



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΚΡΗΤΗΣ**

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Απομόνωση Βακτηρίων Ανθεκτικών σε Αντιβιοτικά από Επιφανειακά
Υδατα και Έλεγχος Αδρανοποίησης τους*

Γαβαλά Κωνσταντίνα
ΑΜ: 2012050017



Εξεταστική Επιτροπή
Βενιέρη Δανάη (Επιβλέπουσα)
Γκίκας Πέτρος
Ξεκουκουλωτάκης Νικόλαος
Χανιά 2018

Ευχαριστίες

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

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στην επίκουρη καθηγήτρια κα. Βενιέρη Δανάη για την ανάθεση του θέματος, καθώς και για την εξαιρετική καθοδήγηση και την θερμή υποστήριξη της καθ' όλη την εκπόνηση της εργασίας.

Επιπλέον, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην κα. Γουνάκη Ιωσηφίνα, ΕΤΕΠ του εργαστηρίου, για την άριστη αλλά και ευχάριστη καθημερινή συνύπαρξη στο εργαστήριο, για την ανεξάντλητη υπομονή της και για την δημιουργική συνεργασία που είχαμε.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης, στα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Ξεκουκουλωτάκη Νικόλαο και κ. Γκίκα Πέτρο για την παρουσία τους και τον χρόνο που διέθεσαν στην αξιολόγηση της εργασίας μου.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω, την πολύ καλή μου φίλη και συνάδελφο Γεωργία Φράγκου για την υποστήριξη της και την εκπληκτική συνεργασία που είχαμε στο εργαστήριο.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τους γονείς μου και την αδερφή μου που με στήριξαν καθ' όλα τα χρόνια των σπουδών μου και που είναι πάντα δίπλα μου.

Περίληψη

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά έχει ήδη χαρακτηριστεί ως μια από τις τρεις πρώτες απειλές για την παγκόσμια υγεία από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization). Ως αποτέλεσμα, τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια, έχουν προκαλέσει διεθνή προβλήματα τα τελευταία χρόνια. Η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις ευρωπαϊκές χώρες με τα υψηλότερα επίπεδα μικροβιακής αντοχής, ενώ είναι πρώτη στη συνολική κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων.

Από περιβαλλοντικής άποψης, το πρόβλημα συνίσταται στην διάχυση και στην εξάπλωση ανθεκτικών γονιδίων μέσω της χρήσης και της μεταφοράς αντιβιοτικών στο περιβάλλον. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, γίνεται απομόνωση βακτηρίων από επιφανειακά ύδατα, μελετάται η αδρανοποίηση τους με την μέθοδο της χλωρίωσης και γίνεται έλεγχος της ανθεκτικότητας τους σε αντιβιοτικά.

Η δειγματοληψία ενός μέρους των βακτηριακών στελεχών που εξετάζονται στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε μεταξύ Ιανουαρίου 2012 και Δεκεμβρίου 2013 στην περιοχή του Αποκόρωνα, στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής της κυρίας Χρύσας Μπούκη. Τα υπόλοιπα στελέχη απομονώθηκαν από τη λίμνη της Αγιάς στα Χανιά, κατά την εκπόνηση των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Τα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν ανήκουν στις οικογένειες Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae και Enterococcaceae.

Ως απολυμαντικό μέσο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα NaOCl (υποχλωριώδες νάτριο) και οι συγκέντρωσεις που εξετάστηκαν ήταν 0,5 και 1 mg/L ως προς το Cl₂. Οι αντιβιοτικές ουσίες που εξετάστηκαν είναι: Ampicillin (Penicillins), Amikacin (Aminoglycosides), Ciprofloxacin (Quinolones), Trimethoprim-Sulfamethoxazole (1:19). 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).

Όσον αφορά στη χλωρίωση, τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα της μεθόδου επηρεάστηκε από την πηγή προέλευσης των βακτηριακών στελεχών. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη που συλλέχθηκαν από τον Αποκόρωνα εμφάνισαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη χλωρίωση σε σχέση με αυτά που συλλέχθηκαν από την Αγιά. Ωστόσο, κατά την απολύμανση των τελευταίων σημειώθηκε σημαντικός αριθμός εναπομείναντων βακτηρίων μετά το πέρας της διαδικασίας. Τα βακτήρια της οικογένειας Enterococcaceae αδρανοποιήθηκαν με τη χρήση 0,5 mg/L ως προς το ελεύθερο χλώριο, καθώς ο πληθυσμός τους μειώθηκε κατά 6 Log εντός 5-10 min της επεξεργασίας για το 80% των απομονωμένων στελεχών. Παρόμοιες ταχύτητες απενεργοποίησης καταγράφηκαν για στελέχη *Escherichia coli*, των οποίων η μείωση έφθασε τα 5-6 Log μετά από 10-20 min. Αντίθετα, άλλα μέλη των Enterobacteriaceae, όπως τα *Plesiomonas shiggeloides* και *Citrobacter freundii* απαιτούσαν υψηλότερη δόση ελεύθερου χλωρίου, δηλαδή 1 mg/L, με την οποία ελήφθη μία μείωση 5-6 Log μετά από 45 min. Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε στην περίπτωση των Pseudomonadaceae, η οποία αποδείχθηκε πιο ανθεκτική βακτηριακή οικογένεια υπό τις ειδικές πειραματικές συνθήκες.

Στην συνέχεια, εξετάστηκε η ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε 4 αντιβιοτικά και παρατηρήθηκε ότι κάθε βακτηριακή οικογένεια παρουσίαζε σε διαφορετική

αντιβιοτική ουσία ανθεκτικότητα. Συνοπτικά, αξίζει να αναφερθεί ότι τα περισσότερα βακτήρια παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην Ampicillin. Οι αντιβιοτικές ουσίες Ciprofloxacin και Trimethoprim-Sulfamethoxazole ήταν περισσότερο δραστικές, ενώ παράλληλα, όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στο αντιβιοτικό Amikacin. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η πιο ανθεκτική βακτηριακή οικογένεια από τις τρεις που μελετήθηκαν ήταν η Enterobacteriaceae.

Εν κατακλείδι, αν και η χλωρίωση αποδείχθηκε αρκετά αποτελεσματική για την απενεργοποίηση των ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων, τα προφίλ αντοχής των εναπομείναντων βακτηρίων μετά την απολύμανση δημιουργούν ανησυχίες σχετικά με την προστασία της δημόσιας υγείας. Παρά τη μείωση των τιμών MIC στις περισσότερες περιπτώσεις, τα επίπεδα αντοχής στα αντιβιοτικά παραμένουν υψηλά, ειδικά στην περίπτωση των Enterobacteriaceae. Ωστόσο, ένας σημαντικός παράγοντας που εξετάζεται πρέπει να είναι η χρονική διάρκεια της επεξεργασίας, η οποία καθορίζει τη δυνατότητα μιας τεχνικής απολύμανσης όσον αφορά στην εξάλειψη της βακτηριακής αντοχής στα αντιβιοτικά. Η γενική παρατήρηση είναι ότι η απολύμανση είναι ικανή να παρουσιάσει δυσμενείς επιπτώσεις στα επίπεδα αντοχής στα αντιβιοτικά στους εναπομείναντες μικροβιακούς πληθυσμούς.

Η παραμένουσα ανθεκτικότητα σε περιβαλλοντικά βακτηριακά στελέχη προκαλεί ενδιαφέρον και για περαιτέρω μελέτη.

Abstract

The presence of pathogenic microorganisms in aquatic environment and their resistant nature to antibiotics impose effective disinfection treatment for public health and environmental protection. The indiscriminate use of antimicrobial agents in human and animals as therapeutic drugs and feed additives has led to their uncontrolled excretion in the environment, resulting in rise of antibiotic resistance in various bacteria by the dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs). The main concern is that those multiple antibiotic resistance bacteria (ARB) may persist during the various applied disinfection processes and revive with unpredictable alterations in their resistance profile. The extent to which treatment and disinfection processes inactivate ARB and eliminate the genes relevant to resistance is still under discussion. Although conventional methods such as chlorination or UV irradiation prove to be effective in inactivating various microorganisms, there is little information regarding their role regarding the alteration of resistance profile in residual cells after treatment. While complete bacterial inactivation is mostly desired, many bacteria remain post treatment with possible changes/mutations in DNA with various consequences, including the different behavior in the presence of antibiotic compounds. Failure to inactivate ARB may contribute to the establishment of routes of their dissemination into the environment.

In this perspective, the objectives of the current study were (i) to study the occurrence of ARB in surface water, (ii) to inactivate them applying chlorination and (iii) to investigate possible changes in bacterial antibiotic resistance profile through treatment.

Water samples were collected from surface waters, located in the area of Chania, in sterilized glass bottles and stored for transport and subsequent analysis in the laboratory. Samples were examined by filtration through nitrocellulose membranes (0.45µm pore size, 47 mm diameter, Pall-Gelman Laboratory) followed by plating on selective media. Different bacterial strains were isolated upon incubation and biochemical identification belonging to the families of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Enterococcaceae. Chlorination was performed with NaOCl (Sigma-Aldrich), added to the samples to establish different doses of free chlorine at 0.5 and 1 mg/L. During disinfection experiments samples were collected from the reaction vessel at specific time intervals and were processed for culture on nutrient agar (LABM). Before culture and right after sample collection, Na₂S₂O₃ solution (Sigma-Aldrich) was added to terminate the reaction. The serial dilution streak plate procedure was used and colonies were counted after incubation of petri dishes at 37°C for 20-24 h. Antibiotic resistance was studied using broth microdilution method and estimating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of selected antibiotics, namely Ampicillin (Penicillins), Amikacin (Aminoglycosides), Ciprofloxacin (Quinolones) and Trimethoprim-Sulfamethoxazole (1:19). MIC is defined as the lowest concentration of an antimicrobial that inhibits the visible growth of a microorganism after overnight incubation. MICs were estimated labeling 96-well sterile microtiter trays with dilutions of each antibiotic, based on standards proposed by EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Standards). Resistance profile of the bacterial isolates was studied in intact cells (untreated) and in residual colonies after inactivation treatment. The bacterial inoculum in each case was prepared using

Mueller-Hinton broth (Merck) and was added in each well after adjustment to 10^5 CFU/mL. Microtiter trays were incubated at 37°C for 18-24 h, followed by optical density measurement at 630 nm, using a microplate reader (Labtech LT-4000 Plate Reader) and Manta LML software.

Chlorination is widely used for the elimination of microbial pathogens in aquatic samples. In this study NaOCl was used to establish two different doses of free chlorine, namely 0.5 and 1 mg/L, to test their potential to inactivate the isolated bacterial strains in water. The low tested concentration introduced substantial bacterial decay in the Enterococaceae, as a 6 Log bacterial reduction was obtained within 5-10 min of treatment for 80% of the isolates. Similar inactivation rates were recorded for *Escherichia coli* isolates, whose reduction reached 5 orders of magnitude after 10-20 min. On the contrary, other members of Enterobacteriaceae, such as *Plesiomonas sh.* and *Citrobacter fr.* required higher dose of free chlorine, i.e. 1 mg/L, with which a 6 Log reduction was obtained after 45 min. A similar trend was observed in the case of Pseudomonadaceae, which proved to be more resistant under the specific experimental conditions.

Antibiotic resistance profiles were investigated in intact and residual cells after disinfection treatment. Resistance was tested against four antibiotics of different classes. Briefly, most of the bacteria were resistant to Ampicillin and it was observed that none of the tested bacteria were resistant to Amikacin. With the view to detect possible changed behavior the MIC of each antibiotic was recorded, which showed variant bacterial responses in relation to the antimicrobial compound and the type of the bacterium tested.

Although chlorination proved to be quite effective for the inactivation of the isolated Antibiotic Resistant Bacteria, the resistance profiles of residual bacteria after treatment raise concerns regarding public health protection. Despite the decrease of MIC values in most of the cases, antibiotic resistance levels still remain high, especially in the case of Enterobacteriaceae. However, an important factor under consideration should be the treatment period, which defines the capacity of a process to remove antibiotic resistance. The general observation is that disinfection may show adverse effects on the levels of antibiotic resistance in the surviving microbial populations.

Πίνακας Περιεχομένων

Ευχαριστίες	2
Περίληψη	3
Abstract	5
Πίνακας Περιεχομένων	7
Ευρετήριο Πινάκων	9
Ευρετήριο Εικόνων.....	10
1. Εισαγωγή	12
1.1. Η σημασία του νερού	12
1.1.1. Επιφανειακά Ύδατα.....	13
1.1.2. Μικροβιολογική Ποιότητα Επιφανειακών Υδάτων.....	14
1.2. Αναγκαιότητα της Απολύμανσης	15
1.2.1 Μηχανισμοί Απολύμανσης	16
1.2.2. Νόμος της Harriette Chick.....	16
1.2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την Απολυμαντική Δράση.....	17
1.3. Απολύμανση με Χλώριο	19
1.3.1. Ιδιότητες του Χλωρίου	20
1.3.2. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Χλωρίωσης	20
1.3.3. Παραπροϊόντα Χλωρίωσης και Επιπτώσεις στην Δημόσια Υγεία.....	21
1.3.4. Αντιδράσεις του Χλωρίου με το Νερό.....	22
1.3.5. Επίδραση της Χλωρίωσης σε Βακτήρια που είναι Ανθεκτικά σε Αντιβιοτικά	23
1.4. Ανθεκτικότητα στα Αντιβιοτικά.....	23
1.4.1. Το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής στην Ελλάδα.....	24
1.4.2. Διάδοση της Ανθεκτικότητας στο Περιβάλλον	25
1.5. Αντιβιοτικά	26
1.5.1. Σιπροφλοξασίνη	26
1.5.2. Αμικασίνη	28
1.5.3. Αμπικιλίνη	28
1.5.5. Μίγμα και Αναλογία Σουλφαμεθοξαζόλη-Τριμεθοπρίμη.....	29
2. Σκοπός	31
3. Μέθοδοι και Υλικά	32
3.1. Υλικά.....	32
3.2. Μέθοδοι	33
3.2.1. Μέθοδος Απομόνωσης Στελεχών με Διήθηση	33
3.2.2. Μέθοδος Απολύμανσης με Χλώριο	34

3.2.1.1. Προετοιμασία.....	34
3.2.1.2. Πειραματική διαδικασία	34
3.2.3. Ανθεκτικότητα σε Αντιβιοτικά	36
3.2.3.1. Προετοιμασία.....	37
3.2.3.2. Πειραματική Διαδικασία.....	37
4. Αποτελέσματα	39
4.1. Εξεταζόμενα Βακτήρια	39
4.1.1. Enterobacteriaceae	39
4.1.2. Enterococcaceae	39
4.1.3. Pseudomonadaceae	39
4.2. Χλωρίωση	40
4.2. Αντιβιοτικά	47
4.2.1. Ανθεκτικότητα ανά Αντιβιοτικό Παράγοντα.....	48
4.2.2. Ανθεκτικότητα ανά Βακτηριακό Είδος.....	61
5. Συμπεράσματα	68
6. Μελλοντικές Προτάσεις	70
7. Βιβλιογραφία	71

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Κανονισμοί για τα Παραπροϊόντα Απολύμανσης στο Νερό World Health Organization (Φραγγεδάκη, 2014).....	22
Πίνακας 2: Βασικές Κατηγορίες Αντιβιοτικών	26
Πίνακας 3: Εύρος των Αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν	37
Πίνακας 4: Εξεταζόμενα Βακτήρια και Χαρακτηριστικά τους	40
Πίνακας 5: Κινητική Σταθερά Αδρανοποίησης Στελεχών που έχουν υποστεί Χλωρίωση με Δόση 1mg/L.....	45
Πίνακας 6: Κινητική Σταθερά Αδρανοποίησης Στελεχών που έχουν υποστεί Χλωρίωση με Δόση 1mg/L.....	45
Πίνακας 7: Τιμές C*t για την μείωση 99,9% του Βακτηριακού Πληθυσμού που υπέστη χλωρίωση με δόση 1mg/L, pH=7, T=25°C	46
Πίνακας 8: Τιμές C*t για την μείωση 99,9% του Βακτηριακού Πληθυσμού που υπέστη χλωρίωση με δόση 0,5 mg/L, pH=7, T=25°C	47
Πίνακας 9: Όρια Ανασταλτικής Συγκέντρωσης για τον προσδιορισμό Ευαίσθησίας των εξεταζόμενων βακτηρίων σύμφωνα με τον EUCAST	48

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Πιθανές Πηγές Μόλυνσης των Επιφανειακών Υδάτων (https://amwater.com/wvaw/water-information/water-learning-center/source-water).....	13
Εικόνα 2: Χρήση Αντιμικροβιακών Εξωνοσοκομειακά στην Ευρωπαϊκή Ένωση κατά το έτος 2017 (ΚΕΕΛΠΝΟ).....	25
Εικόνα 3: Μοριακή Απεικόνιση Ciprofloxacin (www.galinos.gr)	27
Εικόνα 4: Μοριακή Απεικόνιση Amikacin (www.galinos.gr)	28
Εικόνα 5: Μοριακή Απεικόνιση Ampicillin (www.galinos.hr)	29
Εικόνα 6: Μοριακή Απεικόνιση Sulfamethoxazole (www.galinos.gr)	29
Εικόνα 7: Μοριακή Απεικόνιση Trimethoprim (www.galinos.gr).....	30
Εικόνα 8: Αποικίες του βακτηρίου <i>Klebsiella pneumoniae</i> πριν μίτησης & μετά από 10 min χλωρίωσης.....	36
Εικόνα 9 : Διάταξη Πλάκας Μικρο-τιτλοποίησης.....	38
Εικόνα 10 : Αδρανοποίηση Βακτηριακών Στελεχών <i>Escherichia coli</i> με Δόση 0,5mg/L.....	41
Εικόνα 11: Αδρανοποίηση Βακτηριακών Στελεχών <i>Enterococci</i> με Δόση 0,5 mg/L.....	42
Εικόνα 12: Αδρανοποίηση Βακτηριακής Οικογένειας <i>Enterobacteriaceae</i> με Δόση 1mg/L	43
Εικόνα 13: Αδρανοποίηση Βακτηριακής Οικογένειας <i>Pseudomonadaceae</i> με Δόση 1 mg/L	44
Εικόνα 14: Ποσοστό Εμφάνισης Ανθεκτικών Στελεχών στην Αμπικιλλίνη ανά Βακτηριακή Οικογένεια.....	49
Εικόνα 15: Ποσοστό Ευαίσθητων-Ανθεκτικών Στελεχών για Ανέπαφα Κύτταρα στην Αμπικιλλίνη	50
Εικόνα 16: Ποσοστό Ευαίσθητων-Ανθεκτικών Στελεχών για Εναπομείναντα Κύτταρα στην Αμπικιλλίνη	50
Εικόνα 17: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Αμπικιλλίνης (I).....	51
Εικόνα 18: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Αμπικιλλίνης (II).....	51
Εικόνα 19: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Αμπικιλλίνης (III).....	52
Εικόνα 20: Ποσοστό Εμφάνισης Ανθεκτικών Στελεχών στην Σιπροφλοξασίνη ανά Βακτηριακή Οικογένεια.....	53
Εικόνα 21: Ποσοστό Ευαίσθητων-Ανθεκτικών Στελεχών για Ανέπαφα Κύτταρα στην Σιπροφλοξασίνη	54
Εικόνα 22: Ποσοστό Ευαίσθητων-Ανθεκτικών Στελεχών για Εναπομείναντα Κύτταρα στην Σιπροφλοξασίνη	54
Εικόνα 23: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Σιπροφλοξασίνης (I)	54
Εικόνα 24: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Σιπροφλοξασίνης (II)	55
Εικόνα 25: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Σιπροφλοξασίνης (III)	56
Εικόνα 26: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Σιπροφλοξασίνης (IV).....	56
Εικόνα 27: Ποσοστό Εμφάνισης Ανθεκτικών Στελεχών στην Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη (1:19) ανά Βακτηριακή Οικογένεια.....	57
Εικόνα 28: Ποσοστό Ευαίσθητων Στελεχών για Ανέπαφα Κύτταρα στην Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη.....	58

Εικόνα 29: Ποσοστό Ευαίσθητων-Ανθεκτικών Στελεχών για Εναπομείναντα Κύτταρα στην Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη	58
Εικόνα 30: Μείωση του Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Τριμεθοπρίμης-Σουλφαμεθοξαζόλης (1:19) (I)	58
Εικόνα 31: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Τριμεθοπρίμης-Σουλφαμεθοξαζόλης (1:19) (II)	59
Εικόνα 32: Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Ανθεκτικότητας Βακτηρίων ανά Αντιβιοτικό Παράγοντα	60
Εικόνα 33: Προφίλ Ανθεκτικότητας <i>Klebsiella pneumoniae</i>	61
Εικόνα 34: Προφίλ Ανθεκτικότητας <i>Plesiomonas shigelloides</i>	62
Εικόνα 35: Προφίλ Ανθεκτικότητας <i>Citrobacter freundii</i>	62
Εικόνα 36: Προφίλ Ανθεκτικότητας <i>Pseudomonas fluorescens</i>	63
Εικόνα 37: Προφίλ Ανθεκτικότητας <i>Aeromonas hydrophila</i>	64
Εικόνα 38: Προφίλ Ανθεκτικότητας <i>Escherichia coli</i> -1	64
Εικόνα 39: Προφίλ Ανθεκτικότητας <i>Enterococci</i> -2	65
Εικόνα 40: Μέση Τιμή Ανασταλτικής Συγκέντρωσης της Βακτηριακής Οικογένειας <i>Enterobacteriaceae</i> ανά Αντιβιοτικό Παράγοντα	66
Εικόνα 41: Μέση Τιμή Ανασταλτικής Συγκέντρωσης της Βακτηριακής Οικογένειας <i>Enterococcaceae</i> ανά Αντιβιοτικό Παράγοντα	66
Εικόνα 42: Μέση Τιμή Ανασταλτικής Συγκέντρωσης της Βακτηριακής Οικογένειας <i>Pseudomonadaceae</i> ανά Αντιβιοτικό Παράγοντα	67

1. Εισαγωγή

1.1. Η σημασία του νερού

Η σημασία του νερού για τη ζωή και ως συστατικού του παγκόσμιου οικοσυστήματος γίνεται συνεχώς σαφέστερη. Είναι ένας πόρος που όχι μόνο καλύπτει βασικές ανάγκες για τον ανθρώπινο πληθυσμό και αποτελεί το κλειδί για την ανάπτυξη, ιδιαίτερα με τη δημιουργία και διατήρηση του πλούτου μέσω της γεωργίας, της επαγγελματικής αλιείας, της παραγωγής ενέργειας, της βιομηχανίας, των μεταφορών και του τουρισμού, αλλά είναι ζωτικός για όλα τα παγκόσμια οικοσυστήματα. Ωστόσο, τα γεγονότα δείχνουν ότι αντιμετωπίζουμε παγκόσμια κρίση νερού.

Πιο συγκεκριμένα, σχετικά με την κατάσταση νερού παγκοσμίως, είναι γεγονός ότι λιγότερο από 1% των υδάτων του πλανήτη είναι διαθέσιμο για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Επίσης, περισσότεροι από 1,2 δισεκατομμύρια άνθρωποι δεν έχουν πρόσβαση σε ασφαλές πόσιμο νερό. Όσον αφορά στην Ελλάδα, η ποιότητα και η διαχείριση των υδάτων της στην πραγματικότητα απέχει πολύ από το να είναι ικανοποιητική.

Γεγονότα σχετικά με την κατάσταση του νερού στην Ευρώπη:

- 20% όλων των επιφανειακών υδάτων στην Ευρωπαϊκή Ένωση απειλείται σοβαρά από ρύπανση.
- Τα υπόγεια ύδατα παρέχουν περίπου το 65% όλου του πόσιμου νερού της Ευρώπης.
- 60% των ευρωπαϊκών πόλεων κάνουν υπερεκμετάλλευση των πόρων των υπόγειων υδάτων τους.
- 50% των υδροτόπων βρίσκεται σε “επικίνδυνη κατάσταση” λόγω της υπερεκμετάλλευσης των υπόγειων υδάτων.
- Η επιφάνεια της αρδευόμενης γης στη Νότια Ευρώπη έχει αυξηθεί κατά 20% από το 1985(Ευρωπαϊκή Επιτροπή).

Δεδομένων των πολυάριθμων και αυξανόμενων πιέσεων στους υδάτινους πόρους μας, έχει ζωτική σημασία να υπάρξουν νέες μέθοδοι επεξεργασίας του νερού ή βελτιστοποίηση των ήδη υπάρχουσών για να βοηθήσουν στην εξασφάλιση αυτών των πόρων για τις επόμενες γενιές.

1.1.1. Επιφανειακά Ύδατα

Οι γνώσεις μας σχετικά με τη μόλυνση των υδάτων από σημειακές και διάχυτες πηγές έχουν αυξηθεί τα τελευταία χρόνια και έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες που εστιάζουν στα λύματα που προέρχονται από σταθμούς επεξεργασίας λυμάτων ή σταθμούς υπερχειλίσης-αποχέτευσης. Ωστόσο, εξακολουθεί να υπάρχει μόνο περιορισμένη ποσότητα μικροβιακών δεδομένων σε μη σημειακές πηγές που οδηγούν σε διάχυτη ρύπανση των επιφανειακών υδάτων (Schreiber et al., 2015).

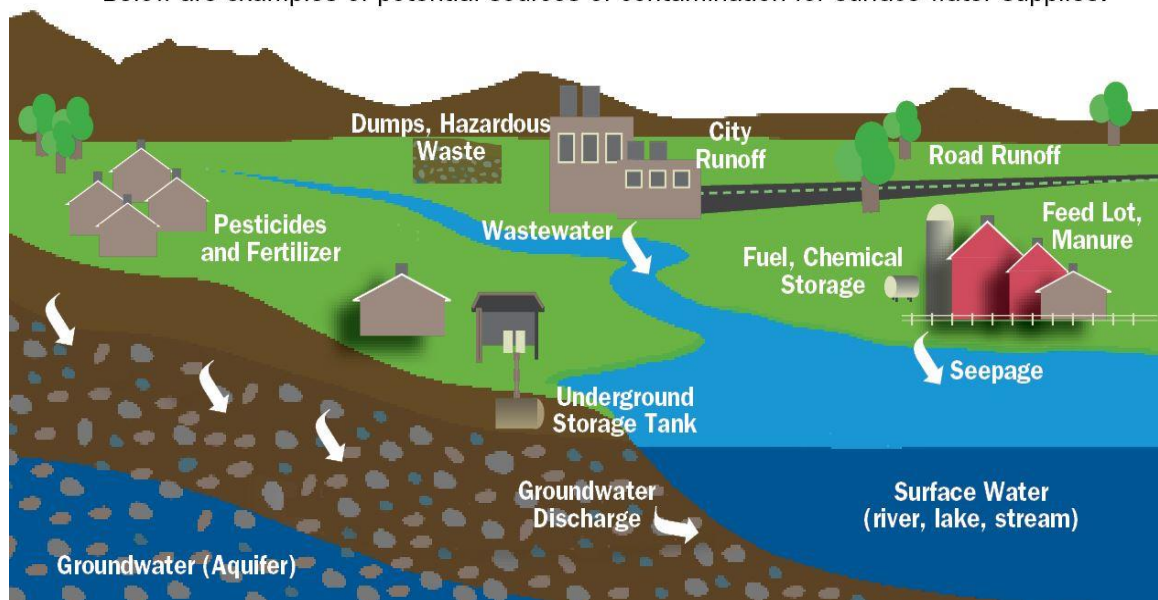
Καθώς τα επιφανειακά ύδατα χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για τις ανθρώπινες ανάγκες, θα ήταν σκόπιμο να επιτυγχάνονται «καλές οικολογικές συνθήκες» αυτών, αλλά και να εξασφαλίζεται η ασφάλεια για την ανθρώπινη υγεία (Kistemann et al., 2003).

