



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

«Παρουσία και τύχη βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων»

Πήττας Θοδωρής

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέπουσα

Επίκουρη καθηγήτρια Βενιέρη Δανάη

Τριμελής Επιτροπή

Επίκουρη Καθηγήτρια Βενιέρη Δανάη

Καθηγητής Διαμαντόπουλος Ευάγγελος

Καθηγητής Καλογεράκης Νικόλαος

Χανιά, Σεπτέμβρης 2018

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτριά μου, κ. Βενιέρη Δανάη για την εξαιρετική συνεργασία μας, καθώς και την κ. Γουνάκη, τη Μαρικήτα, τον Ανδρέα και τους υπόλοιπους φοιτητές από το εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας. Επιπλέον, ευχαριστώ τα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής Καθηγητή Διαμαντόπουλο Ευάγγελο και Καθηγητή Καλογεράκη Νικόλαο για τη συμβολή τους.

Τους γονείς μου Αλέκα και Θανάση, τη Μάρω, τον Άλεξ, την Αλίκη, τον Πάσο, τον Τεμπέλη, τον Μπάρπα, τον Μοναχό Αμόναχο, τον Γιάννη, την Ελένη, τον Πάσπαλο και όσους με στήριξαν με τον έναν ή τον άλλο τρόπο.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	1
Περίληψη στα αγγλικά.....	3
Εισαγωγή.....	5
1. Αντιβιοτικά, ανασκόπηση, πορεία στο οικοσύστημα	6
1.1 Αντιβιοτικά στη γεωργία	7
1.2 Αντιβιοτικά στην κτηνοτροφία	8
1.3 Αντιβιοτικά στα απόβλητα των μονάδων παραγωγής αντιβιοτικών	10
1.4 Αντιβιοτικά στα απόβλητα νοσοκομείων	11
1.5 Αντιβιοτικά σε άλλες υδατικές μήτρες	12
1.6 Αντιβιοτικά στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων	13
1.7 Αντιβιοτικά – ιστορικά στοιχεία, ορισμοί.....	21
1.8 Αντιβιοτικά ενδιαφέροντος	23
1.9 Μέθοδοι προσδιορισμού της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά	30
1.10 Μικροοργανισμοί ενδιαφέροντος (χαρακτηριστικά και μεταβολικά μονοπάτια)	34
1.10.1 <i>E. coli</i>	34
1.10.2 <i>Enterococci</i>	35
1.10.3 <i>Staphylococci</i>	36
1.11 Δημιουργία ανθεκτικότητας και γονίδια	37
1.11.1 Πλασμίδια και ιντεγκρόνια.....	37
1.11.2 Γονίδια του κεντρικού χρωμοσώματος.....	38
2. Πειραματικό μέρος.....	40
2.1 Δειγματοληψία, διήθηση και συντήρηση υγρού αποβλήτου (-80 °C).....	40
2.2 Καλλιέργεια σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο και καταμέτρηση αποικιών.....	40
2.3 Ανακαλλιέργεια και συντήρηση σε γλυκερόλη	41
2.4 Περιγραφή της MIC.....	41
2.5 Απομόνωση γενετικού υλικού	43
2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction).....	45
2.7 Γονίδια ανθεκτικότητας.....	45
2.8 Πειράματα αντιδραστήρα.....	47
3. Αποτελέσματα.....	48

3.1 Αριθμός αποικιών και αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας υγρών αποβλήτων	48
3.2 Ταυτοποίηση <i>S. aureus</i>	50
3.3 Αποτελέσματα πειραμάτων υπολογισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC ₆₀)	51
3.4 Γονίδια ανθεκτικότητας.....	67
3.5 Πειράματα μικτών πληθυσμών σε πρότυπο αντιδραστήρα	72
4. Συμπεράσματα – συζήτηση	80
4.1 MIC και ανθεκτικά βακτήρια	80
4.2 Γονίδια ανθεκτικότητας.....	84
4.3 Αντιδραστήρας και μετάδοση της ανθεκτικότητας	91
4.4 Επιλογή και συνεπιλογή των ARB και ARGs στους βιολογικούς καθαρισμούς και σε διάφορες περιβαλλοντικές μήτρες – Επίλογος.....	95
Λεξικό χρήσιμων όρων	100
Βιβλιογραφία	102
1. Επιστημονικά άρθρα	102
2. Σημειώσεις	107
3. Βιβλία	107
4. Εργασίες	107
5. Σελίδες στο διαδίκτυο	108
Παραρτήματα	110
A. Πειράματα Real – Time PCR για την αναζήτηση των γονιδίων ανθεκτικότητας.	110
B. Ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά γενετικού υλικού	112
Γ. Οπτική απορρόφηση μικτών πληθυσμών στα πειράματα με τους αντιδραστήρες.....	113
Δ. Κατηγοριοποίηση των βακτηριακών ειδών με βάση το EUCAST	113

Περίληψη

Οι φαρμακευτικές ουσίες και τα αντιβιοτικά είναι ενώσεις που χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στην ιατρική και στις ανθρώπινες δραστηριότητες (κτηνοτροφία, γεωργία) και παρατηρείται αύξηση των συγκεντρώσεών τους σε νερά και εδάφη. Συνέπεια αυτού είναι η εμφάνιση και ο επιπολασμός ανθεκτικών παθογόνων βακτηρίων που προκαλεί ιδιαίτερες ανησυχίες στην παγκόσμια υγεία και έχει χαρακτηριστεί ως ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα που καλείται να αντιμετωπίσει η ανθρωπότητα. Η αύξηση στον αριθμό των ανθεκτικών βακτηρίων (ARB, Antibiotic Resistant Bacteria) έχει συνδεθεί με τη μετάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας (ARGs, Antibiotic Resistance Genes) μεταξύ διαφορετικών στελεχών και ειδών και ο συχνός εντοπισμός τους σε διάφορες περιβαλλοντικές μήτρες είχε συνέπεια το χαρακτηρισμό τους ως αναδυόμενους ρυπογόνους παράγοντες. Ιδιαίτερη ανησυχία δε προκαλεί η ανθεκτικότητα των ARB και ARGs στις διάφορες τεχνικές επεξεργασίας που εφαρμόζονται στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, καθώς η παρουσία τους είναι αισθητή και στις εκροές. Η αδυναμία, λοιπόν, της σωστής επεξεργασίας των υδάτων και των υγρών αποβλήτων που περιέχουν τέτοια παθογόνα αλλά και άλλες τοξικές ουσίες και η έλλειψη πολλές φορές βασικών υπηρεσιών υγιεινής, μπορεί να ευνοήσει τη διάδοση των ARB και ARGs στο περιβάλλον.

Με βάση την υπόθεση ότι οι μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων προσφέρουν ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη και διάδοση των ARB και ARGs με ποικίλες μορφές, η παρούσα μελέτη αφορά: 1) στην εξέταση της παρουσίας των ARB και ARGs στην είσοδο, στην έξοδο και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων στην Εγκατάσταση Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (Ε.Ε.Υ.Α) της πόλης των Χανίων, 2) στον εντοπισμό και στην ποσοτικοποίηση των ARGs στα διάφορα στάδια επεξεργασίας και 3) στη συνολική εκτίμηση της αντιμετώπισης των ARB και ARGs σε μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.

Προχωρήσαμε, λοιπόν, στην απομόνωση εκπροσώπων των Gram αρνητικών και θετικών βακτηρίων και συγκεκριμένα των *Escherichia coli*, *Enterococci* και *Staphylococci*, από τα υγρά απόβλητα της Ε.Ε.Υ.Α. Χανίων (πληθυσμιακό ισοδύναμο 117500). Η συλλογή των δειγμάτων έγινε την περίοδο Σεπτέμβριος – Δεκέμβριος 2017 και εφαρμόστηκε η μέθοδος της διήθησης με μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (μέγεθος πόρων 0,45 μm , διάμετρος 47 mm, Pall – Gelman Laboratory) και η καλλιέργεια των βακτηρίων σε εκλεκτικά μέσα. Η μελέτη της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά έγινε με τη μέθοδο της μικροαραίωσης και τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) για την Αμπικιλίνη, Σιπροφλοξασίνη, Τετρακυκλίνη και Σουλφομεθοξαζόλη/Τριμεθοπρίμη. Η MIC₆₀ ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα που μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη του 60% του αρχικού πληθυσμού ενός μικροοργανισμού μετά την έκθεση αυτού για 18 – 24 h. Οι τιμές της MIC εκτιμήθηκαν με τον εγκιβωτισμό αποστειρωμένων πλακών τιτλοδότησης με 96 βυθίσματα με διαδοχικές αραιώσεις των αντιβιοτικών με βάση τα standards που προτείνονται από το EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Standards). Η προετοιμασία του βακτηριακού ενοφθαλμίσματος για κάθε πείραμα έγινε με χρήση του Müller Hinton Broth (Merck) και προστίθενταν σε κάθε βύθισμα κατόπιν επίτευξης τελικής συγκέντρωσης 10⁵ CFU/mL. Οι πλάκες τιτλοδότησης μεταφέρονταν σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 18 – 24 h και ακολουθούσε

μέτρηση της οπτικής απορρόφησής τους στα 630 nm με ειδικό φασματοφωτόμετρο (microplate reader, Labtech LT-4000 Plate Reader) και λογισμικό (Manta LML). Ακολούθησε η επιλογή συγκεκριμένων ARGs στα υπό μελέτη αντιβιοτικά και η συγκέντρωσή τους εκτιμήθηκε με την εφαρμογή της qPCR (μέθοδος SYBR green) και τη χρήση του StepOnePlus System (Applied Biosystems).

Η μικροβιολογική ανάλυση των υγρών αποβλήτων έδειξε την παρουσία αρκετών βακτηρίων, σε ικανές ποσότητες, σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας ακόμα και σε εκείνο της απολύμανσης – συγκεκριμένα μεταξύ των ανθεκτικών στελεχών της εξόδου τα περισσότερα ανήκαν στο είδος *E. coli*. Το αποτέλεσμα αυτό αφενός επιβεβαιώνει την ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε τέτοιες εγκαταστάσεις αφετέρου εγείρει ανησυχίες στη δημόσια υγεία, καθώς η παρουσία μικροοργανισμών όπως οι *S. aureus* και *E. faecalis* στις εκροές έχει σχετιστεί με τη μετάδοση πολλών υδατογενών λοιμώξεων. Τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικότητας καταγράφηκαν για τα *E. coli* και *Enterococci* στην Αμπικιλίνη και για τους *Staphylococci* στην Τετρακυκλίνη. Μεταξύ των βακτηρίων, η *E. coli* έφερε τα μεγαλύτερα ποσοστά ARGs.

Επιπλέον κομμάτι της έρευνας αφορούσε στη συμπεριφορά μικτών πληθυσμών ανθεκτικών – ευαίσθητων στελεχών από το ίδιο είδος, που αναπτύσσονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα όπου μπορεί να επικρατούν συνθήκες στέρξης τροφής και ενέργειας, στα αντιβιοτικά. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν πειράματα κατά τα οποία ανθεκτικά και ευαίσθητα στελέχη από το ίδιο είδος καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα (1) Müller Hinton Broth και (2) υγρό απόβλητο (εκροή δευτεροβάθμιας επεξεργασίας) σε κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης. Στο κάθε θρεπτικό μέσο εφαρμόσαμε μια επιπλέον διάλυση (1:3) για την προσομοίωση των ολιγοτροφικών συνθηκών οι οποίες κυριαρχούν στα υδατικά περιβάλλοντα. Η διάρκεια των καλλιεργειών ήταν 5 ημέρες, η δειγματοληψία γινόταν την 3η και 5η ημέρα και ο μικτός πληθυσμός υποβαλλόταν σε έλεγχο ανθεκτικότητας με τη γνωστή μέθοδο της μικροαραίωσης και εφαρμογή του εκάστοτε αντιβιοτικού. Οι πληθυσμοί όλων των βακτηρίων ήταν ανθεκτικοί στο πυκνό Müller Hinton Broth στις 3 και στις 5 ημέρες. Οι πληθυσμοί των *E. coli* και *Staphylococci* που ανακτήθηκαν την 3η ημέρα παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας και ειδικά στην περίπτωση του αραιωμένου Müller Hinton Broth. Αντίθετα, οι πληθυσμοί αυτών των βακτηρίων ήταν ευαίσθητοι στο αντιβιοτικό στις καλλιέργειες στο υγρό απόβλητο, ενώ οι *Enterococci* έδειξαν ανθεκτικότητα ειδικότερα στην περίπτωση του αραιωμένου υγρού αποβλήτου.

Συνοπτικά, μπορούμε να πούμε ότι ήταν προφανής η παρουσία ARB και ARGs στην Ε.Ε.Υ.Α. Χανίων και, ειδικά στην περίπτωση κάποιων ARGs (*sulI*), ακόμα και η απολύμανση δεν ήταν αρκετή για την αποτελεσματική επεξεργασία τους. Το ενδεχόμενο να είναι οι βιολογικοί καθαρισμοί χώροι που ευνοούν την οριζόντια μετάδοση τέτοιων γονιδίων μεταξύ διαφόρων μικροοργανισμών είναι ακόμη υπό διερεύνηση.

Περίληψη στα αγγλικά

Pharmaceuticals and antibiotics are substances that are extensively used in medicine and agriculture and their presence in soil and water is gradually enlarged. The prevalence and the persistence of antibiotic resistance in bacterial pathogens pose a serious and growing phenomenon and have emerged as one of the pre-eminent public health concerns of the 21st century, particularly as it pertains to pathogenic organisms. The raise of antibiotic resistance in various bacteria is achieved by the dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs), whose prevalence in the environment has characterized them as emerging contaminants. The main concern is that those multiple antibiotic resistant bacteria (ARB) and ARGs may persist during the various applied treatment processes and revive in final effluents of Wastewater Treatment Plants (WWTPs). Failure to treat water/wastewater, which may contain several toxic substances and pathogenic microorganisms and the lack of basic sanitation services, may contribute to the establishment of routes of dissemination of ARB and of their ARGs into the environment.

Given that WWTPs offer an ideal setting for the proliferation of ARB and dissemination of ARGs, as the applicable conditions allow the growth and development of diverse microorganisms, the objectives of the present study comprise the following: i) determination of the presence of ARB in the influent, effluent and during treatment in a WWTP in the city of Chania, ii) detection and quantification of ARGs during wastewater treatment and iii) evaluation of ARGs elimination in WWTPs.

In the current work representative Gram negative and Gram positive bacterial indicators were studied, namely, *Escherichia coli* (*E. coli*) *Enterococci* & *Staphylococci*, respectively, which were isolated from the WWTP (117,500 equivalent inhabitants) located in Chania, W. Crete, Greece. Samples were collected during the period September - December 2017 and were examined by filtration through nitrocellulose membranes (0.45µm pore size, 47 mm diameter, Pall-Gelman Laboratory) followed by plating on selective media. Antibiotic resistance was studied using broth microdilution method and estimating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC₆₀) of selected antibiotics, namely Ampicillin, Ciprofloxacin, Tetracycline and Sulfamethoxazole/Trimethoprim. MIC₆₀ is defined as the lowest concentration of an antimicrobial that inhibits the growth of 60% of the initial population 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). The bacterial inoculum in each case was prepared using Mueller-Hinton broth (Merck) and was added in each well after adjustment to 10⁵ 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. Specific resistance genes against the selected antibiotics were selected for their PCR-detection. The concentration of the target ARGs was estimated applying SYBR green method and using the StepOne Plus System (Applied Biosystems).

According to microbiological analysis of wastewater samples, the selected bacterial indicators were detected in significant levels, even after the disinfection step. Those results indicate possible risks for public health, as the presence of such microorganisms in treated effluents, like *S. aureus* and *E. faecalis*, are responsible for the transmission of waterborne diseases. Higher resistance levels were found for *E. coli* and

Enterococci in Ampicillin and for *Staphylococci* in Tetracycline. Among strains *E. coli* carried the highest amount of ARGs.

Batch experiments with mixed bacterial populations were also conducted. ARB and ASB (Antibiotic Sensitive Bacteria) of the same species were grown together in batch reactor in Müller Hinton Broth and wastewater (secondary effluent) in ambient temperature and pressure. In each case, an extra reactor with 3 – fold dilution of the growth media was used, representative of oligotrophic conditions that may occur in aquatic environments. The duration of the experiments was 5 days and samples were derived from 3rd and 5th day. Bacterial population of 3 and 5 days were subjected to antibiotic treatment and its response to antibiotics was tested. Each population that was grown in Müller Hinton Broth has shown significant antibiotic resistance, after both 3 and 5 days incubation. Number of resistant cells were higher for the population of *E. coli* and *Staphylococci* in the 3rd day and especially in diluted Müller Hinton. On the other hand, both of these bacterial population were sensitive to antibiotic treatment after growth in wastewater, while *Enterococci* showed significant resistance especially in diluted wastewater population.

In brief, ARB and ARGs' presense in WWTP of Chania is eminent and in case of *sulI* chlorination was not effective towards its treatment. Whether horizontal transfer of ARGs and formation of persister cells is favored in WWTPs or not, it still remains unclear.

Εισαγωγή

Η κατάχρηση των αντιμικροβιακών παραγόντων στην παραγωγή αγαθών (γεωργία, κτηνοτροφία, ιχθυοκαλλιέργειες) και στον τομέα της δημόσιας υγείας – λόγω ελλιπούς ενημέρωσης, εσφαλμένης συνταγογράφησης και δοσολογίας – έχει ενισχύσει το φαινόμενο της αυξανόμενης ανθεκτικότητας σε μικροβιακούς πληθυσμούς. Σύμφωνα με στοιχεία του ΚΕΕΛΠΙΝΟ, στην Ελλάδα είναι μεγάλη η έξαρση νοσοκομειακών λοιμώξεων από πολυανθεκτικά βακτήρια. Μεταξύ αυτών έχουν αναφερθεί είδη όπως *Klebsiella sp*, *Acinetobacter sp* και *Pseudomonas sp* και υψηλά ποσοστά αυτών – έως και 55% - καταγράφονται στις Μονάδες Εντατικής Θεραπείας. Αλλά και σε παγκόσμια κλίμακα οι αναφορές σχετικά με τον εντοπισμό ARB μεταξύ κλινικών και περιβαλλοντικών στελεχών αυξάνονται συνεχώς. Απόρροια των ARB είναι και η παρουσία γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (ARGs), τα οποία μπορούν να διατηρούνται σταθερά στο περιβάλλον για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων σε παγκόσμια κλίμακα τα αντιβιοτικά εισέρχονται μέσω της ανθρώπινης δραστηριότητας από διάφορες οδούς παρέα με άλλους ρύπους (προϊόντα προσωπικής φροντίδας, ναρκωτικά, επιβραδυντές φλόγας) και αλληλεπιδρούν με τους μικροβιακούς πληθυσμούς που διαμένουν εκεί. Η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων έχει χαρακτηριστεί πολλές φορές ανίκανη να αποτρέψει την εκ νέου είσοδο των ARB και ARGs στο περιβάλλον (επιφανειακά ύδατα και εδάφη). Μεταξύ των μικροοργανισμών, τα κολοβακτηρίδια και οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι χρησιμοποιούνται από τη νομοθεσία ως δείκτες ποιότητας των υδάτων. Μεταξύ αυτών των δεικτών έχουν εντοπιστεί περιβαλλοντικά στελέχη από τα είδη *E. coli* και *Enterococci* που φέρουν ανθεκτικότητα σε Φθοροκινολόνες, Καρβαπανέμες και Τετρακυκλίνες. Η δευτεροβάθμια επεξεργασία δε, έχει αναφερθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών βακτηρίων. Ακόμα και μέθοδοι απολύμανσης, όπως η χλωρίωση, δεν αρκούν πολλές φορές να απομακρύνουν το μικροβιακό φορτίο. Πολλοί ερευνητές συνδέουν την ανθεκτικότητα με χημικά όπως το χλώριο με την ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία παρουσιάζονται αρχικά οι διάφορες περιβαλλοντικές μήτρες στις οποίες εντοπίζονται τα ARB και ARGs με έμφαση στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Ακολουθεί μια περιγραφή των μηχανισμών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Έπειτα επιχειρούμε πειραματικά τον έλεγχο του προφίλ ανθεκτικότητας μικροοργανισμών που απομονώσαμε από υγρά απόβλητα σε διάφορα αντιβιοτικά καθώς και τη μελέτη της αποδοτικότητας των διεργασιών της Ε.Ε.Υ.Α. Χανίων στην απομάκρυνση των ARB και ARGs. Τέλος, εκτιμούμε την αντιβιοαντοχή μικτών βακτηριακών πληθυσμών που επωάστηκαν σε πρότυπο αντιδραστήρα και συγκρίνουμε την παρουσία και τις συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών, των ARB και ARGs στα υγρά απόβλητα και σε άλλες περιβαλλοντικές μήτρες στις οποίες αυτά ανιχνεύονται.

1. Αντιβιοτικά, ανασκόπηση, πορεία στο οικοσύστημα

Σύμφωνα με έκθεση που διεξήχθη από την AMR το 2015, η ετήσια κατανάλωση αντιβιοτικών σε παγκόσμια κλίμακα, μόνο για την κτηνοτροφία κυμαίνεται από 63000 μέχρι 240000 t. Η παγκόσμια κατανάλωση αντιβιοτικών αναμένεται να αυξηθεί, σύμφωνα με την έρευνα κατά 67% από το 2010 έως το 2030, και 99% στα BRICS (Βραζιλία, Ρωσία, Ινδία, Λαϊκή Δημοκρατία της Κίνας, Νότια Αφρική). Η Κίνα είναι πρώτη παγκοσμίως σε παραγωγή και χρήση αντιβιοτικών. Το 2003 παρήχθησαν 28000 t Πενικιλίνης και 10000 t Οξυτετρακυκλίνης, που αντιστοιχούσαν στο 60 και 65% της παγκόσμιας παραγωγής, αντίστοιχα. Από τα αντιβιοτικά που προορίζονται για χρήση από τον άνθρωπο, περισσότερο από το 70% του αποθέματος στην Αμερική χρησιμοποιείται για την κτηνοτροφία και την αγροτική παραγωγή. Παρόλο που το 1998 η χρήση των αντιβιοτικών στην εκτροφή ζώων απαγορεύτηκε, η χρήση τους εντατικοποιήθηκε τα τελευταία χρόνια σε Αμερική, Ευρώπη – ειδικά μετά την υπογραφή της υπερατλαντικής συμφωνίας TTIP* – Ρωσία και Νοτιοανατολική Ασία.

Το αποτύπωμα της χρήσης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι μεγάλο και συμπεριλαμβάνει:

(α) ανάπτυξη κυμαινόμενης ανθεκτικότητας από βακτήρια και άλλα παθογόνα, πολλαπλασιασμό γονιδίων ανθεκτικότητας (ARG, Antibiotic Resistance Genes) και βακτηρίων που φέρουν ανθεκτικότητα (ARB, Antibiotic Resistant Bacteria) και πολυανθεκτικότητα (MRB, Multidrug Resistant Bacteria) (Sarmah et al., 2006; Paterson et al., 2006; Bouki et al., 2013; Rizzo et al., 2013; Sharma et al., 2016; Hill et al., 2016). Τα πολυανθεκτικά βακτήρια αναφέρονται από πολλούς ερευνητές με τον όρο superbugs και αποτελούν εξαιρετικά επικίνδυνα παθογόνα για τη δημόσια υγεία. Το ζήτημα της εξάπλωσης των ARB στις διάφορες περιβαλλοντικές μήτρες και η επιβάρυνσή αυτών είναι σχετικά καινούριο αντικείμενο μελέτης με αφετηρία μόλις στα τέλη της δεκαετίας του 1990

(β) τροφικά προϊόντα (κρέας, λαχανικά) και πόσιμο νερό με κατάλοιπα αντιβιοτικών,

(γ) προβλήματα οικοτοξικότητας, κίνδυνος για τους αυτόχθονους μικροοργανισμούς

(δ) οικολογικό αντίκτυπο σε αγροτικά οικοσυστήματα, μέσω της ενσωμάτωσης αντιβιοτικών σε κοπριές και λιπάσματα (Boxall et al., 2004; Sarmah et al., 2006; Du et al., 2012).

Μεταξύ των αντιβιοτικών, που χρησιμοποιούνται σε δραστηριότητες όπως η εκτροφή ζώων και οι υδατοκαλλιέργειες, βρίσκονται κυρίως Τετρακυκλίνες (TET ή TC) και έπειτα Σουλφοναμίδες (SMD) και Μακρολίδες. Αυτές οι ομάδες αποτελούν το 90% του συνόλου των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στο Ηνωμένο Βασίλειο και περισσότερο από το 50% σε Νότια Κορέα και Δανία.

Η είσοδος των αντιβιοτικών στα οικοσυστήματα μπορεί να γίνει από το έδαφος, το νερό ή τον αέρα. Εδαφικές εκτάσεις που δέχονται μεγάλο όγκο αντιβιοτικών είναι τα εκτροφεία ζώων, οι αγροτικές εκτάσεις, οι μονάδες παραγωγής αντιβιοτικών, οι χώροι υγειονομικής ταφής.

Τα ύδατα που επιβαρύνονται αντίστοιχα είναι υδάτινα οικοσυστήματα όπως λίμνες, ποτάμια, υδροβιότοποι παρακείμενα σε τέτοιες εδαφικές εκτάσεις, οι υδατοκαλλιέργειες, τα νοσοκομειακά απόβλητα, τα υπόγεια ύδατα, οι βιολογικοί καθαρισμοί, τα νερά αναψυχής και σε κάποιες περιπτώσεις το πόσιμο νερό. Σχετικά με την επιβάρυνση της ατμόσφαιρας δεν έχουν αναφερθεί πολλά, καθώς τα περισσότερα

αντιβιοτικά δεν εξατμίζονται ούτε εξαχνώνονται και είτε εντοπίζονται στην υδατική φάση είτε προσκολλώνται στα βιοστερεά.

*TTIP: Διατλαντική Συμφωνία Εμπορίου και Επενδύσεων: αφορά περιβαλλοντικές ρυθμίσεις (εργασιακά δικαιώματα), κανόνες ασφαλείας για τα τρόφιμα (που συμπεριλαμβάνουν τους περιορισμούς σχετικά με τα γενετικά μεταλλαγμένα τρόφιμα), κανονισμούς για τη χρήση χημικών τοξικών ουσιών, κ.α.

1.1 Αντιβιοτικά στη γεωργία

Στα **αγροτικά οικοσυστήματα** τα αντιβιοτικά εισέρχονται με δύο τρόπους κυρίως: (α) με τη χρήση κοπριάς (βιοστερεά) – από συνδυασμένη κτηνοτροφία – γεωργία – την επεξεργασμένη ιλύ (ως εδαφοβελτιωτικό) και άλλα ιζήματα και (β) μέσω της άρδευσης των καρπών με επεξεργασμένα υγρά απόβλητα, επιφανειακά νερά (λίμνες, ποτάμια, υδροβιότοπους) ή υπόγεια νερά (γεωτρήσεις). Οι Zhang et al. (2008a,b,c) σε μελέτες που έγιναν στην Κίνα αναφέρουν ότι κατάλοιπα αντιβιοτικών εντοπίζονται με φθίνουσα σειρά σε κοπριά γουρουνιών, πουλερικών και βοοειδών και πως τα μεγαλύτερα ποσοστά αντιβιοτικών παρατηρούνται στις μεγάλες βιομηχανικές εγκαταστάσεις, παρά σε μικρά αγροκτήματα. Υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών σε ποτάμια και λίμνες κοντά σε αγροτικές εκτάσεις έχουν επίσης αναφερθεί (Kim & Carlson, 2007). Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η εφαρμογή κοπριάς σε αγροτικές εκτάσεις αύξησε την παρουσία ARB, συγκριτικά με εδάφη όπου δεν είχε εφαρμοστεί κοπριά. Σε τέτοια εδάφη, παράλληλα με τον εντοπισμό ARB, αναφέρουν και αύξηση στον αριθμό των ARGs που μεταδίδονται με οριζόντια μεταφορά (*sul1*, *sul2*, *ermF*) αλλά και στον αριθμό ιντεγκρονίων πρώτης τάξης (Du et al. 2012; Hill, 2016).

Για την εκτίμηση της επιρροής των αντιβιοτικών στις μικροβιακές κοινότητες, που κατοικούν σε τέτοια εδάφη έχουν προταθεί μεθοδολογίες όπως η μέτρηση της μικροβιακής βιομάζας και της αναπνοής. Είναι αναμενόμενο, ότι οι χώροι, που εξελίσσονται δραστηριότητες, όπως η γεωργία και η κτηνοτροφία, να επηρεάζουν τη σύσταση της αυτόχθονης μικροχλωρίδας ποιοτικά και ποσοτικά και να επιτρέπουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά (Du et al., 2012). Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μελέτες σχετικά με την αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών που βρίσκονται στη ριζόσφαιρα με αντιβιοτικά και άλλους επίμονους ρύπους (ορμόνες, ναρκωτικές ουσίες, επιβραδυντές φλόγας κ.α.). Τα φυτά και οι μικροοργανισμοί δημιουργούν ένα ολόκληρο δίκτυο μεταφοράς θρεπτικών και μακρομορίων, μετάλλων και άλλων ουσιών μέσω των συμβιωτικών σχέσεων και των διεργασιών δόμησης – αποδόμησης. Οι μελέτες αφορούν στους τρόπους που επηρεάζεται η ανάπτυξη, η δομή της κοινότητας, οι λειτουργίες, η ποικιλότητα και οι επιδράσεις στα οικοσυστήματα και στον άνθρωπο. Αντιβιοτικά όπως οι SMD έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζουν την αναπνοή του εδάφους (Liu et al., 2009a). Η προσρόφηση των αντιβιοτικών στο έδαφος εξαρτάται από παράγοντες όπως το pH, τα ιόντα, το περιεχόμενο σε οργανικά. Σχετικά με τη δυνατότητα προσρόφησης των αντιβιοτικών σε διάφορα στερεά υποστρώματα θα αναφερθούμε και παρακάτω. Στον Πίνακα 1 φαίνονται οι συγκεντρώσεις στις οποίες ανευρίσκονται διάφορα αντιβιοτικά στις ρίζες, στα φυλλώματα και στους σπόρους διαφόρων καλλιεργειών σε παγκόσμια κλίμακα.

Πίνακας 1. Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στη γεωργία σε παγκόσμια κλίμακα.

Περιοχή	Είδη σπόρων	Αντιβιοτικό	Συγκέντρωση	Πηγή
Ιταλία	Κεχρί, μπιζέλια, καλαμπόκι, κριθάρι	SMZ	1000 – 2000 µg/kg σε φυλλώματα και ρίζες	Migliore et al. (1996)
Αμερική	Σιτάρι	CTC, SDZ	Ρίζες: 1,1 και 0,5 mg/kg για CTC και SDZ, 0.043 για CTC στους σπόρους	Grote et al. (2007)
Μινεσότα, Αμερική	Καρότο, μαρούλι	Florfenicol, Levamisole, Trimethoprim	Μαρουλόφυλα: 6 – 170 µg/kg ρίζα καρότου 2,8 – 13 µg/kg	Boxall et al. (2006)
Guangdong, Κίνα	Πιπεριά, πατάτα, γλυκοπατάτα, <i>ipomoea aquatica</i> , κινέζικο λάχανο, μαρούλι, καρότο, πικρό πεπόνι, λευκό κολοκύθι	OTC, TC	OTC: 0,041 – 0,174 mg/kg TC: 0 – 0,048 mg/kg	Yao et al. (2010)
Tianjin, Κίνα	Ραπάνι, ελαιοκράμβη, σέλινο, κόλιανδρος	OTC, TC, CTC, SMZ, SDO, SCP, CAP, OFL, PEF, CIP, LIN	0,1 – 532 µg/kg	Hu et al. (2010)

CTC Χλωροτετρακυκλίνη, OTC Οξυτετρακυκλίνη, SMZ Σουλφομεθαζίνη, SDZ Σουλφοδιαζίνη.

TYL Τυλοσίνη, CIP Σιπροφλοξασίνη, PEF Πεφλοξασίνη, CAP Χλωραμφενικόλη, SDO Σουλφοδοξίνη, SCP Σουλφοχλωροπυριδαζίνη, OFL Οφλοξασίνη, LIN Λινκομυκίνη

1.2 Αντιβιοτικά στην κτηνοτροφία

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών στα χόματα και στα υδάτινα συστήματα κοντά σε κτηνοτροφικές εγκαταστάσεις έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές. Πολλά από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία, ανεξάρτητα από τον τρόπο εφαρμογής, δεν απορροφούνται από το στομάχι και ως εκ τούτου η αρχική ένωση ή μεταβολίτες αυτής εξέρχονται στο περιβάλλον με τις ζωικές απεκκρίσεις. Πέρα από τη ρύπανση του χώματος και των ιζημάτων περιμετρικά των εγκαταστάσεων, είναι αναπόφευκτη και η ρύπανση των υδάτινων οικοσυστημάτων – των υπόγειων υδάτων λόγω αποστράγγισης της κοπριάς και των επιφανειακών υδάτων λόγω επιφανειακής απορροής, της έκπλυσης χημικών από το δέρμα των ζώων και με άλλους τρόπους. Οι Pan (2011) και Qiao (2012) εντόπισαν υψηλή συγκέντρωση TET (εκατοντάδες mg/kg) σε κοπριά ζώων στην Κίνα. Οι Zhu et al. (2013) έδειξαν ότι η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία μπορεί να προκαλέσει έως και 28000 φορές αύξηση στη δυνατότητα επιλογής κάποιων ARG συγκριτικά με δείγματα που δεν περιέχουν αντιβιοτικά. Σχετικά με τη μετάδοση ARG στον άνθρωπο έχει αναφερθεί μια

περίπτωση μεταφοράς του γονιδίου *mecC* από αποικίες *S. aureus* που απομονώθηκαν από βοοειδή. Ωστόσο, η ζωική προέλευση του γονιδίου δεν έχει επιβεβαιωθεί άμεσα (Garcia – Alvarez et al., 2011). Το ζήτημα ωστόσο χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση καθώς η παγκόσμια κατανάλωση κρέατος είναι ιδιαίτερα υψηλή, όμως πέρα από τον καταναλωτή μπορεί να υπάρξει κίνδυνος και για τον εργαζόμενο σε τέτοιες εγκαταστάσεις.

Το πρόβλημα της χρήσης των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία διογκώνεται όταν παρέα με την εκτροφή ζώων εκτελούνται και αγροτικές δραστηριότητες. Οι Li et al. (2011), σε μελέτη που εκπόνησαν στη βόρεια Κίνα, εντόπισαν υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών σε αγροκτήματα όπου υπάρχουν ζώα και αναφέρουν ότι η σύσταση και η συγκέντρωση των αντιβιοτικών ήταν ανάλογη με τα είδη των λαχανικών. Στον Πίνακα 2 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών σε διάφορες κοπριές σε Ευρώπη, Αμερική και Ασία.

Πίνακας 2. Αντιβιοτικά που εντοπίστηκαν στην κοπριά ζώων σε φάρμες μαζικής παραγωγής. (Du et al., 2012).

Πηγή	Αντιβιοτικά	Είδος δείγματος	Μέση συγκέντρωση	Πηγή
Γερμανία	TC, CTC TYL, TC, SMZ, CAP	Υγρή κοπριά χοίρων 10 – 15 δείγματα από χοίρους (από 1981 – 2000, ανά χρόνο)	0,1 – 4,0 mg/kg στο 90% των δειγμάτων 0,19 – 12,5 mg/kg	Hamscher et al. (2002) Hamscher et al. (2003)
7 περιοχές, Κίνα	OTC, TC, CTC	Κοπριά από 32 γουρούνια και 23 πουλερικά	Γουρούνια: 9,09 mg/kg για το OTC, 5,22 για TC, 3,57 για CTC πουλερικά: 5,97 για OTC, 2,63 για TC, 1,39 για CTC	Zhang et al. (2005a,b)
Tianjin, China	OTC, CIP, CTC, SMZ, SDO, SCP, CAP, OFL, PEF, LIN	Κοπριά συλλεγμένη το χειμώνα και το καλοκαίρι	Χειμώνας: 0,1 – 183,5 mg/kg καλοκαίρι: n.d. – 29,3	Hu et al. (2010)
8 περιοχές στην Κίνα		Κοπριά από 61 γουρούνια, 54 πουλερικά, 28 βοοειδή	Γουρούνια και βοοειδή: 34, 30 mg/kg (CIP), 33 και 47 (EFL), 59 και 60 (OTC), 21 και 28 (CTC) πουλερικά: έως 99 (fleroxacin), 225 (norfloxacin), 46 (CIP), 1,42 (EFL)	Zhao et al. (2010)
Αμερική	Ceftiofur, TC, sulfadimethoxine	Κοπριά/ απορρίματα βοοειδών	Ceftiofur: 11,3 – 216,1 mg/kg TC: 2,5±1,2 µg/kg Sulfadimethoxine: 300 – 900 mg/kg	Boxall et al. (2004)

1.3 Αντιβιοτικά στα απόβλητα των μονάδων παραγωγής αντιβιοτικών

Σχετικά με την παρουσία των αντιβιοτικών σε τέτοιους χώρους τα δεδομένα είναι πολύ λίγα. Αρκετές μονάδες παραγωγής αντιβιοτικών διαθέτουν εγκαταστάσεις επεξεργασίας των δικών τους αποβλήτων. Υπάρχουν ωστόσο και περιπτώσεις κατά τις οποίες τα απόβλητα καταλήγουν σε εγκαταστάσεις όπου επεξεργάζονται παράλληλα με άλλα αστικά και βιομηχανικά απόβλητα.

Αναφορικά με τις συγκεντρώσεις αντιβιοτικών στα υγρά απόβλητα τέτοιων εγκαταστάσεων παρουσιάζουμε κάποιες μελέτες. Οι Larsson et al. (2007) αναφέρουν ότι οι φαρμακευτικές ουσίες που εντοπίστηκαν στα υγρά απόβλητα μονάδας επεξεργασίας που δέχεται απόβλητα από 90 από τις μεγαλύτερες βιομηχανίες παρασκευής φαρμάκων στο Patancheru της Ινδίας, ήταν εξαιρετικά υψηλές, σε σχέση με άλλες τιμές που αναφέρονται σε άλλες μονάδες επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων. Για παράδειγμα, η μέγιστη συγκέντρωση που παρατηρήθηκε ήταν για τη CIP (περίπου 31000 µg/L), που ξεπερνά αρκετά τα επίπεδα τοξικότητας για αρκετά είδη βακτηρίων. Εντοπίστηκαν επίσης κι άλλες Φθοροκινολόνες σε συγκεντρώσεις από 90 έως 2500 ng/L. Η μονάδα επεξεργάζεται 1500 m³/d και οι διεργασίες που εφαρμόζονται είναι χημική καθίζηση των στερεών, βιολογική επεξεργασία με προσθήκη 20% οικιακών αποβλήτων, αερισμό 4 ημέρες, καθίζηση και φυγοκέντρωση της ιλύος. Μια άλλη μελέτη των Xiheng et al. (1988) αναφέρει ότι στην εκροή βιολογικού καθαρισμού μεγάλης βιομηχανίας που παρασκευάζει OTC, η μέση συγκέντρωση του αντιβιοτικού ήταν 50 mg/L. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών στην έξοδο της μονάδας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων ήταν υψηλότερες συγκριτικά με τις συγκεντρώσεις σε γειτονικό ποτάμι. Επιπλέον, ακόμα χαμηλότερες (<1 ng/L) ήταν οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών σε υπόγεια ύδατα περιοχής, όπου δέχονται επιπλέον απόβλητα από φάρμες και γεωργικές εκτάσεις.

Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει μια μελέτη βακτηριακών αποικιών που απομονώθηκαν από τη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων της μεγαλύτερης μονάδας παραγωγής Πενικιλίνης G στην Ασία (Κίνα, Hebei), η οποία παράγει ετησίως 7000 tn αντιβιοτικών. Η μονάδα επεξεργασίας διαθέτει σύστημα βιολογικής επεξεργασίας με αναερόβιο χωνευτή, αντιδραστήρα υδρόλυσης και δύο αερόβιους αντιδραστήρες. Η δειγματοληψία έγινε από 3 σημεία, τη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων και σημεία ανάντη και κατόντη παρακείμενου ποταμού. Οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών στην είσοδο της μονάδας επεξεργασίας ήταν 153 ± 4 µg/L και στην έξοδο 1,68 ± 0,48 µg/L, ανάντη 0,31 ± 0,04 µg/L και κατόντη του ποταμού < 0.03 µg/L. Οι ποσότητες των βακτηρίων, που συλλέχθηκαν από τα 3 σημεία ήταν 5,4 * 10⁷, 3,9 * 10⁷ και 2,3 * 10⁶ CFU/mL, αντίστοιχα και το μεγαλύτερο ποσοστό ανήκε στα Gram αρνητικά. Τα ποσοστά ανθεκτικότητας και οι τιμές της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ήταν αρκετά υψηλά και παρόμοια και για τα τρία σημεία δειγματοληψίας, με υψηλότερες τιμές να καταγράφονται κατόντη του ποταμού και στην έξοδο των υγρών αποβλήτων για τις 18 αντιμικροβιακές ενώσεις που εξετάστηκαν. Στα σημεία αυτά, η ανθεκτικότητα στις β – λακτάμες ήταν πολύ υψηλότερη – με υψηλότερα ποσοστά για την Αμπικιλίνη (AMP) (92,2%) – και σε πολύ υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με άλλες οικογένειες αντιβιοτικών. Όμως και για τις Κινολόνες, όπως η CIP, τα ποσοστά ήταν εξίσου υψηλά (60%). Επιπλέον, οι ερευνητές αναφέρουν και την παρουσία του γονιδίου bla_{TEM-1} – το οποίο έχει σχετιστεί με κωδικοποίηση της ανθεκτικότητας στις β – λακτάμες – σε ποσοστά 17,3% και 11,0% των στελεχών, όπως και άλλα γονίδια (bla_{OXA}, bla_{IMP}) που

απομονώθηκαν από τα υγρά απόβλητα ανάντη και κατάντη του ποταμού. Επιπλέον, ιντεγκρόνια 1ης τάξης που σχετίζονται με ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις Αμινογλυκοσίδες εντοπίστηκαν στο 14% των δειγμάτων των υγρών αποβλήτων και στο 9% των δειγμάτων κατάντη του ποταμού. Οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν και την τύχη βακτηρίων στα ίδια σημεία δειγματοληψίας, αναφορικά με την παρουσία 10 αντιβιοτικών της οικογένειας των TET. Αναφέρουν, λοιπόν, ότι από τα 341 στελέχη γάμμα – πρωτεοβακτηρίων (ανήκουν στα Gram αρνητικά) που συλλέχθηκαν, το 97% αυτών στην έξοδο της μονάδας επεξεργασίας και κατάντη του ποταμού έφεραν ανθεκτικότητα σε ποικιλία αντιβιοτικών. Τα μεγαλύτερα ποσοστά καταγράφηκαν για την OTC και την TET. Τα περισσότερα από αυτά τα στελέχη (95% περίπου στο σύνολο των στελεχών) έφεραν και γονίδια ανθεκτικότητας, μεταξύ των οποίων τα *tetA* (67%), *tetC*, κ.α, καθώς και ιντεγκρόνια 1ης τάξης σε ποσοστά από 86 έως 97%.

1.4 Αντιβιοτικά στα απόβλητα νοσοκομείων

Το 2014 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας χαρακτήρισε τρία βακτήρια, την *E. coli*, την *K. pneumoniae* και τον *S. aureus*, ως ιδιαίτερα ανθεκτικά παθογόνα (WHO, 2014). Έχουν αναφερθεί αρκετά στελέχη από τα συγκεκριμένα είδη που φέρουν ανθεκτικότητα στις β – λακτάμες, τις Φθοροκινολόνες, όπως για παράδειγμα τα στελέχη MRSA (Methicillin, Resistant *S. aureus*).

Κάποιες νοσοκομειακές μονάδες διαθέτουν τα δικά τους συστήματα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, ωστόσο οι περισσότερες τα παροχετεύουν στις μονάδες που επεξεργάζονται τα αστικά και άλλα βιομηχανικά λύματα. Το 2003, οι Giger et al. (2003) μελέτησαν την παρουσία Φθοροκινολονών και Μακρολιδών σε υγρά απόβλητα νοσοκομείων, βιολογικών καθαρισμών και στο υδάτινο περιβάλλον, στην Ελβετία. Αναφέρουν, ότι το 80 – 90% των αντιβιοτικών απομακρύνεται από τους βιολογικούς με προσρόφηση στην ιλύ. Μια μελέτη από τους Lindberg et al. (2005), αναφέρει ότι οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών στις εκροές επεξεργασίας νοσοκομειακών αποβλήτων, είναι υψηλότερες από εκείνες των υγρών αποβλήτων (που αποτελούν μίγμα αστικών, βιομηχανικών και νοσοκομειακών υγρών αποβλήτων), του εδάφους και των ποταμών. Οι Hartmann et al. (1998) μελέτησαν την επίδραση της CIP που απομόνωσαν από υγρά απόβλητα 10 νοσοκομείων στη Γερμανία (συγκεντρώσεις 0,7 – 124,5 µg/L), στο DNA στελεχών του *Bacillus anthracis*. Η φθορά στο γενετικό υλικό έγινε για μικρές δόσεις του αντιβιοτικού (5,2 – 5,9 µg/L) και επιπλέον, οι ερευνητές αναφέρουν, ότι η φθορά δεν προκλήθηκε από κάποια μετάλλαξη στο DNA. Οι Xu et al. (2007) μελέτησαν την παρουσία και τις συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών σε διάφορες υδατικές μήτρες και κατατάσσουν με φθίνουσα σειρά τα ύδατα ως εξής: νοσοκομειακά απόβλητα, εκροές βιολογικών καθαρισμών που επεξεργάζονται αστικά απόβλητα και νερά αναψυχής (θάλασσες, λιμάνια).

1.5 Αντιβιοτικά σε άλλες υδατικές μήτρες

α. Υδατοκαλλιέργειες

Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται σε τέτοιες εγκαταστάσεις είναι η OTC, Αμοξικιλίνη (AMC), Σαραφλοξασίνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Boxall et al. 2004). Οι Grave et al., (2008) αναφέρουν ότι η χρήση αντιβιοτικών σε ιχθυοκαλλιέργειες στη Νορβηγία αυξήθηκε από το 2000 έως το 2005 για διάφορα είδη. Οι Boxall et al., (2004) καταγράφουν τις συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, που έχουν εντοπιστεί στις ιχθυοκαλλιέργειες και κυμαίνονται από 0,05 – 400 $\mu\text{g/kg}$ περίπου σε χώρες όπως Νορβηγία, Φιλανδία και Σκωτία. Ο εντοπισμός δε γονιδίων όπως το *tetM*, που έχει συνδεθεί με την ανθεκτικότητα στις TC έχει αναφερθεί από αρκετούς (Petersen & Dalsgaard, 2003; Akinbowale et al., 2007; Rizzo et al., 2013). Η συσσώρευση αντιβιοτικών σε τέτοια περιβάλλοντα μπορεί να γίνει μέσω της εναπόθεσης από απεκκρίσεις, τροφή, που δεν καταναλώθηκε και άλλου τύπου ιζημάτων και από εκεί υπάρχει δυνατότητα εκ νέου εισροής τους στα υδάτινα οικοσυστήματα. Μετά την επεξεργασία των αποβλήτων από τέτοιες εγκαταστάσεις οι εκροές είτε απορρίπτονται σε παρακείμενα ύδατα είτε προωθούνται για περαιτέρω επεξεργασία σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων και χώρους υγειονομικής ταφής και ανακύκλωσης. Αξίζει να τονιστεί ότι η εφαρμογή επεξεργασμένης ιλύος, που προέρχεται από τέτοιες εγκαταστάσεις, είναι δυνητικά ρυπογόνα.

β. Νερά αναψυχής (θάλασσες, λίμνες, ποτάμια)

Η αποικοδόμηση των αντιβιοτικών στα επιφανειακά ύδατα μπορεί να γίνει αβιοτικά με το φως και/ή την υδρόλυση και βιοτικά μέσω αερόβιων και αναερόβιων οργανισμών των μικροοργανισμών που κατοικούν σε αυτά τα ενδιαίτηματα. Οι Gulkowska et al. (2007) ανίχνευσαν TET, Ερυθρομυκίνη (ERY), Νορφλοξασίνη (NOR) και Τριμεθοπρίμη (TMP) στο Honk Kong. Οι Managaki et al. (2007) εντόπισαν ERY, TMP και διάφορες SMD στο Mekong Delta στο Βιετνάμ. Αντιβιοτικά όπως η TYL, Ολεανδομυκίνη και Σπιραμυκίνη έχουν βρεθεί σε ποτάμια στην Ιταλία. Τέλος, στις ΗΠΑ εντοπίστηκαν 21 ενώσεις αντιβιοτικών σε δείγματα από 139 ρέματα από διάφορες πολιτείες και μεταξύ αυτών TC και SMD σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 1.0 $\mu\text{g/L}$.

γ. Υπόγεια ύδατα

Όπως έχουμε ήδη αναφέρει η παρουσία των αντιβιοτικών στα υπόγεια ύδατα είναι τις περισσότερες φορές απόρροια των εφαρμογών τους στη γεωργία και στην κτηνοτροφία. Οι συγκεντρώσεις που έχουν αναφερθεί είναι της τάξης των $\mu\text{g/L}$ και συγκεκριμένα στο όριο των τεχνικών ανίχνευσης για αντιβιοτικά όπως SMD, Αμινογλυκοσίδες και β – λακτάμες (Hirsch et al., 1999). Παρόμοιες συγκεντρώσεις και ομάδες αντιβιοτικών αναφέρουν και οι Campagnolo et al., 2002 για δείγματα υπογείων υδάτων κοντά σε εκτροφεία ζώων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη που έγινε από τους Holm et al. (1995) σε υπόγεια νερά περιμετρικά ενός Χώρου Υγειονομικής Ταφής Απορριμάτων όπου επεξεργάζονταν απόβλητα από φαρμακοβιομηχανίες και εντοπίστηκαν συγκεντρώσεις SMD μέχρι και 5 mg/L .

δ. Πόσιμο νερό

Οι μελέτες σχετικά με τον εντοπισμό αντιβιοτικών (κυρίως) και ανθεκτικών βακτηρίων στο πόσιμο νερό είναι λιγοστές και τα αποτελέσματα αντικρουόμενα. Οι Watkinson et al. (2009) αναφέρουν ότι δεν εντοπίστηκαν αντιβιοτικά σε κανένα από τα

δείγματα πόσιμου νερού, παρόλο που στα επιφανειακά ύδατα από τα οποία έγινε λήψη για την παραγωγή του βρέθηκαν συγκεντρώσεις έως και 2 µg/L. Αντίθετα οι Barger et al., 2015 εντόπισαν αρκετά ARB (*Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Enterococci*, *Staphylococci*, Bacilli) και ARGs (σχετικά με SMD και TET και 16s rRNA) στα επιφανειακά νερά καθώς και στο πόσιμο νερό που προέκυψε από την επεξεργασία τους με σύστημα διήθησης. Τα αποτελέσματα αυτά τα συνέδεσαν με κακή λειτουργία του φίλτρου αλλά και με τη δημιουργία βιοφίλμ στις σωληνώσεις του νερού. Το βιοφίλμ σχηματίζεται από τους μικροοργανισμούς με φυσικό τρόπο σε επιφάνειες όπως οι σωληνώσεις του δικτύου ύδρευσης, τα τοιχώματα διαφόρων δεξαμενών επεξεργασίας, τα χαλίκια των χαλικοδυλιστηρίων κ.α. και προστατεύουν τις κοινότητες που τα συνθέτουν από διάφορους κινδύνους. Η ανάπτυξη του βιοφίλμ έχει συνδεθεί από πολλούς με τη δημιουργία ανθεκτικότητας σε διάφορες ενώσεις μεταξύ των οποίων τα αντιβιοτικά και το χλώριο.

1.6 Αντιβιοτικά στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων

Ολοένα και πληθαίνουν οι επιστημονικές αναφορές για την παρουσία βακτηρίων στα υγρά απόβλητα και στη λυματολάσπη που έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα σε ομάδες αντιβιοτικών όπως οι β – λακτάμες, οι Κινολόνες, οι TET και οι SMD (Paterson et al., 2006; Kim et al., 2007; Galvin et al., 2010; Bouki et al., 2013; Hill et al., 2016). Πέρα από τα βακτηριακά στελέχη, ιδιαίτερα έντονη είναι και η παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα στις διάφορες ομάδες αντιβιοτικών (Kruse et al., 1994; Guardabassi et al., 2002; Omar et al., 2014; Sharma et al., 2016).

