



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

**ΔΙΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ - ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
(Δ.Π.Μ.Σ.)
"ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ"**

Διπλωματική εργασία:

**Παρουσία αντιβιοτικών σε
ποτάμια ύδατα: ανίχνευση,
επεξεργασία, συνέπειες**

Στάθης Αβραμιώτης

Επιτροπή αξιολόγησης:
**Αικατερίνη Χαραλάμπους
(επιβλέπουσα)
Μαρία Λοϊζίδου
Συμεών Μαλαμής**

**Περιβάλλον
και
Ανάπτυξη**

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2019

Περιεχόμενα

Πρόλογος -	σελίδα 3
Περίληψη/Abstract -	σελίδα 4
Συνοτομογραφίες -	σελίδα 6
1. Η ρύπανση των φυσικών υδάτων από τα αντιβιοτικά -	σελίδα 7
1.1. Ρύπανση από αντιβιοτικά και συνέπειες -	σελίδα 7
1.2. Συχνά απαντώμενα αντιβιοτικά σε φυσικά ύδατα -	σελίδα 8
2. Ανίχνευση αντιβιοτικών σε ποτάμια ύδατα -	σελίδα 11
2.1. Η περιοχή μελέτης -	σελίδα 11
2.2. Αρχική φάση εργασιών -	σελίδα 14
2.2.1. Επιλογή των αντιβιοτικών-αναλυτών -	σελίδα 14
2.2.2. Ανάπτυξη της αναλυτικής μεθοδολογίας -	σελίδα 16
2.3. Δεύτερη φάση εργασιών: διερευνητική ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων ποτάμιων υδάτων -	σελίδα 21
2.4. Τελική φάση εργασιών -	σελίδα 27
2.4.1. Επανα-βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθοδολογίας βάσει της αλλαγής των αναλυτών -	σελίδα 27
2.4.2. Ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων ποτάμιων υδάτων και αποβλήτων που καταλήγουν σε ποτάμια ύδατα -	σελίδα 30
2.5. Διαπιστώσεις -	σελίδα 36
2.5.1. Ποιοτικά αποτελέσματα -	σελίδα 36
2.5.2. Ποσοτικά αποτελέσματα -	σελίδα 36
3. Καινοτόμες τεχνικές απομάκρυνσης των αντιβιοτικών -	σελίδα 38
3.1. Εξελιγμένες πρακτικές αποδόμησης αντιβιοτικών -	σελίδα 38
3.2. Ανάλυση των επεξεργασμένων δειγμάτων -	σελίδα 44
4. Μελλοντικές προοπτικές και τάσεις -	σελίδα 52
4.1. Το έργο Outbiotics -	σελίδα 52
4.2. Ευρωπαϊκές πολιτικές και κατευθύνσεις -	σελίδα 52
Παράρτημα -	σελίδα 54
Βιβλιογραφία -	σελίδα 57

Πρόλογος

Οι εργαστηριακές αναλύσεις, που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια πρακτικής Erasmus+ στο Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux (IPREM), στο Pau της Γαλλίας από το Φεβρουάριο ως τον Ιούλιο του 2019. Υπεύθυνη καθηγήτρια για την εν λόγω πρακτική ήταν η κα Joanna Szpunar. Η εργαστηριακή δουλειά ήρθε σε πέρας σε συνεργασία με τον κ. Sebastiano Gozzo, υποψήφιο διδάκτορα του Université de Pau et des Pays de l'Adour (UPPA), καθώς και τους κ. Simon Godin και Ange Angaits, μηχανικό-ερευνητή και τον τεχνικό του Mass Spectrometry Center for Reactivity and Speciation Sciences (MARSS), αντίστοιχα. Οι δειγματοληψίες, καθώς και η προετοιμασία των δειγμάτων έγιναν στο Universidad de Zaragoza (UNIZAR) και τη Navarra de Infraestructuras Locales S.A. (NILSA) ως μέρος του έργου OUTBIOTICS EFA183/16. Οι εργασίες του έργου αυτού έχουν συγχρηματοδοτηθεί κατά 65% από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης μέσω του προγράμματος Interreg V-A Ισπανία-Γαλλία-Ανδόρα (POCTEFA 2014-2020).

Όσον αφορά το Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (Ε.Μ.Π.), θέλω να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή εξέτασης της παρούσας εργασίας, αποτελούμενη από την κα Αικατερίνη Χαραλάμπους, την κα Μαρία Λοϊζίδου και τον κ. Συμεών Μαλαμή, για την αποδοχή του θέματος της εργασίας και την επιστημονική επίβλεψη της συγγραφής της. Ιδιαίτερα, όσον αφορά το Μετσόβιο Κέντρο Διεπιστημονικής Έρευνας (ΜΕ.Κ.Δ.Ε.), θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές και τους συνεργάτες τους για την ξεχωριστή εκπαιδευτική εμπειρία και την επιστημονική έμπνευση, που μας προσέφεραν. Φοιτήσαμε σε ένα ερευνητικό κέντρο και μια κατεύθυνση -Περιβάλλον & Ανάπτυξη των Ορεινών Περιοχών- που κάνει μια σημαντική και πρωτότυπη δουλειά, η οποία αξίζει να συνεχιστεί για καιρό ακόμα. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου για την εμπιστοσύνη και τη βοήθεια, καθώς και για το ετήσιο συλλογικό πείραμα της ζωής στο ΜΕ.Κ.Δ.Ε., που φέραμε εις πέρας από κοινού, την ακαδημαϊκή χρονιά 2017-18.

Περίληψη

Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών θεωρείται ένα από τα μεγαλύτερα επιστημονικά και ιατρικά επιτεύγματα του 20ού αιώνα. Ωστόσο, αυτά τα σημαντικά φάρμακα απειλούνται όλο και περισσότερο από την εμφάνιση, τη διάδοση και την επιμονή της αντίστασης στα αντιβιοτικά, η οποία επιδεινώνεται από την υπερβολική και ακατάλληλη χρήση αντιβιοτικών στον άνθρωπο και τα ζώα και την επακόλουθη εμφάνισή τους στο περιβάλλον. Η ταυτοποίηση, ο χαρακτηρισμός και η παρακολούθηση αυτών των ενώσεων στο περιβάλλον είναι ζωτικής σημασίας για την εκτίμηση της δυναμικής τους και των πιθανών τοξικολογικών επιπτώσεων στα οικοσυστήματα. Η περιοχή μελέτης, η περιοχή POCTEFA, η οποία καλύπτει τις ισπανικές κοινότητες της Αραγωνίας, της Καταλονίας, της Χώρας των Βάσκων και της Ναβάρρας, καθώς και των γαλλικών περιφερειών της Νέας Ακουιτανίας και της Οξιτανίας χαρακτηρίζεται από έντονη κτηνοτροφία. Ο κλάδος αυτός είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός αντιβιοτικών στο περιβάλλον και οι κύριοι υπεύθυνοι για τις έμμεσες εκθέσεις, λόγω της παρουσίας τους στο κρέας και της άμεσης εκπομπής τους στα γλυκά ύδατα. Η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον έλεγχο αυτών των νεοεμφανιζόμενων ρύπων συνίσταται στην προσυγκέντρωση των αντιβιοτικών με εκχύλιση στερεάς φάσης, ακολουθούμενη από τον διαχωρισμό τους με υγρή χρωματογραφία πολύ υψηλής απόδοσης (UPLC) και την ανίχνευση με διαδοχική φασματομετρία μάζας. Στην εργασία αναφέρονται αποτελέσματα που ελήφθησαν για ενώσεις οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές κατηγορίες αντιβιοτικών που παρατηρήθηκαν στην περιοχή μελέτης. Επίσης, αναλύεται η φωτοκαταλυτική επεξεργασία υδατικών διαλυμάτων αντιβιοτικών παρουσία διοξειδίου του τιτανίου, αλλά και παρατίθενται αποτελέσματα εφαρμογής της συγκεκριμένης τεχνικής. Ακόμη, γίνεται αναφορά στις πιθανές συνέπειες της αντιμικροβιακής αντίστασης και των πολιτικών που έχουν σχεδιαστεί για την αντιμετώπισή της.

Abstract

The discovery of antibiotics is considered one of the greatest scientific and medical achievements of the 20th century. However, these special drugs have been increasingly threatened by the emergence, dissemination, and persistence of antibiotic resistance, which is worsened by excessive and inappropriate use of antibiotics on humans and animals and their subsequent occurrence into the environment. This kind of inappropriate use includes the sub-therapeutic doses. The identification, characterization and monitoring of these compounds in the environment are crucial to assess their dynamics and potential toxicological effects on ecosystems. The study area, the POCTEFA territory, covering the Spanish Communities of Aragon, Catalonia, Basque Country and Navarre, and the French regions of New Aquitaine and Occitania is characterized by intense animal farming; livestock farms are its main rural economic engine. This sector the largest emitter of antibiotics to the environment and the main responsible

for the indirect exposures, due to their presence in meat and their direct emission to freshwaters. The analytical method developed to control these emerging pollutants consists of solid-phase extraction pre-concentration of antibiotics followed by their separation by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) and tandem Mass Spectrometric detection (MS/MS). The present project reports results obtained for compounds representing different categories of antibiotics that were observed in the study area. Moreover, photo-catalytic treatment of aqueous antibiotic solutions, using UV radiation, in the presence of titanium dioxide (Ti_2O) is analyzed, and results of application of this technique are presented. It can be easily concluded that this technique seems effective, feasible and is advancing rapidly these days, concerning the improvements in the procedures and the results obtained. The possible consequences of antimicrobial resistance and the policies designed to counter it are also mentioned.

Συντομογραφίες

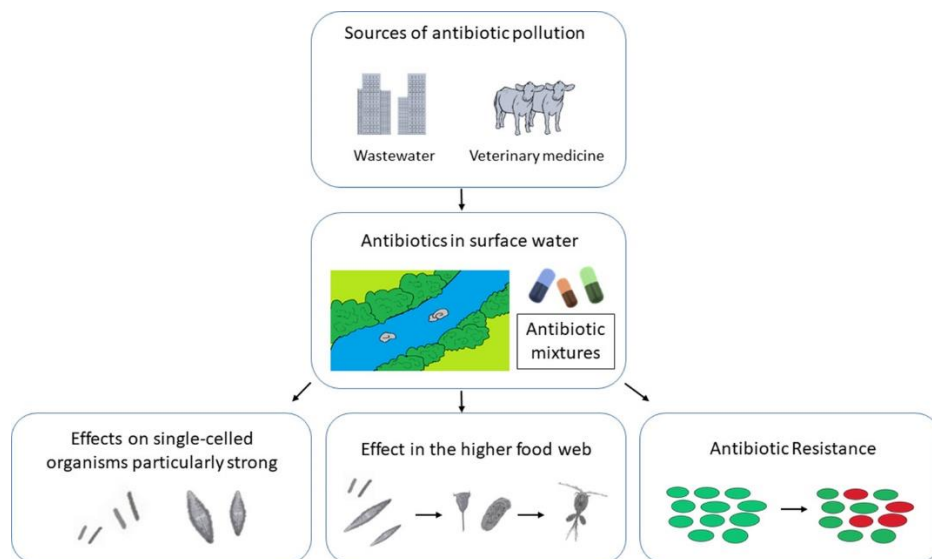
AMR: Αντίσταση στα αντιμικροβιακά (αντιβιοτικά)
AMX: Αμοξικιλίνη
ASE: Λεκάνη απορροής Ebro
ASC: Λεκάνη απορροής Cantabrico
ASA/G: Λεκάνη απορροής Adour/Garonne
AZT: Αζιθρομυκίνη
C: Συγκέντρωση
CAP: Χλωραμπενικόλη
CLAR: Κλαριθρομυκίνη
CLI: Κλινδαμυκίνη
CPFX: Σιπροφλοξακίνη
CTC: Χλωροτετρακυκλίνη
DAD: Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων
ENR: Ενροφλοξακίνη
ERY: Ερυθρομυκίνη
FAO: Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ
HILIC: Υγρή χρωματογραφία υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων
HPLC: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
LC-MS: Υγρή χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας
LIN: Λινκομυκίνη
LOD: Όριο ανίχνευσης
LOQ: Όριο ποσοτικοποίησης
NILSA: Τοπικές Υποδομές της Ναβάρρα, Ανώνυμος Εταιρεία
MS/MS: Διαδοχική φασματομετρία μάζας
MTZ: Μετρονιδαζόλη
OFL: Οφλοξακίνη
PAC: Κονιοποιημένος ενεργός άνθρακας
SD: Διακύμανση
SFD: Σουλφαδιαζίνη
SFP: Σουλφαπυριδίνη
SMX: Σουλφαμεθοξαζόλη
SPE: Εκχύλιση στερεάς φάσης
TCS: Τρικλοσάνη
TMP: Τριμεθοπρίμη
UNIZAR: Πανεπιστήμιο της Σαραγόσα
UPLC: Υγρή χρωματογραφία πολύ υψηλής απόδοσης
UV: Υπεριώδης ακτινοβολία
EE: Ευρωπαϊκή Ένωση

1. Η ρύπανση των φυσικών υδάτων από τα αντιβιοτικά

1.1. Ρύπανση από αντιβιοτικά και συνέπειες

Παγκοσμίως, η χρήση αντιβιοτικών ξεπερνά τους 100.000 τόνους το χρόνο, τόσο στον άνθρωπο όσο και στην κτηνοτροφία σε θεραπευτικές ή και υπο-θεραπευτικές δόσεις, και υπάρχει αυξημένη ανησυχία για τη μοίρα αυτών των ουσιών. Τα αντιβιοτικά βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο περιβάλλον, ενώ σημαντικές συγκεντρώσεις έχουν ανιχνευθεί σε φυσικά ύδατα. Τα κύρια προβλήματα που προκύπτουν από τη σημαντική συγκέντρωση αντιβιοτικών στο περιβάλλον μπορούν να συνοψιστούν στο ότι οι μικροοργανισμοί είναι ευαίσθητοι στη δράση τους, τα βακτήρια ενδέχεται να αναπτύξουν αντίσταση σε αυτά και η ρύπανση από αντιβιοτικά επηρεάζει τα φυσικά τροφικά δίκτυα, ενώ αλληλεπιδρά και με άλλες πιέσεις που δέχονται τα οικοσυστήματα. Ενώ οι καταγεγραμμένες συγκεντρώσεις ενδεχομένως να μην είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο, οργανισμοί που ζουν σε γλυκά νερά, και δεν αποτελούν στόχο των αντιβιοτικών, μπορούν να επηρεαστούν από αυτά. Βιολογικές δοκιμές δείχνουν ότι κάποια από τα αντιβιοτικά που ανιχνεύονται σε επιφανειακά ύδατα επηρεάζουν μικροβιακούς πληθυσμούς σε συγκεντρώσεις κάτω των 10 µg/L. Ανάμεσα στα πιο ισχυρά αντιβιοτικά είναι αυτά που ανιχνεύονται συχνά σε ρέματα και ποταμούς σε αυτές τις συγκεντρώσεις, όπως η σιπροφλοξακίνη. Συγκεντρώσεις κάτω των θανατηφόρων ενδέχεται να μη σκοτώσουν προκαρυωτικούς οργανισμούς, αλλά συμβάλλουν στην αυξημένη βακτηριακή αντίσταση και στην αλλαγή της σύνθεσης μονοκυτταρικών κοινοτήτων. Αυτό έχει συνέπειες στο μικροβιακό τροφικό δίκτυο (π.χ. αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηρίων αλλά με τους πρωτοζωικούς καταναλωτές τους) και κατ' επέκταση, σε μεγαλύτερους οργανισμούς και την υγεία του οικοσυστήματος (Danner et. al, 2019).

Μια σχηματική απεικόνιση όσων αναφέρονται παραπάνω φαίνεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της ρύπανσης των επιφανειακών υδάτων από αντιβιοτικά (Danner et. al, 2019)

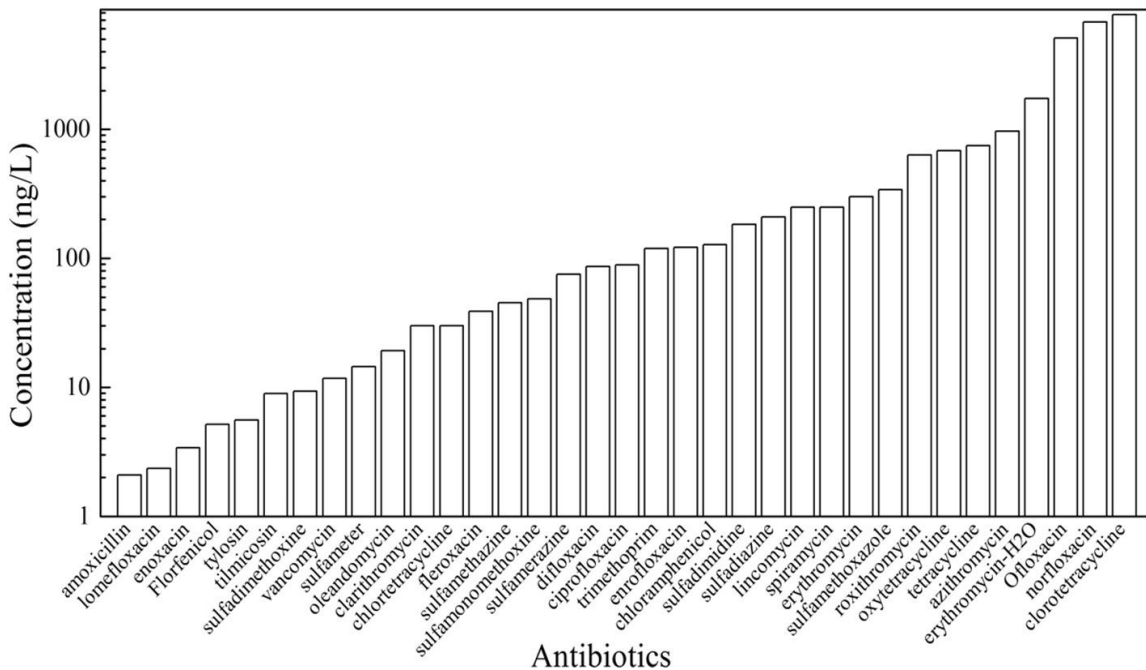
Για να γίνει πιο κατανοητή η ακριβής λειτουργία της, η AMR είναι η ικανότητα των μικροοργανισμών, όπως τα βακτηρίδια, να γίνουν ολοένα και πιο ανθεκτικοί σε ένα αντιμικροβιακό φάρμακο στο οποίο ήταν προηγουμένως ευαίσθητοι. Η AMR είναι συνέπεια της φυσικής επιλογής και της γενετικής μετάλλαξης. Μια τέτοια μετάλλαξη μεταφέρεται στη συνέχεια παρέχοντας αντίσταση. Αυτή η διαδικασία φυσικής επιλογής επιδεινώνεται από ανθρώπινους παράγοντες όπως η ανάρμοστη χρήση αντιμικροβιακών στην ιατρική και την κτηνιατρική, οι κακές συνθήκες υγιεινής και πρακτικές σε χώρους υγειονομικής περίθαλψης ή στην τροφική αλυσίδα που διευκολύνουν τη μετάδοση ανθεκτικών μικροοργανισμών. Με τον καιρό, αυτό καθιστά τα αντιμικροβιακά λιγότερο αποτελεσματικά και τελικά άχρηστα (European Commission, 2017).

1.2. Συχνά απαντώμενα αντιβιοτικά σε φυσικά ύδατα

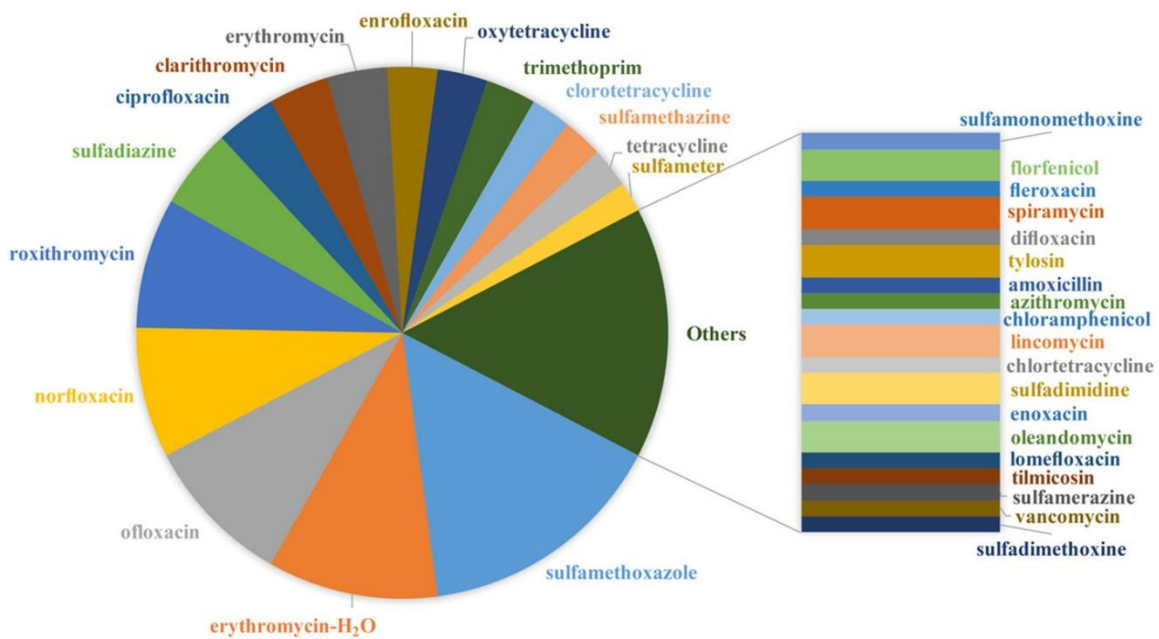
Σύμφωνα με τους Carvalho κ.α. (2016), στα ευρωπαϊκά φυσικά ύδατα παρατηρούνται οι παρακάτω τάσεις για τις διάφορες οικογένειες αντιβιοτικών:

- Οι αμινογλυκοσίδες (π.χ. νεομυκίνη) δε μελετώνται συχνά και αναφέρονται μόνο σε μία δημοσίευση.
- Οι αμπενικόλες (π.χ. χλωραμπενικόλη) δεν ανιχνεύονται συχνά.
- Οι β-λακτάμες (π.χ. πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, αμοξικιλίνη, αμπικιλίνη) συνήθως δεν ανιχνεύονται.
- Οι διαμινοπυριμιδίνες (π.χ. τριμεθοπρίμη) έχουν καταγραφεί από αρκετούς συγγραφείς.
- Οι δημοσιεύσεις που αφορούν γλυκοπεπτιδικά αντιβιοτικά (π.χ. βανκομυκίνη) είναι σπάνιες.
- Τα λινκοσαμίδια (π.χ. κλινδαμυκίνη, λινκομυκίνη), γενικώς, δεν ανιχνεύονται.
- Οι μακρολίδες (π.χ. αζιθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη) ανιχνεύθηκαν σε διαφορετικά ευρωπαϊκά ποτάμια.
- Οι νιτρο-ημιδαζόλες (π.χ. μετρονιδαζόλη, ορνιδαζόλη) καταγράφηκαν σε διάφορες δημοσιεύσεις.
- Οι κινολόνες (π.χ. σιπροφλοξακίνη, οφλοξακίνη, ενροφλοξακίνη) καταγράφηκαν σε διάφορες δημοσιεύσεις.
- Τα σουλφοναμίδια (π.χ. σουλφαμεθοξαζόλη) καταγράφηκαν σε διαφορετικές υδατικά περιβαλλοντικά υποστρώματα.
- Οι τετρακυκλίνες (π.χ. τετρακυκλίνη, οξυτετρακυκλίνη) συνήθως δεν καταγράφονται σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις.
- Μια άλλη κατηγορία που παρατηρήθηκε ήταν τα πλευρομουλινικά αντιβιοτικά (π.χ. τιαμουλίνη).

