



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Φωτοκαταλυτική διάσπαση των αντιβιοτικών Erythromycin και Sulfomethoxazole & έλεγχος της αντιβιοτικής τους δράσης»

Χρόνη Μαρία

Τριμελής εξεταστική επιτροπή: Δανάη Βενιέρη
Διονύσιος Μαντζαβίνος
Νικόλαος Ξεκουκουλωτάκης

Χανιά 2010

Πρόλογος

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στα εργαστήρια Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας & στο εργαστήριο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών & Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων του κ. Μαντζαβίνου του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ.Δανάη Βενιέρη τόσο για την ανάθεση του θέματος, όσο και για την ουσιαστική βοήθειά της καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής διατριβής, καθώς συνετέλεσε στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Ευχαριστώ θερμά την κ.Ιωσιφίνα Γουνάκη για την άριστη συνεργασία και καθοδήγηση της κατά την πειραματική διαδικασία στο εργαστήριο περιβαλλοντικής μικροβιολογίας.

Τον κ.Νίκο Ξεκουκουλωτάκη για τις χρήσιμες πληροφορίες στο κομμάτι της ετερογενούς φωτοκατάλυσης και την Θάλεια για την καθοδήγηση της στο εργαστήριο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Μαίρη για την ηθική στήριξη που μου παρείχε αυτά τα χρόνια των σπουδών μου καθώς και όλους τους φίλους που με στήριξαν με κάθε τρόπο.

Εν κατακλείδι, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην οικογένεια μου, και ιδιαίτερα στους γονείς μου για την υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 – Θεωρητικό μέρος	4
1.1 Αντιβιοτικά	5
1.2 Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών	5
1.3 Παρουσία αντιβιοτικών στο περιβάλλον	7
1.4 Μικροβιακή αντοχή	10
1.4.1 Έλεγχος μικροβιακής αντοχής σε αντιβιοτικά	11
1.4.2 Ομάδες αντιβιοτικών	11
1.5 Μέθοδος Bauer - Kirby	14
1.6 <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>)	15
1.7 Τρόποι επεξεργασίας αντιβιοτικών - Φωτοκατάλυση	17
1.7.1 Φωτοκαταλυτική οξείδωση (φωτοηλεκτρικό φαινόμενο)	18
1.7.2 Ημιαγώγιμα υλικά – καταλύτες	20
Σκοπός της παρούσας μελέτης	24
Κεφάλαιο 2 – Πειραματικό μέρος	25
2.1 Πρότυπη καμπύλη	26
2.1.1 Πρότυπη καμπύλη erythromycin	26
2.1.2 Πρότυπη καμπύλη sulfamethoxazole	29
2.2 Επεξεργασία αντιβιοτικών με την μέθοδο της φωτοκατάλυσης	31
2.3 Έλεγχος αποτελεσματικότητας της φωτοκατάλυσης σε σχέση με την αντιβιοτική δράση	33
Κεφάλαιο 3- Αποτελέσματα – Συμπεράσματα	34
3.1 Πρότυπη καμπύλη Erythromycin- Πειραματικά αποτελέσματα	35
3.2 Φωτοκαταλυτική διάσπαση Erythromycin	38
3.2.1 Έλεγχος αντιβιοτικής δράσης	38
3.2.2 Ολικός οργανικός άνθρακας - TOC	41
3.3 Πρότυπη καμπύλη Sulfamethoxazole- Πειραματικά αποτελέσματα	43
3.4 Φωτοκαταλυτική διάσπαση Sulfamethoxazole	45
3.4.1 Έλεγχος αντιβιοτικής δράσης	45
3.4.2 Ολικός οργανικός άνθρακας - TOC	50
3.5 Συμπεράσματα	51
3.6 Βιβλιογραφία	53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στο κεφάλαιο αυτό αναφέρονται γενικές πληροφορίες για τα αντιβιοτικά, τους τρόπους δράσης των σε σχέση με την καταστολή των μικροβίων αλλά και την επίδρασή τους στο περιβάλλον.

1.1 Αντιβιοτικά

Αντιβιοτικό είναι μια χημική ένωση, που εμποδίζει ή καταργεί την αύξηση των μικροοργανισμών, όπως είναι τα βακτήρια, οι μύκητες, ή τα πρωτόζωα.

Σύμφωνα με τον μηχανισμό δράσης τους αυτές οι φαρμακευτικές ουσίες χαρακτηρίζονται ως βακτηριοστατικά ή βακτηριοκτόνα [1].

1.2 Μηχανισμοί δράσης των αντιβιοτικών

Οι αντιβιοτικές ουσίες ταξινομούνται σε δύο βασικές κατηγορίες ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους:

- **Βακτηριοστατικά**, χαρακτηρίζονται τα αντιβιοτικά που αναστέλλουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηριακών κυττάρων, δίνοντας χρόνο στο ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού να ενεργήσει εναντίον τους. Αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση καθώς και τα σουλφοναμίδια είναι κατ'εξοχήν βακτηριοστατικά.
- **Βακτηριοκτόνα**, χαρακτηρίζονται τα αντιβιοτικά που καταστρέφουν τα παθογόνα βακτήρια εμποδίζοντας τη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος ή παρεμβαίνοντας στην δομή των χρωμοσωμάτων. Εδώ ανήκουν φάρμακα που δρουν στο κυτταρικό τοίχωμα ή την κυτταρική μεμβράνη [2].

Αν ένα αντιβιοτικό είναι βακτηριογόνο ή όχι εξαρτάται όχι μόνον από τον τύπο, την συγκέντρωση ή τον τρόπο δράσης του αντιβιοτικού, αλλά και από το είδος του μικροβίου, τον

αριθμό και την φάση ανάπτυξής του, καθώς και από την διάρκεια δράσης του αντιβιοτικού. Η βακτηριογόνος δράση ενός αντιβιοτικού είναι σημαντική τις πρώτες 4-8 ώρες μετά την χορήγησή του και η αντιμικροβιακή δράση θεωρείται γενικά σημαντική αν ένα υψηλό ποσοστό μικροβίων (>99%) καταστρέφεται κατά τη διάρκεια αυτής της χρονικής περιόδου.

Επιπλέον, ανάλογα με το φάσμα της δράσης τους τα αντιβιοτικά ταξινομούνται σε ευρέως και περιορισμένης δράσης. Τα ευρέως φάσματος αντιβιοτικά είναι αποτελεσματικά έναντι μιας μεγάλης ποικιλίας βακτηρίων. Τα περιορισμένου φάσματος έχουν συγκεκριμένο πεδίο δράσης.

Οι τέσσερις βασικοί τρόποι δράσης των αντιβιοτικών είναι οι εξής:

- Παρεμβαίνουν στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, και εμφανίζουν εκλεκτική τοξικότητα διότι το κυτταρικό τοίχωμα είναι συστατικό μόνον του μικροοργανισμού (προκαρυωτικό κύτταρο) και όχι του κυττάρου ξενιστή (ευκαρυωτικό κύτταρο). Τέτοια αντιβιοτικά είναι οι πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, βανκομυκίνη, βακιτρακίνη, κυκλοσερίνη και νοβοβιοσύνη.
- Τροποποιούν τη δομή της κυτταρικής μεμβράνης, και συνδέονται εκλεκτικά μόνο με την κυτταρική μεμβράνη του μικροοργανισμού και όχι με αυτή του κυττάρου ξενιστή. Προκαλείται αλλαγή στην διαπερατότητα της μεμβράνης σε βαθμό ασύμβατο με τη επιβίωση των βακτηρίων.
- Αναστέλλουν την πρωτεϊνσύνθεση μέσα στο κύτταρο είτε εμποδίζοντας τη σύνθεση του RNA (Rifampicin, Fucidic acid) και του DNA (αναστολείς της γήρανσης), είτε δρώντας στα ριβοσώματα και αναστέλλοντας εκεί την πρωτεϊνική σύνθεση (Chloramphenicol, Tetracycline, Erythromycin, Aminoglycosides).

- Αναστέλλουν ουσιώδες μεταβολικές διεργασίες μέσα στο κυτταρόπλασμα των μικροβίων (σουλφοναμίδες). Η εκλεκτική τοξικότητα που παρουσιάζεται οφείλεται στο ότι η μεταβολική διεργασία που αναστέλλεται είναι ουσιώδης μόνο για τον μικροοργανισμό και όχι για τον ξενιστή.

1.3 Παρουσία αντιβιοτικών στο περιβάλλον

Μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών απελευθερώνονται στο περιβάλλον μαζί με τα ανθρώπινα απόβλητα και περνούν στα συστήματα των υδάτων, του εδάφους και σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.

Σύμφωνα με μελέτη του Martinez, J.M. (2009) [6], η ευρεία χρήση αντιβιοτικών για την πρόληψη και τη θεραπεία λοιμώξεων σε ανθρώπους και ζώα, προκαλεί μόλυνση του περιβάλλοντος. Τις τελευταίες δεκαετίες μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών έχουν απελευθερωθεί στο περιβάλλον, αλλά λίγα είναι γνωστά για τις επιπτώσεις αυτών των αντιβιοτικών σε μικρόβια που ζουν σε φυσικά ενδιαίτηματα. Τα αντιβιοτικά απελευθερώνονται στο περιβάλλον όταν αποβάλλονται μαζί με τα ανθρώπινα απόβλητα και περνούν στα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα και κατ' επέκταση στο έδαφος.

Τα βακτήρια αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, η οποία μπορεί να μεταφερθεί σε άλλα στελέχη. Επομένως, υπάρχει ο κίνδυνος για τα βακτήρια που βρίσκονται φυσιολογικά στο περιβάλλον να αναπτύσσουν αντοχή στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών. Αυτή η αντίσταση με τη σειρά της περνάει σε βακτήρια που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο και στα ζώα, κάνοντας έτσι πιο δύσκολο τον έλεγχο των βακτηριακών λοιμώξεων καθώς καθίσταται μη αποτελεσματική η αντιβιοτική δράση των ήδη υπάρχοντων αντιβιοτικών.

Η μελέτη προτείνει πως ύδατα, λύματα και άλλα απόβλητα μολυσμένα με αντιβιοτικά θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ειδικά, προτού απελευθερωθούν στο περιβάλλον ή χρησιμοποιηθούν ως λίπασμα στη γεωργία.

Ο τομέας όπου σε παγκόσμια κλίμακα παρατηρείται η μεγαλύτερη κατανάλωση αντιβιοτικών, μεγαλύτερη και από την ιατρική χρήση, είναι **η γεωργία, η κτηνοτροφία και οι ιχθυοκαλλιέργειες**. Η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών ουσιών στους παραπάνω τομείς έχει οδηγήσει στη διασπορά μεγάλου αριθμού ανθεκτικών βακτηρίων στο υδάτινο περιβάλλον, με πιθανές επιπτώσεις για τη δημόσια υγεία. Τα ευρήματα από διάφορες μελέτες αναδεικνύουν και επιβεβαιώνουν εκ νέου ένα σημαντικό πρόβλημα για τη Δημόσια Υγεία, που αφορά στην εμφάνιση και τη διασπορά πολυανθεκτικών μικροοργανισμών στο περιβάλλον, την πιθανή οριζόντια μεταφορά γονιδίων μεταξύ των διαφόρων στελεχών, αλλά και την αποτελεσματικότητα ή μη των αντιβιοτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σήμερα [5].

Στους τομείς αυτούς τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται :

- Για θεραπεία λοιμώξεων, όπου τα αντιβιοτικά πρέπει να χρησιμοποιούνται ορθολογικά με τον ίδιο τρόπο όπως στους ανθρώπους.
- Για πρόληψη λοιμώξεων, όπου όμως παρατηρείται υπερκατανάλωση και λανθασμένη χρήση, γιατί οι πραγματικές ενδείξεις είναι συνήθως ελάχιστες.
- Ως αυξητικοί παράγοντες (σε υψηλές δόσεις χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς, σε χαμηλότερες δόσεις χρησιμοποιούνται για χρόνια ως αυξητικοί παράγοντες).
 - Ο βασικός λόγος που γινόταν αυτό ήταν η πρόληψη από διάφορα επικίνδυνα νοσήματα, πχ. η καταπόνηση του απογαλακτισμού σε συνδυασμό με δυσμενείς καιρικές συνθήκες ή οι ακατάλληλες συνθήκες στέγασης και υγιεινής μέσα στο στάβλο αποτελούν προδιαθετικοί παράγοντες εμφάνισης νοσημάτων πχ. διαρροϊκού συνδρόμου. Η χορήγηση αυξητικών παραγόντων στην τροφή βρέθηκε ότι βοηθά τα ζώα να αντεπεξέλθουν στις όποιες δυσμενείς συνθήκες διαβίωσης. Τα αποτελέσματα όμως της χρόνιας χρήσης τους (εδώ και δεκαετίες) παραμένουν και αντικατοπτρίζονται σε στελέχη βακτηρίων που

εμφανίζουν αντοχή σε κατηγορίες αντιβιοτικών, που έχουν αναπόφευκτα αποσυρθεί από την αγορά.