Τα αντιβιοτικά καταλήγουν στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων από το αποχετευτικό δίκτυο, στο οποίο συγκεντρώνονται οικιακά, κτηνοτροφικά, γεωργικά, νοσοκομειακά και βιομηχανικά απόβλητα με μικρή ή καθόλου προεπεξεργασία. Η πλειοψηφία των μονάδων αυτών δε διαθέτει συστήματα ελέγχου και μέτρησης της συγκέντρωσης ενώσεων όπως τα αντιβιοτικά και άλλοι ρύποι, που έχουν χαρακτηριστεί ως αναδυόμενου ενδιαφέροντος (προϊόντα προσωπικής φροντίδας, επιβραδυντές φλόγας, ναρκωτικές ουσίες, κ.α.) και καταλήγουν στα υγρά απόβλητα. Αυτό ισχύει και για άλλους ρύπους όπως τα μέταλλα, με εξαίρεση ίσως τον Υδράργυρο. Έχει δημιουργηθεί, λοιπόν, η υπόθεση από πολλούς ερευνητές ότι η ύπαρξη αντιβιοτικών στα απόβλητα θα ευνοήσει την επιλογή – ή τη συνεπιλογή – συγκεκριμένων βακτηρίων που φέρουν ανθεκτικότητα σε έστω έναν από αυτούς τους παράγοντες έναντι άλλων. Στους τρόπους με τους οποίους η φυσική επιλογή δρα πάνω σε μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε διάφορα ενδιαιτήματα θα αναφερθούμε και πιο αναλυτικά παρακάτω. Εδώ θα αναφέρουμε μια μελέτη σχετικά με την έκθεση βακτηρίων σε τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου (QACs) για 3 χρόνια, η οποία είχε ως συνέπεια την αύξηση του αριθμού των γονιδίων ανθεκτικότητας σε τέτοιες ενώσεις στους πληθυσμούς που κατοικούσαν σε ιζήματα ποταμού (Bouki et al., 2013).

Στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, τα στάδια επεξεργασίας των αποβλήτων συμπεριλαμβάνουν την προεπεξεργασία (δυναμικά), την πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια και την τριτοβάθμια επεξεργασία. Η τριτοβάθμια επεξεργασία αφορά διεργασίες όπως κροκίδωση – συσσωμάτωση, διήθηση σε αμμόφιλτρο ή σε φίλτρα ενεργού άνθρακα, η επεξεργασία με μεμβράνες και εφαρμόζεται κυρίως σε απόβλητα βιομηχανιών (π.χ. φαρμακοβιομηχανίες, βυρσοδεψεία). Η διαχείριση των υγρών

αποβλήτων είναι συνάρτηση του πληθυσμιακού ισοδύναμου, – που θα καθορίσει τα αναγκαία επίπεδα οξυγόνου που απαιτούνται για τη διάσπαση της οργανικής ύλης – του τύπου του αποβλήτου (βιομηχανικά, αστικά, νοσοκομειακά) και τον υδάτινο αποδέκτη (θάλασσες, λίμνες, ποτάμια). Αξίζει, λοιπόν, να αναφερθούμε συνοπτικά στις κύριες μεθόδους επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων.

Στόχος της **πρωτοβάθμιας επεξεργασίας** είναι να απομακρυνθούν τα στερεά που καθιζάνουν εύκολα και τα επιπλέοντα υλικά και να μειωθεί έτσι η περιεκτικότητα σε αιωρούμενα στερεά. Η πρωτοβάθμια καθίζηση χρησιμοποιείται ως ένα προκαταρκτικό στάδιο στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων. Οι δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης που έχουν σχεδιαστεί να λειτουργούν αποδοτικά μπορούν να απομακρύνουν 50 έως 70% των αιωρούμενων στερεών (Total Suspended Solids, TSS) και 25 έως 40% του BOD (Tchobanoglous, 2006). Είναι αναμενόμενο το μικροβιακό φορτίο σε αυτές τις διατάξεις να είναι υψηλό και να συμπεριλαμβάνει ένα απίστευτο εύρος από μικροοργανισμούς όπως βακτήρια, έλμινθες, πρωτόζωα και ιούς. Η επεξεργασία των πρωτοβάθμιων λυμάτων γίνεται στις περισσότερες μονάδες σε μηχανικά καθαριζόμενες κυκλικές ή ορθογώνιες δεξαμενές καθίζησης. Στην εγκατάσταση επεξεργασίας υγρών αποβλήτων Χανίων υπάρχουν δύο κυκλικές δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης. Ακολουθεί δεξαμενή επιλογής στην οποία, υπό ανοξικές συνθήκες τα πρωτοβάθμια λύματα αναμιγνύονται με την ανακυκλοφορία των δεξαμενών δευτεροβάθμιας επεξεργασίας.

Η **δευτεροβάθμια επεξεργασία**, που συχνά αναφέρεται με τον όρο διεργασία ενεργού ιλύος ή βιολογική επεξεργασία ακολουθεί την πρωτοβάθμια και αποτελείται από τρία βασικά στάδια: (α) έναν αντιδραστήρα (δεξαμενή) αερισμού, όπου διατηρούνται αιωρούμενοι και αερίζονται οι μικροοργανισμοί που είναι οι βασικοί πρωταγωνιστές της διεργασίας διάσπασης της οργανικής ύλης, (β) μια δεξαμενή καθίζησης όπου διαχωρίζεται με φυσικό τρόπο το υγρό από το στερεό μέρος και (γ) ένα σύστημα ανακυκλοφορίας για την επιστροφή των στερεών που διαχωρίζονται στο (β) σύστημα, πίσω στο σύστημα (α) (Tchobanoglous, 2006). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της διεργασίας της ενεργού ιλύος είναι ο σχηματισμός συσσωματωμάτων στερεών και στερεών με μικροοργανισμούς, που μπορούν να απομακρυνθούν βαρυτικά στις δεξαμενές καθίζησης. Ενώ η πρωτοβάθμια καθίζηση είναι η πλέον αποτελεσματική διεργασία για την απομάκρυνση των καθιζάνοντων στερεών, οι βιολογικές διεργασίες είναι ουσιώδεις για την απομάκρυνση των διαλυμένων, κολλοειδών και σωματιδιακών (αιωρούμενων) οργανικών ουσιών, μέσω της βιολογικής νιτροποίησης και απονιτροποίησης. Η μεγαλύτερη απομάκρυνση άνθρακα συμβαίνει χάρη στους αερόβιους και απονιτροποιητικούς ετερότροφους μικροοργανισμούς. Τα αερόβια βακτήρια οξειδώνουν το οργανικό υλικό των αποβλήτων σε CO₂, H₂O και νέα βιομάζα (κύτταρα και κυτταρικά συστατικά). Πιο πρόσφατα, η μελέτη και κατανόηση της οικολογίας της ενεργού ιλύος έχει συντελέσει στην καλύτερη απομάκρυνση θρεπτικών όπως ο φωσφόρος, με εκμετάλλευση βακτηρίων που τον δεσμεύουν. Στην οικολογία της ενεργού ιλύος συναντάμε μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών μεταξύ αυτών βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα, ιούς και έλμινθες. Μια μελέτη αναφέρει την ύπαρξη περισσότερων από 700 γένη και 3000 λειτουργικές ταξονομικές μονάδες (OTUs) στις διεργασίες ενεργού ιλύος. Τα βακτήρια βρίσκονται εκεί ως ανεξάρτητα, ελεύθερα διεσπαρμένα κύτταρα στο μείγμα στερεού – υγρού, ως βακτήρια που σχηματίζουν βιοκροκίδες και ως διεσπαρμένα, μη συσσωματωμένα βακτήρια που προσροφούνται όμως στις βιοκροκίδες. Υπάρχουν δε πληθυσμοί που αναφέρονται ως παροδικοί (Saunders et al., 2016) – λόγω του υψηλού ρυθμού μετανάστευσης – και ευθύνονται για

περισσότερο από το 80% μετατροπής των οργανικών ενώσεων. Παραδείγματα τέτοιων βακτηρίων είναι τα Nitrotoga και Nitrospira, τα οποία έχουν εντοπιστεί από πολλούς ερευνητές σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις κατά τη διάρκεια της απονιτροποίησης και χαρακτηρίζονται ως οι βασικότεροι οξειδωτικοί παράγοντες του N_2 στη διεργασία. Αντίθετα με τους παροδικούς μικροοργανισμούς, στους οποίους συμπεριλαμβάνονται και βακτήρια που επιλέγονται αποκλειστικά για διεργασίες όπως της ενεργού ιλύος, υπάρχουν στις δεξαμενές αυτόχθονα βακτήρια, τα οποία μπορεί να βρίσκονται είτε σε συσσωματώματα στον πυθμένα, στα τοιχώματα και στα μηχανικά εξαρτήματα των δεξαμενών, είτε προσκολλημένα στα αιωρούμενα στερεά στην επιφάνεια της δεξαμενής. Πολλοί ερευνητές χαρακτηρίζουν σημαντικές παραμέτρους στη διεργασία ενεργού ιλύος το χρόνο κατακράτησης στερεών (Solid Retention Time, SRT) και τον υδραυλικό χρόνο παραμονής (Hydraulic Retention Time, HRT) για την επιτυχημένη απομάκρυνση αντιβιοτικών. Αυξάνοντας τον SRT, επιτυγχάνονται καλύτερες απομακρύνσεις για κάποιες φαρμακευτικές ενώσεις κατά τη βιολογική επεξεργασία, στηριζόμενοι στο γεγονός ότι αρκετά βακτήρια έχουν πιο αργούς ρυθμούς ανάπτυξης. Αντίστοιχα, αύξηση του HRT παρέχει περισσότερο χρόνο για αντιδράσεις, όπως βιομετατροπές και η ρόφηση της ιλύος.

Στην Εγκατάσταση Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (Ε.Ε.Υ.Α.) των Χανίων, οι δεξαμενές αερισμού διαθέτουν μια ανοξική και μια αερόβια ζώνη. Τα λύματα οξυγονώνονται μέσω διαχυτήρων μεμβράνης λεπτής φυσαλίδας που βρίσκονται στον πυθμένα των δεξαμενών. Παράλληλα, με αφαίρεση του οργανικού φορτίου γίνεται και νιτροποίηση. Για την απομάκρυνση του αζώτου γίνεται μερική απονιτροποίηση στην ανοξική ζώνη μέσω ανακυκλοφορίας των νιτροποιημένων εκροών.

Σημαντικό είναι φυσικά το στάδιο της **απολύμανσης**, σκοπός της οποίας είναι η καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών ώστε να διασφαλίζεται η δημόσια υγεία. Είναι μια μορφή επεξεργασίας του νερού που είναι πλέον υποχρεωτική σε κάθε μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Στο στάδιο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, είναι αναγκαίος ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών για να διασπαστεί το οργανικό φορτίο των αποβλήτων, γι' αυτό και η εκροή της δεξαμενής δευτεροβάθμιας καθίζησης έχει πολλές φορές σημαντικό μικροβιακό φορτίο. Πιο διαδεδομένη μεταξύ των μεθόδων απολύμανσης υγρών αποβλήτων στις ΕΕΥΑ είναι η **χλωρίωση**, ενώ μπορεί κάποιες βιομηχανικές μονάδες να χρησιμοποιούν και άλλες τεχνικές όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία UV ή η οζόνωση. Θα πρέπει να αποφεύγεται η ταύτιση της απολύμανσης με την “αποστείρωση”, η οποία σημαίνει ολοκληρωτική εξόντωση των μικροοργανισμών που βρίσκονται σε ένα εξεταζόμενο δείγμα. Η αδρανοποίηση που επέρχεται σε πολλές περιπτώσεις με την απολύμανση σημαίνει ότι οι μικροοργανισμοί μπορεί να επανενεργοποιηθούν αν το περιβάλλον στο οποίο διοχετεύονται παρέχει ευνοϊκές συνθήκες. Η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη έννοια στην οποία θα αναφερθούμε και παρακάτω. Για τους ιούς, η αδρανοποίηση ταυτίζεται με την ανικανότητά τους να αναπαραχθούν εντός των ξενιστών τους. Η αποδοτικότητα της απολύμανσης μετράται και σχεδιάζεται με βάση τη νομοθεσία για την παρουσία συγκεκριμένων μικροοργανισμών στα νερά άρδευσης και αναψυχής. Όσον αφορά στην παραγωγή νερού για περιορισμένη άρδευση, η νομοθεσία αναφέρει ότι απαιτούνται δευτεροβάθμια επεξεργασία και απολύμανση με *E. coli* ≤ 200 CFU/100 mL και BOD < 25 mg/L, SS < 35 mg/L. Για απεριόριστη άρδευση, κατόπιν δευτεροβάθμιας, τριτοβάθμιας και απολύμανσης, θα πρέπει να ισχύουν: *E. coli* ≤ 5 CFU/100 mL, BOD ≤ 10 mg/L, SS ≤ 10 mg/L και θολότητα ≤ 2 ntu για το 80% των

δειγμάτων. Για την παραγωγή πόσιμου νερού από επιφανειακά ύδατα, η Ευρωπαϊκή Οδηγία (75/440/EK) προτείνει τα χαρακτηριστικά που συνοψίζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Κατηγοριοποίηση των επιφανειακών υδάτων που προορίζονται ως πόσιμο με βάση τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά τους. Ευρωπαϊκή Οδηγία (75/440/EK).

Παράμετροι	Μονάδες μέτρησης	A1	A2	A3
COD	mg/L			30
BOD ₅	mg/L	3	5	7
Ολικά κολοβακτηρίδια 37°C (κολοβακτηριοειδή)	/100 mL	50	5000	5000
Κοπρανώδη κολοβακτηρίδια (εντερικά κολοβακτηρίδια)	/100 mL	20	2000	20000
Κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι (εντερόκοκκοι)	/100 mL	20	1000	10000
Σαλμονέλλες	/100 mL	Απουσία σε 5000 mL	Απουσία σε 5000 mL	

A1: επιφανειακά ύδατα που υπόκεινται σε απλή φυσική επεξεργασία όπως ταχεία διήθηση και απολύμανση

A2: επιφανειακά ύδατα που υπόκεινται σε μεθόδους φυσικής και χημικής επεξεργασίας, όπως προ-

χλωρίωση, κροκίδωση – χημική κατακρήμνιση, διήθηση, απολύμανση (τελική χλωρίωση)

A3: επιφανειακά ύδατα που υπόκεινται σε μεθόδους εντατικής φυσικής και χημικής επεξεργασίας, όπως χλωρίωση μέχρι σημείου ρήξης, κροκίδωση – χημική κατακρήμνιση, διήθηση, προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα, και απολύμανση (όζον, τελική χλωρίωση).

Η χλωρίωση, λοιπόν, όπως αναφέραμε, είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος απολύμανσης στα κοινοτικά δίκτυα ύδρευσης. Σε υδατικά περιβάλλοντα, το ισοζύγιο μεταξύ μη ιοντισμένου υποχλωριώδους οξέος (HOCl) και των υποχλωρικών ιόντων (ClO⁻) εξαρτάται από το pH και τη θερμοκρασία. Μεταξύ των ενώσεων με βάση το χλώριο που χρησιμοποιούνται για απολύμανση είναι το υποχλωριώδες οξύ, το υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl), το αέριο χλώριο Cl₂. Είναι γνωστό ότι το χλώριο μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε πολλά κυτταρικά συστατικά και σε μεταβολικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεϊνοσύνθεσης (Tschobanoglous, 2006). Στη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων του νομού Χανίων η διάταξη της χλωρίωσης ακολουθεί απευθείας τη δευτεροβάθμια επεξεργασία και αποτελείται από αυλάκια μαιανδρικής ροής και μετά την επεξεργασία το νερό καταλήγει με σωληνώσεις στη θάλασσα.

Στόχος της επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, που έχει μετατραπεί και σε κοινωνική στρατηγική τα τελευταία χρόνια, είναι η **επαναχρησιμοποίηση** των υγρών αποβλήτων για την κάλυψη των αναγκών σε άρδευση αλλά ακόμα και σε πόση, σε κάποιες περιπτώσεις. Η τύχη των αντιβιοτικών στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων είναι η αποδόμηση στην υδατική φάση μέσω της υδρόλυσης, της βιομετατροπής και της προσρόφησης στην πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια ιλύ. Οι μικροοργανισμοί αποδομούν το αντιβιοτικό μέσω βιοτικών διεργασιών – βιοαποδόμηση

από βακτήρια και μύκητες – και αβιοτικών – ρόφηση, υδρόλυση, φωτόλυση και οξειδοαναγωγή. Και οι δύο τρόποι αποδόμησης είναι συναρτήσεις παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία, η δομή της ένωσης, το pH. Η προσρόφηση σε στερεά και βιοστερεά εξαρτάται από τη **σταθερά προσρόφησης** (ή το λογάριθμο της στερεάς προσρόφησης), έννοια που εισήγαγε ο Tolls (2001) και σχετίζεται με την υδροφοβικότητα μιας ένωσης. Αναφορικά με τη σταθερά προσρόφησης τα αντιβιοτικά παρουσιάζουν μεγάλο εύρος ($0.2 < K_d < 6000 \text{ L/kg}$). Ο Drewes, 2007 αναφέρει ότι χημικά με $\log K_d < 2.5$ έχουν χαμηλή δυνατότητα ρόφησης (λιγότερο υδρόφοβα). Γενικότερα, οι ενώσεις που έχουν μεγάλη σταθερά προσρόφησης προσροφούνται καλύτερα στα στερεά της ιλύος. Οι πιο υδρόφιλες ενώσεις, θα παραμείνουν στην υδατική φάση. Στον Πίνακα 4 φαίνονται χαρακτηριστικές τιμές της σταθεράς K_d που έχουν καταγραφεί από διάφορους ερευνητές. Άλλοι παράγοντες, που επηρεάζουν την προσρόφηση, μικρότερης όμως επιρροής, είναι οι δεσμοί υδρογόνου και οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Παρακάτω, αναφερόμαστε πιο αναλυτικά στους παράγοντες αυτούς και εστιάζουμε κυρίως στην αλληλεπίδρασή τους με τα αντιβιοτικά, τα οποία μελετήσαμε σε αυτή την εργασία.

Πίνακας 4. Σταθερές ρόφησης των αντιβιοτικών σε στερεά (Le – Minh et al., 2010; Peterson et al., 2010)

Ένωση	Log K_d	Συνθήκες
Σουλφομεθοξαζόλη (SMX)	0,8 – 1,8	Χωνευμένη ιλύς
	2,1 – 2,6	Ενεργός ιλύς
	2,2 – 2,7	Ενεργός ιλύς
TMP	2,2 – 2,6	Ενεργός ιλύς
CIP	4,3	Ενεργός ιλύς
TET	3,9	Ενεργός ιλύς
AMP	1,04	Al_2O_3

Η προσρόφηση στα στερεά, που συμβαίνει για αρκετές οικογένειες αντιβιοτικών, είναι ένας από τους βασικότερους λόγους που ο εντοπισμός τους στα περιβαλλοντικά δείγματα μπορεί να είναι ιδιαίτερα επίπονος. Για παράδειγμα, οι Φθοροκινολόνες, εντοπίζονται πολύ συχνότερα στην ενεργό ιλύ, συγκριτικά με άλλες οικογένειες αντιβιοτικών, όπως οι β – λακτάμες (Gigen et al., 2003; Galvin et al., 2010; Le-Minh et al., 2013).

Η φωτόλυση επηρεάζει την αποδόμηση των αντιβιοτικών και εξαρτάται από το γεωγραφικό πλάτος, το pH, τις εποχικές διακυμάνσεις και το είδος του αντιβιοτικού. Πολλές φορές, η ατελής φωτοαποδόμηση μπορεί να οδηγήσει σε λιγότερο ή περισσότερο σταθερές και/ή τοξικές ενώσεις. Πάντως, οι ρυθμοί, με τους οποίους συμβαίνουν τέτοιες διεργασίες στη φύση είναι ακόμα άγνωστοι και οι μελέτες περιορίζονται σε εργαστηριακή κλίμακα.

Η υδρόλυση ενός αντιβιοτικού εξαρτάται κυρίως από τη δομή του, το pH και τη θερμοκρασία. Έχει αναφερθεί ότι για τις TC, η υδρόλυση συμβαίνει για τιμές του pH κοντά στο 7 και ταυτόχρονη αύξηση της θερμοκρασίας.

Σήμερα, τα αντιβιοτικά ανήκουν στην κατηγορία των επίμονων ρύπων αναδυόμενου ενδιαφέροντος και η ανίχνευσή τους από τα υγρά απόβλητα γίνεται με αναλυτικές μεθόδους όπως LC – MS (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry), LC – MS/MS (για πιο πολύπλοκες περιβαλλοντικές μήτρες, όπως UWTPs), SPE (Solid Phase Extraction), SPME (Solid Phase Micro Extraction) + LC – MS/MS.

Η απομάκρυνσή τους με συμβατικές μεθόδους επεξεργασίας (πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια) ποικίλει. Για κάποιες οικογένειες αντιβιοτικών (π.χ. β – λακτάμες) αρκεί

η επεξεργασία με τη μέθοδο ενεργού ιλύος (Le-Minh et al., 2013). Υδρόφοβα αντιβιοτικά που προσροφούνται σε κροκίδες, αιωρούμενα στερεά και/ή ενεργό ιλύ πλούσια σε οργανικά, απομακρύνονται από την υδατική φάση με καθίζηση της ιλύος. Μπορεί να γίνει επιπλέον, μετατροπή των ουσιών αυτών είναι μέσω της υδρόλυσης, στην υδατική φάση. Στον Πίνακα 5 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που έχουν καταγραφεί στην είσοδο και στην εκροή διαφόρων μονάδων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.

Πίνακας 5. Η απομάκρυνση για διάφορα αντιβιοτικά με διάφορες μεθόδους επεξεργασίας σε μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων παγκοσμίως (Le – Minh et al., 2010).

Αντιβιοτικό/Περιοχή	Συγκέντρωση στην είσοδο (ng/L)	Συγκέντρωση στην εκροή (ng/L)	Μέθοδοι επεξεργασίας
Πενικιλίνη G Αυστραλία	<(2)	<(2)	AS
SMX			
ΗΠΑ	1090	210	AS/χλωρίωση
Κορέα	450	<(30)	AS
Κροατία	590	0,39	AS
Ελβετία	230 – 570	210 – 860	AS/αμμόφιλτρο
Μεξικό	390	0,31	AS
Σουηδία	20	70	AS/χημική κατακρήμνιση P
Ισπανία	580	250	AS
Αυστρία	24 – 155	18 – 91	AS
Κίνα	10 – 118	9 – 78	AS ή UV+χημικά ή χλωρίωση
TMP			
Κροατία	1172	290	AS
Ελβετία	210 – 440	20 – 310	AS
Μεξικό	0,59	180	AS
Αμερική	0,14 – 1,10	<(50) – 550	AS
Σουηδία	80	40	AS/χημική κατακρήμνιση P
Ηνωμένο Βασίλειο	213 – 300	218 – 322	trickling filter/AS/UV
Κίνα	120 – 320	120 – 230	χημική καθίζηση/AS
Ταϊβάν	259 – 949	203 – 415	Δευτεροβάθμια/UV ή χλωρίωση
TET			
ΗΠΑ	200	<(30)	AS/χλωρίωση
Κορέα	110	<(0.03)	AS
Κίνα	96 – 1300	180 – 620	χημική καθίζηση/AS
Ταϊβάν	46 – 234	16 – 38	AS/UV ή χλωρίωση
CIP			
ΗΠΑ	<(50) – 310	<(50) – 60	AS
Σουηδία	90 – 300	<(6) – 60	Χημική κατακρήμνιση P/AS
Αυστραλία	90	130	AS
Ελβετία	320 – 570	60 – 90	AS/κροκίδωση με Fe
Σουηδία	320	31,5	AS/χημική κατακρήμνιση
Κίνα	80	27	P/αμμόφιλτρο
			AS

AS: Activated Sludge

Για τα περισσότερα αντιβιοτικά ισχύει ότι ένα ποσοστό μεταξύ 30 – 90% εξέρχεται από τις ζωικές και ανθρώπινες απεκκρίσεις με την πρωταρχική μορφή του αντιβιοτικού και ένα τμήμα αυτού μετατρέπεται στη συνέχεια σε λιγότερο βλαβερές μορφές με τη δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια επεξεργασία, μέσω της προσρόφησης σε βιοστερεά. Οι β – λακτάμες, για παράδειγμα, έχουν παρατηρηθεί σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο περιβάλλον και υδρολύονται πολύ εύκολα, ωστόσο έχουν εντοπιστεί βακτήρια ανθεκτικά σε αυτή την ομάδα αντιβιοτικών καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα στις β – λακτάμες (Li et al., 2009; Zhang et al., 2011). Συγκεκριμένα, έχουν εντοπιστεί αρκετά γνωστά βακτήρια, μεταξύ των οποίων η *E. coli*, η *Pseudomonas aeruginosa*, το *Acinetobacter sp.* και τα *Enterobacteriaceae* που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Οι Novo & Manaia, (2010) αναφέρουν ότι η τελική εκροή ενός βιολογικού μπορεί ημερησίως να περιέχει 10^9 – 10^{12} CFU ανά κάτοικο και ότι μεταξύ αυτών, τα 10^7 – 10^{10} τουλάχιστον μπορεί να είναι ανθεκτικά σε κάποιον αντιμικροβιακό παράγοντα. Ανθεκτικά χαρακτηρίζονται τα βακτήρια εκείνα που είναι καλλιεργήσιμα μετά την επεξεργασία με το εκάστοτε αντιβιοτικό.

Τα κολοβακτηριοειδή και οι *Enterococci* είναι τα πιο πολυμελετημένα είδη βακτηρίων και κυριότεροι εκπρόσωποι αυτών η *E. coli* και οι *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium*. Ο λόγος είναι η χρήση των μικροοργανισμών αυτών στη νομοθεσία ως μικροβιακών δεικτών σχετικά με την καταλληλότητα διαφόρων τύπων υδάτων για ποικίλες χρήσεις (πόση, άρδευση).

Για την *E. coli* που προέρχεται από την εκροή ενεργού ιλύος τα ποσοστά ανθεκτικότητας διαφοροποιούνται από εκείνα των *Enterococci*, καθώς επίσης διαφοροποιείται και η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις ομάδες αντιβιοτικών. Συγκεκριμένα, οι Lucziewicz et al. (2010) αναφέρουν ότι από τα 153 στελέχη που απομόνωσαν κατόπιν επεξεργασίας ενεργού ιλύος, το 34% ήταν ανθεκτικά στην AMP (Πενικιλίνες), 23% στην TET, 11% στο SMX/TMP (SMD) και 10% στη CIP (Φθοροκινολόνες). Οι Galvin et al. (2010) αναφέρουν ότι μετά τον αερισμό το ποσοστό των ανθεκτικών – και κατόπιν πρωτοβάθμιας επεξεργασίας που μειώθηκε από 24,5 σε 22,3% – μειώθηκε σε 12,5% για την AMP, στην έξοδο όμως της δευτεροβάθμιας το ποσοστό αυξήθηκε στο 19,5%. Για το SMX/TMP το ποσοστό απομάκρυνσης μετά τον αερισμό ήταν 16,4% (από 11,1% της εισόδου, το οποίο αυξήθηκε κατόπιν της πρωτοβάθμιας σε 14,3%) και στην έξοδο της δευτεροβάθμιας τα ανθεκτικά ήταν πλέον 21,8%. Για την TET το ποσοστό μετά την πρωτοβάθμια επεξεργασία αυξήθηκε από 12,4% σε 17% και σε 39% μετά τον αερισμό. Στην έξοδο όμως της δευτεροβάθμιας το ποσοστό μειώθηκε στο 22%. Τέλος, για τη CIP παρατηρήθηκε μείωση μετά την πρωτοβάθμια (0,8% από 7,15%), και μηδενικά ποσοστά κατόπιν επεξεργασίας ενεργού ιλύος.

Για τους *Enterococci* αναφέρονται ποσοστά ανθεκτικότητας από 15 – 33% για την TET και τις Φθοροκινολόνες, και χαμηλότερα ποσοστά για Αμινοπενικιλίνες και SMD (1 – 3%). Οι εν λόγω έρευνες αφορούν στην περίπτωση βακτηρίων που προέρχονται από πρωτοβάθμια επεξεργασία και διεργασίες ενεργού ιλύος. Συγκεκριμένα, στην Πορτογαλία ερευνητές μελέτησαν 983 στελέχη που απομόνωσαν από 14 βιολογικούς καθαρισμούς ως προς την ανθεκτικότητα σε ποικιλία αντιβιοτικών. Περίπου το 50% αυτών εμφάνισε ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό και στην τελική εκροή μετρήθηκαν 10^3 CFU/ml ανθεκτικά βακτήρια του γένους *Enterococci* (Rizzo et al., 2013). Οι Lucziewicz et al. (2010) αναφέρουν ότι το ποσοστό των ανθεκτικών *E. faecium* και *faecalis* στην εκροή της επεξεργασίας ενεργού ιλύος ήταν 33% στην TET, 25% στη CIP και 1% στο SMX/TMP. Στον Πίνακα 6 φαίνεται η

ανταπόκριση βακτηρίων που προέρχονται από βιολογικούς καθαρισμούς σε διάφορα αντιβιοτικά.

Πίνακας 6. Ποσοστά ανθεκτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από WWTPs σε αντιβιοτικά. (Rizzo et al., 2013; Huang et al., 2012)

WWTPs	Βιολογική επεξεργασία	Ανθεκτικά βακτήρια	Αντιβιοτικά στα οποία αναπτύσσεται ανθεκτικότητα
Beni Mellal (Morocco), οικιακά απόβλητα (150000 κάτοικοι, 11000 m ³ /d)	Διεργασία ενεργού ιλύος	Κοπρανώδη κολοβακτηρίδια (FC)	111 στελέχη: συνολικά 72,07% ανθεκτικότητα. Ανθεκτικότητα στο ανεπεξέργαστο απόβλητο 71 % και στο επεξεργασμένο 77,8%. ανθεκτικότητα 54,0% στη Στρεπτομυκίνη, 42,3% στην AMP, 42,3% στην Αμοξικιλίνη και 31,5% στην Αμοξικιλίνη – Κλαβουλανικό οξύ
Βόρεια Πορτογαλία, 70% οικιακά και 30% προεπεξεργασμένα βιομηχανικά απόβλητα (100000 κάτοικοι)	Διεργασία ενεργού ιλύος	<i>Enterococcus hirae</i> , <i>E. faecium</i> and <i>E. faecalis</i>	TET(31/33%), Γκενταμικίνη (50/50%), Ερυθρομυκίνη (33/23%), CIP(9/25%), Αμοξικιλίνη (0/3%), SMX/TMP(0/1%), ευαισθησία στη Βανκομυκίνη
Gdansk – Wschod (βόρεια Πολωνία), κυρίως οικιακά και 5% βιομηχανικά και 0.17% ανεπεξέργαστα νοσοκομειακά απόβλητα (700000 κάτοικοι)	Διεργασία ενεργού ιλύος τροποποιημένη (University of Cape Town)	<i>Enterococci</i> <i>Echerichia</i>	199 στελέχη: Nitrofurantion (53%), Ερυθρομυκίνη (44%), CIP(29%), TET (20%) 153 στελέχη: AMP(34%), Πιπερακιλλίνη (24%), TET(23%), Λεβοφλοξασίνη (10/15%), SMX/TMP(11%), CIP(10%)
Ιρλανδία, απόβλητα από 4 νοσοκομεία (72000 κάτοικοι)	Διεργασία ενεργού ιλύος	<i>Escherichia</i>	AMP (24,5/12,5%), Στρεπτομυκίνη (16,5/0%), SMX(11,1/12,5%), TET(12,4/39%), CIP(7.14/0%), Σεφοξιτίνη (0,11/2,6%)
2 μεγάλες μονάδες στη Δανία (240000 και 500000 κάτοικοι)	Διεργασία ενεργού ιλύος για απομάκρυνση N και P	<i>Acinetobacter</i>	442 στελέχη: AMP(27/22,3%), Γκενταμικίνη (7,2/5,8%), TET(11,5/12,9%), Πολυανθεκτικότητα (Δ.Ε./0,3%)
Ann Arbor (Michigan, USA), κυρίως οικιακά απόβλητα, με λίγα βιομηχανικά και ανεπεξέργαστα νοσοκομειακά (210700 κάτοικοι)	Διεργασία ενεργού ιλύος για απομάκρυνση N και P και χλωριούχου Fe	<i>Acinetobacter</i>	366 στελέχη: TMP(92,2/100%), Ριφαμπίνη (63,1/77,5%), CAP(25,2/35%), Αμοξικιλίνη/Κλαβουλανικό (8,7/20%), Σουλφισοξαζόλη (8,7/22,5%), SMX(4,9/11,3%)
Πεκίνο (Κίνα), οικιακά απόβλητα (200000 m ³ /d)	Διεργασία ενεργού ιλύος	Ετερότροφα βακτήρια	PEN(28-98%), AMP(27-60%), CEF(19-92%), TET(1,5-4,8%), CAP(40-96%), RIF(0,8-59%)
Γερμανία	Διεργασία ενεργού ιλύος	Ετερότροφα βακτήρια	PEN(13-27%), CEF(19-59%)

FC: Fecal Coliforms

Οι Al – Ahmad et al. (2009) και Wiethan et al. (2000), αναφέρουν ότι η ανθεκτικότητα που φέρουν κάποια βακτήρια σε αντιβιοτικά δε συνεπάγεται για αυτά απαραίτητα πλεονέκτημα να επιλεχθούν κατά την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων. Τα αποτελέσματά τους δεν έδειξαν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών στους βιολογικούς καθαρισμούς, καθώς επίσης, αναφέρουν ότι ενώ εντοπίστηκαν αντιβιοτικά, αυτό δεν ωφέλησε ιδιαίτερα τα ανθεκτικά βακτήρια κατά την επεξεργασία τους με διάφορες τεχνικές. Η βάση αυτής της προβληματικής στηρίζεται στο κατά πόσο η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά συμπεριλαμβάνεται στο πλαίσιο μιας γενικότερης στρατηγικής (μηχανισμού επιβίωσης) των βακτηρίων όταν βρίσκονται σε ακραία περιβάλλοντα. Ένα τέτοιο είναι παράδειγμα η σύγκριση των μηχανισμών ανθεκτικότητας στο χλώριο, που εμφανίζουν κάποια βακτήρια και των μηχανισμών που εμπλέκονται στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Για την απόκτηση τέτοιων πληροφοριών απαιτούνται, πέρα από την καταγραφή των ανθεκτικών βακτηρίων και την ποσοτικοποίηση των εκάστοτε γονιδίων, ποιοτικά δεδομένα (μοριακές αναλύσεις, *in vivo* δοκιμές κ.α.).

Επιστρέφοντας στα γονίδια που κωδικοποιούν την ανθεκτικότητα, πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν πως η μελέτη του μεταγενώματος των πλασμιδίων μπορεί να συνεισφέρει σε κάποιο βαθμό στη γνώση σχετικά με τα πρώτα. Μια τέτοια μελέτη έγινε το 2008 από τους Szczepanowski et al. (2008), οι οποίοι απομόνωσαν πλασμιδιακό υλικό βακτηρίων από τη διεργασία ενεργού ιλύος, που ήταν ανθεκτικά σε μεγάλο εύρος αντιβιοτικών. Αφού εντόπισαν την ύπαρξη πλασμιδίων που κωδικοποιούσαν την ανθεκτικότητα (IncP, IncN, IncT), μελέτησαν τα μεταγενώματα ως προς τη γενετική ποικιλότητα και ανέφεραν 1050 διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών, που αποκωδικοποιούσαν ένα μεγάλο μέρος των πλασμιδίων. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι πολλά από αυτά τα πλασμίδια ήταν κινητά και ότι εντός των πλασμιδίων εμπεριέχονταν μεταθετά στοιχεία του κεντρικού γονιδιώματος. Μια επιπλέον μελέτη έγινε σχετικά με την παρουσία 193 συχνότερα εμφανιζόμενων ARGs σε απόβλητο διεργασίας ενεργού ιλύος με τη χρήση PCR. Η παρουσία των ARGs στην εκροή ήταν χαμηλότερη συγκριτικά με τη λάσπη (123 και 140 ARG, αντίστοιχα). Στα πλασμίδια θα αναφερθούμε εκτενέστερα παρακάτω.

1.7 Αντιβιοτικά – ιστορικά στοιχεία, ορισμοί

Η πρώτη μοντέρνα εφαρμογή αντιβιοτικού χρονολογείται το 1796, όταν ο νεαρός γιατρός Edward Jenner εμβολίασε το James Phipps, ένα αγόρι που έπασχε από ευλογιά με ενοφθάλμισμα από λέπια ασθενούς που έπασχε από δαμαλίτιδα (cowpox), ασθένεια συγγενική της ανεμοβλογιάς. Το παιδί ανέπτυξε ήπιο πυρετό και έχασε την όρεξή του, αλλά δέκα μέρες αργότερα, η υγεία του επανήλθε. Αυτή τη φορά, ο Jenner εμβολίασε το παιδί με μια φρέσκια καλλιέργεια του ιού και διαπίστωσε ότι το παιδί δεν εμφάνισε κανένα σύμπτωμα της ασθένειας. Σήμερα, γνωρίζουμε ότι κατόπιν έκθεσης στον ιό της δαμαλίτιδας, ο οργανισμός του νοσούντος, έχοντας ήδη αποκτήσει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει την ομοιότητα μεταξύ των δύο ιών λόγω την ομοιότητας στη δομή των αντιγόνων, μπορεί να αντιμετωπίζει πιο αποτελεσματικά τους δύο ιούς.

Τις μεθόδους του Jenner ενστερνίστηκε αργότερα και ένας λαμπρός ερευνητής, ο Louis Pasteur, ο οποίος το 1877 μελετούσε τη χολέρα των πουλερικών, μια διαρροϊκή ασθένεια που κατέστρεφε την αναπαραγωγική ικανότητα των πουλερικών. Αρχικά,

εμβολίαζε τα πουλερικά με φρέσκες καλλιέργειες του βακτηρίου και το αποτέλεσμα των πειραμάτων του ήταν ο θάνατος των πουλερικών. Όταν το 1879 ζήτησε από το βοηθό του να εμβολιάσει τις κότες με μια φρέσκια καλλιέργεια, ο τελευταίος ξεχάστηκε και πήγε διακοπές. Ένα μήνα αργότερα, όταν ο βοηθός επέστρεψε, εμβολίασε με την ενός μήνα πλέον καλλιέργεια τις κότες και προς έκπληξή του οι κότες εμφάνισαν μόλις ελαφρά συμπτώματα της ασθένειας και τελικά, επιβίωσαν. Ενθουσιασμένος ο Pasteur τις εμβολίασε ξανά με φρέσκια καλλιέργεια βακτηρίων και οι κότες δεν παρουσίασαν κανένα σύμπτωμα της νόσου.

Το 1928 ο Alexander Fleming ανακάλυψε την Πενικιλίνη και έκτοτε, ο αριθμός των αντιβιοτικών έχει πολλαπλασιαστεί και μαζί με αυτά ο αριθμός των λοιμώξεων και των ασθενειών.

Έχουν προταθεί αρκετοί ορισμοί για τα αντιβιοτικά. Αρχικά, ο όρος αντιβιοτικό χρησιμοποιούνταν για να εκφράσει τη βιολογική δραστηριότητα κάποιου παράγοντα ενάντια σε ζωντανούς οργανισμούς, ωστόσο, σήμερα με τον όρο “αντιβιοτικό” αναφερόμαστε σε ουσίες με αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή ή αντιπαρασιτική δραστηριότητα. Θα αναφέρουμε εδώ τους πιο πρόσφατους και κατά τη γνώμη μας τους πιο πλήρεις.

(α) Ο Kümmerer et al. (2009) ορίζει - με την ευρύτερη έννοια - ως αντιβιοτικό ένα χημειοθεραπευτικό παράγοντα, που παρεμποδίζει ή καταστέλλει την ανάπτυξη μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες και/ή πρωτόζωα. Οι εναλλακτικοί όροι, “χημειοθεραπευτικό” ή “αντιμικροβιακό” δεν είναι απόλυτα συνώνυμοι. Για παράδειγμα, τα αντιμικροβιακά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και εναντίων ιών. Η έκφραση “χημειοθεραπευτικό” αναφέρεται σε μια ένωση, που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία μιας ασθένειας - από μικροοργανισμούς ή καρκινικά κύτταρα - η οποία προκαλεί το θάνατο κυττάρων.

(β) Ένας δεύτερος ορισμός δίνεται από τους Du et al. (2011). “Τα αντιβιοτικά είναι οργανικές ενώσεις, που παράγονται από δευτερογενή προϊόντα του μεταβολισμού μικροοργανισμών, ή συντίθενται τεχνητά ή ήμι - τεχνητά και χρησιμεύουν είτε στο θάνατο μικροοργανισμών είτε παρεμβαίνουν σε βασικές βιοχημικές διεργασίες του μεταβολισμού.”

Τα πρώτα αντιβιοτικά, όπως προαναφέραμε ήταν φυσικής προέλευσης, για παράδειγμα οι Πενικιλίνες παράγονταν από μύκητες του γένους *Penicillium*, ή η στρεπτομυκίνη από βακτήρια του γένους *Streptomyces*. Αντίθετα, σήμερα, τα περισσότερα αντιβιοτικά είναι είτε χημικές συνθέσεις, π.χ. η SMX, είτε χημικά τροποποιημένες ενώσεις φυσικής προέλευσης. Αντιβιοτικά, όπως οι β - λακτάμες, οι Στρεπτομυκίνες και οι Αμινογλυκοσίδες, παράγονται από βακτήρια του εδάφους. Επίσης, βακτήρια του χρώματος σε τροπικές περιοχές παράγουν με φυσικό τρόπο TET με υψηλή πυκνότητα.

Πολλά αντιβιοτικά είναι ενώσεις μικρών σχετικά μορίων, με μοριακό βάρος κάτω από 1000 Da. Ως προς τις δραστικές ουσίες, που αποτελούν τη βάση τους, τα αντιβιοτικά χωρίζονται σε μεγάλες οικογένειες, οι πιο γνωστές από αυτές είναι οι β - λακτάμες, οι Κινολόνες, οι TC, οι Μακρολίδες και οι Σουλφοναμίδες. Στη συνέχεια θα παρουσιάσουμε αναλυτικά τα αντιβιοτικά με τα οποία ασχοληθήκαμε στη συγκεκριμένη εργασία.

1.8 Αντιβιοτικά ενδιαφέροντος

α. Αμπικιλλίνη (AMP)

Πρόκειται για ευρείας χρήσης, ημισυνθετικό, μη καρκινογόνο αντιβιοτικό που ανήκει στις β - λακτάμες Πενικιλίνες και έχει βακτηριοκτόνο δράση. Οι β - λακτάμες, μαζί με τις υποομάδες των Πενικιλινών, Κεφαλοσπορινών και Καρβαπενεμών, είναι τα πιο συχνά συνταγογραφούμενα αντιβιοτικά στις περισσότερες χώρες και αντιστοιχούν περίπου στο 50 – 70% της παγκόσμιας παραγωγής αντιβιοτικών.

Η AMP παρασκευάστηκε το 1961 και έκτοτε χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων των μηνίγγων, του λάρυγγα, των ιγμορείων, των πνευμόνων, των αναπαραγωγικών οργάνων, του ουροποιητικού και γαστροεντερικού συστήματος. Σε στελέχη *S. aureus* που είναι ευαίσθητα στις β - λακτάμες – όπως για παράδειγμα τα στελέχη MSSA (Methicillin Sensitive *Staphylococcus Aureus* – το αντιβιοτικό προσκολλάται στις πρωτεΐνες PBP (penicillin – binding proteins), που βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηριακού κυττάρου και τις απενεργοποιεί. Η απενεργοποίηση της PBP επηρεάζει την πολυμερική σύνδεση των αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης, που είναι απαραίτητες για τη σταθερότητα και την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος. Κατά συνέπεια, η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος διακόπτεται κατά το 3ο και τελευταίο στάδιο σύνθεσης καθιστώντας το διαπερατό, κάτι που οδηγεί τελικά στη λύση του κυττάρου. Αντίθετα, σε ανθεκτικά στελέχη *S. aureus* (MRSA – Methicillin Resistant *S. aureus*) η δομή της PBP πρωτεΐνης είναι διαφορετική και δεν ευνοεί το σχηματισμό ενώσεων με τις β - λακτάμες με συνέπεια να συνεχίζεται κανονικά η σύνθεση πεπτιδογλυκάνης και να επιβιώνει το στέλεχος.

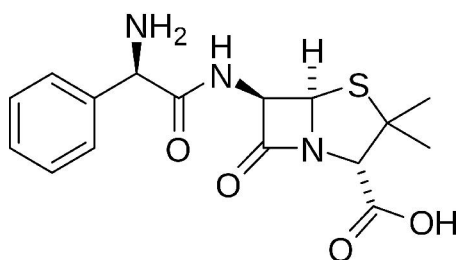
Η AMP παραμένει σταθερή κατά την υδρόλυση, συγκριτικά με άλλες β - λακτάμες, και ως εκ τούτου μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλο εύρος Gram αρνητικών και θετικών βακτηρίων. Μπορεί να αλληλεπιδράσει με ενώσεις όπως οξέα, καρβοξυλικά οξέα, αμίδια και ιμίδια, αμίνες, φωσφίνες, πυριδίνες, σουλφίδια και οργανικά. Η τριένυδρη AMP απορροφά σχεδόν μηδενικές ποσότητες υγρασίας στους 25 °C και υπό σχετική υγρασία 80%, αλλά μπορεί σε συνθήκες υψηλότερης υγρασίας να απορροφά σημαντικές ποσότητες. Η ένωση παρουσιάζει τη μέγιστη σταθερότητά της σε pH 5.8. Αν διαλυθεί σε νερό σε συγκέντρωση 0.25% έχει pH από 3.5 έως 5.5.

Στην εμπορικά διαθέσιμη μορφή της είναι λευκή και άοσμη κρυσταλλική σκόνη, με σημείο τήξης 208 °C και διαλυτότητα στο νερό 10100 mg/L (στους 21 °C). Η ημιζωή όλων των Αμινοπενικιλινών είναι περίπου 60 – 90 min.

Υγιή υποκείμενα μεταβολίζουν περίπου το 20% της χορηγούμενης δόσης, που κυμαίνεται μεταξύ 250 και 500 mg. Εντός 12 h, περίπου το 7% της ολικής δόσης εξέρχεται με τα ούρα υπό μορφή μεταβολιτών (5R, 6R – πενικιλινικό οξύ, 5S,6R – πενικιλινικό οξύ, πιπεραζίνη-2,5-διόνη) μετά από του στόματος πρόσληψη. Η χημική δομή της AMP φαίνεται στο Σχήμα 1 και βλέπουμε πως συμπεριλαμβάνει ένα βενζοϊκό δακτύλιο, ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη βακτηριοκτόνο δράση της. Ο τετράγωνος δακτύλιος, τον οποίο φέρουν όλες οι β - λακτάμες είναι μια κυκλική αμίδα, ιδιαίτερα ευαίσθητη σε χημική ή ενζυμική υδρόλυση. Όταν ο δακτύλιος αυτός σπάει λόγω της υδρόλυσης, η δράση του αντιβιοτικού σταματά.

Στα περιβαλλοντικά δείγματα η παρουσία των AMP, παρέα με άλλες Πενικιλίνες και β - λακτάμες, έχει αναφερθεί αρκετές φορές. Οι Lin et al. (2008), κατόπιν επεξεργασίας υγρών αποβλήτων με τη μέθοδο ενεργού ιλύος στην Taiwan αναφέρουν ότι η τελική συγκέντρωση της AMP ήταν 7 ng/L. Πολλοί είναι, πάντως, οι ερευνητές που

αναφέρουν, ότι παρόλο που οι β - λακτάμες είναι από τα πιο κοινώς συνταγογραφούμενα αντιβιοτικά, η παρουσία τους στα υγρά απόβλητα είναι πολύ περιορισμένη και ότι, αντίστοιχα, η απομάκρυνσή τους στις εκροές είναι πολύ υψηλή. Οι Li et al. (2008) αναφέρουν, για παράδειγμα, ότι η συγκέντρωση της G Πενικιλίνης μειώθηκε από 153 μg/L σε 1,68 μg/L κατά την επεξεργασία με τη μέθοδο της ενεργού ιλύος και ότι η μείωση αυτή οφείλεται στην αποδόμηση της ένωσης κατά τις αερόβιες και αναερόβιες διεργασίες και την υδρόλυση. Για την Κεφαλεξίνη δε έχει αναφερθεί απομάκρυνση μεγαλύτερη από 96% (από 2000 ng/L σε 78 ng/L) με επεξεργασία ενεργού ιλύος, σε βιολογικό καθαρισμό στην Αυστραλία (Cha et al., 2006). Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των δεικτών τοξικότητας των αντιβιοτικών για κάποιους οργανισμούς. Ενδεικτικά, το EC₅₀ για το είδος *vibrio fischeri*, που προέρχεται από θαλάσσιο οικοσύστημα υπολογίστηκε 163 mg/L, για 24 h.



Σχήμα 1. Η χημική δομή της AMP. C₁₆H₁₉N₃O₄S. Μοριακό βάρος = 349.405 g/mol

β. Σιπροφλοξασίνη (CIP)

Ευρείας χρήσης, συνθετικό αντιβιοτικό που ανήκει στην ομάδα των Κινολονών και στην υποομάδα των Φθοροκινολονών. Χορηγείται από το 1979, που παρασκευάστηκε, για τη θεραπεία από διάφορους οργανισμούς σε λοιμώξεις του ουροποιητικού, οξείες κυστίτιδες, χρόνια βακτηριακή προστατίτιδα, λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού, οξεία ιγμορίτιδα, λοιμώξεις του δέρματος και της δομής του, λοιμώξεις των οστών και των αρθρώσεων, μολυσματική διάρροια, τυφοειδή πυρετό, γονόρροια και για επιπλοκές κατόπιν εισπνοής άνθρακα.

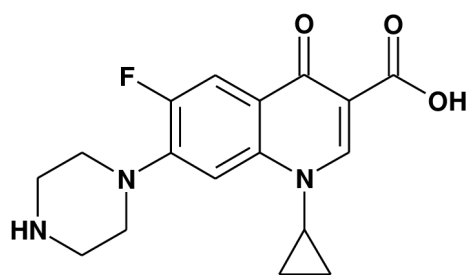
Η CIP προσκολλάται στο ένζυμο DNA γυράση, που είναι απαραίτητο για το διπλασιασμό του DNA των βακτηρίων, παρεμποδίζοντας έτσι τη λειτουργία του. Μάλιστα έχει 100 φορές περισσότερη γειννίαση στη βακτηριακή γυράση σε σχέση με εκείνη των θηλαστικών. Είναι περισσότερο δραστικό σε Gram αρνητικά βακτήρια, συγκριτικά με Gram θετικά. Σε αντίθεση με τις β - λακτάμες και τα αντιφλεγμονώδη, που είναι ιδιαίτερα δραστικά σε βακτήρια κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, μελέτες στην *E. coli* και στην *P. aeruginosa* έδειξαν ότι η CIP μπορεί να δρα το ίδιο καλά στην εκθετική και στη στατική φάση ανάπτυξης. Ωστόσο, αυτό δε φαίνεται να ισχύει πάντα στα Gram θετικά βακτήρια όπως ο *S. aureus*.

Το μοριακό βάρος της CIP είναι 331,347 g/mol. Εμπορικά διαθέσιμη είναι σε μορφή υποκίτρινης κρυσταλλικής σκόνης. Το σημείο τήξης της είναι 255 – 257 °C και η διαλυτότητά της στο νερό ίση με 30000 mg/L στους 20 °C (περίπου 0,1 σε υδροχλωρικό οξύ), ενώ είναι πρακτικά αδιάλυτη στην αιθανόλη. Το pH στα διαλύματα των χορηγούμενων δόσεων κυμαίνεται – για υδατικές συγκεντρώσεις 1,0% - από 3,5 έως 4,6.

Το ποσοστό της CIP που εξέρχεται κατόπιν από του στόματος πρόσληψης με τα ούρα με την αρχική δομή της ένωσης είναι 40 – 50%. Ο μεταβολισμός του αντιβιοτικού γίνεται στο ήπαρ, γι' αυτό και η χρήση της έχει συνδεθεί με περιστατικά παθήσεων του ήπατος που αποδείχτηκαν από αρκετά σοβαρά έως και θανατηφόρα. Ο χρόνος ημιζωής της είναι 4 h.

Στο περιβάλλον μπορεί να βρεθεί στην ατμόσφαιρα στη σωματιδιακή φάση και να απομακρυνθεί με υγρή ή ξηρή εναπόθεση. Στα επιφανειακά ύδατα, μπορεί να υποστεί φωτόλυση από το ηλιακό φως. Αν εναποτεθεί στο χώμα αναμένεται να είναι αδρανής, και δεν πρόκειται να εξαχνωθεί από υγρό χώμα, καθώς βρίσκεται στη μορφή ιόντων (τα ιόντα δεν εξαχνώνονται). Στο νερό, μπορεί να προσροφηθεί από τα αιωρούμενα στερεά και τα ιζήματα, καθώς η οι τιμές για τη σταθερά προσρόφησης ($\log K_d$) είναι αρκετά υψηλές και κυμαίνονται από 2,9 έως 4,3. Αυτός είναι και ο βασικότερος λόγος, που δεν εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα υδάτινα περιβάλλοντα. Σ' αυτό οφείλεται επίσης η εξασθένηση της αντιμικροβιακής της δραστηριότητας.

Αναφορικά με τις συγκεντρώσεις της ουσίας στην είσοδο και στην έξοδο των εγκαταστάσεων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων το εύρος που αναφέρεται είναι μεγάλο (80 – 4600 ng/L και 0 – 5600 ng/L, αντίστοιχα). Για την αποδόμησή της έχουν εφαρμοστεί διεργασίες ενεργού ιλύος, διήθηση με μεμβράνες, χλωρίωση και αντίστροφη όσμωση με αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Οι Lindberg et al. (2005) αναφέρουν ότι μεταξύ 12 αντιβιοτικών που εξέτασαν σε 5 μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων στη Σουηδία, οι Φθοροκινολόνες έφεραν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και το ποσοστό της CIP ήταν 97%. Κατόπιν εφαρμογής διεργασίας ενεργού ιλύος, το ποσοστό του αντιβιοτικού μειώθηκε στο 44%, ενώ το ποσοστό αυτού, που εντοπίστηκε στη χωνευμένη λάσπη ήταν 70%. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει, λόγω και του υψηλού συντελεστή προσρόφησης, είναι αναμενόμενο το μεγαλύτερο μέρος της ένωσης να προσροφάται στα στερεά, συγκριτικά με το κλάσμα, που αποδομείται και βιοαποδομείται στην υδατική φάση. Επιπλέον, λόγω της ιδιαιτερότητας στη δομή της – ένας βενζοϊκός δακτύλιος και ένα κυκλοπροπάνιο – ανθίσταται στην υδρόλυση. Έχει πολύ χαμηλό δείκτη βιοσυσσώρευσης. Ενδεικτικά για την *Pseudomonas putida*, π.χ. το ED_{50} ήταν περίπου 0,08 mg/L, Η χημική δομή της CIP φαίνεται στο Σχήμα 2.



