2011), οι οποίοι προτείνουν ότι οι δύο τύποι ανθεκτικότητας συνεπιλέγονται σπάνια ή καθόλου. Ωστόσο, πολλές μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη πολυανθεκτικότητας σε βαρέα μέταλλα και αντιβιοτικά τόσο σε περιβάλλοντα που δέχονται πιέσεις λόγω ρύπανσης (Alonso *et al.*, 2000; Pathak and Gopal, 2005; Stepanauskas *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2006), όσο και σε περιβάλλοντα ανεπηρέαστα από τον άνθρωπο (De Souza *et al.*, 2006; Dib *et al.*, 2008), όπως είναι οι υδροθερμικές πηγές

της βαθιάς θάλασσας (Farias *et al.*, 2015). Η απουσία παρατηρούμενης συσχέτισης της ανθεκτικότητας σε βαρέα μέταλλα και αντιβιοτικά μπορεί να οφείλεται στον μικρό αριθμό των υπό μελέτη στελεχών και στο γεγονός ότι η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν βασισμένη στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών (culture-dependent method). Για την επιβεβαίωση της συγκεκριμένης υπόθεσης, απαραίτητη είναι και η χρήση γενωμικών αναλύσεων και η στοχευμένη μελέτη γονιδίων που είναι γνωστά ότι προσδίδουν υψηλότερη ανθεκτικότητα στα βακτήρια ως προς συγκεκριμένους τύπους στρες.

Τέλος, ύστερα από εκτεταμένη βιβλιογραφική αναζήτηση, αξίζει να σημειωθεί ότι για πρώτη φορά αναφέρεται συσχέτιση ανάμεσα στην ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και στην ανθεκτικότητα σε υψηλή οξύτητα. Η ανάλυση έδειξε ότι όσο αυξάνεται η ανθεκτικότητα σε χαμηλές τιμές pH, τόσο αυξάνεται και η ανθεκτικότητα στα υπό μελέτη αντιβιοτικά, ή αντίστροφα. Μια πιθανή αιτιολόγηση είναι ότι οι μικροοργανισμοί που έχουν προσαρμοστεί να ζουν υπό τις εκάστοτε αντίξοες συνθήκες μπορεί να έχουν αναπτύξει παρόμοιους μηχανισμούς ανθεκτικότητας για διαφορετικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες. Για παράδειγμα, η ύπαρξη ιδιαίτερα αδιαπέραστης μεμβράνης στα βακτήρια μπορεί να παρεμποδίζει τόσο την είσοδο πρωτονίων στο κυτταρόπλασμα, όσο και την αποτελεσματική δράση των αντιβιοτικών. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης είναι προκαταρκτικά, επομένως για την επιβεβαίωση του ευρήματος απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

## **4.2. Σύνοψη και Προοπτικές μελέτης**

Τα υπάρχοντα δεδομένα σχετικά με την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών των υδροθερμικών πηγών σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες, είναι πολύ περιορισμένα σε παγκόσμιο επίπεδο. Η παρούσα μελέτη της επίδρασης των βαρέων μετάλλων, της υψηλής οξύτητας και των αντιβιοτικών στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών επεκτείνει τις γνώσεις μας σχετικά με τις προσαρμογές και τη φυσιολογική ανοχή που έχουν αποκτήσει οι μικροοργανισμοί έναντι των περίπλοκων επιβαρύνσεων και των ακραίων φυσικοχημικών συνθηκών που επικρατούν στο υδροθερμικό περιβάλλον του υποθαλάσσιου ηφαιστείου Κολούμπο.

Εκτός από τα κενά στη γνώση, ένα σημαντικό εμπόδιο αποτελεί η ασυνέπεια στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση των ιδιοτήτων των περιβαλλοντικών βακτηρίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα. Υπάρχει ανάγκη προτυποποίησης της μεθόδου προσδιορισμού της ανθεκτικότητας. Οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν διαφορετικά θρεπτικά μέσα, συγκεντρώσεις αντιμικροβιακών παραγόντων, περιόδους επώασης, καθιστώντας δύσκολη τη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Η απουσία κατευθυντήριας γραμμής για τις μελέτες της ανθεκτικότητας σε

περιβαλλοντικά βακτήρια δυσχεραίνει την εξαγωγή συμπερασμάτων για ένα περιβάλλον ή για τη σύγκριση διαφορετικών.

