

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επίδραση φαρμακευτικών αναλγητικών ουσιών σε θαλάσσιους
μικροοργανισμούς»**

Ανδρέας Χριστοφή

ΒΟΛΟΣ 2014

**«Επίδραση φαρμακευτικών αναλγητικών ουσιών σε θαλάσσιους
μικροοργανισμούς»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) Κωνσταντίνος Κορμάς**, Αναπληρωτής Καθηγητής Οικολογίας Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- 2) Ιωάννης Μποζιάρης**, Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής και Συντήρησης Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3) Ιφιγένεια Κάγκαλου**, Καθηγήτρια Οικολογίας, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, **Μέλος**.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φαρμακευτικές ουσίες και τα προϊόντα προσωπικής φροντίδας (Pharmaceutical & Personal Care Products, PPCPs) αποτελούν σημαντικούς ρυπαντές του περιβάλλοντος με κύριο αποδέκτη τα υδάτινα οικοσυστήματα. Τα PPCPs, τα οποία αποτελούν ένα αυξανόμενο περιβαλλοντικό πρόβλημα κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας λόγω των σοβαρών επιπτώσεων τους στους ζωντανούς οργανισμούς, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στη βιοιατρική και απελευθερώνονται συνεχώς στα οικοσυστήματα. Κύριες οδοί μεταφοράς αυτών των προϊόντων στα υδάτινα οικοσυστήματα είναι τα αποχετευτικά συστήματα καθώς και οι μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων. Κατά μήκος της διαδρομής τους μπορούν να εξατμιστούν, να αλλάξουν τα φυσικοχημικά ή περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά τους και να τροποποιηθούν σε άλλες μορφές που μπορούν ή δεν μπορούν να δράσουν ως επιβλαβείς ρυπαντές. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες φαρμακευτικών προϊόντων τα οποία ανιχνεύονται στο περιβάλλον. Μια από αυτές είναι τα αναλγητικά και σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι ουσίες οι οποίες μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία: ακεταμινοφαίνη και σαλικυλικό οξύ, τα οποία είναι πλέον πανταχού παρόντα στα επιφανειακά ύδατα και στα λύματα. Τα βακτήρια αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι του μικροβιακού βρόχου και οποιαδήποτε θετική ή αρνητική μεταβολή της αφθονίας τους, μπορεί να έχει άμεσες ή έμμεσες συνέπειες σε ολόκληρη την τροφική αλυσίδα, συμπεριλαμβανομένης και της ανθρώπινης κοινωνίας.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η αύξηση θαλάσσιου βακτηριοπλαγκτού παρουσία και απουσία ακεταμινοφαίνης και σαλικυλικού οξέος, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στον Παγασητικό Κόλπο (περιοχή Άναυρου). Για το σκοπό αυτό

πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε μικρόκοσμους με τη χρήση της μικροσκοπίας επιφθορισμού (χρώση με DAPI).

Λέξεις-κλειδιά: PPCPs, βακτηριακή απόκριση, φωτομέτρηση, μικρο-σκοπία επιφθορισμού (DAPI), υδάτινα οικοσυστήματα, ακεταμινοφαίνη, σαλικυλικό οξύ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. PPCPs.....	1
1.2. Βακτήρια και υδάτινα περιβάλλοντα.....	4
1.3. Ακεταμινοφαίνη & Σαλικυλικό οξύ.....	6
1.4. Παγασητικός κόλπος.....	8
1.5. Σκοπός διπλωματικής εργασίας.....	10
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	11
2.1. In situ δειγματοληψίες.....	11
2.2. Διήθηση, αποστείρωση και εμβολιασμός.....	11
2.2.1. Πείραμα	11
2.2.2. Προετοιμασία κλειστών καλλιιεργειών.....	12
2.3. Χρώση με DAPI.....	13
2.4. Μονιμοποίηση των δειγμάτων.....	14
2.5. Μικροσκοπία επιφθορισμού.....	14
2.6. Τάχος αύξησης.....	17
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	18
3.1 Καταμέτρηση του πληθυσμού.....	18
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	23
4.1. Αύξηση των βακτηριών παρουσία ή μη φαρμακευτικών προϊόντων.....	23
4.2. Συγκρίσεις με άλλες μελέτες.....	24

4.3. Μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων.....	25
4.4. Μελλοντική έρευνα.....	26
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	28
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	29
7. ABSTRACT	33

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. PPCPs

Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις φαρμακευτικών ουσιών καθώς και προϊόντων προσωπικής φροντίδας (Pharmaceutical & Personal Care Products, PPCPs) που διοχετεύονται είτε μέσω των αποχετευτικών συστημάτων ή μέσω μονάδων επεξεργασίας αστικών λυμάτων στο υδάτινο οικοσύστημα αποτελούν πλέον ένα σοβαρό πρόβλημα της θαλάσσιας ρύπανσης. Οι ουσίες αυτές προέρχονται από ανθρωπογενή δραστηριότητα και καταλήγουν στα περισσότερα υδάτινα οικοσυστήματα ως επιβλαβείς περιβαλλοντικοί ρύποι. Τέτοιες ουσίες εντοπίστηκαν σε μικρές συγκεντρώσεις στα διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα όπως παραδείγματος χάριν σε υπόγεια ύδατα, λύματα καθώς στον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα. Στα λύματα, τα PPCPs βρίσκονται συνήθως σε συγκεντρώσεις $<10^{-4}$ g/L (Heberer, 2002). Η χρήση των PPCPs, πέραν του ότι είναι απαραίτητα στις καθημερινές ανάγκες της ζωής όπως θα πρέπει να γίνεται πλήρη εκτίμηση των επιπτώσεων τους που επιφέρουν οι ουσίες αυτές στα υδάτινα οικοσυστήματα (Jjemba, 2008). Επομένως λόγω του ότι οι ανθρωπογενείς αυτοί ρύποι μπορεί να δημιουργήσουν διάφορα προβλήματα στην υγεία όλων των ζωντανών οργανισμών, θα πρέπει να ταυτοποιούνται με ακρίβεια και να προβλέπεται η πορεία της τύχης τους στα υδάτινα οικοσυστήματα καθώς και ο χρόνος παραμονής τους σε αυτά, ώστε να είναι δυνατή η πρόταση λύσης για την απομάκρυνση ή τον περιορισμό τους. Υπάρχουν ενδείξεις για διάφορα προβλήματα τα οποία μπορεί να οφείλονται σε αυτούς τους ρύπους όπως είναι η μείωση της ανδρικής γονιμότητας, γενετικές ανωμαλίες, καρκίνος του μαστού και των όρχεων κ.λ.π. καθώς και δυσμενείς επιπτώσεις στην άγρια πανίδα (Nikolaou et al.,2007).

Η διαδικασία αξιολόγησης του περιβαλλοντικού κινδύνου συνήθως ξεκινά με μια αρχική εκτίμηση μετά από την έκθεση στο συγκεκριμένο ρύπο. Η εκτίμηση και η αξιολόγηση κάποιου συγκεκριμένου ρύπου είναι εφικτή εφόσον η συγκέντρωση της ουσίας αυτής υπερβεί κάποιες οριακές τιμές. Σύμφωνα με την πρόσφατη Ευρωπαϊκή οδηγία 2001/83/EK δεν χρειάζεται να ελεγχθούν χημικές ουσίες όταν είναι κάτω από το όριο δράσης τους, συγκέντρωσης 0,01μg/L. Στις Η.Π.Α., το όριο αυτό είναι διαφορετικό και έως 0,1μg/L δεν αξιολογούνται τα αποτελέσματα. Όταν οι συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών ξεπεράσουν τις οριακές τιμές θα πρέπει να μελετηθούν οι συνέπειες σε διάφορες μορφές ζωής του υδάτινου οικοσυστήματος. Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) απαιτεί μια έκθεση αξιολόγησης περιβαλλοντικών επιδράσεων, αν το δραστικό συστατικό αναμένεται να εισαχθεί στο υδάτινο περιβάλλον σε συγκεντρώσεις $\geq 1\mu\text{g/L}$ (Nikolaou et al., 2007).

Για να κατοχυρωθεί κάποιο φάρμακο για θεραπεία σύμφωνα με την οδηγία 2001/83/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης θα πρέπει πρώτα να εκτιμηθεί ο περιβαλλοντικός κίνδυνος που μπορεί να προκαλέσει. Οι πιο συνήθεις ουσίες που εντοπίζονται στα διάφορα υδάτινα περιβάλλοντα είναι η καφεΐνη, ενώ φαρμακευτικές ουσίες όπως ακεταμινοφαίνη (*acetaminophen*, $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$) και σαλικυλικό οξύ (Salicylic acid, $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$), ιμπουπροφαίνη, 17β- αιθυνυλοιστραδιόλη δικλοφενάκη, ατορβαστατίνη, καρβαμαζεπίνη, γκεμφιμπροζίλη, φλουξετίνη και κλοφιβρικό οξύ βρίσκονται πλέον πανταχού παρόντα στα επιφανειακά ύδατα και λύματα (Nikolaou et al., 2007).

