ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΓΙΓΝΕΣΘΑΙ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΓΙΩΡΓΟΣ ΦΑΣΟΥΛΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2006

UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF SCIENCE AND ENGINEERING
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

<A REVIEW OF THE OCCURANCE, THE FATE AND THE EFFECTS OF THE ANTIBIOTICS IN THE ENVIRONMENT>

GEORGIOS KONSTANTINOU FASOULAKIS

HERAKLION MAY 2006

Επιβλέπων Καθηγητής

Ευριπίδης Στεφάνου

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Τα Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής:

Ευριπίδης Στεφάνου

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Νικόλαος Μιχαλόπουλος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Σπυρίδων Περγαντής

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η Εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Επιστήμες και Μηχανική Περιβάλλοντος» στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ευριπίδη Στεφάνου, τον οποίο και ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση της μελέτης αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Περγαντή Σπύρο για τις καθοριστικές του υποδείξεις καθώς και τον καθηγητή κ. Μιχαλόπουλο Νικόλαο για την συμετοχή του ως μέλος στην εξεταστική μου επιτροπή.

Ευχαριστώ τον Δρ. Αντώνη Κουβαράκη και την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Αποστολάκη για την προθυμία τους να με βοηθήσουν όποτε το χρειάστηκα.

Επίσης πολύ ευχαριστώ την φίλη μου Χνάρη Μάγδα για την βοήθειά της στην δακτυλογράφηση του κειμένου και την καλή μου φίλη Παπαδάκη Μαρία, φιλόλογο, για τις υποδείξεις της.

Τέλος ιδιαίτερα ευχαριστώ την σύζυγό μου Ελπίδα που παρά τη δοκιμασίαπου περνά στην υγεία της δεν έπαψε στιγμή να με στηρίζει.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών χορηγούνται ετησίως για την θεραπεία ανθρώπων και ζώων για ασθένειες και μολύνσεις. Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται επίσης συχνά σε υπο-θεραπευτικά επίπεδα στην κτηνοτροφία, για την πρόληψη ασθενειών και την αύξηση της παραγωγής.

Περίπου 90% των χορηγουμένων αντιβιοτικών μπορούν να απεκκριθούν χωρίς να υποστούν μεταβολισμό και λόγω ατελέσφορης επεξεργασίας απομάκρυνσης ή ακατάλληλης διάθεσης αυτά μπορούν να καταλήξουν στο υδρόβιο περιβάλλον μέσω υγρών αποβλήτων και γεωργικών απορροών.

Η μόλυνση των υδρόβιων συστημάτων από τα αντιβιοτικά θα μπορούσε να διαταράξει τη μικροβιακή οικολογία, να αυξήσει τον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά παθογόνων, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν απειλή για την ανθρώπινη υγεία.

Η παρουσία αντιβιοτικών στο υδρόβιο περιβάλλον παρουσιάζει επίσης προκλήσεις για τη βιομηχανία ύδατος ιδιαίτερα στα ζητήματα της επαναχρησιμοποίησης ύδατος και του προγραμματισμού των υδάτινων πόρων.

Αποτελέσματα πρόσφατων μελετών δείχνουν την παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών στα αστικά απόβλητα και στα επιφανειακά ύδατα αλλά λίγα είναι πράγματι γνωστά για την κατανομή τους στο περιβάλλον, την κινητικότητα και την ανθεκτικότητά τους στα φυσικά και τεχνητά συστήματα ύδατος.

Αν και οι πληροφορίες είναι περιορισμένες, μελέτες στον μετασχηματισμό και την προσρόφηση των αντιβιοτικών δείχνουν ότι αυτές οι διαδικασίες έχουν σημαντικές επιπτώσεις στο γίγνεσθαι των περισσότερων κατηγοριών αντιβιοτικών.

Παρα ταύτα η παρουσία αντιβιοτικών (ng/l) είναι δεδομένη για όλα τα υδατικά διαμερίσματα, χωρίς ευτυχώς να αποτελούν απειλή για την ανθρώπινη υγεία ή τους υδρόβιους οργανισμούς, τουλάχιστον προς το παρόν.

Με βάση τα ανωτέρω θα παρουσιάσουμε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση της παρουσιας, του γίγνεσθαι και των πιθανών επιδράσεων των αντιβιοτικών στο περιβάλλον μαζί με τις αναλυτικές στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό τους.

ABSTRACT

Large quantities of antibiotics are administered to humans and animals every year to treat diseases and infection. Antibiotics are also commonly used at sub-therapeutic levels to livestock to prevent diseases and promote growth.

About 90% of the administered antibiotics can be excreted without undergoing metabolism and due to ineffective treatment removal or improper disposal they may end up into the aquatic environment via wastewater effluent and agriculture runoff.

Contamination of aquatic systems by antibiotics could perturb microbial ecology, increase the proliferation of antibiotic-resistant pathogens, and could pose threats to human health.

The presence of antibiotics in the aquatic environment also presents challenges for the water industry particularly on the issues of water reuse and water resource planning.

Results of recent studies indicate the presence of low concentrations of antibiotics in municipal wastewater effluent and surface water but little is really known about their distribution in the environment, their mobility and persistence in natural and engineered water systems.

Although information is limited, studies on the transformation and sorption of antibiotics indicate that these processes significantly affect the fate of most classes of antibiotics.

Besides all these, the occurance of antibiotics (ng/l) can be taken for granted for all water compartments, luckily, without posing a threat to human health or to aquatic organisms, at least for the time being.

Based on the above we shall present a literature review concerning the occurrence, the fate and the possible environmental effects of antibiotics together with the analytical strategies used for identifying them.

Key words:

Antibiotics, fate, occurance, invironment

Antibiotics, wastewater, surface water, ground water

Antibiotics, analysis, invironment

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ……08

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.1 ΜΙΚΡΟΒΙΑ-ΒΑΚΤΗΡΙΑ

1.1 Δομή των βακτηρίων……11

1.2 Γενετική βάση της μικροβιακής αντίστασης στα αντιβιοτικά……....13

1.3 Ανθεκτικότητα των βακτηρίων στο περιβάλλον……18

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.2 ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

2.1 Ιστορικά Δεδομένα……21

2.2 Ιδιότητες και δράση των αντιβιοτικών……23

2.3 Οι κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών……25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

3.1 Αναλυτική προσέγγιση για τον προσδιορισμό των αντι/κών στο περιβάλλον…..35

3.2 Αναλυτικοί μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών στα διάφορα υδατικά περιβαλλοντικά διαμερίσματα……..43

3.3 Αναλυτική μεθοδολογία για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών σε στερεά περιβαλλοντικά διαμερίσματα……73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.4 ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

4.1 Δίοδοι πρόσβασης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον……..85

4.2 Η παρουσία των αντιβιοτικών σε διάφορα περιβαλλοντικά διαμερίσματα……87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.5 ΤΟ ΓΙΓΝΕΣΘΑΙ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

5.1 Βιοαποιδόμηση……...90

5.2 Φωτοαποιδόμηση, Υδρόλυσης,Θερμόλυσης, οξειδοαναγωγή……92

5.3 Προσρόφηση και συμπλοκοποίηση…….....94

5.4 Γενικά συμπεράσματα……96

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.6 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

6.1 Υγρά απόβλητα και συστήματα αποβλήτων……..97

6.2. Επιφανειακά νερά……..98

6.3 Χώματα και ιζήματα……..100

6.4 Συμπεράσματα……..101

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.7 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΚΙΝΔΥΝΩΝ

7.1 Ορισμοί ειδικών όρων……..102

7.2 Κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης……..103

7.3 Εκτίμηση περιβαλλοντικών κινδύνων βάση της EMEA 2001……...104

7.4 Περιπτωσιολογική μελέτη: Κίνδυνοι που σχετίζονται με την εκροή των αντιβιοτικών στο περιβάλλον……108

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.8 ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....113
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 120

ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

Τα θεραπευτικά φάρμακα, από περιβαλλοντική άποψη, δεν διαφέρουν σε τίποτα από άλλες χημικές ενώσεις όπως για παράδειγμα τα ζιζανιοκτόνα και τα φυτοφάρμακα. Παρά αυτό το γεγονός δεν είχαν τραβήξει την προσοχή ως εν δυνάμει ρυπαντές επειδή εθεωρείτο ότι οι φαρμακευτικές ουσίες βρίσκονται σε υπερβολικά μικρές συγκεντρώσεις για να απειλήσουν το περιβάλλον. Όμως η συνεχόμενη εναπόθεση τους στο περιβάλλον, κυρίως ως αποτέλεσμα της παραγωγικής διαδικασίας, της διάθεσης των αχρησιμοποίητων ή ληγμένων προϊόντων ή της απέκκρισης θα μπορούσε μακροχρόνα να οδηγήσει σε υψηλές συγκεντρώσεις αυτών των ουσιών με δυσμενείς και μη αναστρέψιμες επιπτώσεις τόσο για τους υδρόβιους, όσο και για τους εκτός του νερού οργανισμούς.

Την δεκαετία του 1970 υπήρξε για πρώτη φορά επιστημονικό ενδιαφέρον αναφορικά με την παρουσία φαρμακευτικών ουσιών στο περιβάλλον και συγκεκριμένα των ορμονών. Την δεκαετία του 1980 το ενδιαφέρον για το θέμα των ορμονών πέρασε σε δεύτερη μοίρα και υπήρξε έντονη ερευνητική δραστηριότητα που αφορούσε την παρουσία στο περιβάλλον ουσιών όπως τα βαρέα μέταλλα, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οι χλωριωμένες διοξίνες, τα εντομοκτόνα και τα απορρυπαντικά. Από τα μέσα της δεκαετίας του 1990 προστέθηκαν στις ερευνητικές λίστες και άλλες ουσίες όπως τα αναλγητικά, τα αντιρρευματικά, τα υπολιπιδιμικά και τα αντιβιοτικά. Πολλοί πιστεύουν ότι από όλους τους αποκαλούμενους 'αναδυόμενους' ρυπαντές τα αντιβιοτικά είναι το μεγαλύτερο πρόβλημα για τους εξής λόγους:

α) σε ετήσια βάση χρησιμοποιούνται εκατοντάδες τόνοι αντιβιοτικών παγκοσμίως τόσο για την θεραπεία ασθενειών και μολύνσεων όσο και για την πρόληψη ασθενειών και την αύξηση της ζωικής παραγωγής.

β) περίπου το 90% των χορηγούμενων αντιβιοτικών μπορούν να απεκκριθούν χωρίς να υποστούν μεταβολισμό και λόγω ατελέσφορης επεξεργασίας απομάκρυνσης ή ακατάλληλης διάθεσης τους αυτά μπορούν να καταλήξουν στο υδατικό περιβάλλον μέσω των εκροών των εγκαταστάσεων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων και των γεωργικών απορροών.

γ) Η παρουσία αντιβιοτικών στο υδατικό περιβάλλον παρουσιάζει προκλήσεις για τη βιομηχανία ύδατος ιδιαίτερα στα ζητήματα της επαναχρησιμοποίησης του ύδατος και του προγραμματισμού των υδάτινων πόρων και

δ) η μόλυνση των υδατικών συστημάτων από τα αντιβιοτικά θα μπορούσε να διαταράξει τη μικροβιακή οικολογία, να αυξήσει τον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά παθογόνων και να έχουμε μια γενετική συλλογή περισσότερο βλαβερών βακτηρίων, που θα αποτελούν μια συνεχή απειλή για τα έμβια όντα.

Αναμφίβολα η ανακάλυψη και η χρήση των αντιβιοτικών και των διαδικασιών ανοσοποίησης ενάντια στις μολυσματικές ασθένειες ήταν δύο εξελίξεις στον τομέα της μικροβιολογίας που έχουν συμβάλει στην επέκταση κατά περίπου είκοσι έτη στο μέσο όρο ζωής των ανθρώπων στις αναπτυγμένες χώρες όπου υιοθετούνται αυτές οι πρακτικές.

Όμως είναι προφανές ότι, εάν ένα βακτηριακό παθογόνο είναι σε θέση να αναπτύξει ή να αποκτήσει ανθεκτικότητα σε ένα αντιβιοτικό, τότε το αντιβιοτικό καταλήγει άχρηστο για τη θεραπεία της μολυσματικής ασθένειας που προκαλείται από εκείνο το παθογόνο. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι καθώς τα παθογόνα αναπτύσσουν ανθεκτικότητα, οι άνθρωποι πρέπει να βρίσκουν νέα (διαφορετικά) αντιβιοτικά για να αντικαταστήσουν τα υπάρχοντα. Δυστυχώς όμως δεν αρκεί η εύρεση νέων αντιβιοτικών για να αντιμετωπιστούν οι παλαιές ασθένειες καθώς υπάρχει και το παράλληλο πρόβλημα της εύρεσης νέων αντιβιοτικών για να αντιμετωπιστούν οι νέες ασθένειες.

Αν θέλουμε να ξεφύγουμε από αυτόν το φαύλο κύκλο ενώ παράλληλα να εκμεταλλευόμαστε τα θετικά των αντιβιοτικών θα πρέπει να καταλάβουμε πλήρως το πώς και γιατί λειτουργούν ή δεν λειτουργούν οι αντιμικροβιακοί παράγοντες, και να συνειδητοποιήσουμε ότι πρέπει να διατηρούμε έναν διασκελισμό μπροστά από τα παθογόνα μικροβιακά που μπορούν να αντιμετωπιστούν μόνο με την αντιβιοτική χημειοθεραπεία. Προπαντός όμως θα πρέπει να ελαχιστοποιούμε την παρουσία υπολειμμάτων αντιβιοτικών στο περιβάλλον, που σίγουρα οδηγούν στην δημιουργία ανθεκτικών παθογόνων οργανισμών, και για εκείνα τα αντιβιοτικά που θα επιμείνουν στο περιβάλλον θα πρέπει να υπάρχει συνεχής επιτήρηση για επιστημονική δράση όποτε και εάν χρειαστεί. Υπάρχει ακόμα χρόνος να κερδηθεί το στοίχημα καθότι προς το παρόν τουλάχιστον δεν έχει εκδηλωθεί άμεση απειλή από τα αντιβιοτικά αν και η παρουσία τους στο περιβάλλον έστω και επίπεδα ng/l είναι επιστημονικά αποδεδειγμένη.

Με την παρούσα διατριβή ευελπιστούμε να δώσουμε απαντήσεις στα παρακάτω ερωτήματα, έχοντας ερευνήσει εκτενώς την υπάρχουσα βιβλιογραφία σε ότι τα αφορά.

Ερώτημα1^{0}: Με ποιο τρόπο αποκτούν ανθεκτικότητα τα βακτήρια έναντι των αντιβιοτικών και ποιες οι πιθανές περιβαλλοντικές συνέπειες αυτής της ανθεκτικότητας;

Ερώτημα2^{0}: Ποιες οι καταλληλότερες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών στο περιβάλλον;

Ερώτημα 3^{0}: Ποιοι οι τρόποι πρόσβασης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον;

Ερώτημα 4^{0}: Ποιο το γίγνεσθαι των αντιβιοτικών στο περιβάλλον;

Ερώτημα 5^{0}: Ποιες οι επιδράσεις των αντιβιοτικών στο περιβάλλον;

Ερώτημα6^{0}: Ποια η Εκτίμηση και Διαχείρηση των περιβαλλοντικών κινδύνων από τα αντιβιοτικά σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση;

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.1

ΜΙΚΡΟΒΙΑ-ΒΑΚΤΗΡΙΑ

1.1 Δομή των βακτηρίων [1]

Τα βακτήρια ανήκουν στην κατηγορία των μικροβίων τα οποία περιλαμβάνουν:

α) τα πρωτόζωα και τα βακτήρια που είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί

β) τις άλγες και τους μύκητες που είναι μεγαλύτεροι σε μέγεθος μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί και

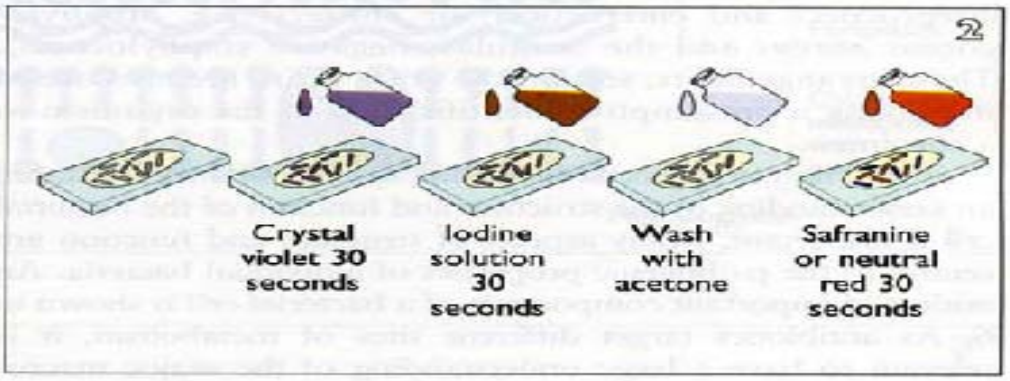
γ) τους ιούς, που δεν έχουν κυτταρική διαμόρφωση.

Τα βακτήρια είναι μια ετερογενής ομάδα από άποψη ανατομική, φυσιολογική και βιοχημική. Διαχωρίζονται κυρίως με βάση τη μορφολογία τους, τους γενετικούς τους χαρακτήρες και μερικές φορές ανάλογα με τη νόσο που προκαλούν.

Το σχήμα των βακτηρίων είναι συνήθως σφαιρικό, επίμηκες ή σπειροειδές (κόκκοι, βακτήρια σπειροχαίτες) Διατάσσονται σε αλυσίδες (στρεπτόκοκκοι, στρεπτοβακτηρίδια), κατά ομάδες σαν σταφύλια (σταφυλόκοκκοι), ανά δύο (διπλόκκοκοι, διπλοβακτηρίδια) ή ακόμα και μεμονωμένα.

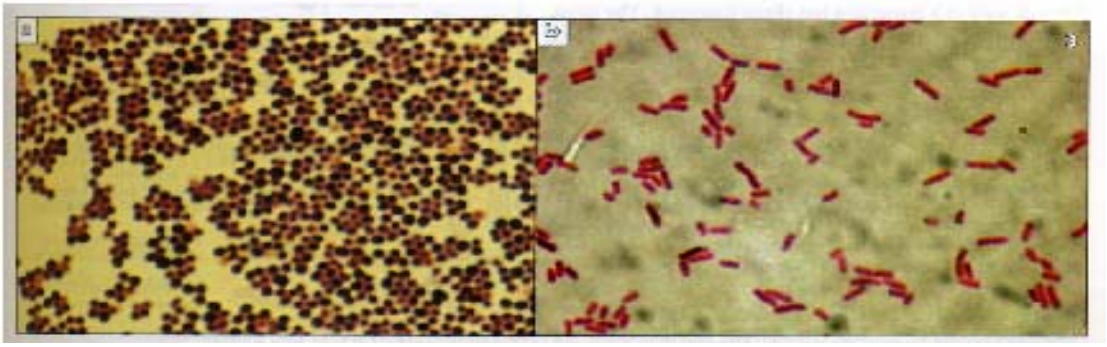
Το μέγεθος των βακτηρίων συνήθως κυμαίνεται από 0,5 έως 5μm. Εξαίρεση αποτελούν οι βάκιλοι με μήκος 5-10 μm και οι σπειροχαίτες με μήκος 5 -100 μm.

Σύμφωνα με τη χρώση Gram τα βακτήρια διακρίνονται σε Gram- θετικά και σε Gram-αρνητικά. Αυτός ο διαχωρισμός ανήκει στον Δανό μικροβιολόγο Hans Christian Gram ο οποίος τον περασμένο αιώνα επινόησε το παρακάτω test :



Σχήμα 1.1 Δοκιμή χρώσης κατά Gram [2]

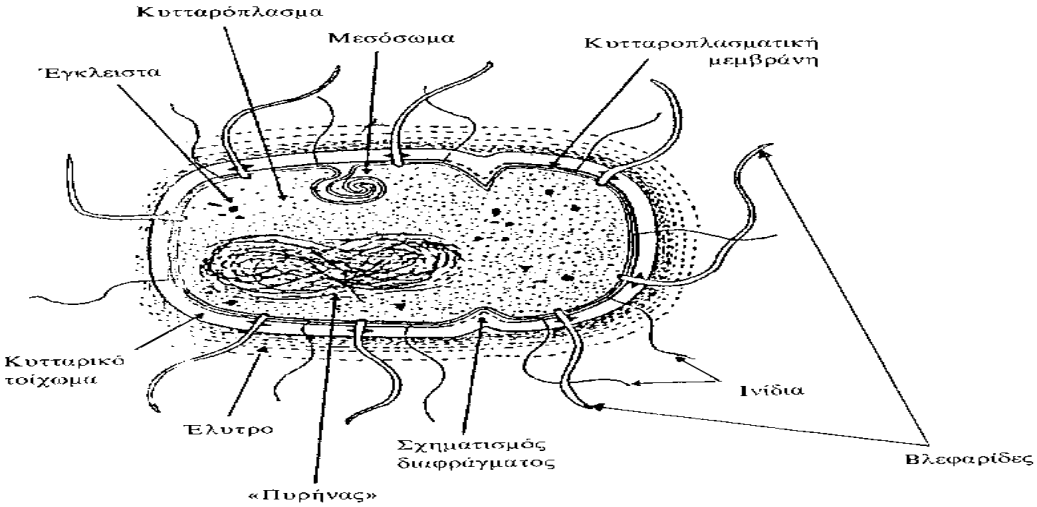
Κατά τη δοκιμή Gram, τα Gram- θετικά βακτήρια διατηρούν την αρχική μπλε χρώση ενώ τα Gram-αρνητικά βακτήρια χάνουν την μπλε χρώση αμέσως μετά την εφαρμογή της ακετόνης παίρνοντας κόκκινη απόχρωση.
Παρακάτω φαίνεται η ηλεκτρονική φωτογραφία δύο διαφορετικών βακτηρίων:



Εικόνα 1.1 Gram- θετικοί κόκκοι και Gram-αρνητικοί ράβδοι [2]

Το βακτηριακό κύτταρο:

Αποτελείται από το κυτταρόπλασμα,την κυτταροπλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα. Το κυτταρόπλασμα περιβάλλεται από την κυτταρο-πλασματική μεμβράνη και έξω από αυτή βρίσκεται το κυτταρικό τοίχωμα. Στα



Σχήμα 1.2 Δομή βακτηριακού κυττάρου [1]

gram- αρνητικά βακτήρια μεταξύ κυτταροπλασματικής μεμβράνης και κυτταρικού τοιχώματος υπάρχει ο περιπλασματικός χώρος. Πολλά βακτήρια έξω από το κυτταρικό τοίχωμα έχουν έλυτρο ή ένα βλεννώδες στρώμα από πολυμερή, συνήθως πολυσακχαρίτες. Μπορεί στο κυτταρικό τοίχωμα να βρίσκονται επίσης νηματοειδή εξαρτήματα, τα ινίδια ή φίμπριες και τα μαστίγια ή βλεφαρίδες.

1.2 Γενετική βάση της μικροβιακής αντίστασης στα αντιβιοτικά.

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά μπορεί να είναι έμφυτη ή επίκτητη.[1]

I. Έμφυτη (φυσική) ανθεκτικότητα:

Τα βακτηρίδια μπορούν να είναι εκ φύσεως ανθεκτικά σε ένα αντιβιοτικό. Παραδείγματος χάριν, ο στρεπτομύκητας έχει κάποιο γονίδιο που είναι αρμόδιο για την αντίσταση του δικού του αντιβιοτικού ή ένα gram-αρνητικό βακτηρίδιο έχει μια εξωτερική μεμβράνη που καθιερώνει ένα εμπόδιο διαπερατότητας ενάντια στο αντιβιοτικό ή ένας οργανισμός στερείται ένα σύστημα μεταφοράς για το αντιβιοτικό ή στερείται το στόχο ή την αντίδραση η οποία προσβάλλεται από το αντιβιοτικό. Θυμίζουμε ότι διάφοροι μικροοργανισμοί παράγουν δικά τους αντιβιοτικά στα οποία είναι σαφώς ανθεκτικά. Π.χ οι μούχλες *Penicillium* και *Cephalosporium* παράγουν β-λακτάμες αντιβιοτικά όπως πενικιλίνη, κεφαλοσπορίνη και τα συγγενικά τους. Οι ακτινομύκητες , κυρίως του είδους *Streptomyces* παράγουν τετρακυκλίνες, αμινογλυκοσίδες και πολλά άλλα αντιβιοτικά με κλινική χρήση που δεν ανήκουν στις β-λακτάμες.

II. Επίκτητη ανθεκτικότητα:

Τα βακτηρίδια μπορούν να αναπτύξουν αντίσταση στα αντιβιοτικά, π.χ βακτηριακοί πληθυσμοί προηγουμένως ευαίσθητοι στα αντιβιοτικά γίνονται ανθεκτικοί. Αυτός ο τύπος αντίστασης προκύπτει από τις αλλαγές στο βακτηριακό γονιδίωμα. Η επίκτητη αντίσταση οδηγείται με δύο γενετικές διαδικασίες στα βακτηρίδια:

(1) μεταλλαγή και επιλογή (μερικές φορές αναφέρεται ως κάθετη εξέλιξη),

(2) ανταλλαγή γονιδίων μεταξύ ιδίων ή και διαφορετικών ειδών βακτηρίων (μερικές φορές αναφέρεται ως οριζόντια εξέλιξη).

Η κάθετη εξέλιξη είναι αυστηρά θέμα δαρβινικού τύπου και οδηγείται από τις αρχές της φυσικής επιλογής: μια αυθόρμητη μεταλλαγή στο βακτηριακό χρωμόσωμα μεταδίδει την ανθεκτικότητα σε ένα μέλος του βακτηριακού πληθυσμού. Στο εκλεκτικό περιβάλλον του αντιβιοτικού, ο μη μεταλλάξιμος τύπος σκοτώνεται και η ανθεκτική μετάλλαξη επιτρέπεται να αυξηθεί και να ακμάσει. Αν λάβουμε υπ'οψη μας ότι το ποσοστό μεταλλαγής για τα περισσότερα βακτηριακά γονίδια είναι περίπου 10^{-8}, αυτό σημαίνει ότι αν ο βακτηριακός πληθυσμός διπλασιαστεί από 10^{-8} σε 2. 10^{-8} κύτταρα, εκεί είναι πιθανό να υπάρξει μια μετάλλαξη για οποιοδήποτε δεδομένο γονίδιο.

Δεδομένου ότι τα βακτηρίδια τείνουν να φθάνουν σε πυκνότητες πληθυσμών πολύ παραπάνω από 10^9 κύτταρα, μια τέτοια μετάλλαξη θα μπορούσε να αναπτυχθεί από μια απλή γενεά κατά τη διάρκεια 15 λεπτών ανάπτυξης.

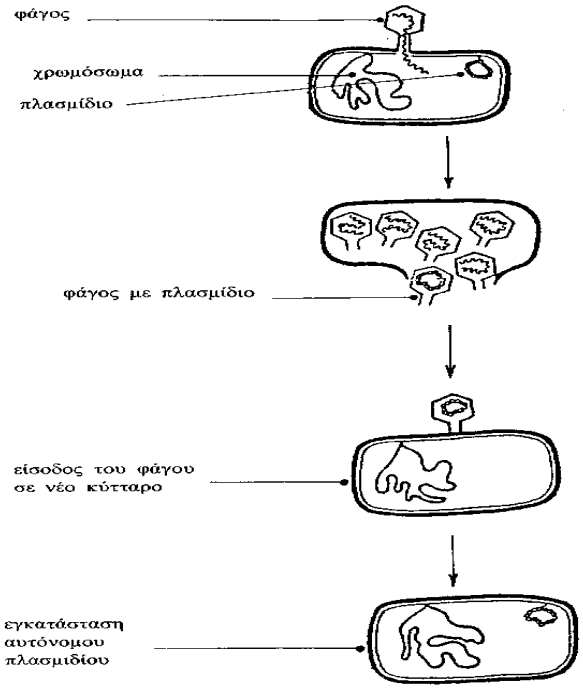
Η οριζόντια εξέλιξη είναι η απόκτηση των ανθεκτικών γονιδίων από έναν άλλο οργανισμό. Παραδείγματος χάριν, ο στρεπτομύκητας έχει ένα γονίδιο για την αντίσταση στην στρεπτομυκίνη (το αντιβιοτικό του), αλλά με κάποιο τρόπο το γονίδιο δραπετεύει και μπαίνει στο *E. Coli* ή *Shigella*. Ή, πιθανότερο, κάποιο βακτηρίδιο αναπτύσσει τη γενετική αντίσταση μέσω της διαδικασίας της μεταλλαγής και της επιλογής και έπειτα δίνει αυτά τα γονίδια σε κάποιο άλλο βακτηρίδιο μέσω μιας από διαφορετικές διαδικασίες γενετικής ανταλλαγής που υπάρχουν στα βακτηρίδια.

Τα βακτηρίδια είναι σε θέση να ανταλλάξουν τα γονίδια στη φύση με τρεις διαδικασίες: **σύζευξη, μεταγωγή και μεταμόρφωση**.

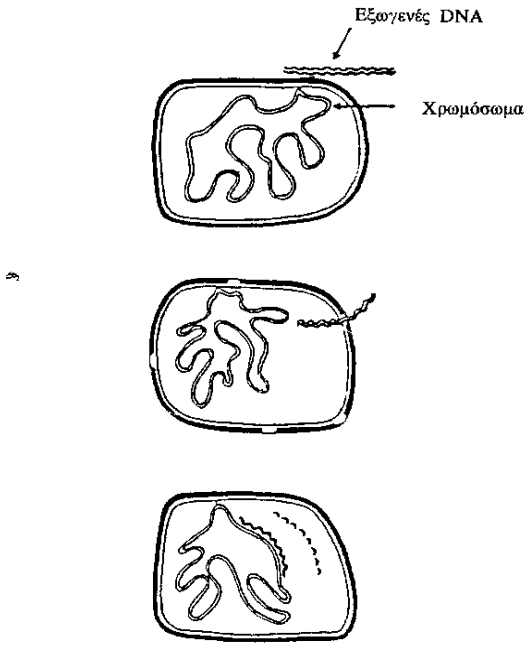
Με τη σύζευξη η μεταβίβαση γενετικού υλικού γίνεται με τα πλασμίδια (τα πλασμίδια αποτελούν ανεξάρτητη μονάδα DNA, εκτός του κυκλικού χρωμοσωματικού DNA του κυττάρου, και ανευρίσκονται μέσα σε πολλά είδη βακτηρίων και σε άλλους μικροοργανισμούς) και αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό μεταβίβασης ανθεκτικότητας. Επειδή είναι συχνό για το DNA να μεταφέρεται ως πλασμίδια μεταξύ βακτηριδίων που ζευγαρώνουν και δεδομένου ότι τα βακτηρίδια αναπτύσσουν συνήθως τα γονίδιά τους για την αντίσταση κατά των φαρμάκων στα πλασμίδια (αποκαλούμενα ως resistance transfer factors, RTFs), είναι σε θέση να διαδώσουν την αντίσταση κατά των φαρμάκων σε άλλα είδη κατά τη διάρκεια των διαδικασιών γενετικής ανταλλαγής.

Κατά την μεταγωγή, γίνεται μεταβίβαση γενετικού υλικού από ένα μικροβιακό καλλιέργημα σε ένα άλλο με βακτηριοφάγους. Ο βακτηριο-φάγος ενσωματώνεται σε ένα ορισμένο σημείο του χρωμοσώματος ή σε οποιοδήποτε σημείο αυτού. Μετά την ενσωμάτωση, είναι πιθανό να αποκολληθεί από το χρωμόσωμα, συμπαρασύροντας ένα κομμάτι από αυτό, να βγει από το κύτταρο, να εισέλθει σε άλλο κύτταρο και να ενσωματωθεί στο χρωμόσωμά του. Το κομμάτι του χρωμοσώματος που μεταφέρεται ανα-συνδυάζεται τελικά με αυτό του κυττάρου ,που δέχτηκε τον βακτηριοφάγο. Κατ'αυτό τον τρόπο, το κύτταρο- δέκτης αποκτά ιδιότητες που δεν είχε προηγουμένως. Ο μηχανισμός αυτός, παρόλο που είναι δυνατός, δεν συμβάλλει σημαντικά στην επίκτητη ανθεκτικότητα των παθογόνων

βακτηρίων. Θεωρείται όμως πιθανό, ότι συμβάλλει αποφασιστικά στην ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των βακτηρίων του εδάφους.
Με βακτηριοφάγο μπορεί να μεταφερθεί, επίσης, τμήμα πλασμιδίου ενός μικροβίου σε πλασμίδιο ή χρωμόσωμα άλλου μικροβίου.



Σχήμα 1.3 Μεταβίβαση πλασμιδίου με μεταγωγή [1]



Σχήμα 1.4 Μεταβίβαση γενετικού υλικού (DNA) με μεταμόρφωση [1]

Τέλος κατά την μεταμόρφωση γίνεται μεταφορά εξωγενούς χρωμοσωματικού DNA από το ένα κύτταρο στο άλλο. Η ενσωμάτωση του DNA στο κύτταρο-δέκτη γίνεται μόνο όταν προέρχεται από συγγενή μικροοργανισμό, καθόσον λειτουργούν μηχανισμοί αποκλεισμού στην περίπτωση που το DNA προέρχεται από μη συγγενή είδη. Η μεταμόρφωση έχει μελετηθεί *in vitro*, αλλά πιστοποιήθηκε ότι λαμβάνει χώρα και *in vivo.*

Βιοχημικοί μηχανισμοί της αντοχής: Οι βιοχημικοί μηχανισμοί της αντοχής αφορούν στην αδρανοποίηση των αντιβιοτικών**,** στην αλλαγή του βιολογικού στόχου δράσης και στην ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα.

a) Η αδρανοποίηση των αντιβιοτικών οφείλεται στην παραγωγή ενζύμων εκ μέρους των βακτηριδίων, που διασπούν ή τροποποιούν τα αντιβιοτικά.

b) Στην αλλαγή του βιολογικού στόχου δράσης τα αντιβιοτικά συγκεντρώνονται σε ενεργό μορφή στα σημεία δράσης τους, αλλά λόγω αλλαγής διαμορφώσης των τελευταίων, δεν μπορούν να δράσουν.

c) Η ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα ενοχοποιείται συχνότερα τα τελευταία χρόνια, ως αποφασιστικός παράγοντας για την έκφραση της αντοχής των βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Η ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα, ως επίκτητος μηχανισμός αντοχής, έχει σημασία μόνο για τα gram-αρνητικά βακτήρια εξ αιτίας της ειδικής δομής του κυτταρικού τοιχώματός τους. Όταν η ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα συνυπάρχει με άλλους μηχανισμούς αντοχής , τότε η αντοχή είναι πολύ υψηλή.

Στην επόμενη σελίδα παρουσιάζεται ένας πίνακας που δείχνει τις χρονολογίες ανάπτυξης γνωστών αντιβιοτικών καθώς και τις αντίστοιχες χρονολογίες που παρατηρήθηκε αντοχή σε αυτά από τα βακτηρίδια.

Πίνακας 1.1 Χρονική εξέλιξη της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά [3]

Αντιβιοτικό	Έτος ανάπτυξης	Έτος που παρουσίασε ανθεκτικότητα
Σουλφοναμίδες	Δεκαετία 1930	Δεκαετία 1940
Πενικιλλίνη	1943	1946
Στρεπτομυκίνη	1943	1959
Χλωραμφαινικόλη	1947	1959
Τετρακυκλίνη	1948	1953
Ερυθρομυκίνη	1952	1988
Βανκομυκίνη	1956	1988
Μεθικιλλίνη	1960	1961
Αμπικιλίνη	1961	1973
Κεφαλοσπορίνες	Δεκαετία 1960	Τέλος δεκαετίας 1960

Από τον πίνακα 1.1 προκύπτει ότι τα βακτήρια απέκτησαν αντοχή σε κάποια αντιβιοτικά εντός ενός έτους από την κυκλοφορία τους και ότι ο μέσος όρος απόκτησης αντοχής ηταν περίπου 14.5 έτη.

Στον αμέσως επόμενο πίνακα φαίνονται τα ποσοστά αντοχής που παρουσίασαν 2164 Gram –αρνητικοί μικροοργανισμοί σε διάφορα αντιβιοτικά σε μια μελέτη που έγινε σε 6 Ευρωπαϊκές χώρες.

Πίνακας 1.2 Ποσοστά % αντοχής στα αντιβιοτικά [4]

Αντιβιοτικό	Σουηδία	Μεγάλη Βρετανία	Γερμανία	Γαλλία	Ιταλία	Ελλάδα
Αζλοκιλλίνη	17	39	23	27	30	56
Αζτρεονάμη	3	2	9	10	10	29
Κεφοταξίμη	2	1	0	7	20	32
Κεφταζιντίμη	2	3	5	4	5	20
Γενταμικίνη	2	3	9	14	21	42
Τομπραμυκίνη	0.6	3	9	14	18	39

Προσέξτε ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικότητας εμφανίζονται στην Ελλάδα η οποία στατιστικά καταναλώνει μεγαλύτερες ποσότητες αντιβιοτικών έναντι των κοινοτικών της εταίρων.

1.3 Ανθεκτικότητα των βακτηρίων στο περιβάλλον-συνέπειες

Ανθεκτικά γονίδια και βακτήρια έχουν ανιχνευθεί σε περιβαλλοντικά διαμερίσματα όπως απόβλητα υπονόμων, επιφανειακά ύδατα, ωκεανούς, ιζήματα, ιλύ και χώματα. Τα πλέον χαρακτηριστικά ιατρικά παραδείγματα είναι οι ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη εντερόκοκκοι (vancomycin resistant *enterococci*, VRE), ο ανθεκτικός στην μεθικιλλίνη σταφυλόκοκκος *aureous* (methicillin resistant Staphylococcus *aureous*, MRSA) και οι πολλαπλής ανθεκτικότητας ψευδομονάδες.

Γενικά η εμφάνιση ανθεκτικότητας είναι μια πολύ περίπλοκη διαδικασία και δεν έχει κατανοηθεί πλήρως η αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών και των αντιβιοτικών, ακόμα και σε ένα ιατρικό περιβάλλον [5], [6]. Η ανθεκτικότητα των βακτηριδίων δεν είναι πάντα δυνατόν να συσχετιστεί με την ποσότητα των αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκε, ή με την υπολειμματική συγκέντρωση των αντιβιοτικών στο περιβάλλον. Ενώ οι γνώσεις μας για τις επιδράσεις των αντιμικροβιακών (σε συγκεντρώσεις κάτω των απαγορευτικών επιπέδων) στα περιβαλλοντικά βακτήρια είναι λιγοστές και αντιφατικές, υπάρχουν πολλαπλές αποδείξεις ότι η ανθεκτικότητα των βακτηριδίων είναι παρούσα στο φυσικό περιβάλλον και ότι ανταλλάσσεται μεταξύ βακτηριδίων [7]. Η μεταφορά καθώς και ο συνδυασμός ανθεκτικών γονιδίων συμβαίνει κατά προτίμηση σε διαμερίσματα με υψηλή βακτηριακή πυκνότητα. Η βακτηριακή πυκνότητα είναι πολύ υψηλή στις αερόβιες και αναερόβιες σηπτικές δεξαμενές των εγκαταστάσεων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, στα ιζήματα και τα χώματα. Το προαπαιτούμενο για την μεταφορά της ανθεκτικότητας είναι το να μπορέσουν τα βακτήρια να επιβιώσουν, ή τουλάχιστον το γενετικό υλικό να παραμείνει αναλλοίωτο κατά την μεταφορά στο νέο περιβάλλον π.χ από το ανθρώπινο σώμα στο επιφανειακό νερό το οποίο είναι περισσότερο κρύο και φτωχότερο σε θρεπτικά συστατικά, ή κατά τη μεταφορά από τα φυτά στα ζώα.

Το ερώτημα που προκύπτει από τα παραπάνω είναι αν η εισαγωγή αντιβιοτικών στο περιβάλλον αποτελεί σημαντική πηγή για την εμφάνιση ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον. Είναι δηλαδή, η συγκέντρωση του αντιβιοτικού και η βακτηριακή πυκνότητα αρκετά υψηλές και είναι ο χρόνος έκθεσης αρκετός ώστε να ευνοείται η ανθεκτικότητα ή η επιλογή ανθεκτικών βακτηριδίων**;** Ή είναι η μεταφορά ανθεκτικότητας από ήδη ανθεκτικά βακτήρια (από τις εκροές νοσοκομείων ή αστικών λυμάτων),πολύ περισσότερο

σημαντική από την εισαγωγή καθαυτών των αντιβιοτικών στο περιβάλλον; Η σύνδεση ανάμεσα στην παρουσία αντιμικροβιακών και της εύνοιας υπέρ των ανθεκτικών βακτηρίων καθώς επίσης και της μεταφοράς της ανθεκτικότητας σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο αυτές που ανιχνεύονται για τα αντιμικροβιακά στο περιβάλλον δεν έχει ακόμα αποδειχθεί.

Πρώτα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μεταφορά της ανθεκτικότητας και η επιλογή ανθεκτικών βακτηρίων δεν ευνοούνται στις συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που βρίσκονται στις εκροές νοσοκομείων ή στο υδατικό περιβάλλον Ohlsen et al. 1998, [8] . Αυτά τα αποτελέσματα μαζί με εκείνα των Kümmerer et al. [9] συνιστούν ότι η εισαγωγή βακτηρίων τα οποία έχουν ήδη αποκτήσει ανθεκτικότητα από την εφαρμογή αντιβιοτικών είναι υπεύθυνα για την εξάπλωση των ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον.

Πριν επιχειρήσουμε να προβούμε σε ένα γενικό συμπέρασμα θεωρούμε χρήσιμο να αναφέρουμε τα αποτελέσματα μερικών ερευνών.

Έτσι, Οι Forney et al., [10], μελέτησαν την ανθεκτικότητα βακτηριακών πληθυσμών έναντι της τετρακυκλίνης σε μια φάρμα παραγωγής οξύρρυγχων ψαριών. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι θα χρειαζόταν συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από εκείνες των θεραπευτικών επιπέδων, για να υπάρξουν επιδράσεις στους πληθυσμούς των βακτηρίων.

Όμως οι Herwig et al.1997 [11], είχαν ανακαλύψει ένα χρόνο νωρίτερα ότι η αντιβιοτική αντίσταση των βακτηρίων μέσα σε θαλάσσια ιζήματα αυξανόταν σταδιακά καθώς πλησίαζαν τις εγκαταστάσεις εκτροφής σολομών στο Puget Sound των ΗΠΑ.