Εκτός από τους δείκτες των μικροοργανισμών που καθορίζονται στην οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, υπάρχουν και πολλοί άλλοι μικροοργανισμοί στα επιφανειακά νερά που δεν διερευνούνται συνήθως, αλλά μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες – όχι μόνο γαστρεντερικές λοιμώξεις. Ένας άλλος σημαντικός κίνδυνος που επιφέρουν τα μολυσμένα επιφανειακά ύδατα είναι η απειλή για τους πόρους πόσιμου νερού (Kistemann et al., 2002).

Έτσι κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της απολύμανσης των επιφανειακών υδάτων και η απόκριση των μικροοργανισμών. Σημαντικός είναι επίσης και ο έλεγχος των διάφορων χαρακτηριστικών και συμπεριφορών που αναπτύσσουν οι μικροοργανισμοί αυτοί, όπως η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά που μελετάται στη παρούσα εργασία.

Examples of Source Water Contamination

Below are examples of potential sources of contamination for surface water supplies.



Εικόνα 1: Πιθανές Πηγές Μόλυνσης των Επιφανειακών Υδάτων

(<https://amwater.com/wvaw/water-information/water-learning-center/source-water>)

1.1.2. Μικροβιολογική Ποιότητα Επιφανειακών Υδάτων

Σημαντικές πηγές ρύπανσης των υδάτων περιλαμβάνουν τα ανθρώπινα λύματα και τα ζωικά απόβλητα που μεταφέρονται σε συστήματα διανομής νερού και επιφανειακά ύδατα (Wallender et al., 2014).

Προέλευση μικροοργανισμών στα επιφανειακά νερά

Οι μικροοργανισμοί στο νερό μπορούν να προέλθουν από τον εντερικό σωλήνα των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων. Οι ανθρώπινες πηγές μόλυνσης περιλαμβάνουν σепτικούς βόθρους που δεν λειτουργούν ορθά, διαρροές αγωγών αποχέτευσης, εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, απορρίμματα σκαφών και αστικά όμβρια ύδατα απορροής. Στις αστικές λεκάνες απορροής, οι βακτηριακοί δείκτες κοπρανώδους επιμόλυνσης σχετίζονται σημαντικά με την πυκνότητα των ανθρώπων (ΚΕΕΛΠΝΟ).

Πηγές μόλυνσης ζωικής προέλευσης αποτελούν η χρήση κοπριάς στη γη και η διαβίωση ζώων στην απορροή ή σε ρέματα, τα απορρίμματα εκτρεφόμενων ζώων που διατίθενται ακατάλληλα, τα κατοικίδια ζώα (σκύλοι, γάτες), τα άγρια ζώα (ελάφια, άλκες, ρακούν, κλπ) και τα πουλιά (χήνες, περιστέρια, πάπιες, γλάροι, κ.λπ.). Όσον αφορά σε λεκάνες απορροής, οι οποίες δεν δέχονται σημαντική επίδραση από τον άνθρωπο, στην περίπτωση που ανιχνευθούν βακτηριακοί δείκτες σε μεγάλη συγκέντρωση, τότε η πηγή της μόλυνσης μπορεί να είναι τα πτηνά ή τα άγρια ζώα. Σε μια μελέτη που συνέκρινε τις συγκεντρώσεις *Escherichia coli* σε νερά από γεωργικά και «παρθένα» μέρη, η μόλυνση βρέθηκε ίδια και στις δύο τοποθεσίες. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι τα επίπεδα της *E. coli* στην παρθένα περιοχή πιθανότατα προήλθαν από τα άγρια ζώα, όπως ελάφια και άλκες, που ζουν στην περιοχή (ΚΕΕΛΠΝΟ).

Οδοί εισόδου των βακτηρίων στα επιφανειακά ύδατα

Μολυσμένο νερό που διατρέχει τη γη και απορρέει στα επιφανειακά ύδατα είναι η κύρια αιτία των προβλημάτων ποιότητας των υδάτων. Κόπρανα, καθώς και άλλοι ρύποι μπορούν να μεταφερθούν στις εσωτερικές οδούς απορροής. Η ταχύτητα μεταφοράς τους εξαρτάται εν μέρει από το είδος της χρήσης γης. Σε ζώνες της υπαίθρου, όπου επικρατεί το γρασίδι και άλλη βλάστηση, οι βροχοπτώσεις απορροφώνται, αυξάνοντας έτσι τη διείσδυση του νερού στο έδαφος και μειώνοντας την απορροή αυτού σε υδάτινες οδούς. Οι επεξεργασμένες περιοχές όπως δρόμοι, ταράτσες, πεζοδρόμια, χώροι στάθμευσης, και άλλες σκληρές επιφάνειες τείνουν να δημιουργούν περισσότερα αδιαπέραστα στρώματα και αυξάνουν την απορροή (ΚΕΕΛΠΝΟ).

1.2. Αναγκαιότητα της Απολύμανσης

Αρχικά, θα πρέπει να αποσαφηνίσουμε την διαφορά των όρων απολύμανση και αποστείρωση. Με τον όρο αποστείρωση εννοούμε την καταστροφή όλων των ζωντανών οργανισμών που υπάρχουν στο νερό, ενώ με τον όρο απολύμανση εννοούμε την αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό.

Νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση πρέπει να είναι απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς. Γι' αυτό είναι απαραίτητη η συνεχής παρακολούθηση των μικροβιολογικών του χαρακτηριστικών.

Η απολύμανση του νερού που προορίζεται για πόσιμο δεν έχει σαν στόχο την εξυγίανση του από τυχόν ρύπανση, αλλά αποτελεί ένα μέτρο προφύλαξης του νερού από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η απολύμανση του νερού είναι η αφαίρεση, απενεργοποίηση ή θανάτωση παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό και μπορεί να συμβεί είτε με χημικά είτε με φυσικά μέσα (Unuabonah. et. al., 2018).

Τα περισσότερα από τα σημερινά κρούσματα ασθενειών στον κόσμο οφείλονται σε εντερικά βακτήρια που προέρχονται από το νερό και τα τρόφιμα, όπως η χολέρα (προκαλούμενη από το *Vibrio cholerae*), η διάρροια, η δυσεντερία (προκαλούμενη από *E. coli*), η τροφική δηλητηρίαση (*Salmonella typhi*) κ.α. Αυτά τα παθογόνα βακτήρια έχουν αποδειχθεί ότι είναι η αιτία των ασθενειών που οδηγούν σε νοσηρότητα και θνησιμότητα στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Περίπου το 88% της νόσου διάρροιας συνδέεται με την επισφαλή παροχή ύδατος και την υγιεινή (Jyoti and Pandit, 2001).

Δεδομένων των διαφόρων ανεπαρειών που συνδέονται με τις τρέχουσες τεχνικές καθαρισμού του νερού, κρίνεται αναγκαίο να αναπτυχθούν αποτελεσματικές τεχνικές καθαρισμού. Μερικές από τις τρέχουσες τεχνικές επεξεργασίας είναι η χημική επεξεργασία (χλωρίωση, οζόνωση), βιολογική επεξεργασία (ενεργός ιλύς) , η φυσικοχημική επεξεργασία (κροκίδωση, πήξη), η χρήση ακτινοβολίας και τα συστήματα μεμβρανών (Ultra-διήθηση, αντίστροφη όσμωση) (Ambashta et. al., 2010, Ma et al., 2014, Unuabonah. et al., 2018).

Γενικά, οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι απολύμανσης είναι οι παρακάτω:

- Χλωρίωση
- Απολύμανση με ακτινοβολία UV
- Οζόνωση

1.2.1 Μηχανισμοί Απολύμανσης

Πρωταρχικός σκοπός της απολύμανσης είναι η αναστολή του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης κάθε παθογόνου μικροοργανισμού μέσα στο σύστημα ύδρευσης. Οι βασικοί παράγοντες της απολυμαντικής δράσης (συγκέντρωση απολυμαντικού και χρόνος επαφής) είναι μεταβλητά στοιχεία, διότι η θερμοκρασία, το pH και η θολερότητα του νερού μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης. Είναι δυνατόν να χρειαστεί να αυξήσουμε την συγκέντρωση ή τον χρόνο δράσης του απολυμαντικού.

Για την απολύμανση του νερού χρησιμοποιούνται συγκεκριμένες χημικές ουσίες οι οποίες επιδρούν στο κύτταρο των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την καταστροφή τους. Ο τρόπος επίδρασης τους στο κυτταρικό τοίχωμα δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως. Ορισμένα απολυμαντικά επιδρούν στην διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ οι χλωραμίνες και το διοξείδιο του χλωρίου παρεμβαίνουν στον ενζυματικό μηχανισμό. Επίσης, ένας ακόμη μηχανισμός απολύμανσης, είναι η αλλαγή της κολλοειδούς φύσης του πρωτοπλάσματος. Η απολυμαντική ουσία μειώνει τον αρχικό πληθυσμό παθογόνων μικροοργανισμών κατά την διάρκεια συγκεκριμένου χρόνου επαφής.

1.2.2. Νόμος της Harriette Chick

Η Harriette Chick παρατήρησε ότι για μία συγκεκριμένη συγκέντρωση απολυμαντικού, όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επαφής, τόσο μεγαλύτερη είναι η θανάτωση των μικροοργανισμών. Ο Νόμος της Chick περιγράφει την απολυμαντική δράση ενός απολυμαντικού μέσου και δίνεται από την εξής σχέση (Metcalf & Eddy, 2007):

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

Όπου:

$\left(\frac{dN_t}{dt}\right)$: Ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών με το χρόνο

k : Σταθερά ρυθμού απενεργοποίησης

N_t : Αριθμός μικροοργανισμών σε χρόνο t

t : Χρόνος

Αν N_0 είναι ο αριθμός των οργανισμών όταν t ισούται με το μηδέν, η παραπάνω εξίσωση μπορεί να ολοκληρωθεί σε :

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

ή

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -kt$$

N_0 = ο αρχικός αριθμός μικροοργανισμών στο σύστημα

N = ο αριθμός των μικροοργανισμών μετά από χρόνο t της απολύμανσης

1.2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την Απολυμαντική Δράση

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης μετράται ευρέως με το λογαριθμικό δείκτη απομάκρυνσης των παθογόνων μικροοργανισμών LVR που δίνεται από τη σχέση $LVR = \log_{10} (C_{in} / C_{out})$,

όπου: C_{in} η συγκέντρωση του παθογόνου στο αρχικό εναιώρημα και C_{out} η συγκέντρωση του παθογόνου στο εναιώρημα μετά την επεξεργασία

Συνεπώς, για συγκεκριμένο παθογόνο τιμή LVR ίση με 2 αντιστοιχεί σε 99% απολύμανση ενώ $LVR=4$ αντιστοιχεί σε 99,99% απολύμανση. Η ικανότητα των απολυμαντικών μέσων να επιδρούν στο κυτταρικό υλικό και να παρεμποδίζουν τους μηχανισμούς λειτουργίας του κυττάρου, εξαρτάται κυρίως από το είδος του απολυμαντικού, το είδος και την κατάσταση του μικροοργανισμού, τη συγκέντρωση του απολυμαντικού, το χρόνο επαφής, το pH, τη θερμοκρασία, τη θολερότητα, το διαλυτό οργανικό υλικό και την ύπαρξη βιολογικού υμενίου (βιοφίλμ) (Βενιέρη, 2017).

- Χρόνος επαφής

Ο χρόνος επαφής ίσως να αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεταβλητές στη διεργασία της απολύμανσης. Όπως προαναφέρθηκε, αυτή είναι μία σχέση που αναπτύχθηκε από την Chick στις αρχές του 1900 (Metcalf & Eddy, 2007) :

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

- 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

Η απόδοση της απολύμανσης εξαρτάται από το είδος του απολυμαντικού που χρησιμοποιούμε εναντίον συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Το χλώριο και οι διάφορες ενώσεις του, για παράδειγμα, δεν επιτυγχάνουν τον υψηλό ρυθμό θανάτωσης κάποιων ιών που επιτυγχάνει το όζον (Βενιέρη, 2017).

- 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 παράδειγμα αν η αποσύνθεση των οργανισμών μπορεί να περιγραφεί με μια πρώτης τάξης 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) :

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

Όπου :

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

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

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

- Τα είδη των μικροοργανισμών

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης επηρεάζεται από τη 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. Επίσης, είναι σαφές ότι μικροοργανισμοί που για κάποιο λόγο έχουν καταστεί λιγότερο ακμαίοι, είναι πιο ευαίσθητοι στα διάφορα απολυμαντικά (Φραγγεδάκη, 2014).

- 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, 2017).

- 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 (Metcalf & Eddy, 2007).

- 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 υποχλωριδίων, των φαινολών και του ιωδίου (Βενιέρη, 2017).

- Θολερότητα

Η θολερότητα έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζει την απολύμανση, επειδή τα σωματίδια που την αποτελούν μπορούν να περιβάλλουν και να προστατέψουν τους μικροοργανισμούς από την δράση του απολυμαντικού. Επίσης το υλικό από το οποίο αποτελούνται τα σωματίδια της θολότητας προκαλεί κατανάλωση απολυμαντικού με αντίστοιχη απαίτηση για αυξημένες δόσεις απολύμανσης (Παλαιολόγου, 2008).

- 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, 2017).

1.3. Απολύμανση με Χλώριο

Η Απολύμανση παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο για την εξασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητας του πόσιμου νερού, μειώνοντας διαφόρους ποθογενείς μικροοργανισμούς όπως είναι τα βακτήρια και οι ιοί που μπορούν να προκαλέσουν κάποια ασθένεια. Το χλώριο είναι το πιο σύνηθες απολυμαντικό μέσο στον κόσμο τόσο για το νερό όσο και για τα λύματα εξαιτίας της αποτελεσματικότητάς του και του χαμηλού κόστους του (Sulaiman, 2012).

1.3.1. Ιδιότητες του Χλωρίου

Το χλώριο κατά την απολύμανση χρησιμοποιείται ως μοριακό χλώριο σε αέρια μορφή (Cl_2) ή ως υποχλωριώδες ανιόν προερχόμενο από το άλας του με νάτριο (NaOCl) (χρησιμοποιείται σε υγρή μορφή) ή από το άλας του με ασβέστιο (Ca(OCl)_2) (σε στερεή μορφή). Το αέριο χλώριο έχει ανοιχτό πράσινο χρώμα, έντονη οσμή και χαρακτηρίζεται ως τοξικό. Λόγω της επικινδυνότητας, αέριο χλώριο χρησιμοποιείται μόνον από μεγάλες εγκαταστάσεις πόσιμου νερού. Στις περισσότερες περιπτώσεις απολύμανσης γίνεται χρήση του υποχλωριώδους νατρίου. Όλα τα διαλύματά του είναι ισχυρά οξειδωτικά, αλλά ασταθή, διασπώνται με το χρόνο και παρουσία φωτός. Οι συνήθεις διαθέσιμες στο εμπόριο συγκεντρώσεις του υποχλωριώδους νατρίου κυμαίνονται μεταξύ 5 και 15% w/v, έχει χρώμα υποκίτρινο, χαρακτηριστική οσμή και είναι ισχυρά αλκαλικό και διαβρωτικό (Διαμαντόπουλος, 2008).

Μία ευρέως διαδεδομένη μέθοδος απολύμανσης είναι η χρήση ελεύθερου χλωρίου, το οποίο είναι τοξικό στους περισσότερους παθογόνους μικροοργανισμούς. Ελεύθερο (ή υπολειμματικό) είναι το χλώριο στην μοριακή του μορφή και τα παράγωγά του (υποχλωριώδες οξύ, υποχλωριώδη ιόντα).

Η επιλογή της μορφής που θα χρησιμοποιηθεί για την απολύμανση του νερού εξαρτάται από το κόστος, τις συνθήκες ασφαλείας και τις λειτουργικές ιδιαιτερότητες της εγκατάστασης. Όταν το pH του νερού είναι όξινο ($\text{pH} < 5$) το χλώριο παραμένει στην μοριακή του μορφή, ενώ για $\text{pH} > 5$ δημιουργείται υποχλωριώδες οξύ.

1.3.2. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της Χλωρίωσης

Το προτέρημα της χλωρίωσης έναντι άλλων απολυμαντικών του νερού είναι ότι είναι αρκετά ισχυρό ώστε να απαλλάσσει το νερό από τους πολλούς παθογόνους μικροοργανισμούς ενώ συγχρόνως παρέχει υπολειμματικό απολυμαντικό το οποίο, ανάλογα με άλλες παραμέτρους του νερού, μπορεί να παραμείνει σαν προστατευτικός παράγοντας για κάποιο χρονικό διάστημα (Βενιέρη, 2017). Επιπλέον είναι οικονομική σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους απολύμανσης και απλή στην εφαρμογή (Καλέμη, 2015).

Εντούτοις, η χλωρίωση, κυρίως λόγω των αντιδράσεων του χλωρίου με το νερό αλλά και άλλες οργανικές και ανόργανες ουσίες, έχει και κάποια μειονεκτήματα ως μέθοδος που αξίζει να σημειωθούν.

Τα βασικά μειονεκτήματά της είναι τα ακόλουθα:

α) Το ελεύθερο χλώριο, που είναι τοξικό για τους μικροοργανισμούς, είναι επίσης τοξικό και καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Είναι απαραίτητη η εγκατάσταση μονάδας στην οποία θα ελέγχεται αυτόματα το επίπεδο του ελεύθερου χλωρίου, καθώς πρέπει να αποφεύγεται η υπερδοσολογία.

β) Το ελεύθερο χλώριο, είναι μια ιδιαίτερα δραστική ουσία, αντιδρά με διάφορες οργανικές ουσίες που εμπεριέχονται στο νερό δημιουργώντας τα παράγωγα της χλωρίωσης (τριοξοχλωρομεθάνια, κ.α.). Τα παράγωγα της χλωρίωσης είναι τοξικότερες ουσίες από το ίδιο το ελεύθερο χλώριο και για αυτά προβλέπονται ανώτατα επιτρεπόμενα όρια. Η τοξικότητα των παραγώγων της χλωρίωσης ως προς τον άνθρωπο, καθιστά τη χρήση της ελεγχόμενης χλωρίωσης του νερού απαραίτητη σε κάθε περίπτωση.

γ) Η χλωρίωση του νερού προσδίδει ιδιαίτερη γεύση σε αυτό που ενοχλεί μέρος των καταναλωτών.

1.3.3. Παραπροϊόντα Χλωρίωσης και Επιπτώσεις στην Δημόσια Υγεία

Η εξέλιξη της τεχνολογίας οδήγησε σε καλύτερες μεθόδους ανίχνευσης των παραπροϊόντων της χλωρίωσης. Χημικές ουσίες διαλυμένες στο νερό είναι δυνατόν να αντιδρούν με το χλώριο και να δημιουργηθούν τριοξοχλωρομεθάνια (πχ χλωροφόρμιο). Η ανησυχία για τις πιθανές επιπτώσεις των τριοξοχλωρομεθανίων στην ανθρώπινη υγεία, άρχισε με την υπόθεση ότι το χλωροφόρμιο είναι καρκινογόνο. Σήμερα όμως μελετώνται και άλλες παρενέργειες (στεριότητα, επίδραση στα νεφρά ή το συκώτι, επίδραση στο νεφρικό ή αιμοποιητικό σύστημα).

Παραπροϊόντα της Χλωρίωσης είναι και οι χλωραμίνες. Παράγονται στο σημείο χρήσης από χλώριο και αμμωνία και βοηθούν στην απομάκρυνση οσμών και γεύσης που αφήνει στο νερό η χλωρίωση. Έχουν ασθενέστερη απολυμαντική δράση από το ελεύθερο χλώριο, έχουν χημικά σταθερότερη υπολειμματική απολυμαντική δράση και δεν ευνοούν την δημιουργία τριοξοχλωρομεθανίων. Γενικά, η χλωραμίνωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δευτερογενής απολύμανση για την βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του χλωριωμένου νερού. Ένα ακόμη σημαντικό παράγωγο της χλωρίωσης είναι το Διοξείδιο του Χλωρίου. Έχει καλή απολυμαντική δράση και δημιουργεί πολύ λίγα παραπροϊόντα, όπως τριοξοχλωρομεθάνια. Είναι όμως ασταθές αέριο και δεν μπορεί να παραχθεί σε εμπορεύσιμη μορφή, αλλά πρέπει να παράγεται στο σημείο χρήσης κάτω από αυστηρές διαδικασίες ασφαλείας.

Πίνακας 1: Κανονισμοί για τα Παραπροϊόντα Απολύμανσης στο Νερό World Health Organization (Φραγγεδάκη, 2014)

<i>U.S. EPA regulations</i>	<i>MCL (mg/L)</i>
Total THMs (chloroform, bromodichloromethane, chlorodibromomethane, bromoform)	0.080
5 Haloacetic acids (chloro-, bromo-, dichloro-, dibromo-, trichloroacetic acid)	0.060
Bromate	0.010
Chlorite	1.0
<i>World Health Organization (WHO) guidelines</i>	<i>Guideline value^a (mg/L)</i>
Chloroform	0.3
Bromodichloromethane	0.06
Chlorodibromomethane	0.1
Bromoform	0.1
Carbon tetrachloride	0.004
Chloroacetic acid	0.02
Dichloroacetic acid	0.05 ^b
Trichloroacetic acid	0.2
Bromate	0.01 ^b
Chlorite	0.7 ^b
Dichloroacetonitrile	0.02 ^b
Dibromoacetonitrile	0.07
Cyanogen chloride	0.07
2,4,6-trichlorophenol	0.2
N-Nitrosodimethylamine (NMDA)	0.1
<i>European Union Standards</i>	<i>Standard value^a (mg/L)</i>
Total THMs	0.1
Bromate	0.01 ^c
<i>Other regulations</i>	<i>MCL (ng/L)</i>
NMDA	9 ^d , 10 ^e

^aWorld Health Organization (WHO) guidelines on THMs state that the sum of the ratio of the concentration of each THM to its respective guideline value should not exceed unity. WHO guidelines can be found at http://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwq3rev/en/. European Union drinking water standards can be found at www.nucfilm.com/eu_water_directive.pdf

^bProvisional guideline value

^cWhere possible, without compromising disinfection, EU member states should strive for a lower value

^dOntario, Canada

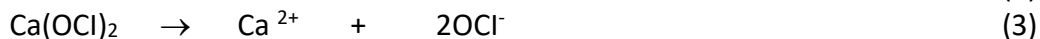
^eCalifornia, U.S.

1.3.4. Αντιδράσεις του Χλωρίου με το Νερό

Η προσθήκη του χλωρίου στο νερό ακολουθείται, όταν πρόκειται για το μοριακό, από υδρόλυση (η διαδικασία κατά την οποία το Cl₂ ενώνεται με το νερό και σχηματίζεται το υποχλωριώδες οξύ (HOCl)) (εξίσωση 1).

Στην περίπτωση των αλάτων του από διάσταση (εξισώσεις 2 και 3), το υποχλωριώδες ασβέστιο και νάτριο υδρολύονται για να σχηματίσουν υποχλωριώδες οξύ (HOCl).

Στη συνέχεια το ασθενές υποχλωριώδες οξύ (HOCl) βρίσκεται σε χημική ισορροπία με το υποχλωριώδες ανιόν (ιονισμός) (εξίσωση 4):



με $\text{pK}_a = 7,537$ στους 25°C

Όπως φαίνεται παραπάνω σε υδατικά διαλύματα τελικά επικρατεί η ισορροπία που περιγράφεται από την εξίσωση (4) ανεξάρτητα από ποια μορφή χλωρίου χρησιμοποιείται ως απολυμαντικό. Σημαντική επίδραση στη χημική ισορροπία και τελικά στο ποιο είδος επικρατεί (ιόν ή αδιάστατη μορφή) έχει το pH του διαλύματος.

1.3.5. Επίδραση της Χλωρίωσης σε Βακτήρια που είναι Ανθεκτικά σε Αντιβιοτικά

Μελέτες σχετικά με την επίδραση της χλωρίωσης σε βακτήρια που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά ξεκινούν από τη δεκαετία του 1970, όπου η χλωρίωση αποδείχθηκε ότι επηρέασε την αναλογία των ανθεκτικών σε πολλαπλά αντιβιοτικά βακτηρίων στο πόσιμο νερό και στα λύματα (Grabow and van Zyl, 1976, Armstrong et al., 1982, Murray et al., 1984). Το γενικό συμπέρασμα ήταν ότι ως μέθοδος δύναται να συμβάλει στην τροποποίηση των μικροβιακών πληθυσμών, επάγοντας την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (Hong-Ying et al., 2011).

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).

Για την κατανόηση των κινδύνων της χλωρίωσης που προκύπτουν από την πιθανή επιβίωση κι εξάπλωση βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά, είναι απαραίτητη η εξέταση των ρυθμών απενεργοποίησης και επανενεργοποίησης τόσο των συνολικών ετεροτροφικών βακτηρίων όσο και των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων (Hong-Ying et al., 2011).

1.4. Ανθεκτικότητα στα Αντιβιοτικά

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ορίζεται από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO) ως η ανθεκτικότητα ενός μικροοργανισμού σε κάποιον αντιβιοτικό παράγοντα, ο οποίος ήταν αρχικά αποτελεσματικός στην θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από τον μικροοργανισμό αυτό. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά έχει ήδη χαρακτηριστεί ως μια από τις τρεις πρώτες απειλές για την παγκόσμια υγεία. Παράλληλα, τα βακτήρια που είναι ανθεκτικά σε αντιβιοτικά (Antibiotic Resistant Bacteria – ARB) και τα αντίστοιχα γονίδια ανθεκτικότητας που φέρουν (Antibiotic Resistance Genes - ARGs) έχουν προκαλέσει αυξανόμενα διεθνή προβλήματα τα τελευταία χρόνια. Παρόλο που υπάρχουν λίγες μελέτες για την ARB, έχει ήδη επιβεβαιωθεί ότι εξακολουθούν να υφίστανται ακόμη και σε χώρους όπου δεν έχει ανιχνευθεί κάποιο αντιβιοτικό (Hongna et. al., 2017).

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν την μικροβιακή αντοχή, όπως τυχαίες μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό ενός κυττάρου ή μόνιμη ενσωμάτωση μεταθετών γενετικών στοιχείων, που περιέχουν γονίδια ανθεκτικά σε

αντιμικροβιακούς παράγοντες, τα οποία μεταφέρονται ελεύθερα μεταξύ των βακτηρίων ή λόγω φυσικής αντίστασης που αφορά συγκεκριμένους τύπους μικροοργανισμών.

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τη φυσική ή ενδογενή αντοχή και την επίκτητη αντοχή (Αβραμίδου, 2017).

Η ενδογενής αντοχή, οφείλεται σε χρωμοσωμικά γονίδια και είναι η δυνατότητα ενός βακτηριακού είδους να αντιστέκεται στη δραστηριότητα ενός συγκεκριμένου αντιμικροβιακού παράγοντα μέσω των εγγενών δομικών ή λειτουργικών χαρακτηριστικών του, τα οποία επιτρέπουν την ανοχή σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό ή σε μία κλάση αντιβιοτικού.

