



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΕΣΤΗΣ Κ. ΜΑΥΡΙΔΗΣ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ  
ΤΟΥ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΣΤΗ ΒΔ ΕΛΛΑΔΑ  
ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ  
ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ  
(ΑΠΟ ΝΕΡΑ ΚΑΙ ΨΑΡΙΑ)**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ Χ. ΖΑΚΑΣ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 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 αιτήσεως: 12/5/1998

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής: Συν. αριθμ.353α/16/6/1998

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Επιβλέπουσα :**

ΧΡΥΣΑΝΘΗ Β. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ, Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

**Μέλη:**

ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ, Καθηγητής Μικροβιολογίας

ΣΤΑΜΑΤΙΝΑ ΛΕΒΕΙΔΙΩΤΟΥ – ΣΤΕΦΑΝΟΥ, Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 23/6/1998

Ημερομηνία αλλαγής του θέματος: 30/3/2001

Ημερομηνία καταθέσεως διδακτορικής διατριβής:20/7/2006

### ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Άγγελος Ευαγγέλου, Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Ανέστης Μαυρίδης, Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Αγαθοκλής Τσατσούλης, Καθηγητής Παθολογίας –Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Βασιλική Καλφακάκου, Αναπληρώτρια καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Μιχάλης Μάλαμας, Αναπληρωτής καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Σταματίνα Λεβειδιώτου-Στεφάνου, Επίκουρη καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Χρυσάνθη Παπαδοπούλου, Επίκουρη καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ:** Επαμεινώντας Τσιάνος Καθηγητής Παθολογίας

**Η ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:**

Ευαγγελία Τσαγγαλιφάκη

Η διδακτορική διατριβή έγινε αποδεκτή με βαθμό: Άριστα



**Στην σύζυγο μου Γιούλα  
Στα δύο παιδιά μου Αντώνη και Χριστίνα**

για την υποστήριξη, την ανοχή, την αντοχή και την αγάπη τους για τις ώρες που έλειπα από κοντά τους, που ήταν η κινητήριος δύναμη για να ολοκληρώσω την παρούσα διατριβή

**Στους γονείς μου Χρήστο και Λαμπρινή  
για τήν απεριόριστη συμπαράσταση και αγάπη τους**



## Π Ρ Ο Λ Ο Γ Ο Σ

Η σύγχρονη ιατρική και κτηνιατρική επιστήμη βασίζονται στην επιτυχία τους στο γεγονός ότι έχουν στην διάθεση τους μια πληθώρα αποτελεσματικών και ταυτόχρονα φθηνών αντιβιοτικών ουσιών. Όμως η ευρεία χρήση αντιβιοτικών τόσο στην ιατρική όσο και στην κτηνιατρική πράξη, έχει οδηγήσει σε ανησυχητική αύξηση των ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων, δυσκολεύοντας έτσι την θεραπεία των λοιμωδών νοσημάτων. Για την κατάσταση αυτή συνήθως ενοχοποιείται η αυξημένη κατανάλωση από τους ασθενείς, που συχνά προμηθεύονται τα αντιβιοτικά από το φαρμακείο χωρίς συνταγή, οι κτηνίατροι, που τα χορηγούν συχνά για μη θεραπευτικούς λόγους στα παραγωγικά ζώα και οι κτηνοτρόφοι που επίσης τα προμηθεύονται για τα ζώα τους χωρίς κτηνιατρική συνταγή ή τα χορηγούν σε μεγαλύτερες από τις συνιστώμενες δόσεις ή κάνουν γενικώς κακή χρήση των αντιβιοτικών. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες έχουν οδηγήσει σε αυξημένη συγκέντρωση των αντιβιοτικών ουσιών στο φυσικό περιβάλλον μας, το οποίο με την σειρά του έχει οδηγήσει τους παθογόνους, αλλά και τους μη παθογόνους μικροοργανισμούς στην ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής.

Η ύπαρξη ανθεκτικών μικροοργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον, στα λύματα και στο έδαφος, δείχνει ότι ήδη έχει δημιουργηθεί στο περιβάλλον μια δεξαμενή αντιβιοανθεκτικών βακτηρίων, από τα οποία η αντοχή θα μπορούσε να μεταφερθεί μέσω της τροφικής αλυσίδας σε βακτήρια που προκαλούν νόσο στον άνθρωπο και στα ζώα. Απομένει λοιπόν στους νομοθέτες να καθορίσουν τα σωστά κίνητρα τόσο για εκείνους, που παρασκευάζουν τις αντιβιοτικές ουσίες, όσο και για εκείνους που τις χρησιμοποιούν, ώστε να λαμβάνουν υπόψη εκτός από τα οφέλη και τα κοινωνικά κόστη από την χρήση αυτών των τόσο ισχυρών και τόσο χρήσιμων φαρμακευτικών ουσιών.



