



118

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

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

Διευθυντής: Ιωάννης Π.Α. Ιωαννίδης

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΥΓΧΡΟΝΩΝ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ
ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΥΔΑΤΩΝ**

Αλεξάνδρα Κουτσοτόλη
Χημικός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2006



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



Ημερομηνία αίτησης της κ. Κουτσοτόλη Αλεξάνδρας: 19-7-2000

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 422α/12-12-2000

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Μάϊτα -Στογιάννη, Επίκουρος Καθηγήτρια Υγιεινής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Ιωαννίδης Ιωάννης, Καθηγητής Υγιεινής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αλμπάνης Τριαντάφυλλος Καθηγητής Βιομηχανικής Χημείας Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 14-2-2001

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 589^α/3-10-2006

Αλμπάνης Τριαντάφυλλος,	Καθηγητής Βιομηχανικής Χημείας, Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ευαγγέλου Άγγελος,	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ιωαννίδης Ιωάννης,	Καθηγητής Υγιεινής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλφακάκου Βασιλική ,	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αγγελίδης Χαράλαμπος,	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αλαμάνος Ιωάννης,	Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής με ιδιαίτερη έμφαση στην επιδημιολογία, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μάϊτα -Στογιάννη,	Επίκουρος Καθηγήτρια Υγιεινής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 23-11-2006

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ρύπανση και μόλυνση είναι όροι που έχουν γίνει πλατιά γνωστοί ως αιτιολογικοί παράγοντες υποβάθμισης του περιβάλλοντος.

Ρύπανση είναι η ενεργειακή και σωματική επιβάρυνση του περιβάλλοντος που εκφράζεται ή γίνεται αντιληπτή σαν υποβάθμιση της βιόσφαιρας και υπολογίζεται ποιοτικά και ποσοτικά με τις επιπτώσεις και τα συμπτώματα που παρατηρούνται στη χλωρίδα, την πανίδα, τον αέρα, το έδαφος, το νερό, τον άνθρωπο.

Η μόλυνση του περιβάλλοντος χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη παθογόνων οργανισμών ή δεικτών που υποδηλώνουν έμμεσα τη δυνατότητα παρουσίας τέτοιων μικροοργανισμών ή χημικών ουσιών σε στοιχεία που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τον άνθρωπο, προξενώντας νοσογόνες καταστάσεις.

Το νερό, μετά τον αέρα, αποτελεί το πλέον αναντικατάστατο φυσικό αγαθό. Είναι κυρίαρχο στοιχείο της ζωής και αγαθό πρωταρχικής ανάγκης για την επιβίωση του ανθρώπου και των οικοσυστημάτων. Ο προβληματισμός σε παγκόσμιο επίπεδο για το νερό είναι έντονος. Η έλλειψη του αποτελεί ένα από τα πλέον ανησυχητικά προβλήματα της νέας χιλιετίας ενώ σε πολλές χώρες έχει φτάσει στα όρια της λειψυδρίας καθώς η ρύπανση, μειώνει ακόμα περισσότερο το κατάλληλο για χρήση νερό, και παράλληλα συντελεί στην καταστροφή των υδάτινων πόρων.

Στις περισσότερες περιπτώσεις η ρύπανση του νερού ξεκινά από την αστική και τη βιομηχανική δραστηριότητα της ξηράς και καταλήγει στις θάλασσες, στους ποταμούς και στις λίμνες.

Οι πιο τοξικοί όμως ρυπαντές στη βιόσφαιρα είναι τα διάφορα παρασιτοκτόνα και τα παραπροϊόντα τους. Οι ρύποι αυτοί απέκτησαν ιδιαίτερη σημασία μετά το Β Παγκόσμιο Πόλεμο λόγω της αυξημένης απελευθέρωσής τους στο περιβάλλον.

Στην παρούσα διατριβή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης της επίδρασης τεσσάρων (4) επιλεγμένων σύγχρονων ζιζανιοκτόνων (atrazine, EPTC, propanil, trifluralin) σε δυο (2) μικροβιακούς δείκτες μόλυνσης των υδάτων (*E. coli*, *Ent. faecalis*).

Η παρούσα έρευνα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το διάστημα 2001-2006.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στην Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Μάιρα Β. για την καθοδήγηση και συμπαράστασή της για την ολοκλήρωση της διατριβής καθώς και για την ηθική και επιστημονική στήριξή της.



Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Τρ. Αλμπάνη Καθηγητή Χημείας και κ. Ι. Ιωαννίδη Καθηγητή Υγιεινής-Επιδημιολογίας τόσο για την καθοδήγηση τους όσο και για την εποικοδομητική κριτική τους.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον Επικ. Καθηγητή Υγιεινής-Επιδημιολογίας κ. Ι. Αλαμάνο, μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις πολύτιμες παρατηρήσεις στην επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστώ τον Ευαγγέλου Άγγελο- Καθηγητή Φυσιολογίας, την Καλφακάκου Βασιλική- Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας και τον Αγγελίδης Χαράλαμπος- Επίκουρο Καθηγητή Βιολογίας που δέχτηκαν να είναι μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις τους.

Τέλος εκφράζω τις βαθύτατες ευχαριστίες στον κ Ανδρέα Τζάκο, Διδάκτορα του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, και στην συνεργάτιδα μου κα Δ. Δήμου, Υποψ. Διδάκτορα του εργαστηρίου Υγιεινής, της Ιατρικής Σχολής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων .

Ιωάννινα 2006



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Κατάλογος Πινάκων	xi
Κατάλογος Σχημάτων	xiii
Κατάλογος Συντομογραφιών	xv

Εισαγωγή	1
----------------	---

Α. Γ Ε Ν Ι Κ Ο Μ Ε Ρ Ο Σ

1. ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ.....	3
1.1. ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΝΕΡΟΥ.....	3
1.2. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΔΕΙΚΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ.....	4
1.3. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΠΙΛΕΧΘΕΝΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ	8
1.4. ΒΙΩΣΙΜΑ ΑΛΛΑ ΜΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΣΙΜΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	10
2. ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ.....	13
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
2.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ.....	15
2.3. ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ.....	17
2.4. Η ΤΥΧΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	19
2.5. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ – ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	22
2.6. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΧΘΕΝΤΩΝ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ.....	24
3. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	33
3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	33
3.2. ΟΜΑΔΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	34
3.3. ΓΕΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	35
3.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	35
3.5. ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	36
3.6. ΑΙΤΙΕΣ ΑΝΤΟΧΗΣ.....	36
3.7. ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.....	36



3.8. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ.....	37
3.9. ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ.....	38
3.10. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΠΙΛΕΧΘΕΝΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ.....	39

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός	41
2. Υλικά & Μέθοδοι	43
3. Στατιστική επεξεργασία	47
4. Αποτελέσματα	49
4.1 ATRAZINE.....	41
4.2 EPTC.....	56
4.3 TRIFLURALIN.....	63
4.4 PROPANIL.....	70
5. Συζήτηση	77
6. Συμπεράσματα	87

Γ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	89
-------------------	----

Δ. SUMMARY	91
------------------	----

Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93
-----------------------	----



Κατάλογος Πινάκων

Σελίδα

1. Βακτήρια για τα οποία έχει βρεθεί ότι εισέρχονται σε βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση.....	12
2. Ιστορική αναδρομή της χρήσης των παρασιτοκτόνων.....	14
3. Αντιβιοτικά κατά ομάδες βασικών χαρακτήρων της χημικής δομής τους.....	34
4. Ζώνες αναστολής των επιλεγμένων αντιβιοτικών.....	46



Κατάλογος Σχημάτων

Σελίδα

1. Τύχη των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον	19
2. Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της <i>E. coli</i> παρουσία atrazine.....	50
3. Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του <i>Ent. faecalis</i> παρουσία atrazine.....	51
4. Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων atrazine στην ανθεκτικότητα της <i>E. coli</i> στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	54
5. Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων atrazine στην ανθεκτικότητα του <i>Ent. faecalis</i> στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	55
6. Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της <i>E. coli</i> παρουσία EPTC.....	57
7. Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του <i>Ent. faecalis</i> παρουσία EPTC.....	58
8. Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων EPTC στην ανθεκτικότητα της <i>E. coli</i> στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	61
9. Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων EPTC στην ανθεκτικότητα του <i>Ent. faecalis</i> στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	62
10. Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της <i>E. coli</i> παρουσία trifluralin.....	64
11. Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του <i>Ent. faecalis</i> παρουσία trifluralin....	65
12. Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων trifluralin στην ανθεκτικότητα του <i>E. coli</i> στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	68
13. Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων trifluralin στην ανθεκτικότητα του <i>Ent. faecalis</i> στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	69
14. Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της <i>E. coli</i> παρουσία propanil.....	71
15. Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του <i>Ent. faecalis</i> παρουσία propanil....	72
16. Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων propanil στην ανθεκτικότητα της <i>E. coli</i> στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	75
17. Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων propanil στην ανθεκτικότητα του <i>Ent. faecalis</i> στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά.....	76



Κατάλογος Συντομογραφιών

βGAL: β-galactosidase
ADH: arginine dihydrolase
AMD: aminosidine
AMP: Αμπικιλίνη
ARA: arabinose
C: Χλωραμφαινικόλη
CFU: colony-forming units
CN: Γενταμικίνη
EPA: Environmental Protection Agency
ESC: esculin
EXTOXNET: Extension Toxicology Network
GLU: glucose
HIP: hippurate
IND: indole
LAC: lactose
LAP: leucine arylamidase
LDC: lysine decarboxylase
MAN: mannitol
MEL: melibiose
ODC: ornithine decarboxylase
ONPG: ortho-nitro-phenyl-galactoside
PAL: alkaline phosphatase
PYRA: pyrrolidonylarylamidase
RHA: rhamnose
RIB: ribose
S: Στρεπτομυκίνη
SOR: sorbitol
TE: Τετρακυκλίνη
TRE: trehalose
VP: Voges Proskauer
WHO: World Health Association



ΕΙΣΑΓΩΓΗ^[1-3]

Το νερό είναι απόλυτα συνυφασμένο με την ύπαρξη της ζωής σε όλες της τις μορφές και για τα θηλαστικά αποτελεί από ποσοτική άποψη το κύριο συστατικό, ίσως εξαιτίας των ιδιαίτερων φυσικοχημικών ιδιοτήτων του· μεταξύ των άλλων είναι άριστος διαλύτης και έχει μεγάλη ειδική θερμότητα.

Σύμφωνα με την ΚΥΑ Υ2/2600/2001 ως «πόσιμο» νερό νοείται το νερό που χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση, είτε στη φυσική του κατάσταση, είτε μετά από επεξεργασία, ανεξάρτητα από την προέλευση του και από το εάν παρέχεται από δίκτυο διανομής, από βυτίο ή συσκευασμένο σε φιάλες ή δοχεία και περιλαμβάνει:

- Το νερό που διατίθεται για ανθρώπινη κατανάλωση (πόση, μαγείρεμα, προπαρασκευή τροφής ή άλλες οικιακές χρήσεις).

- Το νερό που χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών για την παρασκευή, επεξεργασία, συντήρηση ή εμπορία προϊόντων ή ουσιών που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.

- Το νερό που εκπρεάζει τον τελικό βαθμό υγιεινής των τροφίμων και ποτών.

Η πρόσβαση σε καθαρό πόσιμο νερό αποτελεί θεμέλιο για τη Δημόσια Υγεία. Ακόμη και σε περιοχές όπου έχουν γίνει μεγάλες επενδύσεις για τη προστασία του πόσιμου νερού η ρύπανση αυτού αποτελεί μία σοβαρή απειλή τόσο για τον άνθρωπο όσο και για το περιβάλλον.

Τόσο το υπόγειο όσο και το επιφανειακό νερό (λίμνες, ποτάμια) χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση. Το χρησιμοποιούμενο νερό για ανθρώπινη κατανάλωση πρέπει να είναι από κάθε άποψη αβλαβές για την Υγεία των ανθρώπων, οργανοληπτικά άμεμπτο και απολύτως καθαρό, απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς και οποιεσδήποτε ουσίες σε αριθμούς και συγκεντρώσεις που δεν αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία.

Ακόμη και σήμερα που είναι γνωστή η σημασία την μικροβιολογικής καθαρότητας του νερού για τη Δημόσια Υγεία, ο αριθμός των λοιμώξεων εξακολουθεί να είναι μεγάλος.

Οι μικροοργανισμοί που εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον, εκτός των λοιμώξεων μεταδίδουν και την αντοχή τους στα αντιβιοτικά τόσο στους αυτόχθονες όσο και στους αλλόχθονες μικροοργανισμούς.



Η αναζήτηση των μικροοργανισμών στο νερό είναι εξαιρετικά δυσχερής λόγω των ενζυμικών, μεταβολικών και δομικών αλλαγών που υφίστανται στην προσπάθεια προσαρμογής τους στο υδάτινο περιβάλλον.

Η προστασία του πόσιμου νερού αποτελεί στόχο Εθνικής και Κοινοτικής πολιτικής και υπόκειται σε συμφωνίες υποχρεωτικού χαρακτήρα με σκοπό τη διατήρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του, ώστε να διασφαλίζεται η προστασία της Δημόσιας Υγείας.

Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ ορισμένων αποδεκτών ορίων, τα οποία αποτελούν και τα πρότυπα ποιότητας του νερού και θεσπίζονται νομοθετικά.



A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ

1.1 ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΝΕΡΟΥ⁽⁴⁹⁾

Το νερό για να χρησιμοποιηθεί ως πόσιμο, πρέπει να εξασφαλίζει ορισμένες προδιαγραφές οι οποίες χαρακτηρίζουν την καταλληλότητα του.

Για τον καθορισμό της ποιότητας του ύδατος χρησιμοποιούνται η παρουσία μολυσματικών παραγόντων και τα χαρακτηριστικά του ύδατος. Αυτοί οι δείκτες ποιότητας νερού μπορούν να ταξινομηθούν ως:

- *Βιολογικοί*: βακτηρίδια, άλγη
- *Φυσικοί*: θερμοκρασία, θολερότητα και διαύγεια, χρώμα, αλατότητα, αιωρούμενα στερεά, διαλυμένα στερεά
- *Χημικοί*: pH, διαλυμένο οξυγόνο, βιολογική απαίτηση οξυγόνου, θρεπτικές ουσίες (συμπεριλαμβανομένου του αζώτου και του φωσφόρου), οργανικές και ανόργανες ενώσεις (συμπεριλαμβανομένων των τοξικών προϊόντων)
- *Αισθητικοί*: μυρωδιές, κηλίδες, χρώμα, επιπλέοντα υλικά
- *Ραδιενεργοί*: άλφα, βήτα και γάμα εκπομπή ακτινοβολίας.

Οι μετρήσεις αυτών των δευκτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθορίσουν, και για να ελέγχουν τις αλλαγές την ποιότητα νερού, καθώς και για να καθορίζουν εάν η ποιότητα του είναι κατάλληλη για την υγεία του φυσικού περιβάλλοντος και γενικότερα για κάθε είδους χρήσης του.



1.2 ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΔΕΙΚΤΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ [6-8]

Εάν το νερό δεν είναι απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς, τότε είναι δυνατόν να γίνει το αίτιο μεταφοράς, διασποράς και μετάδοσης στον πληθυσμό παθογόνων μικροοργανισμών και επομένως να γίνει πρόξενος εκτεταμένων επιδημιών υδρικής προελεύσεως. Η μη ανεύρεση στο νερό παθογόνων μικροοργανισμών, δεν είναι και εγγύηση της καλής ποιότητας του.

Λεδομένου ότι θα ήταν σχεδόν αδύνατο η αναζήτηση παθογόνων μικροοργανισμών για τον έλεγχο ρουτίνας διότι για την απομόνωση τους απαιτούνται πολύπλοκες, χρονοβόρες και δαπανηρές εξετάσεις, η εκτίμηση της ποιότητας του νερού βασίζεται στις δοκιμές για την εύρεση των μικροβιακών δεικτών.

Ιδανικά, ο εντοπισμός των δεικτών, αποτελεί ένδειξη της παρουσίας περιττωματικής μόλυνσης και συνεπώς πιθανή παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό.

Οι δείκτες αυτοί είναι αλλόχθονοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι περνούν παροδικά μέσα στο υδάτινο οικοσύστημα, προερχόμενοι κυρίως από το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων.

Χρησιμοποιούνται επειδή είναι *ευκολότεροι* και *οικονομικότεροι* για εξέταση απ' ό,τι όλοι οι πιθανοί παθογόνοι μικροοργανισμοί που πιθανό να 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. Για αυτόν το λόγο, από την ευρεία ποικιλία των διαθέσιμων δεικτών κάθε ένας έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του, ενώ πρόκληση είναι να επιλεγεί ο κατάλληλος δείκτης, ή ο συνδυασμός δεικτών, για την κάθε ιδιαίτερη περίπτωση ελέγχου νερού.

Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα είναι περιττωματικής προέλευσης ή προέλευσης λυμάτων, και ακολούθως είναι μερικές από τις σημαντικότερες απαιτήσεις αυτών:

- Να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κάθε τύπο νερού και να παρουσιάζουν εξειδίκευση στην περιττωματική ρύπανση ή ρύπανση λυμάτων.

- Να βρίσκονται παρόντες στους ίδιους ή υψηλότερους αριθμούς από τα παθογόνα χωρίς πολλαπλασιασμό ή γενετική αλλαγή, ώστε να παρέχουν λογική



εκτίμηση της παρουσίας παθογόνων και του πραγματικού ή δυνητικού κινδύνου στην υγεία.

□ Τουλάχιστον τόσο ανθεκτικοί όσο τα παθογόνα στις συνθήκες περιβάλλοντος φυσικού ύδατος, και καθαρισμού και απολύμανσης ύδατος. Να πλησιάζουν τον βαθμό αντοχής σε απολυμαντικές ουσίες και περιβαλλοντικό στρες τον οποίο δείχνουν τα πιο ανθεκτικά από τα παθογόνα που δυνητικά είναι παρόντα σε σημαντικούς αριθμούς στην πηγή μόλυνσης.

□ Μη παθογόνοι

□ Ανηχνεύσιμοι με σχετικά εύκολες, γρήγορες και οικονομικές μεθόδους.

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι, σήμερα, δείκτες για τον έλεγχο της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή, τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή, η *E.coli*, οι Εντερόκοκκοι, οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι, οι κοινοί μεσόφιλοι μικροοργανισμοί ενώ σε ειδικές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ως δείκτες το *Cl. perfringens*, και η *Ps. aeruginosa*.

Ολικός αριθμός κοινών αερόβιων μικροβίων στους 37 °C και 22 °C. Αναφέρεται στους οργανισμούς που δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν το διοξείδιο του άνθρακα σαν 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 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 ποιότητας του, καθώς και της αποτελεσματικότητας της χλωρίωσης και της σωστής λειτουργίας του υδραγωγείου. Αυξομενώσεις 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 κ.λ.π.).

Ολικά κολοβακτηριοειδή (total coliforms). Ανήκουν στην οικογένεια των Εντεροβακτηριακών. Αναφέρεται στην ομάδα των gram-αρνητικών αερόβιων έως δυνητικά αναερόβιων, ραβδόμορφων βακτηρίων που δεν σχηματίζουν σπόρους και ζυμώνουν τη



λακτόζη στους 35°C σε 24 - 48 ώρες. Τυπικά γένη συναντώμενα στα δίκτυα νερού είναι τα *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Klebsiella*. Αυτοί οι οργανισμοί είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση και πολλοί ενδημούν στα έντερα των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Σε κανονικές συνθήκες θεωρούνται μη παθογόνοι.

Δεν θεωρούνται σαν ειδικοί δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης του νερού, δεδομένου ότι πολλά είδη είναι περιβαλλοντικής προέλευσης (έδαφος, φύλλα κ.λ.π.) Παρέχουν ενδείξεις για άλλης προέλευσης μικροβιακής μόλυνσης του νερού, συμπληρώνοντας έτσι τα στοιχεία που παρέχονται από άλλες παραμέτρους. Αποτελούν ενδεικτική παράμετρο εφόσον η απουσία ολικών κολοβακτηριοειδών από το νερό θεωρείται σαν η βάση για να θεωρηθεί κατάλληλο προς πόση.

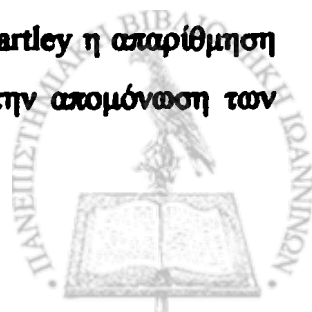
Κολοβακτηρίδια κοπράνων (fecal coliforms). Αναφέρεται στις θερμο-ανεκτικές μορφές της ομάδας των ολικών κολοβακτηριοειδών που ζυμώνουν την λακτόζη στους 44.5±0.2°C σε 24 ώρες. Τα *E.Coli* και *Klebsiella* είναι οι κύριοι οργανισμοί ενδιαφέροντος από την ομάδα αυτή, επειδή όταν είναι παρόντες δείχνουν ότι υπάρχει πρόσφατη, κοπρανώδους προέλευσης μόλυνση, συνοδευόμενη πιθανά από εντερικά παθογόνα.

Στρεπτόκοκκοι κοπράνων και εντερόκοκκοι (faecal streptococci, enterococci). Οι στρεπτόκοκκοι κοπράνων είναι μια ομάδα gram θετικών κόκκων που αναπτύσσονται σε bile esculin agar στους 45°C, ανήκουν στα γένη των εντεροκόκκων και των στρεπτόκοκκων και διαθέτουν το Group D αντιγόνο κατά Lancefield.

Τα προβλήματα στη διαφοροποίηση περιττωματική από τους μη-περιττωματικούς στρεπτοκόκκους, εντούτοις, εμπόδισαν αρχικά τη χρήση τους (Kenner 1978). Συγκεκριμένα τα τέσσερα βασικά σημεία που συνηγόρησαν υπέρ της χρήσης των στρεπτοκόκκων κοπράνων ήταν:

- (1) Σχετικά υψηλοί αριθμοί στα περιττώματα των ανθρώπων και θερμόαιμων ζώων.
- (2) Παρουσία σε απόβλητα και τα γνωστά μολυσμένα ύδατα.
- (3) Απουσία από τα καθαρά ύδατα, τα παρθένα χώματα και τα περιβάλλοντα που δεν έχουν καμία επαφή με την ανθρώπινη και ζωική ζωή.
- (4) Παρουσία στο περιβάλλον χωρίς πολλαπλασιασμό.

Το 1957, με τη διαθεσιμότητα του εκλεκτικού μέσου Slanetz και Bartley η απαρίθμηση τους έγινε δημοφιλής. Από τότε, έχουν προταθεί διάφορα υλικά για την απομόνωση των στρεπτοκόκκων κοπράνων και/ή των εντεροκόκκων.



Ταξινομικά αντιπροσωπεύονται από το διάφορα *Enterococcus* spp. και *Streptococcus* *bovis* και *S. equinus*. Από τους περιττωματικούς στρεπτόκοκκους, οι προτιμημένοι δείκτες της περιττωματικής ρύπανσης είναι οι εντερόκοκοι. Οι κυρίαρχοι εντερικοί εντερόκοκοι είναι *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* και ο *E. hirae*. Επιπλέον, άλλα είδη εντεροκόκκων και μερικά είδη στρεπτοκόκκου (συγκεκριμένα *S. bovis* και *S. equinus*) μπορούν περιστασιακά να ανιχνευθούν. Αυτοί οι στρεπτόκοκοι εντούτοις, δεν επιζούν για πολύ στο ύδωρ και πιθανώς δεν απαριθμούνται ποσοτικά. Κατά συνέπεια, για λόγους εξέτασης ύδατος οι εντερόκοκοι μπορούν να θεωρηθούν ως δείκτες της περιττωματικής ρύπανσης, αν και μερικοί θα μπορούσαν περιστασιακά να προέλθουν από άλλους βιότοπους.



1.3 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΠΙΛΕΧΘΕΝΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ^[5,9]

1.3.1 *Escherichia coli*

Ανήκει στα κολοβακτηριοειδή, συνεπώς είναι μέλος της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών. Θεωρείται ο βασικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης, τόσο του πρωτογενούς, όσο και του κατεργασμένου νερού.

Η απομόνωση της από δείγματα νερού, αποδευκνύει πέρα από κάθε αμφιβολία την πρόσμιξη του νερού με περιττωματικές ουσίες, υποδηλώνοντας ότι και οποιοσδήποτε άλλος μικροοργανισμός που τυχόν βρίσκεται στο έντερο των ανθρώπων και των ζώων μπορεί να εισχωρήσει στο νερό και κατ' επέκταση και παθογόνοι μικροοργανισμοί, επισημαίνοντας τους δυνητικούς κινδύνους μετάδοσης λοιμωδών νοσημάτων.

Αποτελεί το τυπικό μοντέλο για μελέτες μοριακής βιολογίας και γενετικής, φαινομένων αντοχής στα αντιβιοτικά, πλασμιδολογίας και ενζυμολογίας.

Είναι το πιο μελετημένο κύτταρο-οργανισμός γιατί αναπτύσσεται εύκολα σε απλά θρεπτικά μέσα και έχει ταχύτατο ρυθμό πολλαπλασιασμού.

Απομονώθηκε για πρώτη φορά από κόπρανα παιδιού το 1881, από το Γερμανό καθηγητή Escerich στον οποίο οφείλεται η ονομασία της. Είναι μονοκύτταρος οργανισμός ενώ το σχήμα της είναι ραβδόμορφο, διαμέτρου περίπου 1 μm και μήκους 2 μm. Είναι περίτριχο, κινούμενο, αλλά υπάρχουν και ακίνητα στελέχη. Το γενετικό της υλικό που είναι DNA δεν είναι οργανωμένο σε πυρήνα, αλλά διαθέτει πυρηνοειδές, το οποίο δεν περιορίζεται από πυρηνική μεμβράνη.

Η *E.coli* αποτελεί φυσικό ένοικο του εντέρου των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων, όπου μπορεί να υπάρχει σε μεγάλους αριθμούς (μέχρι και 10^9 /gt κοπράνων) και μπορεί να αντιπροσωπεύει το 95% των Εντεροβακτηριακών που ανευρίσκονται στα κόπρανα. Εμφανίζεται στον εντερικό σωλήνα τις πρώτες μέρες μετά τη γέννηση. Στο περιβάλλον αποβάλλεται μέσω των κοπράνων σε πολύ μεγάλο αριθμό και μπορεί να επιζήσει από μερικές ημέρες ή εβδομάδες χωρίς να αναπτύσσεται.

Τα χαρακτηριστικά επιβίωσης και η ευαισθησία της στα απολυμαντικά είναι όμοια με εκείνα πολλών παθογόνων μικροβίων, ιδιαίτερα δε με την Σαλμονέλα και την Σιγκέλλα.



1.3.2 Εντερόκοκκοι - *Enterococcus faecalis*

Από τους περιττωματικούς στρεπτόκοκκους, οι προτιμημένοι δείκτες της περιττωματικής ρύπανσης είναι οι εντερόκοκκοι. Το γένος των εντερόκοκκων περιλαμβάνει όλους τους στρεπτόκοκκους που έχουν σαν κοινό συγκεκριμένες βιοχημικές ιδιότητες και μια ευρεία ανθεκτικότητα σε δύσκολες συνθήκες ανάπτυξης. Διαφοροποιούνται από τους άλλους στρεπτόκοκκους βάσει της ικανότητας τους να αναπτύσσονται σε NaCl 6.5%, pH 9.6 στους 45 °C και περιλαμβάνουν τον *Ent. avium*, *Ent. faecium*, *Ent. durans*, *Ent. faecalis* και *Ent. gallinarum*.

Οι κυρίαρχοι εντερικοί εντερόκοκκοι είναι ο *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* και ο *E. hirae*. Συγκεκριμένα, ο *Ent. faecalis* 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.

Από άποψη μορφολογίας είναι Gram θετικοί κόκκοι ωοειδείς και διατάσσονται συνήθως κατά ζεύγη ή και σε αλυσίδες κοντές. Ο επιμήκης άξονας των κόκκων είναι παράλληλος προς τον επιμήκη άξονα της αλυσίδας.



1.4 ΒΙΩΣΙΜΑ ΑΛΛΑ ΜΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΣΙΜΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ^[10-13]

Τα τελευταία χρόνια, για όσους ασχολούνται με την μικροβιολογία περιβάλλοντος, είναι γνωστό ότι μεγάλα ποσοστά του μικροβιακού πληθυσμού που κατοικούν στους φυσικούς βιότοπους εμφανίζονται να είναι μη καλλιεργήσιμα.

Πράγματι, κατά την αρίθμηση των βακτηριδίων που προέρχονται 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 φαίνονται "να εξαφανίζονται" κατά τη διάρκεια ορισμένων εποχών, για "να επανεμφανιστούν" μόνο σε άλλους χρόνους. Τώρα καταλαβαίνουμε ότι τουλάχιστον μέρος της εξήγησης για αυτές τις παρατηρήσεις δεν οφείλεται στον εποχιακό «θάνατο» των κυττάρων, αλλά στην είσοδό τους μέσα σε μία κατάσταση που ο συνηθέστερα καλείται «βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη» (VBNC, viable but nonculturable).

