



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος

Κατεύθυνση: Μηχανικών Περιβάλλοντος

Επεξεργασία αστικών υγρών αποβλήτων: έλεγχος οικοτοξικότητας και διασποράς
βακτηριακής ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΠΕΡΕΛΑΚΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

A.M. : 2014050035



Χανιά

Νοέμβριος, 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 αναφέρεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης»



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος

Κατεύθυνση: Μηχανικών Περιβάλλοντος

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επεξεργασία αστικών υγρών αποβλήτων: έλεγχος οικοτοξικότητας και διασποράς βακτηριακής ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά»

«Municipal wastewater treatment: assessment of ecotoxicity and dispersion of bacterial antibiotic resistance»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βενιέρη Δανάη (επιβλέπουσα)

Καθηγήτρια Ψυλλάκη Ελευθερία

Αναπληρωτής καθηγητής Παρανυχιανάκης Νικόλαος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πορεία των προπτυχιακών μου σπουδών ολοκληρώνεται με την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος Πολυτεχνείου Κρήτης.

Θερμές ευχαριστίες απευθύνω πρώτα στην επιβλέπουσα αναπληρώτρια καθηγήτρια κα. Βενιέρη Δανάη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας καθώς και στην κα. Γουνάκη Ιωσηφίνα, ΕΔΙΠ του εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας για τη βοήθεια και τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε αλλά και για την υπομονή και επιμονή που υπέδειξε σε όσες δυσκολίες αντιμετωπίσαμε κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Θα ήθελα επίσης να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα. Κατσώνη Αθανασία, προϊσταμένη της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων της ΔΕΥΑΒΑ για την πραγματοποίηση των δειγματοληψιών του πειράματος και την καθοριστική συμβολή της στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την καθηγήτρια κα. Ψυλλάκη Ελευθερία και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Παρανυχιανάκη Νικόλαο για το χρόνο που διέθεσαν στην εξέταση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους συμφοιτητές που εκπονούσαμε παράλληλα τις διπλωματικές μας εργασίες για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα μέσα στο εργαστήριο. Ιδιαίτερα όμως, ευχαριστώ τη συμφοιτήτρια και φίλη Νικολέτα Στουραϊτή που συνεργαστήκαμε πάνω στο ίδιο αντικείμενο. Δε θα μπορούσα να παραλείψω τις συμφοιτήτριες μου Αναστασία Γκιάκα και Κωνσταντίνα Καρακούλα, η καθημερινότητα στο εργαστήριο μου χάρισε δυο καινούριες φίλεις.

Τέλος, μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου Γιώργο και Αγγελική για την αγάπη, την πίστη τους στις ικανότητες μου και την χρηματοδότηση των μακροχρόνιων σπουδών μου. Ευχαριστώ, οφείλω στην αδελφή μου Αντωνία και φίλη μου Αλέξια απλώς γιατί με ανέχονται κάθε μέρα που περνά.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μικροβιακή αντοχή αποτελεί ίσως τη μεγαλύτερη διαχρονική απειλή για τη δημόσια υγεία. Ιδιαίτερα σήμερα, στην εποχή της πολυ-αντοχής η ανθρωπότητα αντιμετωπίζει τον κίνδυνο να μην είναι σε θέση να θεραπεύσει λοιμώξεις από κοινά βακτήρια. Παγκόσμιοι και κρατικοί φορείς υγείας συνιστούν περιορισμό στην αλόγιστη χρήση αντιβιοτικών φαρμάκων, ενώ η επιστημονική κοινότητα διερευνά μεθόδους για τον περιορισμό της μετάδοσης της βακτηριακής ανθεκτικότητας.

Οι μονάδες επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων ως αποδέκτες των απορρίψεων του ανθρώπινου μεταβολισμού, αποτελούν ιδανικά περιβάλλοντα για την εξέλιξη και την εξάπλωση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά φάρμακα. Επίσης, η ύπαρξη αντιβιοτικών ως χημικών ρύπων στα υγρά απόβλητα ενέχουν σοβαρούς κινδύνους για τα υδάτινα οικοσυστήματα, στα οποία απελευθερώνονται έπειτα από την επεξεργασία τους. Προς διερεύνηση των παραπάνω κινδύνων, η παρούσα διπλωματική εργασία εξετάζει αστικά λύματα από την ΕΕΛ Γερανίου της ΔΕΥΑΒΑ δήμου Πλατανιά στα Χανιά.

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν για τους μήνες από Οκτώβριο 2021 έως Φεβρουάριο 2022 και Μάιο 2022 και τα δείγματα προέρχονταν από τρία στάδια: α) από την είσοδο της μονάδας πριν τη πρωτοβάθμια επεξεργασία β) μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία και πριν τη χλωρίωση γ) από την έξοδο της μονάδας. Σκοπός, ήταν η απομόνωση των βακτηριακών στελεχών *Klebsiella pneumoniae* και *Staphylococcus aureus* για να ελεγχθεί η αποδοτικότητα των μεθόδων επεξεργασίας στην απομάκρυνση ή αδρανοποίηση των βακτηρίων και στη συνέχεια ελέγχθηκε η διαφοροποίηση της ανθεκτικότητας τους σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Τα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν ήταν η Αμοξικιλίνη, η Σιπροφλοξασίνη και η Σουλφομεθοξαζόλη και η μέθοδος ελέγχου ήταν αυτή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC₆₀ που εκφράζει τη συγκέντρωση αντιβιοτικού που αναστέλλει την ανάπτυξη στο 60% του βακτηριακού πληθυσμού. Τα περισσότερα βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από δείγματα πριν και μετά την επεξεργασία των λυμάτων εμφανίστηκαν ανθεκτικά στην Αμοξικιλίνη ενώ τα λιγότερα ανθεκτικά στελέχη αφορούσαν τη Σιπροφλοξασίνη. Στη περίπτωση της Σουλφομεθοξαζόλης τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα στελέχη μετά την επεξεργασία τους στην εγκατάσταση απέκτησαν περισσότερη ευαισθησία στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Στη συνέχεια, έγινε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του γονιδίου ανθεκτικότητας sul II που σχετίζεται με το υπό μελέτη αντιβιοτικό Σουλφομεθοξαζόλη και του γονιδίου 16S rRNA που αντιστοιχεί στο συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό που υπάρχει στα υγρά απόβλητα. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν μείωση και των δύο γονιδίων στην έξοδο της μονάδας επεξεργασίας με μείωση της τάξεως των 2,2 Logs για το sul II και 3-6 Logs για το 16S rRNA. Αντιθέτως, ο λόγος του sul II προς το 16S rRNA παρουσίασε αύξηση στην έξοδο κατά 4 περίπου Logs, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων έχουν ενεργό ρόλο στη μετάδοση βακτηριακής ανθεκτικότητας.

Η οικοτοξικότητα των δειγμάτων ελέγχθηκε με τη χρήση του βιοδείκτη *Artemia nauplii*. Στα δείγματα εισόδου η θνησιμότητα του οργανισμού κυμαίνεται σε ποσοστά 90-100% και το LC₅₀ εντοπίζεται σε δείγματα που περιείχαν 37-80% του αρχικού μη αραιωμένου δείγματος. Στην έξοδο τα ποσοστά θανάτωσης μειώνονται σε αρκετά δείγματα φθάνοντας ακόμα και το 20% ενώ το LC₅₀ εντοπίζεται σε δείγματα που περιείχαν 41-60% του αρχικού μη αραιωμένου δείγματος.

Συμπερασματικά, οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων είναι αποδοτικές ως προς την μείωση του βακτηριακού φορτίου και στην απομάκρυνση οργανικών και άλλων ρύπων που επιβαρύνουν τους υδάτινους αποδέκτες. Φαίνεται ωστόσο να μη λειτουργούν το ίδιο αποδοτικά στην απομάκρυνση των γονιδίων ανθεκτικότητας, εντείνοντας τις ανησυχίες της επιστημονικής κοινότητας για τη διάδοση βακτηριακής ανθεκτικότητας μέσα σε αυτές.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is perhaps the greatest long-term threat to public health. Particularly today, in the era of multi-drug resistance, humanity faces the risk of being unable to treat infections caused by common bacteria. Global health agencies are calling for a restriction on the indiscriminate use of antibiotic drugs, while the scientific community is exploring methods to limit the transmission of bacterial resistance.

Municipal wastewater treatment plants, as recipients of human metabolic waste, are ideal environments for the development and spread of antibiotic drug resistance. Furthermore, the presence of antibiotics as chemical pollutants in wastewater poses serious risks to the aquatic ecosystem, into which they are released after treatment. In order to investigate the above risks, this thesis examines the microbiological quality of urban wastewater (influent and effluent) derived from the WWTP located in Gerani (municipality of Platanias, Chania).

The sampling was carried out from October 2021 to February 2022 and May 2022 and the samples were taken from three stages: a) influent, prior to any treatment b) effluent from secondary treatment and before chlorination c) effluent. The aim was to test the efficiency of the treatment methods, regarding the removal and inactivation of important bacterial species, namely, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* and then to test the resistance of the remaining bacterial strains after treatment to specific antibiotics. The antibiotics tested were Amoxicillin, Ciprofloxacin and Sulfamethoxazole and the method referred to the evaluation of the minimum

inhibitory concentration, MIC₆₀, which represents the concentration of the antibiotic that inhibits the growth of 60% of the bacterial population. Most of the bacterial strains isolated from samples before and after wastewater treatment appeared to be resistant to Amoxicillin, while the least resistant strains were related to Ciprofloxacin. In the case of Sulfamethoxazole, the results showed that the strains after treatment were more susceptible to this antibiotic.

Further tests included the detection and quantification of the genes *sul II* and 16S rRNA in wastewater samples (influent and effluent). The *sul II* is an antibiotic resistance gene associated with the antibiotic Sulfamethoxazole and the 16S rRNA gene corresponds to the whole bacterial genetic material. The results showed a reduction of both genes in the effluents, namely, 2,2 Logs for *sul II* and 3-6 Logs for 16S rRNA. In contrast, the ratio of *sul II* to 16S rRNA showed an increase of 4 Logs in the effluents, confirming that wastewater treatment plants have an active role in the transmission of bacterial resistance.

The ecotoxicity of the samples was tested using the *Artemia nauplii* biomarker. The mortality of the bioindicator ranged from 90-100% when influent samples were tested at concentrations of 37-80% v/v. Effluent samples showed lower toxicity levels, as the mortality of *Artemia* reached 20% of its initial population and the LC₅₀ was recorded in samples containing 41-60% v/v of treated wastewater.

In conclusion, municipal wastewater treatment plants are efficient in reducing bacterial load and in removing organic and other pollutants. However, they do not appear to be as efficient in removing resistance genes, increasing the concerns of the scientific community about the spread of bacterial resistance during wastewater treatment.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Ανθεκτικότητα στα βακτήρια	10
1.1.1 Το φαινόμενο της βακτηριακής ανθεκτικότητας στην Ελλάδα	10
1.1.2 Διάδοση στο περιβάλλον	12
1.1.3 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας	13
1.2 Αντιβιοτικά	15
1.2.1 Αμοξικιλίνη	16
1.2.2 Σιπροφλοξασίνη	17
1.2.3 Σουλφομεθοξαζόλη.....	18
1.3 Περιβαλλοντική τοξικολογία – Οικοτοξικολογία.....	19
1.3.1 Οικοτοξικολογία στα υγρά απόβλητα.....	21
1.3.2 Δοκιμές οικοτοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς	22
1.3.3 Δοκιμές οικοτοξικότητας με <i>Artemia</i>	26
2 ΣΚΟΠΟΣ	28
3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
3.1 Υλικά.....	29
3.2 Δειγματοληψία	30
3.3 Απομόνωση βακτηριακών στελεχών	30
3.4 Έλεγχος ανθεκτικότητας	32
3.5 Έλεγχος οικοτοξικότητας	35
3.6 Απομόνωση γενετικού υλικού	37
3.7 Έλεγχος ποσότητας και καθαρότητας DNA	37
3.8 Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας - Real Time PCR	37
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	41
4.1 Βακτηριακή ανθεκτικότητα	41

4.1.1 Εξεταζόμενα βακτήρια	41
4.1.2 Απομάκρυνση μικροοργανισμών έπειτα από επεξεργασία σε Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων.....	43
4.1.3 Έλεγχος διαφοροποίησης του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων	45
4.1.4 Κατηγοριοποίηση των βακτηριακών στελεχών με βάση την ανθεκτικότητα τους	59
4.1.5 Αναζήτηση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά στα υγρά απόβλητα ..	64
4.2 Δοκιμασία οικοτοξικότητας.....	68
5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	72
6 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	75
7 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	76
7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μεταδοτικές ασθένειες έχει εκτιμηθεί ότι οδηγούν στο θάνατο πάνω από 15 εκατομμύρια ανθρώπους το χρόνο με πολλούς θανάτους να οφείλονται σε βακτηριακές λοιμώξεις. Η ακατάσχετη και μη ελεγχόμενη χρήση αντιβιοτικών έχει φέρει στο προσκήνιο ένα από τα πλέον σύγχρονα περιβαλλοντικά προβλήματα που είναι η διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών καθιστά τους πληθυσμούς ευάλωτους σε μεταδοτικές ασθένειες και βακτηριακές λοιμώξεις γεγονός που εγείρει την ανησυχία της επιστημονικής κοινότητας.

1.1 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Τα αντιβιοτικά είναι φάρμακα που μπορούν να σκοτώσουν ή να αναστείλουν την ανάπτυξη βακτηρίων και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία λοιμώξεων σε ανθρώπους, ζώα και φυτά. Τα βακτήρια παρουσιάζουν αντοχή σε συγκεκριμένα αντιβιοτικά όταν αυτά έχουν χάσει πλέον την ικανότητά τους να σκοτώνουν ή να σταματούν την ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών. Ορισμένα βακτήρια είναι φυσικά ανθεκτικά σε κάποια αντιβιοτικά (εγγενής αντίσταση), όμως ανησυχητικό πρόβλημα είναι όταν βακτήρια, τα οποία είναι κανονικά ευαίσθητα στα αντιβιοτικά, γίνονται ανθεκτικά ως αποτέλεσμα γενετικών αλλαγών (επίκτητη αντοχή). Όταν γίνεται εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών τα ευαίσθητα βακτήρια σκοτώνονται, αλλά τα ανθεκτικά επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται καθιστώντας τους πληθυσμούς ευάλωτους σε λοιμώξεις και μολυσματικές ασθένειες. Επιπλέον, διάδοση γονιδίων ανθεκτικότητας συμβαίνει μεταξύ διάφορων μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων βακτηριών, μυκήτων, παρασίτων και ιών (ECDC).

«Η μικροβιακή αντοχή προβλέπεται να γίνει η κύρια αιτία θανάτου μέχρι το 2050, με την αντοχή στα αντιβιοτικά να αποτελεί σημαντική συνιστώσα» (Stanton, et al., 2022).

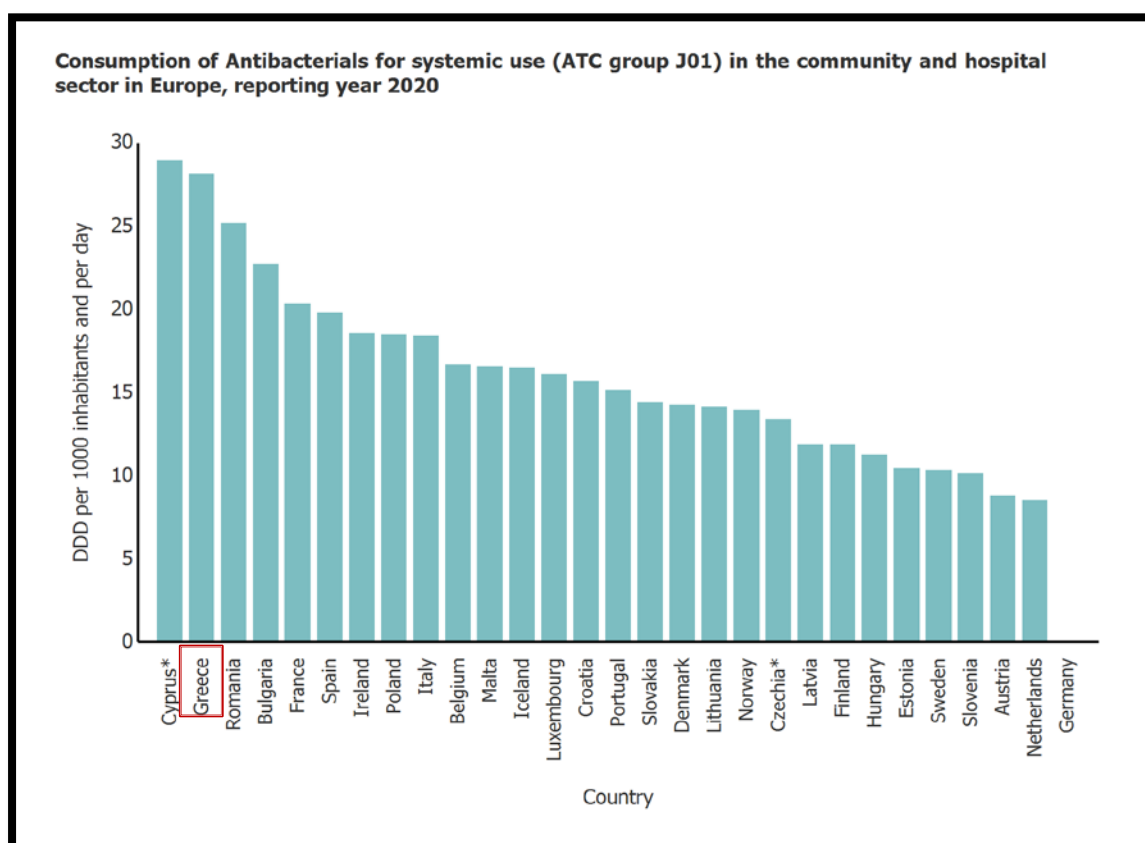
1.1.1 ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΤΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Η Ελλάδα συγκαταλέγεται στις ευρωπαϊκές χώρες με τα υψηλότερα επίπεδα μικροβιακής αντοχής και στις χώρες με την υψηλότερη κατανάλωση αντιβιοτικών τόσο στην κοινότητα όσο και στο νοσοκομειακό χώρο. Η εκτεταμένη και μη ορθολογική χρήση αντιβιοτικών, ειδικότερα αυτών που χαρακτηρίζονται ως ευρέως φάσματος, οδηγεί στη διασπορά πολυανθεκτικών παθογόνων μικροοργανισμών στα νοσοκομεία και αποτελεί τον βασικό παράγοντα ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων.

Η διασπορά στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά περιορίζει συνεχώς τις θεραπευτικές επιλογές για ασθενείς με σοβαρές λοιμώξεις, και αυξάνει τα ποσοστά νοσηλείας και θνησιμότητας ενώ ταυτόχρονα επιβαρύνει το εθνικό σύστημα υγείας.

Για να μειωθεί η μικροβιακή αντοχή καθίσταται επιτακτική η ανάγκη λήψης και εφαρμογής αποτελεσματικών μέτρων για τη πρόληψη και τον έλεγχο της διασποράς βακτηριακής ανθεκτικότητας (ΕΟΔΥ).

Σύμφωνα με τις καταγραφές του ESAC (European Surveillance of Antimicrobial Consumption) που αφορούσαν το έτος 2020, η Ελλάδα είναι η δεύτερη χώρα της Ευρώπης στην κατανάλωση αντιβιοτικών, αμέσως μετά τη Κύπρο, με καθορισμένη δόση 28,1 DDD (Defined Daily Dose) ανά 1000 κατοίκους ανά ημέρα. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι ο αριθμός αυτός είναι σημαντικά μειωμένος αν συγκριθεί με το έτος 2008 όπου η ημερήσια καθορισμένη δόση ανά 1000 άτομα είχε ανέλθει στα 40,4 DDD και αυτό οφείλεται στην συμμόρφωση των τομέων υγείας με τις ευρωπαϊκές οδηγίες (ESAC).



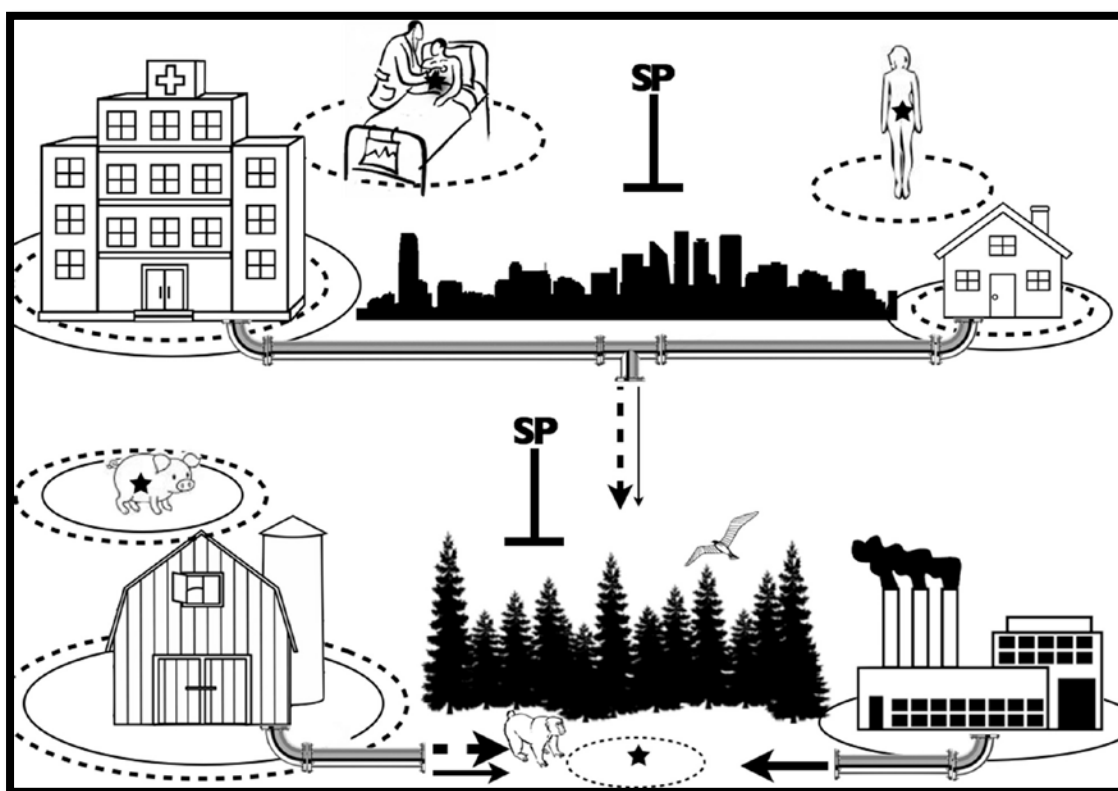
Εικόνα 1. Κατανάλωση αντιβακτηριακών για συστηματική χρήση στον κοινοτικό και νοσοκομειακό τομέα στην Ευρώπη κατά το έτος 2020 (ECDC)

Η συνολική κατανάλωση αντιβιοτικών στα πλαίσια της Ευρωπαϊκής ένωσης μειώθηκε κατά 23% την περίοδο μεταξύ 2011 και 2020. Από το 2019 έως το 2020 συγκεκριμένα, η κατανάλωση αντιβιοτικών μειώθηκε σχεδόν κατά 18%. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κατά το ξέσπασμα της πανδημίας της COVID-19 η κατανάλωση αντιβιοτικών με σκοπό τη πρόληψη ή τη θεραπεία δευτερογενών λοιμώξεων είχε αυξηθεί (Samandari et al., 2022). Ωστόσο, η σχετική χρήση αντιβιοτικών ευρέως

φάσματος παραμένει αυξημένη και η διακύμανση μεταξύ των χωρών υποδηλώνει ότι είναι ακόμη δυνατές οι μειώσεις (ECDC).

1.1.2 ΔΙΑΔΟΣΗ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Πολλά βακτηριακά είδη ανέπτυξαν την ικανότητα ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά πολύ πριν τη μαζική παραγωγή τους από τους ανθρώπους για τη πρόληψη μολυσματικών ασθενειών. Πλέον, έχει παρατηρηθεί ότι οι άνθρωποι και τα ζώα λειτουργούν ως δέκτες αντιβιοτικών φαρμάκων. Επιπλέον, το περιβάλλον που έχει υποστεί ρύπανση από αντιβιοτικά δρα ευεργετικά για την εξέλιξη της βακτηριακής ανθεκτικότητας και αυτό διότι διαθέτουν μεγάλα «αποθέματα» σε γονίδια που φέρουν πληροφορίες ανθεκτικότητας. Ωστόσο η συντριπτική πλειονότητα των γονιδίων ανθεκτικότητας δεν έχει γνωστή προέλευση. Τα γονίδια αυτά είναι πιθανό να προέρχονται από περιβαλλοντικά στελέχη που δεν έχουν καταγραφεί ακόμα, γεγονός που συνηγορεί υπέρ ενός πολύ μεγαλύτερου ρόλου του εξωτερικού περιβάλλοντος στη διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας. Έχει γίνει πλέον αντιληπτό ότι το περιβάλλον και συγκεκριμένα το υδάτινο, παίζει ρόλο τόσο στην εξέλιξη όσο και στη μετάδοση της ανθεκτικότητας αφού έχει άμεση επαφή με την ανθρωπογενή δραστηριότητα (Larsoon, Flach, 2022).



Εικόνα 2. Αντιβιοτικά, ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και Περιβάλλον (Amábile-Cuevas, 2021)

Η κατάληξη αντιβιοτικών ουσιών και βακτηρίων στο υδάτινο περιβάλλον μπορεί να είναι συνέπεια μη ορθολογικής διαχείρισης

- ❖ Επεξεργασμένων αστικών υγρών λυμάτων και ιλύος

- ❖ Νοσοκομειακών αποβλήτων
- ❖ Γεωργικών απορροών

Αντιβιοτικά με νοσοκομειακή, οικιακή, φαρμακευτική ή ακόμα και γεωργική προέλευση εισέρχονται στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων (ΕΕΛ) και τις καθιστούν κύριες πηγές ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων και γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Karkman, et al., 2018) .

Τα γονίδια ανθεκτικότητας ως φορείς γενετικών πληροφοριών ανθεκτικότητας σε φάρμακα θεωρούνται ένας νέος περιβαλλοντικός ρύπος (Zheng, et al., 2017). Η διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας στις ΕΕΛ γίνεται μεταξύ των μη ανθεκτικών βακτηρίων και μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Συμβατικές αλλά και προηγμένες διεργασίες επεξεργασίας έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον μετριασμό ή την ελαχιστοποίηση του κινδύνου μεταφοράς γονιδίων αδρανοποιώντας τα επιτυχώς. Ωστόσο, υπάρχει η πιθανότητα τα ήδη υπάρχοντα γονίδια που φέρουν τα κυτταρικά υπολείμματα από τις διεργασίες , να εξακολουθούν να προσδίδουν αντοχή μέσω μετασχηματισμού και μεταγωγής χωρίς ζωντανά κύτταρα-δότες. Επίσης, οι περισσότερες από τις διαδικασίες απολύμανσης/επεξεργασίας μπορεί να εμπλουτίσουν μακροπρόθεσμα τη συγκέντρωση ανθεκτικών βακτηρίων ή γονιδίων ανθεκτικότητας στα λύματα (Fzeuko, etl al., 2021), ενώ έχει παρατηρηθεί ότι οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων με βάση την ενεργό ιλύ συμβάλλουν σημαντικά στην οριζόντια μεταφορά και εξάπλωση γονιδίων με την ελευθέρωση τους στο περιβάλλον μαζί με τα επεξεργασμένα λύματα (Conco, et al., 2022).

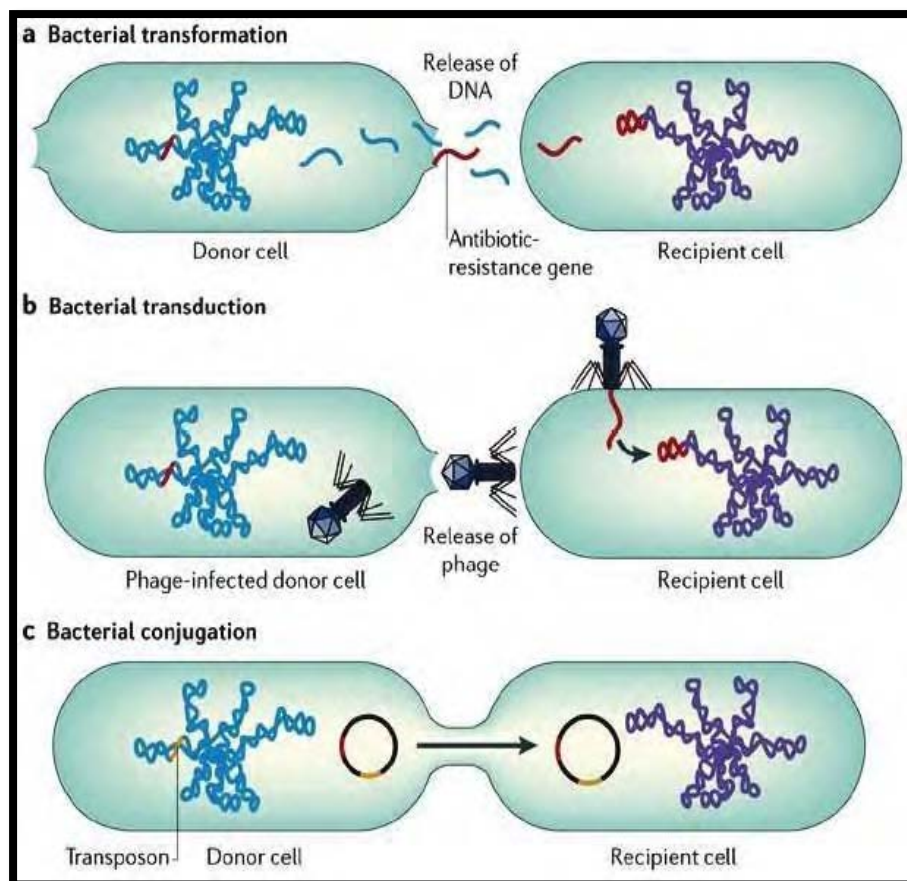
1.1.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που προκύπτουν από τις γενετικές δυνατότητες των βακτηρίων χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες:

- ❖ **Ενδογενής ή φυσική ανθεκτικότητα:** είναι η δυνατότητα ενός βακτηριακού είδους να αντιστέκεται στη δραστηριότητα ενός συγκεκριμένου αντιβιοτικού και οφείλεται σε χρωμοσωμικά γονίδια τα οποία του προσδίδουν αντοχή σε ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό ή σε μία κλάση αντιβιοτικού.
- ❖ **Επίκτητη ανθεκτικότητα:** προκύπτει όταν ένας συγκεκριμένος μικροοργανισμός αποκτά την ικανότητα να αντιστέκεται στην δράση ενός αντιβιοτικού, στον οποίο προηγουμένως ήταν ευαίσθητος. Μπορεί να επιτευχθεί, είτε με σημειακές μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα, οι οποίες είναι τυχαίες και αφορούν το χρωμοσωμικό DNA, είτε με απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού, δηλαδή ανθεκτικού γονιδίου, από άλλους μικροοργανισμούς κυρίως μέσω των πλασμιδίων, τα οποία μεταφέρονται με οριζόντια μεταφορά γονιδίων.

Η απόκτηση εξωγενούς γενετικού υλικού μέσω οριζόντιας μεταφοράς είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει συχνά στο περιβάλλον και η μεταβίβαση των γονιδίων γίνεται με:

- ❖ **Σύζευξη (conjugation):** Ο κυριότερος μηχανισμός μεταβίβασης γονιδίων αντοχής στα Gram(-) βακτήρια. Η μεταβίβαση του γενετικού υλικού γίνεται με πλασμίδια, τα οποία φέρουν ένα ή περισσότερα γονίδια αντοχής (πλασμίδια πολλαπλής αντοχής). Στη σύζευξη απαιτείται η άμεση επαφή μεταξύ δύο βακτηρίων, η οποία εξασφαλίζεται με ειδικά ινίδια.
- ❖ **Μεταγωγή (transduction):** Η μεταβίβαση του γενετικού υλικού πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση βακτηριοφάγου (ιού), ανάμεσα σε δυο βακτήρια. Κατά την πορεία πολλαπλασιασμού του βακτηριοφάγου στο βακτηριακό κύτταρο μικρά τμήματα του βακτηριακού DNA μπορούν τυχαία να ενσωματωθούν στον ιό. Όταν ο ιός προσβάλλει ένα άλλο βακτήριο, το DNA από το πρώτο ελευθερώνεται στο δεύτερο βακτήριο.
- ❖ **Μετασχηματισμός (transformation):** Είναι η διαδικασία πρόσληψης από ορισμένα βακτήρια μορίων χρωμοσωμικού DNA, το οποίο έχει προκύψει, έπειτα από τη λύση-αποσύνθεση άλλου βακτηρίου, ελευθερώνοντας το γενετικό του υλικό στο περιβάλλον. Το ξένο DNA εισέρχεται στο κύτταρο – δέκτη και με ανασυνδυασμό ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα του δότη. Αυτός ο μηχανισμός συνηθίζεται σε Gram(+) βακτήρια (Γαλάνη, 2020).



Εικόνα 3 Τρόποι απόκτησης εξωγενούς γενετικού υλικού α) Μετασχηματισμός β) Μεταγωγή γ) Σύζευξη (Μαυρούλη, 2021)

1.2 ANTIBIOTIKA

Προκειμένου να περιγραφούν σωστά οι επιδράσεις της εκάστοτε κλάσης αντιβιοτικών είναι αναγκαίο να γίνει μια αναφορά σε ορισμένες βασικές έννοιες.

Αρχικά, η **Βιοδιαθεσιμότητα ενός αντιβιοτικού** αναφέρεται στο ποσοστό του φαρμάκου που παραμένει δραστικό στη συστηματική κυκλοφορία, όταν αναφερόμαστε σε ανθρώπινο οργανισμό ή στο υδάτινο περιβάλλον, όπως θα απασχολήσει την παρούσα εργασία.

Τα αντιβιοτικά κατηγοριοποιούνται με βάση το μηχανισμό δράσης τους σε **βακτηριοκτόνα** όπου προκαλούν θάνατο στο βακτήριο και **βακτηριοστατικά** τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη του. Μια ακόμα κατηγοριοποίηση των αντιβιοτικών προκύπτει ανάλογα με το εύρος δράσης τους. **Ευρέως φάσματος** χαρακτηρίζονται αντιβιοτικά που είναι δραστικά έναντι σε πληθώρα Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων ενώ **περιορισμένου φάσματος** όσα δρουν έναντι λίγων τύπων βακτηρίων.

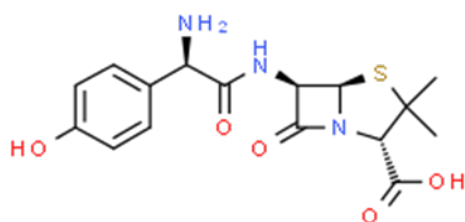
1.2.1 ΑΜΟΞΙΚΙΛΛΙΝΗ

Οι αντιβιοτικές ουσίες β-λακτάμης, στις οποίες υπάγεται η Αμοξικιλίνη, απέκτησαν το όνομά τους εξ' αιτίας της δομής τους, η οποία περιέχει ένα βήτα λακταμικό δακτύλιο στον οποίο οφείλουν τις αντιβιοτικές τους ιδιότητες. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει φυσικές και ημισυνθετικές πενικιλίνες, φυσικές και ημισυνθετικές κεφαλοσπορίνες και κεφαμυκίνες, καρβαπενέμες, μονοβακτάμες και αναστολείς της β-λακταμάσης. Οι αναστολείς β-λακταμάσης είναι ουσίες που σε συνδυασμό με β-λακταμικά αντιβιοτικά δρουν αναστέλλοντας τη δράση των σταφυλοκοκκικών και πολλών πλασμιδιακών λακταμασών καθιστώντας έτσι ευαίσθητα μικρόβια που προηγουμένως ήταν ανθεκτικά στα υπό χορήγηση φάρμακα.

Πολλά μέλη αυτής της κατηγορίας είναι παράγωγα φυσικών προϊόντων μυκήτων, *Penicillium* sp. και *Acremonium* sp., ενώ άλλα προέρχονται από βακτήρια του εδάφους του γένους *Streptomyces* και *Chromobacterium*. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι ότι τα γονίδια που είναι απαραίτητα για την παραγωγή β-λακταμών από μύκητες, στην πραγματικότητα προέρχονται από βακτήρια, καθιστώντας τελικά όλα αυτά τα φάρμακα βακτηριακής προέλευσης.

Τα αντιβιοτικά β-λακτάμης παρεμβαίνουν στη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων αναστέλλοντας τη δράση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, βασικού συστατικού του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Παράλληλα, συνεχίζεται η κυτταρική διαίρεση και η πρόσληψη του νερού μέσω ώσμωσης που λόγω αναστολής της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος οδηγεί τελικά σε λύση του κυττάρου, άρα και θάνατο του βακτηρίου (Amábile-Cuevas, 2021).

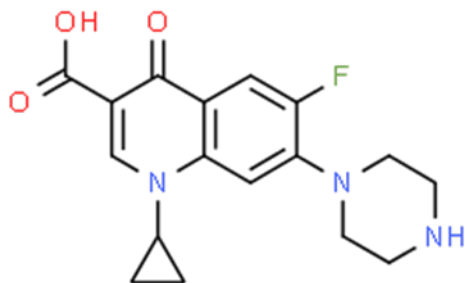
Περισσότερο από το 65% των αντιβιοτικών που χορηγούνται στον κόσμο είναι αντιβιοτικά β-λακτάμης με την αμοξικιλίνη να αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο διότι απορροφάται καλύτερα από τον οργανισμό όταν χορηγείται δια του στόματος. Η αμοξικιλίνη αποβάλλεται από τον οργανισμό 2 ώρες μετά τη κατανάλωση της και έχει υψηλή διαλυτότητα στο νερό, για αυτό μελέτες καταδεικνύουν την παρουσία της στα οικιακά ,βιομηχανικά και νοσοκομειακά απόβλητα καθώς και στα επιφανειακά νερά (Samandari, et al., 2022).



Εικόνα 4. Χημική δομή Αμοξικιλίνης (chemspider.com)

Η Αμοξικιλίνη (Amoxicillin), ανήκει στην οικογένεια των πενικιλινών και είναι ένα ευρέως φάσματος ημι-συνθετικό αντιβιοτικό, που χρησιμοποιείται για να θεραπεύσει λοιμώξεις που προκαλούνται από ευαίσθητους μικροοργανισμούς, όπως λοιμώξεις των αυτιών, της μύτης, του λαιμού, του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, του ουροποιητικού συστήματος, του δέρματος καθώς και κάποια αφροδίσια νοσήματα. Χρησιμοποιείται επίσης σαν απολυμαντικό πριν από κάποια χειρουργική επέμβαση (Δημητρακοπούλου, 2013).

1.2.2 ΣΙΠΡΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗ



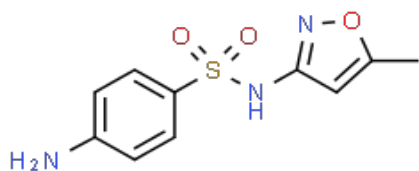
Εικόνα 5. Χημική δομή Σιπροφλοξασίνης (chemspider.com)

Η Σιπροφλοξασίνη (Ciprofloxacin) ανήκει στις κινολόνες, μια από τις σημαντικότερες οικογένειες αντιμικροβιακών παραγόντων που χρησιμοποιούνται εκτενώς για την καταπολέμηση βακτηριακών λοιμώξεων του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος. Ανακαλύφθηκαν ως υπο προϊόν κατά την αναζήτηση για τη βελτίωση της σύνθεσης ενός αντιελονοσιακού φαρμάκου, της χλωροκίνης. Σε αντίθεση με άλλα αντιβιοτικά που έχουν φυσική προέλευση, οι κινολόνες είναι πλήρως συνθετικές (Millanao, et al., 2021). Οι κινολόνες είναι ευρέως φάσματος αντιβιοτικά αφού δρουν ενάντια σε Gram (+) και Gram (-) αερόβια βακτήρια. Ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει

αναστολή του ενζύμου DNA γυράση που είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του βακτηριακού DNA (Μαυρούλη, 2021). Η Σιπροφλοξασίνη μεταξύ άλλων, (norfloxacin, ofloxacin) ανήκει στις κινολόνες δεύτερης γενιάς οι οποίες παρουσιάζονται ιδιαιτέρως αποτελεσματικές έναντι σε Gram (-) βακτήρια (Amábile-Cuevas, 2021).