Σύμφωνα με τους Wang κ.α., 2019, στα φυσικά ύδατα διαφορετικών γεωγραφικών περιφερειών ανά τον πλανήτη, τα αντιβιοτικά που κατατάσσονται στις διάφορες οικογένειες, που περιγράφηκαν παραπάνω, εμφανίζονται σε συγκέντρωση και συχνότητα όπως φαίνεται παρακάτω στα Διαγράμματα 1 και 2:



Διάγραμμα 1. Συγκέντρωση αντιβιοτικών από διαφορετικές γεωγραφικές περιφέρειες του κόσμου (Wang κ.α., 2019)



Διάγραμμα 2. Συχνότητα εμφάνισης αντιβιοτικών από διαφορετικές γεωγραφικές περιφέρειες του κόσμου (Wang κ.α., 2019)

Συγκρίνοντας τις δύο παραπάνω ανασκοπήσεις, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι πιο κοινώς απαντώμενες κατηγορίες αντιβιοτικών στα φυσικά ύδατα είναι οι διαμινοπυριμιδίνες (τριμεθοπρίμη), τα λινκοσαμίδια (λινκομυκίνη), οι μακρολίδες (ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη), οι κινολόνες (οφλοξακίνη,

νορφλοξακίνη, σιπροφλοξακίνη, ενροφλοξακίνη), τα σουλφοναμίδια (σουλφαμεθοξαζόλη, σουλφαδιαζίνη, σουλφαμεθαζίνη, σουλφαμεθοξυδιαζίνη) και οι τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη, χλωροτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη). Επίσης, μπορούν να βρεθούν μερικές διαφορές ανάμεσα στα ευρωπαϊκά δεδομένα που παρουσιάζονται στην πρώτη και τα παγκόσμια δεδομένα που παρουσιάζονται στην τελευταία ανασκόπηση. Η πιο εμφανής εξ αυτών είναι πως, ενώ η εμφάνιση των νιτρο-ημιδαζολών (μετρονιδαζόλη, ορνιδαζόλη) καταγράφεται σε διάφορες ευρωπαϊκές δημοσιεύσεις, καμία από αυτές δεν μπορεί να βρεθεί στα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν από τους Wang κ.α. (2019). Από την άλλη πλευρά, παρά τη σπάνια εμφάνιση των λινκοσαμιδίων (κλινδαμυκίνη, λινκομυκίνη) στην πρώτη, η λινκομυκίνη καταγράφεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, σύμφωνα με τους Wang κ.α. (2019).

2. Ανίχνευση αντιβιοτικών σε ποτάμια ύδατα

2.1. Η περιοχή μελέτης

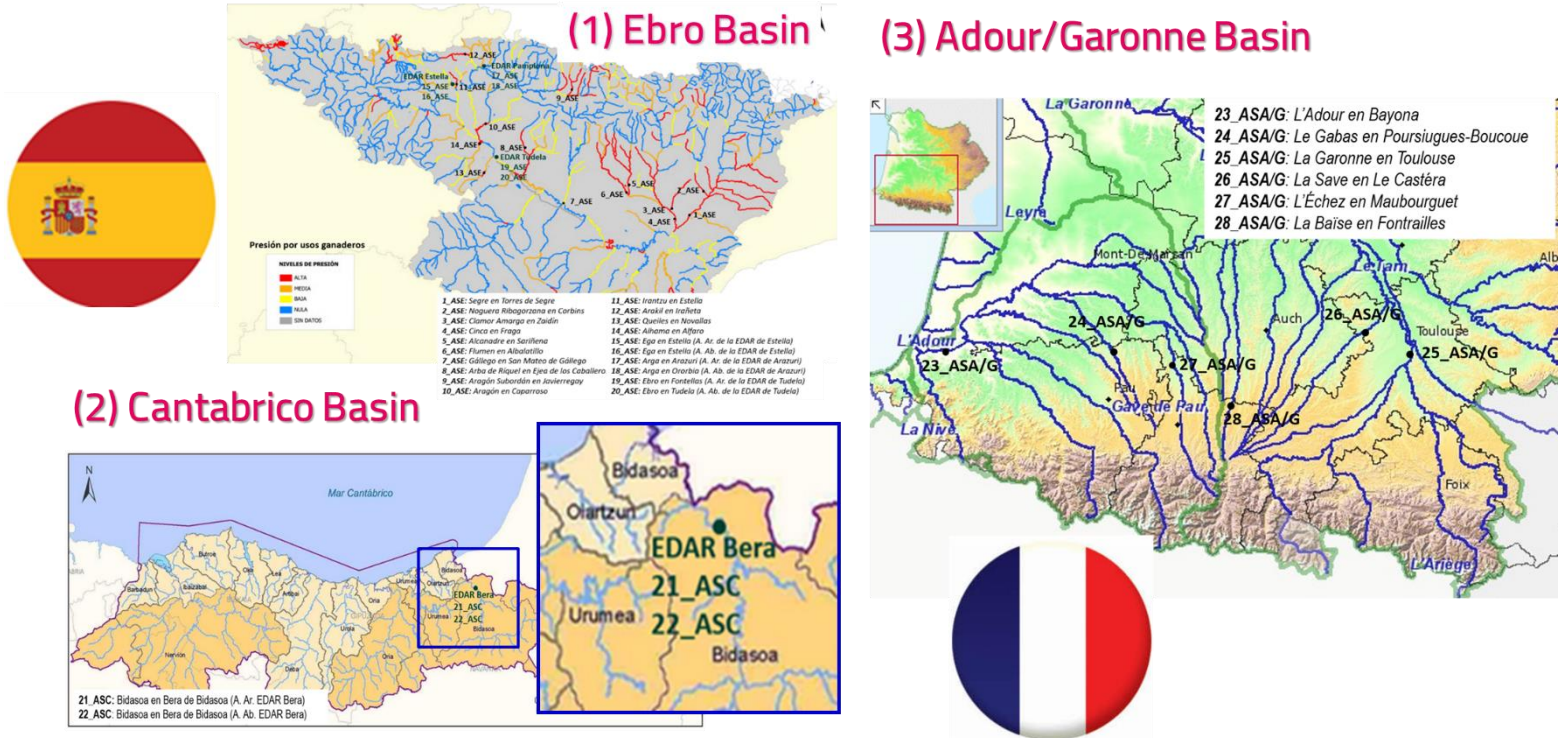
Η περιοχή μελέτης, η περιοχή POCTEFA όπως ορίζεται από το αντίστοιχο πρόγραμμα Interreg Γαλλίας-Ισπανίας-Ανδόρας, η οποία καλύπτει τις ισπανικές κοινότητες της Αραγωνίας, της Καταλονίας, της Χώρας των Βάσκων και της Ναβάρας, καθώς και τις γαλλικές περιφέρειες της Νέας Ακουιτανίας και της Οξιτανίας (Εικόνα 2) χαρακτηρίζεται από έντονη κτηνοτροφία. Οι κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις αποτελούν την κύρια αγροτική οικονομική μηχανή της. Για παράδειγμα, από 41,5 εκατομμύρια χοίρους που είναι εγγεγραμμένοι στην Ισπανία και τη Γαλλία, το 38% βρίσκεται στην περιοχή POCTEFA. Είναι η σημαντικότερη πηγή απόρριψης κτηνιατρικών αντιβιοτικών στο περιβάλλον και οι κύριοι υπεύθυνοι για τις έμμεσες εκθέσεις μας σε αυτά, λόγω της παρουσίας τους στο κρέας και της άμεσης εκπομπής τους στα γλυκά νερά.



Εικόνα 2. Η περιοχή POCTEFA

Επομένως, το έργο OUTBIOTICS έχει σκοπό την εξάλειψη των αντιβιοτικών από την περιοχή POCTEFA εφαρμόζοντας μια σειρά μέτρων. Ανάμεσα σε αυτά, η παρούσα εργασία αφορά σε δύο από τις δέσμες

μέτρων που σχεδιάστηκαν, όπως φαίνεται και παρακάτω: την ανίχνευση αντιβιοτικών σε ποτάμια ύδατα (Εικόνα 3, Πίνακας 1) και απόβλητα που καταλήγουν σε ποτάμια ύδατα (Πίνακας 2) και την αξιολόγηση τεχνικών απομάκρυνσης των αντιβιοτικών αυτών (Κεφάλαιο 3).



Εικόνα 3. Σημεία δειγματοληψίας ποτάμιων υδάτων της περιοχής POCTEFA

Πίνακας 1. Σημεία δειγματοληψίας ποτάμιων υδάτων

Σημείο δειγματοληψίας	Κτηνοτροφική Χρήση	Χώρα
1-ASE	Υψηλή	Ισπανία
2-ASE	Υψηλή	Ισπανία
3-ASE	Υψηλή	Ισπανία
4-ASE	Υψηλή	Ισπανία
5-ASE	Υψηλή	Ισπανία
6-ASE	Χαμηλή	Ισπανία
7-ASE	Υψηλή	Ισπανία
8-ASE	Υψηλή	Ισπανία
9-ASE	Υψηλή	Ισπανία
10-ASE	Υψηλή	Ισπανία
11-ASE	Υψηλή	Ισπανία
12-ASE	Υψηλή	Ισπανία
13-ASE	Υψηλή	Ισπανία
14-ASE	Υψηλή	Ισπανία
15-ASE	Χαμηλή	Ισπανία
16-ASE	Χαμηλή	Ισπανία
17-ASE	Μηδενική	Ισπανία
18-ASE	Μηδενική	Ισπανία
19-ASE	Χαμηλή	Ισπανία
20-ASE	Χαμηλή	Ισπανία
21-ASC	Μεσαία	Ισπανία
22-ASC	Μεσαία	Ισπανία
23-ASA/G	Χαμηλή	Γαλλία
24-ASA/G	Υψηλή	Γαλλία
25-ASA/G	Υψηλή	Γαλλία
26-ASA/G	Υψηλή	Γαλλία
27-ASA/G	Μεσαία	Γαλλία
28-ASA/G	Μεσαία	Γαλλία

Πίνακας 2. Σημεία δειγματοληψίας αποβλήτων που καταλήγουν σε ποτάμια ύδατα

Σημείο δειγματοληψίας	Τοποθεσία	Τύπος αποβλήτων
29_ARD1e	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	Αστικά (ισοδύναμος πληθυσμός 90.000)
30_ARD1s	Έξοδος βιολογικού καθαρισμού	Αστικά (ισοδύναμος πληθυσμός 90.000)
31_ARD2e	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	Αστικά (ισοδύναμος πληθυσμός 550.000)
32_ARD2s	Έξοδος βιολογικού καθαρισμού	Αστικά (ισοδύναμος πληθυσμός 550.000)
33_ARD3e	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	Αστικά (ισοδύναμος πληθυσμός 82.500)
34_ARD3s	Έξοδος βιολογικού καθαρισμού	Αστικά (ισοδύναμος πληθυσμός 82.500)
35_ARD4e	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	Αστικά (ισοδύναμος πληθυσμός 4.900)
36_ARD4s	Έξοδος βιολογικού καθαρισμού	Αστικά (ισοδύναμος πληθυσμός 4.900)
37_ARH	Συλλέκτης	Νοσοκομειακά
38_ARM	Συλλέκτης	Πτηνοσφαγείου (>50 τόνοι / μέρα)
39_ARM	Συλλέκτης	Σφαγείου παπιών
40_ARM	Συλλέκτης	Σφαγείου κουνελιών

2.2. Αρχική φάση εργασιών

Οι αρχικές εργασίες περιέλαβαν την προετοιμασία του εργαστηρίου και την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών στα ποτάμια νερά και τα απόβλητα, καθώς και σε επεξεργασμένα πρότυπα διαλύματα αντιβιοτικών.

2.2.1. Επιλογή των αντιβιοτικών-αναλυτών

Η αναζήτηση βιβλιογραφίας, που πραγματοποιήθηκε, επέτρεψε την αναγνώριση των κατηγοριών αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται περισσότερο στην κτηνοτροφική δραστηριότητα της περιοχής και συχνά βρίσκονται σε παρόμοιες (κυρίως αγροτικές) περιοχές ανά την Ευρώπη

(European Medicine Agency, 2017). Η αρχική λίστα των μορίων προς μελέτη στα δείγματα νερού συμφωνήθηκε σε συνεργασία με τις άλλες ερευνητικές ομάδες που συμμετέχουν στο έργο Outbiotics και παρατίθεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Τα αντιβιοτικά-αναλύτες στην αρχική φάση εργασιών

Όνομα	Κατηγορία	Αριθμός CAS	Συντακτικός τύπος
Δοξυκυκλίνη	Τετρακυκλίνες	564-25-0	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈
Ενροφλοξακίνη	Κινολόνες	93106-60-6	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃
Σουλφαδιαζίνη	Σουλφοναμίδια	68-35-9	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S
Απραμυκίνη	Αμινογλυκοσίδες	65710-07-8	C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O ₁₁
Υγρομυκίνη	Αμινογλυκοσίδες	31282-04-9	C ₂₀ H ₃₇ N ₃ O ₁₃
Λινκομυκίνη	Μακρολίδες	154-21-2	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S
Τυλοσίνη	Μακρολίδες	738-70-5	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇
Αμοξικιλίνη	B-λακτάμες	26787-78-0	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S
Πενικιλίνη G	B-λακτάμες	61-33-6	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S

Ακολουθως, αγοράστηκαν οι αντίστοιχες πρότυπες ουσίες και μελετήθηκε η βιβλιογραφία για τις διαθέσιμες διαδικασίες προσδιορισμού τους. Οι ουσίες αυτές διατηρήθηκαν στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C. Ως βάση για τη δόμηση της αναλυτικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε η Μέθοδος 1964: Φαρμακευτικά και Είδη Προσωπικής Φροντίδας στο Νερό, το Χώμα, τα Ιζήματα και τα Βιο-στερεά με HPLC/MS/MS (United States Environmental Protection Agency, 2007) με κάποιες τροποποιήσεις στις πειραματικές συνθήκες, οι οποίες θα αναφερθούν παρακάτω.

Τα αποθεματικά πρότυπα διαλύματα των ουσιών ενδιαφέροντος παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 500 ng/ml. Οι κατάλληλες ποσότητες για την επίτευξη της συγκεκριμένης συγκέντρωσης μετρήθηκαν σε εργαστηριακό ζυγό ακριβείας με τη βοήθεια σπάτουλας μια χρήσης. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των συγκεκριμένων πρότυπων διαλυμάτων, αλλά και όσων αναφέρονται αργότερα, ακολούθησαν τις οδηγίες της εταιρείας «TOKU-E: The evolution of bio-purity» (TOKU-E, n.d.) και συμπεριέλαβαν το υπερ-καθαρό νερό, την αιθανόλη, τη μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, όξινα υδατικά διαλύματα ή και μίγματα των παραπάνω.

Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας των ουσιών ενδιαφέροντος παρασκευάστηκαν με αραιώση των αποθεματικών πρότυπων διαλυμάτων στους ίδιους διαλύτες, ούτως ώστε να επιτύχουμε συγκεντρώσεις 10 και 1 ng/ml. Πολλές φορές κρίθηκε απαραίτητη η ανανέωσή τους, ακόμα και με συχνότητα εβδομάδας, προκειμένου να αποφύγουμε τη χρήση αλλοιωμένων διαλυμάτων (Berendsen et. al, 2011). Τόσο τα πρότυπα διαλύματα εργασίας όσο και τα αποθεματικά πρότυπα διαλύματα διατηρήθηκαν σε καταψύκτη στους -21°C. Την ίδια στιγμή, όλα τα δείγματα που λάβαμε από UNIZAR και τη NILSA προς ανάλυση (φυσικά

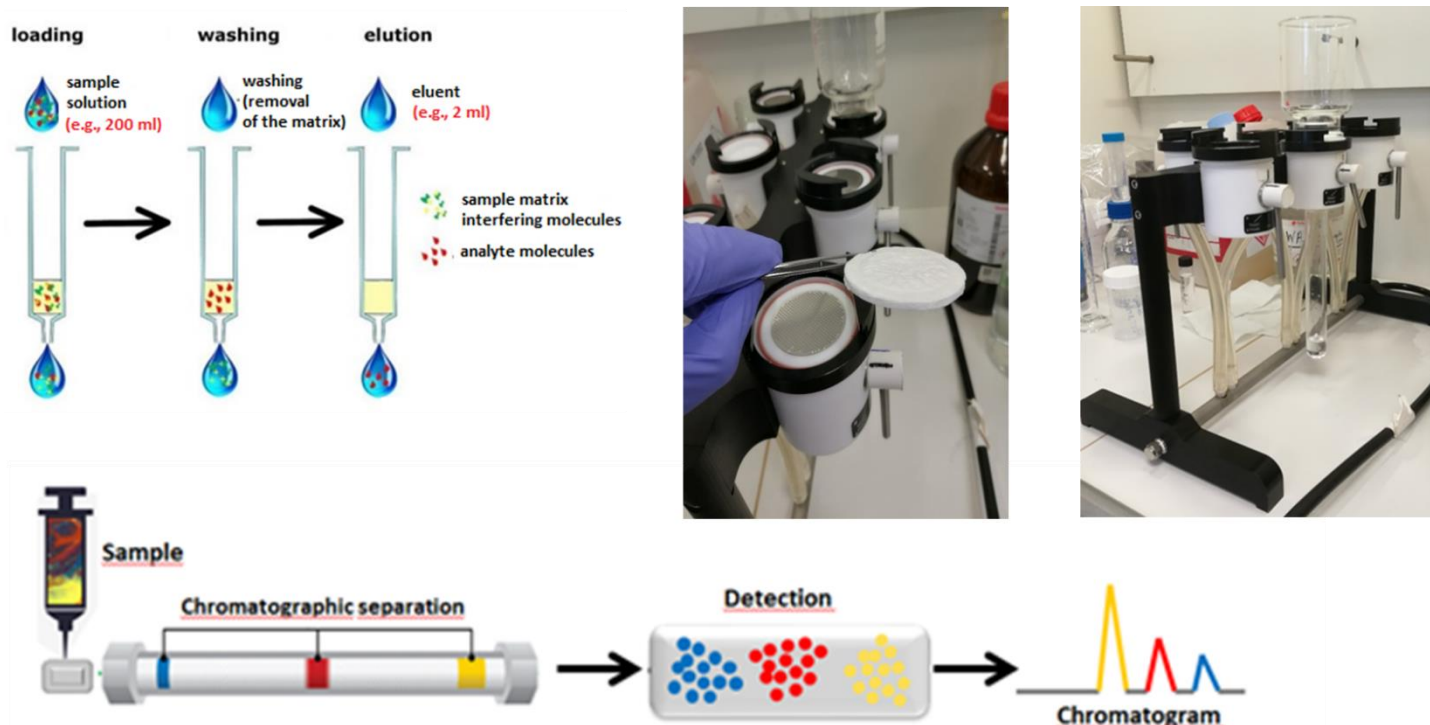
ύδατα, επεξεργασμένα πρότυπα) διατηρήθηκαν σε «ψυχρό δωμάτιο» θερμοκρασίας 5°C.

2.2.2. Ανάπτυξη της αναλυτικής μεθοδολογίας

Η τεχνική που βελτιστοποιήθηκε ήταν αυτή της SPE ακολουθούμενη από υγρή χρωματογραφία με ανίχνευση από φασματόμετρο μάζας (Εικόνα 4). Οι παράμετροι που βελτιστοποιήθηκαν περιλαμβάνουν:

- Συνθήκες διάλυσης για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων
- Επιλογή της κατάλληλης στατικής φάσης για το στάδιο της προσυγκέντρωσης
- Συνθήκες LC-MS, κατάλληλες για να διαχωρίσουν και να ανιχνεύσουν όλους τους αναλύτες
- Έλεγχος του βαθμού ανάκτησης των αναλυτών
- Σταθερότητα των πρότυπων διαλυμάτων

Η τεχνική LC-MS επιλέχθηκε ως μια αναλυτική τεχνική που συνδυάζει τις δυνατότητες φυσικού διαχωρισμού της υγρής χρωματογραφίας με την ανίχνευση από κάποιο φασματόμετρο μάζας υψηλής ευαισθησίας (Danner et. al, 2019).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της αναλυτικής μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε

Ως πηγή ιόντων του φασματομέτρου επιλέχθηκε ο ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI), καθώς θεωρείται «μαλακή» τεχνική ιονισμού. Με τον όρο «μαλακή» υποδηλώνεται πως μέσω της συγκεκριμένης διαδικασίας σχηματίζονται σταθερά μοριακά ιόντα. Έτσι, η τεχνική αυτή κρίνεται κατάλληλη, εκτός από διερευνητικό ποιοτικό έλεγχο, και για την ανάπτυξη ποσοτικής μεθόδου ανίχνευσης με φασματομετρία μάζας, όπου το πρόδρομο ιόν του αναλύτη πρέπει να μας είναι γνωστό (Bozonić & Kulasingam, 2013).