Η εμφάνιση των φαρμακευτικών δραστικών ενώσεων στο υδάτινο περιβάλλον έχει αναγνωρισθεί ως ένα από τα νεοεμφανιζόμενα προβλήματα στην περιβαλλοντική χημεία (Heberer, 2002). Οι φαρμακευτικές ουσίες που ανιχνεύονται

στο περιβάλλον ανήκουν στις κατηγορίες των αναλγητικών, αντιβιοτικών, αντισυλληπτικών, β-αποκλειστές, ρυθμιστές λιπιδίων, ηρεμιστικών, καρκινικά, φάρμακα ανικανότητας και κτηνιατρικά (Hebere, 2002). Η αύξηση της φαρμακευτικής χρήσης διαφόρων ουσιών, που μπορεί να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στους ζωντανούς οργανισμούς, συμπίπτει με την ανίχνευση αυτών των ενώσεων στο περιβάλλον καθώς συνεχώς απελευθερώνονται σε αυτό (Nikolaou et al., 2007). Οι ουσίες αυτές ανιχνεύονται στο υδάτινο οικοσύστημα για το λόγο ότι δεν απορροφούνται πλήρως από το ανθρώπινο ή άλλους ζωικούς οργανισμούς και έτσι εκλύεται ένας συνδυασμός των άθικτων και μεταβολιζόμενων φαρμάκων, με αποτέλεσμα πολλές βιοενεργές ενώσεις να εισέρχονται στα υγρά απόβλητα χωρίς να εξετάζονται οι περιβαλλοντικές τους επιπτώσεις ή ακόμα και από την άμεση εφαρμογή τους στις υδατοκαλλιέργειες (Heberer, 2002, Nikolaou et al., 2007). Αρκετές φαρμακευτικές ενώσεις έχουν βρεθεί σε λύματα σε συγκεντρώσεις έως και της τάξης των $\mu\text{g/L}$ (Heberer, 2002).

Η παρουσία των ανθρώπινων κτηνιατρικών φαρμάκων στο περιβάλλον απασχολούν την τελευταία δεκαετία τους ερευνητές μιας και αυτοί οι αναδυόμενοι ρύποι φαίνεται ότι συνεχίζουν να υπάρχουν στο έδαφος και το νερό (Celiz et al., 2009). Η φυσική οργανική ύλη στο έδαφος και το νερό μπορούν να συνδεθούν με το φάρμακο και να αλλάξουν τη διαλυτότητα και τη δραστικότητα του φαρμάκου (Celiz et al., 2009). Τέλος, οι μεταβολίτες του φαρμάκου που βρίσκονται στο υδάτινο περιβάλλον θα μπορούσαν να ενωθούν ξανά σχηματίζοντας την αρχική ένωση, έτσι μπορούμε να εξηγήσουμε και την αυξημένη συγκέντρωση των αρχικών φαρμάκων στο περιβάλλον (Celiz et al., 2009).

1.2. Βακτήρια και υδάτινα περιβάλλοντα

Τα βακτήρια αποτελούν τη βασική συνιστώσα των υδάτινων οικοσυστημάτων και αποτελούν τους κυριότερους διαμεσολαβητές στην ανακύκλωση της οργανικής ύλης. Λαμβάνουν μέρος στην ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών καθώς και στην επαναφορά της διαλυμένης οργανικής ύλης στην τροφική αλυσίδα. Η αφθονία των ετερότροφων βακτηριακών ομάδων στα ύδατα επιφάνειας αποτελείται από 3 υποδιαιρέσεις των *Proteobacteria* (α -, β - και γ -*Proteobacteria*) και μια υποομάδα των *Bacteroidetes* (Kirchman, et al., 2004). Τα α - *Proteobacteria* εμφανίζονται σε αφθονία στους ωκεανούς ενώ τα *Bacteroidetes* είναι πλούσια τόσο σε γλυκά όσο και σε θαλασσινά οικοσυστήματα (Kirchman et al., 2004). Αφού λοιπόν αυτά είναι τα πιο άφθονα, τότε θα αναμένεται να είναι και πιθανοί αποικοδομητές ρύπων, όπως PPCP. Επομένως η παρακολούθηση των υδάτινων οικοσυστημάτων θα πρέπει να γίνεται και με βακτηριολογικούς ελέγχους στους δείκτες χημικής οργανικής ρύπανσης, ώστε να μπορέσουμε να αξιολογήσουμε της ποιότητά τους από άποψη υγείας (Kagalou et al., 2002).

Η ρύπανση η οποία προκαλείται από τα PPCPs στα υδάτινα οικοσυστήματα έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της μικροβιακής κοινότητας (Kagalou, et al., 2003). Οι μικροβιακές κοινότητες έχουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται στις μεταβαλλόμενες αλλαγές των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων αλλάζοντας τη λειτουργία ή την σύνθεση των ετερότροφων μικροβιακών κοινοτήτων (Eiler et al., 2003, Bielinska et al., 2011, Michelle et al., 2012). Η αερόβια και αναερόβια αποικοδόμηση θεωρείται η σημαντικότερη διαδικασία για την απομάκρυνση των φαρμακευτικών ουσιών από το περιβάλλον, για αυτό ο το λόγο θα πρέπει να μελετηθεί και τη σχέση που υπάρχει μεταξύ των ετερότροφων βακτηρίων και των

φαρμακευτικών ουσιών έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα βακτήρια για την καταπολέμηση και τη μείωση των συγκεντρώσεων των φαρμακευτικών ουσιών από τα διάφορα υδάτινα περιβάλλοντα.

Ο βακτηριακός πληθυσμός μπορεί να διαφοροποιηθεί με το πέρασμα του χρόνου, ενδεχομένως επειδή τα βραδέως αναπτυσσόμενα βακτήρια φθάνουν τελικά στη μέγιστη αφθονία τους (Heberer, 2002). Οι οξειδοαναγωγικές συνθήκες επηρεάζουν την ικανότητα αποδόμησης των βακτηρίων (Heberer, 2002). Οι μικροβιακές κοινότητες μπορούν να ανταποκριθούν στις μεταβαλλόμενες αλλαγές στις συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων αλλάζοντας τη λειτουργία ή την σύνθεση των ετερότροφων μικροβιακών κοινοτήτων (Eiler et al., 2003, Bielinska et al., 2011, Michelle et al, 2012) . Ο βακτηριακός πληθυσμός διαιρείται ανάλογα με την ποσότητα και την ποιότητα των προστιθέμενων υποστρωμάτων (Michelle et al., 2012). Η αερόβια και αναερόβια αποικοδόμηση είναι μια από τις πιο σημαντικές διαδικασίες για την απομάκρυνση των φαρμακευτικών προϊόντων από τη διαλυμένη φάση. Γι αυτό το λόγο είναι σημαντικό να εξετάσουμε και την σχέση μεταξύ των ετερότροφων βακτηρίων και των φαρμακευτικών προϊόντων ώστε να μπορούν να βρεθούν ακόμα και λύσεις σχετικά με τους ρύπους αυτούς.

Ένας ακόμη λόγος για τον οποίο αναπτύσσεται τόσο μεγάλη ερευνητική δραστηριότητα γύρω από την φαρμακοοικολογία είναι διότι η παρουσία διαφόρων φαρμάκων και κυρίως αντιβιοτικών στα οικιακά συστήματα αποχέτευσης, η οποία αποτελεί έναν από τους κύριους τρόπους εμφάνισης αυτών των φαρμάκων σε υδάτινα περιβάλλοντα (Celiz et al., 2009), οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων σε αυτά (Batt, et al., 2006, Nikolaou, et al., 2007). Το γονίδιο αυτό της ανθεκτικότητας θα μπορούσε εύκολα να μεταφερθεί και σε άλλα είδη βακτηρίων τα οποία όταν θα έρχονταν σε επαφή με τον άνθρωπο και θα τον μόλυναν δεν θα

μπορούσαν να αντιμετωπιστούν με τα συγκεκριμένα φάρμακα. Έτσι, θεωρείται αναγκαία η απομάκρυνση των αντιβιοτικών αυτών με διάφορες διαδικασίες από τα λύματα, προτού αυτά φτάσουν σε κάποιον υδάτινο περιβάλλον.

1.3. Ακεταμινοφαίνη & Σαλικυλικό οξύ

Μια από τις κατηγορίες που αναφέραμε στα παραπάνω φάρμακα είναι τα αναλγητικά και σε αυτήν ανήκουν οι ουσίες σαλικυλικό οξύ (ασπιρίνη) και ακεταμινοφαίνη οι οποίες και μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Τα αναλγητικά φάρμακα χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανακούφιση από τον πόνο (Jjemba, 2008).

