



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΚΡΗΤΗΣ**

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

**«ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΑ ΥΓΡΑ
ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΚΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΗΝ ΟΖΟΝΩΣΗ ΩΣ
ΜΕΘΟΔΟ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΔΡΑΚΑ ΑΝΔΡΟΝΙΚΗ

A.M.:2013050053

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΒΕΝΙΕΡΗ ΔΑΝΑΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΓΙΔΑΡΑΚΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΧΑΝΙΑ 2018

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος προπτυχιακών σπουδών του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης και τα πειράματα έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, καθώς και στο Εργαστήριο Τεχνολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας κα. Βενιέρη Δανάη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την άψογη συνεργασία μας και την πολύτιμη καθοδήγηση της καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας. Ακόμη, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στην κα. Γουνάκη Ιωσηφίνα, η οποία υπήρξε δίπλα με ανεξάντλητη υπομονή και επιμονή καθ' όλη την συνεργασία μας και πραγματικά της οφείλω πολλά. Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον κ. Διαμαντόπουλο Ευάγγελο, τόσο για το χρόνο που διέθεσε στην αξιολόγηση της εργασίας μου, όσο και στην παραχώρηση του χώρου του εργαστηρίου για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Επιπλέον, ευχαριστώ πολύ τον κ. Γιδαράκο Ευάγγελο, για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε και για την παρουσία του.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην αδερφή μου Αλεξάνδρα και κυρίως στους γονείς μου Βασίλη και Ντίνα, οι οποίοι με βοήθησαν τόσο οικονομικά όσο και ψυχολογικά όλα αυτά τα χρόνια, για τις αρχές που μου δώσανε και για τον άνθρωπο που είμαι σήμερα.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες και πολύ καλές μου φίλες Αλεξάνδρα και Μαρία που μέσα από πολύ κόπο, αλλά και όμορφες στιγμές ολοκληρώσαμε μαζί αυτό το πολυετές ταξίδι.

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά συνεχίζει να αναπτύσσεται, ενώ ο αγωγός για την ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών ουσιών στερεύει. Σαν αποτέλεσμα, βακτηριακές λοιμώξεις που κάποτε θεραπεύονταν εύκολα, γίνονται ανίατες. Ειδικότερα, η Ελλάδα συγκαταλέγεται σε μία από τις πλέον απειλούμενες χώρες όσον αφορά την μικροβιακή αντοχή, ως συνέπεια των υψηλών επιπέδων κατανάλωσης αντιμικροβιακών ουσιών που έχουν καταγραφεί (ΚΕΕΛΠΝΟ).

Ως μία άκρως σημαντική πηγή ανθεκτικών μικροβίων στα αντιβιοτικά, χαρακτηρίζονται οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, λόγω των εξαιρετικών συνθηκών για την ανάπτυξη τους (Marti et al. 2014)

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν αφενός ο εντοπισμός των ανθεκτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από την Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων στα Χανιά, στα αντιβιοτικά Σουλφαμεθοξαζόλη-Τριμεθοπρίμη, Τετρακυκλίνη και Σιπροφλοξασίνη, και αφετέρου ο έλεγχος μεταβολής του προφίλ της ανθεκτικότητας μερικών εξ' αυτών μετά την εφαρμογή οζόνωσης ως μεθόδου απολύμανσης. Τα στελέχη που εξετάστηκαν ανήκαν στις ευρύτερες βακτηριακές οικογένειες *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Aeromonadaceae*, *Rhizobiaceae* και *Vibrionaceae*. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την εύρεση του ποσοστού μείωσης του 60% του συνολικού πληθυσμού του εκάστοτε βακτηρίου, ήταν αυτή της Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration-MIC). Για την απολύμανση χρησιμοποιήθηκε γεννήτρια Aqua-FloCD1B. Στη Σουλφαμεθοξαζόλη-Τριμεθοπρίμη εντοπίστηκε η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα εκ των τριών ουσιών, με ποσοστό θνησιμότητας των βακτηρίων 82,36% κατά τη δράση της. Για τη σιπροφλοξασίνη και την τετρακυκλίνη το ποσοστό

εμφάνισης ανθεκτικών βακτηρίων ως προς αυτές ήταν στο 5.88%. Συνολικά, παρατηρήθηκε ότι εκ των 17 στελεχών που εξετάστηκαν, η πλειονότητα των ανθεκτικών για τις τρεις αντιβιοτικές ουσίες, προέρχονταν από την εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί και από τις μελέτες άλλων ερευνητών (Manaia et al. 2018). Για περαιτέρω επεξεργασία με οζόνωση, οδηγήθηκαν τα στελέχη *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecium* και *Rhizobium radiobacter*, τα οποία αδρανοποιήθηκαν πλήρως με δόσεις όζοντος 9.9 mg/L, 16.76 mg/L, 9.2 mg/L και 12.98 mg/L αντίστοιχα. Τέλος, στα εναπομείναντα βακτήρια μετά την απολύμανση, ελέγχθηκε η μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας τους και ως προς τα τρία αντιβιοτικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οζόνωση επηρέασε έντονα την αντοχή τους στις ουσίες είτε θετικά είτε αρνητικά, δεδομένης της εκάστοτε δόσης όζοντος, του είδους του βακτηρίου και της προέλευσής του.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 ΟΜΑΔΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	8
1.1.1 ΣΙΠΡΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗ (CIPROFLOXACIN)	9
1.1.2 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ (TETRACYCLINE).....	10
1.1.3 ΣΟΥΛΦΑΜΕΘΟΞΑΖΟΛΗ-ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ (SULFAMETHOXAZOLE-TRIMETHOPRIM)	11
1.2 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	12
1.3 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ.....	14
1.4 ΤΡΟΠΟΙ ΔΙΑΔΟΣΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	15
1.5 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΑ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ	16
1.6 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ	17
1.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΛΥΜΑΝΤΙΚΩΝ	19
1.8 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΜΕ ΟΖΟΝ, ΟΖΟΝΩΣΗ	23
1.8.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΟΖΟΝΩΣΗΣ.....	24
1.8.2 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΟΖΟΝΩΣΗΣ.....	24
2. ΣΚΟΠΟΣ	25
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
3.1 ΥΛΙΚΑ.....	26

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	27
3.2.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.....	27
3.2.2 Οζόνωση	31
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
4.1. Εξεταζόμενα βακτήρια	35
4.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.....	40
4.2.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	43
4.2.2. <i>Enterococcaceae</i>	49
4.2.3. <i>Aeromonadaceae</i>	53
4.2.4. <i>Rhizobiaceae</i>	57
4.2.5. <i>Vibrionaceae</i>	61
4.3. Οζόνωση	64
4.3.1. <i>Aeromonas hydrophila</i>	64
4.3.2. <i>Klebsiella oxytoca</i>	65
4.3.3. <i>Enterococcus faecium</i>	67
4.3.4. <i>Rhizobium radiobacter</i>	69
4.3.5. Μέγεθος C*t.....	71
4.4 Έλεγχος μεταβολής του προφίλ ανθεκτικότητας	72
4.4.1 Sulfamethoxazole-Trimethoprim.....	72
4.4.2 Tetracycline	77
4.4.3 Ciprofloxacin.....	81
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	86
7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	88
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	89

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αντιβιοτικά είναι φυσικά παράγωγα των μικροοργανισμών, τα οποία δρουν ενάντια σε άλλα μικρόβια που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση λοιμώξεων. Στις μέρες μας εκτός από τα φυσικά, οι αντιβιοτικές ουσίες περιλαμβάνουν και τα ημισυνθετικά (με χημική τροποποίηση των φυσικών) ή συνθετικά (χημειοθεραπευτικά) παράγωγα. Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών ουσιών αποτέλεσε την κρηπίδα για την αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών, οι οποίες μάστιζαν και αποδυνάμωναν το ανθρώπινο γένος για πολλές χιλιετίες. Σήμερα, ενενήντα χρόνια μετά το πρώτο αντιβιοτικό εύρημα, η επιστημονική κοινότητα έρχεται αντιμέτωπη με ένα νέο και ανησυχητικό πρόβλημα, το οποίο χρήζει άμεσης επίλυσης, την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Η μικροβιακή αντοχή δεν αποτελεί αποκλειστικά πρόβλημα του ιατρικού-κλινικού κλάδου, αλλά κατατράχεται και στον περιβαλλοντικό τομέα, προκαλώντας αλλαγές στη δομή των βακτηρίων (Tibayrenc et al. 2017). Τα αστικά υγρά απόβλητα, αποτελούν σημαντική πηγή μικροοργανισμών με αυξημένη αντοχή σε αντιβιοτικούς παράγοντες, λόγω του πλούσιου περιβάλλοντος σε θρεπτικά συστατικά και σε οργανικό φορτίο, που ευνοεί την ανάπτυξή τους. Σαν αποτέλεσμα, είναι η εξάπλωση τους στο ευρύτερο περιβάλλον μετά το πέρας της επεξεργασίας και η πιθανή προσβολή των ανθρώπων από αυτά.

1.1 ΟΜΑΔΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

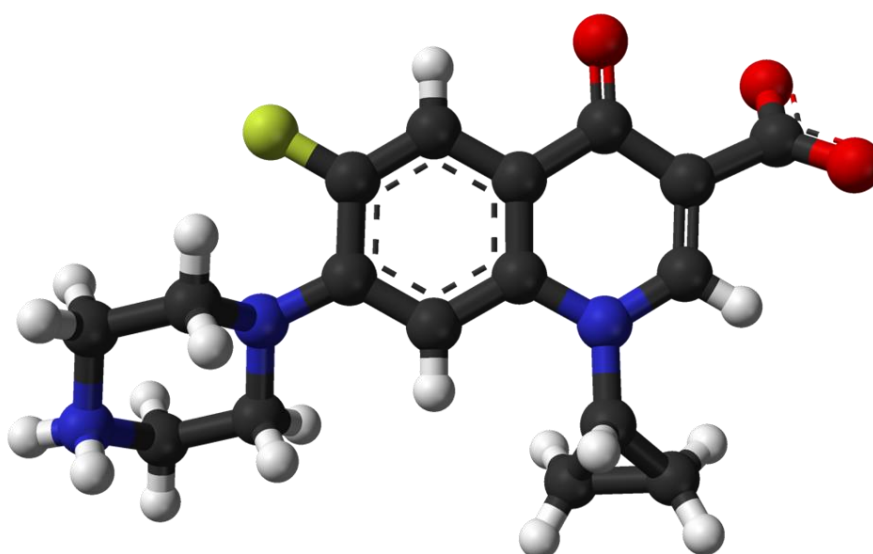
Διαφορετικά αντιβιοτικά (Πίνακας 1) έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, που οφείλονται στη φύση της δομής τους και την εκλεκτικότητα τους για συγκεκριμένους στόχους μέσα στο βακτηριακό κύτταρο.

Πίνακας 1 Ομάδες αντιβιοτικών ουσιών

Ομάδες αντιβιοτικών	Αντιβιοτικά
β-λακτάμες	πενικιλίνη, αμοξυκιλλίνη, φλουκλοξασιλίνη
Αμινογλυκοσίδες	Στρεπτομυκίνη, νεομυκίνη, καναμυκίνη, παραμομυκίνη
Μακρολίδες	Ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη
Λινκοσαμίδες	Λινκομυκίνη, κλινδαμυκίνη
Κετολίδες	Τελθρομυκίνη, σολθρομυκίνη
Γλυκοπεπτίδια	Βανκομυκίνη, τεϊκοπλανίνη
Κινολόνες	Σιπροφλοξασίνη, λεβοφλοξασίνη, τροβαφλοξασίνη
Σουλφοναμίδες	Σουλφισοξαζόλη, προντοσίλ, σουλφανιλαμίδιο
Οξαζολιδονόνες	Λινεζολίδη, κυκλοσερίνη
Τετρακυκλίνες	Τετρακυκλίνη, δοξυκυκλίνη, οξυτετρακυλίνη
Στρεπτογραμίνες	Πριστιναμυκίνη IIIA, πριστιναμυκίνη IA
Γλυκοπεπτίδια	Νταπτομυκίνη

1.1.1 ΣΙΠΡΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗ (CIPROFLOXACIN)

Η σιπροφλοξασίνη (Εικόνα 1) είναι ένα καρβοξυλικό οξύ με μοριακό τύπο $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ και ανήκει στην κατηγορία των κινολόνων, μία ομάδα αντιβιοτικών που είναι κατάλληλη για τη θεραπεία λοιμώξεων ευρέως φάσματος, που προκαλούνται κυρίως από Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια (Zhang et al. 2018). Αναστέλλει την DNA γυράση κατά τέτοιο τρόπο ώστε να σταματά τον βακτηριακό μεταβολισμό και την αναπαραγωγή.

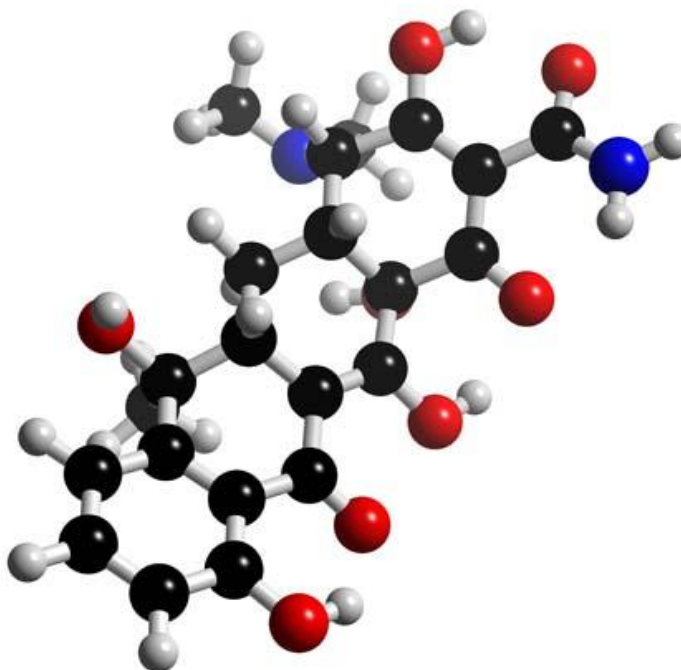


Εικόνα 1 Απεικόνιση μορίου σιπροφλοξασίνης σε τρεις διαστάσεις
(<https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/ciprofloxacin>)

Δυστυχώς, λίγο καιρό μετά την ανακάλυψη του αντιβιοτικού, η εκτεταμένη και εσφαλμένη χρήση του τόσο στα νοσοκομεία όσο και στις κοινότητες οδήγησε στην εμφάνιση και εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών των βακτηρίων ως προς το συγκεκριμένο αντιβιοτικό, καθιστώντας εύκολα θεραπεύσιμες λοιμώξεις σε σαφώς δυσκολότερες .

1.1.2 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ (TETRACYCLINE)

Η τετρακυκλίνη (Εικόνα 2) είναι αντιβιοτική ουσία που ανήκει στην ομώνυμη ομάδα των Τετρακυκλίνων, με μοριακό τύπο $C_{22}H_{24}N_2O_8$.



Εικόνα .2 Απεικόνιση μορίου τετρακυκλίνης σε τρεις διαστάσεις

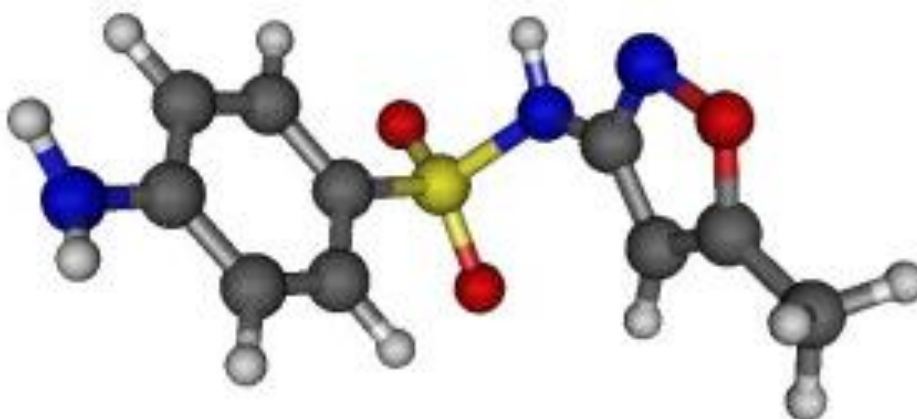
(<http://www.3dchem.com/Tetracycline.asp>)

Οι τετρακυκλίνες ανακαλύφθηκαν πριν από εβδομήντα περίπου χρόνια και αποτελούν μία από τις πρώτες ομάδες αντιβιοτικών ευρέως φάσματος, σαν αποτέλεσμα του δευτερεύοντος μεταβολισμού των μικροοργανισμών του εδάφους. Δεδομένου ότι, η ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη έχει υποτεθεί ότι έχει περιβαλλοντική προέλευση, είναι λογικό να υποτεθεί επίσης ότι οι περιβαλλοντικοί μικροοργανισμοί έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη με σκοπό να αποφύγουν την αυτοτοξικότητα καθώς και τον

εντοπισμό τους από άλλους μικροοργανισμούς (Santiago-Rodriguez et al. 2018).

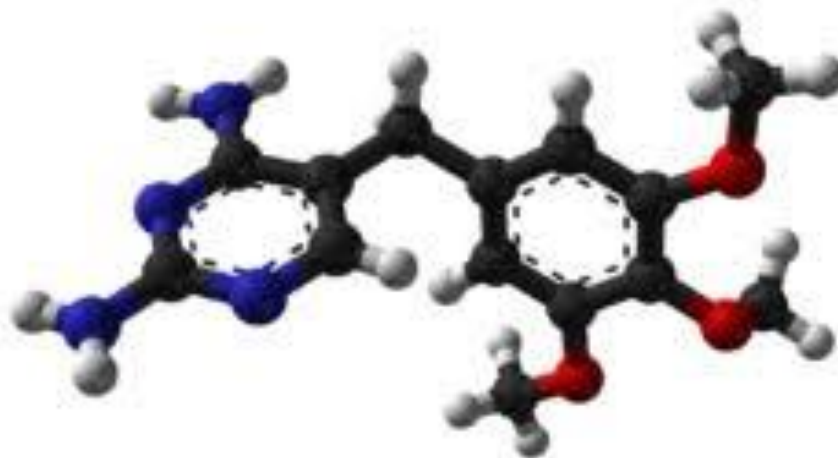
1.1.3 ΣΟΥΛΦΑΜΕΘΟΞΑΖΟΛΗ-ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ (SULFAMETHOXAZOLE-TRIMETHOPRIM)

Η σουλφαμεθοξαζόλη (Εικόνα 3) ανήκει στην ευρύτερη ομάδα των σουλφοναμίδων με μοριακό τύπο $C_{10}H_{11}N_3O_3S$.



Εικόνα 3 Απεικόνιση μορίου σουλφαμεθοξαζόλης σε τρεις διαστάσεις
(Ungurean 2014)

Εκτενής χρήση της αντιβιοτικής ουσίας γίνεται για την αντιμετώπιση λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος και της βρογχίτιδας. Προκείμενου να ενισχυθεί η δράση του αντιβιοτικού συχνά συνδυάζεται με ένα έκδοχο, την τριμεθοπρίμη (Εικόνα 4) σε αναλογία 1:19 τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη.



Εικόνα 4 Απεικόνιση μορίου τριμεθοπρίμης σε τρεις διαστάσεις

(<https://en.wikipedia.org/wiki/Trimethoprim>)

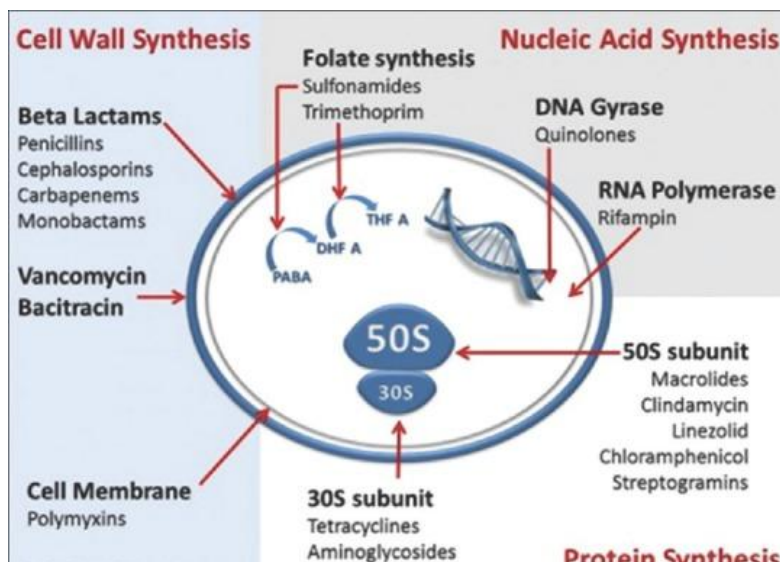
Λαμβάνοντας υπόψη ότι η χρήση της αντιβιοτικής ουσίας αυτής γίνεται κυρίως από τον άνθρωπο, είναι λογικό ότι έχουν ανακαλυφθεί σημαντικά υψηλές συγκεντρώσεις στα λύματα από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων στην Ελλάδα (Thomaidi et al. 2015)

1.2 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ορίζεται ως η ικανότητα των μικροοργανισμών (όπως βακτήρια, ιοί και άλλα παράσιτα) να σταματούν την αντιμικροβιακή δράση (αντιβιοτικών, αντιικών και ανθελμοσισιακών) εναντίον τους. Σαν αποτέλεσμα, συνήθεις θεραπείες γίνονται αναποτελεσματικές και οι λοιμώξεις εμμένουν με πιθανότητα να μεταδοθούν. (World Health Organization- WHO). Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά των παθογόνων βακτηρίων, μπορεί να χαρακτηριστεί μικροβιολογικά ή κλινικά. Η μικροβιολογική αντοχή είναι η ύπαρξη ενός γενετικά καθορισμένου μηχανισμού ανθεκτικότητας (ο οποίος μπορεί να είναι είτε εγγενής είτε επίκτητος), κατηγοριοποιώντας κατά αυτόν τον τρόπο τον παθογόνο μικροοργανισμό ως ανθεκτικό ή ευαίσθητο. Η κλινική αντοχή, είναι ένα επίπεδο αντιμικροβιακής δραστηριότητας που σχετίζεται με

την υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας (MacGowan and Macnaughton 2017).

Όσον αφορά τους τρόπους με τους οποίους δρουν τα αντιβιοτικά, αυτοί είναι οι ακόλουθοι. (Εικόνα 5).



Εικόνα 5 Μηχανισμοί αντίδρασης των αντιβιοτικών

(http://medisynblog.blogspot.com/2015/05/blog-post_72.html)

Ο πρώτος μηχανισμός αντίδρασης αφορά, στην αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος δρώντας σε διαφορετικά στάδια της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης (πολυμερούς ένωσης που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων) και της κατασκευής του κυτταρικού τοιχώματος. Ο δεύτερος μηχανισμός δράσης, σχετίζεται με την αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων, κατά το στάδιο της αντιγραφής, οδηγώντας έτσι το κύτταρο στο θάνατο. Η παρέμβαση κατά την πρωτεϊνοσύνθεση, αποτελεί τον τρίτο μηχανισμό δράσης. Η σύνθεση πρωτεϊνών είναι μία πολύπλοκη, πολλαπλών σταδίων διαδικασία που περιλαμβάνει πολλά ένζυμα. Οι αμινογλυκοσίδες είναι αντιβιοτικά που σταματούν την βακτηριακή σύνθεση πρωτεϊνών επεμβαίνοντας στις διαδικασίες της μικρής (30s subunit) ή της μεγάλης (50s subunit) ριβοσωμικής υπομονάδας. Τέλος, υπάρχει η διατάραξη της κυτταρικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων.

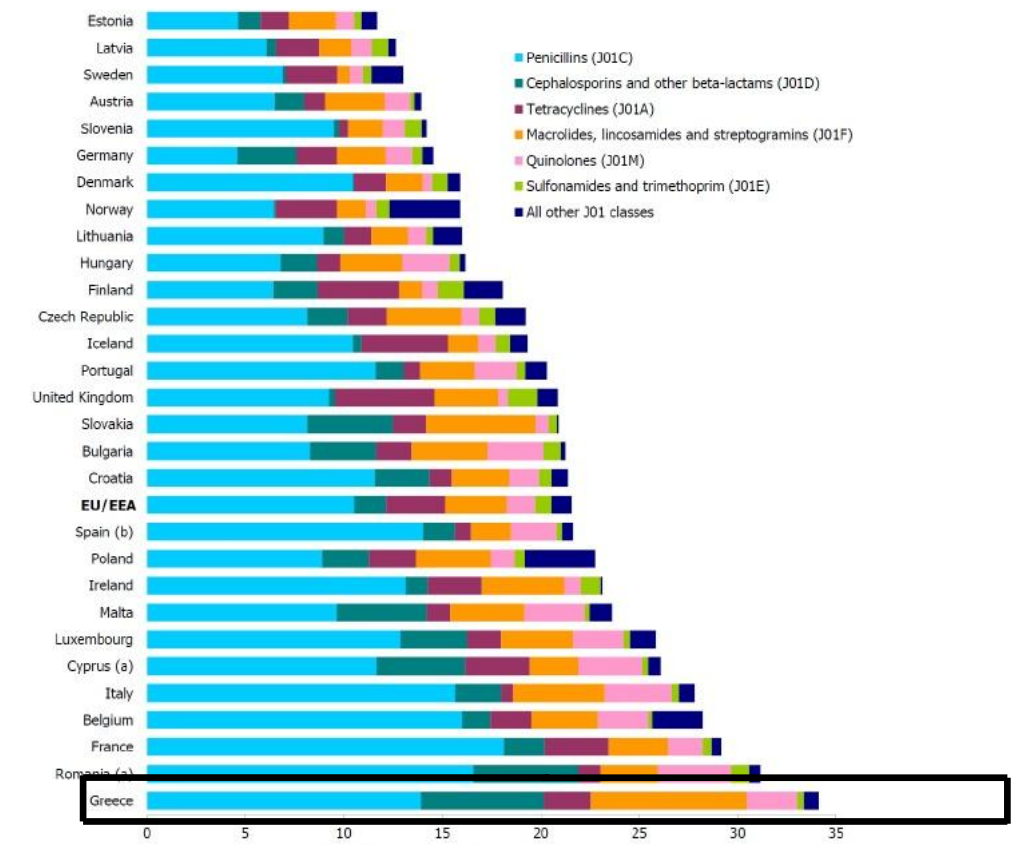
1.3 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Η χώρα μας κατέχει την πρώτη θέση στην Ευρώπη στην κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων και κατά συνέπεια συγκαταλέγεται στις Ευρωπαϊκές χώρες με τα υψηλότερα επίπεδα μικροβιακής αντοχής(Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων-ΚΕΕΛΠΝΟ). Η αλόγιστη χρήση τους και ειδικότερα των αντιβιοτικών ευρέως φάσματος, είτε για νοσοκομειακή είτε για εξωνοσοκομειακή χρήση, έχουν οδηγήσει στην έξαρση των νοσοκομειακών λοιμώξεων από πολυανθεκτικούς μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την αύξηση της νοσηρότητας, της διάρκειας νοσηλείας των ασθενών και της θνησιμότητας των νοσηλευμένων ατόμων. Παρακάτω παρατίθενται ποσοτικά δεδομένα της κατανάλωσης αντιβιοτικών στην Ελλάδα για το έτος 2016 (European Centre for Disease Prevention and Control)

Πίνακας 2 Κατανάλωση αντιβιοτικών για συστηματική χρήση, εξωνοσοκομειακή και νοσοκομειακή στην Ελλάδα και στην Σουηδία εκφρασμένη στην Καθορισμένη Ημερήσια Δόση (DDD) ανά 1000 κατοίκους ανά ημέρα το έτος 2016

Αντιβιοτικά	Κοινότητα		Νοσοκομεία	
	Ελλάδα	Σουηδία	Ελλάδα	Σουηδία
β-λακτάμες, πενικιλίνες	16,13	6,32	0,86	0,90
άλλες β-λακτάμες	7,46	0,14	0,58	0,18
Τετρακυκλίνες	2,69	2,40	0,06	0,18
Μακρολίδες, λινκοσαμίδες, στρεπτογραμίνες	6,07	0,54	0,15	0,06
Κινολόνες	2,63	0,66	0,26	0,16
Σουλφοναμίδες	0,37	0,38	0,02	0,06
Άλλες ουσίες	0,91	1,56	0,45	0,10
Σύνολο	36,26	12,01	2,39	1,65

Figure 1. Consumption of antibiotics for systemic use in the community by antibiotic group in 30 EU/EEA countries, 2014 (expressed in DDD per 1 000 inhabitants and per day)

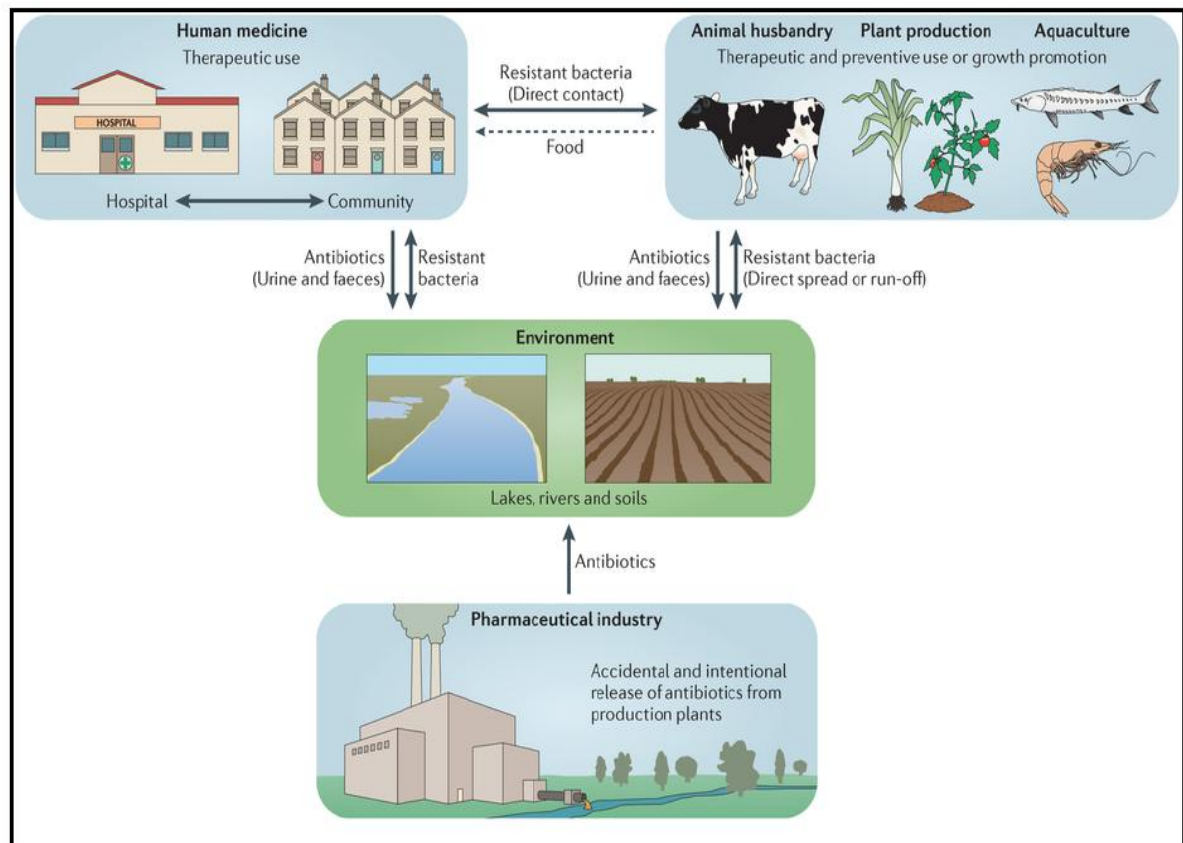


Εικόνα 6 : Χρήση αντιμικροβιακών εξωνοσοκομειακά στην Ευρωπαϊκή Ένωση κατά το έτος 2017, εκφρασμένη σε ημερήσιες δόσεις ανά 1000 κατοίκους ανά ημέρα (<https://pharmapro.ro/en/the-radiography-of-the-romanian-health-system/>)

1.4 ΤΡΟΠΟΙ ΔΙΑΔΟΣΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Οι οργανισμοί που είναι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά και προέρχονται από ανθρώπους και ζώα, απελευθερώνονται στα απόβλητα μέσω της ουρίας, της κοπριάς, των περιττωμάτων και των νεκρών όντων. Συγκεκριμένα, τα λύματα από τα νοσοκομεία και τις εγκαταστάσεις εκτροφής ζώων, είναι πιθανώς μία σημαντική πηγή από παθογόνους και ανθεκτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι εισχωρούν στο περιβάλλον (Baquero et al. 2008) Όπως ήδη αναφέρθηκε, μία ευρεία μίξη αντιβιοτικών και άλλων ρύπων, τα προϊόντα

μεταβολισμού τους και τα ανθεκτικά βακτήρια, απορρέουν στο υδάτινο οικοσύστημα μέσα από εξεργασμένα και ανεπεξέργαστα υγρά απόβλητα, νοσοκομειακά απόβλητα, απορρίψεις υδατοκαλλιεργειών και γεωργικές απορροές (Εικόνα 8). (Marti et al. 2014)



Εικόνα 8 Τρόποι μετάδοσης ανθεκτικότητας στο περιβάλλον

(Marti et al. 2014)

1.5 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΑ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Ειδικότερα, όσον αφορά στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (ΕΕΥΑ), τα τελευταία αποτελούν ίσως την σημαντικότερη πηγή διάδοσης της μικροβιακής αντοχής στα αντιβιοτικά στο υδάτινο περιβάλλον. Ορισμένες

έρευνες έχουν προτείνει ότι οι κοινές τεχνολογίες που εφαρμόζονται στις ΕΕΥΑ, όπως για παράδειγμα η βιολογική επεξεργασία, παρέχουν ένα ιδανικό περιβάλλον (υψηλό βακτηριακό φορτίο, υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών) για την οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας, διότι τα βακτήρια βρίσκονται σε συνεχή επαφή με τα αντιβιοτικά και τους ανθεκτικούς μικροοργανισμούς. Τέλος, αυτές οι έρευνες υποστηρίζουν ότι οι εκροές από τις ΕΕΥΑ μπορούν να προάγουν την διάδοση των ανθεκτικών μικροοργανισμών στο περιβάλλον (Marti et al. 2014)

1.6 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ

Απολύμανση είναι ο καθαρισμός του νερού (ή λυμάτων) από παθογόνους μικροοργανισμούς. Έχει σκοπό την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών, δηλαδή την παρεμπόδιση της ανάπτυξης κι αναπαραγωγής τους. Ωστόσο η έννοια της απολύμανσης δεν θα πρέπει να συγχέεται με αυτήν της αποστείρωσης, η οποία προβλέπει την θανάτωση των μικροβίων (Κ. Χρυσικόπουλος, 2013).