Τέλος, ως απαραίτητη συνέχεια της παρούσας εργασίας θα ήταν ο συνδυασμός μοριακών και μεταγενωμικών τεχνικών για τη διερεύνηση των γονιδίων που εκφράζονται σε όλη τη μικροβιακή κοινότητα. Πιο συγκεκριμένα, θα μπορούσε να διερευνηθεί η ύπαρξη ήδη γνωστών γονιδίων ανθεκτικότητας που σχετίζονται με τους υπό μελέτη αντιμικροβιακούς παράγοντες. Ο συνδυασμών μεθόδων καλλιέργειας και μοριακών μεθόδων θα συμβάλλει στο σχηματισμό μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας σχετικά με το προφίλ της ανθεκτικότητας.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Allen, D. a, Austin, B., and Colwell, R.R. (1977) Antibiotic resistance patterns of metal-tolerant bacteria isolated from an estuary. *Antimicrob. Agents Chemother.* **12**: 545–547.
2. Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., and Handelsman, J. (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 251–259.
3. Alonso, A., Sánchez, P., and Martínez, J. (2001) Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* **3**: 1–9.
4. Alonso, A., Sanchez, P., and Martinez, J.L. (2000) *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1778–1782.
5. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389–3402.
6. Andrews, J.M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **48 Suppl 1**: 5–16.
7. Baker-Austin, C. and Dopson, M. (2007) Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* **15**: 165–171.
8. Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., and McArthur, J. V. (2006) Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* **14**: 176–182.
9. Bartoloni, A., Pallecchi, L., Rodríguez, H., Fernandez, C., Mantella, A., Bartalesi, F., et al. (2009) Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *Int. J. Antimicrob. Agents* **33**: 125–129.
10. Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E.D., Johnston, M.D., et al. (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* **7**: 1–11.
11. Bourbouli, M., Katsifas, E.A., Papathanassiou, E., and Karagouni, A.D. (2015) The Kolumbo submarine volcano of Santorini island is a large pool of bacterial strains with antimicrobial activity. *Arch. Microbiol.* **197**: 539–552.
12. Brewer, P.G. (2013) A different ocean acidification hazard-the kolumbo submarine volcano example. *Geology* **41**: 1039–1040.
13. Brown, M.G. and Balkwill, D.L. (2009) Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microb. Ecol.* **57**: 484–493.
14. Bruins, M.R., Kapil, S., and Oehme, F.W. (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**: 198–207.
15. Cai, L., Liu, G., Rensing, C., and Wang, G. (2009) Genes involved in arsenic transformation and resistance associated with different levels of arsenic-contaminated soils. *BMC Microbiol.* **9**: 4.
16. Calomiris, J. (1984) Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1238–1242.
17. Canganella, F. and Wiegel, J. (2011) Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften* **98**: 253–279.
18. Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M.A., and Cristinzio, G. (1995) Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 393–398.
19. Carey, S., Croff Bell, K.L., Nomikou, P., Vougioukalakis, G., Roman, C.N., Cantner, K., et al. (2011) Exploration of the Kolumbo Volcanic Rift Zone. *Oceanography* **24**: 1–40.
20. Carey, S., Nomikou, P., Bell, K.C., Lilley, M., Lupton, J., Roman, C., et al. (2013) CO<sub>2</sub> degassing from hydrothermal vents at kolumbo submarine volcano, greece, and the accumulation of acidic crater water. *Geology* **41**: 1035–1038.
21. Chapman, J.S. (2003) Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **51**: 271–276.

