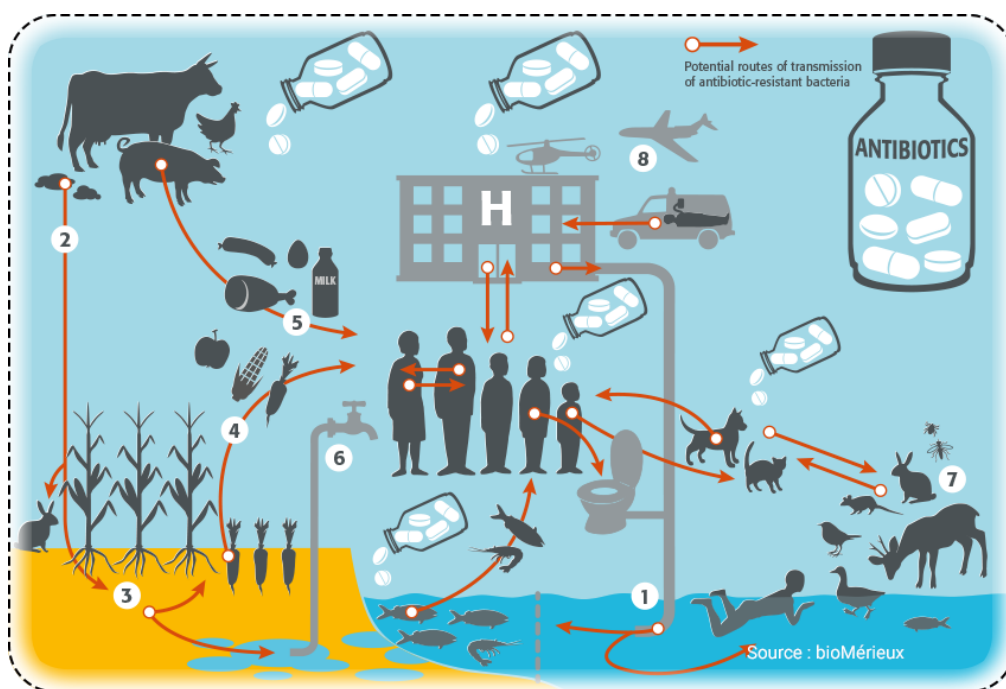




ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Διπλωματική Εργασία

*Αδρανοποίηση βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά
με μεθόδους απολύμανσης*



Φράγκου Γεωργία
Α.Μ. : 2012050103

Εξεταστική Επιτροπή

Βενιέρη Δανάη
Διαμαντόπουλος Ευάγγελος
Ξεκουκουλωτάκης Νικόλαος

Χανιά Σεπτέμβριος 2017

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Βενιέρη Δανάη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτής της διπλωματικής εργασίας η οποία πραγματεύεται ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Το ενδιαφέρον της, οι παρατηρήσεις της και η καθοδήγηση που πρόθυμα προσέφερε όποτε χρειαζόταν υπήρξαν για μένα πολύ σημαντικά. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Γουνάκη Ιωσηφίνα για όλα όσα μου προσέφερε το διάστημα αυτό, ήταν δίπλα μου κάθε στιγμή με επιμονή και κυρίως υπομονή, πάντα πρόθυμη να με καθοδηγήσει και να με βοηθήσει.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης, στα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κύριο Διαμαντόπουλο Ευάγγελο και κύριο Ξεκουκουλωτάκη Νικόλαο για την παρουσία τους και για το χρόνο που διέθεσαν στην αξιολόγηση της εργασίας.

Ευχαριστώ τη φίλη αλλά και συνάδελφο μου στο εργαστήριο, Γαβαλά Κωνσταντίνα για την όμορφη συνεργασία που είχαμε.

Τέλος στο σημείο αυτό δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδελφό μου για την υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου. Χωρίς τη βοήθεια τους θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση των σπουδών μου.

Περίληψη

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η αντίσταση στα αντιβιοτικά αποτελεί ένα από τα πιο κρίσιμα ζητήματα της παγκόσμιας δημόσιας υγείας τα τελευταία χρόνια. Συγκεκριμένα, η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις ευρωπαϊκές χώρες με τα υψηλότερα επίπεδα μικροβιακής αντοχής, ενώ είναι από τις πρώτες χώρες στη συνολική κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων (European Surveillance of Antimicrobial Consumption).

Μια από τις σημαντικότερες αιτίες της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά είναι η ανεξέλεγκτη και ακατάλληλη χρήση τους παγκοσμίως η οποία οφείλεται κυρίως στην έλλειψη ορθής ενημέρωσης και στην εύκολη πρόσβαση του κοινού σε αυτά. Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται από πάρα πολλούς ανθρώπους για να αντιμετωπίσουν λανθασμένο είδος μολύνσεων σε μη ενδεδειγμένη δοσολογία και για μεγάλη χρονική περίοδο (World Health Organization).

Οι ουσίες αυτές διαχέονται και παραμένουν στο περιβάλλον μέσω ενός πολύπλοκου φαύλου κύκλου μετασχηματισμού και βιοσυσσώρευσης. Μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών απελευθερώνονται στα αστικά λυμάτα λόγω ελλιπούς μεταβολισμού από τον άνθρωπο ή λόγω απόρριψης των μη χρησιμοποιηθέντων αντιβιοτικών. Ως αποτέλεσμα, ανθεκτικά βακτήρια στα αντιβιοτικά και ανθεκτικά στα αντιβιοτικά γονίδια έχουν ανιχνευθεί σε μεγάλο βαθμό σε δείγματα λυμάτων. Σύμφωνα με μελέτες τα λύματα, ή ακόμη και τα επεξεργασμένα λύματα, περιέχουν υψηλότερες αναλογίες των διαφόρων ανθεκτικών βακτηριακών πληθυσμών σε σχέση με τις αντίστοιχες αναλογίες που περιέχονται σε επιφανειακά ύδατα. Αυτό συμβαίνει διότι οι συνθήκες στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (ΕΕΛ) είναι ευνοϊκές για τον πολλαπλασιασμό των παραπάνω. Οι ουσίες αυτές μπορούν να εισέλθουν στις ΕΕΛ μέσω των ανθρώπινων και ζωικών απέκκρισεων, αλλά και μέσω άμεσης διάθεσης των ιατρικών και βιομηχανικών αποβλήτων.

Κάποια από τα αντιβιοτικά απομακρύνονται κατά τη διάρκεια των διαδικασιών των ΕΕΛ, αλλά δεν αφαιρούνται όλα εντελώς. Το γεγονός αυτό χρήζει απαραίτητη την βελτιστοποίηση της διαδικασίας της απολύμανσης των λυμάτων, η οποία είναι απαραίτητη για τον έλεγχο μικροβιακών κινδύνων στην υγεία. Έτσι το ανθεκτικό βακτηριακό φορτίο αλλά και η ποσότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων στα υγρά απόβλητα θα αδρανοποιηθούν και θα εξαληφθούν.

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν ο έλεγχος της ανθεκτικότητας βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά, αφού σε πρώτη φάση τα στελέχη αυτά υποβλήθηκαν σε διαδικασία χλωρίωσης. Η δειγματοληψία των βακτηριακών

στελεχών πραγματοποιήθηκε μεταξύ Ιανουαρίου 2012 και Δεκεμβρίου 2012, στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής της κυρίας Χρύσας Μπούκη από την ΕΕΛ που εξυπηρετεί την κοινότητα των Χανίων. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από (i) ακατέργαστα λύματα, στην είσοδο του βιολογικού και (ii) την εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας πριν από την χλωρίωση. Τα στελέχη που απομονώθηκαν ανήκουν στις οικογένειες Enterococcaceae, Aeromonadaceae, Enterobacteriaceae, Rhizobiaceae, Vibrionaceae. Πραγματοποιήθηκε απολύμανση σε 23 διαφορετικά βακτήρια. Ως απολυμαντικό μέσο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα NaOCl (υποχλωριώδες νάτριο) συγκέντρωσης 1 mg/L. Οι αντιβιοτικές ουσίες που εξετάστηκαν είναι : Ampicillin (Penicillins), Cefaclor (2^{ης} γενιάς Cephalosporine). Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών εξετάστηκε βάσει της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration - MIC). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την χαρτογράφηση της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών είναι η μικρομέθοδος αραιώσεων σε ζωμό (Broth Microdilution Method), βάσει πρωτοκόλλου CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι κατά βάση τα στελέχη που είχαν απομονωθεί από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας είχαν πολύ μικρή μείωση του πληθυσμού τους ακόμα μετά τα 45 min του εκάστοτε πειράματος χλωρίωσης. Αντιθέτως η χλωρίωση κατάφερε να αδρανοποιήσει ευκολότερα και με μεγαλύτερη επιτυχία τα βακτήρια με προέλευση την είσοδο του βιολογικού καθαρισμού. Η απολύμανση κατέδειξε ποικίλες αντιδράσεις στο προφίλ ανθεκτικότητας των εναπομεινάντων κυττάρων.

Μεταξύ των αντιβιοτικών τα οποία δοκιμάστηκαν, τα βακτήρια φάνηκαν να εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικότητας στην Ampicillin. Από την άλλη το Cefaclor παρουσίασε αξιοσημείωτες μεταβολές της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης.

Η παραμένουσα ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά ακόμα και μετά την εφαρμογή της χλωρίωσης προκαλεί ανησυχίες και επιβεβαιώνει την υποψία πως τα λύματα αποτελούν φορέα των στοιχείων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
Περίληψη.....	3
Ευρετήριο εικόνων.....	7
Ευρετήριο πινάκων.....	7
Ευρετήριο γραφημάτων.....	8
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Αντιβιοτικά.....	11
1.1.1 β-λακτάμες.....	12
1.1.1.1 Ampicillin.....	13
1.1.1.2 Cefaclor.....	14
1.2 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.....	14
1.2.1. Το φαινόμενο στην Ελλάδα.....	16
1.2.2. Διάδοση της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον.....	19
1.3 Η τύχη των αντιβιοτικών σε μια ΕΕΛ.....	21
1.4 Απολύμανση των λυμάτων για την καταπολέμηση της ανθεκτικότητας.....	23
1.4.1 Μέσα και μέθοδοι απολύμανσης.....	24
1.4.2 Μηχανισμοί απολύμανσης.....	24
1.4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την απολύμανση.....	24
1.4.4 Χλωρίωση.....	28
1.4.4.1. Αντιδράσεις του χλωρίου με το νερό.....	28
1.4.4.2. Παραπροϊόντα της χλωρίωσης.....	29
1.4.5 Επίδραση της χλωρίωσης στα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια.....	29
2. Σκοπός.....	31
3. Μέθοδοι και Υλικά.....	32
3.1. Υλικά.....	32
3.2. Μέθοδοι.....	33
3.2.1. Μέθοδος απολύμανσης με χλώριο.....	33
3.2.1.1. Προετοιμασία.....	34
3.2.1.2. Πειραματική διαδικασία.....	35
3.2.2. Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων στα αντιβιοτικά.....	37
3.2.2.1. Προετοιμασία μητρικού διαλύματος.....	37
3.2.2.2. Προετοιμασία εναιωρήματος.....	38
3.2.2.1.1. Παρασκευή πλακών τιτλοποίησης.....	38

4.	Αποτελέσματα	40
4.1.	Χλωρίωση	41
4.2.	Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.....	56
4.2.1	Ampicillin	59
4.2.2	Cefaclor.....	61
4.2.3	Ανθεκτικότητα ανά βακτηριακό είδος	63
5.	Συμπεράσματα	71
6.	Μελλοντικές προτάσεις.....	73
7.	Βιβλιογραφία.....	74

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1 Ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά (http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial_resistance).	10
Εικόνα 2. Ετήσια παγκόσμια παραγωγή και χρήση αντιβιοτικών (Ρούτσιας, 2008).....	11
Εικόνα 3. Μηχανισμός δράσης των αντιβιοτικών (Πιτταράς, 2016).....	12
Εικόνα 4. Χημική δομή των εξεταζόμενων αντιβιοτικών β-λακτάμης (Ρούτσιας, 2008).	13
Εικόνα 5. Θάνατοι που οφείλονται στην αντιμικροβιακή αντοχή (AMR) σε σύγκριση με άλλες σημαντικές αιτίες (O'Neill, 2014).	15
Εικόνα 6. Θάνατοι που οφείλονται στην αντιμικροβιακή αντοχή (AMR) σε παγκόσμια κλίμακα το 2050 (O'Neill, 2014).....	16
Εικόνα 7. Εξωνοσοκομειακή κατανάλωση αντιβιοτικών στις ευρωπαϊκές χώρες, κατά το έτος 2012 εκφρασμένη σε ημερήσιες δόσεις ανά 100 κατοίκους και ανά ημέρα. Πηγή: ECDC Surveillance of antimicrobial consumption in Europe.	17
Εικόνα 8. Σύγκριση της εξωνοσοκομειακής κατανάλωσης αντιβιοτικών στο βόρειο και νότιο τμήμα της Ευρώπης, κατά το έτος 2012 εκφρασμένη σε ημερήσιες δόσεις ανά 100 κατοίκους και ανά ημέρα. ECDC Surveillance of antimicrobial consumption in Europe.	18
Εικόνα 9. Τρόποι διάδοσης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον http://www.globalhealthaction.co.uk/antibiotic-resistance/environmental-impact-of-antibiotics-production-sparks-global-concerns	20
Εικόνα 10. Διάγραμμα λειτουργείας μια τυπικής εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων (Pepper et al., 2015)	22
Εικόνα 11. Αποικίες του βακτηρίου <i>Klebsiella pneumoniae</i> κατά το 3 ^ο και 5 ^ο λεπτό της χλωρίωσης.....	36
Εικόνα 12. Διάταξη πλάκας τιτλοποίησης	39
Εικόνα 13. Πλάκα τιτλοποίησης μετά από επώαση 24 h.....	39

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1. Εύρος συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ευαισθησίας των μικροοργανισμών	37
Πίνακας 2. Διαλύτες και αραιωτικά των Αντιβιοτικών	37
Πίνακας 3. Ομαδοποίηση βακτηρίων που συλλέχθηκαν από την είσοδο της ΕΕΛ.....	40
Πίνακας 4. Ομαδοποίηση βακτηρίων που συλλέχθηκαν από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας της ΕΕΛ	41
Πίνακας 5. Βακτηριακά στελέχη που υποβλήθηκαν σε χλωρίωση με NaOCl συγκέντρωσης 1mg/L ως προς Cl ₂	52

Πίνακας 6. Τιμές C·t (min) για 99,9 % μείωση πληθυσμού των βακτηρίων που υποβλήθηκαν σε χλωρίωση με χρήση NaOCl συγκέντρωσης 1 mg/L ως προς Cl ₂ .Θερμοκρασία δείγματος 25°C και pH 7.	55
Πίνακας 7. Eucast Breakpoints table	56

Ευρετήριο γραφημάτων

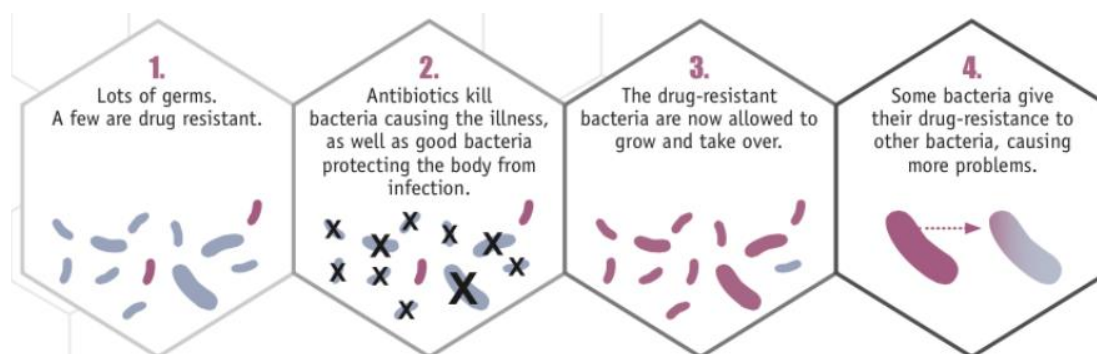
Γράφημα 1. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Enterococcaceae με NaOCl (C _{NaOCl} = 1mg/L)	42
Γράφημα 2. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Rhizobiaceae με NaOCl (C _{NaOCl} = 1mg/L)	43
Γράφημα 3. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Enterocobacteriaceae με NaOCl (C _{NaOCl} =1mg/L).....	44
Γράφημα 4. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Enterocobacteriaceae με NaOCl (C _{NaOCl} = 1mg/L)	46
Γράφημα 5. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Enterocobacteriaceae με NaOCl (C _{NaOCl} = 1mg/L)	47
Γράφημα 6. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Enterocobacteriaceae με NaOCl (C _{NaOCl} = 1mg/L)	48
Γράφημα 7. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Vibrionaceae με NaOCl (C _{NaOCl} = 1mg/L)	49
Γράφημα 8. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Aeromonadaceae με NaOCl (C _{NaOCl} =1mg/L)	50
Γράφημα 9. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του βαθμού ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε κάθε αντιβιοτικό	58
Γράφημα 10. Μέση τιμή ανασταλτικής συγκέντρωσης ανά βακτηριακή οικογένεια και αντιβιοτικό παράγοντα.....	58
Γράφημα 11. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στην Ampicillin επί του συνόλου των στελεχών βάσει επεξεργασίας	59
Γράφημα 12. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στην Ampicillin επί του συνόλου κάθε οικογένειας βακτηρίων.....	60
Γράφημα 13. Σύγκριση της MIC για την Ampicillin των στελεχών βάσει προέλευσης 60	
Γράφημα 14. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στην Cefaclor επί του συνόλου των στελεχών βάσει επεξεργασίας	61
Γράφημα 15. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στην Cefaclor επί του συνόλου κάθε οικογένειας βακτηρίων.....	62
Γράφημα 16. Σύγκριση της MIC για το Cefaclor των στελεχών βάσει προέλευσης	62
Γράφημα 17. Προφίλ ανθεκτικότητας A. hydrophila από την είσοδο του βιολογικού.	63
Γράφημα 18. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου E. faecium από την είσοδο του βιολογικού.....	64

Γράφημα 19. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου <i>E. Sakazakii</i> από την είσοδο του βιολογικού.....	65
Γράφημα 20. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου <i>E.coli</i> από την είσοδο του βιολογικού.....	66
Γράφημα 21. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου <i>K. oxytoca</i> από την είσοδο του βιολογικού.....	67
Γράφημα 22. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου <i>E.cloacae</i> από την είσοδο του βιολογικού.....	68
Γράφημα 23. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου <i>E.cloacae</i> από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	68
Γράφημα 24. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου <i>V.parahaemolyticus</i> από την είσοδο του βιολογικού.....	69
Γράφημα 25. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου <i>V.alginolyticus</i> από την είσοδο του βιολογικού.....	70

1. Εισαγωγή

Η ανάπτυξη των αντιβιοτικών είναι ένα από τα σημαντικότερα επιτεύγματα του 20^{ου} αιώνα, χάρις αυτά εκατομμύρια ανθρώπινες ζωές έχουν σωθεί. Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ευρέος φάσματος μικροβιακών λοιμώξεων και είναι απαραίτητα για την ιατρική περίθαλψη (Marti et al., 2014). Εκτός από τη χρήση τους στην ανθρώπινη θεραπεία, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται επίσης στην κτηνοτροφία και τη γεωργία. Η ευρεία χρήση τους προκάλεσε την αύξηση της κατανάλωσης τους με αποτέλεσμα την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είναι ένα προσαρμοστικό γενετικό γνώρισμα που υπάρχει ή αποκτάται από τους υποπληθυσμούς των βακτηρίων, επιτρέποντάς τους να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν παρουσία του αντιβιοτικού παράγοντα σε θεραπευτική συγκέντρωση, που φυσιολογικά θα έπρεπε να αναστέλλει ή να καταστρέφει αυτούς τους μικροοργανισμούς.



Εικόνα 1. Ανάπτυξη μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά
(http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial_resistance).

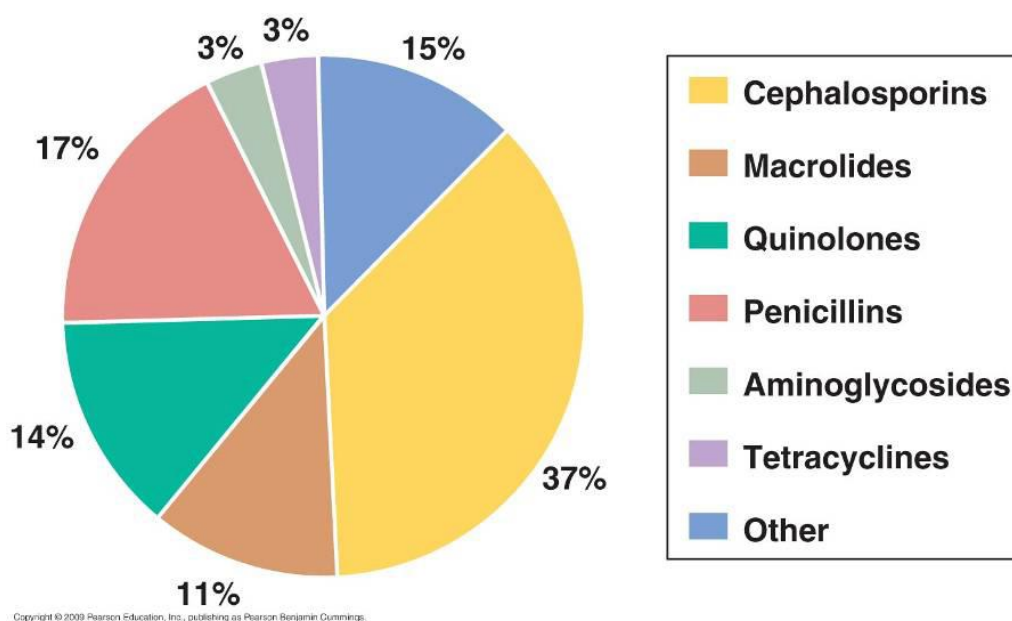
Το φαινόμενο αυτό έχει δυσμενέστερες συνέπειες για τη δημόσια υγεία, καθώς οι οργανισμοί που προκαλούν λοιμώξεις καθίστανται ανθεκτικοί στις πιο συχνά προδιαγεγραμμένες αντιβιοτικές θεραπείες κάνοντας μας ευάλωτους σε λοιμώξεις και μολυσματικές ασθένειες (Cosgrove, 2006). Αυξάνεται έτσι η πρόκληση για την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων αντιβιοτικών.

1.1 Αντιβιοτικά

Πολλά αντιβιοτικά βρίσκονται στη φύση και συντίθενται από βακτήρια και μύκητες. Υπάρχουν 3 διαφορετικά είδη αντιβιοτικών. Τα φυσικά αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη, μερικά ημι-συνθετικά αντιβιοτικά, δηλαδή φυσικά αντιβιοτικά, τα οποία έχουν υποστεί χημική τροποποίηση και τέλος αυτά που ανήκουν στην κατηγορία των συνθετικών παραγώγων, όπως οι κινολόνες.

Τα αντιβιοτικά είναι τα χημικοθεραπευτικά φάρμακα, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ή πρόληψη βακτηριακών λοιμώξεων. Δεν είναι αποτελεσματικά σε λοιμώξεις που προκαλούνται από ιούς, καθώς οι ιοί προσβάλλουν τα ανθρώπινα κύτταρα, ενσωματώνοντας το γενετικό τους υλικό στο γονιδίωμα αυτών. (Sharma et al., 2016).

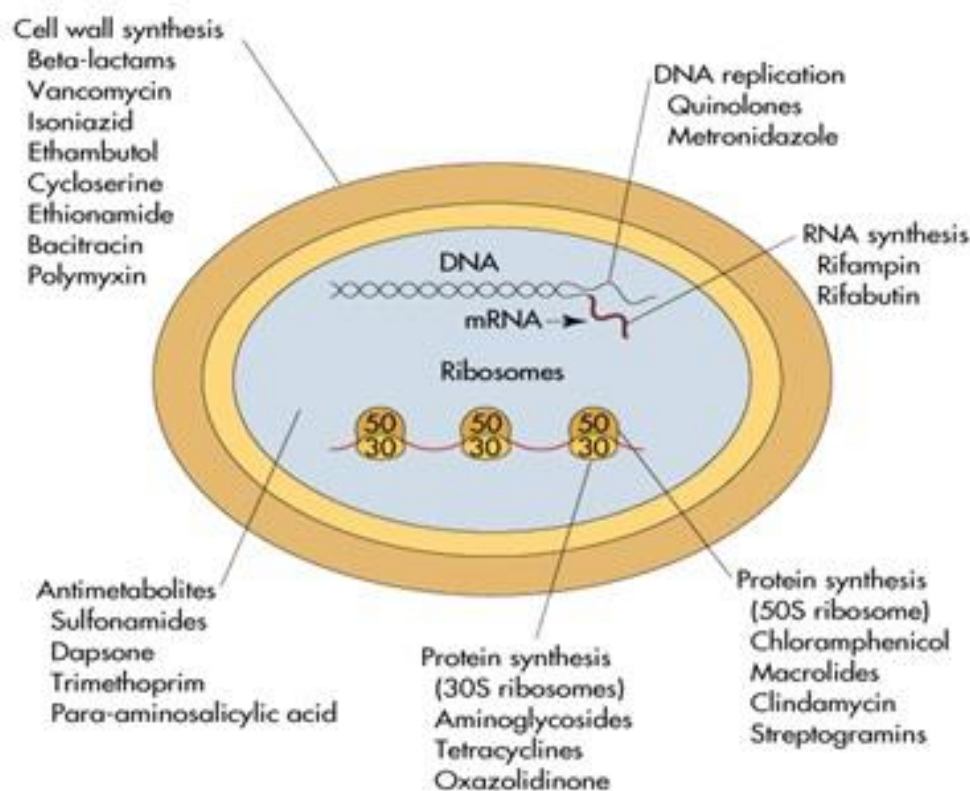
Χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες, όπως β-λακτάμες, κινολόνες, τετρακυκλίνες, μακρολίδες, σουλφοναμίδες, αμινογλυκοσίδες, καρβαπενέμες (Bouki et al., 2013).



Εικόνα 2. Ετήσια παγκόσμια παραγωγή και χρήση αντιβιοτικών (Ρούτσιαν, 2008).

Υπάρχουν πέντε μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών (Εικόνα 3). Ο πρώτος μηχανισμός αφορά την αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, οδηγώντας σε καταστροφή των βακτηρίων. Ένας δεύτερος μηχανισμός δράσης αφορά στα αντιβιοτικά, τα οποία στοχεύουν την αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων κατά την διάρκεια της αντιγραφής. Μερικά βακτηριοστατικά

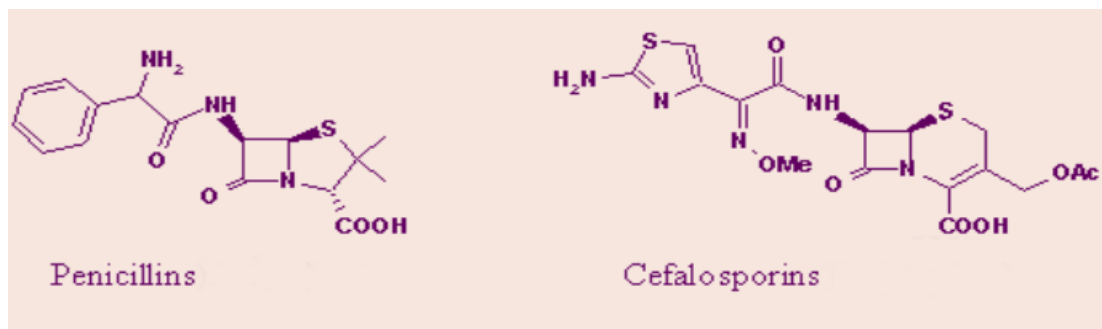
αντιβιοτικά στοχεύουν στην αναστολή της σύνθεσης του φολικού οξέος, με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων, αλλά όχι την θανάτωσή τους. Ένας άλλος μηχανισμός δράσης είναι η διατάραξη της κυτταρικής μεμβράνης και η αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης που οφείλονται στα βακτηριοστατικά αντιβιοτικά.



Εικόνα 3. Μηχανισμός δράσης των αντιβιοτικών (Πιτταράς, 2016).

1.1.1 β-λακτάμες

Περίπου τα δύο τρίτα των αντιβιοτικών που χορηγούνται στον άνθρωπο είναι β-λακτάμες. (Lachmayr et al., 2009). Τα αντιβιοτικά αυτά αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα, με σημαντικές πωλήσεις και παραγωγή στην κλινική βιομηχανία. Οι β-λακτάμες λειτουργούν αναστέλοντας τη σωστή σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Περιλαμβάνουν ομάδες αντιβιοτικών, όπως πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, οξαπενάμες, κεφαλομυκίνες και καρβαπενέμες (Uyaguari et al., 2011).