Μια άλλη μελέτη των Schmidt et al,. [12], έδειξε ότι σε μια φάρμα πέστροφας, τα επίπεδα αντίστασης στα αντιβιοτικά, αυξήθηκαν σε εκείνους τους πληθυσμούς που εκτέθηκαν σε αντιβιοτικά, ιδιαίτερα εκείνων που αποτελούνταν από *aeromonads* και *flavobacteria*.

Σε μια μελέτη παράκτιων ιζημάτων στη Ligurian Sea της Δυτικής Μεσογείου οι Chelossi et al.,[13], βρήκαν μια τριπλάσια αύξηση στην πυκνότητα και βιομάζα των βακτηρίων στα ιζήματα που ήταν κοντά στα κλουβιά ψαριών.

Οι MacMillan et al., [14] θεώρησαν την εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών στην εκτροφή γαρίδων στο Ecuador, υπεύθυνη για την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά του βακτηρίου της χολέρας, (*Vibrio Cholerae*)

….Οι Islam et al., [15] και οι Cottingham et al., [16] απέδωσαν την χολέρα, η

οποία κυριαρχεί και είναι γεωγραφικά περισσότερο διαδεδομένη σήμερα από ότι στο παρελθόν, στην προσκόλληση του ετεροτροφικού βακτηρίου *Vibrio Cholerae* στις επιφάνειες του ζωοπλαγκτόν και φυτοπλαγκτόν.

Οι Chiavelli et al., [17] χρησιμοποίησαν Microarrays, ένα καινούργιο δυναμικό εργαλείο για τη μελέτη της αντίδρασης ενός οργανισμού στο περιβάλλον και απέδειξαν ότι η επιφανειακή εποίκηση και η παραγωγή ενός προστατευτικού στρώματος, είναι οι φυσιολογικές αντιδράσεις οι οποίες μπορούν να επιτρέψουν στα βακτήρια να επιβιώσουν καλύτερα σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες. Έτσι τα εποχιακά ξεσπάσματα χολέρας στις τροπικές περιοχές, τείνουν να σχετίζονται με την εποχική άνθηση του πλαγκτόν στις λίμνες και τα ποτάμια που χρησιμοποιούνται για πόσιμο νερό.

Οι Pommepuy et al., [18] αναφέρουν την παρουσία σε παράκτιες περιοχές μικροοργανισμών, ανάμεσά τους και «νέους» παθογόνους οργανισμούς όπως ανθρώπινους εντερικούς ιούς και παθογενή βακτήρια (Οι παραπάνω μικροοργανισμοί φτάνουν στη θάλασσα μέσω των ποταμών που είναι και τα φυσικά κανάλια μεταφοράς και άλλων υλικών).

Γενικά συμπεράσματα.

Προς το παρών δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για την εξαγωγή ενός τελικού συμπεράσματος για την επίδραση των αντιβιοτικών στις δομικές και λειτουργικές αλλαγές των βακτηριακών πληθυσμών στο περιβάλλον, που θα επέτρεπε την εκτίμηση των κινδύνων, για παράδειγμα στην γονιμότητα του εδάφους. Σύμφωνα με τις παρούσες γνώσεις η εισαγωγή αντιβιοτικών στο περιβάλλον φαίνεται να έχει μικρή σημασία. Η επίδραση των αντιμικροβιακών, που είναι παρόντα στο περιβάλλον, πάνω στην μεταφορά ανθεκτικότητας είναι αμφίβολη. Η εισαγωγή ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον φαίνεται να είναι μια σημαντική πηγή ανθεκτικότητας για το περιβάλλον. Οι πιθανές επιδράσεις των ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον δεν είναι ακόμα γνωστές. Η περαιτέρω έρευνα στα παραπάνω θέματα είναι και χρήσιμη και επιβεβλημένη. Το συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί προς το παρόν είναι το ότι πρέπει να εμποδίζεται πρωταρχικά η επιλογή ανθεκτικών ειδών τόσο στην ιατρική όσο και στην κτηνιατρική. Η χρήση εμβολίων, η συνετή χρήση των αντιβιοτικών, η μείωση του χρόνου θεραπείας, και η ελάττωση της χορήγησης υπο-θεραπευτικών συγκεντρώσεων στην κτηνοτροφία θα μειώσουν τους κινδύνους τόσο για το γενικό κοινό, όσο και για το περιβάλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.2

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

2.1 Ιστορικά Δεδομένα

Ο όρος «αντιβιοτικό» που έχει επικρατήσει μέχρι σήμερα, αφορά σε φυσικά παράγωγα διαφόρων μικροοργανισμών (βακτηριδίων, μυκήτων), τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών και να τους καταστρέφουν (αντι-βιοτικά). Με την παραγωγή ημισυνθετικών παραγώγων ο όρος αντιβιοτικά έχει αντικατασταθεί με τον περιεκτικότερο όρο «αντιμικροβιακά» που περιλαμβάνει φυσικές, ημισυνθετικές ή συνθετικές ουσίες ικανές να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων και να τα καταστρέφουν. Από συνήθεια όμως χρησιμοποιείται ο όρος αντιβιοτικά για όλες τις αντιμικροβιακές ουσίες και η τακτική αυτή θα τηρηθεί και εδώ.

Το πρώτο αντιβιοτικό, η πενικιλίνη [1], ανακαλύφθηκε το 1929 από το Sir Alexander Fleming ο οποίος παρατήρησε την παρεμπόδιση της ανάπτυξης σταφυλόκοκκων σε μια καλλιέργεια βακτηρίων σε υπόστρωμα φυκιών από τη μούχλα *penicillium*.

Ο Β Παγκόσμιος Πόλεμος (και οι αναπόφευκτες βακτηριακές μολύνσεις που εμφανίστηκαν στις πληγές των τραυματισμένων στρατιωτών) ήταν μια σημαντική ώθηση για να μελετηθεί η χημειοθεραπευτική αξία της πενικιλίνης.
Η πενικιλίνη διατέθηκε για τη θεραπεία των βακτηριακών μολύνσεων, ειδικά εκείνων που προκλήθηκαν από σταφυλόκοκκους και στρεπτόκοκκους, περίπου το 1946. Αρχικά, το αντιβιοτικό ήταν αποτελεσματικό ενάντια σε όλα τα είδη των μολύνσεων που προκλήθηκαν από αυτά τα δύο gram-θετικά βακτήρια. Αξίζει να σημειωθεί ότι ένα σημαντικό μέρος όλων των ανθρώπινων μολύνσεων προκαλείται από αυτά τα δύο βακτήρια (π.χ λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού, πνευμονία, σηψαιμία, μολύνσεις του δέρματος, μολύνσεις πληγών, ερυθρός πυρετός, τοξικό σύνδρομο σοκ κ.α).

Η πενικιλίνη είχε την απίστευτη ικανότητα να σκοτώνει τα βακτηριακά παθογόνα χωρίς να προκαλεί βλάβη στους οργανισμούς που την “φιλοξενούσαν”. Αυτό φέρνει στο φως τη θεμελιώδη αρχή της αντιμικροβιακής χημειοθεραπείας αυτή της εκλεκτικής τοξικότητας.Τονίζεται επί τη ευκαιρία ότι τα αντιβιοτικά δεν είναι δραστικά στους ιούς διότι προϋπόθεση για τη δράση τους είναι η ικανότητα του παθογόνου να έχει δικό του μεταβολισμό, ενώ οι ιοί αποτελούν παράσιτα του ανθρωπίνου κυττάρου.

Η ανθεκτικότητα στην πενικιλίνη από ορισμένα είδη σταφυλόκοκκων εντοπίσθηκε σχεδόν αμέσως μετά από την εισαγωγή του φαρμάκου. Ανθεκτικότητα στην πενικιλίνη εμφανίζει σήμερα σχεδόν το 80% όλων των ειδών του *Staphylococcus aureus.* Ευχάριστη έκπληξη αποτελεί το γεγονός ότι ο στρεπτόκοκκος *pyogenes* δεν ανέπτυξε ποτέ πλήρη ανθεκτικότητα στην πενικιλίνη και παραμένει ένα αντιβιοτικό επιλογής για πολλούς τύπους μολύνσεων από στρεπτόκοκκους. Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει το γεγονός ότι η πενικιλίνη [1] δεν είναι ποτέ αποτελεσματική ενάντια στα περισσότερα gram αρνητικά παθογόνα (π.χ. σαλμονέλα, ψευδομονάδες κ.α) με αξιοσημείωτη εξαίρεση εκείνη των βλεννορροιών *Neisseria*. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι εκ φύσεως ανθεκτικά στην πενικιλίνη επειδή το ευάλωτο κυτταρικό τους τοίχωμα προστατεύεται από μια εξωτερική μεμβράνη η οποία εμποδίζει την διείσδυση των μορίων της πενικιλίνης.

Το τέλος της δεκαετίας του 40 και η αρχή της δεκαετίας του 50 είδε την ανακάλυψη και την χρήση της στρεπτομυκίνης, της χλωραμφαινικόλης και της τετρακυκλίνης, και η εποχή της αντιβιοτικής χημειοθεραπείας μπαίνει για τα καλά στην κλινική ιατρική. Αυτά τα αντιβιοτικά ήταν αποτελεσματικά ενάντια μιας πλήρους σειράς βακτηριακών παθογόνων συμπεριλαμβανομένων των gram-θετικών και των gram-αρνητικών βακτηριδίων, των ενδοκυτταρικών παρασίτων, και του βακίλου της φυματίωσης.

Όμως το 1953, κατά τη διάρκεια ενός ξεσπάσματος *Shigella* στην Ιαπωνία, απομονώθηκε ένα είδος του βακίλου της δυσεντερίας που ήταν ανθεκτικό σε πολλαπλά φάρμακα, προβάλλοντας ανθεκτικότητα στην χλωραμφαινικόλη, στην τετρακυκλίνη, στην στρεπτομυκίνη και στις σουλφοναμίδες. Υπήρξε πλέον πληθώρα ενδείξεων ότι τα βακτηρίδια μπορούσαν να ανταλλάξουν μεταξύ τους γονίδια ανθεκτικά σε πολλαπλά φάρμακα, και αυτό δυστυχώς τόσο μεταξύ βακτηρίων του ιδίου είδους όσο και μεταξύ διαφορετικών ειδών.

Σήμερα για παράδειγμα απειλείται η ανθρωπότητα από το πιθανόν ξέσπασμα μιας μεταδοτικής ασθένειας που οφείλεται σε κάποια είδη μετάλλαξης του βακτηρίου *Mycobacterium tuberculosis*, που δυστυχώς είναι ανθεκτικά στα χρησιμοποιούμενα μέχρι σήμερα αντιβιοτικά.

2.2 Ιδιότητες και δράση των αντιβιοτικών

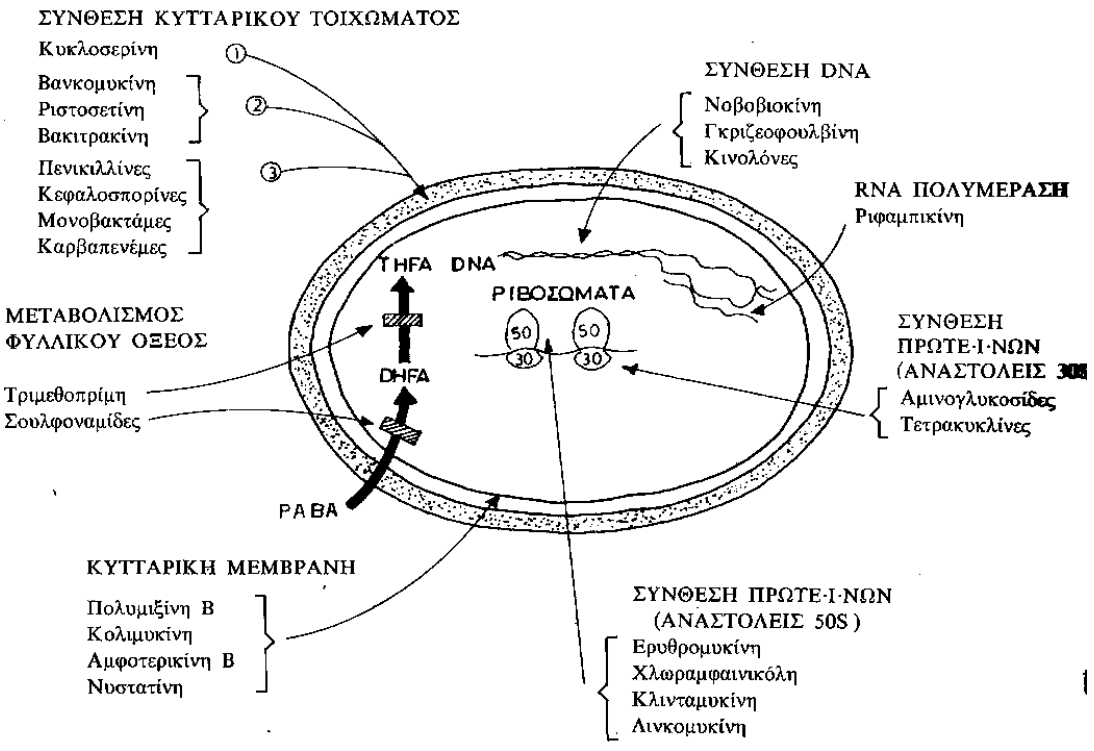
Επανερχόμενοι στη βασική ιδιότητα των αντιβιοτικών που είναι η εκλεκτική δράση τους επί των μικροβίων, μπορούμε να πούμε ότι σε κυτταρικό επίπεδο τα περισσότερα αντιβιοτικά δρουν με ένα ή και περισσότερους από τους ακόλουθους μηχανισμούς [1] :

α) Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος,

β) Αλλαγή στη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης,

γ) Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και

δ) Αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊνικών οξέων



Σχήμα 2.1 Μοριακοί στόχοι της αντιμικροβιακής δράσης των αντιβιοτικών [1]

Στο παραπάνω σχήμα φαίνεται ακριβώς σε ποιο σημείο του κυττάρου των βακτηρίων δρουν τα αντιβιοτικά και τι αποτέλεσμα φέρνουν. Για παράδειγμα η ερυθρομυκίνη δρα στα ριβοσώματα και εμποδίζει την παραγωγή πρωτεϊνών απαραίτητων για την επιβίωση του μικροβίου.

Συνεχίζοντας με τις γενικές ιδιότητες των αντιβιοτικών μπορούμε να τα διαχωρίσουμε σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το φάσμα δράσης τους :σε αντιβιοτικά ευρέως φάσματος (τετρακυκλίνες, χλωραμφαινικόλη, ημισυνθετικές πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες, σουλφοναμίδες, αμινογλυκοσίδες) που δρουν και σε Gram- θετικά και σε Gram-αρνητικά βακτήρια μυκοπλάσματα, χλαμίδια

και άλλα και σε αντιβιοτικά στενού φάσματος που δρουν σε περιορισμένο είδος μικροβίων.Παράδειγμα αποτελεί η πενικιλίνη που δρα μόνο σε Gram θετικά βακτήρια ενώ η πολυμυξίνη δρα μόνο σε Gram αρνητικά βακτήρια.

Τέλος, ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους τα βακτήρια χωρίζονται σε μικροβιοκτόνα που προκαλούν γρήγορα τον θάνατο των μικροβίων και σε μικροβιοστατικά που προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης των μικροβίων.

Στην περίπτωση που χορηγούνται μικροβιοστατικά, ο σταδιακός θάνατος των μικροοργανισμών επέρχεται με τους μηχανισμούς άμυνας του ίδιου του μεγαλοοργανισμού. Στα κοινά μικροβιοκτόνα υπάγονται οι πενικιλλίνες, οι κεφαλοσπορίνες, οι αμινογλυκοσίδες, η βανκομυκίνη, οι πολυμυξίνες κ.ά ενώ στα κοινά μικροβιοστατικά υπάγονται οι σουλφοναμίδες, οι τετρακυκλίνες, η χλωραμφαινικόλη, η ερυθρομυκίνη, κ.ά. Ορισμένα βακτηριοστατικά σε υψηλές συγκεντρώσεις και ανάλογα με το μικρόβιο, μπορούν να ασκούν βακτηριοκτόνο δράση. Το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από την συγκέντρωση του φαρμάκου και τον αριθμό, το είδος και τη μεταβολική κατάσταση (αναπτυσσόμενος ή στατικός πληθυσμός) των μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι η χλωραμφαινικόλη μπορεί να είναι βακτηριο-κτόνος έναντι μερικών βακτηρίων (πνευμονιόκοκος, αιμόφιλος της γρίπης, μηνιγγιτιδόκοκκος) και βακτηριοστατική έναντι άλλων (χρυσίζων σταφυλόκοκκος, εντεροβακτηριοειδή). Κατά συνέπεια ο διαχωρισμός μεταξύ μικροβιοκτόνων και μικροβιοστατικών αντιβιοτικών δεν είναι σαφής.

2.3 Οι κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών:

Οι κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών είναι οι ακόλουθες: [1]

1. β-λακτάμες
2. Τετρακυκλίνες
3. Μακρολίδες
4. Αμινογλυκοσίδες
5. Κινολόνες
6. Γλυκοπεπτίδια
7. Λινκοσαμίδες και
8. Σουλφοναμίδες

Γενικές πληροφορίες για κάθε ομάδα:

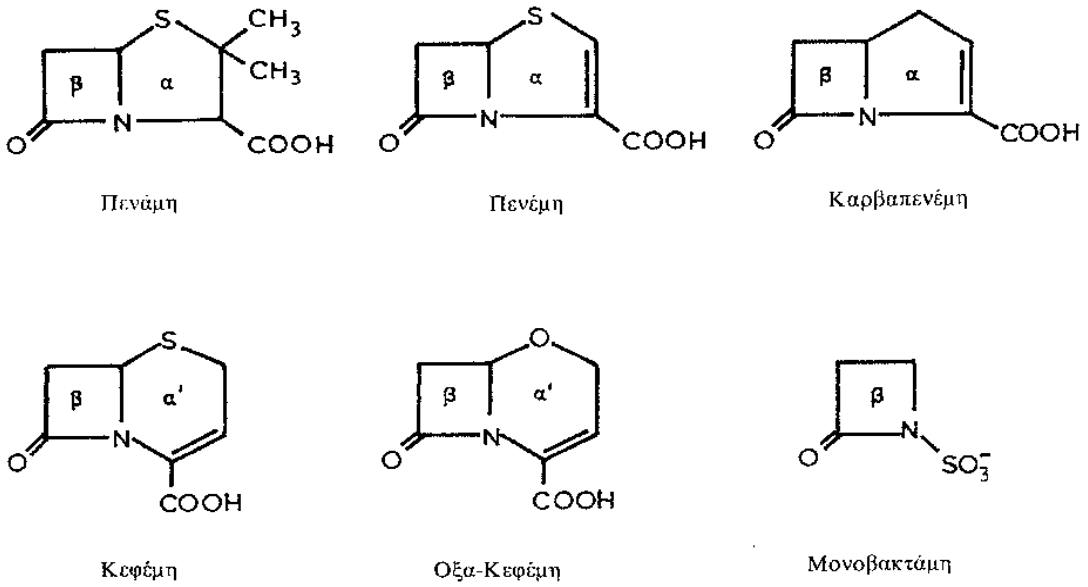
1. β-λακτάμες: Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει ουσίες οι οποίες περιέχουν στο μόριό τους τον πυρήνα της β-λακτάμης (βλέπε σχήμα 2.2). Τα μέλη των β-λακταμικών αντιβιοτικών είναι:

α) Οι πενικιλλίνες, το μόριο των οποίων πλην του τετραμελούς δακτυλίου της β-λακτάμης περιλαμβάνει και τον πενταμελή δακτύλιο της θειαζολιδίνης

β) Οι κεφαλοσπορίνες με το β-λακταμικό και τον εξαμελή δακτύλιο της διυδροθεϊαζίνης

γ) Οι μονοβακτάμες, οι οποίες στον βασικό τους πυρήνα περιέχουν μόνο τον δακτύλιο της β-λακτάμης, και

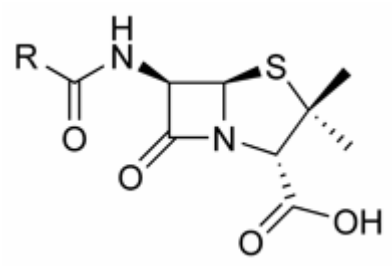
δ) Οι καρβαπενέμες στις οποίες ανήκει η ιμιπενέμη.



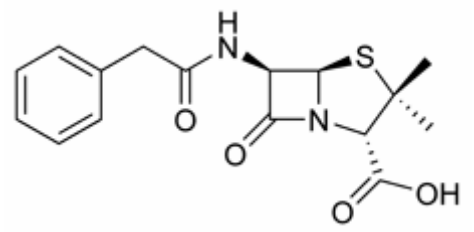
Σχήμα 2.2 Χημική δομή μερικών β-λακταμικών αντιβιοτικών [1]

Όπου β=β-λακταμικός δακτύλιος, α=δακτύλιος θειαζολιδίνης, α΄=δακτύλιος διυθροθειαζίνης

<u>Πενικιλλίνες:</u> Οι πενικιλλίνες αποτελούν παράγωγα του 6-αμινοπενικιλλανικού οξέος. Η πλάγια αλυσίδα R καθορίζει το είδος της πενικιλλίνης.

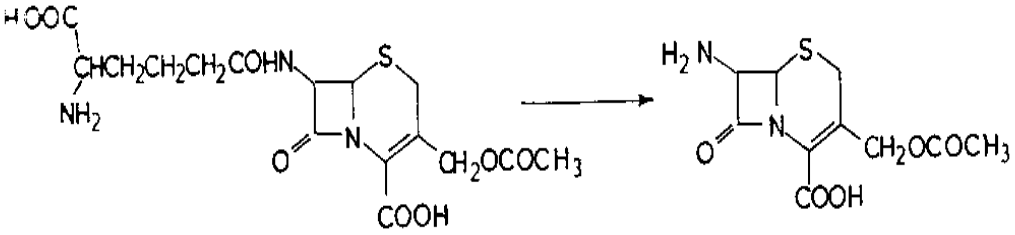


Σχήμα 2.3 Βασική δομή των πενικιλλίνων [1]



Σχήμα 2.4 Πενικιλλίνη G [1]

<u>Κεφαλοσπορίνες:</u> Από το μύκητα *Cephalosporium acremonium* παράγεται η κεφαλοσπορίνη C η οποία έχει περιορισμένη μικροβιακή δράση. Με απομάκρυνση όμως της πλευρικής αλυσίδας παράγεται το 7-αμινο-κεφαλοσπορανικό οξύ, από το οποίο προέρχονται όλες οι άλλες κεφαλοσπορίνες. Αναφέρεται ότι το 30-50% των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στα νοσοκομεία είναι κεφαλοσπορίνες.



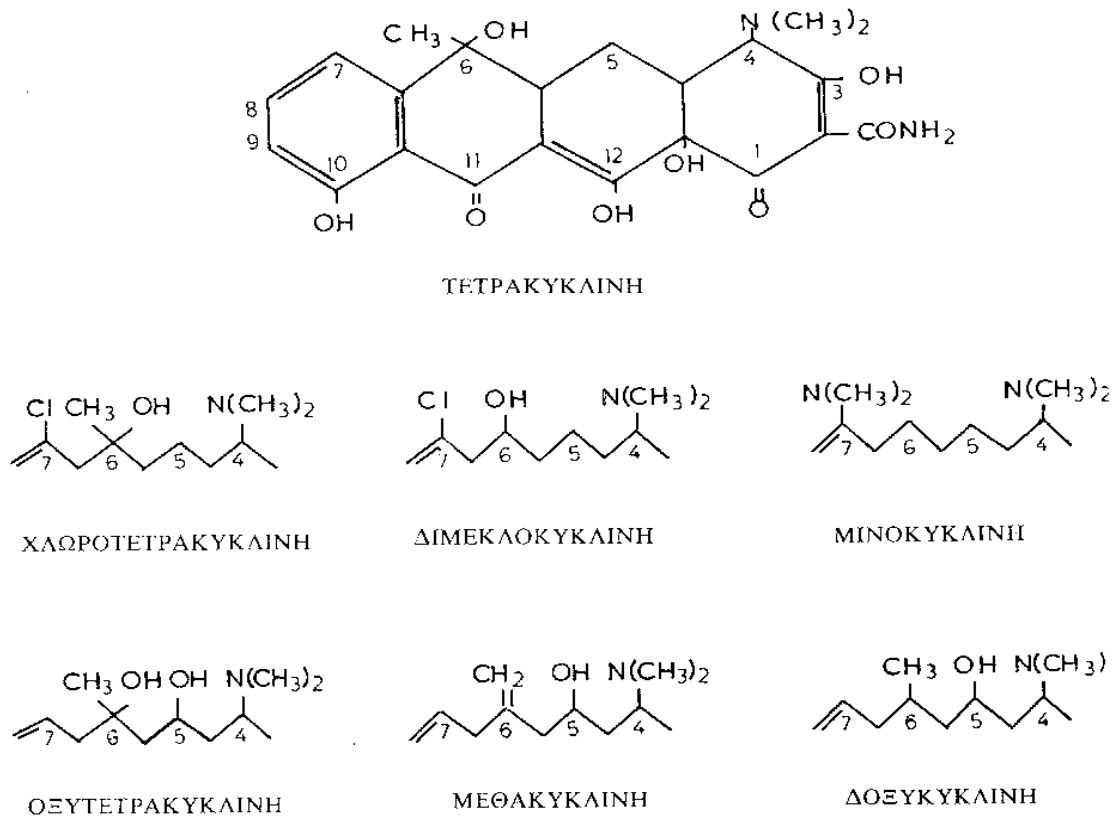
Σχήμα 2.5 Μετατροπή της κεφαλοσπορίνης C σε 7-αμινοκεφαλοσπορανικό οξύ [1]

Πίνακας 2.1Ταξινόμηση των β-λακταμικών αντιβιοτικών [1]

Ομάδα	Υποομάδα	Παράγωγα
Πενικιλλίνες (Πενάμες)	Βενζυλοπενικιλλίνη	Νατριούχος, Προκαϊνική, Βενζαθινική βενζυλοπενικιλλίνη (Πενικιλλίνη G)
	Φαινοξυπενικιλλίνες (Οξεάντοχες)	Φαινοξυμεθυλοπενικιλλίνη (Πενικιλλίνη V), Προπικιλλίνη, Αζιδοκιλλίνη
	Αμινοβενζυλοπενικιλλίνες	Αμπικιλλίνη, Αμοξικιλλίνη, Μπακαμπικιλλίνη Πιβαμπικιλλίνη, Ταλαμπικιλλίνη, Ετακιλλίνη, Επικιλλίνη, Κυκλακιλλίνη
	Ακυλαμινο - (ουρεϊδο -) πενικιλλίνες	Αζλοκιλλίνη, Μεζλοκιλλίνη, Πιπερακιλλίνη, Απαλκιλλίνη
	Καρβοξυπενικιλλίνες	Καρμπενικιλλίνη, Καρινδακιλλίνη, Καρφεκιλλίνη, Τικαρκιλλίνη, Τεμοκιλλίνη
	Ανθεκτικές στις β-λακταμάσες πενικιλλίνες	Δικλοξακιλλίνη, Κλοξακιλλίνη, Μεθικιλλίνη, Ναφκιλλίνη, Οξακιλλίνη, Φλουκλοξακιλλίνη
	Άλλες πενικιλλίνες	Μεκιλλινάμη, Πιμβεκιλλινάμη
Κεφαλοσπορίνες (Κεφέμες)	Ομάδα Κεφαλοθίνης - Κεφαζολίνης	Κεφαλοθίνη, Κεφαλοριδίνη, Κεφαζολίνη, Κεφραδίνη, Κεφασετρίλη, Κεφαπιρίνη
	Ομάδα Κεφουροξίμης	Κεφουροξίμη, Κεφαμανδόλη, Κεφοτιάμη
	Ομάδα Κεφοξιτίνης	Κεφοξιτίνη, Κεφοτετάνη, Κεφμεταζόλη
	Ομάδα Κεφοταξίμης	Κεφοταξίμη, Κεφτριαξόνη, Κεφτιζοξίμη, Κεφμενοξίμη, Κεφταζιδίμη
	Κεφαλοσπορίνες από του στόματος	Κεφαλεξίνη, Κεφακλόρη, Κεφαδροξίλη, Κεφραδίνη, Κεφροξαδίνη, Κεφατριζίνη, Κεφουροξίμη αξετίλ, Κεφιξίμη, Κεφποδιξίμη
	Αλλες Κεφαλοσπορίνες	Κεφσουλοδίνη, Κεφοπεραζόνη
Καρβαπενέμες	–	Θειεναμυκίνη, Ιμιπενέμη, Ολιβανικό οξύ
Μονοβακτάμες	–	Αζτρεονάμη, Νοκαρδικίνη
Αναστολείς των β-λακταμασών		Κλαβουλανικό οξύ, Σουλβακτάμη

2. Τετρακυκλίνες: Οι τετρακυκλίνες θεωρούνται ως τα πρώτα αντιβιοτικά ευρέου φάσματος αν και σήμερα η χρήση τους είναι περιορισμένη για λοιμώξεις από συνήθη βακτήρια λόγω ανάπτυξης αντοχής από τα τελευταία. Όποτε χρησιμοποιούνται αναστέλλουν την πρωτεινοσύνθεση των βακτηρίων.

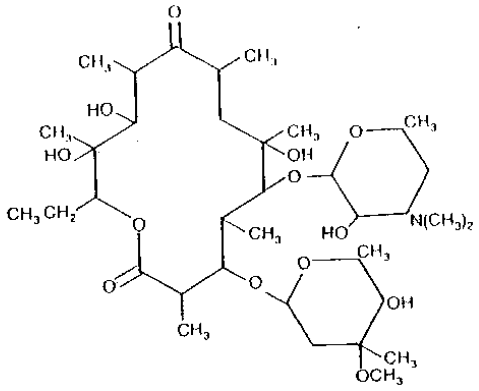
Η βασική δομή των τετρακυκλινών είναι ένας πυρήνας υδροξυναφθακενίου, ο οποίος περιέχει τέσσερις βενζολικούς δακτυλίους.



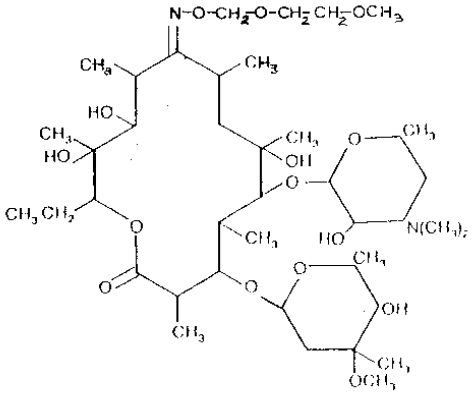
Σχήμα 2.6 Χημική δομή των κυριοτέρων τετρακυκλινών [1]

3. Μακρολίδες: Οι μακρολίδες ανήκουν στα βακτηριοστατικά φάρμακα, έχουν ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων αφού εμποδίζουν τη μεταφορά ή και τη μετάθεση των πεπτιδίων. Η ομάδα των μακρολιδίων περιλαμβάνει τα αντιβιοτικά ερυθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη, αζιθρομυκίνη, ροξιθρομυκίνη, τυλοκίνη κ.α.

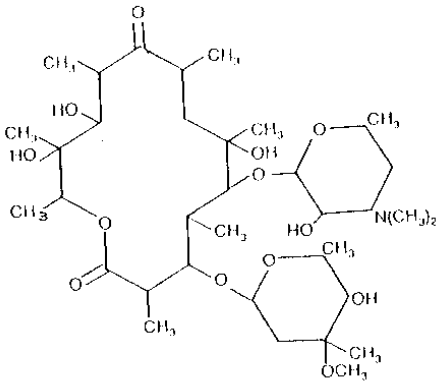
Η βασική χημική δομή των μακρολιδίων είναι ένας μακροκυκλικός δακτύλιος της λακτόνης που αποτελείται από 14, 15 ή 16 άτομα, ενωμένος με τα σάκχαρα δεξοζαμίνη και κλαδινόζη.



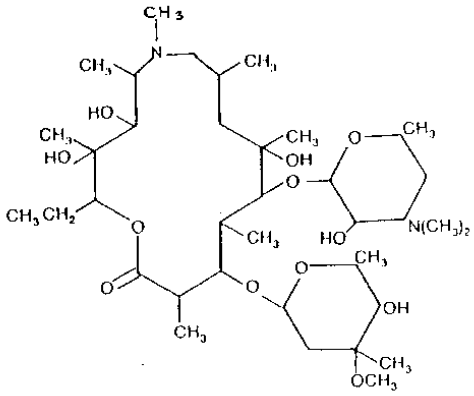
Ερυθρομυκίνη



Ροξιθρομυκίνη



Κλαριθρομυκίνη



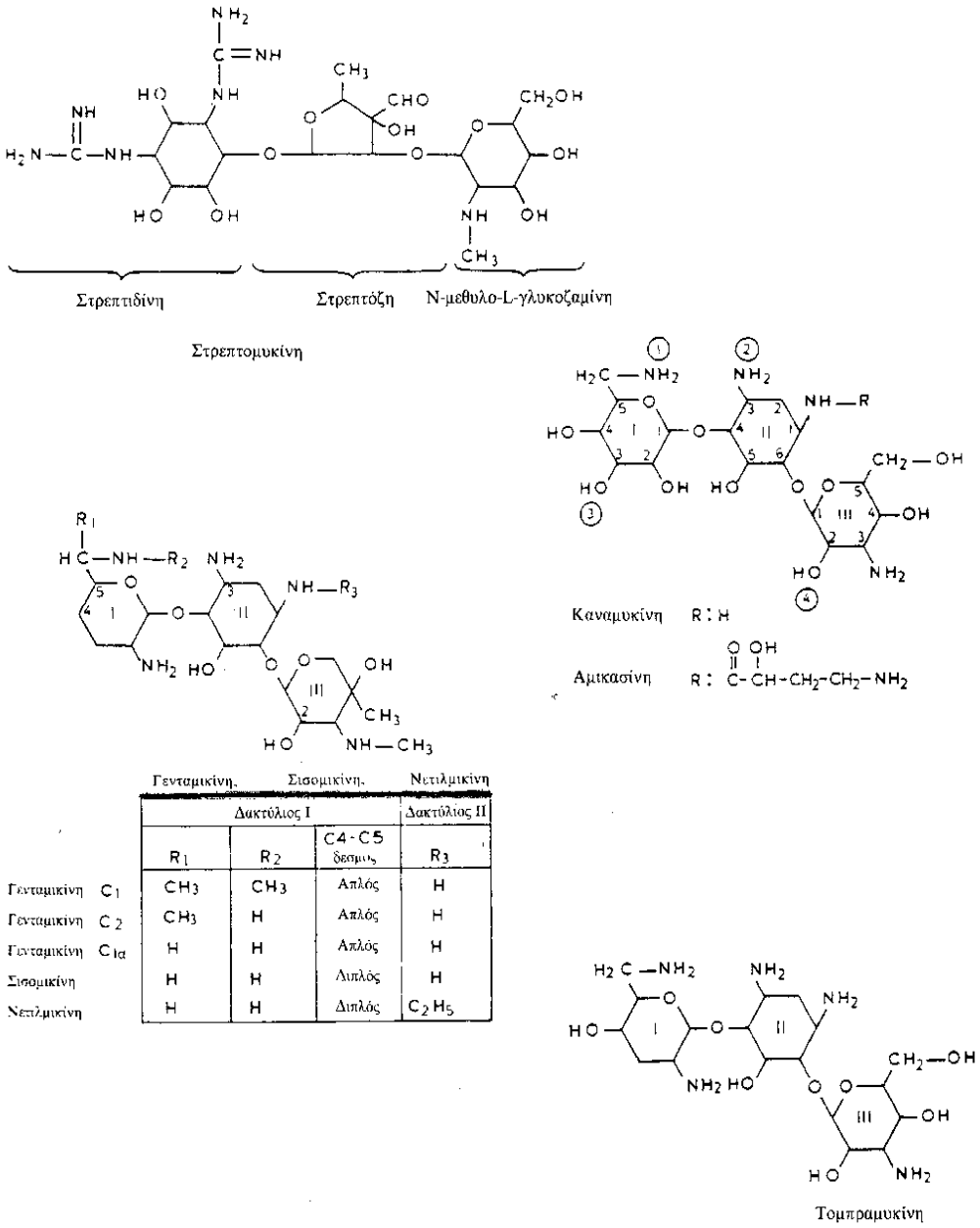
Αζιθρομυκίνη

Σχήμα 2.7 Χημική δομή των μακρολιδίων [1]

4. Αμινογλυκοσίδες: Τα αντιβιοτικά αυτά είναι βακτηριοκτόνα για τα αερόβια βακτήρια και ορισμένα από αυτά έχουν και αντιφυματική δράση. Η ανακάλυψη των αμινογλυκοσιδών ήταν σταθμός στη θεραπευτική των λοιμώξεων, και εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται σε σοβαρές λοιμώξεις παρά την τοξικότητά τους. Όταν οι αμινογλυκοσίδες ενωθούν με τα ριβοσώματα των βακτηρίων γίνεται λανθασμένη ανάγνωση του γενετικού κώδικα με συνέπεια τη σύνθεση μη φυσιολογικών πρωτεϊνών.

Από χημική άποψη οι αμινογλυκοσίδες αποτελούνται από μια αμινοκυκλιτόλη (πολυκυκλική αλκοόλη που φέρει αμινομάδες) ενωμένη μέσω γλυκοσιδικών

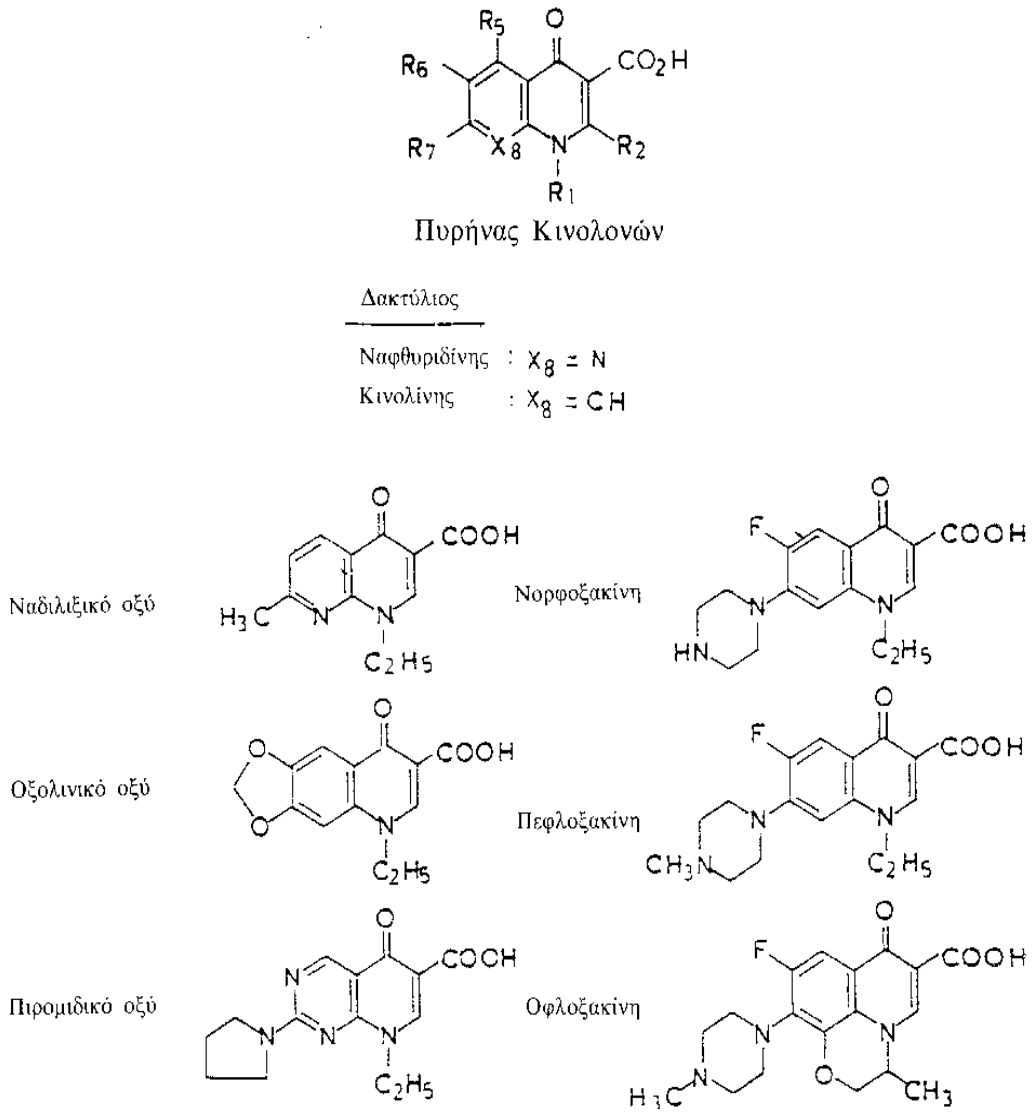
δεσμών με ένα ή και περισσότερα αμινοσάκχαρα, γι'αυτό και λέγονται αμινογλυκοσίδες. Στις αμινογλυκοσίδες ανήκουν η στρεπτομυκίνη, η νεομυκίνη, η γενταμικίνη, κ.ά.