Από την πλευρά της δημόσιας υγείας η παρατηρούμενη αύξηση της αντοχής στα αντιβιοτικά των παθογόνων βακτηρίων, πιθανώς να οδηγήσει σε αδυναμία μας στο άμεσο μέλλον να χρησιμοποιούμε το οπλοστάσιο των αντιβιοτικών, γιατί αυτά δεν θα είναι πλέον αποτελεσματικά. Αυτό θα έχει ως συνέπεια ένα τεράστιο κοινωνικό κόστος εξαιτίας της αύξησης του χρόνου της νοσοκομειακής περίθαλψης, αύξησης της θνητότητας, αύξησης των δαπανών για την ανακάλυψη νέων πιο ισχυρών αντιμικροβιακών ουσιών, οι οποίες δαπάνες πιθανόν θα γίνουν σε βάρος άλλων τομέων βιοϊατρικής έρευνας εξίσου σημαντικών. Το μέγεθος του κόστους των επιπτώσεων της αντιβιοαντοχής σε παγκόσμιο επίπεδο είναι δύσκολο να εκτιμηθεί. Στις Η.Π.Α οι εκτιμήσεις κυμαίνονται από 350 εκατομμύρια δολάρια έως 35 δισεκατομμύρια δολάρια, ανάλογα με το πόσο χρονικό διάστημα παραμένει η αντοχή στον βακτηριακό πληθυσμό και ανάλογα με το αν συνυπολογίζεται ή όχι το κόστος των θανάτων (Okeke IN. και συν., 2005). Τα υπάρχοντα στοιχεία σχετικά με την χρήση των αντιβιοτικών και την βακτηριακή αντοχή είναι ανεπαρκή, γεγονός που δυσκολεύει τους οικονομολόγους να εκτιμήσουν τα πραγματικά κόστη. Όμως επειδή η αντιβιοαντοχή είναι και αυτή αποτέλεσμα φυσικής επιλογής και προσαρμογής των μικροοργανισμών, το πρόβλημα θα παραμένει για όσα χρόνια θα συνεχίσουμε να χρησιμοποιούμε αντιβιοτικά.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της μικροβιολογικής ρύπανσης και η μελέτη της διασποράς ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων στο φυσικό υδάτινο περιβάλλον της ΒΔ. Ελλάδας. Συγκεκριμένα συλλέχθηκαν δείγματα πόσμων υδάτων, δείγματα υδάτων από ποταμούς και λίμνες της ΒΔ Ελλάδας και από τις ακτές του Ιονίου, καθώς και δείγματα εδώδιμων ιχθύων από ιχθυοκαλλιέργειες και ελεύθερης αλιείας.

Η παρούσα διδακτορική έρευνα πραγματοποιήθηκε εξ ολοκλήρου στη Μονάδα Μικροβιολογίας Τροφίμων, Υδάτων και Περιβάλλοντος του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη της Επίκουρης καθηγήτριας κ. Χρυσάνθης Παπαδοπούλου.



Επιθυμώ να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες, αλλά και την ευγνωμοσύνη μου, στην επιβλέπουσα Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Χρυσάνθη Παπαδοπούλου, τόσο για την ανάθεση της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης, όσο και για την πολύτιμη καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθειά της σε όλα τα στάδια εκπόνησης της παρούσας διατριβής, τις σημαντικές υποδείξεις της και την ουσιαστική συμβολή της στην συγγραφή της διατριβής μου.

Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου θέλω να εκφράσω στα υπόλοιπα δύο μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, στην Επίκουρο Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Σταματίνα Λεβειδιώτου-Στεφάνου για το ενδιαφέρον που επέδειξε και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε στη μελέτη της μικροβιοαντοχής καθώς και στον Ομότιμο Καθηγητή Μικροβιολογίας κ. Γρηγόριο Αντωνιάδη για τις χρήσιμες συμβουλές του.

Επίσης, θέλω να εκφράσω θερμές ευχαριστίες στα μέλη της 7μελούς Εξεταστικής Επιτροπής, στον Καθηγητή κ. Ανέστη Κ. Μαυρίδη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, για τις ιδιαίτερα επωφελείς συζητήσεις που είχαμε πάνω στο θέμα της διατριβής μου, στον καθηγητή Παθολογίας κ. Αγαθοκλή Τσατσούλη, στον καθηγητή Φυσιολογίας κ. Άγγελο Ευαγγέλου, στην Αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Βασιλική Καλφακάκου και στον Αναπληρωτή καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Μιχάλη Μάλαμα για τον χρόνο που μου διέθεσαν και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Ακόμη θέλω να εκφράσω τις ολόθερμες ευχαριστίες μου σε όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και ιδιαίτερα στις ιατρούς κ. Ελένη Γκεσούλη και κ. Χριστιάνα Παππά, επιμελήτριες του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου Π.Γ.Ν.Ι., στην επί συμβάσει τεχνολόγο κ. Βασιλική Οικονόμου για την βοήθεια της στην παρασκευή των θρεπτικών υλικών, καθώς και τις γραμματείς του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας κ.κ. Όλγα Σάρρα, Ελευθερία Τσάντα.



Τέλος θέλω να ευχαριστήσω θερμά στους συναδέλφους μου, τους ήδη πλέον διδάκτορες κ.κ. Αικατερίνη Ντόντορου, Ιωάννα Αποστόλου, Ευάγγελο Οικονόμου, Γιώργο Φιλιάουση και τους υποψήφιους διδάκτορες Αικατερίνη Σαλαμούρα, Ηρακλή Σακκά, Δημήτρη Μπασέα και Παναγιώτα Γούσια για την καλή τους συνεργασία όλο το διάστημα εκπόνησης της διατριβής μου, για τις αμέτρητες ώρες που περάσαμε μαζί δουλεύοντας τα θέματα των διατριβών μας υπό την επίβλεψη της κας Παπαδοπούλου, για το ωραίο κλίμα συνεργασίας, αλληλοβοήθειας και κυρίως για την φιλία που αναπτύχθηκε μεταξύ μας με αυτήν την αφορμή.