Βάσει αυτών, η οργανολογία που χρησιμοποιήθηκε περιέλαβε το Φασματόμετρο Μάζας QExactive hybrid Quadrupole - Orbitrap συζευγμένο τον Υγρό Χρωματογράφο Υπερ-υψηλής Απόδοσης UltiMate 3000 της ThermoFischer Scientific (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ενόργανη διάταξη UPLC-MS/MS που χρησιμοποιήθηκε

Η χημική φύση των αντιβιοτικών-στόχων δεν επέτρεψε των ταυτόχρονο προσδιορισμό και των εννέα, αλλά ήταν απαραίτητες δύο ξεχωριστές διαδικασίες: μία για τον προσδιορισμό 7 από τις 9 με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και μία για τον προσδιορισμό των αμινογλυκοσίδων (απραμυκίνη, υγρομυκίνη) με HILIC, με τη χρήση των αντίστοιχων χρωματογραφικών στηλών. Οι βελτιστοποιημένες αναλυτικές συνθήκες δίνονται στον Πίνακα 2. Τα φασματομετρικά χαρακτηριστικά δίνονται στον Πίνακα 1 του παραρτήματος.

Πίνακας 2. Οι βελτιστοποιημένες πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώτη φάση εργασιών

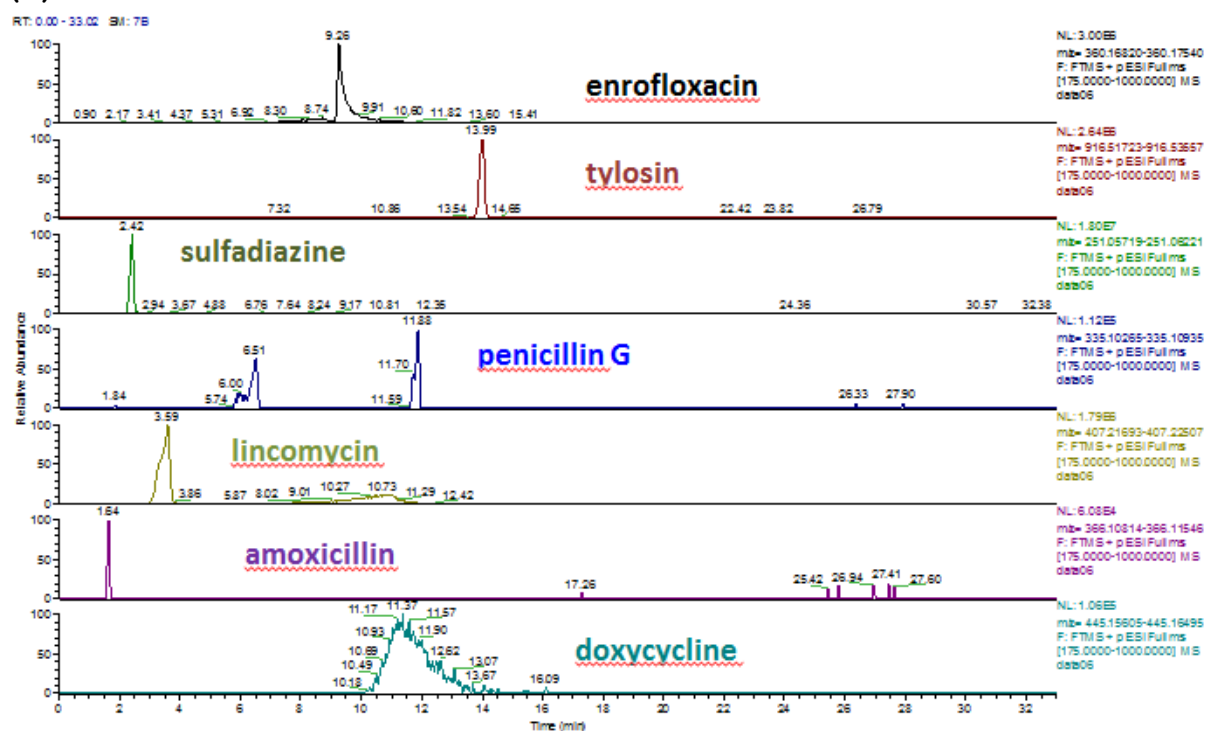
Συνθήκες προσυγκέντρωσης	Χρωματογραφικές συνθήκες	Συνθήκες φασματομετρίας μάζας
1. Εγκλιματισμός με 32ml MeOH, 12ml H ₂ O, 12ml H ₂ O (pH = 2 ± 0.5) 2. Εισαγωγή 250ml δείγματος 3. Έκλουση με 25 ml MeOH 4. Εξάτμιση	Στήλη: Waters Acquity UPLC BEH Shield RP18 1,7μm 2,1x100mm (αντίστροφης φάσης) Κινητή φάση: Διαλύτης A = 0.3% Μυρμηκικό Οξύ και 0.1% Μυρμηκικό Αμμώνιο σε υπερ-καθαρό νερό Διαλύτης B = 1:1 ACN:MeOH Κλίση ράμπας: 4.5%/min Ροή: 0.4 ml/min Όγκος έγχυσης: 10 μL	Γενικά Διάρκεια: 33 λεπτά Πολικότητα: θετική Φορτίο: 1 Full MS Ανάλυση: 140,000 Εύρος σάρωσης: 175 to 1000 m/z dd-MS² / dd-SIM Ανάλυση: 35,000 Παράθυρο αποκλεισμού: 2.0 m/z
	Στήλη: Waters Acquity UPLC BEH Amide 1,7μm 2,1x50mm (HILIC - υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων) Κινητή φάση: Διαλύτης A = 0.2% Μυρμηκικό Οξύ σε υπερ-καθαρό νερό Διαλύτης B = 0.2% Μυρμηκικό Οξύ σε ACN Κλίση ράμπας: 12%/min Ροή: 0.5 ml/min Όγκος έγχυσης: 20 μL	Γενικά Διάρκεια: 12 λεπτά Πολικότητα: θετική Φορτίο: 1 Full MS - SIM Ανάλυση: 140,000 Εύρος σάρωσης: 175 to 1000 m/z Targeted-SIM Ανάλυση: 70,000 Παράθυρο αποκλεισμού: 4.0 m/z

Παραδείγματα χρωματογραφημάτων δίνονται στην Εικόνα 6, ενώ τα LOD και LOQ υπολογίστηκαν σύμφωνα με την EPA 821-R-16-006 (United Stated Environmental Protection Agency, 2016) και δίνονται στον Πίνακα 3.

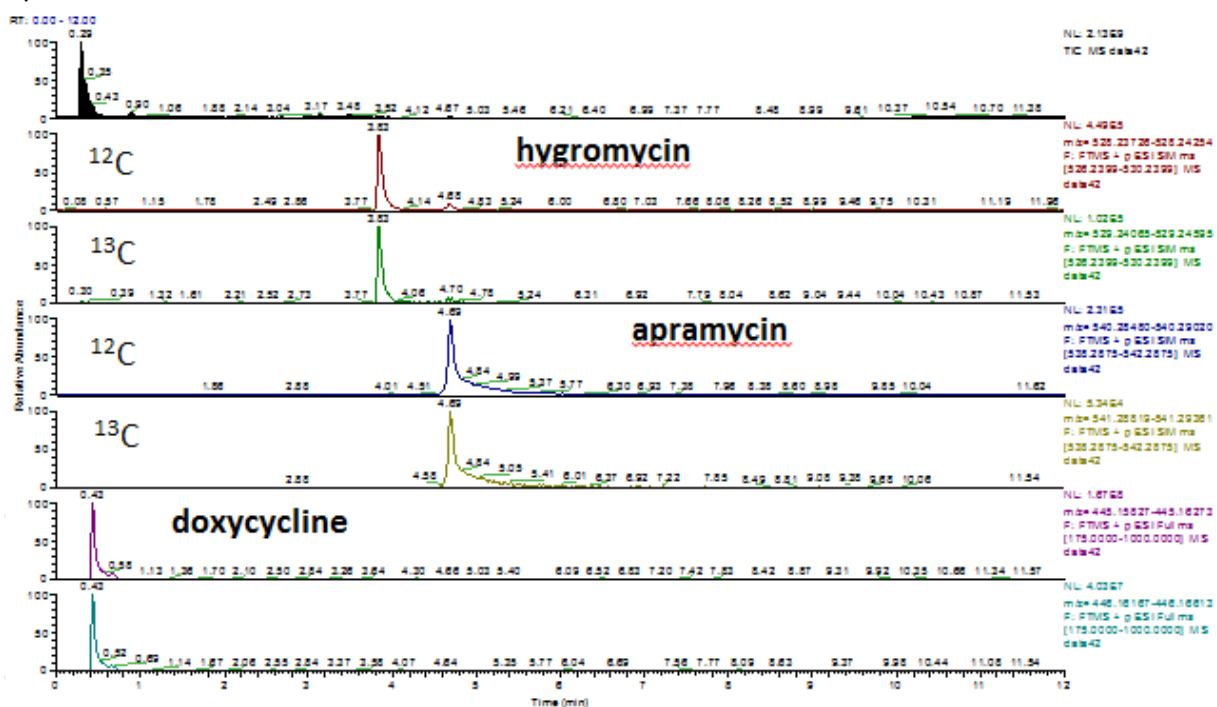
Πίνακας 3. Τα πειραματικά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αντιβιοτικών-στόχων που βρέθηκαν στην αρχική φάση εργασιών (σημειώνεται ότι τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των δειγμάτων εξαρτώνται και από τον παράγοντα προσυγκέντρωσης)

Αναλύτες	LOD	LOQ
Δοξυκυκλίνη	0.5 ng/ml	2.5 ng/ml
Ενροφλοξακίνη	0.01 ng/ml	0.05 ng/ml
Σουλφαδιαζίνη	0.005 ng/ml	0.025 ng/ml
Απραμυκίνη	0.5 ng/ml	2.5 ng/ml
Υγρομυκίνη	0.5 ng/ ml	2.5 ng /ml
Λινκομυκίνη	0.1 ng/ml	0.5 ng/ml
Τυλοσίνη	0.005 ng/ml	0.025 ng/ml
Αμοξικιλίνη	0.05 ng/ml	0.25 ng/ml
Πενικιλίνη G	0.2 ng/ml	1 ng/ml

(α)



(β)



Εικόνα 6. Χρωματογραφήματα (α) αντίστροφης φάσης και (β) HILIC LC-MS που ελήφθησαν σε βελτιστοποιημένες συνθήκες (βλ. Πίνακας 2) για πρότυπο διάλυμα αντιβιοτικών (25 ng/ml)

2.3. Δεύτερη φάση εργασιών: διερευνητική ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων ποτάμιων υδάτων

Η διερευνητική ποιοτική ανάλυση των δειγμάτων ποτάμιων υδάτων και αποβλήτων που καταλήγουν σε ποτάμια ύδατα πραγματοποιήθηκε βάσει των συνθηκών που αναφέρθηκαν παραπάνω (Πίνακας 2 – χρωματογραφία αντίστροφης φάσης). Μετά τη δεκαπλή συμπύκνωση με τη διαδικασία της SPE των 40 δειγμάτων (από δείγμα 250ml σε εκχύλισμα 25ml), ακολούθησε εξάτμιση 1ml εκχυλίσματος υπό ρεύμα αζώτου μέχρι όγκου 0.2ml. Το υπόλειμμα αυτό μεταφέρθηκε σε φιαλίδια χωρητικότητας 2ml και συμπληρώθηκε ως τον όγκο του 1ml με 0.1% Μυρμηκικό Οξύ σε υπερκαθαρό νερό. Τα φιαλίδια των 40 δειγμάτων εισήχθησαν στον αυτόματο δειγματολήπτη (θερμοκρασίας 4°C) του χρωματογράφου προς ανάλυση. Η ανάλυση των 40 δειγμάτων χωρίστηκε σε 4 ομάδες των 10 ανάμεσα στις οποίες παρεμβλήθηκαν από ένα λευκό δείγμα, δηλαδή 1ml διαλύτη [0.1% Μυρμηκικό Οξύ : Μεθανόλη (4:1)], και ένα δείγμα ελέγχου ποιότητας, δηλαδή 1ml διαλύτη εμβολιασμένο με 25 ng/ml από κάθε αναλύτη. Τα δύο αυτά δείγματα λειτούργησαν ως σημεία αναφοράς προκειμένου να γνωρίζουμε αν η στήλη είναι «μολυσμένη» και για να έχουμε μέτρο σύγκρισης με πρότυπο διάλυμα, αντίστοιχα.

Για την ταυτοποίηση όσο περισσότερων δυνατών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό TraceFinder™ (ThermoFisher Scientific). Η χρήση της συγκεκριμένης βάσης δεδομένων χημικών ενώσεων μας επέτρεπε να ανιχνεύσουμε περισσότερες από 100 ουσίες και να επικεντρωθούμε στις συχνότερα ανιχνευόμενες μετά την πρώτη ανάλυση.

Η επικύρωση της ταυτότητας των ενώσεων βασίστηκε σε 4 κριτήρια:

- Χρόνος κατακράτησης στο χρωματογράφο
- Ακριβής μοριακή μάζα
- Παρουσία γνωστών ισοτόπων
- Θραυσματοποίηση – παρουσία αναμενόμενων θραυσμάτων στο MS/MS

Ενώ τα τρία τελευταία κριτήρια αποτελούν γνωστά στοιχεία για την εν λόγω βάση δεδομένων και δεν τροποποιήθηκαν, ο χρόνος κατακράτησης, πολλές φορές, χρειάστηκε να αναπροσαρμοστεί στις συγκεκριμένες χρωματογραφικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν. Η συγκεκριμένη ρύθμιση ήταν συχνότερα απαραίτητη για ενώσεις που ανιχνεύονταν σπανιότερα ή σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Βάσει αυτών, παρατίθενται στον Πίνακα 4 τα αντιβιοτικά που βρέθηκαν στα 40 δείγματα της περιοχής ΡΟCΤΕFΑ κατά τη διερευνητική ποιοτική ανάλυση. Στα διαγράμματα 3-5 επιχειρείται μια σχηματική απεικόνιση της συχνότητας εμφάνισης των διάφορων αντιβιοτικών, μεμονωμένα αλλά και ανά κατηγορία.

Πίνακας 4. Αντιβιοτικά που βρέθηκαν στη διερευνητική ποιοτική ανάλυση για τις τρεις δειγματοληπτικές καμπάνιες

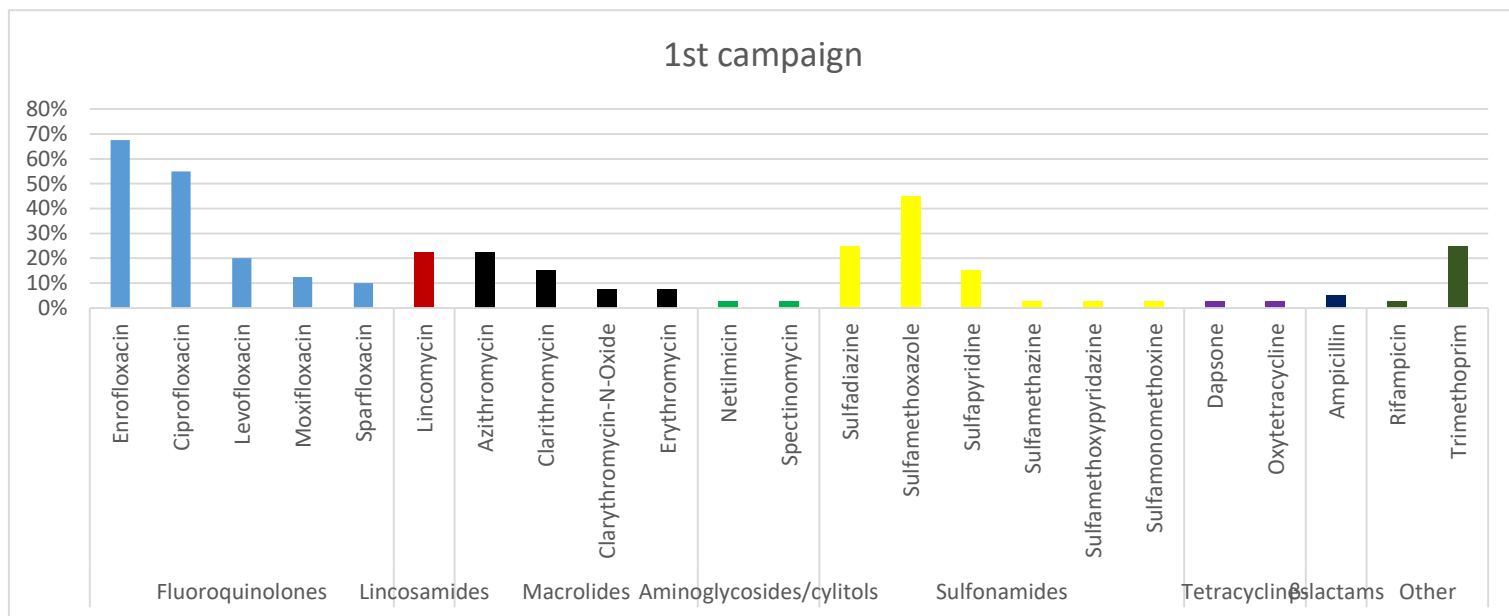
Σημείο δειγματοληψίας	Εαρινή δειγματοληπτική καμπάνια 2018	Φθινοπωρινή δειγματοληπτική καμπάνια 2018	Εαρινή δειγματοληπτική καμπάνια 2019
01-ASE	Ενροφλοξακίνη Σιπροφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη	Ενροφλοξακίνη Λινκομυκίνη Πεφλοξακίνη Σουλφαδιαζίνη	Λινκομυκίνη Σουλφαδιαζίνη
02-ASE	Ενροφλοξακίνη Σιπροφλοξακίνη		Φλουμεκίνη
03-ASE	Ενροφλοξακίνη Λινκομυκίνη Σουλφαδιαζίνη Σιπροφλοξακίνη Σουλφαμεθαζίνη	Λινκομυκίνη Σουλφαδιαζίνη Σουλφαμεθαζίνη Σουλφισομιδίνη	Λινκομυκίνη
04-ASE	Ενροφλοξακίνη Λινκομυκίνη Σουλφαδιαζίνη Σιπροφλοξακίνη Λεβοφλοξακίνη	Λινκομυκίνη Σουλφαδιαζίνη	Λινκομυκίνη Σουλφαδιαζίνη
05-ASE	Ενροφλοξακίνη Σιπροφλοξακίνη		
06-ASE	Σουλφαδιαζίνη Ενροφλοξακίνη Λινκομυκίνη Σιπροφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη	Σουλφαμεθοξαζόλη Λινκομυκίνη Σουλφαδιαζίνη	Ενροφλοξακίνη Μαριμποφλοξακίνη Λινκομυκίνη
07-ASE	Σιπροφλοξακίνη Ενροφλοξακίνη Λινκομυκίνη	Λινκομυκίνη Σουλφαδιαζίνη	Ενροφλοξακίνη Λινκομυκίνη
08-ASE	Ενροφλοξακίνη Λινκομυκίνη Σιπροφλοξακίνη	Σιπροφλοξακίνη	Σιπροφλοξακίνη Λινκομυκίνη
09-ASE			
10-ASE	Ενροφλοξακίνη Λινκομυκίνη		
11-ASE	Ενροφλοξακίνη	Σουλφαδιαζίνη	Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαδιαζίνη
12-ASE	Ενροφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη	Ενροφλοξακίνη Τυλοσίνη Σουλφαδιαζίνη Σιπροφλοξακίνη	Λινκομυκίνη Σπεκτινομυκίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαδιαζίνη
13-ASE	Ενροφλοξακίνη Σιπροφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη	Ενροφλοξακίνη Φλορφενικόλη Πεφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη	Σπεκτινομυκίνη
14-ASE	Ενροφλοξακίνη Σιπροφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Τριμεθοπρίμη	Σουλφαμεθοξαζόλη	Σουλφαμεθοξαζόλη
15-ASE	Σιπροφλοξακίνη Ενροφλοξακίνη	Ενροφλοξακίνη Λεβοφλοξακίνη Σιπροφλοξακίνη	