Σχήμα 2. Η χημική δομή της CIP.

γ. Σουλφομεθοξαζόλη (SMX)

Πρόκειται για βασικό βακτηριοστατικό ευρείας χρήσης, μη καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Ανήκει στην ομάδα των Σουλφοναμιδών και χρησιμοποιείται για την θεραπεία φλεγμονών όπως βρογχίτιδα, προστατίτιδα και διάφορες λοιμώξεις του

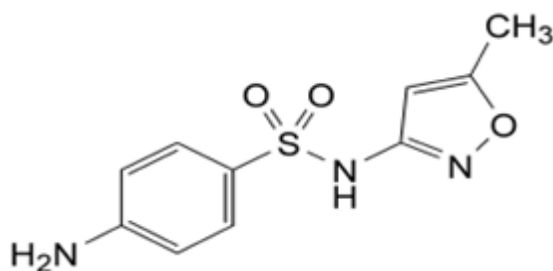
ουροποιητικού συστήματος, παρέα με την Τριμεθοπρίμη (TMP), σε μια συνδυαστική ένωση που ονομάζεται Bactrim (στοματικό αιώρημα που περιλαμβάνει 40 mg/5mL TMP και 200 mg/5mL SMX σε αναλογία 1:5). Η SMX παρεμποδίζει το σχηματισμό μιας πρόδρομης ένωσης του φολικού οξέος, του Διένυδροπτεροϊκού οξέος, μέσω καταστολής του ενζύμου dihydropteroate synthase (DHPS). Η ευρεία χρήση της, όμως, έχει περιοριστεί λόγω ανάπτυξης ανθεκτικότητας από πολλά βακτήρια αλλά και της ικανότητας που έχουν πολλοί μικροοργανισμοί να συνθέτουν από μόνοι τους το φολικό οξύ, ή πρόδρομες ενώσεις αυτού (ζωικά κύτταρα και κάποια βακτήρια). Ένα επιπλέον λόγος που η χρήση της έχει περιοριστεί είναι η σύνδεσή της με περιστατικά σοβαρών δερματικών παθήσεων (σύνδρομο Behcet's, Stevens – Johnson).

Το μοριακό βάρος της ένωσης είναι 253,276 g/mol. Στην εμπορικά διαθέσιμη μορφή της είναι λευκή/υποκίτρινη, άοσμη, κρυσταλλική σκόνη με σημείο τήξης στους 167 °C και διαλυτότητα στο νερό 610 mg/L, στους 37 °C. Όταν θερμαίνεται προς την αποσύνθεση, εκπέμπει αρκετά τοξικές αναθυμιάσεις οξειδίων του αζώτου και του θείου.

Η λήψη της SMX γίνεται από το στόμα και περίπου το 20% του αντιβιοτικού εξέρχεται με τα ούρα με την αρχική του μορφή και το 50 – 70% υπό μορφή N4 - ακετυλιωμένων ενώσεων – από τις οποίες έχει αναφερθεί ότι παρατηρείται επαναφορά στην αρχική δομή της ένωσης – και 15 – 20% σε μορφή συζευγμένων γλυκουρονιδίων. Ο μεταβολισμός της ένωσης γίνεται κυρίως στο ήπαρ, αλλά και σε άλλους ιστούς.

Ο χρόνος ημιζωής της SMX είναι 10 h. Στον αέρα μπορεί να εντοπιστεί σε σωματιδιακή μορφή ή/και υπό μορφή υδρατμών. Η ποσότητα που βρίσκεται υπό μορφή υδρατμών μπορεί να αποδομηθεί με φωτόλυση, από ρίζες υδροξυλίου, ενώ η σωματιδιακής φάσης SMX με υγρή ή ξηρή εναπόθεση. Στο χώμα μπορεί να έχει υψηλή κινητικότητα, καθώς έχει χαμηλή σταθερά απορρόφησης και όχι καλή γεινίαση με οργανικές ενώσεις και αργίλους, καθώς είναι συνήθως αρνητικά ή ουδέτερα φορτισμένη. Λόγω της χαμηλής σταθεράς Henry δεν εξατμίζεται εύκολα. Στο νερό, επίσης δεν προσροφάται στα αιωρούμενα στερεά και στα ιζήματα, ούτε αναμένεται να εξαχνώνεται. Η μορφή με την οποία εντοπίζεται στα υγρά απόβλητα είναι εκείνη των ακετυλιωμένων εκδόχων (περίπου 2,5 – 3,5 φορές περισσότερο από την αρχική δομή του αντιβιοτικού), της αρχικής δομής και των γλυκουρονιδίων.

Από την οικογένεια των Σουλφοναμιδών, η SMX είναι εκείνη που εντοπίζεται συχνότερα στα υγρά απόβλητα και ακολουθούν η Σουλφομεθαζίνη, Σουλφοπυριδίνη και Σουλφοδιαζίνη. Οι συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού στα λύματα ποικίλουν (0,07 – 0,08 μg/L στη Γαλλία, 0,09 μg/L στην Ελλάδα, ND – 0,03 μg/L στην Ιταλία, 0,02 μg/L στη Σουηδία, 0,4 – 2,0 μg/L σε Γερμανία και Ελβετία, 0,243 μg/L ενδιάμεση συγκέντρωση και 0,871 μg/L μέγιστη συγκέντρωση σε 8 μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων στον Καναδά). Η υψηλότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού, που έχει καταγραφεί είναι 5597 ng/L (Peng et al., 2008) και 6000 ng/L (Batt et al., 2006a), στην είσοδο και στην έξοδο μονάδας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, αντίστοιχα. Γενικά τα ποσοστά απομάκρυνσής της με τις συμβατικές μεθόδους επεξεργασίας είναι αρκετά χαμηλά και κυμαίνονται από – 279% -100% (Le – Minh et al., 2010). Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι μπορεί να μειωθεί αρκετά, έως και 100% με διεργασίες όπως η οζόνωση και το photo – Fenton. Η βιοσυσσώρευσή της σε υδρόβιους οργανισμούς θεωρείται χαμηλή (δείκτης βιοσυσσώρευσης BCF 3). Η χημική δομή της ένωσης φαίνεται στο Σχήμα 3 και αποτελείται από ένα βενζοϊκό δακτύλιο, ο οποίος και ευθύνεται για την αντιμικροβιακή της δράση.



Σχήμα 3. Η χημική δομή της SMX.

δ. Τριμεθοπρίμη (TMP)

Πρόκειται για ασθενή βάση και συνθετικό παράγωγο της Τριμεθοξυβενζο-πυριμιδίνης και λειτουργεί ως αναστολέας της dihydrofolate reductase, πρόδρομης ένωσης του Τετραϋδροφολικού οξέος (THF), που χρησιμοποιείται στο μονοπάτι σύνθεσης της θυμιδίνης (αμινοξύ) και παρουσιάζει καλές αντιβακτηριακές και αντι-πρωτοζωικές ιδιότητες. Συνίσταται η χρήση του παρέα με Σουλφοναμίδες, κυρίως με την SMX για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού, πνευμονοφρίτιδα και οξεία προστατίτιδα. Τα περισσότερα Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια είναι ευαίσθητα στην TMP, ωστόσο έχουν αναφερθεί περιπτώσεις που αναπτύχθηκε ανθεκτικότητα. Η ανθεκτικότητα του *S. aureus* στην TMP φαίνεται να οφείλεται περισσότερο σε γονίδιο του χρωμοσώματος, παρά σε πλασμίδιο.

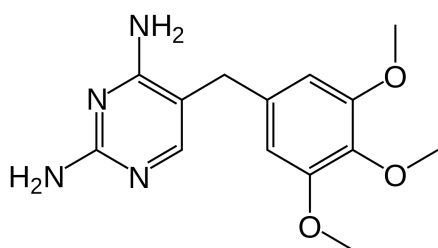
Το μοριακό του βάρος είναι 290,323 g/mol, (μπορεί να δωρίσει μέχρι 2 δεσμούς υδρογόνου και να δεχτεί 7). Όταν θερμαίνεται προς την αποσύνθεση εκπέμπει τοξικές αναθυμιάσεις οξειδίων του αζώτου. Στην εμπορικά διαθέσιμη μορφή του είναι λευκή, άοσμη, κρυσταλλική σκόνη, με σημείο τήξης τους 199 – 203 °C και διαλυτότητα στο νερό ίση με 400 mg/L, στους 25 °C.

Κατόπιν από του στόματος πρόσληψης, περίπου το 10 – 20% της TMP μεταβολίζεται, κυρίως στο συκώτι και το υπόλοιπο εξέρχεται ως έχει σε ποσοστό 50 – 60% με τα ούρα. Ο χρόνος ημιζωής του αντιβιοτικού είναι 8 – 11 h για ενήλικες με κανονική ρινική λειτουργία.

Στην ατμόσφαιρα μπορεί να βρεθεί στη σωματιδιακή φάση και να αποδομηθεί με υγρή και ξηρή εναπόθεση. Στο χώμα έχει αρκετά υψηλή κινητικότητα λόγω χαμηλής σταθεράς απορρόφησης, λόγω όμως pKa 7,12 εντοπίζεται κυρίως σε κατιοντική μορφή στα υγρά χώματα, γι' αυτό και προσροφάται περισσότερο στο χώμα, παρά σε ουδέτερα φορτισμένες ενώσεις. Δεν αναμένεται εξάχνωσή του, λόγω μη πτητικότητας των ιοντικών δομών. Ο χρόνος ημιζωής TMP ενσωματωμένης σε κοιλότητες ιζημάτων μετρήθηκε περίπου 100 και 75 d, υπό αναερόβιες και αερόβιες συνθήκες, αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η βιοαποδόμησή του στο περιβάλλον γίνεται πολύ αργά. Στο νερό, η ουδέτερη μορφή της TMP δεν αναμένεται να προσροφηθεί σε αιωρούμενα στερεά και ιζήματα, καθώς έχει χαμηλή σταθερά προσρόφησης. Ωστόσο, η κατιοντική μορφή της ένωσης αναμένεται να προσροφηθεί σε τέτοιες επιφάνειες. Η υδρόλυσή του είναι δύσκολη λόγω απουσίας λειτουργικών ομάδων που είναι επιρρεπείς στην υδρόλυση.

Ως προς τις συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού που έχουν καταγραφεί οι τιμές είναι αρκετά χαμηλές. Στους βιολογικούς καθαρισμούς η TMP εντοπίζεται σε μικρότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με την SMX. Η απομάκρυνσή της, αν και συχνά ατελής,

μπορεί να γίνει ικανοποιητική με διήθηση σε ενεργό άνθρακα. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις σε 104 και 84 δείγματα υγρών αποβλήτων από 139 πηγές στις ΗΠΑ (30 πολιτείες) κατά την περίοδο 1999 – 2000 ήταν 0,71 µg/L και 0,3 µg/L, αντίστοιχα με συχνότητα εμφάνισης 12,5 και 27,4%. Η απομάκρυνση της TMP με συμβατική βιολογική επεξεργασία έχει αναφερθεί ότι ποικίλει αρκετά και ότι είναι συχνά ατελής. Κάποιες μελέτες αναφέρουν ότι μικροοργανισμοί, που συμμετέχουν στη νιτροποίηση, μπορούν να συνεισφέρουν στην αποδόμηση της ένωσης. Η επιτυχής βιομετατροπή του συνδέεται με τον χρόνο παραμονής των στερεών (SRT) κατά τη βιολογική επεξεργασία υγρών αποβλήτων (Batt et al., 2007). Στα επιφανειακά νερά (σε 10 από τα 52 δείγματα επιφανειακών υδάτων) στη Γερμανία (1999) η μέγιστη συγκέντρωση της TMP ήταν 0.2 µg/L, ενώ δεν εντοπίστηκε καθόλου ποσότητα σε κανένα από τα 59 δείγματα υπόγειου νερού. Επίσης, αναμένεται να έχει χαμηλή βιοσυσσωρευση (BCF 3). Τα EC₅₀ για τους θαλάσσιους οργανισμούς *M. aeruginosa*, *S. capricornutum*, *R. salina* έχει αναφερθεί 112, 130 και 16 µg/L, αντίστοιχα. Στο Σχήμα 4 φαίνεται η χημική σύσταση της TMP.



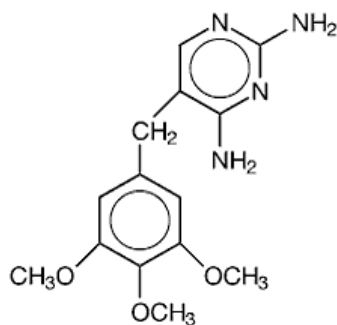
Σχήμα 4. Η χημική σύσταση της TMP.

δ. Μίγμα Σουλφομεθοξαζόλης & Τριμεθοπρίμης (SMX/TMP)

Συνδυασμός αντιβιοτικών με ευρεία χρήση κατά Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων με αποτελεσματικότητα στη θεραπεία λοιμώξεων όπως πνευμονία σε ασθενείς με AIDS, μηνιγγίτιδα, οστεομυελίτιδα, βακτηριαίμια και ενδοκαρδίτιδα λόγω βακτηριακών παραγόντων. Έχει, ωστόσο, συνδεθεί με περιστατικά ηπατικής δυσλειτουργίας καθώς και σοβαρών δερματοπαθειών όπως το σύνδρομο Stevens – Johnson.

Το μοριακό βάρος της ένωσης είναι 543,599 g/mol, ίσο δηλαδή με το άθροισμα των μοριακών βαρών των ενώσεων που τη συνθέτουν. Κατόπιν από του στόματος πρόσληψης η TMP απορροφάται πιο γρήγορα από την SMX. Σε ενήλικες με φυσιολογική ρινική λειτουργία, περίπου 50 – 60% της TMP και 45 – 70% της SMX εξέρχονται με τα ούρα εντός 24 h. Από την TMP, περίπου το 80% που εξέρχεται είναι στην αρχική δομή του αντιβιοτικού, ενώ στην SMX το 20%. Ο χρόνος ημιζωής του SMX/TMP ισούται με το χρόνο ημιζωής του κάθε αντιβιοτικού (10 h για την SMX και 11 h για την TMP).

Η ανθεκτικότητα που αναπτύσσεται στο SMX/TMP είναι χαμηλότερη συγκριτικά με την ανθεκτικότητα σε καθέναν από τους δύο παράγοντες που το αποτελούν. Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε Gram αρνητικά βακτήρια συνδέεται συχνά με την ύπαρξη ενός πλασμιδίου που κωδικοποιεί την τροποποιημένη dihydrofolate reductase. Η περιβαλλοντική τύχη του SMX/TMP συνάδει με την τύχη του κάθε αντιβιοτικού που το αποτελεί. Στο Σχήμα 5 φαίνεται η χημική δομή του SMX/TMP όπως χορηγείται στο εμπόριο.



Σχήμα 5. Η χημική σύσταση του SMX/TMP.

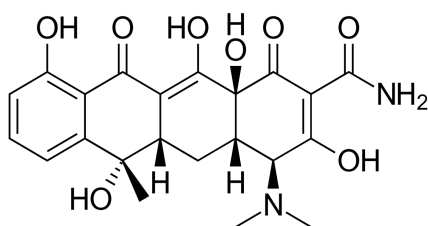
ε. Τετρακυκλίνη (TET)

Είναι ένα ευρέως φάσματος, ημισυνθετικό αντιβιοτικό που προκύπτει από τη Χλωροτετρακυκλίνη – ένωση που απομονώνεται από τον Ακτινομύκητα *Streptomyces aureofaciens* – και ανήκει στην ομάδα των TC. Στα βακτήρια, η TET προσκολλάται στη ριβοσωμική υπομονάδα 30S και παρεμποδίζει την ένωση του aminoacyl – tRNA με το σύμπλοκο mRNA – ριβόσωμα με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η πρωτεϊνοσύνθεση.

Το μοριακό βάρος της TET είναι 444,44 g/mol. Στην εμπορική της μορφή είναι λαμπερή κίτρινη και άοσμη, κρυσταλλική σκόνη, με σημείο τήξης τους 172,5 °C και διαλυτότητά στο νερό 231 mg/L, στους 25 °C. Όταν θερμαίνεται προς την αποσύνθεση, εκπέμπει τοξικές αναθυμιάσεις οξειδίων του αζώτου. Το pH της κυμαίνεται από 3,0 έως 7,0 (σε κορεσμένο υδατικό διάλυμα). Κατόπιν από του στόματος πρόσληψης δόσης 0,5 g TET, 20 – 60% εξέρχεται με τα ούρα εντός 24 h. Η ένωση δε μεταβολίζεται, ο χρόνος ημιζωής της είναι 3 – 12 h.

Έχει αναφερθεί ότι πάνω από 2500 tn και 1800 tn TET καταναλώνονται ετησίως για κτηνιατρικούς λόγους σε Ευρώπη και Αμερική, αντίστοιχα. Μεταξύ των αντιβιοτικών της ομάδας των TC, που ανιχνεύτηκαν σε διάφορες μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, η TET φέρει τις υψηλότερες τιμές και οι συγκεντρώσεις της κυμαίνονται από 0 έως 1300 ng/L στην είσοδο και από 0 μέχρι 1420 ng/L στην έξοδο. Η αποδόμησή της δεν είναι αρκετά αποτελεσματική με τις συμβατικές μεθόδους επεξεργασίας και αναφέρεται ότι δεν επηρεάζεται από αλλαγές στο χρόνο παραμονής στα συστήματα επεξεργασίας ενεργού ιλύος. Στο μεγαλύτερο ποσοστό της, η ένωση αναμένεται να προσροφηθεί στα στερεά, παρά να αποδομηθεί στην υδατική φάση, λόγω του σχετικά υψηλού log K_d. Συγκεκριμένα, η προσρόφηση στα στερεά φαίνεται να είναι ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσής της στην ενεργό ιλύ. Η αλληλεπίδραση της TET με ενώσεις, όπως τα χουμικά οξέα – που εντοπίζονται σε υψηλά ποσοστά στους βιολογικούς καθαρισμούς – τροποποιεί τις επιφανειακές ιδιότητές της, καθώς και τις ενεργές θέσεις του μορίου για προσρόφηση και άλλου τύπου αντιδράσεις. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι το pH και η θερμοκρασία μπορεί να ευνοήσουν την υδρόλυση της ένωσης, κυρίως όμως σε περιοχές με θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 35 °C. Αναφορικά με τα επίπεδα τοξικότητας της TET, ο EC₅₀ για κάποιους θαλάσσιους οργανισμούς, όπως η *D. magna*, *M. aeruginosa* και το *V. fischeri* είναι 340 (2 μέρες), 0,09 (7 μέρες) και 0,0251 mg/L, αντίστοιχα (1 μέρα). Η χημική δομή της TET φαίνεται στο Σχήμα 6 και βλέπουμε ότι αποτελείται από τη βασική ραχοκοκαλιά hydrophacene, που περιέχει 4 δακτυλίους και διαφορετικούς υποκαταστάτες στην πέμπτη, έκτη και έβδομη θέση της

ραχοκοκαλιάς, σχηματίζοντας μια σειρά αναλόγων. Η δομή των δακτυλίων επιτρέπει το σχηματισμό συμπλόκων με διπλά κατιόντα, όπως σιδήρου και μαγνησίου.



Σχήμα 6. Η χημική δομή της TET

1.9 Μέθοδοι προσδιορισμού της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά

Οι πρώτες μέθοδοι για την εκτίμηση της επίδρασης των αντιβιοτικών στα βακτήρια, περιελάμβαναν τη χρήση φρεατίων, τα οποία διανοίγονταν μέσα σε τριβλία που περιείχαν άγαρ. Το αντιβιοτικό εισαγόταν με τη μορφή διαλύματος στο φρέαρ και αφηνόταν να διαχυθεί με σκοπό να αναστείλει την ανάπτυξη του βακτηρίου που είχε τοποθετηθεί περιμετρικά του φρεατίου. Έκτοτε η μεθοδολογία έχει διαφοροποιηθεί αρκετά και ιδιαίτερη μνεία δίνεται στην προσπάθεια ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων. Αναφέρουμε τις σημαντικότερες μεθόδους προσδιορισμού της ανθεκτικότητας.

α. Μέθοδος διάχυσης δίσκων

Το 1943, οι Foster & Woodruff ανέπτυξαν μια μέθοδο, εναλλακτική των φρεατίων, χρησιμοποιώντας χάρτινες ταινίες εμποτισμένες με αντιβιοτικά ως πηγή διάχυσης. Έτσι, τα διαλύματα αντιβιοτικών σε βυθίσματα, άγαρ ή κυλίνδρους αντικαθίστανται από τέτοια χάρτινα δισκία. Τα αποτελέσματα αυτών των tests όμως ερμηνεύονταν αυθαίρετα: η παρουσία μιας ζώνης ανάσχεσης σήμαινε ευαισθησία, ενώ η απουσία της ζώνης ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Υπάρχουν όμως και άλλες παράμετροι που μπορεί να επηρεάζουν τις ζώνες ανάσχεσης εκτός από την ευαισθησία των βακτηρίων. Τα αποτελέσματα που εξάγονταν ήταν κυρίως ποιοτικά.

Το 1960, οι Bauer & Kirby εισήγαγαν τη δοκιμασία με δύο δίσκους εμποτισμένους τον ένα με υψηλή και τον άλλο με χαμηλή συγκέντρωση αντιβιοτικού. Τα αποτελέσματα της μεθόδου ερμηνεύτηκαν αρχικά ως εξής: αν αναπτύσσονταν ζώνες ανάσχεσης γύρω από κάθε δίσκο, τότε ο οργανισμός θεωρείτο ευαίσθητος στο αντιβιοτικό. Μια ζώνη αναστολής γύρω από το δίσκο υψηλής συγκέντρωσης σήμαινε ενδιάμεση ανθεκτικότητα, ενώ η απουσία ζωνών ανάσχεσης γύρω από τους δίσκους σήμαινε ανθεκτικότητα.

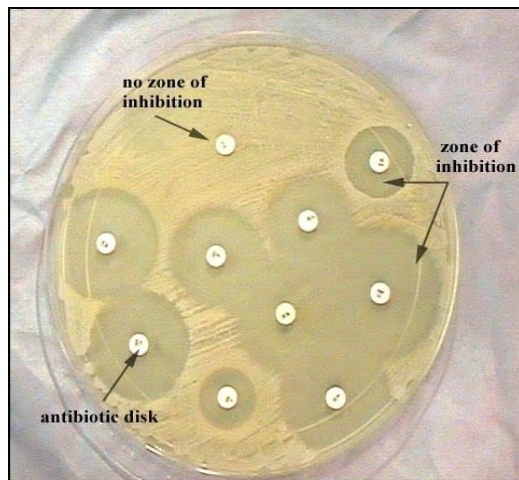
Γρήγορα η μέθοδος διάχυσης των δίσκων εφαρμόστηκε σε πολλά εργαστήρια λόγω της απλότητάς της. Η έλλειψη όμως τυποποιημένων διαδικασιών οδηγούσε σε μη αναπαραγώγιμα αποτελέσματα. Η πρώτη απόπειρα για τυποποιημένη τεχνική πάνω στη μέθοδο αυτή δημοσιεύτηκε από τον Ericsson το 1954 και ονομάστηκε μέθοδος του χάρτινου δίσκου για τη μέτρηση ευαισθησίας σε βακτήρια (Paper Disc Method, PDM). Η χρήση αυστηρά επικαλυμμένων δίσκων με αντιβιοτικό (PDM_ASD) σε συνδυασμό με

ένα ειδικό μέσο ανάπτυξης για το test διάχυσης (PDM_ASM) με συγκεκριμένα επίπεδα θυμίνης, θυμιδίνης και κατιόντων και η χρήση μιας καλά καθορισμένης διαδικασίας με προέγχυση και επώαση, αποτέλεσε τη ραχοκοκαλιά αυτής της μεθόδου. Τότε ήταν η πρώτη φορά που η διάμετρος της ζώνης αναστολής συσχετίστηκε με τιμές ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) του άγαρ διάχυσης, με την υπόθεση ότι υπήρχε μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ των διαμέτρων των ζωνών ανασχεσης και των τιμών της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης των αντιβιοτικών.

Το 1961, οι Ericsson & Sherris σε συνεργασία με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας έλαβαν την πρωτοβουλία να προσδιορίσουν και προτυποποιήσουν τη δοκιμασία ελέγχου της ευαισθησίας σε παγκόσμιο επίπεδο. Στην προσπάθεια αυτή συνέβαλαν αρκετοί επιστήμονες από τις ΗΠΑ και την Ιαπωνία και η κίνηση θεωρήθηκε ως μνημειώδης προσπάθεια να αποκτηθεί παγκόσμια συνείδηση ως προς την τυποποίηση των δοκιμών ευαισθησίας τόσο με τον προσδιορισμό της MIC όσο και με τη μέθοδο των δίσκων διάχυσης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δημοσιεύτηκαν στο περιοδικό *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, με τον τίτλο “Antibiotic sensitivity testing, report from an International Collaborative Study, ICS” (Ericsson & Shems, 1971). Η μελέτη εμπλουτίστηκε από το Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), των ΗΠΑ.

Η γενική αρχή αυτής της μεθόδου υπαγόρευε ότι όταν ένας δίσκος αντιβιοτικού έρθει σε επαφή με μια επιφάνεια άγαρ στην οποία έχει ενοφθαλμιστεί μια ποσότητα ενός βακτηρίου, τότε τα μόρια του αντιβιοτικού διαχέονται από το δίσκο στο άγαρ, δημιουργώντας μια δυναμικά εναλλασσόμενη κλιμάκωση συγκεντρώσεων αντιβιοτικού. Την ίδια στιγμή τα κύτταρα του βακτηρίου αρχίζουν να διαιρούνται και να σχηματίζουν μια κρίσιμη μάζα. Η άκρη της ζώνης αναστολής σχηματοποιείται τη στιγμή που η συγκέντρωση του αντιβιοτικού είναι ικανή να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό της κρίσιμης μάζας. Ο χρόνος για να συμβεί αυτό στα περισσότερα ταχέως αναπτυσσόμενα αερόβια και δυνητικά αναερόβια βακτήρια ποικίλλει μεταξύ 3 και 6 ωρών και δε θα πρέπει να συγχέεται με το χρόνο επώασης που απαιτείται για να επιτευχθεί ανάπτυξη ορατή δια γυμνού οφθαλμού.

Η μέθοδος ωστόσο έχει αρκετά μειονεκτήματα. Η διάχυση του αντιβιοτικού είναι πολυπαραγοντική επηρεάζεται από τις μοριακές ιδιότητες της ένωσης (βάρος, ιοντικό φορτίο, διαλυτότητα) αλλά και το άγαρ και τις συνθήκες επώασης, τη θρεπτική ικανότητα του υλικού ανάπτυξης, την πυκνότητα ενοφθαλμισμού και τη θερμοκρασία επώασης. Στην εφαρμογή δε σε πραγματικούς ασθενείς, θα πρέπει να συνυπολογιστούν και οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες του αντιβιοτικού, όπως η απορρόφησή του, η αποικοδόμησή του και η πρόσδεσή του με πρωτεΐνες αλλά και οι φαρμακοδυναμικές ιδιότητες, αν είναι δηλαδή βακτηριοστατικό ή βακτηριοκτόνο. Πέρα από αυτά, τα αποτελέσματα είναι επίσης μη ποσοτικά και η διαδικασία του πειράματος χρονοβόρα.



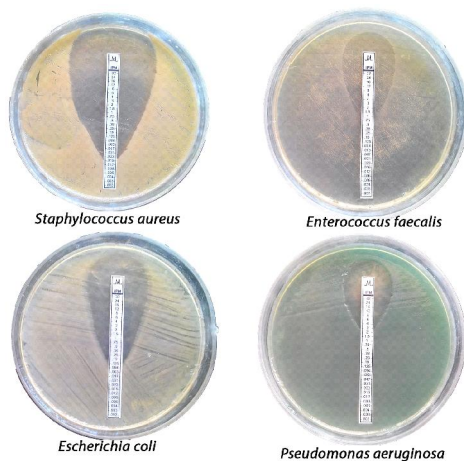
Εικόνα 1. Σκαρίφημα της μεθόδου διάχυσης δίσκων.

β. e – test

Η δοκιμασία αυτή είναι βασισμένη στη χρήση μιας σταθερής προκαθορισμένης κλιμάκωσης συγκέντρωσης αντιβιοτικού με σκοπό να παράγει ακριβείς τιμές MIC. Μια πλαστική ταινία που περιέχει την κλίμακα των συγκεντρώσεων τοποθετείται στην επιφάνεια του άγαρ, αφού έχει προηγηθεί επίστρωση του τελευταίου με τον προς μελέτη μικροοργανισμό. Κατά μήκος της ταινίας αρχίζει να σχηματίζεται μια κλιμάκωση των συγκεντρώσεων. Η σταθερότητα αυτής της κλιμάκωσης διατηρείται για 20 ώρες.

Το e – test πλεονεκτεί έναντι της μεθόδου των δίσκων λόγω απλότητας στην εφαρμογή του, καθώς επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα εύρος διαφορετικών στελεχών. Σε τριβλίο διάστασης 150 mm μπορούν να τοποθετηθούν έως 6 ταινίες και σε μικρότερο τριβλίο (90 mm), 1 με 2 ταινίες. Η πλευρά της ταινίας που περιέχει το αντιβιοτικό θα πρέπει να τοποθετηθεί σε επαφή με την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού. Οι συνθήκες επώασης σε αυτή τη μέθοδο είναι ίδιες με τη μέθοδο των δίσκων και ανάλογες με τις ανάγκες του μικροοργανισμού. Μετά την επώαση, μια παραβολική ζώνη ανάσχεσης εμφανίζεται κατά μήκος της ταινίας και η MIC προσδιορίζεται στο σημείο όπου το όριο ανάπτυξης – αναστολής του οργανισμού τέμνει την ταινία.

Τέλος, σε κάποιες περιπτώσεις στελεχών, όπως ο *S. aureus* και οι *Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE)* ελέγχονται εκτός από τη μέθοδο των δίσκων και με το e – test προκειμένου να προσδιοριστεί η ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά.



Εικόνα 2. Εφαρμογή του e-test σε διάφορα βακτήρια.

γ. Μέθοδος μικροαραίωσης

Με τον όρο ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού που μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού. Ο προσδιορισμός της μπορεί να γίνει σε στερεό (άγαρ) ή υγρό (ζωμός) μέσο ανάπτυξης και βοηθά έναν γιατρό να προβλέψει τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού που απαιτείται για να αναστείλει την ανάπτυξη ενός παθογόνου. Πρόκειται για ποσοτική μέθοδο και απαιτεί υψηλά επίπεδα ακρίβειας και επαναληψιμότητας.

Παραδοσιακά ο προσδιορισμός της MIC γίνεται με τη μέθοδο της αραίωσης, κατά την οποία διαδοχικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού διαλύονται σε υγρό θρεπτικό υλικό, το οποίο βρίσκεται σε βυθίσματα πλακών είτε σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Η συγκέντρωση του αντιβιοτικού ποικίλλει ανάλογα με τον μικροοργανισμό και το σημείο της μόλυνσης. Κάθε βύθισμα (ή σωλήνας) περιέχει μια διαφορετική συγκέντρωση αντιβιοτικού. Μετά από κατάλληλη επώαση, η μικρότερη συγκέντρωση για την οποία δεν παρατηρείται ανάπτυξη με γυμνό οφθαλμό, θεωρείται ως MIC. Πλήρες πρωτόκολλο της μεθόδου υπάρχει στο Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005) και τα βήματα περιγράφονται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος της εργασίας.

Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ο ταυτόχρονος έλεγχος μεγάλου αριθμού στελεχών με τη χρήση των πλακών πιλοδότησης. Πολλές συνθήκες μπορούν να ποικίλουν ανάλογα με τον ερευνητή, όπως η σύσταση των θρεπτικών υλικών, ο χρόνος, επώασης, η θερμοκρασία, το pH και αυτές οι διαφοροποιήσεις μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικά αποτελέσματα. Ένα πρόβλημα της μεθόδου αποτελεί η συσχέτιση μεταξύ της *in vitro* δραστηριότητας του αντιμικροβιακού παράγοντα ενάντια στο παθογόνο στέλεχος και της *in vivo* χορήγησής του στον ασθενή. Μπορεί ο αντιμικροβιακός παράγοντας να δείχνει φτωχή *in vitro* δραστηριότητα έναντι του παθογόνου και να έχει καλά κλινικά αποτελέσματα όταν χορηγείται στον ασθενή ή το αντίστροφο.

1.10 Μικροοργανισμοί ενδιαφέροντος (χαρακτηριστικά και μεταβολικά μονοπάτια)

Τα βακτήρια είναι οργανισμοί με μέγεθος μεγαλύτερο ή ίσο με 0,45 μm – αν και πολλά αυτόχθονα είδη φαίνεται να είναι πολύ μικρότερα σε μέγεθος σε *in situ* μετρήσεις συγκριτικά με την καλλιέργειά τους στα εργαστήρια – και αποτελούν μια από τις κυρίαρχες μορφές ζωής στον πλανήτη. Περιλαμβάνουν πολλά διαφορετικά είδη και υποείδη, τα οποία παρουσιάζουν ένα εξαιρετικά μεγάλο εύρος ως προς τις συνθήκες διαβίωσης. Αποικίες διαφόρων ειδών αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας πολλών ζώων και του ανθρώπου συμμετέχοντας σε σημαντικές λειτουργίες για τους οργανισμούς. Η συμβίωση βακτηρίων και φυτών παρέχει στα δεύτερα προστασία από διάφορους παράγοντες και στα πρώτα τις απαραίτητες επιφάνειες και τα απαραίτητα θρεπτικά για την επιβίωσή τους. Στα οικοσυστήματα τα δίκτυα φυτών, βακτηρίων και μυκήτων ενσαρκώνουν τη μεγάλη ορχήστρα της σύνθεσης και της αποσύνθεσης των βιοτικών διεργασιών της ζωής.

Στα υδάτινα οικοσυστήματα και στο χώμα, όπου πολλές φορές η τροφή και η ενέργεια δεν είναι εξασφαλισμένα, έχουν εντοπιστεί διάφορα στελέχη, αυτόχθονα και αλλόχθονα, τα οποία παρουσιάζουν μια ποικιλία στις μεταβολικές τους δραστηριότητες. Η επιβίωση των αλλόχθονων βακτηρίων είναι συνάρτηση βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων. Οι βιοτικοί παράγοντες, που επηρεάζουν τη διαβίωση των αλλόχθονων οργανισμών είναι πρωτόζωα, φάγοι, βακτήρια, ιοί και μύκητες. Οι ρυθμοί και οι προτιμήσεις στην κατανάλωση των αλλόχθονων βακτηρίων φαίνεται να ποικίλουν αρκετά. Έχει παρατηρηθεί σε υδάτινα συστήματα, τα είδη *E. faecalis* και *Staphylococci* καταναλώνονται με πολύ βραδύτερους ρυθμούς σε σχέση με Gram αρνητικά βακτήρια, όπως η *E. coli*. Αυτή η παρατήρηση αποδίδεται από πολλούς στη δυσκολία πέψης του κυτταρικού τοιχώματος των Gram (+), καθώς και σε εγγενή χαρακτηριστικά των ειδών. Στους αβιοτικούς παράγοντες που επηρεάζουν την τύχη των αλλόχθονων βακτηρίων στα νέα περιβάλλοντα συμπεριλαμβάνονται η αλατότητα, τα θρεπτικά, η θερμοκρασία, η οσμωτική πίεση και το ορατό φως.

Τα βακτήρια που μελετήσαμε στην παρούσα διατριβή είναι η *E. coli*, οι *Enterococci* και οι *Staphylococci*.

1.10.1 *E. coli*

Ο πρώτος που περιέγραψε αυτό το είδος ήταν ο λόρδος Theodor Escherich, το 1885 στη Γερμανία, του οποίου το όνομα φέρει. Λίγα χρόνια αργότερα, το 1897 στην Ιαπωνία, ο βακτηριολόγος Kiyoshi Shiga απομόνωσε ένα βακτήριο το οποίο ομοιάζει φαινοτυπικά με την *E. coli* και προκαλεί δυσεντερία, που το ονόμασε *Shigella dysenteriae*. Αρχικά, τα δύο είδη ήταν δύσκολο να διαχωριστούν, ωστόσο σήμερα γνωρίζουμε ότι διαφοροποιούνται ως προς τη δυνατότητα αυθόρμητης κίνησης, μεταβολικού προφίλ και κλινικών συμπτωμάτων.

Η *E. coli* και συγκεκριμένα το στέλεχος άγριου τύπου *k-12*, αποτελεί σήμερα το πιο πολυμελετημένο βακτήριο στη μοριακή βιολογία και στη γενετική, παρέα με τη φρουτόμυγα (*Drosophila*) και τον ποντικό του αγρού. Πρόκειται για Gram αρνητικό, ραβδόμορφο και προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο που αποικίζει τον εντερικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων και των ανθρώπων και αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της

φυσιολογικής χλωρίδας τους. Άλλες περιοχές που μπορεί να εντοπιστεί είναι η περιγεννητική περιοχή, το στόμιο της ουρήθρας και του κόλπου. Στο περιβάλλον εισέρχεται με τα κόπρανα στα βοθρολύματα και μπορεί να προκαλέσει μόλυνση στα τρόφιμα και στο πόσιμο νερό. Έχει ανευρεθεί επίσης σε τρόφιμα όπως το γάλα, το γιαούρτι, τυριά και φυτικά προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης, όπως οι ελιές και τα τουρσιά. Αρχικά, η *E. coli* θεωρούνταν μη παθογόνος, συμβιωτικός οργανισμός. Ωστόσο, μετά την εκδήλωση σοβαρών εξάρσεων παιδικής διάρροιας τη δεκαετία του 40', αποδείχθηκε πως υπάρχουν και παθογόνα στελέχη. Σήμερα γνωρίζουμε ότι η *E. coli* είναι δυνητικά ή ευκαιριακά παθογόνο μικρόβιο και μπορεί να προκαλέσει στον άνθρωπο μεγάλη ποικιλία εντερικών και εξωεντερικών λοιμώξεων όπως γαστρεντερίτιδα, πνευμονία, μηνιγγίτιδα στα νεογνά και ενδοκαρδίτιδα, μεταξύ άλλων. Μεταξύ των παθογόνων στελεχών συγκαταλέγεται το EHEC (*Enterohemorrhagic E. coli*, O157:H7) που προκαλεί την αιμορραγική κολίτιδα (HC) και το επικίνδυνο για τη ζωή αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS). Επίσης, τα σύμφυτα, εντερο – διεισδυτικά *E. coli* (AIEC) έχουν συνδεθεί με τις χρόνιες εντερικές φλεγμονές της νόσου Crohn (Darfeuille-Michaud, 2002).

Στη Δημόσια υγεία η *E. coli* χρησιμεύει σαν μικροοργανισμός – δείκτης για τον έλεγχο μόλυνσης του πόσιμου νερού και των τροφίμων από κόπρανα, καθώς και στα εργαστήρια τροφίμων (κονσερβοποιεία, ψυκτικοί χώροι, συσκευαστήρια κ.α.) ως δείκτης υγειονομικού ενδιαφέροντος.

Οι αναφορές σχετικά με στελέχη *E. coli* που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είναι πολλές. Συγκεκριμένα έχουν εντοπιστεί στελέχη που είναι ανθεκτικά σε μεγάλη ποικιλία αντιβιοτικών μεταξύ των οποίων οι β – λακτάμες, οι Κινολόνες και Φθοροκινολόνες και οι Καρβαπενέμες.

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας έχει συνδεθεί από πολλούς ερευνητές με την απόκτηση ιογενών παραγόντων διαμέσου των πλασμιδίων, τρανσποσονίων, βακτηριοφάγων ή άλλων μολυσματικών παραγόντων. Συνέπεια αυτών είναι η συνεχώς αυξανόμενη ποικιλομορφία σε παθογόνα στελέχη.

1.10.2 *Enterococci*

Με την ανακάλυψη της Πενικιλίνης, αντιμετωπίστηκαν με επιτυχία λοιμώξεις από πολλά παθογόνα, μεταξύ των οποίων και οι Στρεπτόκοκκοι. Ένα υποείδος όμως αυτών, που αργότερα ονομάστηκαν *Enterococci*, παρουσίαζαν ανθεκτικότητα στην Πενικιλίνη. Οι *Enterococci* χαρακτηρίζονται ως Gram θετικά, μη σπορογόνα βακτήρια και αποτελούν σημαντικό μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα και ευκαιριακά του κόλπου, του δέρματος αλλά και του στοματοφάρυγγα. Ο γαστρεντερικός σωλήνας είναι η κύρια ανατομική περιοχή όπου οι *Enterococci* συμβιώνουν με άλλους μικροοργανισμούς χωρίς να προκαλούν λοιμώξεις. Το γένος των *Enterococci* περιλαμβάνει δώδεκα είδη μεταξύ των οποίων τα *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* και *E. avium*, τα οποία εντοπίζονται με τη μεγαλύτερη συχνότητα σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Θεωρούνται οπορτουνιστικά παθογόνα, που προκαλούν λοιμώξεις του ουροποιητικού και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος και υποξεία ενδοκαρδίτιδα, ενώ αναφέρονται και συχνά ως σημαντικοί δια – νοσοκομειακοί λοιμογόνοι παράγοντες. Στο περιβάλλον μπορεί να εντοπιστούν στο γάλα μέσω της μεταφοράς τους από τα κόπρανα των ζώων στη στρωμνή, με τελικό αποδέκτη το γάλα. Επιπλέον, είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί στη θέρμανση και μπορούν να επιβιώσουν στο παστεριωμένο γάλα, καθώς επίσης ανευρίσκονται σε όξινα τρόφιμα.

Αν και είναι καλοί δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης για επιφανειακά νερά δεν έχει μελετηθεί – στην έκταση που έχει γίνει για την *E. coli* – η τύχη αλόχθονων βακτηρίων σε διάφορα υδατικά συστήματα. Ο *E. faecalis* έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να επιβιώσει σε υδάτινα περιβάλλοντα για περισσότερο χρόνο, συγκριτικά με άλλους *Enterococci*, γι' αυτό και καθίσταται πιο κατάλληλος σαν δείκτης.

Η ανθεκτικότητα κυρίως για τα είδη *E. faecalis* και *E. fecium* σε μεγάλη ποικιλία αντιβιοτικών – Αμινογλυκοσίδες, β – λακτάμες, Κεφαλοσπορίνες – έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές μέχρι σήμερα. Η αντιμετώπιση νόσων όπως η βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα κατέστη επιτυχής μέσω της συνεργιστικής εφαρμογής Αμινογλυκοσίδης – Πενικιλίνης, που αύξησε τα ποσοστά από θεραπείας από 40 σε 88%. Ο συνδυασμός αυτών των αντιβιοτικών χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα για τη θεραπεία επίμονων λοιμώξεων από *Enterococci*. Πέρα από την Πενικιλίνη πολλά στελέχη εμφανίζουν ανθεκτικότητα και στην TET. Ως προς την TMP και την SMX, οι *Enterococci* παρουσιάζουν ευαισθησία σε *in vitro* δοκιμές, ωστόσο έχει αναφερθεί ότι η εφαρμογή των παραγόντων αυτών δεν είναι ιδιαίτερα επιτυχής σε *in vivo* διεργασίες, λόγω της ικανότητας των *Enterococci* να χρησιμοποιούν εξωγενείς πηγές φολικών. Αξίζει να αναφερθεί ότι παρόλο που στους ελέγχους ρουτίνας - συγκεντρώσεις εναιωρήματος 10^5 κύτταρα/ml – πολλά στελέχη *Enterococci* δείχνουν ευαισθησία σε αντιβιοτικά, σε εφαρμογή μεγαλύτερης πυκνότητας κυττάρων, η αυξημένη παραγωγή ενζύμων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

1.10.3 *Staphylococci*

Το γένος *Staphylococcus* ανήκει στην οικογένεια των *Micrococcaceae* και περιλαμβάνει τα είδη *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* και *Staphylococcus saprophyticus*. Ο *S. epidermidis* και ο *S. saprophyticus* διακρίνονται από τον *S. aureus*, από την ανικανότητά τους να παράγουν την κοαγκουλάση (θερμοανθεκτική ενδονουκλεάση) και να ζυμώνουν τη μαννιτόλη.

Ο *S. aureus* παρατηρήθηκε πρώτη φορά το 1880. Είναι Gram θετικό, αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο και μπορεί να αναπτυχθεί σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών υλικών και θερμοκρασιών (ευνοϊκή θερμοκρασία 35 – 37 °C). Αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του βλεννογόνου της πρόσθιας ρινικής κοιλότητας και του φάρυγγα και πολλές φορές αποικίζει παροδικά το παχύ έντερο. Από τα σημεία που εντοπίζεται ως φυσιολογική χλωρίδα διασπείρεται και επιβιώνει στο δέρμα, στο τριχωτό της κεφαλής και στο περίνεο. Λόγω της αντοχής του στην ξηρασία βρίσκεται και διατηρείται ζωντανός στο ρουχισμό και στο σώμα των ανθρώπων φορέων, καθώς και περιβάλλον αυτών (σκόνη δωματίου, τρόφιμα). Θεωρείται δυνητικά παθογόνο και μπορεί να προσβάλλει όλα τα όργανα και τους ιστούς, προκαλεί λοιμώξεις στο δέρμα (τοξική επιδερμική νεκρόλυση) και τροφική δηλητηρίαση, με συνεπαγόμενες βλάβες στο ΚΝΣ και στην καρδιά. Επιπλέον, μπορεί να αναπτυχθεί σε τρόφιμα όπως κρέατα, σαλάμια και λουκάνικα και να εκκρίνει μια ανθεκτική στη θερμοκρασία εντεροτοξίνη η οποία μπορεί να προκαλέσει τροφικές δηλητηριάσεις.

Το 1940, πριν την εφαρμογή της Πενικιλίνης για τη θεραπεία από *S. aureus*, η θνησιμότητα από το βακτήριο ήταν περίπου 80%. Δύο χρόνια μετά, παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στέλεχος του βακτηρίου ανθεκτικό στην Πενικιλίνη. Από το 1960, περίπου το 80% των αποικιών *S. aureus* είναι ανθεκτικές στην Πενικιλίνη. Το 1961, 2 χρόνια μετά την ανακάλυψη την Μεθικιλίνης, ένα στέλεχος *S. aureus* εμφάνισε ανθεκτικότητα στο

αντιβιοτικό, χάρη στην ανάπτυξη του γονιδίου *mecA*. Το γονίδιο αυτό φαίνεται ότι κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη (PBP2') βάρους 78 kDa η οποία δημιουργεί δεσμούς με την Πενικιλίνη και προκαλεί την ανθεκτικότητα στη Μεθικιλίνη και σε άλλες β – λακτάμες. Έκτοτε, πολλές διαφορετικές εκδοχές του ανθεκτικού στην Μεθικιλίνη *S. aureus* (HA – MRSA) έχουν διασκορπιστεί σε παγκόσμια κλίμακα.

1.11 Δημιουργία ανθεκτικότητας και γονίδια

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε ακραίες μεταβολές του περιβάλλοντος, μεταξύ αυτών και σε παράγοντες όπως τα αντιβιοτικά, έχει συνδεθεί όπως αναφέραμε με συγκεκριμένα γονίδια, πρωτεΐνες και ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς.

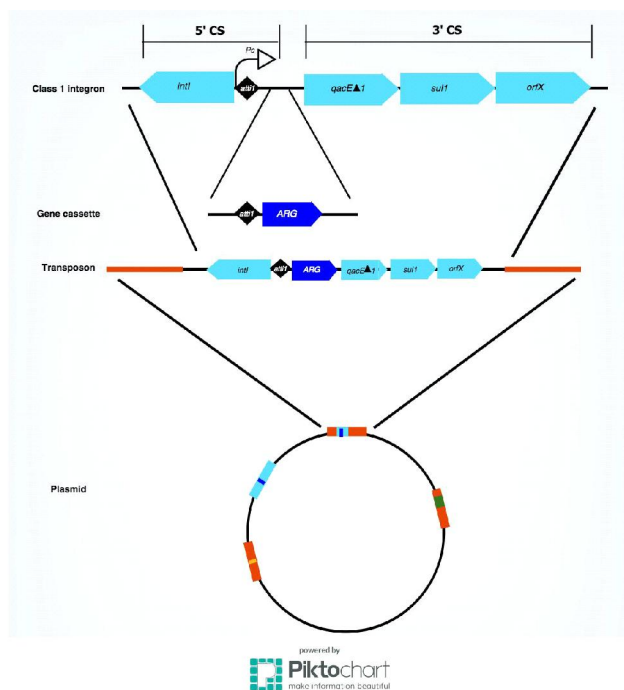
1.11.1 Πλασμίδια και ιντεγκρόνια

Τα πλασμίδια και τα ιντεγκρόνια είναι για πολλούς ερευνητές οι κυρίαρχες δομές που ευνοούν τη μετάδοση των ARG και ως εκ τούτου η απομόνωση και μελέτη τους αποτελεί βασική μεθοδολογία για την εξήγηση και αντιμετώπιση του φαινομένου της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Τέτοιες δομές έχει δείχτει ότι συμμετέχουν στη δημιουργία κλινικών και περιβαλλοντικών ARB.

Τα **πλασμίδια** είναι κυκλικά μόρια DNA που μπορεί να εντοπιστούν εντός του κυττάρου, όπου συμμετέχουν στο μεταβολισμό του, αλλά και αυτόνομα στο περιβάλλον, όπου μπορεί να διατηρούνται αμετάβλητα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Γενικότερα μπορούμε να πούμε ότι συνεισφέρουν στη συσσώρευση και μεταφορά γονιδίων, τα οποία μπορεί να μην είναι αναγκαία για την επιβίωση του κυττάρου, αλλά να προσφέρουν κάποια πλεονεκτήματα σε αυτό υπό διάφορες περιβαλλοντικές πιέσεις. Η πρώτη καταγεγραμμένη μεταφορά πλασμιδιακού ARG έγινε το 1959 από τους Ochiai et al., οι οποίοι μετέφεραν ανθεκτικότητα από τη *Shigella* στην *E. coli*. Η πιθανότητα οι μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων να είναι πηγή πλασμιδίων που εμπεριέχουν ARG άρχισε να μελετάται στις αρχές της δεκαετίας του '80. Οι Altherr & Kasweck έδειξαν ότι πραγματοποιήθηκε σύζευξη με μεταφορά πλασμιδιακού υλικού με ARGs σε ανεπεξέργαστο απόβλητο, αλλά όχι στην εκροή. Οι Mach & Grimes (1982) από την άλλη πέτυχαν τη μεταφορά πλασμιδιακών MRGs (Multidrug Resistance Genes) από ανθεκτικά (σε AMP, Χλωραμφενικόλη, Στρεπτομυκίνη, Σουλφαδιαζίνη και TET) στελέχη *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis* και *E. coli* που είχαν απομονώσει από υγρά απόβλητα σε ευαίσθητα στελέχη *E. coli* και *Shigella sonnei*, απουσία αντιβιοτικών.

Αν τα πλασμίδια μπορούν να μεταφέρουν κασέτες ARGs σε ένα κύτταρο, αυτό το επιτυγχάνουν χάρη στα **ιντεγκρόνια**. Τα ιντεγκρόνια είναι δομές που αναλαμβάνουν να “παγιδεύσουν” και να διαβιβάσουν τη νέα γονιδιακή πληροφορία στο κύτταρο. Πρώτη φορά οι δομές αυτές εντοπίστηκαν σε κλινικά στελέχη, αλλά έκτοτε έχουν βρεθεί και σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως βιολογικούς καθαρισμούς, ιχθυοκαλλιέργειες, κοπριά χοίρων, ακαθαρσίες πουλερικών. Μεταξύ των διαφόρων ειδών ιντεγκρονίων, εκείνο της 1ης τάξης εντοπίζεται συχνότερα τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά στελέχη, Gram θετικά και αρνητικά. Το 2003, προτάθηκε η κατάταξή του ως δείκτη ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, λόγω εντοπισμού του σε όλες τις αποικίες ανθεκτικών

Εντεροβακτηρίων. Η ύπαρξη και ο τρόπος λειτουργίας τους αποτελούν αρκετά καινούριο ερευνητικό κομμάτι και αυτές οι δομές χρήζουν περαιτέρω έρευνας. Η δομή ενός ιντεγκρονίου, που αναλαμβάνει τη διαβίβαση ενός πλασμιδίου φαίνεται στο Σχήμα 7.



Σχήμα 7. Διαδικασία μεταβίβασης της πληροφορίας από τα πλασμίδια στο γονιδίωμα.

1.11.2 Γονίδια του κεντρικού χρωμοσώματος

Πέρα από τις κασέτες γονιδίων, έχουν αναφερθεί και μελετούνται γονίδια, που βρίσκονται στο κεντρικό χρωμόσωμα των βακτηρίων.