- Ως παράγοντες πάχυνσης. Η θεωρητική βάση αυτής της πρακτικής είναι ότι το αντιβιοτικά αλλοιώνουν τη χλωρίδα του εντέρου των ζώων, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται καλύτερη απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής και συνεπώς καλύτερη και γρηγορότερη ανάπτυξη. Σημειώνεται πάντως ότι η θεωρία αυτή έχει αμφισβητηθεί ως προς την επιτυχία της και έχει μετρηθεί πολύ μεγάλη επίδραση της πρακτικής αυτής στην αντοχή των μικροοργανισμών και τη μεταφορά της στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας. Ήδη στα περισσότερα μέρη του κόσμου έχει απαγορευθεί η χορήγηση αντιβιοτικών ως παραγόντων πάχυνσης (διεθνείς οργανισμοί Π.Ο.Υ.Ε.Ε. και διεθνείς νομοθεσίες).
- Μεγάλη είναι η χρήση αντιβιοτικών στη γεωργία, όπως ο ψεκασμός των καλλιεργειών, αλλά και του compost με αντιμυκητιακά φάρμακα.
- Τέλος, ένας σημαντικός λόγος διοχέτευσης αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι η χρήση λιπασμάτων ζωικής προέλευσης στη γεωργία από ζώα στα οποία είχε γίνει εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών. Τα μολυσμένα με αντιβιοτικά λιπάσματα μπορούν να εισχωρήσουν βαθιά μέσα στο χώμα και να διεισδύσουν στους υδροφόρους ορίζοντες. Κι αυτό διότι τα αγροκτήματα δεν είναι ένα αποστειρωμένο περιβάλλον [1].

Αξίζει να σημειωθεί, ότι σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση, η χρήση αντιβιοτικών ως πρόσθετες ύλες στις ζωοτροφές έχει απαγορευτεί από 1/1/2006 [2]. Η απαγόρευση των αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στις ζωοτροφές έχει μεγάλη σπουδαιότητα, όχι μόνο στο πλαίσιο στρατηγικής της ΕΕ για την ασφάλεια των τροφίμων, αλλά και από πλευράς δημόσιας υγείας. Η άσκοπη χρήση των αντιβιοτικών πρέπει να μειωθεί σημαντικά, αν θέλουμε να αντιμετωπίσουμε αποτελεσματικά το πρόβλημα της συνεχώς αυξανόμενης και ποικίλου μικροβιακής αντοχής.

1.4 Μικροβιακή αντοχή

Η **Μικροβιακή αντοχή** στα αντιβιοτικά είναι αποτέλεσμα αλλαγών στο γενετικό υλικό του στελέχους του μικροβιακού είδους και είναι επίκτητη.

Αμέσως μετά την ανακάλυψη των αντιβιοτικών, ο έλεγχος των βακτηριακών λοιμώξεων ήταν άριστος. Πολύ σύντομα όμως πολλά παθογόνα βακτήρια απέκτησαν αντοχή στα περισσότερα από τα δραστικά αντιβιοτικά. Αρχικά το πρόβλημα της αντοχής λύθηκε με την ανακάλυψη νέων ομάδων αντιβιοτικών όπως αμινογλυκοσίδες, μακρολίδες, γλυκοπεπτίδια. Δεν υπάρχει όμως καμία βεβαιότητα ότι η ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών ουσιών μπορεί να κρατηθεί σε ρυθμό παράλληλο με εκείνον της ανάπτυξης αντοχής των παθογόνων μικροβίων. Επειδή οι γνώσεις για τους μηχανισμούς και την επιδημιολογία της αντοχής των αντιβιοτικών εμπλουτίζεται συνεχώς, είναι βέβαιο ότι τα βακτήρια εμφανίζουν αξιοθαύμαστους τρόπους ώστε να ξεπερνούν τα αντιβιοτικά.

Τα αντιβιοτικά δεν είναι δραστικά σε όλα τα είδη μικροοργανισμών, δηλαδή κάποια μικροβιακά είδη έχουν ενδογενή ή ιδιοσυστασιακή αντοχή σε κάποιες ομάδες αντιβιοτικών. Η εγγενής αυτή αντοχή είναι γνωστή και προκαθορισμένη.

Τα μικροβιακά είδη στα οποία το αντιβιοτικό (ή η ομάδα των αντιβιοτικών), είναι δραστικά αποτελούν το αντιμικροβιακό φάσμα του αντιβιοτικού. Η αντοχή που εμφανίζουν ορισμένα μικροβιακά στελέχη, έναντι αντιβιοτικών του φάσματος τους καλείται επίκτητη. Δηλαδή, δεν αποτελεί εγγενή ιδιότητα του είδους του μικροοργανισμού, αλλά συνδέεται με αλλαγές στα κύτταρα των στελεχών αυτού (π.χ. η αντοχή που εμφανίζουν κάποια στελέχη *Escherichia coli* στην αμπικιλίνη οφείλεται στην παραγωγή του ενζύμου β-λακταμάση που αδρανοποιεί την αμπικιλίνη και όχι σε εγγενή ιδιότητα του είδους) [3].

1.4.1 Έλεγχος μικροβιακής αντοχής σε αντιβιοτικά

Ο έλεγχος ευαισθησίας μικροοργανισμών σε ποικιλία αντιβιοτικών με τη μέθοδο της διάχυσης τους στο άγαρ (μέθοδος Bauer-Kirby), αποτελεί μια από τις πιο χρήσιμες και πλέον διαδεδομένες μεθόδους στη μικροβιολογία. Οι εφαρμογές της εκτείνονται από την κλινική μικροβιολογία για την χορήγηση αντιβιοτικών έως την τυποποίηση μικροοργανισμών και τη φαινοτυπική τους διάκριση όσον αφορά στην προέλευσή τους [4]. Ένας από τους πιο διαδεδομένους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιείται ως δείκτης για τον έλεγχο αντοχής σε αντιβιοτικά είναι το κολοβακτηρίδιο *Escherichia coli*.

1.4.2 Ομάδες αντιβιοτικών

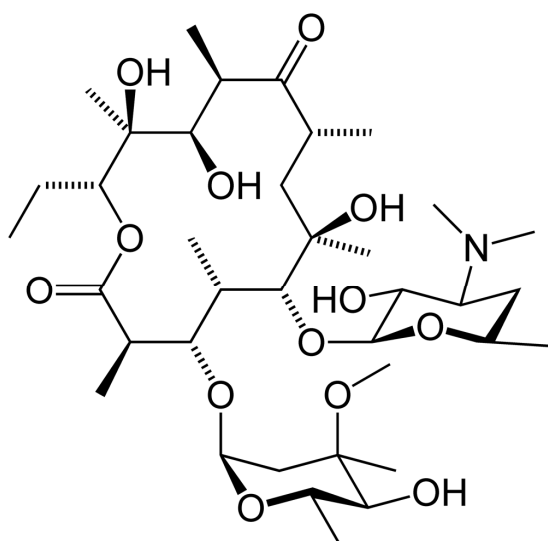
Μακρολίδες

Οι Μακρολίδες επιβραδύνουν την ανάπτυξη των βακτηρίων, ή ενίοτε σκοτώνουν τα ευαίσθητα βακτήρια μειώνοντας την παραγωγή σημαντικών πρωτεϊνών που απαιτούνται από τα βακτήρια για να επιβιώσουν. Ο κύριος μηχανισμός δράσης των μακρολίδων είναι η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης

Η **erythromycin** ($C_{37}H_{67}NO_{13}$) είναι ο κύριος αντιπρόσωπος της ομάδας των μακρολίδων. Είναι αντιβιοτική ουσία που παράγεται από την ποικιλία στρεπτομυκήτων *Streptococcus erythreus*. Είναι βακτηριοστατικό αντιβιοτικό και δρα αναστέλλοντας την πρωτεϊνική σύνθεση μέσω σύνδεσής του με την 50S υπομονάδα των ριβοσωμάτων. Δρα κυρίως κατά των Gram θετικών βακτηρίων, αλλά και ορισμένων Gram αρνητικών όπως είδη *Neisseria* και *Escherichia coli*.

Η ερυθρομικίνη χορηγείται για τη θεραπεία λοιμώξεων σε ασθενείς που είναι αλλεργικοί στην πενικιλίνη. Αρνητικές παρενέργειες από τη λήψη ερυθρομικίνης είναι γαστρεντερικές διαταραχές (εμετός, ναυτία, διάρροια) καθώς επηρεάζει τη χλωρίδα του εντέρου, ενώ σοβαρότερες επιπτώσεις όπως αρυθμία, κώφωση και αλλεργικές αντιδράσεις

είναι πιο σπάνιες. Η μακροχρόνια λήψη αντιμικροβιακών δόσεων ερυθρομυκίνης επηρεάζει τον οργανισμό των νηπίων γι'αυτό δεν συνιστάται η λήψη της σε περιπτώσεις θηλασμού ή εγκυμοσύνης.



Εικόνα 1: Μοριακή δομή της ερυθρομυκίνης

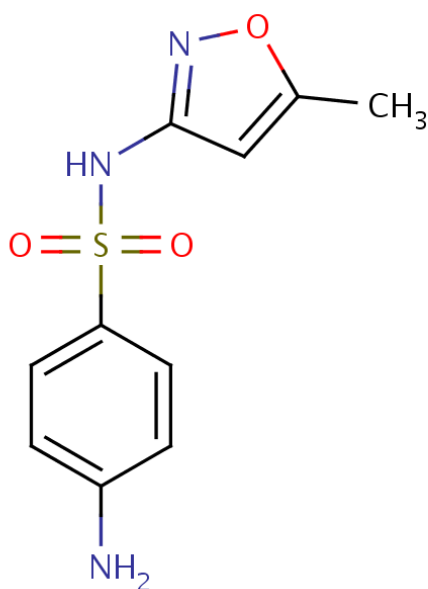
(www.freebase.com/view/wikipedia/images/commons_id/938104)

Σουλφοναμίδες

Οι σουλφοναμίδες είναι παράγωγα της παρααμινοβενζολοσουλφοναμίδης που αποτελείται από το βενζοϊκό δακτύλιο και μια αμινομάδα καθώς και μια αμιδο (SO_2NH_2) ομάδα. Ανήκουν στην κατηγορία των βακτηριοστατικών αντιβιοτικών και δρουν σε αναπτυσσόμενους οργανισμούς με μηχανισμό δράσης την αναστολή της σύνθεσης του φολλικού οξέος και των νουκλεϊκών οξέων, ενώ σε μικρότερο βαθμό με αδρανοποίηση άλλων ενζύμων.

Αντοχή σε αυτή την κατηγορία αντιβιοτικών αναπτύσσεται σχετικά γρήγορα. Η αντοχή συνίσταται σε ολική διασταυρούμενη ανθεκτικότητα μεταξύ των υπαρχουσών σουλφοναμίδων και επιτελείται μέσω γονιδίων που εδράζονται σε πλασμίδια.

Η **sulfomethoxazole** ($C_{10}H_{11}N_3O_3S$) είναι μία μέσης δράσης σουλφοναμίδη. Η κύρια δραστηριότητά της είναι ενάντια στις ήπιες μορφές Στρεπτόκοκκου, Σταφυλόκοκκου χρυσού, *Escherichia coli*, *Influenzae Haemophilus*, και σε αναερόβιους μικροοργανισμούς. Χρησιμοποιείται συνήθως για να θεραπεύσει τις μολύνσεις του ουρικού συστήματος. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση αντί της αμοξικιλίνης (αντιβιοτικό για την αντιμετώπιση της ιγμορίτιδας). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση της τοξοπλάσμωσης.



Εικόνα 2: Μοριακή δομή της σουλφομεθοξαζόλης

(www.drugbank.ca/drugs/DB01015)

1.5 Μέθοδος Bauer-Kirby

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή ακολουθεί κάποιους κανόνες οσον αφορά στο θρεπτικό υλικό, το ελαιώρημα που ενοφθαλμίζεται, τους δίσκους αντιβιοτικών, την επώαση και την ανάγνωση των αποτελεσμάτων [5].

