



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

## Διπλωματική Εργασία

*Αξιολόγηση επικινδυνότητας για τη δημόσια υγεία από την παρουσία των  
ESKAPE παθογόνων σε περιβαλλοντικά δείγματα*



**ANNA ΓΕΩΡΓΙΟΥ**

AM: 2018050053

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δανάη Βενιέρη (Επιβλέπουσα)

Νικόλαος Ξεκουκουλωτάκης

Νικόλαος Καλογεράκης

XANIA

## Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας αποτελεί για μένα ένα σημαντικό ορόσημο, το οποίο δεν θα είχε επιτευχθεί χωρίς την πολύτιμη συμβολή κάποιων ξεχωριστών ανθρώπων, τους οποίους οφείλω να ευχαριστήσω θερμά.

Θα ήθελα πρώτα απ' όλα να εκφράσω την ειλικρινή μου εκτίμηση στην επιβλέπουσα καθηγήτρια, κα Δανάη Βενιέρη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το παρόν θέμα. Η καθοδήγησή της, η διαρκής υποστήριξη και οι στοχευμένες παρατηρήσεις της καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας ήταν καθοριστικές για την εξέλιξη αυτής της εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω στην κα Ιωσηφίνα Γουνάκη, μέλος Ε.ΔΙ.Π., για την καθοριστική συμβολή της στο πειραματικό μέρος της εργασίας. Με καθοδήγησε με συνέπεια και υπομονή σε κάθε στάδιο των πειραμάτων, φροντίζοντας να κατανοώ σε βάθος κάθε βήμα και διαδικασία. Η συνεργασία μας υπήρξε για μένα πολύτιμη εμπειρία και της είμαι βαθιά ευγνώμων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου, με τους οποίους συνεργαστήκαμε στο ίδιο εργαστήριο, και οι οποίοι με την παρουσία και τη συνεργασία τους έκαναν την εμπειρία πιο ευχάριστη και δημιουργική.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για τη σταθερή στήριξη, την υπομονή και την αγάπη της σε όλα τα στάδια των σπουδών μου. Η ηθική τους υποστήριξη και η αστείρευτη εμπιστοσύνη που μου έδειχναν ακόμη και στις πιο απαιτητικές στιγμές ήταν η δύναμή μου για να φτάσω έως εδώ.

## Περίληψη

Η αυξανόμενη ανθεκτικότητα των παθογόνων μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά αποτελεί μία από τις σοβαρότερες απειλές για τη δημόσια υγεία στον 21ο αιώνα. Στο πλαίσιο αυτό, η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στην αξιολόγηση της επικινδυνότητας που προκύπτει από την παρουσία των ESKAPE παθογόνων σε περιβαλλοντικά δείγματα, με ιδιαίτερη έμφαση στους μικροοργανισμούς *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* και *Enterobacter sp.* Οι παθογόνοι αυτοί μικροοργανισμοί είναι γνωστοί για την ικανότητά τους να διαφεύγουν της δράσης πολλαπλών αντιμικροβιακών παραγόντων, προκαλώντας ενδονοσοκομειακές και κοινοτικές λοιμώξεις υψηλής νοσηρότητας και θνησιμότητας.

Η μελέτη σχεδιάστηκε ώστε να ερευνήσει τόσο την παρουσία των παθογόνων σε περιβαλλοντικά δείγματα, όσο και το προφίλ αντιμικροβιακής αντοχής τους. Πραγματοποιήθηκε εκτεταμένη δειγματοληψία από διαφορετικά υδάτινα οικοσυστήματα στην περιοχή των Χανίων, όπως παράκτιες ζώνες (Κουμ Καπί, Κουλούρα), επιφανειακό νερό (Λίμνη Αγιάς) και εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (ΔΕΥΑΧ και ΔΕΥΑΒΑ), κατά το διάστημα Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, με στόχο την αποφυγή επιμολύνσεων και την εξασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.

Η ανάλυση των δειγμάτων περιλάμβανε τη χρήση μεθόδων απομόνωσης βακτηριακών στελεχών μέσω διήθησης, καθώς και ελέγχους ευαισθησίας σε αντιβιοτικά (μέθοδος MIC - Minimum Inhibitory Concentration). Οι αντοχές που καταγράφηκαν σε βασικές κατηγορίες αντιβιοτικών όπως οι β-λακτάμες, οι φθοριοκινολόνες και η βανκομυκίνη ήταν ιδιαίτερα ανησυχητικές. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στον *S. aureus* ανθεκτικό στη μεθικιλίνη (MRSA) και στη *K. pneumoniae* ανθεκτική στις καρβαπενέμες, καθώς πρόκειται για βακτήρια που αποτελούν κορυφαίες προτεραιότητες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας.

Παράλληλα, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης μέσω ακτινοβολίας UVC, ως εναλλακτικής ή συμπληρωματικής μεθόδου επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, αν και η UVC ακτινοβολία συνέβαλε σημαντικά στη μείωση του μικροβιακού φορτίου, δεν επέφερε πλήρη αδρανοποίηση των παθογόνων, κυρίως όταν πρόκειται για στελέχη με υψηλά επίπεδα αντοχής. Η αποδοτικότητα της μεθόδου εξαρτήθηκε από παράγοντες όπως η συγκέντρωση βακτηρίων, η διαύγεια του δείγματος και η διάρκεια της έκθεσης.

Συνολικά, η έρευνα κατέδειξε ότι οι υδάτινοι πόροι μπορούν να λειτουργούν ως δεξαμενές πολυανθεκτικών μικροοργανισμών, ενισχύοντας τη μετάδοση γονιδίων αντοχής στο περιβάλλον και κατά συνέπεια στον άνθρωπο. Η παρουσία των παθογόνων ESKAPE σε περιβαλλοντικά δείγματα που σχετίζονται με καθημερινές ανθρώπινες

δραστηριότητες, όπως η κολύμβηση, η κατανάλωση νερού ή η επαναχρησιμοποίηση λυμάτων, καθιστά αναγκαία την εφαρμογή αυστηρών μέτρων ελέγχου και απολύμανσης.

Η αποτελεσματική διαχείριση της αντιμικροβιακής αντοχής προϋποθέτει συνεργασία μεταξύ ερευνητών, πολιτείας, τοπικών αρχών και του ευρύτερου υγειονομικού συστήματος, προκειμένου να εφαρμοστούν πολιτικές που θα μειώνουν τους κινδύνους και θα προλαμβάνουν τη διασπορά των ανθεκτικών παθογόνων.

Εν κατακλείδι, η συμβολή της παρούσας μελέτης έγκειται όχι μόνο στην καταγραφή της μικροβιακής επιβάρυνσης σε τοπικό επίπεδο, αλλά και στην ανάδειξη της σημασίας τεχνολογιών απολύμανσης και στρατηγικών πρόληψης. Η κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας και των περιβαλλοντικών διαδρομών μετάδοσης ανοίγει τον δρόμο για μελλοντική έρευνα και ανάπτυξη καινοτόμων λύσεων, με σκοπό την προστασία της δημόσιας υγείας σε εθνικό και διεθνές επίπεδο.

## Abstract

The growing threat of antimicrobial resistance represents a critical challenge for global public health. This study focuses on the risk assessment posed by the presence of ESKAPE pathogens in environmental samples, with a particular emphasis on *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterobacter sp.* These opportunistic pathogens are known for their capacity to resist multiple classes of antibiotics and are responsible for a significant portion of healthcare-associated infections (HAIs). Their increasing detection in environmental matrices raises serious concerns about their potential dissemination from environmental reservoirs to human populations.

Environmental water samples were collected from coastal, freshwater, and wastewater treatment sites in the region of Chania, Crete, between November 2023 and April 2024. Isolation of bacterial strains was achieved using filtration methods, while antimicrobial susceptibility was assessed through Minimum Inhibitory Concentration (MIC) testing against a panel of commonly used antibiotics. Additionally, the efficacy of UVC irradiation was evaluated as a disinfection method to reduce microbial load and potentially deactivate resistant strains.

Results revealed widespread occurrence of the targeted pathogens across all sampling points, with several isolates demonstrating high resistance levels to critical antibiotics such as methicillin, vancomycin, and ciprofloxacin. Notably, both methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) and carbapenem-resistant *K. pneumoniae* were detected, underlining the environmental presence of clinically significant multidrug-resistant organisms. Although UVC treatment significantly reduced bacterial counts, complete inactivation was not always achieved, especially in samples with higher turbidity or microbial loads.

The findings confirm the role of aquatic environments as reservoirs and potential transmission routes for antimicrobial resistance. They also highlight the limitations of current wastewater treatment technologies in eliminating resistant bacteria and support the need for integrated monitoring strategies and advanced disinfection approaches.

This study contributes valuable insights into the environmental dimension of antimicrobial resistance and supports the development of targeted public health strategies. The integration of innovative technologies such as UVC irradiation and routine environmental surveillance may help mitigate the dissemination of resistant pathogens, thereby enhancing overall public health preparedness and resilience.

**Keywords:** ESKAPE pathogens, antimicrobial resistance, disinfection, public health.

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	ii
Περίληψη.....	iii
Abstract.....	v
Περιεχόμενα.....	vi
Κατάλογος Εικόνων.....	viii
Κατάλογος Διαγραμμάτων.....	ix
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xi
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Σημασία των παθογόνων μικροοργανισμών ESKAPE για τη δημόσια υγεία.....	1
1.1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	2
1.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
1.1.3 <i>Enterobacter</i> sp. ....	3
1.2 Εμφάνιση παθογόνων ESKAPE σε υδάτινο περιβάλλον.....	4
1.3 Αντιμικροβιακή αντοχή και παθογόνα ESKAPE.....	7
1.4 Μικροβιακή αντοχή.....	8
1.5 Απολύμανση και αδρανοποίηση.....	8
2. Σκοπός.....	11
3. Πειραματικό μέρος.....	13
3.1 Περιοχές και συνθήκες δειγματοληψίας.....	13
3.2 Χρονικό διάστημα συλλογής δειγμάτων.....	13
3.3 Υλικά.....	14
3.4 Μέθοδοι.....	15
3.4.1 Μέθοδος Απομόνωσης Στελεχών με Διήθηση.....	15
3.4.2 Έλεγχος Ανθεκτικότητας σε Αντιβιοτικά.....	16
3.4.2.1 Προετοιμασία.....	17
3.4.2.2 Παρασκευή πλάκας μικροτιτλοποίησης.....	18
3.4.3 Απολύμανση με ακτινοβολία UVC.....	19
3.4.3.1 Προετοιμασία.....	20
3.4.3.2 Πειραματική Διαδικασία.....	20
4. Αποτελέσματα.....	21
4.1 Ανίχνευση των ESKAPE σε περιβαλλοντικά δείγματα.....	21
4.1.1 <i>K. pneumoniae</i> – Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.....	21
4.1.2 <i>K. pneumoniae</i> – Φυσικά νερά.....	24
4.1.3 <i>S. aureus</i> – Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.....	27
4.1.4 <i>S. aureus</i> – Φυσικά νερά.....	29
4.1.5 <i>Enterobacter</i> sp. – Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.....	32
4.1.6 <i>Enterobacter</i> sp. – Φυσικά νερά.....	35
4.2 Συνολική παρουσία των βακτηρίων στους σταθμούς δειγματοληψίας.....	39
4.3 Ανθεκτικότητα των ESKAPE στα αντιβιοτικά.....	45
4.3.1 <i>K. pneumoniae</i> – Ciprofloxacin (MIC).....	47
4.3.2 <i>K. pneumoniae</i> – Imipenem (MIC).....	49

4.3.3	MIC Methicillin – <i>S. aureus</i> .....	50
4.3.4	<i>S. aureus</i> – Vancomycin (MIC) .....	53
4.4	Απολύμανση UVC .....	56
4.4.1	Απολύμανση UVC – <i>K. pneumoniae</i> .....	57
4.4.2	Απολύμανση UVC – <i>S. aureus</i> .....	59
4.4.3	Υπολογισμός κινητικής σταθεράς .....	61
5	Συμπεράσματα .....	64
6	Μελλοντικές Προτάσεις .....	66
	Βιβλιογραφία .....	68

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Χρώση κατά Gram του βακτηρίου <i>Klebsiella pneumoniae</i> , σε δύο διαφορετικούς βαθμούς μεγέθυνσης (Α και Β). Τα μήκη των γραμμών κλίμακας αντιστοιχούν σε 5 μm και στις δύο εικόνες ( <a href="http://www.vetbact.org">www.vetbact.org</a> ).....	4
Εικόνα 2. Χρώση κατά Gram δείγματος <i>Staphylococcus aureus</i> . Οι Gram-θετικοί κόκκοι εμφανίζονται με ιώδες χρώμα και χαρακτηριστική διάταξη σε συστάδες, παρόμοια με τσαμπί σταφυλίου (The Bio Major, 2019).....	6
Εικόνα 3. Μικροσκοπική εικόνα Gram-αρνητικού βακίλου του είδους <i>Enterobacter cloacae</i> , ενδεικτική της μορφολογίας βακτηρίων του γένους <i>Enterobacter</i> ( <a href="https://microbe-canvas.com/">https://microbe-canvas.com/</a> ).....	7
Εικόνα 4. Μηχανισμός αδρανοποίησης μικροοργανισμών μέσω UV-C ακτινοβολίας. Η απορρόφηση UV φωτονίων από το DNA προκαλεί μοριακές αλλοιώσεις, όπως διμερή θυμίνης, οδηγώντας σε παύση της κυτταρικής λειτουργίας ( <a href="https://www.filterwater.com/">https://www.filterwater.com/</a> ) .....	9
Εικόνα 5. Περιοχές δειγματοληψίας της μελέτης. (Αριστερά, από πάνω προς τα κάτω): Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ), Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων Πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ), Λίμνη Αγιάς. (Δεξιά, από πάνω προς τα κάτω): Παραλία Κουλούρας (Χαλέπα), Παραλία Κουμ Καπί (Κέντρο Χανίων) (Προσωπικό αρχείο).....	13
Εικόνα 6. Τρυβλία διήθησης επωάζονται στον θάλαμο επώασης στους 37°C για 24 h.....	16
Εικόνα 7. Τρυβλία με αποικίες βακτηρίων από περιβαλλοντικά δείγματα. Οι διαφορετικές αποχρώσεις αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα βακτηριακά είδη: <i>K. pneumoniae</i> (μωβ αποικίες), <i>S. aureus</i> (κίτρινες αποικίες) και <i>Enterobacter sp.</i> (μπλε-πράσινες αποικίες) (Προσωπικό αρχείο) .	16
Εικόνα 8. Πλάκα τιτλοποίησης 96 βυθισμάτων ( <a href="https://bio.tools">https://bio.tools</a> ) .....	18
Εικόνα 9. Biochrom EZ Read 400 Microplate Reader ( <a href="https://www.fishersci.co.uk/">https://www.fishersci.co.uk/</a> ) .....	19



## Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Ανίχνευση <i>K. pneumoniae</i> σε δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024 .....	21
Διάγραμμα 2. Ανίχνευση <i>K. pneumoniae</i> σε δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ) κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 - Απρίλιος 2024 .....	23
Διάγραμμα 3. Ανίχνευση <i>K. pneumoniae</i> σε δείγματα θαλασσινού νερού από το Κουμ Καπί κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024 .....	24
Διάγραμμα 4. Ανίχνευση <i>K. pneumoniae</i> σε δείγματα επιφανειακού νερού από τη Λίμνη Αγιάς κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024 .....	26
Διάγραμμα 5. Ανίχνευση <i>S. aureus</i> σε δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024 .....	27
Διάγραμμα 6. Ανίχνευση <i>S. aureus</i> σε δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ) κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 - Απρίλιος 2024 .....	28
Διάγραμμα 7. Ανίχνευση <i>S. aureus</i> σε δείγματα θαλασσινού νερού από το Κουμ Καπί κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024 .....	29
Διάγραμμα 8. Ανίχνευση <i>S. aureus</i> σε δείγματα θαλασσινού νερού από την Κουλούρα κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024 .....	30
Διάγραμμα 9. Ανίχνευση <i>S. aureus</i> σε δείγματα επιφανειακού νερού από τη Λίμνη Αγιάς κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024 .....	31
Διάγραμμα 10. Ανίχνευση <i>Enterobacter sp.</i> σε δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024 .....	32
Διάγραμμα 11. Ανίχνευση <i>Enterobacter sp.</i> σε δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ) κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 - Απρίλιος 2024 .....	34
Διάγραμμα 12. Ανίχνευση <i>Enterobacter sp.</i> σε δείγματα θαλασσινού νερού από το Κουμ Καπί κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024 .....	35
Διάγραμμα 13. Ανίχνευση <i>Enterobacter sp.</i> σε δείγματα θαλασσινού νερού από την Κουλούρα κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024 .....	36
Διάγραμμα 14. Ανίχνευση <i>Enterobacter sp.</i> σε δείγματα επιφανειακού νερού από τη Λίμνη Αγιάς κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024 .....	37
Διάγραμμα 15. Παρουσία της <i>K. pneumoniae</i> στα δείγματα από τη ΔΕΥΑΧ .....	39
Διάγραμμα 16. Παρουσία της <i>K. pneumoniae</i> στα δείγματα από τη ΔΕΥΑΒΑ .....	40
Διάγραμμα 17. Παρουσία της <i>K. pneumoniae</i> στα φυσικά ύδατα .....	40
Διάγραμμα 18. Παρουσία του <i>S. aureus</i> στα δείγματα από τη ΔΕΥΑΧ .....	41
Διάγραμμα 19. Παρουσία του <i>S. aureus</i> στα δείγματα από τη ΔΕΥΑΒΑ .....	42
Διάγραμμα 20. Παρουσία του <i>S. aureus</i> στα φυσικά ύδατα .....	42
Διάγραμμα 21. Παρουσία του <i>Enterobacter sp.</i> στα δείγματα από τη ΔΕΥΑΧ .....	43
Διάγραμμα 22. Παρουσία του <i>Enterobacter sp.</i> στα δείγματα από τη ΔΕΥΑΒΑ .....	44
Διάγραμμα 23. Παρουσία του <i>Enterobacter sp.</i> στα φυσικά ύδατα .....	44
Διάγραμμα 24. Ελάχιστη αναστασταλτική συγκεντρωση της Ciprofloxacin για την <i>K. pneumoniae</i> που απομονωθηκε από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) και του Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ) .....	47

Διάγραμμα 25. Ελαχιστη αναστασταλτική συγκεντρωση της Ciprofloxacin για την <i>K. pneumoniae</i> που απομονωθηκε από τα φυσικά ύδατα (Κουμ Καπί - Λίμνη Αγιάς) .....	48
Διάγραμμα 26. Ελαχιστη αναστασταλτική συγκεντρωση του Imipenem για την <i>K. pneumoniae</i> που απομονωθηκε από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) και του Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ).....	49
Διάγραμμα 27. Ελαχιστη αναστασταλτική συγκεντρωση του Imipenem για την <i>K. pneumoniae</i> που απομονωθηκε από τα φυσικά ύδατα (Κουμ Καπί - Λίμνη Αγιάς).....	50
Διάγραμμα 28. Ελαχιστη αναστασταλτική συγκεντρωση του Methicillin για τον <i>S. aureus</i> που απομονωθηκε από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) και του Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ).....	51
Διάγραμμα 29. Ελαχιστη αναστασταλτική συγκεντρωση του Methicillin για τον <i>S. aureus</i> που απομονωθηκε από τα φυσικά ύδατα (Κουμ Καπί - Λίμνη Αγιάς - Κουλούρα) .....	52
Διάγραμμα 30. Ελαχιστη αναστασταλτική συγκεντρωση του Vancomycin για τον <i>S. aureus</i> που απομονωθηκε από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) και του Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ).....	53
Διάγραμμα 31. Ελαχιστη αναστασταλτική συγκεντρωση του Vancomycin για τον <i>S. aureus</i> που απομονωθηκε από τα φυσικά ύδατα (Κουμ Καπί - Λίμνη Αγιάς - Κουλούρα) .....	54
Διάγραμμα 32. Αδρανοποίηση στελεχών <i>K. pneumoniae</i> απομονωμένων από δείγματα λυμάτων (ΔΕΥΑΧ/ ΔΕΥΑΒΑ) με UVC .....	57
Διάγραμμα 33. Αδρανοποίηση στελεχών <i>K. pneumoniae</i> απομονωμένων από επιφανειακό νερό (λίμνη Αγιάς) με UVC.....	58
Διάγραμμα 34. Αδρανοποίηση στελεχών <i>S. aureus</i> που απομονώθηκαν από δείγματα λυμάτων (ΔΕΥΑΧ/ ΔΕΥΑΒΑ) με UVC .....	59
Διάγραμμα 35. Αδρανοποίηση στελεχών <i>S. aureus</i> από απομονώθηκαν από τα φυσικά ύδατα (Κουμ Καπί, Κουλούρα, Λίμνη Αγιάς) με UVC .....	60

## Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

Ανθεκτικός στη Μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* – Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, **MRSA**

Ανθεκτικός στη Βανκομυκίνη *Staphylococcus aureus* – Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*, **VRSA**

Ενδιάμεσης Ευαισθησίας στη Βανκομυκίνη *Staphylococcus aureus* – Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*, **VISA**

Αντιμικροβιακά Πεπτίδια – Antimicrobial Peptides, **AMPs**

Αντιμικροβιακή Φωτοδυναμική Αδρανοποίηση – Antimicrobial Photodynamic Inactivation, **aPDI**

Αντοχή στις Κινολόνες μέσω Πλασμιδίων – Plasmid-Mediated Quinolone Resistance, **PMQR**

Β-Λακταμάσες Εκτεταμένου Φάσματος – Broad-Spectrum Beta-Lactamases, **SBLS** Δραστικές Γονίδια Αντιμικροβιακής Αντοχής – Antimicrobial Resistance Genes, **ARGs**

Ρίζες Οξυγόνου - Reactive Oxygen Species, **ROS**

Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση – Minimum Inhibitory Concentration, **MIC**

Ευαίσθητος στη Μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* – Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*, **MSSA**

Μεταλλο-β-λακταμάσες τύπου Νέου Δελχί – New Delhi metallo-β-lactamase, **NDM**

Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών – Colony Forming Units, **CFUs**

Νοσοκομειακές Λοιμώξεις– Healthcare-Associated Infections, **HAI**

Ομάδα Ανθεκτικών Παθογόνων – ESKAPE Pathogens, **ESKAPE**

Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας – World Health Organization, **ΠΟΥ**

Παγκόσμια λίστα Παθογόνων Προτεραιότητας – Priority Pathogens List, **PPL**

Πολυανθεκτικά Βακτήρια – Multidrug-Resistant, **MDR**

Φωτοευαισθητοποιητής – Photosensitizer, **PS**

Clinical and Laboratory Standards Institute, **CLSI**

Coagulase-Negative Staphylococci, **CNS**

Coagulase – positive staphylococci, **CPS**

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, **EUCAST**

*Klebsiella pneumoniae*, **K. pneumoniae**

*Klebsiella pneumoniae* καρβαπενεμάσες – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases, **KPC**

Penicillin-Binding Protein 2a, **PBP2a**

Penicillin-Binding Proteins, **PBPs**

*Staphylococcus aureus*, **S. aureus**

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Σημασία των παθογόνων μικροοργανισμών ESKAPE για τη δημόσια υγεία

Το ακρωνύμιο ESKAPE αναφέρεται σε μια ομάδα βακτηρίων που περιλαμβάνει τόσο θετικούς όσο και αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς, με εξαιρετική κλινική σημασία. Αυτά τα παθογόνα είναι γνωστά για την ικανότητά τους, να διαφεύγουν της δράσης των περισσότερων αντιμικροβιακών παραγόντων, καθιστώντας τις λοιμώξεις που προκαλούν δύσκολες στη θεραπεία. Το ESKAPE περιλαμβάνει τα είδη *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* και τα είδη του γένους *Enterobacter*.

Τα παθογόνα ESKAPE έχουν προσελκύσει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της αυξανόμενης αντοχής τους σε πολλαπλά αντιμικροβιακά φάρμακα και του δυναμικού τους, γεγονός που ενισχύει τη σημασία και την επικινδυνότητά τους. Η πολυανθεκτικότητα αυτών των βακτηρίων συγκαταλέγεται μεταξύ των τριών κορυφαίων απειλών για την δημόσια υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο, ενώ οι λοιμώξεις από ανθεκτικά στελέχη ESKAPE αποτελούν σημαντική πρόκληση στην κλινική πράξη, περιορίζοντας τις διαθέσιμες θεραπευτικές επιλογές (Santajit & Indrawattana, 2016).

Αυτοί οι οργανισμοί είναι υπεύθυνοι για μια ευρεία γκάμα νοσοκομειακών και κοινοτικών λοιμώξεων, όπως η πνευμονία που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα και η λοίμωξη του διαβητικού ποδιού που προκαλούνται από τον *S. aureus* (Lin et al., 2018). Το ακρωνύμιο ESKAPE εισήχθη για πρώτη φορά το 2008 από τον Rice, προκειμένου να περιγράψει μια ομάδα παθογόνων οργανισμών που όχι μόνο ευθύνονται για σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις, αλλά παρουσιάζουν και ανθεκτικότητα στα περισσότερα αντιμικροβιακά φάρμακα που είναι διαθέσιμα σήμερα (Karlowsky et al., 2017). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα παθογόνα ESKAPE περιλαμβάνονται στις κατηγορίες «Προτεραιότητα 1: Κρίσιμη» και «Προτεραιότητα 2: Υψηλή» σύμφωνα με τον κατάλογο προτεραιότητας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) για πολυανθεκτικούς οργανισμούς. Αυτά τα παθογόνα αποτελούν σημαντική αιτία νοσηρότητας τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες, αυξάνοντας σημαντικά την επιβάρυνση της δημόσιας υγείας (Navidinia et al., 2017).

Τα παθογόνα ESKAPE διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη δημόσια υγεία, όχι μόνο επειδή συμβάλλουν σε μεγάλο ποσοστό νοσοκομειακών λοιμώξεων, αλλά και επειδή αντιπροσωπεύουν νέα παραδείγματα προς μελέτη για την κατανόηση της παθογένεσης και της μετάδοσης των καθοριστικών παραγόντων αντοχής παγκοσμίως (Rice, 2008). Η βαθύτερη διερεύνηση και κατανόηση των βασικών χαρακτηριστικών αυτών των μικροοργανισμών, όπως οι μηχανισμοί λοιμογόνου δράσης, η ανάπτυξη αντοχής, η μετάδοση και η παθογένεια, μπορεί να αποδειχθεί καθοριστική. Αυτή η γνώση μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη καινοτόμων στρατηγικών αντιμετώπισης και νέων αποτελεσματικών αντιμολυσματικών παραγόντων, οι οποίοι θα αποσκοπούν στην καταπολέμηση των σοβαρών επιπλοκών που προκαλούν αυτοί οι μικροοργανισμοί (Pendleton et al., 2013).

Οι φυσικοί ξενιστές των παθογόνων ESKAPE είναι οι άνθρωποι και τα ζώα, γεγονός που καθιστά την κακή υγιεινή και τις ακατάλληλες τεχνικές διαχείρισης των

γεωργικών και κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων καίριους παράγοντες για τη μόλυνση των περιβαλλοντικών πηγών (Hrenovic et al., 2017; Amarasiri et al., 2020). Οι πιθανές πηγές μόλυνσης περιλαμβάνουν διαρροές λυμάτων, ακατάλληλη διαχείριση και απόρριψη νοσοκομειακών και γεωργικών αποβλήτων και ανθρωπογενείς δραστηριότητες (Nyenje et al., 2012; Hrenovic et al., 2017). Τα παθογόνα ESKAPE συνιστούν τον κυριότερο αιτιολογικό παράγοντα νοσοκομειακών λοιμώξεων, ιδιαίτερα στον ανθρώπινο πληθυσμό, υπογραμμίζοντας τη σημασία της διαχείρισης αυτών των μικροοργανισμών (Santajit & Indrawattana, 2016).

Η ικανότητα των παθογόνων ESKAPE να φιλοξενούν και να εκφράζουν ανθεκτικούς στα αντιβιοτικά παράγοντες ενισχύει τη σημασία τους για τη δημόσια υγεία (Santajit & Indrawattana, 2016). Επιπλέον, η προσαρμοστικότητα τους σε μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να ανταλλάσσουν γενετικό υλικό με άλλους μικροοργανισμούς μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, τα καθιστά βασική πηγή για την εξάπλωση μολυσματικών και ανθεκτικών παραγόντων (Venkateswaran et al., 2023). Η δυνατότητα απόκτησης καθοριστικών παραγόντων αντοχής στα αντιβιοτικά από τροφιμογενή παθογόνα, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων ESKAPE, αποτελεί σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία. Αυτό εγείρει έντονες ανησυχίες για τους ρυθμιστικούς φορείς, τους κλινικούς ιατρούς αλλά και την κοινωνία (WHO, 2003).

Η παρουσία γονιδίων μικροβιακής αντοχής στα παθογόνα ESKAPE περιορίζει σημαντικά τις θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση σοβαρών λοιμώξεων. Αυτό όχι μόνο αυξάνει το φορτίο της νόσου αλλά παράλληλα οδηγεί σε υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας λόγω αποτυχιών στη θεραπεία, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για μια συντονισμένη παγκόσμια στρατηγική επιτήρησης της μικροβιακής αντοχής. Τα νοσοκομειακά βακτήρια ESKAPE αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα ανθεκτικότητας, παθογένειας και μετάδοσης ασθενειών (Santajit & Indrawattana, 2016). Ως εκ τούτου, η βαθιά γνώση των προφίλ λοιμογόνου δράσης και ανθεκτικότητας στα φάρμακα αυτών των παθογόνων, όπως αυτά κυκλοφορούν στις κοινότητες και τα νοσοκομεία, είναι απολύτως απαραίτητη για τη διαμόρφωση αποτελεσματικών στρατηγικών αντιμετώπισης.

Η παρούσα μελέτη εστιάζει αποκλειστικά στα βακτήρια *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* και *Enterobacter sp.* Αυτά τα τρία παθογόνα αποτελούν αντικείμενο διερεύνησης λόγω της ιδιαίτερης σημασίας τους στη μικροβιακή αντοχή και της συχνότητάς τους στις νοσοκομειακές λοιμώξεις.

#### **1.1.1 *Klebsiella pneumoniae***

Τα είδη *Klebsiella* είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια και προαιρετικά αναερόβια που ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae (Asha et al., 2017). Τα *Klebsiella sp.* είναι ευρέως καταναμεμημένα στο νερό, το έδαφος, τα φυτά και τα λύματα και υπάρχουν επίσης ως φυσιολογική χλωρίδα στο γαστρεντερικό σωλήνα των ζώων και των ανθρώπων (Namratha et al., 2015). Αυτά τα είδη είναι ευκαιριακά παθογόνα που ευθύνονται για νοσοκομειακές λοιμώξεις (Chakraborty et al., 2016). Η *K. pneumoniae* είναι το πιο συχνά απομονωμένο είδος που ευθύνεται για μεγάλο ποσοστό μολύνσεων από *Klebsiella*

(Gundestrup et al., 2014). Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από την *K. pneumoniae* περιλαμβάνουν σηψαιμία, πνευμονίες, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος και χρόνιες πνευμονικές διαταραχές (Vasaikar et al., 2017). Αυτές οι λοιμώξεις έχουν σοβαρές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία για τους ασθενείς, ιδιαίτερα στις αναπτυσσόμενες χώρες (Rice, 2008).

### 1.1.2 *Staphylococcus aureus*

Τα βακτήρια του γένους *Staphylococcus* είναι θετικοί κατά Gram κόκκοι, οι οποίοι εμφανίζονται είτε σε ζεύγη είτε ως ακανόνιστες σταφυλοειδείς συστάδες (Baorto & Baorto, 2016). Ο *S. aureus* απαντάται στο περιβάλλον και παράλληλα αποτελεί μέρος της ανθρώπινης φυσιολογικής χλωρίδας του σώματος, με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται συχνότερα στο δέρμα και τους βλεννογόνους των περισσότερων υγιών ατόμων (Ateba et al., 2010). Παρότι αυτοί οι οργανισμοί θεωρούνται μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας, ορισμένοι είδη σταφυλόκοκκων, όπως ο *S. aureus*, έχουν συσχετιστεί με ασθένειες σε ανθρώπους και άλλα θηλαστικά (Taylor & Unakal, 2017). Αν και συνήθως δεν προκαλεί λοιμώξεις σε υγιή άτομα, αν εισέλθει στους εσωτερικούς ιστούς ή στην κυκλοφορία του αίματος, ο *S. aureus* μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες δυνητικά σοβαρές λοιμώξεις ιδιαίτερα σε ευπαθείς ασθενείς. Οι λοιμώξεις αυτές περιλαμβάνουν βακτηριαιμία, πνευμονία, βαθιά αποστήματα, οστεομυελίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, φλεβίτιδα, μηνιγγίτιδα και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (Taylor & Unakal, 2017).