Σχήμα 2.8 Χημική δομή των αμινογλυκοσιδών [1]

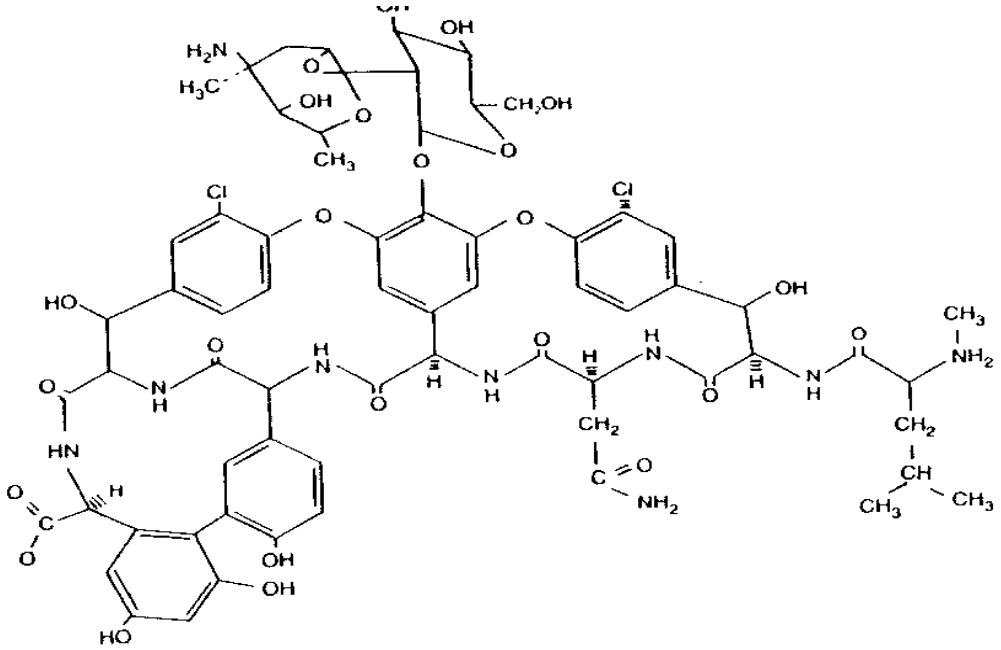
5. Κινολόνες: Οι κινολόνες είναι συνθετικά αντιβιοτικά που δρουν στις λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος αν και τα νεώτερα μέλη της ομάδας είναι πολύ δραστικά σε συστηματικές λοιμώξεις. Δρουν τόσο σε Gram- θετικά όσο και Gram-αρνητικά βακτήρια εχοντας βακτηριοκτόνο επίδραση.

Χημικά, οι κινολόνες διακρίνονται σε δύο ομάδες τα παράγωγα της ναφθυριδίνης και τα παράγωγα της κινολίνης. Η πρώτη ομάδα με εκπρόσωπο το ναλιδιξικό οξύ, χαρακτηρίζεται από την παρουσία N στις θέσεις 1 και 8 του μορίου, ενώ η δεύτερη ομάδα με εκπρόσωπο το οξολινικό οξύ φέρει N μόνο στη θέση 1 του μορίου. Όλες οι νεώτερες κινολόνες φέρουν F στη θέση 6.

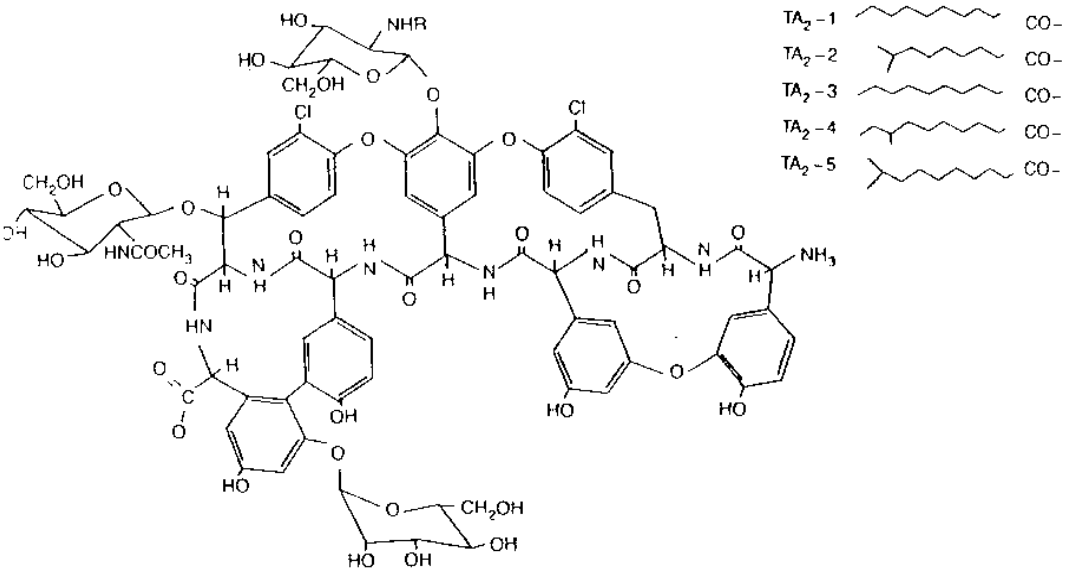


Σχήμα 2.9 Χημική δομή των κινολονών [1]

6. Γλυκοπεπτίδια: Πρόκειται για μια μεγάλη ομάδα ουσιών, που παράγονται από ακτινομύκητες και αποτελούνται από μεγάλα κυκλικά μόρια με αμινοξέα, ενωμένα με σάκχαρα. Είναι αντιβιοτικά στενού φάσματος, με δράση μόνο σε Gram- θετικά βακτήρια. Οι κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας είναι η βανκομυκίνη και η τεϊκοπλανίνη των οποίων οι χημικές δομές φαίνονται παρακάτω:



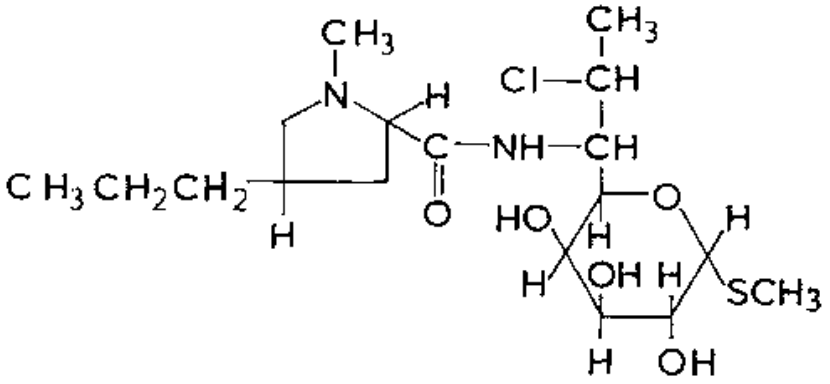
Σχήμα 2.10 Χημική δομή της βανκομυκίνης [1]



Σχήμα 2.11Χημική δομή της τεϊκοπλανίνης [1]

7.Λινκοσαμίδες: Οι λινκοσαμίδες αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση, παρεμβαίνοντας στη μεταφορά των πεπτιδίων κατά την διαδικασία επιμήκυνσης της πεπτιδικής αλυσίδας σε πολλά στελέχη Gram-θετικών και Gram-αρνητικών αναερόβιων βακτηρίων.

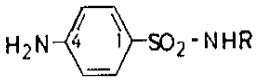
Από χημικής άποψης οι λινκοσαμίδες αποτελούνται από ένα αμινοξύ ενωμένο με ένα αμινοσάκχαρο. Με χημική τροποποίηση της λινκομυκίνης, και αντικαθιστώντας την υδροξυλομάδα της 7^{ης} θέσης με χλώριο παράγεται η κλινταμυκίνη (7-χλωρο-7-δεσοξυλινκομυκίνη).



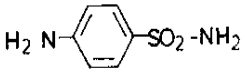
Σχήμα 2.12 Χημική δομή της κλινταμυκίνης [1]

8.Σουλφοναμίδες: Οι σουλφοναμίδες είναι παράγωγα της σουλφανιλαμίδης. Σχηματίζονται με υποκατάσταση των ελευθέρων αμινομάδων με N^1 ή και N^4 με ετεροκυκλικές ομάδες.

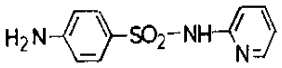
Πρόκειται για βακτηριοστατικά αντιβιοτικά ευρέου φάσματος που δρουν με παρεμβολή στη σύνθεση του φυλλικού οξέος των μικροβίων. Η αντοχή των μικροβίων στις σουλφοναμίδες είναι πολύ διαδεδομένη, είναι διασταυρούμενη για όλα τα μέλη και πολλές φορές συνδυάζεται με αντοχή σε αντιβιοτικά που ανήκουν σε άλλες ομάδες. Η αντοχή μπορεί να οφείλεται σε χρωμοσωματικές μεταλλάξεις ή στην παρουσία πλασμιδίων. Από βιοχημική άποψη, η αντοχή εκφράζεται με αλλαγή διαμόρφωσης των ενζύμων που καταλύουν τη βιοσύνθεση του φυλλικού οξέος, ώστε να μην αναγνωρίζουν τη σουλφοναμίδη.



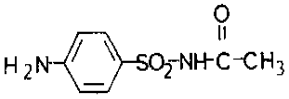
Πυρήνας σουλφοναμιδών



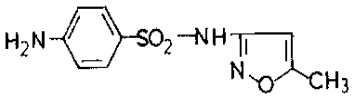
Σουλφανιλαμίδη



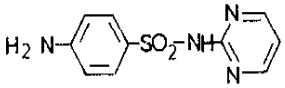
Σουλφαπυριδίνη



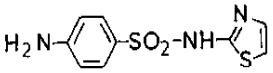
Σουλφακεταμίδη



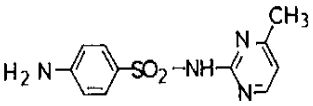
. Σουλφαμεθοξαζόλη



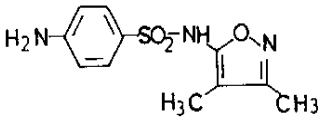
Σουλφαδιαζίνη



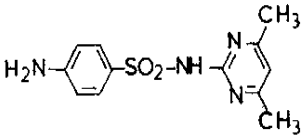
Σουλφαθειαζόλη



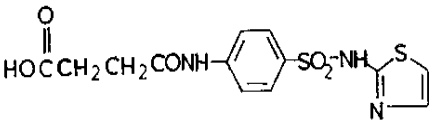
Σουλφαμεραζίνη



Σουλφισοξαζόλη



Σουλφαμεθαζίνη



Σουκκινιλοσουλφαθειαζόλη

Σχήμα2.13 Χημική δομή των κυριοτέρων σουλφοναμιδών [1]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.3

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

3.1 Αναλυτική προσέγγιση για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών στο περιβάλλον.

Τα αντιβιοτικά, καθώς και η πληθώρα των υπολοίπων φαρμακευτικών ουσιών, δεν ανιχνεύονται εύκολα ιδιαίτερα στο περιβάλλον. Η δυσκολία ανίχνευσης έγκειται σε διάφορους παράγοντες.

Καταρχήν δεν πρόκειται για ομοιογενείς ομάδες ενώσεων αλλά ποικίλουν ευρέως σε μοριακό βάρος, δομή, δραστικότητα, ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων κ.τ.λ. Καθώς αποτελούνται από συγκριτικά μεγάλα και χημικά περίπλοκα μόρια, που περιέχουν ετεροάτομα και πολλαπλές δραστικές ομάδες, η πολικότητα τους εξαρτάται κατά βάση από το pH του διαλύματος με συνέπεια την πολύ μεγάλη διακύμανση των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων.

Επειδή τα ενεργά φαρμακευτικά συστατικά υπόκεινται στην διαδικασία της χώνευσης, η χορηγούμενη πρόδρομη ένωση μπορεί να εκκριθεί είτε αναλλοίωτη, είτε ως ένας μείζων μεταβολίτης, ή τέλος ως ένα περίπλοκο μείγμα πολλών μεταβολιτών.

Η μελέτη των πατρικών ενώσεων ίσως να μην δίνει επαρκώς τις χημικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των μεταβολιτών και απαιτείται επιστημονική κρίση και εκτίμηση για τα χημικά ήδη που πιθανώς να εισέρχονται στο περιβάλλον.

Τα ιδιαίτερα προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν αναφορικά με τα αντιβιοτικά είναι:

α) η χαμηλή ευαισθησία στην ανίχνευση UV λόγω έλλειψης κατάλληλων χρωμοφόρων ομάδων,

β) η περιπλοκότητα των μειγμάτων τα οποία αποτελούνται από ενεργά συστατικά με μεταβλητή αναλογία,

γ) η μη ύπαρξη εμπορικά διαθέσιμων προτύπων ουσιών,

δ) οι σημαντικές παρεμποδίσεις στην ποσοτικοποίηση που οφείλονται στην παρουσία οργανικής ύλης στις μήτρες των δειγμάτων και

ε) η μεγάλη ποικιλία φυσικοχημικών ιδιοτήτων τόσο μεταξύ μελών της ίδιας ομάδας όσο και μελών διαφορετικών ομάδων.

Σύμφωνα λοιπόν με όλα τα παραπάνω απαιτείται μία μέθοδος ανάλυσης η οποία να είναι ευαίσθητη, προσαρμόσιμη και αρκετά εξειδικευμένη για να καταγράφει ενώσεις σε επίπεδα ng/L, να περιλαμβάνει όλες τις προς

ανίχνευση υποψήφιες φαρμακευτικές ουσίες και να παρέχει αξιόπιστα δεδομένα για κάθε ένωση χωριστά. Αν και έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία μερικοί μέθοδοι προσδιορισμού αντιβιοτικών με τη χρήση της αεριοχρωματογραφίας (Gas chromatography, GC) συζευγμένης με φασματόμετρο μάζας (Mass spectrometer, MS), ο προσδιορισμός των αντιβιοτικών με αυτή την τεχνική απαιτεί την παραγωγοποίηση τους, καθότι πρόκειται για πολικές ενώσεις [19], [20].

Όμως όπως έχουμε ήδη αναφέρει οι ομάδες των αναλυτών δείχνουν διαφορετικές ιδιότητες όσον αφορά τον αριθμό και το είδος των δραστικών ουσιών και έτσι καθίσταται δύσκολη η ανάπτυξη μιας γενικής διαδικασίας παραγωγοποίησης για όλους τους αναλύτες. Η πλέον ισχυρή τεχνική για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση μιγμάτων αντιβιοτικών είναι αυτή της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) συζευγμένης με φασματόμετρο μάζας, εν συντομία **HPLC-MS**.

Αυτή είναι η τεχνική που συναντάται κατά κόρον στην βιβλιογραφία που αφορά την ανίχνευση των αντιβιοτικών στο περιβάλλον, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν επιδέχεται βελτιώσεις όπως για παράδειγμα την μείωση του ορίου ανίχνευσης πέραν των ng/L ή ότι δεν δημιουργούνται προβλήματα κατά την ανάλυση όπως θα φανεί και από τις περιπτωσιολογικές μελέτες που θα αναφερθούν. Επίσης μπορούμε να έχουμε HPLC σε συνδυασμό με συζευγμένη φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry, MS / MS ή αλλιώς MS^2) και εν συντομία **HPLC tandem MS**.

Για να έχουμε την καλύτερη δυνατή ανάλυση, απαιτείται ακόμη η χρήση προχωρημένων τεχνικών εκχύλισης, όπως υγρή εκχύλιση υπό πίεση (pressurized liquid extraction, PLE), μερικές φορές σε συνδυασμό με εκχύλιση στερεής φάσης (solid phase extraction, SPE). Συνήθως μετά την PLE, απαιτείται καθαρισμός και προσυγκέντρωση του δείγματος.

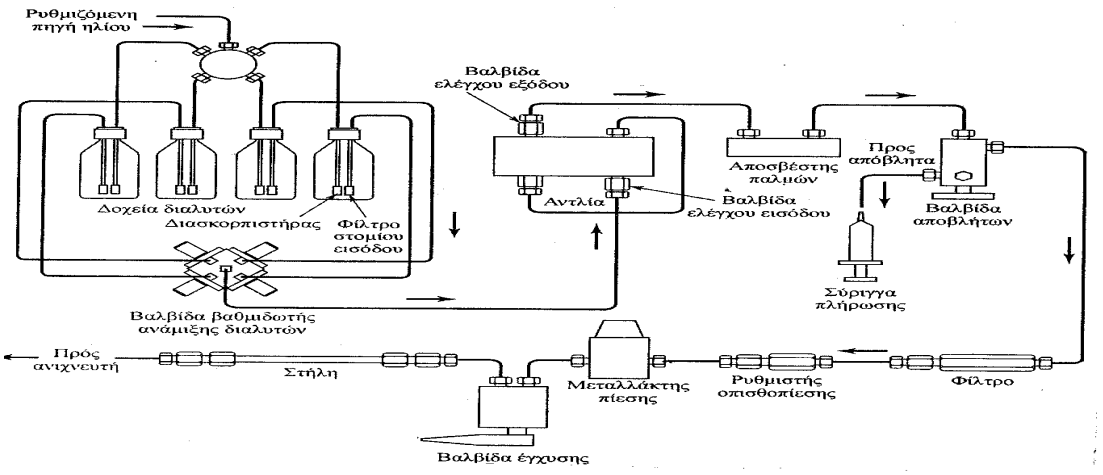
Σε συνέχεια της εισαγωγής αυτής θα αναφερθούμε συνοπτικά στην υγροχρωματογραφία, στην υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης, στην φασματομετρία μάζας καθώς και στην σύζευξη LC-MS, καθώς και σε περιπτωσιολογικές μελέτες ανάλυσης αντιβιοτικών σε υδατικά και στερεά διαμερίσματα.

3.1.1 Υγροχρωματογραφία:

Στην LC το δείγμα κινείται σε μια υγρή κινητή φάση (liquid mobile phase) η οποία εξαναγκάζεται να διέλθει μέσα από μια στατική φάση (stationary phase) καθηλωμένη σε μία στήλη. Οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από την στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από την στατική φάση κινούνται ταχύτερα. Η ταυτοποίηση μιας ένωσης συνήθως βασίζεται στον χρόνο κατακράτησης της (retention time). στη στήλη

Η HPLC αποτελεί εξέλιξη της LC. Όταν οι επιστήμονες συνειδητοποίησαν ότι μειώνοντας το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης θα βελτίωνε την απόδοση της στήλης κατέστη σαφές ότι η βαρυτική ροή για το διαχωρισμό των μιγμάτων ήταν πλέον ανεπαρκής. Το πρόβλημα λύθηκε εξαναγκάζοντας την κινητή φάση να ρέει μέσα από την στήλη κάτω από υψηλή πίεση (70-400 bar) και εξασφαλίστηκαν ροές (0,5-5mL/min).

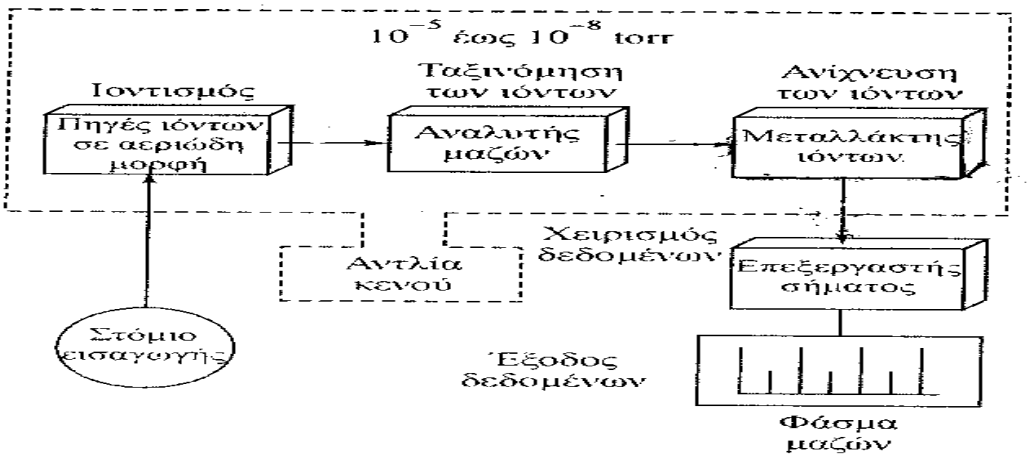
Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι σήμερα η πιο διαδεδομένη απ΄ όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού. Οι λόγοι αποδοχής αυτής της τεχνικής είναι η ευαισθησία και η καταλληλότητα της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών. Παραδείγματα εφαρμογής της είναι ο διαχωρισμός και προσδιορισμός αμινοξέων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, υδρογονανθράκων, υδατανθράκων, τερπενοειδών, φυτοφαρμάκων, αντιβιοτικών, στεροειδών, οργανομεταλλικών ενώσεων και μιας ποικιλίας ανόργανων ουσιών.



Σχήμα 3.1 Διάγραμμα ενός τυπικού HPLC [21]

3.1.2 Φασματομετρία μάζας:

Το φασματόμετρο μάζας είναι ένα όργανο, το οποίο διαχωρίζει ταχέως κινούμενα ιόντα με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο, **m/z**.Το παρακάτω συνοπτικό διάγραμμα δείχνει τα κύρια μέρη, από τα οποία αποτελούνται όλοι οι τύποι των φασματόμετρων μαζών.



Σχήμα 3..2 Συνοπτικό διάγραμμα ενός φασματόμετρου μαζών [21]

Ο ρόλος του σημείου εισόδου είναι η εισαγωγή μικροποσότητας δείγματος στην πηγή των ιόντων, όπου οι ενώσεις του δείγματος μετατρέπονται σε αεριώδη ιόντα μετά από βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, φωτόνια, ιόντα ή μόρια . Εναλλακτικά ο ιονισμός μπορεί να επιτευχθεί με θερμική ή ηλεκτρική ενέργεια. Από την πηγή ιόντων εξέρχεται ένα ρεύμα θετικών (συχνότερα) ή αρνητικών ιόντων σε αεριώδη κατάσταση, τα οποία επιταχύνονται προς τον αναλυτή μαζών. Ο ρόλος του αναλυτή μαζών είναι ανάλογος με αυτόν του μονοχρωμάτορα στα οπτικά φασματόμετρα. Ωστόσο στον πρώτο η διασπορά βασίζεται στον λόγο μάζας προς φορτίο των ιόντων του αναλυτή και όχι στο μήκος κύματος των φωτονίων.

Ο συνηθέστερος τύπος ανάλυσης μαζών είναι το **τετράπολο**. Πρόκειται για τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδους που δρουν ως ηλεκτρόδια. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με τον θετικό πόλο μιας πηγής μεταβλητής τάσης DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Επιπλέον σε κάθε ζεύγος ράβδων εφαρμόζονται μεταβλητές τάσεις AC (με συχνότητα στην περιοχή ραδιοσυχνοτήτων), που βρίσκονται μεταξύ τους σε διαφορά φάσης 180°. Για να ληφθεί το φάσμα μαζών με αυτή τη συσκευή, τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με ένα δυναμικό 5 έως 10V. Τα εναλλασσόμενα και συνεχή δυναμικά των ράβδων αυξάνουν ταυτόχρονα διατηρώντας όμως τον λόγο τους

σταθερό. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z φθάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι φθάνουν στον μεταλλάκτη μόνο ιόντα των οποίων οι τιμές βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών του λόγου m/z. Με τα τετραπολικά όργανα μπορούν εύκολα να διακριθούν ιόντα που διαφέρουν μεταξύ τους κατά μια μονάδα μάζας.

Ο **μεταλλάκτης ιόντων** είναι μια συσκευή που μετατρέπει την ιοντική δέσμη σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο μπορεί να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία, να αποθηκευθεί στη μνήμη ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή και να παρουσιασθεί ή να καταγραφεί με διάφορους τρόπους. Τονίζεται ότι τα φασματόμετρα μαζών απαιτούν ένα πολύπλοκο σύστημα παραγωγής κενού για διατήρηση της πίεσης σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε όλα τα τμήματα τους, εκτός από το τμήμα επεξεργαστή σήματος και το σύστημα ανάγνωσης και καταγραφής.

Οι εφαρμογές της φασματομετρίας μαζών είναι πάρα πολλές. Μερικές από τις σημαντικότερες εφαρμογές της είναι: διευκρίνιση της δομής οργανικών και βιολογικών μορίων, προσδιορισμός αμινοξέων σε δείγματα πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών, προσδιορισμός υπολειμμάτων εντομοκτόνων στα τρόφιμα, παρακολούθηση οργανικών πτητικών ουσιών στα αποθέματα ύδατος, ταυτοποίηση καθαρών ουσιών, μελέτη της μορφής των θραυσμάτων για την παρουσία ή την απουσία διαφόρων δραστικών ομάδων κ.α.Το βασικό μειονέκτημα της MS είναι ο περιορισμός της στον χειρισμό μιγμάτων ενώσεων. Η σύζευξη ενός φασματόμετρου μαζών με ένα δεύτερο μπορεί να λύσει το πρόβλημα αλλά μέχρι ενός σημείου.

Στην τεχνική αυτή το πρώτο φασματόμετρο χρησιμοποιείται για την απομόνωση των μοριακών ιόντων των διαφόρων συστατικών ενός δείγματος. Στη συνέχεια τα ιόντα αυτά εισάγονται σε ένα δεύτερο φασματόμετρο μαζών, όπου θραύονται για να δώσουν μια σειρά φασμάτων μαζών, μια για κάθε μοριακό ιόν που παράγεται στο πρώτο φασματόμετρο. Στις εφαρμογές αυτού του είδους, το πρώτο φασματόμετρο δρα περίπου όπως η χρωματογραφική στήλη στα συστήματα GC-MS ή LC-MS. Παρέχει δηλαδή καθαρές ιοντικές ουσίες για ταυτοποίηση στο δεύτερο φασματόμετρο.

3.1.3 Υγροχρωματογραφία- Φασματομετρία μάζας:

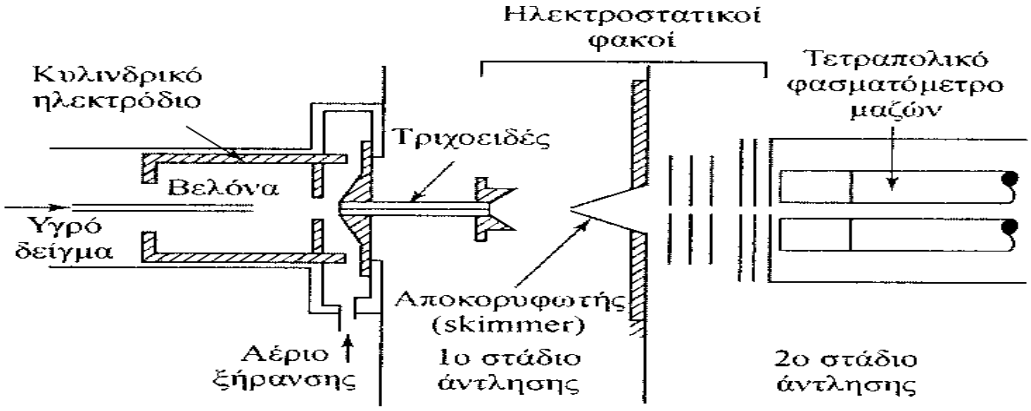
Ένα σύστημα υγροχρωματογραφίας συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας αποτελείται από τρία βασικά μέρη: το όργανο της LC για τον διαχωρισμό ενός περίπλοκου δείγματος ουσιών, την διασύνδεση για τη μεταφορά του αναλυτή στην πηγή ιόντων του φασματόμετρου μάζας και ένα MS για τον ιονισμό και την ανάλυση μάζας του κάθε διαχωρισμένου συστατικού ξεχωριστά.

Ένα βασικό πρόβλημα στη σύζευξη της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών είναι η ασυμβατότητα μεταξύ των σχετικά μεγάλων όγκων διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην πρώτη και του κενού που απαιτείται στη δεύτερη. Επιπλέον η διασύνδεση LC-MS θα πρέπει να είναι ικανή να χειρίζεται το υδατικό περιεχόμενο, τους οργανικούς και ιονικούς τροποποιητές και τα ρυθμιστικά διαλύματα της κινητής φάσης. Από το 1970 έχουν αναπτυχθεί πολλές και διάφορες διασυνδέσεις LC-MS, αλλά λίγες έχουν βρει ευρεία αποδοχή. Σε ένα εμπορικά διαθέσιμο σύστημα το υγρό έκλουσης από τη στήλη διαχωρίζεται και μόνο ένα μικρό κλάσμα εισάγεται κατευθείαν στον ανιχνευτή μαζών. Αλλά και η προοπτική άμεσης εισαγωγής του υγρού στο σύστημα είναι εφικτή στην περίπτωση χρήσης στηλών μικρής διαμέτρου με ταχύτητες ροής από 10 έως 50 μL/min.

Άλλοι τρόποι διασύνδεσης είναι ο κινούμενος ιμάντας ή σύρμα, ο θερμοψεκασμός, η δέσμη σωματιδίων και η διασύνδεση με ιονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (atmospheric pressure ionization, API). Η API με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (electrospray ionization, **ESI**) είναι μοναδική διότι έχει μεγάλη δυναμική για την ανάλυση μακρομορίων, παρέχει υψηλή ευαισθησία και συνδέεται εύκολα με LC. Επειδή η τεχνική **LC– ESI – MS** χρησιμοποιείται κατά κόρον για την ανίχνευση αντιβιοτικών στο περιβάλλον, θεωρούμε σκόπιμο να αναφερθούμε αναλυτικότερα στον ηλεκτροψεκασμό ως μέθοδο ιονισμού.

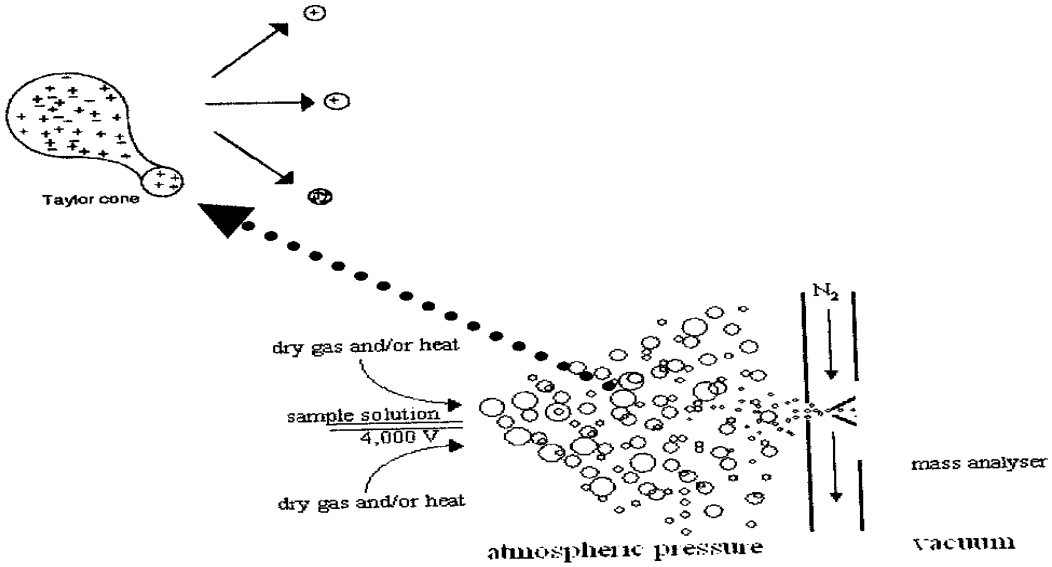
3.1.4 Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό:

Ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία σε μια συσκευή όπως αυτή που απεικονίζεται παρακάτω. Το διάλυμα του δείγματος αντλείται μέσω μιας ανοξείδωτης τριχοειδούς βελόνας με ταχύτητα μερικών μL/min. Η βελόνα βρίσκεται σε δυναμικό αρκετών kV (4-4.5 kV) ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο που περιβάλλει την βελόνα. Οι δημιουργούμενες φορτισμένες μικρές σταγόνες διέρχονται μέσω ενός τριχοειδούς, όπου ο διαλύτης εξατμίζεται και φορτίζονται τα μόρια του αναλυτή.



Σχήμα 3.3 Συσκευή για τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό [21]

Καθώς οι σταγόνες μικραίνουν λόγω της εξαέρωσης του διαλύτη, η πυκνότητα του φορτίου αυξάνει και πραγματοποιείται εκρόφηση των ιόντων στο περιβάλλον αέριο. Τα ιόντα «παρασύρονται» στο **MS,** το οποίο λειτουργεί υπό κενό, όπου διαχωρίζονται και ανιχνεύονται.



Σχήμα 3.4 Διαδικασία ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό [22]

Ένα πολύ ενδιαφέρον και χρήσιμο χαρακτηριστικό της διαδικασίας του ηλεκτροψεκασμού είναι ότι περιορίζεται η θραύση μεγάλων και θερμικά ασταθών βιομορίων. Επιπλέον τα παραγόμενα ιόντα είναι πολλαπλά φορτισμένα, οπότε οι τιμές m/z είναι αρκετά μικρές και ανιχνεύονται εύκολα με τετραπολικά όργανα που καλύπτουν περιοχές μοριακών βαρών 1500 ή μικρότερες. Η αύξηση του ρυθμού εξάτμισης του διαλύτη με την εισαγωγή αερίου ξήρανσης που ρέει αντίθετα με τα ψεκασμένα ιόντα, αυξάνει την έκταση της πολλαπλής φόρτισης [22].

3.1.5 Πλεονεκτήματα της τεχνικής HPLC– ESI – MS

1. Οι δυνατότητες τόσο της HPLC όσο και της MS αυξάνονται συνεργιστικά. Από την μια μεριά μειώνεται η απαιτούμενη υψηλή διαχωριστική ικανότητα του HPLC ενώ από την άλλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα φτηνό, χαμηλής διαχωριστικότητας MS ως ένας αποτελεσματικός ανιχνευτής μάζας.
2. Ο μοριακός προσδιορισμός της ανάλυσης βελτιώνεται περαιτέρω επειδή ο αναλύτης ταυτοποιείται τόσο από τον χρωματογραφικό χρόνο κατακράτησης όσο και από συγκεκριμένα δομικά δεδομένα από το MS.
3. Μίγματα που διαφέρουν σε βαθμό περιπλοκότητας αναλύονται εύκολα.
4. Η ευαισθησία της ανάλυσης βελτιώνεται επειδή το δείγμα εισέρχεται στο φασματόμετρο μάζας με τη μορφή μιας στενής κορυφής HPLC.
5. Αποφεύγονται αρκετά κοπιαστικά πειραματικά βήματα, με αποτέλεσμα να υπάρχει ελάχιστη απώλεια σε δείγμα και μείωση του συνολικού χρόνου ανάλυσης.
6. Επειδή γίνεται καθαρισμός του αναλύτη κατά την HPLC ελαχιστοποιείται η καταστολή σήματος* κατά την ανάλυση με MS και βελτιώνονται τα δεδομένα του φάσματος μάζας.

* Καταστολή σήματος: Η ιονική καταστολή και κατ’ επέκταση και η καταστολή σήματος προκύπτει από την παρουσία λιγότερων πτητικών ενώσεων που μπορούν να αλλάξουν την αποδοτικότητα του σχηματισμού των φορτισμένων ιόντων στη αέρια φάση που τελικά φθάνουν στον ανιχνευτή.

3.2 Αναλυτικοί μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών στα διάφορα υδατικά περιβαλλοντικά διαμερίσματα:

Έχει αποδειχθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος τόσο των παραγομένων όσο και των χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών σταδιακά καταλήγει σε κάποια υδατική λεκάνη, γενικά είτε μέσω των εκροών των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων είτε μέσω των γεωργικών απορροών.

Για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών σε διάφορα υδατικά διαμερίσματα υπάρχει πληθώρα ερευνητικών δημοσιεύσεων από τις οποίες μπορούν να εξαχθούν τρία ασφαλή συμπεράσματα:

α) οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών ποικίλουν μεταξύ μg/L και ng/L

β) Η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με ένα δίδυμο φασματόμετρο μάζας, είναι η ισχυρή τεχνική για το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των πολικών αυτών ενώσεων (οι λόγοι έχουν αναφερθεί στην εισαγωγή του κεφαλαίου) και

γ) οι συνθήκες επεξεργασίας και διαχωρισμού ενός μίγματος πρέπει να προσαρμόζονται ανάλογα με τα συστατικά του.

Οι Petrovic et.al [23] δημοσίευσαν το 2005 μια πλήρη ανασκόπηση των μεθόδων LC-tandem MS που έχουν χρησιμοποιηθεί πρόσφατα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαρμακευτικών ουσιών (περιλαμβανομένων και των αντιβιοτικών) σε δείγματα υγρών αποβλήτων, ποσίμου νερού, επιφανειακών και υπογείων υδάτων καθώς και σε χώματα. Οι ίδιοι ερευνητές παρουσιάζουν πίνακες με τα m/z πρόδρομων και προϊόντων ιόντων πολλών φαρμακευτικών ουσιών. Εμείς θα υιοθετήσουμε αυτήν την ανασκόπηση μιας και είναι πολύ πρόσφατη παραθέτοντας δύο πίνακες, ένα για τις μεθόδους LC-tandem MS (βλέπε πίνακα 3.1), και ένα με πρόδρομα και προϊόντα ιόντα που αφορούν αποκλειστικά τα αντιβιοτικά (βλέπε πίνακα 3.2) .

Στη συνέχεια θα αναφέρουμε αναλυτικά τρεις περιπτωσιολογικές μελέτες που αφορούν την ανίχνευση αντιβιοτικών σε διάφορα υδατικά περιβαλλοντικά διαμερίσματα. Η πρώτη είναι αυτή του Hirsch και των συνεργατών του [24], οι οποίοι μπόρεσαν να προσδιορίσουν ταυτόχρονα 18 διαφορετικά αντιβιοτικά από τις κατηγορίες των πενικιλλίνων, των τετρακυκλίνων, των σουλφον-αμίδων και των μακρολιδίων σε διαφορετικά υδατικά διαμερίσματα, χρησιμοποιώντας LC-tandem MS. Η πλήρης αναφορά στην παραπάνω εργασία κρίθηκε χρήσιμη επειδή ήταν η πρώτη προσπάθεια για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αντιβιοτικών από διαφορετικές ομάδες και σε

διαφορετικά υδατικά διαμερίσματα. Πολλές μεταγενέστερες ερευνητικές εργασίες βασίστηκαν στη μεθοδολογία των Hirsch et al. Η δεύτερη περιπτωσιολογική μελέτη, αυτή των Zhengui et al.,[25] έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον μιας και αφορά την παρουσία των αντιβιοτικών στο πόσιμο νερό.
Η τρίτη περιπτωσιολογική μελέτη, αυτή των Renew and Huang [26] συμπεριλήφθη επειδή η έρευνα των Hirsch et al. στα υγρά απόβλητα δεν έδωσε αποτελέσματα ενώ οι Renew and Huang ασχολήθηκαν αποκλειστικά με την παρουσία των αντιβιοτικών στα υγρά απόβλητα και κάνουν πλήρη αναφορά στην καταστολή σήματος την οποία και ποσοτικοποιούν.

Πίνακας 3.1 Ανασκόπηση των μεθόδων LC- tandem MS για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών στο περιβάλλον [23]

	Οξυτετρακυκλίνη Χλωρατετρακυκλίνη Ερυθρομυκίνη	Τετρακυκλίνη Τυλοσίνη	Μακρολίδια Σουλφοναμίδες Πενικιλλίνες	Μακρολίδια Φθοροκινολόνες Σουλφοναμίδες Τετρακυκλίνες
Μήτρα	Χώμα	Υπόγεια νερά	Πόσιμα Επιφανειακά	Υγρά απόβλητα
Επεξεργασία δείγματος	Ξήρανση με αέρα μέχρι 5% νερό και κοσκίνισμα (2mm)	Όξυνση pH=4.7	Όξυνση pH=5 Προσθήκη Na_2EDTA	Προσθήκη Na_2EDTA για τις τετρακυκλίνες
Μέθοδος εκχύλισης	PLE → SPE Καθαρισμός →	SPE	SPE	SPE
Εκλουτής	MeOH	Οξεογονομένη MeOH	ACN / νερό / TrBE	MeOH
Στήλη	C-18	C-18	C-18	C-18
Κινητή φάση	Aq.μυρμηκικό οξύ / MeOH	Aq.NH_4Ac / ACN /MeOH	Σουλφοναμίδες Μακρολίδια Aq.NH_4Ac / ACN / MeOH	Aq.NH_4Ac / ACN Aq.μυρμικικό οξύ
Σύστημα MS	Triple Quadrupole	Ion trap MS ESI	Triple Quadrupole ESI	Triple Quadrupole ESI
Όριο ανίχνευσης	1-5 mg/Kg	100 ng / l	3.7-21 ng / l	1-8 ng / l

Όπου ACN: ακετονιτρίλιο, TrEA:τριμεθυλαμίνη, Ac(Acetate): οξικό ιόν

Πίνακας 3.2 Βασικές κορυφές (m/z) πρόδρομων και προϊόντων ιόντων που χρησιμοποιούνται για την LC-MS/MS ανάλυση των αντιβιοτικών στο περιβάλλον.[23]

Roxitromycin	838 $[M + H]^+$	158 $[Desosamine + H]^+$	680 $[M – desosamine + H]^+$
Erythromycin	716 $[M – H_2O + H]^+$	522 $[M – desosamine – 2H_2O + H]^+$	558 $[M – desosamine – H_2O + H]^+$
Clarithromycin	750 $[M + H]^+$	116 $[cladinose – OCH_3 + H]^+$	592 $[M – desosamine + H]^+$
Trimethoprim	293 $[M + H]^+$	123 $[M – trimetoxyphenyl]^+$	231 $[M – 2CH_3O + H]^+$
Chloramphenicol	323 $[M − H]^−$	152 $[Nitrobenzylalcohol carbanion]^−$	176 $[194 – H_2O]^−$
Chlortetracycline	479 $[M + H]^+$	444 $[M – H_2O – NH_3 + H]^+$	462 $[M – NH_3 + H]^+$
Doxycycline	445 $[M + H]^+$	428 $[M – NH_3 + H]^+$	410 $[M – H_2O – NH_3 + H]^+$
Oxytetracycline	461 $[M + H]^+$	426 $[M – H_2O – NH_3 + H]^+$	443 $[M – H_2O + H]^+$
Tetracycline	445 $[M + H]^+$	410 $[M – H_2O – NH_3 + H]^+$	427 $[M – H_2O + H]^+$
Cloxacillin	453 $[M + NH_4]^+$	160 [Cleavage in β-lactam + H]$^+$	277 [Cleavage in β-lactam + H]$^+$
Dicloxacillin	487 $[M + NH_4]^+$	160 [Cleavage in β-lactam + H]$^+$	311 [Cleavage in β-lactam + H]$^+$
Methicillin	381 $[M + H]^+$	165 $[Dimethoxybenzaldehyd]^+$	222 [Cleavage in β-lactam + H]$^+$
Nafcillin	432 $[M + NH_4]^+$	171 $[Ethoxynaphthyl]^+$	199 $[Ethoxynaphthylcarbonyl]^+$
Oxacillin	419 $[M + NH_4]^+$	144 [Phenylisoxazolyl + H]$^+$	243 $[M – methylphenylisoxazolyl]^+$
Penicillin G	352 $[M + NH_4]^+$	160 [Cleavage in β-lactam + H]$^+$	176 [Cleavage in β-lactam + H]$^+$
Penicillin V	368 $[M + NH_4]^+$	114 $[160 – CO_2 + H]^+$	160 [Cleavage in β-lactam + H]$^+$
Sulfamethazine	279 $[M + H]^+$	186 $[M – H_2NPh]^+$	124 [Aminodimethylpyridine + H]$^+$
Sulfamethoxazole	254 $[M + H]^+$	156 $[H_2NPhSO_2]$	108 $[H_2NPhO]^+$
Sulfadiazine	251 $[M + H]^+$	156 $[H_2NPhSO_2]^+$	108 $[H_2NPhO]^+$
Ciprofloxacin	332 $[M + H]^+$	314 $[M – H_2O + H]^+$	288 $[M – H_2O – CO_2 + H]^+$
Ofloxacin	362 $[M + H]^+$	344 $[M – H_2O + H]^+$	–
Norfloxacin	320 $[M + H]^+$	302 $[M – H_2O + H]^+$	–

3.2.1 Περιπτωσιολογική μελέτη (Α)

«Προσδιορισμός των αντιβιοτικών σε διάφορα περιβαλλοντικά διαμερίσματα μέσω υγρής χρωματογραφίας – δίδυμης φασματομετρίας μάζας με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού». Hirsch et al., [24]:

Το επιστημονικό ενδιαφέρον, για την ανάλυση υπολειμμάτων αντιβιοτικών στο περιβάλλον, προκύπτει από το γεγονός ότι υπάρχει η υποψία ότι ευθύνονται για την εμφάνιση νέας ποικιλίας βακτηρίων τα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

Οι πενικιλίνες, οι τετρακυκλίνες, οι σουλφανομίδες και τα μακρολίδια είναι οι σπουδαιότερες ομάδες αντιβιοτικών από περιβαλλοντικής άποψης λόγω της εκτεταμένης χρήσης τους τόσο στην ιατρική όσο και στην κτηνιατρική και για αυτό το λόγο απαιτείται ο σχεδιασμός μιας κατάλληλης αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό τους στο νερό σε επίπεδα ng/l.

