



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ
ΣΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΠΟΙΚΙΛΙΑ
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.

ΤΕΓΚΕΛΙΔΗ ΧΡΙΣΤΙΝΑ
ΑΜ:2010050077

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΒΕΝΙΕΡΗ ΔΑΝΑΗ [ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ]
ΞΕΚΟΥΚΟΥΛΩΤΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΓΚΙΚΑΣ ΠΕΤΡΟΣ

Οκτώβριος 2017

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	
1.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	5
1.1.1 ΔΙΑΔΟΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	6
1.1.2 ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΟΣΜΟ	7
1.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑ	9
1.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ	12
1.3.1 ΟΖΟΝΩΣΗ	12
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΣΚΟΠΟΣ</u>	
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	15
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	
3.1 ΥΛΙΚΑ	16
3.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ	18
3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	19
3.4 ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	22
3.5 ΟΖΟΝΩΣΗ	24
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	
4.1 ΟΖΟΝΩΣΗ - ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ	277
4.2 ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MIC (MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION).	3030
4.2.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	30
4.2.2. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ ΟΡΙΩΝ	31
4.2.3. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΟΖΩΝΩΣΗ	344

4.2.3.1 ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	344
4.2.3.2 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	37
4.2.3.3 ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΟΖΟΝΩΣΗ	555

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 - ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1 STAPHYLOCOCCUS SP.	61
5.1.1 AMPICILLIN	61
5.1.2 CIPROFLOXACIN	61
5.1.3 AMIKACIN	61
5.1.4 ERYTHROMYCINE	61
5.1.5 TETRACYCLINE	62
5.2 ENTEROCOCCUS SP.	63
5.2.1 AMIKACIN	63
5.2.2 TRIMETHOPRIM	63
5.2.3 CIPROFLOXACIN	63
5.2.4 IMIPENEM	63
5.2.5 AMPICILLIN	64
5.2.6 AMOXICILLIN	64
5.3 E. COLI	65
5.3.1 AMIKACIN	65
5.3.2 TRIMETHOPRIM	65
5.3.3 CIPROFLOXACIN	65
5.3.4 IMIPENEM	66
5.3.5 AMPICILLIN	66
5.3.6 AMOXICILLIN	66
5.4 PSEUDOMONAS SP.	67
5.4.1 IMIPENEM	67
5.4.2 AMIKACIN	67
5.5 ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70

Περίληψη

Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών αποτέλεσε μια από τις μεγαλύτερες καινοτομίες των τελευταίων αιώνων για την καταπολέμηση ασθενειών σε ανθρώπους και ζώα. Στην πορεία των χρόνων παρατηρήθηκε πως τα βακτήρια στο περιβάλλον άρχισαν να προσαρμόζονται και να εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην χρήση των αντιβιοτικών με διάφορους μηχανισμούς.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να προσδιοριστεί αν η απολύμανση των υδάτων με τη μέθοδο της οζόνωσης επηρεάζει το προφίλ της ανθεκτικότητας των βακτηρίων. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν στελέχη από τα βακτήρια *E. coli*, *Staphylococcus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, που απομονώθηκαν από διάφορα δείγματα νερού (επιφανειακά & θαλασσινά) και λύματα. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν στην ευρύτερη περιοχή των Χανίων, στην Κρήτη. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής: Ampicillin, Amoxicillin, Amikacin, Ciprofloxacin, Imipenem, Erythromycine, Tetracycline, Trimethoprim, ανάλογα την κάθε περίπτωση βακτηρίου, και η μέθοδος που εφαρμόστηκε είναι Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration - MIC) στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Για την οζόνωση χρησιμοποιήθηκε γεννήτρια Aqua-Flo CD1B, και πραγματοποιήθηκαν πειράματα στο εργαστήριο Τεχνολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος, που πολύ ευγενικά μας παραχωρήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων.

Μέσα από όλη αυτή τη διαδικασία, αυτό που κατέστη σαφές, είναι πως η απολύμανση υδάτων με όζον σίγουρα συμβάλλει στη μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αντιβιοτικά. Το πρόβλημα αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη, και να πραγματοποιηθούν ακόμα περισσότερες μελέτες και πειράματα για τον αναλυτικότερο προσδιορισμό και επίλυση του προβλήματος.

Ευχαριστίες

Η διαδικασία της εκπόνησης του πειραματικού μέρους αυτής της διπλωματικής καθώς και της συγγραφής της είχε αρκετά εμπόδια στην πορεία της, με αποτέλεσμα να παραταθεί χρονικά η ολοκλήρωση της. Αρωγοί σε όλη αυτήν την πορεία ήταν πολλοί άνθρωποι που θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς.

Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Επίκουρη Καθηγήτρια Βενιέρη Δανάη, τον Επίκουρο Καθηγητή Ξεκουκουλωτάκη Νικόλαο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γκίκα Πέτρο για τον χρόνο και την παρουσία τους,

Την επιβλέπουσα Επίκουρη Καθηγήτρια κυρία Βενιέρη Δανάη, και την υπεύθυνη του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας κυρία Γουνάκη Ιωσηφίνα για την υπομονή και την στήριξη τους στην προσπάθεια μου, ενώ παράλληλα έκαναν τις μέρες της παρουσίας μου στο εργαστήριο πιο όμορφες,

Τον Καθηγητή Ευάγγελο Διαμαντόπουλο και την υπεύθυνη του Εργαστηρίου Τεχνολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος Κουκουράκη Ελισάβετ, για την παραχώρηση του χώρου και του εξοπλισμού τους, και την συνεργασία τους,

Τους εργαζόμενους του Πολυτεχνείου στο κυλικείο, την καθαριότητα και άλλες λειτουργικές θέσεις, για την παροχή των υπηρεσιών τους και τον σεβασμό που έδειξαν στην δουλειά που έγινε,

Την οικογένειά μου Γιάννη, Αθηνά και Διαμαντή, για την ψυχολογική, και όχι μόνο, στήριξή τους,

Τη Μαρία, τον Μανούσο, τον Αντώνη, τον Μάριο, τη Βασιλική, τον Γιάννη, τον Νίκο, την Ιωάννα και την Ελιάννα, και όλους όσους ήταν δίπλα μου με κάθε τρόπο όλα αυτά τα χρόνια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η εύρεση φαρμάκων για την αντιμετώπιση των βακτηρίων αποτέλεσε επαναστατικό όπλο στη διαδικασία αντιμετώπισης τους. Ενίσχυσε την ικανότητα επιβίωσης και βελτίωσε την ποιότητα ζωής του ανθρώπου. Με τον καιρό, η καινοτομία της εποχής επισκιάστηκε από το γεγονός πως παρατηρήθηκε μια τάση των μικροβιακών πληθυσμών να προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες και να αποκτούν την ικανότητα να αντιστέκονται στις αντιμικροβιακές ουσίες μεταφέροντας δε τα γονίδια με αυτές τις ιδιότητες ακόμα και σε γειτονικές ομάδες βακτηρίων στο περιβάλλον. Η επισήμανση αυτή διακύβευσε την χρησιμότητα των αντιβιοτικών φαρμάκων και προειδοποίησε την επιστημονική κοινότητα για την πιθανότητα οι μολύνσεις από βακτήρια να γίνουν ανεξέλεγκτες. [1]

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε αντιβιοτικά είναι η ικανότητα του μικροοργανισμού να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί παρουσία κάποιου αντιμικροβιακού παράγοντα, ο οποίος υπό φυσιολογικές συνθήκες θα ελάττωνε την ανάπτυξή του ή ακόμα και θα το εξάλειφε. Η ικανότητα αυτή των μικροοργανισμών αποτελεί άλλο ένα χαρακτηριστικό τους στην προσπάθειά τους να προσαρμόζονται και να υπερσχύουν στο περιβάλλον, όπου βρίσκονται. [2]

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά προκύπτει από τέσσερις βασικούς μηχανισμούς:

- Η αδρανοποίηση ή τροποποίηση των αντιβιοτικών
- Η αλλαγή του στόχου του αντιβιοτικού που μειώνει τη δεσμευτική του ικανότητα
- Η τροποποίηση των μεταβολικών οδών που καταστρατηγούν την επίδραση του αντιβιοτικού.
- Η μειωμένη ενδοκυτταρική συσσώρευση αντιβιοτικών, μέσω της μείωσης της διαπερατότητας ή της αύξησης της ροής του αντιβιοτικού.

Τα αστικά υγρά απόβλητα έχουν αναγνωριστεί και καταγραφεί ως η βασική πηγή α) αντιμικροβιακών παραγόντων και των προϊόντων διάσπασής τους, β) βακτηρίων με αυξημένη ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και γ) των αντίστοιχων γονιδίων ανθεκτικότητας. Παράλληλα, το περιβάλλον των υγρών αποβλήτων και της όλης επεξεργασίας προσφέρει ιδανικές συνθήκες για την προαγωγή της ανθεκτικότητας εντός των μικροβιακών πληθυσμών και της μεταφοράς των γονιδίων ανθεκτικότητας. Η σημαντική παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων στα απόβλητα οφείλεται στην εκτενή κι ευρεία χρήση τους τόσο στην κλινική ιατρική όσο και στην κτηνοτροφία και την

αγροτική παραγωγή. [3]

Ως αποτέλεσμα, είναι εμφανής ο κίνδυνος διασποράς των ανθεκτικών βακτηρίων και των αντίστοιχων γονιδίων στο περιβάλλον μετά το πέρας της επεξεργασίας, η εξάπλωσή τους και η περαιτέρω προσβολή ανθρώπινου πληθυσμού. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ποσοστό των λυμάτων κατόπιν επεξεργασίας που καταλήγει σε ποτάμια, λίμνες και θάλασσες αγγίζει το 90%, γίνεται αντιληπτός ο κίνδυνος μετάδοσης της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά εντός μικροβιακών πληθυσμών αλλά και στον άνθρωπο. [4]

1.1.1 ΔΙΑΔΟΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Οι τρόποι με τους οποίους η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά δημιουργείται και εξαπλώνεται είναι αρκετά απλοί. Εν γένει, αυτό συμβαίνει λόγω της κακής χρήσης των αντιβιοτικών, τόσο στους ανθρώπους, όσο και στα ζώα. Σύμφωνα με το ECDC-European Centre of Disease Prevention and Control (Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου των Νόσων) υπάρχουν τρεις βασικοί τρόποι κακής χρήσης αντιβιοτικών:

1. Συχνά τα αντιβιοτικά χορηγούνται χωρίς πραγματική ανάγκη για αντιμετώπιση ιών, όταν στην πραγματικότητα δεν έχουν καμία επίδραση πάνω τους.

2. Όταν η διάγνωση δεν είναι ακριβής, και ο παθογόνος μικροοργανισμός δεν έχει αναγνωριστεί, χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων (broad-spectrum antibiotics) με αποτέλεσμα να μην αντιμετωπίζονται μόνο τα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την πάθηση.

3. Όταν η διάρκεια χρήσης των αντιβιοτικών είναι μικρότερη από την απαιτούμενη, η συγκέντρωση του αντιβιοτικού είναι πολύ μικρή, ή ακόμα, όταν το αντιβιοτικό δεν λαμβάνεται με την κατάλληλη συχνότητα, οι μικροοργανισμοί δεν θανατώνονται με αποτέλεσμα να αποκτούν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε. [5]

Τί είναι όμως αυτό που πρέπει να γίνει για την ελάττωση του φαινομένου;

1. Συντηρητική χρήση των διαθέσιμων αντιβιοτικών, δηλαδή αυστηρά όταν χρειάζονται, στη σωστή δοσολογία, δόση και διάρκεια χρήσης. Ο κάθε άνθρωπος μπορεί να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο κομμάτι αυτό, ακολουθώντας τις συμβουλές των γιατρών ως προς τη χρήση των αντιβιοτικών αλλά και μέσω του εμβολιασμού.

2. Προφυλάξεις που αφορούν την ατομική υγιεινή για τον έλεγχο της μετάδοσης των ανθεκτικών στελεχών μεταξύ ανθρώπων, οι οποίες περιλαμβάνουν την υγιεινή των χεριών, αναγνώριση των φορέων ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών, και απομόνωση των ασθενών.

3. Έρευνα και ανάπτυξη αντιβιοτικών με καινοτόμους μηχανισμούς δράσης.

1.1.2 ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΟΣΜΟ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το φαινόμενο της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά υφίσταται σε όλες τις χώρες του πλανήτη. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, σύμφωνα με το CDC-Centre for Disease Control υπολογίζεται πως περισσότεροι από δύο εκατομμύρια άνθρωποι ετησίως παθαίνουν λοιμώξεις από βακτήρια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό αυτών δεν επιβιώνει. [6]

Στην Ελλάδα, η χρήση των αντιβιοτικών και οι δείκτες ανθεκτικότητας είναι υψηλοί, συμπεριλαμβανομένης της ανθεκτικότητας των Εντεροκόκκων στην πενικιλίνη και στις μακρολίδες. Από το 1950 η νομοθεσία στην Ελλάδα απαγορεύει την διάθεση αντιβιοτικών χωρίς συνταγή από θεράποντα ιατρό. Παράλληλα, από το 2003, με απόφαση του Υπουργείου Υγείας, απαιτείται η συμπλήρωση εντύπου από τον ιατρό, ο οποίος οφείλει να δικαιολογεί την αναγκαιότητα της χρήσης αντιβιοτικών τρίτης γενιάς που ανήκουν στις κεφαλοσπορίνες και τις φλουοροκινολόνες. Στην πραγματικότητα, δεν υπάρχει έλεγχος της πραγματικής άσκησης και κατά συνέπεια ο νόμος δεν τηρείται. [7]

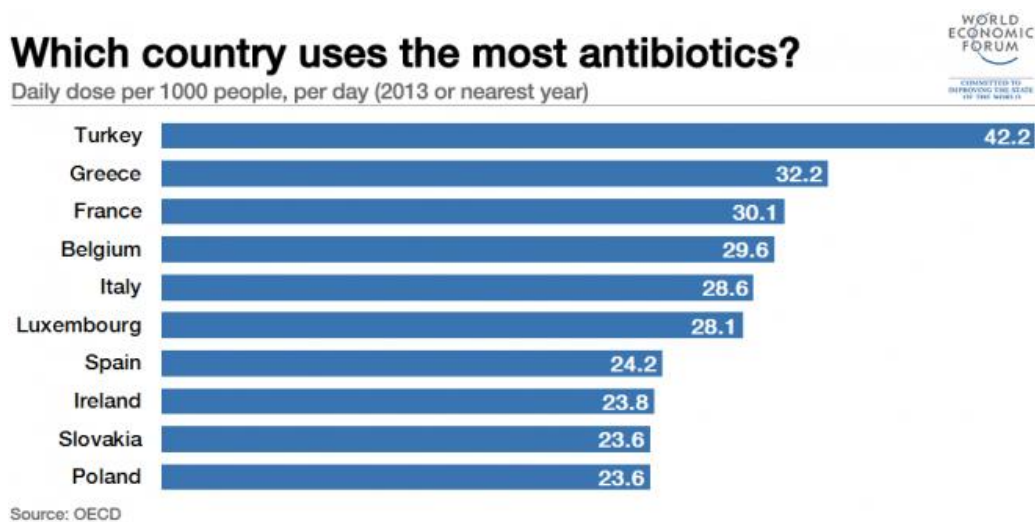
Στα Ελληνικά νοσοκομεία παρατηρείται μεγάλη ανθεκτικότητα σε στελέχη σταφυλόκοκου και εντερόκοκου, ενώ μια γενικότερη ανθεκτικότητα σε Gram-αρνητικά βακτήρια παρατηρείται σε μονάδες εντατικής θεραπείας. Η ανθεκτικότητα σε πληθώρα αντιβιοτικών (multi-drug resistance), έχει ως αποτέλεσμα τη αύξηση της θνησιμότητας, της διάρκειας της διαμονής των ασθενών στις νοσοκομειακές μονάδες και συνεπώς και το κόστος, ενώ γενικά υποβαθμίζει το ιατρικό σύστημα της χώρας. [8]

Από έρευνα που έγινε το 2008, η πλειοψηφία των φαρμακοποιών στην χώρα, δίνουν αντιβιοτικά στους ασθενείς/πελάτες χωρίς την απαραίτητη συνταγή από γιατρό. Πιο συγκεκριμένα, έγιναν 174 επισκέψεις σε φαρμακεία όπου ζητήθηκαν αντιβιοτικά όπως ciprofloxacin, amoxicillin, κ.α. Το ciprofloxacin ζητήθηκε 102 φορές και 54 φαρμακεία το έδωσαν χωρίς συνταγή (53%). Το amoxicillin ζητήθηκε 72 φορές και όλα τα φαρμακεία το έδωσαν χωρίς συνταγή (100%).

Το 2003 μοιράστηκε ένα ερωτηματολόγιο στην πόλη της Πάτρας, σε 173 ενήλικες και 150 γονείς. Το ερωτηματολόγιο αυτό αποκάλυψε πως το 74,6% των ενηλίκων έχουν καταναλώσει μη-συνταγογραφημένα αντιβιοτικά και το 22,7% των γονέων έχουν δώσει μη-συνταγογραφημένα αντιβιοτικά στα παιδιά τους. Επιπρόσθετα, το 55% του συνολικού δείγματος (ενήλικες και γονείς), έχουν χρησιμοποιήσει αντιβιοτικά που είχαν περισσέψει στο παρελθόν και απλά υπήρχαν στο σπίτι. Γενικότερο συμπέρασμα της έρευνας αυτής ήταν πως η αυτο-θεραπεία (self-medication), με μη-συνταγογραφημένα αντιβιοτικά, αποτελεί πολύ μεγάλο ζήτημα στην Ελλάδα, το οποίο κατά συνέπεια, εντείνει το πρόβλημα της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Παρόμοιες

έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί στην Ισπανία, τη Μάλτα, το Ηνωμένο Βασίλειο, την Τουρκία, τη Βραζιλία κ.α. [10, 12, 13]

Στην εικόνα 1 φαίνεται η χρήση των αντιβιοτικών σε δέκα Ευρωπαϊκές χώρες (συμπεριλαμβανομένης και της Τουρκίας), σύμφωνα με το European Centre for Disease Prevention and OECD. Οι χώρες έχουν ταξινομηθεί βάση του συνολικού όγκου των συνταγογραφημένων αντιβιοτικών – την ημερήσια δόση ανά 1000 άτομα το 2013.



Εικόνα 1: Χρήση αντιβιοτικών ανά χώρα, ανά ημέρα, για 1000 άτομα, στην Ευρώπη για το 2013. [159]

Η μέση τιμή ορίζεται στο 20,7 και το χαμηλότερο ποσοστό χρήσης έχει η Χιλή με 9,4%.

1.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως δείκτες βοηθούν στην δημιουργία υδατικών ποιοτικών προτύπων. Σε κάθε χώρα, υπάρχει νομοθεσία που ορίζει τα όρια των συγκεντρώσεων για κάθε μικροοργανισμό, ανάλογα με τη χρήση του νερού (πχ πόσιμο, νερό ύρδευσης, νερό άρδευσης, πισίνες κλπ).

Στην παρούσα διπλωματική ελέγχθηκε η ύπαρξη τεσσάρων διαφορετικών βακτηρίων σε περιβαλλοντικά ύδατα, όπως ποτάμια, λιμάνια κλπ. [21]

Staphylococcus sp.

Ο σταφυλόκοκκος είναι μικρόβιο που προκαλεί τη σταφυλοκοκκίαση, την πιο σημαντική αιτία βακτηριακής λοίμωξης στο γενικό πληθυσμό. Οι σταφυλόκοκκοι αποτελούν συχνό αίτιο πυογόνων λοιμώξεων στα βρέφη και τα παιδιά. Είναι θετικοί κατά Gram κόκκοι, αερόβιοι ή προαιρετικά αναερόβιοι. Τα στελέχη ταξινομούνται ως χρυσίζων (παθογόνος) σταφυλόκοκκος (*S.aureus*), επιδερμικός σταφυλόκοκκος (*S.epidermis*) και σαπροφυτικός σταφυλόκοκκος (*S. saprophyticus*).

Ο σταφυλόκοκκος προκαλεί ποικιλία λοιμώξεων με την εξής κατανομή:

- λοιμώξεις του δέρματος και των μαλακών μορίων (39%)
- λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού (23%)
- βακτηριαμία-ενδοκαρδίτιδα (22%) και
- άλλες λοιμώξεις όπως του ουροποιητικού, ΚΝΣ, κοιλίας, οστών κ.ά. (15%).

Ο σταφυλόκοκκος μπορεί να εκδηλωθεί με μια ποικιλία συμπτωμάτων που κυμαίνονται από μικρά προβλήματα του δέρματος μέχρι και ενδοκαρδίτιδα, μια απειλητική για τη ζωή λοίμωξη του εσωτερικού τοιχώματος της καρδιάς (ενδοκάρδιο). Ως εκ τούτου, τα σημάδια και τα συμπτώματα των λοιμώξεων από σταφυλόκοκκο ποικίλλουν ευρέως, ανάλογα με τη θέση (σημείο του σώματος) και τη σοβαρότητα της λοίμωξης.

Enterococcus sp.

Οι εντερόκοκκοι είναι κόκκοι Gram-θετικοί. Περιλαμβάνουν πολλά στελέχη, από τα οποία δύο

κυρίως, ο *Enterococcus faecium* και ο *Enterococcus faecalis* προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο. Άλλα συχνά στελέχη είναι ο *Enterococcus avium*, ο *Enterococcus durans*, ο *Enterococcus gallinarum* και ο *Enterococcus solitarius*. Τα κύτταρά τους είναι σφαιρικά ή ωοειδή. Το μέγεθος ποικίλλει από 0,6-2 μm, έως 0,6-2,5 μm, δημιουργούν αλυσίδες κοντές ή πιο μακριές και μερικές φορές παρουσιάζονται ως διπλόκοκκοι.

Επιβιώνουν αρκετό καιρό στο εξωτερικό περιβάλλον. Καταστρέφονται από τα συνήθη αντισηπτικά, όπως οινόπνευμα 70%, ιωδιούχα αντισηπτικά και τα συνήθη απολυμαντικά, όπως υδατικό διάλυμα οικιακής χλωρίνης 10% και γλουταραλδεϋδης 2%. Επίσης καταστρέφονται σε υψηλή θερμοκρασία (100 °C για 10 λεπτά). Το μεγαλύτερο μέρος των στελεχών επιζεί στη χαμηλή παστερίωση (30-60 °C) και σε παρατεταμένη κατάψυξη. Επίσης αναπτύσσονται σε υλικά που περιέχουν ορυκτά άλατα, όπως χλωριούχο βάριο και αντέχουν επί μακρόν σε αναερόβιες συνθήκες και σε pH μικρότερο του 5.

Οι εντερόκοκκοι είναι παρασιτικοί μικροοργανισμοί αλλά δεν διαθέτουν δραστικές τοξίνες. Γι' αυτό το λόγο, τα βακτήρια αυτά θεωρούνται ότι έχουν περιορισμένη δυνατότητα πρόκλησης ασθενειών. Οι νόσοι όμως που προκαλούν μπορεί να είναι απειλητικές για τη ζωή, ιδιαίτερα στους νοσηλευόμενους ασθενείς.

Escherichia coli

Η *Escherichia coli* είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο, σχήματος ραβδοειδούς, το οποίο βρίσκεται στο έντερο των θερμόαιμων ζώων (άνθρωποι και ζώα). Συνήθως αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας του εντέρου και μπορούν να φανούν ωφέλιμα προς τους ξενιστές καθώς παράγουν βιταμίνη K2, και εμποδίζουν άλλα παθογόνα βακτήρια να εγκατασταθούν εκεί. Εντούτοις, μπορούν να παράγουν διάφορες τοξίνες όπως την τοξίνη verotoxin (O157:H7) που μοιάζει με τη Shiga και καταστρέφει το έντερο. Αυτή η τοξίνη είναι εφάμιλλη των παραγώγων της *Shigella dysenteriae* και προκαλεί αιμορραγική κολίτιδα στο ξενιστή. Επίσης, όταν βρεθεί σε διπλανά όργανα όπως την ουροδόχο κύστη μπορεί να προκαλέσει ουρολοίμωξη. Το βακτήριο δεν αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες και πεθαίνει όταν θερμαίνεται στους 70 °C για αρκετό χρονικό διάστημα, ενώ μπορεί να επιβιώσει στους 4 °C για αρκετές μέρες υπό ορισμένες συνθήκες. [22]

Pseudomonas sp.

Η ψευδομονάδα είναι ένα Gram-αρνητικό αερόβιο βακτήριο και αποτελείται από 191 είδη. Έχει ραβδοειδές σχήμα και είναι μη σπορογόνος. Παρουσιάζει μεγάλη μεταβολική ποικιλομορφία και κατά συνέπεια μπορεί να δημιουργεί ένα ευρύ φάσμα αποικιών. Το πιο συνηθισμένο μέλος του

γένους της ψευδομονάδας είναι η *Pseudomonas aeruginosa*. Αυτή είναι και η πιο συχνή αιτία λοίμωξης του ανθρώπινου οργανισμού από ψευδομονάδα, ενώ ευθύνεται και για ασθένειες ζώων και φυτών. Οι συχνότερες λοιμώξεις που προκαλεί είναι ουρολοιμώξεις, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, πνευμονία, αλλά και εξωνοσοκομειακές λοιμώξεις όπως ωτίτιδα, επιπεφυκίτιδα κλπ. Μπορεί να επιβιώσει κάτω από δύσκολες συνθήκες ενώ παρουσιάζει μια γενικότερη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. [23]

1.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ

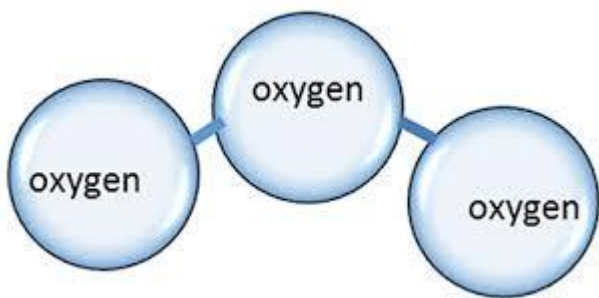
Η απολύμανση των νερών είναι ένα πολύ κρίσιμο βήμα στην μείωση της πιθανής μετάδοσης των παθογόνων από μια υδάτινη πηγή. [26]

Αποτελεί μέτρο αυξήσεως του συντελεστή ασφαλείας και επομένως δεν αναπληρώνει, ούτε αντικαθιστά τα έργα υγειονομικής προστασίας ή την απαραίτητη επεξεργασία καθαρισμού των επιφανειακών νερών. Η απολύμανση πρέπει να επισημανθεί πως δεν είναι αποστείρωση, δεν καταστρέφει συνεπώς κάθε μορφή ζωής μέσα στο νερό. Εντούτοις, αδρανοποιεί το μικροβιακό φορτίο και το ελαττώνει σε αποδεκτά/ανεκτά επίπεδα, με στόχο τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι απολύμανσης.

