



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΚΟΙΝΩΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΨΥΧΙΚΗΣ ΥΓΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥΣ
ΔΕΙΚΤΕΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ (*E. COLI*, *E. FEACALIS*) ΤΩΝ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ
ΣΤΗ *SALMONELLA TYPHI***

**ΔΗΜΗΤΡΑ ΣΠ. ΔΗΜΟΥ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΑΓΡΟ - ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Ημερομηνία αίτησης της κ. Δήμου Δήμητρας: 12-9-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 524^α/27-1-2004

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Μάιπα Βασιλική Επίκουρη Καθηγήτρια Υγιεινής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αλαμάνος Ιωάννης Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής με ιδιαίτερη έμφαση στην Επιδημιολογία της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 30-3-2004

«Επίδραση των μυκητοκτόνων στους μικροβιακούς δείκτες μόλυνσης (E. coli, E. feacalis) των υδάτων και της Salmonella typhi»

Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 644^α/23-9-2008

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Καλφακάκου Βασιλική Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αλαμάνος Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 744^α/23-10-2012

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος	Καθηγητής Τεχνολογίας Ελέγχου και Προστασίας Περιβάλλοντος Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αλαμάνος Ιωάννης	Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Πατρών
Καλφακάκου Βασιλική	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαδοπούλου Χρυσάνθη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βεζυράκη Πατρώνα	Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πέσχος Δημήτριος

Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην
Κυτταρική Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 25-4-2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής

Η Γραμματέας της Σχολής

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ



*Αφιερωμένο στη μνήμη της Βασιλικής Μάιπα,
Επίκουρης Καθηγήτριας
Υγιεινής & Επιδημιολογίας
της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το νερό αποτελεί βασικό στοιχείο για τη διατήρηση και την ανάπτυξη της ζωής στον πλανήτη μας, ένα από τα πολυτιμότερα αγαθά για τον άνθρωπο.

Η ανθρώπινη ιστορία, από την αρχή της έως και τις ημέρες που διανύουμε σήμερα, είναι άρρηκτα δεμένη με το υγρό στοιχείο. Δεν είναι καθόλου τυχαίο το γεγονός ότι οι μεγαλύτεροι αρχαίοι πολιτισμοί αναπτύχθηκαν κοντά σε ποτάμια, λίμνες και θάλασσες.

Κάθε άνθρωπος, με πρόχειρους υπολογισμούς, για να καλύψει επαρκώς τις ημερήσιες ανάγκες του (πόσιμο νερό, μαγείρεμα, υγιεινή, καθαριότητα κ.λ.π.), χρειάζεται περίπου 50 λίτρα νερού. Αν σε αυτά προσθέσουμε το νερό που απαιτείται, καθημερινά, στη βιομηχανία, τη γεωργία, την κτηνοτροφία και άλλους τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας, τότε η κατ' άτομο ημερήσια κατανάλωση νερού υπερβαίνει κατά πολύ τα 150 λίτρα νερού στις αγροτικές-κτηνοτροφικές περιοχές και τα 300 λίτρα νερού στις μεγάλες, αστικές περιοχές.

Σήμερα, οι, ολοένα και περισσότερο, αυξανόμενες απαιτήσεις για νερό στα μεγάλα αστικά κέντρα, στη βιομηχανία, τη γεωργία, την κτηνοτροφία και αλλού, έχουν οδηγήσει από τη μία σε συνεχή διεύρυνση των αναγκών για νερό και από την άλλη σε μεγάλη μείωση της διαθεσιμότητας του πόσιμου-καθαρού νερού (νερό προερχόμενο από τη φύση, ως νερό βροχής, επιφανειακό νερό, υπόγειο νερό).

Η κατάσταση των υδάτινων οικοσυστημάτων, τις τελευταίες δεκαετίες, έχει επιδεινωθεί δραματικά, λόγω της ρύπανσής τους με ανόργανους και οργανικούς ρύπους και της μόλυνσής τους από διάφορους μολυσματικούς παράγοντες.

Οι απαιτήσεις για μεγαλύτερες αποδόσεις στον τομέα της γεωργίας, οδήγησαν στη χρήση διαφόρων μέσων, όπως των φυτοφαρμάκων, τα οποία μπορεί μεν να βοηθούν στην αύξηση της παραγωγής και την πρόληψη διάφορων μεταδοτικών ασθενειών αλλά μπορεί να δράσουν τοξικά, για τους ζωντανούς οργανισμούς, άρα και τον άνθρωπο, ρυπαίνοντας τα υδάτινα οικοσυστήματα.

Τι γίνεται όμως όταν ο ρύπος συνυπάρχει με το μολυσματικό παράγοντα;

Η παρούσα διατριβή φιλοδοξεί να απαντήσει, κατά ένα μέρος, σε αυτό το ερώτημα.

Η Ελληνική Νομοθεσία για την προστασία της δημόσιας υγείας καθορίζει την ποιότητα του νερού με τις αντίστοιχες Υγειονομικές Διατάξεις και με Προεδρικά Διατάγματα, εναρμονισμένα και προσαρμοσμένα στη Νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Η οδηγία 98/83/EK ορίζει τις παραμέτρους που πρέπει να τηρούν τα ύδατα για τη χρήση τους. Μέσα σε αυτές τις παραμέτρους, ορίζονται και οι επιτρεπόμενες, στα ύδατα, ποσότητες των ανόργανων και οργανικών ουσιών, καθώς και των μολυσματικών παραγόντων.

Στην παρούσα πειραματική έρευνα-μελέτη, ως «ρύπος» χρησιμοποιούνται τα μυκητοκτόνα Dodin, Carbendazim, Ziram και Copper Hydroxide και ως «μολυσματικός παράγοντας» χρησιμοποιούνται οι μικροοργανισμοί *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* και *Salmonella typhi* (οι οποίοι είναι δείκτες μόλυνσης των υδάτων).

Σύμφωνα με τη Νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο (UPL), για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκου στο πόσιμο νερό, είναι 0.1μg/L ενώ για το σύνολο των ενώσεων αυτών είναι 0.5μg/L.

Έτσι, οι συγκεντρώσεις των φυτοφαρμάκων στα διαλύματα, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ήταν στο ανώτερο επιτρεπόμενο όριο 0.1 μg/L (UPL) και $10 \times (1.0 \mu\text{g/L})$, $100 \times (10.0 \mu\text{g/L})$ και $1000 \times (100.0 \mu\text{g/L})$, πολλαπλάσια του UPL.

Κατά την πειραματική πορεία, εξετάστηκαν οι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν στα διαλύματα των μυκητοκτόνων ως προς τη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξή τους, ως προς τη μορφολογία τους στα εκλεκτικά υλικά, ως προς τις βιοχημικές τους ιδιότητες και ως προς την ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή ξεκίνησε στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Βασιλικής Μάιπα, στη μνήμη της οποίας είναι αφιερωμένη, και ολοκληρώθηκε υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Βασιλικής Καλφακάκου.

Είχα την ευκαιρία να μαθητεύσω δίπλα τους, τόσο κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών μαθημάτων, όσο και κατά τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής. Μέσα από τις συζητήσεις μας, με την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγησή τους, με το χρόνο που αφιέρωσαν στην παρούσα έρευνα-μελέτη μου και με την ηθική στήριξη που παρείχαν στο πρόσωπό μου, βοήθησαν τα μέγιστα στην επιτυχή έκβαση της διδακτορικής μου διατριβής. Με απέραντο σεβασμό, μέσα από τα βάθη της καρδιάς μου, τις ευχαριστώ απεριόριστα.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Πρύτανη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας

του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη, καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών, κ. Ιωάννη Αλαμάνο, για τις εμπειριστατωμένες παρατηρήσεις τους, τη βοήθεια που μου προσέφεραν και την εποικοδομητική τους κριτική.

Ευχαριστώ ακόμα τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον κ. Ευαγγέλου Άγγελο, Καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, την κ. Παπαδοπούλου Χρυσάνθη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, την κ. Βεζυράκη Πατρώνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Πέσχο Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, που δέχτηκαν να είναι μέλη της Επιτροπής αυτής και για τις πολύτιμες και ουσιαστικές τους παρατηρήσεις.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη συνοδοιπόρο μου, όλα αυτά τα χρόνια που πέρασα στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου μας, τη Δρ Της Ιατρικής Σχολής, κ. Αλεξάνδρα Κουτσοτόλη, για την υποστήριξή της.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<u>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	<u>1</u>
<u>Κεφάλαιο 1</u>	<u>1</u>
<u>ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΥΔΑΤΙΝΩΝ ΠΟΡΩΝ</u>	<u>1</u>
1.1. ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΥΔΑΤΙΝΩΝ ΠΟΡΩΝ	1
1.2. ΡΥΠΑΝΣΗ – ΜΟΛΥΝΣΗ ΥΔΑΤΙΝΩΝ ΠΟΡΩΝ	3
1.2.1. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΡΥΠΑΝΣΗ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	3
1.2.2. ΡΥΠΑΝΣΗ ΑΠΟ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	5
1.2.3. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΥΔΑΤΙΝΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ	7
1.3. ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΥΔΑΤΙΝΩΝ ΠΟΡΩΝ	9
1.3.1. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΥΔΑΤΩΝ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ	9
1.3.2. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ, ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟΝ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΥΓΕΙΑΣ (WHO)	10
<u>Κεφάλαιο 2</u>	<u>13</u>
<u>ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΥΔΑΤΩΝ</u>	<u>13</u>
2.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΥΔΑΤΩΝ	13
2.1.1. ΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΟΙΝΩΝ ΑΕΡΟΒΙΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΣΤΟΥΣ 37 °C ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ 22 °C	14
2.1.2. ΟΛΙΚΑ ΚΟΛΟΒΑΚΤΗΡΙΟΕΙΔΗ (<i>TOTAL COLIFORMS</i> - TC)	15
2.1.3. ΚΟΠΡΑΝΩΔΗ ΚΟΛΟΒΑΚΤΗΡΙΟΕΙΔΗ (<i>FAECAL COLIFORMS</i> - FC)	15
2.1.4. ΚΟΠΡΑΝΩΔΕΙΣ ΣΤΡΕΠΤΟΚΟΚΚΟΙ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ (<i>FAECAL STREPTOCOCCI, ENTEROCOCCI</i> - S)	16
2.2. <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	17
2.2.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	17
2.2.2. <i>SALMONELLA TYPHI</i>	19
2.3. <i>ENTEROCOCCUS</i>	20
2.3.1. <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	20
<u>Κεφάλαιο 3</u>	<u>21</u>
<u>ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ – ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ - ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ</u>	<u>21</u>
3.1. ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ	21
3.1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ	22
3.2. ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ	24
3.2.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ	24
3.3. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΧΘΕΝΤΩΝ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ	29
3.3.1. DODINE	29
3.3.2. CARBENDAZIM	31
3.3.3. ZIRAM	33
3.3.4. COPPER HYDROXIDE	35

Κεφάλαιο 4 **39**

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ – ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ **39**

4.1. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	39
4.1.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	42
4.1.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	42
4.2. ΑΝΤΟΧΗ - ΑΙΤΙΕΣ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	44
4.2.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ	44
4.2.2. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ	45
4.2.3. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ	46
4.3. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΠΙΛΕΧΘΕΝΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	47
4.3.1. ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ (ΑΛΦΑ- ΑΜΙΝΟΒΕΝΖΥΛΟΠΕΝΙΚΙΛΙΝΗ)	47
4.3.2. ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ	47
4.3.3. ΣΤΡΕΠΤΟΜΥΚΙΝΗ	48
4.3.4. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ	48
4.3.5. ΧΛΩΡΑΜΦΑΙΝΙΚΟΛΗ	49

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **51**

Κεφάλαιο 1 **51**

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ **51**

1.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	51
1.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΑΥΤΩΝ	52
1.3. ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΚΑΙ ΜΑΚΡΟΠΡΟΘΕΣΜΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΩΝ	53
1.4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	53
1.5. ΕΠΙΛΟΓΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	54
1.6. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	55
1.7. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	56

Κεφάλαιο 2 **57**

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ **57**

2.1. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	57
2.1.1. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	57
2.1.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	62
2.1.3. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	64
2.1.4. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	68
2.2. <i>SALMONELLA TYPHI</i>	70
2.2.1. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	70
2.2.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	75

2.2.3. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	76
2.2.4. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	79
2.3. <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	81
2.3.1. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	81
2.3.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	86
2.3.3. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	88
2.3.4. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	91
<u>Κεφάλαιο 3</u>	93
<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	93
3.1. ΑΝΑΠΤΥΞΗ	93
3.1.1. ΒΙΩΣΙΜΑ ΑΛΛΑ ΜΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΣΙΜΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (VBNC)	95
3.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	98
3.3. ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	100
3.4. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	103
<u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	105
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	111
<u>SUMMARY</u>	117
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	123

Υπόμνημα συντομογραφιών

FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>	Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας
CFU	<i>Colony Forming Units</i>	Μονάδα Σχηματισμού Αποικίας
WHO	<i>World Health Organization</i>	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
TC	<i>Total Coliforms</i>	Ολικά Κολοβακτηριοειδή
FC	<i>Faecal Coliforms</i>	Κοπρανώδη Κολοβακτηριοειδή
FS ή S	<i>Faecal Streptococci, Enterococci</i>	Κοπρανώδεις Στρεπτόκοκκοι, Εντερόκοκκοι
ETEC	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>	Εντεροτοξινογόνος <i>E.coli</i>
EPEC	<i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>	Εντεροπαθογόνος <i>E.coli</i>
EIEC	<i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>	Εντεροδιεισδυτική <i>E.coli</i>
ST	<i>Heat Stable</i>	Θερμοανθεκτική (<i>E.coli</i>)
LT	<i>Heat Labile</i>	Θερμοευαίσθητη (<i>E.coli</i>)
AHDS	<i>Aromatic Hydrocarbons Dicarboximide</i>	Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες και Δικαρβοξυμιδικά
EBIs	<i>Ergosterol Biosynthesis Inhibitors</i>	Παρεμποδιστές Βιοσύνθεσης Εργοστερόλης
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	Διεθνής Ένωση Αμιγούς και Εφαρμοσμένης Χημείας
DGT	<i>Dodecylguanidine Terephthalate</i>	Δωδεκυλογουανιδίνη Τερεφθαλική
DGH	<i>Dodecylguanidine Hydrochloride</i>	Δωδεκυλογουανιδίνη Υδροχλωρική
LD	<i>Lethal Dose</i>	Θανατηφόρα Δόση
LC	<i>Lethal Concentration</i>	Θανατηφόρος Συγκέντρωση
LDLo	<i>Lowest Dose Causing Lethality</i>	Χαμηλότερη Δόση που Προκαλεί Θνησιμότητα
RF	<i>Resistance Factors</i>	Πλασμίδια Αντοχής
OD	<i>Optical Density</i>	Οπτική Πυκνότητα
R	<i>Resistant</i>	Ανθεκτικότητα
I	<i>Intermediate</i>	Ενδιάμεσος
S	<i>Susceptible</i>	Ευαίσθητο
VBNC	<i>Viable But Non Culturable</i>	Βιώσιμα Αλλά Μη Καλλιεργήσιμα
MDR	<i>Multidrug Resistant</i>	Πολλαπλή Ανθεκτικότητα
UCS	<i>Union of Concerned Scientists</i>	Ένωση Συνειδητών Επιστημόνων
UPL	<i>Upper Permissible Limit</i>	Ανώτερο Επιτρεπόμενο Όριο

	ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ		ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ- ENZYMA	
ARA	<i>L-arabinose</i>	L-αραβινόζη	<i>fermentation / oxidation</i>	ζύμωση/οξειδωση
AMY	<i>amygdalin</i>	αμυγδαλίνη	<i>fermentation / oxidation</i>	ζύμωση/οξειδωση
MEL	<i>D-melibiose</i>	D-μελιβιόζη	<i>fermentation / oxidation</i>	ζύμωση/οξειδωση
SAC	<i>D-sucrose</i>	D-σουκρόζη	<i>fermentation / oxidation</i>	ζύμωση/οξειδωση
RHA	<i>L-rhamnose</i>	L-ραμνόζη	<i>fermentation / oxidation</i>	ζύμωση/οξειδωση
SOR	<i>D-sorbitol</i>	D-σορβιτόλη	<i>fermentation / oxidation</i>	ζύμωση/οξειδωση
INO	<i>inositol</i>	ινοσιτόλη	<i>fermentation / oxidation</i>	ζύμωση/οξειδωση
MAN	<i>D-mannitol</i>	D-μανιτόλη	<i>fermentation / oxidation</i>	ζύμωση/οξειδωση
GLU	<i>D-glucose</i>	D-γλυκόζη	<i>fermentation / oxidation</i>	ζύμωση/οξειδωση
GEL	<i>gelatin</i>	ζελατίνη	<i>gelatinase</i>	ζελατινάση
VP	<i>sodium pyruvate</i>	πυρουβικό νάτριο	<i>acetoin production</i>	παραγωγή ακετοΐνης
IND	<i>L-tryptophane</i>	L-τρυπτοφάνη	<i>indole production</i>	παραγωγή ινδόλης
TDA	<i>L-tryptophane</i>	L-τρυπτοφάνη	<i>tryptophane deaminase</i>	δεαμινάση της τρυπτοφάνης
URE	<i>urea</i>	ουρία	<i>urease</i>	ουρεάση
H2S	<i>sodium thiosulfate</i>	θειοθειικό νάτριο	<i>H₂S production</i>	παραγωγή H ₂ S
CIT	<i>trisodium citrate</i>	κιτρικό τρινάτριο	<i>citrate utilization</i>	χρήση κιτρικού
ODC	<i>L-ornithine</i>	L-ορνιθίνη	<i>ornithine decarboxylase</i>	διυδρολάδη της ορνιθίνης
LDC	<i>L-lysine</i>	L-λυσίνη	<i>lysine decarboxylase</i>	διυδρολάδη της λυσίνης
ADH	<i>L-arginine</i>	L-αργινίνη	<i>arginine dihydrolase</i>	διυδρολάδη της αργινίνης
ONPG	<i>2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside</i>	2-νιτροφενυλ-βD-γαλακτοπυρανοσιδίδη	<i>β-galactosidase</i>	β-γαλακτοσιδάση

		ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ		ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ- ENZYMA	
Υπόμνημα συντομογραφιών του api 20 strep	GLYG	<i>glycogen</i>	γλυκογόνο	<i>acidification</i>	οξίνιση
	AMID	<i>starch</i>	άμυλο	<i>acidification</i>	οξίνιση
	RAE	<i>D-raffinose</i>	D-ραφφινόζη	<i>acidification</i>	οξίνιση
	INU	<i>inulin</i>	ινουλίνη	<i>acidification</i>	οξίνιση
	TRE	<i>D-trehalose</i>	D-τρεαλόζη	<i>acidification</i>	οξίνιση
	LAC	<i>D-lactose</i>	D-λακτόζη	<i>acidification</i>	οξίνιση
	SOR	<i>D-sorbitol</i>	D-σορβιτόλη	<i>acidification</i>	οξίνιση
	MAN	<i>D-mannitol</i>	D-μανιτόλη	<i>acidification</i>	οξίνιση
	ARA	<i>L-arabinose</i>	L-αραβινόζη	<i>acidification</i>	οξίνιση
	RIB	<i>D-ribose</i>	D-ριβόζη	<i>acidification</i>	οξίνιση
	ADH	<i>L-arginine</i>	L-αργινίνη	<i>arginine dihydrolase</i>	διϋδρολάση της αργινίνης
	LAP	<i>L-leucine-β-naphthylamide</i>	L-λευκίνη-β-ναφθυλαμίδιο	<i>leucine aminopeptidase</i>	λευκίνη αμινοπεπτιδάση
	PAL	<i>2-naphthyl phosphate</i>	2-ναφθυλ φωσφατάση	<i>alkaline phosphatase</i>	αλκαλική φωσφατάση
	βGAL	<i>2-naphthyl-βD-galactopyranoside</i>	2-ναφθυλ-βD-γαλακτοπυρανοζίδη	<i>β-galactosidase</i>	β-γαλακτοζιδάση
	βGUR	<i>naphthol ASBI-glucuronic acid</i>	ναφθόληASBI-γλυκουρονικό οξύ	<i>β-glucuronidase</i>	β-γλυκουρονιδάση
	αGAL	<i>6-bromo-2-naphthyl-αD-galactopyranoside</i>	6-βρωμο-2-ναφθυλ-αD-γαλακτοπυρανοζίδη	<i>α-galactosidase</i>	α-γαλακτοζιδάση
	PYRA	<i>pyroglutamic acid-β-naphthylamide</i>	πυρογλουταμινικό οξύ-β-ναφθυλαμίδιο	<i>pyrolidonyl arylamidase</i>	πυρολιδονυλ Αρυλαμιδάση
	ESC	<i>esculin ferric citrate</i>	εσκουλίνη κιτρικό τρινάτριο	<i>β-glucosidase hydrolysis</i>	υδρόλυση (ιππουρικό οξύ)
	HIP	<i>hippuric acid</i>	ιππουρικό οξύ	<i>hydrolysis</i>	υδρόλυση
	VP	<i>sodium pyruvate</i>	πυρουβικό νάτριο	<i>acetoin production</i>	παραγωγή ακετοΐνη

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1

ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΥΔΑΤΙΝΩΝ ΠΟΡΩΝ

"Νερό, αρχή των πάντων"

κατά το Θαλή το Μιλήσιο και ένα από τα τέσσερα βασικά στοιχεία κατά τον Αριστοτέλη.

1.1. Κατανάλωση υδάτινων πόρων

Το νερό είναι το σπουδαιότερο συστατικό του παγκόσμιου οικοσυστήματος και η σημασία του είναι τεράστια για την ίδια τη ζωή. Είναι μοναδικός φυσικός πόρος, απαραίτητος για την επιβίωση του ανθρώπου και των άλλων οργανισμών και αποτελεί το κλειδί για την ανάπτυξη της γεωργίας, της επαγγελματικής αλιείας, της παραγωγής ενέργειας, της βιομηχανίας, των μεταφορών, του τουρισμού και αμέτρητων άλλων δραστηριοτήτων. Ωστόσο, σήμερα, βρισκόμαστε στα πρόθυρα μιας παγκόσμιας κρίσης νερού (Κατσουγιαννόπουλος 1994).

Το 71% της έκτασης της γης καλύπτεται από νερό. Από αυτό, το 97% είναι το νερό των ωκεανών. Ένα ποσοστό 2% είναι αποθηκευμένο και βρίσκεται στις περιοχές των πάγων, στα χιονισμένα βουνά, στα ποτάμια, στις λίμνες και μέσα στη γη. Το φρέσκο λοιπόν νερό που μένει για να καταναλώνουμε καθημερινά είναι περίπου 1%.

Τα τελευταία χρόνια η κατανάλωση του νερού έχει αυξηθεί λόγω της τεχνολογικής εξέλιξης και της αύξησης του πληθυσμού. Από το 1% του παγκοσμίως διαθέσιμου νερού καταναλώνεται στις γεωργικές καλλιέργειες το 69%, στη βιομηχανία το 23% και για οικιακή χρήση το 8% (Γανίδου 2002).

Η έλλειψη του νερού, κατά τη διάρκεια της ιστορίας, συνδέθηκε με πολλά δεινά. Σήμερα, ο κίνδυνος της έλλειψής του γίνεται πιο ορατός σε όλες τις χώρες ενώ περισσότεροι από 1,2 δισεκατομμύρια άνθρωποι δεν έχουν πρόσβαση σε ασφαλές πόσιμο νερό.

Τα επόμενα 25 χρόνια προβλέπεται ότι η χρήση του νερού θ' αυξηθεί κατά 40% και θα χρειαστεί 17% περισσότερο νερό στην αγροτική παραγωγή, για τη κάλυψη των αναγκών του πληθυσμού σε τρόφιμα, σύμφωνα με τον FAO (Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας) (www.environment.nsw.gov).

1.2. Ρύπανση – μόλυνση υδάτινων πόρων

Η ρύπανση και η μόλυνση των υδάτινων πόρων απασχολεί για δεκαετίες τη Διεθνή Κοινότητα. Η μόλυνση του νερού από παθογόνους μικροοργανισμούς είναι το κύριο πρόβλημα στις περισσότερες υπανάπτυκτες και αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ η χημική ρύπανση του νερού αποτελεί εξίσου σοβαρή απειλή σ' όλες τις χώρες με γεωργική και βιομηχανική ανάπτυξη.

Ρύπανση είναι κάθε άμεση ή έμμεση εισαγωγή ουσιών ή ακτινοβολίας κ.τ.λ. στο υδάτινο περιβάλλον που έχει βλαβερή επίδραση στους οργανισμούς, είναι επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία, αλλοιώνει την ποιότητα και τα χαρακτηριστικά του νερού και υποβαθμίζει τις δυνατότητες χρήσης.

Η ρύπανση του υδάτινου περιβάλλοντος μπορεί να διακριθεί σε:

- Ρύπανση που επιφέρει αλλαγή των φυσικών χαρακτηριστικών του νερού:
 - Ρύπανση από «αδρανή» υλικά.
 - Θερμική ρύπανση.
 - Ρύπανση από ακτινοβολία (ραδιενέργεια).
 - Θόρυβος, εκπομπές ήχων.
- Ρύπανση που επιφέρει αλλαγή των χημικών χαρακτηριστικών του νερού:
 - Ρύπανση από τοξικές ουσίες (τοξικολογία).
 - Ρύπανση από άλατα N, P (ευτροφισμός).
 - Οργανική ρύπανση (αποξυγόνωση).
 - Ρύπανση από πετρελαιοειδή.
- Ρύπανση που επιφέρει αλλαγή των βιολογικών χαρακτηριστικών του νερού:
 - Μικροβιακή ρύπανση (μόλυνση).
 - «Βιολογική» ρύπανση (Αντωνόπουλος 2001, www.europa.eu).

1.2.1. Μικροβιακή ρύπανση στο περιβάλλον

Οι εισροές μικροβιακού φορτίου μόλυνσης στο νερό προέρχονται από τα αστικά και βιομηχανικά λύματα, από τα απόβλητα των κτηνοτροφικών μονάδων (σημειακές πηγές

μόλυνσης) καθώς και από τις επιφανειακές απορροές (μη σημειακές πηγές μόλυνσης), με μεγάλο κίνδυνο την αύξηση της παθογένειας των υδάτων λόγω:

- Παρουσίας παθογόνων βακτηρίων (χολέρα, τύφος, δυσεντερία, κλπ).
- Παρουσίας παθογόνων ιών (ηπατίτιδα, πολυομυελίτιδα).
- Παρουσίας παθογόνων παρασίτων (*cryptosporidium*, σχιστοσωμίαση).

Η παρουσία των παθογόνων στο νερό κάνει ακατάλληλη τη χρήση του για πόση, αναψυχή και υδατοκαλλιέργειες.

Τα βακτήρια μέσα στο νερό χάνουν παροδικά την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται αλλά διατηρούν την ικανότητα να προσλαμβάνουν θρεπτικά συστατικά και να τα μεταβολίζουν, διατηρώντας την παθογόνο δράση τους και επιβιώνοντας για μεγάλο χρονικό διάστημα (Meybeck *et al.* 1990).

Οι υδατογενείς λοιμώξεις οφείλονται στη χρήση νερού μολυσμένου με παθογόνους μικροοργανισμούς. Η ποιότητα του παρεχόμενου πόσιμου νερού ποικίλλει ανάλογα με τις γεωγραφικές, πολιτιστικές, κλιματικές και κοινωνικοοικονομικές διαφορές των χωρών. Η ομαδοποίηση των υδατογενών λοιμώξεων από τον Bradley (1987), που στηρίζεται σε επιδημιολογικά δεδομένα, βοηθά στην κατανόηση των προβλημάτων των υδατογενών λοιμώξεων.

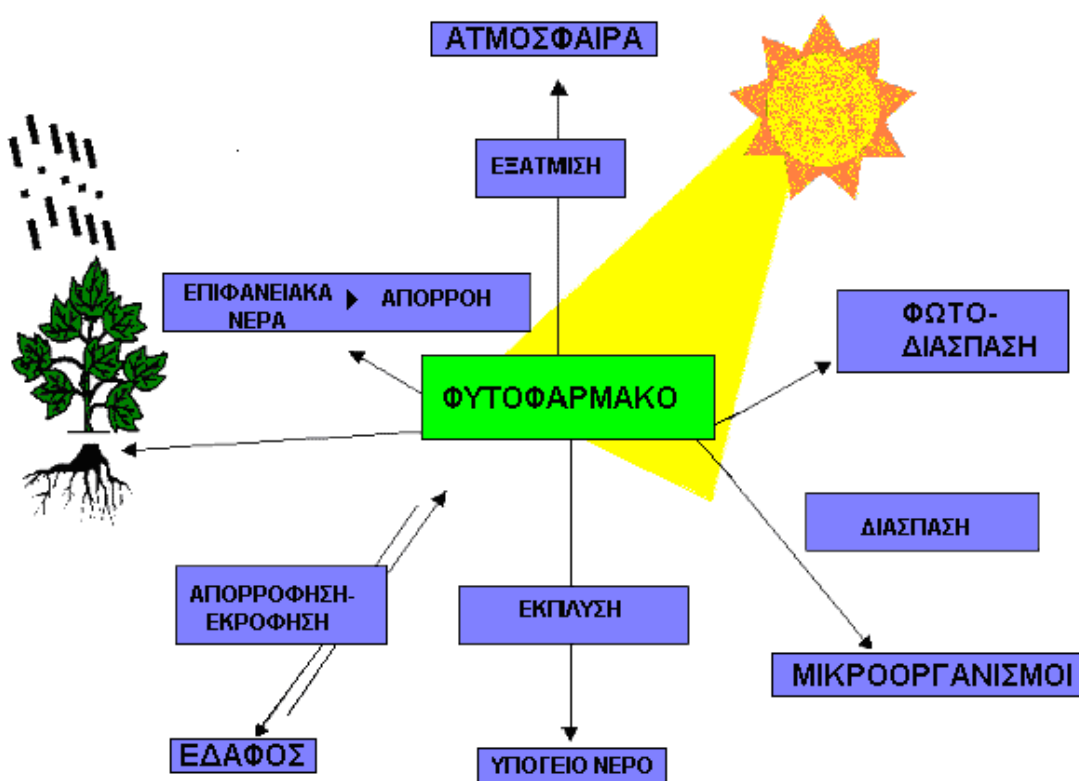
Οι υδατογενείς λοιμώξεις διακρίνονται σε:

- *Λοιμώξεις ή νοσήματα που οφείλονται στην κατανάλωση νερού για πόση* (βακτήρια, ιοί, πρωτόζωα, έλμινθες, κλασικές υδατογενείς λοιμώξεις, χολέρα και τυφοειδής πυρετός).
- *Λοιμώξεις ή νοσήματα που οφείλονται στη χρήση νερού για αναψυχή* (γαστρεντερίτιδες, δερματίτιδες, ωτίτιδες, επιπεφυκίτιδες, ρινοφαρυγγίτιδες, πρωτοπαθής μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, πνευμονία, σηψαιμία, ουρολοιμώξεις, κολπίτιδες).
- *Λοιμώξεις ή νοσήματα που οφείλονται στην εισπνοή υδατοσταγονιδίων* (νόσος των λεγεωνάριων).
- *Λοιμώξεις ή νοσήματα που οφείλονται σε ελλειπή χορήγηση νερού* (ελλειπείς συνθήκες υγιεινής, διάρροιες, επιπεφυκίτιδες, τράχωμα).
- *Λοιμώξεις που οφείλονται σε παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι περνούν ένα σημαντικό μέρος της ζωής τους στο νερό ή το νερό θεωρείται απαραίτητο για τη συμπλήρωση του κύκλου τους* (σχιστοσωμίαση, δρακοντίαση).

- Λοιμώξεις που μεταδίδονται με έντομα, τα οποία εκκολάπτονται στο νερό ή τσιμπούν κοντά σε αυτό (κίτρινος πυρετός, φιλαρίαση, ελονοσία) (Bradley 1987).

1.2.2. Ρύπανση από φυτοφάρμακα στο περιβάλλον

Τα φυτοφάρμακα, μετά την εφαρμογή τους στα φυτά ή στο έδαφος, υφίστανται μια σειρά διαδικασιών φυσικών, χημικών και βιολογικών (υδρόλυση, οξείδωση, διάσπαση, μεταφορά, εξάτμιση, ριζική πρόσληψη από τα φυτά κλπ.), οι οποίες και καθορίζουν την τελική τους τύχη στο περιβάλλον (εικόνα Α.1.).



Εικόνα Α.1. Η τύχη των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον (Αλμπάνης_a 1999).

Οι παραπάνω διαδικασίες μπορούν να μετατρέψουν τα φυτοφάρμακα από σύνθετες ενώσεις σε μια σειρά προϊόντων διάσπασης, τα οποία συχνά έχουν δραστικότητα και τοξικότητα διαφορετική της αρχικής ένωσης. Καθοριστικός είναι ο ρόλος των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των φυτοφαρμάκων στη συμπεριφορά τους στο περιβάλλον και, κυρίως, η διαλυτότητα στο νερό, το μοριακό βάρος, η πολικότητα, η πτητικότητα καθώς και παράγοντες όπως ο τύπος σκευάσματος, η δόση και η μέθοδος εφαρμογής.

Οι συνήθεις τρόποι με τους οποίους διασπώνται τα φυτοφάρμακα στο περιβάλλον, περικλείουν χημικές και βιολογικές διεργασίες. Οι χημικές διεργασίες συμβαίνουν συνήθως στο νερό ή στην ατμόσφαιρα και ακολουθούν αντιδράσεις οξειδωσης, αναγωγής, υδρόλυσης και φωτόλυσης. Οι βιολογικοί μηχανισμοί επικρατούν στο έδαφος και στους ζωντανούς οργανισμούς και ακολουθούν την οξειδωση, την αναγωγή, την υδρόλυση και άλλες αντιδράσεις όπως μεθυλίωση και ακετυλίωση για να διασπάσουν τα φυτοφάρμακα (Αλμπάνης^a 1999).

Η κατανόηση της τύχης των φυτοφαρμάκων απαιτεί κατανόηση συγκεκριμένων διεργασιών: μετασχηματισμός, μεταφορά και μετακίνηση.

- Ο μετασχηματισμός (transformation) αναφέρεται σε βιολογικές και χημικές διεργασίες που μεταβάλλουν τη δομή του φυτοφαρμάκου ή το αποικοδομούν εντελώς.
- Η μεταφορά (transfer) αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο ένα φυτοφάρμακο κατανέμεται μεταξύ στερεών και υγρών ή μεταξύ στερεών και αερίων.
- Η μετακίνηση (transport) αναφέρεται στη μετακίνηση από ένα περιβαλλοντικό διαμέρισμα σε ένα άλλο, όπως είναι η έκπλυση των φυτοφαρμάκων από το έδαφος στα υπόγεια ύδατα, η εξάτμιση στον αέρα ή η απορροή των επιφανειακών υδάτων.

Τα εφαρμοζόμενα στο έδαφος φυτοφάρμακα, γενικά, αλληλεπιδρούν αρχικά με την υγρασία γύρω και μεταξύ των εδαφικών σωματιδίων, επηρεάζοντας τον τρόπο με τον οποίο τελικά η χημική ουσία θα κινηθεί στο περιβάλλον. Κατά συνέπεια, το έδαφος μπορεί να θεωρηθεί ως η χημική περιοχή οργάνωσης για τις περισσότερες αντιδράσεις που ελέγχουν την τύχη των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον. Παραδείγματος χάριν, η διαδικασία προσρόφησης (μεταφορά), η διάσπαση από μικροβιακές και χημικές αντιδράσεις (μετασχηματισμός), η εξάτμιση στην ατμόσφαιρα, η απορροή στα βαθύτερα εδαφικά στρώματα και η χερσαία ροή (μετακίνηση), όλες ξεκινούν, κυρίως, από το έδαφος.

Οι διεργασίες που υφίσταται το φυτοφάρμακο μπορεί να έχουν θετική ή αρνητική επίδραση στη δραστηριότητά του αλλά και στις περαιτέρω επιπτώσεις της παρουσίας του στο περιβάλλον.

Στις θετικές επιδράσεις συγκαταλέγεται η δυνατότητά τους να έρχονται σε επαφή με τα παράσιτα - στόχους (target) για την αποτελεσματική αντιμετώπισή τους. Πολλές φορές όμως αυτοί οι ίδιοι μηχανισμοί μπορεί να είναι επιζήμιοι, προκαλώντας βλάβη σε φυτά, ζώα καθώς και σε μικροοργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο (non-target).