		Νορφλοξακίνη Πεφλοξακίνη	
16_ASE	Ενροφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη	Ενροφλοξακίνη Σιπροφλοξακίνη Πεφλοξακίνη	Λινκομυκίνη Σουλφαδιαζίνη
17_ASE	Ενροφλοξακίνη	Ενροφλοξακίνη Σουλφαπυριδίνη Σουλφαδιαζίνη Σουλφαμεθοξαζόλη	Σπεκτινομυκίνη Σουλφαδιαζίνη
18_ASE	Ενροφλοξακίνη Τριμεθοπρίμη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Σπαρφλοξακίνη	Λινκομυκίνη Σουλφαδιαζίνη Κλαριθρομυκίνη Αζιθρομυκίνη N-Οξείδιο της κλαριθρομυκίνης Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη Σουλφαμεθοξυπυριδαζίνη Σουλφαμονομεθοξίνη	Σπεκτινομυκίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Σουλφαδιαζίνη Τριμεθοπρίμη
19_ASE	Σιπροφλοξακίνη Σουλφαδιαζίνη Σουλφαμεθοξαζόλη	Ενροφλοξακίνη Σουλφαδιαζίνη Σιπροφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη	Σουλφαμεθοξαζόλη Ενροφλοξακίνη
20_ASE	Ενροφλοξακίνη Σουλφαδιαζίνη Σιπροφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη		Σουλφαδιαζίνη Σουλφαμεθοξαζόλη
21_ASC	Ενροφλοξακίνη Σιπροφλοξακίνη	Ενροφλοξακίνη Σουλφαδιαζίνη Σιπροφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη	Σουλφαδιαζίνη
22_ASC		Σουλφαδιαζίνη Σιπροφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη	Σουλφαδιαζίνη Νορφλοξακίνη Πιπεμιδικό Οξύ
23_ASA/G		Ενροφλοξακίνη Λινκομυκίνη Σουλφαδιαζίνη	Σπεκτινομυκίνη Σουλφαδιαζίνη
24_ASA/G	Σουλφαδιαζίνη Σιπροφλοξακίνη		Σπεκτινομυκίνη
25_ASA/G	Σιπροφλοξακίνη	Ενροφλοξακίνη Σουλφαδιαζίνη	
26_ASA/G		Ενροφλοξακίνη Σουλφαπυριδίνη	Σπεκτινομυκίνη
27_ASA/G	Σουλφαμεθοξαζόλη	Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη	Σουλφαπυριδίνη
28_ASA/G	Σουλφαδιαζίνη	Σιπροφλοξακίνη	
29_ARD1e	Ενροφλοξακίνη Κλαριθρομυκίνη N-Οξείδιο της κλαριθρομυκίνης Δαψόνη Ερυθρομυκίνη Λεβοφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη	Ενροφλοξακίνη Αζιθρομυκίνη Δαψόνη Λεβοφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη	Σιπροφλοξακίνη Κλαριθρομυκίνη Αζιθρομυκίνη Λεβοφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη Δαψόνη

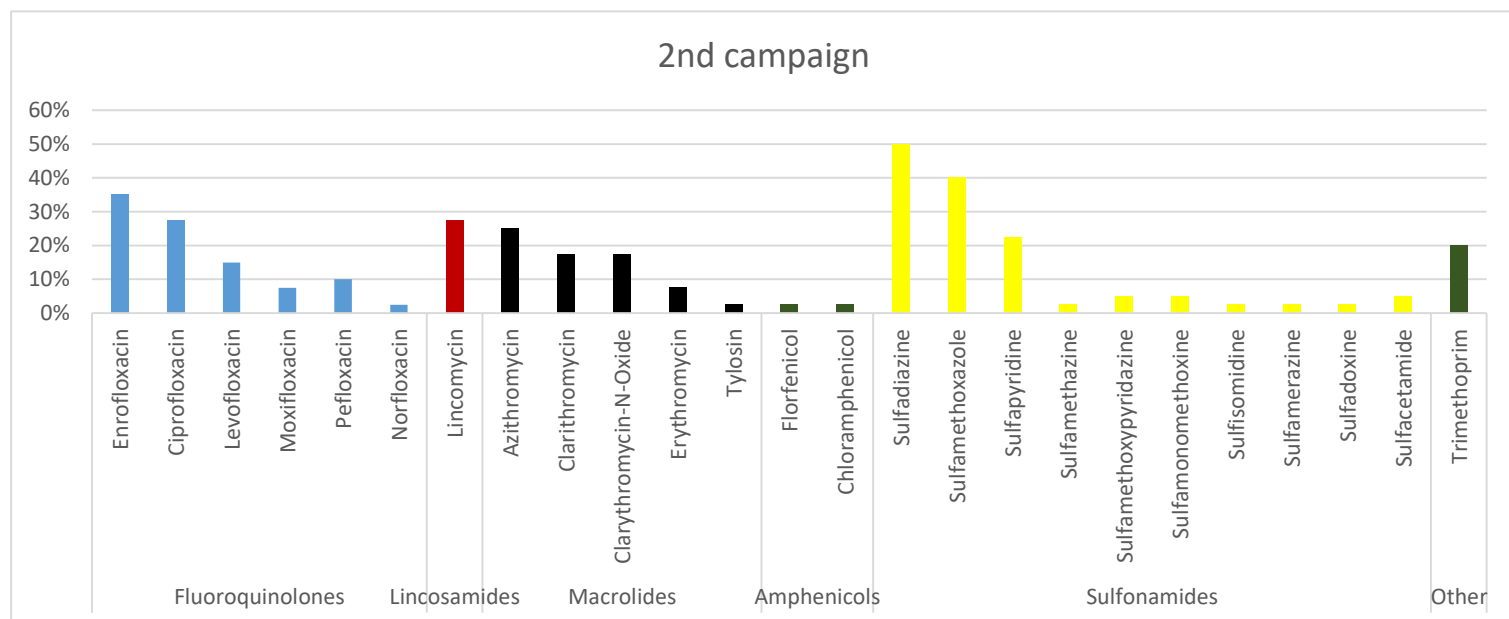
	Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη Αζιθρομκίνη Μοξιφλοξακίνη Αμπικιλίνη		
30_ARD1s	Σουλφαδιαζίνη Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη Αζιθρομκίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Αμπικιλίνη Σπαρφλοξακίνη	Χλωραμπενικόλη Σουλφαμεραζίνη Σιπροφλοξακίνη Μοξιφλοξακίνη Αζιθρομκίνη Τριμεθοπρίμη	Δαψόνη Μοξιφλοξακίνη Σπεκτινομκίνη Αζιθρομκίνη Σιπροφλοξακίνη Λεβοφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη
31_ARD2e	Ενροφλοξακίνη Λινκομκίνη Κλαριθρομκίνη N-Οξείδιο της κλαριθρομκίνης Αζιθρομκίνη Λεβοφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Σιπροφλοξακίνη Μοξιφλοξακίνη Νετιλμικίνη	Σουλφαδιαζίνη Λινκομκίνη Μοξιφλοξακίνη Αζιθρομκίνη Κλαριθρομκίνη N-Οξείδιο της κλαριθρομκίνης Λεβοφλοξακίνη Ερυθρομκίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη	Λινκομκίνη Αζιθρομκίνη Κλαριθρομκίνη N-Οξείδιο της κλαριθρομκίνης Λεβοφλοξακίνη Σουλφαδιαζίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη
32_ARD2s	Λινκομκίνη Κλαριθρομκίνη Λεβοφλοξακίνη Τριμεθοπρίμη Αζιθρομκίνη Μοξιφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σπαρφλοξακίνη Ερυθρομκίνη	Λινκομκίνη Ερυθρομκίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Αζιθρομκίνη Σιπροφλοξακίνη Κλαριθρομκίνη N-Οξείδιο της κλαριθρομκίνης Λεβοφλοξακίνη Τριμεθοπρίμη	Αμπικιλίνη Κλινδαμκίνη Νιτροφουραντίνη Σουλφακεταμίδιο Σουλφαμεθοξαζόλη Αζιθρομκίνη Κλαριθρομκίνη N-Οξείδιο της κλαριθρομκίνης Λεβοφλοξακίνη Τριμεθοπρίμη
33_ARD3e	Ενροφλοξακίνη Σουλφαδιαζίνη Αζιθρομκίνη Λεβοφλοξακίνη Σιπροφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη Μοξιφλοξακίνη Κλαριθρομκίνη	Σουλφαδιαζίνη Δαψόνη Αζιθρομκίνη Κλαριθρομκίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη	Αζιθρομκίνη Σιπροφλοξακίνη Σουλφακεταμίδιο Σουλφαδιαζίνη Κλαριθρομκίνη Λεβοφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη
34_ARD3s	Αζιθρομκίνη Σιπροφλοξακίνη Κλαριθρομκίνη Λεβοφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη Σπαρφλοξακίνη	Σουλφαδιαζίνη Αζιθρομκίνη N-Οξείδιο της κλαριθρομκίνης Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη	Αζιθρομκίνη N-Οξείδιο της κλαριθρομκίνης Μοξιφλοξακίνη Νετιλμικίνη Νιτροφουραντίνη Νορφλοξακίνη Σιπροφλοξακίνη

			Κλαριθρομυκίνη Ενροφλοξακίνη Λεβοφλοξακίνη Τριμεθοπρίμη
35_ARD4e	Ενροφλοξακίνη Αζιθρομυκίνη Σιπροφλοξακίνη	Ενροφλοξακίνη Κλαριθρομυκίνη N-Οξειδίο της κλαριθρομυκίνης Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Τριμεθοπρίμη	Λεβοφλοξακίνη Σουλφαδιαζίνη
36_ARD4s	Ενροφλοξακίνη Αζιθρομυκίνη Λεβοφλοξακίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Τριμεθοπρίμη	Αζιθρομυκίνη N-Οξειδίο της κλαριθρομυκίνης Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφαπυριδίνη Κλαριθρομυκίνη	Αμοξικιλίνη Ενροφλοξακίνη Λεβοφλοξακίνη Σπεκτινομυκίνη Σουλφαπυριδίνη Σουλφαδιαζίνη Σουλφαμεθοξαζόλη
37_ARH	Αζιθρομυκίνη Σιπροφλοξακίνη Κλαριθρομυκίνη N-Οξειδίο της κλαριθρομυκίνης Ερυθρομυκίνη Λεβοφλοξακίνη Μοξιφλοξακίνη Ριφαμπικίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Τριμεθοπρίμη	Σουλφαδιαζίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Τριμεθοπρίμη Αζιθρομυκίνη Σιπροφλοξακίνη Λεβοφλοξακίνη Μοξιφλοξακίνη	Αζιθρομυκίνη Σπεκτινομυκίνη Σουλφακεταμίδιο Αμπικιλίνη Σιπροφλοξακίνη Λεβοφλοξακίνη Τριμεθοπρίμη Σουλφαμεθοξαζόλη
38_ARM	Ενροφλοξακίνη Λινκομυκίνη Τριμεθοπρίμη Σπεκτινομυκίνη Σουλφαμεθοξυπυριδαζίνη Σουλφαμονομεθοξίνη	Λινκομυκίνη Σουλφαδιαζίνη Σουλφαδοξίνη Τριμεθοπρίμη Σουλφαμεθοξυπυριδαζίνη Σουλφαμονομεθοξίνη	Φλουμεκίνη Σουλφακεταμίδιο Σουλφαμεθαζίνη Σουλφαμεθοξαζόλη Σουλφισομιδίνη Σπεκτινομυκίνη
39_ARM	Ενροφλοξακίνη	Ενροφλοξακίνη Σουλφαδιαζίνη Σουλφακεταμίδιο	Ενροφλοξακίνη Σουλφακεταμίδιο Σουλφαδιαζίνη Τριμεθοπρίμη
40_ARM	Ενροφλοξακίνη Σουλφαδιαζίνη Οξυτετρακυκλίνη Σιπροφλοξακίνη	Σουλφακεταμίδιο Λινκομυκίνη Κλαριθρομυκίνη N-Οξειδίο της κλαριθρομυκίνης Ερυθρομυκίνη Οξυτετρακυκλίνη	Λινκομυκίνη Οξυτετρακυκλίνη Τριμεθοπρίμη Ενροφλοξακίνη Σουλφαδιαζίνη

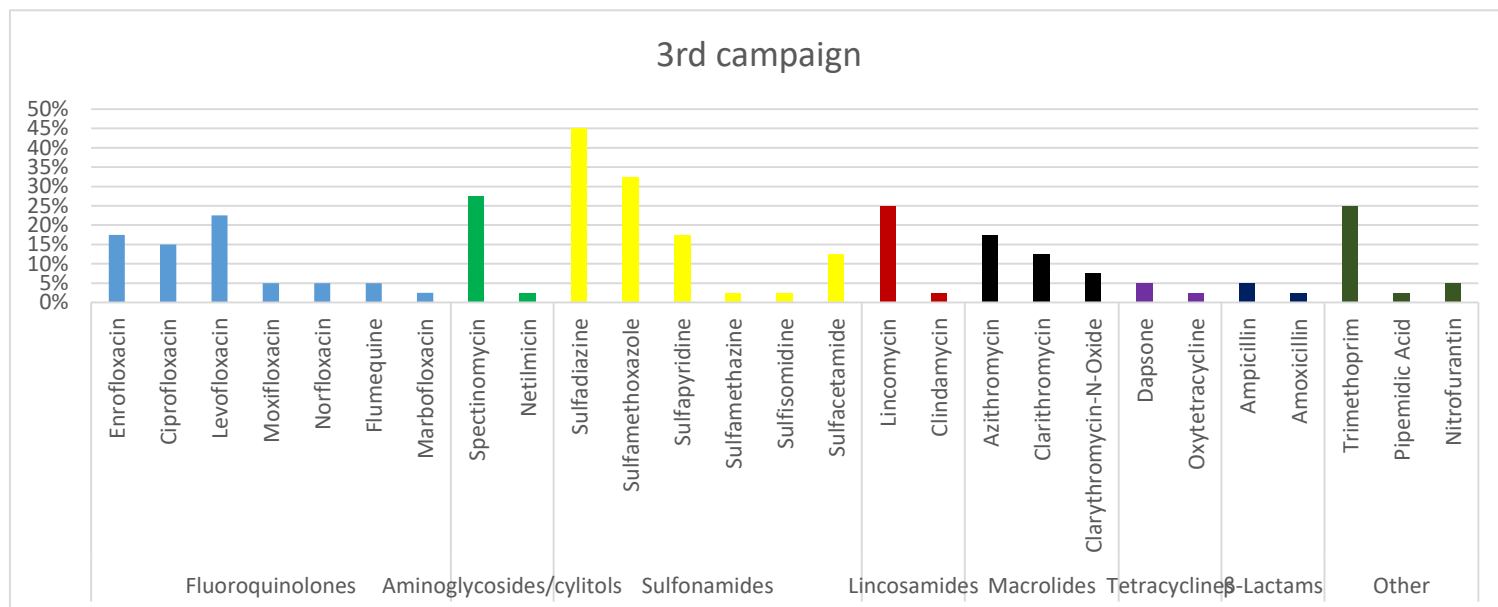
Διάγραμμα 3. Συχνότητα εμφάνισης αντιβιοτικών στην εαρινή δειγματοληπτική καμπάνια 2018



Διάγραμμα 4. Συχνότητα εμφάνισης αντιβιοτικών στη φθινοπωρινή δειγματοληπτική καμπάνια 2018



Διάγραμμα 5. Συχνότητα εμφάνισης αντιβιοτικών στην εαρινή δειγματοληπτική καμπάνια 2018



2.4. Τελική φάση εργασιών

2.4.1. Επανα-βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθοδολογίας βάσει της αλλαγής των αναλυτών

Σε συνέχεια της συνάντησης του έργου Outbiotics στην Huesca στις 18 Οκτωβρίου 2018 και σύμφωνα με τα κριτήρια που αναφέρθηκαν νωρίτερα, αποφασίστηκε η αλλαγή της λίστας των αναλυτών. Η νέα λίστα δίνεται στον Πίνακα 5. Στον Πίνακα 6 δίνονται τα πρόδρομα ιόντα που σχηματίζονται στο φασματόμετρο μετά τον ιονισμό, αλλά και τα πιο συχνά απαντώμενα ισότοπα.

Πίνακας 5. Τα αντιβιοτικά ενδιαφέροντος στην τελική φάση εργασιών

Όνομα	Κατηγορία	Αριθμός CAS	Συντακτικός τύπος
Αμοξικιλίνη	β-Λακτάμες	26787-78-0	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S
Ενροφλοξακίνη	Κινολόνες	93106-60-6	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃
Σουλφαδιαζίνη	Σουλφοναμίδια	68-35-9	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S
Τριμεθοπρίμη	Διαμινοπυριμιδίνες	738-70-5	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃
Αζιθρομυκίνη	Μακρολίδες	83905-01-5	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂

Πίνακας 6. Φασματομετρικά χαρακτηριστικά αναλυτών στην τελική φάση εργασιών

Name	Formula	Precursor Ion	Isotope
Amoxicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	366.1118	367.11517
Sulfadiazine	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	251.05972	252.06308
Trimethoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	291.14517	292.14852
Enrofloxacin	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	360.1718	360.1718
Azithromycin	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	749.5158	750.51916

Η επανα-βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθοδολογίας ήταν απαραίτητη προκειμένου να λάβουμε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Οι βελτιστοποιημένες παράμετροι δίνονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Οι βελτιστοποιημένες πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην τελική φάση εργασιών

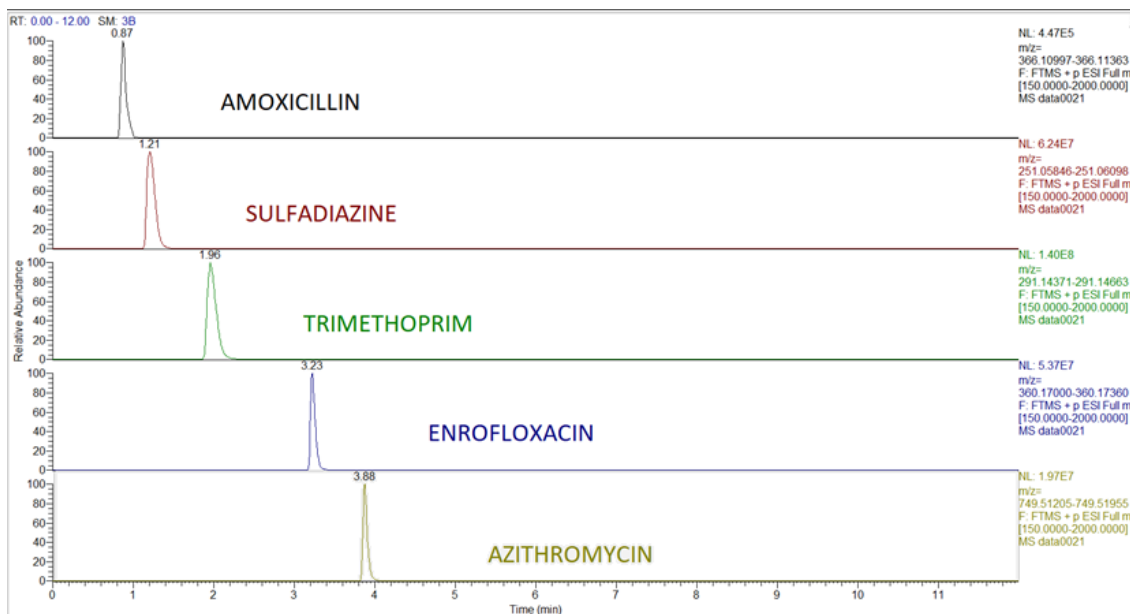
Συνθήκες προσυγκέντρωσης	Χρωματογραφικές συνθήκες	Συνθήκες φασματομετρίας μάζας
<ul style="list-style-type: none"> Εγκλιματισμός: 32ml MeOH, 12ml H₂O, 12ml H₂O pH 2 ± 0.5 Εισαγωγή 250ml δείγματος Έκθλιψη: 25 ml MeOH 	<p>Στήλη: Accucore C18 2.5 μm 100x2.1mm (αντίστροφης φάσης)</p> <p>Κινητή φάση: Διαλύτης A = 0.4% Μυρμηκικό Οξύ και 0.1% Μυρμηκικό Αμμώνιο σε υπερ-καθαρό νερό Διαλύτης B = 1:1 ACN:MeOH</p> <p>Κλίση: 16%/min</p> <p>Ροή: 0.4 ml/min</p> <p>Όγκος έγχυσης: 20 μL</p> <p>Θερμοκρασία: 30°C</p>	<p>Γενικά</p> <p>Διάρκεια: 0 to 12 min</p> <p>Πολικότητα: θετική</p> <p>Φορτίο: 1</p> <p>SIM</p> <p>Ανάλυση: 70,000</p> <p>Παράθυρο αποκλεισμού: 3.0 m/z</p> <p>Full MS - SIM</p> <p>Ανάλυση: 17,500</p> <p>Εύρος σάρωσης: 150 to 2000 m/z</p>

Στον Πίνακα 8 περιγράφεται ο τρόπος με τον οποίο μεταβάλλεται η αναλογία των διαλυτών Α και Β, που περιγράφηκαν στον Πίνακα 6, κατά τη διάρκεια ενός χρωματογραφήματος.

Πίνακας 8. Πρόγραμμα αναλογίας διαλυτών

Time	Flow [ml/min]	%B
0.000		
0.000	0.400	15.0
1.000	0.400	15.0
6.000	0.400	95.0
9.500	0.400	95.0
10.500	0.400	15.0
12.000	0.400	15.0

Παραδείγματα χρωματογραφήματων δίνονται στην Εικόνα 7 και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης στον Πίνακα 9.