Εικόνα 4. Χημική δομή των εξεταζόμενων αντιβιοτικών β-λακτάμης (Ρούτσιος, 2008).

Η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά κατηγορίας β-λακτάμης, οφείλεται κυρίως στην παραγωγή του ενζύμου β-λακταμάση, το οποίο υδρολύει τον δακτύλιο της β-λακτάμης και συνεπώς απενεργοποιεί την αντιβιοτική του δράση. Η εμφάνιση της αντοχής στα αντιβιοτικά β-λακτάμης άρχισε πριν ακόμα αναπτυχθεί η πρώτη β-λακτάμη, δηλαδή η πενικιλίνη. Η πρώτη β-λακταμάση ταυτοποιήθηκε στο βακτήριο *Escherichia coli* πριν από την απελευθέρωση της πενικιλίνης για ιατρική χρήση. Τα τελευταία 20 χρόνια, πολλά νέα αντιβιοτικά β-λακτάμης έχουν αναπτυχθεί ειδικά σχεδιασμένα για να είναι ανθεκτικά στην υδρολυτική δράση των β-λακταμασών (Bradford, 2001).

1.1.1.1 Ampicillin

Η Ampicillin είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά β-λακτάμης με ετήσια παραγωγή 5.600 t. Είναι ένα αντιβιοτικό ευρέος φάσματος (Ospina et al., 1996). Η Ampicillin είναι δραστική έναντι των θετικών κατά Gram κόκκων, συμπεριλαμβανομένων των στρεπτοκοκκικών, σταφυλοκοκκικών και εντεροκοκκικών ειδών που δεν αντέχουν στην πενικιλίνη. Παρουσιάζει δράση έναντι ορισμένων αρνητικών κατά Gram οργανισμών, των Gram-θετικών αναερόβιων οργανισμών και των αρνητικών κατά Gram αναερόβιων οργανισμών. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, των μολύνσεων του δέρματος και της δομής του δέρματος, των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος και της ωτίτιδας (Castle, 2007)

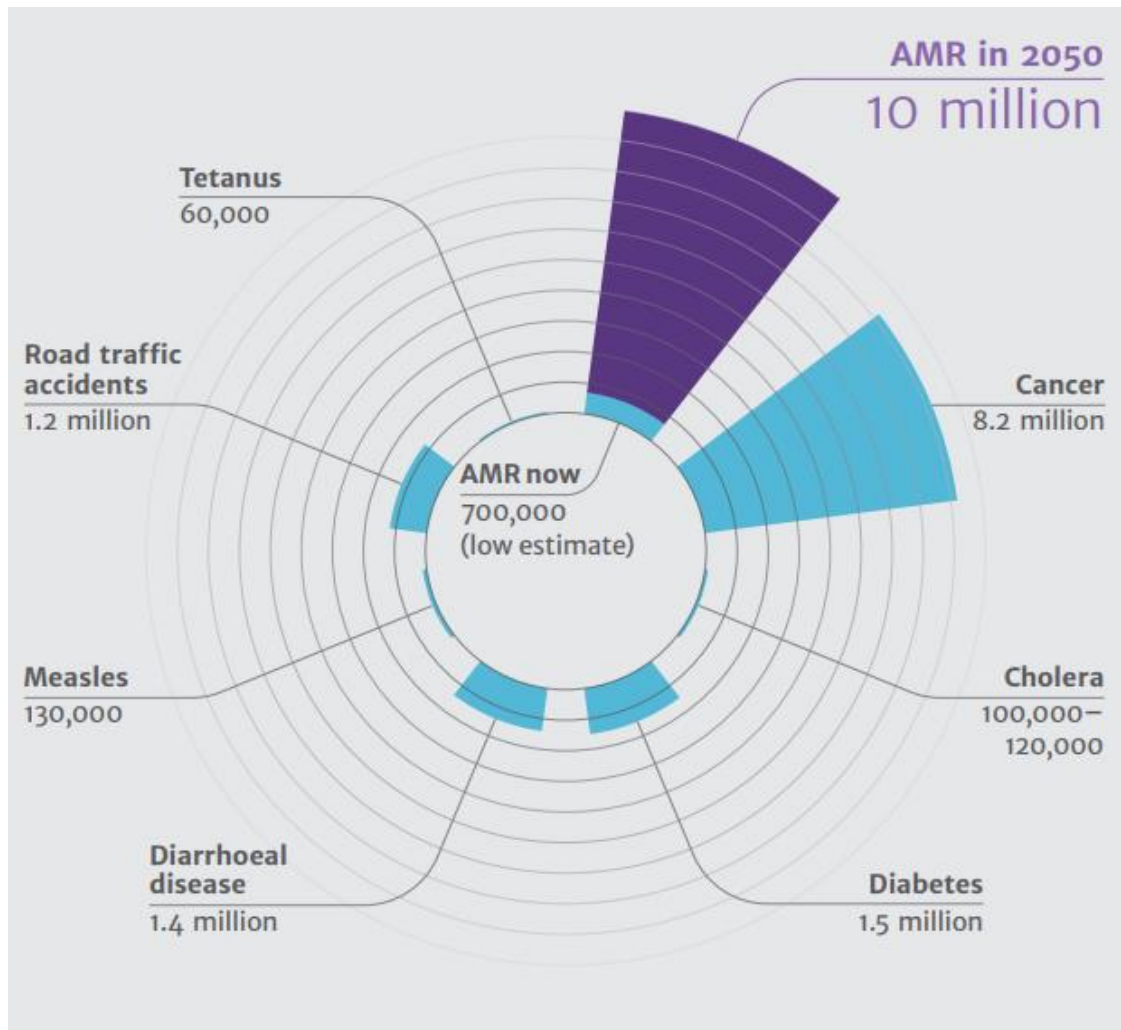
1.1.1.2 Cefaclor

Το Cefaclor κυκλοφόρησε πρώτη φορά το 1975, ανήκει στη δεύτερη γενιά αντιβιοτικών κεφαλοσπορίνης. Το πλεονέκτημα της δεύτερης γενιάς είναι η υψηλότερη ανθεκτικότητα κατά της β-λακταμάσης. Η β-λακταμάση είναι το ενζύμο με το οποίο ορισμένα βακτήρια, ιδίως Gram-αρνητικά ραβδοειδή βακτήρια, δύνανται να προφυλαχθούν από αντιβιοτικά β-λακτάμης. Το αντιβιοτικό αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία λοιμώξεων, όπως η μέση ωτίτιδα, λοιμώξεις της κατώτερης αναπνευστικής οδού κ.α, που προκαλούνται από διάφορα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια. (Meyers, 2000)

1.2 Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

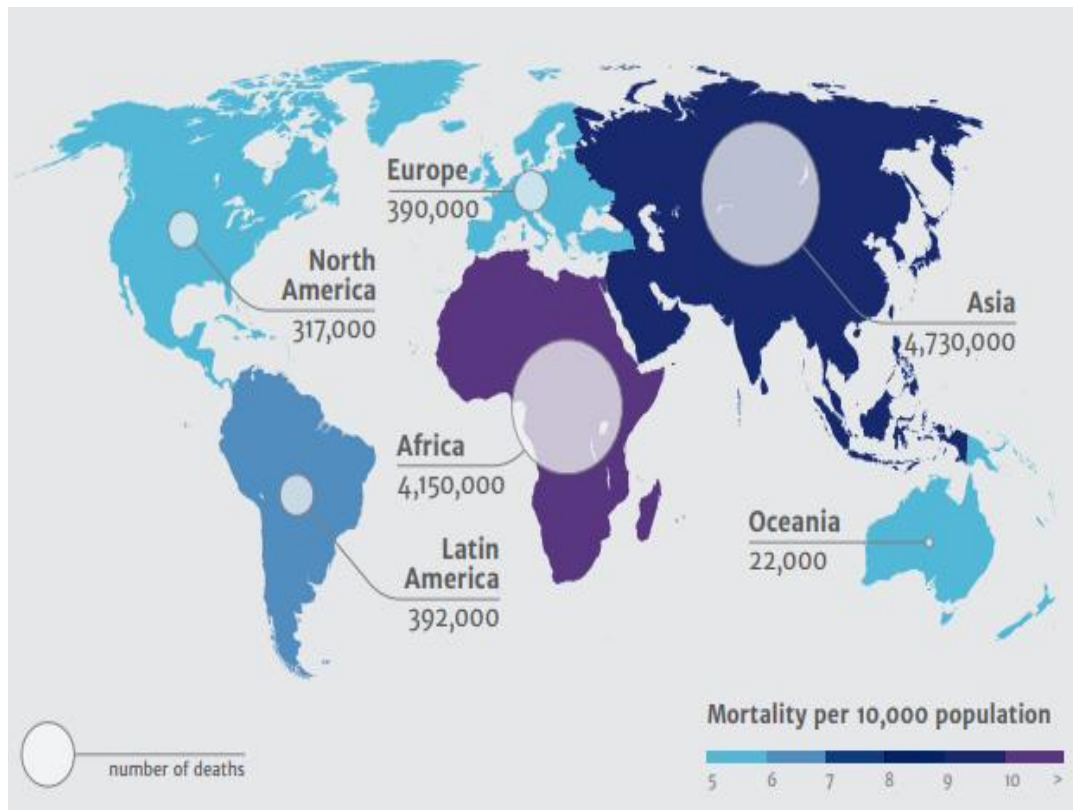
Ο Φλέμινγκ ανακάλυψε το πρώτο αντιβιοτικό, την πενικιλίνη το 1929, ενώ το 1946 άρχισε να παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα και να εμπορεύεται στην ελεύθερη αγορά. Από εκεί και στο εξής, εκατοντάδες αντιβιοτικά αναπτύχθηκαν (Carvalho et al., 2016). Αυτή η σειρά φαρμάκων έχει σώσει τη ζωή εκατομμυρίων ανθρώπων και ζώων για παραπάνω από 60 χρόνια. Παρ' όλα αυτά, το θαύμα αυτών των ειδικών φαρμάκων μετατρέπεται σε αυξανόμενη απειλή λόγω της εμφάνισης και της διάδοσης της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (World Health Organization, 2014).

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ορίζεται από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (World Health Organization), ως η ανθεκτικότητα ενός μικροοργανισμού σε κάποιο αντιβιοτικό παράγοντα, ο οποίος ήταν αρχικά αποτελεσματικός στην θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τον μικροοργανισμό. Το φαινόμενο μπορεί να πάρει μεγαλύτερες διαστάσεις αφού η συνεχόμενη επιλεκτική πίεση στα βακτήρια από διαφορετικά αντιβιοτικά έχει ως αποτέλεσμα την πολλαπλή ανθεκτικότητα των παθογόνων βακτηρίων στα αντιβιοτικά, μερικά από τα οποία δεν ανταποκρίνονται πλέον σε κανένα αντιβιοτικό, συμπεριλαμβανομένων των αντιβιοτικών ευρέος φάσματος, προκαλώντας έτσι ανίατες λοιμώξεις σε ανθρώπους και ζώα (Davies et al., 2010). Εγκυμονεί ο κίνδυνος της επιστροφής στην προ-αντιβιοτική εποχή, όταν οι κοινές μολυσματικές ασθένειες ήταν ακατάσχετες και αποτελούσαν αιτία θανάτου εκατομμυρίων ανθρώπων και ζώων (Gross, 2013).



Εικόνα 5. Θάνατοι που οφείλονται στην αντιμικροβιακή αντοχή (AMR) σε σύγκριση με άλλες σημαντικές αιτίες (O'Neill, 2014).

Στην πραγματικότητα, ο αριθμός των νεκρών που προκλήθηκαν από ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια είναι ήδη σημαντικός αλλά τείνει να αυξάνεται. Σύμφωνα με τις τελευταίες αναφορές, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής 23.000 άτομα πεθαίνουν κάθε χρόνο εξαιτίας μολύνσεων από βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά ενώ στην Ευρωπαϊκή Ένωση αυτό το πρόβλημα μπορεί να είναι η αιτία 25.000 θανάτων ετησίως. Σε παγκόσμιο επίπεδο, μια συντηρητική εκτίμηση υποδηλώνει ότι πεθαίνουν 700.000 άνθρωποι κάθε χρόνο λόγω αντοχής στα αντιβιοτικά. Εάν οι ανθεκτικές στα αντιβιοτικά μολύνσεις δεν αντιμετωπιστούν, επιπλέον 10 εκατομμύρια άνθρωποι μπορούν να πεθάνουν σε όλο τον κόσμο έως το 2050 (O'Neill, 2014). Ταυτόχρονα υπάρχει συνεχής μείωση της ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών.

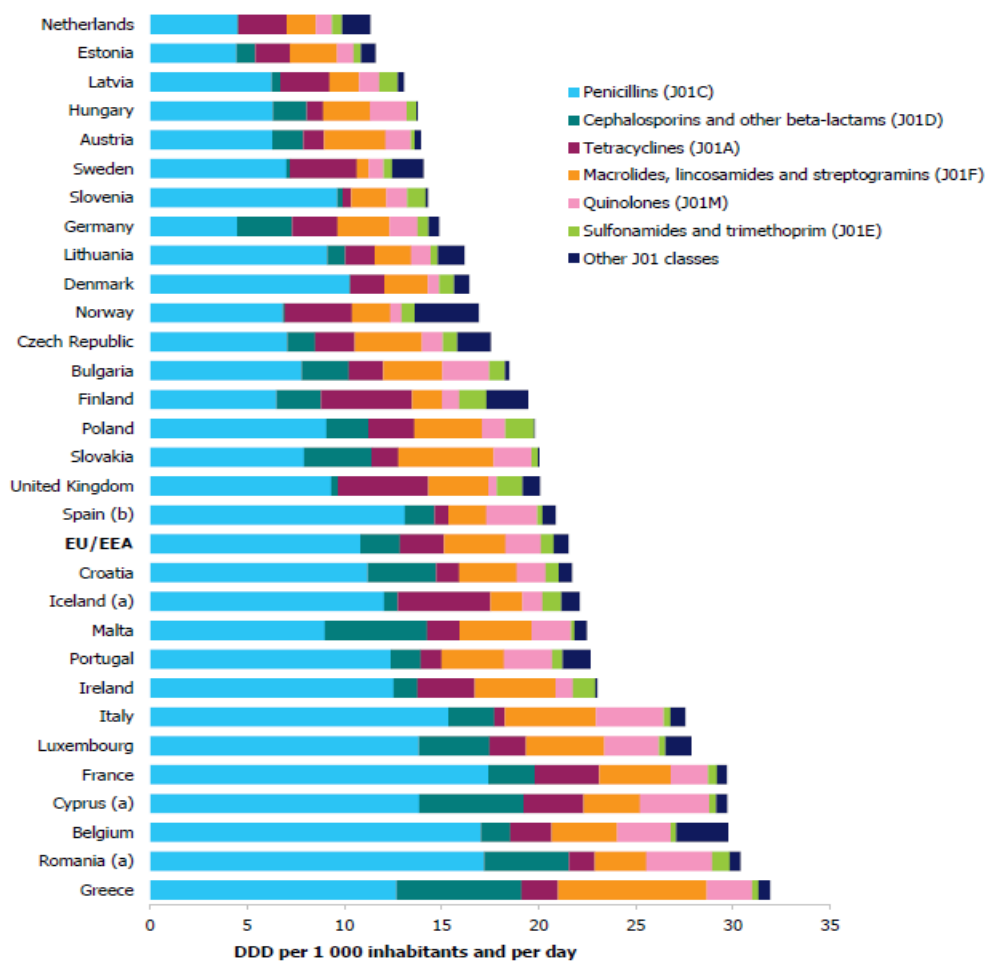


Εικόνα 6. Θάνατοι που οφείλονται στην αντιμικροβιακή αντοχή (AMR) σε παγκόσμια κλίμακα το 2050 (O'Neill, 2014).

1.2.1. Το φαινόμενο στην Ελλάδα

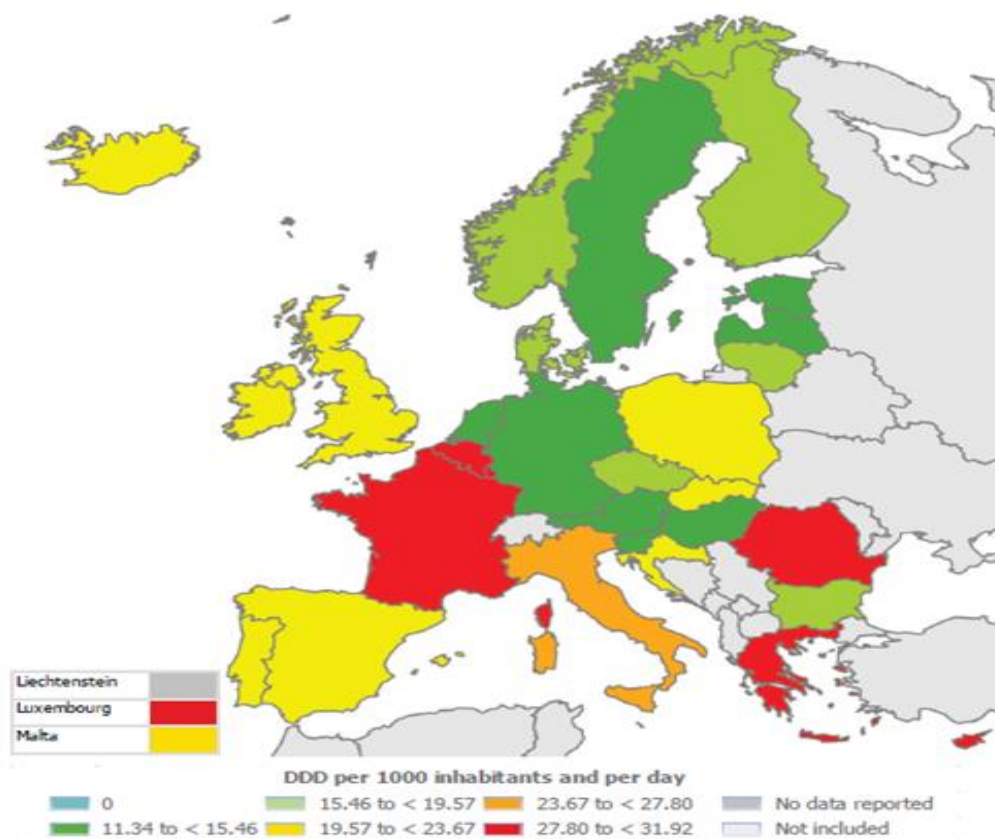
Κάθε χρόνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση 25.000 ασθενείς πεθαίνουν από λοιμώξεις που προκαλούνται από ανθεκτικά στα φάρμακα βακτήρια, γεγονός που συνεπάγεται κόστος άνω του 1,5 δισεκατομμυρίου ευρώ σε δαπάνες περίθαλψης υγείας και σε απώλειες παραγωγικότητας. Συνεπώς, η μικροβιακή αντοχή αποτελεί πρόβλημα που διογκώνεται συνεχώς.

Σύμφωνα με καταγραφές, η Ελλάδα είναι η πρώτη χώρα της Ευρώπης με συνολική, και ειδικότερα εξωνοσοκομειακή κατανάλωση αντιμικροβιακών (Εικόνα 7), με σταδιακή αύξηση από το 1997 (25.06 DID) έως το 2005 (34.73 DID) (DID: Καθορισμένη Ημερήσια Δόση ανά 1000 κατοίκους ανά ημέρα). Σύμφωνα με τα πλέον πρόσφατα στοιχεία, η συνολική εξωνοσοκομειακή κατανάλωση αντιμικροβιακών για το έτος 2008 ανήλθε στα επίπεδα του 45 DDD (DDD: Καθορισμένη Ημερήσια Δόση) στη χώρα μας, επίπεδα σχεδόν διπλάσια συγκριτικά με το μέσο όρο που καταγράφηκε στις υπόλοιπες Ευρωπαϊκές χώρες.



Εικόνα 7. Εξωνοσοκομειακή κατανάλωση αντιβιοτικών στις ευρωπαϊκές χώρες, κατά το έτος 2012 εκφρασμένη σε ημερήσιες δόσεις ανά 100 κατοίκους και ανά ημέρα. Πηγή: ECDC *Surveillance of antimicrobial consumption in Europe*.

Τα παραπάνω δεδομένα οδήγησαν τη χώρα σε εκστρατεία για τη συνετή χρήση αντιμικροβιακών επιχειρώντας με τον τρόπο αυτό να περιοριστεί το πρόβλημα. Από το 2009 κιόλας, η κατανάλωση αντιμικροβιακών για συστηματική χρήση μειώθηκε. Ο βαθμός στον οποίο διάφοροι παράγοντες όπως η οικονομική κρίση συνέβαλαν στη μείωση της κατανάλωσης μεταξύ 2011 και 2012 δεν έχει αξιολογηθεί (European Surveillance of Antimicrobial Consumption).



Εικόνα 8. Σύγκριση της εξωνοσοκομειακής κατανάλωσης αντιβιοτικών στο βόρειο και νότιο τμήμα της Ευρώπης, κατά το έτος 2012 εκφρασμένη σε ημερήσιες δόσεις ανά 100 κατοίκους και ανά ημέρα. Πηγή: ECDC Surveillance of antimicrobial consumption in Europe.

Η κατανάλωση των αντιβιοτικών συνδέεται άμεσα με τη δημιουργία της μικροβιακής αντοχής. Η επίδραση των αντιβιοτικών στις φυσιολογικές χλωρίδες του ανθρώπινου οργανισμού έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία αλλά και επικράτηση για μακρύ χρονικό διάστημα ανθεκτικών μικροβίων. Οι ασθενείς που λαμβάνουν αντιβιοτικά είναι ευάλωτοι στο να αποικιστούν ή να εμφανίσουν λοίμωξη από ανθεκτικά παθογόνα βακτήρια. Επίσης αποτελούν δεξαμενή από την οποία πιθανότατα θα μεταδοθούν ανθεκτικά μικρόβια στο οικείο περιβάλλον ή στους συν-νοσηλευόμενους με αυτούς ασθενείς. Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν περιστατικά κατά τα οποία ανθεκτικά βακτήρια, έχουν αναφερθεί ως παράγοντες θανατηφόρων μολύνσεων. Για παράδειγμα ένα περιστατικό στην Ελλάδα αναφέρει ότι έντεκα νεογνήνητα της ίδιας κλινικής μέσα σε ένα μήνα αποικίσθηκαν από το βακτήριο *Enterobacter sakazakii* με αποτέλεσμα τέσσερα από αυτά να χάσουν τη ζωή τους (White et al., 1997).

Εθνικοί φορείς προστασίας της υγείας σε ολόκληρη την Ευρώπη συνεργάζονται για την ενίσχυση και την ανάπτυξη δράσεων για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής αντοχής στην κοινότητα μέσω της ορθολογικής χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων εκστρατειών

ευαισθητοποίησης (European Centre for Disease Prevention and Control, 2012). Η έκταση του φαινομένου αυτού δεν έχει καταγραφεί σε επαρκή βαθμό. Η παρούσα έρευνα κατευθύνεται προς την κάλυψη αυτής της έλλειψης πληροφοριών.

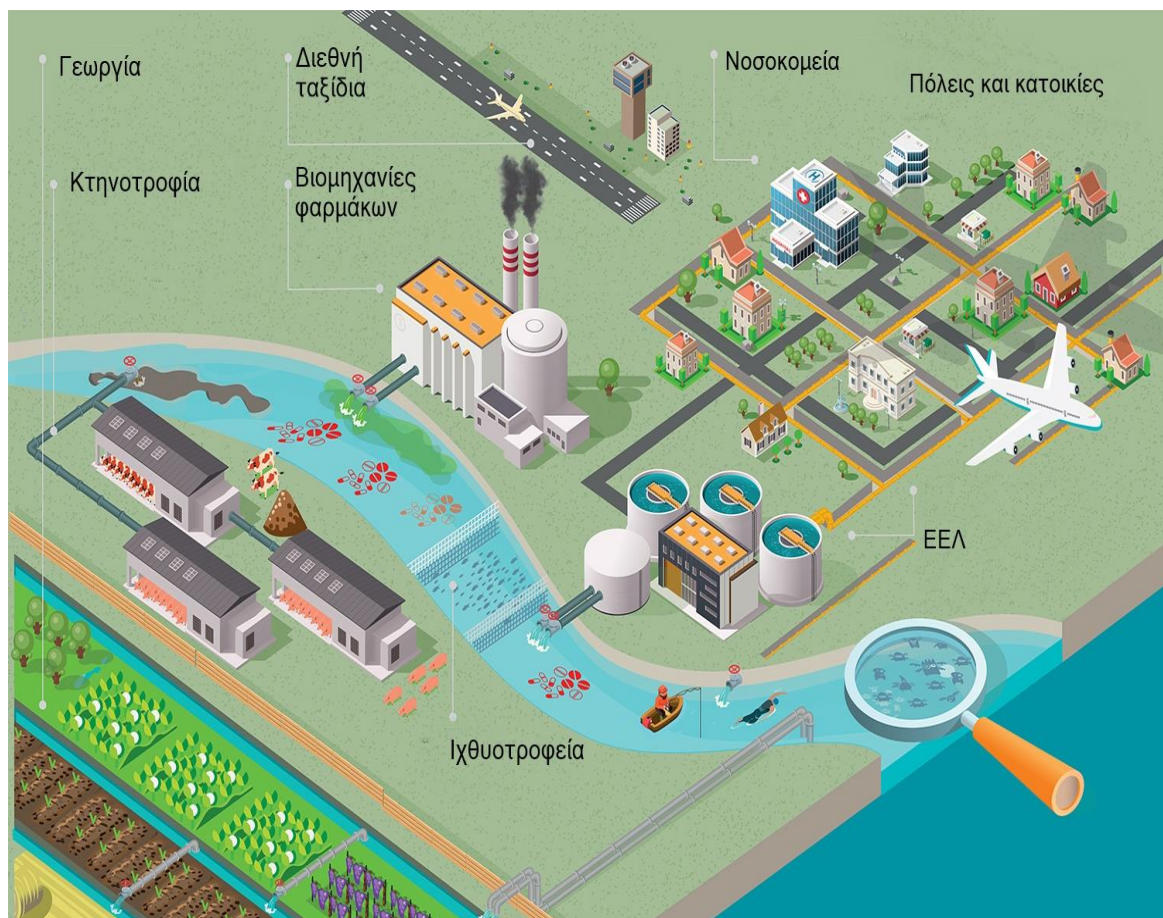
1.2.2. Διάδοση της ανθεκτικότητας στο περιβάλλον

Τα αντιβιοτικά είναι από τις πιο επιτυχημένες ομάδες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την θεραπευτική αγωγή μολυσματικών ασθενειών. Χρησιμοποιούνται όχι μόνο στην ιατρική αλλά και για την πρόληψη και ίαση ασθενειών σε ζώα και φυτά, ακόμα και για την επιτάχυνση της ανάπτυξης των ζώων στην κτηνοτροφία. Η εντατική εφαρμογή των αντιβιοτικών σε όλους τους παραπάνω τομείς οδήγησε στην απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων τους στο περιβάλλον (Εικόνα 9), (Martinez et al., 2009).

Οι κυριότερες αναμενόμενες οδοί έκθεσης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι:

- 1) Άμεση απόρριψη των αποβλήτων μονάδων επεξεργασίας λυμάτων
- 2) Νοσοκομειακά απόβλητα
- 3) Στραγγίσματα των χώρων υγειονομικής ταφής
- 4) Διαρροές υπονόμων
- 5) Απορρίψεις υδατοκαλλιεργειών
- 6) Γεωργικές απορροές

Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων αντιπροσωπεύουν τους κύριους χώρους διάθεσης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον. Οι κοινές τεχνολογίες που εφαρμόζονται στις εγκαταστάσεις αυτές, όπως η βιολογική επεξεργασία, παρέχουν ένα ιδανικό περιβάλλον π.χ. υψηλές βακτηριακές πυκνότητες, υψηλό οξυγόνο και υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών, για τον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων (Rizzo et al., 2013). Κατά συνέπεια η επαναχρησιμοποίηση των επεξεργασμένων αποβλήτων κυρίως για αρδευτικούς σκοπούς και για αστικές ή περιβαλλοντικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της αναπλήρωσης υπογείων υδάτων λόγω παρατεταμένων περιόδων ξηρασίας δημιουργεί μια επιπλέον πίεση στο περιβάλλον. Με τη σειρά της, η εφαρμογή οργανικού λιπάσματος στα εδάφη για αύξηση της γονιμότητας συμβάλλει στη ρύπανση του περιβάλλοντος από τα αντιβιοτικά. Μια εναλλακτική οδός στο υδάτινο περιβάλλον προέρχεται από την εφαρμογή αντιβιοτικών σε υδατοκαλλιέργειες (Carvalho et al., 2016).