Σε πολλές περιπτώσεις μάλιστα, όπως προαναφέρθηκε, οι παραπάνω διεργασίες μπορεί να μετατρέψουν τα φυτοφάρμακα από σύνθετες ενώσεις σε μια σειρά προϊόντων διάσπασης τα οποία συχνά έχουν δραστικότητα και τοξικότητα διαφορετική της αρχικής ένωσης (Arlene 2004, EXTOXNET_a 1993, Brown *et al.* 1990).

1.2.3. Επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων στην υδάτινη μικροβιολογία

Οι μικροοργανισμοί του υδάτινου περιβάλλοντος συμβάλουν στην παραγωγή και ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών καθώς και στην αποσύνθεση των νεκρών σωματιδίων. Επιζήμια είναι η επίδραση των φυτοφαρμάκων στα πρώιμα των υδάτων καθώς και στα υψηλότερα τροφικά επίπεδα.

Στις μέρες μας, ιδιαίτερη σημασία δίνεται στη μετακίνηση των φυτοφαρμάκων στα υδάτινα συστήματα. Τα παρασιτοκτόνα από τους αγρούς, διαμέσου του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα και επιφανειακά, διαμέσου των στραγγιστικών τάφρων, μπορεί να καταλήξουν αρχικά σε ποταμούς και μετά στους τελικούς αποδέκτες, στις εκβολές τους και στη θάλασσα. Ένας άλλος τρόπος μεταφοράς τους στα υδάτινα συστήματα είναι με τις αέριες μάζες, μετά την εξάτμισή τους και την εναπόθεσή τους σε αυτά.

Ακόμη, παρασιτοκτόνα εφαρμόζονται στα υδάτινα οικοσυστήματα για τον έλεγχο των πλαγκτονικών οργανισμών και τον έλεγχο των υδρόβιων παρασίτων, χωρίς να υπολογίζονται οι περαιτέρω επιπτώσεις.

Η μικροβιακή διάσπαση είναι μία διεργασία μετασχηματισμού. Όταν πραγματοποιείται αυτή η διεργασία, οι μικροοργανισμοί (βακτήρια και μύκητες) είναι δυνατόν να προκαλέσουν αλλαγές σε ένα φυτοφάρμακο και, πιο συγκεκριμένα, να το μεταβολίζουν ολικώς ή μερικώς.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες πάνω στη μικροβιακή διάσπαση φυτοφαρμάκων με απώτερο σκοπό την εύρεση τρόπου απομάκρυνσης των υπολειμμάτων τους από το περιβάλλον, κυρίως μέσω της μετατροπής τους σε αβλαβή τελικά προϊόντα (Lopez *et al.* 2005, Das *et al.* 1995).

Παρουσία οξυγόνου, η μικροβιακή διάσπαση χαρακτηρίζεται αερόβιος μεταβολισμός ενώ απουσία οξυγόνου, αναερόβιος μεταβολισμός. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που ζουν στο περίγραμμα του εδάφους, όπου το οξυγόνο είναι άφθονο, διασπούν τα

φυτοφάρμακα μέσω αερόβιου μεταβολισμού. Όταν ένα φυτοφάρμακο υφίσταται αερόβιο μεταβολισμό, κατά κανόνα, μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό.

Υπό αναερόβιες συνθήκες, η μικροβιακή διάσπαση μπορεί να παράγει επιπλέον τελικά προϊόντα, όπως μεθάνιο. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν αναερόβιο μεταβολισμό για τη διάσπαση των φυτοφαρμάκων είναι τυπικά οι μικροοργανισμοί που ζουν σε πλημμυρισμένα εδάφη, σε χερσαία οικοσυστήματα ή ζουν στα κατώτατα ιζήματα λιμνών και ποταμών (Harayama *et al.* 1992).

1.3. Ποιότητα υδάτινων πόρων

Ο όρος “ποιότητα νερού” πρέπει να μελετάται σε σχέση με τα οικολογικά συστήματα και τις διαφορετικές χρήσεις του νερού. Μόνο μία λεπτομερής ανάλυση των ποσοτικών και ποιοτικών απαιτήσεων των διαφορετικών χρήσεων του νερού, μπορεί να οδηγήσει στην εκτίμηση της ποιότητας και της επάρκειας ή της ανεπάρκειας των διαθέσιμων υδάτινων πόρων.

Η ποιότητα των υδάτων καθορίζεται με τη χρήση παραμέτρων, οι οποίες μπορούν να ταξινομηθούν ως:

- *Βιολογικές:* βακτήρια, άλγες.
- *Φυσικές:* θερμοκρασία, θολερότητα και διαύγεια, χρώμα, αλατότητα, αιωρούμενα στερεά, διαλυμένα στερεά.
- *Χημικές:* pH, διαλυμένο οξυγόνο, βιολογική απαίτηση οξυγόνου, θρεπτικές ουσίες (συμπεριλαμβανομένου του αζώτου και του φωσφόρου), οργανικές και ανόργανες ενώσεις (συμπεριλαμβανομένων των τοξικών προϊόντων).
- *Αισθητικές:* μυρωδιές, κηλίδες, χρώμα, επιπλέοντα υλικά.
- *Ραδιενεργές:* άλφα, βήτα και γάμα εκπομπή ακτινοβολίας.

Η παρουσία / απουσία, η ποσότητα και οι τιμές των παραμέτρων αυτών μπορούν να καθορίσουν το εάν η ποιότητα του νερού είναι κατάλληλη για την υγεία του φυσικού περιβάλλοντος και γενικότερα για κάθε είδος χρήσης του (www.environment.nsw.gov.au, Maier *et al.* 2000, Degremont 1979).

1.3.1. Παράμετροι ποιότητας υδάτων σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία

Η διασφάλιση της ποιότητας του νερού και των υδάτινων πόρων αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την κοινωνική και οικονομική ζωή. Στη χώρα μας η ισχύουσα νομοθεσία χωρίζει το νερό στις παρακάτω κατηγορίες:

- Πόσιμο νερό δικτύου ύδρευσης.
- Εμφιαλωμένο νερό.
- Νερό κολυμβητηρίων.
- Επιφανειακό νερό αναψυχής.

Η Υγειονομική Διάταξη για το πόσιμο νερό, που ισχύει σήμερα (Α5/288/23-1-86 ΦΕΚ 53/Τεύχος Β΄/20-2-86) είναι εναρμονισμένη με την 80/778/Οδηγία του Συμβουλίου της ΕΟΚ. Περιλαμβάνει 62 παραμέτρους, ταξινομημένες σε πέντε βασικές ομάδες:

- Οργανοληπτικές.
- Φυσικοχημικές.
- Ανεπιθύμητες.
- Τοξικές.
- Μικροβιολογικές.

Για κάθε παράμετρο καθορίζεται “Ενδεικτικό Επίπεδο” (Ε.Ε.) και “Ανώτατη Παραδεκτή Συγκέντρωση” (Α.Π.Σ.).

Όσον αφορά στις παραμέτρους που εξετάζονται στην παρούσα έρευνα, στο πόσιμο νερό η Ανώτατη Παραδεκτή Συγκέντρωση (Α.Π.Σ.) για τα παρασιτοκτόνα ανά μεμονωμένη ουσία είναι 0,1 μg/L και 0,5 μg/L για το σύνολο των ουσιών. Οι μικροβιολογικές παράμετροι ορίζουν τα ολικά κολοβακτηριοειδή, τα κολοβακτηριοειδή κοπράνων και τους στρεπτόκοκκους κοπράνων στα 0 CFU ανά 100 ml δείγματος πόσιμου νερού.

Στα νερά κολύμβησης, στο σύνολο των κολοβακτηριοειδών (στα 100 ml δείγματος) ορίζεται το Ενδεικτικό Επίπεδο (Ε.Ε.) στα 500 CFU και η Ανώτατη Παραδεκτή Συγκέντρωση (Α.Π.Σ.) στα 10.000 CFU. Στα κολοβακτηρίδια και τους εντερόκοκκους (στα 100 ml δείγματος) το Ενδεικτικό Επίπεδο ορίζεται (Ε.Ε.) στα 100 CFU και η Ανώτατη Παραδεκτή Συγκέντρωση (Α.Π.Σ.) στα 500 CFU.(Νόμος 1650 ΦΕΚ 160/α/16-10-1986, Υγειονομική Διάταξη ΦΕΚ 379/β/86-53/β/20.2.1986, οδηγίας 80/778 /ΕΟΚ, ΚΥΑ Υ2/2600/2001 ΦΕΚ 892/Β/11 892/Β/11-7-2001).

1.3.2. Παράμετροι μικροβιακής ποιότητας υδάτων και κατηγορία επικινδυνότητας, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO)

Για τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η κατανάλωση “υγιεινού” πόσιμου ύδατος είναι δικαίωμα όλων μας και η αξιολόγηση των πιθανών κινδύνων από μικροβιολογική μόλυνση των παροχών πόσιμου ύδατος είναι μέγιστης προτεραιότητας για την ανθρώπινη

υγεία. Χρησιμοποιεί για την αξιολόγηση του κινδύνου τον αριθμό CFU των κολοβακτηριδίων κοπρανώδους προέλευσης της *Escherichia coli* και του *Streptococcus faecalis*, παράμετροι που εξετάζονται στην παρούσα έρευνα.

Ενδεικτικά, σύμφωνα με τον πίνακα A.1. γίνεται η κατηγοριοποίηση για την εκτίμηση της επικινδυνότητας των πόσιμων υδάτων και σύμφωνα με τον πίνακα A.2. γίνεται η κατηγοριοποίηση για την εκτίμηση της επικινδυνότητας των υδάτων αναψυχής (WHO_a 2004).

Μέτρηση Κολοβακτηριδίων Κοπρανώδους Προέλευσης CFU/100ml	Κατηγορία Και Χρωματικός Κώδικας	Σήμανση
0	A (μπλε)	Σύμφωνα με την οδηγία του WHO
1-9	B (πράσινο)	Χαμηλός κίνδυνος
10-99	C (κίτρινο)	Ενδιάμεσος κίνδυνος
100-999	D (πορτοκαλί)	Υψηλός κίνδυνος
>1000	E (κόκκινο)	Πάρα πολύ υψηλός κίνδυνος

Πίνακας A.1. Κατηγοριοποίηση για την εκτίμηση της επικινδυνότητας των πόσιμων υδάτων με τη μέτρηση των κολοβακτηριδίων κοπρανώδους προέλευσης σύμφωνα με τον WHO (WHO_c 2001).

95 th percentile intestinal enterococci /100ml					
Optional 95 th percentile <i>Esherichia coli</i> /100ml					
Κατηγορία	A	B	C	D	E
Οριακές τιμές	<10	11-50	51-200	201-1000	>1000
	<35	36-130	131-500	501-1000	>1000
Ποιότητα ύδατος	Άριστη	Καλή	Μέτρια	Φτωχή	Άμεσα μέτρα

Πίνακας A.2. Κατηγοριοποίηση για την εκτίμηση της επικινδυνότητας των υδάτων αναψυχής (WHO_b 1994).

Κεφάλαιο 2

ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

ΥΔΑΤΩΝ

2.1. Βακτηριακοί δείκτες ποιότητας υδάτων

Η μικροβιολογική καταλληλότητα του νερού ελέγχεται με την καταμέτρηση των μικροβιακών δεικτών. Οι δείκτες αυτοί είναι αλλόχθονοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι περνούν παροδικά μέσα στο υδάτινο οικοσύστημα, προερχόμενοι συνήθως από το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων και δεν αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας του νερού.

Ο εντοπισμός των δεικτών αποτελεί ένδειξη παρουσίας περιττωματικής μόλυνσης και πιθανής παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό. Χρησιμοποιούνται επειδή είναι ευκολότεροι και οικονομικότεροι για εξέταση απ' ό,τι όλοι οι άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί που πιθανόν είναι παρόντες.

Μέχρι σήμερα, παγκοσμίως, δεν υπάρχει ένας μόνο μικροβιακός δείκτης που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για όλους τους σκοπούς του ποιοτικού ελέγχου του ύδατος. Γι' αυτόν το λόγο, από την ευρεία ποικιλία των διαθέσιμων δεικτών, ο κάθε ένας έχει τα

πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του ενώ πρόκληση είναι να επιλεγεί ο κατάλληλος δείκτης ή συνδυασμός δεικτών για την κάθε ιδιαίτερη περίπτωση ελέγχου νερού.

Ο ιδανικός μικροβιολογικός δείκτης για την καταλληλότητα του νερού θα πρέπει να πληροί τις παρακάτω προϋποθέσεις:

- Να είναι παρών όπου υπάρχουν παθογόνοι παράγοντες στους ίδιους ή υψηλότερους αριθμούς από τα μικροβιακά παθογόνα, χωρίς πολλαπλασιασμό ή γενετική αλλαγή, ώστε να παρέχει λογική εκτίμηση της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών και του πραγματικού ή δυνητικού κινδύνου στην υγεία.
- Να μπορεί να επιζήσει στις συνθήκες περιβάλλοντος φυσικού ύδατος, καθαρισμού και απολύμανσης ύδατος όσο και τα δυνητικά παθογόνα.
- Να είναι εύκολο να ανιχνευτεί με μεγάλη ακρίβεια και αξιοπιστία παρά την παρουσία άλλων μικροοργανισμών στο δείγμα.
- Να έχει σταθερά χαρακτηριστικά, σταθερή και αποκλειστική σχέση με την πηγή των παθογόνων.
- Να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κάθε τύπο νερού και να παρουσιάζει εξειδίκευση στην περιττωματική ρύπανση ή ρύπανση λυμάτων.

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι, σήμερα, δείκτες είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή, τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή και οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι, γιατί είναι ευκολότερο να ανιχνευθούν οι κοινοί μεσόφιλοι μικροοργανισμοί. Για τον πληρέστερο έλεγχο της ποιότητας του πόσιμου και του εμφιαλωμένου νερού, στις αντίστοιχες υγειονομικές διατάξεις προτείνονται κι άλλοι δείκτες, όπως η *P. aeruginosa*, το *C. perfringens*, η ομάδα του *Bacteroides fragilis* καθώς και παθογόνοι μικροοργανισμοί (Παπαετροπούλου_α 2001, Παπαετροπούλου_β και συν. 1995).

2.1.1. Ολικός αριθμός κοινών αερόβιων μικροβίων στους 37 °C και στους 22 °C

Αναφέρεται στους οργανισμούς που δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν το διοξείδιο του άνθρακα ως μόνη πηγή άνθρακα και χρειάζονται μία επιπλέον οργανική ένωση για να αναπτυχθούν. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει τα κολοβακτηριοειδή μαζί με πολλά άλλα βακτήρια. Αναπτύσσονται σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα και σε θερμοκρασίες από 20 έως 35°C. Οι ετερότροφοι οργανισμοί που υπάρχουν στο νερό προσφέρονται για την

παρακολούθηση της ποιότητάς του. Η παράμετρος αυτή δεν παρέχει ακριβή στοιχεία για τη μικροβιολογική ποιότητα του νερού, δίνει όμως σημαντικές πληροφορίες ως προς τη σταθερότητα της ποιότητάς του καθώς και για την αποτελεσματικότητα της χλωρίωσης και τη σωστή λειτουργία του υδραγωγείου. Αυξομειώσεις του ολικού αριθμού της τάξεως 1-2 λογαρίθμων αποτελούν ένδειξη επιμόλυνσης, η οποία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης (προβλήματα στη μονάδα επεξεργασίας του νερού, ανάπτυξη βιολογικού υμενίου στο δίκτυο, επιμόλυνση της πηγής υδροληψίας κλπ) (Παπαπετροπούλου, και συν. 1995).

2.1.2. Ολικά Κολοβακτηριοειδή (*Total Coliforms* - TC)

Περιλαμβάνονται όλα τα αερόβια και προαιρετικώς αναερόβια, μη σπορογόνα Gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία ζυμώνουν τη λακτόζη με παραγωγή αερίου σε 48h στους, $36\pm 1^{\circ}\text{C}$. Τυπικά γένη, συναντώμενα στα δίκτυα νερού είναι τα *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Klebsiella*. Αυτοί οι οργανισμοί είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση και σε κανονικές συνθήκες θεωρούνται μη παθογόνοι. Όλοι αυτοί οι μικροοργανισμοί δεν αποικίζουν απαραίτητως στο γαστρεντερικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων γι' αυτό και ο δείκτης αυτός έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση και αρκετοί ερευνητές δεν τον χρησιμοποιούν πλέον για τον έλεγχο της κοπρανώδους ρύπανσης των νερών (Παπαπετροπούλου, και συν. 1995).

2.1.3. Κοπρανώδη Κολοβακτηριοειδή (*Faecal Coliforms* - FC)

Έχουν τις ίδιες ιδιότητες με τα κολοβακτηριοειδή και αποτελούν υποομάδα των ολικών κολοβακτηριοειδών. Διαφέρουν από τα ολικά κολοβακτηριοειδή στην ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες (πολλαπλασιάζονται στους $44\pm 0.2^{\circ}\text{C}$, μετά από επώαση 24h). Η *E. coli* είναι το πιο τυπικό είδος της ομάδας των κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών και παράγει ινδόλη από την τρυπτοφάνη στους $44\pm 0.2^{\circ}\text{C}$. Τόσο τα κολοβακτηριοειδή κοπράνων όσο και οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι βρίσκονται στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των άλλων θερμόαιμων ζώων. Η παρουσία τους στο νερό υποδεικνύει ρύπανση κοπρανώδους προέλευσης και πιθανή παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών. Η επιβίωσή τους στο νερό ποικίλλει από ώρες έως εβδομάδες (Παπαπετροπούλου, και συν. 1995).

2.1.4. Κοπρανώδεις Στρεπτόκοκκοι και Εντερόκοκκοι (*Faecal Streptococci, Enterococci - S*)

Μια άλλη ομάδα βακτηρίων που υπάρχει στα κόπρανα θερμόαιμων ζώων, σε μικρότερη πυκνότητα από τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή, είναι οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι. Είναι οι Gram-θετικοί, καταλάση-αρνητικοί κόκκοι που απαντούν ανά ζεύγη ή μικρές αλύσους. Η ύπαρξή τους στο νερό σημαίνει τη ρύπανσή του από κόπρανα των θερμόαιμων ζώων. Οι *S. faecalis* και *S. faecium* φαίνεται να προέρχονται κυρίως από τα ανθρώπινα κόπρανα. Οι *S. bovis*, *S. equinus* και *S. valium* υπάρχουν σε μεγάλες πυκνότητες στα κόπρανα ζώων.

Η ομάδα των εντεροκόκκων είναι υποομάδα των κοπρανωδών στρεπτόκοκκων και περιλαμβάνουν τα είδη *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. avium* και *S. gallinarum*. Αναπτύσσονται σε θρεπτικά υλικά με πυκνότητα NaCl 6.5% σε pH 9.6 και σε θερμοκρασίες 10°C και 45°C. Παρόλο που οι υγειονομικές διατάξεις αναφέρονται στην καταμέτρηση των κοπρανωδών στρεπτόκοκκων, υπάρχουν ενδείξεις ότι, στα υπάρχοντα θρεπτικά υποστρώματα, αναπτύσσονται μόνο τα είδη που περιλαμβάνονται στην υποομάδα των εντερόκοκκων.

Από τη σχέση των κοπρανωδών στρεπτόκοκκων ως προς τα κολοβακτηριοειδή κοπράνων είναι δυνατόν να ληφθούν πολύτιμες πληροφορίες για την πηγή ρύπανσης. Αν ο λόγος FC:S είναι μικρότερος από 2, η μόλυνση προέρχεται από κόπρανα ζώων, αν είναι από 2-4 είναι ανθρώπινη η πηγή μόλυνσης και αν είναι πάνω από 4 είναι αστική η μόλυνση.

Επειδή ορισμένοι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι προσβάλλουν συγκεκριμένους ξενιστές, γι' αυτό και δεν πρέπει να χρησιμοποιείται ένας μόνο εντερικός δείκτης για τον έλεγχο της ρύπανσης του νερού αλλά τουλάχιστον δύο.

Εκτός των ανωτέρω δεικτών, ο συστηματικός προσδιορισμός των ολικών αερόβιων και προαιρετικώς αναερόβιων ετερότροφων βακτηρίων στο νερό δίνει σημαντικές πληροφορίες ως προς την σταθερότητα της ποιότητάς του. Αυξομειώσεις του ολικού αριθμού της τάξεως των 1-2 λογαρίθμων μπορεί να σημαίνουν πρόβλημα στη μονάδα επεξεργασίας του νερού, ανάπτυξη βιολογικού υμενίου στο δίκτυο, επιμόλυνση της πηγής υδροληψίας (Παπαπετροπούλου, και συν. 1995).

2.2. *Enterobacteriaceae*

Τα εντεροβακτηρίδια είναι Gram αρνητικά βακτηρίδια, αερόβια, ασπορογόνα, κινούμενα με περίτριχες βλεφαρίδες ή ακίνητα. Όλα ζυμώνουν τη γλυκόζη με παραγωγή οξέος, μερικά με παραγωγή αερίου, ανάγουν τα νιτρικά, παράγουν καταλάση όχι όμως και οξειδάση. Αναπτύσσονται στο MacConkey άγαρ και στα πεπτονούχα υγρά υλικά και χωρίς την παρουσία NaCl.

Παρά την ονομασία τους, δεν είναι όλα παράσιτα του εντέρου. Υπάρχουν είδη ή στελέχη που ζουν σε άλλες περιοχές του σώματός μας, στα φυτά και στο έδαφος. Πολλά είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και όλα σχεδόν ευκαιριακά παθογόνα. Στο μόριο του DNA τους ο συνδυασμός G + C αποτελεί το 39-59%.

Το ζεύγος GC δεσμεύεται από τρεις δεσμούς υδρογόνου, ενώ το ζεύγος AT δεσμεύεται από δύο δεσμούς υδρογόνου. Το DNA με υψηλή περιεκτικότητα σε GC είναι περισσότερο σταθερό και από το DNA με χαμηλή περιεκτικότητα σε GC. Πιστεύεται ότι η υψηλή περιεκτικότητα σε GC παίζει ζωτικό ρόλο στην προσαρμογή των μικροοργανισμών (Vinogradov 1994).

Μια αδρή διάκριση ή ομαδοποίηση των εντεροβακτηριδίων, βοηθητική στις τεχνικές ταυτοποιήσεώς των, είναι αυτή που γίνεται με βάση τη ζύμωση ή μη ζύμωση της λακτόζης. Η *Escherichia* ανήκει στα γένη που ζυμώνουν την λακτόζη ενώ η *Salmonella* ανήκει στα γένη που δεν ζυμώνουν τη λακτόζη (Παπαπετροπούλου, και συν. 1995, Αρσένη_a 1994).

2.2.1. *Escherichia coli*

Κοινή ονομασία του είδους που επικράτησε στα ελληνικά είναι η λέξη κολοβακτηρίδιο. Έχει όλους τους γενικούς χαρακτήρες της οικογένειας των εντεροβακτηριδίων, της οποίας αποτελεί το πιο αντιπροσωπευτικό είδος. Αποτελεί το τυπικό μοντέλο για μελέτες μοριακής βιολογίας και γενετικής, φαινομένων αντοχής στα αντιβιοτικά, πλασμιδολογίας και ενζυμολογίας. Αν και είναι απαραίτητο στοιχείο της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας, είναι μικρόβιο ευκαιριακά παθογόνο που προκαλεί μεγάλη ποικιλία εντερικών και άλλων λοιμώξεων.

Είναι Gram αρνητικό, αερόβιο, ασπορογόνο βακτήριο. Είναι περίτριχο, κινούμενο, αλλά υπάρχουν και ακίνητα στελέχη. Παράγει ένα πολύ λεπτό έλυτρο που στα μη κινούμενα στελέχη είναι παχύτερο, σε μια πραγματική κάψα. Τόσο τα κινούμενα όσο και

τα ακίνητα στελέχη παράγουν ινίδια προσκολλητικά και πολλά παράγουν και ινίδια συζευκτικά.

Οι εσερίχιες, δηλαδή τα κολοβακτηρίδια, είναι τα πιο πολυάριθμα αερόβια μικρόβια της εντερικής και όλης της φυσιολογικής χλωρίδας του σώματός μας καθώς και αυτής των ζώων. Αν και δεν είναι μικρόβια του φυσικού περιβάλλοντος, βρίσκονται σχεδόν σε κάθε τρόφιμο που έρχεται σε επαφή με τα χέρια μας, σε αφθονία στα ζωικά προϊόντα, όπως το γάλα και τα παράγωγά του. Οι διαφορές που παρατηρούνται στις σακχαροζυμωτικές ιδιότητες επιτρέπουν το διαχωρισμό των *E. coli* σε διάφορους βιότυπους. Στο έντερο είναι το πολυαριθμότερο από τα αερόβια μικρόβια. Εκεί ζουν διάφορες φυλές που εναλλάσσονται. Στα κόπρανα βρίσκονται 3-4 διαφορετικοί ορότυποι που εναλλάσσονται κατά διαστήματα.

Η εντεροτοξινογόνος *E. coli* (ETEC) είναι δύσκολο να διαφοροποιηθεί από τα υπόλοιπα στελέχη *E. coli* του νερού. Τα τελευταία χρόνια η διαφοροποίηση αυτή πραγματοποιείται με μοριακές τεχνικές. Η ETEC είναι συχνό αίτιο διάρροιας των ταξιδιωτών.

Επειδή η μολυσματική δόση είναι μεγάλη, 10^8 - 10^{10} CFU, η μετάδοση από άτομο σε άτομο δεν είναι συχνή, ενώ θεωρείται σημαντική η μετάδοση διά των τροφών. Η υδατογενής μετάδοση της ETEC είναι αβέβαιη. Η ETEC παράγει 2 είδη τοξινών, την θερμοανθεκτική (ST) και την θερμοευαίσθητη (LT), η οποία προκαλεί χολεροειδή εντερίδα. Η ETEC περιλαμβάνει τους ορότυπους 0:6, 0:8, 0:15, 0:25, 0:27, 0:78, 0:148 και 0:159. Η ικανότητα της ETEC να προκαλεί διάρροια σε παιδιά και ηλικιωμένους εξαρτάται αφ' ενός μεν από την ικανότητά της να παράγει μία ή δύο τοξίνες αφ' ετέρου δε από την ικανότητά της να προσκολλάται στο τοίχωμα του εντέρου. Ο χρόνος επώασης είναι 6-36 ώρες και τα συμπτώματα είναι διάρροια, ναυτία, εμετοί, κοιλιακοί πόνοι, μυαλγίες και χαμηλός πυρετός. Η διάρκεια της νόσου ποικίλλει από 1 ημέρα μέχρι 2 εβδομάδες. Η απομόνωση της ETEC θεωρείται δύσκολη, δαπανηρή, χρονοβόρος και στηρίζεται κυρίως στον έλεγχο παραγωγής εντεροτοξινών.

Εκτός από την ETEC, υπάρχει η εντεροπαθογόνος *E. coli* (EPEC). Είναι συχνότερη στις αναπτυσσόμενες χώρες ενώ έχει εξαφανισθεί σχεδόν στις ανεπτυγμένες. Δεν παράγει εντεροτοξίνη. Ο μηχανισμός παθογόνου δράσης της δεν είναι γνωστός. Προκαλεί διάρροιας σε παιδιά μέχρι 5 ετών και σπανιότερα στους ενήλικους.

Η εντεροδιεισδυτική *E. coli* (EIEC) προκαλεί διάρροιας σε παιδιά και ενήλικους. Δεν παράγει ειδικές τοξίνες. Είναι ακίνητη και χωρίς βλεφαρίδες. Η βιοχημική της ταυτοποίηση παρουσιάζει δυσκολίες και γι' αυτό χρησιμοποιούνται πλέον κυρίως μοριακές τεχνικές.

Υδατογενείς επιδημίες έχει προκαλέσει και η αιμορραγική *E. coli* (O157:H) αλλά είναι σχετικά σπάνιες (Παπαπετροπούλου_b και συν. 1995, Αρσένη_a 1994).

2.2.2. *Salmonella typhi*

Η *Salmonella typhi* προσβάλλει μόνο τον άνθρωπο, ο οποίος είναι και η πηγή του μικροβίου. Είναι Gram αρνητικό βακτήριο και κινείται με περίτριχες βλεφαρίδες. Είναι αερόβια, σπορογόνα, καταλάση θετική, οξειδάση αρνητική. Έχει έλυτρο που παράγει κάψα όταν καλλιεργηθεί στους 22 °C. Δεν παράγει αέριο από τη ζύμωση της γλυκόζης και η παραγωγή του υδρόθειου είναι σε πολύ μικρές ποσότητες. Το ποσοστό της δυάδας G-C στο μόριο του DNA είναι 50-53%. Όλες οι σαλμονέλες λύνονται από ένα συγκεκριμένο φάγο, τον O1 των Felix-callow.

Οι αποικίες στο θρεπτικό άγαρ είναι σχετικά μεγάλες, διαμέτρου 2-3 mm, χαμηλές, κυκλικές, διαφανείς, με μαύρα στίγματα (παραγωγή υδρόθειου). Ευνοϊκή θερμοκρασία αναπτύξεως είναι οι 37°C αλλά αναπτύσσονται και σε άλλες θερμοκρασίες από 10°C έως 42°C. Δεν αναπτύσσεται σε υλικό με μόνη πηγή άνθρακος το κιτρικό οξύ, γιατί έχει ανάγκη παρουσίας τρυπτοφάνης για την ανάπτυξή της. Μερικά στελέχη της ζυμώνουν την ξυλόζη και άλλα την αραβινόζη. Με βάση τις διαφορές αυτές διαχωρίζεται σε βιότυπους.

Ο τυφοειδής πυρετός προκαλείται από την *S. typhi*. Η σαλμονέλα κυκλοφορεί στο αίμα και αποκαλύπτεται με την αιμοκαλλιέργεια κατά την πρώτη εβδομάδα της νόσου. Μετά εγκαθίσταται στο έντερο και αποβάλλεται με τα κόπρανα. Για τον τυφοειδή πυρετό το αντιβιοτικό εκλογής είναι η χλωραμφενικόλη και στη συνέχεια η αμπικιλίνη ή η κοτριμοξαζόλη.

Αντοχή προς τα αντιβιοτικά άρχισαν να εμφανίζουν οι σαλμονέλες εδώ και είκοσι χρόνια, πρώτα προς τις τετρακυκλίνες που χρησιμοποιήθηκαν στην κτηνιατρική και αργότερα προς την αμπικιλίνη. Τα περισσότερα στελέχη στα ελληνικά νοσοκομεία είναι ανθεκτικά στην αμπικιλίνη.

Οι τυφο-παρατυφικές σαλμονελώσεις εμφανίζονται είτε σε σποραδικά κρούσματα είτε σε μικρές και μεγάλες επιδημίες. Και στις δύο περιπτώσεις, η πηγή του μικροβίου είναι κάποιος άνθρωπος ή κάποιο ζώο που πάσχει από σαλμονέλωση (Παπαπετροπούλου_b και συν. 1995, Αρσένη_a 1994).

2.3. *Enterococcus*

Οι εντερόκοκκοι αποτελούν ένα ξεχωριστό γένος που αναγνωρίστηκε και αποσπάστηκε από το γένος *Streptococcus* το 1984. Οι παλιές ονομασίες των χαρακτηριστικών ειδών *Streptococcus faecalis* και *S. faecium* άλλαξαν και έγιναν *Enterococcus faecalis* και *E. faecium*.

Τα βασικά χαρακτηριστικά του γένους αυτού που το διαχωρίζουν από τους στρεπτόκοκκους είναι ότι δίνουν θετική τη δοκιμή PYR (παραγωγή πυρρολινοδάσης), ότι αναπτύσσονται παρουσία 6,5% NaCl και χολής και σε ακραίες θερμοκρασίες των 10°-45° C και ότι υδρολύουν την εσκουλίνη. Στο γένος αυτό ανήκουν 13 είδη. Δύο εξ αυτών έχουν απομονωθεί μόνο από τα ζώα. Τα υπόλοιπα απομονώνονται από τη φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπου και από νόσους αυτού.

Οι δύο συχνότερα απομονωμένοι εντερόκοκκοι είναι ο *Enterococcus faecalis* και ο *E. faecium*. Το 80-90% και 5-10% των απομονωμένων εντεροκόκκων από τον άνθρωπο ανήκουν στα δύο αυτά είδη (Παπαπετροπούλου_b και συν. 1995, Αρσένη_a 1994).

2.3.1. *Enterococcus faecalis*

Οι *Enterococcus faecalis* ή *Streptococcus faecalis*, είναι Gram - θετικοί κόκκοι, ωοειδείς, που διατάσσονται κατά ζεύγη, συνήθως, ή και σε αλυσίδες κοντές. Μερικά στελέχη είναι κινούμενα. Ο επιμήκης άξονας των κόκκων είναι παράλληλος προς τον επιμήκη άξονα της αλυσίδας.

Είναι μικρόβιο της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων. Αποβάλλεται από τα κόπρανα αυτών και διασπείρεται στο έδαφος, το νερό, τα φυτά και τις τροφές του ανθρώπου.

Η παρουσία του στο έδαφος ή στα τρόφιμα χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ρυπάνσεως των στοιχείων αυτών με κόπρανα αλλά δεν είναι μέθοδος εύκολα αξιολογήσιμη, γιατί υπάρχουν στο έδαφος και άλλοι στρεπτόκοκκοι της D-ομάδας που δεν είναι εντερικής προελεύσεως. Για τον ίδιο λόγο, εγκαταλείφθηκε ως μέθοδος υγειονομικού ελέγχου του κρέατος (Παπαπετροπούλου_b και συν. 1995, Αρσένη_a 1994).

Κεφάλαιο 3

ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ – ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ - ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΑ

3.1. Παρασιτοκτόνα

Η χρήση χημικών ουσιών θεωρείται σήμερα αναγκαία για την προστασία της γεωργικής παραγωγής. Πλήθος φυτοφαρμάκων χρησιμοποιείται σε ολόκληρο τον κόσμο με τη μορφή μεγάλου αριθμού διαφορετικών παρασκευασμάτων.

Σύμφωνα με την οδηγία 414/91 της Ε.Ε., ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα (plant protection products) νοούνται οι δραστικές ουσίες και τα σκευάσματα τα οποία περιέχουν μία ή περισσότερες *δραστικές ουσίες και προορίζονται για να:*

- Προστατεύουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδος επιβλαβών οργανισμών ή να προλαμβάνουν τη δράση τους.
- Επηρεάζουν τις βιολογικές διεργασίες των φυτών.
- Διατηρούν τα φυτικά προϊόντα.
- Καταστρέφουν ανεπιθύμητα φυτά.

- Καταστρέφουν μέρη των φυτών, να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίζουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξή τους.

Με βάση τον παραπάνω ορισμό, στα *φυτοπροστατευτικά προϊόντα* εντάσσονται τα παρακάτω:

- *Παρασιτοκτόνα*: είναι χημικές ουσίες ή μείγματα ουσιών που απαντώνται στη φύση ή συντίθενται τεχνητά και έχουν την ιδιότητα να επιδρούν σε συγκεκριμένα βιολογικά υποστρώματα (φυτικά ή ζωικά), μεταβάλλοντας τη βιολογική τους συμπεριφορά. Αποτέλεσμα της δράσης τους είναι ο θάνατος ή η παρεμπόδιση της αύξησης ή της αναπαραγωγής του ζωντανού οργανισμού.
- Εντομοελκυστικά.
- Εντομοαπωθητικά.
- Ρυθμιστές ανάπτυξης εντόμων.
- Φυτορυθμιστικές ουσίες.
- Μικροβιολογικά σκευάσματα.

Σύμφωνα με την Εθνική Νομοθεσία, κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των ασθενειών και των εχθρών των φυτών ή βελτιώνει την αποτελεσματικότητα των παραπάνω, χαρακτηρίζεται ως "γεωργικό φάρμακο" ή "φυτοφάρμακο". Σ' αυτά εντάσσονται όλες σχεδόν οι προαναφερθείσες κατηγορίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων (εκτός των βιολογικών σκευασμάτων) αν και στη γεωργική πρακτική ως φυτοφάρμακα νοούνται κυρίως τα παρασιτοκτόνα (Αλμπάνης^b 1997, Δημόπουλος 1998, www.epa.gov).

3.1.1. Ταξινόμηση παρασιτοκτόνων

Το πλήθος των παρασιτοκτόνων μπορεί να καταταχθεί σε διάφορες *χημικές ομάδες*, ανάλογα με τη *δραστική ουσία* που περιέχουν. Οι κυριότερες χημικές ομάδες είναι:

- Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες.
- Οργανοφωσφορικοί εστέρες.
- Καρβαμιδικά και αλειφατικά οξέα και εστέρες τους.
- Ενώσεις των χλωρο- και αμινο- τριαζινών.
- Ενώσεις της ομάδας των ουριών και των ανιλιδίων.
- Πυρεθρινοειδή και φυσικές πυρεθρίνες.