Το θρεπτικό που χρησιμοποιείται για τη συγκεκριμένη μεθοδολογία είναι το Mueller Hinton Agar (MHA). Το πάχος του άγαρ στα τριβλία είναι καθοριστικός παράγοντας για τη διαμόρφωση της ζώνης αναστολής. Η διάχυση του αντιβιοτικού γίνεται σε 3 διευθύνσεις, εκτός αν το πάχος του υλικού είναι πολύ μικρό οπότε πολύ γρήγορα (όταν η πυκνότητα του αντιβιοτικού στον πυθμένα είναι ίδια με αυτή της επιφάνειας) γίνεται σε δυο διευθύνσεις, με αποτέλεσμα να διαμορφώνεται ζώνη αναστολής με μεγαλύτερη διάμετρο. Παράλληλα, όταν το πάχος του υλικού είναι μεγαλύτερο από 4mm γίνεται μεγαλύτερη διάχυση του αντιβιοτικού προς το βάθος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρότερων ζωνών αναστολής. Ταυτόχρονα με τη διάχυση του αντιβιοτικού, τα βακτήρια που έχουν τοποθετηθεί στο θρεπτικό υλικό αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Η ζώνη αναστολής σχηματίζεται όταν η συγκέντρωση του αντιβιοτικού, ίση ή μεγαλύτερη από την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Microbial Inhibitory Concentration – MIC), επιδρά σε ένα αρκετά μεγάλο βακτηριακό πληθυσμό για να επιτύχει την αναστολή του. Αυτό εξηγεί και την εξάρτηση της ζώνης αναστολής από το ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού και από την ταχύτητα διάχυσης του αντιβιοτικού στο άγαρ.

Όταν μέσα στη ζώνη αναστολής παρατηρείται ελαφρά μικροβιακή ανάπτυξη (80% αναστολή ανάπτυξης), αυτή οφείλεται προφανώς στην παρουσία ανταγωνιστικών ουσιών στο θρεπτικό υλικό, όπως θυμιδίνης και δεν λαμβάνεται υπόψιν, αλλά μετράται η ζώνη μέχρι την κανονική ανάπτυξη.

Η πυκνότητα του ενοφθαλμίσματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη διαμόρφωση της ζώνης αναστολής. Αν οι δίσκοι και το θρεπτικό υλικό είναι σταθερά, ο κυριότερος παράγοντας για την επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι η πυκνότητα του

ενοφθαλμίσματος. Μεγάλη πυκνότητα ελαιωρήματος έχει σαν αποτέλεσμα να διαμορφώνονται ζώνες αναστολής μικρότερης διαμέτρου [6].

Οι δίσκοι των αντιβιοτικών αποτελούνται από διηθητικό χαρτί (*Whatman No 1* ή *Schleicher και Schuell No740 E*) κι έχουν διάμετρο περίπου 13mm. Η τοποθέτηση τους στο τριβλίο γίνεται με αποστειρωμένη λαβίδα και σε περίπτωση που τοποθετηθούν πάνω από 1 δίσκιο στο τριβλίο τοποθετούνται σε απόσταση μεταξύ τους ώστε να μην αλληλεπικαλύπτονται οι ζώνες αναστολής, Η επώαση των τριβλίων γίνεται στους 35° C για 18-24 ώρες και πρέπει να αρχίζει το αργότερο 15 λεπτά μετά την τοποθέτηση των δισκίων για να αποφευχθεί η υπερδιάχυση του αντιβιοτικού [7].

1.6 Escherichia coli (E.coli)

Το γένος *Escherichia* περιλαμβάνει βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*, η οποία περιλαμβάνει κυρίως κινητά Gram-αρνητικά βακτήρια. Η *Escherichia coli* είναι τυπικό είδος του γένους και το πιο αντιπροσωπευτικό είδος της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Προκειται για ευρέως διαδεδομένο μικροοργανισμό αφού είναι το κυρίαρχο δυνητικά αναερόβιο βακτήριο της ανθρώπινης εντερικής χλωρίδας [8]. Ο ανθρώπινος εντερικός σωλήνας αποτελεί το φυσικό περιβάλλον του μικροοργανισμού. Παράλληλα, ανευρίσκεται φυσιολογικά στον εντερικό σωλήνα πολλών θερμόαιμων ζώων, όπως είναι τα βοοειδή, οι σκύλοι κ.α. Η παρουσία της στο νερό ή στα τρόφιμα θεωρείται ότι δείχνει την άμεση ή έμμεση κοπρανώδη μόλυνση από λύματα και την πιθανή παρουσία άλλων παθογόνων [9].

Μορφολογία:

Πρόκειται για Gram-αρνητικό αερόβιο μη σπορογόνο βακτήριο, μήκους 1,5-3μm. Είναι περίτριχο, κινητό, ενώ παράλληλα υπάρχουν και ακίνητα στελέχη. Παράγει ένα πολύ λεπτό έλυτρο, το οποίο στα μη κινούμενα στελέχη είναι παχύτερο και μοιάζει με πραγματική κάψα.

Τα ινίδια που παράγονται από το σύνολο των στελεχών *E.coli* διακρίνονται στα προσκολλητικά και συζευτικά [10].

Ευαισθησία-ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά:

Η *E.coli* είναι βακτήριο ευαίσθητο στις αμινογλυκοσίδες, τη χλωραμφενικόλη, τις σουλφοναμίδες, τις νιτροφουράνες. Από τα β-λακταμικά, είναι ευαίσθητο σε πολλές κεφαλοσπορίνες και ανθεκτικό σε μεγάλο ποσοστό στην πενικιλίνη αλλά ευαίσθητο σε άλλες ημισυνθετικές πενικιλίνες όπως η αμπικιλίνη [11].



Εικόνα 3 : *E.coli* (<http://www.ecoli.bham.ac.uk/index/pics.html>)

Το συγκεκριμένο βακτήριο ενδείκνυται για επιστημονικές μελέτες διότι οι συνθήκες κάτω από τις οποίες αναπτύσσονται οι αποικίες του δεν έχουν ιδιαίτερες απαιτήσεις. Εκκολάπτεται σε οποιοδήποτε θρεπτικό υλικό, η θερμοκρασία επώασης είναι οι 37 ° C και ο χρόνος ανάπτυξης της καλλιέργειας μία ημέρα. Η αναπαραγωγή του γίνεται με διχοτόμηση.

Τέλος το *E.Coli* παρουσιάζει ιδιαίτερη ευαισθησία στην αντιβιοτική δράση ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, όπως αποδείχθηκε και από τα πειραματικά αποτελέσματα.

1.7 Τρόποι επεξεργασίας αντιβιοτικής ουσίας - Φωτοκατάλυση

Η φωτοκατάλυση ανήκει σε μια ομάδα Προχωρημένων Οξειδωτικών Μεθόδων Αντιρύπανσης (Π.Ο.Μ.Α.) που έχει αναπτυχθεί ως επείγουσα τεχνολογία για την επεξεργασία επικίνδυνων οργανικών ενώσεων στα υγρά απόβλητα και στα υπόγεια νερά. Η ικανότητα των μεθόδων αυτών έγκειται στο να αδρανοποιούν τις πλέον βλαβερές, τοξικές και μη βιοαποικοδομήσιμες οργανικές ουσίες που συναντώνται στην υγρή και αέρια φάση [13].

Η αποτελεσματικότητα τους στηρίζεται στην δημιουργία ριζών υδροξυλίου ($\text{OH}^\cdot$), οι οποίες και αποτελούν το ισχυρότερο οξειδωτικό μέσο μετά το φθόριο και επιπλέον δεν ρυπαίνουν το περιβάλλον. Οι ρίζες υδροξυλίου ως ισχυρά οξειδωτικά σώματα αντιδρούν με τις οργανικές ενώσεις αποσπώντας άτομα υδρογόνου (κορεσμένοι υδρογονάνθρακες) ή προστίθενται στο μόριο (ακόρεστοι, αρωματικοί υδρογονάνθρακες) δημιουργώντας υπεροξειδικές ρίζες. Οι τελευταίες προκαλούν οξειδωτικές θερμικές αντιδράσεις, οι οποίες τελικά οδηγούν στην πλήρη μετατροπή των οργανικών ενώσεων σε CO_2 , H_2O .

Η ετερογενής φωτοκατάλυση (heterogeneous photocatalysis) αποτελεί νέα οξειδωτική μέθοδο μέσω της οποίας είναι δυνατή η σχεδόν πλήρης ή και πλήρης καταστροφή τοξικών οργανικών χημικών ουσιών.

Η μέθοδος αποτελεί μία από τις μεθόδους του φωτοηλεκτροχημικού φαινομένου, το οποίο εμφανίζεται κατά τον φωτισμό της ετεροεπαφής ενός ημιαγωγού με ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Η αποτελεσματικότητα της στηρίζεται στην δημιουργία ριζών υδροξυλίου ($\text{OH}^\cdot$), οι οποίες αποτελούν το ισχυρότερο οξειδωτικό μέσο (δυναμικό οξείδωσης 2.8 V) μετά το φθόριο και είναι ιδιαίτερα φιλικές προς το περιβάλλον. Η ανάμειξη του προς καθαρισμό αποβλήτου με έναν ημιαγώγιμο καταλύτη και ο φωτισμός του συστήματος με τεχνητό ή ηλιακό φως, επιφέρουν την πλήρη οξείδωση των οργανικών ενώσεων που υπάρχουν σε αυτό. Πρόκειται για μια μέθοδο, η οποία πρακτικά μιμείται τη φύση, η παρεμβολή δε του καταλύτη επιταχύνει τη διαδικασία καθαρισμού κατά πολλές τάξεις μεγέθους.

1.7.1 Φωτοκαταλυτική οξείδωση (φωτοηλεκτρικό φαινόμενο)

Η μέθοδος της φωτοκαταλυτικής οξείδωσης οργανικών ρύπων βασίζεται στο φωτοηλεκτρικό φαινόμενο και λειτουργεί κατά τρόπο ανάλογο με τα φωτοηλεκτροχημικά στοιχεία, τα οποία αποτελούν έναν από τους 3 τρόπους μετατροπής της ηλιακής ενέργειας σε ηλεκτρική (οι άλλοι δύο είναι τα φωτοβολταϊκά συστήματα και η φωτοσύνθεση).

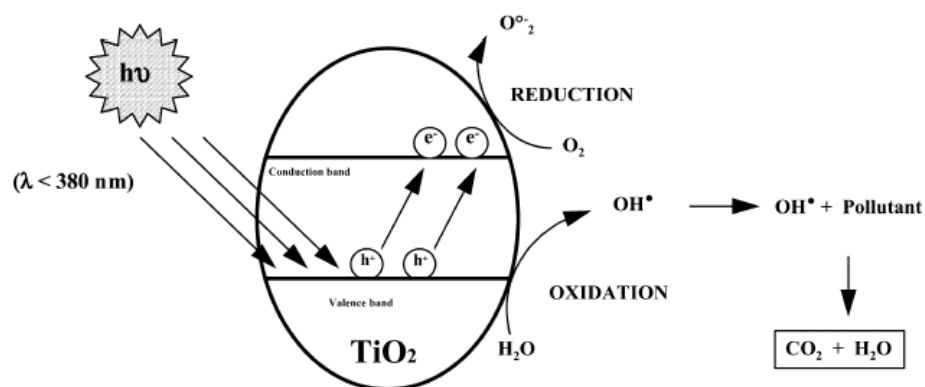
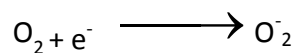
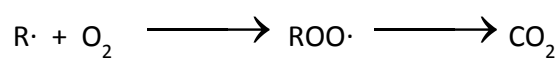
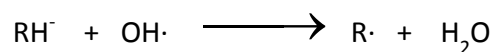
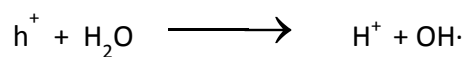
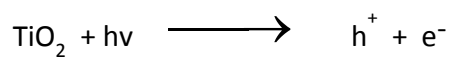
Σύμφωνα με το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο είναι δυνατή η παραγωγή προσανατολισμένης κίνησης ηλεκτρικών φορτίων (ηλεκτρικό ρεύμα) με την «έκθεση» ενός στοιχείου σε ακτινοβολία, όπως αυτή του ήλιου, εξαιτίας της απορρόφησης κβάντων ενέργειας από τα δέσμια ηλεκτρόνια των ατόμων με αποτέλεσμα τη διέγερσή τους και τη μετατροπή τους σε ελεύθερους φορείς.

Η χρησιμοποίηση των μεθόδων, δίνει την δυνατότητα μετατροπής της ηλιακής ενέργειας εκτός από ηλεκτρική, και σε χημική με τις κατάλληλες τροποποιήσεις.

Ο φωτισμός ενός ημιαγώγιμου ηλεκτροδίου με ενέργεια φωτός μεγαλύτερη από το ενεργειακό χάσμα ($E_g > h\nu$) δημιουργεί φορείς ηλεκτρικού ρεύματος, τα ηλεκτρόνια (e^-) και τις οπές (h^+). Τα φωτοδημιουργούμενα αυτά σωματίδια δρουν ως ισχυρά αναγωγικά και οξειδωτικά αντίστοιχα και συνεισφέρουν, μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων με τις κατάλληλες ουσίες στο διάλυμα, στη μετατροπή του φωτός σε ηλεκτρική ενέργεια.