Γενικά οι περισσότερες από τις δημοσιευμένες μεθόδους αφορούν τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών σε περίπλοκες μήτρες όπως το κρέας, το γάλα, το αίμα κ.α. Επιπλέον οι περισσότερες από τις διαδικασίες εκχύλισης είναι ειδικά σχεδιασμένες για μία μόνο ιδιαίτερη ομάδα αντιβιοτικών π.χ. τετρακυκλίνες.

Ο στόχος της ερευνητικής εργασίας των Hirsch et al ήταν να καθιερώσουν μία αποτελεσματική μέθοδο για τον προσδιορισμό διαφορετικών αντιβιοτικών μέσω LC-MS/MS και σε επίπεδα ng/l.

Αναλυτική διαδικασία:

3.2.1α Επεξεργασία δειγμάτων.

Για την εκχύλιση των αναλυτών από το νερό, οι παραπάνω ερευνητές ανέπτυξαν δύο εναλλακτικές μεθόδους βασισμένες στην εκχύλιση στερεής φάσης και στη λυοφιλίωση (lyophilization).

IA. Λυοφιλίωση.

Πριν τη διαδικασία λυοφιλίωσης τα νερά που περιείχαν πολύ οργανική ύλη, όπως εκείνα που προερχόταν από δείγματα απορροών από εγκαταστάσεις επεξεργασίας αποβλήτων (STPs) ή από επιφανειακά ύδατα, φιλτραρίστηκαν χρησιμοποιώντας φίλτρα από ίνες γυαλιού (0,45-μm). Κατόπιν τοποθετήθηκαν 100ml νερού σε μια ογκομετρική φιάλη των 250ml. Για να αποτραπεί ο σχηματισμός στερεών ανθρακικών αλάτων του ασβεστίου και του μαγνησίου προστέθηκαν 100mg Na_2EDTA. Στη συνέχεια τα δείγματα καταψύχθηκαν σε ένα λουτρό αιθανόλης στους –30 ^oC. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ψύξης οι ογκομετρικές φιάλες περιστρεφόταν ώστε να σχηματιστεί μια μεγαλύτερη επιφάνεια πάγου και έτσι να μειωθεί ο συνολικά απαιτούμενος χρόνος ξήρανσης. Για τη λυοφιλίωση τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ένα καταψύκτη - ξηραντήρα όπου αφέθηκαν να αποξηρανθούν σε κενό και χαμηλή θερμοκρασία για 15 συνεχόμενες ώρες.

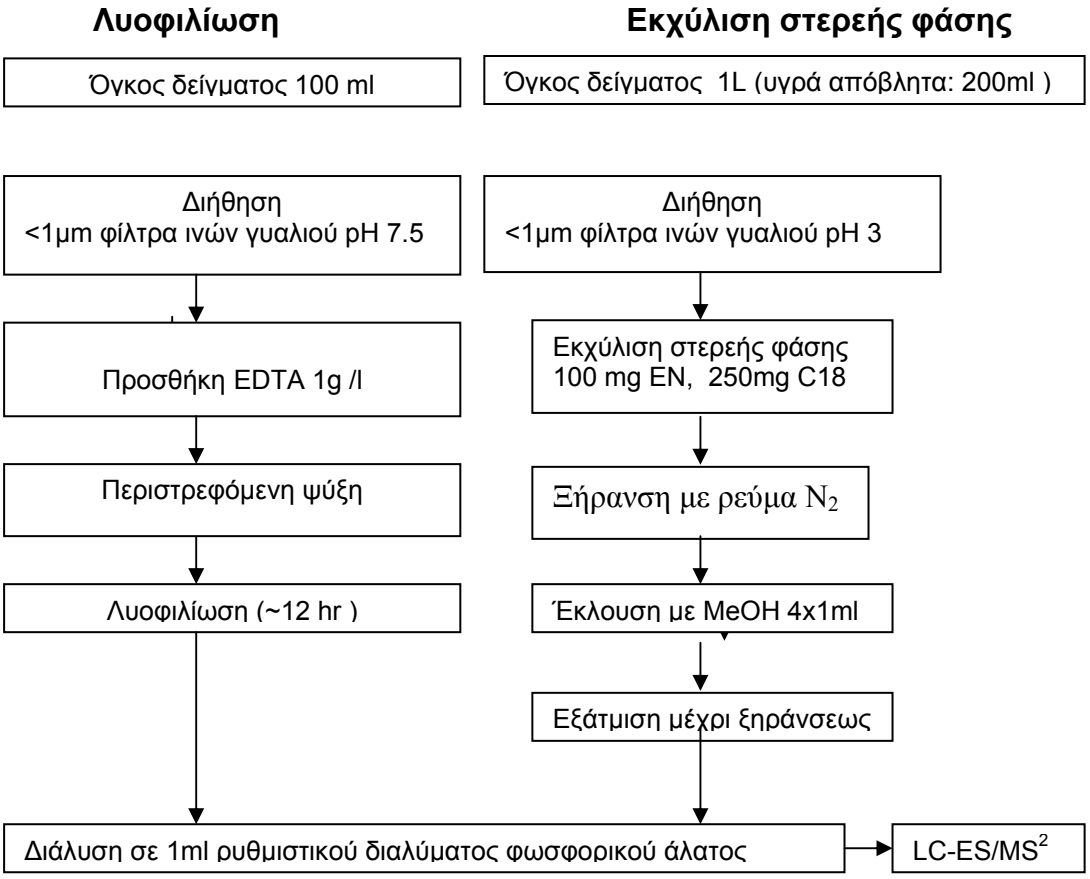
Τελικά τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε ένα φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (20mmol/l) και τα προκύπτοντα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στους –20 ^oC μέχρι αναλύσεως.

Πριν από την ανάλυση τα εκχυλίσματα φιλτραρίστηκαν με 0,45μm φίλτρα σύριγγας για την απομάκρυνση του EDTA. Το ρυθμιστικό διάλυμα προετοιμάστηκε αναμιγνύοντας δύο διαλύματα KH_2PO_4 και K_2HPO_4 συγκέντρωσης 20mmol/l έκαστο, μέχρι να επιτευχθεί pH 6.0.

IIA. Εκχύλιση στερεής φάσης

Ως εναλλακτική μέθοδο της λυοφιλίωσης, οι Hirsch et al., ανέπτυξαν μια μέθοδο SPE για τα αντιβιοτικά (εκτός των τετρακυκλίνων) η οποία βασίστηκε σε άλλες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για μια ποικιλία ουσιών μέσης πολικότητας. Η μέθοδος ήταν η εξής: 1L δείγματος φιλτραρίστηκε χρησιμοποιώντας φίλτρα από ίνες γυαλιού και ρυθμίστηκε το pH του στο 3.0 με τη χρήση H_2SO_4 (3mol/l). Το υλικό της στερεής φάσης (100mg Lichrolute EN και 250mg Lichrolute C_{18}) τοποθετήθηκε μέσα σε γυάλινες στήλες εκχύλισης και κατόπιν ενεργοποιήθηκε με 3x2ml n-εξάνιο, 3x2ml μεθανόλη και

6x2ml νερό (pH 3.0). Το δείγμα αναρροφήθηκε μέσω των στηλών με μια ροή περίπου 20ml/min. Στη συνέχεια ακολούθησε ξήρανση των στηλών με N_2 για μια ώρα και έκλουση με 1ml μεθανόλης για τέσσερις φορές. Τα εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν περίπου στα 20μl με ένα απαλό ρεύμα αζώτου και κατόπιν συμπληρώθηκαν μέχρι 1ml με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος και αποθηκεύτηκαν στους –20C^o. Παρακάτω ακολουθεί μια σχηματική παράσταση των δύο εναλλακτικών μεθόδων.



Σχήμα 3.5 Σχηματική παράσταση της λυοφιλίωσης και της εκχύλισης στερεής φάσης.(προσαρμοσμένο σχήμαTernes et al.,) [27]

3.2.1β Συνθήκες για την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Για την υγρή χρωματογραφία χρειάστηκαν τρία είδη στηλών σε συνδυασμό με βαθμιδωτές εκλούσεις. Οι τετρακυκλίνες διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας μια κλειστή στήλη 125x3mm Macherey και Nagel Lichrospher 100RP-8 (5μm) με την κινητή φάση να αποτελείται από 20mmol/l οξαλικού οξέως σε νερό-ακετονιτρίλιο **(μέθοδος TET).** Για να αποφευχθεί η κατακάθιση του EDTA λόγω του χαμηλού pH του ρυθμιστικού διαλύματος, που πιθανόν θα οδηγούσε σε απόφραξη της τριχοειδούς μεσεπιφάνειας του MS μετά την ένεση του λυοφιλιωμένου εκχυλίσματος, ο διαλύτης της HPLC εστάλη στα απόβλητα για τα τρία πρώτα λεπτά του κύκλου καθώς το EDTA δεν παρακρατείται σχεδόν καθόλου στις χρωματογραφικές στήλες και ως εκ τούτου εκλούεται πρώτο πριν από τους αναλύτες.

Εναλλακτικά το λυοφιλιωμένο εκχύλισμα που αφορά τον προσδιορισμό της τετρακυκλίνης μπορεί να επανέλθει στη φυσική του κατάσταση με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος οξαλικού οξέος και έτσι να αποφευχθεί η κατακάθιση κατά την μέτρηση. Για τη χρωματογραφία των πενικιλίνων, χρησιμοποιήθηκαν κλειστές στήλες 125x3mm Merck Lichrospher 100RP-18 (5μm) με μια κινητή φάση που αποτελείτο από 10mmol/l οξικού αμμωνίου σε νερό-ακετονιτρίλιο **(μέθοδος PEN).** Για τα υπόλοιπα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκε μια στήλη 125x3mm Merck Lichrospher RP-18 (5μm) με μια κινητή φάση που περιείχε 10mmol/l οξικού αμμωνίου σε νερό-ακετονιτρίλιο **(μέθοδος ANT).**

Ο όγκος της εισαγωγής για κάθε δείγμα ήταν 50μl. Οι διαλύτες και οι βαθμιδωτές εκλούσεις, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.3 Σύνθεση των κινητών φάσεων για τις τρις μεθόδους (Hirsch et.al) [24]

Μέθοδος TET			**Μέθοδος PEN**			**Μέθοδος ANT**		
Χρόνος (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)	Χρόνος (min)	Διαλύτης C (%)	Διαλύτης D (%)	Χρόνος (min)	Διαλύτης C (%)	Διαλύτης E (%)
0	90	10	0	90	10	0	74	26
1.7	90	10	8	90	10	2	62	38
2.7	75	25	10	70	30	7	62	38
15	38	62	26	70	30	10	48	52
20	23	77	28	0	100	15	0	100
21	0	100	32	0	100	21	0	100
25	0	100	34	90	10	25	74	26
26	90	10	41	90	10	33	74	26
35	90	10						

Διαλύτης A: 1800 ml 10 mmol/l οξαλικό οξύ + 200 ml ακετονιτρίλιο

Διαλύτης B: 800 ml 10 mmol/l οξαλικό οξύ + 1200 ml ακετονιτρίλιο

Διαλύτης C: Σε 900 ml νερού που περιείχε 20 mmol/l NH_3 προστέθηκε οξικό οξύ μέχρι που το ph έγινε 5.7. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 ml ακετονιτριλίου

Διαλύτης D: 400 ml διαλύτη C + 600 ml ακετονιτρίλιο

Διαλύτης E: 200 ml διαλύτη C + 800 ml ακετονιτρίλιο

3.2.1γ Παράμετροι MS-MS

Το σύστημα φασματομετρίας που χρησιμοποιήθηκε αποτελείτο από ένα φασματόμετρο μάζας τετραπόλου με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού τύπου Perkin-Elmer Sciex API III.

Με εξαίρεση την χλωραμφαινικόλη, η ανάλυση έγινε με παραγωγή θετικών ιόντων. Ως αέριο παραπετάσματος (curtain gas) χρησιμοποιήθηκε το άζωτο με ροή συνθετικού αέρα ίση με 1 lit/min και πίεση 250 Kpa, ενώ ως αέριο εκνέφωσης χρησιμοποιήθηκε το ίδιο αέριο με ροή αέρα ίση με 0.7 lit/min. Η διάμεση επιφάνεια είχε θερμοκρασία 60 ^{0}C. Η ροή από την HPLC διαχωρίστηκε 1:10 στη διάμεση επιφάνεια και η προκύπτουσα ροή ήταν περίπου 40 μl/min. Η τάση στο στόμιο ήταν μεταξύ 60 και 70 V ανάλογα με το βέλτιστο σήμα της μάζας των προϊόντων ιονισμού.

Οι παράμετροι MS- MS βελτιστοποιήθηκαν σε mode συνεχούς ροής ως ακολούθως: μετά τον καθορισμό των καλύτερων συνθηκών για την απομόνωση των πρόδρομων ιόντων (κυρίως προσθήκη πρωτονίου ή αμμωνίου στον αντίστοιχο αναλύτη) βελτιστοποιήθηκαν η τάση ψεκασμού των ιόντων και οι συνθήκες του τετραπόλου και των φακών για την επαγόμενη διάσταση του αργού από την πρόσκρουση.

Ανίχνευση πρόδρομων ιόντων: χρόνος παραμονής 10 ms για 1 Da

Ανίχνευση προϊόντων ιόντων: χρόνος παραμονής 2 ms για 0,1 Da

Μέτρηση πολλαπλής αντίδρασης (multiple reaction monitoring, MRM): χρόνος παραμονής > 200 ms ανάλογα με τον αριθμό των ιχνών μάζας που καταγραφόταν.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι μάζες των πρόδρομων και προϊόντων ιόντων καθώς επίσης και οι πλέον πιθανές θραυσματοποιήσεις.

Πίνακας 3.4 Παράμετροι MS-MS (προσαρμοσμένος πίνακας R. Hirsch et al.) [24]

Ουσία	Πρόδρομο ιόν	Προϊόν ιόν 1	Προϊόν ιόν 2
Κλαρυθρομυκίνη	750.0 $[M+H]^+$	116.1 [κλαδινόζη-OCH_3+H]$^+$	591.7 [M- δισοσαμίνη +H]$^+$
Ερυθρομυκίνη-H_2O	716.2 [M-H_2O+H]	522.2 [M-δισοσαμίνη-2H_2O+H]$^+$	558.4[M-δισοσαμίνη-2H_2O+H]$^+$
Ροξυθρομυκίνη	832.2 $[M+H]^+$	158.2 [δισοσαμίνη+H]$^+$	679.8 [M- δισοσαμίνη +H]$^+$
Σουλφαμεθαζίνη	279.4 $[M+H]^+$	124.1 [αμινοδιμεθυλπυριδίνη+H]$^+$	186.1 [M-αμινοφαινύλιο]$^-$
Σουλφαμεθοξαζόλη	254.2 $[M+H]^+$	92.1 [αμινοφαινύλιο]$^+$	108.1
Τριμεθοπρίμη	292.6 $[M+H]^+$	123.1 [M-τριμεθοξυφαινύλιο]$^+$	231.2 [M-2CH_3O+H]$^+$
Χλωρομφαινικόλη	323.1 $[M-H]^-$	152 [καρβανιόν νιτροβενζυλαλκοόλης]	176.0 [194- H_2O]$^-$
Χλωροτετρακυκλίνη	479.1 $[M+H]^+$	444.1 [M- H_2O- NH_3+ H]$^+$	462.1 [M- NH_3+ H]$^-$
Δοξυκυκλίνη	445.1 $[M+H]^+$	428.1 [M- NH_3+ H]$^-$	410.1 [M- H_2O- NH_3+ H]$^+$
Οξυτετρακυκλίνη	461.2 $[M+H]^+$	426.2 [M- H_2O- NH_3+ H]$^+$	200.6
Τετρακυκλίνη	445.2 $[M+H]^+$	410.1 [M- H_2O- NH_3+ H]$^+$	154.0
Μεκιλλίνη	381.1 $[M+H]^+$	165.0 [διμεθοξυβενζαλδεϋδη]$^-$	222.1 [σχάση σε β-λακτ.+ H]$^+$
Πενικιλλίνη G	352.2 $[M+NH_3]^+$	160.1 [σχάση σε β-λακτάμη+ H]$^-$	176.0 [σχάση σε β-λακτ.+ H]$^+$
Πενικιλλίνη V	368.1 $[M+NH_3]^+$	114.2 [160-CO_2+H]$^-$	160.2 [σχάση σε β-λακτ.+ H]$^+$

3.2.1δ Ανακτήσεις και όρια ποσοτικοποίησης.

Τα πρότυπα βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν προσθέτοντας αντίστοιχες ποσότητες προτύπων ουσιών σε 100ml ορεινού ύδατος το οποίο είναι απαλλαγμένο από ανθρωπογενείς οργανικούς μολυντές. Το Milli-Q νερό δεν απεδείχθη χρήσιμο ως πρότυπος διαλύτης καθώς τα μακρολίδια αντιβιοτικά έδειξαν μειωμένες ανακτήσεις από νερό με χαμηλό ή καθόλου περιεχόμενο σε αλάτι.

Οι λόγοι ανάκτησης προσδιορίστηκαν συγκρίνοντας 1μg/l προτύπων βαθμονόμησης (n=3) με μη εμπλουτισμένο πρότυπο διάλυμα. Με εξαίρεση την ερυθρομυκίνη, την τριμεθοπρίνη και την τετρακυκλίνη οι ανακτήσεις μετά την λυοφυλίωση ξεπέρασαν το 80% με σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ 2 και 15%. Σε σύγκριση με την SPE οι ανακτήσεις με την διαδικασία της λυοφιλίωσης ήταν γενικά υψηλότερες. Οι τετρακυκλίνες μπορούσαν να εξαχθούν με SPE μόνο μετά την προσθήκη Na_2EDTA.

Τα όρια ποσοτικοποίησης χρησιμοποιώντας εμπλουτισμό με την μέθοδο της λυοφιλίωσης ήταν 50ng/l για τις τετρακυκλίνες και 20ng/l (ίσο με 100pg ανά ένεση) για τα υπόλοιπα αντιβιοτικά με τα αποτελέσματα να είναι αρκετά ανεξάρτητα του είδους της μήτρας νερού. Τα όρια ποσοτικοποίησης χρησιμοποιώντας SPE ήταν μια τάξη μεγέθους χαμηλότερα επειδή ο όγκος του δείγματος ήταν 1lt.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι ανακτήσεις καθώς και τα όρια ποσοτικοποίησης των υπό έρευνα αντιβιοτικών:

Πίνακας 3.5 Ανακτήσεις και ποσοτικοποίηση (Ternes,et al.,) [27]

Αναλύτες	Ανακτήσεις Λυοφιλίωσης (%)	Ανακτήσεις SPE (%)	Ανακτήσεις εμβολιασμένου επιφανειακού ύδατος (%)		Όριο ποσοτικοποίησης Λυοφιλ. (ng/l)	Όριο ποσοτικοποίησης SPE (ng/l)
			Schwarzach	Rhine		
Κλαρυθρομυκίνη	102	90	85	91	50	5
Ερυθρομυκίνη-H_2O	54	120	106	120	50	5
Ροξυθρομυκίνη	100	75	79	100	50	5
Σουλφαμεθαζίνη	81	15	40	88	50	5
Σουλφαμεθοξαζόλη	81	75	60	84	50	5
Τριμεθοπρίμη	68	87	78	103	50	5
Χλωρομφαινικόλη	82	90	δ.α	98	50	5
Χλωροτετρακυκλίνη	87	56*	45	δ.α	20	2
Δοξυκυκλίνη	80	86*	68	δ.α	20	2
Οξυτετρακυκλίνη	108	74*	49	δ.α	20	2
Τετρακυκλίνη	72	93*	53	δ.α	20	2
Κλοξακιλλίνη	89	68	123	δ.α	50	5
Δικλοξακιλλίνη	88	61	137	δ.α	50	5
Μεκιλλίνη	88	62	118	δ.α	50	5
Ναφκιλλίνη	86	58	121	δ.α	50	5
Οξακιλλίνη	90	66	116	δ.α	50	5
Πενικιλλίνη G	94	61	106	δ.α	50	5
Πενικιλλίνη V	79	107	114	δ.α	50	5

* Προσθήκη 1g / L Na_2EDTA δ.α: δεν αναλύθηκαν

Συμπεράσματα:

Η LC / ESI / MS^2 είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό των πολικών μικρομολυντών στο νερό όπως είναι τα αντιβιοτικά. Η μέθοδος προσφέρεται για την αποτελεσματική ποσοτικοποίηση 18 αντιβιοτικών σε κλίμακα ng/l σε διαφορετικές μήτρες νερού.

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους για την εκχύλιση των αναλυτών συμπεραίνετε ότι και οι δύο μπορούν να χρησιμοποιηθούν με την εξαίρεση ότι η μέθοδος SPE δεν δύναται να εκχυλίσει τις τετρακυκλίνες. Η μέθοδος της λυοφιλίωσης επιτρέπει τον εμπλουτισμό με ένα βήμα όλων των υπό έρευνα αναλυτών δίνοντας ελαφρώς καλύτερες ανακτήσεις. Επιπλέον η μέθοδος απαιτεί λιγότερο χρόνο το οποίο αποτελεί πλεονέκτημα όταν πρόκειται να αναλυθούν πολλά δείγματα. Από την άλλη μεριά η μέθοδος SPE είναι περισσότερο ευαίσθητη για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών από ότι η

λυοφιλίωση εξαιτίας των μεγαλύτερων όγκων του δείγματος. Ως εκ τούτου για να επιτευχθούν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης σε λιγότερο μολυσμένα υπόγεια και πόσιμα νερά συνίσταται η περισσότερο κοπιαστική μέθοδος SPE.

Τέλος, η λυοφιλίωση ως ένα γενικό βήμα προσυγκέντρωσης επιτρέπει την εύκολη επέκταση της μεθόδου για την ανάλυση διαφόρων άλλων σχετικών ενώσεων.

3.3.2 Περιπτωσιολογική μελέτη (Β)

«Η παρουσία των αντιβιοτικών στο πόσιμο νερό» Zhengui Ye, Howard S. Weinberg [25].

Οι Zhengui και Howard μελέτησαν την παρουσία μιας ποικιλίας αντιβιοτικών περιλαμβανομένων των φθοροκινολινών, των σουλφοναμιδίων, των τετρακυκλινών και της λινκομυκίνης σε δείγματα νερού που συνέλεξαν από 5 εγκαταστάσεις επεξεργασίας πόσιμου νερού τόσο κατά την εισαγωγή στις εγκαταστάσεις όσο και μετά την συμβατική επεξεργασία και πριν από τη διανομή του ύδατος στο σύστημα ύδρευσης απομακρύνοντας το υπολειμματικό χλώριο με ασκορβικό οξύ κατά την δειγματοληψία.

Αναλυτική διαδικασία:

3.3.2α Επεξεργασία δειγμάτων

Εκχυλίστηκαν δείγματα των 250 και 500 ml ακατέργαστου και κατεργασμένου ύδατος αντίστοιχα χρησιμοποιώντας στήλες HLB (200mg).Τα δείγματα εμβολιάστηκαν στη συνέχεια με υποκατάστατα πρότυπα (^{13}C σουλφαμεθαζίνη και μινοκυκλίνη) και προστέθηκαν 1mg/l δείγματος Na_2EDTA για να αποφευχθεί η συμπλοκοποίηση των τετρακυκλίνων με δισθενή ιόντα και μέταλλα. Το pH των δειγμάτων του ακατέργαστου ύδατος ρυθμίστηκε στο 6 ενώ εκείνο του επεξεργασμένου στο 3. Η έκλουση έγινε με οξυνισμένη μεθανόλη. Τα εκχυλίσματα κατά αρχήν μειώθηκαν σε όγκο (100μl) με ένα ήπιο ρεύμα αζώτου, ακολούθησε επανασυγκρότηση στα 250 μl με ένα μίγμα νερού – μεθανόλης (9:1) και εμβολιασμός με το εσωτερικό πρότυπο Simatone.Τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν με σύριγγες των 0,45μm μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη, αποθηκεύτηκαν στους -15C^0 και αναλύθηκαν εντός μιας εβδομάδας.

3.3.2β Χρωματογραφικός διαχωρισμός

Όλοι οι αναλύτες διαχωρίστηκαν με μια στήλη Pursuit C-18 (150x2mm, 3μm) χρησιμοποιώντας βαθμιδωτή έκλουση με ροή κινητής φάσης 0.2 ml/min. Η κινητή φάση **Α** ήταν 0,1% (v/v) μυρμικικού οξέως σε νερό ενώ η κινητή φάση **Β** ήταν 100% ακετονιτρίλιο.

3.3.2γ Ανίχνευση

Η ανίχνευση των αντιβιοτικών έγινε με ένα φασματόμετρο μάζας τριπλού τετραπόλου τύπου Varian, model 1200L. Ο όγκος της ένεσης ήταν 20 μl, και οι αναλύσεις έγιναν με ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό για παραγωγή θετικών ιόντων.

Η μέθοδος ποσοτικοποίησης ήταν αυτή της γνωστής προσθήκης. Τα ακατέργαστα δείγματα νερού εμβολιάστηκαν με αναλύτες από 20 έως 100 ng/l ενώ τα κατεργασμένα με αναλύτες από 10 έως 75 ng/l.

3.3.2δ Αποτελέσματα

Σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύθηκαν αντιβιοτικά. Τα περισσότερα αντιβιοτικά που ανιχνεύθηκαν κατά την εισροή του νερού στις εγκαταστάσεις δεν ανιχνεύθηκαν στο επεξεργασμένο νερό ή βρέθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις που σημαίνει ότι απομακρύνθηκαν εν μέρει κατά την διαδικασία της συμβατικής επεξεργασίας ή μετασχηματίστηκαν κατά την διάρκεια της απολύμανσης. Αξίζει να τονιστεί ότι η εγκατάσταση νερού που ήταν πλησιέστερη σε μία εγκατάσταση αποβλήτων παρουσίασε τον μεγαλύτερο αριθμό αντιβιοτικών.

Γενικά, οι φθοροκινολίνες ήταν εκείνα τα αντιβιοτικά που ανιχνεύθηκαν συχνότερα, ακολουθούμενα από τις σουλφοναμίδες, την λινκομυκίνη, τις τετρακυκλίνες και τα μακρολίδια. Αν και η ανίχνευση της κιπροφλοξακίνης (ciprofloxacin), η οποία χρησιμοποιείται ως φάρμακο στους ανθρώπους, φαίνεται να δείχνει τον αντίκτυπο από τις εκροές των εγκαταστάσεων υγρών αποβλήτων, δεν μπορεί να αποκλειστεί και η επίδραση των γεωργικών απορροών λαμβάνοντας υπόψη ότι για παράδειγμα το κτηνιατρικό αντιβιοτικό ενροφλοξακίνη (enrofloxacin) μπορεί κάτω από ειδικές συνθήκες να μεταβολιστεί σε κιπροφλοξακίνη.

Στους πίνακες 3.6 και 3.7 που φαίνονται οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών πριν και μετά την επεξεργασία του νερού στις αντίστοιχες εγκαταστάσεις

Πίνακας 3.6 Παρουσία των αντιβιοτικών στο νερό πριν την επεξεργασία ng/L [25]

	WTP 1	**WTP 2**	**WTP 3**	**WTP 4**	**WTP 5**
Κιπροφλοξακίνη	70	68	55	(17)	(8.3)
Νορφλοξακίνη	64	37	38	<20	<20
Ενροφλοξακίνη	43	24	20	49	<20
Σαραφλοξακίνη	(15)	<20	<20	<20	<20
Λινκομυκίνη	(8.0)	<20	(14)	(7.0)	<20
Σουλφαμεθοξαζόλη	62	<20	<20	<20	<20
Σουλφαδυμεθοξίνη	(15)	<20	<20	<20	<20
Σουλφαθιαζόλη	<20	<20	<20	<20	<20
Σουλφαμεραζίνη	<20	<20	<20	<20	<20
Σουλφαμεθαζίνη	<20	<20	<20	<20	<20
Σουλφαμεθιζόλη	<20	<20	<20	<20	<20
Σουλφαχλωροπυριδαζίνη	<20	<20	<20	<20	<20
Τριμεθοπρίμη	<20	<20	<20	<20	<20
Οξυτετρακυκλίνη	(15)	<20	<20	<20	<20
Τετρακυκλίνη	25	(13)	<20	<20	<20
Δοξυκυκλίνη	<20	22	<20	<20	<20
Χλωροτετρακυκλίνη	<20	<20	<20	<20	<20
Δυμεκλοκυκλίνη	<20	<20	<20	<20	<20
Μινοκυκλίνη	<100	<100	<100	<100	<100
Τυλοσίνη	21	(12)	<20	<20	<20
Ερυθρομυκίνη	(6.7)	<20	<20	<20	<20
Ροξυθρομυκίνη	<20	<20	<20	<20	<20

Πίνακας 3.7 Εμφάνιση των αντιβιοτικών στο επεξεργασμένο πόσιμο νερό ng/L [25]

	WTP 1	**WTP 2**	**WTP 3**	**WTP 4**	**WTP 5**
Κιπροφλοξακίνη	(18)	(13)	(7.6)	<10	<10
Νορφλοξακίνη	<20	5.5	<75	<10	<20
Ενροφλοξακίνη	<20	<20	<75	<10	<10
Σαραφλοξακίνη	<20	<20	<75	<10	<10
Λινκομυκίνη	(9.6)	<20	<75	<10	<10
Σουλφαμεθοξαζόλη	<20	<20	<75	<20	<10
Σουλφαδυμεθοξίνη	<20	<20	<75	<10	<10
Σουλφαθιαζόλη	<20	<20	<75	<20	<20
Σουλφαμεραζίνη	<20	<20	<75	<20	<10
Σουλφαμεθαζίνη	<20	<20	<75	<10	<10
Σουλφαμεθιζόλη	<20	<20	<75	<20	<20
Σουλφαχλωροπυριδαζίνη	<20	<20	<75	<10	<10
Τριμεθοπρίμη	<20	<20	<75	<10	<10
Οξυτετρακυκλίνη	<20	<20	<75	<10	<10
Τετρακυκλίνη	<20	<20	<75	<10	<10
Δοξυκυκλίνη	<20	(4.5)	<75	<10	<10
Χλωροτετρακυκλίνη	<20	<20	<75	<10	<10
Δυμεκλοκυκλίνη	<20	<20	<75	<10	<10
Μινοκυκλίνη	<20	<75	<75	<50	<50
Τυλοσίνη	<20	(12)	<75	<10	<10
Ερυθρομυκίνη	<20	<20	<75	<10	<10
Ροξυθρομυκίνη	<20	<20	<75	<10	<10

* Οι τιμές στις παρενθέσεις σημαίνουν θετική αναγνώριση του είδους αλλά σε συγκεντρώσεις μικρότερες του χαμηλότερου επιπέδου εμβολιασμού.

Συμπεράσματα:

Τα περισσότερα αντιβιοτικά που ανιχνεύτηκαν στα νερά των πηγών δεν ανιχνεύτηκαν στο επεξεργασμένο νερό, όπως φαίνεται στους πίνακες 3.6 και 3.7 ή βρέθηκαν σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα υποδεικνύοντας την μερική απομάκρυνση τους κατά τις κλασσικές διεργασίες επεξεργασίας ή χημικό μετασχηματισμό κατά την απολύμανση.

Η μη ολική απομάκρυνση μερικών αντιβιοτικών όπως για παράδειγμα της κιπροφλοξακίνης, προκαλεί ανησυχία εξαιτίας των αγνώστων επιδράσεων τους στην υγεία όταν παραμένουν στα κατεργασμένα νερά ακόμα και σε επίπεδα ng/l. Η μελλοντική έρευνα θα πρέπει να εστιάσει πως αυτές οι ενώσεις παραμένουν ανθεκτικές και πως μετασχηματίζονται κατά την επεξεργασία του πόσιμου νερού.

Τέλος η ταυτόχρονη παρουσία διαφορετικών αντιβιοτικών στα νερά των πηγών δεν πρέπει να υποτιμηθεί.

3.2.3 Περιπτωσιολογική μελέτη (Γ)

«Ταυτόχρονος προσδιορισμός φθοριοκινολονών, σουλφοναμίδων και τριμεθοπρίμης σε υγρά απόβλητα χρησιμοποιώντας διαδοχική εκχύλιση στερεής φάσης και υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματόμετρο μάζας με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού**».** Jay E. Renew και Ching-Hua Huang [26]

Οι φθοριοκινολόνες, οι σουλφοναμίδες και η τριμεθοπρίμη αντιπροσωπεύουν συνθετικές κατηγορίες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται τόσο στην θεραπεία των ανθρώπων όσο και των ζώων.

Οι διαθέσιμες μέθοδοι ανίχνευσης των παραπάνω αντιβιοτικών στην κοπριά, στα επιφανειακά ύδατα, στα υπόγεια ύδατα καθώς και στα υγρά απόβλητα αναφέρονται στην κάθε κατηγορία χωριστά. Η μέθοδος Hirsh et al που αφορά τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών κατηγοριών αντιβιοτικών συμπεριλαμβανομένων και των παραπάνω αντιβιοτικών δεν αναφέρει ανακτήσεις από εκροές εγκαταστάσεων υγρών αποβλήτων. Όμως προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι οι φθοριοκινολόνες, οι σουλφοναμίδες και η τριμεθοπρίμη παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή στην μικροβιακή αποιδόμηση, πράγμα που σημαίνει ότι η παρουσία τους στις εκροές των εγκαταστάσεων υγρών αποβλήτων είναι σχεδόν σίγουρη.

Λαμβάνοντας υπ΄ όψιν αυτό το γεγονός οι Renew και Huang ανέπτυξαν μια αναλυτική μέθοδο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των παραπάνω αντιβιοτικών στα υγρά απόβλητα . Η χρήση LC- MS μονού τετραπόλου κάνει την μέθοδο πολύ ελκυστική μιας και τα περισσότερα εργαστήρια ποιοτικού ελέγχου του ύδατος χρησιμοποιούν LC-MS αντί για LC-MS/MS. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου, όπως θα αποδειχθεί αργότερα είναι η ελαχιστοποίηση των επιδράσεων της μήτρας και η αντιμετώπιση της καταστολής σήματος κατά την LS-MS.

Αναλυτική διαδικασία:

3.2.3.α Συλλογή δειγμάτων και προετοιμασία:

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων σε τρεις διαφορετικές πολιτείες των ΗΠΑ: την Γεωργία, την Καλιφόρνια και την Αριζόνα. Οι φιάλες (1L) που χρησιμοποιήθηκαν είχαν κατασκευαστή από φθοριομένο πολυπροπυλένιο με πώματα επικαλυμμένα από πολυτετραφθοροαιθυλένιο (Teflon), επειδή όταν επιχειρήθηκε η χρήση γυάλινων φιαλών παρατηρήθηκαν μικρές απώλειες αντιβιοτικών από την προσρόφηση των τοιχωμάτων των γυάλινων φιαλών. Τα δείγματα

συλλέχθηκαν από τις εκροές και από τα τέσσερα στάδια επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων δηλαδή την πρωτοβάθμια επεξεργασία (απομάκρυνση στερεών), την δευτεροβάθμια επεξεργασία (απομάκρυνση οργανικών ουσιών με βιολογικές διεργασίες), την τριτοβάθμια επεξεργασία (απομάκρυνση βιολογικού υποστρώματος και απολύμανση) και την προχωρημένη επεξεργασία (μικροδιήθηση, αντίστροφη όσμωση, προσρόφηση σε ενεργό άνθρακα και οζόνωση). Για την απομάκρυνση του υπολειμματικού χλωρίου χρησιμοποιήθηκαν 2mg/L $Na_2S_2O_3$ αφού προηγήθηκαν πειράματα που απέδειξαν ότι τα αντιβιοτικά δεν αντιδρούν με $Na_2S_2O_3$.

Τα δείγματα με τα υγρά απόβλητα διηθήθηκαν με φίλτρα ινών γυαλιού (0,5μm), προστέθηκε 0,1M NaCl, ρυθμίστηκαν σε pH 2,5 με την προσθήκη H_3PO_4, εμβολιάστηκαν με αντιβιοτικά (για δείγματα ανάκτησης) και αποθηκεύτηκαν στους 4^oC για να εκχυλιστούν εντός 3 ημερών .

3.2.3.β Εκχύλιση δειγμάτων.

Κάθε δείγμα εκχυλίστηκε μέσω μιας στήλης ανιόντοανταλλαγής Isolute (500mg) η οποία ήταν τοποθετημένη πάνω σε μία στήλη HLB (500mg). Κάθε στήλη ενεργοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 6ml 4,38mM H_3PO_4.Η ροή εκχύλισης ήταν 6ml/min. Για την ορθότητα και ακρίβεια της μεθόδου αναλύθηκαν τυφλά δείγματα, πανομοιότυπα δείγματα και δείγματα ανάκτησης για κάθε παρτίδα δειγμάτων που αναλύθηκε.

Οι ανακτήσεις αξιολογήθηκαν τροποποιώντας τα δείγματα με 1μg/L αντιβιοτικών πριν από την εκχύλιση. Για τον υπολογισμό των ανακτήσεων αφαιρέθηκαν οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που μετρήθηκαν στα δείγματα ανάκτησης. Τα αντιβιοτικά εκλούσθηκαν από τις στήλες HLB με 10ml 95% MeOH και 5% 4,38 mM H_3PO_4 σε κωνικές φιάλες πολυαιθυλενίου. Η έκλουση των στηλών ανταλλαγής ανιόντων με τον ίδιο εκλουτή απέδωσε αμελητέες ποσότητες αντιβιοτικών. Οι αναλύτες εξατμίστηκαν μέχρι ξήρανσης σε ένα λουτρό ύδατος (30^oC) κάτω από ένα ήπιο ρεύμα αζώτου και κατόπιν ανασυγκροτήθηκαν σε 1mL 20% MeOH/ 80% 4,38Mm H_3PO_4 και λομεφλοξακίνη.

Για την ποσοτικοποίηση με την μέθοδο της γνωστής προσθήκης χρησιμοποιήθηκαν κλάσματα δειγμάτων των 300μL με μια γνωστή ποσότητα κάθε αντιβιοτικού. Όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια HPLC και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 0 ^oC πριν από την ανάλυση LC-MS.

3.2.3.γ Χημική Ανάλυση

Τα δείγματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας μια συσκευή HPLC της σειράς Agilent 1100 με ανιχνευτή diode-array UV και ένα αναλυτή MSD Palo Alto,

Τα αντιβιοτικά διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας μια στήλη Zorbax SB–C18 (2,1mm x 150 mm, 5 μm) στους 30°C. Η έκλουση ήταν βαθμιδωτή και χρησιμοποιήθηκαν δύο φάσεις. Η κινητή φάση Α περιείχε 1mM οξικό αμμώνιο, 0,007%(v/v) παγόμορφο οξικό οξύ και 10% ακετονιτρίλιο.

Η βαθμιδωτή έκλουση άρχισε με 0% Β για τα πρώτα 2 λεπτά. Κατόπιν αυξήθηκε η Β ως ακολούθως :8,5% για 8 λεπτά, 18% για 20 λεπτά, 50% για 25 λεπτά και 100% για 30 λεπτά. Για να επιτραπεί στο σύστημα να ισορροπήσει υπήρχε παύση 15 λεπτών πριν την επόμενη έκλουση των νέων δειγμάτων.

Για τον ιονισμό των μορίων χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροψεκασμός καθώς και selected ion monitoring (SIM). Το αέριο ξήρανσης ρυθμίστηκε στους 350°C με ροή 10 L/min. Η πίεση εκνέφωσης και η τάση τριχοειδούς ήταν 30 psig και 3500V αντίστοιχα. Για να αποφευχθεί η μόλυνση και η έμφραξη του φασματόμετρου μάζας επιτρεπόταν η εισαγωγή του εκλουτή στον ανιχνευτή του φασματόμετρου μάζας μόνο μεταξύ 6 και 30 λεπτών από την ένεση του δείγματος.

Οι αναλύτες ανιχνεύθηκαν σε τάσεις θρασματοποιήσης 85 και 120V αντίστοιχα. Ο προσδιορισμός των αναλυτών βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, καθώς και στην παρουσία και σχετική αφθονία των πρόδρομων και προϊόντων ιόντων.

Σε χαμηλή τάση, τα αντιβιοτικά παράγουν λιγότερα θραύσματα και τα μοριακά ιόντα ($[M+H^{+}]$) ανιχνεύονται με μεγαλύτερη ευαισθησία. Η υψηλότερη τάση προκαλεί περισσότερη θραυσματοποίηση και παράγει μεγαλύτερη αφθονία των ιόντων επιβεβαίωσης, παρέχοντας περαιτέρω επιβεβαίωση για τα αντιβιοτικά.