Σε αντίθεση, η επίκτητη ανθεκτικότητα δημιουργείται είτε με σημειακές μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα, οι οποίες είναι τυχαίες και αφορούν το χρωμοσωμικό DNA, είτε με απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού (π.χ. ανθεκτικού γονιδίου) από άλλους μικροοργανισμούς κυρίως μέσω των πλασμιδίων, τα οποία μεταφέρονται με οριζόντια μεταφορά γονιδίων.

Έτσι, η επίκτητη ανθεκτικότητα είναι αυτή που αποτελεί κύριο αίτιο εξάπλωσης της ανθεκτικότητας από ανθρωπογενείς δραστηριότητες στο περιβάλλον.

1.4.1. Το πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής στην Ελλάδα

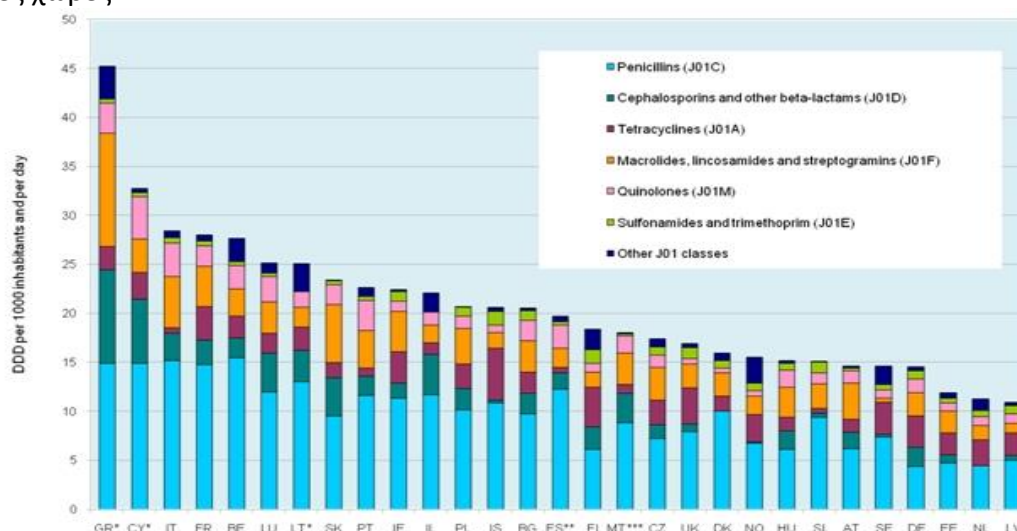
Η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις ευρωπαϊκές χώρες με τα υψηλότερα επίπεδα μικροβιακής αντοχής, ενώ είναι πρώτη στη συνολική κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων.

Η διασπορά στελεχών ανθεκτικών στα περισσότερα αντιβιοτικά ευθύνεται για την πρόκληση σοβαρών λοιμώξεων, ιδίως σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς με αποτέλεσμα την παράταση της νοσηλείας τους, την αύξηση της θνητότητας και την αύξηση του κόστους νοσηλείας για τα νοσηλευτικά ιδρύματα. Οι λοιμώξεις από πολυανθεκτικά παθογόνα αποτελούν καθημερινή πραγματικότητα και για τα ελληνικά νοσοκομεία και καθιστούν επιτακτική την ανάγκη λήψης και εφαρμογής αποτελεσματικών μέτρων για την πρόληψη και τον έλεγχο τους (ΚΕΕΛΠΝΟ).

Η συνεχώς καταγραφόμενη αύξηση της μικροβιακής αντοχής οφείλεται στην κατάχρηση των αντιμικροβιακών παραγόντων, ειδικότερα αυτών που χαρακτηρίζονται ως ευρέος φάσματος. Αποτέλεσμα της αυξανόμενης αντοχής είναι η έξαρση των νοσοκομειακών λοιμώξεων από πολυανθεκτικούς μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την αύξηση της νοσηρότητας, της διάρκειας νοσηλείας των ασθενών, της θνησιμότητας των νοσηλευμένων ασθενών και τελικά την οικονομική επιβάρυνση των Συστημάτων Υγείας (ΚΕΕΛΠΝΟ).

Αναλυτικά, σύμφωνα με καταγραφές από το ESAC (European Surveillance of Antimicrobial Consumption), η Ελλάδα είναι η πρώτη χώρα της Ευρώπης με συνολική – και ειδικότερα εξωνοσοκομειακή – κατανάλωση αντιβιοτικών, 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.



*Συνολική χρήση, συμπεριλαμβανομένων και των νοσηλευομένων (CY, GR, LT)

**Δεδομένα βάσει αποζημίωσης, π.χ. πώληση χωρίς ιατρική συνταγή (ES)

***Δεδομένα του έτους 2007 (MT)

Εικόνα 2: Χρήση Αντιμικροβιακών Εξωνοσοκομειακά στην Ευρωπαϊκή Ένωση κατά το έτος 2017 (ΚΕΕΛΠΝΟ)

1.4.2. Διάδοση της Ανθεκτικότητας στο Περιβάλλον

Τα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για αρκετές δεκαετίες για την προστασία της ανθρώπινης υγείας, τη μείωση των ασθενειών και την προώθηση της ανάπτυξης του ζωικού κεφαλαίου. Δεδομένου ότι τα περισσότερα αντιβιοτικά είναι υδατοδιαλυτά, έως και 30-90% των μητρικών ενώσεων μπορούν να απελευθερωθούν στο περιβάλλον μέσω εκκρίσεων των περιττωμάτων και των ούρων, δημιουργώντας πιθανούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και τα οικοσυστήματα. Τα αντιβιοτικά συχνά έχουν εντοπιστεί στο έδαφος, στα επιφανειακά ύδατα και τα λύματα, ειδικά εκείνα που σχετίζονται με τις συμπυκνωμένες ζωοτροφές. Υψηλές συγκεντρώσεις τετρακυκλινών (TCs) έχουν ανιχνευθεί στα περισσότερα εδάφη που δέχονται μακροχρόνιες εφαρμογές κοπριάς (Hongna et. al., 2017).

Επιπλέον, η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά σε οργανισμούς, είναι επίσης σημαντική εξαιτίας της ικανότητάς τους να μεταδίδουν δυνητικά την αντίσταση σε άλλους οργανισμούς μέσω μεταδοτικών παραγόντων αντίστασης (Séveno et al., 2002, Bennett, 2008, Martínez, 2008). Οι αστικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντικές δεξαμενές για διάφορα βακτήρια και γονίδια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά (Zhang et al., 2009, Pruden et al., 2006, Reinthaler et al., 2003).

Γενικά αξίζει να αναφερθεί ότι οι κυριότερες αναμενόμενες οδοί έκθεσης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι (Νιάρχος, 2015):

- 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

Όσο αφορά κυρίως στα υδάτινα οικοσυστήματα, μπορούν να λειτουργήσουν ως ιδανικό περιβάλλον για την απόκτηση και τη διάδοση της ανθεκτικότητας, αφού είναι συχνά και άμεσα επηρεαζόμενα από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Το υδάτινο περιβάλλον δεν αποτελεί μόνο ένα περιβάλλον όπου γονίδια ανθεκτικότητας εισάγονται σε βακτηριακές κοινότητες αλλά και μέσο διάδοσης των ανθεκτικών μικροοργανισμών στο περιβάλλον.

1.5. Αντιβιοτικά

Πολλά αντιβιοτικά βρίσκονται στη φύση και συντίθενται από βακτήρια, μύκητες ή ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Υπάρχουν 3 διαφορετικά είδη αντιβιοτικών. Τα φυσικά αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη, με μερικά στελέχη από τα οποία προκύπτουν τα φυσικά αντιβιοτικά να είναι τα *Bacillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Streptomyces sp.* Μερικά είναι ημι - συνθετικά αντιβιοτικά, δηλαδή φυσικά αντιβιοτικά, τα οποία έχουν υποστεί χημική τροποποίηση και μερικά ανήκουν στην κατηγορία των συνθετικών παραγώγων, όπως οι κινολόνες και ανήκουν στην κατηγορία των αναδυόμενων οργανικών ρύπων.

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

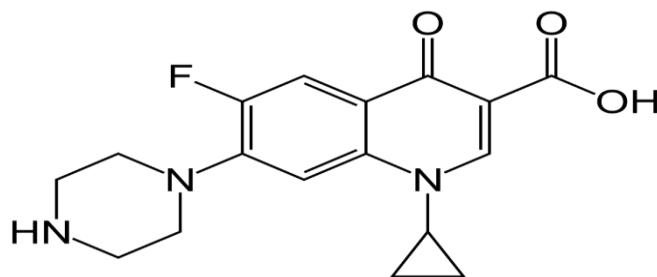
Οι βασικές κατηγορίες αντιβιοτικών είναι οι ακόλουθες:

Πίνακας 2: Βασικές Κατηγορίες Αντιβιοτικών

Κατηγορίες Αντιβιοτικών	Αντιβιοτικά
β –λακτάμες	Penicillins (Ampicillin, Amoxycillin) , Cephalosporin (Cefaclor) , Cefamycins (Cefoxitin), Oxolactams (Latamoxef)
Αμινογλυκωσίδες	Amikacin, Streptomycin, Gentamycin (Garamycin), Netilmycin (Netromycin)
Σουλφοναμίδες	Sulphamethoxazole (Septrin, Bactrimel)
Κινολόνες	Norfloxacin (Norocin), Enoxacin, Ciprofloxacin (Ciproxin)
Τετρακυκλίνες	Doxycyclin (Vibramycin), Minocyclin (Minocin)
Μακρολύδια	Erythromycin Stearate, Clarithromycin (Claridic), Lincomycin

1.5.1. Σιπροφλοξασίνη

Η Σiproφλοξασίνη (ciprofloxacin) ανήκει στις κινολόνες, μια κατηγορία αντιβιοτικών που είναι κατάλληλη για τη θεραπεία λοιμώξεων ευρέος φάσματος.



Εικόνα 3: Μοριακή Απεικόνιση Ciprofloxacin (www.galinos.gr)

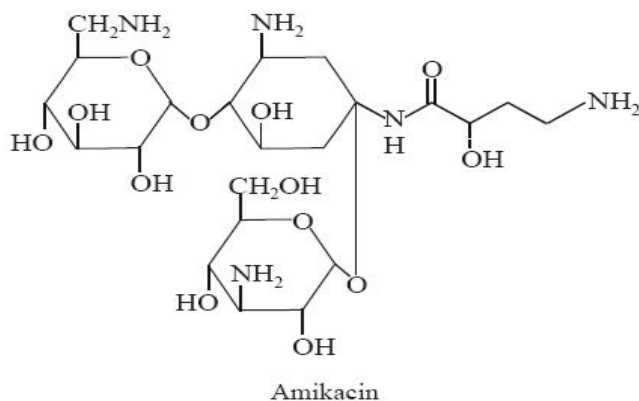
Οι κινολόνες είναι ευρέος φάσματος, συνθετικά αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση βακτηριακού DNA. Αυτά τα φάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πρακτική για τη θεραπεία λοιμώξεων (Beberok et al., 2018).

Οι Κινολόνες εντοπίζονται σε υπόγεια και επιφανειακά ύδατα εξαιτίας της έλλειψης απομάκρυνσης αυτών των ενώσεων με συμβατικές διαδικασίες επεξεργασίας λυμάτων. Συμβάλλουν στην εμφάνιση και εξάπλωση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και των γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Επιπλέον, αυτά τα αντιβιοτικά μπορούν να αυξήσουν την τοξικότητα του πηγαίου νερού και αυτό να δημιουργήσει κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία (Wang et. al., 2017).

Όσο αφορά την Σiproφλοξασίνη (CIP), η οποία έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς τα τελευταία 20 χρόνια, αναφέρεται ότι η συγκέντρωση της CIP στο υδάτινο περιβάλλον είναι γενικά χαμηλή. Η μη αποτελεσματική απομάκρυνση του CIP από συμβατικές τεχνολογίες επεξεργασίας νερού έχει προκαλέσει την ανίχνευση του CIP στο πόσιμο νερό. Ωστόσο, η χαμηλή συγκέντρωση CIP είναι τοξική για μερικούς υδρόβιους οργανισμούς και δρουν εναντίον Gram (-) και Gram (+) βακτηρίων μέσω της αναστολής του βακτηριακού DNA. Το CIP μπορεί επίσης να επηρεάσει τη σύνθεση βακτηριακής κοινότητας στο υδάτινο περιβάλλον και ο αντίκτυπός του στις μικροβιακές κοινότητες είναι επιλεκτικός. Επιπλέον, η μετατόπιση της βακτηριακής κοινότητας οδηγεί στην προώθηση της αντίστασης στα αντιβιοτικά κατά τη διάρκεια της χλωρίωσης του πόσιμου νερού. Επομένως, για να ελέγχεται η ρύπανση του νερού από το CIP, πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει την υποβάθμιση της CIP με διαφορετικές τεχνολογίες επεξεργασίας νερού, συμπεριλαμβανομένης της χλωρίωσης, της οζόνωσης και άλλων προηγμένων διαδικασιών οξείδωσης (Wang et. al., 2017).

1.5.2. Αμικασίνη

Η Αμικασίνη είναι μία ημισυνθετική αμινογλυκοσίδη που προέρχεται από την Καναμικίνη Α. Οι αμινογλυκοσίδες είναι αντιβιοτικά που ανήκουν στην κατηγορία των ολιγοσακχαριδών, με συνδυασμό ομάδων αμινοσακχάρων και κυκλοεξανίων. Αποτελούν μια μεγάλη, ακόμη αυξανόμενη ομάδα από περίπου 200 υδατοδιαλυτά αντιβιοτικά.



Εικόνα 4: Μοριακή Απεικόνιση Amikacin (www.galinos.gr)

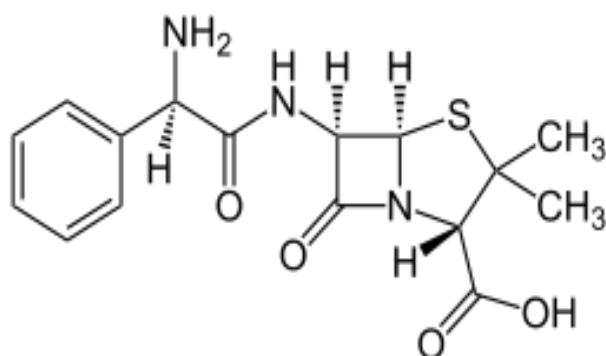
Η Αμικασίνη είναι δραστική έναντι πολλών Gram (-) βακτηρίων (Scholar, 2007) και είναι σήμερα ένα από τα φάρμακα πρώτης γραμμής στη διαχείριση σοβαρών λοιμώξεων από Gram (-) βακτήρια ακόμα και για ασθενείς σε κρίσιμη κατάσταση (Ruiz et. al., 2018). Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιείται ευρέως εδώ και δεκαετίες, η σωστή δοσολογία αμικασίνης σε ασθενείς με κρίσιμη νόσο εξακολουθεί να είναι αβέβαιη.

Η Αμικασίνη είναι ένα πολύ αποτελεσματικό αντιβιοτικό αμινογλυκοσίδης αλλά εξαιτίας της υψηλής του τοξικότητας, η χρήση αυτού του αντιβιοτικού έχει περιοριστεί (Sabaiefard et. al., 2016).

Εύλογα λοιπόν, εφόσον η χρήση της Αμικασίνης έχει περιοριστεί και δεδομένου ότι τα περισσότερα αντιβιοτικά είναι υδατοδιαλυτά, η Αμικασίνη δεν συναντάται και με την ίδια συχνότητα στα επιφανειακά νερά. Οπότε η αντίσταση των βακτηρίων στην Αμικασίνη δεν μεταδίδεται σε τόσο μεγάλο βαθμό.

1.5.3. Αμπικιλλίνη

Η Αμπικιλλίνη (ampicillin) είναι ευρέος φάσματος ημισυνθετική πενικιλλίνη που ασκεί βακτηριοκτόνο δράση εναντίον Gram (-) & Gram (+) βακτηρίων.



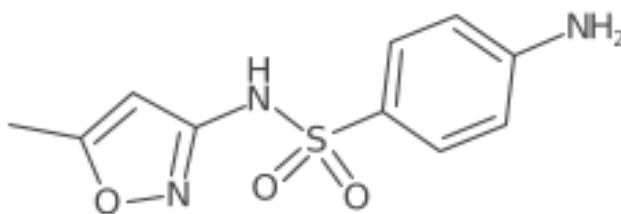
Εικόνα 5: Μοριακή Απεικόνιση Ampicillin (www.galinos.hr)

Η Αμπικιλίνη είναι ένα αντιβιοτικό τύπου πενικιλίνης μέλος των β-λακταμών (BLAs), που χρησιμοποιείται συνήθως για τη θεραπεία ορισμένων βακτηριακών λοιμώξεων όπως η πνευμονία, η βρογχίτιδα και οι λοιμώξεις του ουροποιητικού του δέρματος.(Yu et. al., 2018).

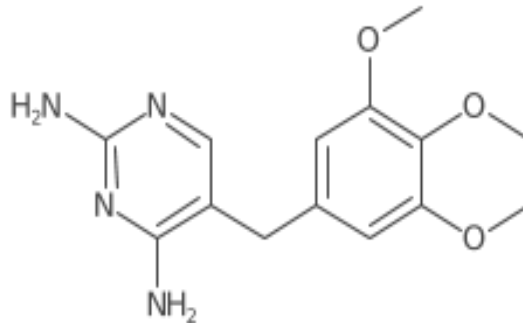
Η Αμπικιλίνη είναι δραστική έναντι μικροοργανισμών με αναστολή της σύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού. Επί του παρόντος, η κακή χρήση και η κατάχρηση της προκαλεί μια μεγάλη ανησυχία μαζί με την αντοχή στο φάρμακο. Τα υπολείμματα αντιβιοτικών σε ανθρώπινα, ιατρικά απόβλητα, αγροκτήματα και φαρμακευτικά και νοσοκομειακά λύματα μπορούν να μολύνουν φυσικά περιβάλλοντα. Η μακροχρόνια έκθεση της Αμπικιλίνης στο υδάτινο περιβάλλον μπορεί να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης και διάδοσης αντοχής, γεγονός που αποτελεί σοβαρή απειλή (Wu, et. al., 2016).

1.5.5. Μίγμα και Αναλογία Σουλφαμεθοξαζόλη-Τριμεθοπρίμη

Η συνέργεια μεταξύ Τριμεθοπρίμης και Σουλφαμεθοξαζόλης περιγράφηκε για πρώτη φορά σε μια σειρά in vitro και in vivo πειράματα που δημοσιεύθηκε στα τέλη του 1960. Το μίγμα αυτών των δύο αντιβιοτικών κατασκευάζεται γιατί είναι ισχυρότερο από ότι είναι ξεχωριστά, δρώντας πιο αποτελεσματικά στην αδρανοποίηση βακτηρίων. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι επειδή αναστέλλουν διαδοχικά βήματα στην οδό σύνθεσης φολικού οξέος.



Εικόνα 6: Μοριακή Απεικόνιση Sulfamethoxazole (www.galinos.gr)



Εικόνα 7: Μοριακή Απεικόνιση Trimethoprim (www.galinos.gr)

Η Σουλφαμεθοξαζόλη είναι ένα αρκετά αποτελεσματικό αντιβιοτικό που ανήκει στην ομάδα των σουλφοναμίδων. Ωστόσο, λόγω της ανθεκτικότητας που έχουν αναπτύξει τα βακτήρια σε αυτή, είναι σχεδόν ανενεργό ως μοναδικό δραστικό συστατικό. Έτσι, χρησιμοποιείται κυρίως σε συνδυασμό με την ουσία Τριμεθοπρίμη.

Η Σουλφαμεθοξαζόλη έχει ανιχνευθεί σε συγκεντρώσεις μέχρι και 2 µg/L σε εκροές εγκαταστάσεων βιολογικών καθαρισμών (Hirsch, 1999) καθώς και σε επιφανειακά νερά σε συγκεντρώσεις μέχρι και 1,9 µg/L (Kolpin, 2002). Επίσης χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν ανιχνευθεί σε μικρό αριθμό δειγμάτων υπόγειων υδάτων στην Γερμανία και στις Η.Π.Α (Hirsch 1999, Lindsey, 2001).

Η Τριμεθοπρίμη έχει ανιχνευθεί σε επιφανειακά νερά στην Ευρώπη από τα τέλη του 1990. Οι περισσότερες μετρήσεις έχουν γίνει στην Γερμανία ενώ ακολουθούν η Γαλλία και η Ολλανδία.

2. Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η απομόνωση βακτηρίων που βρίσκονται σε επιφανειακά ύδατα και ο έλεγχος της αδρανοποίησης τους μέσω της χλωρίωσης, καθώς και η διερεύνηση επίδρασης της απολύμανσης στο προφίλ ανθεκτικότητάς τους σε αντιβιοτικά.

Η δειγματοληψία και απομόνωση στελεχών έγιναν από επιφανειακά νερά της περιοχής των Χανίων και τα στελέχη που εξετάστηκαν ανήκουν στις βακτηριακές οικογένειες *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* και *Enterococcaceae*.

Οι στόχοι της συγκεκριμένης εργασίας είναι:

- Η απομόνωση βακτηριακών στελεχών από επιφανειακά ύδατα.
- Αδρανοποίηση των στελεχών με εφαρμογή της μεθόδου της χλωρίωσης και η ποσοτικοποίηση της μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού σε σχέση με τον χρόνο ώστε να επιτευχθεί η μελέτη της κινητικής της απολύμανσης.
- Συσχέτιση της συμπεριφοράς των στελεχών απέναντι στην απολύμανση με βάση την βακτηριακή οικογένεια στην οποία ανήκουν.
- Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά (Ampicillin, Amikacin, Ciprofloxacin, Trimethoprim-Sulfamethaxazole) πριν και μετά τη χλωρίωση.
- Η εύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) για καθένα από τα υπό μελέτη αντιβιοτικά.
- Σύγκριση των προφίλ ανθεκτικότητας στα βακτήρια πριν και μετά την απολύμανση.

3. Μέθοδοι και Υλικά

3.1. Υλικά

Συσκευές και Όργανα

- Συσκευή διήθησης υπό κενό (PALL Gelman Laboratory).
- 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

Χημικά και Θρεπτικά Υλικά

- Οξικό Οξύ CH_3COOH (Sigma Aldrich)
- Ιωδιούχο κάλιο KI (Sigma Aldrich)
- Θειοθειικό νάτριο $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ κανονικότητας 0,1 N (Panreac)
- Χλωριούχο νάτριο NaCl (Sigma Aldrich)
- Υποχλωριώδες νάτριο NaOCl (Sigma Aldrich)
- Nutrient Agar (Lab M)
- Nutrient Broth (HiMedia)
- HiCrome Broth (Lab M)
- Slanetz & Bartley Medium (HiMedia)

Διαλύματα

- Διάλυμα NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L (ως προς Cl_2)
- Διάλυμα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ συγκέντρωσης 18 mg/L
- Διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 0,8 % w/v

Αντιβιοτικά

- Ampicillin (Sigma-Aldrich)
- Amikacin (Sigma-Aldrich)
- Ciprofloxacin (Sigma-Aldrich)
- Trimethoprim-Sulfamethaxazole (Sigma-Aldrich)

Εργαστηριακά Υλικά

- Φιάλες διήθησης (Whatman)
- Φίλτρα μεμβράνης νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0,45 μm (Whatman)

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

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Μέθοδος Απομόνωσης Στελεχών με Διήθηση

Η απομόνωση μέρους των βακτηρίων που εξετάζονται στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε μεταξύ Ιανουαρίου 2012 και Δεκεμβρίου 2013 στην περιοχή του Αποκόρωνα, στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής της κυρίας Χρύσας Μπούκη.

Για την απομόνωση των υπόλοιπων εξεταζόμενων βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε σειρά δειγματοληψιών κατά τους μήνες Μάιο και Σεπτέμβριο του 2017. Οι δειγματοληψίες έγιναν στην λίμνη της Αγιάς των Χανίων και το νερό συλλέχθηκε από την ακτή σε βάθος περίπου 1m. Εν συνεχεία, έγινε συντήρηση των δειγμάτων στη κατάλληλη θερμοκρασία και η περαιτέρω επεξεργασία τους έγινε σε σύντομο χρονικό διάστημα, μικρότερο δηλαδή από μία ημέρα. Αποφεύχθηκε επίσης η διεξαγωγή δειγματοληψιών κατά τις βροχερές ημέρες, καθώς και η βροχή είναι ένας παράγοντας που συντελεί στην αλλοίωση των δειγμάτων (Ackerman & Weisberg, 2003).

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν, ελέγχθηκαν για την παρουσία των βακτηρίων *Enterococci* και *Escherichia coli*. Η απομόνωση των βακτηριακών στελεχών έγινε με διήθηση των δειγμάτων νερού μέσω φίλτρων και στη συνέχεια τοποθέτηση των φίλτρων αυτών σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά, ώστε να γίνει η καλλιέργεια των επιθυμητών ειδών. Οι διηθήσεις έγιναν σε συσκευή διήθησης υπό κενό σε αποστειρωμένες συνθήκες, χρησιμοποιώντας 100 mL υγρού δείγματος κάθε φορά. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κάποια από τα δείγματα χρειάστηκε να γίνει αραιώση, ώστε να μειωθεί το μικροβιακό φορτίο. Οι αραιώσεις έγιναν με χρήση αποστειρωμένου νερού και ακολουθήθηκε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων.

Γενικά, η διαδικασία της διήθησης βασίζεται στο γεγονός ότι οι πόροι του φίλτρου είναι μικρότεροι από τα κύτταρα με αποτέλεσμα αυτά να παραμένουν στην επιφάνεια της μεμβράνης φίλτρου. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διήθηση ήταν φίλτρα νιτροκυτταρίνη, διαμέτρου 47 mm και μεγέθους πόρων 0,45 μm.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση, οι μεμβράνες μετά τη διήθηση τοποθετήθηκαν σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Slanetz & Bartley Medium (HiMedia) για την απομόνωση των βακτηρίων *Enterococci* και σε HiCrome Agar (HiMedia) για τα βακτήρια *Escherichia coli*. Όσο αφορά τα βακτήρια *Enterococci* έγινε επώαση για 48h στους 37°C, ενώ για τα βακτήρια *Escherichia coli* η επώαση είχε διάρκεια 24h στους 37°C.

Τέλος, αφού πραγματοποιήθηκε η απομόνωση των βακτηριακών στελεχών, έγινε ανακαλλιέργειά τους σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar. Οι συνθήκες ανακαλλιέργειας (θερμοκρασία και χρόνος επώασης), ήταν ίδιες με τις συνθήκες των αντίστοιχων καλλιεργειών.

3.2.2. Μέθοδος Απολύμανσης με Χλωρίο

Το απολυμαντικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την απολύμανση με χλωρίωση είναι διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L. Το κάθε πείραμα λάμβανε χώρα σε ένα δοχείο ζέσεως με συνολικό όγκο 300 mL το οποίο περιείχε διάλυμα NaCl 0,8 % w/v, το οποίο ήταν εμβολιασμένο με το εκάστοτε βακτήριο. Στη συνέχεια προστίθετο το απολυμαντικό μέσο.

