ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Σχολή Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος

Κατεύθυνση: Μηχανικών Περιβάλλοντος

«ΕΛΕΓΧΟΣ ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΣΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

ΣΤΟΥΡΑΪΤΗ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ (ΑΜ: 2014050113)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΒΕΝΙΕΡΗ ΔΑΝΑΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

ΞΕΚΟΥΚΟΥΛΩΤΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΨΥΛΛΑΚΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

ΧΑΝΙΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ, 2022

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών της σχολής Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης και τα πειράματα που την απαρτίζουν, εκπονήθηκαν στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω βαθύτατα την Επιβλέπουσα καθηγήτρια της πτυχιακής μου εργασίας, κα. Βενιέρη Δανάη για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί της, στα πλαίσια ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος, καθώς και την πολύτιμη καθοδήγηση και το ενδιαφέρον που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της.

Ένα ακόμη ξεχωριστό ευχαριστώ οφείλω στην κα. Γουνάκη Ιωσηφίνα, ΕΔΙΠ του εργαστήριου, για την ανεξάντλητη υπομονή και επιμονή της και την μεγάλη θέλησή της να επιτευχθεί το όσο το δυνατόν τελειότερο αποτέλεσμα των πειραμάτων μου. Οι συμβουλές της καθ' όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο και η πολύτιμη καθοδήγησή της θα με ακολουθήσουν στα μετέπειτα βήματά μου με μεγάλη βεβαιότητα.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, την κα. Ψυλλάκη Ελευθερία και τον κ. Ξεκουκουλωτάκη Νικόλαο, για την παρουσία τους και το χρόνο που αφιέρωσαν για την αξιολόγηση της εργασίας μου.

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.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου που μου έδωσαν την ευκαιρία να σπουδάσω μακριά από την πόλη μου και με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, οικονομικά και ψυχολογικά. Χωρίς τη βοήθειά εκείνων και της αδερφής μου, θα ήταν αδύνατη η ολοκλήρωση των σπουδών μου και το ξεκίνημα της νέας πορείας μου. Ευχαριστώ για τις αξίες που μου μετέφεραν, οι οποίες με θεμελίωσαν ως άνθρωπο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλες τις συμφοιτήτριές μου του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συναδελφικότητας που επικράτησε κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, αλλά και όλους μου τους φίλους, από τα πρώτα χρόνια σπουδών μου και μη, που υπήρξαν δίπλα μου, ο καθένας με το δικό του τρόπο και μου προσέφεραν όμορφες αναμνήσεις σε αυτό το πολυετές ταξίδι.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανθεκτικότητα βακτηρίων σε αντιβιοτικά σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες απειλές που δημιουργούν ιδιαίτερη ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα. Συνδέεται άμεσα με την εκτεταμένη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών, και η Ελλάδα παρά το γεγονός ότι έχει περιορίσει την αλόγιστη χρήση τους τα τελευταία χρόνια, παρουσιάζεται ανάμεσα στις χώρες Ευρωπαϊκής Ένωσης με τις υψηλότερες θέσεις στην κατάχρηση αντιβιοτικών παραγόντων (ESAC).

Μία από τις κύριες πηγές ανακυκλοφορίας στο περιβάλλον αντιμικροβιακών ουσιών είναι ο άνθρωπος. Με την κατανάλωση τους από αυτόν και τον ελλιπή μεταβολισμό τους, καταλήγουν σε αστικά λύματα, τα οποία με τη σειρά τους, μετά την επεξεργασία τους σε ειδικές εγκαταστάσεις καταλήγουν σε περιβαλλοντικούς αποδέκτες. Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα μας απασχολήσουν αστικά λύματα από το βιολογικό καθαρισμό του Δήμου Πλατανιά Χανίων. Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, δεχόμενες μεγάλες ποσότητες ανθρώπινων αποβλήτων και σε συνδυασμό με τις ευνοϊκές για βακτήρια συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον τους, επιτρέπουν την συνεχή έκθεση βακτηρίων σε αντιμικροβιακές ουσίες, οδηγώντας σε ανάπτυξη της αντοχής τους σε αυτές. Έρευνες έχουν δείξει πως παρά την υποβολή των λυμάτων σε απολύμανση, ένα μεγάλο ποσοστό βακτηρίων παραμένει ανθεκτικό σε αντιβιοτικά κατά την έξοδο, θέτοντας σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία και το φυσικά, το περιβάλλον.

Η δειγματοληψία στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε για τους μήνες Οκτώβριο 2021 - Φεβρουάριο 2022 και Μάιο 2022 και τα λύματα συλλέχθηκαν (i) ανεπεξέργαστα από την είσοδο του βιολογικού, (ii) επεξεργασμένα μετά τη δευτεροβάθμια επεξεργασία της εγκατάστασης και (iii) επεξεργασμένα μετά την υποβολή τους σε χλωρίωση από την έξοδο της εγκατάστασης. Σκοπός ήταν αρχικά, η απομόνωση βακτηριακών δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης (*Escherichia coli* και *Enterococcus* sp.) και στη συνέχεια ο έλεγχος ανθεκτικότητάς τους σε διάφορα αντιβιοτικά. Συγκεκριμένα, τα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν ήταν η Amoxicillin, η Sulfamethoxazole και η Ciprofloxacin. Η μέθοδος ελέγχου που εφαρμόστηκε, ήταν αυτή της Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC) και χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της συγκέντρωσης στην οποία επήλθε 60% μείωση του εκάστοτε βακτηριακού πληθυσμού. Η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των στελεχών εμφανίστηκε στο αντιβιοτικό της Σουλφαμεθοξαζόλης, ενώ η Σιπροφλοξασίνη δεν εμφάνισε κανένα ανθεκτικό βακτηριακό στέλεχος. Μεταξύ εισόδου και εξόδου, δεν μπορεί να προκύψει κάποιο ακέραιο συμπέρασμα για το προφίλ ανθεκτικότητας, καθώς υπήρξαν περιπτώσεις που τα επεξεργασμένα στελέχη εξόδου εμφάνισαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα μετά την απολύμανση των λυμάτων. Η παραμένουσα ανθεκτικότητα των βακτηρίων μετά την απολύμανση με χλωρίωση επιβεβαιώνει την υποψία πως τα λύματα αποτελούν σημαντικούς φορείς στοιχείων αντιμικροβιακής αντοχής και ενθαρρύνει τις ανησυχίες της επιστημονικής κοινότητας. Τα στελέχη της

E.coli εμφάνισαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην Amoxicillin, ενώ του *Enterococcus sp*. στη Sulfamethoxazole. Ακολούθησε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση γονιδίου ανθεκτικότητας στα δείγματα καθώς και ποσοτικοποίηση του γονιδίου 16S rRNA. Το γονίδιο ανθεκτικότητας που ελέγχθηκε ήταν το ampC που σχετίζεται με το υπό μελέτη αντιβιοτικό Αμοξικιλλίνη. Από τα αποτελέσματα προέκυψε μεγάλη μείωση τόσο του γονιδίου ampC, όσο και του 16S rRNA, στα δείγματα μεταξύ εισροής και εκροής. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων του γονιδίου ampC ως προς το 16S rRNA κατά τα λύματα εξόδου σε σύγκριση με αυτά της εισόδου και συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε κατά την έξοδο του μήνα Ιανουαρίου και ήταν της τάξης των 6Logs. Το γεγονός ότι το ampC ανά λίτρο λύματος εμφάνισε καλά αποτελέσματα απομάκρυνσης κατά την έξοδο, αλλά οι συγκεντρώσεις του ως προς το συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό αυξήθηκαν σημαντικά κατά την έξοδο, αποδεικνύουν ότι το ampC αποτελεί μεγάλο ποσοστό του συνολικού γενετικού υλικού και κατά την έξοδο και επιβεβαιώνει την υποψία πως μια εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων θεωρείται επικίνδυνη ως προς την διάδοση της αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας.

Το δεύτερο σκέλος της παρούσας διπλωματικής εργασίας αφορά στον έλεγχο οικοτοξικότητας των δειγμάτων με τη χρήση του βιοδείκτη *Vibrio fischeri*. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν τα λύματα εισόδου και εξόδου τοξικά απέναντι στο βιοδείκτη, με 100% και 90% θνησιμότητά του στο μη αραιωμένο δείγμα, αντίστοιχα. Το LD50 αναγνωρίστηκε στα λύματα εισόδου να κυμαίνεται μεταξύ των αραιώσεων 3,1-6,3%, ενώ στα λύματα εξόδου σε αραίωση 12,5%.

Συνοψίζοντας, οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων εξ' ορισμού τους θεωρούνται κυρίαρχη λύση για την μείωση βακτηριακών δεικτών πριν την εναπόθεση των λυμάτων στο περιβάλλον. Συγκεκριμένα η διεργασία της χλωρίωσης αποτελεί το τελευταίο και καθοριστικό στάδιο πριν την εναπόθεση στους υδάτινους αποδέκτες. Παρά το γεγονός όμως ότι παρουσιάζουν καλές αποδόσεις απομάκρυνσης μικροβιακού φορτίου, δεν μπορεί να προκύψει το ίδιο συμπέρασμα και για την απομάκρυνση των ARGs που αποτελούν μεγάλο περιβαλλοντικό κίνδυνο, αλλά και απειλή για τον άνθρωπο.

ABSTRACT

The antibiotic resistance of bacteria according to the World Health Organization is one of the most important threats that cause particular concern in the scientific community. It is linked directly to the extensive use of antimicrobial substances, and Greece, despite the fact that it has limited their reckless use in the recent years, is among the European countries with the highest ranking in the misuse of antibiotic agents (ESAC).

One of the main sources of environmental recirculation of antimicrobial substances is humans. Their consumption and incomplete metabolism by humans, lead them to end up as domestic wastewater and consequently, despite being treated in special facilities, contaminate environmental recipients. In this thesis, we will be concerned with domestic sewage coming from the wastewater treatment plant of the Municipality of Platanias, Chania. Wastewater treatment plants, receiving large amounts of human effluents and providing with favorable conditions in their environment, they allow bacteria to be continuously exposed to antimicrobial substances. As a result, this allows them to develop high resistance to them. Research has shown that despite the wastewater's submission to decontamination, a large quota of bacteria remains resistant to antibiotics at the outflaw, endangering human health and, of course, the environment.

Sampling in the context of this thesis was carried out for the months of October 2021-February 2022 and May 2022 and the wastewater was collected (i) untreated from the biological facility's inlet (ii) treated after the treatment plant's secondary processing and (iii) treated after being subjected to chlorination from the facility's outlet. The purpose was initially, the isolation of fecal contamination markers (*Escherichia coli* και *Enterococcus* sp.) and then, the testing of their resistance to various antibiotics. Specifically, the antibiotics which were used are Amoxicillin, Sulfamethoxazole and Ciprofloxacin. The method applied was that of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and was used to determine the concentration at which the 60% reduction of the respective bacterial population, occurred. The highest resistance of the strains appeared to the antibiotic Sulfamethoxazole, while Ciprofloxacin did not show any resistant bacterial strains. Between inlet and outflaw, no accurate conclusion can be drawn, as far as the resistance profile is concerned, as there were cases where the treated strains showed greater resistance after wastewater decontamination. The continued resistance of bacteria after decontamination by chlorination, confirms the suspicion that wastewater is an important carrier of antimicrobial resistance elements and encourages the concerns of the scientific community. *E. coli* strains showed greater resistance to Amoxicillin, while *Enterococcus sp*. to Sulfamethoxazole. This was followed by the detection and quantification of the resistance gene in the samples as well as the quantification of the 16S rRNA gene. The resistance gene tested was ampC related to the antibiotic under study Amoxicillin. The results showed a large decrease in both the ampC gene and 16S rRNA in the samples between inflow and outflow. On the contrary, a significant increase in the concentrations of the ampC gene in terms of 16S rRNA

was observed in the effluent compared to the inlet, and in particular, the greatest increase was observed in the January discharge which reached up to 6Logs. The fact that ampC per liter of sewage showed good removal results at the outlet, but its concentrations in terms of total bacterial genetic material rose significantly at the outlet, demonstrates that ampC constitutes a large proportion of the total genetic material at the outlet as well and confirms the suspicion that a wastewater treatment facility is considered dangerous in terms of the issue of antimicrobial resistance.

The second purpose of this thesis concerns the ecotoxicity testing of the samples to the bacterium *Vibrio fischeri*. The results showed that the inlet and outlet effluents were toxic to the bacterium, causing 100% and 90% bacterial reduction at the undiluted sewage, respectively. LD50 was identified in the input samples to range between dilutions of 3,1-6,3 %, while in the output effluent at a dilution of 12,5 mg/L.

In summary, wastewater treatment facilities are a dominant solution for the reduction of bacterial indicators before the discharge of wastewater into the environment. Specifically, the chlorination process is the last and most decisive stage before the sewage's deposition in the water receivers. However, despite the fact that they lead to high microbial load removal efficiencies, the same conclusion cannot be reached for the removal of ARGs, which constitute high environmental risk, but also a great threat to humans.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΛΥΜΑΤΑ

Ένας από τους σημαντικότερους ρύπους που προκαλεί καταστροφικές επιπτώσεις στους υδάτινους πόρους είναι τα λύματα που καταλήγουν σε αυτούς, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε ρύπανση των υδάτων. Τα λύματα αυτά είναι κατά κύριο λόγο λύματα που προέρχονται από οικιακές χρήσεις, αποχετεύσεις συγκεκριμένα και περιέχουν μεγάλες ποσότητες ανθρώπινων περιττωμάτων, καθώς και μεγάλο όγκο νερού. Περιέχουν μεγάλες ποσότητες οργανικής και ανόργανης ύλης όπως για παράδειγμα αλκαλικά άλατα, περιεκτικότητα σε άνθρακα και πτητικά συστατικά που όταν βρεθούν στο περιβάλλον μπορούν να οδηγήσουν στη ρύπανσή του. (Pooja et al., 2022). Τα λύματα όσον αφορά τα οργανικά τους στοιχεία, αποτελούνται κυρίως από πρωτεΐνες (40-60%), υδατάνθρακες (25-50%) και λιπαρές ενώσεις (5-10%). Οι οργανικές αυτές ενώσεις συνυπάρχουν με τα προϊόντα αποικοδόμησής τους. Σε αυτά τα προϊόντα ανήκουν αμινοξέα, αμμωνία, υδρόθειο, αλκοόλες, λιπαρά οξέα, φαινόλες, ινδόλη, διοξείδιο του άνθρακα, μεθάνιο, υδρογόνο, νιτρικά και νιτρώδη άλατα, θείο και θειικά άλατα καθώς και διάφορες άλλες οργανικές ενώσεις, όπως απορρυπαντικά αλλά και άλατα (Βλυσίδης, 2007). Το pH των αστικών λυμάτων είναι συνήθως ουδέτερο, ενώ η θερμοκρασία τους εξαρτάται από την εποχή, δηλαδή είναι μεγαλύτερη από αυτή που επικρατεί το χειμώνα και μικρότερη από αυτή του καλοκαιριού.

Τα αστικά υγρά απόβλητα περιέχουν παράλληλα και μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν την δυνατότητα να αναπτυχθούν σε αυτά εξαιτίας της βιολογικής προέλευσης των λυμάτων και της επαφής τους με το περιβάλλον των αγωγών προσαγωγής. Η ύπαρξη του οργανικού υποστρώματος επιτρέπει στους μικροοργανισμούς να αναπτύσσονται με μεγάλους ρυθμούς και ταυτόχρονα να είναι ανθεκτικοί σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξάπλωσή τους σε ένα ποσοστό στο περιβάλλον, παρά την επεξεργασία των λυμάτων από ειδικές μονάδες. Η αντιμετώπιση των ανθεκτικών μικροοργανισμών πραγματοποιείται έως ένα βαθμό με τη χρήση αντιβιοτικών ουσιών. Μετά την αλόγιστη όμως χρήση των αντιβιοτικών τα τελευταία χρόνια, διάφοροι μικροοργανισμοί έχουν εμφανίσει ισχυρή αντίσταση απέναντι σε αυτά. Η μικροβιακή αντοχή προκύπτει όταν βακτήρια, μύκητες και παράσιτα τροποποιούνται, καθιστώντας τη χρήση των φαρμάκων για θεραπεία λοιμώξεων, αναποτελεσματική. Όταν οι μικροοργανισμοί γίνονται ανθεκτικοί στα περισσότερα αντιβιοτικά, τότε συχνά ορίζονται ως «υπερβακτήρια», γεγονός που δημιουργεί ιδιαίτερη ανησυχία, καθώς οι ανθεκτικές λοιμώξεις μπορούν είτε να οδηγήσουν σε θάνατο, είτε να εξαπλωθούν σε άλλους και να επιβάλουν υψηλό κόστος στην κοινωνία (WHO, 2017).

Η διαχείριση των υγρών αποβλήτων γίνεται σε ειδικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Ε.Ε.Λ.). Σκοπός τους είναι η εκκαθάριση των λυμάτων από ακαθαρσίες, προτού αυτά απορριφθούν στους υδροφόρους ορίζοντες ή στα φυσικά σώματα νερού, όπως ποτάμια, λίμνες, εκβολές ποταμών και ωκεανούς.

1.2 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

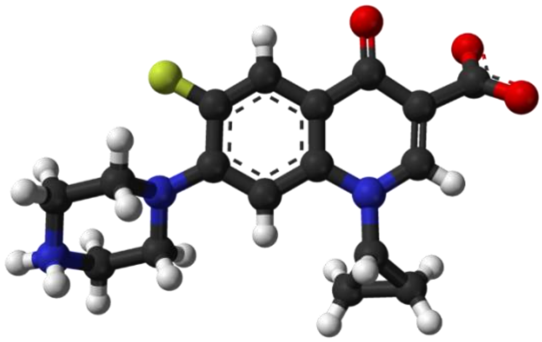
Αντιβιοτικό είναι ένας τύπος αντιμικροβιακής ουσίας, ο οποίος είναι δραστικός έναντι βακτηρίων. Είναι το πιο σημαντικό, φυσικό παράγωγο μικροοργανισμών για την καταπολέμηση βακτηριακών λοιμώξεων και τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια για την θεραπεία και την πρόληψη τέτοιου είδους λοιμώξεων, είτε σκοτώνοντας βακτήρια, είτε αναστέλλοντας την ανάπτυξή τους. Εκτός από τον τομέα της ιατρικής περίθαλψης, η χρήση αντιβιοτικών συναντάται και σε περιβαλλοντικούς τομείς. Παράλληλα όμως με την ανάπτυξη των αντιβιοτικών, γεννήθηκε και το πλέον ευρέως διαδεδομένο πρόβλημα, όπως αναφέρθηκε, της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε αυτά, θέτοντας ξανά σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία και προκαλώντας ιδιαίτερη ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα (ΕΟΔΥ, 2019).

Τα αντιβιοτικά διακρίνονται στις εξής κατηγορίες, β-λακτάμες (όπως πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες ή κεφέμες, κεφαμυκίνες, μονοβακτάμες, οξαλαβακτάμες, θειεναμυκίνες), αμυνογλυκοζίτες (παλαιές και νεότερες όπως η στρεπτομυκίνη), σουλφοναμίδες, κινολόνες, τετρακυλίνες, μακρολίδια.

Συγκεκριμένα, τα αντιβιοτικά που θα μας απασχολήσουν στην παρούσα εργασία είναι η Σιπροφλοξασίνη η οποία ανήκει στις κινολόνες, η Αμοξικιλλίνη η οποία ανήκει στις β-λακτάμες και η Σουλφαμεθοξαζόλη η οποία ανήκει στις σουλφοναμίδες.

ΣΙΠΡΟΦΛΟΞΑΣΙΝΗ (CIPROFLOXACIN)

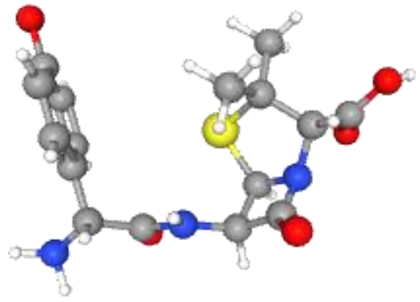
Η σιπροφλοξασίνη με ονομασία IUPAC «1-κυκλοπροπυλ-6-φθορο-4-οξο-7-(πιπεραζιν-1-υλ)-κινολινο-3-καρβοξυλικό οξύ» ανήκει στην κατηγορία των κινολόνων και έχει μοριακό τύπο $C_{17}H_{18}FN_3O_3$. Οι κινολόνες είναι μια κατηγορία αντιβιοτικών κατάλληλων για τη θεραπεία λοιμώξεων ευρέως φάσματος. Η σιπροφλοξασίνη αναστέλει την τοποϊσομεράση τύπου II (DNA γυράση) κατά τέτοιο τρόπο, με σκοπό να αδρανοποιεί τον βακτηριακό μεταβολισμό και την αναπαραγωγή (*Γαληνός - Οδηγός Φαρμάκων*, n.d.). Είναι δραστική έναντι ορισμένων κατά Gram θετικών και πολλών αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.



Εικόνα 1. Απεικόνιση του μορίου Σιπροφλοξασίνης (https://bit.ly/3balNUd)

ΑΜΟΞΙΚΙΛΛΙΝΗ (AMOXICILLIN)

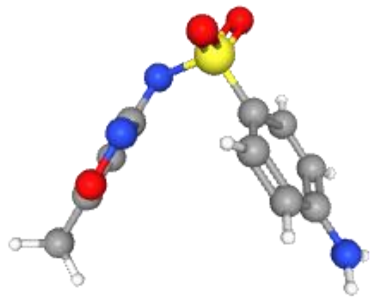
Η αμοξικιλλίνη είναι της κατηγορίας β-λακταμών και πιο συγκεκριμένα, ανήκει στην οικογένεια των αμινοπικιλλινών. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη δράση της απέναντι σε θετικά κατά Gram και αρνητικά κατά Gram βακτήρια και έχει μοριακό τύπο $C_{16}H_{19}N_3O_5S$. Η αμοξικιλλίνη δρα ως εξής: δεσμεύεται και απενεργοποιεί τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν την πενικιλλίνη (PBPs), οι οποίες βρίσκονται στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Η αδρανοποίηση των PBP παρεμβαίνει στη διασύνδεση των αλυσίδων πεπτιδογλυκάνης που είναι απαραίτητη για την αντοχή και την ακαμψία των βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων. Αυτό οδηγεί σε διακοπή της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και έχει ως αποτέλεσμα την αποδυνάμωση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και προκαλεί τη λύση των κυττάρων (PubChem, 2021).



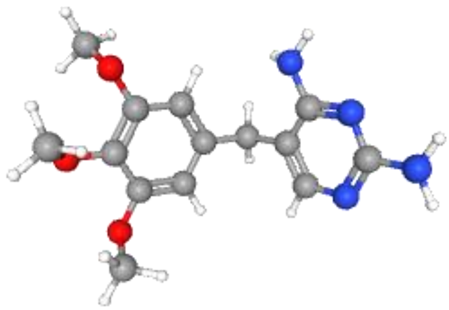
Εικόνα 2. Τρισδιάστατη απεικόνιση του μορίου Αμοξικιλλίνης (https://bit.ly/3oqQYOa)

ΣΟΥΛΦΑΜΕΘΟΞΑΖΟΛΗ (SULFAMETHOXAZOLE)

Η Σουλφαμεθοξαζόλη ανήκει στην κατηγορία των σουλφοναμίδων και έχει μοριακό τύπο $C_{10}H_{11}N_3O_3S$. Οι ρόλοι της την χαρακτηρίζουν ως αντιβακτηριακό παράγοντα, αντιμολυσματικό παράγοντα, αναστολέας EC 2.5.1.15 (διυδροπτεροϊκή συνθάση), αντιμικροβιακό παράγοντα, αναστολέα P450, EC 1.1.1.153 (L-reductase-sepiapterin Σχηματισμός 8-διυδροβιοπτερίνης)] αναστολέα, περιβαλλοντικό ρύπο, ξενοβιοτικό και φαρμακευτικό αλλεργιογόνο. Η σουλφαμεθοξαζόλη έχει την ικανότητα να αναστέλλει ανταγωνιστικά τη διυδροπτεροϊκή συνθάση, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τον σχηματισμό του διυδροπτεροϊκού οξέος, ενός προδρόμου του φολικού οξέος που απαιτείται για την ανάπτυξη των βακτηρίων (Pubhem, 2022). Εφαρμόζεται για την αντιμετώπιση του ουροποιητικού συστήματος και της βρογχίτιδας. Το αντιβιοτικό αυτό χρησιμοποιείται συνήθως σε συνδυασμό με την τριμεθοπρίμη (trimethoprim) σε αναλογία 1 προς 19 τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη.



Εικόνα 3. Τρισδιάστατη απεικόνιση του μορίου Σουλφαμεθοξαζόλης (https://bit.ly/3S1SAvu)



Εικόνα 4. Τρισδιάστατη απεικόνιση του μορίου Τριμεθοπρίμης (https://bit.ly/3Ps3s41)

1.3 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

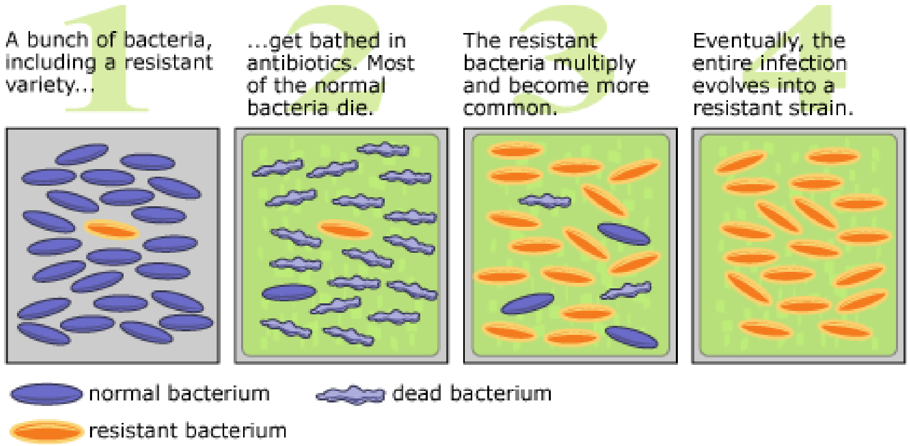
Η αντίσταση των βακτηρίων σε αντιβιοτικά σχετίζεται στην ουσία άμεσα με την ιδιότητά τους που εμποδίζει την αναστολή της ανάπτυξής τους από αντιμικροβιακούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται στο κλινικό περιβάλλον. Η ανθεκτικότητα μπορεί να επιτυγχάνεται είτε με τη χρήση πολύ χαμηλής συγκέντρωσης αντιβιοτικού, είτε αν η αλληλεπίδραση μεταξύ του αντιβιοτικού και του στόχου του δεν είναι τόσο αποτελεσματική, ώστε να αναστείλει την βακτηριακή ανάπτυξη (González-Candelas et al., 2011). Αυτό περιλαμβάνει και την εγγενή και την επίκτητη ανθεκτικότητα.

Η επίκτητη ανθεκτικότητα είναι εκείνη που προκαλεί τη μεγαλύτερη ανησυχία, καθώς αφορά μικροοργανισμούς που είναι ανθεκτικοί σε αντιβιοτικά τα οποία αρχικά ήταν αποτελεσματικά στη θεραπεία λοιμώξεων. Μπορεί να οφείλεται είτε σε σημειακές μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα οι οποίες αφορούν το χρωμοσωμικό DNA, είτε σε μεταφορά εξωγενούς γενετικού υλικού άλλων μικροοργανισμών. Η μεταφορά πραγματοποιείται μέσω πλασμιδίων με τη διαδικασία της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Υπάρχουν τρεις τρόποι απόκτησης εξωγενούς γενετικού υλικού και αυτοί είναι οι:

- Μεταμόρφωση ή μετασχηματισμός (transformation)
- Σύζευξη (transduction)
- Μεταγωγή (conjugation)

Αποτέλεσμα των αλλαγών στο γενετικό υλικό των βακτηρίων είναι η παραγωγή πρωτεϊνών με διαφοροποιημένη δράση με αποτέλεσμα να παράγονται αδρανοποιητικά ένζυμα, να μεταβάλλονται οι πενικιλλινοσυνδετικές πρωτεΐνες (PBP), να παρατηρείται μεταβολή στη διαπερατότητα των πορινών καθώς και τροποποίηση του τρόπου δράσης (Κοντογιάννη, 2015).

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε ορισμένα παθογόνα βακτήρια μάλιστα, επεκτείνεται σε πάνω από ένα αντιβιοτικά, περιορίζοντας έτσι τις δυνατότητες καταπολέμησής τους, αφού τα βακτήρια καταφέρνουν να προσαρμόζονται συνεχώς σε νέα οικοσυστήματα. Επομένως, είναι εμφανές πως οι ανάγκες για παγκόσμια δράση και επενδύσεις, τόσο από τη χρηματοδότηση του δημόσιου τομέα, όσο και του ιδιωτικού, είναι όλο και μεγαλύτερες, προκειμένου η ανάπτυξη νέων αντιμολυσματικών φαρμάκων να καταφέρει να συμβαδίσει με την συνεχώς αυξανόμενη αντίσταση των βακτηρίων.



Εικόνα 5. Ανάπτυξη βακτηριακής αντίστασης σε αντιβιοτικά (*Resisting Our Drugs - Understanding Evolution*, n.d.) (https://bit.ly/3PPLbxk)

Οι βασικοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να δράσει ένα αντιβιοτικό είναι δύο. Είτε προσβάλλοντας τη σύνθεση και κατασκευή του κυτταρικού τοιχώματος, δρώντας σε διαφορετικά στάδια της σύνθεσης πεπτιδογλυκάνης, είτε με το να προσβάλλουν τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων κατά το στάδιο της αντιγραφής, καταστρέφοντας έτσι ολοκληρωτικά το κύτταρο. Μία τρίτη μορφή δράσης είναι η παρέμβαση κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η πρωτεϊνοσύνθεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία συμβάλλουν πολλών ειδών ένζυμα. Στην ομάδα αντιβιοτικών που δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση κυτταρικής μεμβράνης ανήκουν οι β-λακτάμες και τα γλυκοπεπτίδια, σε αυτά που αναστέλλουν τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών ανήκουν οι τετρακυκλίνες και οι αμινογλυκοσίδες, σε αυτά που αναστέλλουν την υπερελίκωση του DNA ανήκουν οι κινολόνες και σε αυτά που αναστέλλουν ένζυμα ανήκουν οι σουλφοναμίδες (Παπαπαρασκευάς, 2020).