22. Christakis, C.A., Polymenakou, P.N., Mandalakis, M., Nomikou, P., Kristoffersen, J.B., Lambridou, D., et al. (2016) Microbial community differentiation between active and inactive sulfide chimneys of the Kolumbo submarine volcano, Hellenic Volcanic Arc.(Submitted).
23. Christopoulou, M.E., Mertzimekis, T.J., Nomikou, P., Papanikolaou, D., Carey, S., and Mandalakis, M. (2016) Influence of hydrothermal venting on water column properties in the crater of the Kolumbo submarine volcano, Santorini volcanic field (Greece). *Geo-Marine Lett.* **36**: 15–24.
24. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Eighth Edition. *CLSI document M07-A8*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009
25. Dash, H.R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., and Das, S. (2013) Marine bacteria: Potential candidates for enhanced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 561–571.
26. Davies, J. and Davies, D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 417–433.
27. Deredjian, A., Colinon, C., Brothier, E., Favre-Bonté, S., Cournoyer, B., and Nazaret, S. (2011) Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Res. Microbiol.* **162**: 689–700.
28. Dhakar, K. and Pandey, A. (2016) Wide pH range tolerance in extremophiles: towards understanding an important phenomenon for future biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1–12.
29. Dib, J., Motok, J., Zenoff, V.F., Ordoñez, O., and Farías, M.E. (2008) Occurrence of resistance to antibiotics, UV-B, and arsenic in bacteria isolated from extreme environments in high-altitude (above 4400 m) Andean wetlands. *Curr. Microbiol.* **56**: 510–517.
30. Edgcomb, V.P., Molyneaux, S.J., Saito, M.A., Lloyd, K., Boer, S., Wirsén, C.O., et al. (2004) Sulfide Ameliorates Metal Toxicity for Deep-Sea Hydrothermal Vent Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2551–2555.
31. El-Sayed, M.H. (2016) Multiple Heavy Metal and Antibiotic Resistance of *Acinetobacter baumannii* Strain HAF – 13 Isolated from Industrial Effluents. *Am. J. Microbiol. Res.* **4**: 26–36.
32. Fabricius, K.E., Langdon, C., Uthicke, S., Humphrey, C., Noonan, S., De 'ath, G., et al. (2011) Losers and winners in coral reefs acclimatized to elevated carbon dioxide concentrations. *Nat. Clim. Chang.* **1**: 165–169.
33. Farias, P., Santo, C.E., Branco, R., Francisco, R., Santos, S., Hansen, L., et al. (2015) Natural hot spots for gain of multiple resistances: Arsenic and antibiotic resistances in heterotrophic, aerobic bacteria from marine hydrothermal vent fields. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 2534–2543.
34. De Felice, B., Pontecorvo, G., and Carfanga, M. (1997) Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnol.* **17**: 231–239.
35. Fisher, C., Takai, K., and Le Bris, N. (2007) Hydrothermal Vent Ecosystems. *Oceanography* **20**: 14–23.
36. Fouque, F. *Santorini and its Eruptions (translated and annotated by A.R. McBirney, 1998): Baltimore, Maryland.* John Hopkins. University Press, 13–21 (1879)Gadd, G.M. and Griffiths, a J. (1978) Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* **4**: 303–317.
37. Hall-Spencer, J.M., Rodolfo-Metalpa, R., Martin, S., Ransome, E., Fine, M., Turner, S.M., et al. (2008) Volcanic carbon dioxide vents show ecosystem effects of ocean acidification. *Nature* **454**: 96–99.
38. Hatosy, S.M. and Martiny, A.C. (2015) The ocean as a global reservoir of antibiotic resistance genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 7593–7599.