Η ασπιρίνη (Εικ. 1), γνωστή με την επιστημονική ονομασία ακετυλοσαλικυλικό οξύ ($C_9H_8O_4$), ανήκει στην κατηγορία των αναλγητικών φαρμακευτικών ουσιών. Έχει λευκό χρώμα, είναι κρυσταλλική, άοσμη ελαφρώς όξινη και το σημείο ζέσεως της είναι $135^{\circ}C$. Η δυνατότητα διάσπασης της ασπιρίνης στο νερό είναι 1g στα 300ml στους $25^{\circ}C$ ή στα 100ml στους $37^{\circ}C$. Διασπάτε ταχέως σε ζεστό νερό ή σε διαλύματα οξικού αμμωνίου και γενικώς σε διαλύματα οξικών, ανθρακικών, κιτρικών αλάτων ή υδροξειδίων των αλκαλίων. Η δομή της παραμένει σταθερή στον ξηρό αέρα αλλά με την παρουσία υγρασίας υδρολύεται. Το ακετυλοσαλικυλικό οξύ αποτελείται από το ακετυλοχλωρίδιο και το σαλικυλικό οξύ. Η πρώτη ανάμειξη έγινε από τον Σαρλ Φρεντερίκ Ζεράρτ το 1853 ο οποίος ονόμασε την αντίδραση των παραπάνω χημικών ουσιών, "σαλικυλικό - οξικό ανυδρίτη". Η ασπιρίνη πρωτοεμφανίστηκε στην αγορά το 1899 μετά από έρευνες της Γερμανικής εταιρείας Μπάγιερ. Η δράση της ασπιρίνης ορίστηκε ως η αναστολή παραγωγής προσταγλανδινών από τον οργανισμό και εξακριβώθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1970. Η φαρμακευτική ουσία ασπιρίνη χρησιμοποιείται ως αναλγητικό, αντιπυρετικό, αντιφλεγμονώδες καθώς και ως αντισυγκολλητικό των αιμοπεταλίων. Επίσης,

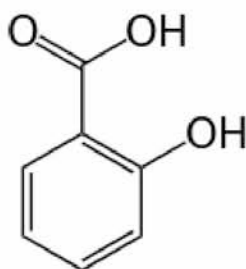
χρησιμοποιείται για την μείωση των καρδιακών προσβολών και εμφάνισης συγκεκριμένων καρκινικών όγκων. Τα όξινα φαρμακευτικά προϊόντα, όπως είναι και το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, εμφανίζονται ως ιόντα σε ουδέτερο pH, οπότε δεν μπορούν εύκολα να προσροφηθούν από την ιλύ και παραμένουν την υδατική φάση, ενώ τα βασικά φαρμακευτικά προϊόντα μπορούν να προσροφηθούν στη λάσπη σε σημαντικό βαθμό επεξεργασίας (Nikolaou, et al., 2007).

Η ακεταμινοφαίνη (Εικ. 2), γνωστή και ως παρακεταμόλη ($C_8H_9NO_2$) είναι χημική ουσία με φαρμακευτική δράση, η οποία χρησιμοποιείται ως αναλγητικό και ως αντιπυρετικό, (ευρέως γνωστή για την χρήση της σε πολλών ειδών φαρμάκων). Είναι επίσης λευκή και κρυσταλλική, άοσμη με ελαφρά πικρή γεύση και το σημείο ζέσεως της είναι $169^{\circ}C$. Η διαλυτότητα της είναι 1,4g στα 100ml στους $20^{\circ}C$. Επιπλέον μπορεί να διασπαστεί μέσα σε αιθανόλη. Η πρώτη ανακαλύψη παρακεταμόλης έχει γίνει στο τέλος του 19^{ου} αιώνα από φυσικούς πόρους όπως τα δέντρα κινόα ή από φλοιό ιτιάς. Αφού η παρατεταμένη χρήση τους απείλησε την εξαφάνιση τους άρχισαν οι πρώτες αναμειξείς ουσιών το 1886-7 για θεραπεία λοιμώξεων και πυρετού. Λόγο της τοξικότητας της ουσίας που εφευρέθηκε, προχώρησαν σε περεταίρω έρευνες και το 1889 παρουσιάστηκε για πρώτη φορά η παρακεταμόλη. Η παρακεταμόλη πρωτοεμφανίστηκε στην αγορά στις Ηνωμένες Πολιτείες, το 1953 και προωθήθηκε αντίθετα με την ασπιρίνη για ευρύ κοινό όπως παραδείγματος χάρη σε ανήλικα άτομα. Στο Ηνωμένο Βασίλειο εμφανίστηκε η παρακεταμόλη σε μορφή δισκίου 500mg με την γνωστή ονομασία Panadol το 1956.

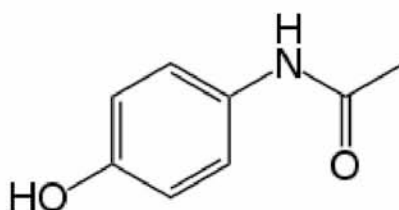
Θεωρείται ένα από τα ασφαλέστερα αναλγητικά, αλλά όταν λαμβάνεται σε μεγάλες δόσεις ($>10g$) εμφανίζονται φαινόμενα τοξικότητας (Savides and Oehme, 1983). Το πλεονέκτημα έναντι του σαλικυλικού οξέος είναι ότι δεν προκαλεί γαστρική αιμορραγία ή ερεθισμό, ούτε καταστέλλει την δραστηριότητα της

προθρομβίνης σε θεραπευτικές δόσεις. Έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί από ασθενείς ή οποίοι είναι δεν μπορούν να λάβουν σαλικυλικό οξύ (Savides and Oehme, 1983).

Σε διάφορες χώρες της Ευρώπης και της Αυστραλίας, τα δύο αυτά αναλγητικά φάρμακα είναι τα πιο διαδεδομένα και έχουμε τη μεγαλύτερη κατανάλωση ανά κάτοικο στις αναπτυσσόμενες αυτές χώρες. Για παράδειγμα, στη Γερμανία και την Αυστρία έχουμε μεγαλύτερη κατανάλωση αυτών των δύο με πρώτο το σαλικυλικό οξύ, ενώ στην Αυστραλία, Δανία, Σουηδία και Αγγλία έχουμε μεγαλύτερη κατανάλωση της ακεταμινοφαίνης (Jjemba, 2008).



Εικόνα 1. Χημική απεικόνιση Σαλικυλικού Οξέως



Εικόνα 2. Χημική απεικόνιση Ακεταμινοφαίνης

1.4. Παγασητικός κόλπος

Ο Παγασητικός κόλπος βρέχει τη περιοχή του Βόλου και γεωγραφικά βρίσκεται $39^{\circ}12'51''\text{N}$ $23^{\circ}1'1''\text{E}$.



(A)



(B)

Εικόνα 3 (A),4 (B). Παραλία Αναύρου, Βόλος

Ο Παγασητικός κόλπος είναι κλειστή και σχετικά αβαθής θάλασσα. Ο κόλπος έχει έκταση περίπου 175 τετρ. χλμ. και μέγιστο βάθος 102 μ. Το άνοιγμα του κόλπου περιορίζεται νότια, προς τον Ευβοϊκό κόλπο και το Αιγαίο πέλαγος, ανάμεσα στο ακρωτήριο Τρίκερι, της Μαγνησίας, (ανατολικά), και το ακρωτήριο Σταυρός της βορειοανατολικής χερσαίας λωρίδας της Φθιώτιδας (δυτικά), διατηρώντας άνοιγμα 4 χλμ.

Ο Παγασητικός κόλπος υπέφερε για πολλά χρόνια από βιομηχανική, γεωργική και αστική ρύπανση. Τα τελευταία χρόνια, η κατάσταση έχει βελτιωθεί μετά την έναρξη λειτουργίας μονάδας επεξεργασίας λυμάτων στον Βόλο και τη διακοπή της απορροής των ομβρίων υδάτων της αποξηραμένης λίμνης Βοιβηίδας (Κάρλα). Ωστόσο δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία για την ρύπανση του παγασητικού κόλπου από τα PPCP.

1.5. Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της απόκρισης του βακτηριοπλγκτού σε δύο διαφορετικά φαρμακευτικά προϊόντα, της ακεταμινοφαίνης και σαλικυλικού οξέος, στις ίδιες συγκεντρώσεις των 500mg/L. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε μικρόκοσμους χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της μικροσκοπίας επιφθορισμού για την ποσοτικοποίηση της βακτηριακής αφθονίας.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στην παραλία Άναυρος Βόλου με κύριο στόχο την μελέτη της απόκριση των βακτηρίων, τα οποία αποτελούν μια βασική συνιστώσα της βιομάζας των υδάτινων οικοσυστημάτων με σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση θρεπτικών, στην παρουσία δύο αναλγητικών φαρμάκων ευρείας χρήσης, της ακεταμινοφαίνης και του σαλικυλικού οξέος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. In situ δειγματοληψία

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης πραγματοποιήσαμε συνολικά δύο δειγματοληψίες. Το πείραμα έγινε Απρίλιο 2011. Το δείγμα (θαλασσινό νερό) συλλέχθηκε στο Βόλο από τη παραλιακή περιοχή του Άναυρου σε πλαστικές φιάλες των 5 l. Οι φιάλες μεταφέρονταν στο εργαστήριο μέσα σε χρονικό διάστημα δύο ωρών.