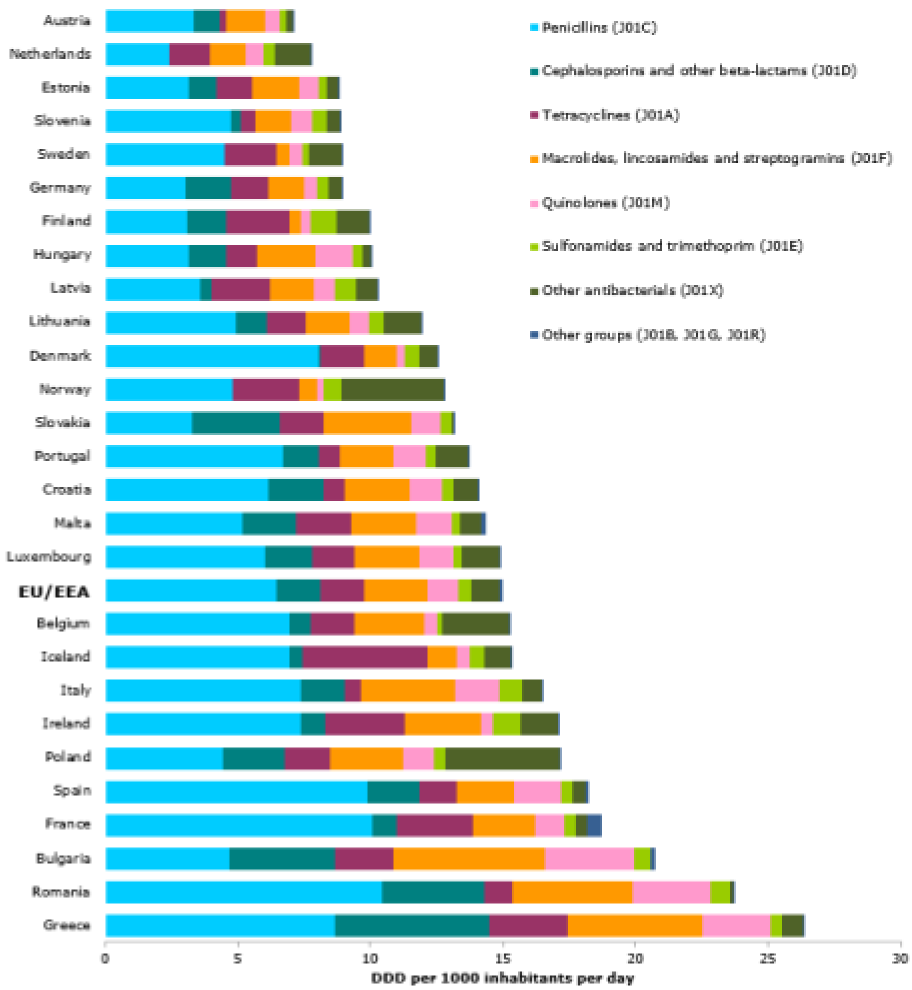
Οι μηχανισμοί αντοχής αντιπροσωπευτικών αντιβιοτικών παρατίθενται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1. Τρόπος δράσης αντιβιοτικών (Ahmed, 2012)

Κατηγορίες αντιβιοτικών	Αντιβιοτικά	Τρόπος δράσης	Κύριοι μηχανισμοί αντίδρασης
β-λακτάμες	Πενικιλίνη Κεφαλοσπορίνη Κετοξίμες Καρβαπενέμες	Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος	Διάσπαση από β-λακτάμες, ESBLs, CTX-mases, καρβαπενεμάσες, αλλοιωμένα PBPs
αμινογλυκοσίδες	Στρεπτομυκίνη Γενταμυκίνη Τομπραμυκίνη Αμικασίνη	Αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης	Ενζυματική τροποποίηση, εκροή, ριβοσωμικές μεταλλάξεις, μεθυλίωση 16S RNA
κινολόνες	Σιπροφλοξασίνη Οφλοξασίνη Νορφλοξασίνη	Αναστολή του DNA	Εκροή, τροποποίηση, μεταλλάξεις στόχων
γλυκοπεπτίδια	Βανκομυκίνη	Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος	Αλλοιωμένα κυτταρικά τοιχώματα, εκροή
τετρακυκλίνες	Τετρακυκλίνη	Αναστολή της μετάφρασης	Εκροή
ριφαμυκίνες	Ριφαμπικίνη	Αναστολή της μεταγραφής	Τροποποιημένη β-υπομονάδα της RNA πολυμεράσης
στρεπτογραμίνες	Βιργιναμυκίνες Κινουπριστίνη Δαλφοπριστίνη	Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος	Ενζυματική διάσπαση, τροποποίηση, εκροή
οξαζολιδινόνες	Λινεζολίδη	Αναστολή σχηματισμού ριβοσωμικού συμπλέγματος 70S	Μεταλλάξεις στα γονίδια 23S rRNA που ακολουθούνται από γονιδιακή μετατροπή

1.3.1 Χρήση αντιβιοτικών στην Ελλάδα

Ως η χρονιά με τη μεγαλύτερη κινητοποίηση ως προς την αντιμετώπιση της Μικροβιακής Αντοχής τόσο σε επιστημονικό, όσο και σε πολιτικό επίπεδο, ορίζεται το 2014. Θεωρείται η πρώτη χρονιά που οι διεθνείς οργανισμοί δραστηριοποιήθηκαν, ξεφεύγοντας από το θεωρητικό επίπεδο και μπαίνοντας σε διαδικασία υλοποίησης στόχων με αυτή τη φορά, μετρήσιμα αποτελέσματα. Η ευρέως διαδεδομένη διασπορά πολυανθεκτικών και πανανθεκτικών βακτηρίων σε τομείς γεωργίας, κτηνοτροφίας αλλά και στον άνθρωπο, αποτέλεσαν αφορμή για άμεση δράση. (ΕΟΔΥ, 2019). Η Ελλάδα φαίνεται να κατέχει την πρώτη θέση μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών στην κατανάλωση αντιμικροβιακών παραγόντων και στην μικροβιακή αντοχή εδώ και αρκετά χρόνια, αλλά και για το έτος 2020, ενώ την ακολουθεί αμέσως μετά η Ρουμανία. Παρά το γεγονός ότι τα δεδομένα με το πέρασμα των χρόνων συνεχίζουν να φέρνουν τη χώρα στην πρώτη θέση, αξίζει να σημειωθεί ότι η κατανάλωση αντιμικροβιακών ουσιών μειώνεται κάθε χρόνο όλο και περισσότερο.



Εικόνα 6. Εξωνοσοκομειακή κατανάλωση αντιβιοτικών στις Ευρωπαϊκές χώρες κατά το έτος 2020, εκφρασμένη σε ημερήσιες δόσεις/κάτοικο/ημέρα (Ecdc, 2021)

1.3.2 Διάδοση ανθεκτικότητας στο περιβάλλον

Με την ικανότητά τους να μειώνουν ασθένειες και να προωθούν την ανάπτυξη ζώων και πουλερικών, τα αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό τα τελευταία χρόνια με σκοπό την προστασία της ανθρώπινης υγείας. Λόγω του ότι τα περισσότερα αντιβιοτικά είναι υδατοδιαλυτά, το 30-90% των μητρικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται, τείνουν να απελευθερώνονται στο περιβάλλον μέσω της έκκρισης κοπράνων και ούρων, θέτοντας πιθανούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και τα οικοσυστήματα. Αντιβιοτικά έχουν επίσης ανιχνευτεί και στο έδαφος και τα λύματα, ειδικά εκείνα που σχετίζονται με ζωοτροφές. Στα περισσότερα εδάφη μάλιστα που δέχονται μακροχρόνιες εφαρμογές κοπριάς έχουν ανιχνευθεί υψηλές συγκεντρώσεις τετρα-κυκλινών (TCs) (Li et al., 2018).

Οι βασικές δίοδοι μέσω των οποίων τόσο οι αντιβιοτικές ουσίες, όσο και τα ανθεκτικά σε αυτές βακτήρια εισέρχονται στο περιβάλλον είναι οι εξής (Νιάρχος, 2015):

- Απόρριψη επεξεργασμένων και ανεπεξέργαστων λυμάτων από μονάδες επεξεργασίας λυμάτων
- Νοσοκομειακά απόβλητα
- Απορρίψεις υδατοκαλλιεργειών
- Γεωργικές απορροές
- Απορροές υπονόμων

Γενικά, μία μονάδα επεξεργασίας λυμάτων έχει ως στόχο το διαχωρισμό των επικίνδυνων ουσιών από το νερό των λυμάτων που εισέρχονται σε αυτήν, έτσι ώστε με την απόρριψή τους, να μην τεθούν σε κίνδυνο τα υδάτινα οικοσυστήματα. Στην είσοδο μιας μονάδας επεξεργασίας, εισέρχονται αστικά λύματα, βοθρολύματα καθώς και τυχόν απορροές από υπερχειλίσεις. Τα αστικά λύματα μπορούν να προέρχονται από νοσοκομεία, δημόσια και ιδιωτικά κτήρια κ.λπ. Ο λόγος που μια τέτοια μονάδα μπορεί να θεωρηθεί ίσως και το πιο σημαντικό μέσο διάδοσης ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, είναι λόγω της τεράστιας ποσότητας αποβλήτων και κατ' επέκταση αντιμικροβιακών παραγόντων που δέχεται καθημερινά. Ταυτόχρονα, οι ιδανικές συνθήκες που επικρατούν σε αυτή, τείνουν να επιτρέπουν στα βακτήρια που έρχονται διαρκώς σε επαφή με αντιμικροβιακές ουσίες, να αυξάνουν την αντοχή τους σε αυτές. Τέτοιου είδους ιδανικές συνθήκες μπορούν να θεωρηθούν για παράδειγμα εκείνες που επικρατούν κατά την βιολογική επεξεργασία των αποβλήτων, δηλαδή υψηλές θερμοκρασίες, υψηλό βακτηριακό φορτίο, αλλά και μεγάλες ποσότητες θρεπτικών ουσιών.

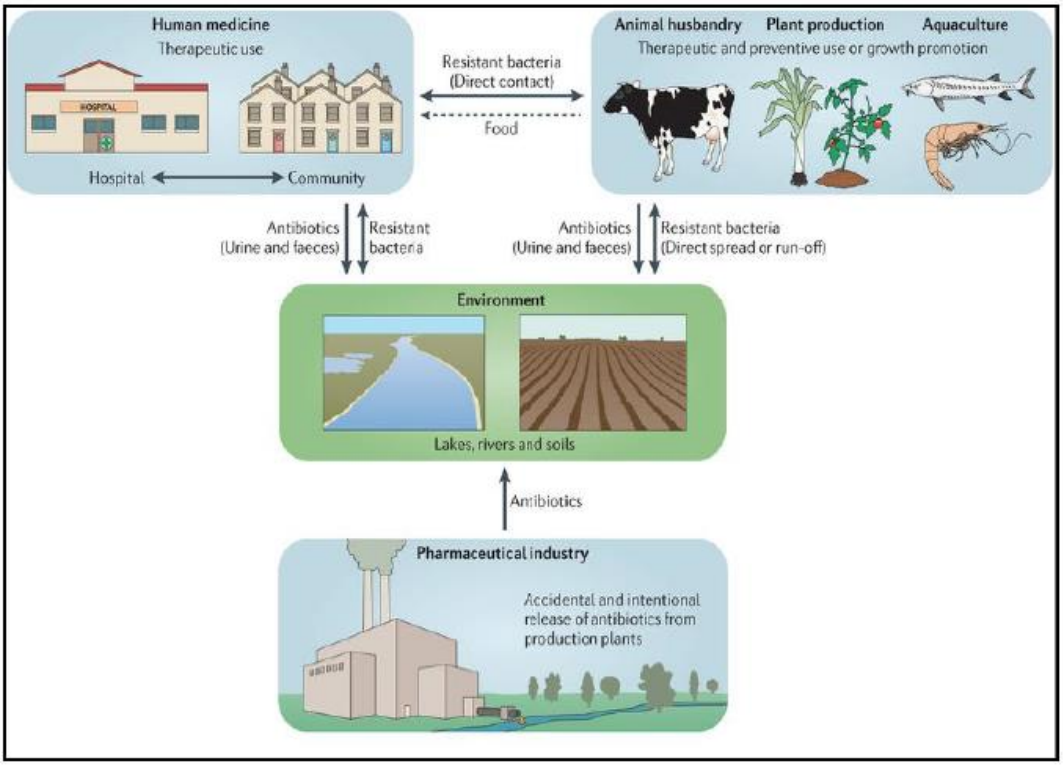
Οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων αποτελούνται από τα εξής στάδια:

- την πρωτοβάθμια επεξεργασία, η οποία περιλαμβάνει την εσχάρωση, εξάμμωση, μέτρηση παροχής και πρωτοβάθμια καθίζηση

- τη δευτεροβάθμια επεξεργασία

- την τριτοβάθμια επεξεργασία, η οποία έχει ως στόχο την επαναχρησιμοποίηση των λυμάτων και περιλαμβάνει διεργασίες όπως η κροκίδωση - ιζηματοποίηση, η διύλιση, η προσρόφηση από ενεργό άνθρακα και διεργασίες με μεμβράνες.

Είτε λάβουμε υπόψιν το ρεύμα επαναχρησιμοποίησης των λυμάτων μιας μονάδας επεξεργασίας με σκοπό την άρδευση, είτε το ρεύμα της κομποστοποίησης με στόχο την δημιουργία οργανικών λιπασμάτων που θα εκμεταλλευτεί ο τομέας της γεωργίας, είναι εμφανές ότι ένα ποσοστό αντιμικροβιακών ουσιών θα καταλήξει στο περιβάλλον. Μόλις οι ουσίες αυτές εξέλθουν από την εγκατάσταση και ξεκινήσουν τον κύκλο ζωής τους στο περιβάλλον, είναι αναπόφευκτη η απορρόφησή τους από ανθρώπινους και ζωικούς οργανισμούς, προκαλώντας σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία τους.



Εικόνα 7. Τρόποι μετάδοσης ανθεκτικότητας στο περιβάλλον (Marti et al., 2014)

Η απολύμανση σε μια μονάδα επεξεργασίας λυμάτων είναι από τα πιο σημαντικά στάδια και μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τρόπους, με οζόνωση, με χλωρίωση και με ακτινοβολία UV. Απολύμανση ονομάζεται μια διεργασία που οδηγεί σε εκλεκτική καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών, δηλαδή στην αδρανοποίησή τους και την αναστολή της ανάπτυξής τους. Κάθε μία από τις μορφές απολύμανσης που αναφέρθηκαν, παίζει κυρίαρχο ρόλο στην καταπολέμηση της ανθεκτικότητας, επομένως όσο πιο αποτυχημένη είναι μια απολύμανση, τόσο περισσότερες είναι οι πιθανότητες να προσβληθεί το περιβάλλον από χαμηλές μεν, αλλά συνεχείς συγκεντρώσεις αντιβιοτικών ουσιών.

1.4 ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Παθογόνος ονομάζεται ένας μικροοργανισμός όταν χρησιμοποιεί κάποιον άλλον μικροοργανισμό ως ξενιστή, προκαλώντας έτσι διαταραχές στην ομοιόστασή του και κατ' επέκταση ασθένειες.

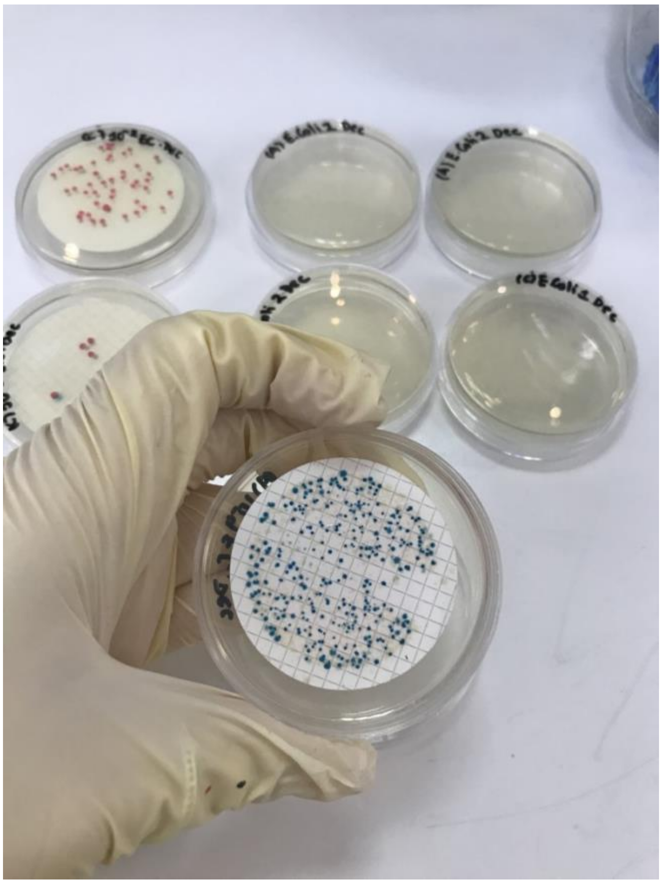
Τα βακτήρια είναι μικροί και απλοί μονοκύτταροι μικροοργανισμοί, δεν έχουν πυρήνα, ούτε άλλα οργανίδια πλην ριβοσωμάτων και το μέγεθός τους είναι από 0,5-5μm, συνήθως. Ωστόσο, υπάρχουν και βακτήρια εκτός αυτών των ορίων. Υποδιαιρούνται σε δύο μεγάλες ομάδες: τα θετικά κατά Gram και αρνητικά κατά Gram και ο διαχωρισμός τους βασίστηκε αρχικά στην τεχνική της χρώσης κατά Gram. Η τεχνική αυτή στην ουσία, διακρίνει τα κύτταρα βάσει διαφορών στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και η διαφορά στην εμφάνισή του μεταξύ θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, είναι χαρακτηριστική. Για τα αρνητικά κατά Gram κύτταρα, το τοίχωμα είναι μια δομή πολυσύνθετη και αποτελείται από πολλές στοιβάδες, ενώ το τοίχωμα του θετικού κατά Gram κυττάρου είναι πιο παχύ και συγκροτείται κυρίως από ένα τύπο μορίου (Βενιέρη, 2015). Ορισμένα μάλιστα βακτήρια έχουν και την ικανότητα να σχηματίζουν ενδοσπόρια, μία μορφή δηλαδή ανθεκτική σε ακραίες συνθήκες και μεγάλες θερμοκρασίες. Με αυτόν τον τρόπο προστατεύουν τον εαυτό τους από ελλείψεις τροφής και θρεπτικών ουσιών και μόλις οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές για αυτά, βλαστάνουν και δίνουν το κάθε ένα από ένα βακτήριο (Lodish et.al;, 1995).

Στην παρούσα εργασία θα μας απασχολήσουν δύο ομάδες βακτηρίων, η *Escherichia coli* και ο *Enterococcus* sp.

<u>Escherichia coli</u>

Η *E. coli* του γένους *Escherichia*, είναι αρνητικό Gram κολοβακτήριο, ραβδοειδούς σχήματος και βρίσκεται συνήθως στο έντερο ενδόθερμων ζώων. Δεν διαθέτει την ικανότητα να αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες και πεθαίνει όταν ζεσταίνεται στους 70 °C για αρκετό χρονικό διάστημα. Έχει όμως την ικανότητα να επιβιώνει σε χαμηλές θερμοκρασίες για αρκετές μέρες υπό ορισμένες συνθήκες. Λόγω της μεγάλης μολυσματικής δόσης του κολοβακτηριδίου, η μετάδοση από άτομο σε άτομο δεν είναι συχνή, αντιθέτως μεταδίδεται πιο εύκολα διά των τροφών. Η *E. coli* ανήκει στους οργανισμούς που έχουν προκαλούν υδατογενείς λοιμώξεις (Βενιέρη, 2015).

Όταν το λύμα υπό επεξεργασία υποστεί διήθηση με σκοπό τη μελέτη του βακτηρίου, αυτό εμφανίζει στα τριβλία του έντονες, πράσινες αποικίες.

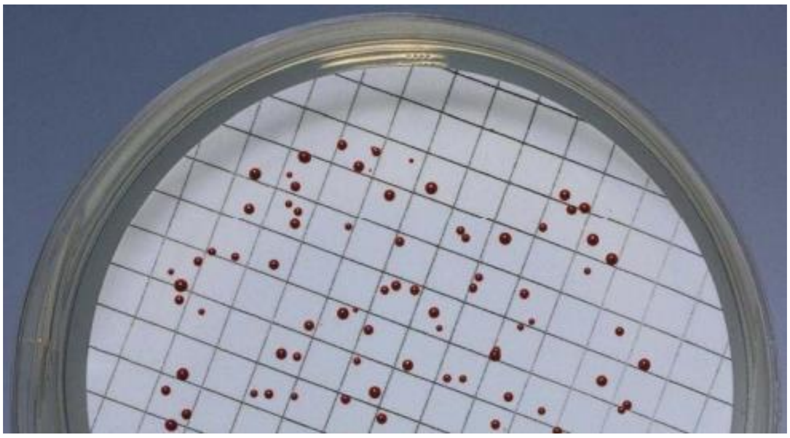


Εικόνα 8. Απεικόνιση αποικιών *E. coli*, ύστερα από διήθηση

Enterococcus

Οι εντερόκοκκοι είναι θετικά Gram βακτήρια, δυνητικά αναερόβια και ανήκουν σε ένα μεγάλο γένος βακτηρίων γαλακτικού οξέος, Bacillota. Στο μικροσκόπιο φαίνονται ως διπλόκοκκοι ή κοντές αλυσίδες και σε γενικές γραμμές, βρίσκονται στο έδαφος, το νερό, τα τρόφιμα, τα λύματα, τα φυτά, το ανθρώπινο δέρμα, τη στοματική κοιλότητα και το παχύ έντερο, αποτελώντας λιγότερο από το 1% της συνολικής μικροχλωρίδας. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί περίπου 58 είδη εντερόκοκκων, τα πιο σημαντικά και κοινά είναι τα *E. faecalis* και *E. faecium*. Οι εντερόκοκκοι είναι εξαιρετικά ανθεκτικά βακτήρια και μπορούν να επιβιώσουν σε διάφορες δύσκολες συνθήκες, όπως κοινά αντισηπτικά και απολυμαντικά, με αποτέλεσμα να είναι ευρέως διαδεδομένα σε συνηθισμένα νοσοκομειακά αντικείμενα (Said et al., 2022).

Όταν τα λύματα υποβληθούν σε διήθηση, το βακτήριο αναγνωρίζεται στα τριβλία με έντονες, μπορντό-κόκκινες αποικίες.



Εικόνα 9. Επιλεκτική απαρίθμηση αποικιών Εντερόκοκκου στο νερό (*Food Microbiologee_ Fecal Contamination Indicators*, n.d.)

Οι πέντε κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους ένα βακτήριο μπορεί να αναπτύξει αντοχή απέναντι σε ένα αντιβιοτικό είναι οι εξής (*Antimicrobial Resistance - Wikiwand*, n.d.):

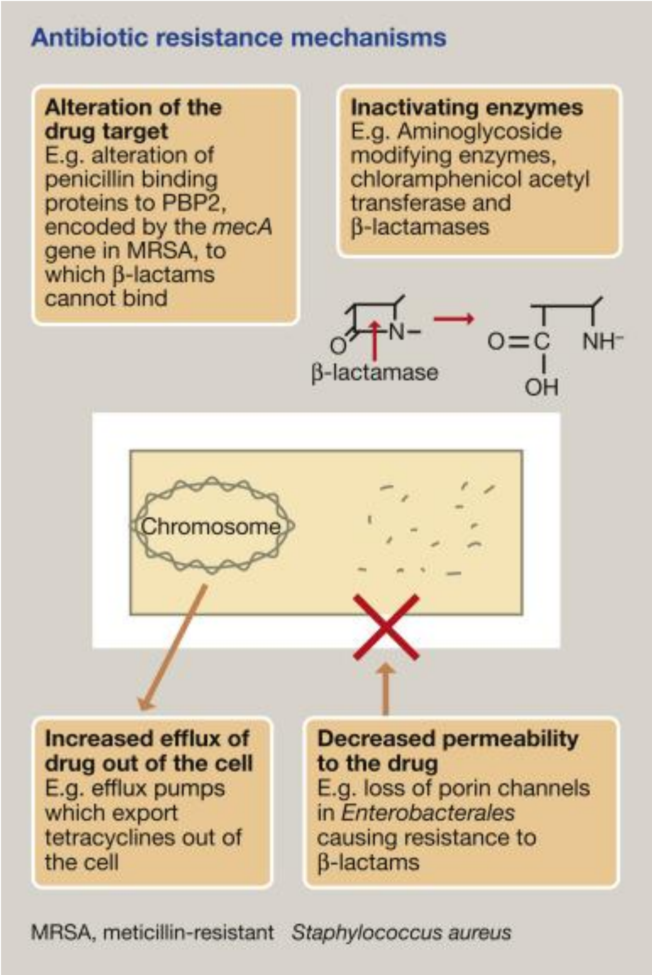
- Απενεργοποίηση ή τροποποίηση φαρμάκου: για παράδειγμα, απενεργοποίηση των ενζύμων της πενικιλλίνης G σε ορισμένα βακτήρια που είναι ανθεκτικά στην πενικιλλίνη μέσω της παραγωγής β-λακταμασών. Επίσης, με την προσθήκη λειτουργικών ομάδων από ένζυμα τρανσφεράσης, ορισμένα φάρμακα μπορούν να υποστούν και χημική τροποποίησή τους. Για παράδειγμα κάποιοι κοινοί μηχανισμοί αντίστασης στις αμινογλυκοσίδες είναι η φωσφορυλίωση, η αδενυλίωση και η ακετυλίωση, η οποία είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος μηχανισμός και μπορεί να επηρεάσει διάφορες κατηγορίες φαρμάκων.

- Αλλαγή της θέσης στόχου ή δέσμευσης: Ένα παράδειγμα είναι η αλλαγή της PBP, δηλαδή της θέσης στόχου δέσμευσης των πενικιλλινών σε MRSA και άλλα ανθεκτικά στην πενικιλλίνη βακτήρια. Άλλος προστατευτικός μηχανισμός είναι οι πρωτεΐνες ριβοσωμικής προστασίας, οι οποίες προστατεύουν το βακτηριακό κύτταρο από αντιβιοτικά τα οποία έχουν ως στόχο τους τα ριβοσώματα του κυττάρου με σκοπό να αναστείλουν τη σύνθεση πρωτεΐνών. Με το μηχανισμό αυτό, δεσμεύονται οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες προστασίας στα ριβοσώματα του βακτηριακού κυττάρου. Το κύτταρο στη συνέχεια αλλάζει το διαμορφωτικό του σχήμα και με αυτόν τον τρόπο επιτρέπεται στα ριβοσώματα η συνέχιση σύνθεσης πρωτεϊνών τους που είναι απαραίτητες για το κύτταρο, ενώ αποτρέπεται η δέσμευση των αντιβιοτικών στο ριβόσωμα για την αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης.

- Αλλαγή της μεταβολικής οδού: για παράδειγμα, ορισμένα βακτήρια που είναι ανθεκτικά στα σουλφοναμίδια δεν απαιτούν παρα-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA), ένα δηλαδή σημαντικό πρόδρομο για τη σύνθεση του φολικού οξέος και των νουκλεϊκών οξέων σε βακτήρια που αναστέλλονται από σουλφοναμίδες. Αντιθέτως μετατρέπονται στη χρήση προσχηματισμένου φολικού οξέος, όπως τα κύτταρα των θηλαστικών.

- Μειωμένη συσσώρευση φαρμάκων: Αυτό πραγματοποιείται είτε με μείωση της διαπερατότητας του φαρμάκου, είτε με αύξηση της ενεργής εκροής των φαρμάκων στην επιφάνεια του κυττάρου. Οι αντλίες που βρίσκονται εντός της κυτταρικής μεμβράνης ορισμένων βακτηριακών ειδών χρησιμοποιούνται για να αντλήσουν και να αποτρέψουν τα αντιβιοτικά που υπάρχουν εκτός του κυττάρου από το να προκαλέσουν οποιαδήποτε ζημιά. Συχνά η ενεργοποίησή τους γίνεται από ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα το οποίο σχετίζεται με ένα αντιβιοτικό, όπως στην αντίσταση στις φθοριοκινολόνες.

- Διάσπαση και ανακύκλωση ριβοσώματος. Η απελευθέρωση του ριβοσώματος από το φάρμακο επιτρέπει περαιτέρω αντίσταση στο φάρμακο.

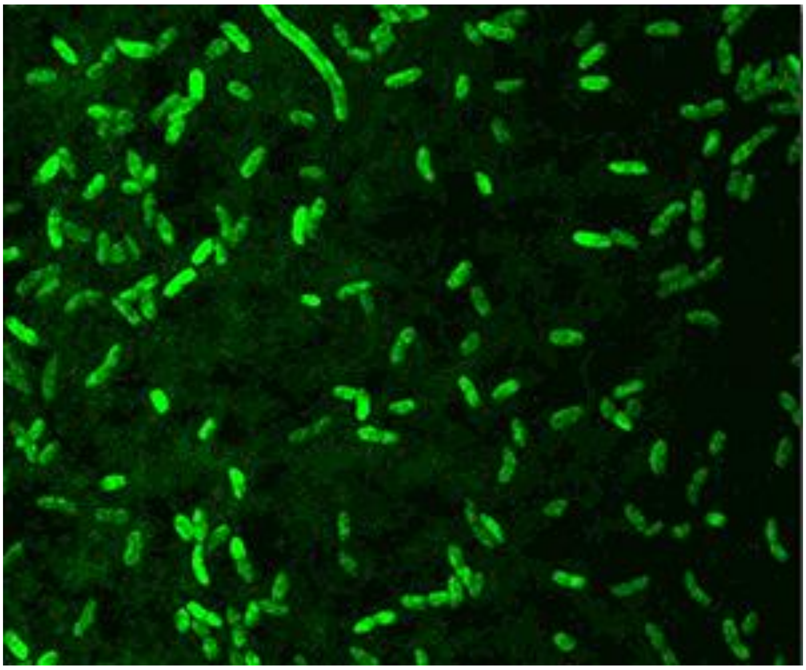


Εικόνα 10. Μηχανισμοί αντιμικροβιακής αντοχής (https://bit.ly/3PUS68x)

1.5 ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Η αξιολόγηση της τοξικότητας λυμάτων είναι πρωταρχικής σημασίας για την αποφυγή αρνητικών επιπτώσεων, τόσο για τον ανθρώπινο οργανισμό, όσο και για τη ρύπανση του περιβάλλοντος (de Castro-Català et al., 2016). Οι δοκιμές τοξικότητας με χρήση διαφορετικών τεχνικών έχουν προχωρήσει αρκετά τα τελευταία χρόνια ως αποτελεσματικό εργαλείο για την εκτίμηση περιβαλλοντικών κινδύνων (Boehler et al., 2017). Η βιοδοκιμασία αναστολής βιοφωταύγειας *Vibrio fischeri* (VFBIA) έχει εφαρμοστεί ευρέως για την παρακολούθηση της τοξικότητας, λόγω των πολλαπλών πλεονεκτημάτων που περιλαμβάνει. Μέσα σε αυτά ανήκουν η μικρότερη διάρκεια δοκιμής, καθώς και το γεγονός ότι είναι ευαίσθητη, οικονομικά αποδοτική και εύκολη στη λειτουργία (Abbas et al., 2018).

Το *V. fischeri*, γνωστό και ως *Photobacterium fischeri*, το οποίο πήρε το όνομά του από τον Bernhard Fischer, Γερμανό βακτηριολόγο, είναι Gram-αρνητικό, ραβδοειδές, μη παθογόνο βακτήριο, που διανέμεται παντού σε υποτροπικά και εύκρατα θαλάσσια περιβάλλοντα (Abbas et al., 2018).



Εικόνα 11. Μικρογραφία κυττάρων Vibrio fischeri που έχουν χρωματιστεί με φθορισμό. Η εικόνα που τραβήχτηκε από τους E. Nelson και L. Sycuro, παρέχεται από το Vbrio fischeri Genome Project (*VIBRIO FISCHERI - MICROBEWIKI*, N.D.)

2. ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως σκοπό κυρίως, τον εντοπισμό ανθεκτικών βακτηρίων και τον έλεγχο οικοτοξικότητας δειγμάτων αστικού λύματος, τα οποία ελήφθησαν από τη Δημοτική Επιχείρηση Ύδρευσης Αποχέτευσης Β. Άξονα Δ. Πλατανιά. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο Οκτώβριος 2021 – Φεβρουάριος 2022 και κατά τον Μάιο του 2022. Τα δείγματα προέρχονταν από την είσοδο του βιολογικού καθαρισμού, την εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας και τέλος από την έξοδο μετά το στάδιο της χλωρίωσης.

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν και μελετήθηκαν περαιτέρω ήταν οι δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης *E. coli* και *Enterococcus* sp.

Αναλυτικότερα, οι στόχοι της παρούσας διπλωματικής είναι:

- Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης στα δείγματα λύματος που προαναφέρθηκαν.

- Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν στα αντιβιοτικά σουλφαμεθοξαζόλη, αμοξικιλλίνη και σιπροφλοξασίνη. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο εύρεσης της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) για κάθε ένα από τα τρία αντιβιοτικά που αναφέρθηκαν.

- Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση γονιδίου.

- Ο έλεγχος οικοτοξικότητας των λυμάτων της εγκατάστασης με τη χρήση του βιοδείκτη *Vibrio fischeri*.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

Εργαστηριακά Υλικά

- Φιάλες διήθησης (Whatman)
- Φίλτρα διήθησης διαμέτρου 0,45 μm (Membrane Solutions)
- Αποστειρωμένα τριβλία Petri διαμέτρου 6cm
- Αποστειρωμένο και απιονισμένο H_2O
- Πλάκες μικρο-τιτλοποίησης 96 υποδοχών (Sarstedt)
- Ογκομετρικοί σωλήνες διαφόρων χωρητικοτήτων
- Κωνικές φιάλες διαφόρων χωρητικοτήτων
- Ρυθμιζόμενες αυτόματες πιπέτες (Eppendorf και Tipor-V)
- Πιπέτες των 5mL και των 10mL
- 12άρες πολυκάναλες αυτόματες πιπέτες (Biopette)
- Ρύγχη αυτόματων πιπετών των 5 μL, 200μL και 1000μL
- Κρίκοι εμβολιασμού
- Eppendorfs χωρητικότητας 1,5μL
- Nucleospin Soil Kit

Θρεπτικά Υλικά

- Nutrient Agar (Lab M)
- Nutrient Broth (Lab M)
- Slanetz and Bartley Medium (Neogen)
- Bile Esculin Agar (Hi Media)
- HiCrome Agar (Hi Media)

Συσκευές Εργαστηρίου

- Συσκευή διήθησης υπό κενό (PALL Gelman Laboratory)
- Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific Heraus)
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa)
- Κλίβανος (Elvem K103)
- Αναλυτικός ζυγός (Adventure OHAUS Balance)

- Ζυγαριά (Kern)
- Υδατόλουτρο (GFL)
- Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu UV mini 1240)
- Vortex (Scientific Industries)
- Vortex χειρός (Selecta)
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Microplate reader (EZ Read 400 biochrom)
- Φυγόκεντρος Certifuge 5418R (Eppendorf)
- Φωτόμετρο (Eppendorf)
- Real Time PCR System (Applied Biosystems)

Αντιβιοτικά

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

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

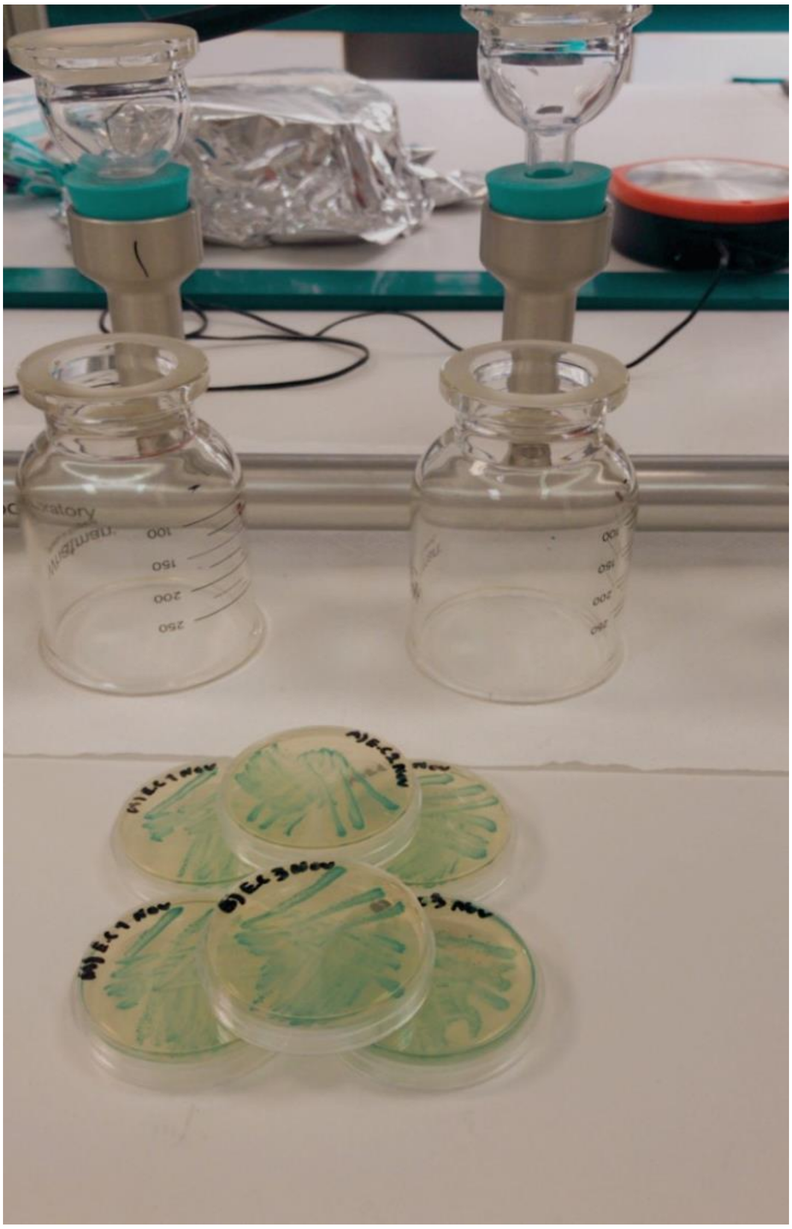
3.2.1 Απομόνωση βακτηριακών στελεχών με διήθηση

Η δειγματοληψία για την παρούσα διπλωματική εργασία προέρχεται από τη ΔΕΥΑΒΑ Πλατανιά Χανίων και αφορά στους μήνες Οκτώβριο 2021 με Φεβρουάριο 2022, καθώς και το μήνα Μάιο 2022. Ο Μάρτιος και ο Απρίλιος 2022 δεν συμπεριλήφθηκαν λόγω έντονης βροχόπτωσης στην περιοχή κατά τη διάρκειά τους, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η σειρά δειγματοληψιών για τυχόν πιθανότητες αλλοίωσης των δειγμάτων. Τα λύματα εισόδου (A), εκροής της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας (B) και εξόδου (C) της εγκατάστασης υπέστησαν διήθηση με τη βοήθεια φίλτρων με διάμετρο πόρων 0,45μm. Στη συνέχεια, τα φίλτρα αυτά τοποθετήθηκαν σε τριβλία με θρεπτικό υλικό, κατάλληλο κάθε φορά για το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος.

Τα δείγματα ελέγχθηκαν για την παρουσία των βακτηριακών στελεχών *E. coli* και *Enterococcus* sp. Για την *E. coli* χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό HiCrome και τα τριβλία επωάστηκαν για 24h στους 37^{o}C, ενώ για τον *Enterococcus* sp. χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό Slanetz and Bartley Medium και έμειναν στον επωαστικό για 48h στους 37^{o}C. Για τον *Enterococcus* sp. μετά την πρώτη επώαση, τα φίλτρα μεταφέρθηκαν σε τριβλία με υπόστρωμα Baile Esculin και επωάστηκαν για μισή ωρα στους 44^{o}C, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ότι οι αποικίες που αναπτύχθηκαν ήταν κοπρανώδους προέλευσης. Ύστερα, έγινε καταμέτρηση των τυπικών αποικιών κάθε τριβλίου και πιο συγκεκριμένα αυτών με πράσινο χρώμα για την *E. coli* και αυτων με μαύρο-κόκκινο χρώμα για τον *Enterococcus* sp.

Εικόνα 12. Μέθοδος δεκαδικών αραιώσεων για τη διαδικασία διήθησης

Μετά την απομόνωση των βακτηριακών στελεχών έγιναν οι πρώτες ανακαλλιέργειες σε τριβλία με θρεπτικά υλικά ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε βακτηριακό στέλεχος μετά τις διηθήσεις, προκειμένου να είναι σίγουρο ότι οι αποικίες που λήφθηκαν με τους κρίκους εμβολιασμού, ήταν αποικίες των στελεχών που θέλαμε να αναπτύξουμε. Ακολούθως, έγιναν ανακαλλιέργειες σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar. Οι συνθήκες επώασης των ανακαλλιεργειών, δηλαδή η θερμοκρασία και ο χρόνος, ήταν ακριβώς ίδιες με αυτές των αντίστοιχων καλλιεργειών.



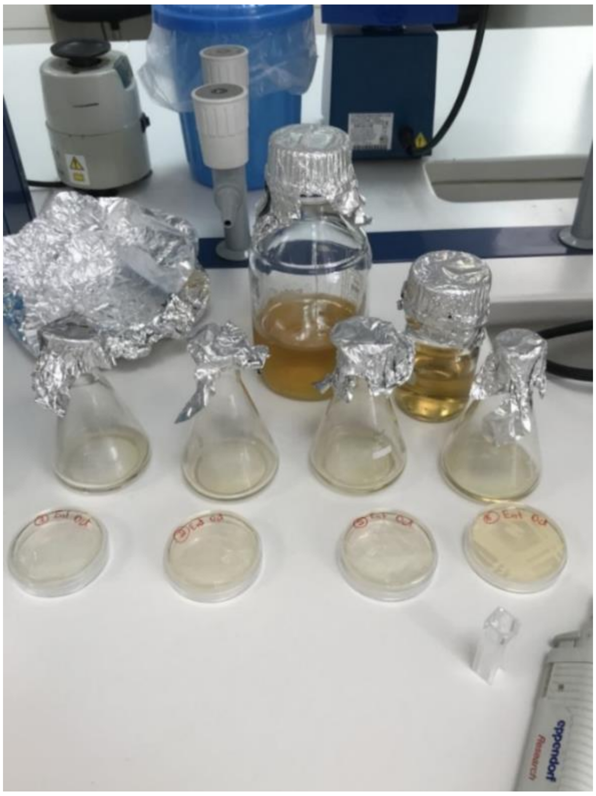
Εικόνα 13. Ανακαλλιέργειες *E. coli* σε θρεπτικό υλικό Hicrome

3.2.2 Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

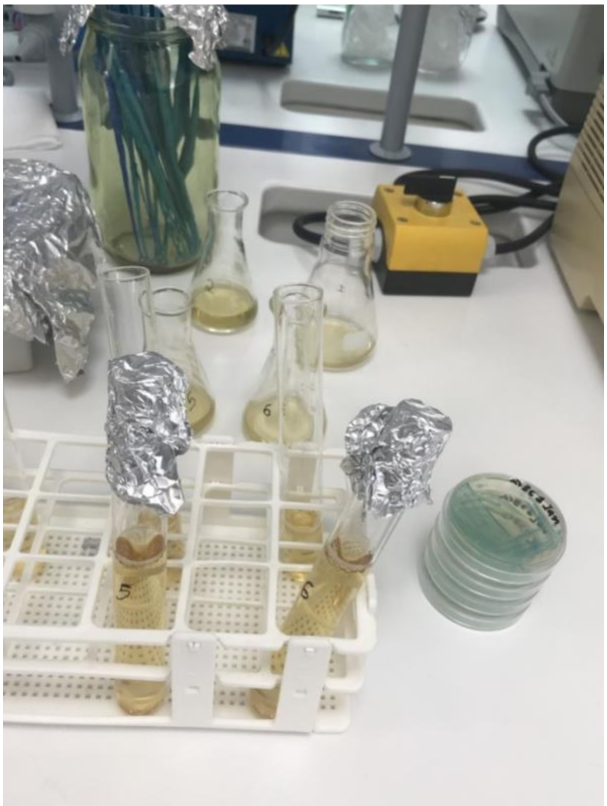
Για τη μελέτη ανθεκτικότητας των βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης με μικρο-αραιώσεις σε ζωμό (MIC Broth Microdillution Method). Η χρήση αυτής της μεθόδου είναι να εξετάσει την ικανότητα ανάπτυξης των στελεχών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών ουσιών και ο σκοπός της είναι ο προσδιορισμός της χαμηλότερης συγκέντρωσης αντιβιοτικού στην οποία σταμάτησε η βακτηριακή επέκταση. Για τη διαδικασία αυτή χρειάστηκαν micro plates 96 πηγαδιών, στα οποία τοποθετήθηκαν τα εναιωρήματα των βακτηρίων και τα αντιβιοτικά, με συγκεκριμένη διάταξη.

<u>Δημιουργία εναιωρημάτων βακτηρίων:</u>

Η δημιουργία των εναιωρημάτων έγινε για την παρούσα έρευνα σε ομάδες των τεσσάρων στελεχών, δύο για την είσοδο της εγκατάστασης (A) και δύο για την έξοδο (C), δηλαδή μετά την χλωρίωση. Επομένως, χρειάστηκαν τέσσερις μικρές κωνικές φιάλες των 50 mL στις οποίες τοποθετήθηκε μια μικρή ποσότητα των 10-15mL Nutrient Broth. Σε κάθε μία από αυτές τις κωνικές προστέθηκε μία «κρικιά» από την ανακαλλιέργεια του κάθε βακτηριακού στελέχους με τη χρήση κρίκου εμβολιασμού. Σκοπός ήταν η δημιουργία εναιωρήματος που θα δώσει στο φασματοφωτόμετρο μία οπτική απορρόφηση κοντά στο A=0,1 η οποία αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αποικιών της τάξης 10^8 CFUS/ mL. Στη συνέχεια, 1mL του κάθε εναιωρήματος τοποθετήθηκε σε κυλινδρικό σωλήνα με 9 mL Broth και μετά από πολύ καλή ανάδευση, 2 mL του διαλύματος τοποθετήθηκαν σε άλλο κυλινδρικό σωλήνα που περιείχε 18mL Broth. Αυτές οι διαδοχικές αραιώσεις στόχευαν στη δημιουργία της επιθυμητής συγκέντρωσης αποικιών 10^6 CFUS/mL.



Εικόνα 14. Πασρασκευή εναιωρημάτων για ανακαλλιέργειες *Enterococcus sp.*



Εικόνα 15. Διαδικασία αραίωσης εναωρημάτων *E.coli*

Παρασκευή διαλύματος αντιβιοτικού:

Η παρασκευή της επιθυμητής συγκέντρωσης αντιβιοτικού έγινε από την αμέσως μεγαλύτερη συγκέντρωση με αραίωση σε αναλογία 1 προς 2. Η αραίωση αποτελείται από ποσότητα αντιβιοτικού και ποσότητα αποστειρωμένου νερού. Το τελικό διάλυμα τοποθετείται στη συντήρηση και χρησιμοποιείται όσο το δυνατόν πιο άμεσα χωρίς να παραληφθεί η ημερομηνία λήξης του, αφού αυτό μπορεί να αλλοιώσει σημαντικά τα αποτελέσματα της μέτρησης.

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην προκειμένη περίπτωση και το εύρος συγκεντρώσεων τους είναι τα εξής:

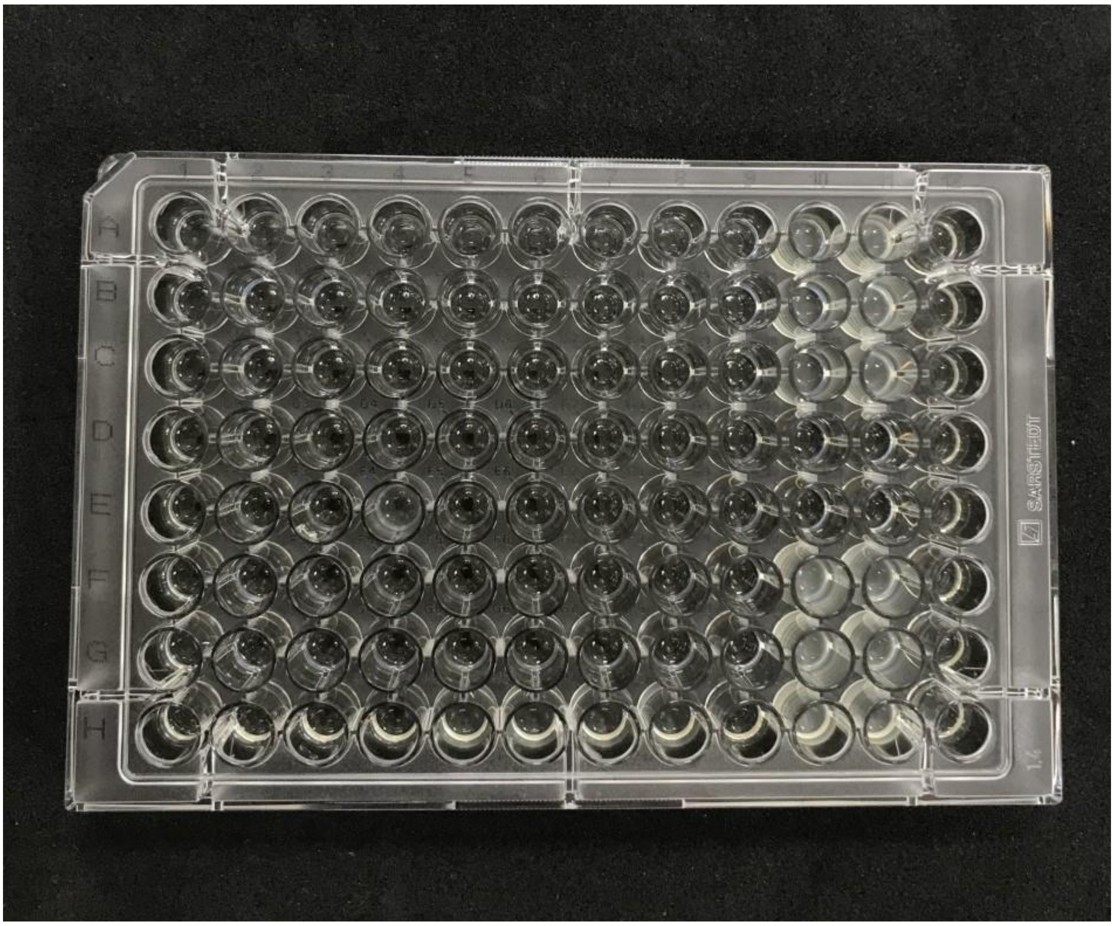
Πίνακας 2. Εύρος συγκεντρώσεων αντιβιοτικών

	AMOXICILLIN (mg/L)							
E.coli	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Enterococcus	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16
	CIPROFLOXACIN (mg/L)							
E.coli	0,015	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2
Enterococcus	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
	SULFAMETHOXAZOLE (mg/L)							
E.coli	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
Enterococcus	0,031	0,062	0,125	0,25	0,5	1	2	4

Διαδικασία MIC:

Στόχος της διαδικασίας MIC ήταν ο υπολογισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης του εκάστοτε αντιβιοτικού που αναστέλλει το 60% του εκάστοτε βακτηριακού πληθυσμού (MIC_{60}). Με την τιμή MIC_{60} λειτουργούν όλες οι βάσεις δεδομένων, συμπεριλαμβανομένου αυτής του EUCAST, η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Ένα microplate 96 πηγαδιών διαθέτει 8 σειρές (A-H) και 12 στήλες. Κάθε τέτοιο plate χρησιμοποιήθηκε για να εξετασθούν τέσσερα μικροβιακά στελέχη που αφορούν την είσοδο και την έξοδο της εγκατάστασης για ένα μήνα την κάθε φορά.



Εικόνα 16. Microplate 96 πηγαδιών

Η διαδικασία ακολούθησε τα παρακάτω βήματα:

- Προσθήκη 100μL Broth με τη χρήση πολυκάναλης αυτόματης πιπέτας σε κάθε πηγάδι του plate. Η 12η στήλη του plate στο τέλος θα περιέχει μόνο την ποσότητα του Broth και θα αποτελεί το τυφλό διάλυμα.

- Προσθήκη 100μL αντιβιοτικού στις στήλες 1-9 της 1ης σειράς. Το αντιβιοτικό που θα υπάρχει στην πρώτη σειρά, θα έχει υποστεί με αυτόν τον τρόπο αραίωση της συγκέντρωσής του κατά ½. Για παράδειγμα, αν θέλουμε η πρώτη σειρά να έχει συγκέντρωση αντιβιοτικού 64mg/L , τότε ξεκινάμε με 100μL από αρχική συγκέντρωση 128mg/L.

- Χρησιμοποιούμε την πολυκάναλη πιπέτα με ρύγχη για τις στήλες 1-9 και ύστερα από πολύ καλή ανάδευση του κάθε πηγαδιού της πρώτης σειράς, παίρνουμε 100μL και τα μεταφέρουμε στη δεύτερη σειρά. Επαναλαμβάνουμε το ίδιο βήμα για κάθε σειρά του plate. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται αραίωση του αντιβιοτικού κάθε φορά κατά ½ και στο τέλος η πρώτη σειρά θα έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ η τελευταία την ελάχιστη. Τα τελευταία 100μL από την ανάδευση της τελευταίας σειράς τα απορρίπτουμε.

- Χρησιμοποιούμε την πολυκάναλη πιπέτα για να προσθέσουμε στο plate τα εναιωρήματα. Τα 5μL κάθε στελέχους συγκέντρωσης 10^6 CFUS/mL θα μπουν σε δύο στήλες κάθε φορά για λόγους επαναληψιμότητας. Το πρώτο στέλεχος θα προστεθεί στις στήλες 1,2 και στα τρία πρώτα πηγάδια της στήλης 10, το δεύτερο στέλεχος θα προστεθεί στις στήλες 3,4 και στα τρία τελευταία πηγάδια της στήλης 10, το τρίτο στέλεχος στις στήλες 5,6 και στα τρία πρώτα πηγάδια της στήλης 11 και το τέταρτο στέλεχος στις στήλες 7,8 και στα τρία τελευταία πηγάδια της στήλης 11. Οι στήλες 10 και 11 στην ουσία, θα περιέχουν μόνο broth και τα control των μικροοργανισμών (για να μετρηθεί η ανάπτυξή τους δηλαδή απουσία αντιβιοτικού), ενώ η στήλη 9 θα περιέχει μόνο το broth και το αντιβιοτικό ώστε να μπορεί να μετρηθεί η οπτική απορρόφησή τους.

- Εντέλει, το plate τοποθετείται στον επωαστικό για 24h στην περίπτωση στελεχών *E. coli* και για 48h στην περίπτωση στελεχών *Enterococcus sp.*, ακριβώς όπως οι συνθήκες επώασης των καλλιεργειών τους. Μετά την επώαση, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών ελέγχεται με φασματοφωτόμετρο πλακέτας (microplate reader).

Πίνακας 3. Διάταξη microplate

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

όπου ***1*** αντιστοιχεί στο στέλεχος 1, ***2*** αντιστοιχεί στο στέλεχος 2, ***3*** στο στέλεχος 3 και ***4*** στο σέλεχος 4.

3.2.3 Μέθοδος ελέγχου οικοτοξικότητας

<u>Δημιουργία εναιωρήματος του βιοδείκτη *Vibrio fischeri*:</u>

Προστέθηκε σε μία μικρή κωνική φιάλη μία μικρή ποσότητα των 10-15μ L Nutrient Broth για να δημιουργηθεί το εναιώρημα του *Vibrio fischeri* που θα αποτελούσε το δείκτη οικοτοξικότητας των δειγμάτων. Στη συνέχεια, προστέθηκε στη φιάλη μία «κρικιά» από την ανακαλλιέργεια του *V. fischeri* και ύστερα από καλό vortex, λήφθηκε με αυτόματη πιπέτα των 1000μ L και τοποθετήθηκε στην κυψελίδα του φασματοφωτόμετρου. Όπως στη διαδικασία του MIC, στόχος ήταν η δημιουργία εναιωρήματος με A=0,1 που θα αντιστοιχεί σε συγκέντρωση αποικιών της τάξης 10^8 CFUS/ mL. Μετά την δημιουργία του εναιωρήματος, λήφθηκε 1mL από αυτό και το τοποθετήθηκε σε κυλινδρικό σωλήνα με 9 mL Broth. Μετά από πολύ καλή ανάδευση, λήφθηκαν 2 mL του διαλύματος και τοποθετήθηκαν σε άλλο κυλινδρικό σωλήνα που περιείχε 18mL Broth. Η διαδοχική αραίωση θα οδηγήσει στη δημιουργία της επιθυμητής συγκέντρωσης αποικιών, αυτή των 10^6 CFUS/mL.

Διαδικασία ελέγχου οικοτοξικότητας:

Για τον έλεγχο οικοτοξικότητας χρησιμοποιήθηκε ίδιου είδους microplate με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία MIC. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Προσθέτουμε σε όλα τα πηγάδια του plate 100μL Nutrient Broth.

- Ο έλεγχος τοξικότητας σε κάθε plate θα γίνεται για δείγματα εισόδου (A) και εξόδου (C) δύο μηνών κάθε φορά. Έστω ότι είναι επιθυμητός ο έλεγχος για τα δείγματα Οκτωβρίου και Νοεμβρίου 2021. Η είσοδος του Οκτωβρίου θα προστεθεί σε ποσότητα των 100μL στις στήλες 1-3 και για την σειρά A, η έξοδος Οκτωβρίου σε ίδια ποσότητας στις στήλες 4-6 και για τη σειρά A, η είσοδος του Νοεμβρίου στις στήλες 7-9 για τη σειρά A και η έξοδος του Νοεμβρίου στις στήλες 10-12 για τη σειρά A.

- Χρησιμοποιούμε την πολυκάναλη πιπέτα με ρύγχη για τις στήλες 1-12 και για τις σειρές A-G και ύστερα από πολύ καλή ανάδευση του κάθε πηγαδιού της πρώτης σειράς, παίρνουμε 100μL και τα μεταφέρουμε στη δεύτερη σειρά. Επαναλαμβάνουμε το ίδιο βήμα για κάθε σειρά. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται αραίωση του δείγματος κάθε φορά κατά ½ και στο τέλος η πρώτη σειρά θα έχει τη μέγιστη συγκέντρωση λύματος, ενώ η τελευταία την ελάχιστη. Τα τελευταία 100μL από την ανάδευση της τελευταίας σειράς τα απορρίπτουμε.

- Στη συνέχεια προστίθεται με πολυκάναλη πιπέτα το εναιώρημα του *V. fischeri* σε ποσότητα των 5μL στις στήλες 1,2,4,5,7,8,10,11 και για τις σειρές A-G, καθώς επίσης και μια τριπλέτα του βιοδείκτη στις στήλες 10-12 μόνο στη σειρά H. Η τριπλέτα θα αποτελεί το control, δηλαδή με αυτή θα μετρηθεί η ικανότητα του *V. fischeri* να αναπτύσσεται εκτός δειγμάτων.

- Η σειρά H και για τις στήλες 1-9 θα περιέχει μόνο το broth για να μετρηθεί η οπτική απορρόφησή του και να βεβαιωθούμε ότι δεν έγινε κάποια επιμόλυνση στο plate. Οι στήλες 3,6,9 και 12 θα περιέχουν μόνο broth και το αντίστοιχο δείγμα για να μπορεί να μετρηθεί η οπτική απορρόφηση του κάθε λύματος.

- Το plate στο τέλος επωάζεται για 24h στους 30°C.

- Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, μετράται με το Microplate reader η οπτική απορρόφηση του plate, ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των απορροφήσεων του λύματος, με και χωρίς την παρουσία του βιοδείκτη και να μετρηθεί η ανάπτυξη του βιοδείκτη εκτός του λύματος.

Πίνακας 4. Διάταξη plate ελέγχου τοξικότητας για την είσοδο (Α) και έξοδο (C) των μηνών Οκτωβρίου και Νοεμβρίου

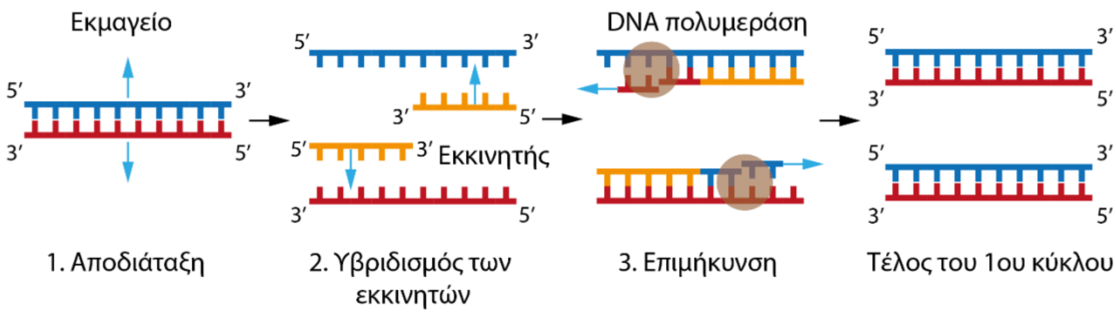
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A OCT. + VIBRIO	A OCT. + VIBRIO	A OCT.	C OCT. + VIBRIO	C OCT. + VIBRIO	C OCT.	A NOV. + VIBRIO	A NOV. + VIBRIO	A NOV.	C NOV. + VIBRIO	C NOV. + VIBRIO	C NOV.
B	A OCT. + VIBRIO	A OCT. + VIBRIO	A OCT.	C OCT. + VIBRIO	C OCT. + VIBRIO	C OCT.	A NOV. + VIBRIO	A NOV. + VIBRIO	A NOV.	C NOV. + VIBRIO	C NOV. + VIBRIO	C NOV.
C	A OCT. + VIBRIO	A OCT. + VIBRIO	A OCT.	C OCT. + VIBRIO	C OCT. + VIBRIO	C OCT.	A NOV. + VIBRIO	A NOV. + VIBRIO	A NOV.	C NOV. + VIBRIO	C NOV. + VIBRIO	C NOV.
D	A OCT. + VIBRIO	A OCT. + VIBRIO	A OCT.	C OCT. + VIBRIO	C OCT. + VIBRIO	C OCT.	A NOV. + VIBRIO	A NOV. + VIBRIO	A NOV.	C NOV. + VIBRIO	C NOV. + VIBRIO	C NOV.
E	A OCT. + VIBRIO	A OCT. + VIBRIO	A OCT.	C OCT. + VIBRIO	C OCT. + VIBRIO	C OCT.	A NOV. + VIBRIO	A NOV. + VIBRIO	A NOV.	C NOV. + VIBRIO	C NOV. + VIBRIO	C NOV.
F	A OCT. + VIBRIO	A OCT. + VIBRIO	A OCT.	C OCT. + VIBRIO	C OCT. + VIBRIO	C OCT.	A NOV. + VIBRIO	A NOV. + VIBRIO	A NOV.	C NOV. + VIBRIO	C NOV. + VIBRIO	C NOV.
G	A OCT. + VIBRIO	A OCT. + VIBRIO	A OCT.	C OCT. + VIBRIO	C OCT. + VIBRIO	C OCT.	A NOV. + VIBRIO	A NOV. + VIBRIO	A NOV.	C NOV. + VIBRIO	C NOV. + VIBRIO	C NOV.
H	BROTH	BROTH	BROTH	BROTH	BROTH	BROTH	BROTH	BROTH	BROTH	VIBRIO	VIBRIO	VIBRIO

3.2.4 Ανίχνευση γονιδίου ανθεκτικότητας

Η ανίχνευση γονιδίου ανθεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR / RT-PCR). Η απομόνωση γενετικού υλικού των δειγμάτων έγινε με τη χρήση του Nucleospin Soil kit και τα αποτελέσματα ποσότητας και καθαρότητας DNA παρατίθενται στο Παράρτημα της εργασίας.