Τα βακτήρια αυτά ονομάζονται βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα και εισέρχονται στην κατάσταση αυτή συνήθως σαν αντίδραση σε κάποιες στρεσογόνες γι' αυτά συνθήκες.

Δεν αποτελούν ένα καινούριο φαινόμενο για όσους ασχολούνται με τη μικροβιακή οικολογία. Για πολύ καιρό τα βακτηριακά κύτταρα αυτών των μικροοργανισμών θεωρούνταν και αποκαλούνταν νεκρά. Επίσης θεωρούνταν ότι ήταν αδύνατη η ανάπτυξη τους στα συνήθη χρησιμοποιούμενα υλικά. Εντούτοις, πολλές μελέτες έδειξαν ότι η κατάσταση ύπνου στην οποία εισέρχονται, είναι μία αντιστρεπτή κατάσταση χαμηλής μεταβολικής δραστηριότητας όπου τελικά σε πολλές περιπτώσεις καταφέρνουν να επανέλθουν και να αναπτυχθούν στην καλλιέργεια.

Ο αριθμός των ειδών που εισέρχονται σε αυτή τη κατάσταση αυξάνει σταθερά και μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περίπου 60 (Πίνακας 1). Ανάμεσα σε αυτά συγκαταλέγονται και η *E. coli* με τον *Ent. faecalis* όπου σε πολλές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να είναι βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα.

Τα τελευταία χρόνια ακόμη και οι μικροβιακοί δείκτες μόλυνσης των υδάτων βρίσκονται υπό αμφισβήτηση επειδή ένα μεγάλο ποσοστό τους δεν είναι δυνατό να αναπτυχθεί στα συνήθως χρησιμοποιούμενα για την καταμέτρηση τους θρεπτικά υλικά.



Η αποτυχία αυτή στη καταμέτρηση οδηγεί σε υποεκτίμηση του αριθμού των μικροοργανισμών αυτών και κατά συνέπεια στην ανακριβή εκτίμηση των συνεπειών επί της δημόσιας υγείας.



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

Πίνακας 1: Βακτήρια για τα οποία έχει βρεθεί ότι εισέρχονται σε βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση ^[11]



2. ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ^[14,19]

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για την ποιότητα του νερού που προορίζεται για πόση από τον άνθρωπο έχει αυξηθεί σημαντικά, κυρίως εξαιτίας της εκτεταμένης ρύπανσης των επιφανειακών ή υπογείων υδάτων από παρασιτοκτόνα που προέρχονται από συγκεκριμένες ή όχι πηγές, όπως είναι οι αγροτικές διαρροές. Η τοξικότητα των παρασιτοκτόνων και των παραγώγων τους καθιστούν την ρύπανση του νερού που προκαλείται από αυτές τις χημικές ουσίες ως ένα πιθανό περιβαλλοντικό κίνδυνο.

Τα παρασιτοκτόνα χρησιμοποιούνται σε όλο τον κόσμο για να αυξήσουν την παραγωγή συγκομιδών. Ως παρασιτοκτόνα (pesticides) ή φυτοφάρμακα ή γεωργικά φάρμακα ορίζονται οι χημικές ουσίες ή τα μίγματα χημικών ουσιών, που προορίζονται για να αποτρέψουν, να μετριάσουν ή να σταματήσουν τη δράση των παρασίτων (pests).

Αναπτύχθηκαν τα τελευταία εξήντα περίπου χρόνια. Το 1942 ο Ελβετός Muller ανακαλύπτει το DDT, ενώ το 1946 τα εργαστήρια της εταιρίας φαρμάκων BAYER κατασκευάζουν το παραθείο. (Πίνακας 2).

Τα πρώτα χρόνια της ανακάλυψής τους, η συμβολή τους στην προστασία της αγροτικής παραγωγής, γέννησε πολλές ελπίδες για τη λύση του προβλήματος τροφής που αντιμετώπιζε η ανθρωπότητα με την αύξηση του πληθυσμού. Ταυτόχρονα η προσφορά τους ήταν μεγάλη και στην προστασία της δημόσιας υγείας με την καταπολέμηση ενοχλητικών εντόμων, που έφεραν διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο ανοίγοντας νέους ορίζοντες στη βελτίωση της ποιότητας της ανθρώπινης ζωής.

Όμως πολλές από τις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν εύκολα βιοαποικοδομήσιμες με αποτέλεσμα να αρχίσει η συσσώρευση τους στη φύση. Για παράδειγμα, η ανθεκτικότητα των οργανοχλωριομένων παρασιτοκτόνων στο περιβάλλον ήταν γνωστή από τις πρώτες εφαρμογές των προϊόντων, η υπολειμματική τους όμως δράση και οι επιπτώσεις τους στο περιβάλλον ανακαλύφθηκαν αργότερα.

Έτσι, η διαδεδομένη χρήση των παρασιτοκτόνων στις καλλιέργειες έχει και εξακολουθεί να έχει ως αποτέλεσμα τη ρύπανση του περιβάλλοντος και συχνά οδηγεί στην παρουσία τους τόσο στα γλυκά νερά όσο και στα θαλάσσια παράκτια περιβάλλοντα.

Σήμερα ούτε η επιστήμη ούτε και οι ίδιες οι βιομηχανίες παραγωγής φυτοφαρμάκων δεν αμφισβητούν τις αρνητικές επιπτώσεις τους στο οικοσύστημα. Γίνεται προσπάθεια ώστε να



παρθούν μέτρα για την καλύτερη αξιοποίησή τους, ελαχιστοποιώντας τις αρνητικές τους συνέπειες παρ' όλα αυτά η αλόγιστη χρήση έχει γίνει πλέον καθημερινή πράξη.

Περίοδος	Παράδειγμα	Πηγή	Χαρακτηριστικά
1800-1920	Αρχικές οργανικές ενώσεις, νιτρο-φαινόλες, χλωρο-φαινόλες, κρεόσωτο (υγρό έντονης οσμής από απόσταξη πίσσας) ναφθαλίνιο, λάδια πετρελαίου	Οργανική χημεία, παραπροϊόντα	Συχνή έλλειψη εξειδίκευσης. Ήταν τοξικά για τον χρήστη, και για οργανισμούς που δεν αποτελούσαν στόχο.
1945-1955	Χλωριωμένες οργανικές ενώσεις, DDT, HCH, χλωριωμένα κυκλοδιένια	Οργανική σύνθεση	Διάρκεια, καλή εκλεκτικότητα, καλές γεωργικές ιδιότητες, καλή επίδοση στη δημόσια υγεία, ανθεκτικότητα, βλαβερές οικολογικές επιδράσεις
1955-1970	Αναστολείς της χολινεστεράσης, οργανοφωσφορικές ενώσεις, καρβαμίδια	Οργανική σύνθεση, σωστή χρήση της σχέσης δομή - δράση	Μικρότερη διάρκεια, μερική τοξικότητα στον χρήστη, μερικά περιβαλλοντικά προβλήματα
1970-1985	Συνθετικά πυρεθρινοειδή,	Ξεκαθάρισμα στη σχέση δομή - δράση, νέα συστήματα στοχεύονται	Μερική έλλειψη στην εκλεκτικότητα, ανθεκτικότητα, κόστος και ποικιλία στη διάρκεια
1985-	Γενετικά μεταλλαγμένοι οργανισμοί	Μεταφορά γονιδίων για βιολογικά φυτοφάρμακα σε άλλους οργανισμούς και σε χρήσιμα φυτά και ζώα. Γενετικές τροποποιήσεις των φυτών να αντέχουν σε επιδράσεις φυτοφαρμάκων που δεν αποτελούν στόχο	Πιθανά προβλήματα με μεταλλάξεις και διαρροές, αναστάτωση μικροβιολογικής οικολογίας, μονοπώλιο σε προϊόντα

Πίνακας 2: Ιστορική αναδρομή της χρήσης των παρασιτοκτόνων ^[15]



2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΣΠΟΚΤΟΝΩΝ

Η κληθέρα ουσιών και σκευασμάτων των παρασποκτόνων οδήγησε στην ανάγκη ταξινόμησης αυτών σε διάφορες κατηγορίες. Η ταξινόμηση βασίζεται στις παρακάτω ιδιότητες και χαρακτηριστικά τους.

2.2.1 Ανάλογα με τη χημική τους δομή

Το κλήθος των φυτοφαρμάκων μπορεί να καταταχθεί σε διάφορες χημικές ομάδες ανάλογα με την δραστική ουσία που περιέχουν και οι κυριότερες απ' αυτές είναι :

- α) χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες
- β) οργανοφωσφορικοί εστέρες
- γ) καρβαμικά και αλειφατικά οξέα και οι εστέρες τους
- δ) ενώσεις των χλωρο- και αμινο- τριαζινών
- ε) ενώσεις της ομάδας των ουριών και των ανιιδίων
- στ) κυρεθρινοειδή και φυσικές κυρεθρίνες
- ζ) φερομόνες
- η) ανόργανα άλατα των μετάλλων As, Zn, Cu κ.α.

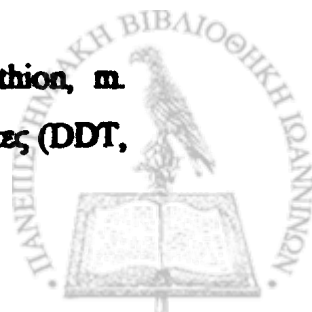
2.2.2 Ανάλογα με τη βιολογική τους δράση

Τα παρασποκτόνα ανάλογα με τη βιολογική τους δράση ταξινομούνται σε εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, ακαρεοκτόνα, αφιδοκτόνα, νηματοκτόνα, μαλακιοκτόνα, τρωκτοκτόνα, βακτηριοκτόνα, φερομόνες και ρυθμιστές αύξησης των φυτών.

Τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι τα ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα ενώ ακολουθούν τα μυκητοκτόνα.

Ζιζανιοκτόνα (herbicides): είναι ενώσεις χλωριωμένων υδρογονανθράκων (2,4-D, 2,4,5-T, trifluralin, δεγλκροδιφαινύλια κ.α.) και των ομάδων της τριαζίνης και της ουρίας (proprazine, simazine, atrazine, monuron, fenuron, diuron, linuron κ.α.).

Εντομοκτόνα (insecticides): είναι κυρίως οργανοφωσφορικοί εστέρες (parathion, malathion, azinphos methyl, phosphamidon κ.α.), χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες (DDT,



lindane, dieldrin, heptachlor, chlordane κ.α.), καρβαμιδικές ενώσεις (carbaryl, carbofuran, barban κ.α.) και πυρεθρίνες.

Μυκητοκτόνα (fungicides): είναι κυρίως καρβαμιδικές ενώσεις (captan, ferbam, nabam κ.α.) και εστέρες αλειφατικών οξέων (TCA, dalapon κ.α.).



2.3 ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΑ^[14-18]

Τα ζιζανιοκτόνα χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των ζιζανίων, δηλαδή φυτών που φυτρώνουν σε ανεπιθύμητα σημεία και αποτελούν την σημαντικότερη κατηγορία φυτοφαρμάκων.

2.3.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ

Όπως και στην περίπτωση των παρασιτοκτόνων έτσι και για τα ζιζανιοκτόνα η πληθώρα ουσιών και σκευασμάτων που κυκλοφορεί οδήγησε στην ανάγκη ταξινόμησης τους σε διάφορες κατηγορίες βάσει διαφόρων ιδιοτήτων και χαρακτηριστικών τους:

Χημική ομάδα. Το πλήθος των ζιζανιοκτόνων μπορεί να καταταχθεί σε διάφορες χημικές ομάδες ανάλογα με την δραστική ουσία που περιέχουν και οι κυριότερες από αυτές είναι: φαίνοξυ-οξέα, βενζοϊκά οξέα, τριαζίνες, φαίνυλ-ουρίες, χλώρο-ακεταμίδια και ανιλίδια, δινίτρο-ανιλίνες, θειοκαρβαμιδικόι εστέρες, διυριδιλία.

Τοξική δράση. Η ιδιότητα αυτή αναφέρεται στον τρόπο δράσης ενός ζιζανιοκτόνου, δηλαδή στο μηχανισμό μέσω του οποίου δρα σε υποκυτταρικό επίπεδο και στο εύρος δράσης του, δηλαδή τον αριθμό και τα είδη των παρασίτων στα οποία μπορεί να εκδηλώσει την τοξική δράση. Οι μηχανισμοί τοξικής δράσης των διαφόρων ζιζανιοκτόνων διαφέρουν σημαντικά και συνδέονται άμεσα με τη δομή του μορίου τους και τις φυτικοχημικές τους ιδιότητες. Συνήθως παρεμποδίζουν:

- Τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης
- Βιοχημικά συστήματα παραγωγής
- Διάφορες βιοσυνθέσεις
- Τη δράση των φυτορμονών
- Τη λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών
- Την κυτταρική διαίρεση



Τρόπο εφαρμογής. Διακρίνονται σε

- προφυτευτικά (όταν εφαρμόζονται πριν τη σπορά ή τη φύτευση)
- προ-φυτρωτικά (όταν εφαρμόζονται μετά τη σπορά και πριν το φύτερωμα)
- μετα-φυτρωτικά (όταν εφαρμόζονται μετά το φύτερωμα).

Τρόπο πρόσληψης και δράσης. Διακρίνονται σε

- επαφής τα οποία εφαρμόζονται στη φυλλική επιφάνεια και νεκρώνουν μόνο τα μέρη του ζιζανίου με τα οποία έρχονται σε επαφή
- διασυστηματικά τα οποία εφαρμόζονται στο φύλλωμα, απορροφώνται και μετακινούνται μέσα στο φυτό με το ανοδικό ή σπανιότερα με το καθοδικό ρεύμα χυμών και δρουν αντίστοιχα στα ακραία μερστώματα και τα ριζώματα ή τους κονδύλους των ζιζανίων
- εδάφους τα οποία εφαρμόζονται στο έδαφος και εμποδίζουν τη βλάστηση των σπόρων των ζιζανίων για μικρό ή μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ανάλογα με την υπολειμματικότητα τους.

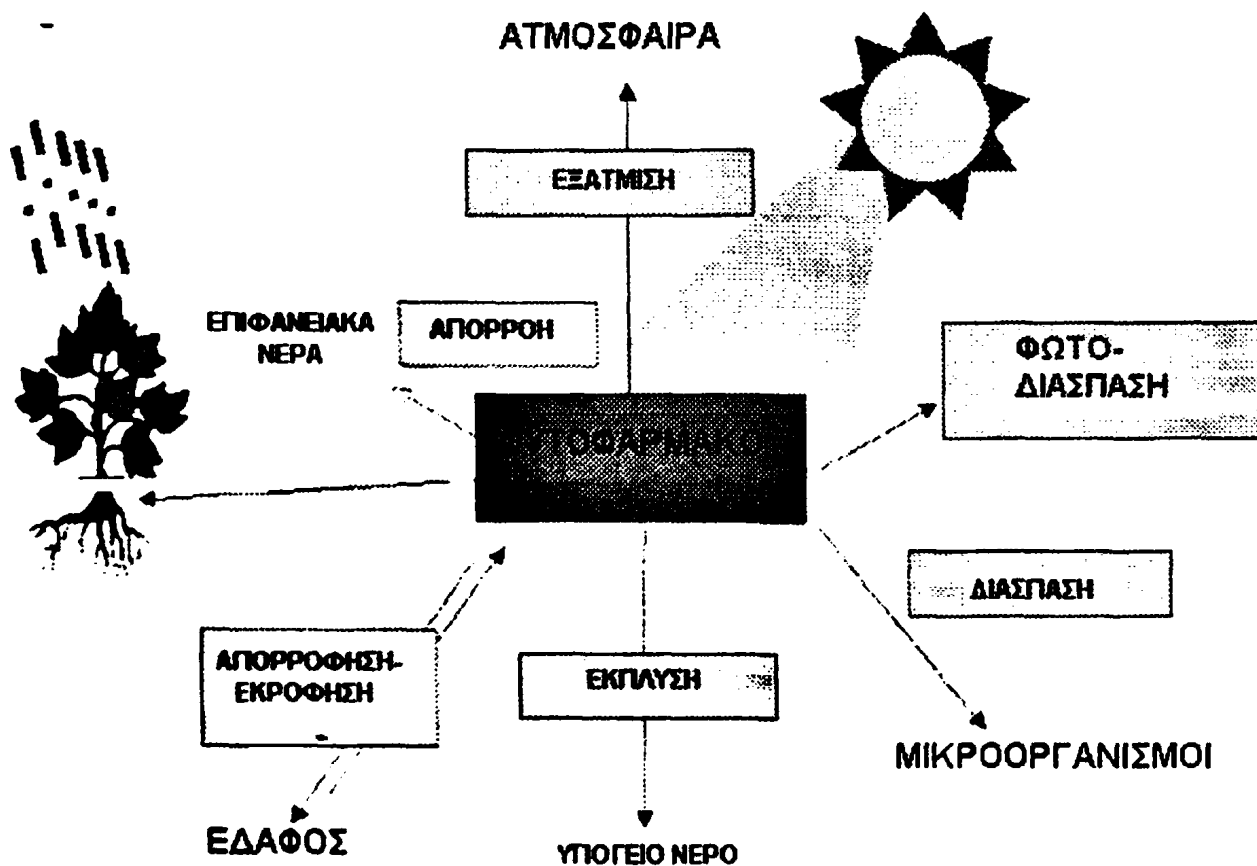
Εκλεκτικότητα. Διακρίνονται σε

- καθολικά αν καταπολεμούν όλα τα φυτά.
- εκλεκτικά αν καταπολεμούν μερικά από τα φυτά



2.4 Η ΤΥΧΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ^[17,19-21]

Από τη στιγμή που ένα φυτοφάρμακο βρεθεί στο περιβάλλον, είτε άμεσα μετά την εφαρμογή του αλλά και έμμεσα λόγω ατυχήματος σε σημειακές πηγές, όπως εργοστάσια παραγωγής και αποθήκες που βρίσκονται κοντά στους επιφανειακούς αποδέκτες υφίστανται μια σειρά διαδικασιών φυσικών, χημικών και βιολογικών (υδρόλυση, οξείδωση, διάσπαση, μεταφορά, εξάτμιση, ριζική πρόσληψη από τα φυτά κ.α.) οι οποίες και καθορίζουν την τελική του τύχη στο περιβάλλον (Σχήμα 1).



Σχήμα 1 Τύχη των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον ^[21]



Καθοριστικός είναι επίσης ο ρόλος των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των φυτοφαρμάκων στην 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.

Έτσι αρχίζουν να ρυπαίνουν το έδαφος, τα νερά των ποταμών, των λιμνών και των θαλασσών, ενώ μπορούν να εμφανιστούν και σε επικίνδυνες συγκεντρώσεις στα τρόφιμα και τα λιπαρά μέρη του ανθρώπινου σώματος).

Οι αλληλεπιδράσεις των φυτοφαρμάκων με εδάφη, επιφανειακά και υπόγεια ύδατα είναι πολύπλοκες. Η τύχη τους ελέγχεται από πολυάριθμες ταυτόχρονες βιολογικές, φυσικές και χημικές αντιδράσεις.

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

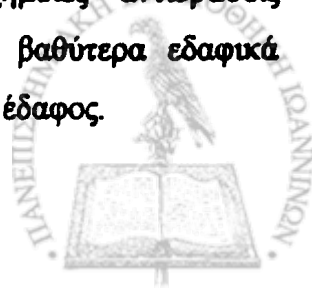
Ο μετασχηματισμός (*transformation*) αναφέρεται σε βιολογικές και χημικές διεργασίες που μεταβάλλουν την δομή του φυτοφαρμάκου ή το αποικοδομούν εντελώς.

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 έκλυση των φυτοφαρμάκων από το έδαφος στα υπόγεια ύδατα, η εξάτμιση στον αέρα ή η απορροή των επιφανειακών υδάτων.

Συγκεκριμένα, μετά την εφαρμογή ενός φυτοφαρμάκου ακολουθούν ορισμένες αντιδράσεις. Τα εφαρμοζόμενα στα φύλλα φυτοφάρμακα κολλούν σε αυτά, όπου και απορροφώνται. Αναπόφευκτα όμως οι βροχοπτώσεις εκπλένουν από την επιφάνεια των φύλλων ένα μέρος από τη χημική ουσία προς το έδαφος ενώ ένα μέρος μπορεί να μετασχηματιστεί από την ηλιακή ακτινοβολία.

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 στις βαθύτερα εδαφικά στρώματα, και η χερσαία ροή (μετακίνηση) όλες ξεκινούν κυρίως από το έδαφος.



Οι διεργασίες που υφίσταται το φυτοφάρμακο μπορούν να έχουν θετική ή αρνητική επίδραση στη δραστηριότητά του άλλα και στις περαιτέρω επιπτώσεις από την παρουσία του στο περιβάλλον.

Στις θετικές επιδράσεις συγκαταλέγεται η δυνατότητά τους να έρχονται σε επαφή με τα παράσιτα στόχους (target) για την αποτελεσματική αντιμετώπισή τους όπως επίσης και η δυνατότητα περιορισμού της συγκεντρώσεως του δραστικού συστατικού σε σχετικά ακίνδυνα επίπεδα.

Πολλές φορές όμως αυτοί οι ίδιοι μηχανισμοί μπορεί να είναι επιζήμιοι προκαλώντας βλάβη σε φυτά, ζώα, καθώς και μικροοργανισμούς που δεν αποτελούν στόχο (non-target).

Σε πολλές περιπτώσεις μάλιστα οι παραπάνω διεργασίες μπορούν να μετατρέψουν τα φυτοφάρμακα από σύνθετες ενώσεις σε μια σειρά προϊόντων διάσπασης τα οποία συχνά έχουν δραστηριότητα και τοξικότητα διαφορετική της αρχικής ένωσης.

Στις μέρες μας, ιδιαίτερη σημασία δίνεται στην μετακίνηση των φυτοφαρμάκων στα υδατικά συστήματα. Σε αυτά μπορούν να βρεθούν είτε από άμεση εφαρμογή τους για τον έλεγχο υδρόβιων παρασίτων είτε κυρίως έμμεσα μέσω απορροής και έκπλυσης του εδάφους από τους αγρούς στους οποίους εφαρμόστηκαν.

Έτσι τα παρασιτοκτόνα από το χωράφι διαμέσου του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα και επιφανειακά διαμέσου των στραγγιστικών τάφρων μπορούν να καταλήξουν αρχικά σε ποταμούς και μετά στους τελικούς αποδέκτες στις εκβολές στη θάλασσα. Ένας άλλος τρόπος μεταφοράς τους στα υδατικά συστήματα είναι με τις αέριες μάζες μετά την εξάτμιση τους και την εναπόθεσή τους σε αυτά.



2.5 ΑΛΛΗΛΕΠΑΡΑΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ – ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ⁽²²⁻²⁷⁾

Οι μικροοργανισμοί είναι σημαντικοί κάτοικοι των οικοσυστημάτων, όπου εκτελούν ρόλους ζωτικής σημασίας. Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών στο έδαφος είναι ποικίλες. Για παράδειγμα, ερευνητές έχουν υπολογίσει σε ένα γραμμάριο εύφορου εδάφους είναι δυνατό να υπάρχουν από 5.000 έως 7.000 διαφορετικά είδη βακτηρίων.

Οι περισσότεροι εδαφικοί μικροοργανισμοί σχηματίζουν αποικίες στην επιφάνεια του εδάφους. Έτσι ένα φυτοφάρμακο π.χ. σε διάλυμα εδάφους πρέπει να μετακινηθεί σε αυτές τις μικροβιακές αποικίες και να διαπεράσει μέσω της μικροβιακής κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου όπου και μεταβολίζεται. Στη περίπτωση αυτή μερικοί μικροοργανισμοί παράγουν ένζυμα τα οποία εξάγονται από το κύτταρο για να μεταβολίσουν φυτοφάρμακα που μεταφέρονται ανεπαρκώς.

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

Μάλιστα 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 αυτών σε αβλαβή τελικά προϊόντα.

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 την διάσπαση των φυτοφαρμάκων είναι τυπικά οι μικροοργανισμοί που ζουν σε πλημμυρισμένα εδάφη σε χερσαία συστήματα ή ζουν στα κατώτατα ιζήματα τεχνητών λιμνών, λιμνών και ποταμών.

Τα φυτοφάρμακα ή οι μεταβολίτες τους που διασπώνται, μπορούν να χρησιμεύσουν ως πηγή άνθρακα, αζώτου, ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών για τους μικροοργανισμούς. Σε



πολλές περιπτώσεις αυτός ο τρόπος διάσπασης έχει ως αποτέλεσμα την ολική διάσπαση της ένωσης με παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα.

Για παράδειγμα τη δεκαετία του '90 πολλά εργαστήρια κατόρθωσαν να απομονώσουν διάφορα είδη βακτηρίων που είχαν την ικανότητα να καταβολίζουν το atrazine με σκοπό τη χρησιμοποίηση του ως πηγή αζώτου ενώ παρατηρήθηκε ότι ο δακτύλιος των ανθράκων απελευθεωνόταν ως διοξείδιο του άνθρακα.

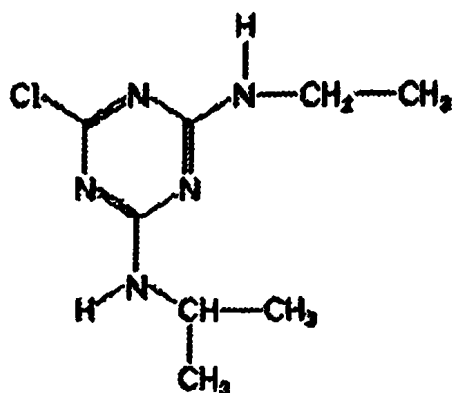
Η ικανότητα των διάφορων μικροοργανισμών να καταβολίζουν φυτοφάρμακα μπορεί να οδηγήσει σε ένα ακόμη αρκετά ενδιαφέρον φαινόμενο. Έχει παρατηρηθεί ότι η επαναλαμβανόμενη έκθεση εδαφικών, υδατικών ή μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα σε κάποια φυτοφάρμακα οδηγεί στον πολλαπλασιασμό τους ειδικά των βακτηρίων που διασπούν αυτές τις ενώσεις.

Στη περίπτωση αυτή όταν έχουμε να κάνουμε με μη παθογόνους μικροοργανισμούς οι επιπτώσεις μπορεί να μην είναι τόσο σημαντικές. Στη περίπτωση όμως που οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι παθογόνοι τότε οι κίνδυνοι για τη Δημόσια Υγεία είναι μεγάλοι. Για τον λόγο αυτό ειδικότερα τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί και σε τέτοιοι είδους αλληλεπιδράσεις.



2.6 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΧΘΕΝΤΩΝ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ

2.6.1. Atrazine^[28-32]



Φυσικοχημικές ιδιότητες

Κοινή ονομασία: Atrazine

Χημική ονομασία : 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine

(IUPAC)

6-chloro-*N*-ethyl-*N*'-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine

(IUPAC)

Χημική κατηγορία: Τριαζίνη

Μοριακός τύπος: $C_8H_{14}ClN_3$

Μοριακό βάρος: 215.69

Φυσική μορφή: λευκό, κρυσταλλικό στερεό

Σημείο τήξης: 176 °C

Τάση ατμών: 40×10^{-6} Pa στους 20 °C

Πυκνότητα: 1.187 g/cm³ στους 20 °C

Διαλυτότητα: στο νερό 28 mg/L στους 20 °C



Τρόπος δράσης

Το atrazine είναι εκλεκτικό διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο που προσλαμβάνεται κυρίως από το ριζικό σύστημα αλλά και τα φύλλα. Αναστέλλει την φωτοσύνθεση και εμποδίζει άλλες ενζυμικές διεργασίες.

Χρήσεις

Χρησιμοποιείται ως προ- και μετά-φυτρωτικό ζιζανιοκτόνο για τον έλεγχο των ζιζανίων (αγριόχορτων) στα σπαράγγια, τον αραβόσιτο, το σόργο, το ζαχαροκάλαμο και τον ανανά. Χρησιμοποιείται επίσης στην δασοκομία και για μη εκλεκτικό έλεγχο ζιζανίων σε μη καλλιεργημένες περιοχές. Πολλές χώρες έχουν απαγορεύσει τη χρήση του.

Τύχη στο περιβάλλον - Διάσπαση στο έδαφος & στα υπόγεια νερά

Το atrazine είναι πολύ σταθερό στο έδαφος. Κυριότερη αιτία διάσπασης του θεωρείται η χημική υδρόλυση ακολουθούμενη από αποικοδόμηση από μικροοργανισμούς του εδάφους. Η υδρόλυση πραγματοποιείται γρήγορα σε όξινα ή αλκαλικά περιβάλλοντα και πιο αργά σε ουδέτερα pH. Προσθήκη οργανικής ύλης αυξάνει το ποσοστό της υδρόλυσης. Είναι μετρίως προς πολύ κινητικό σε εδάφη με χαμηλή περιεκτικότητα σε άργιλο και οργανικό υλικό. Παρόλο την μέτρια διαλυτότητά του στο νερό, επειδή δεν προσροφάται ισχυρά σε εδαφικά σωματίδια και έχει ένα παρατεταμένο χρόνο ημιζωής (60 έως >100 ημέρες), η πιθανότητα που παρουσιάζει για ρύπανση των υπογείων νερών είναι μεγάλη.