Αντίστοιχα ο κάθε κόκκος ημιαγώγιμης κόνεως που βρίσκεται σε επαφή με το κατάλληλο διάλυμα, λειτουργεί υπό την επίδραση του φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος, από μόνος του σαν μια μικροφωτοηλεκτροχημική κυψέλη, όπου συνυπάρχουν η άνοδος και η κάθοδος. Ο φωτισμός ενός τέτοιου συστήματος δημιουργεί στη ζώνη σθένους (vb) και αγωγιμότητας (cb) ηλεκτρόνια (e^-) και οπές (h^+) αντίστοιχα. Στη περίπτωση μας ως ημιαγώγιμο υλικό επιλέχθηκε το TiO_2 . Οι φωτοδημιουργούμενες οπές αντιδούν με τα ιόντα ή με OH^- τα μόρια του H_2O που είναι προσροφημένα στην επιφάνεια του ημιαγωγού και τα οξειδώνουν προς τις αντίστοιχες ρίζες υδροξυλίου. Οι ρίζες αυτές αποτελούν το κύριο οξειδωτικό μέσο, το οποίο αντιδρά με τα οργανικά μόρια που βρίσκονται στο διάλυμα, και μέσω υπεροξειδωτικών ριζών τα αποικοδομεί προς CO_2 και ανόργανα ιόντα. Λόγω δε του υψηλού δυναμικού οξείδωσης των ριζών αυτών, είναι δυνατή η προσβολή σχεδόν όλων των οργανικών ρύπων.

Αντιδράσεις φωτοκατάλυσης που ως ημιαγωγός χρησιμοποιείται το TiO_2 :



Εικόνα 4: Προσομοίωση κόκκου ημιαγώγιμης σκόνης με μικροφωτοηλεκτρικό στοιχείο

1.7.2 ΗΜΙΑΓΩΓΙΜΑ ΥΛΙΚΑ-ΚΑΤΑΛΥΤΕΣ

Ως φωτοκαταλύτες ορίζονται τα στερεά εκείνα που μπορούν να επάγουν αντιδράσεις παρουσία φωτός και τα οποία δεν καταναλώνονται κατά τη διαδικασία αυτή. Στη φωτοκαταλυτική καταστροφή των ρύπων ρόλο αποφασιστικής σημασίας έχει ο ημιαγωγός. Οι φυσικές και οι φυσικοχημικές ιδιότητές του αποτελούν παραμέτρους που επιδρούν αποφασιστικά στη λειτουργικότητα του συστήματος. Στον περιβαλλοντικό αλλά και στον ενεργειακό τομέα ως ημιαγώγιμες ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον τα : TiO_2 , ZnO , SrTiO_3 , WO_3 , Fe_2O_3 , ZnS , CdS .

Μελέτες με σκοπό τη σύγκριση των διαφόρων φωτοκαταλυτών έδειξαν ότι το TiO_2 , που είναι ημιαγωγός n-τύπου, ακολουθούμενο από το ZnO αποτελούν τους πιο αποτελεσματικούς ημιαγωγούς για την οξειδωτική καταστροφή οργανικών ενώσεων. Το TiO_2 εκτός από μεγάλη φωτοκαταλυτική δραστηριότητα παρουσιάζει, σε σχέση με τους υπόλοιπους ημιαγωγούς, και μεγαλύτερη αντοχή στη διάβρωση και φωτοδιάβρωση, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη δυνατότητα ανακύκλωσης του. Επιπλέον, είναι βιολογικά αδρανές υλικό.

Μεγάλο μειονέκτημα του TiO_2 είναι το μεγάλο του ενεργειακό χάσμα, εξαιτίας του οποίου η ενεργοποίηση του επιτυγχάνεται με ακτινοβολία μικρότερη των 385nm, οπότε καθίσταται δυνατή η αξιοποίηση μικρού μόνο μέρους της ηλιακής ακτινοβολίας (περίπου 5%). Ημιαγωγοί με μικρότερο ενεργειακό χάσμα όμως, ενώ απορροφούν μεγαλύτερο μέρος του ορατού φάσματος, παρουσιάζουν εύκολη φωτοδιάβρωση με αποτέλεσμα την απελευθέρωση τοξικών προϊόντων [14].

Από τις διάφορες δομές του TiO_2 (anatase, rutile, brookite) υπερτερεί ως προς τη φωτοκαταλυτική δραστηριότητα η anatase λόγω ισχυρότερης προσρόφησης OH^- και H_2O στην επιφάνεια της και λόγω του χαμηλότερου βαθμού επανασύνδεσης των διεγερμένων e^- και h^+ .

Το TiO_2 προσδιορίζεται πρωταρχικά από τις φυσικοχημικές του ιδιότητες όπως η μορφολογία, η κρυσταλλική δομή, το μέγεθος σωματιδίων, η ειδική επιφάνεια, το πορώδες και η θερμική σταθερότητα. Ο ακριβής έλεγχος αυτών των ιδιοτήτων (ιδίως μορφολογία και κρυσταλλική δομή) κατά την προετοιμασία του TiO_2 σε νανομέγεθος αποτελεί θέμα κλειδί στον τομέα της φωτοκατάλυσης. [15]

Η δομή anatase είναι θερμοδυναμικά ασταθής και μπορεί, με θέρμανση στους 500-600 °C, να μετασχηματιστεί σε rutile. Ο μετασχηματισμός της κρυσταλλικής δομής συνήθως συνοδεύεται από ισχυρή σύντηξη και επομένως ανάπτυξη κρυστάλλων μεγαλύτερου μεγέθους με αποτέλεσμα τη μείωση της φωτοκαταλυτικής δραστηριότητας. Η δομή anatase με μεγαλύτερη κρυσταλλικότητα προτιμάται στη φωτοκατάλυση, αφού η υψηλή κρυσταλλικότητα σημαίνει λιγότερες ατέλειες για την επανασύνδεση των φωτοδημιουργημένων e^- και h^+ .

Βελτιστοποίηση των φωτοκαταλυτικών ιδιοτήτων του TiO_2 μπορεί να επιτευχθεί με:

- i) θερμική κατεργασία υπό κενό ή ατμόσφαιρα H_2 ,
- ii) απόθεση στην επιφάνεια των κόκκων μεταλλικών νησίδων Pt, Au, Pd, Ag,
- iii) δημιουργία μεικτών οξειδίων από TiO_2 / Al_2O_3 , TiO_2 / SiO_2 , TiO_2 / WO_3 ,
- iv) φωτοευαισθητοποίηση του καταλύτη με τη βοήθεια χρωστικών ουσιών οι οποίες προσροφώνται στην επιφάνεια του κόκκου καθιστώντας δυνατή την εκμετάλλευση ενός σημαντικού τμήματος του ορατού φάσματος της ηλιακής ακτινοβολίας. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση υπάρχει το μειονέκτημα της ταυτόχρονης καταστροφής τόσο της τοξικής όσο και της χρωστικής ουσίας,
- v) προσθήκη προσμείξεων από διάφορα μεταλλικά ιόντα όπως Cr, V, Mo, W, Fe κ.α. με στόχο την αύξηση των φωτοκαταλυτικών ιδιοτήτων του TiO_2 και τη μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης προς το ορατό.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου:

Η μέθοδος της ετερογενούς φωτοκατάλυσης έχει σημαντικά πλεονεκτήματα στα οποία συγκαταλέγονται :

- η πλήρης φωτοκαταλυτική οξείδωση των οργανικών μορίων,
- η χρήση και για πολύ μικρές συγκεντρώσεις ρύπων,
- το γεγονός ότι οι καταλύτες είναι χημικά και βιολογικά αδρανή υλικά,
- το χαμηλό κόστος,
- η δυνατότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης του καταλύτη που βοηθά στον περιορισμό του κόστους και στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος με χημικούς ρύπους,
- η δυνατότητα εκμετάλλευσης του ηλιακού φωτός, που είναι ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα για περιοχές με μεγάλη ηλιοφάνεια,
- η απολυμαντική ικανότητα της μεθόδου καθώς η δράση υδροξυλίων καταστρέφει παθογόνους μικροοργανισμούς,
- οι ήπιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας,
- δυνατότητα εφαρμογής στην υγρή και στην αέρια φάση.

Μειονεκτήματα της μεθόδου:

- Ο ρυθμός φωτοκαταλυτικών αντιδράσεων είναι συνήθως μικρός και χρειάζεται παροχή μεγάλης ποσότητας φωτοκαταλύτη στον αντιδραστήρα,
- Πρακτικά είναι αδύνατη η ομοιόμορφη ακτινοβολήση της επιφάνειας του καταλύτη (εξαιτίας της θολότητας του διαλύματος και της διασποράς του φωτός από το υγρό),
- Η επανάκτηση του καταλύτη μετά την διεργασία μέσω διήθησης, είναι μια δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία.

Εφαρμογές των φωτοκαταλυτικών τεχνικών γίνονται σε απόβλητα βαφείων, εταιριών φυτοφαρμάκων, αστικά λύματα, στραγγίσματα χωματερής, απόβλητα ελαιουργείων και σε απόβλητα επεξεργασίας φωτογραφιών. Επιπλέον, έχουν γίνει εργαστηριακές μελέτες για χρήση της μεθόδου σε χρωστικές ουσίες, παρασιτοκτόνα, διοξίνες και τασενεργές ουσίες [12].

Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης περιλαμβάνει:

- εύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) για τα αντιβιοτικά erythromycin και sulfomethoxazole ως προς την ανάπτυξη της *Escherichia coli*
- έλεγχος της διάσπασης των δύο αντιβιοτικών με την ετερογενή φωτοκατάλυση
- διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης των εν λόγω αντιβιοτικών ουσιών κατόπιν της ετερογενούς φωτοκατάλυσης

Για τον έλεγχο αυτόν επεξεργαστήκαμε διαλύματα των δύο αντιβιοτικών με τη μέθοδο της ετερογενούς φωτοκατάλυσης παρουσία καταλύτη TiO_2 . Η επίδραση της μεθόδου στην αντιβιοτική δράση των διαλυμάτων μελετήθηκε με το πρότυπο στέλεχος *Escherichia coli* ATCC 23716 και με τη μέθοδο Bauer-Kirby. Η εύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) για κάθε μία από τις αντιβιοτικές ουσίες προσδιορίστηκε με την μέθοδο διάχυσης αντιβιοτικού σε άγαρ, τεχνική Bauer-Kirby.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στο κεφάλαιο αυτό θα γίνει αναλυτική περιγραφή των πειραματικών μεθοδολογιών, οι οποίες εφαρμόστηκαν για τη διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής διατριβής. Παράλληλα αναφέρεται ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε.

2.1.Πρότυπη καμπύλη

Το πρώτο στάδιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας περιλαμβάνει τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης και για τα δύο αντιβιοτικά, η οποία αφορά στη μεταβολή της ζώνης αναστολής του πρότυπου στελέχους *E. coli* σε συνάρτηση με την ποσότητα του κάθε αντιβιοτικού.

2.1.1. Πρότυπη καμπύλη erythromycin

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης της erythromycin, χρησιμοποιήθηκαν 7 διαλύματα του αντιβιοτικού με τις εξής συγκεντρώσεις:

Πίνακας 1: Αραιώσεις ερυθρομυκίνης για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης

Διαλύματα	C Erythromycin (mg/l)
1	60
2	50
3	40
4	30
5	20
6	10
7	5

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Εμποτισμός των δισκίων

Τα δισκία αποτελούνται από διηθητικό χαρτί, Whatman No 1 ή Schleicher και Schuell No740 E κι έχουν διάμετρο 13 mm.

Η ποσότητα διαλύματος εμποτισμού για κάθε δισκίο είναι 0,5 ml .

- Ξήρανση

Τα δισκία τοποθετούνται σε κλίβανο στους 39° C προς ξήρανση. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία δεν καταστρέφει την αντιβιοτική δράση.

Αξίζει να σημειωθεί πως ο εμποτισμός πραγματοποιήθηκε σταδιακά, ώστε να ελαχιστοποιηθεί τυχόν απώλεια της αντιβιοτικής ουσίας εξαιτίας της διάχυσης της από το δισκίο.

- Εφαρμογή της μεθόδου Bauer-Kirby

- ο Δημιουργία εναιωρήματος *E. coli*

Η προετοιμασία του εναιωρήματος γίνεται από στερεή καλλιέργεια του πρότυπου στελέχους *E.coli*. Η θολρότητα του εναιωρήματος είναι ίση με τη θολρότητα του πρότυπου θολοσιμετρικού διαλύματος της κλίμακας Mc Farland, No 0.5. Τα τριβλία που χρησιμοποιήθηκαν είναι αποστειρωμένα διαμέτρου 9cm, τα οποία επιστρώθηκαν με θρεπτικό υλικό Mueller Hinton Agar (πάχους περίπου 4mm).

- Τοποθέτηση των δισκίων στα τριβλία

- Επώαση

Η επώαση των τριβλίων γίνεται στους 35° C για 18-24 ώρες και πρέπει να αρχίζει το αργότερο 15 λεπτά μετά την τοποθέτηση των δισκίων για να αποφευχθεί η υπερδιάχυση του αντιβιοτικού.



Εικόνα 5: Μέθοδος Bauer-Kirby – δισκίο εμποτισμένο με erythromycin και διάκριση της ζώνης αναστολής ανάπτυξης της *E. coli* σε Mueller Hinton Agar.