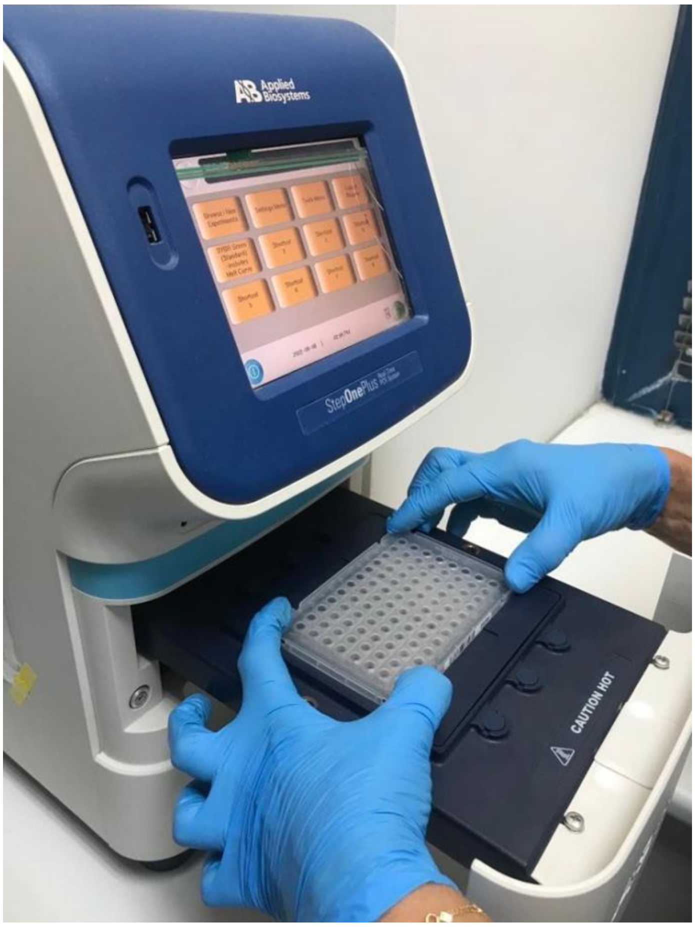
Η RT-PCR αποτελεί μια γρήγορη, ειδική και ευαίσθητη μέθοδο για την ενίσχυση αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων και χρησιμοποιείται ευρέως σε ερευνητικά και κλινικά εργαστήρια (Śpibida et al., 2017). Με την RT-PCR ένα μέρος του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, με την προϋπόθεση ότι γνωρίζουμε την νουκλεοτιδική του αλληλουχία, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό γονιδίων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα (Νιάρχος, 2015). Τα στάδια που ακολουθεί η PCR σε κάθε κύκλο είναι τα εξής (Papanikolaou, 2015):

- Αποδιάταξη (denaturation): Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95 ° C.
- Υβριδισμός εκκινητών (annealing): Οι εκκινητές (primers) υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
- Επιμήκυνση (extension): Η πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας νουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως μήτρα. Η ταχύτητα σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι της τάξης των 1000 bp ανά λεπτό. Η σύνθεση του DNA γίνεται με κατεύθυνση 5’→3’.



Εικόνα 17. Στάδια πρώτου κύκλου PCR (Papanikolaou, 2015)

Η μέθοδος RT-PCR στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση της αλληλουχίας του γονιδίου ανθεκτικότητας ampC και του γονιδίου 16S rRNA. Το γονίδιο ampC προσδίδει αντοχή ενάντια στις πενικιλλίνες και καρβαπενέμες και ακόμη μεγαλύτερη αντίσταση απέναντι στις κεφαλοσπορίνες.



Εικόνα 18. RT-PCR

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων ήταν:

Πίνακας 5. Αλληλουχία εκκινητών RT-PCR.

Γονίδιο στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία (5΄→ 3΄)	Προϊόν PCR (bp)	Βιβλιογραφία
16S rRNA	8-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500	(Dupont et al., 2013)
	1492-R	GGTTACCTTGTTACGACTT		
ampC	ampC-F	TTCTATCAAMACTGGCARCC	550	(Schwartz et al., 2003)
	ampC-R	CCYTTTTATGTACCCAYGA		

Ο όγκος της αντίδρασης είναι 20μL και τα περιεχόμενα αντίδρασης RT-PCR είναι:

Πίνακας 6. Περιεχόμενα αντίδρασης RT-PCR για το ampC

Μείγμα PCR	Συγκέντρωση
Mastermix	1X
Primer F	0.2μM
Primer R	0.2μM
DNA	2μL

Πίνακας 7. Κύκλοι αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση του ampC

Θερμοκρασία	Χρόνος	
94	5min	
94	30s	**35 cycles**
49	30s	
72	1min	
95	15s	**Melt curve stage**
60	1min	
95	15s	

Πίνακας 8. Περιεχόμενα αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA

Μείγμα PCR	Συγκέντρωση
Mastermix	1X
Primer F	500nM
Primer R	500nM
DNA	2μL

Πίνακας 9. Κύκλοι αντίδρασης RT-PCR για την ανίχνευση του γονιδίου 16S rRNA

Θερμοκρασία	Χρόνος	
95	4min	
95	1min	**30 cycles**
55	30s	
72	30s	
95	15s	**Melt curve stage**
60	1min	
95	15s	

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα βακτηριακά στελέχη που μας απασχολούν στην παρούσα εργασία, όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι *E.coli* και *Enterococcus*. Η *E. coli* ανήκει στο γένος *Escherichia* και στη μεγάλη οικογένεια των *Enterobacteriaceae*, ενώ ο *Enterococcus* sp. ανήκει στην οικογένεια των *Enterococcaceae*.

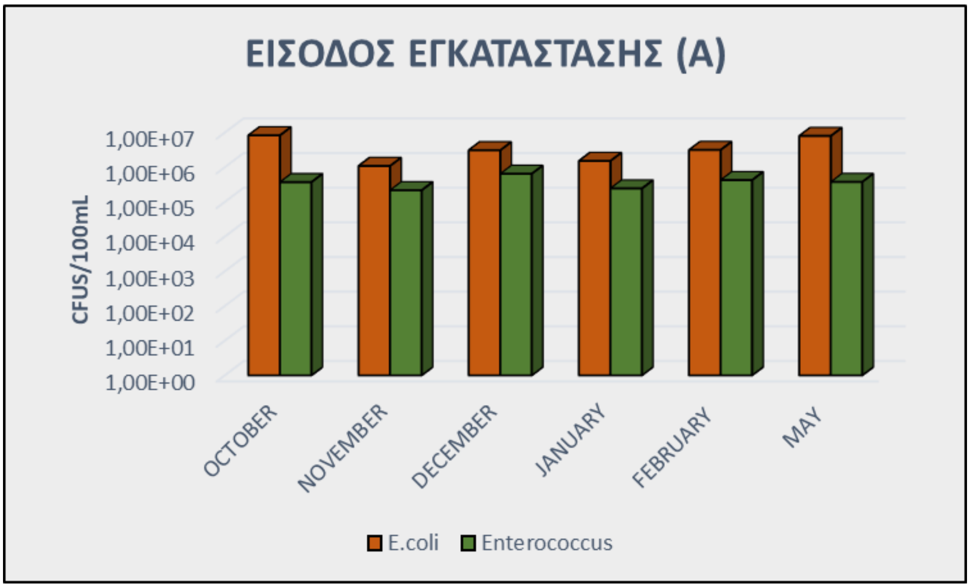
Τα *Enterobacteriaceae* είναι μια μεγάλη οικογένεια αρνητικών Gram (-) βακτηρίων, η οποία περιλαμβάνει πάνω από 30 γένη και σχεδόν όλα είναι προαιρετικά αναερόβια. Περιλαμβάνουν πολλά από τα πιο γνωστά παθογόνα, όπως η *Salmonella,* η *Escherichia coli*, η *Klebsiella* και η *Shigella* και όλα συνήθως εκτός των δύο τελευταίων, διαθέτουν περιτριχώδη μαστίγια που συμβάλλουν στην κινητικότητά τους. Τα μέλη των *Enterobacteriaceae* μπορούν να αναφέρονται ως εντεροβακτήρια ή "εντερικά βακτήρια", καθώς πολλά μέλη ζουν στο έντερο των ζώων (Rock & Donnenberg, 2014).

Τα *Enterococcaceae* είναι μια οικογένεια θετικών κατά Gram βακτηρίων που κατατάσσονται στην τάξη των *Lactobacillales*. Είναι προαιρετικά αναερόβια βακτήρια και δεν έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σπόρια. Περιλαμβάνουν τα *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Pilibacter*, *Tetragenococcus* και *Vagococcus*. Είναι ικανά να επιβιώνουν σε αντίξοο περιβάλλον, όπως σε ακραίες θερμοκρασίες, μεγάλο εύρος pH (4,5-10,0) και υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (Fisher & Phillips, 2009). Το γένος *Enterococcus* αποτελεί το πιο άφθονο γένος, αφού περιλαμβάνει μέχρι σήμερα 43 είδη (Γαβαλά, 2018).

4.1.1 Μικροβιακή ανάλυση λυμάτων

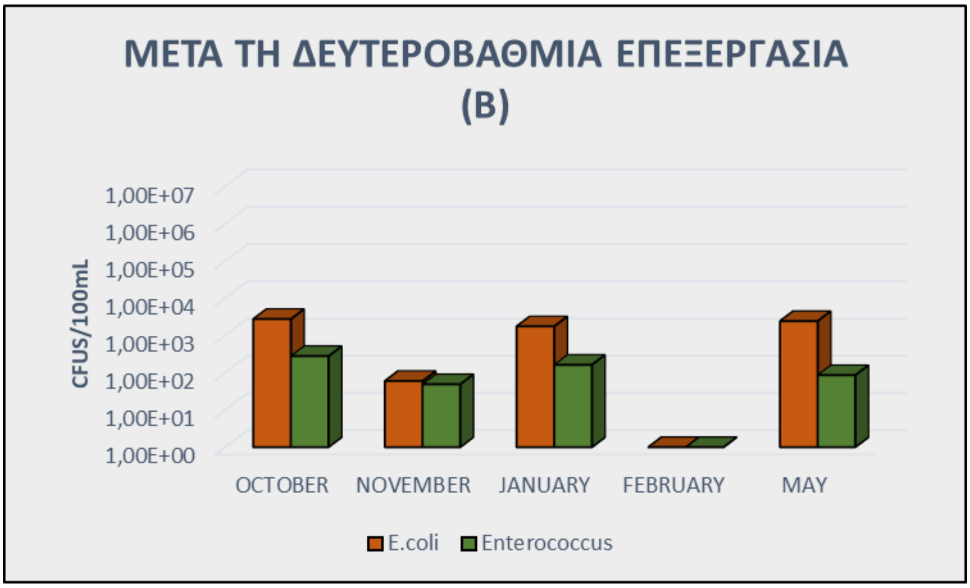
Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής τα δείγματα που συλλέχθηκαν προέρχονται από τη Δημοτική Επιχείρηση Ύδρευσης Αποχέτευσης Β. Άξονα Δ. Πλατανιά. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο Οκτώβριος 2021 – Φεβρουάριος 2022 και κατά τον Μάιο του 2022. Τα δείγματα προέρχονταν από την είσοδο του βιολογικού καθαρισμού, την εκροή της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας και τέλος από την έξοδο μετά το στάδιο της χλωρίωσης.

Η καταμέτρηση των αποικιών για τα βακτηριακά στελέχη έγινε κατόπιν διήθησης του εκάστοτε δείγματος και μετά το πέρας του χρόνου επώασης των τριβλίων. Για την *E.coli* μετρήθηκαν αποικίες με έντονο πράσινο χρώμα, ενώ για τον *Enterococcus* αποικίες με έντονο μαύρο-κόκκινο χρώμα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω γραφήματα.



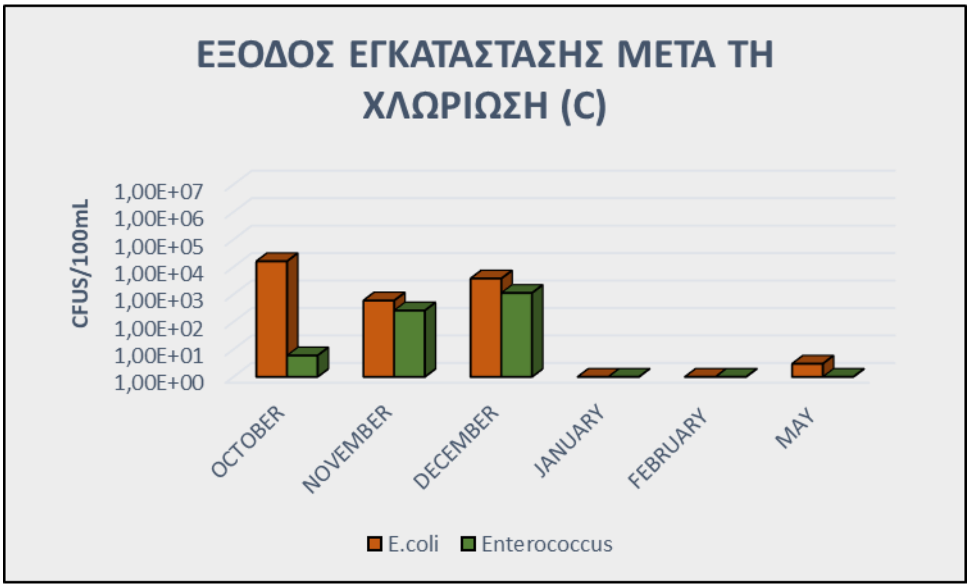
Γράφημα 1. Ανίχνευση *E. coli* και *Enterococcus* για τους μήνες Οκτώβριο με Φεβρουάριο και Μάιο

Παρατηρείται ότι το ποσοστό αποικιών της *E. coli* στην είσοδο της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων είναι μεγαλύτερο από αυτό του *Enterococcus* sp. Παράλληλα, όμως δεν παρατηρείται καμία σημαντική αυξομείωση ανάμεσα στους μήνες, γεγονός που δικαιολογείται, αφού η σύσταση του λύματος δεν υπέστη καμία αλλαγή λόγω του ότι η περίοδος δειγματοληψίας δεν ήταν τουριστική.



Γράφημα 2. Ανίχνευση *E. coli* και *Enterococcus* στην έξοδο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας της εγκατάστασης για τους μήνες Οκτώβριο με Φεβρουάριο και Μάιο

Παρατηρείται ήδη σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των βακτηρίων μετά τη δευτεροβάθμια καθίζηση σε σχέση με τα δείγματα εισόδου της εγκατάστασης. Και για τα δύο βακτηριακά στελέχη δεν υπήρξαν αποικίες προς μέτρηση για το μήνα Φεβρουάριο, επομένως μπορεί να εκτιμηθεί ότι οι συνθήκες κατά την επεξεργασία δεν επέτρεψαν στα βακτηριακά στελέχη να αναπτυχθούν όπως συμβαίνει στους υπόλοιπους μήνες και η δευτεροβάθμια επεξεργασία της εγκατάστασης ήταν επιτυχής από τα πρώτα κιόλας στάδια επεξεργασίας. Για τον μήνα Δεκέμβριο η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε μόνο στην είσοδο και στην έξοδο της εγκατάστασης, επομένως δεν μπορεί να γίνει σύγκριση στο πλαίσιο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας.

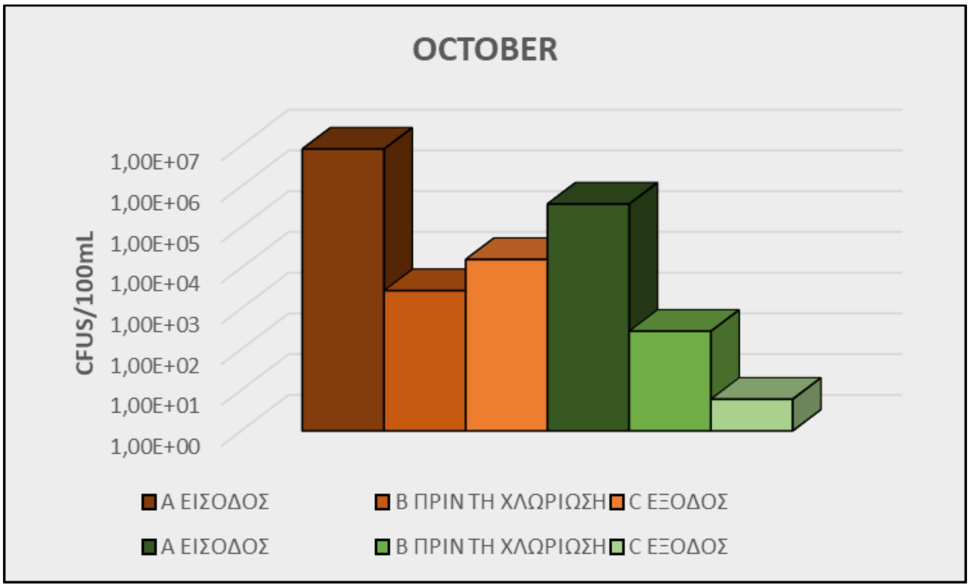


Γράφημα 3. Ανίχνευση *E. coli* και *Enterococcus* στα δείγματα εξόδου της εγκατάστασης για τους μήνες Οκτώβριο με Φεβρουάριο και Μάιο

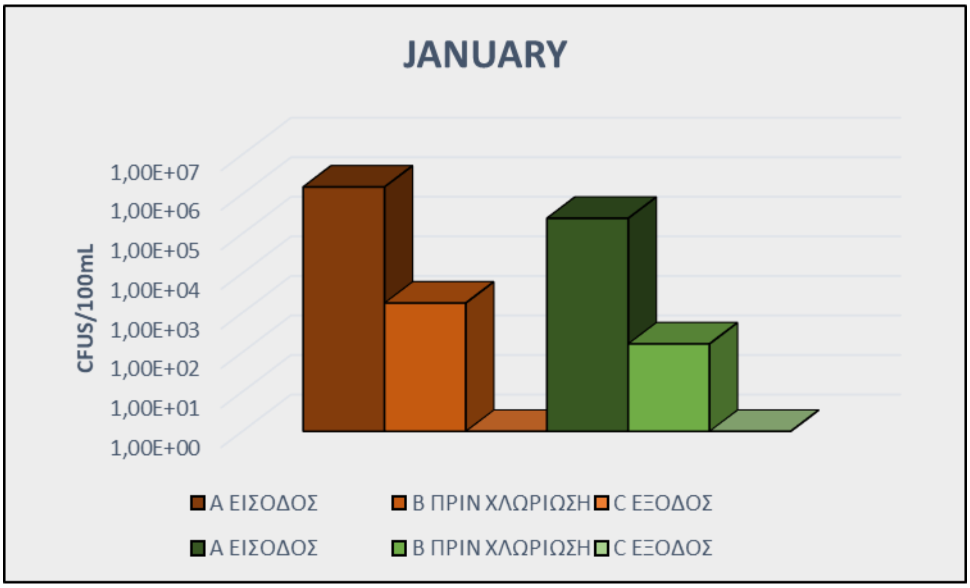
Παρατηρείται εμφανής μείωση συγκέντρωσης των βακτηριακών στελεχών μεταξύ εισόδου και εξόδου της εγκατάστασης. Σημειώνεται ότι η έξοδος έπεται του σταδίου της απολύμανσης, η οποία πραγματοποιείται με την χρήση χλωρίου (Cl_2) και έχει σκοπό την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών. Απώτερος στόχος είναι η αποφυγή μετάδοσης ασθενειών στον υδάτινο αποδέκτη, μέσω του νερού εκροής της εγκατάστασης. Είναι το τελευταίο στάδιο πριν την διάθεση των αποβλήτων στο φυσικό αποδέκτη και το μοναδικό με αποκλειστικό σκοπό την αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών.

Για τους μήνες Ιανουάριο και Φεβρουάριο παρατηρείται ολοκληρωτική καταστροφή των βακτηρίων λόγω χλωρίωσης, ενώ για το μήνα Μάιο, φαίνεται πως η απολύμανση ήταν επιτυχής τόσο απέναντι στον *Enterococcus* sp., αφού η μέτρηση αποκιών είναι μηδενική, αλλά και απέναντι στην *E.coli* αφού η μέτρηση είναι σχεδόν μηδενική. Για τους υπόλοιπους μήνες Οκτώβριο, Νοέμβριο και Δεκέμβριο παρατηρείται μείωση περίπου στο 50% των αποικιών, ενώ η μικρή αυξομείωση ανάμεσα στις μετρήσεις πριν τη χλωρίωση και εξόδου Οκτωβρίου για την περίπτωση της *E.coli* οδηγεί στο συμπέρασμα πως η χλωρίωση κατά το μήνα αυτό, δεν ήταν σημαντικά επιτυχής. Αντιθέτως, δεδομένου ότι η αυξομείωση είναι αρκετά μικρή και ο πληθυσμός αποικιών δεν αλλάζει σημαντικά, φαίνεται πως η απολύμανση δεν λειτούργησε αποτελεσματικά απέναντι στην *E.coli*.

Η αυξομείωση φαίνεται καλύτερα στο παρακάτω γράφημα:



Γράφημα 4. Ανίχνευση βακτηριακών δεικτών για το μήνα Οκτώβριο, όπου με πορτοκαλί χρώμα η *E.coli* και με πράσινο χρώμα ο *Enterococcus sp.*



Γράφημα 5. Ανίχνευση βακτηριακών δεικτών για το μήνα Ιανουάριο, όπου με πορτοκαλί χρώμα η *E.coli* και με πράσινο χρώμα ο *Enterococcus sp.*

Το παραπάνω διάγραμμα παρατίθεται για τη σύγκριση της αποτελεσματικότητας της χλωρίωσης του μήνα Ιανουαρίου σε σχέση με το μήνα Οκτώβριο. Κατά το μήνα Ιανουάριο όπως φαίνεται, ο πληθυσμός της *E.coli* μειώνεται ήδη στο 50% από είσοδο σε δευτεροβάθμια επεξεργασία, ενώ κατά την έξοδο το βακτήριο δεν εμφάνισε καμία αποικία. Είναι λοιπόν εμφανής πως η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης σε μία εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων είναι φανερά σημαντική.

<u>Παρατηρήσεις:</u>

Το γενικό συμπέρασμα που προκύπτει από τα παραπάνω διαγράμματα είναι ότι τα περισσότερα βακτήρια, ανεξαρτήτως του είδους τους δεν ήταν αρκετά ανθεκτικά στην απολύμανση με τη διαδικασία χλωρίωσης, αφού τους περισσότερους μήνες τόσο τα στελέχη *E. coli*, όσο και τα στελέχη *Enterococcus* αδρανοποιήθηκαν τελείως. Παρόλα αυτά, για τα βακτηριακά στελέχη *E.coli* για τους μήνες Οκτώβριο, Νοέμβριο και Δεκέμβριο η μείωση τους σε σχέση με την είσοδο της εγκατάστασης ήταν φανερά σημαντική (3 Logs), ωστόσο δεν υπήρξε πλήρης απομάκρυνση. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη φύση του βακτηρίου *E.coli,* το οποίο ως αρνητικό Gram βακτήριο γενικά χαρακτηρίζεται ευαίσθητο σε συνθήκες απολύμανσης, όπως αυτές της χλωρίωσης. Αντίθετα, τα στελέχη *Enterococcus* sp. που θεωρούνται περισσότερο ανθεκτικά ως Gram (+), απομακρύνθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό (> 5 Logs) μετά τη χλωρίωση κατά τους ίδιους μήνες.

4.2 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών ορίζεται από το ISO 20776-2:2007 (212, ISO/TC, 2007) και με βάση αυτό διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

Πίνακας 10. Κατηγορίες μικροοργανισμών ως προς την ανθεκτικότητά τους

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

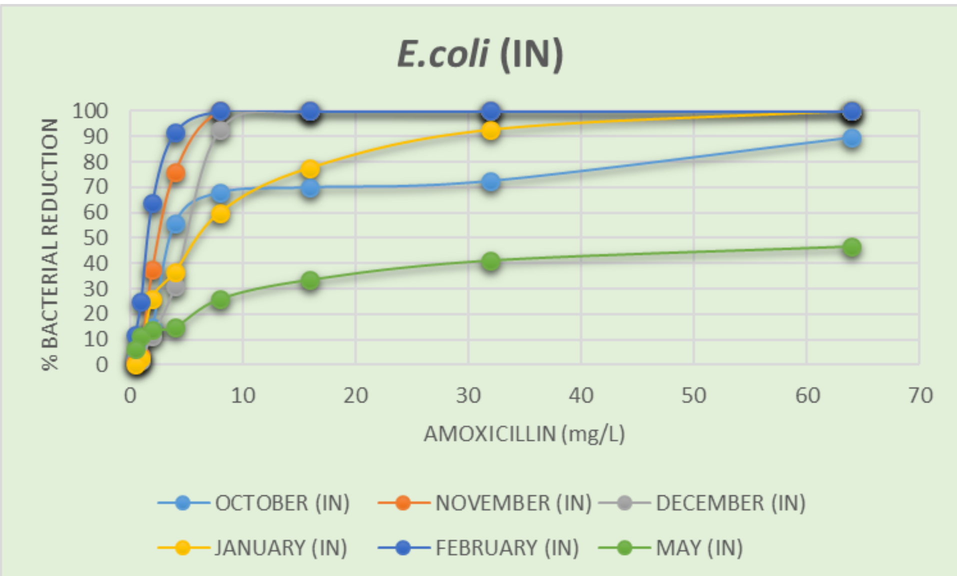
Στην παρούσα διπλωματική εργασία η κατηγοριοποίηση των περιβαλλοντικών μικροβιακών στελεχών που εξετάσθηκαν, κρίθηκε με βάση τα όρια ανασταλτικής συγκέντρωσης που ορίζει ο οργανισμός EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Για να ελεγχθεί η ανθεκτικότητα κάθε στελέχους σε συγκέντρωση αντιβιοτικού, εξετάσθηκε σε ποιά συγκέντρωση του αντιβιοτικού η μείωση του βακτηριακού πληθυσμού ήταν ≥ 60%. Τα όρια για τα εξεταζόμενα στελέχη φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 11. Όρια ανασταλτικής συγκέντρωσης EUCAST (EUCAST, 2022)

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Εύρος Ανασταλτικής Συγκέντρωσης MIC_{60} (mg/L)		
	Ευαίσθητος	Μετρίως ευαίσθητος	Ανθεκτικός
	AMOXICILLIN (AMOX)		
Enterococceae	MIC≤4	4<MIC<8	MIC>8
Enterobacteriaceae	MIC≤8	-	MIC>8
	CIPROFLOXACIN (CIP)		
Enterococceae	MIC≤4	-	MIC>4
Enterobacteriaceae	MIC≤0.25	0.25<MIC<0.5	MIC>0.5
	SULFAMETHOXAZOLE-TRIMETHOPRIM (SULF)		
Enterococceae	MIC≤0.032	0.032<MIC<1	MIC>1
Enterobacteriaceae	MIC≤2	2<MIC<4	MIC>4

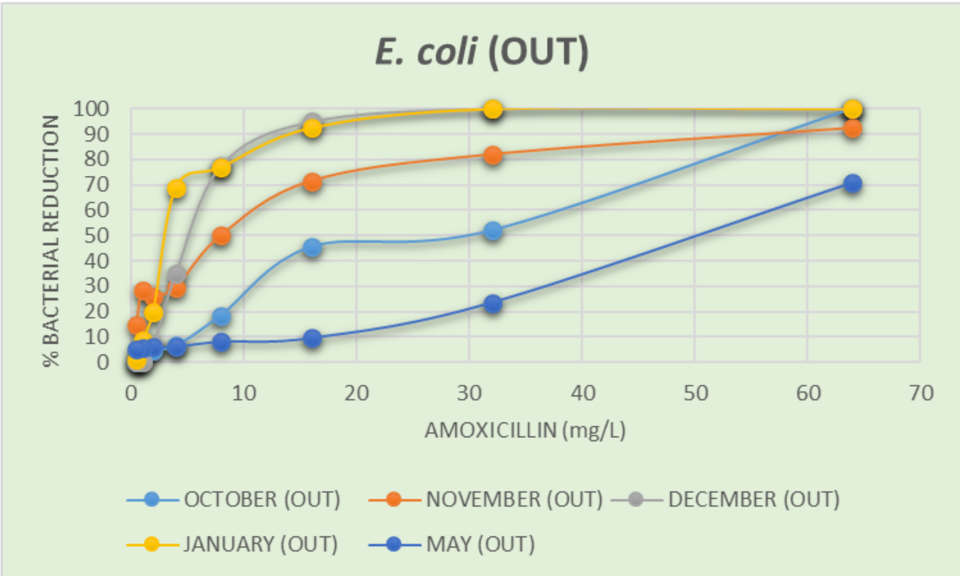
4.2.1 Escherichia coli

AMOXICILLIN



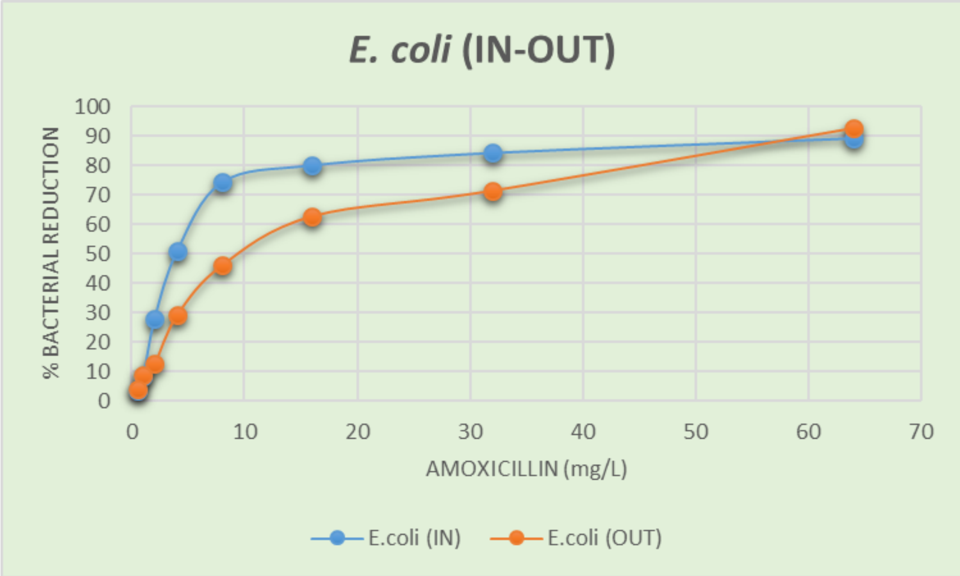
Γράφημα 6. Ποσοστιαία μείωση βακτηριακών στελεχών *E.coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amoxicillin (mg/L) κατά την είσοδο

Στο παραπάνω γράφημα παρατηρείται σημαντική ευαισθησία των βακτηριακών στελεχών στο αντιβιοτικό της Αμοξικιλλίνης για τους μήνες του Οκτωβρίου, Νοεμβρίου, Δεκεμβρίου και Ιανουαρίου, αφού το 60% της θνησιμότητας κυμαίνεται σε συγκέντρωση αντιβιοτικού μεταξύ 2-8mg/L, καθιστώντας τα στελέχη, με βάση τα όρια του Eucast (Πίνακας 4.), ευαίσθητα. Σημαντικά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα εμφανίζουν τα στελέχη *E.coli* κατά το μήνα Μάιο, καθώς η βακτηριακή μείωση δεν φτάνει ποτέ στο 60% ούτε με την μέγιστη συγκέντρωση του αντιβιοτικού, καθιστώντας τα στελέχη ανθεκτικά στο αντιβιοτικό.



