



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΠΜΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΓΡΩΝ
ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ**

Ευαγγελία Λεωνίδου

Χανιά, Ιούνιος 2022

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΠΜΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Μεταπτυχιακή Διατριβή
Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΞΑΠΛΩΣΗ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΤΑ
ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

της
Ευαγγελίας Λεωνίδου

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Δρ. Δανάη Βενιέρη

Χανιά, Ιούνιος 2022

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Ευαγγελία Λεωνίδου, 2022

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναγράφεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς τη συγγραφέα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που αναγράφονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τη συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέτειναν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή. Ιδιαίτερα, ευχαριστώ την Επιβλέπουσα Καθηγήτριά μου Δρ. Βενιέρη Δανάη που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το αντικείμενο της εργασίας αυτής και να διευρύνω τις γνώσεις και τις δεξιότητές μου. Ευχαριστώ θερμά την κυρία Γουνάκη Ιωσηφίνα, ΕΔΙΠ του Πολυτεχνείου Κρήτης για την πολύτιμη βοήθεια κατά την διάρκεια διεξαγωγής των εργαστηριακών πειραμάτων. Ευχαριστώ επίσης την κυρία Συρανίδου Ευδοκία, Επιστημονική Συνεργάτιδα του Πολυτεχνείου Κρήτης για τη συμβολή της στα πειράματα, καθώς επίσης και για τις πολύτιμες συμβουλές της. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου για την αμέριστη στήριξη και κατανόηση καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου αλλά και την υποστήριξη σε κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα μικροπλαστικά έχουν ανιχνευθεί σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων ως αποτέλεσμα της ανθρώπινης δραστηριότητας στη σύγχρονη εποχή. Από την αφθονία των φαρμακευτικών ενώσεων που υπάρχουν στα λύματα, τα αντιβιοτικά ανιχνεύονται σε σημαντικές συγκεντρώσεις, που κυμαίνονται από ng/L έως µg/L. Τα μικροπλαστικά συμβάλλουν στην προσκόλληση και ανάπτυξη μικροοργανισμών, ευνοώντας την ανάπτυξη βιοϋμενίου (βιοφίλμ). Το βιοφίλμ διευκολύνει τη μεταφορά μεταξύ των αποικιστών, συμβάλλοντας έτσι στη διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Antibiotic Resistance Genes - ARGs). Ως αποτέλεσμα, τα αστικά λύματα αποτελούν μια από τις κυριότερες πηγές εξάπλωσης των αντιβιοτικών και των ανθεκτικών γονιδίων στο περιβάλλον. Η απελευθέρωση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων στο περιβάλλον και η χρήση επεξεργασμένης ιλύος για γεωργικούς σκοπούς καθιστούν επιτακτική τη μελέτη της μεταφοράς των ARGs που συνδέονται με τα μικροπλαστικά στο περιβάλλον.

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να προσδιοριστεί κατά πόσο τα μικροπλαστικά που ανιχνεύονται στις δεξαμενές μιας τυπικής μονάδας επεξεργασίας λυμάτων συμβάλλουν στη διασπορά των ARGs στο υδάτινο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό, ελήφθησαν δείγματα από την ενεργό ιλύ και την έξοδο μίας τοπικής μονάδας επεξεργασίας λυμάτων που βρίσκεται στα Χανιά της Κρήτης κατά τους ζεστούς (τουριστική περίοδο) και κρύους (μη τουριστική περίοδο) μήνες του έτους 2020. Από κάθε δείγμα επιλέχθηκε καθορισμένος αριθμός μικροπλαστικών και διαχωρίστηκε το μικροβιολογικό φορτίο που ήταν προσκολλημένο στην επιφάνειά τους. Επιπλέον, λήφθηκαν δείγματα από την ενεργοποιημένη ιλύ, χωρίς προηγούμενη επεξεργασία, για την απομόνωση του συνολικού DNA και τη μέτρηση του συνολικού φορτίου των ARGs. Το διαχωρισμό ακολούθησε ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των πολυμερών από τα δείγματα εξόδου, ενώ το βιοφίλμ από όλα τα δείγματα έτυχε μοριακής ανάλυσης RT-PCR για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των ARGs που είναι υπεύθυνα για την αντοχή στις κινολόνες, τις β-λακτάμες, τις τετρακυκλίνες και τις σουλφοναμίδες. Συγκεκριμένα, τα γονίδια στόχοι ήταν *qnrA*, *ampC*, *tetA* και *sul2*.

Οι κύριοι τύποι πολυμερών που προσδιορίστηκαν ήταν HDPE, PP και PET. Υψηλότερη συγκέντρωση ARGs καταγράφηκε στα δείγματα εξόδου σε σχέση με τα

δείγματα ενεργού ιλύος. Το γεγονός αυτό εγείρει ανησυχίες για τα μικροπλαστικά και τη μεταφορά ARGs, καθώς τελικός αποδέκτης των επεξεργασμένων λυμάτων είναι το θαλάσσιο περιβάλλον. Επιπλέον, καταγράφηκαν υψηλότερες τιμές στα δείγματα που ελήφθησαν από το βιοφίλμ των μικροπλαστικών από ό,τι στα δείγματα που δεν υποβλήθηκαν σε περαιτέρω επεξεργασία. Μεταξύ των τεσσάρων γονιδίων που αξιολογήθηκαν, το *ampC* και το *tetA* ανιχνεύθηκαν στα περισσότερα δείγματα, υποδεικνύοντας ότι οι β-λακτάμες και οι τετρακυκλίνες είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στη συγκεκριμένη κοινότητα. Επιπρόσθετα, η μελέτη έδειξε μεταβαλλόμενη ανίχνευση της ποσότητας των ARGs κατά την περίοδο δειγματοληψίας. Αυτό δείχνει δυνητικά την υπέρμετρη χρήση αντιβιοτικών ή ακόμη και την λανθασμένη κατανάλωσή τους για ιογενείς λοιμώξεις.

Επομένως, η έρευνα συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση της μεταφοράς και της απελευθέρωσης ARGs μέσω των Ε.Ε.Λ, καλύπτοντας τυχόν κενά της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, με απώτερο στόχο την προστασία του περιβάλλοντος και την αειφόρο ανάπτυξη.

Λέξεις κλειδιά: Γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, Αντιβιοτικά, Μικροπλαστικά, Ε.Ε.Λ., *qnrA*, *ampC*, *tetA*, *sul2*

ABSTRACT

Microplastics have been detected in wastewater treatment plants (WWTPs) as a result of human activity in modern times. Among the broad variety of pharmaceutical compounds present in wastewater, antibiotics are detected in significant concentrations, ranging from ng/L to $\mu\text{g/L}$. Microplastics contribute to the adhesion and growth of microorganisms, forming biofilm. The biofilm facilitates transmission between colonists and it contributes to the spread of antibiotic resistance genes (ARGs). As a result, municipal wastewater is one of the main sources of antibiotics and resistance genes in the environment. The release of treated wastewater into the environment and the use of treated sludge for agricultural purposes make it imperative to study the transport of ARGs associated with microplastics into the environment.

The aim of this work is to determine whether the microplastics detected in a typical wastewater treatment plant contribute to the dispersion of ARGs in the aquatic environment. For this reason, samples were taken from the activated sludge and the effluent of a local wastewater treatment plant located in Chania, Crete during the hot (tourist season) and cold (non-tourist season) months in 2020. A specified number of microplastics was selected from each sample and the microbiological load attached to their surface was separated. Furthermore, additional samples were taken from the activated sludge, without any prior treatment, to isolate the total DNA and measure the total load of ARGs. The separation was followed by the qualitative and quantitative determination of polymers from the effluent samples, while the biofilm from all the samples was subjected to RT-PCR molecular analysis to detect and quantify the ARGs responsible for resistance to quinolones, β -lactams, tetracyclines and sulfonamides. Specifically, the target genes were *qnrA*, *ampC*, *tetA* and *sul2*.

The main types of polymers identified were HDPE, PP and PET. Also, higher concentration of ARGs was recorded in the effluent samples compared to the activated sludge samples. This fact, raises concerns about microplastics and the transport of ARGs, as the ultimate recipient of treated wastewater is the marine environment. In addition, higher concentration of the ARGs was recorded in the samples obtained from the biofilm of the microplastics than in the samples that were not further processed. Among the four genes evaluated, *ampC* and *tetA* were detected in the most samples, indicating that β -

lactams and tetracyclines are the most commonly used antibiotics in this community. Moreover, the study showed variable detection of the amount of ARGs during the sampling period. This indicates the overuse of antibiotics or wrong consumption even for viral infections.

Therefore, this research contributes to the better understanding of the transport and release of ARGs through WWTPs, covering any gaps in the existing literature, with the ultimate goal of protecting the environment and sustainable development.

Keywords: ARGs, Antibiotics, Microplastics, WWTPs, *qnrA*, *ampC*, *tetA*, *sul2*

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	v
ABSTRACT.....	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xiii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	xv
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ	xvi
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Προέλευση, τύχη και μεταφορά μικροπλαστικών στο περιβάλλον.....	1
1.2 Τα μικροπλαστικά ως φορείς γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.....	3
1.3 Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων ως πηγή ARGs	4
1.4 Μετάλλαξη και ανθεκτικότητα	6
1.4.1 Αντίσταση στις κινολόνες.....	7
1.4.2 Αντίσταση στις β-λακτάμες.....	8
1.4.3 Αντίσταση στις τετρακυκλίνες	9
1.4.4 Αντίσταση στις σουλφοναμίδες.....	10
2. Σκοπός	11
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	13
3.1 Υλικά.....	13
3.2 Μεθοδολογία που ακολουθήθηκε	13
3.3 Δειγματοληψία	14
3.4 Συλλογή μικροπλαστικών	15
3.5 Συλλογή βιοφίλμ	16
3.6 Απομόνωση DNA	17
3.7 Ποσοτικοποίηση DNA	17
3.8 PCR Πραγματικού Χρόνου (RT-PCR)	18

3.9	Ανάλυση δεδομένων RT-PCR	23
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	24
4.1	Αποτελέσματα Ταυτοποίησης μικροπλαστικών	26
4.2	Αποτελέσματα Ποσοτικοποίησης απομονωμένου DNA	27
4.3	Αποτελέσματα RT-PCR.....	31
4.4	Ποσοτικός προσδιορισμός ARGs	32
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	40
5.1	Ταυτοποίηση μικροπλαστικών.....	40
5.2	Ποσοτικοποίηση απομονωμένου DNA.....	40
5.3	Μοριακή ανάλυση και ταυτοποίηση ARGs.....	41
5.3.1	Μη ενίσχυση 16S rRNA	41
5.3.2	Κατανομή ARGs στα είδη δειγμάτων	42
5.3.3	Κατανάλωση ανά κατηγορία αντιβιοτικών	43
5.3.4	Κατανάλωση και εποχιακή διακύμανση.....	44
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	45
7.	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	47
	ΕΠΙΛΟΓΟΣ	48
8.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	48
8.1	Συστατικά και Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (RT-PCR)	48
8.1.1	Γονίδιο <i>qnrA</i>	48
8.1.2	Γονίδιο <i>tetA</i>	49
8.1.3	Γονίδιο <i>ampC</i>	50
8.1.4	Γονίδιο <i>sul2</i>	51
8.2	Πρότυπες Καμπύλες Αναφοράς.....	52
8.2.1	Γονίδιο 16S rRNA	52

8.2.2	Γονίδιο <i>qnrA</i>	53
8.2.3	Γονίδιο <i>ampC</i>	54
8.2.4	Γονίδιο <i>tetA</i>	55
8.2.5	Γονίδιο <i>sul2</i>	56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		58

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Αλληλουχία εκκινητών RT-PCR.	22
Πίνακας 2: Κωδικοποίηση δειγμάτων με βάση το μήνα δειγματοληψίας και το σημείο δειγματοληψίας.....	24
Πίνακας 3: Αποτελέσματα Bio-photometer.....	28
Πίνακας 4: Στατιστικοί παράγοντες πρότυπων καμπυλών αναφοράς.....	32
Πίνακας 5: Ποσοστό παρουσίας ARG-στόχου.....	33
Πίνακας 6: Συστατικά RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου <i>qnrA</i> ...	49
Πίνακας 7: Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου <i>qnrA</i>	49
Πίνακας 8: Συστατικά RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου <i>tetA</i>	49
Πίνακας 9: Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου <i>tetA</i>	50
Πίνακας 10: Συστατικά RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου <i>ampC</i> 50	
Πίνακας 11: Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου <i>ampC</i>	51
Πίνακας 12: Συστατικά RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου <i>sul2</i> ..	51
Πίνακας 13: Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου <i>sul2</i>	52
Πίνακας 14: Δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς του γονιδίου 16S rRNA.....	52
Πίνακας 15: Δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς του γονιδίου <i>qnrA</i>	53
Πίνακας 16: Δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς του γονιδίου <i>ampC</i>	54
Πίνακας 17: Δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς του γονιδίου <i>tetA</i>	55
Πίνακας 18: Δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς του γονιδίου <i>sul2</i>	56

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1: Εκτιμώμενη ροή μικροπλαστικών σε μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.	3
Εικόνα 2: Τύχη και μεταφορά των φαρμακευτικών προϊόντων και η μετατροπή τους στις παροχές νερού	6
Εικόνα 3: Η χημική δομή τριών ενώσεων κινολόνης.....	8
Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης β-λακταμασών	9
Εικόνα 5: Χημική δομή τετρακυκλίνης. Η συστροφή μεταξύ των δακτυλίων της τετρακυκλίνης επιτυγχάνει τη δέσμευσή της με το ριβόσωμα	10
Εικόνα 6: Χημική δομή τριών σουλφοναμιδικών αντιβιοτικών.....	11
Εικόνα 12: Στάδια για την ποσοτικοποίηση των ARGs.....	14
Εικόνα 13: Σημεία δειγματοληψίας σε ένα τυπικό σχεδιάγραμμα σταθμού επεξεργασίας λυμάτων.....	15
Διάγραμμα 1: Οι τρεις φάσεις της αντίδρασης PCR. Στη γραμμική φάση τα προϊόντα παράγονται με εκθετικό ρυθμό, στη γραμμική ο ρυθμός σύνθεσης επιβραδύνεται και στη φάση πλατώ δε συντίθενται νέα προϊόντα.	Error! Bookmark not defined.
Διάγραμμα 2: Η καμπύλη της ποσοτικής αντίδρασης PCR. Η οριζόντια γκρι γραμμή δείχνει το κατώφλι, στο οποίο ο φθορισμός των προϊόντων αρχίζει να ξεχωρίζει από το βασικό επίπεδο. Ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό αντιστοιχεί στην τιμή C_p	Error! Bookmark not defined.
Διάγραμμα 3: Σύγκριση καμπύλης του γονιδίου στόχου (target gene) με το γονίδιο αναφοράς (control gene).	Error! Bookmark not defined.
Διάγραμμα 4: Καμπύλη αποδιάταξης: οι κορυφές i, ii, iii αντιστοιχούν στην αλληλουχία στόχο, η οποία βρίσκεται σε διαφορετική συγκέντρωση σε κάθε δείγμα. Η κορυφή iiii αντιστοιχεί στον αρνητικό μάρτυρα. Το γεγονός ότι εμφανίζεται κορυφή υποδηλώνει τη παρουσία διμερή εκκινητών. (Τα αποτελέσματα ανήκουν στο Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur).	Error! Bookmark not defined.
Διάγραμμα 5: Συνολική κατανομή των τύπων των πολυμερών στα δείγματα εξόδου.	27

Διάγραμμα 6: Ποσοτικός προσδιορισμός αντιγράφων γονιδίου qnrA κάθε μήνα.	34
Διάγραμμα 7: Ποσοτικός προσδιορισμός του μέσου όρου των αντιγράφων γονιδίου qnrA κάθε μήνα.....	35
Διάγραμμα 8: Ποσοτικός προσδιορισμός αντιγράφων γονιδίου ampC κάθε μήνα.....	36
Διάγραμμα 9: Ποσοτικός προσδιορισμός του μέσου όρου των αντιγράφων γονιδίου ampC κάθε μήνα.	36
Διάγραμμα 10: Ποσοτικός προσδιορισμός αντιγράφων γονιδίου tetA κάθε μήνα.	37
Διάγραμμα 11: Ποσοτικός προσδιορισμός του μέσου όρου των αντιγράφων γονιδίου tetA κάθε μήνα.....	38
Διάγραμμα 12: Ποσοτικός προσδιορισμός αντιγράφων γονιδίου sul2 κάθε μήνα.....	39
Διάγραμμα 13: Ποσοτικός προσδιορισμός του μέσου όρου των αντιγράφων γονιδίου sul2 κάθε μήνα.	39
Διάγραμμα 14: Κατανομή μέσου όρου BOD στις δύο δειγματοληπτικές περιόδους. Οι τιμές τις μέτρησης έχουν ληφθεί από τη Βάση Δεδομένων Παρακολούθησης Εγκαταστάσεων Επεξεργασίας Λυμάτων.....	42
Διάγραμμα 15: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς γονιδίου 16S rRNA	53
Διάγραμμα 16: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς γονιδίου qnrA	54
Διάγραμμα 17: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς γονιδίου ampC.....	55
Διάγραμμα 18: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς γονιδίου tetA	56
Διάγραμμα 19: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς γονιδίου sul2.....	57

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΕΕΛ.	Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων
ARGs	Antibiotic Resistance Genes
ARB	Antibiotic Resistant Bacteria
HGT	Horizontal Gene Transfer
DNA	Deoxyribonucleic Acid
RNA	Ribonucleic Acid
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
MPs	Microplastics

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

ARGs	Γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά
ARBs	Ανθεκτικά στα Αντιβιοτικά Βακτήρια
HGT	Οριζόντια Μεταφορά Γονιδίων
DNA	Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ
rRNA	Ριβοσωμικό Ριβονουκλεϊκό οξύ
RT-PCR	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

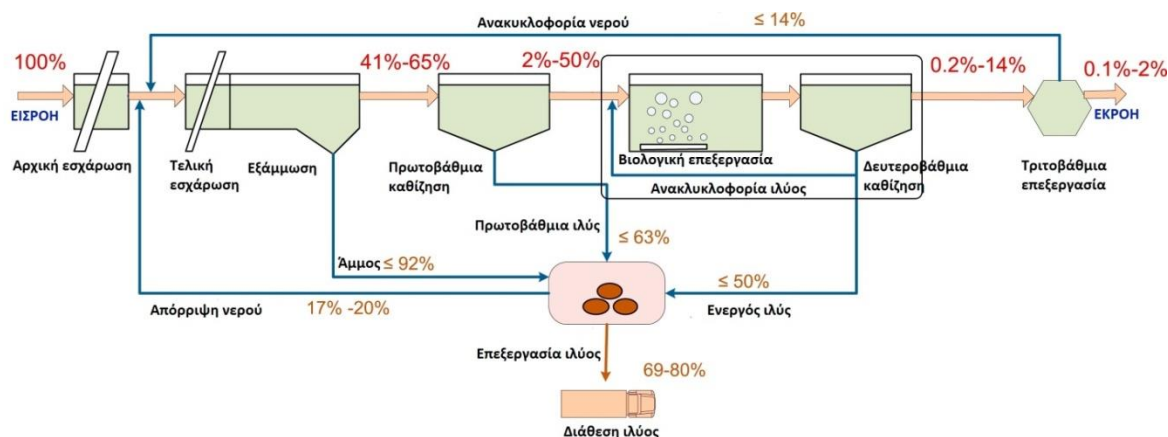
Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένας ανησυχητικά αυξημένος αριθμός αναδυόμενων ρυπογόνων παραγόντων που καταγράφονται στους περιβαλλοντικούς πίνακες, ως αποτέλεσμα της ανθρώπινης δραστηριότητας στη σύγχρονη εποχή. Η ανεξέλεγκτη χρήση τέτοιων ουσιών ενέχει κινδύνους για το περιβάλλον και τους ζώντες οργανισμούς. Τέτοιοι ρύποι είναι τα φαρμακευτικά προϊόντα και προϊόντα προσωπικής φροντίδας (PPCPs), τα φυτοφάρμακα, οι ορμόνες, τα μικροπλαστικά κ.λπ. Οι ενώσεις αυτές, αμέσως μετά τη χρήση τους περνούν μέσα από περίπλοκα μονοπάτια για να καταλήξουν σε υδάτινες πηγές και μέσω αυτών πίσω στον άνθρωπο.

Το γεγονός αυτό, εγείρει το επιστημονικό ενδιαφέρον μιας και αυτού του είδους οι ενώσεις δεν εξαλείφονται πλήρως κατά την επεξεργασία υγρών αποβλήτων με συμβατικές μεθόδους. Οι πιθανοί κίνδυνοι που μπορεί να προκληθούν από την παρουσία των φαρμακευτικών προϊόντων περιλαμβάνουν οξεία και χρόνια τοξικότητα σε ζώντες οργανισμούς, ενδοκρινικές διαταραχές και ανάπτυξη ανθεκτικών γονιδίων έναντι σε αντιβιοτικά. Η πρόκληση την οποία καλούνται να αντιμετωπίσουν οι επιστήμονες είναι η επιλεκτική και συνάμα αποτελεσματική αφαίρεση των ρύπων που βασίζονται στα αντιβιοτικά, έτσι ώστε να μην απειλείται το περιβάλλον και η ποιότητα της ανθρώπινης ζωής από τη παρουσία των εν λόγω ενώσεων.

1.1 Προέλευση, τύχη και μεταφορά μικροπλαστικών στο περιβάλλον

Μικροπλαστικά ορίζονται τα σωματίδια, των οποίων το μέγεθός τους κυμαίνεται από 0.1 μm μέχρι 5 mm.¹ Η εμφάνιση τους στο περιβάλλον αποτελεί ένα θέμα που απασχολεί έντονα την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια, λόγω των δυσμενών οικολογικών επιπτώσεων που φαίνεται να προκαλούν.^{2,3} Ανάλογα με τη πηγή προέλευσης, εμπίπτουν στην κατηγορία των πρωτογενών και των δευτερογενών. Η πρώτη κατηγορία, αφορά αντικείμενα, τα οποία κατασκευάζονται στο μέγεθος αυτό, προκειμένου να εκτελούν ορισμένες λειτουργίες. Για παράδειγμα, τα μικροσφαιρίδια που εμπεριέχονται στα προϊόντα προσωπικής φροντίδας για σκοπούς απολέπισης,^{4,5} ή στις βαφές για αντιδιαβρωτική και αντιρρυπαντική δράση.⁶ Η δεύτερη κατηγορία, αφορά αντικείμενα, τα οποία προέκυψαν από τον κατακερματισμό μεγαλύτερων πλαστικών υπολειμμάτων, ως αποτέλεσμα της δράσης της ηλιακής ακτινοβολίας, της μηχανικής τριβής και της βιολογικής αποδόμησης.^{7,8}

Στην εισροή των εγκαταστάσεων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων εισέρχονται αστικά και βιομηχανικά λύματα. Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις η εισροή συμπεριλαμβάνει απορροή βρόχινων νερών, τα οποία μεταφέρουν σωματίδια που προέρχονται από τη φθορά των ελαστικών, καθώς επίσης και μία ευρεία ποικιλία δευτερογενών μικροπλαστικών.⁶ Παρόλο που πολλές μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων (ΕΕΛ) στην απομάκρυνση των μικροπλαστικών,⁹⁻¹⁴ με μείωση που φθάνει έως και το 99%,^{15,16} έχει αποδειχθεί πως ακόμα και μία μικρή ποσότητα απελευθέρωσης, μικρότερη του 1%, μπορεί να οδηγήσει σε μία σημαντική ποσότητα μικροπλαστικών στο περιβάλλον. Για παράδειγμα, μία εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων στη Φινλανδία με τριτοβάθμια επεξεργασία έχει αποδοτικότητα αφαίρεσης των μικροπλαστικών που φθάνει το 97.8%. Εντούτοις, η ίδια εγκατάσταση απελευθερώνει περισσότερα από 3650 εκατομμύρια μικροπλαστικά την ημέρα.¹⁷ Συμπληρωματικά, μία άλλη εγκατάσταση στην Ιταλία, επίσης με τριτοβάθμια επεξεργασία, απομακρύνει το 84% των εισερχόμενων μικροπλαστικών, ενώ απελευθερώνει 160 εκατομμύρια μικροπλαστικά την ημέρα σε επιφανειακά ύδατα.⁹ Γενικότερα, η απόδοση αφαίρεσης των μικροπλαστικών, είναι άμεσα συνυφασμένη με το σχεδιασμό και τη λειτουργία της εκάστοτε εγκατάστασης, την εφαρμογή ή όχι τριτοβάθμιας επεξεργασίας, την επιλογή τεχνολογίας (βιοαντιδραστήρες μεμβράνης, κοκκώδες φίλτρο, αντίστροφη όσμωση κ.λπ.) καθώς επίσης και με το φορτίο που καλείται να επεξεργαστεί.^{18,19} Επίσης, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι κατά τη διάρκεια έντονων βροχοπτώσεων το φορτίο που φθάνει σε μία εγκατάσταση, μπορεί να είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό που μπορεί να επεξεργαστεί, με αποτέλεσμα να απορρίπτεται άμεσα σε ποτάμια, λίμνες και παράκτιες περιοχές, χωρίς να έχει υποστεί καμία επεξεργασία. Όλα τα παραπάνω ενέχουν σημαντικό αντίκτυπο στη συνολική ποσότητα μικροπλαστικών που απελευθερώνεται στα υδατικά σώματα.⁶ Συνεπώς, οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων θεωρούνται μία από τις βασικές πηγές απελευθέρωσης μικροπλαστικών στο περιβάλλον. Στην Εικόνα 1 φαίνεται η εκτιμώμενη ροή των μικροπλαστικών σε κάθε διεργασία μίας μονάδας επεξεργασίας λυμάτων με τριτοβάθμια επεξεργασία.¹⁹ Η ροή των μικροπλαστικών στην υγρή φάση υπολογίστηκε με βάση την τρέχουσα βιβλιογραφία,^{12,20-22} ενώ η ροή των μικροπλαστικών στην ιλύ υπολογίστηκε με βάση τα ισοζύγια μάζας.¹⁹



Εικόνα 1: Εκτιμώμενη ροή μικροπλαστικών σε μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.