Εικόνα 9. Τρόποι διάδοσης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον
<http://www.globalhealthaction.co.uk/antibiotic-resistance/environmental-impact-of-antibiotics-production-sparks-global-concerns>

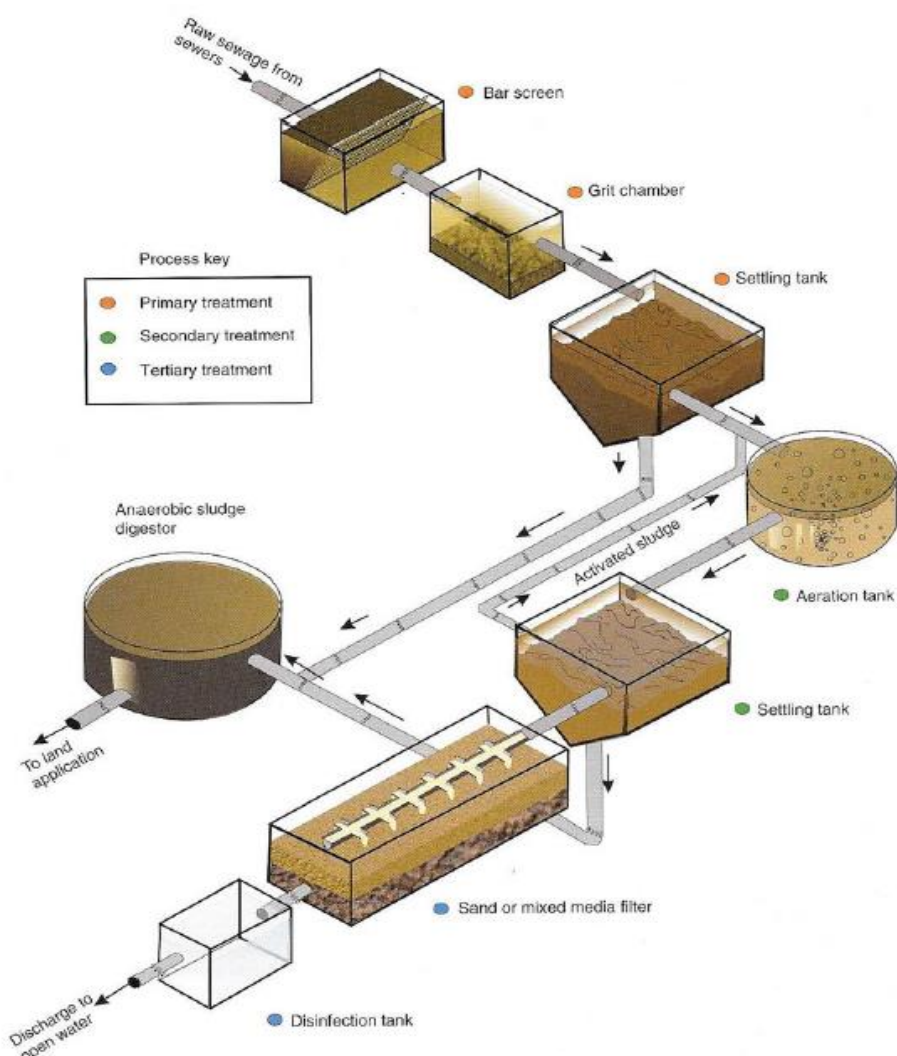
Τα αντιβιοτικά και τα παραπροϊόντα τους στο περιβάλλον μπορεί να παραμείνουν μέσω ενός κύκλου μερικού μετασχηματισμού, βιοσυσσώρευσης και σταδιακής εναπόθεσης στο έδαφος, στα επιφανειακά ύδατα και στα υπόγεια ύδατα. Ο κύκλος ζωής αυτών των ενώσεων στο περιβάλλον διέπεται από μια σειρά βιολογικών και φυσικοχημικών διεργασιών στα συστήματα εδάφους-νερού οι οποίες εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αντιβιοτικών, τις ιδιότητες του εδάφους και τις καιρικές συνθήκες (Manzetti et al., 2014).

Διανύοντας τον κύκλο ζωής τους στο περιβάλλον οι ενώσεις αυτές μπορούν να απορροφηθούν από ζώα ή και να φτάσουν στο πόσιμο νερό, προκαλώντας μακροχρόνιες επιπτώσεις στους ανθρώπους ως μέρος της διατροφής τους, μέσω του νερού και της τροφής. Έτσι πέρα από τη εξάπλωση της βακτηριακής αντοχής και τις συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία, μπορεί να αποτελέσουν ένα δυναμικό οικολογικού κινδύνου για τα οικοσυστήματα (Carvalho et al., 2016).

1.3 Η τύχη των αντιβιοτικών σε μια ΕΕΛ

Η συμβατική επεξεργασία λυμάτων περιλαμβάνει γενικά τρία στάδια: πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια επεξεργασία (Εικόνα 10). Η πρωτοβάθμια επεξεργασία έχει ως στόχο τη μείωση της περιεκτικότητας των στερεών των λυμάτων (λιπαρές ουσίες, λίπη, άμμο, άμμο και καθιζήσιμα στερεά). Αυτό το βήμα πραγματοποιείται εξ ολοκλήρου μηχανικά με διήθηση και καθίζηση και είναι κοινό σε όλες τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Ωστόσο, η δευτεροβάθμια επεξεργασία, η οποία βασίζεται συνήθως σε μια βιολογική διαδικασία για την απομάκρυνση οργανικής ύλης και/ή θρεπτικών ουσιών με αερόβια ή αναερόβια συστήματα, μπορεί να διαφέρει σημαντικά. Στην τριτοβάθμια ή σε προχωρημένη επεξεργασία, χρησιμοποιούνται επιπρόσθετες διαδικασίες (π.χ. απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών, απομάκρυνση των τοξικών υλικών, συμπληρωματική αφαίρεση οργανικών και αιωρούμενων στερεών) για να αφαιρεθούν τα συστατικά, τα οποία δεν μειώθηκαν κατά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία. Κατά τη διάρκεια όλων αυτών των διαδικασιών, σημαντικές αλλαγές συμβαίνουν στην κατανομή του βακτηριακού πληθυσμού (Michael et al., 2013).

Τα αντιβιοτικά μπορούν να εισέλθουν στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων μέσω των ανθρώπινων απέκκρισεων, ζώων εκτροφής και μέσω της άμεσης διάθεσης ιατρικών και βιομηχανικών αποβλήτων. Ορισμένα αντιβιοτικά απομακρύνονται πλήρως κατά τη διάρκεια των διαδικασιών των εγκαταστάσεων επεξεργασίας αλλά δεν απομακρύνονται όλα τα αντιβιοτικά πλήρως (Bouki et al., 2013).



Εικόνα 10. Διάγραμμα λειτουργίας μια τυπικής εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων (Pepper et al., 2015)

Σύμφωνα με μελέτες τα λύματα, ή ακόμη και τα επεξεργασμένα λύματα, περιέχουν υψηλότερες αναλογίες των διαφόρων ανθεκτικών βακτηριακών πληθυσμών σε σχέση με τις αντίστοιχες αναλογίες που περιέχονται σε επιφανειακά ύδατα (Huang et al., 2012). Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων θεωρούνται ως μια από τις κύριες «εστίες» δυνητικής εξέλιξης και διάδοσης της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά στο περιβάλλον καθώς τα βακτήρια αναμειγνύονται συνεχώς με αντιβιοτικά σε υπο-ανασταλτικές συγκεντρώσεις. Οι υψηλές βακτηριακές πυκνότητες, το υψηλό οξυγόνο και οι υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών κατά τη βιολογική επεξεργασία ευνοούν τον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων (Rizzo et al., 2013). Επιπλέον, άλλοι παράγοντες, όπως τα γονίδια ανθεκτικότητας, τα πλασμίδια και τα βαρέα μέταλλα, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανταλλαγή και διάδοση της αντίστασης στα συστήματα αυτά (Zhang et al., 2015). Μελέτες έχουν αναφέρει ότι ο επιπολασμός των ανθεκτικών βακτηρίων στα λύματα μπορεί να ποικίλλει σημαντικά, ανάλογα με

τα χαρακτηριστικά της εγκατάστασης (αρχικά ποιοτικά χαρακτηριστικά των λυμάτων, τύπος επεξεργασίας, λειτουργία της εγκατάστασης κλπ.) (Michael et al., 2013).

1.4 Απολύμανση των λυμάτων για την καταπολέμηση της ανθεκτικότητας

Απολύμανση θεωρείται η εκλεκτική καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών. Έχει σκοπό δηλαδή την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών, δηλαδή της ανάπτυξης και αναπαραγωγής τους. Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι απολύμανσης είναι οι παρακάτω :

- Χλωρίωση
- Απολύμανση με ακτινοβολία UV
- Οζόνωση

Τα λύματα είναι οι κύριοι φορείς των αντιβιοτικών στο περιβάλλον, για το λόγο αυτό η απολύμανση των λυμάτων είναι κρίσιμη, για τον καθαρισμό τους και την αποφυγή της απελευθέρωσής τους στο περιβάλλον. Η κακή απολύμανση των λυμάτων σε συνδυασμό με την ανθεκτικότητα των αντιβιοτικών ενώσεων στις μεθόδους απολύμανσης έχουν ως αποτέλεσμα οι χημικές ενώσεις αυτές να παραμένουν σε χαμηλές μεν αλλά συνεχείς συγκεντρώσεις στο περιβάλλον. Το πρόβλημα της ανεπαρκούς απολύμανσης είναι ιδιαίτερα σημαντικό και αναμένεται να αυξηθεί, καθώς σε πολλά εκσυγχρονισμένα κράτη τα απόβλητα διοχετεύονται στο περιβάλλον χωρίς διαδικασίες απολύμανσης (Manzetti et al., 2014).

Η ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση των λυμάτων χωρίς διεξοδική επεξεργασία για τη μείωση των συγκεντρώσεων των παθογόνων μικροοργανισμών αποτελούν κίνδυνο για την υγεία (Toze, 2006). Ως εκ τούτου, η απολύμανση είναι απαραίτητη για τον έλεγχο των μικροβιακών αυτών κινδύνων αφού ταυτόχρονα παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων στις ΕΕΛ

1.4.1 Μέσα και μέθοδοι απολύμανσης

- Χημικά μέσα : χλώριο και ενώσεις του, βρώμιο, ιώδιο, όζον, φαινόλη και φαινολικές ενώσεις.
- Φυσικά μέσα : θερμότητα, φως και ηχητικά κύματα.
- Μηχανικά μέσα : σχάρες, χημική κατακρήμνιση, βιολογικά φίτρα.
- Ακτινοβολία : ηλεκτρομαγνητική, ηχητική και σωματιδιακή

1.4.2. Μηχανισμοί απολύμανσης

Οι σπουδαιότεροι μηχανισμοί απολύμανσης:

- Καταστροφή ή φθορά του κυτταρικού τοιχώματος
- Αλλαγή της διαπερατότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.
- Αλλαγή της κολλοειδούς φύσης του πρωτοπλάσματος.
- Αναστολή της δράσης των ενζύμων.

1.4.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την απολύμανση

- Χρόνος επαφής

Ο χρόνος επαφής ίσως να αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεταβλητές στη διεργασία της απολύμανσης. Η Harriet Chick παρατήρησε ότι για μια συγκεκριμένη συγκέντρωση απολυμαντικού, όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επαφής, τόσο μεγαλύτερη η θανάτωση. Σε διαφορετική μορφή, ο νόμος της Chick είναι (Metcalf & Eddy, 2007) :

$$\left(\frac{dN_t}{dt}\right) = -kN_t \quad (1)$$

Όπου :

dN_t/dt = ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης των οργανισμών με το χρόνο

k = σταθερά ρυθμού απενεργοποίησης, T^{-1}

N_t = αριθμός των οργανισμών σε χρόνο t

t = χρόνος

Αν N_0 είναι ο αριθμός των οργανισμών όταν t ισούται με το μηδέν
Εξίσωση (1) μπορεί να ολοκληρωθεί σε :

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-kt}$$

ή

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -kt$$

- Συγκέντρωση και είδος του απολυμαντικού

Ο Herbert Watson ανέφερε ότι η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης
σχετίζεται με τη συγκέντρωση ως ακολούθως (Metcalf & Eddy, 2007) :

$$k = k' C^n$$

Όπου :

k = σταθερά ρυθμού απενεργοποίησης

k' = σταθερά θανάτωσης

C = συγκέντρωση του απολυμαντικού

n = συντελεστής διάλυσης

- Ισχύς και φύση των φυσικών μέσων απολύμανσης

Η θερμότητα και το φως είναι φυσικά μέσα απολύμανσης που έχουν
χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς για την απολύμανση των υγρών αποβλήτων.
Παρατηρήθηκε ότι η απόδοση τους εξαρτάται από την ισχύ τους. Για
παραδειγμα αν η αποσύνθεση των οργανισμών μπορεί να περιγραφεί με μια
πρώτης τάξεως αντίδραση, τότε η επίδραση της ισχύος του φυσικού
απολυμαντικού αντιπροσωπεύεται με τη σταθερά k μέσω κάποιων
συναρτησιακών σχέσεων (Metcalf & Eddy, 2007) .

- Θερμοκρασία

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό θανάτωσης με χημικά απολυμαντικά μπορεί να προσδιοριστεί από μια μορφή εξίσωσης van't Hoff-Arrhenius. Η αύξηση της θερμοκρασίας, έχει ως αποτέλεσμα μια πιο γρήγορη θανάτωση. Η σχέση για τον απαιτούμενο χρόνο t ώστε να πραγματοποιηθεί συγκεκριμένο ποσοστό θανάτωσης είναι (Metcalf & Eddy, 2007) :

$$\ln \frac{t_1}{t_2} = \frac{E(T_2 - T_1)}{RT_1T_2}$$

Όπου :

t_1, t_2 = χρόνος για δεδομένο ποσοστό θανάτωσης σε θερμοκρασίες T_1 και T_2, K αντίστοιχα

E = ενέργεια ενεργοποίησης J/mol (cal/mol)

R = σταθερά των αερίων, 8.3144 J/mol·K = (1.99 cal/mol·K)

- Τύπος οργανισμών

Η απόδοση των διάφορων απολυμαντικών επηρεάζεται από τον τύπο, την φύση και την κατάσταση των μικροοργανισμών. Γενικά, είναι πιο δύσκολο να καταπολεμηθούν, λόγω της κυτταρικής τους δομής, τα πρωτόζωα και ακολουθούν οι ιοί και τα βακτήρια. Αυξημένη αντίσταση στην απολύμανση παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί που εμφανίζουν ανθεκτικές μορφές όπως κύστες και σπόρια. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να απαιτείται να χρησιμοποιηθούν άλλα απολυμαντικά μέσα, όπως η ακτινοβολία UV (Metcalf & Eddy, 2007) .

- Βιοφίλμ

Η ύπαρξη συσσωματωμάτων μικροοργανισμών που έχουν προσκολληθεί στις διάφορες επιφάνειες (π.χ δίκτυο ύδρευσης, αντιδραστήρες) φαίνεται ότι δυσχεραίνει τη διαδικασία της απολύμανσης. Οι ποικίλλοι μικροοργανισμοί, που δημιουργούν το βιοφίλμ εκκρίνοντας πολυσακχαρίτες, προστατεύονται ως ένα βαθμό από τη δράση των απολυμαντικών μέσων καθώς τα τελευταία δυσκολεύονται να διεισδύσουν στο εσωτερικό του υμενίου. Ταυτόχρονα, η επιβίωση των προσκολλημένων μικροβίων διευκολύνεται και από την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών ενώ παράλληλα υποβοηθάται ο πολλαπλασιασμός τους λόγω των ευνοϊκών συνθηκών (κατάλληλο pH, θερμοκρασία) που επικρατούν στο υμένιο σε σχέση με το εναιώρημα, καθιστώντας τη διαδικασία της απολύμανσης ακόμη πιο

δύσκολη. Συν τοις άλλοις, τα υλικά των σωληνώσεων μπορεί να διαβρωθούν από τη δράση των μικροοργανισμών και τα προϊόντα αυτής της διάβρωσης δύνανται να αντιδράσουν με το ελεύθερο χλώριο και να οδηγήσουν σε ελάττωση του υπολειμματικού απολυμαντικού (Βενιέρη, 2016).

- Η φύση του υγρού

Κατά την ανασκόπηση της ανάπτυξης διαφόρων σχέσεων που προτάθηκαν για την απενεργοποίηση των μικροοργανισμών, είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι οι περισσότερες δοκιμές έγιναν σε αντιδραστήρες ασυνεχούς λειτουργίας με τη χρήση απεσταγμένου νερού ή νερού με ρυθμιστικό διάλυμα υπό συνθήκες εργαστηρίου. Στην πράξη η φύση του υγρού πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά. Για παράδειγμα, ξένα οργανικά υλικά θα αντιδράσουν με τα περισσότερα οξειδωτικά απολυμαντικά μέσα και θα μειώσουν την αποδοτικότητά τους. Η παρουσία αιωρούμενης ύλης θα μειώσει την αποδοτικότητα των απολυμαντικών με την απορρόφηση του απολυμαντικού και με την προστασία των παγιδευμένων βακτηρίων. Τα χαρακτηριστικά του υγρού εξετάζονται με περισσότερες λεπτομέρειες στις ακόλουθες ενότητες και στη συζήτηση που αφορά την απολύμανση με UV.

- pH

Η επίδραση του pH στην απολύμανση, μπορεί ανάλογα με το απολυμαντικό μέσο να είναι διαφορετική. Για παράδειγμα, αυξημένες τιμές pH ενισχύουν την απολυμαντική δράση ενώσεων του αμμωνίου ενώ μειώνουν εκείνη των υποχλωριώδων, των φαινολών και του ιωδίου (Βενιέρη, 2016).

- Θολερότητα

Η θολερότητα αποτελεί μέτρο της συγκέντρωσης των αιωρούμενων σωματιδίων στο νερό. Έχει αποδειχθεί ότι επιδρά αρνητικά στη διαδικασία απολύμανσης, καθώς τα αιωρούμενα σωματίδια μπορεί να περιβάλλουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς προστατεύοντάς τους από τη δράση του απολυμαντικού. Επιπρόσθετα, αυξάνεται η απαιτούμενη δόση απολυμαντικού καθώς το υλικό από το οποίο αποτελούνται τα σωματίδια αυτά χρήζει κάποιας ποσότητας απολυμαντικού (Βενιέρη, 2016).

- Διαλυτό οργανικό υλικό

Το διαλυτό οργανικό υλικό που περιέχεται στο υπό επεξεργασία υγρό είναι δυνατόν να καταναλώσει απολυμαντικό και να οδηγήσει στη δημιουργία ενώσεων με μικρή ή καθόλου απολυμαντική ικανότητα αλλά και στη δημιουργία ανεπιθύμητων παραπροϊόντων (Βενιέρη, 2016).

1.4.4. Χλωρίωση

Μεταξύ των πολλών μεθόδων απολύμανσης λυμάτων, η χλωρίωση έχει αποκτήσει ευρεία αποδοχή από εμπορική άποψη, λόγω της απλής εφαρμογής και του μέτριου κόστους. Παρά τα πιθανά προβλήματα που σχετίζονται με τα επιβλαβή απολυμαντικά υποπροϊόντα που παράγονται από αυτή τη διαδικασία απολύμανσης, το χλώριο και οι χημικές ενώσεις με βάση το χλώριο εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται σήμερα στην απολύμανση των λυμάτων (Huang et al., 2011)

Οι κύριες ενώσεις του χλωρίου που χρησιμοποιούνται στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων είναι κυρίως :

- Χλώριο (Cl_2)
- Υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl)
- Υποχλωριώδες ασβέστιο [$\text{Ca}(\text{OCl})_2$]
- Διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2)

1.4.4.1. Αντιδράσεις του χλωρίου με το νερό

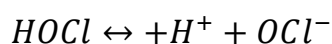
Όταν το αέριο χλώριο Cl_2 έρθει σε επαφή με το νερό θα λάβουν χώρα δυο βασικές αντιδράσεις :

- Η υδρόλυση
- Ο ιονισμός

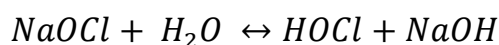
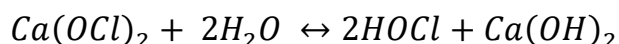
Η υδρόλυση είναι η διαδικασία κατά την οποία το αέριο χλώριο Cl_2 ενώνεται με το νερό και σχηματίζεται το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) :



Ο ιονισμός του υποχλωριώδους οξέως σε υποχλωριώδες ιόν OCl^- γίνεται ως εξής:



Το υποχλωριώδες ασβέστιο και νάτριο όταν έρθουν σε επαφή με το νερό υδρολύονται για να σχηματίσουν υποχλωριώδες οξύ (HOCl) :



1.4.4.2. Παραπροϊόντα της χλωρίωσης

Η αντίδραση του χλωρίου με μερικές οργανικές ενώσεις έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενώσεων που αναφέρονται με τον γενικό όρο παραπροϊόντα χλωρίωσης. Τα πιο κοινά παραπροϊόντα χλωρίωσης είναι τα τριαλογονομεθάνια ή τριαλομεθάνια. Τα τριαλομεθάνια έχουν ταξινομηθεί ως ύποπτα καρκινογόνα. Το τριχλωρομεθάνιο προκύπτει από την αντίδραση του υποχλωριώδους οξέος με διάφορες οργανικές ενώσεις όπως π.χ. με χουμικά οξέα. Σήμερα, εκτός των προαναφερθέντων, θεωρούνται μεγάλης σημασίας για την υγεία και άλλα παραπροϊόντα όπως τα ιωδιούχα οξέα, βρωμιούχα νιτρομεθάνια, ιωδιούχα τριαλογονομεθάνια, αλογονωμένα αμίδια, αλογονωμένες φουρανόνες, αλογονωμένες πυρόλες, αλογονωμένες κινόνες, αλογονωμένες κετόνες, αλογονωμένες αλδεΐδες, αλογονωμένα νιτρίλια και νιτροζαμίνες.

1.4.5 Επίδραση της χλωρίωσης στα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια

Μελέτες σχετικά με την επίδραση της χλωρίωσης στα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια ξεκινούν από τη δεκαετία του 1970, όπου η χλωρίωση αποδείχθηκε ότι επηρεάζει την αναλογία των ανθεκτικών βακτηρίων σε πολλαπλά αντιβιοτικά στο πόσιμο νερό και στα λύματα. Ταυτόχρονα όμως έρευνες οι οποίες εξέτασαν την επίδραση της απολύμανσης με χλώριο σε ίδιους τύπους ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων είχαν αντικρουόμενα αποτελέσματα (Rizzo et al., 2013). Για παράδειγμα αν και έχει αποδειχθεί ότι το ποσοστό των ανθεκτικών στην Ampicillin βακτηρίων στα λύματα μειώθηκε μετά από διαφορετικές δόσεις χλωρίου (Grabow et al., 1976), αντιφατικά αποτελέσματα ελήφθησαν από άλλους συγγραφείς (Murray et al., 1984).

Το επίπεδο της απομάκρυνσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η δομή των βακτηριακών κυττάρων και οι μοριακές ιδιότητες τους, καθώς και ο σχεδιασμός της μονάδας επεξεργασίας λυμάτων (Bouki et al., 2013). Δυστυχώς, βακτήρια που έχουν τραυματιστεί από τη διαδικασία απολύμανσης μπορούν να

επιβιώσουν και να αναπτυχθούν ξανά σε χαμηλές δόσεις χλωρίου (Rizzo et al., 2004). Έρευνες δείχνουν ότι τα βακτήρια μπορούν να αναπαράγονται στους σωλήνες του συστήματος διανομής ακόμη και μετά τη χλωρίωση (Zhang et al., 2002). Ωστόσο, οι μελέτες που εξετάζουν το ενδεχόμενο επανενεργοποίησης των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων μετά την χλωρίωση είναι περιορισμένες.

Το γεγονός της μη ολοκληρωτικής απομάκρυνσης των αντιβιοτικών από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων σε συνδυασμό με την επιμονή των βακτηρίων να αναπαράγονται, ακόμα και μετά την απολύμανση, αλλά και να διαδίδουν την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά κρούει τον κώδωνα κινδύνου για την δημόσια υγεία. Η βελτιστοποίηση της διαδικασίας της απολύμανσης των λυμάτων, η οποία είναι απαραίτητη για τον έλεγχο μικροβιακών κινδύνων, κρίνεται απαραίτητη.

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν ο έλεγχος της ανθεκτικότητας βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά, αφού σε πρώτη φάση τα στελέχη αυτά υποβλήθηκαν σε διαδικασία χλωρίωσης. Η δειγματοληψία και η απομόνωση των στελεχών πραγματοποιήθηκε από δείγματα που ελήφθησαν από την ΕΕΛ που εξυπηρετεί την πόλη των Χανίων. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από: (i) ακατέργαστα λύματα, στην είσοδο του βιολογικού καθαρισμού και (ii) από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας .

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι :

- Εφαρμογής της χλωρίωσης για τον έλεγχο της αδρανοποίησης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών. Καταγραφή της μείωσης του πληθυσμού των βακτηριακών αποικιών συναρτήσει του χρόνου ώστε να επιτευχθεί η μελέτη της κινητική της απολύμανσης.
 - ο Σύγκριση της συμπεριφοράς των βακτηριακών στελεχών της εισόδου με αυτά της εξόδου της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας .
- Έλεγχος της ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά (Ampicillin, Cefaclor). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε ανέπαφα κύτταρα και σε κύτταρα που επιβίωσαν κατόπιν της επεξεργασίας της χλωρίωσης.
 - ο Σύγκριση των προφίλ ανθεκτικότητας στα βακτήρια προ και κατόπιν απολύμανσης.

3. Μέθοδοι και Υλικά

3.1. Υλικά

Θρεπτικά Υλικά

- Nutrient Agar (Lab M)
- Nutrient Broth (Himedia)
- Mueller-Hinton Broth (Lab M)

Χημικά που χρησιμοποιήθηκαν

Χημικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη χλωρίωση :

- Οξικό Οξύ (Sigma Aldrich)
- Ιωδιούχο κάλιο (Sigma Aldrich)
- Θειοθειικό νάτριο κανονικότητας 0,1 N (Panreac)
- Χλωριούχο νάτριο (Sigma Aldrich)
- Υποχλωριώδες νάτριο (Sigma Aldrich)

Διαλύματα που παρασκευάστηκαν

- Διάλυμα NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L v/v (ως προς Cl₂)
- Διάλυμα Na₂S₂O₃ συγκέντρωσης 18 mg/L w/v
- Διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 0,8 % w/v

Αντιβιοτικά

- Ampicillin (Sigma Aldrich)
- Cefaclor (Sigma Aldrich)

Εργαστηριακά Υλικά

- Αποστειρωμένα τριβλία Petri διαμέτρου 9 cm
- Πλάκες μικρο-τιτλοποίησης (96 υποδοχών)

Συσκευές και Όργανα

- Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific Heraeus)

- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa)
- Ζυγός ακριβείας (Adventurer OHAUS Balance)
- Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu UV 1240)
- Microplate reader (Labtech LT-4000 Plate Reader)
- Μετρητής Αποικιών (Stuart)
- Λύχνος Bunsen

Αποστειρωμένο λύμα

Επισημαίνεται πως το αποστειρωμένο λύμα που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση του πειράματος της χλωρίωσης συλλέχθηκε από την Εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων του δήμου Χανίων. Συγκεκριμένα από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, πριν από την απολύμανση. Η χημική σύνθεση του έχει ως εξής : το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο και ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας ήταν 26 και 7.8 mg/L, αντίστοιχα η συγκέντρωση των χλωριδίων, θεικών, νιτρικών, νιτρωδών, διττανθρακικών και ολικών στερεών ήταν 222.1 , 60.3, 25.9, 57.1, 182.1 και 7 mg/L αντίστοιχα. Το pH είχε μια μέση τιμή 7.8. Όλα τα δείγματα λύματος που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο πριν από κάθε πείραμα και στην συνέχεια ενοφθαλμιζόνταν με υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων.

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Μέθοδος απολύμανσης με χλώριο

Σύντομη περιγραφή της χλωρίωσης :

Πραγματοποιήθηκε απολύμανση σε 23 διαφορετικά βακτήρια. Ως απολυμαντικό μέσο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L.

Για κάθε στέλεχος παρασκευάστηκε διάλυμα 300 mL το οποίο περιείχε αποστειρωμένο λύμα, εναιώρημα που παρασκευάστηκε από NaCl συγκέντρωσης 0,8 % w/v και αποικίες του βακτηρίου που επρόκειτο να υποβληθεί σε απολύμανση.

Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με την προσθήκη χλωρίου δόσης 1 mg/L. Η ακριβής ποσότητα του διαλύματος NaOCl που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά δεν αναφέρεται γιατί ανάλογα με την τιτλοδότηση που γινόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα άλλαζε η ποσότητα που χρησιμοποιούνταν από το αρχικό διάλυμα, ώστε να παραμένει σταθερή η συγκέντρωση στο δείγμα 1 mg/L.