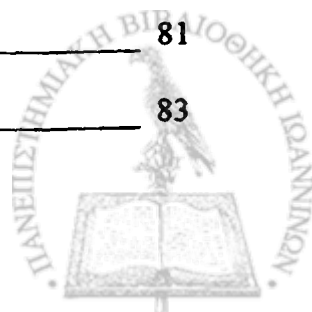


# Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

Π Ρ Ο Λ Ο Γ Ο Σ	XI
Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α	XV
Γ Ε Ν Ι Κ Ο Μ Ε Ρ Ο Σ	1
1. Γενικά	3
1.1. Ιστορική ανασκόπηση	3
1.2. Υδάτινο περιβάλλον και Δημόσια Υγεία	4
1.3. Προέλευση των παθογόνων μικροοργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον	5
1.4. Επιβίωση λυματικών μικροοργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον	6
1.5. Υδατογενώς μεταδιδόμενοι μικροοργανισμοί	7
1.6. Υδατογενείς λοιμώξεις	10
1.7. Λοιμώξεις από κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού	11
1.8. Λοιμώξεις από κολύμβηση σε μολυσμένα φυσικά νερά αναψυχής (θάλασσες, ποταμοί, λίμνες)	13
1.9. Λοιμώξεις από κολύμβηση σε μολυσμένο τεχνητό υδάτινο περιβάλλον (κολυμβητήρια, υδάτινα πάρκα αναψυχής, spa, jakouzi κ. ά)	26
Κίνδυνοι για την υγεία των κολυμβητών από την χλωρίωση	29
1.10. Λοιμώξεις από εισπνοή σταγονιδίων μολυσμένου ύδατος	30
2. Μέθοδοι ελέγχου μικροβιολογικής ποιότητας υδάτων και μικροβιολογικοί δείκτες	35
2.1. Μέθοδοι ελέγχου της μικροβιολογικής ποιότητας των υδάτων	35
2.1.1. Μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων	35
2.1.2. Μέθοδος διήθησης διά μικροβιοκρατών μεμβρανών	37



2.2. Μικροβιολογικοί δείκτες _____	38
2.2.1. Μικροβιακοί δείκτες και Νομοθεσία για τα πόσιμα νερά _____	39
2.2.2. Μικροβιακοί δείκτες και Νομοθεσία για τα επιφανειακά και τα νερά αναψυχής (κολυμβητικά νερά). _____	41
3. Η παρουσία φαρμακευτικών ουσιών στο υδάτινο περιβάλλον _____	45
3.1. Η παρουσία αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον _____	47
3.2. Οι επιπτώσεις για την δημόσια υγεία από την παρουσία αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον _____	51
3.3. Διασπορά μικροβιακής αντοχής δια του υδάτινου περιβάλλοντος _____	52
4. Μελέτες που αφορούν απομόνωση ανθεκτικών βακτηρίων απο τρόφιμα προερχόμενα απο το υδάτινο περιβάλλον. _____	59
5. Μελέτες που αφορούν απομόνωση ανθεκτικών στελεχών απο το υδάτινο περιβάλλον στην Ελλάδα _____	61
<b>Ε Ι Δ Ι Κ Ο   Μ Ε Ρ Ο Σ</b> _____	63
1. Σκοπός _____	65
2. Υλικό _____	67
2.1. Δειγματοληψία υδάτων _____	67
2.1. Δειγματοληψία ψαριών _____	69
3. Μεθοδολογία _____	71
3.1. Μικροβιολογικός έλεγχος υδάτων _____	71
3.1.1 Μέθοδος _____	71
3.1.2. Στερεά υποστρώματα _____	74
3.2. Μικροβιολογικός έλεγχος ψαριών _____	81
3.2.1. Μέθοδος _____	81
3.2.2. Θρεπτικά υλικά _____	83



3.3. Έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά	86
3.3.1. Μέθοδος	86
<b>4. Αποτελέσματα</b>	<b>89</b>
4.1. Είδη μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα δείγματα υδάτων	89
4.2. Είδη μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα δείγματα ψαριών	90
4.3. Αποτελέσματα των δοκιμών ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών, που απομονώθηκαν από δείγματα υδάτων	98
4.4. Αποτελέσματα των δοκιμών ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από δείγματα ψαριών	109
<i>Aeromonas hydrophila</i>	117
<i>Aeromonas sobria</i>	117
<b>5. Συζήτηση</b>	<b>119</b>
5. 1. Μικροβιολογική ποιότητα υδάτων	120
5.2. Μικροβιολογική ποιότητα των ιχθυηρών	134
5.3. Αντοχή στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματα υδάτων	136
5.4. Αντοχή στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματα ιχθυηρών	147
<b>6. Συμπεράσματα</b>	<b>153</b>
<b>7. Περίληψη</b>	<b>161</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>163</b>
<b>9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>167</b>
9.1. Διεθνής Βιβλιογραφία	167
9.2. Ελληνική Βιβλιογραφία	205



# ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

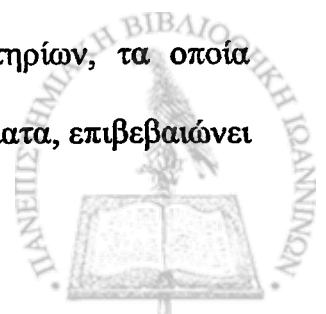


# 1. ΓΕΝΙΚΑ

## 1.1. Ιστορική ανασκόπηση

Η μελέτη του υδάτινου περιβάλλοντος άρχισε ουσιαστικά με τις παρατηρήσεις του Antony van Leewenhoek, που δημοσιεύθηκαν το 1677 (Van Leewenhoek, 1677). Ο Leewenhoek χρησιμοποιώντας ένα αυτοσχέδιο μικροσκόπιο ανακάλυψε την ύπαρξη μικρών οργανισμών (animalcula), οι οποίοι ζούσαν και πολλαπλασιάζονταν στο υδάτινο περιβάλλον (σε νερό πηγαδιών, θάλασσας, ποταμών, βροχής, λειωμένου χιονιού). Στην διάρκεια των αιώνων που ακολούθησαν λεπτομερέστερες παρατηρήσεις και πληθώρα ερευνητικών μελετών οδήγησαν σε μια έκρηξη γνώσεων γύρω από την περιβαλλοντική μικροβιολογία (Παπαδοπούλου, 1998, 2000a).