α. Γονίδια ανθεκτικότητας στις β – λακτάμες

Το πρώτο γονίδιο *bla_{CTX-M}* (ένζυμο) απομονώθηκε το 1989 από ένα στέλεχος *E. coli* που εντοπίστηκε σε έναν καρκινοπαθή και η πρώτη σχετική δημοσίευση αφορούσε στην περίπτωση ενός παιδιού 4 μηνών από το Μόναχο που έπασχε από ωτίτιδα, εξ' ου και το όνομα CTX-M, CefoTaXime και το M από το Μόναχο. Έκτοτε το ένζυμο αυτό είναι το κυρίαρχο και σε άλλα κλινικά στελέχη και είδη, όπως τα *Enterobacteriaceae*, που φέρουν ανθεκτικότητα στις β – λακτάμες. Η διάδοση των γονιδίων αυτών είναι πιθανό να οφείλεται στη συσσώρευσή τους σε κινητά γενετικά στοιχεία (πλασμίδια, ιντεγκρόνια) και της επιλογής και συνεπιλογής αυτών. Άλλα γονίδια που έχουν αναφερθεί είναι το *kluA* (από το βακτήριο *K. ascorbata*), το *bla_{VIM}*, το *bla_{IMP}*, τα *bla_{TEM}*, τα *amp* κ.α.

β. Γονίδια ανθεκτικότητας στις Κινολόνες και Φθοροκινολόνες

Οι μηχανισμοί με τους οποίους έχει παρατηρηθεί ότι συνδέεται η ανθεκτικότητα στις Φθοροκινολόνες είναι οι μεταλλάξεις, η εισαγωγή πλασμιδίων και η είσοδος περιορισμένης ποσότητας του αντιβιοτικού στο κύτταρο λόγω διαμεσολάβησης του χρωμοσώματος. Η ανθεκτικότητα στις Κινολόνες σχετίζεται με διάρρηξη του δεσμού γυράσης/τοποϊσομεράσης, μέσω τροποποίησης της σερίνης ή του υπολείμματος σε οξέα των αμινοξέων στην ένωση νερού – μεταλλικών ιόντων, γεγονός που δεν ευνοεί το σχηματισμό δεσμών με τις Κινολόνες. Σε πολλά είδη συμπεριλαμβανομένων των *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *E. coli*, η ανθεκτικότητα συνδέεται με τις αντλίες ενεργητικής αποβολής (efflux pumps), που βρίσκονται στις εξωτερικές επιφάνειες των κυττάρων. Τα γονίδια που έχουν αναφερθεί σχετικά με την ανθεκτικότητα στις Φθοροκινολόνες είναι τα *qnr* και τα *acr* και έχει αναφερθεί ότι σε πολλές περιπτώσεις οι οργανισμοί τα φέρουν παράλληλα με γονίδια όπως τα *bla_{CTX-M}*, *bla_{FOX}* και *bla_{SHV}*.

γ. Γονίδια ανθεκτικότητας στις Σουλφοναμίδες

Η ανθεκτικότητα στις Σουλφοναμίδες συνδέεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο DHPS (*folP*) ή την απόκτηση εναλλακτικών μορφών του DHPS, όπως τα *sul*. Υπάρχουν τρία *sul* – *sul1*, *sul2*, *sul3* – και έχουν εντοπιστεί σε ιντεγκρόνια και πλασμίδια περιβαλλοντικών στελεχών *E. coli*.

δ. Γονίδια ανθεκτικότητας στις TC

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στις TC έχει σχετιστεί με γονίδια όπως τα *tet* (αναφέρονται κυρίως τα *tetA*, *tetM* και *tetO*), τα οποία κωδικοποιούν μηχανισμούς αντλιών που αναλαμβάνουν την έξοδο του αντιβιοτικού από το κύτταρο ή τη μείωση της ενδοκυτταρικής του συγκέντρωσης. Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διεργασία αυτή και αποκωδικοποιούν τα *tet* βρίσκονται στις μεμβράνες του κυττάρου και ανήκουν στην οικογένεια των MSF (Major Facilitator Superfamily). Εκτός από τα γονίδια *tet* στην επαγωγή ανθεκτικότητας μπορεί να συνεισφέρουν και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που προστατεύουν τα ριβοσώματα. Οι πρωτεΐνες TetM, TetO και OtrA αυξάνουν την ανθεκτικότητα των ριβοσωμάτων στις TC. Παρουσία των TetM και TetO η TET αποδεσμεύεται από τα ριβοσώματα.

2. Πειραματικό μέρος

2.1 Δειγματοληψία, διήθηση και συντήρηση υγρού αποβλήτου (-80 °C)

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε τους μήνες Οκτώβριο – Δεκέμβριο 2017 από την είσοδο – μετά τον εσχαρισμό των λυμάτων - και τις εξόδους των δεξαμενών δευτεροβάθμιας επεξεργασίας και χλωρίωσης της Ε.Ε.Υ.Α Χανίων. Για τη συλλογή των βακτηρίων, τα υγρά δείγματα διηθούνταν απευθείας μετά τη δειγματοληψία. Κατόπιν αραιώσεων με αποστειρωμένο νερό – για την ευκολότερη καταμέτρηση των αποικιών αλλά και λόγω της υψηλής αρχικής μικροβιακής φόρτισης, ιδίως στην περίπτωση των δειγμάτων της εισόδου – διηθήσαμε τα δείγματα με τα φίλτρα μεμβράνης νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0,45 μm (Whatman, GF/C) σε διάταξη διήθησης κενού(Pall Gelman Laboratory). Η ποσότητα διήθησης κάθε φορά ήταν 100 mL. Μετά το πέρας κάθε διήθησης, φυλάσσαμε κάποια ποσότητα του υγρού αποβλήτου σε falcon, το οποίο και συντηρούσαμε στους -80 °C προκειμένου να μελετήσουμε την ύπαρξη και τις ποσότητες συγκεκριμένων γονιδίων ανθεκτικότητας.

2.2 Καλλιέργεια σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο και καταμέτρηση αποικιών

Το φίλτρο, μετά τη διήθηση, τοποθετείτο σε αποστειρωμένα τριβλύα Petri (d = 6 cm), επιστρωμένα με εκλεκτικό θρεπτικό υλικό, βάσει των απαιτήσεων του κάθε βακτηριακού γένους.

1. Για το βακτήριο *E. coli* χρησιμοποιήσαμε το Hicrome agar και ακολούθησε επώασή του σε επωαστικό θάλαμο (Thermo Scientific Heraeus) στους 37 °C για 18 – 24 h και καταμετρήσαμε τις αποικίες που έφεραν κυανή απόχρωση.
2. Για τα βακτήρια του γένους *Staphylococci* χρησιμοποιήσαμε το Mannitol salt agar. Η επώαση των βακτηρίων έγινε στους 37 °C για 18 – 24 h και καταμετρήσαμε τις κίτρινες και χρυσίζουσες αποικίες.
3. Το Slanetz & Burtley Medium, τέλος, χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των *Enterococci*. Η επώαση του βακτηρίου έγινε στους 37 °C για 48 h. Για την καταμέτρησή τους και την αποφυγή σύγχυσής τους με τους στρεπτόκοκκους με τους οποίους φέρουν παρόμοιες αποχρώσεις, μετά την επώαση μεταφέραμε το φίλτρο σε Bile Esculin Agar και αφήσαμε τα βακτήρια να επωαστούν περαιτέρω για 0,5 – 1 h στους 44 °C. Τα στελέχη των *Enterococci* έχουν τη δυνατότητα να υδρολύουν την εσουλίνη σε προϊόντα που αντιδρούν με τον κιτρικό σίδηρο που περιέχεται στο θρεπτικό μέσο, παράγοντας αδιάλυτα άλατα του σιδήρου, τα οποία προκαλούν μαύρισμα του υλικού. Σε περίπτωση, λοιπόν εμφάνισης μαύρου χρώματος, έχουμε θετική αντίδραση και ο μικροοργανισμός κατατάσσεται στους *Enterococci*.

2.3 Ανακαλλιέργεια και συντήρηση σε γλυκερόλη

Μετά την καταμέτρηση των αποικιών για κάθε γένος, οι πιο αναπτυγμένες εξ αυτών ανακαλλιεργήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri (d = 9 cm) εμποτισμένα με μη εκλεκτικό θρεπτικό μέσο (Nutrient Agar (HiMedia Laboratories)). Οι συνθήκες επώασης της ανακαλλιέργειας ήταν ίδιες με εκείνες που εφαρμόστηκαν και στις αρχικές καλλιέργειες στο εκλεκτικό θρεπτικό υλικό. Τέλος, για τη συντήρηση των αποικιών μεταφέραμε τις πιο ανεπτυγμένες σε πλαστικά σωληνάκια με 2 mL Nutrient Broth (HiMedia Laboratories) και αφήσαμε να επωαστούν ανάλογα με τις απαιτήσεις του κάθε βακτηριακού γένους. Μετά την επώαση προσθέσαμε σε πλαστικά σωληνάκια 1 mL γλυκερόλης και τα τοποθετήσαμε στους -80°C . Συνολικά, απομονώσαμε 182 στελέχη και από τα τρία είδη βακτηρίων, δημιουργώντας έτσι τη “βάση δεδομένων” για τα πειράματα μελέτης της ανθεκτικότητας.

2.4 Περιγραφή της MIC

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης με μικρο – αραιώσεις σε ζωμό, MIC (Minimum Inhibitor Concentration) Microdilution Method. Η αρχή της μεθόδου είναι η εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων αντιβιοτικού σε κάποιο μικροοργανισμό.

Για τη μέθοδο χρησιμοποιήσαμε πλάκες τιτλοδότησης με 96 βυθίσματα. Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που εφαρμόστηκαν βασίστηκαν στα προτεινόμενα – για κλινικά στελέχη – όρια από το EUCAST και τροποποιήθηκαν ως προς τις ακραίες τιμές. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις για το κάθε αντιβιοτικό φαίνονται στον Πίνακα 7. Αφού εξοπλίσαμε την απαραίτητη βιβλιοθήκη στελεχών, λάβαμε εκείνα, των οποίων θα μελετούσαμε την ανθεκτικότητα και τα ανακαλλιεργήσαμε σε στερεή καλλιέργεια (Nutrient Agar ή Plate Count Agar & Agar). Από αυτή λαμβάναμε με κρίκο τις αποικίες εκείνες, που έχουν πιο κυκλικό σχήμα και που ξεχωρίζαν από τις γειτονικές και τις μεταφέραμε σε κωνική με Mueller Hinton Broth με κατάλληλη αραιώση, για να δημιουργήσουμε το απαραίτητο εναιώρημα. Η οπτική απορρόφηση του εναιωρήματος ήταν (φασματοφωτόμετρο (Shimadzu)) περίπου 0,1 – 0,15 στα 600 nm κάθε φορά, το οποίο αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 10^8 κύτταρα/mL.

Η παρασκευή του αντιβιοτικού γινόταν με βάση τον Τύπο 1:

$$\text{βάρος αντιβιοτικού (mg)} = \frac{\text{Όγκος διαλύματος (mL)} * \text{Επιθυμητή συγκέντρωση (}\mu\text{g / mL)}}{\text{Δραστικότητα αντιβιοτικού (}\mu\text{g / mg)}} \quad (1)$$

Επειδή τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήσαμε είχαν δραστικότητα πάνω από 99%, μπορούμε να απαλείψουμε τον ανάλογο όρο από τον παραπάνω τύπο.

Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών, που χρησιμοποιήσαμε φαίνονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών για τις οποίες ελέγχθηκε η απόκριση των βακτηρίων.

CIP(mg/L) (Sigma Aldrich)							
0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
AMP(mg/L) (Sigma Aldrich)							
1	2	4	8	16	32	64	128
SMX/TMP(mg/L) (Sigma Aldrich)							
0,5	1	2	4	8	16	32	64
TET(mg/L) (Sigma Aldrich)							
0,25	0,5	1	2	4	8	16	32

Αφού είχαμε προετοιμάσει το αντιβιοτικό και τα εναιωρήματα μεταφέραμε αυτά στην πλάκα τιτλοδότησης. Η διάταξη των βυθισμάτων στα πειράματα εντοπισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC₆₀) είναι αυτή που παρουσιάζεται στο Σχήμα 8. Η αρχή της μεθόδου προϋποθέτει την ύπαρξη βυθισμάτων, που θα λειτουργούν ως blank*¹ και άλλων που θα λειτουργούν ως θετικός*² και αρνητικός έλεγχος*³. Στα πειράματά μας η πλάκα τιτλοδότησης σχεδιάστηκε με σκοπό να εξετάζονται 4 στελέχη κάθε φορά και να υπάρχουν 2 επαναλήψεις για το κάθε στέλεχος. Φυσικά ο σχεδιασμός είναι στην ευχέρεια του κάθε πειραματιστή.

Όλα τα βυθίσματα, λοιπόν, εφοδιάζονταν, αρχικά, με 100 μ L Mueller Hinton Broth. Κατόπιν, στα βυθίσματα A1 – A9, αδειάζονται 100 μ L αντιβιοτικού και με πολυκάναλη πιπέτα μεταφέραμε ίσες ποσότητες μέχρι και τη γραμμή H1 - H9, έτσι ώστε στο τέλος καθένα από αυτά τα βυθίσματα να έχουν φόρτιση ίση με 100 μ L – δηλαδή αραιώση 1:2. Στις στήλες (1,2), (3,4), (5,6), (7,8) προστίθενταν, έπειτα κάθετα 5 μ L από τα εξεταζόμενα στελέχη, ώστε η τελική συγκέντρωση των μικροοργανισμών εντός των βυθισμάτων να είναι 10⁵ CFU/mL. Στα βυθίσματα με το μπλε χρώμα αδειάζονταν 5 μ L από τα αντίστοιχα στελέχη και αυτά αποτελούν τον θετικό έλεγχο. Οι στήλες 9 και 12 αντιστοιχούν στον αρνητικό έλεγχο (Mueller Hinton Broth & αντιβιοτικό) και στο blank (Mueller Hinton Broth), αντίστοιχα. Στις στήλες 10 και 11 αντιστοιχεί ο θετικός έλεγχος (3 επαναλήψεις για το κάθε στέλεχος).

*¹ σκέτο Mueller Hinton Broth, για τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης της πειραματικής διαδικασίας

*² εξεταζόμενο στέλεχος, που αναπτύσσεται σε Mueller Hinton Broth, χωρίς προσθήκη αντιβιοτικού

*³ Mueller Hinton Broth + αντιβιοτικό, για τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης και σωστής παρασκευής και εφαρμογής του αντιβιοτικού



Σχήμα 8. Διάταξη των βυθισμάτων στην πλάκα τιτλοδότησης. Η αρίθμηση δηλώνει την κατεύθυνση του εμβολιασμού.

Αφού ολοκληρωνόταν η διαδικασία, ακολουθούσε η μηχανική ανάδευση της πλάκας και η τοποθέτησή της στον επωαστικό θάλαμο για 18 – 24 h. Ακολουθούσε η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 540 και στα 630 nm των βυθισμάτων με χρήση ειδικού φασματοφωτομέτρου (Microplate reader, LT – 400).

Υπολογισμός πολυανθεκτικότητας **MAR index (Multiple Antibiotic Resistance Index)**

Ο δείκτης αυτός υπολογίζεται από τη σχέση (2) για να εξεταστεί αν ένα στέλεχος είναι ανθεκτικό σε περισσότερους από έναν αντιβιοτικούς παράγοντες. Ένα τέτοιο στέλεχος λέγεται ότι φέρει πολυανθεκτικότητα (Multiple Drug Resistance – MDR).

$$MAR\ Index = \frac{\text{αριθμός αντιβιοτικών στα οποία απουσίαστηκε αυξημένη ανθεκτικότητα}}{\text{συνολικός αριθμός αντιβιοτικών που εξετάστηκαν}} \quad (2)$$

2.5 Απομόνωση γενετικού υλικού

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris – EDTA¹ (TE):
50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0 μετά αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121° C για 15 min.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Lysozyme² lysis buffer: 100 mM NaCl, 500 mM Tris [pH 8.0], lysozyme 30 mg/mL.
- Διάλυμα 10% w/v SDS³
- Διάλυμα πρωτεΐνάσης K⁴ 20 mg/mL

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού – συγκεκριμένα χρωμοσωμικού γενετικού υλικού - εφαρμόσαμε τη μέθοδο φαινόλης – χλωροφορμίου σε συνδυασμό με τη χρήση

ενζύμων, της πρωτεΐνάσης K και της λυσοζύμης, για στελέχη με αρνητική και θετική κατά Gram χρώση. Ακολουθούνταν τα εξής στάδια αναλυτικά:

1. Καλλιέργεια του βακτηρίου σε Nutrient Broth και επώαση στους 37° C για 18 – 20 h – οι *Enterococci* απαιτούν περίπου 48 h.
 2. Λήψη 1.5 mL από την υγρή καλλιέργεια (στατική φάση ανάπτυξης και τοποθέτηση σε αποστειρωμένο eppendorf.
 3. Φυγοκέντρηση 10 min στα 14000X g για καθίζηση των κυττάρων.
 4. αναρρόφηση του υπερκείμενου υγρού με πιπέτα.
 5. Διάλυση του ιζήματος προσθέτοντας 467 μL διαλύματος TE (tris – EDTA buffer solution).
 6. Προσθήκη 30 μL SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) συγκέντρωσης 10% w/v.
 7. Προσθήκη 3 μL διαλύματος ενζύμου πρωτεΐνάση K συγκέντρωσης 20 mg/mL και 100 μL διαλύματος Lysozyme lysis buffer. Ανάδευση με πιπέτα.
 8. Επώαση στους 37° C για 1 h σε Block Heater.
 9. Προσθήκη 80 μL CTAB⁵ που περιέχει 0.7% NaCl.
 10. Επώαση στους 65° C για 10 min.
 11. Προσθήκη 750 μL διαλύματος Φαινόλη/Χλωροφόρμιο/Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1)⁶.
 12. Έντονη ανάδευση με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (Vortex).
 13. Φυγοκέντρηση στα 14000X g για 10 min.
 14. Λήψη της υδατικής φάσης και μεταφορά της σε νέο eppendorf.
 15. Προσθήκη 500 μL ισοπροπανόλης⁷ και ανάδευση με πιπέτα.
 16. Παραμονή στους – 20° C κατά τη διάρκεια της νύχτας.
 17. Φυγοκέντρηση στα 14000X g και στους 4° C για 20 min.
 18. Απόρριψη του υπερκείμενου και λήψη του ιζήματος (DNA).
 19. Καθαρισμός του γενετικού υλικού προσθέτοντας 500 μL αιθανόλης συγκέντρωσης 70% και αναδεύοντας με πιπέτα.
 20. Φυγοκέντρηση στα 10000X g και στους 4° C για 20 min.
 21. Λήψη του ιζήματος και τοποθέτηση του eppendorf στους 37° C (Block Heater) προκειμένου να εξατμιστεί η αιθανόλη.
 22. Επαναδιάλυση του γενετικού υλικού σε 50 μL TE.
 23. Φωτομέτρηση του γενετικού υλικού σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης ορατού – υπεριώδους, με χρήση milliQ H₂O και φύλαξη του στους – 20° C.
- Με τη φωτομέτρηση ελέγχουμε τόσο την ποιότητα όσο και την καθαρότητα του DNA. Η μέθοδος στηρίζεται στην ικανότητα του DNA να απορροφά τη UV ακτινοβολία στα μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Μέσω της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm προσδιορίζουμε τη συγκέντρωση του γενετικού υλικού. Οπτική απορρόφηση της τάξης της μιας μονάδας αντιστοιχεί σε 50 μg/mL δίκλωνου DNA, 40 μg/mL μονόκλωνου DNA και RNA και σε 20 μg/mL περίπου μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων.
- Η καθαρότητα του DNA προσδιορίζεται από την αναλογία των οπτικών απορροφήσεων στα 2 μήκη κύματος:

$$\text{καθαρότητα DNA} = \frac{OD_{260}}{OD_{280}} \quad (3)$$

Για υψηλής καθαρότητας DNA ο λόγος ισούται περίπου με 1,8. Στα περιβαλλοντικά δείγματα η τιμή αυτή μπορεί να είναι λίγο μικρότερη. Σε περίπτωση επιμόλυνσης (πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα, φαινόλες) η τιμή είναι μικρότερη και έτσι είναι πιο δύσκολος ο ποσοτικός χαρακτηρισμός του γενετικού υλικού.

Για τον υπολογισμό της ποσότητας του DNA χρησιμοποιούμε τον ακόλουθο τύπο:

$$Q_{\text{DNA}} [\text{ng}] = \text{OD}_{260} [\text{ng}/\mu\text{L}] * \text{ποσότητα γενετικού υλικού} (\mu\text{L}) \quad (4),$$

Στο παράρτημα φαίνονται τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά του γενετικού υλικού.

Η απομόνωση του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε για 2 λόγους:

α. στα στελέχη, που παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας, ώστε να εξεταστούν ως προς την παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας, που είχαμε προ-επιλέξει. Έγινε απομόνωση γενετικού υλικού και για τα δείγματα των υγρών αποβλήτων, με σκοπό να εξεταστούν ως προς την ύπαρξη των επιλεγμένων γονιδίων ανθεκτικότητας.

β. σε 30 στελέχη του *Staphylococci* - 10 από κάθε δεξαμενή – για την ταυτοποίησή τους ως *S. aureus*.

2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Η PCR επιστρατεύτηκε για την ταυτοποίηση των στελεχών των *Staphylococci* ως *S. aureus*. Το γονίδιο, το οποίο επιλέξαμε για αυτό ήταν το *spa* και οι εκκινητές (primers) φαίνονται στον Πίνακα 8.

Αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων που χρησιμοποιήσαμε στην PCR και οι κύκλοι της PCR φαίνονται στο Παράρτημα.

Πίνακας 8. Εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε για την ταυτοποίηση των *Staphylococci* ως *S. aureus*.

<i>spa</i> gene	Αλληλουχία εκκινητή(5'→3')	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)	Αναφορά
Forward primer	ATC TGG TGG CGT AAC ACC TG	24	Younis Omar et al., (2014)
Reverse primer	CGC TGC ACC TAA CGC TAA TG		

2.7 Γονίδια ανθεκτικότητας

Για την εξέταση του γενετικού υλικού των στελεχών και των υγρών αποβλήτων ως προς την ύπαρξη συγκεκριμένων γονιδίων ανθεκτικότητας και την ποσοτικοποίηση αυτών χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της Real – Time PCR

Τα συστήματα που χρησιμοποιούν τη SYBR green ως χρωστική λέγονται μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας – στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από τη χρήση ειδικού ανιχνευτή.

Στον Πίνακα 9 φαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε, το μέγεθος των προϊόντων και οι αναφορές στις οποίες βασιστήκαμε. Στο Παράρτημα βρίσκονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων που χρησιμοποιήσαμε και οι κύκλοι που

εφαρμόστηκαν στην Real – Time PCR για κάθε γονίδιο. Τα ανθεκτικά στελέχη που εξετάσαμε ως προς την ύπαρξη των γονιδίων ανθεκτικότητας φαίνονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 9. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητας.

Gene	Primer	Nucleotide sequence (5' à 3')	PCR product (bp)	Reference
<i>ampC</i>	ampC-F	TTCTATCAAMACTGGCARCC	550	Schwartz et al., 2003
	ampC-R	CCYTTTTATGTACCCAYGA		
<i>sul1</i>	sul1-R	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC	417	Jacobs and Chenia, 2007
	sul1-F	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC		
<i>tetM</i>	tetM-F	GTAAATAGTGTCTTGGAG	600	Akinbowale et al., 2007
	tetM-R	CTAAGATATGGCTCTAACAA		
<i>qnrA</i>	qnrA-F	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	543	Rodríguez-Martínez et al., 2003
	qnrA-R	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA		

Πίνακας 10. Ανθεκτικά στελέχη και γονίδια ανθεκτικότητας για τα οποία εξετάστηκαν.

Στέλεχος	Γονίδια ανθεκτικότητας που εξετάστηκαν	Δεξαμενή προέλευσης
<i>E. coli 1</i>	<i>sul1</i>	Είσοδος
<i>E. coli 2</i>	<i>sul1</i>	Είσοδος
<i>E. coli 3</i>	<i>sul1</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας
<i>E. coli 4</i>	<i>qnrA</i> <i>ampC</i>	Έξοδος
<i>E. coli 5</i>	<i>qnrA</i> <i>ampC</i>	Είσοδος
<i>E. coli 6</i>	<i>qnrA</i> <i>ampC</i>	Είσοδος
<i>E. coli 7</i>	<i>qnrA</i> <i>ampC</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας
<i>E. coli 8</i>	<i>sul1</i>	Έξοδος
<i>Enterococcus 1</i>	<i>sul1</i>	Είσοδος
<i>Enterococcus 2</i>	<i>tetM</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας
<i>Enterococcus 3</i>	<i>sul1</i> <i>qnrA</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας
<i>Enterococcus 4</i>	<i>tetM</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας
<i>Enterococcus 5</i>	<i>ampC</i>	Είσοδος
<i>Enterococcus 6</i>	<i>sul1</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας
<i>Enterococcus 7</i>	<i>ampC</i> <i>sul1</i>	Είσοδος
<i>Enterococcus 8</i>	<i>ampC</i>	Είσοδος
<i>Staphylococcus 1</i>	<i>qnrA</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας
<i>Staphylococcus 2</i>	<i>tetM</i>	Είσοδος
<i>Staphylococcus 3</i>	<i>qnrA</i>	Είσοδος
<i>Staphylococcus 4</i>	<i>tetM</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας
<i>Staphylococcus 5</i>	<i>tetM</i>	Είσοδος
<i>Staphylococcus 6</i>	<i>qnrA</i>	Έξοδος

2.8 Πειράματα αντιδραστήρα

Για τα πειράματα με τους μικτούς πληθυσμούς επιλέξαμε τα πιο ανθεκτικά και τα πιο ευαίσθητα από κάθε γένος και τα αφήσαμε να επωαστούν σε κωνική φιάλη για 5 ημέρες. Δεν έγινε διασταύρωση δύο διαφορετικών γενών. Συγκεκριμένα, επιλέξαμε 2 στελέχη από τα είδη *E. coli* (από την είσοδο) και *Staphylococci* (από την έξοδο) που είχαμε μελετήσει τη συμπεριφορά ως προς την CIP και 2 στελέχη *Enterococci* (από την είσοδο) τα οποία είχαμε εξετάσει ως προς την AMP.

Για τα πειράματα σχεδιάσαμε δύο πρότυπα περιβάλλοντα. Το ένα ήταν πλούσιο σε θρεπτικό μέσο (Mueller Hinton Broth) και το άλλο σε αποστειρωμένο απόβλητο, από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας της μονάδας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων της πόλης των Χανίων. Επιλέξαμε το συγκεκριμένο τύπο αποβλήτου, λόγω καλής φόρτισης σε οργανικές ενώσεις και το αποστειρώσαμε, προκειμένου να μην επηρεαστεί ο πληθυσμός μας από άλλους μικροοργανισμούς που είναι κανονικά παρόντες. Το αποτέλεσμα της συνένωσης των 2 στελεχών αναμένουμε να είναι ένας νέος πληθυσμός, ο οποίος μπορεί να έχει τις εξής δυνατές ιδιομορφίες:

1. υπεράριθμα ανθεκτικά βακτήρια με λίγα (ή καθόλου) ευαίσθητα
2. υπεράριθμα ευαίσθητα βακτήρια με λίγα (ή καθόλου) ανθεκτικά
3. βακτήρια, που θα προκύψουν μετά από την ένωση ενός ανθεκτικού και ενός ευαίσθητου και κάποια από τις άνω 2 καταστάσεις. Και στα δύο περιβάλλοντα εφαρμόσαμε επιπλέον συνθήκες στέρησης τροφής – δηλαδή αραιώση ίση με το 1:3 του κάθε μέσου – για να εξετάσουμε την υπόθεση της ανάπτυξης της ανθεκτικότητας σε oligοτροφικά περιβάλλοντα. Η αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών ήταν κοινή και στα 2 πειράματα και ίση με 10^2 κύτταρα/mL, καθώς και ο όγκος του αντιδραστήρα 100 mL και οι συνθήκες εντός του. Για τις αραιώσεις στα πειράματα με το απόβλητο χρησιμοποιήσαμε NaCl 0,8%. Ο τύπος του αντιδραστήρα ήταν διαλείπωντος έργου, με ανάδευση. Η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν την 3η και την 5η ημέρα και ο νέος πληθυσμός υπόκεινταν σε έλεγχο ανθεκτικότητας στο ανάλογο αντιβιοτικό με τη μέθοδο της μικροαραιώσης.

3. Αποτελέσματα

3.1 Αριθμός αποικιών και αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας υγρών αποβλήτων

Στον Πίνακα 11 φαίνεται ο αριθμός των αποικιών που εντοπίστηκαν στις δεξαμενές επεξεργασίας της Ε.Ε.Λ. των Χανίων. Για λόγους απλούστευσης χρησιμοποιήσαμε τα κεφαλαία Α, Β, Γ για να δηλώσουμε την είσοδο, την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας και την έξοδο (της χλωρίωσης), αντίστοιχα.

Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υγρών αποβλήτων

pH εισόδου = 7 – 7,5

pH εξόδου = 8

συγκέντρωση χλωρίου που καταλήγει στη θάλασσα: [Cl] = 1 – 1,2 ppm

συνολικό εισερχόμενο φορτίο στην Ε.Ε.Λ. (kg BOD₅/d) = 6740 (7681 max)

συνολική εισερχόμενη παροχή στην Ε.Ε.Λ. (m³/d) = 17359 (22499 max)

Ολικός οργανικός άνθρακας στην έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας: TOC = 5-6 mg/L,

Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο: COD = 40 – 80 mg/L

Ετήσια ποσότητα λυματολάσπης = 967100 kg DS/y

Τα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα παροχετεύονται μετά τη χλωρίωση στον υδάτινο αποδέκτη (θάλασσα).

Πίνακας 11. Αριθμός βακτηριακών αποικιών που καταγράφηκαν στην Ε.Ε.Λ. Χανίων τους μήνες Οκτώβρη – Δεκέμβρη 2017. Α: είσοδος, Β: Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, Γ: έξοδος.

Δείγμα υγρών αποβλήτων	<i>E. coli</i> (CFU/100 mL)			<i>Enterococci</i> (CFU/100 mL)			<i>Staphylococci</i> (CFU/100 mL)		
	A	B	Γ	A	B	Γ	A	B	Γ
1	3,8x10 ⁶	6x10 ²	0	2x10 ⁶	1,8x10 ³	50	3x10 ³	1,1x10 ³	2,5x10 ²
2	6,6x10 ⁶	4,6x10 ³	5,2x10 ³	3,1x10 ⁶	6,2x10 ³	5,8x10 ³	15,5x10 ³	4x10 ³	7,7x10 ²
3	6,7x10 ⁶	1,6x10 ⁴	6x10 ²	5,1x10 ⁶	2,2x10 ⁴	1,5x10 ²	1,5x10 ⁴	3,5x10 ²	8x10 ²
4	6,2x10 ⁶	6,4x10 ³	2	3,9x10 ⁶	3,4x10 ³	2x10 ²	3,5x10 ⁴	10 ³	7,8x10 ²
5	3,4x10 ⁶	3,6x10 ³	1,7x10 ³	2,2x10 ⁶	3,1x10 ³	2,3x10 ³	5,7x10 ⁴	2,8x10 ²	2x10 ²

Παρατηρούμε ότι για την *E. coli* και τους *Enterococci* τα ποσοστά απομάκρυνσης με τη δευτεροβάθμια επεξεργασία κυμαίνονται γύρω στο 99,9% και 99,81%, αντίστοιχα.

Για τους *Staphylococci*, ωστόσο, παρατηρούμε διαφορετική συμπεριφορά. Τις πρώτες δύο μέρες το ποσοστό απομάκρυνσης είναι περίπου 70% και κατά μέσο όρο, για όλα τα δείγματα το ποσοστό απομάκρυνσης είναι 86,36%.

Πιο αναλυτικά, παρουσιάζουμε την **απόδοση της πρωτοβάθμιας και δευτεροβάθμιας επεξεργασίας** για κάθε είδος βακτηρίου ξεχωριστά στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Ποσοστά απομάκρυνσης των βακτηρίων με την πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια επεξεργασία. EC: *E. coli*, EN: *Enterococci*, St: *Staphylococci*

Αριθμός δείγματος	Ποσοστά απομάκρυνσης (%)
1	EC = 99,98%, EN = 99,91%, St = 63,3%
2	EC = 99,93%, EN = 99,8%, St = 74,19%
3	EC = 99,76%, EN = 99,57%, St = 97,67%
4	EC = 99,90%, EN = 99,91%, St = 97,14%
5	EC = 99,89%, EN = 99,86%, St = 99,51%

Για τη χλωρίωση τα ποσοστά απομάκρυνσης φαίνονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13. Ποσοστά απομάκρυνσης των βακτηρίων με τη χλωρίωση. . EC: *E. coli*, EN: *Enterococci*, St: *Staphylococci*

Αριθμός δείγματος	Ποσοστά απομάκρυνσης (%)
1	EC = 100%, EN = 97,22%, St = 77,27%
2	EC = -13%, EN = 6,45%, St = 80,75%
3	EC = 96,25%, EN = 99,32%, St = -128,6%
4	EC = 99,97%, EN = 94,12%, St = 22,00%
5	EC = 55,88%, EN = 25,81%, St = 28,57%

Η συνολική επίδραση των μεθόδων επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων στη Ε.Ε.Υ.Α. Χανίων, φαίνεται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Ποσοστά απομάκρυνσης των βακτηρίων κατόπιν πρωτοβάθμιας, δευτεροβάθμιας επεξεργασίας και απολύμανσης. . EC: *E. coli*, EN: *Enterococci*, St: *Staphylococci*

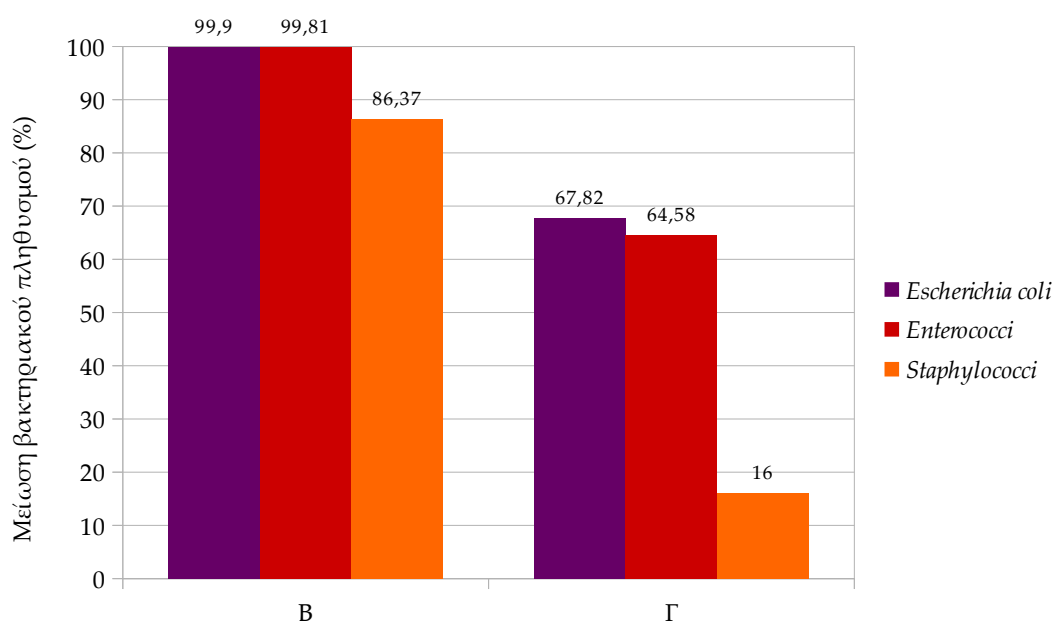
Αριθμός δείγματος	Ποσοστά απομάκρυνσης (%)
1	EC = 100%, EN = 99,997%, St = 91,67%
2	EC = 99,92%, EN = 99,81%, St = 95,03%
3	EC = 99,991%, EN = 99,997%, St = 94,67%
4	EC = 99,999%, EN = 99,995%, St = 97,77%
5	EC = 99,950%, EN = 99,89%, St = 99,65%

Βλέπουμε ξανά ότι για την *E. coli* και τους *Enterococci* η συνολική απομάκρυνση, προσμετρώντας δηλαδή τη δυναμική πρωτοβάθμιας και δευτεροβάθμιας επεξεργασίας και χλωρίωσης, είναι περίπου 99,97% και 99,94%, αντίστοιχα. Και για τους *Staphylococci* η συνολική απομάκρυνση είναι περίπου 95,8% - λίγο χαμηλότερη από τα άλλα δύο βακτήρια.

Ωστόσο, τα αποτελέσματα της χλωρίωσης, ως τεχνικής απολύμανσης, συγκριτικά με εκείνα της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας είναι ποιοτικώς διαφορετικά. Το προφίλ των *E. coli* στη χλωρίωση συγκριτικά με τα άλλα δύο βακτήρια είχε αρκετές διακυμάνσεις. Η αποτελεσματικότητα της χλωρίωσης λαμβάνει μεγάλο εύρος τιμών – από 100%, που αντιστοιχεί σε πλήρη απομάκρυνση, έως και αύξηση του πληθυσμού κατά 13%. Αθροιστικά, το ποσοστό μείωσης του πληθυσμού με τη χλωρίωση είναι 67,82%.

Αντίστοιχες διακυμάνσεις παρατηρούνται και για τους Εντερόκοκκους – εδώ δεν είχαμε αύξηση του αριθμού των αποικιών – και τα ποσοστά απομάκρυνσης κυμαίνονται από 6,45% έως 99,32% (64,58% συνολικά).

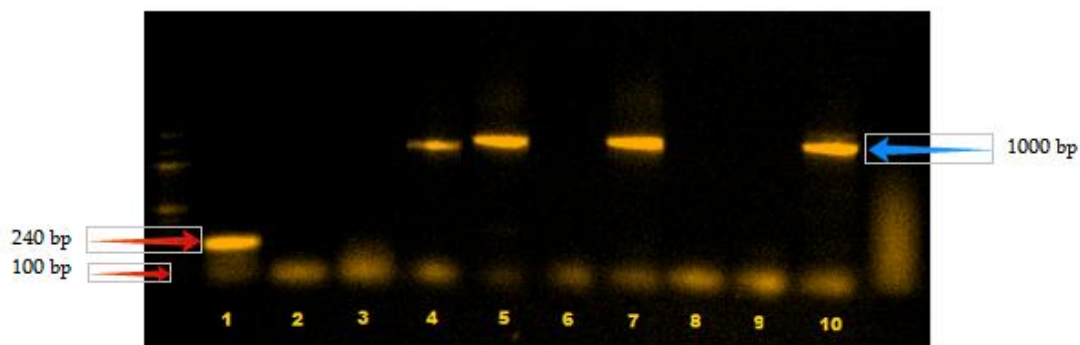
Για τους *Staphylococci* καταγράφηκαν τα σημαντικότερα ποσοστά, καθώς επίσης σε καμία περίπτωση δεν παρατηρήθηκε επιτυχής απολύμανση. Στο 3ο δείγμα μάλιστα παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού κατά 130% περίπου, ενώ συνολικά η επίδραση της χλωρίωσης ήταν μόλις 16%. Στο Σχήμα 9 φαίνεται ένας μέσος όρος των ποσοστών μείωσης των πληθυσμών κάθε βακτηρίου με την εκάστοτε μέθοδο επεξεργασίας στη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, του νομού Χανίων. Τέλος, είναι εμφανές ότι τα ποσοστά μείωσης, που επιτυγχάνονται με τη χλωρίωση δεν είναι καθόλου ικανοποιητικά για κανένα από τα βακτήρια, που εξετάσαμε. Τα βακτήρια που καταλήγουν στη θάλασσα αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 1500 CFU/100mL, 1700 CFU/100mL και 300 CFU/100 mL, για τα είδη *E. coli*, *Enterococci* και *Staphylococci*



Σχήμα 9. Μείωση του βακτηριακού πληθυσμού κατόπιν δευτεροβάθμιας επεξεργασίας (B) και χλωρίωσης (Γ).

3.2 Ταυτοποίηση *S. aureus*

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης φαίνεται στην Εικόνα 3. Η ζώνη 10 αντιστοιχεί στο positive control – το γονίδιο *sra*. Τα στελέχη που αντιστοιχούν στις ζώνες 4,5 και 7, που έχουν τον ίδιο αριθμό bp (περίπου 1000) με το positive control είναι αναμφισβήτητα *S. aureus*. Ωστόσο, επειδή το γονίδιο *sra* έχει αναφερθεί από κάποιους ερευνητές (Younis Omar et al., 2015; Shakeri et al., 2010) ότι εμφανίζει περισσότερες από μια ζώνες, στο γένος *S. aureus* θα ανήκει και το στέλεχος που αντιστοιχεί στη ζώνη 1, το προϊόν της οποίας είναι περίπου 240 bp



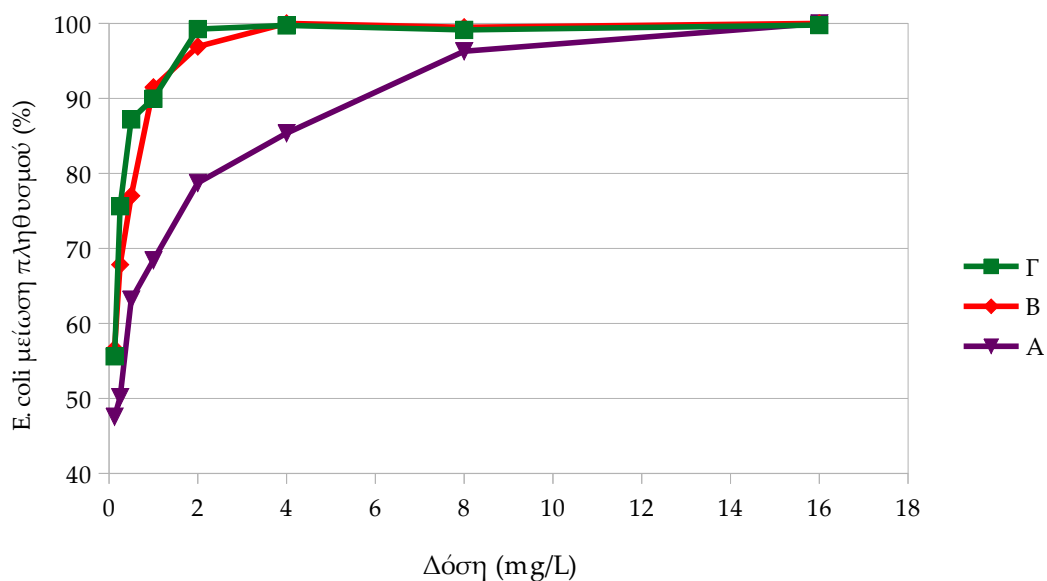
Εικόνα 3. Ανάλυση των προϊόντων του γονιδίου *spr* που προέκυψαν από την ηλεκτροφόρηση.

Όλα τα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *S. aureus* προέρχονται από την είσοδο.

3.3 Αποτελέσματα πειραμάτων υπολογισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC₆₀)

A1. *E. coli* vs CIP

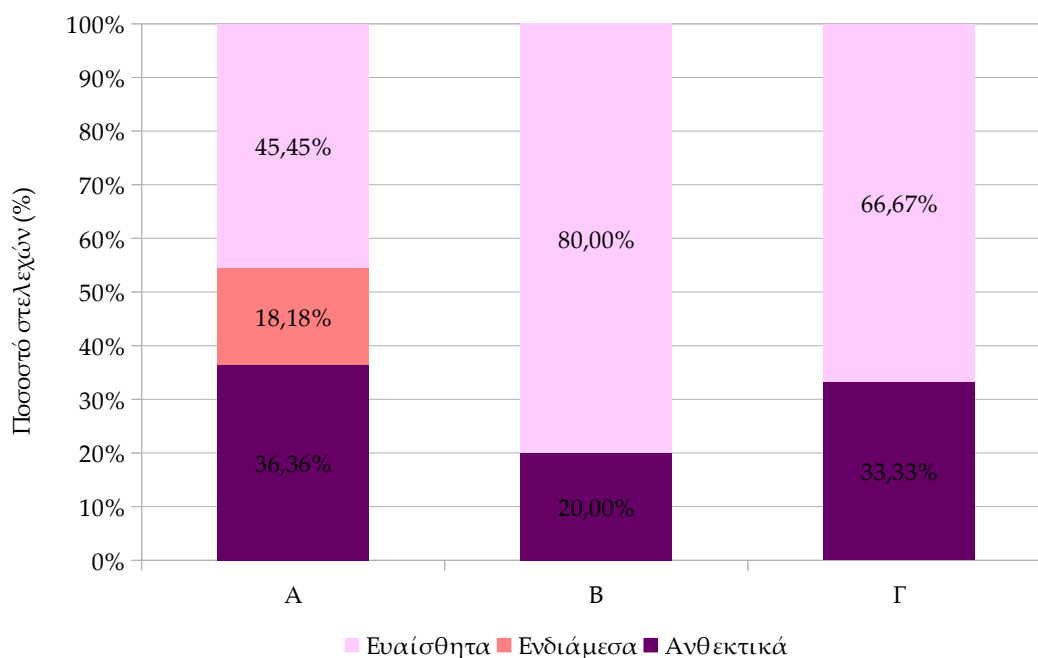
Στο Σχήμα 10 παρατηρούμε ότι για τη μείωση του πληθυσμού της *E. coli* κατά 60%, χρειάστηκαν δόσεις του αντιβιοτικού 0,25 – 0,5 mg/L. Συγκεκριμένα, από τα 30 στελέχη που εξετάσαμε, ο πληθυσμός 23 από αυτά (76,7%) μειώθηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο με 60% με την εφαρμογή του συγκεκριμένου εύρους δόσεων.



Σχήμα 10. Ποσοστιαία μείωση του πληθυσμού της *E. coli* συναρτήσει της δόσης της CIP (mg/L).

Από το παραπάνω σχήμα βλέπουμε ότι μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού έχουμε για τα στελέχη που προέρχονται από τη χλωρίωση και τη δευτεροβάθμια επεξεργασία. Όπως παρατηρήσαμε και στον Πίνακα 11 τα ποσοστά μείωσης των στελεχών από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας και την έξοδο είναι παρόμοια. Επιπλέον, για δόσεις αντιβιοτικού μεγαλύτερες από 8 mg/L – περίπου 16 φορές πάνω από την προτεινόμενη δόση – τα ποσοστά μείωσης σταθεροποιούνται για όλα τα στελέχη, ανεξαρτήτως προέλευσης, κοντά στο 80%.

Από τα 30 εξεταζόμενα στελέχη, 9 ήταν ανθεκτικά στη CIP (30%). Από αυτά, 4 στελέχη εντοπίστηκαν στην είσοδο σε ποσοστό 36,4%, 2 στην έξοδο της δευτεροβάθμιας και 3 στην έξοδο, με ποσοστά 20% και 33,3%, αντίστοιχα. Εντοπίστηκαν και ενδιάμεσα στελέχη, συνολικά 2 (6,67%) που προέρχονταν από την είσοδο. Τα ευαίσθητα στελέχη ήταν συνολικά 21 (70%), με 5 στελέχη (45,4%) από την είσοδο, 8 από την έξοδο της δευτεροβάθμιας (80%) και 6 από την έξοδο (66,7%). Στο Σχήμα 11 φαίνεται το προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών για τις εφαρμοζόμενες δόσεις CIP.

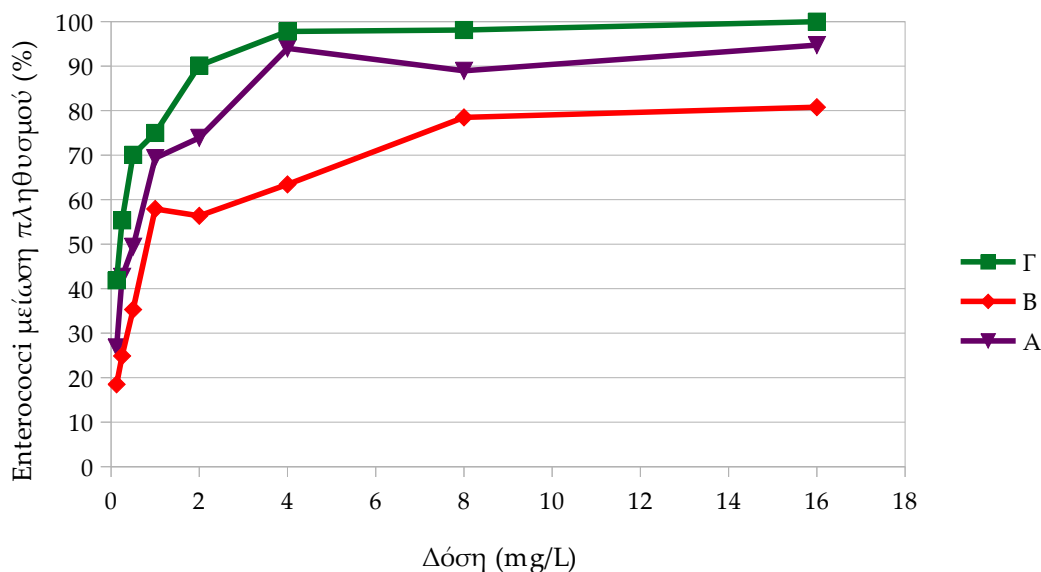


Σχήμα 11. Προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών της *E. coli* ως προς τη συμπεριφορά στη CIP.

A2. *Enterococci* vs CIP

Από τα πειραματικά αποτελέσματα προκύπτει, ότι το εύρος δόσεων που απαιτείται για τους *Enterococci* κυμαίνεται μεταξύ 0,5 και 4 mg/L. Συγκεκριμένα, 23 στελέχη, από τα συνολικά 28 εξεταζόμενα μειώνονταν κατά 60% κατόπιν εφαρμογής της συγκεκριμένης δόσης του αντιβιοτικού.

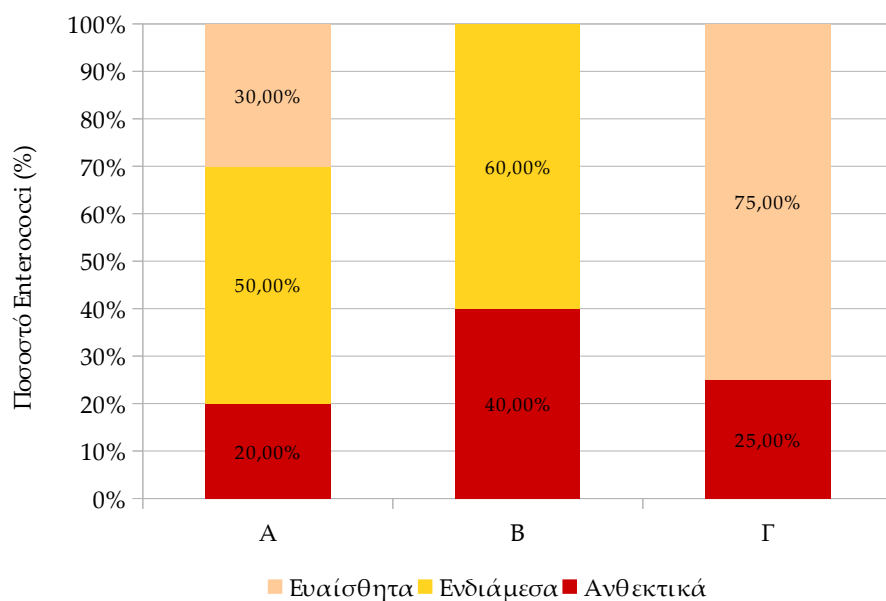
Στο Σχήμα 12 φαίνεται η μείωση του πληθυσμού των *Enterococci* συναρτήσει της δόσης της CIP.



Σχήμα 12. Ποσοστιαία μείωση του πληθυσμού των *Enterococci* συναρτήσει της δόσης της CIP (mg/L).

Αντίθετα από την *E. coli*, στους *Enterococci*, μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού παρατηρείται στα στελέχη, που προέρχονται από την έξοδο και ακολουθούν αυτά της εισόδου και εξόδου της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας. Στην έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας είχαμε το μεγαλύτερο αριθμό ανθεκτικών στελεχών. Για τα στελέχη, που προέρχονται από την είσοδο και την έξοδο της χλωρίωσης παρατηρούμε παρόμοια τάση στις γραμμές μείωσης του πληθυσμού, με λίγο μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης στην έξοδο. Για δόσεις μεγαλύτερες ή ίσες του 4 mg/L η μείωση του πληθυσμού στην είσοδο και στην έξοδο είναι περίπου 100%, ενώ στη δευτεροβάθμια δεν ξεπερνά το 80%.