Αξίζει να σημειωθεί πως αρχικά, τα πρώτα πειράματα εκτελέστηκαν με δόση χλωρίου 5 mg/L, παρατηρήθηκε όμως πως τα βακτήρια που υποβλήθηκαν σε χλωρίωση θανατώθηκαν από τα πρώτα λεπτά του πειράματος.

Έτσι, επιλέχθηκε μικρότερη δόση χλωρίου και συγκεκριμένα αυτή του 1 mg/L.

3.2.1.1. Προετοιμασία

- 1) Το διάλυμα NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L v/v (ως προς Cl₂) παρασκευάστηκε με αραιώση πυκνού διαλύματος NaOCl συγκέντρωσης 50*10³ mg/L (ως προς Cl₂).
- 2) Παρασκευή διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 0,8 % w/v το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή του εναιωρήματος και για τις απαραίτητες αραιώσεις.
- 3) Η τελική συγκέντρωση του βακτηρίου στο διάλυμα θα πρέπει να είναι ίση με 10⁶ CFUs/mL. Αρχικά παρασκευάστηκε εναιώρημα αποτελούμενο από διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 0,8 % w/v και αποικίες του βακτηρίου και στη συνέχεια φωτομετρήθηκε στα 600nm δίνοντας απορρόφηση ίση με A=0,1. Η τιμή της απορρόφησης αυτής βάσει της κλίμακας McFarland αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αποικιών ίση με 10⁸ CFUs/mL. Με διαδοχικές αραιώσεις επιτυγχάνεται η επιθυμητή τελική συγκέντρωση διαλύματος.
- 4) Σε σωλήνες erpendorf (χωρητικότητας 1,5mL) τοποθετείται ποσότητα διαλύματος Na₂S₂O₃ (συγκέντρωσης 18mg/L) ίση με 90μL, με σκοπό την διακοπή της δράσης του υπολειμματικού χλωρίου στο δείγμα σε κάθε χρονική στιγμή t της δειγματοληψίας.

3.2.1.2. Πειραματική διαδικασία

Τιτλοδότηση

Με την πάροδο του χρόνου η δραστικότητα του διαλύματος NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L v/v (ως προς Cl₂) μεταβάλλεται, για το λόγο αυτό πραγματοποιείται τιτλοδότηση μέσω της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση του ως προς Cl₂.

Σε μία κωνική φιάλη προστίθενται τα εξής:

- 10 mL διαλύματος NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L ως προς Cl₂
- 5 mL CH₃COOH
- 1 g KI

Στη συνέχεια, τιτλοδοτείται διάλυμα Na₂S₂O₃ κανονικότητας 0,1N μέχρι να αποχρωματιστεί το δείγμα και μετράται η ποσότητα Na₂S₂O₃ που καταναλώθηκε.

Με την εφαρμογή της παρακάτω σχέσης υπολογίζονται πόσα g/L Cl₂ περιέχονται στο αρχικό διάλυμα NaOCl :

$$\frac{g}{L} Cl_2 = \frac{(ml Na_2S_2O_3 \text{ που καταναλώθηκαν}) \times 0,1N \times 35,5}{10 ml}$$

Όπου :

- 10 mL είναι η ποσότητα διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την τιτλοδότηση
- 35.5 είναι το Ar του χλωρίου

Βήμα 1^ο: Το διάλυμα 300 mL το οποίο περιέχει αποστειρωμένο λύμα και εναιώρημα, το οποίο παρασκευάζεται από NaCl συγκέντρωσης 0,8 % w/v και αποικίες του βακτηρίου, τοποθετείται σε σύστημα ανάδευσης.

Βήμα 2^ο: Για τον χρόνο 0' της πειραματικής διαδικασίας (πριν την έναρξη του χρονομέτρου) με αυτόματη πιπέτα απομονώνεται δείγμα ποσότητας 1 mL και τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf. Στη συνέχεια μεταφέρεται απευθείας στο ψυγείο ώστε να σταματήσει η πιθανή ανάπτυξη του βακτηρίου.

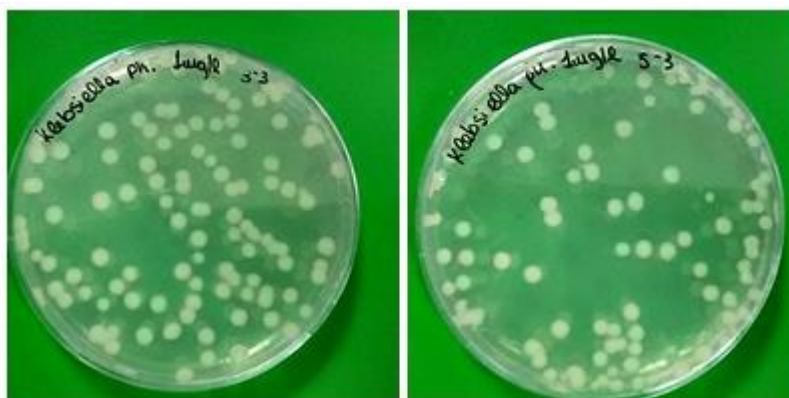
Βήμα 3^ο: Αφού προστεθεί η απαραίτητη δόση χλωρίου στο διάλυμα ενεργοποιείται το χρονόμετρο. Για κάθε χρονική στιγμή t λαμβάνεται και τοποθετείται σε errendorf ποσότητα ίση με 1 mL. Ο κάθε σωλήνας errendorf περιέχει διάλυμα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (συγκέντρωσης 18mg/L) ίση με 90μL, με σκοπό την διακοπή της δράσης του υπολειμματικού χλωρίου στο δείγμα.

Βήμα 4^ο: Η δειγματοληψία πραγματοποιείται μέχρι και την ολοκλήρωση του χρόνου $t = 45\text{min}$.

Βήμα 5^ο: Για κάθε χρονική στιγμή προετοιμάζονται τριβλία με στερεό θρεπτικό υλικό nutrient agar. Αφού αναδευθεί καλά το περιεχόμενο των errendorf, επιστρώνεται στο κάθε τριβλίο ποσότητα ίση με 300 μL.

Βήμα 6^ο: Μετά την επίστρωση τα τριβλία αφήνονται για 20 min περίπου προκειμένου να ενσωματωθεί στο θρεπτικό υλικό το δείγμα. Στη συνέχεια τοποθετούνται ανεστραμμένα στο θάλαμο επώασης σε χρόνο και θερμοκρασία που εξαρτάται από το είδος του βακτηρίου.

Στο σημείο αυτό ολοκληρώνεται η πειραματική διαδικασία της χλωρίωσης.



Εικόνα 11. Αποικίες του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae* κατά το 3^ο και 5^ο λεπτό της χλωρίωσης

3.2.2. Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων στα αντιβιοτικά

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης με μικρο-αραιώσεις σε ζωμό (MIC Broth Microdilution Method). Πρόκειται για μια μέθοδο κατά την οποία το μικροβιακό εναιώρημα εκτίθεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Η μέθοδος υποδεικνύει τη μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη του βακτηρίου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες τιτλοποίησης με 96 βυθίσματα για τα αντιβιοτικά Ampicillin & Cefaclor.

Οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής :

Πίνακας 1. Εύρος συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ευαισθησίας των μικροοργανισμών

AMPICILLIN [μg/mL]									
100	50	25	12,5	6,250	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195
CEFACLOL [μg/mL]									
512	256	128	64	32	16	8	4	2	1

3.2.2.1. Προετοιμασία μητρικού διαλύματος

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των αντιβιοτικών στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Το κάθε αντιβιοτικό διαλύθηκε στον ενδεδειγμένο διαλύτη και ακολούθησαν αραιώσεις με το κατάλληλο μέσο (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Διαλύτες και αραιωτικά των Αντιβιοτικών

Αντιβιοτικό	Διαλύτης	Μέσο αραιώσης
Ampicillin	Κορεσμένο NaHCO ₃	Νερό
Cefaclor	Νερό	Νερό

3.2.2.2. Προετοιμασία εναιωρήματος

Η μέθοδος των μικροαραιώσεων σε ζωμό πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτοκόλλο του οργανισμού CLSI (Clinical And Laboratory Standards Institute). Βάσει αυτού δημιουργήθηκε εναιώρημα από μη εκλεκτικό θρεπτικό ζωμό (Mueller-Hinton-Broth) και αποικίες του κάθε μικροοργανισμού που εξετάζονταν κάθε φορά. Η οπτική απορρόφηση του εναιωρήματος θα πρέπει να είναι γύρω στο $A=0,1$. Η τιμή της απορρόφησης αυτής βάσει της κλίμακας McFarland αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αποικιών ίση με 10^8 CFUs/mL.

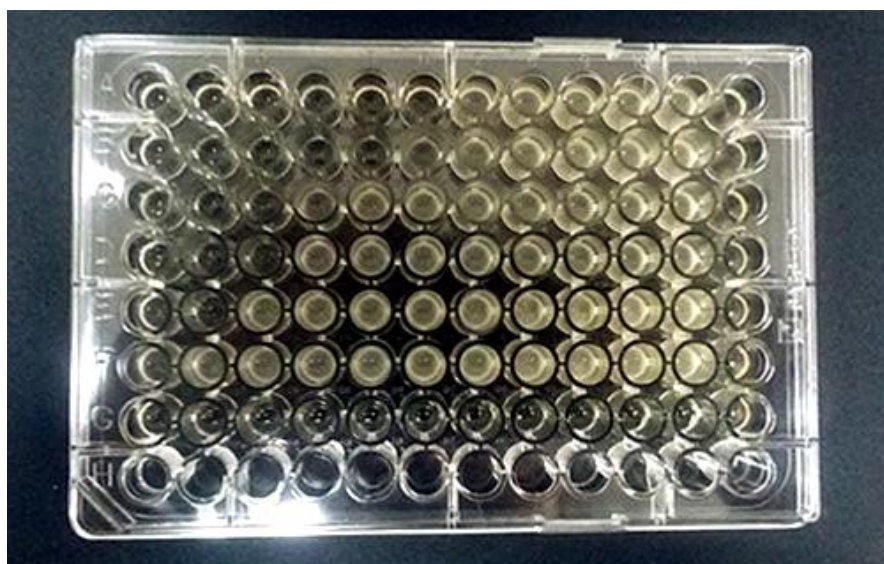
3.2.1.1. Παρασκευή πλακών τιτλοποίησης

Η μέθοδος MIC διεξήχθει σε πλάκα τιτλοποίησης 96 βυθισμάτων. Κάθε πλάκα χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση τριών μικροοργανισμών. Τοποθετήθηκε στα 84 χρησιμοποιούμενα πηγάδια της πλάκας τιτλοποίησης το ίδιο θρεπτικό υλικό - Mueller-Hinton-Broth σε ποσότητα 100 μ L. Έπειτα προστέθηκε ποσότητα αντιβιοτικού 100 μ L στα πηγάδια της πρώτης στήλης. Αφού γίνει ανάδευση στην πρώτη στήλη, η οποία πλέον περιέχει 100 μ L θρεπτικό υλικό και την ίδια ποσότητα αντιβιοτικού, διαμοιράζεται στα επόμενα πηγάδια εξέτασης ποσότητα δείγματος 100 μ L. Με τον τρόπο αυτό το αντιβιοτικό μεταφέρεται από στήλη σε στήλη επιτυγχάνοντας αραίωση $1 \div 2$, διαμορφώνοντας τις συγκεντρώσεις που φαίνονται στον Πίνακα 1. Στην προτελευταία στήλη δεν προστίθεται αντιβιοτικό, καθώς επιδιώκεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού απουσία αντιβιοτικού (control). Τέλος, προστίθεται 5 μ L βακτηριακής καλλιέργειας συγκέντρωσης 10^5 CFUs/mL σε όλα τα πηγάδια εξέτασης, εκτός από την τελευταία στήλη και την τελευταία σειρά. Η τελευταία στήλη (blank) αποτελεί το τυφλό διάλυμα, περιέχει μόνο θρεπτικό υλικό και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης των πηγαδιών. Σε περίπτωση υψηλής οπτικής απορρόφησης του τυφλού, θεωρείται ότι έχει υπάρξει επιμόλυνση είτε των πηγαδιών είτε του θρεπτικού υλικού και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Η τελευταία σειρά περιέχει το θρεπτικό υλικό και το προς εξέταση αντιβιοτικό.

Με το τέλος της διαδικασίας η πλάκα τιτλοποίησης οδηγείται σε επωαστικό κλίβανο με σκοπό την επώαση των μικροοργανισμών. Το διάστημα επώασης είναι 24 h ενώ οι θερμοκρασίες ανάλογες με αυτές της καλλιέργειας των μικροοργανισμών. Μετά το διάστημα των 24 h η ανάπτυξη των μικροοργανισμών ελέγχεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε microplate reader.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	1
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	1
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	1
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	1
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	1
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	1
G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
H												

Εικόνα 12. Διάταξη πλάκας τιτλοποίησης



Εικόνα 13. Πλάκα τιτλοποίησης μετά από επώαση 24 h

4. Αποτελέσματα

Ομαδοποίηση των βακτηρίων, που συλλέχθηκαν βάσει οικογένειας και χρώσης Gram.

Πίνακας 3. Ομαδοποίηση βακτηρίων που συλλέχθηκαν από την είσοδο της ΕΕΛ

Είσοδος ΕΕΛ	Είδος βακτηρίου	Οικογένεια	Gram
1.(143)	<i>Enterococcus faecium</i>	Enterococcaceae	Gram θετικά
2.(162)	<i>Enterococcus faecium</i>		
3.(136)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadaceae	Gram αρνητικά
4.(5)	<i>Enterobacter cloacae</i>	Enterobacteriaceae	
5.(44)	<i>Enterobacter sakazakii</i>		
6.(4)	<i>Escherichia coli</i>		
7.(20 ^α)	<i>Klebsiella oxytoca</i>		
8.(45)	<i>Serratia odorifera</i>		
9.(116)	<i>Rhizobium radiobacter</i>	Rhizobiaceae	
10.(152)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Vibrionaceae	
11.(139)	<i>Vibrio alginolyticus</i>		
12.(153)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		

Πίνακας 4. Ομαδοποίηση βακτηρίων που συλλέχθηκαν από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας της ΕΕΛ

Έξοδος από τη δευτεροβάθμια (πριν τη χλωρίωση)	Είδος βακτηρίου	Οικογένεια	Gram
1.(133)	Enterococcus faecium	Enterococcaceae	Gram θετικά
3.(140)	Aeromonas hydrophila	Aeromonadaceae	Gram αρνητικά
4.(64)	Escherichia coli	Enterobacteriaceae	
5.(128)	Klebsiella oxytoca		
6.(54)	Klebsiella pneumoniae		
7.(131)	Rautella ornithinolytica		
8.(148)	Raoutella terrigena		
9.(70)	Shigella spp.		
10.(46)	Enterobacter cloacae		
11.(117)	Rhizobium radiobacter	Rhizobiaceae	
12.(126)	Vibrio parahaemolyticus	Vibrionaceae	
13.(156)	Vibrio parahaemolyticus		

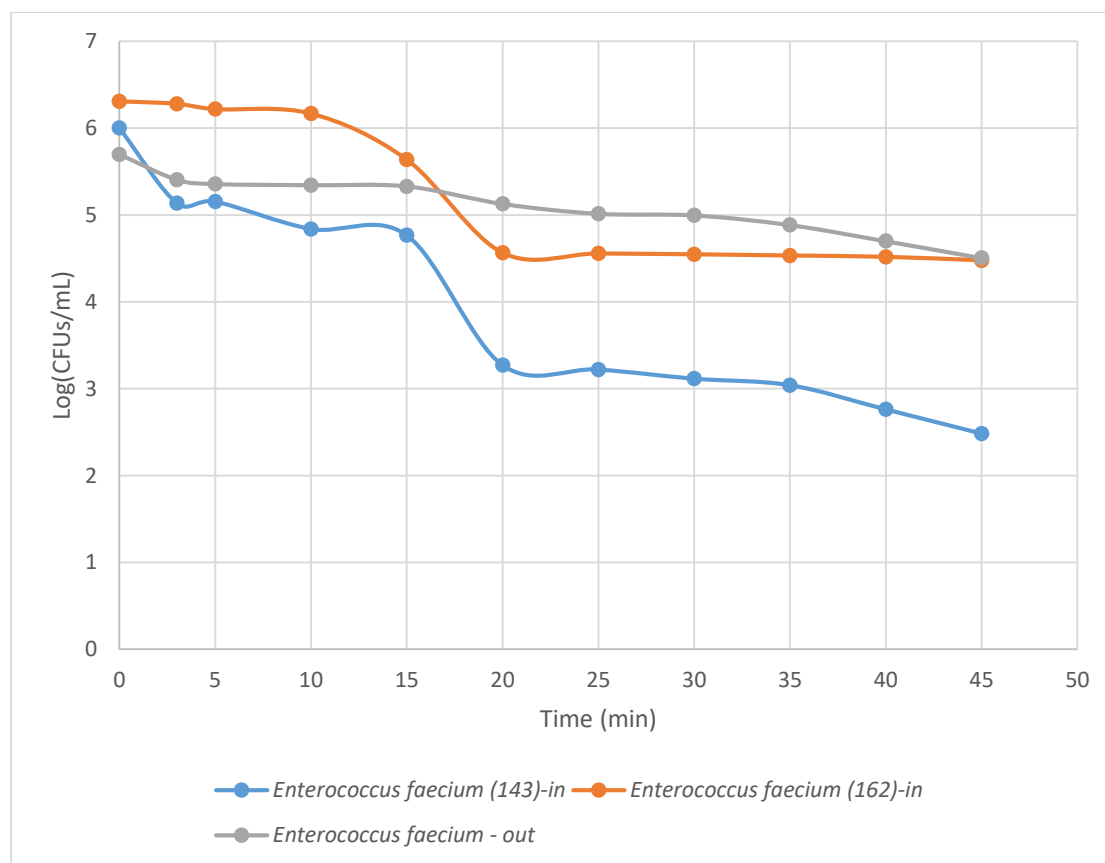
4.1. Χλωρίωση

Τα συγκεντρωτικά γραφήματα που ακολουθούν παρουσιάζουν την αδρανοποίηση των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών κατά τη διάρκεια

της χλωρίωσης. Τα συγκεντρωτικά αυτά γραφήματα με τις καμπύλες απολύμανσης των βακτηρίων υποδηλώνουν πως η κινητική που ακολουθείται είναι ψευδοπρώτης τάξης.

Enterococcus faecium

Το *E. faecium* είναι ένα Gram-θετικό, σφαιρικού σχήματος βακτήριο το οποίο ανήκει στην οικογένεια Enterococcaceae. Επιβιώνει σε θερμοκρασίες 10-45° C, για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε όξινα και βασικά περιβάλλοντα. Το *Enterococcus faecium* είναι ένα σημαντικό νοσοκομειακό παθογόνο βακτήριο με υψηλή συχνότητα αντοχής στα αντιβιοτικά όπως η Ampicillin και η βανκομυκίνη (Holmberg, et al., 2016).



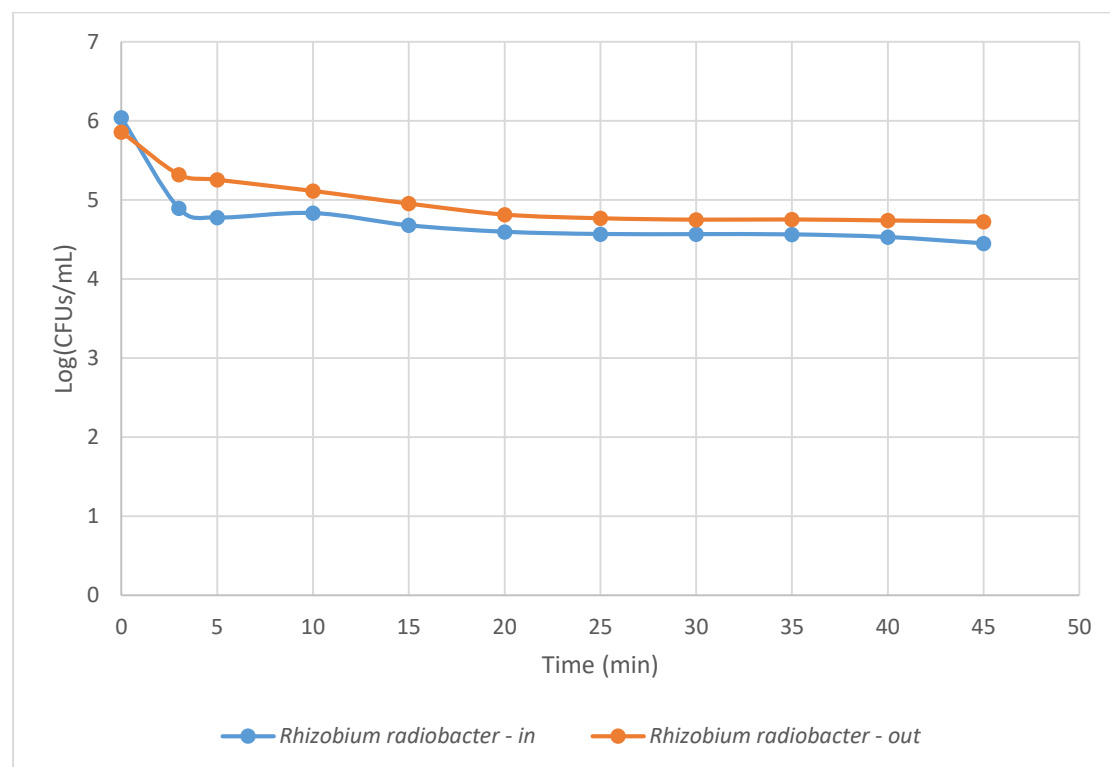
Γράφημα 1 Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Enterococcaceae με NaOCl ($C_{NaOCl} = 1\text{mg/L}$)

Παρατηρώντας τις καμπύλες μείωσης πληθυσμού των βακτηρίων *E. faecium* που απομονώθηκαν από λύμα εισόδου βιολογικού καθαρισμού φαίνεται πως η συμπεριφορά τους κατά την απολύμανση διαφέρει. Ο πληθυσμός του στελέχους (143) μειώνεται απότομα κατά τα τρία πρώτα λεπτά, μείωση του πληθυσμού του παρατηρείται και στη συνέχεια αλλά με πιο ομαλούς ρυθμούς. Αντιθέτως το στέλεχος (162) διατηρεί περισσότερες αποικίες από την αρχή μέχρι και το τέλος της χλωρίωσης. Το βακτήριο το οποίο απομονώθηκε από

λύμα εξόδου της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας παρουσιάζει εντελώς διαφορετική συμπεριφορά σε σχέση με τα βακτήρια της εισόδου. Η ανθεκτικότητα του στη διαδικασία της απολύμανσης φαίνεται ξεκάθαρα αφού η μεταβολή του πληθυσμού του κατά τη χλωρίωση είναι πολύ μικρή, περίπου 1Log. Είναι προφανές πως η επεξεργασία που έχουν υποστεί τα βακτήρια μέχρι και τη δευτεροβάθμια επεξεργασία τα καθιστά πιο ισχυρά.

Rhizobium radiobacter

R. radiobacter είναι ένα κατά Gram αρνητικό, ραβδοειδούς σχήματος βακτήριο το οποίο ανήκει στην οικογένεια Rhizobiaceae. Έχει αναγνωριστεί ως ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο στους ανθρώπους αν και έχει σχετικά χαμηλή μολυσματικότητα. Οι αντιμικροβιακές ευαισθησίες για το *R. radiobacter* ποικίλλουν και θα πρέπει να εξετάζονται για κάθε θεραπεία. Είναι ευαίσθητο σε ορισμένα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των κεφαλοσπορίνων τρίτης γενιάς και των β-λακταμών (Gruszecki et al., 2002).



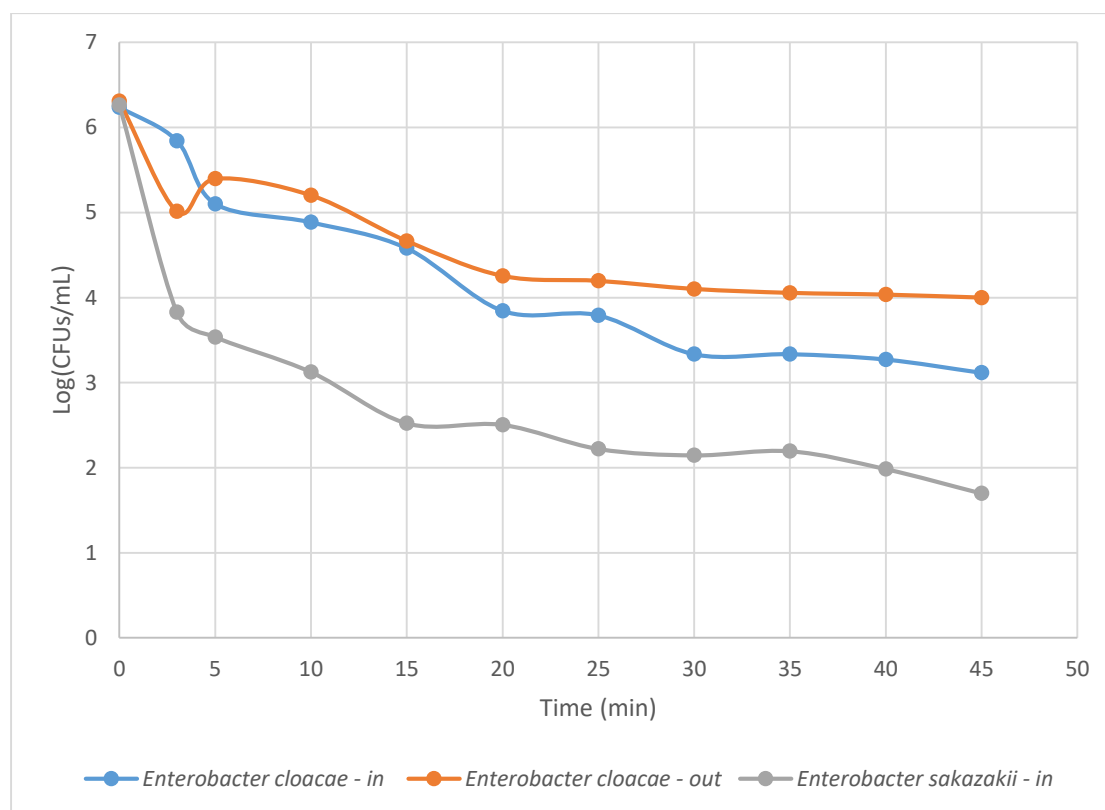
Γράφημα 2. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Rhizobiaceae με NaOCl ($C_{NaOCl} = 1\text{mg/L}$)

Μέσω των παραπάνω καμπυλών απολύμανσης φαίνεται πως το *R. radiobacter* ανεξάρτητα τις προέλευσης του παρουσίασε ανθεκτικότητα στη διαδικασία της χλωρίωσης. Μπορεί το στέλεχος της εισόδου αρχικά να είχε μια απότομη μείωση του πληθυσμού του αλλά δεν αρκεί αυτό για να χαρακτηριστεί επιτυχής η απολύμανση του. Και τα δυο στελέχη χαρακτηρίζονται από μικρή μείωση

τάξης μεγέθους του πληθυσμού τους αφού ακόμα και στα τελευταία λεπτά ο πληθυσμός των αποικιών παραμένει υψηλός.

Enterobacter cloacae – *Enterobacter sakazakii*

Το *E. cloacae* και το *E. sakazakii* είναι αρνητικά κατά Gram, ραβδοειδούς σχήματος βακτήρια. Ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Το *E. cloacae* είναι μέλος της κανονικής χλωρίδας του εντέρου πολλών ανθρώπων. Απαντάται σε επίγεια και υδάτινα περιβάλλοντα (νερό, αποχέτευση, έδαφος και τρόφιμα). Το βακτήριο αυτό αποτελεί ένα ευκαιριακό νοσοκομειακό παθογόνο βακτήριο. Έχει απομονωθεί συχνά από εργοστάσια επεξεργασίας τροφίμων, φρέσκα λαχανικά, ρύζι και το κρέας (Liu et al., 2018). Το *E. sakazakii* μπορεί να ζήσει πολύ ξηρούς χώρους. Το ίδιο έχει καταστεί σοβαρή αιτία νοσοκομειακών μολύνσεων και περιστασιακά, έχει συσχετιστεί με σποραδικά κρούσματα, μινιγγίτιδας, εγκεφαλίτιδας και νεκρωτικής εντεροκολίτιδας (White et al., 1997).