Γράφημα 7. Ποσοστιαία μείωση βακτηριακών στελεχών *E.coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amoxicillin (mg/L) κατά την έξοδο

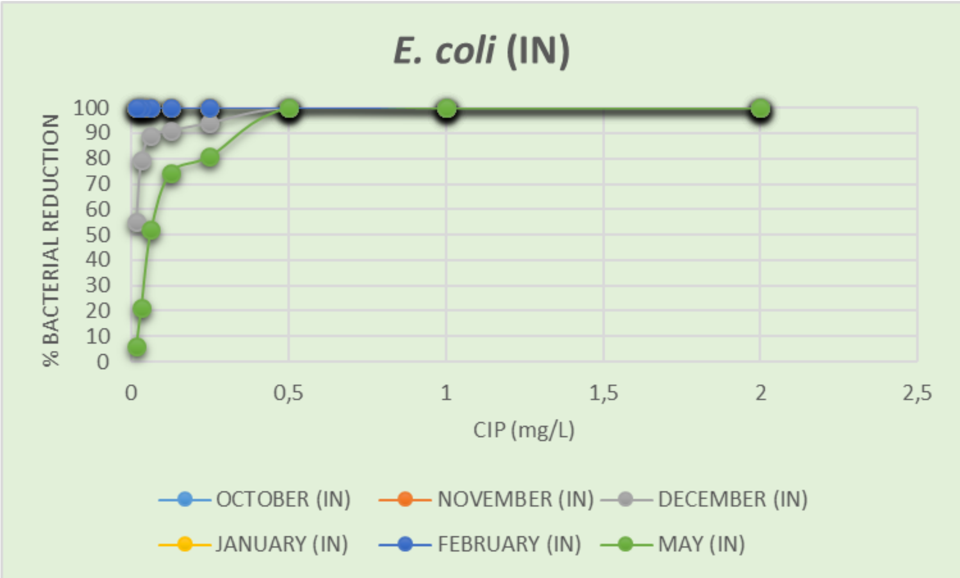
Με βάση το γράφημα παρατηρείται ότι κατά τους μήνες Νοέμβριο, Δεκέμβριο και Ιανουάριο, το 60% της βακτηριακής μείωσης εμφανίζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού 2-8mg/L, χαρακτηρίζοντας τα στελέχη ευαίσθητα και στην έξοδο. Για τους μήνες Οκτώβριο και Μάιο χρειάστηκαν οι μέγιστες συγκεντρώσεις των 32-64mg/L που ελέγχθηκαν, ώστε να επιτευχθεί 60% βακτηριακή μείωση του πληθυσμού. Παρατηρείται επίσης, πως κατά το μήνα Οκτώβριο, παρά τις ανάγκες για υψηλή συγκέντρωση αντιβιοτικού, επέρχεται 100% θνησιμότητα, σε αντίθεση με το μήνα Μάιο που η μέγιστη δοκιμή συγκέντρωσης αντιστοιχεί σε μόνο 70% μείωση του πληθυσμού. Συνεπώς, τα μόνα ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη απέναντι στην Αμοξικιλλίνη είναι αυτά του Οκτωβρίου και του Μαΐου.



Γράφημα 8. Μέση τιμή ποσοστιαίας μείωσης βακτηριακών στελεχών *E.coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amoxicillin (mg/L) κατά την είσοδο και έξοδο

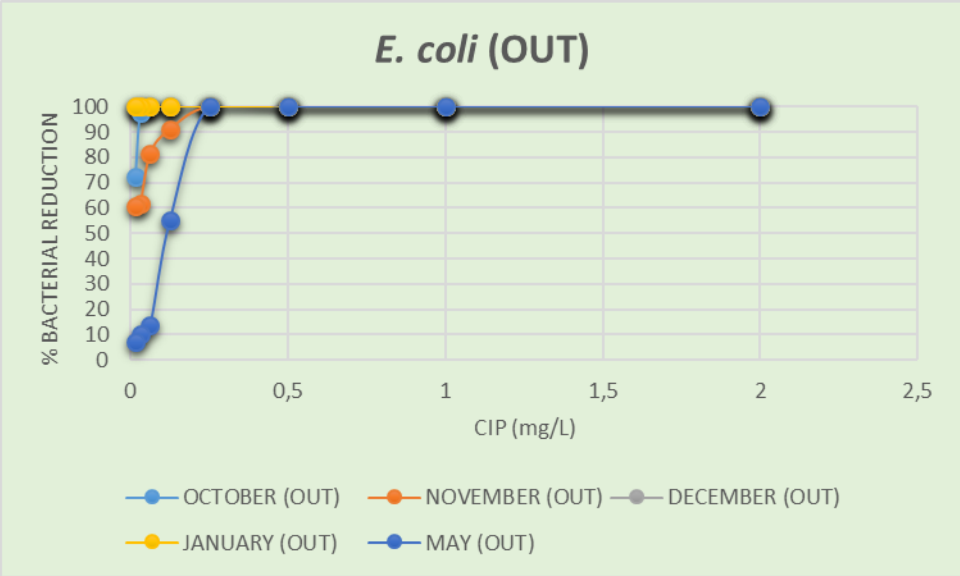
Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται πως το βακτήριο *E.coli* εμφανίζει παρόμοια πορεία θνησιμότητας απέναντι στο αντιβιοτικό της Αμοξικιλλίνης κατά την είσοδο και την έξοδο μετά την χλωρίωση. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού υπάρχει ανάπτυξη, όχι όμως σε σημείο που να μπορούν να χαρακτηριστούν συνολικά τα στελέχη της εισόδου ως ανθεκτικά στο αντιβιοτικό. Η ανθεκτικότητα της εξόδου παράλληλα, οφείλεται όπως αναφέραμε πριν, στα στελέχη του Οκτωβρίου και του Μαΐου. Σε γενικές γραμμές, φαίνεται το προφίλ ανθεκτικότητας διαφέρει από είσοδο σε έξοδο, αυξάνοντας ελαφρώς την ανθεκτικότητα των στελεχών στην Αμοξικιλλίνη κατά την έξοδο.

CIPROFLOXACIN



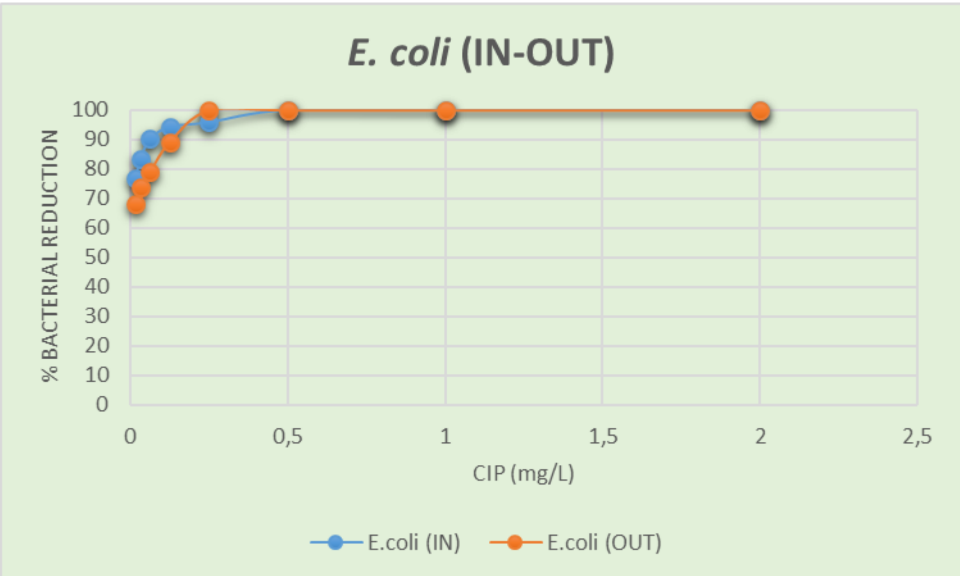
Γράφημα 9. Ποσοστιαία μείωση βακτηριακών στελεχών *E.coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin (mg/L) κατά την είσοδο

Στο γράφημα 8 φαίνεται η βακτηριακή μείωση της *E.coli* σε συγκεντρώσεις Ciprofloxacin. Παρατηρείται ότι κατά τους μήνες Οκτώβριο, Νοέμβριο, Ιανουάριο και Φεβρουάριο έχουμε 100% θνησιμότητα ακόμα και στην ελάχιστη συγκέντρωση CIP που δοκιμάστηκε, με αποτέλεσμα τα στελέχη να ορίζονται ως ευαίσθητα. Ευαίσθητα χαρακτηρίζονται και τα στελέχη για τους μήνες Δεκέμβριο και Μάιο, αφού παρά το γεγονός ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη ανάπτυξη σε σχέση με τη μηδενική ανάπτυξη των υπολοίπων μηνών, το 60% θνησιμότητας αντιστοιχεί σε συγκέντρωση CIP 0,016-0,1mg/L, πολύ χαμηλότερη δηλαδή συγκέντρωση από τη μέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση του EUCAST. Συγκεκριμένα για το μήνα Μάιο, τα στελέχη σε συγκέντρωση 0,016 mg/L εμφανίζουν 6% μείωση.



Γράφημα 10. Ποσοστιαία μείωση βακτηριακών στελεχών *E.coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin (mg/L) κατά την έξοδο

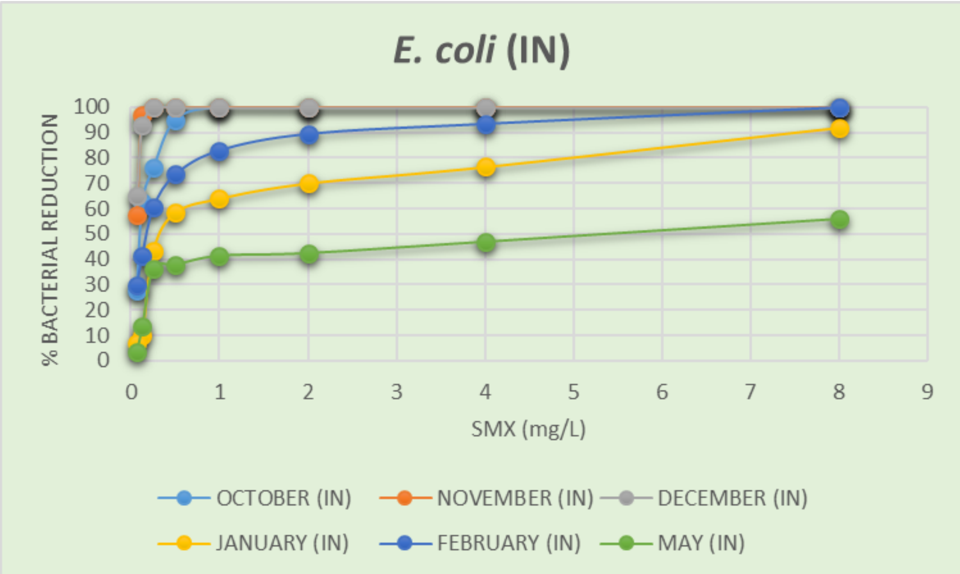
Κατά την έξοδο, για τους μήνες Δεκέμβριο και Ιανουάριο παρατηρείται εξαρχής 100% θνησιμότητα ακόμα και στην ελάχιστη συγκέντρωση CIP, ενώ για τους μήνες Οκτώβριο και Νοέμβριο, το 60-70% της θνησιμότητας παρατηρείται σε συγκεντρώσεις 0,01-0,03mg/L. Για το μήνα Μάιο, το 60% βακτηριακής μείωσης αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 0,12mg/L που και πάλι θεωρείται μικρή συγκέντρωση σε σχέση με το ανώτερο όριο των 0,5mg/L του EUCAST. Επομένως, όλα τα στελέχη κατά την έξοδο είναι ευαίσθητα στο αντιβιοτικό της Σιπροφλοξασίνης.



Γράφημα 11. Μέση τιμή ποσοστιαίας μείωσης βακτηριακών στελεχών *E.coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin (mg/L) κατά την είσοδο και έξοδο

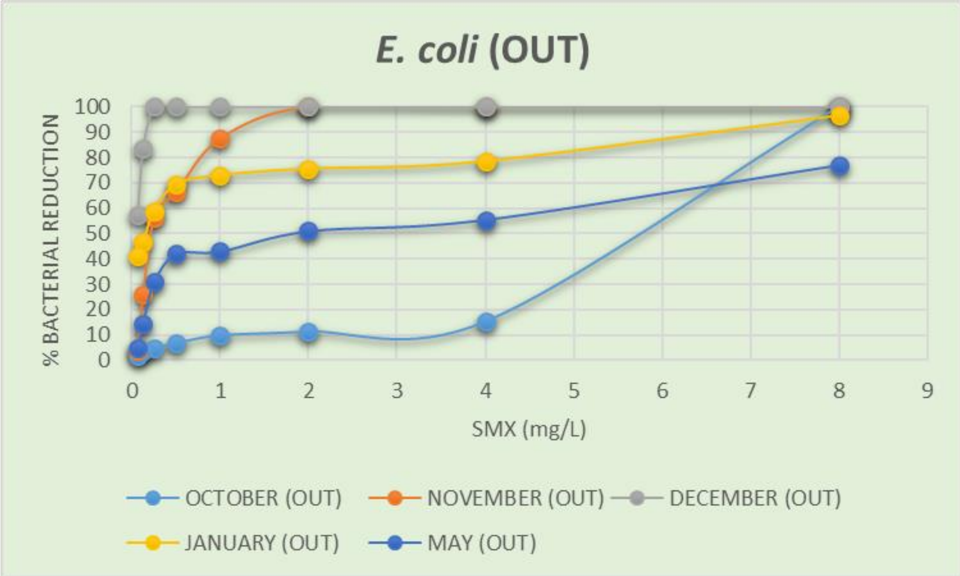
Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η σύγκριση μεταξύ βακτηριακής μείωσης εισόδου και εξόδου για το αντιβιοτικό της Σιπροφλοξασίνης. Παρατηρείται σχεδόν ίδιο προφίλ ανθεκτικότητας, με μία ελάχιστη αύξηση της ευαισθησίας των στελεχών κατά την έξοδο.

SULFAMETHOXAZOLE



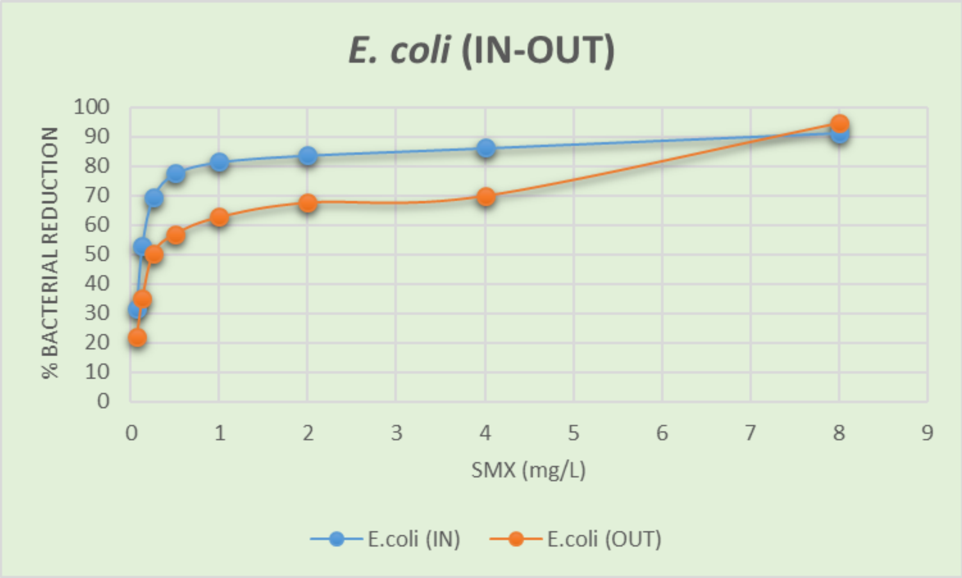
Γράφημα 12. Ποσοστιαία μείωση βακτηριακών στελεχών *E.coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Sulfamethoxazole (mg/L) κατά την είσοδο

Παρατηρείται πως για τους μήνες Οκτώβριο με Δεκέμβριο, το 60% βακτηριακής μείωσης αντιστοιχεί σε συγκέντρωση Σουλφαμεθοξαζόλης 0,06-0,1 mg/L, ενώ επέρχεται 100% θνησιμότητα σε συγκέντρωση αντιβιοτικού 0,25-1mg/L. Τα στελέχη του Ιανουαρίου και Φεβρουαρίου χρειάστηκαν συγκέντρωση αντιβιοτικού 8mg/L για να δώσουν 100% θνησιμότητα, ενώ τα στελέχη του Μαΐου φαίνεται να είναι σημαντικά πιο ανθεκτικά από τα υπόλοιπα, αφού στην ίδια συγκέντρωση φέρουν μόλις 55% βακτηριακή μείωση.



Γράφημα 13. Ποσοστιαία μείωση βακτηριακών στελεχών E.coli σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Sulfamethoxazole (mg/L) κατά την έξοδο

Στο παραπάνω διάγραμμα βλέπουμε την αλλαγή του προφίλ ανθεκτικότητας κατά την έξοδο ως προς το αντιβιοτικό της Σουλφαμεθοξαζόλης. Αρχικά να σημειωθεί ότι ο μήνας Φεβρουάριος δεν συμπεριλαμβάνεται στο διάγραμμα, καθώς δεν υπήρξε απομόνωση του βακτηρίου *E.coli* στο αρχικό λύμα. Για το μήνα Οκτώβριο παρατηρείται σημαντική διαφορά στο προφίλ ανθεκτικότητας, αφού τα στελέχη χρειάστηκαν συγκέντρωση των 8 mg/L για να εμφανίσουν 100% θνησιμότητα, ενώ στην αμέσως μικρότερη συγκέντρωση των 4 mg/L εμφάνισαν μόνο 16% μείωση. Παρόμοια πορεία ακολουθούν και τα στελέχη του Μαΐου που σε συγκέντρωση SMX 4mg/L εμφανίζουν 55% μείωση και δεν φτάνουν την 100% θνησιμότητα ούτε με τη μέγιστη συγκέντρωση, η οποία αντιστοιχεί συγκεκριμένα στο 77%. Τα στελέχη του Δεκεμβρίου δεν εμφανίζουν σχεδόν καμία διαφορά στο προφίλ, ενώ αυτά του Νοεμβρίου φαίνεται να αποκτούν μια αύξηση ανθεκτικότητας σε σχέση με την είσοδο, καθώς το 60% θνησιμότητας αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 0,06mg/L. Τα στελέχη του Μαΐου συνεχίζουν να είναι ανθεκτικά και στην έξοδο, μόνο με τη διαφορά ότι το 55% θνησιμότητας είναι πλέον στη συγκέντρωση 4mg/L Σουλφαμεθοξαζόλης.

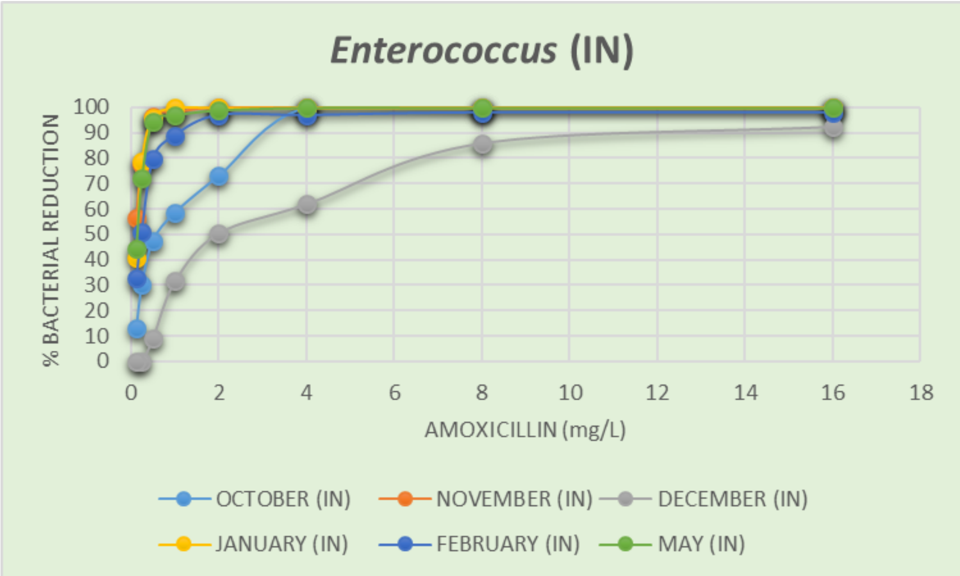


Γράφημα 14. Μέση τιμή ποσοστιαίας μείωσης βακτηριακών στελεχών *E.coli* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Sulfamethoxazole (mg/L) κατά την είσοδο και έξοδο

Το προφίλ ανθεκτικότητας δεν φαίνεται να αλλάζει ιδιαίτερα μεταξύ εισόδου και εξόδου όσον αφορά κυρίως τη μέγιστη συγκέντρωση Σουλφαμεθοξαζόλης. Εντούτοις, παρατηρείται μικρή αύξηση της ανθεκτικότητας των στελεχών στο αντιβιοτικό κατά την έξοδο.

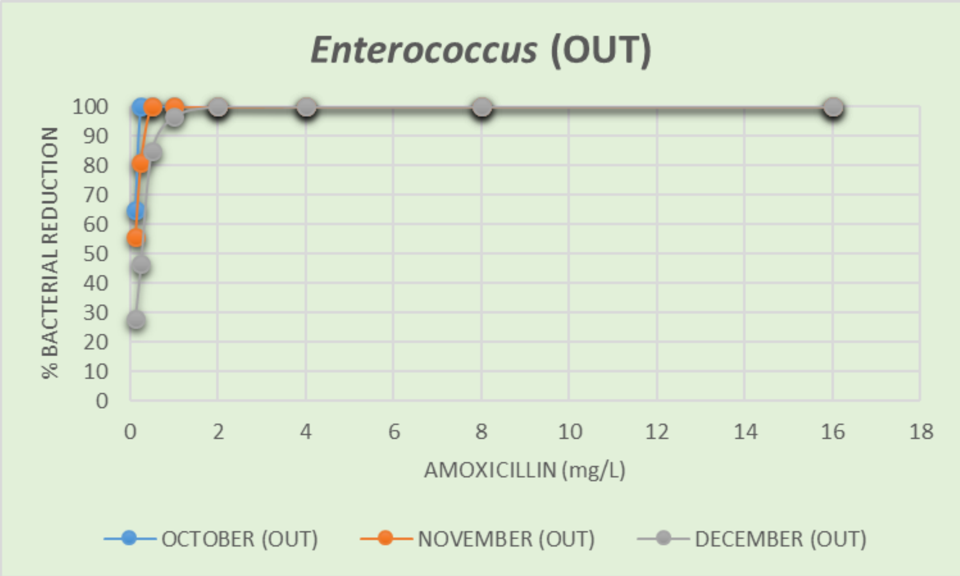
4.2.2 *Enterococcus sp.*

AMOXICILLIN



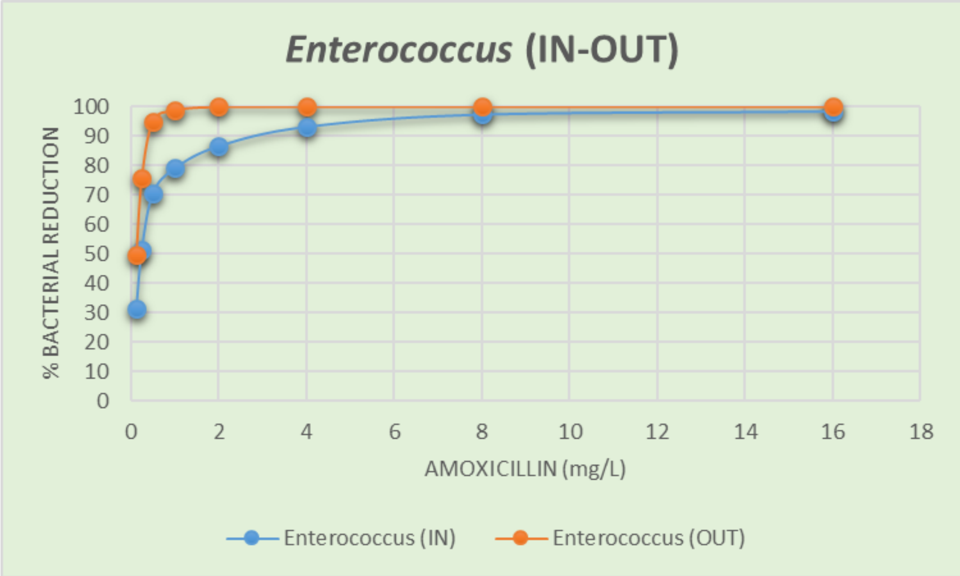
Γράφημα 15. Ποσοστιαία μείωση βακτηριακών στελεχών *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amoxicillin (mg/L) κατά την είσοδο

Από το διάγραμμα παρατηρείται πως για τους μήνες Νοέμβριο, Ιανουάριο, Φεβρουάριο και Μάιο, τα στελέχη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην Αμοξικιλλίνη, αφού το 60% θνησιμότητας επέρχεται σε συγκεντρώσεις αντιβιοτικού 0,1-0,5mg/L και σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 1 mg/L έχουμε 100% θνησιμότητα. Για το μήνα Οκτώβριο, στην ελάχιστη συγκέντρωση των 0,125 mg/L Αμοξικιλλίνης έχουμε 13% μείωση πληθυσμού, όμως η μείωση αυξάνεται ραγδαία μέχρι το 100% από τα 2mg/L και πάνω. Κατά το μήνα Δεκέμβριο παρατηρείται βακτηριακή ανάπτυξη για συγκεντρώσεις μικρότερες των 0,5mg/L, ενώ στα 0,5mg/L έχουμε 9% μόνο βακτηριακή μείωση. Το 60% βακτηριακής μείωσης αντιστοιχεί στα 4mg/L Αμοξικιλλίνης, ενώ η τα στελέχη φτάνουν πολύ κοντά στην ολική θνησιμότητα στα 16mg/L.



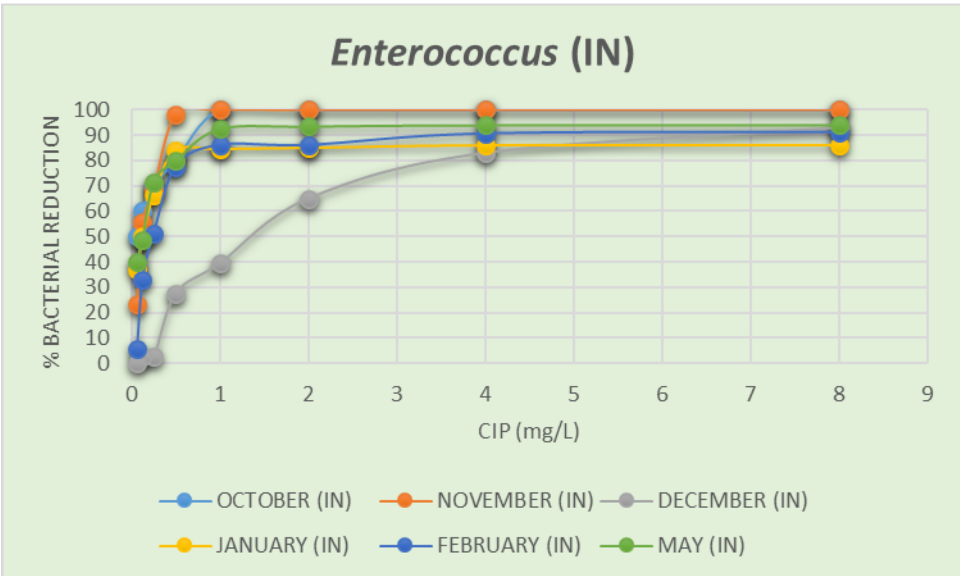
Γράφημα 16. Ποσοστιαία μείωση βακτηριακών στελεχών *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amoxicillin (mg/L) κατά την έξοδο

Σημειώνεται ότι τα στελέχη Ιανουαρίου, Φεβρουαρίου και Μαΐου δεν φαίνονται στο γράφημα, καθώς δεν απομονώθηκαν από το αρχικό δείγμα λύματος. Φαίνεται πως για όλους τους μήνες το προφίλ ανθεκτικότητας έχει διαφοροποιηθεί και πιο συγκεκριμένα παρατηρείται αύξηση της ευαισθησίας των στελεχών στο αντιβιοτικό. Συγκεκριμένα, για το μήνα Οκτώβριο επέρχεται 100% θνησιμότητα στη συγκέντρωση των 0,25mg/L και για το μήνα Νοέμβριο στη συγκέντρωση των 0,5mg/L. Η μεγαλύτερη αλλαγή στο προφίλ φαίνεται στο μήνα Δεκέμβριο, καθώς η 100% θνησιμότητα αντιστοιχεί σε 2mg/L αντιβιοτικού και ακόμα και στην ελάχιστη συγκέντρωση των 0,125 mg/L έχουμε περίπου 30% βακτηριακή μείωση.



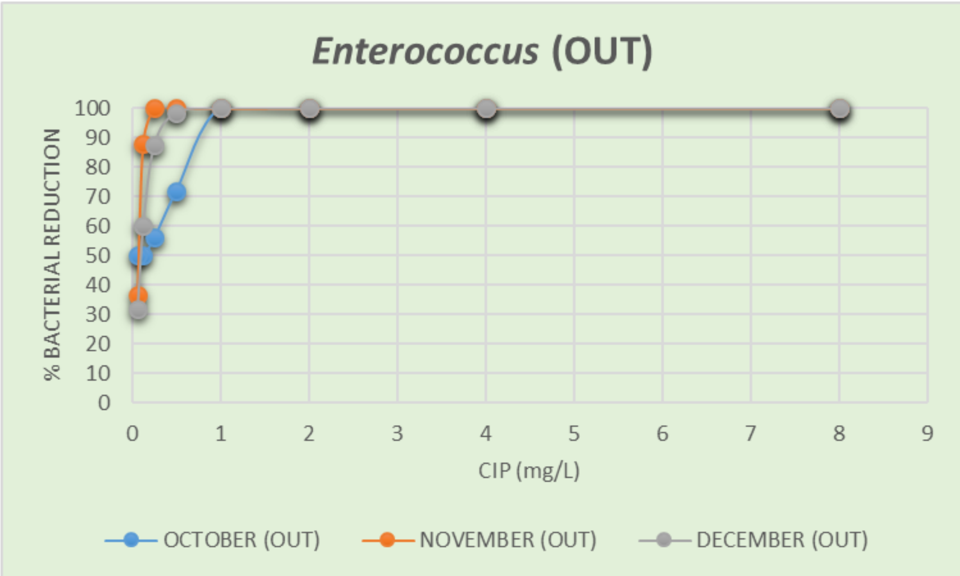
Γράφημα 17. Μέση τιμή ποσοστιαίας μείωσης βακτηριακών στελεχών *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Amoxicillin (mg/L) κατά την είσοδο και έξοδο

Η αλλαγή στο προφίλ ανθεκτικότητας και η αύξηση της ευαισθησίας των στελεχών του *Enterococcus sp*. φαίνεται καλύτερα στο παραπάνω γράφημα. Σύμφωνα με το εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης του EUCAST όλα τα στελέχη, τόσο εισόδου όσο και εξόδου ανήκουν στην κατηγορία των ευαίσθητων.