Κάθε πείραμα απολύμανσης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 300 mL. Το δείγμα

Πιο συγκεκριμένα, η πειραματική διαδικασία ξεκινά με την προσθήκη χλωρίου. Η δόση του απολυμαντικού μέσου διαφοροποιούνταν αναλόγως το είδος του βακτηρίου. Οι δόσεις του χλωρίου που δοκιμάστηκαν ήταν 0,5mg/L και 1mg/L.

3.2.1.1. Προετοιμασία

- 1) Παρασκευή διαλύματος χλωριούχου νατρίου NaCl συγκέντρωσης 0,8 % w/v.
- 2) Παρασκευή Θρεπτικού Υλικού Neutrient Agar για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και επίστρωση του στα τρυβλία ώστε να στερεοποιηθεί.
- 3) Για την παρασκευή του διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L (ως προς Cl_2) πραγματοποιούμε αραίωση πυκνού διαλύματος NaOCl συγκέντρωσης ως προς Cl_2 .
- 4) Αρχικά παρασκευάζεται εναιώρημα, το οποίο περιλαμβάνει διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 0,8 % w/v και αρχική συγκέντρωση βακτηρίου στο διάλυμα ίση με 10^8 CFUs/mL. Η συγκέντρωση αυτή δημιουργήθηκε με φωτομέτρηση στα 600nm δίνοντας απορρόφηση ίση με $A=0,1$. Γνωρίζουμε ότι η τιμή της απορρόφησης αυτής βάσει της κλίμακας McFarland αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αποικιών ίση με 10^8 CFUs/mL.
- 5) Σε σωλήνες erpendorf χωρητικότητας 1,5mL, τοποθετείται ποσότητα διαλύματος θειοθειικού νατρίου $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (συγκέντρωσης 18mg/L) ίση με 90μL, με σκοπό την διακοπή της δράσης του υπολειμματικού χλωρίου στο δείγμα σε κάθε χρονική στιγμή t της δειγματοληψίας.

3.2.1.2. Πειραματική διαδικασία

➤ Τιτλοδότηση

Η κάθε πειραματική διαδικασία ξεκινά με την τιτλοδότηση για τον έλεγχο της δραστηριότητας του διαλύματος NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L ως προς Cl_2 . Η τιτλοδότηση γίνεται με στόχο τον υπολογισμό της συγκέντρωσής του ως προς Cl_2 με την πάροδο του χρόνου.

Σε μία κωνική φιάλη προστίθενται τα εξής με την ακόλουθη σειρά:

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

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

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

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

όπου:

10mL είναι η ποσότητα διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την τιτλοδότηση

35,5 είναι το Ar του χλωρίου

➤ Παρασκευή Διαλύματος στο Δοχείο Ζέσεως

Στο Δοχείο Ζέσεως, με συνολικό όγκο 300 mL, λαμβάνει χώρα το πείραμα τοποθετούνται τα εξής:

- Διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 0,8 % w/v
- Το εναιώρημα με τον εξεταζόμενο μικροοργανισμό

Το Δοχείο τοποθετείται σε σύστημα ανάδευσης.

➤ Δειγματοληψία

Πριν ακριβώς την έναρξη του χρονόμετρου, στον χρόνο 0min δηλαδή, λαμβάνεται δείγμα ποσότητας 1 mL και τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf. Στη συνέχεια μεταφέρεται απευθείας στο ψυγείο ώστε να σταματήσει η πιθανή ανάπτυξη του βακτηρίου.

Στην συνέχεια, προσθέτουμε την απολυμαντική ουσία στην απαραίτητη δόση. Έπειτα ενεργοποιείται το χρονόμετρο και για κάθε χρονική στιγμή t λαμβάνεται δείγμα και τοποθετείται σε erpendorf ποσότητα ίση με 1 mL. Κάθε σωλήνας erpendorf περιέχει διάλυμα Na₂S₂O₃ ώστε να επιτυγχάνεται αποχλωρίωση.

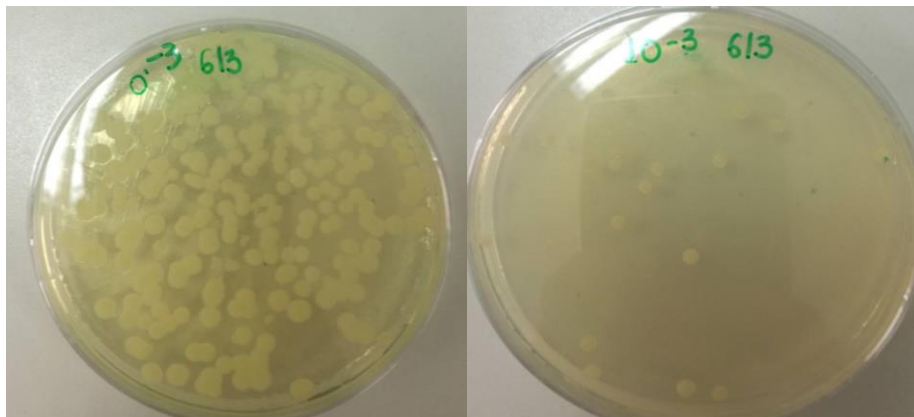
Η δειγματοληψία διαρκεί 45min.

➤ Επίστρωση στα Τρυβλία

Τα τρυβλία είχαν προετοιμαστεί με στερεό θρεπτικό υλικό nutrient agar. Παράλληλα, γίνονται οι απαραίτητες αραιώσεις του δείγματος ώστε να είναι μετρήσιμες οι αποικίες. Αφού αναδευθεί καλά το περιεχόμενο των erpendorf, επιστρώνεται στο κάθε τριβλίο ποσότητα ίση με 300 μL.

Μετά την επίστρωση, τα τριβλία τοποθετούνται στον θάλαμο επώασης στο κατάλληλο χρονικό διάστημα και θερμοκρασία αναλόγως το είδος του βακτηρίου, προκειμένου να γίνει η καταμέτρηση των αποικιών.

Έτσι, ολοκληρώνεται η πειραματική διαδικασία της χλωρίωσης.



Εικόνα 8: Αποικίες του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae* πριν μίτησης & μετά από 10 min χλωρίωσης

3.2.3. Ανθεκτικότητα σε Αντιβιοτικά

Για τον έλεγχο της Ανθεκτικότητας των στελεχών σε αντιβιοτικά, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης με μικρο-αραιώσεις σε ζωμό (MIC Broth Microdilution Method).

Κατά τη διάρκεια της δοκιμής, εξετάζονται ποικίλες συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών και στην συνέχεια προστίθεται στα βυθίσματα της πλάκας το ελαιώδες των βακτηρίων. Η πλάκα στη συνέχεια επωάζεται στους 37 °C για 24 h. Τα αποτελέσματα της μεθόδου μικροαραίωσης του ζωμού αναφέρονται στην Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (MIC) ή αλλιώς τη χαμηλότερη συγκέντρωση αντιβιοτικών που σταμάτησαν τη βακτηριακή επέκταση. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες τιτλοποίησης με 96 βυθίσματα.

Η μέθοδος μικρο-αραιώσεις σε ζωμό επιλέχθηκε, γιατί μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμή της ευαισθησίας των βακτηρίων σε πολλαπλά αντιβιοτικά ταυτόχρονα και τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής είναι επίσης εξαιρετικά ακριβή. Επίσης η συγκεκριμένη μέθοδος έχει χαμηλό κόστος και μικρό χρόνο διεξαγωγής πειραμάτων.

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το εύρος των συγκεντρώσεων τους παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3: Εύρος των Αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν

Ampicillin(mg/L)							
1	2	4	8	16	32	64	128
Amikacin(mg/L)							
1	2	4	8	16	32	64	128
Ciprofloxacin(mg/L)							
0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
Trimethoprim-Sulfamethoxazole (1:19) (mg/L)							
0,5	1	2	4	8	16	32	64

3.2.3.1. Προετοιμασία

➤ Παρασκευή Αντιβιοτικών Διαλυμάτων

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των αντιβιοτικών διαλυμάτων στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά ο κατάλληλος διαλύτης, βάσει αντιβιοτικού.

Το μητρικό διάλυμα αντιβιοτικού ήταν σε κάθε περίπτωση πυκνότερο από την υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση και με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευαζόταν διάλυμα συγκέντρωσης διπλάσιας από τη μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση. Αυτό γινόταν καθώς κατά την εφαρμογή της μεθόδου το τελικό διάλυμα αντιβιοτικού που παρασκευαζόταν, υφίσταται αραιώση 1÷2. Το διάλυμα στην συνέχεια φυλασσόταν σε συνθήκες συντήρησης για την αποφυγή αλλοίωσης και γινόταν χρήση του μέχρι τον αναγραφόμενο χρόνο λήξης.

➤ Παρασκευή Εναιωρήματος

Σύμφωνα με το πρωτοκόλλο του οργανισμού CLSI (Clinical And Laboratory Standards Institute), για την εφαρμογή της μεθόδου μικροαραιώσεων σε ζωμό, δημιουργήθηκε εναιώρημα για ο μικροοργανισμό, σε μη εκλεκτικό υλικό (Nutrient Broth). Η οπτική απορρόφηση του εναιωρήματος είναι $A=0,1$, που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αποικιών ίση με 10^8 CFUs/mL. Στην συνέχεια, με διαδοχικές αραιώσεις, φτάνουμε στη επιθυμητή συγκέντρωση αποικιών 10^5 CFUs/mL.

3.2.3.2. Πειραματική Διαδικασία

Η μέθοδος MIC πραγματοποιήθηκε σε πλάκα τιτλοποίησης 96 βυθισμάτων. Κάθε πλάκα χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση τεσσάρων μικροοργανισμών. Σε όλα τα 96 βυθίσματα, προστίθεται θρεπτικό υλικό Nutrient Broth σε ποσότητα ίση με 100μL.

Επομένο βήμα είναι να προσθέσουμε 100μL του αντιβιοτικού στις πρώτες 9 στήλες της πρώτης σειράς και έτσι γίνεται αραιώση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού 1/2. Το αντιβιοτικό τοποθετείται στις 9 πρώτες στήλες, έτσι ώστε να δοκιμαστούν τα 4 διαφορετικά βακτήρια δύο φορές (για λόγους επαναληψιμότητας) στις πρώτες 8 στήλες και στην 9^η στήλη για να γνωρίζουμε την οπτική απορρόφηση του συνδυασμού Nutrient Broth και αντιβιοτικό.

Αναδεύοντας καλά, με την πολυκάναλη πιπέτα, από τα πηγάδια αυτής της σειράς διαμοιράζονται 100μL σε όλα τα υπόλοιπα βυθίσματα. Έτσι, αντιστοίχως επιτυγχάνεται αραιώση 1/2 κάθε φορά που μεταφέρεται το αντιβιοτικό από σειρά σε σειρά, κι έτσι διαμορφώνονται οι συγκεντρώσεις που προαναφέρθηκαν στον παραπάνω πίνακα. Δηλαδή η 1^η σειρά έχει την μέγιστη συγκέντρωση και η τελευταία την ελάχιστη.

Έπειτα προστίθενται 5 μL βακτηριακής καλλιέργειας συγκέντρωσης 10⁵ 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.

Στη 10^η και 11^η στήλη στις πρώτες τρεις και τελευταίες τρεις σειρές, δεν προστίθεται αντιβιοτικό, καθώς επιδιώκεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού απουσία αντιβιοτικού (control).

Μετά την προετοιμασία της πλακέτας ελέγχου, πραγματοποιήθηκε 24ωρη επώαση των μικροοργανισμών σε ανάλογες θερμοκρασιακές συνθήκες με αυτές της καλλιέργειάς τους. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών ελέγχθηκε σε ειδικό φασματοφωτόμετρο πλακέτας (microplate reader).

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

Εικόνα 9 : Διάταξη Πλάκας Μικρο-τιτλοποίησης

4. Αποτελέσματα

4.1. Εξεταζόμενα Βακτήρια

Γενικά τα βακτήρια που εξετάζονται στην παρούσα εργασία ανήκουν στις τρεις μεγάλες βακτηριακές οικογένειες: Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae και Enterococcaceae.

4.1.1. Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae είναι μία μεγάλη οικογένεια Gram(-) βακτηρίων που περιλαμβάνει, μαζί με πολλούς αβλαβείς μικροοργανισμούς, πολλά από τα πιο γνωστά παθογόνα βακτήρια, όπως η *Salmonella*, η *Escherichia coli*, η *Yersinia pestis*, η *Klebsiella* και η *Shigella*. Άλλα βακτήρια που προκαλούν ασθένειες σε αυτή την οικογένεια, ανήκουν στα γένη *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia* και *Citrobacter*.

Πολλά μέλη αυτής της οικογένειας αποτελούν φυσιολογικό μέρος της χλωρίδας του εντέρου των ανθρώπων και κάποιων ζώων, ενώ άλλα βρίσκονται στο νερό ή το έδαφος ή είναι παράσιτα για μια ποικιλία διαφορετικών ζώων και φυτών.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά αυτής της οικογένειας είναι ότι τα μέλη των Enterobacteriaceae είναι βάκιλλοι, έχουν τυπικά μήκος 1-5 μm και είναι προαιρετικά αναερόβια.

Στην παρούσα εργασία, στην συγκεκριμένη οικογένεια ανήκουν τα ακόλουθα βακτήρια: *Klebsiella pneumoniae*, *Plesiomonas shigelloides*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*.

4.1.2. Enterococcaceae

Enterococcaceae είναι μια οικογένεια Gram(+) βακτηρίων, με αντιπροσωπευτικά γένη τα: *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus* και *Vagococcus* (Ludwig et al., 2009). Το γένος *Enterococcus* αντιπροσωπεύει το πιο άφθονο γένος, αφού σήμερα περιλαμβάνει 43 είδη.

Τα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν σχήμα κόκκου, παρατηρούνται σε ζεύγη και βραχείες αλυσίδες και είναι προαιρετικά αναερόβια.

Στην παρούσα εργασία, στην συγκεκριμένη οικογένεια ανήκουν τα βακτήρια: *Enterococci*.

4.1.3. Pseudomonadaceae

Pseudomonadaceae είναι μία οικογένεια βακτηρίων που περιλαμβάνει τα γένη *Azomonas*, *Azomonotrichon*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rugamonas* και *Serpens*. Η οικογένεια *Azotobacteriaceae* πρόσφατα αναταξινομήθηκε σε αυτήν την οικογένεια.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά αυτής της οικογένειας είναι ότι τα μέλη των Pseudomonadaceae είναι βάκιλλοι, ταξινομούνται ως Gram(-) και είναι αερόβια βακτήρια.

Τα μέλη της οικογένειας αυτής εντοπίζονται στο περιβάλλον στο νερό και στο έδαφος.

Στην παρούσα εργασία, στην συγκεκριμένη οικογένεια ανήκουν τα βακτήρια: *Pseudomonas fluorescens* και *Aeromonas hydrophila*.

Συνοπτικά, τα εξεταζόμενα βακτήρια και κάποια χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4: Εξεταζόμενα Βακτήρια και Χαρακτηριστικά τους

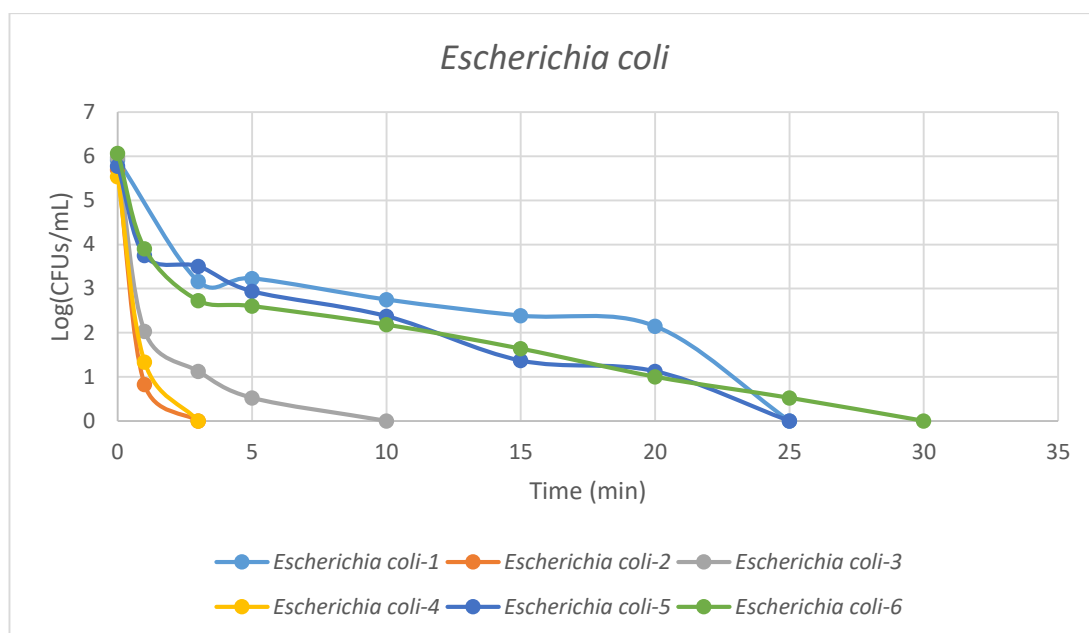
Προέλευση	Είδος Βακτηρίου	Οικογένεια	Gram
Αποκόρωνα	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae	(-)
Αποκόρωνα	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Enterobacteriaceae	(-)
Αποκόρωνα	<i>Citrobacter freundii</i>	Enterobacteriaceae	(-)
Αγιά	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	(-)
Αποκόρωνα	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Pseudomonadaceae	(-)
Αποκόρωνα	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pseudomonadaceae	(-)
Αγιά	<i>Enterococci</i>	Enterococcaceae	(+)

4.2. Χλωρίωση

Η αδρανοποίηση των βακτηριακών στελεχών κατά τη χλωρίωση παρουσιάζεται στις παρακάτω εικόνες και η κινητική της χαρακτηρίζεται ως ψευδοπρώτης τάξης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ανά βακτηριακή οικογένεια και ανά τοποθεσία που έγινε η δειγματοληψία.

Αποτελέσματα από στελέχη που προέρχονται από την λίμνη της Αγίας Χανίων

Escherichia coli



Εικόνα 10 : Αδρανοποίηση Βακτηριακών Στελεχών *Escherichia coli* με Δόση 0,5mg/L

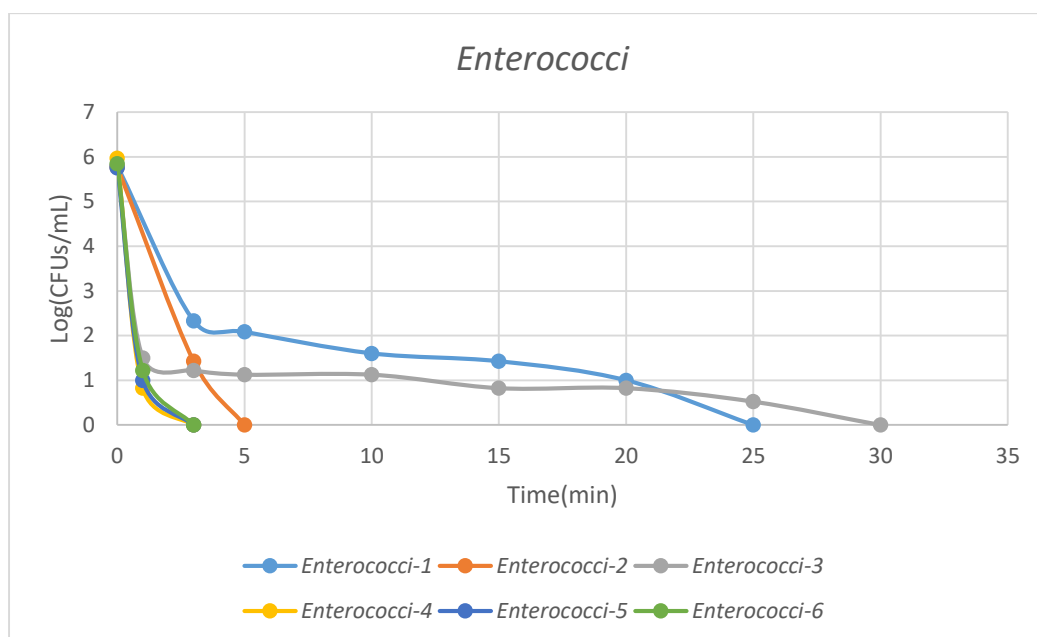
Τα στελέχη *Escherichia coli* απομονώθηκαν από δείγμα που προέρχεται από την λίμνη της Αγιάς στα Χανιά. Η δόση NaOCl που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,5mg/L, αφού για τα στελέχη *Escherichia coli* παρατηρήθηκε ότι με μεγαλύτερη δόση ο πληθυσμός μειωνόταν ακαριαία.

Παρατηρώντας την καμπύλη απολύμανσης των βακτηρίων *Escherichia coli* φαίνεται πως η αντίδραση των στελεχών απέναντι στην απολύμανση ποικίλλει, αφού ο πληθυσμός των στελεχών 2,3,4 αδρανοποιείται από τα πρώτα min κιάλας της χλωρίωσης, ενώ αντίθετα ο πληθυσμός των στελεχών 1,5,6 είναι πιο ανθεκτικός. Ακόμα και στα στελέχη που είναι πιο ανθεκτικά στην απολύμανση, η μεταβολή του πληθυσμού εν τέλει είναι αρκετά μεγάλη αφού μειώνεται κατά 5-6 Log.

Η συμπεριφορά των στελεχών είναι αναμενόμενο να διαφέρει, αφού είναι γνωστό ότι παρόλο που αναφέρονται στο ίδιο γένος, η ανθεκτικότητα από στέλεχος σε στέλεχος διαφέρει.

Η δόση του χλωρίου είναι ίση με 0,5mg/L και θεωρείται σχετικά μικρή. Οπότε, συνολικά σαν πληθυσμός θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι αδρανοποιήθηκε αρκετά αποτελεσματικά.

Enterococci



Εικόνα 11: Αδρανοποίηση Βακτηριακών Στελεχών *Enterococci* με Δόση 0,5 mg/L

Τα στελέχη *Enterococci* απομονώθηκαν επίσης από δείγμα που προέρχεται από την λίμνη της Αγιάς στα Χανιά. Όπως και για τα στελέχη *Escherichia coli*, ο πληθυσμός των *Enterococci* ήταν αρκετά ευαίσθητος για μεγάλες δόσεις NaOCl, οπότε η δόση χλωρίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,5mg/L.

Σύμφωνα με τις παραπάνω καμπύλες, παρατηρούμε ότι μόνο δύο στελέχη, τα *Enterococci* 1,3, είναι ανθεκτικά στην χλωρίωση, αφού ο πληθυσμός τους αδρανοποιείται κατά 100% μετά τα 25 και 30 min αντιστοίχως. Τα υπόλοιπα στελέχη (2,4,5,6) αδρανοποιήθηκαν πλήρως από τα πρώτα 3 ή 5 min της πειραματικής διαδικασίας της χλωρίωσης, αν και η δόση του χλωρίου ήταν σχετικά μικρή. Συνολικά, τα στελέχη *Enterococci* ήταν ο πιο ευαίσθητος πληθυσμός απέναντι στην απολύμανση. Η μείωση του πληθυσμού όλων των στελεχών ήταν 5-6 Log, γεγονός που χαρακτηρίζει τη μέθοδο ικανοποιητική για την αδρανοποίηση των Εντεροκόκκων.

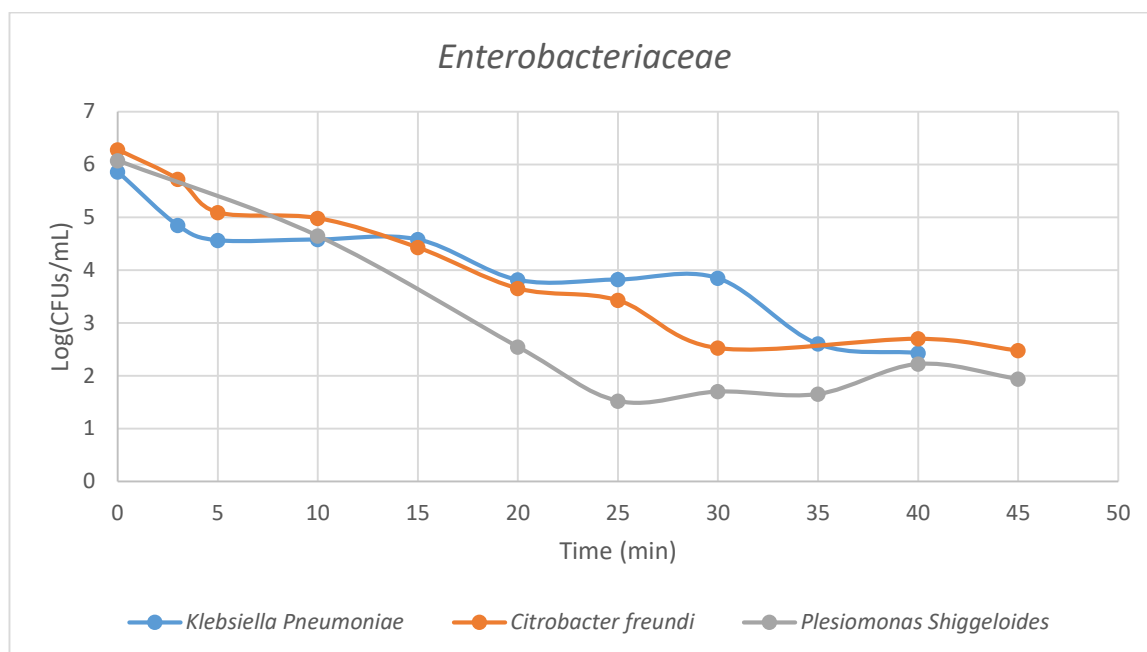
Επικεντρώνεται μεγάλο ενδιαφέρον στο γεγονός ότι, τα διάφορα στελέχη *Enterococci* και *Escherichia coli* που απομονώθηκαν από το ίδιο περιβάλλον είχαν παρόμοια συμπεριφορά ως προς την αδρανοποίησή τους κατά τη χλωρίωση. Πιο συγκεκριμένα, η συμπεριφορά τους χαρακτηρίζεται από το σύντομο χρονικό διάστημα στο οποίο αδρανοποιήθηκε ο πληθυσμός τους και την σχετικά μικρή δόση χλωρίου που χρησιμοποιήθηκε.

Αποτελέσματα από στελέχη που προέρχονται από τον Αποκόρωνα Χανίων

Τα βακτήρια που παρουσιάζονται στην Εικόνα 12 ανήκουν στις βακτηριακές οικογένειες Enterobacteriaceae (*Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*,

Plesiomonas Shiggeloides), Pseudomonadaceae (*Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*).

Γενικά, στα βακτηριακά στελέχη με προέλευση από τον Αποκόρωνα, εφαρμόστηκε δόση χλωρίου ίση με 1 mg/L, σε αντίθεση με αυτά από την Αγιά. Αυτό έγινε, διότι αυτά τα στελέχη ήταν αρκετά πιο ανθεκτικά έναντι της χλωρίωσης.