- Ανάγνωση αποτελεσμάτων

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων γίνεται μετά την επώαση και περιλαμβάνει τη μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής. Σαν όριο της ζώνης αναστολής θεωρείται το σημείο που δεν παρατηρείται μικροβιακή ανάπτυξη με γυμνό μάτι.

2.1.2. Πρότυπη καμπύλη sulfamethoxazole

Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης της sulfamethoxazole χρησιμοποιήθηκαν 10 διαλύματα του αντιβιοτικού με τις εξής συγκεντρώσεις:

Πίνακας 2: Αραιώσεις σουλφαμεθοξαζόλης για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης

Διαλύματα	C Sulfamethoxazole (mg/l)
1	250
2	200
3	180
4	160
5	140
6	120
7	100
8	80
9	60
10	40

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Εμποτισμός των δισκίων

Τα δισκία αποτελούνται από διηθητικό χαρτί, Whatman No 1 ή Schleicher και Schuell No740 E κι έχουν διάμετρο 13 mm.

Η ποσότητα διαλύματος εμποτισμού για κάθε δισκίο είναι 0,5 ml .

- Ξήρανση

Τα δισκία τοποθετούνται σε κλίβανο στους 39° C προς ξήρανση. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία δεν καταστρέφει την αντιβιοτική δράση.

Αξίζει να σημειωθεί πως ο εμποτισμός πραγματοποιήθηκε σταδιακά, ώστε να ελαχιστοποιηθεί τυχόν απώλεια της αντιβιοτικής ουσίας εξαιτίας της διάχυσης της από το δισκίο.

- Εφαρμογή της μεθόδου Bauer-Kirby (όπως ακριβώς και στην περίπτωση της erythromycin)



Εικόνα 6: Μέθοδος Bauer-Kirby – δισκίο εμποτισμένο με sulfomethoxazole και διάκριση της ζώνης αναστολής ανάπτυξης της *E. coli* σε Mueller Hinton Agar.

2.2. Επεξεργασία αντιβιοτικών με την μέθοδο της φωτοκατάλυσης

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων της ετερογενούς φωτοκατάλυσης χρησιμοποιήθηκε σαν πηγή φωτός η λάμπα Radium Ralutec 9W/78, UVA 350-400 nm, G23, υπεριώδους ακτινοβολίας με ισχύ 9 Watt, ο οποίος τοποθετούνταν μέσα σε γυάλινη κυλινδρική υποδοχή (3,5 x 17 cm) που εφαρμοζόταν στο κέντρο του αντιδραστήρα με το υδατικό διάλυμα προς επεξεργασία.

Ως φωτοκαταλύτης χρησιμοποιήθηκε το διοξείδιο του τιτανίου TiO_2 στην δομή anatase (175mg στα 350ml διαλύματος).

Μέσω εσωτερικού κυκλώματος της γυάλινης κυλινδρικής υποδοχής διατηρούταν συνεχής κυκλοφορία νερού, με σκοπό τη διατήρηση της θερμοκρασίας του υδατικού διαλύματος σε χαμηλά επίπεδα ,περίπου στους 25° C. Το δοχείο τυλιγόταν με αλουμινόχαρτο, ώστε να μην επηρεάζεται η διαδικασία από άλλη πηγή φωτός παρά μόνο από την UV ακτινοβολία ,όπως επίσης και τα δείγματα που παίρναμε. Μέσω ειδικού στομίου του αντιδραστήρα, εξασφαλιζόταν η εισαγωγή αέρα στο διάλυμα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων για την ενίσχυση της καταλυτικής δράσης που επιτυγχάνεται μέσω του οξυγόνου.

Το διάλυμα αναδευόταν με μαγνήτη καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, για να υπάρχει αιώρηση του καταλύτη, ώστε να είναι μεγαλύτερη η διαθέσιμη επιφάνεια, να προάγεται η μεταφορά μάζας και να μειώνεται το πάχος του οριακού στρώματος στην επιφάνεια του καταλύτη.

Για κάθε πείραμα ετοιμάζαμε 350 ml διαλύματος.

Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν:

Erythromycin	30mg/lit
Sulfamethoxazole	80 mg/lit

Το διάλυμα του κάθε αντιβιοτικού διοχετευόταν στο γυάλινο δοχείο. Το αρχικό δείγμα λαμβανόταν πριν την προσθήκη του καταλύτη. Ακολουθούσε η προσθήκη του καταλύτη TiO_2 (175mg στα 350ml διαλύματος). Ο καταλύτης και το διάλυμα αναδεύονταν με μαγνήτη για 30 λεπτά χωρίς ακτινοβολήση στο σκοτάδι, προκειμένου να εξασφαλιστεί πλήρης ισορροπία προσρόφησης των οργανικών συστατικών των αντιβιοτικών στην επιφάνεια του καταλύτη. Μετά την πάροδο 30 λεπτών άρχιζε η ακτινοβολήση του διαλύματος και ουσιαστικά ξεκινούσε η διαδικασία της φωτοκατάλυσης. Αυτή ήταν η χρονική στιγμή $t=0$ για το πείραμα. Λαμβάναμε περίπου 2ml διαλύματος ανά τακτά χρονικά διαστήματα, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Χρόνοι επεξεργασίας των δειγμάτων με την μέθοδο της φωτοκατάλυσης

Δείγματα	Χρόνος (min)
1 Χωρίς TiO_2	-
2 Με TiO_2 πριν προσρόφηση	-
3 (Με TiO_2 μετά την προσρόφηση)	0
4	5
5	10
6	15
7	20
8	30
9	45
10	60
11	90
12	150

2.3 Έλεγχος αποτελεσματικότητας της φωτοκατάλυσης σε σχέση με την αντιβιοτική δράση

Για την διερεύνηση της ικανότητας της φωτοκαταλυτικής μεθόδου έναντι της αντιβιοτικής δράσης των αντιβιοτικών ουσιών erythromycin και sulfamethoxazole ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που εφαρμόστηκε για την εύρεση της πρότυπης καμπύλης.

Τα δείγματα των επεξεργασμένων διαλυμάτων που μελετήθηκαν ήταν συνολικά 12, ποσότητας 2ml το καθένα. Αναφέρεται επιγραμματικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε:

- Εμποτισμός των δισκίων με τα επεξεργασμένα διαλύματα για κάθε αντιβιοτικό.
- Ξήρανση των δισκίων
- Εφαρμογή της μεθόδου Bauer-Kirby
 - Δημιουργία υγρής καλλιέργειας *E.coli*
 - Τοποθέτηση των δισκίων στα τριβλία
 - Επώαση
- Ανάγνωση αποτελεσμάτων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

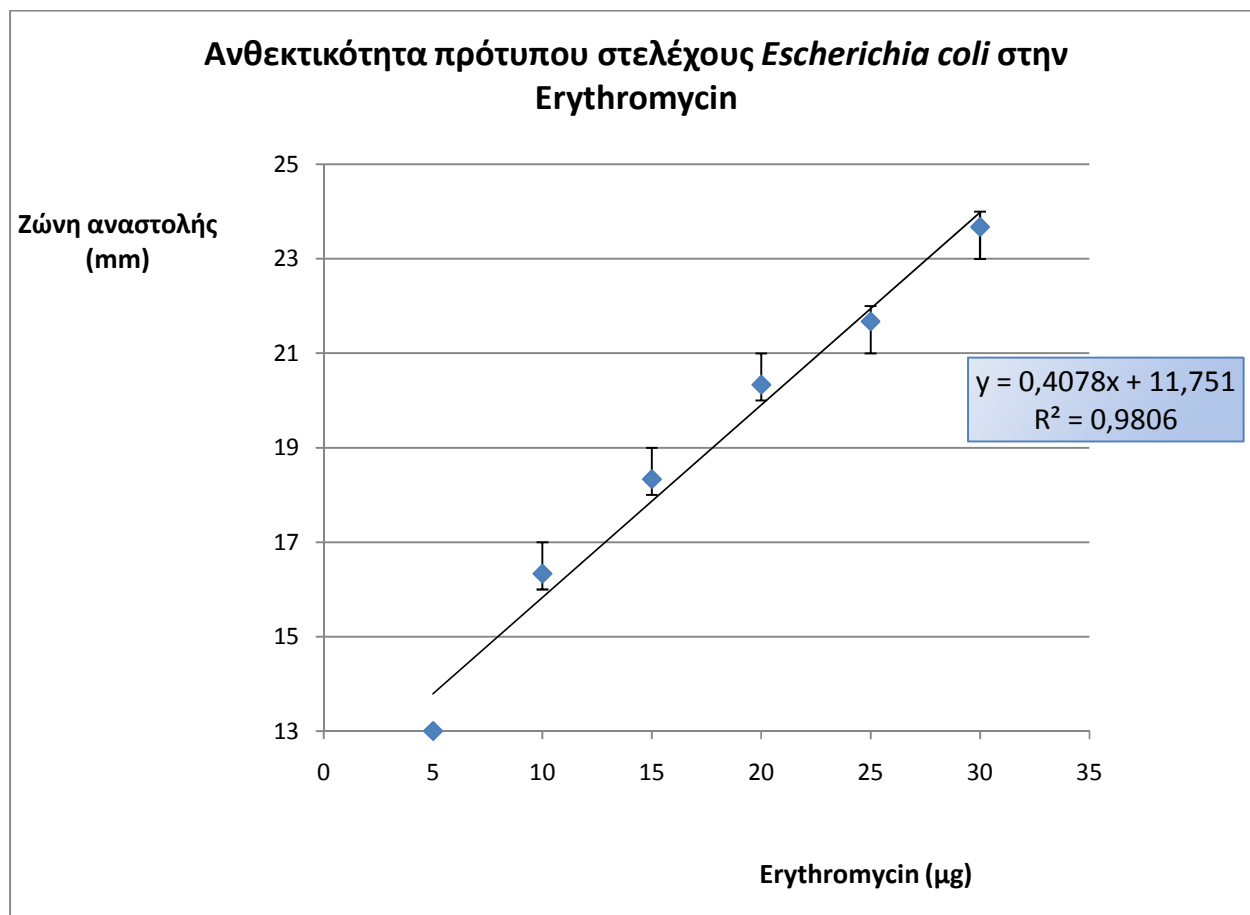
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή της τεχνικής Bauer-Kirby στα αντιβιοτικά erythromycin και sulfamethoxazole, με σκοπό την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αυτών. Επίσης, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την επεξεργασία αυτών μέσω της ετερογενούς φωτοκατάλυσης παρουσία καταλύτη TiO_2 .

3.1 Πρότυπη καμπύλη Erythromycin – Πειραματικά αποτελέσματα

Πίνακας 4: Αποτελέσματα τεχνικής Bauer-Kirby - Erythromycin

Πειράματα	C Erythromycin (mg/l)	C Erythromycin/disk (μg)	Ζώνη αναστολής (mm)	Ζώνη αναστολής - μέση τιμή (mm)
1a	60	30	24	23,67
2a			24	
3a			23	
1b	50	25	22	21,67
2b			22	
3b			21	
1c	40	20	20	20,33
2c			21	
3c			20	
1d	30	15	18	18,33
2d			18	
3d			19	
1e	20	10	16	16,33
2e			17	
3e			16	
1f	10	5	13	13,00
2f			13	
3f			13	



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη Erythromycin

Όπως παρατηρούμε, η σχέση των δύο μεγεθών (ποσότητα αντιβιοτικού, ζώνη αναστολής), είναι γραμμική. Υπήρξε καλή επαναληψιμότητα των πειραμάτων καθώς η τυπική απόκλιση ήταν μικρή.

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) της ερυθρομυκίνης, ανά δισκίο είναι τα 5 μg/disk, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της τεχνικής Bauer-Kirby. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 1, η ποσότητα των 5μg του αντιβιοτικού δεν είχε κάποια επίδραση στην ανάπτυξη του πρότυπου στελέχους *E. coli*, καθώς παρατηρήθηκε μηδενική ζώνη αναστολής

(πλήρης ανάπτυξη του βακτηρίου – τα 13mm που αναφέρονται στο διάγραμμα είναι τα όρια του δισκίου που χρησιμοποιήθηκε).

Αναστολή της ανάπτυξης της *E. coli* σημειώθηκε σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 5 µg/disk, καθώς παρατηρήθηκαν ευδιάκριτες ζώνες αναστολής. Αυτό σημαίνει ότι όταν στο περιβάλλον (νερό, λύματα, έδαφος) διοχετευτεί πολύ μικρή ποσότητα του συγκεκριμένου αντιβιοτικού ενδέχεται να ενεργοποιηθούν οι μηχανισμοί ανάπτυξης άμυνας των βακτηρίων και να πετύχουν ανθεκτικά στελέχη. Όπως φαίνεται και από τα εργαστηριακά πειράματα, ποσότητες erythromycin μεγαλύτερες των 5µg αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Όταν βρεθούν αυτές οι ποσότητες στο περιβάλλον, αφενός καταστρέφονται τα ευαίσθητα στελέχη των περιβαλλοντικών μικροοργανισμών, αφετέρου όμως τα ανθεκτικά από αυτά επικρατούν, καθώς προσαρμόζονται στις εκάστοτε συνθήκες που επικρατούν (παρουσία αντιβιοτικών ουσιών στο μέσο όπου διαβιούν).