Στον άνθρωπο, αυτές οι επιπλοκές συχνά συνδέονται με νοσηλευόμενους ασθενείς. Οι σταφυλόκοκκοι διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες με βάση την ικανότητά τους να προκαλούν πήξη του πλάσματος του αίματος μέσω της αντίδρασης κοαγκουλάσης. Οι θετικοί στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκοι (coagulase – positive staphylococci – CPS) όπως ο *S. aureus* αποτελούν τα πιο παθογόνα είδη. Αντίθετα, οι αρνητικοί στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκοι (coagulase – negative staphylococci – CNS), οι οποίοι περιλαμβάνουν περισσότερα από 30 διαφορετικά είδη, θεωρούνταν στο παρελθόν μη παθογόνοι (Foster, 1996). Η ικανότητα του *S. aureus* να διαθέτει πολλαπλούς μηχανισμούς αντοχής στα αντιβιοτικά, ειδικά στη Μεθικιλίνη, σε συνδυασμό με την έκφραση διαφόρων παραγόντων λοιμογόνου δράσης (επιφανειακές πρωτεΐνες, κάψουλα, πρωτεΐνη A που δεσμεύει ανοσοσφαιρίνη και πλήθος τοξινών) τον καθιστούν σημαντικό αιτιολογικό παράγοντα εστιών μόλυνσης παγκοσμίως.

### 1.1.3 *Enterobacter sp.*

Το γένος *Enterobacter* περιλαμβάνει Gram-αρνητικά, προαιρετικά αναερόβια, ραβδοειδή, βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae (Trivedi et al., 2015). Αυτοί οι οργανισμοί είναι επίσης ευρέως διαδεδομένοι στο έδαφος και τα λύματα και αποτελούν επίσης μέρος της εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα (Mezzatesta et al., 2012). Το γένος *Enterobacter* περιλαμβάνει έξι είδη με το *Enterobacter cloacae* να αναδεικνύεται ως το πιο συχνά απομονωμένο είδος σε ασθενείς. Η σημασία αυτού του παθογόνου για τη δημόσια υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο ενισχύει την ανάγκη διεξαγωγής μελετών επιτήρησης δεδομένου ότι μπορεί να

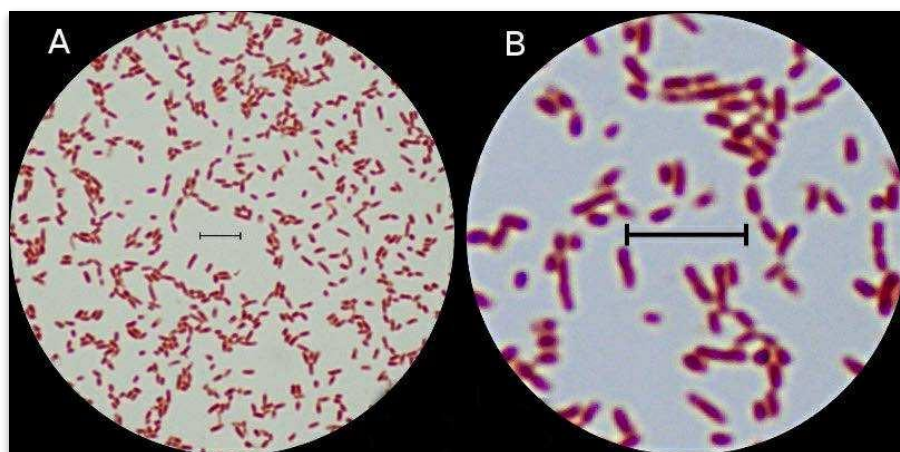
προκαλέσει νοσοκομειακές λοιμώξεις όπως λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, οστεομυελίτιδα και νεογνική μηνιγγίτιδα στον άνθρωπο (Ren et al., 2010).

Συνεπώς, τα παθογόνα ESKAPE συνιστούν την κύρια αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων (hospital-acquired infections - HAI) παγκοσμίως (Tabah et al., 2012). Αυτό επιδεινώνεται από τα αυξανόμενα επίπεδα μικροβιακής αντοχής που αποτελούν πλέον σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας. Ως εκ τούτου, η κατανόηση της δυναμικής μετάδοσης αυτών των παθογόνων είναι κρίσιμης σημασίας. Εξίσου σημαντική είναι και η μελέτη της μεταφοράς τους μεταξύ ασθενών, εργαζομένων στον τομέα της υγείας και του περιβάλλοντος. Η γνώση αυτή συμβάλλει στην αξιολόγηση πιθανών μεθόδων παρέμβασης, αλλά και στον εντοπισμό περιβαλλοντικών δεξαμενών και συμπεριφορών που σχετίζονται με τη μετάδοση του συγκεκριμένου παθογόνου.

## 1.2 Εμφάνιση παθογόνων ESKAPE σε υδάτινο περιβάλλον

### 1.2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Η *K. pneumoniae* είναι ένας οργανισμός που είναι ευρέως διαδεδομένος στο περιβάλλον και έχει απομονωθεί από μια ποικιλία οικοτόπων όπως επιφανειακά ύδατα, θαλασσινό και υφάλμηρο νερό, καθώς και λύματα (Van Ginkel, 2017; Modh et al., 2021). Οι Padschun et al. απομόνωσαν το παθογόνο *K. pneumoniae* από υδάτινο περιβάλλον στη Γερμανία, το οποίο περιείχε παράγοντες λοιμογόνου δράσης (Barati et al., 2016). Η παρουσία αυτών των παραγόντων που συνήθως εντοπίζονται σε κλινικά στελέχη υποδηλώνει ότι το *K. pneumoniae* περιβαλλοντικής προέλευσης ενδέχεται να ενέχει κινδύνους για τη δημόσια υγεία (Barati et al., 2016). Η *K. pneumoniae* θεωρείται πολύτιμος δείκτης μικροβιακής μόλυνσης του νερού, των τροφίμων και των γεωργικών προϊόντων (Maal et al., 2014).



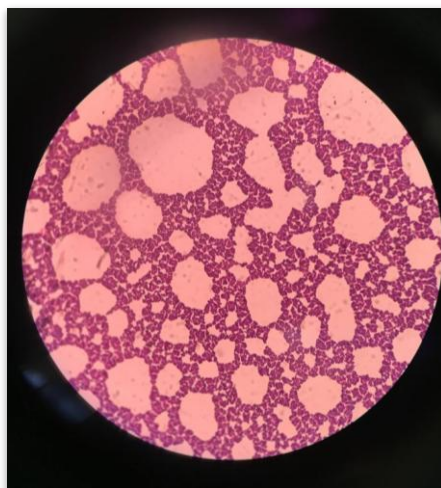
**Εικόνα 1.** Χρώση κατά Gram του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae*, σε δύο διαφορετικούς βαθμούς μεγέθυνσης (A και B). Τα μήκη των γραμμών κλίμακας αντιστοιχούν σε 5  $\mu\text{m}$  και στις δύο εικόνες ([www.vetbact.org](http://www.vetbact.org))

### 1.2.2 *Staphylococcus aureus*

Η παρουσία του *S. aureus* στο πόσιμο νερό προκαλεί ανησυχία λόγω της δυνατότητάς του να προκαλεί μόλυνση στον άνθρωπο και επίσης λόγω της πολλαπλής αντιμικροβιακής του αντοχής (Santos et al., 2020). Το *S. aureus* δεν θεωρείται τυπικά υδατογενές παθογόνο. Σύμφωνα με έρευνες, τόσο κλινικά όσο και περιβαλλοντικά στελέχη αυτού του παθογόνου μπορούν να επιβιώσουν σε θαλάσσια και επιφανειακά νερά για έως και δέκα ημέρες. Το υδατογενές *S. aureus* έχει ανιχνευθεί σε θαλάσσια και επιφανειακά νερά αναψυχής (Hatcher et al., 2016). Μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι κολυμβητές συνδέονται με τη διάδοση του *S. aureus* στο θαλασσινό νερό μέσω της αποβολής του βακτηρίου από τη μύτη, το δέρμα και την αναπνευστική οδό (Akanbi et al., 2017). Ο *S. aureus* βρίσκεται περιστασιακά σε μεγάλη αφθονία σε νερά αναψυχής καθώς και στην άμμο, και η αφθονία σχετίζεται με την πυκνότητα των λουόμενων και αποδίδεται στην ανθρώπινη δραστηριότητα (Goodwin & Pobuda, 2009; Goodwin et al., 2012).

Η παρουσία του *S. aureus* στο πόσιμο νερό δεν σχετίζεται με τη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα, αλλά αποτελεί ένδειξη πιθανής επιμόλυνσης, κυρίως από ανθρώπινες πηγές. Αντίθετα, τα ετερότροφα βακτήρια των πλακών (HPC) που απαντώνται συνήθως σε αποθέματα νερού είναι κατά κανόνα μη παθογόνοι οργανισμοί και χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της γενικής ποιότητας του νερού (Chouhan, 2015; Adesoji et al., 2019). Η συχνότητα εμφάνισης υψηλών συγκεντρώσεων *S. aureus* σε νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση μπορεί να αντιπροσωπεύει δυνητικούς κινδύνους για την υγεία και η κατανάλωση αυτού του νερού μπορεί να οδηγήσει σε εκδηλώσεις ασθένειας όπως εξανθήματα, σηψαιμία, δέρματος, λοιμώξεις μετεγχειρητικών τραυμάτων, εντερικές λοιμώξεις, σηψαιμία, ενδοκαρδίτιδα, οστεομυελίτιδα και πνευμονία (Chouhan, 2015). Ο ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) και ο ευαίσθητος στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MSSA) έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα αέρα από διάφορα περιβάλλοντα, όπως μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Τα βακτήρια αυτά μπορούν να σχηματίσουν αερολύματα μέσω του νερού και είναι ικανά να αποικίσουν το δέρμα και τους μαλακούς ιστούς. Η πιθανότητα έκθεσης μέσω της εισπνοής εγείρει ανησυχίες για τη δημόσια υγεία (Goldstein et al., 2014).

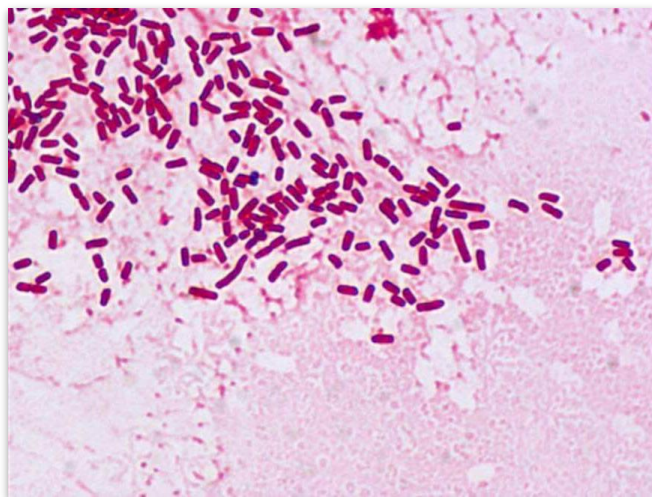




**Εικόνα 2.** Χρώση κατά Gram δείγματος *Staphylococcus aureus*. Οι Gram-θετικοί κόκκοι εμφανίζονται με ιώδες χρώμα και χαρακτηριστική διάταξη σε συστάδες, παρόμοια με τσαμπί σταφυλίου (The Bio Major, 2019)

### **1.2.3 *Enterobacter* sp.**

Τα μέλη του γένους *Enterobacter* βρίσκονται σε ενδιαιτήματα όπως το νερό, τα λύματα, τα λαχανικά και το έδαφος (Grimont & Grimont, 2006). Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι σαπροφυτικοί στο περιβάλλον, καθώς βρίσκονται στο έδαφος και τα λύματα, και αποτελούν επίσης μέρος της κοινής εντερικής χλωρίδας του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα (Akbari et al., 2016). Τα βακτήρια μπορούν, επίσης, να θεωρηθούν ως παθογόνα φυτών, εντόμων και ανθρώπων και είναι πανταχού παρόντα σε χερσαία και υδάτινα περιβάλλοντα (Akbari et al., 2016; Hoffmann & Roggenkamp, 2003a). Μελέτες καταδεικνύουν ότι οι βιοσμάδες 1 και 2 του *Enterobacter amnigenus* έχουν απομονωθεί από πόσιμο νερό, επιφανειακά ύδατα και άγρια εδάφη, ενώ το *Enterobacter asburiae* έχει απομονωθεί από νερό, εδάφη, φυτά, τρόφιμα, νοσοκομειακά περιβάλλοντα και εξοπλισμό προσωπικού υγειονομικής περίθαλψης, όπως ανιχνευτές και καθετήρες (Davin-Regli et al., 2019). Επιπλέον, το *E. cloacae* έχει απομονωθεί από τρόφιμα, ειδικά από δείγματα φόρμουλας που περιέχει φυτά, ωμά λαχανικά και ρίζες, καθώς και από πόσιμο νερό (Davin-Regli et al., 2019).



**Εικόνα 3.** Μικροσκοπική εικόνα Gram-αρνητικού βακίλου του είδους *Enterobacter cloacae*, ενδεικτική της μορφολογίας βακτηρίων του γένους *Enterobacter* (<https://microbe-canvas.com/>)

### 1.3 Αντιμικροβιακή αντοχή και παθογόνα ESKAPE

Η μικροβιακή αντοχή αναφέρεται στην ικανότητα ενός μικροοργανισμού να αναπτύσσεται ή να επιβιώνει παρουσία μιας συγκέντρωσης ενός αντιμικροβιακού παράγοντα που είναι συνήθως επαρκής για την αναστολή ή τη θανάτωση οργανισμών του ίδιου είδους (Sabtu et al., 2015). Οι γενετικές μεταλλάξεις στα βακτήρια, καθώς και η άμεση μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν μηχανισμούς αντοχής, είναι οι κύριες αιτίες της μικροβιακής αντοχής. Η αλόγιστη και ακατάλληλη χρήση αντιμικροβιακών φαρμάκων παρέχει ευνοϊκές συνθήκες για την εμφάνιση, εξάπλωση και διατήρηση ανθεκτικών μικροοργανισμών (Odonkor, 2014).

Τα παθογόνα ESKAPE είναι από τα πιο κοινά ευκαιριακά παθογόνα στις νοσοκομειακές λοιμώξεις (Singh, 2018). Το ακρωνύμιο ESKAPE αντικατοπτρίζει την ικανότητα αυτών των οργανισμών να «ξεφεύγουν» από τη βιοκτόνο ικανότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων και να αψηφούν την εκρίζωση με συμβατικές θεραπείες, γεγονός που οδηγεί σε εκτεταμένη νοσηρότητα και θνησιμότητα για τους ασθενείς και αυξημένη χρήση των πόρων στην υγειονομική περίθαλψη (Ma et al., 2020).

Υπάρχουν δύο τύποι αντοχής στα αντιβιοτικά που περιλαμβάνουν την εγγενή ή έμφυτη αντίσταση καθώς και την επίκτητη αντίσταση (Odonkor, 2014). Η εγγενής αντίσταση αναφέρεται σε μια φυσική αναισθησία σε ορισμένα βακτηριακά στελέχη που δεν ήταν ποτέ ευαίσθητα σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Για παράδειγμα, το *P. aeruginosa* είναι εγγενώς ανθεκτικό σε πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών λόγω της παρουσίας λίγων πορινών στην εξωτερική του μεμβράνη, επομένως πολλά αντιβιοτικά δεν μπορούν να διεισδύσουν στο εσωτερικό αυτών των βακτηριακών κυττάρων (Ma et al., 2020). Επίκτητη αντίσταση ορίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ορισμένα βακτήρια που ανήκουν σε ένα ευαίσθητο είδος δεν αναστέλλονται ή θανατώνονται πλέον από συγκεντρώσεις ενός αντιβιοτικού που κανονικά θα το έκαναν, είτε λόγω χρωμοσωμικής μετάλλαξης είτε λόγω απόκτησης εξωγενών γονιδίων (Odonkor, 2014).

## 1.4 Μικροβιακή αντοχή

Η μικροβιακή αντοχή στα αντιβιοτικά αποτελεί μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως. Τα παθογόνα βακτήρια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται παρά την παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων. Η ανθεκτικότητα αυτή προκύπτει μέσα από φυσική επιλογή και ενισχύεται από την υπερκατανάλωση ή την ακατάλληλη χρήση των αντιβιοτικών στην ιατρική, τη γεωργία και το περιβάλλον. Ειδικότερα, τα λεγόμενα ESKAPE παθογόνα έχουν αναγνωριστεί ως οι κυριότεροι εκπρόσωποι της πολυανθεκτικότητας, καθώς είναι υπεύθυνα για σοβαρές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις που είναι ολόένα και πιο δύσκολες στη θεραπεία (Santajit & Indrawattana, 2016).

Τα βακτήρια αυτά απασχολούν ιδιαίτερα την ερευνητική κοινότητα λόγω της ικανότητάς τους να αποκτούν ανθεκτικότητα με διάφορους τρόπους: είτε μέσω της παραγωγής ειδικών ενζύμων που απενεργοποιούν τα αντιβιοτικά, είτε μέσω γενετικών μεταλλάξεων που τροποποιούν τις θέσεις πρόσδεσης των φαρμάκων, είτε ακόμα μέσω της ενεργής απομάκρυνσης των αντιβιοτικών από το εσωτερικό του κυττάρου με αντλίες εκροής. Παράλληλα, η δημιουργία βιοφίλμ, δηλαδή μικροβιακών κοινοτήτων ενσωματωμένων σε προστατευτικές εξωκυτταρικές ουσίες, προσφέρει στα βακτήρια αυξημένη επιβιωσιμότητα απέναντι στα αντιβιοτικά και το ανοσοποιητικό σύστημα (Ma et al., 2020). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στη διασπορά της αντοχής διαδραματίζει η οριζόντια μεταφορά γονιδίων, δηλαδή η δυνατότητα των βακτηρίων να ανταλλάσσουν γονίδια ανθεκτικότητας μέσω πλασμιδίων, τρανσποζονίων ή ακόμα και βακτηριοφάγων. Αυτή η μεταφορά μπορεί να συμβεί όχι μόνο μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους αλλά και μεταξύ διαφορετικών ειδών, καθιστώντας τη διασπορά ταχύτατη και απρόβλεπτη (Carattoli, 2003). Η κατανόηση των μηχανισμών αυτών είναι κρίσιμη για τον σχεδιασμό αποτελεσματικών στρατηγικών αντιμετώπισης. Η έρευνα σήμερα στρέφεται όχι μόνο στην ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών, αλλά και σε εναλλακτικές θεραπείες όπως οι αναστολείς αντλιών εκροής, τα πεπτιδία που διαταράσσουν τις μεμβράνες των βακτηρίων, καθώς και η χρήση βακτηριοφάγων – ιών που στοχεύουν εκλεκτικά τα παθογόνα βακτήρια.

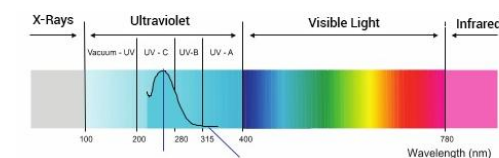
## 1.5 Απολύμανση και αδρανοποίηση

Η συνεχής αύξηση της μικροβιακής αντοχής, ειδικά από τα παθογόνα της ομάδας ESKAPE, περιορίζει δραστικά την αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων αντιβιοτικών θεραπειών. Καθώς η ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών καθυστερεί και οι υπάρχουσες επιλογές εξαντλούνται, εξετάζονται εναλλακτικές προσεγγίσεις όπως η χρήση βακτηριοφάγων, αντιμικροβιακών πεπτιδίων, νανοσωματιδίων ή φωτοδυναμικής θεραπείας. Παρότι αυτές οι τεχνικές παρουσιάζουν ενδιαφέρον σε ερευνητικό επίπεδο, δεν έχουν ακόμη καθιερωθεί ευρέως στην καθημερινή πράξη. Αντιθέτως, η απολύμανση αποτελεί τη βασική μέθοδο που εφαρμόζεται συστηματικά και κατά ρουτίνα για την πρόληψη και τον

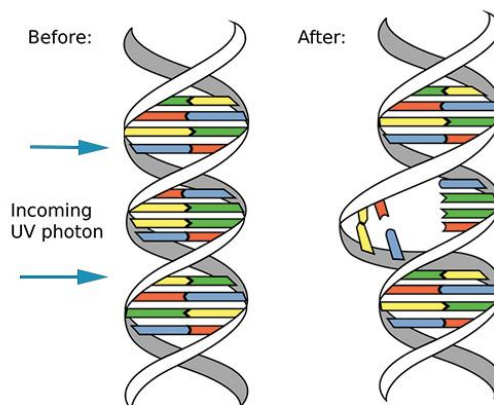
έλεγχο της εξάπλωσης των μικροοργανισμών, τόσο σε υγειονομικά περιβάλλοντα όσο και σε εφαρμογές διαχείρισης υδάτων ή τροφίμων.

Η απολύμανση αποτελεί κρίσιμη στρατηγική για τον έλεγχο της μικροβιακής μόλυνσης, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για παθογόνα υψηλής ανθεκτικότητας. Στην πράξη, εφαρμόζονται είτε χημικά απολυμαντικά όπως το χλώριο, είτε φυσικές μέθοδοι όπως η υπεριώδης ακτινοβολία UV-C, με την επιλογή να εξαρτάται από τις ιδιότητες του μέσου και τον επιθυμητό βαθμό απολύμανσης.

Στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκε η υπεριώδης ακτινοβολία UV-C ως μέθοδος απολύμανσης, λόγω της αποτελεσματικότητάς της στην αδρανοποίηση μικροοργανισμών μέσω άμεσης βλάβης του DNA, καθώς και της ικανότητάς της να περιορίζει τη διασπορά γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά (ARGs). Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της UV-C είναι ότι δρα τοπικά και χωρίς χημικά κατάλοιπα, ενώ παράλληλα παρουσιάζει χαμηλή πιθανότητα ανάπτυξης αντοχής από τα μικρόβια. Ωστόσο, η απόδοσή της επηρεάζεται από παράγοντες όπως η ένταση της ακτινοβολίας, ο χρόνος έκθεσης, και τα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος.



**Cell Inactivation of Microorganisms**



**Εικόνα 4.** Μηχανισμός αδρανοποίησης μικροοργανισμών μέσω UV-C ακτινοβολίας. Η απορρόφηση UV φωτονίων από το DNA προκαλεί μοριακές αλλοιώσεις, όπως διμερή θυμίνης, οδηγώντας σε παύση της κυτταρικής λειτουργίας (<https://www.filterwater.com/>)

Για την ποσοτική ανάλυση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης, χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο Chick-Watson, το οποίο βασίζεται στην εξίσωση πρώτης τάξης (Shimabuku et al., 2018):

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt \Rightarrow \frac{C}{C_0} = e^{-kt}$$

Όπου,  $k$ : είναι η σταθερά του ρυθμού αδρανοποίησης ( $\text{min}^{-1}$ ),  $t$ : ο χρόνος ( $\text{min}$ ),  $C$ : η τελική συγκέντρωση του μικροοργανισμού,  $C_0$ : η αρχική συγκέντρωση του μικροοργανισμού.

Το μοντέλο Chick-Watson αποτελεί μια κλασική προσέγγιση στην περιγραφή της κινητικής της μικροβιακής αδρανοποίησης, η οποία διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στις διεργασίες απολύμανσης. Το μοντέλο βασίζεται στην υπόθεση ότι η ταχύτητα αδρανοποίησης των μικροοργανισμών είναι ανάλογη τόσο με τη συγκέντρωση των ίδιων των μικροοργανισμών όσο και με τη συγκέντρωση του απολυμαντικού παράγοντα. Αυτό συνεπάγεται ότι η μείωση του αριθμού των επιζώντων μικροβίων ακολουθεί εκθετική πορεία. Παρότι σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρούνται αποκλίσεις από τη γραμμικότητα, υποδεικνύοντας πιο σύνθετους μηχανισμούς, το μοντέλο Chick-Watson προσφέρει μια χρήσιμη απλοποιημένη προσέγγιση, ιδίως όταν εφαρμόζεται για την εκτίμηση της σταθεράς ταχύτητας αδρανοποίησης ( $k$ ). Μέσω της πειραματικής επαλήθευσης του μοντέλου, είναι δυνατός ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων και η πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας μιας απολυμαντικής διεργασίας υπό διαφορετικές συνθήκες, συμβάλλοντας στην ορθολογική σχεδίαση και βελτιστοποίηση των εφαρμοζόμενων στρατηγικών απολύμανσης. Η χρήση αυτού του μοντέλου επέτρεψε την κατασκευή διαγραμμάτων απολύμανσης, στα οποία αποτυπώθηκε η μεταβολή της βακτηριακής συγκέντρωσης (ή επιβίωσης) σε συνάρτηση με τον χρόνο, για διαφορετικά είδη και συνθήκες επεξεργασίας. Μέσω της μαθηματικής αυτής προσέγγισης, αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα της UV-C και της συνδυαστικής μεθόδου, παρέχοντας στοιχεία για τον βαθμό αδρανοποίησης των μικροοργανισμών, με ιδιαίτερη έμφαση στα ανθεκτικά στελέχη.

Η παράμετρος  $C \cdot t$  αποτελεί ένα θεμελιώδες εργαλείο για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των απολυμαντικών διαδικασιών, όπως αυτές εφαρμόζονται στην επεξεργασία του νερού. Εκφράζει το γινόμενο της συγκέντρωσης του απολυμαντικού ( $C$ , σε  $\text{mg/L}$ ) και του χρόνου επαφής ( $t$ , σε λεπτά) και παρέχει έναν απλό αλλά αποδοτικό τρόπο υπολογισμού της απαιτούμενης απολυμαντικής δόσης για την επίτευξη συγκεκριμένου επιπέδου μικροβιακής αδρανοποίησης. Η έννοια του  $C \cdot t$  επιτρέπει τη σύγκριση διαφορετικών συνδυασμών δόσης και διάρκειας εφαρμογής, καθιστώντας δυνατή την επιλογή της βέλτιστης στρατηγικής απολύμανσης ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες, όπως η θερμοκρασία και το pH. Για παράδειγμα, υψηλότερες συγκεντρώσεις απολυμαντικού μπορούν να οδηγήσουν στην ίδια απολυμαντική αποτελεσματικότητα σε μικρότερο χρονικό διάστημα, ενώ χαμηλότερες συγκεντρώσεις απαιτούν μεγαλύτερους χρόνους. Στην περίπτωση της υπεριώδους ακτινοβολίας, η αντίστοιχη παράμετρος είναι το γινόμενο της έντασης της ακτινοβολίας με τον χρόνο έκθεσης ( $I \cdot t$ ), το οποίο εκφράζει την ενεργειακή δόση που απαιτείται για την απενεργοποίηση των μικροοργανισμών (Dong et al., 2018).

## 2. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάδειξη της παρουσίας των παθογόνων μικροοργανισμών της ομάδας ESKAPE σε περιβαλλοντικά δείγματα και απόβλητα, ο έλεγχος του προφίλ ανθεκτικότητάς τους σε ποικιλία αντιβιοτικών και η αξιολόγηση της επικινδυνότητας που ενδέχεται να προκύψει για τη δημόσια υγεία. Τα βακτήρια αυτά περιλαμβάνουν τα *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* και *Enterobacter sp.*, τα οποία αποτελούν βασικά παθογόνα τόσο στο νοσοκομειακό περιβάλλον όσο και στο ευρύτερο οικοσύστημα.

Συγκεκριμένα, η εργασία εστιάζει:

- Στη διερεύνηση της παρουσίας των παθογόνων μικροοργανισμών ESKAPE σε περιβαλλοντικά δείγματα, με ιδιαίτερη έμφαση σε υδάτινα συστήματα και απόβλητα.
- Στον έλεγχο της ανθεκτικότητάς τους απέναντι σε μια σειρά αντιβιοτικών, καθώς και στον προσδιορισμό των μηχανισμών αντοχής που ενδέχεται να φέρουν.
- Στην αξιολόγηση της επικινδυνότητας που μπορεί να προκύψει για τη δημόσια υγεία από την παρουσία και διασπορά τους στο περιβάλλον.
- Στην αποτύπωση της διασποράς αυτών των μικροοργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον, εξετάζοντας πιθανές πηγές μόλυνσης και τους παράγοντες που ευνοούν την επιβίωσή τους.
- Στη μελέτη της αποτελεσματικότητας της UVC ακτινοβολίας, ως μεθόδου απολύμανσης και αδρανοποίησης των βακτηρίων αυτών, με σκοπό τη μείωση του μικροβιακού φορτίου και τον περιορισμό της διασποράς τους.
- Στην αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ των περιβαλλοντικών παραμέτρων και της επιβίωσης αυτών των μικροοργανισμών, με στόχο την αναγνώριση κρίσιμων παραγόντων που επηρεάζουν την εξάπλωσή τους.
- Στην ανάδειξη της σημασίας της περιβαλλοντικής επιτήρησης για τον έλεγχο και τη διαχείριση των ανθεκτικών παθογόνων, προτείνοντας στρατηγικές περιορισμού της εξάπλωσής τους.

Η πρωτοτυπία της εργασίας εντοπίζεται στο γεγονός ότι δεν περιορίζεται απλώς στην καταγραφή της παρουσίας αυτών των βακτηρίων σε περιβαλλοντικά δείγματα, αλλά εξετάζει τη διασπορά, την ανθεκτικότητά τους και την πιθανή επίδρασή τους στη δημόσια υγεία. Παράλληλα, διερευνώνται στρατηγικές απολύμανσης και μείωσης της μικροβιακής επιβάρυνσης, με ιδιαίτερη έμφαση στη χρήση UVC ακτινοβολίας, γεγονός που συμβάλλει στην κατανόηση και τον έλεγχο αυτών των παθογόνων στο περιβάλλον. Επιπλέον, η μελέτη εστιάζει στη διερεύνηση της αλληλεπίδρασης αυτών των μικροοργανισμών με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, παρέχοντας μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τους μηχανισμούς επιβίωσης και διασποράς τους. Η αυξανόμενη ανθεκτικότητα των συγκεκριμένων βακτηρίων στα αντιβιοτικά, σε συνδυασμό με την παρουσία τους σε υδάτινα οικοσυστήματα, καθιστά επιτακτική την ανάγκη για μια ολοκληρωμένη προσέγγιση που να συνδυάζει την περιβαλλοντική επιτήρηση με την ανάπτυξη μεθόδων

απολύμανσης, συμβάλλοντας στην προστασία της δημόσιας υγείας και στη διαμόρφωση νέων στρατηγικών αντιμετώπισης των ανθεκτικών μικροοργανισμών.



### 3. Πειραματικό μέρος

#### 3.1 Περιοχές και συνθήκες δειγματοληψίας

Η απομόνωση των βακτηρίων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε από τον Νοέμβριο του 2023 έως τον Απρίλιο του 2024. Οι περιοχές δειγματοληψίας περιλάμβαναν την παραλία της Κουλούρας (Χαλέπα), την παραλία του Κουμ Καπί (Κέντρο Χανίων), τη λίμνη της Αγιάς, στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων – ΔΕΥΑΧ και του Βορείου Άξονα Ν. Χανίων – ΔΕΥΑΒΑ (Εικόνα 5).

Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν μόνο όταν οι καιρικές συνθήκες ήταν κατάλληλες, καθώς δεν επιτρεπόταν η συλλογή δειγμάτων μετά από βροχόπτωση, προκειμένου να αποφευχθεί η αλλοίωση της ποιότητας του νερού από πιθανές προσμίξεις.



**Εικόνα 5.** Περιοχές δειγματοληψίας της μελέτης. (Αριστερά, από πάνω προς τα κάτω): Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ), Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων Πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ), Λίμνη Αγιάς. (Δεξιά, από πάνω προς τα κάτω): Παραλία Κουλούρας (Χαλέπα), Παραλία Κουμ Καπί (Κέντρο Χανίων) (Προσωπικό αρχείο)

#### 3.2 Χρονικό διάστημα συλλογής δειγμάτων

Η απομόνωση των βακτηρίων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε μεταξύ Νοεμβρίου του 2023 και Απριλίου του 2024. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι τιμές της μέσης καθώς και μέγιστης θερμοκρασίας, της μέσης βροχόπτωσης, της μέσης και μέγιστης ταχύτητας του ανέμου, καθώς και η επικρατούσα



διεύθυνση του ανέμου για τους προαναφερθέντες μήνες (Πίνακας 1). Τα μετεωρολογικά δεδομένα προέρχονται από <https://meteosearch.meteo.gr/>.