Εικόνα 7. Χρωματογράφημα LC-MS που ελήφθη σε βελτιστοποιημένες συνθήκες (βλ. Πίνακας 7) για πρότυπο διάλυμα αντιβιοτικών (25 ng/ml)

Πίνακας 9. Τα πειραματικά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των αναλυτών αντιβιοτικών που βρέθηκαν στην τελική φάση εργασιών (σημειώνεται ότι τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των δειγμάτων εξαρτώνται και από τον παράγοντα προσυγκέντρωσης)

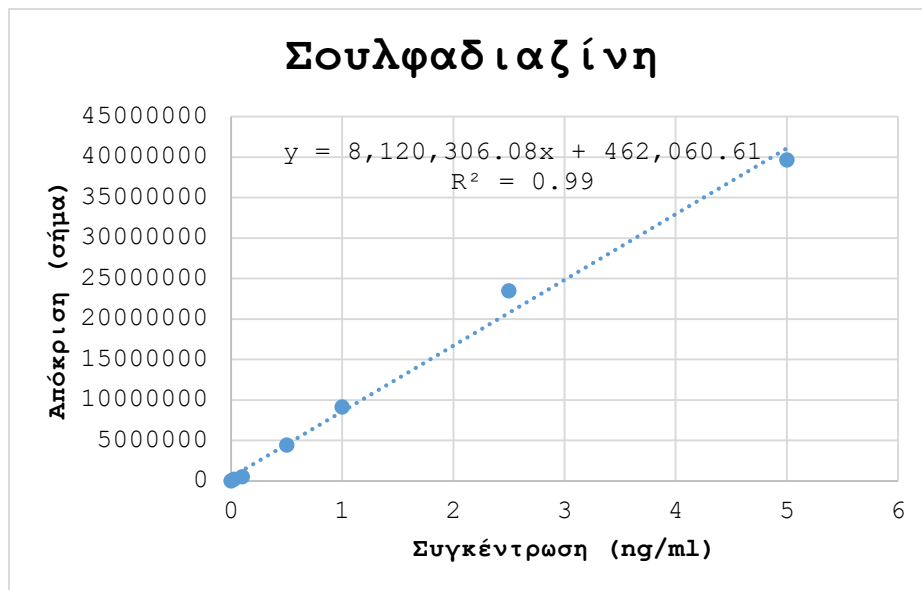
Αναλύτες	Όρια ανίχνευσης	Όρια ποσοτικοποίησης
Αμοξικιλίνη	0.3124 ng/ml	0.9948 ng/ml
Ενροφλοξακίνη	0.0012 ng/ml	0.0037 ng/ml
Σουλφαδιαζίνη	0.0008 ng/ml	0.0025 ng/ml
Τριμεθοπρίμη	0.0008 ng/ml	0.0025 ng/ml
Αζιθρομυκίνη	0.0020 ng/ml	0.0065 ng/ml

2.4.2. Ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων ποτάμιων υδάτων και αποβλήτων που καταλήγουν σε ποτάμια ύδατα

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προετοιμασία των δειγμάτων του ποσοτικού προσδιορισμού των ποτάμιων υδάτων και αποβλήτων που καταλήγουν σε ποτάμια ύδατα ήταν η ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε για το διερευνητικό ποιοτικό προσδιορισμό με τη διαφορά, εκτός όσων περιγράφονται στον Πίνακα 6, ότι δεν έλαβε χώρα εξάτμιση υπό ρεύμα αζώτου. Άρα χρησιμοποιήθηκαν 0.2 ml δείγματος σε τελικό όγκο προς ανάλυση 1 ml, οπότε υπήρξε πενταπλή αραίωση. Συνυπολογίζοντας τον παράγοντα προσυγκέντρωσης (10), η τελική προσυγκέντρωση ήταν διπλή. Η πραγματοποίηση των παραπάνω υπολογισμών, αλλά και γενικότερα η απαραίτητη επεξεργασία για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων, έγινε με τη βοήθεια του Microsoft Excel 2013.

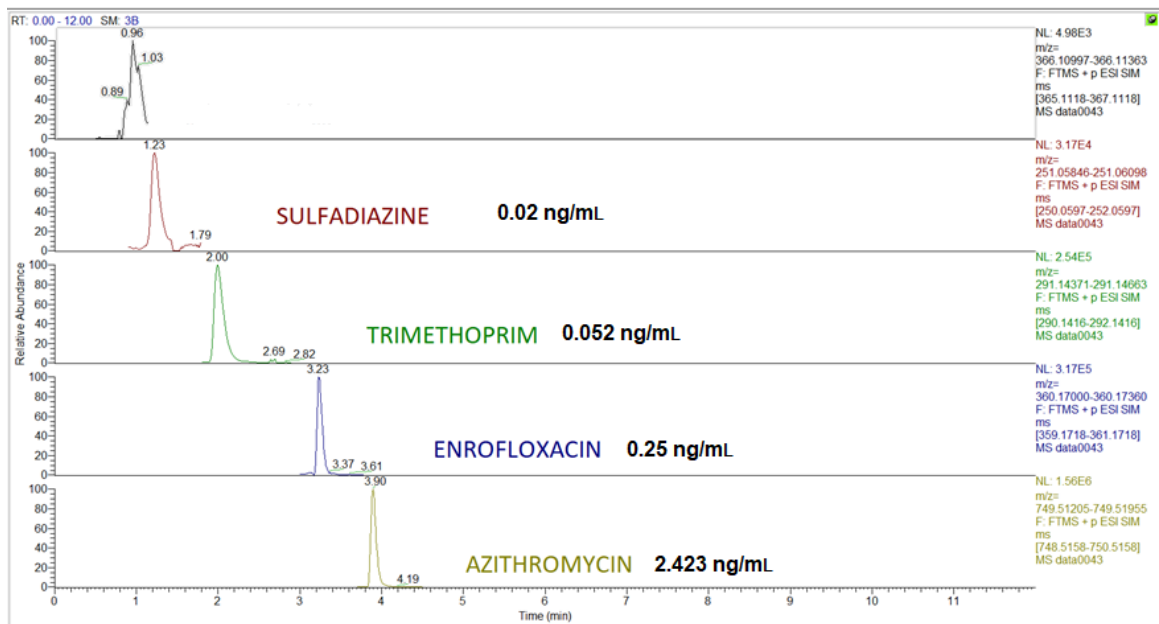
Επίσης, στην ίδια ακολουθία LC-MS πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις πρότυπων διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων, τα οποία παρασκευάστηκαν από τα αποθεματικά πρότυπα διαλύματα και τα πρότυπα διαλύματα εργασίας που αναφέρθηκαν νωρίτερα. Για κάθε μία από τις ενώσεις ενδιαφέροντος αναλύθηκαν διαλύματα 5-8 διαφορετικών συγκεντρώσεων στο εύρος των αναμενόμενων τιμών των πραγματικών δειγμάτων. Για παράδειγμα, για την ανάλυση της εαρινής καμπάνιας του 2019, αναλύθηκαν 8 διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων (0.025, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 ng/ml) και για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκαν τα πρώτα 6 από αυτά και επιπλέον το μηδενικό σημείο. Η αντίστοιχη καμπύλη βαθμονόμησης για τη σουλφαδιαζίνη παρατίθεται στο Διάγραμμα 6. Με βάση τις καμπύλες βαθμονόμησης, έγινε αντιστοίχιση του μετρούμενο σήματος του φασματομέτρου μάζας με τη συγκέντρωση του εκάστοτε εξεταζόμενου δείγματος.

Διάγραμμα 6. Παράδειγμα καμπύλης βαθμονόμησης (σουλφαδιαζίνη, εαρινή δειγματοληπτική καμπάνια 2019)



Όλα τα δείγματα που αναφέρθηκαν παραπάνω (δείγματα φυσικών υδάτων, πρότυπα δείγματα) αναλύθηκαν από τρεις φορές το καθένα προκειμένου να βεβαιωθούμε ότι δε θα υπάρξουν μεγάλες αποκλίσεις από την πραγματική συγκέντρωση λόγω μετρητικού σφάλματος της ενόργανης διάταξης. Βάσει αυτού, οι τιμές που παρουσιάζονται αργότερα αποτελούν μέσο όρο των τριών μετρήσεων που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα, ενώ σε εξαιρετικές περιπτώσεις όπου μία εκ των τριών τιμών θεωρήθηκε εξαιρετικά, αποτελούν μέσο όρο των δύο εναπομεινασών.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για την εαρινή και τη φθινοπωρινή δειγματοληπτική καμπάνια του 2018 δίνονται στους Πίνακες 10 και 11, αντίστοιχα, ενώ για εαρινή καμπάνια του 2019 δίνονται στον Πίνακα 12. Ένα παράδειγμα χρωματογραφήματος για τα ποτάμια ύδατα (δειγματοληπτικό σημείο 29) δίνεται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8. Παράδειγμα χρωματογραφήματος LC-MS που ελήφθη για το δείγμα 29.

Πίνακας 10. Ποσοτικά αποτελέσματα για την εαρινή καμπάνια του 2018

	ΕΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗ [ng/ml]		ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ [ng/ml]		ΕΝΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗ [ng/ml]		ΑΖΙΘΡΟΜΥΚΙΝΗ [ng/ml]		ΑΜΟΞΙΚΙΛΙΝΗ [ng/ml]
	C	SD	C	SD	C	SD	C	SD	C
01-ASE	< LOD		< LOD		0.244	0.000	< LOD		< LOD
02-ASE	D		< LOD		0.251	0.000	< LOD		< LOD
03-ASE	0.302	0.002	D		0.353	0.001	< LOD		< LOD
04-ASE	< LOD		< LOD		0.379	0.000	< LOD		< LOD
05-ASE	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
06-ASE	D		D		D		< LOD		< LOD
07_ASE	< LOD		< LOD		1.558	0.001	< LOD		< LOD
08_ASE	D		< LOD		4.391	0.029	< LOD		< LOD
09_ASE	< LOD		< LOD		0.243	0.000	< LOD		< LOD
10_ASE	< LOD		< LOD		0.279	0.000	< LOD		< LOD
11_ASE	< LOD		< LOD		0.238	0.000	< LOD		< LOD
12_ASE	< LOD		< LOD		0.258	0.000	< LOD		< LOD
13_ASE	D		D		0.247	0.000	< LOD		< LOD
14_ASE	< LOD		D		0.349	0.000	< LOD		< LOD
15_ASE	D		D		0.247	0.000	< LOD		< LOD
16_ASE	< LOD		< LOD		0.242	0.000	< LOD		< LOD
17_ASE	< LOD		< LOD		0.586	0.003	< LOD		< LOD
18_ASE	D		0.005	0.001	0.650	0.002	< LOD		< LOD
19_ASE	D		D		D		< LOD		< LOD
20_ASE	< LOD		< LOD		0.238	0.000	< LOD		< LOD
21_ASC	< LOD		< LOD		0.477	0.001	< LOD		< LOD
22_ASC	< LOD		< LOD		0.275	0.000	< LOD		< LOD
23_ASA/G	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
24_ASA/G	D		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
25_ASA/G	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
26_ASA/G	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
27_ASA/G	< LOD		D		< LOD		< LOD		< LOD
28_ASA/G	D		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
29_ARD1e	D		0.078	0.002	0.287	0.001	1.109	0.019	< LOD
30_ARD1s	D		0.038	0.001	< LOD		0.398	0.002	< LOD
31_ARD2e	D		D		0.590	0.001	0.904	0.024	< LOD
32_ARD2s	D		0.134	0.001	0.261	0.001	1.052	0.009	< LOD
33_ARD3e	0.059	0.002	0.092	0.002	0.276	0.000	0.763	0.022	< LOD
34_ARD3s	D		0.060	0.002	0.274	0.000	0.443	0.010	< LOD
35_ARD4e	< LOD		D		0.375	0.001	0.272	0.002	< LOD
36_ARD4s	< LOD		D		0.259	0.000	0.206	0.001	< LOD
37_ARH	< LOD		3.623	0.012	0.248	0.000	1.080	0.009	< LOD
38_ARM	D		0.048	0.001	0.324	0.002	D		< LOD
39_ARM	< LOD		< LOD		0.247	0.000	< LOD		< LOD
40_ARM	0.142	0.001	0.004	0.001	4.239	0.052	< LOD		< LOD

D - Η συγκέντρωση είναι υψηλότερη από το LOD, αλλά χαμηλότερη από το LOQ [για τις σουλφαδιαζίνη, ενροφλοξακίνη, τριμεθοπρίμη και αζιθρομυκίνη: LOD = 0.0005 και LOQ = 0.0025 ng/ml, ενώ για την αμοξικιλίνη 0.05 και 0.25 ng/ml, αντίστοιχα]

Πίνακας 11. Ποσοτικά αποτελέσματα για τη φθινοπωρινή καμπάνια του 2018

	ΕΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗ [ng/ml]		ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ [ng/ml]		ΕΝΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗ [ng/ml]		ΑΖΙΘΡΟΜΥΚΙΝΗ [ng/ml]		ΑΜΟΞΙΚΙΛΙΝΗ [ng/ml]
	C	SD	C	SD	C	SD	C	SD	C
01-ASE	D		D		0.144	0.010	< LOD		< LOD
02-ASE	D		< LOD		D		< LOD		< LOD
03-ASE	0.019	0.001	< LOD		D		< LOD		< LOD
04-ASE	D		D		D		< LOD		< LOD
05-ASE	< LOD		< LOD		D		< LOD		< LOD
06-ASE	0.040	0.001	< LOD		D		< LOD		< LOD
07_ASE	D		D		D		< LOD		< LOD
08_ASE	< LOD		D		D		< LOD		< LOD
09_ASE	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
10_ASE	< LOD		< LOD		D		< LOD		< LOD
11_ASE	0.021	0.001	D		0.140	0.007	< LOD		< LOD
12_ASE	0.023	0.001	D		0.169	0.007	< LOD		< LOD
13_ASE	< LOD		D		D		< LOD		< LOD
14_ASE	< LOD		< LOD		D		< LOD		< LOD
15_ASE	< LOD		< LOD		2.919	0.218	< LOD		< LOD
16_ASE	< LOD		D		0.327	0.016	< LOD		< LOD
17_ASE	D		D		0.210	0.013	< LOD		< LOD
18_ASE	0.016	0.001	D		D		0.739	0.018	< LOD
19_ASE	D		D		D		< LOD		< LOD
20_ASE	< LOD		D		D		< LOD		< LOD
21_ASC	0.019	0.001	D		0.153	0.005	< LOD		< LOD
22_ASC	0.020	0.001	D		D		< LOD		< LOD
23_ASA/G	D		< LOD		D		< LOD		< LOD
24_ASA/G	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
25_ASA/G	D		D		0.184	0.007	< LOD		< LOD
26_ASA/G	D		D		0.154	0.005	< LOD		< LOD
27_ASA/G	< LOD		D		< LOD		< LOD		< LOD
28_ASA/G	< LOD		D		< LOD		< LOD		< LOD
29_ARD1e	0.020	0.001	0.052	0.001	0.253	0.006	2.423	0.012	< LOD
30_ARD1s	< LOD		0.061	0.001	D		1.100	0.013	< LOD
31_ARD2e	0.084	0.002	0.044	0.002	0.233	0.009	4.171	0.065	< LOD
32_ARD2s	< LOD		0.169	0.003	D		1.698	0.018	< LOD
33_ARD3e	0.054	0.001	0.052	0.001	0.311	0.015	1.793	0.012	< LOD
34_ARD3s	0.068	0.004	0.049	0.001	D		0.705	0.008	< LOD
35_ARD4e	< LOD		D		0.204	0.010	0.675	0.002	< LOD
36_ARD4s	< LOD		D		0.128	0.002	0.416	0.003	< LOD
37_ARH	0.111	0.001	0.024	0.001	0.131	0.002	3.892	0.040	< LOD
38_ARM	0.022	0.001	0.026	0.001	0.131	0.003	0.408	0.004	< LOD
39_ARM	0.427	0.009	< LOD		0.191	0.005	< LOD		< LOD
40_ARM	0.126	0.002	D		0.820	0.063	0.450	0.008	< LOD

D - Η συγκέντρωση είναι υψηλότερη από το LOD, αλλά χαμηλότερη από το LOQ [για τις σουλφαδιαζίνη, ενροφλοξακίνη, τριμεθοπρίμη και αζιθρομυκίνη: LOD = 0.0005 και LOQ = 0.0025 ng/ml, ενώ για την αμοξικιλίνη 0.05 και 0.25 ng/ml, αντίστοιχα]

Πίνακας 12. Ποσοτικά αποτελέσματα για την εαρινή καμπάνια του 2019

	ΕΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗ [ng/ml]		ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ [ng/ml]		ΕΝΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗ [ng/ml]		ΑΖΙΘΡΟΜΥΚΙΝΗ [ng/ml]		ΑΜΟΞΙΚΙΛΙΝΗ [ng/ml]
	C	SD	C	SD	C	SD	C	SD	C
01-ASE	D		D		D		D		< LOD
02-ASE	D		D		0.523	0.007	< LOD		< LOD
03-ASE	D		D		D		< LOD		< LOD
04-ASE	D		D		D		D		< LOD
05-ASE	D		D		< LOD		< LOD		< LOD
06-ASE	D		D		D		D		< LOD
07-ASE	D		D		D		< LOD		< LOD
08-ASE	< LOD		< LOD		D		D		< LOD
09-ASE	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
10-ASE	< LOD		< LOD		D		< LOD		< LOD
11-ASE	D		D		< LOD		D		< LOD
12-ASE	D		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
13-ASE	< LOD		D		D		D		< LOD
14-ASE	D		D		< LOD		< LOD		< LOD
15-ASE	D		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
16-ASE	D		D		< LOD		D		< LOD
17-ASE	0.258	0.001	D		D		< LOD		< LOD
18-ASE	D		0.189	0.005	D		D		< LOD
19-ASE	D		< LOD		3.033	0.018	< LOD		< LOD
20-ASE	D		< LOD		0.672	0.001	< LOD		< LOD
21-ASC	0.264	0.001	D		D		D		< LOD
22-ASC	D		< LOD		D		< LOD		< LOD
23-ASA/G	0.437	0.003	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
24-ASA/G	< LOD		< LOD		D		< LOD		< LOD
25-ASA/G	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
26-ASA/G	D		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
27-ASA/G	< LOD		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
28-ASA/G	D		< LOD		< LOD		< LOD		< LOD
29-ARD1e	D		1.666	0.009	D		21.175	0.038	< LOD
30-ARD1s	D		1.471	0.011	D		7.963	0.043	< LOD
31-ARD2e	0.678	0.001	2.957	0.006	0.913	0.001	21.136	0.035	< LOD
32-ARD2s	D		1.255	0.004	0.526	0.001	9.381	0.029	< LOD
33-ARD3e	D		D		0.521	0.000	3.400	0.010	< LOD
34-ARD3s	0.324	0.001	D		1.281	0.005	2.748	0.011	< LOD
35-ARD4e	D		D		D		1.105	0.001	< LOD
36-ARD4s	0.300	0.001	D		0.648	0.002	1.248	0.001	D
37-ARH	< LOD		3.015	0.021	D		3.408	0.021	< LOD
38-ARM	D		D		D		D		< LOD
39-ARM	D		D		D		1.570	0.002	< LOD
40-ARM	3.545	0.386	D		3.046	0.010	1.230	0.002	< LOD

D - Η συγκέντρωση είναι υψηλότερη από το LOD, αλλά χαμηλότερη από το LOQ [για τις σουλφαδιαζίνη, ενροφλοξακίνη, τριμεθοπρίμη και αζιθρομυκίνη: LOD = 0.0005 και LOQ = 0.0025 ng/ml, ενώ για την αμοξικιλίνη 0.05 και 0.25 ng/ml, αντίστοιχα]

2.5. Διαπιστώσεις

2.5.1. Ποιοτικά αποτελέσματα

Όσον αφορά τους διερευνητικούς ποιοτικούς προσδιορισμούς, τα αποτελέσματα διαμορφώνουν αρκετά σαφείς χωρικές τάσεις όσον αφορά τη μεγάλη κλίμακα: ενώ στα δείγματα που προέρχονται από τη γαλλική επικράτεια δεν ανιχνεύεται πολύ περισσότερο από 1 είδος αντιβιοτικών ανά δείγμα, κατά μέσο όρο, στα δείγματα που προέρχονται από την ισπανική επικράτεια ο αριθμός αυτός υπερδιπλασιάζεται (2.4 είδη αντιβιοτικών ανά δείγμα, κατά μέσο όρο). Στην παραπάνω σύγκριση δε συμπεριλαμβάνονται τα δείγματα που αφορούν απόβλητα, μιας και εμπίπτουν σε άλλη κλίμακα ρύπανσης (~7 είδη αντιβιοτικών ανά δείγμα).

Η συχνότητα εμφάνισης των διάφορων κατηγοριών αντιβιοτικών, όπως καταγράφηκε παραπάνω, συμβαδίζει σε γενικά πλαίσια με τις διεθνείς τάσεις (Κεφάλαιο 1) στη εμφάνιση αντιβιοτικών στα επιφανειακά ύδατα: ότι, δηλαδή, οι πιο κοινώς απαντώμενες κατηγορίες αντιβιοτικών στα φυσικά ύδατα είναι οι διαμινοπυριμιδίνες (τριμεθοπρίμη), τα λινκοσαμίδια (λινκομυκίνη), οι μακρολίδες (ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη), οι κινολόνες (νορφλοξακίνη, σιπροφλοξακίνη, ενροφλοξακίνη, λεβοφλοξακίνη, μοξιφλοξακίνη), τα σουλφοναμίδια (σουλφαμεθοξαζόλη, σουλφαδιαζίνη, σουλφαμεθαζίνη, σουλφαπυριδίνη) και οι τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη, δαψόνη). Οι δύο συχνότερα εμφανιζόμενες ομάδες στα συγκεκριμένα δείγματα είναι οι κινολόνες και τα σουλφοναμίδια με τις πρώτες να κυριαρχούν στην εαρινή καμπάνια του 2018, και τα τελευταία να κυριαρχούν στις δύο επόμενες.

Όσον αφορά τα δείγματα που προέρχονται από την είσοδο και την έξοδο των εργοστασίων βιολογικών καθαρισμών, θα αναμέναμε τη μη ανίχνευση στην έξοδο κάποιων ειδών από αυτά που ανιχνεύονται στην αντίστοιχη είσοδο και κυρίως τη μη εμφάνιση νέων. Το πρώτο συμβαίνει σε πολλές περιπτώσεις και αποτελεί ένδειξη ορθής λειτουργίας των εργοστασίων αλλά και της αναλυτικής διαδικασίας. Το δεύτερο, από την άλλη, δε συμβαίνει πάντα και αποκτά ένα νόημα να διερευνηθούν οι λόγοι που κάτι τέτοιο συμβαίνει. Ένας λόγος είναι η μετατροπή ορισμένων ουσιών σε γνωστά κύρια προϊόντα αποδόμησής τους, π.χ. ενροφλοξακίνη → σιπροφλοξακίνη, κλαριθρομυκίνη → N-οξειδίο της κλαριθρομυκίνης. Ένας δεύτερος λόγος είναι η παρουσία ορισμένων ουσιών σε οριακά ανιχνεύσιμες ποσότητες, οι οποίες άλλοτε ξεπερνούν και άλλοτε όχι το όριο ανίχνευσης, συνυπολογίζοντας το εγγενές σφάλμα της δειγματοληψίας. Τέλος, ανεπιθύμητα ενδεχόμενα μπορούν να αποτελούν η προβληματική λειτουργία του βιολογικού καθαρισμού ή το εργαστηριακό σφάλμα.