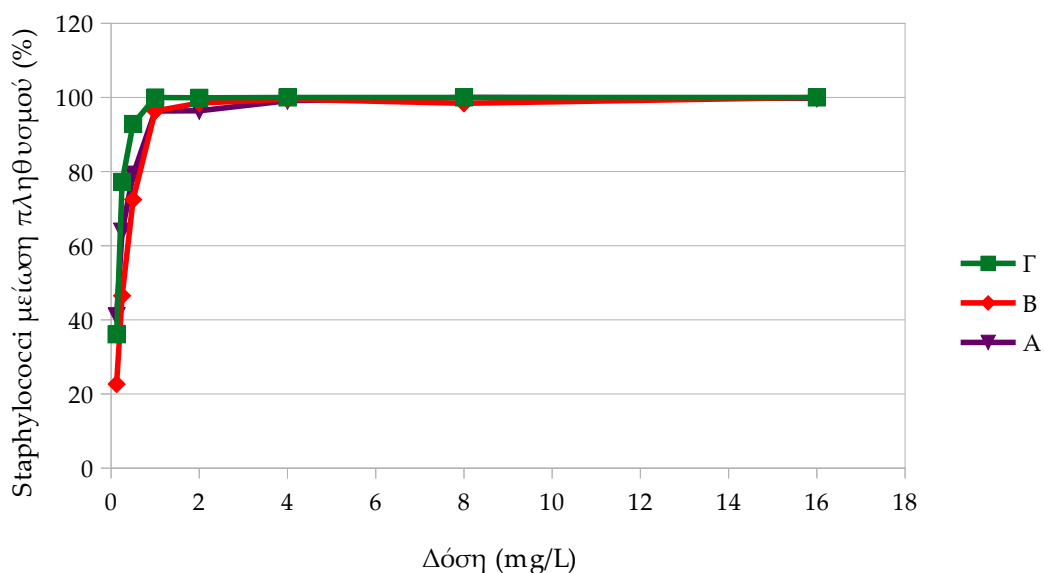
Από τα 28 στελέχη, που εξετάσαμε 8 ήταν ανθεκτικά στη CIP (28,6%). Τα 4 από αυτά (40%) εντοπίστηκαν στην έξοδο της δευτεροβάθμιας, 2 στελέχη (20%) στην είσοδο και 2 (25%) στην έξοδο. Τα ενδιάμεσα στελέχη ήταν συνολικά 11 (39,3%), 5 (50%) προέρχονται από την είσοδο και 6 (60%) από την έξοδο της δευτεροβάθμιας. Τα ευαίσθητα ήταν συνολικά 9 (32,1%) και από αυτά τα 3 (30%) προέρχονταν από την είσοδο και τα υπόλοιπα 6 (75%) από την έξοδο. Στο Σχήμα 13 φαίνεται το προφίλ των στελεχών για τις εφαρμοζόμενες δόσεις CIP.



Σχήμα 13. Προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών των *Enterococci* ως προς τη συμπεριφορά στη CIP.

A3. *Staphylococci* Vs CIP

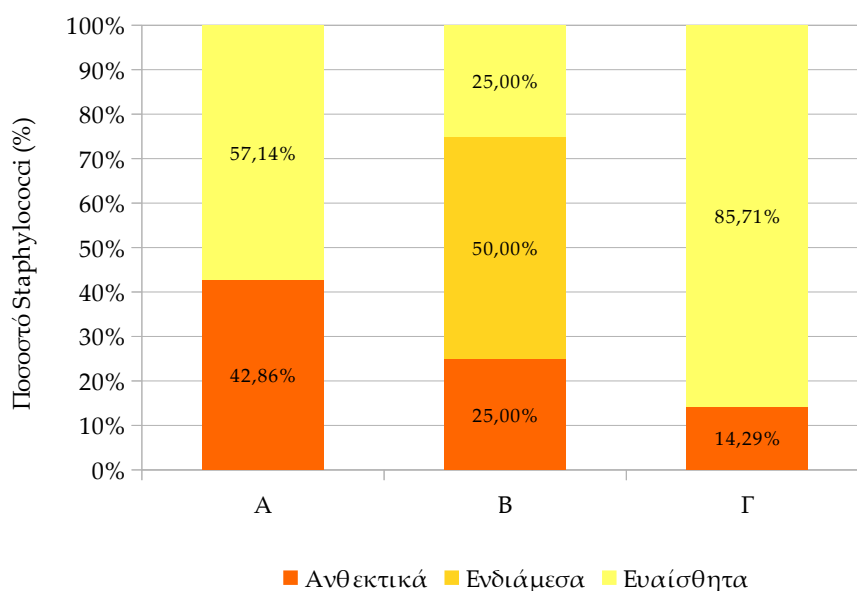
Στην περίπτωση των *Staphylococci* η βέλτιστη δόση βρέθηκε μεταξύ 0,25 και 0.5 mg/L, καθώς από τα συνολικά 22 στελέχη, που εξετάσαμε τα 19 μειώνονταν σε ποσοστό $\geq 60\%$.



Σχήμα 14. Ποσοστιαία μείωση του πληθυσμού των *Staphylococci* με τη δόση της CIP (mg/L).

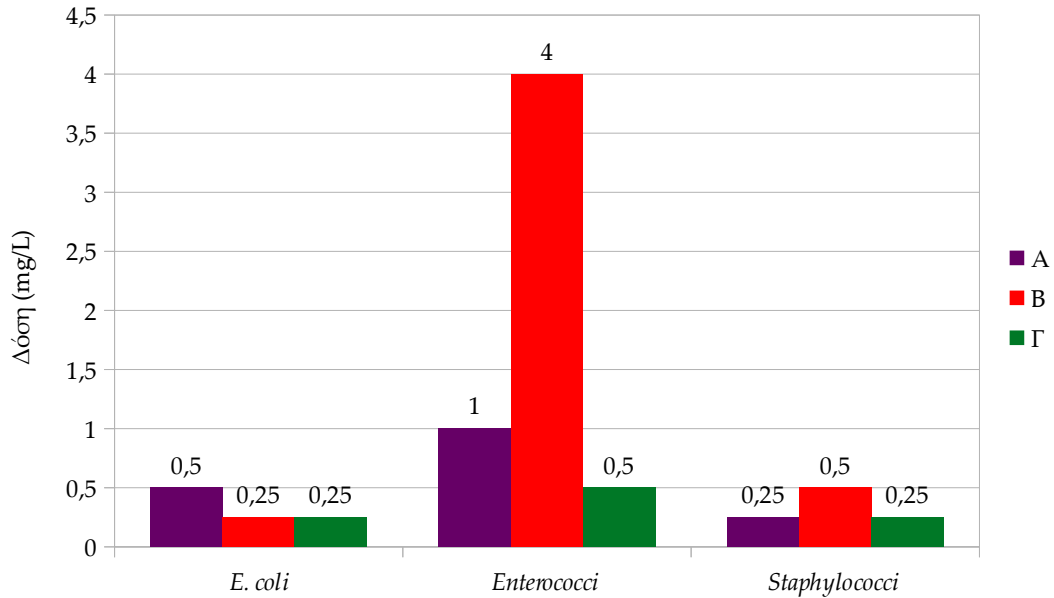
Σε αυτή την περίπτωση τα ποσοστά μείωσης του πληθυσμού ήταν παρόμοια και για τα τρία σημεία δειγματοληψίας, με λίγο υψηλότερα για τα στελέχη, που προέρχονταν από την έξοδο. Στο σύνολο των στελεχών η μείωση του πληθυσμού και στις 3 περιπτώσεις ήταν μεγαλύτερη από 60% αναφορικά με την προτεινόμενη δόση αντιβιοτικού. Αντίστοιχα, μικρότερα από 60% ήταν ποσοστά για χαμηλότερες δόσεις και υψηλότερα για δόσεις πάνω από 0,5 mg/L. Για δόσεις δε μεγαλύτερες από 1 mg/L τα ποσοστά μείωσης κυμαίνονται από 80% - 100% περίπου και στις 3 περιπτώσεις.

Από τα 22 στελέχη, που εξετάσαμε, 6 ήταν ανθεκτικά στη CIP (27,3%). Από αυτά τα 3 εντοπίστηκαν στην είσοδο σε ποσοστό 42,9%, 2 στην έξοδο της δευτεροβάθμιας (25%), και 1 στην έξοδο (14,3%). Μεταξύ των ανθεκτικών στελεχών της εισόδου βρίσκεται και ένας *S. aureus*. Τα ενδιάμεσα στελέχη για το γένος ήταν συνολικά 4 (18,2%) και όλα προέρχονται από την έξοδο της δευτεροβάθμιας (50%). Τα ευαίσθητα στελέχη ήταν συνολικά 12 (54,5%), 4 στην είσοδο (57,1%), 2 στην έξοδο της δευτεροβάθμιας (25%) και 6 στην έξοδο (85,7%).



Σχήμα 15. Προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών των *Staphylococci* ως προς τη συμπεριφορά στη CIP.

Με βάση τα παραπάνω σχήματα ορίσαμε την MIC₆₀ για κάθε γένος βακτηρίων, σε σχέση με τη δεξαμενή προέλευσης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 16.

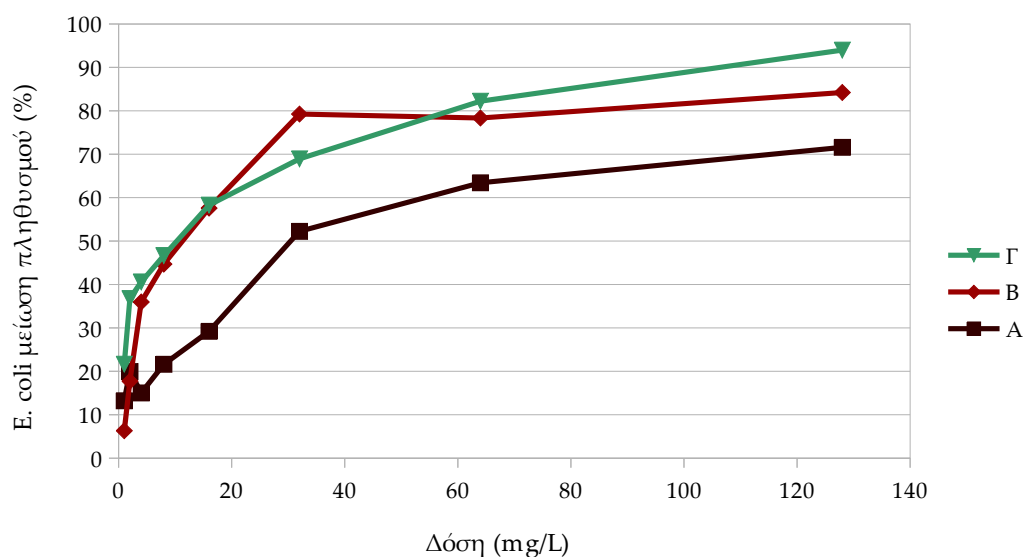


Σχήμα 16. Αντιβιογράμμο για τη CIP των στελεχών της *E.coli*, *Enterococci* και *Staphylococci*.

Στην πραγματικότητα, οι πραγματικές τιμές της MIC₆₀ είναι λίγο πιο χαμηλές από αυτές που φαίνονται στο Σχήμα 16. Εκείνο που παρατηρούμε είναι ότι στην περίπτωση των Gram θετικών βακτηρίων απαιτείται μεγαλύτερη δόση αντιβιοτικού για τη μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων που προέρχονται από την έξοδο της δευτεροβάθμιας.

B1. *E. coli* vs AMP

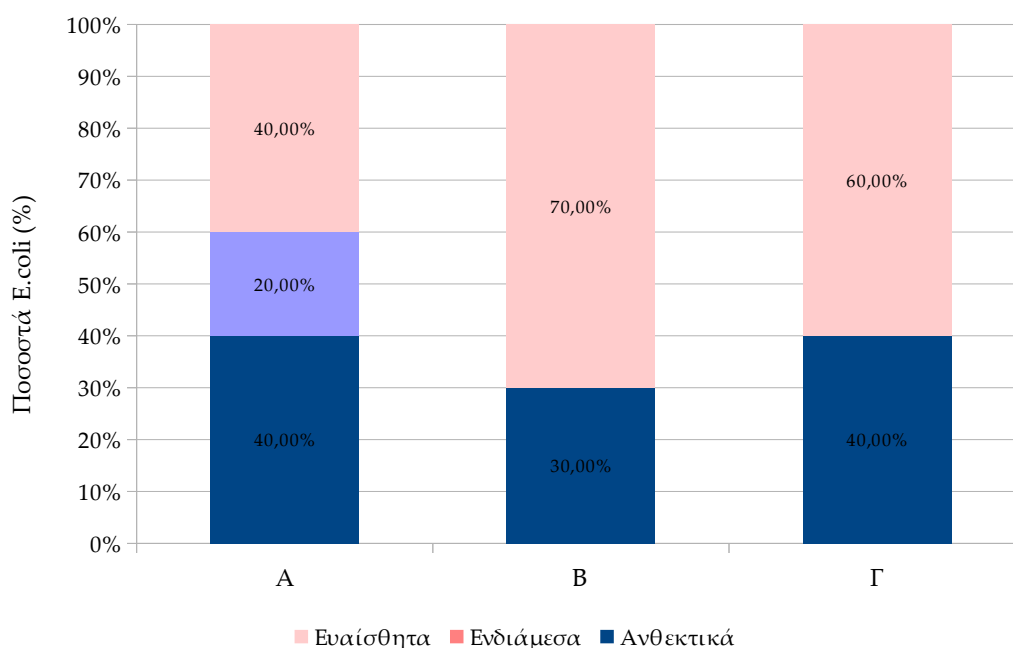
Για τα εξεταζόμενα στελέχη απαιτήθηκαν δόσεις AMP μεταξύ 32 και 64 mg/L.



Σχήμα 17. Ποσοστιαία απομάκρυνση της *E. coli* για διαφορετικές δόσεις AMP (mg/L).

Στο Σχήμα 17 παρατηρούμε, ότι καλύτερη μείωση του αριθμού των στελεχών έχουμε στην έξοδο της δευτεροβάθμιας και στην έξοδο με ποσοστά περίπου 80% για δόση αντιβιοτικού 64 mg/L. Στην είσοδο, για την αντίστοιχη δόση η απομάκρυνση μόλις ξεπερνά το 60%.

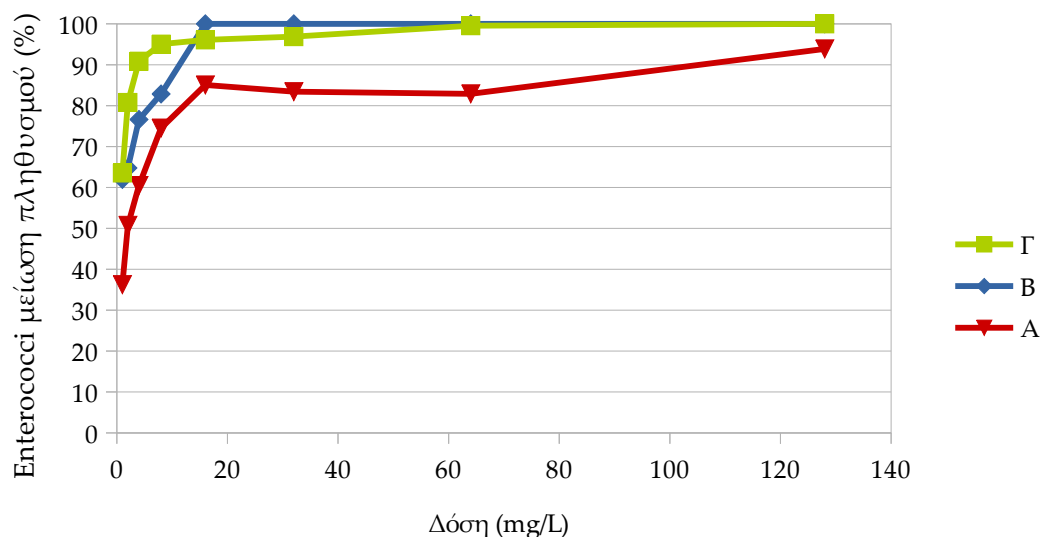
Από τα 30 στελέχη *E. coli*, που εξετάσαμε, 11 ήταν ανθεκτικά στην AMP (36,7%), από τα οποία 4 (40%) καταγράφηκαν στην είσοδο και στην έξοδο και 3 στην έξοδο της δευτεροβάθμιας (30%). Τα ενδιάμεσα στελέχη ήταν συνολικά 2 (6,67%), και εντοπίστηκαν στην είσοδο (20%). Τα ευαίσθητα στελέχη ήταν συνολικά 17 (56,7%) και από αυτά 4 (40%) από την είσοδο, 7 (70%) από την έξοδο της δευτεροβάθμιας και 6 (60%) από την έξοδο.



Σχήμα 18. Προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών της *E. coli* ως προς τη συμπεριφορά στην AMP.

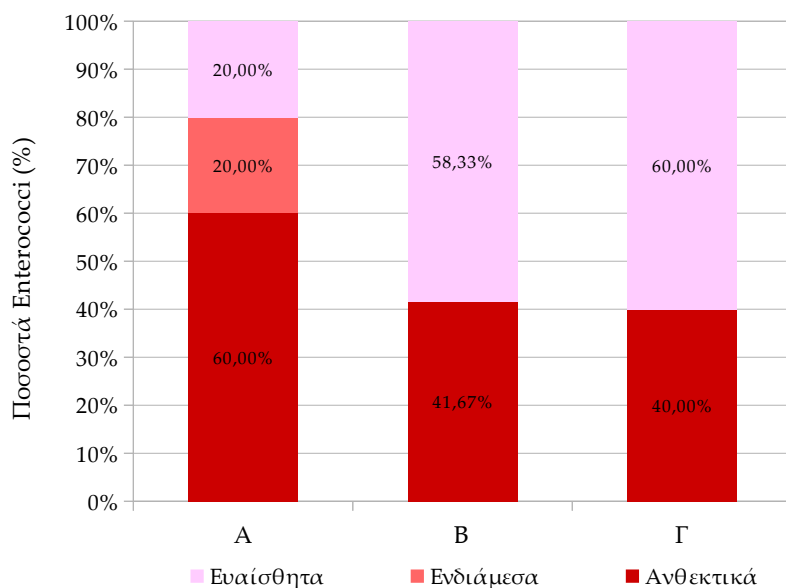
B2. *Enterococci* Vs AMP

Οι δόσεις AMP που απαιτήθηκαν για τους *Enterococci* κυμαίνονται μεταξύ 1 και 4 mg/L, καθώς 21 από τα 32 στελέχη, που εξετάσαμε παρουσίασαν μείωση μεγαλύτερη ίση του 60% εντός των ορίων αυτών.



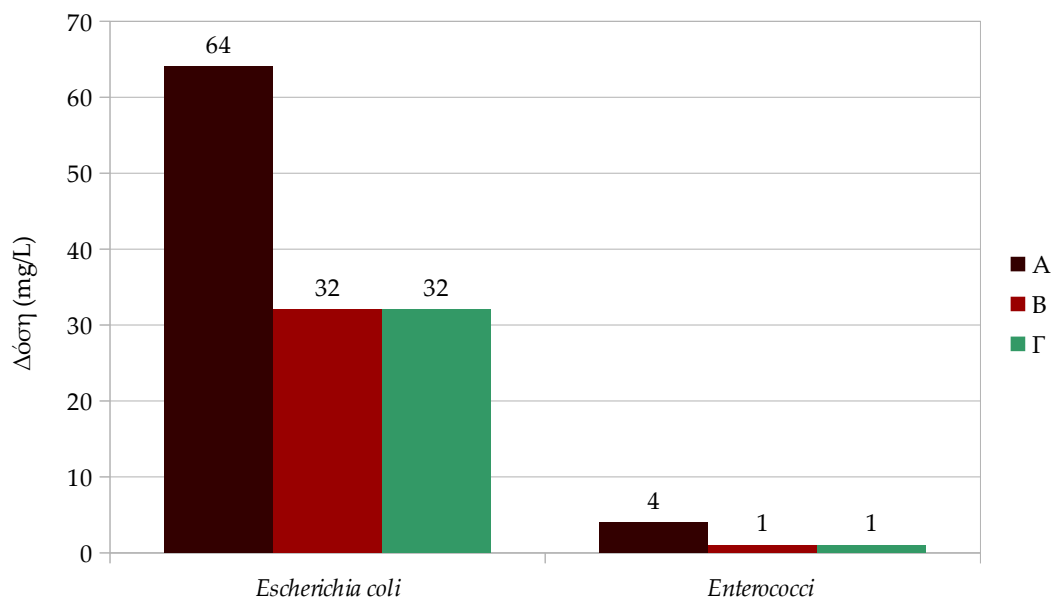
Σχήμα 19. Ποσοστιαία απομάκρυνση των *Enterococci* για διαφορετικές δόσεις AMP (mg/L).

Από το Σχήμα 19 παρατηρούμε ότι ο *Enterococci* παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με την *E. coli*, στην AMP. Στην περίπτωση αυτή, ωστόσο από τα 32 στελέχη, ανθεκτικά ήταν τα 15 (46,9%). Ο μεγαλύτερος αριθμός ανθεκτικών *Enterococci* καταγράφηκε στην είσοδο, όπου εντοπίστηκαν 6 στελέχη (60%). Ακολουθούν η έξοδος της δευτεροβάθμιας και η έξοδος με 5 (41,7%) και 4 (40%) στελέχη, αντίστοιχα. Τα ενδιάμεσα στελέχη ήταν συνολικά 2 (6,25%) και προέρχονται από την είσοδο (20%). Τα ευαίσθητα στελέχη ήταν συνολικά 15 (46,9%), τα 2 (20%) προέρχονται από την είσοδο, τα 7 (58,3%) από την έξοδο της δευτεροβάθμιας και τα υπόλοιπα 6 (60%) από την έξοδο.



Σχήμα 20. Προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών των *Enterococci* ως προς τη συμπεριφορά στην AMP

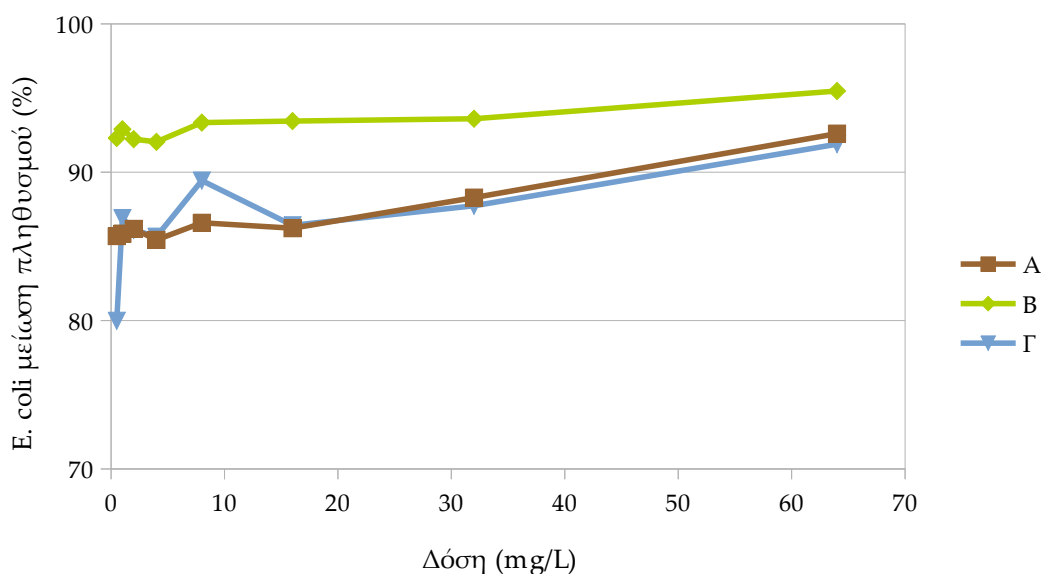
Η MIC₆₀ για κάθε γένος βακτηρίων φαίνεται στο Σχήμα 21.



Σχήμα 21. Αντιβιογράμμα για την AMP.

Γ1. *E. coli* vs SMX/TMP

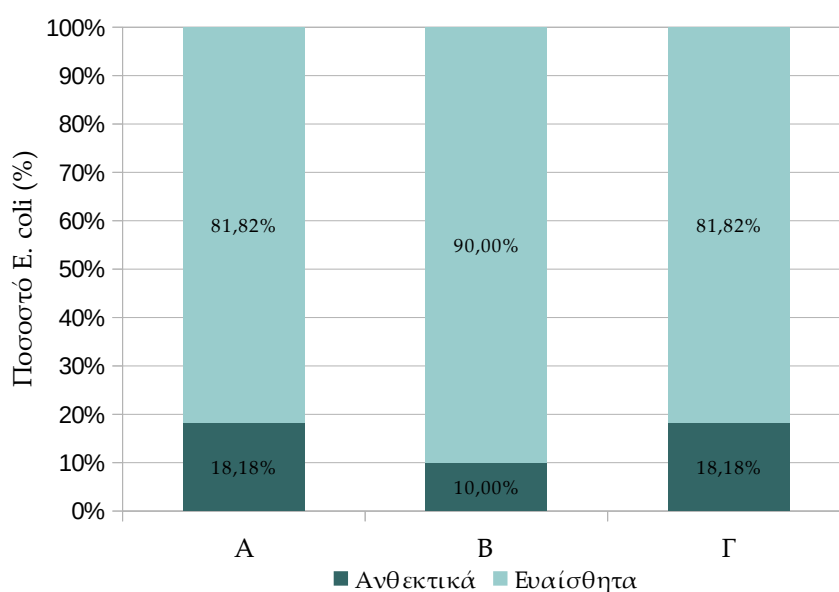
Οι δόσεις που απαιτούνται για τα στελέχη της *E. coli*, ανεξάρτητα από τη δεξαμενή προέλευσης, είναι χαμηλότερες από 0,5 mg/L, καθώς το 84,4% των στελεχών που εξετάσαμε είχε μείωση πάνω από 60% στην εν λόγω δόση.



Σχήμα 22. Μείωση του πληθυσμού της *E. coli* συναρτήσει της δόσης του SMX/TMP. Α: Είσοδος, Β: Έξοδος Δευτεροβάθμιας, Γ: Έξοδος.

Σε αυτή την περίπτωση όλα τα ποσοστά μείωσης του πληθυσμού ήταν υψηλά, με μεγαλύτερα εκείνα της εξόδου της δευτεροβάθμιας και έπειτα της εισόδου και της εξόδου. Επί του συνόλου των στελεχών η μείωση του πληθυσμού και από τις τρεις δεξαμενές ήταν μεγαλύτερη από 60% αναφορικά με την προτεινόμενη δόση αντιβιοτικού.

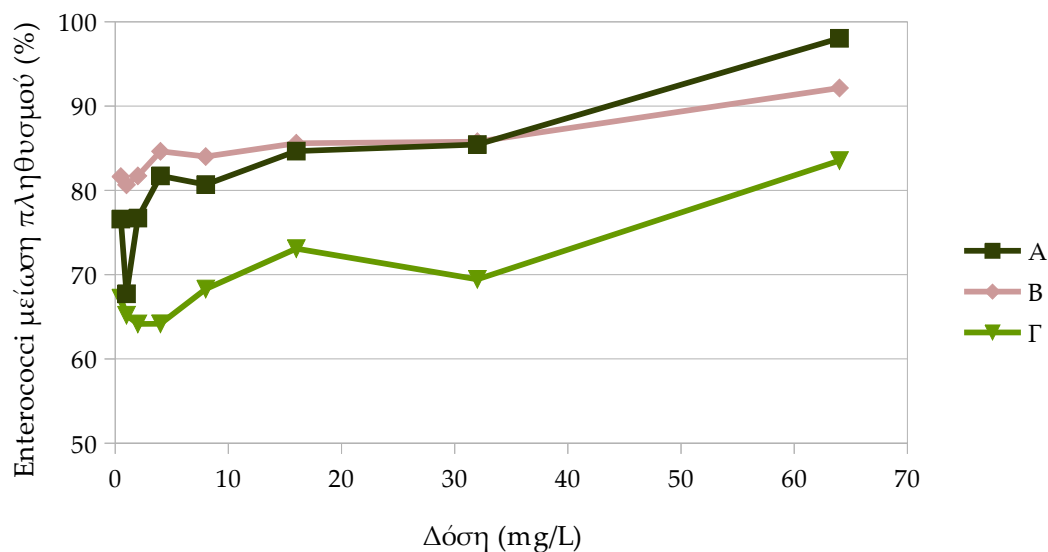
Από τα 32 στελέχη, που εξετάσαμε, 5 ήταν ανθεκτικά στο SMX/TMP (15,6%). Από αυτά τα 2 εντοπίστηκαν στην είσοδο (18,2%), 1 στην έξοδο της δευτεροβάθμιας (10%) και 2 στην έξοδο (18,2%). Ενδιάμεσα στελέχη για το γένος αυτό δεν ορίζονται με βάση τα αποτελέσματα. Τα ευαίσθητα στελέχη ήταν συνολικά 27 (84,4%), 9 στην είσοδο (81,8%), 9 στην έξοδο της δευτεροβάθμιας (90%) και 9 στην έξοδο (81,1%). Στο Σχήμα 23 φαίνεται η συμπεριφορά των στελεχών για τις εφαρμοζόμενες δόσεις SMX/TMP.



Σχήμα 23. Προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών της *E. coli* στο SMX/TMP.

Γ2. *Enterococci* vs SMX/TMP

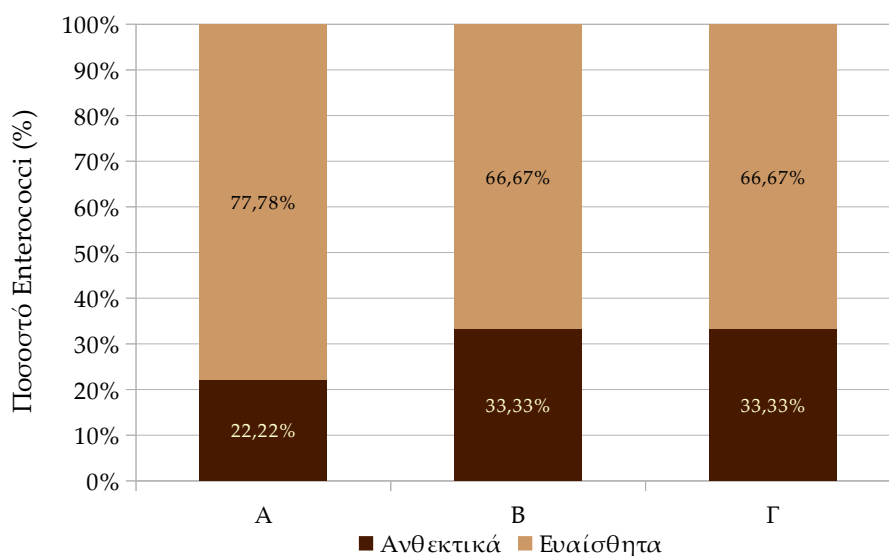
Οι δόσεις που χρειάστηκαν και στην περίπτωση των *Enterococci*, ανεξάρτητα της δεξαμενής προέλευσης, ήταν χαμηλότερες από 0,5 mg/L, καθώς το 70,4% των στελεχών, που εξετάσαμε μειώθηκε πάνω από 60% με εφαρμογή της συγκεκριμένης δόσης.



Σχήμα 24. Μείωση του πληθυσμού των *Enterococci* συναρτήσει της δόσης του SMX/TMP. Α: Είσοδος, Β: Έξοδος Δευτεροβάθμιας, Γ: Έξοδος.

Σε αυτή την περίπτωση όλα τα ποσοστά μείωσης του πληθυσμού ήταν υψηλά, με μεγαλύτερα εκείνα της εισόδου και της εξόδου της δευτεροβάθμιας και έπειτα της εξόδου. Επί του συνόλου των στελεχών η μείωση του πληθυσμού και στις 3 περιπτώσεις ήταν μεγαλύτερη από 60% αναφορικά με την προτεινόμενη δόση αντιβιοτικού.

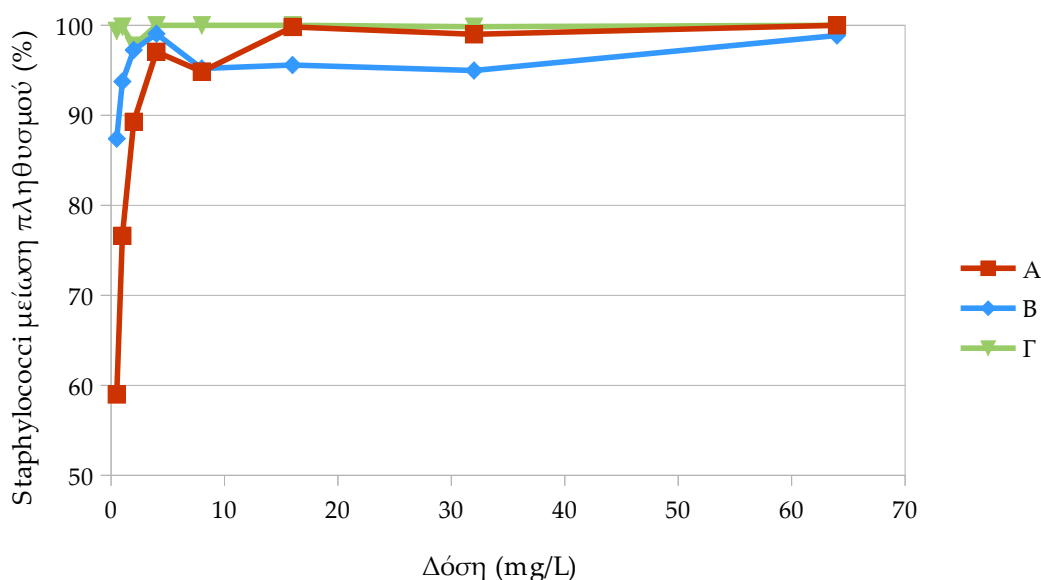
Από τα 27 στελέχη, που εξετάσαμε, 8 ήταν ανθεκτικά στο SMX/TMP (29,6%). Από αυτά τα 2 εντοπίστηκαν στην είσοδο (22,2%), 3 στην έξοδο της δευτεροβάθμιας (33,3%) και 3 στην έξοδο (33,3%). Ενδιάμεσα στελέχη για το γένος αυτό δεν ορίζονται με βάση τα αποτελέσματα. Τα ευαίσθητα στελέχη ήταν συνολικά 19 (70,4%), 7 στην είσοδο (77,8%), 6 στην έξοδο της δευτεροβάθμιας (66,7%) και 6 στην έξοδο (66,7%).



Σχήμα 25. Προφίλ ανθεκτικότητας των *Enterococci* στο SMX/TMP.

Γ3. *Staphylococci* Vs SMX/TMP

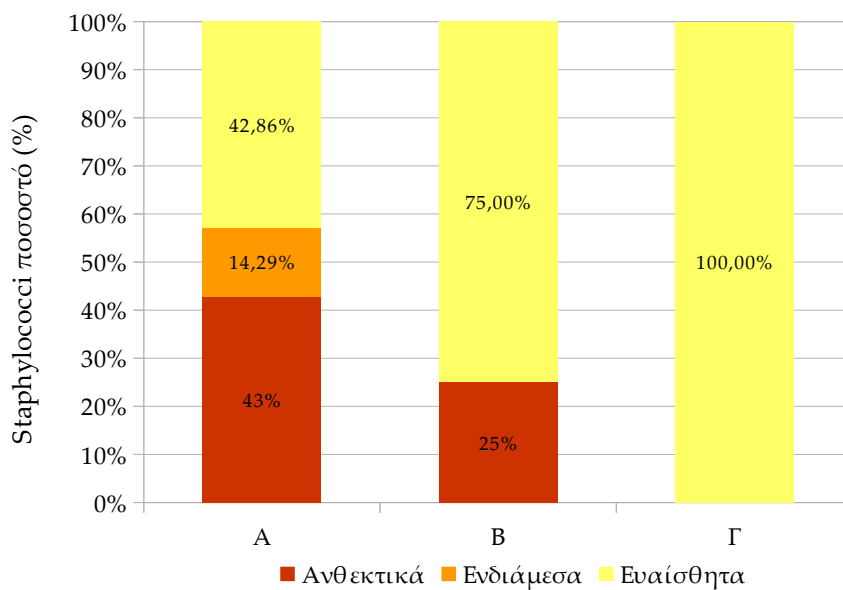
Οι δόσεις που απαιτήθηκαν για τους *Staphylococci* υπολογίστηκαν από 0,5 έως 1 mg/L, καθώς το 87% του πληθυσμού μειώθηκε σε ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο του 60% κατά την εφαρμογή τους.



Σχήμα 26. Μείωση του πληθυσμού των *Staphylococci* συναρτήσει της δόσης του SMX/TMP.

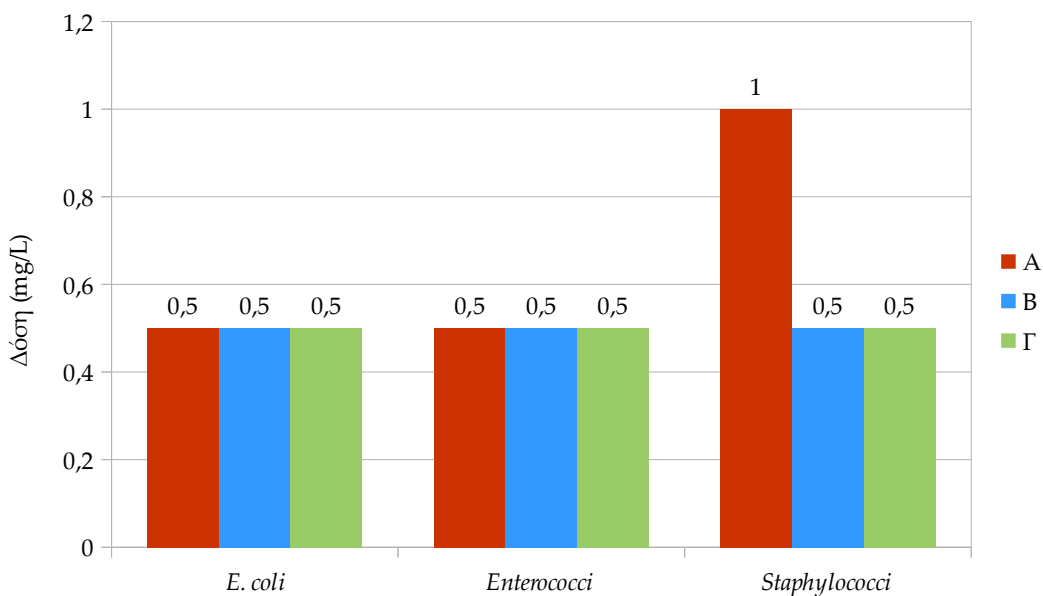
Στο Σχήμα 26 παρατηρούμε ότι τα ποσοστά μείωσης του πληθυσμού ήταν υψηλά και στις 3 περιπτώσεις, με τη διαφορά ότι στην περίπτωση της εισόδου, στις χαμηλότερες δόσεις αντιβιοτικού είχαμε λίγο μικρότερη μείωσης του πληθυσμού, γεγονός που αντανακλάται στη συμπεριφορά του βακτηρίου.

Από τα 23 στελέχη, που εξετάσαμε, 5 ήταν ανθεκτικά στο SMX/TMP (21,7%), 3 προέρχονται από την είσοδο (50%) και άλλα 2 από την έξοδο της δευτεροβάθμιας (25%). Εντοπίστηκε 1 (4,3%) μόλις ενδιάμεσο στέλεχος στην είσοδο (14,3%). Τα ευαίσθητα στελέχη ήταν συνολικά 17 (73,9%), 3 στην είσοδο (42,9%), 6 στην έξοδο της δευτεροβάθμιας (75%) και 8 στην έξοδο (100%). Στο Σχήμα 27 φαίνεται η συμπεριφορά των στελεχών για τις εφαρμοζόμενες δόσεις του SMX/TMP.



Σχήμα 27. Συμπεριφορά των *Staphylococci* στο SMX/TMP

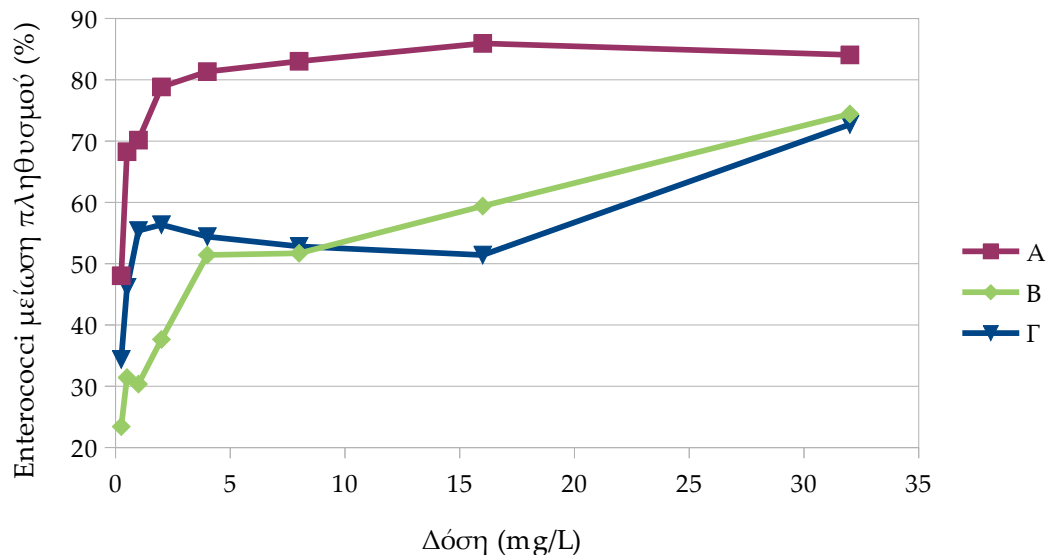
Οι τιμές της MIC που προέκυψαν από τα πειραματικά δεδομένα φαίνονται στο Σχήμα 28. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η πλειοψηφία των βακτηρίων – από όλα τα είδη – παρουσίασαν ευαισθησία στο αντιβιοτικό, επομένως οι δόσεις του Σχήματος 28 αντιστοιχούν στην MIC₈₀, καθώς η απομάκρυνση του πληθυσμού ήταν μεγαλύτερη από 80% στις περισσότερες περιπτώσεις.



Σχήμα 28. Αντιβιογράμμα για το SMX/TMP.

Δ1. *Enterococci* Vs TET

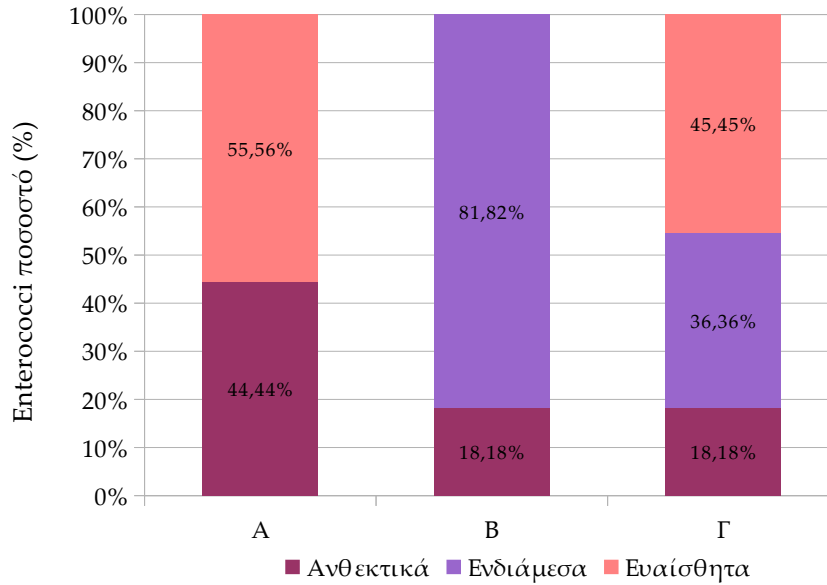
Για τους *Enterococci* χρειάστηκαν δόσεις από 0,5 ως 32 mg/L, καθώς αρκετά ήταν τα στελέχη, που παρουσίασαν κυμαινόμενη ανθεκτικότητα στην TET.



Σχήμα 29. Μείωση του πληθυσμού των *Enterococci* συναρτήσει της δόσης της TET.

Στην περίπτωση αυτή τα μεγαλύτερα ποσοστά μείωσης του πληθυσμού καταγράφηκαν για την είσοδο. Τα ποσοστά για την έξοδο της δευτεροβάθμιας και την έξοδο ήταν αρκετά παρόμοια και χαμηλότερα.

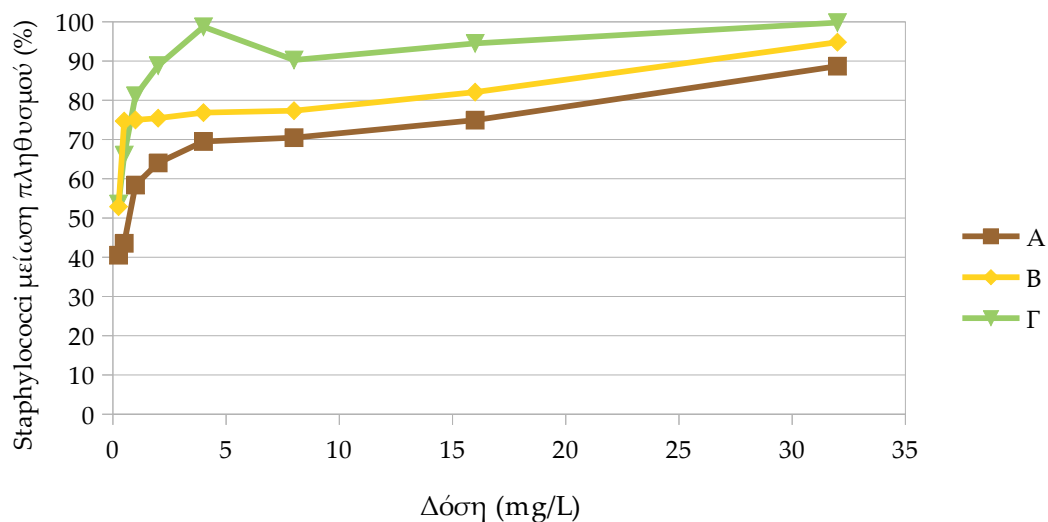
Από τα 30 στελέχη, που εξετάσαμε, 8 ήταν ανθεκτικά στην TET (26,6%). Από αυτά τα 4 (44,4%) εντοπίστηκαν στην είσοδο, και 2 στην έξοδο της δευτεροβάθμιας (18,2%) και στην έξοδο, αντίστοιχα. Λόγω των διακυμάνσεων στις εφαρμοζόμενες δόσεις αντιβιοτικού ήταν αναμενόμενο να έχουμε αρκετά ενδιάμεσα στελέχη, συνολικά 13 (43,3%). Από αυτά 9 προέρχονται από την έξοδο της δευτεροβάθμιας (81,8%) και 4 από την έξοδο (36,6%). Τα ευαίσθητα στελέχη ήταν συνολικά 10 (30%), 5 από την είσοδο (55,6%) και 5 από την έξοδο (45,4%).



Σχήμα 30. Προφίλ ανθεκτικότητας των *Enterococci* στην TET.

Δ2. *Staphylococci* Vs TET

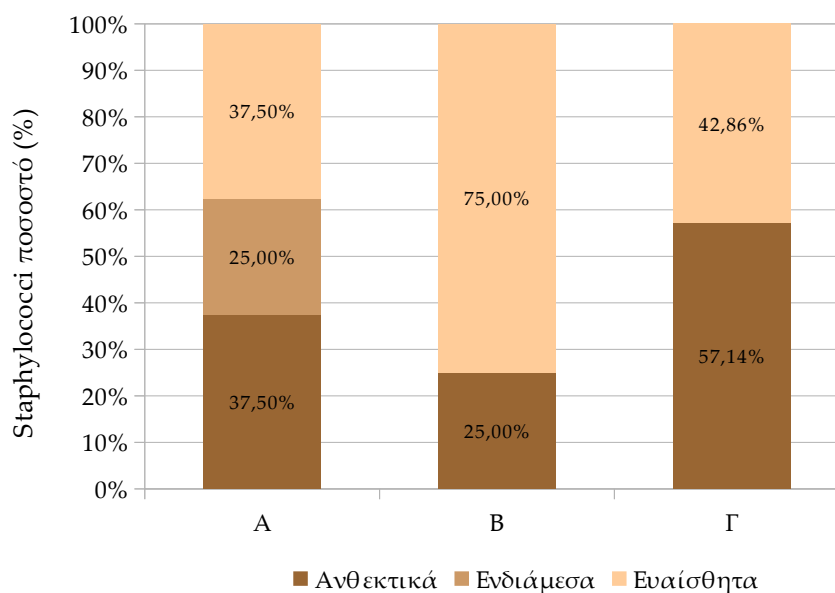
Για τους *Staphylococci* χρειάστηκαν δόσεις TET από 0,5 έως 2 mg/L, καθώς το 74% περίπου των εξεταζόμενων στελεχών μειώνονταν σε ποσοστό μεγαλύτερο από 60% για εφαρμογή αυτών.



Σχήμα 31. Μείωση του πληθυσμού των *Staphylococci* συναρτήσει της δόσης της TET.

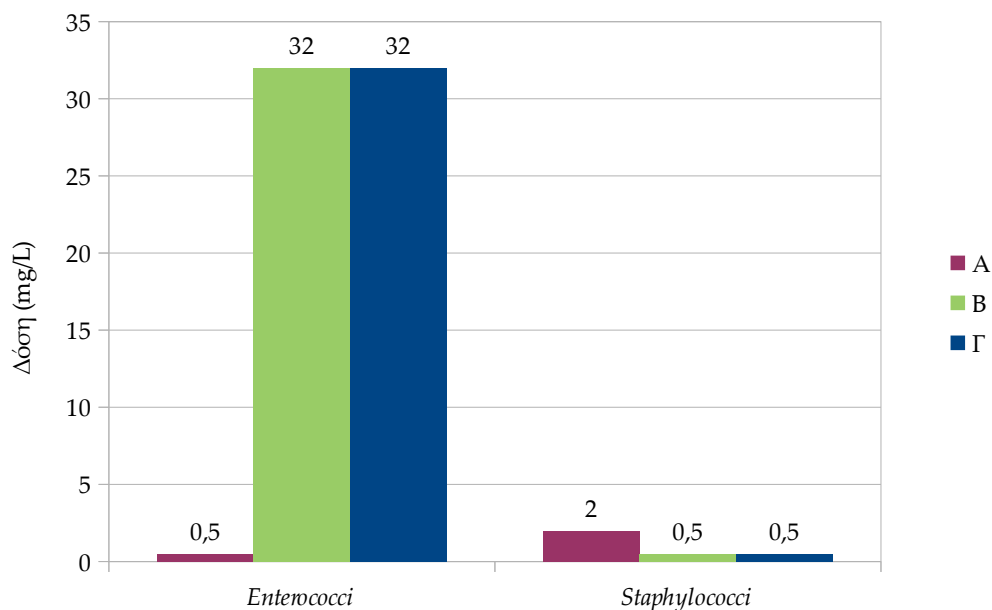
Στο Σχήμα 31 βλέπουμε ότι μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού των *Staphylococci* καταγράφεται για την έξοδο και η χαμηλότερη για την είσοδο. Για δόσεις TET μεγαλύτερες ή ίσες από 2 mg/L, παρατηρούμε ότι και στις τρεις περιπτώσεις η μείωση του πληθυσμού είναι μεγαλύτερη από 60%.

Από τα 23 στελέχη, που εξετάσαμε, 9 ήταν ανθεκτικά στην TET (39,1%). Από αυτά τα 3 εντοπίστηκαν στην είσοδο (37,5%), 2 στην έξοδο της δευτεροβάθμιας (25%) και 4 στην έξοδο (57,1%). Τα ενδιάμεσα στελέχη συνολικά ήταν 2 (8,7%) και προέρχονται από την είσοδο (25%). Τα ευαίσθητα στελέχη ήταν συνολικά 12 (52,2%), 3 από την είσοδο (37,5%), 6 από την έξοδο της δευτεροβάθμιας (75%) και 3 από την έξοδο (42,9%).



Σχήμα 32. Προφίλ ανθεκτικότητας των *Staphylococci* στην TET.

Η MIC₆₀ των *Enterococci* και των *Staphylococci* στα διάφορα στάδια επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων φαίνεται στο Σχήμα 33. Οι υψηλές συγκεντρώσεις που απαιτούνται για τους *Enterococci* που προέρχονται από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας και την έξοδο οφείλονται στην παρουσία πολλών ενδιάμεσων στελεχών. Η ανθεκτικότητα του βακτηρίου στην TET έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές.

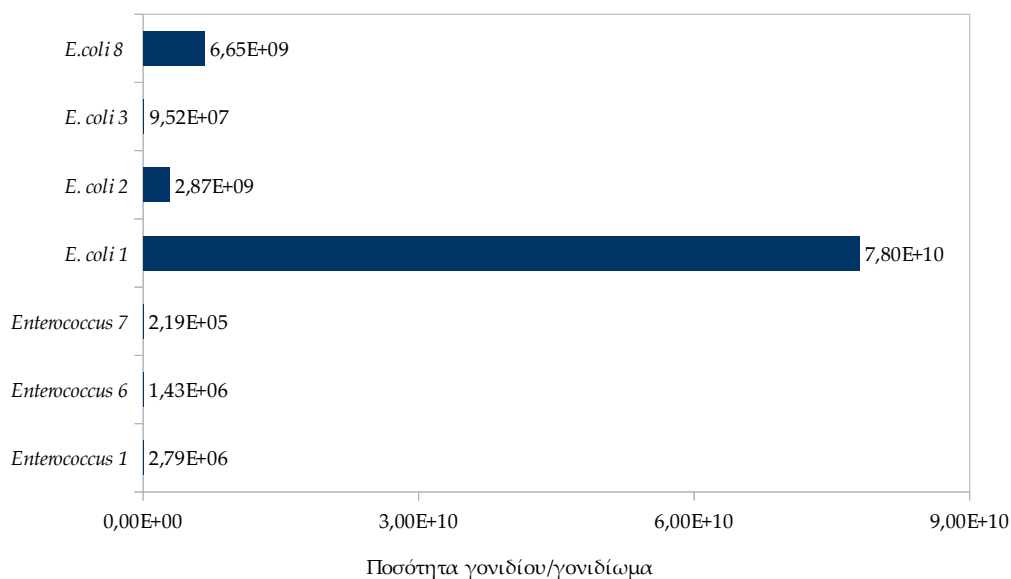


Σχήμα 33. Αντιβιογράμμα για την TET.