2.2. Διήθηση, αποστείρωση και εμβολιασμός

Πριν από κάθε πείραμα πλένονται όλα τα σκεύη που θα χρησιμοποιηθούν με διάλυμα HCl 10%. Όλα τα πειράματα πραγματοποιούνται με γάντια.

2.2.1. Πείραμα

Το βασικό πείραμα πραγματοποιήθηκε στις 10 Μάρτιο του 2011 και ο όγκος νερού που συλλέχθηκε από τον Παγασητικό κόλπο ήταν περίπου 5 L, τα οποία διηθήθηκαν σε φίλτρα μεμβράνης ίσου πόρου 0,2 μm άνοιγμα πόρων και διάμετρο 47mm και 450 ml τοποθετήθηκαν σε κάθε μία από εννέα γυάλινες φιάλες τύπου Schott των 0,5 L και αποστειρώθηκαν στους 121⁰C για 15 λεπτά. Μετά την αποστείρωση και αφού οι φιάλες ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 50 mL εμβολίου και οι αντίστοιχες ποσότητες φαρμακευτικών ουσιών. Τα μπουκάλια χωρίστηκαν ως εξής: 3 τα οποία δεν περιείχαν φάρμακο, 3 με συγκέντρωση σαλικυλικού από 0504-0,508mg/l και 3 με συγκέντρωση ακεταμινοφαίνη από 0,501-

0,506 (Πίν.1). Το πείραμα έγινε τριπλό για να έχουμε έναν καλό αριθμό επαναλήψεων. Οι συνθήκες επώασης ήταν στο σκοτάδι στους 15°C.

2.2.2. Προετοιμασία κλειστών καλλιιεργειών

Αμέσως μετά τη μεταφορά του δείγματος στο εργαστήριο έγινε η διήθηση του θαλασσινού νερού χρησιμοποιώντας αντλία κενού αέρος (150 mm Hg) και πολυκαρβονικό φίλτρο ίσου πόρου 0,2μm. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε το διηθημένο νερό στο αυτόκαυστο για αποστείρωση σε θερμοκρασία 121 °C και σε χρόνο 15 λεπτών, ακολούθως τοποθετήθηκαν οι φιάλες 500 ml με το αποστειρωμένο νερό στη κατάψυξη και το αφήσαμε εκεί για όσο χρονικό διάστημα χρειαζόταν το δείγμα για να κρύνει. Ζυγίστηκαν τα υλικά μας (σαλικυλικό και ακεταμινοφαίνη) (Πίν. 1) και τα προστέθηκαν στα δείγματα μας εφόσον αυτά κρύωσαν. Σε κάθε δείγμα προστέθηκε ποσότητα φαρμακευτικής ουσίας τελικής συγκέντρωσης περίπου 1 g/l .

Πίνακας 1. Τελικές συγκεντρώσεις εμβολιασμού δειγμάτων.

Δείγματα	Συγκέντρωση εμβολιασμού (mg/l)
Μάρτυρας (x3)	0
Σαλικυλικό (x3)	0,504-0,508
Ακεταμινοφέν (x3)	0,501-0,506

Με το πέρας της διαδικασίας αυτής εμβολιάσαμε τα δείγματα μας με το αρχικό θαλασσινό νερό, ώστε να υπάρχει περίπου το 10% της βακτηριακής αφθονίας

του φυσικού δείγματος. Σε κάθε δειγματοληψία, λαμβάνονταν δείγμα 5-10ml από κάθε μεταχείριση και προσθέτονταν φορμαλδεύδη τελικής συγκέντρωσης 2%.

Από τα 10ml του δείγματος διηθήθηκαν 5-7ml σε φίλτρο 0.2μm, στο δείγμα που μας έχει απομείνει προσθέσαμε 3 σταγόνες DAPI (τελική συγκέντρωση 10 μg/ml) και το αφήσαμε στο σκοτάδι για χρονικό διάστημα 5 λεπτών (αυτό γίνεται για να χρωματιστεί το DNA των βακτηρίων έτσι ώστε να μπορούμε να τα διακρίνουμε στο μικροσκόπιο). Εφόσον περιέλθει ο χρόνος των 5 λεπτών διηθήσαμε και το υπόλοιπο δείγμα μας. Πήραμε το φίλτρο με τη βοήθεια μίας λαβίδας, το αφήσαμε μερικά δευτερόλεπτα να στεγνώσει και το τοποθετήσαμε στην αντικειμενοφόρο πλάκα, αφού πρώτα βάλουμε μία σταγόνα μη φθορίζοντος λαδιού σε αυτήν έτσι ώστε να μπορεί το φίλτρο να κολλήσει. Μετά βάλουμε ακόμα μία σταγόνα λάδι στο φίλτρο και τοποθετήσαμε την καλυπτρίδα. Τέλος, μεταφέραμε τα δείγματα μας στο μικροσκόπιο και ακολούθησε η διαδικασία καταμέτρησις των δειγμάτων μας (βακτήρια). Η παραπάνω διαδικασία ακολουθείται για όλα τα δείγματά μας.

2.3. Χρώση με DAPI

Ο προσδιορισμός του αριθμού ολικών βακτηρίων στη στήλη του νερού πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της φθορίζουσας μικροσκοπίας (Hobbie et al., 1977). Όταν οι χλωροπλάστες των φωτοσυνθετικών οργανισμών φωτίσουν με ιώδη ή υπεριώδη ακτινοβολία, εμφανίζουν αυτοφθορισμό. Αντίθετα τα ετερότροφα βακτήρια εμφανίζουν δευτερεύοντα φθορισμό όταν χρωματίζονται με ειδικές χρωστικές όπως πορτοκαλί της ακριδίνης (4,6- diamidino -2- phenylidole). Η χρωστική που χρησιμοποιήθηκε είναι το DAPI. Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι η χρωστική αυτή πλεονεκτεί έναντι της χρωστικής πορτοκαλί της ακριδίνης λόγω της

ισχυρότερης αντίθεσης που δίνει μεταξύ βακτηριακών κυττάρων και σωματιδίων τριπτού δεσμεύεται αποκλειστικά από βακτηριακό DNA αλλά και διαρκεί και περισσότερο επιτρέπονται τη φύλαξη των δειγμάτων για περισσότερο χρόνο.

Σε ορισμένη ποσότητα δείγματος προστίθεται χρωστική DAPI. Μετά από πέντε λεπτά, το δείγμα διειθίζεται από μαύρο φίλτρο με διάμετρο πόρου 0,2μm. Η παρατήρηση στο μικροσκόπιο φθορισμού γίνεται με ελαιοκαταδυτικό φακό. Τα βακτηριακά κύτταρα φθορίζουν και έτσι είναι δυνατή η παρατήρηση και καταμέτρησή τους. Η προετοιμασία των δειγμάτων για τη παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο γινόταν το πολύ τρεις μήνες μετά τη συλλογή των δειγμάτων έτσι ώστε να μειωθούν οι πιθανότητες ελάττωσης του αριθμού βακτηρίων που οφείλεται στη συνάρτηση του δείγματος με φορμαλδεύδη.

2.4. Μονιμοποίηση των δειγμάτων

Η μονιμοποίηση των βακτηριακών δειγμάτων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για καταμέτρηση θα πρέπει να πραγματοποιηθεί αμέσως έτσι ώστε να αποφευχθούν οι αλλαγές στους αριθμούς των βακτηρίων (Kerper & Pratt, 1994). Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο συντηρητικό είναι η φορμαλδεύδη (FMA). Η FMA δρα σκληραίνοντας τα βακτηριακά κύτταρα, εμποδίζοντας έτσι βλάβες σε περαιτέρω επεξεργασία τους (Kerper & Pratt, 1994).

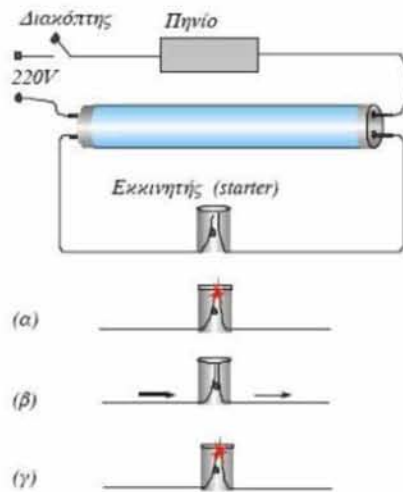
2.5. Μικροσκοπία Επιφθορισμού

Η μέθοδος του επιφθορισμού είναι η καλύτερη για την απευθείας καταμέτρηση του συνόλου των βακτηρίων σε περιβαλλοντικά δείγματα (Kerper & Pratt, 1994). Το πρώτο διηθεί το φως προτού φτάσει στο δείγμα, αφήνοντας να διέλθουν μόνο τα μήκη κύματος που διεγείρουν τη συγκεκριμένη φθορίζουσα

χρωστική (Alberts et al., 2006). Το δεύτερο ανακόπτει αυτό το φως και αφήνει να διέλθουν μόνο τα μήκη κύματος που εκπέμπονται από τη φθορίζουσα χρωστική (Alberts et al., 2006). Τα αντικείμενα που έχουν χρωσθεί αναδεικνύονται με ζωηρό χρώμα σε σκοτεινό φόντο (Alberts et al., 2006). Το μικροσκόπιο φθορισμού εκμεταλλεύεται τη δυνατότητα εκπομπής φθορισμού από ορισμένες ουσίες που απορροφούν το φως μικρού μήκους κύματος (υπεριώδες φάσμα) και εκπέμπουν φως μεγαλύτερου μήκους κύματος (ορατό φάσμα) (Tortora et al., 2009).