Το atrazine είναι μετρίως διαλυτό στο νερό. Μπορεί να διασπαστεί (αποικοδομηθεί) σε επιφανειακά ύδατα με φωτόλυση και από μικροοργανισμούς μέσω N-αποαλκυλίωσης και υδρόλυσης των χλωρό-υποκαταστατών. Οι αντίστοιχοι χρόνοι ημιζωής είναι μεγαλύτεροι των 100 ημερών στους 20 °C. Το ποσοστό διάσπασης μειώνεται με την αύξηση του βάθους, ενώ μπορεί να μείνει εντελώς αδιάσπαστο (σταθερό) στα υπόγεια ύδατα.

Επίπεδα στο περιβάλλον

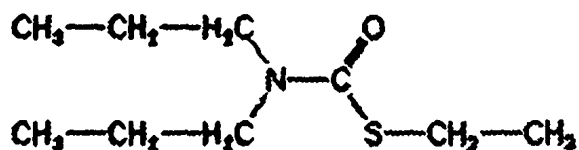
Σε πολλές χώρες, μετά την εφαρμογή σε αγροτικές περιοχές, το atrazine έχει βρεθεί σε υπόγεια ύδατα σε επίπεδα των 0.01-6 µg/L. Έχει επίσης ανιχνευθεί σε διάφορες χώρες στα πόσιμα νερά σε επίπεδα των 0.01-5 µg/L.



Για παράδειγμα σε μελέτες επιφανειακά υδάτων του Ηνωμένου Βασιλείου την τελευταία δεκαετία βρέθηκαν τιμές της τάξης των 550 ng/L, στην Ιταλία των 700 ng/L, στη Ολλανδία των 750 ng/L ενώ στη Γαλλία των 1300 ng/L.

Στην Ελλάδα σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για το Λουδία κατά την περίοδο 1988-89 βρέθηκαν τιμές ως και 5900 ng/L. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε την περίοδο 1992-93 για το ποταμό Λούρο βρέθηκαν τιμές ως και 4100 ng/L, ενώ για τον Καλαμά κατά τη περίοδο 1998-1999 μέχρι και 3870 ng/L. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι στην Ελλάδα από το Σεπτέμβριο του 2004 το atrazine έχει αποσυρθεί (2004/248/EC και 2004/247/EC).



2.6.2 EPTC^(29,32-34)**Φυσικοχημικές ιδιότητες**

Κοινή ονομασία:	EPTC
Χημική ονομασία :	IUPAC: <i>S</i> -ethyl dipropylthiocarbamate
Χημική κατηγορία:	thiocarbamate
Μοριακός τύπος:	C ₉ H ₁₉ NOS
Μοριακό βάρος:	189.32
Φυσική μορφή:	υγρό, άχρωμο προς ανοιχτό κίτρινο, με άρωμα .
Σημείο τήξης:	μη διαθέσιμο
Τάση ατμών:	4700 mPa στους 25 °C
Πυκνότητα:	0.955 Kg/l (20°C)
Διαλυτότητα:	στο νερό 375 mg/L στους 25 °C, σε άλλους δ/τες: όπως ακετόνη, αιθυλική αλκοόλη

Τρόπος δράσης

Το EPTC αναστέλλει την ανάπτυξη των μεσημβρινών περιοχών των φύλλων και τη πρωτεϊνική σύνθεση.

Χρήσεις

Συνήθως εφαρμόζεται ως προ-φυτρωτικό και ενσωματώνεται στο χώμα αμέσως μετά την εφαρμογή είτε μηχανικά είτε από την υπερυψωμένη άρδευση. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ετήσιων γλοωδών ζιζανίων, μερικών πλατύφυλλων ζιζανίων στα φασόλια, τα όσπρια, τις πατάτες, το καλαμπόκι, και τις γλυκοπατάτες.



Τύχη στο περιβάλλον - Διάσπαση στο έδαφος & στα υπόγεια νερά

Για το EPTC έχουν αναφερθεί χρόνοι ημιζωής στο έδαφος 6 έως 32 ημερών (ένας ανταποσωρευτικός χρόνος ημιζωής για τα περισσότερα συστήματα καλλιέργειας είναι 6 ημέρες). Δεν σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς στα εδάφη, ιδιαίτερα με εκείνα με χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανική ύλη και άργιλο. Η μικροβιακές διάσπαση και η εξάτμιση είναι οι κύριοι μηχανισμοί με τους οποίους χάνεται από τα εδάφη.

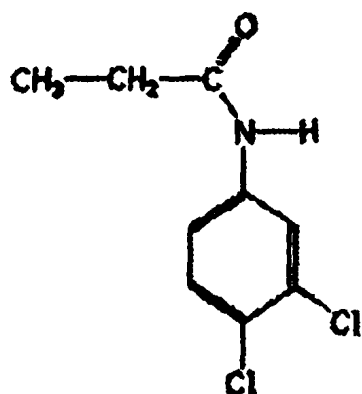
Η πιθανότητα να καταλήξει στα επιφανειακά ή στα υπόγεια νερά είναι σχετικά μικρή εξαιτίας του μικρού χρόνου ημιζωής. Έχουν αναφερθεί χρόνοι ημιζωής του στο νερό από 4-12 ημέρες.

Επίπεδα στο περιβάλλον

Στην Ελλάδα σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για το ποταμό Λούρο κατά την περίοδο 1998-99 βρέθηκαν τιμές ως και 897 ng/L ενώ για το Καλαμά κατά τη περίοδο 1998-1999 βρέθηκαν τιμές ως και 1851 ng/L.



2.6.3 PROPANIL^[32,35-37]



Φυσικοχημικές ιδιότητες

Κοινή ονομασία:	propanil
Χημική ονομασία :	3',4'-dichloropropionanilide
Χημική κατηγορία:	ανιλίδιο
Μοριακός τύπος:	$C_9H_7Cl_2NO$
Μοριακό βάρος:	218.08
Φυσική μορφή:	στερεό, άχρωμο
Σημείο τήξης:	91.5 °C
Τάση ατμών:	12 mPa στους 60 °C
Πυκνότητα:	1.054 στους 25 °C
Διαλυτότητα:	στο νερό 225 ppm στους 25 °C

Τρόπος δράσης

Δρα μέσω της παρεμπόδισης της φωτοσύνθεσης στα φυτά.

Χρήσεις

Το propanil είναι ένα μετά-φυτρωτικό ζιζανιοκτόνο χωρίς υπολειμματική δράση. Χρησιμοποιείται ενάντια σε πλατύφυλλα ζιζάνια στο ρύζι, τις πατάτες, και το σόργο.



Τύχη στο περιβάλλον - Διάσπαση στο έδαφος & στα υπόγεια νερά

Το propanil είναι διαλυτό στο νερό και προσροφάται ασθενώς από το έδαφος. Ο χρόνος ημιζωής του κυμαίνεται από 1 έως 3 ημέρες. Διασπάται γρήγορα από μικροοργανισμούς εδάφους γεγονός που επιταχύνεται σε συνθήκες υγρασίας. Οι μύκητες το χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα. Τα βακτήρια παράγουν παραπροϊόντα όπως tetrachloroazobenzene (έγχρωμο) και dichloroaniline.

Η γρήγορη διάσπαση που υφίσταται στο έδαφος πρακτικά μειώνει τη πιθανότητα για ρύπανση υπογείων υδάτων από αυτό.

Από τη στιγμή όμως που το propanil εισέλθει σε υδάτινο περιβάλλον θα υποστεί μικροβιακή διάσπαση τη κυριότερη αιτία διάσπασης του. Έχουν αναφερθεί χρόνοι ημιζωής των 2 ημερών υπό αερόβιες συνθήκες και των 2 έως 3 ημερών υπό αναερόβιες.

Σε τροποποιημένα και μη, υδάτινα περιβάλλοντα έχουν αναφερθεί χρόνοι ημιζωής λόγω βιοδιάσπασης 17 έως 154 ώρες (με αρχική συγκέντρωση 1 ppm)

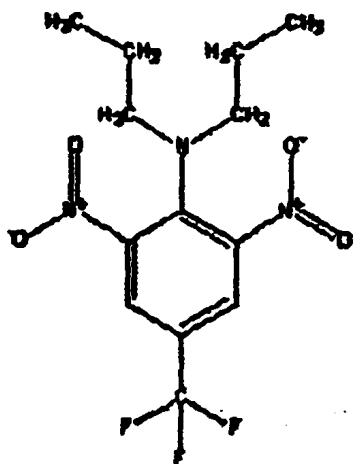
Επίπεδα στο περιβάλλον

Υπολείμματα propanil της τάξης των 0.03 mg/L ανιχνεύθηκαν σε 162 δείγματα νερού 16 φυτειών ρυζιού μετά από 1-120 μέρες από την εφαρμογή του. Πολύ συχνά έχει ανιχνευθεί και σε υπόγεια νερά.

Στην Ελλάδα σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Λουδία κατά την περίοδο 1996-97 βρέθηκαν τιμές ως και 340 ng/L ενώ στον Αξιό κατά τη περίοδο 1993-1994 ως και 20600 ng/L.



2.6.4 TRIFLURALIN^[28,29,32,38-40]



Φυσικοχημικές ιδιότητες

Κοινή ονομασία:	Trifluralin
Χημική ονομασία :	a,a,a-trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine
Χημική κατηγορία:	δινιτροανιλίνη
Μοριακός τύπος:	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$
Μοριακό βάρος:	335.50
Φυσική μορφή:	άοσμο, πορτοκαλο-κίτρινο κρυσταλλικό στερεό .
Σημείο τήξης:	48.5-49 °C
Τάση ατμών:	13.7 mPa στους 25 °C
Πυκνότητα:	
Διαλυτότητα:	στο νερό <1 mg/L στους 27 °C

Τρόπος δράσης

Όταν εφαρμόζεται στα εδάφη σκοτώνει τους σπόρους ζιζανίων καθώς βλασταίνουν. Δεν ελέγχει τα καθιερωμένα ζιζάνια.



Χρήσεις

Το trifluralin είναι ένα προφυτευτικό ζιζανιοκτόνο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ετήσιων χλοών και των πλατύφυλλων ζιζανίων στα φασόλια, το βαμβάκι, το σακχαρότευτλο, τους ηλιάνθους, τις ντομάτες, και τους αμπελώνες.

Τύχη στο περιβάλλον - Διάσπαση στο έδαφος & στα υπόγεια νερά

Σύμφωνα με μελέτες το trifluralin υφίσταται βιοδιάσπαση από μικροοργανισμούς εδάφους τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες που οδηγούν στο σχηματισμό 3,4,5-benzotriamine. Η υποβάθμισή του στο έδαφος περιλαμβάνει τα εξής βήματα: την οξειδωτική απαλκυλίωση, την αναγωγή της νιτρο ομάδας, και την οξειδωτική κυκλοποίηση με συνέπεια το σχηματισμό μικρών ποσοτήτων διάφορων προϊόντων μετασχηματισμού καθώς επίσης και προϊόντων μη ικανών να απομονωθούν εξαιτίας της δέσμευσης τους από το έδαφος.

Μετά την εφαρμογή παραμένει στην επιφάνεια του εδάφους και μπορεί να φωτοδιασπαστεί ή να εξατμίσει. Προσροφάται έντονα από το έδαφος. Οι αναφερόμενοι χρόνοι ημιζωής του trifluralin σε αυτό ποικίλλουν από 45 έως 60 ημέρες σε 6 έως 8 μήνες. Μετά από 6 μήνες σε 1 έτος, το 80-90% της δραστηριότητας του χάνεται.

Το trifluralin έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Μπορεί να εισέλθει στα επιφανειακά ύδατα μέσω απορροής. Από τη στιγμή που θα εισέλθει στο νερό αναμένεται να υποστεί βιοδιάσπαση τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες (υπό αναερόβιες ταχύτερα). Και οι δύο διαδικασίες οδηγούν στο σχηματισμό 3,4,5-benzotriamine.

Επίπεδα στο περιβάλλον

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από την EPA στις ΗΠΑ το 1989, το trifluralin βρέθηκε σε 172 από 2047 συνολικά δείγματα επιφανειακού ύδατος και στο ένα από 507 δείγματα υπόγειων νερών που αναλύθηκαν.

Στο Οντάριο του Καναδά κατά την περίοδο 1984-85 βρέθηκε σε δείγματα νερού που προέρχονταν από πηγάδια σε τιμές των 40 ug/L ενώ το 1975 στο ποταμό Wabash σε τιμές που κυμαίνονταν από 3.12-548 ug/L.

Στην Ελλάδα σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στον Αλιάκμονα κατά την περίοδο 1988-89 βρέθηκαν τιμές ως και 950 ng/L ενώ στο Λούρο κατά την περίοδο 1991-93 έως 360 ng/L.



3. ANTIBIOTIKA [3.41-44]

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς (κυρίως μύκητες αλλά και βακτήρια) και έχουν την ιδιότητα να επιβραδύνουν ή να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Σήμερα ο όρος αντιβιοτικά έχει αντικατασταθεί από τον περιεκτικότερο όρο αντιμικροβιακά φάρμακα, γιατί εκτός από τα φυσικά περιλαμβάνει και τα ημισυνθετικά (με χημική τροποποίηση των φυσικών) ή συνθετικά (χημειοθεραπευτικά) παράγωγα, που δρουν εναντίον των μικροβίων. Από συνήθεια χρησιμοποιείται ο όρος αντιβιοτικά για όλες τις αντιμικροβιακές ουσίες.

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, και τα πρώτα κλινικά πειράματα έγιναν το 1941. Η απομόνωση των αντιβιοτικών και η μαζική παραγωγή τους ακολούθησαν πολύ γρήγορα.

Η χρήση των αντιβιοτικών προκάλεσε επανάσταση στη σύγχρονη ιατρική. Θα έλεγε κανείς ότι η μάχη του ανθρώπου με τις βακτηριακές μολύνσεις θα είχε κερδηθεί χάρη στα δυνατά του όπλα, τα αντιβιοτικά.

Ωστόσο, η αλόγιστη χρήση τους έδωσε την ευκαιρία σε κάποια στελέχη των βακτηρίων να επιβιώνουν παρουσία αντιβιοτικών, και να αναπαράγονται, παρόλο που θα έπρεπε η ανάπτυξή τους να καταστέλλεται από αυτά. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως ανθεκτικότητα στα 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 εξυπηρετούν ως δεξαμενές βακτηρίων με πολλαπλή αντοχή.



3.2 ΟΜΑΔΕΣ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Τα αντιβιοτικά και οι αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι πολλά. Στον πίνακα 3 αναγράφονται τα αντιπροσωπευτικότερα και πλέον εν χρήση είδη αντιβιοτικών κάθε ομάδας.

Ομάδες αντιβιοτικών	Αντιπροσωπευτικά είδη
Β-λακτάμες	
Πενικιλίνες	Penicillin G, ampicillin, amoxicillin
Πενικιλλινασοάντοχες 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 3 Αντιβιοτικά κατά ομάδες βασικών χαρακτήρων της χημικής δομής τους ^[44]



3.3 ΓΕΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

Εκλεκτική τοξικότητα. Βασική ιδιότητα των αντιβιοτικών είναι η εκλεκτική τους δράση επί των μικροβίων, χωρίς να παραβλάπτουν την λειτουργία των κυττάρων του μεγαλο-οργανισμού.

Φάσμα δράσης. Τα αντιβιοτικά αναστέλλουν την ανάπτυξη ή καταστρέφουν διάφορα παθογόνα μικρόβια, κυρίως βακτήρια, και λιγότερο ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς.

A. Ευρέως φάσματος: δρουν σε Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια κ.α.

B. Στενό αντιμικροβιακού φάσματος: δρουν σε περιορισμένο είδος μικροβίων.

Τρόπος δράσης. Τα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να προκαλούν θάνατο στα μικρόβια ή απλώς να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό τους.

A. Μικροβιοκτόνα: τα αντιβιοτικά που προκαλούν γρήγορα το θάνατο των μικροβίων. Διαχωρίζονται σε βακτηριοκτόνα ή μυκητοκτόνα, ανάλογα με τα είδη των μικροοργανισμών που δρουν.

B. Μικροβιοστατικά: τα αντιβιοτικά που προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης των μικροβίων. Ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού διακρίνονται σε βακτηριοστατικά ή μυκητοστατικά.

3.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

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

A. Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (π.χ. β-λακταμικά)

B. Αλλοίωση της διαπερατότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (π.χ. πολυμυξίνες)

Γ. Αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (π.χ. χλωραμφαινικόλη, ερυθρομυκίνη)

Δ. Αναστολή της σύνθεσης των νουκλεϊκών οξέων (π.χ. σουλφοναμίδες)



3.5 ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η χρήση των αντιβιοτικών, παράλληλα με τη δραματική βελτίωση στην πορεία των λοιμώξεων, είχε σαν συνέπεια να αναπτυχθεί αντοχή σε πολλά βακτήρια.

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.

3.6 ΑΙΤΙΕΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

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

- Στην αυξημένη απόρριψη αποβλήτων ο όγκος των οποίων καθημερινά αυξάνει
- Στη μεγαλύτερη επιβίωση μερικών στελεχών στα υδάτινα συστήματα 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.

3.7 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

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

- Αλλαγή του βιολογικού στόχου δράσεως των αντιβιοτικών
- Παραγωγή ενζύμων που υδρολύουν, τροποποιούν ή παγιδεύουν τα αντιβιοτικά
- Ελλειπόμενη κυτταρική διαπερατότητα.



3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΤΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

1η 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 απόγονοι τους είναι ευαίσθητοι.

2η 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 εκτελούνται 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 οι τελευταίοι να καθίστανται ανθεκτικοί. Τρεις μηχανισμοί μεταβίβασης DNA έχουν πιστοποιηθεί:

1. **σύζευξη:** γίνεται με τα πλασμίδια και αποτελεί το 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)



2. **μεταγωγή:** μεταβίβαση γενετικού υλικού από ένα μικροβιακό καλλιέργημα σε άλλο με βακτηριοφάγους.
3. **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 καθώς στην αντίθετη περίπτωση λειτουργούν μηχανισμοί αποκλεισμού.

3.9 ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΝΤΟΧΗΣ

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

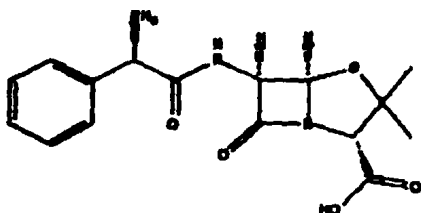
Το χειρότερο σενάριο, το οποίο δυστυχώς δεν είναι απίθανο, είναι ότι αυτά τα επικίνδυνα παθογόνα μικρόβια μπορεί να αποκτήσουν ανθεκτικότητα σε όλα τα προηγουμένως αποτελεσματικά αντιβιοτικά, προκαλώντας κατ' αυτόν τον τρόπο ανεξέλεγκτες επιδημίες βακτηριακών ασθενειών που δεν μπορούν να θεραπευθούν.



1.10 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΕΠΙΔΕΧΘΕΝΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ

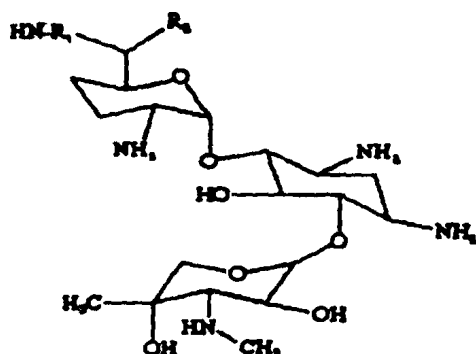
Αμπικιλίνη (άλφα-αμινοβενζυλοπενικιλίνη)



ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ

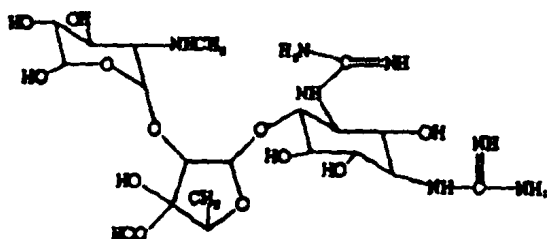
Αναστέλλουν το τελικό στάδιο σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος. Μια αμινική ομάδα και ένας μοναδικός δακτύλιος καθιστά αρκετά υδρόφιλες αυτές τις ουσίες ώστε να διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.

Γενταμικίνη



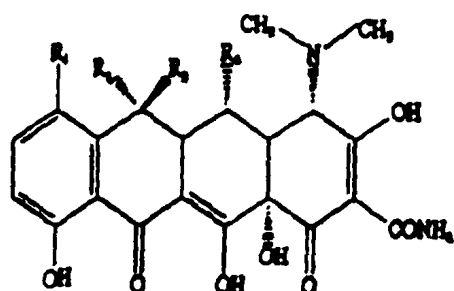
Δεσμεύεται στην υπομονάδα 30S της μονάδας 70S του ριβοσώματος και εμποδίζει την έναρξη του συμπλόκου.

Στρεπτομυκίνη



Αναστέλλει τη πρωτεϊνοσύνθεση. Συνδέονται με την 30S ή τη 50S ριβοσωμική υπομονάδα και καταστρέφουν την έναρξη του συμπλόκου mRNA - ριβοσώματος που είναι βασικό μέρος της σύνθεσης πρωτεϊνών.

Τετρακυκλίνη



Αναστέλλει τη πρωτεϊνική σύνθεση αναστέλλοντας τη δέσμευση αμινοάκυλο-tRNA στη μονάδα 30S των βακτηριακών ριβοσωμάτων. Τα ανθεκτικά βακτήρια δε συγκεντρώνουν το φάρμακο. Είναι κυρίως



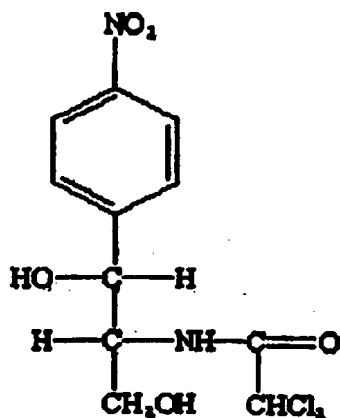
βακτηριοστατική.

Η αντίσταση στη τετρακυκλίνη οφείλεται στον R παράγοντα που κωδικοποιεί πρωτείνες οι οποίες μεταφέρουν το φάρμακο έξω από το κύτταρο.

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

Χλωραμφαινικόλη



Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΑΥΤΗΣ

Η πρόσβαση σε καθαρό πόσιμο νερό αποτελεί θεμέλιο λίθο για τη Δημόσια Υγεία. Ακόμη και σε περιοχές του κόσμου όπου γίνει σημαντικές επενδύσεις για την προστασία της ποιότητας του νερού τα επιφανειακά νερά, καθώς και αυτά που προέρχονται από πηγές ή φρεάτια, ενδέχεται να υποστούν παροδική ή μόνιμη ρύπανση από μικροοργανισμούς εντερικής προέλευσης.

Εκτός από τη μικροβιακή ρύπανση των υδάτων για τη ποιότητα των υδάτων ενδιαφέρον παρουσιάζει και η χημική ρύπανση. Η χρήση χημικών ουσιών θεωρείται σήμερα αναγκαία για την προστασία της γεωργικής παραγωγής. Οι περισσότερες όμως χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στις γεωργικές δραστηριότητες παρουσιάζουν υψηλή βιολογική δραστικότητα έναντι πολλών οργανισμών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου^[45].

Η ρύπανση του εδάφους, των ιζημάτων, και των υδάτινων οδών από τα ζιζανιοκτόνα έχει γίνει ένα όλο και περισσότερο σημαντικό ζήτημα. Η εκτενής χρήση τους στην καταπολέμηση των ζιζανίων έχει σαν αποτέλεσμα την πιθανή μεταφορά τους ύστερα από μια σειρά διεργασιών και ανίχνευση τους στα υδάτινα περιβάλλοντα.

Δεδομένου ότι τα ζιζανιοκτόνα εμφανίζονται σχεδόν μόνιμα σε ρυπασμένες περιοχές, μια αλληλεπίδραση με μικροοργανισμούς φαίνεται πολλή πιθανή. Ως εκ τούτου επί σειρά ετών ερευνητικές ομάδες είχαν στραφεί στη μελέτη της επίδρασης διάφορων μικροοργανισμών στα ζιζανιοκτόνα και συγκεκριμένα στη δυνατότητα αυτών να τα μεταβολίζουν. Άλλες μελέτες επικεντρώθηκαν στην επίδραση των ζιζανιοκτόνων σε διάφορους μικροοργανισμούς συμπεριλαμβανομένου μικροοργανισμούς σε τρόφιμα^[27], μικροοργανισμούς σε εδάφη^[46] φυτοπλανκτόν^[47] και άλγη^[48].

Εντούτοις, καμία έρευνα δεν επικεντρώθηκε στη μελέτη της επίδρασης των ζιζανιοκτόνων στους δείκτες μόλυνσης των υδάτων.

Η παρούσα πειραματική εργασία καλείται να απαντήσει κατά ένα μέρος στο ερώτημα *Τι γίνεται όταν ο ρόπος (επιλεγμένα ζιζανιοκτόνα) συνυπάρχει με τους δείκτες μόλυνσης των υδάτων (*Escherichia coli* και *Enterococcus faecalis*)*.



Κατ' αυτόν τον τρόπο, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης της επίδρασης τεσσάρων (4) επιλεγμένων σύγχρονων ζιζανιοκτόνων (atrazine, EPTC, propanil, trifluralin) σε δυο (2) μικροβιακούς δείκτες μόλυνσης των υδάτων (*E. coli*, *Ent. faecalis*).

Τα συγκεκριμένα ζιζανιοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως στη βορειοδυτική Ελλάδα και έχουν συχνά ανιχνευτεί στα επιφανειακά νερά^[32].

Είναι γνωστό σύμφωνα με την νομοθεσία χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης ότι το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκου στα πόσιμα νερά είναι 0.1 $\mu\text{g/L}$ ενώ για το σύνολο των ενώσεων αυτών 0.5 $\mu\text{g/L}$ ^[49].

Έτσι οι συγκεντρώσεις των φυτοφαρμάκων στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο (0.1 $\mu\text{g/L}$) και 10x (1.0 $\mu\text{g/L}$), 100x (10.0 $\mu\text{g/L}$) και 1000x (100.0 $\mu\text{g/L}$).

Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη της επίδρασης των συγκεκριμένων ζιζανιοκτόνων στην ανάπτυξη των *E. coli*, *Ent. faecalis*, τη μορφολογία τους, τις βιοχημικές τους αντιδράσεις.

Επίσης έγινε μελέτη της ανθεκτικότητας των επιλεγμένων δεικτών που αναπτύχθηκαν στα διαλύματα των ζιζανιοκτόνων σε πέντε (5) αντιβιοτικά (αμπικιλίνη, γενταμικίνη, στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη, χλωραμφαινικόλη). Τα συγκεκριμένα αντιβιοτικά επιλέχθηκαν εξαιτίας της ευρείας χρήσης τους.



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Τα δύο πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν

- ο *E. coli* NCTC 9001 (PHLS-North, England) και
- ο *Ent. faecalis* NCTC 775 (PHLS-North, England).

Το σταντάρισμα του ενοφθαλμίσματος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Guan^[27]. Το σταντάρισμα αυτό 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 TSA (24h, 36 °C).

2.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τα εξής 4 ζιζανιοκτόνα :

- Atrazine (στερεή μορφή καθαρότητας 99.2% Riedel de Haën)
- EPTC (στερεή μορφή καθαρότητας 99.2% Riedel de Haën)
- Propanil (στερεή μορφή καθαρότητας 99.2% Riedel de Haën)
- Trifluralin (στερεή μορφή καθαρότητας 99.2% Riedel de Haën)

Ως αντιπροσωπευτικά των χημικών ομάδων στις οποίες ανήκουν και χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

2.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ

Οι συγκεντρώσεις των φυτοφαρμάκων στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο σύμφωνα με τη νομοθεσία των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης ($0.1 \mu\text{g/L}$)^[49] και 10x, 100x και 1000x. Δηλαδή διαλύματα των:

- $0.1 \mu\text{g/L}$
- $1.0 \mu\text{g/L}$
- $10.0 \mu\text{g/L}$



□ 100.0 µg/L

2.4 ΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ ΤΩΝ ΖΙΖΑΝΙΟΚΤΟΝΩΝ

Προετοιμάστηκαν stock διαλύματα των 100 µg/L των επιλεγμένων ζιζανιοκτόνων με διάλυση αυτών σε αποστειρωμένο (αποστείρωση στα 15lb psi-121°C για 15 min) απεσταγμένο νερό. Στη περίπτωση του trifluralin η ουσία αρχικά διαλύθηκε σε μικρή ποσότητα μεθανόλης και κατόπιν σε νερό.