Πίνακας 3.8 Η σχετική αφθονία των πατρικών και θυγατρικών ιόντων στις δύο τάσεις θραυσματοποίησης [26]

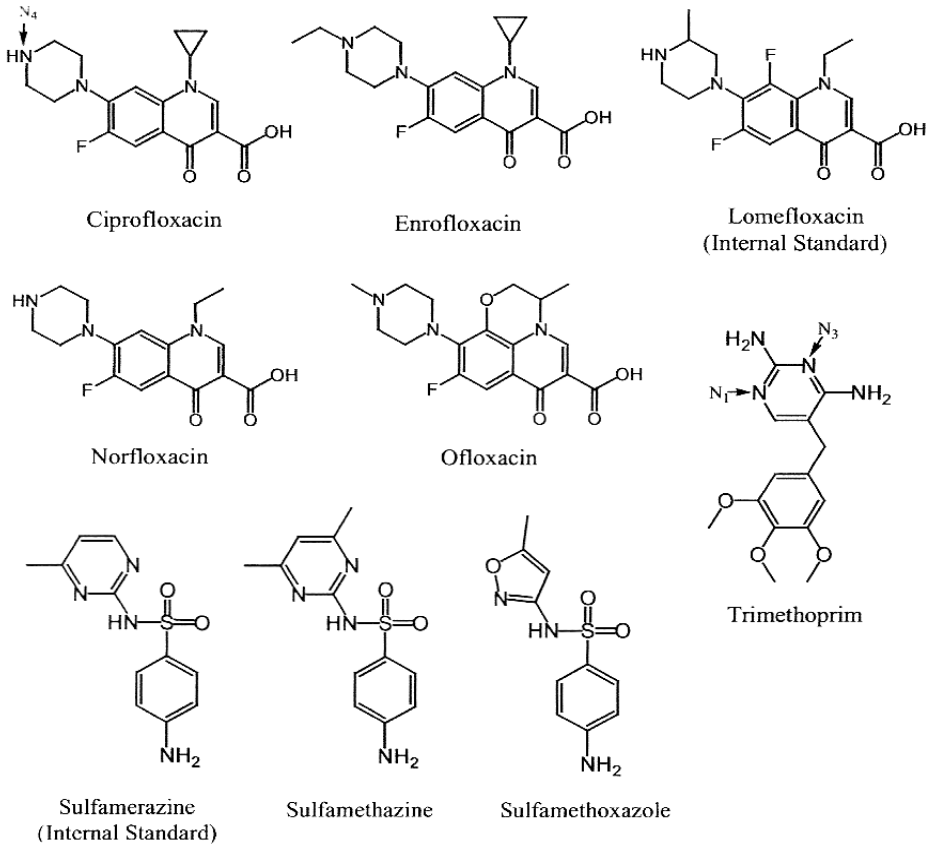
Ένωση	Πρόδρομα ιόντα (%)		Προϊόντα ιόντα.1(%		Προϊόντα ιόντα.2(%	
	85 V	120 V	85 V	120 V	85 V	120 V
Κιπροφλοξακίνη	100	100	4	71	9	73
Ενροφλοξακίνη	100	100	1	36	9	90
Λομεφλοξακίνη	100	100	2	25		
Νορφλοξακίνη	100	97	5	100	13	90
Οφλοξακίνη	100	92	10	100	1	33
Σουλφαμεραζίνη	100	52	15	100		
Σουλφαμεθαζίνη	100	100	5	71		
Σουλφαμεθοξαζόλη	100	27	41	100		
Τριμεθοπρίμη	100	100	1	9		

3.2.3.δ Αποτελέσματα και συζήτηση

I.SPE Ένα από τα προβλήματα που προκύπτουν συχνά κατά την εκχύλιση των οργανικών μολυντών (για παράδειγμα των αντιβιοτικών) από τα υγρά απόβλητα είναι οι παρεμποδίσεις της μήτρας που οφείλονται στις μεγάλες ποσότητες οργανικής ύλης στα δείγματα. Η οργανική ύλη μειώνει την απόδοση της εκχύλισης και εμποδίζει την ανίχνευση.

Η μέθοδος SPE που αναπτύχθηκε σε αυτή τη μελέτη και η οποία χρησιμοποιεί μια στήλη ανταλλαγής ανιόντων σε συνδυασμό με μια στήλη HLB μπορεί ταυτόχρονα να εκχυλίσει τα αντιβιοτικά φθοροκινολόνες, σουλφοναμίδες και τριμεθοπρίμη και να μειώσει τις παρεμποδίσεις από την οργανική ύλη.

Το pH του διαλύματος επηρεάζει σημαντικά την ανάλυση (ποιοτική ή ποσοτική) ανάλογα με το είδος των αντιβιοτικών εξαιτίας της παρουσίας όξινων και βασικών δραστικών ομάδων όπως φαίνεται από το παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 3.6 Δομή των υπό ανίχνευση αντιβιοτικών [26]

Οι σταθερές ιονισμού pk_a δείχνουν ότι η προσθήκη ή αφαίρεση H^+ για αυτά τα αντιβιοτικά συμβαίνει εύκολα σε pH περιβάλλοντος (βλέπε πίνακα3.9). Οι τιμές pka_1 και pka_2 αντιστοιχούν :

α)στην αποπρωτονίωση της ομάδας του καρβοξυλικού οξέος και την πρωτονίωση της αμινομάδας της πιπεραζίνης (N_4) των φθοριοκινολόνων ($C_4H_{10}N_2$) αντίστοιχα,

β) την πρωτονίωση της ομάδας της ανιλίνης ($C_6H_6NH_2$) η οποία παρουσιάζει ασθενείς βασικές ιδιότητες και αποπρωτονίωση της σουλφονυλοαμινομάδας των σουλφοναμίδων αντίστοιχα και

γ)την πρωτονίωση των δύο ετετροκυκλικών ατόμων του αζώτου (N_1 και N_2) της τριμεθοπρίμης.

Η όξυνση των δειγμάτων σε pH 2,5 πριν από την SPE παρήγαγε κυρίως ουδέτερες σουλφοναμίδες και κατιονικές φθοριοκινολόνες και τριμεθοπρίμη. Ως αποτέλεσμα τα ουδέτερα και κατιονικά αντιβιοτικά δεν κατακρατήθηκαν στις στήλες ανιονανταλλαγής ενώ αντίθετα κατακρατήθηκε η οργανική ύλη με υψηλό αρνητικό φορτίο. Η έκλουση των στηλών ανιονανταλλαγής παρείχε αμελητέες ποσότητες αντιβιοτικών πράγμα που απέδειξε ότι τα αντιβιοτικά δεν κατακρατήθηκαν σε αυτές τις στήλες.

Πίνακας 3.9 Τιμές pk_a, χρόνος κατακράτησης, πρόδρομα και προϊόντα ιόντα [26]

Ένωση	Τιμές pk_a	Τυπικός χρόνος κατακράτησης(min)	Πρόδρομο Ιόν $[M+H]^+$	Προϊόν Ιόν 1	Προϊόν Ιόν 2
Κιπροφλοξακίνη	6.09, 8.74	17.2	332	314	288
Ενροφλοξακίνη	5.86, 8.24	20.6	360	342	316
Λομεφλοξακίνη	5.82, 9.30	17.9	352	334	
Νορφλοξακίνη	6.30, 8.38	16.3	320	302	276
Οφλοξακίνη	6.05, 8.22	16.3	362	318	
Σουλφαμεραζίνη	2.17, 6.77	09.5	265	156	
Σουλφαμεθαζίνη	2.28, 7.42	12.6	279	156	
Σουλφαμεθοξαζόλη	1.83, 5.57	18.0	254	156	
Τριμεθοπρίμη	1.32, 7.12	14.1	291	261	

Η οπτική εξέταση των στηλών ανιονανταλλαγής μετά την εκχύλιση έδειξε ότι είχε συσωρευθεί σημαντική ποσότητα οργανικής ύλης στα πολυμερή. Αυτός ο καθορισμός κατά την διάρκεια της SPE ήταν απαραίτητος για τα περισσότερα δείγματα υγρών αποβλήτων που εξετάστηκαν. Εκείνα τα δείγματα που εκχειλίστηκαν μόνο με στήλες HLB έδειξαν ανύψωση της γραμμής βάσης στο χρωματογράφημα και σοβαρές παρεμποδίσεις μήτρας οι οποίες ήταν απαγορευτικές για την ακριβή LC-MS ανάλυση.Η έρευνα έδειξε επίσης ότι η προσθήκη 0.1M NaCl βελτίωσε την απόδοση της εκχύλισης των αντιβιοτικών ιδιαιτέρως των σουλφοναμίδων και της τριμεθοπρίμης διευκολύνωντας προφανώς την προσρόφηση των αντιβιοτικών στα πολυμερή της HLB στήλης.

ΙΙ. Ανίχνευση με LC-MS και καταστολή σήματος

Κατά την ανάλυση με LC-MS υπήρξε σημαντική καταστολή της έντασης του σήματος των αντιβιοτικών. Η καταστολή σήματος μπορεί να προκληθεί από διάφορα φαινόμενα. Πρώτον, τα αντιβιοτικά μπορεί να προσροφηθούν στην οργανική ύλη των δειγμάτων προκαλώντας μείωση της συγκέντρωσης των ελεύθερα διαλυμένων αντιβιοτικών, με αποτέλεσμα να αυξηθεί η δυσκολία ανίχνευσής τους. Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι οι συγκεντρώσεις των φθοριοκινολονών σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν χουμικές ενώσεις, παρουσιάζονται μειωμένες εξαιτίας του ότι οι φθοριοκινολόνες κατανέμονται μεταξύ νερού και διαλυμένου οργανικού άνθρακα.

Δεύτερον, οι μολυντές που περιέχονται στη μήτρα του δείγματος μπορούν να καλύψουν τις κορυφές των αναλυτών, αυξάνοντας τη γραμμή βάσης του χρωματογραφήματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υποτιμάται το εμβαδόν κάτω από τη χρωματογραφική καμπύλη.

Τρίτον, οι μολυντές μπορούν να μειώσουν την ικανότητα ιονισμού των αναλυτών καταλαμβάνοντας με αυτό τον τρόπο κάποιες θέσεις στην επιφάνεια των ηλεκτροψεκασμένων σταγονιδίων. Κατά την ανάλυση πολικών ζιζανιοκτόνων σε επιφανειακά νερά και σε νερά στις εκβολές ποταμών, απεδείχθη ότι οι χουμικές ενώσεις προκάλεσαν καταστολή σήματος, όταν χρησιμοποιήθηκε ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό.

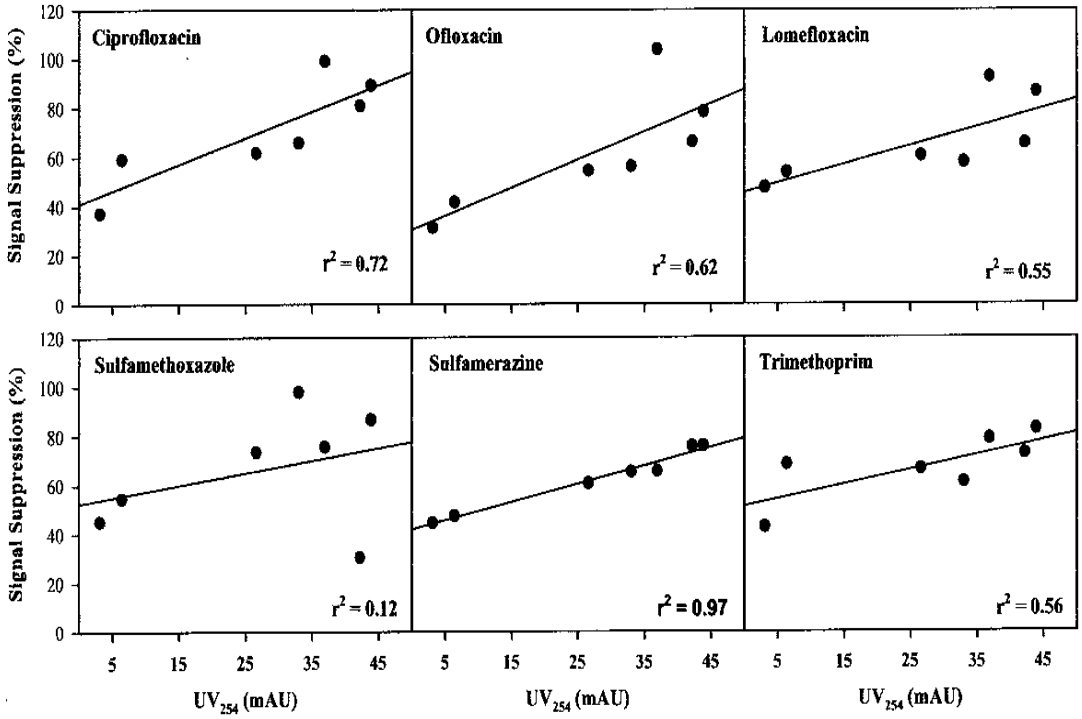
Τέλος, η καταστολή σήματος είναι ένα περίπλοκο φαινόμενο καθ' αυτό και μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τα όργανα ανάλυσης π.χ. τη γεωμετρία και την τάση της πηγής ιόντων κ.α.

Για την εκτίμηση της καταστολής του σήματος για κάθε αντιβιοτικό οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την παρακάτω εξίσωση:

καταστολής σήματος (%) =[1-(I_S- I_X) / I_{DI})] *100

Όπου I_S = ένταση του σήματος από δείγμα εμβολιασμένο με ποσότητα S αντιβιοτικού, I_X = ένταση του σήματος από μη εμβολιασμένο δείγμα εκχυλίσματος, I_{DI}= ένταση του σήματος από αποϊονισμένη μήτρα νερού (20% MeOH /80% 4,38mM H_3PO_4) εμβολιασμένο με ποσότητα S αντιβιοτικού.

Όπως φαίνεται από μερικά παραδείγματα στο παρακάτω σχήμα η καταστολή σήματος για κάθε αντιβιοτικό αυξάνεται περίπου γραμμικά καθώς αυξάνεται η UV_{254} προσρόφηση του υγρού αποβλήτου. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η παρουσία μεγαλύτερης ποσότητα οργανικής ύλης συνεπάγεται μεγαλύτερη καταστολή σήματος.



Σχήμα 3.7 Καταστολή σήματος των αντιβιοτικών σε εκχυλίσματα υγρών αποβλήτων [26]

Η σύγκριση της καταστολής σήματος μεταξύ των αντιβιοτικών δείχνει ότι τα αντιβιοτικά της ίδιας ομάδας παρουσιάζουν παρόμοιο βαθμό καταστολής σήματος και ότι οι φθοριοκινολόνες είναι περισσότερο ευαίσθητες στην καταστολή σήματος από ότι οι σουλφοναμίδες και την τριμεθοπρίμη.

Μια άλλη περιπλοκή που συναντάται κατά την LC-MS ανάλυση είναι ότι ο χρόνος κατακράτησης για τις φθοριοκινολόνες και την τριμεθοπρίμη μπορεί να αυξηθεί στα 2 λεπτά σε μερικά δείγματα. Εν τούτοις τα πρόδρομα και προϊόντα ιόντα παρέχουν αρκετές αποδείξεις για την ταυτοποίηση των αντιβιοτικών σε αυτές τις περιπτώσεις

Για να περιοριστεί στο ελάχιστο η ολίσθηση στο χρόνο κατακράτησης και για να βελτιωθεί η μορφή της κορυφής αυξήθηκε η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος του εκλουτή. Αυτή η αύξηση όμως μειώνει το σήμα. Ως εκ τούτου είναι απαραίτητο να βελτιστοποιηθεί η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος για τη διατήρηση της έντασης το σήματος και της σταθερότητας του χρόνου κατακράτησης. Για αρκετές πολύ περίπλοκες μήτρες υγρών αποβλήτων μειώθηκε η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος ώστε να ανιχνευθούν τα αντιβιοτικά.

3.2.3.ε Ποσοτικοποίηση ανάκτησης και όρια ανίχνευσης.

Η ποσοτικοποίηση των ενώσεων βασίσθηκε στις κορυφές των ιόντων $[M+H]^+$ με την μέθοδο του εσωτερικού προτύπου και την μέθοδο γνωστής

προσθήκης. Για την ανάπτυξη της καμπύλης βαθμονόμησης με την μέθοδο του εσωτερικού προτύπου χρησιμοποιήθηκαν οι αναλογίες σημάτων αναλυτή και εσωτερικού προτύπου.

ως εσωτερικά πρότυπα επιλέγηκαν η λομεφλοξακίνη και η σουλφαμεραζίνη επειδή δεν χρησιμοποιούνται συχνά στην θεραπεία ανθρώπων στις ΗΠΑ και έτσι δεν αναμενόταν σε σημαντικές συγκεντρώσεις στα αστικά υγρά απόβλητα. Ούτε η λομεφλοξακίνη ούτε η σουλφαμεραζίνη ανιχνεύθηκαν στα δείγματα που αναλύθηκαν.

Το γεγονός ότι η καταστολή σήματος που παρατηρήθηκε για την λομεφλοξακίνη ήταν παρόμοια με εκείνη των φθοριοκινολόνων (βλέπε σχ.3.7) και ότι οι χρωματογραφικοί χρόνοι κατακράτησης των φθοριοκινολόνων ήταν εγγύς μεταξύ τους υποδεικνύει ότι η λομεφλοξακίνη είναι ένα καλό εσωτερικό πρότυπο για τα αντιβιοτικά φθοριοκινολόνες.

Η σουλφαμεραζίνη μοιάζει αρκετά με την σουλφαμεθαζίνη και την σουλφαμεθοξαζόλη όμως οι χρωματογραφικοί χρόνοι κατακράτησης καλύπτουν ένα μεγαλύτερο φάσμα από εκείνο των φθοριοκινολόνων και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικές επιδράσεις της μήτρας που προκαλούνται από συστατικά που εκλούονται ταυτόχρονα.

Παρά ταύτα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σουλφομεραζίνη λειτούργησε ικανοποιητικά ως εσωτερικό πρότυπο για τις σουλφοναμίδες στις περισσότερες μήτρες υγρών αποβλήτων που εξετάστηκαν. Σε αντίθεση η σουλφαμεραζίνη δεν ήταν κατάλληλη ως εσωτερικό πρότυπο για την τριμεθοπρίμη. Η χρήση της σουλφαμεραζίνης ως εσωτερικό πρότυπο γενικά υπερεκτιμά την συγκέντρωση της τριμεθοπρίμης επειδή το σήμα της σουλφαμεραζίνης καταστέλλεται περισσότερο από αυτό της τριμεθοπρίμης για μια δεδομένη μήτρα. Αυτή η υπερεκτίμηση ήταν έκδηλη από το γεγονός ότι οι ανακτήσεις εκχύλισης που προσδιορίστηκαν για την τριμεθοπρίμη ήταν γενικά μεγαλύτερες από 150% όταν χρησιμοποιήθηκε σουλφαμεραζίνη ως εσωτερικό πρότυπο. Έτσι χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της γνωστής προσθήκης και υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις τις τριμεθοπρίμης από τον τύπο: $\mathbf{[x] = ([S]\, I_X) / (I_5 - I_X)}$

[x] = συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο άγνωστο δείγμα

[S]= συγκέντρωση του αντιβιοτικού που προστέθηκε στο άγνωστο δείγμα

I_x= η ένταση σήματος του αντιβιοτικού στο άγνωστο δείγμα και

I_s = η ένταση σήματος του αντιβιοτικού στο δείγμα εμβολιασμένο με ποσότητα [s] αντιβιοτικού

Για τον ακριβή υπολογισμό των ανακτήσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εσωτερικού προτύπου για τις φθοριοκινολόνες και τις σουλφοναμίδες και η μέθοδος γνωστής προσθήκης για την τριμεθοπρίμη. Οι μέσες ανακτήσεις για το αποϊονισμένο νερό, και για τα υγρά απόβλητα της δευτεροβάθμιας και τελικής* επεξεργασίας φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 3.10

*Υγρά απόβλητα τελικής επεξεργασίας θεωρούνται εκείνα τα απόβλητα που έχουν υποστεί τριτοβάθμια ή και προχωρημένη επεξεργασία)

Πίνακας 3.10 Οι ανακτήσεις (%) των αντιβιοτικών στα δείγματα υγρών αποβλήτων [26]

Ένωση	αποϊονισμένο νερό (n=8)	Δευτεροβάθμια εκροή (n=13)	Τελική εκροή (n=13)
Κιπροφλοξακίνη[a]	102 ± 15	90 ± 28	98 ± 25
Ενροφλοξακίνη[a]	84 ± 17	92 ± 24	97 ± 24
Νορφλοξακίνη[a]	99 ± 15	106 ± 29	95 ± 31
Οφλοξακίνη[a]	101± 10	129 ± 25	114 ± 24
Σουλφαμεθαζίνη[a]	86 ± 19	37 ± 16	64 ± 24
Σουλφαμεθοξαζόλη[a]	63 ± 30	56 ± 31	65 ± 14
Τριμεθοπρίμη[b]	92 ± 17 [c]	109 ± 56 [d]	98 ± 39 [d]

[a] Ποσοτικοποίηση βασισμένη σε εσωτερικό πρότυπο

[b] Ποσοτικοποίηση βασισμένη σε προσθήκη 7

[c] n=4

[d] n=7

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 3.10 οι ανακτήσεις στα απόβλητα δευτεροβάθμιας κατεργασίας ήταν πάνω από 55% για όλες τις ενώσεις εκτός για την σουλφαμεθαζίνη. Οι μέσες ανακτήσεις για τις φθοριοκινολόνες ήταν πάνω από 90% για όλα τα δείγματα. Η κιπροφλαξακίνη, η ενροφλοξακίνη και η νορφλοξακίνη είχαν συγκρίσιμες ανακτήσεις (90-106%) ενώ η οφλοξακίνη είχε γενικά υψηλότερες ανακτήσεις (114-129%). Οι υψηλότερες ανακτήσεις της οφλοξακίνης ίσως οφείλονται στην ελαφρώς χαμηλότερη καταστολή

σήματος για το συγκεκριμένο αντιβιοτικό σε σύγκριση με την λομεφλοξακίνη Οι μέσες ανακτήσεις για την τριμεθοπρίμη ποίκιλαν από 98 έως 109%. Οι μέσες ανακτήσεις για τα αντιβιοτικά σουλφοναμίδες ήταν χαμηλότερες (37-65%). Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου για τα υπό έρευνα αντιβιοτικά.

Πίνακας 3.11 Όρια ανίχνευσης της μεθόδου (ng/L) για τα αντιβιοτικά [26]

Ένωση	Αποϊονισμένο νερό	Δευτεροβάθμια εκροή	Τελική εκροή
Κιπροφλοξακίνη	4	30	20
Ενροφλοξακίνη	3	40	40
Νορφλοξακίνη	7	30	30
Οφλοξακίνη	3	30	20
Σουλφαμεθαζίνη	2	90	40
Σουλφαμεθοξαζόλη	4	60	50
Τριμεθοπρίμη	2	50	40

Είναι φανερό ότι τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου αυξάνονται καθώς η μήτρα γίνεται πιο περίπλοκη από 2 έως 7ng / L στο αποϊονισμένο νερό, από 20 έως 50ng / L στην τελική εκροή και από 30-90ng / L στην δευτεροβάθμια εκροή. Η αύξηση του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου είναι αποτέλεσμα της αύξησης της καταστολής σήματος στις μήτρες.

3.2.3.στ. Συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών στα υγρά απόβλητα.

Η μέθοδος που περιγράφτηκε έχει εφαρμοστεί σε πολλά δείγματα υγρών αποβλήτων και επιφανειακών νερών. Εδώ αναφέρονται ως παράδειγμα τα αποτελέσματα από δύο εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων που για χάρη συντομίας θα αναφέρονται ως WWTP1 και WWTP2 και τα οποία αμφότερα χρησιμοποιούν πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια επεξεργασία με την διαφορά ότι η WWTP1 χρησιμοποιεί την χλωρίωση για την απολύμανση ενώ η WWTP2 την UV.

Ανάμεσα στα επτά αντιβιοτικά που ερευνήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, τα τέσσερα απ΄αυτά (κιπροφλοξακίνη, οφλοξακίνη, σουλφαμεθοξαζόλη και τριμεθοπρίμη) ανιχνεύτηκαν συχνά στις δευτεροβάθμιες εκροές και στις δύο εγκαταστάσεις. Η νορφλοξακίνη ανιχνεύτηκε σε λιγότερο από 60ng /L στην δευτεροβάθμια εκροή στην WWTP1 ενώ δεν βρέθηκε καθόλου στην WWTP2. Αυτή η παρατήρηση ανταποκρίνεται στο γεγονός ότι στις ΗΠΑ η νορφλοξακίνη χρησιμοποιείται σπανίως. Τα δύο αντιβιοτικά ενροφλοξακίνη και σουλφαμεθαζίνη, που χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική, δεν ήταν ανιχνεύσιμα και αυτό συμφωνεί με το γεγονός ότι οι δύο εγκαταστάσεις δεχόταν κατά πλειοψηφία αστικά απόβλητα . Οι διάμεσες συγκεντρώσεις της σουλφαμεθοξαζόλης, της τριμεθοπρίμης, της κιπρο- φλοξακίνης και της οφλοξακίνης στην δευτεροβάθμια εκροή ήταν 395-575, 40-705, 100-160 και 205-305ng / L αντίστοιχα.

Αν και η εμφάνιση των αντιβιοτικών στις δευτεροβάθμιες εκροές των δύο μονάδων ήταν συγκρίσιμες, τα επίπεδα των αντιβιοτικών στις τριτοβάθμιες εκροές διάφεραν σημαντικά. Γενικά οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών ήταν σημαντικά χαμηλότερες στην WWTP1 από ότι στην WWTP2 πράγμα που δείχνει ότι το χλώριο μάλλον απομακρύνει τα αντιβιοτικά πιο αποτελεσματικά από ότι η επεξεργασία με UV.

Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με εργαστηριακά πειράματα που δείχνουν μεγάλη ευπάθεια των φθοριοκινολόνων, των σουλφοναμίδων και της τριμεθοπρίμης στις αντιδράσεις με χλώριο και μικρή ευαισθησία των σουλφοναμίδων και της τριμεθοπρίμης στην φωτόλυση κατά την απολύμανση με UV. Χρειάζονται όμως περισσότερες μελέτες για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση και να κατανοηθεί η αποτελεσματικότητα και ο μηχανισμός απομάκρυνσης των αντιβιοτικών στις μεγάλες μονάδες επεξεργασίας.

3.2.3.ζ. Γενικά συμπεράσματα της μεθόδου.

Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι η αναπτυχθείσα μέθοδος είναι μια ικανή και ευαίσθητη μέθοδος για την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση τεσσάρων φθοριοκινολόνων, δύο σουλφοναμίδων και της τριμεθοπρίμης σε μήτρες υγρών αποβλήτων και σε συγκεντρώσεις ng/L.

Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκε συζευγμένη στερεά εκχύλιση (HLB/ στήλη ανιονανταλλαγής) ακολουθούμενη από LC – MS. Η μέθοδος εσωτερικού προτύπου χρησιμοποιώντας λομεφλοξακίνη και σουλφαμεραζίνη ως πρότυπα δουλεύει καλά για την ποσοτικοποίηση των φθοριοκινολόνων και των σουλφοναμίδων αντίστοιχα. Όμως η μέθοδος γνωστής προσθήκης είναι απαραίτητη για την ποσοτικοποίηση της τριμεθοπρίμης εξαιτίας των παρεμποδίσεων της μήτρας.

Παρατηρείται μια αύξηση της καταστολής σήματος και συνεπώς και του ορίου ανίχνευσης με την αύξηση της UV_{254} απορρόφησης της μήτρας του δείγματος που δείχνει ότι αυξανόμενες ποσότητες οργανικής ύλης παράγουν μεγαλύτερες παρεμποδίσεις κατά την ανάλυση.

Τέλος αν και αυτή η μέθοδος επιδεικνύεται με την ανάλυση 7.αντιβιοτικών μπορεί, εύκολα να εφαρμοστεί και σε άλλα μέλη των φθοριοκινολόνων και των σουλφοναμίδων. Εφαρμόζοντας αυτήν την αναπτυγμένη μέθοδο σε δείγματα από εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων παρέχονται σημαντικές πληροφορίες για την εμφάνιση και το γίγνεσθαι των αντιβιοτικών μετά τις τελικές επεξεργασίες σε αυτές τις μονάδες.

3.3 Αναλυτική μεθοδολογία για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών σε στερεά περιβαλλοντικά διαμερίσματα.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαρμάκων σε στερεά περιβαλλοντικά δείγματα, απαιτεί συνήθως χρονοβόρες και κοπιαστικές μεθοδολογίες. Η εξασφάλιση της ποιότητας του κάθε βήματος που εμπλέκεται στην όλη αναλυτική διαδικασία, περιλαμβανομένης της δειγματοληψίας και της αποθήκευσης, είναι απαραίτητη για την αξιοπιστία των αναλυτικών προσδιορισμών που ακολουθούν.

3.3.1 Δειγματοληψία και αποθήκευση [28]

Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη δειγματοληψία από χώματα και ιζήματα είναι η δράγα και ο πυρηνολήπτης. Οι δράγες προτιμούνται όταν πρέπει να συλλεχθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων. Οι τετράγωνοι ή οι πολλαπλοί πυρηνοσυλλέκτες χρησιμοποιούνται όταν απαιτούνται λεπτομέρειες όσον αφορά την κατανομή των αναλυτών στο χώρο.

Στη μέτρηση των οργανικών λιπαντών στα στερεά περιβαλλοντικά δείγματα είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπ' όψη ο ανομοιογενής χαρακτήρας της μήτρας. Επειδή τα αποτελέσματα μπορεί να εξαρτώνται από τη διάμετρο του πυρηνοσυλλέκτη, για υπο-δειγματοληψία προτείνεται η διαίρεση του ιζήματος και η λήψη του εσωτερικού μέρους, το οποίο δεν έχει έρθει σε επαφή με τα τοιχώματα του δειγματολήπτη. Όσον αφορά το υλικό κατασκευής των συσκευών δειγματοληψίας, ο ανοξείδωτος χάλυβας δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα.

Τα δείγματα που συλλέγονται μεταφέρονται υπό ψυχρές συνθήκες στο εργαστήριο και αποθηκεύονται στο σκοτάδι στους 4 ^{o}C ή στους –20 ^{o}C μέχρι αναλύσεως. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, θα πρέπει να εμποδίζεται η δραστηριότητα των βακτηρίων ώστε να διατηρείται η ακεραιότητα του δείγματος. Μερικοί συγγραφείς προτείνουν τη χρήση χημικών συντηρητικών όπως Hg^{2+}, φορμαλδεΰδης (HCHO) ή αζίδιο του νατρίου (NaN_3) για την παύση της βακτηριακής δραστηριότητας. Όμως αυτή η πρακτική δε συνηθίζεται επειδή αλλάζει η χημική σύνθεση του δείγματος. Οποτεδήποτε είναι δυνατό, συνίσταται η άμεση ανάλυση των δειγμάτων καθώς η αποθήκευση για μεγάλες χρονικές περιόδους μπορεί να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις των φαρμάκων στο δείγμα.

Εκτός της βακτηριακής δραστηριότητας μπορεί να υπάρξει μείωση των αντιβιοτικών κατά την αποθήκευση του δείγματος, που μπορεί να οφείλεται στην περαιτέρω αποιδόμηση της οργανικής ύλης ή διακυμάνσεις του pH ή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού.

Το υλικό κατασκευής των δοχείων αποθήκευσης μπορεί επίσης να επηρεάσει τα δείγματα. Το γυαλί ταιριάζει για πολλούς τύπους ιζημάτων και χωμάτων, υγρών ή ξηρών και γενικά προτιμάται το καφέ γυαλί για να εμποδίζει την επίδραση του φωτός.

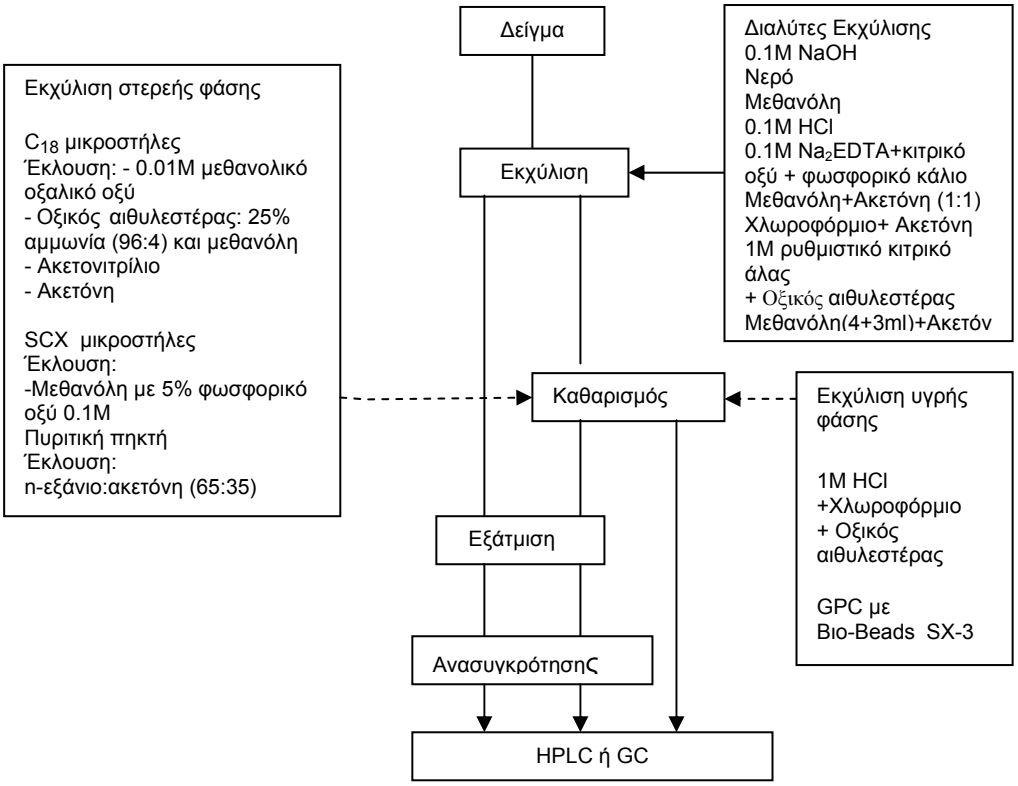
Συνοψίζοντας λοιπόν τονίζεται ότι πριν την αποθήκευση τα δείγματα θα πρέπει να σταθεροποιούνται και να προστατεύονται από το φως, τις υψηλές θερμοκρασίες και τον αέρα (προς αποφυγήν διαδικασιών οξείδωσης).

3.3.2 Επεξεργασία του δείγματος [28]

Τα δείγματα από τα περιβαλλοντικά διαμερίσματα είναι συνήθως περίπλοκα και μπορούν να περιέχουν ουσίες που επηρεάζουν έντονα την εκχύλιση και τα βήματα διαχωρισμού. Για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών σε στερεές περιβαλλοντικές μήτρες, όπου οι αναλύτες-στόχοι βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις μαζί και με πολλές άλλες εν δυνάμει παρεμποδίζουσες ουσίες, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή της επεξεργασίας του δείγματος, η οποία συνήθως περιλαμβάνει αμφότερα ένα βήμα εκχύλισης και ένα βήμα καθαρισμού πριν από την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία ή με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Η εκχύλιση των αναλυτών από τη στερεή μήτρα, γίνεται συνήθως με επεξεργασία υπερήχων, ή με απλή ανάδευση ή ανάμειξη με πολικούς οργανικούς διαλύτες ή μείγματα αυτών, ή με υδατικά διαλύματα.

Ο καθαρισμός των εκχυλισμάτων, όταν γίνεται, εκτελείται με εκχύλιση στερεής φάσης, με εκχύλιση υγρής φάσης (liquid-liquid extraction, LLE), με χρωματογραφία διαπέρασης πηκτής (gel permeation chromatography, GPC) και με ημι-παρασκευαστική HPLC (semi-preparative HPLC).

Η SPE προτιμάται στις περισσότερες περιπτώσεις, επειδή είναι γρήγορη, απαιτεί λιγότερο όγκο οργανικού διαλύτη, παρουσιάζει μικρή επικινδυνότητα επιμόλυνσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί εν σειρά με τον χρωματογράφο. Με εξαίρεση τους Brambilla et al, [29], οι οποίοι χρησιμοποίησαν διαχωριστικές στήλες (cartridges) ισχυρής κατιονανταλλαγής (strong cation



Σχήμα 3.8 Επεξεργασία δειγμάτων πριν την HPLC ή GC (Diaz-Cruz et al.,) [33]

exchange, SCX) και τους Ternes et al., [30] οι οποίοι χρησιμοποίησαν "πυριτική πηκτή" (silica gel) ως μέρος μιας εξαντλητικής διαδικασίας καθαρισμού, ο καθαρισμός με SPE γίνεται πάντα με υλικό προσρόφησης αντίστροφης φάσης. Η χρήση άλλων προχωρημένων τεχνικών καθαρισμού όπως εκχύλιση με ανοσοσυγγένεια (immunoaffinity extraction) ή μοριακά αποτυπωμένων υλικών (molecular imprinted materials), δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία μέχρι τώρα.

Μέχρι σήμερα οι μελέτες που έχουν εκπονηθεί για τον προσδιορισμό των φαρμακευτικών ουσιών σε στερεά περιβαλλοντικά δείγματα είναι λιγοστές σε σύγκριση με εκείνες που έχουν εκπονηθεί σε υγρά μέσα. Ο πίνακας 3.12 συνοψίζει τις μεθοδολογίες που έχουν αναπτυχθεί μέχρι τώρα για τον προσδιορισμό των φαρμακευτικών ουσιών σε πραγματικά και συνθετικά ιζήματα, στην ιλύ και στα χώματα και τις βασικές πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση με LC ή GC. Με εξαίρεση την μέθοδο που αναπτύχθηκε από τους Ternes et al., [30] και βασίζεται στην χρήση GC/MS/MS, η ανάλυση των φαρμακευτικών ουσιών έχει γίνει πάντα με HPLC. Η HPLC προτιμάται από την GC επειδή πολλές φαρμακευτικές

Πίνακας 3.12 Πειραματικές συνθήκες για την ανάλυση αντιβιοτικών (Diaz-Cruz et al.) [30]

Ένωση	Δείγμα	Στήλη	Κινητή φάση (%)	Ανίχνευση	Όριο ανίχνευσης (μg/g)
Τετρακυκλίνη Χλωρατετρακυκλίνη	Τεχνικό θαλάσσιο ίζημα	Spherisorb S3 ODS1 150x2.1mm	Βαθμιδωτή έκλουση Οξαλικό οξύ(10 mM):Μεθανόλη (80:20) σε Ακετονιτρίλιο: Μεθανόλη (80:20)	UV λ 355 nm Frit FAB MS Particle Beam MS (-) mode	- 0.01 1
	Λιπασμένο χώμα	Puresil C18 Στήλη 150x4.6mm	Βαθμιδωτή έκλουση Φορμικό οξύ (0.5%)+οξικό αμμώνιο (1 Mm)+ νερό (pH 2)	ESI (+) mode MS/MS MS/MS/MS	0.001 0.002
Οξυτετρακυκλίνη	Χώμα	Hypersil BDS 250x2.1 mm	Οξικό νάτριο(10mM)+χλωριούχο Ασβέστιο(55 mM)+Na_2EDTA (20 mM), pH 6.5 μεθανόλη: νερό (35:35:30)	Φθορισμός λ_{exc} 390 nm λ_{em} 512 nm	-
	Τεχνικό και φυσικό Θαλάσσιο ίζημα	Hypersil ODS 100x5 mm	Ακετονιτρίλιο: νερό+ Na_2EDTA(1 mM) +νιτρικό κάλιο(100mM), pH 3.2 (14:86)	UV λ 365 nm	0.1, -
	Φυσικό Θαλάσσιο ίζημα	RP-8 254x4 mm	Μεθανόλη:Ακετονιτρίλιο:Οξαλικό οξύ (10mM), pH 2 (20:30:50)	UV λ 350 nm	-
	Φυσικό Θαλάσσιο ίζημα	Microsorv-MV C_8 25 cm	Ακετονιτρίλιο, pH 3.2: Οξαλικό οξύ (10mM), pH 2 (35:65)	UV λ 365 nm	0.2
	Τεχνικό Θαλάσσιο ίζημα	LiChrospher 100-RP18 125x4.6 mm	Ακετονιτρίλιο:Ορθοφοσφορικό οξύ (20mM), pH 2.3 (24:76)	UV λ 355 nm	0.01
	Λιπασμένο χώμα	Puresil C18 Στήλη 150x4.6mm	Βαθμιδωτή έκλουση Φορμικό οξύ (0.5%)+οξικό αμμώνιο (1 mM)+ νερό (pH 2)	Frit FAB (-) mode MS-MS Particle Beam MS (-) mode ESI (+) mode MS/MS MS/MS/MS	0.01 1 0.01
Τυλοσίνη	Χώμα	Hypersil BDS 250x2.1mm	Οξικό αμμώνιο (10 mM): Μεθανόλη(10:90)	ESI (+) mode/SIM	-
	Λιπασμένο χώμα	Puresil C18 Στήλη 150x4.6mm	Βαθμιδωτή έκλουση Φορμικό οξύ (0.5%)+οξικό αμμώνιο (1 mM)+ νερό (pH 2)	ESI (+) mode MS/MS MS/MS/MS	0.01
Σουλφαδιμεθοξίνη	Τεχνικό Θαλάσσιο ίζημα	LiChrospher RP-C18 250x4mm	Βαθμιδωτή έκλουση: Μεθανόλη σε Φωσφορικό οξύ (10 mM), pH 3.0	UV λ 275 nm	10

ουσίες όπως έχουμε αναφέρει είναι ευμετάβλητες με την θερμοκρασία.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.12 ο διαχωρισμός των ουσιών με HPLC έχει γίνει, στις περισσότερες περιπτώσεις με στήλες C18 αντίστροφης φάσης, χρησιμοποιώντας διαφορετικές κινητές φάσεις. Η ανίχνευση με UV και σε λιγότερη έκταση με MS και φθορισμό είναι οι τεχνικές ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται συζευγμένες με την HPLC, για την ανάλυση των φαρμάκων σε στερεές περιβαλλοντικές μήτρες. Η ανίχνευση με UV είναι η τεχνική που χρησιμοποιείται συνήθως για φαρμακευτικούς σκοπούς. Η ανίχνευση με φθορισμό χρησιμοποιείται λιγότερο μέχρι τώρα, ιδιαιτέρως εξαιτίας της αναγκαιότητας για παραγωγοποίηση. Παρά το γεγονός ότι η ανίχνευση με MS δίνει καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά ευαισθησία (sensitivity), δηλαδή μπορεί να διακρίνει μικρές διαφορές στη συγκέντρωση του αναλύτη και ενώ έχει μεγάλη ικανότητα προσδιορισμού ενός αναλύτη παρουσία άλλων ουσιών, δηλαδή μεγάλη εκλεκτικότητα (selectivity), πάρα ταύτα χρησιμοποιείται μόνο για ορισμένες περιπτώσεις. Η περιορισμένη εφαρμογή της MS είναι το αποτέλεσμα της συχνής χρήσεως μη-πτητικών ουσιών, όπως οξαλικού οξέος $(COOH)_2$ ή κιτρικού οξέος $\{(OH)C_3H_4(COOH)_3\}$, στην κινητή φάση της LC για τη βελτίωση της διαχωριστικής ικανότητας (resolution) της υγρής χρωματο-γραφίας. Αυτές οι κινητές φάσεις όταν χρησιμοποιούνται στην HPLC-MS προκαλούν έμφραξη στη διασύνδεση HPLC-MS και συγκέντρωση εναποθέσεων στην πηγή ιόντων.