Η Σιπροφλοξασίνη βρίσκεται σταθερά στο περιβάλλον λόγω της ικανότητάς της να αντιστέκεται στις διαδικασίες αποικοδόμησης στο υδάτινο περιβάλλον και να προσροφάται στα βιοστερεά κατά την επεξεργασία των λυμάτων. Ως εκ τούτου, η παραμονή της στο περιβάλλον εντείνει τη βακτηριακή ανθεκτικότητα. Επίσης, η μακροχρόνια παρουσία του αντιβιοτικού αυτού στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων μειώνει την αποτελεσματικότητα των βακτηρίων που συμμετέχουν σε διάφορα στάδια επεξεργασίας των λυμάτων και είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση θρεπτικών συστατικών όπως ο φώσφορος και το άζωτο (Olasupo, et al., 2022).

1.2.3 ΣΟΥΛΦΟΜΕΘΟΞΑΖΟΛΗ



Εικόνα 6. Χημική δομή
Σουλφομεθοξαζόλης
(chemspider.com)

Η Σουλφομεθοξαζόλη είναι ένα ευρέως φάσματος αντιβιοτικό που ανήκει στις σουλφοναμίδες. Οι σουλφοναμίδες ανιχνεύονται συχνά σε υψηλές συγκεντρώσεις στα γλυκά νερά παγκοσμίως κυρίως σε αναπτυσσόμενες χώρες όπου η κατανάλωσή τους για κλινικούς σκοπούς εξακολουθεί να είναι διαδεδομένη. Τα φάρμακα αυτά στοχεύουν τόσο τα Gram(+) όσο και στα Gram(-) βακτήρια, δεσμεύοντας τη διϋδροπτεροϊκή συνθετάση (DHPS), ένζυμο που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του φυλλικού οξέος το οποίο είναι ένα βασικό πρόδρομο για το σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων. (DNA, RNA, πρωτεΐνες). Οι σουλφοναμίδες από μόνες τους είναι βιοστατικό αντιβιοτικό ενώ αν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τριμεθοπρίμη είναι βακτηριοκτόνα και

χορηγούνται για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών του ουροποιητικού συστήματος, του αναπνευστικού συστήματος, του δέρματος και των γαστρεντερικών λοιμώξεων.

Ακόμα, χρησιμοποιούνται σε μεγάλη κλίμακα στην κτηνοτροφία όχι μόνο ως θεραπεία αλλά και ως πρόσθετο στις ζωοτροφές, γεγονός που εγείρει ανησυχίες για την ελευθέρωση γονιδίων ανθεκτικότητας. Αντοχή έχει παρατηρηθεί ευρέως στη μικροβιακή κοινότητα είτε μέσω μεταλλάξεων του χρωμοσωμικού γονιδίου είτε με την απόκτηση γονιδίων που μεταφέρονται μέσω πλασμιδίων (Borsetto, et al., 2021).

Οι σουλφοναμίδες παρουσιάζουν επίσης ανασταλτική δραστηριότητα έναντι ορισμένων μυκήτων (*Pneumocystis carinii*) και πρωτόζωων (*Toxoplasma*, *Coccidia*). Τόσο μετά όσο και κατά τη διάρκεια της χρήσης αυτών των φαρμάκων ένα υψηλό κλάσμα του φαρμάκου αποβάλλεται από τον οργανισμό χωρίς να μεταβολιστεί και ως αποτέλεσμα να απελευθερώνεται αμετάβλητο στο περιβάλλον μέσω των λυμάτων (Ovung, Bhattacharyya, 2021).

1.3 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ – ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Οι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι που σχετίζονται με τα συστατικά στα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα απασχολούν έντονα την επιστήμη του περιβάλλοντος, καθώς οι μακροχρόνιες επιδράσεις ακόμα και μικρών ποσοτήτων χημικών ουσιών στο υδάτινο περιβάλλον χρήζουν περεταίρω διερεύνησης (Metcalf & Eddy, 2015).

«Οι επιστημονικοί τομείς που αναπτύχθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες για την έρευνα των ποικίλων τοξικών επιδράσεων των χημικών ουσιών, καλύπτονται κάτω από τον όρο της επιστήμης της τοξικολογίας. Οι εφαρμογές των βασικών αρχών της τοξικολογίας και των πειραματικών μεθοδολογιών που μελετούσαν τις επιβλαβείς επιδράσεις των χημικών ρύπων, αλλά με έμφαση την περιβαλλοντική ρύπανση δημιούργησαν τις επιστήμες της περιβαλλοντικής τοξικολογίας και της οικοτοξικολογίας» (Βλαχογιάννη, Βαλαβανίδης, 2007).

- ❖ Ο τομέας της **περιβαλλοντικής τοξικολογίας** περιλαμβάνει την κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους οι χημικές ουσίες επιδρούν σε διάφορους τύπους οργανισμών στα περιβαλλοντικά διαμερίσματα.
- ❖ Η **οικοτοξικολογία** ως μια νεότερη επιστήμη, έχει ενσωματώσει τα πεδία της τοξικολογίας και της οικολογίας με στόχο τη πρόβλεψη και την κατανόηση των βιολογικών επιπτώσεων των χημικών ουσιών σε φυσικές κοινότητες οργανισμών (Chapman, 2002)

Η επιστημονική έρευνα που αφορά την οικοτοξικολογία, βασίζεται τόσο σε μελέτες πεδίου όσο και στην εφαρμογή εργαστηριακών μεθόδων. Σκοπός είναι ο προσδιορισμός των επιδράσεων των τοξικών χημικών ουσιών στους ζωντανούς οργανισμούς που ανήκουν σε ένα οικοσύστημα, των οδών μεταφοράς των ουσιών μέσα σε αυτό, καθώς και των αλληλεπιδράσεων των οργανισμών αλλά και των χημικών ουσιών με το περιβάλλον. Κατά συνέπεια, οι δοκιμές περιλαμβάνουν είτε τη παρατήρηση των επιδράσεων αυτών σε ανώτερα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης, σε μεμονωμένους οργανισμούς ή πληθυσμούς, είτε τη μελέτη συγκεκριμένων επιδράσεων σε συγκεκριμένα είδη οργανισμών μέσα σε μικρο-οικοσυστήματα που προσομοιάζουν τις φυσικές συνθήκες.

«Ο κίνδυνος που προκύπτει από την απελευθέρωση ανθρωπογενών χημικών ουσιών στο υδάτινο περιβάλλον είναι συνάρτηση της πιθανότητας και της έντασης της έκθεσης των βιολογικών συστημάτων στις χημικές ουσίες, καθώς και της δυνατότητας των χημικών ουσιών να βλάψουν τα βιολογικά συστήματα, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της χημικής ουσίας και τα μοναδικά χαρακτηριστικά του εκτεθειμένου βιόκοσμου» (Persoone, Wells, 1987).

Ως εκ τούτου, οι *στρατηγικές εκτίμησης κινδύνου* περιλαμβάνουν πάντα δύο συνιστώσες :

- ❖ Τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ρύπου σε συγκεκριμένο χρόνο και τόπο
- ❖ Τον προσδιορισμό και την ανάλυση των αρνητικών επιπτώσεων που μπορεί να επιφέρει η χημική ουσία στον μελετώμενο οργανισμό ή βιόκοσμο.

Προς εξυπηρέτηση των παραπάνω στρατηγικών χρησιμοποιούνται βασικές έννοιες της περιβαλλοντικής τοξικολογίας όπως η βιοδιαθεσιμότητα, η βιοσυσσώρευση και οι θανατηφόροι/ υπό θανατηφόροι δείκτες τοξικότητας.

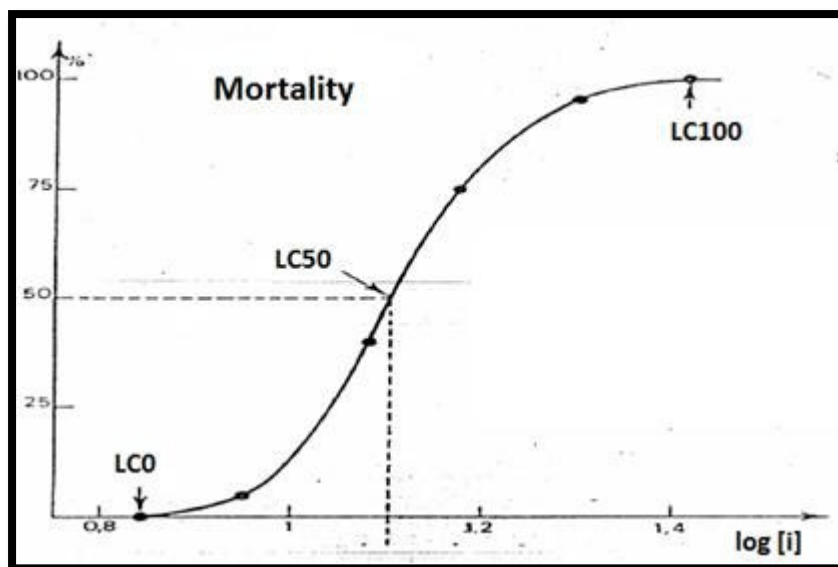
Βιοδιαθεσιμότητα (bioavailability) ορίζεται ως το κλάσμα της συνολικής συγκέντρωσης των χημικών ουσιών που προσλαμβάνει ένας οργανισμός, η ποσότητα δηλαδή του χημικού ρύπου που βρίσκεται στο περιβάλλον (στο νερό, στη τροφή κ.α.) και μπορεί να εισέλθει με ποικίλους τρόπους στο εσωτερικό ενός οργανισμού. Επηρεάζεται από το είδος του χημικού ρύπου και από της φυσικοχημικές ιδιότητες του περιβάλλοντος μέσου (στη παρούσα εργασία του υγρού αποβλήτου).

Βιοσυσσώρευση (bioaccumulation) είναι η ιδιότητα ορισμένων χημικών ρύπων όπως για παράδειγμα τα βαρέλα μέταλλα, να συσσωρεύονται αυξητικά στους ιστούς των οργανισμών μιας τροφικής αλυσίδας μέσω του περιβάλλοντος (βιοσυγκέντρωση) ή μέσω της τροφής (διαιτητική συσσωρευση).

Η σχέση μεταξύ βιοδιαθεσιμότητας και βιοσυσσώρευσης είναι ευθέως ανάλογη καθώς όσο περισσότερο βιοδιαθέσιμος είναι ένας χημικός ρύπος τόσο μεγαλύτερη είναι η βιοσυσσώρευση του, άρα και πιο σοβαρές οι αρνητικές επιδράσεις του στους οργανισμούς και τα οικοσυστήματα.

Η ποσότητα μιας τοξικής ουσίας που προσλαμβάνεται από έναν οργανισμό και δύναται να προκαλέσει βλάβες σε αυτόν, θανατηφόρες ή μη, εκφράζεται ως προς το βάρος του οργανισμού ή ως προς τη συγκέντρωση της χημικής ουσίας στο περιβάλλον μέσο και ονομάζεται *δόση* αυτής της χημικής ουσίας

Τα χαρακτηριστικά έκθεσης σε κάποια χημική ουσία και το φάσμα των διαφορετικών επιδράσεων της σε έναν οργανισμό περιγράφονται από καμπύλες δόσης-αποτελέσματος, όπως φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί. Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται για τη περιγραφή της καμπύλης είναι η συγκέντρωση ή η δόση που προκαλεί θανάτωση στο 50% του πληθυσμού και αναφέρονται ως LC_{50} (Lethal Concentration) ή LD_{50} (Leathal Dose) και η κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης που περνά από το μέσο σημείο (Βλαχογιάννη, Βαλαβανίδης, 2007).



Εικόνα 7. Παράδειγμα υπολογισμού του LC50 σε καμπύλη. Στον οριζόντιο άξονα βρίσκεται η συγκέντρωση σε λογαριθμική κλίμακα και στον κάθετο τα ποσοστά θνησιμότητας. (Matteo Cassoti, 2012, Marie Curie Initial Training Network Environmental Chemoinformatics)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα μας απασχολήσει ο δείκτης LC₅₀ καθώς υπόκεινται σε έλεγχο οικοτοξικότητας δείγματα που προέρχονται από αστικά υγρά απόβλητα, τα οποία έχουν υποστεί διαδοχικές αραιώσεις προκειμένου να βρεθεί η συγκέντρωσή τους που είναι θανατηφόρα για το 50% του πληθυσμού του οργανισμού-δείκτη που έχει επιλεχθεί.

1.3.1 ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ΣΤΑ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Η λειτουργία μιας τυπικής μονάδας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων περιορίζεται συνήθως σε μεθόδους πρωτοβάθμιας και δευτεροβάθμιας επεξεργασίας. Η πρωτοβάθμια επεξεργασία με φυσικομηχανικές μεθόδους (εσχάρωση, εξάμμωση, καθίζηση κ.α.) αφορά στην απομάκρυνση οργανικών και ανόργανων αιωρούμενων στερεών από τα απόβλητα (Kim, Farnazo, 2017). Η δευτεροβάθμια επεξεργασία συχνά αναφερόμενη ως διεργασία ενεργού ιλύος, περιλαμβάνει βιολογικές μεθόδους αερόβιες, αναερόβιες ή ανοξικές (αερισμός, δευτεροβάθμια καθίζηση κ.α.) για την απομάκρυνση διαλυμένων κολλοειδών και σωματιδιακών οργανικών υλών αλλά και θρεπτικών συστατικών όπως ο φώσφορος και το άζωτο (Πίττας, 2018). Η τριτοβάθμια επεξεργασία έχει ως σκοπό την απολύμανση των υγρών αποβλήτων και την απομάκρυνση ορισμένων ρυπαντικών ουσιών που δεν έχουν απομακρυνθεί στα προηγούμενα στάδια, όταν αυτά πρόκειται να διατεθούν στο υδάτινο περιβάλλον ή προς επαναχρησιμοποίηση (Στάμου, Βογιατζής, 1994). Οι διεργασίες είναι φυσικές, χημικές και βιολογικές (διήθηση, προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα, οζονισμός, χλωρίωση, υπεριώδης ακτινοβολία) ωστόσο δεν εφαρμόζεται συνήθως σε μικρές μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων λόγω υψηλού κόστους (Nannou et al., 2020).

Επομένως, παρά τις όποιες διαδικασίες στις οποίες υπόκεινται τα απόβλητα, εξακολουθούν να υπάρχουν ρύποι που εγκυμονούν περιβαλλοντικούς κινδύνους και εγείρουν ανησυχίες ως προς τη χρόνια τοξικότητα που μπορεί να επηρεάσει τη βιωσιμότητα του ανθρώπινου περιβάλλοντος αλλά και των οικοσυστημάτων. Τέτοιοι ρύποι έχουν αστική ή βιομηχανική προέλευση και μερικά παραδείγματα αποτελούν τα φυτοφάρμακα, τα μέταλλα νανο-μεγέθους (Kim, Farnazo, 2017), ενώ τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ενδιαφέρον γύρω από την εμφάνιση και την τύχη των αντιικών φαρμάκων λόγω των μεταβολών που μπορεί να προκαλέσουν στις ισορροπίες του οικοσυστήματος αλλά και στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στους ιούς (Nannou et al., 2020).

Είναι πλέον σαφές ότι η ολοκληρωμένη αξιολόγηση των βιολογικών επιπτώσεων των απορριφθέντων υγρών στα οικοσυστήματα είναι αναγκαία και οι δοκιμές οικοτοξικότητας αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για τον προσδιορισμό των περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Οι διεθνείς και εθνικές αρχές οφείλουν να συμμορφωθούν με την ισχύουσα ή αναπτυσσόμενη νομοθεσία, όπως είναι διάφοροι κανονισμοί της ευρωπαϊκής ένωσης (WFD: EU Water Framework Directive, REACH, IPPC: International Plant Protection Convention) που σχετίζονται με την ανάπτυξη αξιόπιστων και ισχυρών συστημάτων δοκιμών που θα εξασφαλίσουν την κατάλληλη και οικονομικά αποδοτική περιβαλλοντική διαχείριση των υγρών απορρίψεων.

Αυτή η προσέγγιση έχει πλεονεκτήματα ιδίως στην εκτίμηση των επιπτώσεων πολύπλοκων υγρών αποβλήτων, τόσο για την προστασία των εγκαταστάσεων βιολογικής επεξεργασίας από τοξικές εισροές όσο και για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων (Mendonca et al., 2009).

1.3.2 ΔΟΚΙΜΕΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΥΔΡΟΒΙΟΥΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Τα τελευταία χρόνια έχει επισημανθεί η αναγκαιότητα καθορισμού προτύπων για απλές και χαμηλού κόστους δοκιμασίες οικοτοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς (Vanhaeke, 1981).

Οι πιο απλές δοκιμασίες περιλαμβάνουν την έκθεση του υδρόβιου οργανισμού σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις του μελετώμενου ρύπου και σε καθορισμένες συνθήκες μέχρι να επέλθουν μη αναστρέψιμες επιπτώσεις ή θανάτωση.

Βασικές παράμετροι που διέπουν τις δοκιμασίες τοξικότητας είναι:

- ❖ Ο σχεδιασμός διάφορων σεναρίων έκθεσης των οργανισμών σε τοξικές ουσίες (πχ. για υδρόβιους οργανισμούς απαιτείται έκθεση ολόκληρου του σώματος)
- ❖ Ο επαρκής χρόνος έκθεσης ώστε οι επιδράσεις στους οργανισμούς που χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία να καταστούν ορατές

- ❖ Ο εγκλιματισμός στις εργαστηριακές συνθήκες, των οργανισμών που έχουν παρθεί απευθείας από το φυσικό τους περιβάλλον
- ❖ Η σύγκριση των μεθόδων σε διάφορα είδη οργανισμών
- ❖ Ο σχεδιασμός στατιστικών τοξικολογικών παραμέτρων για τα περιβαλλοντικά δεδομένα.

Το είδος των οργανισμών που επιλέγεται για δοκιμασίες οικοτοξικότητας καθορίζεται από:

- ❖ Την αφθονία τους στο υδάτινο οικοσύστημα και την ευκολία συλλογής τους
- ❖ Την ανθεκτικότητα και την ευκολία ανάπτυξης σε εργαστηριακές συνθήκες
- ❖ Τη γνώση της γενετικής τους σύνθεσης και της ευαισθησίας τους σε διάφορους χημικούς ρύπους
- ❖ Την περιορισμένη κινητικότητα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικοί δείκτες ρύπανσης μιας συγκεκριμένης περιοχής
- ❖ Την ικανότητα βιοσυσσώρευσης διάφορων τοξικών χημικών ρύπων
- ❖ Την περίπτωση να αποτελούν τροφή για άλλον υδρόβιο οργανισμό.

Μερικά παραδείγματα τέτοιων οργανισμών είναι φύκη, ψάρια ή τα βενθικά μακροασπόνδυλα. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ενδεικτικά τα πιο δημοφιλή είδη οργανισμών που χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες οικοτοξικότητας

Πίνακας 1. Είδη υδρόβιων οργανισμών που χρησιμοποιούνται ως δείκτες τοξικότητας

Είδος νερού	Οργανισμοί
Γλυκό νερό	<p>Σπονδυλωτά:</p> <ul style="list-style-type: none"> Ψάρια: rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>), goldfish (<i>Carassius auratus</i>), fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>) Αμφίβια: frog (<i>Rana</i> sp.), toad (<i>Bufo</i> sp.) Μύδια: <i>Unio tumidus</i> <p>Ασπόνδυλα:</p> <ul style="list-style-type: none"> Κλαδόκερα: <i>Daphnia magna</i>, <i>D. pulex</i>, <i>D. Pulicaria</i>, <i>Ceriodaphnia dubia</i> Αμφίποδα: <i>Gammarus lacustis</i>, <i>G. Fasciatus</i>, <i>Gammarus pulex</i> Οστρακόδερμα: <i>Orconectes</i> sp., <i>Combarus</i> sp. Έντομα: <i>Megaloptera</i>, <i>Plecoptera</i>, <i>Ephemeroptera</i>, <i>Trichoptera</i>, <i>Odonata</i>, <i>Hemiptera</i>, <i>Coleoptera</i>
Αλμυρό νερό	<p>Σπονδυλωτά:</p> <ul style="list-style-type: none"> Ψάρια: sheephead minnow (<i>Cyprinodon variegates</i>), fathead minnow (<i>Pimephales promelas</i>), lonnose killifish (<i>Fundulus similis</i>), bluefish (<i>Lepomis machrochirus</i>), channel catfish (<i>Ictaluturs punctatus</i>), pinfish (<i>Lagodon rhomboids</i>) <p>Ασπόνδυλα:</p> <ul style="list-style-type: none"> Κοπήποδα: <i>Acartia clause</i>, <i>A. tonsa</i> Γαρίδες: <i>Penaeus sertiferus</i>, <i>P. Duorarum</i>, brine shrimp (<i>Artemia Salina</i>) Μύδια: <i>Mytilus galloprovincialis</i>, <i>Mytilus edulis</i>, <i>Perna perna</i>, <i>Perna viridis</i> Γαστρόποδα: <i>Nucella lapillus</i>, <i>Littorina littorea</i> Στρείδια: <i>Crassostrea gigas</i>

Οι δοκιμασίες τοξικότητας διαφέρουν ως προς τη διάρκεια αλλά και τις προσδιοριζόμενες τελικές παραμέτρους(endpoints). Έτσι, οι δοκιμασίες τοξικότητας διακρίνονται στις δοκιμασίες:

- ❖ **Οξείας τοξικότητας** (acute toxicity tests) όπου η προσδιοριζόμενη τελική παράμετρος είναι η επιβίωση των οργανισμών.
- ❖ **Χρόνιας τοξικότητας** (chronic toxicity tests) όπου παρατηρούνται οι επιδράσεις στην ανάπτυξη και στην αναπαραγωγή. Για το σκοπό αυτό η διάρκεια αυτών των δοκιμασιών είναι μεγαλύτερη από τη διάρκεια ενός πλήρους κύκλου ζωής του χρησιμοποιούμενου οργανισμού. Οι δοκιμασίες χρόνιας τοξικότητας συχνά είναι δύσκολο να διεξαχθούν εξαιτίας της μεγάλης διάρκειάς τους και έχουν αρκετά μεγάλο κόστος.

Ο σχεδιασμός αυτών των δοκιμασιών περιλαμβάνει στατικά συστήματα (το υδάτινο μέσο δεν ανανεώνεται κατά τη διεξαγωγή της δοκιμασίας), συστήματα στατικής ανανέωσης (το υδάτινο μέσο ανανεώνεται περιοδικά) και συστήματα συνεχούς ροής (το υδάτινο μέσο ανανεώνεται συνεχώς). Ο στατικός σχεδιασμός χρησιμοποιείται μόνο για δοκιμασίες οξείας τοξικότητας, ενώ στις δοκιμασίες χρόνιας τοξικότητας συχνά χρησιμοποιείται ο σχεδιασμός συνεχούς ροής.

Σημαντικές για την οικοτοξικολογική έρευνα είναι **οι μελέτες πεδίου** αφού πλησιάζουν τις φυσιολογικές συνθήκες των οικοσυστημάτων. Οι μελέτες πεδίου με υδρόβιους οργανισμούς διακρίνονται σε ελεγχόμενες μελέτες (manipulative) και στις μελέτες παρατήρησης (observational). Στις ελεγχόμενες μελέτες, χρησιμοποιούνται οργανισμοί οι οποίοι δεν είχαν εκτεθεί σε κάποιο ρυπογόνο παράγοντα και στη συνέχεια εκτίθενται σε ελεγχόμενες συγκεντρώσεις χημικών ουσιών. Στις μελέτες παρατήρησης, οι συγκεντρώσεις των τοξικών ουσιών στις οποίες εκτίθενται οι οργανισμοί δεν είναι ελεγχόμενες στόχους τους είναι η συλλογή δεδομένων για ανεξάρτητες έρευνες ή η παρακολούθηση της υγείας των οργανισμών και του περιβάλλοντος (biomonitoring). Ακόμα, Οι μελέτες πεδίου με υδρόβιους οργανισμούς περιλαμβάνουν τις μελέτες με *μικρόκοσμους* ή *μεσόκοσμους*. Οι μικρόκοσμοι αποτελούνται από μεγάλα δοχεία, ενυδρεία ή τεχνητές πισίνες ενώ κλασσικό παράδειγμα μεσόκοσμου αποτελούν οι λίμνες. Τα κοινά χαρακτηριστικά των μικρόκοσμων και των μεσόκοσμων είναι ότι περιέχουν περισσότερα από ένα είδος οργανισμού, είναι τοποθετημένοι σε εξωτερικό χώρο και εμφανίζουν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα από ένα συνηθισμένο ενυδρείο.

Εξαιτίας της πολυπλοκότητας των συνθηκών που επικρατούν στο πεδίο, οι δοκιμασίες οξείας και χρόνιας τοξικότητας αποτελούν τη βάση για την αξιολόγηση της έκθεσης και της επίδρασης των βιολογικών οργανισμών σε συγκεκριμένες χημικές ενώσεις (Βλαχογιάννη, Βαλαβανίδης, 2007).

1.3.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ *ARTEMIA*

Η γαρίδα *Artemia* είναι ένα είδος υδρόβιου καρκινοειδούς που εντάσσεται στην ευρύτερη ομάδα των αρθρόποδων, συναντάται κυρίως στη Μεσόγειο, την Βόρεια Αφρική, τις χώρες της Ανατολής και είναι πολύ διαδεδομένη σε πειράματα ελέγχου τοξικότητας. Είναι ο πρώτος οργανισμός που χρησιμοποιήθηκε σε τοξικολογικά πειράματα και η διαθεσιμότητά του στο εμπόριο είναι ο κύριος λόγος που χρησιμοποιείται ευρύτατα τα τελευταία 30 χρόνια. Πρόκειται για έναν πολύ εύχρηστο οργανισμό αφού εκκολάπτεται από ξηρές κύστες, οι οποίες βρίσκονται στο εμπόριο, αποθηκεύονται εύκολα και μπορούν να καλλιεργηθούν σε λίγες ημέρες χωρίς ιδιαίτερη φροντίδα. (Βλαχογιάννη, Βαλαβανίδης, 2010) .



Εικόνα 8. Ενήλικη *Artemia* (biolib.cz, Jan Hamrský)

Τα διάφορα είδη του γένους *Artemia* έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την έντονη προσαρμοστικότητά τους σε περιβάλλον με υψηλή αλατότητα, όπως αλμυρές λίμνες, παράκτιες λιμνοθάλασσες και τεχνητές αλυκές. Τα ενδιαιτήματα στα οποία συναντάται το γένος αυτό χαρακτηρίζονται από την απουσία αρπακτικών ζωικών ειδών. Ως εκ τούτου, σε τέτοια περιβάλλοντα, η εξέλιξη των πληθυσμών *Artemia* ευνοείται από την αφθονία βακτηρίων, πρωτόζωων και φυκών που αποτελούν τη βάση της διαίτας τους. Ακόμα, αποτελεί ένα από τα πλέον εντυπωσιακά παραδείγματα οργανισμών καλά

προσαρμοσμένων στην εργαστηριακή

πρακτική, εφόσον διατηρείται αυστηρός έλεγχος των εργαστηριακών διαδικασιών και μεθοδολογιών (Nunes et al., 2006). Οι έλεγχοι τοξικότητας με την *Artemia nauplii* (*Artemia Salina nauplius*) (προνύμφη) περιλαμβάνουν τη διερεύνηση των πηγών τοξικότητας σε χημικά μείγματα και περιβαλλοντικά δείγματα, τον έλεγχο οξείας τοξικότητας χημικών ουσιών, την ανίχνευση φυσικών τοξινών σε τρόφιμα και σε φαρμακευτικά προϊόντα, τη μελέτη μοντέλων τοξικής δράσης ουσιών και τη μελέτη μεταφοράς ρύπων μέσω των τροφικών αλυσίδων. Η *Artemia* αποδεικνύεται ότι είναι ένας πολύτιμος οργανισμός σε δοκιμές τοξικότητας ενός είδους αλλά κυρίως αν μελετηθεί σε συνδυασμό με άλλα ενδημικά είδη. Οι δοκιμές με *Artemia* κατατάσσονται υψηλά ως υποψήφιες για ταχείες και οικονομικά αποδοτικές δοκιμές ρουτίνας σε συστήματα εκτίμησης επικινδυνότητας που ενσωματώνουν προσεγγίσεις ενός ή πολλαπλών ειδών (Persoone, Wells, 1987) .

Πλέον, διατίθενται διάφορες δοκιμές τοξικότητας με *Artemia* συμπεριλαμβανομένων βραχυπρόθεσμων και μακροπρόθεσμων μεθόδων. Συγκεκριμένα, τα τελευταία 10

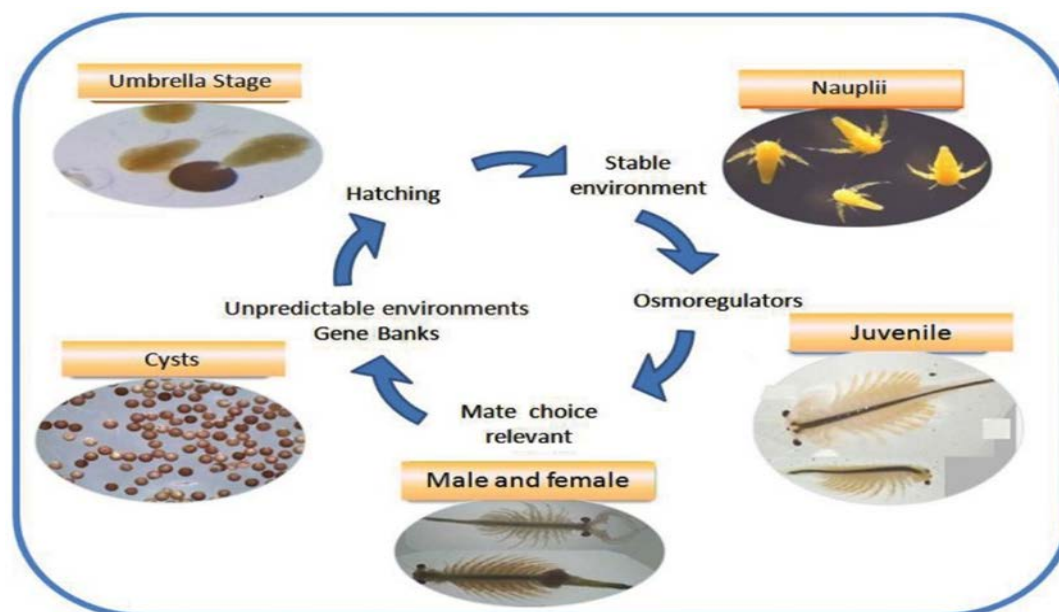
χρόνια έχουν αναπτυχθεί ορισμένα μακροπρόθεσμα πρωτόκολλα, αλλά κανένα από αυτά δεν είναι μια διεθνώς τυποποιημένη μέθοδος όπως ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (ISO), ή η Αμερικανική Εταιρεία Δοκιμών και Υλικών (ASTM). Οι μέθοδοι για τη δοκιμή της ακινητοποιήσης/θνητότητας έχουν τυποποιηθεί μόνο από την Ιταλική Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος, το Ιταλικό Ινστιτούτο Ερευνών για το Νερό (APAT IRSA-CNR) και την Ιταλική Υπηρεσία Τυποποίησης στον Χημικό Τομέα (Unichim). Παρά τη συχνή και διαδεδομένη χρήση της *Artemia* σε δοκιμές τοξικότητας, εξακολουθεί να μην υπάρχει εναρμόνιση των πρωτοκόλλων που ακολουθούνται από τις διεθνείς δραστηριότητες τυποποίησης (Libralatoa, et al., 1981).

Τα πλεονεκτήματα επιλογής της *Artemia* για μελέτες τοξικότητας μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

Οι κύστες είναι άμεσα εμπορικά διαθέσιμες για αυτό οι δοκιμές μπορούν να διεξάγονται παγκοσμίως με το ίδιο αρχικό υλικό. Η ποσότητα κύστεων που απαιτείται ανά δοκιμή είναι πολύ μικρή και μπορούν να αποθηκευτούν για χρόνια σε ξηρές συνθήκες χωρίς να χάσουν τη βιωσιμότητά τους ενώ κατά την εμβάπτιση σε θαλασσινό νερό, ή νερό υψηλής αλατότητας οι προνύμφες εκκολάπτονται μέσα σε περίπου 24 ώρες.

Μεγάλος αριθμός οργανισμών της ίδιας ακριβώς ηλικίας και φυσιολογικής κατάστασης μπορεί εύκολα να ληφθεί για την έναρξη των δοκιμών. Είναι σημαντικό οι οργανισμοί που λαμβάνονται να βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης γιατί από στάδιο σε στάδιο εμφανίζονται περισσότερο ή λιγότερο ευαίσθητες στις δοκιμασίες. (Sorgeloos et al., 1978).

Άλλα πλεονεκτήματα είναι η καλή γνώση της βιολογίας και της οικολογίας του οργανισμού, ο εύκολος χειρισμός η συντήρηση και η υψηλή προσαρμοστικότητα όσον αφορά στις εργαστηριακές δοκιμές (Vanhaecke et al., 1981).



Εικόνα 9. Στάδια ανάπτυξης *Artemia*:: Ξηρές κύστες- έμβρυο- προνύμφη-έφηβη-ενήλικη αρσενική/θηλυκή (Hordijk Wim, Steel Mike, 2018)

2 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο έλεγχος οικοτοξικότητας αστικών λυμάτων πριν και αφού υποστούν επεξεργασία, ο έλεγχος της ανθεκτικότητας μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί από αυτά σε επιλεγμένα αντιβιοτικά, καθώς και η διερεύνηση ύπαρξης γονιδίων ανθεκτικότητας σε αυτά. Συγκεκριμένα, οι στόχοι της εργασίας είναι:

- ❖ Η απομόνωση βακτηρίων από αστικά λύματα και ο έλεγχος της ανθεκτικότητας τους σε ποικιλία αντιβιοτικών (κινολόνες, σουλφοναμίδες και β-λακτάμες)
- ❖ Η εύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) για καθένα από τα επιλεγμένα αντιβιοτικά
- ❖ Η σύγκριση της ανθεκτικότητας ανάμεσα στα διαφορετικά στάδια επεξεργασίας
- ❖ Η παρατήρηση πιθανής εποχιακής διακύμανσης της ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν τα επιλεγμένα βακτήρια
- ❖ Η ταυτοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων ανθεκτικότητας
- ❖ Ο έλεγχος οικοτοξικότητας των αστικών λυμάτων σε συγκεκριμένους υδρόβιους οργανισμούς

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΥΛΙΚΑ

- Φιάλες διήθησης (Whatman)
- Φίλτρα μεμβράνης νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0.45μm (Whatman)
- Αποστειρωμένα τριβλία Petri διαμέτρου 6 cm
- Πλάκες μικρο-τιτλοποίησης 96 υποδοχών
- Artemia mix 18gr (Sera)
- NucleoSpin Soil (Macherey- Nagel)

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ

- Nutrient Agar (NEOGEN)
- Manitol Salt Agar (Lab M)
- Klebsiella Selective Agar Base (HiMedia Laboratories)
- Klebsiella Selective Supplement (FD225)
- Nutrient Broth (Lab M)

ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

- Συσκευή διήθησης υπό κενό (PALL Gelman Laboratory)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa)
- Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης (elvem K103)
- Υδατόλουτρο (GFL)
- Επωαστικός θάλαμος (Thermo Scientific Heraeus)
- Αναδευτήρας Vortex- Genie 2 (Scientific Industries)
- Αναδευτήρας Vortex (JP Selecta)
- Ζυγός (KERN 440-21A)
- Ζυγός ακριβείας (Adventurer OHAUS Balance)
- Φυγόκεντρος 5418R (eppendorf)
- Microplate Reader EZ Read 400 (biochrom)
- Φωτόμετρο Bio Photometer D30 (Eppendorf)
- Φασματοφωτόμετρο UV (Shimadzu)
- Φυγόκεντρος – SIGMA 4-16K
- StepOnePlus -Real Time PCR System (Applied Biosystems)

ANTIBIOTIKA

- Ciprofloxacin (Sigma- Aldrich)
- Sulfamethoxazole (Sigma- Aldrich)
- Amoxicillin (Sigma- Aldrich)

ΥΛΙΚΑ ΜΕΘΟΔΟΥ PCR

- ❖ MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems)
- ❖ SYBR Green qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS)

3.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Προκειμένου να γίνει απομόνωση των επιθυμητών για την παρούσα εργασία βακτηριακών στελεχών πραγματοποιήθηκε σειρά δειγματοληψιών από τον μήνα Οκτώβριο του 2021 έως τον μήνα Φεβρουάριο και τον Μάιο του 2022. Τα δείγματα ήταν υγρά απόβλητα προερχόμενα από τρία στάδια επεξεργασίας, πριν τη πρωτοβάθμια επεξεργασία (Είσοδος), πριν τη χλωρίωση και μετά από αυτή (Εκροή), της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων της ΔΕΥΑΒΑ δήμου Πλατανιά. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η εγκατάσταση αυτή δέχεται μόνο αστικά λύματα.

3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Τα γένη βακτηρίων για τα οποία ελέγχθηκαν τα δείγματα που συλλέχθηκαν, ανήκαν στα γένη *Klebsiella* sp. και *Staphylococcus* sp. και συγκεκριμένα τα είδη *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) και *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Τα επιθυμητά στελέχη απομονώθηκαν με τη διαδικασία της διήθησης των δειγμάτων μέσω φίλτρων. Σε κάποια δείγματα χρειάστηκε να γίνει αραιώση των αρχικών δειγμάτων ώστε να μειωθεί το μικροβιακό φορτίο. Η αραιώση έγινε με αποστειρωμένο νερό και ακολουθήθηκε η μέθοδος διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων. Η διαδικασία περιλάμβανε κάθε φορά τη διήθηση 100mL δείγματος μέσω των φίλτρων, τοποθέτηση των φίλτρων αυτών σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό, ξεχωριστό για κάθε μελετώμενο βακτήριο και επώαση σε κατάλληλες συνθήκες για ορισμένο χρονικό διάστημα ώστε να γίνουν οι καλλιέργειες των επιθυμητών βακτηριακών ειδών.