Φθορισμός είναι η ιδιότητα μερικών χημικών ουσιών να ακτινοβολούν φως, όταν πάνω τους προσπίπτει αόρατη ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος.

Αρχή λειτουργίας λαμπτήρων φθορισμού: Κλείνοντας το διακόπτη ο λαμπτήρας δε διαρρέεται αρχικά από ρεύμα. Όμως στον εκκινητή (starter) αρχίζει αμέσως εκκένωση μεταξύ των ηλεκτροδίων του και διαρρέεται από ρεύμα. Το ένα ηλεκτρόδιο του εκκινητή είναι διμεταλλικό έλασμα και, όταν διαρρέεται από ρεύμα, θερμαίνεται, παραμορφώνεται και κλείνει το διάκενο μεταξύ των ηλεκτροδίων. Τότε η εκκένωση σταματάει και το κύκλωμα διαρρέεται από ισχυρό ρεύμα. Τα ηλεκτρόδια θερμαίνονται και εκπέμπουν ηλεκτρόνια, ενώ ταυτόχρονα εξατμίζεται ο υδράργυρος. Επίσης με τη διακοπή της εκκένωσης το διμεταλλικό έλασμα δε διαρρέεται από ρεύμα, οπότε ψύχεται και το κύκλωμα διακόπτεται.

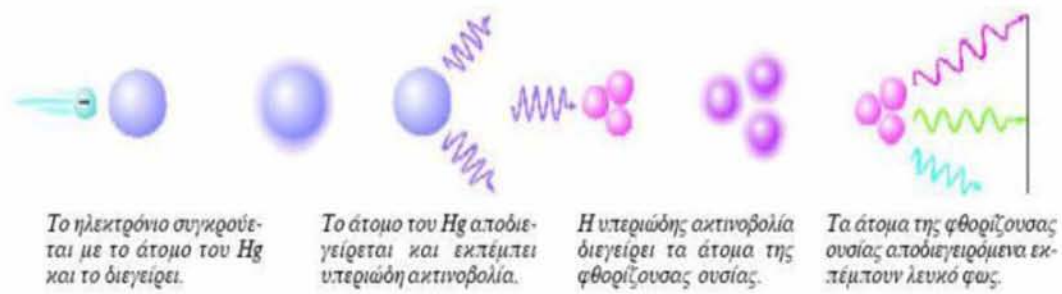


Σχήμα 1. Το κύκλωμα λειτουργίας του λαμπτήρα φθορισμού και οι φάσεις λειτουργίας του εκκινητή (starter).

Η διακοπή αυτή συνοδεύεται με ανάπτυξη τάσης στα άκρα του λαμπτήρα, μεγαλύτερης του δικτύου (επαγωγικό φαινόμενο λόγω ύπαρξης του πηνίου), και έτσι αρχίζει η εκκένωση μέσα από τους ατμούς υδραργύρου.

Τα ηλεκτρόνια, επιταχυνόμενα από το ηλεκτρικό πεδίο μεταξύ των ηλεκτροδίων, συγκρούονται με τα άτομα του υδραργύρου προκαλώντας του ηλεκτρονική διέγερση. Η αποδιέγερση των ατόμων του υδραργύρου έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή υπεριώδους ακτινοβολίας.

Η υπεριώδης ακτινοβολία, όταν προσπίπτει στη φθορίζουσα ουσία (επίχρισμα), προκαλεί τη διέγερση των ατόμων της. Στη συνέχεια, όταν τα άτομα αποδιεγείρονται, εκπέμπουν ορατό φως (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Διαδικασία παραγωγής φωτός στους λαμπτήρες φθορισμού.

2.6. Τάχος αύξησης

Με τον όρο αύξηση ορίζεται κάθε μη αντιστρεπτή μεταβολή στο μέγεθος ενός κυττάρου, ενός οργάνου ή ακόμα και ενός ολόκληρου οργανισμού. Η αύξηση λοιπόν και η διαφοροποίηση αποτελούν αντίστοιχα την ποσοτική και την ποιοτική συνιστώσα της ανάπτυξης.

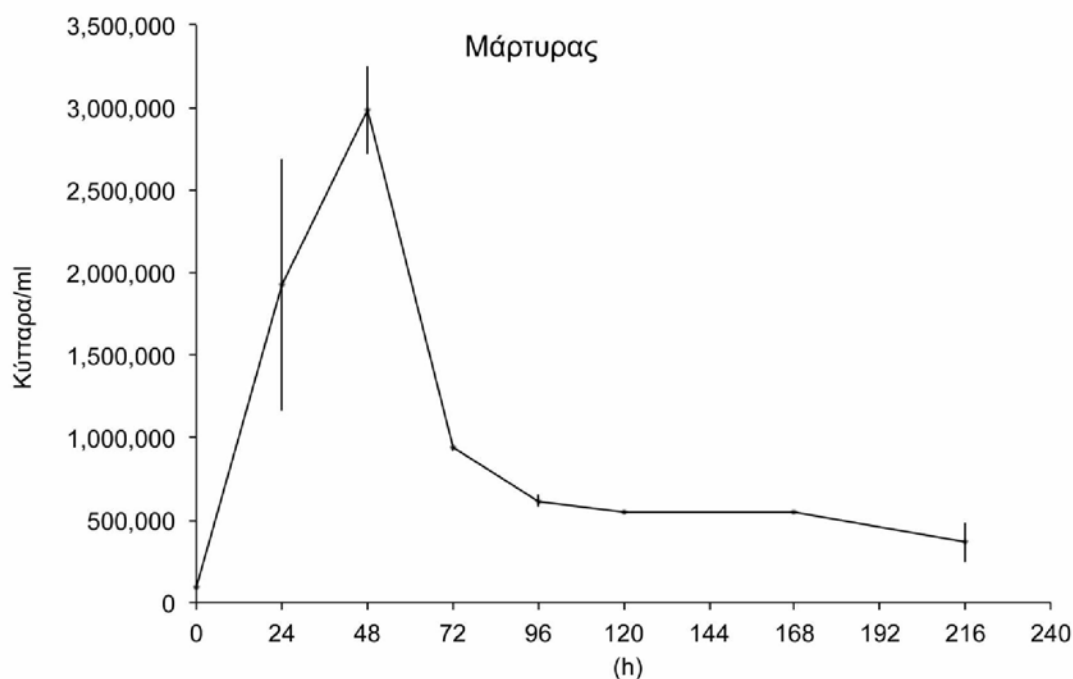
Η τιμή dn/dt παριστά την κλίση της καμπύλης σε κάθε χρονική στιγμή t και αντιπροσωπεύει παράλληλα τον αυξητικό ρυθμό της αποικίας. Αντίθετα, εάν όλα τα άτομα διαιρούνται με τον ίδιο ρυθμό τότε σε κάθε χρονική στιγμή ο αυξητικός ρυθμός της αποικίας (dn/dt) θα είναι ανάλογος με τον αριθμό των ατόμων (n). Ονομάζετε απόλυτο τάχος αύξησης (G) το λόγο dn/dt και σχετικό τάχος αύξησης (R) το λόγο $dn/(dt.n)$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Καταμέτρηση του πληθυσμού

Τα αποτελέσματα των πληθυσμών ($n=3$ επαναλήψεις) τα οποία προκύπτουν από τις μετρήσεις παραθέτονται στη παρακάτω γραφική παράσταση (Σχ. 3.1 – 3.3).