Οι τρεις πιο διαδεδομένες μέθοδοι απολύμανσης των υδάτων είναι:

- Χλωρίωση
- Οζόνωση
- Ακτινοβολία UV

Πίνακας 3 Μηχανισμοί απολύμανσης με χρήση χλωρίου, όζοντος και UV ακτινοβολία,
(Metcalf&Eddy,2007)

Χλώριο	Όζον	ΑκτινοβολίαUV
Οξειδωση	Απευθείας οξειδωση/ καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος με διαρροή κυτταρικών συστατικών έξω από το κύτταρο	Φωτοχημική φθορά στο RNA και DNA(π.χ. σχηματισμός διπλών δεσμών) μέσα στα κύτταρα ενός οργανισμού
Αντιδράσεις με διαθέσιμο χλώριο	Αντιδράσεις με ρίζες παραπροϊόντων από την διάσπαση του όζοντος	Τα νουκλεϊκά οξέα στους μικροοργανισμούς είναι από τα πιο σημαντικά μέσα απορρόφησης της ενέργειας του φωτός σε μήκος κύματος που κυμαίνεται από 240 έως 280nm
Κατακρήμνιση πρωτεΐνης	Φθορά στα συστατικά των νουκλεϊκών οξέων (πουρίνες και πυριμιδίνες)	Επειδή το DNAκαι το RNA φέρουν γενετικές πληροφορίες αναπαραγωγής, η φθορά αυτών των ουσιών μπορεί να επιτύχει την αποδοτική απενεργοποίηση του κυττάρου
Τροποποίηση διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος	Διάσπαση των δεσμών άνθρακα- αζώτου που οδηγεί σε απολυμερισμό	
Υδρόλυση και μηχανική διάσπαση/ σχάση		

1.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΛΥΜΑΝΤΙΚΩΝ

1. Χρόνος Επαφής

Αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεταβλητές στη διεργασία απολύμανσης. Στις αρχές του 1900 η Harriet Chick, παρατήρησε ότι για μία συγκεκριμένη συγκέντρωση απολυμαντικού, όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επαφής, τόσο μεγαλύτερη είναι η θανάτωση. Υπό τη διαφορική μορφή, ο νόμος της Chick είναι (Metcalf & Eddy, 2007):

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

όπου:

$\frac{dN_t}{dt}$ = ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης των οργανισμών με το χρόνο

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

N_t = αριθμός των οργανισμών σε χρόνο t

t = ο χρόνος

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

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

Η τιμή της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης k της εξίσωσης μπορεί να ληφθεί από διάγραμμα του $-\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)$ ως προς το χρόνο επαφής t

2. Συγκέντρωση του απολυμαντικού

Ο Herbert Watson, εργαζόμενος στην Αγγλία στις αρχές του 1900, ανέφερε ότι η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης σχετίζεται με τη συγκέντρωση ως ακολούθως (Metcalf&Eddy,2007):

$$k = k' C^n$$

όπου:

k = σταθερά ρυθμού απενεργοποίησης

k' = σταθερά θανάτωσης

C = συγκέντρωση του απολυμαντικού

n = συντελεστής διάλυσης

3. Ισχύς και φύση των φυσικών μέσων απολύμανσης

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

4. Θερμοκρασία

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

$$\ln \frac{t_1}{t_2} = \frac{E(T_2 - T_1)}{RT_1 T_2}$$

όπου:

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

E = ενέργεια ενεργοποίησης, $\frac{J}{mole}$, ($\frac{cal}{mole}$)

R = σταθερά των αερίων, $8.314 \frac{J}{mole K} = (1.99 \frac{cal}{mole K})$

5. Είδος και κατάσταση μικροοργανισμού

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης επηρεάζεται από τη φύση και την κατάσταση των μικροοργανισμών. Γενικά είναι πιο δύσκολο να καταπολεμηθούν, λόγω της κυτταρικής τους δομής, τα πρωτόζωα και ακολουθούν οι ιοί και τα βακτήρια. Αυξημένη αντίσταση στην απολύμανση παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί που εμφανίζουν ανθεκτικές μορφές όπως κύστες και σπόρια. Επίσης, είναι σαφές ότι μικροοργανισμοί που για κάποιο λόγο έχουν καταστεί λιγότερο ακμαίοι, είναι πιο ευαίσθητοι στα διάφορα απολυμαντικά (Φραγγεδάκη, 2014)

6. Βιοφίλμ

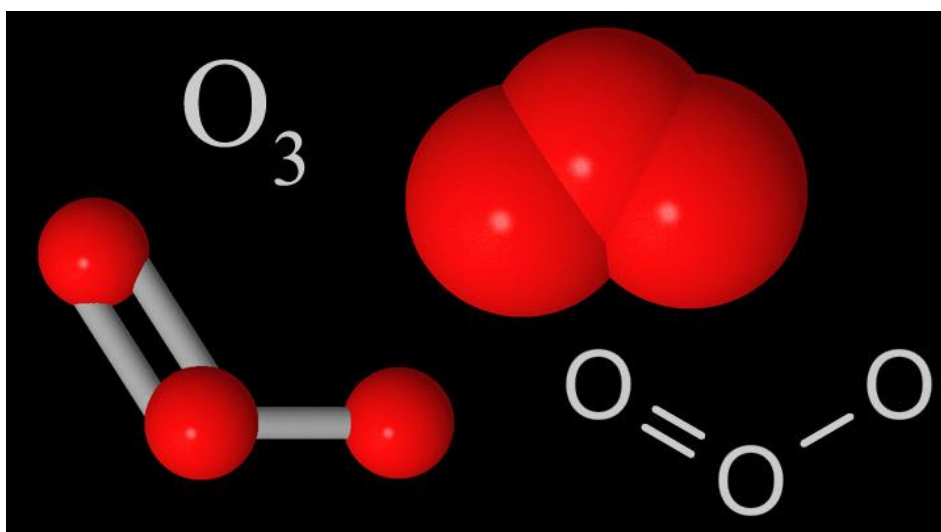
Η ύπαρξη συσσωματωμάτων μικροοργανισμών που έχουν προσκολληθεί στις διάφορες επιφάνειες (π.χ. δίκτυο ύδρευσης, αντιδραστήρες) φαίνεται ότι δυσχεραίνει τη διαδικασία της απολύμανσης. Οι ποικίλοι μικροοργανισμοί, που δημιουργούν το βιοφίλμ εκκρίνοντας πολυσακχαρίτες, προστατεύονται ως ένα βαθμό από τη δράση των απολυμαντικών μέσων καθώς τα τελευταία δυσκολεύονται να διεισδύσουν στο εσωτερικό του υμενίου. Ταυτόχρονα, η επιβίωση των προσκολλημένων μικροβίων διευκολύνεται και από την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών ενώ παράλληλα υποβοηθείται ο πολλαπλασιασμός τους λόγω των ευνοϊκών συνθηκών (κατάλληλο pH, θερμοκρασία) που επικρατούν στο υμένιο σε σχέση με το εναιώρημα, καθιστώντας τη διαδικασία της απολύμανση ακόμη πιο δύσκολη. Συν τοις άλλοις, τα υλικά των σωληνώσεων μπορεί να διαβρωθούν από τη δράση των μικροοργανισμών και τα προϊόντα αυτής της διάβρωσης δύνανται να αντιδράσουν με το ελεύθερο χλώριο και να οδηγήσουν σε ελάττωση του υπολειμματικού απολυμαντικού (Φραγγεδάκη, 2014)

7. pH

Η επίδραση του pH στην απολύμανση, μπορεί ανάλογα με το απολυμαντικό μέσο να είναι διαφορετική. Για παράδειγμα, αυξημένες τιμές pH ενισχύουν την απολυμαντική δράση ενώσεων του αμμωνίου ενώ μειώνουν εκείνη των υποχλωριωδών, των φαινολών και του ιωδίου (Βενιέρη, 2017).

1.8 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΜΕ ΟΖΟΝ, ΟΖΟΝΩΣΗ

Το όζον (O_3) ένα αέριο που ανακαλύφθηκε στα μέσα του 19^{ου} αιώνα, είναι ένα μόριο (Εικόνα 9) που αποτελείται από τρία άτομα οξυγόνου σε μία εξαιρετικά ασταθή δομή. Είναι άχρωμο και η οσμή του είναι χαρακτηριστική δριμεία που θυμίζει την οσμή του λευκού φωσφόρου και του χλωρίου. Διακρίνεται, από χρόνους ημιζωής 40 λεπτών (min) στους 20°C και 140 λεπτών (min) στους 0 °C (Elvis and Ekta 2011).



Εικόνα 9 Το μόριο του όζοντος

O_3 (https://scied.ucar.edu/sites/default/files/images/large_image_for_image_content/ozone_o3_molecule_720x400.jpg)

Η απολύμανση νερού με όζον γίνεται συνήθως σε καλυμμένες δεξαμενές όπου αέρας, εμπλουτισμένος με αέριο όζον τροφοδοτείται στη μάζα του νερού, με τη βοήθεια ειδικών ακροφυσίων. Το όζον διαλύεται στο νερό με εμφύσηση φυσαλίδων. Καλύτερη επαφή των δύο ρευστών (φυσαλίδων και νερό) επιτυγχάνεται μέσα από μαιανδρικές δεξαμενές ή και με παράλληλη εφαρμογή μηχανικής ανάδευσης. Οι δεξαμενές είναι κλειστές έτσι ώστε το όζον στα απαέρια να μην καταλήγει στην ατμόσφαιρα του εργαστηριακού περιβάλλοντος, η οποία δεν πρέπει να ξεπερνά το 0.1 ppm. Τα απαέρια

μεταφέρονται προς καταστροφή με χρήση θερμικού, χημικού ή καταλυτικού μετατροπέα (Κ. Χρυσικόπουλος, 2013)

1.8.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΟΖΟΝΩΣΗΣ

Το όζον είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό οξειδωτικό καταστρέφοντας τα βακτήρια απευθείας με διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος (λύση κυττάρου). Θεωρείται επίσης, πολύ αποδοτικό για την καταστροφή ιών και σε γενικές γραμμές αποδοτικότερο σε σύγκριση με το χλώριο. Επιπρόσθετα, η οζόνωση δεν παράγει διαλυμένα στερεά και δεν επηρεάζεται από το ιόν αμμωνίου ή την τιμή του pH της εισροής. Για τους παραπάνω λόγους, η οζόνωση θεωρείται ως καλύτερη εναλλακτική λύση για τη χλωρίωση, ιδιαίτερα όταν είναι πιθανόν να απαιτείται αποχλωρίωση και όταν οι διατάξεις οξυγόνου υψηλής καθαρότητας στην μονάδα επεξεργασίας είναι διαθέσιμες. Επιπλέον, κατά την οζόνωση η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στην εκροή αυξάνεται κοντά στα επίπεδα κορεσμού, επειδή το όζον διασπάται σε οξυγόνο αμέσως μετά την εφαρμογή του. Εξαλείφεται λοιπόν, η ανάγκη για επανααερισμό της εκροής, με σκοπό την επίτευξη των απαιτούμενων προτύπων ποιότητας νερού σε διαλυμένο οξυγόνο. Τέλος, επειδή το όζον διασπάται αμέσως δεν παραμένουν χημικά υπολείμματα στην επεξεργασμένη εκροή τα οποία απαιτούν απομάκρυνση, όπως στην περίπτωση των υπολειμμάτων χλωρίου (Metcalf&Eddy,2007).

1.8.2 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΟΖΟΝΩΣΗΣ

Φυσικά, όπως όλες οι υπάρχουσες μέθοδοι απολύμανσης, έτσι και η οζόνωση χαρακτηρίζεται από μερικά μειονεκτήματα. Αρχικά, εάν στο νερό υπάρχουν βρωμιόντα, τότε κατά την απολύμανση παράγονται παραπροϊόντα. Επιπλέον, το όζον σπάει περισσότερα σύμπλοκα οργανικής ύλης σε μικρότερες ενώσεις που μπορούν να αυξήσουν την δημιουργία παραπροϊόντων κατά τη διάρκεια

δευτεροβάθμιων διαδικασιών απολύμανσης. Τέλος, απαιτείται πιλοτική εγκατάσταση ώστε να βρεθεί η βέλτιστη δόση όζοντος (Σπύρου, 2014).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν α) ο εντοπισμός ανθεκτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από δύο τύπους λυμάτων, i) ανεπεξέργαστα από την είσοδο και ii) από την εκροή της δευτεροβάθμιας καθίζησης, της Εγκατάστασης Επεξεργασίας Λυμάτων (ΕΕΛ) που εξυπηρετεί τους κατοίκους της πόλης των Χανίων, β) ο έλεγχος αδρανοποίησής τους μέσω οζόνωσης και γ) η διερεύνηση μεταβολής του προφίλ της ανθεκτικότητας κατόπιν εφαρμογής της μεθόδου απολύμανσης.

Πιο αναλυτικά οι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι οι ακόλουθοι:

- Έλεγχος της ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών στα αντιβιοτικά (Ciprofloxacin, Tetracycline, Sulfamethoxazole-Trimethoprim) με τη χρήση της μεθόδου εύρεσης της Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration- MIC) για κάθε αντιβιοτικό παράγοντα.
- Έλεγχος αδρανοποίησης μερικών βακτηρίων με την οζόνωση ως μέθοδο απολύμανσης
- Έλεγχος μεταβολής το προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηριακών κυττάρων που επιβίωσαν κατόπιν της απολύμανσης, μέσω της σύγκρισης των ανέπαφων και των βακτηρίων μετά την οζόνωση.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Αποστειρωμένα τρυβλία Petri διαμέτρου 9cm
- Πλάκες μικρο-τιτλοποίησης 96 υποδοχών

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

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

ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific Heraeus)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa)
- Ζυγός ακριβείας (Adventurer OHAUS Balance)
- Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu UV 1240)
- Microplate reader (Labtech LT-4000 Plate Reader)
- Λύχνος Bunsen
- Aqua-FloCD1B γεννήτρια όζοντος

ANTIBIOTIKA

- Ciprofloxacin(Sigma-Aldrich)
- Tetracycline(Sigma-Aldrich)

- Sulfamethoxazole-Trimethoprim(Sigma-Aldrich)

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Ιωδιούχου καλίου (KI) 2% w/v
- Θειοθειϊκό νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) κανονικότητας 0,1 N

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά

Προκειμένου να ελεγχθεί η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά έγινε χρήση της μεθόδου της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης με μικρο-αραιώσεις σε ζωμό (MIC Minimum Inhibitory Concentration). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, εξετάζεται η ελάχιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού που αποτρέπει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, οι οποίοι επωάζονται στον κατάλληλο θάλαμο επώασης για 24 h. Η αναφερθείσα διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πλάκες μικρο-τιτλοποίησης 96 βυθισμάτων.

Για την επίτευξη του συγκεκριμένου εγχειρήματος χρησιμοποιήθηκαν τα εύρη για το εκάστοτε αντιβιοτικό, τα οποία έχουν θεσπιστεί από την National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Όταν επιμελείται και αναπτύσσει καινούρια όρια, η NCCLS χρησιμοποιεί μία εκτενή διαδικασία προκειμένου να βρει μία κοινή αποδεκτή παραδοχή, λαμβάνοντας υπόψη την κλινική σημασία, το κόστος και άλλες πρακτικές συνέπειες από τα προτεινόμενα όρια (Ginocchio 2002).

Στον παρακάτω Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα εύρη των συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών που εφαρμόστηκαν:

Πίνακας 4 Εύρος συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε αυτά

Trimethoprim-Sulfamethoxazole [SMX-TMP] (1:19) (mg/L)							
128	64	32	16	8	4	2	1
Ciprofloxacin [CIP] (mg/L)							
16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Tetracycline [TET] (mg/L)							
128	64	32	16	8	4	2	1

3.2.1.1 Προετοιμασία αντιβιοτικού

Προκειμένου να αρχίσει η πειραματική διαδικασία, ήταν απαραίτητη η παρασκευή των αντιβιοτικών ουσιών, στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε και για τα τρία αντιβιοτικά ήταν το αποστειρωμένο νερό. Τα μητρικά διαλύματα των αντιβιοτικών ήταν κατά 10 έως και περισσότερες φορές πυκνότερα από την μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση. Στη συνέχεια με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων παρασκευαζόταν το εκάστοτε διάλυμα αντιβιοτικού, συγκέντρωσης διπλάσιας από την μέγιστη εξεταζόμενη, αφού εν συνεχεία κατά την εφαρμογή της μεθόδου, το διάλυμα υπόκεινται σε αραιώση 1:2. Κατόπιν, για την αποφυγή ενδεχομένων αλλοιώσεων και φθορών των διαλυμάτων, αυτά φυλάσσονταν σε συνθήκες συντήρησης στον χώρο του εργαστηρίου.

3.2.1.2 Προετοιμασία εναιωρήματος

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του οργανισμού Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) εφαρμόζεται η μέθοδος των μικροαραιώσεων σε ζωμό, κατά το οποίο ο μικροοργανισμός καλλιεργείται σε μη εκλεκτικό θρεπτικό ζωμό (Mueller-Hinton Broth). Στη συνέχεια με την χρήση του φασματοφωτόμετρου, πραγματοποιείται η φωτομέτρηση με σκοπό η οπτική

απορρόφηση A να είναι ίση με 0,1. Αυτή η τιμή της απορρόφησης είναι η επιθυμητή, διότι αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αποικιών ίση με 10^8 CFUs/mL.

3.2.1.3 Πειραματική Διαδικασία

Οι πλάκες μικρο-τιτλοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούνταν από 96 υποδοχές (βυθίσματα)(Εικόνα 10).



Εικόνα 10 Πλάκα μικρο-τιτλοποίησης για τρεις εξεταζόμενους μικροοργανισμούς, *Vibrio parahaemolyticus* A, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* B, κατά την επίδραση του αντιβιοτικού Τετρακυκλίνη.

Σε κάθε πλάκα εξετάζονταν κάθε φορά τέσσερις ή τρεις μικροοργανισμοί. Ξεκινώντας την πειραματική διαδικασία τοποθετούνταν 100 μ L του θρεπτικού υλικού (Mueller Hinton Broth) σε όλα τα χρησιμοποιούμενα πηγάδια της πλάκας. Έπειτα στα πηγάδια 1 έως 9 τοποθετούνταν 100 μ L του εκάστοτε αντιβιοτικού. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η επιθυμητή αναλογία για την αραιώση 1:2. Στις στήλες 10 και 11 δεν γίνεται προσθήκη αντιβιοτικού, καθώς αποτελούν ενδεικτικές στήλες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών απουσία αντιβιοτικού (control). Στη συνέχεια με τη χρήση της πολυκάναλης

πιπέτας, επιτυγχάνονταν οι αραιώσεις του αντιβιοτικού με φορά από επάνω προς τα κάτω, μεταφέροντας 100 μL από το κάθε πηγάδι στο επόμενο, με ταυτόχρονη καλή ανάδευση. Στο τελευταίο πηγάδι, μετά την ανάδευση απομακρύνονταν τα 100 μL που είχαν απομείνει. Με τον τρόπο αυτό σε κάθε πηγάδι υπήρχαν 100 μL αντιβιοτικού και θρεπτικού υλικού (Broth). Ακολούθως, προστίθενται 5 μL βακτηριακής καλλιέργειας συγκέντρωσης 10^5CFUs/mL σύμφωνα με τη διάταξη που επισυνάπτεται παρακάτω (Εικόνα 11). Το τυφλό διάλυμα της τελευταίας στήλης χρησιμοποιούταν για τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης. Στην περίπτωση όπου κατά την φωτομέτρηση υπήρχε υψηλή τιμή οπτικής απορρόφησης του τυφλού διαλύματος, γινόταν αντιληπτή η ύπαρξη επιμόλυνσης και η διαδικασία επαναλαμβανόταν. Τέλος, οι μικροοργανισμοί επωάζονταν για 24 ώρες στον θάλαμο επώασης στους 32°C για την οικογένεια των *Vibrionaceae* και στους 37°C για τους υπόλοιπους.

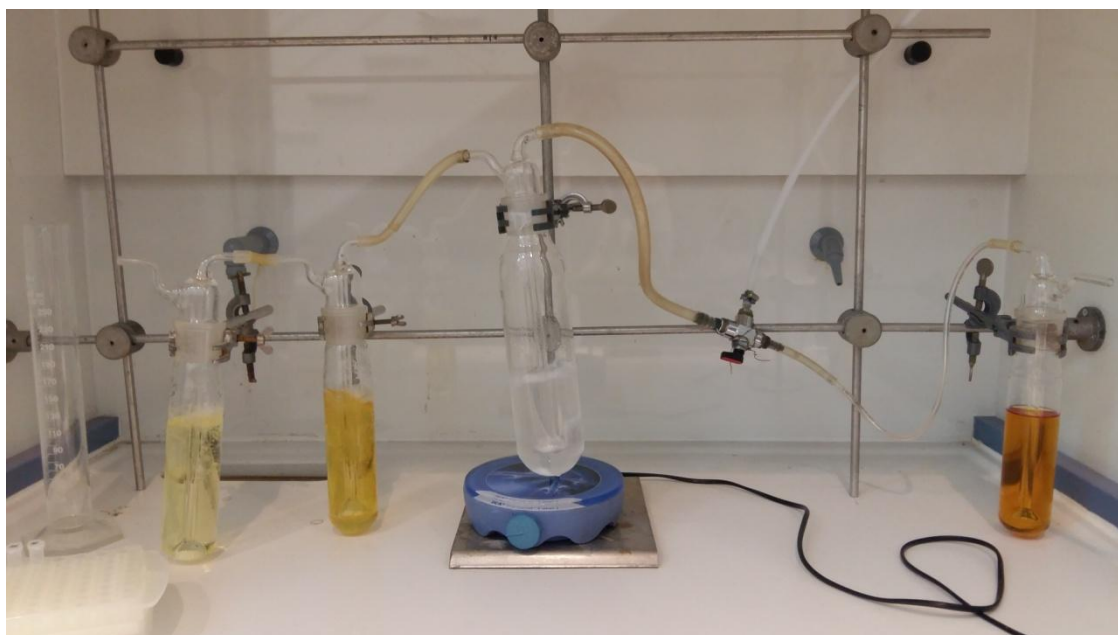
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1
B	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	3	1
C	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	3	1
D	4	4	4	4	4	4	4	4	1			1
E	5	5	5	5	5	5	5	5	1			1
F	6	6	6	6	6	6	6	6	1	2	4	1
G	7	7	7	7	7	7	7	7	1	2	4	1
H	8	8	8	8	8	8	8	8	1	2	4	1

Εικόνα 11 Διάταξη πλάκας μικρο-τιτλοποίησης.

3.2.2 Οζόνωση

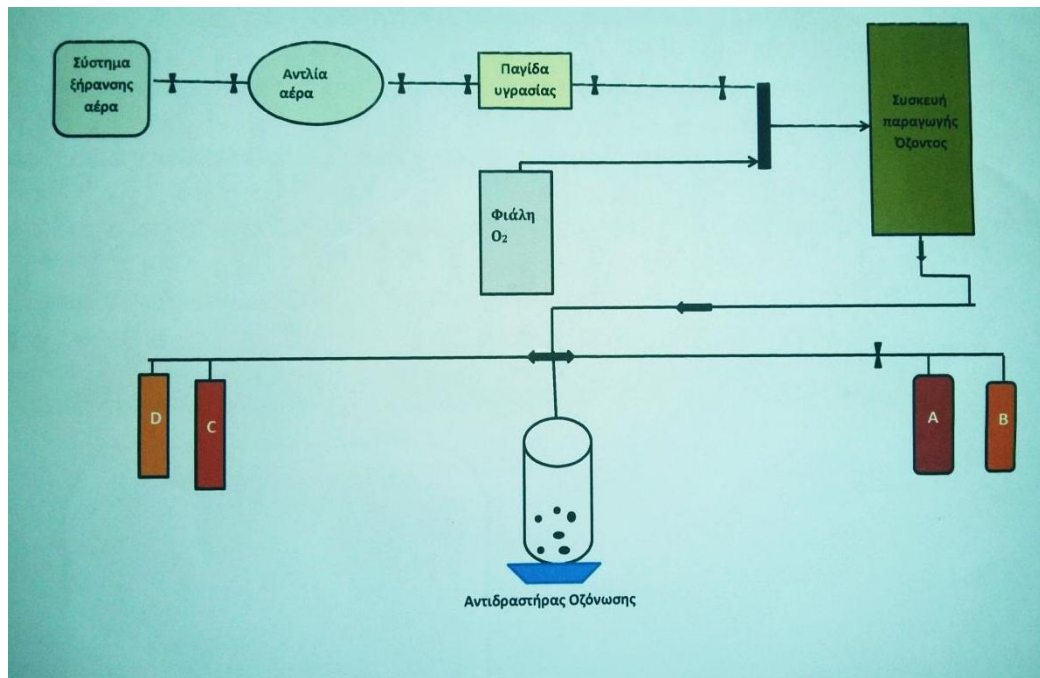
Προκειμένου να ελεγχθεί η αδρανοποίηση των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών, καθώς και η μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας, επιλέχθηκε ως μέθοδος απολύμανσης, αυτή της οζόνωσης.

Το όζον παράχθηκε με παροχή ξηρού αέρα σε μία Aqua-FloCD1B γεννήτρια όζοντος. Η έξοδος του οζονιστήρα του οποίου ο δείκτης ήταν ρυθμισμένος στην ένδειξη 5 ft³/h, συνδεόταν με τον αντιδραστήρα μέσω σωληνώσεων Teflon. Ο αντιδραστήρας ήταν γυάλινος όγκου 500 mL. Η λειτουργία του αντιδραστήρα της οζόνωσης ήταν σε λειτουργία ημιδιαλείποντος έργου (semi-batch mode), δηλαδή το δείγμα νερού εισερχόταν στον αντιδραστήρα στην εκκίνηση της λειτουργίας, ενώ η προσθήκη όζοντος λάμβανε χώρα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος μέσω ενός πέτρινου διαχυτή. Η ροή του όζοντος που διέφευγε παγιδευόταν σε δύο γυάλινες παγίδες που περιείχαν διάλυμα ιωδιούχου καλίου (KI) 2% w/v, τοποθετημένες σε σειρά. Πριν από κάθε πείραμα, ο ρυθμός παροχής του όζοντος μετριοταν κατευθύνοντας τη ροή του όζοντος στις δύο παγίδες ιωδιούχου καλίου για χρονικό διάστημα 10 λεπτών (Gyparakis and Diamadopoulos 2007). Το βακτηριακό εναιώρημα που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα οζόνωσης έγινε σε διάλυμα NaCl 0.8% w/v και περιείχε 10⁸ CFU_s/mL από το κάθε στέλεχος. Ο όγκος του δείγματος ήταν 300 mL και κατά τη διάρκεια κάθε πειράματος, το όζον που παραγόταν άφριζε.



Εικόνα 12 Πειραματική διάταξη οζόνωσης

Λαμβανόταν δείγμα σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα 0, 3, 5, 8, 10, 15, 20 και 30 min, το οποίο κατόπιν ελεγχόταν ως προς την επιβίωση του εκάστοτε βακτηρίου. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, στο διάλυμα από τις παγίδες γινόταν τιτλοδότηση με τη χρήση θειοθειικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) κανονικότητας 0,1 N για κάθε παγίδα χωριστά. Τα mL που καταναλώθηκαν σε κάθε τιτλοδότηση παγίδας καταγράφηκαν, ώστε να επεξεργαστούν στη συνέχεια τα αποτελέσματα της οζόνωσης.