Επισημαίνεται ότι τέτοιου είδους πειράματα εύρεσης της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης για την ανάπτυξη κάποιου βακτηρίου πρέπει να επαναλαμβάνονται κατά τακτά χρονικά διαστήματα, ιδίως όταν μελετώνται περιβαλλοντικοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι διαφοροποιούνται κατά πολύ με την επίδραση των εκάστοτε συνθηκών. Όσον αφορά στα αντιβιοτικά, σε αυτό ακριβώς το στοιχείο έγκειται και το γεγονός ότι τα χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά πρέπει να τροποποιούνται συχνά, ακολουθώντας το προφίλ των μικροοργανισμών.

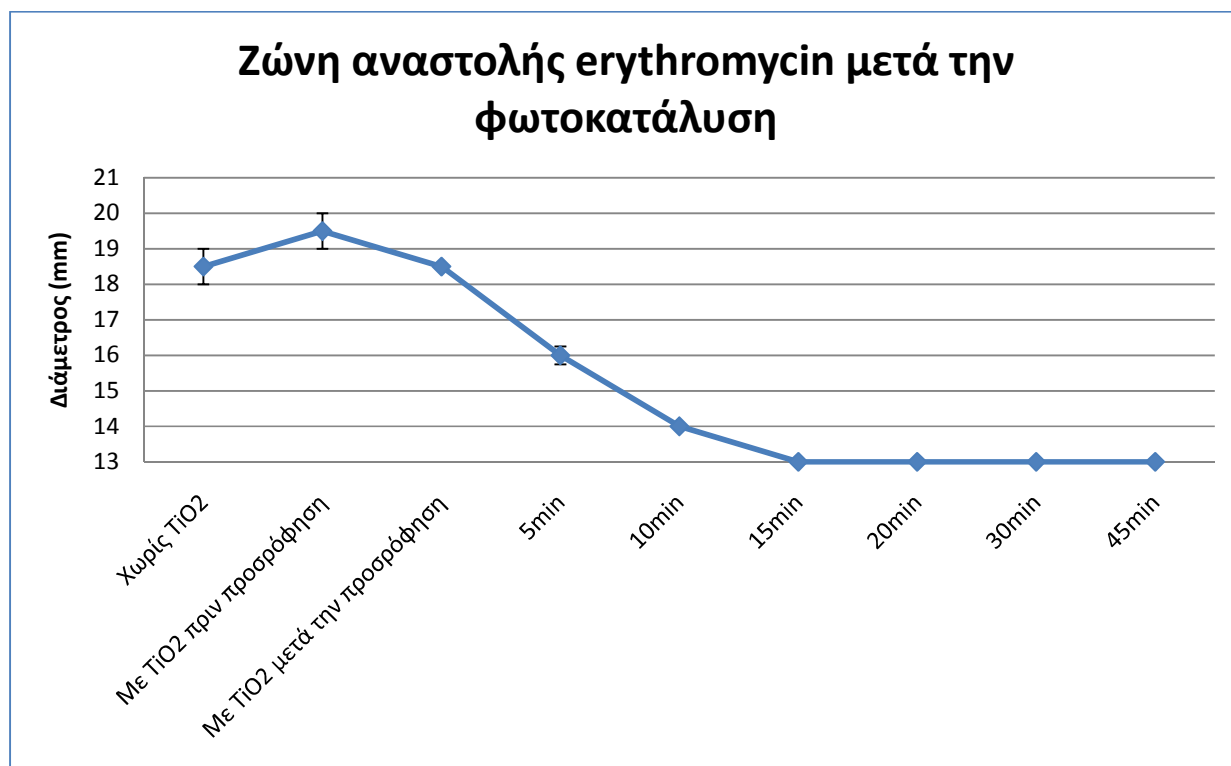
3.2 Φωτοκαταλυτική διάσπαση Erythromycin

3.2.1 Έλεγχος αντιβιοτικής δράσης

Κατά την φωτοκαταλυτική επεξεργασία του διαλύματος erythromycin (30mg/l), μελετήθηκε η ικανότητα της ετερογενούς φωτοκατάλυσης για την αναστολή της αντιβιοτικής δράσης του εν λόγω αντιβιοτικού. Η αποδοτικότητα της μεθόδου καθορίζεται από την ζώνη αναστολής, όπως αυτή διαμορφώθηκε από την εφαρμογή της μεθόδου Bauer-Kirby, στα επεξεργασμένα δείγματα.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα φωτοκαταλυτικής διάσπασης Erythromycin - 1^η Δοκιμή

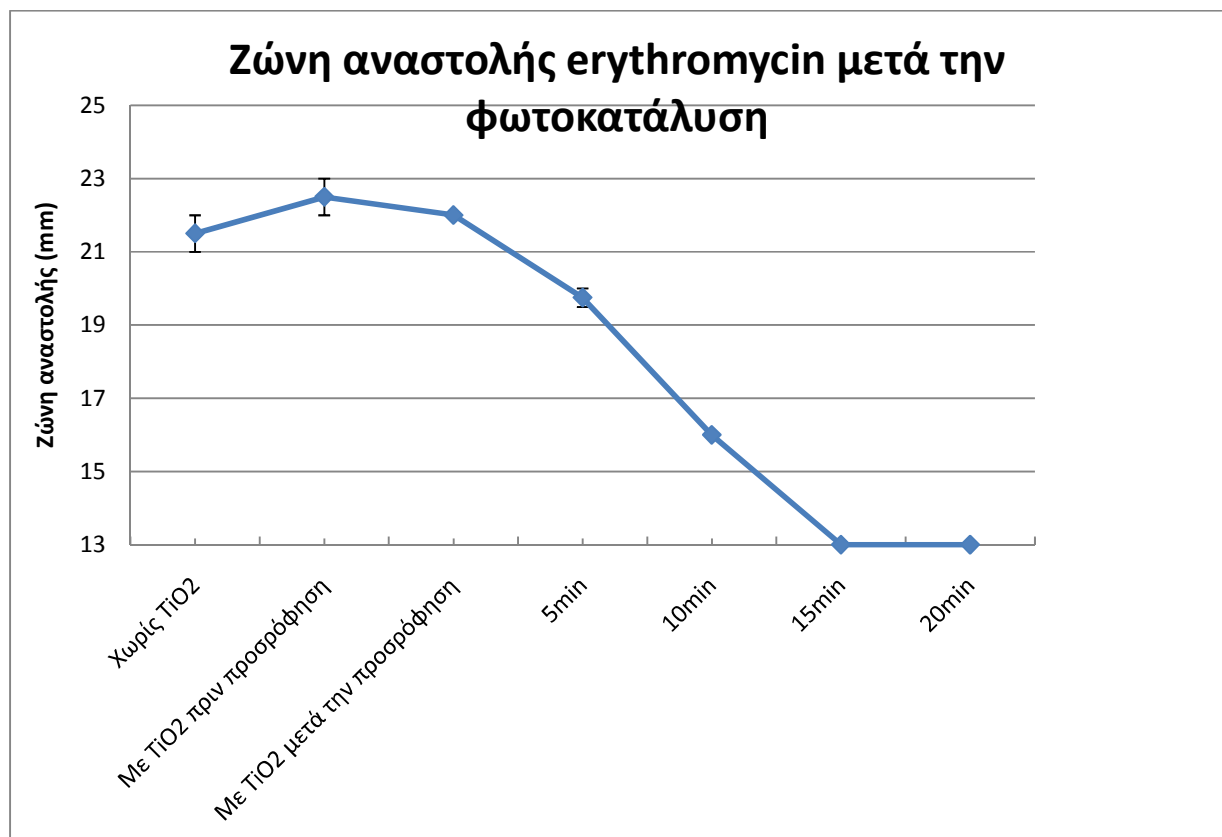
Φωτοκατάλυση - Erythromycin 30mg/l			
	Ζώνη αναστολής (mm)		Ζώνη αναστολής – μέση τιμή (mm)
	1 ^ο πείραμα	2 ^ο πείραμα	
Χωρίς TiO ₂	18	19	18,5
Με TiO ₂ πριν προσρόφηση	19	20	19,5
Με TiO ₂ μετά την προσρόφηση	18	19	18,5
5min	16	16	16
10min	14	14	14
15min	13	13	13
20min	13	13	13
30min	13	13	13
45min	13	13	13
60min	13	13	13
90min	13	13	13
150min	13	13	13



Διάγραμμα 2 . Επεξεργασμένη Erythromycin, με την μέθοδο της φωτοκατάλυσης

Πίνακας 6: Αποτελέσματα φωτοκαταλυτικής διάσπασης Erythromycin - 2^η Δοκιμή

Φωτοκατάλυση - Erythromycin 30mg/l			
	Ζώνη αναστολής (mm)		Ζώνη αναστολής – μέση τιμή (mm)
	1 ^ο πείραμα	2 ^ο πείραμα	
Χωρίς TiO ₂	21	22	21.5
Με TiO ₂ πριν προσρόφηση	22	23	22.5
Με TiO ₂ μετά την προσρόφηση	22	22	22
5min	20	20	19.75
10min	16	16	16
15min	13	13	13
20min	13	13	13
30min	13	13	13
45min	13	13	13
60min	13	13	13
90min	13	13	13
150min	13	13	13



Διάγραμμα 3: Επεξεργασμένη erythromycin με την μέθοδο της φωτοκατάλυσης(2^η δοκιμή)

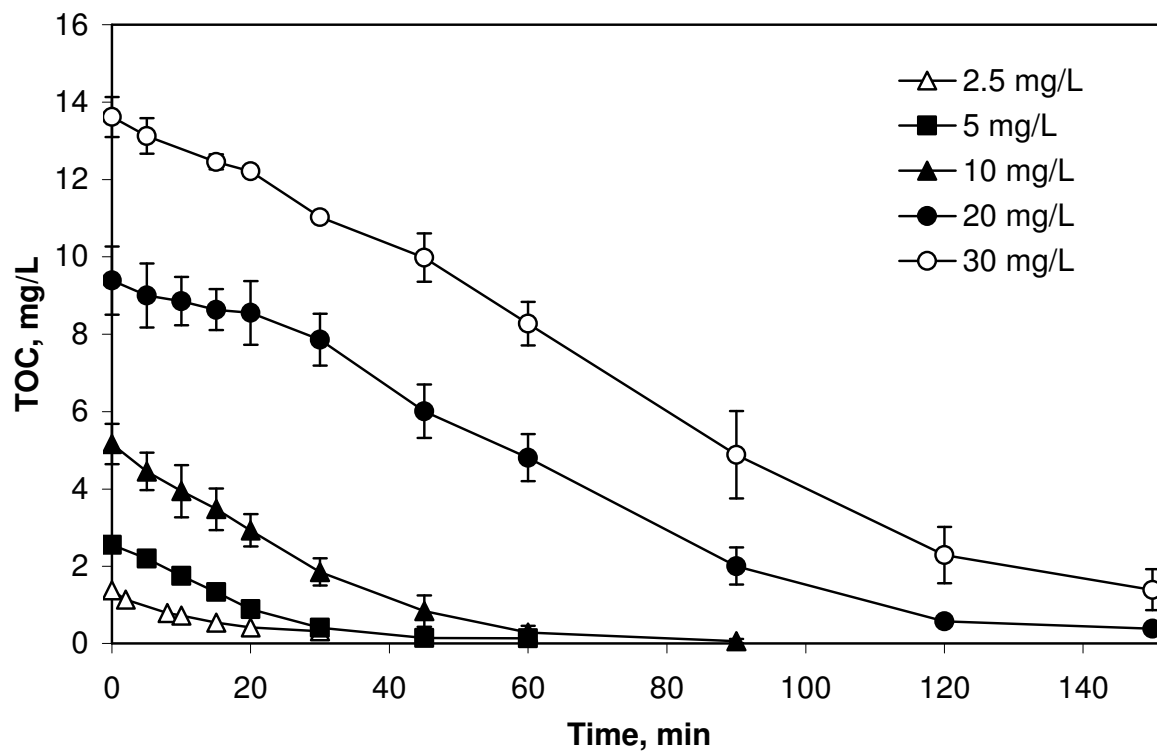
Όπως παρατηρούμε από τα διαγράμματα ο χρόνος της απαιτούμενης επεξεργασίας για την αναστολή της αντιβιοτικής δράσης της ουσίας είναι πολύ μικρός. Στα 15 min επεξεργασίας έχει επιτευχθεί στο 100% η αναστολή της αντιβιοτικής δράσης της Erythromycin, καθώς παρατηρήθηκε ευδιάκριτη ανάπτυξη του υπό εξέταση μικροοργανισμού. Η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων είναι 0.25-0.5 mm.