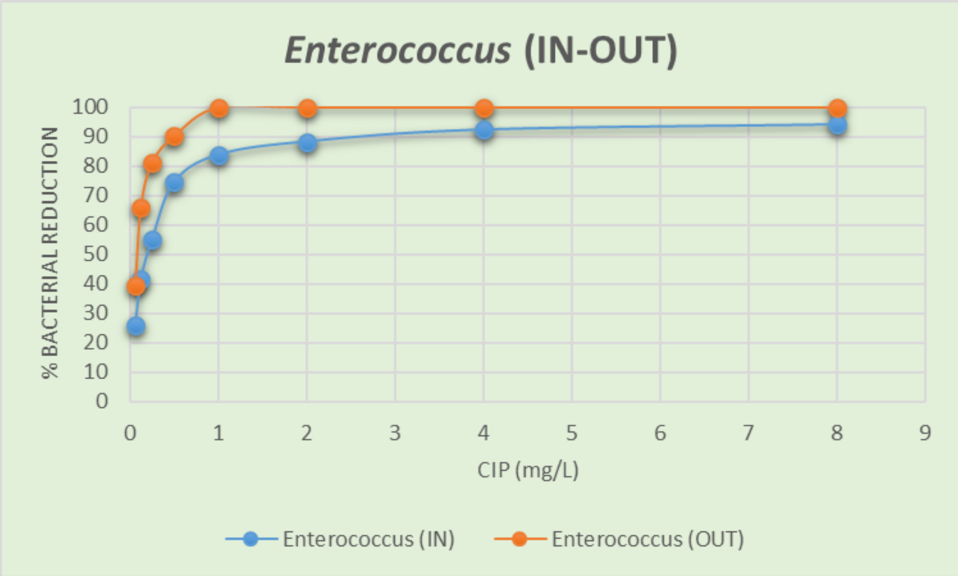
Γράφημα 18. Ποσοστιαία μείωση βακτηριακών στελεχών *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin (mg/L) κατά την είσοδο

Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η βακτηριακή μείωση των στελεχών *Enterococcus sp.* ως προς το αντιβιοτικό της Σιπροφλοξασίνης. Για όλους τους μήνες εκτός από τα Δεκέμβριο, το 60% βακτηριακής μείωσης επέρχεται με συγκέντρωση αντιβιοτικού 0,125-0,25mg/L, ενώ επίσης για τους μήνες Οκτώβριο και Νοέμβριο επιτυγχάνεται και 100% θνησιμότητα σε συγκέντρωση του 1 mg/L. Για το μήνα Δεκέμβριο, τα στελέχη φαίνονται να είναι λίγο πιο ανθεκτικά, καθώς εμφανίζουν ανάπτυξη σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 0,06mg/L και στις συγκεντρώσεις 0,125-0,5 mg/L εμφανίζουν μόλις 2,5% βακτηριακή μείωση. Το 60% μείωσης αντιστοιχεί σε αυτόν τον μήνα σε συγκέντρωση 2 mg/L και η μεγάλη μείωση παρατηρείται στις συγκεντρώσεις 2-8 mg/L.



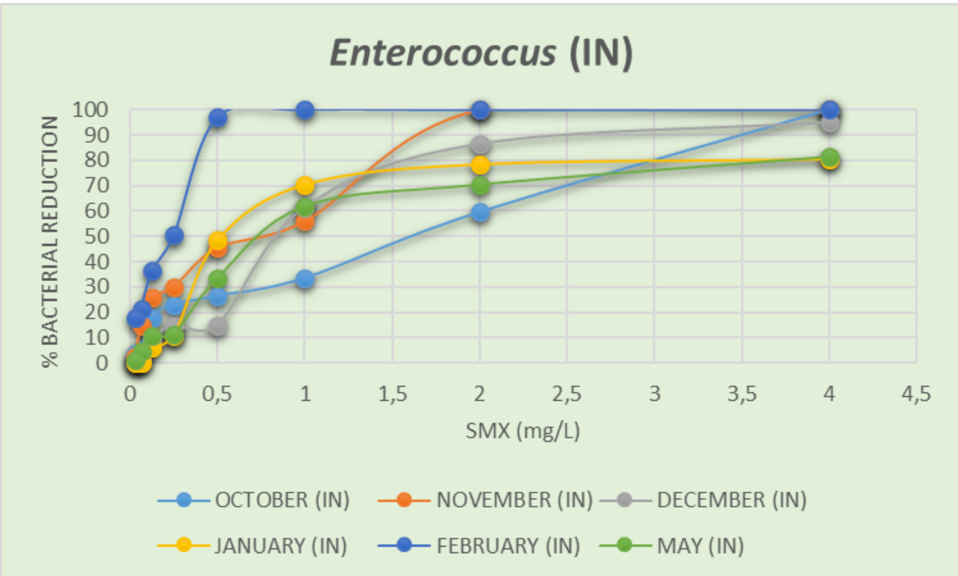
Γράφημα 19. Ποσοστιαία μείωση βακτηριακών στελεχών *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin (mg/L) κατά την έξοδο

Τα στελέχη Ιανουαρίου, Φεβρουαρίου και Μαΐου δεν συμπεριλαμβάνονται όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Το προφίλ ανθεκτικότητας δεν διαφέρει πολύ για τους μήνες Οκτώβριο και Νοέμβριο, αφού επιτυγχάνεται και πάλι 100% θνησιμότητα σε συγκέντρωση 1 mg/L, αλλά αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχει μια μικρή αύξηση της ευαισθησίας των στελεχών στο αντιβιοτικό, ειδικά για το μήνα Νοέμβριο που σε συγκέντρωση 0,125mg/L έχει πλέον βακτηριακή μείωση 90%. Τα στελέχη του Δεκεμβρίου έχουν τη μεγαλύτερη αύξηση ευαισθησίας, καθώς σε συγκέντρωση του 1 mg/L φτάνουν σε 100% θνησιμότητα, ενώ κατά την είσοδο είχαν μείωση μόλις 40%. Ακόμα και στην ελάχιστη συγκέντρωση Σιπροφλοξασίνης των 0,06mg/L εμφανίζουν βακτηριακή μείωση 32%, ενώ στην είσοδο στην ίδια συγκέντρωση όπως αναφέραμε ήδη, είχαν 0% μείωση.



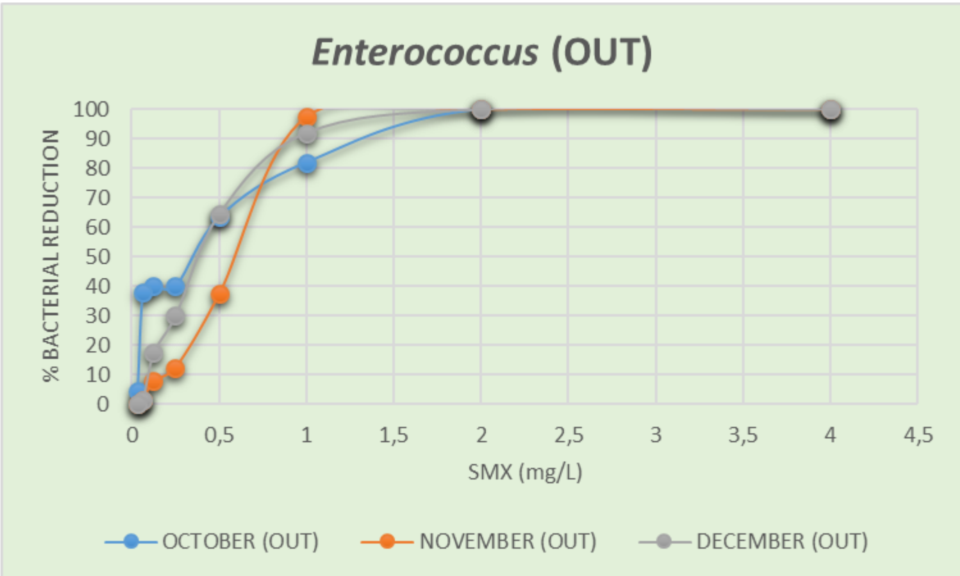
Γράφημα 20. Μέση τιμή ποσοστιαίας μείωσης βακτηριακών στελεχών *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Ciprofloxacin (mg/L) κατά την είσοδο και έξοδο

Σύμφωνα με το γράφημα, δεν φαίνεται να υπάρχει μεγάλη μεταβολή στο προφίλ ανθεκτικότητας, παρόλα αυτά διακρίνεται μια αύξηση της ευαισθησίας των στελεχών στο αντιβιοτικό Σιπροφλοξασίνης κατά την έξοδο σε σχέση με την είσοδο.



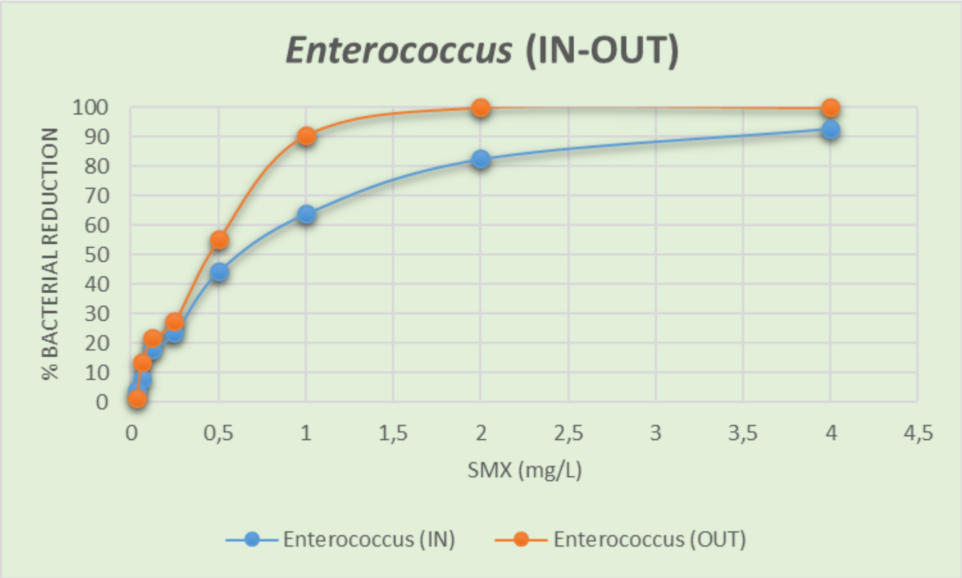
Γράφημα 21. Ποσοστιαία μείωση βακτηριακών στελεχών *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Sulfamethoxazole (mg/L) κατά την είσοδο

Το αντιβιοτικό της Σουλφαμεθοξαζόλης φαίνεται να είναι λιγότερο ισχυρό απέναντι στον *Enterococcus sp.* σε σχέση με τα υπόλοιπα δύο αντιβιοτικά που μελετήσαμε. Σύμφωνα με το παραπάνω γράφημα, μόνο τα στελέχη του Φεβρουαρίου φαίνεται να είναι μετρίως ευαίσθητα ως προς το αντιβιοτικό, αφού εμφανίζουν 100% θνησιμότητα σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 0,5 mg/L. Για το μήνα Οκτώβριο, το 60% βακτηριακής μείωση αντιστοιχεί σε συγκέντρωση Σουλφαμεθοξαζόλης των 2mg/L, ενώ τα στελέχη του Δεκεμβρίου, Ιανουαρίου και Μαΐου εμφανίζουν βακτηριακή ανάπτυξη μέχρι και με συγκέντρωση 0,06mg/L. Συγκεκριμένα, για συγκέντρωση ίση με 0,125 mg/L εμφανίζουν βακτηριακή μείωση 9%, 6% και 11% αντίστοιχα. Στη μέγιστη συγκέντρωση των 4mg/L έχουν σημαντική θανάτωση, χωρίς όμως να αγγίζουν το 100%. Τα στελέχη του Νοεμβρίου θανατώνονται σε συγκέντρωση SMX 2mg/L, όμως το 60% μείωσης αντιστοιχεί στο 1mg/L.



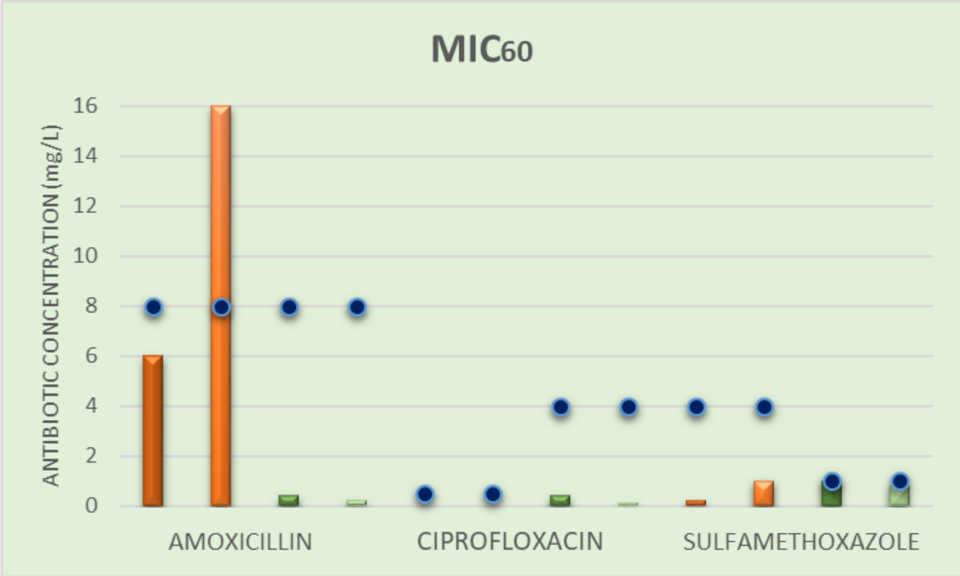
Γράφημα 22. Ποσοστιαία μείωση βακτηριακών στελεχών *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Sulfamethoxazole (mg/L) κατά την έξοδο

Τα στελέχη του Νοεμβρίου και του Δεκεμβρίου συνεχίζουν να εμφανίζουν βακτηριακή ανάπτυξη σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 0,06 mg/L ακόμα και στην έξοδο, ενώ αυτά του Οκτωβρίου στην ίδια συγκέντρωση εμφανίζουν βακτηριακή μείωση 40%. Το 60% βακτηριακής μείωσης εμφανίζεται σε εύρος συγκεντρώσεων κοντά στα 0,5mg/L. Για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2mg/L επιτυγχάνεται 100% θνησιμότητα. Παρά το γεγονός της ολικής θνησιμότητας όμως, αφού αυτή επέρχεται σε υψηλές συγκεντρώσεις Σουλφαμεθοξαζόλης, τα στελέχη δεν μπορούν να θεωρηθούν ευαίσθητα, αλλά μετρίως ευαίσθητα.



Γράφημα 23. Μέση τιμή ποσοστιαίας μείωσης βακτηριακών στελεχών *Enterococcus sp.* σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αντιβιοτικού Sulfamethoxazole (mg/L) κατά την είσοδο και έξοδο

Το προφίλ ανθεκτικότητας φαίνεται να έχει μεταβληθεί αρκετά και η αύξηση ευαισθησίας των στελεχών έχει αυξηθεί κατά πολύ, χωρίς αυτό όμως να κατατάσσει τα στελέχη στην κατηγορία των ανθεκτικών όπως αναφέραμε και παραπάνω.



Γράφημα 24. Μέσος όρος MIC_{60} όλων των μηνών για τα τρία αντιβιοτικά, όπου το έντονο πορτοκαλί αντιστοιχεί στην *E.coli* (in), ανοιχτό πορτοκαλί στην *E.coli* (out), έντονο πράσινο στον *Enterococcus* (in), ανοιχτό πράσινο στον *Enterococcus* (out) και τέλος με μπλε κουκίδες τα MIC breaking points σύμφωνα με το EUCAST.

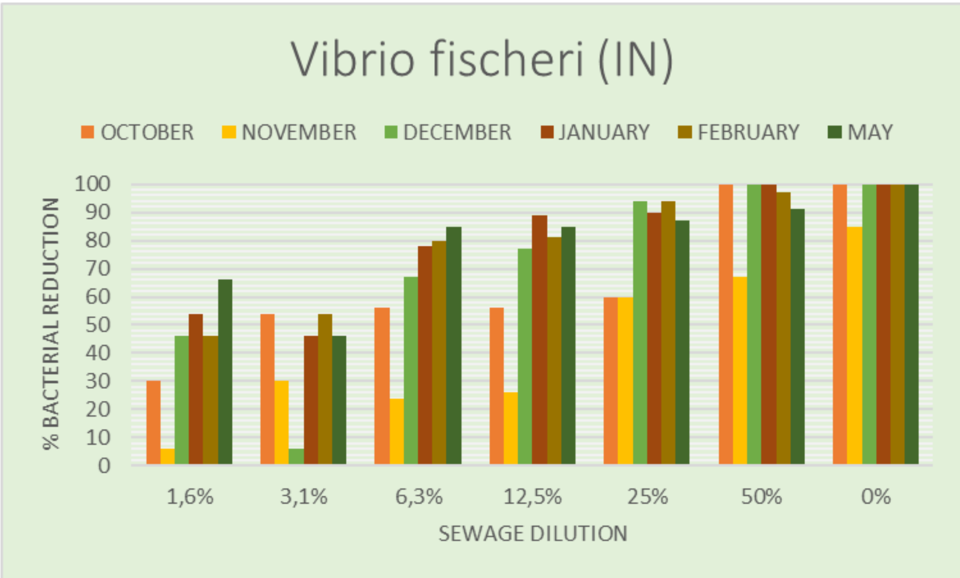
Στο παρακάτω γράφημα γίνεται χαρακτηρισμός των στελεχών που μελετήθηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους κάθε φορά στο εν λόγω αντιβιοτικό. Ο χαρακτηρισμός γίνεται σύμφωνα με το εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης του EUCAST που φαίνεται στον Πίνακα 11. Το διάγραμμα περιλαμβάνει στελέχη εισόδου (ανεπεξέργαστα) και εξόδου (επεξεργασμένα μετά την υποβολή σε χλωρίωση). Ως μη χαρακτηρίσιμα ορίζονται για τυπικούς λόγους τα στελέχη των μηνών Ιανουαρίου, Φεβρουαρίου και Μαΐου που δεν απομονώθηκαν από τα αρχικά δείγματα λύματος.

Γράφημα 25. Χαρακτηρισμός βακτηριακών στελεχών ως προς την ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά

Όπως φαίνεται στο γράφημα τα περισσότερα βακτηριακά στελέχη ήταν ευαίσθητα απέναντι στα τρία αντιβιοτικά που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, η Σιπροφλοξασίνη φαίνεται να είναι το πιο ισχυρό αντιβιοτικό απέναντι στην *E.coli* και στον *Enterococcus* sp., καθώς δεν εμφανίζει κανένα ανθεκτικό στέλεχος ούτε στις ελάχιστες συγκεντρώσεις του. Το λιγότερο αποτελεσματικό αντιβιοτικό ως προς τις δύο ομάδες βακτηρίων φαίνεται να είναι η Σουλφομεθοξαζόλη, αφού εμφανίζει μεγάλο αριθμό ανθεκτικών και μετρίως ευαίσθητων στελεχών. Επίσης αξίζει να σημειωθεί πως όσον αφορά το αντιβιοτικό της Αμοξικιλλίνης, τα ανθεκτικά στελέχη αντιστοιχούν μόνο σε στελέχη *E.coli* και όχι *Enterococcus.*

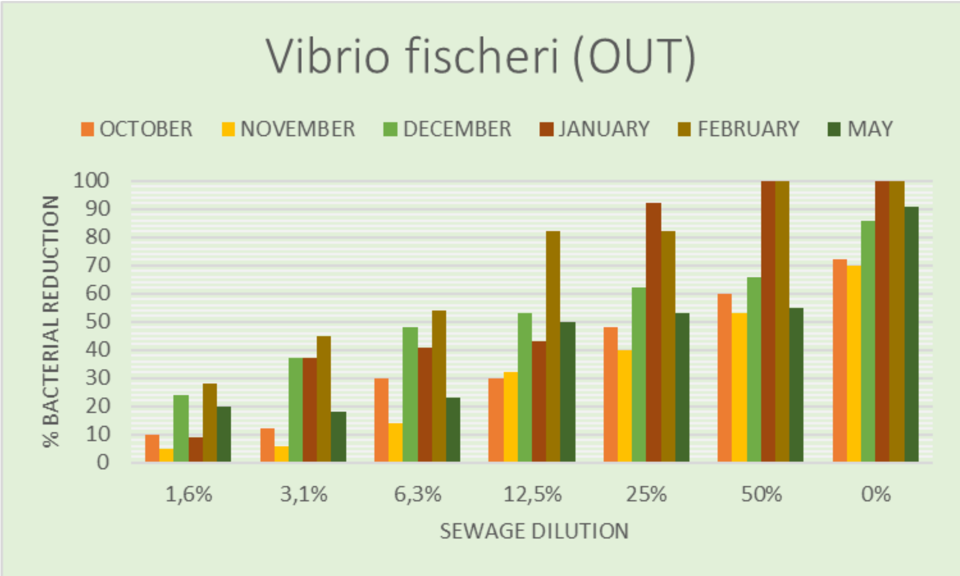
4.3 ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Ο έλεγχος των λυμάτων ως προς την οικοτοξικότητα στην παρούσα διπλωματική, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του βιοδείκτη *V. fischeri*. Για τον προσδιορισμό της υπολογίστηκε το LD50 (mean Lethal Dose for 50% mortality), δηλαδή θανατηφόρος δόση 50% που εκφράζει την αραίωση του λύματος, η οποία οδηγεί σε θάνατο 50% του πληθυσμού του μικροοργανισμού. Η μέθοδος οικοτοξικότητας πραγματοποιήθηκε για δείγματα εισόδου και εξόδου της εγκατάστασης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω γραφήματα:



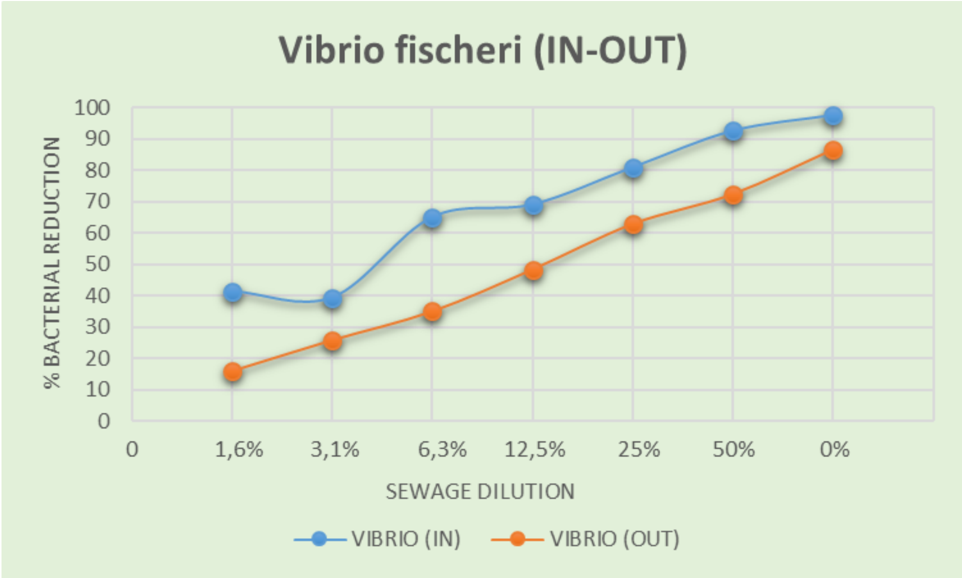
Γράφημα 26. Ποσοστιαία μείωση πληθυσμού *V.fischeri* ως προς ποσοστιαία αραίωση λυμάτων εισόδου

Παρατηρείται ότι σκόμα και στη μεγαλύτερη αραίωση των λυμάτων εισόδου, το *V.fischeri* εμφανίζει σημαντική μείωση του πληθυσμού του. Συγκεκριμένα, για τους μήνες Οκτώβριο, Δεκέμβριο, Ιανουάριο, Φεβρουάριο και Μάιο, η βακτηριακή μείωση κυμαίνεται μεταξύ 30-65%. Το LD50 εμφανίζεται για τους μήνες Οκτώριο και Φεβρουάριο από τη δεύτερη μεγαλύτερη αραίωση λυμάτων 3,1 %, ενώ για τους μήνες Δεκέμβριο, Ιανουάριο, Φεβρουάριο και Μάιο αντιστοιχεί σε αραίωση λύματος 3,1 %. Η μικρότερη ευαισθησία του βακτηρίου παρατηρείται κατά το μήνα Νοέμβριο, αφού μέχρι και αραίωση 12,5% δεν εμφανίζει βακτηριακή μείωση 50%. Το LD50 συναντάται στο 25%, ενώ το *V. fischeri* δεν φτάνει το 100% θνησιμότητας ούτε στο μη αραιωμένο λύμα 0%, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους μήνες. Συμπερασματικά, τα λύματα εισόδου όλων των μηνών θεωρούνται τοξικά για το *V. fischeri*, καθώς σχεδόν σε όλα κατά το μη αραιωμένο λύμα 0% επιτυγχάνεται 100% θνησιμότητα. Το λύμα του Νοεμβρίου είναι ελαφρώς λιγότερο τοξικό για το βακτήριο δεδομένου ότι στο ίδιο λύμα εμφανίζει 85% βακτηριακή μείωση.



Γράφημα 27. Ποσοστιαία μείωση πληθυσμού *V.fischeri* ως προς ποσοστιαία αραίωση λυμάτων εξόδου

Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η συμπεριφορά του *V.fischeri* απέναντι στα επεξεργασμένα λύματα μετά το στάδιο της χλωρίωσης. Η αλλαγή στο προφίλ είναι ιδιαίτερα εμφανής σε σχέση με την είσοδο, αφού για τους περισσότερους μήνες το LD50 δεν εμφανίζεται για αραιώσεις μεγαλύτερες του 12,5%. Για τους μήνες Οκτώβριο και Νοέμβριο, το 50% θνησιμότητας παρατηρείται σε αραίωση 50%. Κατά το μήνα Δεκέμβριο το LD50 αντιστοιχεί σε αραίωση λύματος ίση με 12,5%, σε αντίθεση με το λύμα εισόδου του ίδιου μήνα, που αντιστοιχούσε στην μέγιστη αραίωση. Για το μήνα Ιανουάριο, παρότι το λύμα για αραίωση μεγαλύτερη ή ίση του 12,5% εμφανίζει το 40% βακτηριακής μείωσης, στην αμέσως μικρότερη αραίωση εμφανίζει μια ραγδαία μείωση της τάξης του 90%. Στις δύο μικρότερες αραιώσεις παρατηρείται 100% θανάτωση του βακτηρίου. Κατά το μήνα Φεβρουάριο, το LD50 εμφανίζεται από το 6,25% και από την αραίωση 50% οδηγεί σε 100% θνησιμότητα του *V.fischeri*. Ο βιοδείκτης εμφανίζει λιγότερη ευαισθησία απέναντι στο λύμα του Μαΐου, καθώς σε αραιώσεις μεγαλύτερες του 12,5%, η μείωσή του κυμαίνεται στο 20%. Το LD50 αντιστοιχεί σε αραίωση ίση με 25% και παραμένει εκεί μέχρι και την αραίωση του 50%, ενώ στο μη αραιωμένο λύμα, η βακτηριακή μείωση αγγίζει το 90%.

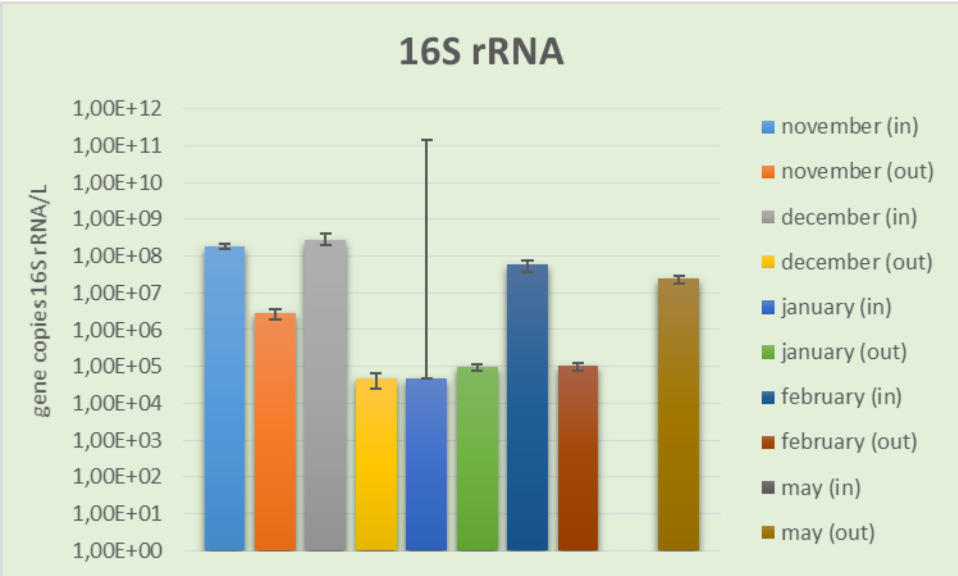


Γράφημα 28. Ποσοστιαία μείωση πληθυσμού *V.fischeri* ως προς ποσοστιαία αραίωση λυμάτων εισόδου και εξόδου

Η διαφορά στην συμπεριφορά του βιοδείκτη μεταξύ λυμάτων εισόδου και εξόδου φαίνεται καλύτερα στο παραπάνω διάγραμμα. Το LD50 κατά την είσοδο παρατηρείται σε αραιώσεις λύματος μεταξύ 3,1% με 6,3%, σε αντίθεση με την έξοδο που η 50% βακτηριακή μείωση αντιστοιχεί σε αραίωση ίση με 12,5%. Σε γενικές γραμμές, τα λύματα τόσο εισόδου, όσο και εξόδου θεωρούνται τοξικά, με τα δεύτερα να εμφανίζουν σημαντικά μικρότερη τοξικότητα σε σχέση με τα πρώτα στις αραιώσεις τους. Το γεγονός ότι τα λύματα είναι τοξικά και κατά την έξοδο θα έπρεπε να μας ανησυχεί, όμως αν λάβουμε υπόψιν ότι μετά την επεξεργασία τους καταλήγουν σε υδάτινο αποδέκτη, όπου αναπόφευκτα θα υποστούν αραίωση, τα αποτελέσματα είναι ελπιδοφόρα.

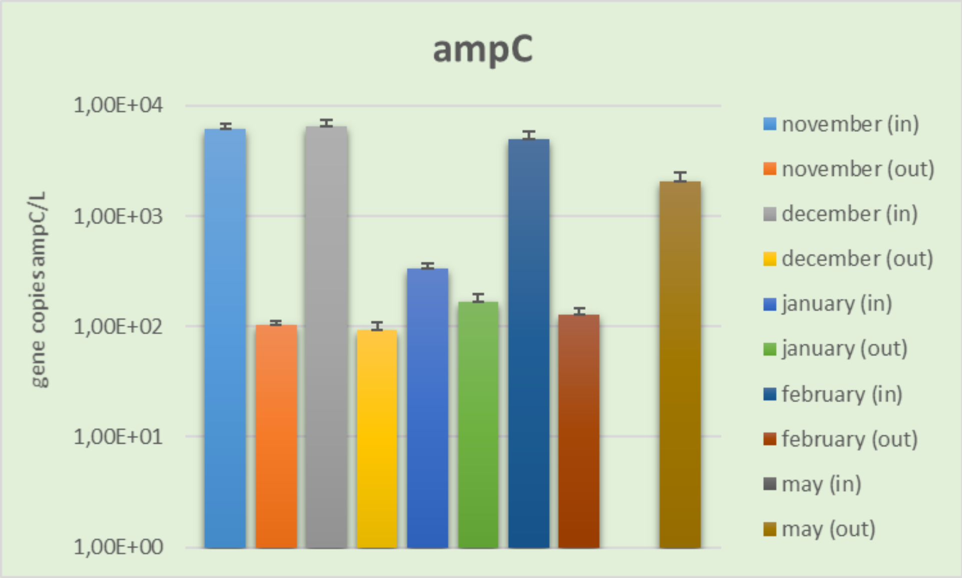
4.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Στα δείγματα από εισροές και εκροές της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων, ύστερα από την απομόνωση του γενετικού υλικού, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του γονιδίου ανθεκτικότητας ampC, το οποίο προσδίδει ανθεκτικότητα σε β-λακταμικά αντιβιοτικά και στην προκειμένη περίπτωση στο αντιβιοτικό Αμοξικιλλίνη που μελετήθηκε. Παράλληλα έγινε ποσοτικοποίηση και του γονιδίου 16S rRNA με κατάλληλους εκκινητές, μέσω των οποίων ανιχνεύεται το συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό στο δείγμα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την RT-PCR, παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στην ποσότητα του γονιδίου ανθεκτικότητας μεταξύ εισροών και εκροών της εγκατάστασης. Τα γραφήματα παρουσιάζονται με το σύνολο των γονιδιακών αντιγράφων ανά L (gene copies / L), καθώς και με το λόγο του γονιδίου ampC ως προς το συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό που υπήρχε στα λύματα.