Εικόνα 13 Σχηματική απεικόνιση της οζόνωσης

Οι τύποι για την επιθυμητή επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι οι ακόλουθοι:

$$\text{Flowrate} = 5 \frac{ft^3}{h} = \frac{5 * 0.0283 \frac{m^3}{h} * 1000 \frac{L}{m^3}}{60 \frac{min}{h}} = 2.36 \frac{L}{min}$$

$$\text{Ozone dose in } \left(\frac{mg}{min} \right) = \frac{(mL \text{ titrant for traps}) * 0.1N * 24}{t}$$

όπου:

- N= η κανονικότητα
- $24 = \frac{\text{Μοριακ } \acute{\alpha} \text{ Β\acute{α}ρος του } \acute{\alpha} \text{ζοντος}}{2} = \frac{(M_r O_3)}{2} = \frac{16 \times 3}{2} = \frac{48}{2}$
- t= ο χρόνος (min)

$$\text{Inlet Ozone Concentration } \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{\text{Ozone dose in } \left(\frac{mg}{min} \right)}{2.36 \frac{L}{min}}$$

$$\text{Ozone dose out } \left(\frac{\text{mg}}{\text{min}} \right) = \frac{(\text{mL titrant for traps}) * 0.1N * 24}{t}$$

$$\text{Outlet Ozone Concentration } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{Ozone dose out } \left(\frac{\text{mg}}{\text{min}} \right)}{2.36 \frac{\text{L}}{\text{min}}}$$

$$\begin{aligned} &\text{Applied Ozone Dose } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \\ &= \frac{[\text{Inlet Ozone Concentration} - \text{Outlet Ozone Concentration}] * \text{Flowrate} * \text{Contact time}}{V_{\text{sample}}} \end{aligned}$$

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Εξεταζόμενα βακτήρια

- *Aeromonas hydrophila*

Το *Aeromonas hydrophila* είναι ένα Gram αρνητικό, ραβδωτού σχήματος και μονοστρωματικού φλοιού βακτήριο, το οποίο δεν σχηματίζει σπόρια. Ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια *Aeromonadaceae* και είναι δυνητικά αναερόβιο βακτήριο, το οποίο απαντάται συχνά σε γλυκά νερά και λύματα. Σε άτομα με σχετικά εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, έχει συνδεθεί με την εμφάνιση σηψαιμίας, πολυεστιακής ηπατικής νέκρωσης με βακτηριακό αποοίωμα και πνευμονίας ή εντεροκολίτιδας (Simmons and Gibson 2012). Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν δείξει ότι το στέλεχος παρουσιάζει αυξημένη ανθεκτικότητα στις σουλφοναμίδες και τις τετρακυκλίνες (Sørum 2008).

- *Enterobacter cloacae*

Το *Enterobacter cloacae* είναι ένα Gram αρνητικό, σε σχήμα ράβδου, δυνητικά αναερόβιο βακτήριο. Αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου και διανέμεται ευρέως στο περιβάλλον. Όπως και τα περισσότερα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορεί να προκαλέσουν λοιμώξεις τόσο σε νοσηλευόμενους όσο και σε εξασθενημένους οργανισμούς. Το *E. cloacae* έχει εγγενή αντίσταση στην αμπικιλίνη και τις κεφαλοσπορίνες στενού φάσματος, ενώ παρουσιάζει επίκτητη ανθεκτικότητα σε κεφαλοσπορίνες ευρέως φάσματος (Keller et al. 1998).

- *Enterobacter sakazakii*

Το *Enterobacter sakazakii* είναι μέλος της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, και είναι ένα Gram αρνητικό, παθογόνο βακτήριο ραβδωτού σχήματος, που ζει σε ιδιαίτερα ξηρά μέρη. Οι μολύνσεις από το βακτήριο, αποτελούν σημαντική

αιτία, απειλητικής για την ζωή, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία και νεκρωτική εντεροκολίτιδα σε βρέφη. Έχουν καταγραφεί κάποια περιστατικά μολύνσεων από το μικρόβιο και σε ενήλικες, χωρίς την ύπαρξη επικείμενης θνησιμότητας. Το *E. sakazakii* είναι εκ φύσεως ανθεκτικό σε όλες τις μακρολίδες, στη λινκομυκίνη και στην φωσφομυκίνη. Αντίθετα, χαρακτηρίζεται ως ευαίσθητο απέναντι στις τετρακυκλίνες, τις κινολόνες, τις αμινογλυκοσίδες και σε πολυάριθμες β-λακτάμες (Drudy et al. 2006).

- *Escherichia coli*

Η *Escherichia coli* , είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο και ταξινομείται στην οικογένεια των Enterobacteriaceae, εντός της τάξης *Gammaproteobacteria*. Το βακτήριο, περιλαμβάνει παθογόνα στελέχη, τα οποία είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση ανθρώπινων ασθενειών, προκαλώντας περισσότερους από δύο εκατομμύρια θανάτους ετησίως. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, στελέχη του βακτηρίου που εντοπίστηκαν στο περιβάλλον χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικά σε πολλαπλά αντιβιοτικά , υποδεικνύοντας έτσι πιθανούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία που απορρέουν από ανθρώπινες δραστηριότητες (Jang et al. 2017)

- *Klebsiella oxytoca & Klebsiella pneumoniae*

Τα *Klebsiella oxytoca* και *Klebsiella pneumoniae* είναι Gram αρνητικά βακτήρια, τα οποία και εξελίσσονται σε σημαντικά παθογόνα στελέχη για το ανθρώπινο είδος και σχετίζονται με την αύξηση νοσηρότητας μεταξύ του πληθυσμού των ασθενών. Συνήθως, εντοπίζονται στο έντερο τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων, στο νερό και στο έδαφος και οι μολύνσεις που οφείλονται σε αυτά, οδηγούν σε παρατεταμένες διαμονές στα νοσοκομεία

(Singh et al. 2016). Τα στελέχη της *Klebsiella* έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά β-λακταμών, συμπεριλαμβανομένων των καρβαπενεμών και των κεφαλοσπορινών (Ierardi et al. 2017)

- *Rhizobium radiobacter*

Τα στελέχη της οικογένειας *Rhizobiaceae* είναι αερόβια, Gramαρνητικά και δεν σχηματίζουν σπόρια. Από αυτά το *Rhizobium radiobacter* είναι το είδος που προκαλεί συχνότερα ασθένειες στον άνθρωπο (Lai et al. 2004). Το βακτήριο χαρακτηρίζεται υπεύθυνο για την εμφάνιση βακτηριαιμίας σε ενήλικες, χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται περιστατικά θνησιμότητας. Ο μικροοργανισμός, διακρίνεται από ευαισθησία ως προς τις αντιβιοτικές ουσίες καρβαπενέμη, κεφεπίμη και σιπροφλοξασίνη.

- *Shigella sp.*

Η *Shigella sp.* είναι ένα Gram αρνητικό, δυνητικά αερόβιο, μη κινητό, μη σπορογόνο, ραβδωτό βακτήριο της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, που γενετικά συνδέεται άμεσα με το *E. coli*. Το μικρόβιο χαρακτηρίζεται ως παθογόνο και η έκθεση του σε αυτό μπορεί να προκαλέσει σιγκέλλωση. Πρόκειται για ένα λοιμώδες νόσημα, με κύρια συμπτώματα διάρροια, πυρετό και κράμπες στο στομάχι. Στις περισσότερες περιπτώσεις η μόλυνση από το βακτήριο γίνεται μέσω της εντερο-στοματικής οδού, καθώς και από κολύμπι σε μολυσμένα ύδατα. Η *Shigella sp.* παρουσιάζει σχετικά μεγάλη ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη, την τριμεθοπρίμη, τη σουλφαμεθοξαζόλη και τη αμπικιλλίνη, ενώ είναι ευαίσθητη ως προς την σιπροφλοξασίνη, την οφλοξασίνη και την κεφταζιδίμη (Qu et al. 2016).

- *Vibrio parahaemolyticus* & *Vibrio alginolyticus*

Τα *Vibrio parahaemolyticus* και *Vibrio alginolyticus* είναι Gram αρνητικά, ραβδωτού σχήματος βακτήρια, που απαντώνται σε υφάλμυρα και θαλασσινά νερά, και ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των *Vibrionaceae*. Το *V. alginolyticus* προκαλεί κυρίως λοιμώξεις στα αυτιά και στα μάτια, ενώ το *V. parahaemolyticus* ευθύνεται κατά κύριο λόγο για γαστρεντερίτιδες, που προκαλούνται από την κατανάλωση θαλασσινών (Elmahdi et al. 2016). Τα στελέχη αυτά παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, την πενικιλίνη και την τετρακυκλίνη.

- *Enterococcus faecium*

Το *Enterococcus faecium* είναι ένα Gram θετικό β-αιμολυτικό ομάδας A, στέλεχος του γένους *Enterococcus*. Μπορεί να είναι συμβιωτικό βακτήριο στην γαστρεντερική οδό των ανθρώπων και των ζώων, αλλά και παθογόνο προκαλώντας ασθένειες όπως νεογνική μηνιγγίτιδα ή ενδοκαρδίτιδα. Ο μικροοργανισμός έχει αναπτύξει ανθεκτικότητα σε πολλαπλά αντιβιοτικά με κυριότερα από αυτά την βανκομυκίνη και την αμπικιλίνη (Holmberg and Rasmussen 2016).

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν ομαδοποιημένοι κατά βακτηριακή οικογένεια και χρώση Gram. Η απομόνωση των βακτηρίων αυτών πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας της κυρίας Γεωργίας Φράγκου (Πολυτεχνείο Κρήτης, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος) από ανεπεξέργαστα και επεξεργασμένα λύματα της Εγκατάστασης Επεξεργασίας Λυμάτων (ΕΕΛ) στα Χανιά.

Πίνακας 5 Ομαδοποίηση εξεταζόμενων βακτηρίων στην εισροή της ΕΕΛ

Βακτηριακό είδος	Οικογένεια	Χρώση Gram
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	GramΑρνητικά
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	
<i>Enterobacter sakazakii</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Klebsiella oxytoca</i>		
<i>Rhizobium radiobacter</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	
<i>Vibrio parahaemolyticus A</i>	<i>Vibrionaceae</i>	
<i>Vibrio alginolyticus</i>		
<i>Vibrio parahaemolyticus B</i>		
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcaceae</i>	Gram Θετικά

Πίνακας 6 Ομαδοποίηση εξεταζόμενων βακτηρίων στην εκροή πριν από την απολύμανση

Βακτηριακό είδος	Οικογένεια	Χρώση Gram
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	Gram Αρνητικά
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Shigella sp.</i>		
<i>Rhizobium radiobacter</i>	<i>Rhizobiaceae</i>	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrionaceae</i>	
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcaceae</i>	Gram Θετικά

4.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά

Για την κατάταξη των μικροοργανισμών σε ομάδες ανάλογα με την ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά, με βάση το ISO 20776-2:2007(212, ISO/TC, 2007), αυτοί χαρακτηρίζονται ως ανθεκτικοί, μετρίως ευαίσθητοι και ευαίσθητοι (Πίνακας 7).

Πίνακας 7 Κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών με βάση την ανθεκτικότητα τους. ISO 20776-2:2007(212, ISO/TC, 2007)

Ανθεκτικοί (Resistant)	Οι μικροοργανισμοί των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μία συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συνδέεται με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής αποτυχίας.
Μετρίως Ευαίσθητοι (Intermediate)	οι μικροοργανισμοί των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μία συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συνδέεται με αμφίβολη θεραπευτική επιτυχία.
Ευαίσθητοι (Susceptible)	οι μικροοργανισμοί των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μία συγκέντρωση αντιμικροβιακού παράγοντα, η οποία συνδέεται με υψηλή πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας.

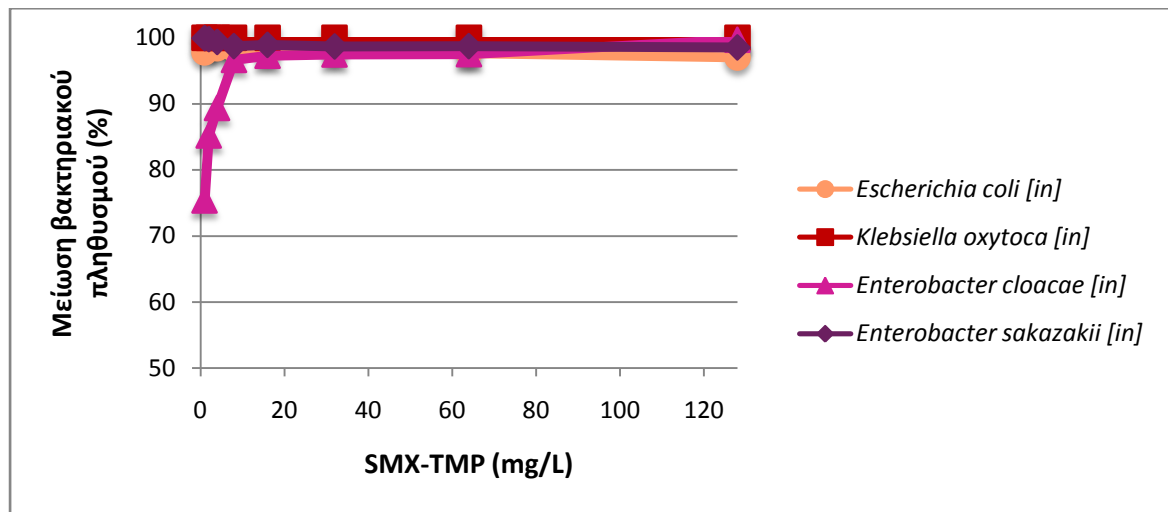
Προκειμένου να ελεγχθεί η ευαισθησία των μικροοργανισμών, εξετάστηκε για ποιες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού η μείωση του βακτηριακού πληθυσμού ήταν ίση ή μεγαλύτερη από το 60%. Τα όρια ανασταλτικής συγκέντρωσης που έχουν οριστεί από τον EUCAST παρατίθενται στον Πίνακα 8. Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές που αναγράφονται στους πίνακες του EUCAST αφορούν κλινικά όρια, τα οποία αποτελούν τον γνώμονα για τον

κλινικό ιατρικό κλάδο στην αντιμετώπιση ασθενειών. Επομένως, για να προσαρμοστούν τα όρια αυτά στα περιβαλλοντικά στελέχη τα οποία εξετάζονται στην παρούσα διπλωματική εργασία, με σκοπό την τελική κατηγοριοποίηση τους ως προς την ανθεκτικότητα τους στα αντιβιοτικά, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης μεταξύ των ίδιων των στελεχών.

Πίνακας 8 Όρια ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για τον έλεγχο ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών που εξετάζονται στα εκάστοτε αντιβιοτικά

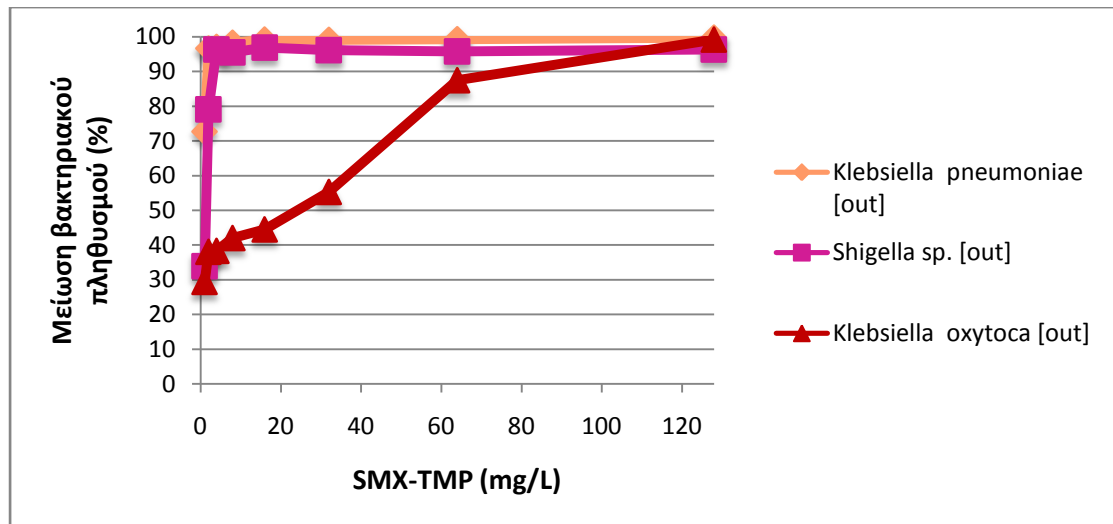
Οικογένεια	Εύρος Ανασταλτικής Συγκέντρωσης MIC (μg/mL)		
	Ευαίσθητος	Μετρίως Ευαίσθητος	Ανθεκτικός
	Ciprofloxacin - CIP		
<i>Enterococcaceae</i>	MIC ≤ 4	-	MIC ≥ 4
<i>Enterobacteriaceae</i>	MIC ≤ 0.25	0.25<MIC< 0.5	MIC ≥ 0.5
<i>Aeromonadaceae</i>	MIC ≤ 0.25	0.25<MIC< 0.5	MIC ≥ 0.5
<i>Rhizobiaceae</i>	MIC ≤ 0.03	0.03<MIC< 0.5	MIC ≥ 0.5
<i>Vibrionaceae</i>	MIC ≤ 0.08	0.08< MIC <0.25	MIC ≥ 0.25
	Tetracycline - TET		
<i>Enterococcaceae</i>	MIC ≤ 2	2 < MIC< 8	MIC ≥ 8
<i>Enterobacteriaceae</i>	MIC ≤ 4	4 < MIC< 16	MIC ≥ 16
<i>Aeromonadaceae</i>	MIC ≤ 2	2 < MIC< 8	MIC ≥ 8
<i>Rhizobiaceae</i>	MIC ≤ 0.08	0.08< MIC <0.25	MIC ≥ 0.25
<i>Vibrionaceae</i>	MIC ≤ 0.03	0.03< MIC < 0.25	MIC ≥ 0.25
	Sulfamethoxazole-Trimethoprim – SMX-TMP		
<i>Enterococcaceae</i>	MIC ≤ 0.032	0.032 < MIC < 1	MIC ≥ 1
<i>Enterobacteriaceae</i>	MIC ≤ 2	2< MIC <4	MIC ≥ 4
<i>Aeromonadaceae</i>	MIC ≤ 0.5	-	MIC ≥ 0.5
<i>Rhizobiaceae</i>	MIC ≤ 0.03	0.03<MIC< 0.5	MIC ≥ 0.5
<i>Vibrionaceae</i>	MIC ≤ 0.03	0.03<MIC< 0.25	MIC ≥ 0.25

4.2.1. *Enterobacteriaceae*



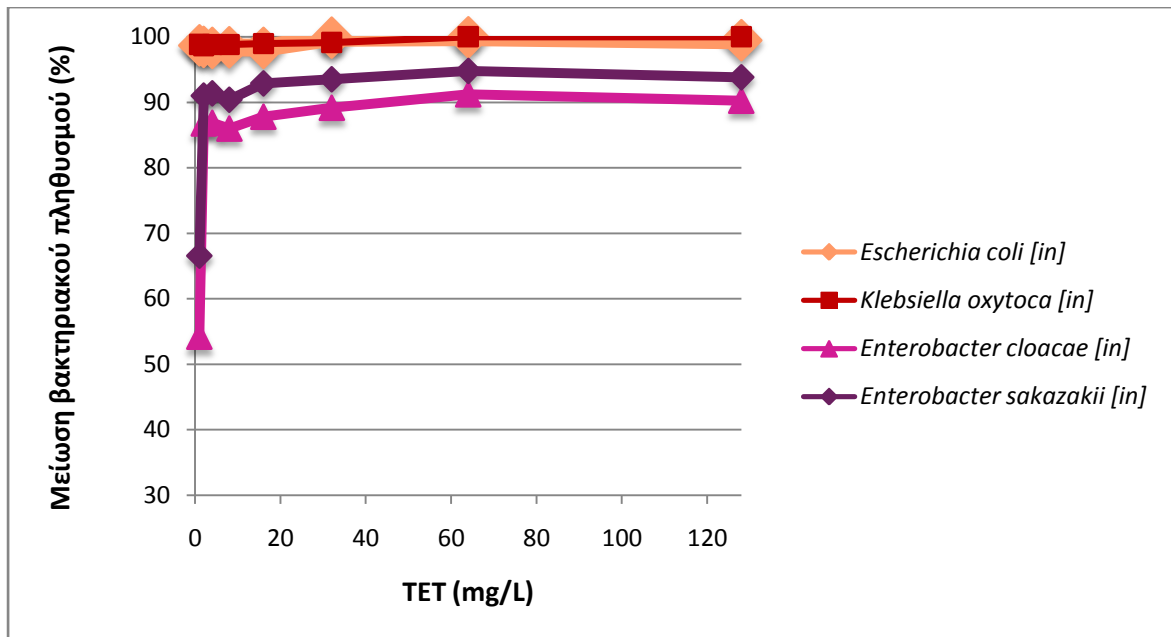
Γράφημα 1 Ποσοστό μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού των *Enterobacteriaceae*, που απομονώθηκαν από την είσοδο της ΕΕΥΑ, συναρτήσει της δόσης του αντιβιοτικού SMX-TMP

Από το γράφημα 1 προκύπτει ότι όλα τα βακτηριακά στελέχη είναι ευαίσθητα ως προς τη σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, αφού για όλα επήλθε μείωση του βακτηριακού πληθυσμού ακόμα και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (1-2mg/L) της τάξης του 100%. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα, γνωρίζοντας ότι η σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη αποτελεί ένα αντιβιοτικό νέας γενιάς και συνεπώς είναι αρκετά δραστικό ενάντια σε πολλαπλά μικρόβια.



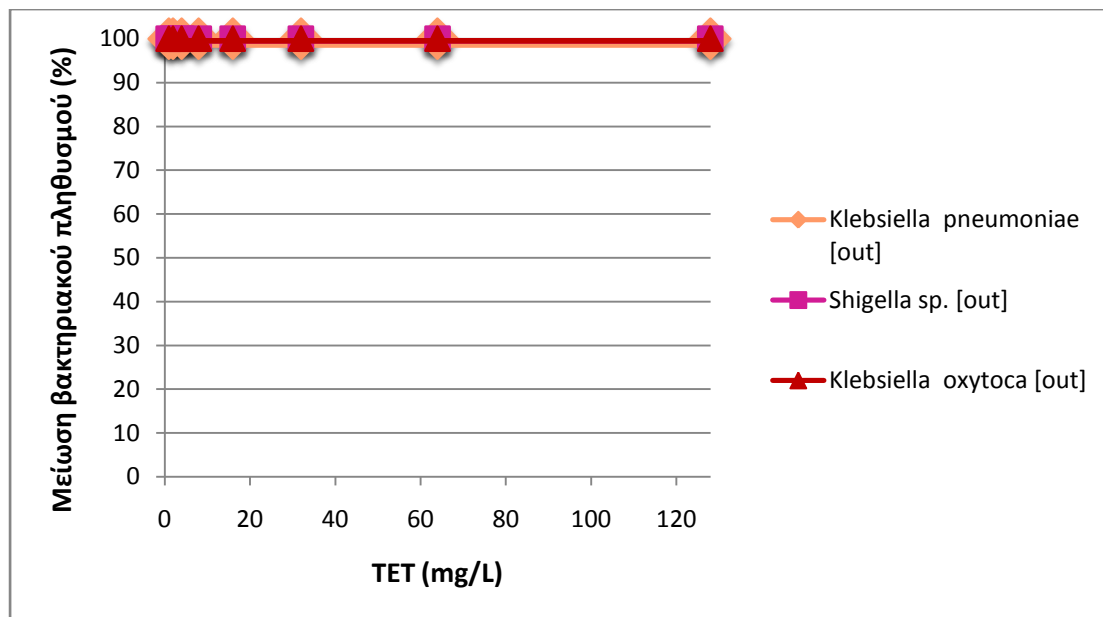
Γράφημα 2 Ποσοστό μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού των *Enterobacteriaceae*, που απομονώθηκαν από την εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, συναρτήσει της δόσης του αντιβιοτικού SMX-TMP

Από το γράφημα 2, το οποίο αφορά τα στελέχη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* που προέρχονται από την εκροή της δευτεροβάθμιας καθίζησης, προκύπτει ότι για τη μείωση του 60% του πληθυσμού τους, απαιτήθηκαν δόσεις αντιβιοτικού 32mg/L για το βακτήριο *Klebsiella oxytoca* και 1mg/L για τη *Shigella sp.* Συγκρίνοντας λοιπόν το προφίλ της μείωσης του πληθυσμού μεταξύ της *Klebsiella oxytoca* [in] και της *Klebsiella oxytoca* [out] γίνεται αντιληπτό πως μετά την επεξεργασία των λυμάτων τα στελέχη που απομένουν μέσα στα επεξεργασμένα λύματα και τα οποία οδηγούνται για απολύμανση είναι τα πιο ανθεκτικά.



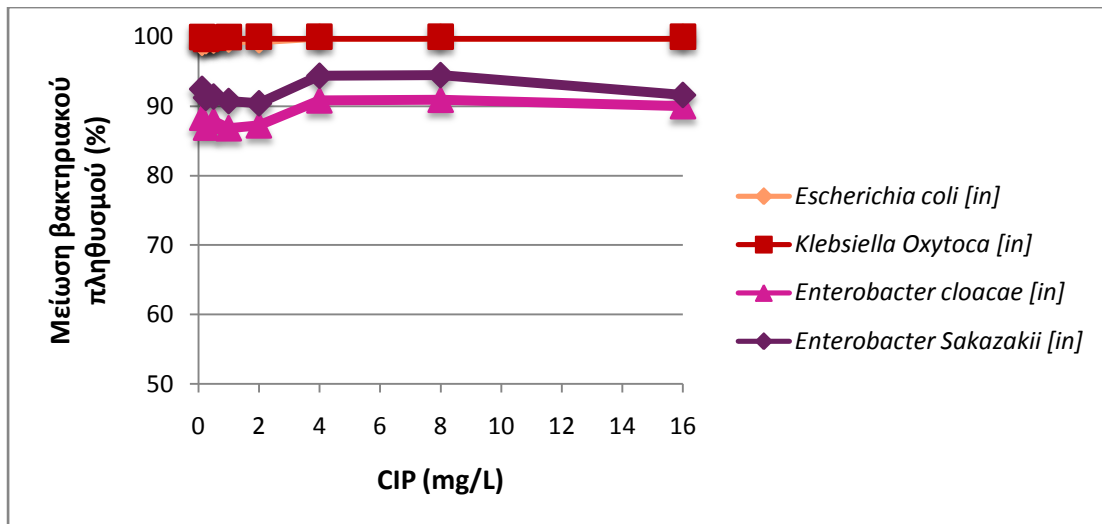
Γράφημα 3 Ποσοστό μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού των *Enterobacteriaceae* που απομονώθηκαν από την είσοδο της ΕΕΥΑ συναρτήσει της δόσης του αντιβιοτικού Tetracycline

Στο γράφημα 3 όλα τα στελέχη φαίνεται πως πλησιάζουν πολύ κοντά ή στην ολική μείωση του πληθυσμού τους σε υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Για τα στελέχη *Enterobacter cloacae* και *Enterobacter sakazakii* παρατηρούμε ότι σε πολύ χαμηλές δόσεις της αντιβιοτικής ουσίας υπάρχει ανάπτυξη του βακτηριακού τους συνόλου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα όλα τα βακτήρια είναι ευαίσθητα ως προς την Τετρακυκλίνη για το εύρος συγκεντρώσεων 16-0.125 mg/L.

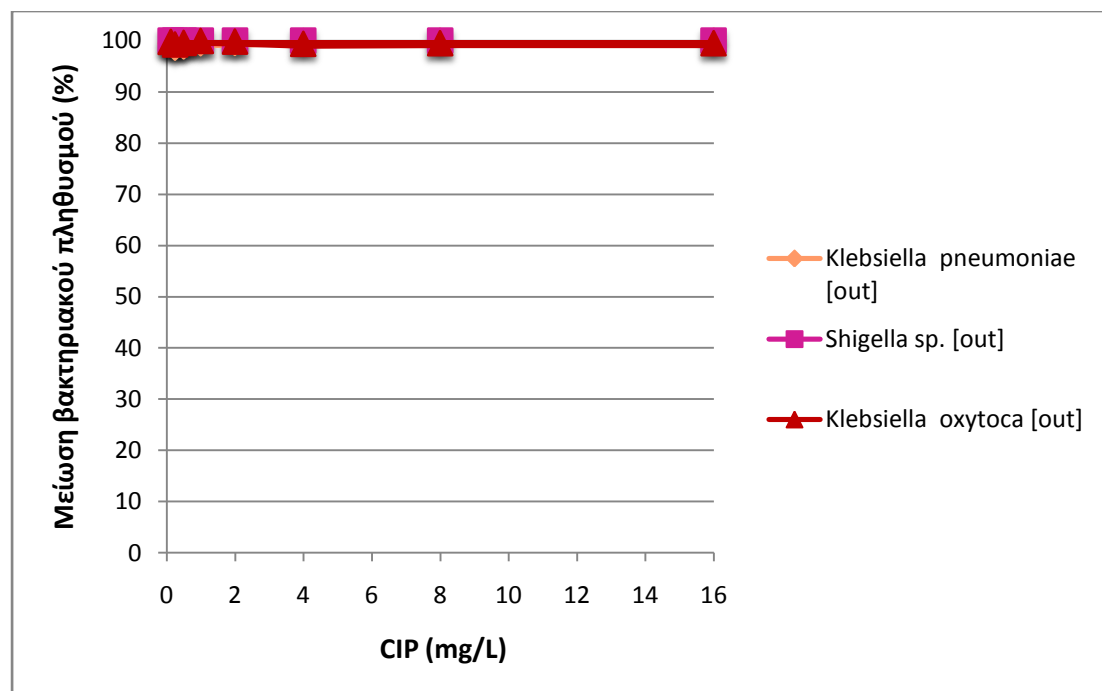


Γράφημα 4 Ποσοστό μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού των *Enterobacteriaceae* που απομονώθηκαν από την εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας συναρτήσει της δόσης του αντιβιοτικού Tetracycline

Είναι εμφανές από το γράφημα 4 πως τα εντεροβακτήρια της εκροής παρουσιάζουν ευαισθησία ως προς τον αντιβιοτικό παράγοντα τετρακυκλίνη. Όπως ήδη αναφέρθηκε το βακτήριο *Shigella sp.* διακρίνεται από ανθεκτικότητα απέναντι στην προκειμένη ουσία ωστόσο, τα αποτελέσματα μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με τον τόπο προέλευσης του εκάστοτε εξεταζόμενου βακτηρίου.