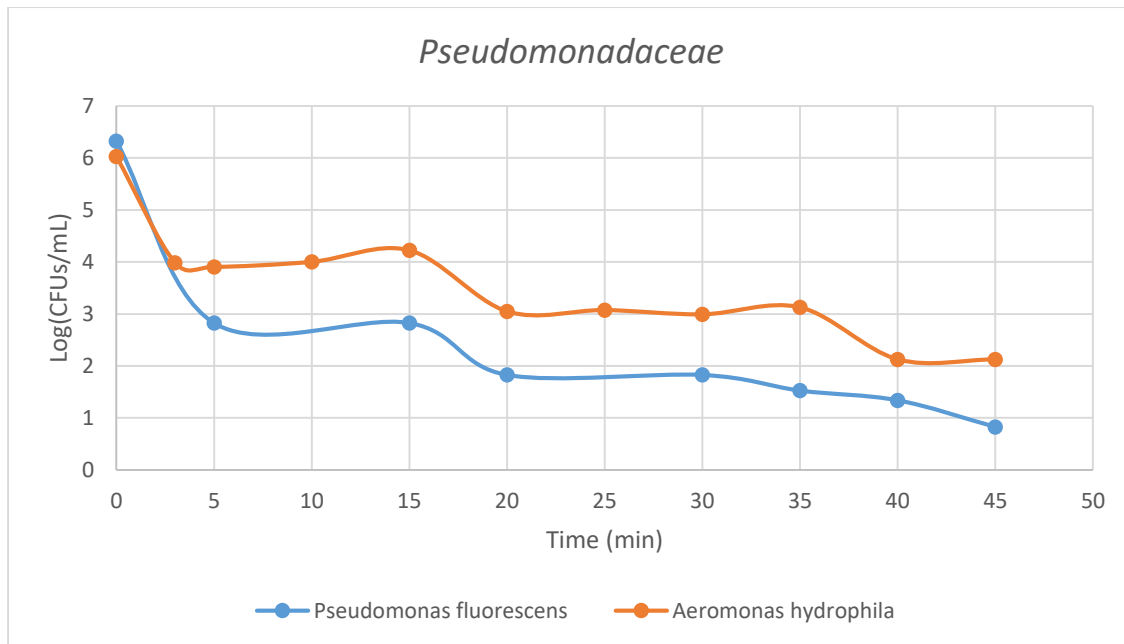


Εικόνα 12: Αδρανοποίηση Βακτηριακής Οικογένειας Enterobacteriaceae με Δόση 1mg/L

Όσο αφορά στα στελέχη που ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae, ο πληθυσμός ελαττώνεται τα πρώτα 30 min και κατόπιν διατηρείται σταθερός, έχοντας σημειώσει μια μείωση της τάξης 4 Log.

Συγκεκριμένα, το στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* έχει μία ομαλή μείωση του πληθυσμού της μέχρι και τα πρώτα 30 με 35 min, όπου ο πληθυσμός σταθεροποιείται.

Ο πλυθησμός του στελέχους *Citrobacter freundii* φαίνεται ότι μειώθηκε πολύ απότομα μέχρι το 30^ο min, ο οποίος μετά έμεινε σταθερός. Με παρόμοιο τρόπο, μειώθηκε και ο πληθυσμός του *Plesiomonas shiggeloides*, αν και η μείωση του πληθυσμού του ήταν αρκετά πιο απότομη, και ο πληθυσμός άρχισε να γίνεται σταθερός μετά τα 25 min.



Εικόνα 13: Αδρανοποίηση Βακτηριακής Οικογένειας *Pseudomonadaceae* με Δόση 1 mg/L

Τα στελέχη *Pseudomonas fluorescens* και *Aeromonas hydrophila* ανήκουν στην βακτηριακή οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* υπόκειται σε μία αρκετά μεγάλη μείωση του πληθυσμού του από την αρχή κιόλας της απολύμανσης. Για το στέλεχος αυτό, φαίνεται ότι μετά την παρέλευση των 20 min ο πληθυσμός του σταματά να επηρεάζεται από την απολύμανση παραμένοντας σχεδόν σταθερός.

Τέλος, όσο αφορά τη καμπύλη του στελέχους *Aeromonas hydrophila*, βλέπουμε ότι ο πληθυσμός του μειώνεται εξ' αρχής με μεγάλο ρυθμό και μετά τα πρώτα 20 min δεν υπόκειται σε μεγάλη μείωση.

Αν και όλα τα στελέχη υπήρξαν ανθεκτικά όσο αφορά τον χρόνο που συναντάμε ακόμη αποικίες, με το πέρας της διαδικασίας, ο πληθυσμός όλων μειώνεται σε κάθε περίπτωση 4-5 Log σε διάρκεια 45 min.

Γενικές Παρατηρήσεις

Το γενικότερο συμπέρασμα που μπορούμε να εξάγουμε από τα παραπάνω γραφήματα, είναι ότι τα βακτήρια εμφάνισαν διαφορετικά επίπεδα ανθεκτικότητας στην επιλεγμένη τεχνική απολύμανσης, τα οποία σχετίζονται άμεσα με τον τύπο και την προέλευση του κάθε στελέχους. Το γεγονός αυτό προκαλεί μεγάλο ενδιαφέρον, αφού επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες πως η συμπεριφορά των στελεχών ποικίλλει και διαμορφώνεται και από φυσικούς παράγοντες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, υπήρχαν στελέχη που μπορούν να χαρακτηριστούν ανθεκτικά ως προς την απολύμανση με χλώριο και κάποια άλλα που ήταν περισσότερο ευαίσθητα.

Σε κάθε περίπτωση, η απολύμανση θεωρείται επιτυχής αφού επιτεύχθηκε μεγάλη μείωση του πληθυσμού τους. Ωστόσο, επιβεβαιώνεται και η αρχική θεωρία ότι υπάρχουν στελέχη ανθεκτικά στην απολύμανση.

Έτσι, έχει ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε στους ακόλουθους πίνακες τον συντελεστή k που εκφράζει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου απολύμανσης. Η μείωση του βακτηριακού πληθυσμού για κάθε στέλεχος, έφτασε το 99,99%.

Πίνακας 5: Κινητική Σταθερά Αδρανοποίησης Στελεχών που έχουν υποστεί Χλωρίωση με Δόση 1mg/L

Βακτηριακό Στέλεχος	Προέλευση	Κινητική Σταθερά Αδρανοποίησης k (min^{-1})	Συντελεστής Γραμμικής Συσχέτισης R^2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Αποκόρωνα	0,65	0,95
<i>Pseudomonas fluorescences</i>	Αποκόρωνα	0,57	0,54
<i>Citrobacter freundii</i>	Αποκόρωνα	0,52	0,96
<i>Plesiomonas shiggeloides</i>	Αποκόρωνα	0,45	0,99
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Αποκόρωνα	0,66	0,57

Πίνακας 6: Κινητική Σταθερά Αδρανοποίησης Στελεχών που έχουν υποστεί Χλωρίωση με Δόση 1mg/L

Βακτηριακό Στέλεχος	Προέλευση	Κινητική Σταθερά Αδρανοποίησης k (min^{-1})	Συντελεστής Γραμμικής Συσχέτισης R^2
<i>Escherichia coli-1</i>	Αγιά	0,92	0,43
<i>Escherichia coli-2</i>	Αγιά	11,12	1
<i>Escherichia coli-3</i>	Αγιά	1	1
<i>Escherichia coli-4</i>	Αγιά	9,6	1
<i>Escherichia coli-5</i>	Αγιά	0,78	0,5
<i>Escherichia coli-6</i>	Αγιά	1	1
<i>Enterococci-1</i>	Αγιά	1	1
<i>Enterococci-2</i>	Αγιά	3,3	1
<i>Enterococci-3</i>	Αγιά	1	1
<i>Enterococci-4</i>	Αγιά	1	1
<i>Enterococci-5</i>	Αγιά	10,94	1
<i>Enterococci-6</i>	Αγιά	10,66	1

Αναφορικά με τους πίνακες, ορίζουμε τον συντελεστή k που αντιπροσωπεύει την Κινητική Σταθερά Αδρανοποίησης (min^{-1}). Αυτός ο συντελεστής εκφράζει την ταχύτητα της απολύμανσης. Με άλλα λόγια όσο μεγαλύτερη είναι η Κινητική Σταθερά, τόσο ταχύτερη είναι η απολύμανση.

Γενικά, έχει επιτευχθεί σχεδόν σε όλα τα στελέχη μείωση του πληθυσμού κατά 99,99%, γεγονός που δείχνει ότι η απολύμανση ήταν επιτυχής. Ωστόσο, για να κρίνουμε ποια στελέχη ήταν περισσότερο ανθεκτικά ή λιγότερο, χρησιμοποιούμε την Κινητική Σταθερά k .

Έτσι, παρατηρούμε ότι τα πιο ευαίσθητα στελέχη που έχουν υποστεί χλωρίωση με δόση 1 mg/L υπήρξαν τα *Klebsiella pneumoniae* και το *Aeromonas hydrophila* που είχαν συντελεστή k ίσο με $0,66 \text{ min}^{-1}$ και $0,65 \text{ min}^{-1}$ αντιστοίχως.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 6, τα πιο ευαίσθητα στελέχη που επεξεργάστηκαν με δόση 0,5 mg/L ήταν γενικά τα: *Escherichia coli*-2 με συντελεστή k $11,12 \text{ min}^{-1}$ και *Enterococci*-5 και *Enterococci*-6 με συντελεστές $10,94 \text{ min}^{-1}$ και $10,66 \text{ min}^{-1}$ αντιστοίχως.

Γενικότερα, από τα παραπάνω αποτελέσματα του συντελεστή k , συμπεραίνουμε ότι γενικά όλα τα στελέχη του Πίνακα 6 ήταν πολύ πιο ευαίσθητα από αυτά του Πίνακα 5.

Παρόλο που αναφέραμε, ότι η απολύμανση ήταν αποτελεσματική, έχει σημασία να προσδιορίσουμε με κάποιο τρόπο ακριβώς την αποτελεσματικότητα που είχε το απολυμαντικό μέσο για κάθε στέλεχος. Έτσι, θεωρώντας επιτυχές το 99,9% μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού, υπολογίζουμε την σχέση C^*t , όπου:

C : η συγκέντρωση του απολυμαντικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε

και

t : ο χρόνος που χρειάστηκε για μειωθεί ο βακτηριακός πληθυσμός κατά 99,9%

Πίνακας 7: Τιμές C^*t για την μείωση 99,9% του Βακτηριακού Πληθυσμού που υπέστη χλωρίωση με δόση 1mg/L, pH=7, T=25°C

Βακτηριακό Στέλεχος	Προέλευση	C^*t
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Αποκόρωνα	10
<i>Pseudomonas fluorescenes</i>	Αποκόρωνα	20
<i>Citrobacter freundii</i>	Αποκόρωνα	30
<i>Plesiomonas shiggeloides</i>	Αποκόρωνα	25
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Αποκόρωνα	10

Πίνακας 8: Τιμές C*t για την μείωση 99,9% του Βακτηριακού Πληθυσμού που υπέστη χλωρίωση με δόση 0,5 mg/L, pH=7, T=25°C

Βακτηριακό Στέλεχος	Προέλευση	C*t
<i>Escherichia coli-1</i>	Αγιά	5
<i>Escherichia coli-2</i>	Αγιά	0,5
<i>Escherichia coli-3</i>	Αγιά	1,5
<i>Escherichia coli-4</i>	Αγιά	0,5
<i>Escherichia coli-5</i>	Αγιά	7,5
<i>Escherichia coli-6</i>	Αγιά	7,5
<i>Enterococci-1</i>	Αγιά	5
<i>Enterococci-2</i>	Αγιά	1,5
<i>Enterococci-3</i>	Αγιά	2,5
<i>Enterococci-4</i>	Αγιά	0,5
<i>Enterococci-5</i>	Αγιά	0,5
<i>Enterococci-6</i>	Αγιά	0,5

Όσο μικρότερη είναι η σχέση C*t καταλαβαίνουμε πως τόσο πιο αποτελεσματικό υπήρξε το απολυμαντικό μέσο στην αδρανοποίηση του βακτηριακού πληθυσμού. Με άλλα λόγια χρειάστηκε λιγότερος χρόνος ή/και μικρότερη δόση χλωρίου για να ελαττωθεί ο βακτηριακός πληθυσμός.

Τα αποτελέσματα αυτού του πίνακα συμπίπτουν με τα αποτελέσματα και των παραπάνω πινάκων, αφού το πιο ανθεκτικά βακτήρια έναντι της απολύμανσης είναι τα *Citrobacter freundii* με C*t ίσο με 30 και το *Plesiomonas shigelloides* με 25 και οι μικρότερες τιμές παρατηρούνται σε αρκετά στελέχη *Enterococci* και *Escherichia coli*.

4.2. 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.

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). Τα όρια που αφορούν τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς φαίνονται στον πίνακα 9.

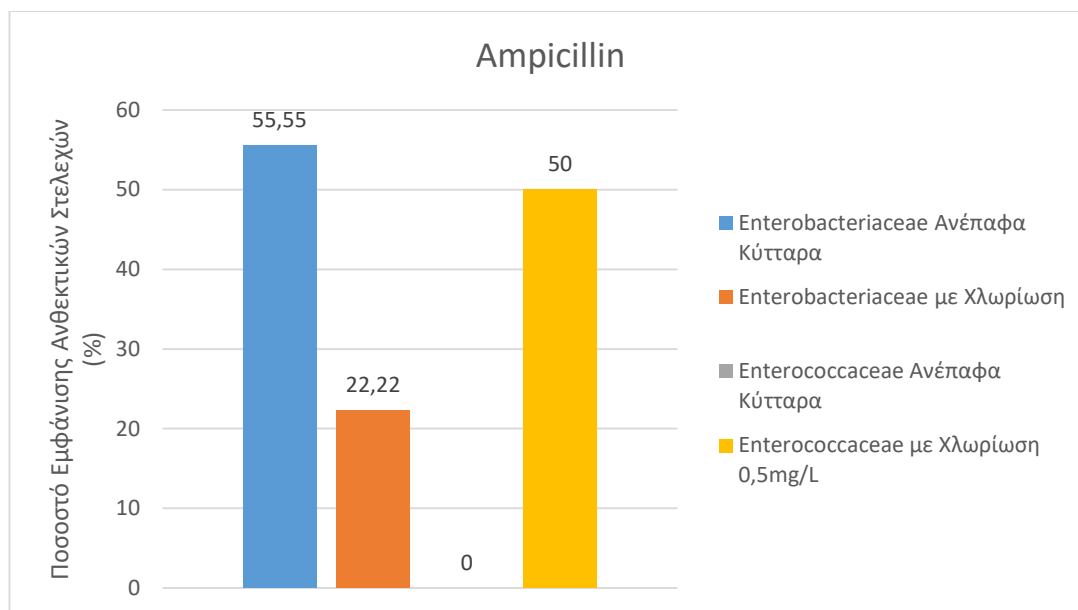
Πίνακας 9: Όρια Ανασταλτικής Συγκέντρωσης για τον προσδιορισμό Ευαισθησίας των εξεταζόμενων βακτηρίων σύμφωνα με τον EUCAST

Οικογένεια	Εύρος Ανασταλτική Συγκέντρωσης MIC (μg/mL)		
	Ευαίσθητος	Μετρίως Ευαίσθητος	Ανθεκτικός
	Ampicillin		
Enterobacteriaceae	MIC≤8	-	MIC>8
Enterococcaceae	MIC≤4	4<MIC<8	MIC>8
Pseudomonadaceae	MIC≤4	4<MIC<16	MIC>16
	Amikacin		
Enterobacteriaceae	MIC≤8	8<MIC<16	MIC≥16
Enterococcaceae	-	-	-
Pseudomonadaceae	MIC≤8	8<MIC<16	MIC>16
	Ciprofloxacin		
Enterobacteriaceae	MIC≤0,25	0,25<MIC<0,5	MIC>0,5
Enterococcaceae	MIC≤4	-	MIC>4
Pseudomonadaceae	MIC≤0,5	-	MIC>0,5
	Trimethoprim-Sulfamethoxazole (1:19)		
Enterobacteriaceae	MIC≤0,25	0,25<MIC<0,5	MIC>0,5
Enterococcaceae	MIC≤4	-	MIC>4
Pseudomonadaceae	MIC≤0,5	-	MIC>0,5

4.2.1. Ανθεκτικότητα ανά Αντιβιοτικό Παράγοντα

Τα στελέχη που ελέγχθηκαν για την ανθεκτικότητα τους στα αντιβιοτικά, ήταν τόσο τα ανέπαφα κύτταρα των βακτηρίων όσο και τα εναπομείναντα κύτταρα μετά από την επεξεργασία της χλωρίωσης. Αυτή η σύγκριση γίνεται ώστε να δούμε αν η χλωρίωση επιδρά θετικά ή αρνητικά στην ανθεκτικότητα των στελεχών στα αντιβιοτικά.

4.2.1.1. Ampicillin



Εικόνα 14: Ποσοστό Εμφάνισης Ανθεκτικών Στελεχών στην Αμπικιλίνη ανά Βακτηριακή Οικογένεια

Η Αμπικιλίνη, που είναι ένα αντιβιοτικό που ανήκει στις β-λακτάμες, παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα εξεταζόμενα αντιβιοτικά.

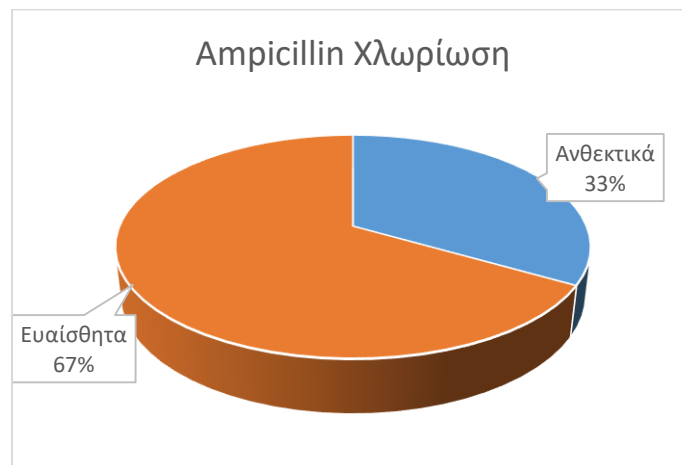
Το ποσοστό αυτό ίσο με 55,55% ανήκει στην βακτηριακή οικογένεια Enterobacteriaceae από τα ανέπαφα κύτταρα και ακολουθεί στην ίδια οικογένεια με ποσοστό 22,22% τα κύτταρα που έχουν υποστεί απολύμανση. Έτσι συμπεραίνουμε, ότι στην συγκεκριμένη περίπτωση, η χλωρίωση είχε θετική επιρροή επάνω στην ανθεκτικότητα αυτής της οικογένειας στην Αμπικιλίνη.

Αντίθετα, όσο αφορά την οικογένεια Enterococcaceae παρατηρείται ότι το προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών άλλαξε με την χλωρίωση. Συγκεκριμένα, στα ανέπαφα στελέχη που εξετάστηκαν δεν εμφανίστηκε σε κανένα ανθεκτικότητα, ενώ στα επεξεργασμένα τα μισά στελέχη χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικά. Τα αποτελέσματα αυτά, επιβεβαιώνουν πως στελέχη της ίδιας βακτηριακής οικογένειας μπορούν να έχουν τελείως διαφορετική αντίδραση στην χλωρίωση ή/και στα αντιβιοτικά.

Ακολουθούν τα γραφήματα με το συνολικό ποσοστό ευαίσθητων/ανθεκτικών στελεχών στην Αμπικιλίνη συγκρίνοντας τα ανέπαφα με τα εναπομείναντα κύτταρα.



Εικόνα 15: Ποσοστό Ευαίσθητων-Ανθεκτικών Στελεχών για Ανέπαφα Κύτταρα στην Αμπικιλλίνη

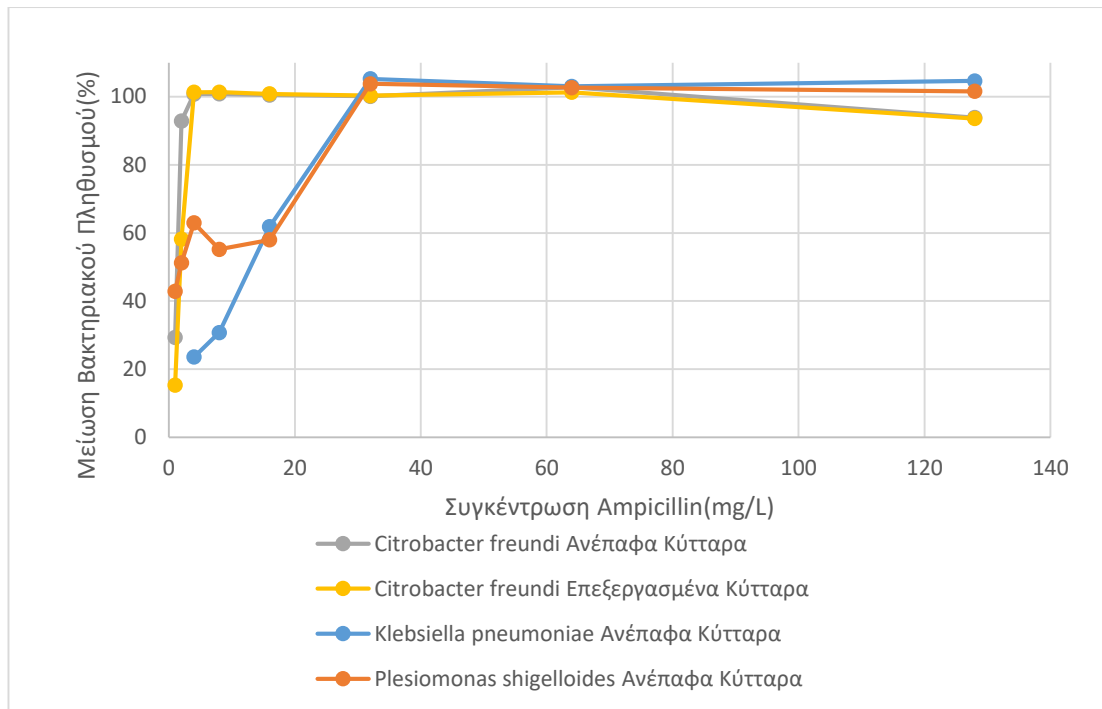


Εικόνα 16: Ποσοστό Ευαίσθητων-Ανθεκτικών Στελεχών για Εναπομείναντα Κύτταρα στην Αμπικιλλίνη

Παρατηρούμε λοιπόν στα γραφήματα ότι, όσον αφορά σ' αυτό το αντιβιοτικό, στα ανέπαφα κύτταρα παρουσιάζεται το ίδιο ποσοστό ανθεκτικών στελεχών σε σχέση με τα επεξεργασμένα. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι για την προκειμένη αντιβιοτική ουσία, η χλωρίωση δεν επηρέασε το προφίλ ανθεκτικότητας. Να τονιστεί, ότι αυτά τα διαγράμματα αφορούν τον συνολικό εξεταζόμενο πληθυσμό, γιατί όπως είδαμε παραπάνω, ανά οικογένεια τα αποτελέσματα διαφέρουν.

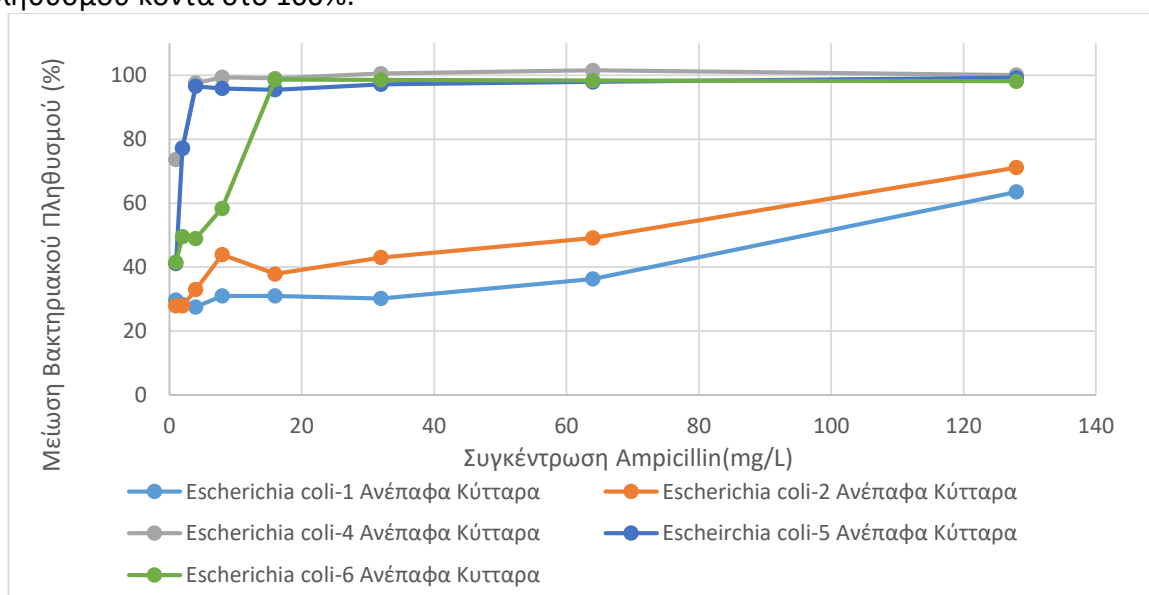
Προκειμένου να περιγραφεί η σχέση της μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού σε σχέση με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκε το κάθε στέλεχος, παρουσιάζονται οι ακόλουθες εικόνες.

Ωστόσο, στις ακόλουθες εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια στελέχη από τα συνολικά εξεταζόμενα. Αυτό συμβαίνει, γιατί ορισμένα στελέχη αδρανοποιήθηκαν σε μεγάλο βαθμό (>90%) ακόμα και για τις πιο χαμηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού και έτσι, οι καμπύλες τους παραλείπονται.