3.4 Γονίδια ανθεκτικότητας

1. *sulI*

Οι ποσότητες του γονιδίου που εντοπίστηκαν στα στελέχη των *E. coli* και των *Enterococci* που εξετάσαμε φαίνονται στο Σχήμα 34 και είναι εκφρασμένες συναρτήσει του συνόλου του γονιδιώματος των βακτηριακών στελεχών. Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήσαμε το μέγεθος του γονιδιώματος των ειδών *E. faecalis* και *E. coli* k-12.

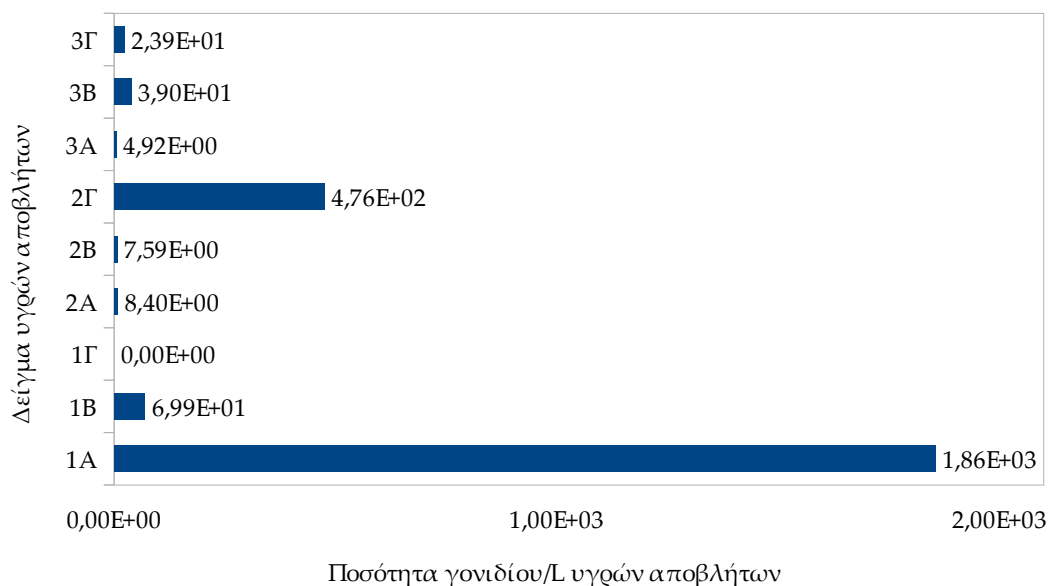


Σχήμα 34. Ποσότητα του γονιδίου *sulI* στο γονιδίωμα των στελεχών που ήταν ανθεκτικά στο SMX/TMP. *Enterococci*: A = (1, 7), B = (6). *E. coli*: (A) = (1, 2), (B) = (3), (Γ) = (8)

Από τα 8 στελέχη που παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας στο SMX/TMP, τα 7 έφεραν το γονίδιο *suII* (87,5%). Οι μεγαλύτερες ποσότητες του γονιδίου καταγράφηκαν για την *E. coli*. Όλα τα στελέχη έφεραν το γονίδιο και η μεγαλύτερη ποσότητα καταγράφηκε στο στέλεχος 1 που προέρχεται από την είσοδο. Ακολουθούν τα στελέχη 8 (έξοδος), 2 (είσοδος) και 3 (έξοδος δευτεροβάθμιας).

Στους *Enterococci* το γονίδιο εντοπίστηκε σε μικρές ποσότητες στα στελέχη 1, 7 και 6 που προέρχονται από την είσοδο και την έξοδο της δευτεροβάθμιας, αντίστοιχα.

Τέλος, στα δείγματα των υγρών αποβλήτων που συλλέξαμε από την είσοδο, την έξοδο της δευτεροβάθμιας και της χλωρίωσης εντοπίστηκαν μεγάλες ποσότητες του γονιδίου και τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 35. Από τα 9 εξεταζόμενα δείγματα, τα 8 φέρουν το *suII* (88,89%). Τα δείγματα 1-3 αντιστοιχούν στην είσοδο, τα 4-6 στην έξοδο της δευτεροβάθμιας και τα 7-9 στην έξοδο. Παρατηρούμε, ότι σε αντιστοιχία με τα στελέχη, στα οποία εντοπίστηκε η μεγαλύτερη ποσότητα του γονιδίου, οι μεγαλύτερες ποσότητες του *suII* βρέθηκαν στην είσοδο.



Σχήμα 35. Ποσότητα του *suII* στα δείγματα των υγρών αποβλήτων, εκφρασμένη ανά L υγρών αποβλήτων.

2. qnrA

Η ποσότητα του γονιδίου που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στην CIP φαίνεται στο Σχήμα 36.

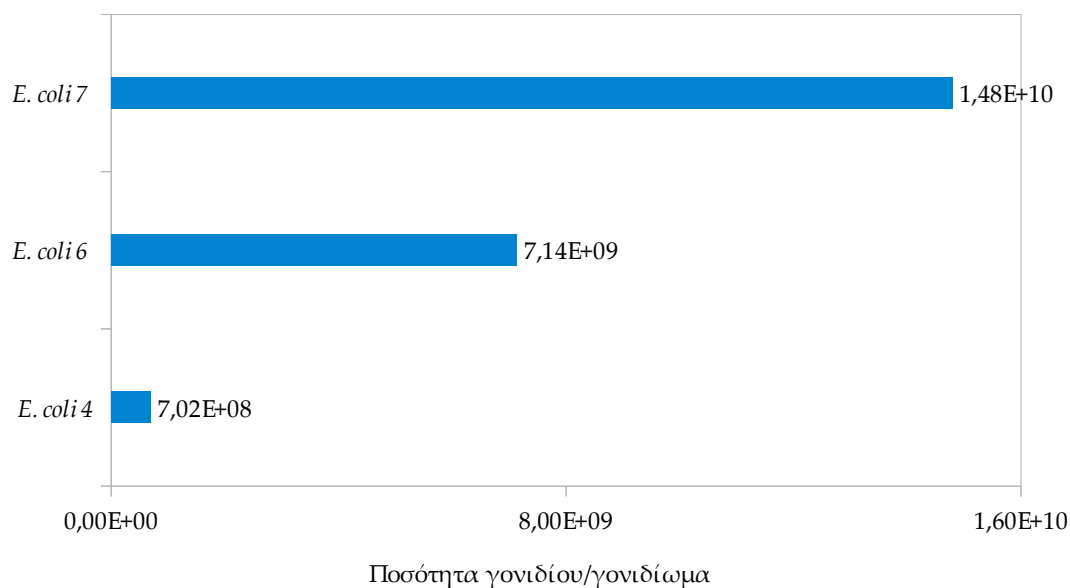


Σχήμα 36. Ποσότητα του γονιδίου *qnrA* στο σύνολο του γονιδιώματος των στελεχών. *E. coli*: (B) = (7), (Γ) = (4).

Από τα 11 πιο ανθεκτικά στη CIP στελέχη που επιλέξαμε, μόλις τα 2 έφεραν το γονίδιο *qnrA* (18,2%). Τα στελέχη αυτά ανήκουν στο γένος *E. coli* και προέρχονται από την έξοδο της δευτεροβάθμιας και την έξοδο με μεγαλύτερη ποσότητα να καταγράφεται για το στέλεχος της εξόδου της δευτεροβάθμιας. Κανένα από τα στελέχη των *Staphylococci* και των *Enterococci* δεν έφερε το συγκεκριμένο γονίδιο. Τέλος, κανένα από τα 9 δείγματα γενετικού υλικού, που εντοπίστηκε στα υγρά απόβλητα, σε κανένα δεν εντοπίστηκε το γονίδιο *qnrA*.

3. *ampC*

Η ποσότητα του γονιδίου που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στην AMP φαίνεται στο Σχήμα 37.

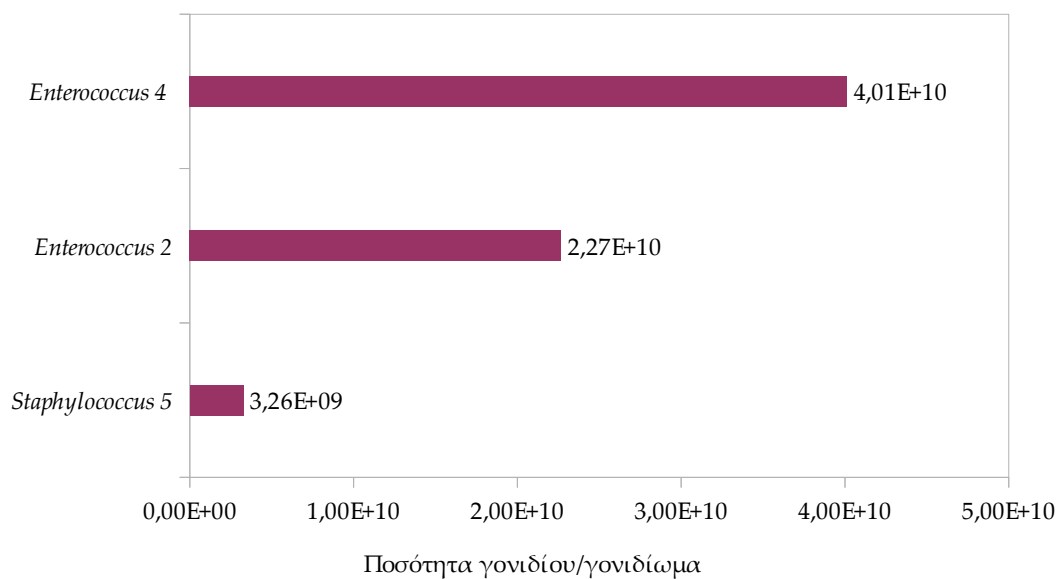


Σχήμα 37. Ποσότητα του γονιδίου *ampC* στο σύνολο του γονιδιώματος των στελεχών. *E. coli*: (Α) = (6), (Β) = (7), (Γ) = (4).

Μεταξύ των 7 πιο ανθεκτικών στην AMP στελεχών, 3 στελέχη έφεραν το γονίδιο *ampC*, δηλαδή το 42,8% των στελεχών και όλα ανήκουν στο γένος *E. coli*. Στο στέλεχος που προέρχεται από την έξοδο της δευτεροβάθμιας (*E. coli* 7) αντιστοιχεί η μεγαλύτερη ποσότητα του γονιδίου και ακολουθούν το το στέλεχος της εισόδου (*E. coli* 6) και της εξόδου (*E. coli* 4). Μεταξύ των *Enterococci* που εξετάσαμε, κανένα στέλεχος δεν έφερε το συγκεκριμένο γονίδιο. Σε κανένα από τα δείγματα των υγρών αποβλήτων δεν εντοπίστηκε το *ampC*.

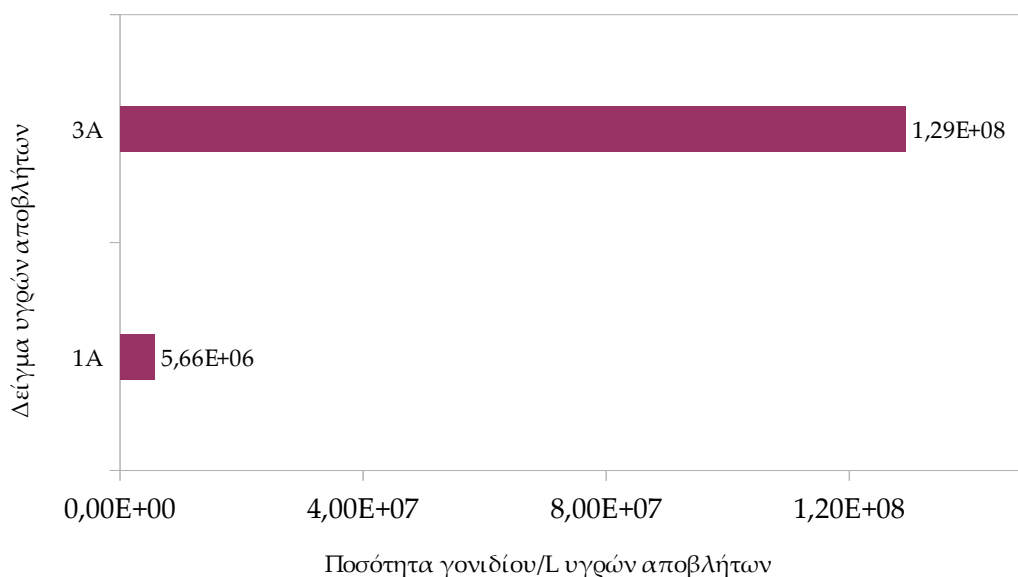
4. *tetM*

Η ποσότητα του γονιδίου που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στην TET φαίνεται στο Σχήμα 38.



Σχήμα 38. Ποσότητα του γονιδίου *tetM* στο σύνολο του γονιδιώματος των στελεχών. *S. aureus*: (A) = (1). *Enterococci*: (B) = (2, 4).

Μεταξύ των 6 πιο ανθεκτικών στην TET στελεχών, 3 στελέχη φέρουν το γονίδιο *tetM*, δηλαδή το 50% του συνόλου των στελεχών. Τη μεγαλύτερη ποσότητα του γονιδίου φέρει το στέλεχος *Enterococcus 4* που προέρχεται από την έξοδο της δευτεροβάθμιας και ακολουθούν το στέλεχος *Enterococcus 2* από την ίδια δεξαμενή και το *Staphylococcus 5* από την είσοδο. Από τα 9 δείγματα υγρών αποβλήτων που εξετάσαμε, 2 (22,22%) και συγκεκριμένα της εισόδου έφεραν το γονίδιο *tetM*. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Σχήμα 39.



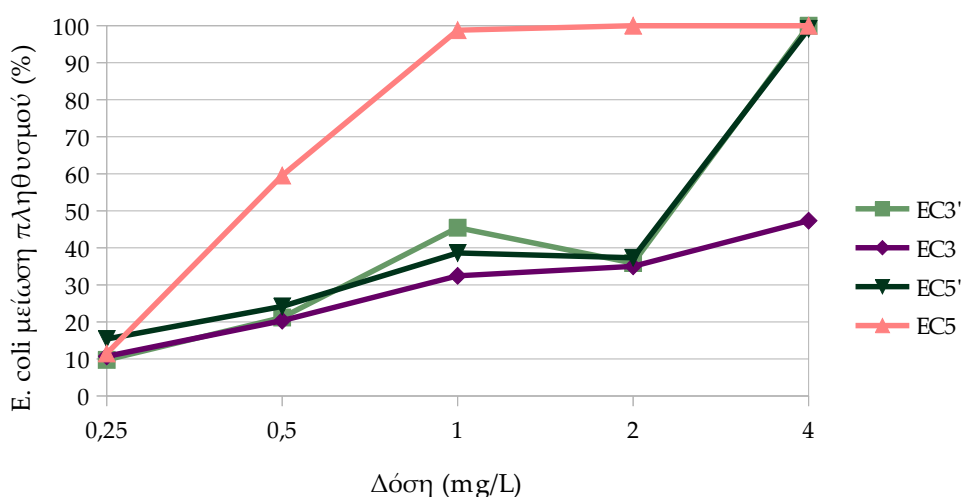
Σχήμα 39. Ποσότητα του γονιδίου *tetM* στα δείγματα των υγρών αποβλήτων, εκφρασμένα ανά L υγρών αποβλήτων.

3.5 Πειράματα μικτών πληθυσμών σε πρότυπο αντιδραστήρα

Η οπτική απορρόφηση των καλλιιεργειών των μικτών πληθυσμών σε κάθε πείραμα φαίνονται στο Παράρτημα.

A1. *E. coli* vs Müller Hinton Broth vs CIP

Στο Σχήμα 40 φαίνεται η μείωση του πληθυσμού που προέκυψε μετά την ταυτόχρονη καλλιέργεια ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών *E. coli* σε πυκνό και αραιωμένο Müller Hinton Broth.



Σχήμα 40. Απόκριση του πληθυσμού της *E. coli* στις χορηγούμενες δόσεις CIP. EC3, EC5: πληθυσμός μετά από επώαση 3 και 5 ημερών σε πυκνό Mueller Hinton Broth, EC3', EC5': πληθυσμός μετά από επώαση 3 και 5 ημερών σε αραιωμένο Mueller Hinton Broth.

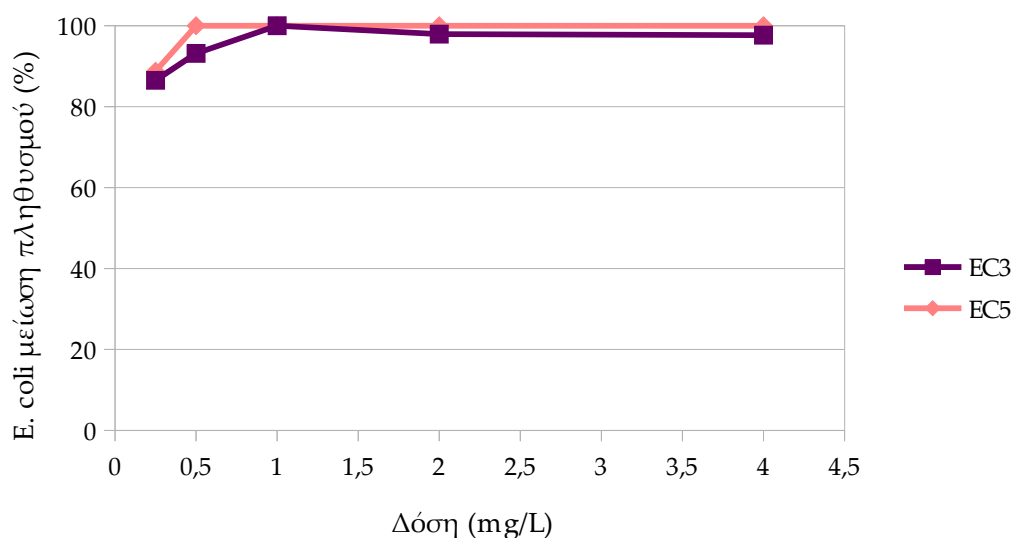
Πυκνό θρεπτικό μέσο: Η διαφορά στη συμπεριφορά του πληθυσμού μεταξύ της 3ης και 5ης μέρας είναι αισθητή. Στην πρώτη περίπτωση η απομάκρυνση του μικτού πληθυσμού δεν ξεπερνά το 50% για δόση 8 φορές πάνω από τα 0,5 mg/L που έχουμε ορίσει ως MIC₆₀ (και τα δύο στελέχη προέρχονται από την είσοδο). Αντίθετα, η μείωση για τον πληθυσμό που λάβαμε στις 5 ημέρες ήταν περίπου 60%, ενώ για δόση διπλάσια από την ορισμένη η μείωση είναι περίπου 100%. Καθώς δεν προσδιορίσαμε πειραματικά σε ποιο στάδιο ανάπτυξης βρισκόταν ο πληθυσμός στις στιγμές της δειγματοληψίας δε μπορούμε να βγάλουμε κάποιο γενικότερο συμπέρασμα. Ωστόσο, από την όψη μόνο του διαλύματος στον αντιδραστήρα την 5η ημέρα επώασης και τις πράσινες αποχρώσεις που προέκυψαν από παραπροϊόντα του μεταβολισμού είναι πιθανό ο πληθυσμός να βρισκόταν στη φάση θανάτου. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί υπάρχει διαφορά μεταξύ των πληθυσμών στις 3 και 5 ημέρες.

Αραιό θρεπτικό μέσο: Και στις 2 περιπτώσεις – 3 και 5 ημέρες – ο πληθυσμός παρουσίασε ανθεκτικότητα στη CIP, καθώς επίσης οι καμπύλες μείωσης του πληθυσμού είναι παρόμοιες. Χρειάστηκε δε 8 φορές παραπάνω δόση για απομάκρυνση του πληθυσμού 100% στις 3 και 5 ημέρες, αντίστοιχα. Όπως έχουν αναφέρει και άλλοι

ερευνητές, τα βακτήρια στο περιβάλλον αναπτύσσονται σε συνθήκες με πολύ λιγότερα θρεπτικά και πηγές ενέργειας. Ο αριθμός των κυττάρων είναι πολύ χαμηλότερος συγκριτικά με τον πληθυσμό στο πυκνό θρεπτικό στις 3 και στις 5 ημέρες, όπως φαίνεται και από τις φωτομετρήσεις. Το χρώμα στο μέσο ανάπτυξης των πληθυσμών ήταν επίσης λιγότερο θολό και με αποχρώσεις του πορτοκαλί συγκριτικά με το άλλο θρεπτικό μέσο.

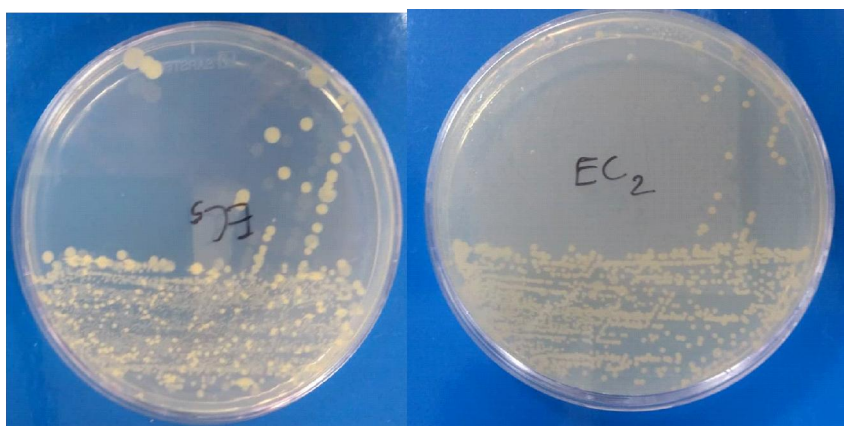
A2. *E. coli* vs Απόβλητο vs CIP

Στο Σχήμα 41 φαίνεται η μείωση του μικτού πληθυσμού των *E. coli* στο πυκνό και στο αραιωμένο απόβλητο.



Σχήμα 41. Απόκριση του πληθυσμού της *E. coli* στις χορηγούμενες δόσεις CIP. EC3, EC5: πληθυσμός μετά από επώαση 3 και 5 ημερών σε πυκνό απόβλητο.

Για τον πληθυσμό, που επωάστηκε σε υγρό απόβλητο (εκροή δευτεροβάθμιας επεξεργασίας) τα αποτελέσματα είναι εμφανώς διαφορετικά. Στην περίπτωση αυτή ο πληθυσμός παρουσίασε μεγάλη ευαισθησία. Επιπλέον, στο αραιωμένο απόβλητο δεν παρατηρήθηκε καθόλου ανάπτυξη του μικροοργανισμού ούτε στις 3 ούτε στις 5 ημέρες. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο μικρό αριθμό των θρεπτικών στο συγκεκριμένο περιβάλλον, είτε στις διατροφικές “προτιμήσεις” του βακτηρίου αυτού. Στην Εικόνα 4 φαίνονται οι αποικίες, μετά την καλλιέργεια 3 και 5 ημερών, αντίστοιχα. Είναι εμφανές ότι οι αποικίες των 5 ημερών έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από εκείνες των 3, γεγονός που έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές. Ενδιαφέρον είχε ότι δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη θολότητα του υγρού σε κανέναν από τους αντιδραστήρες τόσο σε σχέση με το αρχικό όσο και κατά την ανάπτυξη στο πυκνό θρεπτικό μέσο. Αυτό δηλώνουν και οι μεγάλες διαφορές στις τιμές της οπτικής απορρόφησης, που και στις 2 περιπτώσεις είναι περίπου 300 φορές μεγαλύτερες στο πυκνό θρεπτικό μέσο.



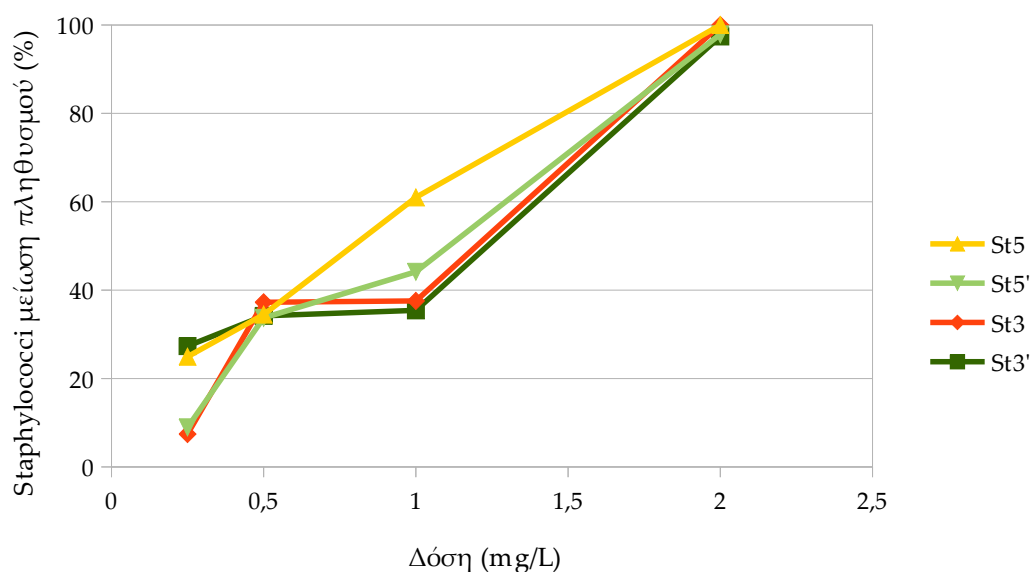
(α)

(β)

Εικόνα 4. Ο μικτός πληθυσμός *E. coli* που προέκυψε μετά από καλλιέργειες 3 ημερών (α) και 5 ημερών (β).

B1. *Staphylococci* vs Mueller Hinton Broth vs CIP

Στο Σχήμα 42 φαίνεται η μείωση του μικτού πληθυσμού των *Staphylococci* στο πυκνό και στο αραιωμένο Müller Hinton Broth.



Σχήμα 42. Απόκριση του πληθυσμού των *Staphylococci* στις χορηγούμενες δόσεις CIP. St3, St5: πληθυσμός μετά από επώαση 3 και 5 ημερών σε πυκνό Mueller Hinton Broth, St3', St5': πληθυσμός μετά από επώαση 3 κι 5 ημερών σε αραιωμένο Mueller Hinton Broth.

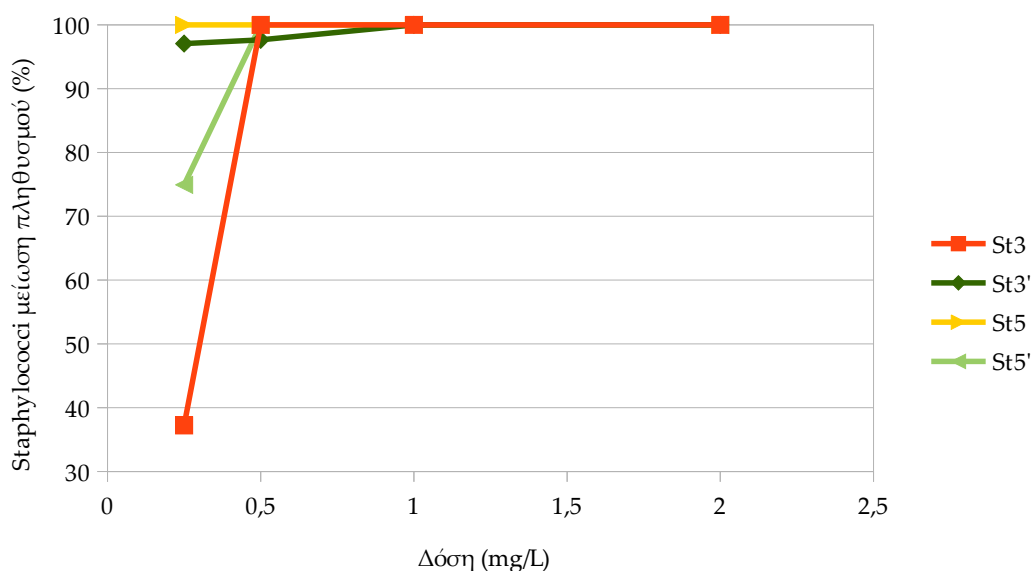
Και στην περίπτωση των *Staphylococci* ο νέος πληθυσμός ήταν ανθεκτικός στη CIP, στη δόση που έχουμε ορίσει ως MIC₆₀.

Πυκνό θρεπτικό μέσο: Η διαφορά στη συμπεριφορά του πληθυσμού μεταξύ της 3ης και 5ης μέρας είναι μικρή, ωστόσο στις δόσεις 0,25 και 1 mg/L τα ποσοστά απομάκρυνσης είναι χαμηλότερα στον πληθυσμό των 3 ημερών. Όπως παρατηρήσαμε και για τον αντίστοιχο πληθυσμό της *E. coli*, το υγρό μέσο στον αντιδραστήρα, που αναπτύσσονταν οι *Staphylococci*, την 5η ημέρα έφερε πράσινες αποχρώσεις, που πιθανό να σχετίζονται με τοξικά παραπροϊόντα του μεταβολισμού. Ωστόσο, για δόση 0,25 mg/L ο πληθυσμός των 5 ημερών, αντίθετα από την *E. coli* ήταν ανθεκτικός στη CIP, γεγονός που θα μπορούσε να οφείλεται στις δομικές αλλαγές μεταξύ των 2 βακτηρίων, ενώ άρχισε να μειώνεται στα επιθυμητά επίπεδα μετά από τετραπλάσια δόση.

Αραιό θρεπτικό μέσο: Και στις 2 περιπτώσεις – 3 και 5 ημέρες – ο πληθυσμός παρουσίασε ανθεκτικότητα στη CIP, καθώς επίσης οι καμπύλες μείωσης του πληθυσμού είναι παρόμοιες. Και οι δύο πληθυσμοί εμφάνισαν υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας συγκριτικά με τον πληθυσμό των 5 ημερών στο πυκνό θρεπτικό μέσο και αυτό πιθανόν σχετίζεται με τις συνθήκες έλλειψης τροφής. Ο αριθμός των κυττάρων είναι πολύ χαμηλότερος συγκριτικά με τον πληθυσμό στο πυκνό θρεπτικό στις 3 και στις 5 ημέρες, όπως φαίνεται και από τις φωτομετρήσεις. Το χρώμα στο μέσο ανάπτυξης των πληθυσμών ήταν επίσης λιγότερο θολό και με αποχρώσεις του πορτοκαλί συγκριτικά με το άλλο θρεπτικό μέσο.

B2. *Staphylococci* vs Απόβλητο vs CIP

Στο Σχήμα 43 φαίνεται η μείωση του μικτού πληθυσμού των *Staphylococci* στο πυκνό και στο αραιωμένο απόβλητο.



Σχήμα 43. Απόκριση του πληθυσμού των *Staphylococci* στις χορηγούμενες δόσεις CIP. St3, St5: πληθυσμός μετά από επώαση 3 και 5 ημερών σε πυκνό απόβλητο, St3', St5': πληθυσμός μετά από επώαση 3 κι 5 ημερών σε αραιωμένο απόβλητο

Ο πληθυσμός που αναπτύχθηκε στο υγρό απόβλητο φαίνεται να παρουσιάζει ανθεκτικότητα στη CIP μόνο στις 3 ημέρες. Ωστόσο απαιτούνται παραπάνω πειράματα προκειμένου να είμαστε βέβαιοι. Επιπλέον, στο αραιωμένο απόβλητο δεν παρατηρήθηκε καθόλου ανάπτυξη του μικροοργανισμού ούτε στις 3 ούτε στις 5 ημέρες. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο μικρό αριθμό των θρεπτικών στο συγκεκριμένο περιβάλλον, είτε στις διατροφικές “προτιμήσεις” του βακτηρίου αυτού. Στις Εικόνες 5 και 6 βλέπουμε τις αποικίες που προέκυψαν στην 3η και στην 5η μέρα καλλιέργειας του μικτού πληθυσμού. Σε αντίθεση με την *E. coli* ο πληθυσμός δεν παρουσιάζει εμφανείς φαινοτυπικές διαφορές ως προς το μέγεθος των αποικιών. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν εμφανείς διαφορές στη θολότητα του υγρού μέσου σε κανέναν από τους αντιδραστήρες τόσο σε σχέση με την εικόνα του αντιδραστήρα στην εκκίνηση του πειράματος όσο και κατά τα πειράματα ανάπτυξης στο πυκνό θρεπτικό μέσο. Αυτό δηλώνουν και οι μεγάλες διαφορές στις τιμές της οπτικής απορρόφησης.



(α)

(β)

Εικόνα 5. Μικτός πληθυσμός *Staphylococci* καλλιεργημένων σε πλούσιο απόβλητο για 3 (α) και 5 (β) ημέρες.



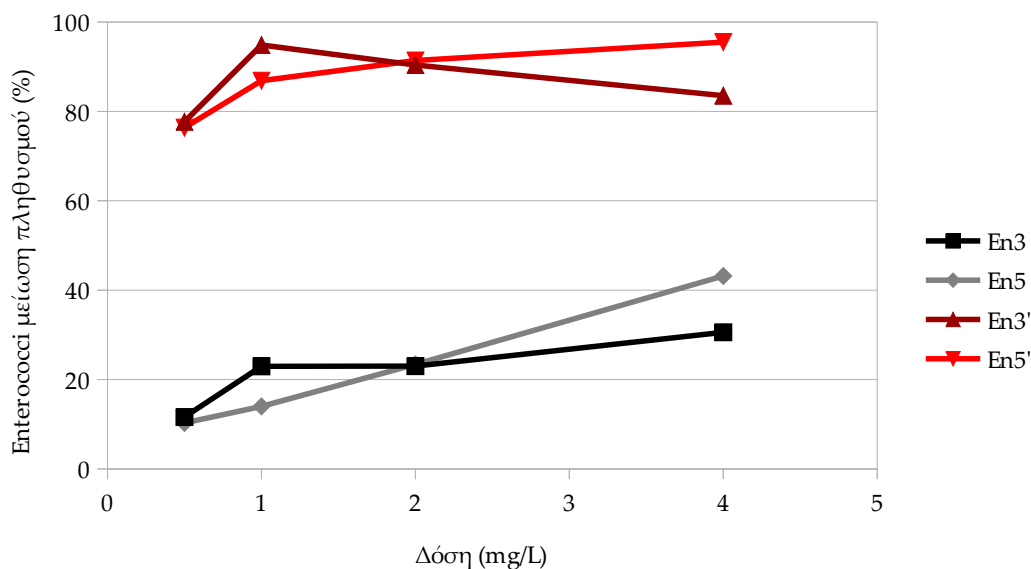
(α)

(β)

Εικόνα 6. Μικτός πληθυσμός *Staphylococci* καλλιεργημένων σε αραιωμένο με NaCl 0.8% απόβλητο (αναλογία 1:3) για 3 (α) και 5 (β) ημέρες

Γ1. *Enterococci* Vs Mueller Hinton Broth vs AMP

Στο Σχήμα 44 φαίνεται η μείωση του μικτού πληθυσμού των *Enterococci* στο πυκνό και στο αραιωμένο Müller Hinton Broth.



Σχήμα 44. Απόκριση του πληθυσμού των *Enterococci* στις χορηγούμενες δόσεις AMP. En3, En5: πληθυσμός μετά από επώαση 3 και 5 ημερών σε πυκνό Mueller Hinton Broth, En3', En5': πληθυσμός μετά από επώαση 3 κι 5 ημερών σε αραιωμένο Mueller Hinton Broth.

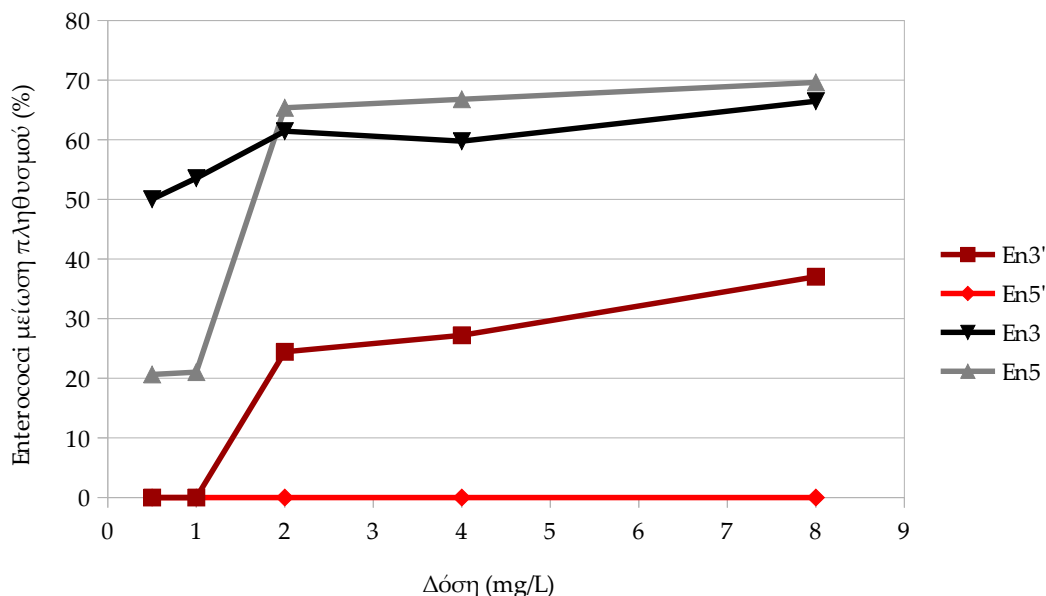
Οι πληθυσμοί των *Enterococci* παρουσίασαν δύο ακραίες συμπεριφορές στην AMP όσον αφορά τα διαφορετικά μέσα ανάπτυξης. Στην περίπτωση του πυκνού θρεπτικού μέσου είχαμε επαγωγή της ανθεκτικότητας, ενώ αντίθετα στο αραιό θρεπτικό είχαμε αυξημένη ευαισθησία του πληθυσμού. Το υγρό στον αντιδραστήρα δεν έφερε τις αποχρώσεις που παρατηρήθηκαν στα πειράματα με τους πληθυσμούς των *E. coli* και των *Staphylococci*, ωστόσο ήταν ελαφρώς πιο θολό συγκριτικά με την εικόνα του αντιδραστήρα στην εκκίνηση του πειράματος. Το γεγονός αυτό αντανακλάται και από τις φωτομετρήσεις, οι οποίες είναι πολύ χαμηλότερες σε σχέση με εκείνες των άλλων δύο βακτηρίων και στο πυκνό και στο αραιό θρεπτικό μέσο.

Πυκνό θρεπτικό μέσο: Η διαφορά μεταξύ της 3ης και 5ης ημέρας είναι ανεπαίσθητη με λίγο χαμηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης στα 4 mg/L για τον πληθυσμό της 3ης ημέρας.

Αραιό θρεπτικό μέσο: Ο πληθυσμός και στις 2 περιπτώσεις ήταν ευαίσθητος στην AMP. Αυτό που αξίζει να παρατηρήσουμε είναι ότι οι φωτομετρήσεις μεταξύ του αραιού και πυκνού θρεπτικού μέσου στις 5 ημέρες δε διαφέρουν πολύ. Η δυνατότητα του Εντερόκοκκου να αναπτύσσεται σε περιβάλλοντα με συνθήκες έλλειψης τροφής έχει περιγραφεί από πολλούς ερευνητές (Giard et al., 1996; Hartke et al, 1998). Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή ενδέχεται η στέρηση τροφής να ήταν καθοριστική για την εξασθένηση του βακτηρίου.

Γ2. *Enterococcus sp.* Vs Απόβλητο vs AMP

Στο Σχήμα 45 φαίνεται η μείωση του μικτού πληθυσμού των *Enterococci* στο πυκνό και στο αραιωμένο απόβλητο.



Σχήμα 45. Απόκριση του πληθυσμού των *Enterococci* στις χορηγούμενες δόσεις AMP. En3, En5: πληθυσμός μετά από επώαση 3 και 5 ημερών σε πυκνό απόβλητο, En3', En5': πληθυσμός μετά από επώαση 3 κι 5 ημερών σε αραιωμένο απόβλητο.

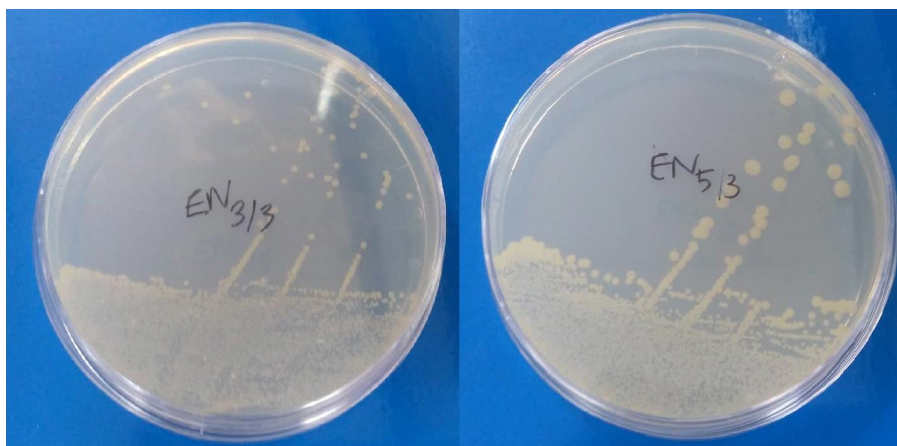
Η καλλιέργεια του μικτού πληθυσμού στο υγρό απόβλητο είχε αντίθετα αποτελέσματα τόσο σε σχέση με την καλλιέργεια στο Mueller Hinton Broth όσο και με τους μικτούς πληθυσμούς *E. coli* και *Staphylococci*. Στην περίπτωση αυτή ο μικτός πληθυσμός ήταν ανθεκτικός στην AMP με εξαίρεση τον πληθυσμό στο πυκνό απόβλητο, ο οποίος ήταν ενδιάμεσος. Επιπλέον, όπως παρατηρούμε και στο Σχήμα 45 η ανθεκτικότητα του πληθυσμού είναι ακόμα μεγαλύτερη στην περίπτωση των καλλιεργειών στο αραιωμένο απόβλητο (1:3 με NaCl 0,8%) και μάλιστα για δόση διπλάσια από την προτεινόμενη το ποσοστό μείωσης του πληθυσμού δεν ξεπερνά το 40%. Φαινοτυπικά, όπως συνέβη και με το μικτό πληθυσμό των *E. coli*, οι αποικίες του πληθυσμού των 5 ημερών είχαν μεγαλύτερο μέγεθος από εκείνες των 3 ημερών και αυτό το χαρακτηριστικό παρατηρήθηκε και στο αραιωμένο απόβλητο. Στις Εικόνες 7 και 8 φαίνεται το μέγεθος των αποικιών ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας.



(α)

(β)

Εικόνα 7. Ο μικτός πληθυσμός των *Enterococci* μετά από 3 (α) και 5 (β) ημέρες καλλιέργειας σε πυκνό υγρό απόβλητο.



(α)

(β)

Εικόνα 8. Ο μικτός πληθυσμός των *Enterococci* μετά από 3 (α) και 5 (β) ημέρες καλλιέργειας σε απόβλητο αραιωμένο 1:3 με NaCl 0,8%.

4. Συμπεράσματα – συζήτηση

4.1 MIC και ανθεκτικά βακτήρια

Συνοπτικά μπορούμε να πούμε τα παρακάτω σχετικά με τα βακτήρια που εξετάσαμε.

E. coli

Στο σύνολο των στελεχών της *E. coli*, τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικότητας καταγράφηκαν για την AMP (36,7%) και ακολουθούν η CIP (30%) και το SMX/TMP (15,6%). Τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη προέρχονται από την έξοδο, με ποσοστό 42,9% και ακολουθούν η είσοδος και η έξοδος της δευτεροβάθμιας με ποσοστά 35,7% και 21,4%. Τα ενδιάμεσα στελέχη ήταν συνολικά 4 (13,3% επί του συνόλου των εξεταζόμενων στελεχών). Δύο ενδιάμεσα στελέχη προέκυψαν κατά την εφαρμογή της CIP και της AMP και όλα προέρχονται από την είσοδο. Κανένα ενδιάμεσο στέλεχος δεν προέκυψε κατά την εφαρμογή του SMX/TMP.

Enterococci

Στους *Enterococci* τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικών βακτηρίων καταγράφηκαν για την AMP (46,9%) και ακολουθούν SMX/TMP (29,6%), CIP (28,6%) και TET (26,6%). Τα περισσότερα ανθεκτικά βακτήρια προέρχονται από την έξοδο της δευτεροβάθμιας (38,5%) και ακολουθούν η είσοδος (34,6%) και η έξοδος (26,9%). Τα ενδιάμεσα στελέχη ήταν συνολικά 21 (62,6% επί του συνόλου των εξεταζόμενων στελεχών). Το μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ των ενδιάμεσων καταγράφηκε για την TET (61,9%) και ακολουθούν CIP (52,3%) και AMP (9,52%). Επίσης η πλειοψηφία των ενδιάμεσων βακτηρίων προέρχεται από την έξοδο της δευτεροβάθμιας (52,3%) και ακολουθούν η είσοδος (28,6%) και η έξοδος (19%).

Staphylococci

Στους *Staphylococci* τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικών βακτηρίων καταγράφηκαν για την TET (39,1%) και ακολουθούν CIP (27,3%) και SMX/TMP (21,7%). Οι περισσότεροι ανθεκτικοί *Staphylococci* εντοπίστηκαν στην είσοδο σε ποσοστό 43,7% και ακολουθούν αυτοί της εξόδου της δευτεροβάθμιας (31,2%) και της εξόδου (25%). Τα ενδιάμεσα στελέχη του γένους ήταν συνολικά 7 (30,4% του συνόλου των εξεταζόμενων στελεχών). Το μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ των ενδιάμεσων καταγράφηκε για τη CIP (57,1%) και ακολουθούν TET (28,6%) και SMX/TMP (14,3%). Η πλειοψηφία των ενδιάμεσων στελεχών εντοπίστηκε στην έξοδο της δευτεροβάθμιας σε ποσοστό 57,1% και ακολουθούν τα στελέχη της εισόδου με ποσοστό 42,9%. Στην έξοδο δεν εντοπίστηκε κανένα ενδιάμεσο στέλεχος για κανένα αντιβιοτικό.

Συνολικά και από τα τρία είδη, μπορούμε να πούμε ότι τα περισσότερα **ανθεκτικά** βακτήρια παρατηρήθηκαν στην είσοδο (37,5%) και ακολουθούν η έξοδος της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας (32,1%) και η έξοδος (30,4%). Η αυξημένη παρουσία ανθεκτικών βακτηρίων στην είσοδο και στην εκροή της διεργασίας της ενεργού ιλύος συγκριτικά με την απολύμανση έχει περιγραφεί από πολλούς ερευνητές (Galvin et al., 2010; Rizzo et al., 2013; Sharma et al., 2016). Τα περισσότερα **ενδιάμεσα** εντοπίστηκαν επίσης στην είσοδο και στην έξοδο της δευτεροβάθμιας. Ειδικά στην περίπτωση της

δευτεροβάθμιας επεξεργασίας η ανθεκτικότητα μπορεί να είναι συνάρτηση της αλληλεπίδρασης των διαφόρων ειδών μικροοργανισμών. Μεταξύ του συνόλου των ανθεκτικών σε τουλάχιστον ένα αντιβιοτικό, τα περισσότερα στελέχη ανήκουν στους *Enterococci* – και συγκεκριμένα στους *Enterococci* της εξόδου της δευτεροβάθμιας – με ποσοστό 46,4% και ακολουθούν οι *Staphylococci* και η *E. coli* με ποσοστά 28,6% και 25%, αντίστοιχα. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να εξηγηθεί και από τις δομικές ιδιομορφίες μεταξύ Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων, από τα οποία τα πρώτα διαθέτουν ένα επιπλέον στρώμα πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Μεταξύ των βακτηρίων της εξόδου που εξετάσαμε, σχετικά υψηλό είναι και το ποσοστό των ανθεκτικών βακτηρίων (56,7%), λιγότερα όμως από εκείνα της εισόδου (66%) και της εξόδου της δευτεροβάθμιας (60%). Στην περίπτωση μας είναι πιθανό η ανθεκτικότητα αυτή να σχετίζεται με την ανεπαρκή χλωρίωση του βιολογικού καθαρισμού των Χανίων.

Όσον αφορά στα **ενδιάμεσα** στελέχη, τα περισσότερα παρατηρήθηκαν στην έξοδο της δευτεροβάθμιας με ποσοστό 50% και ακολουθούν η είσοδος και η έξοδος με ποσοστά 36,7% και 13,3%, αντίστοιχα. Μεταξύ των ενδιάμεσων, οι *Enterococci* (της εξόδου της δευτεροβάθμιας) έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό (70%) και ακολουθούν οι *Staphylococci* (23,3%) και η *E. coli* (13,3%). Κανένα ενδιάμεσο στέλεχος από τα *E. coli* και *Staphylococci* δεν εντοπίστηκε στην έξοδο.

Από τα παραπάνω παρατηρούμε ότι παρουσιάζεται αυξημένη ανθεκτικότητα την AMP στα είδη *E. coli* & *Enterococci* και για την TET στους *Staphylococci*. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Rizzo et al., 2013; Huang et al., 2012; Galvin et al. 2010; Lucziewicz et al. 2010; Franz et al., 2015). Και τα δύο αντιβιοτικά, όπως έχουμε ήδη αναφέρει, αλλά και γενικότερα οι β – λακτάμες και οι TET παράγονται και εφαρμόζονται σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από άλλα αντιβιοτικά σε Ασία, Ευρώπη και Αμερική (Boxall et al., 2003; Sarmah et al., 2006; Kümmerer et al., 2009; O'Neil, 2015). Αντίθετα, η μεγαλύτερη ευαισθησία της πλειοψηφίας των στελεχών σε αντιβιοτικά όπως η SMX ή ο συνδυασμός SMX/TMP και η CIP μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι τα τελευταία αποτελούν αντιβιοτικά νεότερων γενεών. Στην περίπτωση δε της CIP, που ίσως έχει υψηλό logK_a, η ευαισθησία να σχετίζεται με την προσρόφηση του μεγαλύτερου μέρους του αντιβιοτικού στην ιλύ ή άλλα οργανικά υποστρώματα. Πάντως, στην περίπτωση που προσροφάται στα ιζήματα, ενδιαφέρον θα είχε η μελέτη αλληλεπίδρασής της με βακτήρια που αναπτύσσονται και διαβιώνουν στη λυματολάσπη.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι – αν και η απολύμανση ήταν κακή – υπήρχαν βακτήρια, που αφού επιβίωσαν μετά τη χλωρίωση, παρουσίασαν επιπλέον ανθεκτικότητα και σε κάποια από τα εφαρμοζόμενα αντιβιοτικά. Σχετικά με αυτή τη συμπεριφορά των βακτηρίων αξίζει εδώ να παρουσιάσουμε μερικά παραδείγματα. Η καλλιέργεια βακτηρίων σε χημειοστάτη με συνθήκες προσομοίωσης θαλάσσιου περιβάλλοντος (χαμηλές θερμοκρασίες και χαμηλοί ρυθμοί ανάπτυξης) από τον Jansnasch (1967) είχε αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε χημικά όπως το χλώριο. Οι Laplace et al (1996) μελέτησαν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του *E. faecalis* JH2 – 2 (στέλεχος άγριου τύπου) στην επίδραση του υποχλωριώδους νατρίου (NaOCl). Συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι η πρωτεϊνσύνθεση παρεμποδίστηκε σημαντικά από το χημικό, καθώς επίσης παρατήρησαν την υπερπαραγωγή κάποιων πολυπεπτιδίων, που σχετίζονται με την ένωση, δηλαδή όξινες πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους με πιεζοηλεκτρικό σημείο 4,5 – 5,6. Η ανθεκτικότητα αναπτύχθηκε στη χορήγηση μικρών

δόσεων NaOCl, σε στελέχη που είχαν απομονωθεί από τη στατική φάση ανάπτυξης. Οι ίδιοι, αναφέρουν ότι και η προσθήκη Χλωραμφενικόλης, πριν τη χλωρίωση, δεν επηρέασε την ανάπτυξη ανθεκτικότητας του βακτηρίου στο χλώριο και ότι για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο χλώριο υπεύθυνες είναι αλλαγές στη **δομή της μεμβράνης** κι όχι η σύνθεση καινούριων πρωτεϊνών. Κάτι αντίστοιχο έχει παρατηρηθεί και στην *Klebsiella pneumoniae*, όπου η διαφορά στην αλληλεπίδραση με τις χλωραμίνες μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη των ανθεκτικών, στην οποία παρατηρείται υψηλότερος αριθμός κορεσμένων λιπαρών οξέων. Η παρατήρηση αυτή πυροδοτεί τη δημιουργία υποθέσεων, ότι υπάρχουν μηχανισμοί που προσδίδουν διαφορετικού τύπου ανθεκτικότητας (ανθεκτικότητα στο χλώριο και σε κάποιο αντιβιοτικό), οι οποίες μπορεί να δρουν είτε αυτόνομα είτε πολλαπλασιαστικά. Ότι δηλαδή μπορεί η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό να σχετίζεται με κάποιο τρόπο με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο χλώριο, αλλά μπορεί επίσης οι δύο ανθεκτικότητες να είναι τελείως άσχετες. Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων που λαμβάνουμε από περιβαλλοντικά δείγματα σε χημικά όπως το χλώριο μπορεί να είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων όπως η ηλικία του βιοφιλμ, ο εγκλεισμός των βακτηρίων σε προστατευτικά εξωκυτταρικά περιβλήματα (καψίδια) και οι συνθήκες ανάπτυξης (τροφή, ενέργεια) πριν την απολύμανση.