Οι παρατηρήσεις του Leewenhoek βασίστηκαν σε δείγματα νερού. Όμως από τότε μέχρι σήμερα συνεχίζοντας την μελέτη των μικροοργανισμών στο φυσικό περιβάλλον μας, ανακαλύψαμε ότι οι μικροοργανισμοί καλύπτουν όλο τον πλανήτη μας. Μάλιστα, καταφέρνουν να επιβιώνουν σε ακραία για την ζωή περιβάλλοντα όπως π.χ. η ηφαιστειακή λάβα ή οι παγετώνες και να επηρεάζουν όχι απλά την υγεία μας, αλλά την ίδια την ζωή μας. Οι μικροοργανισμοί αντιδρούν χημικά με το φυσικό περιβάλλον και το σημαντικότερο αποτέλεσμα αυτής της χημικής αντίδρασης είναι η δημιουργία της ατμόσφαιρας οξυγόνου στην οποία ζούμε. Οι μικροοργανισμοί αποτελούν την πρωταρχική μορφή ζωής στη γη. Είναι η πρώτη μορφή ζωής που εμφανίστηκε στον πλανήτη και σύμφωνα με τους ερευνητές θα είναι και η τελευταία μορφή ζωής, που θα επιβιώσει, δεδομένου ότι οι μικροοργανισμοί έχουν εξαιρετικούς μηχανισμούς προσαρμογής σε αντίξοα περιβάλλοντα. Μάλιστα, όσο μικρότεροι είναι σε μέγεθος, τόσο ευκολότερη η προσαρμογή τους. (Hurst, 1997). Η παρατηρούμενη την τελευταία 20ετία αύξηση της αντοχής στα αντιβιοτικά στελεχών βακτηρίων, τα οποία απομονώνονται από ασθενείς, από ζώα, από τρόφιμα, από νερά και από λύματα, επιβεβαιώνει



την μεγάλη ικανότητα των μικροοργανισμών να αναπτύσσουν μηχανισμούς προσαρμογής σε αντίξοο περιβάλλον όπως είναι η παρουσία αντιμικροβιακών ουσιών.

## 1.2 Υδάτινο περιβάλλον και Δημόσια Υγεία

Το υδάτινο περιβάλλον (φυσικό και τεχνητό) σχετίζεται άμεσα με την δημόσια υγεία, διότι ένας σημαντικός αριθμός νοσημάτων του ανθρώπου οφείλεται σε παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μεταδίδονται στον άνθρωπο με το νερό. Ο άνθρωπος μολύνεται από το νερό, είτε καταναλώνοντάς το ως πόσιμο νερό (δικτύου, εμφιαλωμένο, μεταλλικό), είτε χρησιμοποιώντας το για άλλες δραστηριότητες του, όπως το καθημερινό μπάνιο ή ντους στο σπίτι, το κολύμπι σε θάλασσες, λίμνες, ποτάμια και πισίνες, οι διάφορες αθλοπαιδιές (σκι, κανό-καγιάκ, ιστιοσανίδα κτλ), το πλύσιμο σκευών μαγειρικής και τροφίμων (π.χ. λαχανικών και φρούτων), την παρασκευή τροφίμων και ποτών (π.χ. χυμοί, παγάκια), την λειτουργία κλιματιστικών συσκευών κτλ. Επιπλέον στο φυσικό υδάτινο περιβάλλον ζουν μεγάλο-οργανισμοί, οι οποίοι αποτελούν βασικό είδος διατροφής του ανθρώπου εδώ και αιώνες (ψάρια, οστρακοειδή, μαλάκια, εδώδιμα φύκη κ.ά.). Όταν λοιπόν το φυσικό υδάτινο περιβάλλον μολύνεται με παθογόνους μικροοργανισμούς, τότε μολύνονται και οι οργανισμοί, οι οποίοι αποτελούν τροφή του ανθρώπου (ή και των ζώων) με αποτέλεσμα την μόλυνση του καταναλωτή τους (ανθρώπου, ζώου).

Τα περισσότερα των νοσημάτων που μεταδίδονται με μολυσμένο νερό είναι λοιμώδη (υδατογενείς λοιμώξεις) και συσχετίζονται με διάφορα παθογόνα βακτήρια, ιούς και πρωτόζωα. Υπάρχει όμως και ένας αριθμός υδατογενών-τροφιμογενών νοσημάτων που οφείλονται σε τοξίνες μικροοργανισμών, οι οποίες βρίσκονται σε τρόφιμα, που προέρχονται από το υδάτινο περιβάλλον (ψάρια, οστρακοειδή). Οι τοξίνες αυτές παράγονται: α) κατά την διάρκεια των μεταβολικών δραστηριοτήτων ορισμένων ειδών βακτηρίων, όπως για παράδειγμα η μετατροπή της ιστιδίνης σε ισταμίνη από είδη *Proteus spp* και *Klebsiella spp*



στην επιφάνεια και στην σάρκα ψαριών, που οδηγεί στη δηλητηρίαση από σκομβροτοξίνη (Scombroid ή Scombrototoxic Poisoning) και β) κατά τον υπέρμετρο πολλαπλασιασμό στο θαλάσσιο περιβάλλον ορισμένων ειδών τοξικών αλγών (*Dynophysis fortii*, *D. acuminata*, *Gonyaulax catenella*, *G. tamarensis*, *Ptychodiscus brevis*, *Gambierdiscus toxicus*), οι οποίες παράγουν διάφορες τοξίνες, που συσσωρεύονται στη σάρκα των ιχθυηρών και προκαλούν τοξικά σύνδρομα (Παπαδοπούλου, 2001a, Οικονόμου, 2006).