39. Hogg, J.C. and Lehane, M.J. (1999) Identification of bacterial species associated with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*) by using amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4227–4229.
40. Holden, J., Breier, J., Rogers, K., Schulte, M., and Toner, B. (2012) Biogeochemical Processes at Hydrothermal Vents: Microbes and Minerals, Bioenergetics, and Carbon Fluxes. *Oceanography* **25**: 196–208.
41. Holden, J.F. and Adams, M.W.W. (2003) Microbe-metal interactions in marine hydrothermal environments. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**: 160–165.
42. Houndt, T. and Ochman, H. (2000) Long-term shifts in patterns of antibiotic resistance in enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5406–5409.
43. Hughes, V.M. and Datta, N. (1983) Conjugative plasmids in bacteria of the “pre-antibiotic” era. *Nature* **302**: 725–726.
44. Jeanthon, C. (2000) Molecular ecology of hydrothermal vent microbial communities. *Antonie Van Leeuwenhoek* **77**: 117–133.
45. Karigar, C.S. and Rao, S.S. (2011) Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Res.* **2011**: 1–11.
46. Karl, D.M. (1995) Ecology of free-living, hydrothermal vent microbial communities. In, *The Microbiology of Deep-sea Hydrothermal Vents*. CRC Press Inc, Boca Raton, pp. 35–124.
47. Kiliyas, S.P., Nomikou, P., Papanikolaou, D., Polymenakou, P.N., Godelitsas, A., Argyraki, A., et al. (2013) New insights into hydrothermal vent processes in the unique shallow-submarine arc-volcano, Kolumbo (Santorini), Greece. *Sci. Rep.* **3**: 2421.
48. Krulwich, T.A., Sachs, G., and Padan, E. (2011) Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 330–343.
49. Kümmerer, K. (2009) Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* **75**: 417–434.
50. Lambert, R.J. and Pearson, J. (2000) Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 784–790.
51. Llanos, J., Capasso, C., Parisi, E., Prieur, D., and Jeanthon, C. (2000) Susceptibility to heavy metals and cadmium accumulation in aerobic and anaerobic thermophilic microorganisms isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Curr. Microbiol.* **41**: 201–205.
52. Loh, K.C. and Cao, B. (2008) Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida*-A review of proteomics studies. *Enzyme Microb. Technol.* **43**: 1–12.
53. Luther, G.W., Rozan, T.F., Taillefert, M., Nuzzio, D.B., Di Meo, C., Shank, T.M., et al. (2001) Chemical speciation drives hydrothermal vent ecology. *Nature* **410**: 813–816.
54. Margesin, R., Bergauer, P., and Gander, S. (2004) Degradation of phenol and toxicity of phenolic compounds: A comparison of cold-tolerant *Arthrobacter* sp. and mesophilic *Pseudomonas putida*. *Extremophiles* **8**: 201–207.
55. Margesin, R. and Schinner, F. (2001) Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 650–663.
56. McKenzie, D. (1972) Active tectonics of the Mediterranean region. *Geophys. J. R. Astron. Soc.* **30**: 109–185.
57. McNamara, C.J., Anastasiou, C.C., O’Flaherty, V., and Mitchell, R. (2008) Bioremediation of olive mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **61**: 127–134.
58. Mercadé, M.E., Manresa, M.A., Robert, M., Espuny, M.J., de Andrés, C., and Guinea, J. (1993) Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. *Bioresour. Technol.* **43**: 1–6.
59. Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernandez, M., Molina-Santiago, C., Roca, A., et al. (2014) Antibiotic resistance determinants in a *Pseudomonas putida* strain isolated from a hospital. *PLoS One* **9**.

60. Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A., and Russell, N.J. (2009) Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**: 25–39.
61. Morozkina, E. V, Slutskaia, E.S., Fedorova, T. V, Tugaï, T.I., Golubeva, L.I., and Koroleva, O. V (2010) Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **46**: 5–20.
62. Moskot, M., Kotlarska, E., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Gabig-Cimińska, M., Fari, K., Wegrzyn, G., and Wróbel, B. (2012) Metal and antibiotic resistance of bacteria isolated from the Baltic sea. *Int. Microbiol.* **15**: 131–139.
63. Neu, H. (1992) Crisis in Antibiotic Resistance. *Science (80- )*. **257**: 1064–1073.
64. Nomikou, P. (2004) Santorini and Nisyros: similarities and differences between the two calderas of the modern Aegean Volcanic Arc. *Hum. Rec. Recent Geol. Evol. Mediterr. basin Hist. Archaeol. evidence, Santorini, 22-25 Oct. 2003* 103–108.
65. Nomikou, P., Carey, S., Croff Bell, K.L., Papanikolaou, D., Bejelou, K., Alexandri, M., et al. (2013) Morphological analysis and related volcanic features of the Kolumbo submarine volcanic chain (NE of Santorini Island, Aegean Volcanic Arc). *Zeitschrift für Geomorphol. Suppl. Issues* **57**: 29–47.
66. Nomikou, P., Carey, S., Papanikolaou, D., Croff Bell, K., Sakellariou, D., Alexandri, M., and Bejelou, K. (2012) Submarine volcanoes of the Kolumbo volcanic zone NE of Santorini Caldera, Greece. *Glob. Planet. Change* **90–91**: 135–151.
67. Nomikou, P., Papanikolaou, D., Alexandri, M., Sakellariou, D., and Rousakis, G. (2013) Submarine volcanoes along the aegean volcanic arc. *Tectonophysics* **597–598**: 123–146.
68. Oulas, A., Pavludi, C., Polymenakou, P., Papanikolaou, N., Kotoulas, G., Arvanitidis, C., and Iliopoulos, I. (2015) Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. *Bioinform. Biol. Insights* **9**: 75.
69. Oulas, A., Polymenakou, P.N., Seshadri, R., Tripp, H.J., Mandalakis, M., Paez-Espino, A.D., et al. (2015) Metagenomic investigation of the geologically unique Hellenic Volcanic Arc reveals a distinctive ecosystem with unexpected physiology. *Environ. Microbiol.* n/a-n/a.
70. Ozer, G., Ergene, A., and Içgen, B. (2013) Biochemical and Molecular Characterization of Strontium-resistant Environmental Isolates of *Pseudomonas fluorescens* and *Sphingomonas paucimobilis*. *Geomicrobiol. J.* **30**: 381–390.
71. Pandey, A., Chaudhry, S., Sharma, A., Choudhary, V.S., Malviya, M.K., Chamoli, S., et al. (2011) Recovery of *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. from the “fired plots” under shifting cultivation in Northeast India. *Curr. Microbiol.* **62**: 273–280.
72. Pathak, S.P. and Gopal, K. (2005) Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. *Environ. Res.* **98**: 100–103.
73. Le Pichon, X. and Angelier, J. (1979) The hellenic arc and trench system: A key to the neotectonic evolution of the eastern mediterranean area. *Tectonophysics* **60**: 1–42.
74. Prieur, D. (1997) Microbiology of deep-sea hydrothermal vents. *Trends Biotechnol.* **15**: 242–244.
75. Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., and Fava, F. (2015) Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**: 7907–7913.
76. Ramos-Cormenzana, A., Juárez-Jiménez, B., and Garcia-Pareja, M.P. (1996) Antimicrobial activity of olive mill wastewaters (alpechin) and biotransformed olive oil mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **38**: 283–290.