Όσον αφορά την τεχνική ιονισμού, με εξαίρεση τους Delépée et al., [31] οι οποίοι προκειμένου να διερευνήσουν τα προϊόντα αποιδόμησης των οξυτετρακυκλίνων σε θαλάσσια ιζήματα χρησιμοποίησαν μια δέσμη σωματιδίων (PB-particle beam) και μια φρίτα (frit- πορώδες κεραμικό υλικό που έχει παραχθεί με θερμοσυσσώρευση) στη μεσεπιφάνεια που βομβαρδίζεται με άτομα μεγάλης ταχύτητας (fast atom bombardment, FAB),
όλη η έρευνα που ανασκοπείται εδώ αναφέρει τη χρήση της πιο ευαίσθητης μεσεπιφάνειας ηλεκτροψεκασμού για την παραγωγή θετικών ή αρνητικών ιόντων, ανάλογα με την ένωση.

Μια πρόσφατη μελέτη των Hamscher et al., [32] αναφέρει την ανάπτυξη μιας καινούργιας μεθόδου για τον προσδιορισμό με HPLC-MS/MS επίμονων υπολειμμάτων τετρακυκλινών σε χώμα λιπασμένο με κοπριά και επιβεβαίωση με MS/ MS/ MS. Εν συντομία, ένα θυγατρικό ιόν που παράγεται από την MS/ MS, παγιδεύεται, θραυσματοποιείται για άλλη μια φορά και καταγράφονται τα παραχθέντα ιόντα. Με τις μεθοδολογίες που ανασκοπούνται εδώ, τα όρια

ανίχνευσης ποικίλουν μεταξύ 10 ng/g και 200 ng/g όταν χρησιμοποιείται UV για ανίχνευση, μεταξύ 0,2 ng/g και 40 ng/g με ανίχνευση MS και τέλος περίπου 10 ng/g για ανίχνευση με φθορισμό.

Όσον αφορά την ακρίβεια των μεθόδων που περιγράφηκαν, μερικές φορές αναφέρονται χαμηλές ανακτήσεις. Αυτές όμως οι χαμηλές ανακτήσεις θα μπορούσαν να εξηγηθούν από την άποψη ότι δημιουργούνται σύμπλοκα μεταξύ των φαρμακευτικών ουσιών και μερικών εκ των συστατικών του ιζήματος ή των χωμάτων όπως δισθενή κατιόντα κ.ά.

Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι μικροβιολογικοί μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ουσιών, ιδιαίτερα σε βιολογικά δείγματα αλλά δεν έχουν βρει εφαρμογή για ανάλυση στα χώματα, στα ιζήματα ή την ιλύ πιθανόν εξαιτίας της περιορισμένης ευαισθησίας τους και της ανικανότητας τους για ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό πολλών συστατικών σε ένα μείγμα.

3.3.3 Συμπεράσματα:

Οι μελέτες που αφορούν την ανάλυση στερεών περιβαλλοντικών δειγμάτων είναι ιδιαίτερα λιγοστές και οι αναλυτικές μέθοδοι που εφαρμόζονται είναι απλά παραλλαγές εκείνων που έχουν αναπτυχθεί για υδατικά δείγματα.

Η HPLC με ανιχνευτή UV είναι η αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται κατά το πλείστον αν και η ανίχνευση με MS γίνεται όλο και πιο δημοφιλής. Ένα από τα προβλήματα ιδιαίτερα στην ανίχνευση με MS είναι η παρουσία παρεμποδίσεων η οποία μπορεί να προκαλέσει καταστολή των ιόντων και ανεπαρκή όρια ανίχνευσης. Γι΄ αυτό το λόγο απαιτούνται προχωρημένες τεχνικές καθαρισμού όπως με SPE ανοσοσυγγένειας (immunaffinity SPE) ή με μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (modecular imprinted polymers, MIPS).

3.3.4 Περιπτωσιολογική μελέτη:

«Ταυτόχρονη εκχύλιση τετρακυκλινών, μακρολιδίων και σουλφοναμιδίων από γεωργικά χώματα χρησιμοποιώντας PLE/SPE και LC tandem MS»

Για να δώσουμε μια πραγματική αίσθηση στον αναγνώστη στα όσα θεωρητικά αναφέραμε μέχρι τώρα θα αναφερθούμε σε μια μελέτη των Jacobsen et al., [33] οι οποίοι χρησιμοποίησαν υγρή εκχύλιση υπό πίεση ακολουθούμενη από εκχύλιση στερεής φάσης και LC-tandem MS για την ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμάτων αντιβιοτικών, από τις ομάδες των τετρακυκλινών, των μακρολιδίων και των σουλφοναμιδίων σε γεωργικά χώματα.

Συγκεκριμένα τα υπό ανίχνευση αντιβιοτικά ήταν η χλωρατετρακυκλίνη και η οξυτετρακυκλίνη από τις τετρακυκλίνες, η σουλφοδιαζίνη από τις σουλφοναμίδες και η τυλοσίνη Α (περιλαμβανομένων και των προϊόντων αποκοδόμησής της ήτοι τυλοσίνη Β, Γ, Δ) με την ερυθρομυκίνη από τις μακρολίδες.

Επιλεγμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των συγκεκριμένων αντιβιοτικών καθώς και επιλεγμένες ιδιότητες των χωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την βελτιστοποίηση και αξιολόγηση της μεθόδου εκχύλισης φαίνονται στους πίνακες 3.13 και 3.14 που ακολουθούν.

Πίνακας 3.13 Φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό προσδιορισμό αντιβιοτικών (προσαρμοσμένος πίνακας Jacobsen et al.,) [33]

Ένωση	M_W (g/mol)	pK_a	Log K_{ow} (α)	K_d^{β} (l/kg) (β)
χλωρατετρακυκλίνη	478.9	3.3, 7.44, 9.27	- 0.36	-
οξυτετρακυκλίνη	460.4	3.27, 7.32, 9.11	- 0.89	680 ± 69 670 ± 149
τυλοσίνη Α	916.1	7.13	1.63 2.50 ± 0.84	128 ± 20 10.8 ± 0.7
τυλοσίνη Β	711.9	-	-	1.66 ± 0.75
τυλοσίνη Γ	902.1	-	2.20 ± 0.84	-
τυλοσίνη Δ	918.2	-	2.17 ± 0.83	-
ερυθρομυκίνη	747.9	8.88	3.06	-
σουλφοδιαζίνη	250.3	6.15	- 0.092	2.0

α) Log K_{ow}: λογάριθμος του συντελεστή κατανομής οκτανόλης / νερού

β) K_d: συντελεστής κατανομής χώματος / νερού

Πίνακας 3.14 Επιλεγμένες ιδιότητες των χωμάτων (προσ.Jacobsen et al.,) [33]

Χώμα	Βάθος	Σύστ.(%)					pH	IAK (α)
	(cm)	Άργιλος <2μm	Ιλύς 2-20 μm	Λεπτή άμμος 20-200 μm	Χοντρή Άμμος 200-2000 μm	Οργαν. C	($CaCl_2$)	(meq/ 100g)
Παχύ αμμώδες	0-20	11.3	10.7	37.9	37.5	1.6	6.1	10.0
Αμμώδες	Ο-20	5.2	4.8	24.4	63.2	1.4	5.6	6.7

α) ΙΑΚ: ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων

Για να πετύχουν ομογένεια στα δείγματα, μείωσαν την περιεκτικότητα τους σε νερό στο 5% και κατόπιν τα κοσκίνισαν (διάμετρος οπών 2mm).

Αναλυτική διαδικασία:

3.3.4α.Υγρή εκχύλιση υπό πίεση

Η εκχύλιση των αντιμικροβιακών παραγόντων από το χώμα έγινε με PLE σε ένα σύστημα ASE 200. Το σύστημα λειτούργησε με κυψελίδες εκχύλισης από ανοξείδωτο χάλυβα όγκου 33ml επενδυμένες με φίλτρα από ίνες γυαλιού (Dionex No. 049458, size1.983 cm).

Το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης αποτελείτο από 1:1 (v/v) μίγματος μεθανόλης και 0,2M κιτρικού οξέος με το pH ρυθμισμένο στο 4,7 με NaOH. Το αυτόματο πρόγραμμα της υγρής εκχύλισης υπό πίεση ήταν το ακόλουθο :

Εκχύλιση με περίπου 30ml ρυθμιστικού διαλύματος σε 1500 psi για 10 λεπτά και ξέπλυμα μέσα σε φιαλίδιο συλλογής. Στη συνέχεια στατική εκχύλιση με επιπλέον 30ml ρυθμιστικού διαλύματος για 3 λεπτά και ξέπλυμα στο ίδιο φιαλίδιο. Ο συνολικός όγκος του εκχυλίσματος ήταν περίπου 60ml (ανάλογα με την υγρασία και τη μάζα του χώματος). Οι εκχυλίσεις έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία δωματίου καθώς οι τετρακυκλίνες μετατρέπονται στην αφυδατωμένη τους μορφή σε υψηλές θερμοκρασίες. Μεταξύ κάθε εκχύλισης οι κυψελίδες καθαρίζονται με υπέρηχους για 15 λεπτά σε ένα μίγμα milli-Q

νερού-μεθανόλης (50:50, v/v) και στην συνέχεια ακολουθούσε καθάρισμα από υπέρηχους με milli-Q νερό για 15 λεπτά.

3.3.4β Εκχύλιση στερεής φάσης

Ο καθαρισμός και προσυγκέντρωση των δειγμάτων έγινε χρησιμοποιώντας στήλες ισχυρής ανιονανταλλαγής (**SAX**) των 6ml με προσροφητικό υλικό των 500mg και στήλες υδρόφιλης/υδρόφοβης εξισορρόπησης (**HLB)** των 6ml με προσροφητικό υλικό 200mg. Οι στήλες τοποθετήθηκαν σε σύζευξη για να απομακρυνθεί η αρνητικά φορτισμένη χουμική ύλη με τις SAX και να κατακρατηθούν οι αντιμικροβιακοί παράγοντες από τις HLB .

Οι στήλες SAX τοποθετήθηκαν πάνω από τις στήλες HLB και στη συνέχεια και οι δυο στήλες ενεργοποιήθηκαν πρώτα με 2ml μεθανόλης και κατόπιν με ρυθμιστικό διάλυμα 2ml κιτρικού οξέος 0.04M και pH 4.7. Τα εκχυλίσματα από την PLE, που περιείχαν περίπου 30ml μεθανόλης, αραιώθηκαν με milli-Q νερό μειώνοντας την περιεκτικότητα σε μεθανόλη κάτω του 10%. Τα αραιωμένα δείγματα διαβιβάστηκαν μέσω των δυο στηλών στερεής εκχύλισης με ροή περίπου 5ml/λεπτό και μετά την εκχύλιση οι στήλες ξεπλύθηκαν με 2ml 5.04M ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος (pH 4.7) και 2ml 0.1M οξικού καλίου. Στην συνέχεια ακολούθησε ξήρανση υπό κενό για 15 λεπτά, απομακρύνθηκαν οι στήλες SAX και εκλούστηκαν οι αντιμικροβιακοί παράγοντες από το προσροφητικό υλικό των μικροστηλών HLB με 2ml μεθανόλης.

Για δείγματα που υπήρχαν υποψίες για χαμηλές συγκεντρώσεις σε αντιβιοτικά και προκειμένου να βελτιωθεί η ευαισθησία της μεθόδου, προηγήθηκαν τρεις εκχυλίσεις PLE πριν την προσυγκέντρωση και έτσι επιτεύχθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στα τελικά εκχυλίσματα.

3.3.4γ Μέθοδοι LC-ESI-MS-MS:

Εξαιτίας των διαφορών των αντιβιοτικών σε φυσικο-χημικές ιδιότητες χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικοί μέθοδοι. Περίληψη των PLE, SPE, HPLC (Μέθοδος I και II) καθώς και πρόδρομα, προϊόντα ιόντα και βελτιστοποιημένοι παράμετροι για την ανάλυση των αντιβιοτικών αναφέρονται στους παρακάτω δύο πίνακες.

Πίνακας 3.15 Περίληψη των PLE, SPE, HPLC (προσαρμοσμέν. Jacobsen et al.,) [33]

	Μέθοδος Ι: τετρακυκλίνες και σουλφοναμίδες CTC$^{\alpha}$, OTC$^{\beta}$, SDZ$^{\gamma}$	**Μέθοδος ΙΙ**: Μακρολίδες TYL$^{\delta}$, ERY$^{\varepsilon}$
Εκχύλιση χώματος	PLE: 1500 psi, θερμοκρασία δωματίου, ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης: 50% μεθανόλη και 50% 0.2 M κιτρικό οξύ (pH 4.7)	
SPE	Αραίωση του εκχυλίσματος PLE με μεθανόλη < 10%: Στήλες SAX και HLB σε σύζευξη	
HPLC	Στήλη: Waters Xterra Ms-C18, 100mmx2.1mm, 3.5μm, θ=13 ^{0}C	
Κινητές φάσεις	A: 5% μεθανόλη+80mM φορμικό B: 95% μεθανόλη+80mM φορμικό οξύ	A: 20% μεθανόλη+80mM B: 95% μεθανόλη+80mM φορμικό οξύ
Ροή	200 μl /λεπτό	250 μl /λεπτό
Βαθμιδωτή έκλουση	0-2.5 λεπτά: 98% A 2.5-8 λεπτά: γραμμική μείωση σε 50% A, 8-23 λεπτά: 50% A, 23-26 λεπτά: γραμμική αύξηση σε 98% A, 26-30 λεπτά: 98% A	0-2 λεπτά: 96% A, 2-8 λεπτά: γραμμική μείωση σε 30% A, 5-15 λεπτά: 30% A, 15-17 λεπτά: γραμμική αύξηση σε 96% A, 17-20 λεπτά: 96% A
Όγκος ένεσης	5μl	

α= χλωρατετρακυκλίνη, β= οξυτετρακυκλίνη, γ= σουλφοδιαζίνη, δ= τυλοσίνη,

ε= ερυθρομυκίνη

Πίνακας 3.16Πρόδρομα ιόντα, προϊόντα ιόντα και βελτιστοποιημένοι παράμετροι για την ανάλυση των αντιβιοτικών των μεθόδων I και II (προσαρμ. Jacobsen et al.,) [33]

Ενώσεις	**Πρόδρομα ιόντα (m/z)**	**Προϊόντα ιόντα (m/z)**
Χλωρατετρακυκλίνη	479.0	444.2
Οξυτετρακυκλίνη	461.0	426.0
Σουλφοδιαζίνη	251.3	156.0
Τυλοσίνη Α	916.0	772.0
Τυλοσίνη Β	772.0	174
Τυλοσίνη Γ	902.5	758.5
Τυλοσίνη Δ	918.0	774.0
Ερυθρομυκίνη	734.0	158.0
Παράμετροι MS	**Μέθοδος I**	**Μέθοδος II**
Αέριο εκνέφωσης (NEB) (l min^{-1})	5	10
Αέριο παραπετάσματος (curtain gas) (CUR) (l min^{-1})	9	6
Αέριο πρόσκρουσης (CAD) (l min^{-1})	7	11
Τάση ηλεκτροψεκασμού (IS) (V)	5500	3000
Θερμοκρασία (TEM) C^0	350	550
Τάση αποσυσταδοποίησης (DP)	41	100
Τάση εστίασης (FP)	230	170
Τάση εισόδου (EP)	- 4.5	- 15
Ενέργεια πρόσκρουσης (CE)	30	40
Τάση εξόδου κυψελίδας πρόσκρουσης (CXP)	15	25

Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Με τη Μέθοδο Ι αναλύθηκαν οι τετρακυκλίνες και οι σουλφοναμίδες και με τη Μέθοδο ΙΙ οι μακρολίδες. Και για τις δύο μεθόδους το αναλυτικό σύστημα αποτελείτο από ένα σύστημα Agilent 1100 series HPLC εξοπλισμένο με ένα απαερωτή, ένα ψυχόμενο αυτόματο δειγματολήπτη (4 ^{0}C) και ένα ψυχόμενο φούρνο στήλης (13 ^{0}C).

Οι διαχωρισμοί με HPLC και για τις δύο μεθόδους επιτεύχθηκαν χρησιμοποιώντας στήλες Waters Xterra MS-C18 (100mmx2.1mm, μέγεθος σωματιδίων 3.5μm).

Η φασματομετρική ανίχνευση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα Sciex API 3000 τετράπολο ανιχνευτή με πηγή ESI. ια την ανίχνευση με MS, το όργανο λειτούργησε για την παραγωγή θετικών ιόντων. Τα όρια ανίχνευσης για την χλωρατετρακυκλίνη και την οξυτετρακυκλινη ήταν 0,6-5,6μg/kg χώματος, για την σουλφοδιαζινη 0,9-2,9μg/kg χώματος και για την ερυθρομυκίνη και την τυλοσίνη 2,4-5,5μg/kg χώματος.

Οι μελετητές θεωρούν τις ανακτήσεις, τα όρια ανίχνευσης και τα όρια ποσοτικοποίησης ικανοποιητικά ώστε να εφαρμόζεται η διαδικασία για περιβαλλοντικά δείγματα. Όμως μεταξύ των μελών της ίδιας ομάδας παρουσιάστηκαν διακυμάνσεις στις ανακτήσεις κάτι που δεν εγγυάται την εφαρμογή της διαδικασίας για άλλα μέλη της ίδιας ομάδας. Παρά ταύτα οι ενώσεις που μελετήθηκαν αντιπροσωπεύουν μια ευρεία κλίμακα φυσικοχημικών ιδιοτήτων και ως εκ τούτου η μέθοδος αναμένεται να είναι εφαρμόσιμη για πολλούς αντιμικροβιακούς παράγοντες που μπορεί να είναι ταυτόχρονα παρόντες στα δείγματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

4.1 Δίοδοι πρόσβασης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον:

Τα περισσότερα αντιβιοτικά (για παράδειγμα αμοξικιλλίνη, σουλφαμεθαζίνη, ερυθρομυκίνη, χλωροτετρακυκλίνη και τετρακυκλίνη) μεταβολίζονται πολύ λίγο μετά την χορήγηση τους σε ανθρώπους και ζώα. Εξαιτίας αυτού, τα αντιβιοτικά και σε μερικές περιπτώσεις και οι μεταβολίτες τους, εκκρίνονται σε σημαντικές ποσότητες και μπορούν να εισχωρήσουν στο περιβάλλον μέσω διαφόρων οδών.

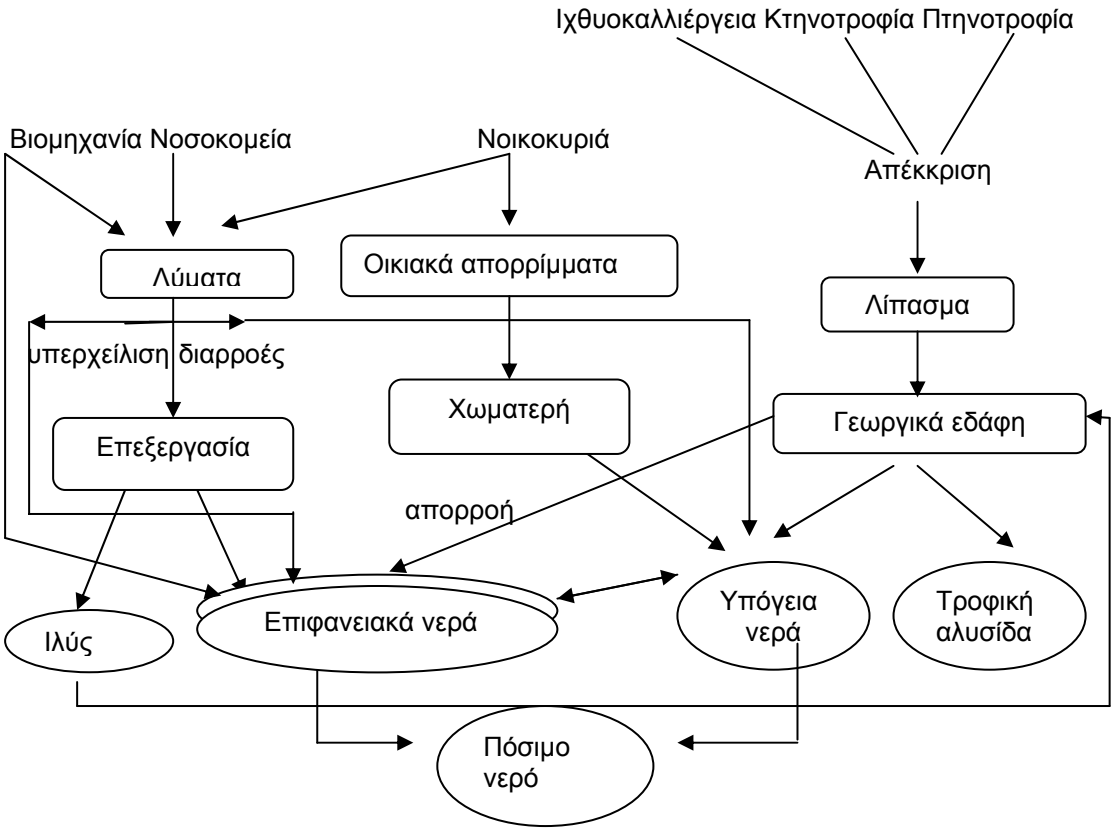
Έτσι τα αντιβιοτικά που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση φθάνουν στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων μέσω των νοσοκομειακών και οικιακών αποχετεύσεων. Από εκεί εάν δεν εξαλειφθούν κατά την διαδικασία του καθορισμού θα καταλήξουν στην ιλύ ή στα επιφανειακά ύδατα μέσω των εκροών των εγκαταστάσεων. Από τα επιφανειακά ύδατα τα αντιβιοτικά μπορούν να φθάσουν στο πόσιμο νερό, είτε απευθείας είτε αφού πρώτα περάσουν στα υπόγεια ύδατα. Εάν η ιλύς απλωθεί σε χωράφια, κάτι που είναι η κοινή τακτική, τότε τα αντιβιοτικά θα καταλήξουν σε κάποιο υδατικό αποδέκτη ή και στην τροφική αλυσίδα.

Επίσης τα οικιακά απορρίμματα αρκετές φορές περιέχουν ληγμένα αντιβιοτικά τα οποία καταλήγουν σε χωματερές. Επειδή οι περισσότερες χωματερές δεν διαθέτουν συστήματα αποστράγγισης υπάρχει ο κίνδυνος τα αντιβιοτικά να καταλήξουν στα υπόγεια ύδατα.

Όσον αφορά τα αντιβιοτικά που προορίζονται για κτηνιατρική χρήση αυτά καταλήγουν στην κοπριά μετά την απέκκριση. Η κοπριά όμως πολύ συχνά χρησιμοποιείται ως λίπασμα στο έδαφος. Από το έδαφος όμως για άλλη μια φορά τα αντιβιοτικά θα καταλήξουν σε κάποιο υδατικό αποδέκτη ή στην τροφική αλυσίδα.

Ιδιαίτερα τώρα στις ιχθυοκαλλιέργειες επειδή τα αντιβιοτικά παρέχονται απ΄ ευθείας στο νερό υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις τόσο στο υδατικό διαμέρισμα όσο και στα γειτνιάζοντα ιζήματα. Είναι πάντως προφανές από όσα έχουν αναφερθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος των αντιβιοτικών καταλήγει σε κάποιο υδατικό διαμέρισμα.

Στο σχήμα της επόμενης σελίδας φαίνονται οι δίοδοι πρόσβασης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον.



Σχήμα 4.1 Βασικοί δίοδοι πρόσβασης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον [29]

4.2 Η παρουσία των αντιβιοτικών σε διάφορα περιβαλλοντικά διαμερίσματα:

Σε αυτή την ενότητα θα αναφέρουμε επιγραμματικά την παρουσία ή μη των αντιβιοτικών σε διάφορα περιβαλλοντικά διαμερίσματα όπως αναφέρονται σε ερευνητικές εργασίες τις οποίες επιλέξαμε αφενός επειδή είναι οι πλέον πρόσφατες και αφετέρου επειδή πραγματεύονται την ανίχνευση πολλών αντιβιοτικών μαζί.

Ο διαχωρισμός των περιβαλλοντικών διαμερισμάτων σε υγρά και σε στερεά θα εφαρμοσθεί για άλλη μια φορά ακόμα.

4.2.1 Υγρά απόβλητα-επιφανειακά ύδατα-υπόγεια ύδατα-πόσιμο νερό-θαλάσσιο νερό.

Οι Hirsch et al.,[30] ανέλυσαν δείγματα νερού από εκροές εγκαταστάσεων επεξεργασίας αποβλήτων, από επιφανειακά και από υπόγεια νερά. Στις μεν εκροές των WWTPs και στα επιφανειακά ύδατα τα δείγματα έδειξαν συχνή εμφάνιση ερυθρομυκίνης–H_2O, ροξιθρομυκίνης και σουλφαμιδοξαζόλης σε συγκεντρώσεις μέχρι 6μg/L.

Οι τετρακυκλίνες και οι πενικιλλίνες ανιχνεύτηκαν σε συγκεντρώσεις που δεν υπερέβαιναν τα 50 και 20 ng/L αντίστοιχα. Όσον αφορά τα υπόγεια νερά, ενώ πήραν ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων από διάφορες αγροτικές περιοχές της Γερμανίας, δεν μπόρεσαν να ανιχνεύσουν κανένα ίχνος αντιβιοτικού με εξαίρεση δυο τοποθεσίες.

Οι Alexy et. al., [34] ερεύνησαν την παρουσία αντιβιοτικών στις εισροές και εκροές τριών εγκαταστάσεων επεξεργασίας αστικών λυμάτων και ανίχνευσαν κυρίως σουλφοναμίδες και μακρολίδια. Επιπλέον ανιχνεύτηκαν τα αντιβιοτικά κλινταμυκίνη, μετρονιδαζόλη και οφλοξακίνη.

Οι Calamari et al., [35], Οι Christian et al., [36], και οι Giger et al., [37][ανίχνευσαν σε διαφορετικές μελέτες μια ποικιλία αντιβιοτικών σε επιφανειακά νερά σε συγκεντρώσεις μέχρι 6 μg/L.

Οι Sacher et al., [38] ανέλυσαν δείγματα από 105 υπόγεια πηγάδια στη Γερμανία. Ανάμεσα 60 φαρμακευτικών ουσιών ανίχνευσαν ερυθρομυκίνη – H_2O και σουλφαμεθοξαζόλη.

Οι Kolpin et al., [39] δημοσίευσαν μια μελέτη που αφορούσε την ανίχνευση 95 οργανικών μολυντών υγρών αποβλήτων, συμπεριλαμβανομένων και των φαρμακευτικών ουσιών, σε 139 ρέματα ανά τις ΗΠΑ. Ανάμεσα σε 31 αντιβιοτικά από τις ομάδες των τετρακυκλινών, των μακρολιδίων, των

σουλφοναμίδων και των φθοριοκινολονών, η ερυθρομυκίνη-H2O και η σουλφαμεθοξαζόλη ανιχνεύθηκαν σε συγκεντρώσεις μέχρι 1.7 και 1 μg/L αντίστοιχα.

Οι Zhengqui et al., [31] μελέτησαν την παρουσία αντιβιοτικών σε δείγματα νερού που συνέλεξαν από 5 εγκαταστάσεις επεξεργασίας νερού τόσο κατά την εισαγωγή στις εγκαταστάσεις όσο και μετά την συμβατική επεξεργασία. Σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύτηκαν αντιβιοτικά. Τα περισσότερα αντιβιοτικά που ανιχνεύθηκαν στην εισροή του νερού δεν ανιχνεύθηκαν στο επεξεργασμένο νερό, ή βρέθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις που σημαίνει ότι απομακρύνθηκαν μερικώς κατά την διαδικασία της συμβατικής επεξεργασίας ή μετασχηματίστηκαν κατά την διάρκεια της απολύμανσης.

Οι Zuccato et al.,[40] προσπάθησαν να προβλέψουν το περιβαλλοντικό φορτίο των φαρμακευτικών ουσιών που μολύνουν το θαλάσσιο περιβάλλον. Η μελέτη τους, παρέχει μια εκτίμηση του είδους και των ποσοτήτων των φαρμακευτικών ουσιών που εισέρχονται στην Αδριατική Θάλασσα μέσω του ποταμού Πάδου (του σημαντικότερου ποταμού στην Ιταλία).

Με βάση αυτή την μελέτη οι ποσότητες γνωστών αντιβιοτικών που φαίνεται να εισέρχονται στην Αδριατική είναι: 57.1 Kg/έτος κλαρυθρομυκίνη, 94 Kg/έτος ερυθρομυκίνη, 4767.5 Kg/έτος λινκομυκίνη, 6.5 Kg/έτος οξυτετρακυκλίνη και 10.3 Kg/έτος τυλοσίνη.

Το σίγουρο συμπέρασμα πάντως είναι ότι εάν οι φαρμακευτικές ουσίες έχουν μεγάλους χρόνους ημιζωής στα νερά των ποταμών τότε μπορεί κάποιος να προβλέψει τη συσσώρευση τους στα παράκτια νερά. Δυστυχώς όμως δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για να προβλεφθεί η περιβαλλοντική συμπεριφορά πολλών αντιβιοτικών που ανιχνεύονται στα ποτάμια, και κατά συνέπεια δεν μπορεί να υπολογισθεί η ενδεχόμενη συσσώρευση τους στα θαλάσσια νερά.

4.2.2 Λάσπη αποβλήτων-χώματα-ιζήματα:

Οι Golet et al., [41] και οι Giger et al., [37] έχουν επιβεβαιώση την υπόθεση ότι οι φθοριοκινολόνες εμπλουτίζονται πάρα πολύ στη λάσπη αποβλήτων με τις συγκεντρώσεις τους να ποικίλουν από 1.4 εως 2.42 mg/kg ξηράς ύλης. Οι ερευνητές απέδειξαν επίσης την παρουσία ιχνών φθοριοκινολονών σε χώματα αρκετούς μήνες μετά την λίπανση τους με λάσπη αποβλήτων.

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι οι τετρακυκλίνες και οι σουλφοναμίδες είναι παρούσες στην υγρή κοπριά σε συγκεντρώσεις μέχρι 20 και 40 mg/L αντίστοιχα

(Hamscher et al., [42], Thiele-Bruhn [43]) Οι ερευνητές συμπέραναν ότι οι τετρακυκλίνες εισέρχονται στο έδαφος μέσω της υγρής κοπριάς, η οποία περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις, αποκτούν αντοχή και κατόπιν συσσωρεύονται στο χώμα.

Οι Coyne et al., [44], Migliore et al., [45] απέδειξαν σε ξεχωριστές έρευνες ότι υπάρχει έντονη παρουσία αντιβιοτικών στα ιζήματα κάτω από τα κλουβιά των ιχθυοτροφείων όπου γίνεται ευρεία χρήση αντιβιοτικών και καμία διαδικασία καθαρισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΤΟ ΓΙΓΝΕΣΘΑΙ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.

Οι ουσίες που φθάνουν στο περιβάλλον μπορούν να υποστούν διάφορες αντιδράσεις με συνέπεια την μερική ή ολική αποσύνθεση τους, όπως για παράδειγμα ορυκτοποίηση της μητρικής ένωσης.

Με βάση την συμπεριφορά τους στην αποσύνθεση, τα αντιβιοτικά μπορούν να καταταγούν στις παρακάτω ομάδες :

α) Αντιβιοτικά μαζί και οι μεταβολίτες τους που ορυκτοποιούνται από μικροοργανισμούς και ως εκ τούτου εξαλείφονται πλήρως.

β) Αντιβιοτικά που αποσυντίθενται μερικώς

γ) Αντιβιοτικά που εμμένουν στο περιβάλλον.

Οι διαδικασίες εξάλειψης μπορεί να είναι βιοτικές ή αβιοτικές, όπως για παράδειγμα προσρόφηση, ορυκτοποίηση, υδρόλυση, θερμόλυση και αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Η βιολογική αποσύνθεση παίζει καθοριστικό ρόλο στο περιβάλλον αλλά εξίσου σοβαρό ρόλο παίζουν οι φωτοχημικές και υδρολυτικές αντιδράσεις καθώς και οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που λαμβάνουν χώρα.

5.1 Βιοαποιδόμηση

Ενώ μερικά αντιβιοτικά φαίνεται να αποσυντίθενται εύκολα στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων, υπάρχουν άλλα τα οποία είτε αποσυντίθενται μερικώς είτε καθόλου, και ως εκ τούτου εμμένουν στο περιβάλλον με τη δυνατότητα να επηρεάσουν το οικοσύστημα [43], [46], [47]. Η μικροβιακή αποσύνθεση στα επιφανειακά νερά είναι πιο αργή από ότι στα συστήματα λυμάτων επειδή η πυκνότητα και η ποικιλία των βακτηρίων είναι μικρότερη. Τα περισσότερα αντιβιοτικά που έχουν ερευνηθεί μέχρι σήμερα αποδείχτηκαν σταθερά σε μια δοκιμή προσομοίωσης επιφανειακών υδάτων [34], [48].

Τα αντιβιοτικά που εμφανίζονται στο χώμα και στα ιζήματα απεδείχθησαν αρκετά ανθεκτικά τόσο σε εργαστηριακές δοκιμές όσο και σε μελέτες πεδίου. [49], [50]. Η επίδραση της σύστασης του χώματος στα αντιβιοτικά ερευνήθηκε από τους Weerasingle και Tawner [51]. Οι δύο ερευνητές μελέτησαν την αερόβια βιοαποσύνθεση της βιργκινιαμυκίνης σε έξι διαφορετικά χώματα, κάτω από εργαστηριακές συνθήκες. Η ουσία βρέθηκε να αποσυντίθενται σε

κάθε είδος χώματος αλλά οι χρόνοι ημιζωής ποίκιλαν μεταξύ 87 και 173 ημέρες.

Οι Alexy et. Al., [52] μελέτησαν την βιοαποιδόμηση 18 σημαντικών αντιβιοτικών και τις επιδράσεις τους σε περιβαλλοντικά βακτήρια χρησιμοποιώντας closed bottle tests. Επιπροσθέτως έκαναν έλεγχο τοξικότητας και παρακολούθησαν την ανάπτυξη της αποικίας των βακτηρίων. Η εξαφάνιση μερικών από τα 18 αντιβιοτικά καταγραφόταν με HPLC. Η ανάλυση με HPLC έδειξε ότι μερικές ουσίες εξαφανίσθηκαν μερικώς ή εντελώς από ένα μη- βιοτικό μηχανισμό. Κανένα από τα 18 αντιβιοτικά δεν βιοαποδομήθηκε εύκολα. Για μερικά αντιβιοτικά έλαβε χώρα βιολογική απομάκρυνση με την βοήθεια του εύκολα βιοαποιδομήσιμου οξικού νατρίου που περιείχαν κάποια δοχεία. Ο έλεγχος τοξικότητας έδειξε όμως ότι η τοξικότητα δεν εξαλείφθηκε.

Οι Gavalchin και Katz [53] εξέτασαν τη σταθερότητα διάφορων γεωργικών αντιβιοτικών στο χώμα. Η παρατηρηθείσα σειρά ανθεκτικότητας των υπό έρευνα αντιβιοτικών ήταν: χλωρατετρακυκλίνη>μπασιτρακίνη>ερυθρομυκίνη> μπαρμπεμυκίνη>τυλοσίνη >πενικιλλίνη και στρεπτομυκίνη. Η απώλεια των αντιβιοτικών αποδόθηκε στη βιοαποιδόμηση αν και είναι πιθανές άλλες αντιδράσεις επίσης .

Σε συστήματα που περιείχαν κοπριά, παρατηρήθηκε η γρήγορη απώλεια της τυλοσίνης από την υδάτινη φάση τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες (Loke et αl.,[54]). Η απώλεια της τυλοσίνης προκλήθηκε από έναν συνδυασμό προσρόφησης, αβιοτικού μετασχηματισμού και βιοαποιδόμησης, εντούτοις δεν εξετάστηκαν περαιτέρω λεπτομέρειες.

Οι Al- Almad et al., [55] αναφέρουν χαμηλή βιοαποιδόμηση για τις β-λακτάμες, τις κινολόνες και τις σουλφοναμίδες.

Οι Ingerslev και Halling –Sorensen [56] εξέτασαν τη βιοαποιδόμηση διάφορων σουλφοναμιδών στην ενεργό ιλύ. Σημαντική βιοδιάσπαση παρουσιάσθηκε μόνο μετά από μια ιδιαίτερα μεγάλη χρονική καθυστέρηση και μετά την χρησιμοποίηση υψηλών συγκεντρώσεων σουλφοναμίδης ώστε να υποκινηθεί η διαδικασία. Προτάθηκε λοιπόν ότι η βιοδιάσπαση της σουλφοναμίδης στα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα.

Με βάση τις προηγούμενες μελέτες, οι αμινογλυκοσίδες, οι β-λακτάμες και μερικά μακρολίδια είναι πιθανό να βιοδιασπαστούν σε μεγαλύτερη έκταση από ότι οι κινολόνες , οι σουλφοναμίδες και οι τετρακυκλίνες.

5.2 Φωτοαποιδόμηση, Υδρόλυσης,Θερμόλυσης, οξειδοαναγωγή

Αν μια ουσία είναι ευαίσθητη στο φως, τότε η φωτοαποιδόμηση μπορεί να αποδειχτεί μια βασική διαδικασία εξάλειψης της, όπως αναφέρεται από τους Lunestad et al., [57]. Η φωτοαποιδόμηση λαμβάνει χώρα κυρίως στα επιφανειακά νερά, επειδή το χώμα και τα ιζήματα εμποδίζουν την εξέλιξη της διαδικασίας, εξαιτίας της έλλειψης φωτός σε αυτές τις μήτρες. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της φωτοαποιδόμησης, όπως και εκείνα της βιοαποιδόμησης, εξαρτούνται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η σύνθεση της μήτρας κ.α.

Σύμφωνα με την έρευνα του Sören [58] που αφορά την φωτοαποιδόμηση και την γήρανση των αντιβιοτικών στην επιφάνεια του εδάφους, η σημαντικότερη διαδρομή των αντιβιοτικών για να εισαχθούν στα γεωργικά χώματα είναι μέσω της χρήσης μολυσμένης κοπριάς ή μολυσμένης λάσπης αποβλήτων. Κατά συνέπεια, τα φαρμακευτικά είδη διαδίδονται αρχικά στις εδαφολογικές επιφάνειες, όπου εκτίθενται στο φως του ήλιου. Πολλές αντιβιοτικές ενώσεις, όπως οι τετρακυκλίνες και οι σουλφοναμίδες, ως γνωστόν αποτελούν στόχο της φωτοαποιδόμησης στα υγρά συνεπώς η φωτοαποιδόμηση μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των συγκεντρώσεων των αντιβιοτικών στις εδαφολογικές επιφάνειες, προτού καν αυτά εισχωρήσουν στα χώματα.

Για να αποδείξει ότι η επίδραση της φωτοαποιδόμησης περιορίζεται μόνο σε μερικά χιλιοστόμετρα εδαφολογικού βάθους, ο παραπάνω ερευνητής επέλεξε δύο είδη χωμάτων (αμμώδες και αργιλώδες) στα οποία άπλωσε (σε βάθος μέχρι 0,5 χιλ.) τα αντιβιοτικά οξυτετρακυκλίνη, χλωροτετρακυκλίνη, σουλφανιλαμίδη, σουλφαδιμεθοξίνη, σουλφαδιαζίνη, σουλφαπυριδίνη και φενμπενταζόλη. Για να αποτραπεί η βιοαποιδόμησης, τα χώματα και η κοπριά απο-στειρώθηκαν πριν από τα πειράματα. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 25 ^{o}C και είτε ακτινοβολήθηκαν από ένα λαμπτήρα ξένου είτε αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι για 28 ημέρες.

Μετά από την εκχύλιση, οι υπολειμματικές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών προσδιορίστηκαν με HPLC. Συγκρίνοντας με τα αποτελέσματα φωτο-αποιδόμησης προτύπων διαλυμάτων διαπιστώθηκε ότι η φωτοαποιδόμηση

της φενμπενταζόλης και των σουλφοναμίδων ήταν αμελητέα ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε σαφής πτώση της συγκέντρωσης των τετρακυκλινών.
Η υποβάθμιση των αντιβιοτικών ακολουθούθησε κινητική πρώτου βαθμού και εξαρτήθηκε από τις εδαφολογικές ιδιότητες.
Εκτός από την φωτοαποιδόμηση, οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών μειώθηκαν έντονα μέσω της αβιοτικής σταθεροποίησης και της γήρανσης, όπως παρατηρήθηκε από τα δείγματα που επωάστηκαν στο σκοτάδι. Αναφέρουμε σε αυτό το σημείο ότι ο ίδιος ερευνητής σε μια άλλη εργασία του, [43] απέδειξε ότι: οι τετρακυκλίνες και οι αμινογλυκοσίδες είναι επιρρεπείς στην φωτοαποιδόμηση, οι φθοριοκινολόνες δεν παρουσιάζουν ευαισθησία στην υδρόλυση και στις μεγάλες θερμοκρασίες, αλλά αποσυντίθενται από την UV ακτινοβολία. Ο β-λακταμικός δακτύλιος μπορεί να ανοιχτεί είτε από την β-λακταμάση, ένα βακτηριακό ένζυμο, είτε με χημική υδρόλυση. Αυτό σημαίνει ότι πολλές από τις συχνά χρησιμοποιούμενες πενικιλλίνες δεν ανιχνεύονται σχεδόν καθόλου στο περιβάλλον.