1.2 Τα μικροπλαστικά ως φορείς γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά

Τα μικροπλαστικά έχουν εντοπιστεί σε διάφορες περιβαλλοντικές μήτρες όπως ποτάμια, λίμνες, ωκεανοί, εδάφη, ακόμα και σε πάγους στην Αρκτική.²³⁻²⁹ Μέρος του συνολικού φορτίου των μικροπλαστικών που διατίθενται στο περιβάλλον προέρχεται από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο Κεφάλαιο. Πολλές έρευνες έχουν αποδείξει τους κινδύνους που ενέχει η παρουσία των μικροπλαστικών σε κυτταρικό επίπεδο, σε επίπεδο πληθυσμού στα υδάτινα οικοσυστήματα, ακόμα και στον άνθρωπο.³⁰⁻³⁴ Μερικά από αυτά περιλαμβάνουν νευροτοξικότητα, διακοπή της ανοσολογικής λειτουργίας, νεοπλασία, οξειδωτικό στρες κ.λπ.³³ Επιπλέον, τα μικροπλαστικά παρέχουν ένα νέο υπόστρωμα για τον αποικισμό ποικίλων μικροοργανισμών σε υδατικά περιβάλλοντα σχηματίζοντας βιοφίλμ.^{35,36} Η θέση του μικροπλαστικού, στην οποία σχηματίζεται το βιοφίλμ ονομάζεται «plastisphere» και έχει αποδειχθεί ότι η μικροχλωρίδα που το αποικεί διαφέρει από αυτή που βρίσκεται ελεύθερη στα υδατικά σώματα.³⁷⁻⁴¹ Παράλληλα, μελέτες έχουν δείξει ότι ο σχηματισμός βιοφίλμ στην επιφάνεια των μικροπλαστικών ευνοεί την οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Horizontal Gene Transfer, HGT), αυξάνοντας έτσι τη μεταφορά γονιδίων μεταξύ διαφορετικών βακτηρίων. Αυτό, επιτρέπει τη μεταφορά παθογένειας και ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά γονίδια (Antibiotic Resistance Genes, ARGs) στο περιβάλλον.^{42,43} Μάλιστα, μελέτη το 2019 στην Κίνα, έδειξε ότι η αφθονία των ARGs στα μικροπλαστικά ήταν 1000 φορές υψηλότερη σε σχέση με αυτήν που βρέθηκε στο νερό ανακυκλοφορίας ενός συστήματος υδατοκαλλιέργειας.⁴⁴

Τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά αποτελούν μία κατηγορία αναδυόμενων ρύπων και έχουν εντοπιστεί σε ποικίλα περιβάλλοντα, είτε αυτά δέχονται μεγάλες περιβαλλοντικές πιέσεις είτε όχι.⁴⁵⁻⁴⁸ Αυτό έγκειται στην αυξημένη χρήση των αντιβιοτικών τα τελευταία χρόνια, ως αποτέλεσμα του ανθρώπινου τρόπου ζωής.⁴⁹ Τα ARGs προσδίδουν στους παθογόνους μικροοργανισμούς ανοχή έναντι στα αντιβιοτικά, με αποτέλεσμα τη μείωση του θεραπευτικού δυναμικού τους και την αύξηση της νοσηρότητας.⁵⁰ Συνεπώς, η θεραπεία με αντιβιοτικά, από την προσβολή κάποιου ανθεκτικού στα αντιβιοτικά βακτηρίου (Antibiotic Resistant Bacteria - ARB) στον άνθρωπο ή στα ζώα καθιστάτε δυσκολότερη. Έτσι, τα ARGs θεωρούνται σημαντικοί δείκτες για το χαρακτηρισμό του κινδύνου στην ανθρώπινη υγεία.⁵⁰

1.3 Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων ως πηγή ARGs

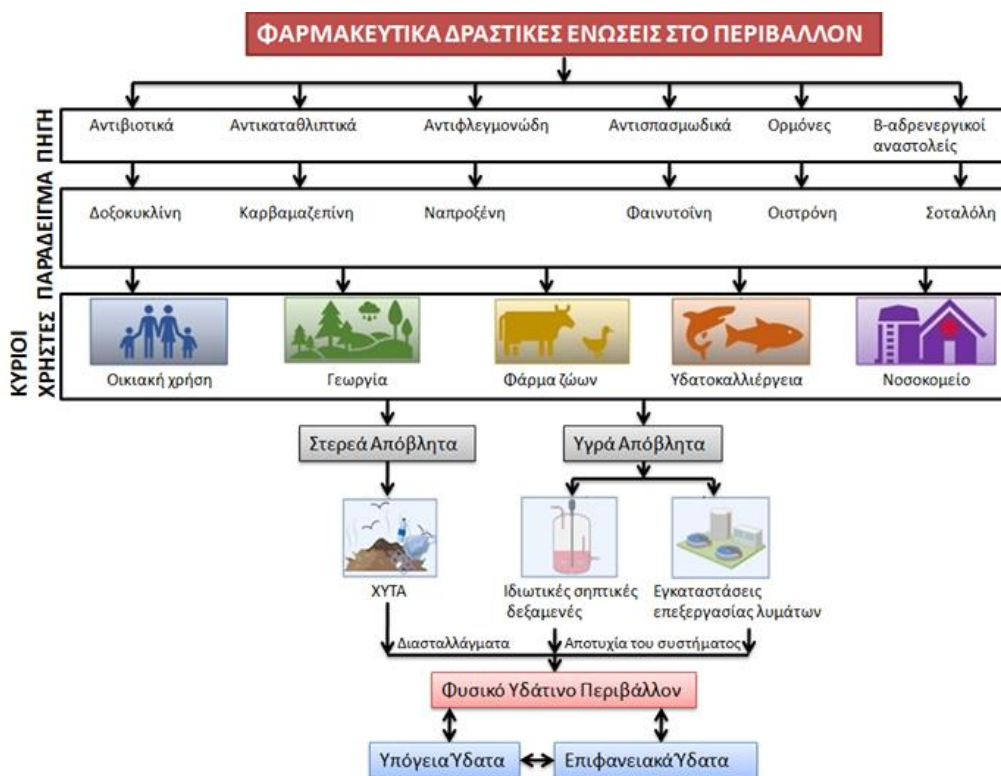
Έχει αναφερθεί ότι το 50% - 90% των χορηγούμενων αντιβιοτικών από ανθρώπους και ζώα, απεκκρίνεται μέσω των ούρων και των κοπράνων, ως μίγμα της μητρικής ένωσης ή των μεταβολιτών της, οδηγώντας τις ενώσεις αυτές σε ΕΕΛ.^{51,52} Από την άλλη, η χρήση των κοπράνων των ζώων, για την παραγωγή οργανικού λιπάσματος, με σκοπό την κάλυψη των αναγκών των καλλιεργειών σε θρεπτικά, αποτελεί πιθανή είσοδο των αντιβιοτικών στην τροφική αλυσίδα και τα επιφανειακά νερά μέσω φαινομένων απόπλυσης και απορροής του εκάστοτε πεδίου. Εκτός αυτού, ο λανθασμένος τρόπος απόρριψης των αχρησιμοποίητων φαρμακευτικών προϊόντων στη λεκάνη της τουαλέτας αποτελεί επίσης πηγή των εν λόγω ουσιών στα λύματα.⁵³

Ένας ακόμα παράγοντας που εντείνει την ανησυχία σχετικά με τα αντιβιοτικά είναι η ταυτοποίησή της μητρικής ένωσης ή των μεταβολιτών της στην έξοδο των ΕΕΛ. Η επαναλαμβανόμενη αυτή τάση, υποδεικνύει την ανικανότητα των συμβατικών μεθόδων επεξεργασίας να απομακρύνουν πλήρως τις ενώσεις αυτές, με αποτέλεσμα να διατίθενται στο περιβάλλον ή για αρδευτικούς σκοπούς.⁵⁴ Εντούτοις, η χρήση των ρυπασμένων αυτών νερών ενέχει κινδύνους για την εισαγωγή και συσσώρευση των αντιβιοτικών και άλλων φαρμακευτικών προϊόντων στην τροφική αλυσίδα με συνεπακόλουθα φαινόμενα βιομεγέθυνσης.⁵³

Η αναποτελεσματική αφαίρεση των ουσιών αυτών από τα λύματα δεν είναι ο μόνος τρόπος εισαγωγής τους στην τροφική πυραμίδα. Ο καταχρηστικός τρόπος απόρριψης στα στερεά απορρίμματα, οδηγεί τις ενώσεις αυτές σε χώρους υγειονομικής

ταφής (XYTA), όπου μέσω των διασταλαγμάτων καταλήγουν στον υπόγειο υδροφόρο.⁵³ Αντίστοιχα φαινόμενα παρατηρούνται με τη διάθεση επεξεργασμένης ιλύος σε XYTA. Η ιλύς που παράγεται κατά τη βιολογική επεξεργασία των αστικών λυμάτων, υπόκειται σε διαδικασία μείωσης του οργανικού φορτίου και σταθεροποίησης της. Παρόλα αυτά, εξακολουθεί να εμπεριέχει μικροποσότητες αντιβιοτικών και άλλων φαρμακευτικών ενώσεων, οι οποίες καταλήγουν και πάλι πίσω στον άνθρωπο.⁵⁵ Μπορεί μέχρι στιγμής η μεγαλύτερη ανησυχία σχετικά με την παρουσία των αντιβιοτικών στο περιβάλλον να είναι η ανάπτυξη ARGs, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις για πιθανή τοξικότητα ευαίσθητων οργανισμών από τα αντιβιοτικά.⁵⁶ Εν κατακλείδι, οι ΕΕΛ θεωρούνται ως βασικοί κόμβοι που συνδέουν τα ανθρώπινα με τα φυσικά περιβάλλοντα, δημιουργώντας τη δυνατότητα για οριζόντια μεταφορά ARGs μεταξύ των ανθρώπινων παθογόνων και τον περιβαλλοντικών βακτηρίων.^{49,57} Έτσι, οι ΕΕΛ αποτελούν πιθανά «σημεία αιχμής» για την εμφάνιση και τον πολλαπλασιασμό των ARGs, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για τη μελέτη και κατανόηση αυτής της συμπεριφοράς.⁵⁸⁻⁶⁰ Η τύχη και μεταφορά των αντιβιοτικών και άλλων φαρμακευτικών προϊόντων και η μετατροπή τους στις παροχές νερού φαίνεται στην Εικόνα 2.

Τα αντιβιοτικά απενεργοποιούν τη δράση των παθογόνων και μη παθογόνων βακτηρίων. Τα βακτήρια με ARGs αντιστέκονται στη δράση του αντιβιοτικού.



Εικόνα 2: Τύχη και μεταφορά των φαρμακευτικών προϊόντων και η μετατροπή τους στις παροχές νερού.⁵⁴

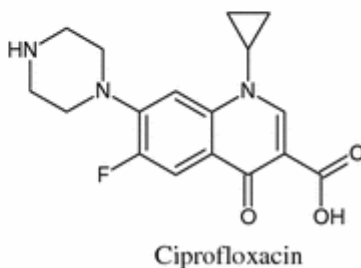
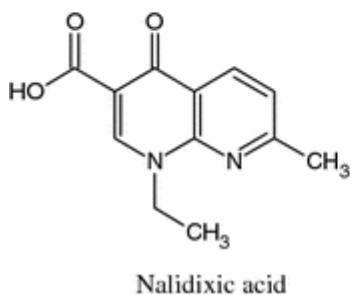
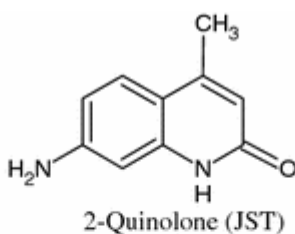
1.4 Μετάλλαξη και ανθεκτικότητα

Η υπέρμετρη χρήση των αντιβιοτικών έχει οδηγήσει σε αυξημένη αντίσταση σε αυτά, με ποσοστά ανοχής που ποικίλλουν ανάλογα με τον οργανισμό και τη γεωγραφική περιοχή. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, στην ενδογενή και την επίκτητη. Η πρώτη κατηγορία αφορά στη φυσική ικανότητα των στελεχών ενός βακτηριακού είδους να αντιστέκεται στη δράση κάποιου αντιμικροβιακού παράγοντα, όπως ένα αντιβιοτικό ή μία κατηγορία αντιβιοτικών, λόγω γενετικών χαρακτηριστικών. Η δεύτερη κατηγορία αφορά στην ανοχή ορισμένων στελεχών κάποιου βακτηριακού είδους έναντι κάποιου αντιμικροβιακού παράγοντα, ως αποτέλεσμα γονιδιακής μετάλλαξης στο χρωμοσωμικό DNA ή πρόσληψης γονιδίων ανθεκτικότητας. Γενικά, οι μεταλλάξεις γίνονται σπάνια και θεωρούνται τυχαία συμβάντα. Ωστόσο, σε περίπτωση τυχαίας χρωμοσωμικής μετάλλαξης, η εξάπλωση γίνεται ταχεία, λόγω της εκθετικής ανάπτυξης των μικροβιακών πληθυσμών. Από την άλλη, η πρόσληψη εξωγενούς γενετικού υλικού, που μεταφέρει γονίδια ανθεκτικότητας αποτελεί συχνό φαινόμενο εντός μιας βακτηριακής κοινότητας και επιτυγχάνεται μέσω της δράσης των πλασμιδίων. Τα πλασμίδια, είναι συνήθως κυκλικά μόρια δίκλωνου DNA και αποτελούν εξωχρωμοσωματικό γενετικό υλικό των προκαρυωτικών και κατώτερων ευκαριωτικών κυττάρων. Μέσω μηχανισμών αντιγραφής, μπορούν να αντιγράφονται αυτόνομα, ανεξάρτητα από το χρωμόσωμα του κυττάρου. Κατά την αντιγραφή, είναι δυνατόν να φέρουν γονίδια υπεύθυνα για τη μεταφορά τους από ένα βακτηριακό κύτταρο σε άλλο ή και γονίδια υπεύθυνα για την ανοχή σε αντιβιοτικά. Τα πλασμίδια αυτά ονομάζονται συζευκτικά ή αυτομεταβιβάσιμα και είναι υπαίτια για την οριζόντια μεταφορά γενετικής πληροφορίας. Συνεπώς, τα πλασμίδια, είναι οι κύριοι μεταφορείς γονιδίων ανθεκτικότητας και μεταφέρονται από ένα κύτταρο στο άλλο μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Horizontal Gene Transfer, HGT).⁶¹ Η επίκτητη ανθεκτικότητα είναι η βασική αιτία της διάδοσης της ανθεκτικότητας από ανθρωπογενείς δραστηριότητες στο περιβάλλον και φανερώνει την προσαρμογή των βακτηρίων σε νέα οικοσυστήματα.

1.4.1 Αντίσταση στις κινολόνες

Οι κινολόνες αποτελούν μία ομάδα αντιβιοτικών, που στοχεύουν στην αναστολή βασικών βακτηριακών ενζύμων όπως η DNA γυράση και η τοποϊσομεράση IV. Η αναστολή της δράσης των εν λόγω ενζύμων, οδηγεί σε αδυναμία συσπείρωσης της έλικας του DNA στα χρωμοσώματα. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί στην επιμήκυνση του βακτηριακού κυττάρου και τη συνεπακόλουθη λύση του. Εκτός αυτού, η αναδίπλωση της έλικας του DNA είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του γονιδιώματος και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η αύξηση του πληθυσμού.

Μέχρι στιγμής, έχουν αναγνωριστεί τρεις μηχανισμοί αντίστασης στις κινολόνες. Ο πρώτος αφορά μεταλλάξεις, οι οποίες παρεμποδίζουν τις λειτουργίες στις οποίες στοχεύει το αντιβιοτικό. Ο δεύτερος αφορά μεταλλάξεις, οι οποίες ενισχύουν την αδιαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, εμποδίζοντας έτσι τη συσσώρευση του φαρμάκου εντός του κυττάρου και ο τρίτος αφορά την υπέρ έκφραση αντλιών εκροής. Στο Πανεπιστήμιο της Αλαμπάμα, το 1994, απομονώθηκε ένα πλασμίδιο στο βακτήριο *Klebsiella pneumonia*, το οποίο παρείχε αντίσταση στην κινολόνη όταν μεταφέρθηκε σε κάποιο βακτηριακό στέλεχος. Οι επιστήμονες Tran & Jacoby απέδειξαν ότι το πλασμίδιο περιέχει ένα νέο γονίδιο, το οποίο ονόμασαν *qnr*. Το γονίδιο αυτό προστατεύει τη γυράση του DNA από την αναστολή της κινολόνης, ενώ η επίδρασή του στην τοποϊσομεράση IV είναι ακόμα ασαφής. Τέλος, φαίνεται ότι η οριζόντια μεταφορά γονιδίων είναι η πλέον υπεύθυνη για τη μεταφορά του γονιδίου αυτού εντός ενός βακτηριακού πληθυσμού.⁶²

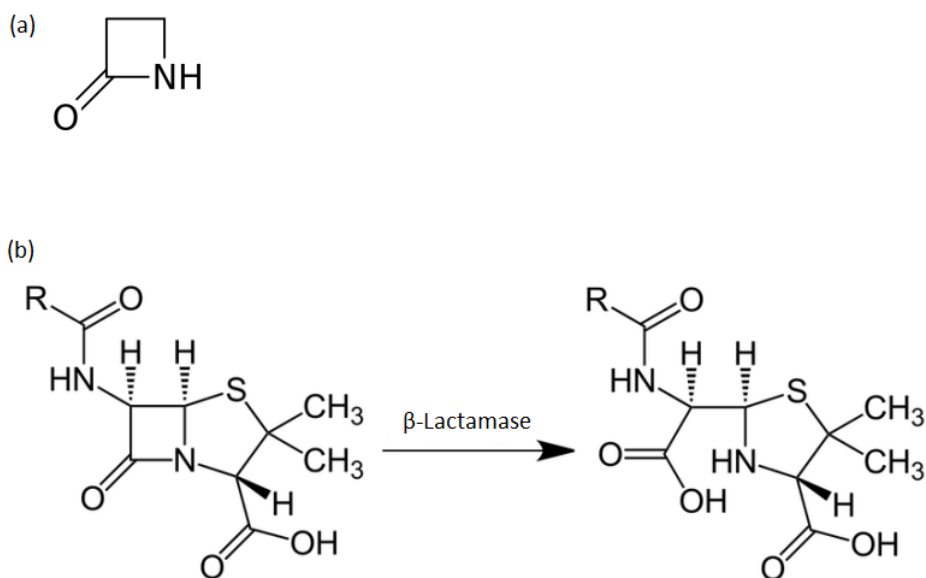


Εικόνα 3: Η χημική δομή τριών ενώσεων κινολόνης⁶³

1.4.2 Αντίσταση στις β-λακτάμες

Τα αντιβιοτικά β-λακτάμης αποτελούν μία ευρεία κατηγορία που περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό αντιβιοτικών, όπως την πενικιλίνη, την κεφαλοσπορίνη, τη μονοβακτάμη και τους αναστολείς β-λακταμασών. Υπολογίζεται ότι η πλειονότητα των χορηγούμενων αντιβιοτικών σε ανθρώπους εμπίπτουν στην κατηγορία των β-λακταμών και ως εκ τούτου είναι τα αντιβιοτικά με την ευρύτερη χρήση. Η αντιβακτηριακή δράση των αντιβιοτικών αυτών οφείλεται στην ύπαρξη ενός χαρακτηριστικού δακτυλίου, ο οποίος στοχεύει στην αναστολή του ενζύμου τρανσπεπτιδάση, το οποίο εκτελεί κεντρικό ρόλο στη σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος.⁶⁴

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί δύο μηχανισμοί ανοχής στα αντιβιοτικά β-λακτάμης. Ο πρώτος είναι η παραγωγή του ενζύμου β-λακταμάση, το οποίο συμβάλει στην υδρόλυση του χαρακτηριστικού δακτυλίου του αντιβιοτικού, με αποτέλεσμα να απενεργοποιεί την αντιβακτηριακή του δράση. Εξαίρεση σε αυτό παρουσιάζουν τα αντιβιοτικά καρμπαπενέμης, που εμπίπτουν στην κατηγορία των β-λακταμών, αλλά παρουσιάζουν μία σχετική ανοχή απέναντί στη δράση των β-λακταμασών.⁶⁵ Το γονίδιο της χρωμοσωμικής κεφαλοσπορινάσης (*ampC*), προσδίδει ανοχή σε μία κατηγορία αντιβιοτικών β-λακτάμης, όπως οι κεφαλοσπορίνες διευρυμένου φάσματος, η αμπικιλίνη και η κεφοξιτίνη.⁶⁶ Ο δεύτερος μηχανισμός ανοχής βασίζεται στην αυξημένη παραγωγή πενικιλινό-δεσμευτικών πρωτεϊνών (Penicillin Binding Proteins – PBPs), οι οποίες δεσμεύουν τα αντιβιοτικά β-λακτάμης, μειώνοντας έτσι τη δραστηρότητά τους.⁶⁷



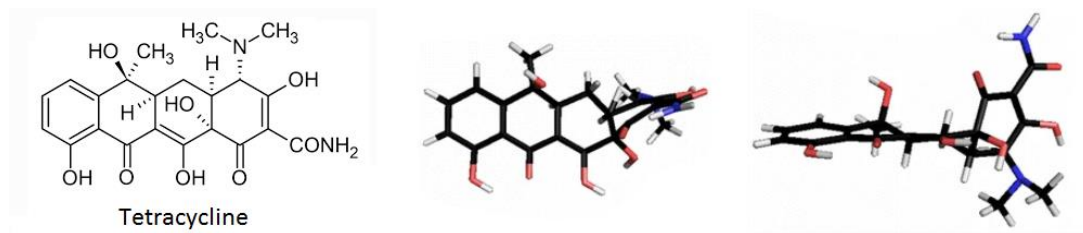
Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης β-λακταμασών. α) Ο δακτύλιος β-λακτάμης, β) Διάσπαση του δακτυλίου β-λακτάμης από τη β-λακταμάση και απενεργοποίηση των ιδιοτήτων του αντιβιοτικού⁶⁸

1.4.3 Αντίσταση στις τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες αποτελούν μία μεγάλη κατηγορία αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως. Η χρήση τους δεν περιορίζεται μόνο για ανθρώπινη κατανάλωση, αλλά είναι ιδιαίτερα δημοφιλής και στη κτηνοτροφία. Ανακαλύφθηκε πριν από περίπου 80 χρόνια και χρησιμοποιήθηκε ως αντιβιοτικό ευρέος φάσματος, για την αντιμετώπιση ασθενειών που προκαλούνται από αρνητικά και θετικά κατά Gram βακτήρια. Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στη δέσμευσή της με την υπομονάδα 30S του ριβοσώματος, αναστέλλοντας έτσι την πρωτεϊνσύνθεση.⁶⁹

Τα βακτήρια αποκτούν αντίσταση στην τετρακυκλίνη κυρίως μέσω οριζόντιας μεταφοράς ενός γονιδίου. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μία αντλία εκροής, μειώνοντας έτσι τη συσσώρευση αντιβιοτικού στο κυτταρόπλασμα. Ένα από τα γνωστότερα γονίδια που ευθύνεται για αυτό το μηχανισμό είναι το *tetA*. Ακόμα ένας μηχανισμός είναι η κωδικοποίηση της σύνθεσης μίας πρωτεΐνης, η οποία προστατεύει το ριβόσωμα από τη δέσμευσή του με το αντιβιοτικό. Με τον έναν, ή τον άλλο τρόπο, τα βακτήρια έχουν

αποκτήσει αντίσταση στα αντιβιοτικά τετρακυκλίνης, λόγω της ευρείας κατανάλωσής τους με τα χρόνια.⁷⁰

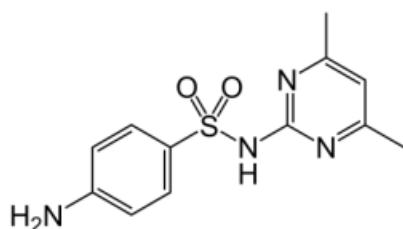


Εικόνα 5: Χημική δομή τετρακυκλίνης. Η συστροφή μεταξύ των δακτυλίων της τετρακυκλίνης επιτυγχάνει τη δέσμευσή της με το ριβόσωμα⁶⁹

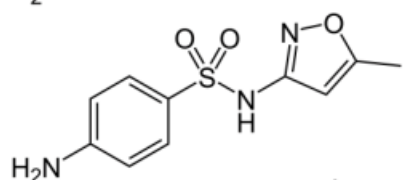
1.4.4 Αντίσταση στις σουλφοναμίδες

Οι σουλφοναμίδες αποτελούν μία κατηγορία αντιβιοτικών που έχουν μία λειτουργική ομάδα σουλφοναμιδίου. Ο τρόπος δράσης τους βασίζεται στην αναστολή του ενζύμου διϋδροπτεροϊκή συνθάση και κατ' επέκταση στην παρεμβολή της σύνθεσης φολικού οξέος. Το φολικό οξύ είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του DNA, την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων.