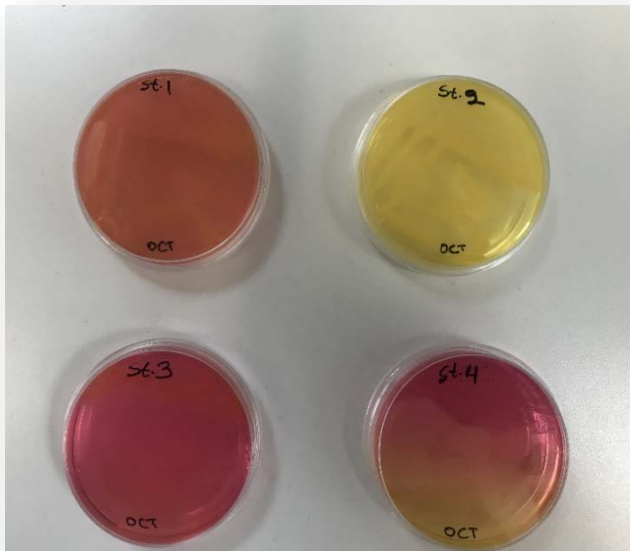
Αναλυτικά η διαδικασία για κάθε βακτηριακό στέλεχος:

- ***Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)**
 1. Διήθηση 100mL υγρού δείγματος
 2. Μεταφορά φίλτρου σε θρεπτικό υπόστρωμα *Klebsiella* Selective Agar Base
 3. Επώαση στους 37°C για 24 h
 4. Καταμέτρηση τυπικών αποικιών (χαρακτηριστικές αποικίες μωβ χρώματος)

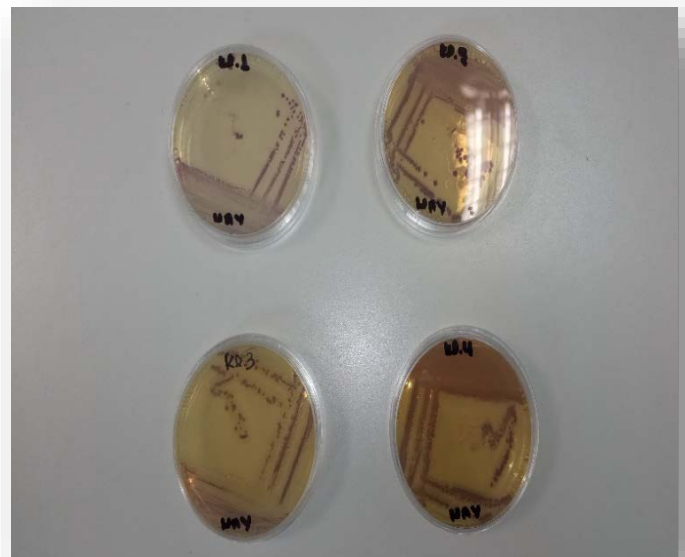
- **Staphylococcus aureus (S. aureus)**

1. Διήθηση 100mL υγρού δείγματος
2. Μεταφορά φίλτρου σε θρεπτικό υπόστρωμα Manitol Salt Agar
3. Επώαση στους 37°C για ≥ 24 h
4. Καταμέτρηση τυπικών αποικιών (ελαφρώς χρυσίζουσες αποικίες που δημιουργούν κίτρινο διάχυτο χρώμα στο υπόστρωμα)

Αφού έγινε απομόνωση των επιθυμητών βακτηριακών στελεχών, στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ανακαλλιέργεια τους αρχικά σε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα και στη συνέχεια σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar στις αντίστοιχες συνθήκες επώασης για το εκάστοτε στέλεχος.



Εικόνα 10. Ανακαλλιέργειες *S. aureus* σε Manitol Salt Agar



Εικόνα 11. Ανακαλλιέργειες *K. pneumoniae* σε Klebsiella selective agar base

3.4 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Ο έλεγχος ανθεκτικότητας των στελεχών σε αντιβιοτικά έγινε με βάση τη τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC (Minimum Inhibitory Concentration) και η μέθοδος εύρεσης αυτής ήταν οι μικρο-αραιώσεις σε ζυμό. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες τιτλοποίησης 96 βυθισμάτων. Κατά τη διαδικασία της μεθόδου MIC εξετάζεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ποικίλες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, έπειτα από την εικοσιτετράωρη επώαση τους σε θάλαμο επώασης στους 37°C. Στόχος της διαδικασίας είναι η εύρεση της ελάχιστης συγκέντρωσης αντιβιοτικού που επιτρέπει την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Η μέθοδος MIC είναι ευρέως διαδεδομένη γιατί παρέχει ακριβή αποτελέσματα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δοκιμή ευαισθησίας βακτηρίων σε πολλαπλά αντιβιοτικά ταυτόχρονα, έχει χαμηλό κόστος και μικρό χρόνο διεξαγωγής πειραμάτων.

Οι πληροφορίες για το εύρος συγκεντρώσεων που εφαρμόστηκαν για το εκάστοτε αντιβιοτικό στη συγκεκριμένη διαδικασία, αντλήθηκαν από τα κλινικά δεδομένα που παρέχει το EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Πίνακας 2. Εύρος συγκέντρωσης των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν

Amoxicillin (mg/L)								
<i>K. pneumoniae</i>	64	32	16	8	4	2	1	0,5
<i>S. aureus</i>	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06
Ciprofloxacin (mg/L)								
<i>K. pneumoniae</i> & <i>S. aureus</i>	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015
Sulfamethoxazole (mg/L)								
<i>K. pneumoniae</i> & <i>S. aureus</i>	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06

-Προετοιμασία αντιβιοτικού

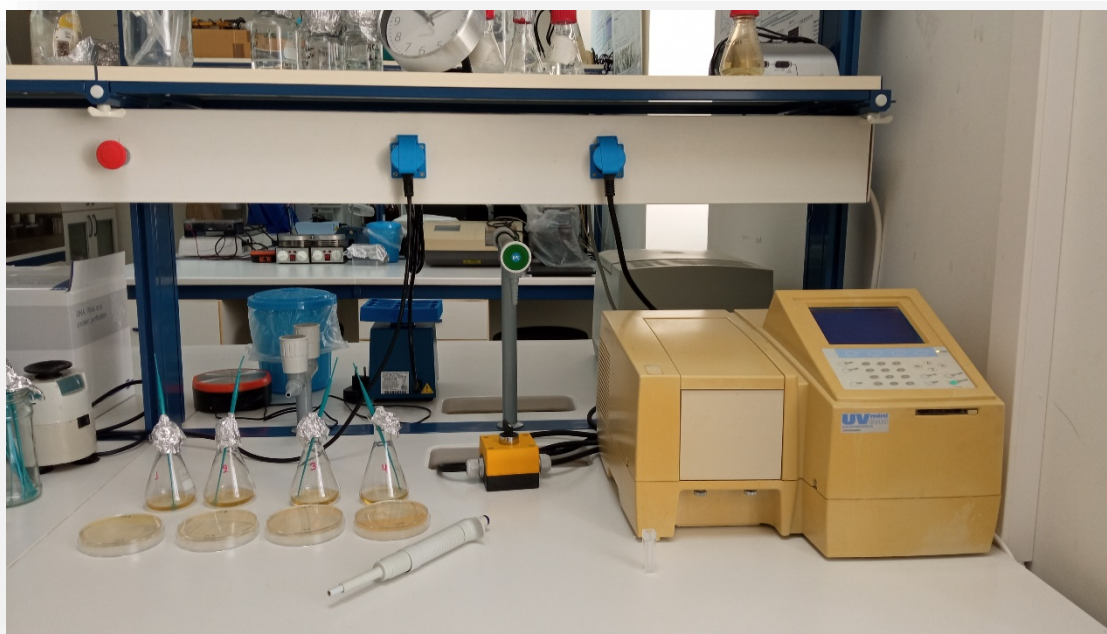
Προτού ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκαν τα διαλύματα των αντιβιοτικών τα οποία είχαν ως βάση αποστειρωμένο νερό.

Το αρχικό διάλυμα ήταν σε κάθε περίπτωση πυκνότερο από αυτό με την υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση. Το επιθυμητό διάλυμα παρασκευάστηκε με διαδοχικές αραιώσεις και είχε τη διπλάσια από τη μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση. Αυτό συνέβη γιατί κατά την εφαρμογή της μεθόδου το τελικό διάλυμα υφίσταται αραιώση $1 \div 2$.

Όλα τα τελικά διαλύματα φυλάσσονταν σε συνθήκες συντήρησης και καταναλώνονταν πριν παρέλθει ο χρόνος λήξης τους.

-Προετοιμασία εναιωρήματος

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του οργανισμού CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) για την εφαρμογή της μεθόδου μικρο-αραιώσεων σε ζυμό δημιουργήθηκε ένα εναιώρημα για κάθε μικροοργανισμό σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Nutrient Broth. Με φωτομέτρηση δημιουργήθηκε αρχικό εναιώρημα με οπτική απορρόφηση $A=0,1$ στα 600 nm που αντιστοιχεί σε 10^8 CFUs/mL και στη συνέχεια με δεκαδικές αραιώσεις παρασκευάστηκε το απαραίτητο για τη σωστή εφαρμογή της μεθόδου εναιώρημα συγκέντρωσης 10^5 CFU/mL



Εικόνα 12. Διαδικασία φωτομέτρησης για την προετοιμασία εναιωρήματος συγκέντρωσης 10^5 CFUs/mL

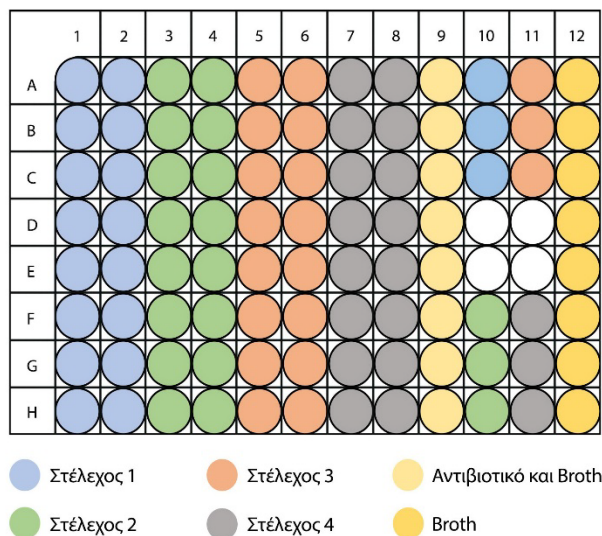
-Πειραματική διαδικασία

Σύμφωνα με το προαναφερθέν πρωτόκολλο τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες μικρο-τιτλοποίησης 96 βυθισμάτων και σε κάθε πλάκα εξετάζονταν κάθε φορά τέσσερα στελέχη βακτηρίων.



Εικόνα 13. Πραγματοποίηση ελέγχου ανθεκτικότητας με τη μέθοδο MIC

Πρώτο βήμα ήταν η τοποθέτηση 100μL θρεπτικού υλικού Nutrient Broth σε όλα τα πηγάδια της πλάκας και μετά από αυτό η τοποθέτηση 100μL του εκάστοτε αντιβιοτικού στη πρώτη σειρά και από τις στήλες 1 έως 9. Στις στήλες 10 και 11 δεν γινόταν προσθήκη αντιβιοτικού διότι χρησιμοποιούνταν ως ενδεικτικές (control) για την ανάπτυξη του κάθε στελέχους απουσία αντιβιοτικού. Ακολουθώντας, με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας πραγματοποιούνταν αραιώση του αντιβιοτικού, από τη πρώτη σειρά και με φορά προς τα κάτω, όπου 100μL από το κάθε πηγάδι μεταφέρονταν στο επόμενο, με ταυτόχρονη καλή ανάδευση. Από τα πηγάδια της τελευταίας σειράς απομακρύνονταν 100μL μετά την ανάδευση. Με αυτόν τον τρόπο, κάθε πηγάδι περιείχε συνολικά 100μL από Broth και αντιβιοτικό. Στη συνέχεια, γινόταν η προσθήκη 5μL βακτηριακής καλλιέργειας συγκέντρωσης 10^5 CFUs/mL. Η τελευταία στήλη χρησιμοποιούνταν ως τυφλό διάλυμα για τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης αφού σ' αυτή τη περίπτωση η μεγάλη τιμή οπτικής απορρόφησης ήταν αυτή που θα υποδείκνυε επιμόλυνση. Τέλος, τα βακτηριακά στελέχη επωάζονταν σε θάλαμο επώασης για 24h στους 37°C. Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η διάταξη στη πλάκα μικρο- τιτλοποίησης.



Εικόνα 14. Ενδεικτικά η διάταξη στη πλάκα μικρο-τιτλοποίησης

3.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Ο έλεγχος οικοτοξικότητας πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του υδρόβιου οργανισμού *Artemia* και οι δοκιμασίες έγιναν με αναφορά στις οδηγίες του ARC (Artemia Reference Center test) (Persoone, Wells, 1987). Τα πειράματα ήταν οξείας τοξικότητας και είχαν ως σκοπό τον προσδιορισμό του ποσοστού θνησιμότητας του συγκεκριμένου οργανισμού.

-Στάδιο προετοιμασίας

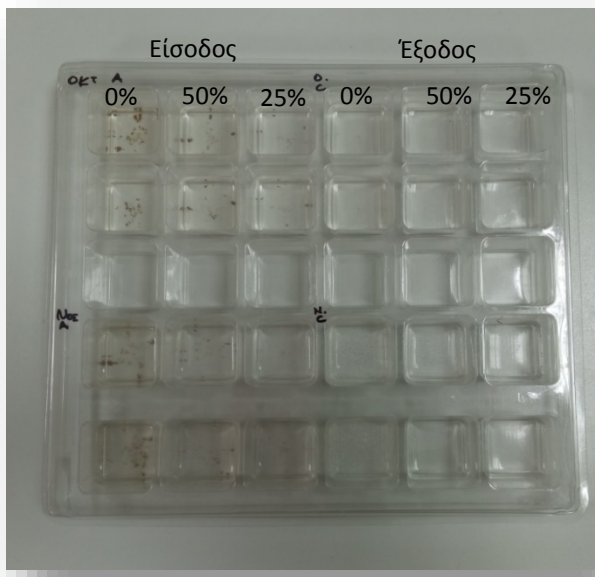
Οι έλεγχοι τοξικότητας γίνονται όταν ο οργανισμός βρίσκεται στο στάδιο της προνύμφης (*Artemia nauplii*). Προκειμένου να εκκολαφθεί ο οργανισμός πραγματοποιήθηκε ενυδάτωση των κύστεων. Σε πλαστικό μπουκάλι που περιείχε 500mL απιονισμένου νερού προστέθηκαν 18gr από το μείγμα *Artemia* και με συνεχή τροφοδότηση αέρα μέσω ενός mouse έγινε η επώαση των κύστεων σε θάλαμο στους 27°C για 24h.

-Στάδιο συλλογής προνυμφών

Κατόπιν επώασης 24 h διακόπηκε η τροφοδότηση αέρα και το μπουκάλι που περιείχε το απιονισμένο νερό με τις κύστες αφέθηκε για μερικά λεπτά, ώστε οι κύστες που δεν εκκολάφθηκαν να κατακαθίσουν. Σε αυτό το σημείο οι προνύμφες που εκκολάφθηκαν ήταν πλέον ορατές με γυμνό μάτι. Ακολούθησε η συλλογή προνυμφών και η μεταφορά τους σε petri ώστε να χρησιμοποιηθούν αργότερα στον έλεγχο οικοτοξικότητας των δειγμάτων.

-Προσδιορισμός ποσοστού θνησιμότητας

Η δοκιμασία οικοτοξικότητας πραγματοποιήθηκε για τα δείγματα που προέρχονταν από την είσοδο και από την έξοδο της ΔΕΥΑΒΑ. Για αυτόν τον σκοπό, χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά plates μέσα στα οποία έγιναν αραιώσεις των αρχικών



Εικόνα 15. Διάταξη στο plate για τους μήνες Οκτώβριο και Νοέμβριο

δειγμάτων. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο βύθισμα τοποθετήθηκαν 10mL του αρχικού δείγματος από την είσοδο (πυκνό) και με φορά προς τα δεξιά προστέθηκαν στα επόμενα δύο βυθίσματα 5mL διαλύματος NaCl συγκέντρωσης 34ppt. Στη συνέχεια 5mL από το πυκνό μεταφέρθηκαν στο διπλανό βύθισμα που περιείχε ήδη 5mL NaCl. Έπειτα από καλή ανάδευση, 5mL μεταφέρθηκαν στο τελευταίο βύθισμα, έγινε ανάδευση και απομακρυνθήκαν 5mL από το διάλυμα που δημιουργήθηκε.

Με αυτόν τον τρόπο, αν εκφραστεί σε ποσοστό 0% η ποσότητα του μη αραιωμένου λύματος (πυκνού) τότε, προέκυψαν δύο ακόμα αραιωμένα διαλύματα που περιέχουν το αρχικό σε ποσοστό 50% και 25% .

Ακολούθως, μεταφέρθηκαν από το petri 5 προνύμφες σε κάθε βύθισμα και 5 ακόμα προνύμφες σε νέο petri που χρησίμευσαν ως control. Το plate σκεπάστηκε και αφέθηκε σε στατικές συνθήκες για 24h. Με το πέρας των 24 ωρών μετρήθηκαν και καταγράφηκαν οι προνύμφες που είχαν παραμείνει ζωντανές σε κάθε ένα από τα βυθίσματα.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για το δείγμα Εξόδου, ενώ και για τα δύο δείγματα έγινε μια ακόμα επανάληψη ώστε να εξασφαλιστεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων. Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται η διάταξη στο plate για τον έλεγχο που διενεργήθηκε για τους μήνες Οκτώβριο και Νοέμβριο.

3.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Απομόνωση γενετικού υλικού έγινε για τα δείγματα Εισόδου και Εξόδου της ΔΕΥΑΒΑ με σκοπό την ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού kit (NucleoSpin Soil).

3.7 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ DNA

Αφού ολοκληρωθεί η απομόνωση του γενετικού υλικού συνίσταται ο έλεγχος ποσότητας και καθαρότητας του, με φωτομέτρηση του δείγματος σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης ορατού- υπεριώδους (Bio Photometer Eppendorf D30). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι το γενετικό υλικό απορροφά την υπεριώδη ακτινοβολία ανάλογα με το μήκος κύματος.

Η φωτομέτρηση γίνεται σε μήκη κύματος 260nm ώστε να προσδιοριστεί η ποσότητα του DNA και σε 280nm για να ανιχνευθούν οι πρωτεΐνες. Ο λόγος των δύο αυτών οπτικών απορροφήσεων είναι ενδεικτικός της καθαρότητας του DNA που απομονώθηκε και έχει αποδεκτά όρια μεταξύ 1,6 και 1,8. Χαμηλότερη τιμή της συγκεκριμένης αναλογίας υποδεικνύει την επιμόλυνση πρωτεϊνών ή φαινόλης, γεγονός που καθιστά αδύνατο τον προσδιορισμό της ποσότητας του γενετικού υλικού που έχει απομονωθεί.

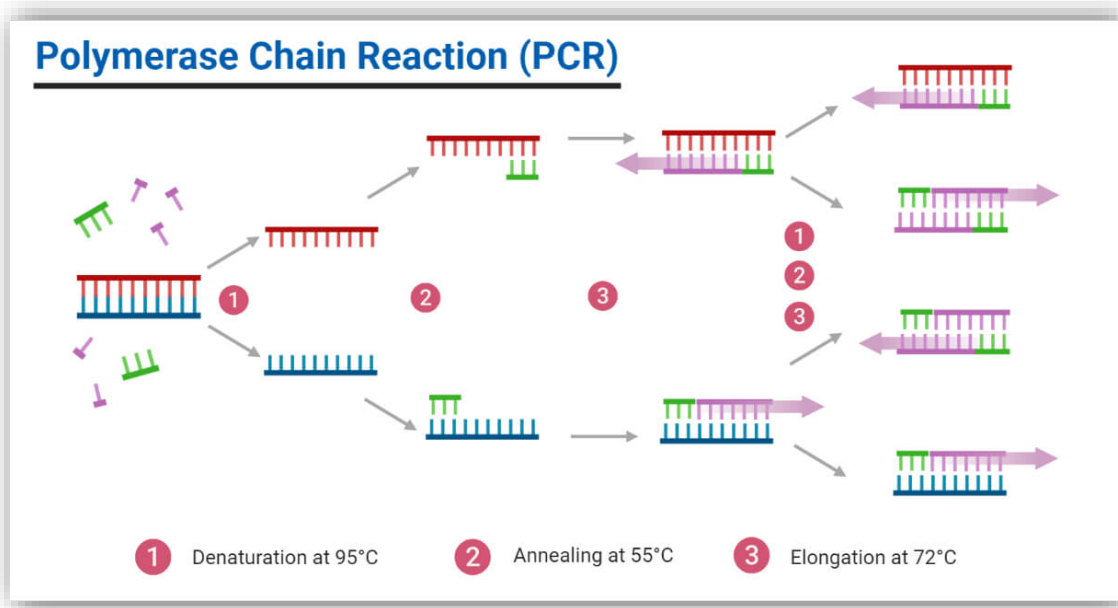
Τα αποτελέσματα του ελέγχου καθαρότητας του DNA βρίσκονται στο αντίστοιχο παράρτημα.

3.8 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ - REAL TIME PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) είναι μια εργαστηριακή τεχνική για την ταχεία παραγωγή εκατομμυρίων έως δισεκατομμυρίων αντιγράφων ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με γνωστή αλληλουχία νουκλεοτιδίων (γονίδιο). Η PCR περιλαμβάνει τη χρήση σύντομων συνθετικών τμημάτων DNA που ονομάζονται εκκινητές (primers) οι οποίοι προσδένονται στα άκρα του γονιδίου που θέλουμε να αντιγράψουμε και αποτελείται από διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής που ξεκινούν από καθορισμένες θέσεις μιας μήτρας DNA. Κάθε κύκλος της διαδικασίας αποτελείται από τρία στάδια:

- 1.Αποδιάταξη της μήτρας DNA.
- 2.Πρόσδεση των εκκινητών στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες.
- 3.Επιμήκυνση των εκκινητών – σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3'

Με τη μέθοδο Real Time PCR η αντίδραση παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο και τα ποσοτικά δεδομένα συλλέγονται και αναλύονται από ειδικό λογισμικό.



Εικόνα 16. Στάδιο RT-PCR: 1. Αποδιάταξη DNA 2. Πρόσδεση εκκινήτων 3. Επιμήκυνση εκκινήτων

Στόχος της εργασίας ήταν η ανίχνευση του γονιδίου *sul II* που αφορά την ανθεκτικότητα στις σουλφοναμίδες και του 16S rRNA, το οποίο αντιστοιχεί στο γενετικό υλικό στα δείγματα που προέρχεται από βακτήρια.

Ακολουθούν πίνακες με πληροφορίες για τα υλικά, τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν και τους κύκλους της διαδικασίας της PCR για κάθε γονίδιο.

Πίνακας 3. Αλληλουχία εκκινήτων και προϊόν αντίδρασης για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των γονιδίων *Sul II* και 16S rRNA

Γονίδιο	Εκκινήτης	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων (5'→3')	Προϊόν PCR (bp)	Βιβλιογραφία
Sul II	Sul II-F	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	293	Kern, 2002
	Sul II-R	GCGTTTGATACCGGCACCCGT		
16S rRNA	8-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	Dupont et al., 2013
	1492-R	GGTTACCTTGTTACGACT T		

Πίνακας 4. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *Sul II*

Μίγμα PCR	Συγκέντρωση
<i>Mastermix</i>	1X
<i>Primer F</i>	200nm
<i>Primer R</i>	200nm
<i>DNA</i>	2μL

Πίνακας 5. Κύκλοι αντίδρασης PCR για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *Sul II*

94°C	5 min	35 κύκλοι
94°C	15 sec	
69°C	30 sec	
72°C	1 min	
95°C	15 sec	
69°C	30 sec	
95°C	15 sec	

Πίνακας 6. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *16S rRNA*

Μίγμα PCR	Συγκέντρωση
<i>Mastermix</i>	1X
<i>Primer F</i>	500nm
<i>Primer R</i>	500nm
<i>DNA</i>	2μL

Πίνακας 7. Κύκλοι αντίδρασης PCR για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *16S rRNA*

95°C	4 min	30 κύκλοι
95°C	1 min	
55°C	30 sec	
72°C	30 sec	
95°C	5 min	
60°C	1 min	
95°C	15 sec	



Εικόνα 17. Προετοιμασία υλικών για την εφαρμογή της μεθόδου PCR



Εικόνα 18. Απεικόνιση των κύκλων κατά τη διάρκεια της Real Time PCR

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

4.1.1 ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

❖ *K. pneumoniae*

Τα βακτήρια του γένους *Klebsiella* sp. παρουσιάζουν τα κύρια χαρακτηριστικά της οικογένειας των Enterobacteriaceae. Πρόκειται για μη κινητά, ραβδωτά βακτήρια που έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσουν βλεννώδεις αποικίες, μια διαδικασία που προστατεύει τα βακτήρια από φαγοκυττάρωση και τα βοηθάει στην προσκόλληση. Η *K. pneumoniae* πήρε το όνομά της από τον Γερμανό βακτηριολόγο Edwin Klebs (1834-1913). Πρόκειται για ένα ραβδόμορφο, μη κινητό Gram (-) βακτήριο. Η *K. pneumoniae* αποτελεί ένα από τα συχνότερα είδη του γένους, που προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο και υπάρχει ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου και του βλεννογόνου του ανωτέρου. Τα στελέχη του γένους *Klebsiella* sp. αποτελούν μια από τις κυριότερες αιτίες νοσοκομειακών λοιμώξεων και θεραπεύονται δύσκολα καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών είναι πολυανθεκτικά. Πολλές γενετικές μεταβολές συμβαίνουν στα στελέχη της *K. pneumoniae* και οι περισσότερες αφορούν κλινικά στελέχη με νοσοκομειακή προέλευση. Τα στελέχη αυτά έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν πλασμίδια που έχουν γονίδια αντοχής στα αντιβιοτικά αποκτώντας έτσι πολυανθεκτικότητα. (Παπανικολάου, 2018) Ένα τυπικό υδάτινο περιβάλλον που φιλοξενεί βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae είναι οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, οι οποίες είναι αποδέκτες διαφόρων κατηγοριών αποβλήτων από νοσοκομεία, αστικές περιοχές και βιομηχανίες, προσφέροντας ευνοϊκές συνθήκες για την ταχεία ανάπτυξη μιας ποικιλόμορφης βακτηριακής κοινότητας (Fadare, Okoh, 2021).

❖ *S. aureus*

Οι σταφυλόκοκκοι είναι Gram (+), σφαιρικοί, ακίνητοι κόκκοι, διαμέτρου 0.5 έως 1.5 μm και εμφανίζονται μόνοι τους, σε ζεύγη, σε τετράδες ή σε μικρές αλυσίδες (3-4 κύτταρα) και διαχωρίζονται χαρακτηριστικά σε πάνω από ένα επίπεδα σχηματίζοντας ομάδες με τη μορφή σταφυλίου. Ανήκουν στην οικογένεια Staphylococcaceae και αναπτύσσονται καλύτερα και ταχύτερα υπό αερόβιες συνθήκες, με εξαίρεση τον *S. aureus*. Ο *S. aureus* είναι ένα ακίνητο, μη σπορογόνο, Gram (+) βακτήριο που απομονώθηκε από τον Alexander Ogston το 1880. Απαντάται ένας-ένας και σχηματίζει ζευγάρια και συστάδες. Το σταφυλοκοκκικό κυτταρικό τοίχωμα είναι μια δυναμική δομή σημαντική για τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας και κρίσιμη στην αλληλεπίδραση ξενιστή-παθογόνου. Η εξωτερική επιφάνεια του *S. aureus* καλύπτεται συνήθως από μια πολυσακχαριδική κάψουλα. Κάτω από την κάψουλα βρίσκεται το κυτταρικό τοίχωμα, μια δομή που αποτελείται από ισχυρά συνδεδεμένη

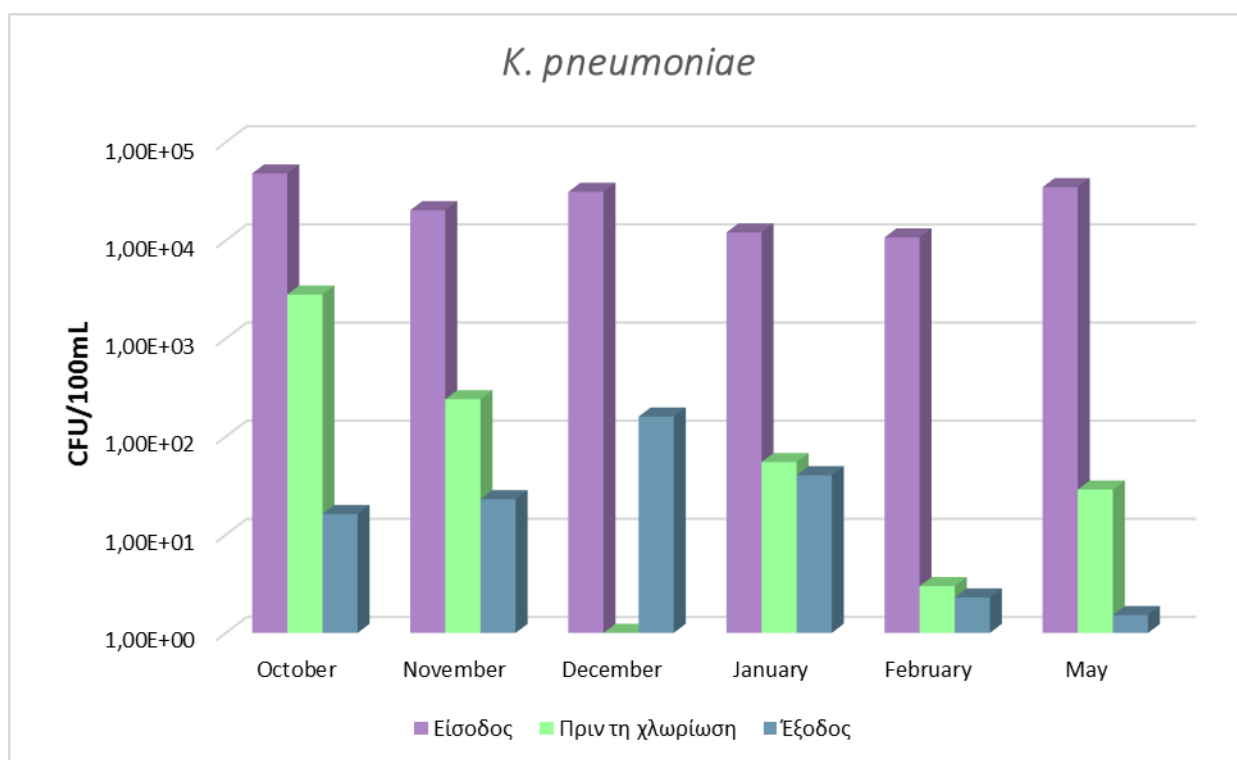
πεπτιδογλυκάνη, τειχοϊκό οξύ και πρωτεΐνες που σχετίζονται με το κυτταρικό τοίχωμα (Σακοράφα, 2012). Ο *S. aureus* απαντάται αρκετά στο περιβάλλον και αποτελεί μέρος της φυσικής βακτηριακής μικροχλωρίδας του ανθρώπου αφού αποικίζει ιδιαίτερα συχνά το δέρμα και τις βλεννογόνους μεμβράνες του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Στα υγρά απόβλητα έχει επιβεβαιωθεί εμπειρικά η παρουσία στελεχών ανθεκτικών στη μεθικιλίνη που έχουν νοσοκομειακή προέλευση (Kozajda, Ježak, 2020).

Για τους σκοπούς της συγκεκριμένης εργασίας μελετήθηκε η απομάκρυνση των δύο ειδών στα δείγματα που ελήφθησαν και κατόπιν, στα στελέχη που απομονώθηκαν ελέγχθηκε η ανθεκτικότητα στα υπό μελέτη αντιβιοτικά.

4.1.2 ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΣΕ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΛΥΜΑΤΩΝ

Σε πρώτο στάδιο, τα δείγματα ελέγχθηκαν με σκοπό να καθοριστεί η αποδοτικότητα των μεθόδων της μονάδας επεξεργασίας ως προς την απομάκρυνση παθογόνων βακτηρίων από τα υγρά απόβλητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα γραφήματα που ακολουθούν.

❖ *K. pneumoniae*



Γράφημα 1. Συγκέντρωση *K. pneumoniae* (CFU/100mL) στην είσοδο, Πριν τη χλωρίωση και στην έξοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ)

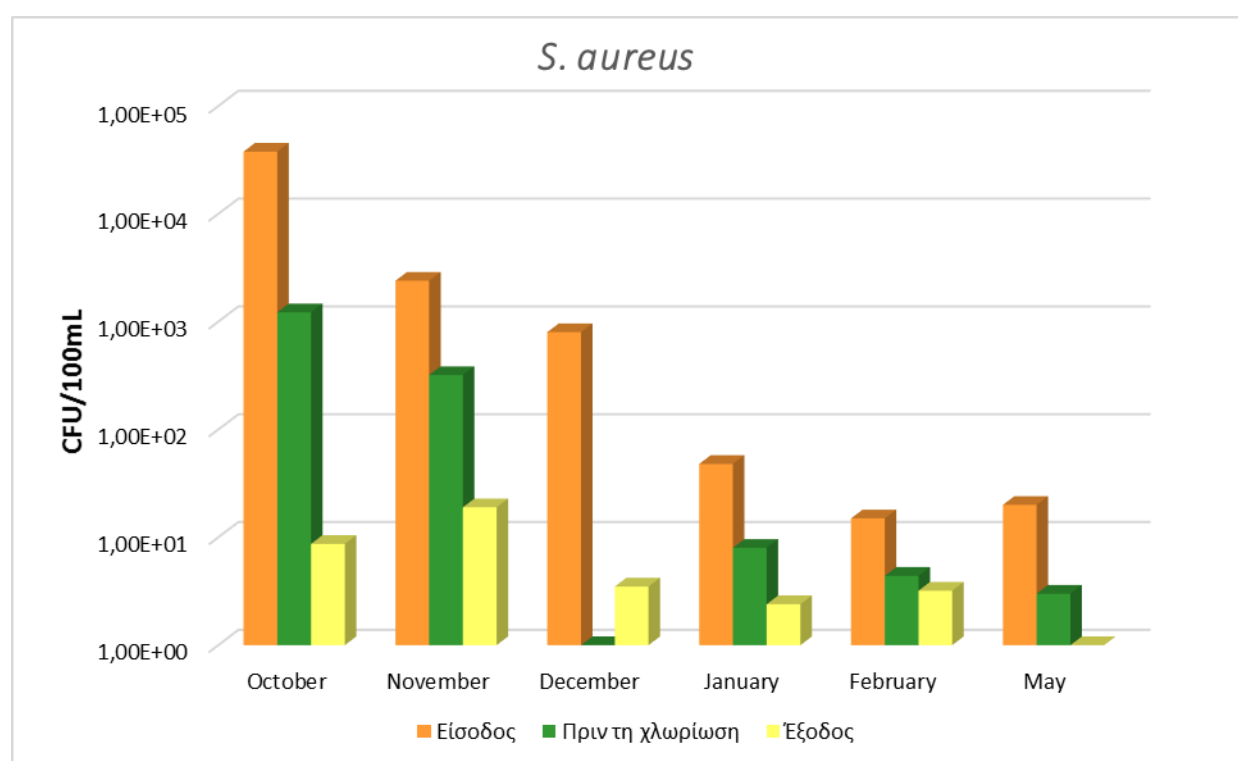
Στη είσοδο, οι συγκεντρώσεις της *K. pneumoniae* είναι σταθερές για όλους τους μήνες και αυτό πιθανόν να οφείλεται στον σταθερό αριθμό ισοδύναμου πληθυσμού που εξυπηρετούσε η συγκεκριμένη εγκατάσταση κατά τους χειμερινούς μήνες που παύει ο τουρισμός.

Η απομάκρυνση της *K. pneumoniae* από τα υγρά απόβλητα επιτυγχάνεται με πολύ υψηλά ποσοστά. Συγκεκριμένα, στο στάδιο αμέσως μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία και πριν τη χλωρίωση, η μεγαλύτερη απομάκρυνση σημειώθηκε τον Φεβρουάριο και αντιστοιχούσε σε 3,55 Logs ενώ η μικρότερη ήταν 1,23 Logs τον Οκτώβριο

Συγκρίνοντας τα στάδια πριν τη χλωρίωση και μετά από αυτή, στη έξοδο του βιολογικού προκύπτει ότι η απολύμανση λειτούργησε καλύτερα τον Ιανουάριο όπου σημειώθηκε μείωση της συγκέντρωσης της *K. pneumoniae* κατά 2,23 Logs, ενώ λιγότερο καλά λειτούργησε τον Φεβρουάριο με μείωση συγκέντρωσης μόλις κατά 0,12 Logs.

Συνολικά, η απόδοση στην επεξεργασία μεταξύ εισόδου και εξόδου κυμαίνεται σταθερά σε ποσοστά της τάξεως του 99% και άνω ,με τη μεγαλύτερη απομάκρυνση να έχει επιτευχθεί το μήνα Μάιο με μείωση 4,36 Logs και 100% απόδοση.

❖ *S. aureus*



Γράφημα 2. Συγκέντρωση *S. aureus* (CFU/100mL) στην είσοδο, Πριν τη χλωρίωση και στην έξοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ)

Στο Γράφημα 2. παρατηρείται μια μειούμενη εμφάνιση του *S. aureus* στα υγρά απόβλητα που φθάνουν στη μονάδα. Παρότι η εναλλαγή των εποχών δεν έχει συσχετισθεί ακόμα με τη παρουσία των βακτηρίων στα αστικά λύματα, έρευνες έχουν δείξει ότι η θερμοκρασία εξωτερικού περιβάλλοντος παίζει ρόλο στην επιβίωση των *S. aureus*. Συγκεκριμένα, στελέχη παρουσιάζονται στα υγρά απόβλητα σε θερμοκρασίες εξωτερικού περιβάλλοντος >15°C (Kozajda, Ježak, 2020). Σε αυτό πιθανόν να οφείλεται το γεγονός ότι καθώς προχωρούν οι δειγματοληψίες ανά μήνα, σε μήνες με χαμηλές θερμοκρασίες παρουσιάστηκαν και τα λιγότερα CFUs/100mL,

ενώ όπως φαίνεται και από το διάγραμμα τον Μάιο, που η άνοδος στη θερμοκρασία είχε ήδη ξεκινήσει, η αύξηση των αποικιών *S. aureus* είναι εμφανής.

Η μεγαλύτερη απομάκρυνση έπεται από τη δευτεροβάθμια διεργασία σημειώθηκε τον Οκτώβριο με μείωση 1,49 Logs ενώ τον Φεβρουάριο η μείωση των αποικιών *S. aureus* ήταν μόλις 0,53 Logs.

Μετά τη χλωρίωση, βρέθηκε ότι τον Ιανουάριο σημειώθηκε η μεγαλύτερη μείωση στη συγκέντρωση στελεχών *S. aureus* με 3,64 Logs ενώ λιγότερο αποτελεσματικά λειτούργησε η χλωρίωση για τα στελέχη του Φεβρουαρίου με μείωση 0,14 Logs.

Συνολικά, η απόδοση της μονάδας ως προς την απομάκρυνση του *S. aureus* κυμαίνεται μεταξύ 78,67-99,98 % . Η μεγαλύτερη απομάκρυνση σημειώθηκε τον μήνα Οκτώβριο με μείωση των αποικιών κατά 3,64 Logs ενώ το Δεκέμβριο η παράλειψη της χλωρίωσης δε φαίνεται να επηρέασε ιδιαίτερα την αποδοτικότητα της μονάδας όσον αφορά την απομάκρυνση του συγκεκριμένου στελέχους ,αφού η μείωση ήταν 2,36 Logs που αντιστοιχούν σε απόδοση 99,56%. Αντίθετα, χαμηλότερη απόδοση παρατηρήθηκε κατά 0,67 Logs τον Φεβρουάριο.

4.1.3 ΈΛΕΓΧΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Τα βακτήρια ενδιαφέροντος εξετάστηκαν ως προς την ανθεκτικότητα τους στα αντιβιοτικά με βάση την τιμή της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC₆₀. Η τιμή MIC₆₀ αναφέρεται στην ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του αντιβιοτικού που προκαλεί θάνατο στο 60% του βακτηριακού πληθυσμού. Τα αντιβιοτικά για το οποία έγινε έλεγχος ανθεκτικότητας ήταν η Αμοξικιλίνη (AMOX), η Σιπροφλοξασίνη (CIP) και η Σουλφομεθοξαζόλη (SMX). Ο λόγος που επιλέχθηκαν τα τρία συγκεκριμένα αντιβιοτικά είναι η ευρεία χρήση τους και η διαφοροποίηση που παρουσιάζουν μεταξύ τους στους μηχανισμούς δράσης έναντι των βακτηρίων, στοιχείο που τα κατατάσσει σε διαφορετικές κλάσεις αντιβιοτικών.