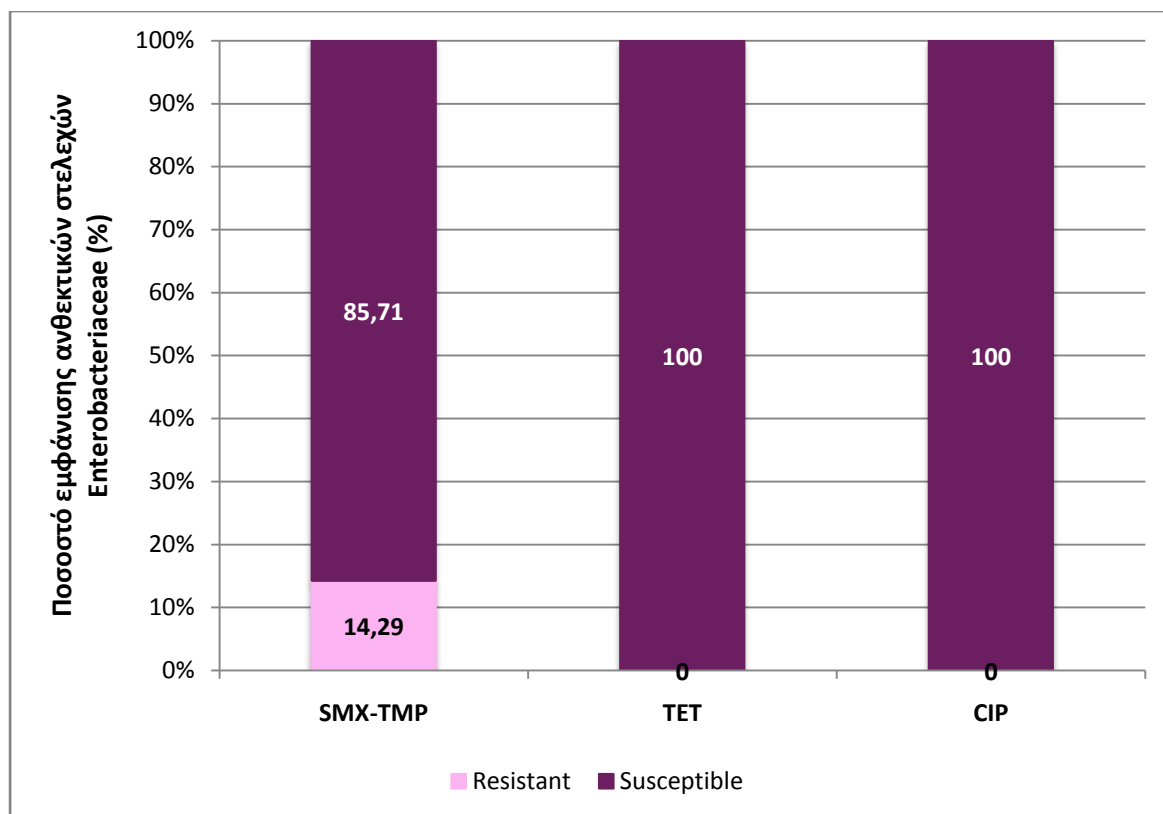
Γράφημα 5 Ποσοστό μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού των *Enterobacteriaceae* που απομονώθηκαν από την είσοδο της ΕΕΥΑ συναρτήσει της δόσης του αντιβιοτικού Ciprofloxacin



Γράφημα 6 Ποσοστό μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού των *Enterobacteriaceae* που απομονώθηκαν από την εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας συναρτήσει της δόσης του αντιβιοτικού Ciprofloxacin

Μέσω της παρατήρησης των γραφημάτων 5 και 6, προκύπτει ότι όλα τα στελέχη της συγκεκριμένης οικογένειας μειώνονται σε ποσοστό 90-100% μετά

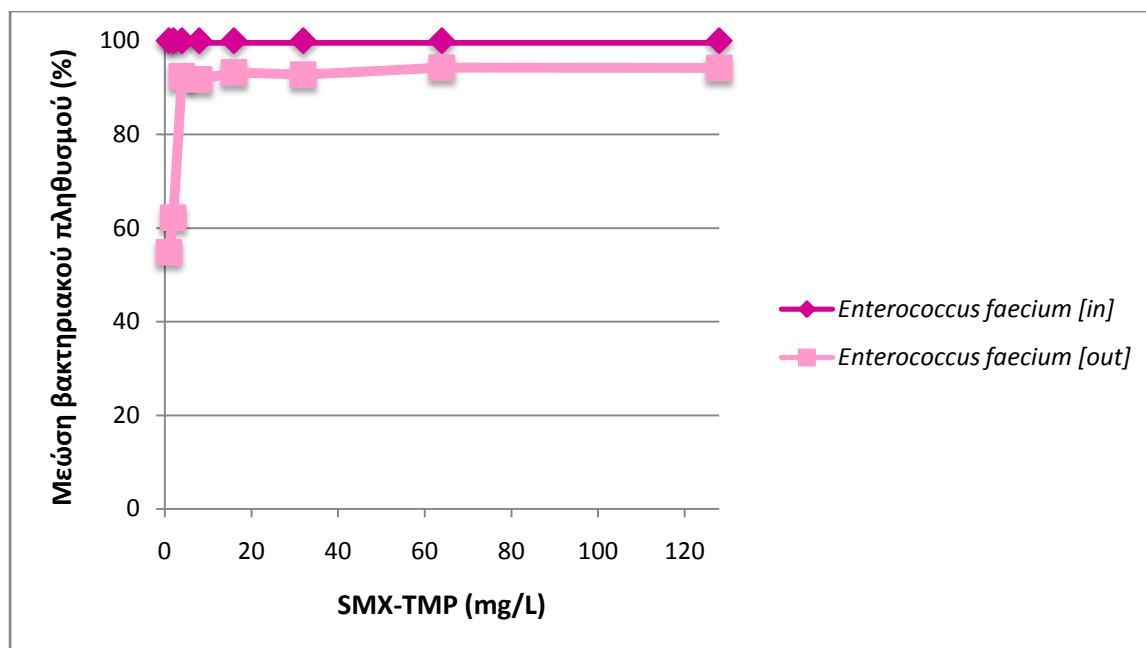
από την έκθεση τους στο αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη και κατά συνέπεια είναι ευαίσθητα ως προς αυτό.



Γράφημα 7 Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών ανά βακτηριακή οικογένεια-*Enterobacteriaceae*

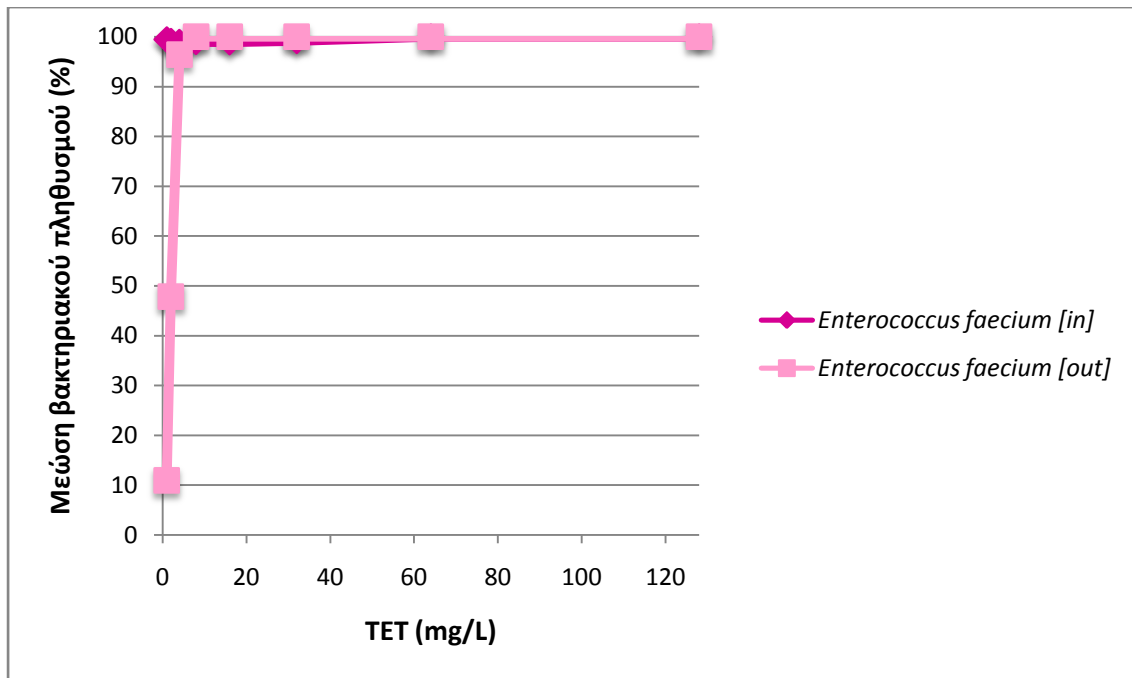
Όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα, από τα 7 στελέχη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* που εξετάσαμε, το 1 από αυτά προερχόμενο από την εκροή της δευτεροβάθμιας καθίζησης, χαρακτηρίζεται από μικροβιακή αντοχή στη σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη (14,29%) ενώ τα υπόλοιπα 6 (85,71%) είναι ευαίσθητα στο εν λόγω αντιβιοτικό. Αναφορικά με τα αντιβιοτικά τετρακυκλίνη και σιπροφλοξασίνη και τα 7 στελέχη (100%), επέδειξαν ευαισθησία ως προς αυτά. Κατά την πειραματική διαδικασία δεν εντοπίστηκαν ενδιάμεσα βακτήρια για κανένα από τα τρία αντιβιοτικά.

4.2.2. Enterococcaceae



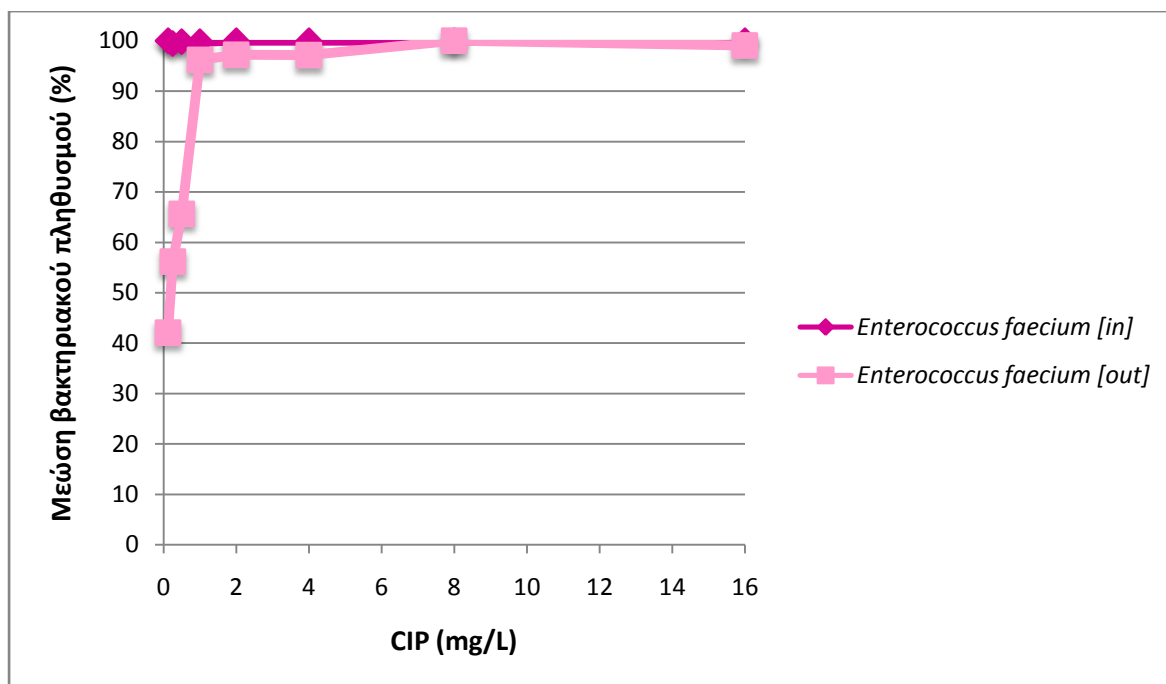
Γράφημα 8 Ποσοστιαία μείωση του βακτηριακού πληθυσμού του στελέχους *Enterococcus faecium* ως προς το SMX-TMP

Από το γράφημα 8 για τον εξεταζόμενο εντερόκοκκο συμπεραίνουμε ότι κατά την εισροή διακατέχεται από μία πολύ υψηλή ευαισθησία ως προς την σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, καθώς μειώνεται εξ' ολοκλήρου ακόμα και στις χαμηλότερες δόσεις του αντιβιοτικού. Μολοταύτα, κατά την εκροή επιτυγχάνεται μείωση μεγαλύτερη ή ίση του 60% του πληθυσμού μεταξύ του εύρους δόσεων 1 έως 2 mg/L. Συνεπώς με βάση τα προτεινόμενα όρια από τον EUCAST ο *Enterococcus faecium* [out] χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικός ενάντια στο SMX-TMP.



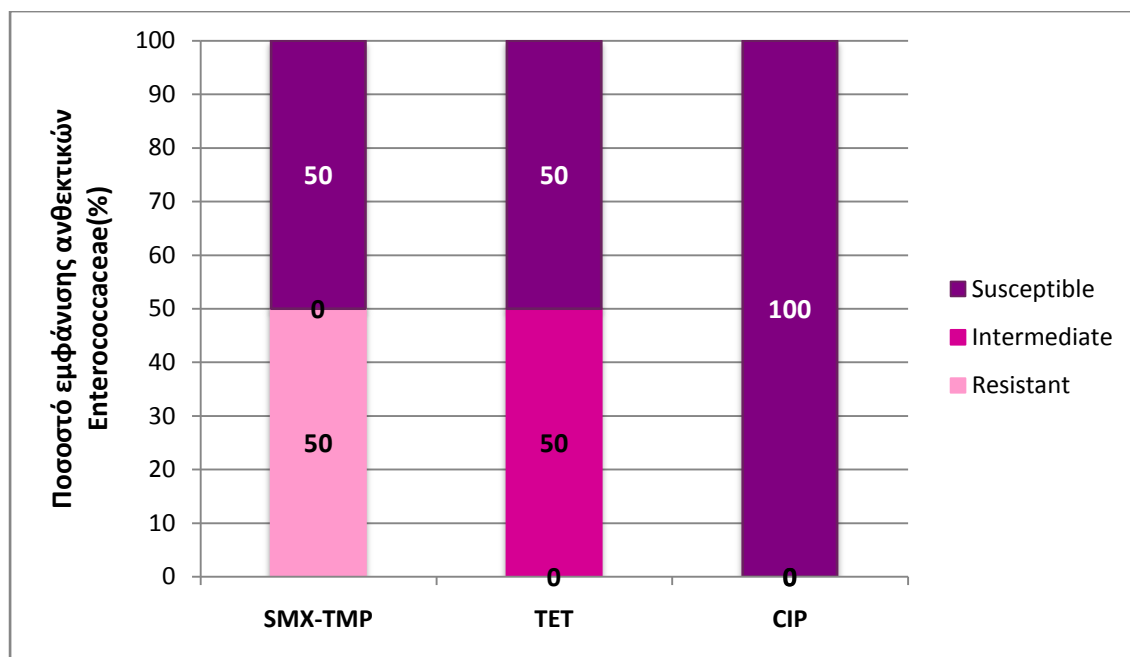
Γράφημα 9 Ποσοστιαία μείωση του βακτηριακού πληθυσμού του στελέχους *Enterococcus faecium* ως προς την Tetracycline

Σύμφωνα με το γράφημα 9 η τετρακυκλίνη επιδράει θετικά στην ολική εξουδετέρωση του μικροβιακού παράγοντα, όταν αυτός προέρχεται από την εισροή της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων. Ωστόσο, τα στελέχη που απομονώθηκαν κατά την εκροή τείνουν να πολλαπλασιάζονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού. Συγκεκριμένα, για δόση ίση με 2mg/L υπήρξε μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού από 60% (47,85%), καθιστώντας έτσι τον εντερόκοκκο ενδιάμεσο στέλεχος.



Γράφημα 10 Ποσοστιαία μείωση του βακτηριακού πληθυσμού του στελέχους *Enterococcus faecium* ως προς την Ciprofloxacin

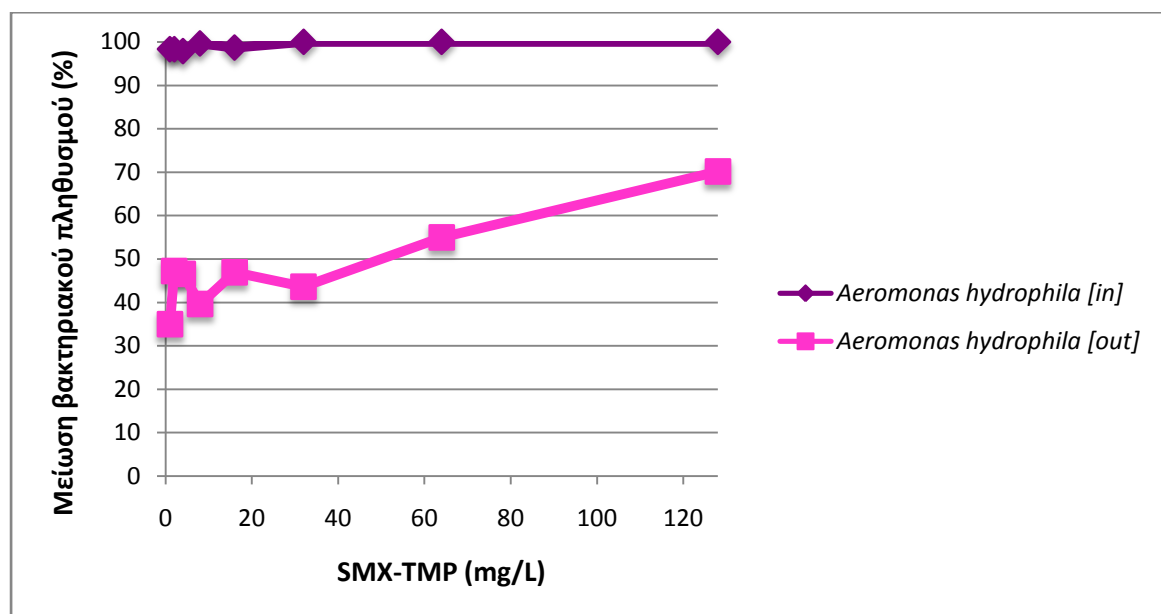
Από το γράφημα 10 παρατηρούμε και πάλι ότι ο *Enterococcus faecium* [in] μειώνεται σε ποσοστό 100% μετά από την επαφή του με την σιπροφλοξασίνη. Για τον *Enterococcus faecium* [out] το εύρος συγκεντρώσεων που απαιτήθηκε για τη μείωση του 60% του πληθυσμού του ήταν το 0,25-0,125 mg/L. Βασιζόμενοι στα όρια της MIC₆₀ που έχουν δοθεί από τον EUCAST χαρακτηρίζουμε τον μικροοργανισμό ευαίσθητο ως προς τη σιπροφλοξασίνη.



Γράφημα 11 Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών ανά βακτηριακή οικογένεια-*Enterococcaceae*

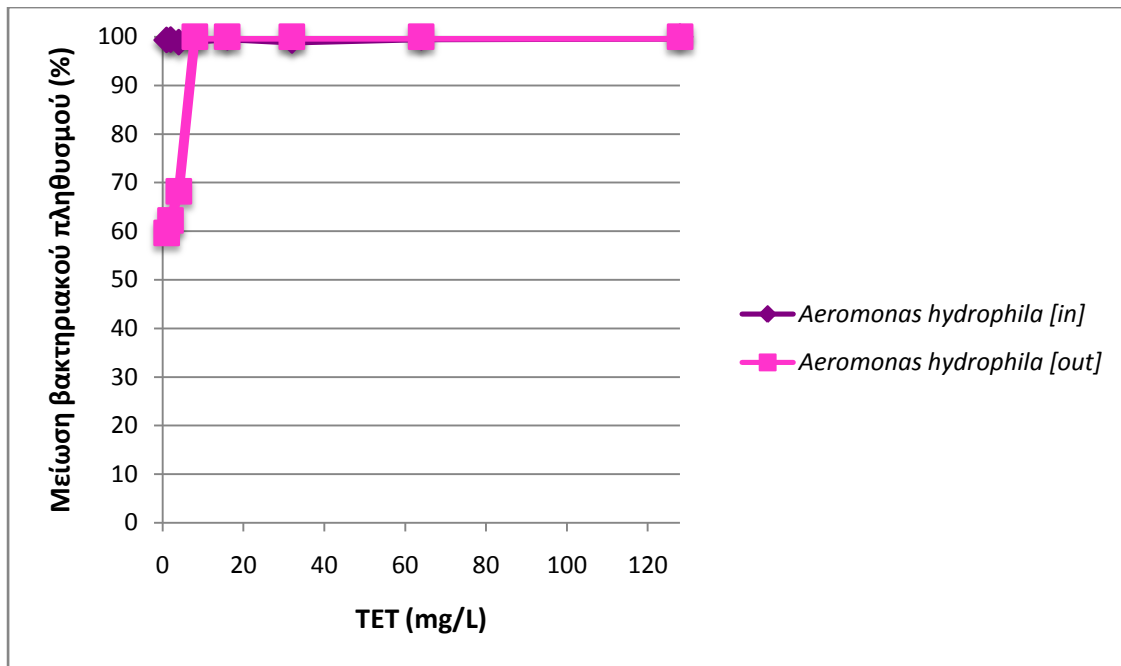
Εξετάζοντας το γράφημα 11, παρατηρούμε ότι από τα 2 στελέχη εντερόκοκκων το 1 (50%) που προήλθε από την εισροή ήταν ευαίσθητο για την σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, ενώ το αντίστοιχο από την εκροή ήταν ανθεκτικό ως προς την εν λόγω αντιβιοτική ουσία, γεγονός που φαίνεται να συνδέει την επεξεργασία των λυμάτων με την απομάκρυνση των λιγότερων ανθεκτικών στελεχών και την παραμονή των πιο ανθεκτικών από αυτά στα επεξεργασμένα λύματα. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούμε και για την περίπτωση της τετρακυκλίνης, όπου ο *Enterococcus faecium* [in] (50%) παρουσιάζει μία ευαισθησία κατά την επαφή του με το αντιβιοτικό, ενώ ο εντερόκοκκος της εκροής (50%) αντιστέκεται στη δράση της ουσίας. Τέλος, και τα 2 στελέχη (100%) χαρακτηρίζονται ως ευαίσθητα για την σιπροφλοξασίνη.

4.2.3. *Aeromonadaceae*



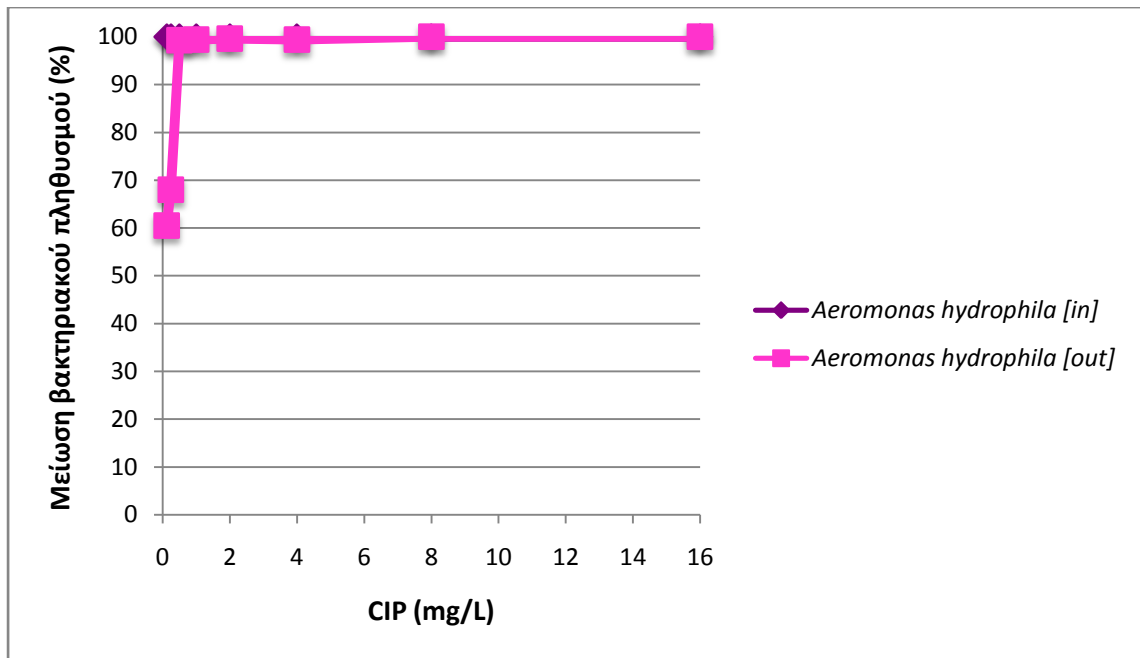
Γράφημα 12 Ποσοστιαία μείωση του βακτηριακού πληθυσμού του στελέχους *Aeromonas hydrophila* ως προς το SMX-TMP

Με γνώμονα το παραπάνω γράφημα, χαρακτηρίζουμε το στέλεχος *Aeromonas hydrophila* της εισροής ως ευαίσθητο για τη σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, εφόσον επιτυγχάνεται ολοκληρωτική μείωση του πληθυσμού του ακόμα και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Αντιθέτως, όσον αφορά το αντίστοιχο στέλεχος της εκροής, για την μείωση του συνόλου του σε ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο του 60% απαιτείται ένα εύρος δόσεων ίσο με 1-2 mg/L. Επίσης, σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (128-64 mg/L) η ελάττωση του βακτηρίου επιτυγχάνεται μόλις στο 70,12%, οπότε είναι ανθεκτικό ως προς αυτόν τον αντιβιοτικό παράγοντα.



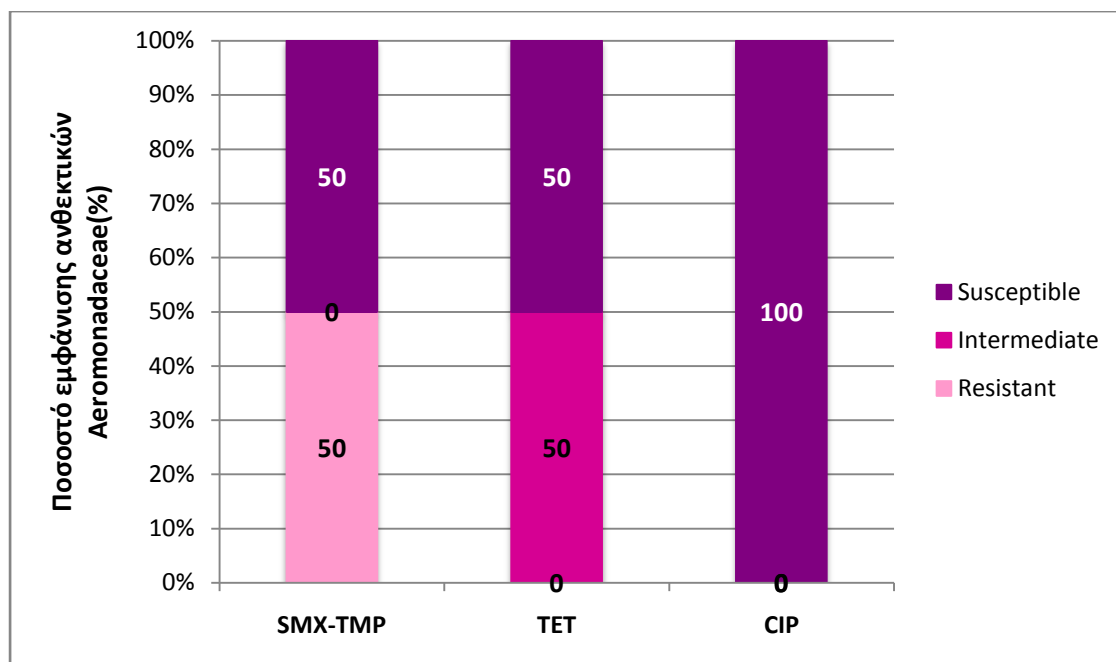
Γράφημα 13 Ποσοστιαία μείωση του βακτηριακού πληθυσμού του στελέχους *Aeromonas hydrophila* ως προς την Tetracycline

Από το γράφημα 13 βλέπουμε ότι το στέλεχος της εισόδου δεν επιβιώνει καθόλου, ακόμα και στις ελάχιστες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη. Για το στέλεχος της εξόδου, ενώ στο εύρος συγκεντρώσεων 128-8 mg/L, η αντιβιοτική ουσία δρα σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό έτσι ώστε να μην αναπτύσσεται καθόλου το βακτήριο, σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ο μικροοργανισμός αρχίζει να επιβιώνει, με αποτέλεσμα να έχουμε μείωση του σε ποσοστό 59,62% για δόση 1 mg/L.



Γράφημα 14 Ποσοστιαία μείωση του βακτηριακού πληθυσμού του στελέχους *Aeromonas hydrophila* ως προς την Ciprofloxacin

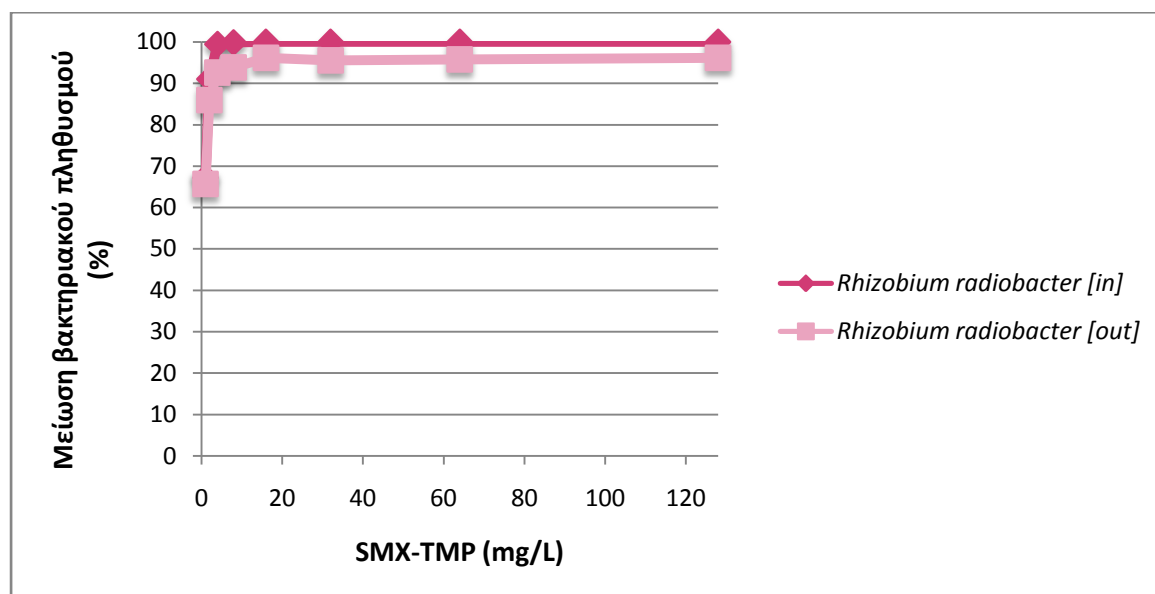
Για το *Aeromonas hydrophila [in]*, από το γράφημα 14 βλέπουμε ότι η πτώση του συνόλου του βακτηρίου είναι και πάλι στο μέγιστο δυνατό (100%) ως προς τη σιπροφλοξασίνη. Για το *Aeromonas hydrophila [out]*, σε υψηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού επιτυγχάνεται ολική ελάττωση του πληθυσμού. Η επίτευξη της μείωσης του 60% του βακτηριακού πληθυσμού πραγματοποιείται για δόση 0,125 mg/L, πλην, όμως η προτεινόμενη δόση από τον EUCAST είναι τα 0,25mg/L, συνεπώς αντιλαμβανόμαστε ότι το συγκεκριμένο στέλεχος είναι ευαίσθητο ως προς τη σιπροφλοξασίνη.