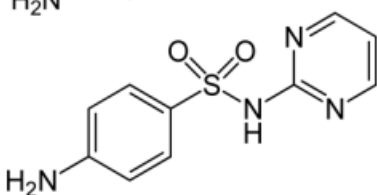
Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας στις σουλφοναμίδες συνίσταται στη μεταφορά γονιδίων, τα οποία προσδίδουν διαφορετική μορφή στη διϋδροπτεροϊκή συνθάση με αποτέλεσμα να διατηρεί τη λειτουργικότητά της. Δύο τέτοια γονίδια είναι τα *sul1* και *sul2*, τα οποία έχουν προσδιοριστεί σε πληθώρα κλινικών δοκιμών.⁷¹



Sulfamethazine (SMZ)



Sulfamethoxazole (SMX)



Sulfadiazine (SDZ)

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας Μεταπτυχιακής Διατριβής είναι να μελετήσει τη συμβολή των μικροπλαστικών στην εξάπλωση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά κατά την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων. Τόσο τα μικροπλαστικά, όσο και τα αντιβιοτικά εμπίπτουν σε μία κατηγορία ρυπογόνων παραγόντων που απασχολεί έντονα την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της ταυτοποίησης τους σε ιχνοποσότητες στο φυσικό περιβάλλον. Εντούτοις, η συνεχής και αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών και των μικροπλαστικών οδηγεί στην αδιάκοπη απελευθέρωση τους, όπου μέσω πολύπλοκων περιβαλλοντικών δίοδων καταλήγουν πίσω στον άνθρωπο. Η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών άγει τις ενώσεις αυτές σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, όπου υπόκεινται σε βιολογική επεξεργασία για την αποδόμηση και την καταστροφή της δραστηότητάς τους. Το γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές έχουν ανιχνευθεί στο φυσικό περιβάλλον έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων αδυνατούν να τις απομακρύνουν πλήρως. Τα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση του οργανικού φορτίου των αποβλήτων ευνοούνται από την ύπαρξη των μικροπλαστικών στο ενδιαίτημά τους, σχηματίζοντας βιοφίλμ. Ο σχηματισμός του τελευταίου διευκολύνει την οριζόντια μεταφορά γονιδίων που φέρουν αντίσταση στα αντιβιοτικά. Επομένως, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη της κατανόησης της συμπεριφοράς τους στα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων. Τα μελετώμενα δείγματα λήφθηκαν από μία τοπική Μονάδα Επεξεργασίας Αστικών Υγρών Αποβλήτων και στάλθηκαν στο Ερευνητικό Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης, όπου έτυχαν προεπεξεργασίας για την απομόνωση του γενετικού υλικού. Η εφαρμογή μοριακών μεθόδων έγινε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης. Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στο να προκύψουν δεδομένα που αφορούν τη συμπεριφορά των μικροπλαστικών σε μία τυπική μονάδα επεξεργασίας λυμάτων και η σχέση τους με τη μεταφορά παθογένειας. Επομένως τίθεται το ερώτημα: Συνεισφέρουν τα μικροπλαστικά στο σχηματισμό και τη μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά στο φυσικό περιβάλλον; Για το λόγο αυτό ακολουθήθηκε μία σειρά ερευνητικών πειραμάτων και συγκρίσεων των αποτελεσμάτων, ώστε να δοθεί απάντηση στο πιο πάνω ερώτημα.

Πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των δεδομένων που προέκυψαν μεταξύ των διαφορετικών ειδών δειγμάτων, ώστε να δοθούν απαντήσεις σχετικά με το ποιο από τα τρία εξεταζόμενα είδη δειγμάτων φέρει το μεγαλύτερο φορτίο ανθεκτικών γονιδίων. Επίσης, προέκυψαν συμπεράσματα αναφορικά με την απελευθέρωση των αναφερόμενων γονιδίων σε αντιπαράβολή με την εποχιακή διακύμανση. Ακόμα, απαντήθηκαν ερωτήματα που σχετίζονται με την κατανάλωση κάθε μίας από τις τέσσερις κατηγορίες αντιβιοτικών που μελετήθηκαν. Συνεπώς, μέσα από την παρούσα έρευνα προέκυψε βιβλιογραφική ανασκόπηση και πειραματική εφαρμογή καινοτόμων μεθόδων που αφορούν τα μέχρι σήμερα δεδομένα για τα μικροπλαστικά και τη σχέση τους με τα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

ΕΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΥΛΙΚΑ

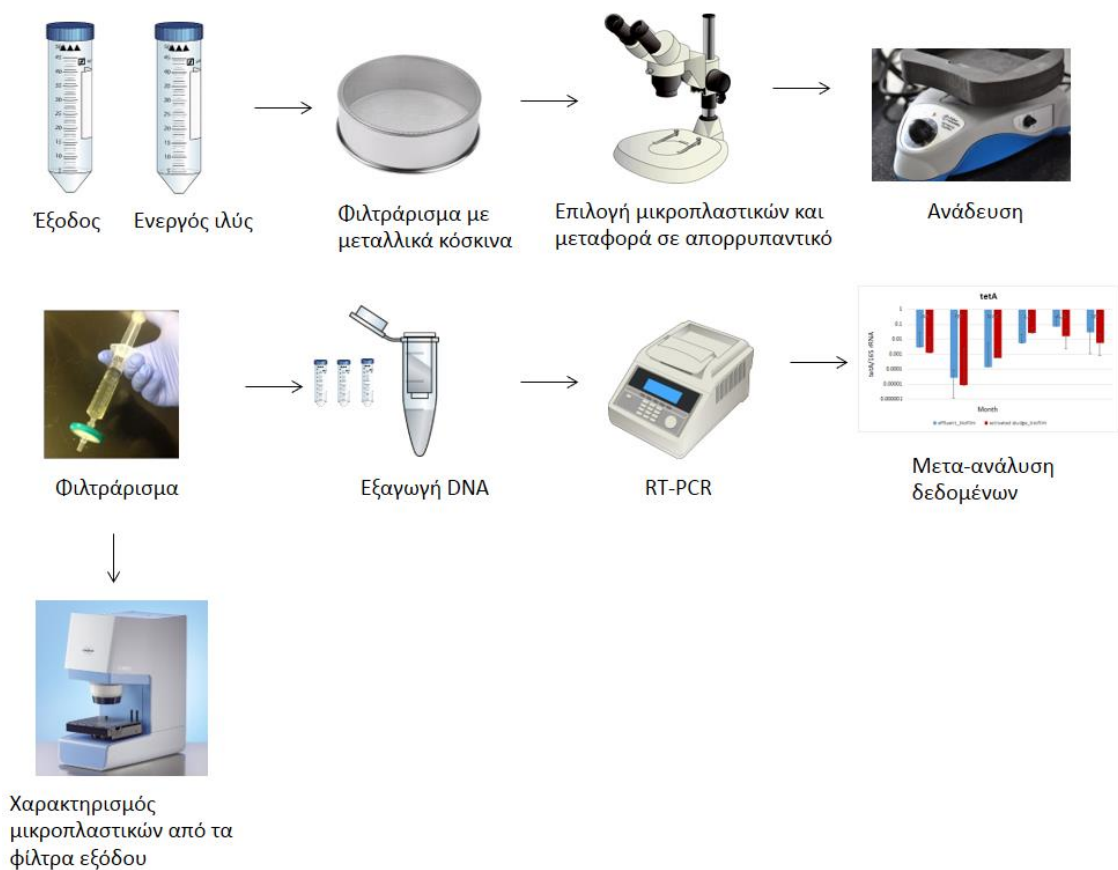
- Μεταλλικά φίλτρα διήθησης 1000 μm και 250 μm
- Φίλτρα διήθησης 20 μm (Nylon Net Filters).
- Σύριγγες χωρίς βελόνα.
- Αποστειρωμένα τρυβλία petri διαμέτρου 6 cm.
- Πιπέτες (Eppendorf).
- Διάλυμα SDS 2% w/v.

ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- Θάλαμος επώσης (Thermo Scientific Heraeus).
- Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού (Micro-FTIR)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Rayra).
- Φυγόκεντρος Centrifuge 5418 R (Eppendorf).
- Bio photometer (Eppendorf).
- Θερμικός κυκλοποιητής AdvancedPrimus 25 (Peqlab)

3.2 Μεθοδολογία που ακολουθήθηκε

Δείγματα από την έξοδο του βιολογικού και από την ανακυκλοφορία της δευτεροβάθμιας δεξαμενής καθίζησης πέρασαν από μεταλλικά φίλτρα με διαφορετικό άνοιγμα πόρων για τη συλλογή των μικροπλαστικών. Ακολούθως, επιλέχθηκαν μικροπλαστικά από τα δείγματα και ακολούθησε διαχωρισμός τους από το βιοφίλμ με χημικά και μηχανικά μέσα. Επιπλέον δείγματα λήφθηκαν από την ενεργό ιλύ χωρίς την πιο πάνω επεξεργασία. Τα μικροπλαστικά ταυτοποιήθηκαν και το βιοφίλμ συλλέχθηκε για απομόνωση του γενετικού του υλικού. Ακολούθησε πολλαπλασιασμός και ποσοτικοποίηση των γονιδίων στόχων με τη μέθοδο της RT-PCR. Τα δεδομένα συλλέχθηκαν και υπέστησαν επεξεργασίας για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Κάθε βήμα αναλύεται εκτενώς σε αυτό το Κεφάλαιο.



Εικόνα 7: Στάδια για την ποσοτικοποίηση των ARGs.

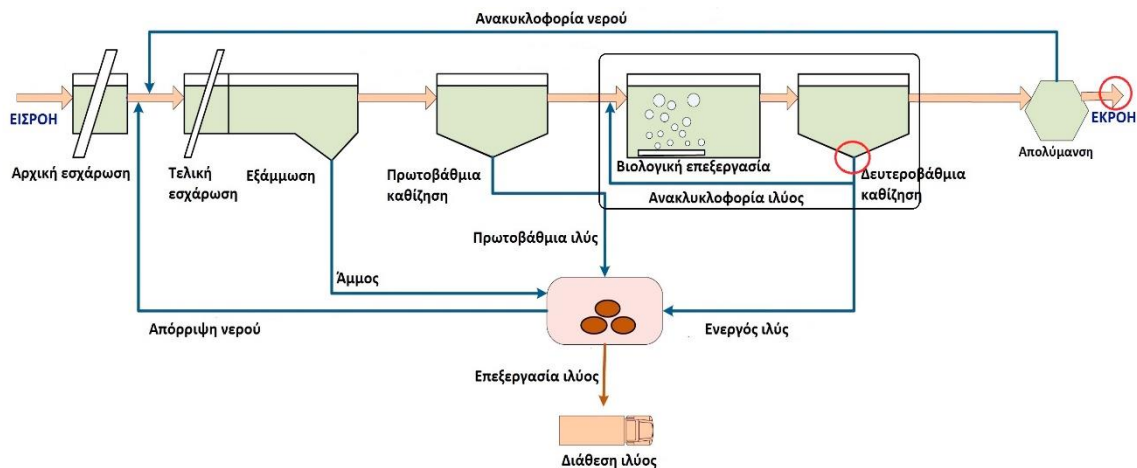
3.3 Δειγματοληψία

Τα δείγματα λήφθηκαν από δύο σημεία του σταθμού επεξεργασίας αστικών λυμάτων της Δ.Ε.Υ.Α Χανίων (Δημοτική Επιχείρηση Ύδρευσης Αποχέτευσης Χανίων), από Μηχανικό της εταιρείας. Το πρώτο σημείο δειγματοληψίας αφορά την ανακυκλοφορούσα ενεργό ιλύ της δευτεροβάθμιας δεξαμενής καθίζησης, ενώ το δεύτερο την έξοδο του επεξεργασμένου αποβλήτου. Τα δύο σημεία δειγματοληψίας φαίνονται στους κόκκινους κύκλους της Εικόνας 8, στην οποία απεικονίζεται ένα τυπικό διάγραμμα ροής μίας εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων.

Η δειγματοληψία χωρίστηκε σε δύο περιόδους προκειμένου να μελετηθεί η εποχιακή διακύμανση μεταξύ της κατανομής των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων. Αυτό έγκειται σε δύο παράγοντες. Ο πρώτος αφορά την θερμοκρασιακή διακύμανση λόγω διαφορετικών εποχών του έτους και ο δεύτερος την τουριστική διακύμανση. Για το λόγο αυτό, η πρώτη δειγματοληπτική περίοδος περιλάμβανε τους

μήνες Ιανουάριο, Φεβρουάριο και Μάρτιο του 2020, ενώ η δεύτερη τους Ιούλιο, Αύγουστο και Σεπτέμβριο του ίδιου έτους.

Όλα τα δείγματα λήφθηκαν σε τριπλέτες για την εξομάλυνση τυχόν αποκλίσεων και συνεπώς τη λήψη αποτελεσμάτων που να αντικατοπτρίζουν όσο το δυνατόν καλύτερα την πραγματικότητα. Συνεπώς συλλέχθηκαν 9 δείγματα ανά περίοδο. Αναλυτικότερα, λήφθηκε 1 L από την ενεργό ιλύ και 50 L από την έξοδο, το οποίο στη συνέχεια αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.



Εικόνα 8: Σημεία δειγματοληψίας σε ένα τυπικό σχεδιάγραμμα σταθμού επεξεργασίας λυμάτων.¹⁹

3.4 Συλλογή μικροπλαστικών

Τα δείγματα εξόδου και ενεργού ιλύος έτυχαν προεπεξεργασίας πριν από την απομόνωση του γενετικού τους υλικού. Σκοπός της προεπεξεργασίας είναι η συλλογή των μικροπλαστικών και ο μετέπειτα διαχωρισμός τους από το βιοφίλμ. Για το λόγο αυτό τα δείγματα πέρασαν μέσα από δύο μεταλλικά κόσκινα, με άνοιγμα πόρων 1000 μm και 250 μm , για το διαχωρισμό των στερεών σωματιδίων. Τα δείγματα ιλύος έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα και για αυτό ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό για να υποβοηθηθεί η διαδικασία. Ακολούθως, έγινε συλλογή των σωματιδίων που συγκρατήθηκαν από το φίλτρο. Σε αυτό το σημείο, το μέγεθος των μικροπλαστικών κυμαίνεται από 250 μm μέχρι 1 mm. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο στερεοσκόπιο, όπου έγινε η συλλογή των μικροπλαστικών με τη χρήση λαβίδας και μεταφέρθηκαν σε διάλυμα SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) περιεκτικότητας 2% w/v. Σημειώνεται ότι για την πρώτη δειγματοληπτική περίοδο (Ιανουάριος, Φεβρουάριος και Μάρτιος)

συλλέχθηκαν 25 μικροπλαστικά από κάθε δείγμα, ενώ για τη δεύτερη (Ιούλιος, Αύγουστος και Σεπτέμβριος) συλλέχθηκαν 30 μικροπλαστικά από κάθε δείγμα. Αυτό έγινε προκειμένου να διασφαλιστεί μεγαλύτερη συγκέντρωση γενετικού υλικού. Τη μεταφορά των μικροπλαστικών στο SDS ακολούθησε η ανάδευση τους για 2 ώρες στα 105 rpm (περιστροφές ανά λεπτό) και σε θερμοκρασία δωματίου. Το SDS δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας και σε συνδυασμό με την ανάδευση επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του βιοφίλμ από τα μικροπλαστικά. Σε αυτό το σημείο τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την απομάκρυνση των διαχωρισμένων πλέον μικροπλαστικών από τα προς επεξεργασία δείγματα.

3.5 Συλλογή βιοφίλμ

Προκειμένου να απομακρυνθούν τα μικροπλαστικά από το δείγμα, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η διήθηση τους με φίλτρα με μέγεθος πόρων μικρότερο από το μέγεθος των μικροπλαστικών. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα Nylon Net με διάμετρο πόρων 20 μm . Η διήθηση των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας χωρίς βελόνα και με ξέπλυμα των δειγμάτων με απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό, προκειμένου να διασφαλιστεί η διέλευση όλου του δείγματος από το φίλτρο. Έτσι, τα μικροπλαστικά συγκρατήθηκαν από το φίλτρο, ενώ το βιολογικό υλικό διαπέρασε το φίλτρο. Σε αυτό το σημείο τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι να γίνει η απομόνωση του γενετικού υλικού. Τα φίλτρα των δειγμάτων της εξόδου, με τα συγκρατημένα μικροπλαστικά στην επιφάνειά τους, ξηράθηκαν στους 40°C για τρεις ημέρες και στη συνέχεια τα πιθανά είδη μικροπλαστικών ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού (micro Fourier Transform infrared spectroscopy, micro-FTIR).

Η πιο πάνω διαδικασία έλαβε χώρα σε αποστειρωμένο περιβάλλον. Προηγήθηκε αποστείρωση του Laminar Flow Hood και των υλικών με UV ακτινοβολία ($\lambda = 254 \text{ nm}$) για 15-20 λεπτά. Τέλος, σημειώνεται ότι λήφθηκαν επιπλέον δείγματα από την ανακυκλοφορία της δευτεροβάθμιας δεξαμενής καθίζησης, στα οποία απομονώθηκε το γενετικό υλικό χωρίς καμία προηγούμενη επεξεργασίας. Αυτό κρίθηκε αναγκαίο, ώστε να μελετηθεί το συνολικό φορτίο των ARGs που εμπεριέχεται στο δείγμα και να γίνει αντιπαραβολή με το φορτίο που βρίσκεται προσκολλημένο πάνω στα μικροπλαστικά.

3.6 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA μπορεί να γίνει με τη χρήση απλών χημικών αντιδραστηρίων, με εμπορικά διαθέσιμα συστήματα αντιδραστηρίων, γνωστά ως κίτ, ή με αυτοματοποιημένα συστήματα (ρομπότ). Για την πραγματοποίηση της απομόνωσης του γενετικού υλικού από τα δείγματα ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο Quick-Start DNeasy® PowerSoil® Kit. Το συγκεκριμένο κιτ, χρησιμοποιείται για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA, συνήθως για δείγματα εδάφους, χρησιμοποιώντας 0.25 gr δείγματος. Παρόλα αυτά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για υγρά περιβαλλοντικά δείγματα με μικρή τροποποίηση του πρωτοκόλλου. Για το λόγο αυτό 1 mL από το κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 4000-5000 rcf (σχετική φυγοκεντρική δύναμη) προκειμένου όλο το γενετικό υλικό να καθιζάνει στο κάτω μέρος του σωληνάριου erppendorf. Ακολούθως, έγινε απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και διαλυτοποίηση του ιζήματος με το υγρό που εμπεριέχεται στα Power Beat Tube. Μετέπειτα, το νέο διάλυμα μεταφέρθηκε πίσω στο Power Beat Tube. Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή. Τα βασικά βήματα που ακολουθούνται για την απομόνωση του DNA με αυτό το κιτ είναι τα εξής:

1. Αφαίρεση χουμικών ενώσεων και απομάκρυνση αναστολέων.
2. Λύση των κυττάρων με χημικές ενώσεις και μηχανική ανάδευση.
3. Προσρόφηση ολικού γονιδιωματικού DNA στη μεμβράνη πυριτίου.
4. Έκλυση DNA από τη μεμβράνη.
5. Καθαρισμός DNA.
6. Αποθήκευση στους -20 °C μέχρι την ανάλυση PCR.