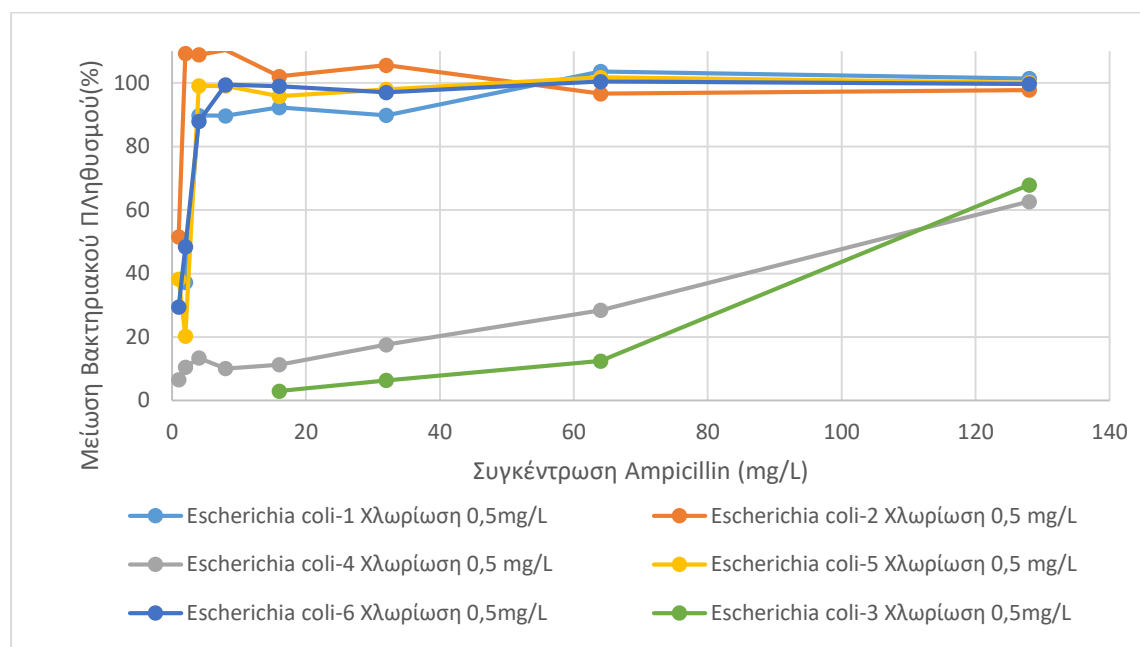
Εικόνα 17: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Αμπικιλλίνης (I)

Σύμφωνα με την εικόνα που βρίσκεται παραπάνω, το στέλεχος *Citrobacter freundii* φαίνεται ότι έχει μία παρόμοια συμπεριφορά για τα επεξεργασμένα και για ανέπαφα κύτταρα. Συγκεκριμένα, για μεγάλες συγκεντρώσεις η μείωση του βακτηριακού πληθυσμού άγγιζε το 100%, ενώ όταν η συγκέντρωση της Αμπικιλλίνης γίνεται μικρότερη από 4 mg/L ο βακτηριακός πληθυσμός μειώνεται με πολύ μεγάλο ρυθμό. Τα ανέπαφα κύτταρα από τα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* και *Plesiomonas shigelloides* ήταν περισσότερο ανθεκτικά, αφού χρειάστηκαν συγκέντρωση Αμπικιλλίνης μεγαλύτερη από 32 mg/L για να επιτευχθεί αδρανοποίηση του πληθυσμού κοντά στο 100%.



Εικόνα 18: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Αμπικιλλίνης (II)

Η παραπάνω εικόνα παρουσιάζει τις καμπύλες της μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού των ανέπαφων κυττάρων των στελεχών *Escherichia coli*. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, τα στελέχη 2 και 5 διαφέρουν από τα υπόλοιπα, αφού και για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, δεν μειώνεται κατά 100% ο πληθυσμός τους, όπως συμβαίνει για τα υπόλοιπα στελέχη. Εντούτοις, για όλα τα στελέχη η μείωση είναι αρκετά μεγάλη.



Εικόνα 19: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Αμπικιλλίνης (III)

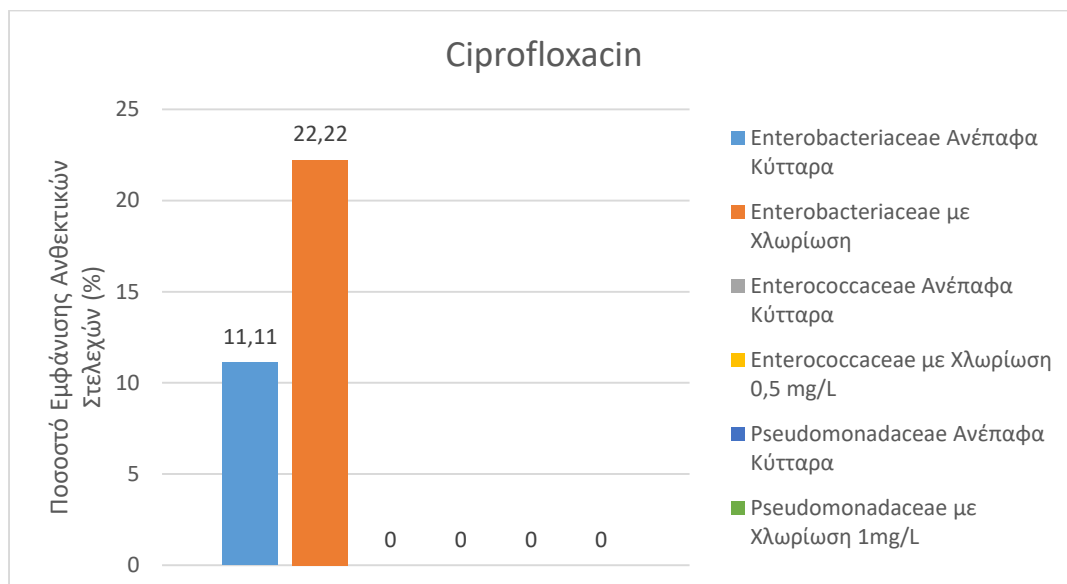
Αντίστοιχα, στην Εικόνα 19 φαίνονται οι καμπύλες της μείωσης του πληθυσμού των επεξεργασμένων κυττάρων των *Escherichia coli* για την Αμπικιλλίνη. Τα στελέχη 3 και 4 φαίνεται πως δεν φτάνουν σε ολική μείωση του πληθυσμού τους ακόμα και τις πιο υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ τα υπόλοιπα αντιθέτως μόνο για χαμηλές συγκεντρώσεις (1 με 2 mg/L) έχουν ανάπτυξη του πληθυσμού τους.

4.2.1.2. Αμικασίνη

Η Αμικασίνη δοκιμάστηκε μόνο για την αδρανοποίηση της βακτηριακής οικογένειας *Pseudomonadaceae*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, κανένα στέλεχος αυτής της οικογένειας, είτε από αυτά που είχαν υποστεί απολύμανση είτε ανέπαφα, δεν εμφάνισε ανθεκτικότητα απέναντι στην Αμικασίνη. Όπως προαναφέρθηκε, η Αμικασίνη είναι ένα πολύ αποτελεσματικό αντιβιοτικό αμινογλυκοσίδης αλλά σύμφωνα με την υψηλή του τοξικότητα, η χρήση αυτού του αντιβιοτικού έχει περιοριστεί (Sabaeifard et. al., 2016). Έτσι, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η Αμικασίνη, λόγω της περιορισμένης χρήσης της, δεν καταλήγει σε υδάτινα περιβάλλοντα τόσο εκτεταμένα. Έτσι, τα διάφορα βακτηριακά στελέχη δεν έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα ως προς την συγκεκριμένη αντιβιοτική ουσία, αφού δεν έχουν εκτεθεί αρκετά σε αυτή.

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω στα εξεταζόμενα δείγματα αυτής της μελέτης δεν συναντάται κάποιο ανθεκτικό στέλεχος και κατ' επέκταση δεν παρουσιάζεται και κάποιο εικόνα.

4.2.1.3. Σιπροφλοξασίνη



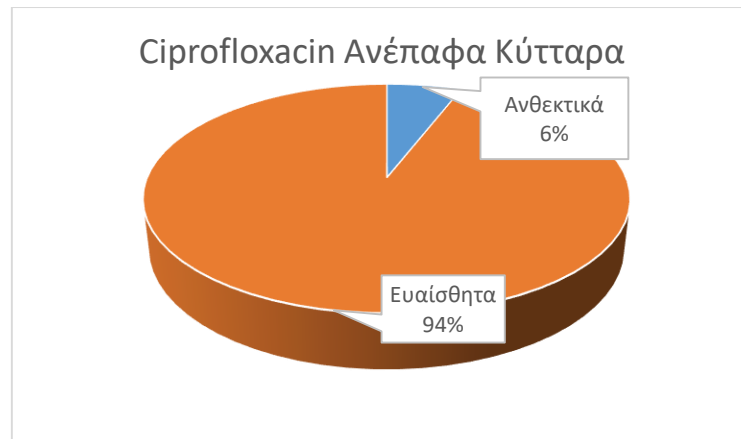
Εικόνα 20: Ποσοστό Εμφάνισης Ανθεκτικών Στελεχών στην Σιπροφλοξασίνη ανά Βακτηριακή Οικογένεια

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα για την Σιπροφλοξασίνη εμφανίζονται ανθεκτικά στελέχη μόνο για την βακτηριακή οικογένεια Enterobacteriaceae. Οι υπόλοιπες βακτηριακές οικογένειες φαίνεται ότι είναι αρκετά ευαίσθητες έναντι αυτού του αντιβιοτικού.

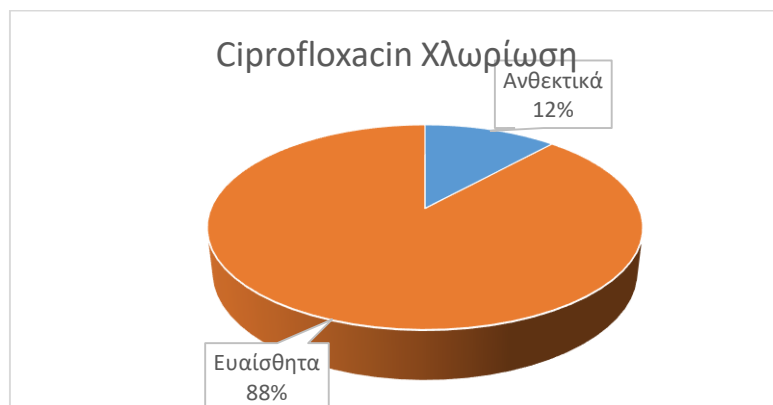
Εντούτοις, Σιπροφλοξασίνη εμφανίζεται μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικών στελεχών στα κύτταρα με την εφαρμογή της χλωρίωσης σε σχέση με τα ανέπαφα. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι σε αυτή την περίπτωση η χλωρίωση δεν επιφέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα σε σχέση με την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.

Αξίζει να τονιστεί, ότι παρόλο που υπάρχει εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών στην Σιπροφλοξασίνη, τα ποσοστά της εμφάνισης τους είναι μικρά. Μόλις το 11,11% των εξεταζόμενων ανέπαφων κυττάρων και το 22,22% των εναπομείναντων είναι ανθεκτικό.

Ακολουθούν τα γραφήματα με το συνολικό ποσοστό ευαίσθητων/ανθεκτικών στελεχών στην Σιπροφλοξασίνη συγκρίνοντας τα ανέπαφα με τα εναπομείναντα κύτταρα. Σύμφωνα και με τα γραφήματα, επιβεβαιώνεται ότι τα στελέχη στα οποία έχει εφαρμοστεί χλωρίωση είναι πιο ανθεκτικά από τα ανέπαφα.

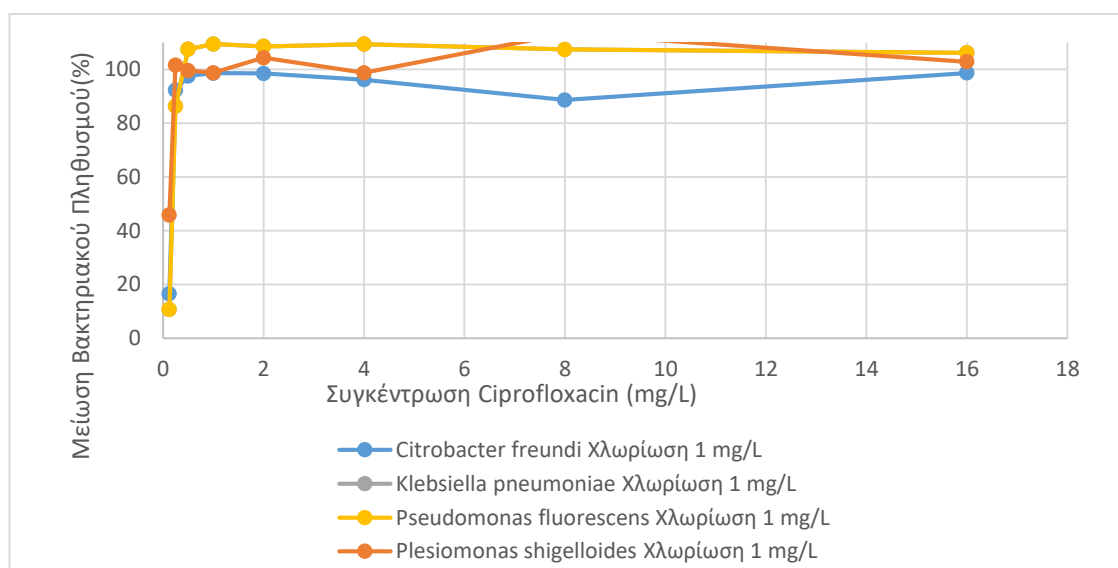


Εικόνα 21: Ποσοστό Ευαίσθητων-Ανθεκτικών Στελεχών για Ανέπαφα Κύτταρα στην Σιπροφλοξασίνη



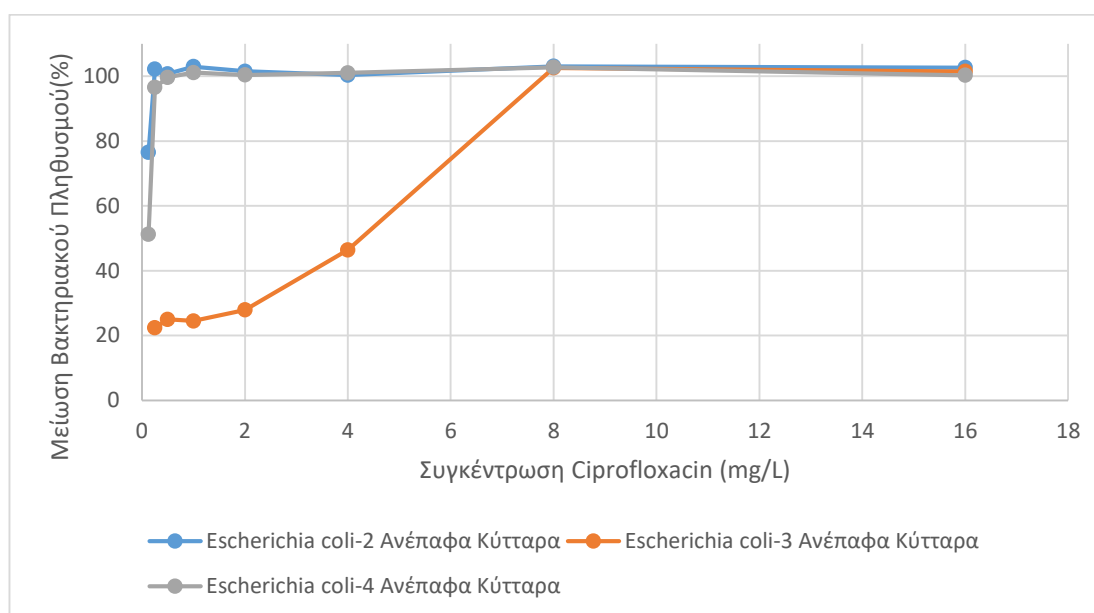
Εικόνα 22: Ποσοστό Ευαίσθητων-Ανθεκτικών Στελεχών για Εναπομείναντα Κύτταρα στην Σιπροφλοξασίνη

Ακολουθούν τα διαγράμματα μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού (%) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης.



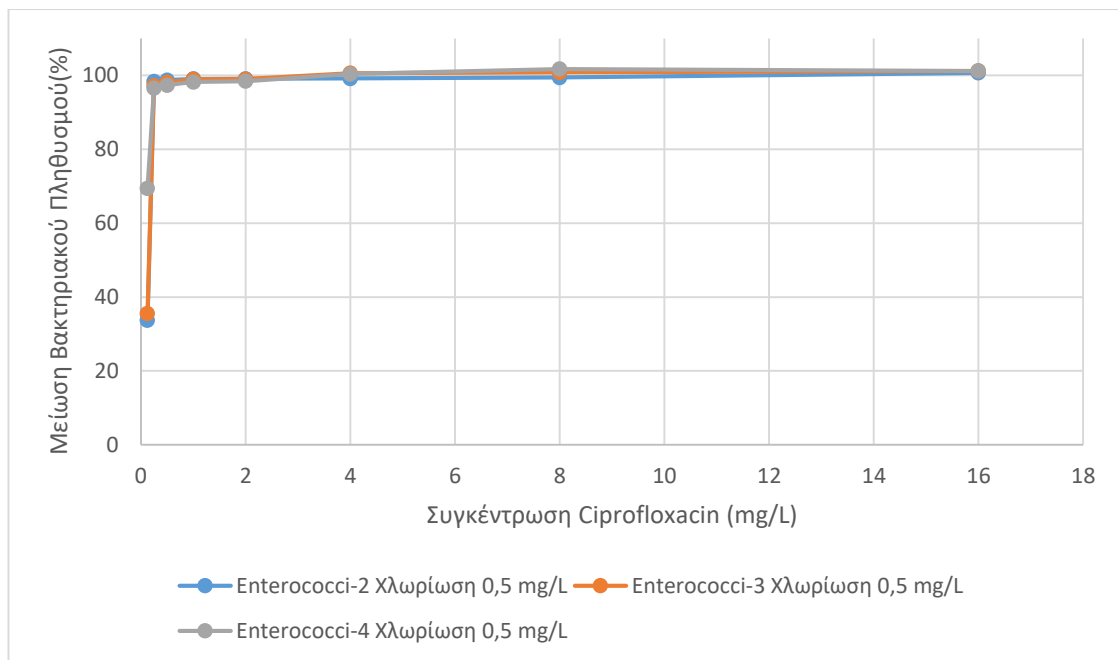
Εικόνα 23: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Σιπροφλοξασίνης (I)

Παρατηρώντας την παραπάνω εικόνα, προκύπτει ότι τα επεξεργασμένα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas fluorescens* έχουν αρκετά όμοια αντίδραση στις διάφορες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού Σιπροφλοξασίνη. Και για τα δύο στελέχη, η αύξηση του πληθυσμού συμβαίνει για συγκέντρωση Σιπροφλοξασίνης μικρότερη από 0,5 mg/L, ενώ για συγκέντρωση ίση με 0,125 mg/L υπάρχει μείωση του βακτηριακού πληθυσμού μόλις περίπου 12%. Το στέλεχος *Citrobacter freundii* είχε στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της Σιπροφλοξασίνης μείωση του βακτηριακού πληθυσμού της τάξης 90-95% και μόνο για συγκέντρωση 0,125 mg/L υπήρχε μικρή μείωση του πληθυσμού της τάξης 16%. Με παρόμοιο τρόπο αντέδρασε και το στέλεχος *Plesiomonas shigelloides*, όπου για συγκέντρωση 0,125 mg/L η μείωση του πληθυσμού ήταν ίση με 45%.



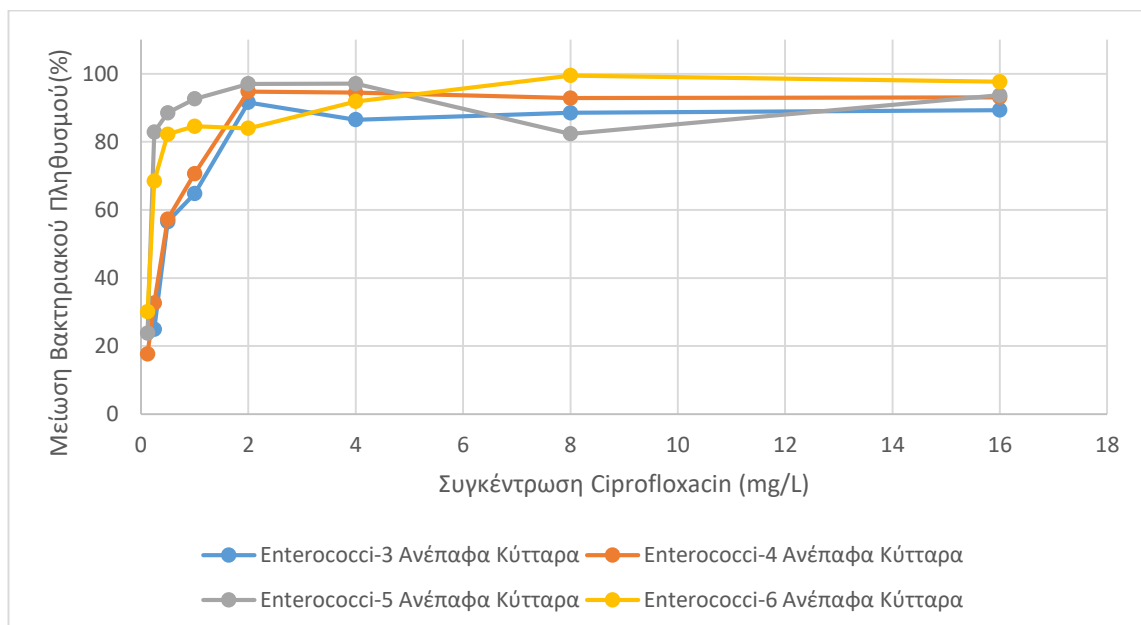
Εικόνα 24: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Σιπροφλοξασίνης (II)

Στην εικόνα 24 παρουσιάζεται η μείωση του βακτηριακού πληθυσμού των ανέπαφων στελεχών *Escherichia coli* σε σχέση με την συγκέντρωση της Σιπροφλοξασίνης που εξετάστηκαν. Τα στελέχη 2 και 4 έχουν πανομοιότυπη συμπεριφορά, αφού μέχρι για την χαμηλότερη συγκέντρωση της Σιπροφλοξασίνης, ο βακτηριακός πληθυσμός μειώνεται σχεδόν εξ' ολοκλήρου. Αντίθετα, το στέλεχος 3 φαίνεται να είναι αρκετά πιο ανθεκτικό στην δράση της Σιπροφλοξασίνης αφού σε συγκέντρωση 4 mg/L αδρανοποιείται μόλις το 46% του πληθυσμού.



Εικόνα 25: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Σιπροφλοξασίνης (III)

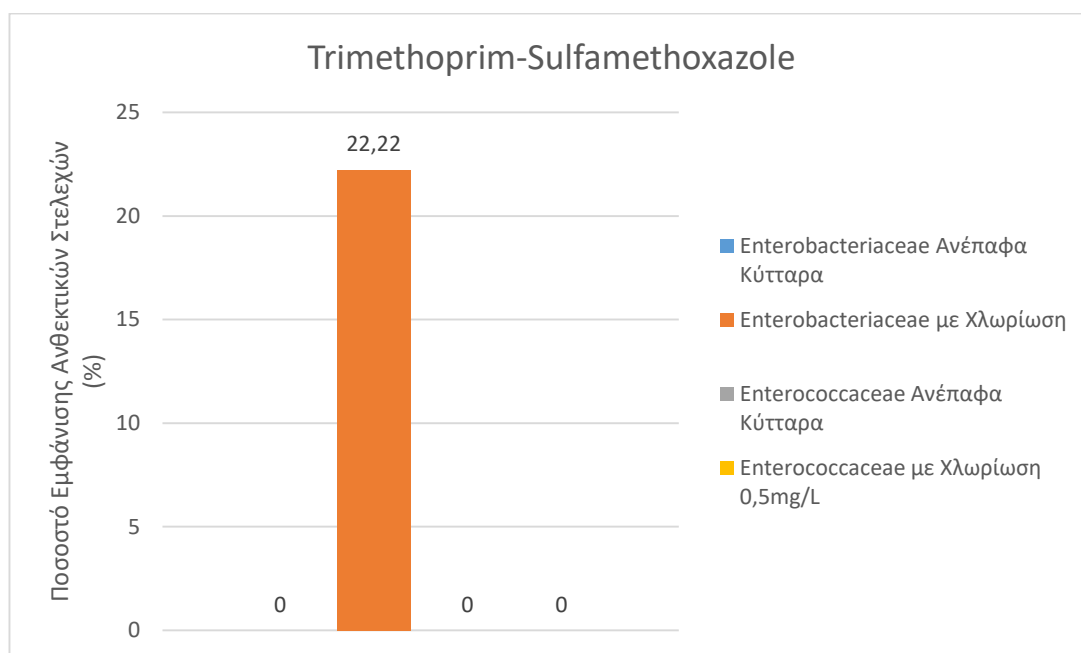
Σύμφωνα με την Εικόνα 25, βλέπουμε ότι τα επεξεργασμένα στελέχη *Enterococci* αντέδρασαν όλα με όμοιο τρόπο απέναντι στο αντιβιοτικό. Όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην Σιπροφλοξασίνη, αφού και για τις πιο χαμηλές συγκεντρώσεις προκαλούσε σχεδόν 100% μείωση του πληθυσμού τους. Μόνο στην ελάχιστη δόση του αντιβιοτικού (0,125 mg/L) παρατηρείται μικρότερη μείωση του πληθυσμού τους.



Εικόνα 26: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Σιπροφλοξασίνης (IV)

Παραπάνω απεικονίζεται η γραφική σχέση της μείωσης του πληθυσμού των ανέπαφων στελεχών *Enterococci* με την δοσολογία της Σιπροφλοξασίνης. Όλα τα στελέχη για υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού, προσέγγιζαν το 100% της μείωσης του πληθυσμού τους αλλά κανένα δεν το άγγιξε. Υπήρξε μία σχετικά ομαλή μείωση του πληθυσμού των στελεχών σε σχέση με την συγκέντρωση. Για τα στελέχη 2 και 3 η μείωση του πληθυσμού κατά το ήμισυ, έγινε για συγκέντρωση μικρότερη από 0,5 mg/L, ενώ για τα στελέχη 5 και 6 για συγκέντρωση μικρότερη από 0,25 mg/L.

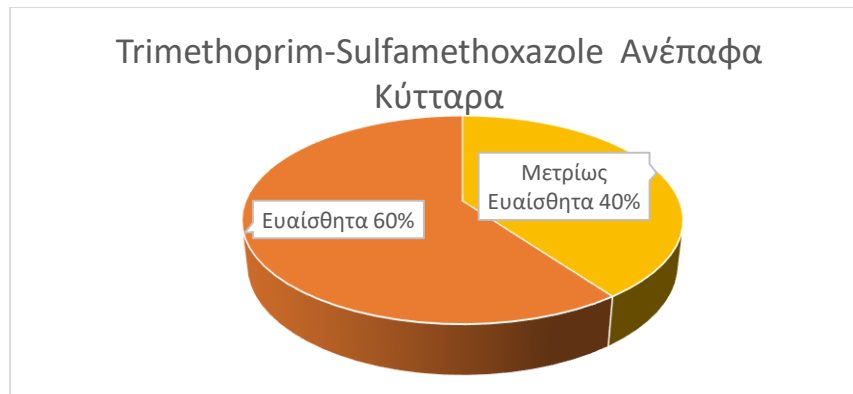
4.2.1.4. Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη (1:19)



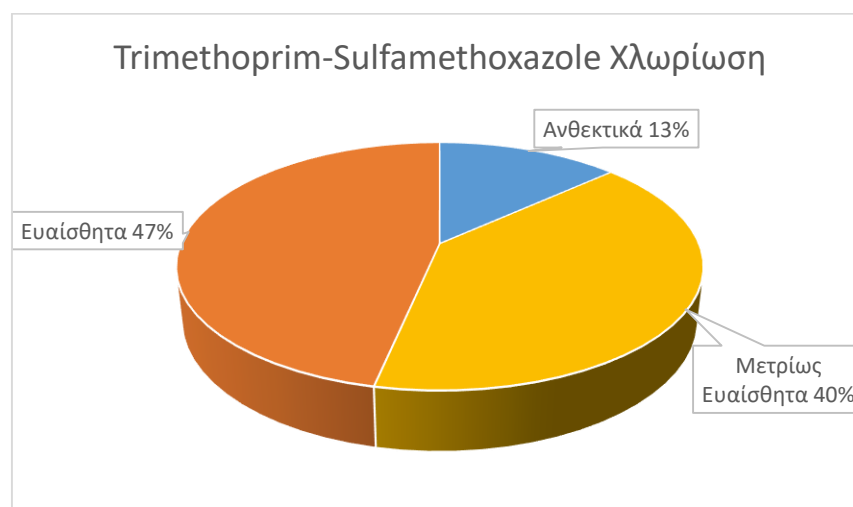
Εικόνα 27: Ποσοστό Εμφάνισης Ανθεκτικών Στελεχών στην Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη (1:19) ανά Βακτηριακή Οικογένεια

Το μίγμα Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη φαίνεται να είναι σχετικά δραστικό για κάποια από τα βακτηριακά στελέχη που εξετάστηκαν. Η βακτηριακή οικογένεια που ανέπτυξε ανθεκτικά στελέχη είναι η Enterobacteriaceae και συγκεκριμένα μόνο τα εναπομείναντα από την χλωρίωση στελέχη. Το ποσοστό βέβαια είναι μικρό αφού δεν ξεπερνάει το 22,22 %. Ωστόσο, είναι ανησυχητικό αφού αλλάζει το επίπεδο ανθεκτικότητας μετά την εφαρμογή της απολύμανσης.