Γράφημα 15 Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών ανά βακτηριακή οικογένεια-*Aeromonadaceae*

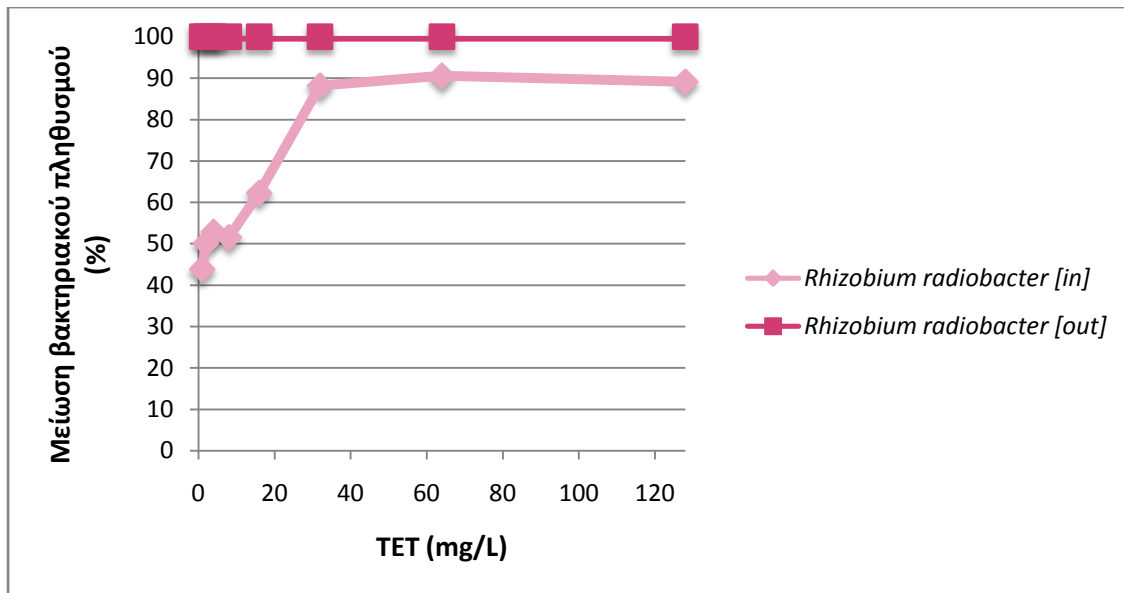
Παρατηρώντας το γράφημα 15 προκύπτει ότι από τα 2 στελέχη που εξετάστηκαν, το 1 (50%) που προήλθε από την εισροή είναι ευαίσθητο και για τα τρία αντιβιοτικά. Διαφοροποίηση επέρχεται στην εκροή, όπου το 2ο στέλεχος (50%) είναι ανθεκτικό για την σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, εντούτοις ευαίσθητο για την σιπροφλοξασίνη, γεγονός που επιβεβαιώνεται όπως ήδη αναφέρθηκε και από τις μελέτες άλλων ερευνητών. Επιπλέον, ως προς την τετρακυκλίνη το *Aeromonas hydrophila* [out] (50%) χαρακτηρίζεται ως ενδιάμεσο στέλεχος.

4.2.4. *Rhizobiaceae*



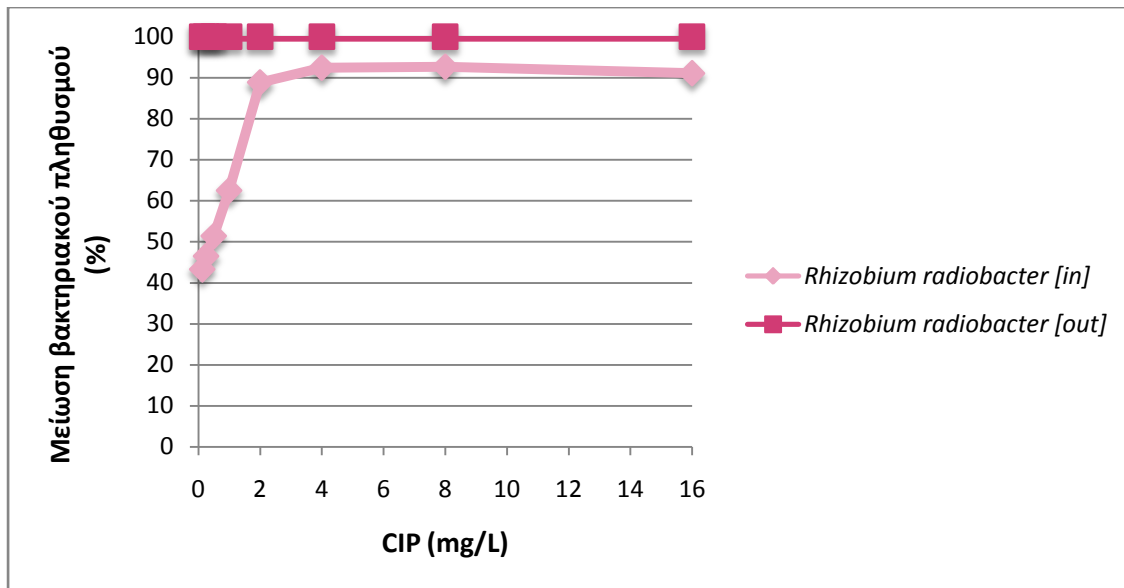
Γράφημα 16 Ποσοστιαία μείωση του βακτηριακού πληθυσμού του στελέχους *Rhizobium radiobacter* ως προς το SMX-TMP

Με βάση το γράφημα 16 παρατηρούμε ότι το στέλεχος *Rhizobium radiobacter* [in] ελαχιστοποιείται σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό (100%) για υψηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, ενώ με την φθίνουσα πορεία της δόσης ακολουθεί και η ποσοστιαία ελάττωση του βακτηριακού πληθυσμού, μέχρι το 67,19% για δόση ίση με 1 mg/L. Αναφορικά με το στέλεχος με προέλευση από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, το προφίλ της ποσοστιαίας μείωσης είναι σχετικά το ίδιο με αυτό της εισροής. Συνεπώς, το προφίλ ανθεκτικότητας ως προς την σιπροφλοξασίνη για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό, δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τις διεργασίες επεξεργασίας στις οποίες υπόκειται.



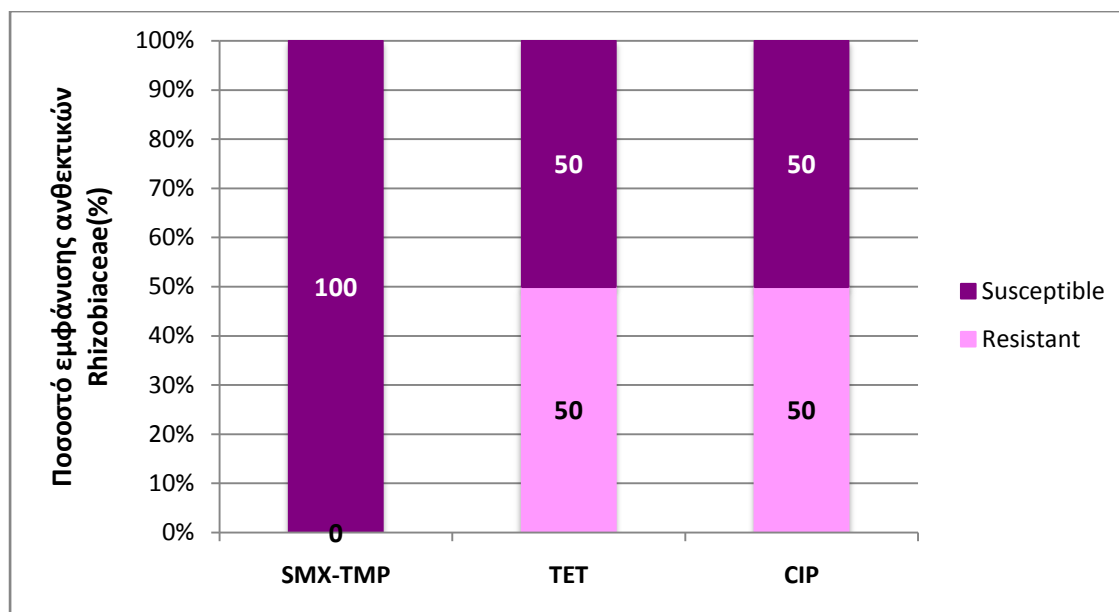
Γράφημα 17 Ποσοστιαία μείωση του βακτηριακού πληθυσμού του στελέχους *Rhizobium radiobacter* ως προς την Tetracycline

Εν αντιθέσει με τα προηγούμενα στελέχη που εξετάσαμε, από το γράφημα 17 βλέπουμε ότι η δευτεροβάθμια επεξεργασία, ενέργησε θετικά απέναντι στο βακτήριο. Συγκεκριμένα, ξεκινώντας από την εισροή παρατηρούμε ότι ακόμα και στην μέγιστη συγκέντρωση (128 mg/L) ο βακτηριακός πληθυσμός δεν μειώνεται τελείως, φτάνοντας μέχρι το 89,12%. Επιπλέον, για την επίτευξη ελάττωσης του βακτηριακού συνόλου σε ποσοστό 60%, η απαιτούμενη δόση εντοπίστηκε στα 8 mg/L, η οποία αποκλίνει σημαντικά από την προτεινόμενη δόση $MIC_{60} = 0,25 \text{ mg/L}$, γεγονός που καθιστά το μικρόβιο ανθεκτικό ως προς την τετρακυκλίνη. Ωστόσο, διακρίνουμε ότι κατά την εκροή το *Rhizobium radiobacter* αδρανοποιήθηκε στον υπέρτατο δυνατό βαθμό (100%), σε όλο το εύρος των εξεταζόμενων δόσεων.



Γράφημα 18 Ποσοστιαία μείωση του βακτηριακού πληθυσμού του στελέχους *Rhizobium radiobacter* ως προς την Ciprofloxacin

Παρόμοια αποτελέσματα έχουμε και για την περίπτωση της σιπροφλοξασίνης. Το στέλεχος της εισροής, φαίνεται να αντιστέκεται στην αντιβιοτική ουσία μέσω του πολλαπλασιασμού του σε ποσοστό γύρω στο 9% στην μεγαλύτερη συγκέντρωση των 16 mg/L. Η δόση που προτείνεται ως η ελάχιστη δυνατή για να επιτευχθεί ελάττωση 60% του βακτηριακού συνόλου είναι τα 0,5 mg/L. Στη προκειμένη περίπτωση η επιθυμητή μείωση πραγματοποιείται για διπλάσια δόση από την προτεινόμενη (1 mg/L), συνεπώς καταλαβαίνουμε ότι το *Rhizobium radiobacter* [in] είναι ανθεκτικό ως προς τη σιπροφλοξασίνη. Μετά την επεξεργασία, τα στελέχη που απομένουν στα λύματα είναι ευαίσθητα ως προς την αντιβιοτική ουσία, και έτσι ακόμα και σε δόση 0,125mg/L η αδρανοποίηση του βακτηρίου φτάνει σε ποσοστό 100%.

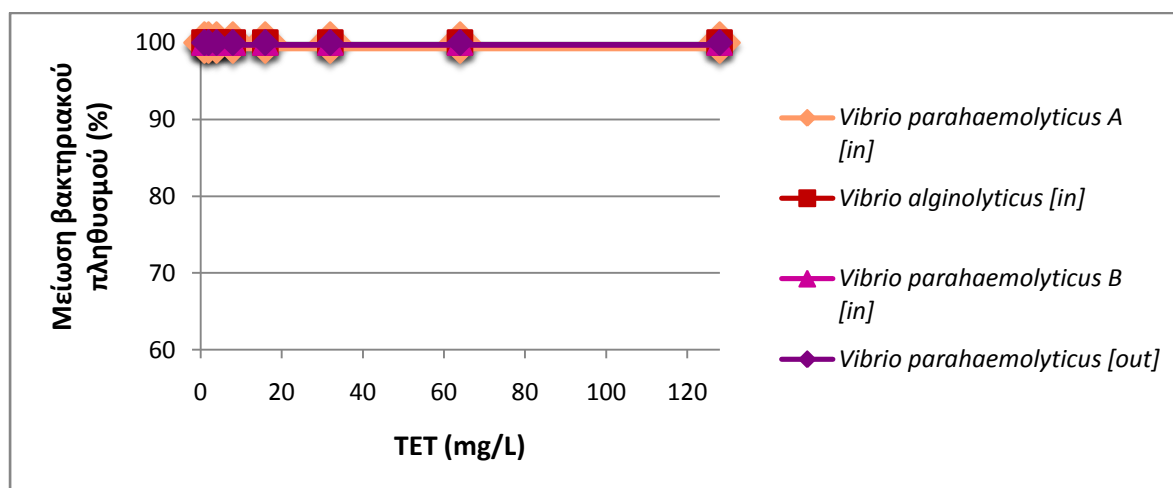


Γράφημα 19 Ποσοστό εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών ανά βακτηριακή οικογένεια-*Rhizobiaceae*

Μέσω της παρατήρησης του γραφήματος 19, γίνεται διακριτό ότι από τα 2 στελέχη της οικογένειας *Rhizobiaceae* αυτά που προήλθαν από την εισροή του βιολογικού (50%), παρουσιάζουν ανθεκτικότητα ως προς την σιπροφλοξασίνη και την τετρακυκλίνη, ενώ είναι ευαίσθητα ως προς την σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη. Αυτό πιθανότατα να εξηγείται λόγω του ότι η CIP και η TET αποτελούν αντιβιοτικά ευρέως φάσματος και συνεπώς χρησιμοποιούνται συχνότερα, με αποτέλεσμα το στέλεχος να έχει αποκτήσει ανθεκτικότητα έναντι σε αυτά, ενώ αντίθετα το SMX-TMP είναι ένα αντιβιοτικό νέας γενιάς με υψηλή δράση. Το *Rhizobium radiobacter* [out] διακρίνεται από ευαισθησία και για τα τρία αντιβιοτικά, γεγονός που όπως αναφέρθηκε σχετίζεται με τη θετική επίδραση της επεξεργασίας των λυμάτων. Για το συγκεκριμένο είδος δεν εντοπίστηκαν ενδιάμεσα στελέχη.

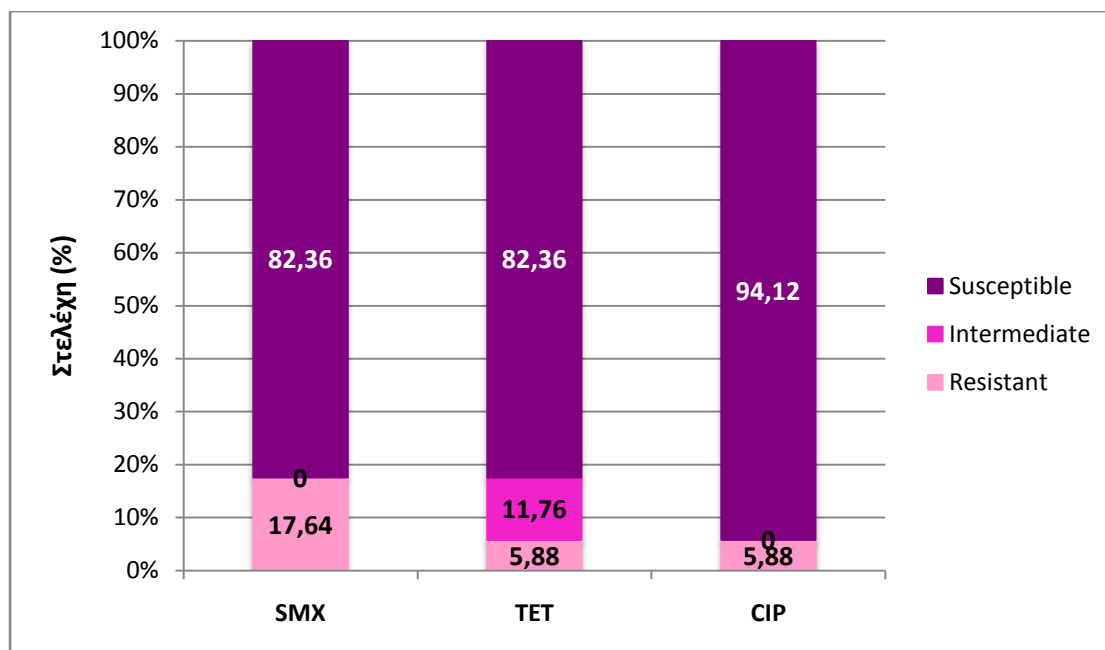
4.2.5. *Vibrionaceae*

Για τα στελέχη της οικογένειας *Vibrionaceae* παρατηρήθηκε με γενική ολική μείωση της τάξης του 100% του πληθυσμού τους και για τα τρία αντιβιοτικά. Συνεπώς, καταλαβαίνουμε ότι τα βακτήρια που απομονώθηκαν τόσο από την είσοδο της εγκατάστασης όσο και από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας είναι ευαίσθητα ως προς την σιπροφλοξασίνη, την τετρακυκλίνη και τη σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη για τις δόσεις που εξετάστηκαν. Ενδεικτικά παρατίθεται παρακάτω το γράφημα 20, που αναπαριστά την ελάττωση του βακτηριακού συνόλου των *Vibrionaceae* σε συνάρτηση με τη δόση του αντιβιοτικού τετρακυκλίνη.



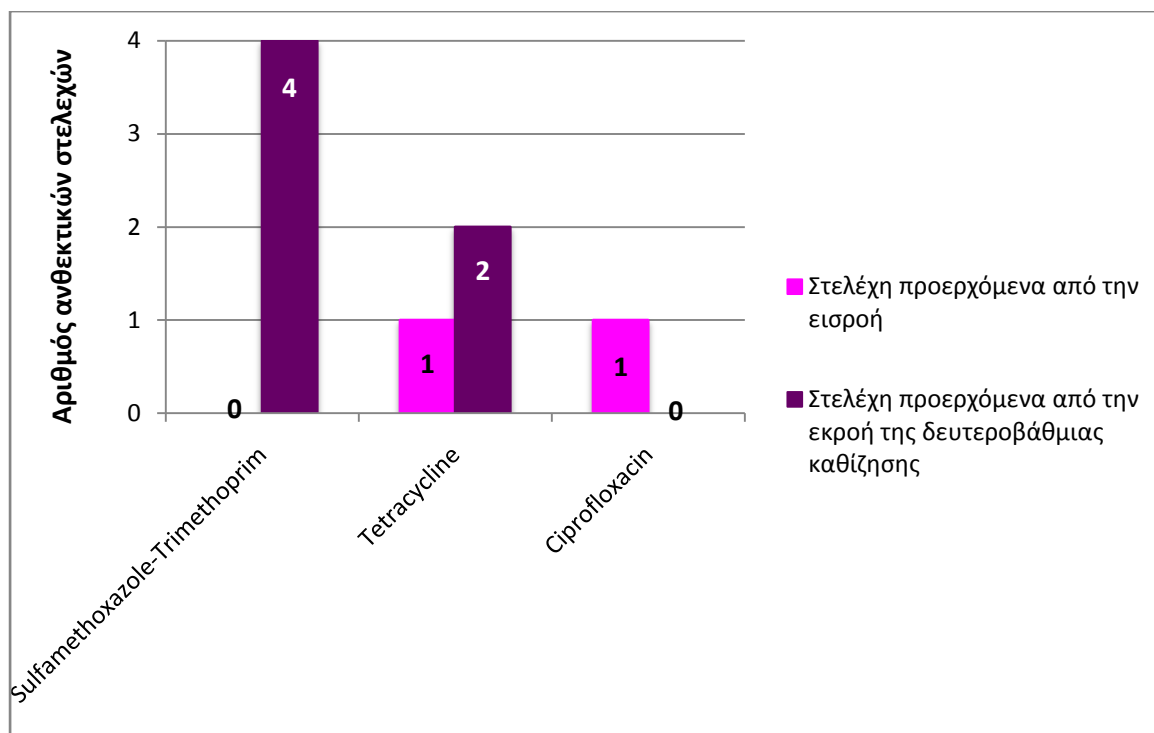
Γράφημα 20 Ποσοστιαία μείωση του βακτηριακού πληθυσμού της οικογένειας *Vibrionaceae* ως προς την Tetracycline

Στο γράφημα 21 απεικονίζονται σχηματικά τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα του βαθμού ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε κάθε αντιβιοτικό παράγοντα που εξετάστηκε.



Γράφημα 21 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του βαθμού ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε κάθε αντιβιοτικό

Από τα 17 στελέχη που εξετάστηκαν, τα 3 (17,64 %) ήταν ανθεκτικά στο SMX-TMP, το 1 στη CIP (5,88%) και το 1 στη TET (5,88%). Επιπλέον 2 από αυτά (11,76%) χαρακτηρίζονται ως ενδιάμεσα για την TET. Τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν, όπως ήδη έχει αναφερθεί, με γνώμονα τα όρια δόσεων που προτείνονται από τον EUCAST.



Γράφημα 22 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του αριθμού ανθεκτικών στελεχών μικροοργανισμών ανά αντιβιοτικό παράγοντα

Στο γράφημα 22 βλέπουμε τον συνολικό αριθμό των ανθεκτικών στελεχών ανά αντιβιοτική ουσία. Στην προκειμένη περίπτωση δεχτήκαμε ως ανθεκτικά και τα ενδιάμεσα στελέχη. Παρατηρούμε λοιπόν μία άρρηκτη σχέση μεταξύ της επεξεργασίας στην οποία υπόκεινται οι μικροοργανισμοί με το βαθμό ανθεκτικότητας τους. Τα ανθεκτικά βακτήρια ενάντια και στα τρία αντιβιοτικά, που επιβιώνουν μετά την δευτεροβάθμια επεξεργασία φαίνεται να είναι σαφώς περισσότερα από εκείνα που εισέρχονται στην εγκατάσταση. Συγκεκριμένα το 100% του συνόλου για το SMX-TMP, το 66,67% του πληθυσμού για την Tetracycline και το 100% για τη Ciprofloxacin, προέρχονται από την εκροή της δευτεροβάθμιας καθίζησης.

4.3. Οζόνωση

Εν συνεχεία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των βακτηρίων που υποβλήθηκαν σε οζόνωση. Η επιλογή των βακτηρίων έγινε με βασικό κριτήριο το προφίλ ανθεκτικότητας τους ως προς το εκάστοτε αντιβιοτικό (ανθεκτικά βακτήρια) και δευτερευόντως, με βάση την προέλευση τους και την οικογένεια στην οποία υπάγονται. Τα τέσσερα λοιπόν βακτήρια που επιλέχθηκαν είναι το *Aeromonas hydrophila* [out], η *Klebsiella oxytoca* [out], ο *Enterococcus faecium* [out] και το *Rhizobium radiobacter* [in].

4.3.1. *Aeromonas hydrophila*

Χρόνος σταθεροποίησης ρυθμού εφαρμογής όζοντος = 30min

$$\text{Flow rate} = 2,36 \frac{L}{min}$$

$$\text{Παγίδα In} = 3,6 \text{ mL}$$

$$\text{Παγίδα Out} = 2,4 \text{ mL}$$

$$O_{3 \text{ in}} = \frac{\text{Παγίδα In} * 0.1 * 24}{\text{Χρόνος Σταθεροποίησης}} = \frac{3.6 \text{ mL} * 0.1 * 24}{30 \text{ min}} = 0.288 \frac{mg}{min} \rightarrow$$

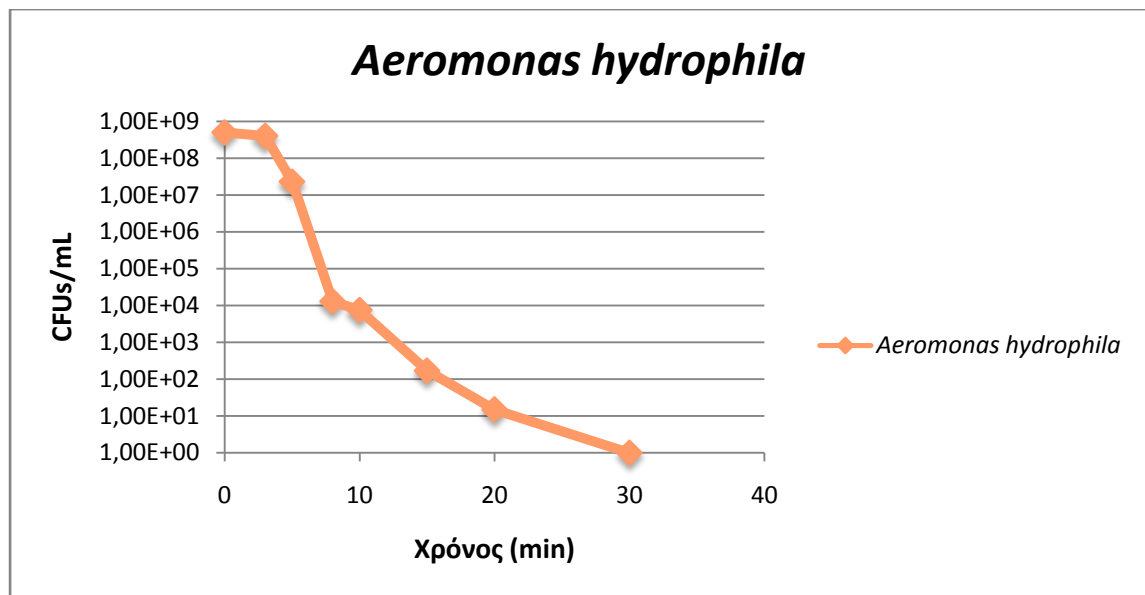
$$\frac{O_{3 \text{ in}}}{\text{Flowrate}} = \frac{0.288 \frac{mg}{min}}{2.36 \frac{L}{min}} \rightarrow O_{3 \text{ in}} = 0.122 \frac{mg}{L}$$

$$O_{3 \text{ out}} = \frac{\text{Παγίδα Out} * 0.1 * 24}{\text{Χρόνος Σταθεροποίησης}} = \frac{2.4 \text{ mL} * 0.1 * 24}{30 \text{ min}} = 0.192 \frac{mg}{min} \rightarrow$$

$$\frac{O_{3 \text{ out}}}{\text{Flowrate}} = \frac{0.192 \frac{mg}{min}}{2.36 \frac{L}{min}} \rightarrow O_{3 \text{ out}} = 0.080 \frac{mg}{L}$$

$$\begin{aligned} \text{Applied } O_3 \text{ dose} &= \frac{(O_{3 \text{ in}} - O_{3 \text{ out}}) * \text{Flow rate} * \text{Χρόνο πειράματος}}{\text{Όγκος Δείγματος}} \\ &= \frac{(0.122 - 0.081) \frac{mg}{L} * 2.36 \frac{L}{min} * 30 \text{ min}}{0.3 \text{ L}} \end{aligned}$$

$$\rightarrow \text{Applied } O_3 \text{ dose} = 9.9 \frac{mg}{L}$$



Γράφημα 23 Αδρανοποίηση του στελέχους *Aeromonas hydrophila* [out] με δόση όζοντος 9,9 mg/L

Από το γράφημα 23 παρατηρούμε ότι το βακτήριο αδρανοποιείται εντελώς στα τελευταία λεπτά της πειραματικής διαδικασίας (30min). Στους πρώτους χρόνους (0-3 min), ο πληθυσμός του βακτηρίου είναι σχετικά σταθερός και έπειτα αρχίζει να μειώνεται αρχικά απότομα και στη συνέχεια πιο ομαλά, μέχρι την πλήρη ελάττωση του. Αυτό συμβαίνει διότι ο μικροοργανισμός τείνει να αντιστέκεται στις αντίξοες συνθήκες στις οποίες υποβάλλεται. Τέλος, αξίζει να σχολιασθεί ότι η αντίδραση μπορεί να θεωρηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό μία αντίδραση ψευδοπρώτης τάξης με σταθερά ταχύτητας αδρανοποίησης $k=0,95 \text{ min}^{-1}$.

4.3.2. *Klebsiella oxytoca*

Χρόνος σταθεροποίησης ρυθμού εφαρμογής όζοντος =30min

$$\text{Flow rate} = 2,36 \frac{L}{\text{min}}$$

$$\text{ΠαγίδαIn} = 4,06 \text{ mL}$$

$$\text{ΠαγίδαOut} = 1,99 \text{ mL}$$

$$O_{3\text{ in}} = \frac{\text{Παγίδα In} * 0.1 * 24}{\text{Χρόνος Σταθεροποίησης}} = \frac{4.06 \text{ mL} * 0.1 * 24}{30 \text{ min}} = 0.325 \frac{\text{mg}}{\text{min}} \rightarrow$$

$$\frac{O_{3\text{ in}}}{\text{Flowrate}} = \frac{0.325 \frac{\text{mg}}{\text{min}}}{2.36 \frac{\text{L}}{\text{min}}} \rightarrow O_{3\text{ in}} = 0.138 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

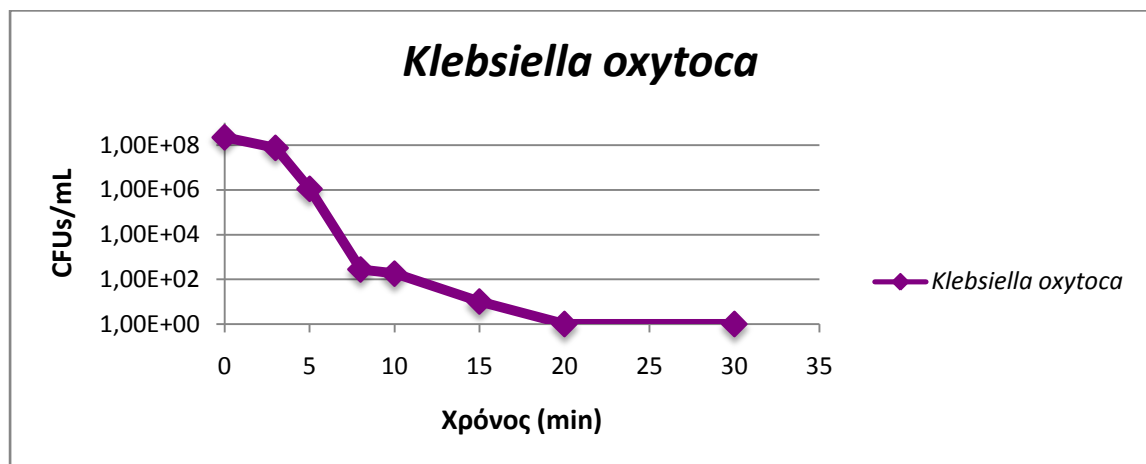
$$O_{3\text{ out}} = \frac{\text{Παγίδα Out} * 0.1 * 24}{\text{Χρόνος Σταθεροποίησης}} = \frac{1.99 \text{ mL} * 0.1 * 24}{30 \text{ min}} = 0.159 \frac{\text{mg}}{\text{min}} \rightarrow$$

$$\frac{O_{3\text{ out}}}{\text{Flowrate}} = \frac{0.159 \frac{\text{mg}}{\text{min}}}{2.36 \frac{\text{L}}{\text{min}}} \rightarrow O_{3\text{ out}} = 0.067 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$\text{Applied } O_3 \text{ dose} = \frac{(O_{3\text{ in}} - O_{3\text{ out}}) * \text{Flow rate} * \text{Χρόνο πειράματος}}{\text{Όγκος Δείγματος}}$$

$$= \frac{(0.138 - 0.067) \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 2.36 \frac{\text{L}}{\text{min}} * 30 \text{ min}}{0.3 \text{ L}}$$

$$\rightarrow \text{Applied } O_3 \text{ dose} = 16.76 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$



Γράφημα 24 Αδρανοποίηση του στελέχους *Klebsiella oxytoca* [out] με δόση όζοντος 16,76mg/L

Μέσω του γραφήματος 24 παρατηρούμε ότι το βακτήριο αδρανοποιείται στο έπακρον στους τελευταίους χρόνους. Ωστόσο, στην προκειμένη περίπτωση ο χρόνος της πλήρους ελάττωσης του βακτηριακού πληθυσμού είναι τα 20 min, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στη μεγαλύτερη δόση όζοντος την οποία είχαμε. Η σταθερά ταχύτητας αδρανοποίησης $k=1,25 \text{ min}^{-1}$.