Τα stock διαλύματα φυλάσσονταν στο σκοτάδι ενώ νέα διαλύματα ετοιμάζονταν όπου χρειαζόνταν.

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 τοποθετήθηκαν σε φιάλες.

2.5 ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΚΑΙ ΜΑΚΡΟΠΡΟΘΕΣΜΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

1ml σταθερής καλλιέργειας (όπως περιγράφηκε προηγουμένως) που αποτελούνταν από 10^7 cfu ml⁻¹ προστέθηκαν σε φιάλες που η κάθε μία περιείχε 99 ml διαλύματος ζιζανιοκτόνου.

Σαν control χρησιμοποιήθηκαν φιάλες που περιείχαν 99 ml αποστειρωμένου - απεσταγμένου νερού και 1 ml σταθερής καλλιέργειας των 10^7 cfu ml⁻¹.

Όλες οι φιάλες αναμείχθηκαν ζωηρά και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-22 °C).

Η ανάπτυξη προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας 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 (0-80 d) των *E. coli* και *Ent. faecalis* παρουσία των διαφόρων συγκεντρώσεων των επιλεγμένων ζιζανιοκτόνων.



2.6 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ^[50-52]

Για το βακτηριακό χαρακτηρισμό (control και βακτηρίων παρουσία των διαλυμάτων ζιζανιοκτόνων) 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 ζιζανιοκτόνων τα οποία φιλτράρονταν είτε αμέσως είτε κατόπιν αραιώσεων (εφόσον ήταν αναγκαίο) σύμφωνα με τη μέθοδο διήθησης δια μεμβράνης. Κατόπιν οι διηθητικές μεμβράνες τοποθετούνταν σε διαφορετικά εκλεκτικά υλικά και επωάζονται στους 37 (*E. coli*) και τους 44 °C (*Ent. faecalis*) για 24-48 h έτσι ώστε να μελετηθεί η μορφολογία των παραγόμενων αποικιών (μακροσκοπική εμφάνιση συμπεριλαμβανομένου του σχήματος του χρώματος και της υφής). Οι παραγόμενες αποικίες συγκρίνονταν με αυτές του control.

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)

Ενώ για τον *Ent. faecalis* ήταν :

- ☐ Slanetz and Bartley (MERCK)
- ☐ KF Streptococcus (OXOID).

Για το βιοχημικό χαρακτηρισμό των μικροοργανισμών και τον προσδιορισμό των βιοχημικών αλλαγών μεταξύ των control και των εξεταζόμενων μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν το API 20E και το API STREP σύστημα (BioMérieux).

Όλες οι ταινίες API προετοιμάστηκαν, επωάστηκαν και γενικά χρησιμοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το τεστ οξειδάσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια σλάντς (BBL).

Τα αποτελέσματα των API και των τεστ οξειδάσης ερμηνεύθηκαν περαιτέρω με τη χρήση του λογισμικού πακέτου APILAB PLUS (version 3.3.2)



2.7 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η μελέτη της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών που απομονώνονταν από τα διαλύματα των ζιζανιοκτόνων και από τα controls στα αντιβιοτικά πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Kirby-Bauer. Η μελέτη διήρκεσε συνολικά 20 μέρες, ενώ δείγματα λαμβάνονταν ανά 5 μέρες.

Επιλέχθηκαν πέντε (5) αντιβιοτικά τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως.

- Αμπικιλίνη (AMP), (OXOID)
- Γενταμικίνη (CN), (OXOID)
- Στρεπτομυκίνη (S), (OXOID)
- Τετρακυκλίνη (TE), (OXOID)
- Χλωραμφαινικόλη (C), (OXOID)

Από καθαρό καλλιέργημα των μικροοργανισμών επιλέγονταν με κρίκο αποικίες και εναιωρούνταν σε 4-5 ml TSB για την ανάπτυξη 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 McFarland).

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 επώαση των τρυβλίων για 18-24 ώρες στους 35 °C.

Η ανάγνωση πραγματοποιήθηκε με τη μέτρηση της διαμέτρου των ζωνών αναστολής γύρω από κάθε δισκίο. Από την έκταση της ζώνης γίνονταν ο χαρακτηρισμός του μικροοργανισμού σαν ευαίσθητο, ενδιάμεσο ή ανθεκτικό σύμφωνα με το Πίνακα 4 .

			Διάμετρος ζώνης αναστολής σε mm		
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ		ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΔΙΣΚΙΟΥ	ΑΝΘΕ- ΚΤΙΚΟ	ΕΝΔΙΑ- ΜΕΣΟ	ΕΥΑΙ- ΣΘΗΤΟ
Αμπικιλίνη	Εντ/ειδή	10μg	≤13	14-16	≥17
	Εντερόκοκκοι	10μg	≤16		≥17
Γενταμικίνη		10μg	≤12	13-14	≥15
Στρεπτομυκίνη		10μg	≤11	12-14	≥15
Τετρακυκλίνη		30μg	≤14	15-18	≥19
Χλωραμφαινικόλη		30μg	≤12	13-17	≥18

Πίνακας 4 Ζώνες αναστολής των επιλεγμένων αντιβιοτικών



Β. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τρεις σειρές διαλυμάτων ζιζανιοκτόνων. Για τον προσδιορισμό της επίδρασης των επιλεγμένων ζιζανιοκτόνων στους μικροβιακούς δείκτες 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 $P \leq 0.05$.



4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ATRAZINE^[53]

4.1.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Atrazine - *E. coli*

Οι καμπύλες ανάπτυξης της *E. coli* παρουσιάζονται στο Σχήμα 2. Τις πρώτες 45 ώρες η ανάπτυξη της *E. coli* ήταν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το control (εκτός της συγκεντρώσεως 1 µg/L).

Η μεγαλύτερη ανάπτυξη παρατηρήθηκε μετά την 8^η μέρα για τη συγκέντρωση 0.1 µg/L. Ακολουθούν οι συγκεντρώσεις 100 µg/L και 10 µg/L με εμφάνιση μέγιστης ανάπτυξης μετά τη 16^η και τη 23^η μέρα αντίστοιχα. Στη μακροπρόθεσμη ανάπτυξη η συγκέντρωση 1 µg/L παραμένει σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις άλλες τρεις συγκεντρώσεις αλλά σε υψηλότερα σε σχέση με το control ($p < 0.05$).

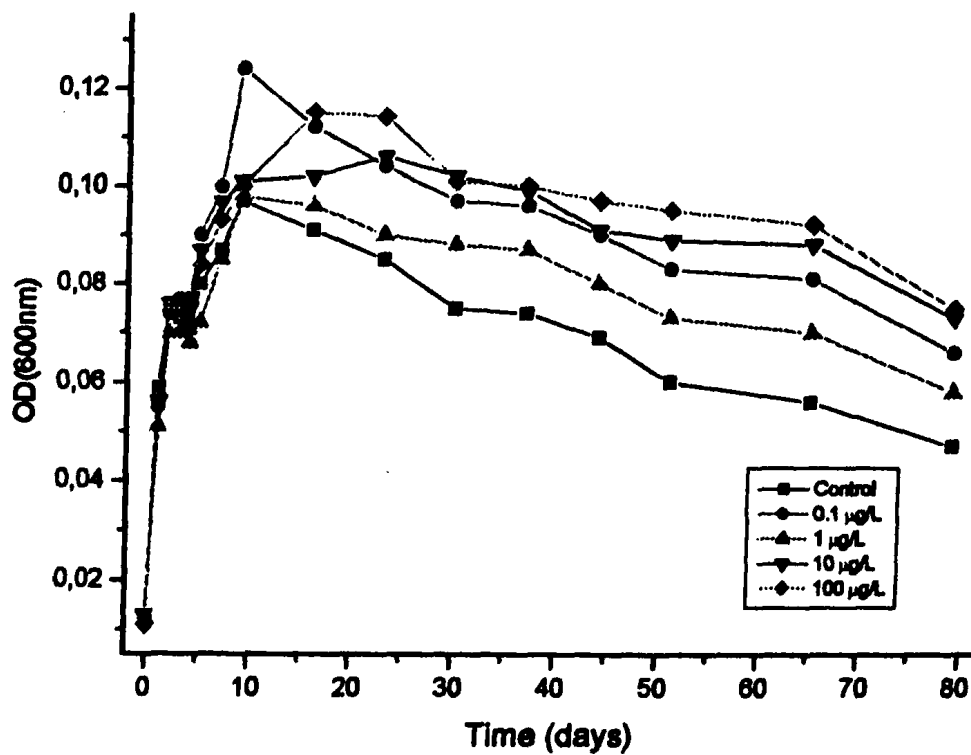
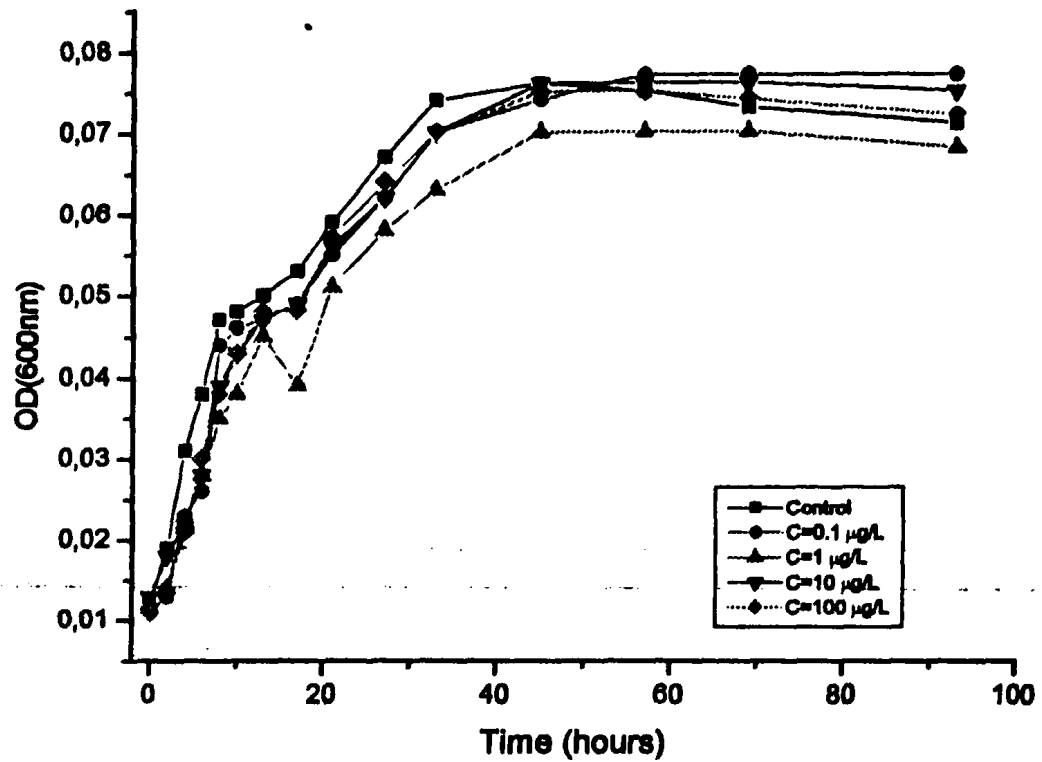
Atrazine - *Ent. faecalis*

Μέχρι τη 12η ώρα η καμπύλη ανάπτυξης της συγκεντρώσεως 10 µg/L παραμένει σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το control ($p \leq 0.05$) (Σχήμα 3). Το γεγονός ότι και οι καμπύλες ανάπτυξης και των τεσσάρων συγκεντρώσεων παρουσιάζουν μία καμπή σε σχέση με την αρχική τιμή OD (ώρα 0) οφείλεται πιθανότατα σε autolysis των βακτηριακών κυττάρων.

Μετά την 6^η ώρα οι καμπύλες ανάπτυξης για τις συγκεντρώσεις 1 και 100 µg/L έφτασε σε στατιστικά σημαντικές υψηλότερες τιμές OD. Οι ίδιες τιμές OD τις ώρες 0 και 96 για τη συγκέντρωση των 100 µg/L μας δείχνει ότι τα κύτταρα του *Ent. faecalis* είναι ικανά να επιβιώνουν παρουσία αυτής της συγκέντρωσης atrazine.

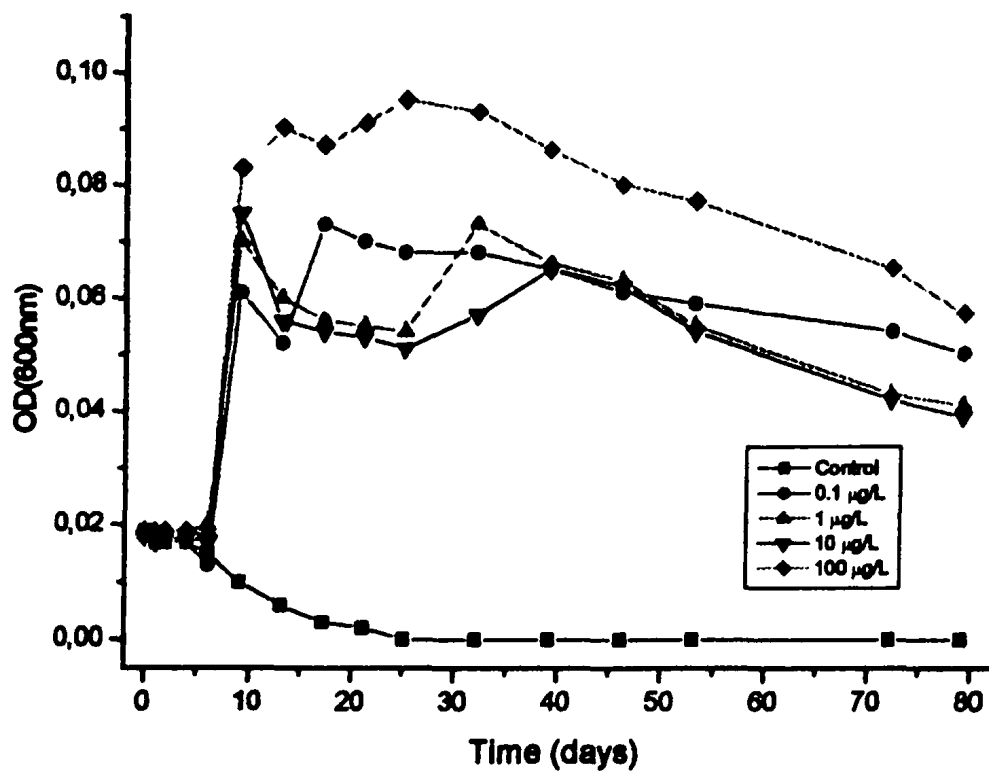
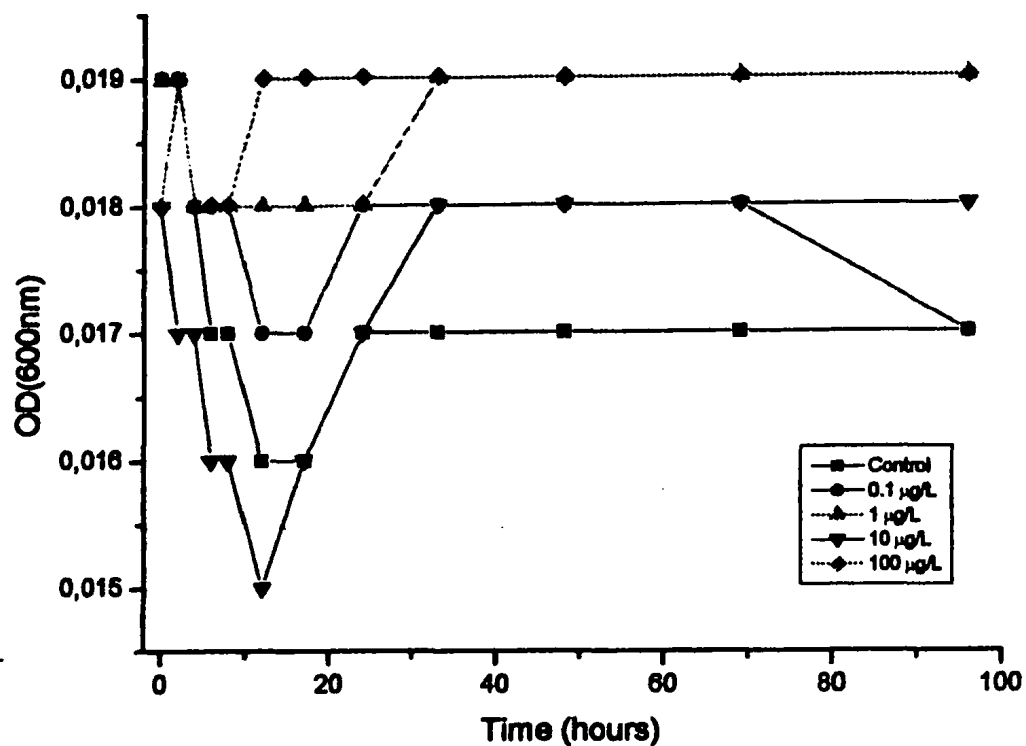
Την 9^η μέρα παρατηρήθηκε μία απότομη αύξηση και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις. Η μεγαλύτερη ανάπτυξη παρατηρήθηκε την 25^η μέρα για τη συγκέντρωση 100 µg/L. Για τη μελέτη των μακροπρόθεσμων επιπτώσεων του atrazine στην ανάπτυξη του *Ent. faecalis* οι συγκεντρώσεις 1 και 100 µg/L εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το control ενώ οι συγκεντρώσεις 0.1 και 10 µg/L εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές μετά τη 4^η μέρα.





Σχήμα 2 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της *E. coli* παρουσία atrazine





Σχήμα 3 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του *Ent. faecalis* παρουσία atrazine



4.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΗΛΕΓΜΕΝΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

E. coli

Η μορφολογία των αποικιών της *E. coli* αρχικά ήταν τυπικές και έδιναν θετικές τις εξής βιοχημικές αντιδράσεις στο API 20E : ONPG, LDC, ODC, IND, GLU, MAN, SOR, RHA, MEL και ARA. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η μορφολογία και οι βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli* στο control δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή.

Εντούτοις παρουσιάστηκαν αλλαγές τόσο στη μορφολογία όσο και στις βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli* που απομονώθηκε από τα διαλύματα του atrazine. Οι παραγόμενες στο Tergitol 7 αποικίες παρουσίασαν αλλαγή στο χρώμα (από κίτρινες εμφανίζονταν ωχρές) ενώ στο m-Endo agar Les εμφανίζονταν κόκκινες αποικίες αλλά μικρότερου μεγέθους. Στο mFC agar οι λείες μπλε αποικίες *E. coli* εμφανίζονταν ρυτιδιασμένες.

Μετά την 9^η μέρα παρουσιάστηκαν αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli* που απομονώθηκαν από τις συγκεντρώσεις των 0.1, 10 και 100 µg/L. Η αντίδραση των CIT από αρνητική εμφανίζονταν πια θετική. Αυτή η αλλαγή διήρκησε ως την 30^η μέρα για τις τρεις αυτές συγκεντρώσεις atrazine αλλά όχι για τη συγκέντρωση 1 µg/L. Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *Kluyvera* spp 77.5% και *E. coli* 19.3%

Μετά την 37^η μέρα είχαμε απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών του *E. coli* στα κλασσικά υλικά για τις συγκεντρώσεις 1, 10 και 100 µg/L. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για τη συγκέντρωση 0.1 µg/L μετά την 60^η μέρα.

Εξαιτίας της απώλειας αυτής, 0.1 mL από τα διαλύματα της *E. coli* atrazine εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν TSA άγαρ με atrazine. Ύστερα από επώαση αυτών των τρυβλίων με το τροποποιημένο άγαρ στους 36 °C για 24-48 ώρες και κατόπιν σε θερμοκρασία δωματίου για 24-48 ώρες είχαμε επανεμφάνιση των αποικιών της *E. coli*. Οι εμφανιζόμενες αποικίες χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά με το σύστημα API 20E και το βιοχημικό προφίλ που έδωσε το σύστημα αυτό ήταν το τυπικό προφίλ της *E. coli*.



Ent. faecalis

Η μορφολογία των αποικιών του *Ent. faecalis* αρχικά ήταν τυπικές και έδιναν στο API STREP θετικές τις εξής βιοχημικές αντιδράσεις: VP, ESC, PYRA, LAP, ADH, RIB, MAN, SOR LAC, TRE και AMD. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η μορφολογία και οι βιοχημικές αντιδράσεις του *Ent. faecalis* του control δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή.

Εντούτοις, παρουσιάστηκαν αλλαγές τόσο στη μορφολογία όσο και στις βιοχημικές αντιδράσεις του *Ent. faecalis* που απομονώθηκε από τα διαλύματα atrazine. Οι αποικίες του *Ent. faecalis* που εμφανίζονταν στα εκλεκτικά υλικά ήταν μικρότερες σε μέγεθος σε σχέση με το control ενώ μετά την 9^η μέρα παρουσιάστηκαν και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις. Η αντίδραση SOR από θετική εμφανίζονταν αρνητική. Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *Ent. faecalis* (60,1%) και σε *Lc. lactis lactis* (37%)

Επαλέον, μετά την 72^η μέρα είχαμε απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών του *Ent. faecalis* στα κλασσικά υλικά για όλες τις συγκεντρώσεις πλην της 0.1 μg/L.

Εξαιτίας της απώλειας αυτής, 0.1 mL από τα διαλύματα του *Ent. faecalis* σε atrazine εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν TSA άγαρ με atrazine. Ύστερα από επώαση αυτών των τρυβλίων με το τροποποιημένο άγαρ στους 36 °C για 24-48 h ώρες και κατόπιν σε θερμοκρασία δωματίου για 24-72 ώρες είχαμε επανεμφάνιση των τυπικών αποικιών του *Ent. faecalis*. Οι εμφανιζόμενες αποικίες χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά με το σύστημα API STREP.

Διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στις βιοχημικές αντιδράσεις ADH και SOR όπου από θετικές εμφανίζονταν αρνητικές. Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *Ent. faecalis* (33.4%), *Lc. lactis lactis* (31.5%) και *Ent. avium* (26.6%).

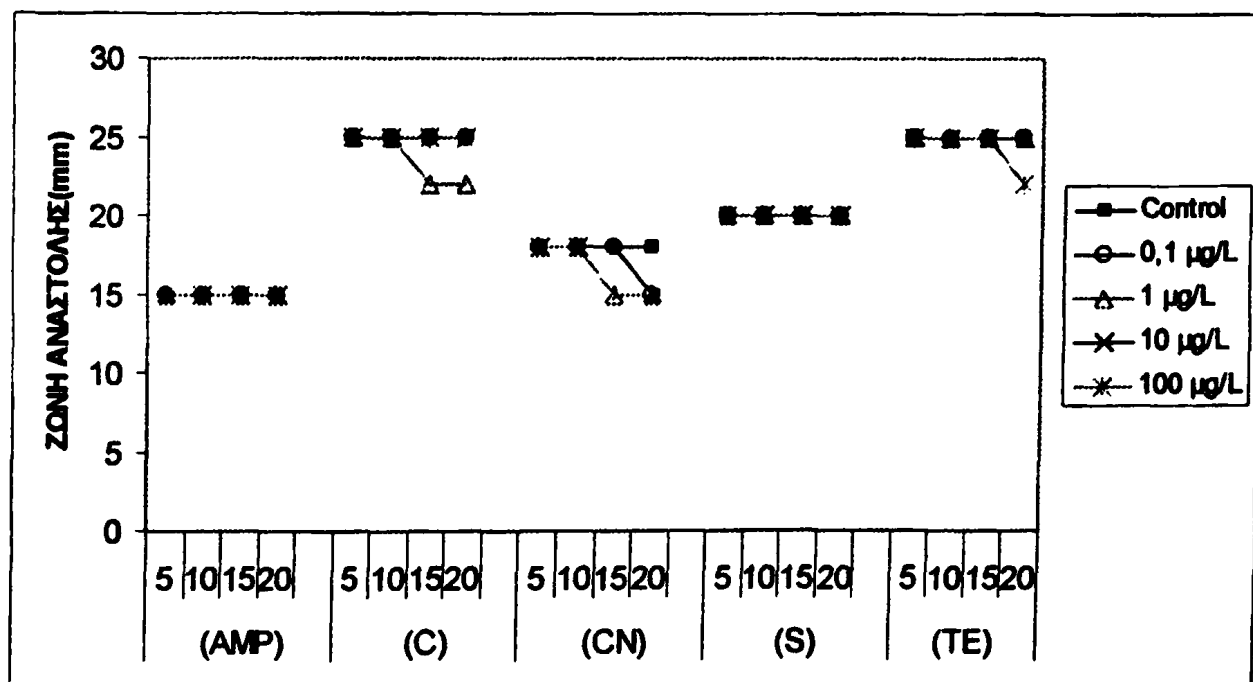


4.1.3 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

E. coli

Η *E. coli* που απομονώθηκε από τα διαλύματα atrazine δεν παρουσίασε καμία αλλαγή σε σχέση με το control στις ζώνες αναστολής, για τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και στρεπτομυκίνη (Σχήμα 4). Συγκεκριμένα στη πρώτη περίπτωση παρέμεινε μετρίως ευαίσθητη και στη δεύτερη ευαίσθητη.

Αλλαγές εμφανίστηκαν στη χλωραμφαινικόλη και για τη συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/L}$ όπου από τη 15^η μέρα είχαμε μείωση της ζώνης αναστολής. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στη γενταμυκίνη για όλες τις συγκεντρώσεις εκτός της 0.1 $\mu\text{g/L}$ όπου η μείωση της ζώνης αναστολής εμφανίστηκε την 20^η μέρα. Στη τετρακυκλίνη μείωση της ζώνης αναστολής εμφανίστηκε για τις συγκεντρώσεις 10 και 100 $\mu\text{g/L}$ την 20^η μέρα. Και για τα τρία όμως αυτά αντιβιοτικά οι αλλαγές δεν επέφεραν αλλαγή στην ανθεκτικότητα της *E. coli*. Συνέχισε δηλαδή να είναι ευαίσθητη στη χλωραμφαινικόλη, στη γενταμυκίνη και στη τετρακυκλίνη όπως ακριβώς και η *E. coli* του control.



Σχήμα 4. Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων atrazine στην ανθεκτικότητα της *E. coli* στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά

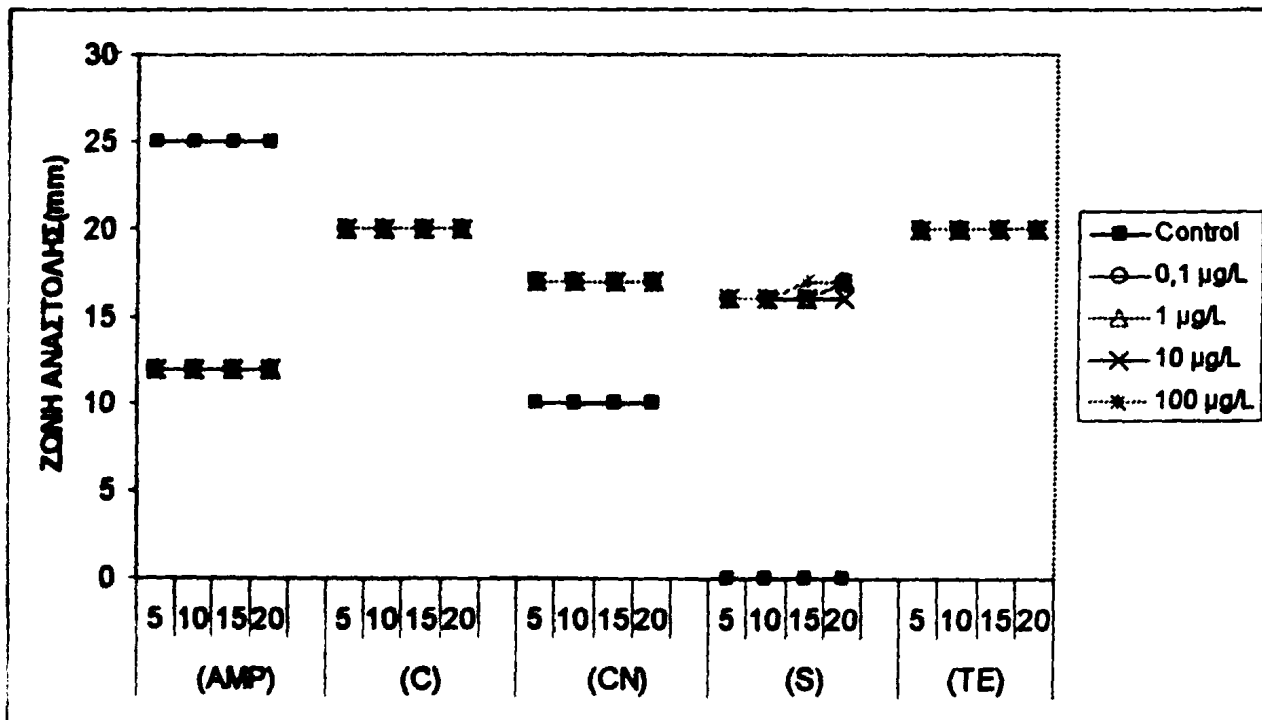


Ent. faecalis

1) *Ent. faecalis* που απομονώθηκε από τα διαλύματα atrazine δεν παρουσίασε καμία αλλαγή σε σχέση με το control στις ζώνες αναστολής, για τα αντιβιοτικά χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη και στις δύο περιπτώσεις παρέμεινε ευαίσθητο (Σχήμα 5).