1.3.1 ΟΖΟΝΩΣΗ

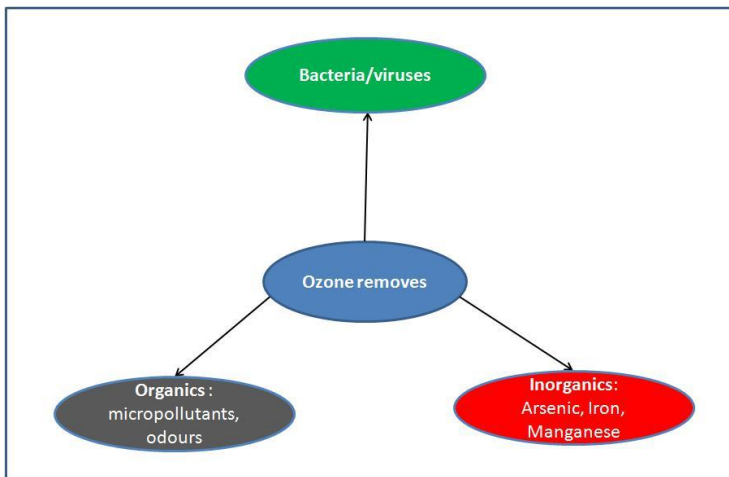
Η οζόνωση χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά στην επεξεργασία υδάτων στα τέλη του 19ου αιώνα και το όζον είναι πολύ πιο ευρέως διαδεδομένο στην Ευρώπη και την Ασία, σε σύγκριση με τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής.

Το όζον είναι ένα αέριο, αρκετά ασταθές, που αποτελείται από τρία άτομα οξυγόνου (O_3). Το αέριο αποδομείται άμεσα και δημιουργεί οξυγόνο και ένα ελεύθερο άτομο οξυγόνου. Είναι ιδιαίτερα αντιδραστικό και με μικρή διάρκεια ζωής, κάτω από κανονικές συνθήκες επιβιώνει μόνο για κάποια χιλιοστά του δευτερολέπτου (msec). Το αέριο είναι άχρωμο, ενώ η οσμή του είναι παρόμοια με αυτή που έχει ο αέρας κατόπιν μιας καταιγίδας. Μπορεί να διασπαστεί γρήγορα και να σχηματιστούν οξειδωτικά μέσα όπως η ρίζα υδροξυλίου ($HO\bullet$).



Εικόνα 2: Το μόριο του όζοντος. [14]

Το όζον έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι στα βακτήρια και τους ιούς σε σύγκριση με το χλώριο και τη διαδικασία της χλωρίωσης. Η δόση που θα χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία νερού ορίζεται από την ποιότητα του ακατέργαστου νερού καθώς και από τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται.



Εικόνα 3: Οι περιπτώσεις που το όζον χρησιμοποιείται σαν απολυμαντικό.[πηγή 12]

Η ιστορία του όζοντος ξεκινά λίγο μετά το 1800. Η θεραπεία με τη χρήση όζοντος έχει μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για πολλές δεκαετίες. Τα αποτελέσματα των μελετών είναι αποδεδειγμένα, ενώ φαίνεται πως οι παρενέργειες είναι ελάχιστες. Το όζον χρησιμοποιείται για ιατρικούς λόγους, για τη θεραπεία λοιμώξεων, πληγών και πολλών ασθενειών με πολύ μεγάλη αποτελεσματικότητα (περισσότερες απο 114). Παράλληλα χρησιμοποιείται για την απολύμανση του πόσιμου νερού πριν από την στροφή του προηγούμενου αιώνα. Το 1896 ο Nikola Tesla κατοχύρωσε την πρώτη γεννήτρια O_3 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής.

Πλεονεκτήματα οζόνωσης

1. Το όζον έχει επίδραση έναντι σε ένα μεγάλο εύρος pH και γρήγορα αντιδρά με βακτήρια, ιούς και πρωτόζωα, και έχει πιο ισχυρές μικροβιοκτόνες ιδιότητες σε σχέση με το χλώριο. Έχει μια έντονη οξειδωτική δύναμη με μικρό χρόνο αντίδρασης.
2. Η διαδικασία δεν προσθέτει χημικά στο νερό.
3. Το όζον μπορεί να εξαλείψει μια μεγάλη ποικιλία ανόργανων, οργανικών και μικροβιολογικών προβλημάτων καθώς και προβλήματα γένυσης και οσμής. Οι μικροβιολογικοί παράγοντες περιλαμβάνουν βακτήρια, ιούς και πρωτόζωα.

Μειονεκτήματα οζόνωσης

1. Το κόστος λειτουργίας και εξοπλισμού είναι σαφώς μεγαλύτερο και ενδεχομένως σχετικά δυσεύρετο.
2. Η οζόνωση δεν έχει υπολειμματική δράση, γι' αυτό συχνά πρέπει να συνδυαστεί με χλωρίωση. Τα παραπροϊόντα της επεξεργασίας με όζον ακόμα αξιολογούνται και είναι πιθανό κάποια από αυτά να είναι καρκινογόνα. Τέτοια είναι οι αλδεϋδες, οι κετόνες, και τα καρβοξυλικά οξέα. Αυτό αποτελεί τον βασικό λόγο ύπαρξης ενός συστήματος φίλτρων με φίλτρα ενεργού άνθρακα.
3. Το σύστημα ίσως απαιτεί προεπεξεργασία για την μείωση της σκληρότητας ή την προσθήκη πολυφωσφορικών.
4. Το όζον είναι λιγότερο διαλυτό στο νερό, σε σύγκριση με ο χλώριο και για το λόγο αυτό απαιτούνται ειδικές τεχνικές ανάμιξης.
5. Υπάρχουν πιθανοί κίνδυνοι πυρκαγιάς και θεμάτων τοξικότητας που σχετίζονται με την παραγωγή του όζοντος.

Η οζόνωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την απομάκρυνση αντιβιοτικών από νερά και απόβλητα. Από έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2002, προέκυψε πως με τη χρήση των τυπικών δοσολογιών όζοντος (5-10 mg/L), μπορεί να επιτευχθεί μέχρι και 99% απομάκρυνση των αντιβιοτικών από νερά ποταμών και λύματα.

[27, 28, 29, 30]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έχει ως γενικό και βασικό σκοπό τον έλεγχο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά βακτηρίων που απομονώθηκαν από το υδάτινο περιβάλλον και η μελέτη μεταβολής της κατόπιν εφαρμογής της οζόνωσης ως μεθόδου απολύμανσης.

Πιο αναλυτικά, οι επιμέρους στόχοι είναι οι εξής:

- Απομόνωση και ταυτοποίηση βακτηρίων από το υδάτινο περιβάλλον.
- Έλεγχος ανθεκτικότητας τους σε ποικιλία αντιβιοτικών με την εκτίμηση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για κάθε αντιβιοτικό (μέθοδος MIC - Minimum Inhibitory Concentration).
- Έλεγχος αδρανοποίησης επιλεγμένων βακτηριακών στελεχών με οζόνωση.
- Έλεγχος μεταβολής του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων που παρέμειναν μετά την εφαρμογή της μεθόδου απολύμανσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΥΛΙΚΑ

Φίλτρα μεμβράνης νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0,45 μm (Whatman).

Αποστειρωμένα τρυβλία Petri διαμέτρου 9 cm και 6 cm.

Πλάκες μικρο-τιτλοποίησης (96 υποδοχών).

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ

Nutrient Agar (HiMedia Laboratories)

Pseudomonas Agar Base (HiMedia Laboratories)

Slanetz & Bartley Medium (HiMedia Laboratories)

Bile Esculin Agar (HiMedia Laboratories)

Nutrient Broth (HiMedia Laboratories)

Mueller-Hinton Broth (Lab M)

HiCrome Agar (Lab M)

Buffered Peptone Water (HiMedia Laboratories)

Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone(RVS) Broth (HiMedia Laboratories)

Selenite Cystine Broth (HiMedia Laboratories)

Baird Parker Agar (Lab M)

Mannitol Salt Agar (Lab M)

XLD Agar (HiMedia Laboratories)

ANTIBIOTIKA (Sigma-Aldrich)

Imipenem

Amikacin

Trimethoprim

Ciprofloxacin

Ampicillin

Amoxicillin

Erythromycin

Tetracycline

ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Λύχνος Bunsen.

Μετρητής αποικιών (Stuart).

Συσκευή διήθησης υπό κενό (PALL Gelman Laboratory).

Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific Heraeus).

Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa).

Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu).

Microplate reader (LT-4000).

Ζυγός ακριβείας (Adventurer OHAUS Balance).

Aqua-Flo CD1B ozone generator

Φιάλη ιατρικού οξυγόνου, Σύσταση : $O_2 \geq 99,5\%$, $CO \leq 5 \text{ ppm}$, $CO_2 \leq 300 \text{ ppm}$ και $H_2O \leq 60 \text{ ppm}$

3.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ

Πραγματοποιήθηκε μια σειρά από δειγματοληψίες τους μήνες Απρίλιο, Μάιο, Ιούνιο, Σεπτέμβριο και Οκτώβριο 2015 από διάφορες περιβαλλοντικές πηγές στην ευρύτερη περιοχή του Νομού Χανίων. Τα δείγματα περιλαμβάνουν θαλασσινό νερό, νερό από ποτάμια, νερό από πισίνα και λύμα από μονάδα επεξεργασίας βιολογικού καθαρισμού ώστε να μπορέσουμε να καλύψουμε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο φάσμα και να δώσουμε μεγαλύτερη ποικιλία στα δείγματα και χωρικά αλλά και χρονικά.

Η λήψη των δειγμάτων γινόταν σε γυάλινα μπουκάλια, τα οποία είχαν αποστειρωθεί κατάλληλα στο εργαστήριο. Η επεξεργασία τους ήταν όσο το δυνατόν πιο άμεση μετά την λήψη τους (σε διάστημα μικρότερο των δώδεκα ωρών) και με κατάλληλη συντήρηση του δείγματος για να αποφευχθεί η αλλοίωση των αποτελεσμάτων. Επίσης, τις μέρες όπου είχε προηγηθεί βροχή δεν έγιναν δειγματοληψίες για τον ίδιο λόγο. [31]

Παρακάτω, ακολουθεί ένας συγκεντρωτικός πίνακας (Πίνακας 1) των δειγματοληψιών γι' αυτήν την περίοδο.

Πίνακας 1: Αναλυτική παράθεση των δειγματοληψιών που πραγματοποιήθηκαν.

<u>ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ</u>		
ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΠΕΡΙΟΧΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ
Δ1	28/4/2015	Ιστιοποικός Όμιλος Σούδας
Δ2	5/5/2015	Παραλία Κουμ Καπί
Δ3	6/5/2015	Βιολογικός Καθαρισμός Χανίων, Χαλέπα, Δευτεροβάθμια επεξεργασία
Δ4	12/5/2015	Ποτάμι Νέας Χώρας, Κλαδισσός
Δ5	19/5/2015	Κολυμβητήριο Νέας Χώρας
Δ6	20/5/2015	Παλιό Λιμάνι Χανίων
Δ7	2/6/2015	Ποτάμι Βαμβακόπουλου
Δ8	30/9/2015	Παλιό Λιμάνι Χανίων
Δ9	2/10/2015	Παραλία Κουμ Καπί

3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Στόχος ήταν να βρεθούν στελέχη βακτηρίων από τα γένη *Staphylococcus* sp, *Enterococcus* sp, *Pseudomonas* sp, *E. coli*, και *Salmonella* sp. Για να επιτευχθεί η απομόνωση των στελεχών, πραγματοποιήθηκε μέθοδος διήθησης των δειγμάτων σε φίλτρα, τα οποία κατόπιν τοποθετήθηκαν σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Συνήθως τα δείγματα τοποθετούνταν στη συσκευή διήθησης χωρίς κάποια επεξεργασία εκτός από περιπτώσεις όπως του Βιολογικού Καθαρισμού όπου στα δείγματα πραγματοποιήθηκε αραίωση. Σε όλες τις αραιώσεις έγινε χρήση αποστειρωμένου νερού.

Πιο αναλυτικά, για κάθε βακτήριο ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Enterococcus sp.

1. Διήθηση υγρού δείγματος
2. Μεταφορά μεμβράνης σε θρεπτικό υπόστρωμα Slanetz & Bartley Medium.
3. Επώαση στους 37 °C για 48 ± 4 h.
4. Σε περίπτωση εμφάνισης τυπικών αποικιών (καφέ, κόκκινου ή ροζ χρώματος) μεταφορά της μεμβράνης σε υπόστρωμα Bile-Aesculin για την διαφοροποίηση εντερόκκωκων από στρεπτόκοκκους.
5. Επώαση στους 44 °C για 2 h.
6. Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών (αποικίες που δημιουργούν μαύρο διάχυτο χρώμα στο υπόστρωμα).

Staphylococcus sp.

1. Διήθηση υγρού δείγματος
2. Μεταφορά μεμβρανών σε θρεπτικό υπόστρωμα Baird-Parker και Mannitol Salt Agar
3. Επώαση στους 37 °C για 48 ± 4 h και 24 ± 4 h αντίστοιχα
4. Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών.

E. coli

1. Διήθηση υγρού δείγματος
2. Μεταφορά μεμβρανών σε θρεπτικό υπόστρωμα HiCrome Agar
3. Επώαση στους 37 °C για 24 ± 4 h

4. Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών (αποικίες που δημιουργούν μπλε χρώμα στο υπόστρωμα).

Pseudomonas sp.

1. Διήθηση υγρού δείγματος
2. Μεταφορά μεμβρανών σε θρεπτικό υπόστρωμα *Pseudomonas* Agar
3. Επώαση στους 37 °C για 48 ± 4 h
4. Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών.

Salmonella sp.

1. Διήθηση υγρού δείγματος
2. Μεταφορά μεμβράνης σε Buffered Peptone Water.
3. Επώαση στους 37 °C για 24 ± 4 h.
4. Μεταφορά 0,1 mL από το επωασμένο δείγμα σε 10 mL Rappaport Vassiliadis Broth και 1mL από το επωασμένο δείγμα σε 9mL Selenite Cystine Broth.
5. Επώαση στους 37 °C για 24 ± 4 h.
6. Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών.

Τα αποτελέσματα των δειγματοληψιών που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Επειδή η παρουσίαση των αποτελεσμάτων είναι δύσκολο να παρουσιαστεί σε έναν απλό πίνακα, ακολουθεί και επεξηγηματικός πίνακας.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα δειγματοληψιών που πραγματοποιήθηκαν.

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ										
ΒΑΚΤΗΡΙΟ	Συγκέντρωση βακτηρίων CFU/100mL									ΣΥΝΟΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕ- ΝΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ
	Δ1	Δ2	Δ3	Δ4	Δ5	Δ6	Δ7	Δ8	Δ9	
<i>E. coli</i>	3	2	243	132	0	13	1	0	1	382
<i>Staphylococcus sp. (m)***</i>	**20+	0	11	**20+	0	9	3	6	10	**76+
<i>Staphylococcus sp. (b) ***</i>	0	0	0	0	12	0	2	0	0	12
<i>Pseudomonas sp.</i>	0	0	0	1	0	** *0	2	0	0	3
<i>Salmonella sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	*-	-	0

<i>Enterococcus sp.</i>	4	5	100	149	0	0	2	1	1	260
-------------------------	---	---	-----	-----	---	---	---	---	---	-----

Πίνακας 3: Επεξηγηματικός πίνακας δειγματοληψιών.

*	Στην περίπτωση αυτή παρουσιάστηκε αποικία στο τριβλίο αλλά ύστερα από ταυτοποίηση με API, καταλήξαμε πως είναι κάποιο άλλο είδος μικροοργανισμού, που δεν συμπεριλαμβάνεται στη συγκεκριμένη μελέτη.
**	Στην περίπτωση αυτή η καταμέτρηση των αποικιών ήταν δύσκολη, καθ'ότι οι περισσότερες ήταν πάρα πολύ μικρές ή ενωμένες, συνθήκες που καθιστούν τον ακριβή προσδιορισμό τους σχεδόν αδύνατο. Για τον λόγο αυτό καταμετρήθηκαν οι πιο ευδιάκριτες αποικίες με ακρίβεια και το σύμβολο + υποδηλώνει την ύπαρξη άλλων πολύ μικρών και απροσδιόριστου αριθμού αποικιών.
***	Στην περίπτωση αυτή, έγινε καλλιέργεια για τον εντοπισμό των στελεχών του σταφυλόκοκκου σε δύο διαφορετικά εκλεκτικά υλικά. Το (m) υποδηλώνει την καλλιέργεια σε τριβλίο που περιείχε το εκλεκτικό υλικό Mannitol ενώ το (b) υποδηλώνει την καλλιέργεια σε τριβλίο με το εκλεκτικό υλικό Baird Parker.

Οι μικροοργανισμοί διατηρήθηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης στους -80 °C.

3.4 ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Για να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά έγινε χρήση της μεθόδου Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC), όπου στην ουσία αφορά στην ελάχιστη συγκέντρωση φαρμάκου η οποία αποτρέπει την ανάπτυξη μικροοργανισμών κατά την επώαση για 24 h. Θεωρείται ενδεδειγμένη μέθοδος για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. [32]

Αρχικά, έγινε η παρασκευή των διαλυμάτων αντιβιοτικών προς χρήση. Το βασικό διάλυμα που παρασκευάστηκε ήταν δυο φορές πιο πυκνό από τη μέγιστη απαιτούμενη συγκέντρωση κατά τη διαδικασία. Για κάθε αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε ο κατάλληλος διαλύτης. Για την εφαρμογή της μεθόδου, έγινε χρήση ειδικών πλακετών με κυψέλες στις οποίες τοποθετήθηκαν 100 μL από Muller Hinton Broth (πηγάδια από στήλες 1-10 και στη στήλη 12) και στη συνέχεια βάζουμε 100 μL από το αντιβιοτικό στις κυψέλες της πρώτης στήλης. Επιλέχθηκε να γίνουν δύο επαναλήψεις για κάθε αντιβιοτικό και βακτήριο. Δηλαδή, κάθε συνδυασμός βακτηρίου με αντιβιοτικό καταλάμβανε δυο σειρές από την πλακέτα. Αφού η πρώτη στήλη κάθε σειράς ήταν έτοιμη, με τη χρήση της πολυκάναλης πιπέτας έγιναν διαδοχικές αραιώσεις μέχρι τη στήλη 10 της πλακέτας μεταφέροντας 100 μL από την προηγούμενη. Κάθε φορά που μεταφέρονται 100 μL από τη μία στήλη στην επόμενη επιτυγχάνεται αραιώση 1÷2. Έτσι, αν παραδείγματος χάρη η πρώτη στήλη είχε συγκέντρωση αντιβιοτικού 160 mg/L, η δέκατη στήλη θα περιείχε συγκέντρωση αντιβιοτικού 0,3 mg/L. Στην στήλη 12 δεν προστίθεται αντιβιοτικό καθώς χρησιμοποιείται σαν control, να παρατηρηθεί δηλαδή η ανάπτυξη του μικροοργανισμού χωρίς αντιβιοτικό κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες. Οι αρχικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αντιβιοτικό είναι οι εξής:

Imipenem 80 mg/L

Amikacin 160 mg/L

Ampicillin 80mg/L

Amoxicillin 80mg/L

Ciprofloxacin 40 mg/L

Trimethoprim 20 mg/L

Erythromycin 20 mg/L

Tetracycline 20 mg/L

Ο επιλογές των συγκεντρώσεων αυτών έγιναν ώστε να καλύπτονται όλα τα γένη βακτηρίων για τα οποία θα γινόταν χρήση και να επιτευχθεί έτσι ένα ευρύ φάσμα για την γρηγορότερη διεξαγωγή της διαδικασίας.

Η ανάπτυξη των βακτηρίων που επήλθε από την 24ωρη επώαση ελέγχθηκε σε ειδικό φασματοφωτόμετρο πλακέτας (microplate reader).

3.5 ΟΖΟΝΩΣΗ

Εφαρμόστηκε η μέθοδος της οζόνωσης για τον έλεγχο αδρανοποίησης των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών και τον έλεγχο μεταβολής του προφίλ ανθεκτικότητας μετά το πέρας της διαδικασίας.

Παράχθηκε όζον με παροχή ξηρού αέρα σε μια γεννήτρια όζοντος Aqua-Flo CD1B. Η παροχή αέρα ήταν 140 L/h. Η έξοδος του οζονιστή συνδέθηκε με τον αντιδραστήρα μέσω σηληνών Teflon. Ο αντιδραστήρας ήταν γυάλινος και κυλινδρικού σχήματος, όγκου 500 mL και βρισκόταν σε λειτουργία semi-batch mode (αντιδραστήρας ημιδιαλείποντος έργου). Αυτό σημαίνει το δείγμα νερού εισέρχεται στον αντιδραστήρα στην αρχή της διαδικασίας, ενώ παράλληλα η προσθήκη του όζοντος γίνεται συνεχόμενα καθ'όλη την πειραματική διαδικασία μέσω ενός πέτρινου διαχύτη. Η ροή του όζοντος που διαφέυγει, παγιδεύεται σε δυο γυάλινα δοχεία με ιωδιούχο κάλιο που λειτουργούν ως “παγίδες”.

Το βακτηριακό εναιώρημα που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα οζόνωσης έγινε σε διάλυμα NaCl 0,8% κ.β. και περιείχε 10^8 CFU/mL από το κάθε στέλεχος. Ο όγκος του δείγματος ήταν 300 mL. Ως «παγίδα» του όζοντος χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ιωδιούχου καλίου KI 2%.

Πριν από κάθε πείραμα οζόνωσης, ο ρυθμός παροχής όζοντος μετρήθηκε με την οδήγηση του όζοντος σε δυο παγίδες με ιωδιούχο κάλιο για το χρονικό διάστημα των 10 λεπτών.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, 250 mL δείγματος νερού εμβολιασμένο με το επιθημητό βακτηριακό στέλεχος τοποθετήθηκε στον αντιδραστήρα, και το όζον που παράχθηκε άφρισε. Λαμβανόταν δείγμα σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, το οποίο κατόπιν ελεγχόταν ως προς την επιβίωση του εκάστοτε βακτηρίου (καλλιέργεια σε Nutrient Agar & επώαση στους 37 °C για 24 h).

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, στο διάλυμα από τις παγίδες γινόταν τιτλοδότηση με τη χρήση $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N για κάθε παγίδα χωριστά. Τα mL που καταναλώθηκαν σε κάθε τιτλοδότηση παγίδας καταγράφηκαν, ώστε να επεξεργαστούν στη συνέχεια τα αποτελέσματα της οζόνωσης.

Οι τύποι που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

$$\text{In (mg/min)} = (\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 * 0,1 \text{ N} * 24) / t$$

όπου

0,1 N: κανονικότητα

24: $\text{MBO}_3/2$

t: χρόνος (min)

Ομοίως υπολογίζεται και το **Out**

applied ozone dose = [(inlet ozone concentration – outlet ozone concentration) * flow rate * contact time] / V_{sample}

Δόση όζοντος:

Δόση = (F_{out} – F_{in}) * t (c) σε [mg O₃]

Ισοζύγιο όζοντος:

Οζον_{in} (mg/min) = **Οζον που αντέδρασε** (mg/L)+ **Υπολειμματικό Όζον** (mg/L) = **Οζον_{out}** (mg/min)

Τα εναπομείναντα βακτηριακά κύτταρα μετά το πέρας της διαδικασίας ελέγχθηκαν ως προς το προφίλ ανθεκτικότητας στην ποικιλία αντιβιοτικών που είχαν ελεγχθεί αρχικά με στόχο την σύγκριση των αποτελεσμάτων πριν και μετά την οζόνωση κάθε στελέχους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δείγματα με υψηλό μικροβιακό φορτίο (λύμα από τη δευτεροβάθμια επεξεργασία του Βιολογικού Καθαρισμού των Χανίων) αραιώθηκαν κατάλληλα και κατόπιν ακολούθησε η ανίχνευση των βακτηρίων μέσω διήθησης και καλλιέργειας στα εκλεκτικά καλλιεργητικά υλικά. ή, το πόσο μεγάλη ήταν η αρχική συγκέντρωση.

Το δείγμα που ελήφθη από την πισίνα του κολυμβητηρίου της Νέας Χώρας, δεν είχε καθόλου μικροβιακό φορτίο, πιθανώς λόγω κατάλληλης χλωρίωσης και υγιεινής και για το λόγο αυτό δεν συμπεριελήφθη στη μελέτη .

Το βακτήριο που ανιχνεύθηκε στη χαμηλότερη συχνότητα ήταν η ψευδομονάδα, ενώ το πλέον συχνό η *E. coli* καθώς βρέθηκε σχεδόν σε όλα τα δείγματα. Όσον αφορά στον σταφυλόκοκκο και τον εντερόκοκκο, ο εντοπισμός τους στα δείγματα ήταν επίσης αρκετά συχνός. Δυστυχώς, δεν ήταν εφικτό να εντοπίσουμε σαλμονέλλα παρόλο που το δείγμα νερού που λήφθηκε στην περιοχή του Βαμβακόπουλου ήταν πολλά υποσχόμενη, καθώς τριγύρω υπάρχουν παραγωγοί και εκτροφείς με κοτέτσια.