Παρά όλα τα προαναφερθέντα δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι υπό συνθήκες πεδίου, η φωτοαποιδόμησης θα μπορούσε να είναι η διαδικασία για την απομάκρυνση των αντιβιοτικών από το περιβάλλον.

Ένα άλλο είδος αβιοτικής εξάλειψης μιας ουσίας είναι η υδρόλυσης [59]. Η υδρόλυση είναι ένας σημαντικός τρόπος υποβάθμισης των οργανικών ρυπαντών στο υδρόβιο περιβάλλον. Από τις κοινές ομάδες αντιβιοτικών οι β - λακτάμες, τα μακρολίδια και οι σουλφοναμίδες είναι οι πλέον ευαίσθητες στην υδρόλυση. Εντούτοις, η υδρόλυση των μακρολιδίων και των σουλφοναμίδων σε ουδέτερο pH είναι πολύ αργή και μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα σύμφωνα με τους Volmer και Hui, [60].Οι β-λακτάμες γενικά υφίστανται υδρόλυση αρκετά γρήγορα σε ήπιες όξινες και βασικές συνθήκες σύμφωνα με τους Hou και Poole, [61].

Τέλος αυτή την περίοδο λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τον αβιοτικό αναγωγικό ή οξειδωτικό μετασχηματισμό των αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον.

5.3 Προσρόφηση και συμπλοκοποίηση

Η εξαφάνιση μιας ουσίας κατά την διάρκεια μιας ερευνητικής περιόδου δεν σημαίνει βιολογική ή φωτοχημική αποσύνθεση. Μερικά αντιβιοτικά, π.χ οι τετρακυκλίνες, είναι γνωστό ότι έχουν την τάση να ενώνονται με τα σωματίδια του εδάφους ή να σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ιόντα που είναι παρόντα στο χώμα, [43], [50], [62]. Η προσρόφηση των αντιβιοτικών επηρεάζεται ιδιαίτερα από το pH του χώματος, την οργανική ύλη του χώματος, τα ορυκτά του χώματος και τους συντελεστές κατανομής (Kd), [43].

Η ένωση των αντιβιοτικών με τα σωματίδια ή ο σχηματισμός των συμπλοκών μπορεί να προκαλέσει απώλεια κατά την ανίχνευση καθώς επίσης και μείωση της αντιβακτηριακής δραστηριότητας [63]. Οι τετρακυκλίνες μπορούν και σχηματίζουν σύμπλοκα με δισθενή κατιόντα π.χ ασβεστίου ή μαγνησίου [36]. Αυτό σημαίνει ότι όταν χρησιμοποιούνται αυτά τα αντιβιοτικά για την θεραπεία ψαριών σε θαλάσσιο νερό πρέπει να προστίθενται πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από ότι θα αναμενόταν επειδή μέρος των αντιβιοτικών θα καταστεί ανενεργό λόγω της πλούσιας συγκέντρωσης του θαλάσσιου νερού σε ασβέστιο και μαγνήσιο.

Οι Huang et.al., [64] σε μια ανασκόπηση των ερευνών που αφορούν την προσρόφηση των αντιβιοτικών αναφέρουν: Οι αμινογλυκοσίδες όπως είναι γνωστό αποτελούνται χαρακτηριστικά από δύο ή περισσότερα ζάχαρα ή αμινοζάχαρα συνδεδεμένα με ένα δακτύλιο αμινοκυκλιτόλης, με συνέπεια την υψηλή πολικότητα των ενώσεων. Οι αμινομάδες των αμινογλυκοσιδών μπορούν να φορτιστούν θετικά από την πρωτονίωση υπό όξινες συνθήκες. Το θετικό φορτίο μπορεί να διευκολύνει την προσρόφηση στα μεταλλεύματα αργίλου που κατέχουν χαρακτηριστικά αρνητικό φορτίο.

Τα αντιβιοτικά β-λακτάμης είναι ιδιαίτερα πολικές ενώσεις. Η προσρόφηση των β -λακταμών στο χώμα αναμένεται χαμηλή και αυτό οφείλεται στην υψηλή πολικότητα και τις όξινες καρβοξυλικές λειτουργικές ομάδες τους. Γενικά οι πληροφορίες για την προσρόφηση β-λακταμών και αμινογλυκοσιδών είναι λιγοστές. Παρατηρείται ισχυρή προσρόφηση των τετρακυκλινών και ιδιαίτερα της τετρακυκλίνης, της χλωροτετρακυκλίνης και της οξυτετρακυκλίνης, στα υλικά αργίλου, στο χώμα και στα ιζήματα μέσα σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Ορισμένες μακρολίδες (π.χ η τυλοσίνη) και κινολόνες δείχνουν σημαντική προσρόφηση σε αργιλώδη υλικά αλλά όχι τόσο

ισχυρή όσο αυτή των τετρακυκλινών και τέλος οι σουλφοναμίδες δείχνουν αδύναμη προσρόφηση στο χώμα.

Οι Stauffenberg και Weinberg [65] στην μελέτη τους αναφορικά με το γίγνεσθαι των αντιβιοτικών στα επιφανειακά ύδατα και τα ιζήματα, επισημαίνουν ότι η εξισορρόπηση μαζών σε επίπεδα αντιβιοτικών που εκρέουν από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων είναι ελλιπής ακόμα και όταν λαμβάνεται υπόψη και η αραίωση. Από εργαστηριακές μελέτες προσδιορισμού των αντιβιοτικών σε δείγματα επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων φαίνεται ότι αυτές οι ουσίες κατανέμονται μέσω προσρόφησης περισσότερο στα βιοστερεά παρά στην προκύπτουσα εκροή. Τα αντιβιοτικά είχαν προηγουμένως εξαχθεί από κοπριά και χώματα παρά τους χαμηλούς συντελεστές Kow. Αυτό σημαίνει, ότι για μια πληρέστερη άποψη για το γίγνεσθαι και την μεταφορά των αντιβιοτικών στο υδρόβιο περιβάλλον δεν χρειάζονται μόνο τα επίπεδα αυτών των ουσιών στην υγρή φάση αλλά και οι ποσότητες που προσροφήθηκαν στα αιωρούμενα συστατικά και στα ιζήματα.

5.4 Γενικά συμπεράσματα σχετικά με το γίγνεσθαι των αντιβιοτικών στο περιβάλλον

1. Όταν βρεθούν στο περιβάλλον τα αντιβιοτικά υπόκεινται σε μηχανισμούς προσρόφησης, αβιοτικού και βιοτικού μετασχηματισμού και αντιδράσεις οξειδοαναγωγής.
2. Όσον αφορά τη σταθερότητα στο περιβάλλον των πλέον συχνά χρησιμοποιούμενων ομάδων αντιβιοτικών έχουμε τα εξής: τα αντιβιοτικά σουλφοναμίδες εμφανίζονται να είναι ελάχιστα επιρρεπή σε οποιοδήποτε μετασχηματισμό, η αποιδόμηση των κινολονών και των τετρακικλινών είναι αργή όταν η έκθεση στο φως του ήλιου είναι περιορισμένη. Μερικά μακρολίδια μπορούν να αποιδομηθούν ως ένα βαθμό και τέλος οι αμινογλυκοσίδες και οι β-λακτάμες αποσυντίθενται άμεσα στο περιβάλλον.
3. Αναφορικά με την προσρόφηση στο χώμα και τα ιζήματα, οι τετρακυκλίνες προσροφούνται εντονότερα ακολουθούμενες από τις κινολόνες και τα μακρολίδια. Οι σουλφοναμίδες δείχνουν αδύναμη έως μέτρια προσρόφηση στα χώματα.
4. Εκείνο που συμβαίνει στα αντιβιοτικά που βρίσκονται στα επάνω στρώματα των επιφανειακών υδάτων είναι η άμεση φωτόλυση με UV ενώ για τα βαθύτερα στρώματα έχουμε έμμεση φωτόλυση με τη βοήθεια των χουμικών ενώσεων
5. Η εξισορρόπηση μαζών σε επίπεδα αντιβιοτικών που εκρέουν από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων είναι ελλιπής ακόμα και όταν λαμβάνεται υπόψη και η αραίωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Εάν μια ουσία δεν εξαλειφθεί με κάποιο τρόπο κατά την διάρκεια της επεξεργασίας των αποβλήτων μπορεί να φθάσει στο περιβάλλον με την δυνατότητα να επιδράσει βλαβερά στους υδρόβιους ή μη υδρόβιους οργανισμούς. Τα αντιβιοτικά, όπως έχουμε αναφέρει παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον επειδή προς το παρόν δεν γνωρίζουμε εάν η παρουσία τους στα φυσικά ύδατα συντελεί στην εξάπλωση της αντιβιοτικής αντίστασης των μικροοργανισμών.

Τα βακτήρια, οι μύκητες και τα μικροάλγη είναι οι οργανισμοί οι οποίοι επηρεάζονται κατά κύριο λόγο επειδή τα αντιβιοτικά είναι σχεδιασμένα να επιδρούν στους μικροοργανισμούς. Γενικά οι επιδράσεις των αντιμικροβιακών παραγόντων στα βακτήρια και στα μικροάλγη είναι από 2 έως 3 τάξεις μεγέθους κάτω από τις τοξικές τιμές για τα υψηλά τροφικά επίπεδα [66].

Επειδή οι πειραματικές συνθήκες επηρεάζουν τα αποτελέσματα των τοξικών ερευνών, μερικές φορές αρκετές τάξεις μεγέθους [67], για να εκτιμηθούν οι επιδράσεις στο περιβάλλον πρέπει να δοθούν οι ακριβείς συνθήκες θερμοκρασίας, pH, διάρκεια πειραματισμού κ.α. Ως εκ τούτου οι επιδράσεις που αναφέρονται παρακάτω και αφορούν διάφορα περιβαλλοντικά διαμερίσματα θα δώσουν απλά μια ένδειξη του τι μπορεί να συμβεί όταν μία αντιμικροβιακή ουσία βρεθεί στο περιβάλλον.

6.1 Υγρά απόβλητα και συστήματα αποβλήτων

Τα αντιβιοτικά έχουν την δυνατότητα να επηρεάζουν τις μικροβιακές κοινότητες των συστημάτων αποβλήτων. Η παρεμπόδιση των βακτηρίων των υγρών αποβλήτων μπορεί να επηρεάσει σοβαρά την αποσύνθεση της οργανικής ύλης. Ως εκ τούτου οι επιδράσεις των αντιμικροβιακών παραγόντων στους μικροβιακούς πληθυσμούς παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Η νιτροποίηση είναι ένα σημαντικό βήμα για τον καθαρισμό των υγρών αποβλήτων καθότι εξαλείφει την τοξική αμμωνία. Πολλά αντιβιοτικά αποδείχθηκαν να έχουν χαμηλή τοξικότητα έναντι των βακτηρίων νιτροποίησης κατά την διάρκεια δοκιμών οξείας τοξικότητας.Αυτές οι ουσίες δεν έδειξαν επιδράσεις στην νιτροποίηση ούτε ακόμα σε συγκεντρώσεις υψηλότερες εκείνων που θα μπορούσαν να εμφανιστούν στο περιβάλλον

[68]. Οι δοκιμές οξείας τοξικότητας φαίνεται να μην είναι κατάλληλες για την αξιολόγηση των επιδράσεων των αντιβιοτικών στο περιβάλλον. Τα αντιβιοτικά δρουν κατά ένα ιδιαίτερο τρόπο. Οι επιδράσεις τους συχνά γίνονται εμφανείς εκτείνοντας την περίοδο επώασης των βακτηρίων [34].

Δεν έχει αποδειχθεί ακόμα αν η μόνιμη παρουσία αντιβιοτικών στα συστήματα λυμάτων προωθεί την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας και επιλογής των βακτηριακών πληθυσμών και ως εκ τούτου χρειάζεται περαιτέρω μελέτη και έρευνα.

6.2. Επιφανειακά νερά

Οι ουσίες που δεν αποσυντίθενται εντελώς ή αποσυντίθενται μερικώς στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αποβλήτων, σταδιακά θα φθάσουν στα επιφανειακά ύδατα όπου ίσως επηρεάσουν οργανισμούς διαφορετικών τροφικών επιπέδων.

Οι Thomulka και McGee [69] προσδιόρισαν την τοξικότητα διαφόρων αντιβιοτικών (τετρακυκλίνη, χλωραμφαινικόλη, στρεπτομυκίνη, αμπικιλλίνη) στο θαλάσσιο οργανισμό *Vibrio Harveyi* : δεν βρέθηκαν σχεδόν καθόλου τοξικές επιδράσεις μετά από σύντομους χρόνους επώασης αλλά σε μακροχρόνια βάση και χρησιμοποιώντας την αναπαραγωγή ως τελικό σημείο ανιχνεύτηκαν τοξικά αποτελέσματα από σχεδόν όλες τις ουσίες, οι συγκεντρώσεις των οποίων θα μπορούσαν να είναι αυτές που συναντώνται στο περιβάλλον. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τις παρατηρήσεις των Froehner et al., [70].

Η ευαισθησία που αφορά τα άλγη ποικίλει ευρέως έναντι των αντιβιοτικών. Σε ένα τεστ τοξικότητας το *Selenastrum capricornutum* απεδείχθη από δυο έως τρεις τάξεις μεγέθους λιγότερο ευαίσθητο από το *Microcystis aeruginosa*. Η ανάπτυξη του *Microcystis aeruginosa* παρεμποδίσθη σε συγκεντρώσεις λιγότερο από 0.1mg/L, [59]. Τα κυανή άλγη φαίνεται να είναι ευαίσθητα σε πολλά αντιβιοτικά π.χ αμοξικιλλίνη, βενζυλοπενικιλλίνη, σαραφλοξακίνη, σπιραμυκίνη και τετρακυκλίνη, [71]. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν μπορούν να αποκλειστούν οι αρνητικές επιπτώσεις των αντιβιοτικών στα άλγη και καθώς τα τελευταία αποτελούν την βάση της τροφικής αλυσίδας, ακόμα και ελαφριά μείωση του πληθυσμού των αλγών μπορεί να επηρεάσει την ισορροπία ενός υδατικού συστήματος.

Οργανισμοί υψηλότερων τροφικών επιπέδων όπως τα οστρακοειδή επηρεάζονται λιγότερο σοβαρά από τα αντιβιοτικά, και αυτό μάλιστα

συμβαίνει σε συγκεντρώσεις υψηλότερες εκείνων που παρουσιάζονται στο περιβάλλον. Οι συγκεντρώσεις που μπορούν να επηρεάσουν είναι μεταξύ 10 και 100 mg/L ή ακόμα και περισσότερο όπως αναφέρεται από τους Lutzhoft et al., [72].

Η έκθεση των αντιβιοτικών στο περιβάλλον μπορεί να έχει αρνητικές επιδράσεις στην αναπαραγωγή, κατά τα αρχικά στάδια της ζωής διαφόρων οργανισμών. Αυτό με τη σειρά του μπορεί να επηρεάσει δραματικά τους διαφόρους πληθυσμούς. Ο υψηλός ρυθμός θνησιμότητας των *nauplii* καθώς και οι τοξικές επιδράσεις στην αναπαραγωγή της *Daphnia magna* δείχνουν τις σοβαρές επιπτώσεις που μπορούν να έχουν τα αντιβιοτικά για αυτούς τους οργανισμούς [73], [74]. Για τιμές LC_{50} < 1 mg/L το αντιβιοτικό φουραζολιδόνη έδειξε σημαντική τοξικότητα στους οργανισμούς *Culex pipiens molestus larvae, Daphnia magna* και *Artemia Salina* (Macri et al., [75]). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα οι συγγραφείς τονίζουν την πιθανότητα σημαντικής ζημιάς στην φυσική ισορροπία, επειδή οι υπο έρευνα οργανισμοί αποτελούν την τροφή άλλων υδρόβιων ζώων και ως εκ τούτου η εξαφάνιση τους επιρεάζει άλλους οργανισμούς.

Εκτός των επιπτώσεων στους πληθυσμούς, τα αντιβιοτικά μπορούν επίσης να επηρεάσουν την συμπεριφορά των υδρόβιων οργανισμών. Για παράδειγμα έχει αποδειχτεί ότι τα αντιβιοτικά επηρεάζουν την phototaxis της *Daphnia magna* [73], [76].

Τα αντιβιοτικά δεν φαίνεται πιθανόν να επηρεάζουν τα ψάρια. Σε όλες τις έρευνες οι επιδράσεις στα ψάρια αφορούσαν συγκεντρώσεις που δεν συναντώνται στο περιβάλλον ή δεν παρατηρήθηκαν καθόλου τοξικές επιδράσεις. Τοξικές δοκιμές σε διάφορα είδη ψαριών π.χ *Acartia tonsa, Brachydania rerio, Lebistes reticulates, Salmo gairdnei, Salvelinus namayeush,* δεν έδειξαν καθόλου τοξικότητα για αυτά τα είδη [77], [78].

6.3 Χώματα και ιζήματα

Πολλές δημοσιεύσεις αφορούν τον αντίκτυπο των αντιβιοτικών στους οργανισμούς που ζουν στο χώμα. Τα αντιμικροβιακά φάρμακα ίσως να έχουν ποιοτικές και ποσοτικές επιδράσεις στις μικροβιακές κοινότητες των ιζημάτων και αυτό μπορεί να επηρεάσει την αποιδόμηση της οργανικής ύλης [79].

Οι Colinas et al., [80] παρατήρησαν ότι όταν προστεθούν αντιβιοτικά στα χώματα δασών, σε συγκεντρώσεις 10mg/Kg, τότε υπάρχουν ανασταλτικές επιδράσεις στην αύξηση πολλών βακτηρίων καθώς επίσης και σε διάφορα είδη μούχλας.

Η κατάσταση στα ιζήματα κάτω από φάρμες ψαριών είναι κρίσιμη εξαιτίας των υψηλών τοπικών συγκεντρώσεων σε αντιβιοτικά. Έχει παρατηρηθεί ότι μερικά αντιβιοτικά μειώνουν των αριθμό των βακτηρίων στα παραπάνω ιζήματα. Οι Hansen et al., [81] κατέγραψαν μια προσωρινή επίδραση στην μείωση των θειικών ιόντων μετά την προσθήκη αντιβιοτικών σε ιζήματα, και αυτό πιθανόν να οφειλόταν στην αύξηση των βακτηρίων που μειώνουν τα θεϊικά ιόντα.

Τα αντιβιοτικά που είναι παρόντα στο χώμα και στα ιζήματα μπορούν να χάσουν την αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα ως αποτέλεσμα της σύνδεσης τους με τα σωματίδια των ιζημάτων ή του σχηματισμού συμπλόκων με ιόντα. Αυτό έχει ήδη αποδειχτεί για μερικές ουσίες. Όμως έχουν βρεθεί αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά την απώλεια της αντιμικροβιακής δραστηριότητας μετά την ένωση ή τον σχηματισμό συμπλόκων για την ίδια και την αυτή ουσία [63], [81], [82]. Η αιτία για αυτό θα μπορούσε να είναι η διαφορά στην σύνθεση των ιζημάτων, η οποία φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο για τις επιδράσεις των ουσιών στους διαμένοντες πληθυσμούς, επειδή η σύνθεση του ιζήματος ή του χώματος καθορίζει τον βαθμό και την ένταση της προσρόφησης.

Οι οργανισμοί που ζουν στο χώμα και δεν αποτελούν τον στόχο των αντιβιοτικών, δεν βρέθηκε να επηρεάζονται από αυτά . Αυτό όμως που πρέπει να θεωρηθεί κρίσιμο είναι η δυνατότητα ενός μολυντή να συσσωρεύεται σε ένα οργανισμό. Τα αντιβιοτικά που δεν διαλύονται εύκολα στο νερό, ιδιαίτερα εάν ο παράγοντας βιοσυγκέντρωσης είναι μεταξύ 500 και 1000 ή εάν ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού ξεπερνά την τιμή 1000, έχουν την τάση να συσσωρεύονται στους οργανισμούς. Αυτό έχει αποδειχθεί για μερικά αντιβιοτικά όπως για παράδειγμα την σουλφαδιμεθοξίνη [83].

6.4 Συμπεράσματα

Πολύ λίγα είναι γνωστά γύρω από την εμφάνιση και το γίγνεσθαι των αντιβιοτικών στο περιβάλλον και τους κινδύνους στους οποίους θέτουν τα υδρόβια και χερσαία οικοσυστήματα. Με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα δεν μπορεί να γίνει εκτίμηση των περιβαλλοντικών κινδύνων. Υπάρχει ακόμα σημαντικότατη έλλειψη δεδομένων γύρω από την εμφάνιση και το γίγνεσθαι των αντιβιοτικών στο περιβάλλον και η διάθεση τέτοιων δεδομένων είναι προαπαιτούμενο για την ανάληψη προγραμμάτων εκτίμησης και διαχείρησης των κινδύνων τόσο για τους ανθρώπους όσο και για το περιβάλλον.

Επειδή οι γνώσεις μας είναι περιορισμένες, όσον αφορά την τοξικότητα των αντιβιοτικών στο οικοσύστημα καθώς και την απόκτηση ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά εκ μέρους των βακτηρίων, η Ευρωπαϊκή Ένωση, [84] προτείνει την συνετή χρήση των αντιβιοτικών στην ιατρική.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.7

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΚΙΝΔΥΝΩΝ

7.1 Ορισμοί ειδικών όρων:

Πριν αναφερθούμε στην εκτίμηση και διαχείριση των περιβαλλοντικών κινδύνων που απορρέουν από την παρουσία των φαρμακευτικών ουσιών στο περιβάλλον, θεωρούμε χρήσιμο να δώσουμε την έννοια ορισμένων όρων που χρησιμοποιούνται σε αυτόν τον ιδιαίτερο επιστημονικό τομέα.

Εκτίμηση Περιβαλλοντικών Κινδύνων (Environmental risk assessment, ERA)

Η εκτίμηση Περιβαλλοντικών Κινδύνων αφορά την πιθανότητα δυσμενών οικολογικών επιδράσεων που μπορούν να προκύψουν από την έκθεση του περιβάλλοντος σε μια ουσία. Η εκτίμηση της έκθεσης εξετάζει το γίγνεσθαι της ουσίας που ελευθερώνεται στο περιβάλλον και προβλέπει την συγκέντρωση της στο περιβάλλον. (Predicted environmental concentration, PEC).

Εκτίμηση της επίδρασης (effect assessment):

Η εκτίμηση της επίδρασης εξετάζει τα δεδομένα που σχετίζονται με την επίδραση μιας ουσίας πάνω σε επιλεγμένους οργανισμούς και χρησιμοποιώντας αυτά τα δεδομένα μπορεί να προβλεφθεί η συγκέντρωση της ουσίας από την οποία δεν αναμένονται δυσμενείς επιδράσεις σε ένα περιβαλλοντικό διαμέρισμα (Predicted no- effect concentration, PNEC).

Οι τιμές PEC και PNEC συνδυάζονται ώστε να μπορεί να αποφασισθεί κατά πόσον μια ουσία αποτελεί απειλή για το περιβάλλον. Συγκεκριμένα το πηλίκον PEC/PNEC είναι αυτό που καθορίζει και την απειλή. Έτσι για PEC/PNEC<1 η ουσία δεν αποτελεί κίνδυνο για το περιβάλλον ενώ για PEC/PNEC>1 υπάρχει κίνδυνος για το περιβάλλον αν δεν ληφθούν κάποια μέτρα.

Διαχείριση περιβαλλοντικών κινδύνων (Risk Environmental Management, ERM)

Η διαχείριση περιβαλλοντικών κινδύνων είναι η διαδικασία αναγνώρισης και εκτίμησης των κινδύνων καθώς και η επιλογή και εφαρμογή δράσεων για τη μείωσή τους.

7.2 Κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Το 1965 η Ευρωπαϊκή Ένωση άρχιξε να ρυθμίζει την αποκλειστική εκμετάλλευση των ιατρικών προϊόντων μέσω της οδηγίας 65/65/EEC, [85]. Στην συνέχεια ακολούθησε η οδηγία 93/39/ EEC, [86] η οποία τροποποίησε την οδηγία 65/65/EEC, συγκεκριμένα το άρθρο 4.6, ώστε να ληφθούν υπ΄οψιν πιθανοί κίνδυνοι για το περιβάλλον από τα ιατρικά προϊόντα. Το ίδιο έτος με τον κανονισμό 2309/93/ EEC, [87] ρυθμίστηκαν οι διαδικασίες για την καταγραφή των ιατρικών προϊόντων, την εκτίμηση περιβαλλοντικών κινδύνων και ιδρύθηκε η Ευρωπαϊκή Υπηρεσία Αξιολόγησης Φαρμάκων (European Medicines Evaluation Agency, EMEA).

Από τις αρχές έως τα μέσα της δεκαετίας του 90΄κυκλοφόρησαν διάφορα προσχέδια για την καθιέρωση μιας οδηγίας ERA που να αφορούσε μη γενετικά τροποποιημένα ιατρικά προϊόντα για ιατρική και κτηνιατρική χρήση. Ενώ τα πρώτα προσχέδια κάλυπταν αμφότερα τα ιατρικά και τα κτηνιατρικά προϊόντα στην πορεία υπηρξε διαχωρισμός.Το 1997 εκδώθηκε μια οδηγία ERA για μη τροποποιημένα κτηνιατρικά προϊόντα [88]. Στην συνέχεια το 2000 η οδηγία εναρμονίστηκε με αυτές των ΗΠΑ και της Ιαπωνίας [89].

Εν τω μεταξύ το 1998 δημοσιεύθηκε στις ΗΠΑ μια αντίστοιχη οδηγία για ιατρικά φάρμακα [90]. Ακολούθησε τον Ιανουάριο 2001 η EMEA με ένα προσχέδιο [91] που κυκλοφόρησε για σχολιασμό και βελτίωση αναφορικά με την εκτίμηση περιβαλλοντικών κινδύνων από μη τροποποιημένα ιατρικά προϊόντα. Αυτό είναι το πλέον πρόσφατο προσχέδιο που έχει δημοσιεύσει η Ευρωπαϊκή Ένωση και σε αυτό θα αναφερθούμε ευθύς αμέσως.

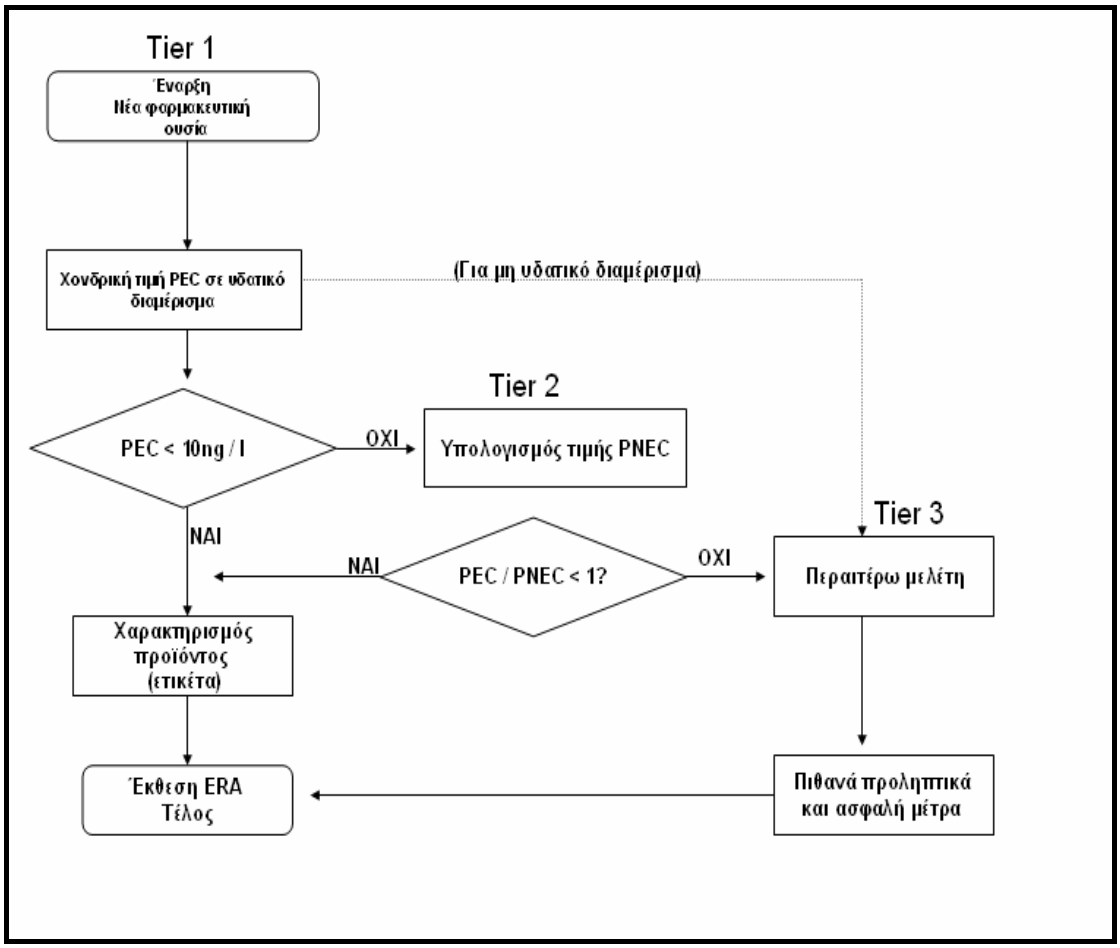
7.3 Γενικές αρχές για την εκτίμηση των περιβαλλοντικών κινδύνων από ιατρικά φάρμακα βάση της EMEA 2001

Η εκτίμηση των πιθανών κινδύνων για το περιβάλλον από μια φαρμακευτική ουσία, ιατρική ή κτηνιατρική, είναι μια βήμα προς βήμα διαδικασία που μπορεί να τερματιστεί όταν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες που να δείχνουν ότι ένα φαρμακευτικό προϊόν είναι μάλλον απίθανο να αποτελεί κίνδυνο για το περιβάλλον ή όταν έχουν αναγνωρισθεί και χαρακτηριστεί οι πιθανοί κίνδυνοι.

Η εκτίμηση των περιβαλλοντικών κινδύνων συντελείται σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση **(phase I)** εκτιμάται η έκθεση (exposure) του περιβάλλοντος στη φαρμακευτική ουσία. Στην δεύτερη φάση **(phase II)** εξασφαλίζονται οι πληροφορίες γύρω από τις φυσικοχημικές, φαρμακολογικές και τοξικολογικές ιδιότητες μιας ουσίας και εκτιμούνται σε σχέση με την χρονική περίοδο της έκθεσης του περιβάλλοντος. Κατά την διάρκεια εκτέλεσης των απαιτούμενων τεστ, ο ερευνητής θα πρέπει να εξετάσει εάν απαιτείται επιπλέον έρευνα για το γίγνεσθαι και τις επιδράσεις της ουσίας σε συγκεκριμένα οικοσυστήματα.

Η phase II διαιρείται σε δυο μέρη, την βαθμίδα A **(Tier A)** και την βαθμίδα B **(Tier B)**. Η Tier A αρχίζει με μια αξιολόγηση του γίγνεσθαι και των πιθανών επιδράσεων της ουσίας και των βασικών μεταβολιτών της. Εάν δεν ανιχνευτούν κίνδυνοι στην Tier A δεν υπάρχει λόγος για τον ερευνητή να προχωρήσει στην Tier B. Αν ανιχνευτεί κάποιος κίνδυνος τότε θα πρέπει να ανιχνευτούν επαρκώς στην Tier B το γίγνεσθαι και οι επιδράσεις του φαρμακευτικού προϊόντος στο σχετικό περιβαλλοντικό διαμέρισμα.

Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ο τρόπος αξιολόγησης των περιβαλλοντικών κινδύνων βάση της 2001 EU ERA.



Σχ.7.1 Διάγραμμα ροής για tiered εκτίμηση σύμφωνα με την 2001 EU ERA (προσαρμοσμένο διάγραμμα) [92]

Οι τιμές PEC μπορούν να υπολογιστούν χονδρικά για τα επιφανειακά νερά χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση:

$$\mathbf{PEC\ (g/L) = \frac{A \times (100 - R)}{365 \times P \times V \times D \times 100}} \qquad (1)$$

Όπου **A** είναι η μέγιστη προβλεπόμενη ποσότητα της ουσίας που χρησιμοποιήθηκε σε όλη την Ευρωπαϊκή Ένωση ή στην χώρα με την μέγιστη κατανάλωση τα πρώτα 5 χρόνια από την κυκλοφορία της ουσίας΄; **R (%)** είναι ο ρυθμός απομάκρυνσης λόγω βιοαποιδόμησης ή αποδείξιμες απώλειες μέσω προσρόφησης, υδρόλυσης ή φωτόλυσης; **P (million)** είναι ο αριθμός των κατοίκων στην υπο μελέτη περιοχή ή περιοχές; **V** είναι ο κατά κεφαλήν όγκος των υγρών αποβλήτων την ημέρα (λαμβάνεται ως $0.2m^3$); **D** είναι ο συντελεστής αραίωσης των υγρών αποβλήτων στα επιφανειακά ύδατα (γενικά λαμβάνεται ίσος με 10 στην Ε.Ε); 100 είναι η αντιστάθμιση για τις ποσοστιαίες τιμές της απομάκρυνσης.

Για τον υπολογισμό των PNECs στο νερό η EMEA προτείνει την εξίσωση:

PNEC=EC / AF —— (2)

Όπου **EC** (effect concentration) είναι οι χαμηλότερες τιμές LC_{50} ή EC_{50} που υπολογίζονται κατά την διάρκεια προτύπων τεστ οξείας τοξικότητας σε ψάρια, *Daphnia* και άλγη; **AF** είναι ένας συντελεστής εκτίμησης που χρησιμοποιείται για την προέκταση των περιβαλλοντικών δεδομένων από ένα περιορισμένο αριθμό ειδών και λαμβάνεται συνήθως ίσος με 1000.

Στην περίπτωση που δεν μπορούν να αποκλειστούν περιβαλλοντικοί κίνδυνοι στην Tier 3 θα πρέπει να υιοθετηθούν μέτρα ασφαλείας που να μετριάζουν την έκθεση του περιβάλλοντος σε μια νέα φαρμακευτική ουσία. Αυτά τα μετρα μπορεί να είναι η αποκλειστική κλινική χρήση μιας ουσίας, η παρακολούθησή της στο περιβάλλον μετά την χορήγησή της και η τοποθέτηση ετικέτας στο προϊόν που να αναφέρει τον τρόπο αποθήκευσής του, την διάθεσή του μετά την λήξη και γενικά την χρήση του από τον ασθενή. Σαν γενική αρχή η EMEA 2001 προτείνει να επιστρέφονται στον φαρμακοποιό τα ληγμένα ή αχρησιμοποίητα προϊόντα.

Όσον αφορά την διαχείριση των κινδύνων ο διαχειριστής θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη του τους ηθικούς, πολιτιστικούς, κοινωνικούς, πολιτικούς και νομικούς περιορισμούς όταν κάνει την επιλογή του καθώς επίσης και την υγεία του εργαζομένου, την υγεία της κοινότητας και των οικολογικών κινδύνων που συνεπάγεται η επιλογή του. Κατά την διάρκεια μιας τυπικής διαδικασίας διαχείρισης κινδύνων οι διαχειριστές (συνήθως κρατικοί λειτουργοί) συλλέγουν πληροφορίες γύρω από μια κατάσταση που δημιουργεί κινδύνους για την υγεία των ανθρώπων ή την σταθερότητα ενός οικοσυστήματος. Στην συνέχεια οι διαχειριστές χρησιμοποιούν αυτές τις πληροφορίες για να μελετήσουν:

α) την φύση και το μέγεθος των κινδύνων,

β) την ανάγκη μείωσης ή εξάλειψης των κινδύνων και

γ) την αποτελεσματικότητα και το κόστος των επιλογών για την μείωση των κινδύνων.

Τέλος τα ιατρικά φάρμακα αποσκοπούν στο να βοηθήσουν τους ανθρώπους που έχουν προσβληθεί από μια ασθένεια. Τα μοντέρνα φάρμακα γίνονται όλο και πιο εξεζητημένα ως προς την δράση τους σε ειδικούς υποδοχείς ή ένζυμα παρακωλύοντας ή ενισχύοντας τις αντίστοιχες λειτουργίες τους. Αυτό από την μια μεριά αυξάνει τον χρόνο έρευνας και ανάπτυξης ενός

φαρμάκου ενώ από την άλλη τα ενεργά φαρμακευτικά συστατικά (active pharmaceautical ingredients, API) δεν μπορούν να μετατραπούν χημικά χωρίς να χαθεί η εξειδικευμένη δράση του φαρμάκου ή να είναι αποδεκτές οι παρενέργειές του.

Για τους παραπάνω λόγους δεν μπορεί να βρεθεί εύκολα το υποκατάστατο ενός φαρμάκου και έτσι τα οφέλη για τους ασθενείς προηγούνται των πιθανών περιβαλλοντικών κινδύνων. Αυτό στην ουσία σημαίνει ότι ακόμα και στην περίπτωση που απειλείται το περιβάλλον από τα υπολείμματα ενός νέου API αυτό παραταύτα θα διοχετευθεί στην αγορά. Όμως θα υιοθετηθούν προληπτικά ή καταπραϋντικά μέτρα προστασίας για το περιβάλλον.

7.4 Περιπτωσιολογική μελέτη: Κίνδυνοι που σχετίζονται με την εκροή των αντιβιοτικών στο περιβάλλον. E. Zuccato, S. Castigliani, R. Fandli, R. Bagnnati, G. Reitano, D. Calamari [93]

Η μέθοδος αξιολόγησης των φαρμακευτικών προϊόντων που προτείνεται από την EMEA 2001είναι ένα καινούργιο εργαλείο για την αξιολόγηση των κινδύνων που σχετίζονται με φαρμακευτικά προϊόντα που προορίζονται για ανθρώπους, προβλέποντας τις περιβαλλοντικές τους συγκεντρώσεις. Όμως η μέθοδος EMEA 2001 απευθύνεται στην αξιολόγηση των κινδύνων από «νέα» φαρμακευτικά προϊόντα πριν αυτά διατεθούν στο εμπόριο.

Η μελέτη των Zuccato et al., είχε ως στόχο την αξιολόγηση των κινδύνων από «παλαιά» φαρμακευτικά προϊόντα (δηλαδή εκείνων που ήδη κυκλοφορούσαν στο εμπόριο), συγκρίνοντας τις τιμές PECs που υπολόγισαν (σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της EMEA) στον ποταμό Πάδο της Βόριας Ιταλίας με εκείνες τις τιμές PNECs που εξασφάλισαν από την βιβλιογραφία. Με αυτή την μελέτη τονίζονται τα προτερήματα και οι αδυναμίες του μοντέλου της EMEA και αναγνωρίζεται η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα.

Εκτίμηση των περιβαλλοντικών κινδύνων

7.4.1 Προβλεπόμενες περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις (PECs)

Επειδή η μόλυνση του εδάφους από φαρμακευτικές ουσίες μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα το ενδιαφέρον για την εκτίμηση των περιβαλλοντικών κινδύνων από φαρμακευτικές ουσίες για ανθρώπινη χρήση, επικεντρώνεται στο νερό. Ως ένα πρώτο βήμα αξιολόγησης των κινδύνων από τις «νέες» φαρμακευτικές ουσίες, η EMEA προτείνει τον κατά προσέγγιση υπολογισμό των προβλεπομένων συγκεντρώσεων των ουσιών στο νερό (crude PECs). Στα επιφανειακά νερά αυτό μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας την εξίσωση (1) που αναφέρθηκε στην ενότητα 7.3 ήτοι: PEC(g/L)=[Ax(100-R)]/(365xPxVxDx100)

Οι ερευνητές έθεσαν την τιμή R ίση με μηδέν για να λάβουν υπ όψιν τους το χειρότερο σενάριο και για τον υπολογισμό των PECs έκαναν ακόμα τις εξής παραδοχές

- Η προβλεπόμενη ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε ανά έτος ήταν ομοιόμορφα κατανεμημένη κατά την διάρκεια του έτους
- Η φαρμακευτική ουσία χρησιμοποιήθηκε εξ ίσου σε όλη την περιοχή
- Το αποχετευτικό σύστημα ήταν η κύρια έξοδος του φαρμακευτικού προϊόντος προς το περιβάλλον

- Δεν υπήρξε μεταβολισμός ή υποβάθμιση του προϊόντος.

7.4.2 Υπολογισμός των PNECs

Για τον υπολογισμό των PNECs στο νερό οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την εξίσωση (2) όπως προτείνεται από την EMEA ήτοι: PNEC=EC / AF

Στον πίνακα 7.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές LC_{50} και EC_{50} που χρησιμοποιήθηκαν από τους ερευνητές.

Πίνακας 7.1 LC_{50} και EC_{50} τιμές και ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες επιλεγμένων φαρμακευτικών ουσιών(Προσαρμοσμένος Zuccato et al., [93])

Φαρμακευτική Ουσία	Οικοτοξικά δεδομένα (mgl^{-1})	pk_a	Διαλυτότητα στο νερό(gl^{-1})	$Logk_{ow}$
Αμοξικιλλίνη	EC_{50} *M.aeruginosa* 0.0037	2.4-7.4	4	0.87
Σεφτριαξιόνη	–	3-3.2-4.1	400	–4.30
Κιπροφλοξακίνη	EC_{50} *M.aeruginosa* 0.005 EC_{50} *S.capricornutum* 2.97	5.9-8.89	30	0.4
Κλαριθρομυκίνη	–	8.99	0.00034	3.16
Ερυθρομυκίνη	LC_{50} (48h) *D.Magna* 210.6 LC_{50} (24h) *D.Magna* 388	8.88	1	2.54
Φουροσιμίδη	–	3.7	0.013	–0.92
Λινκομυκίνη	LC_{50} (72h) *D.Magna* 379.4 EC_{50} (72h) *Artemia salina* 283.1	7.6	50	0.20
Σπειραμυκίνη	EC_{50} *M.aeruginosa* 0.005 EC_{50} *S.capricornutum* 2.3	8.0		

–: Δεν υπάρχουν πληροφορίες

7.4.3 Σύγκριση των PECS/PNECS

Ο πίνακας 7.2 παρουσιάζει τις τιμές PECs που υπολογίστηκαν στο ποταμό Πάδο, τις τιμές PNECs και τους λόγους PEC/PNEC. Οι λόγοι PEC/PNEC είναι μεγαλύτεροι της μονάδας για την αμοξικιλλίνη, την κιπροφλοξακίνη και την σπειραμυκίνη που σημαίνει ότι υπάρχει ανάγκη για περισσότερες πληροφορίες για την βελτίωση της μεθόδου.

