

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Υδατοκαλλιέργειες» -

«Παθολογικά Προβλήματα Εκτρεφόμενων Υδρόβιων Οργανισμών»

ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ ΜΕ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΧΘΥΟΚΟΜΙΑΣ-ΑΛΙΕΙΑΣ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι. ΗΠΕΙΡΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

“ Αβιοτικοί παράγοντες που επιδρούν στην αποδόμηση των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες ”

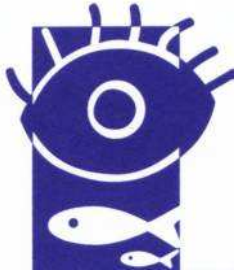
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

Καλόγηρος Παναγιώτης

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Μπέζα Παρασκευή

ΗΓΟΥΜΕΝΙΤΣΑ 2010



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM

“Aquaculture” – “Aquatic Animal Health”

**IN COLLABORATION WITH
THE DEPARTMENT OF AQUACULTURE & FISHERIES, TEI OF EPIRUS**

Thesis:

“Abiotic processes that affect the degradation of antibiotics which are used
in aquaculture”

POSTGRADUATE STUDENT

Kalogiros Panagiotis

SUPERVISOR

Mpeza Paraskeyi

IGOUMENITSA 2010

Αφιερώνεται στην ανιψιά μου

Θεοδώρα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με την ανάπτυξη και εξάπλωση των αντιβιοτικών καταφέραμε να μειώσουμε τους θανάτους από μικροβιακές λοιμώξεις δραματικά. Η πρόοδος υπήρξε τέτοια που κάποιοι επιστήμονες πίστεψαν πριν τρεις δεκαετίες πως ήρθε το τέλος των ασθενειών από λοιμώξεις. Ωστόσο, η υπερβολική και πολλές φορές η ανεύθυνη χρήση των αντιβιοτικών οδήγησε στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών και στη μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα από τα ίδια τα αντιβιοτικά και από μερικούς τοξικούς μεταβολίτες των αντιβιοτικών. Όπως είναι ευρέως γνωστό, περισσότερο από 90 % από ένα αντιβιοτικό καταλήγει αυτούσιο στο περιβάλλον. Τα τελευταία χρόνια πολλές έρευνες έχουν δει το φως της δημοσιότητας, όπου εξετάζουν τη συμπεριφορά των αντιβιοτικών στο περιβάλλον και τι επιδράσεις και ρίσκα φέρνει μαζί της αυτή η είσοδος. Είναι δυνατόν να διακρίνουμε αρκετούς παράγοντες που επιδρούν στην αποδόμηση των αντιβιοτικών. Στην παρούσα εργασία εξετάσαμε τρία αντιβιοτικά, την τριμεθοπρίμη, την τετρακυκλίνη και την οξυτετρακυκλίνη προκειμένου να ελέγξουμε την επίδραση του φωτός σε αυτά. Επίσης, σε ένα επιπλέον πείραμα έγινε χρήση και νιτρικών που προστέθηκαν στην τριμεθοπρίμη προκειμένου να ελεγχθούν και τα νιτρικά αν και κατά πόσο διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην αποδόμηση. Στα πειράματα με την τριμεθοπρίμη τόσο με, όσο και χωρίς νιτρικά δεν παρατηρήθηκε καμία αποδόμηση της ουσίας, αλλά παρέμεινε σταθερή. Στα πειράματα όπου εξετάσαμε την τετρακυκλίνη και την οξυτετρακυκλίνη παρατηρήσαμε μια σημαντική αποδόμηση τους υπό την επίδραση του ηλιακού φωτός σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα που τοποθετήθηκαν σε σκοτάδι και μια γρηγορότερη αποδόμηση σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

ABSTRACT

With the development and widespread application of antibiotics, death from infectious diseases has been reduced dramatically. Progress was so great, that three decades ago, some experts predicted the end of infectious diseases. However, the non responsible use of antibiotics has lead a number of bacteria to be now resistance to antibiotics and as a result in the aquatic environment antibiotics and some toxic metabolites of them can now be found. As it is widely known, more than 90 per cent of any antibiotic which used goes back to the environment. A lot of studies have taken place to analyze the behavior of the antibiotics in the aquatic environment and the risks that it carries. In the degradation of the antibiotics we can recognize a lot of factors that can play a role. In the present study we experiment with three antibiotics, trimethoprim, tetracycline and oxytetracycline, and we see how photolysis affects them. In another experiment we use nitrate as an abiotic factor to see if and how much it can affect the degradation of trimethoprim. The experiments with trimethoprim, both with and without nitrate, have shown no changes or any sign of degradation. In the other two experiments where oxytetracycline and tetracycline were examined for their degradation, we could see that photolysis plays a key role in the degradation of them. Also we recognized faster degradation as the concentration of the antibiotics became lower.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
I. ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....	9
1. Εισαγωγή.....	9
2. Ορισμός αντιβιοτικών.....	10
3. Γενικά στοιχεία για τα αντιβιοτικά.....	10
4. Ταξινόμηση Αντιβιοτικών.....	12
5. Μηχανισμός δράσης των αντιβιοτικών.....	13
6. Χρήση αντιβιοτικών (γενικά).....	15
7. Χρήση αντιβιοτικών στις ιχθυοκαλλιέργειες.....	16
8. Μη ορθή χρήση των αντιβιοτικών.....	17
9. Στοιχεία των εξεταζόμενων αντιβιοτικών Χημική δομή και μηχανισμός δράσης της τριμεθοπρίμης.....	18
9.1 Αντιμικροβιακό φάσμα τριμεθοπρίμης.....	19
9.2 Απορρόφηση της τριμεθοπρίμης.....	19
9.3 Χημική δομή και μηχανισμός δράσης τετρακυκλίνης και οξυτετρακυκλίνης.....	20
9.4 Αντιμικροβιακό φάσμα τετρακυκλινών.....	21
9.5 Απορρόφηση της τετρακυκλίνης και της οξυτετρακυκλίνης.....	22
9.6 Είσοδος και παραμονή των αντιβιοτικών στο περιβάλλον.....	22
9.7 Ευρωπαϊκή Ένωση και νομοθεσία για υπολείμματα αντιβιοτικών στο περιβάλλον.....	24
9.8 Μικροβιακή αντοχή.....	24
10. Αποδόμηση αντιβιοτικών. Διεργασίες αποδόμησης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον.....	25
10.1 Φωτόλυση, υδρόλυση και θερμόλυση.....	26
10.2 Νιτρικά ως συνεργικός παράγοντας στην αποδόμηση.....	27

II. ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....	30
1. Γενικές αρχές υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Εισαγωγή.....	30
2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	31
3. Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.....	31
4. Οργανολογία.....	32
5. Σύστημα διανομής διαλυτών.....	33
6. Μονάδα εισαγωγής δείγματος.....	34
7. Χρωματογραφική στήλη.....	34
8. Σύστημα ανίχνευσης.....	36
9. Χαρακτηριστικά απόδοσης χρωματογραφήματος.....	37
III. ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....	38
1. Πειραματικό μέρος.....	38
Περιοχή μελέτης.....	38
2. Πείραμα 1 ^ο . Επίδραση της φωτόλυσης σε δείγματα τριμεθοπρίμης με διαφορετικές συγκεντρώσεις.....	39
3. Πείραμα 2 ^ο . Επίδραση της φωτόλυσης σε δείγματα τριμεθοπρίμης που προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτρικών.....	40
4. Πείραμα 3 ^ο . Επίδραση της φωτόλυσης στην αποδόμηση της τετρακυκλίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.....	41
5. Πείραμα 4 ^ο . Επίδραση της φωτόλυσης στην αποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.....	43
IV. ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....	45
Αποτελέσματα και συζήτηση.....	45
1. Πείραμα 1 ^ο	45
2. Πείραμα 2 ^ο	47
3. Πείραμα 3 ^ο	49
4. Πείραμα 4 ^ο	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	66
Α. Όργανα και συσκευές.....	66
Β. Αντιδραστήρια – Υλικά.....	66

Γ. Οργανολογία χρωματογραφικού συστήματος.....	67
Δ. Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων.....	67

I. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

1. Εισαγωγή.

Οι περισσότεροι άνθρωποι έχουν συνδυάσει τις διάφορες φαρμακευτικές ουσίες με θεραπεία ασθενειών και ίσως με κάποιες παρενέργειες που μπορεί να έχουν στον οργανισμό από τη χρήση τους. Λίγοι είναι αυτοί που συνδυάζουν τη χρήση φαρμακευτικών ουσιών με μόλυνση του περιβάλλοντος (Umweltbundesamt, 2005).

Αναμφισβήτητη είναι η τεράστια κατανάλωση αντιβιοτικών που γίνεται σε παγκόσμιο επίπεδο τόσο από τους ίδιους τους ανθρώπους όσο και από την χρήση τους στην κτηνοτροφία, στις ιχθυοκαλλιέργειες και στα φυτά. Ανάλογα μεγάλες είναι και οι ποσότητες που εισέρχονται στο περιβάλλον. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, ένας μεγάλος αριθμός από εργασίες έχουν δημοσιευτεί σχετικά με την είσοδο, παραμονή, πεπρωμένο και τελικά την επίδραση στο περιβάλλον των αντιβιοτικών. Υπάρχει ακόμα ένα μεγάλο κενό και άγνοια για την «μοίρα» των αντιβιοτικών στο περιβάλλον, παρά τις συνεχείς έρευνες. Γίνεται όμως φανερό πως παρά τα πλεονεκτήματα των αντιβιοτικών ως θεραπευτικά μέσα, παρατηρούνται στο περιβάλλον και επιδράσεις που μόνο ως πλεονεκτήματα δεν μπορούν να θεωρηθούν.

Ευρήματα δείχνουν πως μετά την είσοδο τους στο περιβάλλον, τα αντιβιοτικά δεν εξαφανίζονται, αλλά είναι παρόντα (Umweltbundesamt,2005). Τα αντιβιοτικά μπορεί να καταλήγουν στον υδροφόρο ορίζοντα και έπειτα στο πόσιμο νερό και ίσως να περνούν στα φυτά και στα ζώα.

Η είσοδος των αντιβιοτικών στο περιβάλλον επιδρά στα βακτήρια που συναντά και είναι δυνατόν να αλλάζει τη χλωρίδα τους (Thiele-Bruhn,2003A). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε στελέχη μικροβίων ιδιαίτερα ανθεκτικών που στην πορεία του χρόνου ενδεχομένως να μην καταπολεμούνται από αντιβιοτικά (BGVV, 1997).

Μετά την είσοδό τους τα αντιβιοτικά δεν παραμένουν σταθερά, αλλά επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες που μπορεί να είναι αβιοτικοί ή βιοτικοί και αποδομούνται. Η αποδόμηση των διαφόρων ομάδων αντιβιοτικών είναι διαφορετική και δεν ακολουθεί πάντα τον ίδιο δρόμο. Κάτω από διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος ακόμα και μεταξύ των ιδίων αντιβιοτικών είναι δυνατόν να διακρίνουμε αξιοσημείωτες διαφορές.

2. Ορισμός αντιβιοτικών.

Αντιμικροβιακά είναι ουσίες φυσικές, ημισυνθετικές ή συνθετικές, οι οποίες προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού μικροοργανισμών ή/και τη θανάτωσή τους. Αντιβιοτικά είναι τα αντιμικροβιακά τα οποία συντίθενται και απεκκρίνονται από μικροοργανισμούς και τα οποία δρουν έναντι άλλων ειδών μικροοργανισμών (Μπατζιάς, 2003).

Ο αρχικός όρος «αντιβιοτικό» περιλαμβάνει οποιαδήποτε ουσία έχει βιολογική δράση έναντι των ζωντανών οργανισμών. Παρ' όλα αυτά ο όρος πλέον χρησιμοποιείται για ουσίες που έχουν δράση αντι-βακτηριακή, αντι-μυκητιακή και αντι-παρασιτική (Gräfe, 1992)

3. Γενικά στοιχεία για τα αντιβιοτικά.

Τα αντιβιοτικά χωρίζονται με βάση την πηγή προέλευσής τους σε τρεις κατηγορίες. Τα «φυσικά αντιβιοτικά» τα οποία είναι χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς, συνήθως βακτήρια και μύκητες, και παρεμποδίζουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Τα πρώτα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην σύγχρονη ιατρική απομονώθηκαν από ζωντανούς οργανισμούς και ήταν για παράδειγμα η ομάδα της πενικιλίνης που παράγεται από τους μύκητες του γένους *Penicillium* ή η στρεπτομυκίνη που προέρχεται από τα βακτήρια του γένους *Streptomyces*. Εκατοντάδες είναι τα φυσικά αντιβιοτικά που έχουν ταυτοποιηθεί και περίπου 100 είναι αυτά που έχουν αναπτυχθεί σε τέτοιο στάδιο, που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών.

Η δεύτερη κατηγορία των αντιβιοτικών είναι τα «ημισυνθετικά», τα οποία προέρχονται από τα φυσικά αντιβιοτικά με μικρές τροποποιήσεις στη δομή τους. Για παράδειγμα, μετά την ανακάλυψη της βενζυλοπενικιλίνης, μια μικρή τροποποίηση στον αυξητικό παράγοντα του *Penicillium* οδήγησε στην εισαγωγή ενός μόνο ατόμου οξυγόνου στην αλυσίδα του φυσικού προϊόντος σχηματίζοντας τη φαινοξυμεθυλοπενικιλίνη. Το παράγωγο αυτό είναι πιο σταθερό σε όξινο περιβάλλον και είναι κατάλληλο για τη χορήγηση από το στόμα (per os). Μετά τη χημική ταυτοποίηση πολλών φυσικών αντιβιοτικών, πλήθος παραγώγων προέκυψαν και συνεχίζουν να ανακαλύπτονται. Άλλο παράδειγμα ημι -

συνθετικών αντιβιοτικών είναι οι πενικιλινάσες, οι οποίες είναι ανθεκτικές, ημι-συνθετικές πενικιλίνες, όπως η ναφκιλλίνη, κλοξακιλλίνη και φλουκλοξακιλλίνη.

Η τρίτη κατηγορία, τα «συνθετικά αντιβιοτικά», είναι προϊόντα χημικής σύνθεσης και χαρακτηρίζονται ως χημειοθεραπευτικά. Η πρόοδος της Οργανικής Χημείας είχε ως αποτέλεσμα πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών να είναι προϊόντα χημικής σύνθεσης. Τα περισσότερα αντιβιοτικά είναι σχετικά μικρά μόρια με μοριακή μάζα που συνήθως δεν ξεπερνάει τα 2000 Da. Η πρώτη ένωση με χημειοθεραπευτική δράση σε κλινική χρήση ήταν το Prontosil ένα αζω - παράγωγο με δομή παραπλήσια των σουλφονιλαμιδίων. Αργότερα αναπτύχθηκαν τα σουλφοναμίδια που μέχρι σήμερα, παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών. Πιο πρόσφατα παραδείγματα συνθετικών αντιβιοτικών είναι τα νιτροφουράνια και οι κινολόνες.

Μερικά αντιβακτηριακά αντιβιοτικά καταστρέφουν τα βακτήρια (βακτηριοκτόνα), ενώ άλλα αποτρέπουν τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου (βακτηριοστατικά). Τα βακτηριοκτόνα είναι ουσίες που σκοτώνουν εκλεκτικά τα βακτήρια, ενώ τα βακτηριοστατικά εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων με βακτηριακή αλληλεπίδραση (πρωτεϊνική παραγωγή, αντιγραφή του DNA, μεταβολισμός των κυττάρων) (<http://wikipedia.org/wiki/Antibiotic>).

Στον άνθρωπο τα αντιβιοτικά χορηγούνται συνήθως από το στόμα. Για σοβαρές καταστάσεις η χορήγηση γίνεται παρεντερικά (ενδομυϊκά, υποδόρια, ενδοφλέβια). Η αποτελεσματικότητα των μεμονωμένων αντιβιοτικών ποικίλει ανάλογα με το σημείο της μόλυνσης, την ικανότητα του αντιβιοτικού να προσεγγίσει το σημείο της μόλυνσης και την δυνατότητα του μικροβίου να αλληλεπιδράσει με το αντιβιοτικό.

Επίσης τα αντιβιοτικά χορηγούνται και για τοπική χρήση, όπως είναι οι σταγόνες για τα μάτια ή και σε μορφή αλοιφής.

Στα ψάρια η χορήγηση των αντιβιοτικών γίνεται είτε με την τροφή είτε με λουτρά στα οποία υποβάλλονται.

Τα τελευταία χρόνια τρεις νέες κατηγορίες αντιβιοτικών έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται σε κλινικό επίπεδο. Ύστερα από ένα κενό 40 χρόνων ανακαλύφθηκαν οι τρεις νέες κατηγορίες αντιβιοτικών: α) τα κυκλικά λιποπεπτίδια (όπως η δαπρομυκίνη), β) οι γλυκυλοκυκλίνες (όπως τιγκεκυκλίνη) και γ) οι οξαζολιδινόνες (όπως το λινεζολίδη). Η τιγκεκυκλίνη είναι ευρέως φάσματος

αντιβιοτικό, ενώ τα άλλα δύο χρησιμοποιούνται έναντι των Gram-θετικών μολύνσεων.

Οι καινούριες αυτές κατηγορίες αντιβιοτικών είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικές, αφού μπορούν να αντιμετωπίσουν τα αναπτυσσόμενα βακτήρια που αντιδρούν στη δράση των υπαρχόντων αντιβιοτικών (EMEA , 1999)

4. Ταξινόμηση Αντιβιοτικών.

Τα αντιμικροβιακά φάρμακα ταξινομούνται με βάση το αντιμικροβιακό φάσμα τους, τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους και με βάση το μηχανισμό δράσης τους (Μπατζιάς, 2003)

Τα αντιβακτηριακά αντιβιοτικά ταξινομούνται με βάση το αντιμικροβιακό φάσμα τους: «στα στενού φάσματος αντιβιοτικά» (narrow-spectrum) που επιδρούν σε συγκεκριμένου τύπου βακτήρια, όπως είναι τα Gram - αρνητικά και τα Gram - αρνητικά και τα Gram - θετικά βακτήρια, «στα ευρέος φάσματος» (broad spectrum), που δρουν αποτελεσματικά σε μεγαλύτερο εύρος βακτηρίων, και στα ενδιάμεσου «αντιμικροβιακού φάσματος».