2.5.2. Ποσοτικά αποτελέσματα

Η εποχική διακύμανση που παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις των αναλυτών που επιλέχθηκαν για την ποσοτική ανάλυση έρχεται σε συμφωνία με τα συνήθη κλιματικά πρότυπα. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις και για τις 4 ενώσεις, που ποσοτικοποιήθηκαν

επιτυχώς, παρατηρήθηκαν σε εαρινές δειγματοληπτικές καμπάνιες: για την ενροφλοξακίνη στην εαρινή καμπάνια του 2018, ενώ για τις σουλφαδιαζίνη, τριμεθοπρίμη και αζιθρομυκίνη στην εαρινή καμπάνια του 2019. Συνήθως, η τάση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι το φθινόπωρο οι βροχοπτώσεις, καθώς και τα υδάτινα ρεύματα από τα μεγαλύτερα υψόμετρα, είναι πλουσιότερα «αραιώνοντας» τα υπάρχοντα ύδατα των ποταμών, αν τα θεωρήσουμε για τη συγκεκριμένη περίπτωση ως «διαλύματα αντιβιοτικών» (Albanis et. al, 2003).

Δεν ήταν δυνατή κάποια άμεση συσχέτιση της ποσότητας των αντιβιοτικών – στόχων που ανιχνεύθηκαν με την καταγεγραμμένη ένταση της κτηνοτροφικής χρήσης της περιοχής. Το γεγονός αυτό επιδέχεται βαθύτερης υδρολογικής ανάλυσης της ροής των ποταμών μελέτης. Πρωτογενώς, αξίζει μία ακόμα αναφορά στο ενδεχόμενο μετατροπής αντιβιοτικών σε προϊόντα αποδόμησής τους κατά το ρου του ποταμού.

3. Καινοτόμες τεχνικές απομάκρυνσης των αντιβιοτικών

3.1. Εξελιγμένες πρακτικές αποδόμησης αντιβιοτικών

Η απομάκρυνση των αντιβιοτικών από κτηνοτροφικά απόβλητα μπορεί να επιτευχθεί μέσα από μια ποικιλία μηχανισμών αποδόμησης, συμπεριλαμβανομένων της φυσικοχημικής οξειδωσης, της φωτο-οξειδωσης (φωτόλυση), της βιο-οξειδωσης (μικροβιακή δραστηριότητα), και της προσρόφησης σε χώμα υγροτόπων και φυτά (διαθέσιμες οργανικές επιφάνειες). Οι μηχανισμοί απομάκρυνσης εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αντιβιοτικών (Choi κ.α., 2016). Στον Πίνακα 13 περιγράφεται μια σειρά τεχνικών αποδόμησης.

Πίνακας 13. Τεχνικές απομάκρυνσης αντιβιοτικών από υδατικά δείγματα

Αντιβιοτικά	Μέθοδος	Μηχανισμός	Προϊόντα αποδόμησης	Κόστος	Αποτελεσματικότητα	Αναφορά
AZT, TMP, OFX, SMX: αντιπροσωπεύουν διακριτές κατηγορίες και είναι μεταξύ των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών για τη θεραπεία ανθρώπινων και κτηνιατρικών ασθενειών	Ti ₂ O / UV-A	TMP: HO•/ CO ₃ •- OFX: απόβλητη οργανική ύλη - κατάσταση τριπλέτας (³ EfOM) AZT, SMX: απόβλητη οργανική ύλη - κατάσταση τριπλέτας (³ EfOM) / MeOH	Άγνωστα	Χαμηλότερο κόστος και υψηλότερη ενεργειακή αποδοτικότητα από τη UV-C και UV-B. 25g Ti ₂ O μπορούν να προμηθευθούν προς 112€ από το Sigma-Aldrich. Αξιολόγηση: Χαμηλό κόστος (Thiruvengkatachari et. al, 2008)	SMX, TMP: >90% (Cai και Hu, 2018) OFX: 89,3% (Peres κ.α., 2015) AZT: 100% (Babic κ.α., 2017) Μέσος όρος: 92,3% (4 ^η αποτελεσματικότερη)	Biancullio κ.α., 2019
AZT, CLAR (μακρολίδες), CFPX, OFX (κινολόνες), SMX, SFD, SFP (σουλφοναμίδια), TMP (διαμινοπυριμιδίνη), MTZ (νιτρο-ημιδαζόλη) και CLI (λινκοσαμίδιο)	PMS / UV-C [/ Fe(II)]	SO ₄ ²⁻ + αντιβιοτικά → προϊόντα + CO ₂ + H ₂ O OH ⁻ + αντιβιοτικά → προϊόντα + CO ₂ + H ₂ O	Προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι τα προϊόντα αποδόμησης και τα μονοπάτια για τους ίδιους αναλύτες (π.χ. SMX) ήταν διαφορετικά σε διάφορες οξειδωτικές διαδικασίες με SO ₄ ²⁻	25kg PMS μπορούν να αγοραστούν έναντι 510€, ενώ 1kg FeSO ₄ *7H ₂ O μπορεί να αγοραστεί έναντι 57,4€ από το Sigma-Aldrich. Αξιολόγηση: Μεσαίο κόστος (Ahmadi και Ghanbari, 2017)	CFPX: 96% MTZ: 92% TMP: 43% CLAR: 24% SMX: 26% SFP: 41% SFD: 95% AZT, OFX, CLI: 100% Μέσος όρος: 71,7% (8 ^η αποτελεσματικότερη)	Rodriguez-Chueca κ.α., 2019
Κτηνιατρικά αντιβιοτικά: ENR, CEF	Τεχνητός υγρότοπος (φυτά, κοινότητες βακτηριακών μικροοργανισμών)	Οι μηχανισμοί απομάκρυνσης μπορούν να είναι φυσικοί (προσρόφηση, φωτο-αποδόμηση, εξάερωση και ιζηματοποίηση), χημικοί (αποδόμηση και υδρόλυση) και βιολογικοί (βιο-αποδόμηση, και φυτο-	Άγνωστα	Αξιολόγηση: Χαμηλό κόστος (Li κ.α., 2014)	>85% - κάτω του LOD 1.6 μg/L για την ENR και 15μg/L για την CEF (6 ^η αποτελεσματικότερη)	Santos κ.α., 2019

		αποκατάσταση) (Garcia- Rodriguez κ.α., 2014)				
LIN, CFPX, CTC, ERY, CLAR, TCS (παρόντα σε δείγματα), AMX, OFX	Αναερόβια συν-χώνευση / PAC	Φυσική προσρόφηση σε PAC και απενεργοποιημένα βακτήρια	-	5kg ενεργοποιημένου άνθρακα μπορούν να αγοραστούν έναντι 274€ από το Sigma-Aldrich Αξιολόγηση: Υψηλό κόστος (Li κ.α., 2014)	>90% ~100% για την OFX (5 ^η αποτελεσματικότερη)	Zhang κ.α., 2019
SMX	Αποδόμηση σε αντιδραστήρα MFC - βιο-ηλεκτροχημικό σύστημα	Παράρτημα - Διάγραμμα 1	3A5MI - σταθερή, τοξική - εξουδετερώθηκε περαιτέρω ως εξαφάνισης μετά από 9 ώρες	Το Microbial H-Cell μπορεί να αγοραστεί έναντι 940\$ από το Fuel Cell Store Αξιολόγηση: Χαμηλό κόστος (Patra, 2008)	85% μέσα σε 12 ώρες (7 ^η αποτελεσματικότερη)	Wang κ.α., 2016
CAP (ρύπος προτεραιότητας στα απόβλητα ύδατα)	Βιο-ηλεκτροχημικό σύστημα: αναγωγή σε βακτηριακή βιο-κάθοδο με εφαρμοζόμενη τάση 0.5V	Παράρτημα - Διάγραμμα 2	AMCl ₂ → AMCl (μη τοξικό) Το ενδιάμεσο ακέτυλο-CAP εξαφανίζεται στιγμιαία	Αξιολόγηση: Χαμηλό κόστος (Yan κ.α., 2019)	87.1 ± 4.2% στις 4 ώρες, 96.0 ± 0.9% στις 24 ώρες (3 ^η αποτελεσματικότερη)	Liang κ.α., 2013
CAP (ρύπος προτεραιότητας στα απόβλητα ύδατα)	Βιο-ηλεκτροχημικό σύστημα: αναγωγή σε κάθοδο αφρού χαλκού με εφαρμοζόμενη τάση 0.3/0.5V	Παράρτημα - Διάγραμμα 3	Μονο- και διυδροξυλικά παράγωγα της CAP. Διάφορες προσβολές υδροξυλικών ριζών καταλήγουν στο σχηματικό CO ₂ και H ₂ O	Αυτό το μη επικαλυμμένο υλικό μπορεί να μειώσει δραματικά το κόστος. Ένα κομμάτι αφρού χαλκού 500mm x 500mm μπορεί να αγοραστεί έναντι 60\$ στο GICT. Αξιολόγηση: Χαμηλό Κόστος	100% σε 24 ώρες για εφαρμοζόμενη τάση 0.3V, 100% σε 12 ώρες για εφαρμοζόμενη τάση 0.5V (1 ^η αποτελεσματικότερη)	Wu κ.α., 2017

SFD (Τα σουλφοναμίδια είναι μια κατηγορία που χρησιμοποιείται ευρέως σε θεραπείες στον άνθρωπο και τα ζώα. Ανάμεσα σ' αυτά, η SFD δεν βιοδιασπάται εύκολα και βρίσκεται συχνά σε υδατικούς αποδέκτες)	Ακτινοβολία Γ / Διαδικασία Fenton [H ₂ O ₂ , Fe (II)]	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S + 36H ₂ O ₂ → 10CO ₂ + 38H ₂ O + 4HNO ₃ + H ₂ SO ₄	Τα οργανικά προϊόντα αποδόμησης οξειδώνονται περαιτέρω, όπως φαίνεται στην εξίσωση αριστερά	Το κόστος της διαδικασίας Fenton εκτιμάται περί τα 8640€ (Patil και Raut, 2014) Αξιολόγηση: Υψηλό Κόστος (Kurt et al., 2017)	Πλήρης απομάκρυνση (1 ^η αποτελεσματικότερη)	Rivas-Ortiz κ.α., 2017
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------	------------------------

Πίνακας 13 (συνέχεια)

Αντιβιοτικά και προϊόντα	Μέθοδος διαχωρισμού	Ανίχνευση	Προετοιμασία δειγμάτων	Αναφορά
AZT, TMP, OFX, SMX	UPLC με τη χρήση μιας συσκευής Shimadzu με μια στήλη Kinetex™ XB-C18 100 Å (100 × 2.1 mm i.d.; 1.7 μm διάμετρος σωματιδίων) που παρέχεται από τη Phenomenex, Inc. (Torrance, CA, USA). Θερμοκρασία κλίβανου στήλης και αυτόματου δειγματολήπτη: 35 και 4°C, αντίστοιχα.	MS/MS	Τα δείγματα συμπυκνώθηκαν και καθαρίστηκαν με SPE πριν την ανάλυση με UPLC-MS/MS, με τη χρήση φίλτρων OASIS® HLB για την εκχύλιση αντιβιοτικών από 100ml πραγματικών μη επεξεργασμένων αποβλήτων υδάτων	Bianculli κ.α., 2019
AZT, CLAR, CPF, OFX, SMX, SFD, SFP, TMP, MTZ, CLI	UPLC (Waters Corp. Mildford, MA, USA), στήλη Acquity HSS T3 (50 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 μm) (PI), στήλη Acquity BEH C18 column (50 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 μm(NI) (Waters)	5500QqLit, φασματόμετρο μάζας τριπλό τετράπολο-γραμμική παγίδα ιόντος (5500 QTRAP, Applied Bio-systems, Foster City, CA, USA) με Turbo V πηγή ψεκασμού ιόντων	Τα δείγματα συμπυκνώθηκαν με SPE. Το εκχύλισμα εξεαρώθηκε υπό ρεύμα αζώτου.	Rodriguez-Chueca κ.α., 2019
ENR, CEF	HPLC (Beckam Coulter System Gold)	DAD, module 168	Χρησιμοποιήθηκε προ-επεξεργασία με SPE	Santos κ.α., 2019

			για την ανάλυση δειγμάτων αποβλήτων υδάτων μετά από δύο διαδοχικές υπερηχητικές εκχυλίσεις (15 λεπτά έκαστη) με μίγμα μεθανόλης-ακετόνης (95:5).	
LIN, CPFX, CTC, ERY, CLAR, TCS, AMX, OFX	Acquity UPLC με στήλη Agilent Poroshell 120 EC-C18 (3.0x100mm, 2.7 μm)	Διαδοχική φασματομετρία μάζας	Τα δείγματα επεξεργάστηκαν με SPE	Zhang κ.α., 2019
SMX → 3A5MI	Hitachi L-2000 SMX: στήλη Phenomenex C18 (Luna, 4.6 x 250 mm, 5 mm). 3A5MI: στήλη Agilent (Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6 x 250 mm, 5 mm). Για τα προϊόντα αποδόμησης της SMX: UPLC (Waters, USA) με μια στήλη C18 (Acquity UPLC BEH C18, 2.1 x 100 mm, 1.7 mm).	Ανίχνευση UV στα 203 nm για την SMX και στα 200 nm για το 3A5MI. Ο ESI-Q-TOF/MS (Bruker, Γερμανία) χρησιμοποιήθηκε για τα προϊόντα αποδόμησης της SMX. Χρησιμοποιήθηκε θετικός και αρνητικός ιονισμός στον ESI για την ανάλυση των δειγμάτων.	Τα δείγματα αποβλήτων φιλτραρίστηκαν μέσω μιας μεμβράνης με μέγεθος πόρου 0.22mm πριν την ανάλυση.	Wang κ.α., 2016
CAP → AMCl ₂ , AMCl	Τα δείγματα αναλύθηκαν με χρήση RP LC (Agilent 1200), που πραγματοποιήθηκε σε στήλη Agilent Zorbax XDB C18 (1.8 μm, 2.1 x 100mm). Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου (26 ± 2°C).	Φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης σε τετράπολο (Agilent 6520) ανίχνευση με αρνητικό ιονισμό	Ο καθαρισμός των κύριων προϊόντων της CAP μέσω εκροής TLC της βιο-καθόδου ελήφθη στις 4 και 48 ώρες και εκχυλίστηκε με ανακίνηση με οξικό αιθυλεστέρα. Το πρώτο περιείχε κυρίως ακέτυλο-CAP και CAP	Liang κ.α., 2013

			ενώ το τελευταίο περιείχε κυρίως AMCl ₂ και AMCl.	
CAP → CO ₂ , H ₂ O	HPLC (1260, Agilent) με στήλη C18 (Gemini-NX 3 m, 110A, 100 x 2.0 mm, Phenomenex).	MS/MS (G6460C, Agilent) σε αρνητική πολικότητα	SPE (Stra-ta-X, Phenomenex Co. Singapore). Τα δείγματα φιλτραρίστηκαν μέσω φίλτρων 0.22mm.	Wu κ.α., 2017
SFD	HPLC (Shimadzu Prominence), Phenomenex Nucleoil με στήλη C18 (125 x 4.0 mm, 5 μm) Θερμοκρασία: 30°C	UV/Ορατό DAD (μονιτέλο SPD-M20A)	-	Rivas-Ortiz κ.α., 2017

Όπως φαίνεται στην πρώτη σειρά του Πίνακα 13 (Biancullu et al., 2019), η επεξεργασία με Ti₂O υπό ακτινοβολία UV, είναι μια μέθοδος απομάκρυνσης αντιβιοτικών που αφορά ποικιλία σημαντικών, όσον αφορά την εμφάνισή τους στα φυσικά ύδατα, κατηγοριών των ουσιών αυτών (μακρολίδες, διαμινοπυριμιδίνες, κινολόνες, σουλφοναμίδια). Παράλληλα, η αποτελεσματικότητά της είναι σχετικά υψηλή και το κόστος της αρκετά χαμηλό. Επομένως, τεκμηριώνεται και η χρήση της στο παρόν μέρος αυτής της εργασίας. Επίσης, είναι μια τεχνική με χημική και βιολογική σταθερότητα και ασφάλεια. Την τελευταία δεκαετία, οι εξελίξεις στη νανοτεχνολογία επέτρεψαν την ανάπτυξη νέων προϊόντων βασισμένων στο TiO₂, τα οποία αύξησαν σημαντικά την αποτελεσματικότητά του. Ο μηχανισμός της φωτο-επαγόμενης ενεργοποίησης το διοξειδίου του τιτανίου παρουσία ρύπων (M) δίνεται στην Εικόνα 1 του παραρτήματος.

Η τεχνολογία αυτή δεν χρησιμοποιείται σε πραγματική κλίμα. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω του κόστους, καθώς και των περιορισμών που αφορούν τον τρόπο εφαρμογής. Κατ' αυτή την έννοια, το TiO₂ είναι μια ουσία που δεν μπορεί να απορριφθεί στο περιβάλλον μετά τη επεξεργασία, λόγω του περιβαλλοντικού κινδύνου. Σε αυτό το πλαίσιο, η ανάπτυξη τεχνολογιών που να επιτρέπουν τη μόνιμη σταθεροποίηση ή την άμεση απομάκρυνσή του από το νερό είναι το κλειδί για τα κύρια λειτουργικά προβλήματα που υπάρχουν επί του παρόντος.

Όσον αφορά τη συγκεκριμένη μέθοδο επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκε, αποτελούταν από τα εξής τρία στάδια:

A) ένα πρώτο στάδιο φωτοκαταλυτικής αντίδρασης του υδατικού μέσου παρουσία φωτοκαταλύτη αποτελούμενου από νανοσωματίδια TiO_2 , όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση σε αναδευμένο αντιδραστήρα με επαρκή φωτισμό για να πραγματοποιηθεί η κατάλυση. Με αυτό τον τρόπο, το υδατικό μέσο έρχεται σε άμεση επαφή με τα νανοσωματίδια TiO_2 που έχουν ενεργοποιηθεί μέσω του φωτισμού, οξειδώνουν και διασπούν τους οργανικούς ρύπους ως μετατροπής τους σε H_2O και CO_2 . Η συγκέντρωση του καταλύτη ορίζεται σε 0.5 and 2.5 g/L, και προτιμότερα μεταξύ 1 και 2 g/L.

B) Εφ' όσον η αντίδραση έχει ολοκληρωθεί, λαμβάνει χώρα ένα στάδιο φυσικού διαχωρισμού των νανοσωματιδίων, προτιμότερα με βαρυτική καθίζηση. Η διαδικασία αυτή διαρκεί μεταξύ 15 και 100 λεπτών.

Γ) Το απολυμασμένο μέσο απομακρύνεται και τα νανοσωματίδια επιστρέφουν στον αντιδραστήρα για επανάχρηση, προκειμένου να επαναχρησιμοποιηθούν ως φωτοκαταλύτης. Η απομάκρυνση του υπερκείμενου γίνεται αργά για να αποφευχθεί ο επαναδιασκορπισμός του ιζήματος.

Χάρη στην περιγραφόμενη διαδικασία, είναι δυνατή η ανάκτηση τουλάχιστον 95% των νανοσωματιδίων προς επανάχρηση. Η επανάχρηση αυτή μέχρι και για 100 φορές των νανοσωματιδίων μειώνει τα λειτουργικά κόστη και εξασφαλίζει ότι δεν μένουν στο μέσο που λαμβάνουμε, εξαφανίζοντας το περιβαλλοντικό κόστος που θα εισήγαγε η διατήρησή τους σε αυτό. Επίσης, παρόμοια αποτελέσματα έχουμε και λόγω της αποφυγής χρήσης χημικών προϊόντων, π.χ. χλωρίωση, διαδικασία ενεργού άνθρακα, και άλλων σύνθετων διαδικασιών. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι η συγκεκριμένη τεχνική είναι αποτελεσματική όσον αφορά την απομάκρυνση και άλλων κοινών ρύπων προτεραιότητας όπως το αμμώνιο ή το *Escherichia coli* (Spanish Patent No. ES2585087, 2017).

3.2. Ανάλυση των επεξεργασμένων δειγμάτων

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε, λοιπόν, για την απομάκρυνση αντιβιοτικών ενδιαφέροντος ήταν η ετερογενής φωτο-καταλυτική επεξεργασία των πρότυπων δειγμάτων με τη χρήση διοξειδίου του τιτανίου (Ti_2O) και ακτινοβολίας UV (Εικόνα 6). Η αρχική συγκέντρωση των αντιβιοτικών, εκτός από όπου σημειώνεται διαφορετικά παρακάτω, ήταν 1000 μ g/L. Ο αρχικός όγκος του δείγματος ήταν 200 ml. Η συγκέντρωση του Ti_2O ήταν 1g/L, ενώ η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C. Οι χρόνοι κατά τους οποίους ελήφθησαν δείγματα, εκτός από όπου σημειώνεται διαφορετικά παρακάτω, ήταν 0, 10, 30, 60 και 120 λεπτά μετά την έναρξη της επεξεργασίας.



Εικόνα 6. Ενόργανη διάταξη επεξεργασίας των πρότυπων διαλυμάτων αντιβιοτικών

Επομένως, όσον αφορά την 1^η καμπάνια επεξεργασμένων δειγμάτων, τα δείγματα με την ένδειξη M9 εμβολιάστηκαν με 100μg/L για κάθε έναν από τους αναλύτες του Πίνακα 1 και ελήφθησαν δείγματα στα 0, 20, 60, 120, 240 και 1440 λεπτά μετά την έναρξη της επεξεργασίας. Τα δείγματα με την ένδειξη E_M εμβολιάστηκαν με ενροφλοξακίνη, ενώ τα δείγματα με την ένδειξη E_B εμβολιάστηκαν με 100μg/L ενροφλοξακίνης και ελήφθησαν δείγματα στα 0, 20, 60, 120, 240 και 1440 λεπτά μετά την έναρξη της επεξεργασίας. Τα δείγματα με την ένδειξη D εμβολιάστηκαν με δοξυκυκλίνη. Τα δείγματα με την ένδειξη H εμβολιάστηκαν με υγρομυκίνη. Τα δείγματα με την ένδειξη T εμβολιάστηκαν με τυλοσίνη. Τα δείγματα με την ένδειξη AP εμβολιάστηκαν με απραμυκίνη. Τα δείγματα με την ένδειξη AX εμβολιάστηκαν με αμοξικιλίνη. Τα δείγματα με την ένδειξη L εμβολιάστηκαν με λινκομυκίνη. Τα δείγματα με την ένδειξη S εμβολιάστηκαν με σουλφαδιαζίνη. Τα δείγματα με την ένδειξη P εμβολιάστηκαν με πενικιλίνη G.