77. Raulf, F.F., Fabricius, K., Uthicke, S., de Beer, D., Abed, R.M.M., and Ramette, A. (2015) Changes in microbial communities in coastal sediments along natural CO<sub>2</sub> gradients at a volcanic vent in Papua New Guinea. *Environ. Microbiol.* **17**: 3678–3691.
78. Ribera, R.G., Monteoliva-Sanchez, M., and Ramos-Cormenzana, A. (2001) Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas putida* KT2442 harboring pSK2665 in wastewater from olive oil mills (alpechin). *Electron. J. Biotechnol.* **4**: 116–119.
79. Rizzo, A.L., Caracausi, A., Chavagnac, V., Nomikou, P., Polymenakou, P.N., Mandalakis, M., et al. (2016) Kolumbo submarine volcano (Greece): An active window into the Aegean subduction system. *Sci. Rep.* **6**: 28013.
80. Rothschild, L.J. and Mancinelli, R.L. (2001) Life in extreme environments. *Nature* **409**: 1092–1101.
81. Sakellariou, D., Sigurdsson, H., Alexandri, M., Carey, S., Rousakis, G., Nomikou, P., et al. (2010) Active tectonics in the hellenic volcanic arc: the Kolumbo submarine volcanic zone. *Bull. Geol. Soc. Greece* **43**: 1056–1063.
82. Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, a R., Fiddes, C. a, et al. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**: 687–695.
83. Seiler, C. and Berendonk, T.U. (2012) Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* **3**: 1–10.
84. Sigurdsson, H., Carey, S., Alexandri, G., Vougioukalakis, G.E., Croff-bell, K., Roman, C., et al. (2006) Marine Investigations of Greece's Santorini Volcanic Field. *EOS, Trans. Am. Geophys. Union* **87**: 337–348.
85. Smith, D.H. (1967) R factor infection of *Escherichia coli* lyophilized in 1946. *J. Bacteriol.* **94**: 2071–2072.
86. De Souza, M.J., Nair, S., Loka Bharathi, P.A., and Chandramohan, D. (2006) Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. *Ecotoxicology* **15**: 379–384.
87. Stepanauskas, R., Glenn, T.C., Jagoe, C.H., Tuckfield, R.C., Lindell, A.H., King, C.J., and McArthur, J. V. (2006) Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environ. Microbiol.* **8**: 1510–1514.
88. Stepanauskas, R., Glenn, T.C., Tuckfield, R.C., Lindell, A.H., and McArthur, J.V. (2005) Elevated Microbial Tolerance to Metals and Antibiotics in Metal-Contaminated Industrial Environments. *Environ. Sci. Technol.* **39**: 3671–3678.
89. Summers, A.O. (2002) Generally Overlooked Fundamentals of Bacterial Genetics and Ecology. *Clin. Infect. Dis.* **34**: S85–S92.
90. Synnes, M. (2007) Bioprospecting of organisms from the deep sea: Scientific and environmental aspects. *Clean Technol. Environ. Policy* **9**: 53–59.
91. Takai, K., Nakagawa, S., Reysenbach, A.-L., and Hoek, J. (2006) Microbial ecology of mid-ocean ridges and back-arc basins. In, *GEOPHYSICAL MONOGRAPH SERIES*. American Geophysical Union, pp. 185–213.
92. Thakur, D., Baishya, M., Sarma, B., Bora, T.C., and Saikia, R. (2008) Antimicrobial Resistance in Gram Positive and Gram Negative Bacteria: Progress and Challenges. *Microb. Biotechnol.*
93. Timmis, K.N. (2002) *Pseudomonas putida*: A cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ. Microbiol.* **4**: 779–781.
94. Vetriani, C., Chew, Y.S., Miller, S.M., Coombs, J., Lutz, R. a, and Barkay, T. (2005) Mercury Adaptation among Bacteria from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 220–226.

95. Von Damm, K.L. (1995) Controls on the chemistry and temporal variability of seafloor hydrothermal fluids. In, Humphris, S.E., Zierenberg, R.A., Mullineaux, L.S., and Thomson, R.E. (eds), *Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, Chemical, Biological, and Geological Interactions*. American Geophysical Union, Washington, D.C., pp. 245–268.
96. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletie, D. a, Lane, D.J., Pelletier, D. a., and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697–703.
97. Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R.E.W. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **3**: 163–175.
98. Wright, G.D. (2010) Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 589–594.
99. Wright, M.S., Peltier, G.L., Stepanauskas, R., and McArthur, J.V. (2006) Bacterial tolerances to metals and antibiotics in metal-contaminated and reference streams. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58**: 293–302.
100. Xu, Y., Miao, L., Li, X.-C., Xiao, X., and Qian, P.-Y. (2007) Antibacterial and antilarval activity of deep-sea bacteria from sediments of the West Pacific Ocean. *Biofouling* **23**: 131–7.
101. Yanagawa, K., Morono, Y., De Beer, D., Haeckel, M., Sunamura, M., Futagami, T., et al. (2012) Metabolically active microbial communities in marine sediment under high-CO<sub>2</sub> and low-pH extremes. *ISME J.* **7**: 555–567.