Η δυνατότητα να ευνοείται η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά σε χώρους όπως οι βιολογικοί καθαρισμοί είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Συγκεκριμένα, δεν έχει ξεκαθαρίσει κατά πόσο οι χαμηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που ανευρίσκονται στο περιβάλλον – της τάξης των $\mu\text{g/L}$ στα επιφανειακά ύδατα – είναι δυνατό να προκαλέσουν την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε βακτηριακούς πληθυσμούς. Ένα άλλο ουσιώδες θέμα που παραμένει άλυτο είναι αν η ανθεκτικότητα μπορεί να μεταδίδεται μέσω της εγγενούς αναπαραγωγής των βακτηρίων, δηλαδή μέσω οριζόντιας μεταφοράς της πληροφορίας από ανθεκτικό σε μη ανθεκτικό βακτήριο, με τη διαμεσολάβηση κινητών γενετικών στοιχείων όπως τα γονίδια, τα πλασμίδια και τα ιντεγκρόνια. Η δυνατότητα εγγενούς μετάδοσης της ανθεκτικότητας έχει αποδειχτεί πειραματικά από τους Mach & Grimes (1982) με τη μεταφορά πλασμιδίου από ανθεκτικό σε μη ανθεκτικό περιβαλλοντικό στέλεχος. Η σύζευξη (conjugation) θεωρείται γενικά ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των βακτηρίων, ωστόσο, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις σύζευξης μεταξύ Βασιλείων, όπως έγινε το 1989 με μεταφορά πλασμιδίου από την *E. coli* στον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Ωστόσο, η βακτηριακή σύζευξη, ο ανασυνδυασμός δηλαδή του γενετικού υλικού, είναι περιστασιακός τρόπος αναπαραγωγής – όχι ο κυρίαρχος – και είναι δύσκολο να παρατηρηθεί όχι μόνο στους βιολογικούς καθαρισμούς, αλλά και γενικότερα στη φύση πόσο μάλλον να συσχετιστεί με την εγγενή μετάδοση της ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό.

Εκείνο που μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα είναι ότι οι βιολογικοί καθαρισμοί μπορεί να είναι δεξαμενές βακτηρίων ανθεκτικότητας και γονιδίων ανθεκτικότητας. Αυτό προκύπτει απλώς και μόνο από τις καταγραφές ανθεκτικών (ARB) και πολυανθεκτικών βακτηρίων (MRB) και των αντίστοιχων γονιδίων (ARG). Ως προς την πρόσληψη, τώρα, των αντιβιοτικών, από τους βασικότερους ανταγωνιστές των βακτηρίων φαίνεται να είναι οι χουμικές ενώσεις. Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν πως οι χουμικές ενώσεις δεσμεύουν το μεγαλύτερο μέρος των αντιβιοτικών ουσιών, με αποτέλεσμα ένα μόλις μικρό ποσοστό από αυτές να φτάνει στους μικροοργανισμούς.

Αυτός είναι ένας παραπάνω λόγος – και συμπεριλαμβανομένων και των εξαιρετικά χαμηλών συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών στο περιβάλλον, $\mu\text{g/L}$ – που δε μπορούμε να ισχυριστούμε σε ποιο βαθμό η μετάδοση και εξάπλωση της ανθεκτικότητας είναι εφικτή σε χώρους όπως οι βιολογικοί καθαρισμοί. Είναι, λοιπόν, προφανές πως χρειάζονται επιπλέον δεδομένα αφενός μεν για το ποσοστό των ανθεκτικών βακτηρίων (στο σύνολο του μικροβιακού φορτίου της εξόδου) που εντοπίζονται στους βιολογικούς αφετέρου δε για τις συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών και τις αλληλεπιδράσεις αυτών με άλλες οργανικές ενώσεις που είναι παρούσες κατά την επεξεργασία των αποβλήτων, καθώς και ρύπους αναδυόμενου ενδιαφέροντος και μέταλλα. Δεν υπάρχουν, επίσης, έρευνες που να συγκρίνουν τους αριθμούς ARB και ARG στα ιζήματα και στα υδάτινα συστήματα, ενώ φαίνεται ότι και τα δύο ενδιαφέροντα φέρουν μεγάλο αριθμό από αυτά και μπορούν να θεωρηθούν ως δεξαμενές που ευνοούν το “μαγείρεμα” ανθεκτικών βιολογικών συστημάτων. Το θέμα πάντως παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον προς διερεύνηση.

Ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου της μικροαραίωσης και του υπολογισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) είναι ότι πρόκειται για φαινοτυπική μέθοδο, η οποία δε λαμβάνει υπόψη της τις κυτταρικές λειτουργίες που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα. Άλλα προβλήματα που προκύπτουν μπορεί να σχετίζονται με τα σφάλματα των οργάνων μέτρησης, την αρχική συγκέντρωση του ενοφθαλμισμού (καθώς ο ρυθμός του μεταβολισμού είναι διαφορετικός για τους διάφορους μικροοργανισμούς) και τη μεταφορά της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, που μπορεί να συμβεί μεταξύ των στελεχών. Επιπλέον, δε πρέπει να ξεχνάμε ότι η περιβαλλοντική εξάρτηση είναι μια μεταβλητή ιδιότητα που επηρεάζει την αλληλεπίδραση μικροοργανισμού – αντιβιοτικού με συνέπεια τα εργαστηριακά αποτελέσματα να μην αντανakλούν ακριβώς τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Τέλος, δεν εξετάσαμε κατά πόσο τα αντιβιοτικά για τα οποία καταγράψαμε την ανθεκτικότητα βρίσκονταν επίσης στα υγρά απόβλητα, καθώς και σε τί συγκεντρώσεις και με ποια μορφή.

Από τις τιμές της MIC₆₀ που προέκυψαν και συγκρίνοντας με τα προτεινόμενα όρια από το EUCAST (Παράρτημα) προκύπτουν οι εξής παρατηρήσεις:

1. τα περιβαλλοντικά στελέχη που απομονώσαμε και εξετάσαμε ως προς την ανθεκτικότητα απαιτούν μεγαλύτερες τιμές MIC₆₀ συγκριτικά με τα κλινικά. Αυτό έχει καταγραφεί και από άλλους ερευνητές.
2. Στις δοκιμές των αντιβιοτικών σε διάφορα στελέχη είναι προτιμότερο να μελετάται η MIC₆₀ και όχι η MIC₉₀ ή MIC₁₀₀, διότι όπως έχει αποδειχτεί είναι δυνατή η μετάδοση της ανθεκτικότητας στα στελέχη μέσω της εφαρμογής υψηλών δόσεων και τη διαδοχική αύξηση των δόσεων από τον ίδιο τον πειραματιστή.

Υπολογισμός MAR Index

Μεταξύ των ανθεκτικών στελεχών της *E. coli* εντοπίστηκαν 3 από την είσοδο (*E. coli* 1, *E. coli* 5, *E. coli* 6), 2 από την έξοδο της δευτεροβάθμιας (*E. coli* 3, *E. coli* 7) και 1 από την έξοδο (*E. coli* 4), που έφεραν ανθεκτικότητα σε 2 αντιβιοτικά ταυτόχρονα και σε αυτά το MAR Index είναι ίσο με ή 66,7%. Εντοπίστηκε, ωστόσο και 1 βακτήριο στην είσοδο (*E. coli* 2) και 1 στην έξοδο (*E. coli* 8), τα οποία έφεραν ανθεκτικότητα και στα 3 αντιβιοτικά που εξετάσαμε και το MAR Index που αντιστοιχεί σε αυτό είναι 1 ή 100%. τα υπόλοιπα στελέχη ήταν ανθεκτικά σε 1 μόνο από τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά.

Αντίστοιχα, για τους *Enterococci* εντοπίσαμε 7 στελέχη που εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε 2 αντιβιοτικά και από αυτά 2 προέρχονται από την είσοδο (97, 46), 4 από την έξοδο της δευτεροβάθμιας (*Enterococcus* 3, *Enterococcus* 4, 54 *Enterococcus* 6) και 4 από την έξοδο (44, 57, 148, 153). Το MAR Index αυτών των στελεχών είναι ίσο με ή 66,7%. Εντοπίστηκε ακόμα 1 στέλεχος στην είσοδο (36), το οποίο έφερε ανθεκτικότητα και στα 4 αντιβιοτικά και του αντιστοιχεί MAR Index ίσο με 1.

Τέλος, από τους *Staphylococci* 2 στελέχη που προέρχονται από την είσοδο (*Staphylococcus* 3, 78) και 1 στέλεχος από έξοδο δευτεροβάθμιας (70) και έξοδο (*Staphylococcus* 6), αντίστοιχα, εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε 2 αντιβιοτικά και σε αυτά αντιστοιχεί MAR Index ίσο με ή 66,7%.

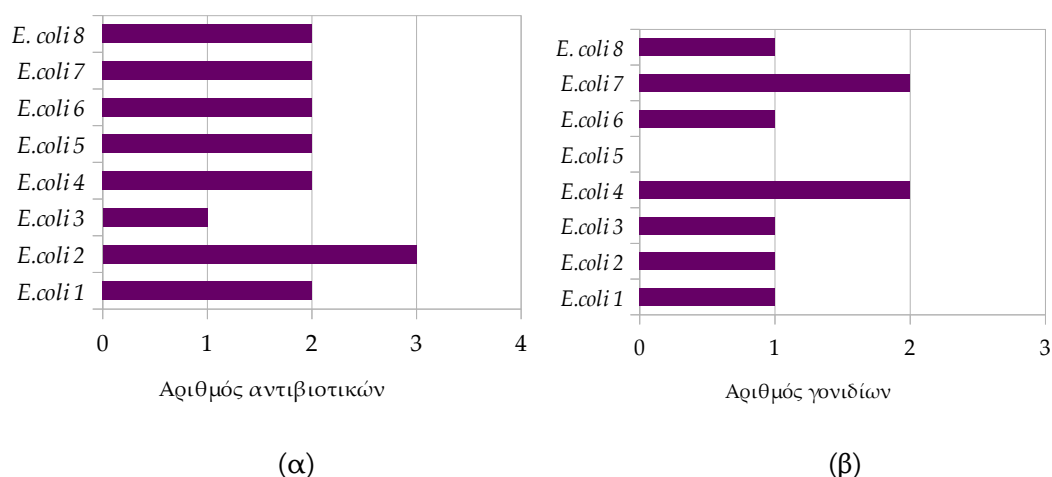
4.2 Γονίδια ανθεκτικότητας

Στον Πίνακα 15 φαίνεται η αντιστοίχιση των στελεχών που εξετάσαμε με τα αντιβιοτικά στα οποία εμφάνισαν ανθεκτικότητα και με τα γονίδια ανθεκτικότητας που εντοπίστηκαν στο κάθε στέλεχος.

Πίνακας 15. Ανθεκτικά *E. coli* και τα γονίδια ανθεκτικότητας που φέρουν.

Στέλεχος	Αντιβιοτικό	Γονίδια
<i>E. coli</i> 1	SMX/TMP AMP	<i>sul1</i>
<i>E. coli</i> 2	CIP AMP SMX/TMP	<i>sul1</i>
<i>E. coli</i> 3	AMP SMX/TMP	<i>sul1</i>
<i>E. coli</i> 4	CIP AMP	<i>qnrA</i> <i>ampC</i>
<i>E. coli</i> 5	CIP AMP	
<i>E. coli</i> 6	CIP AMP	<i>ampC</i>
<i>E. coli</i> 7	CIP AMP	<i>qnrA</i> <i>ampC</i>
<i>E. coli</i> 8	CIP AMP SMX/TMP	<i>sul1</i>

Στο Σχήμα 46 φαίνονται τα στελέχη για τα οποία εξετάσαμε την ύπαρξη των γονιδίων ανθεκτικότητας ως προς τον αριθμό των αντιβιοτικών στα οποία εμφάνισαν ανθεκτικότητα και την ύπαρξη ή μη των αντίστοιχων γονιδίων που σχετίζονται με το αντιβιοτικό.



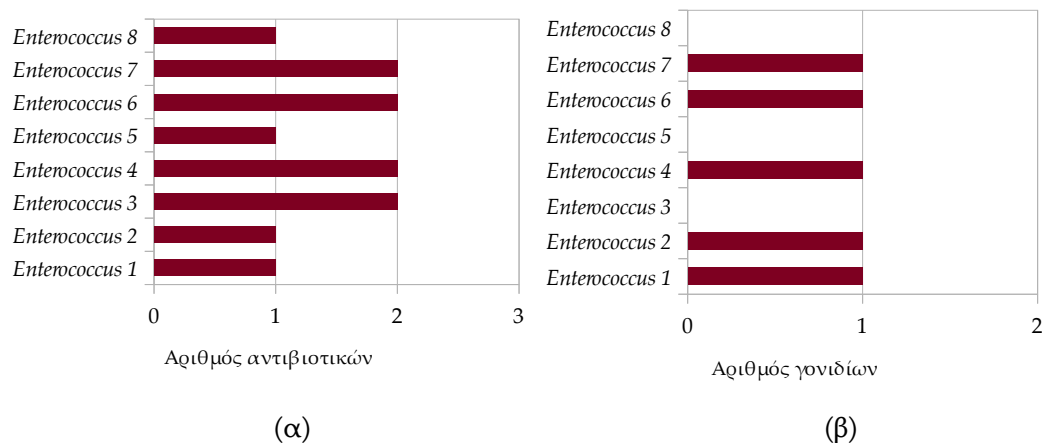
Σχήμα 46. Προφίλ πολυανθεκτικών στελεχών του είδους *E. coli*.

Τα στελέχη 1, 2, 5 και 6 προέρχονται από την είσοδο (Α), τα 3 και 7 από την έξοδο της δευτεροβάθμιας (Β) και τα 4 και 8 από την έξοδο (Γ). Τα στελέχη αυτά παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας κατά την εφαρμογή της μεθόδου MIC. Από το Σχήμα 46 (α) παρατηρούμε ότι όλα σχεδόν τα στελέχη φέρουν ανθεκτικότητα σε 2 αντιβιοτικά, με εξαίρεση το στέλεχος 3 και το 2 που φέρουν ανθεκτικότητα σε 1 και 3 αντιβιοτικά, αντίστοιχα. Αντίστοιχα, στο 46 (β) βλέπουμε ότι από τα ίδια στελέχη το 50% φέρει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας, ενώ δύο στελέχη (25%) έφεραν ταυτόχρονα τα γονίδια *qnrA* και *ampC*. Στο στέλεχος 5 που δεν εντοπίστηκε κανένα γονίδιο η ανθεκτικότητα οφείλεται σε άλλους μηχανισμούς.

Στους *Enterococci* τα αντίστοιχα στελέχη και γονίδια φαίνονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16. Ανθεκτικοί *Enterococci* και τα γονίδια ανθεκτικότητας που φέρουν.

Στέλεχος	Αντιβιοτικό	Γονίδια
<i>Enterococcus 1</i>	CIP	<i>sul1</i>
<i>Enterococcus 2</i>	TET	<i>tetM</i>
<i>Enterococcus 3</i>	CIP SMX/TMP	
<i>Enterococcus 4</i>	TET SMX/TMP	<i>tetM</i>
<i>Enterococcus 5</i>	AMP	
<i>Enterococcus 6</i>	CIP SMX/TMP	<i>sul1</i>
<i>Enterococcus 7</i>	AMP SMX/TMP	<i>sul1</i>
<i>Enterococcus 8</i>	AMP	



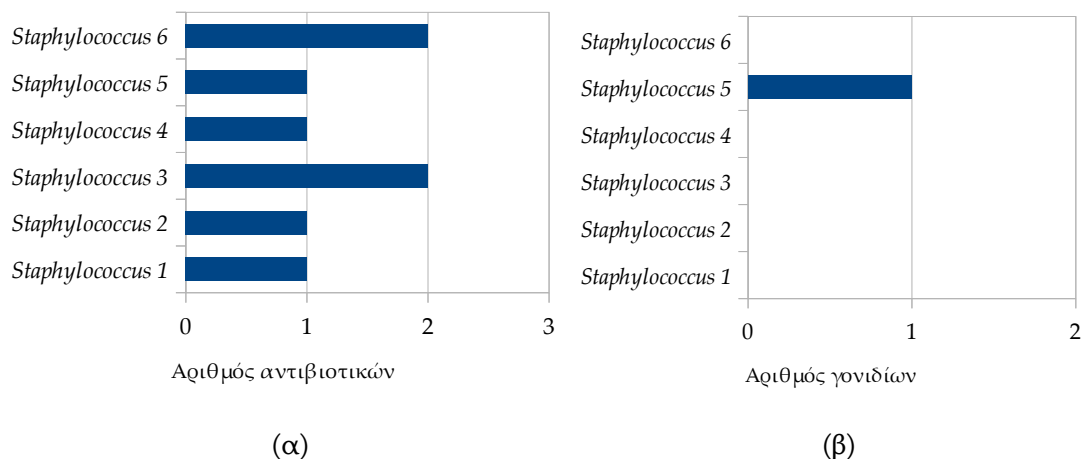
Σχήμα 47. Προφίλ πολυανθεκτικών στελεχών του είδους *Enterococci*.

Τα στελέχη 1, 5, 7 και 8 προέρχονται από την είσοδο και τα 2, 3, 4 και 6 από την έξοδο της δευτεροβάθμιας. Τα στελέχη αυτά παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας κατά την εφαρμογή της μεθόδου MIC. Στο Σχήμα 47 (α) παρατηρούμε ότι τα στελέχη 3, 4, 6 και 7 φέρουν ανθεκτικότητα σε 2 αντιβιοτικά. Αναφορικά με τα γονίδια ανθεκτικότητας, στο 47 (β) βλέπουμε ότι από τα ίδια στελέχη το 62.5% φέρει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας, ενώ για το στέλεχος 3 που παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε 2 αντιβιοτικά δεν εντοπίστηκε κανένα γονίδιο ανθεκτικότητας. Σε αυτό το στέλεχος, όπως και στα 5 και 8 ισχύουν άλλοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας.

Στους *Staphylococci* τα αντίστοιχα στελέχη και γονίδια φαίνονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17. Ανθεκτικοί *Staphylococci* και τα γονίδια ανθεκτικότητας που φέρουν.

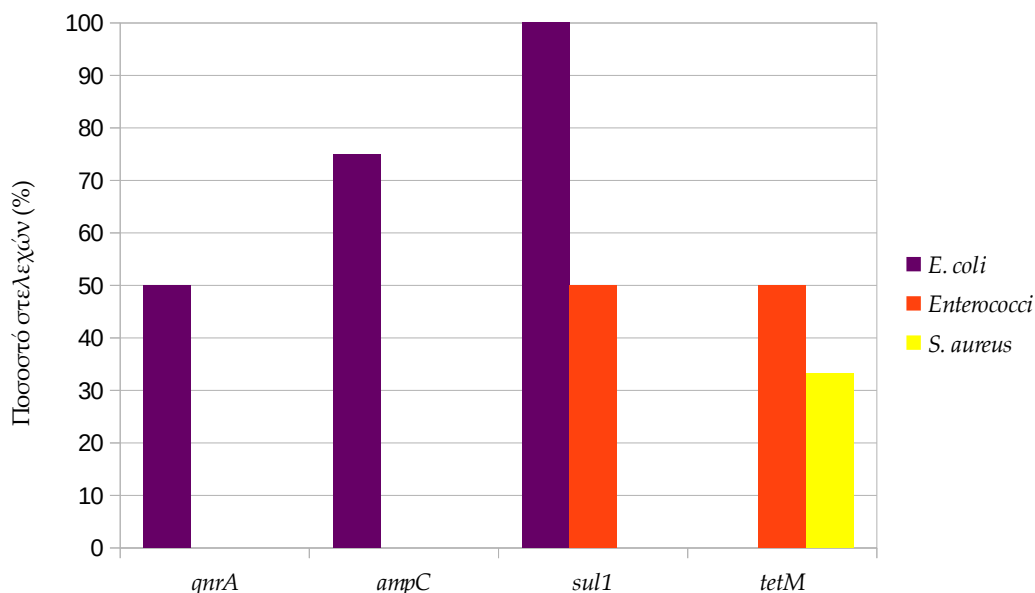
Στέλεχος	Αντιβιοτικό	Γονίδια
<i>Staphylococcus</i> 1	CIP	
<i>Staphylococcus</i> 2	TET	
<i>Staphylococcus</i> 3	CIP TET	
<i>Staphylococcus</i> 4	CIP	
<i>Staphylococcus</i> 5	TET	<i>tetM</i>
<i>Staphylococcus</i> 6	CIP TET	



Σχήμα 48. Προφίλ πολυανθεκτικών στελεχών του είδους *Staphylococci*.

Τα στελέχη 1, 2, 3 και 5 – από τα οποία τα 2, 3 και 5 έχουν ταυτοποιηθεί ως *S. aureus* – προέρχονται από την είσοδο, το 4 από την έξοδο της δευτεροβάθμιας και το 6 από την έξοδο και είναι εκείνα που εμφάνισαν τα υψηλότερα ποσοστά ανθεκτικότητας κατά την εφαρμογή της MIC. Στο Σχήμα 48 (α) παρατηρούμε ότι το στέλεχος 3 φέρει ανθεκτικότητα σε 2 αντιβιοτικά. Όσον αφορά βέβαια τα γονίδια ανθεκτικότητας παρατηρούμε (48 (β)) ότι ένα μόλις στέλεχος φέρει 1 γονίδιο ανθεκτικότητας

Τέλος, στο Σχήμα 49 βλέπουμε τα ποσοστά των στελεχών που έφεραν το κάθε γονίδιο στο σύνολο των στελεχών που εξετάσαμε από κάθε είδος ξεχωριστά.



Σχήμα 49. Γονίδια ανθεκτικότητας που εντοπίστηκαν στις βακτηριακές αποικίες.

Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι σε κάθε ανθεκτικό στέλεχος δεν αντιστοιχεί απαραίτητα το αντίστοιχο γονίδιο, που θεωρούμε ότι φέρει την ανθεκτικότητα στο αντίστοιχο αντιβιοτικό. Οι μεγαλύτερες ποσότητες των γονιδίων *sul1* και *tetM* στα υγρά απόβλητα εντοπίστηκαν στην είσοδο. Για το *sul1* βλέπουμε επίσης ότι στα δείγματα 3

και 4 εντοπίστηκε και στην έξοδο, γεγονός που υποδηλώνει τη σταθερότητά του κατά την απολύμανση των υγρών αποβλήτων. Το *tetM* δεν εντοπίστηκε καθόλου στην έξοδο της δευτεροβάθμιας ούτε στην έξοδο, παρόλα αυτά εντοπίστηκαν 2 *Enterococci* – από την έξοδο της δευτεροβάθμιας – ανθεκτικοί στην TET που το έφεραν. Τα γονίδια *ampC* και *qnrA* δεν εντοπίστηκαν σε κανένα από τα εξεταζόμενα δείγματα, ενώ υπήρχαν στελέχη της *E. coli* που έφεραν αυτά τα γονίδια και ήταν ανθεκτικά στην AMP και στη CIP, αντίστοιχα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι ένα στέλεχος των *Enterococci*, στο οποίο ενώ λανθασμένα είχε εκτιμηθεί και χαρακτηριστεί ανθεκτικό στο SMX/TMP, έφερε το γονίδιο *sulI*. Το συγκεκριμένο στέλεχος, το οποίο προέρχεται από την είσοδο, είναι ανθεκτικό στη CIP. Μεταξύ των στελεχών συνολικά το *sulI* εντοπίστηκε σε 7 στελέχη (*Enterococci* και *E. coli*), το *ampC* και το *qnrA* εμφανίστηκε μόνο στις *E. coli* και το *tetM* σε 2 *Enterococci* και 1 *Staphylococci*. Οι Schwartz et al. (2003) αναφέρουν ότι το *ampC* εντοπίστηκε στο σύνολο των *E. coli* που εξετάστηκαν και προέρχονταν από μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, αλλά αντίθετα δεν εντοπίστηκε σε κανέναν από τους *Enterococci*. Αντίστοιχα η παρουσία του *tetM* στα υδάτινα περιβάλλοντα, κυρίως σε μονάδες που στεγάζουν ιχθυοκαλλιέργειες, έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές και έχει εντοπιστεί σε πολλά Gram θετικά βακτήρια (Petersen & Dalsgaard, 2003; Akinbowale et al., 2007; Rizzo et al., 2013).

Όσον αφορά στη μέθοδο SYBR green, σημαντικό μειονέκτημά της, αποτελεί το γεγονός ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου. Παρ'όλα αυτά υπάρχει τρόπος να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί (σωστός σχεδιασμός εκκινητών, βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης). Επιπλέον, η μελέτη των καμπύλων αποδιάταξης (melting curves) μετά το πέρας της αντίδρασης, δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται ειδικά συστήματα ανίχνευσης, με ανιχνευτές ειδικούς ως προς την αλληλουχία – στόχο και συμπεριλαμβάνουν τις μεθόδους Taqman probes, Molecular beacon probes και Scorpions.

Μια πρόσφατη δημοσίευση στο περιοδικό Science με θέμα τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούν διάφορα βακτήρια που εκτίθενται σε **γενικότερες στρεσογόνες συνθήκες**⁸ – μεταξύ αυτών και αντιβιοτικά – έρχεται να προτείνει κάποιους επιπλέον μηχανισμούς που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα. Έχει παρατηρηθεί ότι τα ανθεκτικά κύτταρα κατά τη φάση θανάτου της αποικίας, μετά από επεξεργασία με αντιβιοτικά, παρουσιάζουν δύο φάσεις θανάτου στην καμπύλη μείωσης των πληθυσμών. Αντίστοιχη συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και όταν τα βακτήρια εκτίθενται σε γενικότερες στρεσογόνες συνθήκες (θερμοκρασία, pH, οσμωτική πίεση). Διαφορετικά σηματοδοτικά μόρια συμμετέχουν στην επαγωγή ανθεκτικότητας στα βακτήρια και ενεργοποιούν κινητά γενετικά στοιχεία. Από την ομοιότητα που παρουσιάζουν οι δύο καμπύλες, υποστηρίζεται το ενδεχόμενο η ανθεκτικότητα να υπάγεται σε μια γενικότερη στρατηγική επιβίωσης (μηχανισμού) που υιοθετούν οι οργανισμοί. Ο μεγαλύτερος αριθμός δε ανθεκτικών κυττάρων εντοπίζεται στη στατική φάση ανάπτυξης και όχι στην εκθετική φάση, όπως αναφέρουν οι Harms et al. (2016). Μπορεί με παρόμοιο δηλαδή τρόπο τα κύτταρα να πραγματοποιούν ποιοτικές μεταβολές στην ολότητά τους, προκειμένου να επιβιώσουν και να αναπαραχθούν ξανά όταν βρεθούν σε ευνοϊκό περιβάλλον – αυτό περιγράφεται με τον όρο προσαρμοστική ποικιλομορφία (responsive

diversification). Ως προς τη μεταβολική δραστηριότητα και τη δυνατότητα για αναπαραγωγή υπάρχει (Barcina et al. 1997) μια κατάσταση του μεταβολισμού που χαρακτηρίζεται ως ληθαργική. Τα κύτταρα που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία χαρακτηρίζονται ως ζωντανά αλλά μη καλλιεργήσιμα (Viable but Non Culturable Bacterial cells, VbNCBs). Μορφολογικά φαίνεται είτε να συρρικνώνονται – αυτή η τάση έχει συνδεθεί με συνθήκες όπως θέρμανση, οξειδωτικό και οσμωτικό στρες – είτε να αυξάνουν σε μέγεθος, χωρίς να διαιρούνται αλλά μερικές φορές μπορεί να μη διαφέρουν και καθόλου ως προς τον τυπικό φαινότυπο κάποιου πληθυσμού. Πολλοί περιγράφουν αυτή την κυτταρική κατάσταση ως **αδραναιοποίηση**, ή μια “αντιστρεπτή διακοπή της φαινοτυπικής ανάπτυξης ενός οργανισμού” ή μια «ληθαργική – μη διχοτομική κατάσταση (Bigger, 1944; Penrose & Dawe, 1978; Xu et al., 1984; Colwell et al., 1987), που υποδηλώνει ότι μπορεί η μεταβολική και αναπαραγωγική ικανότητα του κυττάρου να επιστρέψει στην πρωταρχική κατάσταση αν αυτό βρεθεί ξανά σε ευνοϊκό περιβάλλον, μετά την πάροδο μιας φάσης καθυστέρησης. Μικροοργανισμοί, που ανήκουν στην κατηγορία των VbNCBs και μπορεί να διατηρούνται παθογόνοι έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα αρκετοί και μεταξύ αυτών, εκπρόσωποι, σπορογόνων και μη, *E. coli*, *E. faecalis*, *Clostridia*, *Bacilli* και *Vibrio cholerae*. Έχει παρατηρηθεί ότι σε εργαστηριακές συνθήκες, η παροχή θρεπτικών (στερεού υποστρώματος) σε βακτήρια που είχαν πρότινος υποστεί στέρηση θρεπτικών προκάλεσε αντιστροφή στην κινητικότητα, αύξηση του μεγέθους του κυττάρου και τελικά κυτταρική διαίρεση. Οι Heinmets et al. για παράδειγμα υποστήριξαν πως η πρωτεϊνοσύνθεση και κάποιες μεταβολικές λειτουργίες συνεχίζουν, χωρίς κυτταρική διαίρεση, ακόμα και όταν το κύτταρο βρίσκεται σε γενικότερες στρεσογόνες συνθήκες. Σε τέτοιες συνθήκες η σύνθεση του DNA σταματά προσωρινά, εμποδίζοντας την κυτταρική διαίρεση, ενώ άλλες αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως η σύνθεση RNA και πρωτεϊνών συνεχίζονται και η κυτταρική μάζα αυξάνεται. Ωστόσο, λιγιστές πληροφορίες έχουμε για τη φυσιολογία τέτοιων οργανισμών καθώς επίσης και για τα είδη που μπορεί να εμφανίσουν τέτοια συμπεριφορά.

Μεταξύ του φάσματος των αντιδράσεων που έχουν παρατηρηθεί σε ανθεκτικά βακτήρια είναι η σήμανση pp(p)Gpp (αλαρμόνες, γουανοσίνη τετραφωσφατάση και πενταφωσφατάση) που συνδέεται με τη στέρηση αμινοξέων, λιπαρών οξέων, σιδήρου και άλλων παραγόντων (stringent response). Οι αλαρμόνες αυτές επηρεάζουν και άλλα γονίδια που συμμετέχουν σε αντιδράσεις στρες (γονίδια για την πρόσληψη αμινοξέων και τη βιοσύνθεση) αλλά και παρεμποδίζουν τη σύνθεση του ριβοσωμικού και μεταφορικού RNA. Ωστόσο έχουν καταγραφεί περιπτώσεις που σε ανθεκτικά σε αντιβιοτικά στελέχη *S. aureus* δεν καταγράφηκε τέτοια σήμανση και οι ερευνητές αιτιολογούν την ανθεκτικότητα με μηχανισμούς που σχετίζονται με άλλου τύπου κυτταρικές αντιδράσεις (SOS & υποξία⁹). Ένας άλλος μηχανισμός που έχει περιγραφεί κατά την εφαρμογή αντιβιοτικών σε ανθεκτικά βακτήρια είναι εκείνος της τοξίνης – αντιτοξίνης (TA). Τα συστήματα αυτά σχετίζονται με αλλοιώσεις στη δομή των μεμβρανών αλλά και παρεμβολές στη σύνθεση του ATP και στη μετάφραση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση κατά την οποία έγινε αφαίρεση από βακτήριο *S. aureus* γνωστό σύστημα TA, χωρίς όμως να τροποποιηθεί η ανθεκτικότητα του βακτηρίου. Τα ανθεκτικά κύτταρα που προέκυψαν από την αναπαραγωγή του βακτηρίου αυτού είχαν χαμηλά επίπεδα ATP στην στατική φάση, μια παρατήρηση που έχει καταγραφεί και από άλλους ερευνητές και που σχετίζεται με βραδύτερο ενεργειακό μεταβολισμό. Το πείραμα αυτό αποδεικνύει αφενός ότι το σύστημα TA που αφαιρέθηκε δεν ήταν το κυρίαρχο ως προς την επαγωγή της ανθεκτικότητας και αφετέρου ότι η

ανθεκτικότητα μπορεί να είναι συνδυασμός είτε συστημάτων TA ή συστημάτων TA και άλλων σηματοδοτικών διεργασιών.

Γενικά, η αδυναμία απόδοσης του φαινομένου της ανθεκτικότητας στον τάδε και στο δείνα γονίδιο, σηματοδοτικό μόριο ή μηχανισμό ανθεκτικότητας καταδεικνύει τη δυσκολία στον προσδιορισμό της διαλεκτικής σχέσης μεταξύ αιτίου και αιτιατού. Τα παραδείγματα των ανθεκτικών *S. aureus* που δεν εμφάνισαν σήμανση $pp(p)Gpp$ (Harms et al., 2016; Amato et al., 2014; Geiger et al., 2014), ή οι *S. aureus* από τους οποίους αφαιρέθηκαν οι “κατάλληλες” τοξίνες και παρουσίασαν εκ νέου ανθεκτικότητα (Conlon et al., 2016) αποτελούν αποδείξεις της διαπίστωσης αυτής. Τέτοια πειράματα, όμως, αποτελούν και λαμπρά παραδείγματα της αναπτυξιακής πλαστικότητας, της ικανότητας δηλαδή των έμβιων συστημάτων να προσαρμόζονται βάσει των εμπειριών και των περιβαλλοντικών συνθηκών, αντισταθμίζοντας τις όποιες δομικές ανεπάρκειες. Η παρουσία δε κυττάρων, όπως τα VbNCBs είναι ακριβώς η έκφραση αυτής της ποικιλότητας. Ούτε βέβαια μπορούμε να ισχυριστούμε με βεβαιότητα, ότι οι μηχανισμοί που επάγουν την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είναι ομόλογοι και όχι ανάλογοι με εκείνους που επάγουν την ανθεκτικότητα στις συνθήκες έλλειψης τροφής και ενέργειας, στις συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και σε γενικότερες στρεσογόνες συνθήκες (Hartke et al., ; Harms et al., 2016). Ο λειτουργικός όμως πλεονασμός που διαθέτουν όλοι οι οργανισμοί είναι που τους παρέχει τη δυνατότητα ανάπτυξης πολλών εναλλακτικών οδών, οι οποίες καταλήγουν στο ίδιο ουσιαστικά αποτέλεσμα. Οι Monod & Jacob, πριν μισό αιώνα μας περιέγραψαν τον τρόπο με τον οποίο η αλληλεπίδραση του οργανισμού με το περιβάλλον του καθορίζει ποια από τα διαθέσιμα γονίδια θα ενεργοποιηθούν σε κάθε περίπτωση. Για παράδειγμα, βακτήρια που δε διαθέτουν τα κατάλληλα ένζυμα για να μεταβολίσουν το σάκχαρο λακτόζη, τα συνθέτουν, αν βρεθούν σε περιβάλλον που τους παρέχει μόνο λακτόζη. Τα βακτήρια περιέχουν τις απαιτούμενες αλληλουχίες DNA για να παραχθεί μια λακτάση, αλλά σε φυσιολογικές συνθήκες αυτές οι αλληλουχίες παραμένουν ανενεργές· ενεργοποιούνται από σήματα που παράγονται μέσα στο κύτταρο μόνο όταν βρεθεί σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε λακτόζη και φτωχό σε γλυκόζη. Κάποια άλλα αερόβια βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιούν είτε το οξυγόνο είτε το νιτρικό άλας για τις οξειδωτικές διεργασίες του μεταβολισμού τους. Η αλληλεπίδραση, λοιπόν, μικροοργανισμών – αντιβιοτικών είναι μια διεργασία που συντελείται σε συγκεκριμένο χωροχρόνο και συμμετέχουν μόρια τα οποία μπορεί να συντίθενται στον ενδοκυτταρικό χώρο απ' ης στιγμής, επηρεάζοντας ποικιλοτρόπως το κύτταρο. Γι' αυτό το λόγο ενδείκνυνται οι *in vivo* μελέτες στο σύστημα αντιβιοτικό – μικροοργανισμός, κατά τις οποίες ο μικροοργανισμός βρίσκεται στο φυσικό του περιβάλλον και η χρήση τεχνικών όπως η μικροσκοπία.

Πέρα από τα γονίδια, σε κυτταρικές διαδικασίες όπως η μεταγραφή και η μετάφραση των γονιδίων συμμετέχουν μόρια όπως RNA, ένζυμα και πρωτεΐνες και συμβαίνουν ενεργειακές μεταβολές. Η έκφραση των περισσότερων γονιδίων μπορεί να τροποποιηθεί από άλλα γονίδια που είναι παρόντα στο γονιδίωμα, από το κυτταρικό περιβάλλον και από το εξωκυτταρικό περιβάλλον του οργανισμού. Υπάρχουν πρωτεΐνες που συντίθενται υπό μια μορφή από το DNA, αλλά κατόπιν υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία εντός του κυττάρου (επιδιόρθωση) μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλα μακρομόρια και κυτταρικές διαδικασίες. Η μελέτη τέτοιων πρωτεϊνών θα μπορούσε να μας παρέχει χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά. Η ύπαρξη επίσης των μεταθετών στοιχείων του γονιδιώματος και η αλληλεπίδρασή τους με δομές όπως τα πλασμίδια και τα ιντεγκρόνια, που εντοπίζονται σε αφθονία στη φύση και έχουν συνδεθεί με την ανθεκτικότητα έχει αρκετό ενδιαφέρον για μελέτη.

Τα επίπεδα σύνθεσης ATP (Conlon et al., 2014) είναι ένας καλός δείκτης εκτίμησης της αποτελεσματικότητας ενός αντιβιοτικού – καθώς έχει παρατηρηθεί η μειωμένη παραγωγή ATP σε βακτήρια που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά – αλλά δε μπορεί να σταθεί μόνος του. Ο μεταβολισμός των κυττάρων συνεχίζει να λειτουργεί ακόμα και όταν παρεμποδίζεται η σύνθεση του DNA, στηριζόμενος σε ιδιότητες και λειτουργίες του RNA και των πρωτεϊνών και ο ρόλος αυτών των συστημάτων πρέπει να διερευνηθεί. Ερωτήματα όπως γιατί τα ανθεκτικά κύτταρα πεθαίνουν με πιο αργό ρυθμό κατά την επεξεργασία με αντιβιοτικά, πως διαφοροποιούνται ποιοτικά τα ανθεκτικά από τα ληθαργικά κύτταρα και ποιος είναι ο μηχανισμός, ο οποίος ευνοεί την ανάνηψη των κυττάρων και την έξοδο από τη ληθαργική φάση παραμένουν αναπάντητα.

4.3 Αντιδραστήρας και μετάδοση της ανθεκτικότητας

Ο μεταβολισμός των βακτηρίων είναι άμεσα συνδεδεμένος με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται και με το οποίο ανταλλάσσουν ύλη και ενέργεια και αναπαράγονται. Στις διάφορες υδάτινες μήτρες έχει παρατηρηθεί η τάση των μικροοργανισμών να προσκολλώνται σε στερεά υποστρώματα και να δημιουργούν συσσωματώματα. Οι επιφάνειες των στερεών και οι διεπιφάνειες υγρών – στερεών είναι πηγές συσσώρευσης θρεπτικών, που επιτρέπουν στα βακτήρια να αναπτύσσονται. Τα βακτήρια που μπορούν να προσεγγίσουν τη διεπιφάνεια χάρη σε δομικές ιδιαιτερότητες (κινητικότητα, χημειοταξική απόκριση, τυχαία κίνηση), που δε διαθέτουν άλλα είδη, έχουν ίσως ένα πλεονέκτημα ως προς την επιλογή σε περιβάλλοντα που είναι φτωχά σε θρεπτικά. Επιφάνειες όπως κόκκοι σκόνης, οργανικές και ανόργανες ενώσεις μεγαλύτερου μοριακού βάρους, αλλά και η συμβιωτική σχέση των βακτηρίων με μεγαλύτερης πολυπλοκότητας οργανισμούς όπως μακροσπονδυλωτά (Crustacea, Nematoda, Platyhelminthes) ή και άλγες, παρέχει επίσης πολλαπλά οφέλη στην αντιμετώπιση διαφόρων περιβαλλοντικών συνθηκών. Αυτές οι ιδιομορφίες επηρέασαν (και επηρεάζουν) την εξελικτική ιστορία και τα χαρακτηριστικά των ειδών.

Κάποιοι ερευνητές έχουν, για λόγους απλούστευσης, κατηγοριοποιήσει τους πληθυσμούς που εντοπίζονται στα υδάτινα οικοσυστήματα (θάλασσες, ποτάμια, λίμνες) σε εκείνους που να αναπτύσσονται με πολύ βραδείς ρυθμούς, σε χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών, τους οποίους ονομάζουν **ολιγότροφους**, και εκείνους που αναπτύσσονται μόνο παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων θρεπτικών, αλλά μπορεί να επιβιώνουν και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις θρεπτικών, τους **ευτροφικούς**. Στα ολιγοτροφικά περιβάλλοντα έχει παρατηρηθεί ότι αρκετοί βακτηριακοί πληθυσμοί αποβάλλουν μικρότερες ποσότητες ενέργειας, ελαττώνοντας τους μεταβολικούς τους ρυθμούς, ενώ ως προς τους χρόνους ανάπτυξης (κατά την εκθετική φάση), το εύρος είναι εκπληκτικά μεγάλο και κυμαίνεται από 10 min έως 8 d! Η ιδιότητα των βακτηρίων να επιβραδύνουν τις μεταβολικές τους λειτουργίες έχει χαρακτηριστεί από πολλούς ερευνητές ως μια γενικότερη στρατηγική επιβίωσης, όπως είναι για παράδειγμα η ανάπτυξη σπορίων.

Οι συνθήκες ανάπτυξης (συγκέντρωση θρεπτικών, διαθέσιμες πηγές ενέργειας, κλίμα) είναι, λοιπόν, καθοριστικοί παράγοντες για την ανάπτυξη των πληθυσμών σε οποιοδήποτε περιβάλλον και είναι υπεύθυνοι για ένα μεγάλο φάσμα συμπεριφορών. Ερευνητές αναφέρουν, ότι η ανάπτυξη της *Legionella pneumophilla* σε περιβάλλον έλλειψης θρεπτικών αύξησε την ανθεκτικότητα του βακτηρίου στο χλώριο 6 με 9 φορές συγκριτικά με κύτταρα του βακτηρίου που είχαν αναπτυχθεί σε Άγαρ. Ο Le Chevalier και οι συνεργάτες του παρατήρησαν κάτι αντίστοιχο σε κύτταρα *Klebsiella pneumoniae* που είχε καλλιεργηθεί σε πλούσιο και 4 φορές αραιωμένο θρεπτικό μέσο. Για ίδιους χρόνους επώασης, τα βακτήρια που ανατράφηκαν στο ολιγοτροφικό περιβάλλον είχαν 3-4 φορές περισσότερη ανθεκτικότητα στο χλώριο σε σχέση με εκείνα που αναπτύχθηκαν στο πλούσιο σε θρεπτικά περιβάλλον. Οι Hartke et al. (1998) μελέτησαν την συμπεριφορά του γένους *E. faecalis* υπό την επίδραση παραγόντων, όπως υψηλής θερμοκρασίας (62 °C), χαμηλής οξύτητας (pH = 3,3), ακτινοβολίας UV₂₅₄ (180 J/m²) και υποχλωριώδους νατρίου (0,05%) - τους οποίους ονομάτισαν ως γενικότερους στρεσογόνους παράγοντες - για διαφορετικές συνθήκες επώασης. Αφού άφησαν να επωαστούν σε συνθήκες στέρησης ενέργειας (γλυκόζης), έλαβαν δύο αρχικούς πληθυσμούς, έναν από την εκθετική φάση ανάπτυξης και έναν από τη στατική φάση και τους εισήγαγαν σε ολιγοτροφικό περιβάλλον (νερό βρύσης). Μετά από επώαση μιας ημέρας, εξέθεσαν τους δύο πληθυσμούς σε καθέναν από τους παράγοντες ξεχωριστά αλλά και συνδυασμένα. Παρατήρησαν, λοιπόν, ότι τα κύτταρα της στατικής φάσης (κατά τη στέρηση της γλυκόζης) παρουσίαζαν μια σταθερή ανθεκτικότητα τόσο στο ολιγοτροφικό περιβάλλον, όσο και στην εφαρμογή των ακραίων συνθηκών. Αντίθετα, τα κύτταρα της εκθετικής φάσης - και τα οποία θεωρητικά θα ήταν πιο ευαίσθητα σε ακραία περιβάλλοντα παρουσίαζαν μια ανθεκτικότητα που αυξανόταν, τόσο στον ολιγοτροφικό μικρόκοσμο όσο και στην έκθεση στους στρεσογόνους παράγοντες. Οι ερευνητές συμπεραίνουν ότι η στέρηση ενέργειας πυροδοτεί παρόμοιες αντιδράσεις - συμπεριφορές με εκείνες που προκαλεί η στέρηση τροφής (λιμοκτονία σε ολιγοτροφικά περιβάλλοντα) και ότι ταυτόχρονη στέρηση ενέργειας και τροφής δεν έχει απαραίτητα συνεργιστική επίδραση στη δημιουργία ανθεκτικότητας. Προχωρώντας περαιτέρω τη συλλογιστική τους, αναφέρουν ότι η στέρηση ενέργειας συνδέεται με τη στέρηση τροφής σε μοριακό επίπεδο κι αυτό το συμπέρασμα προέκυψε από τη σύνθεση καινούριων πρωτεϊνών τόσο κατά τη στατική φάση στέρησης γλυκόζης όσο και κατά την είσοδο των στο μικρόκοσμο. Συγκεκριμένα, συνετέθησαν 42 πολυπεπτίδια κατά τη στατική φάση και 16 καινούρια κατά την είσοδο στο μικρόκοσμο. Για τις πρωτεΐνες που αναπτύχθηκαν στο μικρόκοσμο, παρατήρησαν ότι στην αρχή ήταν όλες μικρού μοριακού βάρους, γεγονός που εξηγείται λογικά από τα λιγοστά θρεπτικά που είναι παρόντα στο νερό βρύσης. Με την πάροδο του χρόνου παρατήρησαν μεγαλύτερου μοριακού βάρους πρωτεΐνες και απέδωσαν το γεγονός σε σταδιακή αποκατάσταση του μεταβολισμού, ο οποίος είχε παρεμποδιστεί από το αρχικά δυσμενές περιβάλλον. Ωστόσο, επισημαίνουν ότι η μέτρηση των πολυπεπτιδίων ήταν ικανή μόνο μετά την πάροδο μεγάλου χρόνου παραμονής στο μικρόκοσμο, οπότε δε προκύπτει κάποιο συμπέρασμα σχετικά με την ανάμιξη των πρωτεϊνών μικρότερου μοριακού βάρους στο μηχανισμό ενεργοποίησης των μεγαλύτερων πρωτεϊνών.

Από τη μελέτη καλλιεργειών, στις οποίες εφαρμόστηκε λιμοκτονία, παρατηρήθηκε από πολλούς ερευνητές, ότι ένα μικρό ποσοστό των βακτηρίων, της τάξης του 2 με 4% παραμένουν ζωντανά μετά τη φάση θανάτου. Στο στάδιο αυτό κάποια βακτήρια πεθαίνουν αποβάλλοντας προϊόντα με τη λύση των κυττάρων τους, ενώ κάποια άλλα, επιδιδόμενα σε ένα είδος κανιβαλισμού, καρπώνονται αυτά τα

παραπροϊόντα και εξακολουθούν να επιβιώνουν. Οι Dean & Hinselwood περιγράφουν αυτή τη φάση σαν μια διακύμανση στην ανάπτυξη, με περιοδική εξισορρόπηση των διεργασιών λύσης και σύνθεσης, κατά τη φάση θανάτου.

Δύο εξίσου ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις, που έχουν αναφερθεί κι από άλλους ερευνητές (Byrd et al., 1999) είναι οι εξής:

1. Μετά από 24 h ώρες επώασης *E. faecalis* σε συνθήκες λιμοκτονίας, τα κύτταρα έμοιαζαν φαινοτυπικά (δια γυμνού οφθαλμού και μικροσκοπίας) με στέλεχος του ίδιου γένους που αναπτύχθηκε σε πρότυπες συνθήκες, είχαν δηλαδή σφαιρικό σχήμα και ήταν οργανωμένα σε αλυσίδες. Ωστόσο, μετά από 3 – 7 d στέρησης θρεπτικών, τα κύτταρα είχαν διαρραγεί, κάποια έφεραν αυλακώσεις στην επιφάνεια και η οργάνωσή τους ήταν ανά ζεύγη.

2. Με βάση την παρατήρηση 1 αλλά και από πειραματικά δεδομένα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι πληθυσμοί που προκύπτουν από την έκθεση σε γενικότερες στρεσογόνες συνθήκες παρουσιάζουν ποικιλία ως προς τη μεταβολική τους δραστηριότητα, κάτι που σε κάποιες περιπτώσεις εκδηλώνεται και στο φαινότυπο. Ένα άλλο χαρακτηριστικό τέτοιου τύπου κυττάρων είναι η δυνατότητα τους προς περαιτέρω αναπαραγωγή και καλλιέργεια. Οι Hartke et al., (1998), αναφέρουν ότι μόλις το 10 – 30% των κυττάρων που επώαστηκαν στο ολιγοτροφικό περιβάλλον ήταν καλλιεργήσιμα. Άλλοι ερευνητές αναφέρουν, ότι κατά τη διάρκεια της εφαρμογής γενικότερων στρεσογόνων συνθηκών (θέρμανσης, οξειδωτικού και οσμωτικού στρες), τα κύτταρα γίνονται πιο υδρόφοβα και “κολλώδη” και παρατηρούνται αλλαγές στα λιπαρά οξέα των μεμβρανών, στα αμινοξέα του κυτταρικού τοιχώματος και στην τοπολογία του χρωμοσώματος. Άλλες μελέτες (Dill et al., 2011; Boersma et al., 2015) αναφέρουν ότι κάποια κύτταρα προσαρμόζουν τον όγκο τους προκειμένου να καταφέρουν να ρυθμίσουν την πυκνότητά τους και συνεπώς το πλήθος των μορίων του εσωτερικού τους υπό την επίδραση αυξημένης οσμωτικής πίεσης.

Στα δικά μας πειράματα, με την ανάπτυξη των μικτών πληθυσμών στις διάφορες συνθήκες, όλοι οι πληθυσμοί που προέκυψαν από τις καλλιέργειες ανθεκτικών – ευαίσθητων βακτηρίων στο **Müller Hinton Broth** ήταν ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά που εξετάσαμε, καθώς επίσης τα ποσοστά μείωσης ήταν χαμηλότερα στις καλλιέργειες με το αραιωμένο θρεπτικό μέσο (εξαιρείται ο πληθυσμός των *Enterococci*). Επιπλέον, σε όλες τις περιπτώσεις τα ποσοστά απομάκρυνσης την 3η ημέρα ήταν ελαφρώς χαμηλότερα σε σχέση με εκείνα των 5 ημερών. Το γεγονός αυτό σχετίζεται σε κάποιο βαθμό με τη φάση στην οποία βρίσκεται η καλλιέργεια την 3η και την 5η μέρα και αυτό το συμπεραίνουμε και από την έντονη αλλαγή στο χρώμα του περιεχομένου του αντιδραστήρα.

Αντίθετα, από τις καλλιέργειες στο **υγρό απόβλητο**, ο πληθυσμός των *E. coli* στο πυκνό απόβλητο παρουσίασε ευαισθησία στη CIP, ενώ στο αραιωμένο απόβλητο δεν αναπτύχθηκε κανένα κύτταρο ούτε στις 3 ούτε στις 5 ημέρες. Στους *Staphylococci* μόνο ο πληθυσμός των 3 ημερών στο πυκνό απόβλητο ήταν ενδιάμεσος στη CIP, ωστόσο απαιτούνται περισσότερα πειράματα προκειμένου να καταλήξουμε σε ασφαλέστερο συμπέρασμα.

Τέλος, οι *Enterococci* που αναπτύχθηκαν στο αραιωμένο απόβλητο ήταν ανθεκτικοί στην AMP, ενώ οι πληθυσμοί στο πυκνό απόβλητο ενδιάμεσοι. Όπως είδαμε στις δοκιμές μας για τον υπολογισμό της MIC, τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικών *Enterococci* παρατηρήθηκαν στην AMP.