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση επιλεγμένων αντιβιοτικών εξετάστηκε σε βακτήρια που απομονώθηκαν από:

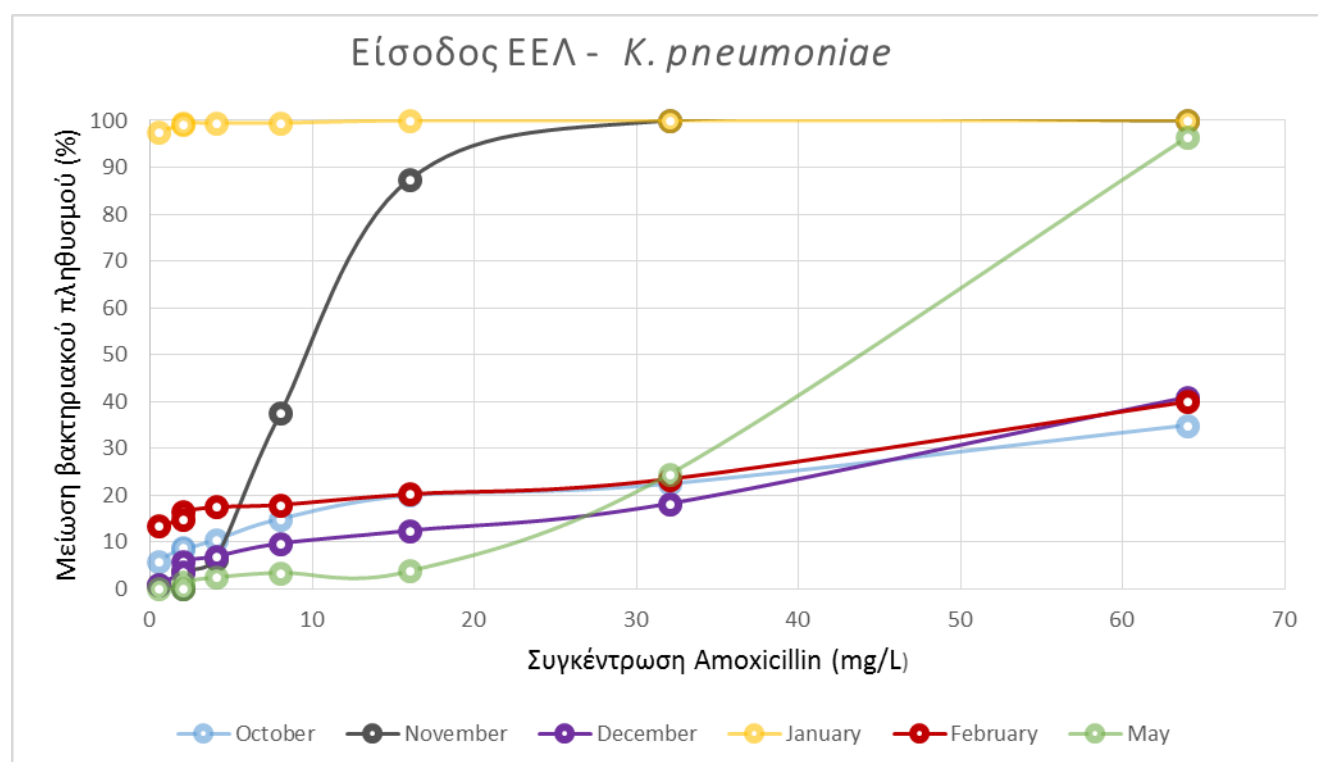
- i) το αρχικό ανεπεξέργαστο λύμα της εισόδου της μονάδας επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων
- ii) το πλέον επεξεργασμένο και απολυμασμένο με χλώριο λύμα της εξόδου της μονάδας επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων (ΔΕΥΑΒΑ)

Η διαφοροποίηση του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων εξετάστηκε για τους μήνες Οκτώβριο, Νοέμβριο, Δεκέμβριο, Ιανουάριο, Φεβρουάριο και Μάιο. Οι ενδιάμεσοι μήνες παραλείφθηκαν γιατί εξαιτίας των διαρκών βροχοπτώσεων εκείνης της χρονικής περιόδου, τα όμβρια ύδατα που εισέρχονταν στις δεξαμενές της

μονάδας, υπήρχε περίπτωση να οδηγήσουν σε «αλλοιωμένα» αποτελέσματα όσον αφορά στην παρουσία των βακτηρίων και του γενετικού υλικού στα δείγματα.

❖ *K. pneumoniae*

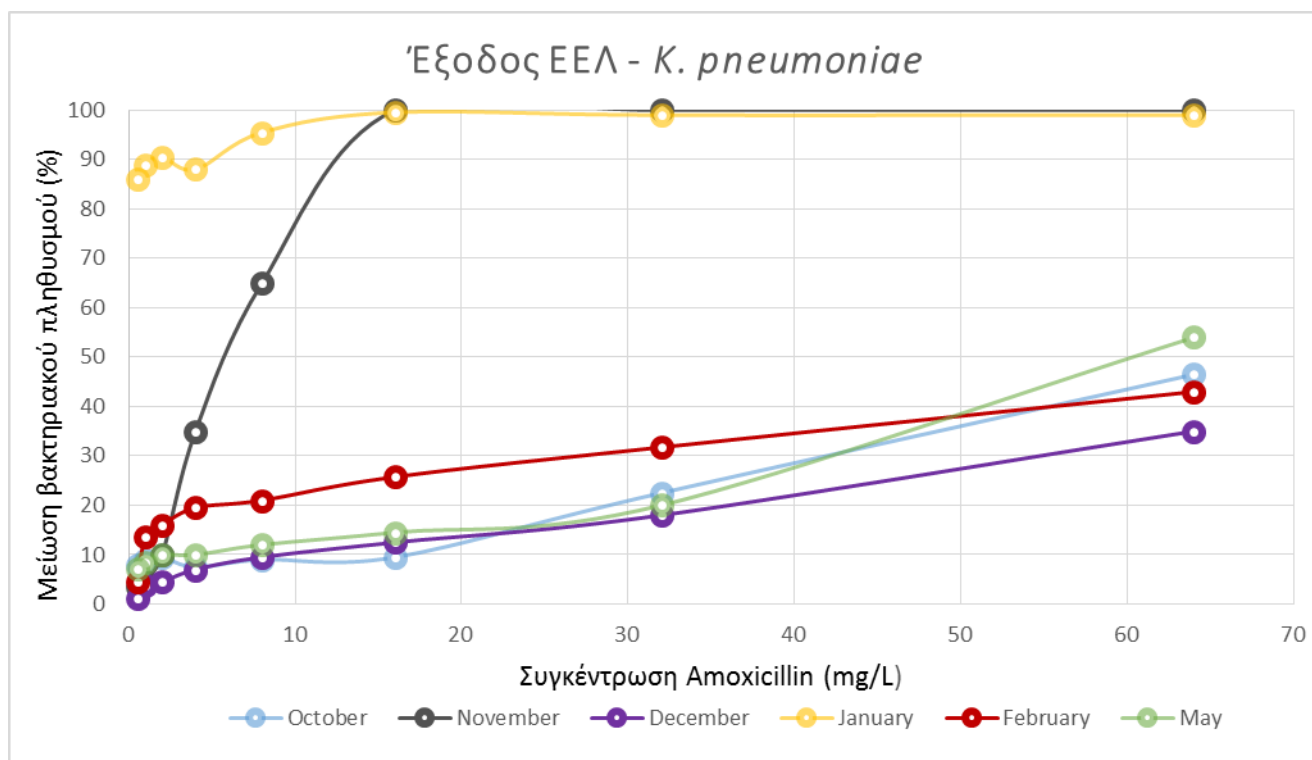
AMOXICILLIN



Γράφημα 3. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* στην είσοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης

Στο Γράφημα 3 φαίνεται ότι τα περισσότερα στελέχη που απομονώθηκαν από τα δείγματα εισόδου είναι ανθεκτικά στην Αμοξικιλίνη καθώς η τιμή MIC₆₀ εντοπίζεται σε συγκεντρώσεις που ξεκινούν από 49mg/L τον Μάιο και ξεπερνούν τα 64mg/L (μέγιστη συγκέντρωση αντιβιοτικού που εφαρμόστηκε, γι' αυτό δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστούν) τους μήνες Οκτώβριο, Δεκέμβριο και Φεβρουάριο.

Εξαιρέση αποτελούν τα στελέχη που απομονώθηκαν τους μήνες Νοέμβριο όπου το MIC₆₀ βρίσκεται σε συγκέντρωση αντιβιοτικού περίπου 11mg/L και Ιανουάριο, όπου ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού τα βακτήρια ήταν εξαιρετικά ευαίσθητα σε αυτό με σταθερό ποσοστό θανάτωσης 100% του πληθυσμού.



Γράφημα 4. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* στην έξοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης

Το προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών *K. pneumoniae* που προέρχονται από την έξοδο της μονάδας επεξεργασίας δεν αλλάζει ιδιαίτερα καθώς η πλειονότητα των στελεχών παραμένει ανθεκτική στην Αμοξικιλίνη.

Για τους μήνες Οκτώβριο, Δεκέμβριο, Φεβρουάριο οι τιμές MIC_{60} συνεχίζουν να βρίσκονται υψηλότερα από τα 64mg/L. Τους μήνες Οκτώβριο και Φεβρουάριο παρατηρήθηκε μια αύξηση στα ποσοστά μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού, ωστόσο οι τιμές MIC_{60} όπως αναφέρθηκε παρέμειναν μεγαλύτερες των 64mg/L, ενώ τον Δεκέμβριο για τις ίδιες υψηλές συγκεντρώσεις αντιβιοτικού τα ποσοστά μειώθηκαν, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα στελέχη έγιναν πιο ανθεκτικά.

Τον Μάιο, τα στελέχη της εξόδου έδωσαν τιμή $MIC_{60} = 64 \text{ mg/L}$ δηλαδή παρουσιάστηκαν πιο ανθεκτικά στην Αμοξικιλίνη σε σχέση με αυτά της εισόδου.

Αξίζει να παρατηρηθεί ότι τα στελέχη του Νοέμβρη παρουσίασαν μειωμένη ανθεκτικότητα έναντι της Αμοξικιλίνης, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα της Εισόδου, αφού η τιμή της MIC_{60} έπεσε κάτω στα 8mg/L.

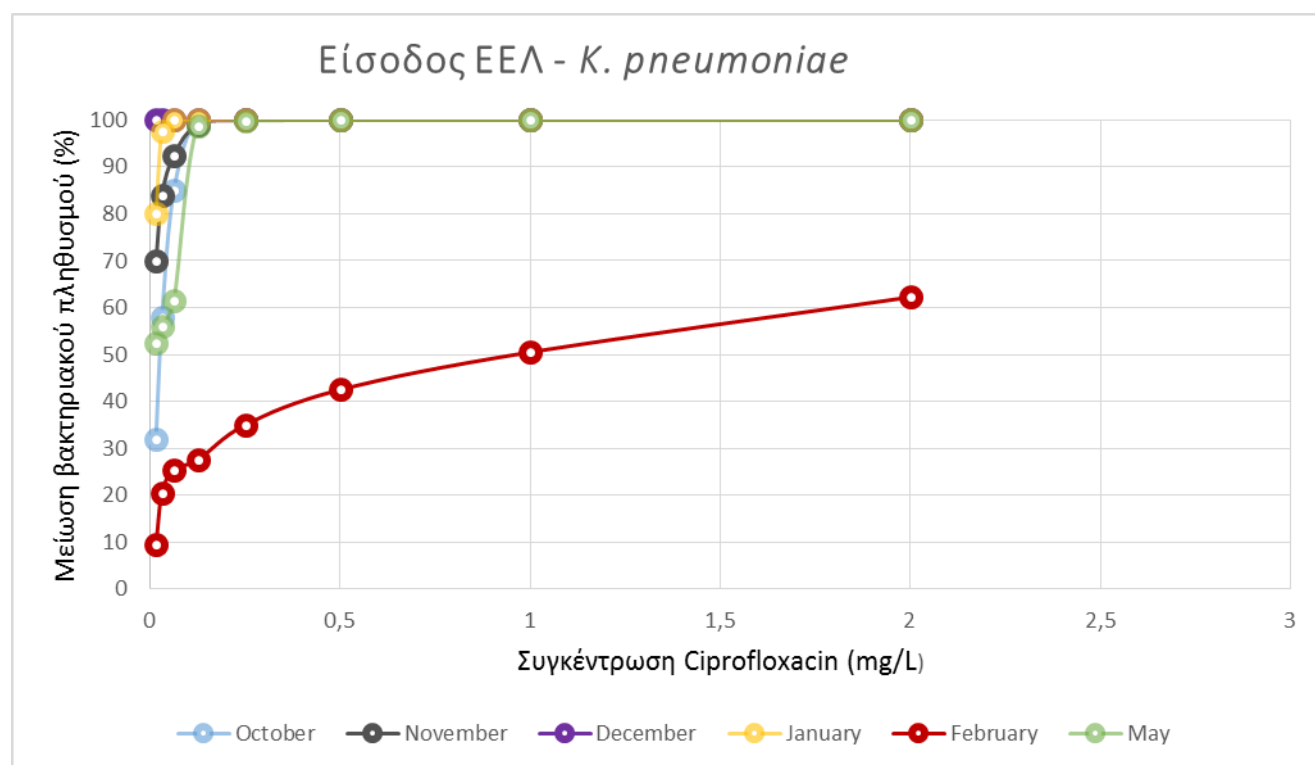
Τον Ιανουάριο παρατηρήθηκε αύξηση της ανθεκτικότητας των στελεχών με ποσοστά θνησιμότητας 86-99%), μικρότερα σε σύγκριση με αυτά της Εισόδου, κυρίως για τις μικρότερες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού (0,5 – 1 mg/L), ωστόσο η τιμή MIC_{60} παρέμεινε κάτω από τα 0,5mg/L.

Τα στελέχη *K. pneumoniae* είναι στελέχη ανθεκτικά στην Αμοξικιλίνη και αυτό το συμπέρασμα προκύπτει από της υψηλές τιμές MIC_{60} τόσο στην είσοδο όσο και στην έξοδο του βιολογικού. Όμως, δεν μπορεί να προκύψει κάποιο ακέριο συμπέρασμα

για το πώς αλλάζει το προφίλ ανθεκτικότητας των στελεχών μετά την επεξεργασία γιατί για τους μισούς μήνες αυξήθηκε η ανθεκτικότητα και για τους άλλους μισούς μειώθηκε, ακόμα κι αν αυτή η μείωση στην ανθεκτικότητα εμφανίστηκε στο πλαίσιο υψηλών τιμών MIC₆₀ αλλά με αυξημένα ποσοστά μείωσης βακτηριακού πληθυσμού της εξόδου σε σχέση με αυτά της εισόδου που αντιστοιχούν στην ίδια MIC₆₀.

Οι Stock και Wiedemann σε έρευνα τους αναφέρουν (Stock, Wiedemann, 2001) αναφέρουν ότι τα στελέχη *Klebsiella* sp. διαθέτουν φυσική αντοχή σε διάφορα αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένης της Αμοξικιλίνης, η οποία μέσα στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων ενισχύεται. Στους ελέγχους που πραγματοποίησαν οι τιμές MIC που αφορούσαν στελέχη *K. pneumoniae* ήταν 0,5 , 4 και 16-128mg/L , ένα εύρος τιμών που περιλαμβάνει τις ευρεθείσες τιμές της παρούσας εργασίας. Υψηλά ποσοστά αντοχής στην Αμοξικιλίνη ιδίως μετά την επεξεργασία, επιβεβαιώθηκαν και από άλλη έρευνα (Ferreira da Silva et al., 2006), τα οποία αποδίδονται στη φυσική αντοχή του στελέχους σε αυτό το αντιβιοτικό .

CIPROFLOXACIN

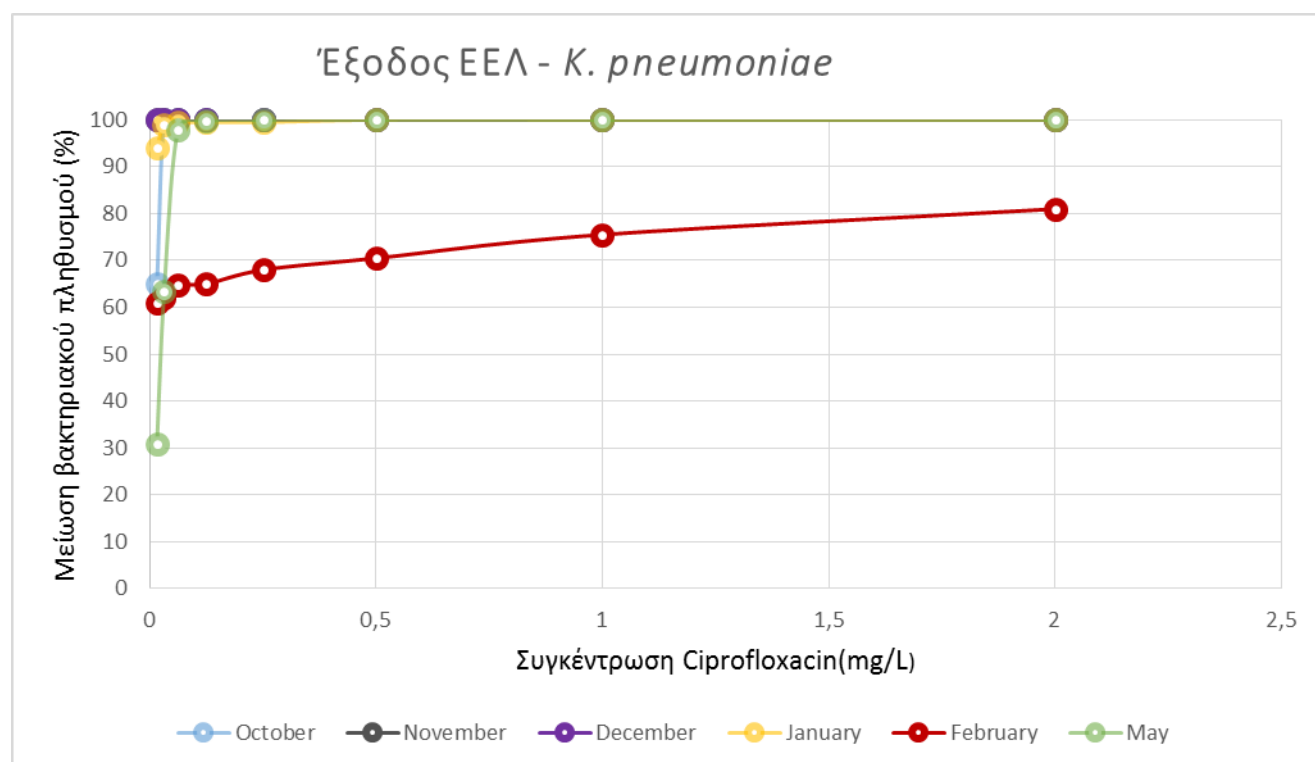


Γράφημα 5. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* στην είσοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης

Τα στελέχη που απομονώθηκαν από την είσοδο της μονάδας παρουσιάζουν ευαισθησία στη Σιπροφλοξασίνη με πολύ χαμηλές τιμές MIC₆₀ που εντοπίζονται ανάμεσα στα 0,03 mg/L για τους μήνες Οκτώβριο και Ιανουάριο και 0,06 mg/L για τον Μάιο.

Τον Δεκέμβριο τα ποσοστά μείωσης βρίσκονται στο 100% για όλο το εύρος συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού.

Εξαίρεση αποτελούν τα στελέχη που απομονώθηκαν τον Φεβρουάριο τα οποία παρουσιάστηκαν ανθεκτικά στη Σιπροφλοξασίνη με την MIC₆₀ να βρίσκεται στα κοντά στα 2mg/L η οποία ήταν η αρχική και μεγαλύτερη συγκέντρωση της Σιπροφλοξασίνης που εξετάστηκε.



Γράφημα 6. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* στην έξοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης

Τα στελέχη που απομονώθηκαν από την έξοδο της μονάδας δείχνουν ακόμα μεγαλύτερη ευαισθησία στη Σιπροφλοξασίνη με υποδιπλάσιες τιμές MIC₆₀ από αυτές της Εισόδου, που εντοπίζονται ανάμεσα στα 0,016 mg/L και 0,03mg/L για τους μήνες Ιανουάριο και Μάιο αντίστοιχα

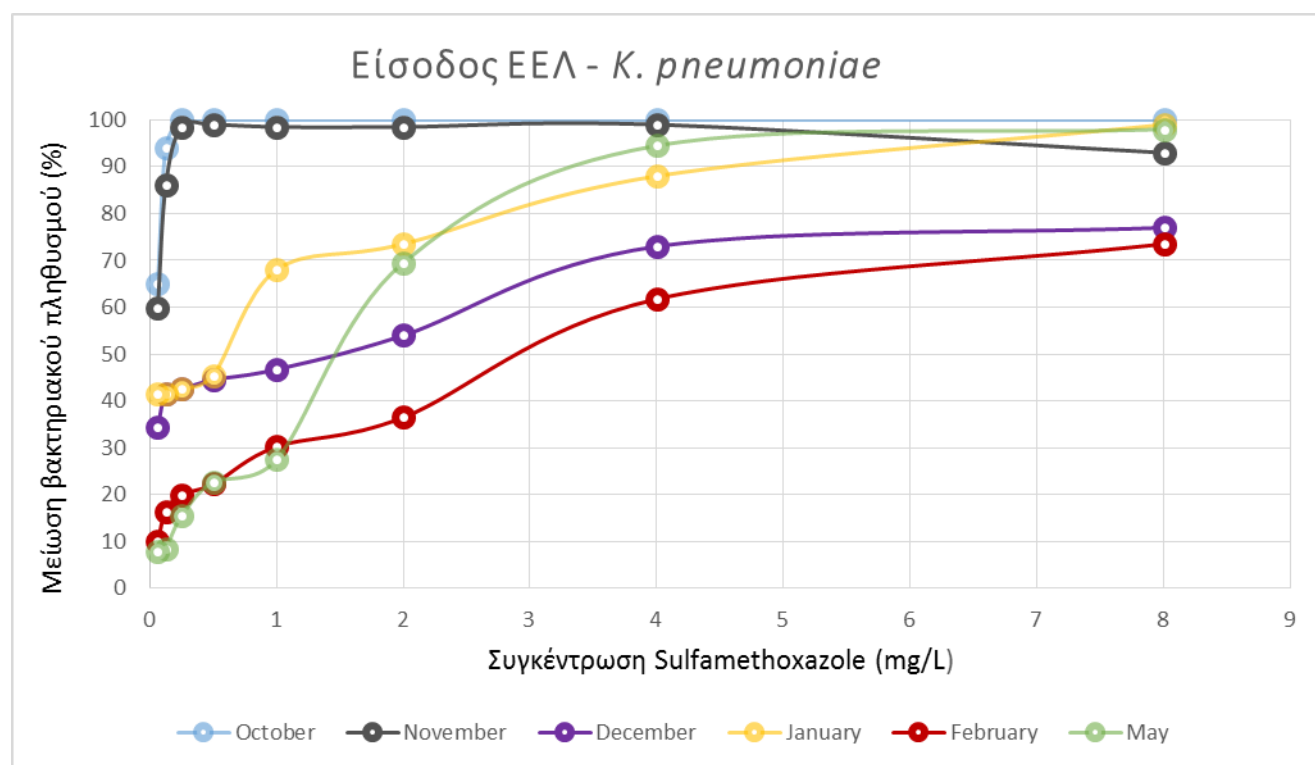
Τους μήνες Οκτώβριο, Νοέμβριο και Δεκέμβριο θανατώνεται το 100% του βακτηριακού πληθυσμού για όλο το εύρος συγκεντρώσεων αντιβιοτικού που εφαρμόστηκαν.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν τον Φεβρουάριο παρουσίασαν μια δραματική αύξηση ευαισθησίας στο αντιβιοτικό με τη τιμή MIC₆₀ να ελαττώνεται στα 0,016mg/L.

Γενικευμένη αύξηση της ευαισθησίας λοιπόν παρατηρείται στα στελέχη *K. pneumoniae* όσον αφορά την Σιπροφλοξασίνη με χαμηλότερες τιμές MIC₆₀ στην έξοδο από ότι στην είσοδο.

Έχει αποδειχθεί ότι οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών είναι πολύ μεγαλύτερες σε στερεά/ ημι-στερεά μέσα (ιλύες) απ' ότι σε υδατικά μέσα. Η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα της Σιπροφλοξασίνης στα υγρά λύματα πιθανόν να ευθύνεται για την ύπαρξη ευαίσθητων στελεχών τα οποία μετά την απολύμανση με χλώριο γίνονται ακόμα πιο ευαίσθητα (Li W, et al., 2013, Larsson, Flach, 2022). Οι τιμές MIC στην έρευνα των Stock και Wiedemann ταυτίζονται αρκετά με τα ευρήματα της εργασίας αυτής καθώς οι τιμές κυμαίνονταν στα 0,01-0,25 mg/L. Επιπλέον, δοκιμές που έγιναν σε λύματα που συλλέχθηκαν από τον βιολογικό πόλη της Νότιας Αφρικής και είχαν νοσοκομειακή προέλευση, μόνο το 10% από τα 37 στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν ήταν ανθεκτικά στη Σιπροφλοξασίνη (King et al., 2019). Τέλος, έχει γίνει γνωστό ότι προσφάτως ανεπτυγμένες κινολόνες όπως η Σιπροφλοξασίνη ή Οφλοξασίνη, είναι ενεργές έναντι Gram (+) βακτηρίων άρα όχι στην *K. pneumoniae* που είναι Gram (-) (Millanao et al., 2021). Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με το ότι τα φυσικά στελέχη *K. pneumoniae* είναι ευαίσθητα στη Σιπροφλοξασίνη (Stock, Wiedemann, 2001), ενισχύουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων στις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία.

SULFAMETHOXAZOLE



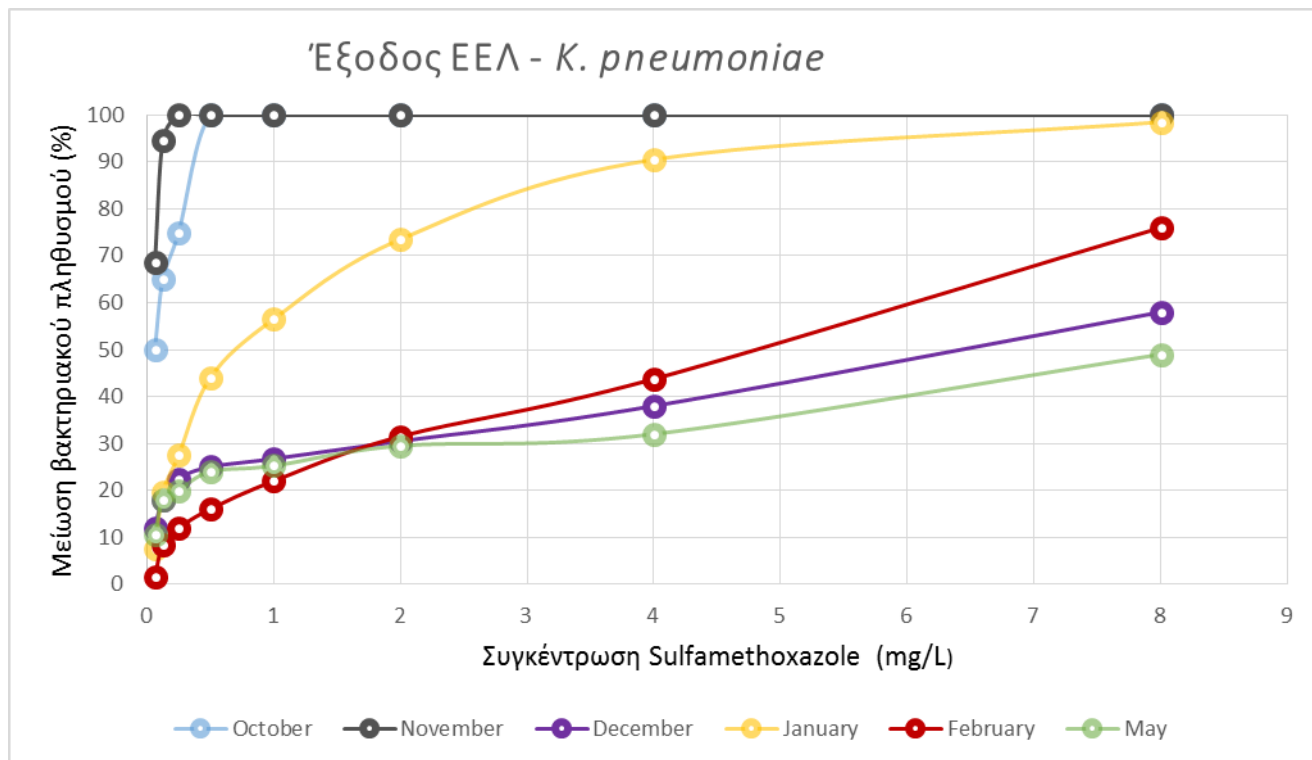
Γράφημα 7. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* στην είσοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 7 τα στελέχη είναι κατά βάση ευαίσθητα στη Σουλφομεθοξαζόλη αφού οι τιμές MIC₆₀ κυμαίνονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις

0,06 – 2,5 mg/L, με τα πιο ευαίσθητα στελέχη να είναι αυτά που απομονώθηκαν το πρώτο δίμηνο των πειραμάτων με MIC₆₀ = 0,06 mg/L.

Τους μήνες Δεκέμβριο, Ιανουάριο και Μάιο οι τιμές MIC₆₀ βρέθηκαν στα 2,5mg/L , 0,75mg/L και 1,75mg/L αντίστοιχα.

Διαφοροποίηση παρουσίασαν κάποια στελέχη που απομονώθηκαν Φεβρουάριο με MIC₆₀ = 4mg/L .



Γράφημα 8. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* στην έξοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης

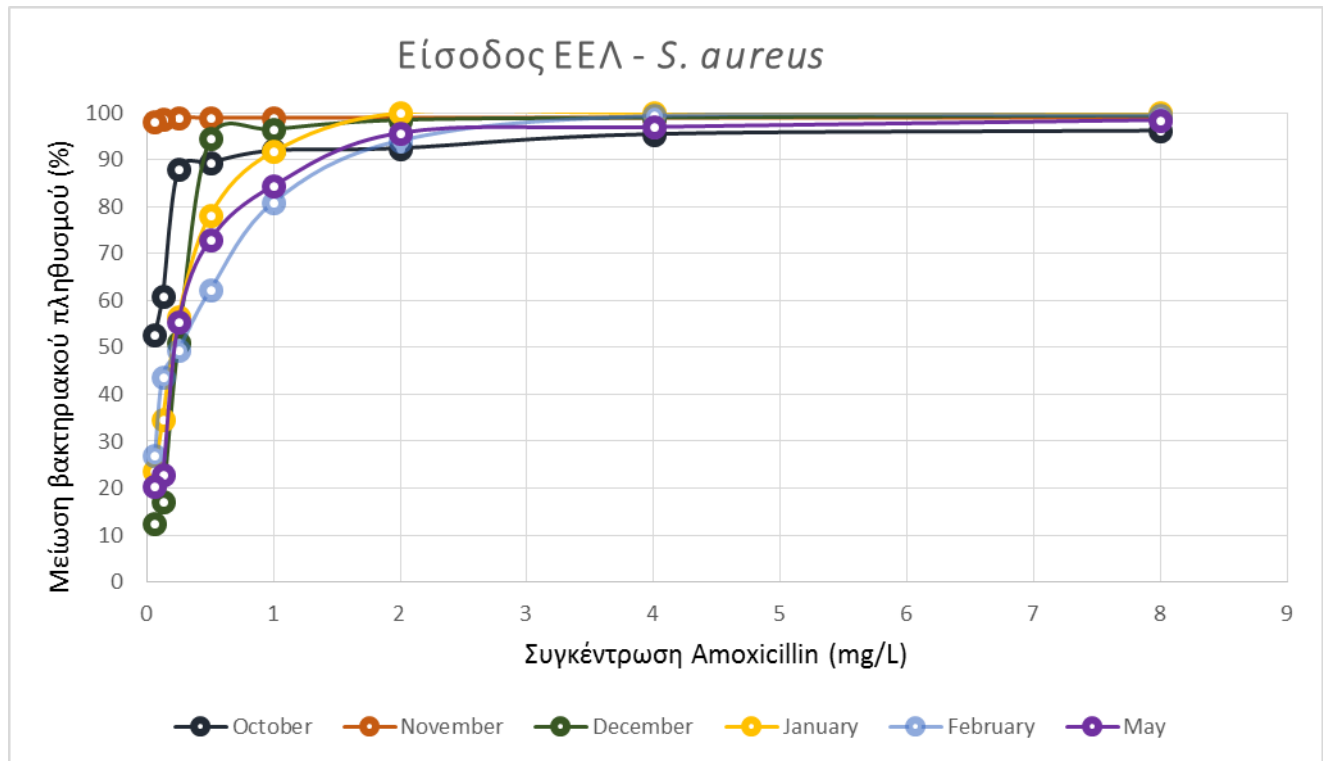
Από το Γράφημα 8 γίνεται αντιληπτό ότι μια γενικευμένη αύξηση της ανθεκτικότητας των στελεχών έναντι της Σουλφομεθοξαζόλης σημειώθηκε συνολικά. Ιδιαίτερα τους μήνες Δεκέμβριο, Ιανουάριο, Φεβρουάριο οι τιμές MIC₆₀ ήταν 8mg/L , 1,5mg/L , 6mg/L αντίστοιχα, ενώ τον Μάιο η μέγιστη δόση αντιβιοτικού ήταν θανατηφόρα μόνο για το 49% του πληθυσμού, άρα δε προσδιορίστηκε η MIC₆₀.

Τον Οκτώβριο, η ανθεκτικότητα μειώθηκε στην τιμή MIC₆₀ = 0,06mg/L , ενώ τον Νοέμβριο η ελάχιστη δόση αντιβιοτικού ήταν ανασταλτική για το 80% του πληθυσμού των στελεχών άρα η MIC₆₀ δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστεί.

Σε έρευνα των Fadare και Okoh , 6 από τα 7 στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν από αστικά λύματα παρουσιάστηκαν ανθεκτικά στη Σουλφομεθοξαζόλη (Fadare, Okoh, 2021), ενώ τα πολλαπλά ευρήματα έρευνας σχετικά με τις ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις ταυτίζονται με αυτά της συγκεκριμένης εργασίας καθώς πληθώρα στελεχών είχαν MIC μεταξύ 0,25 και 1-128mg/L (Stock, Wiedemann, 2001).

❖ *S. aureus*

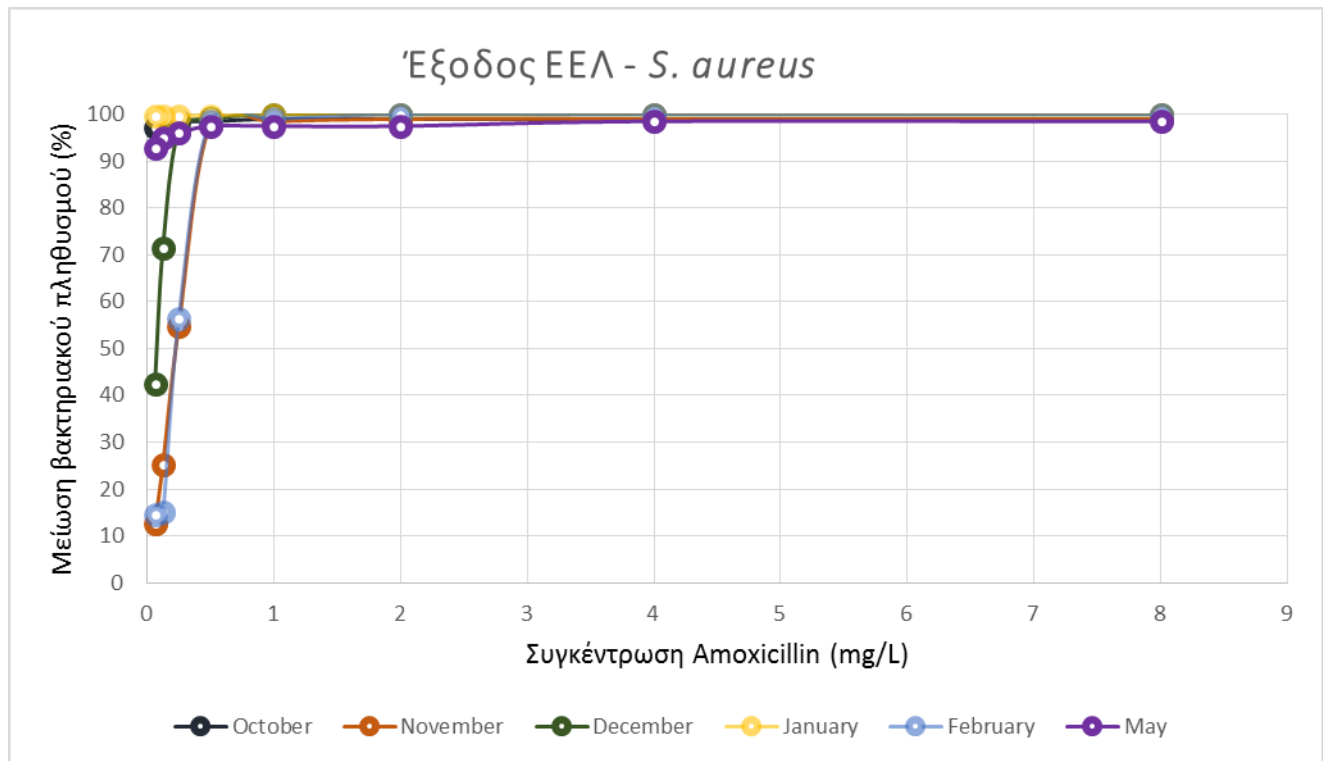
AMOXICILLIN



Γράφημα 9. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* στην είσοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης

Στο Γράφημα 9 παρατηρούμε ότι για όλους τους μήνες οι συγκεντρώσεις της Αμοξικιλίνης που είναι ανασταλτικές για το 60% του βακτηριακού πληθυσμού στην είσοδο της μονάδας βρίσκονται μεταξύ 0,125mg/L τον Οκτώβριο, 0,25mg/L τους Δεκέμβριο και Ιανουάριο και 0,5 mg/L τους Φεβρουάριο και Μάιο. Καθίσταται σαφές λοιπόν η ευαισθησία των στελεχών στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Τα στελέχη που απομονώθηκαν τον Νοέμβριο ήταν όλα ευαίσθητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό, καθώς τα ποσοστά μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού είναι σταθερά στο 99% για όλο το εύρος συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού που ελέγχθηκαν.