Γράφημα 3. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Enterobacteriaceae με NaOCl ($C_{NaOCl}=1\text{mg/L}$)

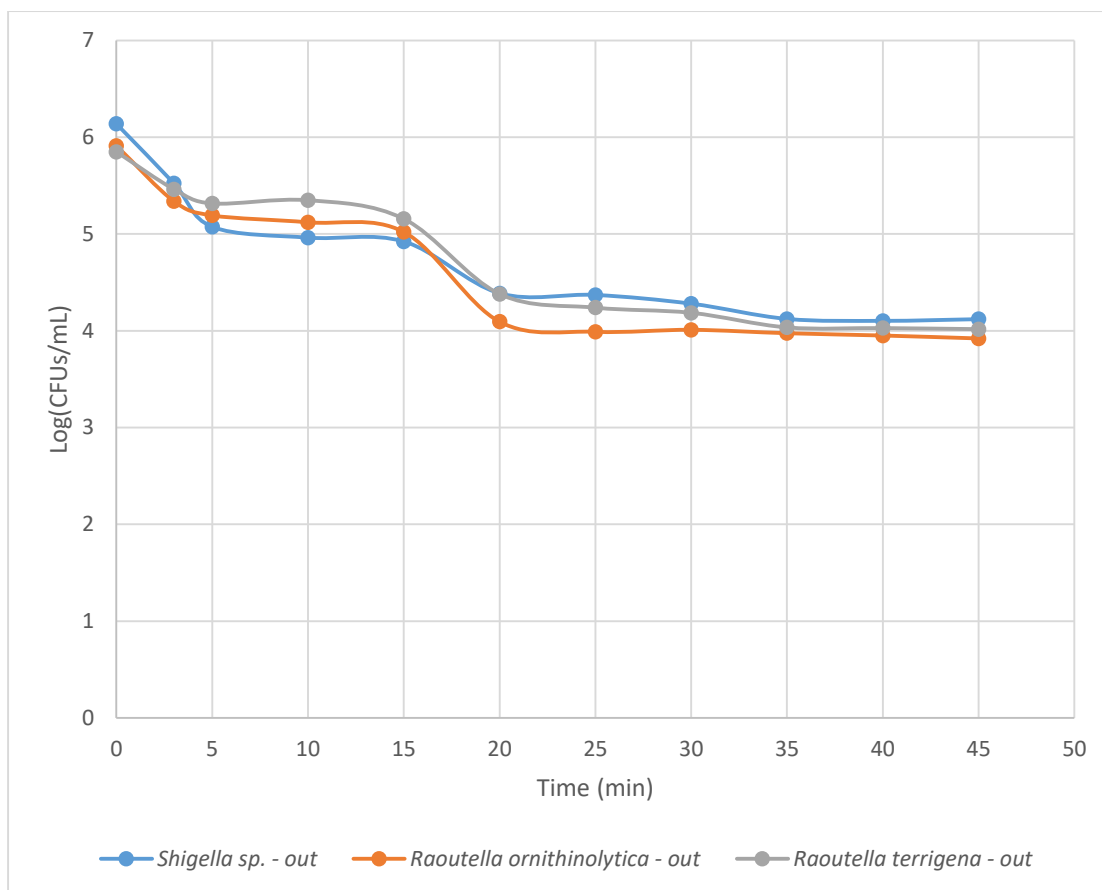
Ο πληθυσμός των δυο στελεχών, τα οποία συλλέχθηκαν από το λύμα της εισόδου του βιολογικού φαίνεται να επηρεάζεται πολύ από τη διαδικασία της απολύμανσης. Ειδικότερα το *E. sakazakii* δείχνει να είναι πιο αδύναμο αφού ο πληθυσμός του μειώθηκε κατά πολύ και με απότομο ρυθμό. Το *E. cloacae*

μπορεί μεν να είναι πιο ανθεκτικό σε σχέση με το *E. sakazakii* αλλά και σε αυτό ο αριθμός των αποικιών του στα 45 min είναι αισθητά μικρότερος σε σχέση με τον αρχικό. Όσον αφορά το στέλεχος *E. cloacae* το οποίο συλλέχθηκε από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας φαίνεται να μην επηρεάστηκε το ίδιο με το αντίστοιχο στέλεχος της εισόδου χωρίς αυτό να σημαίνει πως η απολύμανση του δεν μπορεί να χαρακτηριστεί επιτυχής. Μια ακόμα περίπτωση που επιβεβαιώνει το γεγονός ότι τα βακτήρια που έχουν υποστεί επεξεργασία κατά τη διαδρομή τους στην ΕΕΛ είναι πιο ανθεκτικά.

Shigella sp.– *Raoutella ornithinolytica* – *Raoutella terrigena*

Το *Shigella* sp. είναι ένα Gram αρνητικό, μη κινητό, μη σπορογόνο, ραβδόμορφο βακτήριο της οικογένειας Enterobacteriaceae. Η ασθένεια που προκαλείται από τον μικροοργανισμό ονομάζεται συγγέλλωση. Το βακτήριο *Shigella* σπάνια εμφανίζεται στα ζώα: είναι κυρίως μια ασθένεια των ανθρώπων καθώς και των άλλων πρωτευόντων θηλαστικών. Ο μικροοργανισμός βρίσκεται συχνά στο νερό που μολύνεται με τα ανθρώπινα περιττώματα. Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ανθεκτικό σε αντιβιοτικά όπως η στρεπτομυκίνη, η τριμεθοπρίμη, η Ampicillin και το ναλιδιξικό οξύ. Λίγότερο ανθεκτικό είναι στην τετρακυκλίνη, στην τριμεθοπρίμη, στη σουλφαμεθοξαζόλη, στη σουλφιζοξαζόλη και στη γενταμικίνη (Zhang et al., 2014).

Το *R. terrigena* και το *R. ornithinolytica* είναι δυο κατά Gram αρνητικά, ραβδοειδούς σχήματος βακτήρια τα οποία ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Η *R. terrigena* βρίσκεται στο πόσιμο νερό, στα επιφανειακά νερά, στο έδαφος και στα λύματα. Πολύ λίγες αναφορές για κλινικές λοιμώξεις που προκαλούνται από αυτό το είδος για το λόγο αυτό η κλινική σημασία του είναι ακόμη ασαφής (Wang et al., 2016). Το *R. ornithinolytica* και έχει απομονωθεί από έντομα, ψάρια και υφάλμυρο νερό. Πρόκειται για ένα ευκαιριακό παθογόνο που βρίσκεται στα κλινικά δείγματα του ανθρώπου, κυρίως από την αναπνευστική οδό και το αίμα, ενώ έχει συσχετιστεί με ποικίλες λοιμώξεις. Η απελευθέρωση βακτηριακών χρωμοσωμικών β-λακταμασών κατηγορίας A, οι οποίες προσδίδουν αντίσταση στην Ampicillin και άλλες αμινοπεπικιλίνες αποτελούν πρόκληση για την αντιμετώπιση του βακτηρίου αυτού (Nakasone et al., 2015).



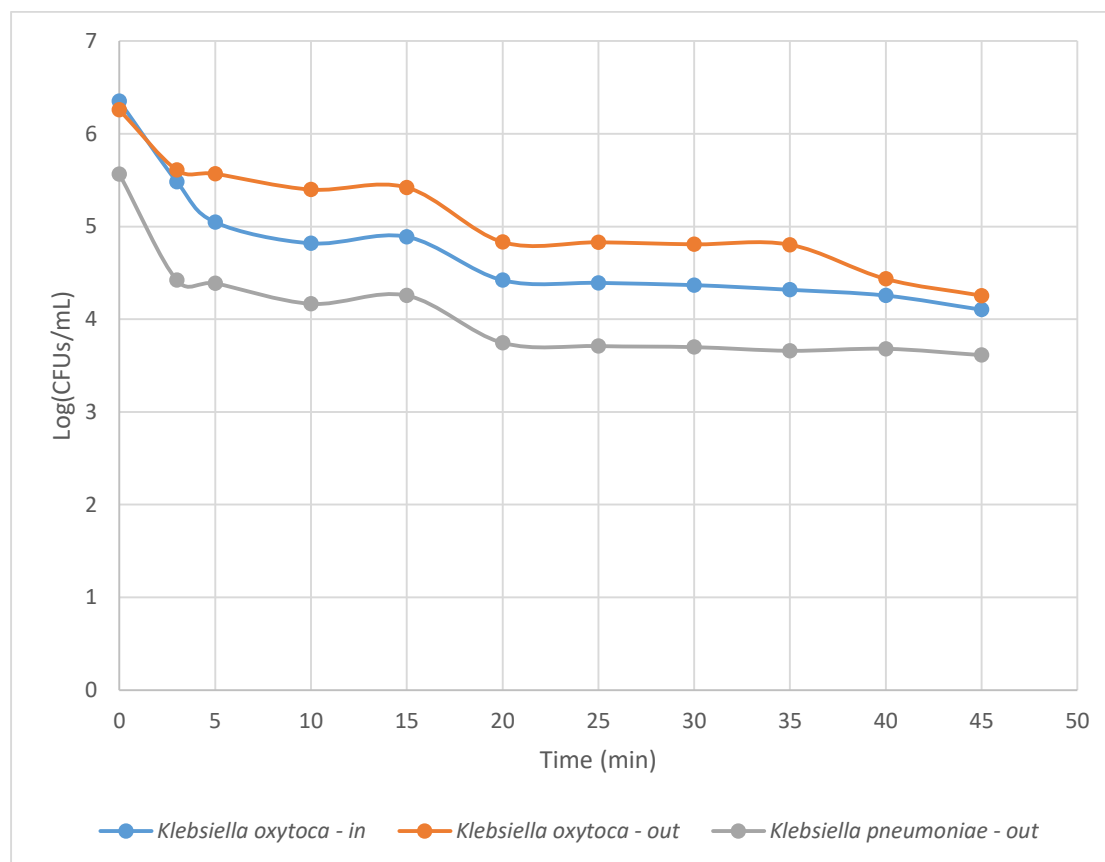
Γράφημα 4. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας *Enterocobacteriaceae* με NaOCl ($C_{NaOCl} = 1\text{mg/L}$)

Το παραπάνω διάγραμμα περιλαμβάνει 3 στελέχη τα οποία απομονώθηκαν από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας του βιολογικού καθαρισμού. Πρόκειται για βακτήρια τα οποία ανεξάρτητα του είδους τους αντέδρασαν με σχεδόν πανομοιότυπο τρόπο κατά τη διαδικασία της απολύμανσης. Τα *Shigella sp.*, *R. ornithinolytica* και *R. terrigena* παρουσίασαν πολύ μικρή μείωση πληθυσμού. Επίσης μετά το πέρας των 20 min η καμπύλη απολύμανσης των βακτηρίων σχηματίζει ένα πλατό, συνεπώς η χλωρίωση σταματά να επηρεάζει τον πληθυσμό των στελεχών. Η απολύμανση και των τριών στελεχών δεν ήταν επιτυχής.

Klebsiella oxytoca – *Klebsiella pneumoniae*

Το *K. oxytoca* και το *K. pneumoniae* είναι κατά Gram αρνητικά, ραβδοειδούς σχήματος βακτήρια τα οποία ανήκουν στην οικογένεια *Enterocobacteriaceae*. Αυτά τα βακτήρια απαντώνται φυσικά στο εντερικό σύστημα, στο στόμα και τη μύτη, στο νερό και στο έδαφος. Διαδίδονται συνήθως σε περιβάλλοντα υγειονομικής περίθαλψης και μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή λοίμωξη. Ένας τύπος μόλυνσης προκαλεί συμπτώματα που ομοιάζουν με πνευμονία (Singh et al., 2016). Τα βακτήρια του γένους *Klebsiella* είναι συχνά ανθεκτικά σε πολλαπλά αντιβιοτικά. Τα είδη *Klebsiella* με ικανότητα παραγωγής β-λακταμάσης

εκτεταμένου φάσματος είναι ανθεκτικά σε σχεδόν όλα τα αντιβιοτικά β-λακτάμης εκτός από την καρβαπενέμη (Rechenchoski et al., 2017).



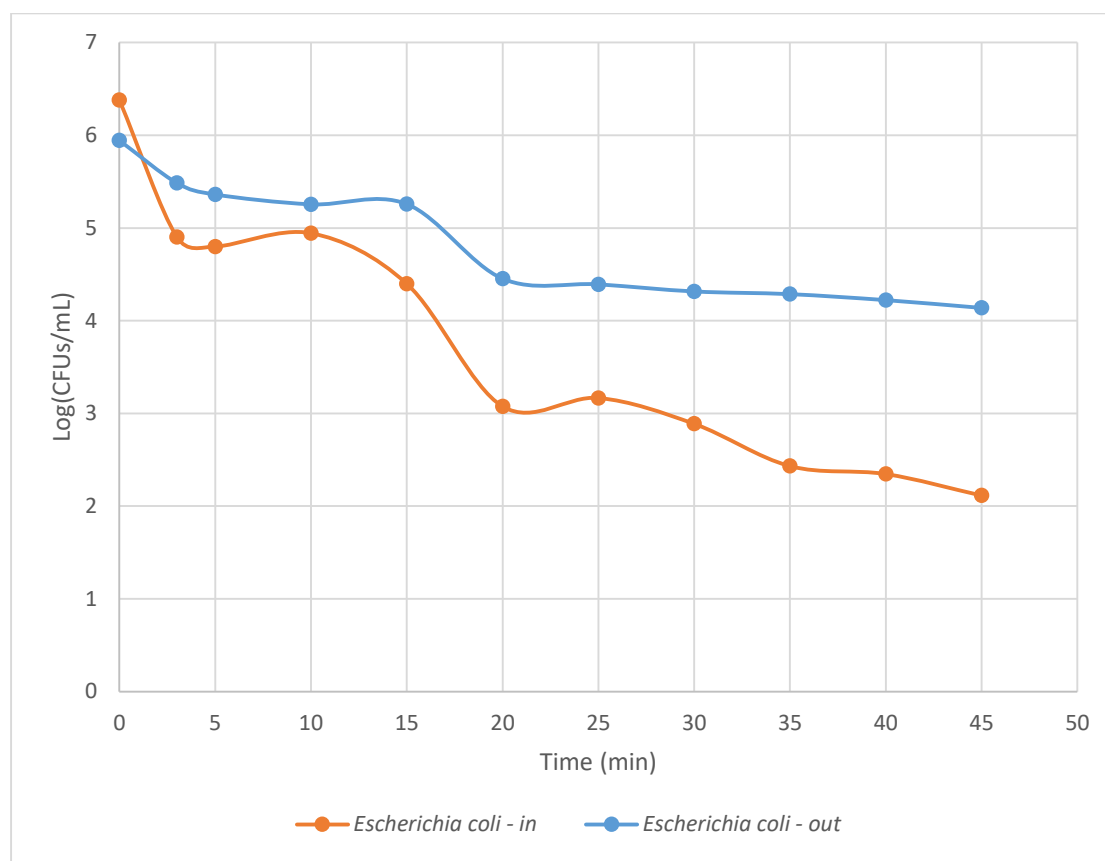
Γράφημα 5. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας *Enterocobacteriaceae* με NaOCl ($C_{NaOCl} = 1\text{mg/L}$)

Η διαδικασία της απολύμανσης για το είδος *K. oxytoca* είχε επιτυχή αποτελέσματα μόνο για το βακτήριο το οποίο απομονώθηκε από την είσοδο του βιολογικού καθαρισμού. Συγκεκριμένα το στέλεχος αυτό παρουσίασε έντονη μείωση του πληθυσμού του κατά τα πρώτα λεπτά της απολύμανσης ενώ στη συνέχεια ο ρυθμός μείωσης ήταν πιο ομαλός. Η χλωρίωση του αντίστοιχου βακτηρίου της εξόδου χαρακτηρίζεται από μια ομαλή καμπύλη που υποδηλώνει μικρή μείωση του πληθυσμού. Το *K. pneumoniae* παρουσίασε μείωση πληθυσμού μικρότερη από δυο τάξεις μεγέθους, γεγονός που κρίνει την απολύμανση του ανεπιτυχή.

Escherichia coli

Το *E. coli* είναι ένα αρνητικό κατά Gram, ραβδοειδούς σχήματος βακτήριο. Συνήθως «φιλοξενείται» στο έντερο των ανθρώπων και ζώων. Τα στελέχη αυτά αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου. Τα περισσότερα στελέχη του βακτηρίου είναι αβλαβή, ωστόσο υπάρχουν και κάποια που

παράγουν επικίνδυνες τοξίνες. Το συγκεκριμένο βακτήριο δεν αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες. Το *E. coli* είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος βακτηριακός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης. Αυτή η ομάδα δεικτών χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ποιότητας των λυμάτων, των ποταμών, των θαλάσσιων υδάτων, του πόσιμου νερού που χρησιμοποιείται για την άρδευση, των τόπων υδατοκαλλιέργειας και των υδάτων αναψυχής (Osuolale et al., 2017).

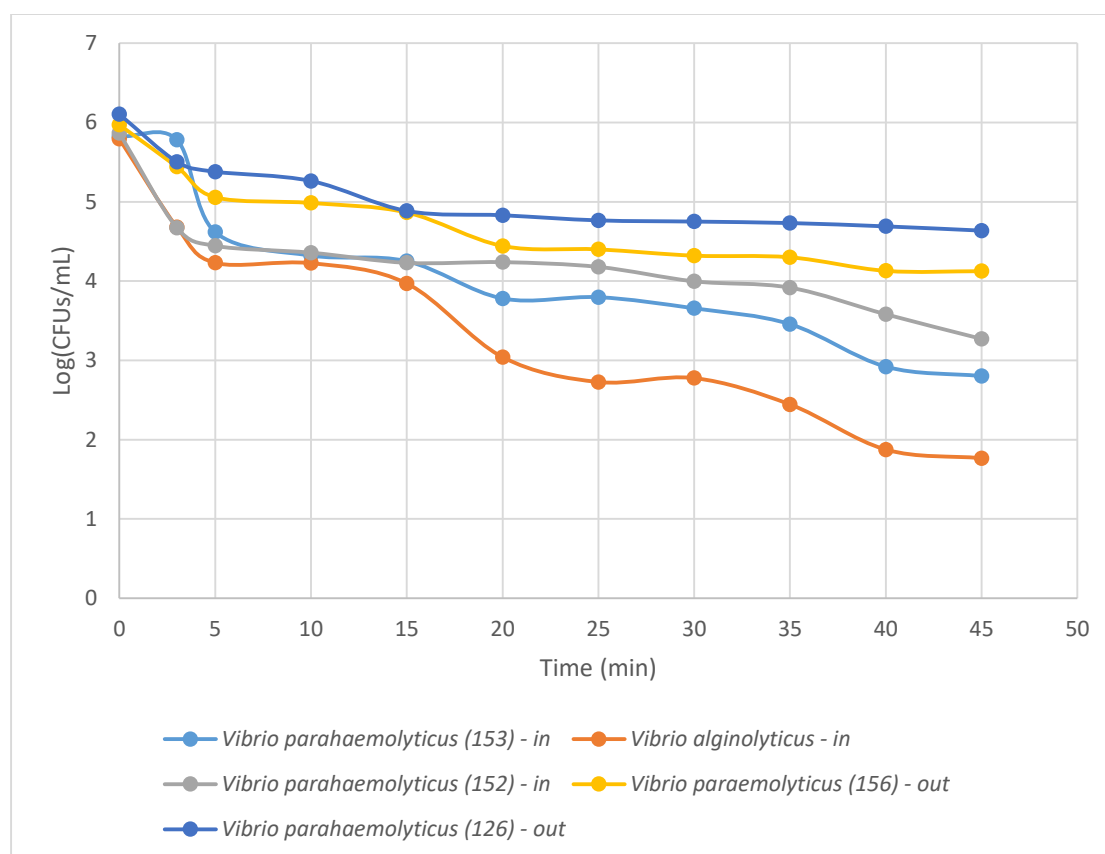


Γράφημα 6. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας *Enterobacteriaceae* με NaOCl ($C_{\text{NaOCl}} = 1\text{mg/L}$)

Η καμπύλη του στελέχους που απομονώθηκε από το λύμα της εισόδου του βιολογικού παρουσιάζει πολύ απότομη μείωση πληθυσμού στα τρία πρώτα λεπτά της διαδικασίας της απολύμανσης. Μέχρι και το πέρας της διαδικασίας ο πληθυσμός του συνεχίζει να μειώνεται έως και τέσσερις τάξεις μεγέθους από τον αρχικό. Αντιθέτως, η απολύμανση για το στέλεχος με προέλευση την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας δεν δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το στέλεχος αυτό φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικό αφού μετά το πέρας των 20 min ο πληθυσμός του σταματά να επηρεάζεται από την απολύμανση παραμένοντας σχεδόν σταθερός.

Vibrio paraemolyticus – *Vibrio alginolyticus*

Το *V. paraemolyticus* και το *V. alginolyticus* είναι δυο κατά Gram αρνητικά βακτήρια τα οποία ανήκουν στην οικογένεια Vibrionaceae. Είναι βακτήρια που ευδοκιμούν σε παράκτια υφάλμυρα νερά θαλασσών και εκβολών ποταμών αλλά και στα θαλάσσια φυτά, ψάρια και οστρακοειδή. Κατά την κατάποση προκαλούν γαστρεντερικές ασθένειες στους ανθρώπους. Αυτά τα βακτήρια βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις τους καλοκαιρινούς μήνες όταν το νερό θερμαίνεται. Τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, στην πενικιλίνη και στην τετρακυκλίνη (Elmahdi et al., 2016).



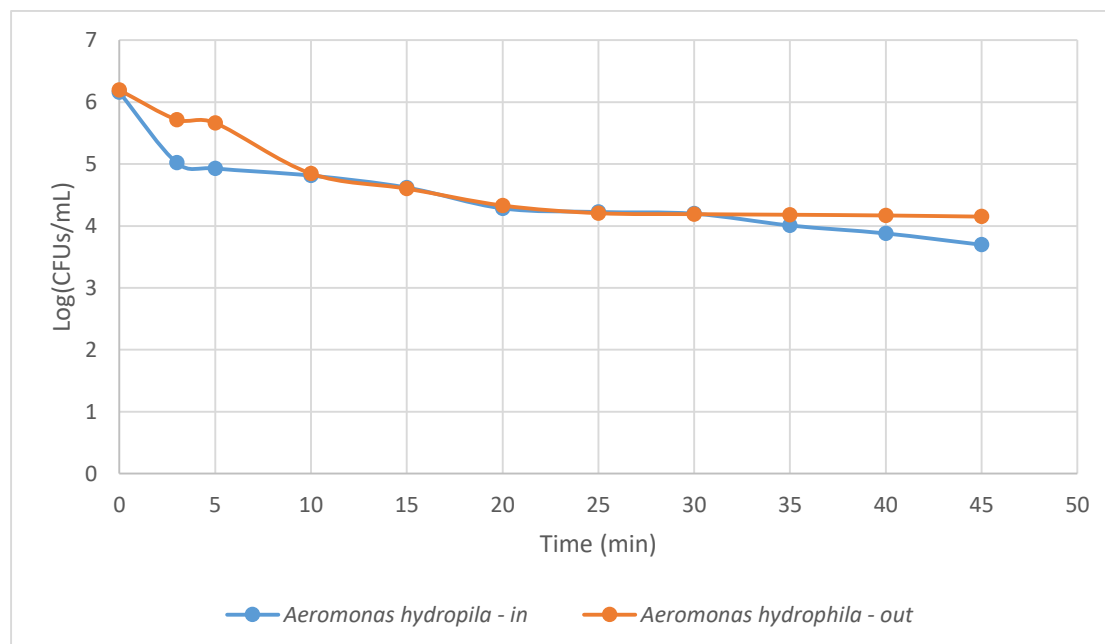
Γράφημα 7. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Vibrionaceae με NaOCl ($C_{NaOCl} = 1\text{mg/L}$)

Παρατηρώντας το συγκεντρωτικό γράφημα της αδρανοποίησης των βακτηρίων της οικογενείας Vibrionaceae γίνεται κατανοητό πως τα βακτήρια τα οποία προέρχονται από λύμα της εισόδου του βιολογικού καθαρισμού είναι λιγότερο ανθεκτικά από αυτά της εξόδου της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας. Συγκεκριμένα από τα τρία βακτήρια της εισόδου αυτό που επηρεάζεται περισσότερο από τη χλωρίωση είναι το *V. alginolyticus*, καθώς παρουσιάζει μεγάλη και απότομη μείωση του πληθυσμού του, ξεπερνώντας τα 4Log. Το πιο ανθεκτικό φαίνεται να είναι το *V. paraemolyticus* (152) καθώς έχει την πιο ομαλή καμπύλη απολύμανσης. Όσον αφορά τα δυο στελέχη της εξόδου της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, *V. paraemolyticus* (126) και (156), όπως και

ήταν αναμενόμενο, πρόκειται για δυο αρκετά ανθεκτικά στελέχη. Το γεγονός αυτό είναι εμφανές από την τάξη μεγέθους του πληθυσμού τους ο οποίος όχι μόνο δεν μειώθηκε αλλά ταυτόχρονα διατηρήθηκε υψηλός μέχρι και το τέλος της απολύμανσης. Συνεπώς η απολύμανση για τα βακτήρια *V. parahaemolyticus* (126) και (156) μπορεί να χαρακτηριστεί ανεπιτυχής.

Aeromonas hydrophila

Το στέλεχος *A. hydrophila* είναι ένα ετερότροφο, Gram-αρνητικό, σε σχήμα ράβδου βακτήριο το οποίο ανήκει στην οικογένεια Aeromonadaceae. Βρίσκεται κυρίως σε περιοχές με ζεστό κλίμα και είναι παρόν σε όλα τα περιβάλλοντα τρεχούμενου νερού αλλά και σε υφάλμυρα νερά. Μπορεί και επιβιώνει σε αερόβια και αναερόβια περιβάλλοντα. Εκτός από την απομόνωση από τις υδάτινες πηγές, το *A. hydrophila* έχει απομονωθεί από το κρέας και τα προϊόντα κρέατος, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα και τα λαχανικά. Το ίδιο μπορεί να προκαλέσει γαστρεντερίτιδα σε υγιή άτομα ή σηψαιμία σε άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Ωστόσο, διάφορες μελέτες έδειξαν ότι αυτό το ευκαιριακό παθογόνο είναι ανθεκτικό στα εμπορικά αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη και η αμπικιλίνη. Το συγκεκριμένο όμως βακτήριο είναι ευαίσθητο στις αμινογλυκοσίδες, στην τετρακυκλίνη, στην σουλφαμεθοξαζόλη, στις κινολόνες και στις κεφαλοσπορίνες δεύτερης και τρίτης γενιάς (Strateva et al., 2016).



Γράφημα 8. Αδρανοποίηση βακτηρίων οικογένειας Aeromonadaceae με NaOCl ($C_{NaOCl} = 1\text{mg/L}$)

Συγκρίνοντας τις καμπύλες μείωσης πληθυσμού των βακτηρίων *A. hydrophila* φαίνεται πως η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ τους έγκειται στο γεγονός ότι ο πληθυσμός του βακτηρίου της εισόδου μειώθηκε με πολύ απότομο ρυθμό κατά την έναρξη της απολύμανσης, ενώ ταυτόχρονα υπήρξε μεγαλύτερη μείωση στις αποικίες του. Το βακτήριο *A. hydrophila* που προέρχεται από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας παρουσιάζει μια πιο ομαλή καμπύλη απολύμανσής, με λιγότερες διακυμάνσεις. Το συγκεκριμένο βακτήριο θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ανθεκτικό αφού ακόμα και στα τελευταία λεπτά της απολύμανσης ο πληθυσμός των αποικιών του παραμένει υψηλός.

Παρατηρήσεις

Το γενικό συμπέρασμα που αποφαίνεται από τα αποτελέσματα της διαδικασίας της χλωρίωσης είναι ότι όλα τα βακτήρια, ανεξάρτητα της προέλευσής τους και του είδους τους ήταν ανθεκτικά στη διαδικασία της χλωρίωσης. Αυτό γίνεται κατανοητό παρατηρώντας τα παραπάνω διαγράμματα, αφού δεν υπήρξε κανένα στέλεχος που να θανατώθηκε τελείως. Αντιθέτως τα περισσότερα από αυτά διατήρησαν αρκετά υψηλούς πληθυσμούς ακόμα και μετά τη χλωρίωση. Ακόμα πιο έντονη ανθεκτικότητα παρουσιάζουν τα βακτήρια εκείνα που απομονώθηκαν από τα δείγματα λύματος εξόδου της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η επεξεργασία που έχουν υποστεί τα βακτήρια μέχρι και τη δευτεροβάθμια επεξεργασία τα καθιστά πιο ισχυρά σε σχέση με τα βακτήρια του δείγματος από λύμα της εισόδου του βιολογικού.

Στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα παρατίθενται όλα τα βακτηριακά στελέχη που υποβλήθηκαν σε χλωρίωση με NaOCl συγκέντρωσης 1mg/L ως προς Cl₂

Πίνακας 5. Βακτηριακά στελέχη που υποβλήθηκαν σε χλωρίωση με NaOCl συγκέντρωσης 1mg/L ως προς Cl₂

Βακτηριακό Στέλεχος	Προέλευση	C _{αρχικό} (CFUs/mL)	C _{τελικό} (CFUs/mL)	Μείωση Πληθυσμού (%)	k (Κινητική σταθερά αδρανοποίησης, min ⁻¹)	R ² (Συντελεστής γραμμικής συσχέτισης)
<i>Enterococcus faecium</i> (143)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	10 ⁶	3x10 ²	99,97	0,28	0,81
<i>Enterococcus faecium</i> (162)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	2x10 ⁶	3x10 ⁴	98,52	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> (136)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	10 ⁶	5x10 ³	99,65	0,25	0,36
<i>Enterobacter cloacae</i> (5)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	2x10 ⁶	10 ³	99,92	0,24	0,91
<i>Enterobacter sakazakii</i> (44)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	2x10 ⁶	10 ²	99,99	0,62	0,96
<i>Escherichia Coli</i> (4)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	2x10 ⁶	10 ²	99,99	0,37	0,68
<i>Klebsiella oxytoca</i> (20 ^a)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	2x10 ⁶	10 ⁴	99,44	0,42	0,75
<i>Rhizobium radiobacter</i> (116)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	10 ⁶	3x10 ⁴	97,42	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (152)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	10 ⁶	2x10 ³	99,75	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (153)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	10 ⁶	6x10 ²	99,91	0,18	0,77
<i>Vibrio alginolyticus</i> (139)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	10 ⁶	10 ²	99,99	0,25	0,78

<i>Serratia odorifera</i> (45)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	10 ⁶	3x10 ⁴	93,56	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> (140)	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	2x10 ⁶	10 ⁴	99,09	-	-
<i>Escherichia coli</i> (64)	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	10 ⁶	10 ⁴	98,44	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (128)	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	2x10 ⁶	2x10 ⁴	99,01	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (54)	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	3x10 ⁵	4x10 ³	98,88	-	-
<i>Raoutella ornithinolytica</i> (131)	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	10 ⁶	10 ⁴	98,98	-	-
<i>Raoutella terrigena</i> (148)	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	10 ⁶	10 ⁴	98,53	-	-
<i>Shigella spp.</i> (70)	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	10 ⁶	10 ⁴	99,04	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (46)	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	2x10 ⁶	10 ⁴	99,51	0,22	0,96
<i>Rhizobium radiobacter</i> (117)	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	10 ⁶	5x10 ⁴	92,64	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (126)	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	10 ⁶	4x10 ⁴	96,59	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (156)	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας	10 ⁶	10 ⁴	98,57	-	-

Ο συντελεστής k εκφράζει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου απολύμανσης. Όσο πιο μεγάλος ο συντελεστής, τόσο ταχύτερη είναι η μέθοδος απολύμανσης. Αν παρατηρηθεί το ποσοστό μείωσης του πληθυσμού (%), του παραπάνω πίνακα, συγκριτικά με τον συντελεστή k είναι εμφανείς οι διακυμάνσεις του ανάλογα τη μείωση του πληθυσμού του εκάστοτε βακτηρίου.

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα αποφαίνεται πως η διαδικασία της απολύμανσης επιτεύχθηκε με μεγαλύτερη επιτυχία στο βακτήριο *E.sakazakii*, το οποίο έχει απομονωθεί από την είσοδο του βιολογικού, σημειώνοντας ποσοστό μείωσης πληθυσμού 99,99%. Ο συντελεστής k της κινητικής του συγκεκριμένου στελέχους επιβεβαιώνει την υψηλή αποτελεσματικότητα της μεθόδου, αφού παρουσιάζει μια υψηλή τιμή της (0,62). Τα ανθεκτικότερα στελέχη ενάντια στη χλωρίωση είναι το *E.faecium* και το *R. radiobacter* τα οποία απομονώθηκαν από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, με ποσοστό μείωσης πληθυσμού 93,56% και 92,64% αντίστοιχα. Σε γενικές γραμμές η διαδικασία της απολύμανσης μπορεί να χαρακτηριστεί επιτυχής για τα στελέχη που απομονώθηκαν από την είσοδο του βιολογικού καθαρισμού. Το ίδιο δεν ισχύει σε καμία περίπτωση για τα ανθεκτικά βακτήρια της εξόδου του βιολογικού. Το *E.colascae* από την έξοδο είχε το υψηλότερο ποσοστό μείωσης πληθυσμού 99,51 % . Το ποσοστό αυτό όμως δεν αρκεί διότι ο συντελεστής k της κινητικής του βακτηρίου είναι 0,22, δηλαδή αρκετά χαμηλός.

Υπολογισμός του C.t

Με την σχέση C·t υπολογίζεται η αποτελεσματικότητα του απολυμαντικού μέσου. Όπου C αντικαθίσταται η συγκέντρωση του απολυμαντικού μέσου σε mg/L και t (min) αντιστοιχεί στον χρόνο που χρειάστηκε ώστε να επέλθει 99,9 % αδρανοποίηση του πληθυσμού των βακτηρίων ο οποίος υποβλήθηκε σε απολύμανση. Όσο χαμηλότερο είναι το αποτέλεσμα C·t, τόσο αποτελεσματικότερο είναι το απολυμαντικό μέσο για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Ακόμη, αυτή η σχέση επιτρέπει την σύγκριση διαφόρων απολυμαντικών μέσων ως προς την αποτελεσματικότητά τους έναντι διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών .

Πίνακας 6. Τιμές C·t (min) για 99,9 % μείωση πληθυσμού των βακτηρίων που υποβλήθηκαν σε χλωρίωση με χρήση NaOCl συγκέντρωσης 1 mg/L ως προς Cl₂. Θερμοκρασία δείγματος 25°C και pH 7.

Είδος Βακτηρίου	Προέλευση	C·t
<i>Enterococcus faecium</i> (143)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	45
<i>Enterobacter cloacae</i> (5)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	45
<i>Enterobacter sakazakii</i> (44)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	45
<i>Escherichia Coli</i> (4)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	45
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (153)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	45
<i>Vibrio alginolyticus</i> (139)	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	45

Η τιμή του C·t στον παραπάνω πίνακα είναι ίδια για όλα τα βακτηριακά στελέχη. Αυτό συμβαίνει διότι ο χρόνος που χρειάστηκε για όλα τα στελέχη, τα οποία υποβλήθηκαν σε χλωρίωση με χρήση NaOCl συγκέντρωσης 1 mg/L, για να επέλθει μείωση πληθυσμού 99,9% ήταν 45 min. Γεγονός που επιβεβαιώνει την ανθεκτικότητα όλων των στελεχών αφού ακόμα και στα τελευταία λεπτά της απολύμανσης διατηρούσαν κάποιες αποικίες.

4.2. Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών ορίζεται από το ISO 20776-2:2007 (212, ISO/TC, 2007), με βάση το οποίο οι μικροοργανισμοί κατηγοριοποιούνται ως ανθεκτικοί (Resistant), μετρίως ευαίσθητοι (Intermediate) και ευαίσθητοι (Susceptible):

- Ευαίσθητοι: οι μικροοργανισμοί των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μία συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συνδέεται με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας.
- Μετρίως ευαίσθητοι: οι μικροοργανισμοί των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μία συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συνδέεται με αμφίβολη θεραπευτική επιτυχία.
- Ανθεκτικοί: οι μικροοργανισμοί των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μία συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συνδέεται με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας.

Πίνακας 7. Eucast Breakpoints table

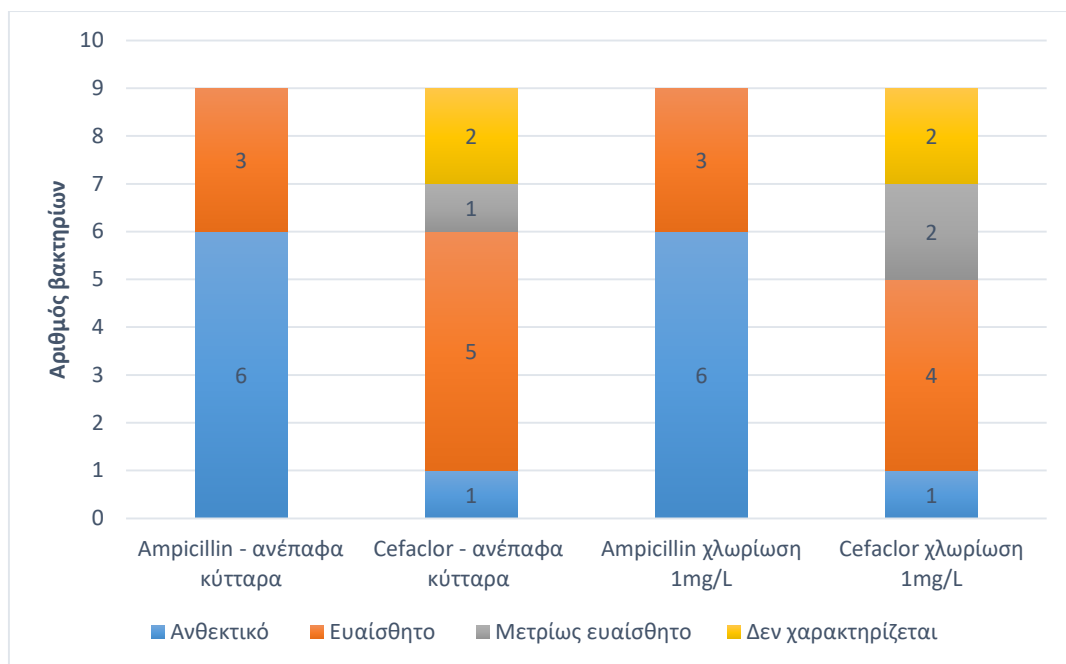
Οικογένεια	Εύρος Ανασταλτικής Συγκέντρωσης MIC (μg/mL)		
	Ευαίσθητος	Μετρίως ευαίσθητος	Ανθεκτικός
	Ampicillin		
Enterococcaceae	MIC ≤ 4	4 < MIC < 8	MIC ≥ 8
Aeromonadaceae	MIC ≤ 4	4 < MIC < 16	MIC ≥ 16
Enterobacteriaceae	MIC ≤ 8	—	MIC ≥ 8
Rhizobiaceae	MIC ≤ 2	2 < MIC < 8	MIC ≥ 8
Vibrionaceae	MIC ≤ 2	2 < MIC < 8	MIC ≥ 8
	Cefaclor		
Enterococcaceae	MIC ≤ 8	8 < MIC < 32	MIC ≤ 32
Aeromonadaceae	MIC ≤ 8	8 < MIC < 32	MIC ≤ 32
Enterobacteriaceae	MIC ≤ 8	8 < MIC < 32	MIC ≤ 32
Rhizobiaceae	-	-	-
Vibrionaceae	-	-	-

*Δεν υπάρχουν καταχωρημένες μετρήσεις στη βάση δεδομένων Eucast Breakpoints

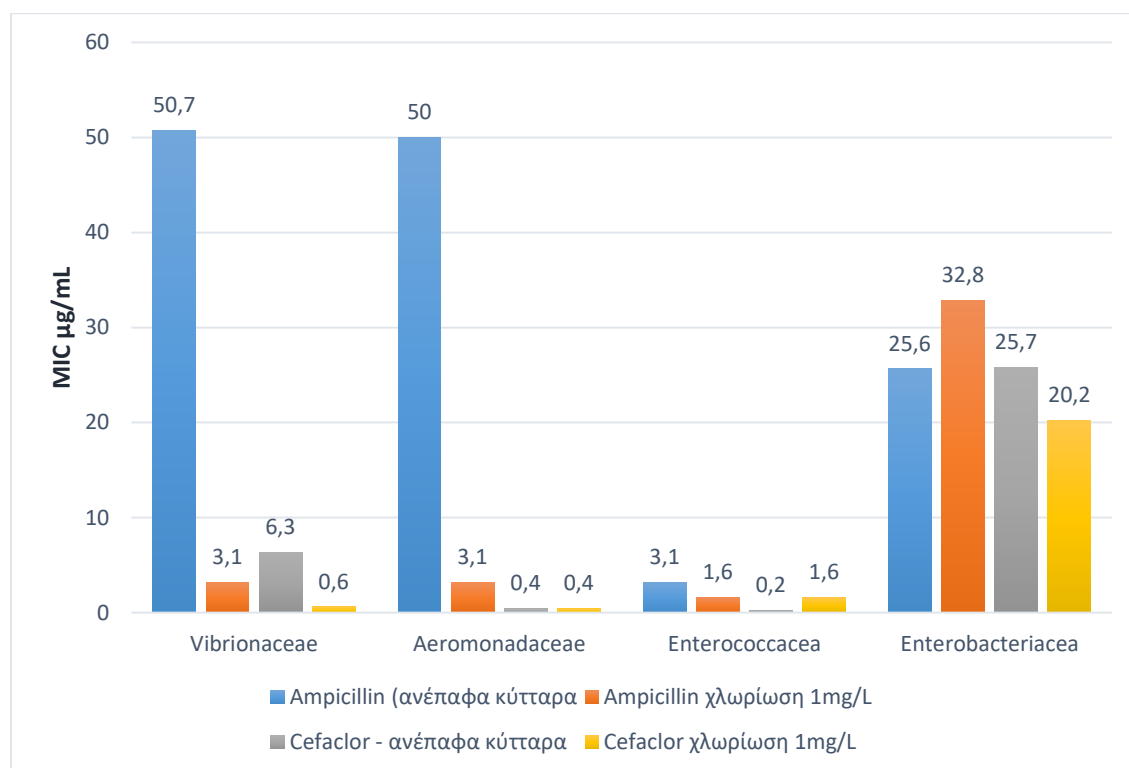
Η ευαισθησία των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά κρίθηκε βάσει των ορίων ανασταλτικής συγκέντρωσης που έχουν οριστεί από τον οργανισμό *EUCAST* (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Ο οργανισμός αυτός ασχολείται με την ανίχνευση της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά και τις τιμές της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης. Τα όρια που αφορούν τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς φαίνονται στον Πίνακα 7.

Για την τελική κατηγοριοποίησή των βακτηρίων ως προς την ανθεκτικότητα, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων των τιμών ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ανέπαφων κυττάρων των βακτηρίων και των εναπομεινάντων κυττάρων μετά από την επεξεργασία της απολύμανσης. Ελέγχθηκε επίσης η διαφοροποίηση της ανθεκτικότητας ανάμεσα σε στελέχη που προέρχονται από ανεπεξέργαστα υγρά λύματα και σε στελέχη που έχουν περάσει το στάδιο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας των λυμάτων. Το προφίλ ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά ελέγχθηκε έναντι δυο αντιβιοτικών της ίδιας κατηγορίας, Ampicillin και Cefaclor. Η Ampicillin και το Cefaclor ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των β-λακταμών, η παρουσία των οποίων στο υδάτινο περιβάλλον και στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας των λυμάτων έχει ήδη παρατηρηθεί

Βάσει των παραπάνω κρίθηκε η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών και τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα φαίνονται στο Γράφημα 9. Όπως παρατηρούμε, εμφανίστηκαν υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό Ampicillin στα ανέπαφα κύτταρα αλλά και σε αυτά που έχουν υποστεί χλωρίωση. Όσον αφορά το Cefaclor τα περισσότερα στελέχη φάνηκε να είναι ευαίσθητα σε αυτό. Η οικογένεια με τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικότητας και στα δυο αντιβιοτικά ήταν αυτή των *Enterobacteriaceae*. Οι οικογένειες *Vibrionaceae* και *Aeromonadaeaceae* εμφάνισαν μεγάλα ποσοστά ανθεκτικότητας μόνο στην Ampicillin. Η πιο ευάλωτη οικογένεια και στους δυο αντιβιοτικούς παράγοντες είναι αυτή των *Enterococcaceae* (Γράφημα 10).



Γράφημα 9. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του βαθμού ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε κάθε αντιβιοτικό

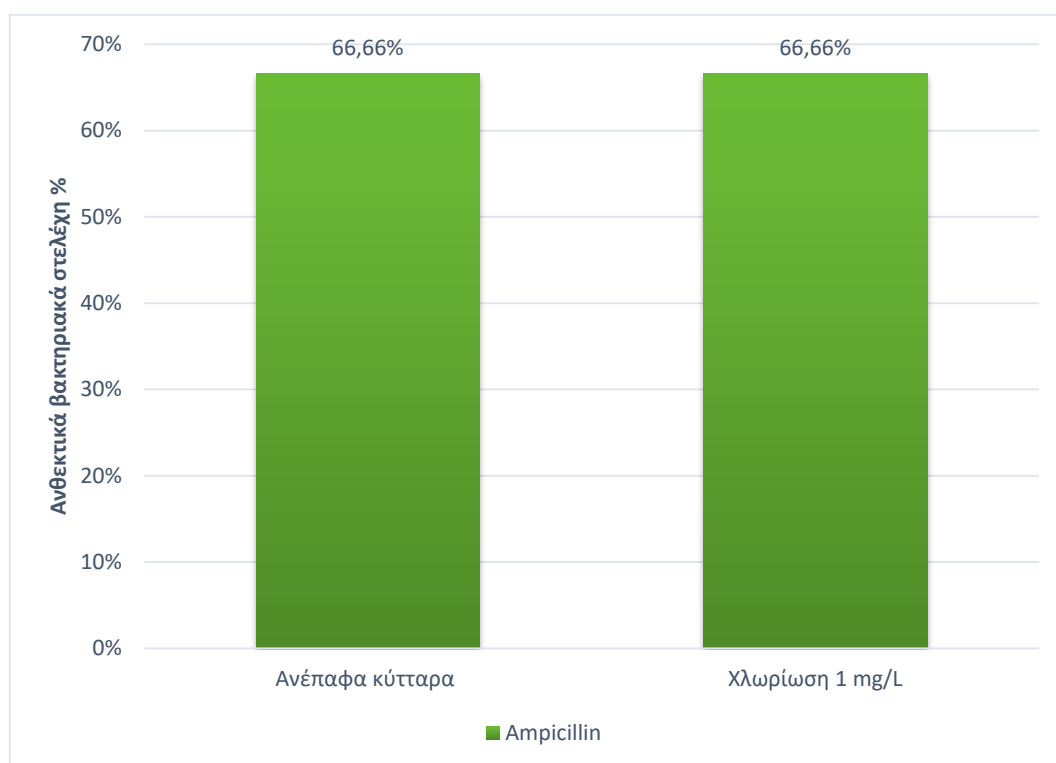


Γράφημα 10. Μέση τιμή ανασταλτικής συγκέντρωσης ανά βακτηριακή οικογένεια και αντιβιοτικό παράγοντα.

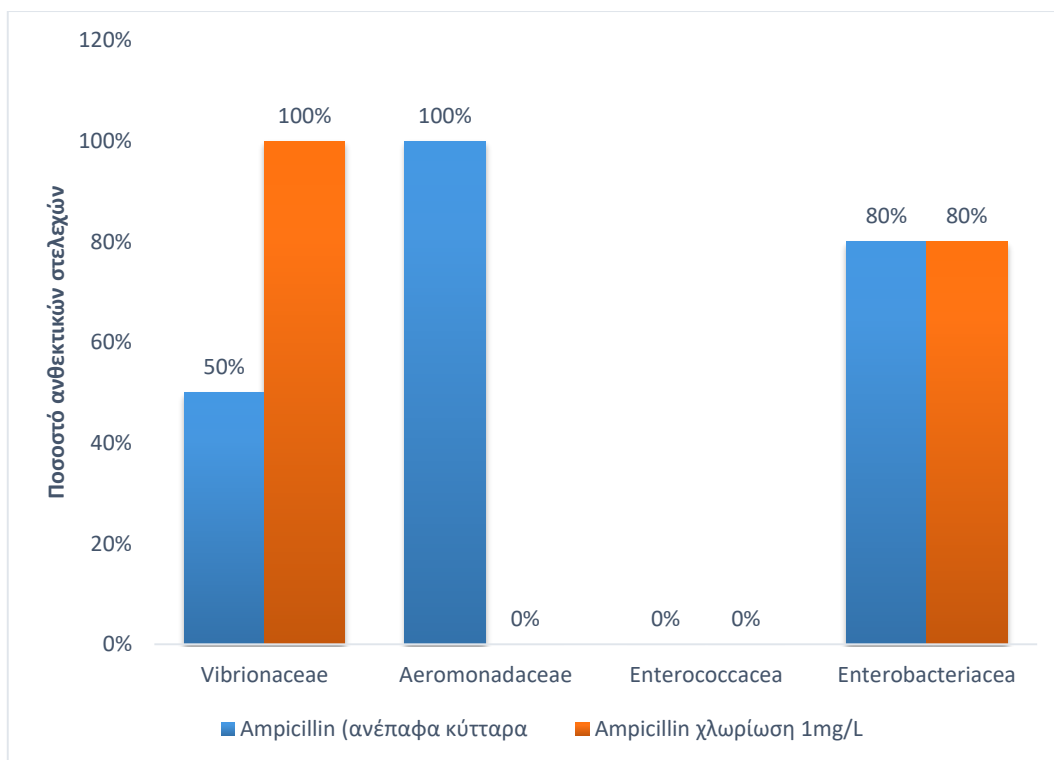
4.2.1 Ampicillin

Ανάμεσα στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά, τα στελέχη παρουσίασαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην Ampicillin. Συγκεκριμένα, το 66,66 % των επεξεργασμένων και μη στελεχών εμφάνισε αυξημένη αντοχή (Γράφημα 11).

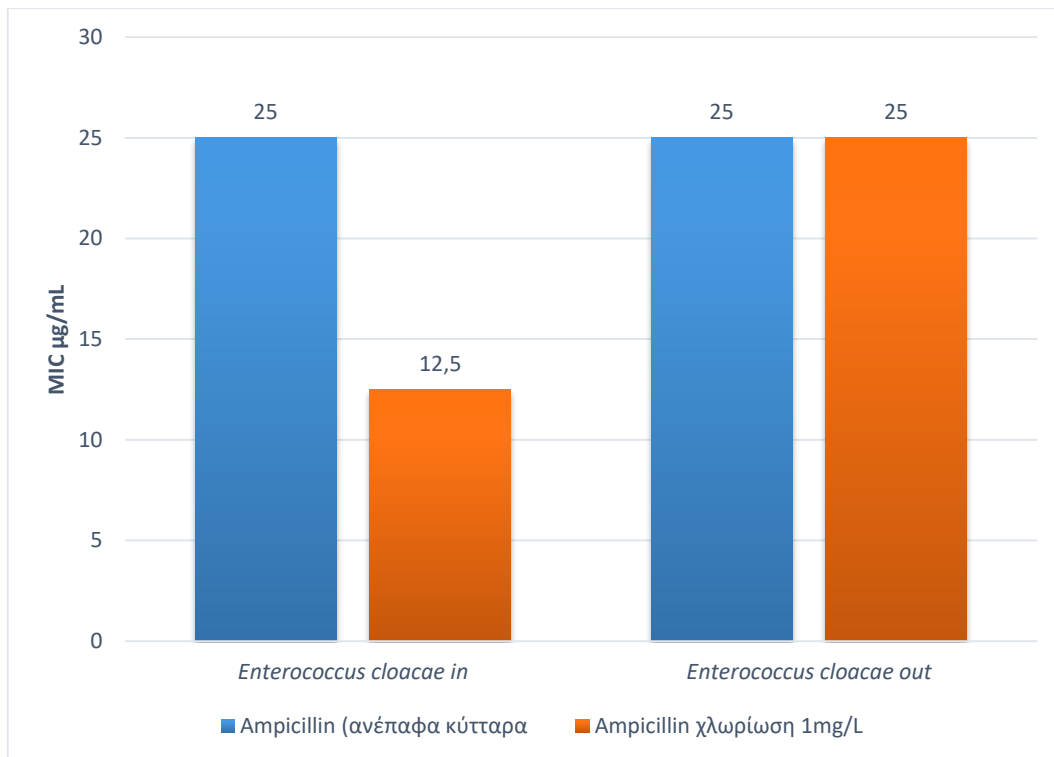
Από τις βακτηριακές οικογένειες που εξετάστηκαν η πλέον πιο ανθεκτική ήταν αυτή των Enterobacteriaceae, της οποίας το 80 % των στελεχών, ανέπαφα αλλά και επεξεργασμένα ήταν ανθεκτικά. Η οικογένεια Vibrionaceae εμφάνισε 100% ανθεκτικότητα στα στελέχη που είχαν υποστεί χλωρίωση. Αντίστοιχα η οικογένεια Aeromonadaceae εμφάνισε 100% ανθεκτικότητα στα ανέπαφα κύτταρα. Αντιθέτως, οι εντερόκοκκοι εμφάνισαν μεγαλύτερη ευαισθησία από τους άλλους μικροοργανισμούς (Γράφημα 12).



Γράφημα 11. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στην **Ampicillin** επί του συνόλου των στελεχών βάσει επεξεργασίας



Γράφημα 12. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στην **Ampicillin** επί του συνόλου κάθε οικογένειας βακτηρίων



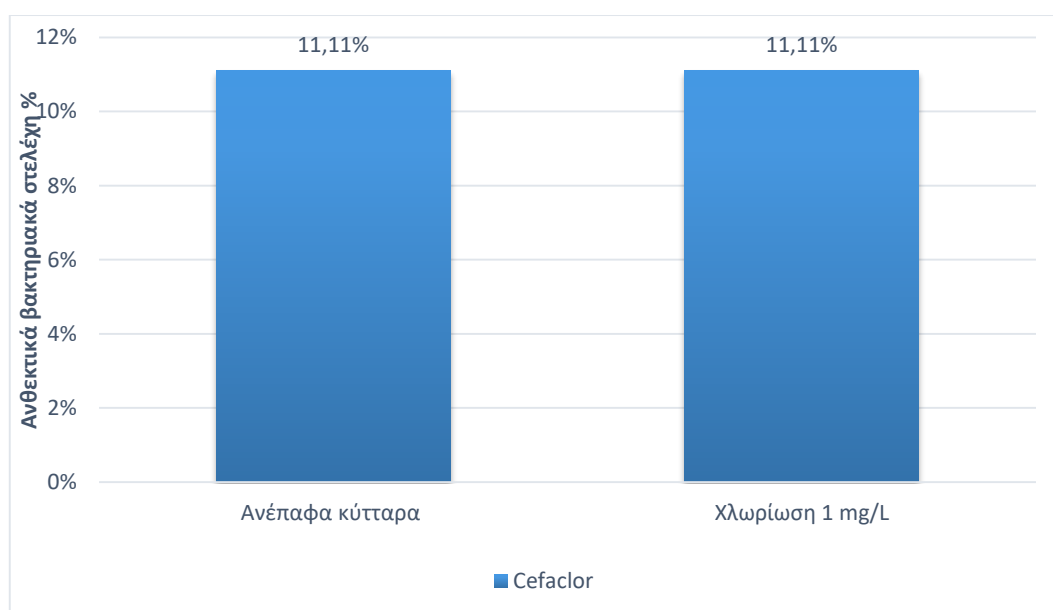
Γράφημα 13. Σύγκριση της *MIC* για την **Ampicillin** των στελεχών βάσει προέλευσης

Όπως παρατηρείται στο Γράφημα 13, η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στην Ampicillin δεν διαφοροποιείται ιδιαίτερα από την είσοδο στην έξοδο των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων. Η μοναδική διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι η MIC του στελέχους της εισόδου μειώνεται μετά τη χλωρίωση, ακόμα όμως και με τη μείωση αυτή το στέλεχος παραμένει ανθεκτικό. Το στέλεχος της εξόδου διατηρεί το επίπεδο ανθεκτικότητας του ακόμα και μετά την απολύμανση. Συνεπώς, η επεξεργασία των υγρών λυμάτων φαίνεται μην επηρεάζει ούτε θετικά ούτε αρνητικά την ευαισθησία των μικροοργανισμών στην Ampicillin.