4.3.3. *Enterococcus faecium*

Χρόνος σταθεροποίησης ρυθμού εφαρμογής όζοντος = 30min

$$\text{Flow rate} = 2,36 \frac{L}{min}$$

$$\text{Παγίδα In} = 3,57 \text{ mL}$$

$$\text{Παγίδα Out} = 2,43 \text{ mL}$$

$$O_{3 \text{ in}} = \frac{\text{Παγίδα In} * 0.1 * 24}{\text{Χρόνος Σταθεροποίησης}} = \frac{3.57 \text{ mL} * 0.1 * 24}{30 \text{ min}} = 0.286 \frac{mg}{min} \rightarrow$$

$$\frac{O_{3 \text{ in}}}{\text{Flowrate}} = \frac{0.286 \frac{mg}{min}}{2.36 \frac{L}{min}} \rightarrow O_{3 \text{ in}} = 0.121 \frac{mg}{L}$$

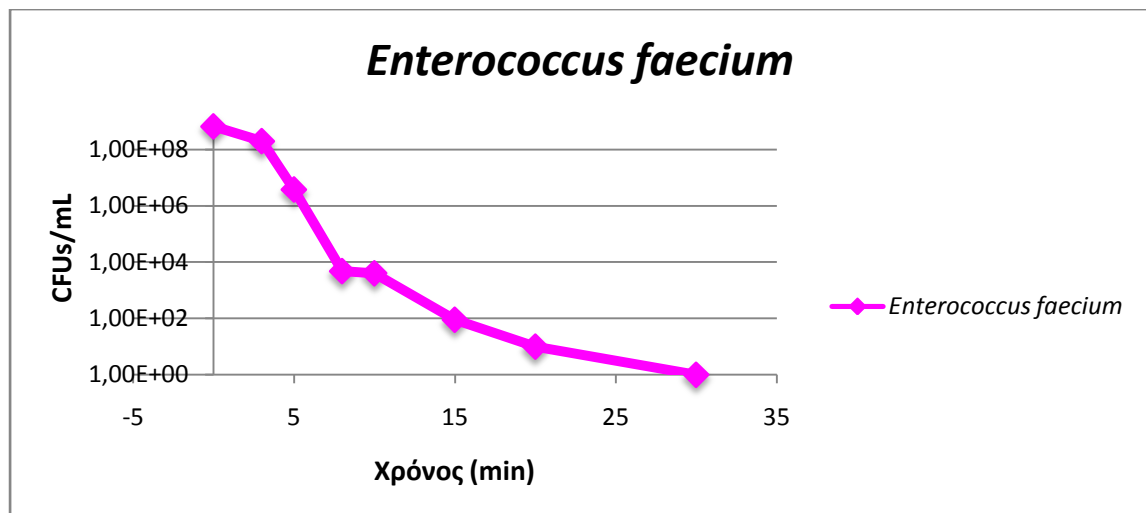
$$O_{3 \text{ out}} = \frac{\text{Παγίδα Out} * 0.1 * 24}{\text{Χρόνος Σταθεροποίησης}} = \frac{2.43 \text{ mL} * 0.1 * 24}{30 \text{ min}} = 0.194 \frac{mg}{min} \rightarrow$$

$$\frac{O_{3 \text{ out}}}{\text{Flowrate}} = \frac{0.194 \frac{mg}{min}}{2.36 \frac{L}{min}} \rightarrow O_{3 \text{ out}} = 0.082 \frac{mg}{L}$$

$$\text{Applied } O_3 \text{ dose} = \frac{(O_{3 \text{ in}} - O_{3 \text{ out}}) * \text{Flow rate} * \text{Χρόνο πειραματος}}{\text{Όγκος Δείγματος}}$$

$$= \frac{(0.121 - 0.082) \frac{mg}{L} * 2.36 \frac{L}{min} * 30 \text{ min}}{0.3 \text{ L}}$$

$$\rightarrow \text{Applied } O_3 \text{ dose} = 9.2 \frac{mg}{L}$$



Γράφημα 25 Αδρανοποίηση του στελέχους *Enterococcus faecium* [out] με δόση όζοντος 9,2mg/L

Μέσω του γραφήματος 25 βλέπουμε την αδρανοποίηση του εντερόκοκκου της εκροής. Το βακτήριο εξουδετερώνεται εξ' ολοκλήρου στα 30 min. Η διαφορά στην ταχύτητα αδρανοποίησης μεταξύ των πειραμάτων μπορεί να οφείλεται στην αρχική συγκέντρωση του εκάστοτε μικροοργανισμού. Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική συγκέντρωση τόσοι περισσότεροι χρόνος απαιτείται για να αδρανοποιηθεί το βακτήριο. Στην προκειμένη περίπτωση λοιπόν, η αρχική συγκέντρωση του μικροβίου ανερχόταν στα $6,6 \times 10^8 \text{ CFUs/mL}$, η οποία είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με τη αρχική συγκέντρωση της *Klebsiella oxytoca* και για αυτό το λόγο ο χρόνος της πλήρους αδρανοποίησης είναι τα 30 και όχι τα 20 min. Σε αντιστοιχία με τα προηγούμενα πειράματα και σε αυτή την περίπτωση η αντίδραση χαρακτηρίζεται ως ψευδοπρώτης τάξης με σταθερά $k=1,02 \text{ min}^{-1}$.

4.3.4. *Rhizobium radiobacter*

Χρόνος σταθεροποίησης ρυθμού εφαρμογής όζοντος = 30min

$$\text{Flow rate} = 2,36 \frac{L}{min}$$

$$\text{Παγίδα In} = 4,03 \text{ mL}$$

$$\text{Παγίδα Out} = 2,41 \text{ mL}$$

$$O_{3 \text{ in}} = \frac{\text{Παγίδα In} * 0.1 * 24}{\text{Χρόνος Σταθεροποίησης}} = \frac{4.03 \text{ mL} * 0.1 * 24}{30 \text{ min}} = 0.322 \frac{mg}{min} \rightarrow$$

$$\frac{O_{3 \text{ in}}}{\text{Flowrate}} = \frac{0.322 \frac{mg}{min}}{2.36 \frac{L}{min}} \rightarrow O_{3 \text{ in}} = 0.137 \frac{mg}{L}$$

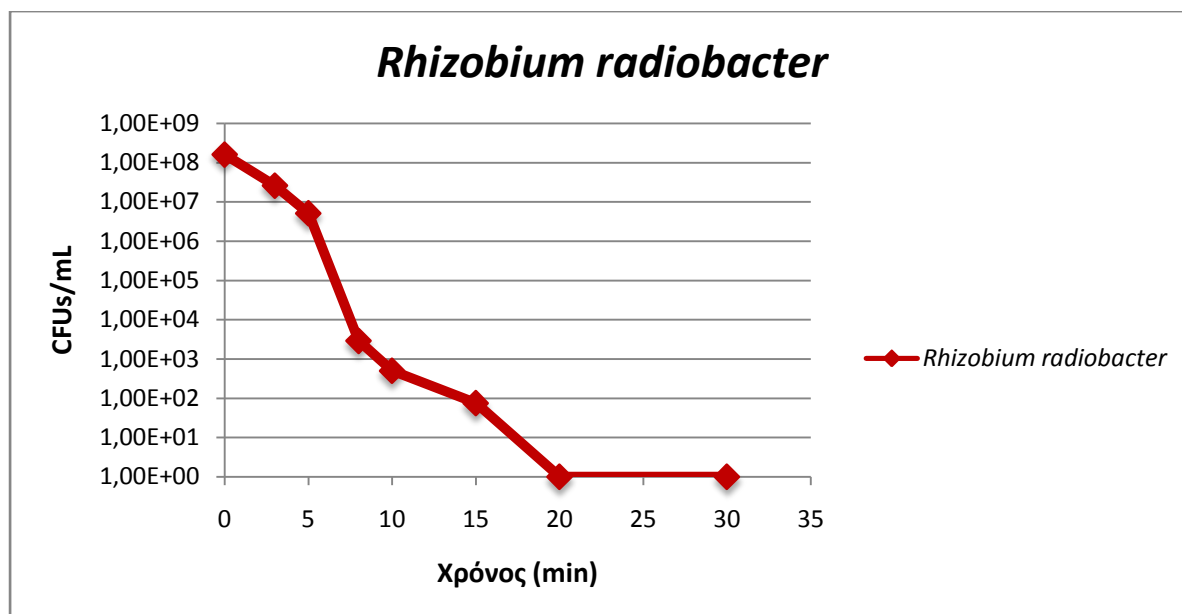
$$O_{3 \text{ out}} = \frac{\text{Παγίδα Out} * 0.1 * 24}{\text{Χρόνος Σταθεροποίησης}} = \frac{2.41 \text{ mL} * 0.1 * 24}{30 \text{ min}} = 0.193 \frac{mg}{min} \rightarrow$$

$$\frac{O_{3 \text{ out}}}{\text{Flowrate}} = \frac{0.193 \frac{mg}{min}}{2.36 \frac{L}{min}} \rightarrow O_{3 \text{ out}} = 0.082 \frac{mg}{L}$$

$$\text{Applied } O_3 \text{ dose} = \frac{(O_{3 \text{ in}} - O_{3 \text{ out}}) * \text{Flow rate} * \text{Χρόνο πειραματος}}{\text{Όγκος Δείγματος}}$$

$$= \frac{(0.136 - 0.082) \frac{mg}{L} * 2.36 \frac{L}{min} * 30 \text{ min}}{0.3 \text{ L}}$$

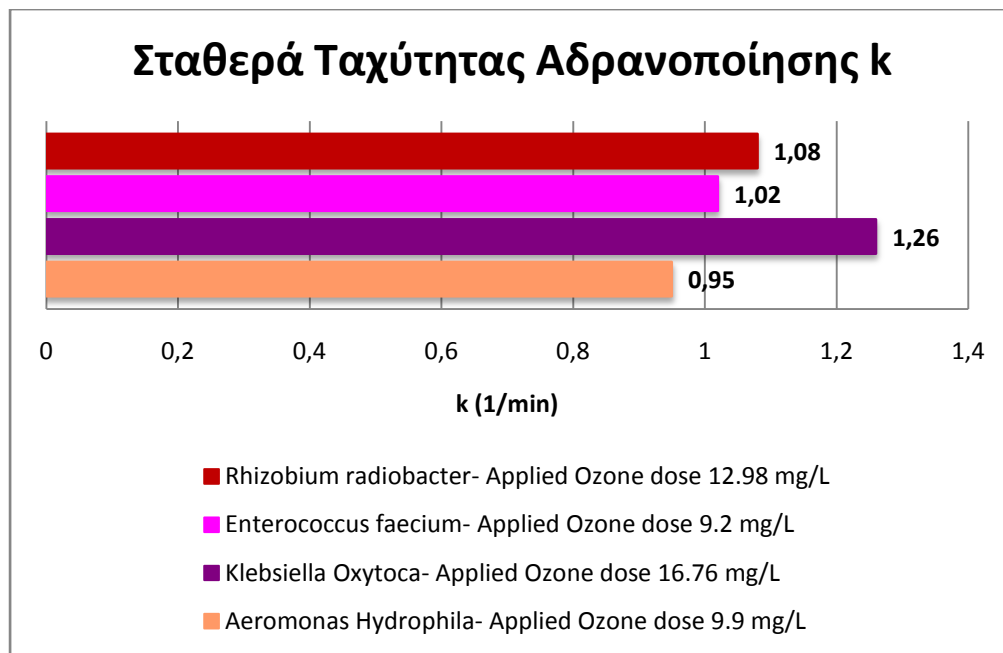
$$\rightarrow \text{Applied } O_3 \text{ dose} = 12.98 \frac{mg}{L}$$



Γράφημα 26 Αδρανοποίηση του στελέχους *Rhizobium radiobacter* [in] με δόση όζοντος 12,98mg/L

Σύμφωνα με το γράφημα 26 το βακτήριο αδρανοποιείται πλήρως στα 20 min. Παρατηρούμε ότι η κλίση της καμπύλης είναι αρκετά μεγάλη γεγονός που υποδηλώνει ότι η αντίδραση πραγματοποιείται με σχετικά γρήγορο ρυθμό. Εν αντιθέσει με τον *Enterococcus faecium* ο χρόνος αδρανοποίησης είναι μικρός λόγω της αρχικής συγκέντρωσης του βακτηρίου στο δείγμα που είναι ίση με $1.6 \cdot 10^8 \text{CFUs/mL}$ και κατά συνέπεια απαιτεί λιγότερο χρόνο για να ελαττωθεί. Η κινητική της αντίδρασης είναι ψευδοπρώτης τάξης με σταθερά ταχύτητας αδρανοποίησης $k=1,08 \text{ min}^{-1}$.

Στο παρακάτω γράφημα 27 παρουσιάζονται συνολικά όλες οι τιμές των σταθερών ταχύτητας αδρανοποίησης k . Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της σταθεράς k , τόσο πιο γρήγορα πραγματοποιείται η αντίδραση. Αντίθετα, μικρή τιμή της σταθεράς k συνεπάγεται και μικρότερη ταχύτητα της εκάστοτε αντίδρασης.



Γράφημα 27 Τιμές σταθεράς ταχύτητας αδρανοποίησης k (min^{-1}) για καθένα από τα τέσσερα εξεταζόμενα βακτήρια

4.3.5. Μέγεθος C^*t

Το γεγονός ότι, και για τα τέσσερα βακτήρια επιτεύχθηκε αδρανοποίηση τους μέσω της οζόνωσης σε ποσοστό 100%, μας δείχνει ότι η απολύμανση ήταν επιτυχής. Ωστόσο, αν θέλαμε να προσδιορίσουμε την ακριβή αποτελεσματικότητα του απολυμαντικού μέσου θα υπολογίσουμε το μέγεθος C^*t όπου:

- **C:** η συγκέντρωση του απολυμαντικού μέσου, δηλαδή η δόση O_3 (mg/L)
- **t:** χρόνος που απαιτείται για την απενεργοποίηση ενός συγκεκριμένου ποσοστού του πληθυσμού.

Για το χρόνο τυπικά χρησιμοποιείται ένα ποσοστό της τάξης του 99% κατά τη σύγκριση C^*t τιμών. Μικρές τιμές του γινομένου C^*t , αντιστοιχούν σε αποτελεσματικότερα απολυμαντικά μέσα.

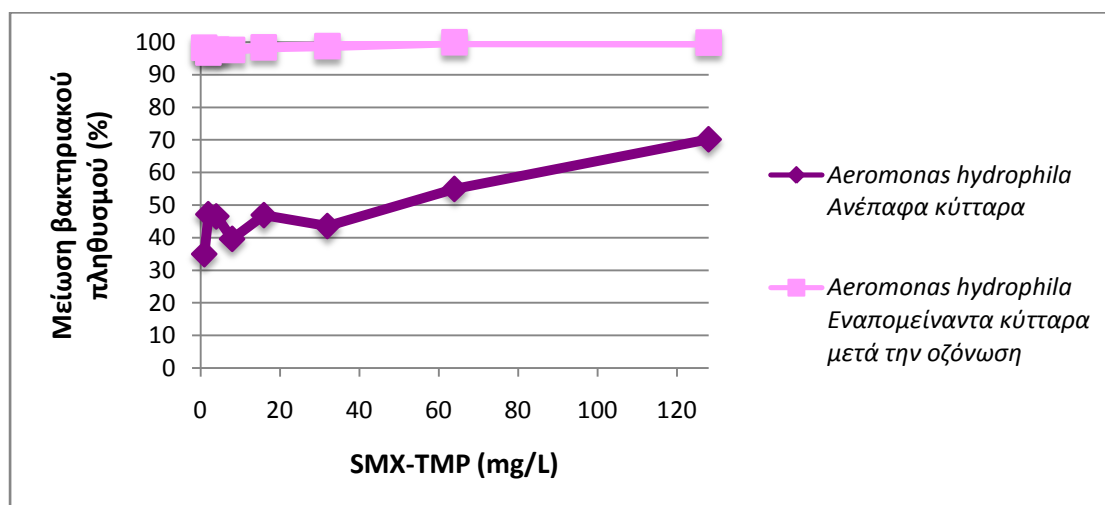
Βακτηριακό στέλεχος	Εφαρμοσμένη δόση O ₃ (mg/L)	Μέγεθος C*t
<i>Aeromonas hydrophila</i>	9,9	29,7
<i>Klebsiella oxytoca</i>	16,76	50,28
<i>Enterococcus faecium</i>	9,2	27,6
<i>Rhizobium radiobacter</i>	12,98	38,94

Πίνακας 7 Τιμές γινομένου C*t για μείωση του 99% του συνόλου των βακτηρίων που υποβλήθηκαν σε οζόνωση για διαφορετικές δόσεις όζοντος, pH=7 και T=25°C (C: δόση όζοντος – mg/L, t: χρόνος – min)

4.4 Έλεγχος μεταβολής του προφίλ ανθεκτικότητας

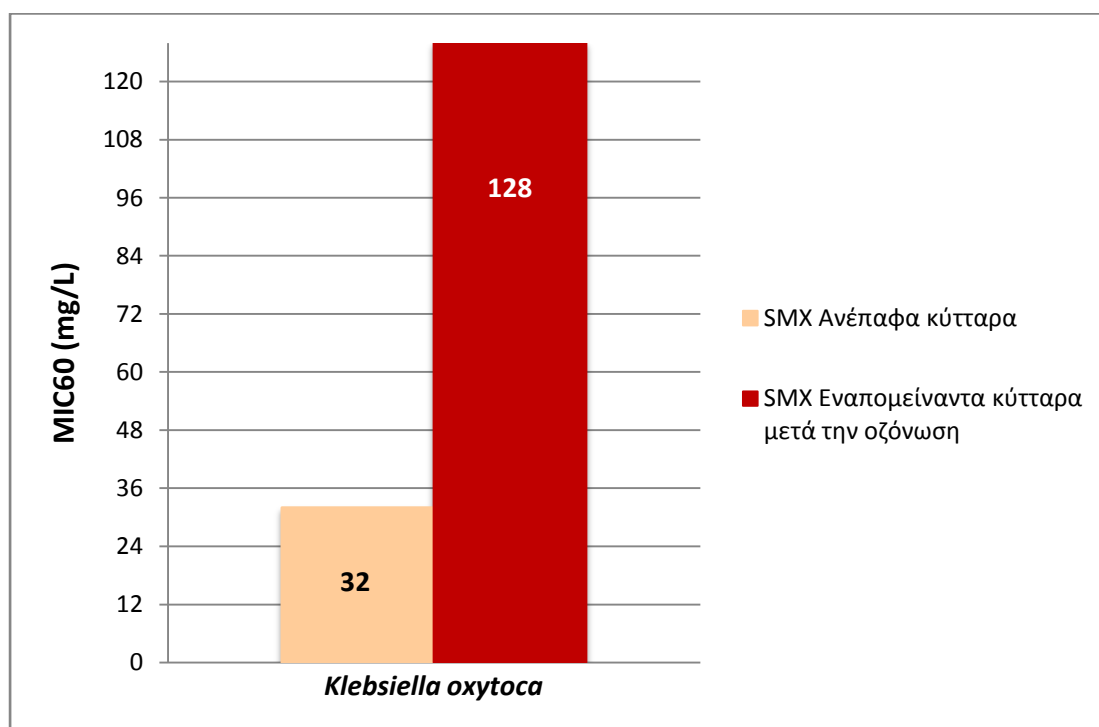
Εν συνεχεία εξετάστηκε η μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας των τεσσάρων αυτών βακτηρίων μετά την υποβολή τους στην διαδικασία της οζόνωσης. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν, έλεγχος της ανθεκτικότητας των εναπομείναντων στελεχών των τελευταίων χρόνων (των 15 ή των 20min) στα αντιβιοτικά σιπροφλοξασίνη, τετρακυκλίνη και σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη με τη μέθοδο της Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC).

4.4.1 Sulfamethoxazole-Trimethoprim



Γράφημα 28 Ποσοστιαία μείωση του *Aeromonas hydrophila* σε συνάρτηση με τη δόση του SMX-TMP

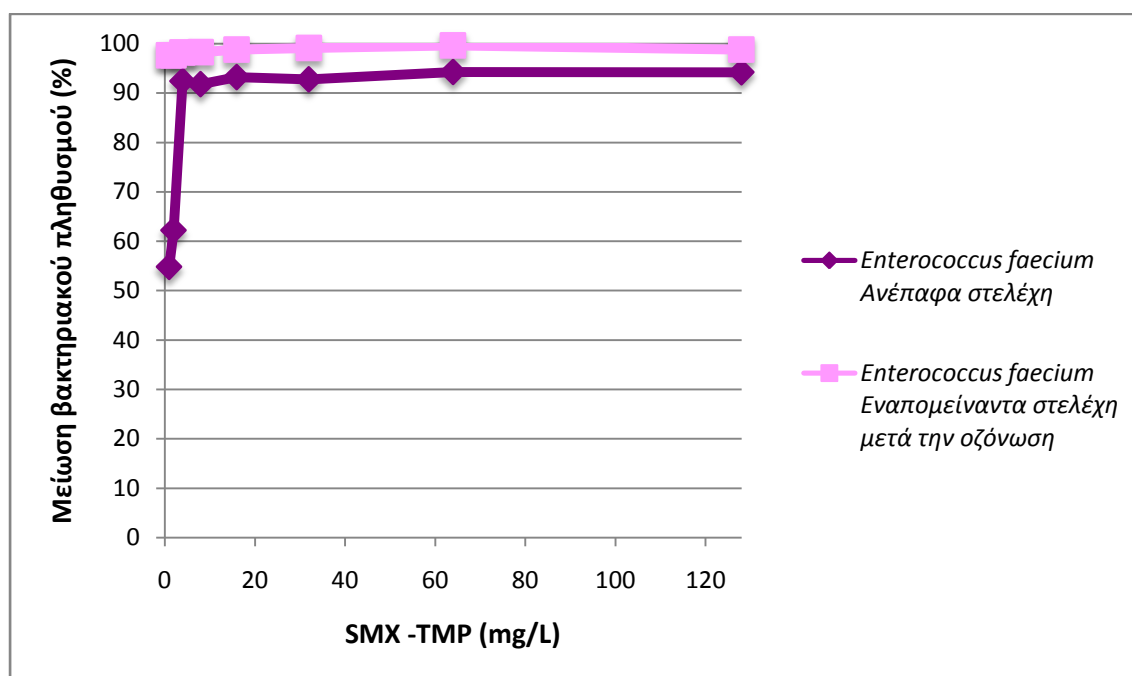
Σύμφωνα με το γράφημα 28 η οζόνωση φαίνεται να έχει θετική επίδραση ως προς το βακτήριο *Aeromonas hydrophila*. Ελέγχοντας την ανθεκτικότητα των εναπομείναντων κυττάρων ως προς τη σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, εκείνη φαίνεται να είναι ιδιαίτερα χαμηλή, αφού το μικρόβιο αδρανοποιείται πλήρως ακόμα και στη συγκέντρωση του 1 mg/L, κάτι το οποίο δεν συνέβαινε στα ανέπαφα κύτταρα.



Γράφημα 29 Μέση τιμή της MIC₆₀ για την *Klebsiella oxytoca* στο αντιβιοτικό SMX-TMP

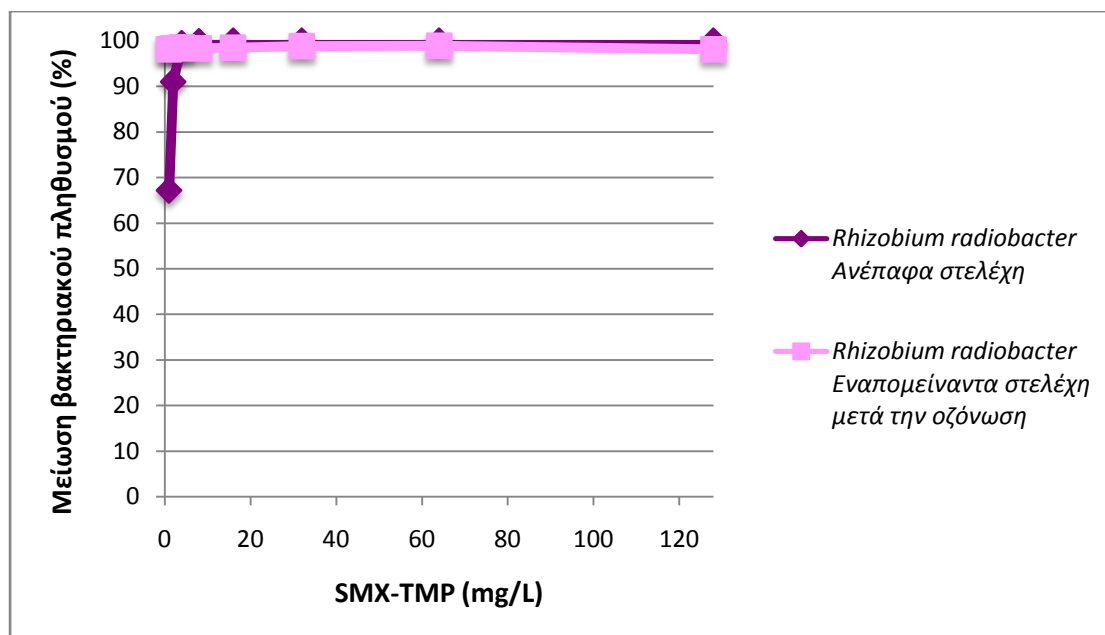
Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρούνται στην περίπτωση της *Klebsiella oxytoca*. Όπως φαίνεται από το γράφημα 29 το βακτήριο μετά την οζόνωση απέκτησε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην αντιβιοτική ουσία. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι στην υψηλότερη δόση των 128 mg/L επήλθε μείωση του συνόλου του βακτηριακού πληθυσμού κατά 48,9%, ενώ στην αντίστοιχη δόση για τα ανέπαφα κύτταρα η ποσοστιαία ελάττωση ανερχόταν στο 99,16%. Προκύπτει

ότι το συγκεκριμένο βακτήριο προσαρμόζεται πολύ καλά σε αντίξοες συνθήκες και η ύπαρξη του στα λύματα αποτελεί σημαντικό πρόβλημα.



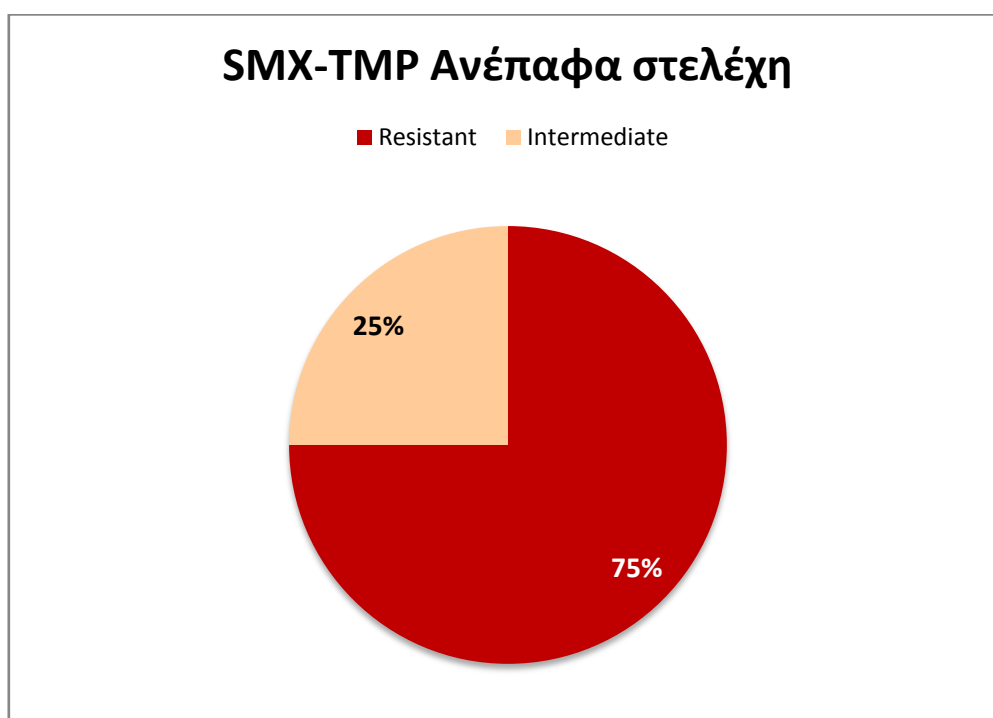
Γράφημα 30 Ποσοστιαία μείωση του *Enterococcus faecium* σε συνάρτηση με τη δόση του SMX-TMP

Παρατηρώντας το γράφημα 30 φαίνεται πως η οζόνωση ενέργησε θετικά και στην περίπτωση του εντερόκοκκου, καθιστώντας τον από ανθεκτικό, σε ένα αμιγώς ευαίσθητο βακτήριο απέναντι στη σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη. Η ελάττωση του βακτηριακού πληθυσμού ήταν απόλυτα επιτυχής στα εναπομείναντα στελέχη φτάνοντας το 100% ακόμα και στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις της ουσίας.