Οι μετρήσεις της 1^{ης} καμπάνιας επεξεργασμένων δειγμάτων έλαβαν χώρα για δείγματα νερού που εμβολιάστηκαν με αντιβιοτικά και έπειτα επεξεργάστηκαν από το UNIZAR και τη NILSA (Πίνακας 14). Η ανάλυση έγινε με τον ίδιο τρόπο που έγινε και η ποσοτικοποίηση των αναλυτών για τα δείγματα φυσικών υδάτων, με τη διαφορά ότι απουσίαζε το στάδιο της προσυγκέντρωσης. Υπολογίζοντας και την πενταπλή αραίωση, ο τελικός παράγοντας προσυγκέντρωσης ήταν 1/5 (0.2). Οι αναλύτες συμπεριέλαβαν 9 αντιβιοτικά από την αρχική λίστα (βλ. Πίνακας 3). Σχετικά ικανοποιητικά δεδομένα ελήφθησαν για 5 από αυτά: πενικιλίνη G, ενροφλοξακίνη, σουλφαδιαζίνη, λινκομυκίνη και τυλοσίνη. Ως σχετικά ικανοποιητικά δεδομένα θεωρούμε εκείνα για τα οποία:

- η αρχική συγκέντρωση των αντιβιοτικών - στόχων βρέθηκε εντός του αναμενόμενου εύρους
- μπορεί να παρατηρηθεί μείωση της συγκέντρωσης του/των αναλύτη/υτών με την αύξηση του χρόνου επεξεργασίας.

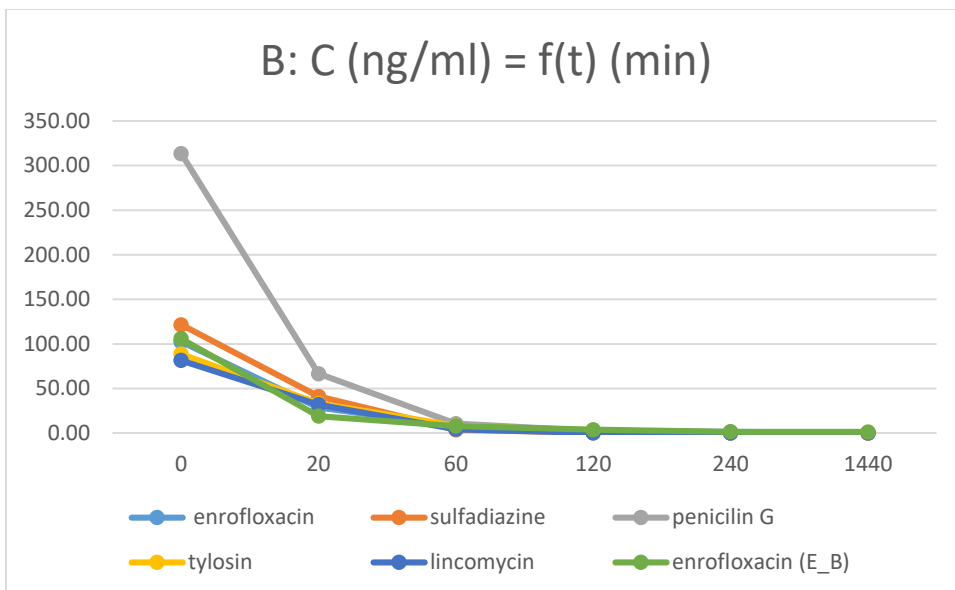
Πίνακας 14. Ποσοτικά αποτελέσματα για τα επεξεργασμένα δείγματα νερού (1^η καμπάνια)

	ΕΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗ [ng/ml]		ΥΓΡΟΜΥΚΙΝΗ [ng/ml]		ΕΝΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗ [ng/ml]		ΤΥΛΟΣΙΝΗ [ng/ml]		ΠΕΝΙΚΙΛΙΚΗ G [ng/ml]		ΔΙΝΚΟΜΥΚΙΝΗ [ng/ml]	
	C	SD	C	SD	C	SD	C	SD	C	SD	C	SD
M9_B_t0_T1_FC_NILSA	121.42	5.20			102.40	11.70	88.70	4.25	313.47	7.00	81.55	38.35
M9_B_t20_T1_FC_NILSA	41.20	0.95			28.76	3.10	33.31	1.30	66.65	3.25	32.06	10.50
M9_B_t60_T1_FC_NILSA	3.87	0.20			7.97	0.40	8.08	0.35	10.70	2.05	4.36	1.00
M9_B_t120_T1_FC_NILSA	0.34	0.05			2.82	0.20	2.90	0.10	2.64	1.15	0.24	0.15
M9_B_t240_T1_FC_NILSA	< LOD				1.30	0.05	1.11	0.05	< LOD		< LOD	
M9_B_t1440_T1_FC_NILSA	< LOD				0.65	0.05	0.30	0.05	< LOD		< LOD	
E_M_t0_FC_NILSA					1369.81	3.90						
E_M_t10_FC_NILSA					369.40	0.35						
E_M_t30_FC_NILSA					108.81	0.10						
E_M_t60_T1_FC_NILSA					80.49	0.10						
E_M_t120_T1_FC_NILSA					40.07	0.35						
E_B_t0_T1_FC_NILSA					105.95	11.15						
E_B_t20_T1_FC_NILSA					19.08	1.30						
E_B_t60_T1_FC_NILSA					7.98	0.25						
E_B_t120_T1_FC_NILSA					3.82	0.05						
E_B_t240_T1_FC_NILSA					1.54	0.05						
E_B_t1440_T1_FC_NILSA					1.25	0.05						
H_M_t0_FC_UZ			20.31	0.10								
H_M_t10_FC_UZ			< LOD									
H_M_t30_FC_UZ			< LOD									
H_M_t60_FC_UZ			< LOD									
H_M_t120_FC_UZ			< LOD									
T_M_t0_FC_UZ							791.92	0.70				
T_M_t10_FC_UZ							150.30	0.70				
T_M_t30_FC_UZ							33.01	0.05				
T_M_t60_FC_UZ							10.61	0.40				
T_M_t120_FC_UZ							5.86	0.05				
L_M_t0_FC_UZ											638.64	40.85
L_M_t10_FC_UZ											118.85	4.45
L_M_t30_FC_UZ											4.00	0.10
L_M_t60_FC_UZ											< LOD	
L_M_t120_FC_UZ											< LOD	
S_M_t0_FC_UZ	901.99	5.15										
S_M_t10_FC_UZ	95.96	0.25										
S_M_t30_FC_UZ	8.63	0.10										
S_M_t60_FC_UZ	12.56	0.55										
S_M_t120_FC_UZ	< LOD											
P_M_t0_FC_UZ									1119.68	6.60		
P_M_t10_FC_UZ									160.20	3.10		
P_M_t30_FC_UZ									25.59	1.25		
P_M_t60_FC_UZ									20.04	1.15		
P_M_t120_FC_UZ									< LOD			

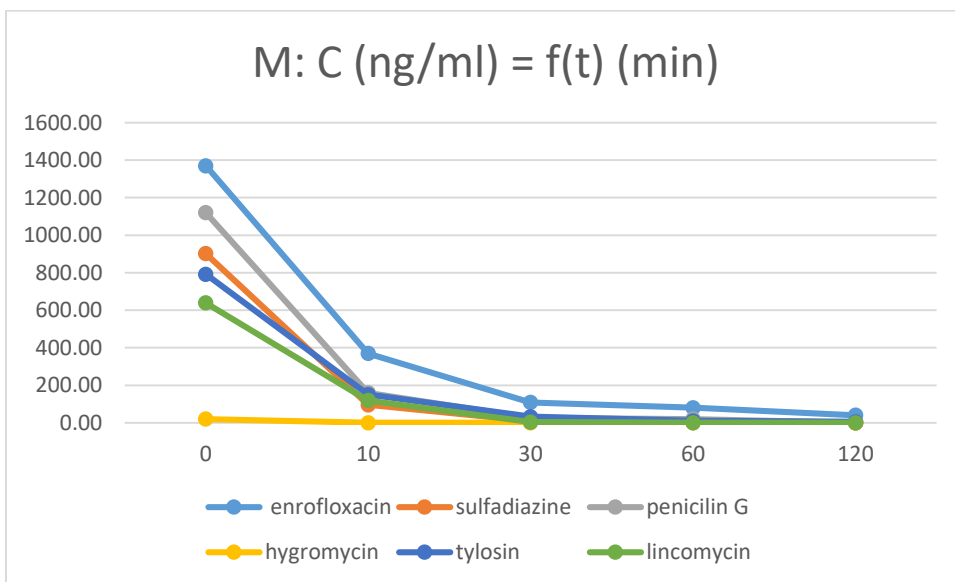
Από την άλλη πλευρά, τέσσερις ουσίες ενδιαφέροντος δεν ανιχνεύθηκαν (δοξυκυκλίνη, αμοξικιλίνη, απραμυκίνη) ή ανιχνεύθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα (υγρομυκίνη).

- Η δοξυκυκλίνη δεν μπόρεσε να ανιχνευθεί σε κανένα από τα δείγματα που ελήφθησαν από το UNIZAR και τη NILSA, παρά το γεγονός ότι η ανάκτηση της συγκεκριμένης ένωσης στα πρότυπα διαλύματα ήταν ικανοποιητική.
- Η ποσοτικοποίηση της αμοξικιλίνης δεν ήταν ικανοποιητική στα εξεταζόμενα δείγματα. Εκτός από την αμοξικιλίνη, κάποια προϊόντα οξειδωσής, όπως η δικετοπιπεραζίνη, το πενικιλοϊκό οξύ και το πενιλοϊκό οξύ αμοξικιλίνης, έγιναν ορατά. Οι β-λακτάμες χαρακτηρίζονται δομικά από τον β-λακταμικό δακτύλιο, που είναι ευαίσθητος στη διάσπαση από υψηλές θερμοκρασίες, φως, ακραία pH, μεταλλικά ιόντα, και οξειδωτικούς ή αναγωγικούς παράγοντες (Deshpande, 2004), καθώς και από ενζυματική και βιολογική αποδόμηση. Επομένως, είναι αναμενόμενα χαμηλά επίπεδα περιβαλλοντικής έκθεσης των β-λακταμών, παρά την υψηλή κατανάλωσή τους (Mitchell κ.α., 2014). Παρότι η υδρόλυση του β-λακταμικού δακτυλίου μειώνει την αντιβιοτική δραστηριότητα, η ταυτοποίηση των προϊόντων μετατροπής και η μελέτη της εμφάνισης, της πορείας, της αποτελεσματικότητας, αλλά και της αντοχής του στο περιβάλλον είναι απαραίτητες για μια ορθή εκτίμηση κινδύνου (Längin κ.α., 2009, Mompelat κ.α., 2009).
- Αμινογλυκοσίδες: η απραμυκίνη δεν βρέθηκε σε κανένα δείγμα, ενώ η υγρομυκίνη βρέθηκε μόνο σε ένα δείγμα (t_0) σε πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση από την αναμενόμενη.

Η εξεταζόμενη μέθοδος αποδείχθηκε εξαιρετικά αποδοτική κατά την 1^η καμπάνια επεξεργασμένων δειγμάτων, μιας και υπήρχε σχεδόν πλήρης απομάκρυνση των αναλυτών μέσα στις πρώτες 2 ώρες (Διαγράμματα 7 και 8). Στο M9 παρατηρήθηκε απομάκρυνση των αντιβιοτικών σε ποσοστό 96,7–99,7% μέσα σε 120 λεπτά. Στο E_B παρατηρήθηκε απομάκρυνση 96,5% μέσα σε 120 λεπτά. Στα υπόλοιπα δείγματα, παρατηρήθηκε απομάκρυνση από 97,1% ως 100% μέσα στις 2 πρώτες ώρες.



Διάγραμμα 7. Συγκέντρωση αναλυτών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας στα δείγματα με ένδειξη B (διάρκεια επεξεργασίας: 1440 λεπτά)



Διάγραμμα 8. Συγκέντρωση αναλυτών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας στα δείγματα με ένδειξη M (διάρκεια επεξεργασίας: 120 λεπτά)

Όσον αφορά τη 2^η καμπάνια επεξεργασμένων δειγμάτων, τα δείγματα με την ένδειξη M5 εμβολιάστηκαν με όλους τους αναλύτες του Πίνακα 5. Τα δείγματα με την ένδειξη E εμβολιάστηκαν με ενροφλοξακίνη. Τα δείγματα με την ένδειξη AZ εμβολιάστηκαν με αζιθρομυκίνη. Τα δείγματα με την ένδειξη AX εμβολιάστηκαν με αμοξικιλίνη. Τα δείγματα με την ένδειξη S εμβολιάστηκαν με σουλφαδιαζίνη. Τα δείγματα με την ένδειξη T εμβολιάστηκαν με τριμεθοπρίμη. Η ισχύς της ακτινοβολία ορίστηκε στα 500 Watt/m², ενώ η επεξεργασία πραγματοποιήθηκε σε ηλιακό θάλαμο.

Οι μετρήσεις της 2^{ης} καμπάνιας επεξεργασμένων δειγμάτων έλαβαν χώρα για δείγματα νερού που εμβολιάσθηκαν με αντιβιοτικά και έπειτα επεξεργάστηκαν από το UNIZAR και τη NILSA (Πίνακας 15). Οι αναλύτες συμπεριέλαβαν 5 αντιβιοτικά από την τροποποιημένη λίστα (βλ. Πίνακας 9).

Πίνακας 15. Ποσοτικά αποτελέσματα για τα επεξεργασμένα δείγματα νερού (2^η καμπάνια)

	ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗ [ng/ml]		ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ [ng/ml]		ΕΝΡΟΦΛΟΞΑΚΙΝΗ [ng/ml]		ΑΖΙΘΟΜΥΚΙΝΗ [ng/ml]		ΑΜΟΞΙΚΙΛΙΚΗ [ng/ml]	
	C	SD	C	SD	C	SD	C	SD	C	SD
MIX_T0	1791.28	1.29	1882.17	1.55	1187.19	0.02	1338.21	2.79	1086.66	7.77
MIX_T10	407.98	0.04	742.18	0.51	9.56	0.00	849.91	0.18	< LOQ	
MIX_T30	< LOQ		15.16	0.02	< LOQ		221.24	0.30	< LOQ	
MIX_T60	< LOQ		< LOQ		< LOQ		33.05	0.01	< LOQ	
MIX_T120	< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ		< LOQ	
AMX_T0									818.98	3.55
AMX_T10									< LOQ	
AMX_T30									< LOQ	
AMX_T60									< LOQ	
AMX_T120									< LOQ	
ENR_T0					1066.99	2.33				
ENR_T10					9.31	0.00				
ENR_T30					< LOQ					
ENR_T60					< LOQ					
ENR_T120					< LOQ					
SLD_T0	1145.06	1.29								
SLD_T10	334.43	0.04								
SLD_T30	< LOQ									
SLD_T60	< LOQ									
SLD_T120	< LOQ									
TRM_T0			1721.22	0.12						
TRM_T10			120.17	0.08						
TRM_T30			< LOQ							
TRM_T60			< LOQ							
TRM_T120			< LOQ							
AZT_T0							794.76	1.17		
AZT_T10							347.022	0.19		
AZT_T30							100.80	0.11		
AZT_T60							22.32	0.00		
AZT_T120							< LOQ			

Η εξεταζόμενη μέθοδος αποδείχθηκε εξαιρετικά αποδοτική και στη 2^η καμπάνια επεξεργασμένων δειγμάτων, μιας και υπήρχε σχεδόν πλήρης απομάκρυνση των αναλυτών μέσα στην πρώτη ώρα. Στο M5 παρατηρήθηκε απομάκρυνση των αντιβιοτικών σε ποσοστό 97,5-100% μέσα σε 60 λεπτά.

Στα υπόλοιπα δείγματα, παρατηρήθηκε απομάκρυνση από 97,2% ως 100% μέσα στην πρώτη ώρα.

Η συγκεκριμένη μεθοδολογία απομάκρυνσης των αντιβιοτικών ενδιαφέροντος μένει να ελεγχθεί και σε πραγματικές συνθήκες. Για το σκοπό αυτό, σε επόμενα βήματα του έργου *Outbiotics*, προβλέπεται ο έλεγχος της αποδοτικότητας της συγκεκριμένης μεθόδου και σε πραγματικά δείγματα από συνεργαζόμενα με το πρόγραμμα ΡΟΤΕΦΑ εργοστάσια βιολογικού καθαρισμού.

4. Μελλοντικές προοπτικές και τάσεις

4.1. Το έργο Outbiotics

Βάσει όσων αναφέρθηκαν και εισαγωγικά, αξίζει να δούμε κατά πόσο το ζήτημα της AMR είναι ένα ζήτημα το οποίο απασχολεί τη διεθνή κοινότητα. Το 2014, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας δηλώνει ότι η αύξηση του αριθμού των αντιστάσεων έναντι των αντιβιοτικών αποτελεί απειλή για την αποτελεσματικότητα μεγάλου αριθμού φαρμάκων. Το 2015 ξεκίνησε ένα παγκόσμιο έργο συνεργασίας του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, του FAO και του Παγκόσμιου Οργανισμού για την Υγεία των Ζώων με σκοπό την καταπολέμηση της AMR. Το Σεπτέμβριο του 2016, η Γενική Συνέλευση των Ηνωμένων Εθνών αφιέρωσε μια συνάντηση στην AMR για να επαναλάβει τη δέσμευση των μελών της σε αυτό το πρόβλημα με άξονες τη βελτίωση της ευαισθητοποίησης και την ενθάρρυνση καινοτόμων λύσεων με όρους εναλλακτικών στα αντιβιοτικά. Σ' αυτή τη λογική και το έργο OUTBIOTICS, κατέγραψε ως στόχο του τη εξάλειψη των αντιβιοτικών από τα ύδατα της περιοχής POCTEFA.

Εκτός από την απομάκρυνση των αντιβιοτικών από τα φυσικά ύδατα μέσω της επεξεργασίας των αποβλήτων, στο έργο Outbiotics του προγράμματος POCTEFA πραγματοποιούνται και άλλες δράσεις που αφορούν άλλα στάδια στη διαδρομή των ουσιών αυτών προς τους υδατικούς αποδέκτες. Μια από τις βασικές του δράσεις είναι η προσπάθεια να μειωθεί ή και να πάψει εντελώς η κατανάλωση τους με την υποκατάστασή της δράσης τους με βακτηριοκτόνα νανο-υλικά και νανο-σωματίδια με πυρήνα αργύρου. Οι δράση αυτή πραγματοποιείται με δοκιμές εναλλακτικών «φαρμάκων» σε φάρμες της περιοχής μελέτης, παράλληλα με τα πειράματα που αφορούσαν φιλτράρισμα αποβλήτων. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν μελέτες για τη διαχείριση της αγροτικής (συμπεριλαμβανομένης και της κτηνοτροφικής) γης με γνώμονα τη μείωση της ρύπανσης των υδατικών αποδεκτών με αντιβιοτικά.

4.2. Ευρωπαϊκές πολιτικές και κατευθύνσεις

Τα περισσότερα αντιβιοτικά, που χρησιμοποιήθηκαν σε τοξικολογικές δοκιμές, βρέθηκαν σε γλυκά νερά και στις περισσότερες περιπτώσεις καταγράφηκε EC_{50} . Η μέση αποτελεσματική συγκέντρωση EC_{50} είναι η συγκέντρωση που προκαλεί μια επίδραση στους οργανισμούς δοκιμής που ανέρχεται σε 50% εντός μιας δεδομένης περιόδου έκθεσης σε σύγκριση με την αρχική κατάσταση, π.χ. μια συγκέντρωση που προκάλεσε 50% μείωση του βαθμού ανάπτυξης ενός πληθυσμού. Έτσι, η Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων κατηγοριοποιεί τα χημικά με EC_{50} μεταξύ 10 και 100 mg/L ως επιβλαβή, μεταξύ 1 και 10 mg/L ως τοξικά και κάτω του 1 mg/L ως πολύ τοξικό στους υδατικούς οργανισμούς. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι για τους μονοκύτταρους οργανισμούς το μέσο EC_{50} ήταν κάτω του 1 mg/L (δηλαδή τα αντιβιοτικά ήταν «πολύ τοξικά») και σε μερικές περιπτώσεις το EC_{50} μετρήθηκε σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις και μέσα στο εύρος που βρέθηκε ως ρύπανση ποταμών και ρεμάτων (Danner et. al, 2019). Επίσης, λαμβάνοντας υπόψη τη βιοδραστικότητα και τον πιθανό κίνδυνο που προκύπτει από την τοξικότητα των προϊόντων οξείδωσης των

αντιβιοτικών, έχει δοθεί προσοχή στα «μονοπάτια» που ακολουθούν οι διαδικασίες αποδόμησης των κοινώς χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών με σκοπό να εκτιμήσουμε την ασφάλεια των μεθόδων επεξεργασίας τους (Rodríguez-Chueca κ.α., 2019, Havelkova κ.α., 2016).