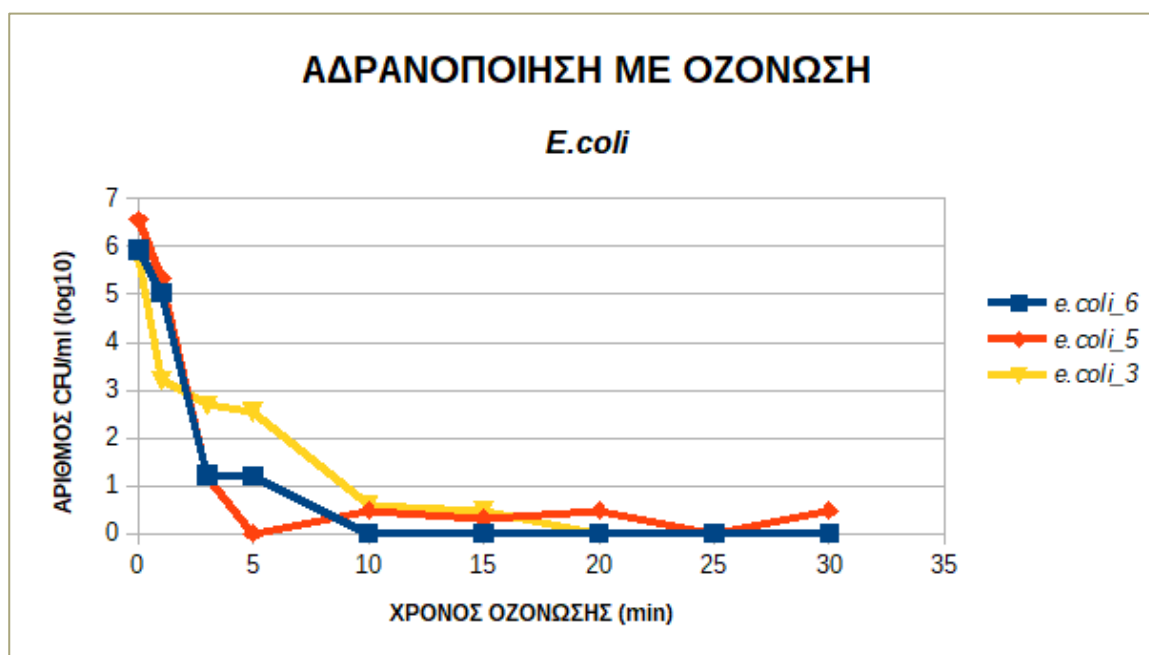
4.1 ΟΖΟΝΩΣΗ – ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια της οζόνωσης, η εφαρμοσμένη δόση όζοντος υπολογίστηκε ως εξής :

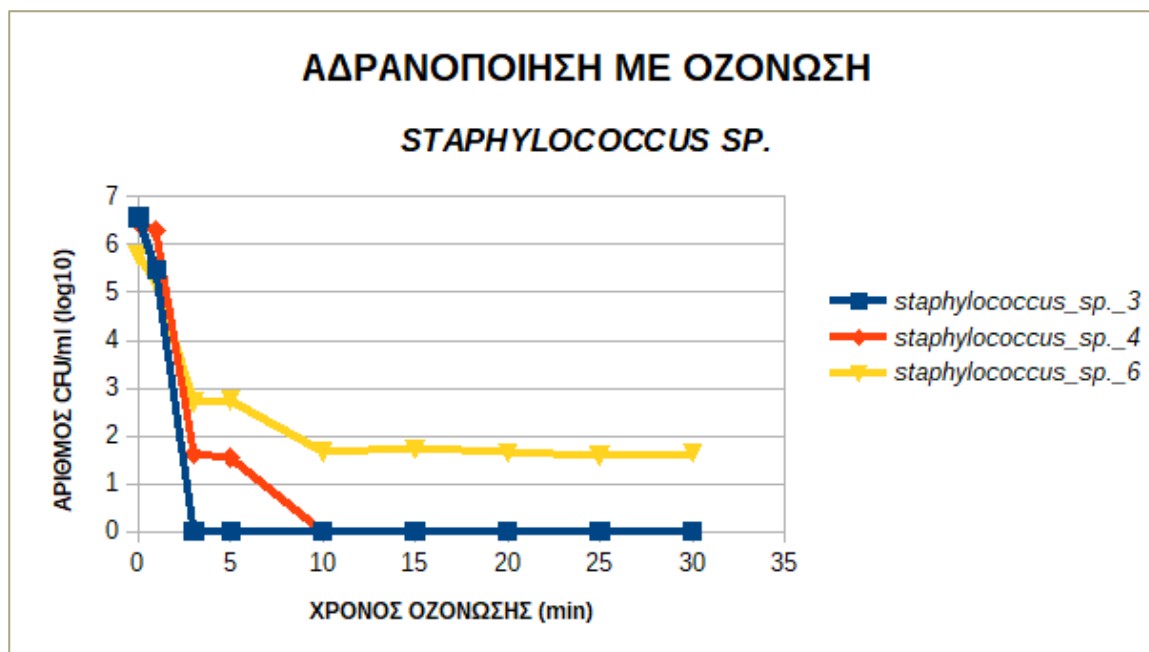
(Inlet ozone concentration—Outlet ozone concentration) Flowrate Contact time]/Vsample

και αυτό αντιπροσωπεύει τη δόση όζοντος που μεταφέρθηκε στο δείγμα νερού και είχε μέση τιμή 25.4 mg/L.

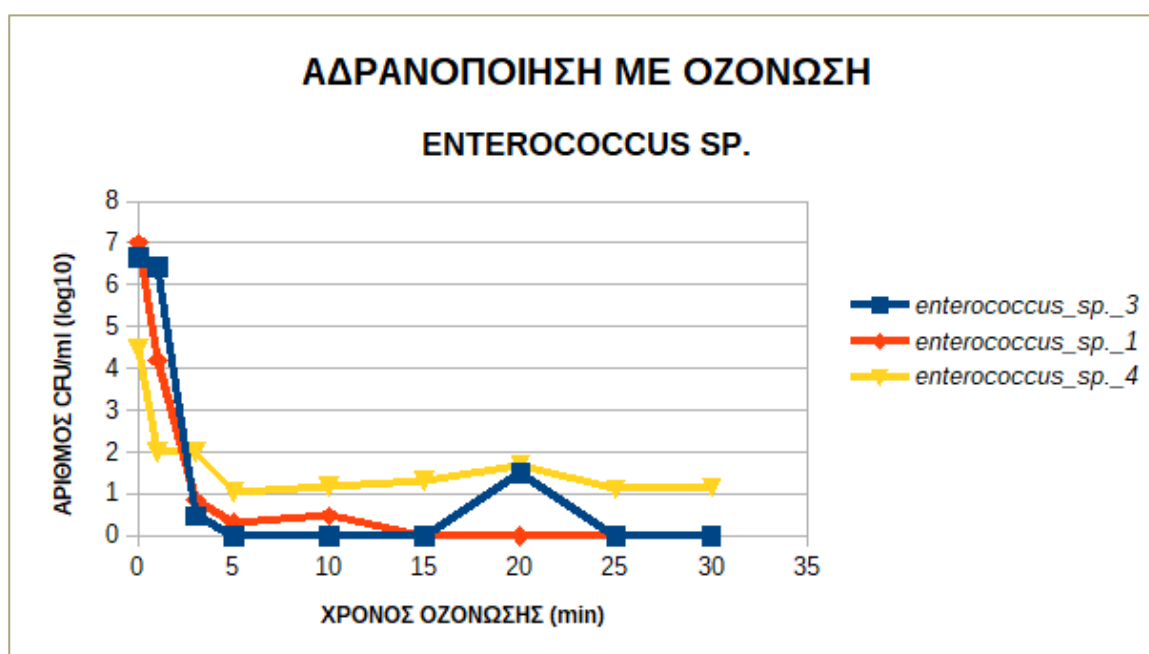
Στις εικόνες 4, 5, 6 και 7 παρουσιάζεται λογαριθμικά (δεκαδικός λογάριθμος) η αδρανοποίηση των στελεχών των βακτηρίων σε σχέση με το χρόνο εφαρμογής του όζοντος. Με μια πρώτη ματιά παρατηρείται πως στην πλειοψηφία τους τα στελέχη αδρανοποιούνται σε αρκετά μικρό χρονικό διάστημα. Υπάρχουν βέβαια και κάποια όπως η *E.coli_5* ο *Staphylococcus sp._6* και ο *Enterococcus sp._4* όπου καθόλη τη διάρκεια των 30 λεπτών που διήρκεσε κάθε πείραμα οζόνωσης άντεχαν ακόμη, σε πολύ μικρό φυσικά ποσοστό.



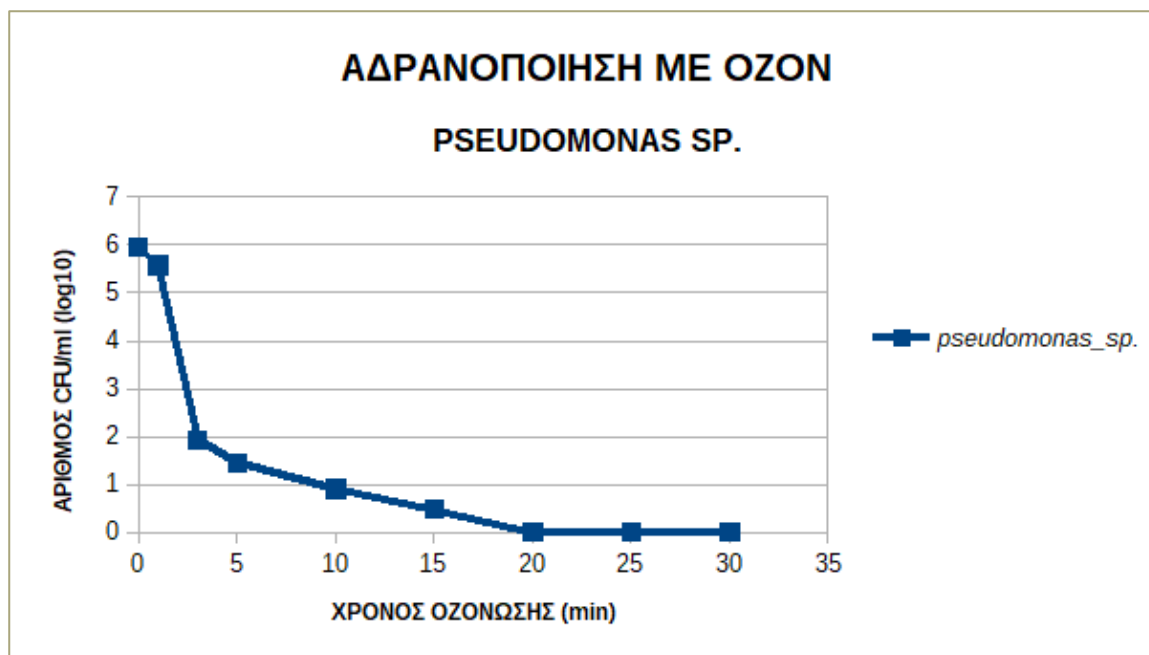
Εικόνα 4: ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ *E.coli*



Εικόνα 5: ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ *Staphylococcus* sp.



Εικόνα 6: ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ *Enterococcus* sp.



Εικόνα 7: ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ *Pseudomonas sp.*

4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ANTIBIOTIKA ME TH MEΘΟΔΟ MIC (Minimum Inhibitory Concentration).

Βασικός στόχος αυτής της μελέτης είναι η εύρεση του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων που συγκεντρώθηκαν από την διαδικασία των δειγματοληψιών. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η Μέθοδος Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC). Ο προσδιορισμός των ορίων για την κατηγοριοποίηση των βακτηρίων έγινε με τη χρήση των δεδομένων της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τον Αντιμικροβιακό Έλεγχο Ευαισθησίας EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

4.2.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Σύμφωνα με το ISO 20776-2:2007 (212, ISO/TC, 2007), γίνεται κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών βάσει της ανθεκτικότητας τους ως:

- **Ανθεκτικοί (Resistant).**

“Ανθεκτικοί μικροοργανισμοί είναι εκείνοι των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από κάποια συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συγκέντρωση συνδέεται με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας.”

- **Μετρίως ευαίσθητοι (Intermediate).**

“Μετρίως ευαίσθητοι μικροοργανισμοί είναι εκείνοι των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από κάποια συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συγκέντρωση συνδέεται με αμφίβολη θεραπευτική επιτυχία.”

- **Ευαίσθητοι (Susceptible).**

“Ευαίσθητοι μικροοργανισμοί είναι εκείνοι των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από κάποια συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συγκέντρωση συνδέεται με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας.”

Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας, ελέγχθηκε τότε η μείωση της συγκέντρωσης του εκάστοτε μικροοργανισμού είναι μεγαλύτερη ή ίση με 60%, σύμφωνα με τον EUCAST.

4.2.2. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ ΟΡΙΩΝ

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζεται αναλυτικά το εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC(μg/mL) της δράσης κάθε αντιβιοτικού που χρησιμοποιήθηκε, για κάθε ένα βακτήριο αντίστοιχα.

Πίνακας 4: Εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης μικροοργανισμών για το αντιβιοτικό Ampicillin.

ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ MIC(μg/mL)			
AMPICILLIN			
ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΜΕΤΡΙΩΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ
<i>Staphylococcus sp.</i>	MIC ≤ 2	2 < MIC ≤ 8	MIC > 8
<i>Enterococcus sp.</i>	MIC ≤ 4	4 < MIC ≤ 8	MIC > 8
<i>Escherichia coli</i>	MIC ≤ 8	-	MIC > 8
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	-

Πίνακας 5: Εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης μικροοργανισμών για το αντιβιοτικό Ciprofloxacin.

ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ MIC(μg/mL)			
CIPROFLOXACIN			
ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΜΕΤΡΙΩΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ
<i>Staphylococcus sp.</i>	MIC ≤ 1	-	MIC > 1
<i>Enterococcus sp.</i>	MIC ≤ 4	-	MIC > 4
<i>Escherichia coli</i>	MIC ≤ 0,25	0,25 < MIC ≤ 0,5	MIC > 0,5
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	-

Πίνακας 6: Εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης μικροοργανισμών για το αντιβιοτικό Amikacin.

ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ MIC($\mu\text{g/mL}$)			
AMIKACIN			
ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΜΕΤΡΙΩΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ
<i>Staphylococcus sp.</i>	MIC ≤ 8	$8 < \text{MIC} \leq 16$	MIC > 16
<i>Enterococcus sp.</i>	MIC ≤ 8	$8 < \text{MIC} \leq 16$	MIC > 16
<i>Escherichia coli</i>	MIC ≤ 8	$8 < \text{MIC} \leq 16$	MIC > 16
<i>Pseudomonas sp.</i>	MIC ≤ 8	$8 < \text{MIC} \leq 16$	MIC > 16

Πίνακας 7: Εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης μικροοργανισμών για το αντιβιοτικό Erythromycin.

ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ MIC($\mu\text{g/mL}$)			
ERYTHROMYCINE			
ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΜΕΤΡΙΩΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ
<i>Staphylococcus sp.</i>	MIC ≤ 1	$1 < \text{MIC} \leq 2$	MIC > 2
<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	-

Πίνακας 8: Εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης μικροοργανισμών για το αντιβιοτικό Tetracycline.

ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ MIC($\mu\text{g/mL}$)			
TETRACYCLINE			
ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΜΕΤΡΙΩΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ
<i>Staphylococcus sp.</i>	MIC ≤ 1	$1 < \text{MIC} \leq 2$	MIC > 2
<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	-

Πίνακας 9: Εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης μικροοργανισμών για το αντιβιοτικό Imipenem.

ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ MIC(μg/mL)			
IMIPENEM			
ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΜΕΤΡΙΩΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ
<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	-
<i>Enterococcus sp.</i>	MIC ≤4	4<MIC ≤8	MIC >8
<i>Escherichia coli</i>	MIC ≤2	2<MIC ≤8	MIC >8
<i>Pseudomonas sp.</i>	MIC ≤4	4<MIC ≤8	MIC >8

Πίνακας 10: Εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης μικροοργανισμών για το αντιβιοτικό Amoxicillin.

ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ MIC(μg/mL)			
AMOXICILLIN			
ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΜΕΤΡΙΩΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ
<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	-
<i>Enterococcus sp.</i>	MIC ≤4	4<MIC ≤8	MIC >8
<i>Escherichia coli</i>	MIC ≤8	-	MIC >8
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	-

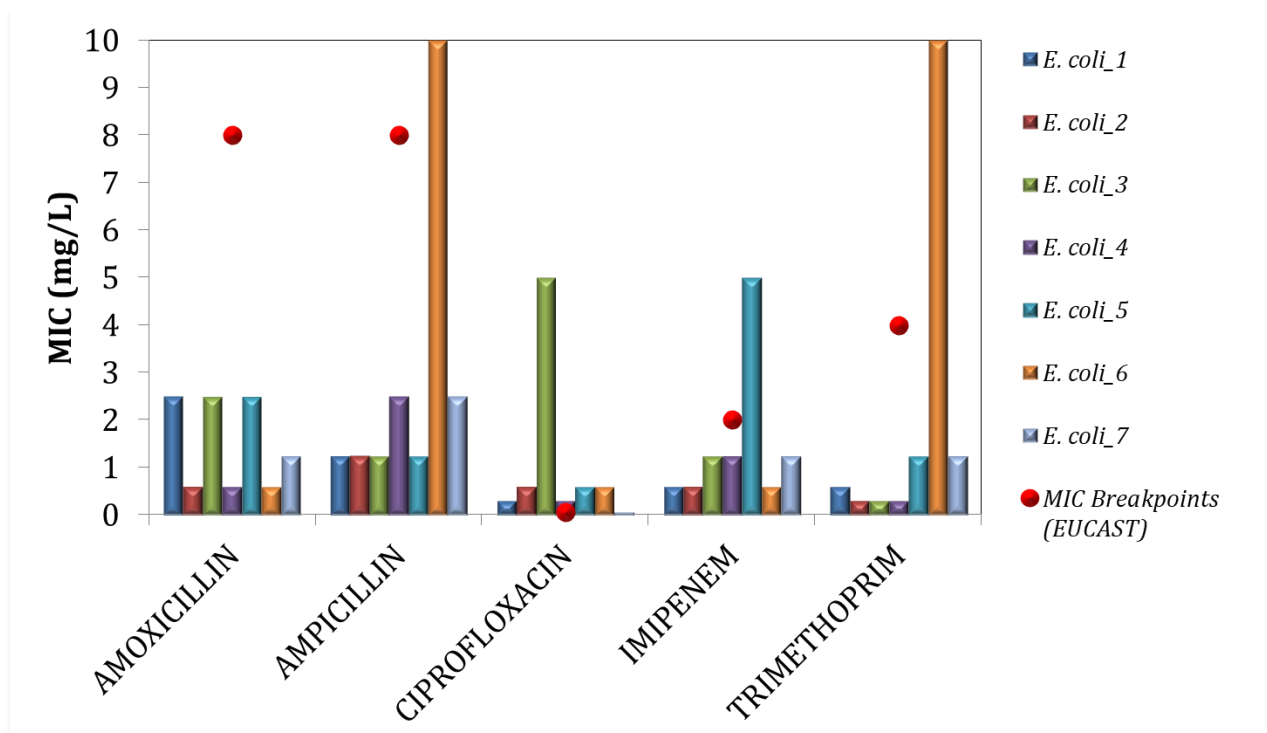
Πίνακας 11: Εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης μικροοργανισμών για το αντιβιοτικό Trimethoprim.

ΕΥΡΟΣ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ MIC(μg/mL)			
TRIMETHOPRIM			
ΒΑΚΤΗΡΙΟ	ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΜΕΤΡΙΩΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΣ	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΣ
<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	-
<i>Enterococcus sp.</i>	MIC ≤0, 0009	0, 0009<MIC ≤1	MIC >1
<i>Escherichia coli</i>	MIC ≤2	2<MIC ≤4	MIC >4
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	-

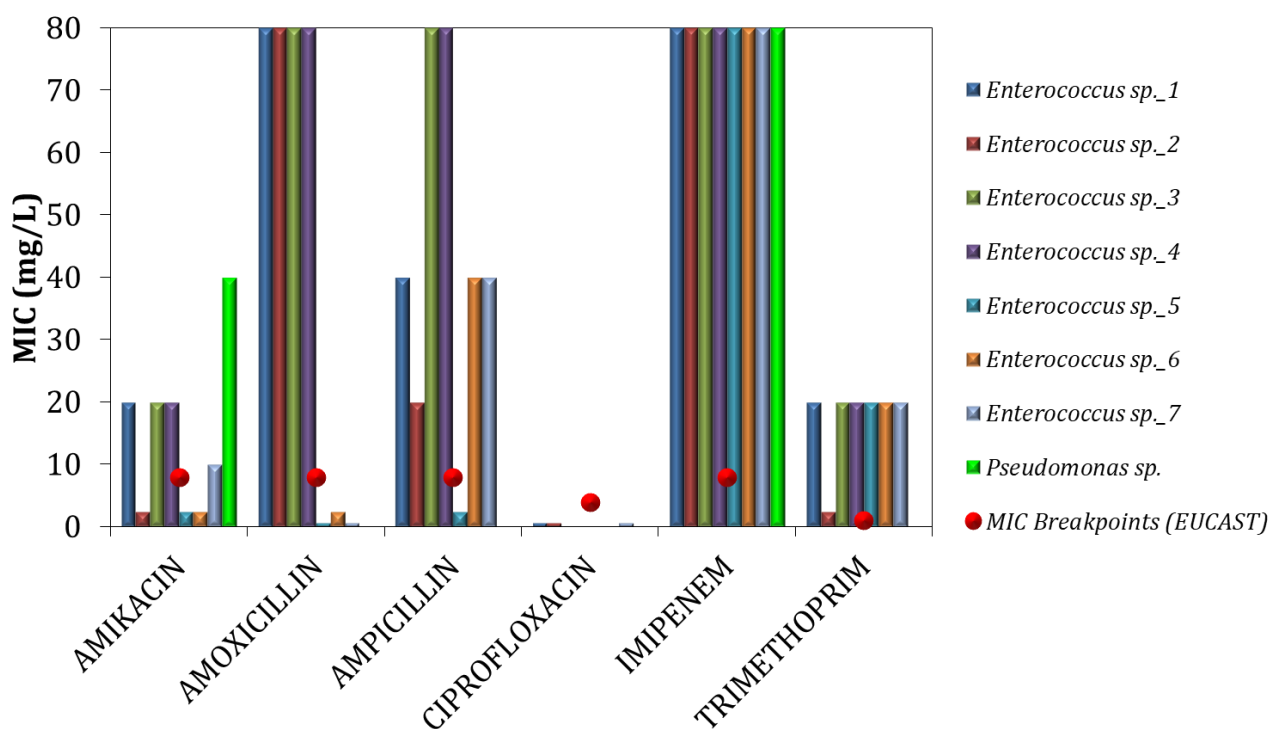
4.2.3. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΟΖΩΝΩΣΗ

4.2.3.1 ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

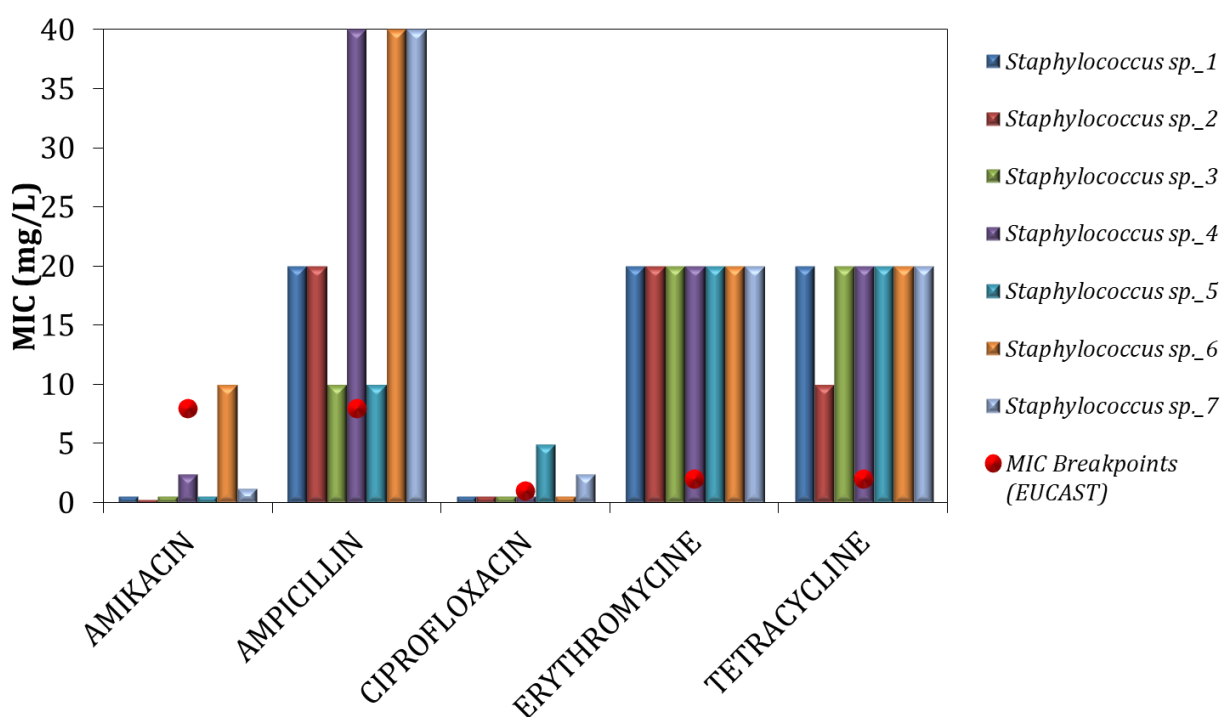
Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζεται το προφίλ ανθεκτικότητας των εξεταζόμενων βακτηρίων σύμφωνα με τα δεδομένα για τα όρια της MIC απο το EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).



Εικόνα 8: Προφίλ ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά για τα στελέχη του βακτηρίου *E. coli* πριν την οζόνωση.



Εικόνα 9: Προφίλ ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά για τα στελέχη των βακτηρίων *Enterococcus* sp. και *Pseudomonas* sp. πριν την οζόνωση.



Εικόνα 10: Προφίλ ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά για τα στελέχη του βακτηρίου *Staphylococcus* sp. πριν την οζόνωση.

Σε γενικές γραμμές, πριν την οζόνωση, όλα τα στελέχη του βακτηρίου *Staphylococcus sp.* είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά Ampicillin, Erythromycine και Tetracycline. Όλα τα στελέχη εκτός του 6 παρουσιάζουν ευαισθησία στο Amikacin, και όλα τα στελέχη εκτός του 5 και του 7 παρουσιάζουν ευαισθησία στο Ciprofloxacin.

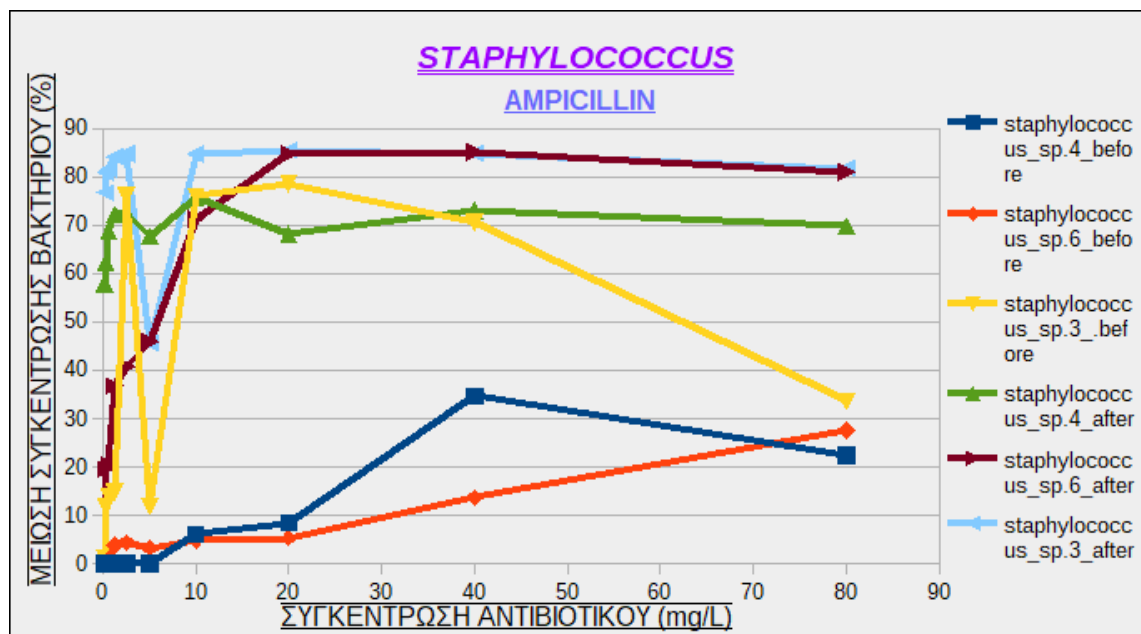
Το βακτήριο *E. coli* δείχνει ένα γενικότερο προφίλ ευαισθησίας απέναντι σε όλα τα αντιβιοτικά εκτός από κάποια στελέχη που σε ορισμένες περιπτώσεις έδειξαν ανθεκτικότητα. Το 6 στο Ampicillin και το Trimethoprim, το 3 στο Ciprofloxacin, και το 5 στο Imipenem.

Ο εντερόκοκκος παρουσιάζει μια γενικότερη ανθεκτικότητα σε όλα τα αντιβιοτικά εκτός του Ciprofloxacin στο οποία όλα τα στελέχη έδειξαν ευαισθησία. Επίσης ευαισθησία έδειξαν τα στελέχη 2,5,6 στο Amikacin, τα στελέχη 5,6,7 στο Amoxicillin και το στέλεχος 5 στο Ampicillin.