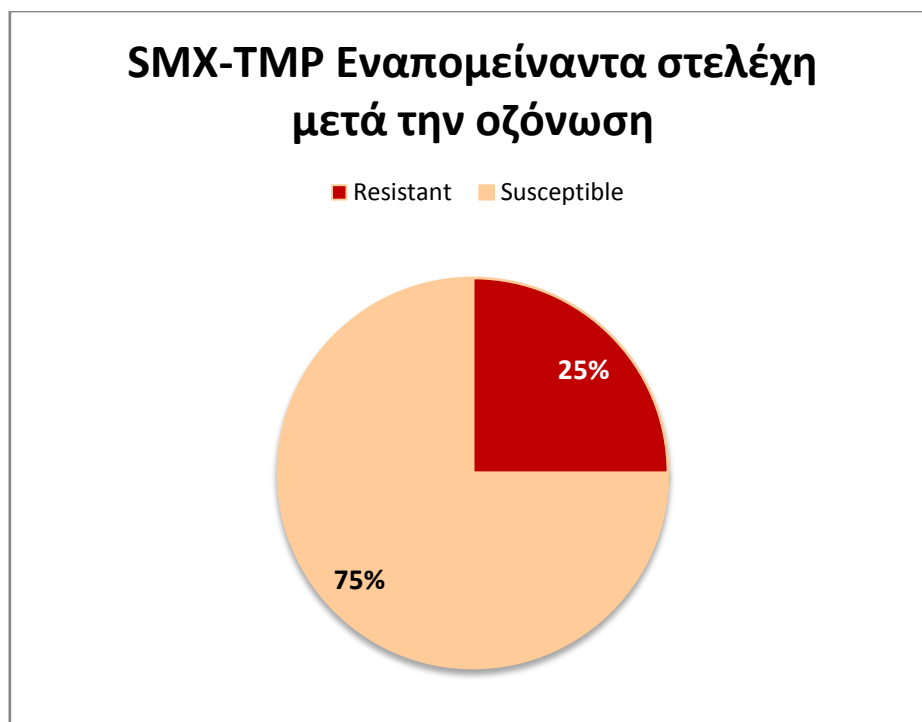


Γράφημα 31 Ποσοστιαία μείωση του *Rhizobium radiobacter* σε συνάρτηση με τη δόση του SMX-TMP

Παρατηρώντας το γράφημα 31, βλέπουμε ότι στην περίπτωση του *Rhizobium radiobacter*, που ήταν ενδιάμεσο στέλεχος ως προς τη σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη, τελικά μετά την απολύμανση γίνεται ευαίσθητο ως προς αυτή με μείωση πληθυσμού στο μέγιστο βαθμό.



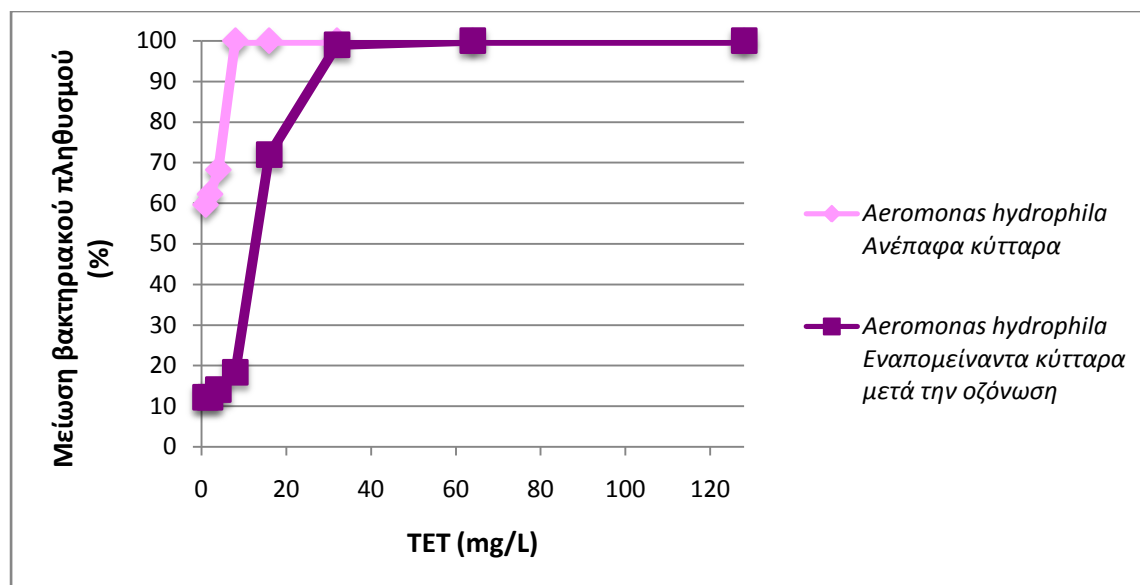
Γράφημα 32 Ποσοστό ανθεκτικών- ενδιάμεσων στελεχών για ανέπαφα κύτταρα στο SMX-TMP



Γράφημα 33 Ποσοστό ανθεκτικών-ευαίσθητων στελεχών για εναπομείναντα στελέχη στο SMX-TMP

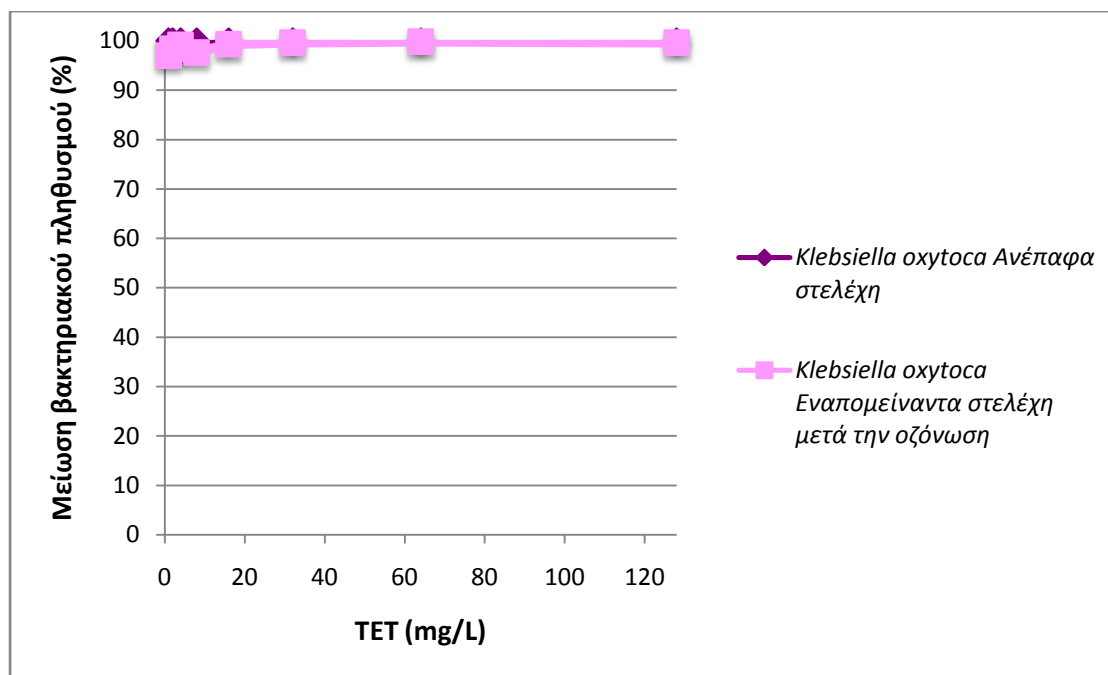
Στα παραπάνω δύο γραφήματα φαίνεται συγκριτικά η μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας των τεσσάρων βακτηρίων που επιλέξαμε ως προς τη σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη. Θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι η επίδραση της οζόνωσης στην προκειμένη περίπτωση είχε κατά την πλειονότητα θετικά αποτελέσματα.

4.4.2 Tetracycline



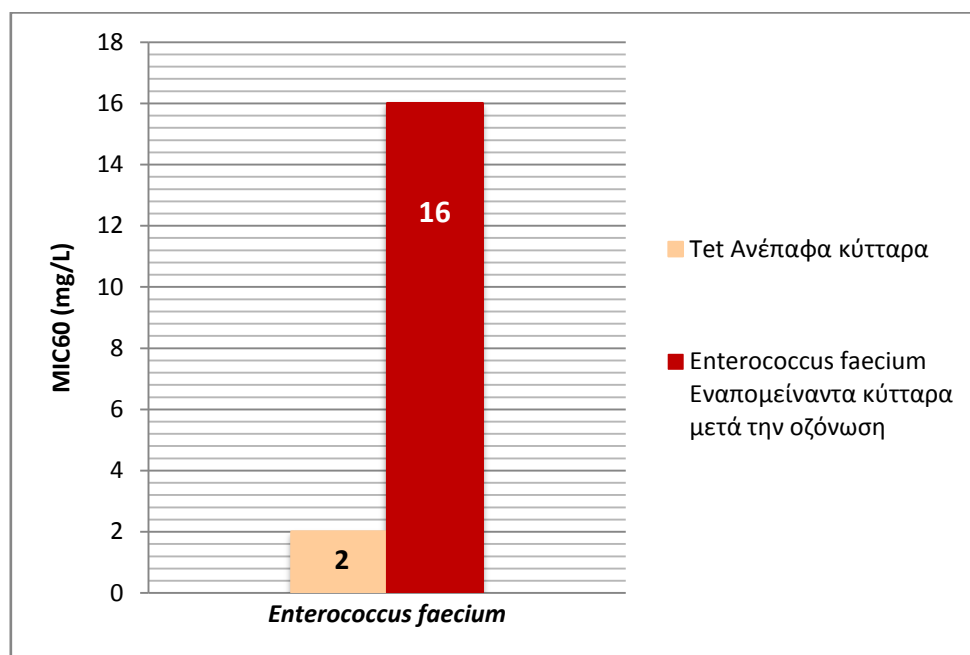
Γράφημα 34 Ποσοστιαία μείωση του *Aeromonas hydrophila* σε συνάρτηση με τη δόση της Tetracycline

Όπως φαίνεται από το γράφημα 34, τα κύτταρα που απέμειναν μετά την πειραματική διαδικασία της οζόνωσης είναι ανθεκτικά ως προς την τετρακυκλίνη. Ειδικά, βλέπουμε ότι τα το βακτήριο ήταν ενδιάμεσο ως προς το αντιβιοτικό, ενώ τα εναπομείναντα στελέχη του φαίνεται να αντιστέκονται πολύ περισσότερο στη δράση της ουσίας, καθιστώντας το ένα αμιγώς ανθεκτικό βακτήριο. Η ελάχιστη δόση για να επιτευχθεί μείωση μεγαλύτερη ή ίση του 60% του βακτηριακού συνόλου στα ανέπαφα κύτταρα ήταν το 1 mg/L (59,62%), εν αντιθέσει με τα στελέχη που επιβίωσαν μετά την απολύμανση, όπου η δόση ανέρχεται στα 8 mg/L (18,34%).



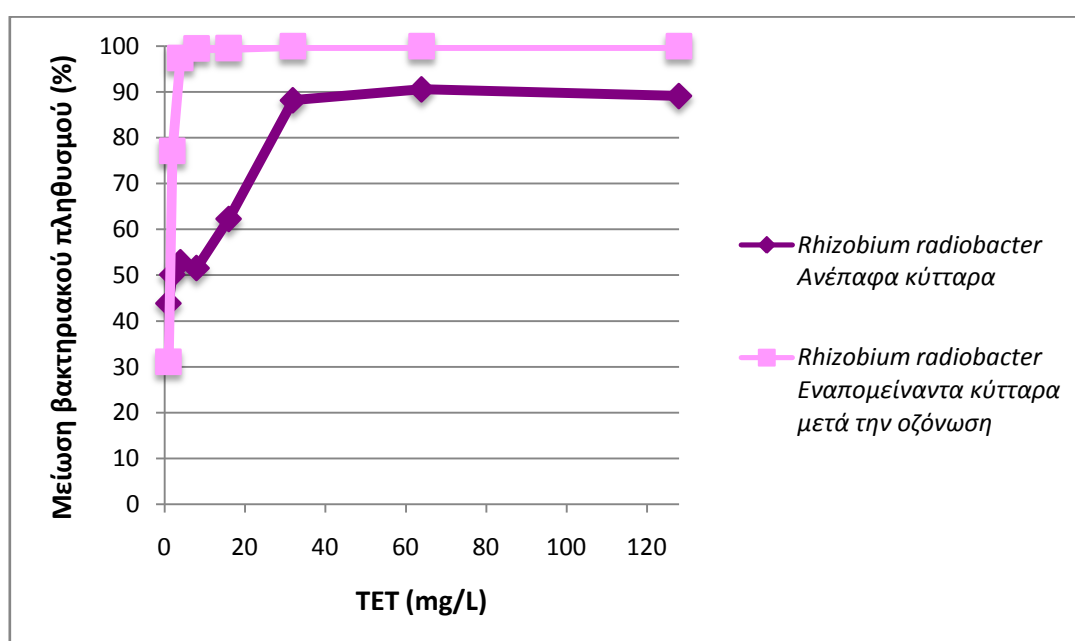
Γράφημα 35 Ποσοστιαία μείωση της *Klebsiella oxytoca* σε συνάρτηση με τη δόση της Tetracycline

Με βάση το παραπάνω γράφημα γίνεται αντιληπτό ότι στην προκειμένη περίπτωση η οζόνωση δεν επηρέασε καθόλου το προφίλ της *Klebsiella oxytoca*, η οποία είναι ευαίσθητη ως προς την τετρακυκλίνη πριν και μετά την απολύμανση.



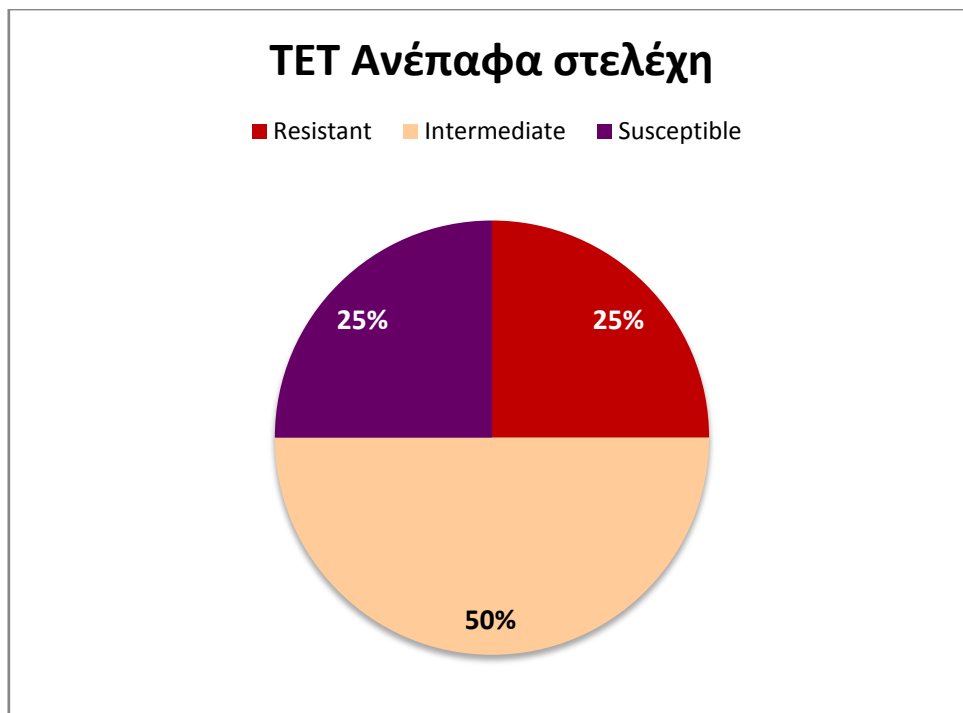
Γράφημα 36 Μέση τιμή της MIC₆₀ για τον *Enterococcus faecium* στο αντιβιοτικό Tetracycline

Στην περίπτωση του εντερόκοκκου, τα στελέχη που απέμειναν μετά την οζόνωση είναι πολύ ανθεκτικά απέναντι στην τετρακυκλίνη. Όπως φαίνεται και από το γράφημα 36 η MIC₆₀ για τα εν λόγω κύτταρα ισούται με 16mg/L, δηλαδή οκταπλάσια ποσότητα σε σχέση με αυτή των ανέπαφων στελεχών (2mg/L). Παρ' όλο που ο εντερόκοκκος δεν είναι ικανός να σχηματίσει σπόρια, είναι ανεκτικός σε ένα ευρύ φάσμα ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών όπως είναι και η υψηλή δόση όζοντος.

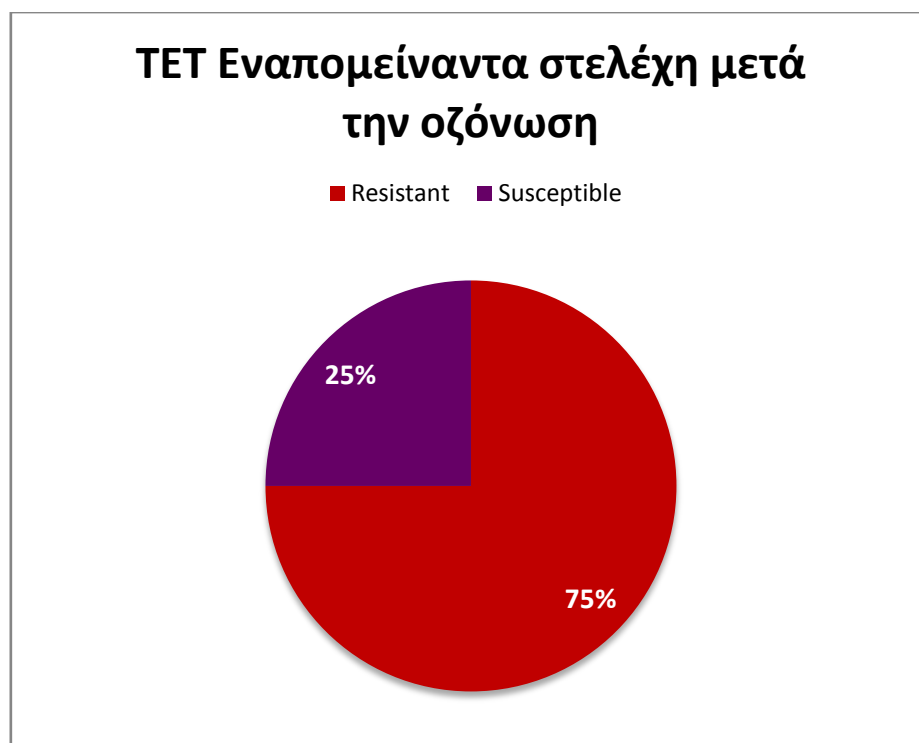


Γράφημα 37 Ποσοστιαία μείωση του *Rhizobium radiobacter* σε συνάρτηση με τη δόση της Tetracycline

Σύμφωνα με το γράφημα 37, το βακτήριο μετά την οζόνωση παραμένει ανθεκτικό ως προς την τετρακυκλίνη. Μολοταύτα, παρατηρούμε ότι σε αντίθεση με τα ανέπαφα, τα εναπομείναντα στελέχη μειώνονται σε ποσοστό 100% μέχρι και τη συγκέντρωση των 8 mg/L, γεγονός που δείχνει ότι μέσω της απολύμανσης απομακρύνθηκε ένα σημαντικό, πλην, όμως όχι το ολικό μέρος των ανθεκτικών κυττάρων.



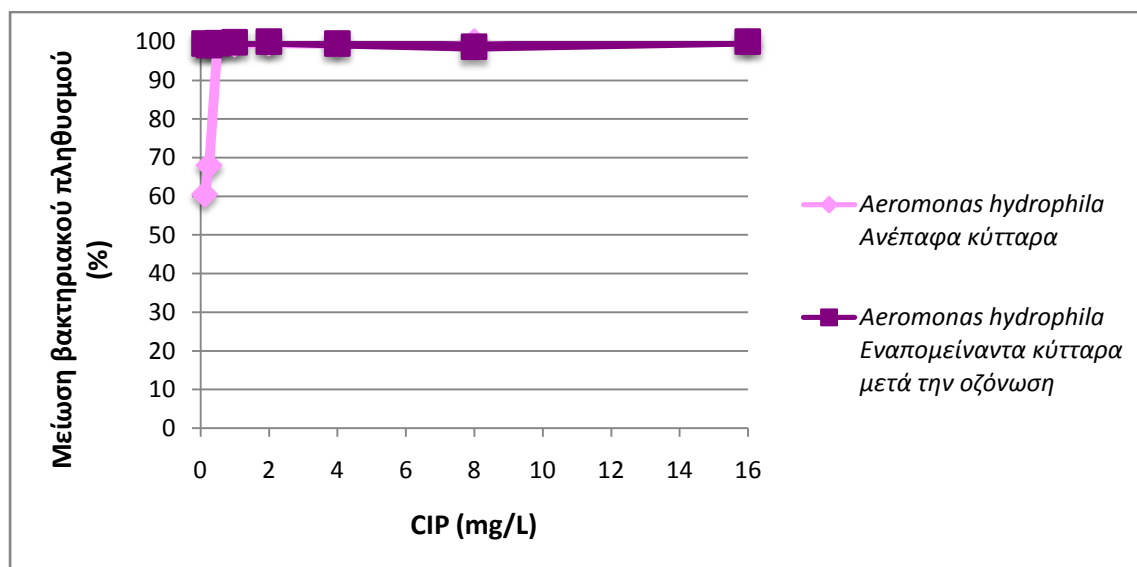
Γράφημα 38 Ποσοστό ανθεκτικών- ενδιάμεσων-ευαίσθητων στελεχών για ανέπαφα κύτταρα στην Tetracycline



Γράφημα 39 Ποσοστό ανθεκτικών-ευαίσθητων στελεχών για εναπομείναντα στελέχη στην Tetracycline

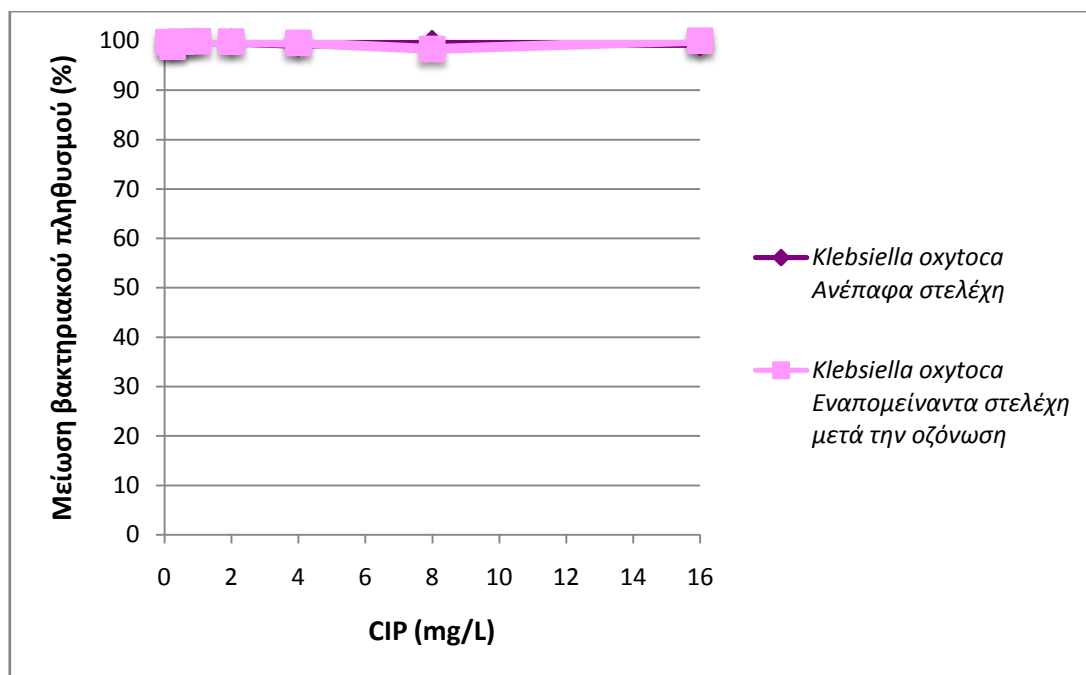
Μέσω των γραφημάτων 38 και 39 παρατηρούμε ότι κατά την οζόνωση τα στελέχη που επιβίωσαν ήταν όλα, με εξαίρεση αυτά της *Klebsiella oxytoca*, ανθεκτικά ως προς τον αντιβιοτικό παράγοντα τετρακυκλίνη. Γενικά λοιπόν θα μπορούσαμε να πούμε ότι στην προκειμένη περίπτωση η απολύμανση είχε αρνητική επίδραση στη μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών.

4.4.3Ciprofloxacin



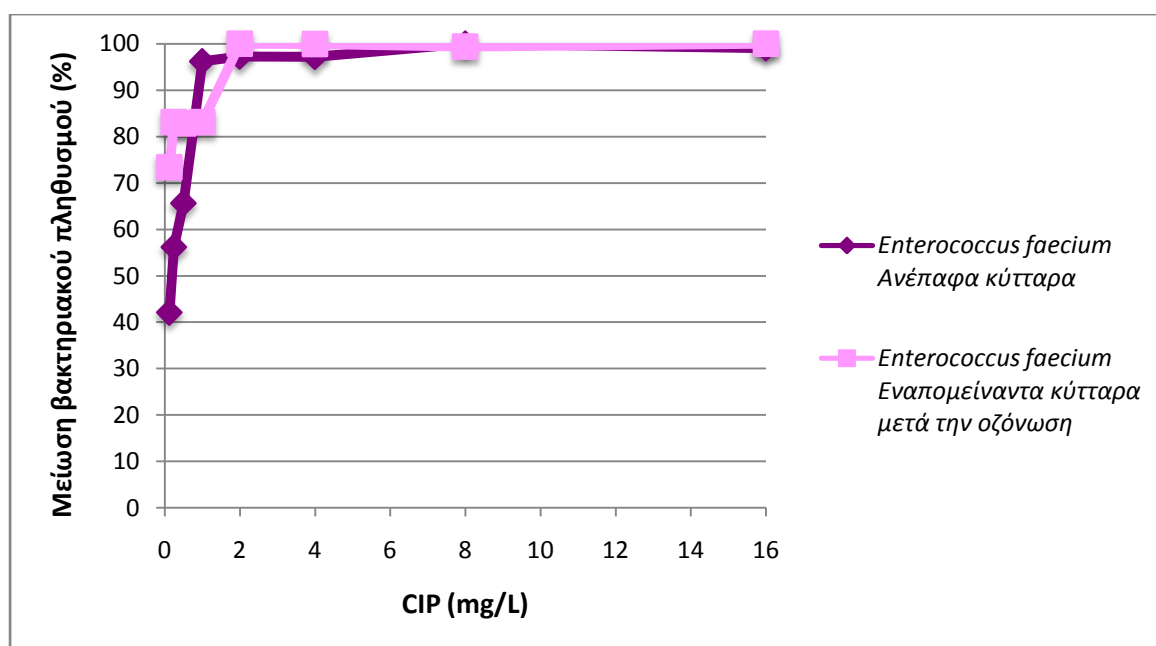
Γράφημα 40 Ποσοστιαία μείωση του *Aeromonas hydrophila* σε συνάρτηση με τη δόση της Ciprofloxacin

Τα αποτελέσματα, όπως αυτά προκύπτουν από το γράφημα 40, είναι ευέλπιδα, καθώς αν και το βακτήριο *Aeromonas hydrophila* ήταν εξ' αρχής ευαίσθητο ως προς τη δράση της σιπροφλοξασίνης, στα εναπομείναντα κύτταρα του παρατηρούμε την θεμιτή μείωση του πληθυσμού του στο μέγιστο δυνατό (100%) σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που εξετάστηκε (16-0,125 mg/L).



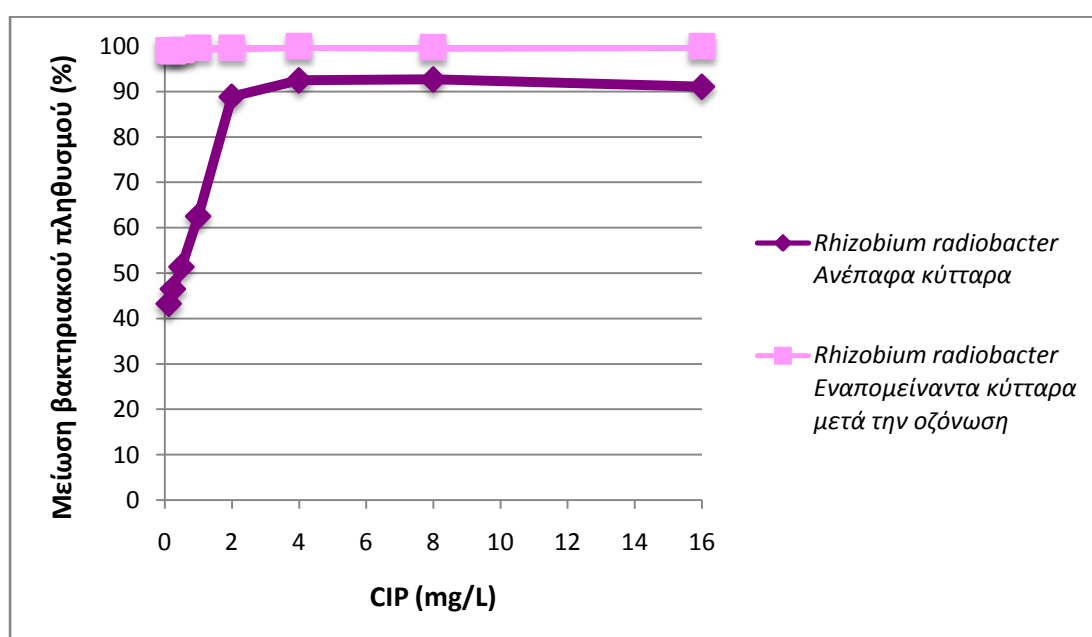
Γράφημα 41 Ποσοστιαία μείωση της *Klebsiella oxytoca* σε συνάρτηση με τη δόση της Ciprofloxacin

Όμοια με την περίπτωση της τετρακυκλίνης, μέσω του διαγράμματος 41 βλέπουμε ότι το εντεροβακτήριο, παρέμεινε ευαίσθητο ως προς το αντιβιοτικό σιπροφλοξασίνη και μετά την απολύμανση.



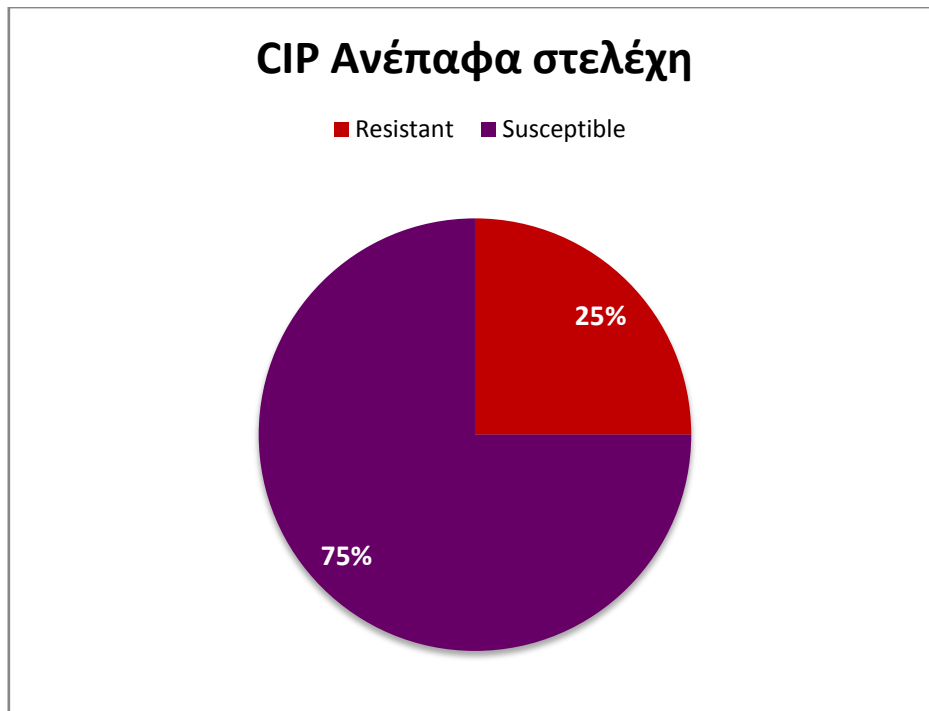
Γράφημα 42 Ποσοστιαία μείωση του *Enterococcus faecium* σε συνάρτηση με τη δόση της Ciprofloxacin

Οι εντερόκοκκοι παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα εγγενούς ανθεκτικότητας απέναντι στις κινολόνες, ωστόσο μπορούν να αποκτήσουν υψηλών-επιπέδων αντοχή μέσω διαφόρων μηχανισμών (Miller et al. 2014), κάτι το οποίο παρατηρείται και στο γράφημα 42, αφού στα ανέπαφα κύτταρα παρατηρείται μείωση μέχρι και 42,1% του συνολικού βακτηριακού πληθυσμού. Ωστόσο, τα στελέχη που επιζούν μετά την οζόνωση φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα συγκριτικά με τα ανέγγιχτα με μέγιστη μείωση τους μέχρι και τα 2 mg/L.