- Φερομόνες.
- Ανόργανα άλατα των μετάλλων As, Zn, Cu, κ.ά.

Τα παρασιτοκτόνα ανάλογα με τη βιολογική τους δράση διακρίνονται σε:

- Ζιζανιοκτόνα.
- Εντομοκτόνα.
- Μυκητοκτόνα.
- Νηματοδοκτόνα.
- Ακαρεοκτόνα.
- Βακτηριοκτόνα.
- Κοχλιολειμακοκτόνα.
- Τρωκτικοκτόνα.

(Αλμπάνης^β 1997, Δημόπουλος 1998, www.epa.gov).

3.2. Μυκητοκτόνα

Από τις μεταδοτικές ασθένειες της γεωργικής παραγωγής, σημαντικότερες είναι αυτές που οφείλονται σε μύκητες και για τη χημική καταπολέμησή τους στη γεωργική πράξη, χρησιμοποιούνται ουσίες που προκαλούν θανάτωση ή παρεμποδίζουν την αύξηση ή την αναπαραγωγή ή τη δυνατότητά τους για πρόκληση ασθένειας και χαρακτηρίζονται ως *μυκητοκτόνα* (Αλμπάνης^b 1997, Δημόπουλος 1998).

3.2.1. Ταξινόμηση μυκητοκτόνων

A. Με βάση την *ικανότητά τους να κινούνται ή όχι στο εσωτερικό του φυτού*, τα μυκητοκτόνα διακρίνονται σε:

- *Προστατευτικά*: είναι εκείνα τα μυκητοκτόνα που δεν εισέρχονται στο εσωτερικό των φυτικών ιστών και προστατεύουν μόνο το τμήμα του φυτού επί του οποίου έχουν εναποτεθεί. Η δραστηριότητά τους εκδηλώνεται πριν ο παθογόνος μύκητας μολύνει και εγκατασταθεί στο εσωτερικό των φυτικών ιστών και κατά συνέπεια η εφαρμογή τους πρέπει να γίνεται πριν τη μόλυνση. Η νέα βλάστηση δεν προστατεύεται όσο καλά και αν έχουν καλυφθεί τα παλαιότερα όργανα του φυτού. Τα μυκητοκτόνα αυτά είναι σε υποκυτταρικό επίπεδο, συνήθως, μη εξειδικευμένοι παρεμποδιστές και ο κίνδυνος ανάπτυξης ανθεκτικότητας των φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι πολύ μικρός.
- *Διασυστηματικά*: είναι εκείνα τα μυκητοκτόνα που διεισδύουν και κινούνται στο εσωτερικό του φυτού και κατά συνέπεια θα πρέπει να επιδεικνύουν εκλεκτική τοξικότητα. Η ανάπτυξή τους άρχισε το 1966 με τα καρβοξιμιδικά και συνεχίζεται μέχρι σήμερα. Σημαντικό πρόβλημά τους είναι η εύκολη ανάπτυξη ανθεκτικότητας εκ μέρους των φυτοπαθογόνων μυκήτων. Τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται σήμερα έχουν ακροπεταλική και αποπλαστική μόνο κίνηση και αν εφαρμοσθούν στα φύλλα ελάχιστα μετακινούνται προς το μίσχο και το υπόλοιπο φυτό. Συνήθως χρησιμοποιούνται για τοπική εξουδετέρωση παθογόνων που έχουν εγκατασταθεί μέσα στους ιστούς του φυτού αλλά και για προστατευτική δράση. Αν εφαρμοσθούν στη ρίζα, τείνουν να συγκεντρωθούν στα άκρα των φύλλων, ιδίως των νεότερων, χωρίς τη δυνατότητα ανακατανομής τους μέσα στο φυτό. Στους

καρπούς, που επιδεικνύουν μικρή διαπνοή, η συγκέντρωση των διασυστηματικών μυκητοκτόνων είναι μικρή εκτός και αν έχουν καλυφθεί εξωτερικά (Δημόπουλος 1998, www.epa.gov, EXTTOXNET, 1993).

B. Με βάση τη χημική τους δομή διακρίνονται σε:

- *Ανόργανα:* σε αυτά περιλαμβάνονται το θείο καθώς και ενώσεις βαρέων μετάλλων από τις οποίες σήμερα χρησιμοποιούνται μόνο ενώσεις του χαλκού.
- *Οργανομεταλλικά:* είναι μυκητοκτόνα που αποτελούνται από ενώσεις, στις οποίες ένα μεταλλικό ιόν, που συνήθως εκδηλώνει την τοξικότητα, είναι ενωμένο με μια ανθρακική αλυσίδα που βοηθά στην είσοδο του μετάλλου προς τη θέση δράσης. Για τα περισσότερα από τα μυκητοκτόνα αυτά, η χρήση τους στη γεωργία έχει σήμερα απαγορευθεί.
- *Οργανικά προστατευτικά μυκητοκτόνα με μη εξειδικευμένη δράση* που διακρίνονται σε:
 - *Φθαλιμίδια:* σε υποκυτταρικό επίπεδο παρεμποδίζουν την αναπνοή. Πολλά από τα μέλη της ομάδας αυτής έχουν αναγνωρισθεί ως μεταλλαξιογόνα και τερατογόνα και η χρήση τους έχει σήμερα απαγορευθεί. Αντιπρόσωποι: captan, folpet, dichlofluanid.
 - *Διθειοκαρβαμιδικά:* δρουν αφαιρώντας μέταλλα ή σχηματίζοντας σύμπλοκα με τα ένζυμα, παρεμποδίζοντας τη βιολογική τους δράση. Από την αποδόμηση όλων σχεδόν των διθειοκαρβαμιδικών στη φύση αλλά και κατά τη βιομηχανική τους παραγωγή, την αποθήκευση (ιδιαίτερα σε υψηλή θερμοκρασία και υγρασία) και τη διαδικασία παρασκευής των φαγητών, σχηματίζεται η αιθυλενοθειουρία, η οποία έχει τερατογόνες και καρκινογόνες ιδιότητες (προκαλεί καρκίνο του θυρεοειδούς και του ήπατος). Αντιπρόσωποι: thiram, ziram, zineb, maneb, mancozeb, propineb.
 - *Κινόνες:* σε υποκυτταρικό επίπεδο αντιδρούν με διάφορα κυτταρικά συστατικά που έχουν σουλφυδρο- ή αμινο- ομάδες και παρεμβάλλονται στο σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση πολλών μυκήτων εκτός των ωιδίων. Αντιπρόσωποι: dithianon.
 - *Αρωματικοί υδρογονάνθρακες και δικαρβοξυμιδικά (AHDS):* οι AHDS προκαλούν υπεροξείδωση των λιπιδίων της μιτοχονδριακής και πυρηνικής μεμβράνης αλλά και του ενδοπλασματικού δικτύου των ευαίσθητων μυκήτων. Επιπλέον, φαίνεται να

προκαλούν θραύσεις των χρωματοσωμάτων κατά τη μίτωση, γι' αυτό και εμφανίζουν γενετική δραστικότητα. Χαρακτηριστικό τους είναι ότι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Αντιπρόσωποι: dicloran, prosymidone.

- Επιφανειοδραστικά: αντιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες των λιπιδίων ή τις καρβοξυλομάδες των πρωτεϊνών προκαλώντας βλάβες στην κυττοπλασματική μεμβράνη. Αντιπρόσωποι: dodine, guazatine.
- *Οργανικά διασυστηματικά* μυκητοκτόνα με εξειδικευμένη δράση που διακρίνονται σε:
 - Καρβοξαμιδικά: ο τρόπος δράσης τους εντοπίζεται αποκλειστικά στην παρεμπόδιση της "αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος" στην αναπνοή, χωρίς να επηρεάζουν καμία άλλη κυτταρική λειτουργία. Η εκλεκτική τους δράση οφείλεται στη μειωμένη συγγένεια του μορίου τους με την "αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος" των φυτών και των ανθεκτικών μυκήτων. Αντιπρόσωποι: carboxin, oxycarboxin.
 - Βενζιμιδαζολικά: παράγωγα της βενζιμιδαζόλης που παρεμποδίζουν το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου με αποτέλεσμα να μη γίνεται σωστά ο αποχωρισμός των θυγατρικών χρωματοσωμάτων. Αντιπρόσωποι: benomyl, carbendazim, thiophanate-methyl.
 - Αμινοπυριμιδινικά: εξειδικευμένα για την καταπολέμηση των ωιδίων. Παρεμποδίζουν το σχηματισμό της πλάκας συγκράτησης (appressorium) μυκηλιακής κατασκευής, απαραίτητης για την είσοδο των ωιδίων στο εσωτερικό των φυτικών ιστών. Αντιπρόσωποι: ethirimol, bupirimate.
 - Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης Εργοστερόλης (EBIs): παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση της εργοστερόλης η οποία βρίσκεται στις μεμβράνες των μυκήτων. Σήμερα αποτελούν τη μεγαλύτερη και σημαντικότερη ομάδα διασυστηματικών μυκητοκτόνων. Με βάση τη χημική τους δομή οι EBIs διακρίνονται σε έξι ομάδες:
 - Πιπεραζινικά: triforine.
 - Πυριμιδινικά: fenarimol, nuarimol.
 - Πυριδινικά: pyrifenox.
 - Ιμιδαζολικά: imazalil, prochloraz.
 - Τριαζολικά: bitertanol, cyproconazole, difenoconazole, diniconazole, flusilazol.
 - Μορφολινικά: dodemorph, fenpropimorph, tridemorph.

- Καρβαμιδικά: εμφανίζουν μικρή διασυστηματική κίνηση και χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές στο έδαφος. Ο τρόπος δράσης τους σε υποκυτταρικό επίπεδο παραμένει άγνωστος. Αντιπρόσωποι: propanoicarb.
- Οργανοφωσφορικά: δεν έχουν κοινό τρόπο δράσης σε υποκυτταρικό επίπεδο και σε μερικές περιπτώσεις δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς. Ορισμένοι αντιπρόσωποι (edifenphos, pyrazophos) χαρακτηρίζονται και ως παρεμποδιστές της κουτινάσης. Η κουτινάση είναι ένζυμο με το οποίο οι μύκητες διασπών την κουτίνη, που αποτελεί κύριο συστατικό της εφυμενίδας των περισσότερων φυτών. Η παρεμπόδιση της κουτινάσης αποτρέπει την εκδήλωση της ασθένειας χωρίς άμεση τοξική επίδραση στο παθογόνο. Αντιπρόσωποι: pyrazophos, ditalimfos, edifenophos.
- Φαινυλαμίδια: σταματούν την ανάπτυξη των παθογόνων μετά την είσοδό τους στο φυτό και αφού σχηματίσουν τον πρώτο μυζητήρα, παρεμποδίζοντας τη βιοσύνθεση του RNA. Αντιπρόσωποι: benalaxyl, metalaxyl.
 - *Αντιπαθογονικά*: είναι ενώσεις που εμποδίζουν την ανάπτυξη του παθογόνου και της ασθένειας, χωρίς να είναι άμεσα τοξικές στο παθογόνο ή σε άλλους οργανισμούς. Οι ενώσεις αυτές είτε παρεμποδίζουν λειτουργίες του παθογόνου, που είναι απαραίτητες για την πρόκληση της ασθένειας, όχι όμως και για την επιβίωσή του, είτε αυξάνουν την ανοχή του φυτού - ξενιστή στην προσβολή.
 - *Αντιβιοτικά*: είναι οργανικές ενώσεις που παράγονται από μικροοργανισμούς και είναι, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, τοξικές σε άλλους μικροοργανισμούς. Παρ' ότι σε πολλές περιπτώσεις είναι κατάλληλα για την καταπολέμηση ασθενειών των φυτών, στην πράξη πολύ λίγο χρησιμοποιούνται, λόγω του υψηλού κόστους τους και, κυρίως, λόγω του κινδύνου επιλογής ανθεκτικών στελεχών ανθρωποπαθογόνων μυκήτων και βακτηρίων (Δημόπουλος 1998, www.epa.gov, EXTOXNET_b 1993).

Γ. Με βάση τον τρόπο δράσης τους διακρίνονται σε μυκητοκτόνα που:

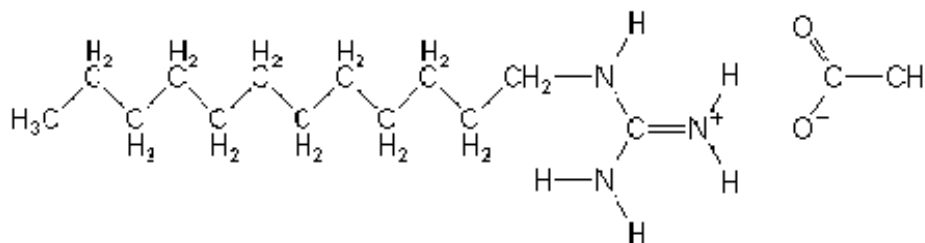
- Παρεμβαίνουν στην αύξηση και ανάπτυξη των μυκήτων, μέσω των διαδικασιών της μίτωσης και της κυτταροδιαίρεσης.
- Παρεμβαίνουν στις απαραίτητες κυτταρικές λειτουργίες παραγωγής ενέργειας, αντιδρώντας με ενζυμικά συστήματα της γλυκόλυσης του κύκλου του Krebs και με

το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων (αναπνευστική αλυσίδα) που είναι σε σύζευξη με το σύστημα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

- Αναστέλλουν τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, απαραίτητων συστατικών των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών.
- Δρουν επηρεάζοντας τη σχέση ξενιστή-παθογόνου.
- Μυκητοκτόνα με μη εξειδικευμένο τρόπο δράσης ή με μηχανισμό δράσης που δεν υπάγεται σε κάποια από τις παραπάνω κατηγορίες (Δημόπουλος 1998, www.epa.gov, EXTOXNET_b 1993).

3.3. Ιδιότητες των επιλεχθέντων μυκητοκτόνων

3.3.1. Dodine



Φυσικοχημικές ιδιότητες

Κοινή ονομασία:	Dodin(e).
Χημική ονομασία :	1-dodecylguanidinium acetate (IUPAC).
Χημική κατηγορία:	επιφανειοδραστικό (dodecylguanidine monoacetate).
Μοριακός τύπος:	C ₁₅ H ₃₃ N ₃ O ₂ .
Μοριακό βάρος:	287,4.
Φυσική μορφή:	λευκό, κρυσταλλικό στερεό.
Σημείο τήξης:	136 °C.
Τάση ατμών:	< 10 ⁻⁷ Pa στους 20 °C.
Διαλυτότητα:	στο νερό 63 mg/L στους 25 °C. (EXTOXNET _c 1993, EPA _a

2005)

Τρόπος δράσης

Χαρακτηρίζεται από ισχυρές επιφανειοδραστικές ιδιότητες, αντιδρά με τις φωσφορικές ομάδες των λιπιδίων και τις καρβοξυλομάδες των πρωτεϊνών, προκαλώντας βλάβες στην κυττοπλασματική μεμβράνη. (EXTOXNET_c 1993, EPA_a 2005)

Χρήσεις

Χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες των μηλοειδών και των πυρηνόκαρπων για την καταπολέμηση του φουζικλάδιου.

Επίσης, χρησιμοποιούνται άλλα δύο παράγωγά του με τις ίδιες χημικές ιδιότητες, το dodecylguanidine terephthalate (DGT) και το dodecylguanidine hydrochloride (DGH). Στις 10 Οκτωβρίου του 1989 απαγορεύθηκε η κυκλοφορία και η παραγωγή του DGT.

Όσον αφορά στη χρήση του DGH, βρίσκεται εφαρμογή εκτός γεωργίας, σε πύργους υδρόψυξης, στην κατασκευή χάρτου και ως πρόσθετη ουσία που συντηρεί το τελικό χαρτί και τα χάρτινα προϊόντα (συμπεριλαμβανομένων των επιφανειών επαφής τροφίμων), στο παστεριωμένο νερό της ζυθοποιίας, σε συστήματα πλυντηρίων, σε υδάτινα συστήματα αποβλήτων - αποχέτευσης λυμάτων, στη βιομηχανική επεξεργασία μη πόσιμου νερού, σε κόλλες, επιστρώματα, λάσπη διατρήσεων αποκατάστασης πετρελαίου, δευτεροβάθμιο νερό εγχύσεων αποκατάστασης πετρελαίου, πολυμερή σώματα, λάτεξ, γαλακτώματα ρητίνης, γαλακτώματα λάτεξ, πάνες της μιας χρήσης και στους πηλούς.

Στη χώρα μας, το Dodine στη γεωργία, χρησιμοποιείται ως δραστική ουσία σε πέντε σκευάσματα με τις ονομασίες Syllit, Melprex, Venturol, Guanidol και Serbam (Δημόπουλος 1998, EXTOXNET_c 1993, EPA_a 2005).

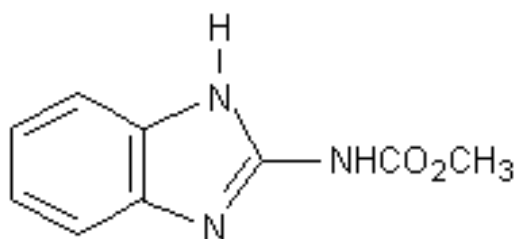
Οικολογικές επιπτώσεις

Το Dodine είναι ελαφρώς τοξικό για τα πουλιά, σύμφωνα με δοκιμές που έγιναν σε πρασινοκέφαλες πάπιες (LD50 είναι στα 1142 mg/kg). Στους υδρόβιους οργανισμούς το Dodine είναι ιδιαίτερα τοξικό στα ψάρια (σε 48 ώρες το LC50 είναι 0.53 mg/L). Στις μέλισσες το LD50 είναι μεγαλύτερο από 11 mg/bee σε τοπική εφαρμογή και χαρακτηρίζεται μη τοξικό (EXTOXNET_c 1993, Kidd *et al.* 1991).

Τύχη στο περιβάλλον

Για το Dodine, αν και είναι διαλυτό στο νερό, υπάρχουν ελάχιστες αναφορές για το χρόνο ημιζωής του και τις τυχόν συγκεντρώσεις του. Ο εδαφολογικός τύπος επηρεάζει το χρόνο ημιζωής του και, συνήθως, κυμαίνεται στις δεκαοχτώ ημέρες. Στο πηλώδες χώμα η ημιζωή του είναι περίπου έξι ημέρες. Στο νερό με pH 3.0, 6.0 ή 9.0, σχεδόν 95% της ένωσης παραμένει μετά από 28 εβδομάδες. Η ένωση είναι πολύ σταθερή στο νερό (EXTOXNET_c 1993, EPA_b 1990).

3.3.2. Carbendazim



Φυσικοχημικές ιδιότητες

Κοινή ονομασία:	Carbendazim.
Χημική ονομασία :	methyl benzimidazol-2-ylcarbamate (IUPAC).
Χημική κατηγορία:	βενζιμιδαζολικό.
Μοριακός τύπος:	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ .
Μοριακό βάρος:	191.2.
Φυσική μορφή:	κρυσταλλική σκόνη.
Σημείο τήξης:	307-312 °C.
Τάση ατμών:	<100 Pa στους 20 °C.
Διαλυτότητα:	στο νερό 8 mg/L στους 20 °C (EXTOXNET _d 1993).

Τρόπος δράσης

Το Carbendazim είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο, προϊόν αποδομής του Benomyl. Παρεμποδίζει την παραγωγή σπορίων των μυκήτων, δρα στο σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου, με αποτέλεσμα να μη γίνεται σωστά ο αποχωρισμός των θυγατρικών χρωματοσωμάτων. Έχει μεγάλη διάρκεια ζωής μέσα στους φυτικούς ιστούς και μικρή έως μέτρια τοξικότητα για τα ανώτερα φυτά και ζώα. Εμφανίζει εύκολη ανάπτυξη ανθεκτικότητας με μεταλλαγές και γενετική δραστικότητα (πρόκληση μεταλλαγών) σε ανώτερα φυτά και ζώα (EXTOXNET_d 1993, Pease *et al.* 1971, Clemons *et al.* 1971).

Χρήσεις

Χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες των μηλοειδών (φουζικλάδιο, ωίδιο), των πυρηνόκαρπων (φαιά σήψη, μετασυλλεκτικές σήψεις), του αμπελιού (τεφρά σήψη, ωίδιο), των ζαχαρότευτλων (κερκοσπορίωση), των κολοκυνθοειδών (ωίδιο), των κηπευτικών (κλαδοσπορίωση, σκληρωτίαση) και των καλλωπιστικών (ωίδιο).

Στη χώρα μας, το Carbendazim χρησιμοποιείται ως δραστική ουσία σε πέντε σκευάσματα με τις ονομασίες Bavistin, Derosal, Carben, Kapezim και Kerdazin (Δημόπουλος 1998, EXTOXNET_d 1993).

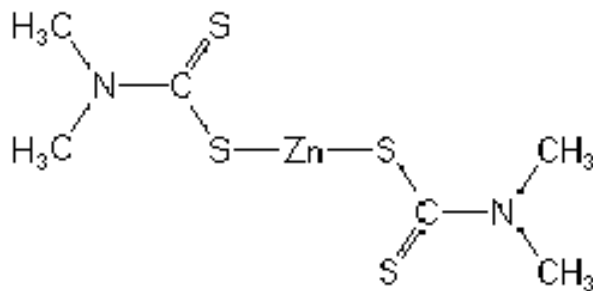
Οικολογικές επιπτώσεις

Το Carbendazim παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς. Τα εργαστηριακά τεστ, όσον αφορά το LD50 έδωσαν για την ιριδίζουσα πέστροφα 0.36 mg/litre, 0.098 mg/litre για τις γαρίδες και 0.087 mg/litre για τα υδρόβια ασπόνδυλα. Το Carbendazim προσροφάται έντονα στο ίζημα και στο έδαφος. Έρευνες σε γαιοσκώληκες έδειξαν ότι επηρεάζεται αρνητικά ο πληθυσμός και τα αναπαραγωγικά αποτελέσματα στα συνιστώμενα ποσοστά εφαρμογής του φυτοφαρμάκου. Το Carbendazim έχει χαμηλή οξεία τοξικότητα για τα πουλιά. Το LD50 για τα ορτύκια είναι 5828 - 15595 mg/litre και δεν είναι τοξικό στις μέλισσες (EXTOXNET_d 1993, Moser *et al.* 2002).

Τύχη στο περιβάλλον

Το Carbendazim έχει χρόνο ημιζωής 6-12 μήνες στο χώμα και 3-6 μήνες στην τύρφη και αποσυντίθεται κυρίως από τους μικροοργανισμούς. Δεν υπάρχουν αναφορές για την τύχη στο νερό τόσο του Carbendazim όσο και του Benomyl (EXTOXNET_d 1993, Clemons *et al.* 1971).

3.3.3. Ziram



Φυσικοχημικές ιδιότητες

Κοινή ονομασία:	Ziram.
Χημική ονομασία :	zinc bis(dimethyldithiocarbamate) (IUPAC).
Χημική κατηγορία:	διθειοκαρβαμιδικό.
Μοριακός τύπος:	C ₆ H ₁₂ N ₂ S ₄ Zn.
Μοριακό βάρος:	305.83.
Φυσική μορφή:	λευκό, κρυσταλλικό στερεό.
Σημείο τήξης:	240-250 °C.
Τάση ατμών:	εξατμίζεται σε θερμοκρασία δωματίου.
Διαλυτότητα:	στο νερό 65 mg/L στους 20 °C (EXTOXNET _e 1993, EPA _c 2004).

Τρόπος δράσης

Το Ziram είναι παράγωγο του διθειοκαρβαμιδικού οξέος, δεν είναι φυτοτοξικό και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση πολλών μυκήτων, εκτός του ωιδίου. Ο μηχανισμός δράσης του δεν είναι απόλυτα γνωστός αλλά φαίνεται ότι αφαιρεί μέταλλα ή σχηματίζει σύμπλοκα με τα ένζυμα, παρεμποδίζοντας τη βιολογική τους δράση. Κατά την αποδόμησή του στη φύση, την παραγωγή στη βιομηχανία και τη διαδικασία παρασκευής των φαγητών, σχηματίζεται η αιθυλενοθειουρία, η οποία έχει τερατογόνες και καρκινογόνες ιδιότητες (προκαλεί καρκίνο του θυρεοειδούς και του ήπατος). Παρ' ότι συσσωρεύεται στο θυρεοειδή των ζώων, δεν συσσωρεύεται στα φυτά και το έδαφος (EXTOXNET_e 1993, EPA_c 2004).

Χρήσεις

Χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες των πυρηνόκαρπων (εξώασκος, φαιά σήψη, κορόνιο), των μηλοειδών (φουζικλάδιο), των κηπευτικών (αλτερναρίωση, ανθράκωση, σκωρίαση) και των καλλωπιστικών (σκωρίαση, μελανή κηλίδωση). Στη βιομηχανία, το Ziram χρησιμοποιείται στην παραγωγή χαρτιού, κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων (υφαντικές ίνες και σκοινί), σε κόλλες και εξωτερικά χρώματα.

Στη χώρα μας, το Ziram στη γεωργία, χρησιμοποιείται ως δραστική ουσία σε πέντε σκευάσματα με τις ονομασίες Pomarsol, Ziramvis, Crittam, Carbazinc και Mezene (Δημόπουλος 1998, EXTOXNET_e 1993, EPA_c 2004).

Οικολογικές επιπτώσεις

Η τοξικότητα του Ziram στα πτηνά ποικίλει από μη τοξικό ως τοξικό. Το LD₅₀ για τους κότσυφες και τις κοκκινότσιγλες είναι 100 mg/kg, στα ορτύκια είναι 3346 ppm και στα κοτόπουλα 56 mg/kg. Σε διάστημα πέντε ωρών το LC₅₀ για το Ziram στα χρυσόψαρα ήταν μεταξύ 5 και 10 mg/L. Με βάση τη χαμηλή διαλυτότητά του στο νερό, το Ziram πρέπει να έχει μια χαμηλή δυνατότητα βιοσυγκέντρωσης στους υδρόβιους οργανισμούς (Smith 1993, Kidd *et al.* 1991).

Τύχη στο περιβάλλον

Ο χρόνος ημιζωής του Ziram στο έδαφος είναι 30 ημέρες. Επειδή η ένωση είναι τοξική στα βακτηρίδια, η βιοδιάσπαση στο έδαφος και στο ίζημα μπορεί να είναι αργή ή να εμφανίζεται μόνο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η τύχη του Ziram στο περιβάλλον, μετά την εφαρμογή του, θα βρισκόταν πρώτα στην ατμόσφαιρα ως αερόλυμα ή σκόνη και τελευταία στο χώμα, μέσω της υγρής ή και ξηράς πτώσης. Στον αέρα και στο χώμα, η ένωση εύκολα διασπάται από το υπεριώδες φως. Υπάρχουν ελάχιστες αναφορές για την τύχη της ένωσης στα φυσικά νερά (EXTOXNET_e 1993, Howard 1989).

3.3.4. Copper Hydroxide



Φυσικοχημικές ιδιότητες

Κοινή ονομασία:	Copper Hydroxide.
Χημική ονομασία :	copper(II) hydroxide (IUPAC).
Χημική κατηγορία:	χαλκούχο.
Μοριακός τύπος:	CuH_2O_2 .
Μοριακό βάρος:	81,56 (77% χαλκός).
Φυσική μορφή:	μπλε σκόνη (EPA _d 2006).

Τρόπος δράσης

Η πρώτη καταγραφή για τη χρήση του χαλκού ως μυκητοκτόνου ήταν στα μέσα του 1700. Το 1880, ο γάλλος επιστήμονας Pierre Marie Alexis Millardet ανακάλυψε τις μυκητοκτόνες ιδιότητες ευρέως φάσματος του χαλκού από τη χρήση βορδιγάλειου πολτού, που προκύπτει από την αντίδραση του θειϊκού χαλκού με το υδροξείδιο του ασβεστίου σε νερό. Η πρώτη εγγραφή του χαλκού ως φυτοφαρμάκου εκδόθηκε το 1956. Εκτός από τον βορδιγάλειο πολτό, χρησιμοποιούνται και άλλες χαλκούχες ενώσεις, οι λεγόμενες fixed coppers, τόσο στην γεωργία όσο και στη βιομηχανία τροφίμων.

Το Copper Hydroxide είναι το υδροξείδιο του χαλκού. Ο μηχανισμός δράσης των δισθενών ιόντων χαλκού $[\text{Cu}^{++}]$ δεν είναι απόλυτα γνωστός. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών, αντιδρώντας με σουλφυδρυλικές και άλλες ομάδες ή μεταβάλλει την περατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Χρησιμοποιείται επίσης και ως βακτηριοκτόνο (EPA_d 2006).

Χρήσεις

Χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες των μηλοειδών (φουζικλάδιο, φαιά σήψη, σепτορίωση, βακτηριώσεις), των πυρηνόκαρπων (κορύνεο, εξώασκος, κλαδοσπορίωση, φαιά σήψη), της καρδιάς (ανθράκωση), της αμυγδαλιάς (κορύνεο), της ελιάς (κυκλοκόνιο, γλοιοσπόριο, βακτηριώσεις), των εσπεριδοειδών (κορυφοξήρα, φυτοφθίρες, ανθράκωση, βακτηριώσεις), του αμπελιού (περονόσπορος, ανθράκωση, βακτηριακή

νέκρωση), των κολοκυνθοειδών (περονόσπορος, ανθράκωση, βακτηριώσεις, κλαδοσπορίωση) και των κηπευτικών (περονόσπορος, ανθράκωση, σепτορίωση, βακτηριώσεις).

Επίσης, ο χαλκός και τα παράγωγά του, χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των αλγών, των υδρόβιων ζιζανίων, των μακρο-ασπόνδυλων και των βρύων, σε εγκαταστάσεις υδατοκαλλιεργειών, σε συστήματα αποξηράνσεων (κανάλια, τάφρους και πλευρικές επεκτάσεις), σε λίμνες, πηγές, δεξαμενές (άρδευση, πόσιμες), λιμνοθάλασσες λυμάτων, κανάλια άρδευσης και συστήματα υπονόμων. Στη βιομηχανία, χρησιμοποιείται σε πολλά προϊόντα συμπεριλαμβανομένου του χρώματος, της κόλλας, των οικοδομικών και των δομικών υλικών καθώς και στη συντήρηση της ξυλείας και στην κατεργασία του ύδατος.

Στη χώρα μας, το Copper Hydroxide στη γεωργία, χρησιμοποιείται ως δραστική ουσία σε πέντε σκευάσματα με τις ονομασίες Kocide, Cupravit, Funguran και Champ (EPA_d 2006, Δημόπουλος 1998).

Οικολογικές επιπτώσεις

Το θειϊκό άλας του χαλκού είναι σχεδόν μη τοξικό στα πουλιά. Η χαμηλότερη θανατηφόρα δόση (LDLo) είναι 1000 mg/kg στα περιστέρια και 600 mg/kg στις πάπιες. Το LD50 για το βορδιγάλειο πολτό στους νεοσσούς των πρασινοκέφαλων παπιών είναι 2000 mg/kg.

Ο χαλκός είναι ιδιαίτερα τοξικός, ακόμη και στα συνιστώμενα ποσοστά εφαρμογής, στην πέστροφα και σε άλλα ψάρια, ειδικά στα μαλακά ή όξινα νερά. Η τοξικότητά του στα ψάρια μειώνεται γενικά καθώς η σκληρότητα του νερού αυξάνεται. Τα αυγά των ψαριών είναι ανθεκτικότερα από τα νεογνά ψάρια. Ο χαλκός είναι τοξικός στα υδρόβια ασπόνδυλα, όπως το καβούρι, οι γαρίδες, και τα στρείδια. Σε 96 ώρες το LC50 για το θειϊκό άλας του χαλκού στα σαλιγκάρια λιμνών είναι 0.39 mg/L.

Ο χαλκός είναι δηλητηριώδης στα πρόβατα και τα κοτόπουλα στα κανονικά ποσοστά εφαρμογής. Ο βορδιγάλειος πολτός είναι ιδιαίτερα τοξικός στις μέλισσες (EPA_d 2006, Tucker *et al.* 1970, Pimentel 1971).

Τύχη στο περιβάλλον

Ο χαλκός είναι συνδεδεμένος ή προσροφημένος στα οργανικά υλικά, στον άργιλο και στις ορυκτές επιφάνειες. Ο βαθμός προσρόφησής του στα χόματα εξαρτάται από την

οξύτητα ή την αλκαλικότητα του χώματος. Επειδή το θειϊκό άλας του χαλκού είναι ιδιαίτερα υδροδιαλυτό, θεωρείται ένα από τα πιο κινητά μέταλλα στα χώματα. Το 60% του χαλκού εναποτίθεται στα ιζήματα (EPA_d 2006).

Κοινή Ονομασία	Επιστημονική Ονομασία
<i>Αλτερναρίωση</i>	<i>Alternaria spp.</i>
<i>Άνθρακες</i>	<i>Ustilago spp.</i>
<i>Ανθράκωση</i>	<i>Colletotrichum spp., Elsinoe ampelina, Marssonina juglandis</i>
<i>Βακτηριώσεις</i>	<i>Pseudomonas spp., Erwinia spp., Xantomonas spp., Agrobacterium spp., Corynebacterium spp., Streptomyces spp.</i>
<i>Γλοιοσπόριο</i>	<i>Gleosporium olivarum.</i>
<i>Εξώασκος</i>	<i>Taphrina spp.</i>
<i>Κερκοσπορίωση</i>	<i>Cercospora beticola.</i>
<i>Κλαδοσπορίωση</i>	<i>Cladosporium spp.</i>
<i>Κορόνιο</i>	<i>Stigmia carpophila.</i>
<i>Κορυφοξήρα</i>	<i>Phoma tracheiphilla.</i>
<i>Κυκλοκόνιο</i>	<i>Spilocaea olegina.</i>
<i>Μαύρη κηλίδωση</i>	<i>Diplocarpon sosae.</i>
<i>Μετασυλλεκτικές σήψεις</i>	<i>Botrytis cinerea, Rhizopus spp., Penicillium spp.</i>
<i>Περονόσπορος</i>	<i>Peronospora spp., Pseudoperonospora spp., Plasmopara viticola, Bremia spp., Sclerospora spp., Phytophthora infestans.</i>
<i>Σεπτορίωση</i>	<i>Septoria spp.</i>
<i>Σκληρωτίαση</i>	<i>Sclerotium spp.</i>
<i>Σκωρίαση</i>	<i>Puccinia spp., Uromyces spp.</i>
<i>Τεφρά σήψη</i>	<i>Botrytis cinera.</i>
<i>Φαιά σήψη</i>	<i>Monilinia spp.</i>
<i>Φουζικλάδιο</i>	<i>Venturia spp.</i>
<i>Φυτόφθορα</i>	<i>Phytophthora spp.</i>
<i>Ωίδια</i>	<i>Uncinula necator, Erisiphae spp., Sphaerotheca spp., Podosphaera spp., Microcosphaera spp., Phyllactinia spp.</i>

Πίνακας Α.3. Κοινά και επιστημονικά ονόματα των πιο συνηθισμένων φυτοπαθογόνων που καταπολεμούν τα επιλεγμένα μυκητοκτόνα (Δημόπουλος 1998).

Κεφάλαιο 4

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ – ΓΕΝΙΚΕΣ

ΕΝΩΣΕΙΣ

4.1. Αντιβιοτικά

Ένας από τους μεγαλύτερους θριάμβους της ιατρικής κατά τον εικοστό αιώνα είναι η αποτελεσματική εκρίζωση πολλών λοιμωδών νοσημάτων με τη χρήση των αντιμικροβιακών χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων. Τα αντιβιοτικά είναι φυσικά παράγωγα μικροοργανισμών που παράγονται κυρίως από μύκητες αλλά και βακτήρια και έχουν την ιδιότητα να επιβραδύνουν ή να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών.

Το πρώτο αντιβιοτικό που απομονώθηκε ήταν η πενικιλίνη, που παράγεται από το *Penicillium notatum* και εμποδίζει τη σύνθεση του βακτηριακού τοιχώματος. Ο Α. Φλέμινγκ ανακάλυψε τυχαία τις αντιβακτηριακές της ιδιότητες το 1928, αν και ανακοινώθηκε το 1940 από τον Florey και τους συνεργάτες του στην Οξφόρδη.