**Πίνακας 1.** Μετεωρολογικά δεδομένα

Μήνας \ Μετεω. Δεδομ.	Μέση Θερμ. (°C)	Μέγιστη Θερμ. (°C)	Μέση Βροχόπτωση (mm)	Μέση ταχύτητα ανέμου (km/h)	Μέγιστη ταχύτητα ανέμου (km/h)	Επικρ. Δ/νση ανέμου
1 <sup>η</sup> Δειγματοληψία - Νοέμβριος 2023	19,7	33,7	0,95	5,6	59,5	W
2 <sup>η</sup> Δειγματοληψία- Δεκέμβριος 2023	15,3	24,1	1,65	4,3	49,9	SW
3 <sup>η</sup> Δειγματοληψία- Μάρτιος 2024	16,1	32,5	0,68	5,7	72,4	W
4 <sup>η</sup> Δειγματοληψία- Απρίλιος 2024	19,0	35,3	0,26	5,9	56,3	NE

### 3.3 Υλικά

#### Συσκευές και Όργανα

- Συσκευή διήθησης υπό κενό (PALL Gelman Laboratory).
- Θάλαμος επώασης (Heraeus Incubator, Thermo Scientific)
- Αυτόκαυστο - Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa)
- Κλίβανος ξήρανσης (K103, Elvem)
- Υδατόλουτρο (GFL)
- Ζυγός ακριβείας (Cole Parmer)
- Φασματοφωτόμετρο (UV mini 1240, Shimadzu)
- Microplate photometer (Biochrom EZ READ 400)
- Λαμπτήρας ακτινοβολίας UVC 15W (Osram)
- Μαγνητικός αναδευτήρας (LLG Labware)
- Αναδευτήρας vortex

#### Θρεπτικά Υλικά

- \* Nutrient Agar (Neogen Culture Media)
- \* Nutrient Broth (Neogen Culture Media)
- \* Mueller-Hinton Broth (Condalab )
- \* HiCrome Klebsiella Selective Agar Base (HiMedia)
- \* Mannitol Salt Agar (Neogen Culture Media)
- \* Cronobacter sp. ChromoSelect Agar (Millipore)

#### Χημικά Υλικά

- Χλωριούχο νάτριο (Honeywell Fluka)

#### Διαλύματα

- Διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 0,8 % w/v

#### Αντιβιοτικά

- Methicillin (MedChemExpress)
- Vancomycin (MedChemExpress)
- Imipenem (MedChemExpress)
- Ciprofloxacin (MedChemExpress)

#### Εργαστηριακά Υλικά

- Αυτόματες πιπέτες
- Αυτόματη πολυκάναλη πιπέτα
- Γυάλινες ογκομετρικές πιπέτες 5mL και 10mL
- Φίλτρα μεμβράνης νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0,45 μm (Whatman)
- Αποστειρωμένα τριβλία Petri διαμέτρου 6 και 9 cm
- Σωλήνες φυγοκέντρησης - Eppendorf tubes 1,5 και 2 mL
- Ρύγχη Πιπέτας (tips)
- Πλάκες μικροτιτλοποίησης (96 υποδοχών)

### **3.4 Μέθοδοι**

#### **3.4.1 Μέθοδος Απομόνωσης Στελεχών με Διήθηση**

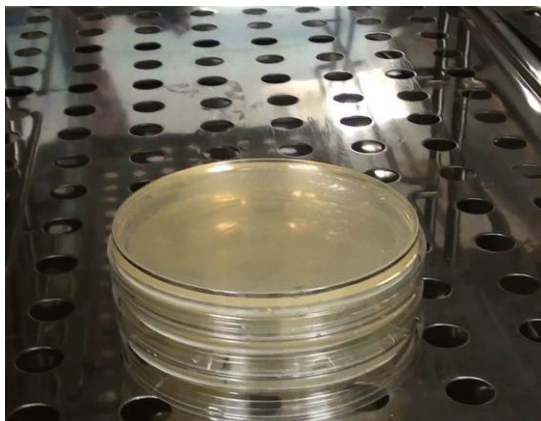
Τα δείγματα εξετάστηκαν για την παρουσία των βακτηρίων *K. pneumoniae*, *S. aureus* και *Enterobacter sp.* Η απομόνωση των βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε μέσω διήθησης του νερού με χρήση ειδικών φίλτρων.

Η διήθηση έγινε σε συσκευή διήθησης υπό κενό, σε αποστειρωμένες συνθήκες, με τη χρήση 100 mL δείγματος για κάθε ανάλυση. Σε ορισμένα δείγματα κρίθηκε απαραίτητη η αραιώση με αποστειρωμένο νερό, εφαρμόζοντας τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, ώστε να μειωθεί το μικροβιακό φορτίο και να διασφαλιστεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων.

Μετά τη διήθηση, οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε κατάλληλα εκλεκτικά θρεπτικά μέσα για την καλλιέργεια των βακτηρίων. Ειδικότερα:

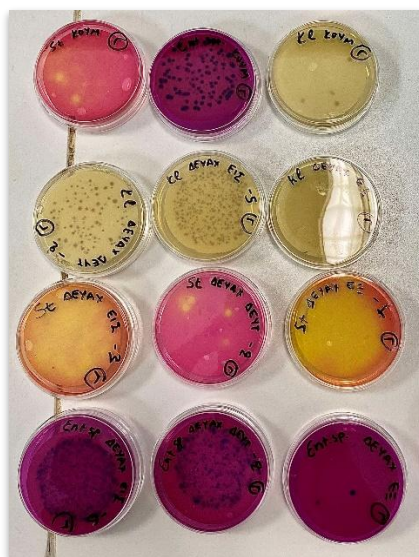
- Για την απομόνωση του *S. aureus* χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό θρεπτικό μέσο Mannitol Salt Agar.
- Για το *Enterobacter sp.* χρησιμοποιήθηκε το Cronobacter sp. ChromoSelect Agar.
- Για το *K. pneumoniae* χρησιμοποιήθηκε το HiCrome Klebsiella Selective Agar Base.

Τα τρυβλία επώστηκαν στον κλίβανο για 24 h στους 37°C, επιτρέποντας την ανάπτυξη των αποικιών για την καταγραφή τους (Εικόνα 6). Η καταμέτρηση των αποικιών (CFUs) πραγματοποιήθηκε ως εξής: μωβ αποικίες για *K. pneumoniae*, κίτρινες αποικίες για *S. aureus* και μπλε-πράσινες αποικίες για *Enterobacter* sp (Εικόνα 7).



**Εικόνα 6.** Τρυβλία διήθησης επωάζονται στον θάλαμο επώασης στους 37°C για 24 h.

Τέλος, μετά την απομόνωση των βακτηριακών στελεχών, πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar. Οι συνθήκες ανακαλλιέργειας παρέμειναν ίδιες με αυτές των αρχικών καλλιεργειών.



**Εικόνα 7.** Τρυβλία με αποικίες βακτηρίων από περιβαλλοντικά δείγματα. Οι διαφορετικές αποχρώσεις αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα βακτηριακά είδη: *K. pneumoniae* (μωβ αποικίες), *S. aureus* (κίτρινες αποικίες) και *Enterobacter* sp. (μπλε-πράσινες αποικίες) (Προσωπικό αρχείο)

#### 3.4.2 Έλεγχος Ανθεκτικότητας σε Αντιβιοτικά

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αντιβιοτικά, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης – Minimum Inhibitory Concentration (MIC), πραγματοποιώντας μικρο-αραιώσεις σε Broth, με σκοπό

να εντοπιστούν οι συγκεντρώσεις που οδηγούν σε αδρανοποίηση του 60% των μικροοργανισμών. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην έκθεση του βακτηριακού εναιωρήματος σε διάφορες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Στόχος είναι να προσδιοριστεί η ελάχιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη του βακτηρίου. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε πλάκες τιτλοδότησης 96 βυθισμάτων, χρησιμοποιώντας τα αντιβιοτικά Methicillin και Vancomycin για τα στελέχη του *S. aureus* και τα αντιβιοτικά Imipenem και Ciprofloxacin για τα στελέχη της *K. pneumoniae*. Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Οι τιμές των συγκεντρώσεων επιλέχθηκαν βάσει τα όρια ευαισθησίας/αντοχής που αναφέρει το European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) και περιλαμβάνουν τόσο τις προτεινόμενες συγκεντρώσεις όσο και τιμές τόσο υψηλότερες και χαμηλότερες αυτών (<https://www.eucast.org/>).

**Πίνακας 2.** Εύρος συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για την μέθοδο MIC

Methicillin (mg/L)			
0,5	1	2	4
Vancomycin (mg/L)			
0,5	1	2	4
Imipenem (mg/L)			
1	2	4	8
Ciprofloxacin (mg/L)			
0,125	0,25	0,5	1

### 3.4.2.1 Προετοιμασία

#### ➤ Παρασκευή Αντιβιοτικών

Ως πρώτο βήμα πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των αντιβιοτικών στις καθορισμένες συγκεντρώσεις. Κάθε αντιβιοτικό διαλύθηκε σε αποστειρωμένο νερό. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση του μητρικού διαλύματος του αντιβιοτικού ήταν πολύ υψηλότερη από την μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση, απαιτήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις, έως ότου το διάλυμα να φτάσει σε συγκέντρωση διπλάσια της υψηλότερης εξεταζόμενης. Αυτή η προσέγγιση ήταν αναγκαία, καθώς κατά την διεξαγωγή της μεθόδου του MIC, το διάλυμα υπέστη περαιτέρω αραιώση 1:2. Το τελικό διάλυμα διατηρήθηκε υπό κατάλληλες συνθήκες συντήρησης για να διασφαλιστεί η σταθερότητα του και χρησιμοποιήθηκε εντός του προβλεπόμενου χρόνου λήξης.

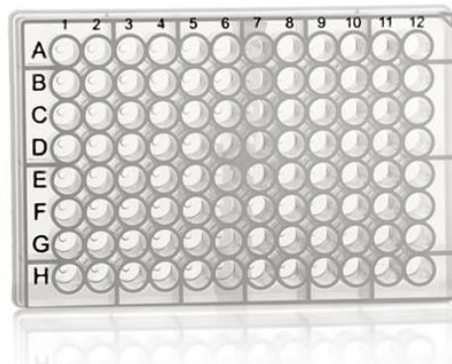
### ➤ Παρασκευή Εναιωρήματος

Η μέθοδος των μικροαραιώσεων σε broth πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του οργανισμού CLSI (Clinical And Laboratory Standards Institute) (<https://clsi.org/>). Το βακτηριακό εναιώρημα δημιουργήθηκε σε Muller-Hinton Broth και η συγκέντρωση του εκτιμήθηκε βάσει την κλίμακας McFarland. Συγκεκριμένα, όταν η οπτική απορρόφηση στα 600 nm είναι  $A=0,1$ , η συγκέντρωση αντιστοιχεί σε  $10^8$  CFUs/mL. Στη συνέχεια, με διαδοχικές αραιώσεις, διαμορφώθηκε η τελική συγκέντρωση, ώστε κατά την προσθήκη 5  $\mu$ L στο microplate να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση  $10^5$  CFUs/mL.

#### 3.4.2.2 Παρασκευή πλάκας μικροτιτλοποίησης

Η μέθοδος MIC πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής χρησιμοποιώντας πλάκα τιτλοποίησης 96 βυθισμάτων (Εικόνα 8). Κάθε πλάκα αξιοποιήθηκε για την εξέταση 8 διαφορετικών στελεχών κάθε βακτηρίου, έναντι των καθορισμένων αντιβιοτικών. Σε όλα τα βυθίσματα, προστέθηκαν 100  $\mu$ L. θρεπτικού υλικού Muller-Hilton Broth, με χρήση αυτόματης πολυκάναλης πιπέτας. Στην συνέχεια, το αντιβιοτικό αναδεύτηκε καλά στον αναδευτήρα vortex. Ακολούθως, προστέθηκαν 100  $\mu$ L από το εκάστοτε αντιβιοτικό στις σειρές A (1–9) και E (1–9), χρησιμοποιώντας αυτόματη πιπέτα των 100  $\mu$ L. Για να διασφαλιστεί η ομοιογενής συγκέντρωση του αντιβιοτικού πραγματοποιήθηκε επιπλέον ανάδευση με την ίδια πιπέτα μέσα στο φιαλίδιο του αντιβιοτικού.

Έπειτα με την πολυκάναλη πιπέτα, 100  $\mu$ L από τα βυθίσματα των σειρών A και E μεταφέρθηκαν διαδοχικά στα υπόλοιπα βυθίσματα των σειρών B, C, D (από A) και F, G H (από E). Με κάθε μεταφορά, επιτυγχανόταν αραιώση 1:2 σχηματίζοντας τις επιθυμητές συγκεντρώσεις, όπως αναφέρονται στον σχετικό πίνακα. Έτσι, η 1η σειρά περιείχε τη μέγιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού, ενώ η τελευταία την ελάχιστη.



**Εικόνα 8.** Πλάκα τιτλοποίησης 96 βυθισμάτων (<https://bio.tools/>)

Τέλος, προστέθηκαν 5  $\mu$ L βακτηριακής καλλιέργειας σε όλα τα βυθίσματα των στηλών 1–8, καθώς και στις στήλες 10 και 11. Η πλάκα χωρίστηκε οριζόντια στην μέση, ώστε να τοποθετηθούν οι καλλιέργειες των οκτώ διαφορετικών στελεχών του ίδιου βακτηρίου. Συγκεκριμένα:

- Στο επάνω μισό της πλάκας (σειρές A–D), τα στελέχη τοποθετήθηκαν ως εξής: στις θέσεις 1–2 το 1ο στέλεχος, στις θέσεις 3–4 το 2ο, στις θέσεις 5–6 το 3ο, και στις θέσεις 7–8 το 4ο.
- Στο κάτω μισό της πλάκας (σειρές E–H), ακολουθήθηκε η ίδια διάταξη για τα υπόλοιπα τέσσερα στελέχη.

Η δομή της πλάκας ολοκληρώθηκε ως εξής:

- Στις στήλες 1–8 περιείχαν Muller-Hinton Broth, μικροοργανισμό και αντιβιοτικό.
- Η 9η στήλη περιείχε μόνο Muller-Hinton Broth με αντιβιοτικό.
- Οι στήλες 10 και 11 περιείχαν Muller-Hinton Broth και μικροοργανισμό χωρίς αντιβιοτικό, για να διαπιστωθεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού απουσία αντιβιοτικού (control).
- Η 12η στήλη (blank) περιείχε μόνο Muller-Hinton Broth, ως τυφλό διάλυμα, για την ανίχνευση πιθανής επιμόλυνσης.

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, η πλάκα μικροτιτλοδότησης τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο για την επώαση των μικροοργανισμών. Η επώαση διήρκησε 24 h σε θερμοκρασία 37°C. Μετά το πέρας των 24 h, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών ελέγχθηκε μέσω μέτρησης της οπτικής απορρόφησης σε microplate reader (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9.** Biochrom EZ Read 400 Microplate Reader (<https://www.fishersci.co.uk/>)

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας, η πλάκα μικροτιτλοδότησης τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο για την επώαση των μικροοργανισμών (Εικόνα 3.5). Η επώαση διήρκησε 24 ώρες σε θερμοκρασία 37°C. Μετά το πέρας των 24 ωρών, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών ελέγχθηκε μέσω μέτρησης της οπτικής απορρόφησης στα 600nm σε φασματοφωτόμετρο.

### 3.4.3 Απολύμανση με ακτινοβολία UVC

Μετά τον έλεγχο αντοχής στα αντιβιοτικά με την μέθοδο MIC, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των διαγραμμάτων που προέκυψαν. Με βάση τα αποτελέσματα, επιλέχθηκαν τα ανθεκτικά στελέχη των βακτηρίων *K. pneumoniae* και *S. aureus* που θα εξετάζονταν στην απολύμανση με ακτινοβολία UVC.

### 3.4.3.1 Προετοιμασία

#### ➤ Παρασκευή Εναιωρήματος

Για τις ανάγκες του πειράματος παρασκευάστηκε εναιώρημα με χρήση διαλύματος NaCl 0,8% w/v. Το εναιώρημα δημιουργήθηκε από αποικίες του εκάστοτε βακτηριακού στελέχους και φωτομετρήθηκε στα 600nm, ώστε να εκτιμηθεί η συγκέντρωσή του. Η απορρόφηση ρυθμίστηκε στο 0,1 όπου σύμφωνα με την κλίμακα McFarland, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αποικιών  $10^8$  CFUs/mL. Για να επιτευχθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση στο δείγμα, πραγματοποιήθηκαν σταδιακές αραιώσεις, μέχρι να προσεγγιστεί η τιμή των  $10^5$  CFUs/mL.

Στο πείραμα επιλέχθηκε γυάλινο σκεύος για την ομοιόμορφη διάχυση της ακτινοβολίας σε όλο το διάλυμα. Το σκεύος βρισκόταν πάνω σε πλάκα που δημιουργεί μαγνητικό πεδίο, και μέσω του μαγνήτη στο εσωτερικό του διαλύματος, επιτεύχθηκε πλήρης ανάδευση καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος για την εξασφάλιση ομοιογένειας στη συγκέντρωση.

### 3.4.3.2 Πειραματική Διαδικασία

Για τη μέτρηση στον χρόνο 0 min, μετά την ανάδευση του διαλύματος για λίγα λεπτά σε μαγνητικό αναδευτήρα, συλλέχθηκαν 1000  $\mu$ L, τα οποία τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο Eppendorf. Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης στο χρόνο 0, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις έως και το  $10^{-3}$ , ώστε κατά την επώαση του τρυβλίου να υπάρχουν ευδιάκριτες αποικίες για σωστή καταμέτρηση.

Στη συνέχεια, το σκεύος με το εναιώρημα μεταφέρθηκε σε κλειστό θάλαμο κάτω από λαμπτήρα ακτινοβολίας UVC ισχύος 15 W, ο οποίος ενεργοποιήθηκε ταυτόχρονα με το χρονόμετρο. Συνολικά λήφθηκαν δείγματα στους προκαθορισμένους χρόνους για κάθε βακτήριο και τοποθετήθηκαν σε αντίστοιχα σωληνάρια Eppendorf. Η διάρκεια του πειράματος για τα στελέχη και των δύο βακτηρίων ήταν 15 min.

Από κάθε σωληνάριο Eppendorf έγινε επιφανειακή επίστρωση 100  $\mu$ L με κρίκο εμβολιασμού σε τρυβλία, τα οποία τοποθετήθηκαν στον θάλαμο επώασης στους 37°C για 24 h. Μετά την επώαση, ακολούθησε η καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν και η καταγραφή των αποτελεσμάτων.

Μετά το πέρας της διαδικασίας UVC, το σκεύος με το διάλυμα καλύφθηκε και τοποθετήθηκε σε σκιερό μέρος για 24 h. Έπειτα, 100  $\mu$ L από το διάλυμα επιστρώθηκαν σε τρυβλίο, επώαστηκαν στους 37°C για 24 h, και ακολούθησε η καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν.

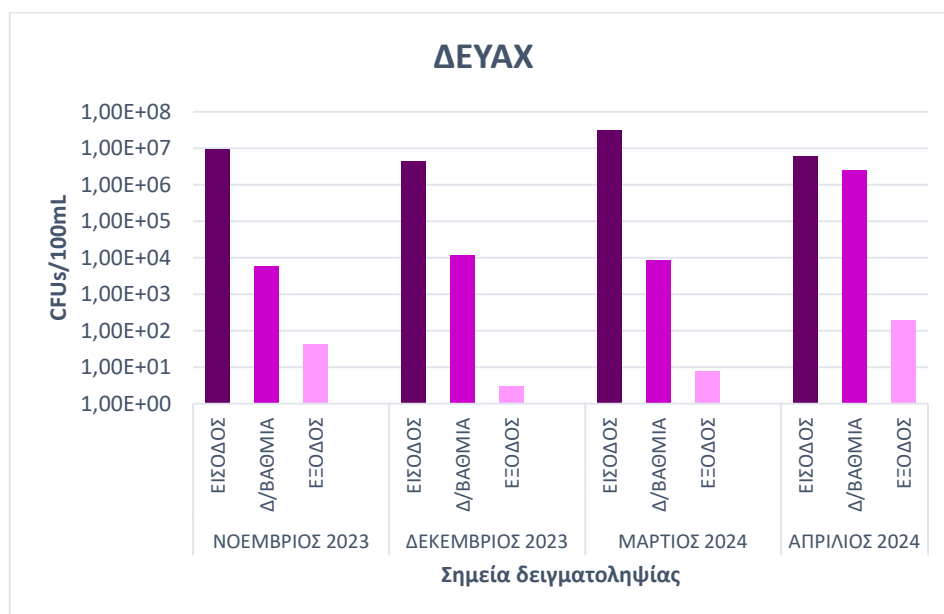
## 4 Αποτελέσματα

### 4.1 Ανίχνευση των ESKAPE σε περιβαλλοντικά δείγματα

Το φαινόμενο της παρουσίας ανθεκτικών παθογόνων μικροοργανισμών στο περιβάλλον συνιστά ένα κρίσιμο ζήτημα για τη δημόσια υγεία και την ασφάλεια των υδάτινων πόρων. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση βακτηρίων της ομάδας ESKAPE σε περιβαλλοντικά δείγματα, με στόχο την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου και την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών επεξεργασίας του νερού. Τα βακτηριακά στελέχη απομονώθηκαν από περιβαλλοντικά δείγματα που συλλέχθηκαν στην περιοχή των Χανίων και συγκεκριμένα από παράκτιες ζώνες (Κουμ Καπί, Κουλούρα), επιφανειακό νερό (Λίμνη Αγιάς) και εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (ΔΕΥΑΧ και ΔΕΥΑΒΑ), κατά το διάστημα Νοεμβρίου 2023 – Απριλίου 2024.

Γενικά τα βακτήρια που εξετάζονται στην παρούσα εργασία είναι τα: *K. pneumoniae*, *S. aureus* και *Enterobacter sp.* Τα παρακάτω γραφήματα αφορούν στην παρουσία αυτών των βακτηρίων σε δειγματοληψίες στις διάφορες πηγές. Τα γραφήματα απεικονίζουν τις αποικίες (CFUs) ανά 100mL.

#### 4.1.1 *K. pneumoniae* – Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων



**Διάγραμμα 1.** Ανίχνευση *K. pneumoniae* σε δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024

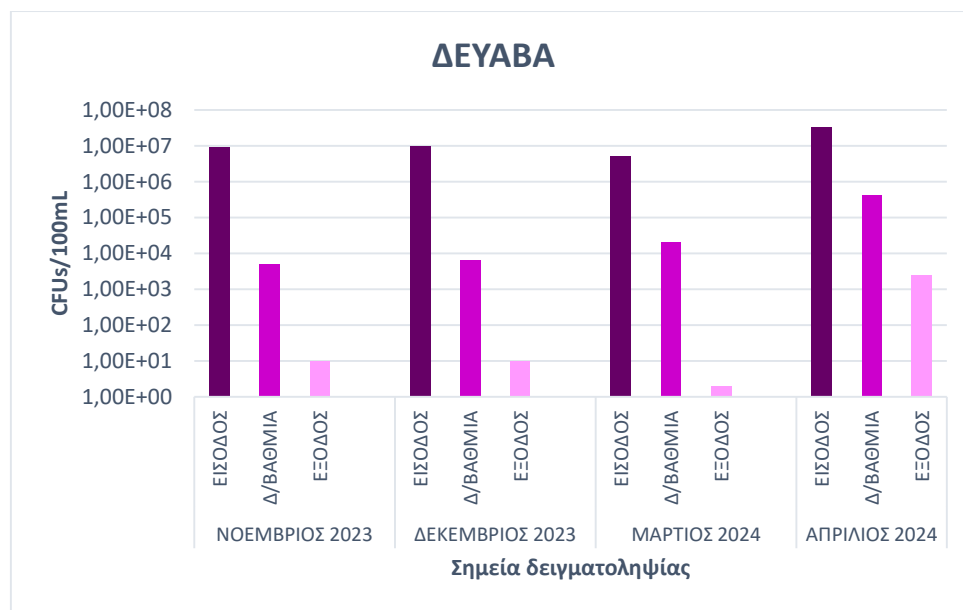
Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1, κατά την 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023), καταγράφηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις, κυρίως στην είσοδο της μονάδας,



υποδεικνύοντας υψηλό μικροβιακό φορτίο στα εισερχόμενα λύματα. Οι ασυνήθιστα υψηλές θερμοκρασίες (19,7°C) και η χαμηλή βροχόπτωση (0,95 mm) δημιούργησαν συνθήκες ευνοϊκές για τη συσσώρευση παθογόνων, λόγω μειωμένης απορροής και περιορισμένου φυσικού καθαρισμού. Στη 2η δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2023), παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης *K. pneumoniae* στην είσοδο και στην έξοδο, ενώ αντίθετα καταγράφεται αύξηση στη δευτεροβάθμια επεξεργασία. Η αυξημένη βροχόπτωση (1,65 mm) και η πτώση της θερμοκρασίας (15,3°C) πιθανόν περιόρισαν τη βακτηριακή δραστηριότητα ή συνέβαλαν στην αραίωση του μικροβιακού φορτίου, μειώνοντας προσωρινά τη συγκέντρωση του παθογόνου. Η αύξηση στη δευτεροβάθμια επεξεργασία ενδέχεται να σχετίζεται με προσωρινή ανακατανομή μικροβίων, ενώ η τελική μείωση στην έξοδο υποδεικνύει αποτελεσματική απολύμανση.

Κατά την 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024), παρατηρήθηκε αναζωπύρωση των συγκεντρώσεων, ιδιαίτερα στην είσοδο, με τιμές που έφτασαν έως  $3 \times 10^7$  CFUs/100 mL. Οι συνθήκες ήταν ευνοϊκές για βακτηριακή ανάπτυξη, με μέση θερμοκρασία 16,1°C, περιορισμένη βροχόπτωση (0,68 mm) και ισχυρούς δυτικούς ανέμους (μέγιστη ταχύτητα 72,4 km/h), οι οποίοι πιθανόν συνέβαλαν και στη μεταφορά ρύπων από παράκτιες περιοχές. Στην 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024), οι συγκεντρώσεις παρέμειναν υψηλές, ειδικά στην είσοδο της μονάδας. Οι πολύ χαμηλές βροχοπτώσεις (0,26 mm) και οι υψηλές θερμοκρασίες (μέση 19°C, μέγιστη 35,3°C) ευνόησαν την επιβίωση και τη συγκέντρωση των μικροοργανισμών, περιορίζοντας ταυτόχρονα τον φυσικό καθαρισμό. Η διατήρηση αυτών των υψηλών τιμών ενδέχεται να σχετίζεται με μειωμένη αποτελεσματικότητα των συστημάτων επεξεργασίας.

Συμπερασματικά, η παρουσία της *K. pneumoniae* στη ΔΕΥΑΧ παρουσιάζει εποχική μεταβλητότητα, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις να εμφανίζονται σε θερμές και ξηρές περιόδους. Η αυξημένη βροχόπτωση και οι χαμηλότερες θερμοκρασίες φαίνεται να συμβάλλουν στη μείωση του μικροβιακού φορτίου, πιθανώς μέσω αραίωσης, ενώ τα μετεωρολογικά φαινόμενα όπως οι άνεμοι επιδρούν στη διασπορά του μικροβίου.



**Διάγραμμα 2.** Ανίχνευση *K. pneumoniae* σε δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ) κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 - Απρίλιος 2024

Κατά την περίοδο μελέτης, η παρουσία της *K. pneumoniae* στις εγκαταστάσεις της ΔΕΥΑΒΑ εμφάνισε σημαντικές διακυμάνσεις, οι οποίες φαίνεται να συνδέονται τόσο με τις κλιματικές συνθήκες όσο και με την απόδοση της επεξεργασίας των λυμάτων (Διάγραμμα 2). Στην 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023), καταγράφηκε αυξημένο μικροβιακό φορτίο τόσο στην είσοδο όσο και στην έξοδο της μονάδας, υποδηλώνοντας πιθανή δυσλειτουργία ή κορεσμό του συστήματος επεξεργασίας. Η υψηλή μέση θερμοκρασία (19,7°C) και η ελάχιστη βροχόπτωση (0,95 mm) δημιούργησαν ευνοϊκές συνθήκες για την επιβίωση και ανάπτυξη του μικροοργανισμού, περιορίζοντας ταυτόχρονα τη φυσική απορροή και την αραίωση του μικροβιακού φορτίου.

Οι συγκεντρώσεις της *K. pneumoniae* παραμένουν σχεδόν αμετάβλητες σε όλα τα στάδια επεξεργασίας σε σχέση με τον Νοέμβριο. Η ελαφρώς αυξημένη συγκέντρωση στη δευτεροβάθμια επεξεργασία μπορεί να αποδοθεί σε μεταβολές της ροής ή στη διαταραχή της ισορροπίας του μικροβιακού φορτίου, χωρίς ουσιαστική αλλαγή στην είσοδο ή στην απόδοση της επεξεργασίας. Οι υδρομετεωρολογικές συνθήκες (1,65 mm βροχόπτωσης και 15,3°C θερμοκρασία) δεν φαίνεται να επηρέασαν σημαντικά την παρουσία του βακτηρίου.

Στην 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024), παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης στην είσοδο και στην έξοδο, σε συνδυασμό με σημαντική αύξηση στη δευτεροβάθμια επεξεργασία. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να υποδεικνύει προσωρινή αποσύνδεση της επεξεργαστικής ικανότητας ή μικροβιακή ανακατανομή εντός της εγκατάστασης. Παράλληλα, η μείωση της βροχόπτωσης (0,68 mm) και η παρουσία ισχυρών δυτικών ανέμων (72,4 km/h) μπορεί να συνέβαλαν σε εξωτερικές εισροές ή στη διασπορά ρύπων, χωρίς όμως να αυξήσουν το φορτίο στην είσοδο.

Κατά την 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024), οι συγκεντρώσεις παρέμειναν υψηλές, κυρίως στην είσοδο της μονάδας. Η μέση θερμοκρασία ανήλθε στους 19°C, ενώ η βροχόπτωση ήταν εξαιρετικά περιορισμένη (0,26 mm), δημιουργώντας συνθήκες που ευνοούν την επιμονή του βακτηρίου. Παρά τη θερμοκρασιακή αύξηση, η αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας φάνηκε μειωμένη, πιθανώς εξαιτίας αυξημένου εισερχόμενου φορτίου ή λειτουργικών παραγόντων της εγκατάστασης. Συμπερασματικά, στη ΔΕΥΑΒΑ, το *K. pneumoniae* παρουσιάζει αυξημένες συγκεντρώσεις κατά περιόδους χαμηλής βροχόπτωσης και υψηλών θερμοκρασιών, ιδιαίτερα στην είσοδο της μονάδας. Οι μετεωρολογικές συνθήκες φαίνεται να επηρεάζουν το μικροβιακό προφίλ, ενώ πιθανές αλλαγές στην απόδοση της επεξεργασίας επιδρούν στην απομάκρυνση του παθογόνου, ειδικά σε περιόδους αυξημένου φορτίου.

#### 4.1.2 *K. pneumoniae* – Φυσικά νερά

Στην συνέχεια, παρουσιάζονται τα διαγράμματα που αποτυπώνουν την παρουσία της *K. pneumoniae* σε φυσικά ύδατα από τρεις διαφορετικές τοποθεσίες (Κουλούρα, Κουμ Καπί και Λίμνη Αγιάς) κατά τη διάρκεια των τεσσάρων δειγματοληψιών, σε συνδυασμό με τα μετεωρολογικά δεδομένα που καταγράφηκαν τις αντίστοιχες περιόδους.

Κατά την υπό μελέτη περίοδο, η παρουσία της *K. pneumoniae* στο Κουμ Καπί εμφανίζεται διακεκομμένη, με ανίχνευση του μικροοργανισμού μόνο από τη 2η δειγματοληψία και έπειτα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει πιθανή περιοδική επιβάρυνση της περιοχής, επηρεαζόμενη από εξωγενείς παράγοντες όπως η απορροή ομβρίων, οι μεταβολές στην ποιότητα των αστικών εκροών ή η επίδραση των καιρικών συνθηκών.



**Διάγραμμα 3.** Ανίχνευση *K. pneumoniae* σε δείγματα θαλασσινού νερού από το Κουμ Καπί κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024

Κατά τη 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023) δεν καταγράφηκε παρουσία του μικροοργανισμού στο Κουμ Καπί, γεγονός που υποδηλώνει είτε χαμηλή μικροβιακή

ρύπανση εκείνη την περίοδο είτε απουσία συνθηκών που να ευνοούν τη μεταφορά του παθογόνου στη συγκεκριμένη ακτή. Στη 2η δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2023) σημειώθηκε η πρώτη ανίχνευση της *K. pneumoniae* (10 CFUs/100 mL), πιθανώς ως αποτέλεσμα της αυξημένης βροχόπτωσης (1,65 mm) που διευκόλυνε την επιφανειακή απορροή και μετέφερε μικροβιακούς ρύπους από το αστικό περιβάλλον ή από πλησιέστερες εστίες μόλυνσης προς την παράκτια ζώνη. Η μέση θερμοκρασία παρέμεινε ευνοϊκή για την επιβίωση του μικροοργανισμού. Κατά την 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024) καταγράφηκε μικρή μείωση στη συγκέντρωση (6 CFUs/100 mL), ωστόσο ο παθογόνος παράγοντας συνέχισε να είναι παρών. Η σχετικά χαμηλή βροχόπτωση (0,68 mm), σε συνδυασμό με τους έντονους δυτικούς ανέμους (μέγιστη ταχύτητα 72,4 km/h), πιθανόν συνέβαλαν στην ανακυκλοφορία και αναδιάταξη του μικροβιακού φορτίου, μεταφέροντας ρύπους στην ακτή.

Στην 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024), *K. pneumoniae* δεν ανιχνεύθηκε στο δείγμα από το Κουμ Καπί, σε αντίθεση με τους προηγούμενους μήνες. Η υψηλή θερμοκρασία (μέγιστη 35,3°C, μέση 19°C) και η ιδιαίτερα χαμηλή βροχόπτωση (0,26 mm) ενδέχεται να μην δημιούργησαν ευνοϊκές συνθήκες για την επιβίωση του βακτηρίου. Επιπλέον, η αυξημένη θερμοκρασία και η ηλιακή ακτινοβολία πιθανόν συνέβαλαν στην αδρανοποίηση ή καταστροφή του παθογόνου, κυρίως σε περιοχές με στάσιμα ή ρηχά νερά.

Συμπερασματικά, η παρουσία της *K. pneumoniae* στο Κουμ Καπί χαρακτηρίζεται από ήπια αλλά επαναλαμβανόμενη εμφάνιση μετά τον Δεκέμβριο 2023. Η μικροβιακή επιβάρυνση φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με εποχιακούς και μετεωρολογικούς παράγοντες, όπως η βροχόπτωση και η διεύθυνση του ανέμου, που επηρεάζουν τη μεταφορά ρύπων από το χερσαίο στο θαλάσσιο περιβάλλον. Η σταδιακή επιμονή του παθογόνου υποδεικνύει την ανάγκη για τακτική παρακολούθηση της ποιότητας των παράκτιων υδάτων και πιθανή αξιολόγηση των πηγών ρύπανσης στο ευρύτερο αστικό περιβάλλον.