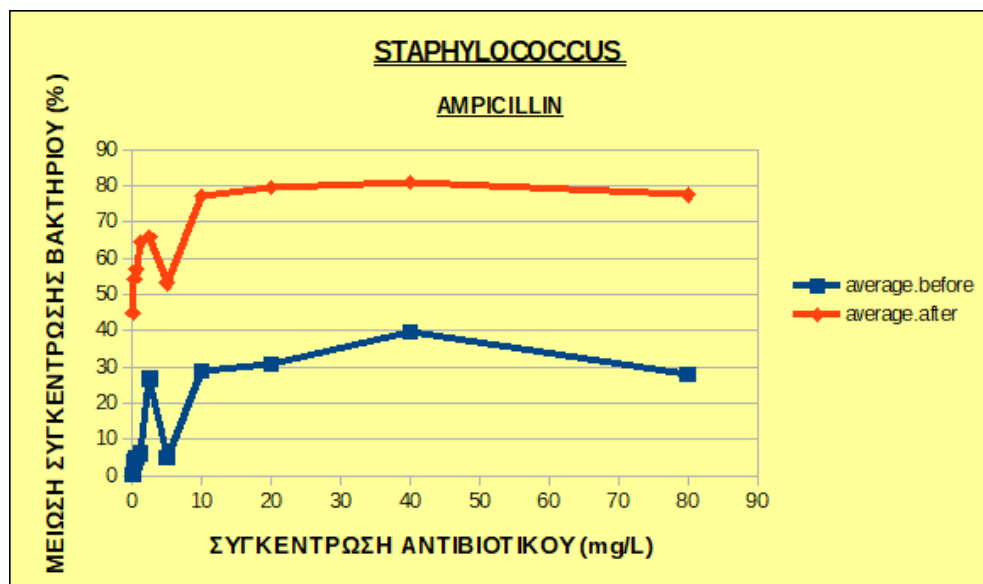
Η ψευδομονάδα δείχνει ιδιαίτερα ανθεκτική και στα δυο αντιβιοτικά που εξετάστηκε.

4.2.3.2 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

○ *Staphylococcus* sp.



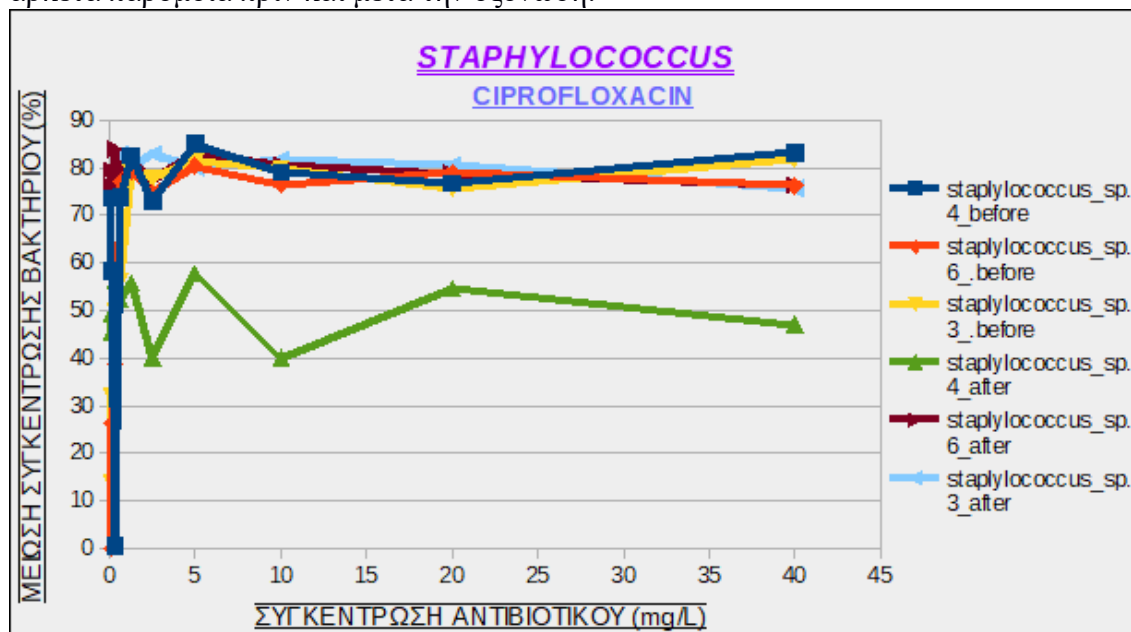
Εικόνα 11: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Staphylococcus* sp. σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ampicillin, πριν και μετά την οζόνωση.



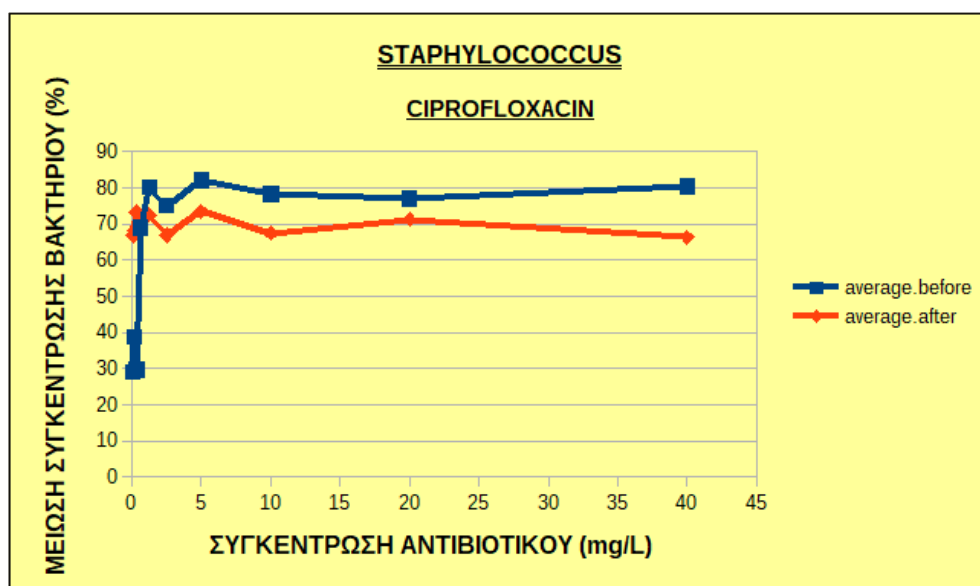
Εικόνα 12: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Staphylococcus* sp. σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ampicillin, πριν και μετά την οζόνωση.

Το ποσοστό της μείωσης της συγκέντρωσης του βακτηρίου αυξάνεται τόσο που θα μπορούσαμε να πούμε πως οι τιμές είναι σχεδόν διπλάσιες. Η πορεία όμως της αντίδρασης στο αντιβιοτικό είναι

αρκετά παρόμοια πριν και μετά την οζόνωση.

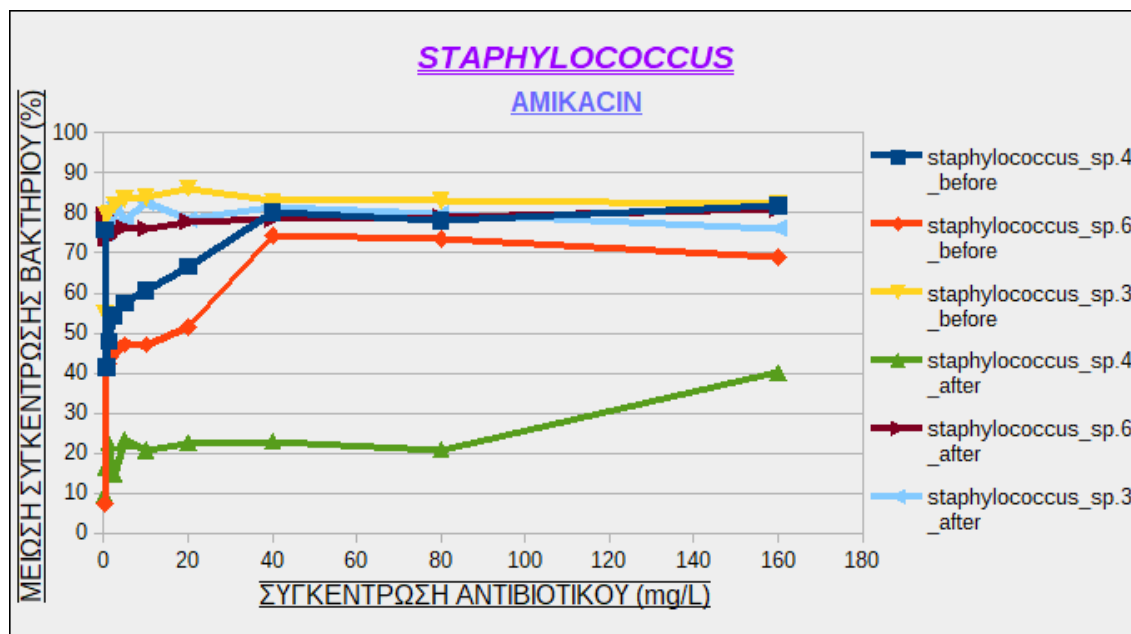


Εικόνα 13: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Staphylococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin, πριν και μετά την οζόνωση.

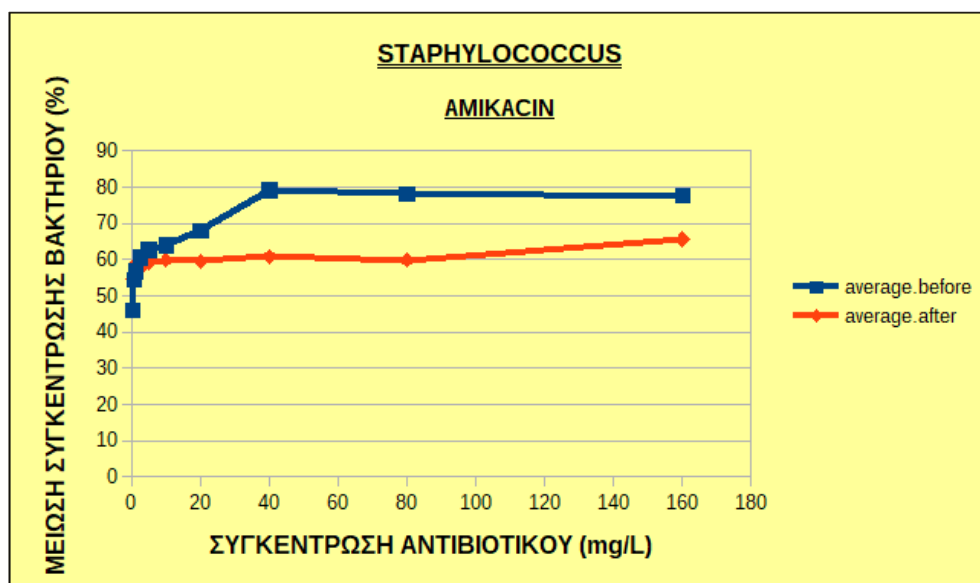


Εικόνα 14: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Staphylococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin, πριν και μετά την οζόνωση.

Μετά την οζόνωση το προφίλ του βακτηρίου *Staphylococcus sp.* δεν έχει πολύ έντονες διαφορές, με εξαίρεση το ένα μόνο στέλεχος από τα τρία που η διαφορά πριν και μετά, είναι αρκετά εμφανής και ο βακτήριο γίνεται ελαφρώς πιο ανθεκτικό στο αντιβιοτικό Ciprofloxacin.

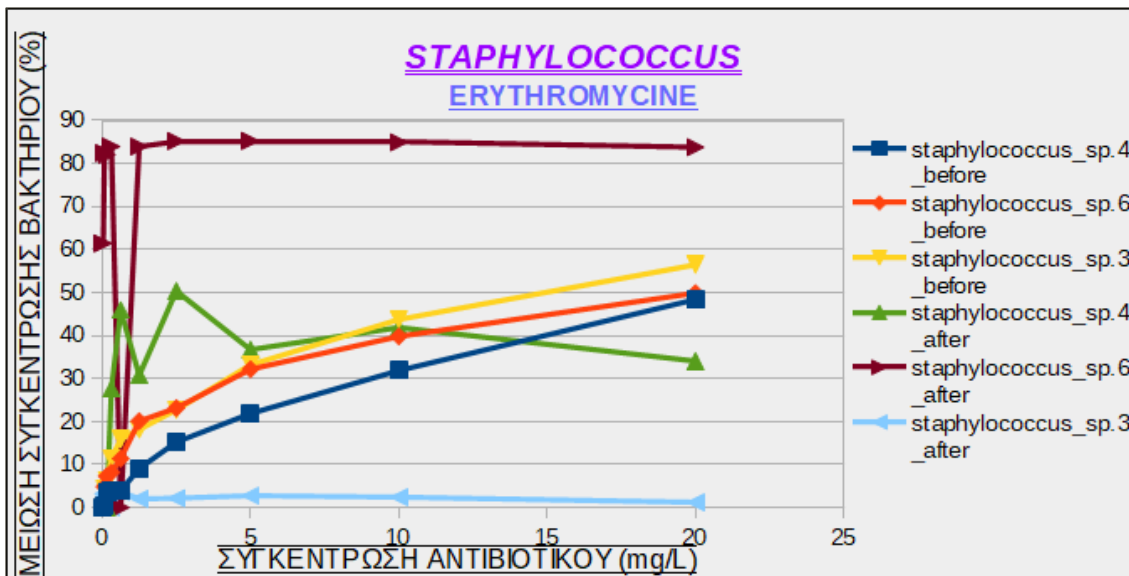


Εικόνα 15: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Staphylococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amikacin, πριν και μετά την οζόνωση.

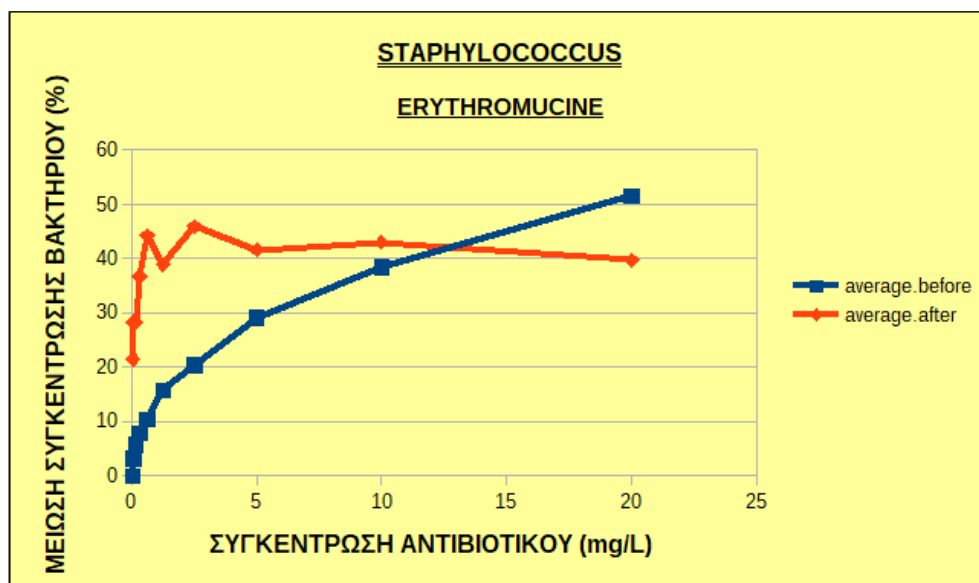


Εικόνα 16: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Staphylococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amikacin, πριν και μετά την οζόνωση.

Οι διαφορές στο ποσοστό και στο ρυθμό μείωσης του βακτηρίου είναι μικρές, με το ποσοστό να μειώνεται ελαφρώς και ο ρυθμός να μειώνεται και να παραμένει πιο σταθερός. Κατά συνέπεια, καταλήγουμε πως το βακτήριο γίνεται ελαφρώς πιο ανθεκτικό στο αντιβιοτικό Amikacin.

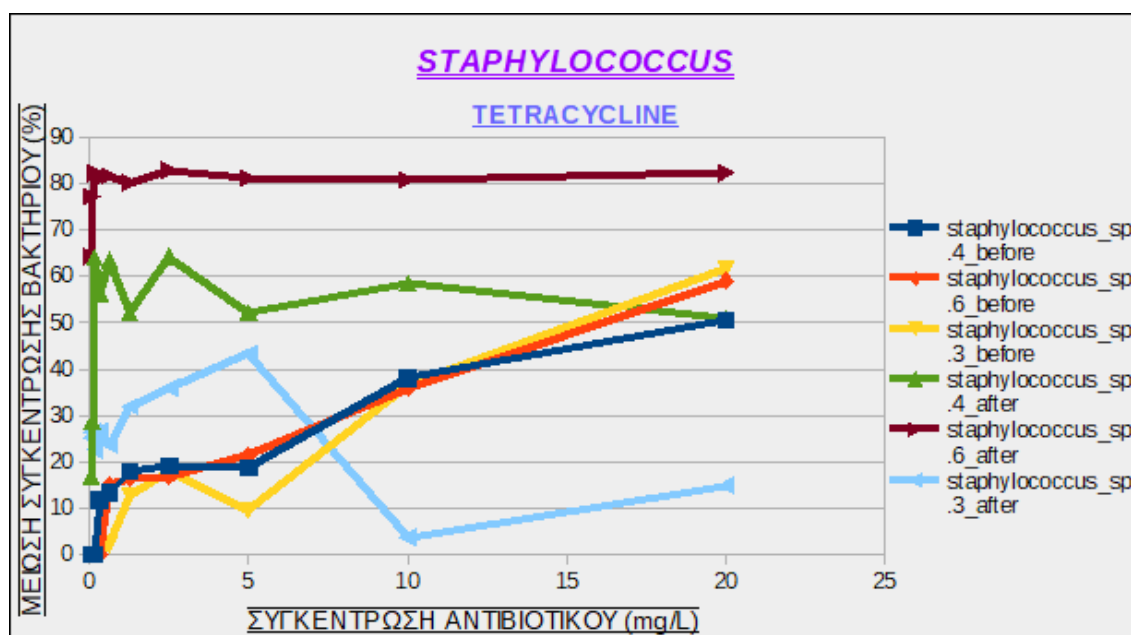


Εικόνα 17: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Staphylococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Erythromycine, πριν και μετά την οζόνωση.

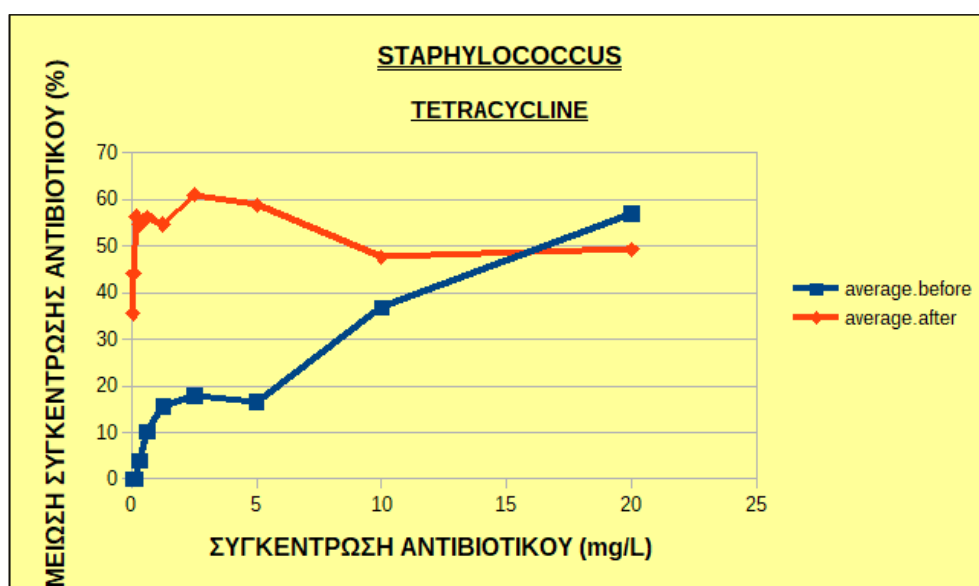


Εικόνα 18: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Staphylococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Erythromycine, πριν και μετά την οζόνωση.

Το βακτήριο εμφανίζει μια μεγαλύτερη ευαισθησία στο αντιβιοτικό στις χαμηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού ενώ με την αύξηση της συγκέντρωσης του, δείχνει να κρατά σταθερό ρυθμό και αντίσταση σε περαιτέρω μείωση της συγκέντρωσης.



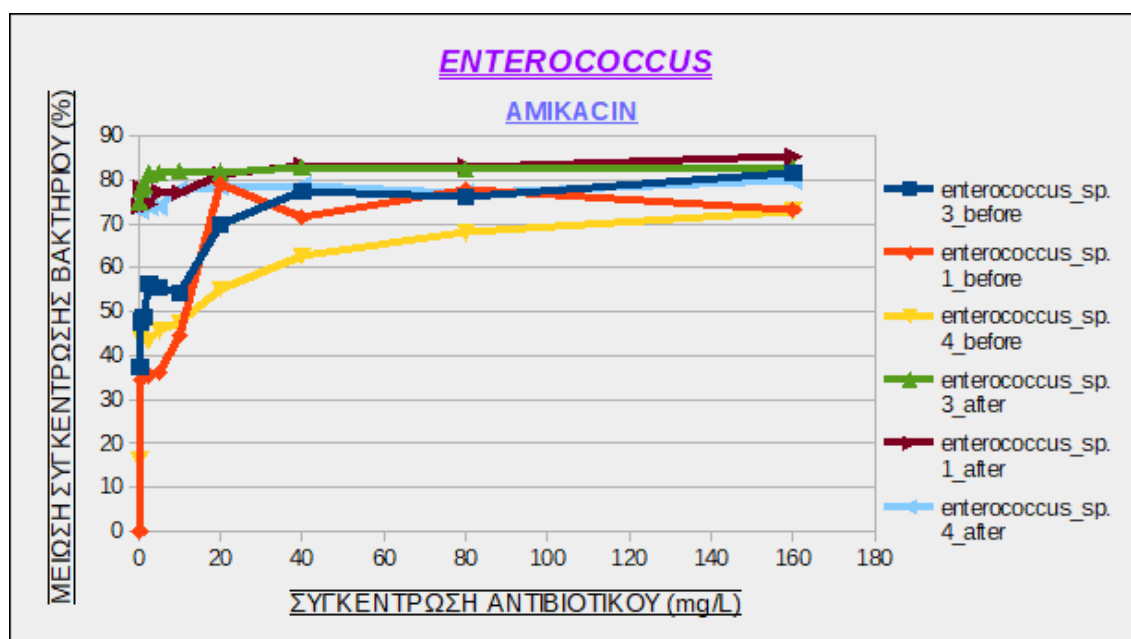
Εικόνα 19: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Staphylococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Tetracycline, πριν και μετά την οζόνωση.



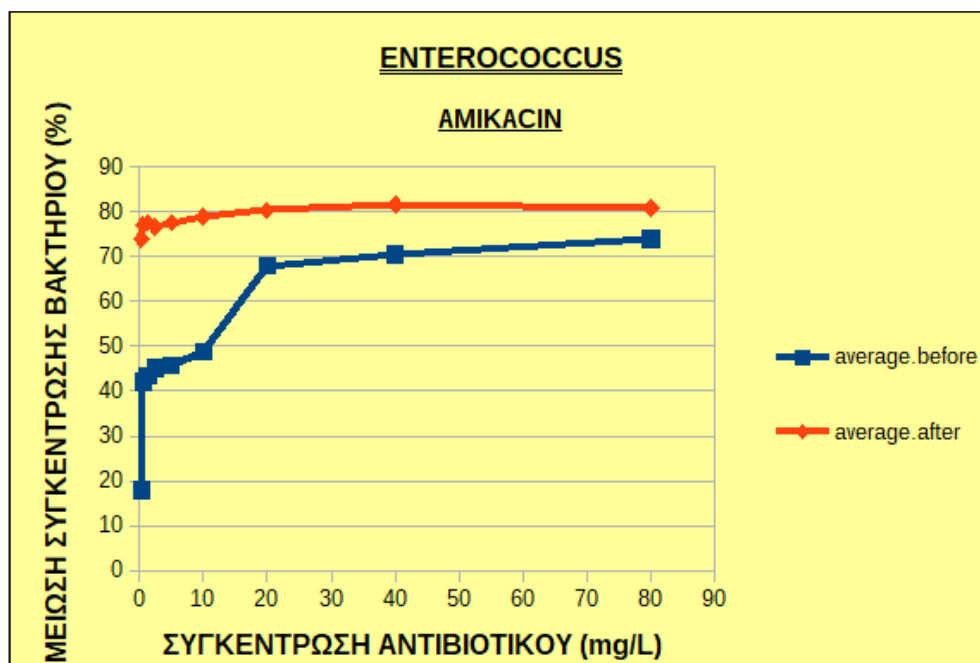
Εικόνα 20: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Staphylococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Tetracycline, πριν και μετά την οζόνωση.

Το βακτήριο παρουσιάζει μια μεγαλύτερη ευαισθησία στο αντιβιοτικό σε μικρές συγκεντρώσεις, ενώ όσο αυτές αυξάνονται δείχνει να σταθεροποιεί το ρυθμό μείωσης, σε αντίθεση με το προφίλ του πριν την εφαρμογή του όζοντος που ενώ αρχικά φαίνεται ανθεκτικό, αυξάνει το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης του βακτηρίου με γρηγορους ρυθμούς.

○ *Enterococcus sp*

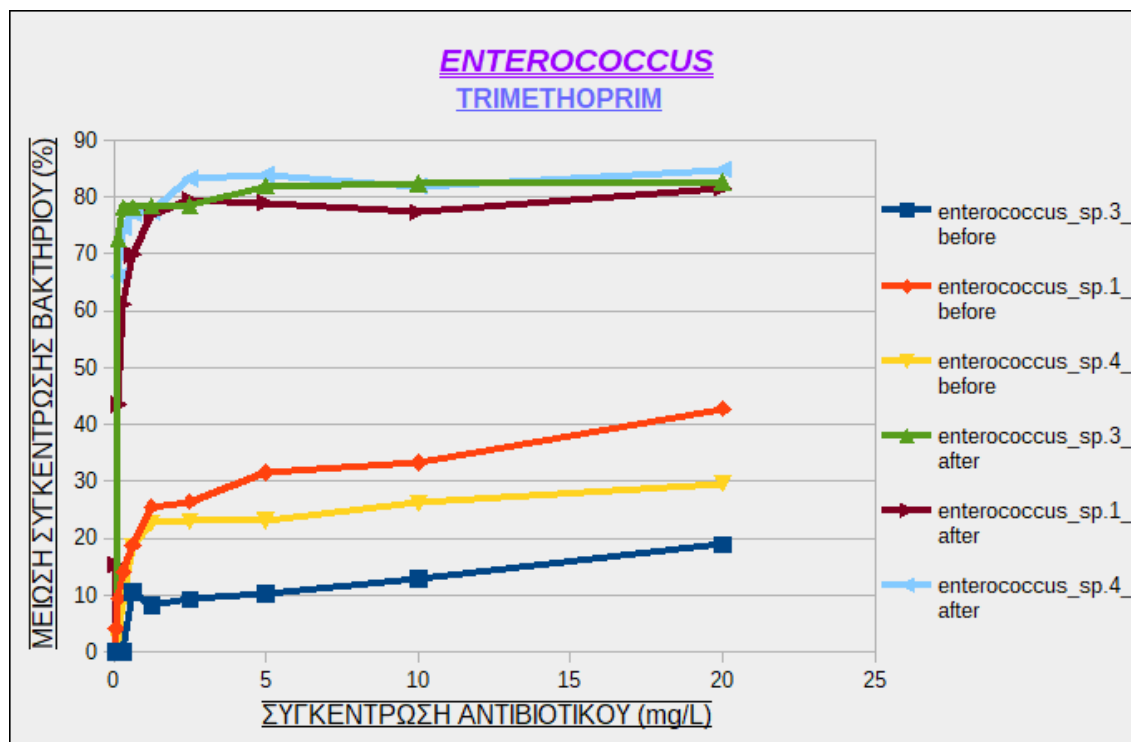


Εικόνα 21: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amikacin, πριν και μετά την οζόνωση.