Με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες σε:

- όξινου ή βασικού χαρακτήρα
- λιπόφιλα ή υδρόφιλα
- οργανικά ή ανόργανα

Συνήθως όμως, η ταξινόμηση των αντιβιοτικών γίνεται με βάση το μηχανισμό δράσης τους. Έτσι οι κυριότερες κατηγορίες αντιβιοτικών είναι οι εξής:

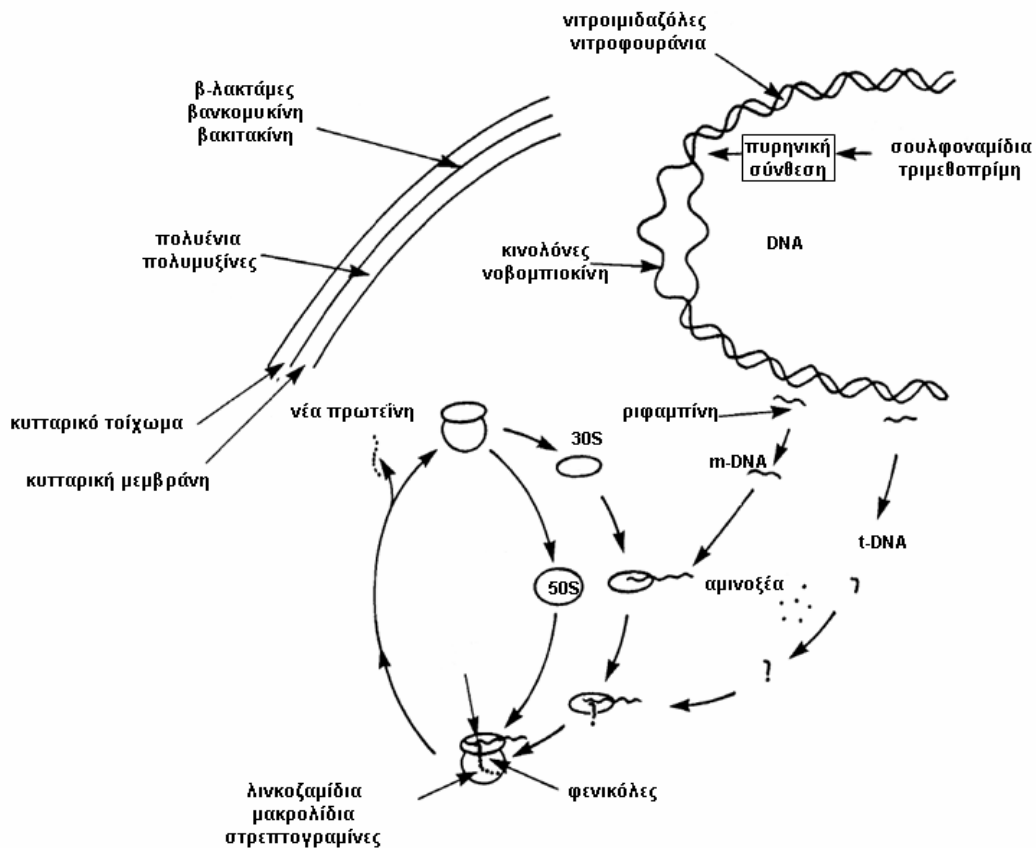
- Αμινογλυκοσίδες
- Ανσαμυκίνη
- Καρμπασεφέμες
- Καρβαπενέμες
- Κεφαλοσπορίνες
- Κινολόνες
- Μακρολίδια
- Μονοβακτάμες
- Πενικιλίνες
- Πολυπεπτίδια
- Σουλφοναμίδια
- Τετρακυκλίνες κ.ά.

5. Μηχανισμός δράσης των αντιβιοτικών.

Τα αντιβιοτικά είναι αντιβακτηριακά φάρμακα που παρεμβάλλονται σε δομές ή λειτουργίες απαραίτητες για την επιβίωση ή ανάπτυξη των βακτηρίων, χωρίς να προκαλούν βλάβες στον ξενιστή. Η δράση τους μπορεί να είναι βακτηριοκτόνος ή βακτηριοστατική, οπότε εμποδίζει την περαιτέρω ανάπτυξή τους. (Walsh, 2003).

Οι κυριότεροι μηχανισμοί δράσης τους που περιγράφονται είναι οι εξής :

- Αναστέλλουν τη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Αντιβιοτικά με τη συγκεκριμένη δράση είναι οι β-λακτάμες (πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες) και η βανκομυκίνη, οι οποίες αναστέλλουν τη σύνθεση της τρανσπεπτιδάσης. Τον ίδιο μηχανισμό δράσης έχει και η βακιτρακίνη, της οποίας η δράση εστιάζεται στην αναστολή της μεταφοράς συστατικών από τα κυτταρικά τοιχώματα, μέσω των μεταφορέων.
- Καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες, όπως η πολυμυξίνη Β η οποία συμπλέκεται με την κυτταρική μεμβράνη και οδηγεί στην καταστροφή της.
- Αναστέλλουν τη σύνθεση του νουκλεϊνικού οξέος. Αντιβιοτικά με τη συγκεκριμένη δράση είναι οι κινολόνες, όπως το ναλιδιξικό οξύ και η κiproφλοξακίνη οι οποίες συμπλέκονται με τη DNA - γυράση. Επίσης η αζιθρομυκίνη παρεμποδίζει την ανάστροφη αντιγραφή των ρέτρο – ιών (HIV-1).
- Παρεμποδίζουν την αντιγραφή, όπως η ριφαμπικίνη η οποία συμπλέκεται με την RNA - πολυμεράση
- Αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση (συνήθως τα βακτηριοστατικά αντιβιοτικά). Αντιβιοτικά με συγκεκριμένη δράση είναι οι αμινογλυκοσίδες, όπως η στρεπτομυκίνη και η νεομυκίνη και οι τετρακυκλίνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν με την υπομονάδα 30S, η χλωραμφαινικόλη, με σημαντικά τοξικές παρενέργειες, που χρησιμοποιείται μόνο σε περιπτώσεις που δε μπορούν να δράσουν άλλες ουσίες και τα μακρολίδια, όπως η ερυθρομυκίνη, που αλληλεπιδρούν με την υπομονάδα 50S.



(Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης των αντιβιοτικών από Χριστοδούλου, 2008)

- Δρουν ως αντιμεταβολίτες (ανάλογα μεταβολιτών), προκαλώντας ανταγωνιστική αναστολή των μεταβολικών ενζύμων και μπλοκάρουν την ολοκληρωτική βιοσύνθεση ουσιαστικών συστατικών. Για παράδειγμα τα σουλφοναμίδια αναστέλλουν τη σύνθεση του φολικού οξέος, ενώ η τριμεθοπρίμη παρεμποδίζει τη σύνθεση του φολικού οξέος (EMEA, 1999).

6. Χρήση αντιβιοτικών (γενικά).

Τα αντιβιοτικά είναι η πιο διαδεδομένη και σημαντική κατηγορία φαρμακευτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται. Η χρήση τους δεν περιορίζεται μόνο στην ιατρική του ανθρώπου αλλά και στην κτηνιατρική, στις ιχθυοκαλλιέργειες, στην εκτροφή μελισσών καθώς και στην γεωργία (Alexy, 2003)

Στην ιατρική του ανθρώπου χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση μικροβιακών λοιμώξεων. Και σε αντίθεση με την κοινή γνώμη που έχει την εντύπωση πως η κύρια κατανάλωση αντιβιοτικών γίνεται στα νοσοκομεία έρευνες δείχνουν πως στο Ηνωμένο Βασίλειο 70% της κατανάλωσης γίνεται ιδιωτικά (House of Lords, 1998). Επίσης στις ΗΠΑ και στη Γερμανία 75% γίνεται πάλι ιδιωτικά και μόνο 25% σε νοσοκομεία (Wise 2002, Kümmerer and Henninger, 2003). Στο Όσλο λιγότερο από 10% από τα αντιβιοτικά που περνούν στο περιβάλλον προέρχονται από νοσοκομεία (Thomas et al.,2007).

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τον άνθρωπο είναι νεότερες κατηγορίες (π.χ. φθοροκινολόνες) ή νεότερα φάρμακα της κατηγορίας των β-λακταμών σε σχέση με αυτά που χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική (Bettin,1996).

Στην κτηνιατρική δε χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται μόνο για την καταπολέμηση των μικροβιακών λοιμώξεων, αλλά παλιότερα χρησιμοποιήθηκαν και για την πρόληψη ασθενειών και ως αυξητικοί παράγοντες αφού προστίθονταν στις ζωοτροφές (Alexy, 2003). Οι αλλαγές που έχουν γίνει παγκόσμια στην κτηνοτροφία με τη μαζική εστίαση ζώων οδήγησε στο να χρησιμοποιούνται τεράστιες ποσότητες για την προφύλαξη των ζώων, καθώς είναι πολύ εύκολη και γρήγορη η μετάδοση ενός παθογόνου μικροοργανισμού (Rassow et al.,1996). Για παράδειγμα στην πτηνοτροφία το 90 % των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται και το 50 % στην χοιροτροφία εξυπηρετούν μόνο την πρόληψη ασθενειών.

Όπως αναφέρθηκε στην κτηνιατρική χρησιμοποιούνται παλαιότερα φάρμακα από ότι στην ιατρική. Τα αντιβιοτικά που κυριαρχούν είναι οι τετρακυκλίνες και οι σουλφοναμίδες. Οι τετρακυκλίνες κατέχουν την πρώτη θέση με περίπου 70 % της συνολικής κατανάλωσης αντιβιοτικών και αυτή τη θέση την κατέχουν διότι απαγορεύτηκαν στην δεκαετία του 90 η χλωραμφαινικόλη και τα νιτροφουράνια (Bettin, 1996). Επίσης κάποια αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τα ζώα δε χρησιμοποιούνται και για τον άνθρωπο όπως είναι η ενροφλοξασίνη, η

σπεκτινομυκίνη, η λινκομυκίνη, η τιαμουλίνη, η μαρβοφλοξασίνη, η φλορφαινικόλη κ.α. (Ungemach, 1999b).

Περίπου το 1/3 του συνόλου των αντιβιοτικών που καταναλώνονται από ζώα της Ευρωπαϊκής Ένωσης προορίζονται ως πρόσθετα ζωοτροφών για την επίτευξη γρηγορότερης σωματικής ανάπτυξης και αύξησης του σωματικού βάρους (Ungemach, 1999a). Τα αντιβιοτικά που προστίθενται στις ζωοτροφές αλλάζουν τη μικροχλωρίδα του πεπτικού συστήματος των ζώων και οδηγούν σε μια αύξηση της ενεργητικότητας των πεπτικών ενζύμων και στη συνέχεια αυξάνεται και η όρεξη των ζώων (Alexy, 2003).

Και σε ότι αφορά τον αριθμό των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται είναι γνωστό πως μόνο στη Γερμανία χρησιμοποιούνται περισσότερες από 250 αντιβιοτικές και αντιμυκητιακές ουσίες στην ιατρική και στην κτηνιατρική (Kümmerer and Henninger, 2003).

Επίσης στη γεωργία ένα σημαντικός όγκος αντιβιοτικών χρησιμοποιείται παγκόσμια. Τα κυριότερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται είναι η στρεπτομυκίνη, η χλωραμφαινικόλη, το οξολινικό οξύ (Alexy, 2003). Η παγκόσμια κατανάλωση αντιβιοτικών στη γεωργία υποστηρίζεται πως ξεπερνά αυτή της κατανάλωσης από τα ζώα (Ungemach, 1999b).

Αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ακόμα και στα φίλτρα του καπνίσματος, για το βάψιμο των πλοίων (τετρακυκλίνη, πενικιλίνη) και για την εκτροφή της μέλισσας (Alexy, 2003).

7. Χρήση αντιβιοτικών στις ιχθυοκαλλιέργειες.

Η χρήση των αντιβιοτικών στις ιχθυοκαλλιέργειες ξεκίνησε από το 1946 όταν ο Gutsell αναγνώρισε το δυναμικό και την χρηστικότητα τους στην αντιμετώπιση βακτηριακών νοσημάτων.

Στις ιχθυοκαλλιέργειες στην Ευρώπη χρησιμοποιούνται κυρίως η οξυτετρακυκλίνη, τριμεθοπρίμη, σουλφοναμίδη, φλουμεκίνη, οξολινικό οξύ, φλορφαινικόλη (Weston, 1996 και Hansen et al., 1993). Στην Ιαπωνία και σε άλλα Ασιατικά κράτη γίνεται χρήση αντιβιοτικών που στην Ευρωπαϊκή ένωση έχουν απαγορευτεί (όπως χλωραμφαινικόλη)(Greenpeace, 2001). Στις Η.Π.Α. 3 αντιβιοτικά επιτρέπονται για χρήση στις ιχθυοκαλλιέργειες , η οξυτετρακυκλίνη υδροχλωρική, η σουλφαμεθαξίνη και η ορμεθοπρίμη (Benbrook, 2002).

Τα αντιβιοτικά στα ψάρια χορηγούνται κυρίως με την τροφή και η δοσολογία τους κυμαίνεται από 38 έως 75 mg/kg σωματικού βάρους ανάλογα με τη δραστική ουσία. Η εκτροφή των ψαριών γίνεται σήμερα με μεγάλη ιχθυοπυκνότητα και είναι αδύνατο να παραμεληθεί η χρήση των αντιβιοτικών καθώς ένας παθογόνος παράγοντας μπορεί να προκαλέσει πολύ γρήγορα μεγάλη ζημιά. Ωστόσο είναι αξιοσημείωτο πως τα τελευταία χρόνια η χρήση αντιβιοτικών στις ιχθυοκαλλιέργειες έχει μειωθεί εξαιτίας νέων τεχνικών όπως εμβολιασμοί, συγχρονισμός εγκαταστάσεων και χωρισμός ανάλογα με την ηλικία τους και της τάσης της Ευρωπαϊκής Ένωσης που νομοθετεί ανάλογα (Grave and Nafstad, 1995).

8. Μη ορθή χρήση των αντιβιοτικών.

Μη ορθή χρήση των αντιβιοτικών από τους ανθρώπους, συνήθως σημαίνει λήψη του αντιβιοτικού για χρονικό διάστημα μικρότερο από αυτό που καθορίζεται από την ιατρική συνταγή. Συχνά οι ασθενείς δεν αφήνουν το απαραίτητο χρονικό διάστημα που απαιτείται μεταξύ της χορήγησης του αντιβιοτικού και της εκκαθάρισης του ανθρώπινου οργανισμού από τους μολυσματικούς μικροοργανισμούς. Οι πρακτικές αυτές συχνά οδηγούν στην ανάπτυξη βακτηριακών πληθυσμών με ιδιαίτερη αντοχή στα αντιβιοτικά. Συχνά γίνεται και λανθασμένη χορήγηση των αντιβιοτικών, όπως για παράδειγμα είναι η χρήση αντιβακτηριακών αντιβιοτικών για τη θεραπεία σοβαρών μολύνσεων ή για κάποιο συνηθισμένο κρυολόγημα.

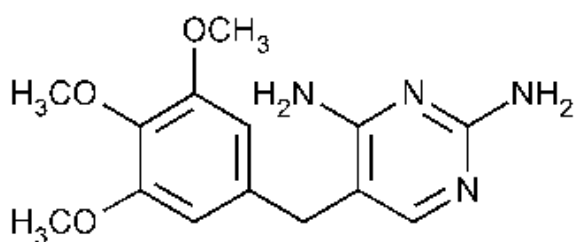
Σοβαρότερες είναι όμως οι επιπτώσεις όταν γίνεται λάθος χρήση των αντιβιοτικών σε ζώα που εκτρέφονται και προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Εκτιμάται ότι πάνω από το 50% των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στην Αμερική δίνονται σε εκτροφές ζώων (π.χ. πουλερικά και χοιρινά κρέατα) απουσία κάποιας ασθένειας. Η χρήση των αντιβιοτικών στην παραγωγή εδώδιμων κρεάτων σχετίζεται άμεσα με το ζήτημα της αντοχής των αντιβιοτικών σε στελέχη βακτηρίων που περιλαμβάνουν τα *Salmonella ssp.*, *Campylobacter ssp.*, *Escherichia coli*. και *Enterococcus ssp.* Αποτελέσματα Ευρωπαϊκών και Αμερικάνικων ερευνών καταλήγουν στο ότι ανθεκτικά βακτήρια προκαλούν μολύνσεις στον άνθρωπο, οι οποίες δε θεραπεύονται με τα συνηθισμένα αντιβιοτικά που συνταγογραφούνται (Χριστοδούλου, 2008).

9. Στοιχεία των εξεταζόμενων αντιβιοτικών. Χημική δομή και μηχανισμός δράσης της τριμεθοπρίμης.

Η τριμεθοπρίμη (TMP) είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό με αντιβακτηριακή και ανθελονοσιακή δράση, που πρωτοπαρήχθη το 1956 ως αποτέλεσμα συστηματικής έρευνας (Gleckman et al., 1979 και Schweitzer et al., 1990).

Η τριμεθοπρίμη διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο σε συνδυασμό με τις σουλφοναμίδες. Πρακτικά χρησιμοποιείται κυρίως με σουλφοναμίδες. Με το συνδυασμό διαφόρων σουλφονιλαμιδίων και τριμεθοπριμών είναι δυνατόν να αναπτυχθεί ένα δυναμικό που αυξάνει την αντιμικροβιακή δραστηριότητα αυτών των ουσιών (Kroger et al., 2002).

Όσον αφορά στη χημική της δομή , πρόκειται για μια διαμινο-τριμεθυλοβενζυλο-πυριμιδίνη (Σχ. 2) που ανήκει στην οικογένεια των διαμινοπυριμιδινών. Οι διαμινοπυριδίνες ανακαλύφθηκαν το 1947 από τον Georg Hitching.



Χημική δομή τριμεθοπρίμης

(Σχ. 2.)