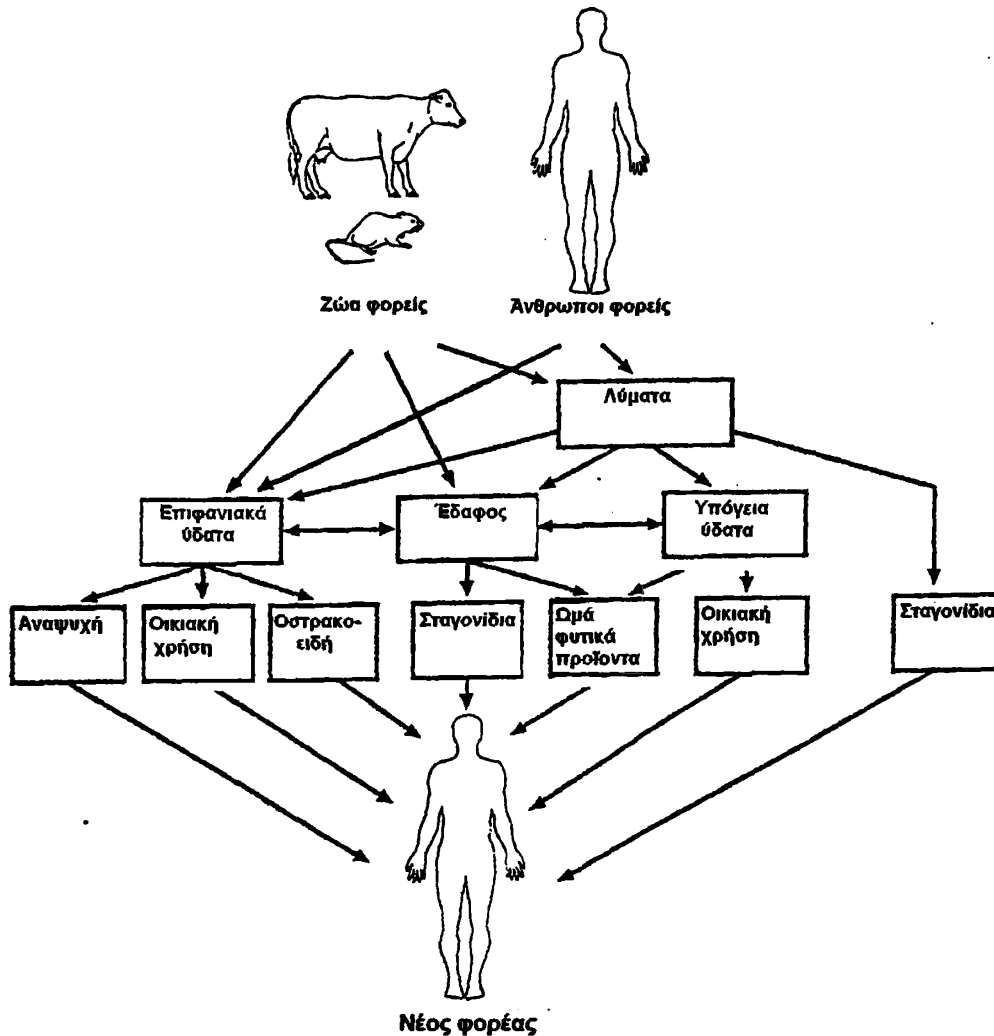
### 1.3. Προέλευση των παθογόνων μικροοργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, που υπάρχουν στο φυσικό υδάτινο περιβάλλον προέρχονται από τρεις πηγές: τον άνθρωπο, τα διάφορα είδη ζώων και το ίδιο το περιβάλλον.

Όμως ο μεγαλύτερος ρυπαντής του περιβάλλοντος θεωρείται ο άνθρωπος (Grimes 1991, Hurst 1997). Η ανθρωπογενής ρύπανση του περιβάλλοντος οφείλεται σε απόρριψη ανεπεξέργαστων αστικών λυμάτων στο υδάτινο περιβάλλον και σε ανθρώπινες δραστηριότητες π.χ. ψυχαγωγικές (κολύμπι, υδάτινα σπορ κτλ), απευθείας αποδεύσεις σε υδατοσυλλογές (ποτάμια, λίμνες, θάλασσα) και σε απόρριψη ανεπεξέργαστων βιομηχανικών λυμάτων (από βιομηχανίες τροφίμων, σφαγεία, κτηνοτροφικές μονάδες κτλ). Η επεξεργασία (βιολογικός καθαρισμός) των λυμάτων ανθρώπινης ή βιομηχανικής προέλευσης μπορεί να βοηθήσει στην μείωση των προβλημάτων δημόσιας υγείας, που προκαλούνται από την ρύπανση λυμάτων στα επιφανειακά νερά (ποτάμια, λίμνες, θάλασσα) και κατά συνέπεια στη μείωση των περιστατικών (σποραδικών ή επιδημικών) υδατογενών λοιμώξεων σε κολυμβητές και σε καταναλωτές νερού και μολυσμένων θαλασσινών τροφίμων (βλέπε Σχήμα 1). Παράλληλα αυτή η επεξεργασία των λυμάτων θα συντελέσει και στην μείωση της μόλυνσης των ιχθυοκαλλιεργειών, των υδατοκαλλιεργειών (ορυζοκαλλιεργειών), των φυτικών



καλλιεργειών, που ποτίζονται με επιφανειακά γλυκά νερά (λίμνες, ποτάμια), αλλά και των παραγωγικών ζώων (βοοειδή, αιγοπρόβατα) τα οποία συχνά ποτίζονται από λίμνες και ποτάμια (Hurst και Murphy, 1998).