Στα υπόλοιπα τρία αντιβιοτικά είχαμε αλλαγές στην ανθεκτικότητα του *Ent. faecalis*. Στην αμικιλίνη είχαμε μείωση της ζώνης αναστολής και στις τέσσερις συγκεντρώσεις και από ευαίσθητος έγινε ανθεκτικός.

Αντίθετα, στη γενταμικίνη και τη στρεπτομυκίνη είχαμε αύξηση των ζωνών αναστολής και από ανθεκτικός έγινε ευαίσθητος.



Σχήμα 5 Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων atrazine στην ανθεκτικότητα του *Ent. faecalis* στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά

4.2 EPTC^[54]

4.2.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

EPTC - *E. coli*

Οι καμπύλες ανάπτυξης της *E. coli* παρουσία EPTC απεικονίζεται στο Σχήμα 6. Τις πρώτες 21 ώρες οι καμπύλες ανάπτυξης παρουσιάζουν χαμηλότερες ή ίσες τιμές OD με το control και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις (0,1, 1, 10 και 100 µg/L). Για τη συγκέντρωση 100 µg/L το φαινόμενο αυτό συνεχίζεται μέχρι την 27^η ώρα με στατιστικά σημαντικές αποκλίσεις ($p < 0.05$) από την 6^η έως την 21^η ώρα.

Την 9^η μέρα παρατηρείται μία απότομη αύξηση του OD για τις συγκεντρώσεις 1, 10 και 100 µg/L ($p < 0.05$). η συγκέντρωση 0,1 µg/L παραμένει σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις υπόλοιπες τρεις συγκεντρώσεις αλλά σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το control ($p < 0.05$).

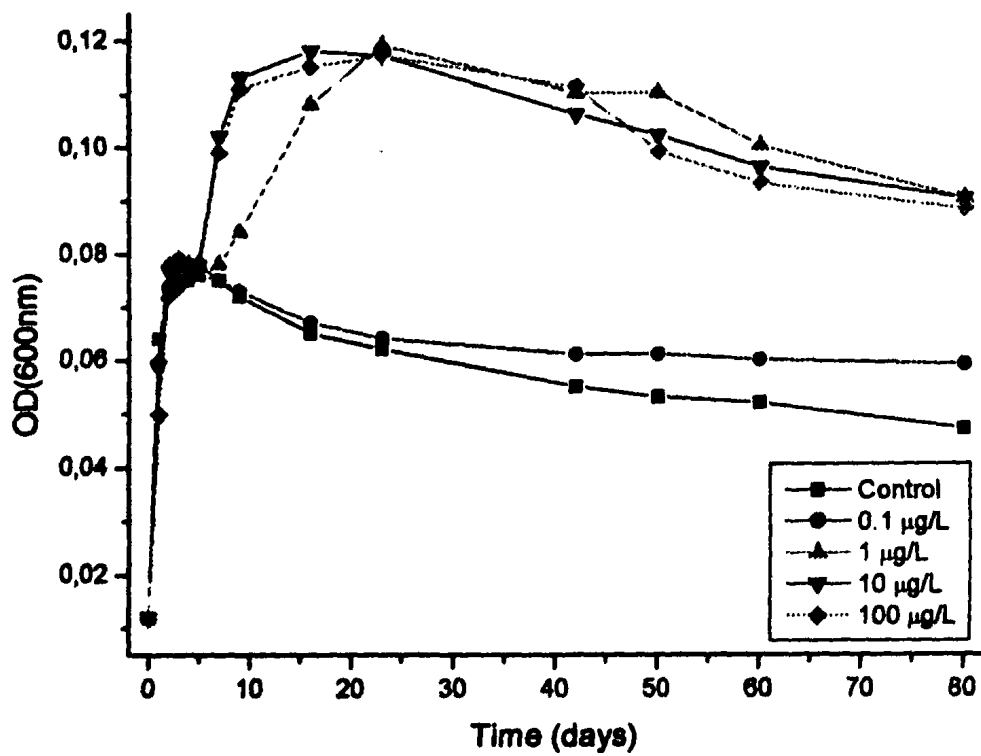
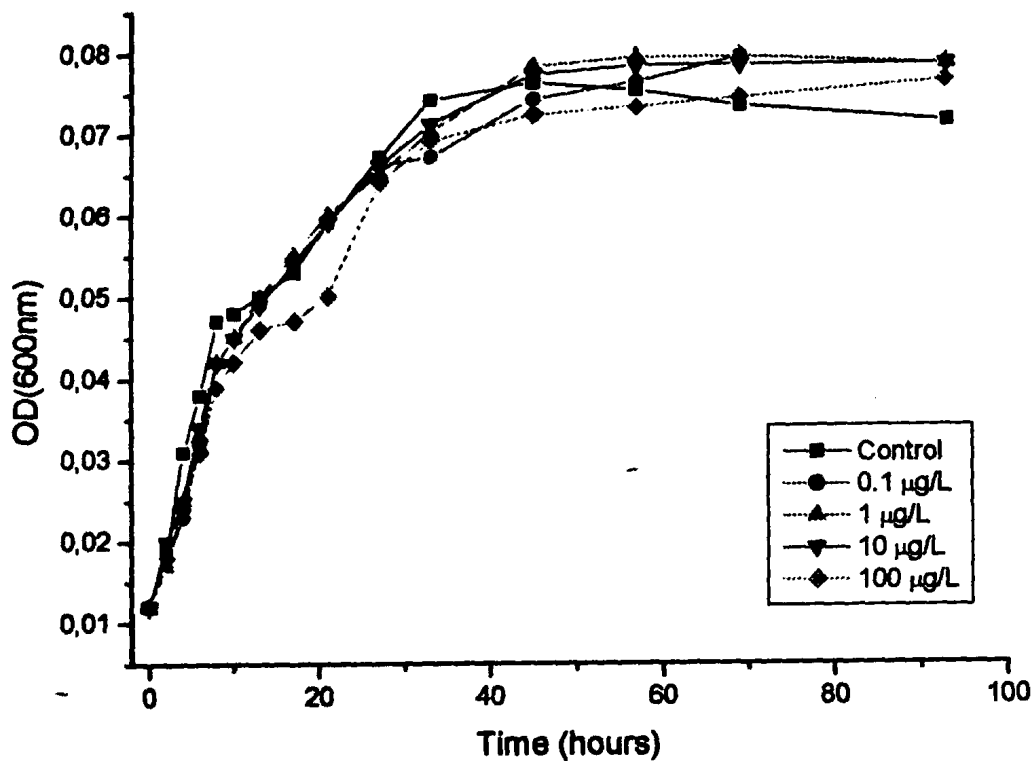
EPTC – *Ent. faecalis*

Η βραχυπρόθεσμη και η μακροπρόθεσμη καμπύλες ανάπτυξης του *Ent. faecalis* παρουσία EPTC απεικονίζονται στο Σχήμα 7.

Στη συγκέντρωση 0,1 µg/L και μέχρι την 24^η ώρα (όπου και εμφανίζεται και η μέγιστη τιμή OD για τον *Ent. faecalis*) ο *Ent. faecalis* παρουσιάζει στατιστικά σημαντική ανάπτυξη. Οι υπόλοιπες τρεις συγκεντρώσεις μέχρι την 4^η μέρα παραμένουν στα ίδια ή σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το control.

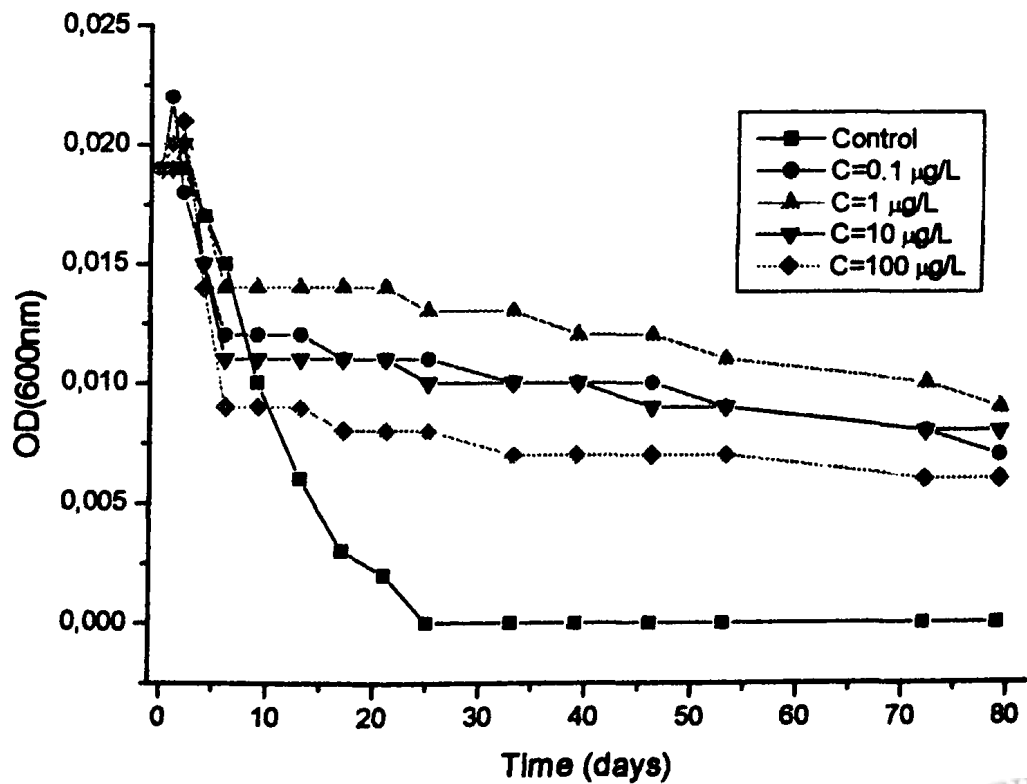
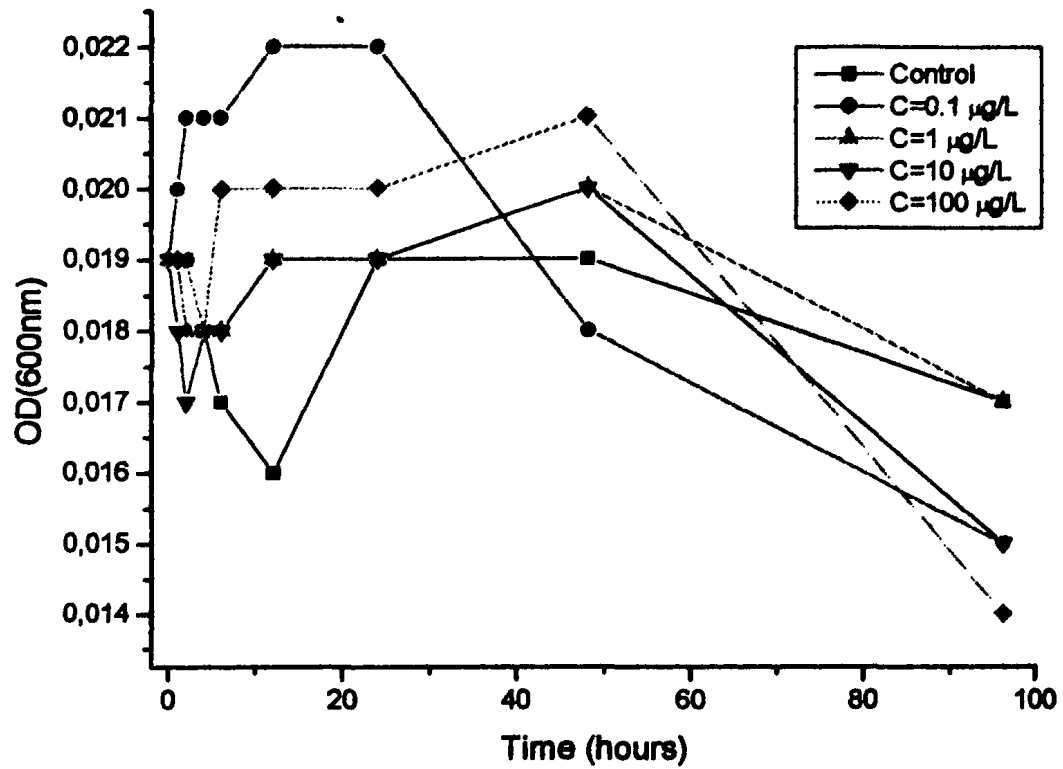
Στη μακροπρόθεσμη μελέτη της επίδρασης του EPTC στον *Ent. faecalis* το control παρουσιάζει πτώση μέχρι την 25^η μέρα. Για τις τέσσερις υπό μελέτη συγκεντρώσεις (0,1, 1, 10 και 100 µg/L) η πτώση αυτή είναι μικρότερη και εμφανίζεται μετά την 4^η μέρα όπου και οι τιμές OD σταθεροποιούνται σε στατιστικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το control ($p < 0.05$).





Σχήμα 6 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της *E. coli* παρουσία ΕΡΤC





Σχήμα 7 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του *Ent. faecalis* παρουσία EPTC



2.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΗΛΑΕΓΜΕΝΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

E. coli

Η μορφολογία των αποικιών της *E. coli* αρχικά ήταν τυπικές και έδιναν θετικές τις εξής βιοχημικές αντιδράσεις στο API 20E : ONPG, LDC, ODC, IND, GLU, MAN, SOR, RHA, MEL και ARA. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η μορφολογία και οι βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli* του control δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή.

Ωστόσο, αλλαγές παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης στη μορφολογία της *E. coli* που απομονώνονταν από τα διαλύματα του EPTC. Οι παραγόμενες στο m-Endo agar Les αποικίες εμφανίζονταν μικρότερες σε μέγεθος ενώ οι παραγόμενες στο mFC άγαρ αποικίες αντί για λείες μπλε εμφανίζονταν ρυτιδώδεις. Στα υπόλοιπα τρία υλικά (Tergitol 7 agar, Mac Conkey Agar MUG και Chromocult) δεν παρουσιάστηκε καμία αλλαγή στη μορφολογία των αποικιών.

Μετά τη 15η μέρα άλλαξε το βιοχημικό προφίλ της *E. coli* σε όλες τις συγκεντρώσεις. Η αλλαγή επήλθε στην αντίδραση MEL όπου από θετική εμφανίζονταν πλέον αρνητική. Σε όλες τις περιπτώσεις όμως δεν είχαμε αλλαγή στο είδος.

Επιπλέον, μετά την 23^η μέρα, παρατηρήθηκε απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών της *E. coli* στα κλασσικά υλικά σε όλες τις συγκεντρώσεις.

Λόγω της απώλειας αυτής, 0.1 mL από τα διαλύματα της *E. coli* EPTC εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν TSA άγαρ με EPTC. Ύστερα από επώαση των συγκεκριμένων τρυβλίων στους 36 °C για 24-48 h ώρες είχαμε επανεμφάνιση των αποικιών της *E. coli*. Οι εμφανιζόμενες αποικίες χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά με το σύστημα API 20E και το βιοχημικό προφίλ που έδωσε το σύστημα αυτό ήταν το τυπικό προφίλ της *E. coli*.



Ent. faecalis

Η μορφολογία των αποικιών του *Ent. faecalis* αρχικά ήταν τυπικές και έδιναν στο API STREP θετικές τις εξής βιοχημικές αντιδράσεις: VP, ESC, PYRA, LAP, ADH, RIB, MAN, SOR LAC, TRE και AMD. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η μορφολογία και οι βιοχημικές αντιδράσεις του *Ent. faecalis* του control δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή.

Την 21^η μέρα οι αποικίες του *Ent. faecalis* που εμφανίστηκαν στα εκλεκτικά υλικά ήταν μικρότερες σε μέγεθος σε σχέση με το control ενώ μετά την 25^η μέρα είχαμε απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών του *Ent. faecalis* στα κλασσικά υλικά για όλες τις συγκεντρώσεις.

Εξαιτίας της απώλειας αυτής, 0.1 mL από τα διαλύματα του *Ent. faecalis* σε EPTC εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν TSA άγαρ με EPTC. Ύστερα από επώαση αυτών των τρυβλίων με το τροποποιημένο άγαρ στους 36 °C για 24-48 h ώρες είχαμε επανεμφάνιση των αποικιών του *Ent. faecalis*.

Οι εμφανιζόμενες αποικίες χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά με το σύστημα API STREP. Διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στη βιοχημική αντίδραση ADH όπου από θετική εμφανίζονταν αρνητική.

Το βιοχημικό αυτό προφίλ αντιστοιχεί σε *Ent. faecalis* (44,6%) και *Ent. avium* (55,0%).



4.2.3 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

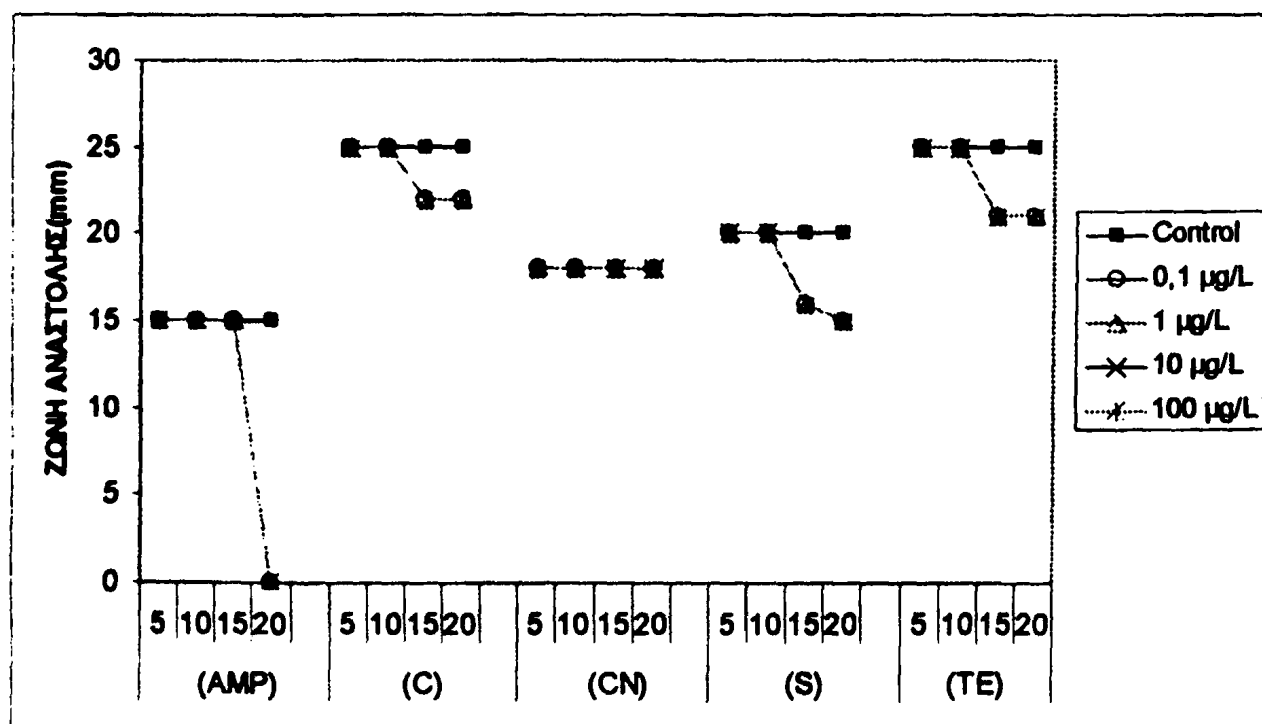
E. coli

Η *E. coli* που απομονώθηκε από τα διαλύματα EPTC δεν παρουσίασε για τη γενταμικίνη καμία αλλαγή στις ζώνες αναστολής σε σχέση με το control, και συγκεκριμένα παρέμεινε ευαίσθητη (Σχήμα 8).

Αλλαγές εμφανίστηκαν και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις στη χλωραμφαινικόλη όπου από τη 15^η μέρα είχαμε μείωση της ζώνης αναστολής. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε για όλες τις συγκεντρώσεις στη στρεπτομυκίνη και στη τετρακυκλίνη.

Ωστόσο οι αλλαγές που είχαμε και στα τέσσερα αντιβιοτικά δεν επέφεραν αλλαγή στην ανθεκτικότητα της *E. coli*. Εξακολούθησε δηλαδή να είναι και στα τέσσερα ευαίσθητη, όπως ακριβώς ήταν η *E. coli* στο control.

Αλλαγή στην ανθεκτικότητα της *E. coli* είχαμε στην αμπικιλίνη την 20^η μέρα και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις, όπου από ενδιάμεσα ευαίσθητη έγινε ανθεκτική.



Σχήμα 8 Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων EPTC στην ανθεκτικότητα της *E. coli* στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά

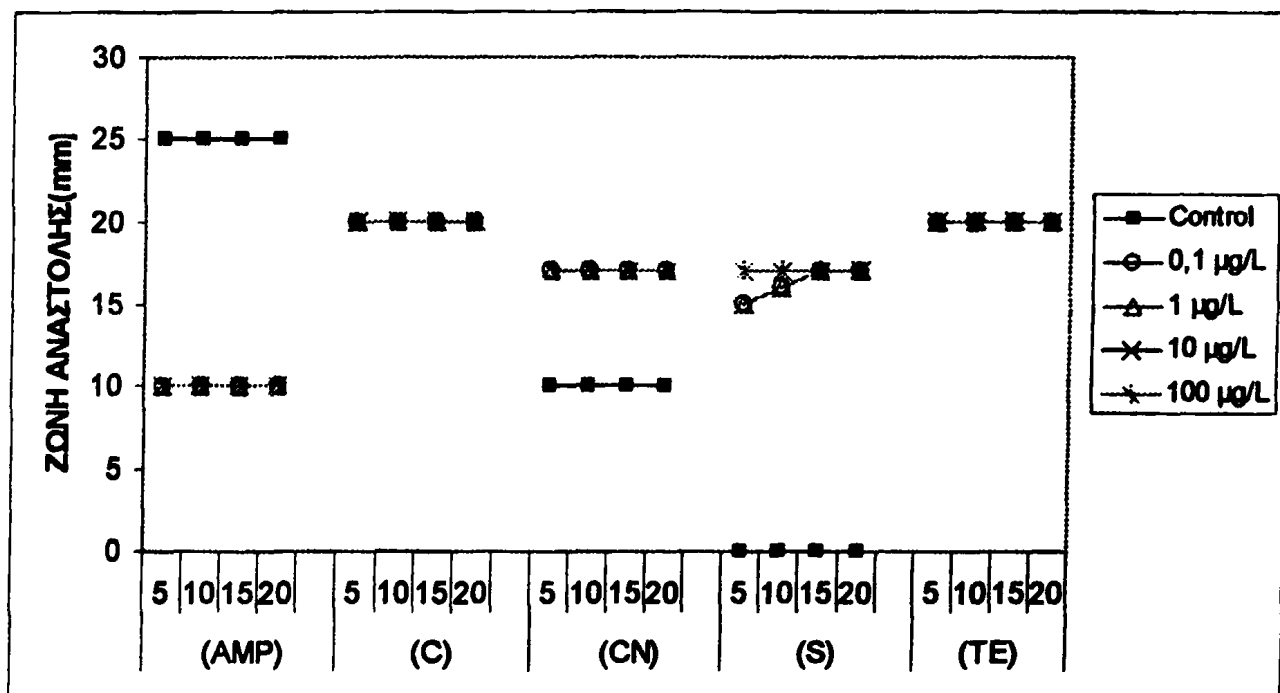


Ent. faecalis

Ο *Ent. faecalis* που απομονώθηκε από τα διαλύματα EPTC δεν παρουσίασε καμία αλλαγή στις ζώνες αναστολής σε σχέση με το control, για τα αντιβιοτικά χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη και στις δύο περιπτώσεις παρέμεινε ευαίσθητο (Σχήμα 9).

Στα υπόλοιπα τρία αντιβιοτικά είχαμε αλλαγές στην ανθεκτικότητα του *Ent. faecalis*. Στην αμπικιλλίνη είχαμε και στις τέσσερις συγκεντρώσεις μείωση της ζώνης αναστολής και από ευαίσθητος έγινε ανθεκτικός.

Αντίθετα, στη γενταμικίνη και τη στρεπτομικίνη είχαμε αύξηση των ζωνών αναστολής και από ανθεκτικός έγινε ευαίσθητος.



Σχήμα 9 Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων EPTC στην ανθεκτικότητα του *Ent. faecalis* στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά



3 TRIFLURALIN^[54]

3.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

trifluralin - *E. coli*

Οι καμπύλες ανάπτυξης της *E. coli* στο σχήμα 10. Την 1^η ώρα η ανάπτυξη της *E. coli* είναι ίδια με του control ($p \geq 0.05$) και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις (0.1, 1, 10 και 100 $\mu\text{g/L}$). Στατιστικά σημαντική ανάπτυξη ($p < 0.05$) σε σχέση με το control αρχίζει παρουσιάζεται για τη συγκέντρωση των 10 $\mu\text{g/L}$ τη 2^η h, για τη 0.1 $\mu\text{g/L}$ τη 4^η h, για την 100 $\mu\text{g/L}$ την 6^η h και για τη 1 $\mu\text{g/L}$ την 21^η h.

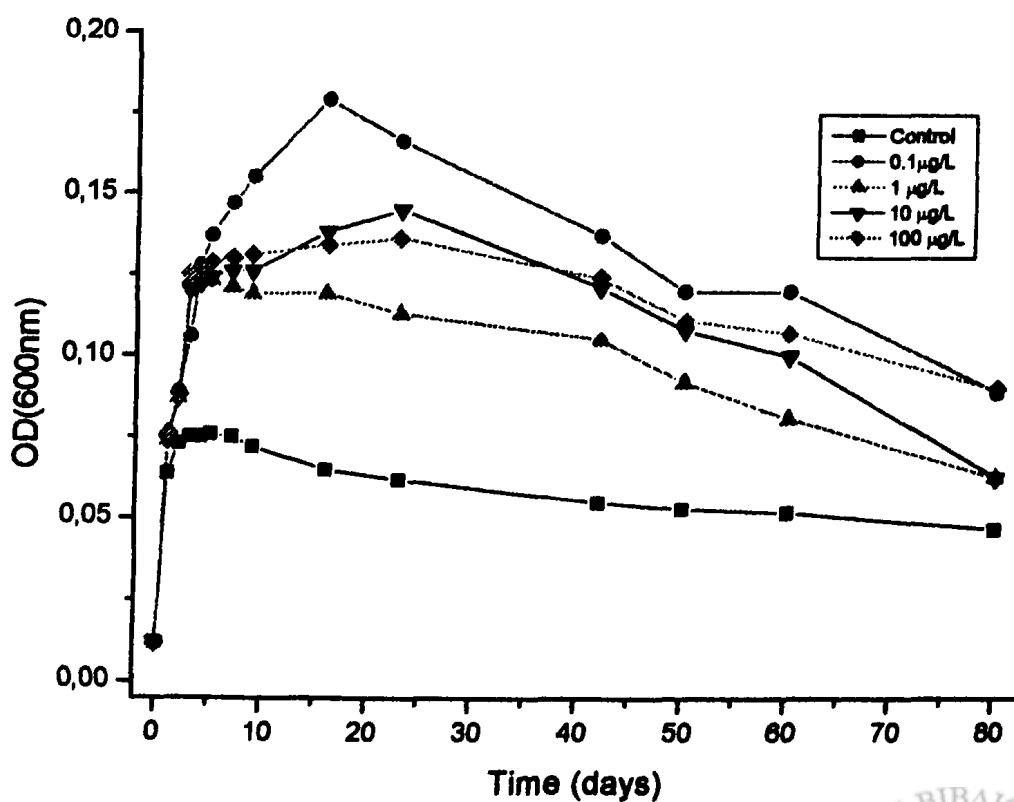
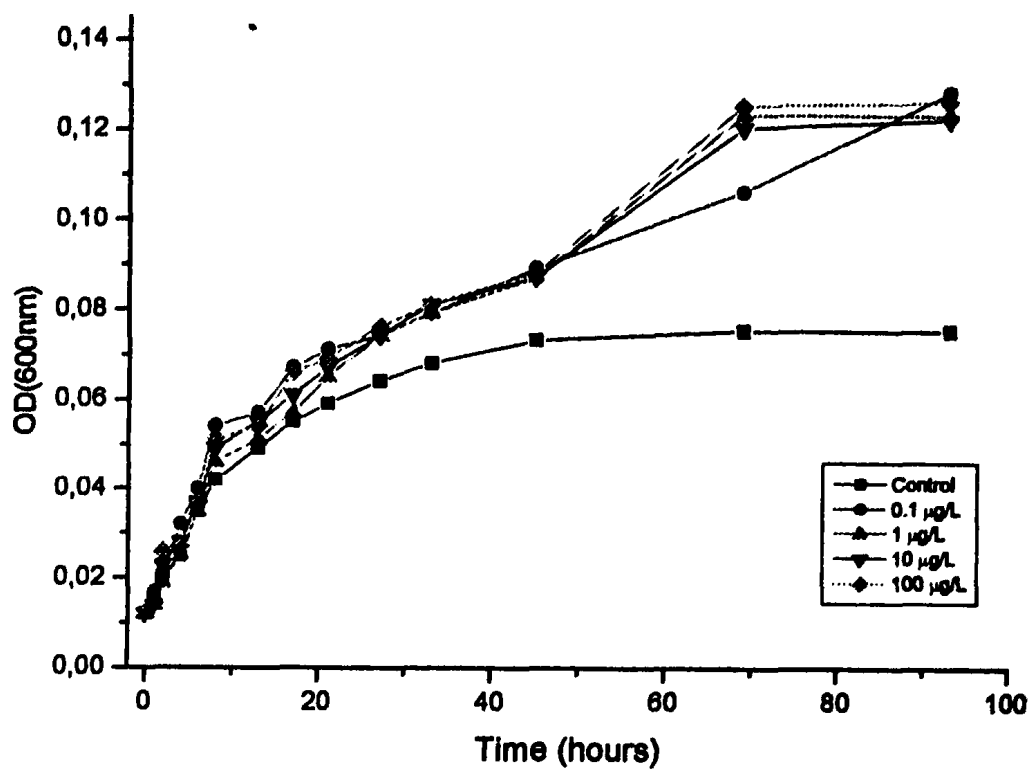
Η υψηλότερη ανάπτυξη εμφανίζεται τη 16^η μέρα για την συγκέντρωση των 0.1 $\mu\text{g/L}$. Ακολουθούν κατόπιν με την υψηλότερη ανάπτυξη την 23^η μέρα οι συγκεντρώσεις των 10 $\mu\text{g/L}$ και 100 $\mu\text{g/L}$ ενώ η ανάπτυξη στη συγκέντρωση του 1 $\mu\text{g/L}$ παραμένει σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το control ($p \leq 0.05$).