Η τριμεθοπρίμη αναστέλλει το ένζυμο διυδροφυλλική αναγωγάση (DHFR) που καταλύει τη μετατροπή του διυδροφυλλικού σε τετραυδροφυλλικό οξύ. Συγκεκριμένα, δεσμεύεται ανταγωνιστικά στην ίδια θέση με το διυδροφυλλικό οξύ. Το τετραυδροφυλλικό οξύ αποτελεί δότη μεθυλοομάδων για τη μεθυλίωση της ουρακίλης και τη μετατροπή της σε θυμίνη και γενικότερα αποτελεί κύριο παράγοντα των βιοχημικών μονοπατιών σύνθεσης πουρινών, πυριμιδινών, αμινοξέων κλπ. (Hartman,1993). Κατά συνέπεια, αναστολή της παραγωγής του τετραυδροφυλλικού οξέος από την τριμεθοπρίμη παρεμποδίζει την ανάπτυξη και επιβίωση του βακτηριακού κυττάρου, ενώ τα ανθρώπινα ή τα ζωικά κύτταρα δεν

επιηρεάζονται λόγω της πρόσληψης έτοιμου φυλλικού οξέος από το περιβάλλον (Hithching et al., 1973)

Πέρα όμως από την κύρια δράση της τριμεθοπρίμης δηλαδή την αναστολή σύνθεσης τετραυδροφυλλικού οξέος , επιπρόσθετη συνέπεια δράσης της είναι η αύξηση της συγκέντρωσης διυδροφυλλικού οξέος , που οδηγεί σε ενεργοποίηση του μηχανισμού αναδρομής αναστολής της βιοσύνθεσής του, καθώς και σε επαγωγή του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA (Lewin et al.,1991).

9.1 Αντιμικροβιακό φάσμα τριμεθοπρίμης.

Η τριμεθοπρίμη όπως αναφέρθηκε έχει ανθελονοσιακή και αντιμικροβιακή δράση. Είναι δραστική έναντι πολλών Gram θετικών βακτηρίων, όπως σταφυλόκοκκοι (*Staph. Aureus*, *Staph. Epidermidis*) στρεπτόκοκκοι (*Str. pyogenes*, *Str. Pneumoniae*), εντερόκοκοι (*Ent. faecalis*) κορυνοβακτήρια (*Corynebacterium diphtheriae*), λιστέρειες (*Listeria monocytogenes*) και κλωστρήδια (*Clostridium perfringens*).

Επίσης και έναντι των περισσότερων Gram αρνητικών αερόβιων βακτηρίων όπως Εντεροβακτηριακά, *Escherichia coli*, *Klebsesiella spp*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Haemophilus influenza*, *Vibrio cholera*, *Nocardia steroides*, *Chlamydomphila trachomatis*, *Brucella* και *Neisseria* (Zinner et al. 2000). Ενδογενή αντοχή στην τριμεθοπρίμη παρουσιάζουν η ωχρά σπειροχαίτη, τα *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas* και τα αναερόβια βακτήρια.

Η τριμεθοπρίμη μόνη ή σε συνδυασμό συνήθως με σουλφοναμίδες, χρησιμοποιείται ειδικότερα για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος, του αναπνευστικού, του γαστρεντερικού, σε αφροδίσια νοσήματα, λοιμώξεις των χοληφόρων οδών, οστεομυελίτιδες κλπ.

9.2 Απορρόφηση της τριμεθοπρίμης.

Έπειτα από του στόματος χορήγηση της τριμεθοπρίμης το 50 έως 80 % της ουσίας αποβάλλεται χωρίς καμία μεταβολή στο περιβάλλον (Hirsch et al.1999). Τόσο όμως η μητρική ουσία όσο και οι μεταβολίτες της αποβάλλονται από τους νεφρούς. Σε ότι αφορά το ποσοστό της ουσίας που αποβάλλεται από τα ούρα

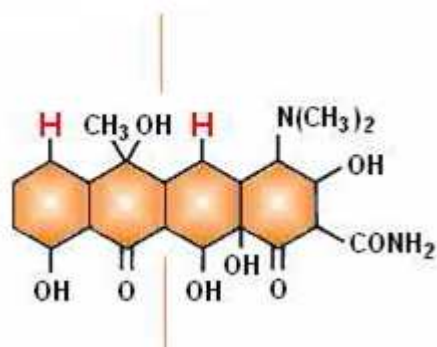
χοίρων και βοοειδών μαζί με τους μεταβολίτες της φτάνει το 65% (Halling Sörensen et al. 2001).

9.3 Χημική δομή και μηχανισμός δράσης τετρακυκλίνης και οξυτετρακυκλίνης.

Ο βασικός χημικός πυρήνας των τετρακυκλινών είναι παράγωγο του ναφθαλενίου και αποτελείται από τέσσερις δακτυλίους , γι' αυτό και ονομάστηκε με αυτόν τον τρόπο. Η ονομασία τετρακυκλίνη ανήκει στην ξεχωριστή ημισυνθετική ουσία τετρακυκλίνη. (Μουζούρας, 1996).

Οι πρώτες φυσικές τετρακυκλίνες ήταν η οξυτετρακυκλίνη και η χλωροτετρακυκλίνη. Είναι κρυσταλλικές , αμφοτερικές ενώσεις , λίγο διαλυτές στο νερό, αλλά σχηματίζουν διαλυτά άλατα (με υδροχλωρικό οξύ και νάτριο). Οι τετρακυκλίνες γενικά εμφανίζουν μεγάλη συνδεσιμότητα με κατιόντα δι- ή τριπολικά όπως Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} και σχηματίζουν χηλικές ενώσεις που είναι δύσκολα απορροφήσιμες. Οι κυριότεροι μεταβολίτες είναι: 4 επι –τετρακυκλίνη, επι-χλωροτετρακυκλίνη, ισο-χλωροτετρακυκλίνη (με ελάχιστη ή μηδαμινή αντιμικροβιακή δράση) όπως και ανυδρο-τετρακυκλίνη και επι-ανυδρο-τετρακυκλίνη (που είναι δραστικές έναντι μικροβίων αλλά περισσότερο τοξικές από τις μητρικές τους ενώσεις που κατάγονται) (Sattelberger et al., 2005).

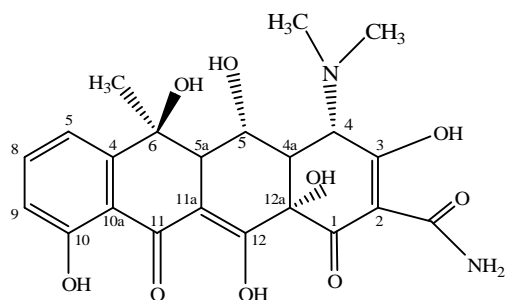
Παρόλο που η οξυτετρακυκλίνη και η χλωροτετρακυκλίνη είναι παράγωγα της τετρακυκλίνης ωστόσο η τετρακυκλίνη ανακαλύφθηκε αργότερα απ' αυτές, όταν δύο ανεξάρτητοι ερευνητές κατέληξαν σ' αυτήν ύστερα από αποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης και της χλωροτετρακυκλίνης. Σπάνια χρησιμοποιείται στην κτηνιατρική. (Μουζούρας, 1996).



(Σχήμα 3 Χημική δομή τετρακυκλίνης)

Η οξυτετρακυκλίνη απομονώθηκε από τον στρεπτομύκητα του εδάφους *Streptomyces rimosus* και γι' αυτό πήρε και την εμπορική ονομασία Terramycin

(Terra = έδαφος). (Μουζούρας , 1996). Αποτελεί ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά στην κτηνιατρική, ενώ στις ιχθυοκαλλιέργειες αποτελεί το πιο διαδεδομένο και πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό ως θεραπευτικό μέσο.



(Σχήμα 4. Χημική δομή οξυτετρακυκλίνης)

Στην ιατρική του ανθρώπου χρησιμοποιούνται πλέον μόνο η δοξυκυκλίνη και η μινοκυκλίνη εξαιτίας της ανθεκτικότητας των μικροβίων στα άλλα αντιβιοτικά αυτής της οικογένειας, ενώ στην κτηνιατρική η χρήση των τετρακυκλινών είναι πιο διαδεδομένη (Radka et al.,2003)

Οι τετρακυκλίνες εμποδίζουν τη ριβοσωματική πρωτεϊνοσύνθεση των μικροβίων, καθώς συνδέονται με τα ριβοσώματα και τα μικρόβια αντιδρούν με ιδιαίτερη ευαισθησία σε αυτό το μηχανισμό. Συγκεκριμένα συνδέονται με τους υποδοχείς της 30 S υποομάδας των ριβοσωμάτων του μικροβιακού κυττάρου με αποτέλεσμα να ανακόπτεται η σύνθεση του αμινοακέτυλο tRNA με την ενεργό πλευρά του συμπλέγματος mRNA . Διακόπτεται έτσι η σύνθεση νέων αμινοξέων στην υπό σύνθεση πεπτιδική αλυσίδα. Είναι όπως αναφέρθηκε τυπικοί εκπρόσωποι της κατηγορίας των βακτηριοστατικών και θεωρούνται ευρέως φάσματος αντιβιοτικά (Satellberger et al., 2005).

9.4 Αντιμικροβιακό φάσμα τετρακυκλινών.

Οι τετρακυκλίνες είναι βακτηριοστατικά αντιμικροβιακά ευρέος φάσματος. Το αντιμικροβιακό τους φάσμα περιλαμβάνει κατά Gram θετικά και αρνητικά βακτηρίδια. Είναι δραστικές έναντι μερικών παθογόνων μικροοργανισμών, που είναι ανθεκτικοί σε άλλα αντιμικροβιακά, όπως οι ρικέτσιες και μερικοί μεγαλοϊοί (όπως π.χ. οι ψιτακοϊοί) καθώς επίσης έναντι των μυκοπλασμάτων, των σπειροχαιτών (*Leptospira*, *Treponema*) και των ακτινομυκήτων. Επίσης οι μεγάλες

οι δόσεις είναι δραστικές έναντι μερικών παθογόνων πρωτοζωικών οργανισμών, όπως το *Anaplasma marginale* που προκαλεί την αναπλάσμωση.

Μεγάλος αριθμός μικροβιακών στελεχών αναπτύσσει εύκολα ανθεκτικά στελέχη έναντι των τετρακυκλινών. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι: *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aerobacter aerogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *Chlamydia psittaci*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*, *Klebsiella pneumoniae* και β-αιμολυτικοί στρεπτόκοκοι. Η αντοχή αυτή αναπτύσσεται με μηχανισμούς που παρεμποδίζουν την είσοδο των τετρακυκλινών στο κυτταρόπλασμα ή με ένζυμα που η σύνθεση τους κωδικοποιείται στους πλασμιδιακούς γόνους των μικροβίων. (Μουζούρας , 1996).

Είναι δραστική έναντι βακτηρίων Gram + όπως στρεπτόκοκοι και πνευμονόκοκοι, έναντι Gram – όπως *Neisseria*, *Bordetella*, *Campylobacter* αλλά και μυκοπλάσματα, χλαμύδιες , ρικέτσιες και σπειροχέτες. (Radka et al., 2003).

9.5 Απορρόφηση της τετρακυκλίνης και της οξυτετρακυκλίνης.

Η τετρακυκλίνη τόσο στο ανθρώπινο σώμα όσο και σε αυτό των ζώων μεταβολίζεται ελάχιστα και αποβάλλεται από τα ούρα και τα κόπρανα σε ποσοστό 80 με 90% στον άνθρωπο (Kuhne et al. 2000) και έως 72% στους χοίρους.

Η οξυτετρακυκλίνη σύμφωνα με τους Satellberger et al (2005) αποβάλλεται έως 90% αυτούσια, στη δραστική μορφή της από τα κόπρανα και τα ούρα στο περιβάλλον

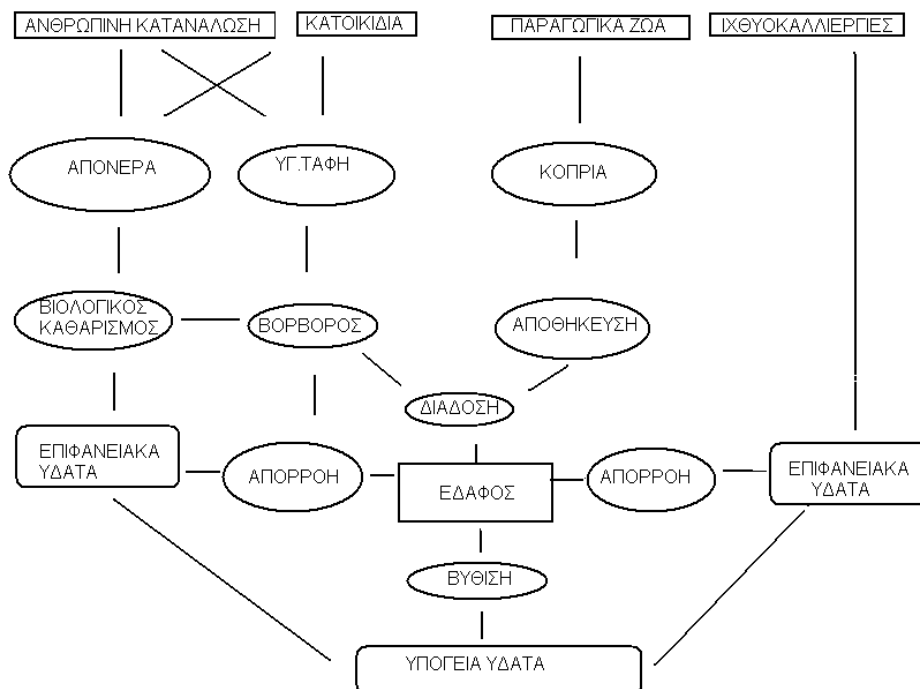
9.6 Είσοδος και παραμονή των αντιβιοτικών στο περιβάλλον.

Μετά τη χρήση τους οι δραστικές ουσίες καθώς και οι μεταβολίτες τους καταλήγουν και εισδύουν με διαφορετικούς τρόπους στο περιβάλλον (Sommer,2002). Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή το 90 % των αντιβιοτικών που εισέρχονται σε έναν οργανισμό περνά χωρίς να μεταβολιστεί στο περιβάλλον. Η είσοδος των αντιβιοτικών στο περιβάλλον από την χρήση τους στην κτηνοτροφία διαφέρει αρκετά από αυτήν που συμβαίνει από την ανθρώπινη χρήση. Αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τον άνθρωπο καταλήγουν στο περιβάλλον από τα απόνερα των σπιτιών και των νοσοκομείων και έπειτα με τους υπονόμους στα επιφανειακά ύδατα και τελικά καταλήγουν στα υπόγεια ύδατα. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία πάνε στο έδαφος όπου είτε

με επιφανειακά ύδατα παρασύρονται και απολήγουν στα υπόγεια νερά ή κατακάθονται στην κοπριά και έπειτα αφού χρησιμοποιηθούν ως κοπριά καταλήγουν στο έδαφος και τελικά στα υπόγεια ύδατα (σχήμα 5).

Ένας άλλος άμεσος τρόπος που αντιβιοτικά εισδύουν άμεσα στο περιβάλλον χωρίς καν να περάσουν από έναν οργανισμό είναι με τη χρήση τους στις ιχθυοκαλλιέργειες (Feuerpfel et al .1999). Σε αυτή την περίπτωση τα αντιβιοτικά είτε παρέχονται με την τροφή (και ένα μεγάλο μέρος βυθίζεται αμέσως) είτε δίνονται απευθείας στο νερό.

Επίσης δεν θα έπρεπε να παραβλέψουμε τις τεράστιες ποσότητες από αντιβιοτικά που τελικά δεν χρησιμοποιούνται και διαμέσου των σκουπιδιών καταλήγουν στο περιβάλλον από τις χωματερές όπου δεν καταστρέφονται (Schneider et al 2001).



(Σχήμα 5. Σχεδιάγραμμα για την είσοδο των αντιβιοτικών στο περιβάλλον από Arge Elbe, 2003)

Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών φαίνεται πως βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα απόνερα των νοσοκομείων, ενώ στις μικρότερες συγκεντρώσεις στους υπονόμους των δημόσιων κτιρίων (Xu et al., 2007) και η

επιβάρυνση που δέχεται το περιβάλλον είναι σαφώς μεγαλύτερη από περιοχές όπου υπάρχει αυξημένη κατανάλωση αντιβιοτικών.

Τέλος πρέπει να αναφερθεί πως δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα ακόμα για την παρουσία αντιβιοτικών υπολειμμάτων στο πόσιμο νερό. Υπάρχει αναφορά πως έχουν βρεθεί αντιβιοτικά στο πόσιμο νερό (Ye et al., 2007)

9.7 Ευρωπαϊκή Ένωση και νομοθεσία για υπολείμματα αντιβιοτικών στο περιβάλλον.

Το 1965 ήταν η πρώτη χρονιά που τέθηκαν οι πρώτοι όροι στην Ευρώπη για την ορθή χρήση των φαρμάκων (Διάταξη 65/65/EG) (Umweltbundesamt 2005). Επιτρεπτά όρια για υπολείμματα αντιβιοτικών στο περιβάλλον τέθηκαν στην Ευρωπαϊκή Ένωση από το 1998. Αφορμή για αυτό στάθηκε η διάταξη N.2309/93 από τις 22 Ιουλίου 1993 (EWG, 1993). Η διάταξη απαιτούσε εκτός από την δημιουργία μιας ενιαίας επιτροπής για την έγκριση των φαρμάκων και ίδρυση μιας Ευρωπαϊκής επιτροπής για την αξιολόγηση των φαρμάκων. Αυτή η ευρωπαϊκή επιτροπή αξιολόγησης των φαρμάκων (EMEA – European Agency for the Evaluation of Medicinal Products) που ιδρύθηκε το 1995, μαζί με την επιτροπή για κτηνιατρικά φάρμακα (CVMP – Committee for Veterinary Medicinal Products) ιδρύθηκαν το 1995 (Rönnefahrt et al., 2002). Επίσης το 1996 ιδρύθηκε η VICH (International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Autorization of Veterinary Medicinal Products) η οποία το 2000 και το 2004 εξέδωσε σε δυο φάσεις μια λίστα αξιολόγησης των κτηνιατρικών φαρμάκων (Rönnefahrt et al., 2002).

9.8 Μικροβιακή αντοχή.