3.7 Ποσοτικοποίηση DNA

Η ποιότητα του απομονωμένου DNA επηρεάζει την απόδοση των μετέπειτα εφαρμογών. Για το λόγο αυτό, η μέτρηση της απορρόφησης του DNA κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία συνίσταται προκειμένου να γνωρίζει ο αναλυτής, την «καθαρότητα» των δειγμάτων, η οποία εκτιμάται με την αναλογία της απορρόφησης στα 260 nm/280 nm. Οι τιμές της αναλογίας της συγκέντρωσης του DNA στην περιοχή 1.8 - 2.0 θεωρούνται αποδεκτές.⁷²

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης κάθε δείγματος έγινε με τη χρήση του Biophotometer (Eppendorf). Το όργανο αυτό είναι σχεδιασμένο για να ποσοτικοποιεί συγκεντρώσεις νουκλεϊκών οξέων. Χρησιμοποιείται για τη φασματική ανάλυση μικροσταγονιδίων δειγμάτων με όγκο 1-3 μL . Η ποσοτικοποίηση μικρο-όγκων λαμβάνει χώρα σε μία αυτοματοποιημένη ροή εργασίας, βασισμένη στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στα 260 nm. Αυτό έγκειται στο ότι τα νουκλεϊκά οξέα διαθέτουν ένα μέγιστο απορρόφησης σε αυτό το μήκος κύματος. Η φασματική ανάγνωση στα 260 nm αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο για την ανίχνευση dsDNA (double stranded DNA), ssDNA (single stranded DNA), RNA και ολιγονουκλεοτιδίων σε ένα διάλυμα.⁷³

Στον υποδοχέα του συστήματος φορτώθηκαν 3 μL από κάθε δείγμα και το πλήρες φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες ορατό (UV-Vis) εμφανίστηκε στην οθόνη του οργάνου. Η συγκέντρωση του γενετικού υλικού στο κάθε δείγμα υπολογίστηκε με βάση τη σχέση του Beer-Lambert όπως φαίνεται πιο κάτω. Τέλος, μέσω του οργάνου, προσδιορίστηκε η καθαρότητα των δειγμάτων με τον υπολογισμό της αναλογίας της απορρόφησης στα 260 nm/280 nm.

$$\text{Νόμος του Beer-Lambert: } A = -\log T = \log \left(\frac{I_0}{I} \right) = ebc$$

Στην πιο πάνω σχέση όπου,

A: Απορρόφηση (μονάδες απορρόφησης)

T: Διαπερατότητα

I_0 : Ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας (cd)

I: Ένταση ακτινοβολίας που διαπερνά το δείγμα (cd)

e: Συντελεστής γραμμομοριακής απορρόφησης (L/mol.m)

b: Μήκος που διαπερνά η ακτινοβολία μέσα στο δείγμα (m)

c: Συγκέντρωση ουσίας (mol/L)⁷³

3.8 PCR Πραγματικού Χρόνου (RT-PCR)

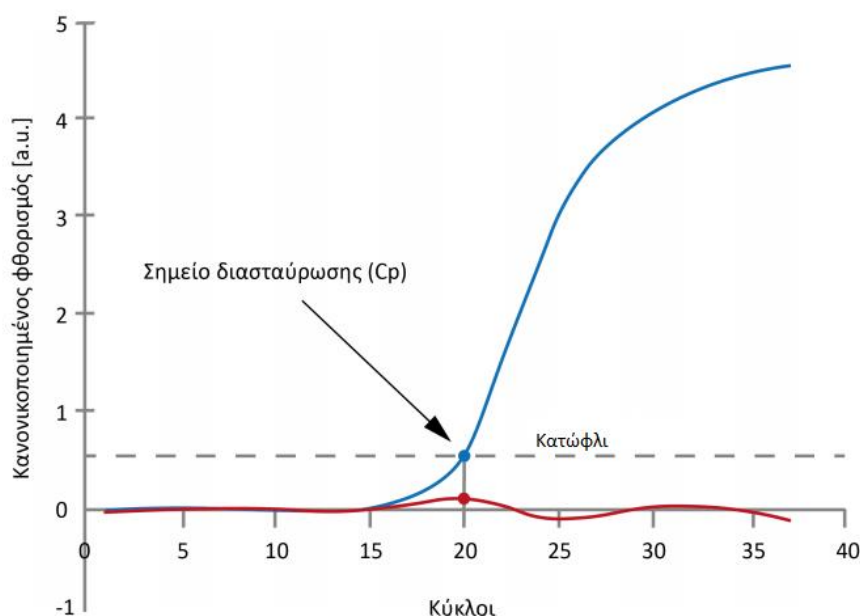
Αδιαμφισβήτητα, η εφεύρεση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR), έφερε επανάσταση στον τομέα της μοριακής βιολογίας. Η υψηλή ευαισθησία, σε συνδυασμό με την ταχύτητα και το χαμηλό κόστος εφαρμογής, την καθιστούν μία από τις πιο χρήσιμες μοριακές τεχνικές που εφαρμόζονται

στα ερευνητικά εργαστήρια. Η ποσοτική PCR (RT-PCR) επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της αλληλουχίας στόχου σε πραγματικό χρόνο, παρέχοντας τη δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο.

Οι μηχανισμοί ανίχνευσης του DNA βασίζονται στη χρήση φθορίζων χρωστικών και ο φθορισμός είναι ανάλογος της παραγωγής αντιγράφων DNA που παράγονται σε κάθε κύκλο.⁷⁴ Για να πραγματοποιηθεί η ποσοτικοποίηση του DNA πρέπει να υπολογιστεί η παράμετρος Cp (Crossing point ή threshold cycle, Ct). Η τιμή αυτή, αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά ένα βασικό επίπεδο (baseline) και φθάνει ένα κατώφλι (threshold) όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 1. Το κατώφλι υπολογίζεται από το μηχανήμα σύμφωνα με τη διακύμανση των τιμών του βασικού επιπέδου. Θεωρώντας ότι στο σημείο Cp η αντίδραση βρίσκεται στην εκθετική φάση, τότε τα προϊόντα της αντίδρασης διπλασιάζονται σε κάθε κύκλο, και ως εκ τούτου η απόδοση της αντίδρασης είναι ίση με 2. Λαμβάνοντας υπόψη την τελευταία, μπορεί να υπολογιστεί ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου ενδιαφέροντος βάσει της πιο κάτω εξίσωσης:

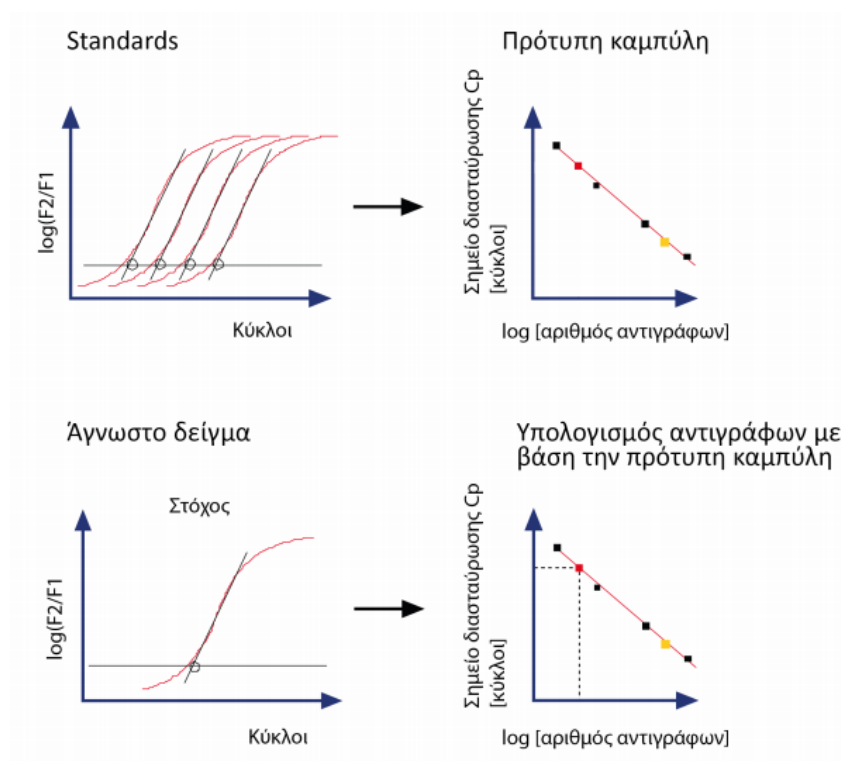
$$N_0 = N_t / (E+1)^{Cp}$$

Στην πιο πάνω εξίσωση, όπου N_0 είναι ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου στόχου (gene copies) στο αρχικό δείγμα, N_t είναι ο αριθμός των αντιγράφων γονιδίου στόχου στο σημείο Cp, και E (Efficiency) είναι η απόδοση της αντίδρασης ($E = 2$ όταν η αντίδραση βρίσκεται στην εκθετική φάση). Η τιμή N_t υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.⁷⁵



Διάγραμμα 1: Η καμπύλη της ποσοτικής αντίδρασης PCR. Η οριζόντια γκρι γραμμή δείχνει το κατώφλι, στο οποίο ο φθορισμός των προϊόντων αρχίζει να ξεχωρίζει από το βασικό επίπεδο. Ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό αντιστοιχεί στην τιμή C_p .⁷⁵

Η πρότυπη καμπύλη βασίζεται στη χρήση δειγμάτων αναφοράς με γνωστό αριθμό αντιγράφων γονιδίου στόχου. Τα δείγματα αναφοράς, υποβάλλονται σε μία σειρά τουλάχιστον τεσσάρων διαδοχικών αραιώσεων και κάθε δείγμα αναφοράς υποβάλλεται στην ίδια RT-PCR με αυτή των πειραματικών δειγμάτων. Μετά το πέρας της αντίδρασης, η πρότυπη καμπύλη εμφανίζεται σε γράφημα ως μία ευθεία γραμμή που εκφράζει την τιμή C_p (ή C_t) κάθε δείγματος αναφοράς σε σχέση με τη συγκέντρωση των γονιδίων στόχου (αριθμός αντιγράφων γονιδίου στόχου στο δείγμα αναφοράς). Αφού λοιπόν κατασκευαστούν οι πρότυπες καμπύλες κάθε υπό μελέτη γονιδίου και υποβληθούν τα πειραματικά δείγματα σε αντίδραση RT-PCR, υπολογίζεται ο αριθμός των αντιγράφων του κάθε γονιδίου στο σημείο C_p . Έτσι το αποτέλεσμα της έκφρασης ενός γονιδίου, δίνεται ως αριθμός αντιγράφων γονιδίου στόχου ανά μονάδα αρχικού δείγματος (π.χ. n αντίγραφα / mL δείγματος).⁷⁶



Εικόνα 9: Απόλυτη ποσοτικοποίηση των αντιγράφων γονιδίων με τη χρήση πρότυπης καμπύλης. Η ποσοτικοποίηση του υπό μελέτη γονιδίου γίνεται με σύγκριση της τιμής Cp του αγνώστου δείγματος (δίνεται από το μηχάνημα) και τη χρήση της πρότυπης καμπύλης.

Οι μέθοδοι ανίχνευσης των προϊόντων RT-PCR μπορεί να γίνει με τη χρήση μη ειδικών φθορίζων τεχνικών ή με τη χρήση ιχνηθετών. Για αυτή την πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε η χρωστική SYBR green I. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ενσωμάτωση της χρωστικής με δίκλωνο μόριο DNA (double stranded DNA, dsDNA). Η ουσία αυτή παρουσιάζει ελάχιστο έως καθόλου φθορισμό όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα, αλλά φθορίζει όταν δεσμευθεί με το DNA. Έτσι, ο φθορισμός της έχει γραμμική συσχέτιση με τη συγκέντρωση του παραγόμενου προϊόντος.⁷⁵

Για την πραγμάτωση της RT-PCR με τη χρωστική SYBR Green είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός κοινού διαλύματος (master mix) για κάθε γονίδιο-στόχο. Το διάλυμα εμπεριέχει σε προκαθορισμένες ποσότητες τη χρωστική (SYBR Green), τους εκκινητές, το ρυθμιστικό διάλυμα, τα ιόντα μαγνησίου, τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, τη taq πολυμεράση και το δείγμα αναφοράς που έχει εκχυλιστεί κατά την απομόνωση. Για την ανάλυση των επιλεγμένων γονιδίων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 5 μL πρότυπου DNA για κάθε προς ανάλυση δείγμα και οι όγκοι αντιδραστηρίων που

αναφέρονται στην τρέχουσα βιβλιογραφία. Επομένως, ο όγκος του διαλύματος μείξης παρασκευάστηκε ανάλογα με τον αριθμό των προς ανάλυση δειγμάτων και το κάθε δείγμα αναλύθηκε τρεις φορές ώστε τα αποτελέσματα να αντικατοπτρίζουν όσο το δυνατόν καλύτερα την πραγματικότητα. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η αλληλουχία των εκκινητών για κάθε γονίδιο στόχο που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση RT-PCR. Η υλοποίηση της διεργασίας προϋποθέτει για κάθε προς ανάλυση γονίδιο την παρασκευή ενός διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας. Σε αυτό, δεν εμπεριέχεται γενετικό υλικό και η εξισορρόπηση του όγκου γίνεται με την προσθήκη δις απεσταγμένο νερού (ddH₂O). Έτσι, αφού παρασκευάστηκαν τα απαραίτητα διαλύματα, τοποθετήθηκαν στο ειδικό πλακίδιο 96 θέσεων και στη συνέχεια φορτώθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος ρυθμίστηκε να εκτελέσει το επιθυμητό πρόγραμμα θερμοκρασίας και χρόνου. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι το πρόγραμμα θερμοκρασίας και χρόνου διαφέρει για κάθε γονίδιο στόχο. Ο θερμικός κυκλοποιητής συνδέθηκε με τον ηλεκτρονικό υπολογιστή και με την έναρξη της διεργασίας εμφανίστηκε στην οθόνη το σήμα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Τέλος, καταγράφηκε η τιμή C_p και μέσω των πρότυπων καμπυλών αναφοράς υπολογίστηκε ο αριθμός των αντιγράφων γονιδίων που αντιστοιχεί στο C_p για κάθε γονίδιο στόχο. Οι όγκοι των συστατικών της αντίδρασης RT-PCR καθώς και οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς για κάθε γονίδιο στόχο παρουσιάζονται στο Παράρτημα.

Πίνακας 1: Αλληλουχία εκκινητών RT-PCR.

Γονίδιο στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Προϊόν PCR (bp)	Βιβλιογραφία
16S rRNA	8-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	77
	1492-R	GGTTACCTTGTTACGACTT		
<i>qnrA</i>	<i>qnrA</i> -F	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	543	78
	<i>qnrA</i> -R	ATCCAGATCGGCAAAGGTTA		
<i>ampC</i>	<i>ampC</i> -F	TTCTATCAAMACTGGCARCC	550	79
	<i>ampC</i> -R	CCYTTTTATGTACCCAYGA		

<i>tetA</i>	<i>tetA</i> -F	CGATATCACTGATGGCGATG	318	80
	<i>tetA</i> -R	TGTCCGACAAGTTGCATGAT		
<i>sul2</i>	<i>sul2</i> -F	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	293	81
	<i>sul2</i> -R	GCGTTTGATACCGGCACCCGT		

3.9 Ανάλυση δεδομένων RT-PCR

Τα δεδομένα που λήφθηκαν με την ολοκλήρωση της RT-PCR έτυχαν της ανάλογης επεξεργασίας ώστε να εξαχθούν τα αποτελέσματα. Για κάθε δείγμα καταγράφηκε η τιμή Cp και υπολογίστηκε ο αριθμός των γονιδίων στόχων, με τον τρόπο που αναλύθηκε πιο πάνω. Έτσι, για κάθε δείγμα υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών Cp, το Nt (αριθμός των γονιδίων στόχων στο Cp) και η αντίστοιχη τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) ώστε να εξαχθεί ένα μέτρο της διακύμανσης μεταξύ των τιμών. Ακολούθως, υπολογίστηκε η αβεβαιότητα των τιμών, ώστε να εισαχθεί στα Διαγράμματα που αναλύονται στο επόμενο Κεφάλαιο, και ως εκ τούτου να αναπαρασταθεί η μεταβλητότητα των δεδομένων. Τέλος, υπολογίστηκε η αναλογία των επιλεγμένων ARGs προς το 16S rRNA γονίδιο. Αυτό έγκειται στο ότι το γονίδιο 16S rRNA αποτελεί ένα σχετικά σταθερό μόριο, με μεγάλη αλληλουχία και παρόν σε 5-10 αντίγραφα σε κάθε βακτήριο, γεγονός που καθιστά υψηλή την ευαισθησία ανίχνευσης. Ως εκ τούτου, η αναλογία ARG/16S rRNA παρέχει ένα μέτρο προσδιορισμού της συγκέντρωσης του ARG ως προς την πλειονότητα του γονιδιώματος.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε αυτό το Κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις πιο πάνω αναλύσεις. Δίνονται απαντήσεις αναφορικά με την ταυτοποίηση των μικροπλαστικών που συλλέχθηκαν από τα δείγματα εξόδου και ανακυκλοφορίας του βιολογικού σταθμού. Επίσης, παρουσιάζονται ποσοτικά δεδομένα αναφορικά με την απομόνωση του γενετικού υλικού από όλα τα δείγματα που επεξεργάστηκαν. Τέλος, εκφράζεται διαγραμματικά η ποσοτικοποίηση των επιλεγμένων γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, αναφορικά με το σημείο δειγματοληψίας και την εποχιακή διακύμανση. Για σκοπούς διευκόλυνσης της παρουσίασης των αποτελεσμάτων, ο Πίνακας 2 παρουσιάζει την κωδικοποίηση των δειγμάτων σε σχέση με τον μήνα και το σημείο δειγματοληψίας.

Πίνακας 2: Κωδικοποίηση δειγμάτων με βάση το μήνα δειγματοληψίας και το σημείο δειγματοληψίας

Μήνας Δειγματοληψίας	Σημείο Δειγματοληψίας	Αρ. Δείγματος
Ιανουάριος	effluent_biofilm	1
		2
	activated sludge_biofilm	3
		4
		5
	activated sludge	6
		7
		8
Φεβρουάριος	effluent_biofilm	9
		10
	activated sludge_biofilm	11
		12

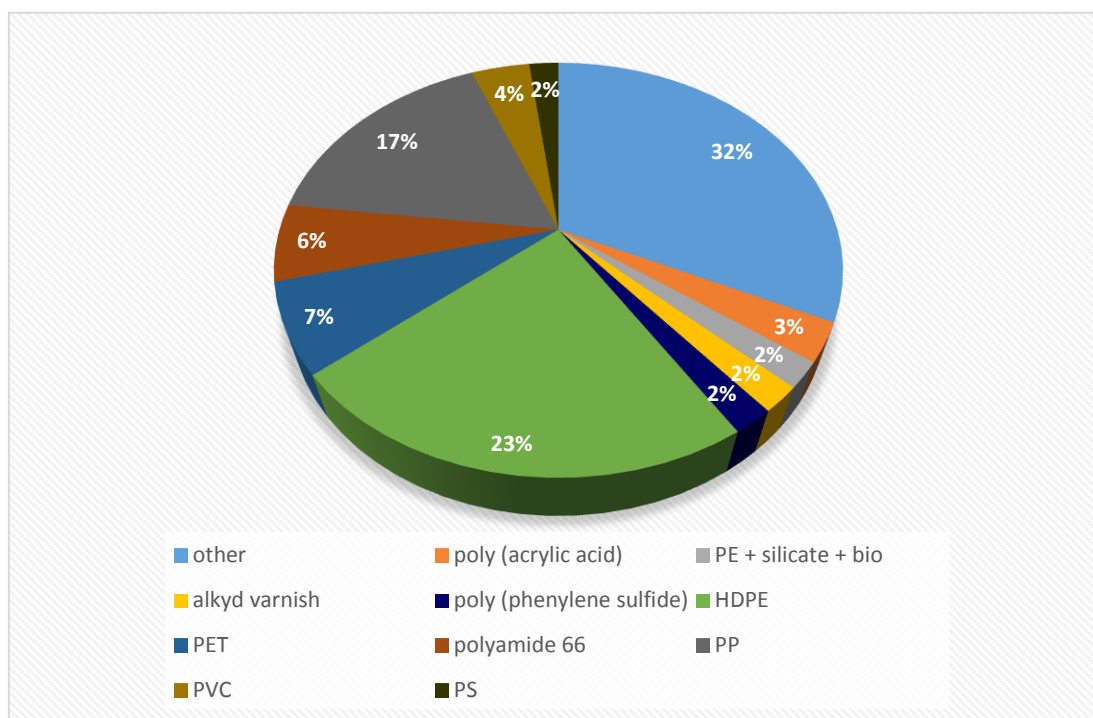
Μήνας Δειγματοληψίας	Σημείο Δειγματοληψίας	Αρ. Δείγματος
	activated sludge	13
		14
		15
		16
Μάρτιος	effluent_biofilm	17
		18
		19
	activated sludge_biofilm	20
		21
		22
	activated sludge	23
		24
		25
Ιούλιος	effluent_biofilm	26
		27
		28
	activated sludge_biofilm	29
		30
		31
	activated sludge	32
		33
		34
Αύγουστος	effluent_biofilm	35

Μήνας Δειγματοληψίας	Σημείο Δειγματοληψίας	Αρ. Δείγματος
		36
		37
	activated sludge_biofilm	38
		39
	activated sludge	40
		41
		42
Σεπτέμβριος	effluent_biofilm	43
		44
		45
	activated sludge_biofilm	46
		47
		48
	activated sludge	49
		50
		51

4.1 Αποτελέσματα Ταυτοποίησης μικροπλαστικών

Τον διαχωρισμό των κυττάρων της εξόδου από τα μικροπλαστικά, ακολούθησε η ταυτοποίηση τους με τη χρήση φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (micro-FTIR). Το FTIR επιτρέπει τον προσδιορισμό χαρακτηριστικών χημικών δεσμών και η ταυτοποίηση της σύνθεσης του πολυμερούς γίνεται με τη χρήση βιβλιογραφικών αναφορών.⁸² Μερικές από αυτές είναι οι Hummel Polymers and Additives Library (2011 spectra), Polymer Additives and Plasticizers (1799 spectra), Sprouse Scientific Systems

Polymers by ATR Library (500 spectra) και Rubber Compounding Materials (350 spectra). Τα αποτελέσματα φαίνονται στο πιο κάτω κυκλικό Διάγραμμα, όπου παρουσιάζεται η ποσοστιαία συνεισφορά κάθε πολυμερούς, στο σύνολο των προς εξέταση δειγμάτων. Συνολικά, στα δείγματα εξόδου, ταυτοποιήθηκαν 39 διαφορετικά είδη πολυμερών. Από αυτά, τα κυριότερα ήταν το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (High Density Polyethylene, HDPE), το πολυπροπυλένιο (Polypropylene, PP) και το τереφθαλικό πολυαιθυλένιο (Polyethylene Terephthalate, PET) με τη συνολική ποσοστιαία αφθονία στα δείγματα εξόδου να ήταν 23%, 17% και 7% αντίστοιχα. Σε ποσοστό 6% ανιχνεύθηκε το νάιλον 66 (Nylon 66/Polyamide 66), ενώ σε μικρότερα ποσοστά ακολούθησαν το πολυβινυλοχλωρίδιο (Polyvinyl Chloride, PVC), το πολυακρυλικό οξύ (Poly (acrylic acid), PAA), το πολυστυρόλιο (Polystyrene, PS), το πολυφαινυλενόθειο (Poly (phenylene sulfide), PPS) και άλλα.



Διάγραμμα 2: Συνολική κατανομή των τύπων των πολυμερών στα δείγματα εξόδου.