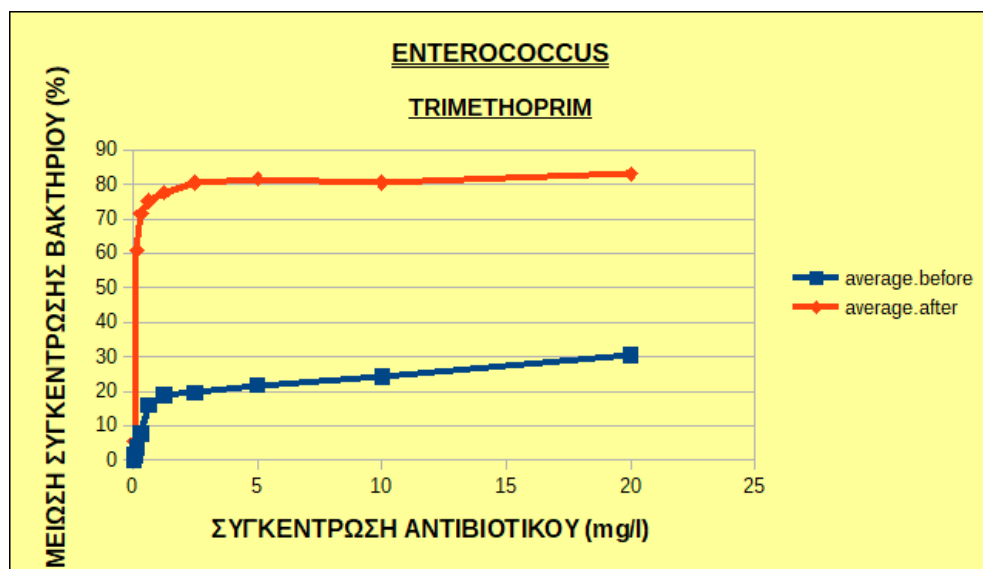


Εικόνα 22: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amikacin, πριν και μετά την οζόνωση.

Το βακτήριο *Enterococcus sp.* γίνεται περισσότερο ευαίσθητο στην χρήση της Αμικασίνης. Παρά το γεγονός πως οι μεταβολές δεν είναι πολύ έντονες, είναι ξεκάθαρο ότι το προφίλ ανθεκτικότητας επηρεάζεται, και όλα τα στελέχη αντιδρούν με συνέπεια.

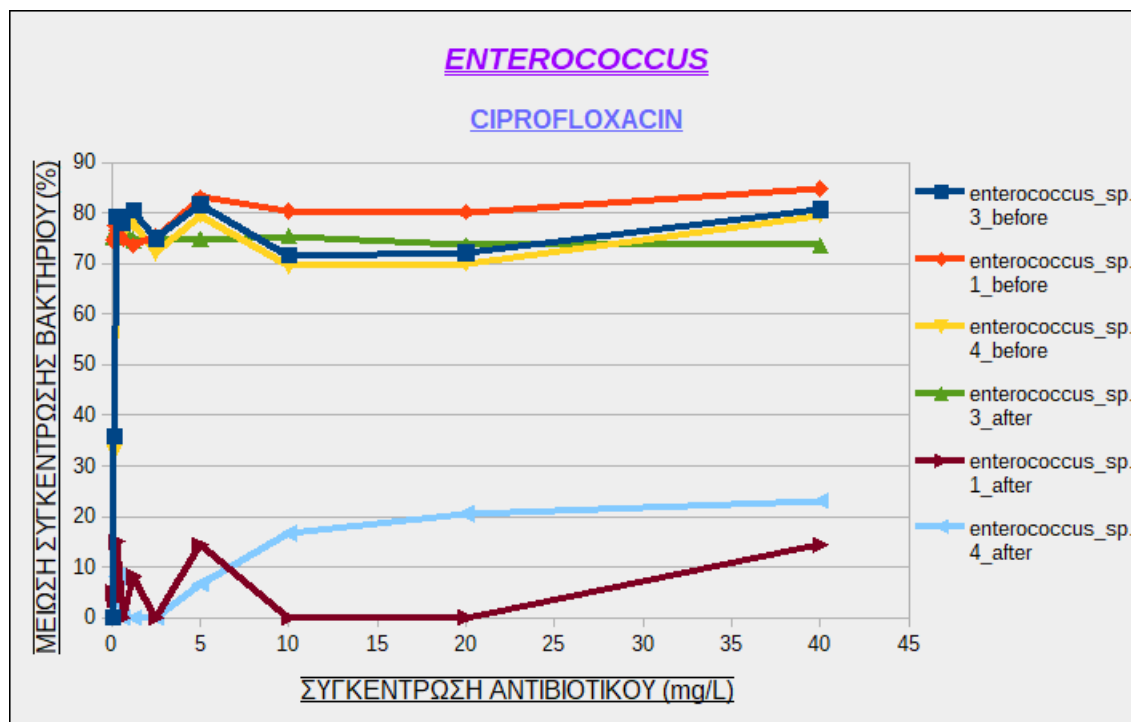


Εικόνα 23: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Enterococcus* sp.σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Trimethoprim, πριν και μετά την οζόνωση.

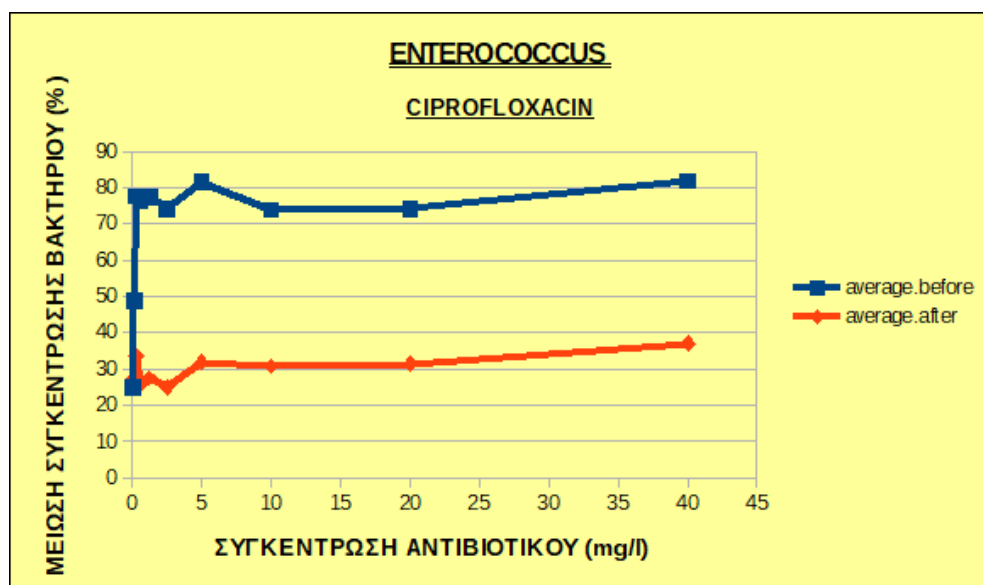


Εικόνα 24: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Enterococcus* sp.σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Trimethoprim, πριν και μετά την οζόνωση.

Ο εντερόκοκκος στην συγκεκριμένη περίπτωση παρουσιάζει εντονότερη ευαισθησία, αλλάζοντας κατά πολύ το προφίλ του.

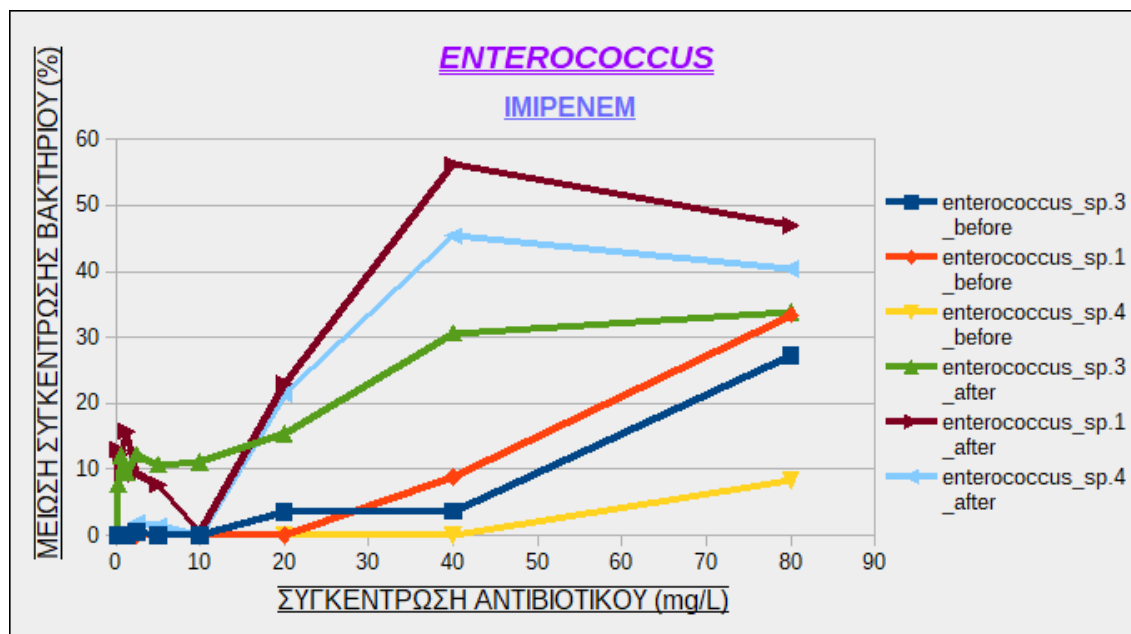


Εικόνα 25: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin, πριν και μετά την οζόνωση.

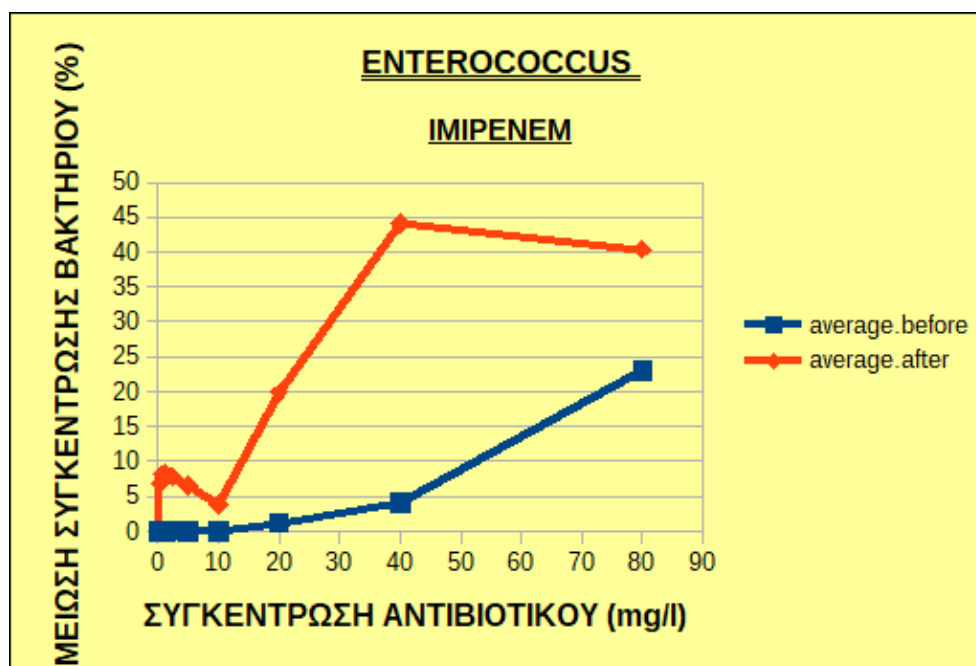


Εικόνα 26: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin, πριν και μετά την οζόνωση.

Φαίνεται πως το βακτήριο μετά την εφαρμογή του όζοντος παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην Σiproφλοξασίνη (Ciprofloxacin).

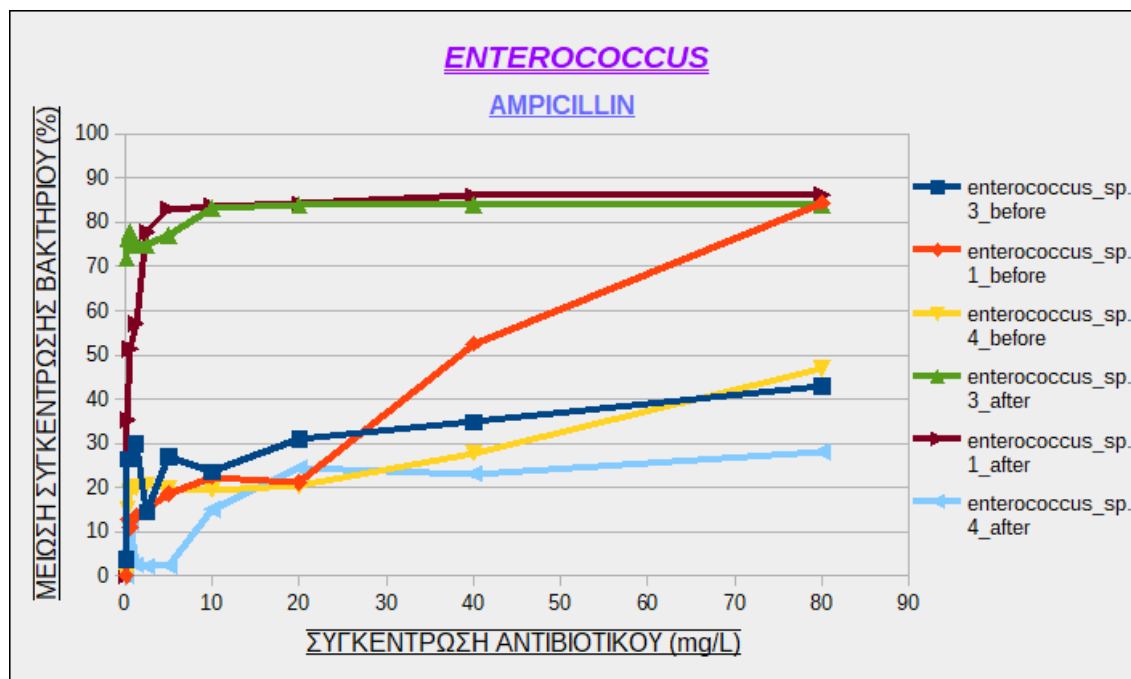


Εικόνα 27: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Enterococcus* sp.σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Imipenem, πριν και μετά την οζόνωση.

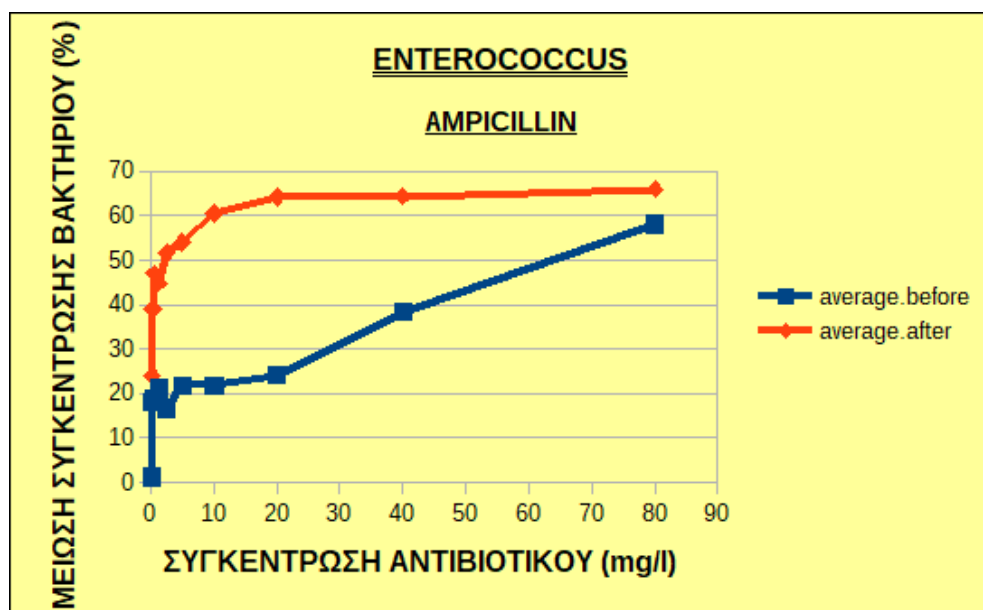


Εικόνα 28: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Enterococcus* sp.σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Imipenem, πριν και μετά την οζόνωση.

Σε γενικές γραμμές μετά την οζόνωση παρατηρείται εμφάνισης ευαισθησίας του βακτηρίου στο αντιβιοτικό.

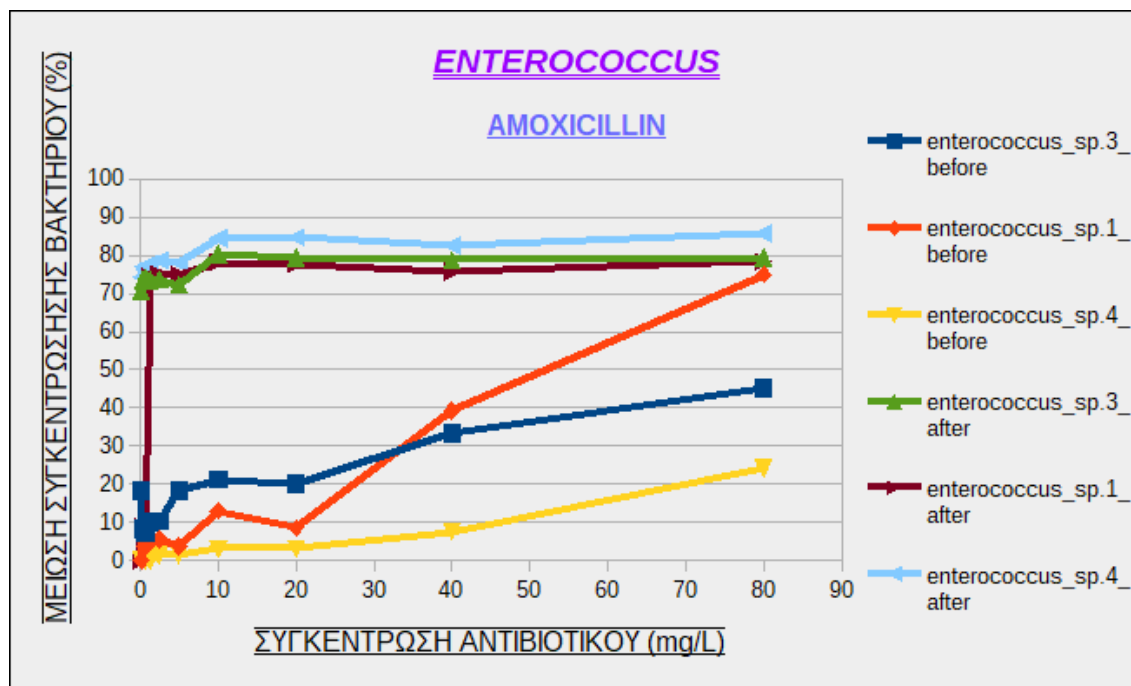


Εικόνα 29: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ampicillin, πριν και μετά την οζόνωση.

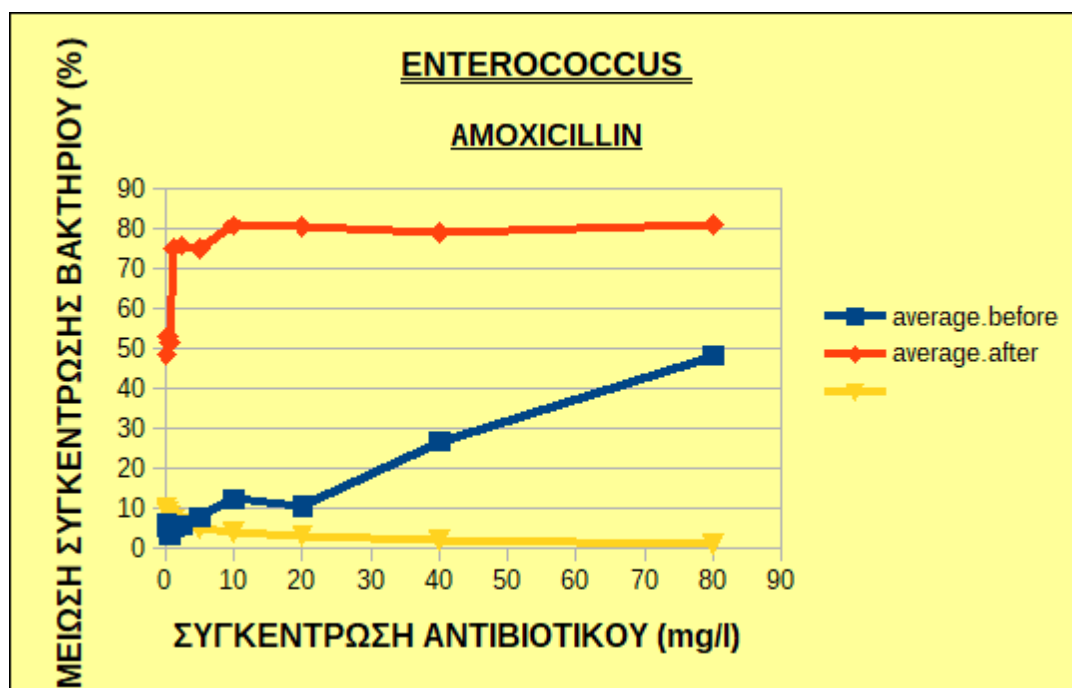


Εικόνα 30: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ampicillin, πριν και μετά την οζόνωση.

Φαίνεται πως το βακτήριο μετά την οζόνωση εμφανίζει κάποια ευαισθησία στο αντιβιοτικό, η οποία είναι δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα με την αύξηση του αντιβιοτικού αλλά παραμένει αρκετά υψηλή από τις μικρές δόσεις της Αμπικιλίνης.



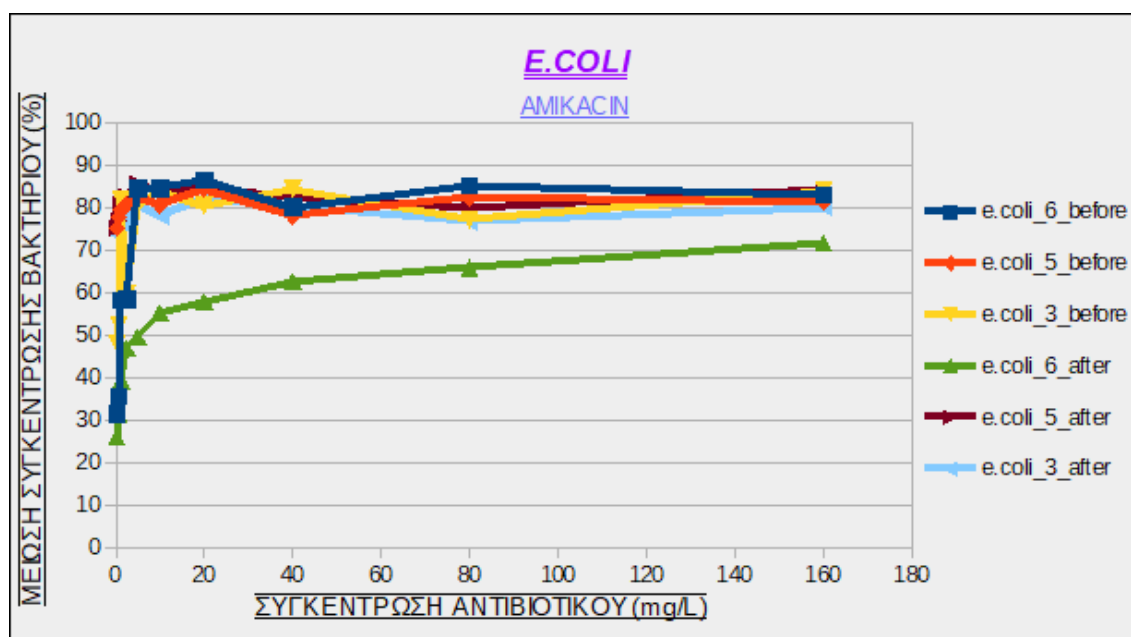
Εικόνα 31: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Enterococcus* sp.σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amoxicillin, πριν και μετά την οζόνωση.



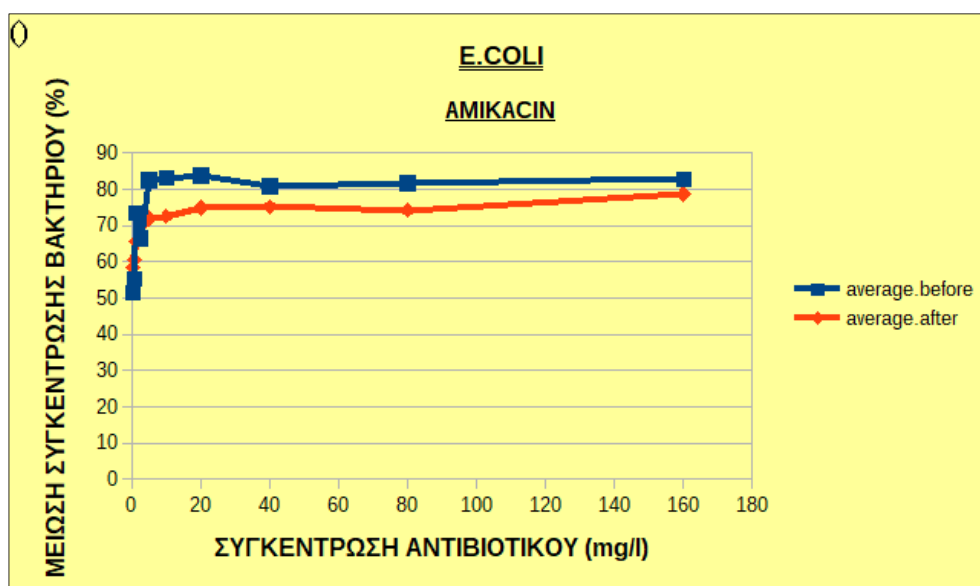
Εικόνα 32: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Enterococcus* sp.σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amoxicillin, πριν και μετά την οζόνωση.

Μετά τη διαδικασία της οζόνωσης, φαίνεται καθαρά πως το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης του βακτηρίου αυξάνεται δραματικά, από τις πλέον χαμηλές συγκεντρώσεις Αμοξυκιλλίνης έως και τις υψηλότερες.