Για να χαρακτηρίσουμε κάποιον μικροοργανισμό ως ανθεκτικό σε κάποιο αντιβιοτικό τότε θα πρέπει κάτω από συνθήκες θεραπευτικής δόσης του αντιβιοτικού να παραμένει η ικανότητα των μικροοργανισμών να πολλαπλασιάζονται και να επιβιώνουν (Hahn und Miksit 1999). Εάν ένα μικρό υποσύνολο του πληθυσμού αυτού επιβιώσει της θεραπείας, θα αρχίσει να πολλαπλασιάζεται και η ευαισθησία του νέου αυτού πληθυσμού στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό θα είναι κατά μέσο όρο πολύ χαμηλότερη από αυτή του αρχικού πληθυσμού, αφού ο νέος πληθυσμός θα έχει προέλθει από στελέχη που επιβίωσαν μετά την αρχική θεραπεία. Η επιβίωση του πληθυσμού συχνά οδηγεί σε

κληρονομικότητα της αντοχής στις συγκεκριμένες ενώσεις, γεγονός που συναντάται πιο συχνά στον αρχικό πληθυσμό.

Καθώς τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται με στόχο να δράσουν ενάντια σε μικροοργανισμούς, κατά την είσοδο και παραμονή τους στο περιβάλλον παρατηρείται αυτή η ανεπιθύμητη ενέργεια τόσο στους μικροοργανισμούς του εδάφους, όσο και σε αυτούς του νερού. Κυρίως σε εκείνους τους μικροοργανισμούς (μικρόβια) που ζουν στους βιολογικούς καθαρισμούς δρουν τα αντιβιοτικά. Εκεί ακριβώς είναι δυνατόν να γίνει μια αλλαγή του πληθυσμού των μικροβίων στη δυναμικότητα και να αναπτυχθούν ιδιαίτερα ανθεκτικά μικρόβια που μπορούν στη συνέχεια να εισβάλουν στο περιβάλλον (Feuerpfeil et al. 1999). Και σε αυτό ακριβώς το σημείο υπάρχει σοβαρός κίνδυνος καθώς η είσοδος αυτών των ανθεκτικών μικροβίων στο περιβάλλον, αποτελεί μεγάλη δυσκολία στην καταπολέμησή τους (Feuerpfeil et al. 1999).

Η ανάπτυξη της αντοχής έναντι των αντιβιοτικών έχει εξελιχθεί σε σημαντικό πρόβλημα των αναπτυγμένων και των υποανάπτυκτων κρατών. Από το 1984 ο μισός πληθυσμός που νοσούσε από φυματίωση, στην Αμερική, περιελάμβανε φορείς ενός στελέχους ιδιαίτερα ανθεκτικού στα συνηθισμένα αντιβιοτικά. Αυτό οδήγησε στη χρήση καινούργιων και ακριβότερων συστατικών, τα οποία με τη σειρά τους γίνονται επίσης ανθεκτικά και έτσι η σύγχρονη επιστημονική κοινότητα οδηγείται σε ένα συνεχή αγώνα ανακάλυψης νέων και διαφορετικών αντιβιοτικών για να μειώνεται το κίνδυνος της εξάπλωσης των μολύνσεων.

Το πρόβλημα της ανάπτυξης στην αντοχή των αντιβιοτικών επιδεινώνεται όταν γίνεται λανθασμένη χρήση των αντιβιοτικών, όπως είναι η χρήση του για την αντιμετώπιση συνηθισμένων κρυολογημάτων ή ασθένειες ιογενούς προέλευσης, περιπτώσεις στις οποίες δεν έχουν κανένα θετικό αποτέλεσμα. Η κατάσταση επιδεινώνεται όταν τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ασύστολα για την προφύλαξη και όχι για την θεραπεία των ζώων που προορίζονται (<http://wikipedia.org/wiki/Antibiotic>).

10. Αποδόμηση αντιβιοτικών. Διεργασίες αποδόμησης των αντιβιοτικών στο περιβάλλον.

Στοιχεία για την αστάθεια των αντιμικροβιακών είναι δυνατόν να αναζητηθούν στην ιατρική και στην φαρμακευτική βιβλιογραφία. Ωστόσο γίνεται

φανερό πως οι διαδικασίες αποδόμησης των αντιβιοτικών είναι διαφορετικές κάτω από διαφορετικές συνθήκες pH ή σκληρότητα του νερού (Werner et al. 2006) ενώ και η τοποθεσία, η εποχή και η συγκέντρωση της ουσίας μπορεί να επηρεάζουν.

Με την είσοδο ενός αντιβιοτικού στο περιβάλλον είναι δυνατόν αυτό να υποστεί διάφορες φυσικές και χημικές (αβιοτικές) μεταβολές καθώς επίσης και βιολογικές (βιοτικές) διεργασίες που μπορούν να οδηγήσουν στην αποδόμηση του.

Από τις σημαντικότερες αβιοτικές διεργασίες που συναντώνται είναι η υδρόλυση, η φωτόλυση, η θερμόλυση ενώ από τις βιοτικές είναι αυτές που προκαλούνται από μικροοργανισμούς όπως μικρόβια, μύκητες, άλγη κλπ. Στα αντιβιοτικά βέβαια όπως γίνεται γνωστό από πλήθος δημοσιευμένων εργασιών φαίνεται πως δεν βιοδιασπώνται. (Hirsch et al., 1999, Richardson and Bowron, 1985, Wiethan et al., 2000, Al-Ahmad et al. 1999, Kümmerer et al., 2000, Ingerslev et al., 2001, Ingerslev and Halling-Sørensen, 2001, Thiele-Bruhn, 2003, Alexy et al., 2003, Alexy et al., 2004, Gartiser et al., 2007a,b).

10.1 Φωτόλυση, υδρόλυση και θερμόλυση.

Στην παρούσα εργασία μας απασχόλησε η φωτόλυση κατά πρώτο βαθμό ως αβιοτικός παράγοντας καθώς είναι ο παράγοντας που κυριαρχεί στις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα επιφανειακά στρώματα της υδρόσφαιρας (περίπου 70 % της επιφάνειας της γης). Έτσι τα επιφανειακά στρώματα των υδάτινων συστημάτων όπως τα γλυκά νερά των ποταμών και λιμνών, τα θαλάσσια καθώς και το περιβάλλον των εκβολών όπου γλυκό και αλμυρό νερό συνυπάρχουν και δημιουργούν ξεχωριστό σύστημα (Σακκάς, 2002).

Ανάλογα βέβαια με την ένταση του ηλιακού φωτός παρατηρούνται διαφορετικές φωτοχημικές διεργασίες και δύναται να διακρίνουμε δυο κατηγορίες φωτόλυσης, την άμεση και την έμμεση. Η σημασία και το εύρος της άμεσης και της έμμεσης φωτόλυσης των αντιβιοτικών στο υδάτινο οικοσύστημα είναι ακόμα ευρέως άγνωστο. Είναι σημαντικό όμως να τονιστεί ότι μη πλήρη φωτομεταφορά και φωτοαποδόμηση μπορεί να οδηγήσει σε τοξικά σύμπλοκα , άλλα όχι απαραίτητα. (Coqgor et al.,2006, Arslan-Alaton and Caglayan, 2006, Gonzales et al., 2007, Iksender et al., 2007) . Η δραστηριότητα όμως της φωτόλυσης εξαρτάται από την ένταση του φωτός , την εποχή του έτους και από την περιοχή του φάσματος του ηλιακού φωτός (Hu and Coats, 2007).

Ορισμένα αντιβιοτικά εξαιτίας της χημικής δομής τους τείνουν να είναι περισσότερα ευαίσθητα στην φωτόλυση ή και στην θερμόλυση. Με την επιρροή αυτών των παραγόντων χάνουν τη χημική δομή τους και συνεπώς και την δραστηρότητα τους.

Είναι αυτονόητο όμως και πως όταν η μεταφορά του φωτός εμποδίζεται όπως σε θολά νερά ποταμών ή σε σκοτεινά από ακαθαρσίες ή αν επισκιάζονται από δέντρα η φωτοαποδόμηση δεν λαμβάνει χώρα ή είναι πολλή περιορισμένη (Kallenborn et al., 1998).

Η φωτοαποδόμηση λοιπόν λαμβάνει κυρίως χώρα σε επιφανειακά ύδατα. Ο Samouelsen (1989) για παράδειγμα εξέτασε το ποσοστό της οξυτετρακυκλίνης που επηρεάζεται από το φως σε θαλασσινό νερό καθώς και στο ίζημα. Η αντιμικροβιακή ουσία αποδείχτηκε πως παρέμεινε περισσότερο σταθερή στο ίζημα παρά στο θαλασσινό νερό. Καθώς λοιπόν δεν είναι άλλος μηχανισμός γνωστός αποσύνθεσης για αυτό το αντιβιοτικό, η ουσία παραμένει στο ίζημα για πολύ καιρό, όπως απέδειξαν οι Lunestad and Goksöyr (1990). Επίσης σε έρευνες η αμοξικιλίνη που είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αντιβιοτικό στον άνθρωπο στη Γερμανία (από Kümmerer και Henninger 2003), σε αποχετεύσεις βρέθηκαν συγκριτικά ελάχιστες ποσότητες από τις χρησιμοποιούμενες (Färber et al.2004).

Ωστόσο, και ένας άλλος αβιοτικός παράγοντας είναι η υδρόλυση όπου όπως παρατηρούν κάποιοι μελετητές (Halling-Sörensen 2000) η οξυτετρακυκλίνη και οι β-λακτάμες επηρεάζονται σημαντικά. Οι φλουοκινολόνες είναι ευαίσθητες στην υδρόλυση και στην αυξημένη θερμοκρασία και ανθεκτικές στην υπεριώδη ακτινοβολία. (Viola et al., 2004, Turiel et al., 2005b, Thiele-Bruhn, 2003, Burhenne et al., 1997a).

10.2 Νιτρικά ως συνεργικός παράγοντας στην αποδόμηση.

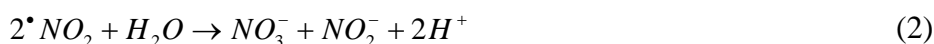
Η κατανάλωση των αντιβιοτικών γίνεται είτε από τα ζώα είτε από τους ανθρώπους και η αποβολή τους γίνεται με τα ούρα και συνεπώς συνδέεται άμεσα η παρουσία των αντιβιοτικών με τα νιτρικά. Η παρουσία των νιτρικών αποτελούν έναν σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει την αποδόμηση των αντιβιοτικών. Η παρουσία του στα απόνερα τόσο των ζώων όσο και των ανθρώπων είναι ένα γεγονός που παλαιότερα δεν εκτιμήθηκε ιδιαίτερα. Ωστόσο θα ήταν παράλογο να τον αγνοήσουμε ως παράγοντα καθώς και μόνο στα απόνερα ενός σπιτιού η συγκέντρωση των νιτρικών είναι κατά μέσο όρο 30-50 mg/l και μπορεί να

βρίσκεται με τη μορφή αμμωνίας, ούρων ή άλλων οργανικών ουσιών. Η επιρροή που έχουν συνίσταται κυρίως στη φύση τους καθώς είναι οξέα και μειώνουν το pH του νερού ή δημιουργώντας συνθήκες ευτροφισμού (Alexy, 2003).

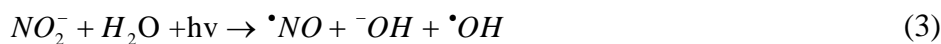
Τα νιτρικά που τυχόν υπάρχουν στα νερά φωτολύονται και παράγουν ρίζες διοξειδίου του αζώτου $-NO_2$ και υδροξυλίου $-OH$ σύμφωνα με την αντίδραση (1)



Οι παραγόμενες ρίζες είναι ένας εξαιρετικά δραστικός παράγοντας και προκαλεί την απόσπαση ατόμων υδρογόνου από οποιοδήποτε οργανικό τύπο που περιέχεται στο διάλυμα των νιτρικών. Οι ρίζες $-NO_2$ μπορεί να προκαλέσουν την νιτροποίηση τυχόν συνυπαρχόντων αρωματικών δακτυλίων. Ένα άλλο προϊόν της φωτόλυσης των νιτρικών είναι τα ιόντα των νιτρωδών τα οποία μπορεί να παραχθούν σύμφωνα με την αντίδραση (2)



Η κβαντική απόδοση της παραγωγής νιτρωδών αυξάνει σε αλκαλικά pH. Παράλληλα τα νιτρώδη επανοξειδώνονται από τις παραγόμενες ρίζες υδροξυλίου ή φωτολύονται σύμφωνα με την εξίσωση (3)



(Minero et al., 2006)

Σε αερόβιες συνθήκες το αμμώνιο μετατρέπεται σε νιτρώδη και έπειτα σε νιτρικά. Υπεύθυνη για τη νιτροποίηση αυτή είναι μια ομάδα νιτροποιητών βακτηρίων που είναι Gram - αερόβια και ζουν στο έδαφος και σε υδάτινα συστήματα (Singleton 1995). Τα μικρόβια αυτά είναι τα *Nitrosomonas* και *Nitrobacter*. Τα μικρόβια αυτά δεν χρειάζονται οργανική ύλη για να πολλαπλασιαστούν και να επιβιώσουν και η ενέργεια τους που προέρχεται από την οξείδωση του ανόργανου αμμωνίου είναι ελάχιστη σε σχέση με αυτή που χρησιμοποιούν ετερότροφοι οργανισμοί. Έτσι οι νιτροποιητές μικρόβια έχουν πολύ μεγάλα διαστήματα μεταξύ των γενεών και είναι εξαρτώμενα παρά πολύ από τη θερμοκρασία. Θεωρούνται ιδιαίτερα ευαίσθητοι έναντι σε χημικές μεταβολές. Εξαιτίας του ότι ο αριθμός τους γενικά είναι μικρός, είναι δυνατόν η εισροή κάποιων ρύπων να φέρει την απώλεια της δραστικότητας τους (Frühling et

al.,2000). Μια βλάβη της νιτροποίησης μπορεί να εμποδίσει την αποδόμηση του αμμωνίου και να αυξηθούν τα επίπεδα του αμμωνίου. Τα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να επιδρούν με τα μικρόβια αυτά και να εμποδίζεται η νιτροποίηση στα απόνερα.

II. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

1. Γενικές αρχές υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης.

Εισαγωγή. Οι τεχνικές που σχετίζονται με τη χρωματογραφία χρησιμοποιούνται εδώ και αιώνες με αρχικές εφαρμογές το διαχωρισμό υλικών όπως χρωστικές που εκχειλίζονται από τα φυτά. Παρ' όλ' αυτά ο όρος «χρωματογραφία» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1906 από τον Ρώσο χημικό και βοτανολόγο Mikhail Semenovich Tswett (1872 - 1919) για να περιγράψει τη δουλειά του και άλλα υλικά όπως πολυσακχαρίτες, σακχαρόζη και ινδουλίνη. Ο Tswett παρατήρησε τις επιδράσεις που είχαν στο διαχωρισμό τα διαφορετικά υλικά πλήρωσης των στηλών και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Η σημαντικότητα του έργου του αναγνωρίστηκε το 1930, όταν ο Lederer και οι συνεργάτες του πέτυχαν το διαχωρισμό της λουτεΐνης και της ζεαξανθίνης σε διθειάνθρακα και των ξανθόφυλλων από τον κρόκο του αυγού σε στήλη με υλικό πλήρωσης ανθρακικό ασβέστιο σε μορφή σκόνης διαμέτρου 7μm. Στη συνέχεια οι Khun, Karrier και Ruzicka βραβεύτηκαν με το βραβείο Nobel (1937, 1938 και 1939, αντίστοιχα) για την εργασία τους στη χρωματογραφία.

Στις πρώτες δημοσιεύσεις του Tswett (1906) όρος χρωματογραφία αναφερόταν σε μια μέθοδο με την οποία τα συστατικά ενός δείγματος διαχωρίζονται σε μια στήλη προσρόφησης με βάση τη ροή του συστήματος. Αργότερα το 1903 ο Διεθνής Οργανισμός Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) έδωσε τον εξής ορισμό: χρωματογραφία είναι η φυσική μέθοδος διαχωρισμού κατά την οποία τα συστατικά που πρόκειται να διαχωριστούν κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, μια στατική και μια κινητή προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να διαχωριστούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τη φύση των δυνάμεων που καθορίζουν την κατανομή ανάμεσα στις φάσεις, την επιλογή των δύο φάσεων, τη διάταξη της στατικής φάσης, τη διεργασία ανάπτυξης και την κλίμακα εφαρμογής (Braithwaite et al., 1996).

2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

Η Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) άρχισε να αναπτύσσεται τη δεκαετία του '60, με την πρόοδο της τεχνολογίας, καθώς άρχισαν να κατασκευάζονται χαλύβδινες στήλες ανθεκτικές στις μεγάλες πιέσεις και αντλίες υψηλής πίεσης σταθερής παροχής. Η HPLC ουσιαστικά είναι εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται μικρόκοκκα υλικά πλήρωσης των στηλών, οπότε και αναπτύσσονται μεγάλες πιέσεις. Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους ανάμεσα στη στατική και την κινητή φάση, ως αποτέλεσμα συνδυασμού των διαφορετικών μηχανισμών. Στην HPLC το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της χρωματογραφικής στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλούνται το ένα μετά το άλλο.

Στα πειράματα που αρχικά έγιναν από τον Tswett είχε χρησιμοποιηθεί μια πολική στατική φάση και η κινητή φάση ήταν περισσότερο άπολη. Το είδος αυτό της χρωματογραφίας προσρόφησης καλείται «χρωματογραφία κανονικής φάσης» (Braithwaite et al., 1996, Snyder et al., 1979 και Παπαδογιάννης κ.α., 2001)

3. Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.

Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη τεχνική, αφού σε αυτή βρίσκουν εφαρμογή πάνω από το 80% των αναλύσεων με HPLC. Η στατική φάση είναι λιγότερη πολική της κινητής. Μεταξύ των μορίων του προσδιοριζόμενου συστατικού και της κινητής φάσης αναπτύσσονται κυρίως ασθενείς μη εκλεκτικές αλληλεπιδράσεις van der Waals. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις διαχωρίζονται με βάση το βαθμό της υδρόφοβης αλληλεπίδρασής τους με τη στατική φάση και έτσι όσο πιο πολικό είναι κάποιο μόριο, τόσο πιο γρήγορα εκλύεται από τη χρωματογραφική στήλη (Παπαδογιάννης κ.α., 2001)

Τα συνηθέστερα υλικά πλήρωσης στη Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (RPHPLC) έχουν ως βάση την πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου, με ελεύθερες πυριτικές (- SiOH) και πυριτοξικές ομάδες (- Si - O - Si). Η κατεργασία της πηκτής του διοξειδίου του πυριτίου με οργανοχλωροσιλάνια και οργανο - αλκοξυ - σιλάνια οδηγεί στην εισαγωγή διαφόρων ομάδων, όπως όκτυλο (- C₈), δεκαόκτυλο (- C₁₈), φαίνυλο (- Ph), κύανο (- CN) και άλλων αλκυλοάζωτο ομάδων [R - N₁(CH₃)]. Στη δεσμευμένη πηκτή του SiO₂ επιτυγχάνεται

μεγαλύτερη προσρόφηση των ενώσεων και συνήθως καλύτερος διαχωρισμός. Η κινητή φάση στην RP-HPLC είναι περισσότερο πολική. Πρόκειται για μίγματα νερού ή υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων με οργανικούς τροποποιητές, συνήθως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ισοπροπανόλη, τετραϋδροφουράνιο κ.ά. Σημαντική παράμετρος για τη συγκράτηση των ιονικών ενώσεων είναι η τιμή του pH της κινητής φάσης. Η πολικότητα της κινητής φάσης καθορίζει τη σειρά έκλουσης των προσδιοριζόμενων ενώσεων (Braithwaite et al., 1996).

4. Οργανολογία.

Μία απλή διάταξη ενός συστήματος HPLC αποτελείται από τα εξής μέρη: α) τις φιάλες αποθήκευσης των διαλυτών, β) την αντλία υψηλής πίεσης, γ) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, δ) τη χρωματογραφική στήλη, ε) τον ανιχνευτή και στ) την μονάδα επεξεργασίας και καταγραφής των δεδομένων. Επιπλέον μπορούν να προστεθούν και άλλα τμήματα βελτιώνοντας την απόδοση της τεχνικής όπως:

- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος μπορεί να αποτελείται από βαλβίδα σταθερού όγκου για έγχυση του δείγματος ή από αυτόματο δειγματολήπτη
- Η χρωματογραφική στήλη μπορεί να βρίσκεται σε ειδικό θερμοστατούμενο φούρνο, εξασφαλίζοντας μεγαλύτερη επαναληψιμότητα στις μετρήσεις
- Στον πρώτο ανιχνευτή μπορεί να συνδεθεί σε σειρά και δεύτερος ανιχνευτής
- Με την σύνδεση και δεύτερης χρωματογραφικής στήλης σε σειρά επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός, ενώ με μια προστήλη αμέσως πριν τη χρωματογραφική στήλη αυξάνεται ο χρόνος ζωής της τελευταίας.
- Επίσης συνδέοντας μια δεύτερη αντλία και μαζί και ένα κατάλληλο σύστημα επιλογής διαλυτών μετατρέπεται ένα σύστημα χαμηλής πίεσης (Low Pressure) σε υψηλής πίεσης (High Pressure), εξασφαλίζοντας κυρίως πιο επαναλήψιμες ροές των διαλυτών (Braithwaite et al., 1996).



(Εικόνα 1. HPLC μηχανήμα εργαστηρίου ΤΕΙ Ηγουμενίτσας)

5. Σύστημα διανομής διαλυτών.

Η μικρή κοκκομετρική διάσταση των υλικών πλήρωσης των χρωματογραφικών στηλών δημιουργεί στο σύστημα υψηλή αντίσταση στη ροή της κινητής φάσης, η οποία υπερνικείται με τη χρήση αντλίας. Οι αντλίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίζονται σε αυτές που εξασφαλίζουν σταθερή πίεση στο σύστημα και σε αυτές που εξασφαλίζουν σταθερή ροή των διαλυτών. Και στις δύο περιπτώσεις οι αντλίες θα πρέπει να αντέχουν σε πίεση μέχρι 7000 psi. Είναι κατασκευασμένες από υλικά ανθεκτικά στους οργανικούς διαλύτες και στα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα, που συνήθως χρησιμοποιούνται ως κινητές φάσεις. Σε όλες τις εφαρμογές της HPLC χρησιμοποιούνται ευρέως οι αντλίες σταθερής ροής και από αυτές οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι οι αντλίες παλινδρόμησης.

Στη βαθμωτή έκλυση, όπου η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται με το χρόνο, απαιτείται η ανάμιξη των διαλυτών να γίνεται από ειδική διάταξη μίξης. Συστήματα ανάμιξης χρησιμοποιούν είτε μια αντλία, είτε συνδυασμό δύο αντλιών, όπου επιτρέπονται οι δραστικές αλλαγές της σύστασης του διαλύτη. Η βαθμωτή

έκλυση είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό ενώσεων με παρόμοια δομή και ιδιότητες (Braithwaite et al., 1996 και Snyder et al., 1979) .

6. Μονάδα εισαγωγής δείγματος.

Ο πιο απλός τρόπος εισαγωγής δείγματος στη στήλη είναι με τη βοήθεια βαλβίδας καθορισμένου όγκου, η οποία αποτελείται από έξι κανάλια δύο θέσεων. Το δείγμα με μια μικροσύριγγα εισάγεται στο βρόχο (loop). Στη συνέχεια με περιστροφή της βαλβίδας από τη θέση πλήρωσης, στη θέση έγχυσης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης το δείγμα οδηγείται στην κορυφή της αναλυτικής στήλης.

Στις πιο σύγχρονες διατάξεις χρησιμοποιούνται αυτόματα συστήματα δειγματοληψίας, εξασφαλίζοντας την πλήρη αυτοματοποίηση του συστήματος και τους επαναλήψιμους όγκους δείγματος. Οι αυτόματοι δειγματολήπτες είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι στις αναλύσεις ρουτίνας, για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων (Braithwaite et al., 1996 και Snyder et al., 1979) .

7. Χρωματογραφική στήλη.

Οι χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι κυρίως οι προστήλες και οι αναλυτικές στήλες. Οι προστήλες χρησιμοποιούνται για την προστασία της αναλυτικής στήλης, είναι συνήθως μικρότερες σε διαστάσεις και τοποθετούνται πριν την αναλυτική στήλη. Ενώ η αναλυτική στήλη είναι η καρδιά του χρωματογραφικού συστήματος αφού εκεί πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών. Η διαχωριστική ικανότητα της στήλης εξαρτάται από το υλικό πλήρωσης, το σχήμα και τις διαστάσεις των κόκκων, την ενεργή επιφάνεια και το ποσοστό πλήρωσής της.

Οι παρασκευαστικές στήλες είναι στήλες μεγάλων διαστάσεων, με υλικά πλήρωσης παρόμοια με αυτά των αναλυτικών στηλών, που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό και την παραλαβή ενώσεων από ένα μίγμα, σε ποσότητες της τάξης των mg. Τα υλικά πλήρωσης των στηλών που χρησιμοποιούνται είναι η πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) και το οξείδιο του αργιλίου (alumina). Τα ανόργανα υλικά πλήρωσης είναι αρκετά ανθεκτικά και δεν αλληλεπιδρούν με τους διαλύτες. Πολυμερή υλικά πλήρωσης καθαρότητας HPLC βασίζονται σε διασταυρούμενους δεσμούς στυρενίου - διβινυλβενζολίου ή μεθακρυλικών. Τα πολυμερή υλικά πλήρωσης δεν χαρακτηρίζονται από υψηλή ανθεκτικότητα και είναι περισσότερο συμπιεσμένα. Οι διαλύτες και οι προσδιοριζόμενες ενώσεις

μπορεί να εισχωρήσουν στο πολυμερές υπόστρωμα οδηγώντας σε μικρότερες αποδόσεις της στήλης εξαιτίας της μειωμένης μάζας που μεταφέρεται.

Το συνηθέστερο υλικό που χρησιμοποιείται ως υλικό πλήρωσης στις στήλες HPLC είναι η πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου. Επιπλέον της υψηλής φυσικής σταθερότητας που τη χαρακτηρίζει, στην επιφάνεια της πηκτής του διοξειδίου του πυριτίου μπορεί εύκολα να προσαρτηθεί ένα μεγάλο εύρος συναρμοτών (ligands). Με την τεχνική αυτή τροποποίηση της επιφάνειάς της παρασκευάζονται υλικά πλήρωσης στηλών για την αντίστροφη χρωματογραφία, για χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, για υδροφιλικές ή υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και για χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους. Υλικά πλήρωσης από πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου είναι συμβατά με μεγάλο εύρος διαλυτών από πολικούς μέχρι και μη πολικούς. Για αναλύσεις ρουτίνας που γίνονται σε στήλες με υλικό πλήρωσης που βασίζεται στην πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου το εύρος pH που ενδείκνυται είναι 2.0 – 8.0, γιατί έχει αποδειχθεί ότι μειονέκτημά της είναι η μειωμένη της σταθερότητα σε υδατικές αλκαλικές κινητές φάσεις. Ένα άλλο μειονέκτημα της πηκτής του διοξειδίου του πυριτίου είναι η παρουσία ελεύθερων σιλανολικών ομάδων, δίνοντας κορυφές με ουρά σε ουδέτερες συνθήκες (pH 7.0).

Η επιφάνεια της πηκτής του διοξειδίου του πυριτίου τροποποιείται εύκολα με χημικές αντιδράσεις με οργανοσιλανολικά αντιδραστήρια. Σκοπός είναι να δημιουργηθεί ομοιόμορφη μονομοριακή στιβάδα (δεσμευμένα υλικά πλήρωσης, bonded phase). Υπάρχουν διάφορα είδη σιλανίων που χρησιμοποιούνται για τις αντιδράσεις δέσμευσης, τα οποία χαρακτηρίζονται ως μόνο - , δι - ή τρι - δραστικά σιλάνια, ανάλογα με τον αριθμό των ομάδων πάνω στο σιλάνιο (συνήθως ομάδες χλωρίου) που αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια της πηκτής (Braithwaite et al., 1996 και Snyder et al., 1979) .

Συχνά τα υλικά πλήρωσης στηλών χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης υποβάλλονται και σε δεύτερο στάδιο δέσμευσης, με σκοπό τη δέσμευση των μη δραστικών σιλανολικών ομάδων της πηκτής του διοξειδίου του πυριτίου. Ένα μικροσιλάνιο, συνήθως τριμεθυλοχλωροσιλάνιο χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό. Οι στήλες αυτές ονομάζονται «end capped» και είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Τα υλικά «end capped» δε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε pH < 2.0.

8. Σύστημα ανίχνευσης.

Στην HPLC χρησιμοποιούνται κυρίως ανιχνευτές συνεχούς παρακολούθησης του υγρού που βγαίνει από τη στήλη, μέσω μιας κυψελίδας συνεχούς ροής. Διάφοροι ανιχνευτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν, η αρχή λειτουργίας των οποίων βασίζεται είτε στη μέτρηση μιας συγκεκριμένης φυσικοχημικής ιδιότητας των προσδιοριζόμενων ενώσεων, είτε στη μέτρηση κάποιας φυσικοχημικής ιδιότητας της κινητής φάσης. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά ενός ανιχνευτή στην HPLC είναι ο θόρυβος, η ευαισθησία, ο χρόνος απόκρισης και η γραμμικότητα. Ο πιο διαδεδομένος ανιχνευτής στην HPLC είναι ο ανιχνευτής υπεριώδους - ορατού. Ενώσεις που απορροφούν στο υπεριώδες - ορατό (190 - 600 nm) μπορούν να προσδιοριστούν με ανιχνευτές τέτοιου τύπου. Σύμφωνα με το νόμο Lambert – Beer, η απορρόφηση της ακτινοβολίας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ένωσης στην κυψελίδα και του μήκους της διαδρομής στην κυψελίδα.

Η ανίχνευση βασίζεται στην απορρόφηση φωτονίων από κάποια χαρακτηριστική ομάδα της ένωσης. Ο ανιχνευτής υπεριώδους μετράει την απορρόφηση σε ένα συγκεκριμένο προεπιλεγμένο μήκος κύματος κι έτσι για την ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιείται μόνο ο χρόνος συγκράτησης, στοιχείο όχι πάντα ιδιαίτερα αξιόπιστο, αφού μπορεί στον ίδιο χρόνο να συνεκλουεται και κάποια παρεμπόδιση μαζί με την ένωση που εξετάζεται.

Λύση στο πρόβλημα αυτό έδωσε ο ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων (photodiode array detector, PDA) η λειτουργία του οποίου βασίζεται στη σάρωση του ολικού φάσματος απορρόφησης της προσδιοριζόμενης ένωσης στο ορατό και στο υπεριώδες.

Η ουσιαστικότερη διαφορά με τον απλή ανιχνευτή UV-Vis είναι ότι στη θέση του μονοχρωμάτορα υπάρχει ένα ολογραφικό φράγμα. Το δείγμα στην κυψελίδα δέχεται την ακτινοβολία ολόκληρου του φάσματος και η ακτινοβολία που εκπέμπεται, αφού διέλθει από το ολογραφικό φράγμα προσπίπτει στην παράταξη φωτοδιόδων. Κάθε δίοδος δέχεται την ακτινοβολία ενός μόνο nm. Το πλεονέκτημα του PDA είναι η δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης σε δύο ή περισσότερα μήκη κύματος, αυξάνοντας την ευαισθησία του προσδιορισμού. Η μελέτη σε άλλα μήκη κύματος μπορεί να γίνει και αφού ληφθεί το χρωματογράφημα, αφού στην μνήμη του υπολογιστή αποθηκεύεται το ολικό

φάσμα απορρόφησης της κάθε ένωσης. Επίσης μπορεί να επιλεγθεί το βέλτιστο μήκος κύματος με βάση το φάσμα που λαμβάνεται την κάθε χρονική στιγμή.

Σημαντικό πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα μελέτης της καθαρότητας της κορυφής, αφού την κάθε χρονική στιγμή καταγράφεται το φάσμα της ένωσης που διέρχεται μέσα από την κυψελίδα του ανιχνευτή και μπορεί να δημιουργηθεί βιβλιοθήκη φασμάτων, η οποία χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των κορυφών, με σύγκριση των φασμάτων. Οι φθορισμομετρικοί ανιχνευτές χρησιμοποιούνται για ενώσεις που φθορίζουν και δίνουν σήμα ανάλογα της συγκέντρωσης του συστατικού που φθορίζει. Ο φθορισμός στηρίζεται στην εκπομπή φωτονίων από ηλεκτρονικά διεγερμένα μόρια.

Η ευαισθησία του φθορισμομετρικού ανιχνευτή είναι 10-100 φορές υψηλότερη έναντι του ανιχνευτή UV-Vis. Οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές χωρίζονται στους αμπερομετρικούς, τους αγωγιμομετρικούς και τους ποτενσιομετρικούς. Εντούτοις στην HPLC έχει ταυτιστεί ηλεκτροχημικός με τον αμπερομετρικό, ο οποίος αναφέρεται στη μέτρηση του ηλεκτρικού ρεύματος που παράγεται κατά την οξειδωση ή αναγωγή κάποιου συστατικού στην επιφάνεια ηλεκτροδίων μιας κυψελίδας συνεχούς ροής. Αυτοί είναι οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC, ενώ άλλοι πιο σπάνιοι είναι οι ανιχνευτές δείκτη διάθλασης και οι ανιχνευτές σκεδασμού φωτός μετά από εξάτμιση. Με την ανάπτυξη της φασματογραφίας μάζας αναπτύχθηκε σήμερα και η συνδυασμένη τεχνική LC - MS με σημαντικές εφαρμογές σε όλα τα πεδία της ανάλυσης (Braithwaite et al., 1996 , Snyder et al., 1979 και Παπαδογιάννης κ.α., 2001).

9. Χαρακτηριστικά απόδοσης χρωματογραφήματος.

Ως χρωματογράφημα ορίζεται η γραφική απεικόνιση του συνεχόμενου σήματος που καταγράφεται από τον ανιχνευτή για τη σύσταση της κινητής φάσης, συμπεριλαμβανομένων και των προσδιοριζόμενων ενώσεων, που βγαίνουν κάθε στιγμή από την έξοδο της αναλυτικής στήλης σε σχέση με το χρόνο. Το προφίλ της συγκέντρωσης του κάθε συστατικού που εκλύεται έχει στο χρωματογράφημα την κατανομή κατά Gauss, αναπαριστώντας τη διασπορά των μορίων κατά το διαχωρισμό. Όσο περισσότερο χρόνο χρειάζεται μια ένωση για να κινηθεί και να εξέλθει από τη στήλη, τόσο πιο διευρυμένη είναι η κορυφή της (Παπαδογιάννης κ.α., 2001).

III. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

1. Πειραματικό μέρος.

Περιοχή μελέτης. Το πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας εκπονήθηκε στις εγκαταστάσεις του Τ.Ε.Ι. της Ηγουμενίτσας (Εικ.2).



(Εικόνα 2. Αεροφωτογραφία από Google earth)

Οι εγκαταστάσεις του τμήματος προσφέρουν τόσο υλικοτεχνική υποστήριξη όσο και προσωπικό που παρόλο που είναι λίγο κατέχει επίπεδο γνώσεων υψηλό. Στο χημείο αλλά και στις βοηθητικές αίθουσες είναι διαθέσιμα μηχανήματα και υλικά υψηλού κόστους όπως είναι το μηχάνημα της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Επίσης είναι αξιόλογο πως υπάρχει μια βιβλιοθήκη που είναι

εξαιρετικά ενημερωμένη παρά των μικρό αριθμό φοιτητών που διαθέτει σήμερα το Τ.Ε.Ι.

2. Πείραμα 1^ο. Επίδραση της φωτόλυσης σε δείγματα τριμεθοπρίμης με διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Το πείραμα αυτό ξεκίνησε στις 03/11/2009 και ολοκληρώθηκε στις 07/02/2010. Σε τρεις φιάλες τοποθετήθηκε δις αποσταγμένο νερό 500 ml που εμβολιάστηκαν με το αντιβιοτικό τριμεθοπρίμη στις συγκεντρώσεις των 1 mg/l 5 mg/l και 7 mg/l.