**Διάγραμμα 4.** Ανίχνευση *K. pneumoniae* σε δείγματα επιφανειακού νερού από από τη Λίμνη Αγιάς κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024

Η Λίμνη Αγιάς εμφανίζει σταθερή και έντονη παρουσία της *K. pneumoniae* σε όλες τις δειγματοληψίες, σε αντίθεση με τις άλλες περιοχές φυσικών υδάτων, γεγονός που υποδηλώνει μια πιο μόνιμη και εγγενή μικροβιακή επιβάρυνση (Διάγραμμα 4). Το εύρημα αυτό πιθανόν σχετίζεται με τον υγρόστατο και σχετικά στάσιμο χαρακτήρα του υδάτινου σώματος, ο οποίος ευνοεί τη συσσώρευση και τον πολλαπλασιασμό παθογόνων μικροοργανισμών.

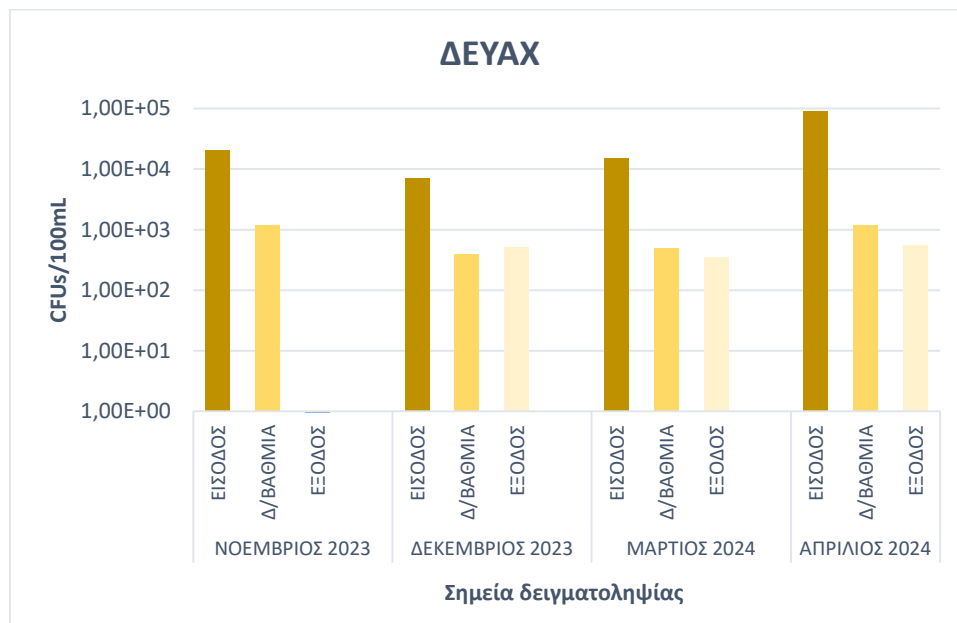
Τον Νοέμβριο 2023, η *K. pneumoniae* ανιχνεύεται σε συγκέντρωση 72 CFUs/100 mL. Οι σχετικά υψηλές θερμοκρασίες (μέση 19,7°C) και η περιορισμένη βροχόπτωση (0,95 mm) συμβάλλουν στη στασιμότητα του νερού και στην έλλειψη φυσικού καθαρισμού, επιτρέποντας την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου. Τον Δεκέμβριο 2023 καταγράφεται αύξηση στη συγκέντρωση (95 CFUs/100 mL), παρά τη μειωμένη θερμοκρασία. Η αύξηση της βροχόπτωσης (1,65 mm) πιθανώς προκάλεσε απορροή από γεωργικές ή αστικές περιοχές, ενισχύοντας την είσοδο ρύπων στη λίμνη, ενώ η ελλιπής ροή εξόδου ευνόησε τη διατήρησή τους.

Τον Μάρτιο 2024 σημειώνεται σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης (140 CFUs/100 mL), η υψηλότερη της περιόδου. Παρά τη μέτρια θερμοκρασία (16,1°C) και τη μειωμένη βροχόπτωση (0,68 mm), η ιδιαίτερα υψηλή ταχύτητα ανέμου (72,4 km/h) από δυτικές διευθύνσεις ενδέχεται να προκάλεσε αναμόχλευση του νερού ή μεταφορά ρύπων μέσω επιφανειακών απορροών. Τον Απρίλιο 2024, η συγκέντρωση παραμένει σταθερή (140 CFUs/100 mL), γεγονός που δείχνει επιμονή του μικροβιακού φορτίου και πιθανή σταθεροποίηση της οικολογικής παρουσίας του παθογόνου. Η αυξημένη θερμοκρασία (μέγιστη 35,3°C) και η πολύ χαμηλή βροχόπτωση (0,26 mm) συνεχίζουν να ευνοούν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου σε περιορισμένα ανανεούμενα ύδατα.

Συμπερασματικά, η Λίμνη Αγιάς λειτουργεί ως σταθερή εστία παρουσίας της *K. pneumoniae* καθόλη τη διάρκεια της παρακολούθησης, ανεξάρτητα από τις εποχιακές διακυμάνσεις. Ο υδρολογικά κλειστός χαρακτήρας της λίμνης, η χαμηλή ροή, και οι θερμοκρασιακές συνθήκες αποτελούν τους βασικούς παράγοντες που υποστηρίζουν την επιμονή του μικροβιακού φορτίου. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν την ανάγκη για συστηματική παρακολούθηση της ποιότητας του νερού στη λίμνη, τόσο από υγειονομική όσο και από περιβαλλοντική σκοπιά.

#### 4.1.3 *S. aureus* – Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων

Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζεται η ποσοτική κατανομή του παθογόνου *S. aureus* σε δείγματα από διάφορα σημεία των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων (ΔΕΥΑΧ και ΔΕΥΑΒΑ) κατά τις τέσσερις δειγματοληψίες.



**Διάγραμμα 5.** Ανίχνευση *S. aureus* σε δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024

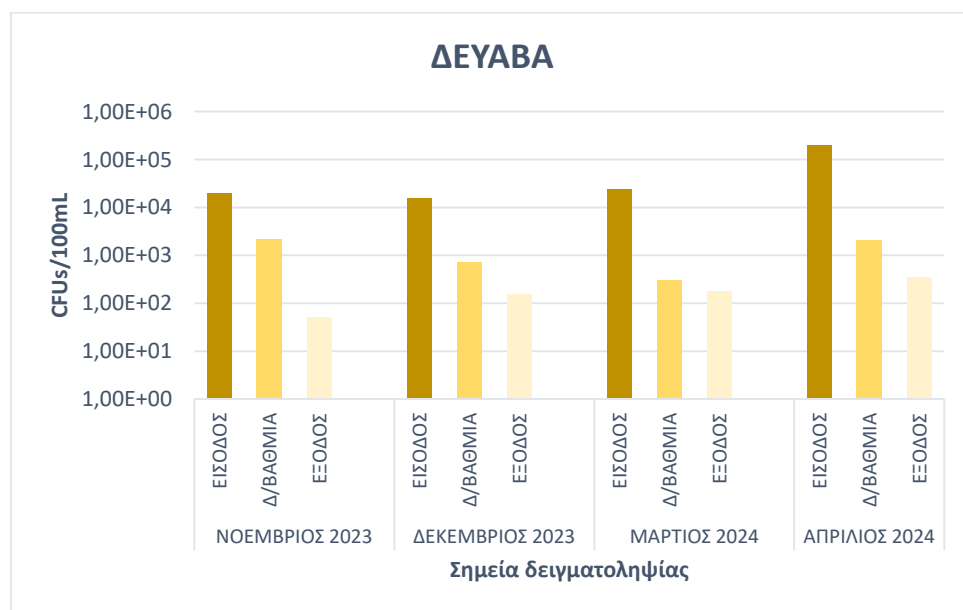
Σύμφωνα με Διάγραμμα 5, κατά την 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023), η είσοδος της ΔΕΥΑΧ παρουσίασε υψηλές τιμές αποικιών *S. aureus* ( $2,10 \times 10^4$  CFUs/100 mL), στην έξοδο καταγράφηκε μηδενικό φορτίο, επιβεβαιώνοντας την ιδιαίτερα υψηλή αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας υπό συνθήκες περιορισμένων βροχοπτώσεων (0,95 mm).

Στη 2η δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2023), το μικροβιακό φορτίο στην είσοδο μειώθηκε στις  $7,00 \times 10^3$  CFUs/100 mL, ενώ η έξοδος κατέγραψε  $5,20 \times 10^2$  CFUs/100 mL, διατηρώντας καλή αποδοτικότητα παρά τη μέτρια βροχόπτωση (1,65 mm).

Κατά την 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024), η είσοδος σημείωσε νέα αύξηση στα  $1,50 \times 10^4$  CFUs/100 mL, με αντίστοιχη επιβάρυνση και στην έξοδο ( $3,50 \times 10^2$  CFUs/100 mL), γεγονός που υποδεικνύει πιθανή επιρροή από επιφανειακές απορροές ή αλλαγές στη σύσταση του φορτίου.

Τέλος, στην 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024) παρατηρείται αύξηση φορτίου στην είσοδο, με τιμή  $9,00 \times 10^4$  CFUs/100 mL, ενώ και η έξοδος φτάνει τα  $5,50 \times 10^2$  CFUs/100 mL. Η σχεδόν πλήρης απουσία βροχόπτωσης (0,26 mm) και οι αυξημένες θερμοκρασίες πιθανώς συνέβαλαν στην ενίσχυση του μικροβιακού φορτίου στα ανεπεξέργαστα λύματα. Συνολικά, η μονάδα της ΔΕΥΑΧ επιδεικνύει αποτελεσματική απομάκρυνση του *S. aureus*, ωστόσο η αυξημένη μικροβιακή φόρτιση την άνοιξη υπογραμμίζει την ανάγκη για συνεχόμενη παρακολούθηση και ενδεχομένως ενίσχυση των μέτρων διαχείρισης μικροβιακής μόλυνσης.

Σύμφωνα με τα δεδομένα, κατά την 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023), η ΔΕΥΑΒΑ Δευτεροβάθμια παρουσίασε υψηλές τιμές *S. aureus* ( $2,00 \times 10^4$  CFUs/100 mL), ενώ η έξοδος εμφάνισε την χαμηλότερη τιμή μεταξύ των δειγματοληψιών ( $5,00 \times 10^1$  CFUs/100 mL), υποδεικνύοντας υψηλή αποτελεσματικότητα στην επεξεργασία των λυμάτων (Διάγραμμα 6). Οι ήπιες καιρικές συνθήκες και οι περιορισμένες βροχοπτώσεις (0,95 mm) συνέβαλαν στην ομαλή λειτουργία του συστήματος.



**Διάγραμμα 6.** Ανίχνευση *S. aureus* σε δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ) κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 - Απρίλιος 2024

Κατά τη 2η δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2023), η είσοδος διατήρησε σημαντικά επίπεδα *S. aureus* ( $1,50 \times 10^4$  CFUs/100 mL), ενώ η έξοδος παρουσίασε αύξηση σε σχέση με την πρώτη δειγματοληψία, αλλά παραμένει χαμηλή ( $1,50 \times 10^2$  CFUs/100 mL). Η αυξημένη βροχόπτωση (1,65 mm) πιθανώς προκάλεσε αραιώσεις στα εισερχόμενα λύματα και αύξηση της μικροβιακής φόρτισης από επιφανειακές απορροές.

Στην 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024), οι τιμές του *S. aureus* στην είσοδο παρουσίασαν άνοδο, φτάνοντας τα  $2,40 \times 10^4$  CFUs/100 mL, ενώ η έξοδος ακολούθησε ανοδική τάση με τιμές  $1,80 \times 10^3$  CFUs/100 mL. Παρά τις περιορισμένες βροχοπτώσεις (0,68 mm), η αυξημένη παρουσία ανέμου ενδέχεται να ενίσχυσε τις απορροές μικροβίων από το περιβάλλον προς το δίκτυο αποχέτευσης.

Τέλος, στην 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024), καταγράφεται η υψηλότερη τιμή όλων των δειγματοληψιών στην είσοδο ( $2,00 \times 10^5$  CFUs/100 mL), ενώ και η έξοδος σημείωσε σημαντική αύξηση ( $3,50 \times 10^2$  CFUs/100 mL). Η σχεδόν πλήρης απουσία βροχόπτωσης (0,26 mm) και η αυξημένη θερμοκρασία πιθανόν ενίσχυσαν την ανάπτυξη του *S. aureus*, οδηγώντας σε υψηλότερη μικροβιακή επιβάρυνση στα εισερχόμενα λύματα. Παρόλα αυτά, η μονάδα παραμένει ικανή να μειώνει αισθητά το φορτίο του παθογόνου μικροοργανισμού.

Συνολικά, η ΔΕΥΑΒΑ παρουσιάζει πιο αποδοτική επεξεργασία λυμάτων για τον *S. aureus*, ειδικά κατά τις πρώτες δύο δειγματοληψίες. Ωστόσο, η άνοδος του μικροβιακού φορτίου την άνοιξη αναδεικνύει την ανάγκη για συνεχόμενη παρακολούθηση και πιθανή ενίσχυση των μέτρων ελέγχου.

#### 4.1.4 *S. aureus* – Φυσικά νερά



**Διάγραμμα 7.** Ανίχνευση *S. aureus* σε δείγματα θαλασσινού νερού από το Κουμ Καπί κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024

Κατά την 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023), ο *S. aureus* δεν ανιχνεύθηκε στην περιοχή του Κουμ Καπί, γεγονός που υποδηλώνει χαμηλή ή μηδαμινή μικροβιακή επιβάρυνση εκείνη την περίοδο (Διάγραμμα 7). Στη 2η δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2023),



ο μικροοργανισμός εντοπίστηκε για πρώτη φορά με συγκέντρωση 15 CFUs/100 mL, υποδηλώνοντας την εμφάνιση ή εισροή παθογόνων μικροοργανισμών στην περιοχή. Η αύξηση αυτή συνέπεσε με πτώση της θερμοκρασίας (15,3°C) και αυξημένη βροχόπτωση (1,65 mm), η οποία πιθανώς συνέβαλε στη μεταφορά μικροβίων μέσω επιφανειακών απορροών από γειτονικές αστικές ή αγροτικές περιοχές.

Κατά την 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024), η συγκέντρωση του *S. aureus* σημειώθηκε μικρή μείωση στα 9 CFUs/100 mL, με σταθερή θερμοκρασία 16,1°C και περιορισμένη βροχόπτωση (0,68 mm). Η έντονη ατμοσφαιρική δραστηριότητα (μέγιστη ταχύτητα ανέμου 72,4 km/h) πιθανώς συνέβαλε στην επιφανειακή διασπορά παθογόνων και επηρέασε την τοπική μικροβιακή εικόνα.

Τέλος, στην 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024), καταγράφηκε η υψηλότερη συγκέντρωση *S. aureus* στο Κουμ Καπί (150 CFUs/100 mL), υποδεικνύοντας πιθανή επιμόλυνση από ανθρωπογενείς ή περιβαλλοντικούς παράγοντες, ενδεχομένως σχετιζόμενη με αυξημένες δραστηριότητες στην περιοχή ή βελτιωμένες συνθήκες επιβίωσης για το παθογόνο.

Συνολικά, η παρουσία του *S. aureus* στο Κουμ Καπί δεν παρουσιάζει σταθερή αύξηση, αλλά κυμαινόμενη τάση με σημαντική κορύφωση τον Απρίλιο. Τα δεδομένα αυτά υπογραμμίζουν τη δυναμική φύση της μικροβιακής ρύπανσης σε παράκτιες ζώνες και καθιστούν απαραίτητη τη συστηματική παρακολούθηση της ποιότητας του νερού.



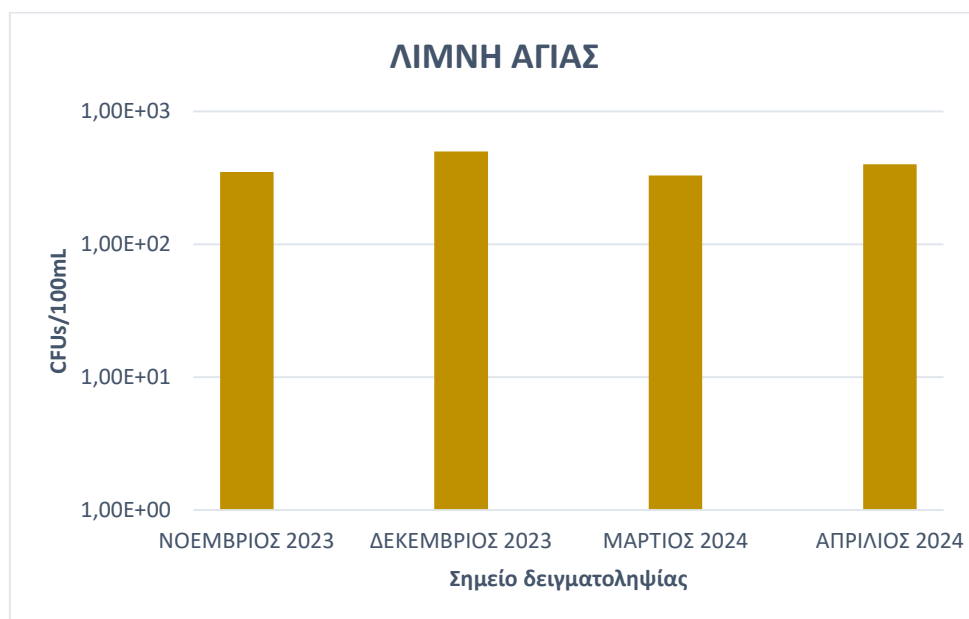
**Διάγραμμα 8.** Ανίχνευση *S. aureus* σε δείγματα θαλασσινού νερού από την Κουλούρα κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024

Κατά την 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023), ο *S. aureus* ανιχνεύθηκε σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση (7 CFUs/100 mL), υποδεικνύοντας την παρουσία του μικροοργανισμού στην περιοχή, πιθανόν λόγω τοπικών πηγών ρύπανσης ή στασιμότητας των υδάτων (Διάγραμμα 8). Οι υψηλές θερμοκρασίες (19,7°C) και η περιορισμένη βροχόπτωση (0,95 mm) ευνόησαν τη διατήρηση του μικροβιακού φορτίου. Στη 2η

δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2023), η συγκέντρωση του *S. aureus* στην Κουλούρα μειώθηκε σημαντικά, με μηδενική ανίχνευση του μικροοργανισμού. Η πτώση αυτή πιθανόν σχετίζεται με την αυξημένη βροχόπτωση (1,65 mm) και τη μείωση της θερμοκρασίας (15,3°C), που ευνόησαν την αραιωση και απομάκρυνση των βακτηρίων.

Κατά την 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024), παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης σε 10 CFUs/100 mL, σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας (16,1°C) και περιορισμένης βροχόπτωσης (0,68 mm). Η έντονη ατμοσφαιρική δραστηριότητα με ισχυρούς ανέμους (μέγιστη ταχύτητα 72,4 km/h) πιθανώς συνέβαλε στη διασπορά μικροβίων στην περιοχή. Στην 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024), η συγκέντρωση του *S. aureus* αυξήθηκε σημαντικά φτάνοντας τα 95 CFUs/100 mL. Οι ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, με υψηλή θερμοκρασία (19,0°C), σχεδόν μηδενική βροχόπτωση (0,26 mm) και μέτρια ταχύτητα ανέμου (5,9 km/h) συνέβαλαν στην ενίσχυση της μικροβιακής επιβίωσης και συσσώρευσης.

Συνολικά, η παρουσία του *S. aureus* στην Κουλούρα εμφανίζει διακυμάνσεις που σχετίζονται στενά με τις καιρικές συνθήκες, ιδιαίτερα τη θερμοκρασία και τη βροχόπτωση, καθώς και την ατμοσφαιρική δραστηριότητα. Η ανάγκη για συνεχόμενη παρακολούθηση παραμένει κρίσιμη για την αξιολόγηση της ποιότητας των φυσικών υδάτων στην περιοχή.



**Διάγραμμα 9.** Ανίχνευση *S. aureus* σε δείγματα επιφανειακού νερού από τη Λίμνη Αγίας κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024

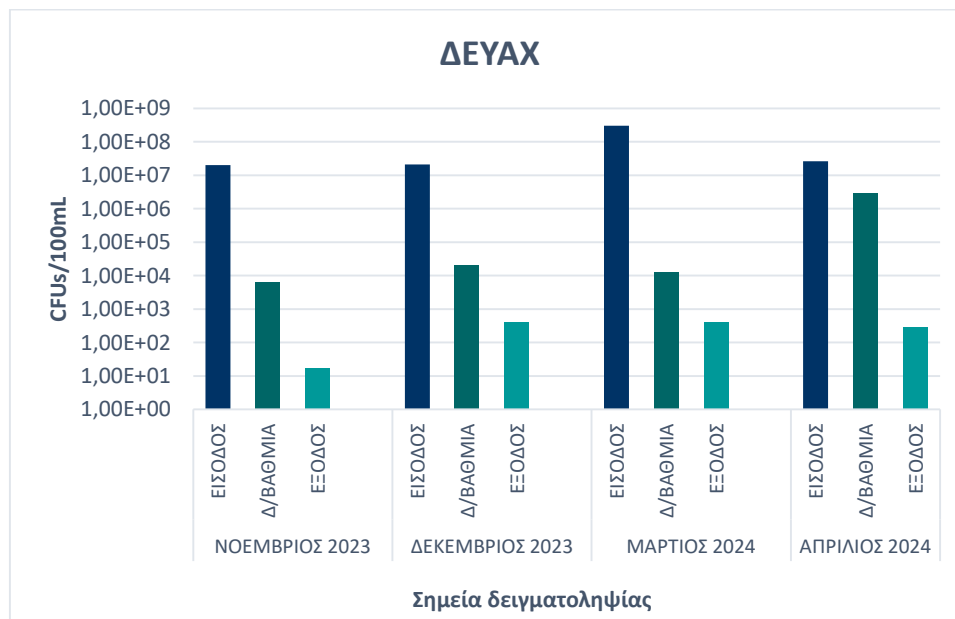
Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 9, κατά την 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023), η Λίμνη Αγίας παρουσίασε σημαντική συγκέντρωση *S. aureus*, με  $3,5 \times 10^2$  CFUs/100 mL, γεγονός που πιθανόν οφείλεται στη γεωμορφολογία της και τη στασιμότητα των νερών, οι οποίες ευνοούν τη συγκράτηση μικροβιακού φορτίου. Η σχετικά υψηλή θερμοκρασία (19,7°C) και η περιορισμένη βροχόπτωση (0,95 mm) συνέβαλαν στη διατήρηση αυτών των τιμών. Στη 2η δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2023), η συγκέντρωση αυξήθηκε σε  $5,0 \times 10^2$  CFUs/100 mL, παρά την πτώση της θερμοκρασίας (15,3°C). Η

αυξημένη βροχόπτωση (1,65 mm) πιθανώς προκάλεσε μεταφορά μικροβίων μέσω επιφανειακών απορροών, αυξάνοντας το μικροβιακό φορτίο στη λίμνη.

Κατά την 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024), η συγκέντρωση παρέμεινε υψηλή (330 CFUs/100 mL), παρά τη σταθερή θερμοκρασία (16,1°C) και την περιορισμένη βροχόπτωση (0,68 mm). Η έντονη ατμοσφαιρική δραστηριότητα με ισχυρούς ανέμους (μέγιστη ταχύτητα 72,4 km/h) συνέβαλε πιθανώς στη διασπορά των μικροβίων και τη διατήρηση του υψηλού μικροβιακού φορτίου. Στην 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024), καταγράφηκε μικρή αύξηση στη συγκέντρωση του παθογόνου (400 CFUs/100 mL), υπό ευνοϊκές συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (19,0°C), σχεδόν μηδενικής βροχόπτωσης (0,26 mm) και μέτριας ταχύτητας ανέμου (5,9 km/h). Οι συνθήκες αυτές ευνόησαν την επιβίωση και την συσσώρευση του βακτηρίου στη λίμνη.

Συνολικά, η Λίμνη Αγιάς αποτελεί το κυρίαρχο σημείο εμφάνισης του *S. aureus* στις φυσικές υδάτινες περιοχές, με σταθερή παρουσία του μικροοργανισμού καθ' όλη τη διάρκεια των δειγματοληψιών. Οι διακυμάνσεις του μικροβιακού φορτίου συνδέονται στενά με τις μετεωρολογικές συνθήκες, κυρίως τη θερμοκρασία, τη βροχόπτωση και την ατμοσφαιρική δραστηριότητα, καθιστώντας επιτακτική τη συνεχή παρακολούθηση και διαχείριση της ποιότητας των υδάτων.

#### 4.1.5 *Enterobacter sp.* – Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων



**Διάγραμμα 10.** Ανίχνευση *Enterobacter sp.* σε δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024

Κατά την 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023), η είσοδος της μονάδας ΔΕΥΑΧ παρουσίασε υψηλές συγκεντρώσεις *Enterobacter sp.* ( $2 \times 10^7$  CFUs/100 mL), υποδεικνύοντας σημαντικό μικροβιακό φορτίο στα εισερχόμενα λύματα (Διάγραμμα 10). Η έξοδος εμφάνισε πολύ χαμηλές τιμές ( $<10^2$  CFUs/100 mL), αποδεικνύοντας την καλή

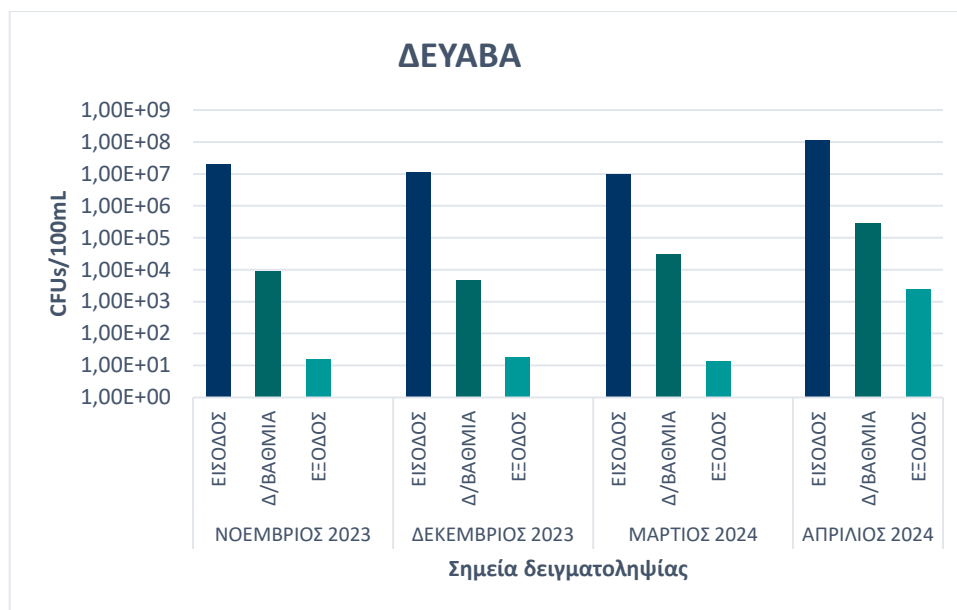
απόδοση της μονάδας στον καθαρισμό των λυμάτων. Οι ευνοϊκές καιρικές συνθήκες, με μέση θερμοκρασία 19,7°C και ελάχιστη βροχόπτωση (0,95 mm), συνέβαλαν στη συγκράτηση του μικροβιακού φορτίου στις εισροές χωρίς σημαντική διασπορά στο περιβάλλον.

Κατά τη 2η δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2023), τα φορτία εισόδου παρέμειναν υψηλά ( $2,1 \times 10^7$  CFUs/100 mL), ενώ παρατηρήθηκε αύξηση στις τιμές εξόδου στη δευτεροβάθμια επεξεργασία ( $2 \times 10^4$  CFUs/100 mL). Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες (15,3°C) και η αυξημένη βροχόπτωση (1,65 mm) πιθανόν επιβράδυναν τη μικροβιακή αποδόμηση, ίσως λόγω αυξημένου υδραυλικού φορτίου και ελαττωμένης αποδοτικότητας.

Η 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024) έδειξε σημαντική αύξηση στο φορτίο εισόδου ( $3 \times 10^8$  CFUs/100 mL), την υψηλότερη τιμή της μελέτης, πιθανώς συνδεόμενη με τις έντονες ατμοσφαιρικές συνθήκες (άνεμοι 72,4 km/h) που ενίσχυσαν τη μεταφορά ρυπαντών. Παρότι τα εισερχόμενα φορτία ήταν αυξημένα, η έξοδος παρέμεινε σε σχετικά χαμηλά επίπεδα ( $< 10^4$  CFUs/100 mL), επιβεβαιώνοντας την ικανότητα της μονάδας στη μείωση του μικροβιακού φορτίου.

Κατά την 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024), παρατηρήθηκε μείωση του φορτίου εισόδου ( $2,6 \times 10^7$  CFUs/100 mL), ενώ οι τιμές στην δευτεροβάθμια επεξεργασία αυξήθηκαν σημαντικά ( $2,85 \times 10^6$  CFUs/100 mL). Οι ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες (υψηλή θερμοκρασία 19°C, εξαιρετικά χαμηλή βροχόπτωση 0,26 mm και ήπιος άνεμος) πιθανόν ενίσχυσαν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του *Enterobacter sp.* εντός του συστήματος, πιθανόν σε συνδυασμό με τη δημιουργία βιοφίλμ ή ανεπαρκή απολυμαντική δράση.

Συνολικά, η μονάδα ΔΕΥΑΧ δέχεται υψηλά μικροβιακά φορτία *Enterobacter sp.* στις εισόδους καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, με ικανοποιητική μείωση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, αν και η αυξημένη παρουσία του μικροβίου στις εξόδους τον Απρίλιο υπογραμμίζει την ανάγκη για βελτίωση της διαχείρισης και απολύμανσης εντός της μονάδας.



**Διάγραμμα 11.** Ανίχνευση *Enterobacter sp.* σε δείγματα από την εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ) κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 - Απρίλιος 2024

Κατά την 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023), η είσοδος της μονάδας ΔΕΥΑΒΑ παρουσίασε υψηλές συγκεντρώσεις *Enterobacter sp.* ( $2 \times 10^7$  CFUs/100 mL), υποδεικνύοντας σημαντική ρύπανση των εισερχόμενων λυμάτων (Διάγραμμα 11). Η δευτεροβάθμια επεξεργασία μείωσε το φορτίο στα  $8,80 \times 10^3$  CFUs/100 mL, ενώ στην έξοδο καταγράφηκαν χαμηλά επίπεδα ( $1,60 \times 10^1$  CFUs/100 mL), υποδεικνύοντας αποτελεσματική λειτουργία της μονάδας καθαρισμού κατά την περίοδο αυτή.

Κατά τη 2η δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2023), το φορτίο εισόδου παρέμεινε υψηλό ( $1,14 \times 10^7$  CFUs/100 mL), με παρόμοια επίπεδα δευτεροβάθμιας επεξεργασίας ( $4,70 \times 10^3$  CFUs/100 mL) και ελαφρώς αυξημένες τιμές εξόδου ( $1,80 \times 10^1$  CFUs/100 mL) σε σχέση με τον προηγούμενο μήνα. Οι ψυχρότερες και υγρότερες συνθήκες ( $15,3^\circ\text{C}$ , 1,65 mm βροχόπτωσης) ενδέχεται να επηρέασαν αρνητικά την αποδοτικότητα της εγκατάστασης, πιθανώς λόγω αυξημένου υδραυλικού φορτίου ή αναστολής της βιολογικής δραστηριότητας.

Κατά την 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024), η είσοδος διατήρησε υψηλά επίπεδα *Enterobacter sp.* ( $1 \times 10^7$  CFUs/100 mL), ενώ οι έξοδοι παρέμειναν σε σχετικά χαμηλά επίπεδα ( $<10^4$  CFUs/100 mL). Η παρουσία ισχυρών ανέμων ( $72,4 \text{ km/h}$ ) πιθανώς ευνόησε τη διασπορά μικροβίων. Στην 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024), τα επίπεδα εισόδου αυξήθηκαν σημαντικά ( $1,15 \times 10^8$  CFUs/100 mL), ενώ οι έξοδοι παρουσίασαν αξιοσημείωτη αύξηση ( $3 \times 10^5$  CFUs/100 mL). Οι ευνοϊκές για την ανάπτυξη του μικροβίου συνθήκες (υψηλή θερμοκρασία  $19^\circ\text{C}$ , πολύ χαμηλή βροχόπτωση 0,26 mm, ήπιος άνεμος) πιθανόν ενίσχυσαν τη μικροβιακή επιβίωση και πολλαπλασιασμό εντός της μονάδας, υποδεικνύοντας πιθανές αδυναμίες στη βιολογική ή απολυμαντική διαδικασία.

Συνολικά, η ΔΕΥΑΒΑ δέχεται σταθερά υψηλά φορτία *Enterobacter sp.* στις εισόδους, ενώ η απόδοση καθαρισμού είναι καλή αλλά όχι απόλυτα αποτελεσματική,

ιδίως το Απρίλιο όπου παρατηρούνται αυξημένα μικροβιακά υπολείμματα στις εξόδους. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η βροχόπτωση και οι άνεμοι, φαίνεται να επηρεάζουν τη μικροβιακή δυναμική εντός του συστήματος.