- *E. coli*

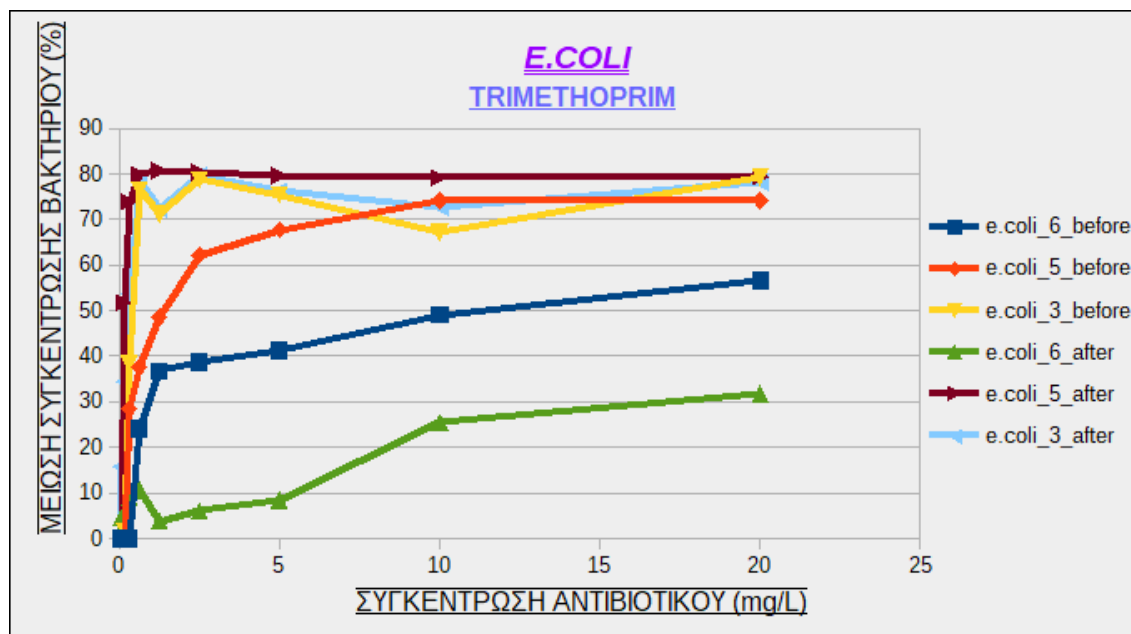


Εικόνα 33: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *E. coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amikacin, πριν και μετά την οζόνωση.

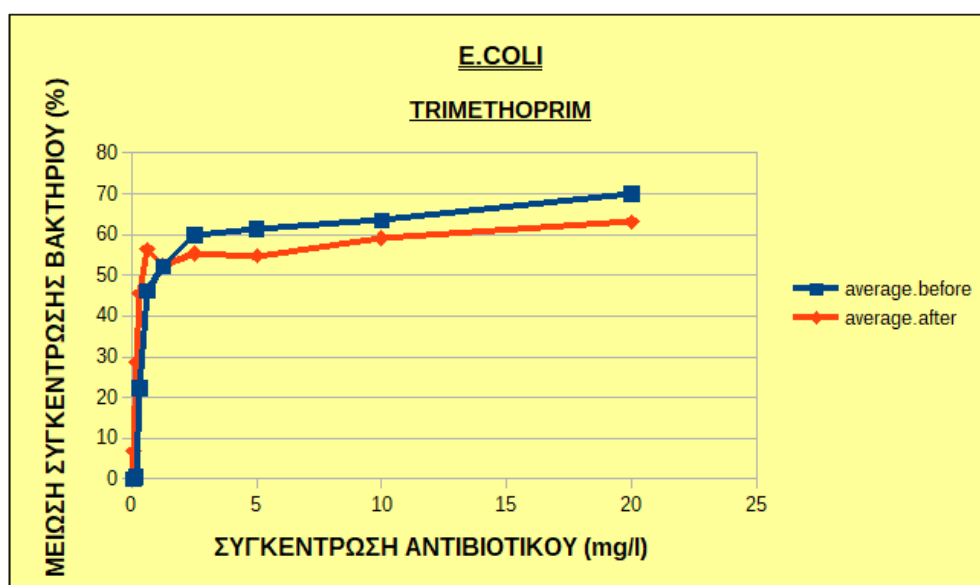


Εικόνα 34: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *E. coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amikacin, πριν και μετά την οζόνωση.

Παρατηρείται πως σε γενικές γραμμές το βακτήριο μειώνει την ευαισθησία του σε σύγκριση με πριν την οζόνωση, παραμένει όμως αρκετά ευαίσθητο και μετά από αυτή.

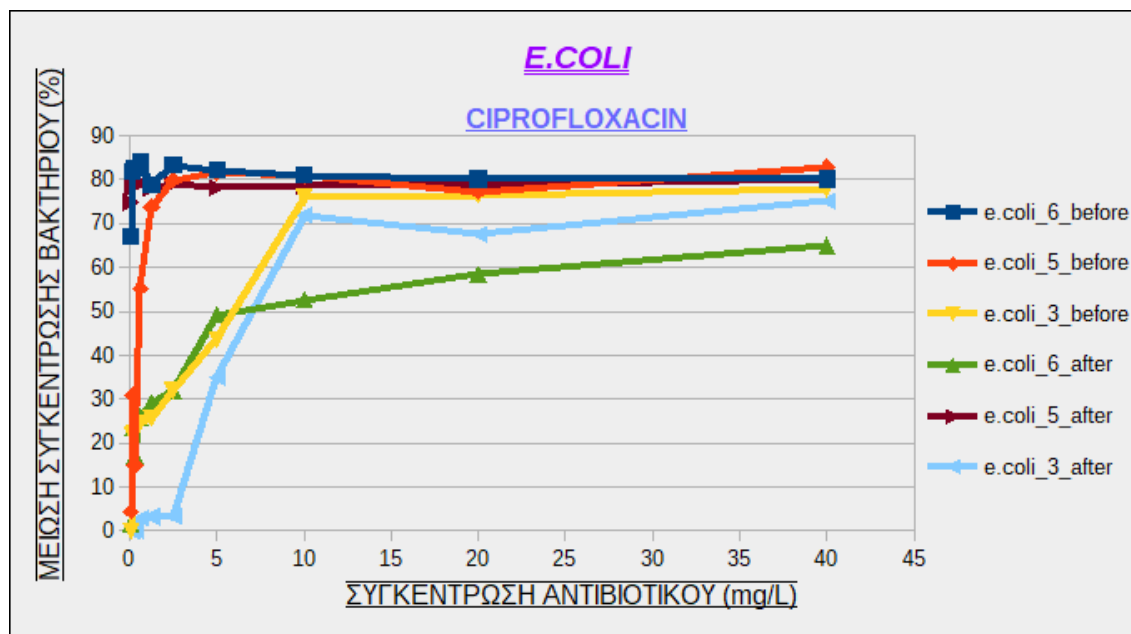


Εικόνα 35: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *E. coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Trimethoprim, πριν και μετά την οζόνωση.

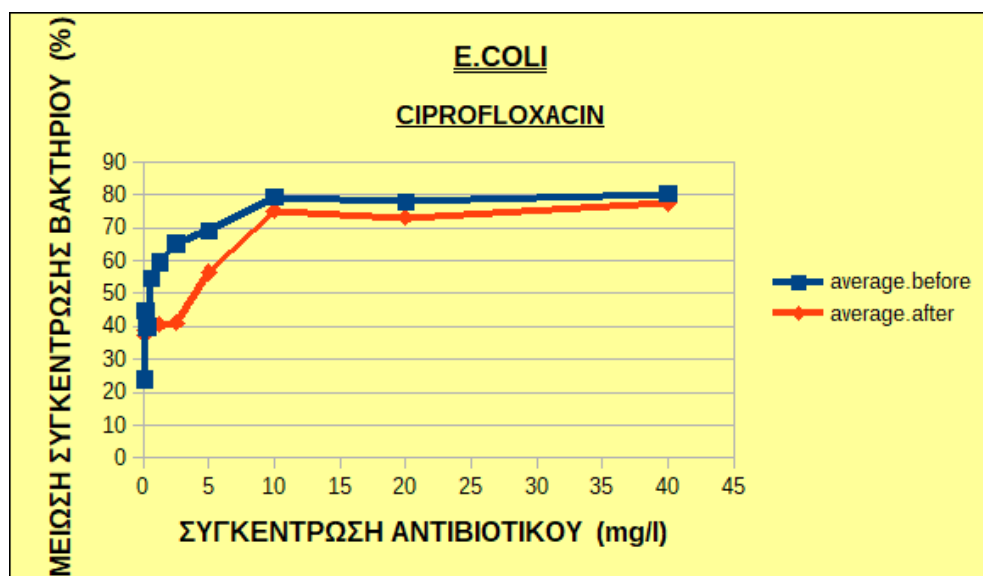


Εικόνα 36: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *E. coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Trimethoprim, πριν και μετά την οζόνωση.

Σε γενικές γραμμές παρατηρείται μια ελαφριά μείωση της ευαισθησίας μεταβάλλοντας ελαφρώς το προφίλ του βακτηρίου.

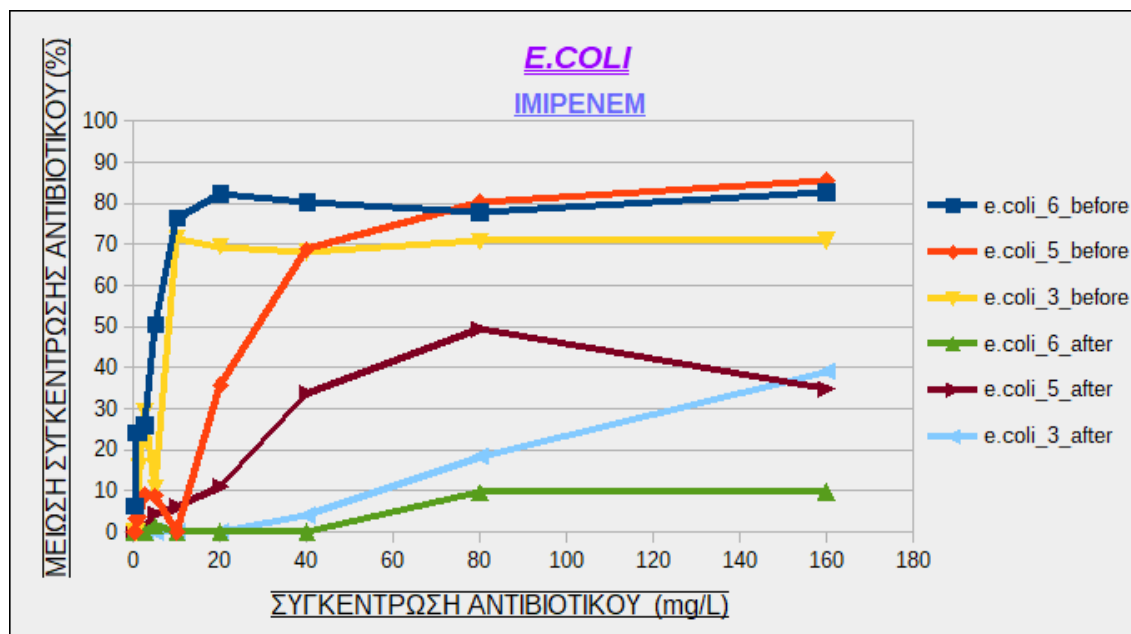


Εικόνα 37: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *E. coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin, πριν και μετά την οζόνωση.

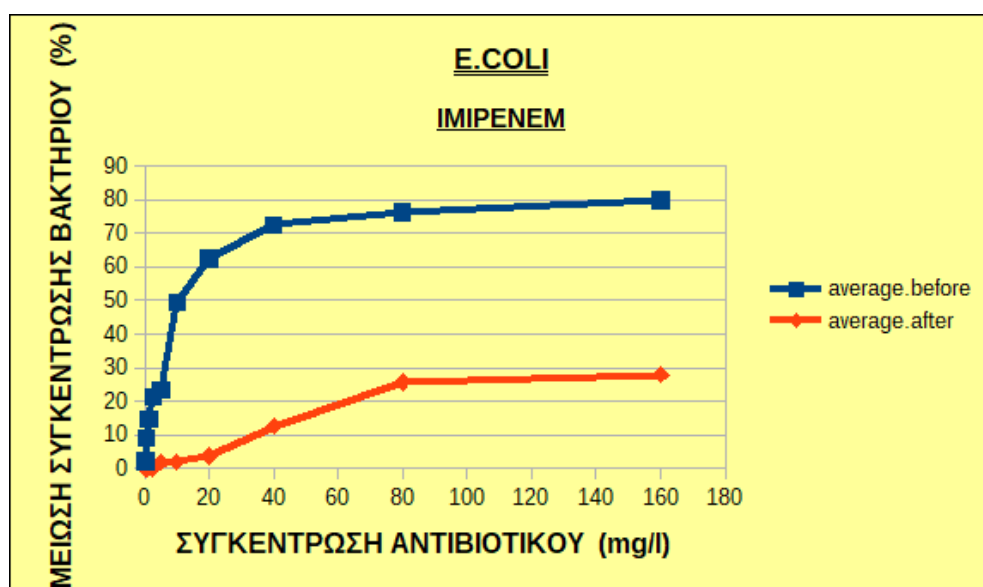


Εικόνα 38: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *E. coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin, πριν και μετά την οζόνωση.

Για ακόμα μια φορά, με την εφαρμογή της οζόνωσης το προφίλ ανθεκτικότητας μεταβάλλεται, σε μικρό βαθμό αλλά ευδιάκριτα, κάνοντας το βακτήριο λιγότερο ευαίσθητο στο αντιβιοτικό από πριν.

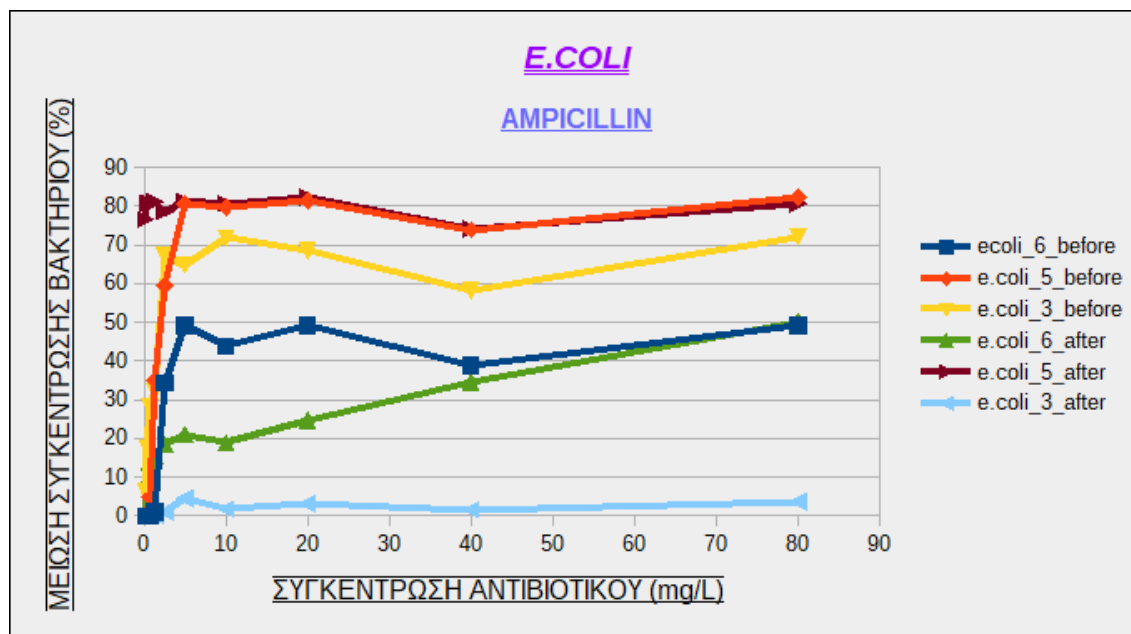


Εικόνα 39: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *E. coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Imipenem, πριν και μετά την οζόνωση.

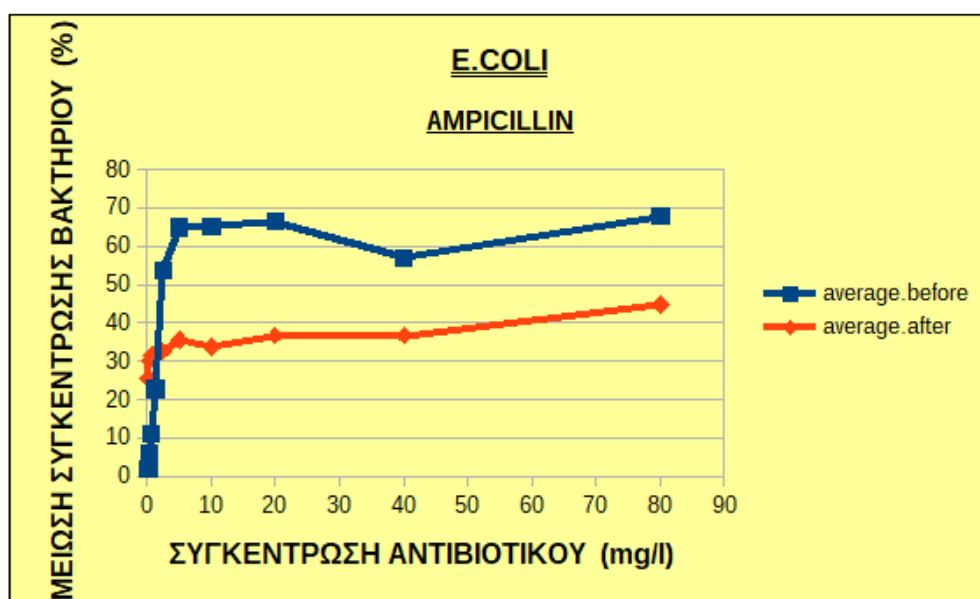


Εικόνα 40: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *E. coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Imipenem, πριν και μετά την οζόνωση.

Από τις μέσες τιμές των αποτελεσμάτων των στελεχών, είναι αρκετά ξεκάθαρο ότι το προφίλ ανθεκτικότητας επηρεάζεται, και όλα τα στελέχη αντιδρούν με συνέπεια.

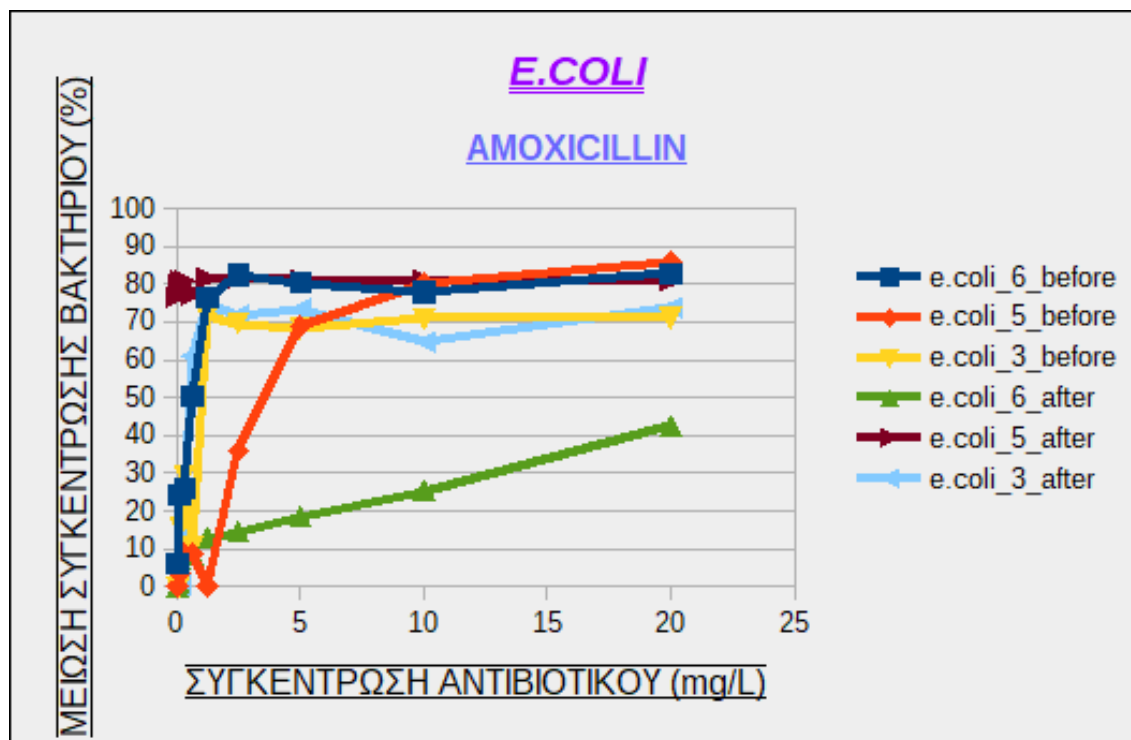


Εικόνα 41: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *E. coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ampicillin, πριν και μετά την οζόνωση.

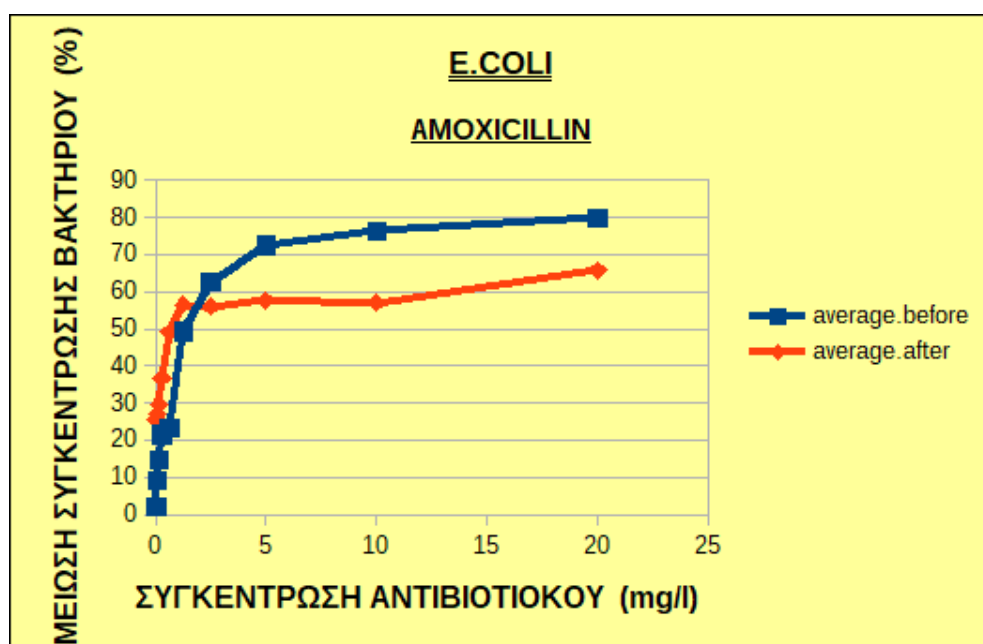


Εικόνα 42: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *E. coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ampicillin, πριν και μετά την οζόνωση.

Συνολικά, φαίνεται πως μετά την οζόνωση το βακτήριο παρουσιάζει κάποια ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Ampicillin, μεταβάλλοντας έτσι αρκετά το προφίλ του.



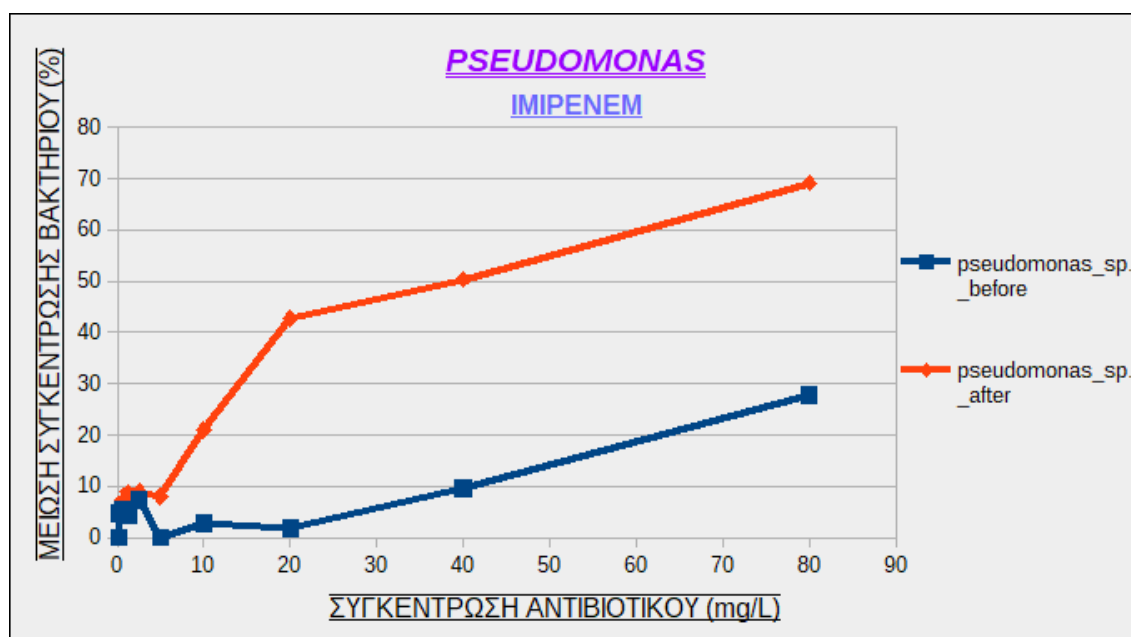
Εικόνα 43: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *E. coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Αμοξικιλίνη, πριν και μετά την οζόνωση.



Εικόνα 44: Μέση τιμή της μείωσης της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *E. coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Αμοξικιλίνη, πριν και μετά την οζόνωση.

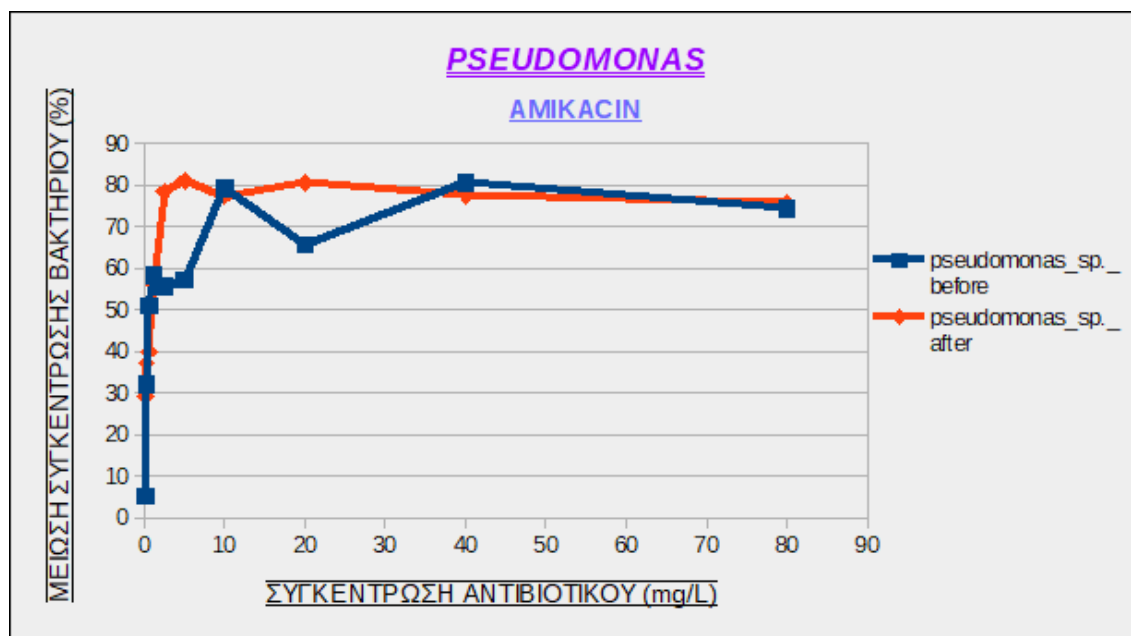
Σε γενικές γραμμές, αν λάβουμε υπόψη το σύνολο των τιμών, φαίνεται πως το προφίλ της ανθεκτικότητας της *E. coli* στην Αμοξικιλίνη δεν αλλάζει δραματικά, παρά μειώνει ελαφρώς την ευαισθησία των στελεχών της σε αυτή.