Trifluralin - *Ent. faecalis*

Η βραχυπρόθεσμη και η μακροπρόθεσμη καμπύλες ανάπτυξης του *Ent. faecalis* παρουσία trifluralin απεικονίζονται στο σχήμα 11. Κατά τη διάρκεια των 6 πρώτων ωρών η καμπύλη ανάπτυξης παρουσιάζει μία κλίση πιθανότατα λόγω στρεσαρίσματος ή αυτόλυσης. Αντίθετα στη περίπτωση της συγκέντρωσης του 0.1 $\mu\text{g/L}$ εμφανίζεται μία μικρή ανάπτυξη σε σχέση με το control. Ελάχιστο στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού εμφανίζεται την 6^η ώρα για τη συγκέντρωση των 100 $\mu\text{g/L}$. Την 48^η ώρα εμφανίζεται μία απότομη αύξηση για την συγκέντρωση του 0.1 $\mu\text{g/L}$ και ακολουθούν οι συγκεντρώσεις των 10 και 100 $\mu\text{g/L}$. Αντίθετα η συγκέντρωση του 0.1 $\mu\text{g/L}$ παραμένει σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με το control.

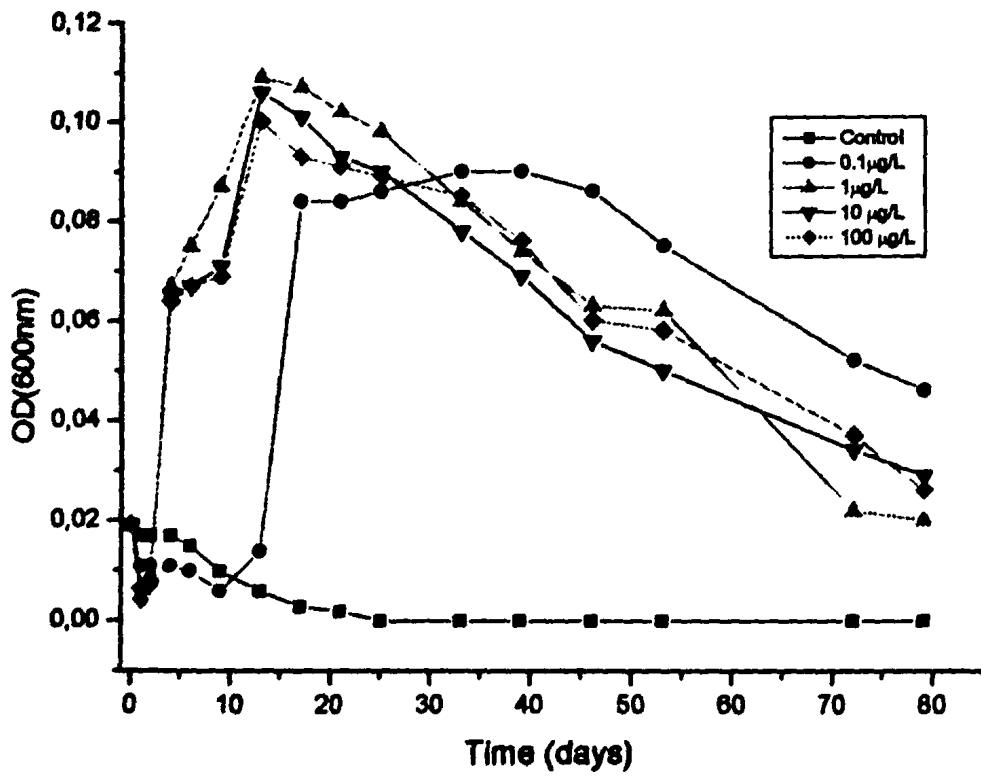
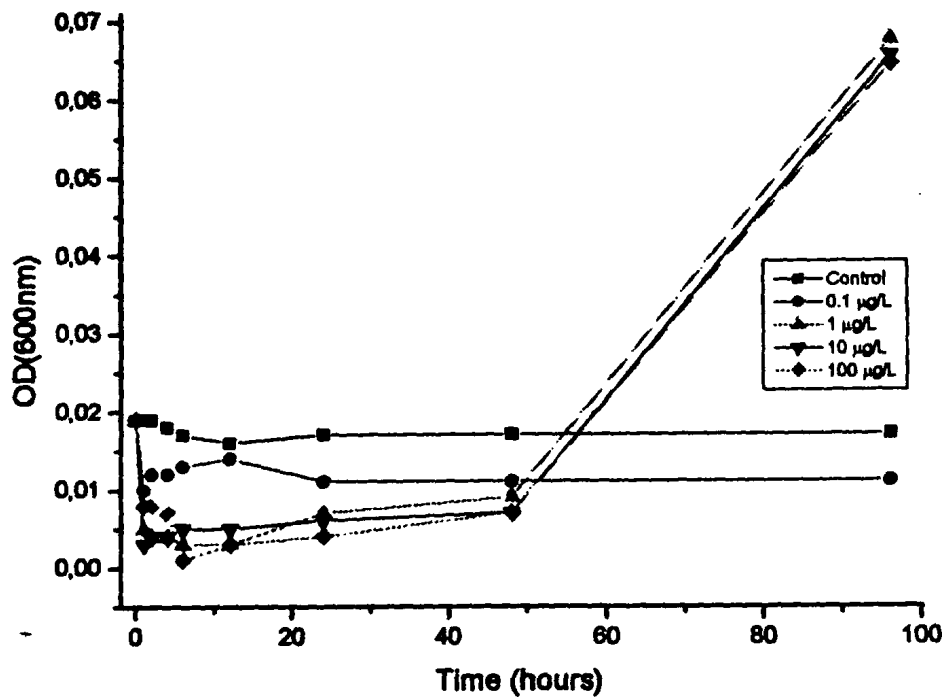
Η μεγαλύτερη ανάπτυξη για τον *Ent. faecalis* εμφανίζεται τη 13^η μέρα για τις συγκεντρώσεις των 1, 10 και 100 $\mu\text{g/L}$. Την 17^η μέρα για τη συγκέντρωση του 0.1 $\mu\text{g/L}$ παρουσιάζεται μία απότομη ανάπτυξη, ενώ την 25^η μέρα το control τείνει στο 0. Δε θα πρέπει να παραλειφθεί ότι τόσο η βραχυπρόθεσμη όσο και η μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του *Ent. faecalis* παρουσία του trifluralin ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με το control ($p < 0.05$).





Σχήμα 10 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της *E. coli* παρουσία trifluralin





Σχήμα 11 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του *Ent. faecalis* παρουσία rifluralin



4.3.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

E. coli

Η μορφολογία των αποικιών της *E. coli* αρχικά ήταν τυπικές και έδιναν θετικές τις εξής βιοχημικές αντιδράσεις στο API 20E : ONPG, LDC, ODC, IND, GLU, MAN, SOR, RHA, MEL και ARA. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η μορφολογία και οι βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli* του control δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή.

Εντούτοις, παρουσιάστηκαν αλλαγές τόσο στη μορφολογία όσο και στις βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli* που απομονώθηκε από τα διαλύματα του trifluralin. Οι παραγόμενες στο Mac Conkey Agar MUG αποικίες δεν φωσφόριζαν έντονα ενώ οι παραγόμενες στο Chromocult αποικίες αντί για μοβ έβγαιναν ροζ. Επιπλέον οι παραγόμενες στο mFC άγαρ αποικίες αντί για λείες μπλε εμφανίζονταν ρυτιδώδεις.

Μετά τη 15η μέρα άλλαξε το βιοχημικό προφίλ της *E. coli* στη συγκέντρωση των 100 µg/L. Η αλλαγή επήλθε στην αντίδραση MEL όπου από θετική εμφανίζονταν πλέον αρνητική. Η ίδια αλλαγή επήλθε την 23η μέρα για την συγκέντρωση των 10 µg/L και την 42η μέρα για την συγκέντρωση του 1 µg/L. Σε όλες τις περιπτώσεις όμως δεν είχαμε αλλαγή στο είδος.

Επιπλέον, μετά την 23^η μέρα, παρατηρήθηκε απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών της *E. coli* στα κλασσικά υλικά σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός του 0.1 µg/L. Η ίδια παρατήρηση έγινε και την 60^η μέρα για τη συγκέντρωση του 0.1 µg/L.

Λόγω της απώλειας αυτής, 0.1 mL από τα διαλύματα της *E. coli* trifluralin εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν TSA άγαρ με trifluralin. Ύστερα από επώαση αυτών των τρυβλίων με το τροποποιημένο άγαρ στους 36 °C για 24-48 h ώρες είχαμε επανεμφάνιση των αποικιών της *E. coli*. Οι εμφανιζόμενες αποικίες χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά με το σύστημα API 20E και οι διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν για τις συγκεντρώσεις των 10 και 100 µg/L ήταν οι εξής: -IND, +VP, ±GLU, ±SOR, -MEL και -ARA. Ενώ για τη συγκέντρωση 0.1 µg/L: -IND, +VP και ±GLU. Τα συγκεκριμένα βιοχημικά προφίλ αντιστοιχούν σε *Hafnia alvei* (καλή αναγνώριση του γένους).



E. faecalis

Η μορφολογία των αποικιών του *Ent. faecalis* αρχικά ήταν τυπικές και έδιναν στο API STREP θετικές τις εξής βιοχημικές αντιδράσεις: VP, ESC, PYRA, LAP, ADH, RIB, MAN, OR LAC, TRE και AMD. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η μορφολογία και οι βιοχημικές αντιδράσεις του *Ent. faecalis* του control δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή.

Την 20^η μέρα οι αποικίες του *Ent. faecalis* που εμφανίστηκαν στα εκλεκτικά υλικά ήταν μικρότερες σε μέγεθος σε σχέση με το control ενώ μετά την 25^η μέρα είχαμε απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών του *Ent. faecalis* στα κλασσικά υλικά για όλες τις συγκεντρώσεις πλην της 0.1 μg/L όπου η απώλεια αυτή ανιχνεύτηκε μετά την 41^η μέρα.

Εξαιτίας της απώλειας αυτής, 0.1 mL από τα διαλύματα του *Ent. faecalis* σε trifluralin εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν TSA άγαρ με trifluralin. Ύστερα από επώαση αυτών των τρυβλίων με το τροποποιημένο άγαρ στους 36 °C για 24-48 h ώρες είχαμε επανεμφάνιση των αποικιών του *Ent. faecalis*. Οι εμφανιζόμενες αποικίες χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά με το σύστημα API STREP και οι διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν ήταν οι εξής:

Στη συγκέντρωση των 0.1 μg/L +HIP (24h), +βGAL, +PAL, +ARA, και -AMD. Το βιοχημικό αυτό προφίλ αντιστοιχεί σε *Ent. faecium* (99.5%).

Στη συγκέντρωση των 1 μg/L +βGAL, +PAL, -ADH, +ARA και -AMD. Το βιοχημικό αυτό προφίλ αντιστοιχεί σε *Ent. faecium* (9,2%) και *Ent. avium* (90,7%).

Στη συγκέντρωση των 10 μg/L +PAL, -ADH, -RIB, +ARA και -AMD. Το βιοχημικό αυτό προφίλ αντιστοιχεί σε *Ent. avium* (99%).

Στη συγκέντρωση των 100 μg/L +HIP, +βGAL, +PAL, -ADH, +ARA και -AMD. Το βιοχημικό αυτό προφίλ αντιστοιχεί σε *Ent. avium* (67,6%) και *Ent. faecium* (32,2%).



4.3.3 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

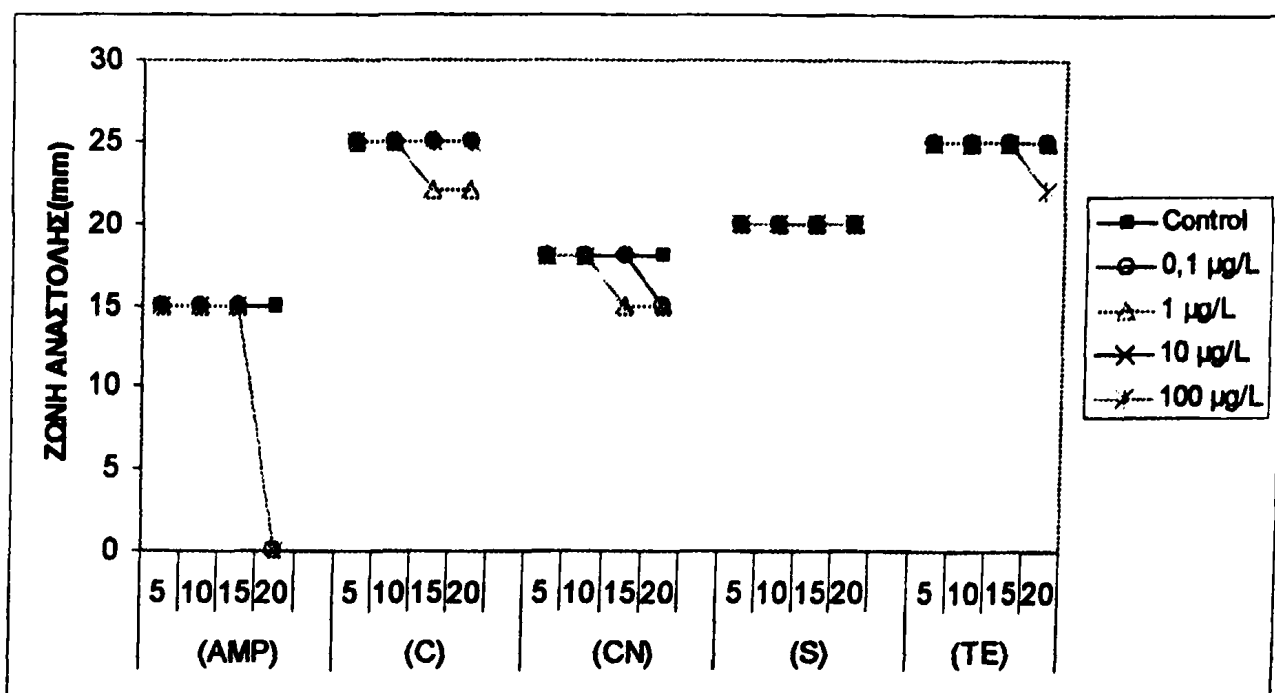
E. coli

Η *E. coli* που απομονώθηκε από τα διαλύματα trifluralin δεν παρουσίασε για τη στρεπτομυκίνη καμία αλλαγή σε σχέση με το control στις ζώνες αναστολής και συγκεκριμένα παρέμεινε ευαίσθητη (Σχήμα 12).

Αλλαγές εμφανίστηκαν στη χλωραμφαινικόλη, για τη συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/L}$ όπου από τη 15^η μέρα είχαμε μείωση της ζώνης αναστολής. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στη γενταμυκίνη για όλες τις συγκεντρώσεις εκτός της 0.1 $\mu\text{g/L}$ όπου η μείωση της ζώνης αναστολής εμφανίστηκε την 20^η μέρα.

Στη τετρακυκλίνη μείωση της ζώνης αναστολής εμφανίστηκε για τις συγκεντρώσεις 10 και 100 $\mu\text{g/L}$ την 20^η μέρα. Και στα τρία όμως αυτά αντιβιοτικά οι αλλαγές δεν επέφεραν αλλαγή στην ανθεκτικότητα της *E. coli*. Συνέχισε δηλαδή να είναι ευαίσθητη στη χλωραμφαινικόλη, στη γενταμυκίνη και στη τετρακυκλίνη όπως δηλαδή ήταν και η *E. coli* στο control.

Αλλαγή στην ανθεκτικότητα της *E. coli* είχαμε στην αμπικιλίνη την 20^η μέρα και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις όπου από ενδιάμεσα ευαίσθητη έγινε ανθεκτική.



Σχήμα 12 Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων trifluralin στην ανθεκτικότητα της *E. coli* στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά

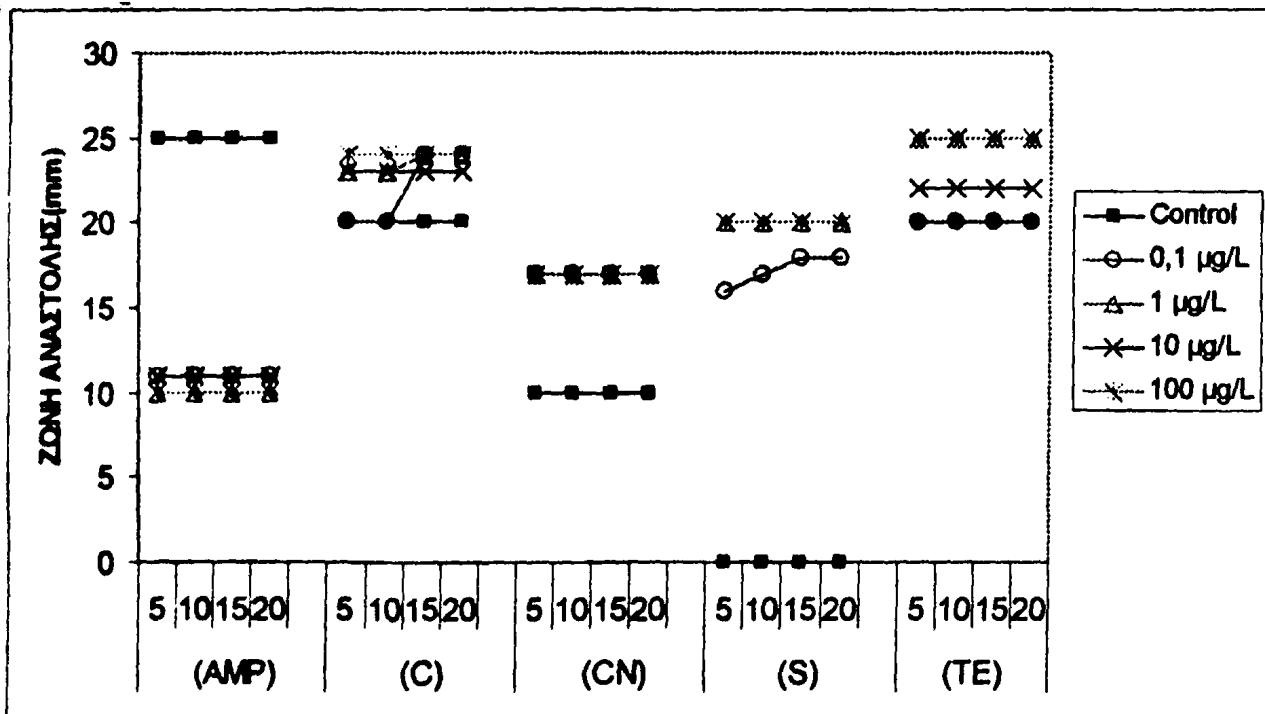


Ent. faecalis

Ο *Ent. faecalis* που απομονώθηκε από τα διαλύματα trifluralin παρουσίασε αλλαγές σε σχέση με το control στις ζώνες αναστολής, για τα αντιβιοτικά χλωραμφαινικόλη και τετρακυκλίνη (Σχήμα 13). Παρατηρήθηκε αύξηση των ζωνών ευαισθησίας σε όλες τις συγκεντρώσεις πλην της συγκέντρωσης 0.1 µg/L στην τετρακυκλίνη. Εντούτοις, παρέμεινε ευαίσθητος και στα δύο αντιβιοτικά..

Στα υπόλοιπα τρία αντιβιοτικά είχαμε αλλαγές και στην ανθεκτικότητα του *Ent. faecalis*. Στην αμπικιλλίνη είχαμε μείωση της ζώνης αναστολής και στις τέσσερις συγκεντρώσεις και από ευαίσθητος έγινε ανθεκτικός.

Αντίθετα, στη γενταμικίνη και τη στρεπτομυκίνη είχαμε αύξηση των ζωνών αναστολής και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις και από ανθεκτικός έγινε ευαίσθητος.



Σχήμα 13 Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων trifluralin στην ανθεκτικότητα του *Ent. faecalis* στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά

4.4 PROPANIL

4.4.1 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Propanil - *E. coli*

Οι καμπύλες ανάπτυξης της *E. coli* παρουσία propanil παρουσιάζονται στο Σχήμα 14. Τις πρώτες 21 ώρες οι καμπύλες ανάπτυξης εμφανίζουν μία στατιστικά σημαντική ανάπτυξη της *E. coli* ($p < 0.05$) σε σχέση με το control (εκτός της συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g/L}$ για την 17^η ώρα όπου το OD παίρνει την ίδια τιμή με το control). Ειδικότερα για τη συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/L}$ η ανάπτυξη αυτή συνεχίζει μέχρι τη 93^η ώρα ($p < 0.05$).

Μετά την 2^η μέρα και μέχρι την 4^η μέρα για τις συγκεντρώσεις 1 και 100 $\mu\text{g/L}$ ενώ μέχρι την 5^η μέρα για τη 10 $\mu\text{g/L}$, εμφανίζονται μικρότερες ή ίσες τιμές OD σε σχέση με το control. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται πάλι την 9^η μέρα για όλες τις συγκεντρώσεις και συνεχίζεται μέχρι την 23^η για τις 0,1, 10 και 100 $\mu\text{g/L}$ όπου έχουμε πάλι μικρότερες τιμές OD σε σχέση με αυτές του control. Από την 42^η μέρα και μέχρι το τέλος της μελέτης αυτής (80^η μέρα) είχαμε στατιστικά σημαντική ανάπτυξη και για τις 4 συγκεντρώσεις ($p < 0.05$).

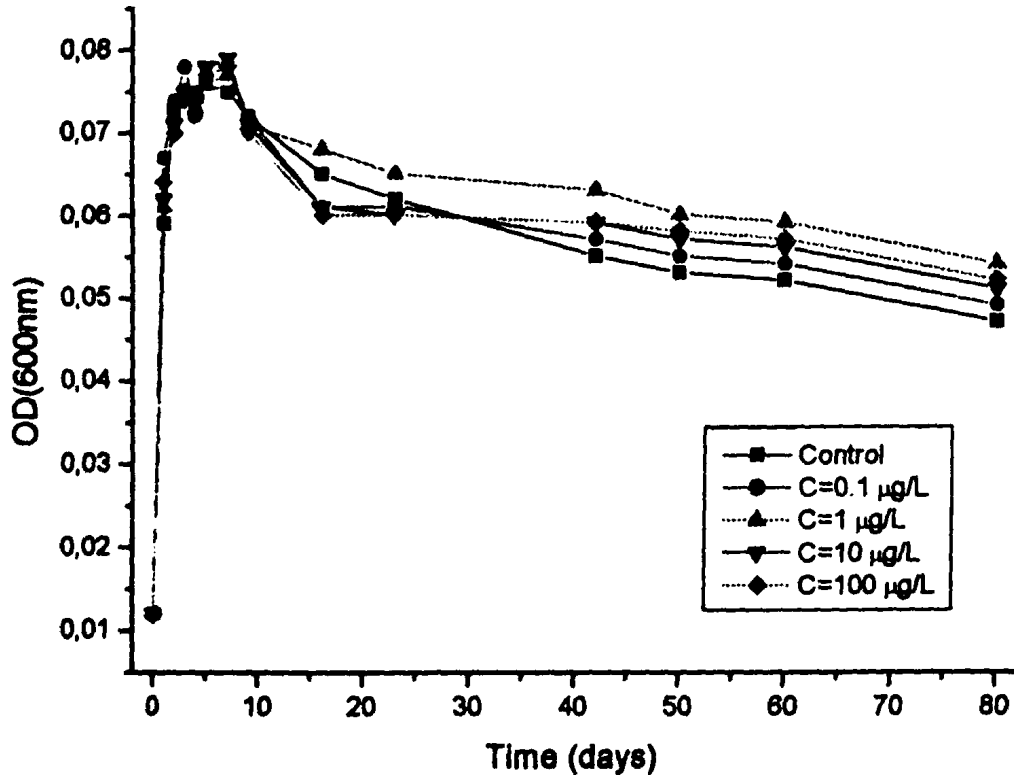
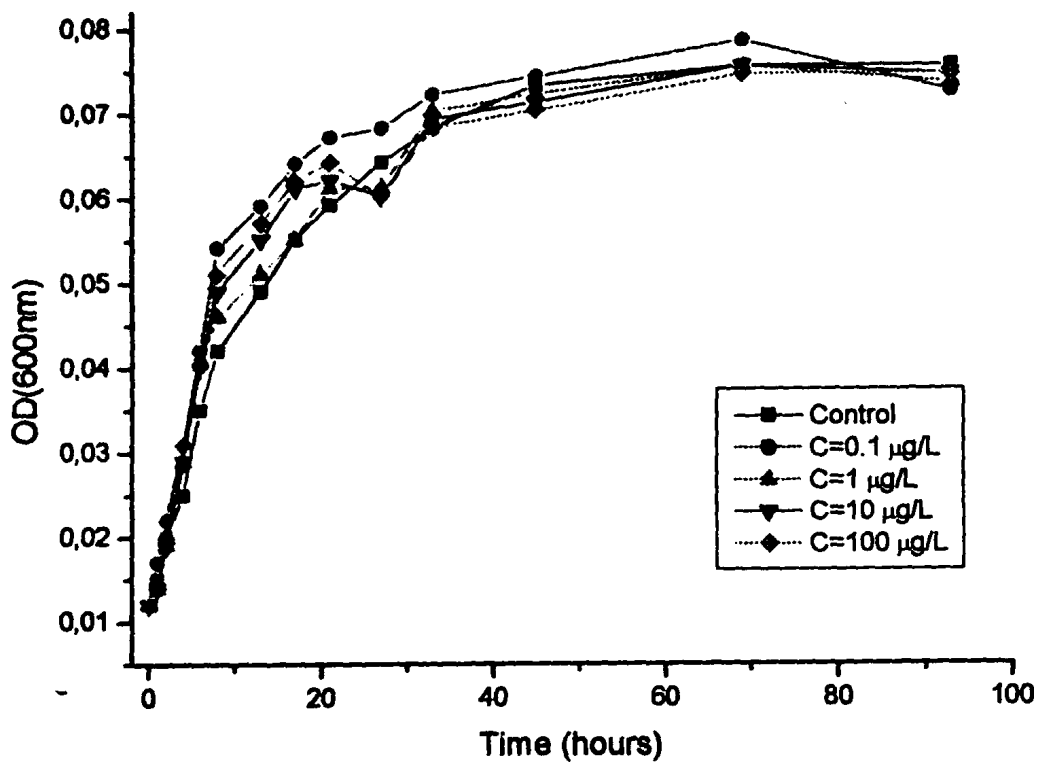
Propanil – *Ent. faecalis*

Η βραχυπρόθεσμη και η μακροπρόθεσμη καμπύλη ανάπτυξης του *Ent. faecalis* παρουσία propanil απεικονίζονται στο Σχήμα 15.