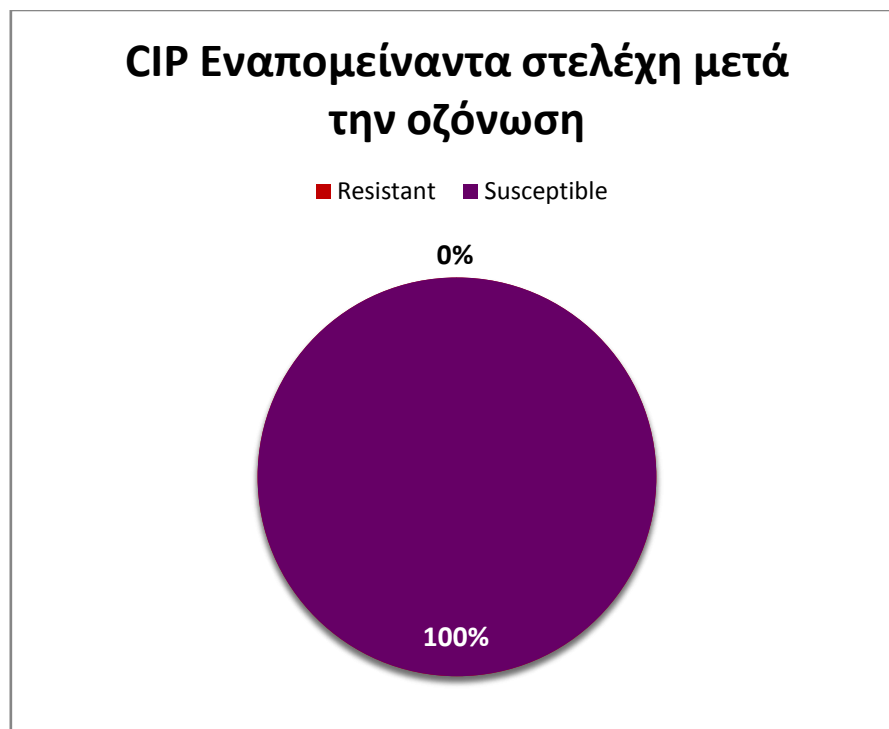


Γράφημα 43 Ποσοστιαία μείωση του *Rhizobium radiobacter* σε συνάρτηση με τη δόση της Ciprofloxacin

Εξαιρετικά ευοίωνα, φαίνεται να είναι τα αποτελέσματα της οζόνωσης στην περίπτωση του *Rhizobium radiobacter*. Αρχικά το βακτήριο δεν αδρανοποιούταν πλήρως φτάνοντας στην υψηλότερη συγκέντρωση των 16 mg/L, το ποσοστό μείωσης της τάξης του 91,07% και το αντίστοιχο ποσοστό του 60% σε δόση ίση με 0,5mg/L. Αντίθετα, κατά την απολύμανση απομακρύνθηκαν όλα τα ανθεκτικά στελέχη του μικροβίου, επιφέροντας με αυτόν τον τρόπο μείωση έως και 100% σε όλο το εύρος των εξεταζόμενων δόσεων της σιπροφλοξασίνης.

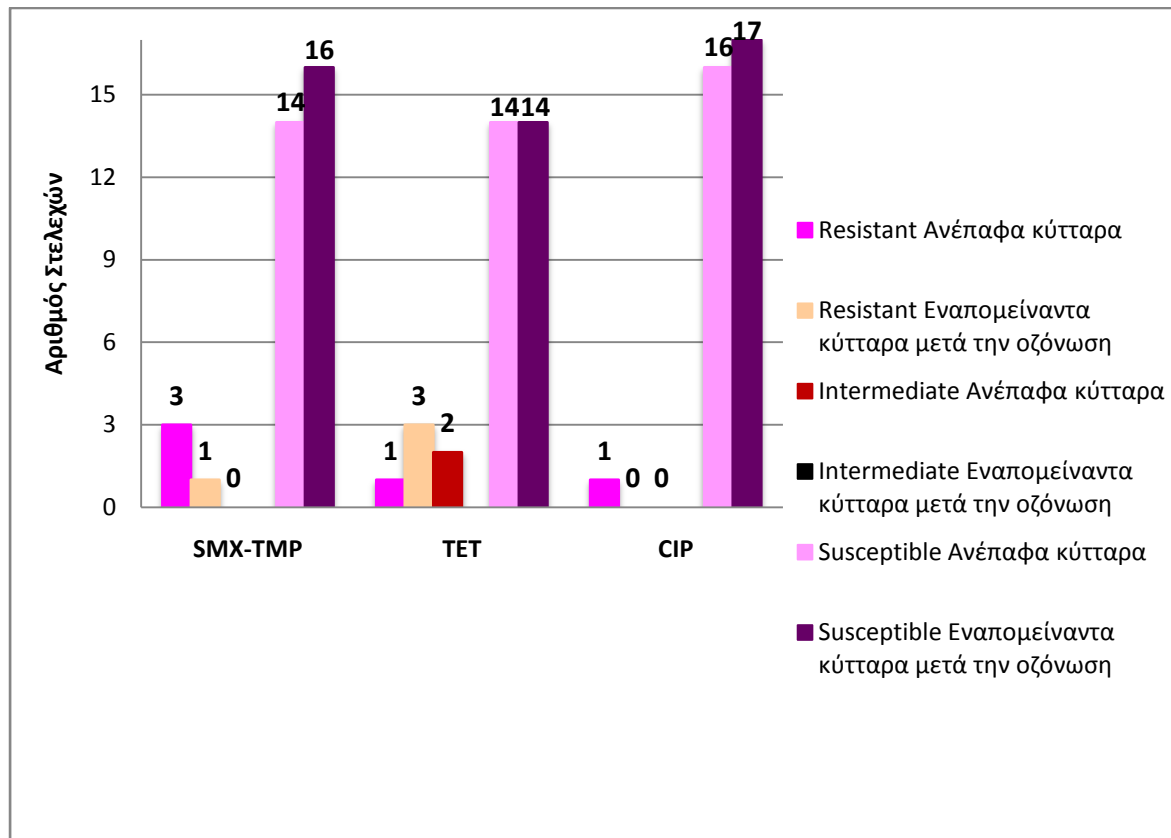


Γράφημα 44 Ποσοστό ανθεκτικών- ευαίσθητων στελεχών για ανέπαφα κύτταρα στην Ciprofloxacin



Γράφημα 44 Ποσοστό ανθεκτικών-ευαίσθητων στελεχών για εναπομείναντα στελέχη στην Ciprofloxacin

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω γραφήματα η απολύμανση είχε πολύ θετική επίδραση στην περίπτωση της σιπροφλοξασίνης, αφού απομάκρυνε όλα τα στελέχη που χαρακτηρίζονταν από αντοχή απέναντι στην αντιβιοτική ουσία.



Γράφημα 45 Συγκεντρικά αποτελέσματα του βαθμού ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών ανά αντιβιοτικό παράγοντα πριν και μετά την οζόνωση

Τέλος, στο παραπάνω γράφημα αναπαριστάται το προφίλ ανθεκτικότητας των 17 στελεχών που εξετάστηκαν ως προς τα τρία αντιβιοτικά, στα ανέπαφα και στα εναπομείναντα μετά την οζόνωση στελέχη. Την αποτελεσματικότερη συμβολή της απολύμανσης την εντοπίζουμε στην περίπτωση της σιπροφλοξασίνης, όπου το στέλεχος που ήταν ανθεκτικό σε αυτή αδρανοποιήθηκε σε τέτοιο βαθμό ώστε τελικά, να παρατηρείται ολική ευαισθησία του συνόλου των μικροοργανισμών απέναντι στη κινολόνη. Αρκετά τελεσφόρα, είναι και τα πειράματα για τη σουλφαμεθοξαζόλη-

τριμεθοπρίμη όπου η απομάκρυνση εκείνων των στελεχών που αντιστέκονταν στην δράση της ουσίας επέφερε την ύπαρξη μόνο ενός εκ των 17 βακτηρίων που είναι εν τέλει ανθεκτικό στην ουσία. Κλείνοντας, για την τετρακυκλίνη φαίνεται πως τα βακτήρια που επέζησαν κατά την απολύμανση, αναπτύσσουν τέτοιους μηχανισμούς αντοχής, ώστε να καθίστανται ανθεκτικά απέναντι στον αντιβιοτικό παράγοντα, ακόμα και στην περίπτωση όπου ως ανέπαφα στελέχη ήταν πιο ευαίσθητα ως προς αυτόν.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτουν κάποια συμπεράσματα τα οποία παρατίθενται παρακάτω.

Μολονότι, η οζόνωση ως μία συμβατική μέθοδος απολύμανσης φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική, η ύπαρξη ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά (ARB) και γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά (ARGs) ,απαιτούν την εύρεση πιο ισχυρών μεθόδων απολύμανσης (Oh et al. 2014). Όσον αφορά στον έλεγχο ανθεκτικότητας των βακτηρίων στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, μεγαλύτερη ανθεκτικότητα ανά αντιβιοτικό στα ανέπαφα κύτταρα συναντήσαμε στην ουσία Σουλφαμεθοξαζόλη-Τριμεθοπρίμη, με τρία ανθεκτικά βακτήρια απέναντι στην ουσία έναντι της Τετρακυκλίνης και της Σιπροφλοξασίνης οι οποίες είχαν από ένα ανθεκτικό η κάθε μία αντίστοιχα. Η αλόγιστη χρήση λοιπόν του SMX-TMP από τον άνθρωπο, ως ένα αρκετά ισχυρό αντιβιοτικό ευρέως φάσματος και νέας γενιάς, οδήγησαν στην αθέμιτη επίκτητη μικροβιακή αντοχή πολλαπλών οικογενειών όπως είναι οι *Enterobacteriaceae*, οι *Enterococcaceae* και οι *Aeromonadaceae*.

Κατά την πειραματική διαδικασία της απολύμανσης οι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν προέρχονταν τόσο από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας όσο και από την εισροή και ανήκαν σε τέσσερις διαφορετικές οικογένειες με σκοπό να ελέγξουμε πόσο αποτελεσματική είναι η οζόνωση για κάθε περίπτωση. Τα στελέχη που αδρανοποιήθηκαν γρηγορότερα κατά την απολύμανση ήταν η *Klebsiella oxytoca* προερχόμενη από την εκροή, με εφαρμοσμένη δόση όζοντος 16,76 mg/L και το *Rhizobium radiobacter* προερχόμενο από την εισροή με εφαρμοσμένη δόση όζοντος 12,98 mg/L. Ο αρχικός μικρός τους πληθυσμός, των $3,6 \cdot 10^8 \text{CFU}_s/\text{mL}$ και $1,6 \cdot 10^8 \text{CFU}_s/\text{mL}$ αντίστοιχα, καθώς και οι μεγάλες δόσεις όζοντος στην οποίες υποβλήθηκαν, υπήρξαν καθοριστικοί παράγοντες για την ταχύτητα με την οποία αδρανοποιήθηκαν. Συνεπώς, υπάρχει άμεση σχέση ανάμεσα στην αρχική συγκέντρωση του βακτηρίου με το χρόνο εξάλειψής του. Η οζόνωση επέδρασε έντονα στη μεταβολή του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων. Γενικά, η διεξαγωγή ενός ξεκάθολου πορίσματος για το αν η επίδραση αυτή είναι αμιγώς θετική ή αρνητική, βρίσκεται υπό συζήτηση. Η φύση των αντιβιοτικών και η φύση των διαφόρων μικροοργανισμών δυσκολεύουν τη σαφή απάντηση στο ερώτημα. Σε γενικές γραμμές παρατηρήθηκε ότι, η Τετρακυκλίνη υπήρξε αναποτελεσματική ως αντιβιοτική ουσία απέναντι στα εναπομείναντα στελέχη που προήλθαν από την οζόνωση, τα οποία ήταν και τα πιο ανθεκτικά. Συμπερασματικά λοιπόν, η ανακάλυψη των τετρακυκλινών πριν από 70 χρόνια και η υπέρμετρη χρήση τους μέχρι σήμερα (Santiago-Rodriguez et al. 2018), την καθιστά μη αποτελεσματικό αντιβιοτικό ενάντια σε πληθώρα μικροβίων που βρίσκονται διάσπαρτα στο περιβάλλον. Επιπλέον, όσον αφορά το μοναδικό βακτήριο που προερχόταν από την εισροή, το *Rhizobium radiobacter* φαίνεται να είναι αυτό που μετά την απολύμανση, υπήρξε και το λιγότερο ανθεκτικό απέναντι και στα τρία αντιβιοτικά. Αντιλαμβανόμαστε λοιπόν ότι τα υπόλοιπα τρία βακτήρια, που επιβίωσαν μετά τη δευτεροβάθμια

επεξεργασία ήταν πιο ανθεκτικά σε σχέση με αυτό. Κλείνοντας, μπορούμε με βεβαιότητα να πούμε ότι ο κίνδυνος για την εξάπλωση των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά, δύναται να επηρεάσει σημαντικά το προφίλ της συγκέντρωσης των επιφανειακών υδάτων στα οποία απορρέονται τα επεξεργασμένα λύματα. Μέσω ενός φαύλου κύκλου λοιπόν, απειλείται τόσο το περιβάλλον όσο και κατ' επέκταση η ανθρώπινη υγεία, δίχως να υπάρχει δραστικός τρόπος αντιμετώπισης.

7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Προκειμένου να υπάρξει μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα θα ήταν θεμιτό να πραγματοποιηθούν οι παρακάτω προτάσεις.

- Έλεγχος διαφορετικού εύρους συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών ουσιών.
- Έλεγχος διαφορετικών αντιβιοτικών ουσιών.
- Αδρανοποίηση των ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά με χρήση διαφορετικών μεθόδων απολύμανσης όπως είναι η ακτινοβολία UV και η φωτοκατάλυση
- Συνδυασμός της οζόνωσης με διάφορες τεχνικές φιλτραρίσματος όπως είναι η αργή διήθηση μέσω άμμου και ο ενεργός άνθρακας.
- Ανίχνευση των γονιδίων ανθεκτικότητας σε κινολόνες, σουλφοναμίδες και τετρακυκλίνες.

8.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baquero F, Martínez J-L, Cantón R (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 19:260–265 . doi: 10.1016/J.COPBIO.2008.05.006
- Barenfanger, Joan, et al. “Microbiology: Improving Antimicrobial Susceptibility Testing.” *Laboratory Medicine*, vol. 29, no. 1, Jan. 1998, pp. 45–52, <http://dx.doi.org/10.1093/labmed/29.1.45>.
- Ben, Weiwei, et al. “Distribution of Antibiotic Resistance in the Effluents of Ten Municipal Wastewater Treatment Plants in China and the Effect of Treatment Processes.” *Chemosphere*, vol. 172, Pergamon, Apr. 2017, pp. 392–98, doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.01.041.
- Bouki, Chryssa, et al. “Detection and Fate of Antibiotic Resistant Bacteria in Wastewater Treatment Plants: A Review.” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 91, Academic Press, May 2013, pp. 1–9, doi:10.1016/J.ECOENV.2013.01.016.
- Brady, Michael T., and Mario J. Marcon. “Less Commonly Encountered Nonenteric Gram-Negative Bacilli.” *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*, Content Repository Only!, Jan. 2012, p. 832–835.e4, doi:10.1016/B978-1-4377-2702-9.00153-7.
- Costanzo, Simon D., et al. “Ecosystem Response to Antibiotics Entering the Aquatic Environment.” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 51, no. 1–4, Pergamon, Jan. 2005, pp. 218–23, doi:10.1016/J.MARPOLBUL.2004.10.038.
- Crider, S. R., and S. D. Colby. “Susceptibility of Enterococci to Trimethoprim and Trimethoprim-Sulfamethoxazole.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 27, no. 1, Jan. 1985, pp. 71–75, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC176207/>.
- Czekalski, Nadine, et al. “Inactivation of Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes by Ozone: From Laboratory Experiments to Full-Scale Wastewater Treatment.” *Environmental Science & Technology*, vol. 50, no. 21, American Chemical Society, Nov. 2016, pp. 11862–71, doi:10.1021/acs.est.6b02640.
- Dodd, Michael C. “Potential Impacts of Disinfection Processes on Elimination and Deactivation of Antibiotic Resistance Genes during Water and Wastewater Treatment.”

Journal of Environmental Monitoring, vol. 14, no. 7, The Royal Society of Chemistry, 2012, pp. 1754–71, doi:10.1039/C2EM00006G.

Drudy D, Mullane NR, Quinn T, et al (2006) *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. *Clin Infect Dis* 42:996–1002

Elmahdi S, DaSilva L V., Parveen S (2016) Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: A review. *Food Microbiol* 57:128–134 . doi: 10.1016/J.FM.2016.02.008

Elvis AM, Ekta JS (2011) Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med* 2:66–70 . doi: 10.4103/0976-9668.82319

Ginocchio CC (2002) Role of NCCLS in antimicrobial susceptibility testing and monitoring. *Am J Heal Pharm* 59:S7 LP-S11

Gomes, João, et al. “Application of Ozonation for Pharmaceuticals and Personal Care Products Removal from Water.” *Science of The Total Environment*, vol. 586, Elsevier, May 2017, pp. 265–83, doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.01.216.

Goodman, L. J., et al. “Comparative in Vitro Activity of Ciprofloxacin against *Campylobacter* Spp. and Other Bacterial Enteric Pathogens.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 25, no. 4, Apr. 1984, p. 504 LP-506, <http://aac.asm.org/content/25/4/504.abstract>.

Gyparakis S, Diamadopoulos E (2007) Formation and Reverse Osmosis Removal of Bromate Ions during Ozonation of Groundwater in Coastal Areas. *Sep Sci Technol* 42:1465–1476 . doi: 10.1080/01496390701290011

Holmberg A, Rasmussen M (2016) Mature biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are highly resistant to antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 84:19–21 . doi: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2015.09.012

Ierardi V, Domenichini P, Reali S, et al (2017) *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance identified by atomic force microscopy. *J Biosci* 42:623–636 . doi: 10.1007/s12038-017-9713-6

Jang J, Hur H-G, Sadowsky MJ, et al (2017) Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J Appl Microbiol* 123:570–581 . doi: 10.1111/jam.13468

Jury, Karen L., et al. “Are Sewage Treatment Plants Promoting Antibiotic Resistance?” *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, vol. 41, no. 3, Taylor & Francis, Jan. 2011, pp. 243–70, doi:10.1080/10643380902772589.

- Keller R, Pedroso MZ, Ritchmann R, Silva RM (1998) Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. *Infect Immun* 66:645–649
- Kim, Sungpyo, and Diana S. Aga. “Potential Ecological and Human Health Impacts of Antibiotics and Antibiotic-Resistant Bacteria from Wastewater Treatment Plants.” *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, vol. 10, no. 8, Taylor & Francis, Nov. 2007, pp. 559–73, doi:10.1080/15287390600975137.
- Kümmerer, Klaus. “Antibiotics in the Aquatic Environment – A Review – Part I.” *Chemosphere*, vol. 75, no. 4, Pergamon, Apr. 2009, pp. 417–34, doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2008.11.086.
- Lai C-C, Teng L-J, Hsueh P-R, et al (2004) Clinical and Microbiological Characteristics of *Rhizobium radiobacter* Infections. *Clin Infect Dis* 38:149–153
- Lee, Jangwoo, et al. “Quantitative and Qualitative Changes in Antibiotic Resistance Genes after Passing through Treatment Processes in Municipal Wastewater Treatment Plants.” *Science of The Total Environment*, vol. 605–606, Elsevier, Dec. 2017, pp. 906–14, doi:10.1016/J.SCITOTENV.2017.06.250.
- Le-Minh, N., et al. “Fate of Antibiotics during Municipal Water Recycling Treatment Processes.” *Water Research*, vol. 44, no. 15, Pergamon, Aug. 2010, pp. 4295–323, doi:10.1016/J.WATRES.2010.06.020.
- Loos, Robert, et al. “EU-Wide Monitoring Survey on Emerging Polar Organic Contaminants in Wastewater Treatment Plant Effluents.” *Water Research*, vol. 47, no. 17, Pergamon, Nov. 2013, pp. 6475–87, doi:10.1016/J.WATRES.2013.08.024.
- Lüddecke, Frauke, et al. “Removal of Total and Antibiotic Resistant Bacteria in Advanced Wastewater Treatment by Ozonation in Combination with Different Filtering Techniques.” *Water Research*, vol. 69, Pergamon, Feb. 2015, pp. 243–51, doi:10.1016/J.WATRES.2014.11.018.
- MacGowan A, Macnaughton E (2017) Antibiotic resistance. *Medicine (Baltimore)* 45:622–628 . doi: 10.1016/J.MPMED.2017.07.006
- Manaia, Célia M., et al. “Antibiotic Resistance in Wastewater Treatment Plants: Tackling the Black Box.” *Environment International*, vol. 115, Pergamon, June 2018, pp. 312–24, doi:10.1016/J.ENVINT.2018.03.044.
- Marti E, Variatza E, Balcazar JL (2014) The role of aquatic ecosystems as reservoirs of

- antibiotic resistance. *Trends Microbiol* 22:36–41 . doi: 10.1016/j.tim.2013.11.001
- Martinez, Jose Luis. “Environmental Pollution by Antibiotics and by Antibiotic Resistance Determinants.” *Environmental Pollution*, vol. 157, no. 11, Elsevier, Nov. 2009, pp. 2893–902, doi:10.1016/J.ENVPOL.2009.05.051.
- Miller WR, Munita JM, Arias CA (2014) Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12:1221–1236 . doi: 10.1586/14787210.2014.956092
- Oh J, Salcedo DE, Medriano CA, Kim S (2014) Comparison of different disinfection processes in the effective removal of antibiotic-resistant bacteria and genes. *J Environ Sci* 26:1238–1242 . doi: 10.1016/S1001-0742(13)60594-X
- Overman, T. L. “Antimicrobial Susceptibility of *Aeromonas Hydrophila*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 17, no. 4, Apr. 1980, pp. 612–14, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC283840/>.
- Poulter, Melinda D., and Janet F. Hindler. “Challenges in Antimicrobial Susceptibility Testing and Reporting.” *Laboratory Medicine*, vol. 33, no. 11, Nov. 2002, pp. 877–84, <http://dx.doi.org/10.1309/1V7U-RP9N-2A9Q-95X8>.
- Qu M, Lv B, Zhang X, et al (2016) Prevalence and antibiotic resistance of bacterial pathogens isolated from childhood diarrhea in Beijing, China (2010-2014). *Gut Pathog* 8:31 . doi: 10.1186/s13099-016-0116-2
- Reglinski, Mark, and Shiranee Sriskandan. “*Streptococcus Pyogenes*.” *Molecular Medical Microbiology*, Academic Press, Jan. 2015, pp. 675–716, doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00038-X.
- Rodriguez-Mozaz, Sara, et al. “Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Hospital and Urban Wastewaters and Their Impact on the Receiving River.” *Water Research*, vol. 69, Pergamon, Feb. 2015, pp. 234–42, doi:10.1016/J.WATRES.2014.11.021.
- Rodriguez-Mozaz, Sara, and Howard S. Weinberg. “Meeting Report: Pharmaceuticals in Water—An Interdisciplinary Approach to a Public Health Challenge.” *Environmental Health Perspectives*, vol. 118, no. 7, National Institute of Environmental Health Sciences, July 2010, pp. 1016–20, doi:10.1289/ehp.0901532.
- Santiago-Rodriguez TM, Fornaciari G, Luciani S, et al (2018) Tetracycline-like Resistome of Ancient Human Guts. *Hum Microbiome J*. doi: 10.1016/J.HUMIC.2018.07.001

- Sharma, Virender K., et al. "A Review of the Influence of Treatment Strategies on Antibiotic Resistant Bacteria and Antibiotic Resistance Genes." *Chemosphere*, vol. 150, Pergamon, May 2016, pp. 702–14, doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2015.12.084.
- Simmons J, Gibson S (2012) Bacterial and Mycotic Diseases of Nonhuman Primates. *Nonhum Primates Biomed Res* 105–172 . doi: 10.1016/B978-0-12-381366-4.00002-X
- Singh L, Cariappa MP, Kaur M (2016) *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen? *Med J Armed Forces India* 72:S59–S61 . doi: 10.1016/J.MJAFI.2016.05.002
- Sørum H (2008) Antibiotic resistance associated with veterinary drug use in fish farms. *Improv Farmed Fish Qual Saf* 157–182 . doi: 10.1533/9781845694920.1.157
- Sousa, José M., et al. "Ozonation and UV254 Nm Radiation for the Removal of Microorganisms and Antibiotic Resistance Genes from Urban Wastewater." *Journal of Hazardous Materials*, vol. 323, Elsevier, Feb. 2017, pp. 434–41, doi:10.1016/J.JHAZMAT.2016.03.096.
- Ternes, Thomas A., et al. "Ozonation: A Tool for Removal of Pharmaceuticals, Contrast Media and Musk Fragrances from Wastewater?" *Water Research*, vol. 37, no. 8, Pergamon, Apr. 2003, pp. 1976–82, doi:10.1016/S0043-1354(02)00570-5.
- Thomaidi VS, Stasinakis AS, Borova VL, Thomaidis NS (2015) Is there a risk for the aquatic environment due to the existence of emerging organic contaminants in treated domestic wastewater? Greece as a case-study. *J Hazard Mater* 283:740–747 . doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2014.10.023
- Thornsberry, Clyde. "NCCLS Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests." *Laboratory Medicine*, vol. 14, no. 9, Sept. 1983, pp. 549–53, <http://dx.doi.org/10.1093/labmed/14.9.549>.
- Tibayrenc M, González-Candelas F, Comas I, et al (2017) The Evolution of Antibiotic Resistance. *Genet Evol Infect Dis* 257–284 . doi: 10.1016/B978-0-12-799942-5.00012-3
- Truant, Allan L., et al. "Methylobacterium Species: An Increasingly Important Opportunistic Pathogen ." *Laboratory Medicine*, vol. 29, no. 11, Nov. 1998, pp. 704–10, <http://dx.doi.org/10.1093/labmed/29.11.704>.
- Tyrrell, Sherri A., et al. "Inactivation of Bacterial and Viral Indicators in Secondary Sewage Effluents, Using Chlorine and Ozone." *Water Research*, vol. 29, no. 11, Pergamon, Nov. 1995, pp. 2483–90, doi:10.1016/0043-1354(95)00103-R.

- Ungurean, Alia, et al. "Adsorption of Sulfamethoxazole Molecule on Silver Colloids: A Joint SERS and DFT Study." *Journal of Molecular Structure*, vol. 1073, Elsevier, Sept. 2014, pp. 71–76, doi:10.1016/J.MOLSTRUC.2014.05.074.
- Vargiu, Attilio V, and Hiroshi Nikaido. "Multidrug Binding Properties of the AcrB Efflux Pump Characterized by Molecular Dynamics Simulations." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 50, National Academy of Sciences, Dec. 2012, pp. 20637–42, doi:10.1073/pnas.1218348109.
- Vatopoulos, A. C., et al. "Bacterial Resistance to Ciprofloxacin in Greece: Results from the National Electronic Surveillance System." *Emerging Infectious Diseases*, vol. 5, no. 3, Centers for Disease Control and Prevention, 1999, pp. 471–76, doi:10.3201/eid0503.990325.
- Wanger, Audrey, et al. "Antibiotics, Antimicrobial Resistance, Antibiotic Susceptibility Testing, and Therapeutic Drug Monitoring for Selected Drugs." *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology*, Elsevier, Jan. 2017, pp. 119–53, doi:10.1016/B978-0-12-805351-5.00007-7.
- Wastewater Engineering Treatment and Reuse, Metcalf & Eddy Inc., 4th edition, revised by George Tchobanoglous, Franklin L. Burton, H. Daviv Stensel
- Watson, David A. "What Is Behind Antibiotic Resistance?" *Laboratory Medicine*, vol. 28, no. 5, May 1997, pp. 324–27, <http://dx.doi.org/10.1093/labmed/28.5.324>.
- Yargeau, Viviane, and Christine Leclair. "Impact of Operating Conditions on Decomposition of Antibiotics During Ozonation: A Review." *Ozone: Science & Engineering*, vol. 30, no. 3, Taylor & Francis, May 2008, pp. 175–88, doi:10.1080/01919510701878387.
- Zhang G-F, Liu X, Zhang S, et al (2018) Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *Eur J Med Chem* 146:599–612 . doi: 10.1016/J.EJMECH.2018.01.078
- Zheng, Ji, et al. "Effects and Mechanisms of Ultraviolet, Chlorination, and Ozone Disinfection on Antibiotic Resistance Genes in Secondary Effluents of Municipal Wastewater Treatment Plants." *Chemical Engineering Journal*, vol. 317, Elsevier, June 2017, pp. 309–16, doi:10.1016/J.CEJ.2017.02.076.
- Αβραμίδου, Μ.Χ., (2017) ,Παρουσία Αντιβιοτικών στο Υδάτινο Περιβάλλον: Επίδραση στο αλόφυτο *Juncus acutus* ως προς την ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

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

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

Εισαγωγή στις διεργασίες καθαρισμού νερού και λυμάτων, Κωνσταντίνος Β. Χρυσικόπουλος

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

Νιάρχος, Γ. "Μικροοργανισμοί και αντιβιοτικά: διασπορά ανθεκτικών βακτηρίων και των αντίστοιχων γονιδίων τους στο υδάτινο περιβάλλον", Διπλωματική Εργασία, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, Ελλάς, 2015

Σπύρου, Σ., Τεχνική Επιτροπή Ε.Δ.Ε.Υ.Α., Διεύρυνση εναλλακτικών τρόπων απολύμανσης του πόσιμου νερού, Ρέθυμνο, Νοέμβριος 2014

Τεγκελίδη, Χ. "Επίδραση της απολύμανσης στην ανθεκτικότητα βακτηρίων σε ποικιλία αντιβιοτικών", Διπλωματική Εργασία, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, Ελλάς, 2017

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

Ιστοσελίδες

<https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>

<https://ecdc.europa.eu/en/home>

www.keelpno.gr