Σημαντικό ρόλο παίζει ο καταλύτης που χρησιμοποιήθηκε (TiO₂), καθώς παρατηρούμε μείωση της ζώνης αναστολής μετά την προσρόφηση της ουσίας στον καταλύτη, δηλαδή, πριν ακόμα τεθεί σε πλήρη λειτουργία η μέθοδος της φωτοκατάλυσης .

Αξίζει να σημειωθεί ότι για όλες τις συγκεντρώσεις το πείραμα διεξήχθη 2 φορές, καθώς εμποτίζονταν δύο δισκία με την επεξεργασμένη erythromycin, για μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Σε όλες τις επαναλήψεις, με τις υπάρχουσες συνθήκες φωτοκατάλυσης σημειώθηκε πλήρης αναστολή της αντιβιοτικής δράσης της ερυθρομυκίνης μετά από επεξεργασία 15 λεπτών.

3.2.2 Ολικός οργανικός άνθρακας - TOC

Παράλληλα με τον έλεγχο της αντιβιοτικής δράσης, κατά τη φωτοκαταλυτική διάσπαση διεξήχθησαν πειράματα μέτρησης του ολικού οργανικού άνθρακα (TOC). Το TOC προσδιορίστηκε με το TOC-5000A (Total Organic Carbon Analyzer), της εταιρείας Shimadzu. Η βαθμονόμηση του μηχανήματος έγινε με πρότυπα διαλύματα όξινου φθαλικού καλίου ($\text{KHC}_8\text{O}_4\text{H}_4$). Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 4 στα 15 λεπτά που σημειώθηκε η αναστολή της αντιβιοτικής δράσης της ερυθρομυκίνης έχει πραγματοποιηθεί μείωση του TOC κατά 10%. Όπως διαπιστώνεται ακόμα και μια τόσο μικρή μείωση του οργανικού άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης του συγκεκριμένου αντιβιοτικού. Το στοιχείο αυτό αναμένεται, δεδομένου ότι γενικά η δράση των αντιβιοτικών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την οργανική τους δομή και σύσταση. Η παραμικρή αλλοίωση του μορίου τους συνεπάγεται την αναίρεση της δράσης τους.

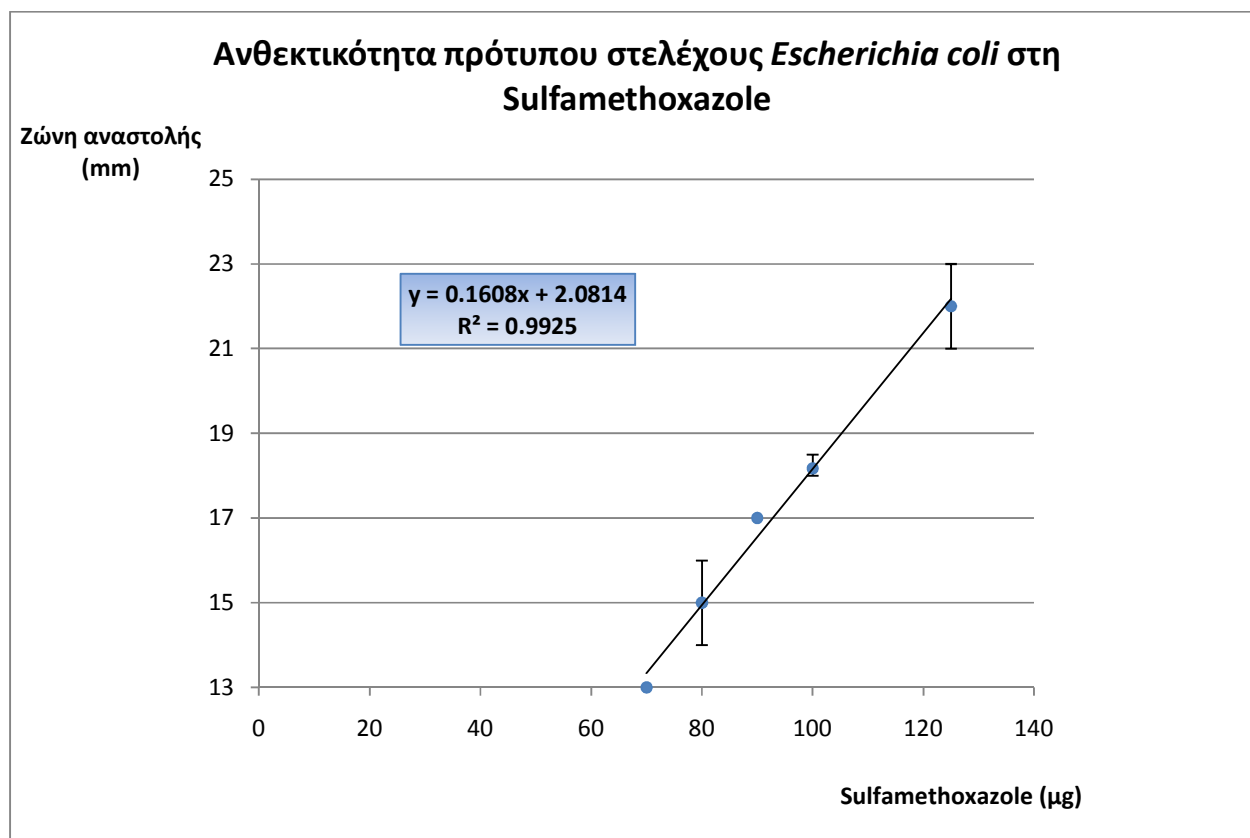


Διάγραμμα 4: Ανοργανοποίηση της ερυθρομικίνης κατόπιν επεξεργασίας της με τη μέθοδο της φωτοκατάλυσης.

3.3 Πρότυπη καμπύλη Sulfamethoxazole- Πειραματικά αποτελέσματα

Πίνακας 7: Αποτελέσματα τεχνικής Bauer-Kirby – Sulfamethoxazole

Πειράματα	C Sulfamethoxazole (mg/l)	C Sulfamethoxazole /disk (μg)	Ζώνη αναστολής (mm)	Ζώνη αναστολής - μέση τιμή (mm)
1a	250	125	23	22
2a			22	
3a			21	
1b	200	100	18.5	18.17
2b			18	
3b			18	
1c	180	90	17	17
2c			17	
3c			17	
1d	160	80	16	15
2d			15	
3d			14	
1e	140	70	13	13
2e			13	
3e			13	
1f	120	60	13	13
2f			13	
3f			13	



Διάγραμμα 5 : Πρότυπη καμπύλη Sulfamethoxazole

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) της sulfamethoxazole ανά δισκίο είναι τα 70 μg/disk, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της τεχνικής Bauer-Kirby. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 5 η ποσότητα των 70μg του αντιβιοτικού δεν είχε κάποια επίδραση στην ανάπτυξη του πρότυπου στελέχους *E. coli*, καθώς παρατηρήθηκε μηδενική ζώνη αναστολής (πλήρης ανάπτυξη του βακτηρίου – τα 13mm που αναφέρονται στο διάγραμμα είναι τα όρια του δισκίου που χρησιμοποιήθηκε).

Αναστολή της ανάπτυξης της *E. coli* σημειώθηκε σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 70 μg/disk, καθώς παρατηρήθηκαν ευδιάκριτες ζώνες αναστολής.

Συγκρίνοντας την ευαισθησία του πρότυπου στελέχους *E. coli* στα δύο αντιβιοτικά, παρατηρούμε ότι για να ανασταλεί η ανάπτυξή του απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα Sulfamethoxazole απ' ότι Erythromycin. Στην πρώτη περίπτωση η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση είναι 70μg/δισκίο ενώ στη δεύτερη μόλις 5μg/δισκίο. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στα γονίδια ανθεκτικότητας και τους μηχανισμούς άμυνας που διαθέτει ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός. Επισημαίνεται σε αυτό το σημείο ότι εξαιτίας του ότι απαιτούνται μεγάλες ποσότητες της sulfamethoxazole για την αναστολή ανάπτυξης της της *E. coli*, στο εμπόριο το συγκεκριμένο αντιβιοτικό χορηγείται συνήθως σε συνδυασμό με κάποιο άλλο (trimethoprim), το οποίο έχει συνεργιστική δράση. Εντούτοις, επιλέξαμε να το μελετήσουμε μεμονωμένα, καθώς στο περιβάλλον ανευρίσκεται συχνά, προκαλώντας έξαρση ανθεκτικότητας των περιβαλλοντικών μικροοργανισμών.

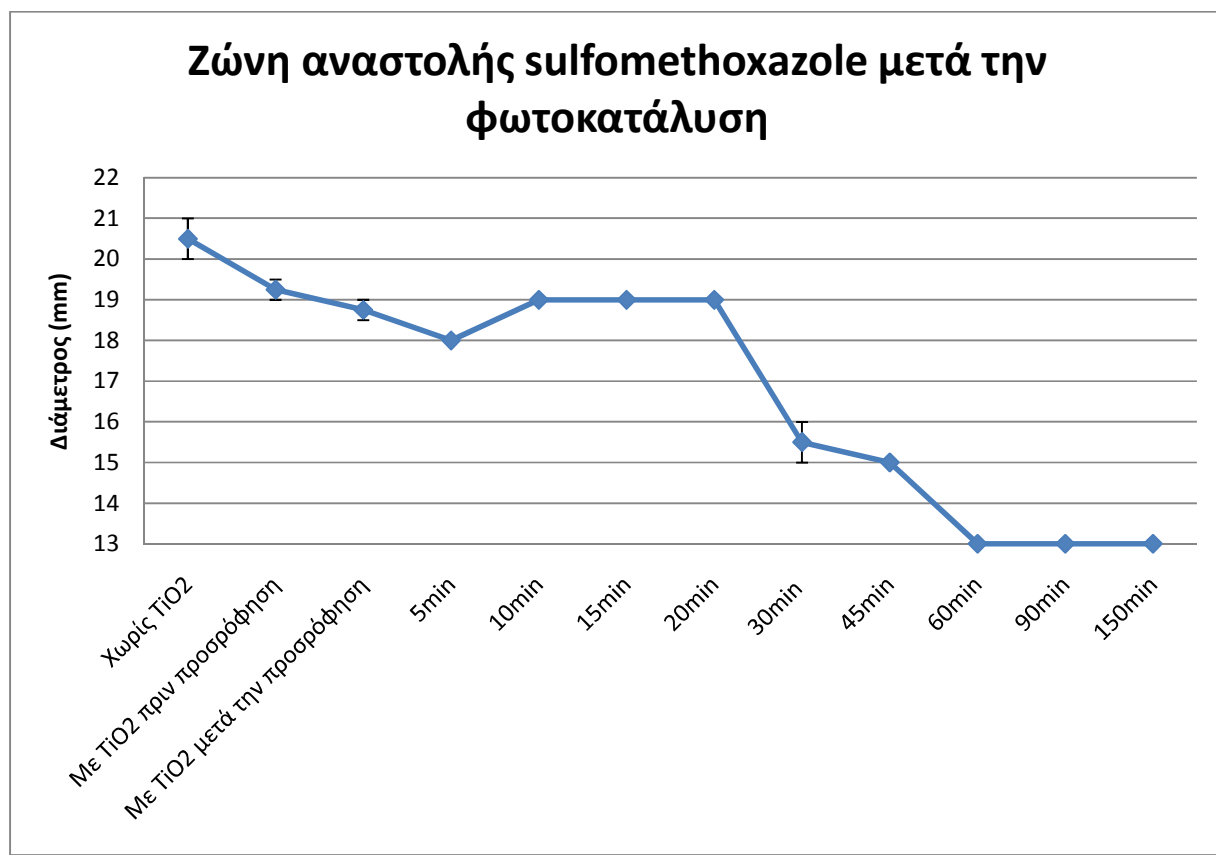
3.4 Φωτοκαταλυτική διάσπαση Sulfamethoxazole

3.4.1 Έλεγχος αντιβιοτικής δράσης

Κατά την φωτοκαταλυτική επεξεργασία του διαλύματος sulfomethoxazole, μελετήθηκε η ικανότητα της ετερογενούς φωτοκατάλυσης για την αναστολή της αντιβιοτικής δράσης του εν λόγω αντιβιοτικού. Η αποδοτικότητα της μεθόδου καθορίζεται από την ζώνη αναστολής, όπως αυτή διαμορφώθηκε από την εφαρμογή της μεθόδου Bauer-Kirby, στα επεξεργασμένα δείγματα.