Οι φιάλες με τα αντιβιοτικά (εικόνα 3) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις, τοποθετήθηκαν σε σημεία των Τ.Ε.Ι. όπου υπάρχει υψηλή ηλιοφάνεια καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας. Δεν μετακινήθηκαν καθόλου από τις αρχικές τους θέσεις.



(Εικόνα 3 Φωτογραφία από φιάλες με διαφορετικές συγκεντρώσεις τριμεθοπρίμης σε φως)

Οι δειγματοληψίες γινόταν σε συχνά χρονικά διαστήματα και μετρήθηκαν με υγρο-χρωματογραφική μέθοδο.

Οι μετρήσεις έγιναν με κινητή φάση του μηχανήματος της υγρής χρωματογραφίας στην αναλογία δις αποσταγμένου νερού με τριφθοροξικό οξύ (0,1 %) προς ακετονιτρίλιο 50/50 v/v. Η ροή ρυθμίστηκε στο 1 ml/min και τα

αποτελέσματα μετρήθηκαν στα 270 nm. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν 30⁰ C, και ο όγκος του δείγματος που εκχέονταν σε κάθε μέτρηση ήταν 20 μL.

Τα αποτελέσματα αφορούσαν το φάσμα των 270 nm και των 240 nm και μελετήθηκε το ύψος της κορυφής από την επιφάνεια κάτω από το ύψος της κορυφής (Area under the curve, AVC).

3. Πείραμα 2^ο. Επίδραση της φωτόλυσης σε δείγματα τριμεθοπρίμης που προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτρικών.

Το πείραμα αυτό έλαβε χώρα το χρονικό διάστημα από 02/12/2009 έως 03/02/2010. Εξετάστηκε πάλι το αντιβιοτικό τριμεθοπρίμη μόνο που σε αυτό το πείραμα έγινε και πρόσθεση νιτρικών.

Χρησιμοποιήθηκαν 4 φιάλες στις οποίες προστέθηκε δις αποσταγμένο νερό 500 ml και εμβολιάστηκαν με 5 mg/l αντιβιοτικού τριμεθοπρίμης. Στην πρώτη φιάλη που ονομάστηκε μάρτυρας δεν προστέθηκε κάτι άλλο. Στις άλλες προστέθηκαν νιτρικά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Στη δεύτερη προσθέσαμε 10⁻⁶ M νιτρικά. Στην τρίτη 2x10⁻⁶ M και στην τέταρτη 3x10⁻⁶ M νιτρικά.

Οι φιάλες με τα αντιβιοτικά (εικόνα 4) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις, τοποθετήθηκαν σε σημεία των Τ.Ε.Ι. όπου υπάρχει υψηλή ηλιοφάνεια καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας. Δεν μετακινήθηκαν καθόλου από τις αρχικές τους θέσεις.



(Εικόνα 4 Φωτογραφία με διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτρικών σε φως)

Οι δειγματοληψίες γίνονταν σε συχνά χρονικά διαστήματα και μετρήθηκαν με υδρο-χρωματογραφική μέθοδο. Οι μετρήσεις έγιναν με κινητή φάση του μηχανήματος της υγρής χρωματογραφίας στην αναλογία δις αποσταγμένου νερού με τριφθοροξικό οξύ (0,1 %) προς ακετονιτρίλιο 50/50 v/v. Η ροή ρυθμίστηκε στο 1 ml/min και τα αποτελέσματα μετρήθηκαν στα 270 nm. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν στους 30⁰ βαθμούς κελσίου, και ο όγκος του δείγματος που εκχέονταν σε κάθε μέτρηση ήταν 20 μL.

Τα αποτελέσματα αφορούσαν το φάσμα των 270 nm και των 240 nm και αφορούσε μετρήσεις για το ύψος της κορυφής από την επιφάνεια κάτω από το ύψος της κορυφής (Area under the curve, AVC).

4. Πείραμα 3^ο. Επίδραση της φωτόλυσης στην αποδόμηση της τετρακυκλίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Στο πείραμα αυτό εξετάστηκε η επίδραση του ηλιακού φωτός στην αποδόμηση της τετρακυκλίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις τόσο σε συνθήκες φωτός όσο και σε συνθήκες σκότους. Η διάρκεια αυτού του πειράματος είναι από τις 09/01/2010 έως τις 04/02/2010.

Σε αυτό το πείραμα τοποθετήθηκαν 6 φιάλες (εικόνα 5) με δις αποσταγμένο νερό και εμβολιάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης. 3 από αυτές τοποθετήθηκαν όπως φαίνεται στην φωτογραφία σε συνθήκες σκοταδιού και 3 σε άμεση επίδραση του φωτός.



(Εικόνα 5 Φωτογραφία από φιάλες με διαφορ. συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης σε φώς και σε σκοτάδι)

Οι συγκεντρώσεις της τετρακυκλίνης και σε συνθήκες φωτός και σε σκότος ήταν 1 mg/l , 3 mg/l και 5 mg/l σε κάθε φιάλη.

Στη συνέχεια έγιναν δειγματοληψίες σε τακτά χρονικά διαστήματα. Οι μετρήσεις έγιναν πάλι με υγρή χρωματογραφία που η κινητή φάση της ρυθμίστηκε δις αποσταγμένου νερού με τριφθοροξικό οξύ (0,1 %) προς ακετονιτρίλιο 60/40 v/v. Η ροή ρυθμίστηκε στο 1 ml/min και τα αποτελέσματα μετρήθηκαν στα 270 nm. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν 30⁰ C, και ο όγκος του δείγματος που εκχέονταν σε κάθε μέτρηση ήταν 20 μL.

Τα αποτελέσματα αφορούσαν το φάσμα των 270 nm και των 240 nm και αφορούσε μετρήσεις για το ύψος της κορυφής από την επιφάνεια κάτω από το ύψος της κορυφής (Area under the curve, AVC).

5. Πείραμα 4^ο. Επίδραση της φωτόλυσης στην αποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Στο πείραμα αυτό εξετάστηκε η επίδραση του ηλιακού φωτός στην αποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις τόσο σε συνθήκες φωτός όσο και σε συνθήκες σκότους. Η διάρκεια αυτού του πειράματος είναι από τις 09/01/2010 έως τις 04/02/2010.

Σε αυτό το πείραμα τοποθετήθηκαν 6 φιάλες (εικόνα 6) με δις αποσταγμένο νερό και προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις οξυτετρακυκλίνης. 3 από αυτές τοποθετήθηκαν όπως φαίνεται στην φωτογραφία σε συνθήκες σκοταδιού και εμβολιάστηκαν αντίστοιχα με 5 mg/l οξυτετρακυκλίνης, 3 mg/l και 1 mg/l. Άλλες 3 σε άμεση επίδραση του φωτός και πάλι οι συγκεντρώσεις ήταν αντίστοιχα 5 , 3 και 1mg/l οξυτετρακυκλίνης.



(Εικόνα 6 Φωτογραφία από φιάλες με διαφορ. συγκεντρώσεις οξυτετρακυκλίνης σε φώς και σε σκοτάδι)

Στη συνέχεια έγιναν δειγματοληψίες σε τακτά χρονικά διαστήματα. Οι μετρήσεις έγιναν με υγρή χρωματογραφία που η κινητή φάση της ρυθμίστηκε δις αποσταγμένου νερού με τριφθοροξικό οξύ (0,1 %) προς ακετονιτρίλιο 60/40. Η

ροή ρυθμίστηκε στο 1 ml/min και τα αποτελέσματα μετρήθηκαν στα 270 nm. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν 30⁰ βαθμοί κελσίου, και ο όγκος του δείγματος που εκχέονταν σε κάθε μέτρηση ήταν 20 μL.

IV. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Αποτελέσματα και συζήτηση.

1. Πείραμα Γ°.

Στο πρώτο πείραμα που εξετάσαμε την φωτο-αποδόμηση της τριμεθοπρίμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 1 που ακολουθεί. Οι τιμές αφορούν το ύψος της κορυφής στα 270 nm για κάθε συγκέντρωση του αντιβιοτικού και αντίστοιχα δίπλα αναφέρονται οι ημερομηνίες στις οποίες έγιναν οι δειγματοληψίες.

Οι διακυμάνσεις που παρατηρούνται στις μετρήσεις δεν υποδηλώνουν κάποια μεταβολή στη συγκέντρωση του αντιβιοτικού αλλά είναι μικρο-διακυμάνσεις που οφείλονται στη λειτουργία του μηχανήματος. Ουσιαστικά δεν παρατηρείται μεταβολή στη συγκέντρωση της τριμεθοπρίμης κάτω από την επίδραση του ηλιακού φωτός για το χρονικό διάστημα που διενεργήθηκε το πείραμα σε καμία από τις συγκεντρώσεις της τριμεθοπρίμης. Παριστάνεται και γραμμικά στο ακόλουθο διάγραμμα (σχέδιο 6).

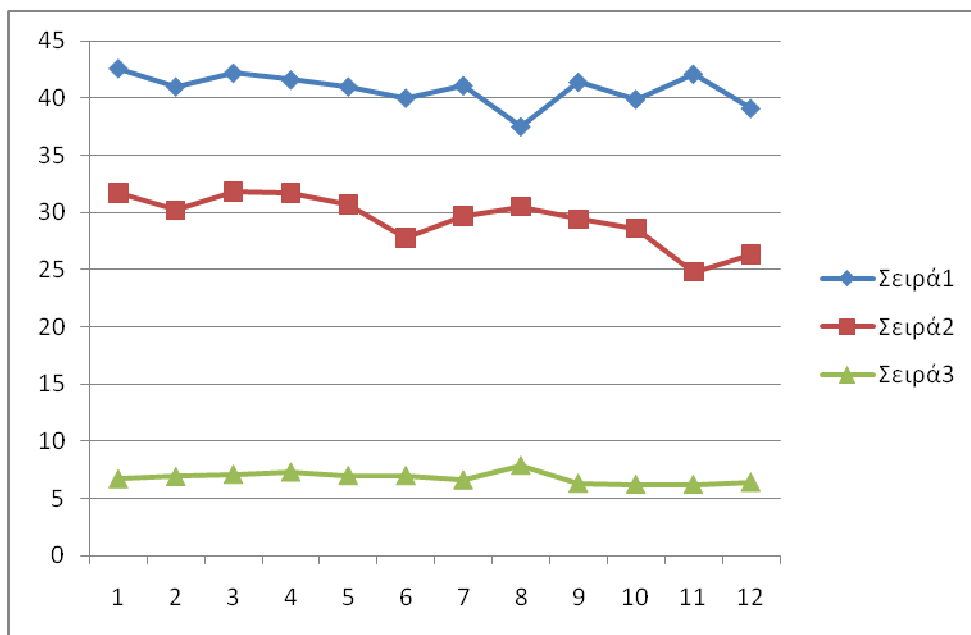
Στα ίδια αποτελέσματα έρχονται και έρευνες όπως η Alexy (2003), η οποία για χρονικό διάστημα 28 ημερών εξέτασε αν υφίσταται φωτοαποδόμηση η τριμεθοπρίμη. Χαρακτηριστικά αναφέρει πως ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι αρκετά χρόνια για αυτή την ουσία. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων της παρατήρησαν και αυτοί κάποιες διακυμάνσεις της τάξης του $\pm 3,4\%$ που το αιτιολόγησαν ως σφάλμα μέτρησης του μηχανήματος. Σε άλλες έρευνες όπως Römcke et al., (1996) και Alexy et al., (2004) ήρθαν στα ίδια αποτελέσματα χαρακτηρίζοντας την τριμεθοπρίμη ως σταθερή απέναντι στο φως.

Άλλες έρευνες όπως των Lunestad et al. (1995) που είχαν τοποθετήσει τριμεθοπρίμη σε φιαλίδια με θαλασσινό νερό τόσο στην επιφάνεια του νερού όσο και σε ένα μέτρο βάθος για χρονικό διάστημα 3 εβδομάδων επιβεβαιώνουν τη φωτοσταθερότητα της τριμεθοπρίμης. Αλλά και οι Fjerde et al.,(1993) έρχονται στα ίδια αποτελέσματα σε πείραμα διάρκειας 20 ημερών.

Από τα αποτελέσματα μας φαίνεται πως ούτε η διαφορετική συγκέντρωση έπαιξε κάποιο ρόλο στην φωτοαποδόμηση της ουσίας. Επίσης η διάρκεια του πειράματος είναι μεγαλύτερη από τις αντίστοιχες έρευνες που αναφέρονται και η ηλιακή ακτινοβολία είναι πιο έντονη στη χώρα μας από τις αντίστοιχες χώρες .

ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ				
α/α	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	7mg/l	5mg/l	1mg/l
1	03/11/2009	42.6	31.7	6,7
2	11/11/2009	41	30,2	6,9
3	19/11/2009	42,2	31,8	7,1
4	20/11/2009	41,6	31,7	7,3
5	02/12/2009	41	30,7	7
6	06/12/2009	40	27,8	7
7	09/12/2009	41,1	29,7	6,6
8	19/12/2009	37,5	30,5	7,9
9	27/12/2009	41,4	29,4	6,3
10	15/01/2010	39,9	28,6	6,2
11	23/01/2010	42,1	24,8	6,2
12	07/02/2010	39.1	26.3	6.4

(Πίνακας 1)



(Σχήμα 6 Σχεδιάγραμμα φωτοαποδόμησης τριμεθοπρίμης ανάλογα με τις συγκεντρώσεις Σειρά 1 παριστάνει την τριμεθοπρίμη 7 mg/L, Σειρά 2 την τριμεθοπρίμη 5mg/L και Σειρά 3 την τριμεθοπρίμη 1mg/L. Στον οριζόντιο άξονα φαίνονται οι δειγματοληψίες που αντιστοιχούν στις ημερομηνίες του πίνακα και στον κάθετο άξονα το ύψος της στήλης χρωματογραφήματος).

2. Πείραμα 2^ο.

Στο πείραμα αυτό εξετάστηκε η πιθανή φωτοαποδόμηση της τριμεθοπρίμης στην ίδια συγκέντρωση στην οποία προστέθηκαν νιτρικά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

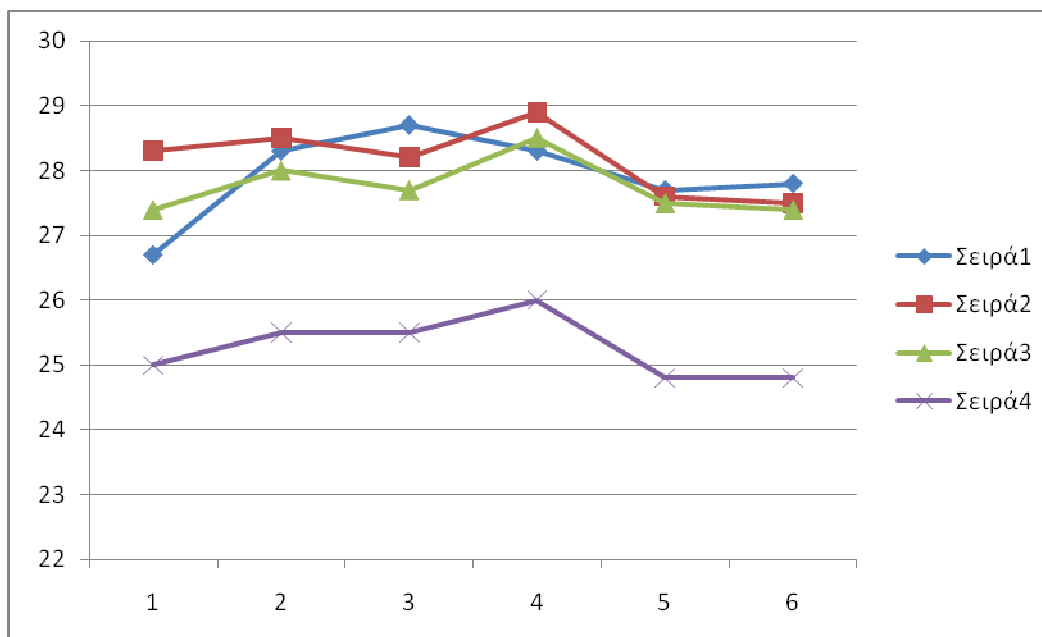
Οι τιμές που φαίνονται στον πίνακα αφορούν το ύψος της κορυφής στα 270 nm για κάθε συγκέντρωση των νιτρικών και αντίστοιχα δίπλα αναφέρονται οι ημερομηνίες στις οποίες έγιναν οι δειγματοληψίες.

ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ με προσθήκη νιτρικών					
α/α	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	Άνευ νιτρικών	$10^{-6}M$	$2 \times 10^{-6} M$	$3 \times 10^{-6} M$
1	02/12/2009	26,7	28,3	27,4	25
2	06/12/2009	28,3	28,5	28	25,5
3	27/12/2009	28,7	28,2	27,7	25,5
4	15/01/2010	28,3	28,9	28,5	26
5	23/01/2010	27,7	27,6	27,5	24,8
6	07/02/2010	27.8	27.5	27.4	24.8

(Πίνακας 2)

Όπως γίνεται φανερό και σε αυτό το πείραμα η τριμεθοπρίμη παραμένει σταθερή σε όλες τις συγκεντρώσεις των νιτρικών. Οι διακυμάνσεις και εδώ δεν εκτιμώνται καθώς είναι πολλοί μικρές και ανάγονται σε αδυναμία του μηχανήματος μέτρησης

Βιβλιογραφικά οι έρευνες που εξετάζουν την επίδραση των νιτρικών στην αποδόμηση εμπεριέχουν και την βιολογική αποδόμηση και συνεπώς και άλλους παράγοντες που στην παρούσα εργασία δεν εξετάζονται.



(Σχήμα 7. Σχεδιάγραμμα φωτοαποδόμησης τριμεθοπρίμης ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των νιτρικών. Σειρά 1 χωρίς νιτρικά, Σειρά 2 νιτρικά $10^{-6}M$, Σειρά 3 νιτρικά $2 \times 10^{-6}M$ και Σειρά 4 νιτρικά $3 \times 10^{-6}M$. Στον οριζόντιο άξονα φαίνονται οι δειγματοληψίες που αντιστοιχούν στις ημερομηνίες του πίνακα και στον κάθετο άξονα το ύψος της στήλης χρωματογραφήματος).