4.2 Αποτελέσματα Ποσοτικοποίησης απομονωμένου DNA

Μετά την εκχύλιση του γενετικού υλικού από τα δείγματα, ακολούθησε η ποσοτικοποίηση του με τη χρήση του Bio-photometer (Eppendorf). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μελετήθηκαν τρία είδη δειγμάτων. Αυτά αφορούν τη μελέτη των ARGs

που βρίσκονται προσκολλημένα στα μικροπλαστικά των δειγμάτων της εξόδου του βιολογικού σταθμού (effluent_biofilm), τα ARGs που βρίσκονται προσκολλημένα στα μικροπλαστικά των δειγμάτων της ενεργού ιλύος (activated sludge_biofilm) και τα ARGs που βρίσκονται συνολικά στο δείγμα ενεργού ιλύος (activated sludge). Τα αποτελέσματα του Bio-photometer συνοψίζονται στον Πίνακα 3. Διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση μικροβιακού DNA που φέρουν τα συλλεγόμενα μικροπλαστικά στο σημείο εξόδου και το σημείο ανακυκλοφορίας της δευτεροβάθμιας καθίζησης κυμαίνεται από 0.5 ng/μL - 23.9 ng/μL και 1.4 ng/μL - 25 ng/μL αντίστοιχα. Η ανεπεξέργαστη ιλύς βρέθηκε να περιέχει DNA σε συγκέντρωση 32.6 ng/μL - 207.1 ng/μL. Η συγκέντρωση των δειγμάτων με αριθμό 22, 28 και 35 σε συνδυασμό με το R κρίθηκε ανικανοποιητική και ως εκ τούτου δεν έτυχαν περαιτέρω ανάλυσης PCR.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα Bio-photometer

Μήνας Δειγματοληψίας	Σημείο Δειγματοληψίας	Αρ. Δείγματος	Συγκέντρωση γενετικού υλικού (ng/μL)	Καθαρότητα-R (260 nm/280 nm)
Ιανουάριος	effluent_biofilm	1	1.7	1.16
		2	8.1	1.99
	activated sludge_biofilm	3	1.4	0.79
		4	2.6	0.98
		5	2.5	0.92
	activated sludge	6	77.5	1.81
		7	39.7	1.81
		8	41.9	1.82
Φεβρουάριος	effluent_biofilm	9	1.5	0.93
		10	14.2	0.46
		11	1.6	0.72

Μήνας Δειγματοληψίας	Σημείο Δειγματοληψίας	Αρ. Δείγματος	Συγκέντρωση γενετικού υλικού (ng/μL)	Καθαρότητα-R (260 nm/280 nm)
	activated sludge_biofilm	12	4.6	1.08
		13	2.6	0.98
	activated sludge	14	96.8	1.8
		15	126.7	1.82
		16	116.2	1.82
Μάρτιος	effluent_biofilm	17	1.8	0.96
		18	0.9	0.87
		19	1.5	0.9
	activated sludge_biofilm	20	6.1	1.75
		21	2.8	1.11
		22	0	0
	activated sludge	23	34.9	1.69
		24	32.6	1.96
		25	207.1	1.87
Ιούλιος	effluent_biofilm	26	23.9	1.43
		27	23.9	1.19
		28	0.8	1.1
	activated sludge_biofilm	29	3.8	2
		30	3.2	1.81
		31	3.7	1.66
	activated sludge	32	111	1.86

Μήνας Δειγματοληψίας	Σημείο Δειγματοληψίας	Αρ. Δείγματος	Συγκέντρωση γενετικού υλικού (ng/μL)	Καθαρότητα-R (260 nm/280 nm)
		33	132.4	1.87
		34	164	1.87
Αύγουστος	effluent_biofilm	35	0.5	0.88
		36	3.5	1.96
		37	4.5	1.93
	activated sludge_biofilm	38	10.7	1.75
		39	9.1	1.81
	activated sludge	40	152.2	1.69
		41	67.4	1.82
		42	95	1.5
Σεπτέμβριος	effluent_biofilm	43	10.2	1.83
		44	8.7	1.73
		45	11.5	1.75
	activated sludge_biofilm	46	25	2.39
		47	10.4	1.73
		48	8.4	1.87
	activated sludge	49	190.5	1.85
		50	108.5	1.83
		51	125.8	1.86

4.3 Αποτελέσματα RT-PCR

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των γονιδίων στόχων βασίζεται στην πρότυπη καμπύλη αναφοράς κάθε γονιδίου. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται δύο βασικοί παράγοντες που αναφέρονται στις πρότυπες καμπύλες που κατασκευάστηκαν για τα προς εξέταση γονίδια. Αυτοί αφορούν το συντελεστή συσχέτισης (Correlation coefficient, R^2) και την απόδοση της αντίδρασης (Efficiency, E) για κάθε πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

Ο συντελεστής R^2 εκφράζει τη γραμμικότητα της καμπύλης. Επομένως, αποτελεί ένα μέτρο του πόσο καλά εκφράζονται τα εκάστοτε δεδομένα από τη καμπύλη. Ιδανικά, ο συντελεστής συσχέτισης είναι ίσος με τη μονάδα. Σε αυτή τη περίπτωση, τα δεδομένα αντικατοπτρίζονται 100% από την καμπύλη. Ωστόσο, στην πραγματικότητα, η μέγιστη τιμή του είναι $R^2=0.999$. Στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται πιο κάτω, το μεγαλύτερο R^2 έχει το γονίδιο *sul2*, ενώ το μικρότερο R^2 έχει το γονίδιο *ampC*. Επομένως, δυνητικά, τα αποτελέσματα που αφορούν το γονίδιο *sul2* εκφράζονται καλύτερα από την καμπύλη αναφοράς του γονιδίου αυτού, σε σχέση με το *ampC* για την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς του.

Η απόδοση της αντίδρασης της RT-PCR πρέπει να είναι ιδανικά ίση με 100% και άρα κάθε γονίδιο στόχος να διπλασιάζεται με το τέλος κάθε κύκλου. Συνεπώς, η φάση της αντίδρασης, στην οποία συλλέγονται τα δεδομένα, είναι στην εκθετική. Αυτό επιτυγχάνεται όταν η κλίση (slope) της καμπύλης αναφοράς είναι ίση με -3,32 βάσει της πιο κάτω εξίσωσης:

$$E = 10 \left(\frac{-1}{\text{slope}} \right) - 1$$

Επομένως, όσο πιο κοντά είναι η απόδοση στο 100%, τόσο πιο αξιόπιστα είναι τα αποτελέσματα. Στον Πίνακα πιο κάτω, τη μεγαλύτερη απόδοση έχει το γονίδιο *sul2*, ενώ τη μικρότερη το γονίδιο *ampC*. Ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν αρνητικά την απόδοση ($E < 90\%$), είναι συνυφασμένοι με τη συγκέντρωση των αντιδραστηρίων, την ποιότητα της πολυμεράσης και τη δυναμική της αντίδρασης. Στην πραγματικότητα, οι τιμές της απόδοσης κυμαίνονται μεταξύ 90% και 105%.⁸³

Πίνακας 4: Στατιστικοί παράγοντες πρότυπων καμπυλών αναφοράς.

Γονίδιο στόχος	Συντελεστής συσχέτισης (R^2)	Απόδοση (%)	Κλίση
16S rRNA	0.953	124.656	-2.845
<i>qnrA</i>	0.975	134.165	-2.706
<i>ampC</i>	0.94	186.553	-2.187
<i>tetA</i>	0.944	113.641	-3.033
<i>sul2</i>	0.979	72.193	-4.237

4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ARGs

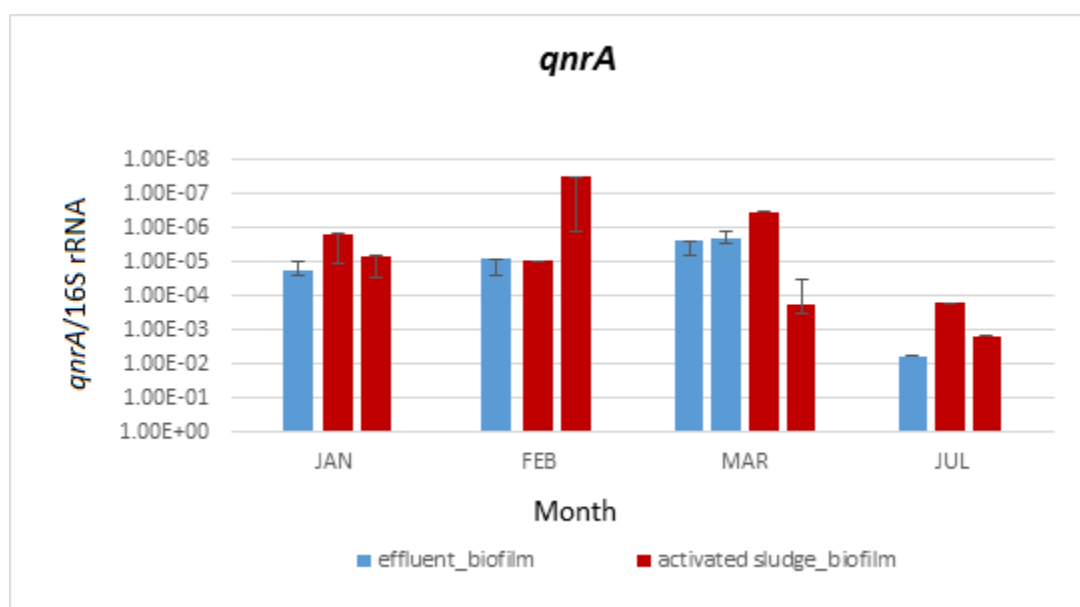
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αποτελεσμάτων της RT-PCR βασίζεται στον υπολογισμό του αριθμού των αντιγράφων γονιδίων κάθε δείγματος στο σημείο Cp. Από τα 48 δείγματα που έτυχαν ανάλυσης PCR, στα 11 δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA. Κατά συνέπεια, ο υπολογισμός του λόγου ARG-στόχου/16S rRNA είναι αδύνατος, ακόμα και αν σε κάποιο από τα 11 αυτά δείγματα ανιχνεύθηκε το ARG-στόχος. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα εν λόγω δείγματα ανήκουν όλα στα δείγματα ανεπεξέργαστης ιλύος (activated sludge), τα οποία δεν έτυχαν προεπεξεργασίας για τη συλλογή των μικροπλαστικών και το διαχωρισμό τους από το βιοφίλμ. Επίσης, αφορούν τους μήνες Μάρτιο, Ιούλιο, Αύγουστο και Σεπτέμβριο. Τέλος, σημειώνεται ότι τα αρνητικά δείγματα δεν ελήφθησαν υπόψη στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζεται το ποσοστό παρουσίας κάθε γονιδίου-στόχου στο κάθε ένα από τα τρία είδη δειγμάτων καθώς επίσης και ο αριθμός των δειγμάτων, στα οποία παρατηρήθηκε το εκάστοτε γονίδιο.

Πίνακας 5: Ποσοστό παρουσίας ARG-στόχου

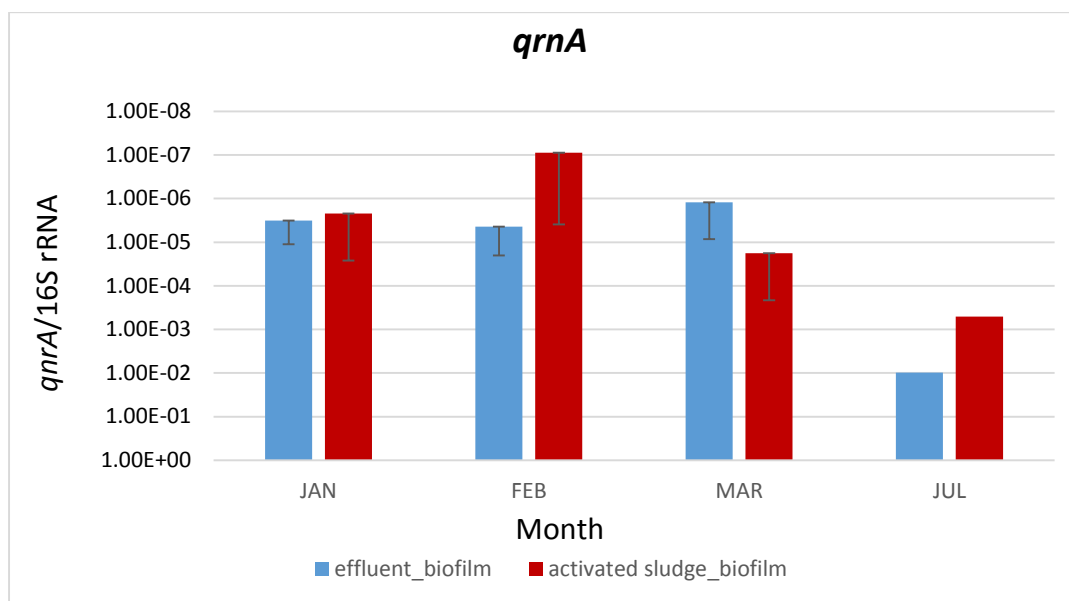
Είδος ARG	Είδος Δείγματος	Ποσοστό παρουσίας ARG γονιδίου στα υπό ανάλυση δείγματα (%)	Αρ. Δειγμάτων
<i>qnrA</i>	effluent_biofilm	65	1, 10, 17, 18, 26
	activated sludge_biofilm	50	3, 4, 12, 13, 20, 21, 30, 31
	activated sludge	0	-
<i>ampC</i>	effluent_biofilm	100	1, 2, 9, 10, 17, 18, 19, 26, 27, 36, 37, 43, 44, 45
	activated sludge_biofilm	100	3, 4, 5, 11, 12, 13, 20, 21, 29, 30, 31, 38, 39, 46, 47, 48
	activated sludge	57	6, 14, 15, 16
<i>tetA</i>	effluent_biofilm	100	1, 2, 9, 10, 17, 18, 19, 26, 27, 36, 37, 43, 44, 45
	activated sludge_biofilm	100	3, 4, 5, 11, 12, 13, 20, 21, 29, 30, 31, 38, 39, 46, 47, 48
	activated sludge	0	-
<i>sul2</i>	effluent_biofilm	21	36, 44, 45
	activated sludge_biofilm	18.75	46, 47, 48
	activated sludge	57	6, 7, 8, 14, 15, 16

Η κατανομή των ARGs σε σχέση με τα σημεία δειγματοληψίας και την εποχιακή διακύμανση φαίνεται στα παρακάτω Διαγράμματα, όπου εκφράζεται η αναλογία των

επιλεγμένων ARGs προς το 16S rRNA γονίδιο. Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η κατανομή του γονιδίου αντίστασης που εξετάστηκε για τις κινολόνες. Η συγκέντρωση του *qnrA* αναφέρεται στην παρουσία του στο βιοφίλμ στα επιλεγμένα μικροπλαστικά. Το γονίδιο αυτό ανιχνεύθηκε σε όλους τους μήνες της πρώτης δειγματοληπτικής περιόδου, ενώ για τη δεύτερη ανιχνεύθηκε μόνο τον Ιούλιο. Επιπρόσθετα, παρατηρώντας μεμονωμένα τον κάθε μήνα φαίνεται ότι το *qnrA* ανιχνεύθηκε σε τουλάχιστον ένα δείγμα εξόδου (μπλε χρώμα) και σε δύο δείγματα ενεργοποιημένης ιλύος (κόκκινο χρώμα). Στα δείγματα ενεργοποιημένης λάσπης, τα οποία δεν έτυχαν προεπεξεργασίας για τη συλλογή μικροπλαστικών και το διαχωρισμό τους από το βιοφίλμ, το *qnrA* δεν ανιχνεύθηκε σε καμία περίοδο. Εξαίρεση σε αυτό αποτελούν οι μήνες Μάρτιος, Ιούλιος, Αύγουστος και Σεπτέμβριος, στους οποίους το γονίδιο 16S rRNA δεν ενισχύθηκε κατά την αντίδραση RT-PCR και συνεπώς δεν συμπεριελήφθησαν στο Διάγραμμα. Για σκοπούς απλοποίησης της παρουσίασης των αποτελεσμάτων, ο μέσος όρος της κατανομής του *qnrA* ανά μήνα φαίνεται στο Διάγραμμα 4. Οι τιμές της συγκέντρωσης του γονιδίου στόχου είναι υψηλότερες στα δείγματα εξόδου από ότι στην ενεργοποιημένη ιλύ. Τέλος, φαίνεται να υπάρχει μια απροσδόκητη αύξηση της κατανάλωσης κινολονών κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού.

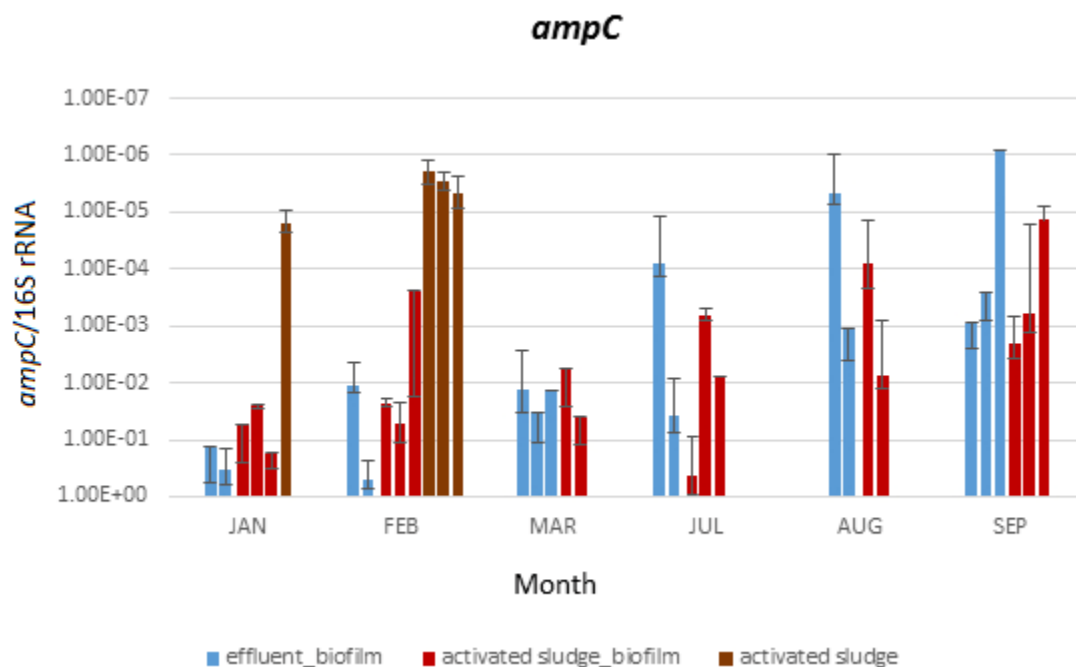


Διάγραμμα 3: Ποσοτικός προσδιορισμός αντιγράφων γονιδίου *qnrA* κάθε μήνα.

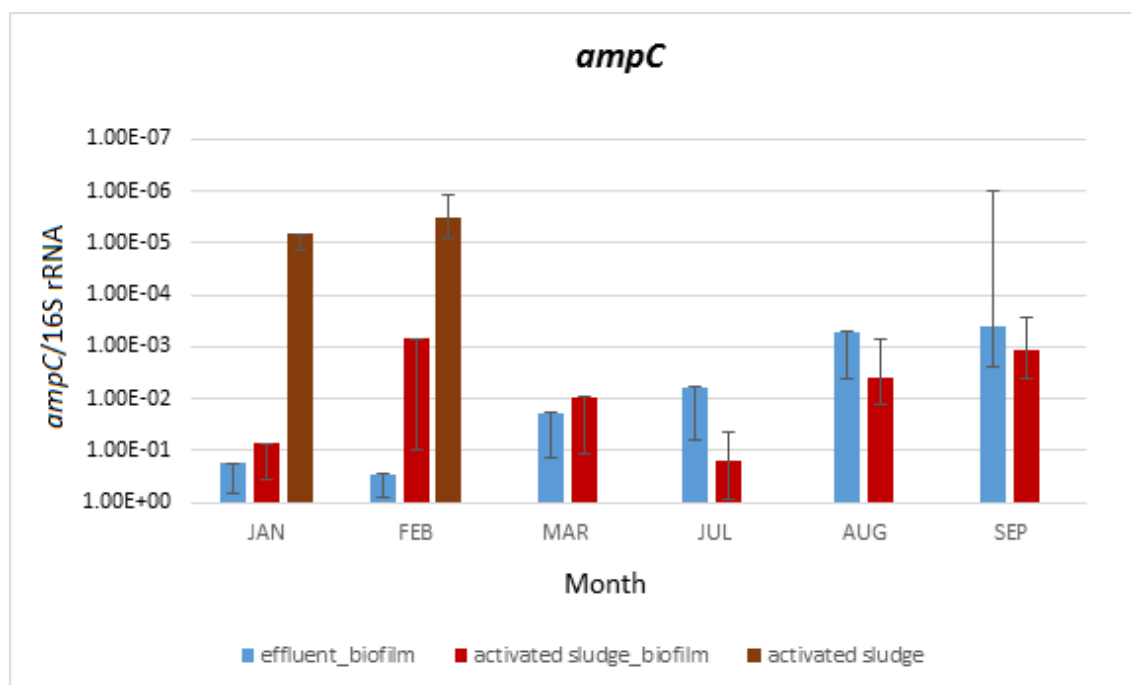


Διάγραμμα 4: Ποσοτικός προσδιορισμός του μέσου όρου των αντιγράφων γονιδίου *qnrA* κάθε μήνα.

Στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζεται η κατανομή του γονιδίου αντίστασης που εξετάστηκε για τις β-λακτάμες. Το γονίδιο αυτό ανιχνεύθηκε σε όλους τους μήνες που εξετάστηκαν. Παρατηρώντας μεμονωμένα τον κάθε μήνα φαίνεται ότι το γονίδιο αυτό ανιχνεύθηκε σε τουλάχιστον δύο δείγματα εξόδου (μπλε χρώμα) και ενεργοποιημένης ιλύος (κόκκινο χρώμα) και τουλάχιστον σε ένα δείγμα ενεργοποιημένης ιλύος που δεν έτυχε προεπεξεργασίας (καφέ χρώμα). Υπενθυμίζεται ότι τους μήνες Μάρτιο, Ιούλιο, Αύγουστο και Σεπτέμβριο, το γονίδιο 16S rRNA δεν ενισχύθηκε κατά την αντίδραση RT-PCR και ως εκ τούτου δεν συμπεριλήφθηκε στο Διάγραμμα. Ο μέσος όρος της κατανομής του *ampC* ανά μήνα φαίνεται στο Διάγραμμα 6. Για την πρώτη δειγματοληπτική περίοδο οι τιμές της συγκέντρωσης είναι υψηλότερες στα δείγματα εξόδου από ότι στην ενεργοποιημένη ιλύ, ενώ στη δεύτερη δειγματοληπτική περίοδο παρατηρείται η αντίθετη τάση. Επιπρόσθετα, συγκρίνοντας τα τρία σημεία δειγματοληψίας φαίνεται ότι τη μικρότερη συγκέντρωση σε ARGs έχουν τα δείγματα ενεργοποιημένης ιλύος που δεν έτυχαν προεπεξεργασίας. Τέλος, παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του γονιδίου με τη μεταβολή της περιόδου από τους κρύους μήνες του έτους στους ζεστούς.



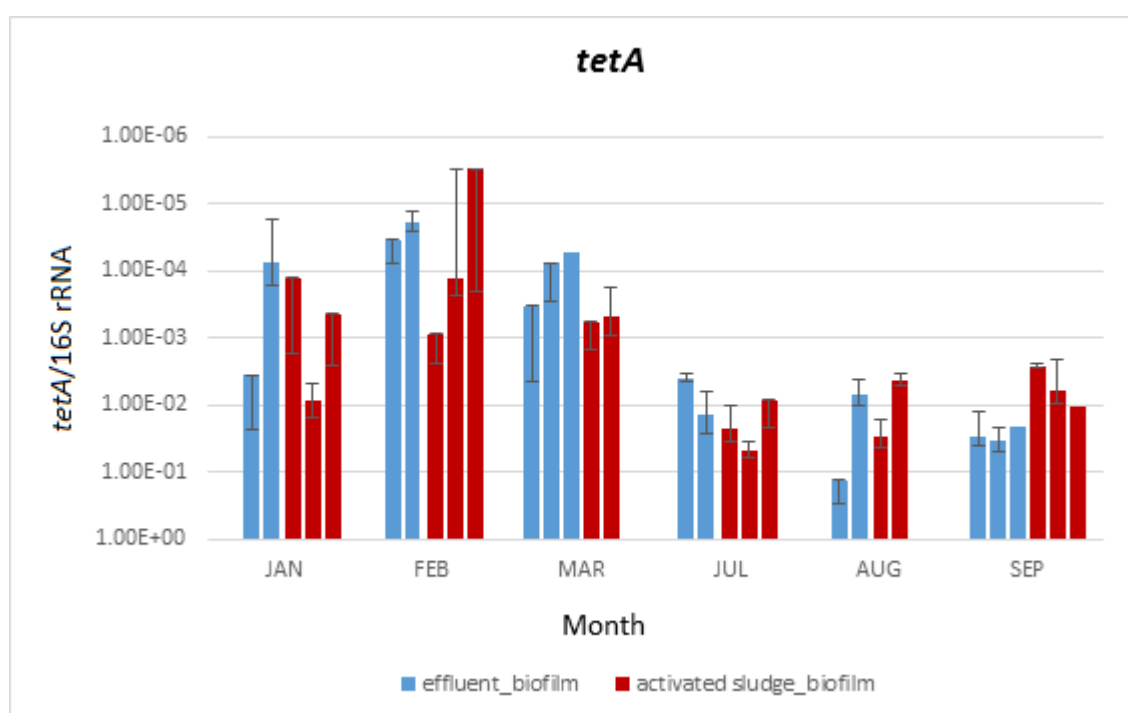
Διάγραμμα 5: Ποσοτικός προσδιορισμός αντιγράφων γονιδίου *ampC* κάθε μήνα.