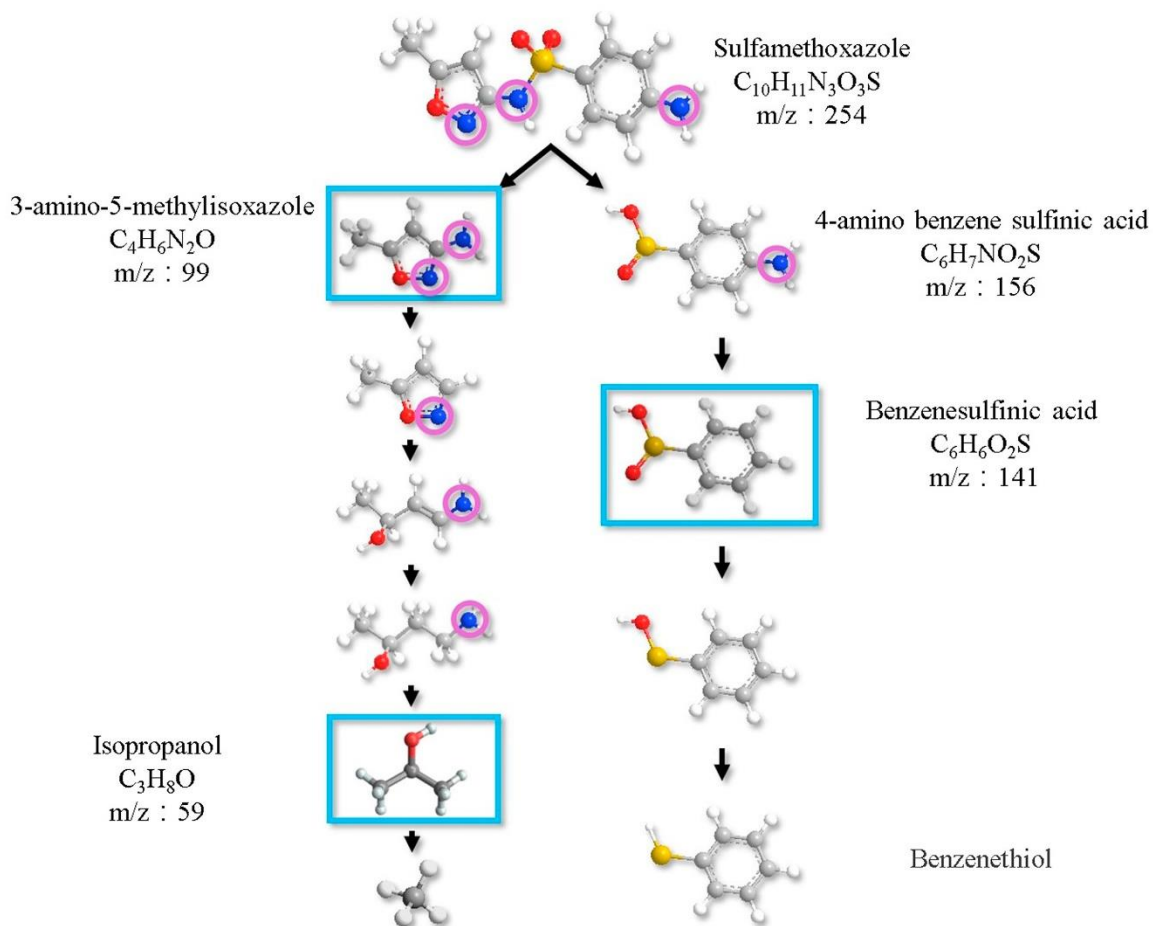
Η αποτελεσματική δράση κατά της αύξησης της AMR θα μετριάσει τον αρνητικό της αντίκτυπο στην οικονομία και συνεπώς μπορεί να θεωρηθεί συμβολή στην οικονομική ανάπτυξη, στους βιώσιμους προϋπολογισμούς της υγειονομικής περίθαλψης με τη μείωση του κόστους της και σε έναν παραγωγικό και υγιή πληθυσμό. Η ΕΕ αναγνώρισε γρήγορα τη σημασία της αντιμετώπισης της AMR, όπως δείχνει η κοινοτική στρατηγική του 2001 κατά της AMR. Η πολιτική αυτή ενισχύθηκε με το σχέδιο δράσης της Επιτροπής για το 2011, περιλαμβάνοντας την αξιοσημείωτη προσέγγιση της «One Health», η οποία ασχολείται με την AMR τόσο στους ανθρώπους όσο και στα ζώα. Από το 1999, η Επιτροπή έχει επενδύσει πάνω από 1,3 δισεκατομμύρια ευρώ στην έρευνα για την AMR, θέτοντας την Ευρώπη σε ηγετική θέση στον τομέα αυτό. Τα επιτεύγματα της ΕΕ περιλαμβάνουν τη δρομολόγηση του νέου προγράμματος ND4BB, της μεγαλύτερης δημόσιας-ιδιωτικής έρευνας στον τομέα της AMR στον κόσμο, που αποτελεί μέρος της πρωτοβουλίας για τα καινοτόμα φάρμακα (IMI). Η ΕΕ έχει επίσης θεσπίσει την πρωτοβουλία κοινού προγραμματισμού για την AMR (JPIAMR, η οποία αποσκοπεί στον καλύτερο συντονισμό και ευθυγράμμιση των ερευνητικών προσπαθειών στον τομέα της AMR σε παγκόσμιο επίπεδο. Παρά ταύτα, οι συχνότητες των λοιμώξεων που είναι ανθεκτικές στις θεραπείες γενικών φαρμάκων και στις θεραπείες τελευταίας προσφυγής έχουν αυξηθεί σημαντικά στην ΕΕ τα τελευταία χρόνια. Ταυτόχρονα, η ανακάλυψη, ανάπτυξη, κατασκευή και εμπορία νέων αντιμικροβιακών ουσιών έχει επιβραδυνθεί σημαντικά τα τελευταία 20 χρόνια. Τα ιστορικά δεδομένα δείχνουν χαμηλό ποσοστό επιτυχίας: μόνο 1 στα 16 αντιβιοτικά από την αρχική έρευνα φτάνει σε κλινική εφαρμογή για τους ασθενείς (European Commission, 2017). Επομένως, η αντιμετώπιση της αντίστασης στα αντιβιοτικά παραμένει σήμερα μία πρόκληση για την ευρωπαϊκή αλλά και τη διεθνή κοινότητα.

Παράρτημα

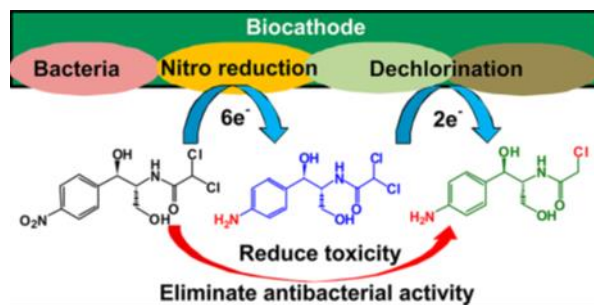
Πίνακας 1. Φασματομετρικά χαρακτηριστικά αναλυτών στην αρχική φάση εργασιών

Αναλύτης	Τάση φακού S (V)	Τάση ψεκασμού (V)	NCE (J)	RT (λεπτά)	1° Θραύσμα (m/z)	2° Θραύσμα (m/z)	Εύρος Σάρωσης (m/z)
Αμοξικιλίνη	50	3	10	2.14	349.0853	208.0426	50-390
Σουλφαδιαζίνη	70	4	30	2.98	156.0114	108.0444	50-275
Λινκομυκίνη	80	3	30	3.94	353.2177	126.1277	50-435
Ενροφλοξακίνη	90	3	30	4.44	316.1808	245.0327	50-385
Δοξυκυκλίνη	75	3	40	5.53	428.1340	410.1234	50-470
Πενικιλίνη G	55	3	15	5.94	176.0706	160.0426	50-360
Τυλοσίνη	80	3.5	25	6.15	772.4468	174.1125	50-955

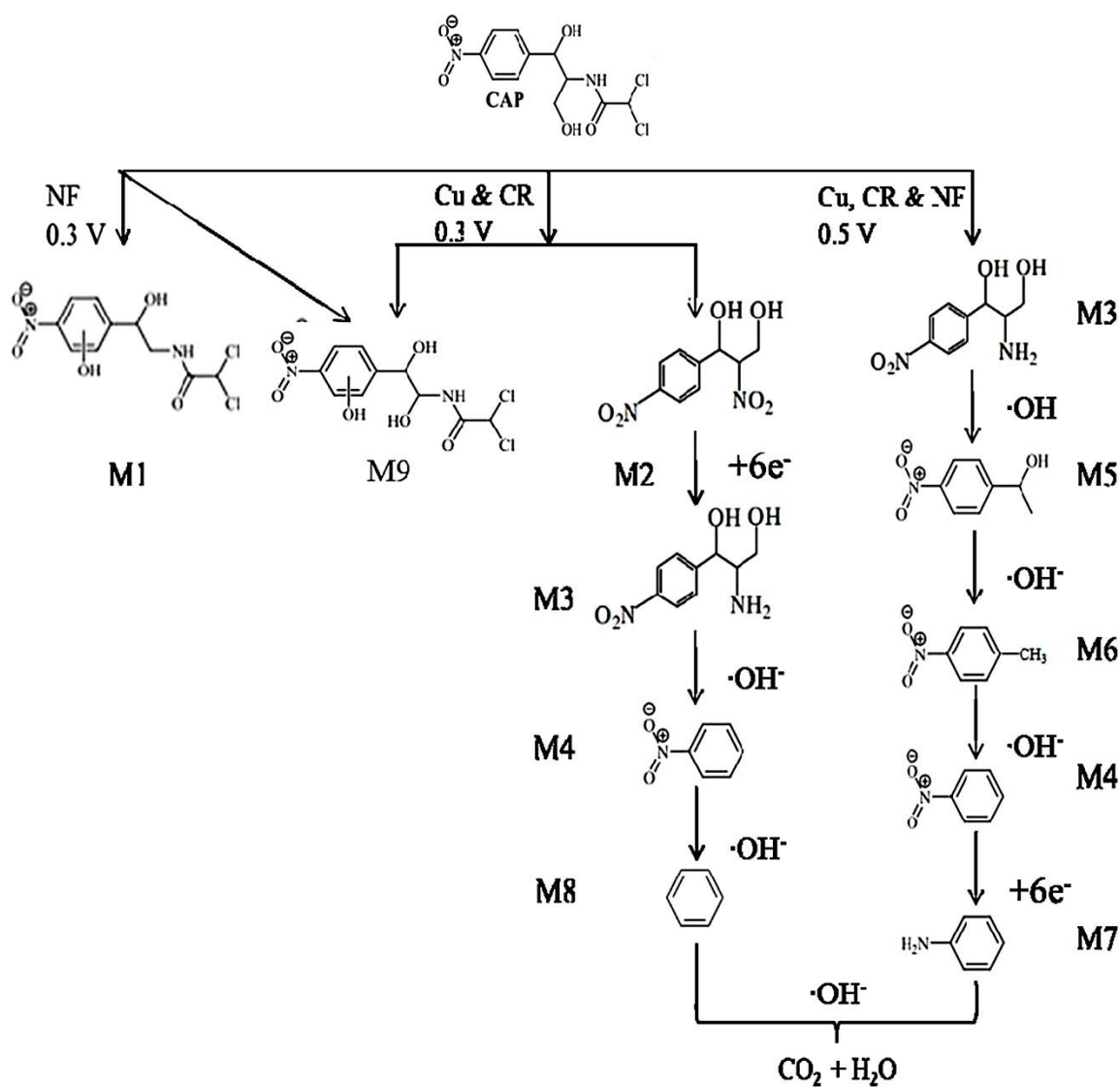
Διάγραμμα 1. Μονοπάτια αποδόμησης της σουλφαμεθοξαζόλης (Wang κ.α., 2016)



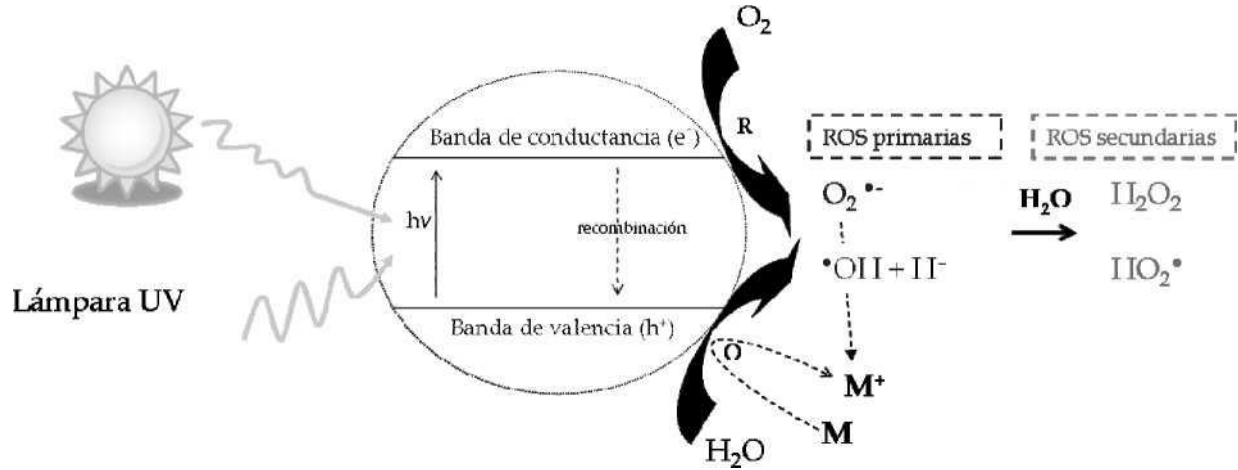
Διάγραμμα 2. Μηχανισμός αναγωγής χλωραμπενικόλης (Liang κ.α., 2013)



Διάγραμμα 3. Μονοπάτια αποδόμησης της χλωραμπενικόλης (Wu κ.α., 2017)



Εικόνα 1. Μηχανισμός της φωτο-επαγόμενης ενεργοποίησης του διοξειδίου του τιτανίου παρουσία ρύπων (M) (Orpenlander, 2003)



Όπου: lampara = λάμπα, banda de conductancia = ζώνη αγωγιμότητας, recombinación = ανασυνδυασμός, banda de valencia = ζώνη σθένους, ROS = ενεργοποιημένο οξυγόνο, primarias = πρωτογενώς, secundarias = δευτερογενώς

Βιβλιογραφία

1. Ahmadi, M., & Ghanbari, F. (2017). Combination of UVC-LEDs and ultrasound for peroxymonosulfate activation to degrade synthetic dye: influence of promotional and inhibitory agents and application for real wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(6), 6003-6014. doi: 10.1007/s11356-017-0936-8
2. Albanis, T., Lambropoulou, D., Sakkas, V., & Hela, D. (2003). Monitoring of priority pesticides using SPME (solid phase microextraction) in river water from Greece. *Water Science and Technology: Water Supply*, 3(1-2), 335-342. doi: 10.2166/ws.2003.0122
3. Babić, S., Čurković, L., Ljubas, D., & Čizmić, M. (2017). TiO₂ assisted photocatalytic degradation of macrolide antibiotics. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 6, 34-41. doi: 10.1016/j.cogsc.2017.05.004
4. Berendsen B., Elbers I., Stolker L. (2011). The stability of antibiotics in matrix and reference solutions determined using a straight-forward procedure applying mass spectrometric detection. *Food Additives and Contaminants*, 2011. doi:10.1080/19440049.2011.604045 <hal-00740779>
5. Biancullo, F., Moreira, N. F., Ribeiro, A. R., Manaia, C. M., Faria, J. L., Nunes, O. C., Silva, A. M. (2019). Heterogeneous photocatalysis using UVA-LEDs for the removal of antibiotics and antibiotic resistant bacteria from urban wastewater treatment plant effluents. *Chemical Engineering Journal*, 367, 304-313. doi: 10.1016/j.cej.2019.02.012
6. Božović, A., & Kulasingam, V. (2013). Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation: From small molecules to proteins. *Clinical Biochemistry*, 46(6), 444-455. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.09.024
7. Cai, Q., & Hu, J. (2018). Effect of UVA/LED/TiO₂ photocatalysis treated sulfamethoxazole and trimethoprim containing wastewater on antibiotic resistance development in sequencing batch reactors. *Water Research*, 140, 251-260. doi: 10.1016/j.watres.2018.04.053
8. Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736-757. doi:10.1016/j.envint.2016.06.025
9. Choi, Y., Kim, L., & Zoh, K. (2016). Removal characteristics and mechanism of antibiotics using constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 91, 85-92. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.01.058
10. Danner, M., Robertson, A., Behrends, V., & Reiss, J. (2019). Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. *Science of The Total Environment*, 664, 793-804. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.01.406
11. Deshpande, G. (2004). Overlapping mechanisms function to establish transcriptional quiescence in the embryonic

- Drosophila* germline. Development, 131(6), 1247-1257. doi: 10.1242/dev.01004
12. European Commission (2017). A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). Ανακτήθηκε από https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_action_plan_2017_en.pdf
 13. European Medicine Agency (2017). Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015: trends from 2010 to 2015: seventh ESVAC report. Ανακτήθηκε από https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/seventh-esvac-report-sales-veterinary-antimicrobial-agents-30-european-countries-2015_en.pdf
 14. Garcia-Rodríguez, A., Matamoros, V., Fontàs, C., & Salvadó, V. (2014). The ability of biologically based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants—a review. Environmental Science and Pollution Research, 21(20), 11708-11728. doi: 10.1007/s11356-013-2448-5
 15. Havelkova, B., Belkova, M., Kovacova, V., Hlavkova, D., Pikula, J. (2016). Ecotoxicity of selected antibiotics for organisms of aquatic and terrestrial ecosystems. Neuroendocrinology Letters, 37(1), 38-44. PMID: 28263529
 16. Kurt, A., Mert, B. K., Özengin, N., Sivrioğlu, Ö., & Yonar, T. (2017). Treatment of Antibiotics in Wastewater Using Advanced Oxidation Processes (AOPs). Physico-Chemical Wastewater Treatment and Resource Recovery. doi: 10.5772/67538
 17. Längin, A., Alexy, R., König, A., & Kümmerer, K. (2009). Deactivation and transformation products in biodegradability testing of β -lactams amoxicillin and piperacillin. Chemosphere, 75(3), 347-354. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.032
 18. Lasheas-Anon, A.-M., Gomez-Munoz, J., Bezdicek-Vondrackova, J., Prochazka, J. (2017). Spanish Patent No. ES2585087. Madrid, ACT: IP Spain.
 19. Li, Y., Zhu, G., Ng, W. J., & Tan, S. K. (2014). A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. Science of The Total Environment, 468-469, 908-932. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.09.018
 20. Liang, B., Cheng, H.-Y., Kong, D.-Y., Gao, S.-H., Sun, F., Cui, D., Lee, D.-J. (2013). Accelerated Reduction of Chlorinated Nitroaromatic Antibiotic Chloramphenicol by Biocathode. Environmental Science & Technology, 47(10), 5353-5361. doi: 10.1021/es400933h
 21. Mitchell, S. M., Ullman, J. L., Teel, A. L., & Watts, R. J. (2014). pH and temperature effects on the hydrolysis of three β -lactam antibiotics: Ampicillin, cefalotin and cefoxitin. Science of The Total Environment, 466-467, 547-555. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.06.027
 22. Mompelat, S., Bot, B. L., & Thomas, O. (2009). Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-

- products, from resource to drinking water. *Environment International*, 35(5), 803-814. doi: 10.1016/j.envint.2008.10.008
23. Oppenländer Thomas (2003). Photochemical purification of water and air. Weinheim: Wiley-VCH.
 24. Patil, A. D. & Raut, P. D. (2014). Treatment of textile wastewater by Fenton's process as a Advanced Oxidation Process. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(10), 29-32. doi: 10.9790/2402-081032932
 25. Patra, A. (2008). Low-Cost, Single-Chambered Microbial Fuel Cells for Harvesting Energy and Cleansing Wastewater.
 26. Rivas-Ortiz, I. B., Cruz-González, G., Lastre-Acosta, A. M., Manduca-Artiles, M., Rapado-Paneque, M., Chávez-Ardanza, A., Jáuregui-Haza, U. J. (2017). Optimization of radiolytic degradation of sulfadiazine by combining Fenton and gamma irradiation processes. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 314(3), 2597-2607. doi: 10.1007/s10967-017-5629-8
 27. Rodríguez-Chueca, J., Giustina, S. V., Rocha, J., Fernandes, T., Pablos, C., Encinas, Á, Marugán, J. (2019). Assessment of full-scale tertiary wastewater treatment by UV-C based-AOPs: Removal or persistence of antibiotics and antibiotic resistance genes? *Science of The Total Environment*, 652, 1051-1061. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.223
 28. Santos, F., Almeida, C. M. R. D., Ribeiro, I., Ferreira, A. C., & Mucha, A. P. (2019). Removal of veterinary antibiotics in constructed wetland microcosms - Response of bacterial communities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169, 894-901. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.11.078
 29. Thiruvenkatachari, R., Vigneswaran, S., & Naidu, R. (2008). Permeable reactive barrier for groundwater remediation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14(2), 145-156. doi: 10.1016/j.jiec.2007.10.001
 30. TOKU-E (n.d.). Antibiotic Solubility Data Table. Ανακτήθηκε από το <https://www.toku-e.com/Antibiotic-Solubility-Data-Table.aspx>
 31. United States Environmental Protection Agency (2007). Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2008_01_03_methods_method_1694.pdf.
 32. United States Environmental Protection Agency (2016). Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit, Revision 2. https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-12/documents/mdl-procedure_rev2_12-13-2016.pdf
 33. Wang, J., Zhuan, R., & Chu, L. (2019). The occurrence, distribution and degradation of antibiotics by ionizing radiation: An overview. *Science of The Total Environment*, 646, 1385-1397. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.415

34. Wang, L., Liu, Y., Ma, J., & Zhao, F. (2016). Rapid degradation of sulphamethoxazole and the further transformation of 3-amino-5-methylisoxazole in a microbial fuel cell. *Water Research*, 88, 322-328. doi: 10.1016/j.watres.2015.10.030
35. Yan, W., Xiao, Y., Yan, W., Ding, R., Wang, S., & Zhao, F. (2019). The effect of bioelectrochemical systems on antibiotics removal and antibiotic resistance genes: A review. *Chemical Engineering Journal*, 358, 1421-1437. doi: 10.1016/j.cej.2018.10.128