Μέχρι το 1960 ανακαλύφθηκαν πολλά φυσικά αντιβιοτικά με διαφορετική χημική δομή. Έκτοτε, μόνο λίγα νέα αντιβιοτικά ανακαλύφθηκαν. Σήμερα, ο όρος αντιβιοτικά έχει αντικατασταθεί από τον περιεκτικότερο όρο αντιμικροβιακά φάρμακα, γιατί εκτός από τα φυσικά περιλαμβάνει και τα ημισυνθετικά (με τροποποίηση χημικής δομής) ή

συνθετικά (χημειοθεραπευτικά) παράγωγα, που δρουν εναντίον των μικροβίων. Από συνήθεια χρησιμοποιείται ο όρος αντιβιοτικά για όλες τις αντιμικροβιακές ουσίες.

Η χρήση των αντιβιοτικών προκάλεσε επανάσταση στη σύγχρονη ιατρική. Δημιούργησε την εντύπωση ότι πρόκειται για θαυματουργά φάρμακα. Η πάροδος του χρόνου όμως, εκτός από τις δυνατότητες και τις ωφέλειες, έδειξε και τους περιορισμούς της αντιμικροβιακής θεραπείας.

Τα μικρόβια επέδειξαν μια πραγματικά καταπληκτική ικανότητα να αποφεύγουν, να αντιμετωπίζουν ή να εξουδετερώνουν την έφοδο των αντιβιοτικών. Μια υπερβολική και σε πολλές περιπτώσεις ακατάλληλη χρήση στην ανθρώπινη ιατρική, την κτηνιατρική και τη γεωργία, οδήγησε στην εμφάνιση άλλων μικροβίων και στην ταχεία εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών στα αντιβιοτικά.

Θα έλεγε κανείς ότι η μάχη του ανθρώπου με τις βακτηριακές μολύνσεις θα είχε κερδηθεί χάρη στα δυνατά του όπλα, τα αντιβιοτικά.

Τα ανθεκτικά σε αντιβιοτικά βακτήρια εισέρχονται στο περιβάλλον μέσω των περιττωμάτων των ζώων ή μέσω της ανθρώπινης απέκκρισης. Επίσης, ανθεκτικά βακτήρια βρίσκονται στην εντερική χλωρίδα και τα περιττώματα υγιών ανθρώπων, όπου όλο και περισσότερο λειτουργούν ως δεξαμενές βακτηρίων με πολλαπλή αντοχή (Λεγάκης και συν.1990, europa.eu.ntt).

ΟΜΑΔΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ	ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΑ ΕΙΔΗ
Β-λακτάμες	
Πενικιλίνες	Penicillin G, ampicillin, amoxicillin.
Πενικιλινασοάντοχες πενικιλίνες	Methicillin, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, nafcillin.
Ευρέως φάσματος Πενικιλίνες	Carbenicillin, piperacillin, mezlocillin, ticarcillin.
Κεφαλοσπορίνες	
1 ^{ης} γενεάς	Cefalothin, cefaloridin, cefazolin.
2 ^{ης} γενεάς	Cefoxitin, cefoteta, cefuroxime, cefaclor.
3 ^{ης} γενεάς	Cefotaxime, ceftazidime, ceftizoxime, ceftriaxone.
Μονομπακτάμες	Aztreonam.
Καρμπαπενέμη	Imipenem.
Αμινογλυκοσιδάσες	Gentamicin, tobramycin, netilmicin, kanamycin, amikacin, streptomycin.
Μακρολίδες	Erythromycin, lincomycin, clindamycin.
Γλυκοπεπτίδια	Vancomycin, teicoplanin.
Ανασταλτές β-λακταμασών	Clavulanic acid, sulbactam (σε συνδυασμό με β-λακτάμες).
Κινολόνες	Ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin.

Πίνακας Α.4. Αντιβιοτικά κατά ομάδες βασικών χαρακτήρων της χημικής δομής τους (Αρσένη_b 1994).

4.1.1. Γενικές ιδιότητες των Αντιβιοτικών

- *Εκλεκτική τοξικότητα.* Βασική ιδιότητα των αντιβιοτικών είναι η εκλεκτική τους δράση επί των μικροβίων, χωρίς να επηρεάζουν τη λειτουργία των κυττάρων του μεγαλο-οργανισμού. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο βιολογικός στόχος δράσης των αντιβιοτικών λείπει από τα κύτταρα του μεγαλο-οργανισμού.
- *Φάσμα δράσης.* Τα αντιβιοτικά αναστέλλουν την ανάπτυξη ή καταστρέφουν διάφορα παθογόνα μικρόβια, κυρίως βακτήρια, και λιγότερο ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, όπως μύκητες, πρωτόζωα και έλμινθες.
- Ευρέως φάσματος αντιβιοτικά: (τετρακυκλίνες, χλωραμφαινικόλη, ημισυνθετικές πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, σουλφοναμίδες, αμινογλυκοσίδες) δρουν σε Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια κ.α.
- Στενού αντιμικροβιακού φάσματος αντιβιοτικά: δρουν σε περιορισμένο είδος μικροβίων.
- *Τρόπος δράσης.* Τα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να προκαλούν θάνατο στα μικρόβια ή απλώς να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό τους.
- Μικροβιοκτόνα: τα αντιβιοτικά που προκαλούν γρήγορα το θάνατο των μικροβίων. Διαχωρίζονται σε βακτηριοκτόνα ή μυκητοκτόνα, ανάλογα με τα είδη των μικροοργανισμών ενάντια στα οποία δρουν.
- Μικροβιοστατικά: τα αντιβιοτικά που προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης των μικροβίων. Ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού κατά του οποίου δρουν, διακρίνονται σε βακτηριοστατικά ή μυκητοστατικά. (Λεγάκης και συν.1990, europa.eu.ntt).

4.1.2. Μηχανισμοί δράσης των Αντιβιοτικών

Σε κυτταρικό επίπεδο τα περισσότερα αντιβιοτικά δρουν με έναν ή περισσότερους από τους ακόλουθους μηχανισμούς:

- Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (π.χ. β-λακταμικά).
- Μεταβολή της διαπερατότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (π.χ. πολυμυξίνες).

- Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (π.χ. χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη).
- Αναστολή της συνθέσεως των νουκλεϊκών οξέων (π.χ. σουλφαναμίδες) (Λεγάκης και συν.1990).

4.2. Αντοχή - αιτίες αντοχής των μικροβίων στα Αντιβιοτικά

Με τον όρο αντοχή εννοείται η ικανότητα του βακτηρίου να εξουδετερώνει με ποικίλους μηχανισμούς τη δράση του αντιβιοτικού εναντίον του. Αυτό επιτυγχάνεται με διάφορες γενετικές μεταβολές του βακτηρίου που συνήθως μεταβιβάζονται και στις επόμενες γενιές του, οι οποίες θα είναι πλήρως ανθεκτικές. Πολλές φορές η αντοχή επεκτείνεται και σε άλλα αντιβιοτικά που διαθέτουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης.

Τελευταία, η συχνότητα των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά περιβαλλοντικών βακτηριακών στελεχών αυξήθηκε πολύ. Το υδάτινο περιβάλλον αποτελεί δεξαμενή που περιέχει βακτήρια, τα οποία εμφανίζουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Οι κυριότερες αιτίες στις οποίες αποδίδεται η αυξημένη αντοχή στα αντιβιοτικά των διάφορων βακτηρίων, που απομονώνονται από το υδάτινο περιβάλλον, οφείλονται:

- Στην αυξημένη απόρριψη αποβλήτων, ο όγκος των οποίων καθημερινά αυξάνει.
- Στη μεγαλύτερη επιβίωση μερικών στελεχών στα υδάτινα οικοσυστήματα, η οποία φαίνεται να έχει σχέση, σε μερικές περιπτώσεις, με την αντοχή σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως π.χ. φως και μέταλλα.
- Στη διαδικασία μεταφοράς αντοχής, στην οποία συμμετέχει η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών (Λεγάκης και συν.1990).

4.2.1. Μηχανισμοί ανάπτυξης και διασποράς της αντοχής

- Μη Γενετική προέλευση: Για να δράσουν τα αντιμικροβιακά φάρμακα είναι απαραίτητος ο πολλαπλασιασμός των μικροβίων. Μικροοργανισμοί οι οποίοι είναι μεταβολικά αδρανείς και δεν πολλαπλασιάζονται είναι φαινομενικά ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά ενώ οι απόγονοί τους είναι ευαίσθητοι.
- Γενετική προέλευση: Η αντοχή των μικροβίων στα αντιβιοτικά επέρχεται κατόπιν μεταβολής (μεταλλαγής) του DNA του κυττάρου. Η μεταβολή του γενετικού υλικού μπορεί να γίνει με:
 - *Αλλαγή της δομής του χρωμοσωματικού DNA.*
 - *Μεταλλαγή DNA:* Η μεταλλαγή αφορά το χρωμοσωματικό DNA. Τροποποιείται το γενετικό υλικό, ώστε ο μικροοργανισμός να καθίσταται ανθεκτικός στη δράση των αντιβιοτικών. Οι μεταλλαγές που οδηγούν σε ανθεκτικά στελέχη επιτελούνται

κάτω από την επίδραση μεταλλαξιογόνων παραγόντων από το περιβάλλον και είναι τυχαία γεγονότα.

- *Απόκτηση του εξωχρωμοσωματικού DNA (αποτέλεσμα ανταλλαγής γενετικού υλικού).*
- *Μεταβίβαση DNA:* Η αντοχή ενός μικροοργανισμού σ' ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να μεταβιβαστεί σε άλλους μικροοργανισμούς που είναι αρχικά ευαίσθητοι, με αποτέλεσμα να καθίστανται ανθεκτικοί. Τρεις μηχανισμοί μεταβίβασης DNA έχουν πιστοποιηθεί:
 - *Σύζευξη:* γίνεται με τα πλασμίδια και αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό μεταβίβασης αντοχής στα κλινικά στελέχη. Η μεταβίβαση γενετικού υλικού με τη σύζευξη γίνεται με: πλασμίδια, πλασμίδια αντοχής (Resistance factors, Rf), μεταθετά στοιχεία (transposons).
 - *Μεταγωγή:* μεταβίβαση γενετικού υλικού από ένα μικροβιακό καλλιέργημα σε άλλο με βακτηριοφάγους.
 - *Μεταμόρφωση:* είναι η μεταφορά εξωγενούς χρωμοσωματικού DNA από ένα κύτταρο στο άλλο. Η ενσωμάτωση του DNA στο κύτταρο - δέκτη γίνεται μόνο όταν προέρχεται από συγγενή μικροοργανισμό, καθ' όσον στην αντίθετη περίπτωση λειτουργούν μηχανισμοί αποκλεισμού (Παπαετροπούλου, και συν.1995, Λεγάκης και συν.1990).

4.2.2. Βιοχημικοί μηχανισμοί της αντοχής

Η αντοχή των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά, από βιοχημική άποψη, μπορεί να οφείλεται σε οποιονδήποτε από τους παρακάτω βασικούς μηχανισμούς:

- Αδρανοποίηση των αντιβιοτικών με παραγωγή ενζύμων που υδρολύουν, τροποποιούν ή παγιδεύουν τα αντιβιοτικά.
- Αλλαγή του βιολογικού στόχου δράσεως των αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά συγκεντρώνονται σε ενεργό μορφή στα σημεία δράσεώς τους αλλά λόγω αλλαγής διαμορφώσεως των τελευταίων, δεν μπορούν να δράσουν.
- Ελαττωμένη κυτταρική διαπερατότητα (Παπαετροπούλου, και συν.1995, Λεγάκης και συν.1990).

4.2.3. Συνέπειες βακτηριακής αντοχής

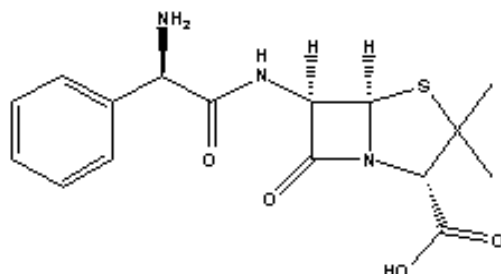
Αναμφισβήτητα, η σοβαρότερη συνέπεια της βακτηριακής αντοχής στα αντιβιοτικά είναι η εμφάνιση νέων βακτηριακών στελεχών που είναι ανθεκτικά σε περισσότερα από ένα αντιβιοτικά ταυτόχρονα.

Οι λοιμώξεις που οφείλονται σε τέτοιου είδους ανθεκτικά και, σε πολλαπλά φάρμακα, παθογόνα βακτήρια αποτελούν ιδιαίτερη πρόκληση, προκαλώντας αυξανόμενες κλινικές επιπλοκές και τον κίνδυνο σοβαρής λοίμωξης, που προηγουμένως θα μπορούσε να θεραπευτεί επιτυχώς και προκαλώντας μεγαλύτερης διάρκειας παραμονές στα νοσοκομεία καθώς και σημαντικά υψηλότερες δαπάνες για την κοινωνία.

Το χειρότερο σενάριο, το οποίο δυστυχώς δεν είναι απίθανο, είναι ότι αυτά τα επικίνδυνα παθογόνα μικρόβια μπορεί να αποκτήσουν ανθεκτικότητα σε όλα τα προηγουμένως αποτελεσματικά αντιβιοτικά, προκαλώντας κατ' αυτόν τον τρόπο ανεξέλεγκτες επιδημίες βακτηριακών ασθενειών που δεν μπορούν να θεραπευθούν (Παπαπετροπούλου, και συν.1995).

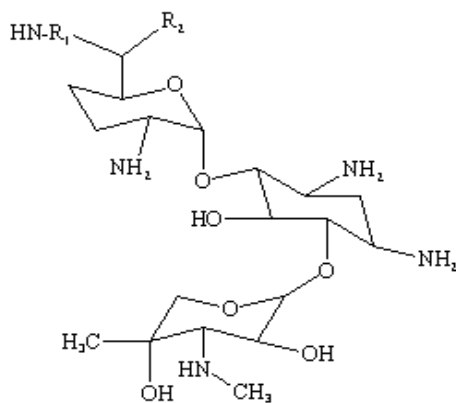
4.3. Ιδιότητες επιλεγθέντων Αντιβιοτικών

4.3.1. Αμπικικιλίνη (άλφα- αμινοβενζυλοπενικιλίνη)



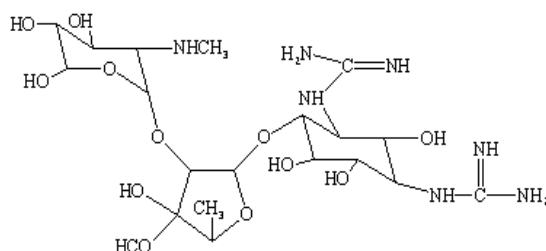
Η αμπικικιλίνη αναστέλλει το τελικό στάδιο σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Μια αμινική ομάδα και ένας μοναδικός δακτύλιος καθιστά αρκετά υδρόφιλες αυτές τις ουσίες, ώστε να διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Αρσένη_β 1994, Jawetz *et al.* 1985).

4.3.2. Γενταμικίνη



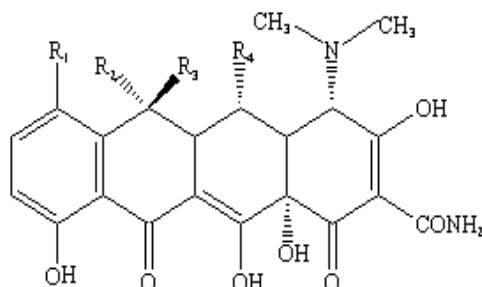
Η γενταμικίνη δεσμεύεται στην υπομονάδα 30S της μονάδας 70S του ριβοσώματος και εμποδίζει την έναρξη του συμπλόκου (Αρσένη_β 1994, Jawetz *et al.* 1985).

4.3.3. Στρεπτομυκίνη



Η στρεπτομυκίνη αναστέλλει τη πρωτεϊνοσύνθεση. Συνδέονται με την 30S ή την 50S ριβοσωμική υπομονάδα και καταστρέφουν την έναρξη του συμπλόκου mRNA – ριβοσώματος που είναι βασικό μέρος της σύνθεσης πρωτεϊνών (Αρσένη_b 1994, Jawetz *et al.* 1985).

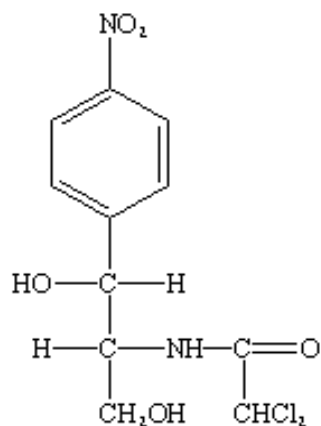
4.3.4. Τετρακυκλίνη



Η τετρακυκλίνη αναστέλλει την πρωτεϊνική σύνθεση, εμποδίζοντας τη δέσμευση αμινοακυλο-tRNA στη μονάδα 30S των βακτηριακών ριβοσωμάτων. Τα ανθεκτικά βακτήρια δε συγκεντρώνουν το φάρμακο. Είναι κυρίως βακτηριοστατική.

Η αντίσταση στην τετρακυκλίνη οφείλεται στον R παράγοντα που κωδικοποιεί πρωτεΐνες, οι οποίες μεταφέρουν το φάρμακο έξω από το κύτταρο (Αρσένη_b 1994, Jawetz *et al.* 1985).

4.3.5. Χλωραμφαινικόλη



Η χλωραμφαινικόλη είναι ισχυρός αναστολέας της πρωτεϊνικής συνθέσεως στους μικροοργανισμούς. Αποκλείει τη σύνδεση αμινοξέων στη σχηματιζόμενη αλυσίδα πεπτιδίων στη μονάδα 50S των ριβοσωμάτων, επηρεάζοντας τη δράση της πεπτιδικής τρανσφεράσης. Είναι κυρίως βακτηριοστατική.

Η αντίσταση στη χλωραμφαινικόλη οφείλεται σε καταστροφή του φαρμάκου από ένα ένζυμο (ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφαινικόλης) που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του πλασμιδίου (Arsène, 1994, Jawetz *et al.* 1985).

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1. Επιλογή των μικροοργανισμών

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- *Escherichia coli* NCTC 9001 (PHLS-North, England).
- *Enterococcus. faecalis* NCTC 775 (PHLS-North, England) και
- *Salmonella typhi* ATCC 19430 (9,12Vi:d:-) (Σχολή Δημόσιας Υγείας, Αθήνα).

Η σταθεροποίηση του βακτηριακού φορτίου του ενοφθαλμίσματος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Guan (Guan *et al.* 2005). Η σταθεροποίηση αυτή οδηγεί σε ένα βακτηριακό πληθυσμό των περίπου 10^7 colony forming units (cfu) mL⁻¹, το οποίο πιστοποιήθηκε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και plate counting σε Tryptone Soy Agar-LAB M (24h, 36 °C).

1.2. Επιλογή των Μυκητοκτόνων και των συγκεντρώσεων αυτών

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τα εξής τέσσερα μυκητοκτόνα:

- *Dodine* σε στερεά μορφή καθαρότητας 99,2% (Riedel de Haën).
- *Carbendazim* σε στερεά μορφή καθαρότητας 99,2% (Riedel de Haën).
- *Ziram* σε στερεά μορφή καθαρότητας 99,2% (Riedel de Haën).
- *Copper Hydroxide* σε στερεά μορφή 77% χαλκός (Aldrich).

Τα συγκεκριμένα μυκητοκτόνα χρησιμοποιήθηκαν ως αντιπροσωπευτικά των χημικών ομάδων στις οποίες ανήκουν και του πλήθους των συσκευασμάτων στα οποία χρησιμοποιούνται και χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

Οι συγκεντρώσεις των φυτοφαρμάκων στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο, σύμφωνα με τη νομοθεσία των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 0.1 µg/L (UPL) και 10×, 100× και 1000×, πολλαπλάσια του UPL, δηλαδή, διαλύματα των 0.1 µg/L, 1.0 µg/L, 10.0 µg/L και 100.0 µg/L.

Προετοιμάστηκαν stock διαλύματα των 100 µg/L των επιλεγμένων μυκητοκτόνων, με διάλυση αυτών, αρχικά σε μικρή ποσότητα μεθανόλης και κατόπιν σε αποστειρωμένο (αποστείρωση στα 15lb psi-121°C για 15 min) - απεσταγμένο νερό.

Τα stock διαλύματα φυλάσσονταν στο σκοτάδι ενώ νέα διαλύματα ετοιμάζονταν, όπου χρειάζονταν.

Τα διαλύματα, που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας, παρασκευάστηκαν ύστερα από διαδοχικές αραιώσεις των stock διαλυμάτων, σε αποστειρωμένο-απεσταγμένο νερό, έτσι ώστε να δώσουν τις τελικές επιθυμητές συγκεντρώσεις των 0.1, 1, 10 και 100 µg/L και κατόπιν τοποθετήθηκαν σε φιάλες.

1.3. Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα διαλύματα των μυκητοκτόνων

Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν φιάλες που η κάθε μία περιείχε 99 ml διαλύματος μυκητοκτόνου. Κάθε φιάλη εμβολιάστηκε με 1 ml σταθερής καλλιέργειας (όπως περιγράφηκε προηγουμένως) που αποτελούνταν από 10^7 cfu mL⁻¹ βακτήρια.

Για λόγους επαναληψιμότητας χρησιμοποιήθηκαν τρεις φιάλες για κάθε συγκέντρωση, 0.1 µg/L, 1 µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L μυκητοκτόνου και τρεις χωρίς μυκητοκτόνο (control). Το μυκητοκτόνο τοποθετήθηκε στις φιάλες μετά την αποστείρωση.

Οι φιάλες αναμείχθηκαν ζωηρά και επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-22°C). Η ανάπτυξη των βακτηρίων προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας OD στα 600 nm (JenWay 6405 UV/Vis. Spectrophotometer).

Αμέσως μετά τον ενοφθαλμισμό των μικροοργανισμών (ώρα 0) και, κατόπιν, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, μελετήθηκε η βραχυπρόθεσμη (0-96 h) και η μακροπρόθεσμη ανάπτυξη (0-30 d) των *E. coli*, *E. faecalis* και *S. typhi*, παρουσία των διαφόρων συγκεντρώσεων των επιλεγμένων μυκητοκτόνων.

1.4. Στατιστική επεξεργασία

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των επιλεγμένων μυκητοκτόνων στους μικροοργανισμούς, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων τιμών OD για κάθε χρονική στιγμή και για κάθε συγκέντρωση με τις αντίστοιχες μέσες τιμές OD του control. Το στατιστικό πακέτο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SPSS. Το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε στο $P \leq 0.05$.

1.5. Επιλογή θρεπτικών υποστρωμάτων για το μορφολογικό χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών

Για την παρατήρηση της μορφολογίας των αποικιών των βακτηρίων του control αλλά και των βακτηρίων των διαλυμάτων των μυκητοκτόνων, χρησιμοποιήθηκαν υλικά και τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια που πραγματοποιούν μικροβιολογικές εξετάσεις ρουτίνας σε δείγματα νερού.

Μετά από κάθε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας, λαμβάνονταν δείγματα από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων, τα οποία φιλτράρονταν είτε αμέσως είτε κατόπιν αραιώσεων (εφόσον ήταν αναγκαίο), σύμφωνα με τη μέθοδο της διήθησης διά μεμβράνης. Κατόπιν, οι διηθητικές μεμβράνες τοποθετούνταν σε διαφορετικά εκλεκτικά υλικά και επωάζονταν στους 37°C (*E. coli* και *S. typhi*) και στους 44 °C (*E. faecalis*) για 24-48 h (Council of the European Communities 1992, ISO/DIS 9308-1, ISO/DIS 7899-2). Έτσι, οι παραγόμενες αποικίες συγκρίνονταν με αυτές του control, ως προς τη μακροσκοπική εμφάνιση, συμπεριλαμβανομένου του σχήματος, του χρώματος και της υφής (Koneman *et al.* 1979).

Τα εκλεκτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την *E. coli* ήταν:

- Tergitol 7 Agar – Difco.
- mFC Agar – Difco.
- m Endo Agar Les –Difco.
- Mac Conkey Agar MUG –BBL.
- Chromocult –MERCK.

Τα εκλεκτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον *E. faecalis* ήταν:

- Slanetz and Bartley –MERCK.
- KF Streptococcus –OXOID.

Τα εκλεκτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη *S. typhi* ήταν:

- Bismuth Sulfite Agar –Difco.
- Triple Sugar Iron Agar -LAB M.
- Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar -LAB M.
- Gelose SS Salmonella Shigella Agar-LAB M.

1.6. Βιοχημικός χαρακτηρισμός των μικροοργανισμών

Ο βιοχημικός χαρακτηρισμός των μικροοργανισμών και ο προσδιορισμός των βιοχημικών αλλαγών, μεταξύ των βακτηρίων του control και των εξεταζόμενων μικροοργανισμών, έγιναν με το προτυποποιημένο σύστημα ταυτοποίησης API - BioMérieux (με το Api 20E για την *E. coli* και *S. typhi*, με το Api20 Strep για τον *E. faecalis*) (Council of the European Communities 1992, ISO/DIS 9308-1, ISO/DIS 7899-2, Koneman *et al.* 1979).

Όλες οι ταινίες API αποτελούνταν από 20 μικροσωλήνες που περιείχαν αφυδατωμένα υποστρώματα (βιοχημικές εξετάσεις σε μικρογραφία). Αυτές οι εξετάσεις ενοφθαλμίζονταν με βακτηριακό εναιώρημα που προκαλεί ανασύσταση των υλικών. Κατά τη διάρκεια της επώασης, ο μεταβολισμός προκάλεσε χρωματικές μεταβολές που είτε ήταν αυτόματες είτε αποκαλύπτονταν με την προσθήκη των αντιδραστηρίων. Το τεστ οξειδάσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ταινιών (BBL).



Εικόνα Β.1. api 20 E πριν την επώαση.



Εικόνα Β.2. api 20 Strep πριν την επώαση.

Οι αντιδράσεις των API και των τεστ οξειδάσης διαβάστηκαν σύμφωνα με τον πίνακα ανάγνωσης του κατασκευαστή και η ταυτοποίηση έγινε με αναφορά στον αναλυτικό κατάλογο προφίλ ή με χρησιμοποίηση του λογισμικού ταυτοποίησης APILAB PLUS (version 3.3.2).

1.7. Ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα Αντιβιοτικά

Η μελέτη της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών, που απομονώνονταν από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων και από τα controls, στα αντιβιοτικά, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Kirby-Bauer. Η μελέτη διήρκεσε συνολικά 30 ημέρες ενώ δείγματα λαμβάνονταν ανά 5 ημέρες.

Επιλέχθηκαν πέντε (5) αντιβιοτικά τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως:

- Αμπικιλίνη (AMP 10μg)-OXOID.
- Γενταμυκίνη (CN 10μg)-OXOID.
- Στρεπτομυκίνη (S10μg)-OXOID.
- Τετρακυκλίνη (TE30μg)-OXOID.
- Χλωραμφαινικόλη (C30μg)-OXOID.

Από καθαρό καλλιέργημα των μικροοργανισμών επιλέγονταν, με κρίκο, αποικίες και εναιωρούνταν σε 4-5 ml Tryptone Soy Broth-LAB M η *E.coli* και ο *E. faecalis* και σε 4-5 ml Selenite Broth-Difco η *S. typhi* για την ανάπτυξή τους. Το εναιώρημα επωάζονταν στους 35 °C για μερικές ώρες, ώστε να αρχίσει ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών και να θολώσει το διάλυμα (0.5 της κλίμακας Mc Farland).

Κατόπιν, πραγματοποιούνταν σπορά σε Muller Hinton agar, με τη βοήθεια βαμβακοφόρου στυλεού. Μετά από 3-5 λεπτά, γίνονταν η τοποθέτηση των, εμποτισμένων σε αντιβιοτικά, δισκίων πάνω στο Muller Hinton agar και ακολουθούσε η επώαση των τρυβλίων για 18-24 ώρες στους 35 °C.

Η ανάγνωση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της μέτρησης της διαμέτρου των ζωνών αναστολής, γύρω από κάθε δισκίο. Από την έκταση της ζώνης γίνονταν ο χαρακτηρισμός του μικροοργανισμού ως ευαίσθητου, ενδιάμεσου ή ανθεκτικού, σύμφωνα με τον Πίνακα Β.1. (National Committee for Clinical and Laboratory Standard).

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ		Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm		
		Ανθεκτικό	Ενδιάμεσο	Ευαίσθητο
<i>Αμπικιλίνη 10μg</i>	Εντ/ειδή	≤13	14-16	≥17
	Εντερόκοκκοι	≤16		≥17
<i>Γενταμυκίνη 10μg</i>		≤12	13-14	≥15
<i>Στρεπτομυκίνη 10μg</i>		≤11	12-14	≥15
<i>Τετρακυκλίνη 30μg</i>		≤14	15-18	≥19
<i>Χλωραμφαινικόλη 30μg</i>		≤12	13-17	≥18

Πίνακας Β.1. Ζώνες αναστολής των επιλεγμένων αντιβιοτικών.

Κεφάλαιο 2

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.1. *Escherichia coli*

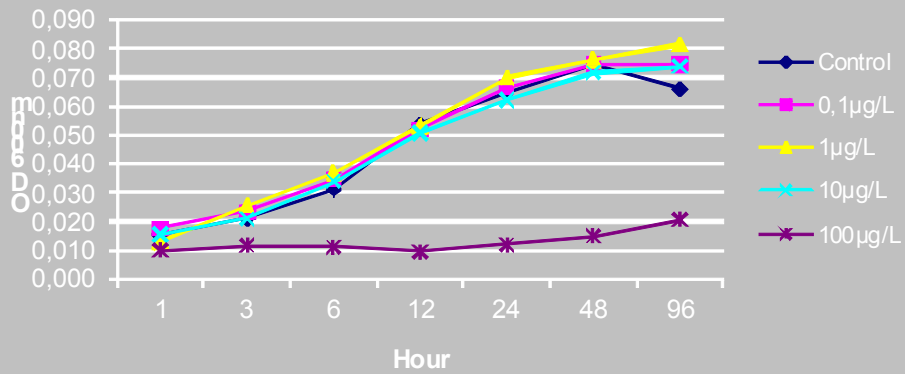
2.1.1. Καμπύλες ανάπτυξης

Dodin short-term και long-term

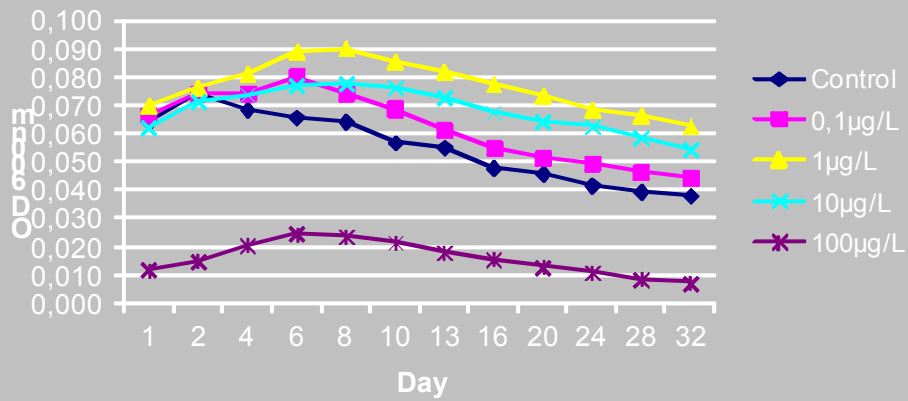
Οι βραχυπρόθεσμες καμπύλες ανάπτυξης της *E. coli* παρουσία του Dodin, εμφανίζονται στο γράφημα Β.1. Την 1^η ώρα η ανάπτυξη της *E. coli* είναι ίδια με την ανάπτυξη του control ($p \geq 0.05$) και για τις τρεις συγκεντρώσεις (0.1, 1 και 10 $\mu\text{g/L}$) ενώ στατιστικά σημαντική διαφορά ανάπτυξης ($p \leq 0.05$), σε σχέση με το control, αρχίζει να παρουσιάζεται για τη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/L}$ από την 1^η ώρα. Οι συγκεντρώσεις των 0.1, 1 και 10 $\mu\text{g/L}$ στις 96 ώρες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) σε σχέση με την ανάπτυξη του control.

Στο γράφημα Β.2. απεικονίζεται η μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της *E. coli*, παρουσία του Dodine. Η υψηλότερη ανάπτυξη εμφανίζεται την 8^η μέρα για τη συγκέντρωση του 1 $\mu\text{g/L}$. Ακολουθούν με την υψηλότερη ανάπτυξη την 6^η μέρα η συγκέντρωση του 0.1 $\mu\text{g/L}$ και την 8^η μέρα η συγκέντρωση των 10 $\mu\text{g/L}$. Οι τιμές του OD στη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/L}$ παραμένουν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτές του control ($p \leq 0.05$).

Γράφημα Β.1. βραχυπρόθεσμη ανάπτυξη της *E.coli* στο Dodin



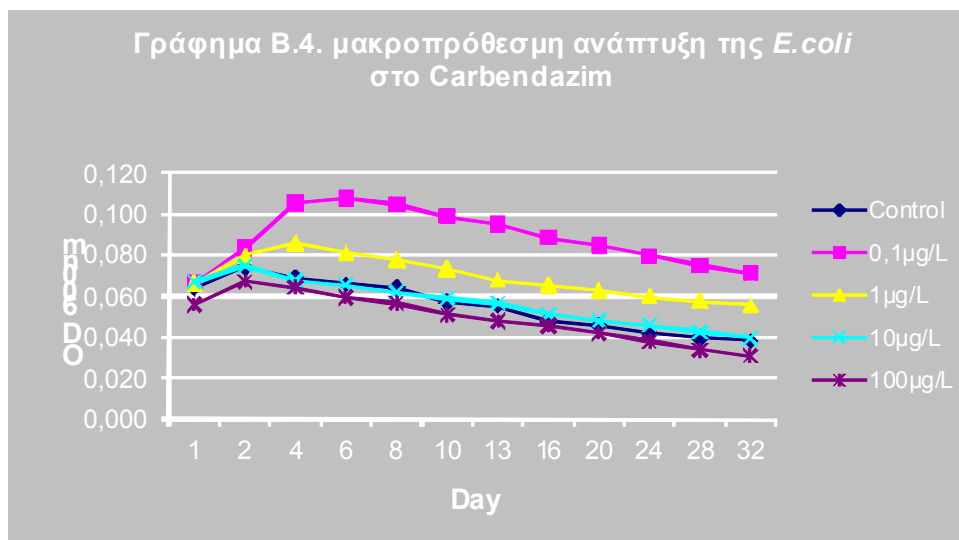
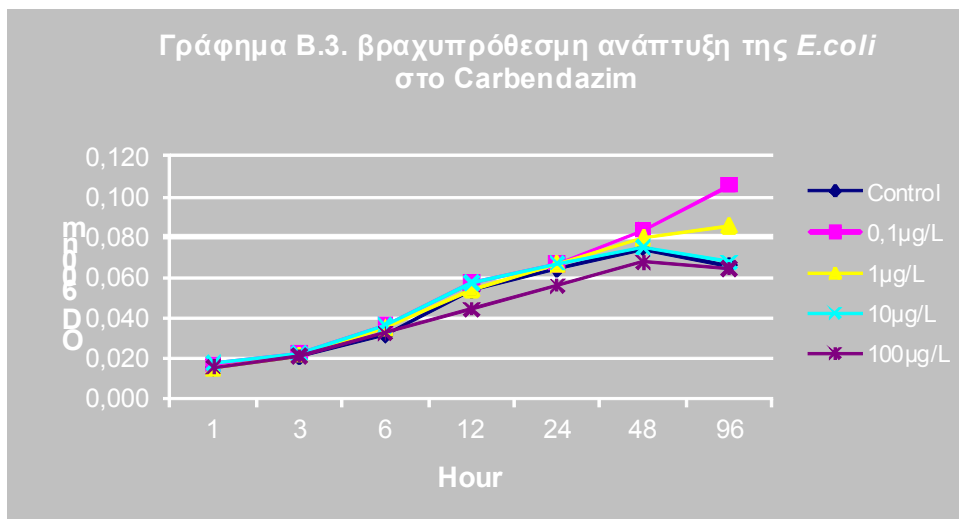
Γράφημα Β.2. μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της *E.coli* στο Dodin



Carbendazim short-term και long-term

Οι βραχυπρόθεσμες καμπύλες ανάπτυξης της *E. coli*, παρουσία του Carbendazim, απεικονίζονται στο γράφημα Β.3. Τις πρώτες 6 ώρες οι καμπύλες ανάπτυξης παρουσιάζουν παραπλήσιες ή ίσες τιμές OD με αυτές του control και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις (0.1, 1, 10 και 100 µg/L). Η συγκέντρωση των 10 µg/L ακολουθεί τις τιμές του OD του control έως τις 24 ώρες, ενώ στη συνέχεια παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις ($p \leq 0.05$).