**Σχήμα 1.** Περιβαλλοντικές πορείες του νερού δια μέσου των οποίων μολυσματικοί παράγοντες μεταδίδονται στον άνθρωπο (Πηγή: Hurst, 1997)

#### 1.4. Επιβίωση λυματικών μικροοργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον

Η μελέτη των μηχανισμών επιβίωσης των λυματικών μικροοργανισμών στο θαλάσσιο περιβάλλον ξεκίνησε στην δεκαετία του 1960. Σχετικές μικροβιολογικές έρευνες έδειξαν ότι οι παράγοντες, που βοηθούν τον μηχανισμό εξουδετέρωσης των λυματικών μικροοργανισμών



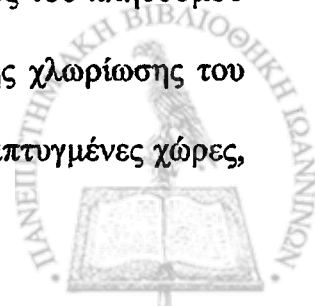


στο υδάτινο περιβάλλον μπορεί να είναι φυσικοί, χημικοί και βιολογικοί. Στους φυσικούς παράγοντες συγκαταλέγονται η φυσική αραίωση, η διάρκεια και η ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας και η θερμοκρασία του νερού. Στους χημικούς παράγοντες περιλαμβάνονται το pH, η αλατότητα και η έλλειψη θρεπτικών ουσιών, ενώ στους βιολογικούς ο ανταγωνισμός με την χλωρίδα και πανίδα του νερού, και το είδος των μικροοργανισμών (βακτήρια, ιοί, πρωτόζωα, μύκητες). Η επίδραση όλων αυτών των παραγόντων στους λυματικούς μικροοργανισμούς επηρεάζει καθοριστικά την δυνατότητα αυτοκαθαρισμού ενός υδάτινου οικοσυστήματος. Όταν η επιβάρυνση ενός υδάτινου οικοσυστήματος με λύματα και κατά επέκταση με λυματικούς μικροοργανισμούς είναι μεγαλύτερη από την δυνατότητα αυτοκαθαρισμού αυτού του υδάτινου περιβάλλοντος τότε δημιουργείται μικροβιακή ρύπανση του νερού (Wheeler, 1990).

Έχει παρατηρηθεί ότι ο αρχικός πληθυσμός των λυματικών βακτηρίων, που καταλήγουν στο υδάτινο περιβάλλον μειώνεται σταθερά με την πάροδο του χρόνου. Ο χρόνος (T), που απαιτείται για την εξουδετέρωση του 90% του αρχικού πληθυσμού των βακτηρίων ορίζεται ως χρόνος T90. (Παπαπετροπούλου και Μαυρίδου, 1995).

## 1.5. Υδατογενώς μεταδιδόμενοι μικροοργανισμοί

Η υδατογενής μετάδοση αποτελεί ένα ταχύτατο και δραστικό μέσο εξάπλωσης λοιμογόνων παραγόντων σε ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού. Υδατογενείς επιδημίες, οι οποίες προσέβαλαν εκατοντάδες ή χιλιάδες ανθρώπους αναφέρονται από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα σε όλες τις ηπείρους (Παπαπετροπούλου και Μαυρίδου, 1995, Παπαδοπούλου 1999, 2000a,b). Ο τυφοειδής πυρετός, η χολέρα και η δυσεντερία είναι μερικά από τα πιο γνωστά υδατογενή νοσήματα, τα οποία παλαιότερα ταλάνιζαν μεγάλο μέρος του πληθυσμού της γης (Havelaar και συν., 1985, Hunter, 1997). Μετά την εφαρμογή της χλωρίωσης του πόσιμου νερού τα νοσήματα αυτά έχουν εξαφανιστεί τουλάχιστον στις αναπτυγμένες χώρες,



ενώ παραμένουν στις λιγότερο αναπτυγμένες περιοχές (Ασία, Αφρική, Ν. Αμερική). Όμως, οι υδατογενείς επιδημίες από άλλα αίτια (ιός ηπατίτιδας, κρυπτοσπορίδια, γκιάρντια κ.ά.) δεν έχουν εξαφανιστεί και συχνά προκαλούν μεγάλες επιδημίες ακόμη και στις πλέον αναπτυγμένες χώρες, όπως η επιδημία κρυπτοσποριδίασης του 1993 στο Milwaukee (Wisconsin) των ΗΠΑ, στην διάρκεια της οποίας υπολογίζεται ότι προσβλήθηκαν 403.000 άτομα (Mac Kenzie και συν., 1994).

Η υδατογενής μετάδοση των μικροοργανισμών γίνεται με κατάποση, με επαφή και με εισπνοή σταγονιδίων μολυσμένου νερού. Οι συνήθεις εκδηλώσεις των υδατογενών λοιμώξεων είναι: γαστρεντερίτιδα (συχνά απειλητική για την ζωή), ηπατίτιδα, δερματικές αλλοιώσεις, επιμολύνσεις τραυμάτων, επιπεφυκίτιδες, αναπνευστικές λοιμώξεις και γενικευμένες λοιμώξεις (Παπαπετροπούλου και Μαυρίδου 1995, Παπαδοπούλου 2000a,b, 2001).