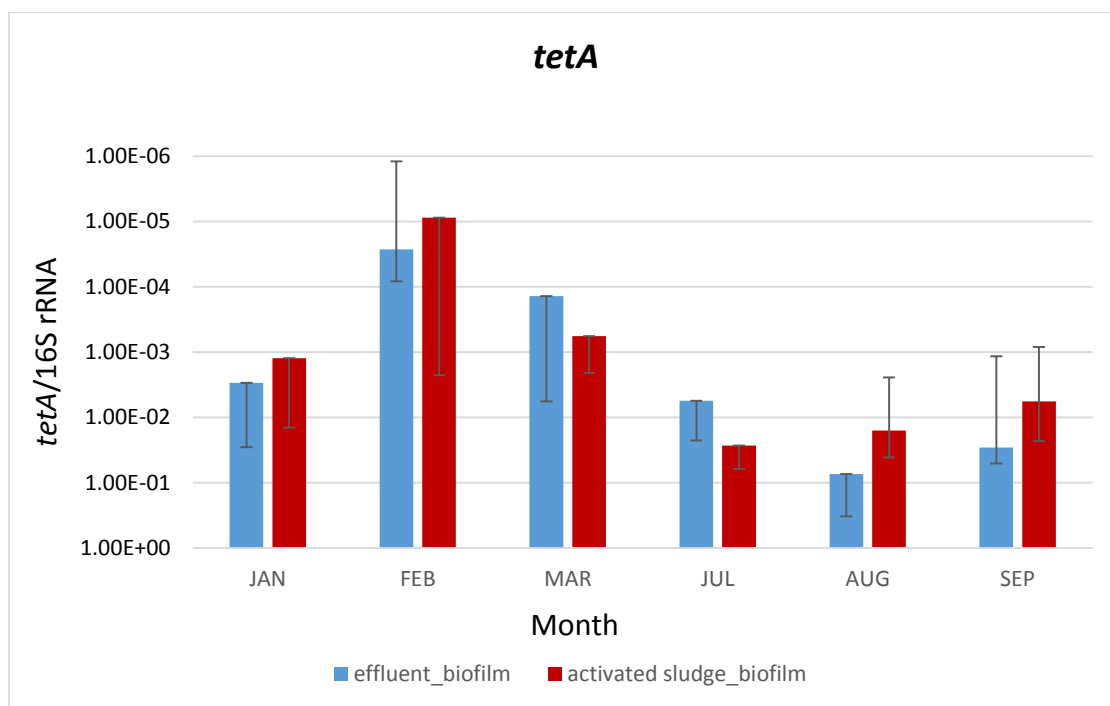
Διάγραμμα 6: Ποσοτικός προσδιορισμός του μέσου όρου των αντιγράφων γονιδίου *ampC* κάθε μήνα.

Στο Διάγραμμα 7 παρουσιάζεται η κατανομή του γονιδίου αντίστασης που εξετάστηκε για τις τετρακυκλίνες. Το γονίδιο αυτό ανιχνεύθηκε σε όλους τους μήνες που

εξετάστηκαν. Επιπρόσθετα, παρατηρώντας μεμονωμένα τον κάθε μήνα φαίνεται ότι το *tetA* ανιχνεύθηκε σε τουλάχιστον δύο δείγματα εξόδου (μπλε χρώμα) και ενεργοποιημένης ιλύος (κόκκινο χρώμα). Στα δείγματα ενεργοποιημένης λάσπης, τα οποία δεν έτυχαν προεπεξεργασία για τη συλλογή μικροπλαστικών και το διαχωρισμό τους από το βιοφίλμ, δεν ανιχνεύθηκαν σε καμία περίοδο. Ο μέσος όρος της κατανομής του *tetA* ανά μήνα φαίνεται στο Διάγραμμα 8. Ως επί το πλείστον οι τιμές της αναλογίας της συγκέντρωσης είναι υψηλότερες στα δείγματα εξόδου από ότι στην ενεργοποιημένη ιλύ. Εξαίρεση σε αυτό αποτελεί ο μήνας Ιούλιος, στον οποίο παρατηρείται η αντίθετη τάση. Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη την εποχιακή διακύμανση φαίνεται πως η κατανάλωση σε τετρακυκλίνες αυξάνεται το καλοκαίρι.

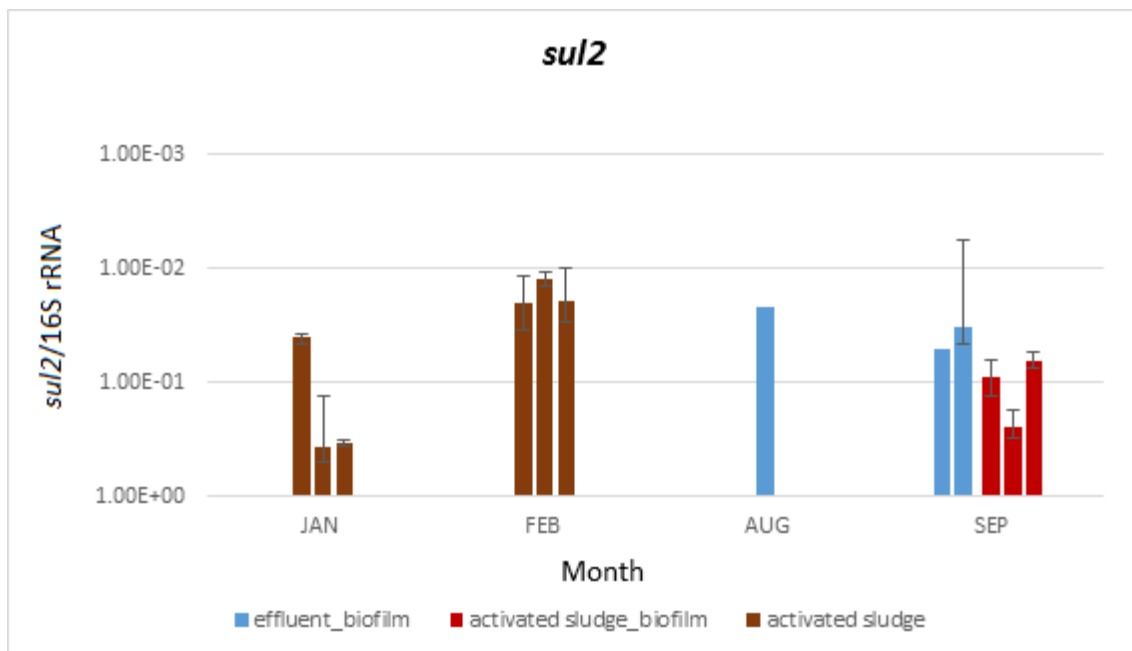


Διάγραμμα 7: Ποσοτικός προσδιορισμός αντιγράφων γονιδίου *tetA* κάθε μήνα.

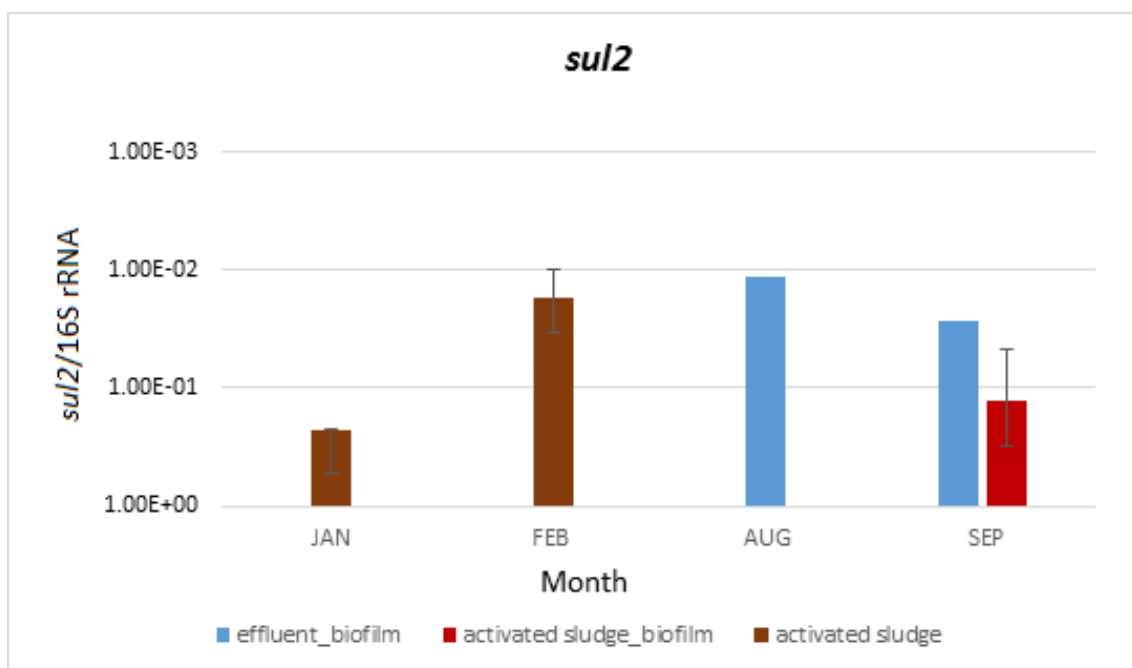


Διάγραμμα 8: Ποσοτικός προσδιορισμός του μέσου όρου των αντιγράφων γονιδίου *tetA* κάθε μήνα.

Στο Διάγραμμα 9 παρουσιάζεται η κατανομή του γονιδίου αντίστασης που εξετάστηκε για τις σουλφοναμίδες. Το γονίδιο αυτό ανιχνεύθηκε σε δύο μήνες για κάθε δειγματοληπτική περίοδο. Επιπλέον, βρέθηκε σε ένα δείγμα εξόδου (μπλε χρώμα) μόνο τους μήνες Αύγουστο και Σεπτέμβριο, ενώ στην ενεργό ιλύ (κόκκινο χρώμα) μόνο το Σεπτέμβριο. Ακόμα, ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα ενεργοποιημένης λάσπης, τα οποία δεν έτυχαν προεπεξεργασίας για τη συλλογή μικροπλαστικών και το διαχωρισμό τους από το βιοφίλμ (καφέ χρώμα). Υπενθυμίζεται ότι τους μήνες Μάρτιο, Ιούλιο, Αύγουστο και Σεπτέμβριο, το γονίδιο 16S rRNA δεν ανιχνεύθηκε και συνεπώς δεν συμπεριελήφθησαν στο Διάγραμμα. Ο μέσος όρος της κατανομής του *sul2* ανά μήνα φαίνεται στο Διάγραμμα 10. Παρατηρώντας το μήνα Σεπτέμβριο, φαίνεται και πάλι ότι τα δείγματα εξόδου διαθέτουν μεγαλύτερη συγκέντρωση ARGs σε σχέση με την ενεργοποιημένη ιλύ. Το *sul2* παρουσίασε τη μικρότερη ανίχνευση στα δείγματα και ως εκ τούτου είναι δύσκολο να προσδιοριστεί επαρκώς η διακύμανση της κατανάλωσης σε αυτό το είδος αντιβιοτικών σε σχέση με την εποχιακή διακύμανση.



Διάγραμμα 9: Ποσοτικός προσδιορισμός αντιγράφων γονιδίου *sul2* κάθε μήνα.



Διάγραμμα 10: Ποσοτικός προσδιορισμός του μέσου όρου των αντιγράφων γονιδίου *sul2* κάθε μήνα.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

5.1 Ταυτοποίηση μικροπλαστικών

Η ταυτοποίηση των πολυμερών στα δείγματα εξόδου έδειξε την παρουσία 39 ειδών. Το πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας (High Density Polyethylene, HDPE), το πολυπροπυλένιο (Polypropylene, PP) και το τereφθαλικό πολυαιθυλένιο (Polyethylene Terephthalate, PET) βρέθηκαν να είναι παρόν στα περισσότερα δείγματα, αντικατοπτρίζοντας το 53% του συνόλου. Το HDPE αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο υλικό για την κατασκευή διαφόρων αντικειμένων, όπως παιχνιδιών, σακουλιών, μπουκαλιών κ.λπ. Επομένως, η παρουσία του στα αστικά λύματα δεν αποτελεί έκπληξη. Αντίστοιχη παρατήρηση σημειώθηκε σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων, στη Νοτιοανατολική Ισπανία το 2019, όπου το HDPE και το PET βρέθηκαν να είναι τα πιο κοινά πολυμερή σε ίνες.⁸⁴ Από την άλλη, το PP και PET είναι επίσης πολύ κοινά πολυμερή και χρησιμοποιούνται κυρίως στις βιομηχανίες κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων, όπως ρούχων, χαλιών κ.λπ. Μάλιστα, σε παλαιότερη έρευνα, στην οποία ταυτοποιήθηκαν μικροπλαστικά από την εκροή δύο εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων στην Αθήνα, το PP και το PET βρέθηκαν να είναι από τα πιο άφθονα πολυμερή.⁸⁵ Επομένως, η έρευνα αυτή, εδραιώνει ακόμη περισσότερο τη συνεισφορά των ΕΕΛ στην εξάπλωση των μικροπλαστικών, παρέχοντας ενδεικτικά τη σχετική εξάπλωση των ειδών των πολυμερών στα νερά της Μεσογείου.

5.2 Ποσοτικοποίηση απομονωμένου DNA

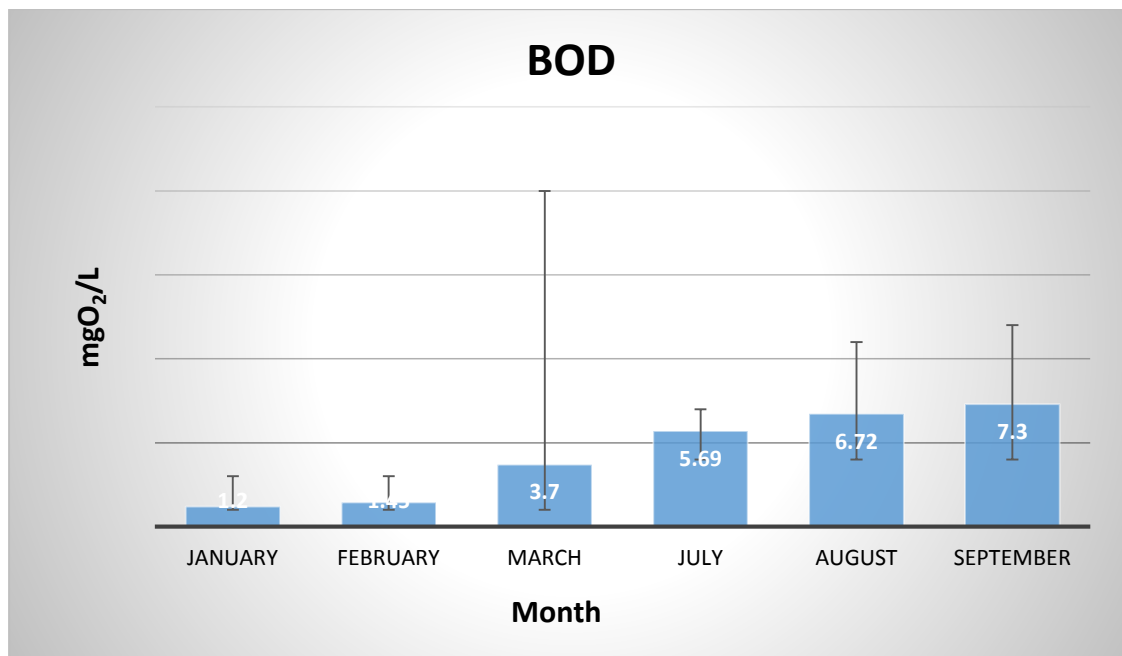
Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου DNA από το βιοφίλμ έδειξε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γενετικού υλικού στη δεύτερη δειγματοληπτική περίοδο. Αυτό έγκειται στο ότι επιλέχθηκαν 25 μικροπλαστικά στην πρώτη δειγματοληψία και 30 μικροπλαστικά στη δεύτερη. Παρ' όλα αυτά, η διαφοροποίηση αυτή δε φέρει κανένα αντίκτυπο στα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης που ακολούθησε, διότι ο λόγος της ποσότητας των αντιγράφων του γονιδίου-στόχου προς την ποσότητα των αντιγράφων του 16S rRNA παραμένει σταθερός. Επίσης, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης του γενετικού υλικού στην έξοδο (effluent_biofilm) με αυτά στο βιοφίλμ της ενεργού ιλύος (activated sludge_biofilm),

φαίνεται ότι στην ενεργό ιλύ η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη. Αυτή η παρατήρηση είναι αναμενόμενη, μιας και η ενεργός ιλύ, λόγω της φύσης της, έχει το μεγαλύτερο ποσό βιολογικού φορτίου από οποιοδήποτε στάδιο της επεξεργασίας. Τέλος, η συγκέντρωση του γενετικού υλικού στα δείγματα της ενεργού ιλύος, που δεν έτυχαν επεξεργασίας (activated sludge), είναι η μεγαλύτερη, μιας και αντικατοπτρίζει το συνολικό γενετικό υλικό που υπάρχει στο δείγμα της ενεργού ιλύος.

5.3 Μοριακή ανάλυση και ταυτοποίηση ARGs

5.3.1 Μη ενίσχυση 16S rRNA

Η μοριακή ανάλυση έδειξε μηδενική ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA σε 11 δείγματα της ενεργοποιημένης λάσπης (activated sludge), τα οποία δεν υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για τη συλλογή μικροπλαστικών και το διαχωρισμό τους από το βιοφίλμ. Τα δείγματα αυτά αφορούν τους μήνες Μάρτιο, Ιούλιο, Αύγουστο και Σεπτέμβριο. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στα υψηλά επίπεδα αναστολέων που περιέχονται σε τέτοια πολύπλοκα περιβαλλοντικά δείγματα. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της τουριστικής περιόδου, ο ρυθμός ροής αποβλήτων είναι σημαντικά υψηλός, με αποτέλεσμα να οδηγεί πιθανώς σε σημαντική αλλοίωση της σύνθεσης των δειγμάτων. Η προσέγγιση αυτή ενισχύεται από την κατανομή του BOD για τους μήνες που μελετήθηκαν. Στο Διάγραμμα 11 φαίνεται η κατανομή του μέσου όρου του BOD για τις δύο δειγματοληπτικές περιόδους. Η τιμή του αυξάνεται με την πάροδο του έτους, ως συνεπακόλουθο της αύξησης του τουρισμού και του συνολικού φορτίου που δέχεται ο σταθμός. Οι τιμές μετρήσεων για την κατασκευή του Διαγράμματος έχουν ληφθεί από τη Βάση Δεδομένων Παρακολούθησης Εγκαταστάσεων Επεξεργασίας Λυμάτων.⁸⁶



Διάγραμμα 11: Κατανομή μέσου όρου BOD στις δύο δειγματοληπτικές περιόδους. Οι τιμές της μέτρησης έχουν ληφθεί από τη Βάση Δεδομένων Παρακολούθησης Εγκαταστάσεων Επεξεργασίας Λυμάτων.⁸⁶

5.3.2 Κατανομή ARGs στα είδη δειγμάτων

Συγκρίνοντας την ποσοστιαία κατανομή των ανθεκτικών γονιδίων που μελετήθηκαν, σε σχέση με τον τύπο του δείγματος, φαίνεται πως ακολουθείται μία σχεδόν σταθερή τάση. Αναλυτικότερα, η συγκέντρωση των γονιδίων στόχων φαίνεται να είναι μικρότερη στα δείγματα ενεργού ιλύος, που έτυχαν αυτούσια μοριακής ανάλυσης. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο είδος των δειγμάτων, το οποίο λόγω της πολυπλοκότητάς του, διαθέτει μεγάλα ποσά αναστολέων, που πιθανών αναστέλλουν την αντίδραση της RT-PCR. Μολαταύτα, αναδύεται η υποψία ότι η μικροχλωρίδα που αποικεί τα μικροπλαστικά, είναι διαφορετική από αυτή που βρίσκεται ελεύθερη στην ενεργό ιλύ. Πράγματι, προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι η συγκέντρωση των ARGs που ανιχνεύθηκε σε μικροπλαστικά, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή που βρέθηκε ελεύθερη σε υγρό δείγμα ιχθυοκαλλιέργειας.⁴⁴ Ομοίως, μία μελέτη στην Κίνα το 2020, απέδειξε ότι η αναλογία καλλιεργήσιμων ARBs προς τα συνολικά καλλιεργήσιμα βακτήρια στα μικροπλαστικά, ήταν πολύ υψηλότερη από αυτή στα δείγματα θαλασσινού νερού, ενώ το ποσοστό ανίχνευσης ARGs ήταν 15% υψηλότερο στα μικροπλαστικά από ότι στο νερό. Επομένως, ενισχύεται η προσέγγιση που θέλει τα μικροπλαστικά να είναι

σημαντικοί φορείς ARBs και ARGs στις Ε.Ε.Λ και κατ' επέκταση στο φυσικό περιβάλλον. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η ιλύς τυγχάνει περαιτέρω επεξεργασίας όπως πάχυνση για τη μείωση της υγρασίας και αναερόβια χώνευση για την περαιτέρω μείωση του οργανικού της φορτίου.⁸⁷ Ωστόσο, ακόμα και μετά την αναερόβια επεξεργασία, παραμένει ένα ποσοστό οργανικού φορτίου, το οποίο οδηγείται προς Χώρο Υγειονομικής Ταφής, όπου μέσω των διασταλαγμάτων το οργανικό φορτίο περνάει στον υπόγειο υδροφόρο. Συγκρίνοντας τα δείγματα του βιοφίλμ, φαίνεται ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά βρίσκεται στα δείγματα εξόδου, στα οποία αξιολογήθηκε η αναλογία ARG/16S rRNA που φέρουν τα επιλεγμένα μικροπλαστικά, φαίνεται ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά ARGs έχουν τα δείγματα εξόδου. Το γεγονός αυτό, εντείνει την ανησυχία σχετικά με την απελευθέρωση των ARGs στο περιβάλλον και το ρόλο των μικροπλαστικών για τη μεταφορά αυτών των γονιδίων στο οικοσύστημα, όπως επίσης και τη συνεπακόλουθη μεταφορά τους στην τροφική αλυσίδα, ιδίως αν αναλογιστεί κανείς ότι τελικός αποδέκτης των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων είναι η θάλασσα.⁸⁷

5.3.3 Κατανάλωση ανά κατηγορία αντιβιοτικών

Συγκρίνοντας τα Διαγράμματα της κατανομής των ανθεκτικών γονιδίων που μελετήθηκαν, μπορεί εκτιμηθεί η σχέση μεταξύ τους αναφορικά με την κατανάλωσή των αντιβιοτικών. Το *ampC* γονίδιο ανιχνεύθηκε στα περισσότερα δείγματα και ως εκ τούτου οι β-λακτάμες είχαν τη μεγαλύτερη κατανάλωση από τις τέσσερις κατηγορίες αντιβιοτικών για την περίοδο που εξετάστηκε. Η παρατήρηση αυτή είναι αναμενόμενη, μιας και τα αντιβιοτικά β-λακτάμης θεωρούνται από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Μάλιστα, δεδομένα από το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Επιτήρησης της Κατανάλωσης Αντιμικροβιακών (ESAC-Net), έδειξαν ότι στην Ελλάδα, τη μεγαλύτερη κατανάλωση είχαν τα αντιβιοτικά β-λακτάμης για την περίοδο 1997-2017.⁸⁸ Συνεπώς, τα αντιβιοτικά αυτής της κατηγορίας χορηγούνται συχνότερα από τα υπόλοιπα, εδώ και δύο δεκαετίες.