Σχετικά με αυτή την «διατροφική ιδιαιτερότητα» των *Enterococci* αλλά και την ανθεκτικότητα που παρουσιάζει η συγκεκριμένη ομάδα βακτηρίων σε διάφορες στρεσογόνες συνθήκες και περιβάλλοντα, αξίζει εδώ να αναφέρουμε μερικές παρατηρήσεις. Οι *Enterococci* ανήκουν σε μια οικογένεια βακτηρίων που ονομάζονται γαλακτικά βακτήρια (LAB, Lactic Acid Bacteria) και έχουν τη δυνατότητα να αλλάζουν τις μεταβολικές τους διεργασίες μεταξύ ομογαλακτικής ζύμωσης και ζύμωσης μικτών ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης (στέρωση γλυκόζης)(Mehmeti, 2011). Μπορούν να ζυμώσουν μια μεγάλη ποικιλία υδατανθράκων προκειμένου να παράξουν γαλακτικό οξύ. Η έκφραση δε κάποιων γονιδίων και πρωτεϊνών (όπως για παράδειγμα οι PBP2' που σχετίζονται με τη δομή και τη λειτουργία των μεμβρανών) ποικίλει ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης του βακτηρίου και εκφράζει την πλαστικότητα του βακτηρίου, στην προσπάθειά του για επιβίωση σε διάφορες περιβαλλοντικές μεταβλητές. Αναφορικά με τις συνθήκες ανάπτυξης και τις τροφικές “προτιμήσεις” αξίζει να αναφέρουμε είναι ότι οι *Enterococci* που λάβαμε από τα υγρά απόβλητα (ανεξάρτητα από τη δεξαμενή προέλευσης), συγκριτικά με τα δύο άλλα είδη, χρειάζονται 2 ημέρες επώαση και φαινοτυπικά οι αποικίες που σχηματίζουν είναι πολύ μικρότερες από εκείνες των *Staphylococci* στο Nutrient Broth και στο Plate Count Agar. Οι αποικίες όμως του μικτού πληθυσμού της *E. coli* και των *Enterococci* που επώαστηκαν στο υγρό απόβλητο ήταν, όπως είδαμε, μεγαλύτερες σε μέγεθος από εκείνες που αναπτύχθηκαν στο Müller Hinton Broth. Και οι δύο τύποι φαινοτύπων – λεπτότερα ή παχύτερα από τη συνήθη μορφή – έχουν παρατηρηθεί σε ανθεκτικά κύτταρα. Ο συγκεκριμένος όμως φαινότυπος δεν αντιστοιχεί και σε ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό. Η *E. coli* στην προκειμένη περίπτωση ήταν ευαίσθητη, ενώ οι *Enterococci* ανθεκτικοί. Η καλλιέργεια, λοιπόν στα ίδια τροφικά υποστρώματα έδωσε δυο φαινοτυπικά παρόμοιους πληθυσμούς με ουσιώδη όμως διαφορά στη μεταβολική δραστηριότητα (ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό). Η στέρωση της τροφής (ή της ενέργειας) δε συνεπάγεται, επομένως, και ανθεκτικότητα σε άλλους στρεσογόνους παράγοντες (π.χ. αντιβιοτικό), ίσχυει όμως ότι επηρεάζει ποικιλοτρόπως τη μορφολογία του κυττάρου. Φαίνεται, όμως, πως η λειτουργία του **ενδογενούς μεταβολισμού**, η προτίμηση σε διαφορετικά οργανικά υποστρώματα ή και η ικανότητα μεταβολισμού εναλλακτικών τύπων σακχάρων είναι πειστικές εξηγήσεις και έχουν παρατηρηθεί σε είδη βακτηρίων (όπως και οι *Enterococci*) που προέρχονται από διάφορα ενδιαίτηματα (ιζήματα, θάλασσες, ποτάμια) αλλά και σε πολλές μεταλλάξεις διαφόρων ειδών. Σίγουρα απαιτούνται περισσότερα πειραματικά δεδομένα αλλά και περαιτέρω ανάλυση σε μοριακό επίπεδο για να εμπλουτίσουμε τα συμπεράσματά μας. Άλλες δοκιμές που θα είχαν ενδιαφέρον είναι (α) ο προσδιορισμός και η μελέτη των φάσεων από τις οποίες λαμβάνουμε τον πληθυσμό, (β) η εξέταση των γονιδίων που εντοπίζονται στις διάφορες φάσεις της καλλιέργειας, (γ) η εξέταση της ανάπτυξης του πληθυσμού παρουσία αντιβιοτικού σε συγκεντρώσεις κοντά σε αυτές που καταγράφονται στη φύση, (δ) η χρήση μοριακών τεχνικών και μικροσκοπίας για τη λήψη ποιοτικών δεδομένων (όπως είναι για παράδειγμα η πιθανότητα σύζευξης). Τέλος, δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι η μορφολογία των βακτηρίων που εντοπίζονται στο περιβάλλον είναι αρκετά διαφορετική από εκείνα που καλλιεργούνται στα εργαστήρια, όπου τους παρέχεται πλούσιο θρεπτικό υλικό (πλουσιότερες πηγές άνθρακα).

Σε συνθήκες περιβάλλοντος τα βακτήρια έρχονται αντιμέτωπα με συνθήκες πολλαπλής στέρωσης. Όσον αφορά στην τύχη αλλόχθονων οργανισμών σε υδάτινα οικοσυστήματα, η η μορφή με την οποία θεωρούμε ότι επιβιώνουν είναι εκείνη η κυτταρική κατάσταση, που προκύπτει από την αλληλεπίδραση με κύτταρα του ίδιου είδους αλλά και με το νέο, μη ευνοϊκό περιβάλλον, στο οποίο κυριαρχούν οι αυτόχθονοι

μικροοργανισμοί, μη επαρκή θρεπτικά, διαφορετικές συνθήκες και τοξίνες φυσικής ή ανθρωπογενούς προέλευσης. Στα περισσότερα πειράματα *in vitro* γίνεται στέρηση συνήθως ενός παράγοντα (πηγής άνθρακα ή ενέργειας) και μελετάται η ανάπτυξη ανθεκτικότητας με βάση την απώλεια αυτού του παράγοντα. Σε πιο πολύπλοκες μήτρες, όπως τα υδάτινα οικοσυστήματα, στα οποία και καταλήγουν από τις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων έρχονται αντιμέτωπα με συνθήκες περιβαλλοντικού στρες αλλά και άλλους κατασταλτικούς παράγοντες πολύ πιο σύνθετους, που πυροδοτούν ένα ευρύ φάσμα πιθανών συμπεριφορών. Φαίνεται πάντως πως τα oligοτροφικά περιβάλλοντα είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει τη δυνατότητα καλλιέργειας αλλόχθονων κοπρανώδων βακτηρίων, γεγονός που έχει καταγραφεί και από άλλους ερευνητές.

4.4 Επιλογή και συνεπιλογή των ARB και ARGs στους βιολογικούς καθαρισμούς και σε διάφορες περιβαλλοντικές μήτρες – Επίλογος

Η παρουσία ARB και ARGs στους βιολογικούς καθαρισμούς είναι αναμφισβήτητη και αποτελεί συνέπεια του φρενήρη ρυθμού παραγωγής και κατανάλωσης των αντιβιοτικών σε παγκόσμια κλίμακα, καθώς και την ελλιπή και πολλές φορές κατευθυνόμενη ενημέρωση του κοινού από τα μέλη της επιστημονικής και ιατρικής κοινότητας. Ο βαθμός όμως στον οποίον τα αντιβιοτικά που ανευρίσκονται στους βιολογικούς καθαρισμούς και επηρεάζουν τα αυτόχθονα είδη είναι ακόμα άγνωστος. Στα βακτήρια μπορεί να υπάρξουν προσαρμοστικές μεταλλάξεις, δηλαδή μεταλλάξεις κατευθυνόμενες κατά κάποιον τρόπο από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και οι οποίες, όταν συμβάλλουν στην επιβίωση του οργανισμού μπορεί να γίνουν συχνότερες απ' ό,τι θα ανέμενε κανείς αν οφείλονταν μόνο στην τύχη. Η είσοδος των μικροοργανισμών στον oligοτροφικό μικρόκοσμο (Hartke et al., 1998) είχε αποτέλεσμα την παραγωγή πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους λόγω της μικρής συγκέντρωσης των θρεπτικών στο νερό βρύσης και είναι χαρακτηριστική της αλληλεπίδρασης μικροοργανισμού - περιβάλλοντος. Οι νέοι μοριακοί τύποι (πολυμορφισμοί) που μπορεί να προκύπτουν κάθε φορά, λόγω του μεγάλου αριθμού δυνατών συνδυασμών, υποβάλλονται σε έλεγχο από τη φυσική επιλογή. Αυτή περιορίζει δραστικά την επιβίωση των μεταλλάξεων. Αυτό σημαίνει ότι οποιεσδήποτε προσαρμοστικές μεταβολές μπορούν να συμβούν σε ένα κύτταρο είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με το περιβάλλον στο οποίο ένα κύτταρο βρίσκεται και αναπαράγεται. Η επιλογή, λοιπόν, της οποιασδήποτε δομής και η δημιουργία απογόνων είναι μια δυναμική διαδικασία κατά την οποία ο οργανισμός μετασχηματίζεται και μετασχηματίζει το περιβάλλον του. Η λύση ενός κυττάρου που διαθέτει δομές όπως πλασμία, γονίδια ανθεκτικότητας ή ιντεγκρόνια εφοδιάζει το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται με τέτοιες δομές, τις οποίες μπορεί να χρησιμοποιήσουν άλλα κύτταρα. Ένα χαρακτηριστικό όπως η πλαστικότητα, είναι ακριβώς απότοκος της ανάγκης για επιβίωση, όπως κατά ανάλογο τρόπο ένα κύτταρο μεταβολίζει κάποιο εναλλακτικό σάκχαρο ή μεταβάλλει τις δομές και τις ιδιότητες των μακρομορίων κατά τη στέρηση της ενέργειας.

Τα στοιχεία που προκύπτουν από πληθώρα μελετών σχετικά με τις περιβαλλοντικές μήτρες όπου ανευρίσκονται αντιβιοτικά και βακτήρια ανθεκτικά σε αυτά κατατάσσουν πρώτες τις κτηνοτροφικές μονάδες, στις οποίες έχουν καταγραφεί συγκεντρώσεις αντιβιοτικών από 0,1 ως 900 mg/kg (στο χόμα και στα ιζήματα

παρακείμενων ποταμών, λιμνών, στραγγισμάτων). Ακολουθούν οι βιολογικοί καθαρισμοί μονάδων παρασκευής αντιβιοτικών (συγκεντρώσεις 1,68 μg/L – 50 mg/L) και ύδατα παρακείμενα σε φαρμακοβιομηχανίες (0,01 – 31 mg/L), οι αγροτικές εκτάσεις (0,1 – 2 mg/kg), οι ιχθυοκαλλιέργειες (0,05 – 400 μg/kg στα ιζήματα), τα νοσοκομειακά απόβλητα (0,7 – 124,5 μg/L), οι βιολογικοί καθαρισμοί (10 – 1000 ng/L) και τελευταία τα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα με συγκεντρώσεις της τάξης των ng/L.

Οι πληροφορίες για τις 4 πρώτες κατηγορίες είναι πολύ λίγες ως προς τις συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών, ωστόσο σε αυτές που ήδη υπάρχουν οι τιμές είναι αρκετά υψηλές. Λίγα είναι και τα δεδομένα σχετικά με την ύπαρξη ανθεκτικών βακτηρίων και γονιδίων ανθεκτικότητας κοντά σε τέτοιες εγκαταστάσεις. Είναι, λοιπόν, αναγκαίο να διερευνηθεί η πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας και σε τέτοιους χώρους, καθώς επηρεάζουν πολύ πιο άμεσα την ανθρώπινη ζωή και δραστηριότητα. Η παρουσία επίσης ρύπων, που η χρήση τους έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, όπως αυξητικοί παράγοντες, φυτοφάρμακα και διάφορες τοξικές και χημικές ενώσεις είναι ιδιαίτερα έντονη σε τέτοιες εγκαταστάσεις. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να έχουν και συνεργιστική επίδραση στους αυτόχθονους οργανισμούς και να επηρεάζουν την επιλογή και συνεπιλογή τους κάτι που πρέπει εξίσου να μελετηθεί.

Όσον αφορά στην επεξεργασία των διαφόρου τύπου υγρών αποβλήτων μια απαραίτητη ενέργεια είναι ο διαχωρισμός των αγροτοκτηνοτροφικών, βιομηχανικών, νοσοκομειακών αποβλήτων από τα αστικά και η άλλου τύπου επεξεργασία τους, κατά προτίμηση στην πηγή. Ουσιαστική λύση θα αποτελούσαν και *in situ* μελέτες επεξεργασίας τέτοιων αποβλήτων. Έχουν προταθεί πολλές μέθοδοι σχετικά με την αντιμετώπιση των αντιβιοτικών και των ρύπων αναδυόμενου ενδιαφέροντος στην πηγή παραγωγής τους, μεταξύ των οποίων οι προηγμένες οξειδωτικές διεργασίες (οζόνωση, φωτοκατάλυση), φυσικές (προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα, διήθηση σε αμμόφιλτρο) και φυσικοχημικές (κροκίδωση – συσσωμάτωση). Θα μπορούσε, λοιπόν, να εξεταστεί η εφαρμογή τους σε τέτοιου τύπου εγκαταστάσεις.

Στην κλινική τώρα αντιμετώπιση των κυττάρων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα έχουν αναφερθεί προτάσεις μεταξύ των οποίων είναι οι εξής:

α. Θεραπεία με βακτηριοφάγους

Αυτή η μέθοδος αναπτύχθηκε για πρώτη φορά στη Σοβιετική Ένωση τη δεκαετία του 30' από τους Felic D'herelle και George Eliava στο Eliava Institute της Γεωργίας και εφαρμόστηκε με επιτυχία για την αντιμετώπιση παθογόνων βακτηρίων που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνταν ήδη για την θεραπεία των λοιμώξεων. Η ιδέα στηρίζεται στην εκλεκτικότητα των φάγων σε συγκεκριμένα παθογόνα στελέχη, καθώς και στη δυνατότητα γενετικής τροποποίησής τους για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων. Επίσης, πρόκειται για ένα είδος ιών, το οποίο βρίσκεται σε αφθονία σε διάφορες γωνίες του πλανήτη, για παράδειγμα στις θαλάσσιες κοιλότητες. Μπορεί να εφαρμοστεί ως αυτόνομη θεραπεία ή συνδυαστικά με αντιβιοτικά.

Ενώ η Δυτική Ιατρική αρχικά δυσκολευόταν να αποδεχτεί τη θεραπεία με φάγους, πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν πρόσφατα στρέψει την προσοχή τους σε αυτή την κατεύθυνση (Kutateladze et al., 2010; Yilmaz et al., 2013; Chan et al., 2013). Το Μάρτιο του 2014, το Εθνικό Ινστιτούτο Αλλεργιών και Μολυσματικών Ασθενειών της Αμερικής κατέταξε τη θεραπεία με φάγους στις 7 επικρατούσες θεραπείες για την αντιμετώπιση του φαινομένου της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Παρόλο που τα

βακτήρια μπορεί να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα ακόμα και στους φάγους, οι τελευταίοι διαφέρουν από τα αντιβιοτικά ως προς τη δυνατότητα εξέλιξης. Η μελέτη και εφαρμογή της μεθόδου βοηθά τους ερευνητές να κατανοήσουν τόσο τους μηχανισμούς και την εξέλιξη των φάγων όσο και για τα ίδια τα παθογόνα βακτήρια, μέσω της αλληλεπίδρασης των δύο συστημάτων.

β. Μπάλωμα των γονιδίων

Η ανάπτυξη μοριακών εργαλείων, όπως το CRISPR (Clustered Regularly Inverspaced Short Palindromic Repeats) μπορεί να ωφελήσει εξίσου στην θεραπεία των ανθεκτικών βακτηρίων. Χάρη στη δυνατότητά του να τροποποιεί μεταλλάξεις ή να επιδιορθώνει βλάβες στο γονιδίωμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε μόνο του ή σε συνδυασμό με βακτηριοφάγους. Οι Marraffini & Sontheimer (2008) παρεμπόδισαν την οριζόντια μεταφορά γονιδίου σε κλινικό στέλεχος *S. epidermidis* με χρήση του CRISPR. Οι Yosef et al. (2015) χρησιμοποίησαν ειδικά τροποποιημένους με CRISPR φάγους για να επιτεθούν στο γονιδίωμα ανθεκτικού βακτηρίου *E. coli* και να θανατώσουν μόνο τα ανθεκτικά και όχι τα ευαίσθητα στο αντιβιοτικό στελέχη. Η μέθοδος αυτή, ειδικά με τη χρήση του Cas9, μιας δίκλωνης νουκλεάσης DNA που μπορεί να προγραμματιστεί κατάλληλα ώστε να επιδιορθώνει κάποια συγκεκριμένη ακολουθία DNA, προσφέρει λαμπρές προοπτικές στην αντιμετώπιση των ανθεκτικών παθολογιών αλλά και σε ένα ευρύ ερευνητικό φάσμα του κλάδου της Βιολογίας και της Ιατρικής.

Εν κατακλείδι μπορούμε να καταλήξουμε συνοπτικά σε μερικά σχόλια και συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα εργασία.

1. Τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικότητας καταγράφηκαν για τα είδη *E. coli* και *Enterococci* στην AMP, 36,7% και 46,9%, αντίστοιχα και για τους *Staphylococci* στην TET (39,1%)
2. Αυξημένη ευαισθησία όλων των ειδών καταγράφηκε στο SMX/TMP – MIC₈₀ αντί για MIC₆₀. Και τα δύο αντιβιοτικά και ειδικά ο συνδυασμός SMX/TMP είναι νεότερης γενιάς, γεγονός που μπορεί να δικαιολογήσει τη συγκεκριμένη παρατήρηση.
3. Αυξημένη παρουσία ανθεκτικών βακτηρίων είχαμε στην είσοδο (37,5% του συνολικού αριθμού των ανθεκτικών), κάτι που έχει περιγραφεί και από άλλους ερευνητές.
4. Τα χαμηλότερα ποσοστά ανθεκτικών βακτηρίων καταγράφηκαν στην έξοδο (30,4% στο σύνολο των ανθεκτικών) και τα περισσότερα ανήκαν στο είδος *E. coli*.
5. Υψηλές τιμές MIC₆₀ καταγράφηκαν για τα περιβαλλοντικά στελέχη συγκριτικά με δόσεις που προτείνονται για κλινικά στελέχη
6. Μεγάλες ποσότητες των γονιδίων *sulI* και *tetM* εντοπίστηκαν στην είσοδο και στην έξοδο της δευτεροβάθμιας. Η παρουσία του *sulI* στην έξοδο υποδηλώνει και τη σταθερότητα του γονιδίου στο χλώριο. Δεν εντοπίστηκαν καθόλου τα *qnrA* και *ampC* σε κανένα από τα δείγματα των υγρών αποβλήτων, παρόλο που εντοπίστηκαν βακτήρια που έφεραν ανθεκτικότητα στην AMP και στη CIP.

Επιπλέον δε έφευρεν όλα τα στελέχη που παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε (ένα ή περισσότερα) αντιβιοτικά τα μελετούμενα ARGs.

7. Η παρουσία ARB και ARGs στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων και η αδυναμία επεξεργασίας τους με συμβατικές μεθόδους επεξεργασίας και με χλωρίωση καταγράφηκαν και στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.
8. Όλοι οι πληθυσμοί ήταν ανθεκτικοί στο εκάστοτε αντιβιοτικό μετά από επώαση 3 και 5 ημερών σε πυκνό Müller Hinton Broth – μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στους πληθυσμούς των 3 ημερών.
9. Οι μικτοί πληθυσμοί των ειδών *E. coli* και *Staphylococci* ήταν ευαίσθητοι στη CIP, ενώ οι *Enterococci* ανθεκτικοί στην AMP μετά από επώαση σε αραιωμένο απόβλητο. Η ανθεκτικότητα σε έλλειψη θρεπτικών μπορεί να ευνοεί την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό αλλά μπορεί να είναι και τελείως άσχετη.
10. Η εφαρμογή κυμαινόμενων δόσεων αντιβιοτικών από τους πειραματιστές μπορεί αποδεδειγμένα να επάγει την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά σε διάφορα είδη μικροοργανισμών. Τα μεταβολικά μονοπάτια των οργανισμών εξαρτώνται άμεσα από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται και με το οποίο ανταλλάσσουν ύλη και ενέργεια και αναπαράγονται. Η επιλογή και συνεπιλογή ανθεκτικών βακτηρίων μπορεί να ευνοείται και σε άλλους χώρους όπου υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, όπως κτηνοτροφικές μονάδες, μονάδες παρασκευής αντιβιοτικών, αγροτικές εκτάσεις, νοσοκομειακά απόβλητα.

Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

1. Απομόνωση, καταμέτρηση και καταγραφή των ποιοτικών χαρακτηριστικών των ARB (γονίδια, πρωτεΐνες, ένζυμα) σε εδάφη και υδάτινα οικοσυστήματα παρακείμενα σε βιολογικούς καθαρισμούς, κτηνοτροφικές μονάδες, αγροτικές εκτάσεις, μονάδες παραγωγής αντιβιοτικών, ιχθυοκαλλιέργειες. Εκτίμηση της επίδρασης των αντιβιοτικών στους οργανισμούς συνεργιστικά με άλλους επίμονους ρύπους (μέταλλα, αυξητικούς παράγοντες, εντομοκτόνα) στην επιλογή και συνεπιλογή μικροοργανισμών.
2. Πειράματα προσρόφησης αντιβιοτικών σε χουμικές ενώσεις και εξέταση της συμπεριφοράς μικτών πληθυσμών σε περιβάλλον (αποστειρωμένου) υγρού αποβλήτου παρουσία αντιβιοτικών σε συγκεντρώσεις ανάλογες με εκείνες που μπορεί να εντοπιστούν σε μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (ή σε άλλους τύπους υγρών αποβλήτων).
3. Μελέτη των ομοιοτήτων και διαφορών των VbNCBs και των ανθεκτικών κυττάρων με μοριακές τεχνικές, μικροσκοπία.
4. Λήψη ποιοτικών δεδομένων μέσω μελέτης πρωτεϊνών, ενζύμων, RNA και δομών όπως τα πλασμίδια και τα ιντεγκρόνια για τον εμπλουτισμό των συμπερασμάτων σχετικά με ανθεκτικά κύτταρα. Εφαρμογή μικροσκοπίας και μοριακών τεχνικών για τη λήψη ποιοτικών χαρακτηριστικών όπως η αλλοίωση

της δομής των πρωτεϊνών ή οι διαφορές στα επίπεδα του ATP κατά την εφαρμογή γενικότερων στρεσογόνων συνθηκών. Χρήση των επιπέδων του ATP ως δείκτη για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας ενός αντιβιοτικού.

5. In situ επεξεργασία των αντιβιοτικών και των ARB και ARGs στους χώρους όπου ανευρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες. Όχι αλόγιστη μίξη υγρών αποβλήτων διαφόρων πηγών προέλευσης.

Λεξικό χρήσιμων όρων

¹ **Tris(hydroxymethyl aminomethane) – EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid):** λειτουργεί ως ρυθμιστικός παράγοντας του pH διατηρώντας το σταθερό και αντισταθμίζοντας, καθώς η εξαγωγή του DNA εξαρτάται από αυτό. Με τη λύση του κυττάρου ξεκινά η διεργασία εξαγωγής του DNA. Το EDTA δημιουργεί δεσμούς με τα δισθενή ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου, παγιδεύοντάς τα, τα οποία συμβάλουν στη συντήρηση της δομής της κυτταρικής μεμβράνης. Η μεμβράνη αποσταθεροποιείται. Ο ρόλος του Tris είναι από τη μία η διατήρηση του pH του διαλύματος κοντά στο 8, τη στιγμή που το DNA και τα άλλα συστατικά απελευθερωθούν στο εναιώρημα και από την άλλη μπορεί να δρα συνεργιστικά με το EDTA, αλληλεπιδρώντας με τους πολυσακχαρίτες των μεμβρανών.

² **Lysozyme:** ένζυμο, που χρησιμοποιείται για τη λύση των Gram θετικών βακτηριακών κυττάρων, καθώς επιδρά στο στρώμα πεπτιδογλυκάνης, που αποτελεί βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος.

³ **SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, Δωδεκυλοθειικό Νάτριο):** χρησιμοποιείται στο στάδιο της λύσης του κυττάρου. Παγιδεύει τα ανιόντα σχηματίζοντας μικκύλια, τα οποία εύκολα μπορούν να απομακρυνθούν από το κύτταρο και δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας για τις πρωτεΐνες (μεμβρανικές και μη μεμβρανικές υδατοδιαλυτές) και τα λιπίδια, που σχηματίζουν τις κυτταρικές μεμβράνες. Ταυτόχρονα βοηθά στην ευκολότερη εξαγωγή του χρωμοσώματος, που εμπεριέχει το DNA, απομακρύνοντας τις ιστόνες

⁴ **Πρωτεΐνάση K:** ένζυμο, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορα πρωτόκολλα απομόνωσης γενετικού υλικού. Ο ρόλος της είναι διττός. Αφενός, μπορεί να δρα έναντι ευρέος φάσματος πρωτεϊνών, οι οποίες λειτουργούν σαν “θόρυβος” σε διαδικασίες όπως η απομόνωση του γενετικού υλικού. Αφετέρου δε, μετά την προσθήκη της στο διάλυμα απενεργοποιεί τις ενδογενείς νουκλεάσες, που μπορεί να κατακερματίσουν το DNA κατά τη διαδικασία της απομόνωσης. Πλεονέκτημα της Πρωτεϊνάσης K είναι ότι παραμένει δραστήρια ακόμη και παρουσία SDS και χηλικών παραγόντων όπως το EDTA.

⁵ **CTAB:** ο ρόλος του μοιάζει με του SDS, με τη διαφορά ότι αυτό επιδρά κυρίως στα κατιόντα (π.χ. πολυσακχαρίτες)

⁶ **Φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1):** η μέθοδος αυτή βασίζεται στο διαχωρισμό φάσεων σε ένα υγρό δείγμα με φυγοκέντρωση. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία τριών φάσεων, μιας υδατικής φάσης (ανώτερη), μιας ενδιάμεσης και μιας οργανικής (κατώτερη), που διαχωρίζονται οι ενώσεις λόγω διαφορές πυκνοτήτων.

⁷ **Ισοπροπανόλη:** διαλύτης που χρησιμοποιείται παγωμένος (0 °C) για την κατακρήμνιση του γενετικού υλικού. Ωστόσο, επειδή μαζί με το γενετικό υλικό κατακρημνίζονται και άλατα, προτείνεται ο καθαρισμός του γενετικού υλικού με αιθανόλη (τα άλατα είναι λιγότερο διαλυτά στην ισοπροπανόλη συγκριτικά με την αιθανόλη).

⁸ **Γενικότερες στρεσογόνες συνθήκες:** οι μεταβολικές αντιδράσεις των μικροοργανισμών σε συνθήκες περιβαλλοντικού στρες (στέρξη τροφής και ενέργειας, ακραίες θερμοκρασίες, pH, οσμωτική πίεση)

⁹ **Αντίδραση SOS & υποξία:** πρόκειται για δυο γενικότερους μηχανισμούς επιβίωσης, που έχουν παρατηρηθεί κατά την αλληλεπίδραση βακτηρίων – αντιβιοτικών. Με τον όρο αντίδραση SOS αναφέρονται κάποιες ακολουθίες οπερονίων, που είναι υπεύθυνες για την επιδιόρθωση του DNA, μετά από έκθεση σε οξειδωτικού στρες, ακραίο pH και αντιβιοτικούς παράγοντες. Αντίθετα, η υποξία αντίδραση έχει σχετιστεί περισσότερο με συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, που αναπτύσσονται σε δομές όπως τα βιοφιλμ.

Βιβλιογραφία

1. Επιστημονικά άρθρα

1. O.L.Akinbowale, H.Peng, M.D.Barton. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology* 103 (2007), pp: 2016-2025
2. R.Ali, K.Al-Achkar, A.Al-Marini, M.Safi. Role of Polymerase Chain Reaction (PCR) in the detection of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 15 (2014), pp: 293-298
3. S.M.Amato, C.H.Fazen, T.C.Henry, W.W.K.Mok, M.A.Orman, E.L.Sandvik, K.G.Volzing, M.P.Brynildsen. The role of metabolism in bacterial persistence. *Frontiers in Microbiology* 5 (2015), 1-9.
4. S.M.Amato, M.P.Brynildsen. Persister Heterogeneity Arising from a Single Metabolic Stress. *Current Biology* 25 (2015), pp: 2090-2098
5. I.Barcina, P.Lebaron, J.Vives-Rego. Survival of allocthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microbiology Ecology* 23 (1997), pp: 1-9
6. S.Bargerion, R.Boopathy, R.Nathaniel, A.Corbin, G.LaFleur. Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. *International Biodeterioration & Biodegradation* 102 (2015), pp: 370-374
- 7.R.Barrangou, C.Fremaux, H.Deveau, M.Richards, P.Boyaval, S.Moineau, D.A.Romero, P.Horvath. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 315 (2007) 5819, pp. 1709-1712
8. A.L.Batt, S.Kim, D.S.Aga. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. *Chemosphere* 68 (2007) 3, pp: 428-435
9. J.van den Berg, A.J.Boersma, B.Poolman. Microorganisms maintain crowding homeostasis. *Nature reviews* 2017, pp: 1-10
10. C.Bouki, D.Venieri, E.Diamadopoulos. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 91 (2013), pp: 1-9
11. A.B.A. Boxall, L.A. Fogg, P.A. Blackwell, P. Kay, E.J. Pemberton, and A. Croxford. Veterinary Medicines in the Environment. *Rev Environ Contam Toxicol* 180 (2004), pp: 1-91
12. E.R.Campagnolo, K.R.Johnson, A.Karpati, C.S.Rubin, D.W.Kolpin, M.T.Meyer, J.E.Esteban, R.W.Currier, K.Smith, K.M.Thu, M.McGeehin. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large scale swine and poultry feeding operations. *Science of The Total Environment* 229 (2002) 1-3, pp: 88-95
13. B.K.Chan, S.T.Abedon, C.Loc-Carrillo. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology* 8 (2013) 6, pp: 769-783
14. R.R.Chaudhuri, I.R.Henderson. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution* 12 (2012), pp: 214-226
15. B.P.Conlon, S.E.Rowe, A.B.Gandt, A.S.Nuxoll, N.P.Donegan , E.A.Zalis, G.Clair, J.N.Adkins, A.L.Cheung, K.Lewis. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nature Microbiology* (2016), pp: 1-7

16. S.D.Costanzo, J.Murby, J.Bates. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin* 51 (2005) 1e4, pp: 218-223.
17. L.K.Dawe, W.R.Penrose. "Bactericidal" property of seawater: death or debilitation? *Applied and Environmental Microbiology* 35 (1978) 5, pp: 829-833
18. R.H.Deurenberg, E.E.Stobberingh. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution* 8 (2008), pp: 747-763
19. K.A.Dill, K.Ghosh, J.D.Schmit. Physical limits of cells and proteomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (2011), pp: 17876-17882
20. J.E.Drewes. Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle. Petrovic, M., Barcelo, D. (Eds.), *Wilson & Wilsons*. Elsevier (2007), pp. 427-446
21. L.Du, W.Liu. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 32 (2012), pp: 309-327
22. E.Franz, C.Veenman, A.H.A.M.van Hoek, A.R.Husman, H.Blaak. Pathogenic *Escherichia coli* producing Extended-Spectrum β -Lactamases isolated from surface water and wastewater. *Nature Scientific Reports* 5 (2015), pp: 1-9
23. S.Galvin, F.Boyle, P.Hickey, A.Vellinga, D.Morris, M.Cormican. Enumeration and Characterization of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Bacteria in Effluent from Municipal, Hospital, and Secondary Treatment Facility Sources. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (2010) 14 , pp: 4772-4779
24. J.E.Garneu, M.E.Dupuis, M.Villion, D.A.Romero, R.Barrangou, P.Boyaval, C.Fremaux, P.Horvath, A.H.Magadan, S.Moineu. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468 (2010), pp: 67-71
25. T.Geiger, B.Kästle, F.L.Gratani, C.Goerke, C.Wolz. Two Small (p)ppGpp Synthases in *Staphylococcus aureus* Mediate Tolerance against Cell Envelope Stress Conditions. *Journal of Bacteriology* 196 (2014), pp: 894-902
26. J.Giard, A.Hartke, S.Flahaut, A.Benachour, P.Boutibonnes, Y.Auffray. Starvation-Induced Multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Current Microbiology* 32 (1996), pp: 264-271
27. W.Giger, A.C.Alder, E.M.Golet, H.E.Kohler, C.S.McArdell, E.Molnar, H.Siegrist, M.J.Suter. Occurrence and Fate of Antibiotics as Trace Contaminants in Wastewaters, Sewage Sludges, and Surface Waters. *Chimia* 57 (2003), pp: 485-491
28. L.Guarda bassi, D.M.A.L.F.Wong, A.Dalsgaard. The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobialresistant bacteria. *Water Research* 36 (2002), pp: 1955-1964
29. A.Gulkowska, H.W.Leung, M.K.So, S.Taniyasu, N.Yamashita, L.W.Y.Yeung, B.J.Richardson, A.P.Lei, J.P.Giesy, P.K.S.Lam. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China. *Water Research* 42 (2008) 1-2, pp: 395-403
30. A.Harms, E.Maisonneuve, K.Gerdes. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 354 (2016), pp: 1-9
31. A.Hartke, J.Giard, J.Laplace, Y.Auffray. Survival of *Enterococcus faecalis* in an Oligotrophic Microcosm: Changes in Morphology, Development of General Stress Resistance, and Analysis of Protein Synthesis. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 64 (1998) 11, pp: 4238-4245

32. A. Hartmann, E. M. Golet, S. Gartsler, A. C. Alder, T. Koller, R. M. Widmer. Primary DNA Damage But Not Mutagenicity Correlates with Ciprofloxacin Concentrations in German Hospital Wastewaters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36 (1999), pp: 115–119
33. R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K. Kratz. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment* 225 (1999), pp: 109–118
34. M. T. G. Holden, E. J. Feil, J. A. Lindsay, S. J. Peacock, N. P. J. Day, M. C. Enright, T. J. Foster, C. E. Moore, L. Hurst, R. Atkin, A. Barron, N. Bason, S. D. Bentley, C. Chillingworth, T. Chillingworth, C. Churcher, L. Clark, C. Corton, A. Cronin, J. Doggett, L. Dowd, T. Feltwell, Z. Hance, B. Harris, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, K. D. James, N. Lennard, A. Line, R. Mayes, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, S. Whitehead, B. G. Barrell, B. G. Spratt, and J. Parkhill. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *PNAS* 101 (2004) 26, pp: 9786–9791
35. J. Huang, H. Hu, S. Lu, Y. Li, F. Tang, Y. Lu, B. Wei. Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environment International* 42 (2012), pp: 31–36
36. J. V. Holm, K. Rügge, P. L. Bjerg, T. H. Christensen. Occurrence and Distribution of Pharmaceutical Organic Compounds in the Groundwater Downgradient of a Landfill (Grindsted, Denmark). *Environmental Science and Technology* 29 (1995) 5, pp: 1415–1420
37. L. Jacobs, H. Y. Chenia. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas spp.* isolated from South African aquaculture systems. *International Journal of Food Microbiology* 114 (2007), pp: 295–306
38. K. Kleppe, E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux, H. G. Khobana. Studies on Polynucleotides. Repair Replication of Short Synthetic DNA's as catalyzed by DNA Polymerases. *J. Mol. Biol.* 56 (1971), pp: 341–361
39. H. Kruse, H. Sorum. Transfer of Multiple Drug Resistance Plasmids between Bacteria of Diverse Origins in Natural Microenvironments. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (1994) 11, pp: 4015–4021
40. K. Kümmerer. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75 (2009) 417–434
41. M. Kutateladze, R. Adamia. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology* 28 (2010) 12, pp: 591–595
42. J. Laplace, M. Thuault, A. Hartke, P. Boutibonnes, Y. Auffray. Sodium Hypochlorite Stress in *Enterococcus faecalis*: Influence of Antecedent Growth Conditions and Induced Proteins. *Current Microbiology* 34 (1997), pp: 284–289
43. D. G. J. Larsson, C. de Pedro, N. Paxeus. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials* 148 (2007), pp: 751–755
44. N. Le-Minh, S. J. Khan, J. E. Drewes, R. M. Stuetz. Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes. *Water research* 44 (2010) 4, pp: 295–323

45. M.W.LeChevallier, C.D.Cawthon, R.G.Lee. Factors Promoting Survival of Bacteria in Chlorinated Water Supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (1988) 3, pp: 649-654
46. D.Li, M.Yang, J.Hu, Y.Zhang, H.Chang, F.Jin. Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Water Research* 42 (2008) 1e2, pp: 307-317
47. D.Li, M.Yang, J.Hu, J.Zhang, R.Liu, X.Gu, Y.Zhang, Z.Wang. Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river. *Environmental Microbiology* 11 (2009) 6, pp: 1506–1517
48. D.Li, T.Yu, Y.Zhang, M.Yang, Z.Li, M.Liu, R.Qi. Antibiotic Resistance Characteristics of Environmental Bacteria from an Oxytetracycline Production Wastewater Treatment Plant and the Receiving River. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (2010) 11, pp: 3444–3451
49. R.H.Lindberg, P.Wennberg, M.I.Johansson, M.Tysklind, B.A.V.Andersson. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. *Environmental Science & Technology* 39 (2005) 10, pp: 3421e3429.
50. M.A.Lobritz, P.Belenky, C.B.M.Porter, A.Gutierrez, J.H.Yang, E.G.Schwarz, D.J.Dwyer, A.S.Khalil, J.J.Collins. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *PNAS* 112 (2015) 27, pp: 8173–8180
51. T.Lorenz. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments* 63 (2012)
52. A.Luczkiwicz, K. Jankowska, S.Fudala-Ksiazek, K.Olanczuk-Neyman. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wasteater treatment plant. *Water research* 44 (2010) 17, pp: 5089-5097
53. P.A.Mach, D.J.Grimes. R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Applied and Environmental Microbiology* 44 (1982) 6, pp: 1395-1403
54. S.Managaki, A.Murata, H.Takada, B.C.Tuyen, N.H.Chiem. Distribution of Macrolides, Sulfonamides and Trimethoprim in Tropical Waters: Ubiquitous Occurrence of Veterinary Antibiotics in the Mekong Delta. *Environmental Science and Technology* 41 (2007) 23, pp: 8004-8010
55. L.A.Marraffini, E.J.Sontheimer. CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in *Staphylococci* by Targeting DNA. *Science* 322 (2008) 5909, pp: 1843-1845
56. W.R.Miller, J.M.Munita, C.A.Arias. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 12 (2014) 10, pp: 1221–1236
57. A.Novo, S.Andre, P.Viana, O.C.Nunes, C.M.Manaia. Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water research* 47 (2013) 5, pp: 1875-1887
58. J.O'Neil. Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. *The Review on Antimicrobial Resistance*. 2015
59. N.Y.Omar, H.A.S.Ali, R.A.H.Harfoush, E.H.E.Khayat. Molecular Typing of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates on the Basis of Protein A and Coagulase Gene Polymorphisms. *International Journal of Microbiology* 11 (2014), pp: 1-11
60. J.D.Orth, T.M.Conrad, J.Na, J.A.Lerman, H.Nam, A.M.Feist, B.O Palsson. A comprehensive genome-scale reconstruction of *Escherichia coli* metabolism—2011. *Molecular Systems Biology* 7 (2011), pp: 1-9

61. D.L.Paterson. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. The American Journal of Medicine 119 (2006) 6A, pp: S20–S28
62. J.W.Peterson, R.S.Burkhart, D.C.Shaw, A.B.Schuilng, M.J.Haserodt, M.D.Seymour. Experimental determination of ampicillin adsorption to nanometer-size Al₂O₃ in water. Chemosphere 80 (2010) 11, pp: 1268-1273
63. L. Rizzo, C. Manaia, C. Merlin, T. Schwartz, C. Dagot, M.C. Ploy, I. Michael, D. Fatta-Kassinos. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. Science of the Total Environment 447 (2013), pp: 345–360
64. J.M.Rodriguez-Martinez, A.Pascual, I.Garcia, L.Martinez-Martinez. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type β -lactamase. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 52 (2003), pp: 703–706
65. D.B.Roszak, R.R.Colwell. Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. Microbiological Reviews 51 (1987) 3, pp: 365-379
66. A.K.Sarmah, M.T.Meyer, A.B.A.Boxall. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. Chemosphere 65 (2006), pp: 725–759
67. A.M.Saunders, M.Albertsen, J.Vollertsen, P.H.Nielsen. The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms. The ISME Journal 10 (2016), pp: 11–20
68. T.Schwarz, W.Kohnen, B.Jansen, U.Obst. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiology Ecology 43 (2003), pp: 325-335
69. G.Sezonov, D.Joseleau-Petit, R.D'Ari. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. JoJJournal of Bacteriology 2007, pp: 8746-8749
70. V.K.Sharma, N.Johnson, L.Cizmas, T.J.McDonald, H.Kim. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. Chemosphere 150 (2016), pp: 702 – 714
71. M.F.da Silva, I.Tiago, A.Verissimo, R.A.R.Boaventura, O.C.Nunes, C.M.Manaia. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. FEMS Microbiol. Ecol. 55 (2006), pp: 322–329
67. H.W.Stokes, R.M.Hall. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site – specific gene – integration function. Molecular Microbiology 3 (1989) 12, pp: 1669-1683
68. R.B.Sykes, C.M.Cimarusti, D.P.Bonner, K.Bush, D.M.Floyd, N.H.Georgopapadakou, W.H.Koster, W.C.Liu, W.L.Parker, P.A.Principe, M.L.Rathnum, W.A.Slusarchyk, W.H.Trejo, J.S.Wells. Monocyclin β -lactam antibiotics produced by bacteria. Nature 291 (1981), pp: 489-491
69. R.Szczepanowski, T.Bekel, A.Goesmann, L.Krause, H.Kroemke, O.Kaiser, W.Eichler, A.Puhler, A.Schluter. Insight into the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to antimicrobial drugs analysed by the 454-pyrosequencing technology. J Biotechnol 136 (2008), pp: 54-64
69. T.Tennstedt, R.Szczepanowski, I.Krahn, A.Pühler, Andreas Schüter. Sequence of the 68,869 bp IncP-1 α plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. Plasmid 53 (2005), pp: 218-238

70. A.J.Watkinson, D.W.Kolpin, S.D.Constanzo. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of The Total Environment*. Volume 407, Issue 8, 1 April 2009, Pages 2711-2723
71. J.A.Webster. The Continuously Fed Batch Reactor for Measuring Microbial Growth Rates. *Biotechnology and Bioengineering*, XXV (1983), pp: 2981-2990
72. H.Xu, N.Roberts, F.L.Singleton, R.W.Attwell, D.J.Grimes, R.R.Colwell. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology* 8 (1982) 4, pp: 313-323
73. 17. C.Yilmaz, M.Colak, B.C.Yilmaz, G.Ersoz, M.Kutateladze, M.Gozlugol. Bacteriophage Therapy in Implant-Related Infections: An Experimental Study. *JBJS* 95 (2013) 2, pp: 117-125
74. T.Zhang, B.Li. Occurrence, Transformation, and Fate of Antibiotics in Municipal Wastewater Treatment Plants. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41 (2011), pp: 951-998

2. Σημειώσεις

1. K.Shibata, A.A.Benson, M.Calvin. The Absorption Spectra of Suspensions of Living Micro-Organisms. Lawrence Berkeley National Laboratory. 1954
2. P.Zumbo.Phenol-chloroform Extraction. Weill Cornell Medical College, Laboratory of Christopher E. Mason. Ph.D. Department of Physiology & Biophysics
3. Σ.Μπάκκα. Θεραπευτική των λοιμώξεων. Αρεταίειο Νοσοκομείο.

3. Βιβλία

1. J.E.Bennett, R.Dolin, M.J.Blaser. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th Edition. 2015
2. M.B.Coyle. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. Americal Society for Microbiology, 2005.
3. F.Jacob. Το παιχνίδι της εξέλιξης. Τροχαλία, 1989
4. S.Kjelleberg. Starvation in Bacteria. Springer Science+Business Media, LLC, 1993
- G.J.Tortora, B.R.Funke, C.L.Case. Εισαγωγή στη Μικροβιολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδης, 2009
5. S.Rose. Μονοπάτια της ζωής. Βιολογία, Ελευθερία, Ντετερμινισμός. Πρώτη έκδοση, Μάρτιος 2005, Κάτοπτρο.
6. G.Tchobanoglous, F.L.Burton, H.D.Stensel. Μηχανική υγρών αποβλήτων. Επεξεργασία και επαναχρησιμοποίηση. 4η έκδοση, 2006. Metcalf & Eddy, Inc
7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ στον υπολογιστή και στον πάγκο. ΣΕΑΒ, 2015

4. Εργασίες

1. G.L.Hill. Investigation wastewater treatment plant impact on antibiotic resistance within UK river systems. Ph.D. Thesis. School of Life Sciences, University of Warwick, 2016.

2. I.Mehmeti. Regulation of energy metabolism in *Enterococcus faecalis* studied by transcriptome, proteome and metabolome approaches. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, 2011.
3. R.Tuckwell. The impact of receiving waters of pharmaceutical residues and antibiotic resistant faecal bacteria found in urban waste water effluents. Ph.D. Thesis. Middlesex University, 2014.
4. Κ.Γαβαλά. Απομόνωση βακτηρίων ανθεκτικών σε αντιβιοτικά από επιφανειακά ύδατα και έλεγχος αδρανοποίησής τους. Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, 2018
5. Ι.Σ.Μαντζουράνη. Αξιολόγηση της ανάπτυξης αντοχής στα αντιβιοτικά μικροβιακών στελεχών απομονωθέντων από περιβαλλοντικά οικοσυστήματα ή κλινικό περιβάλλον. Διδακτορική διατριβή. Τμήμα Αγροτικής Ανάπτυξης, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, 2011
6. Μ.Μπικουβαράκη. Αδρανοποίηση της *Klebsiella pneumoniae* στα απόβλητα και διερεύνηση μεταβολών του προφίλ ανθεκτικότητας σε ποικιλία αντιβιοτικών. Μεταπτυχιακή Διατριβή. Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, 2016
7. Γ.Νιάρχος. Μικροοργανισμοί και αντιβιοτικά: διασπορά ανθεκτικών βακτηρίων και των αντίστοιχων γονιδίων τους στο υδάτινο περιβάλλον. Διπλωματική εργασία. Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, 2015
8. Δ.Γ.Παπαμιχαήλ. Διερεύνηση της αντοχής στα αντιβιοτικά των *S. aureus* & *Enterococcus spp* με προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης και με μοριακές τεχνικές. Διδακτορική Διατριβή. Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2009
9. Συμεωνίδου Ιωάννα Ελένη. Ποιτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου Cdt1 και Geminin σε ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς. Διπλωματική εργασία. Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Ιατρικής. Πανεπιστήμιο Πατρών, 2008
10. Γ.Φράγκου. Αδρανοποίηση βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά με μεθόδους απολύμανσης. Διπλωματική εργασία. Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, 2017.
11. Ε.Ε.Χαλικιά. Η ευαισθησία των ανθεκτικών στη Methicillin Σταφυλόκοκκων στα πολυπεπτιδικά αντιβιοτικά. Διδακτορική διατριβή. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 1993

5. Σελίδες στο διαδίκτυο

<https://www.addgene.org/protocols/gel-electrophoresis/>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ampicillin#section=Human-Toxicity-Excerpts>

<https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a685002.html>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ciprofloxacin#section=Abiotic-Degradation>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sulfamethoxazole>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trimethoprim#section=Information-Sources>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/CO-Trimoxazole>

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15628019>

<https://sciencing.com/function-tris-buffer-dna-extraction-6370973.html>

<https://bitesizebio.com/2839/dna-precipitation-ethanol-vs-isopropanol/>

http://www.environ-develop.ntua.gr/uploads/k_11.pdf

Παραρτήματα

A. Πειράματα Real – Time PCR για την αναζήτηση των γονιδίων ανθεκτικότητας.

1. *sulI*

Όγκος αντίδρασης = 20 μ L

Πίνακας 18. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για την αναζήτηση του γονιδίου *sulI*.

Μίγμα αντίδρασης	Συγκέντρωση (μ M)	Όγκος (μ L)
SYBR green	1X	780
Forward primer	10 μ M	31,2
Reverse primer	10 μ M	31,2
DNA		2
H ₂ O		561,6

Πίνακας 19. Κύκλοι της PCR για την αναζήτηση του γονιδίου *sulI*.

94 °C	5 min	35 κύκλοι
94 °C	30 s	
55 °C	1 min	
72 °C	2 min	
95 °C	15 s	
65 °C	1 min	
95 °C	15 s	

2. *qnrA*

Όγκος αντίδρασης = 20 μ L

Πίνακας 20. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για την αναζήτηση του γονιδίου *qnrA*.

Μίγμα αντίδρασης	Συγκέντρωση (μ M)	Όγκος (μ L)
SYBR green	1X	860
Forward primer	0,4 μ M	68,8
Reverse primer	0,4 μ M	68,8
DNA		2
H ₂ O		550,4

Πίνακας 21. Κύκλοι της PCR για την αναζήτηση του γονιδίου *qnrA*.

95 °C	5 min
-------	-------

94 °C	90 s	35 κύκλοι
64 °C	30 s	
72 °C	1 min	
95 °C	15 s	
64 °C	1 min	
95 °C	15 s	

3. ampC

Όγκος αντίδρασης = 20 μ L

Πίνακας 22. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για την αναζήτηση του γονιδίου ampC.

Μίγμα αντίδρασης	Συγκέντρωση (μ M)	Όγκος (μ L)
SYBR green	1X	750
Forward primer	10 μ M	30
Reverse primer	10 μ M	30
DNA		2
H ₂ O		540

Πίνακας 23. Κύκλοι της PCR για την αναζήτηση του γονιδίου ampC.

94 °C	5 min	35 κύκλοι
94 °C	30 s	
49°C	30 s	
72 °C	1min	
95 °C	15 s	
65 °C	1 min	
95 °C	15 s	

4. tetM

Όγκος αντίδρασης = 20 μ L

Πίνακας 24. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για την αναζήτηση του γονιδίου TETM.

Μίγμα αντίδρασης	Συγκέντρωση (μ M)	Όγκος (μ L)
SYBR green	1X	700
Forward primer	10 μ M	28
Reverse primer	10 μ M	28
DNA		2
H ₂ O		504

Πίνακας 25. Κύκλοι της PCR για την αναζήτηση του γονιδίου TETM.

94 °C	5 min
-------	-------

94 °C	1 min	35 κύκλοι
55 °C	1 min	
72 °C	5min	
95 °C	15 s	
65 °C	1 min	
95 °C	15 s	

Β. Ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά γενετικού υλικού

Πίνακας 26. Συγκέντρωση και ποιοτικά χαρακτηριστικά του γενετικού υλικού των στελεχών που χρησιμοποιήσαμε για την αναζήτηση των γονιδίων ανθεκτικότητας.

Στέλεχος	Συγκέντρωση γενετικού υλικού (μg/ml)	R (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
<i>Enterococcus 1</i>	238,5	2,1
<i>Enterococcus 6</i>	67,5	1,49
<i>Enterococcus 7</i>	211,2	1,27
<i>E. coli 1</i>	253,6	1,73
<i>E. coli 2</i>	279,2	1,67
<i>E. coli 3</i>	200,3	1,29
<i>E. coli 8</i>	173,4	1,47
<i>Enterococcus 3</i>	147,8	1,27
<i>Staphylococcus 3</i>	195,3	1,14
<i>Staphylococcus 4</i>	97,9	1,5
<i>Enterococcus 8</i>	104,7	1,59
<i>E. coli 4</i>	1041,8	1,83
<i>E. coli 5</i>	107,8	1,02
<i>E. coli 6</i>	439,1	1,81
<i>E. coli 7</i>	200,2	1,82
<i>Enterococcus 5</i>	93,7	1,13
<i>Staphylococcus 6</i>	199,9	1,76
<i>Staphylococcus 1</i>	107,1	1,18
<i>Staphylococcus 2</i>	125,2	1,23
<i>Enterococcus 4</i>	128	1,52
<i>Staphylococcus 5</i>	11,1	1,78
<i>Enterococcus 2</i>	145,8	1,24

Πίνακας 27. Αντιστοίχιση των στελεχών ανάλογα με την πηγή δειγματοληψίας. Α, Β, Γ: είσοδος, έξοδος δευτεροβάθμιας, έξοδος

Βακτήρια	Α	Β	Γ
<i>E.coli</i>	1, 2, 5, 6	3, 7	4, 8
<i>Enterococci</i>	1, 7, 8, 5	6, 4, 2, 3	
<i>Staphylococci</i>	1, 2, 3(<i>S. aureus</i>), 5(<i>S. aureus</i>)	4	6

Γ. Οπτική απορρόφηση μικτών πληθυσμών στα πειράματα με τους αντιδραστήρες

Πίνακας 28. Οπτικές απορροφήσεις των μικροοργανισμών. MBH: Müller Hinton Broth

Πληθυσμός	Απορρόφηση (600 nm)							
	MHB		MHB αραιωμένο		Απόβλητο		Αραιωμένο απόβλητο	
	3 d	5d	3d	5d	3d	5d	3d	5d
<i>E.coli</i>	2,2601	2,5911	1,5612	1,7642	0,0072	0,006	0	0
<i>Enterococci</i>	0,1429	0,2446	0,045	0,2341	0,0094	0,0059	0,005	0,0015
<i>Staphylococci</i>	1,7039	2,6345	1,1957	0,9640	0,009	0,0098	0,001	0,0028

Δ. Κατηγοριοποίηση των βακτηριακών ειδών με βάση το EUCAST

Πίνακας 29. Προφίλ ανθεκτικότητας κλινικών στελεχών στα αντιβιοτικά ενδιαφέροντος.

Αντιβιοτικό	<i>Enterococci</i>		<i>E. coli</i>		<i>Staphylococci</i>	
	R _≥ (mg/L)	S _≤ (mg/L)	R _≥ (mg/L)	S _≤ (mg/L)	R _≥ (mg/L)	S _≤ (mg/L)
CIP	4	4	0,5	0,25	1	1
AMP	81	8	8	4		
SMX/TMP	1	0,032	4	2	4	2
TET	8	1			16	8