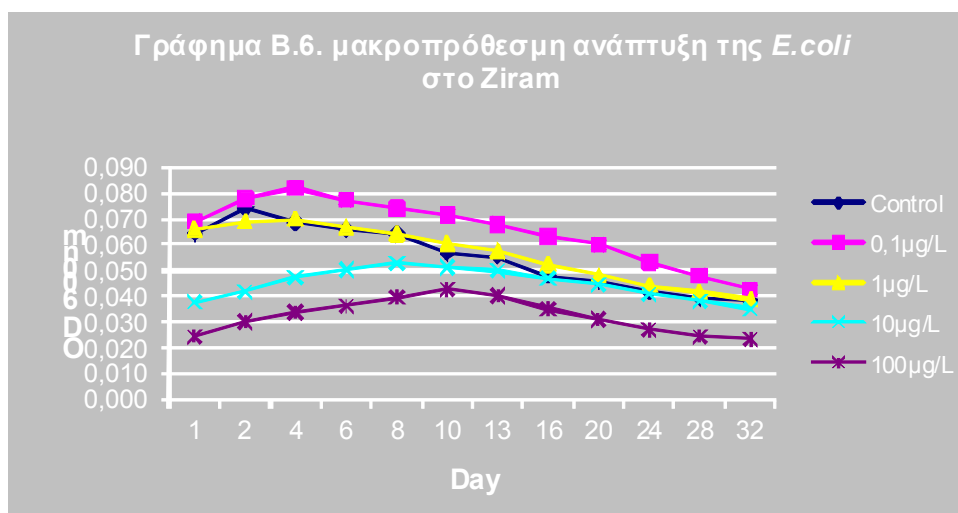
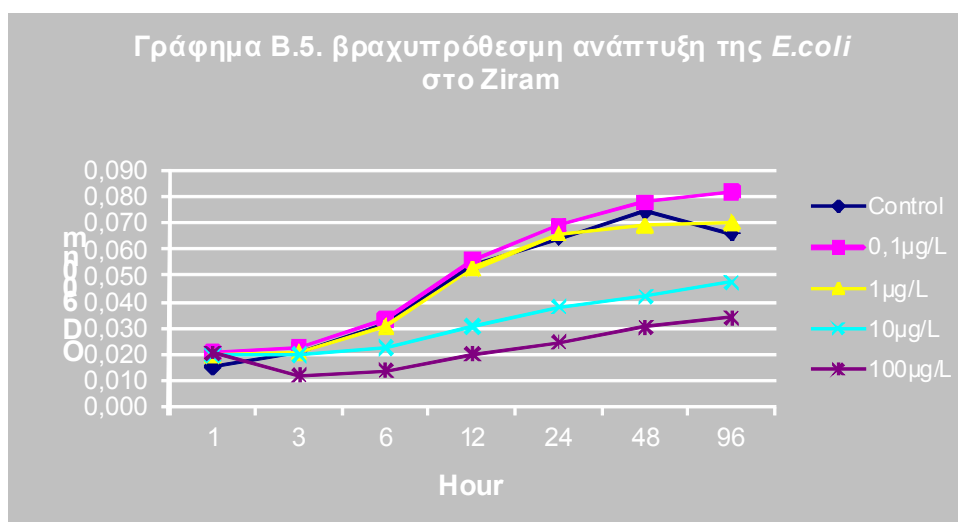
Την 4^η μέρα παρατηρείται μία απότομη αύξηση του OD για τις συγκεντρώσεις των 0.1 και 1 µg/L ($p \leq 0.05$), γράφημα Β.4. Η συγκέντρωση των 100 µg/L παραμένει σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτή του control, το ίδιο και οι υπόλοιπες τρεις συγκεντρώσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις σε σχέση με το control ($p \leq 0.05$).



Ziram short-term και long-term

Οι βραχυπρόθεσμες καμπύλες ανάπτυξης της *E. coli*, παρουσία του Ziram, απεικονίζονται στο γράφημα Β.5. Από την 1^η ώρα οι καμπύλες ανάπτυξης εμφανίζουν μία στατιστικά σημαντική διαφορά στην ανάπτυξη της *E. coli* ($p \leq 0.05$) σε σχέση με αυτή του control (εκτός της συγκέντρωσης του 1 $\mu\text{g/L}$ για την 3^η έως 24^η ώρα όπου το OD παίρνει κοντινές τιμές σε σχέση με αυτές του control).

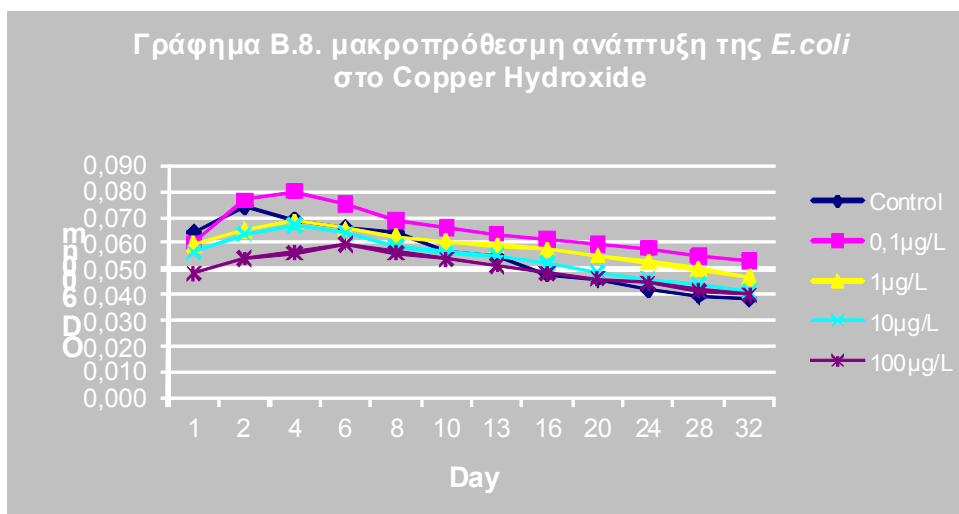
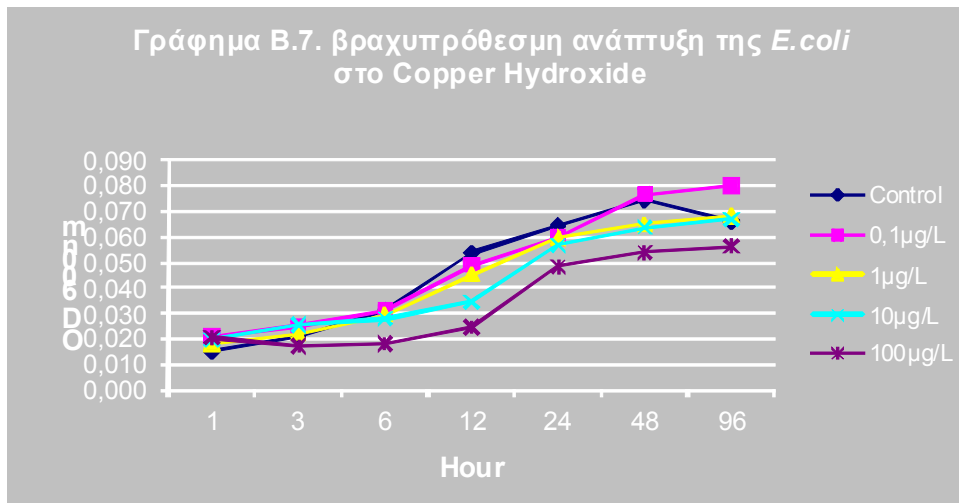
Στο γράφημα Β.6. απεικονίζεται η μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της *E. coli*, παρουσία του Ziram. Η υψηλότερη ανάπτυξη εμφανίζεται την 4^η μέρα για τη συγκέντρωση του 0.1 $\mu\text{g/L}$. Οι τιμές του OD στη συγκέντρωση των 10 και 100 $\mu\text{g/L}$ παραμένουν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτές του control ενώ η συγκέντρωση του 1 $\mu\text{g/L}$ ακολουθεί την ίδια πορεία με αυτή του control. Σε όλες τις περιπτώσεις ισχύει $p \leq 0.05$.



Copper Hydroxide short-term και long-term

Οι βραχυπρόθεσμες καμπύλες ανάπτυξης της *E. coli*, παρουσία του Copper Hydroxide, απεικονίζονται στο γράφημα B.7. Για τις πρώτες 6 ώρες οι καμπύλες ανάπτυξης όλων των συγκεντρώσεων παραμένουν σε υψηλότερα ή στα ίδια επίπεδα με αυτές του control ενώ από την 6^η έως την 48^η ώρα αυτές του control ξεπερνούν αυτές του Copper Hydroxide. Οι τιμές του OD στη συγκέντρωση των 100 μg/L κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα από αυτές του control.

Η υψηλότερη ανάπτυξη εμφανίζεται την 4^η μέρα για τη συγκέντρωση του 0.1 μg/L, γράφημα B.8. Οι τιμές του OD στη συγκέντρωση των 1, 10 και 100 μg/L παραμένουν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το control ενώ από τη 16^η μέρα και μετά οι τιμές του OD του control είναι οι χαμηλότερες. Για τη 16^η - 20^η ημέρα οι τιμές των 100 μg/L είναι ίδιες με αυτές του control. Σε όλες τις περιπτώσεις ισχύει $p \leq 0.05$.



2.1.2. Μορφολογικός χαρακτηρισμός

Κατά τη διάρκεια του πειράματος η μορφολογία της *E. coli* του control δεν παρουσίασε καμία αλλαγή (Πίνακας Β.2.).

Εντούτοις, παρουσιάστηκαν αλλαγές στη μορφολογία της *E. coli* που απομονώθηκε από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων.

Οι αποικίες της *E. coli* που εμφανίζονταν στα εκλεκτικά υλικά ήταν μικρότερες σε μέγεθος σε σχέση με αυτές του control και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων. Μετά την 21^η μέρα παρουσιάστηκε σημαντική μείωση της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών της *E. coli* στα κλασικά υλικά σε όλες τις συγκεντρώσεις από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων.

Στον πίνακα Β.2 καταγράφονται οι τελικές αλλαγές της μορφολογίας των αποικιών της *E. coli*.

Υλικό	Φυσιολογική Μορφολογία Αποικιών	Dodine	Carbendazim	Ziram	Copper hydroxide
<i>mFC Agar</i>	Λείες μπλε	Άτονο μπλε χρώμα, με λακκούβα στο κέντρο, χρώματος γκρι	Εμφανίζονται με ομόκεντρους κύκλους	Εμφανίζονται μπλε αλλά ρυτidiaσμένες σε ομόκεντρους κύκλους	Εμφανίζονται μπλε- γκρι
<i>Tergitol 7 Agar</i>	Κίτρινες	Εμφανίζονται ωχρές		Χάνουν τη μεταλλική χροιά και εμφανίζεται μια τελεία στη μέση	
<i>m-Endo Agar Les</i>	Πράσινες με μεταλλική χροιά				
<i>Mac-Conkey</i>	Φούξια όπου	Ροζ-φούξια, δεν	Έντονο φούξια		Έντονο φούξια με
<i>Agar-MUG</i>	φωσφορίζουν υπό την επίδραση υπεριώδους φωτός	φωσφορίζουν και έχουν λακκούβα με έντονο φούξια χρώμα			γκρι τελεία στο κέντρο, δεν σχηματίζουν λακκούβα, δεν φωσφορίζουν
<i>Chromocult</i>	Μοβ βαθύ		Άτονες μοβ-γκρι		

Τελικές Αλλαγές Μορφολογίας Αποικιών

Πίνακας Β.2. Τελικές αλλαγές της μορφολογίας των αποικιών της *E. coli*.

2.1.3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός

Κατά τη διάρκεια του πειράματος οι βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli* στο control δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή και έδιναν θετικές τις ακόλουθες βιοχημικές αντιδράσεις στο API 20E : ONPG, LDC, ODC, IND, GLU, MAN, SOR, RHA, MEL και ARA (Εικόνα Β.3.). Ωστόσο, παρουσιάστηκαν αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli* που απομονώθηκε από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων (Πίνακας Β.3.).



Εικόνα Β3. api 20 E με θετικές τις αντιδράσεις των ONPG, LDC, ODC, IND, GLU, MAN, SOR, RHA, MEL, και ARA.

Μετά την 6^η μέρα παρουσιάστηκαν αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli*, που απομονώθηκαν από τις συγκεντρώσεις των 0.1, 1, 10 και 100 µg/L του Dodin. Οι αντιδράσεις των GLU και MEL από θετικές εμφανίζονταν αρνητικές για τις συγκεντρώσεις των 0.1, 1 και 10 µg/L (Εικόνα Β.4.). Οι αντιδράσεις των RHA και ARA από θετικές εμφανίζονταν αρνητικές για τις συγκεντρώσεις των 100 µg/L (Εικόνα Β.5.).



Εικόνα Β.4. api 20 E με αρνητικές τις αντιδράσεις των GLU και MEL.



Εικόνα Β.5. api 20 E με αρνητικές τις αντιδράσεις των RHA και ARA.

Αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli*, που απομονώθηκαν από τις συγκεντρώσεις των 0.1, 1, 10 και 100 µg/L του Carbendazim, παρουσιάστηκαν μετά τη 10^η μέρα. Στις συγκεντρώσεις των 0.1, 1 και 10 µg/L οι αντιδράσεις του ADH από αρνητικές έγιναν θετικές και του MEL από θετικές αρνητικές (Εικόνα Β.6.).



Εικόνα Β.6. api 20 E με θετική την αντίδραση του ADH και αρνητική την αντίδραση του MEL.

Για τη συγκέντρωση των 100 µg/L στο Carbendazim, οι βιοχημικές αντιδράσεις των ONPG, LDC, ODC, SOR και RHA από θετικές έγιναν αρνητικές και οι αρνητικές ADH, SAC και AMY έγιναν θετικές (Εικόνα Β.7.). Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *Klebsiella spp* 55.4%, *Erwinia spp* 26.8% και *E. coli* 15.3%.



Εικόνα Β.7. api 20 E με αρνητικές τις αντιδράσεις των ONPG, LDC, ODC, SOR και RHA, θετικές των ADH, SAC και AMY.

Επίσης τη 10^η ημέρα παρουσιάστηκαν αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli*, που απομονώθηκαν από τις συγκεντρώσεις των 0.1, 1, 10 και 100 µg/L του Ziram. Οι αντιδράσεις του MEL από θετικές έγιναν αρνητικές για τις συγκεντρώσεις των 0.1 και 1 µg/L (Εικόνα Β.8.) ενώ για τις συγκεντρώσεις των 10 και 100 µg/L οι αντιδράσεις των GLU και MEL από θετικές εμφανίζονταν αρνητικές (Εικόνα Β.9.).



Εικόνα Β.8. api 20 E με αρνητική την αντίδραση του MEL



Εικόνα Β.9. api 20 E με αρνητικές τις αντιδράσεις των GLU και MEL.

Στο Copper Hydroxide οι αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli*, που απομονώθηκαν από τις συγκεντρώσεις των 0.1, 1, 10 και 100 µg/L, σημειώθηκαν τη 13^η μέρα. Οι αντιδράσεις των MEL και ARA από θετικές έγιναν αρνητικές για τις συγκεντρώσεις των 0.1 και 1 µg/L ως την 20^η μέρα και έπειτα επανήλθαν.

Στις συγκεντρώσεις των 10 και 100 µg/L, στο Copper Hydroxide, οι βιοχημικές αντιδράσεις των RHA, MEL και ARA από θετικές έγιναν αρνητικές. Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *Pasteurella spp* 85.3% και *E. coli* 13.7% (Εικόνα Β.10.).



Εικόνα Β.10. api 20 E με αρνητικές τις αντιδράσεις των RHA, MEL και ARA.

ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA		
ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ- ENZYMATA	2-νιτροφενυλ-βD-γαλακτοπιρανοσίδη	β-γαλακτοσιδάση	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
		L-αργινίνη	διυδρολάδη της αργινίνης	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
		L-λυσίνη	διυδρολάδη της λυσίνης	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		L-ορνιθίνη	διυδρολάδη της ορνιθίνης	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		κιτρικό τρινάτριο	χρήση κιτρικού	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		θειοθειικό νατριο	παραγωγή H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ουρία	ουρεάση	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		L-τρυπτοφάνη	δεαμινάση της τρυπτοφάνης	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		L-τρυπτοφάνη	παραγωγή ινδόλης	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		πυρροβικό νάτριο	παραγωγή ακετοϊνής	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		ζελατίνη	ζελατινάση	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		D-γλυκόζη	ζύμωση/οξείδωση	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		D-μανιτόλη	ζύμωση/οξείδωση	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		ινοσιτόλη	ζύμωση/οξείδωση	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		D-σορβιτόλη	ζύμωση/οξείδωση	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		L-ραμνόζη	ζύμωση/οξείδωση	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		D-σοκρόζη	ζύμωση/οξείδωση	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		D-μελιβιόζη	ζύμωση/οξείδωση	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		αμυγδαλίνη	ζύμωση/οξείδωση	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		L-αραβινόζη	ζύμωση/οξείδωση	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Πίνακας Β.3. Τελικά αποτελέσματα των βιοχημικών αλλαγών της *E. coli* στο api 20E.

2.1.4. Ανθεκτικότητα στα Αντιβιοτικά

Η *E. coli* που απομονώθηκε από το διάλυμα του control δεν παρουσίασε καμία αλλαγή στις ζώνες αναστολής των επιλεγμένων αντιβιοτικών (Πίνακας Β.4.).

Πλήρης ανθεκτικότητα εμφανίσθηκε ως την 25^η μέρα στην αμπικιλίνη για τα στελέχη της *E. coli* που απομονώθηκαν από τα διαλύματα του Copper Hydroxide των 100 µg/L.

Αύξηση της ζώνης αναστολής σημείωσαν στη χλωραμφαινικόλη τα στελέχη της *E. coli* που απομονώθηκαν από τα διαλύματα του Carbendazine των 0.1, 1 µg/L (10^η ημέρα) και 10, 100 µg/L (5^η ημέρα), του Dodin των 0.1 µg/L (20^η ημέρα), 1 µg/L (10^η ημέρα) και των 10, 100 µg/L (5^η ημέρα). Το ίδιο και τα στελέχη της *E. coli* του Copper Hydroxide των 1, 10, 100 µg/L (25^η ημέρα).

Στη γενταμυκίνη τα στελέχη της *E. coli* του Ziram 1, 10 µg/L (25^η ημέρα) και Ziram 100 µg/L (20^η ημέρα) σημείωσαν μείωση της ζώνης αναστολής. Τα στελέχη της *E. coli* του Ziram 100 µg/L μετακινήθηκαν από την ευαίσθητη ζώνη αναστολής στην ανθεκτική.

Στην τετρακυκλίνη εμφανίστηκε μείωση της ζώνης αναστολής στις συγκεντρώσεις των Dodin 100 µg/L (25^η ημέρα), Ziram 0.1 µg/L (25^η ημέρα), 1, 10 µg/L (20^η ημέρα) και 100 µg/L (10^η ημέρα). Τα στελέχη της *E. coli* του Dodin 100 µg/L μετακινήθηκαν από την ευαίσθητη ζώνη αναστολής στην ανθεκτική.

Η ζώνη αναστολής για τα στελέχη της *E. coli* που απομονώθηκαν από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων στη στρεπτομυκίνη δεν σημείωσε καμία αλλαγή.

ANTIBIOTIKO	ΔΕΙΓΜΑ	START			ΑΛΛΑΓΕΣ				FINAL		
		Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm			1 ^η		2 ^η		Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm		
		R	I	S	day	mm	day	mm	R	I	S
Ampicillin 10	CONTROL	15			NO ALTERATION				15		
	Copper hydroxide 1,10,100μg/L	15			25 ^η	0			0		
Chloramphenicol 30	CONTROL	25			NO ALTERATION				25		
	Carbendazine 0.1,1μg/L	25			10 ^η	30					30
	Carbendazine 10,100μg/L	25			5 ^η	30					30
	Dodin 0.1μg/L	25			20 ^η	30					30
	Dodin 1μg/L	25			10 ^η	30					30
	Dodin 10,100μg/L	25			5 ^η	30					30
	Copper hydroxide 1,10,100μg/L	25			25 ^η	12			12		
Gentamicin 10	CONTROL	18			NO ALTERATION				18		
	Ziram 1,10μg/L	18			25 ^η	13					13
	Ziram 100μg/L	18			20 ^η	13	25 ^η	10	10		
Tetracyclin 30	CONTROL	25			NO ALTERATION				25		
	Dodin 100μg/L	25			10 ^η	11			11		
	Ziram 0.1μg/L	25			25 ^η	20					20
	Ziram 1,10μg/L	25			20 ^η	20					20
	Ziram 100μg/L	25			10 ^η	20					20

R= resistant (ανθεκτικό), I= intermediate (ενδιάμεσο), S= susceptible (ευαίσθητο)

Πίνακας Β.4. Αποτελέσματα των αντιβιογραμμάτων της *E. coli*.

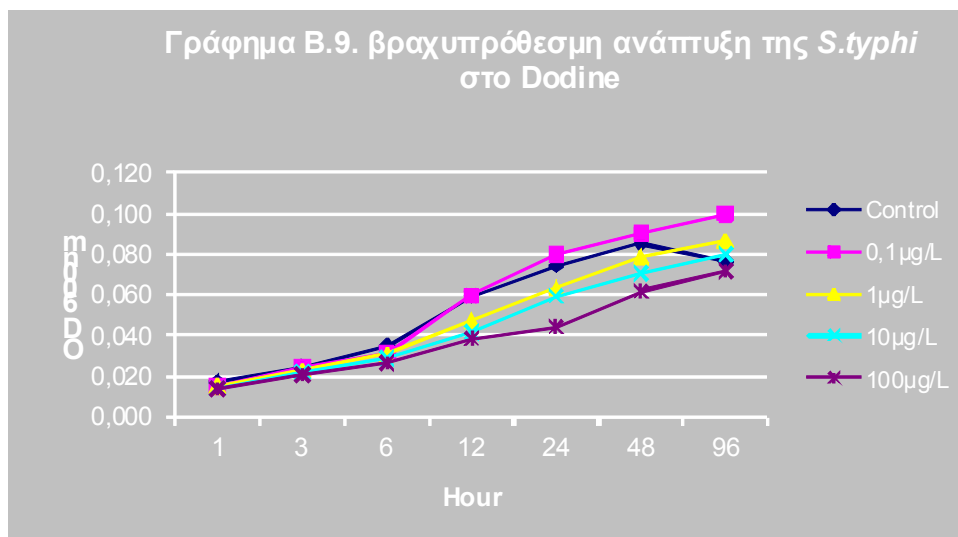
2.2. *Salmonella typhi*

2.2.1. Καμπύλες ανάπτυξης

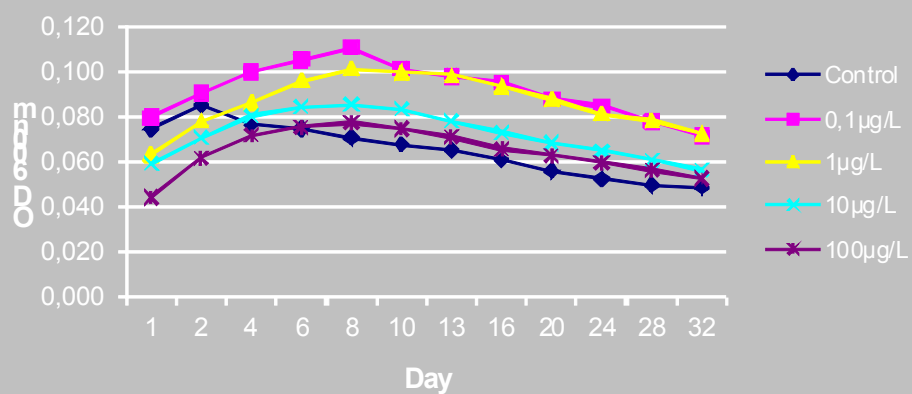
Dodin short-term και long-term

Οι βραχυπρόθεσμες καμπύλες ανάπτυξης της *S. typhi*, παρουσία του Dodin, εμφανίζονται στο γράφημα Β.9. Κατά την 1^η ώρα η ανάπτυξη της *S. typhi* είναι ίδια με αυτή του control ($p \geq 0.05$) και για τις τρεις συγκεντρώσεις (0.1, 1 και 10 $\mu\text{g/L}$) ενώ στατιστικά σημαντική μείωση ανάπτυξης ($p \leq 0.05$) σε σχέση με αυτή του control αρχίζει να παρουσιάζεται στη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/L}$ από την 1^η ώρα. Το ίδιο παρουσιάζουν οι συγκεντρώσεις των 1 και 10 $\mu\text{g/L}$ στις 6 ώρες. Η συγκέντρωση των 0.1 $\mu\text{g/L}$ στις 24 ώρες εμφανίζει στατιστικά σημαντική ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) σε σχέση με αυτή του control.

Στο γράφημα Β.10. απεικονίζεται η μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της *S. typhi*, παρουσία του Dodine. Η υψηλότερη ανάπτυξη εμφανίζεται την 8^η μέρα για τη συγκέντρωση του 0.1 $\mu\text{g/L}$. Ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των 1, 10, 100 $\mu\text{g/L}$ σε παράλληλα, χαμηλότερα επίπεδα. Οι τιμές του OD όλων των συγκεντρώσεων σε σχέση με αυτές του control εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0.05$).



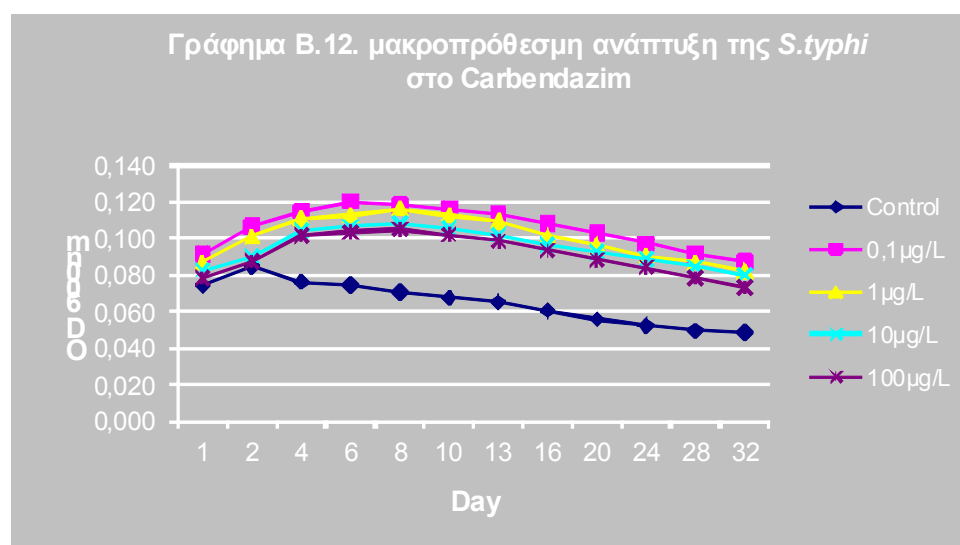
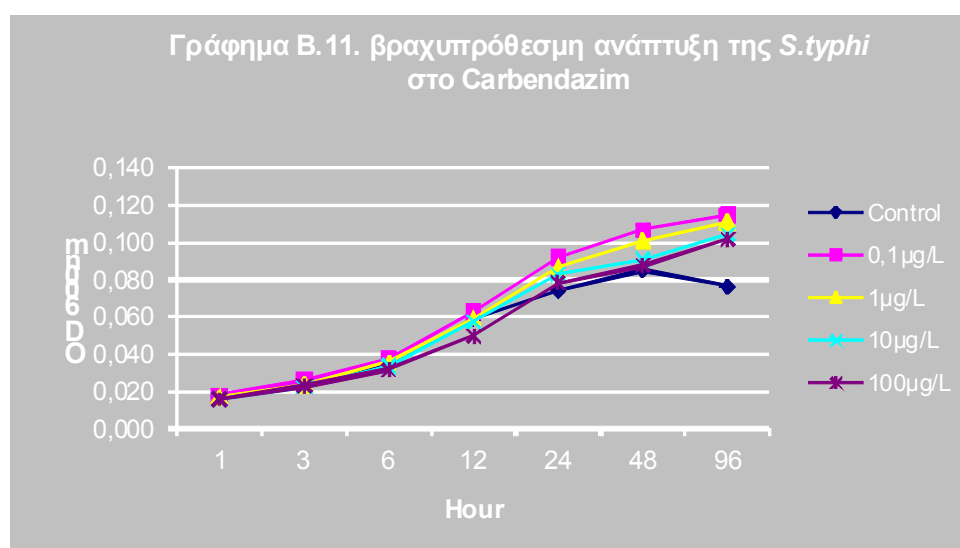
Γράφημα Β.10. μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της *S.typhi* στο Dodine



Carbendazim short-term και long-term

Οι καμπύλες ανάπτυξης της *S. typhi* στο Carbendazim εμφανίζονται στο γράφημα B.11. Την 1^η ώρα η ανάπτυξη της *S. typhi* είναι ίδια με αυτή του control ($p \geq 0.05$) και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις (0.1, 1, 10 και 100 $\mu\text{g/L}$). Στατιστικά σημαντική ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) σε σχέση με αυτή του control αρχίζει να παρουσιάζεται στη συγκέντρωση των 10 $\mu\text{g/L}$ την 6^η ώρα, στις συγκεντρώσεις των 0.1 και 100 $\mu\text{g/L}$ τη 12^η ώρα και στις συγκεντρώσεις των 1 και 10 $\mu\text{g/L}$ την 24^η ώρα.

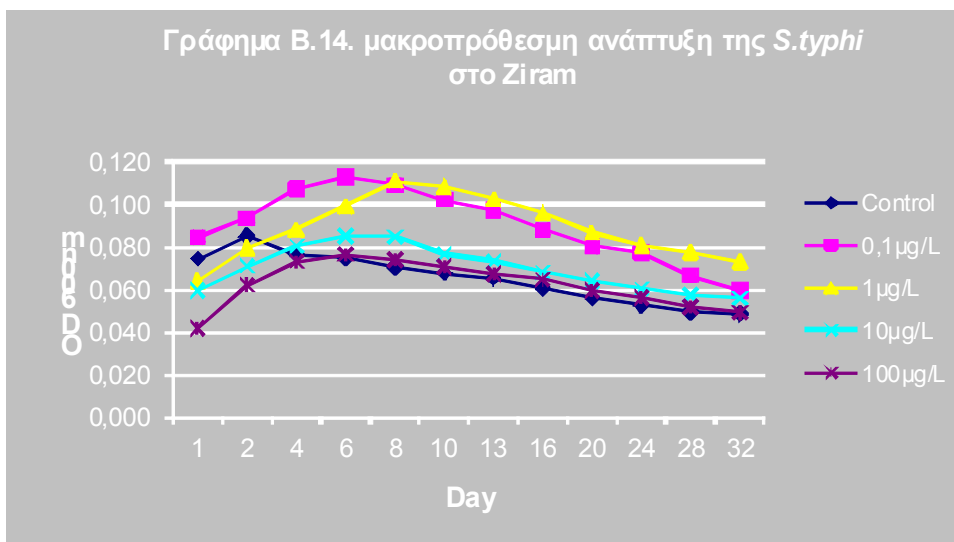
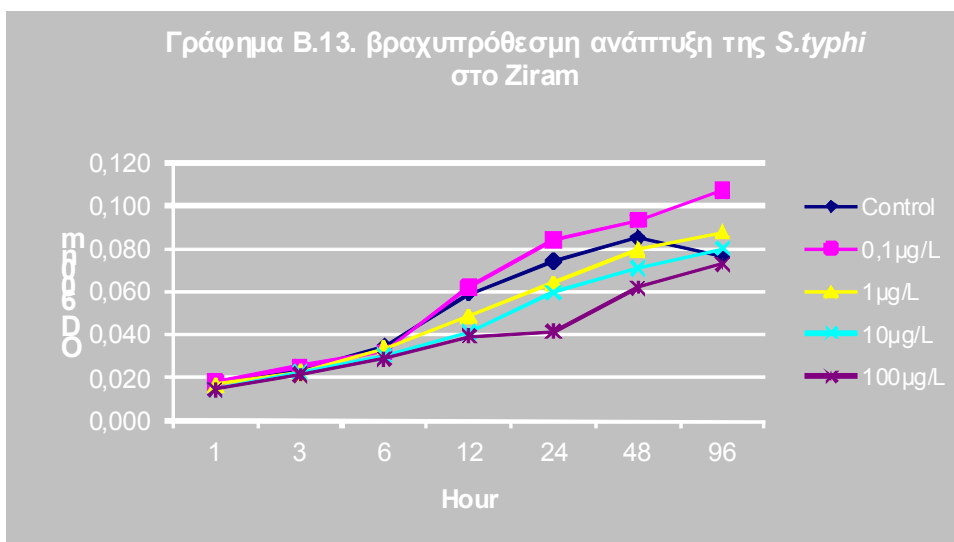
Η υψηλότερη ανάπτυξη εμφανίζεται στο γράφημα B.12 την 6^η μέρα στη συγκέντρωση των 0.1 $\mu\text{g/L}$. Ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των 1, 10, 100 $\mu\text{g/L}$ σε παράλληλα χαμηλότερα επίπεδα. Οι τιμές του OD όλων των συγκεντρώσεων σε σχέση με αυτές του control εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p \leq 0.05$).



Ziram short-term και long-term

Οι καμπύλες ανάπτυξης της *S. typhi*, παρουσία του Ziram, παρουσιάζονται στο γράφημα B.13. Από την 3^η ώρα οι καμπύλες ανάπτυξης εμφανίζουν μία στατιστικά σημαντική διαφορά της *S. typhi* ($p \leq 0.05$) σε σχέση με αυτή του control.

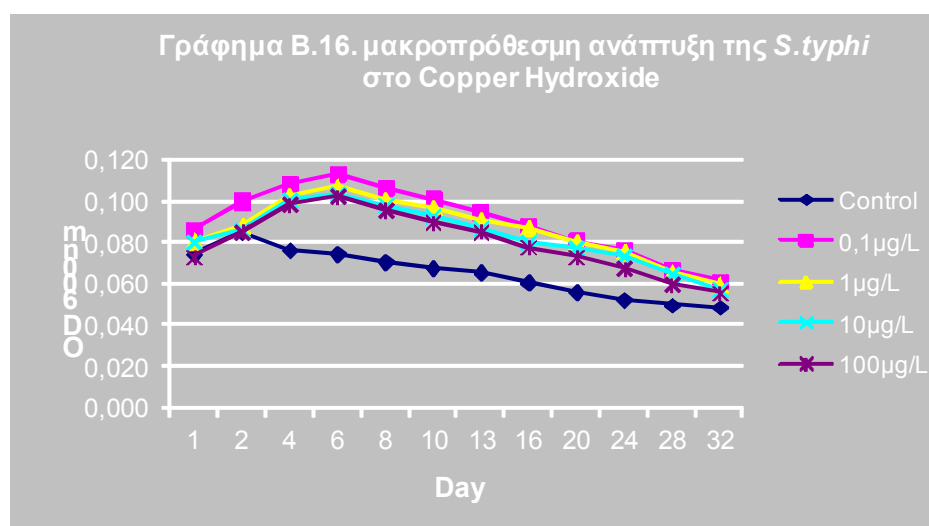
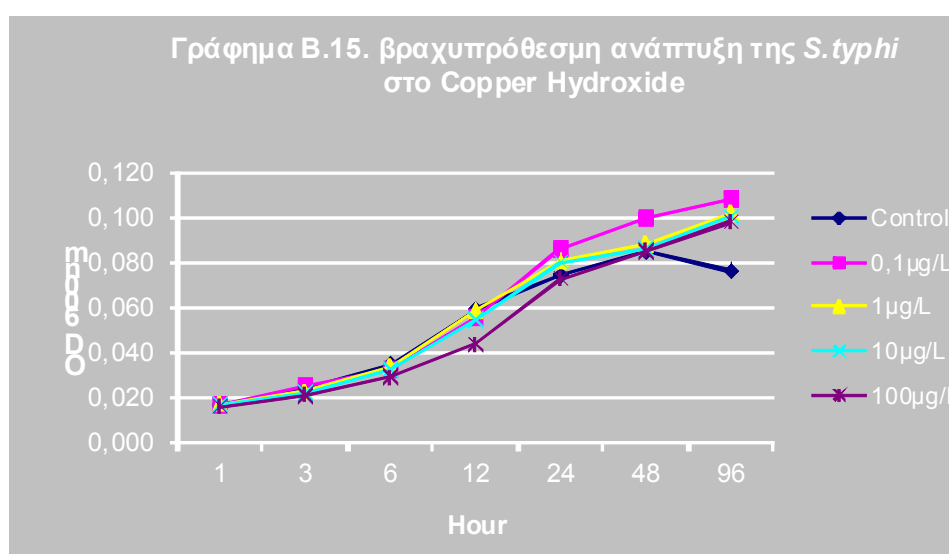
Στο γράφημα B.14. υψηλότερη ανάπτυξη εμφανίζει η συγκέντρωση του 0.1 $\mu\text{g/L}$ την 6^η μέρα. Ακολουθεί η συγκέντρωση του 1 $\mu\text{g/L}$ την 8^η μέρα. Η ανάπτυξη εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις ($p \leq 0.05$).