3. Πείραμα 3^ο.

Η φωτοαποδόμηση της τετρακυκλίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εξετάστηκε σε συνθήκες σκοταδιού καθώς και σε συνθήκες φωτός.

Στους παρακάτω πίνακες (3 και 4) φαίνονται τα αποτελέσματα ανάλογα με τις ημερομηνίες που έγιναν οι δειγματοληψίες και τα αντίστοιχα ύψη κορυφών σε κάθε συγκέντρωση. Οι μετρήσεις αφορούν τα 270 nm.

Ημερομηνίες δειγματοληψίας	Ύψος κορυφής 5mg/l	Ύψος κορυφής 3mg/l	Ύψος κορυφής 1mg/l
09/01/2010	39,8	24,2	7,9
10/01/2010	37,3	23,1	7,4
12/01/2010	35,2	19,9	5,1
15/01/2010	35,1	20,2	5,7
18/01/2010	32	18,3	4,8
20/01/2010	30,3	16,7	4,8
22/01/2010	30,2	16,9	5,2
23/01/2010	28,5	14,6	4,3
25/01/2010	28,3	14,4	3,8
29/01/2010	22	13,7	2,7
04/02/2010	24,8	11,6	2,7

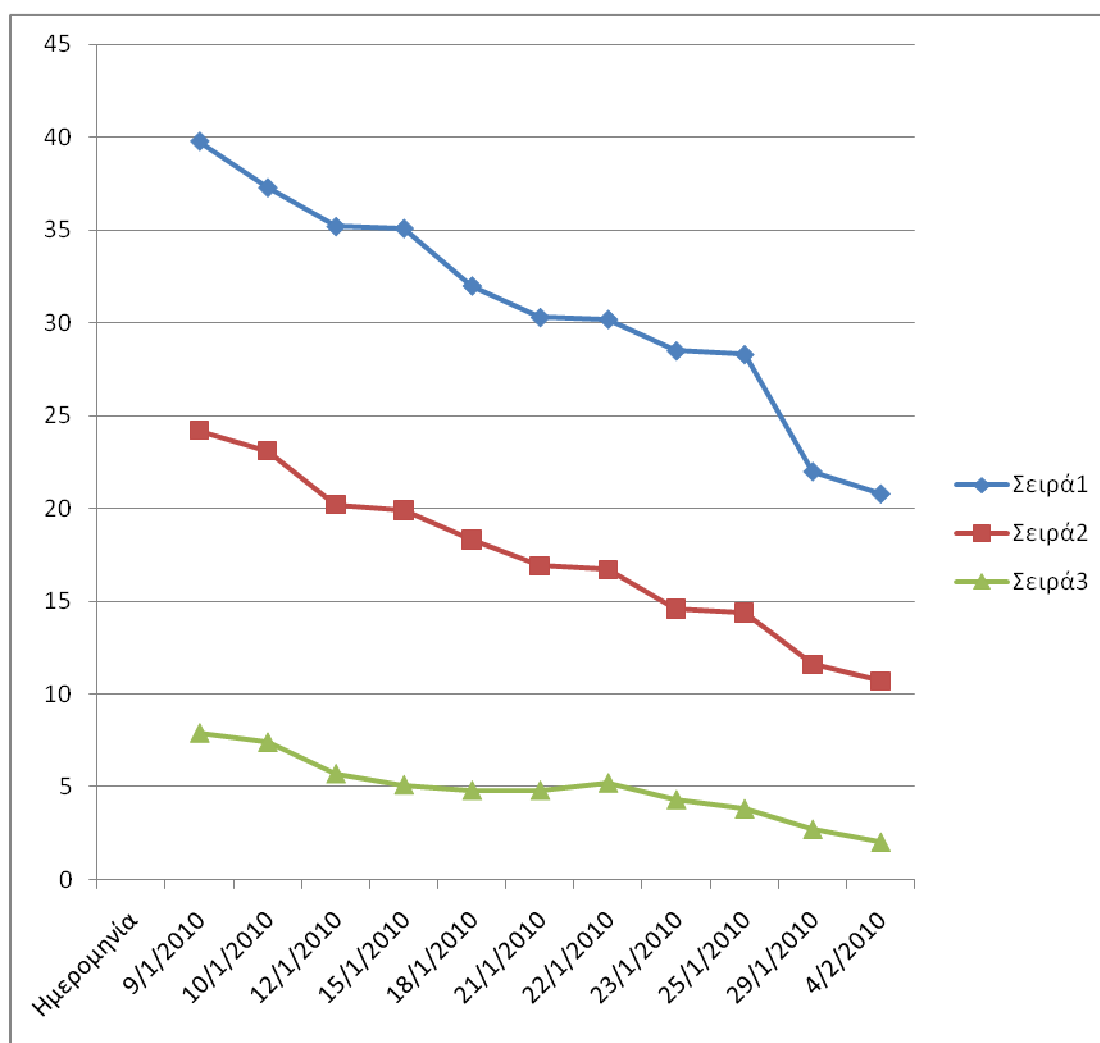
(Πίνακας 3. Τετρακυκλίνη σε φώς)

ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ σε σκοτάδι				
	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	5mg/l	3mg/l	1mg/l
	09/01/2010	40,1	23,4	7.6
	15/01/2010	40	23,3	7,6
	22/01/2010	41,2	24,4	8,2
	04/02/2010	39.6	22.8	7.4

(Πίνακας 4)

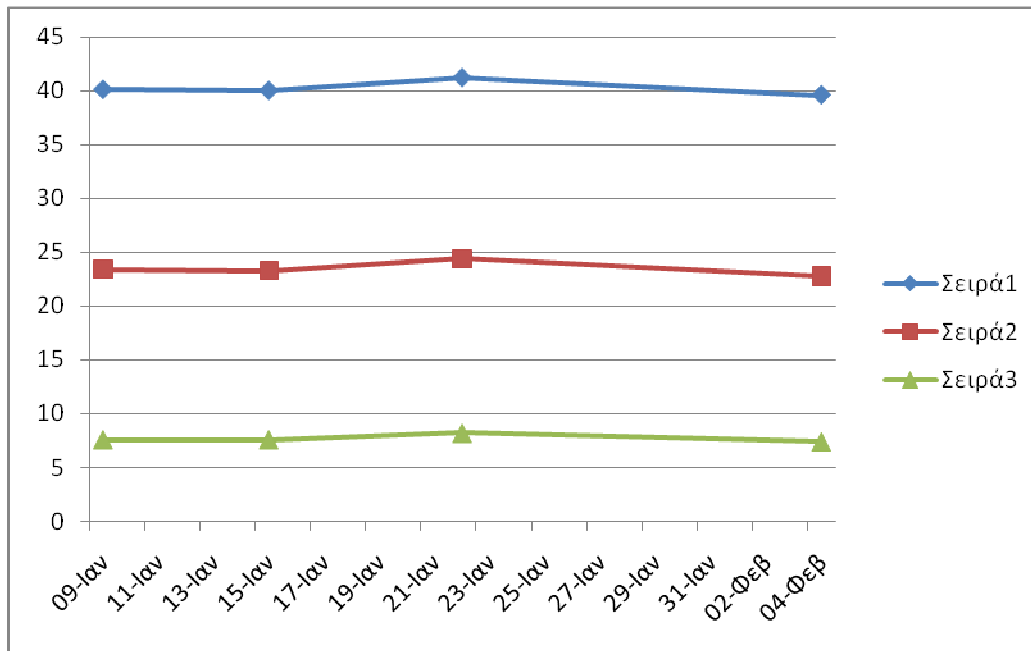
Τα αποτελέσματα δείχνουν ξεκάθαρα μια μεταβολή της συγκέντρωσης της τετρακυκλίνης σε συνθήκες φωτός ενώ στο σκοτάδι για το χρονικό διάστημα του πειράματος δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή.

Στο σχήμα που ακολουθεί απεικονίζεται η πρόοδος της αποδόμησης με γραφική παράσταση του σήματος της κορυφής συναρτήσει του χρόνου. Παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση του αντιβιοτικού μεταβάλλεται λογαριθμικά με το χρόνο.



(Σχήμα 8. Σχεδιάγραμμα φωτοαποδόμησης τετρακυκλίνης σε φως ανάλογα με τις συγκεντρώσεις της Σειρά 1: 5mg/l, Σειρά 2: 3mg/l Σειρά 3: 1 mg/l⁶. Στον οριζόντιο άξονα φαίνονται οι δειγματοληψίες που αντιστοιχούν στις ημερομηνίες του πίνακα 3 και στον κάθετο άξονα το ύψος της κορυφής χρωματογραφήματος).

Το αντίστοιχο σχεδιάγραμμα για τις συνθήκες σκότους παριστάνεται ως εξής:



(Σχήμα 9. Σχεδιάγραμμα φωτοαποδόμηση τετρακυκλίνης σε σκοτάδι ανάλογα με τις συγκεντρώσεις της Σειρά 1: 5mg/l, Σειρά 2: 3mg/l Σειρά 3: 1 mg/l⁶. Στον οριζόντιο άξονα φαίνονται οι δειγματοληψίες που αντιστοιχούν στις ημερομηνίες του πίνακα 4 και στον κάθετο άξονα το ύψος της στήλης χρωματογραφήματος).

Σε συνθήκες σκότους δεν παρατηρείται αποδόμηση της τετρακυκλίνης και συνεπώς και η συγκέντρωση δε φαίνεται να έπαιξε κάποιο ρόλο καθώς κάτω από διαφορετικές συγκεντρώσεις υπάρχει σταθερότητα της ουσίας. Η πολύ μικρή μεταβολή της θερμοκρασίας της είναι δυνατόν να οφείλεται σε υδρόλυση καθώς στη βιβλιογραφία αναφέρεται υδρολυτική ικανότητα της τετρακυκλίνης 1,7g/l (Sattelberger et al.,2005) ενώ άλλοι ερευνητές αναφέρουν υδρολυτική ικανότητα για τους 25^ο βαθμούς 0,23g/l.

Η φωτοαποδόμηση της τετρακυκλίνης είναι γνωστή και αναφέρεται από πολλούς συγγραφείς όπως σε εργασίες των Burhenne et al.1997, Lunestadt et al.1995, Oka et al.1989. Στα ίδια συμπεράσματα καταλήγουν και οι Fjerde et al.1993 οι οποίοι τοποθέτησαν 20 μέρες την τετρακυκλίνη σε συνθήκες φωτός και παρατήρησαν φωτοαποδόμηση 75%.

Γενικά χαρακτηρίζεται ως πολύ σταθερή ουσία στο περιβάλλον και παραμένει για πολύ καιρό στο έδαφος (άνω το 6 μηνών) χωρίς να αποδομείται (Hamscher et al.2002).

Αυτό που είναι αξιοσημείωτο είναι πως η φωτοαποδόμηση που λαμβάνει χώρα στις διάφορες συγκεντρώσεις δεν είναι στο ίδιο ποσοστό αλλά διαφέρει. Η αποδόμηση της τετρακυκλίνης στη συγκέντρωση 1 mg/l είναι μεγαλύτερη από αυτή που λαμβάνει χώρα στα 3 mg/l και στα 5 mg/l. Σε χρονικό διάστημα 25 ημερών αποδομείται από τη φιάλη με το 1mg/l τετρακυκλίνης το 66% , στη φιάλη με τα 3 mg/l αποδομείται το 44% ενώ στη φιάλη με τα 5 mg/l αποδομείται το 38%.

4. Πείραμα 4^ο.

Η φωτοαποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εξετάστηκε σε συνθήκες σκοταδιού καθώς και σε συνθήκες φωτός.

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται τα αποτελέσματα ανάλογα με τις ημερομηνίες που έγιναν οι δειγματοληψίες και τα αντίστοιχα ύψη κορυφών σε κάθε συγκέντρωση. Οι μετρήσεις αφορούν τα 270 nm και έγιναν σε συνθήκες σκότους και φωτός και αναφέρονται ξεχωριστά στους παρακάτω πίνακες.

Ημερομηνίες δειγματοληψίας	Ύψος κορυφής 5mg/l	Ύψος κορυφής 3mg/l	Ύψος κορυφής 1mg/l
09/01/2010	35,4	21,2	6,9
10/01/2010	25,6	18,7	6,6
12/01/2010	27,7	17,5	6,1
15/01/2010	27	15,4	4,8
18/01/2010	23,2	11,9	3,5
21/01/2010	20,8	10,2	3,1
22/01/2010	19,9	10,5	3,1
23/01/2010	19,9	9,8	2,7
25/01/2010	14,5	9	3,1
29/01/2010	14,2	7,4	2,3
02/02/2010	13,5	4,8	1,9
04/02/2010	13,4	7,2	1,8

(Πίνακας 5. Οξυτετρακυκλίνη σε φως)

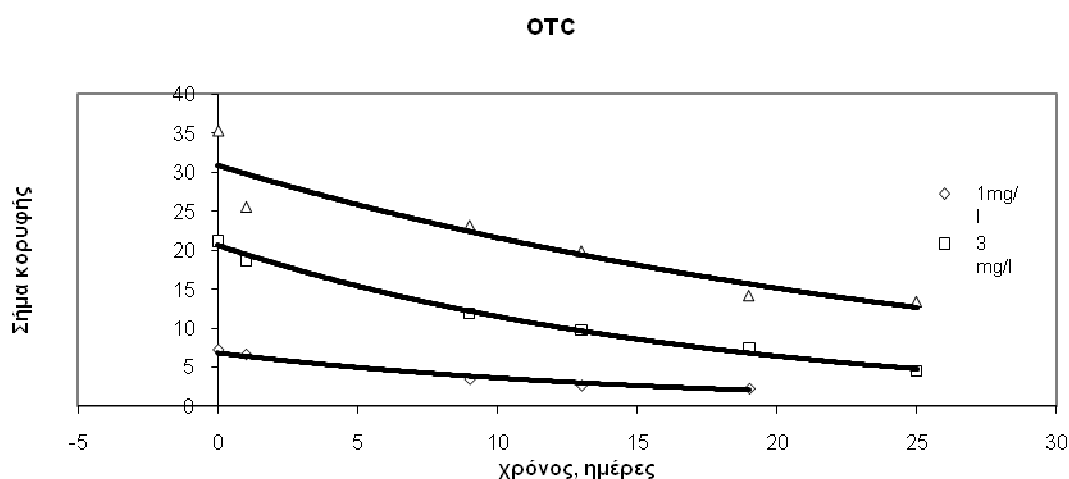
Ημερομηνίες δειγματοληψίας	Ύψος κορυφής 5mg/l	Ύψος κορυφής 3mg/l	Ύψος κορυφής 1mg/l
09/01/2010	35.4	19.6	7.2
15/01/2010	34.1	19.3	7.1
22/01/2010	33.4	18.2	6.5
04/02/2010	30.8	16.5	6.1

(Πίνακας 6 Οξυτετρακυκλίνη σε σκοτάδι)

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων γίνεται φανερό πως σε συνθήκες φωτός υπάρχει μια έντονη αποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης και στα τρία δείγματα με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις.

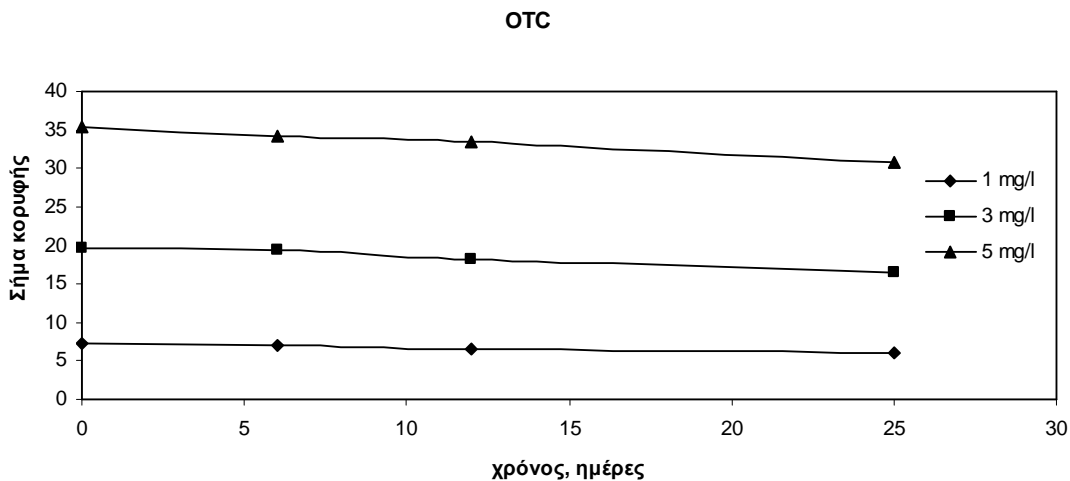
Η οξυτετρακυκλίνη που τοποθετήθηκε σε συνθήκες σκότους φαίνεται να μειώνεται σε όλες τις συγκεντρώσεις .

Στα σχήματα που ακολουθούν απεικονίζεται η πρόοδος της αποδόμησης με γραφική παράσταση του σήματος της κορυφής συναρτήσει του χρόνου. Παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση του αντιβιοτικού μεταβάλλεται λογαριθμικά με το χρόνο.



(Σχήμα 10. Φωτοαποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σε συνθήκες φωτός.)

Σε συνθήκες σκότους το αντίστοιχο σχεδιάγραμμα απεικονίζεται ως εξής:



(Σχήμα 11. αποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σε συνθήκες σκότους.)

Η οξυτετρακυκλίνη αποδομείται από το φως όπως δείχνουν και αντίστοιχες έρευνες των Fjerde et al.(1993) οι οποίοι τοποθέτησαν φιάλες στον ήλιο για χρονικό διάστημα 20 ημερών. Σε ανάλογα αποτελέσματα ήρθε και ο Samuelsen (1989) ο οποίος εξέτασε την επιρροή που έχει η θερμοκρασία (5°και 15° C) και το φως έναντι του σκότους. Υψηλότερες θερμοκρασίες και υψηλότερη ηλιοφάνεια επιτάχυναν την αποδόμηση της οξυτετρακυκλίνης. Στο πείραμα μας παρατηρήθηκε μικρή μεταβολή της συγκέντρωσης της οξυτετρακυκλίνης που πιθανόν οφείλεται σε θερμόλυση καθώς ενώ οι φιάλες βρισκόταν σε συνθήκες σκότους, είχαν την ίδια θερμοκρασία περιβάλλοντος με τις φιάλες που ήταν στο φως.