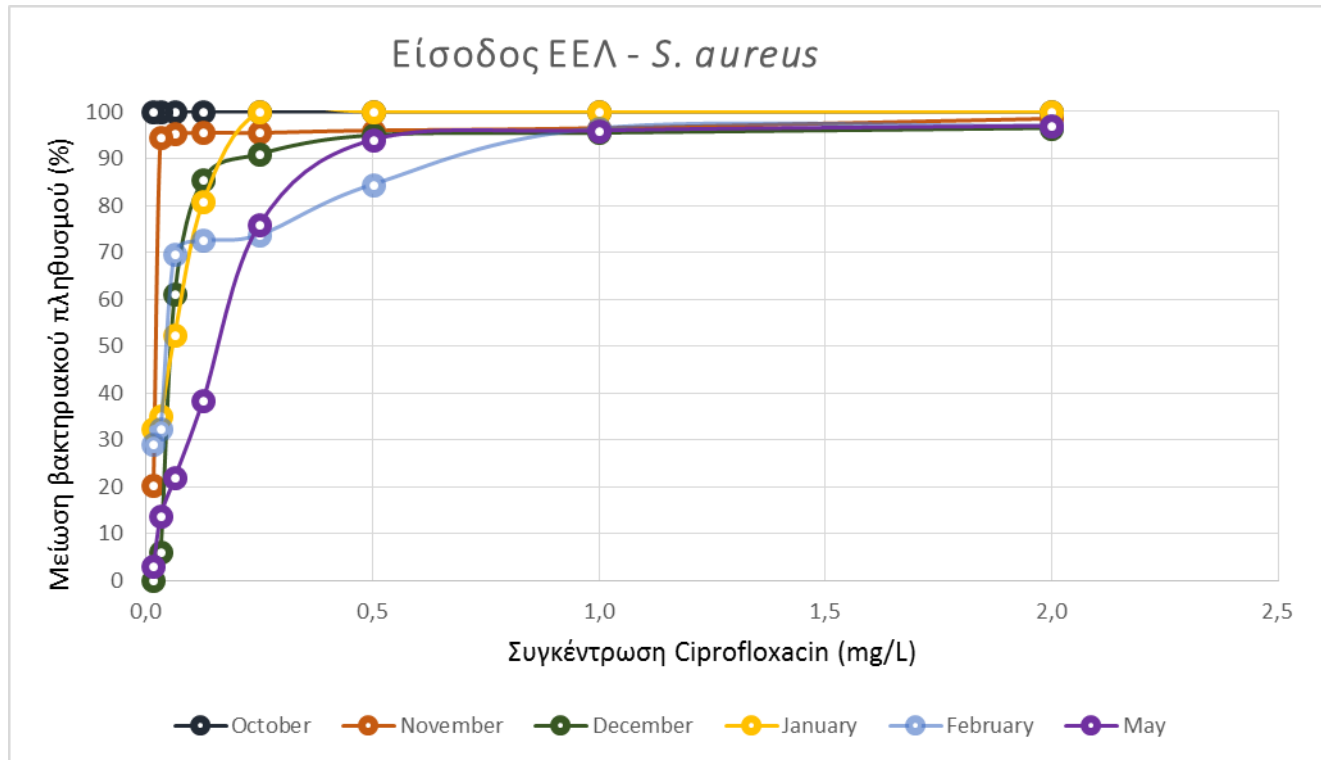
Γράφημα 10. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* στην έξοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης

Στα στελέχη που απομονώθηκαν από την έξοδο της μονάδας επεξεργασίας παρατηρήθηκε αύξηση της ευαισθησίας τους στην Αμοξικιλίνη. Οι τιμές MIC_{60} ήταν 0,125mg/L για τον Δεκέμβριο και 0,25mg/L για τον Φεβρουάριο, τιμές υποδιπλάσιες από αυτές της εισόδου για τους ίδιους μήνες. Τα ποσοστά μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού ήταν κοντά στο 90-98%, ακόμα και για τη μικρότερη δόση αντιβιοτικού που εφαρμόστηκε, άρα ο προσδιορισμός της MIC_{60} δεν ήταν εφικτός.

Αντίθετα, για τον μήνα Νοέμβριο, τα στελέχη που απομονώθηκαν τη συγκεκριμένη χρονική περίοδο έγιναν περισσότερο ανθεκτικά στην Αμοξικιλίνη με τιμή MIC_{60} = 0,25 mg/L.

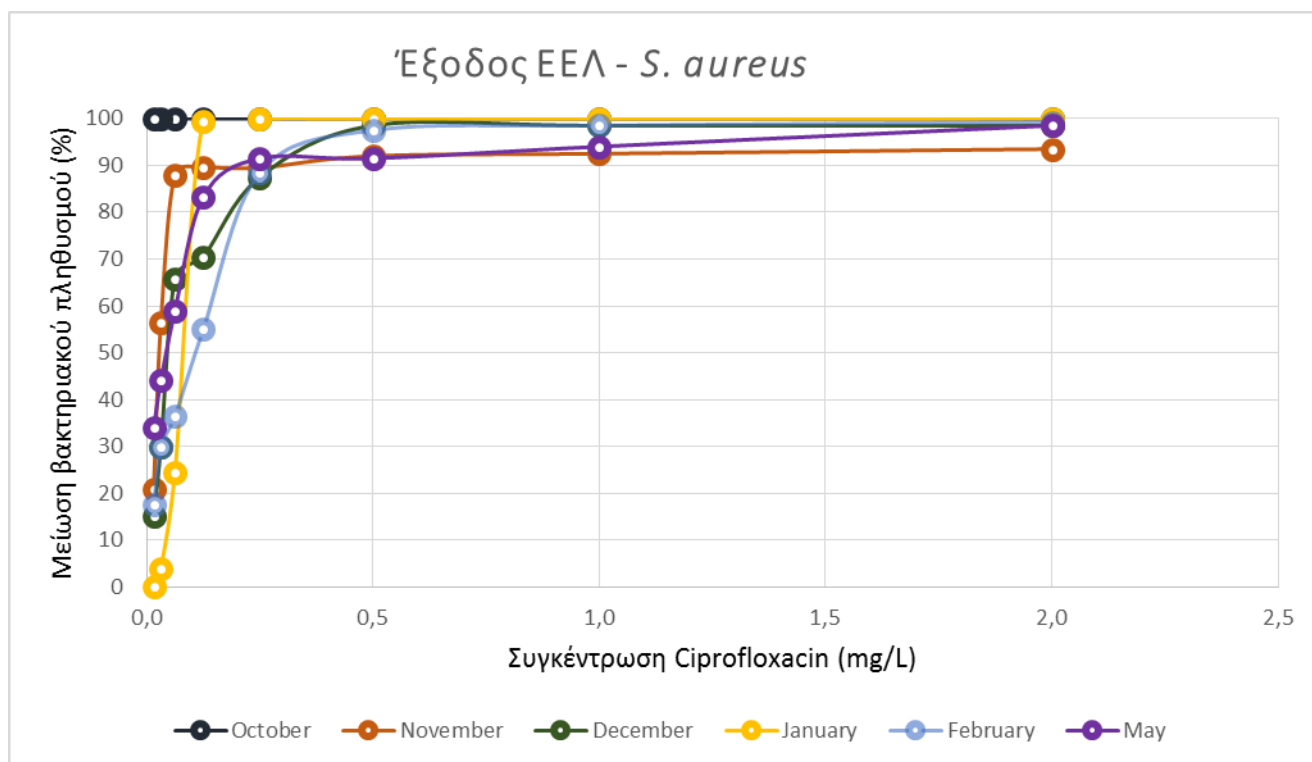
Όπως γίνεται αντιληπτό από τα παραπάνω η συντριπτική πλειοψηφία των στελεχών *S. aureus* έγιναν πιο ευαίσθητα στην Αμοξικιλίνη.

CIPROFLOXACIN



Γράφημα 11. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* στην είσοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης

Στο Γράφημα 11 φαίνεται ότι η πλειοψηφία των στελεχών είναι ευαίσθητα στην Σιπροφλοξασίνη με τιμές MIC_{60} που κυμαίνονται από 0,03 – 0,125 mg/L ενώ για τον μήνα Οκτώβριο αναστέλλεται η ανάπτυξη στο 100% του βακτηριακού πληθυσμού για όλο το εύρος συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού που εφαρμόστηκαν.



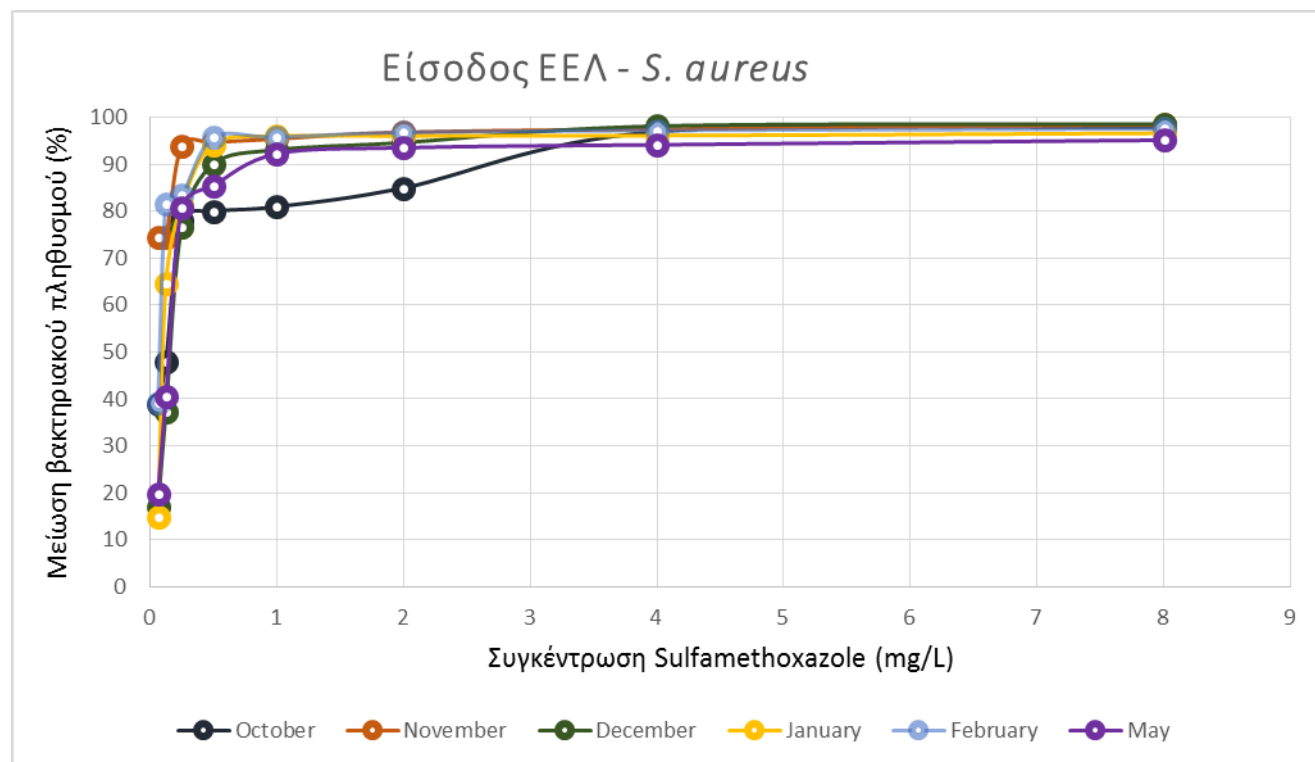
Γράφημα 12. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* στην έξοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης

Όσον αφορά στα στελέχη που απομονώθηκαν από την έξοδο της μονάδας οι τιμές MIC₆₀ κυμαίνονται σε συγκεντρώσεις 0,06 – 0,25mg/L. Τον Οκτώβριο αναστέλλεται η ανάπτυξη στο 100% του βακτηριακού πληθυσμού για όλο το εύρος συγκεντρώσεων του αντιβιοτικού που εφαρμόστηκαν, ενώ για τις ίδιες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού τα ποσοστά μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού υπέδειξαν αύξηση της ανθεκτικότητας για τον Νοέμβριο και μείωση της ανθεκτικότητας για τον Δεκέμβριο.

Θα μπορούσαμε να πούμε λοιπόν ότι η πλειοψηφία των στελεχών *S. aureus* παρουσίασε αύξηση στην ανθεκτικότητα έναντι της Σιπροφλοξασίνης. Σε αυτό το σημείο, ενδιαφέρον έχει να αναφερθούν δυο επιπλέον «μηχανισμοί επιβίωσης» των μικροοργανισμών, i) η υπερέκφραση αντλιών εκροής (Efflux Pumps ή EPs) και ii) το βιοφίλμ (biofilm formation). Τα EPs είναι πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης που εκφράζονται είτε από το βακτηριακό χρωμοσωμικό DNA είτε από τα πλασμίδια και απομακρύνουν από το κυτταρόπλασμα μεταβολίτες, τοξίνες, χρωστικές ουσίες καθώς και διάφορες κατηγορίες αντιβιοτικών συνεισφέροντας έτσι στην πολυαντοχή στα αντιβιοτικά. Τα βιοφίλμ είναι δομημένες μικροβιακές κοινότητες στις οποίες τα βακτήρια προσκολλώνται σε μια επιφάνεια (ιστός ξενιστή ή αβιοτικές επιφάνειες) προσφέροντας προστασία και μειώνοντας την ευαισθησία σε αντιβιοτικά ή σε μεθόδους απολύμανσης. Ο *S. aureus* μεταξύ άλλων (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) διαθέτουν την ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ. Έρευνες ανέδειξαν (Resch, et al., 2005, X.He, J.Ahn, 2011) ισχυρή συσχέτιση μεταξύ σχηματισμού βιοφίλμ και EPs. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στον *S.aureus* έχουν βρεθεί γονίδια που είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση κινολονών όπως είναι η Σιπροφλοξασίνη.

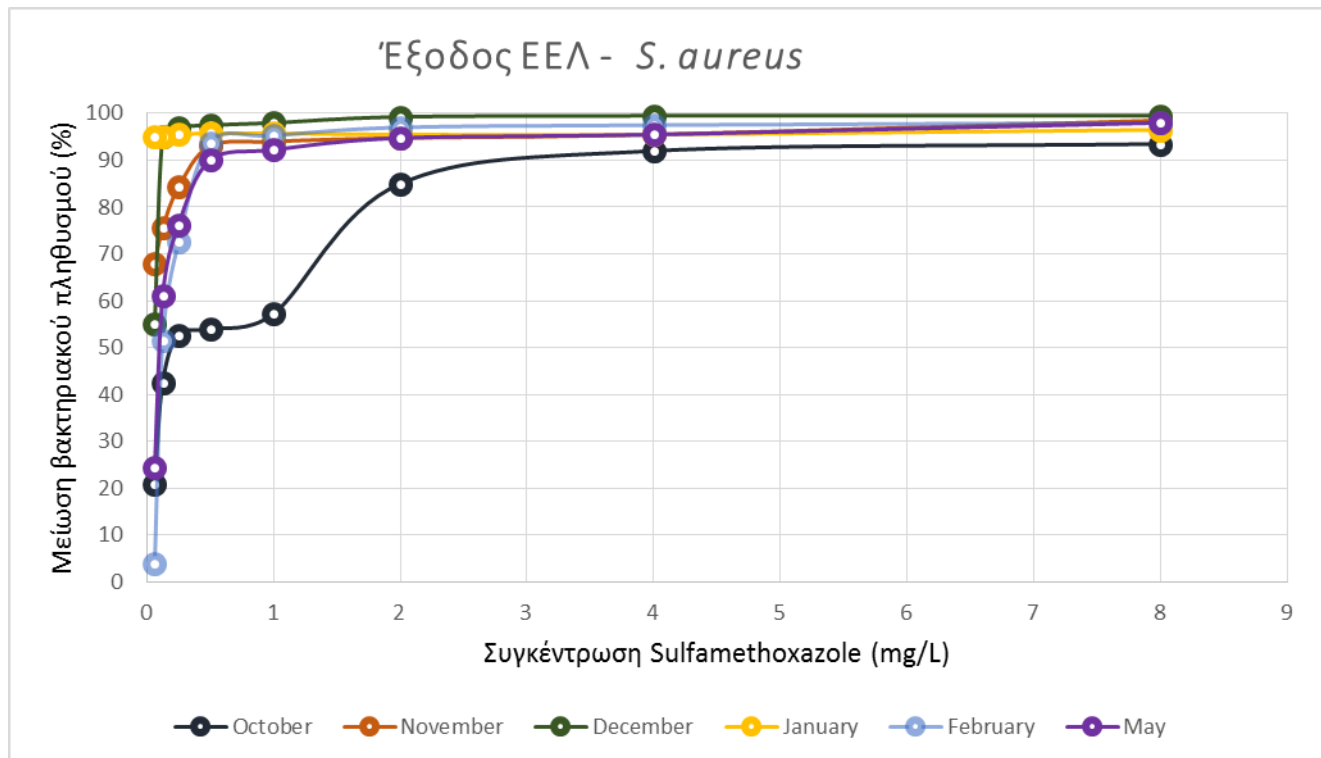
Άλλη έρευνα (Pittas, 2018) έχει δείξει ότι τα περισσότερα στελέχη που ανήκουν στην οικογένεια *Staphylococci* βρέθηκαν πιο ανθεκτικά στη Σιπροφλοξασίνη στην είσοδο, απ' ότι στην εκροή της δευτεροβάθμιας, πριν την απολύμανση και ακόμα λιγότερο ανθεκτικά στην έξοδο της μονάδας επεξεργασίας.

SULFAMETHOXAZOLE



Γράφημα 13. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* στην είσοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης

Τα στελέχη που απομονώθηκαν από την είσοδο της μονάδας επεξεργασίας, όπως φαίνεται στο Γράφημα 13 είναι ευαίσθητα στη Σουλφομεθοξαζόλη με τιμές MIC_{60} 0,125 – 0,25 mg/L . Μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσίασαν τα στελέχη που απομονώθηκαν τον Νοέμβριο όπου η ακόμα και για τη μικρότερη εφαρμοσμένη συγκέντρωση αντιβιοτικού, 0,06mg/L , το ποσοστό μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού παραμένει στο αρκετά υψηλό ποσοστό του 74,4% .



Γράφημα 14. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* στην έξοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης

Όπως φαίνεται και από τις καμπύλες του Γραφήματος 14, για τα βακτήρια που απομονώθηκαν τους μήνες Νοέμβριο και Φεβρουάριο υπήρξε μια αύξηση στην ευαισθησία έναντι της Σουλφομεθοξαζόλης με τιμές MIC_{60} μεταξύ 0,06-0,125mg/L. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση της τιμής MIC_{60} σημειώθηκε τον Οκτώβριο όπου έφτασε το 1mg/L. Τα στελέχη του εξόδου του Μαΐου είχαν παρόμοια συμπεριφορά με τα αντίστοιχα της εισόδου με ελαφρώς αυξημένη MIC_{60} μεγαλύτερη από 0,125mg/L αλλά μικρότερη όμως από 0,25 mg/L. Αντίθετα, τα στελέχη των υπόλοιπων μηνών παρουσίασαν αυξημένη ευαισθησία με τιμές MIC_{60} 0,06 -0,125 mg/L .

Σύμφωνα με τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να πούμε ότι στη πλειοψηφία τους τα στελέχη *S. aureus* εμφάνισαν αυξημένη ανθεκτικότητα απέναντι στη Σουλφομεθοξαζόλη. Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι οι Σουλφοναμίδες και τα παράγωγά τους είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές έναντι Gram (+) βακτηρίων και κυρίως έναντι του *S. aureus* (Onung, Bhattacharyya, 2021).

Εξετάζοντας συνολικά τα αποτελέσματα της ενότητας αυτής δεν μπορεί να προκύψει κάποια γενική συνθήκη που διέπει τα αποτελέσματα στα οποία κατέληξε η συγκεκριμένη έρευνα. Μια παρατήρηση που θα μπορούσαμε να κάνουμε είναι ότι τα στελέχη *K. pneumoniae* και *S. aureus* παρουσιάζουν ως επί το πλείστο αντίθετη συμπεριφορά ως προς τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά. Πιο συγκεκριμένα:

- ❖ Όσον αφορά την Αμοξικιλίνη, η *K. pneumoniae* μετά την επεξεργασία παρουσίασε είτε αύξηση στις τιμές MIC₆₀ , είτε για την ίδια τιμή MIC₆₀ στην είσοδο και την έξοδο , μειωμένα ποσοστά μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού, δηλαδή έγινε πιο ανθεκτική απέναντι στο αντιβιοτικό αυτό. Αντιθέτως, τα στελέχη *S. aureus* φάνηκαν να γίνονται πιο ευαίσθητα έπειτα από την επεξεργασία τους.
- ❖ Σχετικά με τη Σιπροφλοξασίνη, τα βακτήρια *K.pneumoniae* παρουσίασαν μια σημαντική μεταβολή στο προφίλ ανθεκτικότητας μετά την επεξεργασία των λυμάτων, με υποδιπλάσιες έως και υποεφταπλάσιες τιμές MIC₆₀ στην έξοδο σε σχέση με την έξοδο, ενώ αντίθετα τα βακτήρια *S. aureus* έγιναν πιο ανθεκτικά στο αντιβιοτικό, με τιμές MIC₆₀ εξόδου διπλάσιες από της εισόδου.
- ❖ Εξαίρεση αποτελεί η κοινή συμπεριφορά των βακτηρίων έναντι της Σουλφομεθοξαζόλης καθώς και τα δύο παρουσίασαν, έπειτα από την επεξεργασία των λυμάτων στη μονάδα, ενισχυμένη αντοχή στο αντιβιοτικό με τιμές MIC₆₀ εξόδου διπλάσιες και τριπλάσιες από ότι στην είσοδο της μονάδας

4.1.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ

Με βάση το ISO 20776-2:2021 (ISO/TC 212) έγινε η κατηγοριοποίηση των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών σε ευαίσθητα (Susceptible), μετρίως ευαίσθητα (Intermediate) και ανθεκτικά (Resistant):

- ❖ Ευαίσθητα χαρακτηρίζονται τα βακτήρια των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μια συγκέντρωση αντιβιοτικού η οποία συνδέεται με πιθανότητα θεραπευτικής επιτυχίας
- ❖ Μετρίως ευαίσθητα ονομάζονται τα βακτήρια των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μια συγκέντρωση αντιβιοτικού η οποία συνδέεται με αμφίβολη θεραπευτική επιτυχία
- ❖ Ανθεκτικά ονομάζονται τα βακτήρια των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται από μια συγκέντρωση αντιβιοτικού η οποία συνδέεται με υψηλές πιθανότητες θεραπευτικής αποτυχίας.

Η ευαισθησία των βακτηρίων στα αντιβιοτικά κρίθηκε με βάση τα στοιχεία που έχουν αναρτηθεί στην ιστοσελίδα του οργανισμού EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 3. Η κατηγοριοποίηση έγινε με βάση την τιμή MIC₆₀ που αφορούσε το εκάστοτε βακτήριο σε σχέση με τα επιλεγμένα αντιβιοτικά.

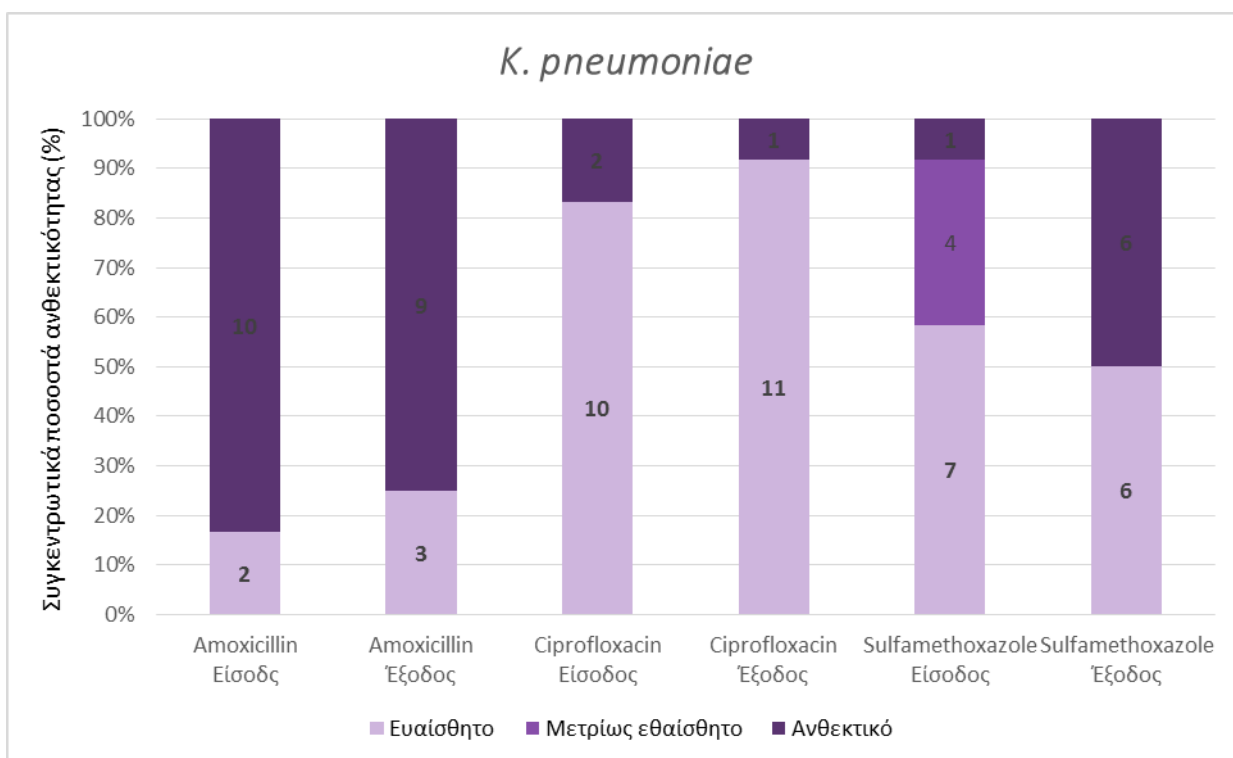
Πίνακας 8. Όρια ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για την κατηγοριοποίηση των στελεχών με βάση την ανθεκτικότητα τους όπως έχουν οριστεί από το EUCAST

Μικροοργανισμοί	Εύρος ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC (mg/L)		
	Ευαίσθητοι	Μετρίως ευαίσθητοι	Ανθεκτικοί
AMOXICILLIN			
<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	MIC≤8	-	MIC>8
<i>S. aureus</i>	-	-	-
CIPROFLOXACIN			
<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	MIC≤0,25	-	MIC>0,5
<i>S. aureus</i>	MIC≤0,001	-	MIC>1
SULFAMETHOXAZOLE			
<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	MIC≤2	2<MIC<4	MIC≥4
<i>S. aureus</i>	MIC≤2	-	MIC>4

Τα όρια που έχουν δημοσιευθεί από το EUCAST αφορούν κλινικά στελέχη και εξυπηρετούν τον ιατρικό κλάδο στην αντιμετώπιση των ασθενειών. Προκειμένου να προσαρμοστούν τα όρια αυτά στα περιβαλλοντικά στελέχη που αφορούν στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα του Πίνακα 3 ως βιβλιογραφική αναφορά και για την τελική κατηγοριοποίηση έγινε σύγκριση των τιμών MIC₆₀ μεταξύ των βακτηριακών στελεχών.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στα γραφήματα 15 και 16

❖ *K. pneumoniae*



Γράφημα 15. Κατηγοριοποίηση των στελεχών *K. pneumoniae* σε σχέση με το βαθμό ανθεκτικότητας στην Αμοξικιλίνη, στη Σιπροφλοξασίνη και στη Σουλφομεθοξαζόλη

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 15, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αντιβιοτικά, τα στελέχη *K. pneumoniae* που απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων είναι ιδιαίτερος ανθεκτικά στην Αμοξικιλίνη. Από τα στελέχη Είσοδου παρουσίασε ανθεκτικότητα ένα ποσοστό 83,33% έναντι του συνόλου ενώ από τα στελέχη της Εξόδου 75%. Ενώ τα τεστ αντιβιοτικών υπέδειξαν μεγαλύτερες τιμές MIC₆₀, αύξηση δηλαδή της ανθεκτικότητας έναντι της Αμοξικιλίνης, η μειωμένη τιμή του τελευταίου ποσοστού οφείλεται στο γεγονός ότι όλα τα στελέχη του Νοέμβρη παρουσίασαν αυξημένη ευαισθησία με μεγάλη πτώση της MIC₆₀.

Όσον αφορά στη Σιπροφλοξασίνη τα ανθεκτικά στελέχη *K. pneumoniae* που βρέθηκαν στην είσοδο και την έξοδο βρίσκονται σε ποσοστά 16,7% και 8,33%. Αυτή η μείωση στο ήδη μικρό ποσοστό ανθεκτικών στελεχών επιβεβαιώνει το γεγονός ότι τα βακτήρια μετά την παραμονή τους και την επεξεργασία στην ΕΕΛ έγιναν περισσότερο ευαίσθητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Παρόλο που οι έλεγχοι ανθεκτικότητας υπέδειξαν μια γενικευμένη ευαισθησία των βακτηρίων έναντι στη Σουλφομεθοξαζόλη, η παραμονή τους στην μονάδα επεξεργασίας τους προσέδωσε ανθεκτικότητα που αντικατοπτρίστηκε τόσο σε αυξημένες τιμές MIC₆₀ όσο και στο γεγονός ότι από το 8,33% στην είσοδο, τα ανθεκτικά στελέχη έφτασαν σε ποσοστό 50% στην έξοδο.

Εξετάζοντας συνολικά τα παραπάνω και συνυπολογίζοντας τα στελέχη που απομονώθηκαν από την είσοδο και αυτά που απομονώθηκαν από την έξοδο τα περισσότερα στελέχη είναι ανθεκτικά στην Αμοξικιλίνη (71,17%), και

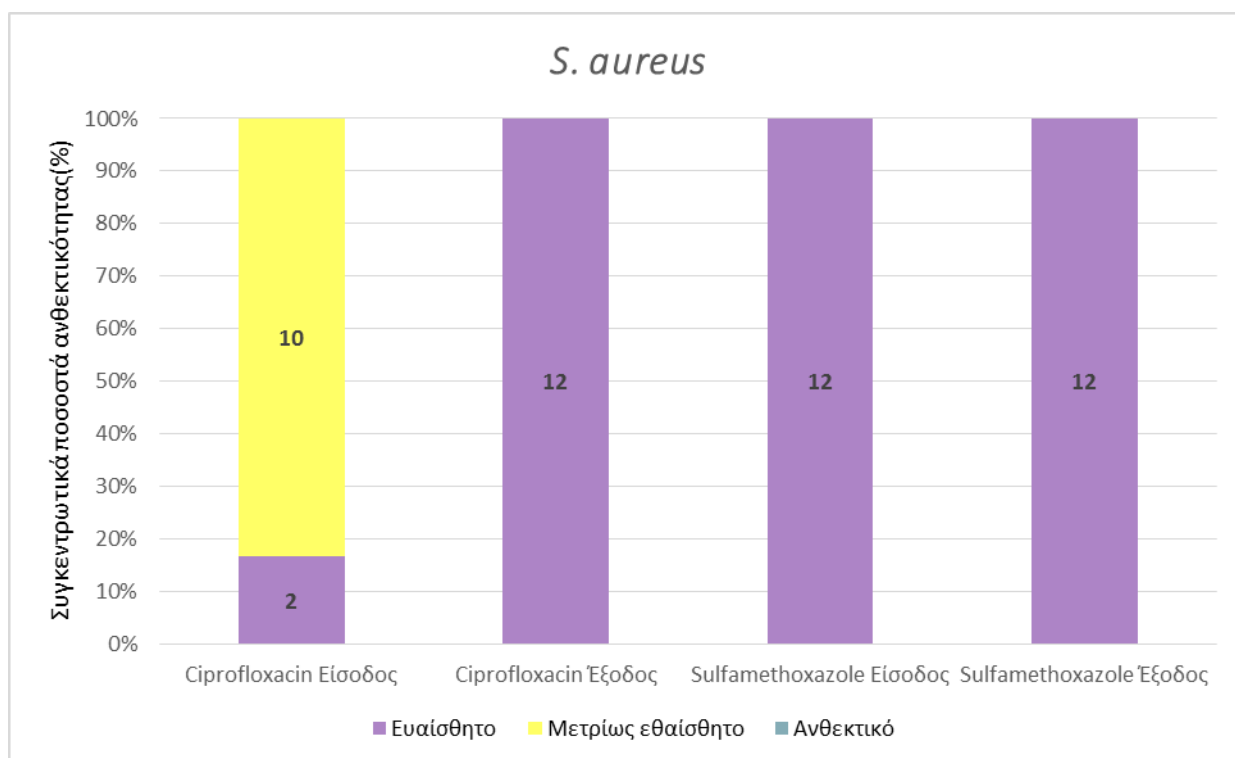
ακολουθούν η Σουλφομεθοξαζόλη (21,17%) και η Σιπροφλοξασίνη (12,5%). Αθροιστικά το ποσοστό είναι μεγαλύτερο από το 100% γιατί πολλά στελέχη ήταν ανθεκτικά σε παραπάνω από ένα αντιβιοτικό.

Ρίχνοντας μια ματιά ξεχωριστά στην είσοδο και την έξοδο όσον αφορά στην ανθεκτικότητα ή την ευαισθησία των στελεχών στο εκάστοτε αντιβιοτικό μας δίνονται ορισμένες πληροφορίες για το πώς τελικά αντιδρούν οι μικροοργανισμοί στις διεργασίες επεξεργασίας και κυρίως στην απολύμανση. Όπως φάνηκε, η πλειοψηφία των στελεχών *K. pneumoniae* ήταν και παρέμεινε μετά την επεξεργασία ανθεκτική στην Αμοξικιλίνη. Η ευαισθησία των στελεχών στη Σιπροφλοξασίνη αντιθέτως αυξήθηκε μετά την επεξεργασία, ενώ η ευαισθησία στη Σουλφομεθοξαζόλη μειώθηκε, έγιναν δηλαδή τα βακτήρια περισσότερο ανθεκτικά προς αυτή.

Ακολουθούν ξεχωριστά και σε αύξουσα σειρά τα ποσοστά για τα ανθεκτικά στελέχη της εισόδου και της εξόδου καθώς και τα ποσοστά για τα ευαίσθητα στελέχη που εντοπίστηκαν στην είσοδο και την έξοδο.

- ο Ανθεκτικά στελέχη εισόδου: AMOX (83,33%) > CIP (16,67%) > SMX (8,33%)
- ο Ευαίσθητα στελέχη εισόδου: SMX (91,67%) > CIP (83,33%) > AMOX (16,67%)
- ο Ανθεκτικά στελέχη εξόδου: AMOX (75%) > SMX (50%) > CIP (8,33%)
- ο Ευαίσθητα στελέχη εξόδου: CIP (91,67%) > SMX (50%) > AMOX (25%)

❖ *S. aureus*



Γράφημα 16. Κατηγοριοποίηση των στελεχών *S. aureus* σε σχέση με το βαθμό ανθεκτικότητας στη Σιπροφλοξασίνη και στη Σουλφομεθοξαζόλη

Στο EUCAST δεν παρουσιάζονται στοιχεία για την κατάταξη των στελεχών *S. aureus* με βάση την ευαισθησία τους στην Αμοξικιλίνη. Αν κρίνουμε μονάχα με τις τιμές MIC₆₀ η οποίες μειώθηκαν στην έξοδο, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα ανθεκτικά στελέχη στην είσοδο υπήρξαν σε μεγαλύτερα ποσοστά από ότι στην έξοδο, άρα η παραμονή τους στην ΕΕΛ συνέβαλε στην αύξηση της ευαισθησίας τους.

Όσον αφορά στη συμπεριφορά των στελεχών απέναντι στη Σιπροφλοξασίνη είναι προφανής η ευαισθησία των στελεχών και αυτό προκύπτει και από τις πολύ χαμηλές τιμές MIC₆₀ που εντοπίστηκαν. Στην είσοδο της μονάδας επεξεργασίας το 83,33% των στελεχών χαρακτηρίστηκαν ευαίσθητα στο αντιβιοτικό ενώ τα υπόλοιπα που αντιστοιχούν σε ποσοστό 16,67% μετρίως ευαίσθητα. Στην έξοδο, το 100% των βακτηρίων κατατάσσονται, βάση των ορίων, στην κατηγορία των ευαίσθητων παρόλο που τα τεστ αντιβιοτικών υπέδειξαν μια αύξηση στις τιμές MIC₆₀ των περισσότερων στελεχών. Η αύξηση του ποσοστού αυτού συγκεντρωτικά οφείλεται στο γεγονός ότι τα στελέχη του Μαΐου μονάχα εμφανίστηκαν κατά τρεις φορές περισσότερο ευαίσθητα από ότι τα στελέχη της εισόδου για τον αντίστοιχο μήνα.

Όσον αφορά στη Σουλφομεθοξαζόλη στην είσοδο της μονάδας, το 100% των στελεχών *S. aureus* χαρακτηρίζεται ευαίσθητο. Στα δείγματα ορισμένων μηνών παρουσιάστηκε στην έξοδο της μονάδας αύξηση στις τιμές MIC₆₀, που σημαίνει ότι ενισχύθηκε η ανθεκτικότητα των αντίστοιχων στελεχών. Εντούτοις, οι τιμές αυτές

παρέμειναν αρκετά χαμηλές ώστε αυτά να συνεχίζουν να κατηγοριοποιούνται ως ευαίσθητα με βάση τα όρια που έχουν οριστεί από το EUCAST.

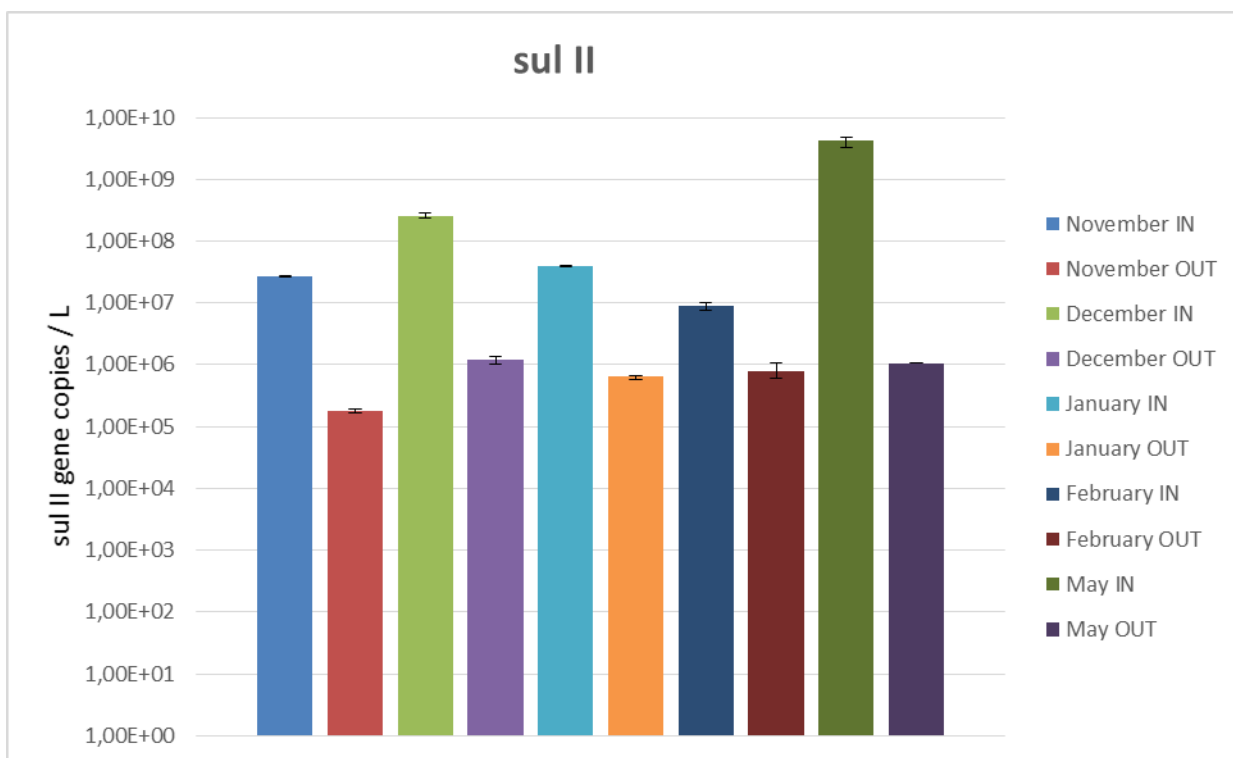
Η τιμή MIC₆₀ των εξεταζόμενων βακτηρίων μετά από την δευτεροβάθμια επεξεργασία και την απολύμανση του λύματος, μπορεί να μεταβληθεί και επομένως να αλλάξει την κατάταξη των βακτηρίων από ανθεκτικά σε ευαίσθητα ή και το αντίστροφο.