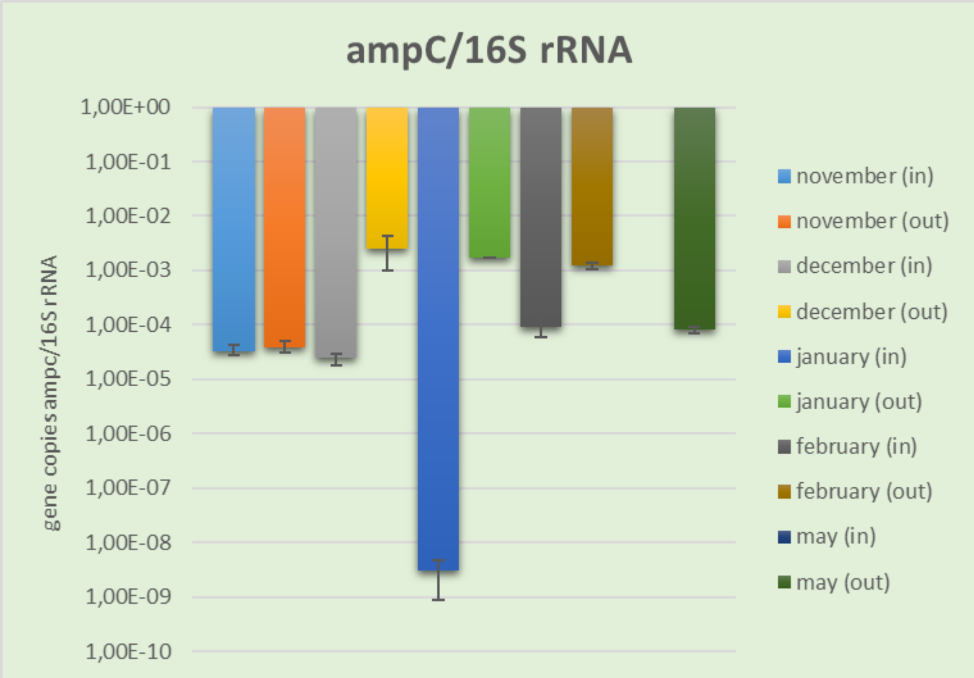
Γράφημα 29. gene copies 16S rRNA ανά λίτρο (L)

Στο γράφημα 29 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από δειγματοληψίες σε λύματα εισόδου και εξόδου της εγκατάστασης. Παρατηρείται πως δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά στη συγκέντρωση του συνολικού βακτηριακού γενετικού υλικού στην είσοδο μεταξύ Νοεμβρίου και Δεκεμβρίου, ενώ ακολουθεί μεγάλη μείωση του γονιδίου της τάξης των 3Logs για την είσοδο του Ιανουαρίου. Κατά την είσοδο του Φεβρουαρίου το γονίδιο αυξάνεται ξανά κατά 3Logs ανεβαίνοντας στο επίπεδο των δύο πρώτων δειγματοληψιών. Στην είσοδο του Μαΐου το γονίδιο δεν ανιχνεύτηκε (πιθανώς το απομονωμένο γενετικό υλικό από το συγκεκριμένο δείγμα να περιείχε αναστολείς της PCR). Όσον αφορά στις διαφορές μεταξύ εισροών και εκροών της εγκατάστασης, παρατηρείται μείωση του γονιδίου κατά τη δειγματοληψία Νοεμβρίου, Δεκεμβρίου και Φεβρουαρίου της τάξεως 2-3Logs, σε αντίθεση με τον μήνα Ιανουάριο κατά τον οποίο παρατηρείται μια αμελητέα αύξηση του γονιδίου κατά την έξοδο. Για το μήνα Μάιο δεν μπορεί να προκύψει κάποιο συμπέρασμα μεταξύ εισροής και εκροής, φαίνεται όμως πως η ποσότητα του γονιδίου κατά την έξοδο φτάνει σε επίπεδα ίσα με των εισόδων των προηγούμενων μηνών.



Γράφημα 30. gene copies ampC ανά λίτρο (L)

Στο γράφημα 30 παρουσιάζεται το γονίδιο ampC ανά λίτρο λύματος εισροής και εκροής των περιόδων δειγματοληψιών. Σε γενικές γραμμές, παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του γονιδίου κατά την έξοδο περίπου 2Logs κατά τους περισσότερους μήνες και συγκεκριμένα, της τάξης 0,3Logs κατά το μήνα Ιανουάριο. Στην είσοδο του Μαΐου το γονίδιο δεν ανιχνεύτηκε, όμως στην έξοδο του ίδιου μήνα το γονίδιο κυμαίνεται σε συγκεντρώσεις όμοιες με αυτές των εισόδων των υπόλοιπων μηνών.



Γράφημα 31. Συγκεντρώσεις γονιδίου ampc (gene copies/16S rRNA) σε εισροές και εκροές της εγκατάστασης

Όσον αφορά στο γονίδιο ανθεκτικότητας ampC ως προς το συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό, παρατηρείται σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του γονιδίου κατά τις εξόδους και συγκεκριμένα, κατά το μήνα Ιανουάριο η αύξηση φτάνει περίπου στα 6Logs. Για το μήνα Νοέμβριο η διαφορά είναι της τάξης του 0,07Logs, δηλαδή σχεδόν ανεπαίσθητη. Για το μήνα Μάιο όπως προαναφέρθηκε, το γονίδιο δεν ανιχνεύτηκε κατά την είσοδο. Η έξοδος όμως και πάλι αγγίζει τα επίπεδα εισόδων των προηγούμενων μηνών.

Προκύπτει επομένως το συμπέρασμα ότι, παρά το γεγονός της σημαντικής μείωσης του γονιδίου ampC και του συνολικού βακτηριακού γενετικού υλικού κατά την επεξεργασία του λύματος και συγκρίνοντας τα δείγματα από την είσοδο και την έξοδο, ο λόγος τους δεν ακολουθεί την ίδια συμπεριφορά. Αντιθέτως, από εισροή σε εκροή παρατηρείται αύξηση του λόγου γονιδίου ανθεκτικότητας προς το συνολικό βακτηριακό γενετικό υλικό. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υποψία πως μια εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων θεωρείται επικίνδυνο μέσο μεταφοράς γονιδίων ανθεκτικότητας και επιτρέπει στα βακτήρια να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα απέναντι σε αντιβιοτικά, απειλώντας τόσο το περιβάλλον, όσο και τον άνθρωπο.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω αποτελέσματα καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον έλεγχο αλλαγής του προφίλ ανθεκτικότητας των βακτηρίων *E.coli* και *Enterococcus* sp. στο αντιβιοτικό της Αμοξικιλλίνης, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως η ανίχνευση του γονιδίου ανθεκτικότητας ampC στα λύματα εισόδου και εξόδου δεν συνδέεται απαραίτητα με τις τιμές MIC_{60} που καθορίζουν την ανθεκτικότητα κάθε βακτηριακού στελέχους στο αντιβιοτικό. Για παράδειγμα παρά την αυξημένη συγκέντρωση του γονιδίου σε είσοδο και έξοδο της εγκατάστασης, το

MIC_{60} των περισσότερων στελεχών τα κατέταξε ως ευαίσθητα στο αντιβιοτικό της Αμοξικιλλίνης. Σίγουρα η ύπαρξη του γονιδίου ampC μπορεί να θεωρηθεί πως επέτρεψε σε ορισμένα στελέχη να αναπτύξουν ανθεκτικότητα, αλλιώς δεν θα υπήρχε κανένα ανθεκτικό στέλεχος κατά την καταμέτρησή τους, όμως το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται και στην ύπαρξη άλλων γονιδίων ανθεκτικότητας που αντιστοιχούν σε β-λακταμικά αντιβιοτικά, τα οποία δεν εξετάσθηκαν στο πλαίσιο της συγκεκριμένης έρευνας και θα μπορούσαν να προσδώσουν στα βακτηριακά στελέχη ανθεκτικότητα ως προς την Αμοξικιλλίνη. Επίσης, αυτό που καθίσταται σημαντικό είναι ότι ενώ κατά την επεξεργασία των λυμάτων μπορεί να μειώνεται σημαντικά το βακτηριακό φορτίο, ιδίως μετά την απολύμανση, εντούτοις, το πλασμιδιακό γενετικό υλικό και κυρίως τα γονίδια ανθεκτικότητας που φέρει ενδέχεται να παραμείνουν ανέπαφα και συνεπώς να καταλήξουν μέσω της εκροής σε κάποιον υδάτινο φορέα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής αποτελούταν από τέσσερα σκέλη: την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης στα δείγματα λύματος, τον έλεγχο ανθεκτικότητας των βακτηριακών δεικτών που απομονώθηκαν απέναντι σε τρία αντιβιοτικά, την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση γονιδίου ανθεκτικότητας και τέλος τον έλεγχο των λυμάτων ως προς την οικοτοξικότητά τους απέναντι στο βακτήριο *V. fischeri*.

Όσον αφορά την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης προκύπτουν τα εξής:

- Για τους περισσότερους μήνες, τα περισσότερα βακτηριακά στελέχη *E. coli* και *Enterococcus* αδρανοποιήθηκαν τελείως. Υπήρξαν όμως και στελέχη *E.coli* τα οποία ενώ εμφάνισαν σημαντική μείωση κατά την έξοδο σε σχέση με την είσοδο της εγκατάστασης, δεν υπήρξε πλήρης απομάκρυνσή τους. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη φύση του αρνητικού Gram βακτηρίου το οποίο θεωρείται ευαίσθητο σε συνθήκες χλωρίωσης. Αντιθέτως, τα στελέχη *Enterococcus* sp. που ως Gram θετικά βακτήρια συνηθίζουν να έχουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα, απομακρύνθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό κατά τους ίδιους μήνες μετά τη χλωρίωση.

Όσον αφορά τον έλεγχο αντιμικροβιακής ανθεκτικότητας σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτουν συμπεράσματα διακεκριμένα σε κατηγορίες:

- Σε σχέση με το χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό:

Το μεγαλύτερο ποσοστό βακτηριακών στελεχών ήταν σε γενικές γραμμές ευαίσθητο σε όλα τα αντιβιοτικά, όμως υπήρξε ένας αριθμός στελεχών που ήταν περισσότερο ανθεκτικά από τα υπόλοιπα. Τα ανθεκτικά στελέχη στο σύνολο τους, εμφάνισαν σε περίπου ίδιο αριθμό ανθεκτικότητα απέναντι στο αντιβιοτικό της Αμοξικιλλίνης και της Σουλφαμεθοξαζόλης. Αν μάλιστα λάβουμε υπόψιν μας και τα μετρίως ευαίσθητα βακτηριακά στελέχη, τότε το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν ανθεκτικό στη Σουλφαμεθοξαζόλη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα δύο αυτά αντιβιοτικά έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως τις τελευταίες δεκαετίες και τα βακτήρια έχουν συνηθίσει να προστατεύονται απέναντι σε αυτά. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε ιδιαίτερη ευαισθησία στο αντιβιοτικό της Σιπροφλοξασίνης, το οποίο δεν εμφάνισε κανένα ανθεκτικό βακτηριακό στέλεχος.

- Σε σχέση με το είδος των βακτηριακών δεικτών:

Όσον αφορά το αντιβιοτικό της Αμοξικιλλίνης, η οικογένεια των *Enterococcus* εμφάνισε ιδιαίτερη ευαισθησία, σε αντίθεση με την οικογένεια των *Enterobacteriaceae* στην οποία ανήκει η *E. coli*. Παρά το γεγονός ότι και στις δύο οικογένειες βακτηρίων παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο ολική θανάτωση των στελεχών σε μεγάλες συγκεντρώσεις, σύμφωνα με τα όρια του EUCAST, τα περισσότερα στελέχη της *E.coli* χαρακτηρίζονται ανθεκτικά στο αντιβιοτικό. Στη Σουλφαμεθοξαζόλη, τόσο ο *Enterococcus* sp. όσο και η *E.coli*, φάνηκαν να έχουν κατά μέσο όρο την ίδια συμπεριφορά απέναντι στο αντιβιοτικό. Σύμφωνα όμως με το εύρος ανασταλτικής συγκέντρωσης, ο εντερόκοκκος χαρακτηρίστηκε στα περισσότερα στελέχη του ανθεκτικός και μετρίως ευαίσθητος. Η *E.coli* φάνηκε να είναι ευαίσθητη, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο ότι παρότι η Σουλφαμεθοξαζόλη από μόνη της δεν σκοτώνει απαραίτητα τα βακτήρια, αλλά απενεργοποιεί απλά τον πολλαπλασιασμό τους, σε συνδυασμό με την Τριμεθοπρίμη που δρα σε ένα διαφορετικό ένζυμο στην οδό του φολικού οξέος, δημιουργούν ένα αντιβιοτικό σημαντικά ισχυρό απέναντι στα βακτήρια. Στο αντιβιοτικό της Σιπροφλοξασίνης όλα τα βακτηριακά στελέχη όπως αναφέρθηκε, ήταν ευαίσθητα ανεξαρτήτως βακτηριακής οικογένειας, παρά το γεγονός ότι το αντιβιοτικό είναι ευρέως διαδεδομένο τα τελευταία χρόνια και έχει παρατηρηθεί μεγάλη αντοχή σε αυτό λόγω της εκτεταμένης χρήσης του.

- Σε σχέση με την προέλευση των βακτηριακών στελεχών κατόπιν του σταδίου της απολύμανσης που πραγματοποιήθηκε κατά την επεξεργασία των λυμάτων:

Σε γενικές γραμμές, η διεργασία της χλωρίωσης άλλοτε οδήγησε σε ανάπτυξη της ανθεκτικότητας σε σχέση με τα ανέπαφα στελέχη και άλλοτε σε αύξηση ευαισθησίας. Ως προς το αντιβιοτικό της Αμοξικιλλίνης, παρότι τα περισσότερα στελέχη ήταν ευαίσθητα, τόσο στην είσοδο, όσο και στην έξοδο μετά τη χλωρίωση, αξίζει να σημειωθεί ότι τα ανθεκτικά στελέχη της εξόδου ήταν σε αριθμό περισσότερα από αυτά της εισόδου. Συγκεκριμένα, τα στελέχη που εμφάνισαν αλλαγή στο προφίλ και εμφάνισαν ανθεκτικότητα ανήκαν σε αυτά της *E.coli*. Η διαφορά αυτή του προφίλ ανθεκτικότητας μπορεί να οφείλεται στις συνθήκες που επικράτησαν κατά την απολύμανση των υγρών αποβλήτων, δίνοντας τη δυνατότητα στα βακτήρια να προστατευτούν και να βελτιώσουν την αντοχή τους. Κατά τη δοκιμασία της Σουλφαμεθοξαζόλης, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα κατά την είσοδο σε σχέση με την έξοδο. Τα περισσότερα ανθεκτικά στελέχη κατά την είσοδο αντιστοιχούσαν στον *Enterococcus sp*. γεγονός που θεωρείται λογικό, αφού το συγκεκριμένο αντιβιοτικό είναι περισσότερο δραστικό έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων όπως η *E.coli*. Όσον αφορά τη δοκιμή της Σιπροφλοξασίνης δεν υπήρξε αλλαγή στο προφίλ ανθεκτικότητας, αφού δεν υπήρξαν ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη.

Το αν πληθώρα βακτηρίων έχουν την ικανότητα να αναπτύξουν ή όχι την αντιμικροβιακή τους αντοχή κατά την παρουσία τους σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, αποτελεί ένα ζήτημα που δεν έχει τεκμηριωθεί ακόμη. Σύμφωνα με μία έρευνα που καταπονήθηκε το 2007 (Schlüter et al., 2007) και αφορά την δοκιμή τόσο βακτηρίων, όσο και αντιβιοτικών, οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων αποτελούν πηγή ποικίλων στοιχείων βακτηριακής αντίστασης σε αντιβιοτικά και ο υψηλός πληθυσμός βακτηρίων καθώς και η ποικιλότητα ενεργούς ιλύος, καθιστούν την γενετική αλλαγή πολύ πιο εύκολη. Οι (Rodriguez-Mozaz et al., 2020) ύστερα από εκτεταμένη παρακολούθηση δύο ετών (2015-2016) ενός συνόλου αντιβιοτικών στα τελικά απόβλητα επτά Ευρωπαϊκών χωρών, παρατήρησαν πως από τα 53 αντιβιοτικά που εξέτασαν, τα 17 ανιχνεύθηκαν τουλάχιστον μία φορά στην εκροή των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων. Σε αυτά τα αντιβιοτικά ανήκαν και τα δύο από τα τρία αντιβιοτικά που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική, η Σουλφαμεθοξαζόλη και η Σιπροφλοξασίνη.

Εν συνεχεία όσον αφορά την ανίχνευση του γονιδίου ανθεκτικότητας, ύστερα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκύπτουν τα εξής:

- Ενώ κατά την ποσοτικοποίηση του ampC παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσής του ανά τιμή λίτρου λύματος εισροής και εκροής των δειγματοληψιών, τα αντίγραφα του γονιδίου ως προς το συνολικό ριβοσωμικό γενετικό υλικό παρουσίασαν μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσής του κατά την έξοδο. Επομένως, παρότι η λειτουργία της εγκατάστασης καθιστά την χλωρίωση άκρως σημαντικό και χρήσιμο μέσο για την απομάκρυνση βακτηριακών δεικτών, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα στα οποία κατά την έξοδο επιτυγχάνεται σε ορισμένους μήνες 100% απομάκρυνση και οι αποδόσεις μπορούν να γίνουν ακόμα καλύτερες με το πέρασμα του χρόνου λειτουργίας των μονάδων, ταυτόχρονα οι συγκεντρώσεις του γονιδίου ανθεκτικότητας είναι φανερά μεγάλες κατά την έξοδο της Ε.Ε.Λ και σημαντικά μεγαλύτερες από αυτές της εισόδου. Το γεγονός αυτό ενισχύει την ιδιαίτερη ανησυχία που επικρατεί για την απόκτηση ανθεκτικότητας των βακτηριακών δεικτών εξαιτίας των ευνοϊκών συνθηκών εντός της εγκατάστασης και την μετάδοσή της μέσω των ARGs στο περιβάλλον και τον άνθρωπο, αποτελώντας τεράστιο κίνδυνο.

Η επίκτητη ανθεκτικότητα όπως έχει αναφερθεί, μπορεί να οφείλεται είτε σε σημειακές μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα, είτε σε μεταφορά εξωγενούς γενετικού υλικού άλλων μικροοργανισμών, η οποία πραγματοποιείται μέσω πλασμιδίων με τη διαδικασία της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Οι (Raza et al., 2022) οι οποίοι υιοθέτησαν την Hiseq προσέγγιση μεταγονιδιωματικής αλληλουχίας με σκοπό τον προσδιορισμό της πυρηνικής αντίστασης και του παθογόνου δυναμικού των ARGs σε δείγματα εισροής και εκροής δώδεκα αστικών εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων στην Νότια Κορέα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μεταγωγή (ένας από τους τρόπους μεταφοράς εξωγενούς γενετικού υλικού) μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη διάδοση ARGs στο περιβάλλον. Οι (Wang et al., 2021) αναφέρουν στη μελέτη τους πως στις περισσότερες περιπτώσεις που έλεγξαν, τα λύματα των εγκαταστάσεων δεν αποτελούσαν την κύρια πηγή αντιβιοτικών και ARGs στα υδάτινα συστήματα. Παρόλα αυτά αναφέρουν πως τα ARGs και τα αντιβιοτικά αυξήθηκαν στις μονάδες χλωρίωσης, οζονισμού και διήθησης. Οι (Alexander et al., 2020) στο πλαίσιο της έρευνάς τους διαφορετικού μεγέθους εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων στη Γερμανία με διαφορετικές λεκάνες απορροής, απέδειξαν πως το πλήρες φάσμα των γονιδίων ανθεκτικότητας που ανίχνευσαν, καθώς και των προαιρετικά παθογόνων βακτηριακών τους στόχων πέρασε από τις WWTP (Wastewater Treatment Plants) και κατέληξε μέσω των λυμάτων στα περιβαλλοντικά οικοσυστήματα, ανεξαρτήτως του μεγέθους και των όγκων απόρριψης λυμάτων ανά ημέρα.

Τέλος, όσον αφορά στον έλεγχο των υγρών λυμάτων ως προς την τοξικότητά τους απέναντι στο βιοδείκτη *V.fischeri* παρατηρήθηκαν τα εξής:

- Τα λύματα που ελέγχθηκαν, τόσο αυτά της εισόδου, όσο και αυτά της εξόδου μετά την επεξεργασία τους, φάνηκαν να είναι ιδιαίτερα τοξικά για το βιοδείκτη στο μη αραιωμένο δείγμα, με τα πρώτα να δίνουν 100% θνησιμότητα του *V.fischeri* και τα δεύτερα να δίνουν της τάξης του 90% βακτηριακή μείωση. Το LD50 αναγνωρίστηκε στα λύματα εισόδου να κυμαίνεται μεταξύ αραιώσεων 3,1-6,3%, ενώ στα λύματα εξόδου σε αραίωση 12,5%. Σύμφωνα όμως με τα διαγράμματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι κατά μέσο όρο, τα λύματα εξόδου ήταν σημαντικά λιγότερο τοξικά σε σχέση με εκείνα της εισόδου στα αραιωμένα δείγματα. Το γεγονός αυτό ελαττώνει τις ανησυχίες για ρύπανση του υδάτινου αποδέκτη, αφού τα λύματα εξόδου με την εναπόθεσή τους σε αυτόν, θα υποστούν αναπόφευκτα αραίωση.

6. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Η παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο μικρού φάσματος αντιβιοτικών ουσιών και συγκεντρώσεων τους. Για να μπορούν να προκύψουν ολοκληρωμένα συμπεράσματα μπορούσαν να ελεγχθούν και τα εξής:

- Έλεγχος ανθεκτικότητας των βακτηριακών δεικτών που αναφέρθηκαν και σε άλλες αντιβιοτικές ουσίες.

- Ανίχνευση γονιδίων ανθεκτικότητας σε αμινογλυκοσίδες, τετρακυκλίνες, κινολόνες, σουλφοναμίδες, μακρολίδια.

Όσον αφορά τον έλεγχο οικοτοξικότητας:

- Έλεγχος οικοτοξικότητας με τη δοκιμή δειγμάτων λυμάτων της εγκατάστασης άλλων εποχιακών μηνών, ως προς το *V. fischeri*.

- Έλεγχος οικοτοξικότητας των δειγμάτων που ερευνήθηκαν ως προς άλλους βιοδείκτες, όπως *Artemia* sp. και *Daphnia magna*.

- Έλεγχος οικοτοξικότητας σε μεγαλύτερο φάσμα συγκεντρώσεων υγρού λύματος.

Όσον αφορά στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του γονιδίου ανθεκτικότητας:

- Έλεγχος περισσότερων γονιδίων ανθεκτικότητας που να αντιστοιχούν και στα β-λακταμικά αντιβιοτικά αλλά και στις υπόλοιπες κατηγορίες αντιβιοτικών που μελετήθηκαν και μη.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abbas, M., Adil, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Munir, B., Yameen, M., Ghaffar, A., Shar, G. A., Asif Tahir, M., & Iqbal, M. (2018). Vibrio fischeri bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. In *Science of the Total Environment* (Vol. 626, pp. 1295–1309). https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.066

Ahmed, M. (2012). *Antibiotic Resistance: An Emerging Global Headache*. www.intechopen.com

Alexander, J., Hembach, N., & Schwartz, T. (2020). Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany. *Scientific Reports 2020 10:1*, *10*(1), 1–9. https://doi.org/10.1038/s41598-020-65635-4

Antimicrobial resistance - Wikiwand. (n.d.). Retrieved August 30, 2022, from https://www.wikiwand.com/en/Antimicrobial_resistance

Boehler, S., Strecker, R., Heinrich, P., Prochazka, E., Northcott, G. L., Ataria, J. M., Leusch, F. D. L., Braunbeck, T., & Tremblay, L. A. (2017). Assessment of urban stream sediment pollutants entering estuaries using chemical analysis and multiple bioassays to characterise biological activities. In *Science of the Total Environment* (Vols. 593–594, pp. 498–507). https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.209

de Castro-Català, N., Kuzmanovic, M., Roig, N., Sierra, J., Ginebreda, A., Barceló, D., Pérez, S., Petrovic, M., Picó, Y., Schuhmacher, M., & Muñoz, I. (2016). Ecotoxicity of sediments in rivers: Invertebrate community, toxicity bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools. In *Science of the Total Environment* (Vol. 540, pp. 297–306). https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.071

Dupont, S., Carré-Mlouka, A., Descarrega, F., Ereskovsky, A., Longeon, A., Mouray, E., Florent, I., & Bourguet-Kondracki, M. L. (2013). Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge Phorbas tenacior (Porifera, Demospongiae). *Letters in Applied Microbiology*, *58*(1), 42–52. https://doi.org/10.1111/LAM.12154

Ecdc. (2021). *ESAC-NET AER 2020 - Antimicrobial consumption in the EU EEA*.

EUCAST. (2022). *EUCAST: Calibration and validation*. https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/calibration_and_validation/

Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*, *155*(6), 1749–1757. https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0

Food Microbiologee_ Fecal contamination indicators. (n.d.). https://foodmicrobiologee.blogspot.com/2012/08/fecal-contamination-indicators.html

González-Candelas, F., Comas, I. T., Luis Martínez, J. A., Carlos Galán, J., & Baquero, F. (2011). The Evolution of Antibiotic Resistance. *Genetics and*

Evolution of Infectious Diseases, 305–337. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384890-1.00012-1

Li, H., Li, B., Ma, J., Ye, J., Guo, P., & Li, L. (2018). Fate of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in the electrokinetic treatment of antibiotic-polluted soil. *Chemical Engineering Journal*, *337*, 584–594. https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2017.12.154

Lodish et.al; (1995). *Molecular Cell Biology - 5TH EDITION*.

Marti, E., Variatza, E., & Balcazar, J. L. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, *22*(1), 36–41. https://doi.org/10.1016/J.TIM.2013.11.001

Papanikolaou, G. P. D. (2015). *Τα στάδια της αντίδρασης PCR*. https://repository.kallipos.gr/handle/11419/594

Pooja, K., Priyanka, V., Rao, B. C. S., & Raghavender, V. (2022). Cost-effective treatment of sewage wastewater using microalgae Chlorella vulgaris and its application as bio-fertilizer. *Energy Nexus*, *7*, 100122. https://doi.org/10.1016/J.NEXUS.2022.100122

PubChem. (2021). *Amoxicillin* (Issue January 1974, pp. 1–58). https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amoxicillin

Pubhem. (2022). *Sulfamethoxazole*. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole

Raza, S., Shin, H., Hur, H. G., & Unno, T. (2022). Higher abundance of core antimicrobial resistant genes in effluent from wastewater treatment plants. *Water Research*, *208*, 117882. https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2021.117882

Resisting our drugs - Understanding Evolution. (n.d.). Retrieved August 30, 2022, from https://evolution.berkeley.edu/battling-bacterial-evolution/resisting-our-drugs/

Rock, C., & Donnenberg, M. S. B. T.-R. M. in B. S. (2014). *Human Pathogenic Enterobacteriaceae*. Elsevier. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00136-7

Rodriguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Varela Della Giustina, S., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., Berendonk, T. U., Michael-Kordatou, I., Fatta-Kassinos, D., Martinez, J. L., Elpers, C., Henriques, I., Jaeger, T., Schwartz, T., Paulshus, E., O'Sullivan, K., Pärnänen, K. M. M., Virta, M., Do, T. T., … Manaia, C. M. (2020). Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environment International*, *140*. https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.105733

Said, M. S., Tirthani, E., & Lesho, E. (2022). *Enterococcus Infections*. 1–15. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567759/

Schlüter, A., Szczepanowski, R., Pühler, A., & Top, E. M. (2007). Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiology Reviews*, *31*(4), 449–477. https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2007.00074.X

Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., & Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, *43*(3), 325–335. https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00444-0

Śpibida, M., Krawczyk, B., Olszewski, M., & Kur, J. (2017). Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. *Journal of Applied Genetics*, *58*(1), 133–142. https://doi.org/10.1007/s13353-016-0371-4

Vibrio fischeri - microbewiki. (n.d.). Retrieved August 30, 2022, from https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Vibrio_fischeri

Wang, R., Ji, M., Zhai, H., Guo, Y., & Liu, Y. (2021). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in WWTP effluent-receiving water bodies and reclaimed wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, *796*, 148919. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.148919

WHO. (2017). *Antimicrobial resistance*. https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/antimicrobial-resistance

Βενιέρη, Δ. (2015). *Πολυτεχνειο Κρητησ Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος*.

Βλυσίδης, Α. (2007). *ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ Σχολή Χημικών Μηχανικών ΒΛΥΣΙΔΗΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ Καθηγητής*.

Γαβαλά, Κ. (2018). *Απομόνωση Βακτηρίων Ανθεκτικών σε Αντιβιοτικά από Επιφανειακά Εξεταστική Επιτροπή Βενιέρη Δανάη (Επιβλέπουσα) Ξεκουκουλωτάκης Νικόλαος*.

Γαληνός - Οδηγός Φαρμάκων. (n.d.). https://www.galinos.gr/web/drugs/main/substances/ciprofloxacin

ΕΟΔΥ. (2019). *Ορθολογική Χρήση των Αντιβιοτικών - Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας*.

Κοντογιάννη, Ν. (2015). *Ευαισθησία των μικροβίων στα αντιβιοτικά _ MEDISYN*.

Νιάρχος, Γ. (2015). *ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ: ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ* (Vol. 15, Issue 2).

Παπαπαρασκευάς, Ι. (2020). *Αντιβιοτικά Μηχανισμοί δράσης και μηχανισμοί αντοχής*.