#### 4.1.6 *Enterobacter sp.* – Φυσικά νερά

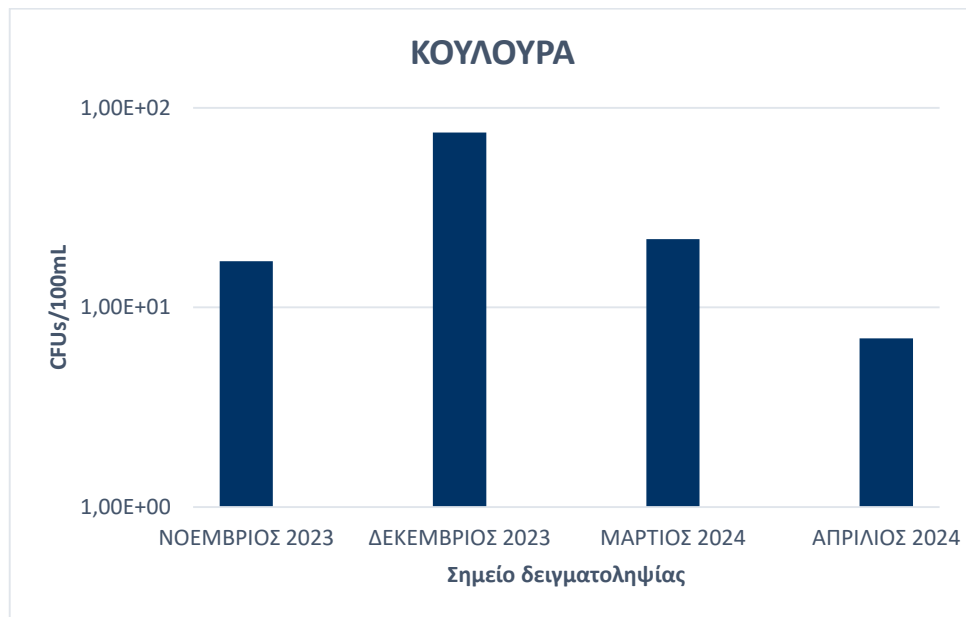


**Διάγραμμα 12.** Ανίχνευση *Enterobacter sp.* σε δείγματα θαλασσινού νερού από το Κουμ Καπί κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024

Κατά την 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023), το *Enterobacter sp.* ανιχνεύθηκε στο Κουμ Καπί σε χαμηλή σχετικά συγκέντρωση (18 CFUs/100 mL) (Διάγραμμα 12). Η υψηλή θερμοκρασία (19,7°C) και η περιορισμένη βροχόπτωση (0,95 mm) δημιουργούσαν συνθήκες ευνοϊκές για την επιβίωση μικροοργανισμών σε ήρεμα ή σχετικά στασιμότερα νερά. Στη 2η δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2023), παρατηρήθηκε αύξηση του μικροβιακού φορτίου στο Κουμ Καπί (180 CFUs/100 mL), πιθανώς λόγω της αυξημένης βροχόπτωσης (1,65 mm) που ενίσχυσε την επιφανειακή απορροή και τη μεταφορά μικροβίων από αστικές ή γεωργικές περιοχές προς την παράκτια ζώνη.

Κατά την 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024), οι συγκεντρώσεις παρέμειναν σε σχετικά υψηλά επίπεδα (140 CFUs/100 mL), παρά την ελαφρώς χαμηλότερη θερμοκρασία (16,1°C) και την περιορισμένη βροχόπτωση (0,68 mm). Οι έντονοι άνεμοι (72,4 km/h) πιθανώς συνέβαλαν στη διασπορά και αναμόχλευση μικροβίων, διατηρώντας σταθερά υψηλό το φορτίο. Στην 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024), το μικροβιακό φορτίο μειώθηκε σημαντικά (6 CFUs/100 mL), σε συνθήκες πολύ χαμηλής βροχόπτωσης (0,26 mm) και ήπιων ανέμων, γεγονός που πιθανώς συνέβαλε στη μείωση της μεταφοράς μικροβίων στην περιοχή.

Συνολικά, το *Enterobacter sp.* στο Κουμ Καπί παρουσίασε εποχικές διακυμάνσεις, με αυξήσεις κατά τη διάρκεια περιόδων βροχόπτωσης και ισχυρών ανέμων, που ευνοούν τη μεταφορά μικροβίων από τις αστικές και γεωργικές ζώνες προς την παράκτια περιοχή. Η μείωση των συγκεντρώσεων σε πιο ξηρές και ήπιες καιρικές συνθήκες υπογραμμίζει την ισχυρή επίδραση των μετεωρολογικών παραγόντων στη μικροβιακή δυναμική.



**Διάγραμμα 13.** Ανίχνευση *Enterobacter sp.* σε δείγματα θαλασσινού νερού από την Κουλούρα κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 13, κατά την 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023), το *Enterobacter sp.* ανιχνεύθηκε σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση (17 CFUs/100 mL). Οι υψηλές θερμοκρασίες (19,7°C) και η περιορισμένη βροχόπτωση (0,95 mm) δημιούργησαν ευνοϊκές συνθήκες για την επιβίωση μικροοργανισμών, αν και η Κουλούρα, ως παράκτια ζώνη με πιθανότερη κίνηση νερών, διατήρησε χαμηλότερο μικροβιακό φορτίο σε σχέση με τη λίμνη. Στη 2η δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2023), παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση (75 CFUs/100 mL), που πιθανόν συνδέεται με την αυξημένη βροχόπτωση (1,65 mm) και τις επιφανειακές απορροές που μεταφέρουν μικροοργανισμούς από αστικές ή γεωργικές περιοχές.

Κατά την 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024), το φορτίο μειώθηκε αισθητά (22 CFUs/100 mL), παρά τις σταθερές σχετικές θερμοκρασίες και τους ισχυρούς ανέμους (72,4 km/h). Η αυξημένη κυκλοφορία νερών και η αναμόχλευση πιθανώς συνέβαλαν στην ανακατανομή και ενδεχομένως στην αραίωση των μικροβίων. Στην 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024), η συγκέντρωση μειώθηκε ακόμη περισσότερο (7 CFUs/100 mL), σε συνθήκες χαμηλής βροχόπτωσης (0,26 mm) και ήπιων ανέμων, που φαίνεται να ευνόησαν τη μείωση του μικροβιακού φορτίου.

Συνολικά, το *Enterobacter sp.* στην Κουλούρα παρουσίασε μικρές αλλά αξιοσημείωτες μεταβολές, με τις βροχοπτώσεις να σχετίζονται με αυξήσεις του μικροβιακού φορτίου και τους ανέμους και την κυκλοφορία νερών να παίζουν ρόλο στη μείωση ή ανακατανομή του.



**Διάγραμμα 14.** Ανίχνευση *Enterobacter sp.* σε δείγματα επιφανειακού νερού από τη Λίμνη Αγιάς κατά την περίοδο Νοέμβριος 2023 – Απρίλιος 2024

Κατά την 1η δειγματοληψία (Νοέμβριος 2023), η Λίμνη Αγιάς παρουσίασε σημαντικά υψηλότερο μικροβιακό φορτίο *Enterobacter sp.* (670 CFUs/100 mL) σε σχέση με τις άλλες περιοχές, όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 14. Οι υψηλές θερμοκρασίες (19,7°C) και η ελάχιστη βροχόπτωση (0,95 mm) ευνόησαν τη συγκράτηση και ανάπτυξη μικροοργανισμών στα στασιμότερα ύδατα της λίμνης, όπου η κυκλοφορία νερού είναι περιορισμένη.

Στη 2η δειγματοληψία (Δεκέμβριος 2023), το φορτίο αυξήθηκε περαιτέρω (1.020 CFUs/100 mL), πιθανόν λόγω των αυξημένων βροχοπτώσεων (1,65 mm) που προκάλεσαν επιφανειακές απορροές και μεταφορά μικροβίων από τις γύρω αστικές και γεωργικές περιοχές στην λίμνη.

Κατά την 3η δειγματοληψία (Μάρτιος 2024), παρά τη μικρή πτώση στις θερμοκρασίες και τη μέτρια βροχόπτωση (0,68 mm), η Λίμνη Αγιάς διατήρησε υψηλές συγκεντρώσεις (770 CFUs/100 mL). Η παρουσία ισχυρών ανέμων (72,4 km/h) πιθανώς συνέβαλε στην αναμόχλευση βακτηρίων από το βυθό προς την επιφάνεια, διατηρώντας το μικροβιακό φορτίο σε υψηλά επίπεδα.

Στην 4η δειγματοληψία (Απρίλιος 2024), το *Enterobacter sp.* διατήρησε την πρωτιά στη λίμνη με 1.100 CFUs/100 mL. Οι πολύ χαμηλές βροχοπτώσεις (0,26 mm) και



οι ήπιες ανέμοι ευνόησαν τη συγκράτηση και επιβίωση του βακτηρίου στο ζεστό και σχετικά ήσυχο υδάτινο περιβάλλον της λίμνης.

Συνολικά, η Λίμνη Αγιάς φαίνεται να αποτελεί σταθερό αποθετήριο υψηλών φορτίων *Enterobacter sp.*, όπου οι υδρολογικές και μετεωρολογικές συνθήκες όπως η στάθμη βροχής, η θερμοκρασία και η κυκλοφορία νερών επηρεάζουν καθοριστικά τη διακύμανση του μικροβιακού φορτίου. Η περιορισμένη κυκλοφορία νερού και η αυξημένη θερμοκρασία δημιουργούν ιδανικές συνθήκες για τη συσσώρευση και επιβίωση των μικροοργανισμών.

Η παρουσία παθογόνων και εν δυνάμει παθογόνων μικροοργανισμών σε φυσικές υδάτινες πηγές και εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται άρρηκτα με τις εκάστοτε κλιματολογικές συνθήκες και τις εποχικές μεταβολές. Οι αλλαγές στη θερμοκρασία, τα επίπεδα θρεπτικών ουσιών, η ηλιακή ακτινοβολία, καθώς και η σταθερότητα της υδατικής στρωμάτωσης διαμορφώνουν ένα δυναμικό οικολογικό περιβάλλον, που επηρεάζει άμεσα την ικανότητα ορισμένων βακτηρίων να πολλαπλασιάζονται ή να επιβιώνουν.

Μια χαρακτηριστική περίπτωση είναι η εποχιακή μαζική αύξηση των κολοβακτηριοειδών *Enterobacter sp.* σε ταμιευτήρες και λίμνες πόσιμου νερού, κυρίως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού. Η αύξηση αυτή δεν σχετίζεται με κοπρανώδη ρύπανση αλλά είναι αποτέλεσμα αυτοχθόνων διεργασιών εντός του υδάτινου σώματος, ιδιαίτερα κατά τις περιόδους θερινής στρωμάτωσης, όπου η υδατική στήλη παραμένει θερμικά διαστρωματωμένη και σταθερή για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Leister & Hügler, 2022).

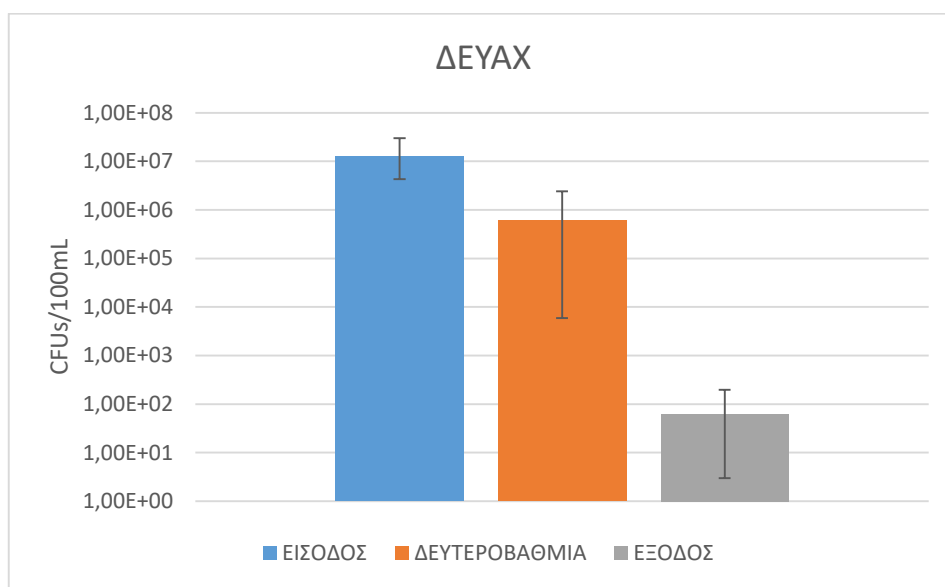
Η αύξηση της θερμοκρασίας του νερού τους καλοκαιρινούς μήνες, σε συνδυασμό με τον θάνατο των φυτοπλαγκτονικών οργανισμών, οδηγεί σε απελευθέρωση διαλυτών οργανικών ουσιών (DOM), όπως αμινοξέα, σακχαρίτες, πολυσακχαρίτες (π.χ. αλγινικό οξύ, χιτίνη), και άλλα υποστρώματα που αξιοποιούνται από βακτήρια όπως τα *E. asburiae* και *Lelliottia*. Αυτή η διατροφική διαθεσιμότητα, σε συνδυασμό με την σταθερότητα του περιβάλλοντος (έλλειψη ανάμειξης λόγω απουσίας ανακυκλοφορίας της στήλης νερού), δημιουργεί ιδανικές συνθήκες για ραγδαίο πολλαπλασιασμό των εν λόγω βακτηρίων. Επιπλέον, τα βακτήρια αυτά φαίνεται να εμφανίζουν γονιδιακή προσαρμογή σε περιβάλλοντα με χαμηλά επίπεδα αζώτου και φωσφόρου, στοιχείο χαρακτηριστικό των ολιγότροφων οικοσυστημάτων.

Η συχνότητα εμφάνισης αυτών των περιβαλλοντικών «ανθοφοριών» κολοβακτηριοειδών ενδέχεται να αυξηθεί στο μέλλον εξαιτίας της κλιματικής αλλαγής, η οποία συνδέεται με παρατεταμένες θερμές περιόδους, χαμηλή βροχόπτωση και αυξημένη θερμοκρασία του νερού. Οι παράγοντες αυτοί οδηγούν σε πιο σταθερή και μακρόχρονη θερινή στρωμάτωση, ευνοώντας τις συνθήκες μαζικής ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Αυτή η εξέλιξη καθιστά επιτακτική τη συνεχή παρακολούθηση των μικροβιολογικών παραμέτρων σε επιφανειακά ύδατα, ιδιαίτερα σε περιοχές με εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων και χρήσεις σχετικές με πόσιμο νερό ή αναψυχή (Leister & Hügler, 2022).

## 4.2 Συνολική παρουσία των βακτηρίων στους σταθμούς δειγματοληψίας

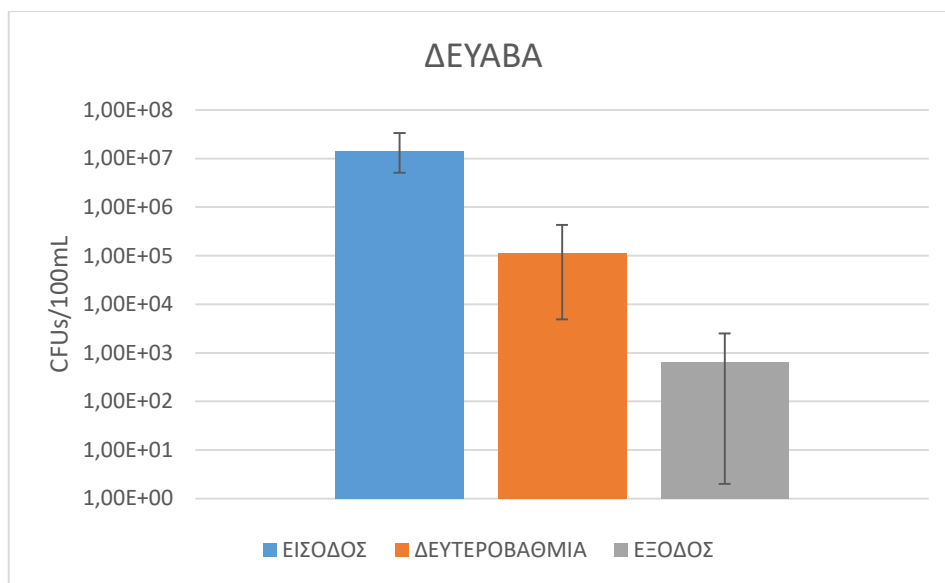
Στη συνέχεια, παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η παρουσία καθενός παθογόνου μικροοργανισμού στα σημεία δειγματοληψίας. Από την ανάλυση, θα αναδειχθούν οι τάσεις ρύπανσης και οι πιθανές πηγές μικροβιακής επιβάρυνσης, συμβάλλοντας στην καλύτερη κατανόηση και διαχείριση των περιβαλλοντικών κινδύνων.

### ο *K. pneumoniae*



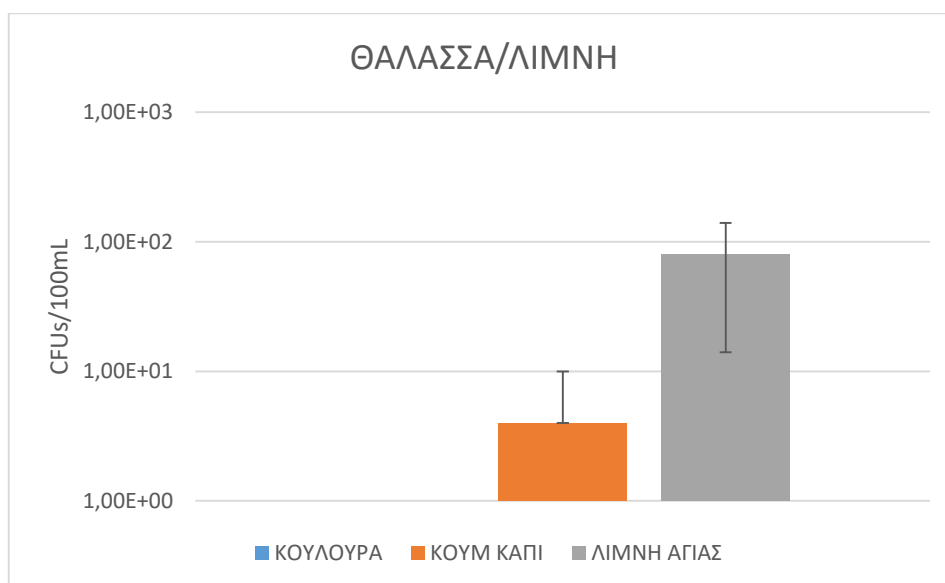
**Διάγραμμα 15.** Παρουσία της *K. pneumoniae* στα δείγματα από τη ΔΕΥΑΧ

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 15, η συγκέντρωση της *K. pneumoniae* μειώνεται σημαντικά από την είσοδο ( $\sim 1.25 \times 10^7$  CFUs/100mL) προς την έξοδο ( $\sim 6.23 \times 10^1$  CFUs/100mL). Στη δευτεροβάθμια επεξεργασία, η τιμή μειώνεται ( $\sim 6.07 \times 10^5$  CFUs/100mL), αλλά με σχετικά υψηλή διακύμανση. Διαπιστώνεται ότι η αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας ποικίλλει, ειδικά στο ενδιάμεσο στάδιο.



**Διάγραμμα 16.** Παρουσία της *K. pneumoniae* στα δείγματα από τη ΔΕΥΑΒΑ

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 16, η αρχική συγκέντρωση της *K. pneumoniae* είναι ιδιαίτερα υψηλή ( $\sim 1.42 \times 10^7$  CFUs/100mL), ωστόσο μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία παρατηρείται σημαντική μείωση ( $\sim 1.15 \times 10^5$  CFUs/100mL), γεγονός που καταδεικνύει την αποτελεσματικότητα του συστήματος. Συγκριτικά, η ΔΕΥΑΧ εμφανίζει καλύτερη συνολική απομάκρυνση της *K. pneumoniae*, πιθανώς λόγω πιο αποτελεσματικής απολύμανσης στο τελικό στάδιο. Αντίθετα, στη ΔΕΥΑΒΑ, η διακύμανση του βακτηρίου στα δείγματα κατόπιν της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας είναι μικρότερη, υποδηλώνοντας πιο σταθερή διαδικασία σε αυτό το στάδιο. Ωστόσο, τα δείγματα εξόδου περιέχουν περισσότερα βακτήρια.



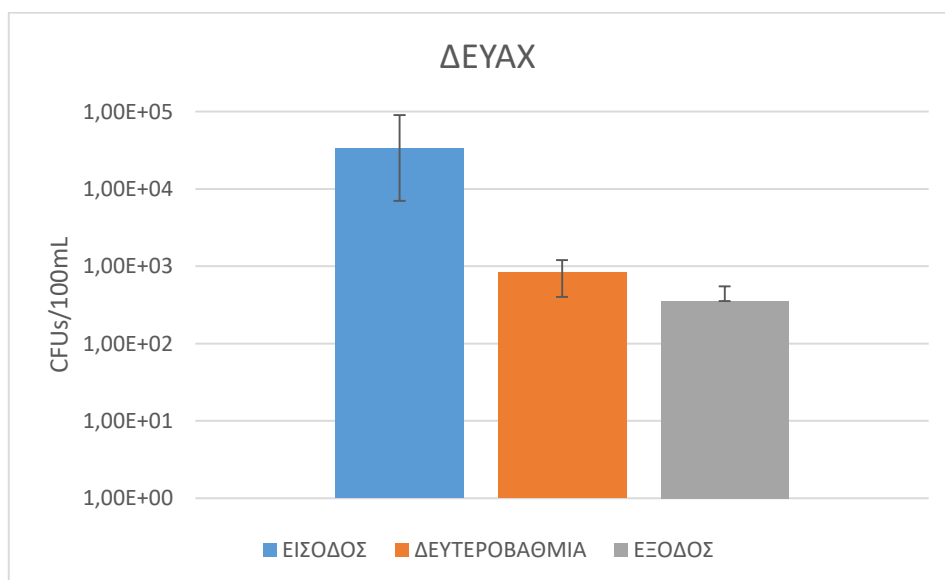
**Διάγραμμα 17.** Παρουσία της *K. pneumoniae* στα φυσικά ύδατα

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 17, οι συγκεντρώσεις στα δείγματα της θάλασσας και της λίμνης είναι σημαντικά χαμηλότερες σε σύγκριση με τις εγκαταστάσεις λυμάτων, όπως ήταν αναμενόμενο. Στην περιοχή του Κουμ Καπί οι μετρήσεις καταγράφουν χαμηλές τιμές (~4 CFUs/100mL) με μικρή διακύμανση, ενώ στη Λίμνη Αγιάς οι συγκεντρώσεις είναι υψηλότερες (~80 CFUs/100mL) και παρουσιάζουν μεγαλύτερη μεταβλητότητα. Η διακύμανση στη Λίμνη Αγιάς είναι μεγαλύτερη, γεγονός που υποδηλώνει αστάθεια στη μόλυνση, πιθανώς λόγω εποχιακών ή περιβαλλοντικών παραγόντων.

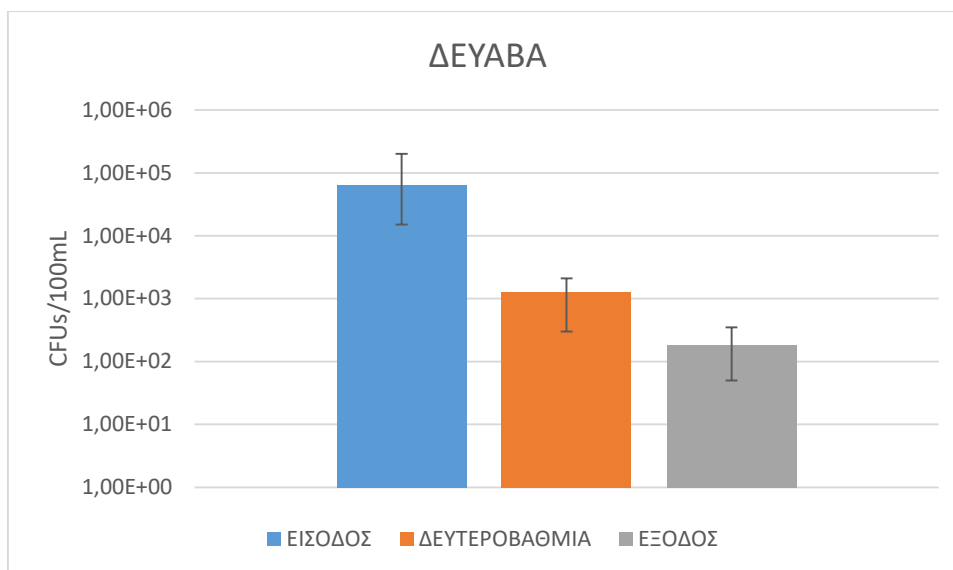
Όσον αφορά στις εγκαταστάσεις λυμάτων, τόσο η ΔΕΥΑΧ όσο και η ΔΕΥΑΒΑ μειώνουν δραστικά το μικροβιακό φορτίο, με τη ΔΕΥΑΒΑ να επιδεικνύει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Η διακύμανση στις τιμές είναι πιο έντονη στη δευτεροβάθμια επεξεργασία, γεγονός που ενδέχεται να σχετίζεται με μεταβολές στην αποδοτικότητα της διαδικασίας, αλλά και με το αρχικό φορτίο στην είσοδο της μονάδας. Στα περιβαλλοντικά δείγματα, το επίπεδο μόλυνσης είναι χαμηλότερο, ωστόσο στη Λίμνη Αγιάς καταγράφεται έντονη μεταβλητότητα, πιθανώς λόγω εξωτερικών επιδράσεων.

#### ο *S. aureus*

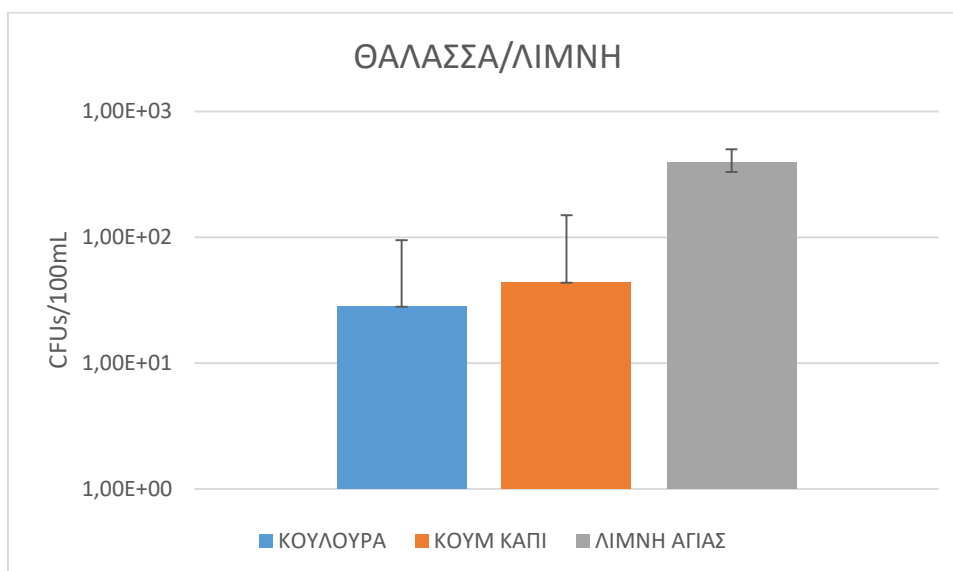
Σύμφωνα με τα Γραφήματα 18 και 19, ο *S. aureus* παρουσιάζει διαφορετικό μοτίβο σε σχέση με τα άλλα δύο βακτήρια. Στις εγκαταστάσεις ΔΕΥΑΧ και ΔΕΥΑΒΑ, οι συγκεντρώσεις στην είσοδο είναι μικρότερες συγκριτικά με τα άλλα βακτήρια, αλλά παραμένουν ανησυχητικές. Η μείωση στη δευτεροβάθμια επεξεργασία είναι εμφανής, ωστόσο, συγκεκριμένα στη ΔΕΥΑΧ, η περιορισμένη μείωση μετά τη δευτεροβάθμια παραπέμπει σε χαμηλή αποδοτικότητα.



**Διάγραμμα 18.** Παρουσία του *S. aureus* στα δείγματα από τη ΔΕΥΑΧ



**Διάγραμμα 19.** Παρουσία του *S. aureus* στα δείγματα από τη ΔΕΥΑΒΑ



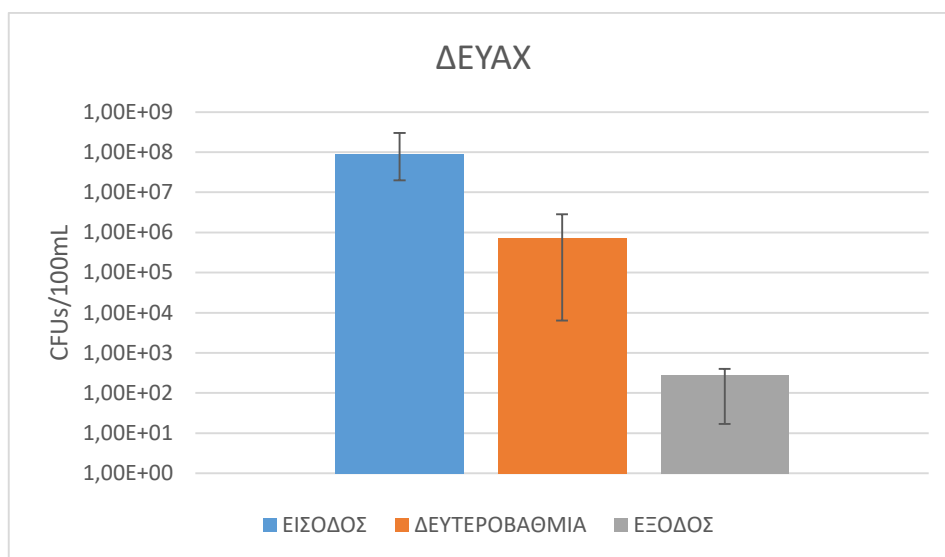
**Διάγραμμα 20.** Παρουσία του *S. aureus* στα φυσικά ύδατα

Στα θαλάσσια και λιμναία περιβάλλοντα (Διάγραμμα 20), καταγράφηκαν γενικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις, με τη Λίμνη Αγίας να εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές. Η Κουλούρα και το Κουμ Καπί παρουσίασαν μεγαλύτερη διακύμανση, πιθανώς λόγω εποχικής επιβάρυνσης ή αυξημένης ανθρώπινης δραστηριότητας

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προκύπτουν διαπιστώνεται ότι η επεξεργασία των λυμάτων είναι αποτελεσματική στη μείωση των βακτηριακών φορτίων, χωρίς όμως να τα εξαλείφει πλήρως. Τα υδάτινα οικοσυστήματα επηρεάζονται, με τη λίμνη να φαίνεται να διατηρεί υψηλότερες συγκεντρώσεις βακτηρίων. Η μεγάλη διακύμανση σε ορισμένες περιπτώσεις, όσον αφορά στην παρουσία του βακτηρίου συνεπάγεται ότι η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης μπορεί να μην είναι απόλυτα σταθερή.

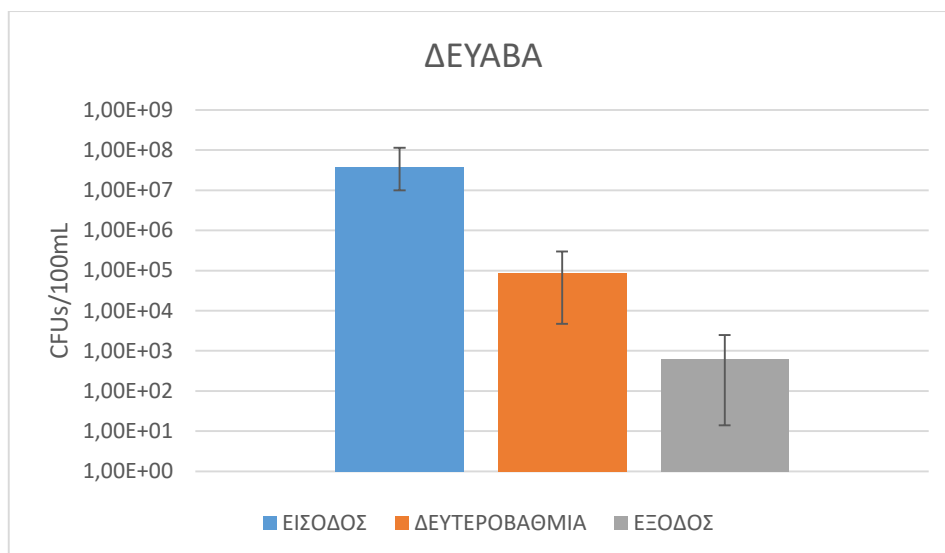
ο *Enterobacter sp.*

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 21, στη ΔΕΥΑΧ η συγκέντρωση του μικροβιακού φορτίου ξεκινά από  $9.18 \times 10^7$  CFUs/100mL στην είσοδο, μειώνεται σημαντικά στη δευτεροβάθμια ( $7.22 \times 10^5$  CFUs/100mL) και φτάνει στο χαμηλό επίπεδο των  $2.79 \times 10^2$  CFUs/100mL στην έξοδο. Η διακύμανση στα δείγματα από τη δευτεροβάθμια επεξεργασία είναι σημαντική, υποδεικνύοντας αφενός αντίστοιχη διακύμανση ως προς τη σύσταση του λύματος, αφετέρου, ποικίλη αποδοτικότητα της διαδικασίας.