Πίνακας 7.2 Crude PECs Όπως υπολογίστηκαν στον ποταμό Ρο σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της EMEA, PNECs όπως υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας EC_{50} από τεστ οξείας τοξικότητας και οι λόγοι PEC/PNEC (Προσαρμοσμένος Zuccato et al.,[93])

Φαρμακευτική ουσία	PEC crude ($\mu g l^{-1}$)	PNEC ($\mu g l^{-1}$)	PEC/PNEC
Αμοξικιλλίνη	4.95	0.0037	1337.84
Σεφτριαξιόνη	0.35	–	–
Κιπροφλοξακίνη	0.2 0.2	0.005 2.97	40 0.067
Κλαριθρομυκίνη	0.8	–	–
Ερυθρομυκίνη	0.093	210.6	0.00044
Φουροσιμίδη	0.151	–	–
Λινκομυκίνη	0.17	379.4	0.00045
Σπειραμυκίνη	0.121 0.121	0.005 2.3	24.2 0.053

7.4.4 Ανάγκη για περισσότερη έρευνα

Σύμφωνα με την EMEA αν η προβλεπόμενη περιβαλλοντική συγκέντρωση είναι χαμηλότερη από 0,01μg/L, (PEC<0,01$\mu g l^{-1}$), τότε η ουσία είναι μάλλον απίθανο να παρουσιάσει κάποιο κίνδυνο για το περιβάλλον. Όπως φαίνεται όμως από τον πίνακα 7.2 οι περισσότερες ουσίες ξεπερνούν αυτήν την συγκέντρωση. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να βελτιωθεί η εκτίμηση της PEC, το οποίο μπορεί να γίνει εισάγοντας στην εξίσωση (1) μια τιμή για τον ρυθμό απομάκρυνσης (R). Μια συνεισφορά σε αυτή την τιμή προέρχεται από το

μεταβολικό ρυθμό στους ανθρώπους (δηλαδή το ποσοστό της ουσίας που αποβάλλεται ως πατρική ένωση) και την υποβάθμιση του μορίου στο περιβάλλον.

Σύμφωνα με τους Mackay et al., [94] οι χημικοί ρυπαντές μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις τύπους, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Οι φαρμακευτικές ουσίες ανήκουν στον τύπο 2 (Type 2) .Είναι δηλαδή χαμηλής πτητικότητας ουσίες που κατανέμονται στο νερό, το χώμα και τις οργανικές μήτρες. Αυτή η κατάταξη βοηθάει στην πρόβλεψη του περιβαλλοντικού γίγνεσθαι των μορίων επειδή το νερό, το χώμα και τα ιζήματα είναι τα διαμερίσματα που ενδιαφέρουν. Ένα δεύτερο βήμα για την πρόβλεψη του περιβαλλοντικού γίγνεσθαι ενός μορίου είναι η μελέτη των φυσικοχημικών του χαρακτηριστικών. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων που μελετήθηκαν φαίνονται στο πίνακα 7.2. Όλα τα αντιβιοτικά έχουν διαλυτότητα μεγαλύτερη των 100 mg/L, [95] που σημαίνει ότι είναι πολικά μόρια, εύκολα διαλυόμενα στο νερό και μπορούν σταδιακά να προσκολληθούν στο επιφανειακό χώμα και τα ιζήματα. Η βασική ιδιότητα που καθορίζει το περιβαλλοντικό γίγνεσθαι των φαρμακευτικών ουσιών είναι η πολλαπλότητα των λειτουργικών τους ομάδων με περισσότερες της ενός σταθεράς διάστασης. Το φορτίο αυτών των ενώσεων μπορεί ως εκ τούτου να μεταβάλλεται ανάλογα με το pH και η ιοντική τους μορφή μπορεί συνεπώς να επηρεάσει την διαλυτότητα και την κατανομή τους στο περιβάλλον.

Χρειάζεται λοιπόν μια νέα προσέγγιση για την πρόβλεψη του περιβαλλοντικού γίγνεσθαι τέτοιων μορίων επειδή η κατανομή η οποία προβλέπεται στα περιβαλλοντικά μέσα με την βοήθεια συντελεστών όπως οκτανόλης / νερού (K_{ow}), οργανικού άνθρακα (K_{oc}) και στερεής φάσης / νερού (K_d) μπορεί να μην είναι ρεαλιστική.

Τα πρότυπα τεστ τοξικότητας των φαρμακευτικών ουσιών δίνουν ακόμα λίγες πληροφορίες και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να αποσαφηνιστούν οι οξείες και χρόνιες επιδράσεις τους στο περιβάλλον. Στον πίνακα 7.2 φαίνεται ότι οι λόγοι PEC/PNEC είναι μεγαλύτεροι της μονάδας όταν χρησιμοποιούνται οι EC_{50} στα άλγη , αλλά μικρότεροι της μονάδας όταν χρησιμοποιούνται EC_{50} στα οστρακοειδή και τα ψάρια. Επειδή τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν προερχόταν από δοκιμές οξείας τοξικότητας, τα αποτελέσματα προφανώς επηρεάσθηκαν από τους εμπλεκόμενους

οργανισμούς. Οι τιμές λοιπόν EC_{50} που αποκτήθηκαν για διαφορετικούς οργανισμούς δεν μπορούν να συγκριθούν εύκολα.

Επιπλέον, διαφορετικοί οργανισμοί διαφέρουν εντελώς ως προς την ευαισθησία τους στις φαρμακευτικές ουσίες, και η τοξικότητα μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες όπως τον μηχανισμό δράσης της ουσίας και των υποδοχέων του υπο δοκιμή οργανισμού. Μια ρεαλιστική εκτίμηση περιβαλλοντικών κινδύνων θα απαιτούσε ως εκ τούτου μια πλήρη σειρά δεδομένων για κάθε φαρμακευτική ουσία χωριστά (ή για ομάδες ουσιών που δρουν με τον ίδιο μηχανισμό ή που έχουν συγγενική χημική δομή) και οι δοκιμές τοξικότητας να απευθύνονται σε μια ευρεία κλίμακα οργανισμών.

Επιπροσθέτως, πολλές φαρμακευτικές ουσίες είναι ανθεκτικές στο περιβάλλον και μπορούν συνεπώς να συσσωρευτούν προκαλώντας επιδράσεις που σχετίζονται με την χρόνια έκθεση.

Τέλος, μπορούν να προκληθούν αρνητικές επιδράσεις από την αθροιστική ενέργεια πολλών διαφορετικών ουσιών μαζί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ.8

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

8.1 Γενικές παρατηρήσεις

Τα αντιβιοτικά και γενικά οι φαρμακευτικές ουσίες χαρακτηρίζονται από τις ισχυρές τους επιδράσεις και τα ευρείας κλίμακας οφέλη τους στους διάφορους τομείς όπου βρίσκουν εφαρμογή. Όμως παρά τα ωφέλιμα θεραπευτικά τους αποτελέσματα, μερικά φάρμακα επηρεάζουν τους οργανισμούς στο περιβάλλον και τα οικοσυστήματα και από την άποψη της περιβαλλοντικής υγιεινής η μόλυνση των υπογείων και πόσιμων υδάτων είναι πολύ ανεπιθύμητη ακόμα και όταν οι εμπλεκόμενες ουσίες έχουν χαμηλή τοξικότητα για τον άνθρωπο.

Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο εάν επηρεάζεται η δυναμική των βακτηριακών πληθυσμών του περιβάλλοντος από την εισαγωγή αντιβιοτικών και ανθεκτικών βακτηρίων. Όσον αφορά τους ανθρώπους και τους οργανισμούς στο περιβάλλον, το κατά πόσον επιτρέπεται η σύγκριση ανάμεσα σε μια σύντομη αλλά υψηλή δόση (για διάγνωση και θεραπεία) και μια χαμηλή αλλά μακροχρόνια δόση (μέσω του πόσιμου νερού), παραμένει ένα ανοικτό θέμα τουλάχιστον εξαιτίας των πολυμορφικών διαφορών σε ευαισθησία και αντίδραση του κάθε ατόμου χωριστά.

Τέλος, δεν απαιτείται μια θεμελιώδη καινούρια προσέγγιση για την έρευνα των αντιβιοτικών στο περιβάλλον. Αντίθετα μπορεί να χρησιμοποιηθεί η εμπειρία από άλλες χημικές ενώσεις, ιδιαίτερα για τα εντομοκτόνα και άλλα βιοκτόνα, και αν χρειαστεί να αναπτυχθεί περαιτέρω.

8.2 Τρόποι χρήσης των αντιβιοτικών

Ενώ η χρήση συγκεκριμένων φαρμάκων απαγορεύεται σε ορισμένες χώρες σε άλλες χώρες επιτρέπεται η χρήση τους, ιδιαίτερα σε χώρες του Τρίτου Κόσμου. Η χρήση των αντιβιοτικών είναι πολύ περιορισμένη σε μερικές Δυτικές χώρες αλλά δεν είναι τόσο περιορισμένη σε άλλες. Οι τρόποι χρήσης των αντιβιοτικών είναι καλά τεκμηριωμένη στις Σκανδιναβικές χώρες, όπου έχει μειωθεί σημαντικά από τις αρχές της δεκαετίας του ’80, η χρήση αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στην κτηνοτροφία και την ιχθυοτροφία, δεν έχουν όμως απαγορευθεί πλήρως.

Τέλος, δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για την χρήση των αντιβιοτικών σε διάφορες βιομηχανίες (π.χ παραγωγής τροφίμων), Υπάρχει έλλειψη πληροφοριών για την παγκόσμια χρήση των αντιβιοτικών και δεν υπάρχουν

δεδομένα για την παραγωγή τους. Πρέπει οπωσδήποτε να ξεκαθαριστεί ο ρόλος των βιομηχάνων όσον αφορά την παροχή των απαιτούμενων δεδομένων τόσο για τα υπάρχοντα όσο και για τα νέα αντιβιοτικά.

8.3 Αναλυτικά δεδομένα

Μέχρι σήμερα έχει δημοσιευθεί ένας αυξανόμενος αριθμός αναλυτικών αποτελεσμάτων που αφορά τον ρόλο των αντιβιοτικών, κυρίως στο υδατικό περιβάλλον.

Γενικά, τα δεδομένα δείχνουν ότι η παρουσία των αντιβιοτικών και οι συγκεντρώσεις τους είναι συγκρίσημες σε διαφορετικές χώρες (ngl^{-1} μέχρι λίγα μgl^{-1} στο επιφανειακό νερό). Όμως, μπορεί να υπάρχουν διαφορές για συγκεκριμένα αντιβιοτικά των οποίων η παρουσία οφείλεται στους διαφορετικούς τρόπους χρήσης.

Η ποιότητα των δημοσιευθέντων δεδομένων έχει βελτιωθεί και φαίνεται επαρκής αλλά δεν υπάρχουν ακόμα αξιόπιστα δεδομένα για μερικά περιβαλλοντικά διαμερίσματα όπως τα ιζήματα και η ενεργός ιλύς.

Θα ήταν επιθυμητή η ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων για κάποια αντιβιοτικά που δεν έχουν ερευνηθεί ακόμα και να καθιερωθεί ένα ενδο-εργαστηριακό σύστημα ελέγχου. Οι αναλυτικές μέθοδοι θα πρέπει να τυποποιηθούν και να συντονιστούν οι έρευνες (διαδικασίες δειγματοληψίας και τοποθεσίες).

Η κατηγοριοποίηση ουσιών σύμφωνα με την ιατρική τους χρήση ή την χημικής τους δομή και η χρήση χαρακτηριστικών ενώσεων με τυπικές ιατρικές καθώς και φυσικοχημικές ιδιότητες μπορεί να αποδειχτεί χρήσιμη.

8.4 Το γίγνεσθαι και οι επιδράσεις των αντιβιοτικών

Είναι σημαντικό να μελετηθούν τα φυσικοχημικά δεδομένα (για παράδειγμα η οξύτητα, η πτητικότητα, η διαλυτότητα, οι συντελεστές κατανομής κ.α) των αντιβιοτικών και να προβλεφθεί το γίγνεσθαι και οι επιδράσεις τους στο περιβάλλον. Αυτά τα δεδομένα, είναι μερικώς διαθέσιμα και η ποιότητά τους αμφισβητήσιμη. Για αυτό το σκοπό πρέπει να βελτιωθούν οι υπάρχουσες in-silico μέθοδοι.

Τα αντιβιοτικά είναι πολύ πολικά με πολλές δραστικές ομάδες. Από αυτήν την άποψη είναι συγκρίσιμα με τις χρωστικές ουσίες.

Για μερικά περιβαλλοντικά διαμερίσματα είναι πιθανός ο εμπλουτισμός με συγκεκριμένες φαρμακευτικές ουσίες. Για παράδειγμα οι κινολόνες και οι τετρακυκλίνες έχουν την τάση να προσροφούνται στα στρώματα λάσπης των

λυμάτων ή στα σωματίδια του εδάφους ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο με άλλα αντιβιοτικά.

Πρέπει να ερευνηθούν στο χρόνο και στο χώρο με περισσότερη λεπτομέρεια διαφορετικά περιβαλλοντικά διαμερίσματα χρησιμοποιώντας αναλυτικά μοντέλα, καθώς επίσης η ανταλλαγή και η κατανομή μεταξύ διαφορετικών περιβαλλοντικών διαμερισμάτων. Το ίδιο ισχύει και για τα βιολογικά δεδομένα (επιδράσεις στην βιοποικιλία, στην βιοαποιδόμηση όπως στα βιολογικά συστήματα ελέγχου). Τα σχετικά διαμερίσματα (χώμα, ιζήματα, λύματα) θα πρέπει να επιλέγονται για μελέτες βιοαποιδόμησης σύμφωνα με τους τρόπους χρήσης των αντιβιοτικών και σε μερικές περιπτώσεις μετά την πρόβλεψη της περιβαλλοντικής συμπεριφοράς και κατανομής τους με τη βοήθεια μοντέλων (όπως μοντέλα πτητικότητας).Στην βιβλιογραφία αναφέρονται πολλά μοντέλα αλλά δεν είναι βέβαιο ποια θα πρέπει να επιλεχθούν.

Μόλις γίνει κατανοητή η συμπεριφορά μιας ουσίας στο περιβάλλον μπορούν να αναγνωρισθούν τα διαμερίσματα που απαιτούν ανάλυση και με βάση αυτές τις πληροφορίες μπορούν να στηθούν κατάλληλα αναλυτικά προγράμματα. Η ισοστάθμιση μάζας μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον έλεγχο των αναλυτικών αποτελεσμάτων. Οι πιθανές τροφικές αλυσίδες μπορούν να αναγνωρισθούν. Ίσως να πρέπει να μελετηθούν και οι τοπικές συνθήκες. Οι δοκιμές αποιδόμησης, δεν είναι καλά μοντέλα για τον έλεγχο του τι πράγματι συμβαίνει στο περιβάλλον. Τεστ όπως τα Closed Bottle tests βοηθούν μόνο στην κατηγοροποίηση των ουσιών. Πρότυπα τεστ μπορούν να εκτελεστούν με πραγματικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών. Οι ραδιενεργοί δείκτες (^{14}C) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μελέτη της βιοαποιδόμησης και της κατανομής αυτών των ουσιών.

Ποιες είναι οι επιδράσεις αυτών των ουσιών στους οργανισμούς και τα οικοσυστήματα; Μερικές φορές μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα δεδομένα που κατατίθενται για την έγκριση των ουσιών. Θα πρέπει να γνωρίζει κάποιος ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις που εμφανίζονται για μεγάλη χρονική περίοδο προκαλούν ανησυχία για το περιβάλλον, ενώ στην ιατρική χρησιμοποιούνται μεγάλες δόσεις για μικρή χρονική περίοδο. Υπάρχει μια έλλειψη γνώσεων για τις μακροχρόνιες επιδράσεις.

Όσον αφορά τις τρέχουσες γνώσεις μας, τα άλγη φαίνεται να είναι ευαίσθητοι οργανισμοί. Αλλά λίγα είναι γνωστά για τους οργανισμούς που ζουν στα ιζήματα ή που δεν αποτελούν τον άμεσο στόχο των αντιβιοτικών.

Τα κριτήρια για την επιλογή των ουσιών θα πρέπει να είναι ο όγκος των ουσιών που χρησιμοποιείται και το φορτίο που φθάνει στο περιβάλλον σε σχέση με τις συγκεντρώσεις που επηρεάζουν τους οργανισμούς στο περιβάλλον, αν φυσικά υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα. Όμως αυτή την χρονική στιγμή δεν είναι βέβαιο ποιοι οργανισμοί θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν για αυτό τον σκοπό. Το ερώτημα ποια τεστ είναι κατάλληλα για την απόκτηση αυτών των δεδομένων, χρειάζεται διευκρίνιση. Τα τωρινά πρότυπα τεστ μπορεί και να μην είναι πάντοτε κατάλληλα και ίσως πρέπει να αναπτυχθούν καινούρια.

Η αυξανόμενη ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά αποτελεί ένα σοβαρό πρόβλημα στην ιατρική. Το θέμα των ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον και η σημασία τους δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητά και δικαιολογούν περαιτέρω έρευνα. Η σπουδαιότητα της εισαγωγής στο περιβάλλον ανθεκτικών ήδη βακτηρίων έναντι της εισαγωγής αντιβακτηριακών ενώσεων δεν έχει ακόμα αποδειχτεί. Η ανθεκτικότητα μεταφέρεται επίσης από χώρα σε χώρα από τους ταξιδιώτες. Τα αντιβιοτικά που είναι παρόντα στο περιβάλλον μπορούν να ευνοήσουν την ανάπτυξη ανθεκτικών παθογενών βακτηρίων. Πρέπει να λαμβάνεται υπ'όψιν η διασταυρωμένη ανθεκτικότητα που προκαλείται από τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην ιατρική και την κτηνιατρική. Η συσχέτιση μεταξύ ανθεκτικότητας και συγκέντρωσης των ενώσεων υπό εξέτασιν θα πρέπει να ερευνάται κάτω από περιβαλλοντικές συνθήκες. Θα πρέπει επίσης να εξεταστεί το γίγνεσθαι και οι επιδράσεις σημαντικών μεταβολιτών που είναι ακόμα ενεργείς. Για την εκτίμηση του φορτίου είναι απαραίτητοι οι ρυθμοί απέκκρισης, βιοαποιδόμησης και μεταβολισμού στους ανθρώπους και τα ζώα καθώς και οι ρυθμοί αποιδόμησης από περιβαλλοντικούς οργανισμούς. Σε ένα μεγάλο βαθμό αυτά τα δεδομένα δεν είναι διαθέσιμα.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις σε πρότυπα τεστ δεν οδηγούν απαραίτητα σε αναγνωρίσιμες βραχυπρόθεσμες επιδράσεις. Όταν επιλέγονται υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να παραχθούν μη ρεαλιστικά αποτελέσματα. Ως εκ τούτου μπορεί να είναι απαραίτητες κάποιες τροποποιήσεις στα πρότυπα τεστ.

Θα πρέπει να εκτιμηθεί ο ρόλος των ιδιοτήτων βιοαποιδόμησης των αντιβιοτικών καθώς επίσης και οι κύριοι δίοδοι αποιδόμησης στο χώμα, τα ιζήματα και τις μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων. Οι περισσότερες από τις υπάρχουσες φαρμακευτικές ουσίες παρασκευάζονται ως ρακεμικά μίγματα (ρακεμικό μείγμα είναι μείγμα ίσων ποσοτήτων των δυο εναντιομερών μορφών μιας ουσίας) ενώ αντιθέτως η αποτελεσματικότητα και το γίγνεσθαι τους στο περιβάλλον μπορεί να εξαρτάται από την στερεοχημεία τους. Υπάρχει μια τάση να παράγεται και να χρησιμοποιείται το στερεοϊσομερές το οποίο είναι ενεργό. Αυτό πρέπει να ληφθεί υπ'όψιν στο μέλλον.

8.5 Εκτίμηση και Διαχείριση κινδύνων

Πρέπει οπωσδήποτε να προσδιοριστούν οι ποιοτικοί περιβαλλοντικοί στόχοι για τα αντιβιοτικά και τα ενεργά συστατικά τους. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία είναι επιθυμητή μια γενική απουσία αυτών των ενώσεων στο πόσιμο νερό. Υπό το πρίσμα της αειφόρου ανάπτυξης ο μακροχρόνιος στόχος θα πρέπει να είναι η μηδενική εκπομπή των ουσιών που δεν έχουν σημαντικό φυσικό υπόβαθρο συγκέντρωσης ενώ η εκπομπή άλλων ουσιών θα πρέπει να κρατηθεί τόσο χαμηλή ώστε να μην αυξηθεί η φυσική συγκέντρωση υπόβαθρου.

Για να επιτευχθούν οι παραπάνω στόχοι, η προληπτική αρχή υπαγορεύει μια μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση 0,01 $\mu g l^{-1}$ στα επιφανειακά και πόσιμα νερά. Αυτή η συγκέντρωση μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως κατώφλι. Αν αναμένεται μια υψηλότερη συγκέντρωση στα επιφανειακά νερά ως συνέπεια του όγκου παραγωγής τότε θα απαιτηθούν περαιτέρω έρευνες και μελέτες περιβαλλοντικής αλληλεπίδρασης. Αν καταστούν γνωστά νέα και χαμηλότερα κατώφλια για τις ουσίες θα πρέπει να χαμηλώσει αντίστοιχα η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση.

Το γίγνεσθαι των ουσιών κατά την διάρκεια επεξεργασίας του πόσιμου νερού θα πρέπει να εκτιμηθεί με μεγαλύτερη λεπτομέρεια. Υπάρχει ανάγκη για μια κοντινότερη ματιά σε διάφορα επίπεδα (τοπικά, περιφερειακά, παγκόσμια).

Οι οργανισμοί πάνω στους οποίους γίνονται οι δοκιμές θα πρέπει να διαιρεθούν σε δυο κύριες ομάδες: α) τα μικρόβια και β) άλλους οργανισμούς όπως τα ζώα. Μια πρώτη εκτίμηση θα πρέπει να εξετάζει τους οργανισμούς στους οποίους στοχεύουν τα αντιβιοτικά. Οι λειτουργικοί στόχοι θα πρέπει να

είναι βασικοί όπως οι επιδράσεις στους κύκλους του άνθρακα και του αζώτου, η αναπνοή ή η ενζυματική δραστηριότητα.

Δεν είναι ξεκάθαρο αν υφίσταται κρίσιμη συγκέντρωση μιας φαρμακευτικής ουσίας στο περιβάλλον. Οι φαρμακευτικές ουσίες παρουσιάζουν διαφορετικές καμπύλες συγκέντρωσης / αντίδρασης και μερικές από αυτές έχουν υψηλό επίπεδο αντίδρασης ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι τοπικές εκπομπές μπορούν να προκαλέσουν όχι μόνο τοπικές βραχυπρόθεσμες επιδράσεις αλλά περιφερειακές ή ακόμα και παγκόσμιες. Προτείνονται λοιπόν μακροχρόνιες παρατηρήσεις. Για την εκτίμηση της ανάπτυξης ανθεκτικότητας και την εμφάνιση μακροχρόνιων επιδράσεων προτείνεται η χρήση χαμηλών συγκεντρώσεων. Θα πρέπει επίσης να ληφθούν υπ΄οψιν πιθανές αλλεργικές αντιδράσεις από τους ανθρώπους.

Όσον αφορά το γίγνεσθαι των φαρμακευτικών ουσιών χρειάζονται περισσότερα δεδομένα για να εκτιμηθεί ο περιβαλλοντικός αντίκτυπος. Οποιοδήποτε φάρμακο που φθάνει οπουδήποτε στο περιβάλλον αποτελεί πιθανό κίνδυνο. Οι πληροφορίες για την διαχείριση κινδύνων είναι ζωτικής σημασίας. Όταν δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία οι άνθρωποι πιστεύουν ή ότι δεν υπάρχει κίνδυνος (‘no data, no risk’) ή ότι υπάρχει μεγάλος κίνδυνος (‘no data, big risk’). Είναι γνωστό ότι η διάδοση πληροφοριών που αφορούν τον περιβαλλοντικό αντίκτυπο των φαρμακευτικών ουσιών θα πρέπει να βελτιωθεί τόσο για τους γιατρούς όσο και για τους ασθενείς. Υπολογίζεται ότι μέχρι το 50% των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται δεν ωφελούν σε τίποτα είτε επειδή η διάγνωση είναι λανθασμένη είτε επειδή η λήψη αντιβιοτικών προηγήθηκε της διάγνωσης.

Η διαχείριση κινδύνων συχνά έχει βραχυπρόθεσμους οικονομικούς προσανατολισμούς και όχι την αποφυγή των περιβαλλοντικών επιδράσεων. Εν πάση περιπτώσει θα πρέπει να βρεθεί μια λύση η οποία θα μειώσει την χρήση των αντιβιοτικών και τους κινδύνους που σχετίζονται με αυτήν. Χρησιμοποιώντας την εμπειρία των Σκανδιναβικών Χωρών ως παράδειγμα, αυτό θα μπορούσε να γίνει εφαρμόζοντας αυστηρή διαχείριση για τα αντιβιοτικά ή χρησιμοποιώντας εμβόλια στις φάρμες ψαριών. Η χρήση αντιβιοτικών για την ενίσχυση της ζωικής παραγωγής θα μπορούσε να απαγορευτεί όπως στην Σουηδία, στην Δανία και στην Ελβετία. Άλλες χώρες μπορούν να ακολουθήσουν αυτά τα παραδείγματα όχι μόνο για την βελτίωση

του περιβάλλοντος αλλά επίσης για την αντιμετώπιση της διαφαινόμενης ανθεκτικότητας γενικότερα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Αντιβιοτικά και συνήθεις Λοιμώξεις: 2η Έκδοση ISBN 960-220-547-4 Γ.Ε.Χαλεβελάκης, Ν.Ι.Λεγάκης, Τ.Η.Περόγαμβρος. Εκδόσεις: Χριστοδουλία Χαλεβελάκη.

2. Antimicrobial Agents Used in Treatment of Infectious Disease 2002 Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bactiriology file://D:/classesantibiotics.htm

3. Bacterial resistance to antibiotics © 2002 Kenneth Todar University of Wisconsin Department of Bactiriology http://textbookofbactrriology.net

4. Εθνικό Συνταγολόγιο και Συμπλήρωμα –Εκδόσεις ΕΟΦ

5. Mutation frequencies and antibiotic resistance. Minireview. Antimicrob Agents Chem 44:1771-1777.

6. Effects of environment on compensatory mutation to ameliorate costs of antibiotic resistance. Björkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Anderson DI (2000). Science 287

7. Genetic exchange between bacteria in the environment. Davison J (1999). Plasmid 42

8. Impact of antibiotics on conjugational resistance in gene transfer in Staphylococcus aureus in sewage. Ohlsen K, Ternes T, Werner G, Hacker J, 2003. Environ Microbiol 5:711-716

9. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. Kümmerer K, Henniger A, 2003. Clin Microbiol Inf 9:1203-1214.

10. Effects of tetracycline use in aquaculture on microbial communities. Fotney C.M, B.A. Dixon and D.P Weston, 1998. Aquaculture ’98 Book of Abstracts, p.181

11. Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound, Washington. Herwig, R. P., Gray, J. P., and Weston, D. P. Aquaculture, 149(3-4): 263-283. 1997

12. Occurrence of antimicrobial resistance in-fish pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. Schmidt A.S., M.S., Bruun, I. Dalsgaard, K. Pedersen and J.L. Laresen, 2000. Appl. Environ. Microbiol., 66: 4908-4915.

13. Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. E. Chelossi, L. Vezzulli, A. Milano, M. Branzoni, M. Fabiano, G. Riccardi and I. M. Banat. Aquaculture 2003;219 (1-4):83-97.

14. Aquaculture and antibiotic resistance: a negligible public health risk? Macmillan J.R., 2001 World Aquacult., 32: 49-50.

15. Toxigenic *vibrio cholerae* in the environment—a mini review. Islam M.S., B.S Drasar, M.J. Albert, R.B. Sack, A. Huq and R.R. Colwell, 1997. Trop. Dis. Bull., R1 – R11

16. Environmental microbe and human pathogen: The ecology and microbiology of vibrio cholerae. Cottingham K.L., D.A. Chiavelli and R.K. Taylor, 2003. Frontiers in Ecology and the Environment, 1: 80-86.

17. Linking the ecology, epidemiology and pathogenicity of Vibrio cholerae: a molecular genetic approach-Deborah A. Chiavelli, Kathryn L. Cottinghamand Ronald K. Taylor—CIESM Workshop Monograph 26, 12-15 May 2004

18. Emerging pathogens in coastal areas. Pommepuy M., Hervio-Heath D.,Gourmelon M., Caprais M.P., Le Cann P., Le Saux J.C. and F.Le Guyader CIESM Workshop Monograph 26, 12-15 May 2004

19. Confirmation of chloramphenicol residues in bovine milk by gas chromatography-mass spectometry. Kijak P.J., 1994, J. AOAC Int., 77, 34–40.

20. Development of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions. Martina Preu, Dominique Guyot and Michael Petz, Journal of Chromatography A, Volume 818, Issue 1, 28 August 1998, Pages 95-108

21. Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης: Πέμπτη Έκδοση-Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΩΣΤΑΡΑΚΗΣ 2002

22. Introduction to Modern Mass Spectrometry. Euripides G. Stephanou. University of Crete Environmental Chemical Processes Laboratory.

23. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. Mira Petrovic, Maria Dolores Hernando, M. Silvia Dyaz-Cruz, Damia Barcelo. Journal of Chromatography A, 1067 (2005) 1–14

24. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry. Roman Hirsch,

Thomas A. Ternes, Klaus Haberer, Armin Mehlich, Frank Ballwanz, Karl-Ludwig Kratz. Journal of Chromatography A, 815 (1998)

25. Occurrence of Antibiotics in Drinking Water. Zhengqi Ye, Howard Weinberg Dept. of Environmental Science and Engineering, University of North Carolina

26. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide and Trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and LC-ESI-MS. Jay E. Renew and Ching-Hua Huang. Journal of Chromatography A, Volume 1042, Issues 1-2, 9 July 2004, Pages 113-121.

27. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. Thomas A.Ternes. Trends in analytical chemistry, vol. 20, no. 8, 2001

28. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. M. Silvia Diaz-Cruz, Maria j. Lopez de Alda, Damia Barcelo. Trends in analytical chemistry, Vol. 22, No. 6, 2003

29. Brambilla G., Civitareole C., Migliore L., Quimica Analytica B, S114, 1994

30. Removal of Pharmaceuticals during Drinking Water Treatment.Ternes, T.A., M. Mesenheimer, D. McDowell, F. Sacher, H-J. Brauch, G. Haist-Gulde, G.Preuss, U. Wilme and N. Zulei-Seibert (2002). Environ. Sci. Technol. 36: 3855 – 3863.

31. Determination of natural tetracyclines by high-performance liquid chromatography-fast atom bombardment mass spectrometry. R. Délepée, D. Maume, B. Le Bizec, H.PoulikenJ Chromatogr B 2000 748:369-81.

32. Antibiotics in Dust Originating from a Pig-Fattening Farm. Hamscher G, Sczesny S, Höper H, Nau H. 2002. Anal Chem 74:1509-1518

33. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurized liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anne Marie Jacobsen, Bent Halling-Sørensen, Flemming Ingerslev, Steen Honoré Hansen. Journal of Chromatography A, 1038 (2004) 157-170

34. Antibiotics in the aquatic environment. Alexy R, Scholl A, Kumpel T, Kummererk Federal Environmental Agency, Berlin 2003 F+E 29863722]

35. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy. Calamari D, Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R (2003). Environ Sci Technol 37:1241-1248]

36. Determination of antibiotic residues in manure, soil and surface waters. Christian T, Schneider RJ, Farber HA, Skatlarek D, Meyer MT, Goldbach HE. Acta Hydroch Hydrob(2003) 31:36-44

37. Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludge, and surface waters. Giger W, Alder AC, Golet EM, Kohler H, McArdell CS, Molnar E, Siegrist h, Suter MJ-E (2003). Chimia 57 (9): 485-491

38. Pharamaceuticals in groundwaters. Sacher, Lang FT, Brauch HJ, Blankenhorn I. J Chromatogr A (2001) 938 (1-2): 199-210

39. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. Environ Sci Technol. 2002 36(6): 1202-1211

40. Prediction of the environmental load of rharmaceuticals contaminating the marine environment. A case for the Adriatic Sea-Ettore Zuccato. CIESM Workshop Monograph 26, 12-15 May 2004.

41. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid phase extraction. Golet EM, Streher A, Alder AC, Giger W. Anal. Chem. 2002, 74: 5455-5462

42. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Hamscher G, Sczesny S, Hoper H, Nau H Anal Chem. 2002, 74:1509-1518

43. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils- a review Thiele-Bruhn S J Plant Nutr Soil Sci 2003 166:145-167].

44. Concentration and Persistence of Oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm.. Coyne R, Hiney M, O'Conner B, Cazabon D, Smith P. Aquaculture 1994123:31-42}

45. Toxicity of several important antibiotics to Artemia. Migliore L, Civitareale C, Brambilla G, Dojni di Delupis G. Wat Res 1997, 31:1801-1806.

46. Occurance of antibiotics in the aquatic environment. Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL. Sci Total Environ 1999, 225:109-118

47. The fate of pharmaceutical chemicals in the environment. Richardson ML, Brown JM J. Pharm Pharmacol 1985, 37:1-12.

48. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. Kummerer K, Al-Ahmad A, Mersch – Sundermann V Chemosphere 2000, 40:701-710

49. Persistance of oxytetracycline in sediment from fish farms. Jacobsen P, Berglind L. Aquaculture 1998, 70:365-370,

50. Aerobic biodegradation of ^{14}C-Sarafloxacin hydrochloride in soil. Marengo JR, O'Brian RA, Stamm JM. Environ Toxical Chem 1997, 16:462-471

51. Aerobic biodegradation of virginiamycin in soil. Weerasinghe CA, Towner D. Environ Toxicol chem. 1997, 16:1873-1876

52. Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed battle test. Alexy R, Kumplel T, Kummerer K, Chemosphere 2004 57, 505-512

53. The persistence of Faecal-Borne Antibiotics in soil. Gavalchin J, Katz S. E. Journal of AOAC International 1994, Vol. 77, No. 2, pp. 481-485

54. Stability of Tylosin in Manure Containing Test Systems Determined by HPLC. Loke M-L, Ingerslev F, Halling-Sorensen B, Tjornelund J. Chemosphere 2000, Vol. 40, pp. 759-765.

55. Biodegradability of Cefotiam, Ciprofloxacin, Meropenem, Penicillin G, and Inhibition of Wastewater Bacteria. Al-Almad A, Daschner F, Kümmerer K. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 1999, Vol. 37, pp.158-163.

56. Biodegradability Properties of Sulfonamides in Activated sludge. Ingerslev F, Halling-Sorensen. Environmental Toxicology and Chemistry 2000, Vol. 19, No. 10, pp.2467-2473

57. Photostability of eight antibacterial agents in seawater. Lunestad BT, Samuelsen OB, Ervik A. Aquaculture 1995, 134:217-225

58. Photodegradation and ageing of antibiotic pharmaceuticals on soil surfaces SörenThiele-Bruhn University of Rostock, Rostock, Germany

59. Algal toxicity of antibacterial agents used intensive Farming. Halling – Sørensen B. Chemosphere, 2000 40:731-739

60. Study of Erythromycin A Decomposition Products in Aqueous Solution. Volmer D. A, Hui J.P.M. Rapid Communication in Mass Spectrometry 1998, Vol. 12, pp.123-129

61. Kinetics and Mechanism of Degradation of Ampicillin in solution. Hou J.P, Poole J.WJournal of pharmaceutical Sciences 1969, Vol. 58, No. 4, pp.447-454

62. Sorption and mobility of metronidazole, olaquindox, oxytetracycline and tylosin in soil. Rabølle M, Spliid NH. Chemosphere 2000, 40:715-722

63. Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in seawater by complex formation with magnesium and calcium. Lunestad BT, Goksøyr J. Dis Aquat Organ 1990, 9:67-72

64. Occurrence and fate of antibiotic compounds in municipal wastewater and animal waste. Ching-Hua Huang, Jay E. Renew, Karen Pinkston, David L.Sedlak. Georgia Institute of Technology, Atlanda, GA 30332

65. Fate of antibiotics in surface waters and sediments. Kathrine Stauffenberg, Howard Weinberg. Dept. of Environmental Science and Engineering, UNC School of Public Health.

66. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to Daphia mangna Wollberger I, Halling – Sorensen B, Kusk KO Chemosphere 2000, 40:723-730))

67. Data ranges in aquatic toxicity of chemicals. Consequences for environmental risk analysis. Koller G, Hungerburger K, Frent K. Environ Sci Pollet Res 2000, 78:135-143

68. The effect of antibiotics on nitrification processes. Gomez Mendez R, Lema JM App Biochem Biotechnol 1996, 57/58:869-876

69. Detection of biohazardous materials in water by measuring bioluminescene reduction with the marine organism Vibrio Harveyi. Thomulka KW, Mc Gee Dj Environ Sci Health 1993, A 28:2153-2166

70. Bioassays with Vibrio ficheri for the assessment of delayed toxicity. Froehner K, Backhaus T, Grimme LH Chemosphere 2000, 40:821-828

71. Are veterinary medicines causing environmental risks? Boxall ABA, Kolpin DW, Halling-Sorensen B, Tolls J Environ Sci Technol 2003, I: 286-294

72. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. Holten-lutzhoft HC, Halling – Sorensen B, Jorgensen SE. Arch Environ Con Tox 1999, 36:1-6

73. Experimental toxicity and analysis of bacitracin, Flumequine and sulphadimethoxin in terrestrial and aquatic organisms as a predictive model for ecosystem damage. Brambilla G, Civitareale C, Migliore L. Quim Anal 1994, 13: 573-577

74. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to Daphnia magna. Wollenberger L, Halling-Sorensen B, Kusk KO. Chemosphere 2000, 40: 723-730

75. Acute toxicity of furazolidone on Artemia salina, Daphnia magna and Culex pipiens molestus larvae. Macri A, Stazi AV, Dojmi di Delupis G. Ecotox Environ Safe 1988, 16:90-94

76. Antibiotics of zootechnical use: effects of acute high and low dose contamination on Daphnia magna Straus. Dojmi di Delupis G, Macri A, Civitareale C, Migliore L. Aquat. Toxicol 1994, 22:53-60

77. The toxic effect of the antibiotic metronidazol on aquatic organisms. Lanzky PF, Halling-Sorensen B. Chemosphere 1977, 35:2553-2561

78. The short-term toxicity of some feed additives to different freshwater organisms. Canton JH, Van Esch GJ. B Environ contam Tox 1976, 15:720-725

79. Bacterial antibiotic resistance levels in farmland as a result of treatment with pig slurry. Sengelov G, Agerso Y, Halling-Sorensen B, Baloda SB, Jensen LB. Environm Int 2001, 28:587-595

80. Population responses of target and non-target forest soil organisms to selected biocides. Colinas C, Ingham E, Molina R. Soil Biol Biochem 1994, 26:41-47

81. Effects of oxytetracycline, oxolinic acid and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment. Hansen PK, Lunestad BT, Samuelsen OB Can J. Microbiol 1992, 38:307-

82. Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. Bjorklund H, Rabergh CMI, Bylund G. Aquaculture 1991, 86:359-367

83. Toxicity and bioaccumulation of Sulphadimethixine in Artemia. Migliore L, Brambilla G, Grassitellis A, DelupisG. Int J Teaspoon salt Lake 1993, Res. 2:141-152

84. EU (2002) Council recommendation of 15 November 2001 on the prudent use of antimicrobial agents in human medicine. The Council of the European Union, Brussels, Belgium (2002/77/EC, 5 February)

85. CEEC, 1965 Council Directive 91/414/EEC of 26 January 1965 on the approximation of provisions laid down by Law, Regulation or Administrative Action relating to proprietary products Off J. 22 (09/02/1965), pp 369-373

86. CEEC 1993a. Council Directive 93/39/EEC of 14 June 1993 amending Drectives 65/65/EEC 75/318/EEC and 75/319/EPIC in respect of medicinal products Off J. L214 (24/08/1993), pp. 22-30

87. CEEC, 1993b Concil Regulation (EEC) No 2309/93 of 22 July 1993 laying dawn Community procedures for the authorization and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Agency for the Evaluation of Medical Products. Off. J. L214 (24/08/1993$, pp 1-21)

88. EMEA, 1997. Enviromental risk assessment for veterinary medicinal products other then GMO-containg and immunological products. EMEA/CVMP/055/96.

89. EMEA, 2000. Guideline on environmental impact assessment (EIAS) for veterinary medicinal products phase 1. VICH Topic GL6 (Ecotoxicity Phase I), step 7. EMEA/CVMP/VICH/592/98 final.

90. EDA 1998 Guidance for industry. Enviromental Assessment of Human Drugs and biologics application.FDA CDER/CBER, CMT 6, rev 1. Availiable from http://www.fda.gov/cber/gdlns/environ.pdf

91. EMEA 2001 Draft CPMP discussion paper on environmental risk assessment of non-geneticaly modified organism (non-GMO) containing medicinal products for human use. CPMP/SWP/4447/00 draft corr. Availiable from ttp://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf

92. Environmental risk assessment for new human pharmaceuticals in the European Union according to the draft guidline/discussion paper of January 2001. Jürg Oliver Straub. Toxicology Letters 135 (2002) 231-237

93. Risks Related to the Discharge of Pharmaceuticals in the Environment: Further Research is needed. Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R, Bagnati R, Reitano G, Calamari D. Chapter 31. Pharmaceuticals in the Environment: Klaus Kümmerer, Second Edition

94. Assessing the fate of new and existing chemicals: a five-stage process. Mackay D, Di Guardo A, Paterson S, Kicsi G, Cowan CE. Environ Toxicol chem. 1996 15:1618-1626]

95. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment.Halling-Sorensen B, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Lützhøft HC Jørgensen SE Chemosphere 1998, vol. 36, No.2, pp.357-393