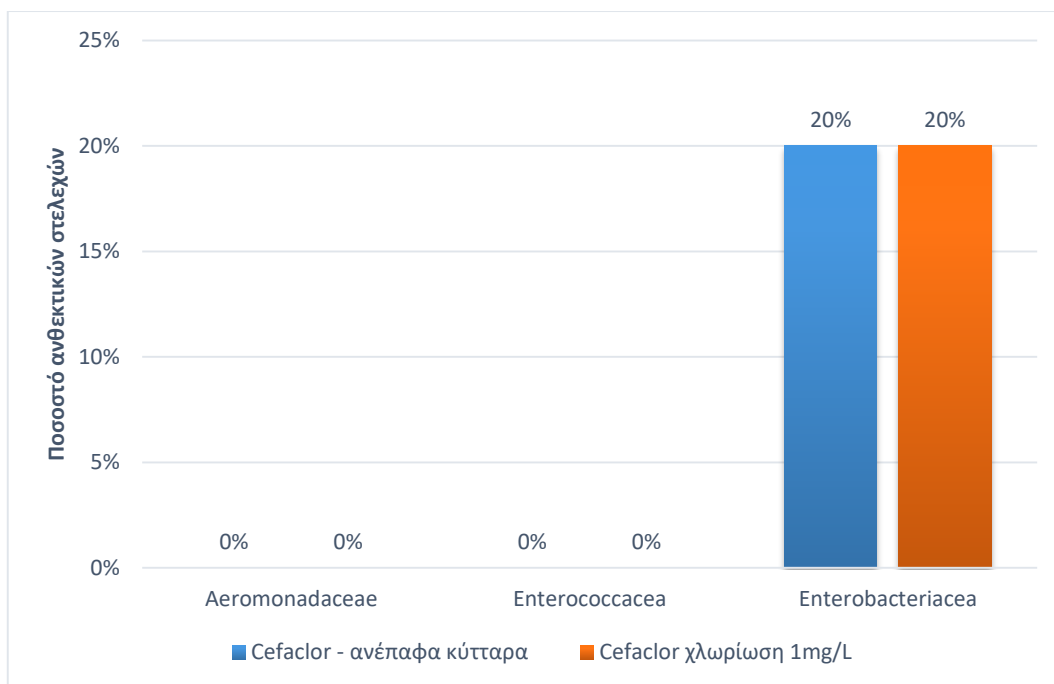
4.2.2 Cefaclor

Το Cefaclor φαίνεται να ήταν πιο δραστικό σε σχέση με την Ampicillin στα βακτηριακά στελέχη που εξετάστηκαν. Το ποσοστό ανθεκτικότητας του ήταν σχετικά χαμηλό αφού δεν ξεπερνούσε το 11,11% για ανέπαφα αλλά και επεξεργασμένα στελέχη(Γράφημα 14).

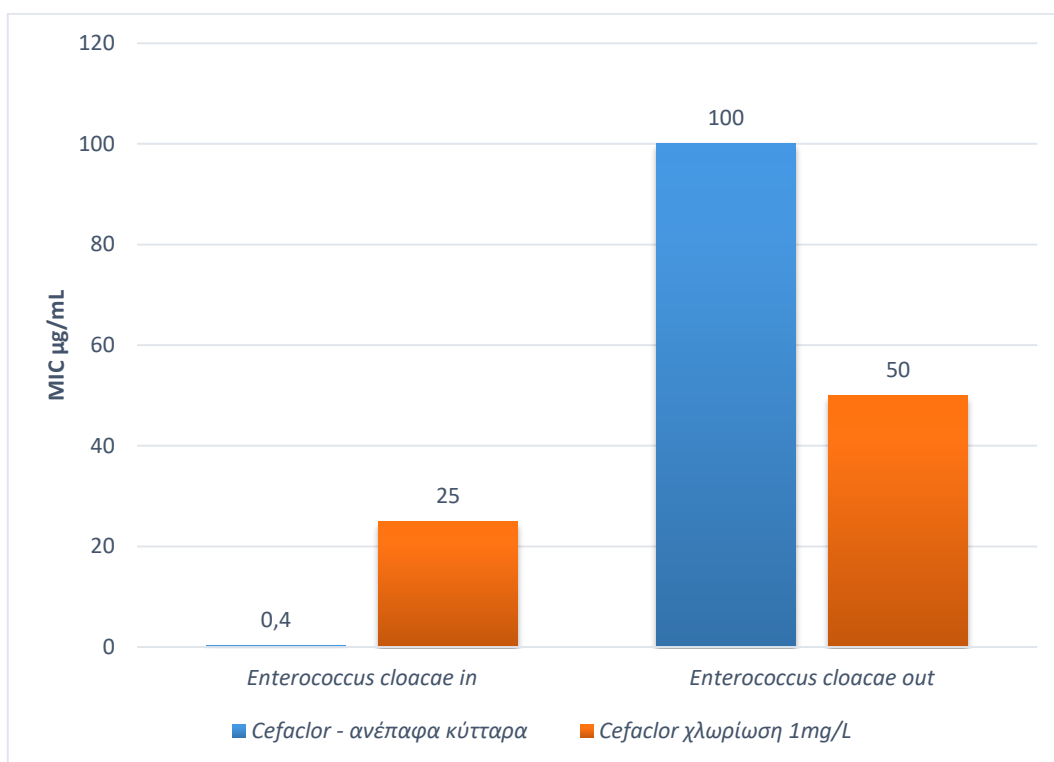
Από τις βακτηριακές οικογένειες που εξετάστηκαν η πλέον πιο ανθεκτική ήταν αυτή των Enterobacteriaceae, της οποίας το 20 % των στελεχών, ανέπαφα αλλά και επεξεργασμένα ήταν ανθεκτικά. Οι οικογένειες Enterococcaceae και Aeromonadaceae εμφάνισαν 0% ανθεκτικότητα (Γράφημα 15)



Γράφημα 14. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στην **Cefaclor** επί του συνόλου των στελεχών βάσει επεξεργασίας



Γράφημα 15. Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών στην **Cefaclor** επί του συνόλου κάθε οικογένειας βακτηρίων



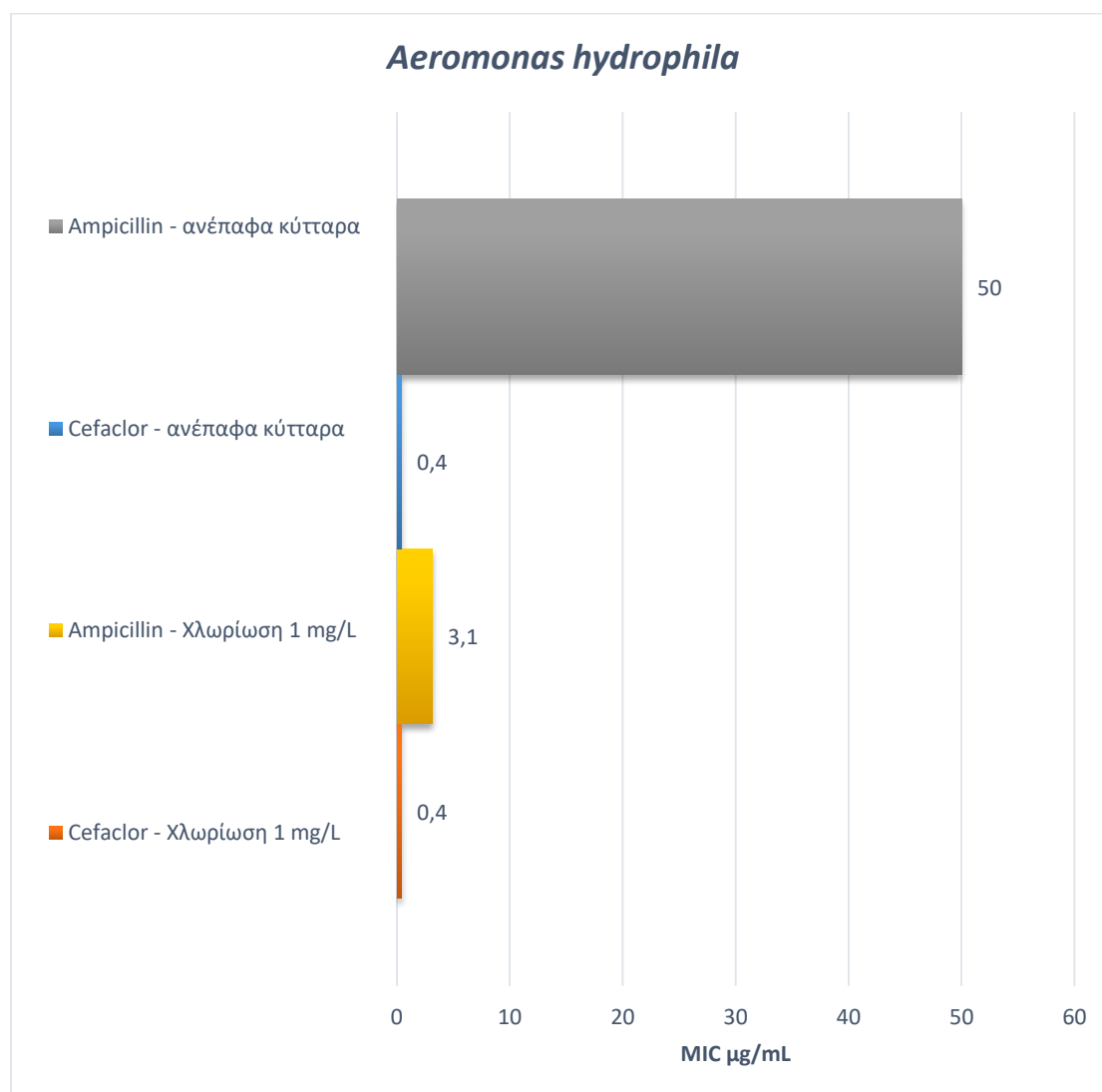
Γράφημα 16. Σύγκριση της MIC για το **Cefaclor** των στελεχών βάσει προέλευσης

Όπως παρατηρείται στο γράφημα 16, η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στο Cefaclor διαφοροποιείται ιδιαίτερα από την είσοδο στην έξοδο των

εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων. Το στέλεχος της εισόδου επηρεάζεται αρνητικά από την χλωρίωση αφού η MIC του μετά από αυτή αυξάνεται. Το στέλεχος από την έξοδο το οποίο χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικό στη Cefaclor μειώνει την MIC του κατά το ήμισυ μετά από την απολύμανση. Συνεπώς, η απολύμανση το επηρεάζει θετικά.

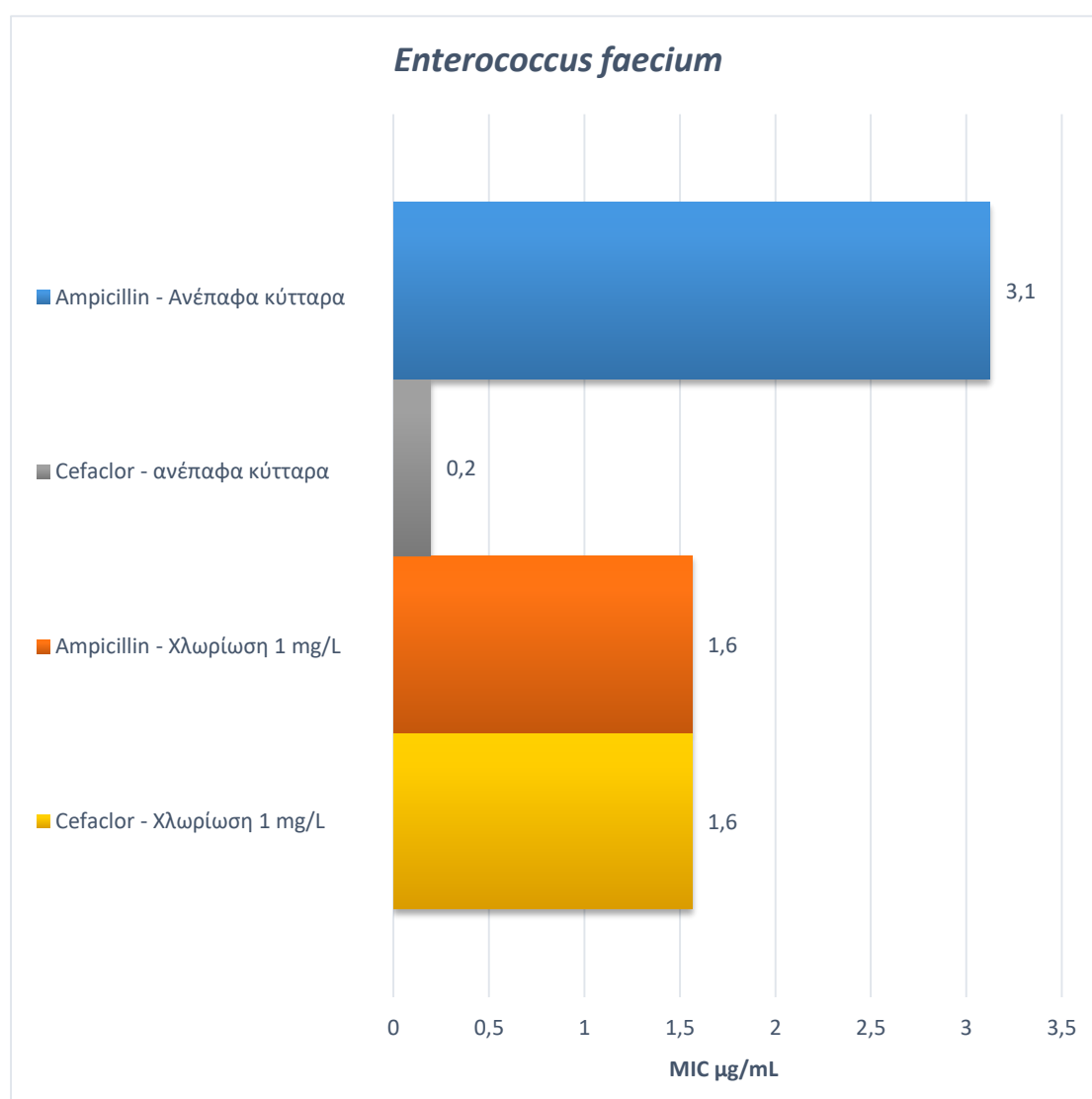
4.2.3 Ανθεκτικότητα ανά βακτηριακό είδος

Στην συνέχεια θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα των δοκιμών ευαισθησίας στα αντιβιοτικά κατηγοριοποιημένα ανά το είδος των βακτηρίων.



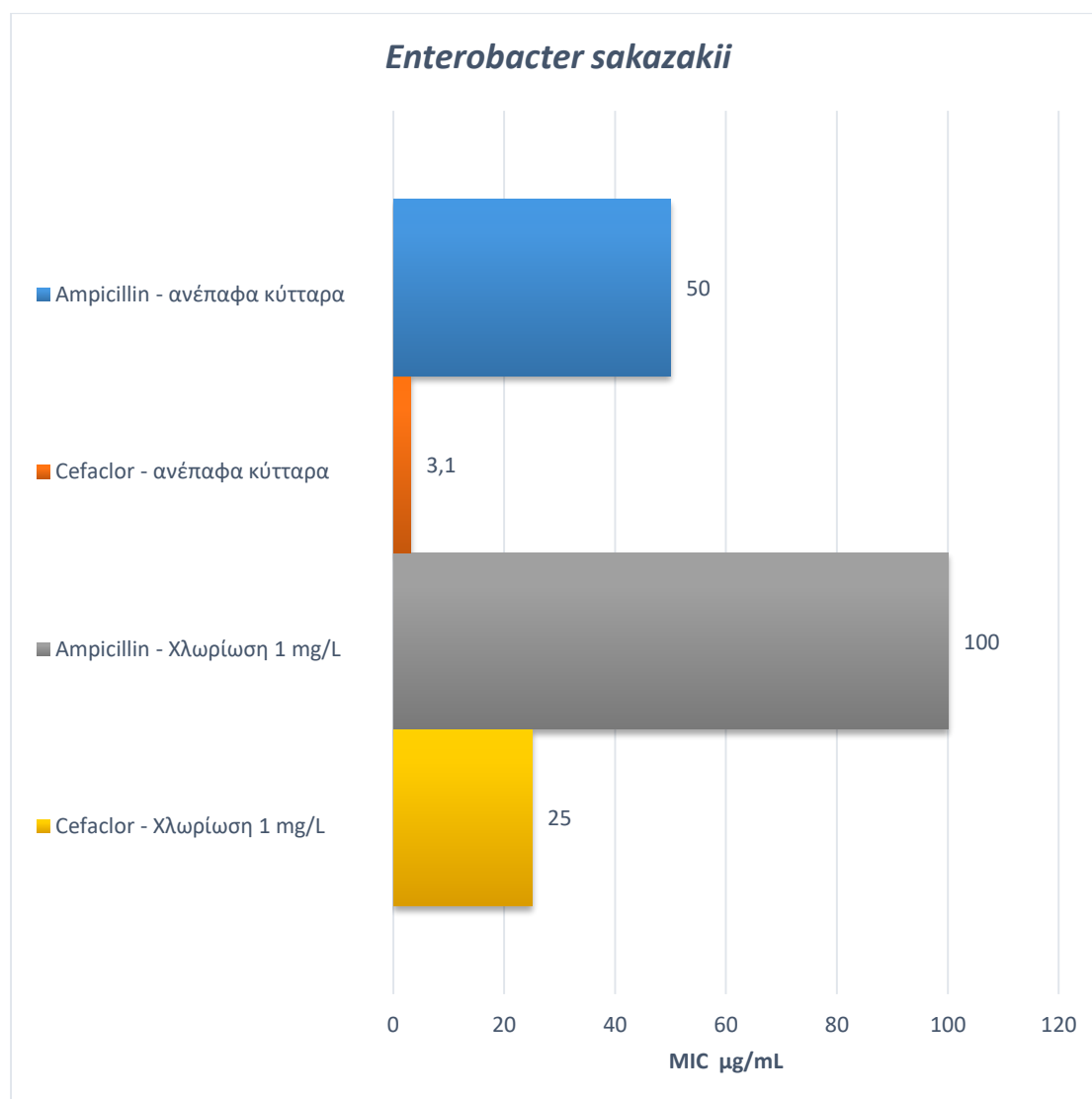
Γράφημα 17. Προφίλ ανθεκτικότητας *A. hydrophila* από την είσοδο του βιολογικού

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση της Ampicillin φαίνεται πως μειώνεται από 50 $\mu\text{g/mL}$ στα ανέπαφα κύτταρα, σε 3,1 $\mu\text{g/mL}$ μετά τη χλωρίωση. Αυτό είναι πολύ σημαντικό αφού το στέλεχος αρχικά θεωρείται ανθεκτικό ενώ στη συνέχεια η διαδικασία της απολύμανσης το αποδυναμώνει κάνοντας το πλέον ευαίσθητο. Στην περίπτωση του Cefaclor η τιμή της MIC 0,4 $\mu\text{g/mL}$, το κατατάσσει σε ευαίσθητο στέλεχος. Το πρότυπο της ανθεκτικότητας του βακτηρίου για το αντιβιοτικό αυτό παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο ακόμα και μετά τη διαδικασία της απολύμανσης.



Γράφημα 18. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου *E. faecium* από την είσοδο του βιολογικού

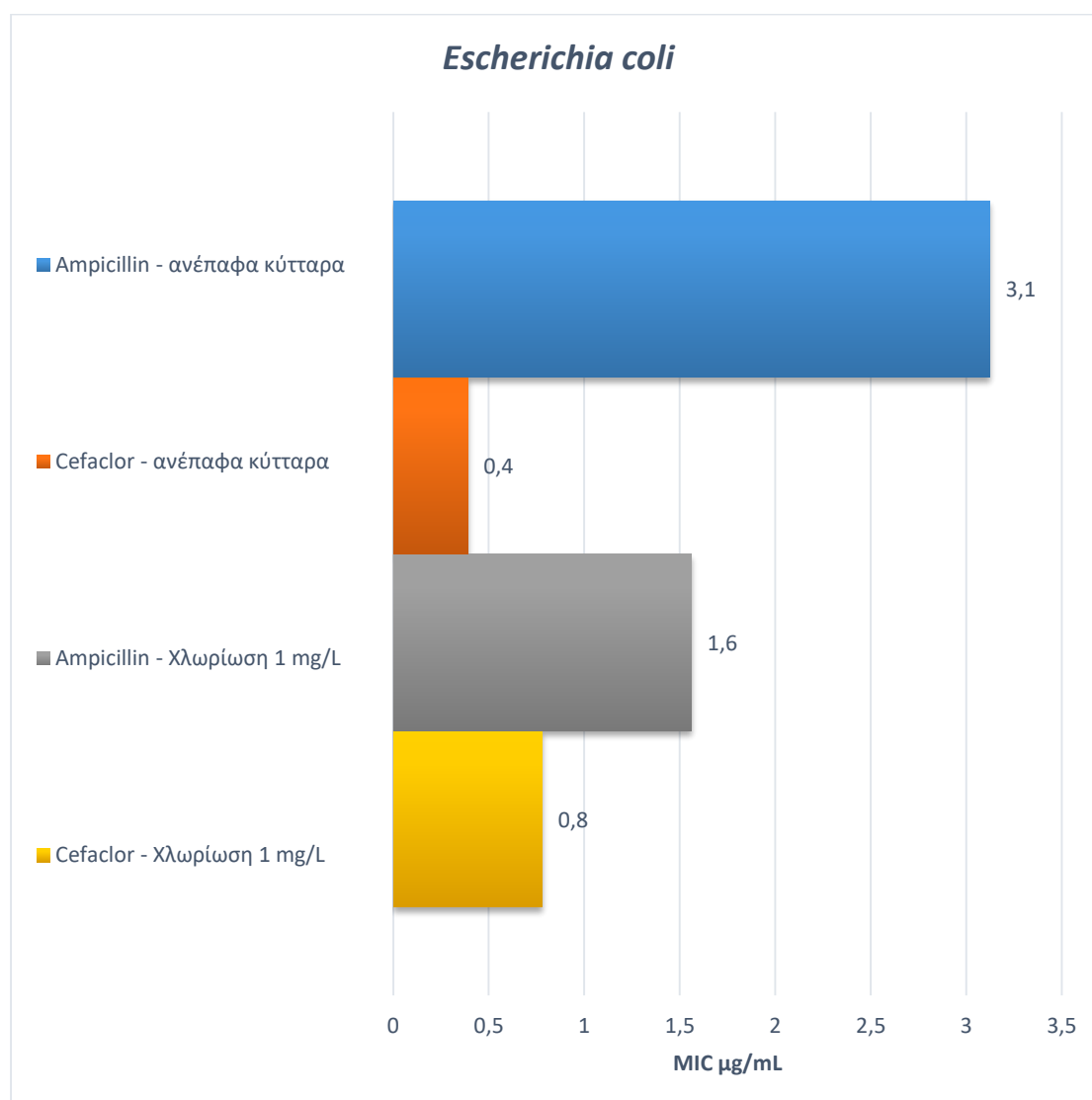
Σύμφωνα με τους Holmberg, et al. τα βακτήρια *E.faecium* εμφανίζουν υψηλή συχνότητα αντοχής στην Ampicillin. Το παραπάνω στέλεχος όμως φαίνεται να είναι ευαίσθητο στην Ampicillin αφού η MIC του στα ανέπαφα κύτταρα εμφανίζει τιμή μικρότερη των 4 $\mu\text{g/mL}$. Μετά την χλωρίωση η MIC του βακτηρίου μειώνεται ακόμα πιο πολύ. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ενώ η MIC του στελέχους αυτού για το Cefaclor στα ανέπαφα κύτταρα είναι αρκετά μικρή μετά την απολύμανση η τιμή της αυξάνεται. Στην συγκεκριμένη περίπτωση η απολύμανση του βακτηρίου το καθιστά πιο ανθεκτικό. Σε κάθε περίπτωση η τιμή της MIC του βακτηρίου *E. faecium* για την Cefaclor το κατατάσσει σε ευαίσθητο βακτήριο.



Γράφημα 19. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου *E. Sakazakii* από την είσοδο του βιολογικού

Το βακτήριο *E. sakazakii* εμφανίζει ανθεκτικότητα στην Ampicillin τόσο στα μη επεξεργασμένα κύτταρα του όσο και σε αυτά που υποβλήθηκαν σε

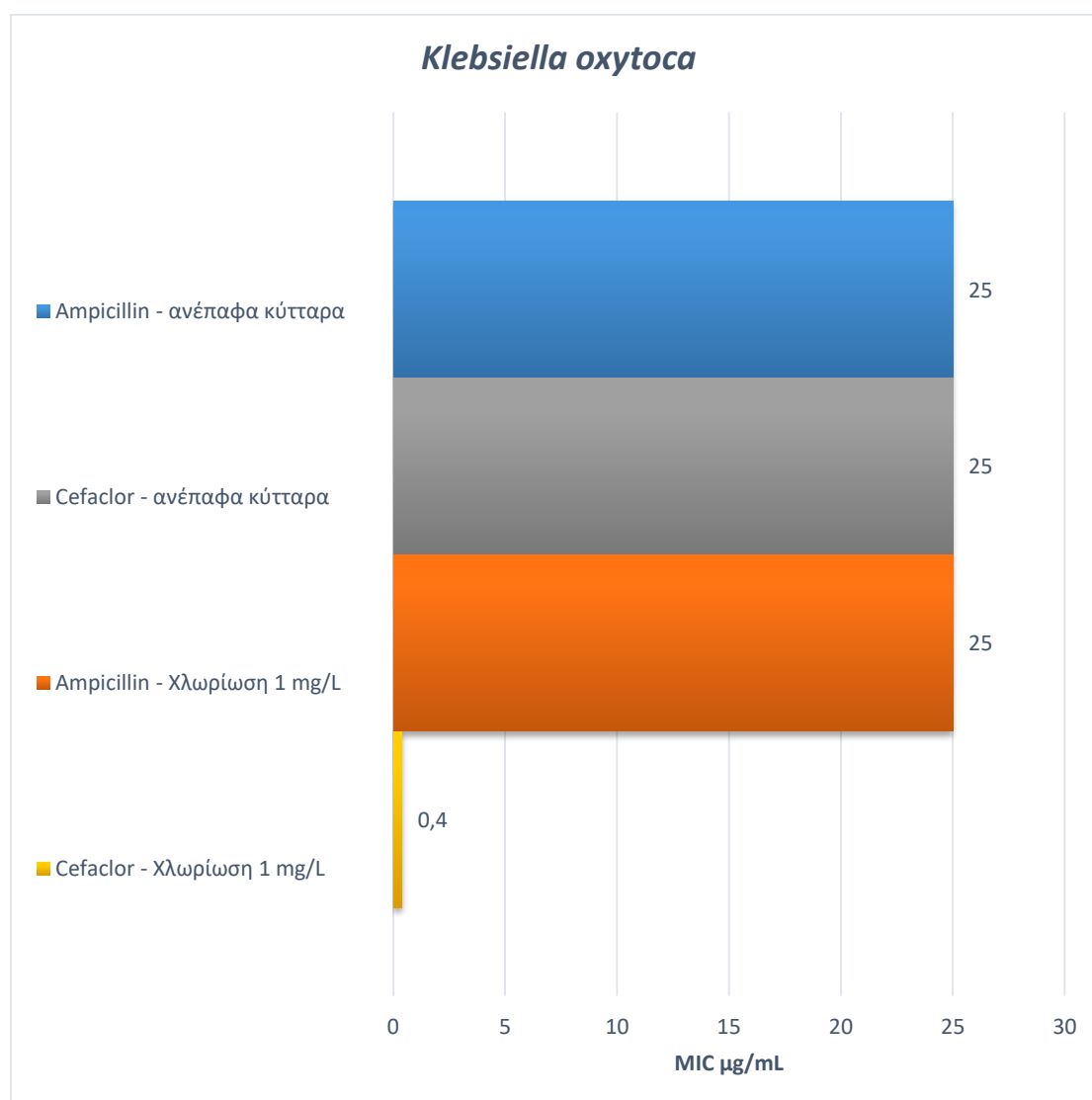
απολύμανση. Συγκεκριμένα η τιμή της MIC του τετραπλασιάζεται μετά την χλωρίωση. Η διαδικασία της απολύμανσης λειτούργησε αρνητικά και στην περίπτωση της Cefaclor αυξάνοντας το επίπεδο της αντοχής των επεξεργασμένων κυττάρων σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα. Η αύξηση που σημειώθηκε στην MIC για το Cefaclor μετά την διαδικασία της απολύμανσης μετατρέπει το βακτήριο από ευαίσθητο σε μετρίως ευαίσθητο πλέον.