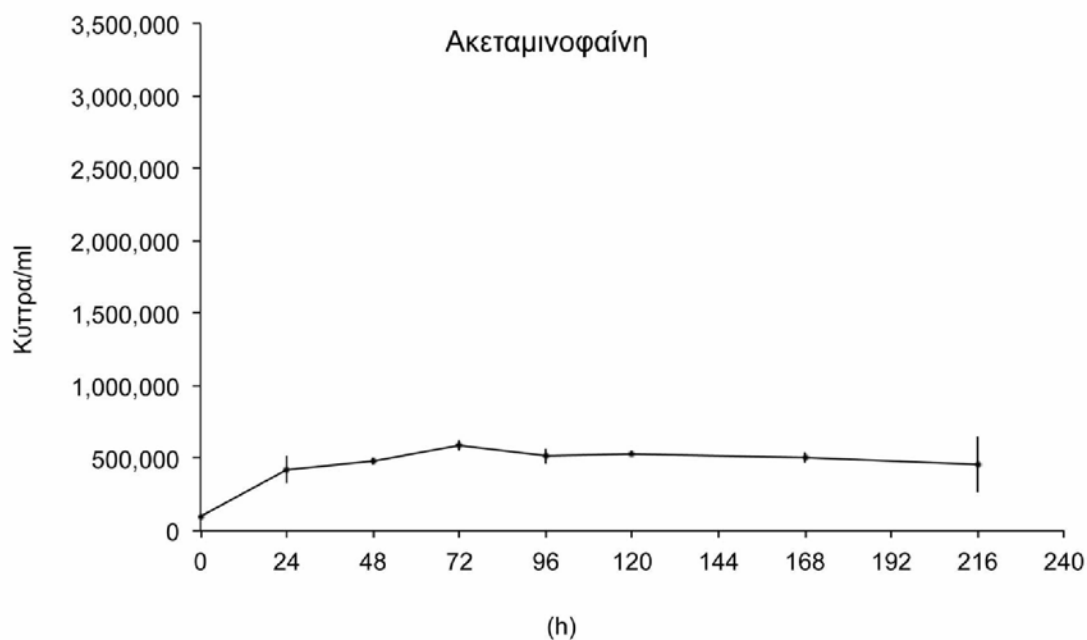
Οι μετρήσεις έγιναν σε βακτήρια.



Σχήμα 3.1 Μέτρηση της αφθονίας των ετερότροφων βακτηριακών πληθυσμών απουσία της ακεταμινοφαίνης και του σαλικυλικού οξέος, μέσω της μεθόδου φθορισμού.

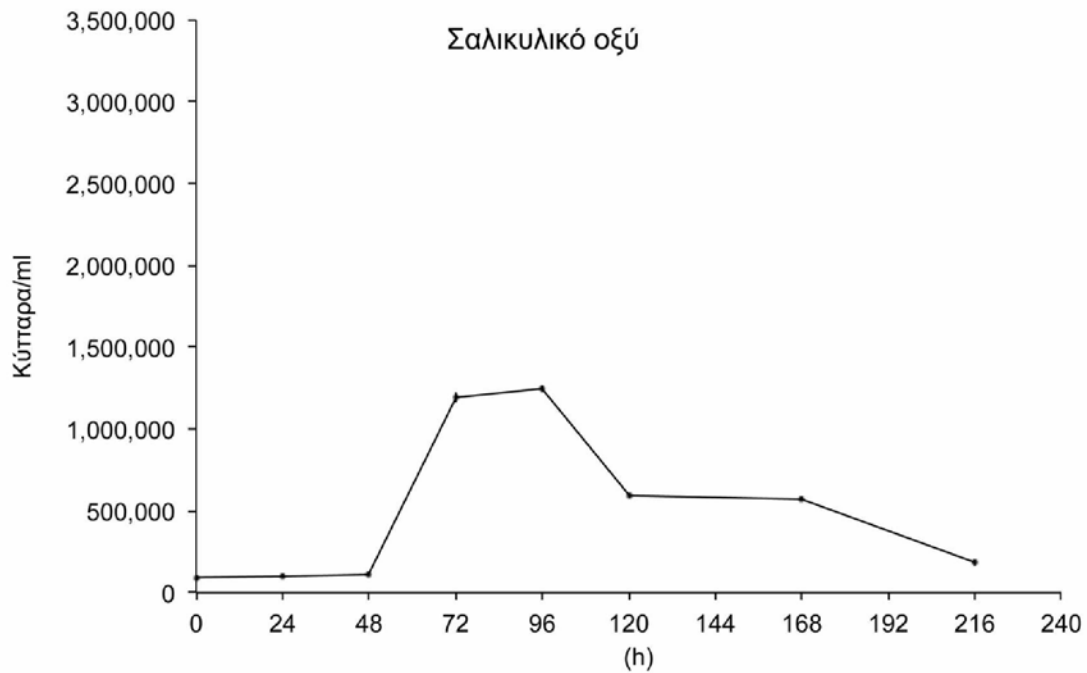
Από την παραπάνω γραφική παράσταση παρατηρείται ότι φάση προσαρμογής δεν υπάρχει ενώ η εκθετική φάση διαρκεί 48 ώρες και ο αριθμός των κυττάρων κυμαίνεται από $0-3 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml. Στατική φάση δεν υπάρχει. Η φάση θανάτου

διαρκεί από 48-72 ώρες με το τελικό αριθμό των κυττάρων/ml να φτάνει τα 500.000 κύτταρα/ml. Το μέγιστο τάχος αύξησης (Πίν. 2) εμφανίζεται στις 48 ώρες.



Σχ. 3.2. Μέτρηση της αφθονίας των ετερότροφων βακτηριακών πληθυσμών παρουσία της φαρμακευτικής ουσίας ακεταμινοφαίνης τελικής συγκέντρωσης 500 mg/l μέσω της μεθόδου φθορισμού.

Από το παραπάνω γράφημα προκύπτει ότι η φάση προσαρμογής δεν υπάρχει ενώ η εκθετική φάση διαρκεί 72 ώρες και ο αριθμός των κυττάρων ανέρχεται τα 600.000 κύτταρα/ml. Στατική φάση δεν εμφανίζεται και η φάση θανάτου διαρκεί 216 ώρες και ο αριθμός των κυττάρων φτάνει τα 490.000 κύτταρα/ml Το μέγιστο τάχος αύξησης (Πίν. 2) εμφανίζεται στις 72 ώρες.



Σχ. 3.3 Μέτρηση της αφθονίας των ετερότροφων βακτηριακών πληθυσμών παρουσία της φαρμακευτικής ουσίας σαλικυλικού οξέος τελικής συγκέντρωσης 500 mg/l μέσω της μεθόδου φθορισμού. Στον κάθετο άξονα έχουμε τους αριθμούς των βακτηρίων και στον οριζόντιο το χρόνο σε ώρες.

Στην παραπάνω γραφική παράσταση η φάση προσαρμογής του βακτηριακού πληθυσμού διαρκεί 48 ώρες. Η εκθετική φάση διαρκεί από 48 μέχρι και 72 ώρες και ο αριθμός των κυττάρων ανήλθε τα 120000 κύτταρα/ml. Από τις 72 μέχρι και τις 96 ώρες εμφανίζεται η στατική φάση. Στη φάση θανάτου ο αριθμός των κυττάρων από το $1,2 \times 10^6$ πέφτει στα 600.000 κύτταρα/ml για να φτάσει τελικά τα 200.000 κύτταρα/ml και διαρκεί από 96-216 ώρες. Το μέγιστο τάχος αύξησης (Πίν. 2) εμφανίζεται στις 96 ώρες.

Πίνακας 2. Μέγιστο τάχος αύξησης στις τρεις πειραματικές μεταχειρίσεις.

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΕΥΘΕΙΑΣ	ΜΕΓΙΣΤΟ ΤΑΧΟΣ ΑΥΞΗΣΗΣ (h ⁻¹)	ΑΡΧΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ
ΜΑΡΤΥΡΑΣ	0 – 48 ΩΡΕΣ	0,07	93287
ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟ	0 – 72 ΩΡΕΣ	0,10	92983
ΑΚΕΤΑΜΙΝΟΦΑΙΝΗ	48 – 72 ΩΡΕΣ	0,06	102251

Ο μάρτυρας φαίνεται να παρουσιάζει τη μέγιστη και γρηγορότερη αύξηση στις πρώτες 24 ώρες με ρυθμό ανάπτυξης 0,07h⁻¹, σε αντίθεση με τη ακεταμινοφαίνη το οποίο μέχρι και τις 48 ώρες παρουσιάζει σταθερότητα (πιθανώς βακτηριοστατικό), το σαλικυλικό οξύ παρουσιάζει και αυτό αύξηση η οποία όμως είναι πολύ μικρή σε σχέση με το μάρτυρα.

Μετά τις 48 ώρες το δείγμα το οποίο είναι ο μάρτυρας παρουσιάζει μια ραγδαία πτώση η οποία διαρκεί μέχρι και τις 72 ώρες πράγμα το οποίο μας λέει ότι τα βακτήρια άρχισαν να πεθαίνουν, η ακεταμινοφαίνη καταγράφει την αυξητική της τάση μετά τις 48 ώρες μέχρι και τις 72 ώρες ενώ το σαλικυλικό οξύ συνεχίζει την ανάπτυξη του με σαφώς πιο βραδύ ρυθμό.

Από τις 72 ώρες μέχρι και τις 96 ώρες ο μάρτυρας μας συνεχίζει να καταγράφει πτώση, το δείγμα το οποίο περιέχει το αναλγητικό ακεταμινοφαίνη συνεχίζει την ανάπτυξη με πολύ αργό ρυθμό από τις 72 μέχρι και τις 96 ώρες ενώ το δείγμα το οποίο περιέχει το σαλικυλικό οξύ παρουσιάζει μία σταθερότητα μέχρι και τις 216 ώρες.