- *Pseudomonas sp*



Εικόνα 45: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Pseudomonas sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Imipenem, πριν και μετά την οζόνωση.

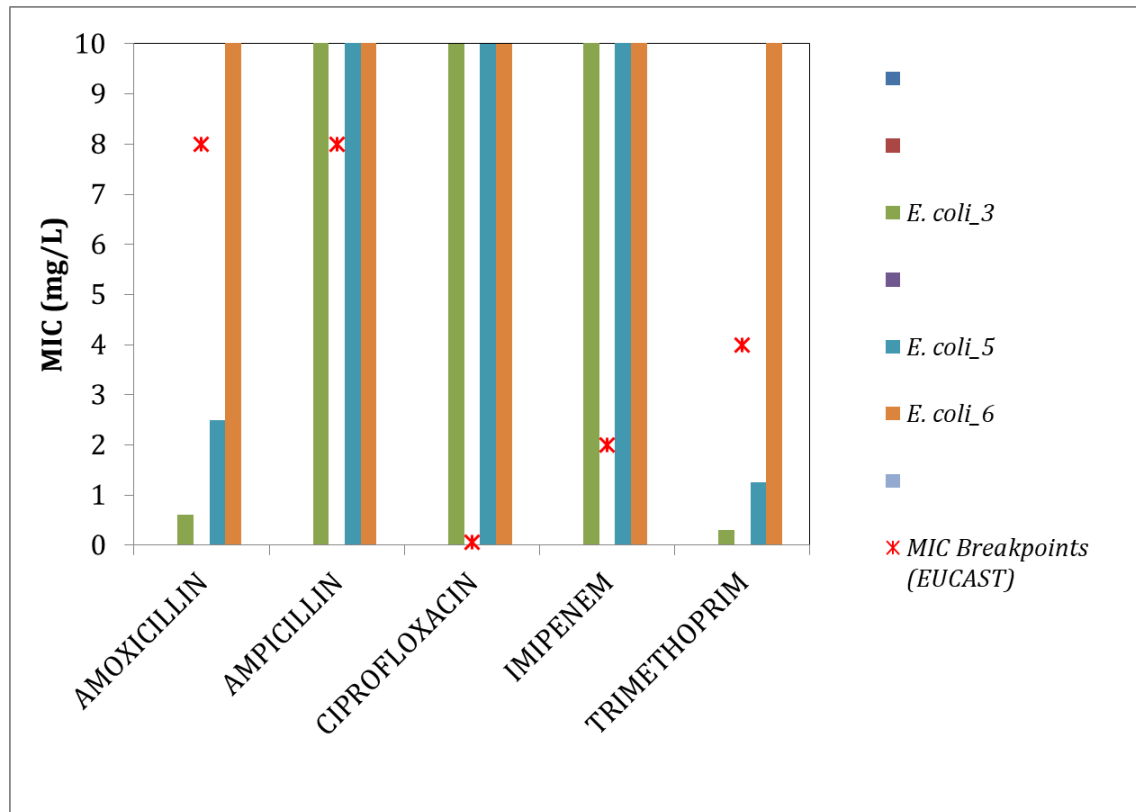
Το στέλεχος παρουσιάζει κάποια ευαισθησία στο αντιβιοτικό ειδικά όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του δεύτερου, κάτι που σημαίνει πως παρατηρείται μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας.



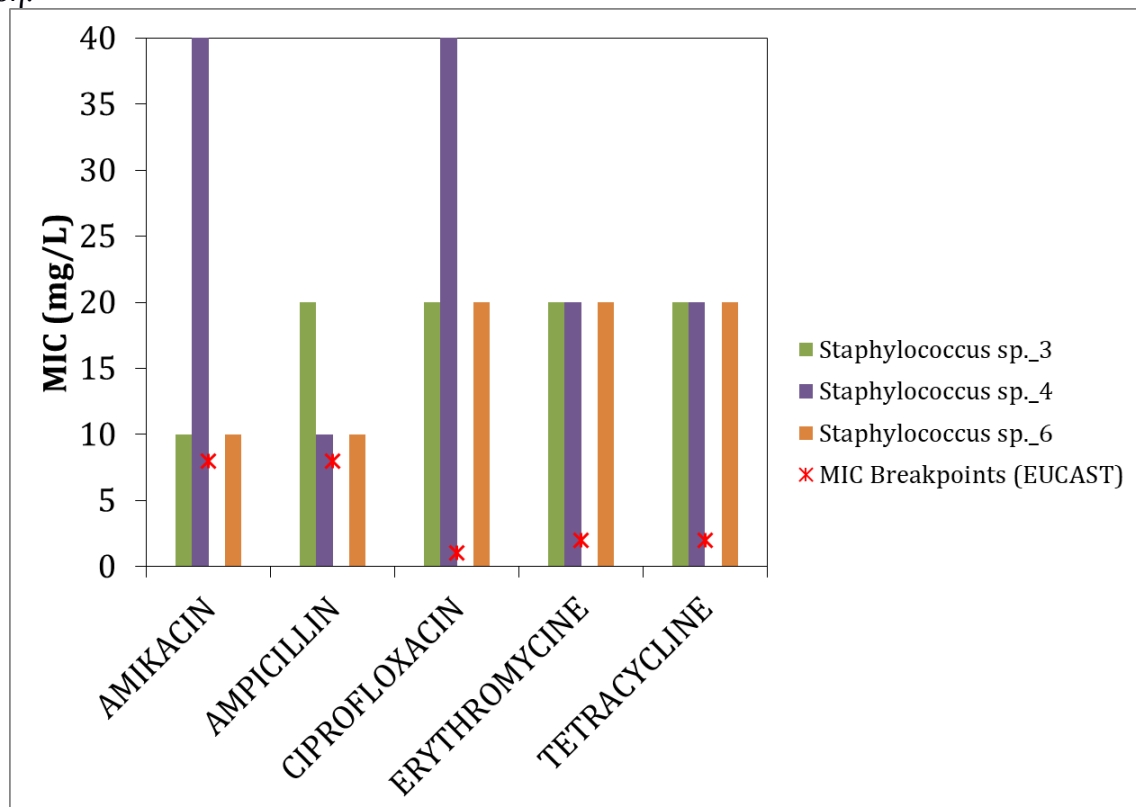
Εικόνα 46: Μείωση της συγκέντρωσης των στελεχών του βακτηρίου *Pseudomonas sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amikacin, πριν και μετά την οζόνωση.

Το προφίλ αυτό δεν δείχνει να μεταβάλλεται δραματικά, παραμένει σχεδόν ίδιο, ίσως με μια ελαφριά μείωση της ευαισθησίας του στελέχους, κυρίως σε μικρότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού.

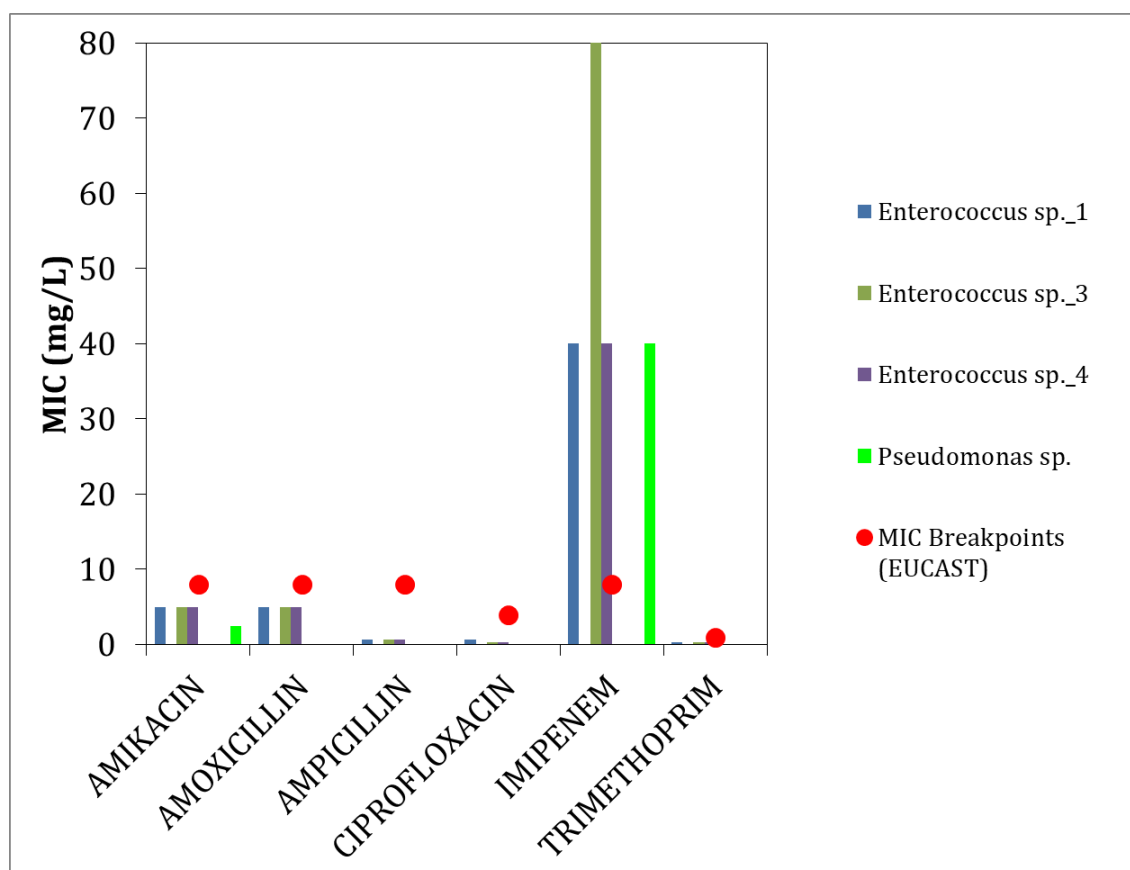
4. 2.3.3 ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΟΖΟΝΩΣΗ



Εικόνα 47: Προφίλ ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά για τα στελέχη του βακτηρίου *E. coli* μετά την οζόνωση.

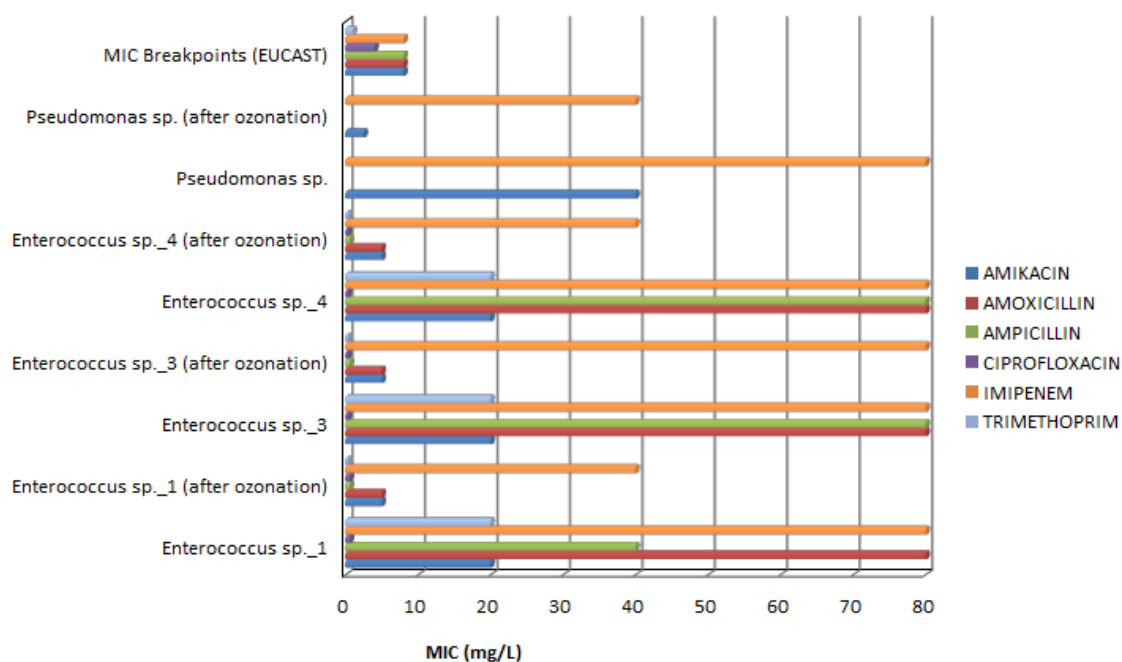


Εικόνα 48: Προφίλ ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά για τα στελέχη του βακτηρίου *Staphylococcus* sp. μετά την οζόνωση.

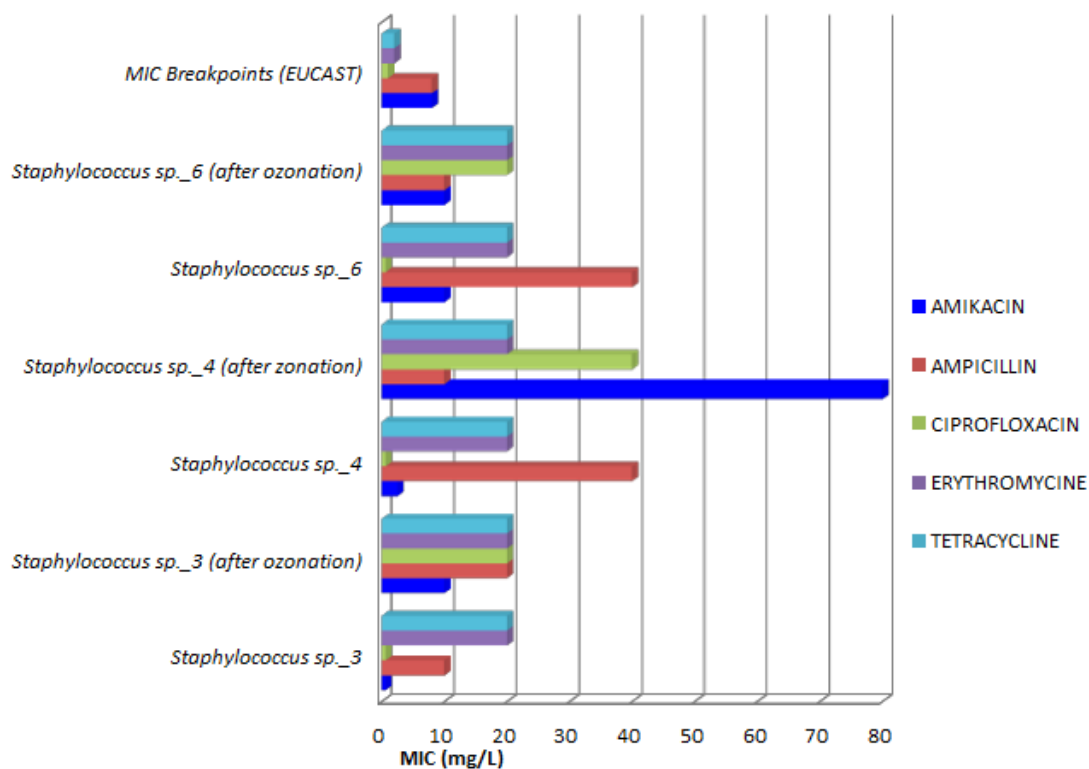


Εικόνα 49: Προφίλ ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά για τα στελέχη των βακτηρίων *Enterococcus sp.* και *Pseudomonas sp.* μετά την οζόνωση.

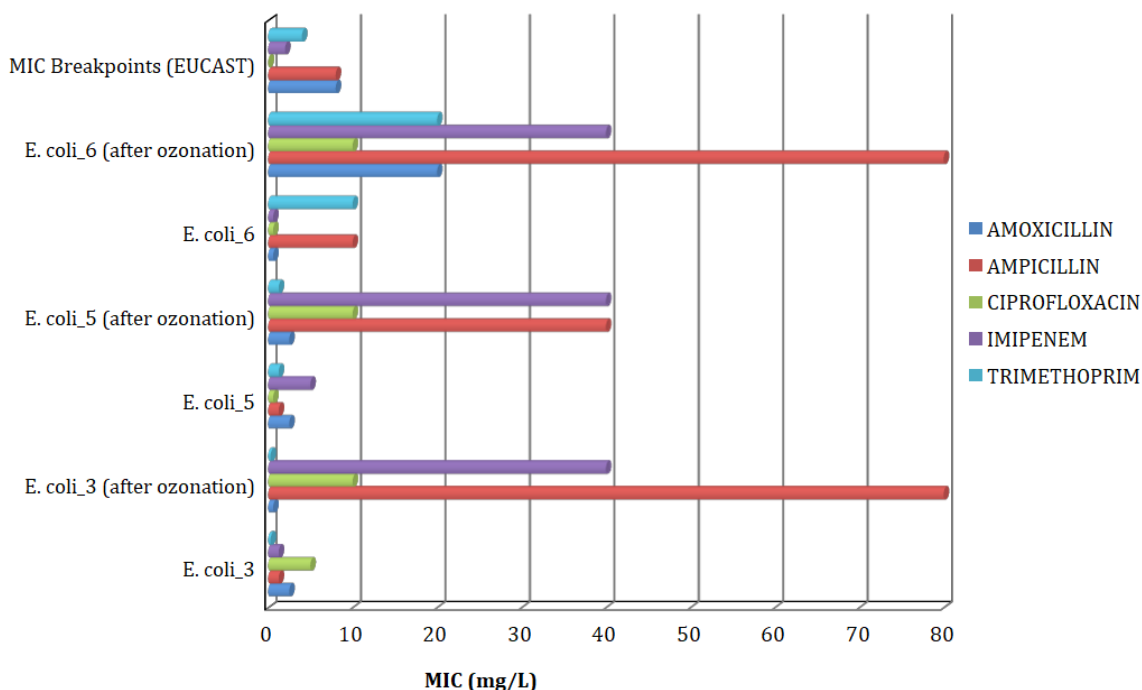
Παρακάτω παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η μεταβολή των στελεχών για κάθε αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε, ανάλογα με το βακτήριο.



Εικόνα 50: Μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας για τα βακτήρια *Enterococcus* sp. και *Pseudomonas* sp.



Εικόνα 51: Μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας για το βακτήριο *Staphylococcus* sp.



Εικόνα 52: Μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας για το βακτήριο *E.coli*

Σε γενικές γραμμές, μετά την οζόνωση το προφίλ ανθεκτικότητας μεταβάλλεται ως εξής.

Όλα τα στελέχη του βακτηρίου *Staphylococcus sp.* που εξετάστηκαν είναι ανθεκτικά σε όλα τα αντιβιοτικά, ενώ πριν την οζόνωση τα στελέχη 3 και 4 εμφάνιζαν ευαισθησία στο Amikacin, και όλα τα στελέχη εμφάνιζαν ευαισθησία στο Ciprofloxacin. (Με τον όρο “όλα” εννοούμε φυσικά όλα όσα πήραν μέρος στην οζόνωση και ξαναεξετάστηκαν.)

Η *E. coli* μετά την οζόνωση παρουσιάζει μια γενικότερη ανθεκτικότητα, σε αντίθεση με πριν. Τα στελέχη 3 και 5 εμφανίζουν ευαισθησία στα αντιβιοτικά Amoxicillin και Trimethoprim.

Μετά την οζόνωση ο εντερόκοκκος δείχνει να αποκτά μια γενικότερη ευαισθησία σε όλα τα αντιβιοτικά εκτός του Imipenem, όπου όλα τα στελέχη δείχνουν ανθεκτικά, σε αντίθεση με όλα τα στελέχη για τα υπόλοιπα αντιβιοτικά που δείχνουν ευαισθησία.

Η ψευδομονάδα δείχνει να αποκτά ευαισθησία στο Amikacin, ενώ διατηρεί την ανθεκτικότητά της στη δράση του Imipenem.

Παρατηρήθηκε κατά τη διαδικασία, ότ τα Gram (+) στελέχη ανέπτυξαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σύγκριση με τα Gram (-).

Αυτό που θα πρέπει να επισημανθεί είναι πως σε πολλές περιπτώσεις τα στελέχη αυξομειώνουν το βαθμό ευαισθησίας και ανθεκτικότητας, αλλά αυτό δεν τα αλλάζει κατηγορία. Μπορεί δηλαδή κάποιο «ανθεκτικό» στέλεχος να μειώσει την ανθεκτικότητά του σε κάποιο αντιβιοτικό με έντονη και εμφανή διαφορά, αλλά η αλλαγή αυτή να μην είναι αρκετή για να το κατατάξει πλέον στην κατηγορία «ευαίσθητο». Η μεταβολή όμως αυτή είναι σημαντική και πρέπει να ληφθεί υπόψη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε γενικές γραμμές, μέσα από όλη αυτή την πειραματική διαδικασία προέκυψαν κάποια βασικά, συμπεράσματα για την ανθεκτικότητα των βακτηρίων που εξετάστηκαν σε μια πληθώρα αντιβιοτικών.

- Σημαντική παρουσία βακτηρίων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά στο υδάτινο περιβάλλον (κυρίως για *Staphylococcus sp.* και *Enterococcus sp.* που παρουσιάζουν αρκετά υψηλή ανθεκτικότητα σε ποικιλία αντιβιοτικών).
- Η οζόνωση φαίνεται να αποτελεί αποτελεσματική μέθοδο απολύμανσης, ενώ καταγράφηκε υψηλός ρυθμός αδρανοποίησης για όλα τα εξεταζόμενα στελέχη.
- Το προφίλ ανθεκτικότητας επηρεάστηκε σε κάποιο βαθμό σε όλες τις περιπτώσεις, ανάλογα με το κάθε στέλεχος βακτηρίου
- Όσον αφορά στη MIC, δηλαδή στη Μέθοδο Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας, οι πλέον αξιοσημείωτες αλλαγές παρατηρήθηκαν για τον *Enterococcus sp.* ενώ οι μικρότερες αλλαγές παρουσιάζονται στην *Pseudomonas sp.* κάτι που μπορεί όμως να οφείλεται στο γεγονός πως δεν είχαμε αρκετά δείγματα για μελέτη. Συνεπώς δεν μπορεί αυτό να θεωρηθεί καθοριστικό.
- Η απολυμαντική διαδικασία (οζόνωση), φαίνεται να επηρεάζει το ποσοστό των βακτηρίων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα καθώς και το προφίλ ανθεκτικότητας αυτών. Παρατηρείται ανάπτυξη ανθεκτικότητας ή ευαισθησίας, τροποποίηση των αποτελεσμάτων της MIC καθώς και πιθανή εμφάνιση και ραγδαία εξάπλωση βακτηρίων με υψηλή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.

- Μετά την οζόνωση η πλειοψηφία των στελεχών του *Staphylococcus sp* παρουσιάζει μείωση της ανθεκτικότητας στη χρήση αντιβιοτικών. Ομοίως και ο *Enterococcus sp*.
- Τα στελέχη της *E. coli* αντίθετα, τείνουν να γίνονται πιο ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, στην πλειοψηφία των στελεχών που εξετάστηκαν.
- Όσον αφορά στα αντιβιοτικά, η πλειοψηφία των στελεχών εμφάνισε μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις στο προφίλ ανθεκτικότητας τους στις εφαρμογές των αντιβιοτικών Ampicillin, και Imipenem, ενώ την μικρότερη επίδραση είχε το αντιβιοτικό Amikacin. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, δεν υπάρχει κάποιο άλλο αντιβιοτικό που να ξεχωρίζει, και η δράση τους κυμαίνεται ανάλογα το βακτήριο.
- Ο κίνδυνος επιπολασμού της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά υπάρχει ακόμα και μετά τις μεθόδους απολύμανσης.

5.1 *Staphylococcus* sp.

5.1.1 AMPICILLIN

Όσον αφορά στην Αμπικιλλίνη (Ampicillin), από τις Εικόνες 11 και 12 βλέπουμε πως μετά την οζόνωση το προφίλ του βακτηρίου *Staphylococcus* sp. αλλάζει εμφανώς. Το ποσοστό της μείωσης της συγκέντρωσης του βακτηρίου αυξάνεται τόσο που θα μπορούσαμε να πούμε πως οι τιμές είναι σχεδόν διπλάσιες. Ο ρυθμός με τον οποίο μειώνεται η συγκέντρωση του βακτηρίου ποικίλει ανάλογα με το κάθε στέλεχος αλλά από το γράφημα των μέσων τιμών, παρατηρούμε πως συνολικά ο ρυθμός μετά την οζόνωση δεν αποκλίνει ιδιαίτερα από αυτόν που παρατηρήθηκε πριν.

5.1.2 CIPROFLOXACIN

Όσον αφορά στην Σιπροφλοξασίνη (Ciprofloxacin), από τις Εικόνες 13 και 14 βλέπουμε πως μετά την οζόνωση το προφίλ του βακτηρίου *Staphylococcus* sp. δεν έχει πολύ έντονες διαφορές, με εξαίρεση το ένα μόνο στέλεχος από τα τρία που η διαφορά πριν και μετά, είναι αρκετά εμφανής. Η μείωση της συγκέντρωσης του βακτηρίου φαίνεται να κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα στα δύο από τα τρία στελέχη και στο ποσοστό αλλά και στον ρυθμό μείωσης. Το ένα στέλεχος που αποκλίνει αλλάζει το μέσο όρο των τιμών (*Staphylococcus* sp.4). Συνολικά, μπορούμε να συμπεράνουμε πως μετά την οζόνωση το βακτήριο γίνεται ελαφρώς πιο ανθεκτικό στο αντιβιοτικό Ciprofloxacin.

5.1.3 AMIKACIN

Σε γενικές γραμμές, βλέπουμε από τις Εικόνες 15 και 16 πως και για την Αμικασίνη (Amikacin), ισχύουν τα ίδια με την Σιπροφλοξασίνη. Για ακόμα μία φορά, όπως και στις δύο προηγούμενες (Ampicillin Ciprofloxacin), το στέλεχος *Staphylococcus* sp.4 αποκλίνει από τα άλλα δύο στελέχη. Συνολικά, φαίνεται ότι και εδώ οι διαφορές στο ποσοστό και στο ρυθμό μείωσης του βακτηρίου είναι μικρές, με το ποσοστό να μειώνεται ελαφρώς και ο ρυθμός να μειώνεται και να παραμένει πιο σταθερός. Κατά συνέπεια, καταλήγουμε πως το βακτήριο γίνεται ελαφρώς πιο ανθεκτικό στο αντιβιοτικό Amikacin.