Γράφημα 20. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου *E.coli* από την είσοδο του βιολογικού

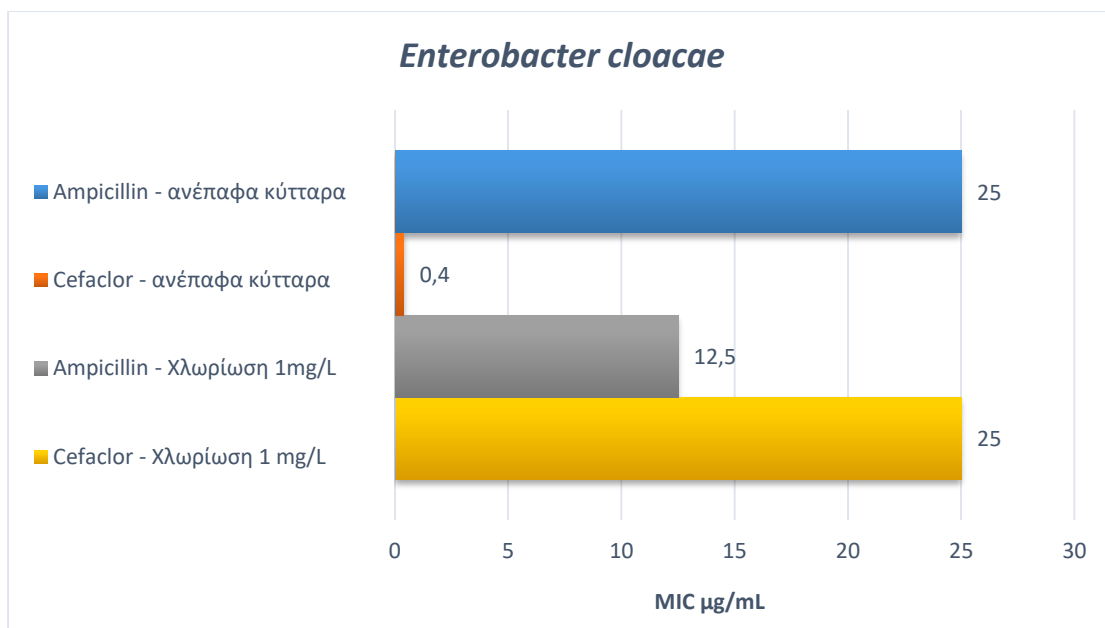
Το στέλεχος *E.coli* παρουσιάζει χαμηλές τιμές MIC και για τα δυο αντιβιοτικά. Σύμφωνα με τα πρότυπα του Eucast το συγκεκριμένο βακτήριο μπορεί να χαρακτηριστεί ευαίσθητο στην Ampicillin αλλά και στο Cefaclor. Στην δοκιμή της Ampicillin η απολύμανση φαίνεται να το αποδυναμώνει ακόμα περισσότερο αφού η MIC μειώνεται από 3,1 μg/mL σε 1,6 μg/mL. Η χλωρίωση δεν φαίνεται να λειτούργησε το ίδιο θετικά στη περίπτωση του Cefaclor αφού η MIC σχεδόν διπλασιάστηκε. Τα παραπάνω δεδομένα δεν ήταν τα αναμενόμενα αφού δεν

συμφωνούν με τις υψηλές τιμές MIC που μετρήθηκαν με τους Rizzo et al. (2013) σε πληθυσμούς *E.coli* στα λύματα.



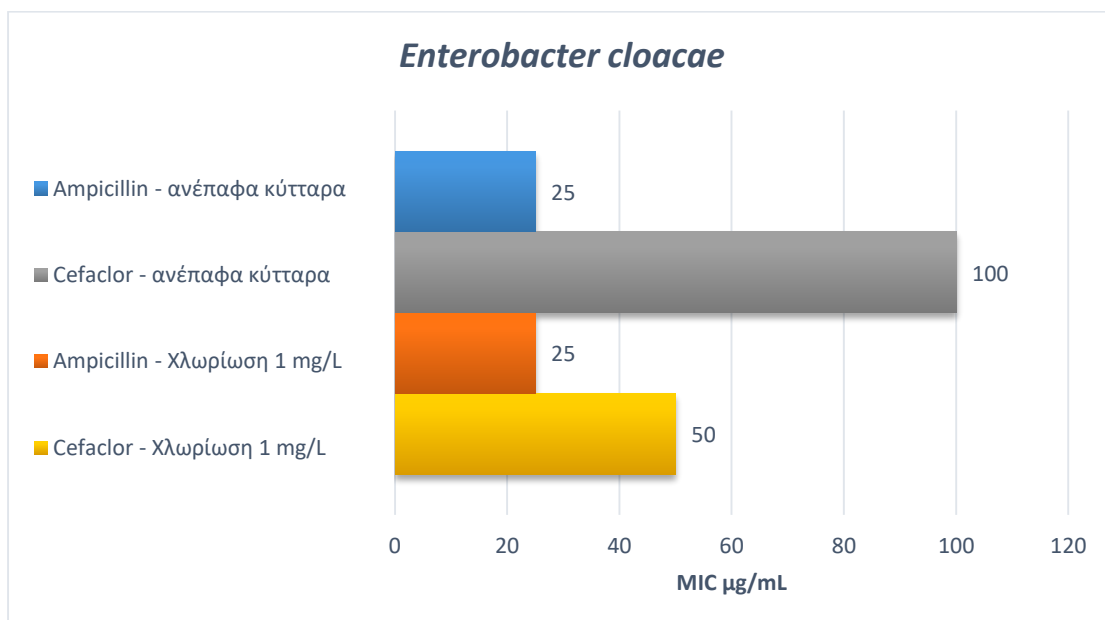
Γράφημα 21. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου *K. oxytoca* από την είσοδο του βιολογικού

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα το βακτήριο *K. oxytoca* μπορεί να χαρακτηριστεί ανθεκτικό στην Ampicillin αφού η MIC του ξεπερνά την τιμή 8 μg/mL που θέτει ως όριο το Eucast. Τα επίπεδα ανθεκτικότητας του βακτηρίου *K. oxytoca*, όσων αφορά το αντιβιοτικό Ampicillin, παραμένουν στο ίδιο σημείο ακόμα και μετά τη διαδικασία της απολύμανσης. Αυτό λογικά οφείλεται στην ικανότητα του στελέχους να παράγει β-λακταμάση, κάνοντας την ανθεκτική σε πολλά αντιβιοτικά β-λακτάμης (Rechenchoski et al., 2017). Το βακτήριο φαίνεται να είναι πιο ευάλωτο στο Cefaclor. Ενώ το επίπεδο της ανασταλτικής συγκέντρωσης μειώθηκε κατά πολύ μετά την απολύμανση, μετατρέποντας το βακτήριο από μετρίως ευαίσθητο σε ευαίσθητο. Η απολύμανση λειτούργησε θετικά στην προκειμένη περίπτωση.



Γράφημα 22 . Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου *E.cloacae* από την είσοδο του βιολογικού

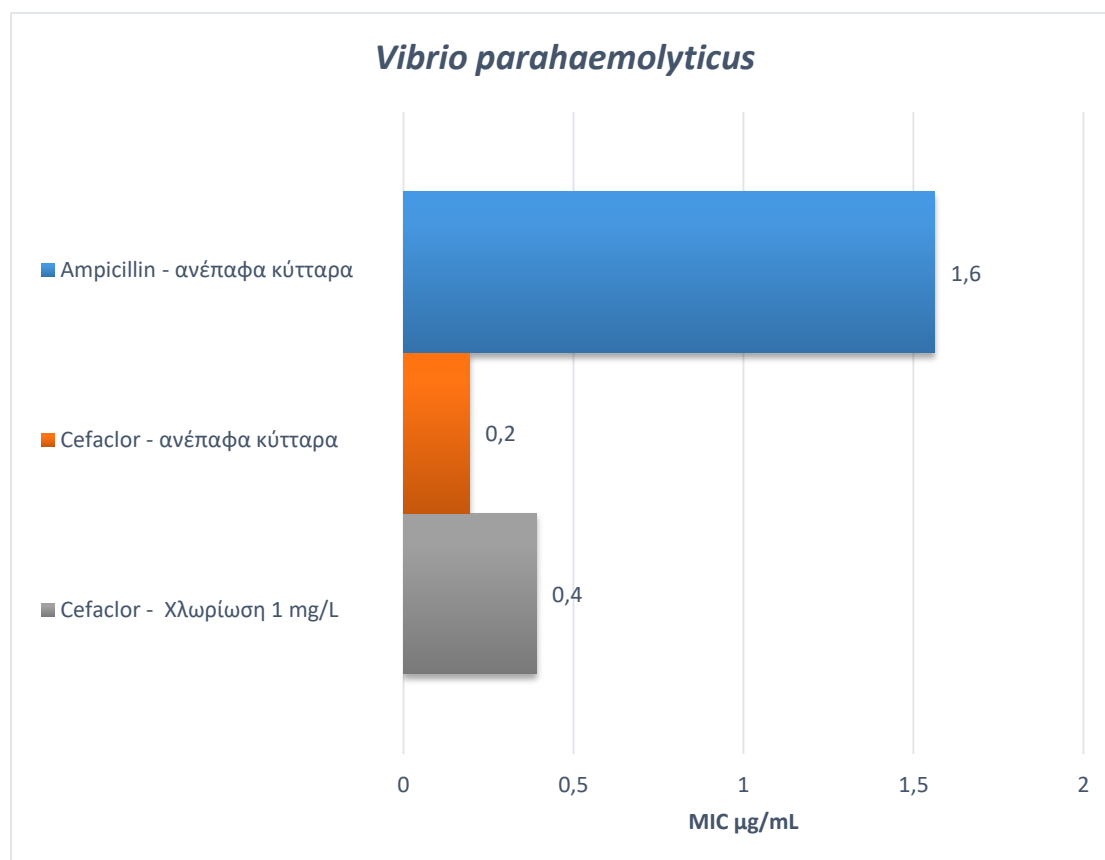
Το παραπάνω στέλεχος εμφανίζει ανθεκτικότητα στην Ampicillin. Το επίπεδο ανθεκτικότητας του βακτηρίου για το αντιβιοτικό αυτό παραμένει υψηλό ακόμα και για τα επεξεργασμένα κύτταρα. Το ίδιο στέλεχος είναι ευαίσθητο στο Cefaclor πριν, και μετά τη διαδικασία της απολύμανσης μετρίως ευαίσθητο. Για άλλη μια φορά το επίπεδο της MIC αυξάνεται μετά τη χλωρίωση.



Γράφημα 23. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου *E.cloacae* από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας

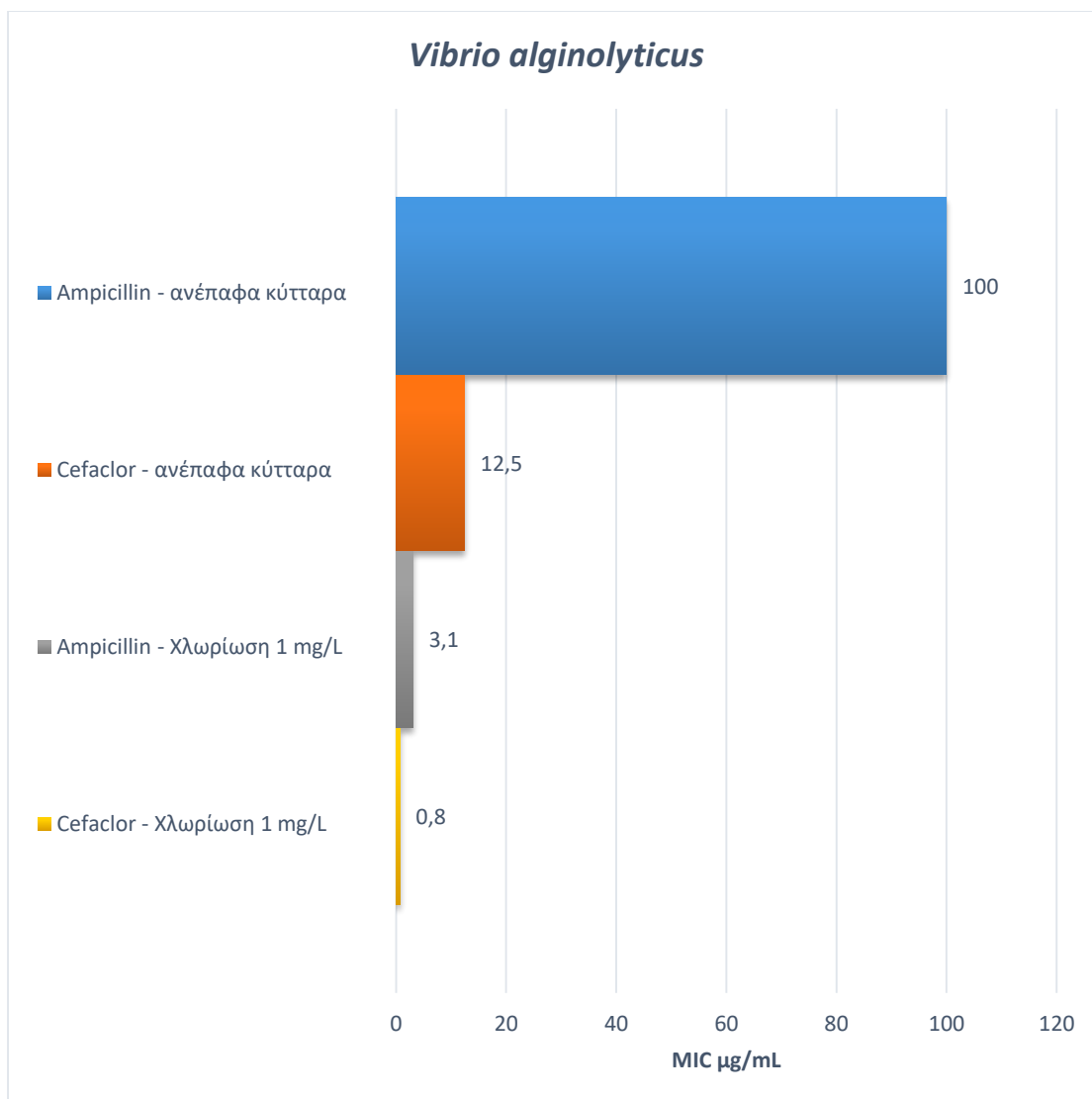
Το στέλεχος με *E. cloacae* είναι το μοναδικό με προέλευση την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας για το οποίο πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος

ευαισθησίας. Εμφανίζει ακριβώς την ίδια τιμή MIC για την Ampicillin με το στέλεχος από την είσοδο του βιολογικού. Παρ' όλα αυτά όμως η MIC παραμένει στο ίδιο επίπεδο και μετά τη χλωρίωση. Αντίθετα με το στέλεχος της εισόδου το συγκεκριμένο χαρακτηρίζεται ανθεκτικό και ως προς το Cefaclor. Ενώ στην περίπτωση αυτή η χλωρίωση θα μειώσει την τιμή της MIC.



Γράφημα 24. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου *V.parahaemolyticus* από την είσοδο του βιολογικού.

Όσον αφορά στο *V.parahaemolyticus* ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ενώ η MIC του στην Ampicillin για τα ανέπαφα κύτταρα ήταν αρκετά χαμηλή, το ίδιο στέλεχος όταν δοκιμάστηκε μετά την απολύμανση καμία συγκέντρωση του αντιβιοτικού δεν εμφάνισε μείωση του πληθυσμού $\geq 60\%$. Συγκεκριμένα τη μεγαλύτερη μείωση πληθυσμού 58 % προκάλεσε η συγκέντρωση 100 µg/mL. Συνεπώς η διαδικασία της χλωρίωσης είχε ως αποτέλεσμα μεγάλη αύξηση της ανθεκτικότητας του βακτηρίου.



Γράφημα 25. Προφίλ ανθεκτικότητας βακτηρίου *V.alginolyticus* από την είσοδο του βιολογικού.

Το *V. alginolyticus* έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία από τους Elmahdi et al.(2016), ως ανθεκτικό στην Ampicillin. Το συγκεκριμένο διάγραμμα συμβαδίζει με τα παραπάνω αφού η τιμή της MIC για τα ανέπαφα κύτταρα φτάνει τα 100 μg/mL. Αν και η MIC για το αντιβιοτικό αυτό μειώνεται κατά πολύ μετά την διαδικασία της απολύμανσης το στέλεχος παραμένει στο εύρος των ανθεκτικών βακτηρίων. Η ανθεκτικότητα του στελέχους αυτού ως προς το Cefaclor επίσης δεν μπορεί να χαρακτηριστεί. Παρ' όλα αυτά μπορεί να σημειωθεί ότι η τιμή της MIC μετά τη διαδικασία της χλωρίωσης μειώνεται.

5. Συμπεράσματα

Ο στόχος της παρούσας μελέτης περιλάμβανε δύο σκέλη. Αρχικά την καταγραφή του δυναμικού της απολύμανσης με χλώριο με σκοπό την αδρανοποίηση ανθεκτικών βακτηρίων, και στη συνέχεια τη συνολική της επίδραση στο αντιβιοτικό προφίλ ανθεκτικότητας τους.

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου της απολύμανσης με χλώριο είχε δύο άξονες :

- *Συσχέτιση της αποτελεσματικότητας της χλωρίωσης με την πηγή προέλευσης του βακτηρίου.*

Πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην προέλευση καθώς το περιβάλλον από το οποίο προέρχεται ο μικροοργανισμός επηρεάζει τον τρόπο που αντιδρά στην διαδικασία της απολύμανσης. Αποδείχθηκε πως τα βακτήρια που συλλέχθηκαν από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας ήταν πολύ ανθεκτικά στη χλωρίωση. Ακόμα και μετά τα 45 min που διαρκούσε το εκάστοτε πείραμα, εξακολουθούσαν να παρουσιάζουν υψηλό αριθμό αποικιών. Αυτό συνέβη διότι η επεξεργασία που έχουν υποστεί τα βακτήρια μέχρι και τη δευτεροβάθμια επεξεργασία τα καθιστά πιο ισχυρά σε σχέση με τα βακτήρια του δείγματος από λύμα της εισόδου του βιολογικού.

- *Συσχέτιση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου με το είδος και την οικογένεια του βακτηρίου.*

Βακτήρια όπως το *E. faecium* και το *R. radiobacter* ήταν τα πιο ανθεκτικά στην απολύμανση. Αντίθετα το πιο επιρρεπές βακτήριο στην χλωρίωση ήταν το *E. sakazakii*.

Σε γενικές γραμμές η χλωρίωση επέφερε επιτυχή αποτελέσματα για τα στελέχη που ανεξάρτητα του είδους τους είχαν συλλεχθεί από την είσοδο του βιολογικού καθαρισμού.

Το αντιβιοτικό προφίλ είχε σκοπό την χαρτογράφηση της ανθεκτικότητας των βακτηριακών πληθυσμών σε σχέση με :

- *Το χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό*

Τα περισσότερα βακτήρια παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην Ampicillin. Πράγμα που δικαιολογείται λόγω της ευρείας χρήσης του συγκεκριμένου αντιβιοτικού κατά τις τελευταίες δεκαετίες τόσο στην ιατρική όσο και σε άλλες εφαρμογές όπως η κτηνοτροφία.

- *Την οικογένεια και την προέλευση των βακτηρίων*

Την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα τόσο στην Ampicillin όσο και στο Cefaclor εμφάνισε η οικογένεια Enterobacteriaceae. Στην οικογένεια αυτή ανήκει και το *E. cloacae* το οποίο ήταν το μοναδικό βακτήριο με προέλευση την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας που υποβλήθηκε στο τεστ ανθεκτικότητας. Το συγκεκριμένο στέλεχος ήταν το μοναδικό το οποίο παρουσίασε ανθεκτικότητα ταυτόχρονα και στα δυο αντιβιοτικά και σε ανέπαφα κύτταρα του αλλά και μετά από χλωρίωση.

- *Την απολύμανση που είχε προηγηθεί*

Σε γενικές γραμμές, η απολύμανση δεν ήταν επιλεκτική προς τα ανθεκτικά σε αντιβιοτικά βακτήρια και προκάλεσε άλλοτε την ανάπτυξη είτε της αντοχής στα αντιβιοτικά είτε της ευαισθησίας. Η MIC των περισσότερων βακτηρίων τα οποία δοκιμάστηκαν με Ampicillin μειώθηκε μετά την απολύμανση. Αντίθετα, όταν το Cefaclor δοκιμάστηκε, στις περισσότερες περιπτώσεις η MIC ήταν υψηλότερη μετά την απολύμανση, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη ανοχή σε σύγκριση με αυτή που παρουσιάζεται σε μη επεξεργασμένα κύτταρα.

6. Μελλοντικές προτάσεις

Για μια ολοκληρωμένη εικόνα θα ήταν προτιμότερο να εξεταστούν περαιτέρω τα παρακάτω :

- Αδρανοποίηση των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά με χρήση ακτινοβολίας UV.
- Αδρανοποίηση των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά με οζόνωση.
- Έλεγχος ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες, κινολόνες, μακρολίδια.
- Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε β-λακτάμες, τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες, κινολόνες, μακρολίδια.

7. Βιβλιογραφία

Bouki, C., Venieri, D. & Diamadopoulos, E., 2013, Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 91(1), pp. 1-9.

Bradford, P. A., 2001, Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), pp. 933-951.

Carvalho, I. T., Santos, L., 2016, Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94 (1), pp 736-757.

Castle, S. S., 2007, Ampicillin. *The Comprehensive Pharmacology Reference*, pp. 1-6.

Chopra, I., Roberts, M., 2001, Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(2), pp. 60-232.

Clinical and Laboratory Standards Institute, January 2012, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. 9th

Cosgrove, S. E., 2006, The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clinical Infectious Diseases*, 42 (2), pp. 82–89.

Davies, J., Davies, D., 2010, Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74, pp. 417–433.

Elmahdi, S., DaSilva L.V., Parveen, S., 2016, Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. *Food Microbiology*, 57, pp. 128-134.

European Centre for Disease Prevention and Control, 2012, *Surveillance of antimicrobial consumption in Europe*. Stockholm: ECDC.

EUCAST-The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

Grabow, W.O.K., van Zyl, M., 1976, Behavior in conventional sewage purification processes of coliform bacteria with transferable or non-transferable drug-resistance. *Water Research*, 10, pp. 717-723.

Gross, M., 2013, Antibiotics in crisis. *Current Biology*. 23 (24), pp. 1063-1065

Gruszecki, A.C., D.O., Armstrong, S.H., M.T. (ASCP), and Waites, K.B., 2002, Rhizobium radiobacter Bacteremia and Its detection in the Clinical Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter*, 24 (20), pp. 151-155.

Huang, J.J., Hu, H.Y., Lu, S.Q., Li, Y, Tang, F., Lu, Y, Wei, B., 2012, Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environment International*. 42, pp. 31–36.

Holmberg, A., Rasmussen, M., 2016, Mature biofilms of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium are highly resistant to antibiotics. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84, pp. 19-21

Huang, J.J., Hu, H.Y., Tang, F., Li, Y., Lu, S.Q., Lu, Y., 2011, Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 45, pp. 2775-2781

Lachmayr, K. L., Kerkhof, L. J., DiRienzo, A. G., Cavanaugh, C. M. & Ford, T. E., 2009, Quantifying Nonspecific TEM β -Lactamase (blaTEM) Genes in a Wastewater Stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), pp. 203-211.

Liu, F., Wang, F., Du, L., Zhao, T., Doyle, M.P., Wang, D., Zhang, X., Sun, Z., Xu, W., 2017, Antibacterial and antibiofilm activity of phenyllactic acid against Enterobacter Cloacae. *Food Control*, 84, pp. 442-448

Manzetti, S., Ghisi, R., 2014, The environmental release and fate of antibiotics . *Marine Pollution Bulletin*, 79, pp. 7-15.

Marti, E., Variatza, E. & Balcazar, J. L., 2014. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 22(1), pp. 36-41.

Martinez, J. L., 2009, Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 157 (11), pp. 2893–2902.

Meyers, B. R., 2000, Cefaclor Revisited. *Clinical Therapeutics*, 22(2), pp. 154-166
Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C.S., Manaia, C.M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C. & Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research*, 47, pp. 957–995.

Murray, G.E., Tobin, R.S., Junkins, B., Kushner, D.J., 1984, Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewer-related bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 48 (1), pp. 73-77.

Nakasone, E.S., Kaneshiro, R., Min, K., Tokeshi, J., 2015, Emergence of *Raoultella ornithinolytica* on O'ahu: A Case of Community-acquired *R. ornithinolytica* Urinary Tract Infection. *Hawaii J Med Public Health*, 74(5), pp. 174–175.

Ospina, S., Barzana, E., Ramirez, O. T. & Lopez-Munguia. A., 1996, Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(6), pp. 462-469.

Osuolale, O., Okoh, A., 2017, Human enteric bacteria and viruses in five wastewater treatment plants in the Eastern Cape, South Africa. *Journal of Infection and Public Health*, 10, pp. 541–547.

O'Neill, J., 2014, Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance* (London).

Rechenchoski, D.Z., Dambrozio, A.M.L., Vivan, A.C.P., Schuroff, P.A., Burgos T.N., Pelisson, M., Perugini, M.R.E., Vespero, E.C., 2017. Antimicrobial activity evaluation and comparison of methods of susceptibility for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacter* spp. Isolates. *Brazilian Journal of microbiology*, 48, pp. 509–514

Rizzo L., Belgiorno V., Napoli, R.M.A., 2004, Regrowth evaluation of coliform bacteria injured by low chlorine doses using selective and nonselective media. *Journal of Environmental Science and Health*, 39(8), pp. 2081–2092.

Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Ploy, M.C., Michael, I. & Fatta-Kassinos, D., 2013, Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment*, 447, pp. 345–360.

Singh, C.L., Cariappa, C.M.P., Kaur L.C. M., 2016, *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen ?. *Medical Journal Armed Forces India*, 72, pp. 59-61.

Sharma, V. K., Johnson, N., Cizmas, L., McDonald, T. J., Kim, H., 2016. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. *Chemosphere*, 150, pp. 702-714

Speer, B. S., Shoemaker, N. B. & Salyers, A. A., 1992, Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(4), pp. 387-389.

Strateva, D., Odeyemib, O.A., 2016, Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *Journal of Infection and Public Health*, 9, pp. 535-544.

Toze, S., 2006, Water reuse and health risks-real vs. perceived. *Desalination*, 187, pp. 41-51.

Uyaguari, M. I., Fichot, E. B., Scott, G. I. & Norman, R. S., 2011, Characterization and Quantitation of a Novel β -Lactamase Gene Found in a Wastewater Treatment Facility and the Surrounding Coastal Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(23), pp. 8226-8233.

Wang, Y., Jiang, X., Xu, Z., Ying, C., Yu, W. and Xiao, Y., 2016, Identification of *Raoultella terrigena* as a Rare Causative Agent of Subungual Abscess Based on 16S rRNA and Housekeeping Gene Sequencing 2016. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2016, 4 pages

White, M., Farber, J.M., 1997, *Enterobacter sakazakii* : a review. *International Journal of Food Microbiology*, 34, pp. 103-113.

World Health Organization, 1996, The world health report. Geneva, Switzerland.

World Health Organization, 2014, Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. Geneva, Switzerland.

Zhang, J., Jin, H., Hu, J., Yuan, Z., Shi, W., Yang, X., Xu, X., Meng, J., 2014, Antimicrobial resistance of *Shigella* spp. from humans in Shanghai, China, 2004–2011, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78, pp. 282–286.

Zhang, S., Han, B., Gu, J., Wang, C., Wang, P., Ma, Y., Cao, J., He, Z., 2015, Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes. *Chemosphere*, 135, pp. 138-145

Zhang, W.D., DiGiano, F.A., 2002, Comparison of bacterial regrowth in distribution systems using free chlorine and chloramine: a statistical study of causative factors. *Water Research*, 36, pp. 1469-1482.

Αβραμίδου, Μ.Χ., 2017, Παρουσία αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον : Επίδραση στο αλόφυτο *Juncus acutus* ως προς την ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας. Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Καλέμη, Ε., 2015, Αποτελεσματικότητα μεθόδων απολύμανσης όσον αφορά στην αδρανοποίηση βακτηρίων του υδάτινου περιβάλλοντος. Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Μπικουβαράκη, Μ., 2016, Αδρανοποίηση της *Klebsiella pneumoniae* στα απόβλητα και διερεύνηση μεταβολών του προφίλ ανθεκτικότητάς σε ποικιλία αντιβιοτικών. Μεταπτυχιακή διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Νιάρχος, Γ., 2015, Μικροοργανισμοί και αντιβιοτικά : διασπορά ανθεκτικών βακτηρίων και των αντίστοιχων γονιδίων τους στο υδάτινο περιβάλλον. Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Φραγγεδάκη, Α., 2014, Απολύμανση νερού με τη χρήση φωτοκατάλυσης: Αδρανοποίηση της *Klebsiella pneumoniae* και επίδραση στο γενετικό υλικό της, Μεταπτυχιακή διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Βιβλία

Metcalf & Eddy, 2007, Μηχανική Υγρών Αποβλήτων: Επεξεργασία και Επαναχρησιμοποίηση, Αθήνα, Εκδόσεις Τζιόλα.

Pepper, I.L., Gerba C.P., and Gentry T.J., 2015, Environmental Microbiology. Third Edition, Academic Press.

Χρυσικόπουλος, Κ., 2013, Εισαγωγή στις Διεργασίες Καθαρισμού, Νερού και Λυμάτων, Εκδόσεις Τζιόλα

Πανεπιστημιακές σημειώσεις

Βενιέρη Δ., Γουνάκη Ι., 2016, Πανεπιστημιακές σημειώσεις μαθήματος «Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας», Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Βενιέρη Δ., Γουνάκη Ι., 2016, Πανεπιστημιακές σημειώσεις μαθήματος «Οικολογία», Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Διαμαντόπουλος Ε., 2014, Πανεπιστημιακές σημειώσεις μαθήματος «Χημικές διεργασίες στην επεξεργασία νερού & υγρών αποβλήτων», Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Πιτταράς, Θ. Η., 2016, Αντιμικροβιακά φάρμακα.

Ρούτσιος Ι., 2008, Ομάδες αντιβιοτικών – Αντιβιοτικό φάσμα, Σημειώσεις μαθημάτων ειδικευόμενων, Μικροβιολογικό εργαστήριο.

Ιστοσελίδες

212, ISO/TC, 2007. *ISO 20776-2:2007*. Available at: <https://www.iso.org>

http://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial_resistance

<http://www.keelpno.gr>