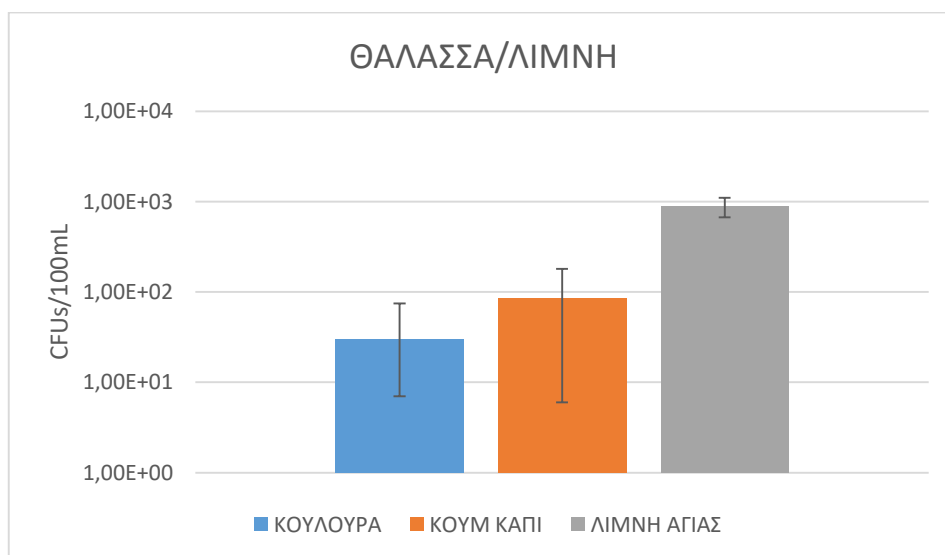
**Διάγραμμα 21.** Παρουσία του *Enterobacter sp.* στα δείγματα από τη ΔΕΥΑΧ

Στη ΔΕΥΑΒΑ η συγκέντρωση στην είσοδο έχει μικρότερη συγκέντρωση από τη ΔΕΥΑΧ ( $3.91 \times 10^7$  CFUs/100mL) (Διάγραμμα 19). Η δευτεροβάθμια επεξεργασία μειώνει τη συγκέντρωση σε  $8.59 \times 10^4$  CFUs/100mL, επίπεδο αρκετά χαμηλότερο από αυτό της ΔΕΥΑΧ. Στην έξοδο, η συγκέντρωση παραμένει σε χαμηλό επίπεδο ( $6.37 \times 10^2$  CFUs/100mL), αλλά ελαφρώς υψηλότερη από τη ΔΕΥΑΧ.



**Διάγραμμα 22.** Παρουσία του *Enterobacter sp.* στα δείγματα από τη ΔΕΥΑΒΑ

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 23, οι συγκεντρώσεις είναι αυξημένες στη Λίμνη Αγίας ( $8.90 \times 10^2$  CFUs/100mL), ακολουθώντας παρόμοιο μοτίβο με την *Klebsiella*.



**Διάγραμμα 23.** Παρουσία του *Enterobacter sp.* στα φυσικά ύδατα

Και στα δύο βακτήρια, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις καταγράφονται στην είσοδο των εγκαταστάσεων επεξεργασίας. Η δευτεροβάθμια επεξεργασία μειώνει σημαντικά τα επίπεδα των βακτηρίων, αλλά με υψηλότερη διακύμανση στα αποτελέσματα. Στην τελική έξοδο, οι συγκεντρώσεις είναι πολύ χαμηλές, με τη ΔΕΥΑΒΑ να εμφανίζει ελαφρώς υψηλότερες τιμές. Στα φυσικά ύδατα, οι συγκεντρώσεις είναι γενικά χαμηλότερες, με εξαίρεση τη Λίμνη Αγίας, όπου παρατηρείται αυξημένη παρουσία βακτηρίων και στις δύο περιπτώσεις.

#### 4.3 Ανθεκτικότητα των ESKAPE στα αντιβιοτικά

Τα πολυανθεκτικά βακτήρια (MDR) έχουν γίνει προτεραιότητα για την υγεία και έχουν γίνει προσπάθειες για την πρόληψη του αποικισμού, της μόλυνσης και της μείωσης της θνησιμότητας. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) πρότεινε μια παγκόσμια λίστα παθογόνων προτεραιότητας (PPL) των βακτηρίων MDR για να καθοδηγήσει την έρευνα, την ανακάλυψη και την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών (Rello et al., 2019). Το παγκόσμιο PPL ταξινομεί τα βακτηριακά παθογόνα σε τρία επίπεδα προτεραιότητας: κρίσιμη, υψηλή και μεσαία. Το ανθεκτικό στην καρβαπενέμη *A. baumannii*, *P. aeruginosa* και *Enterobacteriaceae sp.*, το οποίο περιλαμβάνει το *K. pneumoniae*, περιλαμβάνονται στην κρίσιμη βαθμίδα προτεραιότητας. Το ανθεκτικό στη μεθικιλίνη, το ενδιάμεσο στη βανκομυκίνη και το ανθεκτικό *S. aureus*, εκτός από το *E. faecium*, εμφανίζονται στη βαθμίδα υψηλής προτεραιότητας (Ramsamy et al., 2018).

***K. pneumoniae*** Η αντοχή της *K. pneumoniae* οφείλεται κυρίως στην παραγωγή βήτα-λακταμάσες εκτεταμένου φάσματος (ESBLs), που είναι ένζυμα που υδρολύουν και αδρανοποιούν φάρμακα βήτα-λακτάμης όπως η πενικιλίνη, οι κεφαλοσπορίνες τρίτης γενιάς και η αζτρεονάμη. Πρόσφατες αναφορές αναφέρουν ότι η *Klebsiella sp.* που παράγει ESBL είναι ανθεκτική σε αμινογλυκοσίδες, φθοροκινολόνες, τετρακυκλίνη, χλωραμφενικόλη και σουλφοναμίδες (Asha et al., 2017).

Οι ESKAPE παθογόνοι φέρουν εξελιγμένους μηχανισμούς επιβίωσης απέναντι σε πλήθος αντιμικροβιακών παραγόντων, καθιστώντας τη διαχείρισή τους ιδιαίτερα απαιτητική. Η *K. pneumoniae*, χαρακτηριστικός εκπρόσωπος αυτής της ομάδας, παρουσιάζει ανθεκτικότητα έναντι των κινολονών μέσω μεταλλάξεων στα γονίδια *gyrA* και *parC*. (Kareem et al., 2021). Παράλληλα, καταγράφεται υπερέκφραση αντλίων εκροής, που απομακρύνουν τα φάρμακα από το εσωτερικό του κυττάρου, ενώ πλασμιδιακά γονίδια ανθεκτικότητας PMQR (Plasmid-Mediated Quinolone Resistance), ενισχύουν περαιτέρω την επιβίωση υπό φαρμακευτική πίεση. Οι μηχανισμοί αυτοί, συχνά σε συνδυασμό, οδηγούν σε μέτρια έως υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας, ακόμα και χωρίς την παρουσία κλασικών σημείων αντοχής, και διευκολύνουν τη μεταφορά των σχετικών γονιδίων σε άλλα εντεροβακτηριοειδή μέσω κινητών γενετικών στοιχείων (Kareem et al., 2021).

Η *K. pneumoniae* έχει αναδειχθεί σε έναν από τους σημαντικότερους φορείς ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες, κυρίως μέσω της παραγωγής καρβαπενεμασών – ενζύμων που υδρολύουν αποτελεσματικά τη δράση αυτών των κρίσιμων αντιβιοτικών. Οι κυριότερες τάξεις καρβαπενεμασών που έχουν απομονωθεί σε *K. pneumoniae* είναι οι KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases), NDM (New Delhi metallo-β-lactamase) και OXA-48-like. Οι KPC ανήκουν στην τάξη A των β-λακταμασών και μεταφέρονται εύκολα μέσω πλασμιδίων μεταξύ βακτηρίων, γεγονός που διευκολύνει τη διασπορά της ανθεκτικότητας. Από την άλλη, η NDM ανήκει σε διαφορετική κατηγορία ενζύμων (τάξη B), απαιτεί ιόντα ψευδαργύρου για να λειτουργήσει, ενώ η OXA-48 (τάξη D) παρουσιάζει ελαφρώς διαφορετικό φάσμα υδρόλυσης (Lee et al., 2016).



***S. aureus*** Ο *S. aureus*, κυρίως ανθεκτικός στη μεθικιλίνη *S. aureus* (MRSA) είναι ένα από τα σημαντικότερα παθογόνα του ανθρώπου MDR. Ο αριθμός των λοιμώξεων από MRSA, τόσο σε νοσοκομεία όσο και σε κοινότητα, αυξάνεται παγκοσμίως και συχνά είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν. Πάνω από το 90% των κλινικών απομονώσεων του *S. aureus* είναι ανθεκτικά στην πενικιλίνη και το 60% από αυτά είναι MRSA. Έχουν αναφερθεί ορισμένα στελέχη *S. aureus* με μειωμένη ευαισθησία στη βανκομυκίνη ή ακόμη και ανθεκτικά στα γλυκοπεπτίδια (Nakoneczna et al., 2019).

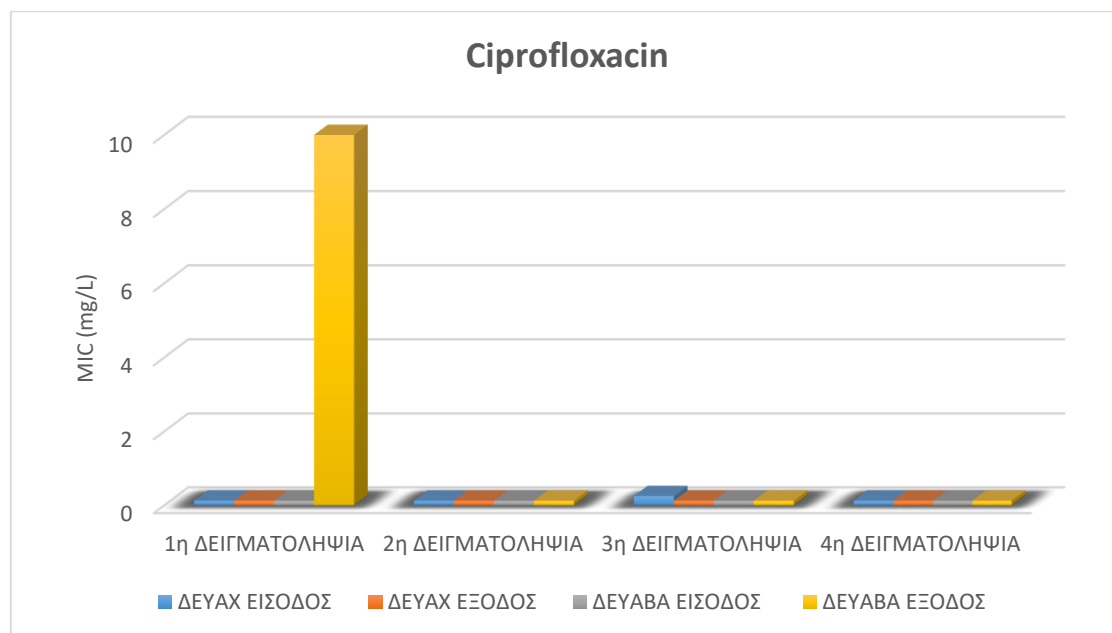
***Enterobacter sp.*** Πολλά από τα είδη *Enterobacter* έχουν πολλαπλή αντοχή στα αντιβιοτικά που είναι μη ανιχνεύσιμη *in vitro*, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη θεραπεία ασθενών που έχουν μολυνθεί από αυτά τα μικρόβια. Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, το *E. cloacae* είναι ανθεκτικό στις αμινοπενικιλίνες, την αζτρεονάμη και τις κεφαλοσπορίνες ευρέος φάσματος (Trivedi et al., 2015). Οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να υπερπαράγουν AmpC β-λακταμάσες με αποκαταστολή ενός χρωμοσωμικού γονιδίου που προσδίδει αντίσταση στα αντιβιοτικά (Trivedi et al., 2015).

Σε αυτή την ενότητα εξετάζονται τα επίπεδα ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών *S. aureus* και *K. pneumoniae* έναντι των αντιβιοτικών Methicillin, Vancomycin, Imipenem και Ciprofloxacin με τη μέθοδο MIC. Για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων, από κάθε σημείο δειγματοληψίας απομονώθηκαν δύο στελέχη του κάθε παθογόνου, τα οποία εξετάστηκαν ανεξάρτητα.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των MIC τιμών για κάθε ζεύγος στελεχών, και εντοπίστηκαν οι συγκεντρώσεις όπου το ποσοστό μείωσης (% reduction) ξεπερνά το 60%. Τα δεδομένα αποτυπώθηκαν σε συγκεντρωτικά διαγράμματα, ώστε να καταστεί σαφής η συμπεριφορά των στελεχών στις διαφορετικές χρονικές περιόδους και στα επιλεγμένα σημεία εισόδου και εξόδου. Μέσω αυτής της μεθοδολογίας, είναι δυνατή η σύγκριση μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών, καθώς και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων σε συνάρτηση με τις περιβαλλοντικές και κλιματικές συνθήκες κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών.

#### 4.3.1 *K. pneumoniae* – Ciprofloxacin (MIC)

##### ο Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων



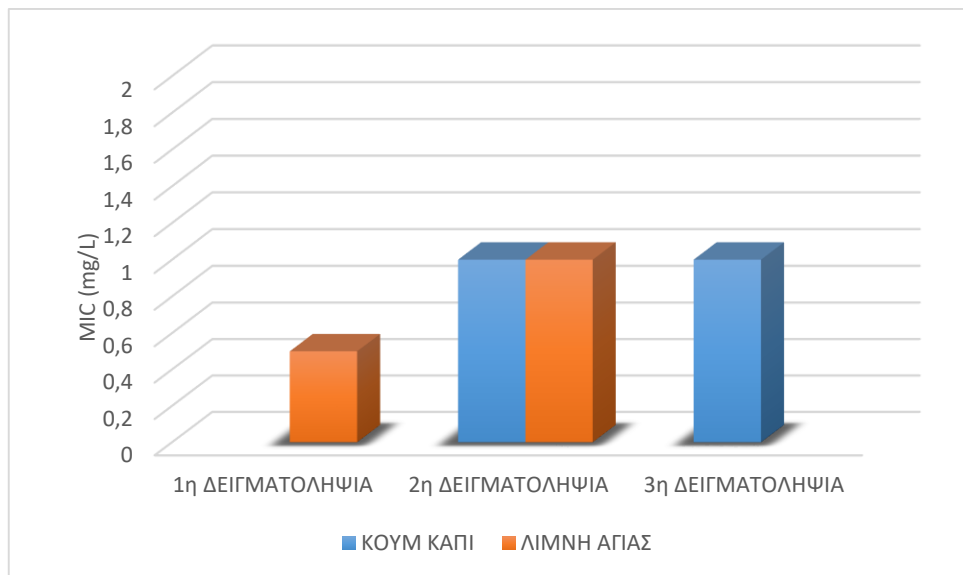
**Διάγραμμα 24.** Ελάχιστη ανασταταλτική συγκεντρωση της Ciprofloxacin για την *K. pneumoniae* που απομονωθηκε από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) και του Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ)

Η ανάλυση των τιμών MIC για την Ciprofloxacin έναντι της *K. pneumoniae* στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (ΔΕΥΑΧ και ΔΕΥΑΒΑ) αποκάλυψε, σε γενικές γραμμές, ένα σταθερό προφίλ ευαισθησίας (Διάγραμμα 24). Οι περισσότερες τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 0,125 και 0,25 mg/L, γεγονός που υποδηλώνει την απουσία ευρέως διαδεδομένων μηχανισμών ανθεκτικότητας. Εξαίρεση αποτέλεσε η πρώτη δειγματοληψία στην έξοδο της ΔΕΥΑΒΑ, όπου παρατηρήθηκε αιφνίδια αύξηση της MIC, χωρίς να καταγραφεί τιμή που να υποδεικνύει μείωση μεγαλύτερη από 60%, τιμή που αντιστοιχεί σε έντονα ανθεκτικό φαινότυπο. Το μεμονωμένο αυτό εύρημα, απουσία αντίστοιχων ενδείξεων στις υπόλοιπες μετρήσεις, υποδηλώνει την πιθανή παρουσία ενός σποραδικού υπερανθεκτικού στελέχους, ενδεχομένως προερχόμενου από νοσοκομειακές απορρίψεις ή άλλη στοχευμένη πηγή ρύπανσης.

Η ανθεκτικότητα της *K. pneumoniae* στις φθοριοκινολόνες, όπως η ciprofloxacin, είναι γνωστό ότι συνδέεται με μεταλλάξεις στα γονίδια *gyrA* και *parC*, που επηρεάζουν τους κυτταρικούς στόχους του αντιβιοτικού, καθώς και με τη δράση αντλιών εκροής και μηχανισμών πλασμιδιακής αντοχής (PMQR). Η απομονωμένη αύξηση της MIC ενδέχεται να αντικατοπτρίζει τη συνέργεια αυτών των μηχανισμών, ιδιαίτερα όταν προκύπτουν σε περιβάλλοντα όπως τα λύματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από έντονη μικροβιακή ποικιλομορφία και συνθήκες ευνοϊκές για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Παρότι το εύρημα δεν μαρτυρά διάχυτη ανθεκτικότητα στα λύματα των εγκαταστάσεων που

μελετήθηκαν, αποτελεί σαφή ένδειξη ότι ο κίνδυνος εμφάνισης και περαιτέρω διασποράς ανθεκτικών στελεχών είναι υπαρκτός.

#### ο Φυσικά ύδατα



**Διάγραμμα 25.** Ελάχιστη ανασταταλτική συγκεντρωση της Ciprofloxacin για την *K. pneumoniae* που απομονωθηκε από τα φυσικά ύδατα (Κουμ Καπί - Λίμνη Αγιάς)

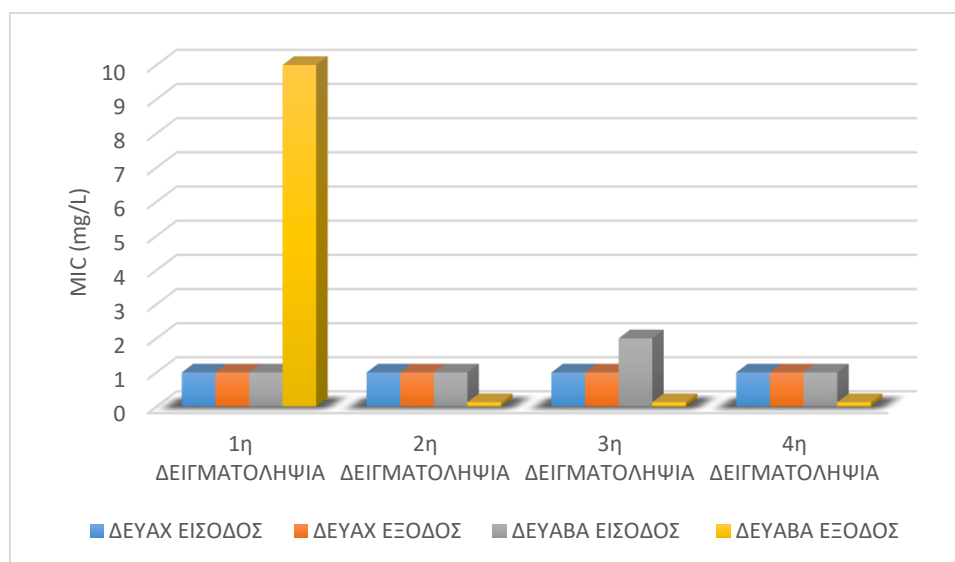
Σύμφωνα με το Διάγραμμα 25, η μελέτη των τιμών MIC της ciprofloxacin για την *K. pneumoniae* στους υδάτινους αποδέκτες Κουμ Καπί και Λίμνη Αγιάς αποκάλυψε ένα πρότυπο ήπιας αλλά σταθερής ανθεκτικότητας. Κατά την πρώτη δειγματοληψία, στη Λίμνη Αγιάς καταγράφηκε τιμή MIC 0,5 mg/L, που αν και εντός των ορίων ευαισθησίας, μπορεί να υποδηλώνει αρχόμενη μικροβιακή προσαρμογή. Στη συνέχεια, κατά τη δεύτερη και τρίτη δειγματοληψία, η MIC σταθεροποιήθηκε στο 1 mg/L και για τα δύο σημεία, τιμή η οποία πλησιάζει τα κλινικά όρια ευαισθησίας και ενδεχομένως υποδεικνύει την εγκατάσταση ενός μέτρια ανθεκτικού μικροβιακού πληθυσμού. Η ομοιομορφία στις τιμές MIC ανεξαρτήτως τοποθεσίας και χρόνου υποδηλώνει πιθανή κοινή προέλευση των στελεχών ή/και παρόμοιο επίπεδο έκθεσης σε επιλεκτική πίεση από την παρουσία υπολειμμάτων φθοριοκινολονών στο υδάτινο περιβάλλον.

Η παρατηρούμενη μέτρια αντοχή μπορεί να αποδοθεί σε μηχανισμούς όπως μεταλλάξεις στα γονίδια *gyrA* και *parC*, που επηρεάζουν τη δράση των τοποϊσομερασών, καθώς και στην παρουσία αντλιών εκροής, οι οποίες περιορίζουν τη συσσώρευση του αντιβιοτικού στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου. Επιπλέον, δεν αποκλείεται η ύπαρξη πλασμιδιακών γονιδίων PMQR, τα οποία μεταδίδουν χαμηλού επιπέδου ανθεκτικότητα συμβατή με τις παρατηρούμενες τιμές MIC. Παρότι δεν έχουν εντοπιστεί ακόμη στελέχη με υψηλό επίπεδο αντοχής (MIC >4 mg/L), η γενική εικόνα υποδηλώνει έναν οικολογικά επηρεασμένο χώρο όπου η μικροβιακή ανθεκτικότητα αρχίζει να καθιερώνεται. Η προληπτική διαχείριση τέτοιων οικοσυστημάτων είναι κρίσιμη,

προκειμένου να αποφευχθεί η εγκαθίδρυση και εξάπλωση πολυανθεκτικών στελεχών στο υδάτινο περιβάλλον.

#### 4.3.2 *K. pneumoniae* – Imipenem (MIC)

##### ο Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων

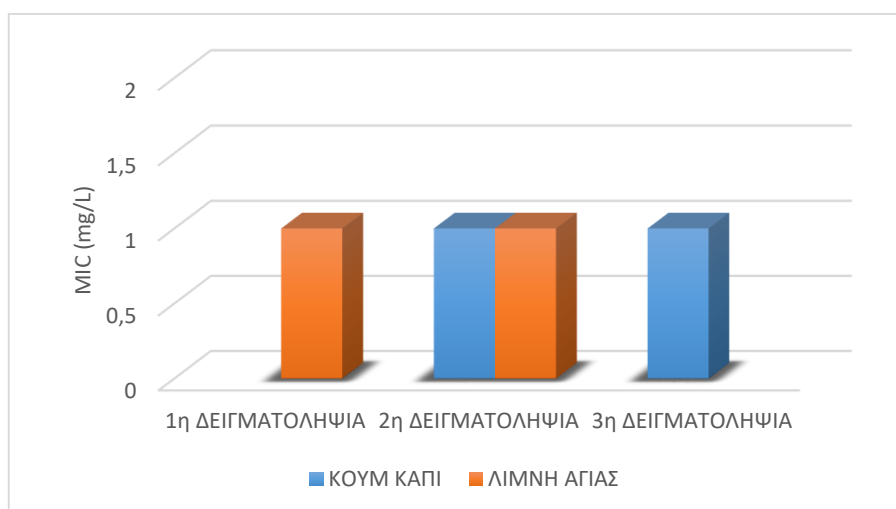


**Διάγραμμα 26.** Ελάχιστη αναστασταλτική συγκεντρωση του Imipenem για την *K. pneumoniae* που απομονωθηκε από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) και του Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ)

Η ανάλυση των τιμών MIC για το Imipenem στην *K. pneumoniae* από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (ΔΕΥΑΧ και ΔΕΥΑΒΑ) κατέδειξε σε γενικές γραμμές ένα προφίλ ευαισθησίας, με μία αξιοσημείωτη εξαίρεση που υποδηλώνει πιθανή παρουσία πολυανθεκτικού στελέχους (Διάγραμμα 26). Στις περισσότερες δειγματοληψίες (2η, 3η και 4η), οι τιμές MIC παρέμειναν εντός του εύρους ευαισθησίας (0,125–1 mg/L), τόσο στις εισόδους όσο και στις εξόδους των εγκαταστάσεων, υποδεικνύοντας απουσία ευρείας ανθεκτικότητας στις καρβαπενέμες. Ωστόσο, στην πρώτη δειγματοληψία στην είσοδο της ΔΕΥΑΒΑ καταγράφηκε αιφνίδια αύξηση της MIC, καθώς δεν εντοπίστηκε τιμή που να υποδεικνύει μείωση μεγαλύτερη από 60%, εύρημα που αποτελεί ισχυρή ένδειξη παρουσίας εξαιρετικά ανθεκτικού στελέχους.

Το φαινόμενο αυτό μπορεί να σχετίζεται με την παρουσία καρβαπενεμασών, όπως οι KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase), NDM ή OXA-48, ένζυμα που υδρολύουν αποτελεσματικά τις καρβαπενέμες και μεταδίδονται εύκολα μέσω πλασμιδίων, ενισχύοντας την οριζόντια γονιδιακή μεταφορά. Η εντοπισμένη φύση της υψηλής MIC σε μία μόνο χρονική και χωρική συγκυρία υποδηλώνει την ύπαρξη βακτηριακού στελέχους που όχι μόνο επιβίωσε της επεξεργασίας, αλλά ανέπτυξε επιπλέον μηχανισμούς ανθεκτικότητας, οδηγώντας σε αύξηση της τιμής της MIC στο τελικό εκρόημα. Το γεγονός ότι δεν καταγράφηκαν αντίστοιχες αυξήσεις σε επόμενες δειγματοληψίες ενισχύει την υπόθεση του μεμονωμένου περιστατικού.

#### ο Φυσικά ύδατα



**Διάγραμμα 27.** Ελαχιστη ανασταστατική συγκεντρωση του Imipenem για την *K. pneumoniae* που απομονώθηκε από τα φυσικά ύδατα (Κουμ Καπί - Λίμνη Αγίας)

Η μελέτη των τιμών MIC της Imipenem για την *K. pneumoniae* στα επιφανειακά ύδατα των περιοχών Κουμ Καπί και Λίμνη Αγίας ανέδειξε σταθερή και ενθαρρυντική εικόνα ευαισθησίας (Διάγραμμα 27). Σε όλες τις δειγματοληψίες (1η έως 3η), η τιμή MIC παρέμεινε σταθερά στο 1 mg/L, εντός των ορίων ευαισθησίας που καθορίζονται από τα διεθνή πρότυπα CLSI και EUCAST. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την απουσία ενεργών μηχανισμών αντοχής στις καρβαπενέμες, όπως οι καρβαπενεμάσες ή άλλες μορφές τροποποίησης των πορειών πρόσληψης του αντιβιοτικού στο βακτηριακό κύτταρο.

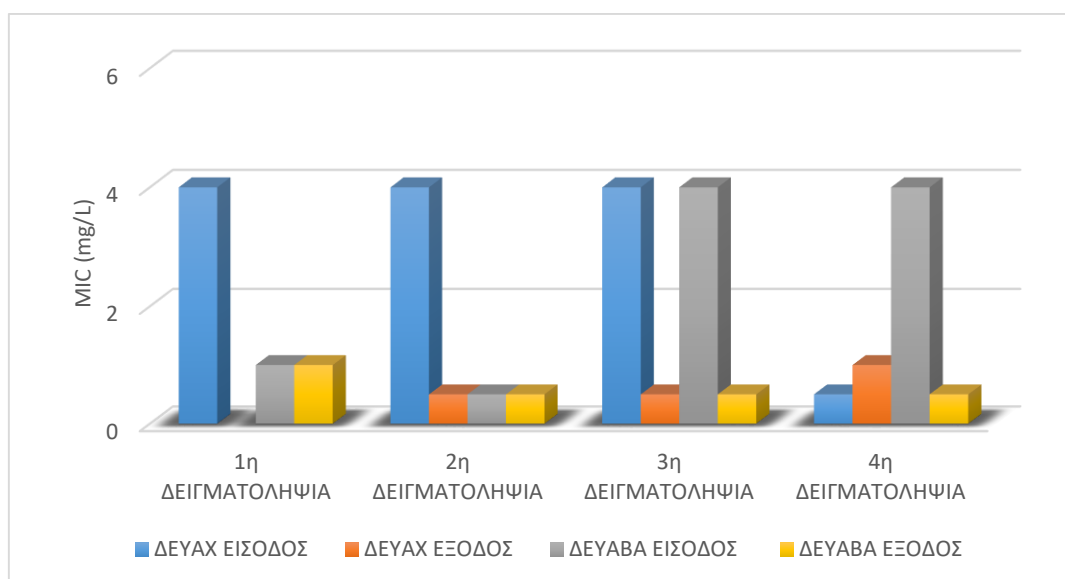
Το εύρημα αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι η χρήση καρβαπενεμών παραμένει περιορισμένη ή ελεγχόμενη στο συγκεκριμένο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να μην ασκείται έντονη επιλεκτική πίεση για την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών. Συνεπώς, η εικόνα που προκύπτει για την αποτελεσματικότητα της Imipenem στα συγκεκριμένα υδάτινα οικοσυστήματα είναι εξαιρετικά θετική, χωρίς ωστόσο να αναιρείται η ανάγκη για συνεχή παρακολούθηση, δεδομένου του κλινικού βάρους των στελεχών της *K. pneumoniae* που φέρουν μηχανισμούς αντοχής στις καρβαπενέμες.

#### 4.3.3 MIC Methicillin – *S. aureus*

Προκειμένου να αξιολογηθεί η διαφοροποίηση της ανθεκτικότητας του βακτηριακού δείκτη *S. aureus* στη μεθικιλίνη, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της MIC σε τέσσερις διαφορετικές δειγματοληψίες.

Στο Διάγραμμα 28 λαμβάνει χώρα σύγκριση των συγκεντρώσεων MIC στις εισόδους και εξόδους των δύο διαφορετικών συστημάτων επεξεργασίας λυμάτων (ΔΕΥΑΧ και ΔΕΥΑΒ).

### ο Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων



**Διάγραμμα 28.** Ελαχιστη αναστασταλτική συγκεντρωση του Methicillin για τον *S. aureus* που απομονωθηκε από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) και του Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ)

Από την ανάλυση του Γραφήματος 28 για τη Methicillin έναντι του *S. aureus* στους δύο βιολογικούς καθαρισμούς (ΔΕΥΑΧ και ΔΕΥΑΒΑ), προκύπτει σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των τιμών MIC στην είσοδο και στην έξοδο των μονάδων επεξεργασίας. Ειδικότερα, σε όλα τα δείγματα εισόδου καταγράφεται σταθερά υψηλή τιμή MIC (4 mg/L), γεγονός που υποδηλώνει την παρουσία ανθεκτικών στελεχών, πιθανώς MRSA (Methicillin-Resistant *S. aureus*). Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με τη γνωστή ικανότητα του *S. aureus* να αποκτά ανθεκτικότητα μέσω του γονιδίου *mecA*, το οποίο κωδικοποιεί μια τροποποιημένη πρωτεΐνη δέσμησης πενικιλίνης (PBP2a) με μειωμένη συγγένεια για τα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Μετά την επεξεργασία των λυμάτων, παρατηρείται αισθητή μείωση της MIC, ιδιαίτερα στη ΔΕΥΑΧ όπου η τιμή φτάνει τα 0,5 mg/L στις δειγματοληψίες 2 και 3, ενώ στη ΔΕΥΑΒΑ κυμαίνεται μεταξύ 0,5 και 1 mg/L. Η πτωτική αυτή τάση πιθανόν αντικατοπτρίζει την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας στην απομάκρυνση των ανθεκτικών βακτηριακών πληθυσμών. Παράλληλα, ενδέχεται να σχετίζεται με την περιορισμένη επιβίωση ή αναπαραγωγή των MRSA στελεχών στο περιβάλλον μετά την επεξεργασία, όπου απουσιάζουν ευνοϊκές συνθήκες όπως η παρουσία βιοφίλμ ή συμβατών ξενιστών για την οριζόντια μεταφορά του *mecA*. Συνολικά, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι, παρότι τα λύματα εισέρχονται στους βιολογικούς καθαρισμούς με υψηλό μικροβιακό φορτίο ανθεκτικών παθογόνων, η διαδικασία επεξεργασίας έχει αξιοσημείωτη επίδραση στον περιορισμό της ανθεκτικότητας, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις δεν επιτυγχάνεται πλήρης εξάλειψη.