Για τις πρώτες 6 ώρες οι καμπύλες ανάπτυξης των συγκεντρώσεων 1 και 10 $\mu\text{g/L}$ παραμένουν σε χαμηλότερα ή στα ίδια επίπεδα με το control. Για τη συγκέντρωση 0.1 $\mu\text{g/L}$ το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται μέχρι την 4^η ώρα ενώ για τη συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/L}$ μέχρι τη 2^η ώρα.

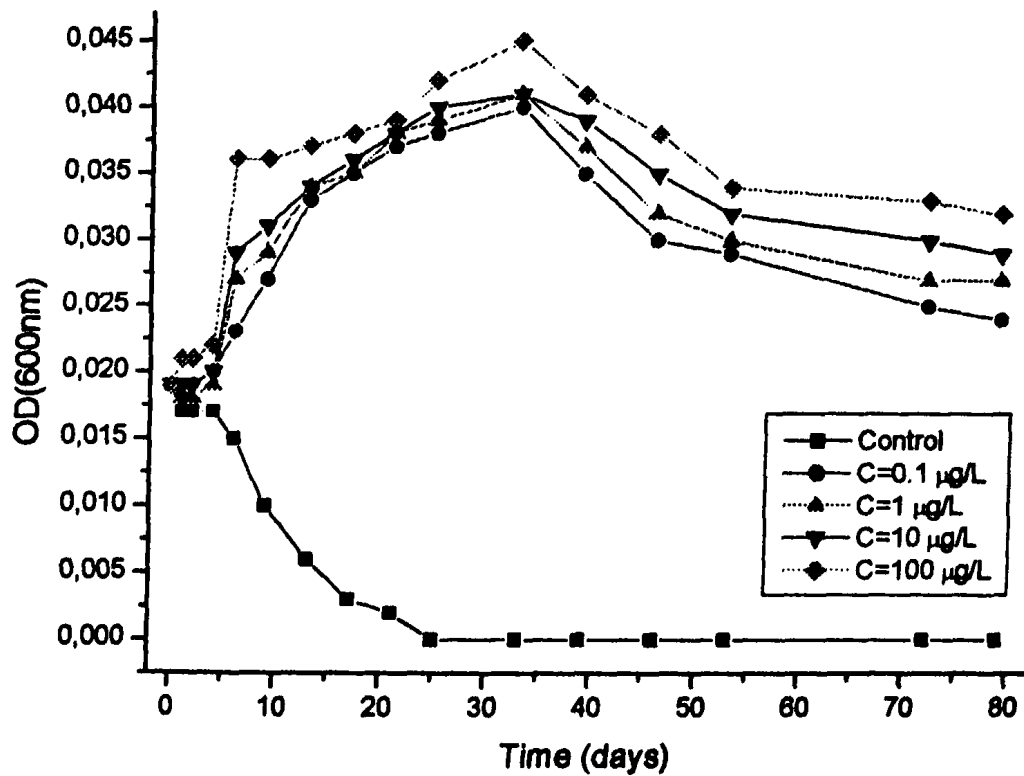
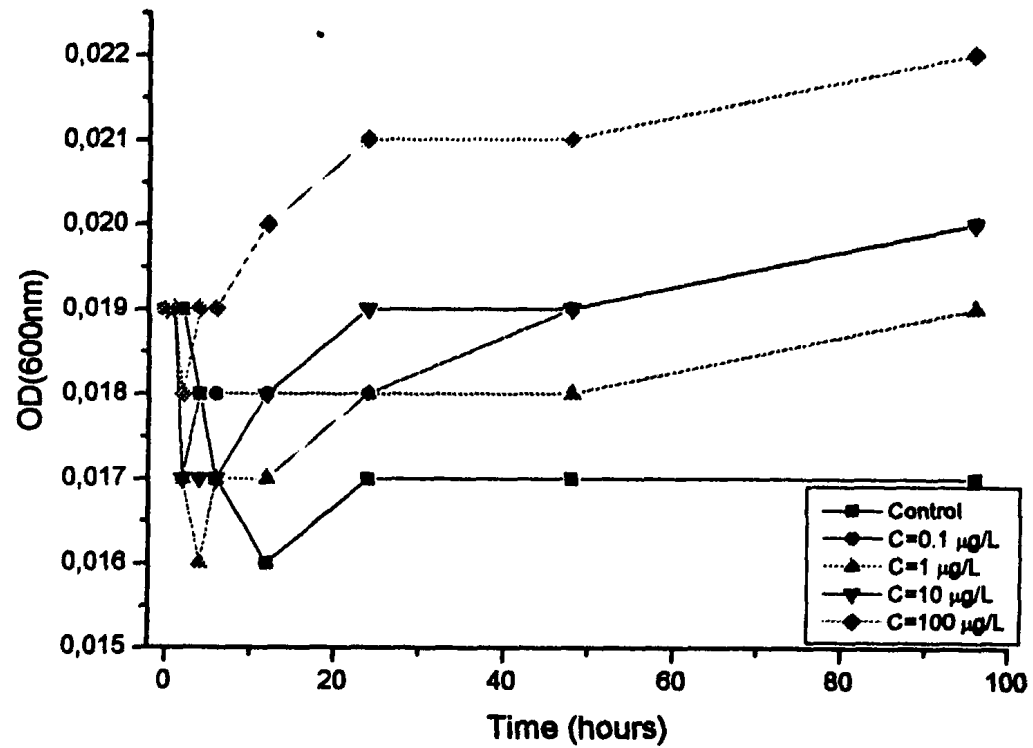
Από την 6^η μέρα παρατηρήθηκε απότομη αύξηση του OD και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις με στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με το control. Μέγιστη τιμή OD παρατηρήθηκε την 33^η μέρα για τη συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/L}$.





Σχήμα 14 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη της *E. coli* παρουσία propanil





Σχήμα 15 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη ανάπτυξη του *Ent. faecalis* παρουσία propanil



4.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΛΑΕΓΜΕΝΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

coli

Η μορφολογία των αποικιών της *E. coli* αρχικά ήταν τυπική. Στο API 20E θετικές εμφανίζονταν οι εξής βιοχημικές αντιδράσεις: ONPG, LDC, ODC, IND, GLU, MAN, SOR, HA, MEL και ARA. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η μορφολογία και οι βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli* του control δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή.

Παρουσιάστηκαν αλλαγές εντούτοις τόσο στη μορφολογία όσο και στις βιοχημικές αντιδράσεις της *E. coli* που απομονώθηκε από τα διαλύματα του propa₁il.

Οι παραγόμενες στο m-Endo agar Les αποικίες εμφανίζονταν μικρότερες σε μέγεθος ενώ μετά την 23^η μέρα έχασαν την μεταλλική τους χροιά. Οι παραγόμενες στο mFC άγαρ αποικίες αντί για λείες μπλε εμφανίζονταν ρυτιδώδεις.

Μετά τη 15^η μέρα άλλαξε το βιοχημικό προφίλ της *E. coli* σε όλες τις συγκεντρώσεις. Η αλλαγή επήλθε στην αντίδραση MEL όπου από θετική εμφανίζονταν πλέον αρνητική. Σε όλες τις περιπτώσεις όμως δεν είχαμε αλλαγή στο είδος.

Επιπλέον, μετά την 37^η μέρα, παρατηρήθηκε απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών της *E. coli* στα κλασσικά υλικά σε όλες τις συγκεντρώσεις.

Λόγω της απώλειας αυτής, 0.1 mL από τα διαλύματα της *E. coli* EPTC εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν TSA άγαρ με EPTC. Ύστερα από επώαση των συγκεκριμένων τρυβλίων στους 36 °C για 24-48 h ώρες είχαμε επανεμφάνιση των αποικιών της *E. coli*. Οι εμφανιζόμενες αποικίες χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά με το σύστημα API 20E και το βιοχημικό προφίλ που έδωσε το σύστημα αυτό ήταν το τυπικό προφίλ της *E. coli*.



Ent. faecalis

Η μορφολογία των αποικιών του *Ent. faecalis* αρχικά ήταν τυπικές και έδιναν στο API STREP θετικές τις εξής βιοχημικές αντιδράσεις: VP, ESC, PYRA, LAP, ADH, RIB, MAN, SOR LAC, TRE και AMD. Κατά τη διάρκεια του πειράματος η μορφολογία και οι βιοχημικές αντιδράσεις του *Ent. faecalis* του control δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή.

Εντούτοις, παρουσιάστηκαν αλλαγές τόσο στη μορφολογία όσο και στις βιοχημικές αντιδράσεις του *Ent. faecalis* που απομονώθηκε από τα διαλύματα atrazine.

Οι αποικίες του *Ent. faecalis* που εμφανίζονταν στα εκλεκτικά υλικά ήταν μικρότερες σε μέγεθος σε σχέση με το control ενώ μετά την 23^η μέρα παρουσιάστηκαν και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις αλλαγές στις βιοχημικές αντιδράσεις. Η αντίδραση SOR από θετική εμφανίζονταν αρνητική. Το συγκεκριμένο βιοχημικό προφίλ αντιστοιχεί σε *Ent. faecalis* (60,1%) και σε *Lc. lactis lactis* (37%).

Επιπλέον, μετά την 72^η μέρα είχαμε απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών του *Ent. faecalis* στα κλασσικά υλικά για όλες τις συγκεντρώσεις.

Για το λόγο αυτό, 0.1 mL από τα διαλύματα του *Ent. faecalis* σε prapanil εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν TSA άγαρ με prapanil. Ύστερα από επώαση αυτών των τρυβλίων με το τροποποιημένο άγαρ στους 36 °C για 24-48 h ώρες και κατόπιν σε θερμοκρασία δωματίου για 24-72 ώρες είχαμε επανεμφάνιση των τυπικών αποικιών του *Ent. faecalis*. Οι εμφανιζόμενες αποικίες χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά με το σύστημα API STREP και το βιοχημικό προφίλ που έδωσε το συγκεκριμένο σύστημα αντιστοιχούσε στο τυπικό προφίλ του *Ent. faecalis*.



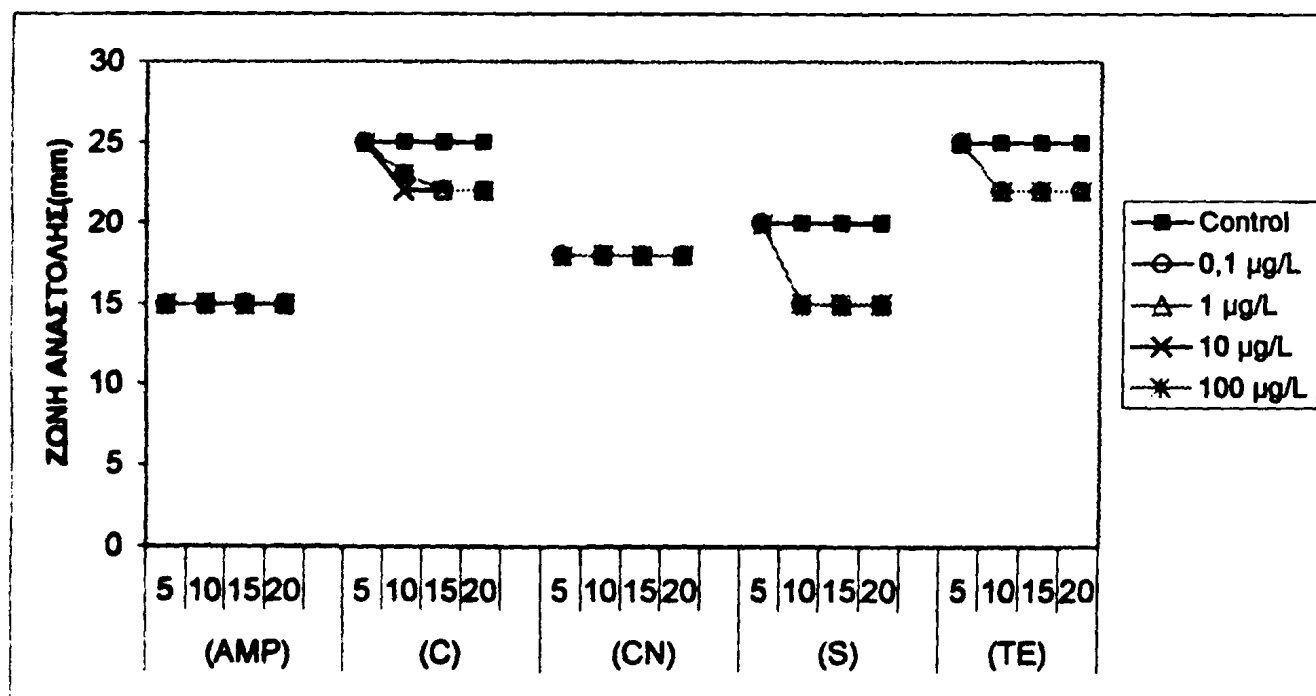
4.3 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

E. coli

Η *E. coli* που απομονώθηκε από τα διαλύματα groranil δεν παρουσίασε καμία αλλαγή στις ζώνες αναστολής σε σχέση με το control, για τα αντιβιοτικά αμπικιλίνη και κενταμυκίνη Σχήμα 16. Συγκεκριμένα στη πρώτη περίπτωση παρέμεινε μετρίως ευαίσθητη και στη δεύτερη ευαίσθητη.

Αλλαγές εμφανίστηκαν και για τις τέσσερις συγκεντρώσεις στη χλωραμφαινικόλη όπου από τη 10^η μέρα είχαμε μείωση της ζώνης αναστολής. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε στη στρεπτομυκίνη και τη τετρακυκλίνη.

Και για τα τρία όμως αυτά αντιβιοτικά οι αλλαγές δεν επέφεραν αλλαγή στην ανθεκτικότητα της *E. coli*. Συνέχισε δηλαδή να είναι ευαίσθητη στα συγκεκριμένα αντιβιοτικά όπως και η *E. coli* του control.



Σχήμα 16 Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων groranil στην ανθεκτικότητα της *E. coli* στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά



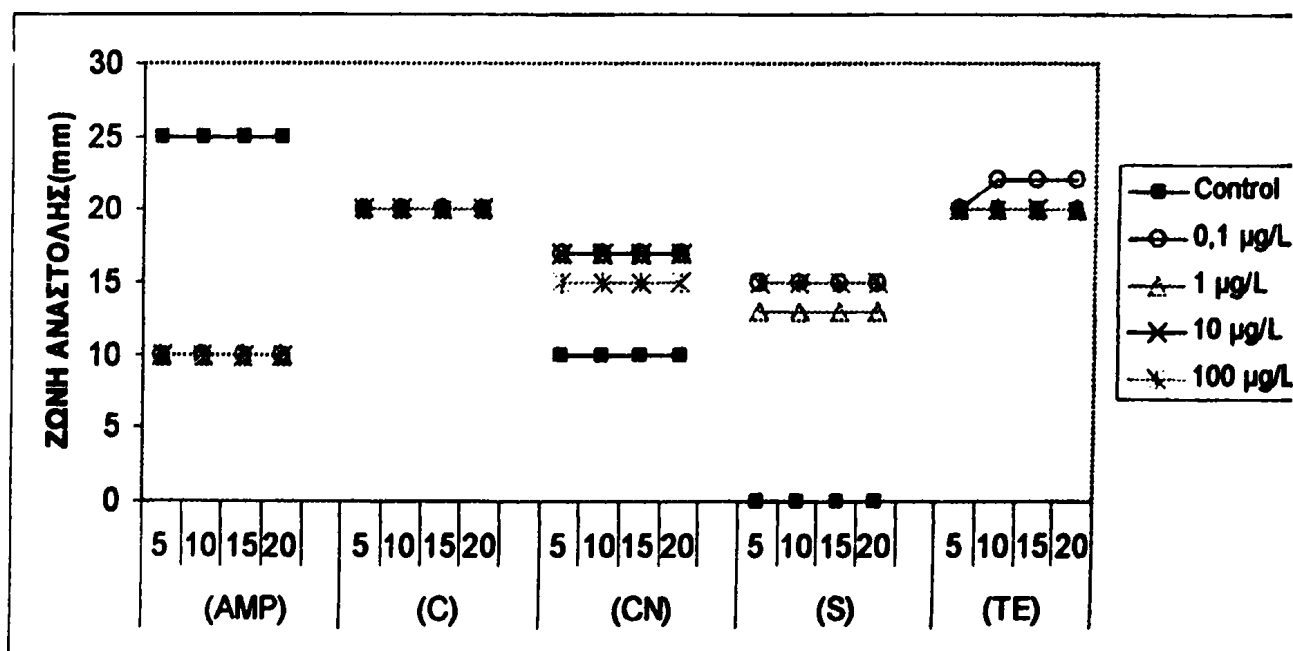
Ent. faecalis

Ο *Ent. faecalis* που απομονώθηκε από τα διαλύματα propanil, δεν παρουσίασε καμία αλλαγή στις ζώνες αναστολής σε σχέση με το control στη χλωραμφαινικόλη δηλαδή παρέμεινε ευαίσθητος Σχήμα 17.

Στη τετρακυκλίνη και για τη συγκέντρωση 0.1 µg/L παρατηρήθηκε μία μικρή μείωση στη ζώνη αναστολής από τη 10^η μέρα παρόλα αυτά παρέμεινε ευαίσθητος.

Στα υπόλοιπα τρία αντιβιοτικά από τη 5^η μέρα είχαμε αλλαγές στην ανθεκτικότητα του *Ent. faecalis*. Στην αμπικιλίνη παρατηρήθηκε και στις τέσσερις συγκεντρώσεις μείωση της ζώνης αναστολής και από ευαίσθητος έγινε ανθεκτικός.

Αντίθετα, στη γενταμικίνη και τη στρεπτομικίνη είχαμε αύξηση των ζωνών αναστολής. Στη πρώτη περίπτωση ο *Ent. faecalis* από ανθεκτικός έγινε ευαίσθητος, ενώ στη δεύτερη από ανθεκτικός ενδιάμεσα ευαίσθητος (1 µg/L) και ευαίσθητος (0.1, 10 και 100 µg/L).



Σχήμα 17 Επίδραση των τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων propanil στην ανθεκτικότητα του *Ent. faecalis* στα πέντε επιλεγμένα αντιβιοτικά



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μικροοργανισμοί καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα μεγεθών και μορφολογιών, εμφανίζονται σε κάθε νοητό φυσικό περιβάλλον και χρησιμοποιούν διάφορα είδη πηγών θρεπτικών συστατικών, κινητές και μη κινητές μορφές, καθώς και ένα ευρύ φάσμα βιολογικών αναπαραγωγής και ανάπτυξης.

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν υδάτινους οργανισμούς έχουν να κάνουν με άλγη, ενώ το περισσότερο μελετούμενο φυτοφάρμακο είναι το atrazine. Ένα σημαντικό ποσοστό μελετών εστιάζεται στην μικροβιακή αποικοδόμηση των φυτοφαρμάκων παρά στους εντίκτυπους στους φυσικούς μικροβιακούς πληθυσμούς. Επιπρόσθετα, οι μελέτες που αφορούν τις επιδράσεις των φυτοφαρμάκων σε μικροοργανισμούς του εδάφους είναι μακράν περισσότερες από εκείνες που αφορούν τις επιδράσεις αυτών στα υδάτινα περιβάλλοντα^[55].

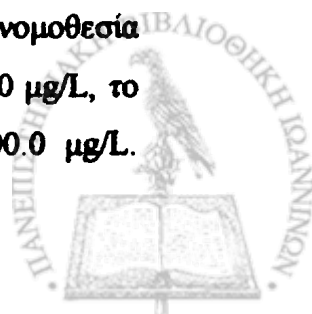
Η κατανόηση της συμπεριφοράς των βακτηρίων στους χημικούς ρύπους των υδάτων μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για εκείνους που είναι αρμόδιοι για τη βελτίωση της ποιότητας νερού και τη προάσπιση της δημόσιας υγείας.

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 ανάπτυξη τους^[56,57]. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι υπολογισμοί βάσει της καταμέτρησης τους να μας δίνουν λανθασμένες εκτιμήσεις.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μας έδωσαν πληροφορίες για την επίδραση τεσσάρων επιλεγμένων σύγχρονων ζιζανιοκτόνων του atrazine του EPTC του propanil και του trifluralin σε δύο μικροβιακούς δείκτες την *E. coli* και τον *Ent. faecalis* και συγκεκριμένα στην ανάπτυξη τους, τη μορφολογία τους, τις βιοχημικές τους αντιδράσεις, και στην ανθεκτικότητα τους στα αντιβιοτικά.

Η *E. coli* και ο *Ent. faecalis* επιλέχθηκαν ως οι αντιπροσωπευτικότεροι μικροβιακοί δείκτες για την εκτίμηση της ποιότητας του πόσιμου νερού. Αποτελούν φυσικούς ενοίκους της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας των ανθρώπων και των ζώων και χρησιμοποιούνται από εργαστήρια που πραγματοποιούν μικροβιολογικές εξετάσεις ρουτίνας^[58,59].

Οι συγκεντρώσεις των ζιζανιοκτόνων στα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το ανώτερο επιτρεπόμενο όριο για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκου σύμφωνα με την νομοθεσία χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης^[49] δηλαδή το 0.1 μg/L το δεκαπλάσιο δηλαδή 1.0 μg/L, το εκατονταπλάσιο δηλαδή 10.0 μg/L και χίλιες φορές το 0.1 μg/L δηλαδή 100.0 μg/L.



5.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και αφορούν στα έμμεσα αποτελέσματα της έκθεσης οργανισμών μη-στόχων στα παρασιτοκτόνα, και ειδικότερα οργανισμών που βρίσκονται στα υψηλότερα επίπεδα της τροφικής αλυσίδας. Εντούτοις, πολύ λιγότερες μελέτες αφορούν στον έμμεσο αντίκτυπο τέτοιων μολυσματικών παραγόντων σε οργανισμούς των χαμηλότερων επιπέδων της τροφικής αλυσίδας, και ειδικότερα στο βακτηριακό επίπεδο.

Μία ξαφνική έκθεση υδάτινων συστημάτων σε παρασιτοκτόνα μπορεί να έχει σημαντικές επιδράσεις στους μικροβιακούς πληθυσμούς. Παρόλα αυτά ελάχιστες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις επιπτώσεις αυτής της έκθεσης στις βακτηριακές κοινότητες και τη μεταβολική δραστηριότητά τους στα υδάτινα οικοσυστήματα^[60].

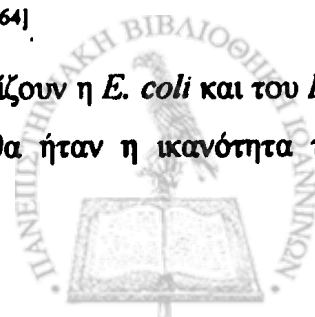
Τα αποτελέσματα ανάπτυξης των επιλεγμένων μικροβιακών δεικτών παρουσία ζιζανιοκτόνων έχουν ξεχωριστή σημασία διότι όπως έχει ήδη αναφερθεί ένα από τα κριτήρια που θα πρέπει να πληροί ένας μικροβιακός δείκτης κοπρανώδους ρύπανσης είναι να βρίσκεται παρόν στους ίδιους ή υψηλότερους αριθμούς από τα παθογόνα χωρίς πολλαπλασιασμό ή γενετική αλλαγή, ώστε να παρέχει λογική εκτίμηση της παρουσίας παθογόνων και του πραγματικού ή δυνητικού κινδύνου στην υγεία.

Στη προκειμένη περίπτωση παρατηρήθηκε ότι η παρουσία των επιλεγμένων ζιζανιοκτόνων σε ένα ολιγοτροφικό περιβάλλον βοηθά στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό της *E. coli* και του *Ent. faecalis*. Στις περισσότερες περιπτώσεις μάλιστα με στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το control ($p < 0.05$).

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι φυτοφάρμακα μπορούν να αποτελέσουν ένα ιδανικό περιβάλλον για την επιβίωση και την ανάπτυξη μικροοργανισμών και σε πολλές περιπτώσεις μάλιστα παθογόνων^[61]. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί με μία αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να διασπούν-αποικοδομούν φυτοφάρμακα με σκοπό να χρησιμοποιήσουν αυτά ή τα προϊόντα διάσπασης αυτών ως πηγή ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών^[62,63].

Μάλιστα σε πολλές περιπτώσεις το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε και στην ικανότητα των συγκεκριμένων χημικών ενώσεων να διεισδύουν στο βακτηριακό κύτταρο με επακόλουθο την κατόπιν προσαρμογή του μικροοργανισμού στο φυτοφάρμακο^[64].

Έτσι μία πιθανή εξήγηση για τα προφίλ ανάπτυξης που εμφανίζουν η *E. coli* και του *Ent. faecalis* παρουσία των τεσσάρων επιλεγμένων ζιζανιοκτόνων θα ήταν η ικανότητα των



τοφαρμάκων να διεισδύει στο βακτηριακό κύτταρο καθώς και η ικανότητα του τελευταίου να αναπτύσσει μηχανισμούς με σκοπό την διάσπαση και χρησιμοποίησή τους ως πηγή ενέργειας ή θρεπτικών συστατικών.



5.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Οι αλλαγές που εμφανίστηκαν στην μορφολογία των αποικιών στα εκλεκτικά υλικά είναι επίσης μία πολλή σημαντική διαπίστωση. Οι αλλαγές αυτές είχαν να κάνουν τόσο με το σχήμα όσο και με το χρώμα ή την υφή των αποικιών.

Μελέτες έχουν δείξει ότι 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)^[65].

Για παράδειγμα σε μία μελέτη που πραγματοποίησε ο Rychert και ο Stephenson στις ΗΠΑ κατά την απομόνωση κολοβακτηριδίων κοπρανώδους προέλευσης από υδατίνα περιβάλλοντα, με τη μέθοδο διήθησης μέσω μεμβράνης και τη χρησιμοποίηση mFC άγαρ, παρατήρησαν την εμφάνιση άτυπων *E. coli* σε ποσοστό μάλιστα μεγαλύτερο του 80% ^[66].

Στη δική μας περίπτωση η *E. coli* παρουσίασε αλλαγές τόσο στο χρώμα όσο και στη μορφολογία. Στο mFC άγαρ οι αποικίες εμφανίζονταν ρυτιδώδεις και για τα τέσσερα ζιζανιοκτόνα, ενώ στο m-Endo agar Les οι αποικίες εμφανίζονταν μικρότερες σε μέγεθος και πολλές φορές με διαφορετικό χρώμα (στο atrazine κόκκινες, στο gripanil χωρίς μεταλλική χροιά). Στο atrazine είχαμε αλλαγές και στα δύο άλλα εκλεκτικά υλικά που χρησιμοποιήσαμε: στο chromocult οι αποικίες εμφανίζονταν πλέον ροζ αντί για μοβ, ενώ στο Tergitol από κίτρινες ωχρές.

Ο *Ent. faecalis* παρουσίασε αλλαγές μόνο στο μέγεθος των αποικιών: και για τα τέσσερα ζιζανιοκτόνα οι αποικίες εμφανίζονταν μικρότερες σε μέγεθος σε σχέση με το control.

Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σύμφωνα με άλλες μελέτες που έχουν γίνει στο παρελθόν όπου έχουν δείξει μορφολογικές αλλαγές σε αποικίες βακτηρίων που απομονώθηκαν από διαλύματα φυτοφαρμάκων^[67]. Δεν παύουν όμως να αποτελούν έκπληξη εφόσον τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν θεωρούνται εκλεκτικά για την απομόνωση της *E. coli* και του *Ent. faecalis*^[68,69] και χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια που πραγματοποιούν μικροβιολογικές αναλύσεις ρουτίνας για τον έλεγχο της ποιότητας του πόσιμου νερού.

Αποτυχία στην προσμέτρηση των άτυπων αποικιών θα είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά λάθη στην εκτίμηση της ποιότητας του πόσιμου νερού.



ΒΙΩΣΙΜΑ ΑΛΛΑ ΜΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΣΙΜΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Μία ακόμη ενδιαφέρουσα παρατήρηση από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής είναι το γεγονός ότι μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα είχαμε απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών της *E. coli* και του *Ent. faecalis* στα κλασσικά εκλεκτικά υλικά.

Εξαιτίας της απώλειας αυτής, 0.1 mL από τα διαλύματα της *E. coli* και του *Ent. faecalis* με ζιζανιοκτόνο εμβολιάστηκαν σε τρυβλία που περιείχαν TSA άγαρ με ζιζανιοκτόνο. Ύστερα από επώαση αυτών των τρυβλίων με το τροποποιημένο άγαρ είχαμε επανεμφάνιση των αποικιών της *E. coli* και του *Ent. faecalis*.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών μπορεί να αντέξει σε μία μη καλλιεργήσιμη κατάσταση όπου τα μικροβιακά κύτταρα υφίστανται μία ποικιλία μορφολογικών, δομικών και μεταβολικών αλλαγών. Αρχικά παρατηρείται ελάττωση του μεγέθους τους, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα παρόντα αποτελέσματα, ενώ σημαντικές αλλαγές επέρχονται στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης, στη πρωτεϊνική σύνθεση καθώς και στο ριβοσωμικό περιεχόμενο^[70].