Οι υδατογενώς μεταδιδόμενοι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι: παθογόνοι, ευκαιριακά παθογόνοι και ορισμένοι μπορεί να είναι τοξινογόνοι. Ο συνολικός αριθμός των δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών, που μεταδίδονται μέσω του υδάτινου περιβάλλοντος είναι άγνωστος, ενώ συνέχεια αναγνωρίζονται νέα παθογόνα (αναδυόμενοι παθογόνοι μικροοργανισμοί). Ορισμένοι μικροοργανισμοί, που προκαλούν υδατογενείς λοιμώξεις (*Legionella* spp., *Vibrio* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*) αποτελούν μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του υδάτινου περιβάλλοντος (ενδογενείς μικροοργανισμοί). Οι περισσότεροι όμως από τους μικροοργανισμούς, που ανευρίσκονται στο υδάτινο περιβάλλον και στα τρόφιμα, που προέρχονται από αυτό το περιβάλλον, αποτελούν μέρος της εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου και των ζώων, η δε παρουσία τους οφείλεται στην ρύπανση με λύματα ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης (Moe, 1997). Οι σημαντικότεροι μικροοργανισμοί, που προκαλούν υδατογενείς λοιμώξεις αναφέρονται στον Πίνακα 1.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Υδατογενώς μεταδιδόμενοι παθογόνοι μικροοργανισμοί**

Ιοί	Βακτήρια	Παράσιτα	Άλγες
<b>Μετάδοση με κατάποση μολυσμένου νερού</b>			
		<b>Πρωτόζωα</b>	<b>Κυανοβακτήρια</b>
Ιός <i>Astro</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>Balantidium coli</i>	<i>Anabaena</i>
Ιός <i>Calici</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Aphanizomenon</i>
Εντεροϊοί <i>Polio, Echo</i> <i>Coxsackie</i>	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Entamoeba</i> <i>histolytica</i>	<i>Microcystis</i> spp.
Ιός Ηπατίτιδας Α	<i>Plesiomonas</i> <i>shigelloides</i>	<i>Giardia lamblia</i>	
Ιός Ηπατίτιδας Ε	<i>Salmonella</i> spp	<b>Έλμινθες</b>	
Ιοί Norovirus και συγγενείς ιοί Snow Mountain, Hawai, Southampton, Taunton, Toronto	<i>Shigella</i> spp	<i>Draculus</i> <i>medinensis</i>	
Ιοί Rota ομάδες Α & Β	<i>Vibrio cholerae</i> O1		
	<i>Non-O1 V. cholerae</i>		
	<i>Yersinia enterocolitica</i>		
<b>Μετάδοση από κολυμβητικά νερά</b>			
		<b>Πρωτόζωα</b>	<b>Κυανοβακτήρια</b>
Αδενοϊοί Ορότυποι 1,3,4,7,14	<i>A. hydrophila</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>Anabaena</i>
	<i>Legionella</i> spp	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Aphanizomenon</i>
	<i>Mycobacterium</i> spp. <i>M. marinum,</i> <i>M. balnei, M. plavy,</i> <i>M. kansasii, M. szylgai</i>	<b>Έλμινθες</b>	<i>Microcystis</i> spp.
	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Schistosoma</i> spp.	
	<i>Vibrio</i> spp <i>V. alginolyticus</i> <i>V. parahaemolyticus,</i> <i>V. vulnificus, V. mimicus</i>		



## 1.6 Υδατογενείς λοιμώξεις

Οι υδατογενείς λοιμώξεις οφείλονται στη χρήση νερού (για πόση, παρασκευή τροφίμων, προσωπική υγιεινή, κολύμβηση κτλ) μολυσμένου με παθογόνους μικροοργανισμούς. Η ταξινόμηση των υδατογενών λοιμώξεων από τον Bradley (1987), η οποία βασίστηκε σε επιδημιολογικά δεδομένα, έχει βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση τους. Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Bradley οι λοιμώξεις που σχετίζονται με το νερό διακρίνονται σε:

### 1) *Λοιμώξεις οφειλόμενες σε κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού.*

Οι λοιμώξεις αυτές μεταδίδονται με την κατάποση ακατάλληλου νερού, το οποίο θεωρείται φορέας του υπεύθυνου λοιμογόνου παράγοντα. Κλασικές υδατογενείς λοιμώξεις είναι η χολέρα και ο τυφοειδής πυρετός. Πολλά νοσήματα που οφείλονται σε βακτήρια, ιούς, πρωτόζωα και έλμινθες μπορεί να μεταδοθούν εύκολα με το πόσιμο νερό.

### 2) *Λοιμώξεις που οφείλονται σε ελλιπή παροχή ή χρήση νερού*

Οι λοιμώξεις αυτές σχετίζονται με ελλιπείς συνθήκες υγιεινής και ελλιπή παροχή νερού για πλύσιμο, προσβάλλουν συνήθως οφθαλμούς και δέρμα (επιπεφυκίτιδες, τράχωμα) και το γαστρεντερικό σύστημα (γαστρεντερίτιδες, διαρροϊκά σύνδρομα). Οι γαστρεντερίτιδες αυτές μεταδίδονται από άνθρωπο σε άνθρωπο εξαιτίας των κακών συνθηκών υγιεινής (άπλυτα χέρια, ρύπανση τροφών).