Ο μάρτυρας μας καταγράφει μία σταθερή πορεία από τις 96 ώρες μέχρι και τις 216 ώρες όπου είναι και το τέλος του πειράματος, η ακεταμινοφαίνη από τις 96 μέχρι και τις 120 ώρες καταγράφει πτώση ενώ από τις 120 ώρες έως και 168 ώρες παρουσιάζει σταθερότητα και περαιτέρω από τις 168 ώρες μέχρι και τις 216 ώρες παρουσιάζει πτώση.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Αύξηση των βακτηρίων παρουσία ή μη φαρμακευτικών προϊόντων

Παρατηρώντας την πορεία ανάπτυξης του βακτηριακού πληθυσμού στη μη παρουσία φαρμακευτικών προϊόντων παρατηρείται ότι η εκθετική φάση σημειώνεται αμέσως χωρίς να προηγηθεί η φάση προσαρμογής. Η βακτηριακή ανάπτυξη έχει διάρκεια 48 ωρών και ο αριθμός των βακτηρίων ανέρχεται στις 3×10^6 κύτταρα/ml και αμέσως επέρχεται η φάση θανάτου πριν καν προηγηθεί η στατική φάση. Από τις 48 ώρες μέχρι και τις 72 υπάρχει μία άμεση θανάτωση των βακτηρίων όπου και ο αριθμός των βακτηρίων πέφτει 1×10^6 κύτταρα/ml ενώ από τις 72 ώρες μέχρι και το τέλος της πειραματικής διαδικασίας η θανάτωση του βακτηριακού πληθυσμού γίνεται με πολύ αργό ρυθμό με το τελικό αριθμό να πέφτει 100.000 κύτταρα/ml.

Κατά την παρακολούθηση της πορείας αύξησης των βακτηρίων στο θρεπτικό υπόστρωμα εμβολιασμένο με ακεταμινοφαίνη παρατηρείται ότι από τις 0 ώρες μέχρι και τις 24 η εκθετική φάση είναι άμεση και ο αριθμός των βακτηρίων είναι 400.000 κύτταρα/ml. Από τις 24 ώρες μέχρι και τις 72 ώρες εξακολουθείτε να υπάρχει η βακτηριακή ανάπτυξη σε χαμηλότερους όμως ρυθμούς και ο αριθμός των βακτηρίων να ανέρχεται στα 600.000 κύτταρα/ml. Επίσης ούτε και στην περίπτωση αυτή δεν προηγείται της εκθετικής φάσης η φάση προσαρμογής από τις 72 ώρες μέχρι και τις 96 ώρες παρατηρείται μία κατακόρυφη θανάτωση του βακτηριακού πληθυσμού το οποίο από τα 600.000 κύτταρα/ml φτάνει στα 500.000 κύτταρα/ml. Από τις 96 ώρες μέχρι και το τέλος του πειράματος δηλαδή μέχρι και τις 216 ώρες η θανάτωση πραγματοποιείται με αργό και σταθερό ρυθμό και η τελική συγκέντρωση να φτάνει τις 400.000 κύτταρα/ml.

Παρακολουθώντας την πορεία αύξησης του βακτηριακού πληθυσμού στο θρεπτικό μέσον το οποίο είναι εμβολιασμένο με σαλικυλικό οξύ εμφανίζεται να υπάρχει η φάση προσαρμογής των βακτηρίων η οποία διαρκεί 48 ώρες. Από τις 48 ώρες μέχρι και τις 72 ώρες παρατηρείται η εκθετική φάση και ο αριθμός των βακτηρίων από τα 150.000 κύτταρα/ml που υπήρχαν στη φάση προσαρμογής ανέρχονται κατά την εκθετική φάση στα $1,2 \times 10^6$ κύτταρα/ml. Από τις 72 μέχρι και τις 96 ώρες η εκθετική φάση συνεχίζει να εμφανίζεται με χαμηλότερο ρυθμό και με το βακτηριακό αριθμό να ανέρχεται στα $1,2 \times 10^6$ κύτταρα/ml. Από τις 96 μέχρι και τις 120 ώρες επέρχεται η φάση θανάτου με τον αριθμό των κυττάρων να φτάνει 600.000 κύτταρα/ml. Η φάση θανάτου συνεχίζει να εμφανίζεται από τις 120 μέχρι και τις 180 ώρες με πάρα πολύ αργό ρυθμό και ο αριθμός των κυττάρων πέφτει στα 500.000 κύτταρα/ml. Από τις 180 μέχρι και τις 216 ώρες υπάρχει άμεση πτώση στο βακτηριακό πληθυσμό όπου ο αριθμός του φτάνει τελικά στις 200.000 κύτταρα/ml.

4.2. Συγκρίσεις με άλλες μελέτες

Ο ρυθμός ανάπτυξης για το control είναι $0,07h^{-1}$, ενώ σε αντίστοιχα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στη λίμνη Παμβωτίδα ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν $0,087h^{-1}$ (Ματσίγκο, 2012) δηλαδή παραπλήσιος με το αποτέλεσμα της συγκεκριμένης έρευνας. Η μέγιστη τιμή ήταν μεγαλύτερη στον Παρασητικό Κόλπο, $2,98 \times 10^6$ κύτταρα/ml, απ' ότι στην λίμνη Παμβώτιδα, $1,025 \times 10^6$ κύτταρα/ml, ωστόσο και τα δύο ήταν της ίδιας τάξης του 10^6 κύτταρα/ml. Η τάξη αυτή συμφωνεί και με πειράματα εμπλουτισμού των (Burkert et al., 2003). Όσον αφορά τα πειράματα με προσθήκη ακεταμινοφαίνης, στην λίμνη Παμβωτίδα, ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν $0,116 h^{-1}$ με μέγιστη τιμή στις 172h, $1,219 \times 10^6$ κύτταρα/ml, ενώ στον Παρασητικό

κόλπο ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν $0,06 \text{ h}^{-1}$, με μέγιστη τιμή στις 48h, $0,59 \times 10^6$ κύτταρα/ml, και σε αυτή την περίπτωση τα μέγιστα ήταν της τάξης του 10^6 αλλά ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν κατά πολύ μεγαλύτερος στην λίμνη Παμβώτιδα, σχεδόν διπλάσιος, απ'ότι στον Παγασητικό Κόλπο. Τέλος, στα πειράματα με προσθήκη σαλικυλικού οξέος, στον Παγασητικό Κόλπο ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν $0,1 \text{ h}^{-1}$, με μέγιστη τιμή στις 196 h, $1,25 \times 10^6$ κύτταρα/ml, ενώ στο αντίστοιχο πείραμα στην λίμνη Παμβώτιδα ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν $0,069 \text{ h}^{-1}$ και η μέγιστη τιμή εμφανίστηκε στις 72 h, $0,534 \times 10^6$ κύτταρα/ml. Και οι 3 ρυθμοί ανάπτυξης ήταν αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με άλλα πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί σε χαμηλές ($0,01 \text{ h}^{-1}$) και σε υψηλές ($0,04 \text{ h}^{-1}$) συγκεντρώσεις διαλυμένου οργανικού άνθρακα (Eiler et al., 2003). Στην τελευταία περίπτωση, ο ρυθμός ανάπτυξης καθώς και η μέγιστη τιμή στον Παγασητικό Κόλπο ήταν μεγαλύτερα σε σύγκριση με τη Λίμνη Παμβώτιδα. Άρα, βλέπουμε διαφορετική απόκριση των ετερότροφων βακτηρίων στην παρουσία ακεταμινοφαίνης και σαλικυλικού οξέος στο θαλάσσιο περιβάλλον και σε εσωτερικά ύδατα. Στο θαλάσσιο περιβάλλον η ακεταμινοφαίνη αναστέλλει τη βακτηριακή αύξηση, ενώ σε εσωτερικά ύδατα, όπως το περιβάλλον της λίμνης των Ιωαννίνων, δεν παρατηρείται κάποια αναστολή στην ανάπτυξη. Παρουσία σαλικυλικού οξέος συμφωνούν και τα δύο πειράματα ότι στην αρχή παρατηρήθηκε μια λανθάνουσα φάση μέχρι τις 48 h περίπου, η οποία συμφωνεί και με τους (Burkert et al., 2003), αλλά στην θάλασσα ο ρυθμός ανάπτυξη ήταν μεγαλύτερος σε σύγκριση με το δείγμα αναφοράς, ενώ αντιθέτως στην λίμνη ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν μικρότερος από το δείγμα αναφοράς.