5.1.4 ERYTHROMYCINE

Τα αποτελέσματα της Ερυθρομυκίνης (Erythromycine), είναι λίγο περισσότερο ασαφή, και δίνουν μια περίεργη εικόνα για το προφίλ του βακτηρίου, Εικόνες 17 και 18. Το στέλεχος *Staphylococcus* sp.4 δείχνει να αποκτά μια ευαισθησία μετά την εφαρμογή του όζοντος στις μικρές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού, και να κρατά έναν πιο σταθερό ρυθμό σε σχέση με πριν την οζόνωση. Το στέλεχος *Staphylococcus* sp.6 φαίνεται ότι επηρεάζεται πολύ περισσότερο καθώς μετά την

οξόνωση αυξάνεται κατά πολύ το ποσοστό μείωσης της συγκεντρώσης του βακτηρίου, ενώ τέλος το στέλεχος *Staphylococcus sp.3* δείχνει να γίνεται άκρως ανθεκτικό στο αντιβιοτικό καθώς ελαχιστοποιεί το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης του. Λαμβάνοντας υπόψη τις μέσες τιμές και από τα τρία στελέχη συμπεραίνουμε πως το βακτήριο εμφανίζει μια μεγαλύτερη ευαισθησία στο αντιβιοτικό στις χαμηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού ενώ με την αύξηση της συγκέντρωσης του, δείχνει να κρατά σταθερό ρυθμό και αντίσταση σε περεταίρω μείωση της συγκέντρωσης.

5.1.5 TETRACYCLINE

Όσον αφορά στην Τετρακυκλίνη (Tetracycline), από τις Εικόνες 19 και 20, παρατηρούμε αρκετές ομοιότητες με την Ερυθρομυκίνη, όπου κι εδώ τα στελέχη παρουσιάζουν μεταξύ διαφορές στην αντίδραση τους στο αντιβιοτικό μετά την οξόνωση. Το στέλεχος *Staphylococcus sp.4* δείχνει να αποκτά μια ευαισθησία μετά την εφαρμογή του όζοντος στις μικρές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού, και να κρατά έναν πιο σταθερό ρυθμό σε σχέση με πριν την οξόνωση, όπως και στην Ερυθρομυκίνη. Το στέλεχος *Staphylococcus sp.6* αντιδρά ομοίως, καθώς μετά την οξόνωση, το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσής του αυξάνεται θεαματικά. Το στέλεχος *Staphylococcus sp.3* φαίνεται να αυξάνει την ευαισθησία του ελαφρώς σε χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, ενώ όσο αυξάνεται η ανθεκτικότητά του, και έχει ακριβώς την αντίθετη πορεία από αυτή που είχε πριν την οξόνωση. Λαμβάνοντας για μία ακόμα φορά υπόψη τις μέσες τιμές, θα μπορούσαμε να πούμε πως το βακτήριο παρουσιάζει μια μεγαλύτερη ευαισθησία στο αντιβιοτικό σε μικρές συγκεντρώσεις, ενώ όσο αυτές αυξάνονται δείχνει να σταθεροποιεί το ρυθμό μείωσης, σε αντίθεση με το προφίλ του πριν την εφαρμογή του όζοντος που ενώ αρχικά φαίνεται ανθεκτικό, αυξάνει το ποσοστό μείωσης της συγκεντρώσης του βακτηρίου με γρηγορους ρυθμούς.

5.2 *Enterococcus* sp.

5.2.1 AMIKACIN

Τα αποτελέσματα της Αμικασίνης (Amikacin), δίνουν ένα σαφές αποτέλεσμα για το προφίλ του βακτηρίου, Εικόνες 21 και 22. Όλα τα στελέχη δείχνουν μια ευαισθησία πριν την οζόνωση, η οποία αυξάνεται μετά από αυτή, σχεδόν μεγιστοποιώντας το ποσοστό μείωσης του εντερόκοκκου με την εφαρμογή του αντιβιοτικού. Σε αντίθεση με το βακτήριο *Staphylococcus* sp. το βακτήριο *Enterococcus* sp. γίνεται περισσότερο ευαίσθητο στην χρήση της Αμικασίνης. Παρά το γεγονός πως οι μεταβολές δεν είναι πολύ έντονες, είναι ξεκάθαρο ότι το προφίλ ανθεκτικότητας επηρεάζεται, και όλα τα στελέχη αντιδρούν με συνέπεια.

5.2.2 TRIMETHOPRIM

Οι μεταβολές στην περίπτωση της Τριμεθοπρίμης (Trimethoprim), είναι αρκετά πιο ξεκάθαρες και όλα τα στελέχη δείχνουν παρόμοια αντίδραση στο αντιβιοτικό. Όπως παρατηρείται στις Εικόνες 23 και 24, μετά την οζόνωση, το βακτήριο φαίνεται πως αυξάνει σχεδόν στο τριπλάσιο το ποσοστό μείωσης του, από τις χαμηλές μέχρι και τις υψηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού, με συνέπεια και όμοιο ρυθμό και για τα τρία στελέχη που εξετάστηκαν. Κατά συνέπεια, ο εντερόκοκκος στην συγκεκριμένη περίπτωση παρουσιάζει εντονότερη ευαισθησία, αλλάζοντας κατά πολύ το προφίλ του.

5.2.3 CIPROFLOXACIN

Σε αυτή την περίπτωση τα αποτελέσματα δεν είναι όσο εμφανή ήταν στην προηγούμενη. Το στέλεχος *Enterococcus* sp.3 δείχνει να μην επηρεάζεται ιδιαίτερα από τη διαδικασία της οζόνωσης. Σε αντίθεση με τα άλλα δύο στελέχη, που παρουσιάζουν πολύ έντονες διαφορές, Εικόνες 25 και 26. Πριν την οζόνωση τα στελέχη δείχνουν πολύ μεγάλη ευαισθησία στο αντιβιοτικό από τις πλέον χαμηλές συγκεντρώσεις του. Μετά την οζόνωση, τα στελέχη φαίνεται να παρουσιάζουν έντονη ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό, ακόμα και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις του. Λαμβάνοντας υπόψη τις μέσες τιμές, φαίνεται πως το βακτήριο μετά την εφαρμογή του όζοντος παρουσιάζει ανθεκτικότητα στην Σιπροφλοξασίνη (Ciprofloxacin).

5.2.4 IMIPENEM

Όσον αφορά στην Ιμιπενέμη (Imipenem), στις Εικόνες 27 και 28 βλέπουμε πως τα στελέχη του βακτηρίου δείχνουν να αποκτούν κάποια ευαισθησία στο αντιβιοτικό όσο αυξάνεται η δόση του, ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν παρουσιάζει έντονες μεταβολές. Όσον αφορά συγκεκριμένα στα στελέχη, πάλι το στέλεχος *Enterococcus* sp.3 δείχνει την μικρότερη μεταβολή, παρόλ' αυτά είναι εμφανής. Παρατηρώντας τις μέσες τιμές των στελεχών, καταλήγουμε πως μετά την οζόνωση παρατηρείται εμφάνιση ευαισθησίας του βακτηρίου στο αντιβιοτικό.

5.2.5 AMPICILLIN

Από τις Εικόνες 29 και 30 προκύπτει πως η μεταβολή του προφίλ της ανθεκτικότητας του βακτηρίου στην Αμπικιλίνη (Ampicillin), παρουσιάζει κάποια ανομοιομορφία στα στελέχη του. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *Enterococcus sp.4* δεν δείχνει να μεταβάλει ιδιαίτερα το προφίλ του και παρουσιάζει μια ελαφριά μείωση της ευαισθησίας του. Τα δύο άλλα στελέχη από την άλλη, αυξάνουν θεαματικά το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσής τους από τις χαμηλές κι όλες συγκεντρώσεις της Αμπικιλίνης. Από τις μέσες τιμές των στελεχών, φαίνεται πως το βακτήριο μετά την οζόνωση εμφανίζει κάποια ευαισθησία στο αντιβιοτικό, η οποία είναι δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα με την αύξηση του αντιβιοτικού αλλά παραμένει αρκετά υψηλή από τις μικρές δόσης της Αμπικιλίνης, σε αντίθεση με πριν την οζόνωση, που αρχικά εμφάνιζε κάποια ανθεκτικότητα.

5.2.6 AMOXICILLIN

Όσον αφορά στην Αμοξυκιλλίνη (Amoxicillin), τα στελέχη του *Enterococcus sp.* παρουσιάζουν συνέπεια ως προς την μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητάς τους. Στις Εικόνες 31 και 32 φαίνεται πως πριν την οζόνωση το βακτήριο παρουσιάζει κάποια ανθεκτικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού, κάτι που ανατρέπεται όσο οι συγκεντρώσεις αυτές αυξάνονται. Μετά τη διαδικασία της οζόνωσης, φαίνεται καθαρά πως το ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης του βακτηρίου αυξάνεται δραματικά, από τις πλέον χαμηλές συγκεντρώσεις Αμοξυκιλλίνης έως και τις υψηλότερες. Στην περίπτωση αυτή, η μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας είναι ξεκάθαρη.

5.3.1 AMIKACIN

Στις Εικόνες 33 και 34, φαίνεται η μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών της *E. coli* για την Αμικασίνη (Amikacin). Σε γενικές γραμμές, φαίνεται πως δεν παρατηρούνται μεγάλες αλλαγές στο προφίλ. Πριν την οζόνωση τα ποσοστά μείωσης της συγκέντρωσης του βακτηρίου είναι αρκετά υψηλά, και παραμένουν υψηλά και μετά την οζόνωση. Με εξαίρεση το στέλεχος *E. coli* 6, όπου υπάρχει ξεκάθαρα μια μείωση της ευαισθησίας (παραμένει βέβαια σε υψηλά επίπεδα), τα άλλα δύο στελέχη δεν έχουν ξεκάθαρη μείωση ή αύξηση καθώς μεταβάλλεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του αντιβιοτικού, είτε θετικά είτε αρνητικά. Από τις μέσες τιμές των στελεχών, παρατηρείται πως σε γενικές γραμμές το βακτήριο μειώνει την ευαισθησία του σε σύγκριση με πριν την οζόνωση, παραμένει όμως αρκετά ευαίσθητο και μετά από αυτή.

5.3.2 TRIMETHOPRIM

Για ακόμα μία φορά, τα στελέχη του βακτηρίου αντιδρούν με ασυνέπεια απέναντι στη μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας του βακτηρίου για την Τριμεθοπρίμη (Trimethoprim), όπως φαίνεται στις Εικόνες 35 και 36. Το στέλεχος *E. coli* 6 φαίνεται να μειώνει την ευαισθησία του μετά την οζόνωση, σε αντίθεση με το στέλεχος *E. coli* 5, το οποίο πριν την οζόνωση παρουσιάζει ήδη μεγάλη ευαισθησία, ενώ μετά η ευαισθησία αυτή αυξάνεται ακόμα περισσότερο. Τέλος το στέλεχος *E. coli* 3 δεν φαίνεται να επηρεάζεται ιδιαίτερα καθώς και πριν και μετά εμφανίζει μεγάλα ποσοστά μείωσης της συγκέντρωσης του βακτηρίου, και ίσως να μπορούσαμε να πούμε πως η ευαισθησία αυτή μειώνεται ελάχιστα. Καταλαβαίνουμε λοιπόν πως τα αποτελέσματα αυτά δεν προσδιορίζουν οριστικά το αποτέλεσμα της μεταβολής του προφίλ ανθεκτικότητας. Λαμβάνοντας υπόψη τις μέσες τιμές, το πόρισμα φαίνεται να κλίνει περισσότερο προς το 3^ο στέλεχος, κάτι που σημαίνει πως σε γενικές γραμμές παρατηρείται μια ελαφριά μείωση της ευαισθησίας μεταβάλλοντας ελαφρώς το προφίλ του βακτηρίου.

5.3.3 CIPROFLOXACIN

Όσον αφορά στην Σιπροφλοξασίνη (Ciprofloxacin), τα στελέχη της *E. coli* παρουσιάζουν συνέπεια ως προς την μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητάς τους (Εικόνες 37 και 38). Τα στελέχη του βακτηρίου πριν την οζόνωση παρουσιάζουν πολύ μεγάλα ποσοστά μείωσης της συγκέντρωσής τους. Μετά την οζόνωση, τα ποσοστά αυτά μειώνονται αρκετά για τα δύο από τα τρία στελέχη, ενώ για το στέλεχος *E. coli* 5 η διαφορά αυτή δεν είναι εμφανής, καθώς το συγκεκριμένο στέλεχος δείχνει να διατηρεί το προφίλ του σταθερό. Συνολικά, μπορούμε να συμπεράνουμε πως για ακόμα μια φορά, με την εφαρμογή της οζόνωσης το προφίλ ανθεκτικότητας μεταβάλλεται, σε μικρό βαθμό αλλά ευδιάκριτα, κάνοντας το βακτήριο λιγότερο ευαίσθητο στο αντιβιοτικό από πριν.

5.3.4 IMIPENEM

Τα αποτελέσματα της Ιμιπενέμης (Imipenem), δίνουν ένα αρκετά σαφές αποτέλεσμα για το προφίλ του βακτηρίου *E. coli*, όπως φαίνεται και στις Εικόνες 39 και 40. Όλα τα στελέχη δείχνουν μια ευαισθησία πριν την οξόνωση, η οποία μειώνεται αρκετά μετά από αυτή, κατατάσσοντας το βακτήριο από ευαίσθητο σε ανθεκτικό, με την εφαρμογή του αντιβιοτικού. Από τις μέσες τιμές των αποτελεσμάτων των στελεχών, είναι αρκετά ξεκάθαρο ότι το προφίλ ανθεκτικότητας επηρεάζεται, και όλα τα στελέχη αντιδρούν με συνέπεια.

5.3.5 AMPICILLIN

Η μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας του βακτηρίου στην Αμπικιλίνη (Ampicillin), θυμίζει αρκετά αυτή της Ιμιπενέμης. Η μόνη διαφορά είναι πως σε γενικές γραμμές, η ευαισθησία του βακτηρίου σε αυτό το αντιβιοτικό μειώνεται λιγότερο. Επίσης, μεμονωμένα τα στελέχη, λειτουργούν ελαφρώς διαφορετικά, παρατηρώντας τις Εικόνες 41 και 42. Συνολικά, φαίνεται πως μετά την οξόνωση το βακτήριο παρουσιάζει κάποια ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό Ampicillin, μεταβάλλοντας έτσι αρκετά το προφίλ του.

5.3.6 AMOXICILLIN

Τα αποτελέσματα της Αμοξυκιλίνης (Amoxicillin), είναι λίγο περισσότερο ασαφή για μια ακόμη φορά, όπως φαίνεται και στις Εικόνες 43 και 44. Τα δύο από τα τρία στελέχη δείχνουν να μην επηρεάζονται ιδιαίτερα από την οξόνωση καθώς τα ποσοστά μείωσης της συγκέντρωσης του βακτηρίου μεταβάλλονται ελάχιστα. Όσον αφορά όμως στο στέλεχος *E. coli* 6, φαίνεται πως παρουσιάζει ανθεκτικότητα πριν την εφαρμογή της οξόνωσης, η οποία όμως αλλάζει δραματικά μετά από αυτή, καθώς το στέλεχος παρουσιάζει μεγάλα ποσοστά μείωσης της συγκέντρωσης του βακτηρίου, παρόμοια με τα προηγούμενα στελέχη. Σε γενικές γραμμές, αν λάβουμε υπόψη το σύνολο των τιμών, φαίνεται πως το προφίλ της ανθεκτικότητας της *E. coli* στην Αμοξυκιλίνη δεν αλλάζει δραματικά, παρά μειώνει ελαφρώς την ευαισθησία των στελεχών της σε αυτή.

5.4 *Pseudomonas sp.*

5.4.1 IMIPENEM

Δυστυχώς όσον αφορά στο βακτήριο *Pseudomonas sp.* δυστυχώς, μέσα από όλες τις δειγματοληψίες καταφέραμε να απομονώσουμε μόνο ένα στέλεχος και για την παρούσα μελέτη θα πρέπει να βασιστούμε στα αποτελέσματα αυτού. Από την Εικόνα 45 βλέπουμε πως πριν την οζόνωση, η ψευδομονάδα εμφανίζει κάποια ανθεκτικότητα στην χρήση της Ιμιπενέμης (Imipenem), ενώ μετά την οζόνωση το προφίλ αυτό αλλάζει. Συγκεκριμένα, το στέλεχος παρουσιάζει κάποια ευαισθησία στο αντιβιοτικό ειδικά όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του δεύτερου, κάτι που σημαίνει πως παρατηρείται μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας.

5.4.2 AMIKACIN

Αντίθετα, όσον αφορά στην Αμικασίνη (Amikacin), οι αλλαγές στο προφίλ δεν είναι τόσο ευδιάκριτες. Για την ακρίβεια, όπως φαίνεται στην Εικόνα 46, το στέλεχος *Pseudomonas sp.* παρουσιάζει υψηλά ποσοστά μείωσης της συγκέντρωσης του πριν την εφαρμογή του όζοντος. Το προφίλ αυτό δεν δείχνει να μεταβάλλεται δραματικά, παραμένει σχεδόν ίδιο, ίσως με μια ελαφριά μείωση της ευαισθησίας του στελέχους, κυρίως σε μικρότερες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού.

5.5 ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά από όλα αυτά, μπορούμε με ευκολία να συμπεράνουμε πως η οζόνωση, ως μέθοδος απολύμανσης επιδρά έντονα στο προφίλ μεταβολής της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.

Το πρώτο βασικό πόρισμα είναι πως δεν μπορεί να ειπωθεί ξεκάθαρα αν η οζόνωση κάνει τα βακτήρια πιο ανθεκτικά ή πιο ευαίσθητα συνολικά, γιατί οι διαφορές από βακτήριο σε βακτήριο και από αντιβιοτικό σε αντιβιοτικό είναι πολλές. Σε όλα όμως τα βακτήρια παρατηρήθηκε μεταβολή, είτε μεγάλη είτε μικρή. Κανένα βακτήριο δεν διατήρησε το προφίλ ανθεκτικότητας του στα αντιβιοτικά αμετάβλητο.

Αυτό σημαίνει πως ό,τι ξέρουμε για την αντίδραση των βακτηρίων στα αντιβιοτικά μέχρι τώρα μπορεί να αλλάξει δραματικά με την πάροδο του χρόνου. Αυτό θα επηρεάσει σε πολύ μεγάλο βαθμό τη χορήγηση των αντιβιοτικών σε κάθε περίπτωση και κατα συνέπεια, τις δόσεις των αντιβιοτικών που υπάρχουν στο περιβάλλον. Με την αύξηση της ανθεκτικότητας, συνεπάγεται η αναγκαστική χορήγηση μεγαλύτερων συγκεντρώσεων αντιβιοτικών. Ακόμα όμως και η εμφάνιση της ευαισθησίας μπορεί να αποτελέσει εξίσου μεγάλο πρόβλημα. Η μεταβολή της ανθεκτικότητας αυτής είναι αρκετά δύσκολο να προσδιορίζεται συχνά καθώς είναι μια χρονοβόρα και σχετικά κοστοβόρα διαδικασία. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα της χορήγηση πολύ μεγαλύτερης δόσης φαρμάκων από ότι χρειάζεται στην πραγματικότητα, κάτι που θα έχει αντίκτυπο άμεσα στον άνθρωπο αλλά και στο περιβάλλον.

Το δεύτερο βασικό πόρισμα που προκύπτει είναι πως η οζόνωση, σα μέθοδο απολύμανσης, πρέπει να εξεταστεί και να μελετηθεί περαιτέρω. Η επιλογή της μεθόδου απολύμανσης μέχρι σήμερα αφορούσε κυρίως παραμέτρους που σχετίζονται με το χρόνο και το κόστος της κάθε μίας. Από τη μελέτη αυτή προκύπτει ξεκάθαρα, πως η μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας θα πρέπει να λαμβάνεται ξεκάθαρα ως παράμετρος επιλογής, για όλες φυσικά τις μεθόδους και όχι μόνο για την οζόνωση.

Το τρίτο βασικό πόρισμα είναι πως ο κίνδυνος για την εξάπλωση βακτηρίων με έντονη ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά είναι κάτι παραπάνω από εμφανής. Τα βακτήρια που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, είναι βακτήρια που είναι ευρέως διεσπαρμένα στο υδάτινο περιβάλλον, καθόλου δυσεύρετα και σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις. Αποτέλεσμα των μεταβολών στον προφίλ ανθεκτικότητας τους, είναι να αλλάξει γενικότερα το προφίλ της μικροβιακής συγκέντρωσης των νερών, και κατά συνέπεια του περιβάλλοντος.

Η ανθρώπινη υγεία καθώς και η γενικότερη κατάσταση του περιβάλλοντος αποτελούν δύο πολύ σημαντικά θέματα στην παγκόσμια επιστημονική κοινότητα και οι μελέτες που αφορούν σε αυτά

είναι αντικείμενα μείζονος σημασίας.

Η αποφυγή των αντιβιοτικών φυσικά και δεν είναι πανάκεια. Η σωστή χρήση των αντιβιοτικών, με μέτρο και υπακοή στις οδηγίες των ειδικών είναι μονόδρομος. Όπως επίσης, μονόδρομος είναι η διαφορετική προσέγγιση στις μεθόδους απολύμανσης υδάτων από δω και στο εξής, λαμβάνοντας υπόψη τη ραγδαία μεταβολή κάθε παραμέτρου για την αποφυγή λαθών και μεγαλύτερων προβλημάτων.

Βιβλιογραφία

1. World Health Organization, October 2016, Antibiotic resistance, *fact sheet*
2. R Schmieder & R Edwards 2012, Insights into antibiotic resistance through meta-genomic approaches, *Future Microbiol* 7, 73-89.
3. World Health Organization 2014, MD Sobsey, L Abebe, A Andremont, NJ Ashbolt, AM de Roda Husman, KYH Gin, PR Hunter, JS Meschke, S Vilchez, Antimicrobial Resistance: An Emerging Water, *Sanitation and Hygiene Issue* .
4. E Corcoran, C Nellemann, E Baker, R Bos, D Osborn, H Savelli (eds). 2010. Sick Water? The central role of wastewater management in sustainable development. A Rapid Response Assessment. United Nations Environment Programme, UN-HABITAT, GRID-Arendal. www.grida.no ISBN: 978-82-7701-075-5
5. <http://www.greenfacts.org/en/antimicrobial-resistance/>
6. World Health Organization, September 2016, Antimicrobial resistance, *fact sheet*,
7. D Plachouras, D Kavatha, A Antoniadou, E Giannitsioti, G Poulakou, K Kanellakopoulou, H Giamarellou, 2010, Dispensing of antibiotics without prescription in Greece, 2008: another link in the antibiotic resistance chain, *Euro Surveill*. 2010 Feb 18;15(7). pii: 19488.
8. S Miyakis, A Pefanis, A Tsakiris, 2011, The Challenges of Antimicrobial Drug Resistance in Greece, *Clinical Infectious Diseases*, 53(2),177-84.
9. M Dameh, J Green, P Norris, 2010, Over-the-counter sales of antibiotics from community pharmacies in Abu Dhabi, *Pharmacy World & Science*, 32(5), 643-650.
10. CAM McNulty, DM Lecky, MKD Hawking, C Roberts, A Quigley, CC Butler, 2016, How much information about antibiotics do people recall after consulting in primary care, *Family Practice*, 33(4), 395-400.
11. DS Reeves, RG Finich, PG Davey, AL Po, G Lingam, SG Mann, MA Pringle, 1999, Self-medication of antibacterials without prescription (also called 'over-the-counter' use). A report of a Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(2),163-77.
12. CA McNulty, B Boyle, T Nichols, P Clappison, P Davey, 2007, Don't wear me out-the public's knowledge of and attitudes to antibiotic use, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59(4),727-38.

13. MA Borg, EA Scicluna, 2002, Over-the-counter acquisition of antibiotics in the Maltese general population, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 20(4), 253-257.
14. S Harbarth, DL Monnet, 2008, Cultural and Socioeconomic Determinants of Antibiotic Use, Springer, Boston, MA pp 29-40
15. <http://cbw.ge/world/which-countries-use-the-most-antibiotics/>
16. <http://www.peerlessva.com/ozone-can-help/#.Wcfo6shJbIU>
17. <http://www.sswm.info/content/ozonation>
18. AM Elvis, JS Ekta, 2011, Ozone therapy: A clinical review, *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 2(1), 66–70.
19. E Torok, E Moran, F Cooke, 2009, Oxford handbook of infectious diseases and microbiology, Oxford University Press.
20. Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων, Παιδαγωγικό Ινστιτούτο, Μενεγάτου Δ., Νικολοπούλου-Ντέρου Ε., Παυλινέρη Π., Αθήνα 2001, ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΙΙ.
21. IL Pepper, CP Gerba, TJ Gentry, 2015, Environmental Microbiology, Third Edition Chapter 20, Academic Press.
22. <http://www.webmd.com> *E. coli* infection from food or water-treatment overview
23. AC Parte, 2014, LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature, *Nucleic Acids Res.* 1; 42(Database issue): D613–D616.
24. <https://www.drugs.com/pro/amikacin.html> , Copyright © 2000-2017 Drugs.com
25. J Fischer, CR Ganellin, 2006, Analogue-based Drug Discovery, Wiley Online Library.
26. ΔΓ Γκαλιμάνας, 2013, Χημεία & Τεχνολογία Υδάτων, Σχολή Τεχνολογικών Εφαρμογών, Τμήμα Τεχνολογίας Πετρελαίου.
27. TV Suslow, 2004, Oxidation-Reduction Potential (ORP) for Water Disinfection Monitoring, Control, and Documentation, Department of Vegetable Crops, University of California, Davis, Publication 8149.
28. <http://www.water-research.net>. B Oram Ozonation in Water Treatment, Water Research Center.
29. IL Pepper, CP Gerba, TJ Gentry, 2015, Environmental Microbiology, Third Edition Chapter 23, Academic Press.
30. N Le-Mihn, SJ Khan, JE Drewes, RM Stuetz, 2010, Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes, *Water Research* 44(15), 4295-323.
31. D Ackerman, SB Weisberg, 2003, Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica bay beaches, *Journal of Water and Health* 1(2), 85-9.

32. JM Andrews, 2001, Determination of minimum inhibitory concentrations, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 Suppl 1, 5-16.
33. V Yargeau, C Leclair, 2008, Impact of operating conditions on decomposition of antibiotics during ozonation: a review, *Ozone: Science and Engineering* 30(3), 175-188.
34. J Kuo, T Hicks, 2011, Disinfection and Antimicrobial Processes, *Water Environment Research* 83(10), 1333-1350.
35. DM Silva, L Domingues, 2015, On the track for an efficient detection of *Escherichia coli* in water: A review on PCR-based methods, *Ecotoxicol Environ Saf.* 113, 400-411.
36. L Rodriguez-Tudela, F Barchiesi, J Bille, E Chryssanthou, M Cuenca-Estrella, D Denning, JP Donnelly, B Dupont, W Fegeler, C Moore, M Richardson, PE Verweij, 2002, Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts, *Clinical Microbiology and Infection* 8, 1-8.
37. CR Proctor, F Hammes, 2015, Drinking water microbiology – from measurement to management, *Current Opinion in Biotechnology* 33, 87-94.
38. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017, <http://www.eucast.org> .”
39. C Bouki, D Venieri, E Diamadopoulos, 2013, Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91:1-9.
40. R Schmieder, R Edwards, 2012, Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches, *Future Microbiology* 7(1), 73-89.
41. V Yargeau, C Leclair, 2008, Ozone: Science and Engineering, Impact of Operating Conditions on Decomposition of Antibiotics During Ozonation: A Review. *Ozone: Science & Engineering*, 30(3), 175-188.