Ακόμα και σε ορισμένα στελέχη, όπως αυτά του *S. aureus*, για τα οποία δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη αλλαγή στο χαρακτηρισμό τους μετά από την επεξεργασία, παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις στη τιμή της MIC₆₀ όπως αναλύθηκε και στην προηγούμενη ενότητα.

4.1.5 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΑ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Στα δείγματα από την είσοδο και την έξοδο του βιολογικού, για κάθε μήνα από Νοέμβριο έως Μάιο, έγινε ποσοτικοποίηση γονιδίου ανθεκτικότητας (ARG: Antibiotic Resistance Gene) που αφορά στο αντιβιοτικό Σουλφομεδοξαζόλη (Sulfamethoxazole). Το γονίδιο που διερευνήθηκε ονομάζεται *sul II*. Επίσης, έγινε η αναζήτηση και ποσοτικοποίηση του γονιδίου 16S rRNA που αντιστοιχεί στο συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό. Τα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζουν την ποσότητα των γονιδίων *sul II* και 16S rRNA που εντοπίστηκαν στα δείγματα καθώς και τον λόγο του γονιδίου *sul II* ως προς το συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό που εντοπίστηκε σε κάθε δείγμα.

❖ Γονίδιο *sul II*



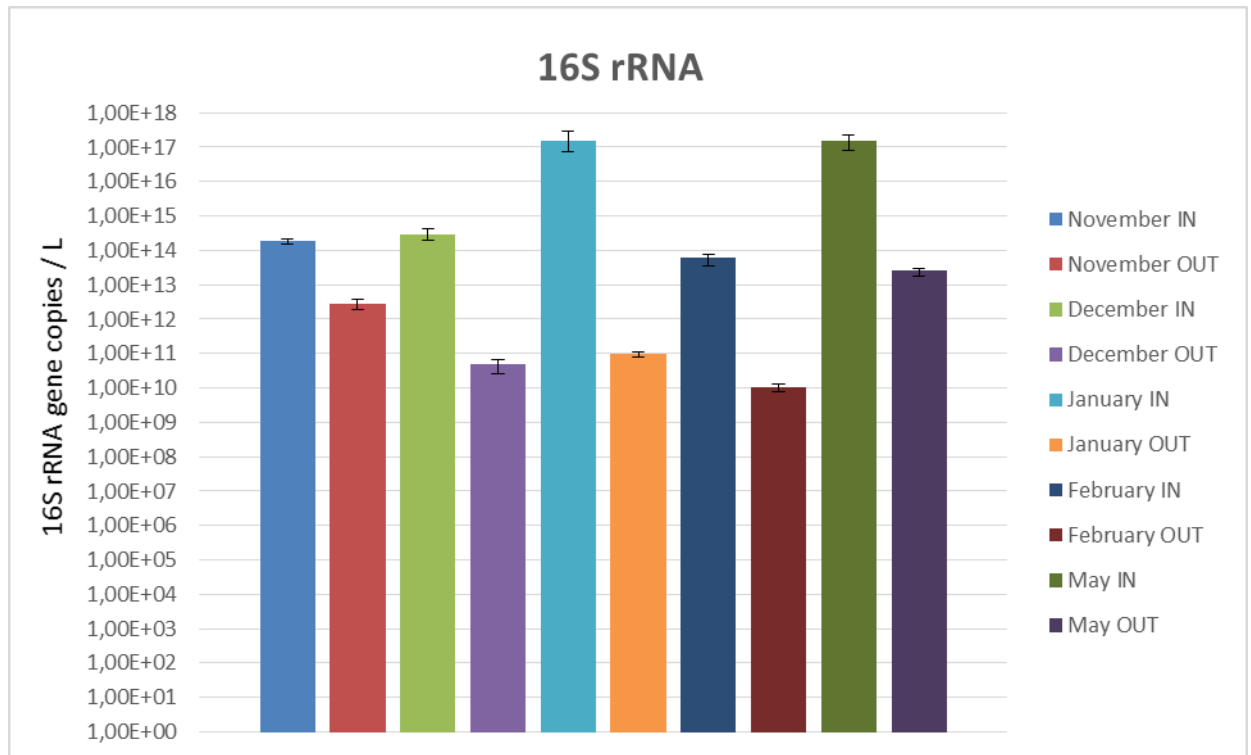
Γράφημα 17. Συγκέντρωση γονιδίου *sul II* (gene copies/ L λύματος)

Στο Γράφημα 17 βλέπουμε ότι η μείωση της συγκέντρωσής του γονιδίου *sul II* στην εκροή του βιολογικού κυμαίνεται σταθερά σε τιμές κοντά στα 2 Logs. Μικρότερη μείωση της συγκέντρωσης στην εκροή του βιολογικού σε σύγκριση με την είσοδο παρατηρήθηκε τον Φεβρουάριο με μόλις 1,06 Logs. Η μεγαλύτερη απομάκρυνση σημειώθηκε τον Μάιο με μείωση της συγκέντρωσής του γονιδίου κατά 3,59 Logs.

Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι οι μέθοδοι απολύμανσης όπως η χλωρίωση, παίζουν σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των ARGs. Είναι γνωστό ότι οι διαδικασίες απολύμανσης οδηγούν στην αδρανοποίηση των ανθεκτικών βακτηρίων καταστρέφοντας το DNA ή το κυτταρικό τους τοίχωμα, όμως ARGs συνεχίζουν να υπάρχουν στα κυτταρικά υπολείμματα και να διαδίδονται. Δείγματα λυμάτων δευτεροβάθμιας επεξεργασίας από μονάδες επεξεργασίας σε πόλη της Κίνας ελέγχθηκαν ως προς τη συγκέντρωση ARGs. Όσον αφορά στο γονίδιο *sul II*, μετά τη

χλωρίωση βρέθηκαν $9,02 \cdot 10^4$ gene copies/mL δείγματος, συγκέντρωση μεγαλύτερη από αυτή των υπολοίπων γονιδίων που ανιχνεύθηκαν. Γενικά, η πληθώρα ARGs μειωνόταν με την αύξηση της δόσης χλωρίου. Η ανάλυση έδειξε ότι η μείωση στον αριθμό των μικροοργανισμών ήταν ο βασικός παράγοντας στην απομάκρυνση των ARGs (Zheng et al., 2017).

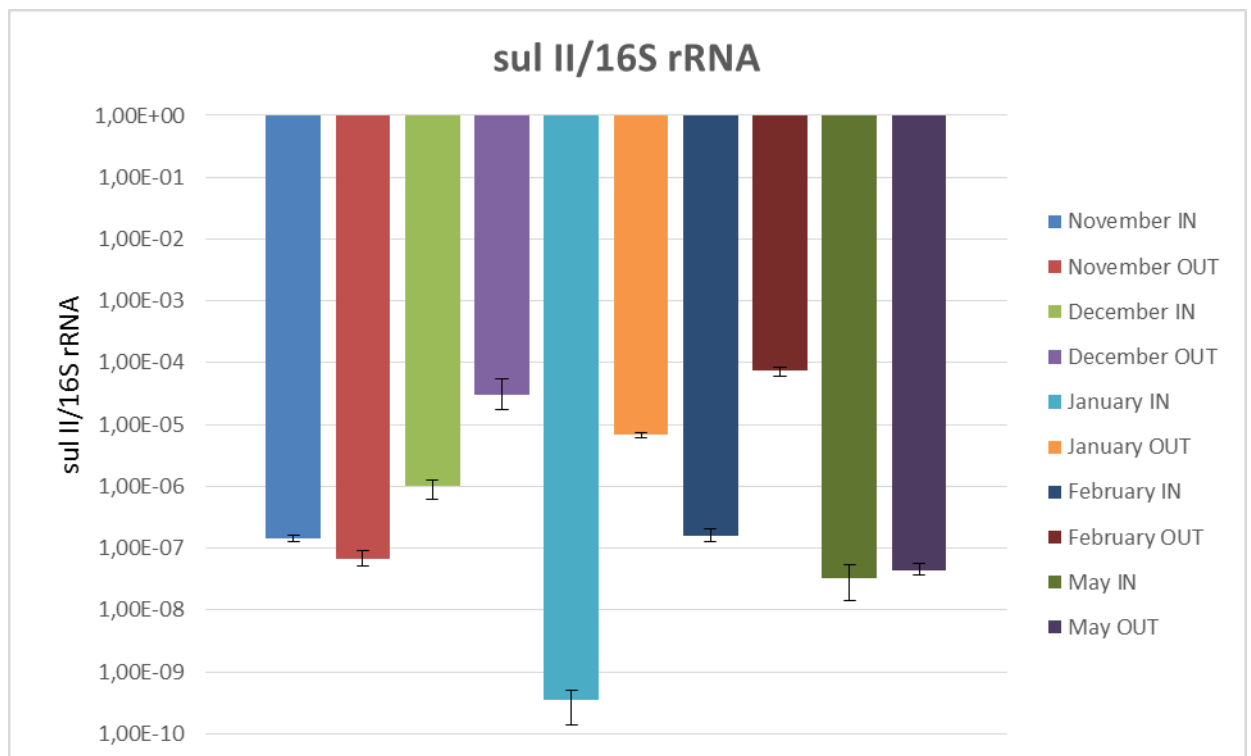
❖ Γονίδιο 16S rRNA



Γράφημα 18. Συγκέντρωση γονιδίου 16S rRNA (gene copies/ L λύματος)

Σχετικά με το γονίδιο 16S rRNA η μείωση της συγκέντρωσης του γονιδίου κυμαίνεται στα πλαίσια 3-6 Logs. Συγκεκριμένα, μικρότερη απομάκρυνση του γονιδίου σημειώθηκε τον Νοέμβριο που μεταφράστηκε σε μείωση κατά 1,82 Logs ενώ η μεγαλύτερη πραγματοποιήθηκε τον Ιανουάριο με 6,22 Logs.

❖ Sul II / 16S rRNA



Γράφημα 19. Συγκέντρωση γονιδίου *sul II* (*gene copies/16S rRNA*)

Στο Γράφημα 19 όπου απεικονίζεται ο λόγος του γονιδίου *sul II* ως προς το συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό, παρατηρούνται κυρίως αρνητικές απομακρύνσεις. Αυτό σημαίνει, ότι η συγκέντρωση του γονιδίου *sul II* ως προς το συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό είναι μεγαλύτερο στην έξοδο της μονάδας επεξεργασίας από ότι στην είσοδο. Το βακτηριακό γενετικό υλικό στο επεξεργασμένο λύμα περιέχει σε μεγαλύτερη αναλογία το συγκεκριμένο γονίδιο ανθεκτικότητας σε σύγκριση με το λύμα εισόδου της μονάδας. Συγκεκριμένα, η αύξηση της συγκέντρωσης ήταν μεγαλύτερη τον Μάιο με διαφορά εισόδου-εξόδου 4,29 Logs. Μονάχα τον Νοέμβριο παρατηρήθηκε μειωμένη συγκέντρωση του γονιδίου κατά μόλις 0,33 Logs.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν στην επί μέρους ποσοτικοποίηση των γονιδίων *sul II* και 16S rRNA ως προς τα δείγματα εισόδου και εξόδου όπου υπήρχε σταθερή μείωση των συγκεντρώσεων τους στην έξοδο της μονάδας, ο λόγος των δύο αυτών γονιδίων υποδεικνύει αύξηση του γονιδίου *sul II* ως προς συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό στην έξοδο της μονάδας.

Η αυξημένη ευαισθησία και των δύο εξεταζόμενων στελεχών που υπέδειξε ο έλεγχος του προφίλ ανθεκτικότητας έναντι της Σουλφομεθοξαζόλης έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα της ποσοτικοποίησης του γονιδίου *sul II* που αφορά σε αυτό το αντιβιοτικό. Η αύξηση ανθεκτικότητας μεμονωμένων στελεχών μπορεί να οφείλεται στην παρουσία άλλων γονιδίων που αφορούν άλλα αντιβιοτικά από την ομάδα των σουλφοναμιδών και δεν εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία.

Πολλές έρευνες έχουν επιβεβαιώσει την σημαντική παρουσία του γονιδίου *sul II* στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Έρευνα που έκανε ανάλυση του λόγου διάφορων γονιδίων όπως και του *sul II* ως προς το 16S rRNA έδειξε ότι από τις 18 κλάσεις

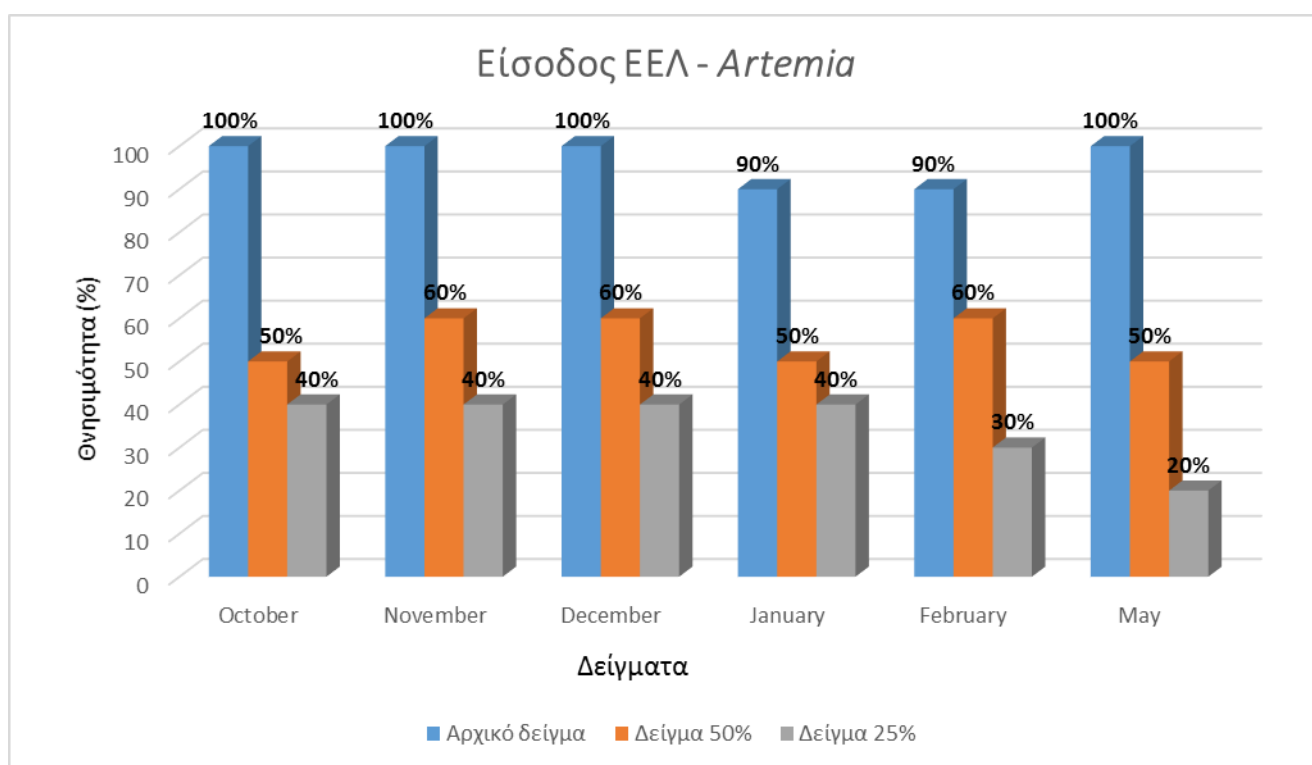
αντιβιοτικών που ελέγχθηκαν, γονίδια που αφορούσαν τις σουλφοναμίδες παρουσίασαν, μεταξύ άλλων, υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης στα επεξεργασμένα λύματα σε σχέση με αυτά πριν την επεξεργασία. Συγκεκριμένα τα ποσοστά εμφάνισης γονιδίων στα μη επεξεργασμένα λύματα ήταν 13,06% ενώ στα επεξεργασμένα 16,86% (Osama S., et al., 2021). Άλλη έρευνα που ανίχνευσε 30 ARGs σε δείγματα προερχόμενα από μονάδες επεξεργασίας λυμάτων κατέδειξε ότι για 12 από αυτά, συμπεριλαμβανομένου και του *sul II*, τα δείγματα εξόδου ήταν εμπλουτισμένα σε σχέση με αυτά της εισόδου (Mao et al., 2015). Οι Wang et al., σε έρευνα τους αναφέρουν ότι η επίμονη παρουσία του *sul II* στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων οφείλεται στη χημική σταθερότητα των σουλφοναμιδών και στην αυξημένη τους διαλυτότητα στο νερό (Wang et al., 2013).

4.2 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Προκειμένου να προσδιοριστεί η οικότοξικότητα των δειγμάτων που προέρχονταν από τη μονάδα επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων πραγματοποιήθηκε δοκιμασία οξείας τοξικότητας με χρήση του βιοδείκτη *Artemia*. Η δοκιμασία αφορούσε τα δείγματα εισόδου και εξόδου της μονάδας και πραγματοποιούνταν μια φορά το μήνα κατά τους μήνες Οκτώβριο ως Φεβρουάριο και Μάιο.

Ακολουθούν τα συγκεντρωτικά διαγράμματα που παρουσιάζουν τα αποτελέσματα του τεστ θνησιμότητας που υπέστη ο βιοδείκτης σε συνάρτηση με τις διαδοχικές αραιώσεις των αρχικών δειγμάτων-λυμάτων προκειμένου να υπολογιστεί το LC₅₀.

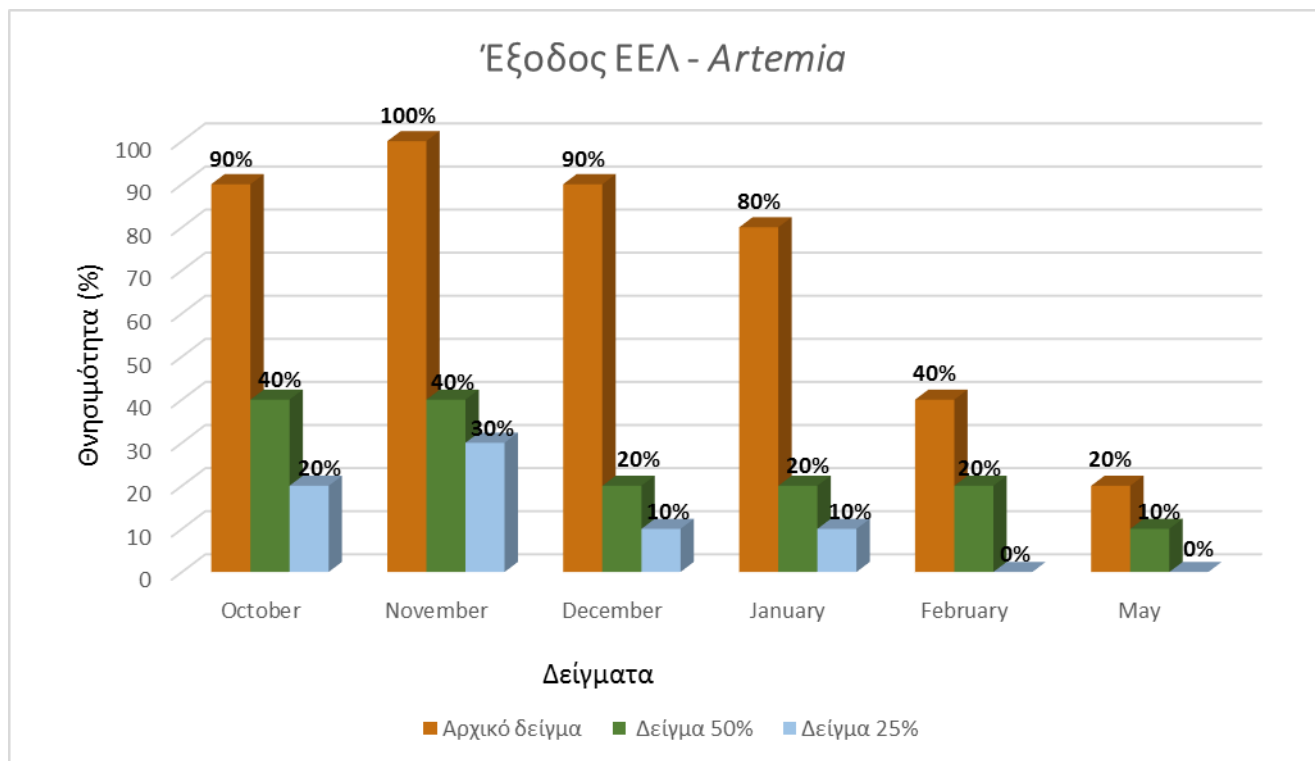
❖ Είσοδος ΕΕΛ



Γράφημα 20. Ποσοστό θνησιμότητας του πληθυσμού *Artemia* παρουσία των δειγμάτων λύματος από την είσοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

Στο Γράφημα 20 φαίνεται ότι στο μη αραιωμένο δείγμα εισόδου τα ποσοστά θνησιμότητας κυμαίνονται από 90-100% γεγονός που καταδεικνύει ότι τα υγρά απόβλητα που φθάνουν στη μονάδα επεξεργασίας είναι άκρως τοξικά για τον συγκεκριμένο βιοδείκτη. Το LC₅₀ εντοπίστηκε για τους μήνες Οκτώβριο, Ιανουάριο και Μάιο στην στο δείγμα που περιέχει το 50% του αρχικού δείγματος, ενώ για τους υπόλοιπους μήνες το LC₅₀ καταγράφηκε σε δείγματα που περιείχαν το αρχικό λύμα σε ποσοστό 37,5 - 41,6 % .

❖ Έξοδος ΕΕΛ



Γράφημα 21. Ποσοστό θνησιμότητας του πληθυσμού *Artemia* παρουσία των δειγμάτων λύματος από την έξοδο της ΕΕΛ (ΔΕΥΑΒΑ) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις

Στο Γράφημα 21 όσον αφορά στο μη αραιωμένο δείγμα εξόδου, αξιοσημείωτη είναι η μεταβολή του ποσοστού θνησιμότητας καθώς από ποσοστά 80 – 100% τους πρώτους μήνες (Οκτώβριο – Ιανουάριο), μειώνεται σε ποσοστό 40% τον Φεβρουάριο ενώ υποδιπλασιάζεται τον μήνα Μάιο σε ποσοστό 20%. Το LC_{50} για τους πρώτους μήνες εντοπίζεται στα δείγματα που περιείχαν 41,48% του αρχικού λύματος και 60% αυτού τον Δεκέμβριο. Τους μήνες Φεβρουάριο και Μάιο φαίνεται καθαρά και στο γράφημα ότι το μη αραιωμένο δείγμα είναι λιγότερο τοξικό αφού το ποσοστό θνησιμότητας δε ξεπερνάει το 40% γεγονός που δεν επέτρεψε τον προσδιορισμό του LC_{50} .

Πράγματι, σε έρευνα των M.I Vasquez και D.Fatta-Kassinos, αποδείχθηκε ότι τα είδη *Artemia* sp. είναι λιγότερο ευαίσθητα σε λύματα που έχουν υποστεί χημική επεξεργασία. Επίσης, δοκιμές οξείας τοξικότητας στις οποίες έχουν υποβληθεί οργανισμοί που ανήκουν στην ίδια κατηγορία (καρκινοειδή) με την *Artemia*, έχουν αποδείξει ότι μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία η τοξικότητα των λυμάτων μειώνεται σε βαθμό που παύει να είναι θανατηφόρα για τους οργανισμούς-δείκτες (Younghee, Farnazo, 2017).

Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι όπως τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αποκτούν ανθεκτικότητα σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες, έτσι και οργανισμοί όπως τα είδη *Artemia* έχουν εξελιχθεί μέσα στα χρόνια και αυτός είναι ένας από τους λόγους που μπορούν και προσαρμόζονται σε αντίξοες συνθήκες όπως αυτές της

υψηλής αλατότητας. Οι ΕΕΛ, πέρα από «hot spot» γονιδίων ανθεκτικότητας, αποτελούν μέρος όπου βασικά στοιχεία της διατροφής των ειδών *Artemia* όπως βακτήρια, πρωτόζωα και άλγη, υπάρχουν σε αφθονία, συνθήκες που τις καθιστούν ιδανικό περιβάλλον για την εξέλιξη του οργανισμού (Nunes, et al., 2006).

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι άξονες πάνω στους οποίους κινήθηκε η έρευνα στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ήταν:

- ❖ Η απόδοση της μονάδας επεξεργασίας ως προς την απομάκρυνση επιλεγμένων βακτηριακών δεικτών
 - ❖ Ο έλεγχος του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηριακών δεικτών σε τρία συγκεκριμένα αντιβιοτικά
 - ❖ Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση γονιδίου που σχετίζεται με ένα από τα τρία εξεταζόμενα αντιβιοτικά
 - ❖ Ο έλεγχος των λυμάτων ως προς την οικοτοξικότητα τους
- Ως προς την *απομάκρυνση των βακτηριακών δεικτών* οι διεργασίες της εγκατάστασης και συγκεκριμένα η απολύμανση με χλώριο φαίνεται να αποδίδουν εξαιρετικά για την *K. pneumoniae* αφού το ποσοστό απομάκρυνσης της ήταν σταθερά στο 99%. Μικρότερες απομακρύνσεις σημειώθηκαν για τον *S. aureus* με αποδόσεις 79-99% γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα Gram (+) βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά στη χλωρίωση από ότι τα Gram (-) (Mir et al., 1997).
- Τα συμπεράσματα ως προς τον *έλεγχο ανθεκτικότητας* περιγράφονται καλύτερα κοιτώντας ξεχωριστά τα αποτελέσματα σε σχέση με το κάθε εξεταζόμενο αντιβιοτικό και σε σχέση με το εκάστοτε μελετώμενο βακτήριο.

Στην κατηγορία των ευαίσθητων κατατάσσεται η πλειοψηφία των στελεχών που εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία, όμως για τα ανθεκτικά εμφανίστηκαν τάσεις αυξημένης αντοχής απέναντι σε συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Αν λάβουμε υπόψιν και όσα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως μετρίως ευαίσθητα τότε η πλειοψηφία των στελεχών παρουσίασε ανθεκτικότητα στην Αμοξικιλίνη. Δεύτερη στη κατάταξη είναι η Σουλφομεθοξαζόλη ενώ για τη Σιπροφλοξασίνη μόνο το ένα από τα δύο εξεταζόμενα βακτήρια (*K. pneumoniae*) παρουσίασε στελέχη ανθεκτικά στη Σιπροφλοξασίνη αλλά και αυτά σε μικρά ποσοστά σε σχέση με τα αντίστοιχα στα άλλα δύο αντιβιοτικά.

Τα στελέχη *K. pneumoniae* αποδείχθηκαν ανθεκτικά στην Αμοξικιλίνη και το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από τις υψηλές τιμές MIC₆₀ τόσο στην είσοδο όσο και στην έξοδο του βιολογικού καθαρισμού. Όμως, δεν μπορεί να προκύψει ακέραιο συμπέρασμα για το πώς αλλάζει το προφίλ ανθεκτικότητας μετά την επεξεργασία αφού ως προς την Αμοξικιλίνη για τους μισούς μήνες αυξήθηκε η ανθεκτικότητα ενώ για τους άλλους μισούς μειώθηκε. Γενικευμένη μείωση της ανθεκτικότητας παρουσίασαν τα στελέχη *K. pneumoniae* στη Σιπροφλοξασίνη με χαμηλότερες τιμές MIC₆₀ στην έξοδο από ότι στην είσοδο. Όσον αφορά στη Σουλφομεθοξαζόλη, τα στελέχη απέκτησαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα συνολικά με αυξημένες τιμές MIC₆₀ που προέκυψαν μετά την

επεξεργασία σε σύγκριση με αυτές που μετρήθηκαν στα δείγματα που προέρχονταν από την εισροή.

Οι ήδη ευαίσθητοι *S. aureus* μετά την επεξεργασία τους έγιναν ακόμα πιο ευαίσθητοι στην Αμοξικιλίνη. Σχετικά με τη Σιπροφλοξασίνη τα περισσότερα στελέχη εμφάνισαν αύξηση της ανθεκτικότητας μετά την επεξεργασία με διπλάσιες σχεδόν τιμές MIC₆₀ που όμως παρέμειναν αρκετά χαμηλές σε σχέση με τα πρωτόκολλα, κατατάσσοντας έτσι τα στελέχη αυτά ευαίσθητα στο αντιβιοτικό. Όσον αφορά στη Σουλφομεθοξαζόλη, τα στελέχη παρουσίασαν στην πλειοψηφία τους αυξημένες τιμές MIC₆₀ στην έξοδο του βιολογικού καθαρισμού, υποδηλώνοντας αύξηση της ανθεκτικότητας απέναντι στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό.

Η γενικευμένη ευαισθησία των στελεχών *S. aureus* στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά έρχεται σε αντίθεση με την ανθεκτικότητα τους έναντι στη χλωρίωση. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι τιμές χαμηλές ή υψηλές τιμές MIC₆₀ που κατατάσσουν τα βακτήρια ευαίσθητα ή ανθεκτικά απέναντι σε αντιβιοτικά δεν συνδέονται άρρηκτα με τα ποσοστά απομάκρυνσης των στελεχών από τα υγρά απόβλητα

- Αναφορικά με την *ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του γονιδίου sul II* , η συγκέντρωση του φάνηκε να μειώνεται από τα δείγματα εισροής στα δείγματα εκροής όμως ο λόγος του sul II προς το συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό ήταν μεγαλύτερος στα δείγματα εκροής απ' ότι στα δείγματα εκροής.

Έρευνες έχουν αναδείξει την αναγέννηση ή επαναενεργοποίηση βακτηρίων ανθεκτικών σε αντιβιοτικά μετά τη χλωρίωση. Συσχετίζουν την αύξηση του ποσοστού των ARGs στις εκροές των βιολογικών με τον τύπο ανθεκτικότητας, δηλαδή σε ποια κλάση αντιβιοτικών φέρουν ανθεκτικότητα τα βακτήρια που επαναδραστηριοποιούνται, την δόση του χλωρίου που χρησιμοποιείται, τον τρόπο λειτουργίας της μονάδας και το χρόνο αποκατάστασης μετά τη χλωρίωση (Huang et al., 2011) , (Bouki et al., 2013).

Το ερώτημα αν η αναγέννηση των βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά γίνεται σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι για τα ευαίσθητα βακτήρια δε μπορεί να απαντηθεί με σιγουριά και χρήζει περεταίρω διερεύνησης. Όμως αυτό που αποδεικνύεται συνεχώς είναι ότι με την επεξεργασία των λυμάτων μπορεί να μειώνεται το βακτηριακό φορτίο, όμως η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών δεν συνοδεύεται από την απομάκρυνση του γενετικού υλικού που αυτοί φέρουν. Καθίσταται προφανές, ότι τα γονίδια παραμένουν σε μεγάλο βαθμό ανέπαφα και άρα ο κίνδυνος μεταφοράς τους μέσω των εκροών στο υδάτινο περιβάλλον παραμένει υψηλός.

- Ο έλεγχος *οικοτοξικότητας* που πραγματοποιήθηκε για τα δείγματα απέδειξε ότι τα ανεπεξέργαστα λύματα είναι εξαιρετικά τοξικά για τον βιοδείκτη *Artemia* αφού τα ποσοστά θνησιμότητας ήταν 90% και 100% και το LC₅₀ εντοπιζόταν

στις αρκετά μεγάλες αραιώσεις του δείγματος που άγγιζαν έως και το 80% επί του αρχικού. Ωστόσο, η επεξεργασία στην εγκατάσταση έδειξε να μειώνει την τοξικότητα των λυμάτων για τον συγκεκριμένο βιοδείκτη. Τα ποσοστά θνησιμότητας σε σχέση με τα αντίστοιχα στα δείγματα εισόδου παρουσιάστηκαν κατά βάση μειωμένα και άγγιξαν και το αρκετά χαμηλό ποσοστό θνησιμότητας της τάξεως του 20%. Το LC_{50} εντοπίστηκε χαμηλότερα, σε ποσοστά περιεκτικότητας σε αρχικό δείγμα 41-60%. Τα βελτιωμένα αποτελέσματα ως προς την οικοτοξικότητα μετά την επεξεργασία στην εγκατάσταση σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα απόβλητα της εκροής αραιώνονται με την απελευθέρωση τους στους υδάτινους αποδέκτες αποδεικνύει ότι η επεξεργασία τους είναι αρκετά ωφέλιμη για το περιβάλλον.

6 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Η περαιτέρω επιστημονική έρευνα όσον αφορά στο συγκεκριμένο θέμα θα μπορούσε να περιλαμβάνει τα εξής:

- ❖ Επέκταση του χρονικού πλαισίου με έλεγχο δειγμάτων κατά τη θερινή περίοδο όπου η παροχή εισόδου στη μονάδα επεξεργασίας είναι η μέγιστη όλου του χρόνου.
- ❖ Έλεγχος ανθεκτικότητας των συγκεκριμένων βακτηριακών στελεχών και σε άλλες ομάδες αντιβιοτικών ουσιών (κεφαλοσπορίνες, τετρακυκλίνες, καρβαπενέμες, αμινογλυκοσίδες, μακρολίδες).
- ❖ Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας έναντι ποικιλίας αντιβιοτικών

Σχετικά με τον έλεγχο οικοτοξικότητας σε υγρά απόβλητα προτείνεται:

- ❖ Έλεγχος οικοτοξικότητας με χρήση βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται για χρόνια από ερευνητές και διέπονται από καθορισμένα πρωτόκολλα όπως η *Daphnia magna*
- ❖ Έλεγχος οικοτοξικότητας σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων λύματος και με περισσότερες επαναλήψεις

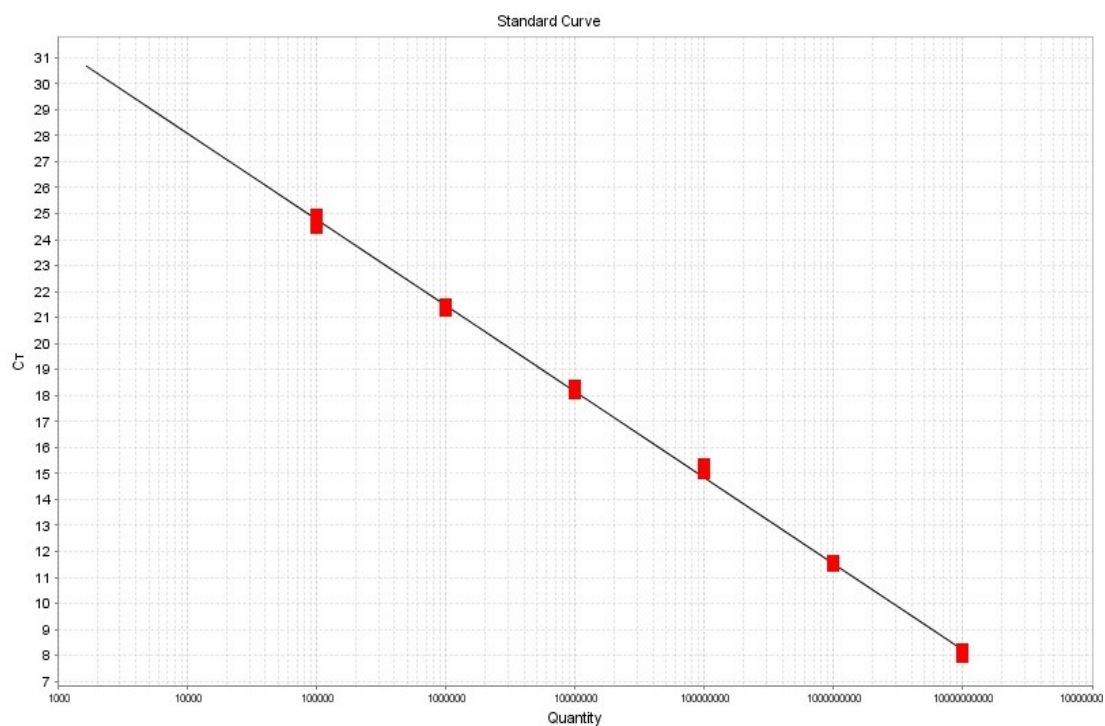
7 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

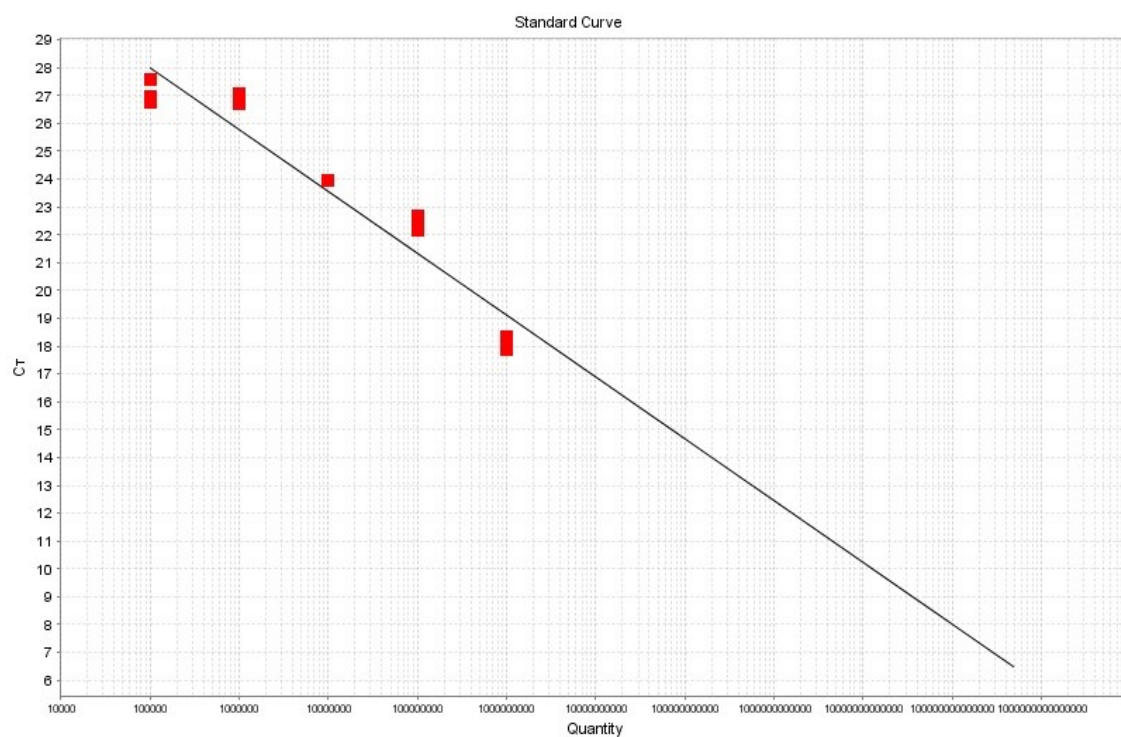
Πίνακας 9. Οπτική απορρόφηση και συγκέντρωση DNA σε κάθε δείγμα

Μήνας	Δείγμα ΔΕΥΑΒΑ	R ($OD_{\frac{260\text{ nm}}{280\text{ nm}}}$)	DNA Concentration (ng/μL)
Νοέμβριος	Είσοδος	1,78	14,3
	Έξοδος	1,74	11
Δεκέμβριος	Είσοδος	1,78	7,4
	Έξοδος	1,61	4,8
Ιανουάριος	Είσοδος	1,83	12,1
	Έξοδος	1,64	11,2
Φεβρουάριος	Είσοδος	1,83	7,1
	Έξοδος	1,72	6,4
Μάιος	Είσοδος	2,11	100,7
	Έξοδος	1,97	7,9

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ – Real Time PCR



Εικόνα 19. Πρότυπη καμπύλη RT-PCR γονιδίου *sul II* (slope: -3,302 R^2 :0,999)



Εικόνα 20. Πρότυπη καμπύλη RT-PCR γονιδίου 16S rRNA (slope: -2,218 R^2 : 0.92)