4.3. Μονάδες επεξεργασίας αστικών λυμάτων

Μέσων των μονάδων επεξεργασίας αστικών λυμάτων το οργανικό φορτίο των PPCPs δεν αφαιρείται λόγω του ότι έχουν περιορισμένη βιολογική αποικοδόμηση (Heberer,

2002). Για παράδειγμα, η μέση συγκέντρωση εισροής του acetylsalicylic acid είναι 3.2 ± 1.2 $\mu\text{g/L}$, η μέση συγκέντρωση εκροής είναι 0.62 ± 0.30 $\mu\text{g/L}$, οπότε ένα $81 \pm 12 \mu\text{g/L}$ μένει στα ανεπεξέργαστα απόβλητα (Heberer, 2002). Επομένως, θα πρέπει να παρθούν κάποια μέτρα όσον αφορά τα PPCPs, με απώτερο σκοπό να μετριάσουμε την εμφάνιση τους στα υδάτινα περιβάλλοντα. Τρόποι οι οποίοι έχουν προταθεί είναι η σήμανση των PPCPs σχετικά με τις επιπτώσεις στο περιβάλλον, ώστε να μπορέσουν οι γιατροί και οι ασθενείς να διαλέξουν τα πιο φιλικά ως προς το περιβάλλον φαρμακευτικά προϊόντα (Heberer, 2002). Η διάθεση των PPCPs θα πρέπει να ελέγχεται καθώς και ο διαχωρισμός των ούρων (Nikolaou et al., 2007).

4.4. Μελλοντική έρευνα

Μέσα από μια μελλοντική έρευνα θα μπορούσαμε σε μελλοντική έρευνα να μελετήσουμε την ανάπτυξη των ετερότροφων βακτηρίων παρουσία και των δύο αυτών αναλγητικών φαρμάκων στο ίδιο περιβάλλον, μιας και ύστερα από διάφορες μοντελοποιήσεις που έχουν πραγματοποιηθεί σε άλλη ερευνητική δραστηριότητα έχει παρατηρηθεί ότι ο συνδυασμός ακεταμινοφαίνης και σαλικυλικού οξέος καθώς και των μεταβολιτών τους σε ένα μείγμα θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναν οικολογικό κίνδυνο (Celiz, et al., 2009). Στο επόμενο στάδιο θα πρέπει να μελετηθεί και ο συνδυασμός διαφορετικών συγκεντρώσεων από το καθένα, για να μπορούμε να κρίνουμε πότε μια κατάσταση σε ένα υδάτινο περιβάλλον είναι καλή ή κακή, και να μπορούμε να προβλέψουμε την εξέλιξή της.

Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, οι συγκεντρώσεις του αζώτου και του φωσφόρου, η αλατότητα, το pH, κ.τ.λ. είναι κάποιοι από τους φυσικοχημικούς παράγοντες που θα πρέπει να εξετάζονται κατά τη διάρκεια του πειράματος για να

δούμε αν συσχετίζονται οι μεταβολές τους με τις μεταβολές της αφθονίας των βακτηριακών πληθυσμών. Η βακτηριακή δευτερογενής παραγωγή συχνά περιορίζεται από τα θρεπτικά συστατικά (P και N), αντί για τον άνθρακα (Burkert et al., 2003). Ειδικά όσον αφορά τη θερμοκρασία θα πρέπει να είμαστε σίγουροι ότι παραμένει σταθερή, μιας και αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις των βακτηρίων (Gordon, 1985).

Ο προσδιορισμός των φαρμακευτικών μεταβολιτών σε πολύπλοκα περιβαλλοντικά υποστρώματα είναι δύσκολο, κυρίως λόγω των πολύ χαμηλών συγκεντρώσεών τους στην παρουσία φυσικών οργανικών ουσιών, πρωτεϊνών, και άλλων σύνθετων μακρομορίων που μπορεί να αλληλεπιδράσουν με τα συστήματα ανίχνευσης (Celiz, et al., 2009). Η ευαισθησία τους θα πρέπει να βελτιωθεί για τα διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα (Nikolaou et al., 2007).

Η υγρή διαδοχική χρωματογραφία (MS), έχει φέρει επανάσταση στην περιβαλλοντική ανάλυση, παρέχοντας ένα αναλυτικό εργαλείο που προσδιορίζει οργανικούς ρύπους ακόμα και σε νανογραμμάρια ανά λίτρο (ng/L) (Daughton & Ternes, 1999). Επομένως θα μπορούσαμε λοιπόν να χρησιμοποιήσουμε αυτή τη μέθοδο για να προσδιορίσουμε αν τα δύο φαρμακευτικά προϊόντα που μελετώνται υπάρχουν στο περιβάλλον του Παγασητικού κόλπου και σε τι συγκεντρώσεις, ώστε να μπορέσουμε να προχωρήσουμε σε τυχόν μέτρα, μιας και το σαλικυλικό οξύ και η ακεταμινοφαίνη επηρεάζουν την βακτηριακή ανάπτυξη.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως παρατηρείται, η βακτηριακή αύξηση αναστέλλεται διαφορετικά με τη παρουσία τόσο του σαλικυλικού οξέος, όσον και με τη παρουσία της ακεταμινοφαίνης σε σχέση με το μάρτυρα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alberts B., Johnson A, Lewis J, Raff M., Roberts K, Walter P. (2006)
Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας. Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης
Ε.Π.Ε., σελ 10

Batt A.L., Bruce I.B., Aga D.S. (2006) Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. *Environmental Pollution* 142: 295-302

Bielinska B.A., Stolte S., Arning J., Uebers U., Boschen a., Stepnowski P., Matzke M. (2011) Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. *Chemosphere* 85: 928–933

Burkert U., Warnecke F., Babenzien D., Zwirnmann E., Pernthaler J. (2003) Members of a Readily Enriched β -Proteobacterial Clade Are Common in Surface Waters of a Humic Lake. *Applied and environmental microbiology*, 11: 6550–6559

Celiz M.D., Tso J., Aga D.S. (2009) Pharmaceutical metabolites in the environment: Analytical challenges and ecological risks. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28:2473–2484.

Daughton C.G and Ternes T.A. (1999) Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment Q Agents of Subtle Change.

Eiler A., Langenheder S., Bertilsson S., Tranvik L.J. (2003) Heterotrophic bacterial growth efficiency and community structure at different natural organic carbon concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 3701–3709

Gordon R.C. (1985) Winter survival of fecal bacteria in a subarctic Alaskan river. US Environmental Protection Agency, Corvallis, Ore. EPA-R2-72-013.

Heberer T. (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131: 5–17

Hobbie J.E., Daley R.J., Jasper S. (1977) Use of Nuclepore Filters for Counting Bacteria by Fluorescence Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 33: 1225-1228

Jjemba P.K. (2008) Pharma- Ecology: The Occurrence and Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment. American Water, Deltran, New Jersey.

Kagalou I., Tsimarakis G., Bezirtzoglou E. (2002) Inter-relationships between Bacteriological and Chemical Variations in Lake Pamvotis—Greece. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 14:37-41

Kepner R.L., & Pratt J.R. (1994) Use of Fluorochromes for Direct Enumeration of Total Bacteria in Environmental Samples: Past and Present. American Society for Microbiology, Microbiological reviews, 603-615 Vol. 58, No. 4 0146-0749/94

Kirchman D.L., Dittel A.I., Findlay E.G, Fischer D. (2004) Changes in bacterial activity and community structure in response to dissolved organic matter in the Hudson River, Aquatic Microbial Ecology, 35: 243–257

Michelle K.L., Schmelzer H., Zwirnmann E., Krüger A., Grossart H.P. (2012) Enrichment and cultivation of pelagic bacteria from a humic lake using phenol and humic matter additions. FEMS Microbiology Ecology, 72: 58–73

Nikolaou A., Meric S., Fatta D. (2007) Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. Anal Bioanal Chem 387:1225–1234

Savides M.C., Oehme F.W. (1983) Acetaminophen and its toxicity. Journal of applied, Vol. 3, No. 2

Ternes T.A., Joss A., Siegrist H. (2004) Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. Environmental Science & Technology, 38:392A-399A

Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2009) Εισαγωγή στη μικροβιολογία.
Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, σελ 105-7

Ματσίνγκο Σ. (2012) Απόκριση των βακτηρίων στην παρουσία των PPCPs
στο υδάτινο περιβάλλον. Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

7. ABSTRACT

Pharmaceutical and Personal care products are significant environmental pollutants, especially for the aquatic ecosystem. PPCPs, which have been considered as an increasing environmental problem in the last decade due to the severe consequences they have on living organisms, are more and more widely used in medicine and are constantly released in the ecosystem. These products are mainly released into the aquatic ecosystem through sewers and municipal wastewater treatment plants. Along their way to the ecosystem they may evaporate, alter their physicochemical or environmental characteristics and be modified into other form that can or cannot act as harmful environmental pollutants. There are different categories of pharmaceutical products that can be detected in the environment. Such a category are painkillers; acetaminophen and aspirin, which were investigated in this study, belong to this category and can be found everywhere in shallow waters and wastewater. Bacteria are an important part of the bronchial microbial, and any change to them either positive or negative has direct or indirect consequences to the whole food chain, including human society as well.

In the current project we examined marine bacterial growth in the presence and absence of acetaminophen and aspirin. For this purpose the experiments were carried out in microcosmos with the use of the DAPI bacteria counts.