Πίνακας 8: Φωτοκατάλυση – Sulfomethoxazole (1^η δοκιμή)

Φωτοκατάλυση- Sulfomethoxazole 250mg/l			
	Ζώνη αναστολής(mm)		Ζώνη αναστολής – μέση τιμή
	1 ^ο πείραμα	2 ^ο πείραμα	
Χωρίς TiO ₂	20	21	20.5
Με TiO ₂ πριν προσρόφηση	19.5	19	19.25
Με TiO ₂ μετά την προσρόφηση	19	18.5	18.75
5min	18	18	18
10min	19	19	19
15min	19	19	19
20min	19	19	19
30min	15	16	15.5
45min	15	15	15
60min	13	13	13
90min	13	13	13
150min	13	13	13

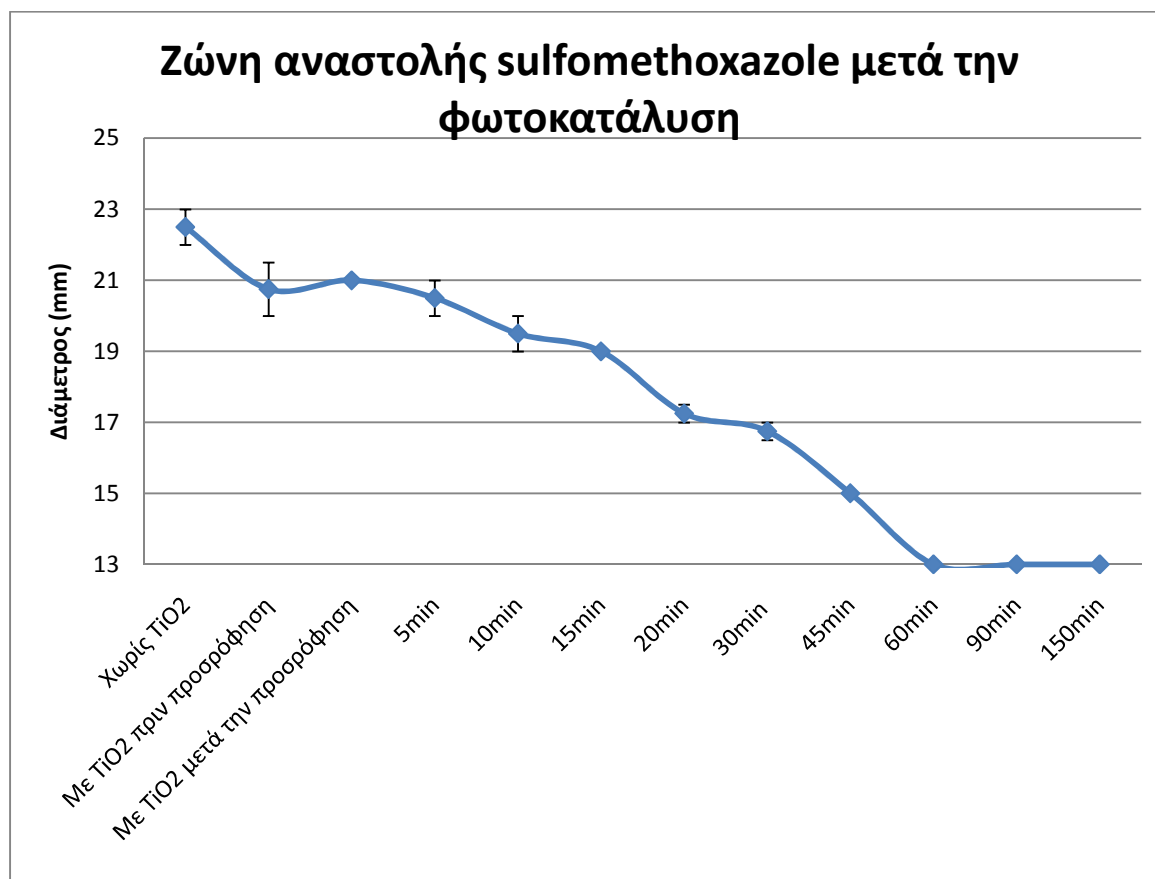


Διάγραμμα 6: Επεξεργασμένη sulfamethoxazole με την μέθοδο της φωτοκατάλυσης(1^η δοκιμή)

2^η Δοκιμή:

Πίνακας 9: Φωτοκατάλυση – Sulfomethoxazole (2^η δοκιμή)

Φωτοκατάλυση- Sulfomethoxazole 250mg/l			
	Ζώνη αναστολής(mm)		Ζώνη αναστολής – μέση τιμή
	1 ^ο πείραμα	2 ^ο πείραμα	
Χωρίς TiO ₂	23	22	22.5
Με TiO ₂ πριν προσρόφηση	21.5	20	20.75
Με TiO ₂ μετά την προσρόφηση	21	21	21
5min	20	21	20.5
10min	20	19	19.5
15min	19	19	19
20min	17	17.5	17.25
30min	17	16.5	16.75
45min	15	15	15
60min	13	13	13
90min	13	13	13
150min	13	13	13



Διάγραμμα 7: Επεξεργασμένη sulfamethoxazole με την μέθοδο της φωτοκατάλυσης (2^η δοκιμή)

Όπως παρατηρούμε από τα διαγράμματα ο χρόνος της απαιτούμενης επεξεργασίας για την αναστολή της αντιβιοτικής δράσης της ουσίας είναι 60min, διάστημα μεγαλύτερο από αυτό που απαιτείται για την erythromycin (15min). Σε όλες τις επαναλήψεις, με τις υπάρχουσες συνθήκες φωτοκατάλυσης, στα 60 min επεξεργασίας επιτεύχθηκε 100% αναστολή της αντιβιοτικής δράσης της Sulfamethoxazole, καθώς παρατηρήθηκε ευδιάκριτη ανάπτυξη του υπό εξέταση μικροοργανισμού. Η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων είναι 0-0.75 mm.

Από την παρατήρηση των διαγραμμάτων εμφανίζονται κάποια σημεία που ενώ θα περιμέναμε την μείωση της ζώνης αναστολής αυτή αυξάνεται. Μία ερμηνεία είναι η παρουσία του συγκεκριμένου καταλύτη, με τον οποίο ενδεχομένως να δημιουργείται κάποιο σύμπλοκο,

το οποίο να δρα ανασταλτικά για την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό του πρότυπου στελέχους της *E. coli*.

Επίσης, κατά την ανάγνωση των αποτελεσμάτων και κατά τη μέτρηση της ζώνης αναστολής παρατηρήθηκε ότι η τελευταία δεν ήταν απόλυτα διαυγής στο σύνολο των τριβλίων και των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν. Δηλαδή, σε όλες τις περιπτώσεις κάποια από τα στελέχη εμφάνιζαν μια φυσική ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Γενικά, το κολοβακτηρίδιο αναπτύσσει φυσιολογικά και με μεγάλο ρυθμό ανθεκτικότητα στη sulfamethoxazole. Γι' αυτό το λόγο η sulfomethoxazole χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με ένα δεύτερο αντιβιοτικό, το trimethoprim σε αναλογία 1:5, το οποίο ενισχύει τη δράση του πρώτου καθώς δρουν συνεργιστικά [18].

3.4.2 Ολικός οργανικός άνθρακας - TOC

Όσον αφορά στον ολικό οργανικό άνθρακα, σημειώθηκε μείωση κατά 40% στα 60min επεξεργασίας του διαλύματος sulfamethoxazole. Σε σύγκριση με την erythromycine απαιτήθηκε γενικά μεγαλύτερος χρόνος επεξεργασίας και μεγαλύτερη μείωση του ολικού οργανικού άνθρακα προκειμένου να ανασταλεί πλήρως η αντιβιοτική δράση. Κάτι τέτοιο αναμενόταν, δεδομένου ότι η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση της sulfamethoxazole για την ανάπτυξη του βακτηρίου ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με την erythromycin.

3.5 Συμπεράσματα

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη διπλωματική διατριβή, μπορούμε να καταλήξουμε στα παρακάτω συμπεράσματα:

- Το βασικό συμπέρασμα που προέκυψε από τα αποτελέσματα της τεχνικής Bauer- Kirby, είναι ότι η παρουσία των δύο αντιβιοτικών ουσιών, sulfamethoxazole και erythromycin, στο περιβάλλον ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις είναι ικανά να επηρεάσουν αρνητικά το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία, συμβάλλοντας στο πρόβλημα της μικροβιακής αντοχής.
- Η μέθοδος της ετερογενούς φωτοκατάλυσης παρουσία καταλύτη TiO_2 , αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική καθώς διασπά κατά ένα μεγάλο ποσοστό τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά. Επομένως, η φωτοκατάλυση αποτελεί μια ελπιδοφόρα τεχνολογία για την μείωση των επιπτώσεων αυτών των ενώσεων, ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις.
- Η εξάλειψη της αντιβιοτικής δράσης με την ετερογενή φωτοκατάλυση καθιστά δυνατή και οικονομική την επεξεργασία των λυμάτων, με χρήση φιλικής προς το περιβάλλον μεθόδου, για αποτελεσματική αντιμετώπιση του προβλήματος. Όπως αποδείχθηκε και με τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής, ακόμα και με πολύ μικρή ποσότητα καταλύτη επιτυγχάνεται πλήρης αναστολή της αντιβιοτικής δράσης της erythromycin και της sulfamethoxazole εντός 60 min.
- Όσον αφορά στα δύο αντιβιοτικά, παρατηρήθηκε διαφορά ως προς τον απαιτούμενο χρόνο επεξεργασίας για την πλήρη αναστολή της δράσης τους. Για την erythromycin απαιτήθηκε επεξεργασία 15 min, ενώ για τη sulfamethoxazole 60min με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες φωτοκαταλυτικής διάσπασης. Ενδεχομένως, εάν αυξανόταν η ποσότητα του καταλύτη στην περίπτωση της sulfamethoxazole να μειωνόταν και ο απαιτούμενος χρόνος επεξεργασίας. Η διαφορά που παρατηρήθηκε στο χρόνο

οφείλεται στη φύση των συγκεκριμένων αντιβιοτικών και στο γεγονός ότι η *E. coli* παρουσιάζει σε μεγάλο βαθμό μια φυσική ανθεκτικότητα στη sulfamethoxazole. Πάντως και στις δύο περιπτώσεις οι χρόνοι επεξεργασίας των 15min και 60min θεωρούνται μικροί.

Βιβλιογραφία

- [1] Gerba C.,Pepper I., Maier R., Environmental Microbiology(second edition),2009, Academic Press, ISBN-13: 978-0-120370519-8
- [2] Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1831/2003 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του συμβουλίου (22 Σεπτεμβρίου 2003), για τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στην διατροφή των ζώων..
- [3] Madigan M.T.,J.M. Martinko,J. Parker, Microbiology 1999, WCB McGraw-Hill,ISBN:0-07-115830-80
- [4] Prescott L.M.,J.P. Harley,D.A. Klein,Biology of Microorganisms,2000, Prentice-Hall Inc., ISBN:0-13-085264-3
- [5] Martinez, J.M. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environmental Pollution. 157: 2893-2902
- [6] Αλμπάνης Α. Τ., Σάκκας Α. Β., «Μείωση των τοξικών χημικών παραγώγων στο περιβάλλον: φωτοκαταλυτική αποικοδόμηση οργανικών ενώσεων με χρήση υδατικών αιωρημάτων TiO₂ και ηλιακού φωτός», Ερευνητικό Εργαστήριο Τεχνολογίας, Προστασίας Περιβάλλοντος, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- [7] Kaspar et al.1990, Graves et al.2002, Cole et al.2003,Bryan et.al 2004,Hayes et al.2004,Stoeckel et al.2004
- [8] Caprioli et al.2000,Lalitha 2005
- [9] Lennette E.H.,Balows A., Hausler W.S. and Shadows H.S.(ed)'Manual of clinical microbiology'4th ed American society for microbiology.Washington D.C. 1985
- [10] Δημητρακόπουλος Γ.Ο. «Εισαγωγή στην κλινική μικροβιολογία και τα λοιμώδη νοσήματα»,Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ.Πασχαλίδη,1987
- [11] Κολιάης Σ. 1992 Μικροβιολογία. University Studio Press
- [12] Saenz et al. 2001, McLellan 2004, Mora et al. 2004, Pearce et al. 2004
- [13] Escherichia coli and Salmonella – cellular and molecular biology, ASM press 1996
- [14] Gul. N.,Mujahid T.Y. and Ahmad., S. 2004 isolation identification and antibiotic resistance profile of indigenious bacterial isolates from urinary tract infection patients. Pak J. Biol p.,2051-2054

- [15] Πούλιος Ι., “Προχωρημένες Οξειδωτικές Μέθοδοι Αντιρρύπανσης (Π.Ο.Μ.Α), Εργαστήριο Φυσικής Χημείας Τμήμα Χημείας, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη, 2004
- [16] Angela-guiovana Rinconaud Cesar Pulgarin,(2005), Use of coaxial photocatalytic reactor in the TiO_2 photo-assisted treatment of mixed E.coli and Bacillus sp. and bacterial community present in wastewater , Science Direct, Catalysis Today 101,pages:331-344.
- [17] Erasmia Bizani, Φωτοκαταλυτική αποικοδόμηση οργανικών ρύπων,
- [18] JosephM.Mylotte, Theodore R. Bates,Kim A.Sergeant, Ronald E Matson and Thomas R.Beam, Adimicrobial Agents and Chemotherapy, July 1981,p.81-87