Copper Hydroxide short-term και long-term

Οι καμπύλες ανάπτυξης της *S. typhi*, παρουσία του Copper Hydroxide, παρουσιάζονται στο γράφημα Β.15. Τις πρώτες 12 ώρες η ανάπτυξη της *S. typhi* ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτή του control.

Η μεγαλύτερη ανάπτυξη παρατηρήθηκε την 6^η μέρα στη συγκέντρωση του 0.1 µg/L (γράφημα Β.16). Ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των 1, 10 και 100 µg/L σε παράλληλα, χαμηλότερα επίπεδα. Οι τιμές του OD όλων των συγκεντρώσεων σε σχέση με αυτές του control είναι διαφορετικές σημαντικά ($p \leq 0.05$).



2.2.2. Μορφολογικός χαρακτηρισμός

Κατά τη διάρκεια του πειράματος η μορφολογία της *S. typhi* του control δεν παρουσίασε καμία αλλαγή (Πίνακας Β.5). Μετά τη 13^η μέρα υπήρξε απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών της *S. typhi* στα επιλεγμένα υλικά στις συγκεντρώσεις 0.1, 1, 10 και 100 µg/L.

Εξαιτίας της απώλειας αυτής, εμβολιάστηκε 0.1 mL από τα διαλύματα της *S. typhi* σε τρυβλία TSA agar, που περιείχαν ξεχωριστά τα μυκητοκτόνα. Ύστερα από επώαση αυτών των τρυβλίων με το τροποποιημένο agar, στους 36 °C για 24-48 ώρες, επανεμφανίστηκαν οι αποικίες της *S. typhi*. Οι εμφανιζόμενες αποικίες χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά με το σύστημα API 20E και το βιοχημικό προφίλ που έδωσε το σύστημα αυτό ήταν το τυπικό προφίλ της *S. typhi*.

Στη συνέχεια, προστέθηκαν ξεχωριστά τα μυκητοκτόνα και στα επιλεγμένα υλικά. Μόνο στο Bismuth Sulfite ξαναεμφανίστηκαν αποικίες πιο μικρές από τις αρχικές με καφέ-γκρι χρώμα. Τα υλικά Triple Sugar Iron, Xylose Lysine Decarboxylase και Gelose SS Salmonella Shigella εμφάνισαν απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών της *S. typhi*.

Υλικό	Φυσιολογική Μορφολογία Αποικιών	Τελικές Αλλαγές Μορφολογίας Αποικιών	Dodine	Carbendazim	Ziram	Copper Hydroxide
<i>Bismuth Sulfite Agar</i>	Μαύρες με γυαλάδα		Μικρές καφέ-γκρι	Μικρές καφέ-γκρι	Μικρές καφέ-γκρι	Μικρές καφέ-γκρι
<i>Triple Sugar Iron Agar</i>	Μαύρο ίζημα		Πλήρης αναστολή ανάπτυξης	Πλήρης αναστολή ανάπτυξης	Πλήρης αναστολή ανάπτυξης	Πλήρης αναστολή ανάπτυξης
<i>Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar</i>	Κόκκινες με μαύρο κέντρο		Πλήρης αναστολή ανάπτυξης	Πλήρης αναστολή ανάπτυξης	Πλήρης αναστολή ανάπτυξης	Πλήρης αναστολή ανάπτυξης
<i>Gelose SS Salmonella Shigella Agar</i>	Άχρωμες και ελάχιστες με μαύρο κέντρο		Πλήρης αναστολή ανάπτυξης	Πλήρης αναστολή ανάπτυξης	Πλήρης αναστολή ανάπτυξης	Πλήρης αναστολή ανάπτυξης

Πίνακας Β.5. Τελικές αλλαγές της μορφολογίας των αποικιών της *S. typhi*.

2.2.3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός

Οι βιοχημικές αντιδράσεις της *S. typhi* στο control δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή κατά τη διάρκεια του πειράματος και έδιναν θετικές τις ακόλουθες βιοχημικές αντιδράσεις στο API 20E : LDC, H₂S, GLU, MAN, SOR και MEL (Εικόνα Β.11.). Ωστόσο, παρουσιάστηκαν αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις της *S. typhi* που απομονώθηκε από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων (Πίνακας Β.6.).



Εικόνα Β.11. api 20 E με θετικές τις αντιδράσεις των LDC, H₂S, GLU, MAN, SOR και MEL.

Μετά την 8^η μέρα παρουσιάστηκαν αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις της *S. typhi*, που απομονώθηκε από τις συγκεντρώσεις των 0,1, 1, 10 και 100 µg/L του Dodin. Οι αντιδράσεις των ODC και RHA από αρνητικές εμφανίζονταν θετικές στις συγκεντρώσεις των 10 και 100 µg/L (Εικόνα Β.12.). Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *S.choleraesuis* 95.5%.



Εικόνα Β.12. api 20 E με αρνητικές τις αντιδράσεις των ODC και RHA.

Αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις της *S. typhi*, που απομονώθηκε από τις συγκεντρώσεις των 1, 10 και 100 µg/L του Carbendazim, παρουσιάστηκαν μετά τη 13^η μέρα. Οι αντιδράσεις των GLU και MEL από θετικές έγιναν αρνητικές (Εικόνα Β.13.). Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *Pasteurella spp* 75.3%.



Εικόνα B.13. api 20 E με αρνητικές τις αντιδράσεις των GLU και MEL.

Την 8^η μέρα παρουσιάστηκαν αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις της *S. typhi*, που απομονώθηκε από τις συγκεντρώσεις των 10 και 100 µg/L του Ziram. Οι αντιδράσεις των SOR και MEL από θετικές έγιναν αρνητικές και του ARA από αρνητική έγινε θετική (Εικόνα B.14.). Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *S. typhimurium* 96.5%.



Εικόνα B.14. api 20 E με αρνητικές τις αντιδράσεις των SOR και MEL, θετική του ARA.

Στο Copper Hydroxide οι αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις της *S. typhi*, που απομονώθηκε από τις συγκεντρώσεις των 0.1, 1, 10 και 100 µg/L, σημειώθηκαν τη 13^η μέρα. Η αντίδραση του MEL από θετική έγινε αρνητική (Εικόνα B.15.). Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *S. typhi*.



Εικόνα B.15. api 20 E με αρνητική την αντίδραση του MEL

2.2.4. Ανθεκτικότητα στα Αντιβιοτικά

Η *S. typhi*, που απομονώθηκε από το διάλυμα του control, δεν παρουσίασε καμία αλλαγή στις ζώνες αναστολής των επιλεγμένων αντιβιοτικών (Πίνακας Β.7.).

Μείωση στη ζώνη αναστολής σημείωσαν στην αμπικιλίνη τα στελέχη της *S. typhi*, που απομονώθηκαν από τα διαλύματα του Copper Hydroxide των 1 µg/L (25^η μέρα), 10 και 100 µg/L (15^η μέρα), του Ziram των 0.1, 1 µg/L (25^η μέρα), 10, 100 µg/L (15^η μέρα), του Dodin των 0.1 µg/L (25^η μέρα), 1 µg/L (20^η & 25^η μέρα) και των 10, 100 µg/L (5^η & 15^η μέρα), του Carbendazine των 1 µg/L (25^η μέρα), 10 µg/L (15^η & 25^η μέρα) και 100 µg/L (5^η & 15^η μέρα).

Μείωση στη ζώνη αναστολής σημείωσαν στη χλωραμφαινικόλη τα στελέχη της *S. typhi*, που απομονώθηκαν από τα διαλύματα του Carbendazine των 0.1 µg/L (25^η μέρα), 1 µg/L (20^η μέρα) και 10, 100 µg/L (15^η μέρα), του Copper Hydroxide των 0.1, 1, 10 µg/L (25^η ημέρα), του Ziram των 0.1 και 1 µg/L (25^η μέρα). Τα στελέχη της *S. typhi* του Dodin των 10 και 100 µg/L, αν και σημείωσαν μείωση κατά τη διάρκεια του πειράματος, στην τελική τιμή επανήλθαν στην αρχική τους διάμετρο της ζώνης αναστολής. Όμοια εξέλιξη είχαν και τα στελέχη της *S. typhi* από τα διαλύματα του Copper Hydroxide των 100 µg/L και του Ziram των 10 και 100 µg/L.

Στη γενταμυκίνη τα στελέχη της *S. typhi* του Dodin των 0.1, 1 µg/L (25^η μέρα) σημείωσαν μείωση της ζώνης αναστολής ενώ στα στελέχη των διαλυμάτων των 10 µg/L (10^η μέρα) και των 100 µg/L (5^η μέρα) η τελική τιμή τους μετακινήθηκε από την ευαίσθητη ζώνη αναστολής στην ανθεκτική.

Στην τετρακυκλίνη εμφανίστηκε αύξηση της ζώνης αναστολής στις συγκεντρώσεις των Copper Hydroxide των 10 µg/L (25^η μέρα) και των 100 µg/L (15^η μέρα), του Ziram του 1 µg/L (25^η μέρα), των 10 και των 100 µg/L (10^η μέρα).

Η ζώνη αναστολής για τα στελέχη της *S. typhi* που απομονώθηκαν από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων στη στρεπτομυκίνη δεν σημείωσε καμία αλλαγή.

ANTIBIOTIKO	ΔΕΙΓΜΑ	START Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm			ΑΛΛΑΓΕΣ				FINAL Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm		
		R	I	S	1 ^η		2 ^η		R	I	S
					day	mm	day	mm			
Ampicillin 10	CONTROL			30	NO ALTERATION						30
	Copper hydroxide 1μg/L			30	25 ^η	25					25
	Copper hydroxide 10,100μg/L			30	15 ^η	25					25
	Ziram 0.1,1μg/L			30	25 ^η	26					26
	Ziram 10,100μg/L			30	15 ^η	26					26
	Dodin 0,1μg/L			30	25 ^η	28					28
	Dodin 1μg/L			30	20 ^η	28	25 ^η	25			25
	Dodin 10,100 μg/L			30	5 ^η	28	15 ^η	25			25
	Carbendazine 1μg/L			30	25 ^η	28					28
	Carbendazine 10μg/L			30	15 ^η	28	25 ^η	25			25
	Carbendazine 100μg/L			30	5 ^η	28	15 ^η	24			24
	Chloramphenicol 30	CONTROL			27	NO ALTERATION					
Dodin 10μg/L				27	15 ^η	25	25 ^η	27			27
Dodin 100μg/L				27	5 ^η	25	20 ^η	27			27
Carbendazine 0.1μg/L				27	25 ^η	25					25
Carbendazine 1μg/L				27	20 ^η	25					25
Carbendazine 10,100μg/L				27	15 ^η	25					25
Copper hydroxide 0.1,1,10μg/L				27	25 ^η	25					25
Copper hydroxide 100μg/L				27	15 ^η	25	25 ^η	27			27
Ziram 0.1,1μg/L				27	25 ^η	26					26
Ziram 10μg/L				27	20 ^η	26	25 ^η	27			27
Ziram 100μg/L				27	15 ^η	26	20 ^η	27			27
Gentamicin 10		CONTROL			18	NO ALTERATION					
	Dodin 0.1,1μg/L			18	20 ^η	15					15
	Dodin 10μg/L			18	10 ^η	15	20 ^η	12	12		
	Dodin 100μg/L			18	5 ^η	16	10 ^η	12	12		
Tetracyclin 30	CONTROL			23	NO ALTERATION						23
	Copper hydroxide 10μg/L			23	25 ^η	25					25
	Copper hydroxide 100μg/L			23	15 ^η	25					25
	Ziram 1 μg/L			23	25 ^η	25					25
	Ziram 10,100μg/L			23	10 ^η	25					25

R= resistant (ανθεκτικό), I= intermediate (ενδιάμεσο), S= susceptible (ευαίσθητο)

Πίνακας Β.7. Αποτελέσματα των αντιβιογραμμάτων της *S. typhi*.

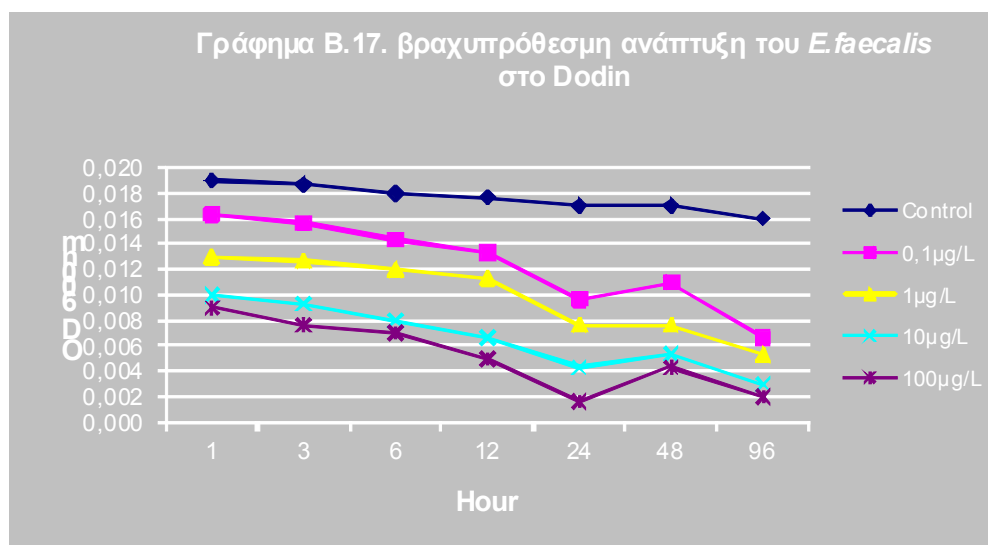
2.3. *Enterococcus faecalis*

2.3.1. Καμπύλες ανάπτυξης

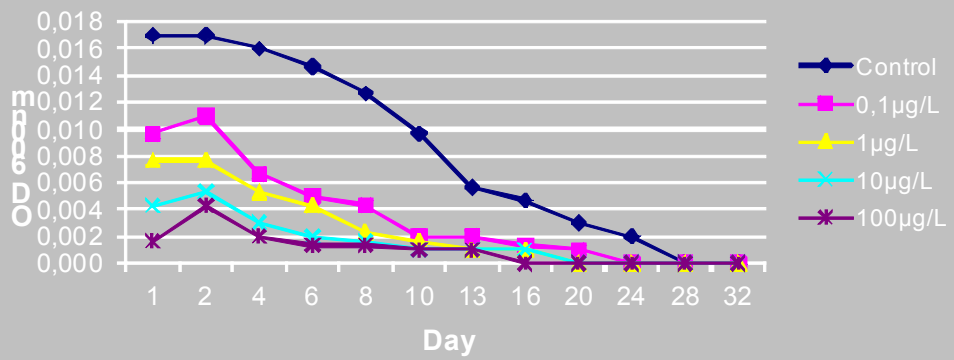
Dodin short-term και long-term

Οι βραχυπρόθεσμες καμπύλες ανάπτυξης του *E. faecalis*, παρουσία του Dodin, εμφανίζονται στο γράφημα B.17. Όλες οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται σε χαμηλότερες τιμές από αυτές του control. Η διαφορά τους είναι στατιστικά σημαντική ($p \leq 0.05$). Η χαμηλότερη τιμή παρουσιάζεται στην συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/L}$ την 5^η και 7^η ώρα.

Στη μακροπρόθεσμη μελέτη της επίδρασης του Dodin στον *E. faecalis*, γράφημα B.18., οι καμπύλες ανάπτυξης των συγκεντρώσεων του Dodin εμφανίζουν καμπή από την 4^η μέρα. Μηδενική είναι η τιμή των 100 $\mu\text{g/L}$ τη 16^η μέρα και ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των 10, 1, 0.1 $\mu\text{g/L}$ και του control την 20^η, 20^η, 24^η και 28^η μέρα, αντίστοιχα. Και στις τέσσερις συγκεντρώσεις η διαφορά τους με το control είναι στατιστικά σημαντική ($p \leq 0.05$).



Γράφημα Β.18. μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του *E.faecalis* στο Dodin

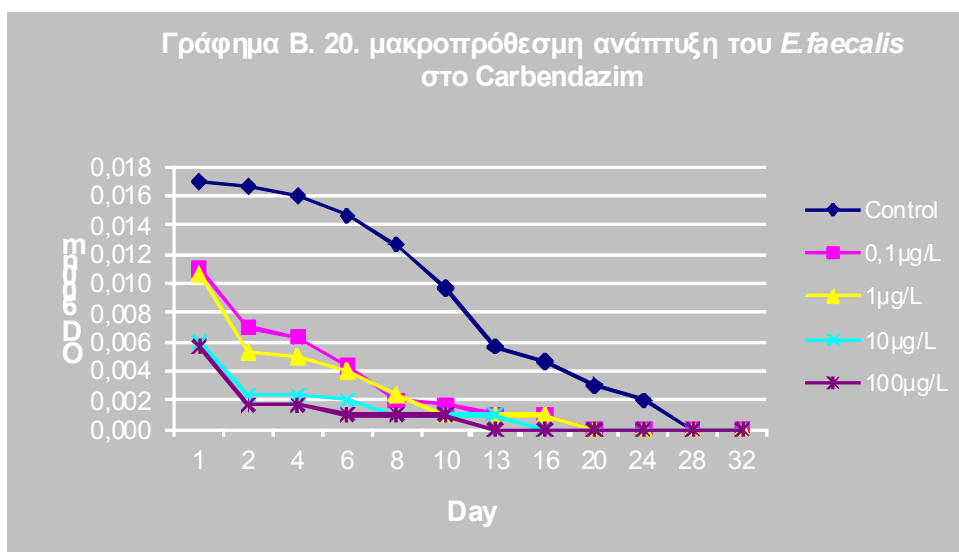
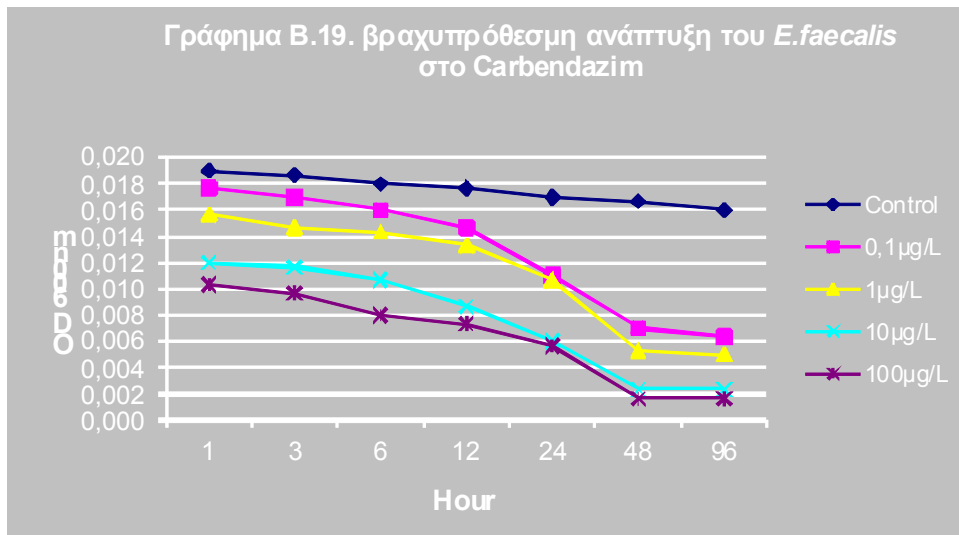


Carbendazim short-term και long-term

Η βραχυπρόθεσμη καμπύλη ανάπτυξης του *E. faecalis*, παρουσία του Carbendazim, απεικονίζεται στο γράφημα B.19. Η καμπύλη του control παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές. Ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των 0.1, 1, 10 και 100 µg/L.

Η μακροπρόθεσμη καμπύλη ανάπτυξης του *E. faecalis*, παρουσία του Carbendazim, απεικονίζεται στο γράφημα B.20., όπου οι καμπύλες ανάπτυξης και των τεσσάρων συγκεντρώσεων παρουσιάζουν έντονη καμπή σε σχέση με αυτή το control. Οι τιμές του OD αγγίζουν το μηδέν στις συγκεντρώσεις των 100, 10, 1, 0.1 µg/L και του control τη 13^η, 16^η, 20^η, 20^η και 28^η μέρα, αντίστοιχα.

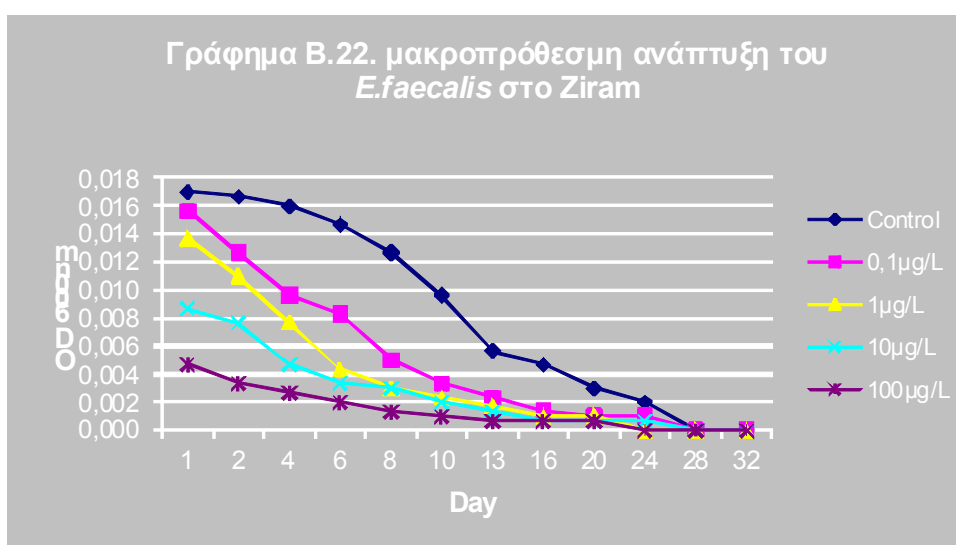
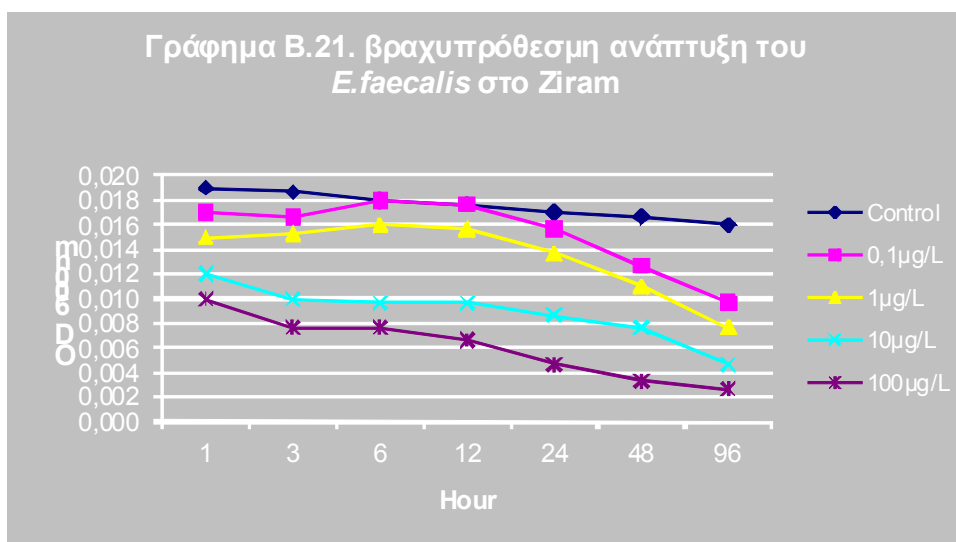
Τόσο η βραχυπρόθεσμη όσο και η μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του *E. faecalis*, παρουσία του Carbendazim, είναι στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με το control ($p \leq 0.05$).



Ziram short-term και long-term

Η βραχυπρόθεσμη καμπύλη ανάπτυξης του *E. faecalis*, παρουσία του Ziram, απεικονίζεται στο γράφημα B.21. Η καμπύλη του control κυμαίνεται υψηλότερα από αυτές των συγκεντρώσεων του Ziram, εκτός από την 6^η και 12^η ώρα όπου οι τιμές του 0.1 μg/L συμπίπτουν με αυτές του control. Ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των 1, 10 και 100 μg/L με στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \leq 0.05$).

Στο γράφημα B.22. απεικονίζεται η μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του *E. faecalis*, παρουσία του Ziram. Οι καμπύλες των συγκεντρώσεων του Ziram κυμαίνονται σε μικρότερες τιμές από αυτές του control. Την τιμή του μηδέν αγγίζουν οι συγκεντρώσεις των 100 και 1 μg/L την 24^η μέρα και ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των 10, 0.1 μg/L και του control την 28^η μέρα. Και στις τέσσερις συγκεντρώσεις η διαφορά τους με το control είναι στατιστικά σημαντική ($p \leq 0.05$).

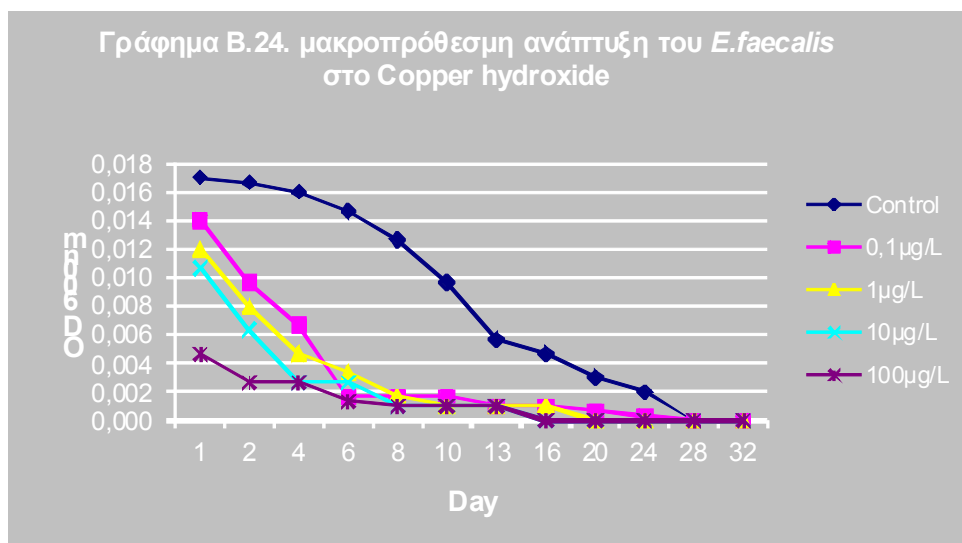
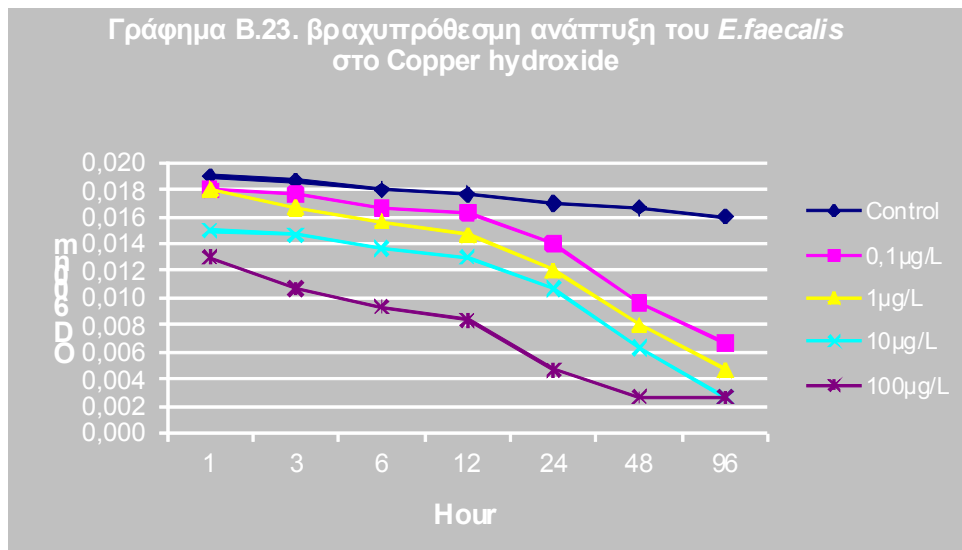


Copper Hydroxide short-term και long-term

Η βραχυπρόθεσμη καμπύλη ανάπτυξης του *E. faecalis*, παρουσία του Copper Hydroxide, απεικονίζεται στο γράφημα Β.23. Η καμπύλη του control κυμαίνεται σε υψηλότερα επίπεδα. Ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των 0.1, 1, 10 και 100 µg/L.

Από τη δεύτερη μέρα στο μακροπρόθεσμο γράφημα Β.24. παρατηρούμε απότομη καμπή στις συγκεντρώσεις των 0.1, 1 και 10 µg/L. Οι τιμές του OD αγγίζουν το μηδέν στις συγκεντρώσεις των 100, 10, 1, 0.1 µg/L και του control τη 16^η, 16^η, 20^η, 24^η και 28^η μέρα, αντίστοιχα.

Τόσο η βραχυπρόθεσμη όσο και η μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του *E. faecalis*, παρουσία του Copper Hydroxide, είναι στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με αυτή του control ($p \leq 0.05$).



2.3.2. Μορφολογικός χαρακτηρισμός

Κατά τη διάρκεια του πειράματος η μορφολογία του *E. faecalis* του control δεν παρουσίασε καμία αλλαγή (Πίνακας Β.8.).

Ωστόσο, παρουσιάστηκαν αλλαγές στη μορφολογία του *E. faecalis*, που απομονώθηκε από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων.

Οι αποικίες του *E. faecalis*, που εμφανίζονταν στα εκλεκτικά υλικά, ήταν μικρότερες σε μέγεθος σε σχέση με αυτές του control και στις τέσσερις συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων ενώ σημαντική ήταν και η μείωση της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών του *E. faecalis* στα κλασικά υλικά σε όλες τις συγκεντρώσεις από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων.

Στον πίνακα Β.8. καταγράφονται οι τελικές αλλαγές της μορφολογίας των αποικιών του *E. faecalis*.

Υλικό	Φυσιολογική Μορφολογία Αποικιών	Τελικές Αλλαγές Μορφολογίας Αποικιών				Copper Hydroxide
		Dodine	Carbendazim	Ziram		
<i>Slanetz and Bartley</i>	Σκούρες κόκκινες	Μικρότερο μέγεθος	Μικρότερο μέγεθος	Μικρότερο μέγεθος	Μικρότερο μέγεθος	Μικρότερο μέγεθος
<i>KF Streptococcus</i>	Κόκκινες	Μικρότερο μέγεθος	Μικρότερο μέγεθος	Μικρότερο μέγεθος	Μικρότερο μέγεθος	Μικρότερο μέγεθος

Πίνακας Β.8. Τελικές αλλαγές της μορφολογίας των αποικιών του *E. faecalis*.

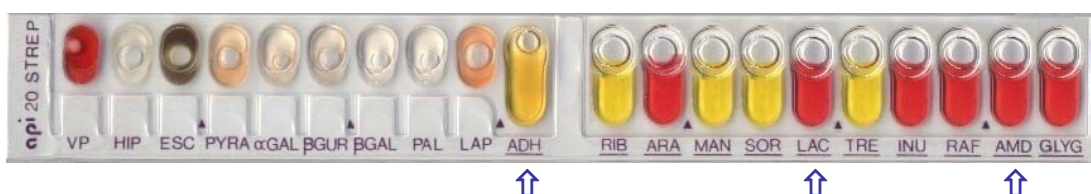
2.3.3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός

Οι βιοχημικές αντιδράσεις του *E. faecalis* στο control δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή κατά τη διάρκεια του πειράματος και έδιναν θετικές τις ακόλουθες βιοχημικές αντιδράσεις στο API 20 STREP : VP, ESC, PYRA, LAP, ADH, RIB, MAN, SOR LAC, TRE και AMD (Εικόνα Β.16.). Ωστόσο, παρουσιάστηκαν αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις του *E. Faecalis*, που απομονώθηκε από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων (Πίνακας Β.9.).



Εικόνα Β.16. api 20 STREP με θετικές τις αντιδράσεις των VP, ESC, PYRA, LAP, ADH, RIB, MAN, SOR LAC, TRE και AMD.

Αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις του *E. faecalis*, που απομονώθηκε από τις συγκεντρώσεις των 1, 10 και 100 µg/L του Dodin, παρουσιάστηκαν μετά την 4^η μέρα. Οι αντιδράσεις των ADH, LAC και AMD από θετικές έγιναν αρνητικές (Εικόνα Β.17.). Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *E. faecalis* 45,7% και *E. avium* 53,0%.



Εικόνα Β.17. api 20 STREP με αρνητικές τις αντιδράσεις των ADH, LAC και AMD.

Μετά την 8^η μέρα παρουσιάστηκαν αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις του Carabendazim. Οι αντιδράσεις των MAN και SOR από θετικές έγιναν αρνητικές (Εικόνα Β.18.). Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *E. durans* 63,0%.



Εικόνα B.18. αρι 20 STREP με αρνητικές τις αντιδράσεις των MAN και SOR.

Στο Ziram οι αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις του *E. faecalis*, που απομονώθηκε από τις συγκεντρώσεις των 10 και 100 μg/L, παρουσιάστηκαν μετά τη 10^η μέρα. Η αντίδραση του AMD από θετική έγινε αρνητική και του ARA από αρνητική έγινε θετική (Εικόνα B.19.). Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *E. faecalis* 42,0% και *E. faecium* 55,3%.



Εικόνα B.19. αρι 20 STREP με αρνητική την αντίδραση του AMD και θετική την αντίδραση του ARA.

Τη 10^η μέρα παρουσιάστηκαν αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις του *E. faecalis*, που απομονώθηκε από τις συγκεντρώσεις των 0,1, 1, 10 και 100 μg/L του Copper Hydroxide. Η αντίδραση του SOR από θετική έγινε αρνητική (Εικόνα B.20.). Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *E. faecalis* 60,1% και σε *L. lactis lactis* 37,0%.



Εικόνα B.20. αρι 20 STREP με αρνητική την αντίδραση του SOR

2.3.4. Ανθεκτικότητα στα Αντιβιοτικά

Ο *E. faecalis*, που απομονώθηκε από το διάλυμα του control, δεν παρουσίασε καμία αλλαγή στις ζώνες αναστολής των επιλεγμένων αντιβιοτικών (Πίνακας Β.10.).

Αύξηση στη ζώνη αναστολής σημείωσαν στην αμικικιλίνη τα στελέχη του *E. faecalis*, που απομονώθηκαν από τα διαλύματα του Copper Hydroxide των 10 µg/L (15^η μέρα) και των 100 µg/L (10^η μέρα), του Dodin των 10 µg/L (15^η μέρα) και των 100 µg/L (5^η μέρα) και του Ziram των 10 µg/L (15^η μέρα) και των 100 µg/L (10^η μέρα).

Η ζώνη αναστολής στη στρεπτομυκίνη αυξήθηκε από το ανθεκτικό στο ευαίσθητο για τα στελέχη του *E. faecalis*, που απομονώθηκαν από τα διαλύματα του Carbendazine των 0.1 µg/L (10^η μέρα), 1, 10 µg/L (5^η μέρα) και 100 µg/L (5^η & 15^η μέρα), του Dodin των 0.1 µg/L (10^η μέρα), 1, 10 και 100 µg/L (5^η μέρα) και του Ziram των 1, 10 µg/L (5^η & 10^η μέρα) και 100 µg/L (5^η μέρα).

Στην τετρακυκλίνη εμφανίστηκε αύξηση της ζώνης αναστολής στις συγκεντρώσεις του Ziram των 0.1 µg/L (10^η μέρα) και 1, 10, 100 µg/L (5^η μέρα), του Carbendazine των 0.1, 1 µg/L (15^η μέρα) και 10, 100 µg/L (5^η μέρα) και του Dodin των 0.1 µg/L (5^η & 10^η μέρα) και 1, 10, 100 µg/L (5^η μέρα).