Συγκρίνοντας τα Διαγράμματα του γονιδίου *qnrA* (Διάγραμμα 3 και 4) και του *tetA* (Διάγραμμα 7 και 8) φαίνεται ότι το δεύτερο γονίδιο εντοπίστηκε σε περισσότερα δείγματα από το πρώτο, γεγονός που υποδεικνύει ότι η χρήση των τετρακυκλινών είναι πιο συχνή από αυτή των κινολών. Αυτό συνάδει και πάλι με τα δεδομένα του ESAC-Net,

που θέλουν τα αντιβιοτικά τετρακυκλίνης να καταναλώνονται περισσότερο από τα αντιβιοτικά κινολόνης, αλλά λιγότερο σε σχέση με τις β-λακτάμες.⁸⁸ Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα αντιβιοτικά τετρακυκλίνης, αποτελούν μία από τις κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών, που εκτός της ανθρώπινης χρήσης, βρίσκουν εφαρμογή στην κτηνοτροφία και τη γεωργία.⁸⁹ Επομένως, η ανίχνευση του γονιδίου *tetA* στα δείγματα, δεν αντιστοιχεί μόνο στην ανθρώπινη κατανάλωση, μιας και η Κρήτη έχει έντονη αγροτική δραστηριότητα όλο το χρόνο και πιθανόν να δικαιολογεί την αύξηση που παρατηρείται τους ζεστούς μήνες του έτους.⁹⁰ Τέλος, από τα τέσσερα γονίδια που μελετήθηκαν, το *sul2* ανιχνεύθηκε στα λιγότερα δείγματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αποβαλλόμενες ποσότητες που προέρχονται από τις σουλφοναμίδες είναι λιγότερες. Η παρατήρηση αυτή θεωρείται αναμενόμενη μιας και η χρήση των σουλφοναμίδων έχει περιοριστεί τα τελευταία χρόνια, όπως έχουν παρατηρήσει και παλαιότερα οι επιστήμονες τόσο στην Ελλάδα⁹¹ όσο και στο εξωτερικό.⁹²

5.3.4 Κατανάλωση και εποχιακή διακύμανση

Λαμβάνοντας υπόψη, τα Διαγράμματα της κατανομής των γονιδίων σε σχέση με την εποχιακή διακύμανση παρατηρούνται ορισμένες διαφοροποιήσεις. Τους κρύους μήνες του έτους, αναμένεται μεγαλύτερη κατανάλωση αντιβιοτικών, λόγω της συχνότερης λοίμωξης του οργανισμού με κάποιο παθογόνο βακτήριο. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της μελέτης, έδειξαν μεταβαλλόμενη ανίχνευση της ποσότητας των ARGs κατά την περίοδο δειγματοληψίας. Αυτό αντικατοπτρίζει δυνητικά την υπερβολική χρήση αντιβιοτικών ή ακόμη και τη χρήση τους για ιογενείς λοιμώξεις. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε Έκθεση της Ευρωπαϊκής Ένωσης που δημοσιεύθηκε το 2017, η Ελλάδα κατέλαβε την τέταρτη υψηλότερη θέση στην κατανάλωση αντιβιοτικών χωρίς ιατρική συνταγή.⁹¹ Επίσης, αξίζει να επισημανθεί ότι η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε το 2020, κατά τη διάρκεια της οποίας, καταγράφηκαν πολυάριθμα κρούσματα του ιού SARS-CoV-2 (Covid-19) στην Ελλάδα, οδηγώντας σε ολική απαγόρευση κυκλοφορίας το Νοέμβριο του ίδιου έτους. Αυτό, ενισχύει την προσέγγιση της λανθασμένης κατανάλωσης αντιβιοτικών για ιογενείς λοιμώξεις. Τέλος, αυτή η τάση πιθανόν να σχετίζεται με την τουριστική περίοδο στα Χανιά και την αλλαγή της συνολικής σύνθεσης των λυμάτων. Πράγματι, μια προηγούμενη μελέτη αποκάλυψε ότι ο πληθυσμός των ανθεκτικών βακτηρίων μειώθηκε πολύ στα λύματα κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου.⁹¹

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα από την ταυτοποίηση των μικροπλαστικών για τα δείγματα εξόδου προκύπτουν ορισμένα συμπεράσματα. Τα συμβατικά συστήματα επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων αδυνατούν να απομακρύνουν εξολοκλήρου τα μικροπλαστικά που εισέρχονται στο σύστημα, με αποτέλεσμα να καταλήγουν αθροιστικά στο περιβάλλον. Τα HDPE, PP και PET ήταν τα πιο άφθονα πολυμερή που εντοπίστηκαν στα εξεταζόμενα δείγματα, και ως εκ τούτου αντικατοπτρίζουν τη σχετική τους αφθονία σε μία «θάλασσα μικροπλαστικών». Επιπλέον, τα αποτελέσματα υποδεικνύουν τη σχετική συνεισφορά της αναφερόμενης μονάδας επεξεργασίας στην απελευθέρωση των μικροπλαστικών στα νερά της Μεσογείου. Επομένως, αναδύεται η αναγκαιότητα της δημιουργίας βάσης δεδομένων αναφορικά με την απελευθέρωση των μικροπλαστικών στα υδάτινα σώματα και λήψης μέτρων μετριασμού της απελευθέρωσής τους.
2. Η ταυτοποίηση των ARGs στα δείγματα και η αντιπαραβολή μεταξύ τους, οδηγεί στην κατανόηση της συμπεριφοράς τους στα Συστήματα Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ARGs που καταγράφηκε στα δείγματα εξόδου σε σχέση με αυτά της ενεργοποιημένης λάσπης, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι συνθήκες που επικρατούν στη δεξαμενή αερισμού ευνοούν το σχηματισμό βιοφίλμ και κατά συνέπεια την οριζόντια μεταφορά γονιδίων (HGT) εντός του μικροβιακού πληθυσμού. Το γεγονός αυτό εγείρει ανησυχίες αναφορικά με τα μικροπλαστικά και τη μεταφορά των ARGs, καθώς τελικός αποδέκτης των επεξεργασμένων αστικών υγρών αποβλήτων είναι η θάλασσα.
3. Ελέγχοντας τη συγκέντρωση των ARGs στόχων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα της ενεργοποιημένης λάσπης, φαίνεται ότι καταγράφηκαν υψηλότερες τιμές στα δείγματα που ελήφθησαν από το βιοφίλμ των μικροπλαστικών σε σχέση με τα δείγματα που δεν υποβλήθηκαν σε περαιτέρω επεξεργασία. Αυτό υποδηλώνει ότι η στα μικροπλαστικά προσκολλώνται βακτήρια, τα οποία σχηματίζουν βιοφίλμ, αυξάνοντας έτσι την οριζόντια μεταφορά γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων και των ARGs. Επιπλέον, η διαπίστωση αυτή μπορεί να υποδηλώνει ότι τα ARGs παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στα μικροπλαστικά από ότι στην υγρή φάση. Συμπερασματικά, τα μικροπλαστικά προσφέρουν υπόστρωμα για την

εποίκηση μικροοργανισμών, και κατά συνέπεια, της μεταφοράς και απελευθέρωσης των ARGs. Από την άλλη, φάνηκε ότι η ενεργοποιημένη ιλύ περιέχει και αυτή σημαντικές ποσότητες ARGs, τα οποία μεταφέρονται με την επεξεργασμένη ενεργό ιλύ σε Χώρους Υγειονομικής Ταφής, όπου μέσω των διασταλαγμάτων και των απορροών καταλήγουν στον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα.

4. Η έρευνα δείχνει ενδεικτικά την κατανάλωση των μελετώμενων τύπων αντιβιοτικών κατά τη διάρκεια του έτους. Μεταξύ των τεσσάρων γονιδίων που αξιολογήθηκαν, φαίνεται ότι οι β-λακτάμες και οι τετρακυκλίνες χρησιμοποιούνται πιο συχνά από ότι οι κινολόνες και τις σουλφοναμίδες. Επομένως, αντικατοπτρίζεται η σχετική συνεισφορά των τύπων των αντιβιοτικών που απελευθερώνονται στο θαλάσσιο περιβάλλον.
5. Η ποσοστιαία κατανομή των γονιδίων που εξετάστηκαν σε σχέση με την εποχιακή διακύμανση παρουσιάζει αυξομειώσεις. Αυτό, φανερώνει δυναμικά την υπέρμετρη χρήση των αντιβιοτικών στην Ελλάδα, και τη συνεπακόλουθη αντίδρασή τους στα αστεία λύματα, ακόμη και το καλοκαίρι. Το γεγονός αυτό εγείρει ανησυχίες αναφορικά με την κατανάλωση των αντιβιοτικών στην Ελλάδα και τα συνεπακόλουθα φαινόμενα που παρατηρούνται από τη χρήση των αντιβιοτικών τόσο στο φυσικό περιβάλλον, όσο και στην ίδια την ανθρώπινη υγεία. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η καταγραφή και ο έλεγχος της χορήγησης των αντιβιοτικών ώστε να περιοριστεί η χρήση τους μόνο σε περιπτώσεις όπου κρίνεται αναγκαία.
6. Όλα τα πιο πάνω επικυρώνουν την ανησυχία της επιστημονικής κοινότητας αναφορικά με την κατανάλωση των αντιβιοτικών στη σύγχρονη εποχή. Αδιαμφισβήτητα, οι Ε.Ε.Λ αποτελούν σημαντική δεξαμενή των ARBs, την ίδια στιγμή που τα μικροπλαστικά προσφέρουν ιδανική επιφάνεια για τη δημιουργία βιοφίλμ και της εξάπλωσης των ARGs. Επομένως, θα πρέπει συλλογικά να ληφθούν μέτρα περιορισμού τόσο της κατανάλωσης αντιβιοτικών από ανθρώπους και ζώα, όσο και της χρήσης πλαστικών στα σπίτια και τη βιομηχανία. Η εκπαίδευση, η στροφή προς πιο οικολογικούς τρόπους ζωής ή ακόμα η δημιουργία δημόσιας διαβούλευσης, ώστε να συγκεντρωθούν οι απόψεις και οι ανησυχίες όλων των εμπλεκόμενων φορέων και των πολιτών, αποτελούν μέτρα περιορισμού για την προστασία του περιβάλλοντος, τη μείωση του οικολογικού αποτυπώματος και τη διαφύλαξη της δημόσιας υγείας. Ταυτόχρονα, οι ειδικοί έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους σε προηγμένες τεχνολογίες επεξεργασίας λυμάτων, οι οποίες στοχεύουν στην περαιτέρω

μείωση του οργανικού φορτίου στις Ε.Ε.Λ και στην αποδόμηση των επίμονων ρύπων όπως τα αντιβιοτικά και τα μικροπλαστικά. Επομένως, η διατήρηση ενός βιώσιμου κόσμου είναι θέμα που αφορά όλη την ανθρωπότητα και ο κάθε ένας από εμάς, μπορεί με μικρές αλλαγές στην καθημερινότητά του να προσφέρει το λιθαράκι του, ώστε οι επόμενες γενεές να μπορέσουν να επενδύσουν τις ζωές τους πάνω σε αυτό.

7. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

1. Μοριακή προσέγγιση για ποσοτικοποίηση της αναλογίας ARGs/16S rRNA στην ενεργό ιλύ με προεπεξεργασία των δειγμάτων, ώστε να απομακρυνθούν αναστολείς, οι οποίοι πιθανόν να εμποδίζουν την ενίσχυση των γονιδίων αναφοράς, ώστε να ληφθούν περισσότερο συγκρίσιμα αποτελέσματα μεταξύ των ειδών των δειγμάτων και της συνολικής συνεισφοράς της ενεργού ιλύος στην απελευθέρωση των ARGs στο περιβάλλον.
2. Δημιουργία βάσης δεδομένων αναφορικά με την απελευθέρωση των μικροπλαστικών και των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γονιδίων στα υδάτινα σώματα, λαμβάνοντας υπόψη την συμπεριφορά τους στις Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων. Επιπλέον είναι απαραίτητη η λήψη μέτρων περιορισμού της απελευθέρωσής τους στο περιβάλλον.
3. Δημιουργία βάσης δεδομένων αναφορικά με την κατανάλωση των αντιβιοτικών που χορηγούνται για ανθρώπινη χρήση και για κτηνοτροφικούς σκοπούς. Επιπλέον, είναι απαραίτητη η λήψη μέτρων για περιορισμό της κατανάλωσης αντιβιοτικών χωρίς ιατρική συνταγή, ώστε η χρήση τους να γίνεται μόνο για σκοπούς αναγκαιότητας.
4. Εφαρμογή τεχνολογικών μεθόδων για την αποδόμηση των αντιβιοτικών και άλλων αναδυόμενων οργανικών παραγόντων και των μεταβολίτων τους στις Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων, ώστε να περιοριστεί η απελευθέρωσή τους στο ελάχιστο.
5. Προγράμματα μέτρων, δημόσια διαβούλευση, με όλους τους εμπλεκόμενους φορείς, και εκπαίδευση για την ενημέρωση του κοινού αναφορικά με περιβαλλοντικά θέματα αιχμής που αντιμετωπίζει η ανθρωπότητα από τον σύγχρονο τρόπο ζωής

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Συγκεφαλαιώνοντας, τα μικροπλαστικά και τα ARGs αποτελούν μία ξεχωριστή ομάδα αναδυόμενων οργανικών παραγόντων. Ο αυξημένος αριθμός μελετών που υπάρχει στην τρέχουσα βιβλιογραφία, επιβεβαιώνει την παρουσία τους σε ποικίλες περιβαλλοντικές μήτρες. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι οι συμβατικές μέθοδοι επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων αδυνατούν να απομακρύνουν πλήρως αυτούς τους ρύπους. Τα μικροπλαστικά ευνοούν το σχηματισμό βιοφίλμ και τη μεταφορά παθογένειας μεταξύ των βακτηρίων. Το HDPE, PP και PET συνεισφέρουν περισσότερο, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους τύπους, στο φορτίο των πολυμερών που δέχεται η θάλασσα από την αναφερόμενη μονάδα. Τα επεξεργασμένα λύματα περιέχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ARGs από ότι η ενεργοποιημένη ιλύ, γεγονός που εγείρει ανησυχίες για τη διάθεση των επεξεργασμένων λυμάτων στη θάλασσα και τη μεταφορά τους στην τροφική αλυσίδα. Μολαταύτα, η ενεργός ιλύς εμπεριέχει και αυτή σημαντικές ποσότητες γονιδίων ανθεκτικότητας, τα οποία μεταφέρονται στον υπόγειο υδροφόρα με φαινόμενα απόπλυσης πεδίου. Τα μελετώμενα γονίδια ανιχνεύθηκαν σε όλους τους εξεταζόμενους μήνες, γεγονός που σηματοδοτεί την υπερβολική κατανάλωσή τους όλο το έτος. Τα αντιβιοτικά β-λακτάμης χρησιμοποιούνται περισσότερο από ότι τα αντιβιοτικά των υπόλοιπων κατηγοριών. Επομένως καθίσταται επιτακτική η μελέτη της συμπεριφοράς των μικροπλαστικών στις ΕΕΛ, καθώς η συνεισφορά τους στην εξάπλωση των ARGs αποτελεί πλέον ένα αδιαμφισβήτητο γεγονός. Τέλος, μέσα από την παρούσα έρευνα αναδύονται μελλοντικοί στόχοι, οι οποίοι αποσκοπούν να καλύψουν τα κενά που υπάρχουν στην τρέχουσα βιβλιογραφία, ώστε να προκύψει επιπλέον γνώση γύρω από αυτό το θέμα. Η διασφάλιση της προστασίας του περιβάλλοντος είναι θέμα μείζονος σημασίας για όλο τον πλανήτη και αποτελεί παρακαταθήκη για τη βιωσιμότητα των επόμενων γενεών.

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

8.1 Συστατικά και Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (RT-PCR)

8.1.1 Γονίδιο *qnrA*

Όγκος Αντίδρασης: 40 μ L.

Πίνακας 6: Συστατικά RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου *qnrA*

Μείγμα PCR (Master Mix)	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	1.5 mM
dNTPs	0.25 mM
Primer F	0.4 μM
Primer R	0.4 μM
Tag	2 U
DNA	5 μL

Πίνακας 7: Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου *qnrA*

Θερμοκρασία	Χρόνος	< 35 κύκλοι
95 °C	5 min	
94 °C	1.5 min	
64 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
> 72 °C	7 min	

8.1.2 Γονίδιο *tetA*

Όγκος Αντίδρασης: 40 μL.

Πίνακας 8: Συστατικά RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου *tetA*

Μείγμα PCR (Master Mix)	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	4 mM
dNTPs	0.3 mM
Primer F	0.25 μM
Primer R	0.25 μM
Tag	2 U
DNA	5 μL

Πίνακας 9: Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου *tetA*

Θερμοκρασία	Χρόνος	< 35 κύκλοι
94 °C	5 min	
94 °C	1 min	
55 °C	1 min	
72 °C	5 min	
> 72 °C	5 min	

8.1.3 Γονίδιο *ampC*

Όγκος αντίδρασης: 40 μL.

Πίνακας 10: Συντακτικά RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου *ampC*

Μείγμα PCR (Master Mix)	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	4 mM
dNTPs	0.3 mM
Primer F	0.3 μM
Primer R	0.3 μM
Tag	2 U
DNA	5 μL

Πίνακας 11: Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου *ampC*

Θερμοκρασία	Χρόνος	< 35 κύκλοι
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	
49 °C	30 sec	
72 °C	60 sec	
> 72 °C	7 min	

8.1.4 Γονίδιο *sul2*

Όγκος αντίδρασης: 40 μL.

Πίνακας 12: Συστατικά RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου *sul2*

Μείγμα PCR (Master Mix)	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0.25 mM
Primer F	0.2 μM
Primer R	0.2 μM
Tag	2 U
DNA	5 μL

Πίνακας 13: Συνθήκες αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση και ενίσχυση του γονιδίου *sul2*

Θερμοκρασία	Χρόνος	< 35 κύκλοι
94 °C	5 min	
94 °C	15 sec	
69 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
> 72 °C	1 min	

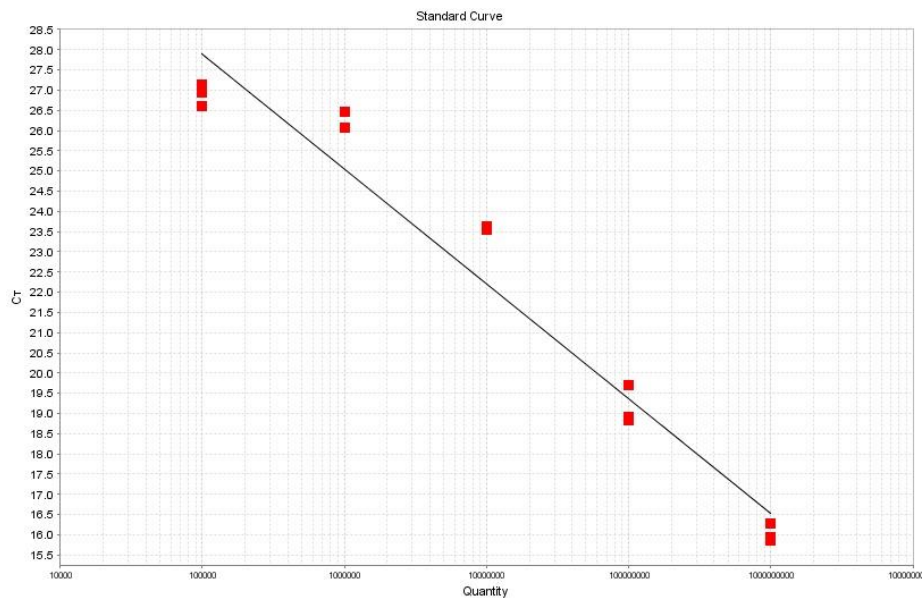
8.2 Πρότυπες Καμπύλες Αναφοράς

8.2.1 Γονίδιο 16S rRNA

Καθολικοί εκκινητές: 8F & 1492R

Πίνακας 14: Δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς του γονιδίου 16S rRNA

Γονίδιο-Στόχος	Κλίση	Τομή με άξονα Y	R ²	Απόδοση (%)
16S rRNA	-2.845	42.13	0.953	124.656



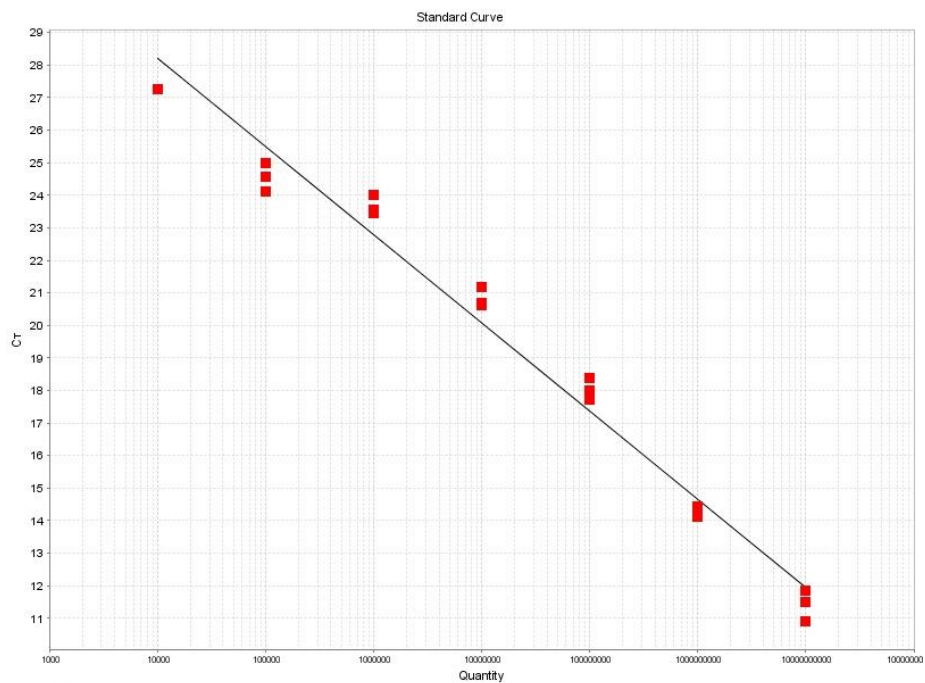
Διάγραμμα 12: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς γονιδίου 16S rRNA

8.2.2 Γονίδιο *qnrA*

Εκκινητές: *qnrA*-F & *qnrA*-R

Πίνακας 15: Δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς του γονιδίου *qnrA*

Γονίδιο-Στόχος	Κλίση	Τομή με άξονα Y	R ²	Απόδοση (%)
<i>qnrA</i>	-2.706	39.032	0.975	134.135



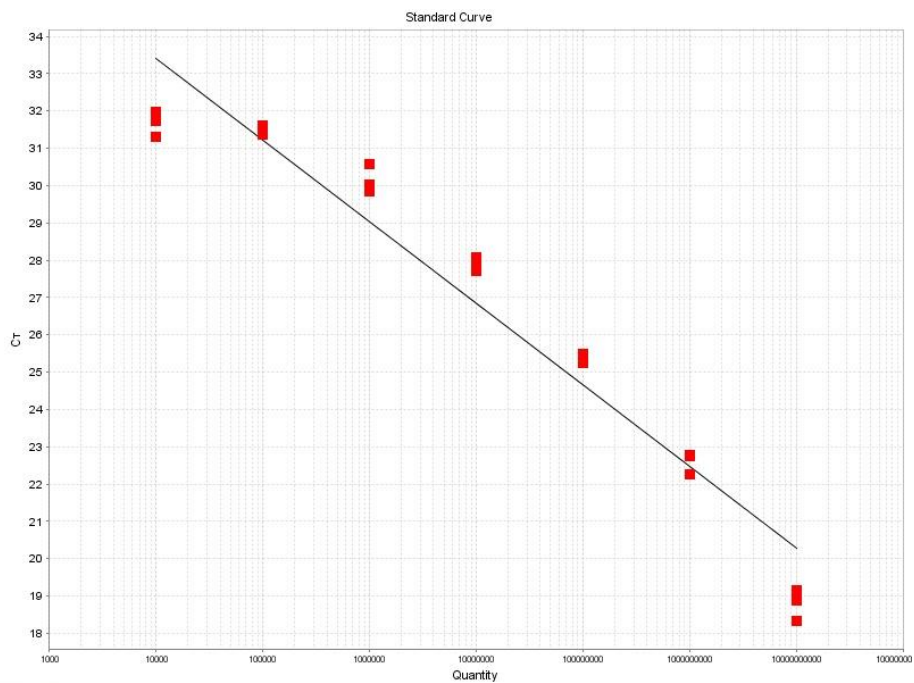
Διάγραμμα 13: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς γονιδίου *qnrA*

8.2.3 Γονίδιο *ampC*

Εκκινητές: *ampC*-F & *ampC*-R

Πίνακας 16: Δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς του γονιδίου *ampC*

Γονίδιο-Στόχος	Κλίση	Τομή με άξονα Y	R ²	Απόδοση (%)
<i>ampC</i>	-2.187	42.159	0.94	186.557