8.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

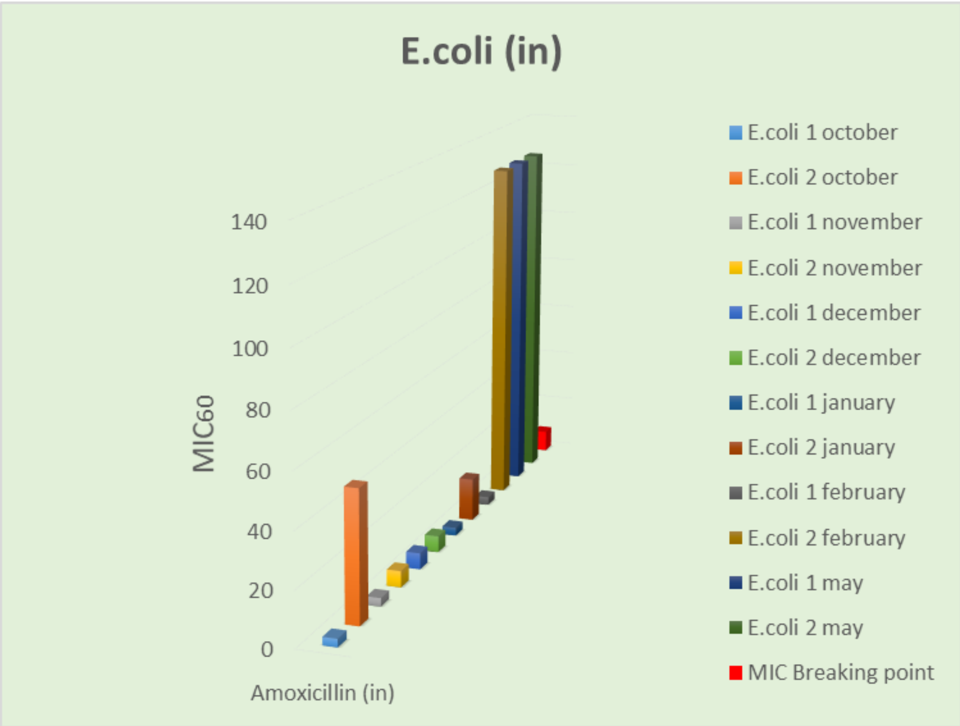
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Πίνακας 12. Ονομασία βακτηριακών στελεχών που μελετήθηκαν

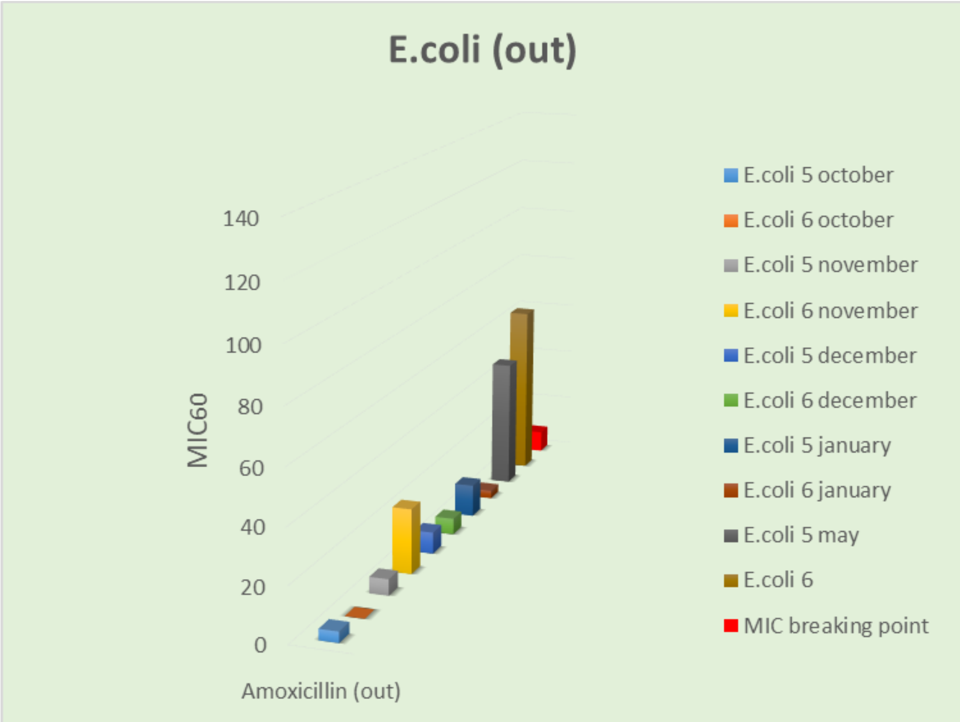
Ονομασία	Αντιστοιχία
E. coli 1	Στέλεχος 1 E. coli εισόδου
E. coli 2	Στέλεχος 2 E. coli εισόδου
E. coli 5	Στέλεχος 5 E. coli εξόδου
E. coli 6	Στέλεχος 6 E. coli εξόδου
Enterococcus 1	Στέλεχος 1 Enterococcus εισόδου
Enterococcus 2	Στέλεχος 2 Enterococcus εισόδου
Enterococcus 5	Στέλεχος 5 Enterococcus εξόδου
Enterococcus 6	Στέλεχος 6 Enterococcus εξόδου

Παρακάτω παρουσιάζονται τα γραφήματα μεταξύ του MIC_{60} κάθε βακτηριακού στελέχους σε mg/L και το όριο ανασταλτικής συγκέντρωσης του εκάστοτε αντιβιοτικού.

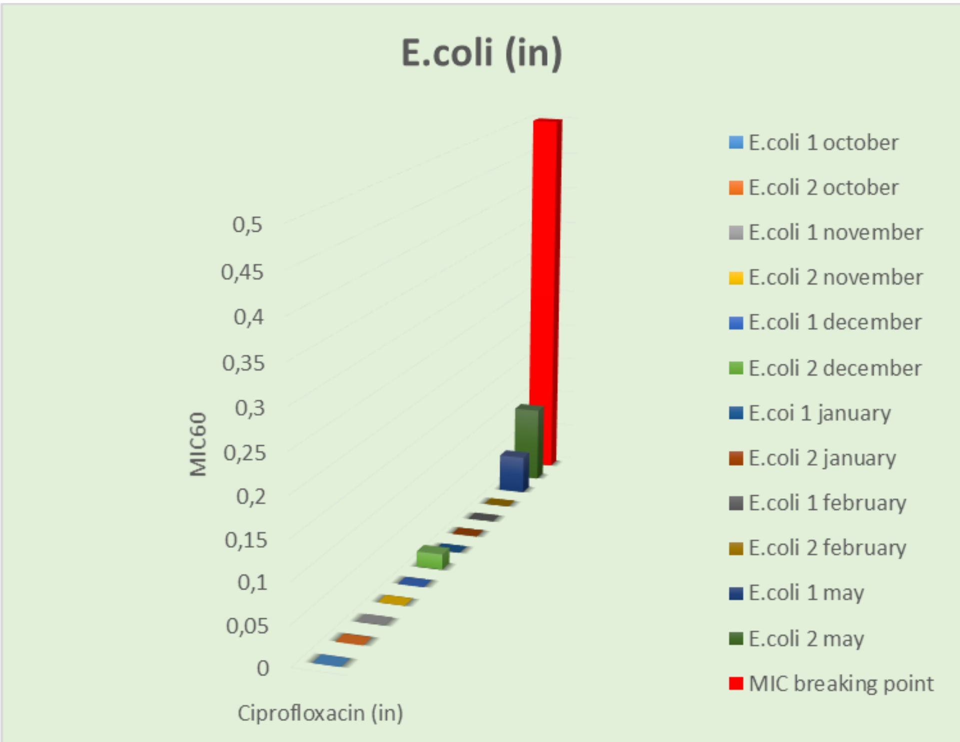
- ***E.coli***



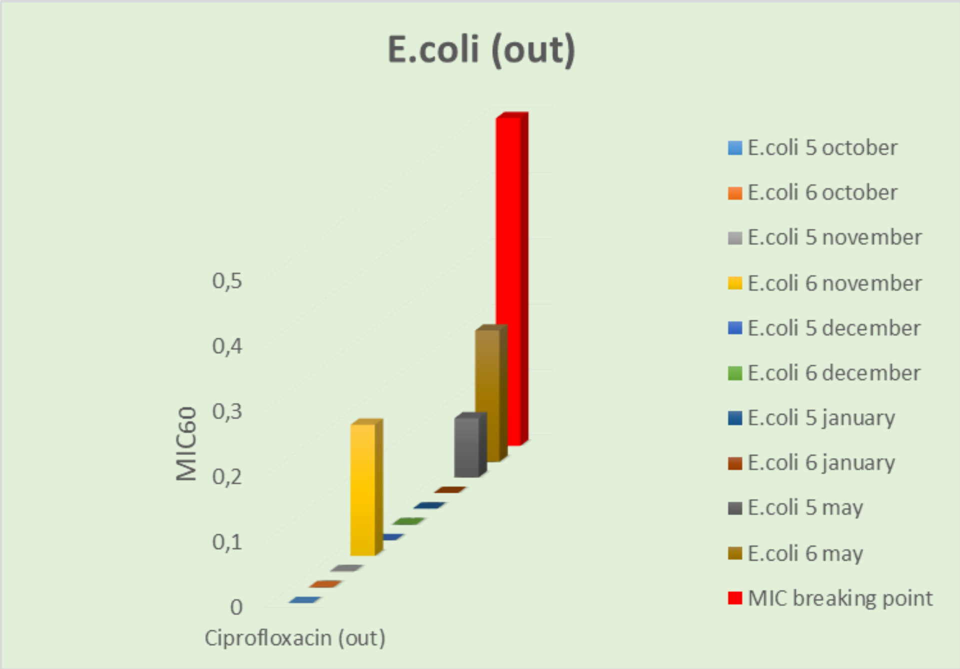
Γράφημα 32. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Αμοξικιλλίνης για την E.coli ανά στέλεχος ανά μήνα εισόδου



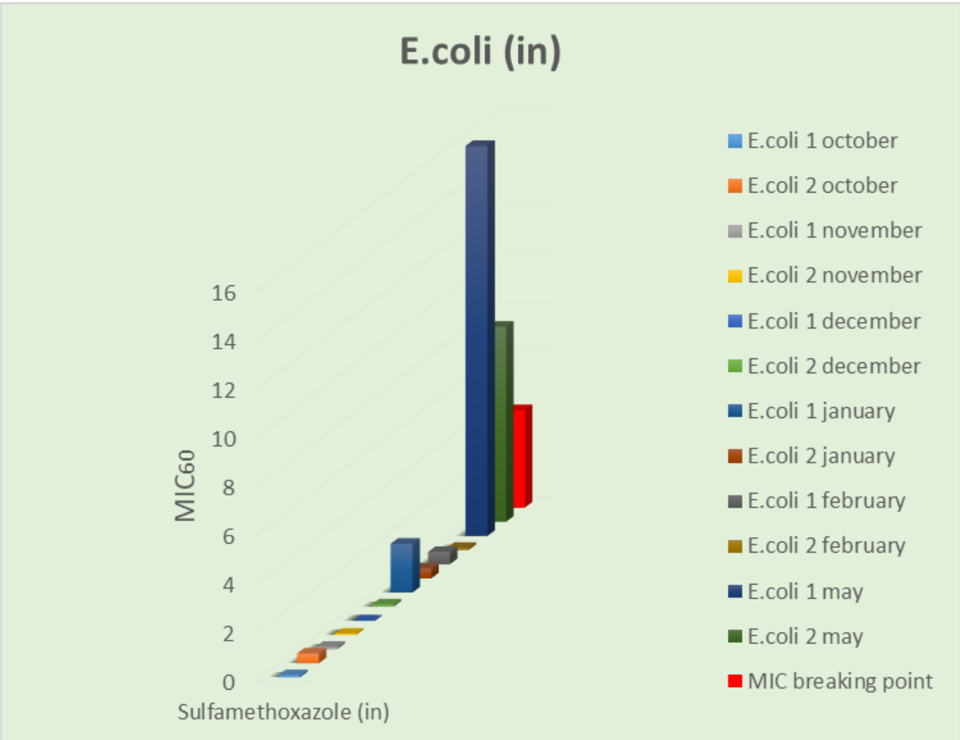
Γράφημα 33. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Αμοξικιλλίνης για την E.coli ανά στέλεχος ανά μήνα εξόδου



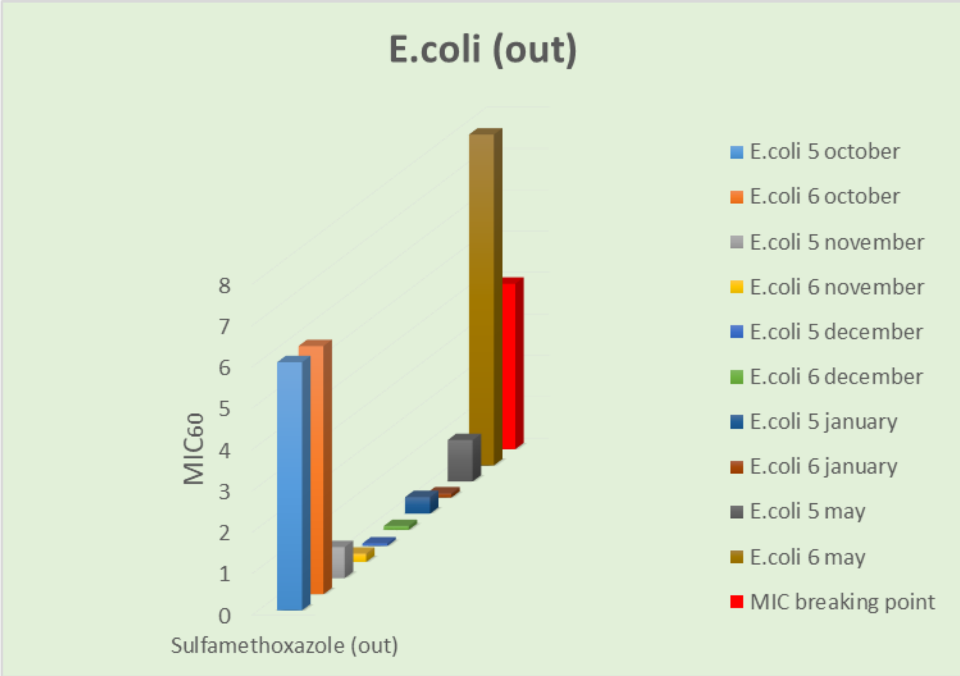
Γράφημα 34. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Σιπροφλοξασίνης για την E.coli ανά στέλεχος ανά μήνα εισόδου



Γράφημα 35. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Σιπροφλοξασίνης για την E.coli ανά στέλεχος ανά μήνα εξόδου

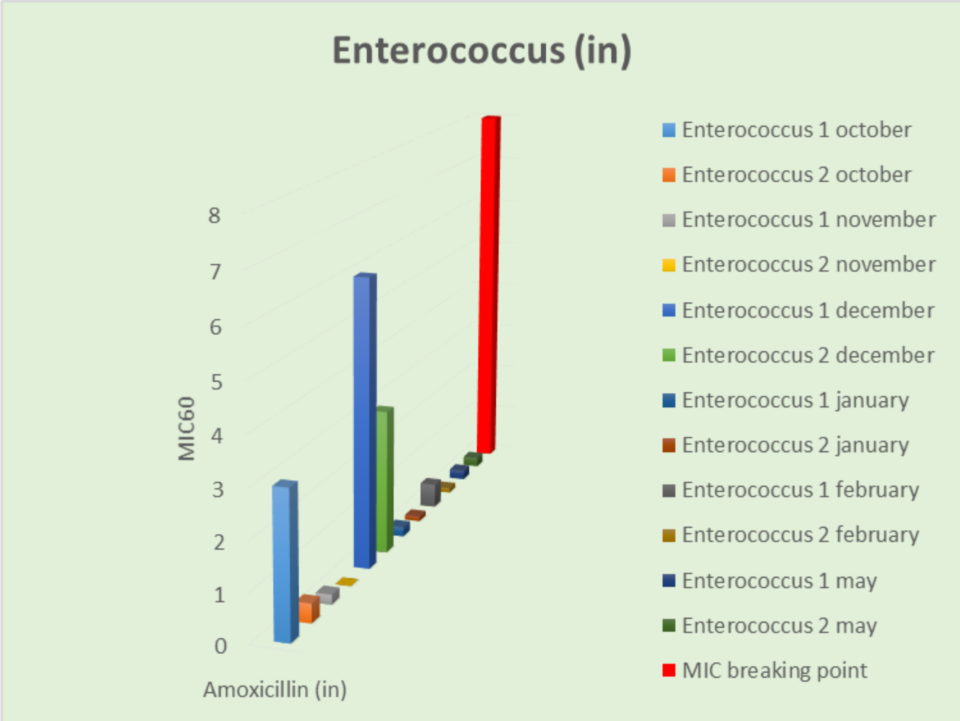


Γράφημα 36. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Σουλφαμεθοξαζόλης για την E.coli ανά στέλεχος ανά μήνα εισόδου

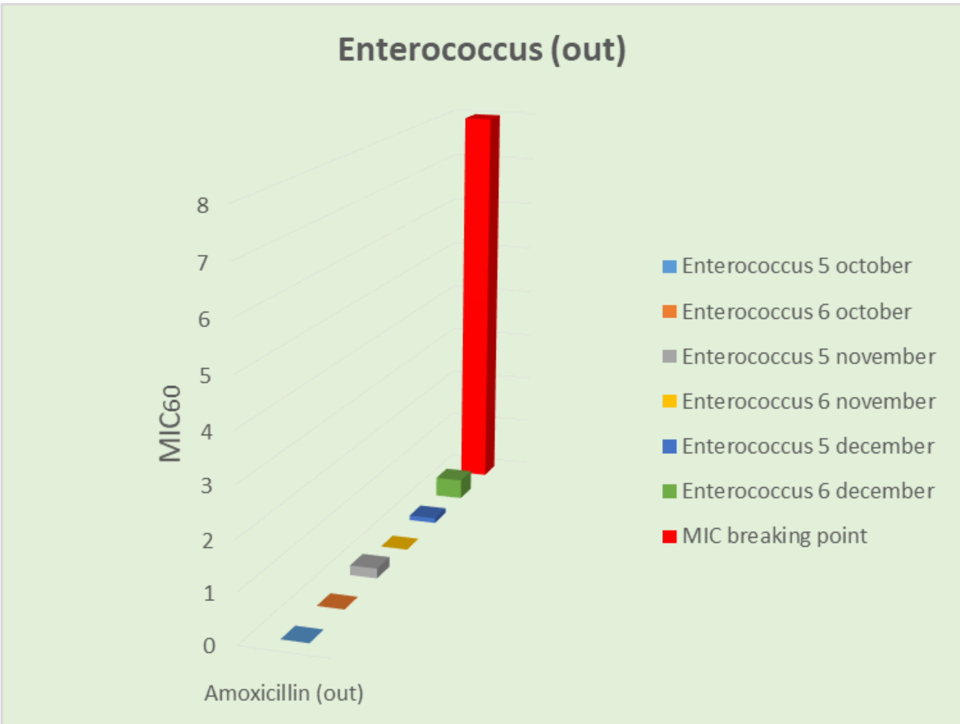


Γράφημα 37. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Σουλφαμεθοξαζόλης για την E.coli ανά στέλεχος ανά μήνα εξόδου

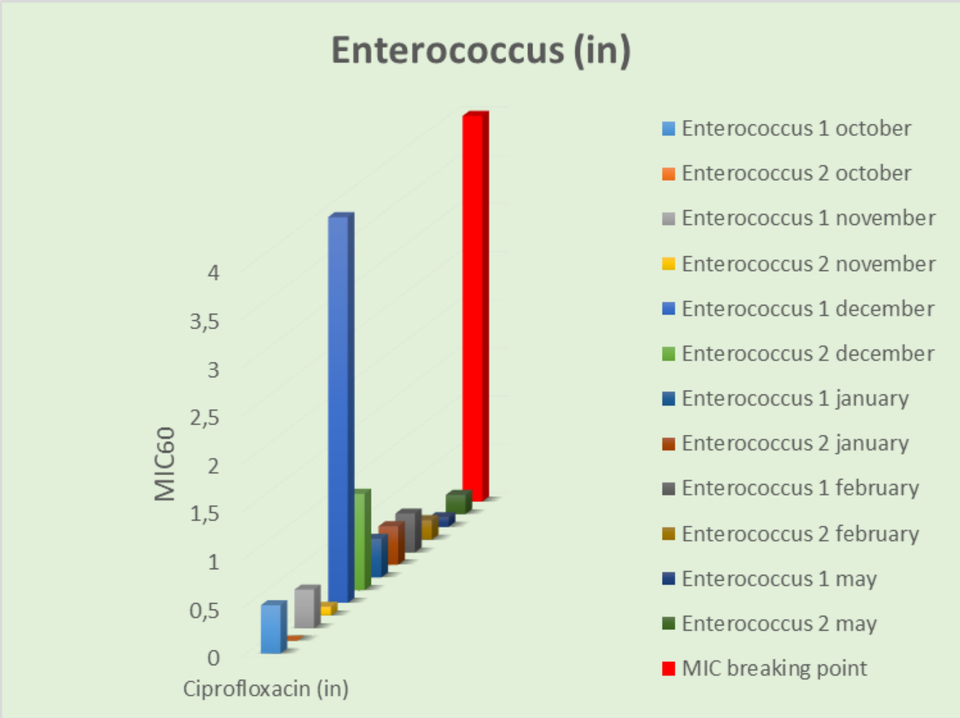
Enterococcus



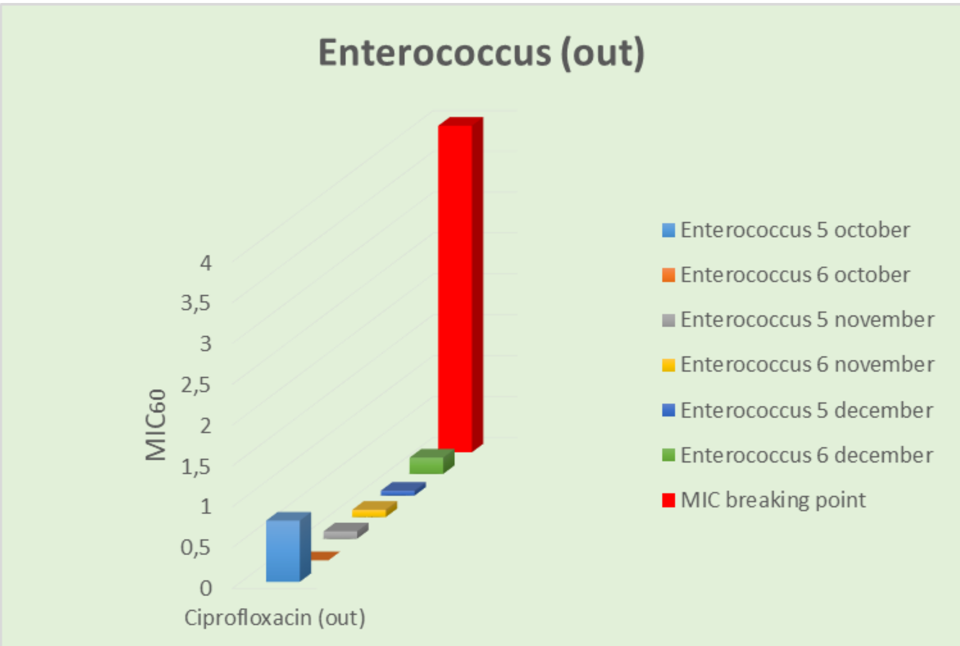
Γράφημα 38. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Αμοξικιλλίνης για τον Enterococcus ανά στέλεχος ανά μήνα εισόδου



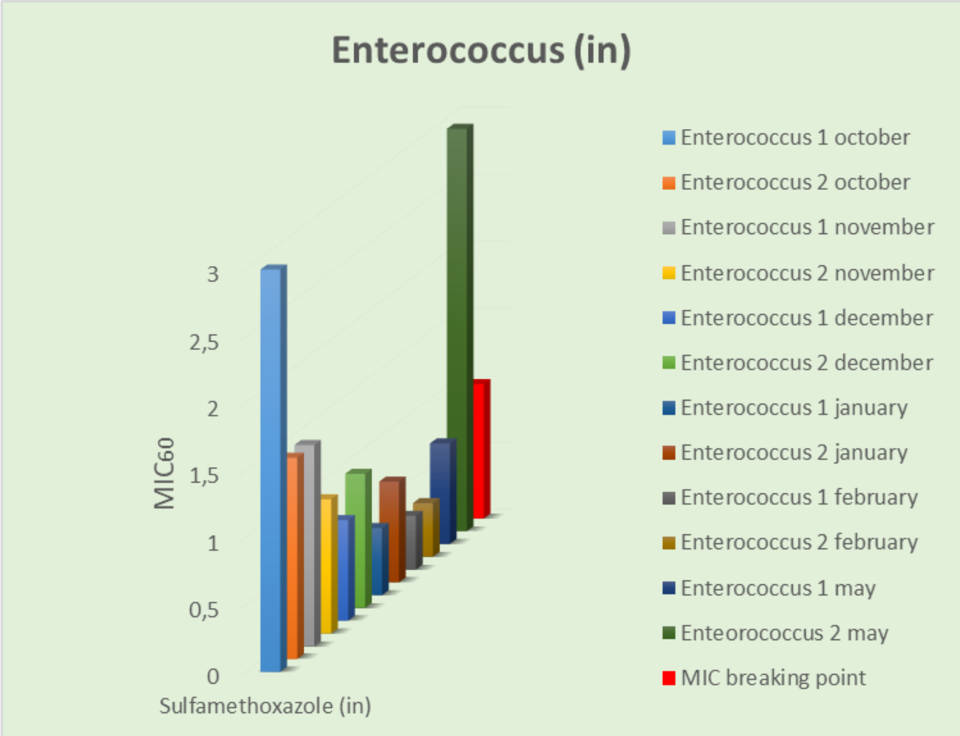
Γράφημα 39. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Αμοξικιλλίνης για τον Enterococcus ανά στέλεχος ανά μήνα εξόδου



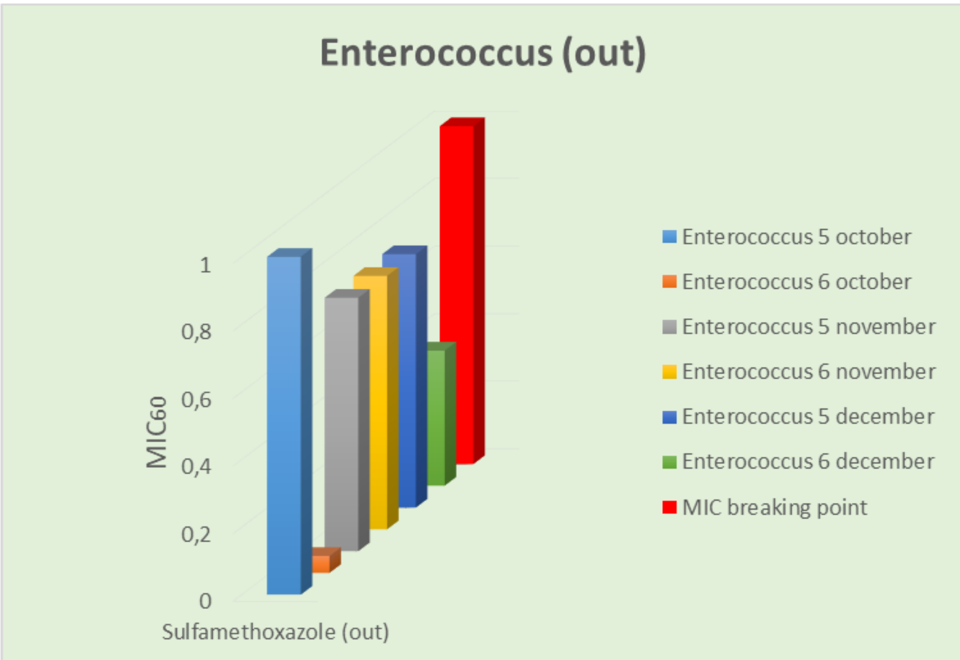
Γράφημα 40. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Σιπροφλοξασίνης για τον Enterococcus ανά στέλεχος ανά μήνα εισόδου



Γράφημα 41 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Σιπροφλοξασίνης για τον Enterococcus ανά στέλεχος ανά μήνα εξόδου



Γράφημα 42. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Σουλφαμεθοξαζόλης για τον Enterococcus ανά στέλεχος ανά μήνα εισόδου

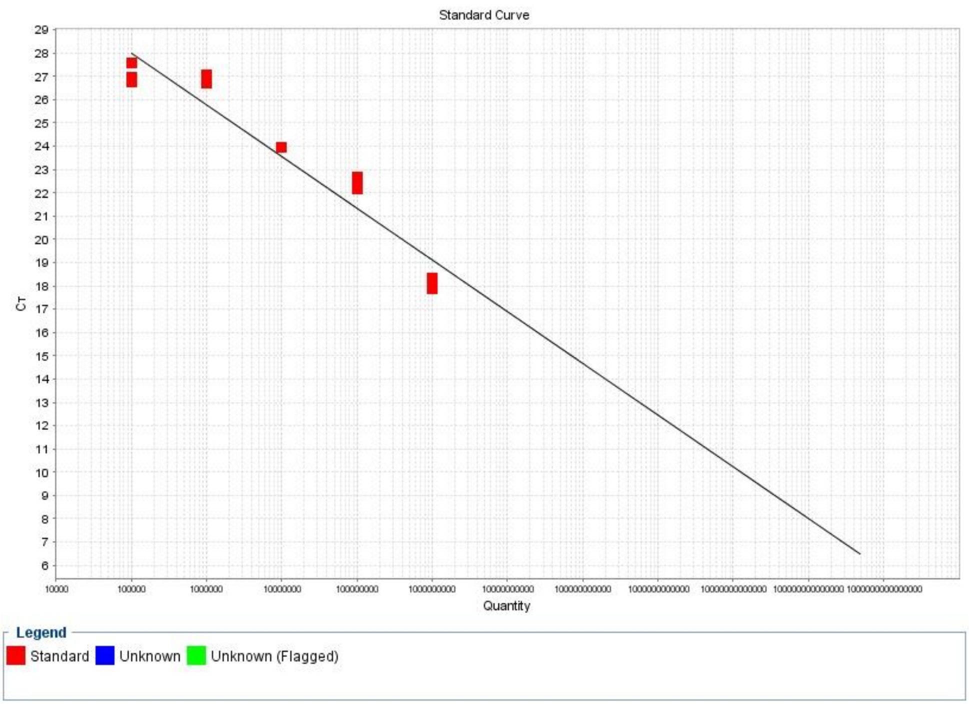


Γράφημα 43. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Σουλφαμεθοξαζόλης για τον Enterococcus ανά στέλεχος ανά μήνα εξόδου

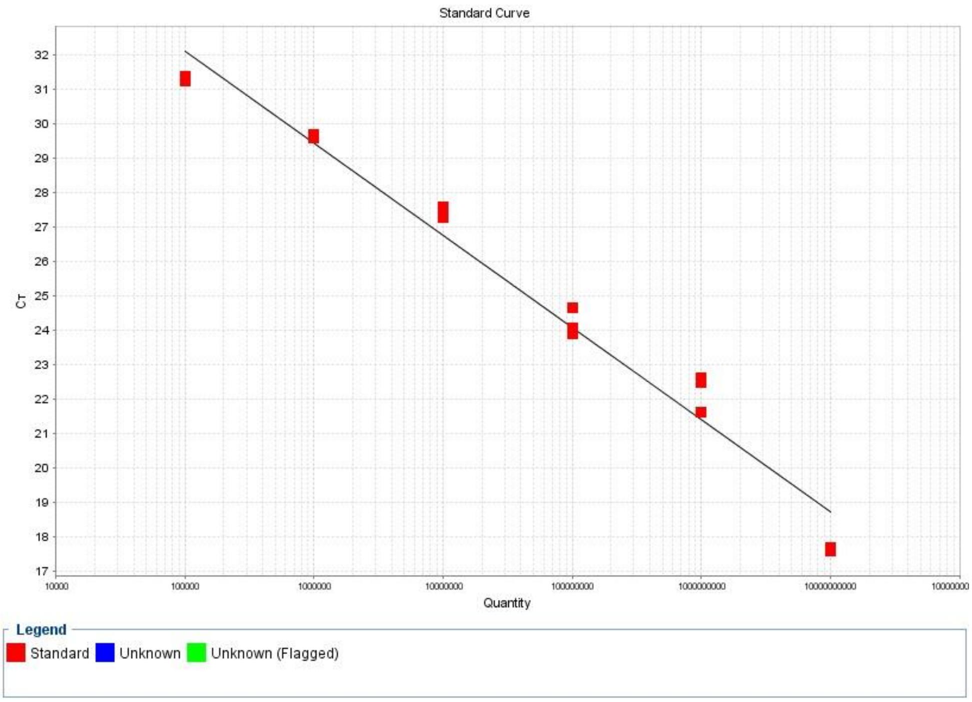
Έλεγχος καθαρότητας γενετικού υλικού

ΔΕΙΓΜΑ	R	DNA concentration (ng/μL)
Νοεμβρίου Είσοδος	1.99	6.4
Νοεμβρίου Έξοδος	1.92	4.8
Δεκεμβρίου Είσοδος	1.99	6.4
Δεκεμβρίου Έξοδος	1.70	6.1
Ιανουαρίου Είσοδος	1.89	6.7
Ιανουαρίου Έξοδος	1.88	9.3
Φεβρουαρίου Είσοδος	1.73	6.0
Φεβρουαρίου Έξοδος	2,00	6.4
Μαΐου Είσοδος	1.83	119.0
Μαΐου Έξοδος	1.84	8.8

Real Time PCR:



Εικόνα 19. Πρότυπη καμπύλη RT-PCR γονιδίου 16S rRNA (Slope: -2.217, R^2:0.92)



Εικόνα 20. Πρότυπη καμπύλη RT-PCR γονιδίου ampC (Slope: -2.676, R^2:0.974)