Η ζώνη αναστολής για τα στελέχη του *E. faecalis*, που απομονώθηκαν από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων, στη γενταμυκίνη και στη χλωραμφαινικόλη, δεν σημείωσε καμία αλλαγή.

ANTIBIOTIKO	ΔΕΙΓΜΑ	START Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm			ΑΛΛΑΓΕΣ				FINAL Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm		
		R	I	S	1 ^η		2 ^η		R	I	S
					day	mm	day	mm			
Ampicillin 10	CONTROL			25	NO ALTERATION						25
	Copper hydroxide 10μg/L			25	15 ^η	30					30
	Copper hydroxide 100 μg/L			25	10 ^η	30					30
	Dodin 10μg/L			25	10 ^η	30					30
	Dodin 100 μg/L			25	5 ^η	30					30
	Ziram 10 μg/L			25	15 ^η	30					30
	Ziram 100μg/L			25	10 ^η	30					30
Streptomycin 10	CONTROL	0			NO ALTERATION				0		
	Carbendazine 0.1μg/L	0			10 ^η	10					10
	Carbendazine 1,10μg/L	0			5 ^η	10					10
	Carbendazine 100 μg/L	0			5 ^η	10	15 ^η	15			15
	Dodin 0.1μg/L	0			10 ^η	20					20
	Dodin 1,10, 100μg/L	0			5 ^η	20					20
	Ziram 0.1μg/L	0			10 ^η	15					15
	Ziram 1,10μg/L	0			5 ^η	10	10 ^η	15			15
	Ziram 100μg/	0			5 ^η	15					15
Tetracyclin 30	CONTROL			20	NO ALTERATION						20
	Ziram 0.1μg/L			20	10 ^η	30					30
	Ziram 1,10,100μg/L			20	5 ^η	30					30
	Carbendazine 0.1,1μg/L			20	15 ^η	30					30
	Carbendazine 10,100μg			20	5 ^η	30					30
	Dodin 0.1μg/L			20	5 ^η	30	10 ^η	35			35
	Dodin 1,10, 100μg/L			20	5 ^η	35					35

R= resistant (ανθεκτικό), I= intermediate (ενδιάμεσο), S= susceptible (ευαίσθητο)

Πίνακας Β.10. Αποτελέσματα των αντιβιογραμμάτων του *E. faecalis*.

Κεφάλαιο 3

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Ανάπτυξη

Η ρύπανση και η μόλυνση των υδάτινων πόρων απασχολεί επί δεκαετίες τη διεθνή κοινότητα. Η μόλυνση του νερού από παθογόνους μικροοργανισμούς είναι το κύριο πρόβλημα στις περισσότερες υποανάπτυκτες και αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ η χημική ρύπανση του νερού αποτελεί εξίσου σοβαρή απειλή σ' όλες τις χώρες με γεωργική και βιομηχανική ανάπτυξη.

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν τη σχέση υδάτινου μικροοργανισμού και χημικού ρύπου (φυτοφάρμακα, ορυκτέλαια κ.τ.λ.) εξετάζουν την αποικοδόμηση του χημικού ρύπου παρά το αντίκτυπο στους φυσικούς μικροβιακούς πληθυσμούς.

Η μελέτη της συμπεριφοράς των βακτηρίων των υδάτων που συνυπάρχουν με τους χημικούς ρύπους, μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο, για την εκτίμηση, τη διαχείριση και τη βελτίωση της ποιότητας του νερού.

Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η καταμέτρηση των μικροβιακών δεικτών μπορεί σε πολλές περιπτώσεις να επηρεαστεί δραματικά από την παρουσία κάποιου στρεσογόνου παράγοντα είτε αναστέλλοντας είτε παρατείνοντας την ανάπτυξή τους. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι υπολογισμοί με βάση την καταμέτρηση των αποικιών να μας δίνουν λανθασμένες εκτιμήσεις (Balague *et al.* 2001, Yurovskaya 1975).

Μελέτες έδειξαν ότι οι *E. coli* και *E. faecalis*, παρουσία της Atrazine και του Trifluralin, σε συγκεντρώσεις µg/L, παρουσίασαν σημαντικές αλλαγές στην ανάπτυξη (Koutsotoli_a *et al.* 2005, Koutsotoli_b *et al.* 2005). Νεότερες μελέτες, βασιζόμενες στις παραπάνω έρευνες, είχαν παραπλήσια αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα:

-στις Η.Π.Α, μελέτη σχετικά με τις επιδράσεις χημικών ρυπαντών, (καφεΐνη, 17b οιστραδιόλη, οιστρόνη, αιθυλενογλυκόλη, και μεθυλο-τριτ-βουτυλο αιθέρας, Simazine, diazinon, Atrazine, 2,4-D (2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ), και τριχλωροαιθέριο), ευρέως διαδεδομένων στα γλυκά επιφανειακά ύδατα, στην *in vitro* ανάπτυξη της *E. coli* έδειξε πως μόνο η αιθυλενογλυκόλη και το ζιζανιοκτόνο 2,4-D, ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη της *E. coli*, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους χημικούς ρυπαντές, που αύξησαν την ανάπτυξή της (Higgins *et al.* 2008),

-στις Η.Π.Α, μελέτη, σχετικά με τις επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων (Atrazine, Chlorothalonil, Fertilizer και Malathione) στην επιβίωση των βακτηριακών δεικτών, έδειξαν ότι η έκθεση της *E. coli* ευρισκόμενης σε μη αποστειρωμένο νερό λίμνης, σε σκοτεινό περιβάλλον, δεν αναστέλλει την ανάπτυξή της ενώ, παρουσία φωτός, το OD αυξάνεται σημαντικά (Zachery *et al.* 2011) και

-στη Βραζιλία, μελέτη, σχετικά με την επιβίωση της *E. coli*, κάτω από την επίδραση των σκευασμάτων-φυτοφαρμάκων (DMA, Agimix, Siptran, Atranex, Herbitrim, Fusilade, Gliz, Roundup, Dual, Fortex, MSMA, Gramoxone, Padron, Tordon, Combine και Trifluralina), έδειξε πως όλα συντέλεσαν στην αύξησή της εκτός από το Paraquat, το οποίο ανέστειλε την ανάπτυξή της (Botelh *et al.* 2012).

Τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των μικροβιακών δεικτών, *E. coli*, *E. faecalis* και *S. typhi*, παρουσία μυκητοκτόνων, έχουν ξεχωριστή σημασία ως προς τη χρήση τους. Ένα από τα κριτήρια που θα πρέπει να πληροί ένας μικροβιακός δείκτης κοπρανώδους ρύπανσης είναι να βρίσκεται παρών στους ίδιους ή υψηλότερους αριθμούς από τα παθογόνα χωρίς πολλαπλασιασμό ή γενετική αλλαγή, ώστε να παρέχει λογική εκτίμηση στην παρουσίας παθογόνων και του πραγματικού ή δυνητικού κινδύνου στην υγεία.

Στη προκειμένη περίπτωση παρατηρήθηκε ότι η παρουσία των επιλεγμένων μυκητοκτόνων σε ένα ολιγοτροφικό περιβάλλον βοηθά στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό της *E. coli* και της *S. typhi* ενώ αναστέλλει την ανάπτυξη του *E. faecalis*, στις περισσότερες περιπτώσεις μάλιστα με στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το control ($p < 0.05$).

Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να διασπών-αποικοδομούν φυτοφάρμακα με σκοπό να χρησιμοποιήσουν αυτά ή τα προϊόντα διάσπασης αυτών ως πηγή ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών (Karaena 1988, Hang *et al.* 2001). Έρευνες έχουν δείξει ότι τα φυτοφάρμακα μπορούν να αποτελέσουν ένα ιδανικό περιβάλλον για την επιβίωση και την ανάπτυξη μικροοργανισμών, σε πολλές περιπτώσεις, παθογόνων (Ng *et al.* 2005).

Το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως μία αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και ως ικανότητα των συγκεκριμένων χημικών ενώσεων να διεισδύουν στο βακτηριακό κύτταρο, με επακόλουθο την προσαρμογή του μικροοργανισμού στο φυτοφάρμακο (Breazeale *et al.* 1972).

Μία πιθανή εξήγηση για τον τρόπο ανάπτυξης που εμφανίζουν τα *E. coli*, *E. faecalis* και *S. typhi*, παρουσία των τεσσάρων επιλεγμένων μυκητοκτόνων, θα ήταν η ικανότητα των μικροοργανισμών να αναπτύσσουν μηχανισμούς, διάσπασης του μυκητοκτόνου, με σκοπό τη επιβίωσή τους, χρησιμοποιώντας το ως πηγή ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών, στις κλειστές συνθήκες της ολιγοτροφικής φιάλης.

3.1.1. Βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια (VBNC)

Ο όρος βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα (Viable But Non Culturable) βακτήρια, αναφέρεται σε βακτήρια που η μεταβολική τους δραστηριότητα είναι σχεδόν ανύπαρκτη, δεν αναπτύσσονται, δε διαιρούνται αλλά είναι βιώσιμα.

Η κατάσταση αυτή αναγνωρίστηκε αρχικά από τη μικροβιολογική εξέταση βακτηριακών πληθυσμών σε φυσικά ιζήματα. Είναι γνωστό, για όσους ασχολούνται με τη μικροβιολογία περιβάλλοντος, ότι μεγάλα ποσοστά του μικροβιακού πληθυσμού που κατοικούν στους φυσικούς βιοτόπους εμφανίζονται να είναι μη καλλιεργήσιμα (Olivera 2000).

Κατά την αρίθμηση των βακτηριδίων που προέρχονταν από εδαφικά ή υδάτινα περιβάλλοντα, έχει παρατηρηθεί ότι πολύ λιγότερο από 1% των συνολικών βακτηριδίων, που παρατηρούνται από την άμεση μικροσκοπική εξέταση, μπορεί να αναπτυχθεί στα συνήθη χρησιμοποιούμενα υλικά. Επίσης, από καιρό ήταν γνωστό ότι στα φυσικά περιβάλλοντα ορισμένοι βακτηριακοί πληθυσμοί φαίνεται να "εξαφανίζονται" κατά τη διάρκεια ορισμένων εποχών, για να "επανεμφανιστούν" σε άλλες εποχές. Τώρα, έχει γίνει

κατανοητό ότι ένα μέρος της εξήγησης του φαινομένου αυτού δεν οφείλεται στον εποχιακό «θάνατο» των κυττάρων, αλλά στην είσοδό τους σε μία κατάσταση που συνηθέστερα καλείται «βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη» (VBNC, viable but nonculturable) (Oliver_b, 2005).

Τα βακτήρια αυτά ονομάζονται βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα και εισέρχονται στην κατάσταση αυτή συνήθως ως απάντηση στην πίεση κάποιων στρεσογόνων συνθηκών. Έχει αποδειχθεί ότι πολλά παθογόνα και μη παθογόνα βακτήρια μπορεί να εισέλθουν στην VBNC κατάσταση και αυτό έχει σημαντικές επιπτώσεις στην παθογένεια, στη βιοαποκατάσταση και σε άλλους τομείς της μικροβιολογίας (Colwell 2000).

Ο αριθμός των ειδών που εισέρχονται σε αυτή την κατάσταση αυξάνει σταθερά και μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περίπου 60 (Πίνακας Β.11.). Ανάμεσα σε αυτά συγκαταλέγονται και η *E. coli*, η *S.typhi* και ο *E. faecalis*, όπου σε πολλές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να είναι βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα (Oliver_c 2010).

Μετά τη 13^η μέρα είχαμε απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών της *S. typhi* στα επιλεγμένα υλικά στις συγκεντρώσεις των 0.1, 1, 10 και 100 µg/L. Εξαιτίας της απώλειας αυτής, εμβολιάστηκε 0.1 mL από τα διαλύματα της *S. typhi* σε τρυβλία TSA agar, που περιείχαν ξεχωριστά τα μυκητοκτόνα. Ύστερα από επώαση αυτών των τρυβλίων με το τροποποιημένο agar, στους 36 °C για 24-48 ώρες, επανεμφανίστηκαν οι αποικίες της *S. typhi*.

Μελέτες έδειξαν ότι ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών μπορεί να εισέλθει σε μία μη καλλιεργήσιμη κατάσταση (Koutsotoli_a et al. 2005, Koutsotoli_b et al. 2005) όπου τα μικροβιακά κύτταρα υφίστανται μία ποικιλία μορφολογικών και μεταβολικών αλλαγών στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης, στην πρωτεϊνική σύνθεση καθώς και στο ριβοσωμικό περιεχόμενο.

Όπως και στην περίπτωση της *S. typhi*, αρχικά παρατηρείται ελάττωση του μεγέθους των αποικιών τους και στη συνέχεια δεν μπορούν να καλλιεργηθούν στα συνηθισμένα υλικά, σύμφωνα με τις κλασικές τεχνικές (βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα). Εντούτοις, σε πολλές περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι, υπό κατάλληλες συνθήκες, αυτή η κατάσταση μπορεί να αντιστραφεί και τα βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα να γίνουν μεταβολικά ενεργά και πλήρως καλλιεργήσιμα (Sardessai 2005).

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Aquaspirillum</i> sp.	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Tenacibaculum</i> sp.
<i>Campylobacter lari</i>	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio campbellii</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Enterobacter. cloacae</i>	<i>Pasteurella piscida</i>	<i>Vibrio fischeri</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Vibrio natriegens</i>
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> (including	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Vibrio proteolytica</i>
EHEC)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Vibrio shiloi</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Vibrio vulnificus</i> (types 1&2)
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
		<i>Xanthomonas axonopodis</i>

Πίνακας Β.11. Βακτήρια για τα οποία έχει βρεθεί ότι εισέρχονται σε βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση (Oliver, 2010).

3.2. Μορφολογία

Οι αλλαγές που εμφανίστηκαν στη μορφολογία των αποικιών στα εκλεκτικά υλικά σχετίζονται τόσο με το σχήμα, το χρώμα, την υφή όσο και με τη συχνότητα εμφάνισης.

Σε πολλές περιπτώσεις, κατά την απομόνωση μικροοργανισμών από το περιβάλλον, παρατηρείται εμφάνιση άτυπων αποικιών στα εκλεκτικά υλικά, δηλαδή αποικιών με διαφορετικά χαρακτηριστικά (π.χ. χρώμα, σχήμα) (Rompreg *et al.* 2002).

Μελέτη που πραγματοποίησαν ο Rychert και ο Stephenson, κατά την απομόνωση κολοβακτηριδίων κοπρανόδους προέλευσης από υδάτινο περιβάλλον, με τη μέθοδο της διήθησης, μέσω μεμβράνης, έδειξε την εμφάνιση άτυπων *E. coli* σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% για το mFC agar και 60% για το MacConkey (Oliver_a 2000).

Στην παρούσα μελέτη κανένας μικροοργανισμός από το control δεν παρουσίασε αλλαγή στη μορφολογία των αποικιών στα εκλεκτικά υλικά. Οι αποικίες των *E. coli*, *S. typhi* και *E. faecalis*, που προέρχονταν από τις συγκεντρώσεις των μυκητοκτόνων, εμφανίζονταν στα εκλεκτικά υλικά μικρότερες σε μέγεθος και σημείωσαν τις προαναφερόμενες μορφολογικές αλλαγές.

Επίσης, κατά τη διάρκεια του πειράματος, παρουσιάστηκε σημαντική μείωση της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών της *E. coli* και του *E. faecalis* στα κλασικά υλικά, σε όλες τις συγκεντρώσεις από τα διαλύματα των μυκητοκτόνων. Ενώ η *S. typhi* σημείωσε πλήρη αναστολή ανάπτυξης στα υλικά Triple Sugar Iron, Xylose Lysine Decarboxylase και Gelose SS Salmonella Shigella.

Μορφολογικές αλλαγές, σε αποικίες βακτηρίων που απομονώθηκαν από επιφανειακά ύδατα, έχουν παρατηρηθεί και στο παρελθόν (Buck *et al.* 2004, Edwards *et al.* 1997). Δεν παύουν όμως να αποτελούν έκπληξη, εφόσον τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν θεωρούνται εκλεκτικά για την απομόνωση της *E. coli*, του *E. faecalis* και της *S. typhi* (Koneman *et al.* 1979) και χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια που πραγματοποιούν μικροβιολογικές αναλύσεις ρουτίνας για τον έλεγχο της ποιότητας του πόσιμου νερού.

Η *E. coli* ανήκει στα φωταυγή βακτήρια (*Luminescent bacteria*), τα οποία εκπέμπουν φως ως αποτέλεσμα μιας χημικής αντίδρασης κατά την οποία χημική ενέργεια μετατρέπεται σε φως ενέργειας. Με βάση αυτή την ιδιότητά της η *E. coli* χρησιμοποιείται ως δείκτης ρύπανσης του περιβάλλοντος από ακτινοβολία και χημικούς ρύπους (Nagvenkar *et al.* 2009). Στην παρούσα έρευνα η *E. coli* που αναπτύχθηκε στο Dodin και

στο Copper hydroxide έχασε την ιδιότητά της αυτή στο εκλεκτικό υλικό Mac Conkey Agar MUG.

Η αποτυχία στην προσμέτρηση των άτυπων αποικιών θα είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά λάθη στην εκτίμηση της ποιότητας του πόσιμου νερού που μπορεί να μας δώσει ο λόγος FC:FS (*Faecal Coliforms: Faecal Streptococci*) (Young *et al.* 1999, Baudišová 2009).

3.3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρατηρήθηκαν και αλλαγές στις βιοχημικές ιδιότητες των επιλεγμένων δεικτών. Οι αλλαγές αυτές παρατηρήθηκαν είτε απ' ευθείας μετά την καλλιέργειά τους στα εκλεκτικά υλικά είτε μετά από την ανάπτυξή τους στο τροποποιημένο, με την προσθήκη μυκητοκτόνου, υλικό.

Το control διατήρησε το βιοχημικό του προφίλ ως το τέλος της πορείας των πειραμάτων. Σε μερικές περιπτώσεις το βιοχημικό προφίλ δε διέφερε σημαντικά από το αρχικό ενώ σε άλλες περιπτώσεις είχαμε σημαντικές διαφορές όπως π.χ. αλλαγή στο γένος.

Στην *E. coli* οι σημαντικότερες βιοχημικές αλλαγές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν για τη συγκέντρωση των 100 µg/L στο Carbendazim, οι βιοχημικές αντιδράσεις των ONPG, LDC, ODC, SOR και RHA από θετικές έγιναν αρνητικές και οι αρνητικές ADH, SAC και AMY έγιναν θετικές. Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ, μετά από ταυτοποίηση με το API 20E σύστημα, φέρονταν να αντιστοιχεί, εκτός από την *E. coli*, σε δύο ακόμη διαφορετικά γένη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella spp* και *Erwinia spp*).

Η *Erwinia* είναι gram αρνητικό βακτηρίδιο που σχετίζεται με τα *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* και *Yersinia*. Η *Klebsiella* αποτελεί φυσικό άποικο της γαστρεντερικής οδού του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων, είναι ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο και αποτελεί μέλος της ομάδας των κολοβακτηριοειδών (*E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*). Τη συναντάμε στα οικιακά και βιομηχανικά λύματα, στο πόσιμο νερό, στο έδαφος, στα επιφανειακά ύδατα. Ανιχνεύεται δύσκολα αλλά μπορεί να οδηγήσει σε ένα ευρύ φάσμα νοσηρών καταστάσεων, κυρίως πνευμονία, λοιμώξεις του ουροποιητικού, σηψαιμία και λοιμώξεις μαλακών ιστών (Bagley 1985, Podschun *et al.* 1998).

Και οι δυο μικροοργανισμοί που ελήφθησαν ως αποτέλεσμα της βιοχημικής ταυτοποίησης, βλέπουμε ότι έχουνε πολλά κοινά και συσχετίζονται με την *E. coli*. Στις συγκεντρώσεις των 10 και 100 µg/L, στο Copper Hydroxide, οι βιοχημικές αντιδράσεις των RHA, MEL και ARA από θετικές έγιναν αρνητικές. Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ, μετά από ταυτοποίηση με το API 20E σύστημα, φέρονταν να αντιστοιχεί, εκτός από την *E. coli*, και στο γένος της *Pasteurella spp*.

Το βιοχημικό προφίλ του γένος της *Pasteurella spp* το ξανασυναντάμε στα στελέχη της *S. typhi* που απομονώθηκε από τις συγκεντρώσεις των 1, 10 και 100 µg/L του

Carbendazim. Οι αντιδράσεις των GLU και MEL από θετικές έγιναν αρνητικές και το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ φέρεται να αντιστοιχεί σε *Pasteurella spp.*

Οι βιοχημικές αντιδράσεις των ODC και RHA από αρνητικές εμφανίζονταν θετικές στις συγκεντρώσεις των 10 και 100 µg/L του Dodin. Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *S.choleraesuis*. Από τις συγκεντρώσεις των 10 και 100 µg/L του Ziram οι αντιδράσεις των SOR και MEL από θετικές έγιναν αρνητικές και του ARA από αρνητική έγινε θετική. Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *S. typhimurium*. Η *S. typhi*, η *S.choleraesuis* και η *S. typhimurium* είναι υποείδη του είδους *S. enterica*.

Μία πιθανή εξήγηση για τις αλλαγές του βιοχημικού προφίλ που εμφανίζουν οι υπό εξέταση μικροοργανισμοί, παρουσία των τεσσάρων επιλεγμένων μυκητοκτόνων, είναι η ικανότητα των φυτοφαρμάκων να διεισδύουν στο βακτηριακό κύτταρο και να αναπτύσσουν ενζυμικούς μηχανισμούς με σκοπό τη διάσπαση και τη χρησιμοποίησή τους ως πηγή ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών. Το ολιγοτροφικό περιβάλλον του πειράματος προσφέρεται για την παραπάνω κατάσταση, έχοντας ως αποτέλεσμα μικρο-ενζυμικές αλλαγές με «ψευδή» βιοχημικά προφίλ που δεν αντιπροσωπεύουν τον αρχικό μικροοργανισμό.

Στον *E. faecalis* οι σημαντικότερες βιοχημικές αλλαγές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν για τη συγκέντρωση των 1, 10 και 100 µg/L του Dodin, οι αντιδράσεις των ADH, LAC και AMD από θετικές έγιναν αρνητικές, στο Carbendazim οι αντιδράσεις των MAN και SOR από θετικές έγιναν αρνητικές. Στο Ziram στις συγκεντρώσεις των 10 και 100 µg/L η αντίδραση του AMD από θετική έγινε αρνητική και του ARA από αρνητική έγινε θετική και για τις συγκεντρώσεις του Copper Hydroxide η αντίδραση του SOR από θετική έγινε αρνητική. Τα βιοχημικά προφίλ, μετά από ταυτοποίηση με το API STREP σύστημα, φέρονταν να αντιστοιχούν, εκτός από τον *E. faecalis*, σε *E. avium*, *E. durans*, *E. faecium* και *L. lactis lactis*.

Ο *E. avium*, ο *E. durans* και ο *E. faecium* είναι βακτήρια της εντερικής χλωρίδας των ανθρώπων και των ζώων όπως και ο *E. faecalis*. Ανήκουν στο γένος *Enterococcus* και παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες τόσο στη μορφολογία των κυττάρων όσο και στη μορφολογία των αποικιών.

Πριν από το 1984, οι εντερόκοκκοι ήταν μέλη του γένους *Streptococcus*. Έτσι ο *E. faecalis* ήταν γνωστός ως *Streptococcus faecalis*, ο *E. durans* ήταν γνωστός ως *durans Streptococcus* (Schleifer_a et al. 1984, Murray 1990, Amyes 2007). Στην περίπτωση του *L. lactis lactis*, το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ένα gram θετικό βακτήριο που συγγενεύει

σημαντικά με τους στρεπτόκοκκους. Το 1923 ο David Hendricks Bergey κάνει την πρώτη δημοσίευση του *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, στην οποία το γένος *Streptococcus* περιλάμβανε και τα είδη από τα γένη των *Enterococcus* και *Lactococcus*. Με την πάροδο των χρόνων, το 1985 εκδίδεται το πιο εμπειρικό πλέον *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Παράλληλα, ο Schleifer και οι συνεργάτες του πρότειναν το γένος *Lactococcus* και σε αυτό περιέλαβαν και το είδος *L. lactis* που άλλοτε αποκαλούνταν *S. lactis*. Πολλές φορές μάλιστα έχει παρατηρηθεί ότι ταυτοποιείται, λανθασμένα, ως εντερόκοκκος ή στρεπτόκοκκος (Bergey's 1985, Wydau *et al.* 2006, Schleifer, *et al.* 1985, Goyache *et al.* 2001).

Τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών μας επιβεβαιώνουν ότι, σε πολλές περιπτώσεις, τα φυτοφάρμακα μπορεί να έχουν επιπτώσεις στις ενζυμικές λειτουργίες και στη βιοσύνθεση ορισμένων βακτηρίων (Guven *et al.* 2003, El-Said *et al.* 2005) κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

3.4. Ανθεκτικότητα στα Αντιβιοτικά

Μετά το 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο, στην πρακτική της μικροβιακής λοίμωξης, εφαρμόστηκε η χρήση των φαρμακευτικών παρασκευασμάτων (αντιβιοτικών). Με τον καιρό, εμφανίστηκε η γενική αντοχή των βακτηρίων στα αντιβιοτικά. Για την καταπολέμηση των λοιμώξεων, άρχισαν να χρησιμοποιούνται πολλαπλά αντιβιοτικά, περιμένοντας να αντιμετωπιστεί μια πιθανή παρουσία μεγάλης ανθεκτικότητας. Αυτή η κατάχρηση έχει συμβάλει στην αύξηση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων, στην ανάπτυξη της πολλαπλής ανθεκτικότητας, multidrug resistant (MDR), και στην εξάπλωση της ανθεκτικότητας μεταξύ των βακτηριακών ειδών (Watanabe 1963, Akiba *et al.* 1960, Datta 1962).

Η διερεύνηση της χρήσης των αντιβιοτικών περιλαμβάνει και την κτηνοτροφία για την πρόληψη, τη θεραπεία και την ανταγωνιστική αύξηση της παραγωγής. Το 2001 η Union of Concerned Scientists (UCS), μια μη κερδοσκοπική ερευνητική ομάδα, εκτιμά ότι περίπου το 70% όλων των αντιβιοτικών, που χρησιμοποιούνται στις ΗΠΑ, χορηγούνται ως πρόσθετα στις ζωοτροφές που δίνονται σε υγιείς χοίρους, πουλερικά και βοοειδή. Μεγάλο ποσοστό των αντιβιοτικών απεκκρίνονται από τα ζώα και καταλήγουν στο φυσικό περιβάλλον (www.ucsusa.org, Union of Concerned Scientists).

Διαπιστώθηκε ότι σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών σε ορισμένα περιβάλλοντα, όπως ιζήματα ποταμών, λιμνοθαλασσών, περιττώματα χοίρων εκτροφής και χώμα μπορεί να είναι αρκετές να επιταχύνουν τη διάδοση της ανθεκτικότητας. Τα βακτήρια, σε κάθε περιβάλλον που χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά, εξελίσσονται συνεχώς, ανταλλάσσουν τα γονίδια που παρέχουν την αντίσταση και είναι σε θέση να τη μεταφέρουν και σε άλλα βακτήρια που γίνονται ολοένα και πιο ανθεκτικά. Είναι ο νόμος της φυσικής επιλογής. Τα επικρατούντα γονίδια έχουν τότε τη δυνατότητα να διεισδύουν στο πόσιμο νερό, αυξάνοντας την ανθρώπινη έκθεση και την πιθανότητα ότι θα εξαπλωθούν (Schneider *et al.* 2009, Castanon *et al.* 2007).

Μελέτες έδειξαν πως η βιομηχανική ρύπανση φαίνεται, να έχει σχέση σε μερικές περιπτώσεις, με την αντοχή σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τα μέταλλα. Η συχνότητα της αντιβιοτικής αντοχής είναι υψηλή στα βαρέα μέταλλα και τα μεταλλομολυσμένα περιβάλλοντα. Έχει αποδειχθεί ότι τα γονίδια, που κωδικοποιούν την κληρονομικότητα της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και τα γονίδια αντίστασης που

κωδικοποιούν την αντίσταση στα μέταλλα, απαντώνται συχνά στα ίδια πλασμίδια ή στα κινητά γενετικά στοιχεία (Wireman *et al.* 1997, Wright 2010).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση των φυτοφαρμάκων στην ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *E. coli*, η *S. typhi* και ο *E. faecalis*, που απομονώθηκαν από τα διαλύματα των επιλεγμένων μυκητοκτόνων, γενικά, παρουσίασαν μικρές μεταβολές στα πέντε αντιβιοτικά.

Οι σημαντικότερες μεταβολές στην *E. coli* είναι αυτές με την αλλαγή στη ζώνη της ανθεκτικότητας, της χλωραμφαινικόλης για τα στελέχη από το copper hydroxide, της γενταμυκίνης για τα στελέχη από το Ziram και της τετρακυκλίνης για τα στελέχη από το Dodin. Οι μεταβολές στην αμπικιλίνη είναι στα πλαίσια της ανθεκτικότητας.

Στην *S. typhi* εμφανίστηκαν μικρές μεταβολές στην τετρακυκλίνη, στην χλωραμφαινικόλη και στην αμπικιλίνη, στη ζώνη της ευαισθησίας. Μεταβολή από τη ζώνη της ευαισθησίας στη ζώνη της ανθεκτικότητας εμφάνισε η γενταμυκίνη για τα στελέχη του Dodin.

Στην περίπτωση του *E. faecalis* ενδιαφέρον εμφανίζει η στρεπτομυκίνη με την αύξηση της ζώνης αναστολής για τα στελέχη του Carbendazine ως και τη ζώνη της ευαισθησίας για τα στελέχη του Dodin και του Ziram. Για την αμπικιλίνη και την τετρακυκλίνη οι μεταβολές ήταν στα πλαίσια της ζώνης ευαισθησίας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η συνύπαρξη μόλυνσης και ρύπανσης στα νερά είναι γεγονός συχνό και διαπιστωμένο.
2. Η συμπεριφορά των *E. coli*, *S. typhi* και *E. faecalis* σε ρυπασμένο, με τα μυκητοκτόνα Dodin, Carbendazim, Ziram και Copper Hydroxide έδειξε: Πίνακες B.10., B.11., B.12., B.13.
3. Τα μυκητοκτόνα μεταβάλλουν σημαντικά την ανάπτυξη, τη μορφολογία των αποικιών σε εκλεκτικά υποστρώματα, τις βιοχημικές ιδιότητες και την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά των μικροβιακών δεικτών μόλυνσης των υδάτων.
4. Η παρουσία των μυκητοκτόνων επηρεάζει τον αριθμό των μικροβιακών δεικτών - μικρές συγκεντρώσεις προκαλούν τη διέγερση του μικροβιακού πληθυσμού - κάτι που αποτελεί ένα πολύ σημαντικό κριτήριο για την επιλογή τους ως «δεικτών μόλυνσης των υδάτων». Συγκεκριμένα, δείχνουν να πολλαπλασιάζονται ενώ με την πάροδο του χρόνου χάνουν την ικανότητά τους να αναπτύσσονται στα κλασικά θρεπτικά υποστρώματα, με αποτέλεσμα να μην παρέχουν λογική εκτίμηση της παρουσίας παθογόνων βακτηρίων και του πραγματικού ή δυνητικού κινδύνου για τη δημόσια υγεία.
5. Σε ένα μολυσμένο-ρυπασμένο, φυσικό οικοσύστημα, οι σχέσεις είναι πολύπλοκες. Γενικά, με τα όρια των τιμών και με κλασικές τεχνικές, δεν μπορεί πάντα να εκτιμηθεί με ασφάλεια η ποιότητα των υδάτων. Θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη οι μολυσματικοί- ρυπαντικοί παράγοντες και οι φυσικοχημικές διεργασίες. Για να μην οδηγούμαστε, επομένως, σε ελλειπίς και λάθος εκτιμήσεις, θα ήταν ιδανική η δημιουργία ενός αλγορίθμου, ο οποίος θα περιλαμβάνει όλους τους φυσικοχημικούς παράγοντες που επιδρούν στο περιβάλλον.
6. Το νερό είναι ένας ευαίσθητος πόρος και η ρύπανση, που υφίστανται σήμερα τα υδάτινα οικοσυστήματα, είναι δυνατό να επηρεάσει πολλές γενεές, οι δε δείκτες ελέγχου της μικροβιολογικής ποιότητας των υδάτων αποτελούν έναν από τους βασικότερους παράγοντες για τη βιώσιμη διαχείρισή τους.
Άρα, η έρευνα και οι εφαρμογές της μπορούν να οδηγήσουν στην εξυγίανση των υδάτινων πόρων, προς όφελος ολόκληρης της ανθρωπότητας.

Επίδραση του *Dodin* στους μικροβιακούς δείκτες

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. faecalis</i>
Καμπύλη ανάπτυξης (short-term, long-term)	στατιστικά σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από τη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/L}$ όπου παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$)	στατιστικά σημαντική μείωση στη βροχυπρόδεσμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) στη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/L}$ ενώ στη μακροπρόδεσμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση	στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις
Μορφολογία αποικιών στα εκλεκτικά υλικά	αλλαγή στο mFC Agar, στο Tergitol 7 Agar και στο Mac-Conkey Agar-MUG	αλλαγή στο Bismuth Sulfite Agar και πλήρης αναστολή ανάπτυξης στα Triple Sugar Iron Agar, Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar και Gelose SS Salmonella Shigella Agar	αλλαγή στα Slanetz and Bartley και KF Streptococcus
Βιοχημικός χαρακτηρισμός - API 20E, 20 STREP	(-) GLU, (-) MEL, (-) RHA, (-) ARA	(+) ODC, (+) RHA, βιοχημικό προφίλ <i>S. choleraesuis</i> (95.5%)	(-) ADH, (-) LAC, (-) AMD, βιοχημικό προφίλ <i>E. faecalis</i> (45.7%) και <i>E. avium</i> (53%)
Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά – ζώνες αναστολής	αύξηση της ζώνης αναστολής στην Chloramphenicol και μείωση της ζώνης αναστολής στην Tetracyclin	μείωση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin, στην Chloramphenicol και στην Gentamicin	αύξηση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin, στην Streptomycin και στην Tetracyclin

Πίνακας Β.10. Επίδραση του *Dodin* στους μικροβιακούς δείκτες.

Επίδραση του Carbendazim στους μικροβιακούς δείκτες

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. faecalis</i>
Καμπύλη ανάπτυξης (short-term, long-term)	στατιστικά σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από τη συγκέντρωση των 100 µg/L όπου παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$)	στατιστικά σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις	στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις
Μορφολογία αποικιών στα εκλεκτικά υλικά	αλλαγή στο Mac-Conkey Agar-MUG και στο Chromocult	αλλαγή στο Bismuth Sulfite Agar και πλήρης αναστολή ανάπτυξης στα Triple Sugar Iron Agar, Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar και Gelose SS Salmonella Shigella Agar	αλλαγή στα Slanetz and Bartley και KF Streptococcus
Βιοχημικός χαρακτηρισισμός - API 20E, 20 STREP	(+) ADH, (-) MEL σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από τη συγκέντρωση των 100 µg/L όπου παρουσιάστηκε (-) ONPG, (-) LDC, (-) ODC, (-) SOR, (-) RHA, (+) ADH, (+) SAC, (+) AMY, βιοχημικό προφίλ <i>Klebsiella spp</i> (55.4%), <i>Erwinia spp</i> (26.8%) και <i>E. coli</i> (15.3%)	(-) GLU, (-) MEL, βιοχημικό προφίλ <i>Pasteurella spp</i> (75.3%)	(-) MAN, (-) SOR, βιοχημικό προφίλ <i>E. durans</i> (63%)
Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά – ζώνες αναστολής	αύξηση της ζώνης αναστολής στην Chloramphenicol	μείωση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin και στην Chloramphenicol	αύξηση της ζώνης αναστολής στην Streptomycin και στην Tetracyclin

Πίνακας Β.11. Επίδραση του Carbendazim στους μικροβιακούς δείκτες.