## ο Φυσικά ύδατα



**Διάγραμμα 29.** Ελάχιστη ανασταστατική συγκέντρωση του Methicillin για τον *S. aureus* που απομονώθηκε από τα φυσικά ύδατα (Κουμ Καπί - Λίμνη Αγιάς - Κουλούρα)

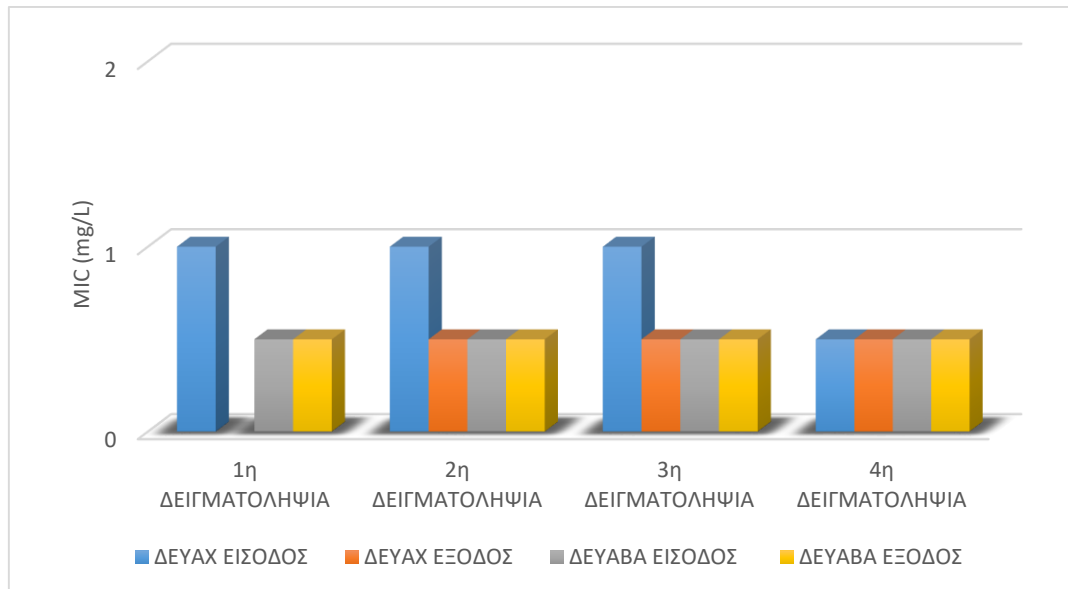
Η μελέτη της ευαισθησίας του *S. aureus* στη μεθικυλλίνη (MIC) αποκάλυψε σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των βιολογικών καθαρισμών και των υδάτινων οικοσυστημάτων, τόσο χωρικά όσο και χρονικά. Πιο συγκεκριμένα, στους βιολογικούς καθαρισμούς (ΔΕΥΑΧ και ΔΕΥΑΒΑ), οι υψηλές τιμές MIC στην είσοδο (4 mg/L) καταδεικνύουν την παρουσία ανθεκτικών στελεχών, πιθανότατα MRSA, που σχετίζονται με ανθρωπογενή λύματα. Η αξιολογη μείωση των τιμών MIC μετά την επεξεργασία (σε επίπεδα 0,5–1 mg/L) υποδηλώνει ότι τα συστήματα καθαρισμού είναι εν μέρει αποτελεσματικά στην απομάκρυνση ή αδρανοποίηση των ανθεκτικών βακτηρίων, ενδεχομένως λόγω μηχανικών και βιολογικών διεργασιών που περιορίζουν την επιβίωση των MRSA ή την εξάπλωση του γονιδίου *mecA*, υπεύθυνου για την παραγωγή της πρωτεΐνης PBP2a και κατ' επέκταση για την αντοχή στα β-λακταμικά αντιβιοτικά.

Στα παράκτια και υγροτοπικά περιβάλλοντα (Κουμ Καπί, Λίμνη Αγιάς και Κουλούρα), οι τιμές MIC παρουσίασαν πιο έντονες διακυμάνσεις, αποκαλύπτοντας ένα δυναμικό και ενδεχομένως επιβαρυνμένο μικροβιακό περιβάλλον (Διάγραμμα 29). Στις πρώτες δύο δειγματοληψίες, οι τιμές κυμαίνονταν σε χαμηλά έως ενδιάμεσα επίπεδα (0,5–2 mg/L), γεγονός που δεν παραπέμπει ευθέως σε MRSA, αλλά πιθανόν σε στελέχη με ενδιάμεση αντοχή. Αντίθετα, στην τρίτη και τέταρτη δειγματοληψία, καταγράφηκαν τιμές έως 4 mg/L στη Λίμνη Αγιάς και την Κουλούρα, ενισχύοντας την υπόθεση παρουσίας MRSA, πιθανόν ως αποτέλεσμα εποχικής ρύπανσης (π.χ. αυξημένη τουριστική πίεση, χρήση αντιβιοτικών ή γεωργικές απορροές). Οι παρατεταμένες υψηλές τιμές MIC στα υδάτινα οικοσυστήματα υποδηλώνουν ότι παράγοντες όπως η δημιουργία βιοφίλμ, οι μικροκλιματικές συνθήκες και η δυνατότητα οριζόντιας μεταφοράς του *mecA* μέσω πλασμιδίων, ευνοούν την επιβίωση και εγκατάσταση ανθεκτικών πληθυσμών. Το Κουμ Καπί, όπου οι τιμές παρέμειναν σταθερά χαμηλότερες, ενδέχεται να αντιπροσωπεύει ένα λιγότερο επιβαρυνμένο περιβάλλον. Συνολικά, τα δεδομένα αναδεικνύουν πως, ενώ οι οργανωμένες μονάδες καθαρισμού φαίνεται να μειώνουν το φορτίο των ανθεκτικών βακτηρίων, οι υγρότοποι μπορεί να λειτουργούν ως δεξαμενές ή εστίες διατήρησης και

διάδοσης της αντοχής, με πιθανές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία και την περιβαλλοντική ισορροπία.

#### 4.3.4 *S. aureus* – Vancomycin (MIC)

##### ο Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων



**Διάγραμμα 30.** Ελάχιστη ανασταστατική συγκεντρωση του Vancomycin για τον *S. aureus* που απομονωθηκε από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων πόλεως Χανίων (ΔΕΥΑΧ) και του Βορείου Άξονα Ν. Χανίων (ΔΕΥΑΒΑ)

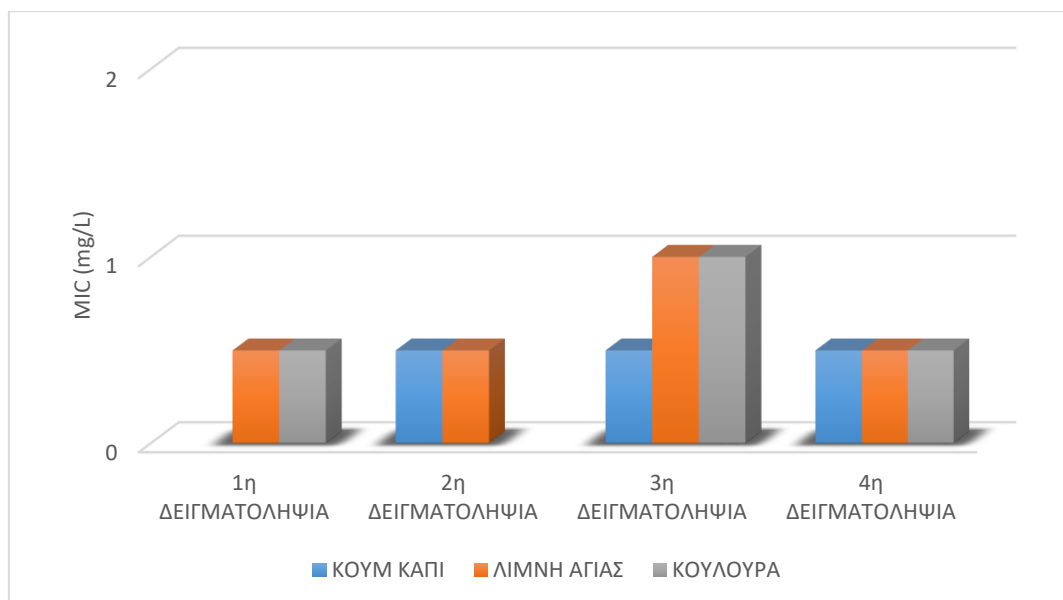
Σύμφωνα με το Διάγραμμα 30, η ανάλυση των τιμών MIC της βανκομυκίνης για τον *S. aureus* στους βιολογικούς καθαρισμούς ΔΕΥΑΧ και ΔΕΥΑΒΑ αποκάλυψε ένα σταθερό προφίλ ευαισθησίας καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Συγκεκριμένα, οι τιμές MIC στην είσοδο των εγκαταστάσεων διατηρήθηκαν σταθερά στο 1 mg/L, ενώ μετά την επεξεργασία μειώθηκαν οριακά στο 0,5 mg/L, καταδεικνύοντας όχι μόνο την απουσία ανθεκτικών ή ενδιάμεσων στελεχών (VISA/VRSA), αλλά και την αποτελεσματικότητα των συστημάτων επεξεργασίας λυμάτων στη συγκράτηση ή αποδόμηση μικροβιακών φορτίων. Η καταγραφή αυτών των χαμηλών τιμών σε όλα τα δείγματα ενισχύει τη διαπίστωση ότι, τουλάχιστον για την περίοδο της μελέτης, ο *S. aureus* διατηρεί υψηλή ευαισθησία στη βανκομυκίνη.

Η απουσία φαινοτύπων ανθεκτικότητας πιθανόν σχετίζεται με την περιορισμένη εξωνοσοκομειακή χρήση της βανκομυκίνης, η οποία αποτελεί θεραπευτικό μέσο κυρίως για νοσοκομειακές λοιμώξεις, γεγονός που περιορίζει τη διασπορά της στο περιβάλλον. Παράλληλα, ο μηχανισμός ανθεκτικότητας μέσω του γονιδίου *vanA* ή της αύξησης του πάχους του κυτταρικού τοιχώματος δεν φαίνεται να εντοπίζεται στα εξεταζόμενα δείγματα. Η γενική εικόνα υποδηλώνει ότι η βανκομυκίνη διατηρεί, προς το παρόν, την αποτελεσματικότητά της έναντι του *S. aureus* σε περιβαλλοντικό επίπεδο, ωστόσο η



ανάγκη για συνεχή επιτήρηση παραμένει επιτακτική, δεδομένου του κλινικού κινδύνου που ενέχει η πιθανή εμφάνιση VRSA/VISA στελεχών στο μέλλον.

#### ο Φυσικά ύδατα



**Διάγραμμα 31.** Ελάχιστη ανασταστατική συγκεντρωση του Vancomycin για τον *S. aureus* που απομονώθηκε από τα φυσικά ύδατα (Κουμ Καπί - Λίμνη Αγιάς - Κουλούρα)

Η κατανομή των τιμών MIC της βανκομυκίνης για τον *S. aureus* στα παράκτια και υγροτοπικά περιβάλλοντα (Κουμ Καπί, Λίμνη Αγιάς και Κουλούρα) παρουσιάζει σταθερά χαμηλά επίπεδα ευαισθησίας, με μικρές και μη ανησυχητικές διακυμάνσεις (Διάγραμμα 31). Κατά τις περισσότερες δειγματοληψίες (1η, 2η και 4η), καταγράφηκαν τιμές της τάξεως των 0,5 mg/L σε όλα τα σημεία, γεγονός που καταδεικνύει γενικευμένη ευαισθησία του βακτηριακού πληθυσμού. Μόνο στην 3η δειγματοληψία παρατηρήθηκε μία ήπια αύξηση στο 1 mg/L σε δείγματα από τη Λίμνη Αγιάς και την Κουλούρα, παραμένοντας ωστόσο κάτω από το κλινικά καθορισμένο όριο για εμφάνιση αντοχής. Η συνολική εικόνα των υδάτινων οικοσυστημάτων ευθυγραμμίζεται με εκείνη των επεξεργασμένων λυμάτων, καθώς δεν καταγράφηκαν ενδείξεις ύπαρξης ανθεκτικών ή μετρίως ανθεκτικών στελεχών (VISA/VRSA), διατηρώντας τις τιμές εντός των ορίων ευαισθησίας.

Από ερμηνευτική σκοπιά, η διατήρηση αυτών των χαμηλών τιμών MIC πιθανόν οφείλεται στον περιορισμένο βαθμό χρήσης της βανκομυκίνης στην κοινότητα και στον κυρίως νοσοκομειακό χαρακτήρα της, γεγονός που περιορίζει τη διασπορά της στο περιβάλλον. Η παροδική αύξηση που καταγράφηκε ενδέχεται να αντανάκλα τοπικές περιβαλλοντικές μεταβολές, μικροβιακή προσαρμογή ή και στατιστική διακύμανση, χωρίς ωστόσο να αποτελεί ένδειξη εγκατεστημένης αντοχής. Τα δεδομένα αυτά επιβεβαιώνουν ότι οι πληθυσμοί του *S. aureus* στους υγροτόπους διατηρούν υψηλά επίπεδα ευαισθησίας στη βανκομυκίνη, γεγονός ενθαρρυντικό από επιδημιολογική και περιβαλλοντική σκοπιά. Παρά ταύτα, υπογραμμίζεται η ανάγκη για συνεχή επιτήρηση των φυσικών αποδεκτών,

δεδομένου ότι αυτοί λειτουργούν ως οικολογικές δεξαμενές μικροβιακής ποικιλομορφίας και δυνητικής οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς, με μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στη δημόσια υγεία.

Συμπερασματικά, η μελέτη των τιμών MIC για τα επιλεγμένα παθογόνα *S. aureus* και *K. pneumoniae* έναντι των αντιβιοτικών Methicillin, Vancomycin, Ciprofloxacin και Imipenem ανέδειξε ενδιαφέροντα πρότυπα ευαισθησίας και ανθεκτικότητας στα εξεταζόμενα σημεία δειγματοληψίας.

Όσον αφορά στο *S. aureus*, η ανάλυση της δράσης της Methicillin κατέδειξε υψηλές τιμές MIC στα δείγματα εισόδου των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, με την τιμή να παραμένει σταθερά στα 4 mg/L και στις τέσσερις δειγματοληψίες τόσο στη ΔΕΥΑΧ όσο και στη ΔΕΥΑΒΑ. Οι τιμές αυτές υποδηλώνουν την παρουσία ανθεκτικών στελεχών MRSA (Methicillin-Resistant *S. aureus*), κάτι που συνάδει με τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας που εντοπίστηκαν, όπως η παρουσία του γονιδίου *mecA*. Στον αντίποδα, τα δείγματα εξόδου εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές MIC, υποδηλώνοντας πιθανή αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας λυμάτων στην αποδυνάμωση ή απομάκρυνση των ανθεκτικών στελεχών.

Στα επιφανειακά νερά, οι τιμές MIC για τη Methicillin παρουσίασαν αυξομειώσεις, με εμφανή τάση αύξησης κυρίως κατά την τρίτη και τέταρτη δειγματοληψία στη Λίμνη Αγιάς και στην Κουλούρα, φτάνοντας έως και τα 4 mg/L. Το εύρημα αυτό ενδεχομένως συνδέεται με την επιβίωση και διασπορά ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον, είτε μέσω ανεπαρκούς επεξεργασίας λυμάτων είτε μέσω άλλων πηγών ρύπανσης.

Η Vancomycin εμφάνισε εξαιρετικά χαμηλές τιμές MIC σε όλα τα δείγματα, τόσο στις εγκαταστάσεις λυμάτων όσο και στα επιφανειακά ύδατα. Στη συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων, οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 0,5 και 1 mg/L, χωρίς καμία ένδειξη εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η Vancomycin παραμένει αποτελεσματική έναντι των κυκλοφορούντων στελεχών *S. aureus* στην περιοχή μελέτης και ότι πιθανόν δεν ασκείται ισχυρή επιλεκτική πίεση που να ευνοεί την ανάπτυξη αντοχής.

Η *K. pneumoniae* εμφάνισε διαφοροποιημένες αποκρίσεις έναντι της Ciprofloxacin. Στα δείγματα λυμάτων, δεν παρατηρήθηκε τιμή MIC που να αντιστοιχεί σε μείωση 60%, στη πρώτη δειγματοληψία της ΔΕΥΑΒΑ εξόδου, γεγονός που υποδεικνύει παρουσία έντονα ανθεκτικών στελεχών, πιθανώς μέσω της δράσης αντλιών εκροής ή τροποποιήσεων στον στόχο της φθοριοκινολόνης. Στα υπόλοιπα σημεία και χρόνους δειγματοληψίας, οι τιμές παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα (0,125 mg/L), αντανακλώντας ικανοποιητική δραστηριότητα του αντιβιοτικού. Στα επιφανειακά νερά, οι τιμές MIC παρέμειναν χαμηλές (0,5 – 1 mg/L), χωρίς να προκύπτουν ιδιαίτερες ενδείξεις για διασπορά ανθεκτικών στελεχών στο περιβάλλον.

Η δραστηριότητα της Imipenem έναντι της *K. pneumoniae* ήταν συνολικά υψηλή, με τις περισσότερες τιμές MIC να κυμαίνονται μεταξύ 0,125 και 1 mg/L. Σημαντική

εξαίρεση αποτέλεσε η έξοδος της ΔΕΥΑΒΑ κατά τη πρώτη δειγματοληψία, όπου δεν καταγράφηκε τιμή MIC που να αντιστοιχεί σε μείωση 60%, ένδειξη ύπαρξης στελεχών με πιθανή παραγωγή καρβαπενεμασών ή άλλων μηχανισμών αντοχής. Ωστόσο, η απουσία αντίστοιχης αύξησης στις επόμενες δειγματοληψίες υποδηλώνει ότι το συγκεκριμένο περιστατικό μπορεί να ήταν μεμονωμένο ή το ανθεκτικό στέλεχος περιορίστηκε. Στα επιφανειακά νερά, οι τιμές MIC διατηρήθηκαν σταθερές στο 1 mg/L, χωρίς ενδείξεις ανθεκτικότητας.

Συνολικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν αφενός την ύπαρξη ανθεκτικών στελεχών σε συγκεκριμένα σημεία και χρονικές στιγμές, και αφετέρου την αποτελεσματικότητα ορισμένων αντιβιοτικών, όπως η Vancomycin και η Imipenem, στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Η παρακολούθηση των MIC σε συνδυασμό με την ανίχνευση γονιδίων αντοχής κρίνεται απαραίτητη για την κατανόηση της οικολογίας της αντοχής στα αστικά και περιβαλλοντικά υδάτινα οικοσυστήματα.

#### 4.4 Απολύμανση UVC

Στη συνέχεια των πειραμάτων, εξετάστηκε η απολυμαντική δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας UVC για τα παθογόνα *S. aureus* και *K. pneumoniae*. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα προερχόμενα από μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (ΔΕΥΑΧ και ΔΕΥΑΒΑ), καθώς και από φυσικά περιβάλλοντα (λίμνη Αγιάς, Κουλούρα, Κουμ Καπί), αντιπροσωπεύοντας έτσι ένα ευρύ φάσμα πραγματικών υδατικών υποστρωμάτων με διαφορετικά χαρακτηριστικά. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων διατηρήθηκαν σταθερές οι πειραματικές συνθήκες (π.χ. ισχύς ακτινοβολίας, θερμοκρασία, χρόνος έκθεσης). Η συνολική διάρκεια της ακτινοβολήσης ήταν 20 min για κάθε δείγμα, με δειγματοληψία ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

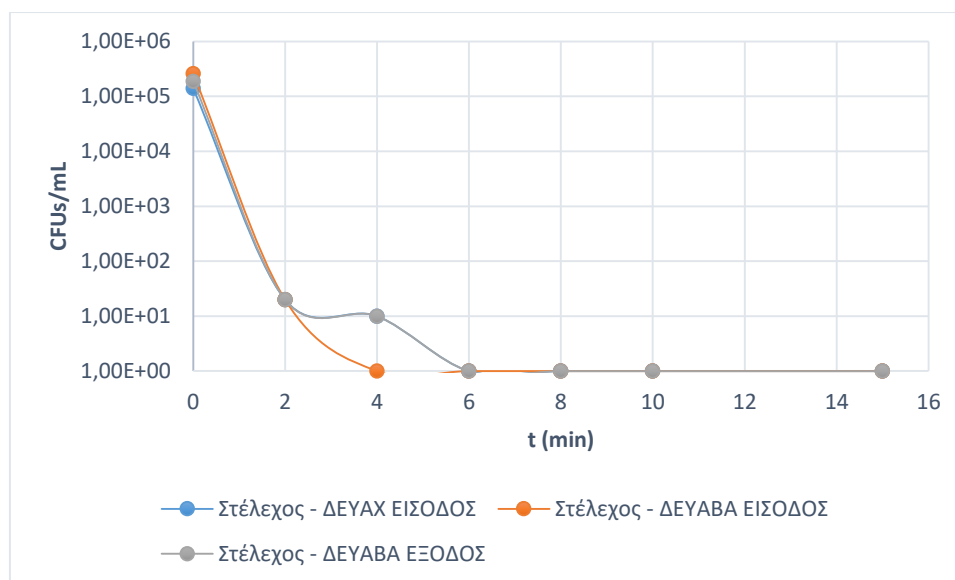
Η ακτινοβολία UVC, σε μήκος κύματος περίπου 254–260 nm, δρα καταστρεπτικά στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών προκαλώντας θραύσεις στο DNA και οδηγώντας σε μη αναστρέψιμη αδρανοποίηση. Η μέθοδος θεωρείται αποτελεσματική και εφαρμόζεται ευρέως στην απολύμανση υδάτων, ωστόσο η αποδοτικότητα της επηρεάζεται σημαντικά από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η παρουσία οργανικής ύλης, θολερότητας και αιωρούμενων σωματιδίων μπορεί να μειώσει την ένταση της ακτινοβολίας που φτάνει στους μικροοργανισμούς, δρώντας προστατευτικά για αυτούς και καθυστερώντας την αδρανοποίησή τους.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα της επίδρασης της UVC στα δύο μικροβιακά στελέχη, *S. aureus* και *K. pneumoniae*, όπως αυτά καταγράφηκαν στα διαγράμματα και τους συγκεντρωτικούς πίνακες.

#### 4.4.1 Απολύμανση UVC – *K. pneumoniae*

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής υπεριώδους ακτινοβολίας UVC για την αδρανοποίηση στελεχών *K. pneumoniae* από διάφορα δείγματα καταδεικνύουν την υψηλή αποδοτικότητα της μεθόδου, ιδίως στα δείγματα προερχόμενα από λύματα δευτεροβάθμιας επεξεργασίας και από φυσικούς υδάτινους αποδέκτες.

##### ο Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων

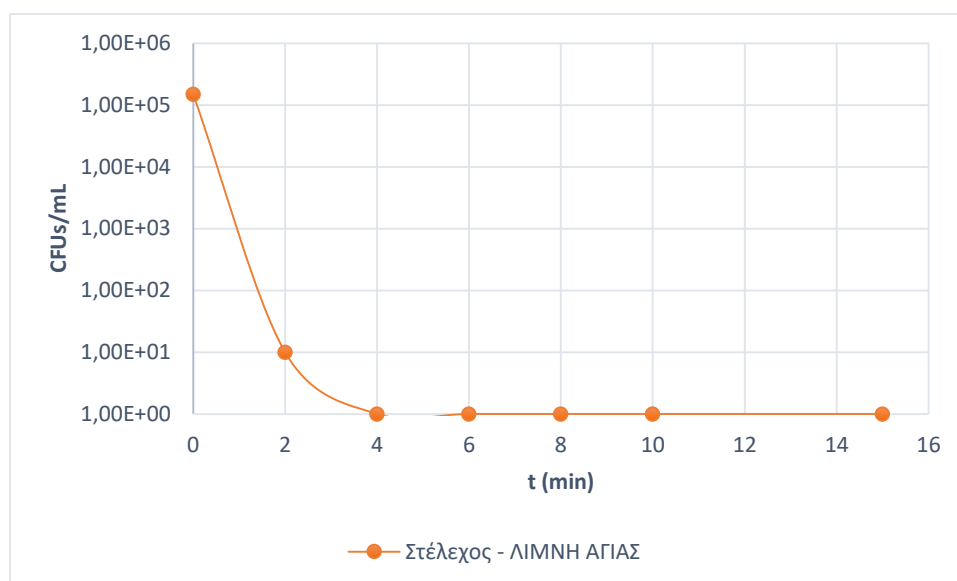


**Διάγραμμα 32.** Αδρανοποίηση στελεχών *K. pneumoniae* απομονωμένων από δείγματα λυμάτων (ΔΕΥΑΧ/ ΔΕΥΑΒΑ) με UVC

Σύμφωνα με το Διάγραμμα 32, τα στελέχη που προέρχονται από τις εξόδους των ΔΕΥΑΧ και ΔΕΥΑΒΑ, παρουσίασαν απότομη μείωση του μικροβιακού φορτίου εντός των πρώτων 4 min έκθεσης σε ακτινοβολία UVC. Το στέλεχος από την είσοδο της ΔΕΥΑΧ παρουσίασε πλήρη αδρανοποίηση στα 6 min, ενώ το στέλεχος από την είσοδο της ΔΕΥΑΒΑ την είσοδο της ΔΕΥΑΒΑ εξουδετερώθηκε ταχύτερα, έως το 4ο λεπτό. Το στέλεχος από την έξοδο της ΔΕΥΑΒΑ έδειξε επίσης ταχεία μείωση και πλήρη εξάλειψη του μικροβιακού φορτίου μέχρι τα 6 min, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητα της UVC.

Μετά από 24 h παραμονής των δειγμάτων (κά'τοπιν της έκθεσης στην ακτινοβολία), πλήρης εξάλειψη του *K. pneumoniae* παρατηρήθηκε μόνο στο στέλεχος από την είσοδο της ΔΕΥΑΧ, ενώ στα υπόλοιπα στελέχη από την είσοδο και έξοδο της ΔΕΥΑΒΑ καταγράφηκε οριακή μικροβιακή επαναδραστηριοποίηση, με ανίχνευση 1 και 4 CFUs/mL αντίστοιχα.

ο Φυσικά ύδατα



**Διάγραμμα 33.** Αδρανοποίηση στελεχών *K. pneumoniae* απομονωμένων από επιφανειακό νερό (λίμνη Αγιάς) με UVC

Αντίστοιχα, στο Διάγραμμα 33 που αφορά στα στελέχη από τη Λίμνη Αγιάς καταγράφεται ταχύτατη μείωση του μικροβιακού φορτίου ήδη από τα πρώτα λεπτά, με πλήρη αδρανοποίηση του βακτηρίου μέχρι το 4<sup>ο</sup> λεπτό έκθεσης, αποτέλεσμα που διατηρήθηκε σταθερό και μετά από 24 h.

Η συνολική εικόνα των αποτελεσμάτων υποστηρίζει την αποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας UVC έναντι της *K. pneumoniae*, ανεξαρτήτως του υδατικού περιβάλλοντος απ' όπου απομονώθηκε. Η πλήρης ή σχεδόν πλήρης εξάλειψη του παθογόνου τόσο σε δείγματα από λύματα επεξεργασίας όσο και σε φυσικό νερό, ενισχύει τη χρήση της UVC ως αποτελεσματικής μεθόδου απολύμανσης.

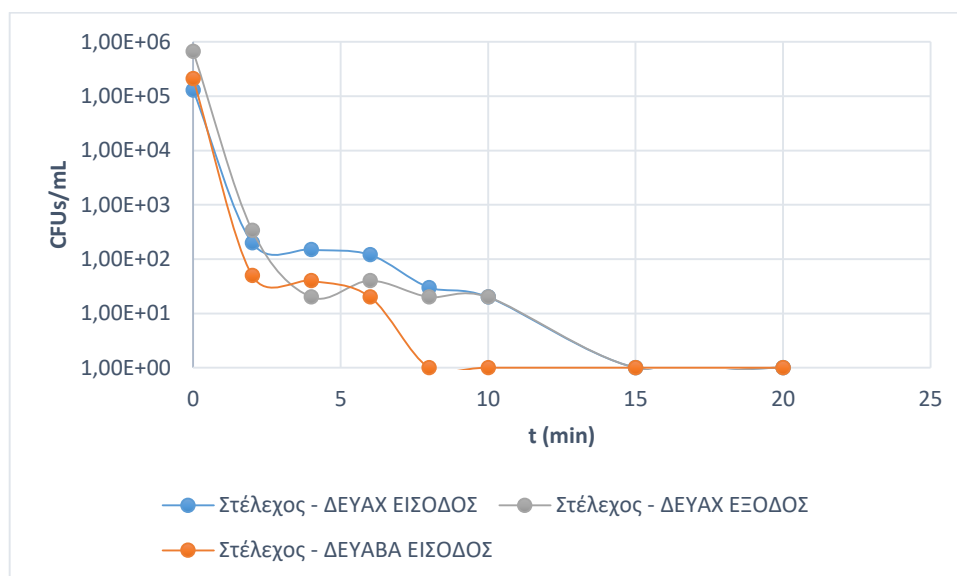
**Πίνακας 3.** Επαναδραστηριοποίηση της *K. pneumoniae* έπειτα από 24h

Στέλεχος	Μετά από 24h (CFUs/mL)
ΔΕΥΑΧ ΕΙΣΟΔΟΣ	0
ΔΕΥΑΒΑ ΕΙΣΟΔΟΣ	1
ΔΕΥΑΒΑ ΕΞΟΔΟΣ	4

Στέλεχος	Μετά από 24h (CFUs/mL)
ΛΙΜΝΗ ΑΓΙΑΣ	0

#### 4.4.2 Απολύμανση UVC – *S. aureus*

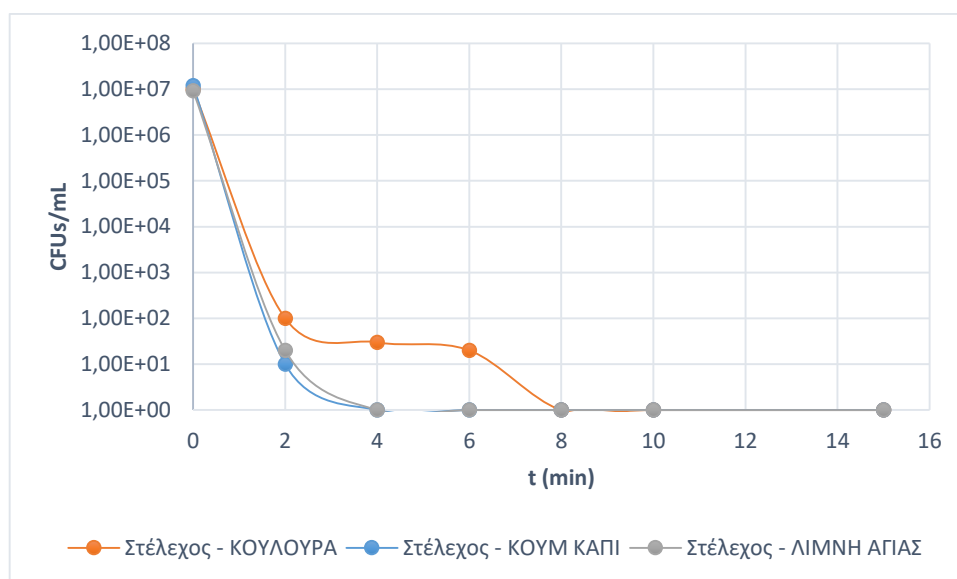
##### ο Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων



**Διάγραμμα 34.** Αδρανοποίηση στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα λυμάτων (ΔΕΥΑΧ/ ΔΕΥΑΒΑ) με UVC

Τα αποτελέσματα του Διαγράμματος 34 επιβεβαιώνουν την αποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας UVC στην αδρανοποίηση του *S. aureus* σε δείγματα προερχόμενα από μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Και τα τρία στελέχη παρουσιάζουν σημαντική μείωση του μικροβιακού φορτίου, με πλήρη αδρανοποίηση έως το 15<sup>ο</sup> λεπτό. Το στέλεχος από την είσοδο της ΔΕΥΑΒΑ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ευαισθησία, με μηδενικές αποικίες ήδη πριν το 10<sup>ο</sup> λεπτό. Τα στελέχη από την είσοδο και έξοδο της ΔΕΥΑΧ εμφανίζουν παρόμοια δυναμική: ραγδαία μείωση του φορτίου στα πρώτα λεπτά και ολοκληρωτική αδρανοποίηση στο 15<sup>ο</sup> λεπτό. Οι μικρές διαφορές στον ρυθμό μείωσης μπορεί να σχετίζονται με την προέλευση των στελεχών και τη διαφορετική προσαρμογή τους στις εκάστοτε συνθήκες.

## ο Φυσικά ύδατα



**Διάγραμμα 35.** Αδρανοποίηση στελεχών *S. aureus* από απομονώθηκαν από τα φυσικά ύδατα (Κουμ Καπί, Κουλούρα, Λίμνη Αγιάς) με UVC

Η αδρανοποίηση του *S. aureus* από τα φυσικά δείγματα παρουσιάζει ακόμη καλύτερη εικόνα (Διάγραμμα 35). Στο στέλεχος από τη Λίμνη Αγιάς επιτυγχάνεται πλήρης αδρανοποίηση πριν από τα 6 min. Το στέλεχος από την Κουλούρα απαιτεί έως 8 min για την πλήρη εξάλειψη, ενώ το στέλεχος από το Κουμ Καπί παρουσιάζει ήπια καθυστέρηση σε σχέση με το δείγμα της Λίμνης Αγιάς, χωρίς ωστόσο να δείχνει ανθεκτικότητα. Η συνολική αδρανοποίηση επιτεύχθηκε εντός 10 min για όλα τα στελέχη.