Σύμφωνα με τις εικόνες 28 και 29 που ακολουθούν, με το μίγμα Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη συναντάμε πρώτη φορά στελέχη ενδιάμεσης ευαισθησίας.

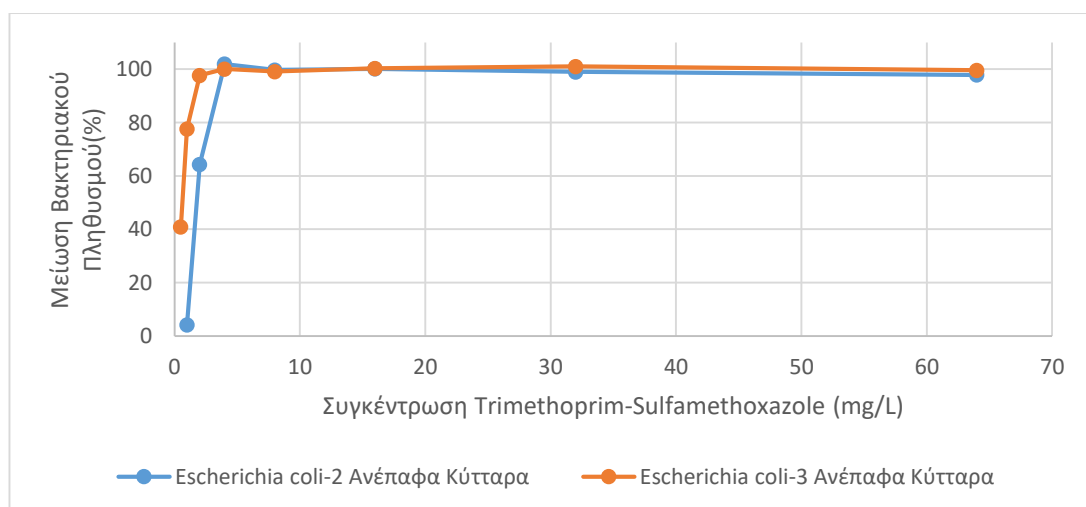


Εικόνα 28: Ποσοστό Ευαίσθητων Στελεχών για Ανέπαφα Κύτταρα στην Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη



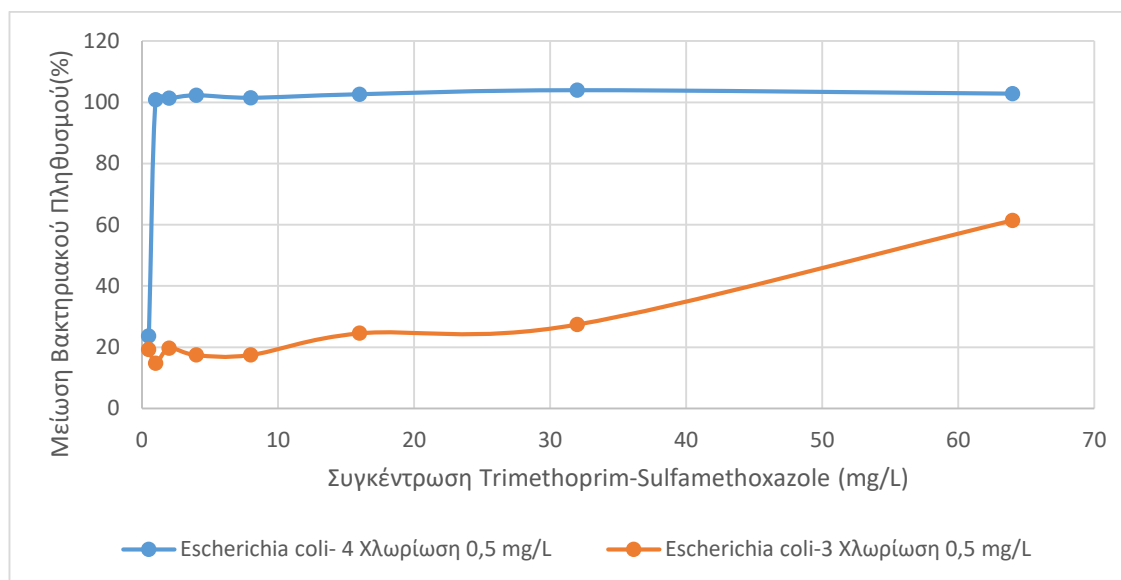
Εικόνα 29: Ποσοστό Ευαίσθητων-Ανθεκτικών Στελεχών για Εναπομείναντα Κύτταρα στην Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη

Στην συνέχεια, παρατίθενται τα σχετικά γραφήματα μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού (%) για τις διάφορες συγκεντρώσεις Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλη.



Εικόνα 30: Μείωση του Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Τριμεθοπρίμης-Σουλφαμεθοξαζόλη (1:19) (I)

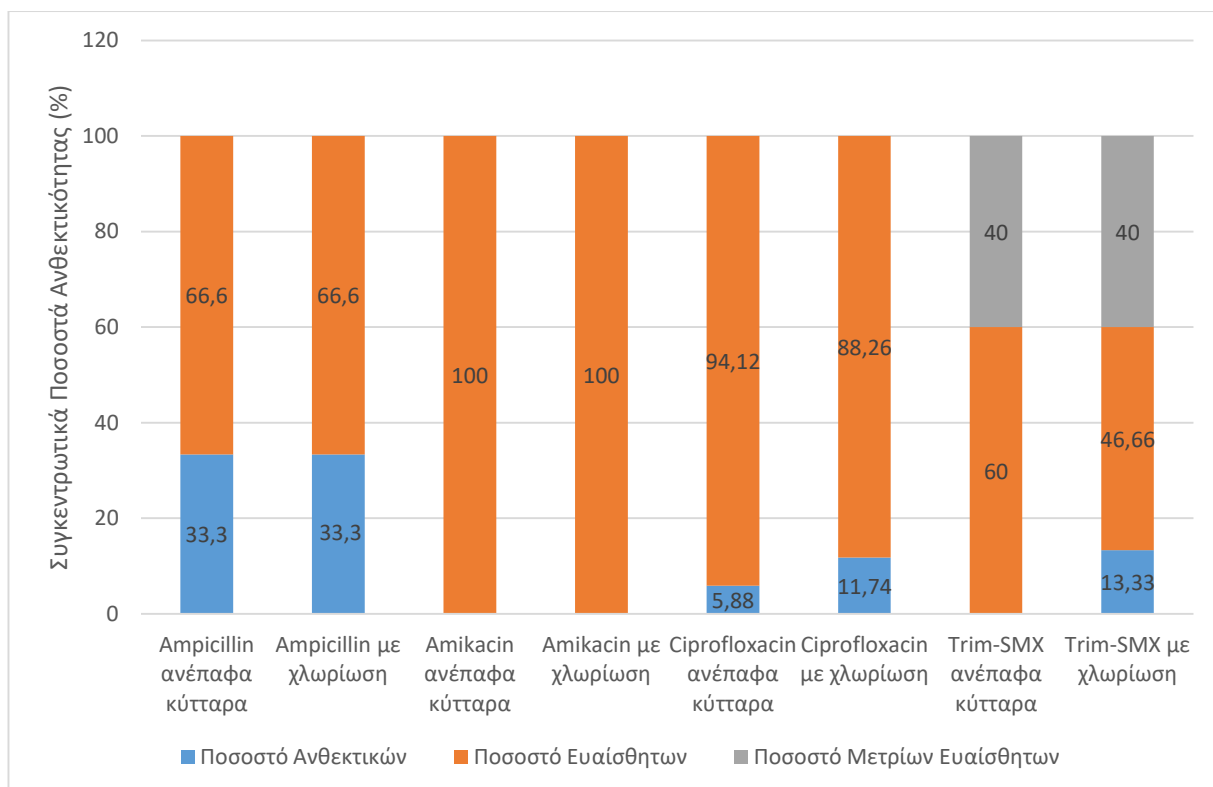
Για τα ανέπαφα στελέχη *Escherichia coli* που δοκιμάστηκαν στις διάφορες συγκεντρώσεις του μίγματος Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλης (1:19) παρουσιάζεται η παραπάνω Εικόνα. Όσο αφορά το στέλεχος 2, παρατηρούμε ότι μέχρι και την δόση 4mg/L η μείωση του πληθυσμού ήταν σχετικά μικρή, ενώ για μεγαλύτερες δόσεις ο πληθυσμός αδρανοποιήθηκε κατά 100%. Το στέλεχος 3 χρειάστηκε να εκτεθεί σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 2 mg/L του αντιβιοτικού, προκειμένου να επέλθει ο πληθυσμός του σε μείωση κατά 100%.



Εικόνα 31: Μείωση Βακτηριακού Πληθυσμού σε σχέση με την Συγκέντρωση της Τριμεθοπρίμης-Σουλφαμεθοξαζόλης (1:19) (II)

Για τα στελέχη *Escherichia coli* που έχουν υποστεί την μέθοδο της χλωρίωσης, τα αποτελέσματα ποικίλουν όπως παρουσιάζεται παραπάνω. Τα στελέχη 4 και 6 για την χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που είναι ίση με 0,5mg/L έχουν μείωση του πληθυσμού τους κατά 23% και 42% αντιστοίχως. Για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, η μείωση τους αγγίζει το 100%. Αντίθετα, το στέλεχος 3 υπήρξε ιδιαίτερα ανθεκτικό στην δράση της Τριμεθοπρίμη-Σουλφαμεθοξαζόλης, αφού ακόμα και για την μέγιστη συγκέντρωση της ίση με 64mg/L θανατώθηκε μόνο το 62% του πληθυσμού του.

Όπως προαναφέρθηκε, γίνεται χαρακτηρισμός των στελεχών ως προς την ανθεκτικότητά τους (ευαίσθητα, μετρίως ευαίσθητα, ανθεκτικά) το οποίο εξαρτάται από την τιμή της ανασταλτικής συγκέντρωσης που διαμορφώνει το καθένα. Το ακόλουθο διάγραμμα παραθέτει συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα ανά αντιβιοτικό παράγοντα και συγκρίνονται τα ανέπαφα κύτταρα με τα επεξεργασμένα.



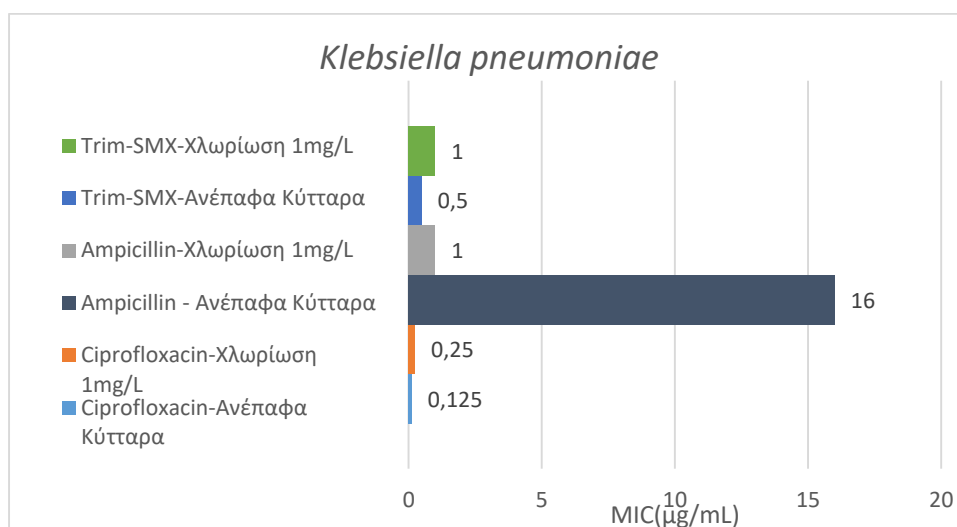
Εικόνα 32: Συγκεντρωτικά Αποτελέσματα Ανθεκτικότητας Βακτηρίων ανά Αντιβιοτικό Παράγοντα

Γενικά, παρατηρούμε ότι η πλειοψηφία των στελεχών κατηγοριοποιούνται ως ευαίσθητα, κάποια ως μετρίως ευαίσθητα και τα ανθεκτικά στελέχη αποτελούν μόνο την μειοψηφία των στελεχών. Είναι σημαντικό να τονιστεί, ότι στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζονται τα ποσοστά ανθεκτικότητας για όλα τα στελέχη που εξετάστηκαν στο εκάστοτε αντιβιοτικό. Έτσι συνολικά, τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη τα εμφάνισε η Αμπικιλίνη, στην συνέχεια το μίγμα Trimethoprim-Sulfamethoxazole (1:19) , μετά η Ciprofloxacin ,ενώ στην Amikacin δεν εμφάνισε κανένα στέλεχος ανθεκτικότητα.

4.2.2. Ανθεκτικότητα ανά Βακτηριακό Είδος

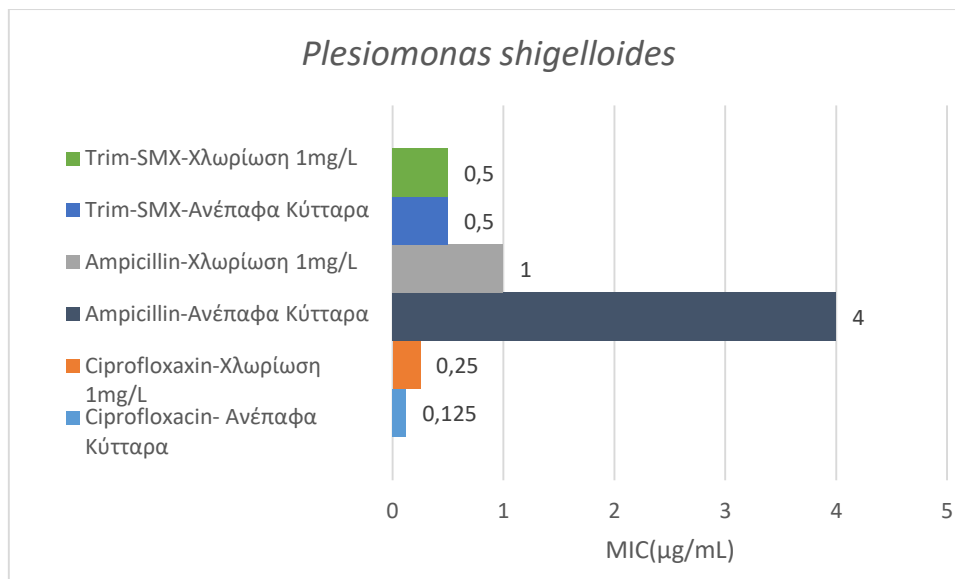
Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC είναι η συγκέντρωση η οποία επιφέρει αδρανοποίηση σε ένα συγκεκριμένο ποσοστό του πληθυσμού. Στην παρούσα εργασία, επιλέχθηκε ως ποσοστό το 60%. Οπότε, οι MIC που παρουσιάζονται παρακάτω είναι οι πρώτες συγκεντρώσεις που παρατηρείται τουλάχιστον 60% μείωση του πληθυσμού.

Στα ακόλουθα γραφήματα, περιγράφεται η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση για καθένα από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αδρανοποίηση του εκάστοτε βακτηρίου.



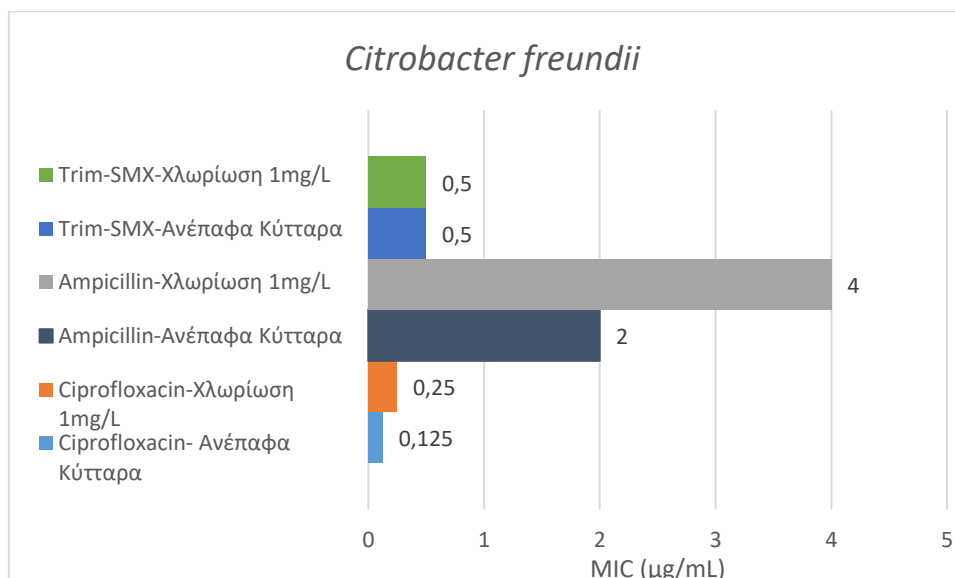
Εικόνα 33: Προφίλ Ανθεκτικότητας *Klebsiella pneumoniae*

Το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae* εξετάστηκε σε τρία διαφορετικά αντιβιοτικά. Όσον αφορά στο Ciprofloxacin και το μίγμα Trimethoprim-Sulfamethoxazole, παρατηρούμε ότι τα κύτταρα που έχουν υποστεί χλωρίωση έχουν την διπλάσια MIC σχετικά με τα ανέπαφα. Αυτό δείχνει ότι χρειάστηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού, για να ανασταλθεί ο πληθυσμός των εναπομείναντων από την χλωρίωση κυττάρων και έτσι κρίνονται και ως πιο ανθεκτικά από αυτά που δεν έχουν υποστεί απολύμανση. Αντίθετα, για το αντιβιοτικό Ampicillin φαίνεται να υπάρχει μεγάλη διαφορά της MIC μεταξύ ανέπαφων (16μg/mL) και εναπομείναντων (1μg/mL) κυττάρων, γεγονός θετικό αφού φαίνεται ότι η διαδικασία της απολύμανσης αποδυνάμωσε το συγκεκριμένο στέλεχος. Αξίζει επίσης να σχολιαστεί, ότι υπάρχει αλλαγή και του προφίλ ανθεκτικότητας του στελέχους στην Ampicillin, αφού τα ανέπαφα κύτταρα σύμφωνα με την MIC τους χαρακτηρίζονται ανθεκτικά, ενώ αυτά που έχουν υποστεί απολύμανση ευαίσθητα.



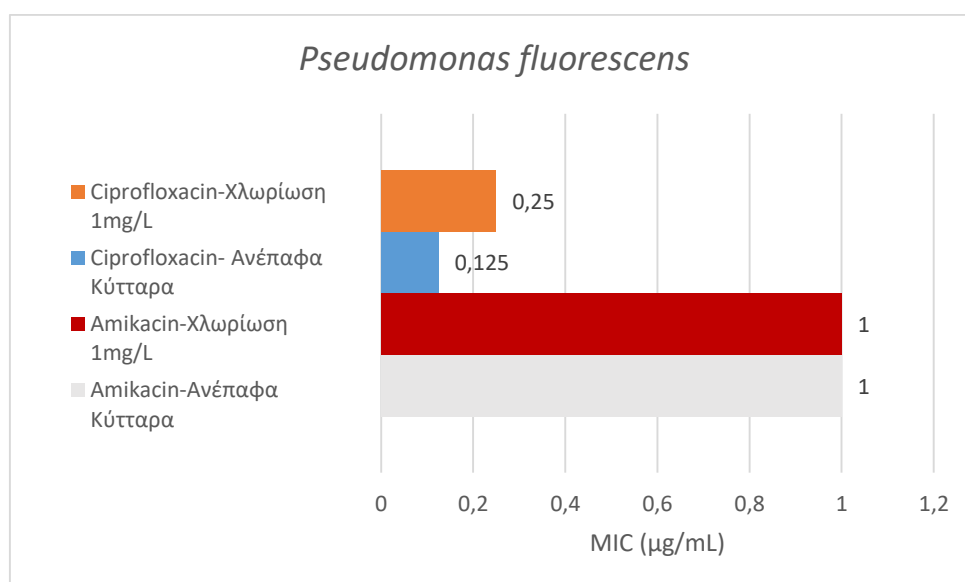
Εικόνα 34: Προφίλ Ανθεκτικότητας *Plesiomonas shigelloides*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του βακτηρίου *Plesiomonas shigelloides* για το αντιβιοτικό Ciprofloxacin η απολύμανση του στελέχους το καθιστά πιο ανθεκτικό αφού η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση διπλασιάζεται για το στέλεχος που έχει υποστεί χλωρίωση. Ωστόσο, στον αντιβιοτικό παράγοντα Ampicillin το στέλεχος ήταν αρκετά πιο ευαίσθητο μετά την χλωρίωση. Για το αντιβιοτικό Trimethoprim-Sulfamethoxazole η χλωρίωση δεν φαίνεται να επιδρά με κάποιον τρόπο στην ανθεκτικότητα του στελέχους.



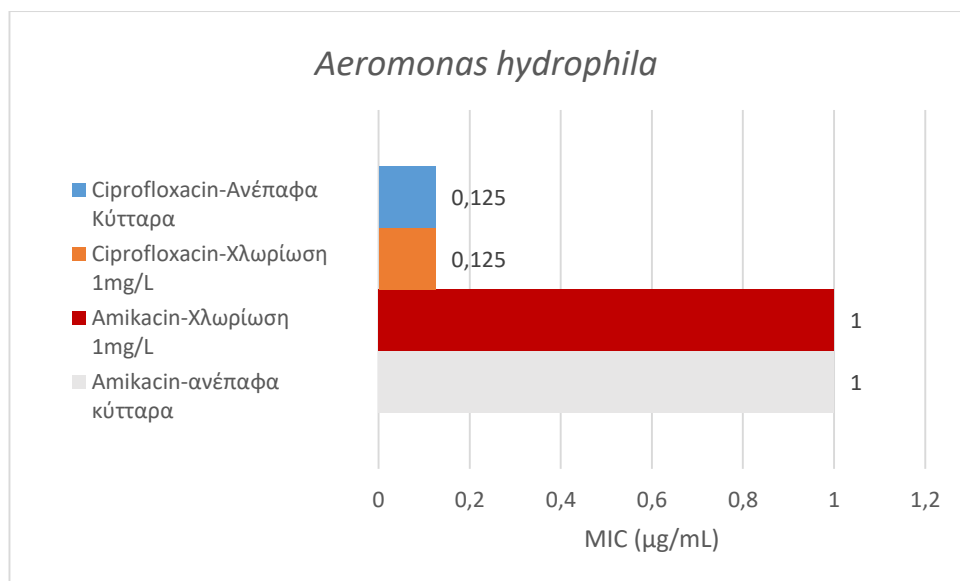
Εικόνα 35: Προφίλ Ανθεκτικότητας *Citrobacter freundii*

Το προφίλ ανθεκτικότητας του στελέχους *Citrobacter freundii* παραμένει ίδιο, αφού για όλους τους αντιβιοτικούς παράγοντες κατηγοριοποιείται ως ευαίσθητο. Εντούτοις, αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο για το αντιβιοτικό Ampicillin όσο και για το Ciprofloxacin, η απολύμανση λειτούργησε αρνητικά, αυξάνοντας το επίπεδο της αντοχής των επεξεργασμένων κυττάρων σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα. Όσο αφορά το αντιβιοτικό Trimethoprim-Sulfamethoxazole, η MIC είναι ίδια για τα ανέπαφα και επεξεργασμένα κύτταρα.



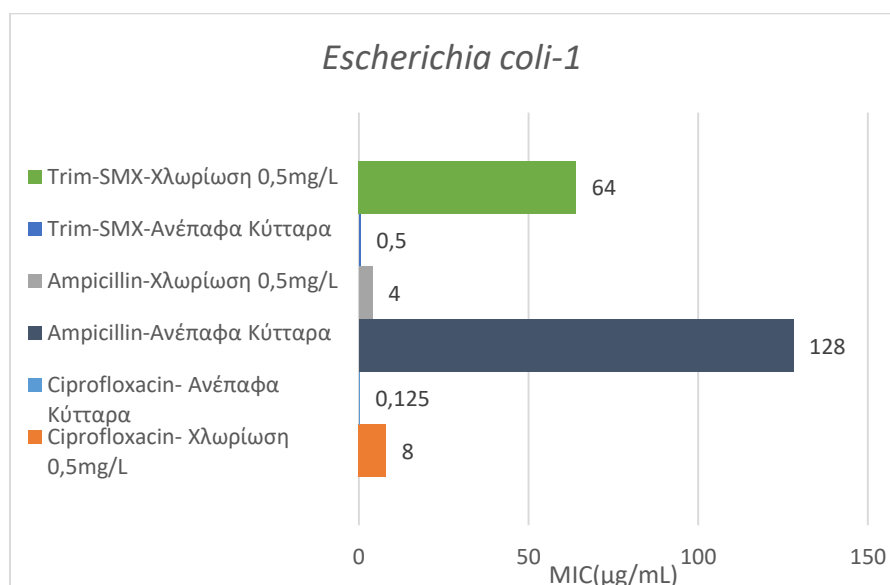
Εικόνα 36: Προφίλ Ανθεκτικότητας *Pseudomonas fluorescens*

Σύμφωνα με τα πρότυπα του EUCAST το στέλεχος *Pseudomonas fluorescens*, κατατάσσεται τόσο στην Amikacin όσο και στο Ciprofloxacin ως ευαίσθητο. Η αντιβιοτική ουσία Amikacin έχει την ίδια τιμή MIC τόσο για τα μη επεξεργασμένα κύτταρα όσο και σε αυτά που υποβλήθηκαν σε χλωρίωση. Η διαδικασία της απολύμανσης λειτούργησε αρνητικά στην περίπτωση του Ciprofloxacin, αυξάνοντας το επίπεδο της αντοχής των επεξεργασμένων κυττάρων σε σχέση με τα ανεπεξέργαστα.