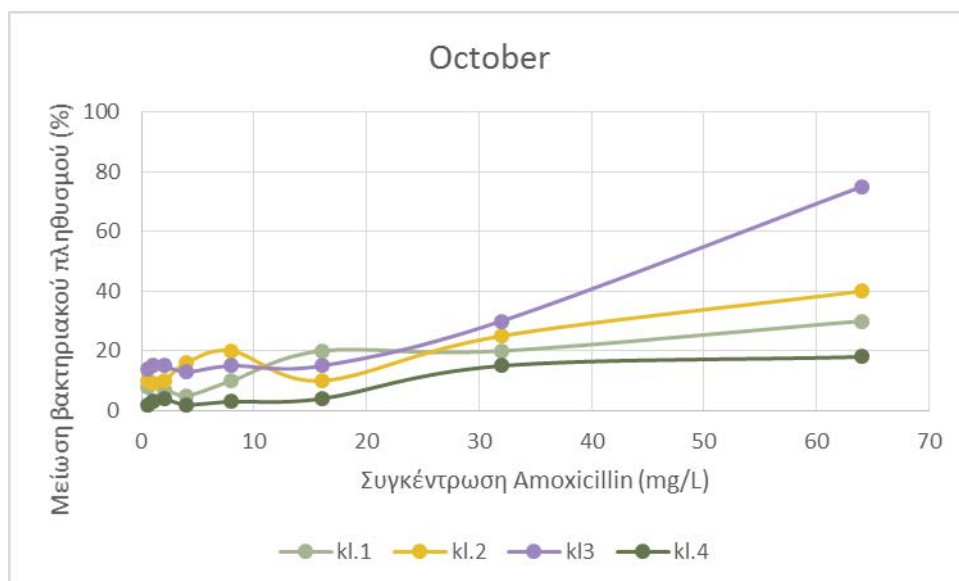
ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΟΛΑ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ

Πίνακας 10. Συνοτομογραφίες στελεχών που απομονώθηκαν από την είσοδο και την έξοδο της μονάδας επεξεργασίας

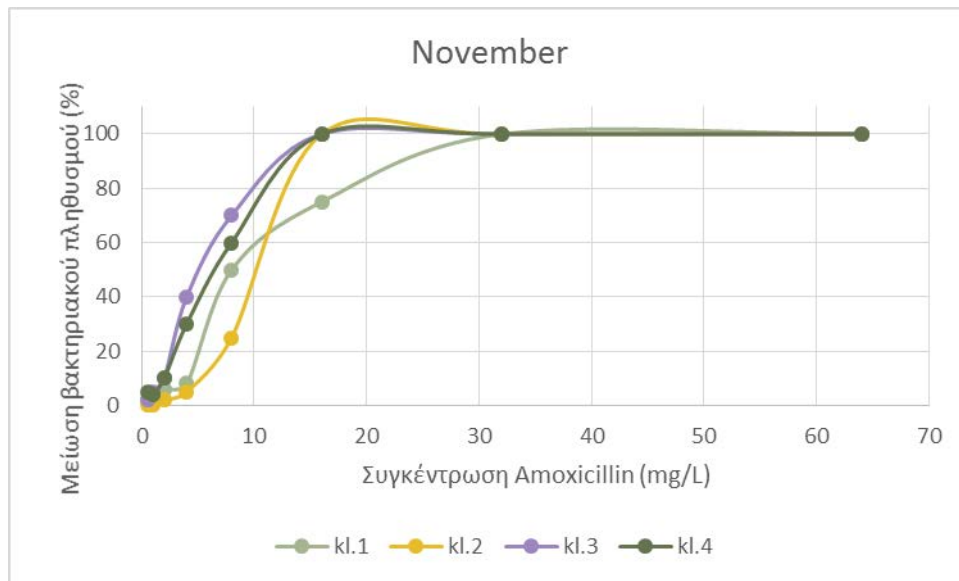
kl.1	1 ^ο στέλεχος <i>K. pneumoniae</i> εισόδου	st.1	1 ^ο στέλεχος <i>S. aureus</i> εισόδου
kl.2	2 ^ο στέλεχος <i>K. pneumoniae</i> εισόδου	st.2	2 ^ο στέλεχος <i>S. aureus</i> εισόδου
kl.3	3 ^ο στέλεχος <i>K. pneumoniae</i> εξόδου	st.3	3 ^ο στέλεχος <i>S. aureus</i> εξόδου
kl.4	4 ^ο στέλεχος <i>K. pneumoniae</i> εξόδου	st.4	4 ^ο στέλεχος <i>S. aureus</i> εξόδου

AMOXICILLIN

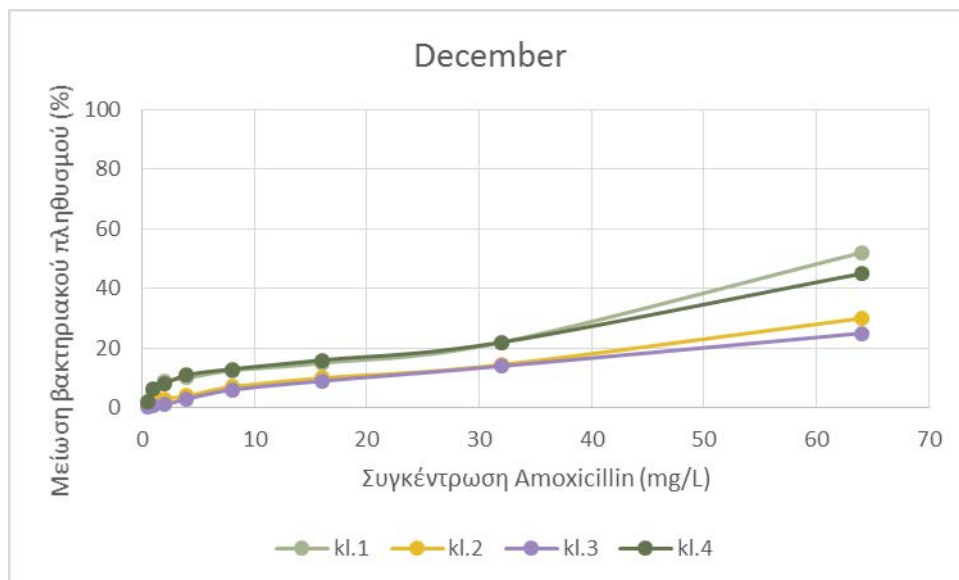
❖ *K. pneumoniae*



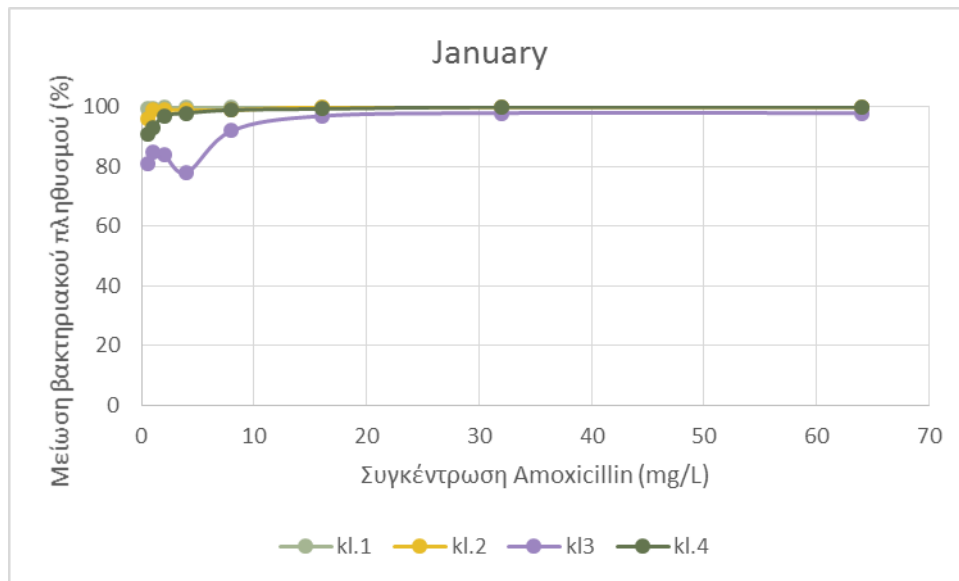
Γράφημα 22. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης



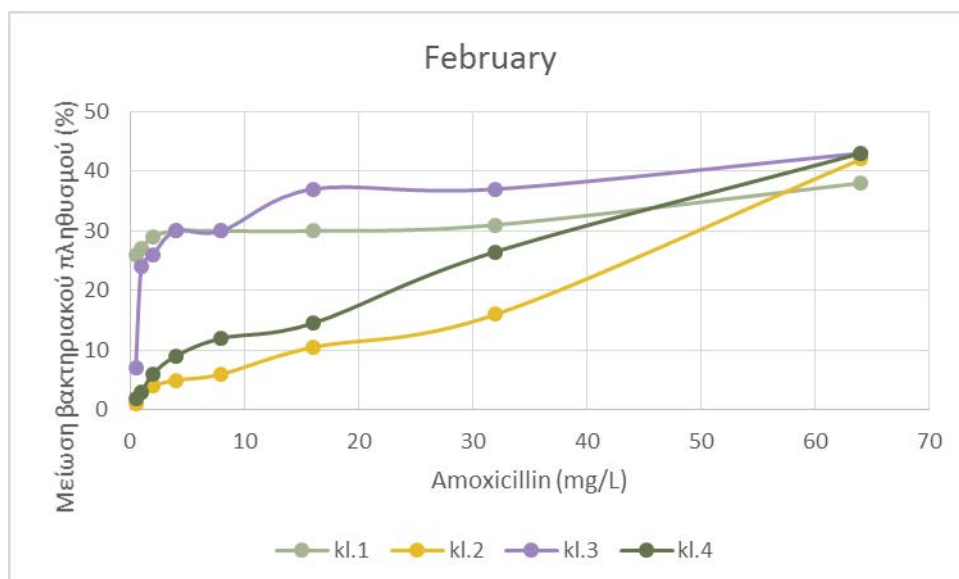
Γράφημα 23. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης



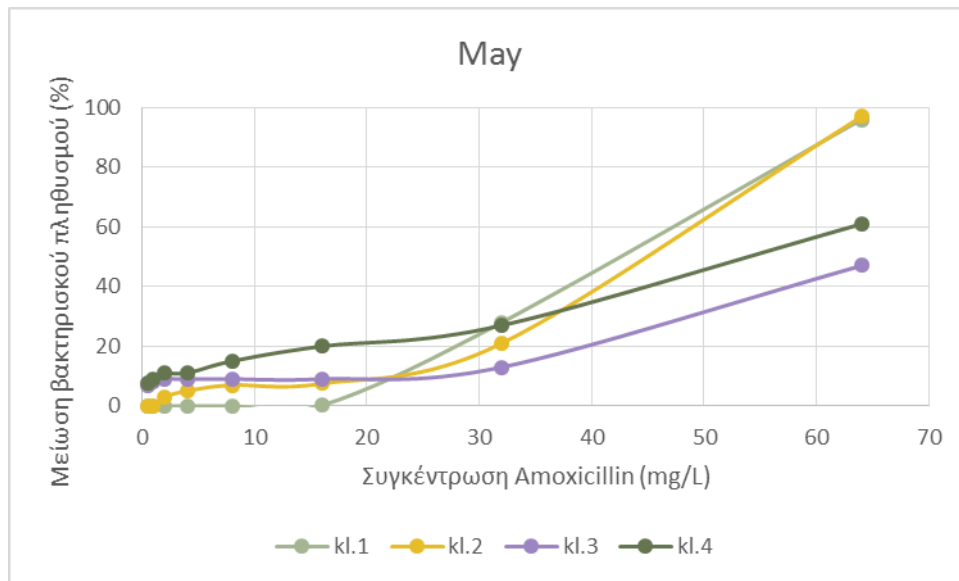
Γράφημα 24. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης



Γράφημα 25. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης

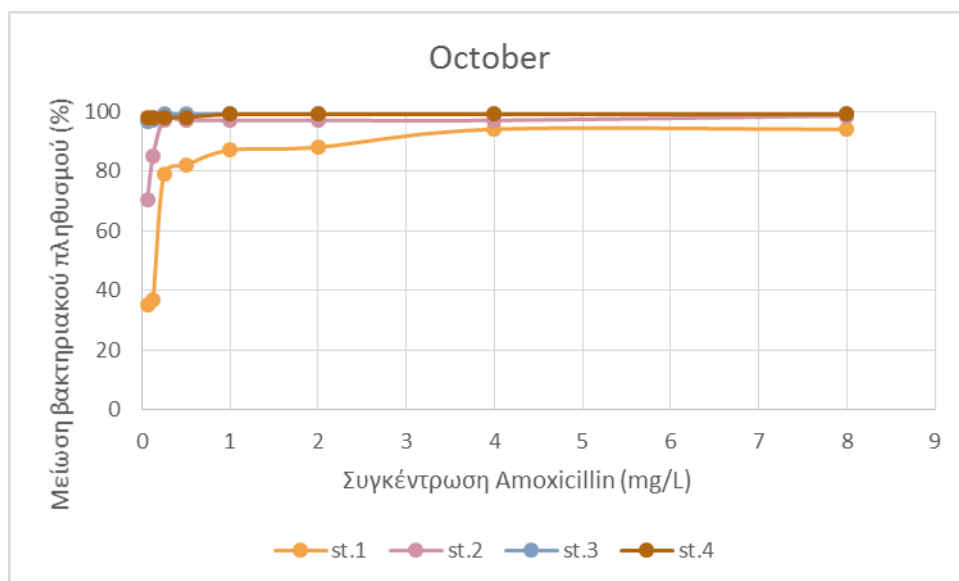


Γράφημα 26. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* της συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης

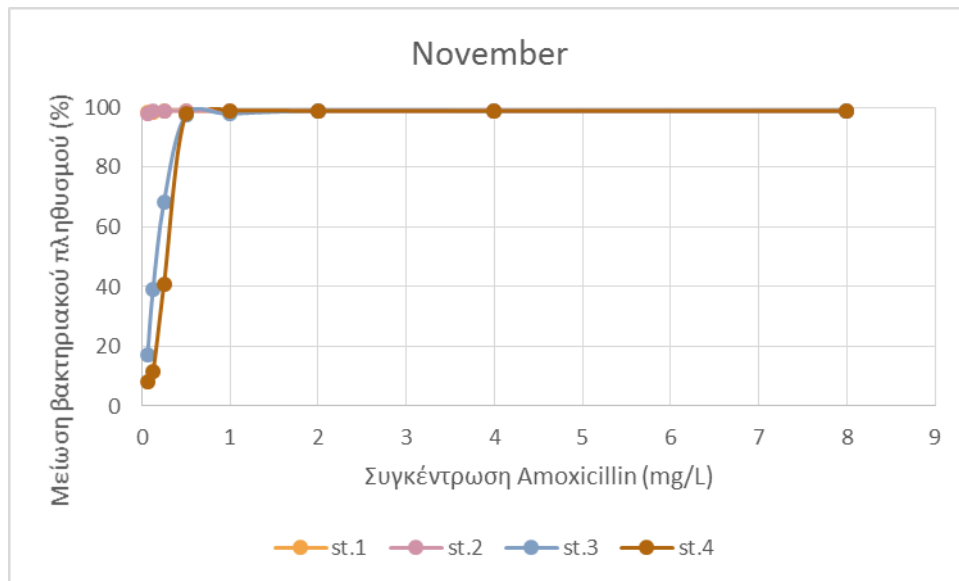


Γράφημα 27. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης

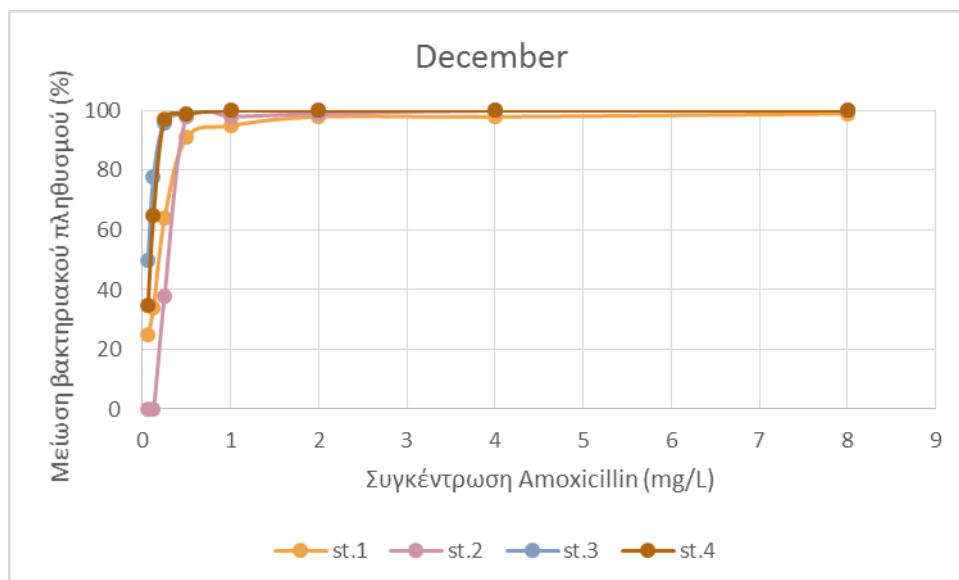
❖ *S. aureus*



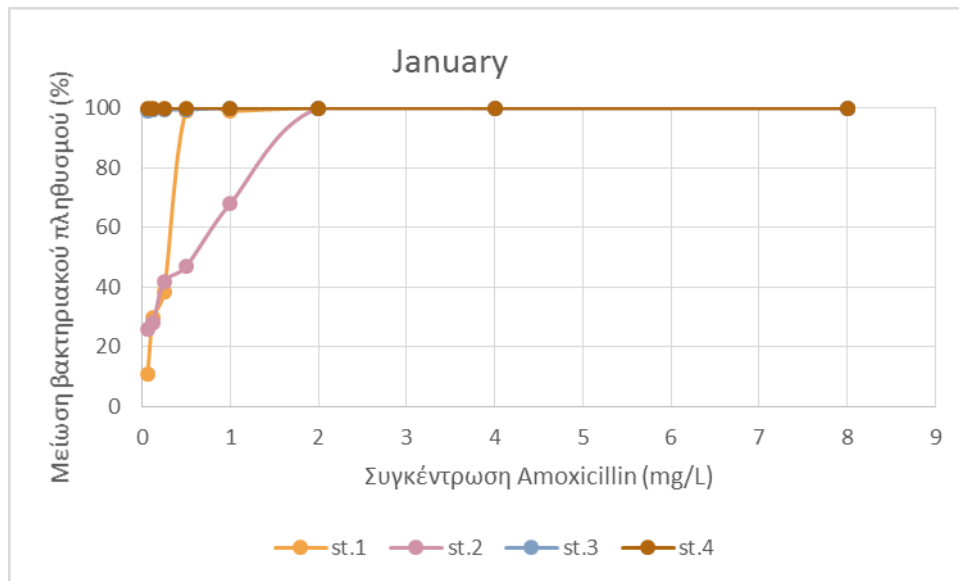
Γράφημα 28. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης



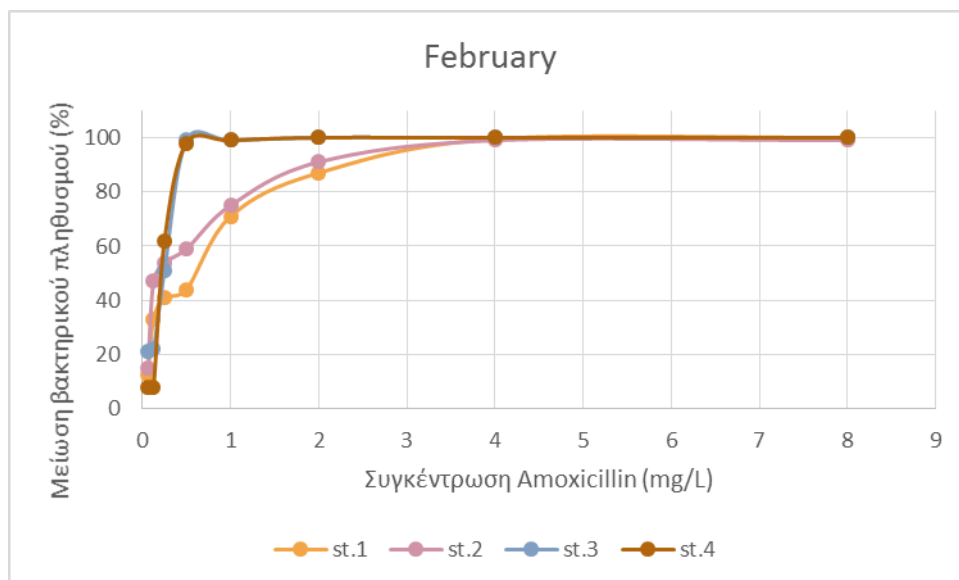
Γράφημα 29. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης



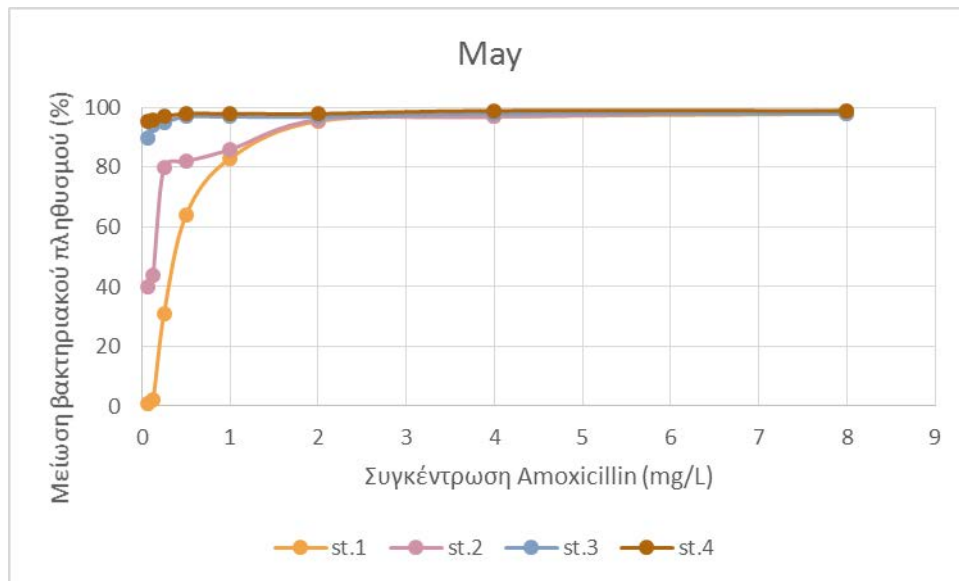
Γράφημα 30. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης



Γράφημα 31. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης



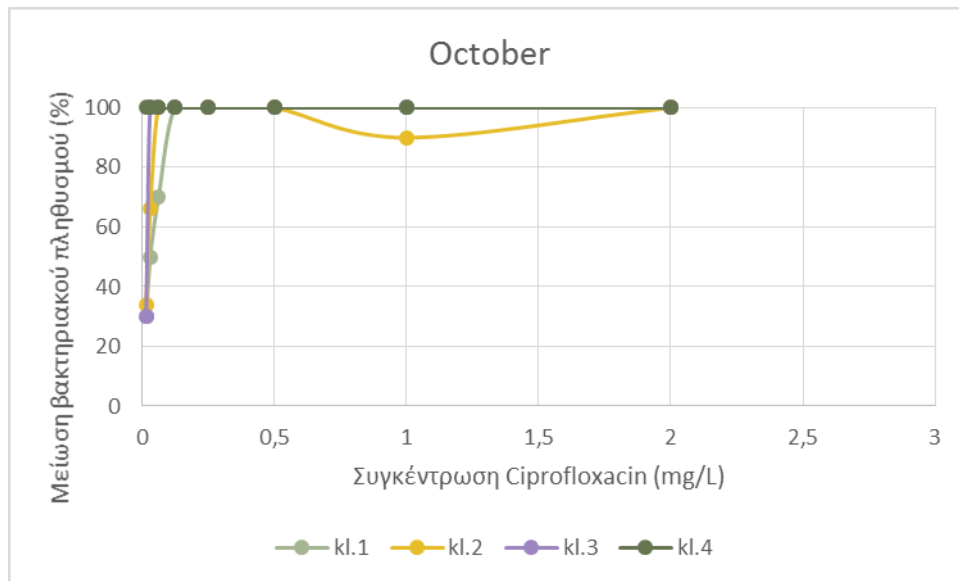
Γράφημα 32. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης



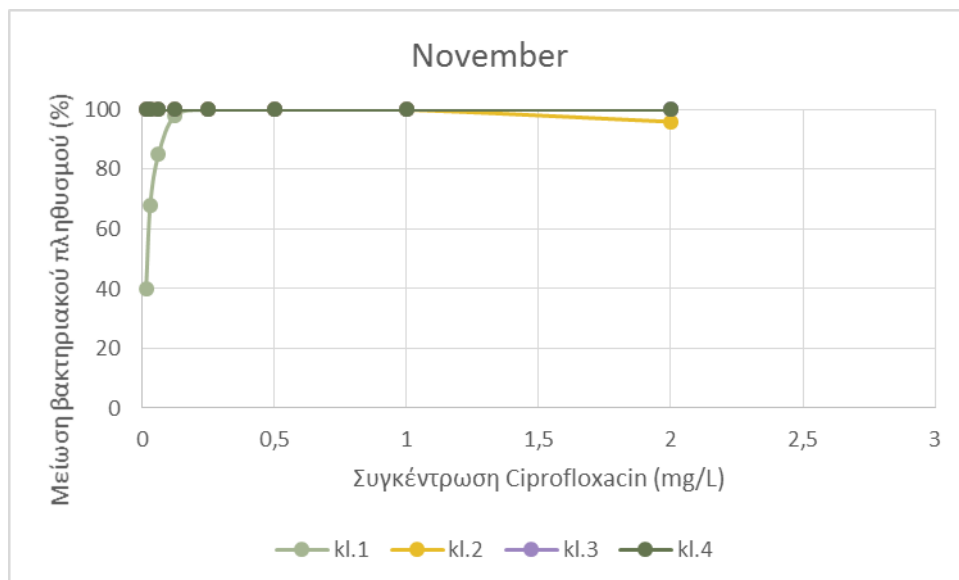
Γράφημα 33. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Αμοξικιλίνης

CIPROFLOXACIN

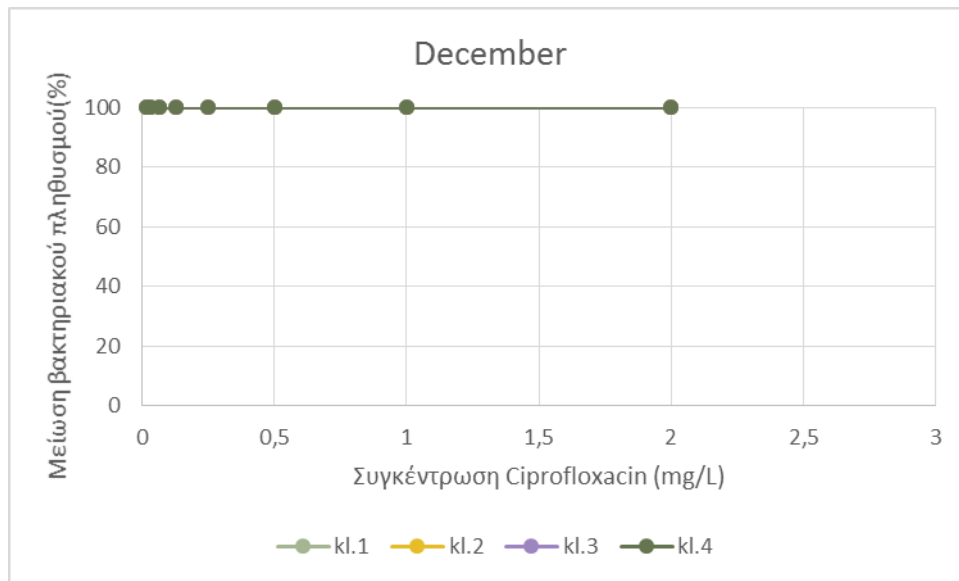
❖ *K. pneumoniae*



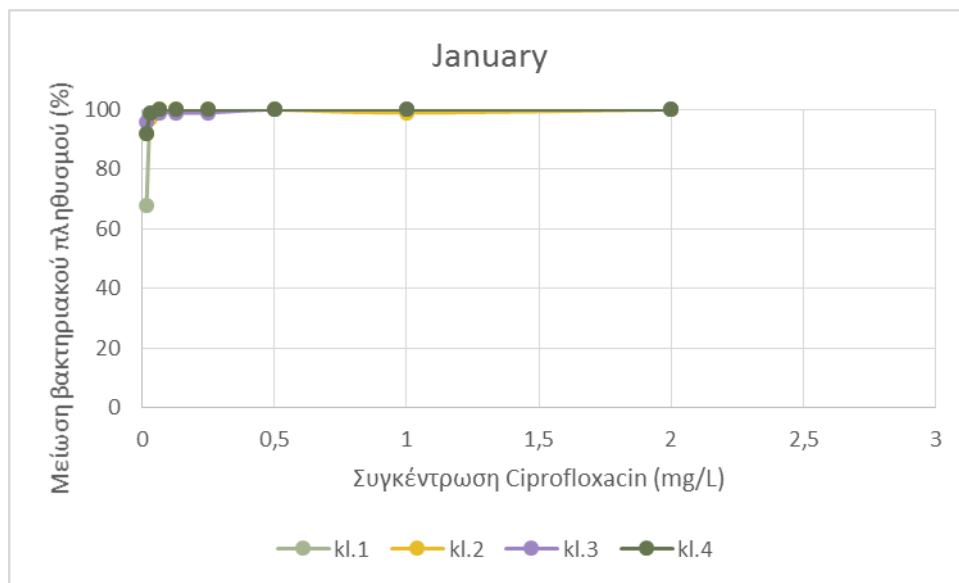
Γράφημα 34. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης



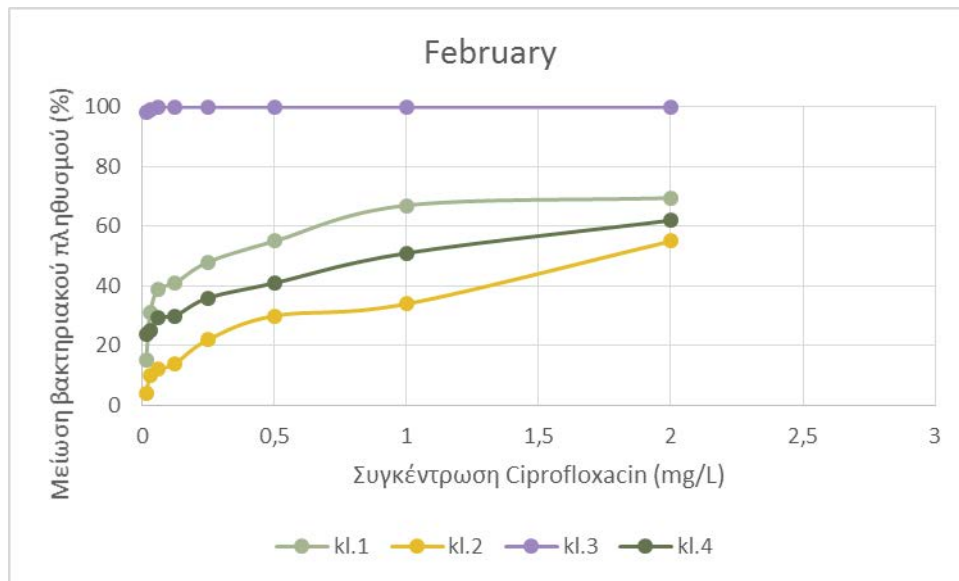
Γράφημα 35. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης



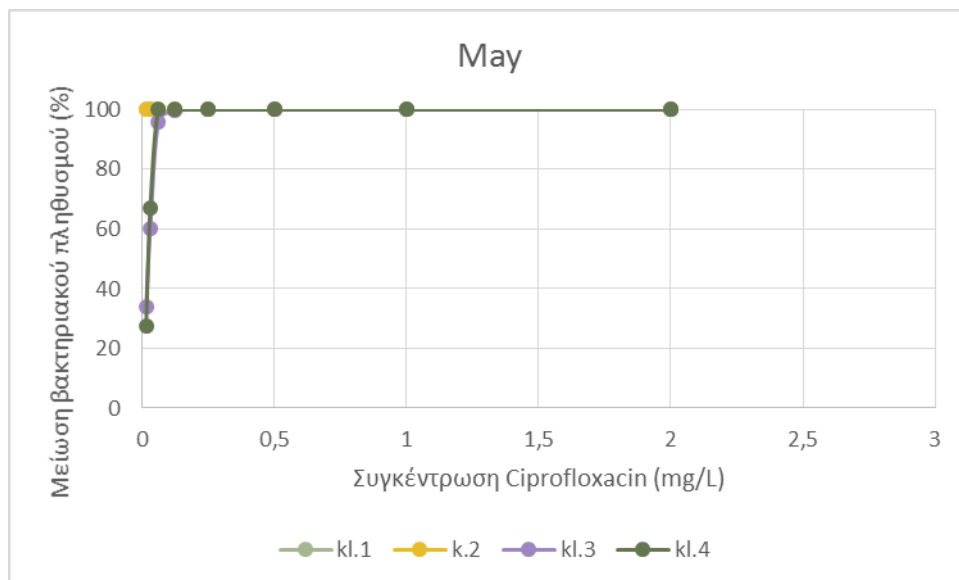
Γράφημα 36. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης



Γράφημα 37. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης

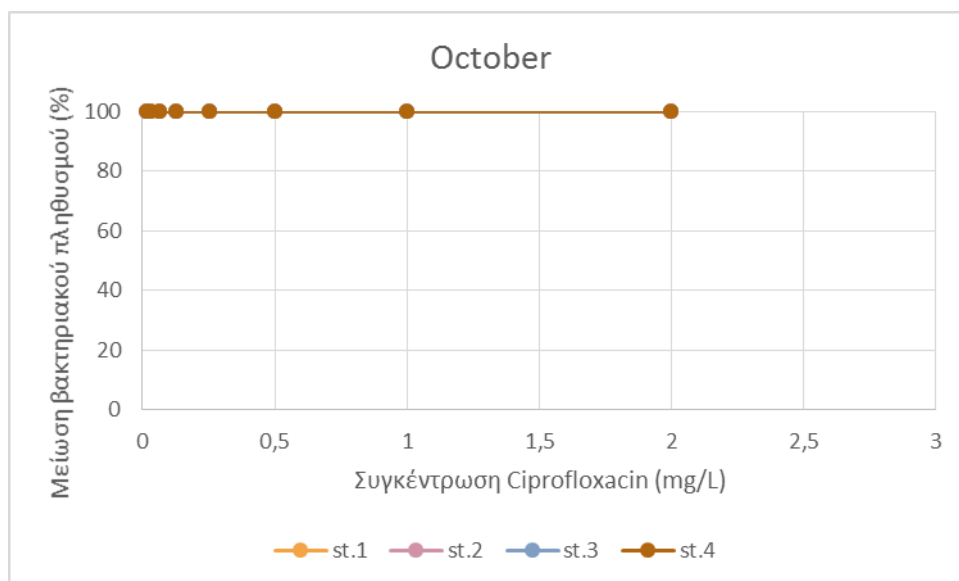


Γράφημα 38. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης

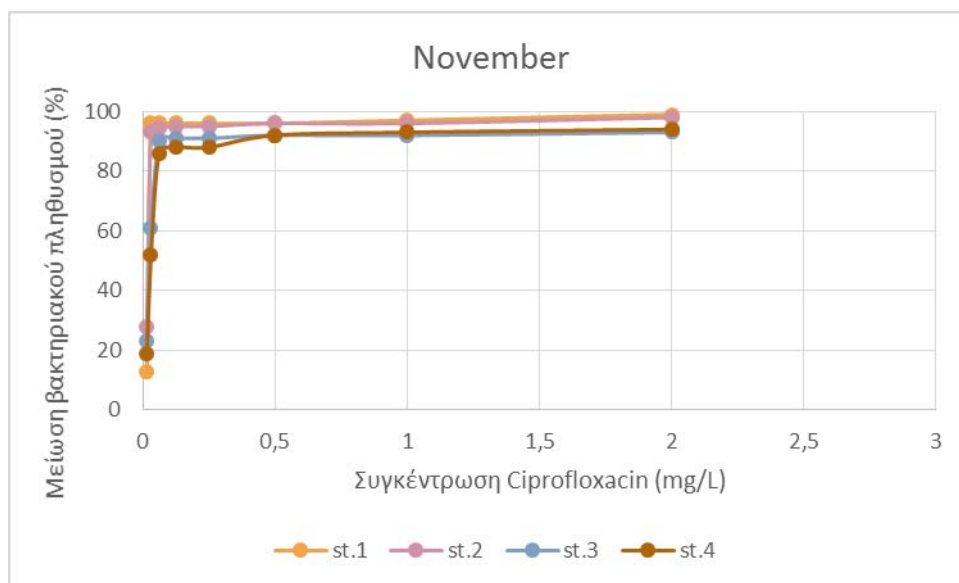


Γράφημα 39. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης

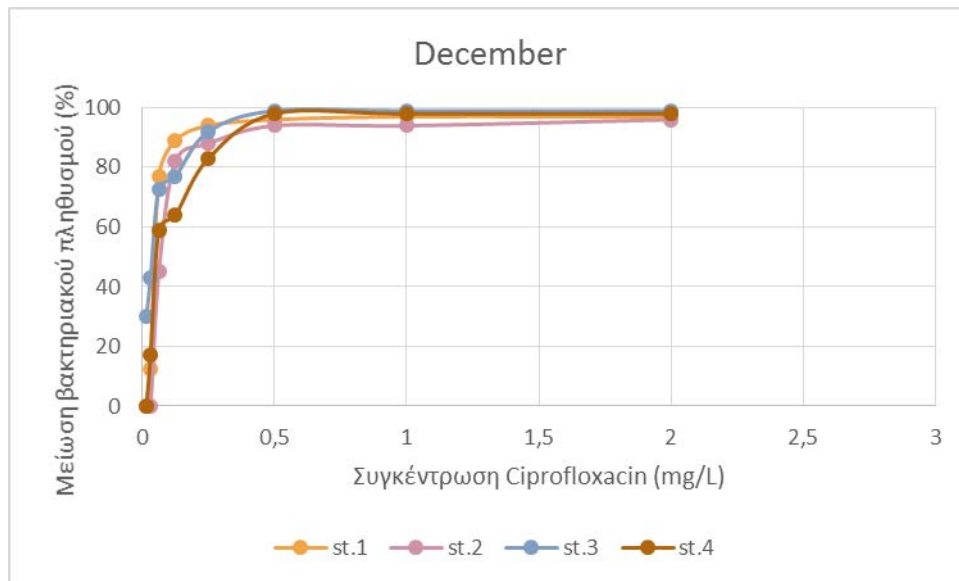
❖ *S. aureus*



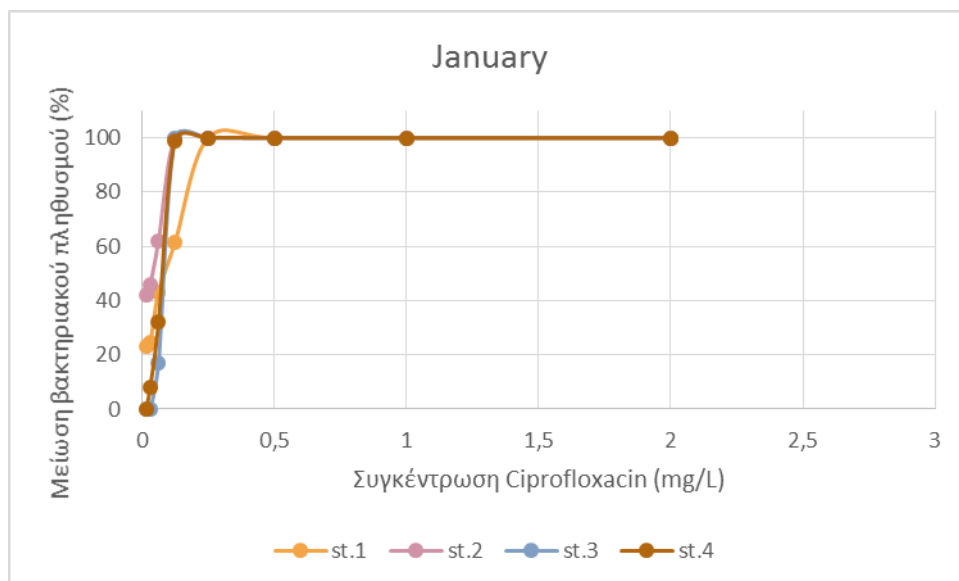
Γράφημα 40. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης



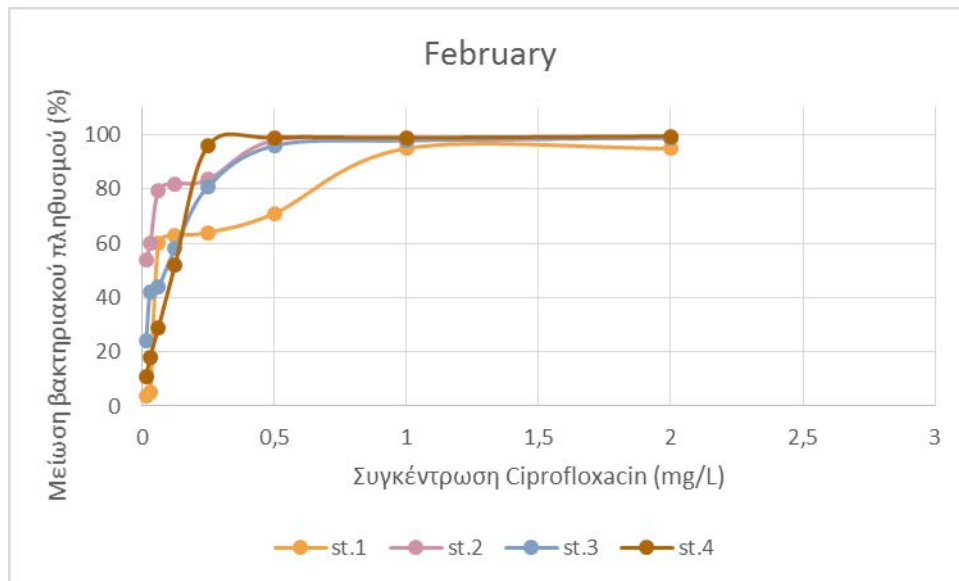
Γράφημα 41. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης



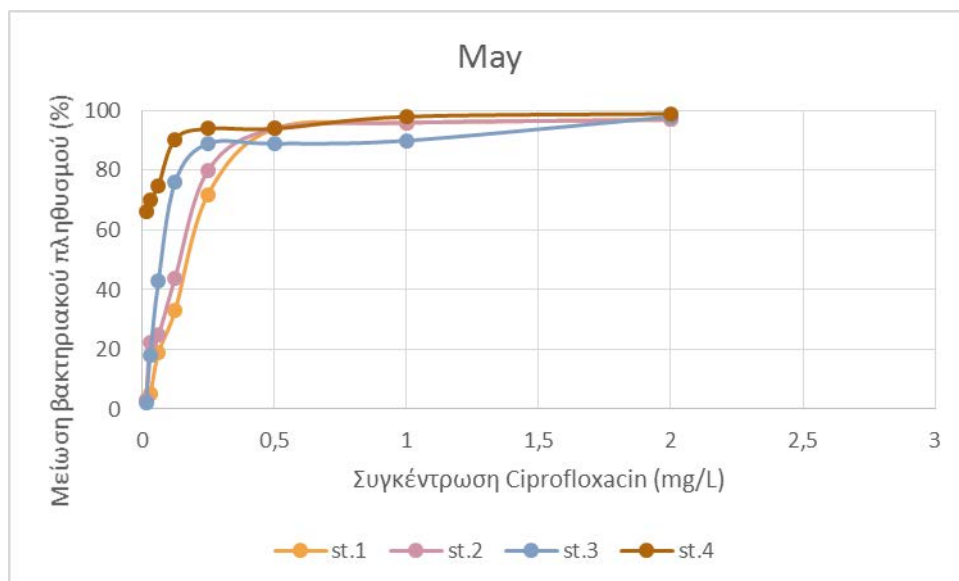
Γράφημα 42. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης



Γράφημα 43. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης



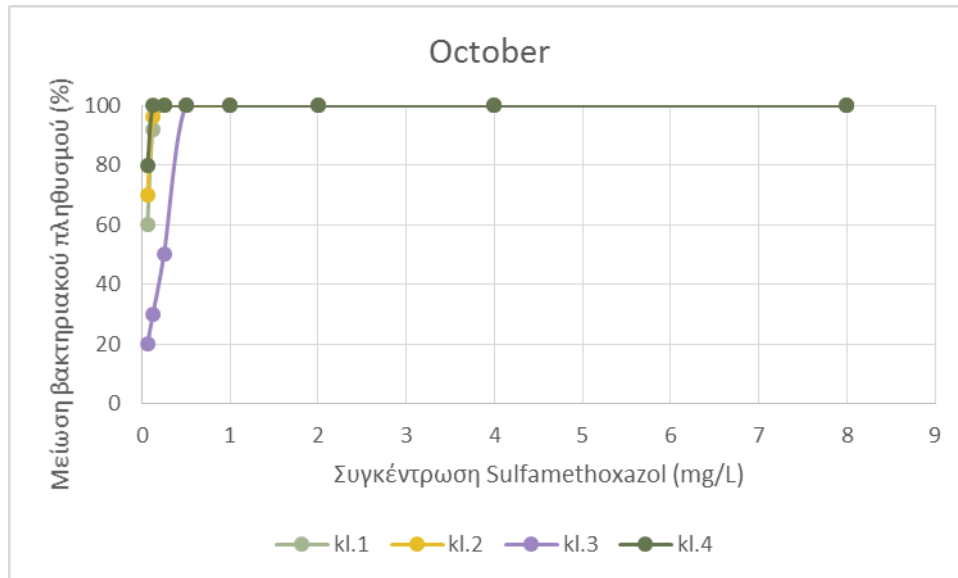
Γράφημα 44. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης



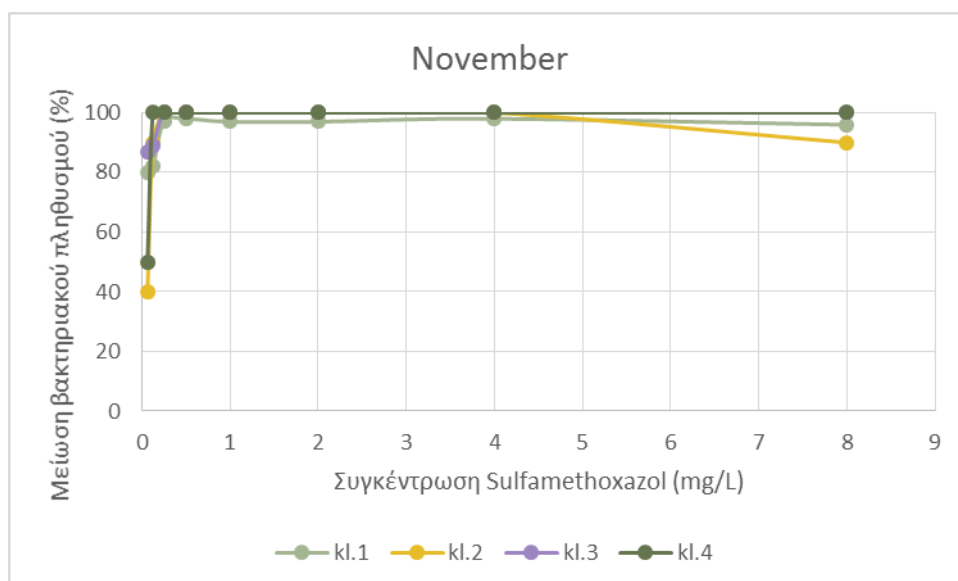
Γράφημα 45. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σιπροφλοξασίνης

SULFAMETHOXAZOLE

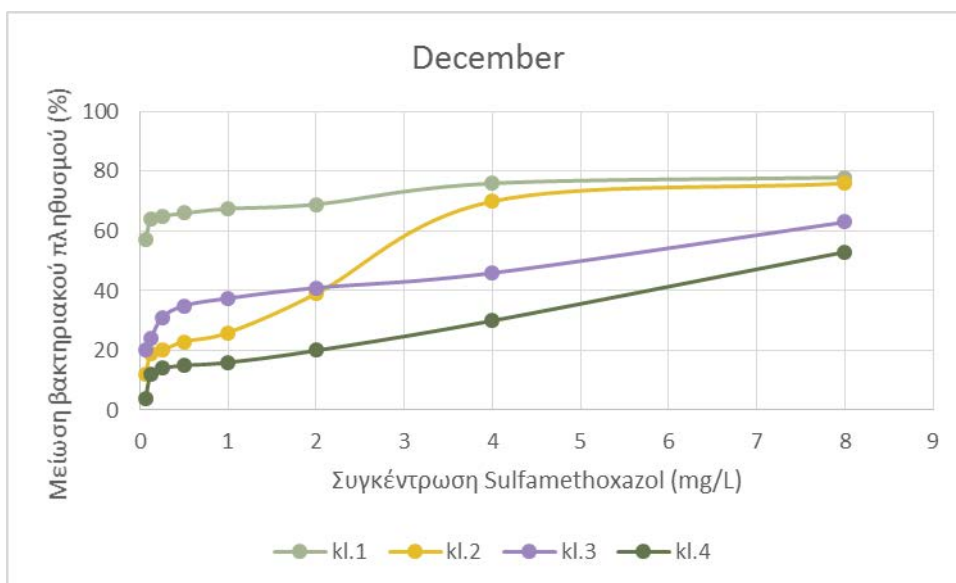
❖ *K. pneumoniae*



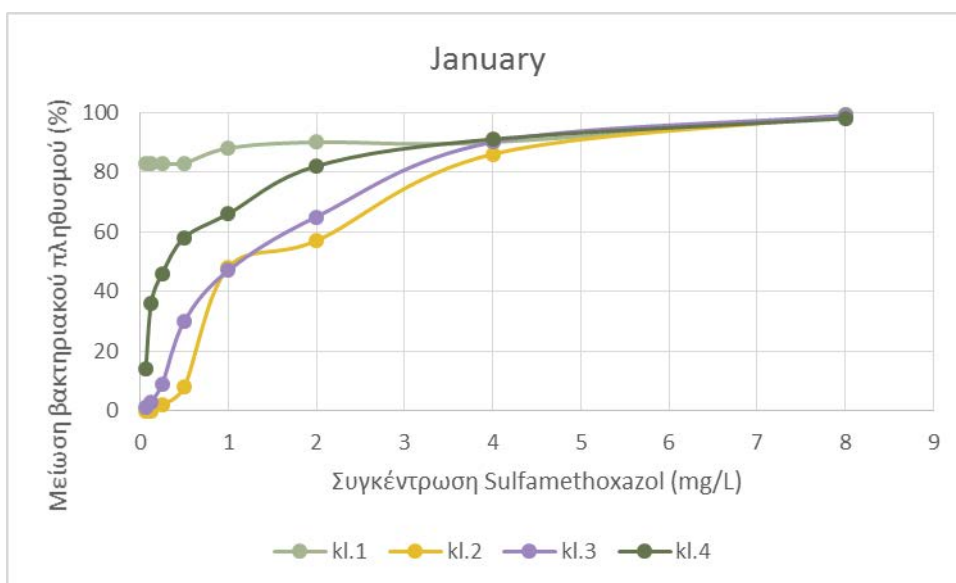
Γράφημα 46. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης



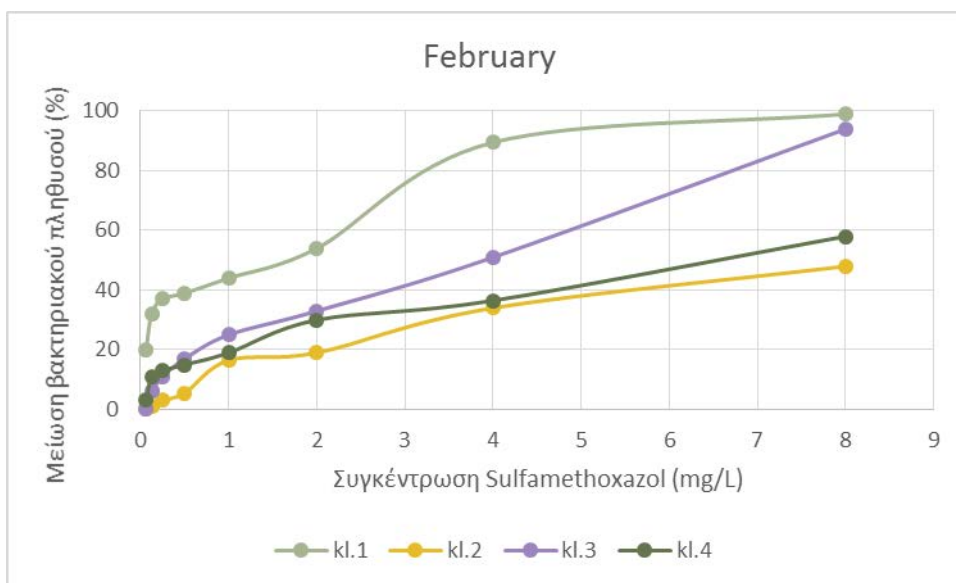
Γράφημα 47. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης



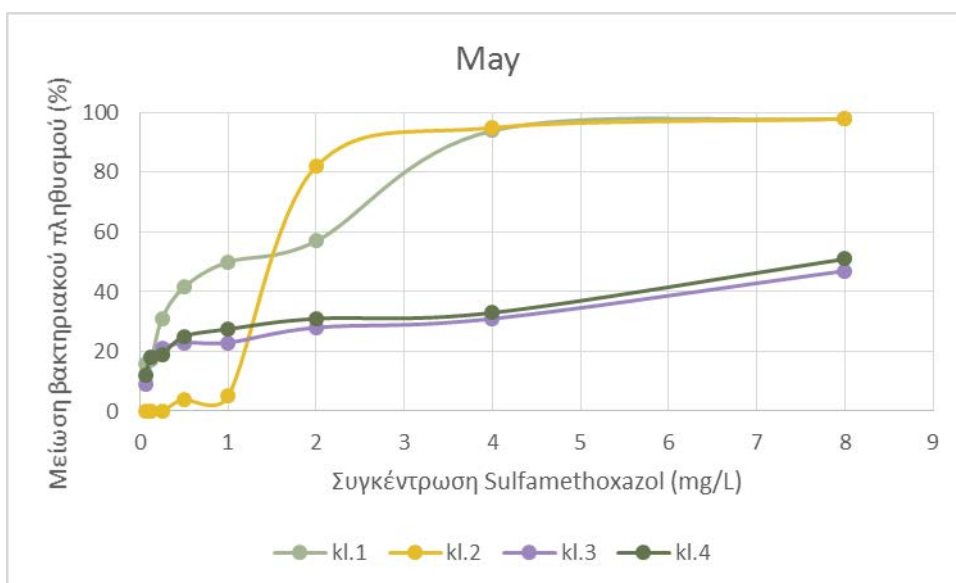
Γράφημα 48. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης



Γράφημα 49. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης

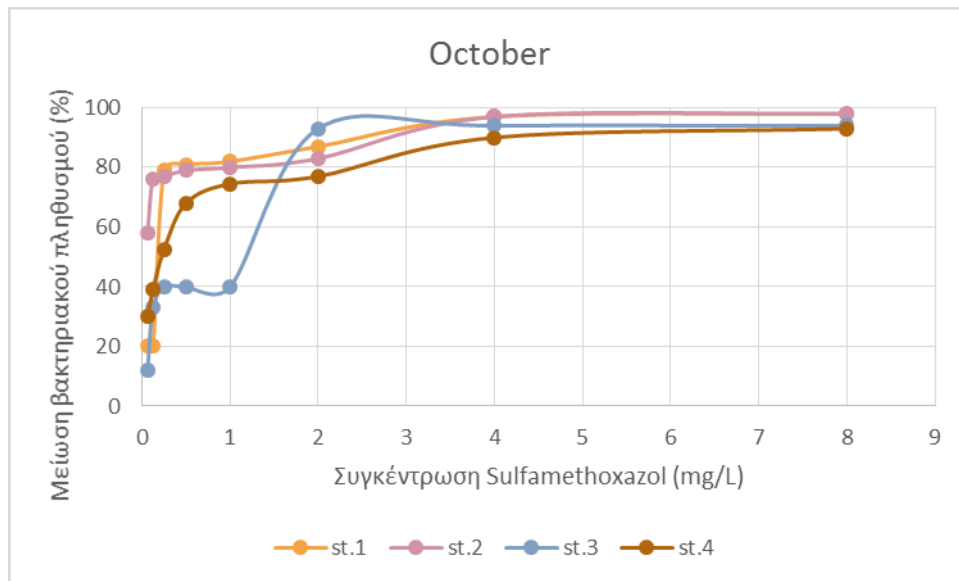


Γράφημα 50. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης

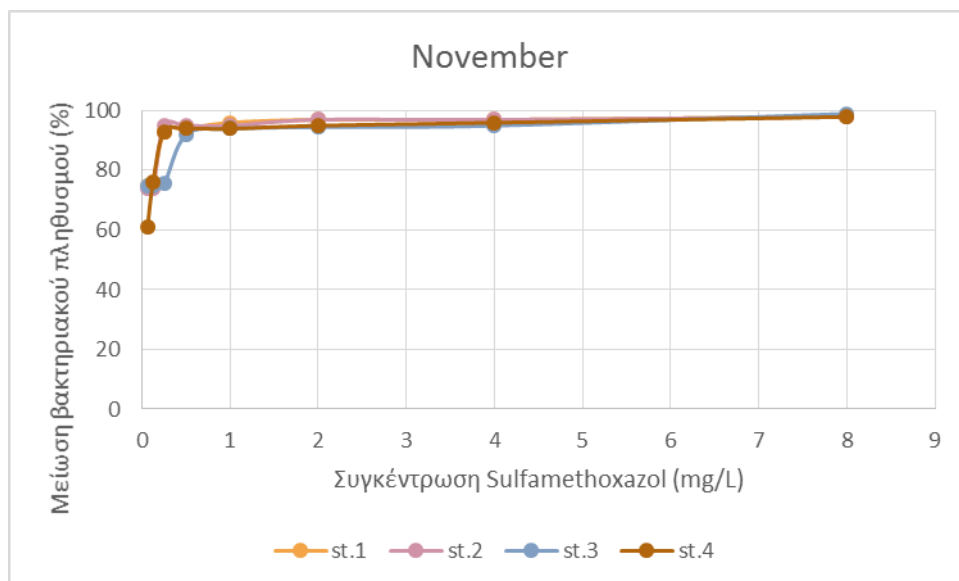


Γράφημα 51. Μείωση του πληθυσμού *K. pneumoniae* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης

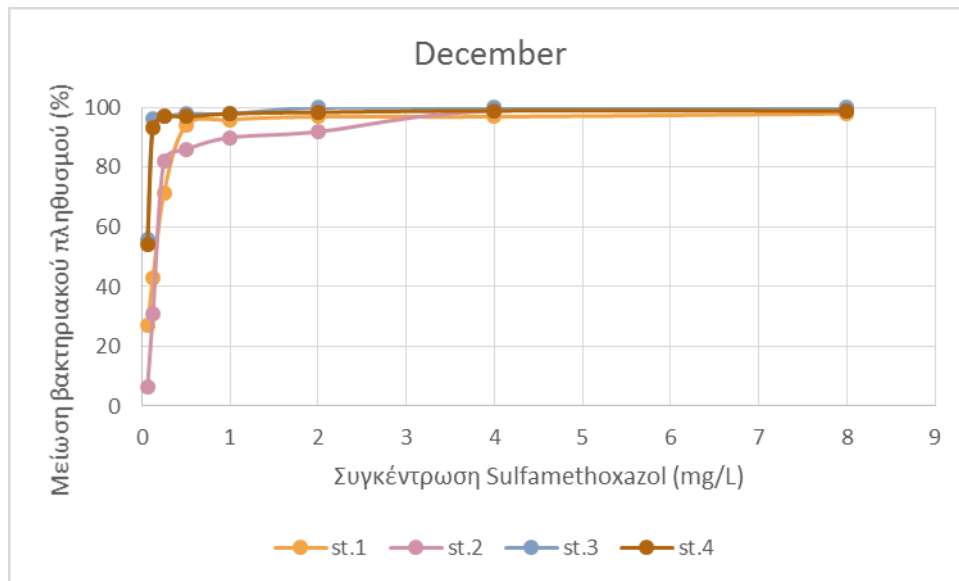
❖ *S. aureus*



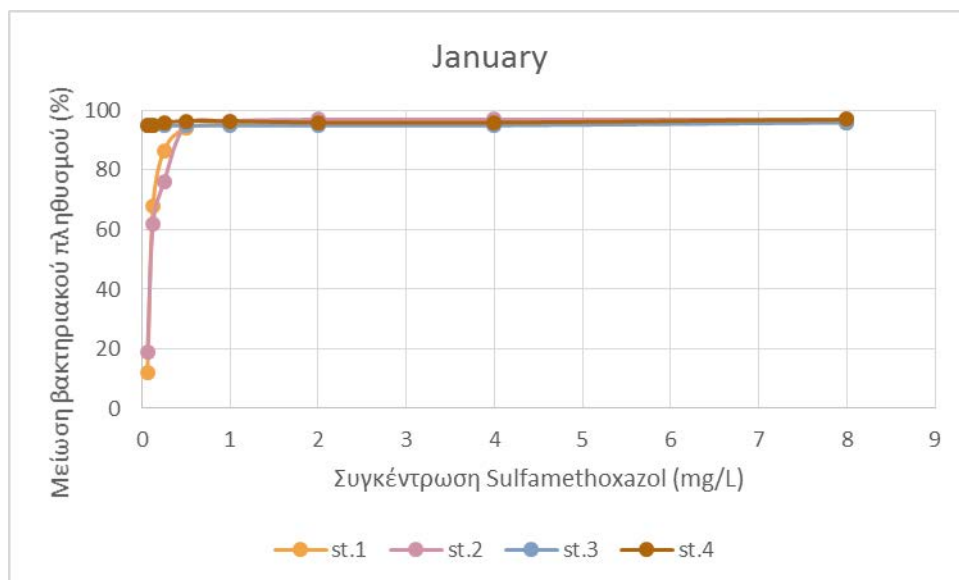
Γράφημα 52. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης



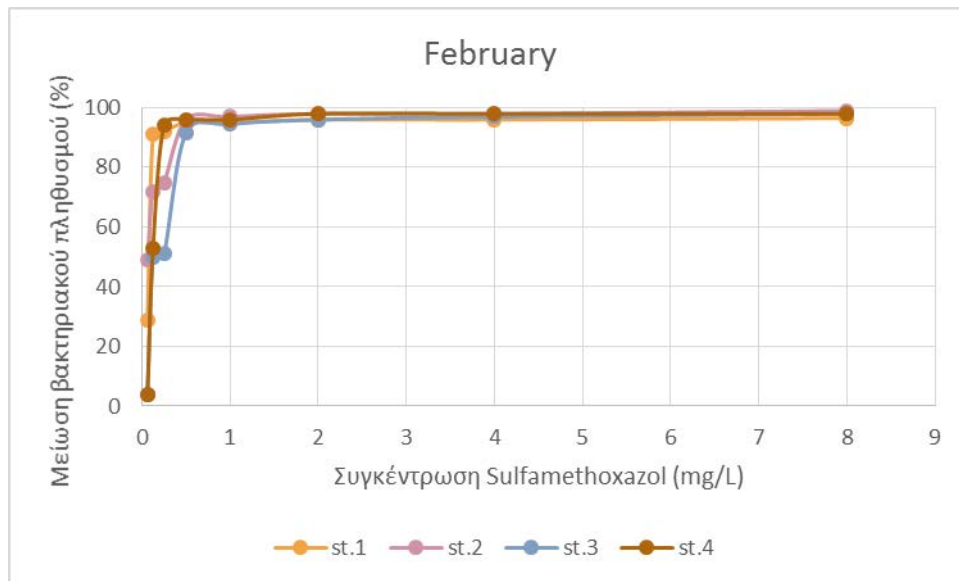
Γράφημα 53. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης



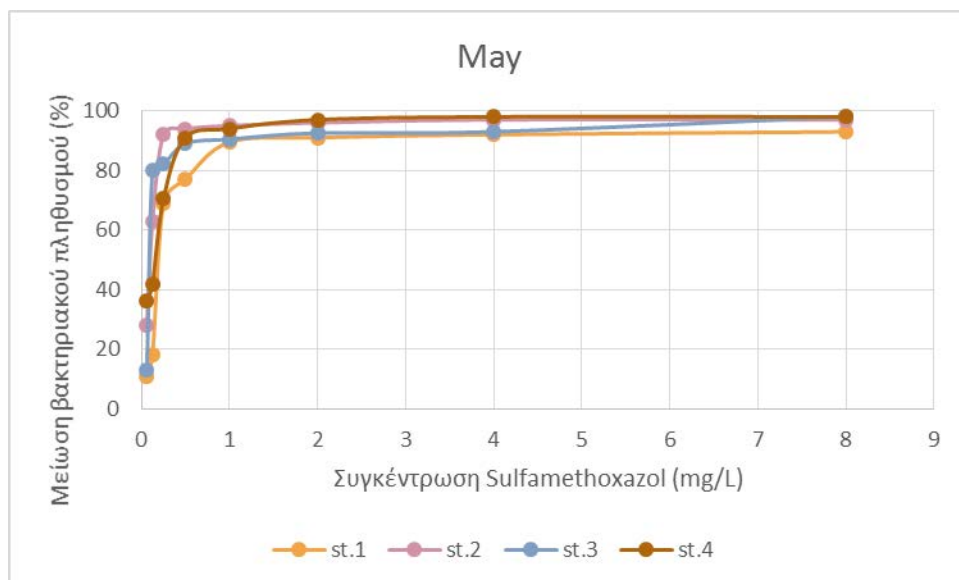
Γράφημα 54. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης



Γράφημα 55. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης



Γράφημα 56. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης



Γράφημα 57. Μείωση του πληθυσμού *S. aureus* συναρτήσει της συγκέντρωσης της Σουλφομεθοξαζόλης

7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- ❖ Αναστάσιος Ι. Στάμου, Ζηνόβιος Σ. Βογιατζής, 1994, Βασικές αρχές και σχεδιασμός συστημάτων επεξεργασίας αποβλήτων, Τεχνικό Επιμελητήριο Ελλάδας, 2η έκδοση
- ❖ Βλαχογιάννη Θ. , Βαλαβανίδης Αθ ,2010, *Δοκιμασίες τοξικότητας και οικοτοξικότητας σε υδρόβιους οργανισμούς*, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών , Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο Χημείας Περιβάλλοντος
- ❖ Δημητρακοπούλου Δέσποινα, 2013, Διπλωματική εργασία, Ετερογενής Φωτοκαταλυτική Διάσπαση Της Αντιβιοτικής Ουσίας Αμοξικιλίνη Σε Υδατικά Διαλύματα, Πολυτεχνείο Κρήτης , Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος
- ❖ Εθνικό Σχέδιο δράσης για την αντιμετώπιση της μικροβιακής αντοχής στην Ελλάδα στο πλαίσιο της ενιαίας υγείας 2019-2023, 2019
- ❖ Ειρήνη Γαλάνη, 2020, Γενετική βάση αντιμικροβιακής αντοχής , Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ΠΜΣ λοιμωξιολογία
- ❖ Μαρούλη Μαρία, Θεραπευτική των λοιμώξεων- Αντιμικροβιακά φάρμακα, εργαστηριακές δοκιμασίες ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά, 2021, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών , Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Μικροβιολογίας
- ❖ Παπανικολάου Ροδάνθη- Άννα, 2018, Διπλωματική εργασία, Αναζήτηση των γονιδίων αντοχής OXA-48 σε καρβαπενέμη-ανθεκτικά στελέχη *Klebsiella pneumoniae*, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή επιστημών υγείας, Τμήμα Ιατρικής
- ❖ Πήττας Θοδωρής, 2018, Μεταπτυχιακή εργασία, Παρουσία και τύχη βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, Πολυτεχνείο Κρήτης, Σχολή Μηχανικών περιβάλλοντος
- ❖ Σακοράφα Β. Χριστίνα, 2012, Διπλωματική εργασία, Διερεύνηση αντιβιοαντοχής *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus spp* από βιολογικό συμβατικό πρόβειο και αίγιο γάλα, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή επιστημών υγείας, Τμήμα Ιατρικής

- ❖ Aben Ovung, Jhimli Bhattacharyya, 2021, Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions, *Biophysical Reviews*, 13(2), pp. 259–272 <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00795-9>

- ❖ Anna Kozajda, Karolina Jeřak, 2020, Occupational exposure to *Staphylococcus aureus* in the Wastewater Treatment plants environment, *Medycyna Pracy*, 71(3), pp.265-278 <https://doi.org/10.13075/mp.5893.00946>

- ❖ Ana R. Millanao , Aracely Y. Mora , Nicolás A. Villagra , Sergio A. Bucarey , Alejandro A. Hidalgo, 2021, Biological Effects of Quinolones: A Family of Broad-Spectrum, Antimicrobial Agents , *Molecules*, 26, p.7153 <https://doi.org/10.3390/molecules26237153>

- ❖ Ayo Olasupo, Abubakar Chadi Sadiq, Faiz Bukhari Mohd Suah, 2022, A novel approach in the removal of ciprofloxacin antibiotic in an aquatic system using polymer inclusion membrane, *Environmental Technology & Innovation*, 27, p.102523 <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102523>

- ❖ Carlos F. Amábile-Cuevas, 2016, Antibiotics and Antibiotic Resistance in the Environment, CRC Press Taylor and Francis Group [ISBN 9781315679419](https://doi.org/10.1080/9781315679419)

- ❖ Chiara Borsetto, Sebastien Raguideau , Emma Travis , Dae-Wi Kim , Do-Hoon Lee , Andrew Bottrill , Richard Stark , Lijiang Song , Chang-Jun Cha , Jonathan Pearson , Christopher Quince, Andrew C. Singer , Elizabeth M.H. Wellington, 2021, Impact of sulfamethoxazole on a riverine microbiome, *Water Research*, 201, p.117382 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117382>

- ❖ Chryssa Bouki, Danae Venieri, Evan Diamadopoulos, 2013, Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, pp.1-9 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.016>

- ❖ Christina Nannou, Anna Ofrydopoulou, Eleni Evgenidou, David Heath, Ester Heath, Dimitra Lambropoulou, 2020, Antiviral drugs in aquatic environment and wastewater treatment plants: A review on occurrence, fate, removal and ecotoxicity , *Science of the Total Environment*, 699, pp. 134322-134352
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134322>

- ❖ Daqing Mao, ShuaiYu, Michal Rysz, Yi Luo, Fengxia Yang, Fengxiang Li, Jie Hou, Quanhua Mu, P.J.J.Alvarez, 2015, Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants, *Water Research*, 85, pp. 458-466
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.010>

- ❖ D. G. Joakim Larsson , Carl-Fredrik Flach , 2022, Antibiotic resistance in the environment, *Nature Reviews microbiology*, volume 20, pp. 257-269
<https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>

- ❖ 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 *Phorbastenia tenacior* (Porifera, Demospongiae). *Lett. Appl. Microbiol.* 2014, 58 (1), 42–52

- ❖ Elsa Mendonca, Ana Picado, Susana Maria Paixao, Luis Silva, Maria Ana Cunha, Sara Leitao, Isabel Moura, Cristina Cortez, Fatima Brito, 2009, Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal, *Journal of Hazardous Materials*, 163, pp.665–670 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.012>

- ❖ Folake Temitope Fadare, Anthony Ifeanyi Okoh, 2021, The Abundance of Genes Encoding ESBL, pAmpC and Non- β -Lactam Resistance in Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae Recovered From Wastewater Effluents, *Frontiers in Environmental Science*, 9, p. 711950
<https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.711950>

- ❖ Fzeuko, A. S., Ojemaye, M. O., Okoh, O. O., & Okoh, A. I., 2021, Technological advancement for eliminating antibiotic resistance genes from wastewater: A review of their mechanisms and progress, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), p.106183
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106183>

- ❖ G. Libralato, E. Prato, L. Migliore, A.M. Cicero, L. Manfra, , 2016, A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp, *Ecological Indicators*, 69, pp.35-49 <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>

- ❖ George Tchobanoglous, Franklin L. Burton, H. David Stensel, 2015, *Wastewater Engineering, Treatment and Reuse*, Medcalf & Eddy, Inc., 4th edition ISBN 9604181092
- ❖ Hordijk Wim, Steel Mike, Autocatalytic Networks at the Basis of Life's Origin and Organization, *Life*, 2018, 8, p.62) <https://doi.org/10.3390/life8040062>

- ❖ Ingo Stock, Bernd Wiedemann, 2001, Natural antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* and *K. terrigena* strains, *Journal of Medical Microbiology*, vol.50, pp.396-406

- ❖ Isobel Catherine Stanton, Alison Bethel, Anne Frances Clare Leonard, William Hugo Gaze, Ruth Garside, 2022, Existing evidence on antibiotic resistance exposure and transmission to humans from the environment: a systematic map, *Environmental Evidence*, 11(1), 8 <https://doi.org/10.1186/s13750-022-00262-2>

- ❖ J. Mir, J. Morato and F. Ribas, 1997, Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains, *Journal of Applied Microbiology*, 82, pp.7-18

- ❖ Jing-Jing Huang , Hong-Ying Hu, Fang Tang, Yi Li, Sun-Qin Lu, Yun Lu, 2011, Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant, *Water Research*, 45, pp. 2775 -2781 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.02.026>

- ❖ Ji Zheng , Chao Su , Jianwen Zhou , Like Xu , Yanyun Qian , Hong Chen, 2017, Effects and mechanisms of ultraviolet, chlorination, and ozone disinfection on antibiotic resistance genes in secondary effluents of municipal wastewater treatment plants, *Chemical Engineering Journal*, 317, pp.309-316 <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.076>

- ❖ Julia P. Galkiewicz, Christina A. Kellogg, 2008, Cross-Kingdom Amplification Using Bacteria-Specific Primers: Complications for Studies of Coral Microbial Ecology, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), pp.7828–7831 <https://doi.org/10.1128%2FAEM.01303-08>

- ❖ Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F., & Virta, M. P. J. , 2018, Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water, *Trends in Microbiology*, 26(3), pp.220–228 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.005>
- ❖ 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
- ❖ Li, W., Shi, Y., Gao, L., Liu, J. & Cai, Y. ,2013, Occurrence, distribution and potential affecting factors of antibiotics in sewage sludge of wastewater treatment plants in China, *Science of The Total Environment*, 446, pp. 306–313 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.050>
- ❖ Mehri Samandari, Hossein Movahedian Attar , Karim Ebrahimpour and Farzaneh Mohammadi, 2022, Monitoring of Amoxicillin and Cephalexin Antibiotics in Municipal WWTPs During Covid-19 Outbreak: A Case Study in Isfahan Iran, *Air, Soil and Water Research*, 15, pp.1-12 <https://doi.org/10.1177/11786221221103879>
- ❖ M.I Vasquez, D.Fatta-Kassinos, 2013, Is the evolution of “traditional” physiochemical parameters sufficient to explain the potential toxicity treated at wastewater sewage treatment plants? , *Environmental Science and Pollution Research*, 20, pp.3516-3528 <https://doi.org/10.1007/s1135601316376>
- ❖ Miguel Ferreira da Silva, Ivone Vaz-Moreira, Maria Gonzalez-Pajuelo, Olga C. Nunes, Célia M. Manaia, 2007, Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant, *FEMS Microbiololy Ecology*, 60, pp.166–176 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00268.x>
- ❖ Morse Audra Nicole, 2003, Fate and effect of Amoxicillin in space and terrestrial water reclamation systems, Ph.D Thesis, Texas Tech University
- ❖ Nunes S, Carvahlo F, Guilhermino L, Van Stappen G, 2006, Use of the genous Artemia in ecotoxicity testing, *Environmental Pollution*, 144, pp.453-462 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.037>
- ❖ Osama S. Ali, Walaa G. Hozayen , Abdulwahab S. Almutairi, Sherif A. Edris, Aala A. Abulfaraj, Amged A. Ouf, Hamada M. Mahmoud, 2021, Metagenomic Analysis Reveals the Fate of Antibiotic Resistance Genes in a Full-Scale Wastewater Treatment Plant in Egypt, *Sustainability*, 13, p.11131, <https://doi.org/10.3390/su132011131>

- ❖ Paul Vanhaecke, Guido Persoone, Christine Claus, Patrick Sorgeloos, 1981, Proposal for a Short-Term Toxicity Test with *Artemia Nauplii*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5, pp.382-387 [https://doi.org/0147-6513/81/030382-06\\$02.00/0](https://doi.org/0147-6513/81/030382-06$02.00/0)

- ❖ Persoone, G.; Wells, P.G., *Artemia* in aquatic toxicology: a review in: Sorgeloos, P. et al. (Ed.) *Artemia* research and its applications: 1. Morphology, genetics, strain characterization, toxicology, *Proceedings of the Second International Symposium on the brine shrimp Artemia*, 1987, pp. 259-275

- ❖ P.M. Chapman, 2002, Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology, *Marine Pollution Bulletin*, 44, pp.7-15 [https://doi.org/0025-326X/02/\\$](https://doi.org/0025-326X/02/$)

- ❖ R. Rosenstein, C. Nerz, F. G“otz, 2005, Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions, *Applied Environmental Microbiology*, 71, pp. 2663–2676 <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2663-2676.2005>

- ❖ Sorgeloos P, Remiche-Van Der Wielen C, Persoone G, 1978, The use of *Artemianauplii* for toxicity tests—a critical analysis, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2, pp.249-255

- ❖ Thobela Conco , Sheena Kumari, Oluyemi Olatunji Awolusi, Mushal Allam, Arshad Ismail , Thor A. Stenstr“om, Faizal Bux, 2022, Profiling of emerging pathogens, antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in different biological wastewater treatment plants, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10, p.107596 <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107596>

- ❖ Tracy L.B. King, Stefan Schmidt , Sabiha Y. Essack, 2020, *Science of the Total Environment*, Antibiotic resistant *Klebsiella* spp. from a hospital, hospital effluents and wastewater treatment plants in the uMgungundlovu District, KwaZulu-Natal, South Africa, 712, p.135550, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135550>

- ❖ X. He, J. Ahn, 2011, Differential gene expression in planktonic and biofilm cells of multiple antibiotic-resistant *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiology Letters*, 325, pp.180–188 <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2011.02429.X>

- ❖ Younghee Kim, Danvir Mark Farnazo, 2017, Toxicity characteristics of sewage treatment effluents and potential contribution of micropollutant residuals, *Journal of Ecology and Environment*, 41:39
<https://doi.org/10.1186/s41610-017-0057-9>

- ❖ Zhu Wang, Xu-Xiang Zhang , Kailong Huang, Yu Miao, Peng Shi, Bo Liu, Chao Long, Aimin Li, 2013, Metagenomic Profiling of Antibiotic Resistance Genes and Mobile Genetic Elements in a Tannery Wastewater Treatment Plant, *Plos One*, 8, p.76079, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076079>

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

www.researchgate.net, Matteo-Cassotti, Αύγουστος 2022

<http://www.chemspider.com> , Αύγουστος 2022

ECDC: www.ecdc.europa.eu , Αύγουστος 2022

<https://thebiologynotes.com>, Prashant Dahal, Νοέμβριος 2022

<http://www.antimicrobe.org> , Νοέμβριος 2022