**Πίνακας 4.** Επαναδραστηριοποίηση του *S. aureus* έπειτα από 24h

Στέλεχος	Μετά από 24h (CFUs/mL)
ΔΕΥΑΧ ΕΙΣΟΔΟΣ	16
ΔΕΥΑΧ ΕΞΟΔΟΣ	33
ΔΕΥΑΒΑ ΕΙΣΟΔΟΣ	2

Στέλεχος	Μετά από 24h (CFUs/mL)
ΚΟΥΜ ΚΑΠΙ	1
ΚΟΥΛΟΥΡΑ	0
ΛΙΜΝΗ ΑΓΙΑΣ	0

Ο έλεγχος επαναδραστηριοποίησης των βακτηρίων κατόπιν απολύμανσης με UVC ακτινοβολία κρίνεται σημαντικός, καθώς αυτό αποτελεί κι ένα από τα βασικά μειονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου αδρανοποίησης μικροοργανισμών. Σύμφωνα με ατα αποτελέσματα, τα βακτήρια που προέρχονται από λύματα φαίνεται να

επαναδραστηριοποιούνται σε μεγαλύτερο βαθμό. Αυτό ίσως σχετίζεται με το περιβάλλον όπου έχουν αναπτυχθεί, το οποίο τα καθιστά περισσότερο ανθεκτικά ή και ικανά να επιδιορθώνουν τυχόν βλάβες που πραγματοποιούνται στο κύτταρό τους, όπως αυτές που λαμβάνουν χώρα κατά την απολύμανση.

#### 4.4.3 Υπολογισμός κινητικής σταθεράς

Πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της κινητικής σταθεράς απολύμανσης ( $k$ ). Η ανάλυση βασίστηκε στο πρότυπο κινητικής πρώτης τάξης, το οποίο επιτρέπει την εκτίμηση του ρυθμού με τον οποίο μειώνεται η μικροβιακή συγκέντρωση σε συνάρτηση με τον χρόνο έκθεσης στην UVC.

Για την εφαρμογή της κινητικής εξίσωσης, υπολογίστηκαν οι τιμές του  $\ln(C_0/C)$ , όπου  $C_0$  η αρχική συγκέντρωση και  $C$  η συγκέντρωση σε δεδομένο χρόνο  $t$ . Μέσω γραμμικής παλινδρόμησης προσδιορίστηκε η τιμή της σταθεράς  $k$  για κάθε μικροοργανισμό και υδατική μήτρα (λύματα ΔΕΥΑΧ/ΔΕΥΑΒΑ, λίμνη Αγιάς, Κουλούρα, Κουμ Καπί). Τα κινητικά δεδομένα των πειραμάτων απολύμανσης με υπεριώδη ακτινοβολία UVC παρουσιάζονται στους Πίνακες 5-8. Η σύγκριση των τιμών αυτών επιτρέπει την αξιολόγηση της ταχύτητας απολύμανσης και την ανάδειξη των παραγόντων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ακτινοβολίας, όπως η θολρότητα, η οργανική επιβάρυνση και η φυσιολογία του μικροοργανισμού. Η κινητική ανάλυση παρέχει ουσιαστικά συμπεράσματα για τη συμπεριφορά των δύο παθογόνων σε διαφορετικές περιβαλλοντικές μήτρες και αναδεικνύει την UVC ως μέθοδο υψηλής αποτελεσματικότητας υπό κατάλληλες συνθήκες.

**Πίνακας 5.** Κινητική σταθερά αδρανοποίησης  $k$  στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν από λύματα

Στελέχη <i>S.aureus</i>	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$
ΔΕΥΑΧ ΕΙΣΟΔΟΣ	0,93	0,91
ΔΕΥΑΧ ΕΞΟΔΟΣ	2,1	0,91
ΔΕΥΑΒΑ ΕΙΣΟΔΟΣ	1,7	0,92



**Πίνακας 6.** Κινητική σταθερά αδρανοποίησης  $k$  στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν από φυσικά ύδατα

Στελέχη <i>S.aureus</i>	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$
ΚΟΥΛΟΥΡΑ	2,35	0,91
ΚΟΥΜ ΚΑΠΙ	4,66	0,94
ΛΙΜΝΗ	4,51	0,95

**Πίνακας 7.** Κινητική σταθερά αδρανοποίησης  $k$  στελεχών *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν από λύματα

Στελέχη <i>K. pneumoniae</i>	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$
ΔΕΥΑΧ ΕΙΣΟΔΟΣ	2,27	0,93
ΔΕΥΑΒΑ ΕΙΣΟΔΟΣ	3,44	0,96
ΔΕΥΑΒΑ ΕΞΟΔΟΣ	2,33	0,93

**Πίνακας 8.** Κινητική σταθερά αδρανοποίησης  $k$  στελεχών *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν από φυσικά ύδατα

Στελέχη <i>K. pneumoniae</i>	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$
ΛΙΜΝΗ ΑΓΙΑΣ	2,27	0,96

Η συγκριτική αξιολόγηση των τιμών κινητικής σταθεράς  $k$  για τα δύο παθογόνα (*S. aureus* και *K. pneumoniae*) ανέδειξε διακριτές τάσεις ευαισθησίας στην απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία UVC.

Συγκεκριμένα, ο *S. aureus* παρουσίασε μεγαλύτερη διακύμανση στις τιμές του  $k$ , υποδηλώνοντας ίσως ότι η διάρκεια αδρανοποίησης του βακτηρίου εξαρτάται και από την πηγή προέλευσης των στελεχών. Η αδρανοποίηση του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε πιο γρήγορα στην περίπτωση στελεχών που προέρχονταν από τα φυσικά ύδατα.

Αντιθέτως, στην περίπτωση της *K. pneumoniae* οι τιμές της σταθεράς κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα και συγκεκριμένα από 2,27 έως 3,44  $\text{min}^{-1}$ . Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση η απολύμανση με UVC κρίνεται αποδοτική μέθοδος για την αδρανοποίηση παθογόνων, όπως αυτά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, καθώς σε λίγα λεπτά επιτυγχάνεται υψηλή μείωση του βακτηριακού πληθυσμού (~5 Logs). Οι διαφορές μεταξύ των δύο παθογόνων ενισχύουν τη σημασία της μικροβιακής μορφολογίας και αντοχής, ενώ

υπογραμμίζουν την ανάγκη εξατομικευμένης προσέγγισης κατά την εφαρμογή μεθόδων απολύμανσης σε περιβαλλοντικά δείγματα.

## 5 Συμπεράσματα

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε με σαφήνεια την ύπαρξη και διασπορά των παθογόνων μικροοργανισμών της ομάδας ESKAPE – συγκεκριμένα των *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* και *Enterobacter sp.* – σε περιβαλλοντικά υδάτινα δείγματα. Η ανάλυση των δειγμάτων από διάφορα σημεία συλλογής, που περιλάμβαναν τόσο παράκτιες περιοχές όσο και εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, αποκάλυψε όχι μόνο την παρουσία αυτών των παθογόνων, αλλά και σημαντικά επίπεδα αντιμικροβιακής αντοχής. Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι τα περιβαλλοντικά υδάτινα συστήματα μπορούν να λειτουργούν ως σημαντικές δεξαμενές μικροβιακής αντοχής, με εν δυνάμει σοβαρές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων κατέδειξαν σημαντική παρουσία των εξεταζόμενων παθογόνων σε όλα τα σημεία δειγματοληψίας, τόσο σε φυσικά όσο και σε ανθρωπογενώς επιβαρυνόμενα περιβάλλοντα. Η παρουσία τους σε λύματα, επιφανειακά και θαλάσσια νερά υποδηλώνει ευρεία διασπορά και ενισχύει τις ανησυχίες για την πιθανότητα μετάδοσής τους σε ανθρώπινους πληθυσμούς, μέσω της άμεσης ή έμμεσης επαφής με το νερό ή τη χρήση του για άρδευση, αναψυχή ή κατανάλωση. Η αντίσταση των βακτηρίων αυτών σε σημαντικά αντιβιοτικά, όπως οι β-λακτάμες, οι φθοριοκινολόνες και η βανκομυκίνη, εγείρει σοβαρά ερωτήματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα της σημερινής θεραπευτικής προσέγγισης σε περιπτώσεις μόλυνσης.

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης με UVC ακτινοβολία αξιολογήθηκε ως υποσχόμενη, ωστόσο όχι απόλυτα επαρκής για την πλήρη αδρανοποίηση των μικροοργανισμών. Αν και η εφαρμογή UVC μείωσε σημαντικά τον αριθμό των βακτηρίων, παρατηρήθηκε επιβίωση ανθεκτικών στελεχών, γεγονός που καταδεικνύει την ανάγκη για συνδυαστικές τεχνικές απολύμανσης, όπως η σύζευξη UVC με χλωρίωση ή άλλες προηγμένες μεθόδους επεξεργασίας. Η επιλογή της UVC ως μεθόδου μελέτης κρίνεται εύστοχη, καθώς προσφέρει τη δυνατότητα μη χημικής παρέμβασης, όμως η τελική της αποδοτικότητα εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων, όπως η σύσταση του νερού και το μικροβιακό φορτίο.

Αξιοσημείωτο εύρημα της μελέτης ήταν το γεγονός ότι, παρά τη σημαντική μείωση του μικροβιακού φορτίου με την εφαρμογή UVC ακτινοβολίας, ορισμένα βακτηριακά στελέχη δεν αδρανοποιήθηκαν πλήρως. Ενδείξεις επιβίωσης μετά την ακτινοβολία ή και ενδεχόμενης επαναδραστηριοποίησης παρατηρήθηκαν, ιδιαίτερα σε δείγματα με υψηλό αρχικό φορτίο ή αυξημένη θολότητα. Το φαινόμενο αυτό εγείρει προβληματισμούς σχετικά με την ικανότητα κάποιων βακτηρίων να παραμένουν σε βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη μορφή (Viable But Non-Culturable - VBNC), επιβιώνοντας της απολύμανσης και ενδεχομένως επανενεργοποιούμενα υπό ευνοϊκές συνθήκες. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω διερεύνηση της μακροχρόνιας αποδοτικότητας των απολυμαντικών μεθόδων και της συμπεριφοράς των ανθεκτικών βακτηρίων μετά την επεξεργασία, ιδίως σε εφαρμογές που σχετίζονται με την επαναχρησιμοποίηση νερού.

Ένα από τα σημαντικότερα συμπεράσματα είναι η αναγνώριση της σημασίας της περιβαλλοντικής επιτήρησης. Η ύπαρξη ανθεκτικών παθογόνων σε δείγματα από φυσικά και ανθρωπογενώς επηρεασμένα υδάτινα περιβάλλοντα αναδεικνύει την ανάγκη δημιουργίας μόνιμων μηχανισμών παρακολούθησης και ελέγχου της μικροβιακής επιβάρυνσης. Η ανίχνευση τέτοιων οργανισμών, πριν ακόμα φτάσουν να αποτελέσουν πρόβλημα για τη δημόσια υγεία, είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη και τον σχεδιασμό έγκαιρων παρεμβάσεων. Η ενίσχυση του θεσμικού πλαισίου, η ανάπτυξη δικτύων επιτήρησης και η επένδυση στην καινοτομία απολύμανσης και επεξεργασίας υγρών αποβλήτων θα μπορούσαν να αποτελέσουν βασικούς άξονες μιας ολοκληρωμένης στρατηγικής.

Επιπλέον, η μελέτη ανέδειξε την ανάγκη για επαναπροσδιορισμό των πολιτικών διαχείρισης των υδάτινων πόρων. Τα παθογόνα ESKAPE δεν είναι απλώς νοσοκομειακά βακτήρια, αλλά φαίνεται να έχουν διεισδύσει και στα περιβαλλοντικά συστήματα, διευρύνοντας την πολυπλοκότητα του προβλήματος της αντιμικροβιακής αντοχής. Η ολιστική προσέγγιση “One Health” (Μία Υγεία), που αναγνωρίζει τη διασύνδεση μεταξύ ανθρώπινης, ζωικής και περιβαλλοντικής υγείας, πρέπει να αποτελέσει θεμέλιο λίθο στον σχεδιασμό στρατηγικών ελέγχου και περιορισμού της διασποράς τους.

Τέλος, η εργασία αυτή επιβεβαιώνει ότι η πρόκληση της μικροβιακής αντοχής δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί μονοδιάστατα. Απαιτείται διεπιστημονική συνεργασία, επένδυση σε έρευνα και καινοτομία, και ενημέρωση του κοινού και των επαγγελματιών υγείας για τη σημασία της ορθής χρήσης των αντιβιοτικών και της προστασίας του περιβάλλοντος. Η επιστημονική τεκμηρίωση της παρούσας μελέτης συμβάλλει στην κατανόηση της περιβαλλοντικής διάστασης του φαινομένου και ελπίζεται ότι θα αποτελέσει βάση για περαιτέρω έρευνα και εφαρμογή αποτελεσματικών πολιτικών προστασίας της δημόσιας υγείας.

## 6 Μελλοντικές Προτάσεις

Η ενίσχυση της επιτήρησης αποτελεί έναν από τους βασικότερους πυλώνες για την αποτελεσματική αντιμετώπιση των παθογόνων ESKAPE. Η τακτική και συστηματική παρακολούθηση των βακτηριακών φορτίων σε υδάτινα οικοσυστήματα και εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων θα επιτρέψει την έγκαιρη ανίχνευση μεταβολών στα επίπεδα ανθεκτικότητας. Μέσω αυτής της διαρκούς επιτήρησης, θα είναι δυνατή η πρόβλεψη επιδημικών εξάρσεων και η άμεση εφαρμογή κατάλληλων μέτρων για τον περιορισμό της διασποράς ανθεκτικών στελεχών.

Παράλληλα, η ανάπτυξη νέων στρατηγικών απολύμανσης αποτελεί μια κρίσιμη ανάγκη, δεδομένων των περιορισμών των υφιστάμενων μεθόδων. Η εφαρμογή τεχνολογιών όπως η υπεριώδης ακτινοβολία τύπου C (UVC) και οι προηγμένες οξειδωτικές διεργασίες (AOPs) μπορεί να ενισχύσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης, μειώνοντας τα βακτηριακά φορτία ακόμη και σε ανθεκτικά στελέχη. Επιπλέον, η διερεύνηση της συνδυαστικής χρήσης αυτών των μεθόδων με τις παραδοσιακές τεχνικές θα μπορούσε να οδηγήσει στη δημιουργία καινοτόμων, ασφαλών και οικονομικά βιώσιμων λύσεων για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Ιδιαίτερη σημασία έχει η εις βάθος μελέτη των μηχανισμών ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν. Η ανάλυση των γενετικών και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών αυτών των μικροοργανισμών θα επιτρέψει τον εντοπισμό νέων μηχανισμών αντοχής και θα συμβάλει στην κατανόηση της εξέλιξης και της διασποράς τους στο περιβάλλον. Αυτή η γνώση μπορεί να αξιοποιηθεί τόσο για την ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών όσο και για τον περιορισμό της μικροβιακής αντοχής σε περιβαλλοντικό επίπεδο.

Εξίσου σημαντική είναι η συνεργασία με δημόσιους φορείς υγείας, καθώς και με ερευνητικά ιδρύματα, για τη δημιουργία μιας εθνικής βάσης δεδομένων που θα περιλαμβάνει τα προφίλ ανθεκτικότητας των παθογόνων ESKAPE. Μια τέτοια πλατφόρμα θα διευκολύνει την ανταλλαγή πληροφοριών μεταξύ κλινικών, εργαστηρίων και δημόσιων αρχών, συμβάλλοντας στην έγκαιρη λήψη μέτρων διαχείρισης λοιμώξεων και στην ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών.

Τέλος, η εκπαίδευση και ενημέρωση των επαγγελματιών υγείας, των φορέων διαχείρισης υδάτινων πόρων και του ευρύτερου κοινού είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση της αντιμικροβιακής αντοχής. Εκστρατείες ευαισθητοποίησης και εκπαιδευτικά προγράμματα μπορούν να συμβάλουν στη διάδοση καλών πρακτικών και στην κατανόηση της σημασίας της πρόληψης. Η ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών, τόσο στην ιατρική όσο και στη γεωργία, αποτελεί βασικό πυλώνα στη μάχη κατά της μικροβιακής αντοχής.

Συνολικά, οι μελλοντικές προτάσεις που προκύπτουν από την παρούσα μελέτη εστιάζουν στη δημιουργία ενός ολοκληρωμένου και πολυδιάστατου πλαισίου δράσης, το

οποίο θα μπορεί να αντιμετωπίσει τις προκλήσεις που θέτουν τα παθογόνα ESKAPE και να διασφαλίσει τη δημόσια υγεία με τρόπο βιώσιμο και επιστημονικά τεκμηριωμένο.

## Βιβλιογραφία

- Adesoji, A., Onuh, J., Bagu, J., & Itohan, S. (2019). Prevalence and antibiogram study of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and selected drinking water of Dutsin-Ma, Katsina State, Nigeria. *African Health Sciences*, 19(2), 1385-1392.
- Akanbi, O. E., Njom, H. A., Fri, J., Otigbu, A. C., & Clarke, A. M. (2017). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from recreational waters and beach sand in Eastern Cape Province of South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(9), 1001.
- Akbari, M., Bakhshi, B., & Peerayeh, S. N. (2016). Particular distribution of *Enterobacter cloacae* strains isolated from urinary tract infection within clonal complexes. *Iranian Biomedical Journal*, 20(1), 49.
- Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M.-L., Hamze, M., & Kempf, M. (2016). Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* species. *Frontiers in Microbiology*, 7(49). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00049>.
- Amarasiri M., Sano D., Suzuki S. (2020). Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 50, 2016–2059.
- Arias, C. A., Contreras, G. A., & Murray, B. E. (2010). Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(6), 555–562. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03214.x>.
- Asha, A., Karnaker, V. K., & Rai, R. (2017). Characterization and antibiogram of *Klebsiella* isolated from clinical samples. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3), 386–396. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.603.044>.
- Ateba, C. N., Mbewe, M., Moneoang, M. S., & Bezuidenhout, C. C. (2010). Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk in the Mafikeng area, North West Province, South Africa. *South African Journal of Science*, 106(11/12), 1–6. <https://doi.org/10.4102/sajs.v106i11/12.422>.
- Baorto, E. P., & Baorto, D. (2016). *Staphylococcus aureus* infection. *Medscape*.
- Barati, A., Ghaderpour, A., Chew, L. L., Bong, C. W., Thong, K. L., Chong, V. C., & Chai, L. C. (2016). Isolation and characterization of aquatic-borne *Klebsiella pneumoniae* from tropical estuaries in Malaysia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(4), 426.
- Carattoli, A. (2003). Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Current issues in molecular biology*, 5 4, 113-22.
- Caruso, G., Monticelli, L., Caruso, R., & Bergamasco, A. (2008). Development of a fluorescent antibody method for the detection of *Enterococcus faecium* and its potential for coastal aquatic environment monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 56(2), 318-324.
- Castillo-Rojas, G., Mazari-Hiriart, M., De León, S. P., Amieva-Fernández, R. I., Agis-Juárez, R. A., Huebner, J., & López-Vidal, Y. (2013). Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from water and clinical samples: Antimicrobial susceptibility and genetic relationships. *PLoS ONE*, 8(3), e59491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059491>.

- Chakraborty, S., Mohsina, K., Sarker, P. K., Alam, M. Z., Karim, M. I. A., & Sayem, S. A. (2016). Prevalence, antibiotic susceptibility profiles, and ESBL production in *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* among hospitalized patients. *Periodicum Biologorum*, 118(1).
- Chouhan, S. (2015). Increased prevalence of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in municipal drinking water supplies. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 5(1), 163-171.
- Davin-Regli, A., Lavigne, J.-P., & Pagès, J.-M. (2019). *Enterobacter* spp.: Update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(4), e00002-19.
- Dodd, M. C. (2012). Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(6), 1754–1771. <https://doi.org/10.1039/c2em00006g>
- Dong, S., Massalha, N., Plewa, M. J., & Nguyen, T. H. (2018). The impact of disinfection Ct values on cytotoxicity of agricultural wastewaters: Ozonation vs. chlorination. *Water Research*, 144, 482–490. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.07.065>
- Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., & Benade, S. (2009). The ecology, biology, and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An overview. *Microbes and Environments*, 24(1), 1.
- Foster, T. (1996). *Staphylococcus*. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed., Chapter 12). Galveston, TX: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Gallego, L. (2016). *Acinetobacter baumannii*: Factors involved in its high adaptability to adverse environmental conditions. *Journal of Microbiology and Experimentation*, 3(2), 00085.
- Garcia, P., Martinez, B., Obeso, J., & Rodriguez, A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*, 47(6), 479-485.
- Goldstein, R. E. R., Micallef, S. A., Gibbs, S. G., He, X., George, A., Sapkota, A., Joseph, S. W., & Sapkota, A. R. (2014). Occupational exposure to *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. among spray irrigation workers using reclaimed water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4340-4355.
- Goodwin, K. D., McNay, M., Cao, Y., Ebentier, D., Madison, M., & Griffith, J. F. (2012). A multi-beach study of *Staphylococcus aureus*, MRSA, and enterococci in seawater and beach sand. *Water Research*, 46(13), 4195-4207.
- Goodwin, K., & Pobuda, M. (2009). Performance of CHROMagar™ Staph aureus and CHROMagar™ MRSA for detection of *Staphylococcus aureus* in seawater and beach sand: Comparison of culture, agglutination, and molecular analyses. *Water Research*, 43(19), 4802-4811.
- Grimont, F., & Grimont, P. A. (2006). The genus *Enterobacter*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (Vol. 6, pp. 197-214). Springer.
- Gundestrup, S., Struve, C., Stahlhut, S. G., & Hansen, D. S. (2014). First case of liver abscess in Scandinavia due to the international hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clone



- ST23. *The Open Microbiology Journal*, 8, 22–25.  
<https://doi.org/10.2174/1874285801408010022>.
- Hatcher, S., Myers, K., Heaney, C., Larsen, J., Hall, D., Miller, M., & Stewart, J. (2016). Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in surface waters near industrial hog operation spray fields. *Science of the Total Environment*, 565, 1028–1036.
- Hoffmann, H., & Roggenkamp, A. (2003). Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5306–5318.
- Hrenovic, J., Durn, G., Music, M. S., Dekic, S., Troskot-Corbic, T., & Skoric, D. (2017). Extensively and multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* recovered from technosol at a dump site in Croatia. *Science of the Total Environment*, 607–608, 1049–1055. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.271>.
- Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., Hackel, M. A., Lob, S. H., & Sahm, D. F. (2017). Antimicrobial susceptibility of Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Asia–Pacific countries: SMART 2013–2015. *Journal of Medical Microbiology*, 66(1), 61–69. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000425>
- Karumathil, D. P., Yin, H.-B., Kollanoor-Johny, A., & Venkitanarayanan, K. (2014). Effect of chlorine exposure on the survival and antibiotic gene expression of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(2), 1844–1854.
- Kauppinen, A., Siponen, S., Pitkänen, T., Holmfeldt, K., Pursiainen, A., Torvinen, E., & Miettinen, I. T. (2021). Phage biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Viruses*, 13(5), 928.
- Khan, N. H., Ahsan, M., Taylor, W. D., & Kogure, K. (2009). Culturability and survival of marine, freshwater, and clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes and Environments*, 24(1), 1008090221.
- Leister, C., & Hügler, M. (2022). Genome Analysis of *Enterobacter asburiae* and *Lelliottia* spp. Proliferating in Oligotrophic Drinking Water Reservoirs and Lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(14), e00471–22. <https://doi.org/10.1128/aem.00471-22>
- Lee, C. S., Wetzal, K., Buckley, T., Wozniak, D., & Lee, J. (2011). Rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated water and aerosols targeting gyrB gene using real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 893–903. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05071.x>.
- Lee, C.-R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, C.-J., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 55. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>.
- Lin, Q., Deslouches, B., Montelaro, R. C., & Di, Y. P. (2018). Prevention of ESKAPE pathogen biofilm formation by antimicrobial peptides WLBU2 and LL37. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(5), 667–672. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.002>.

- Loveday, H., Wilson, J., Kerr, K., Pitchers, R., Walker, J., & Browne, J. (2014). Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: A rapid systematic review. *Journal of Hospital Infection*, 86(1), 7-15.
- Ma, Y. X., Wang, C. Y., Li, Y. Y., Li, J., Wan, Q. Q., Chen, J. H., Tay, F. R., & Niu, L. N. (2020). Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. *Advanced Science*, 7(9), 1901872.
- Maal, K. B., Delfan, A. S., & Salmanizadeh, S. (2014). Isolation and identification of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* bacteriophages and their applications in wastewater treatment and coliform's phage therapy. *Research Journal of Environmental Sciences*, 8(3), 123-133.
- Martino, G.P., Espariz, M., Gallina Nizo, G., Esteban, L., Blancato, V.S., & Magni, C. (2018). Safety assessment and functional properties of four enterococci strains isolated from regional Argentinean cheese. *International journal of food microbiology*, 277, 1-9.
- Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: Clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7(7), 887–902. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.61>.
- Modh, K. S., Parmar, B., Chaudhary, J., Bhandari, B., Nayak, J., Thakur, S., Pargi, Z., & Patel, N. (2021). Molecular detection of *Klebsiella* spp. from poultry meat. *Indian Journal of Pure & Applied Biosciences*, 9(5), 511-518.
- Moneoang, M. S., & Bezuidenhout, C. C. (2009). Characterization of enterococci and *Escherichia coli* isolated from commercial and communal pigs from Mafikeng in the North-West Province, South Africa. *African Journal of Microbiology Research*, 3(2), 88–96.
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10, 539.
- Nakonieczna, J., Wozniak, A., Pieranski, M., Rapacka-Zdonczyk, A., Ogonowska, P., & Grinholc, M. (2019). Photoinactivation of ESKAPE pathogens: Overview of a novel therapeutic strategy. *Future Medicinal Chemistry*, 11(5), 443-461.
- Namratha, K., Sreeshma, P., Subbannayya, K., Dinesh, P., & Champa, H. (2015). Characterization and antibiogram of *Klebsiella* spp. isolated from clinical specimens in a rural teaching hospital. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, 3(3), 878–883.
- Narciso-da-Rocha, C., Vaz-Moreira, I., Svensson-Stadler, L., Moore, E. R., & Manaia, C. M. (2013). Diversity and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. in water from the source to the tap. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(1), 329-340.
- Navidinia, M., Goudarzi, M., Rameshe, S. M., Farajollahi, Z., Asl, P. E., & Mounesi, M. R. (2017). Molecular characterization of resistance genes in MDR-ESKAPE pathogens. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(2), 779–792.
- Nyenje, M. E., Odjadjare, C. E., Tanih, N. F., Green, E., & Ndip, R. N. (2012). Foodborne pathogens recovered from ready-to-eat foods from roadside cafeterias and retail outlets in Alice, Eastern Cape Province, South Africa: Public health implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(8), 2608–2619. <https://doi.org/10.3390/ijerph9082608>.

- Odonkor, S. T. (2014). Radiation sensitivity and molecular characterization of water-borne multidrug-resistant *Escherichia coli*.
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 11(3), 297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>.
- Pirnay, J.-P., Verbeken, G., Ceyssens, P.-J., Huys, I., De Vos, D., Ameloot, C., & Fauconnier, A. (2018). The magistral phage. *Viruses*, 10(2), 64.
- Rai, M. K., Deshmukh, S., Ingle, A., & Gade, A. (2012). Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 841-852.
- Ren, Y., Ren, Y., Zhou, Z., Guo, X., Li, Y., Feng, L., & Wang, L. (2010). Complete genome sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* type strain ATCC 13047. *Journal of Bacteriology*, 192(9), 2463–2464. <https://doi.org/10.1128/JB.00067-10>.
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *The University of Chicago Press*. <https://doi.org/10.1086/533452>
- Sabtu, N.S., Enoch, D.A., & Brown, N.M. (2015). Antibiotic resistance: what, why, where, when and how? *British medical bulletin*, 116, 105-13.
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed Research International*, 2016, Article 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>.
- Santos, G. A., Dropa, M., Rocha, S. M., Peternella, F. A., & Razzolini, M. T. P. (2020). *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in drinking water fountains in urban parks. *Journal of Water and Health*, 18(5), 654-664.
- Shimabuku, Q. L., Ueda-Nakamura, T., Bergamasco, R., & Fagundes-Klen, M. R. (2018). Chick–Watson kinetics of virus inactivation with granular activated carbon modified with silver nanoparticles and/or copper oxide. *Process Safety and Environmental Protection*, 117, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.04.005>
- Simcox, L. J., Pereira, R. P., Wellington, E. M., & Macpherson, J. V. (2019). Boron-doped diamond as a low biofouling material in aquatic environments: Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(27), 25024-25033.
- Singh, B. R. (2018). ESKAPE pathogens in animals and their antimicrobial drug resistance pattern. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 7(1), 1-10.
- Staley, C., Dunny, G. M., & Sadowsky, M. J. (2014). Environmental and animal-associated enterococci. *Advances in Applied Microbiology*, 87, 147-186.
- Stover, C., Pham, X., Erwin, A., Mizoguchi, S., Warrenner, P., Hickey, M., Brinkman, F., Hufnagle, W., Kowalik, D., & Lagrou, M. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>.
- Tabah, A., Koulenti, D., Laupland, K.B., Misset, B., Vallés, J., Bruzzi de Carvalho, F., Paiva, J.A., Çakar, N., Ma, X., Eggimann, P., Antonelli, M., Bonten, M.J., Csomós, Á., Krueger, W.A., Mikstacki, A., Lipman, J., Depuydt, P., Vésin, A., Garrouste-Orgeas,

- M., Zahar, J., Blot, S.I., Carlet, J.M., Brun-Buisson, C., Martin, C.D., Rello, J., Dimopoulos, G., & Timsit, J. (2012). Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROBACT International Cohort Study. *Intensive Care Medicine*, 38, 1930-1945.
- Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2017). *Staphylococcus aureus*. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Tiroidimos, I., Arvanitidou, M., Dardavessis, T., Bisiklis, A., & Alexiou Daniil, S. (2010). Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from swimming pools in northern Greece. *EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal*, 16(7), 783-787.
- Trautmann, M., Halder, S., Hoegel, J., Royer, H., & Haller, M. (2008). Point-of-use water filtration reduces endemic *Pseudomonas aeruginosa* infections on a surgical intensive care unit. *American Journal of Infection Control*, 36(6), 421-429. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2007.08.010>.
- Trivedi, M., Patil, S., Shettigar, H., Mondal, S., & Jana, S. (2015). In vitro evaluation of biofield treatment on *Enterobacter cloacae*: Impact on antimicrobial susceptibility and biotype. *Bacteriology & Parasitology*, 6, Article 1000206. <https://doi.org/10.4172/2332-0910.1000206>.
- Tsai, H.-C., Chou, M.-Y., Shih, Y.-J., Huang, T.-Y., Yang, P.-Y., Chiu, Y.-C., Chen, J.-S., & Hsu, B.-M. (2018). Distribution and genotyping of aquatic *Acinetobacter baumannii* strains isolated from the Puzi River and its tributaries near areas of livestock farming. *Water*, 10(10), 1374.
- Umar, M., Roddick, F., & Fan, L. (2019). Moving from the traditional paradigm of pathogen inactivation to controlling antibiotic resistance in water—Role of ultraviolet irradiation. *Science of the Total Environment*, 662, 923-939. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.277>
- Valenzuela, A. S., Benomar, N., Abriouel, H., Cañamero, M. M., & Gálvez, A. (2010). Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiology*, 27(8), 955-961.
- Van Ginkel, M. (2017). *Molecular characterisation of the multi-antibiotic resistant bacteria, Klebsiella pneumoniae isolated from nosocomial infections* (Master's thesis, Cape Peninsula University of Technology).
- Vasaikar, S., Obi, L., Morobe, I., & Bisi-Johnson, M. (2017). Molecular characteristics and antibiotic resistance profiles of *Klebsiella* isolates in Mthatha, Eastern Cape province, South Africa. *International Journal of Microbiology*, 2017, Article 8367375. <https://doi.org/10.1155/2017/8367375>.
- Vazquez-Grande, G., & Kumar, A. (2015). Optimizing antimicrobial therapy of sepsis and septic shock: Focus on antibiotic combination therapy. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 36(2), 154-166.
- Venkateswaran, P., Vasudevan, S., David, H., Shaktivel, A., Shanmugam, K., Neelakantan, P., & Solomon, A.P. (2023). Revisiting ESKAPE Pathogens: virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13.

- Wang, C.-H., Hsieh, Y.-H., Powers, Z. M., & Kao, C.-Y. (2020). Defeating antibiotic-resistant bacteria: Exploring alternative therapies for a post-antibiotic era. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1061. <https://doi.org/10.3390/ijms21031061>.
- Yaneja, N., & Kaur, H. (2016). Insights into newer antimicrobial agents against Gram-negative bacteria. *Microbiology Insights*, 9, MBI.S29459.
- Zhang, Y., Hunt, H. K., & Hu, Z. (2013). Application of bacteriophages to selectively remove *Pseudomonas aeruginosa* in water and wastewater filtration systems. *Water Research*, 47(14), 4507-4518.

## Ιστότοποι

- Clinical And Laboratory Standards Institute - <https://clsi.org/>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) - <https://www.eucast.org/>
- <https://bio.tools/Biotools>
- <https://www.fishersci.co.uk/>
- <https://meteosearch.meteo.gr/>
- <https://microbe-canvas.com>
- <https://www.filterwater.com>
- [www.vetbact.org](http://www.vetbact.org)