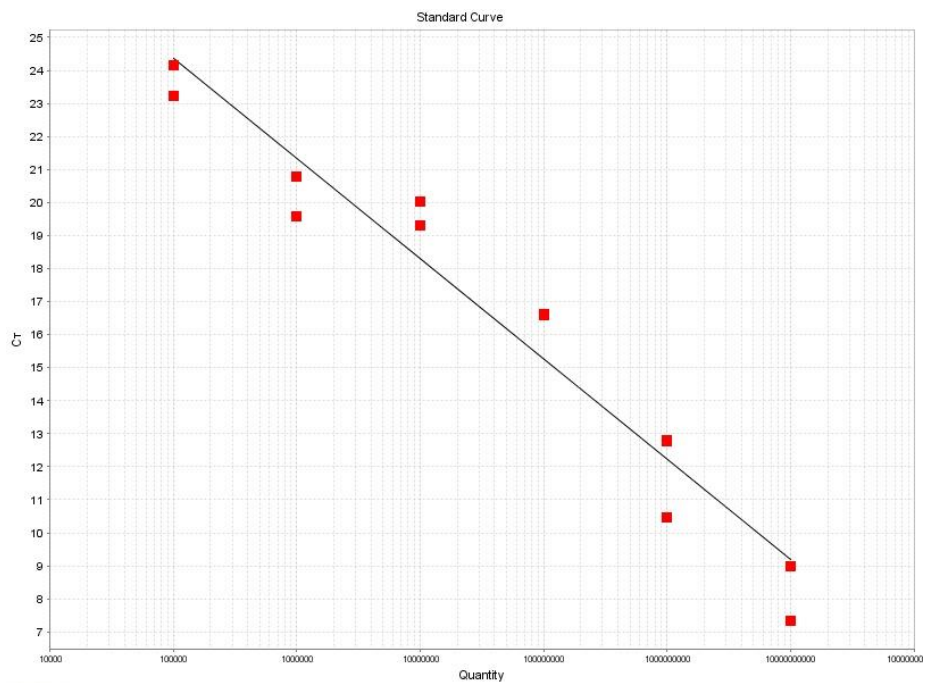
Διάγραμμα 14: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς γονιδίου *ampC*

8.2.4 Γονίδιο *tetA*

Εκκινητές: *tetA*-F & *tetA*-R

Πίνακας 17: Δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς του γονιδίου *tetA*

Γονίδιο-Στόχος	Κλίση	Τομή με άξονα Y	R ²	Απόδοση (%)
<i>tetA</i>	-3.033	39.531	0.944	113.641



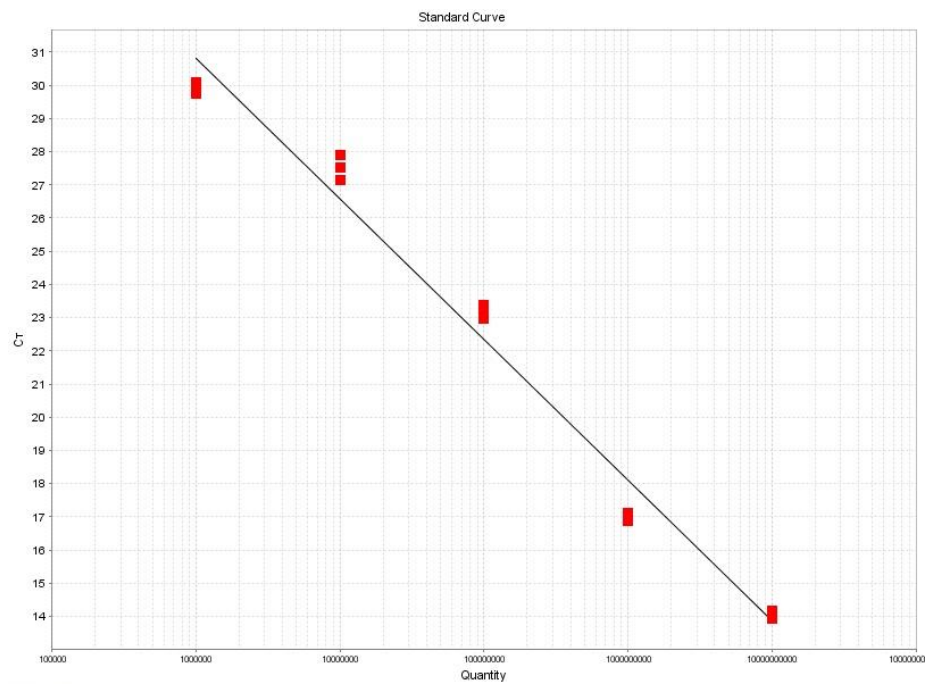
Διάγραμμα 15: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς γονιδίου *tetA*

8.2.5 Γονίδιο *sul2*

Εκκινητές: *sul2*-F & *sul2*-R

Πίνακας 18: Δεδομένα για την καμπύλη αναφοράς του γονιδίου *sul2*

Γονίδιο-Στόχος	Κλίση	Τομή με άξονα Y	R ²	Απόδοση (%)
<i>sul2</i>	-4.237	56.234	0.979	72.193



Διάγραμμα 16: Πρότυπη Καμπύλη Αναφοράς γονιδίου *sul2*

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Alimi, O. S.; Farner Budarz, J.; Hernandez, L. M.; Tufenkji, N. Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. *Environmental Science and Technology*. American Chemical Society February 20, 2018, pp 1704–1724.
- (2) Galloway, T. S.; Lewisa, C. N. Marine microplastics spell big problems for future generations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (9), 2331–2333.
- (3) Wilcox, C.; Van Sebille, E.; Hardesty, B. D.; Estes, J. A. Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (38), 11899–11904.
- (4) Duis, K.; Coors, A. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Sciences Europe*. Springer Verlag December 1, 2016, pp 1–25.
- (5) Hernandez, L. M.; Yousefi, N.; Tufenkji, N. Are there nanoplastics in your personal care products? *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2017**, *4* (7), 280–285.
- (6) Galafassi, S.; Nizzetto, L.; Volta, P. Plastic sources: A survey across scientific and grey literature for their inventory and relative contribution to microplastics pollution in natural environments, with an emphasis on surface water. *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. November 25, 2019, p 133499.
- (7) Dawson, A. L.; Kawaguchi, S.; King, C. K.; Townsend, K. A.; King, R.; Huston, W. M.; Bengtson Nash, S. M. Turning microplastics into nanoplastics through digestive fragmentation by Antarctic krill. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 1–8.
- (8) Galloway, T. S.; Cole, M.; Lewis, C. Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. *Nature Ecology and Evolution*. Nature Publishing Group April 20, 2017, pp 1–8.
- (9) Magni, S.; Binelli, A.; Pittura, L.; Avio, C. G.; Della Torre, C.; Parenti, C. C.; Gorbi, S.; Regoli, F. The fate of microplastics in an Italian Wastewater Treatment Plant. *Sci. Total Environ.* **2019**, *652*, 602–610.
- (10) Lares, M.; Ncibi, M. C.; Sillanpää, M.; Sillanpää, M. Occurrence, identification and removal of microplastic particles and fibers in conventional activated sludge

- process and advanced MBR technology. *Water Res.* **2018**, *133*, 236–246.
- (11) Leslie, H. A.; Brandsma, S. H.; van Velzen, M. J. M.; Vethaak, A. D. Microplastics en route: Field measurements in the Dutch river delta and Amsterdam canals, wastewater treatment plants, North Sea sediments and biota. *Environ. Int.* **2017**, *101*, 133–142.
 - (12) Murphy, F.; Ewins, C.; Carbonnier, F.; Quinn, B. Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50* (11), 5800–5808.
 - (13) Magnusson, K.; Norén, F. *Screening of microplastic particles in and down-stream a wastewater treatment plant*; 2014.
 - (14) Browne, M. A.; Crump, P.; Niven, S. J.; Teuten, E.; Tonkin, A.; Galloway, T.; Thompson, R. Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: Sources and sinks. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (21), 9175–9179.
 - (15) Simon, M.; van Alst, N.; Vollertsen, J. Quantification of microplastic mass and removal rates at wastewater treatment plants applying Focal Plane Array (FPA)-based Fourier Transform Infrared (FT-IR) imaging. *Water Res.* **2018**, *142*, 1–9.
 - (16) Carr, S. A.; Liu, J.; Tesoro, A. G. Transport and fate of microplastic particles in wastewater treatment plants. *Water Res.* **2016**, *91*, 174–182.
 - (17) Talvitie, J.; Mikola, A.; Setälä, O.; Heinonen, M.; Koistinen, A. How well is microlitter purified from wastewater? – A detailed study on the stepwise removal of microlitter in a tertiary level wastewater treatment plant. *Water Res.* **2017**, *109*, 164–172.
 - (18) Gatidou, G.; Arvaniti, O. S.; Stasinakis, A. S. Review on the occurrence and fate of microplastics in Sewage Treatment Plants. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *367*, 504–512.
 - (19) Sun, J.; Dai, X.; Wang, Q.; van Loosdrecht, M. C. M.; Ni, B. J. Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal. *Water Research*. Elsevier Ltd April 1, 2019, pp 21–37.
 - (20) Dris, R.; Gasperi, J.; Rocher, V.; Saad, M.; Renault, N.; Tassin, B. Microplastic contamination in an urban area: a case study in Greater Paris. *Environ. Chem.* **2015**,

12 (5), 592.

- (21) Michielssen, M. R.; Michielssen, E. R.; Ni, J.; Duhaime, M. B. Fate of microplastics and other small anthropogenic litter (SAL) in wastewater treatment plants depends on unit processes employed. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* **2016**, 2 (6), 1064–1073.
- (22) Talvitie, J.; Heinonen, M.; Pääkkönen, J. P.; Vahtera, E.; Mikola, A.; Setälä, O.; Vahala, R. Do wastewater treatment plants act as a potential point source of microplastics? Preliminary study in the coastal Gulf of Finland, Baltic Sea. *Water Sci. Technol.* **2015**, 72 (9), 1495–1504.
- (23) Liu, Y.; Zhang, J. Di; Tang, Y.; He, Y.; Li, Y. J.; You, J. A.; Breider, F.; Tao, S.; Liu, W. X. Effects of anthropogenic discharge and hydraulic deposition on the distribution and accumulation of microplastics in surface sediments of a typical seagoing river: The Haihe River. *J. Hazard. Mater.* **2021**, 404, 124180.
- (24) Xiong, X.; Zhang, K.; Chen, X.; Shi, H.; Luo, Z.; Wu, C. Sources and distribution of microplastics in China's largest inland lake – Qinghai Lake. *Environ. Pollut.* **2018**, 235, 899–906.
- (25) Cole, M.; Lindeque, P.; Halsband, C.; Galloway, T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin*. Pergamon December 1, 2011, pp 2588–2597.
- (26) Huang, Y.; Liu, Q.; Jia, W.; Yan, C.; Wang, J. Agricultural plastic mulching as a source of microplastics in the terrestrial environment. *Environ. Pollut.* **2020**, 260, 114096.
- (27) Xu, C.; Zhang, B.; Gu, C.; Shen, C.; Yin, S.; Aamir, M.; Li, F. Are we underestimating the sources of microplastic pollution in terrestrial environment? *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V. December 5, 2020, p 123228.
- (28) Xiong, W.; Wang, Y.; Sun, Y.; Ma, L.; Zeng, Q.; Jiang, X.; Li, A.; Zeng, Z.; Zhang, T. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome* **2018**, 6 (1), 34.
- (29) Peeken, I.; Primpke, S.; Beyer, B.; Gütermann, J.; Katlein, C.; Krumpfen, T.; Bergmann, M.; Hehemann, L.; Gerdt, G. Arctic sea ice is an important temporal

- sink and means of transport for microplastic. *Nat. Commun.* **2018**, 9 (1), 1–12.
- (30) Cole, M.; Liddle, C.; Consolandi, G.; Drago, C.; Hird, C.; Lindeque, P. K.; Galloway, T. S. Microplastics, microfibrils and nanoplastics cause variable sub-lethal responses in mussels (*Mytilus* spp.). *Mar. Pollut. Bull.* **2020**, 160, 111552.
 - (31) Lee, K. W.; Shim, W. J.; Kwon, O. Y.; Kang, J. H. Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod *tigriopus japonicus*. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 47 (19), 11278–11283.
 - (32) Nelms, S. E.; Galloway, T. S.; Godley, B. J.; Jarvis, D. S.; Lindeque, P. K. Investigating microplastic trophic transfer in marine top predators. *Environ. Pollut.* **2018**, 238, 999–1007.
 - (33) Prata, J. C.; da Costa, J. P.; Lopes, I.; Duarte, A. C.; Rocha-Santos, T. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V. February 1, 2020, p 134455.
 - (34) Sussarellu, R.; Suquet, M.; Thomas, Y.; Lambert, C.; Fabioux, C.; Pernet, M. E. J.; Goïc, N. Le; Quillien, V.; Mingant, C.; Epelboin, Y.; et al. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, 113 (9), 2430–2435.
 - (35) Amaral-Zettler, L. A.; Zettler, E. R.; Mincer, T. J. Ecology of the plastisphere. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research March 1, 2020, pp 139–151.
 - (36) Wright, R. J.; Erni-Cassola, G.; Zadjelovic, V.; Latva, M.; Christie-Oleza, J. A. Marine Plastic Debris: A New Surface for Microbial Colonization. *Environ. Sci. Technol.* **2020**, 54 (19), 11657–11672.
 - (37) McCormick, A.; Hoellein, T. J.; Mason, S. A.; Schluep, J.; Kelly, J. J. Microplastic is an abundant and distinct microbial habitat in an urban river. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, 48 (20), 11863–11871.
 - (38) Wang, J.; Huang, M.; Wang, Q.; Sun, Y.; Zhao, Y.; Huang, Y. LDPE microplastics significantly alter the temporal turnover of soil microbial communities. *Sci. Total Environ.* **2020**, 726, 138682.
 - (39) Yang, Y.; Liu, W.; Zhang, Z.; Grossart, H.-P.; Gadd, G. M. Microplastics provide

new microbial niches in aquatic environments.

- (40) Wang, J.; Qin, X.; Guo, J.; Jia, W.; Wang, Q.; Zhang, M.; Huang, Y. Evidence of selective enrichment of bacterial assemblages and antibiotic resistant genes by microplastics in urban rivers. *Water Res.* **2020**, *183*, 116113.
- (41) Zettler, E. R.; Mincer, T. J.; Amaral-Zettler, L. A. Life in the “plastisphere”: Microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (13), 7137–7146.
- (42) Eckert, E. M.; Di Cesare, A.; Kettner, M. T.; Arias-Andres, M.; Fontaneto, D.; Grossart, H. P.; Corno, G. Microplastics increase impact of treated wastewater on freshwater microbial community. *Environ. Pollut.* **2018**, *234*, 495–502.
- (43) Imran, M.; Das, K. R.; Naik, M. M. Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. *Chemosphere*. Elsevier Ltd January 1, 2019, pp 846–857.
- (44) Lu, J.; Zhang, Y.; Wu, J.; Luo, Y. Effects of microplastics on distribution of antibiotic resistance genes in recirculating aquaculture system. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *184*, 109631.
- (45) Christou, A.; Agüera, A.; Bayona, J. M.; Cytryn, E.; Fotopoulos, V.; Lambropoulou, D.; Manaia, C. M.; Michael, C.; Revitt, M.; Schröder, P.; et al. The potential implications of reclaimed wastewater reuse for irrigation on the agricultural environment: The knowns and unknowns of the fate of antibiotics and antibiotic resistant bacteria and resistance genes – A review. *Water Research*. Elsevier Ltd October 15, 2017, pp 448–467.
- (46) Gao, Q.; Li, Y.; Qi, Z.; Yue, Y.; Min, M.; Peng, S.; Shi, Z.; Gao, Y. Diverse and abundant antibiotic resistance genes from mariculture sites of China’s coastline. *Sci. Total Environ.* **2018**, *630*, 117–125.
- (47) Hayward, J. L.; Jackson, A. J.; Yost, C. K.; Truelstrup Hansen, L.; Jamieson, R. C. Fate of antibiotic resistance genes in two Arctic tundra wetlands impacted by municipal wastewater. *Sci. Total Environ.* **2018**, *642*, 1415–1428.
- (48) Li, J.; Cao, J.; Zhu, Y. G.; Chen, Q. L.; Shen, F.; Wu, Y.; Xu, S.; Fan, H.; Da, G.; Huang, R. J.; et al. Global Survey of Antibiotic Resistance Genes in Air. *Environ.*

Sci. Technol. **2018**, 52 (19), 10975–10984.

- (49) Finley, R. L.; Collignon, P.; Larsson, D. G. J.; McEwen, S. A.; Li, X.-Z.; Gaze, W. H.; Reid-Smith, R.; Timinouni, M.; Graham, D. W.; Topp, E. The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of the Environment. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, 57 (5), 704–710.
- (50) Li, A. D.; Metch, J. W.; Wang, Y.; Garner, E.; Zhang, A. N.; Riquelme, M. V.; Vikesland, P. J.; Pruden, A.; Zhang, T. Effects of sample preservation and DNA extraction on enumeration of antibiotic resistance genes in wastewater. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, 94 (2), 189.
- (51) Kümmerer, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere*. Pergamon April 1, 2009, pp 417–434.
- (52) Tran, N. H.; Chen, H.; Reinhard, M.; Mao, F.; Gin, K. Y. H. Occurrence and removal of multiple classes of antibiotics and antimicrobial agents in biological wastewater treatment processes. *Water Res.* **2016**, 104, 461–472.
- (53) United States Environmental Protection Agency | US EPA <https://www.epa.gov/> (accessed Mar 11, 2021).
- (54) Rasheed, T.; Bilal, M.; Hassan, A. A.; Nabeel, F.; Bharagava, R. N.; Romanholo Ferreira, L. F.; Tran, H. N.; Iqbal, H. M. N. Environmental threatening concern and efficient removal of pharmaceutically active compounds using metal-organic frameworks as adsorbents. *Environmental Research*. Academic Press Inc. June 1, 2020.
- (55) Zhao, R.; Feng, J.; Huang, J.; Li, X.; Li, B. Responses of microbial community and antibiotic resistance genes to the selection pressures of ampicillin, cephalexin and chloramphenicol in activated sludge reactors. *Sci. Total Environ.* **2021**, 755, 142632.
- (56) Richardson, S. D.; Ternes, T. A. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*. American Chemical Society June 15, 2011, pp 4616–4648.
- (57) Yang, Y.; Li, B.; Zou, S.; Fang, H. H. P.; Zhang, T. Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach. *Water Res.*

2014, 62, 97–106.

- (58) Renew, J. E.; Huang, C. H. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1042 (1–2), 113–121.
- (59) Brown, K. D.; Kulis, J.; Thomson, B.; Chapman, T. H.; Mawhinney, D. B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci. Total Environ.* **2006**, 366 (2–3), 772–783.
- (60) Watkinson, A. J.; Murby, E. J.; Kolpin, D. W.; Costanzo, S. D. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Sci. Total Environ.* **2009**, 407 (8), 2711–2723.
- (61) Martinez, J. L.; Baquero, F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44 (7), 1771–1777.
- (62) Jacoby, G. A.; Chow, N.; Waites, K. B. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47 (2), 559–562.
- (63) Jayashree, B. S.; Thomas, S.; Nayak, Y. Design and synthesis of 2-quinolones as antioxidants and antimicrobials: a rational approach. *Med. Chem. Res.* 2009 192 **2009**, 19 (2), 193–209.
- (64) Tipper, D. J. Mode of action of β -lactam antibiotics. *Pharmacol. Ther.* **1985**, 27 (1), 1–35.
- (65) Bradford, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, 14 (4), 933–951.
- (66) Song, W.; Kim, J. S.; Kim, H. S.; Yong, D.; Jeong, S. H.; Park, M. J.; Lee, K. M. Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal ampC gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2006**, 55 (3), 219–224.
- (67) Nguyen-Distèche, M.; Leyh-Bouille, M.; Ghuysen, J. M. Isolation of the membrane-bound 26 000-Mr penicillin-binding protein of Streptomyces strain K15

- in the form of a penicillin-sensitive d-alanyl-d-alanine-cleaving transpeptidase. *Biochem. J.* **1982**, 207 (1), 109–115.
- (68) Skagseth, S. Site-directed mutagenesis of the metallo- β -lactamase VIM-7 from the opportunistic human pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, Universitetet i Tromsø, 2012.
 - (69) Thaker, M.; Spanogiannopoulos, P.; Wright, G. D. The tetracycline resistome. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009 673 **2009**, 67 (3), 419–431.
 - (70) Nguyen, F.; Starosta, A. L.; Arenz, S.; Sohmen, D.; Dönhöfer, A.; Wilson, D. N. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol. Chem.* **2014**, 395 (5), 559–575.
 - (71) Sköld, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist. Updat.* **2000**, 3 (3), 155–160.
 - (72) Dairawan, M.; Shetty, P. J. The Evolution of DNA Extraction Methods. **2020**, No. 1, 39–45.
 - (73) Schuhmacher, L.-N. How Measurement of Concentration and Purity of Nucleic Acids Works, Part I <https://bitesizebio.com/13532/how-measurement-of-concentration-and-purity-of-nucleic-acids-works/> (accessed Sep 13, 2021).
 - (74) Houghton, S. G.; Cockerill, F. R. Real-time PCR: Overview and applications. *Surgery* **2006**, 139 (1), 1–5.
 - (75) Παλαιολόγου, Δ.; Κατσαρέλη, Ε.; Παπανικολάου, Γ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης; 2016.
 - (76) Malcolm, T. Nutritional Regulation of Sulfonamide Antibiotic Biodegradation by *Microbacterium* sp. Strain C448. *Electron. Thesis Diss. Repos.* **2017**.
 - (77) Dupont, S.; Carré-Mlouka, A.; Descarrega, F.; Ereskovsky, A.; Longeon, A.; Mouray, E.; Florent, I.; Bourguet-Kondracki, M. L. Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge *Phorbas tenacior* (Porifera, Demospongiae). *Lett. Appl. Microbiol.* **2014**, 58 (1), 42–52.
 - (78) Rodríguez-Martínez, J. M.; Pascual, A.; García, I.; Martínez-Martínez, L. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type β -lactamase. *J.*

- Antimicrob. Chemother.* **2003**, 52 (4), 703–706.
- (79) Schwartz, T.; Kohnen, W.; Jansen, B.; Obst, U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, 43 (3), 325–335.
 - (80) Tennstedt, T.; Szczepanowski, R.; Krahn, I.; Pühler, A.; Schlüter, A. Sequence of the 68,869 bp IncP-1α plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid* **2005**, 53 (3), 218–238.
 - (81) Kern, M. B.; Klemmensen, T.; Frimodt-Møller, N.; Espersen, F. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 50 (4), 513–516.
 - (82) Murphy, F.; Ewins, C.; Carbonnier, F.; Quinn, B. Wastewater Treatment Works (WwTW) as a Source of Microplastics in the Aquatic Environment. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, 50 (11), 5800–5808.
 - (83) Kralik, P.; Ricchi, M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front. Microbiol.* **2017**, 0 (FEB), 108.
 - (84) Bayo, J.; Olmos, S.; López-Castellanos, J. Assessment of Microplastics in a Municipal Wastewater Treatment Plant with Tertiary Treatment: Removal Efficiencies and Loading per Day into the Environment. *Water* **2021**, Vol. 13, Page 1339 **2021**, 13 (10), 1339.
 - (85) Zeri, C.; Adamopoulou, A.; Koi, A.; Koutsikos, N.; Lytras, E.; Dimitriou, E. Rivers and Wastewater-Treatment Plants as Microplastic Pathways to Eastern Mediterranean Waters: First Records for the Aegean Sea, Greece. *Sustain.* **2021**, Vol. 13, Page 5328 **2021**, 13 (10), 5328.
 - (86) Αρχική σελίδα - Βάση Δεδομένων Παρακολούθησης Λειτουργίας Ε.Ε.Λ. <http://astikalimata.ypeka.gr/Default.aspx> (accessed Oct 16, 2021).
 - (87) Αρχική - Δ.Ε.Υ.Α. ΧΑΝΙΩΝ <https://deyach.gr/> (accessed Nov 1, 2021).
 - (88) European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network (ESAC-Net) <https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and->

laboratory-networks/esac-net (accessed Nov 1, 2021).

- (89) Daghrir, R.; Drogui, P. Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ. Chem. Lett.* 2013 113 **2013**, 11 (3), 209–227.
- (90) Kouli, M.; Soupios, P.; Vallianatos, F. Soil erosion prediction using the Revised Universal Soil Loss Equation (RUSLE) in a GIS framework, Chania, Northwestern Crete, Greece. *Environ. Geol.* 2008 573 **2008**, 57 (3), 483–497.
- (91) Kolokotsa, A.; Leotsinidis, M.; Kalavrouziotis, I.; Sazakli, E. Effects of tourist flows on antibiotic resistance in wastewater of a Greek island. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, 130 (2), 516–527.
- (92) Sköld, O. E.; Swedberg, G. Sulfonamides and Trimethoprim. *Antimicrob. Drug Resist.* **2017**, 345–358.