Επίσης η Alexy (2003) εξέτασαν δείγματα οξυτετρακυκλίνης σε φως και σκοτάδι και παρατηρούν αποδόμηση στα δείγματα που τοποθετήθηκαν σε φως και επισημαίνουν πως αυξάνει όταν αυξάνεται και η θερμοκρασία.

Σε ότι αφορά την φωτοαποδόμηση σε σχέση με τη συγκέντρωση, όπως και στην τετρακυκλίνη παρατηρείται γρηγορότερη φωτοαποδόμηση στις μικρότερες συγκεντρώσεις. Στη φιάλη με το 1mg/l οξυτετρακυκλίνης αποδομείται το 74%, στη φιάλη με τα 3 mg/l αποδομείται το 66% και στη φιάλη με τα 5mg/l αποδομείται το 62,2% σε χρονικό διάστημα 25 ημερών.

Η οξυτετρακυκλίνη αποδομείται σε συνθήκες σκότους στα 5 mg/l σε ποσοστό 13%, στα 3 mg/l σε ποσοστό 15,3% και στο 1 mg/l σε ποσοστό 15,4%. Όπως αναφέρουν οι Sattelberger et al. (2005) η οξυτετρακυκλίνη παρουσιάζει σημαντική υδρόλυση και είναι μεγαλύτερη των 100g/l (http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_DE_CB9311671.htm). Το γεγονός αυτό εξηγεί την αποδόμηση που παρατηρείται στο πείραμα μας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adremont A.,Corpet D., Courvalin P. (1997): Antibiotikaresistenz. *Spektrum der Wissenschaft*, 50-57.
- Al-Ahmad A, Daschner F. D., Kümmerer K. (1999) *Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. Arch Environ Contam Toxicol* 37:158–163.
- Alexy R.(2003) Antibiotika in der aquatischen Umwelt: *Eintrag, Elimination und Wirkung auf Bakterien. Thesis. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg.*
- Alexy R., Kümpel T., Kümmerer K. (2004) *Assessment of degradation of 18 antibiotics in the Closed Bottle Test. Chemosphere* 57:505–512.
- Alexy R., Scholl A., Kümpel T., Kümmerer K. (2003) Antibiotics in the aquatic environment: *Testing the biodegradability of selected antibiotics, their occurrence in waste water, their potential impact on the purification performance of municipal sewage treatment plants and identification of associated risks. Final Report. F&E 298 63 722, Federal Environmental Agency, Berlin (in German).*
- Althaus F. R., Mevissen M., Nageli H. (2005): *Pharmakologie II – Antimikrobielle Wirkstoffe. Ein Begleittext zur Vorlesung für die Studierenden der Veterinärmedizin. Universität Zürich, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, http://www.vetpharm.unizh.ch/script/pdf_data/abcs.pdf.*
- Benbrook Charles M. (2002) Antibiotic Drug Use in U.S. Aquacultur. *The Northwest Science and Environmental Policy Center Sandpoint, Idaho.*

- Bettin U. (1996): *Überwachung des Vertriebes und der Anwendung von Tierarzneimitteln in Schleswig-Holstein*. Deutsche tierärztliche Wochenschrift 103, 237-284.
- BgVV (1998): Nationaler Rückstandskontrollplan – Ergebnisse der amtlichen Rückstandsuntersuchungen der Länder.
<http://www.bgvv.de/fbs/fb6/rkp/rkp1998.htm>
- Braithwaite A., F. J. Smith, *Chromatographic Methods*, 5th edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London (1996).
- Burhenne, J., Ludwig, M., Nikoloudis P., Spitteller M. (1997): *Photolytic degradation of fluoroquinolone carboxylic acids in aqueous solution. Primary photoproducts and half-lives*. *ESPR - Environ Sci Pollut Res.* 4, 10.
- Färber H., Skutlarek D., Alberti J., Reupert R.-R. (2004): *Belastung kommunaler Abwässer mit Arzneimitteln aus medizinischen Einrichtungen*. *GWA*, 193, 24/1-24/16.
- Feuerpfeil I., Lopez- Pila J., Schmidt R., Schneider E., Szewzyk R. *Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt*. *Bundesgeshbl.* 42, 32-50.
- Fjelde S., Lunestad B. T., Samuelsen O. B., Ervik A. (1993): *Photostability of oxytetracycline, nitrofurazolidone, oxolinic acid, flumequine, sulfadiazine, sulfadimethoxine, trimethoprim and ormethoprim in seawater*. In: *Haagsma, N., Ruiter, A., Czedik-Eysenberg, P. B. (Eds.): Proc. 2. Euro Residue Conf. Vol. 1, 285-288.*

- Frühling W., Rönnpagel K., Ahlf W. (2000): *Nitrifikanten als Indikator für Bodekontaminationen - Effekte von Umweltchemikalien auf Mikroorganismen als Beurteilungsgrundlage für Toxizität und stoffliche Verfügbarkeit. SETAC Germany, Jahrestagung, 12.-13.9., Hamburg.*
- Gartiser S., Urich E., Alexy R., Kümmerer K. (2007a) *Ultimate biodegradation and elimination of antibiotics in inherent tests.* Chemosphere 67:604–613.
- Gartiser S., Urich E., Alexy R., Kümmerer K. (2007b) *Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes.* Chemosphere 66:1839–1848.
- Geiss H.K. (1997): *Aspekte der Antibiotikaresistenz - Bedeutung von Betalaktamase-Inhibitoren.* Management & Krankenhaus, 4, 4-5.
- Gleckman R., Alvarez S., Joubert D.W. (1979) *Drug therapy reviews: trimethoprim – sulfamethoxazole.* Am J Hosp Pharm. 1979 Jul; 36(7): 893 – 906.
- Grafe U. (1992): *Biochemie der Antibiotika, Struktur – Chemie Wirkmechanismus.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York. ISBN 3-86025-002-7.
- Gutsell J. (1946). *Sulfa drugs and the treatment of furunculosis in trout.* Science, 104, 85 – 86.
- Hahn H., Miksit K. (1999) *Legionellen.* In H. Hahn, D. Falke et al. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* Springer, Berlin.
- Halling-Sørensen B. (2000) *Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming.* Chemosphere 40:731–739.

- Halling-Sørensen B., Jensen J., Tjørnelund J., Montforts M. H. M. M. (2001): Worst-case estimations of predicted environmental soil concentrations (PEC) of selected veterinary antibiotics and residues used in Danish agriculture. In: K. Kümmerer K. (Hrsg.) 2001: *Pharmaceuticals in the Environment, 1. Ed.*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 143-157.
- Hamscher G., Sczesny S., Höper H., Nau H. (2002): *Determination of Persistent Tetracycline Residues in Soil Fertilized with Liquid Manure by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry* 74, 1509-18.
- Hartman P.G. (1993) *Molecular aspects and mechanism of action of dihydrofolate reductase inhibitors*. *J Chemother.* 1993 Dec.; 5(6):369-76
- Hartman Arge Elbe (2003): *Arzneistoffe in Elbe und Saale. Arbeitsgemeinschaft zur Reinhaltung der Elbe*.
- Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K. L. (1999) *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment*. *Sci. Tot. Environ.* 225:109–118.
- Hitchings G.H. (1973) *Mechanism of action of trimethoprim-sulfamethoxazole*. *I.J Infect Dis.* 1973 Nov.; 128:Suppl:433-6 p.
- House of Lords (UK) (1998). House of Lords Select Committee on Science and Technology. *7th Report*. The Stationery Office, London.
- Ingerslev F., Halling-Sørensen B. (2001) Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin, and formation of tylosin degradation products in aerobic soil/manure slurries. *Ecotox Environ Saf* 48:311–320.
- Ingerslev F., Torng Loke M.L., Halling-Sørensen B., Nyholm N. (2001) Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems. *Chemosphere* 44:865–872.

- Kroker R., Scherkl R., Ungemach F.R. (2002): Chemotherapie bakterieller Infektionen in: FREY, H.-H.; LÖSCHER, W. (Hrsg.) Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Enke Verlag Stuttgart, 2. Auflage, ISBN 3-7773-1797-7.
- Kuhne M., Ihnen D., Moller G., Agthe O. (2000): Stability of tetracycline in water and liquid manure. *Journ. Veterin. Medic. Series A - Physiology, Pathology and Clinical Medicine* 47, 379 – 384.
- Kümmerer K., Henninger A. (2003) Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. *Clin Microbiol Inf* 9:1203 – 1214.
- Minero Cl., Chiron S., Falletti G., Maurino V., Pelizzeti E., Ajassa R., Carloti E. M., Vione D., (2006) *Photochemical processes involving nitrite in surface water samples.*
- Lewin C.S., Amyes S.G. (1991) *The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim.* J Med Microb.;34(6):329-32.
- Lunestad B. T., Goksöyr J. (1990) *Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium.* Dis Aquatic Organisms 9:67–72.
- Lunestad B. T., Samuelsen O. B., Fjelde S., Ervik A. (1995): Photostability of eight antibacterial agents in seawater. *Aquaculture.* 134, 217-225.
- Oka H., Ikai Y., Kawamura N., Yamada M., Harada K., Ito S., Suzuki M. (1989): Photodecomposition products of tetracycline in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.* 37, 226-231.
- Rassow D., Schaper H. (1996): Zum Einsatz von Fütterungsarzneimitteln in Schweine- und Geflügelbeständen in der Region Weser-Ems. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 103, 244-249.

- Richardson M.L., Bowron J.M. (1985) *The fate of pharmaceutical chemicals in the environment*. J Pharm.Pharmacol 37:1–12.
- Römbke J., Knacker T., Stahlschmidt-Allner P. (1996): Umweltprobleme durch Arzneimittel – Literaturstudie. *Forschungsbericht* 10604 121, UBA-FB 96-060.
- Rönnefahrt I. (2002): Humanarzneimittel in der Umwelt - *Neue Ansätze in der Risikobewertung in der EU. Jahrestagung 2002 Umweltchemie und Ökotoxikologie*, Tagungsband, 189.
- Samuelson O. B. (1989): Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm. *Aquaculture* 83, 7-16.
- Sanderson H., Ingerslev F., Brain R. A., Halling-Sørensen B., Bestari J. K., Wilson C. J., Johnson D. J., Solomon K. R. (2005): Dissipation of oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline and doxycycline using HPLCUV and LC/MS/MS under aquatic semi-field microcosm conditions. In: *Chemosphere*, 60:619-629.
- Sattleberger R., Gans O., Martinez E., (2005): Veterinärantibiotika in Wirtschaftsdünger und Boden. Umweltbundesamt Wien, Bericht Nr. BE-272, ISBN 3-85457-775-3.
- Schneider C., Möhle E., Stenz G., Krauß P., Metzger J. W. (2001): Arzneimittel in Siedlungsabfällen und in Deponiesickerwässern. Tagung Wasserchemisches Gesellschaft, Bad Wildungen Mai 2001.
- Schweitzer B.I., Dicker AP., Bertino J.R. (1990) Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J.* 1990 May; 4 (8):2441-52.
- Simon C., Stille W. (1993): *Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis*. 8. neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Schattauer Stuttgart, New York.

- Snyder L.R., Kirkland J.J. (1979) Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd Edition, John Willey& Sons, Inc, New York, Chichester, Brisbane, Toronto.
- Sommer A. (2002): *Antibiotika in der aquatischen Umwelt – Bilanzierung des Verbrauchs und Einfluss auf Bakterien in Modellkläranlagen. Diplomarbeit.* Fachhochschule Offenburg.
- Thiele-Bruhn S. (2003) Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *J Plant Nutr Soil Sci* 166:145–167.
- Thomas K.V., Dye C., Schlabach M., Langford KH. (2007) *Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works.* *J Environ Monit* 9:1410–1418.
- Tina Kümpel, Alice Schöll, Klaus Kümmerer u.a. (2003) Eintrag von Antibiotika in die aquatische Umwelt Prüfung der biologischen Abbaubarkeit ausgewählter Antibiotika, ihr Vorkommen im Abwasser und ihr möglicher Einfluss auf die Reinigungsleistung kommunaler Kläranlagen Identifizierung von Risikofeldern Abschlussbericht Freiburg im August 2003.
- Umweltbundesamt (2005) Arzneimittel in der Umwelt -Zu Risiken und Nebenwirkungen fragen Sie das Umweltbundesamt, Dessau Dezember 2005.
- Ungemach F. R. (1999a): Antibiotika und Resistenzproblematik. *Deut. Tierärztl.* 3, 224-226.
- Ungemach F. R. (1999b): Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation, *Acta Vet. Scand. Suppl.* 93, 89-98
- Walsh Ch. (2003) Antibiotics, actions, origins, resistance, 5-47.

- Walsh Ch. (2000) Molecular mechanism that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 2000 Aug. 17; 406(6797):775-81.
- Wiethan J., Al-Ahmad A., Henninger A., Kümmerer K. (2000) Simulation des Selektionsdrucks der Antibiotika Ciprofloxacin und Ceftazidim in Oberflächengewässern mittels klassischer Methoden. *Vom Wasser* 95:107–118.
- Williamson J. S. and Wyandt C. M. (2001) Microbial resistance: the plague of tomorrow. *Drug topics*. 2001; 55 – 64.
- Wise R. (2002) Antimicrobial resistance: priorities for action. *J Antimicrob Chemoth* 49: 585–86.
- Xu W.H., Zhang G., Zou S.C., Li X.D., Liu Y.C. (2007) *Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Environ Pollut* 145:672–679.
- Ye Z., Weinberg H.S, Meyer M.T. (2007) Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 79:1135–1144.
- Zinner S.H. and Mayer K.H. (2000) Sulphonamides and trimethoprim. In Mandell, Douglas and Bennet. Principles and practice of infectious diseases. 5th edition 2000 VI p.2294-2309
http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_DE_CB931167
 I (Ιανουάριος 2010)
- <http://wikipedia.org/wiki/Antibiotic> (Ιανουάριος 2010)
- <http://www.naturkost.de/wiki/index.php/Aquazucht> (Ιανουάριος 2010).

Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic Use of Veterinary Medicines, EMEA/CVMP/342/99-corr-Final.

Μουζούρας Σάββας, (1996), *Κτηνιατρική Φαρμακολογία*, Αθήνα, σελ. 311 - 313.

Μπατζιάς Γ. (2003) *Κτηνιατρική Φαρμακολογία, Αντιμικροβιακά, Αντιμυκητιακά* Θεσσαλονίκη, σελ. 3-23.

Παπαδογιάννης Ι. Ν ., Σαμανίδου Β. Φ. (2000), *Εισαγωγή στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση*, Πήγασος.

Σακκάς Βασίλειος (2002) *Επίπεδα συγκεντρώσεων και μελέτη της φωτολυτικής και φωτοκαταλυτικής διάσπασης επιλεχθέντων βιοκτόνων συστατικών υφαλοχρωμάτων σε υδατικά οικοσυστήματα*. Διδακτορική διατριβή, Ιωάννινα.

Χριστοδούλου Ελ. (2008) *Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης για τον προσδιορισμό κινολονών σε διάφορα δείγματα τροφίμων ζωικής προέλευσης και σε φαρμακευτικά*. Διδακτορική διατριβή, Θεσσαλονίκη, σελ.9.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

A. Όργανα και συσκευές.

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων είναι τα εξής:

- Ψυγείο ARISTON για συντήρηση των δειγμάτων.
- Μηχάνημα HPLC Agilent Technologies συνδεδεμένο με υπολογιστή.
- Σύριγγα Agilent Technologies LC 50nl FN για έκχυση δειγμάτων στο μηχάνημα HPLC.
- Μικροπιπέτα SOCOREX των 100-1000 ul.
- Συσκευή διήθησης MILLIROPE.
- Κλίβανος MEMMERT.
- Συσκευή διπλής απόσταξης JENCONS AUTOSTILL AF/B.

B. Αντιδραστήρια – Υλικά.

Τα αντιδραστήρια και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη καθαρότητας 95% w/w SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany.
- Τριμεθοπρίμη καθαρότητας 98% w/w SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany.
- Νερό διπλά αποσταγμένο από συσκευή διπλής απόσταξης AQUATRON A 4D.
- Τετρακυκλίνη καθαρότητας 95% w/w SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany.
- Νιτρικά καθαρότητας 99% w/w, Potassium nitrate, MERCK.
τριφθοροξικό οξύ (TFA) καθαρότητας 99,5% w/w, FLUKA ,Biochemica.
- Ακετυλονιτρίλιο (CH₃CN) LAB SCAN ANALYTICAL SCIENCES για τη λειτουργία του μηχανήματος HPLC καθώς και για την πλύση της σύριγγας έπειτα από κάθε έγχυση.
- Ακετόνη από εταιρία FLUKA.
- Φιαλίδια VISITOR γυάλινα των 4 ml με πόματα για τη συλλογή των δειγμάτων.
- Φιάλες PYREX για τοποθέτηση στην έκθεση του ηλίου των αντιβιοτικών
- Μεθανόλη LABSCAN.

Γ. Οργανολογία χρωματογραφικού συστήματος.

Η οργανολογία αποτελείται από:

- Αντλίες S LC-10 ADVP.
- Θάλαμος θερμοστάτης στηλών LC-.
- Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων DAD AGILENT 1200 Series.
- Λογισμικό ελέγχου ανιχνευτή LAB SOLUTIONS-LC SOLUTIONS Shimadzu
- Βαλβίδα μίξης διαλυτών της κινητής φάσης.
- Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος RHEODYNE 7725i εφοδιασμένη με βρόγχο όγκου 20 μl.
- Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών.
- Στήλες χρωματογραφίας C18 RP-18 (e) 100 5 μm 150x4,6 mm.

Δ. Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων.

Προετοιμάζονται πρότυπα διαλύματα τριμεθοπρίμης και οξυτετρακυκλίνης σε CH₃CN περιεκτικότητας 1000 mg/L⁻¹, και τετρακυκλίνης σε CH₃OH περιεκτικότητας 1000 mg.L⁻¹. Τα διαλύματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία 4° C και από αυτά παρασκευάζονται στη συνέχεια με αραιώσεις τα διαλύματα συγκεκριμένων συγκεντρώσεων που φωτοδιασπώνται.