Εικόνα 37: Προφίλ Ανθεκτικότητας *Aeromonas hydrophila*

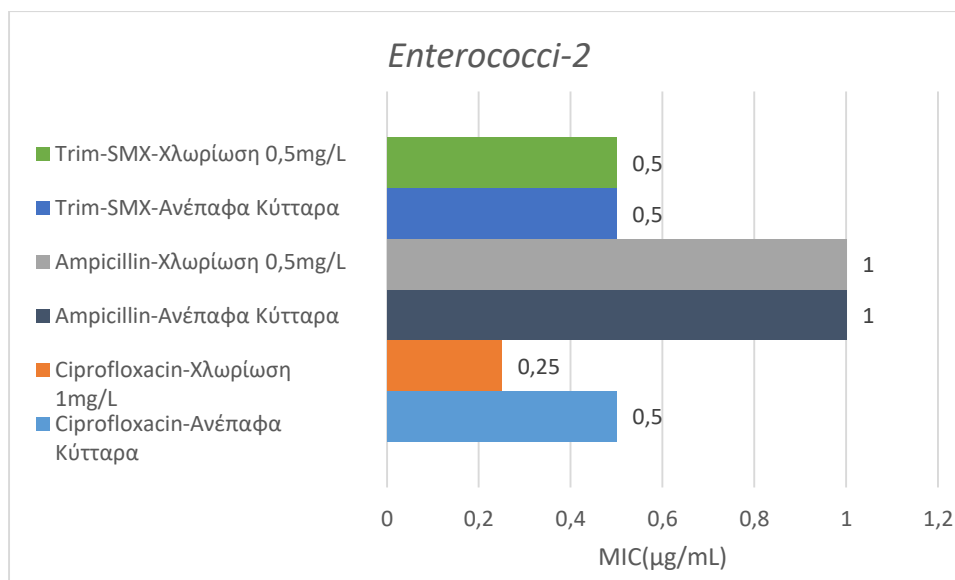
Τα επίπεδα ανθεκτικότητας του βακτηρίου *Aeromonas hydrophila*, για τα αντιβιοτικά Amikacin και Ciprofloxacin, παραμένουν στο ίδιο σημείο ακόμα και μετά τη διαδικασία της απολύμανσης. Η ανθεκτικότητα του στελέχους σε κάθε περίπτωση είναι χαμηλή, και χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητο.



Εικόνα 38: Προφίλ Ανθεκτικότητας *Escherichia coli-1*

Στο στέλεχος *Escherichia coli-1* συναντάμε πιο υψηλές τιμές MIC σε ορισμένες δοκιμές. Πιο συγκεκριμένα, για την δοκιμή της Ampicillin παρατηρούμε ότι τα κύτταρα που έχουν υποστεί χλωρίωση έχουν πολύ χαμηλότερη τιμή MIC σε σχέση με την τιμή της MIC για τα ανεπεξέργαστα. Σύμφωνα με τα πρότυπα του EUCAST, το συγκεκριμένο βακτήριο μπορεί να χαρακτηριστεί ανθεκτικό στην Ampicillin για τα ανεπεξέργαστα κύτταρα αλλά ευαίσθητο για τα εναπομείναντα. Στην δοκιμή του Ciprofloxacin και της Trimethoprim-Sulfamethoxazole η απολύμανση φαίνεται να μην

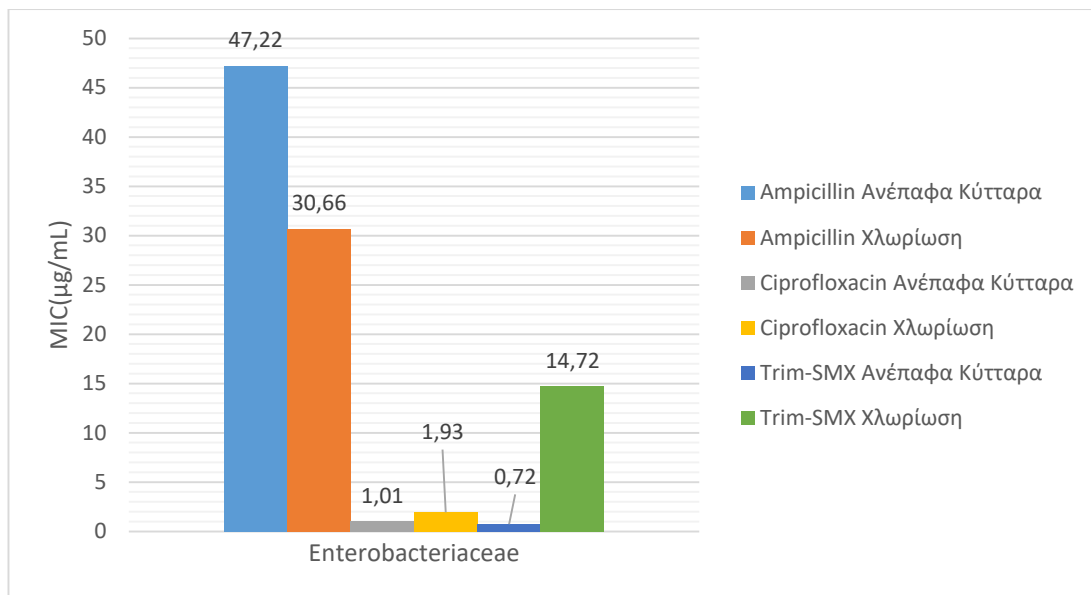
αποδυναμώνει το βακτήριο, αφού το προφίλ ανθεκτικότητας αλλάζει από ευαίσθητο σε ανθεκτικό μετά την απολύμανση. Η χλωρίωση δεν φαίνεται να λειτούργησε θετικά σε αυτές τις περιπτώσεις, αφού η MIC αυξήθηκε ραγδαία για την χλωρίωση. Τα παραπάνω δεδομένα ήταν τα αναμενόμενα αφού συμφωνούν με τις υψηλές τιμές MIC που μετρήθηκαν με τους Rizzo et al. (2013) σε πληθυσμούς *E.coli*.



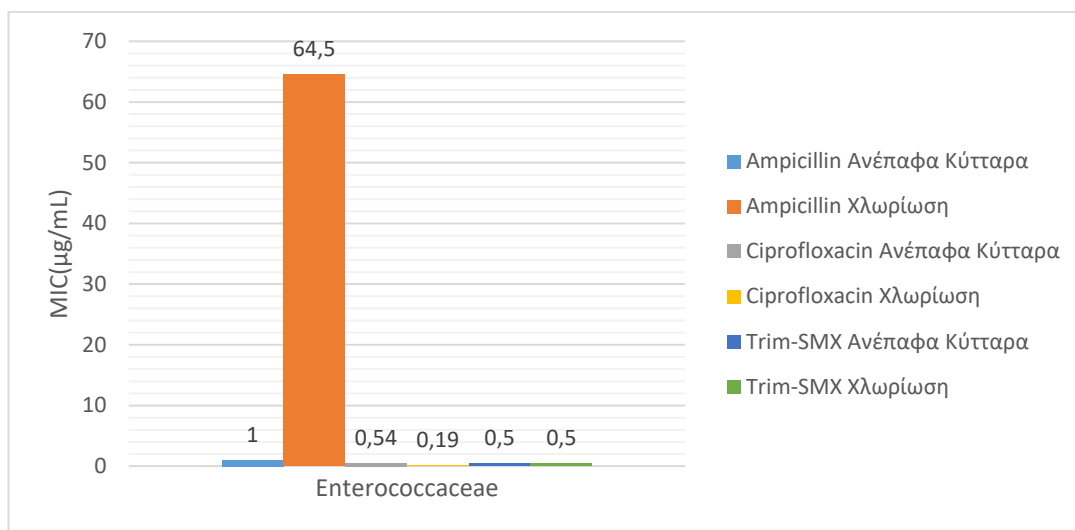
Εικόνα 39: Προφίλ Ανθεκτικότητας *Enterococci-2*

Όσον αφορά το στέλεχος *Enterococci-2*, παρατηρούμε σύμφωνα με το παραπάνω εικόνα, ότι για τις αντιβιοτικές ουσίες Trimethoprim-Sulfamethoxazole και Ampicillin δεν εντοπίζεται κάποια διαφορά στην ανθεκτικότητα του στελέχους πριν και μετά την απολύμανση. Ωστόσο, για την περίπτωση της Ampicillin το βακτήριο σύμφωνα με τα πρότυπα του EUCAST χαρακτηρίζεται ευαίσθητο, ενώ για την Trimethoprim-Sulfamethoxazole μετρίως ευαίσθητο. Η MIC για το αντιβιοτικό Ciprofloxacin υποδιπλασιάζεται μετά την διαδικασία της απολύμανσης, βέβαια το στέλεχος και στις δύο περιπτώσεις είναι στο εύρος των ευαίσθητων βακτηρίων.

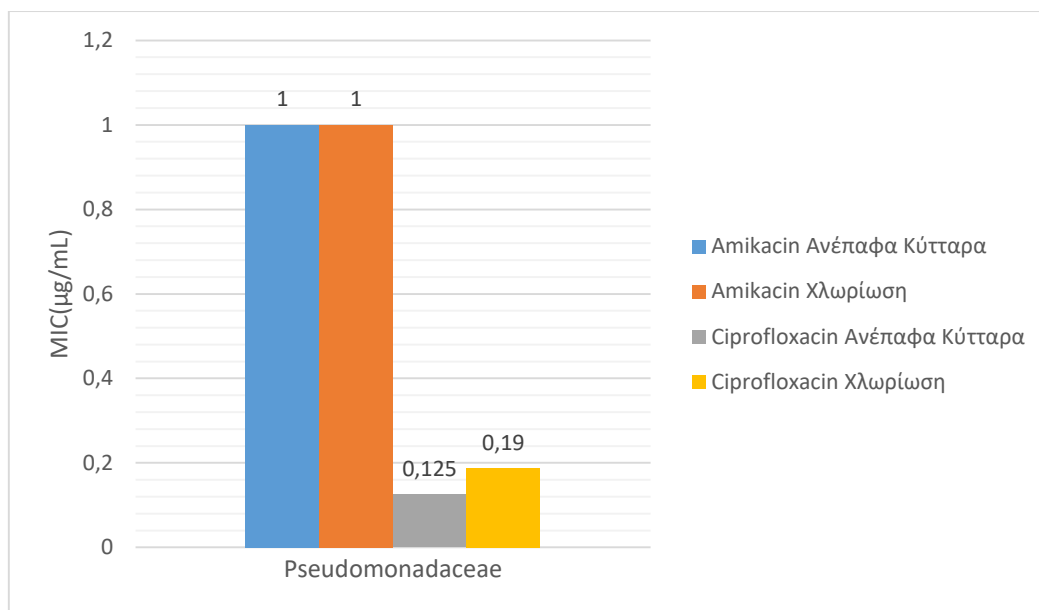
Ακολουθώς, παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της μέσης τιμής ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC (μg/mL) ανά αντιβιοτικό παράγοντα για τις τρεις βακτηριακές οικογένειες που εξετάστηκαν.



Εικόνα 40: Μέση Τιμή Ανασταλτικής Συγκέντρωσης της Βακτηριακής Οικογένειας *Enterobacteriaceae* ανά Αντιβιοτικό Παράγοντα



Εικόνα 41: Μέση Τιμή Ανασταλτικής Συγκέντρωσης της Βακτηριακής Οικογένειας *Enterococcaceae* ανά Αντιβιοτικό Παράγοντα



Εικόνα 42: Μέση Τιμή Ανασταλτικής Συγκέντρωσης της Βακτηριακής Οικογένειας *Pseudomonadaceae* ανά Αντιβιοτικό Παράγοντα

Όπως φαίνεται στις τρεις παραπάνω εικόνες (40,41,42) η Αμπικικιλίνη εμφανίζει τα υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας, αφού η MIC τόσο για τα ανέπαφα, όσο και για τα εναπομείναντα κύτταρα είναι η μέγιστη που συναντάμε. Αυτό σημαίνει δηλαδή ότι χρειάστηκε μεγαλύτερη δόση αντιβιοτικού για να ελαττωθεί ο βακτηριακός πληθυσμός στο επιθυμητό ποσοστό. Επίσης, παρατηρείται ότι τα ανέπαφα κύτταρα για την βακτηριακή οικογένεια *Enterobacteriaceae* ήταν πιο ανθεκτικά από τα αυτά που είχαν υποστεί χλωρίωση. Αντίθετα, στην βακτηριακή οικογένεια *Enterococcaceae*, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η MIC για τα επεξεργασμένα στελέχη, είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή των ανέπαφων.

Το Ciprofloxacin, που είναι και το μοναδικό αντιβιοτικό που εφαρμόστηκε για όλες τις βακτηριακές οικογένειες, είχε γενικά αρκετά χαμηλές MIC, ιδιαίτερα απέναντι στην βακτηριακή οικογένεια *Enterobacteriaceae* και ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό με χαμηλές MIC και στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*. Περισσότερο ανθεκτική ήταν η οικογένεια *Enterococcaceae* στο Ciprofloxacin. Όσον αφορά στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, τα αποτελέσματα ποικίλλουν, αφού για τις οικογένειες *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonadaceae* τα εναπομείναντα κύτταρα ήταν ανθεκτικότερα από τα ανέπαφα ενώ συμβαίνει αντίστροφα για την οικογένεια *Enterococcaceae*.

Το μίγμα Trimethoprim-Sulfamethoxazole (1:19) έχει πολύ χαμηλές MIC για τα ανέπαφα κύτταρα στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*, ενώ έχει σημαντική διαφορά για τα κύτταρα που έχουν υποστεί χλωρίωση. Αντίθετα, στην οικογένεια *Enterococcaceae* η μέση τιμή της ανασταλτικής συγκέντρωσης είναι ίδια.

Τέλος, όσον αφορά στην Αμικασίνη που χρησιμοποιήθηκε μόνο για τον πληθυσμό των βακτηρίων που ανήκουν στην οικογένεια *Pseudomonadaceae*, τα στελέχη φαίνεται να είναι σχετικά ευαίσθητα απέναντι της, αφού δεν παρατηρούνται υψηλές MIC. Καμία διαφορά δεν παρατηρείται μεταξύ των ανέπαφων και εναπομείναντων κύτταρων.

5. Συμπεράσματα

Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον και η αντοχή τους στα αντιβιοτικά επιβάλλουν αποτελεσματική απολυμαντική θεραπεία για τη δημόσια υγεία και την προστασία του περιβάλλοντος. Έτσι, οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν (i) η μελέτη της εμφάνισης ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων στα επιφανειακά ύδατα, (ii) η αδρανοποίησή τους μέσω εφαρμογής χλωρίωσης και (iii) η διερεύνηση πιθανών αλλαγών στο προφίλ αντοχής των βακτηρίων κατόπιν της απολύμανσης.

Απολύμανση

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την χλωρίωση, επηρεάστηκαν κυρίως από την πηγή προέλευσης του βακτηρίου και το είδος του.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει στα αποτελέσματα που έδειξαν μεγάλη συσχέτιση της αποτελεσματικότητας της χλωρίωσης σε σχέση με το υδάτινο περιβάλλον στο οποίο συλλέχθηκε ο εκάστοτε μικροοργανισμός. Θα μπορούσαμε να κατηγοριοποιήσουμε τα στελέχη μας σε δύο τμήματα. Τα στελέχη από τον ποταμό του Αποκόρωνα υπήρξαν πολύ ανθεκτικά στην χλωρίωση, αφού μετά από ένα σημαντικό χρονικό διάστημα ($>30\text{min}$) εξακολουθούσαν να παρουσιάζονται αποικίες. Αντίθετα, τα στελέχη από την λίμνη της Αγιάς, μετά από μικρότερο χρονικό πέρασ αδρανοποιήθηκαν πλήρως. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν και για διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωρίου, 1mg/L για τα στελέχη από τον Αποκόρωνα και $0,5\text{mg/L}$ για τα στελέχη από την Αγιά, λόγω της διαφοράς τους ως προς την ανθεκτικότητα.

Το είδος των βακτηρίων επίσης καθόρισε την ανθεκτικότητά τους στην μέθοδο απολύμανσης. Τα πιο ανθεκτικά βακτήρια έναντι στην απολύμανση ήταν τα: *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Plesiomonas shigelloides*. Ιδιαίτερα ευαίσθητα ήταν τα στελέχη *Escherichia coli* και *Enterococci*. Τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Enterococci* εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα ανθεκτικότητας κατά την εφαρμογή της χλωρίωσης. Υπήρχαν κάποιες διακυμάνσεις στα αποτελέσματα, που είναι αναμενόμενο γιατί αν και στο ίδιο γένος, η συμπεριφορά των στελεχών ποικίλλει.

Σε κάθε περίπτωση, η απολύμανση εν τέλει κατάφερε να αδρανοποιήσει το 99,99% του βακτηριακού πληθυσμού για τα περισσότερα στελέχη, και έτσι θεωρείται γενικά σαν διαδικασία επιτυχής.

Ανθεκτικότητα σε Αντιβιοτικά

Ο πληθυσμός των βακτηρίων που εξετάστηκαν στα αντιβιοτικά αποτελείται από τα ανέπαφα στελέχη και από αυτά που έχουν υποστεί χλωρίωση. Ο βαθμός στον οποίο οι διαδικασίες επεξεργασίας και απολύμανσης απενεργοποιούν τα ανθεκτικά σε αντιβιοτικά βακτήρια και εξαλείφουν τα γονίδια που σχετίζονται με την αντίσταση εξακολουθεί να βρίσκεται υπό συζήτηση (Bouki et al., 2013, Jahne et al., 2015). Αν και

οι συμβατικές μέθοδοι όπως η χλωρίωση αποδεικνύονται αποτελεσματικές στην απενεργοποίηση διαφόρων μικροοργανισμών, υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με το ρόλο τους όσον αφορά στη μεταβολή του προφίλ αντοχής στα υπολειμματικά κύτταρα μετά τη θεραπεία. Όλα τα παραπάνω, συναινούν στο γεγονός ότι από τα αποτελέσματα δεν μπορεί να εξαχθεί ένα γενικευμένο συμπέρασμα, αφού οι αντιδράσεις των στελεχών παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία. Με άλλα λόγια, η απολύμανση προκάλεσε άλλοτε την ανάπτυξη της αντοχής στα αντιβιοτικά και άλλοτε της ευαισθησίας, ανεξαρτήτως από το είδος του αντιβιοτικού ή το βακτηριακό είδος. Ωστόσο, γενικευμένα, θα μπορούσε κανείς να πει ότι τα περισσότερα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χλωρίωση ενίσχυσε την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά αντιβιοτικά. Τα περισσότερα βακτήρια παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην Ampicillin, γεγονός αναμενόμενο, λόγω της ευρείας χρήσης του συγκεκριμένου αντιβιοτικού κατά τις τελευταίες δεκαετίες τόσο στην ιατρική όσο και σε άλλες εφαρμογές. Τα αντιβιοτικά Ciprofloxacin και Trimethoprim-Sulfamethoxazole είχαν λιγότερα ανθεκτικά βακτήρια, ενώ στην αντιβιοτική ουσία Amikacin δεν προέκυψε κανένα ανθεκτικό στέλεχος. Το τελευταίο μπορεί να εξηγηθεί και από το γεγονός ότι η χρήση της Amikacin έχει περιοριστεί, καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή τοξικότητα (Sabaeifard et. al., 2016).

Αξίζει επίσης να επισημανθεί, ότι τα αποτελέσματα φαίνεται να μπορούν να κατηγοριοποιηθούν και ως βακτηριακή οικογένεια. Η οικογένεια Enterobacteriaceae φαίνεται να είναι η πιο ανθεκτική σε όλες τις αντιβιοτικές ουσίες που δοκιμάστηκαν, ακολουθεί η οικογένεια Enterococcaceae και τέλος η οικογένεια Pseudomonadaceae.

Τα στελέχη που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είναι διαφορετικά από αυτά που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στην απολύμανση. Δηλαδή, ανθεκτικά στα αντιβιοτικά στελέχη βρέθηκαν τα παρακάτω: *Klebsiella pneumoniae*, κάποια στελέχη *Escherichia coli* και κάποια στελέχη *Enterococci*. Ενώ, έναντι στην απολύμανση ανθεκτικότερα χαρακτηρίστηκαν τα στελέχη: *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Plesiomonas shigelloides*. Το στέλεχος *Klebsiella pneumoniae* και τα στελέχη *Escherichia coli* και *Enterococci* που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, έδειξαν μία αντίσταση έναντι της απολύμανσης, αλλά σίγουρα όχι τόσο μεγάλη όσο αυτή στα αντιβιοτικά.

Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι υπάρχουν ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια, των οποίων η ανθεκτικότητα αδρανοποιείται μέσω της χλωρίωσης και πιθανόν μέσω άλλων αντίξων συνθηκών. Σύμφωνα με τα παραπάνω, διατυπώνεται το γενικό συμπέρασμα ότι, κάθε στέλεχος παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε διαφορετικό μέσο.

6. Μελλοντικές Προτάσεις

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

- Επανάληψη πειράματος με προσθήκη και άλλων αντιβιοτικών.
- Αδρανοποίηση των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά με χρήση και άλλων μεθόδων (π.χ. ακτινοβολία UV & οζόνωση).
- Έλεγχος ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνες και μακρολίδια.
- Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε β-λακτάμες, αμινογλυκοσίδες, τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες, κινολόνες, μακρολίδια.
- Καταγραφή του μέσου στο οποίο κάθε στέλεχος παρουσιάζει ανθεκτικότητα.

7. Βιβλιογραφία

Ackerman, D. , Weisberg, S. B., (2003), Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay beaches, *Journal of Water and Health*, pp. 85-89

Ambashta, M. , Sillanpa, A., (2010), Water purification using magnetic assistance: a review, *Hazardous Materials*, 180, pp. 38-49

Beberok, A., Wrześniok, D., Minecka, A., Rok, J., Delijewski, M., Rzepka, Z., Respondek, M., Buszman, M., (2018), Ciprofloxacin-mediated induction of S-phase cell cycle arrest and apoptosis in COLO829 melanoma cells , *Pharmacological Reports*, 70(1), pp. 6-13

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

Esteve, C., (1995), Numerical Taxonomy of Aeromonadaceae and Vibrionaceae associated with Reared Fish and Surrounding Fresh and Brackish Water, *Systematic and Applied Microbiology*, 3 (18), pp. 391-402

Hirsch R. T. , (1999), Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *Science of the Total Environment*, 225, pp. 109–118

Hongna, L., Binxu, L., Jinlian, M., Jing, Y., Ping, G., Lianfang, L., (2017), Fate of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in the electrokinetic treatment of antibiotic-polluted soil, *Chemical Engineering Journal*, In Press, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.12.154>

Hong-Ying, H., Huang, J.J., Fang, T., Yi, L., Sun-Qin, L., Yun, L., (2011), Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant, *Water Research*, 45(9), pp. 2775-2781

Jahne M.A., Rogers S.W., Ramler I.P., Holder E., Hayes G., (2015), Hierarchical clustering yields insight into multidrug-resistant bacteria isolated from a cattle feedlot wastewater treatment system, *Environmental Monitoring and Assessment* , 187, 4168-4182

Jyoti, K., Pandit, B., (2001), Water disinfection by acoustic and hydrodynamic cavitation, *Biochemical Engineering Journal*, 7 , pp. 201-212

Kistemann, T. , Classen, T., Koch, C., Dangendorf, F., Fischeder, R., Gebel, J. ,Vacata, V., (2002) , Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff, *Applied Environmental Microbiology*, 68 , pp. 2188-2197

Kistemann, T., Claßen, T., (2003) Guter humanökologischer Zustand des Wassers?, [Good human-ecological condition of water?], Wasser - Raum - Planung, ILS Schriften, Dortmund ,187, pp. 74-77

Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T., (2002) Pharmaceuticals, hormones, and others organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance, Environmental Science Technology, 36, pp. 1202–1211

Ludwig, W., Schleifer, K.H. & Whitman, W.B. ,(2009), Family IV. Enterococcaceae, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology , 3, pp. 594

Ma, X., Zhou, W., Fu, Z., Cheng, Y., Min, M., Liu, Y. , Zhang, Y., Chen, P., Ruan, R., (2014), Effect of wastewater-borne bacteria on algal growth and nutrients removal in wastewater-based algae cultivation system, Bioresource Technology, 167, pp. 8-13

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

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.

Ruiz ,J., Ramirez, P., Company, M.J., Gordon, M., Villarreal, E., Concha, P., Arocha, M., Frasset, J., Remedios-Marques, M., Castellanos-Ortega, A., (2018), Impact of amikacin pharmacokinetic/pharmacodynamic index on treatment response in critically ill patients, Journal of Global Antimicrobial Resistance, 12, pp. 90-95

Sabaeifard, P., Abdi-Ali, A., Soudi, M.R., Gamazo, C., Irache, M., (2016), Amikacin loaded PLGA nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* , European Journal of Pharmaceutical Sciences ,93, pp. 392-398

Scholar, R., (2007), xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, Reference Module in Biomedical Sciences, pp.1-5

Schreiber, Ch. , Rechenburg, A., Rind, E., Kistemann., T., (2015) , The impact of land use on microbial surface water pollution, International Journal of Hygiene and Environmental Health, 218(2), pp. 181-187

Sulaiman, N., Ramli, M., (2012), Comparison of the Effectiveness Between Post-Chlorination and Pre-Chlorination on Nanofiltration of Sulfonamide, Procedia Engineering, 44, pp. 2006-2009

Templeton, M.R., Oddy, F., Leung, W., Rogers, M., (2009), Chlorine and UV disinfection of ampicillin-resistant and trimethoprim-resistant *Escherichia coli*, Canadian Journal of Civil Engineering, 36, pp. 889-894

Unuabonah, E., Ugwuja, C., Omorogie, M., Adewuyi, A., Oladoja, N., (2018), Clays for Efficient Disinfection of Bacteria in Water, Applied Clay Science, 151, pp. 211-223

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

Wallender, E.K., Ailes, E.C., Yoder, J.S., Roberts, V.A., Brunkard J.M., (2014), Contributing factors to disease outbreaks associated with untreated groundwater, Groundwater, 52, pp. 886-897

Wang, H., Hu, C., Liu, L., Xing, X., (2017) ,Interaction of ciprofloxacin chlorination products with bacteria in drinking water distribution systems, Journal of Hazardous Materials, 339, pp. 174-181

Wu, N., Luo, Z., Ge, Y., Guo, P., Du, K., Tang, W., Du, W., Zeng, A., Chang, C., Fu, Q., (2016), A novel surface molecularly imprinted polymer as the solid-phase extraction adsorbent for the selective determination of ampicillin sodium in milk and blood samples, Journal of Pharmaceutical Analysis, 3(6), pp. 157-164

Yu, Z., Lai, R., (2018), A reagentless and reusable electrochemical aptamer-based sensor for rapid detection of ampicillin in complex samples, Talanta, 176, pp. 619-624

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

Βενιέρη Δ., Γουνάκη Ι., (2017), Πανεπιστημιακές σημειώσεις μαθήματος «Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας», Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Διαμαντόπουλος Ε., (2008), Πανεπιστημιακές σημειώσεις μαθήματος «Χημικές διεργασίες στην επεξεργασία νερού & υγρών αποβλήτων», Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

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

Παλαιολόγου, Α., (2008), Εφαρμογές των Εξελιγμένων Διεργασιών Οξειδωσης στην Απολύμανση του νερού, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

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

Ιστοσελίδες:

- http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/pdf/waterislife_el.pdf
- <https://epoptes.wordpress.com/θέματα-δημόσιας-υγείας/πόσιμο-νερό/απολύμανση-του-νερού/>
- www.keelpno.gr
- http://www.aclabs.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=63%3A2009-04-07-11-41-59&catid=41%3Apublic&Itemid=76&showall=1
- <https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/>