Επίδραση του Ziram στους μικροβιακούς δείκτες

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. faecalis</i>
Καμπύλη ανάπτυξης (short-term, long-term)	στατιστικά σημαντική μείωση στη βραχυπρόθεσμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) στις συγκεντρώσεις των 10 και 100 $\mu\text{g/L}$, στατιστικά σημαντική αύξηση στη μακροπρόθεμνη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$), στη συγκέντρωση των 0.1 $\mu\text{g/L}$ και στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$) στη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/L}$	στατιστικά σημαντική μείωση στη βραχυπρόθεσμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) στη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/L}$, στατιστικά σημαντική αύξηση στη μακροπρόθεμνη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$), στις συγκεντρώσεις των 0.1, 1, και 10 $\mu\text{g/L}$	στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις
Μορφολογία αποικιών στα εκλεκτικά υλικά	αλλαγή στο mFC Agar και στο m-Endo Agar Les	αλλαγή στο Bismuth Sulfite Agar και πλήρης αναστολή ανάπτυξης στα Triple Sugar Iron Agar, Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar και Gelose SS Salmonella Shigella Agar	αλλαγή στα Slanetz and Bartley και KF Streptococcus
Βιοχημικός χαρακτηρισισμός - API 20E, 20 STREP	(-) MEL, (-) GLU	(-)SOR, (-) MEL, (+) ARA, βιοχημικό προφίλ <i>S. typhimurium</i> (96.5%)	(-) AMD, (+) ARA, βιοχημικό προφίλ <i>E. faecalis</i> (42%) και <i>E. faecium</i> (55.3%)
Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά – ζώνες αναστολής	μείωση της ζώνης αναστολής στην Tetracyclin και στην Gentamicin	μείωση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin και στην Chloramphenicol και αύξηση της ζώνης αναστολής στην Tetracyclin	αύξηση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin, στην Tetracyclin και στην Streptomycin

Πίνακας Β.12. Επίδραση του Ziram στους μικροβιακούς δείκτες.

Επίδραση του Copper Hydroxide στους μικροβιακούς δείκτες

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. faecalis</i>
Καμπύλη ανάπτυξης (short-term, long-term)	στατιστικά σημαντική μείωση στη βραχυπρόθεσμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$), ίδια επίπεδα ανάπτυξης στη μακροπρόθεμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από τη συγκέντρωση του 0.1 μg/L όπου είχαμε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$)	στατιστικά σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις	στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις
Μορφολογία αποικιών στα εκλεκτικά υλικά	αλλαγή στο mFC Agar και στο MacConkey Agar-MUG	αλλαγή στο Bismuth Sulfite Agar και πλήρης αναστολή ανάπτυξης στα Triple Sugar Iron Agar, Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar και Gelose SS Salmonella Shigella Agar	αλλαγή στα Slanetz and Bartley και KF Streptococcus
Βιοχημικός χαρακτηρισισμός - API 20E, 20 STREP	(-) RHA, (-) MEL, (-) ARA, βιοχημικό προφίλ <i>Pasteurella spp</i> (85.3%) και <i>E. coli</i> (13.7%)	(-) MEL	(-) SOR, βιοχημικό προφίλ <i>E. faecalis</i> (60.1%) και <i>L. lactis lactis</i> (37%)
Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά – ζώνες αναστολής	μείωση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin και στην Chloramphenicol	μείωση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin και στην Chloramphenicol και αύξηση της ζώνης αναστολής στην Tetracyclin	αύξηση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin

Πίνακας Β.13. Επίδραση του Copper Hydroxide στους μικροβιακούς δείκτες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα πειραματική μελέτη διερευνώνται οι επιπτώσεις των μυκητοκτόνων Dodin, Carbendazim, Ziram και Copper Hydroxide στους μικροβιακούς δείκτες μόλυνσης των υδάτων *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* και *Salmonella typhi*.

Σύμφωνα με τη Νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο, για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκου στο πόσιμο νερό, είναι 0.1 μg/L ενώ για το σύνολο των ενώσεων αυτών είναι 0.5 μg/L.

Οι συγκεντρώσεις των φυτοφαρμάκων στα διαλύματα, που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη, ήταν στο ανώτερο επιτρεπόμενο όριο 0.1 μg/L (UPL) και $10 \times (1.0 \mu\text{g/L})$, $100 \times (10.0 \mu\text{g/L})$ και $1000 \times (100.0 \mu\text{g/L})$, πολλαπλάσια του UPL.

Οι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν στα διαλύματα των μυκητοκτόνων ελέγχθηκαν ως προς τη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξή τους, τη μορφολογία των αποικιών τους στα εκλεκτικά υλικά, τις βιοχημικές τους ιδιότητες και την ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά. Στους παρακάτω πίνακες καταγράφονται τα αποτελέσματα της πειραματικής πορείας (Πίνακες B.10, B.11, B.12, B.13.).

Η συμπεριφορά των μικροβιακών δεικτών, παρουσία των μυκητοκτόνων, εμφάνισε στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην καμπύλη ανάπτυξης, στη μορφολογία των αποικιών στα εκλεκτικά υλικά, στις βιοχημικές ιδιότητες και στην ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

Κατά συνέπεια, αποπροσανατολιστικά δεδομένα σχετικά με τους μικροβιακούς δείκτες της ρύπανσης του νερού εξαιτίας παρεμβολών, προερχομένων από τα φυτοφάρμακα, είναι δυνατό να οδηγήσουν σε ακατάλληλη νομοθεσία και οδηγίες και να συντελέσουν σε αναποτελεσματικές πρακτικές αναφορικά με την προστασία του περιβάλλοντος και του νερού.

Συμπερασματικά, διαφαίνεται ότι, πιθανόν, υπάρχει ανάγκη αλγορίθμων διόρθωσης, κατά τις εκτιμήσεις της ρύπανσης και της μόλυνσης του νερού, σε σχέση με τα συνυπάρχοντα βιοκτόνα ή και άλλους περιβαλλοντικούς ρύπους, όπως τα μέταλλα ή άλλοι περιβαλλοντικοί διαταράκτες.

Σε ένα μολυσμένο-ρυπασμένο, φυσικό οικοσύστημα, οι σχέσεις είναι πολύπλοκες. Γενικά, με τα όρια των τιμών και με κλασικές τεχνικές, δεν μπορεί πάντα να εκτιμηθεί με ασφάλεια η ποιότητα των υδάτων. Θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψην όλοι οι μολυσματικοί- ρυπαντικοί παράγοντες και οι φυσικοχημικές διεργασίες. Για να μην

οδηγούμαστε, επομένως, σε ελλειψείς και λάθος εκτιμήσεις, θα ήταν ιδανική η δημιουργία ενός αλγορίθμου, ο οποίος θα περιλαμβάνει όλους τους φυσικοχημικούς παράγοντες που επιδρούν στο περιβάλλον.

Το νερό είναι ένας ευαίσθητος πόρος και η ρύπανση, που υφίστανται σήμερα τα υδάτινα οικοσυστήματα, είναι δυνατό να επηρεάσει πολλές γενεές, οι δε δείκτες ελέγχου της μικροβιολογικής ποιότητας των υδάτων αποτελούν έναν από τους βασικότερους παράγοντες για τη βιώσιμη διαχείρισή τους.

Επίδραση του <i>Dodín</i> στους μικροβιακούς δείκτες		
	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>
<i>Καμπύλη ανάπτυξης (short-term, long-term)</i>	στατιστικά σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από τη συγκέντρωση των 100 µg/L όπου παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$)	στατιστικά σημαντική μείωση στη βραχυπρόθεσμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) στη συγκέντρωση των 100 µg/L ενώ στη μακροπρόθεσμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση
<i>Μορφολογία αποικιών στα εκλεκτικά υλικά</i>	αλλαγή στο mFC Agar, στο Tergitol 7 Agar και στο Mac-Conkey Agar-MUG	αλλαγή στο Bismuth Sulfite Agar και πλήρης αναστολή ανάπτυξης στα Triple Sugar Iron Agar, Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar και Gelose SS Salmonella Shigella Agar
<i>Βιοχημικός χαρακτηρισμός - API 20E, 20 STREP</i>	(-) GLU, (-) MEL, (-) RHA, (-) ARA	(+) ODC, (+) RHA, βιοχημικό προφίλ <i>S. choleraesuis</i> (95.5%)
<i>Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά – ζώνες αναστολής</i>	αύξηση της ζώνης αναστολής στην Chloramphenicol και μείωση της ζώνης αναστολής στην Tetracyclin	μείωση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin, στην Chloramphenicol και στην Gentamicin
		στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις
		αλλαγή στα Slanetz and Bartley και KF Streptococcus
		(-) ADH, (-) LAC, (-) AMD, βιοχημικό προφίλ <i>E. faecalis</i> (45.7%) και <i>E. avium</i> (53%)
		αύξηση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin, στην Streptomycin και στην Tetracyclin

Πίνακας Β.10. Επίδραση του Dodín στους μικροβιακούς δείκτες.

Επίδραση του Carbendazim στους μικροβιακούς δείκτες

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. faecalis</i>
Καμπύλη ανάπτυξης (short-term, long-term)	στατιστικά σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από τη συγκέντρωση των 100 µg/L όπου παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$)	στατιστικά σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις	στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις
Μορφολογία αποικιών στα εκλεκτικά υλικά	αλλαγή στο Mac-Conkey Agar-MUG και στο Chromocult	αλλαγή στο Bismuth Sulfite Agar και πλήρης αναστολή ανάπτυξης στα Triple Sugar Iron Agar, Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar και Gelose SS Salmonella Shigella Agar	αλλαγή στα Slanetz and Bartley και KF Streptococcus
Βιοχημικός χαρακτηρισμός - API 20E, 20 STREP	(+) ADH, (-) MEL σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από τη συγκέντρωση των 100 µg/L όπου παρουσιάστηκε (-) ONPG, (-) LDC, (-) ODC, (-) SOR, (-) RHA, (+) ADH, (+) SAC, (+) AMY, βιοχημικό προφίλ <i>Klebsiella spp</i> (55.4%), <i>Erwinia spp</i> (26.8%) και <i>E. coli</i> (15.3%)	(-) GLU, (-) MEL, βιοχημικό προφίλ <i>Pasteurella spp</i> (75.3%)	(-) MAN, (-) SOR, βιοχημικό προφίλ <i>E. durans</i> (63%)
Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά – ζώνες αναστολής	αύξηση της ζώνης αναστολής στην Chloramphenicol	μείωση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin και στην Chloramphenicol	αύξηση της ζώνης αναστολής στην Streptomycin και στην Tetracyclin

Πίνακας Β.11. Επίδραση του Carbendazim στους μικροβιακούς δείκτες.

Επίδραση του Ziram στους μικροβιακούς δείκτες

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. faecalis</i>
Καμπύλη ανάπτυξης (short-term, long-term)	στατιστικά σημαντική μείωση στη βραχυπρόθεσμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) στις συγκεντρώσεις των 10 και 100 $\mu\text{g/L}$, στατιστικά σημαντική αύξηση στη μακροπρόθεμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$), στη συγκέντρωση των 0.1 $\mu\text{g/L}$ και στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$) στη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/L}$	στατιστικά σημαντική μείωση στη βραχυπρόθεσμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) στη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/L}$, στατιστικά σημαντική αύξηση στη μακροπρόθεμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$), στις συγκεντρώσεις των 0.1, 1, και 10 $\mu\text{g/L}$	στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις
Μορφολογία αποικιών στα εκλεκτικά υλικά	αλλαγή στο mFC Agar και στο m-Endo Agar Les	αλλαγή στο Bismuth Sulfite Agar και πλήρης αναστολή ανάπτυξης στα Triple Sugar Iron Agar και Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar και Gelose SS Salmonella Shigella Agar	αλλαγή στα Slanetz and Bartley και KF Streptococcus
Βιοχημικός χαρακτηρισισμός - API 20E, 20 STREP	(-) MEL, (-) GLU	(-)SOR, (-) MEL, (+) ARA, βιοχημικό προφίλ <i>S. typhimurium</i> (96.5%)	(-) AMD, (+) ARA, βιοχημικό προφίλ <i>E. faecalis</i> (42%) και <i>E. faecium</i> (55.3%)
Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά – ζώνες αναστολής	μείωση της ζώνης αναστολής στην Tetracyclin και στην Gentamicin	μείωση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin και στην Chloramphenicol και αύξηση της ζώνης αναστολής στην Tetracyclin	αύξηση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin, στην Tetracyclin και στην Streptomycin

Πίνακας Β.12. Επίδραση του Ziram στους μικροβιακούς δείκτες.

Επίδραση του Copper Hydroxide στους μικροβιακούς δείκτες

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. faecalis</i>
Καμπύλη ανάπτυξης (short-term, long-term)	στατιστικά σημαντική μείωση στη βραχυπρόθεσμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$), ίδια επίπεδα ανάπτυξης στη μακροπρόθεμη ανάπτυξη ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από τη συγκεντρωσή του 0.1 mg/L όπου είχαμε στατιστικά σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$)	στατιστικά σημαντική αύξηση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις	στατιστικά σημαντική μείωση ($p \leq 0.05$) σε όλες τις συγκεντρώσεις
Μορφολογία αποικιών στα εκλεκτικά υλικά	αλλαγή στο mFC Agar και στο MacConkey Agar-MUG	αλλαγή στο Bismuth Sulfite Agar και πλήρης αναστολή ανάπτυξης στα Triple Sugar Iron Agar, Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar και Gelose SS Salmonella Shigella Agar	αλλαγή στα Slanetz and Bartley και KF Streptococcus
Βιοχημικός χαρακτηρισισμός - API 20E, 20 STREP	(-) RHA, (-) MEL, (-) ARA, βιοχημικό προφίλ <i>Pasteurella spp</i> (85.3%) και <i>E. coli</i> (13.7%)	(-) MEL	(-) SOR, βιοχημικό προφίλ <i>E. faecalis</i> (60.1%) και <i>L. lactis lactis</i> (37%)
Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά – ζώνες αναστολής	μείωση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin και στην Chloramphenicol	μείωση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin και στην Chloramphenicol και αύξηση της ζώνης αναστολής στην Tetracycline	αύξηση της ζώνης αναστολής στην Ampicillin

Πίνακας Β.13. Επίδραση του Copper Hydroxide στους μικροβιακούς δείκτες.

SUMMARY

This experimental study investigates the effects of the fungicides Dodin, Corbendazim, Ziram and Copper Hydroxide on the microbial indicators of water pollution *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Samonella typhi*.

According to the European Union legislation, the upper permissible limit, for pesticide residues in drinking water, is 0.1 mg/L whereas for the total of these compounds is 0.5 mg/L.

Pesticide concentrations in solutions, applied in this study, were in the upper permissible limit 0.1 mg/L (UPL) and at 10 x (1.0 mg/L), 100 x (10.0 mg/L) and 1000 x (100.0 mg/L), folds of the UPL.

Micro-organisms grown in fungicide solutions as above were examined regarding their short-term and long-term growth data, their morphology in selective materials, their biochemical properties and their resistance in antibiotics. Results of the experimental procedure are recorded in the following tables (Tables B.10, B.11, B.12, B.13.).

Microbial indicators behavior, in the presence of fungicides, presented statistically major changes in growth curve, colony forming morphology in selective materials, biochemical properties and antibiotic resistance.

Accordingly, misleading data on microbial indicators of water pollution due to pesticide originating interferences may produce inappropriate legislation and directives and result to ineffective practices regarding environmental and water protection.

Therefore it reveals that there may be need for correction factors, in estimating water pollution and contamination, in relation to coexisting biocides or even other environmental pollutants such as metals or other environmental disruptors.

Water is a sensitive resource and pollution, that aquatic eco-systems are subjected nowadays, may probably go on for generations. The control indicators of microbiological quality of water make up one of the most basic factors for their sustainable management.

Effect of Dodin on the microbial indicators

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. faecalis</i>
Growth curve (short-term, long-term)	statistically significant increase ($p \leq 0.05$) at all concentrations except the concentration of 100 µg/L where a statistically significant decrease was presented ($p \leq 0.05$)	statistically significant decrease on the short-term growth ($p \leq 0.05$) at the concentration of 100 µg/L while on the long-term growth ($p \leq 0.05$) at all concentrations a statistically significant increase was presented	statistically significant decrease ($p \leq 0.05$) at all concentrations
Morphology of colonies in the selective materials	change at the mFC Agar, at the Tergitol 7 Agar and Mac-Conkey Agar-MUG	change at the Bismuth Sulfite Agar and total growth suspension at the Triple Sugar Iron Agar, Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar and Gelose SS Salmonella Shigella Agar	change at the Slanetz and Bartley and KF Streptococcus
Biochemical characterization - API 20E, 20 STREP	(-) GLU, (-) MEL, (-) RHA, (-) ARA	(+) ODC, (+) RHA, biochemical profile <i>S. choleraesuis</i> (95.5%)	(-) ADH, (-) LAC, (-) AMD, biochemical profile <i>E. faecalis</i> (45.7%) and <i>E. avium</i> (53%)
Resistibility to antibiotics – inhibition zones	increase of the inhibition zone at Chloramphenicol and decrease of the inhibition zone at Tetracyclin	decrease of the inhibition zone at Ampicillin, at Chloramphenicol and Gentamicin	increase of the inhibition zone at Ampicillin, at Streptomycin and Tetracyclin

Table B.10. Effect of Dodin on the microbial indicators.

Effect of Carbendazim on the microbial indicators

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Growth curve (short-term, long-term)</i>	statistically significant increase ($p \leq 0.05$) at all concentrations except the concentration of 100 µg/L where α statistically significant decrease was presented ($p \leq 0.05$)	statistically significant increase ($p \leq 0.05$) at all concentrations	statistically significant decrease ($p \leq 0.05$) at all concentrations
<i>Morphology of colonies in the selective materials</i>	change at the Mac-Conkey Agar-MUG and the Chromocult	change at the Bismuth Sulfite Agar and total growth suspension at the Triple Sugar Iron Agar, Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar and Gelose SS Salmonella Shigella Agar	change at the Slanetz and Bartley and KF Streptococcus
<i>Biochemical characterization - API 20E, 20 STREP</i>	(+) ADH, (-) MEL at all concentrations except the concentration of 100 µg/L where we had (-) ONPG, (-) LDC, (-) ODC, (-) SOR, (-) RHA, (+) ADH, (+) SAC, (+) AMY, biochemical profile <i>Klebsiella spp</i> (55.4%), <i>Erwinia spp</i> (26.8%) and <i>E. coli</i> (15.3%)	(-) GLU, (-) MEL, biochemical profile <i>Pasteurella spp</i> (75.3%)	(-) MAN, (-) SOR, biochemical profile <i>E. durans</i> (63%)
<i>Resistibility to antibiotics – inhibition zones</i>	increase of the inhibition zone at Chloramphenicol	decrease of the inhibition zone at Ampicillin and Chloramphenicol	increase of the inhibition zone at Streptomycin and Tetracyclin

Table B.11. Effect of Carbendazim on the microbial indicators.

Effect of Ziram on the microbial indicators

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. faecalis</i>
Growth curve (short-term, long-term)	statistically significant decrease on the short-term growth ($p \leq 0.05$) at the concentrations of 10 and 100 µg/L, statistically significant increase on the long-term growth ($p \leq 0.05$), at the concentration of 0.1 µg/L and statistically significant decrease ($p \leq 0.05$) at the concentration of 100 µg/L	statistically significant decrease on the short-term growth ($p \leq 0.05$) at the concentration of 100 µg/L, statistically significant increase on the long-term growth ($p \leq 0.05$), at the concentrations of 0.1, 1 and 10 µg/L	statistically significant decrease ($p \leq 0.05$) at all concentrations
Morphology of colonies in the selective materials	change at the mFC Agar and the m-Endo Agar Les	change at the Bismuth Sulfite Agar and total growth suspension at the Triple Sugar Iron Agar, Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar and Gelose SS Salmonella Shigella Agar	change at the Slanetz and Bartley and KF Streptococcus
Biochemical characterization - API 20E, 20 STREP	(-) MEL, (-) GLU	(-) SOR, (-) MEL, (+) ARA, biochemical profile <i>S. typhimurium</i> (96.5%)	(-) AMD, (+) ARA, biochemical profile <i>E. faecalis</i> (42%) and <i>E. faecium</i> (55.3%)
Resistibility to antibiotics – inhibition zones	decrease of the inhibition zone at Tetracyclin and Gentamicin	decrease of the inhibition zone at Ampicillin and Chloramphenicol and increase of the inhibition zone at Tetracyclin	increase of the inhibition zone at Ampicillin, Tetracyclin and Streptomycin

Table B.12. Effect of Ziram on the microbial indicators.

Effect of Copper Hydroxide on the microbial indicators

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Growth curve (short-term, long-term)</i>	statistically significant decrease on the short-term growth ($p \leq 0.05$), same level of growth on the long-term growth ($p \leq 0.05$) at all concentrations except the concentration of 0.1 µg/L where a statistically significant increase was presented ($p \leq 0.05$)	statistically significant increase ($p \leq 0.05$) at all concentrations	statistically significant decrease ($p \leq 0.05$) at all concentrations
<i>Morphology of colonies in the selective materials</i>	change at the mFC Agar and the MacConkey Agar-MUG	change at the Bismuth Sulfite Agar and total growth suspension at the Triple Sugar Iron Agar, Xylose Lysine Decarboxylase XLD Agar and Gelose SS Salmonella Shigella Agar	change at the Slanetz and Bartley and KF Streptococcus
<i>Biochemical characterization - API 20E, 20 STREP</i>	(-) RHA, (-) MEL, (-) ARA, biochemical profile <i>Pasteurella spp</i> (85.3%) and <i>E. coli</i> (13.7%)	(-) MEL	(-) SOR, biochemical profile <i>E. faecalis</i> (60.1%) and <i>L. lactis lactis</i> (37%)
<i>Resistibility to antibiotics – inhibition zones</i>	decrease of the inhibition zone at Ampicillin and Chloramphenicol	decrease of the inhibition zone at Ampicillin and Chloramphenicol and increase of the inhibition zone at Tetracyclin	increase of the inhibition zone at Ampicillin

Table B.13. Effect of Copper Hydroxide on the microbial indicators.

VIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

Akiba T., Koyame K., Ishiki Y., Kumiras. *On the mechanism of the development of multiple drugresistance clones of shigella*, Japan, j. Microbiol. 4,219 1960.

Amyes SG. *Enterococci and streptococci*, Int. J. Antimicrob. Agents 29 Suppl 3 May 2007.

Arlene Blessing *The fate of pesticides in the environment Purdue Pesticide Programs, Pesticides and Water Quality: Principles, Policies, and Programs PPP-35 USA 2004.*

Bagley S. *Habitat association of Klebsiella species*, Infect Control 6 (2): 52–8. PMID 3882590 1985.

Balague C., Sturtz N, Duffard R, Evangelista de Duffard AM. *Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide on E. coli growth, chemical composition, and cellular envelope*, Environ Toxicol.16:43-53 2001.

Baudišová D. *Microbial pollution of water from agriculture*, PLANT SOIL ENVIRON. 55 (10): 429–435 2009.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Book Review, Int. J. of Syst. Bact. July 1985.

Botelh RG., Froes CM. and Santos JB. *Toxicity of herbicides on Escherichia coli growth*, Braz. J. Biol., vol. 72, no. 1, 2012.

Bradley DJ. *Health problems of water management*, J. Trop. Med Hyg 73,;286-289. 1987.

Breazeale FW., Camper ND. *Effect of selected herbicides on bacterial growth rates*, Appl Microbiol.23(2):431-432 Feb 1972.

Brown CL. and Hock WK. *The Fate of Pesticides in the Environment and Groundwater Protection*, by. Agrichemical Factsheet 8, Penn State Cooperative Extension 1990.

Buck O., Nyiogi DK., Townsend CR. *Scaledependent of land use effects on water quality of streams in agricultural catchments*, Environmental Pollution 130: 287–299 2004.

Castanon JI. *History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds*, Poult. Sci. 86 (11): 2466–71 2007.

Clemons GP. and Sisler H.D. *Localization of the site of action of a fungitoxic benomyl derivative*, Pest Biochem. and Physiol.1: 32-43. 1971.

Colwell RR. *Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy*, J Infect Chemother. 6(2):121-125 Jun 2000.

Council of the European Communities *Council directive of 15 July 1980 relating APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater*, 18th edn. Washington, DC: 1992.

Das AC., Chakravarty A., Sukul P., Mukherjee D. *Insecticides: their effect on microorganisms and persistence in rice soil*, Microbiol Res. 150(2):187-194, May 1995.

Datta N. *Transmissible drug resistance in an epidemic strain of Salmonella typhimurium*, J.Ityg. 60, 301-310, 1962.

Degremont *Water Treatment Handbook*, John Wiley & Sons Fifth Edition 1979.

Edwards DR., Coyne MS., Vendrell PF., Daniel TC., Moore PA. Jr., Murdoch JF. *Fecal coliform and Streptococcus concentrations in runoff from grazed pastures in northwest Arkansas*, Journal of the American Water Resources Association, 33: 413–422 1997.

El-Said AH, Abdel-Hafez SI, Saleem A. *Effect of herbizid and touchdown herbicides on soil fungi and on production of some extracellular enzymes*, Acta Microbiol Immunol Hung.52(1):105-130 2005.

EPA_a *Re-registration Eligibility Decision (RED) Document for Dodin*, United States Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides And Toxic Substances (7508C) EPA 738-R-05-013 September 2005.

EPA_b *Environmental Fate and Effects Division*, U.S. Environmental Protection Agency, Pesticide Environmental Fate One Line Summary for Triademifon, 1990.

EPA_c *Re-registration Eligibility Decision (RED) Document for Ziram*, United States Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides And Toxic Substances (7508C) EPA 738 -F-04-008 July 2004.

EPA_d *Re-registration Eligibility Decision (RED) Document for Coppers*, United States Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides And Toxic Substances (7508P) EPA 738-R-06-020 July 2006.

EXTOXNET_a *Toxicology Information Brief Movement of Pesticides in the Environment*, Michigan State University 1993.

EXTOXNET_b *Publication Pesticides by Group*, Michigan State University 1993.

EXTOXNET_c *Publication Dodine*, Michigan State University 1993.

EXTOXNET_d *Publication Carbendazim*, Michigan State University 1993.

EXTOXNET_e *Publication Ziram*, Michigan State University 1993.

Goyache J, Vela AI, Gibello A, et al. *Lactococcus lactis subsp. lactis infection in waterfowl: first confirmation in animals*, Emerg Infect Dis. 7(5):884-886 Sep-Oct 2001.

Guan TT, Blank G, Holley RA. *Survival of pathogenic bacteria in pesticide solutions and on treated tomato plant*, J Food Prot. 68(2):296-304 Feb 2005.

Guven K, Togrul S, Uyar F, Ozant S, De Pomerai DI. *A comparative study of bioassays based on enzyme biosynthesis in E. coli and Bacillus subtilis exposed to heavy metals and organic pesticides*, Enzyme Microb Technol. 32: 658–664 2003.

Hang M., Zhongyun C, Yuhua Z, Meichi C. *Effects of trifluralin on soil microbial populations and the nitrogen fixation activitie*, J Environ Sci Health B. 36(5):569-579 Sep 2001.

Harayama S., Timmis KN. *Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria*. In: Sigel H, Sigel A (eds) Metal ions in biological systems. Marcel Dekker, New York, Vol. 28, pp 99–156 1992.

Higgins James, Hohn Christina *Effects of prevalent freshwater chemical contaminants on in vitro growth of Escherichia coli and Klebsiella pneumonia*, Environmental Pollution 152 259e266 2008.

Howard P.H. *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals: Pesticides*, Lewis Publishers, Chelsea, MI4-20, 1989.

<http://europa.eu.ntt/comm./research/leaflets/antibiotics>

<http://www.environment.nsw.gov.au/envirom/waterqual.htm>

<http://www.environment.nsw.gov.au/envirom/waterqual.htm>.

<http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>.

<http://www.europa.eu.int/comm/environment/water/>

http://www.ucsus.org/food_and_agriculture/science_and_impacts/impacts_industrial_agriculture/

ISO/DIS 7899-2 *Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci- Part 2: Membrane filtration method.to the quality of water intended for human consumption (80/778/EEC)*. Official Journal of the European Communities L229.

ISO/DIS 9308-1 *Water quality - Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria- Part 1: Membrane filtration method*.

Jawetz E., Melnick J., Adelberg E. *Ιατρική Μικροβιολογία*, Τόμος Α, 16η Έκδοση, Επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Παρισσιανού Αθήνα 1985.

Karaeva N. *Effect of various herbicides on pathogenic microflora in outdoor reservoir water*, Gig Sanit.;8:24-6 1988.

Kidd H. and James DR. *The Agrochemicals Handbook*, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge (As Updated).10-2 UK 1991.

Koneman E., Allen S., Dowell V. and Sommers H. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, J.B.Lippincott Company Philadelphia 1979.

Koutsotoli, AD., Dimou DS., Alamanos YP., Maipa VE. *Inductive effects of environmental concentration of atrazine on Escherichia coli and Enterococcus faecalis*, Folia Microbiol (Praha) 50(4) 283-7 2005.

Koutsotoli, A., Dimou D., Bezirtzoglou E., Alamanos Y., Maipa V. *Long-term and short-term inducible effects of trifluralin on Escherichia coli and Enterococcus faecalis*, Microbial Ecology in Health and Disease 17(2) 121-127 2005.

Lopez L., Pozo C., Rodelas B., *et al.* *Identification of bacteria isolated from an oligotrophic lake with pesticide removal capacities*, Ecotoxicology 14(3):299-312, Apr 2005.

Maier RM., Pepper IL., Gerba CP. *Environmental Microbiology*, Academic Press 2000.

Meybeck M., Chapman D.V. and Helmer R. *Global Freshwater Quality*, A First Assessment, WHO and UNEP, B. Blackwell Ltd U.K. 1990.

Moser T. and Rombke R. *Effects of Carbendazim on the abundance of the Enchytraeid genera Achaeta, Enchytraeus and Fridericia in Terrestrial Model Systems and in the field*, Fifth International Colloquium on Enchytraedicae, Wageningen, www.dow.wau.nl/soil_quality/enchycol/moser.htm, April 2002.

Murray BE. *The life and times of the Enterococcus*, Clin Microbiol Rev 3 (1): 46-65 Jan 1990.

Nagvenkar GS. and Ramaiah N. *Abundance of sewage-pollution indicator and human pathogenic bacteria in a tropical estuarine complex*, Environ. Monit. Assess.: 155(1-4), 245-256, 2009.

National Committee for Clinical and Laboratory Standard *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, Eleventh Informational Supplement M100-S11 2001.

Ng PJ., Fleet GH, Heard GM. *Pesticides as a source of microbial contamination of salad vegetables*, Int J Food Microbiol.101(2):237-250 May 25 2005.

Oliver_a JD. *The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. In Microbial Biosystems: New Frontiers*, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Bell, C.R., Brylinsky, M and Johnson-Green, P. (eds). Halifax, Canada: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, 2000; 723–730.

Oliver_b JD. *The viable but nonculturable state in bacteria*, J Microbiol. 43 Spec No:93-100 Feb 2005.

Oliver_c JD. *Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria* FEMS Microbiol Rev 34 (4): 415–25 Jul 2010.

Pease HL. and Holt R.F. *Improved method for determining benomyl residues*, J. Assoc. Off. Agric. Chem. 54: 1399. 1971.

Pimentel D. *Ecological Effects of Pesticides on Nontarget Species*, Executive Office of the President's Office of Science and Technology, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 10-29,1971.

Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors*, Clin Microbiol Rev 11 (4): 589–603 1998.

Romppe A, Servais P, Baudart J, de-Roubin MR, Laurent P. *Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches*, J Microbiol Methods. 49(1):31-54 Mar 2002.

Rychert RC., Stephenson GR. *Atypical Escherichia coli in streams*, Appl Environ Microbiol. 41(5):1276-1278 May 1981.

Sardesai YN. *Viable but non culturable bacteria: their impact to public health*, Current Science, vol 89(10), 25 Nov 2005.

Schleifer_a KH. Kilpper-Balz R. *Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov.*, Int. J. Sys. Bacteriol. 34 : 31–34 1984.

Schleifer_b KH, Kraus J, Dvorak C. et al *Transfer of Streptococcus lactis and related streptococci to the genus Lactococcus gen*, Systematic and Applied Microbiology 6: 183–195 Nov. 1985.

Schneider K., Garrett L. *Non-therapeutic Use of Antibiotics in Animal Agriculture, Corresponding Resistance Rates, and What Can be Done About It*, Center for Global Development June 19 2009.

Smith GJ. *Toxicology and Pesticide Use in Relation to Wildlife: Organophosphorus and Carbamate Compounds*, Boca Raton, FL: CK. Smoley 1993.

Tucker R. and Crabtree D.G. *Handbook of Toxicity of Pesticides to Wildlife*, U.S. Department of Agriculture, Fish and Wildlife Service, Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 10-28,1970.

Union of Concerned Scientists, Executive summary from the UCS report, *Hogging It: Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock*, January 2010.

Vinogradov AE. *Measurement by flow cytometry of genomic AT/GC ratio and genome size*, Cytometry1;16(1):34-40 May 1994.

Watanabe T., *Infection resistance in bacteria*, Bact.Rev. 27, 87-115, 1963.

WHO_a *Guidelines for drinking-water quality*, third edition, Microbiological Aspects Session Objectives, 2004.

WHO_b *Guidelines for health-related monitoring of coastal recreational and shellfish areas: part II: bacterial indicator organisms*, Copenhagen DNK Titre 1994.

WHO_c *Water quality - Guidelines, standards and health: Assessment of risk and risk management for water-related infectious disease*, Edited by Lorna Fewtrell and Jamie Bartram 2001.

Wireman J., Liebert CA., Smith T., and Summers AO. *Association of mercury resistance with antibiotic resistance in gram-negative fecal bacteria of primates*, Appl. Environ. Microbiol. 63:4494-4503 1997.

Wright GD. *Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?*, Current opinion in microbiology 13(5): 589–94. Oct 2010.

Wydau S., Dervyn R, Anba J, Dusko Ehrlich S, Maguin E. *Conservation of key elements of natural competence in Lactococcus lactis ssp.*, FEMS Microbiol Lett. 257(1):32-42 Apr 2006.

Young KD., Thackston EL. *Housing density and bacterial loading in urban streams*, Journal of Environmental Engineering, 125: 1177–1180 1999.

Yurovskaya EM. *Behaviour and indicator value of some microorganisms under conditions of soil contamination by pesticides*, J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.19:10-6 1975.

Zachery R. Staley, Jason R. Rohr, and Valerie J. Harwood *Test of Direct and Indirect Effects of Agrochemicals on the Survival of Fecal Indicator Bacteria*, Applied And Environmental Microbiology p. 8765–8774 Vol. 77, No. 24, Dec. 2011.

Αλμπάνης^a Τ. *Ρύπανση και τεχνολογία προστασίας περιβάλλοντος*, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων 1999.

Αλμπάνης^b Τ. *Φυτοφάρμακα χρήση επιπτώσεις και νομοθεσία*, Ιωάννινα 1997.

Αντωνόπουλος Β. *Ποιότητα και Ρύπανση Υπόγειων Νερών*, Εκδόσεις Ζήτη Θεσσαλονίκη 2001.

Αρσένη^a Α. *Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση των λοιμώξεων*, τόμος 1, εκδόσεις ΖΗΤΑ Αθήνα 1994.

Αρσένη^b Α. *Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση*, Τόμος 2, Ιατρικές Εκδόσεις Ζήτη Αθήνα 1994.

Γανίδου ΜΚ. *Καταναλωτικά Βήματα*, Άρθρο της Γανίδου Μ. Κ. Χημικός(Βιολόγος Αυτοτελές Τμήμα Περιβάλλοντος ΥΜΑΘ), Τεύχος Μαρτίου - Απριλίου 2002.

Δημόπουλος Β. *Φυτοπροστατευτικά προϊόντα εκδόσεις*, Έμβρυο Αθήνα 1998.

Κατσουγιαννόπουλος Β. *Υγιεινή και κοινωνική ιατρική*, τόμος Α, εκδόσεις Κυριακίδη 1994.

ΚΥΑ Υ2/2600/2001 *Ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης* (ΦΕΚ 892/Β/11 892/Β/11-7-2001).

Λεγάκης ΝΙ. και Περόγαμβρος Τ.Η., *Αντιβιοτικά*, εκδόσεις Βαρβάκη Αθήνα 1990.

Νόμος 1650 *Για την προστασία του περιβάλλοντος* ΦΕΚ 160/α/16-10-1986

Παπαπετροπούλου^a Μ. *Δείκτες ελέγχου της μικροβιολογικής ποιότητας νερών κολύμβησης*, Acta Microbiologica Hellenica, Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρίας vol 4 N 4 July-August 2001.

Παπαπετροπούλου^b Μ. και Μαυρίδου Α. *Μικροβιολογία του υδάτινου περιβάλλοντος*, εκδόσεις Τραυλός-Κωσταράκη 1995.

Υγειονομική Διάταξη *Περί ποιότητας πόσιμου νερού σε εναρμόνιση οδηγίας 80/778/ΕΟΚ* ΦΕΚ 379/β/86-53/β/20.2.1986