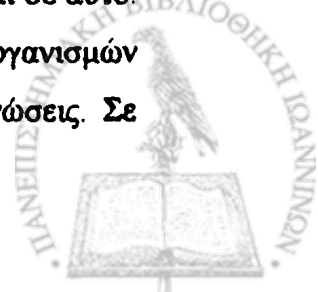
Κατ' αυτόν τον τρόπο τα βακτήρια δεν μπορούν να καλλιεργηθούν στα συνηθισμένα υλικά σύμφωνα με τις κλασσικές τεχνικές (βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα). Εντούτοις σε πολλές περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι υπό κατάλληλες συνθήκες αυτή η κατάσταση μπορεί να αντιστραφεί και τα βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα να γίνουν μεταβολικά ενεργά και πλήρως καλλιεργήσιμα^[71,11].

Μία άλλη θεωρία υποστηρίζει ότι τα κύτταρα αυτά σταδιακά οδηγούνται στο θάνατο. Μπορεί να δείχνουν μεταβολικά ενεργά αλλά δεν είναι δυνατό να επανέλθουν, να αναζωογονηθούν^[11].

Στη δική μας περίπτωση η *E. coli* και ο *Ent. faecalis* φαίνεται να ακολουθούν την πρώτη θεωρία. Συγκεκριμένα μετά την μακροπρόθεσμη παραμονή τους σε διαλύματα ζιζανιοκτόνων τα συνήθη εκλεκτικά υλικά φαίνεται να αποτελούν γι' αυτά ένα μη ιδανικό περιβάλλον για να αναπτυχθούν, ένα «θρεπτικά ανεπαρκές περιβάλλον».

Είναι σαφές ότι η μεταφορά ενός πληθυσμού από ένα περιβάλλον σε άλλο, διαφορετικό από απόψεως θρεπτικών ουσιών, αποτελεί μία πρόκληση της ικανότητάς του για προσαρμογή. Οι μικροβιακοί δείκτες ύστερα από μία μακροπρόθεσμη παραμονή σε ένα περιβάλλον με ζιζανιοκτόνο (διαλύματα ζιζανιοκτόνων) άρχισαν να προσαρμόζονται σε αυτό.

Η μετέπειτα λουπόν συμπεριφορά τους αποτελεί μία τυπική αντίδραση μικροοργανισμών που έχουν προσαρμοστεί σε ένα περιβάλλον με τις συγκεκριμένες οργανικές ενώσεις. Σε



τέτοιες περιπτώσεις από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι μετά από μία περίοδο που μπορεί να κυμαίνεται από ώρες ως και μήνες ξεκινά ο μεταβολισμός αυτών των ενώσεων^[72].

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη το γεγονός ότι η απώλεια της ικανότητας ανάπτυξης καλλιεργησιμότητας των αποικιών της *E. coli* και του *Ent. faecalis* στα κλασσικά εκλεκτικά υλικά αναστράφηκε σε μία καλλιεργήσιμη κατάσταση στα τροποποιημένα υλικά με ζιζανιοκτόνο, το TSA με ζιζανιοκτόνο δείχνει να αποτελεί πλέον το ιδανικό περιβάλλον για την ανάκτηση τους.

Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με τα προφίλ ανάπτυξης παρουσία ζιζανιοκτόνου που παρουσιάστηκαν νωρίτερα, μας δίνουν μια ολοκληρωμένη εξήγηση της συμπεριφοράς των μικροβιακών δεικτών στα ζιζανιοκτόνα.

Ως αποτέλεσμα όμως αυτής της απώλειας της ικανότητας ανάπτυξης των αποικιών της *E. coli* και του *Ent. faecalis* στα συνήθη εκλεκτικά υλικά και με τη χρήση των κλασσικών μεθόδων ένα σημαντικό μέρος κατά την καταμέτρηση τους μπορεί να χάνεται.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχουν αρκετές μελέτες που αναφέρονται στην εφαρμογή διαφόρων μεθόδων αξιολόγησης του μικροβιολογικού κινδύνου σε θέματα ποιότητας νερού. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αποτελεί η αξιολόγηση τον μικροβιολογικού κίνδυνο του νερού (πόσιμου ή θαλάσσιου) σύμφωνα με την ΠΟΥ, η οποία πραγματοποιείται βάσει του συνδυασμού των αποτελεσμάτων μικροβιολογικών αναλύσεων του νερού και επιτόπιας υγειονομολογικής αναγνώρισης της υπό μελέτη περιοχής^[73,74].

Μία πιθανή υποεκτίμηση του αριθμού των μικροοργανισμών αυτών εξαιτίας της εισόδου τους σε βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση θα οδηγούσε σε λανθασμένη εκτίμηση του μικροβιολογικού κίνδυνο του νερού και κατά συνέπεια στην ανακριβή εκτίμηση των συνεπειών επί της δημόσιας υγείας.



ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων εκτός των μορφολογικών αλλαγών παρατηρήθηκαν και αλλαγές τις βιοχημικές ιδιότητες των επιλεγμένων δεικτών. Οι αλλαγές αυτές παρατηρήθηκαν είτε απ' ευθείας μετά τη καλλιέργεια τους στα εκλεκτικά υλικά είτε μετά από την ανάπτυξη τους στο τροποποιημένο με τη προσθήκη ζιζανιοκτόνου υλικό.

Σε πολλές περιπτώσεις το βιοχημικό προφίλ δε διέφερε σημαντικά από το αρχικό και το control, σε μερικές όμως περιπτώσεις είχαμε σημαντικές διαφορές όπως π.χ. αλλαγή στο γένος.

Στη περίπτωση της *E. coli* οι σημαντικότερες βιοχημικές αλλαγές που επήλθαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν στις αντιδράσεις των CIT, IND, VP, GLU, SOR, MEL και ARA. Τα βιοχημικά προφίλ μετά από ταυτοποίηση με το API 20E σύστημα φέρονταν να αντιστοιχούν εκτός από την *E. coli* σε δύο ακόμη διαφορετικά της *Escherichia* γένη (*Kluyvera* spp και *Hafnia alvei*).

Η *Kluyvera* προτάθηκε το 1956 -57 στην Ιαπωνία από τον Asai και τους συνεργάτες του ως καινούριο γένος στη μνήμη του Kluyver και του van Niel όπου το 1936 υπέθεσαν ότι στα *Pseudomonadeae* ίσως υπάρχει μία ομάδα μικροοργανισμών όπου εμφανίζει μερικά χαρακτηριστικά της *Escherichia*. Το 1962 πάλι ο Asai και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι η *Kluyvera* θα πρέπει να μεταφερθεί στο γένος των *Escherichia* δηλαδή στην οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών. Έτσι μέχρι το 1980 η ονομασία *Kluyvera* καταργήθηκε. Το 1981 ο J.J. Farmer και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι η *Kluyvera* θα πρέπει αποτελέσει ένα νέο γένος των εντεροβακτηριοειδών όπως και ισχύει μέχρι σήμερα^[75].

Όπως η *Kluyvera* έτσι και η *Hafnia alvei* αποτελεί ένα τυπικό μέλος της ομάδας των εντεροβακτηριοειδών. Φυσιολογικά μοιάζει με τη διαρροϊκή *E. coli*. Μάλιστα σε αρκετές μελέτες έχουν καταγραφεί απομονώσεις που έμοιαζαν με *Hafnia alvei* για τις οποίες όμως τίθονταν το ερώτημα αν είναι *Hafnia alvei* που παρουσιάζουν όμως αποκλίσεις από την τυπική *Hafnia alvei* ή αν είναι μέλη του γένους *Escherichia*^[76,77].

Βλέπουμε λοιπόν ότι οι δύο αυτοί μικροοργανισμοί που ελήφθησαν ως αποτέλεσμα βιοχημικής ταυτοποίησης της *E. coli* μετά την παραμονή της σε διαλύματα φυτοφαρμάκων, στο παρελθόν έχουν τεθεί πολλές φορές υπό αμφισβήτηση για το αν θα πρέπει να ταξινομηθούν ως διαφορετικό ή στο ίδιο γένος με την *Escherichia*.

Στη περίπτωση του *Ent. faecalis* οι σημαντικότερες βιοχημικές αλλαγές που επήλθαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν στις αντιδράσεις των HIP, βGAL, PAL, ADH, ARA,



AMD και SOR. Τα βιοχημικά προφίλ μετά από ταυτοποίηση με το API STREP σύστημα φέρονταν να αντιστοιχούν εκτός από *Ent. faecalis*, σε *Ent. faecium*, *Ent. anium* και *Lc. lactis lactis*.

Τόσο ο *Ent. faecium* όσο και ο *Ent. anium* είναι βακτήρια των οποίων η προέλευση είναι σχεδόν ίδια με εκείνη του *Ent. faecalis* δηλαδή περιττώματα ανθρώπων και ζώων. Σημαντικές ομοιότητες παρουσιάζουν επίσης στη μορφολογία τόσο των κυττάρων όσο και των αποικιών.

Στην περίπτωση του *Lc. lactis lactis* το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ένα gram θετικό βακτήριο που συγγενεύει σημαντικά με τους στρεπτόκοκκους. Το 1985 ο Schleifer και ο συνεργάτης του πρότειναν το γένος *Lactococcus* και σε αυτό περιέλαβαν και το είδος *Lc. lactis* που άλλοτε αποκαλούνταν *Str. lactis*. Πολλές φορές μάλιστα έχει παρατηρηθεί ότι ταυτοποιείται λαθεμένα ως εντερόκοκκος ή στρεπτόκοκκος^[78-80].

Εναντι προηγούμενων ερευνών τα αποτελέσματα μας επιβεβαιώνουν το ότι σε πολλές περιπτώσεις τα φυτοφάρμακα μπορούν να έχουν επιπτώσεις στην ενζυμική βιοσύνθεση ορισμένων βακτηρίων^[81,82]. Όπως προαναφέρθηκε μάλιστα σε πολλές περιπτώσεις οι μικροοργανισμοί παράγουν ένζυμα προκειμένου να μεταβολίσουν φυτοφάρμακα κάτι που επίσης έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης.



5 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Δύο από τα μεγαλύτερα επιστημονικά επιτεύγματα του 20^{ου} αιώνα ήταν η πράσινη επανάσταση και η ανάπτυξη των αντιβιοτικών. Η πράσινη επανάσταση με μία ευρεία γκάμα χρησιμοποιούμενων παρασιτοκτόνων βοήθησε στην αύξηση της ποιότητας και της ποσότητας των τροφίμων και κατά συνέπεια στην αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού. Επιπρόσθετα τα αντιβιοτικά μείωσαν δραματικά τα ποσοστά θνησιμότητας που οφείλονταν σε βακτηριακές ασθένειες. Παραταύτα, η «Αχίλλειος πτέρνα» και των δύο επιτευγμάτων ήταν η αύξηση της ανθεκτικότητας^[83].

Στο παρελθόν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που αφορούσαν στη συσχέτιση μεταξύ ανθεκτικότητας μικροοργανισμών σε μέταλλα ή οργανικές (αρωματικές) ενώσεις και σε αντιβιοτικά.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει μία συσχέτιση μεταξύ της βιομηχανικής ρύπανσης και της χωρικής κατανομής της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Πολλοί μικροοργανισμοί, σαν αντίδραση σε τοξικές συγκεντρώσεις ρύπων, μπορούν να αναπτύξουν ανθεκτικότητα και ικανότητα να τα αποικοδομούν και να τα αξιοποιούν ως πηγές άνθρακα και ενέργειας. Ως αποτέλεσμα, νέοι φαινότυποι κληρονομούνται στις κοινότητες των μικροοργανισμών^[84-86].

Συγκεκριμένα, όσον αφορά τις σχετικές με την αντίσταση σε μέταλλα μελέτες, έχει αποδειχθεί ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν την κληρονομικότητα της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά και τα γονίδια αντίστασης που κωδικοποιούν την αντίσταση στα μέταλλα φέρονται συχνά στα ίδια πλασμίδια ή τα κινητά γενετικά στοιχεία^[87,88].

Εν τούτοις η μελέτη της επίδρασης των φυτοφαρμάκων στην ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά αποτελεί ένα πεδίο που δεν έχει μελετηθεί και για το λόγο αυτό στη παρούσα διατριβή έγινε προσπάθεια να ερευνηθεί.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *E. coli* που απομονώθηκε από τα διαλύματα των επιλεγμένων ζιζανιοκτόνων γενικά δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές στα πέντε αντιβιοτικά. Στις περισσότερες περιπτώσεις είχαμε μείωση των ζωνών αναστολής αλλά μόνο στην αμπικιλίνη άλλαξε η ανθεκτικότητά της όπου από μετρίως ευαίσθητη έγινε ανθεκτική.

Ο *Ent. faecalis* παρουσίασε περισσότερες μεταβολές. Στα δύο από τα πέντε αντιβιοτικά (γενταμικίνη, στρεπτομυκίνη) είχαμε μεταβολή της ανθεκτικότητας του: από ανθεκτικό σε ευαίσθητο. Στην αμπικιλίνη ο *Ent. faecalis* από ευαίσθητος έγινε ανθεκτικός, ενώ στα άλλα δύο αντιβιοτικά (χλωραμφαινικόλη, τετρακυκλίνη) δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην ανθεκτικότητά του.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, ίσως θα πρέπει να αναθεωρηθεί ο ρόλος της *E. coli* και του *Ent. faecalis* ; δείκτες μόλυνσης σε ρυπασμένα νερά με φυτοφάρμακα για την εκτίμηση της ποιότητας του νερού καθώς παρουσία αυτών υφίστανται σημαντικές αλλαγές (μορφολογία των κοκκίων στα εκλεκτικά υλικά, βιοχημικές ιδιότητες, ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά).

Επιπλέον είναι προφανές ότι η παρουσία ζιζανιοκτόνων επηρεάζει τον αριθμό των μικροβιακών δεικτών, είναι ένα πολύ σημαντικό κριτήριο στην επιλογή τους ως δείκτες μόλυνσης των υδάτων. Συγκεκριμένα, δείχνουν να πολλαπλασιάζονται ενώ με τη πάροδο του χρόνου χάνουν την ικανότητα τους να αναπτύσσονται στα κλασσικά θρεπτικά υποστρώματα με αποτέλεσμα να μην παρέχουν λογική εκτίμηση της παρουσίας παθογόνων και του πραγματικού ή δυνητικού κινδύνου στην Δημόσια Υγεία.

Ένα πεδίο που χρειάζεται περαιτέρω έρευνα είναι και η περίπτωση όπου σε ένα υδάτινο περιβάλλον συνυπάρχουν οι μικροβιακοί δείκτες με περισσότερα του ενός φυτοφάρμακα. Επίσης ο συνδυασμός φυτοφαρμάκων με λιπάσματα καθώς στις περισσότερες αγροτικές δραστηριότητες χρησιμοποιούνται συνδυαστικά. Χρήσιμες στη βιβλιογραφία θα μπορούσαν να φανούν και οι μελέτες που συγκρίνουν τις επιδράσεις των φυτοφαρμάκων στους μικροβιακούς δείκτες σε ένα μη ολιγοτροφικό περιβάλλον έναντι ενός ολιγοτροφικού περιβάλλοντος.



Ι. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη της επίδρασης τεσσάρων επιλεγμένων γγχορων ζιζανιοκτόνων (atrazine, EPTC, propanil, trifluralin) σε δυο μικροβιακούς δείκτες βλυνσης των υδάτων (*E. coli*, *Ent. faecalis*). Τα συγκεκριμένα ζιζανιοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως στη βορειοδυτική Ελλάδα και έχουν συχνά ανιχνευτεί στα επιφανειακά νερά. 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) και 10x, 100x και 1000x. Τα αποτελέσματα δείξαν ότι και τα τέσσερα ζιζανιοκτόνα επέφεραν αλλαγές στην ανάπτυξη τόσο της *E. coli* όσο και του *Ent. faecalis*. Συγκεκριμένα είχαμε ανάπτυξη σε σχέση με control και μάλιστα τις περισσότερες φορές στατιστικά σημαντική. Επίσης αλλαγές παρατηρήθηκαν στη μορφολογία των αποικιών στα εκλεκτικά υλικά, στις βιοχημικές τους ιδιότητες καθώς και στην ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά.



SUMMARY

The current study was undertaken to investigate the effects of four different herbicides (atrazine, EPTC, propanil, trifluralin) on two indicator bacteria (*Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*). These herbicides have been widely used in north-western Greece and are frequently detected in surface water. European council legislation restricts the occurrence of individual pesticides in drinking water to 0.1 µg/L. Therefore the final exposures that were chosen were 0.1 µg/L, 10×, 100× and 1000× the maximum concentration permitted in drinking water. Generally, population levels of both strains were significantly higher ($p \leq 0.05$) from the control. In addition, differentiations in the colonies' morphology, the biochemical and the antibiotic resistance profiles were denoted.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΚΥΑ Υ2/2600/2001 «Ποιότητα, του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης» (ΦΕΚ 892/Β/11 892/Β/11-7-2001).
2. Lu Z, Lapen D, Scott A, Dang A, Topp E. Identifying host sources of fecal pollution: diversity of *Escherichia coli* in confined dairy and swine production systems. *Appl Environ Microbiol.* Oct 2005;71(10):5992-5998.
3. Μικροβιολογία του Υδάτινου Περιβάλλοντος, Μ. Παπαπετροπούλου, Α. Μαυρίδου, 2η Έκδοση, Εκδοτικός Οίκος Τραυλός, Αθήνα 2001.
4. <http://www.environment.nsw.gov.au/envirom/waterqual.htm>
5. Maier RM., Pepper IL., Gerba CP. Environmental Microbiology, Academic Press, 2000.
6. WHO, Guidelines for drinking-water quality, third edition, Microbiological Aspects Session Objectives, 2004.
7. WHO, Guidelines for health-related monitoring of coastal recreational and shellfish areas: part II: bacterial indicator organisms. Copenhagen. DNK Titre 1994.
8. WHO, 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.
9. Αρσένη Α., Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση, 4η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Ζήτα, Αθήνα 1994, Τόμος 1.
10. Oliver, 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.
11. Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol.* Feb 2005;43 Spec No:93-100.



12. Colwell RR. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J Infect Chemother.* Jun 2000;6(2):121-125.
13. Lleo MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Pruzzo C, Canepari P. Molecular vs culture methods for the detection of bacterial faecal indicators in groundwater for human use. *Lett Appl Microbiol.* 2005;40(4):289-294.
14. <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>
15. Stephenson, GA. and Solomon, KR. 1993. Pesticides and the Environment. Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.
16. EXTTOXNET publication *Pesticides by Group*, Michigan State University;1993.
17. Αλμπάνης Τριαντάφυλλος, Ρύπανση και τεχνολογία προστασίας περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 1999.
18. Gonsolus, JL., and WS. Curran. Herbicide mode of action and injury symptoms. North Central Extension Publication 377. 1999.
19. CL. Brown and WK. Hock "The Fate of Pesticides in the Environment and Groundwater Protection," by. Agrichemical Factsheet 8, Penn State Cooperative Extension. 1990.
20. Arlene Blessing, The fate of pesticides in the environment Purdue Pesticide Programs, Pesticides and Water Quality: Principles, Policies, and Programs PPP-35 USA 2004
21. EXTTOXNET Toxicology Information Brief *Movement of Pesticides in the Environment*, Michigan State University;1993.
22. Harayama S, Timmis KN (1992) 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.
23. Lopez L, Pozo C, Rodelas B, et al. Identification of bacteria isolated from an oligotrophic lake with pesticide removal capacities. *Ecotoxicology.* Apr 2005;14(3):299-312.



24. Wackett LP, Sadowsky MJ, Martinez B, Shapir N. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. *Appl Microbiol Biotechnol.* Jan 2002;58(1):39-45.
25. Gundi VA, Narasimha G, Reddy BR. Interaction effects of insecticides on microbial populations and dehydrogenase activity in a black clay soil. *J Environ Sci Health B.* 2005;40(2):269-283.
26. Das AC, Chakravarty A, Sukul P, Mukherjee D. Insecticides: their effect on microorganisms and persistence in rice soil. *Microbiol Res.* May 1995;150(2):187-194.
27. Guan TT, Blank G, Holley RA. Survival of pathogenic bacteria in pesticide solutions and on treated tomato plants. *J Food Prot.* Feb 2005;68(2):296-304.
28. Kidd, H. and James, D. R., Eds. The Agrochemicals Handbook, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991 (as updated).8-7
29. Wauchope RD, Buttler TM, Hornsby AG, Augustijn-Beckers PW, Burt JP. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev Environ Contam Toxicol.* 1992;123:1-155.
30. WHO, Atrazine in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality 2003
31. EXTTOXNET publication *Atrazine*, Michigan State University;1993.
32. Konstantinou IK, Hela DG, Albanis TA. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environ Pollut.* Jun 2006;141(3):555-570.
33. Weed Science Society of America. Herbicide Handbook, 7th Edition. Champaign, IL, 1994.4-8
34. EXTTOXNET publication *EPTC*, Michigan State University;1993
35. WHO, Propanil in Drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality 2004.
36. Weed Science Society of America. Herbicide Handbook, Seventh Edition. Champaign, IL, 1994.10-59.



37. EXTTOXNET publication *Propanil*, Michigan State University;1993.
38. U.S. National Library of Medicine. Hazardous Substances Databank. Bethesda, MD, 1995.10-9.
39. WHO, Trifluralin in Drinking-water, Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality 2003.
40. EXTTOXNET publication *Trifluralin*, Michigan State University;1993.
41. Reinthaler FF, Posch J, Feierl G, et al. Antibiotic resistance of E. coli in sewage and sludge. *Water Res.* Apr 2003;37(8):1685-1690.
42. Davison J. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid.* Sep 1999;42(2):73-91.
43. Jawetz E., Melnick J., Adelberg E, Ιατρική Μικροβιολογία, 16η Έκδοση, Επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Παρισσιανού, Αθήνα 1985, Τόμος Α.
44. Αρσένη Α., Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση, 4η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Ζήτα, Αθήνα 1994, Τόμος 2.
45. Αλεξάκης Σ. Περιβάλλον - Φύση και πολιτισμός, Αλέξανδρος, Εκδόσεις Μ. Σιδέρη
46. Seghers D, Verthe K, Reheul D, Bulcke R, Siciliano SD, Verstraete W, Top EM. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiol Ecol.* 2003;46: 139-146.
47. DeLorenzo ME, Serrano L. Individual and mixture toxicity of three pesticides; atrazine, chlorpyrifos, and chlorothalonil to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta* . *J Environ Sci Health B.* 2003;38:529-538.
48. Ma J, Xu L, Wang S, Zhang R, Jin S, Huang S, et al. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris* . *Ecotoxicol Environ Saf.* 2002;51:128-32.
49. Council of the European Communities. Council directive of 15 July 1980 relating to the quality of water intended for human consumption (80/778/EEC). Official Journal of the European Communities L229, 1980.
50. APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th edn. Washington, DC:, 1992.



51. ISO/DIS 9308-1 Water quality Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria-
Part 1: Membrane filtration method.
52. ISO/DIS 7899-2 Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci-
Part 2: Membrane filtration method.
53. Koutsotoli A.D., Dimou D.S., Alamanos Y.P., Maipa V.E., Inductive effects of
environmental concentration of atrazine on *Escherichia coli* and *Enterococcus*
faecalis. *Folia Microbiol (Praha)*, 2005; 50(4), 283-7.
54. 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*, 2005; 17(2), 121-127.
55. DeLorenzo ME, Scott GI, Ross PE. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms:
a review. *Environ Toxicol Chem.* Jan 2001;20(1):84-98.
56. 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.* 2001;16:43-53.
57. Yurovskaya EM. Behaviour and indicator value of some microorganisms under
conditions of soil contamination by pesticides. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.*
1975;19:10-6.
58. Baleux B, Troussellier M. Optimization of a sampling design and significance of
bacterial indicators: application to the bacteriological survey of the Ardeche River,
France. *Water Res.* 1989;23:1183-90.
59. Toranzos GA, McFeters GA. Detection of indicator microorganisms in environmental
freshwaters and drinking waters. In: Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ,
Stetzenbach LD, Walter MV. editors. *Manual of environmental microbiology.*
Washington, DC: ASM Press; 1997.
60. Knapp CW, Caquet T, Hanson ML, Lagadic L, Graham DW Response of water
column microbial communities to sudden exposure to deltamethrin in aquatic
mesocosms *FEMS Microbiol Ecol.* 2005 Sep 1;54(1):157-65.
61. Ng PJ, Fleet GH, Heard GM. Pesticides as a source of microbial contamination of
salad vegetables. *Int J Food Microbiol.* May 25 2005;101(2):237-250.



62. Karaeva N. [Effect of various herbicides on pathogenic microflora in outdoor reservoir water.] *Gig Sanit.* 1988;8:24-6 (in Russian).
63. Hang M, Zhongyun C, Yuhua Z, Meichi C. Effects of trifluralin on soil microbial populations and the nitrogen fixation activities. *J Environ Sci Health B.* Sep 2001;36(5):569-579.
64. Breazeale FW, Camper ND. Effect of selected herbicides on bacterial growth rates. *Appl Microbiol.* Feb 1972;23(2):431-432.
65. Rompre 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.* Mar 2002;49(1):31-54.
66. Rychert RC, Stephenson GR. Atypical *Escherichia coli* in streams. *Appl Environ Microbiol.* May 1981;41(5):1276-1278.
67. Jilani S. and Altaf Khan M. Isolation, Characterization and Growth Response of Pesticides Degrading Bacteria. *J Biol Sci.* 2004; 4: 15-20.
68. Hernandez JF, Guibert JM, Delattre JM, Oger C, Charriere C, Hughes B, Serceau R, and Sinigre F. Evaluation of a miniaturized procedure for enumeration of *E. coli* in sea water, based upon hydrolysis of 4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide. *Water Res.* 1991; 25: 1073-8.
69. Finney M, Smullen J, Foster HA, Brokx S, Storey DM. Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae from faecal samples from healthy subjects. *J Microbiol Methods.* Sep 2003;54(3):353-358.
70. Sardessai YN. Viable but non culturable bacteria: their impact to public health, *Current Science*, Nov 2005;vol 89(10), 25
71. McDougald D, Rice SA, Weichart D, Kjelleberg S. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol Ecol.* 1998;25:1-9.
72. Van der Meer JR, de Vos WM, Harayama S, Zehnder AJ. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol Rev.* Dec 1992;56(4):677-694.
73. WHO, Guidelines for Drinking-water Quality, Vol. 1, Recommendations, Geneva, 1984.



74. WHO, Guidelines for safe recreational water environments Vol. 1, Coastal and fresh waters, Geneva, 2003.
75. Farmer JJ, 3rd, Fanning GR, Huntley-Carter GP, et al. *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family Enterobacteriaceae: identification of *Kluyvera ascorbata* sp. nov. and *Kluyvera cryocrescens* sp. nov. in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* May 1981;13(5):919-933.
76. Ridell J, Siitonen A, Paulin L, Lindroos O, Korkeala H, Albert MJ. Characterization of *Hafnia alvei* by biochemical tests, random amplified polymorphic DNA PCR, and partial sequencing of 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* Sep 1995;33(9):2372-2376.
77. Janda JM, Abbott SL, Albert MJ. Prototypal diarrheagenic strains of *Hafnia alvei* are actually members of the genus *Escherichia*. *J Clin Microbiol.* Aug 1999;37(8):2399-2401.
78. 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.* Apr 2006;257(1):32-42.
79. Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C et al Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. *Systematic and Applied Microbiology* Nov. 1985; 6: 183-195.
80. Goyache J, Vela AI, Gibello A, et al. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* infection in waterfowl: first confirmation in animals. *Emerg Infect Dis.* Sep-Oct 2001;7(5):884-886.
81. Guven K, Togrul S, Uyar F, Ozant S, De Pomerai, D.I. 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.* 2003; 32: 658-664
82. 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.* 2005;52(1):105-130.
83. Pittendrigh BR, Gaffney PJ. Pesticide resistance: can we make it a renewable resource? *J Theor Biol.* Aug 21 2001;211(4):365-375



84. Filali BK, Taoufik J, Zeroual Y, Dzairi FZ, Talbi M, Blaghen M. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics. *Curr Microbiol. Sep* 2000;41(3):151-156.
85. Lin J, Biyela BT, Puckree T., Antibiotic resistance profiles of environmental isolates from Mhlathuse River, KwaZulu-Natal (RSA), *Water SA* 2004;30(1):23-28.
86. Sabry SA, Ghozlan HA, Abou-Zeid DM. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *J Appl Microbiol. Feb* 1997;82(2):245-252.
87. Wireman, J., C. A. Liebert, T. Smith, and A. O. Summers. Association of mercury resistance with antibiotic resistance in gram-negative fecal bacteria of primates. *Appl Environ. Microbiol.* 1997;63:4494-4503.
88. Yurieva, O., G. Kholodii, L. Minakhin, Z. Gorlenko, E. Kalyaeva, S. Mindlin, and V. Nikiforov. Intercontinental spread of promiscuous mercury resistance transposons in environmental bacteria. *Mol. Microbiol.* 1997;24:321-329.