### 3) *Λοιμώξεις οφειλόμενες σε παθογόνους μικροοργανισμούς, που ζουν στο υδάτινο περιβάλλον ή περνούν μέρος του βιολογικού κύκλου τους σε αυτό.*

Στις λοιμώξεις αυτές ανήκουν παρασιτικές νόσοι, όπως η σχιστοσωμίαση και η δρακοντίαση, οι οποίες ενδημούν σε περιοχές με υγρό και θερμό κλίμα.

### 4) *Λοιμώξεις μεταδιδόμενες με έντομα, τα οποία διαβιούν στο υδάτινο περιβάλλον.*



Οι λοιμώξεις αυτές (π.χ. κίτρινος πυρετός, πυρετός Δ. Νείλου, φιλαρίαση, ελονοσία) οφείλονται σε διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς ( ιούς, βακτήρια, παράσιτα), που μεταδίδονται στον άνθρωπο με δήγματα εντόμων (π.χ. κουνούπια, σκνίπες).

Επίσης οι υδατογενείς λοιμώξεις διακρίνονται ανάλογα με τον τρόπο πρόκλησης τους σε:

- α) λοιμώξεις από κατάποση μολυσμένου νερού
- β) λοιμώξεις από επαφή με μολυσμένο νερό αναψυχής, είτε σε φυσικό περιβάλλον (θάλασσα, λίμνες, ποτάμια) είτε σε τεχνητό (κολυμβητήρια, κέντρα υδροθεραπείας, spa, jakouzi)
- γ) λοιμώξεις από εισπνοή μολυσμένων σταγονιδίων νερού (κλιματιστικά, ντους, συντριβάνια)

### 1.7. Λοιμώξεις από κατανάλωση μολυσμένου πόσιμου νερού

Διάφοροι μικροοργανισμοί έχουν απομονωθεί κατά καιρούς από πόσιμα νερά (επιφανειακά ή υπόγεια). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, που ενοχοποιούνται για πρόκληση υδατογενών λοιμώξεων είναι βακτήρια, παράσιτα και ιοί. Κύρια πηγή προέλευσης των μικροοργανισμών αυτών είναι ο άνθρωπος, τα παραγωγικά ζώα και τα άγρια ζώα. Ο χρόνος επιβίωσης των παθογόνων μικροοργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον κυμαίνεται από μερικές μέρες μέχρι πολλούς μήνες (π.χ. 12 μήνες για τα ωά των ελμίνθων) και η λοιμογόνος δόση κυμαίνεται από ένα μικροβιακό κύτταρο μέχρι πολλές χιλιάδες. Όμως η εμφάνιση και η βαρύτητα των συμπτωμάτων εξαρτάται και από τα χαρακτηριστικά του ξενιστή (ηλικία, διατροφική κατάσταση, κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος, προϋπάρχοντα χρόνια νοσήματα κτλ). Στον πίνακα 2 αναφέρονται ο χρόνος επιβίωσης, η λοιμογόνος δόση, ο χρόνος επώασης και τα κλινικά σύνδρομα των κυριότερων παθογόνων, που απομονώνονται από το πόσιμο νερό. Οι υδατογενείς επιδημίες εμφανίζουν εποχική κατανομή, με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης τους θερινούς μήνες και κυρίως τον Ιούλιο (Craun, 1986).



**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.** Χρόνος επιβίωσης, μολυσματική δόση, χρόνος επώασης και κλινικά σύνδρομα των κυριότερων παθογόνων μικροοργανισμών, που απομονώνονται από το πόσιμο νερό (Μαυρίδου και Παπαετροπούλου, 1998).

ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΗ ΔΟΣΗ (αριθμός ζώντων κυττάρων)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΩΑΣΗΣ	ΚΛΙΝΙΚΗ-ΕΙΚΟΝΑ-ΣΥΜΤΩΜΑΤΑ
<i>Salmonella typhimurium</i>	~ 16 ώρες	<10 <sup>3</sup> CFU*	6-48 ώρες	Διάρροια, ναυτία, έμετοι, Πυρετός, κακουχία
<i>Salmonella typhi</i>	~ 16 ώρες	10 <sup>5</sup> CFU	1-10 εβδομ	Πυρετός, Κεφαλαλγία, ανορεξία, Λευκοπενία, σπληνομεγαλία
<i>Shigella dysenteriae</i>	~ 22 ώρες	10-100 CFU	12-48 ώρες	Διάρροια Πυρετός, Αιματηρά κόπρανα
<i>Y. enterocolitica</i>	~ 540 μέρες	10 <sup>9</sup> CFU	3-7 μέρες	Πυρετός, Διάρροια, Κοιλιακοί πονοι, ψευδή συμπτώματα σκωληρκοειδίτιδας
<i>E. coli</i> (ETEC)	~ 13 ώρες	10 <sup>8</sup> -10 <sup>10</sup>	3-36 ώρες	Διάρροια, έμετοι, μυαλγίες
<i>Campylobacter jejuni</i>	~ 3 μέρες	>10 <sup>2</sup> CFU	2-5 μέρες	Χαμηλός Πυρετός, κοιλιακοί πόνοι
<i>V. cholerae</i>	~ 7 ώρες	10 <sup>6</sup> -10 <sup>11</sup> CFU	1-5 μέρες	Διάρροια, ναυτία, έμετοι, πυρετός, Αιματηρά κόπρανα, κακουχία
<i>Legionella pneumophila</i>	>20 μέρες	>10 CFU	24-72 ώρες	Διάρροια βαριά, με ταχεία αφυδάτωση
<i>enteroviruses</i>	~ 50 μέρες	>10 <sup>2</sup> CFU	1-4 εβδομάδες	Πνευμονία, συχνά θανατηφόρος
<i>G. lamblia</i>	~ 5 ώρες ~ 50 μέρες (αναλόγως των περιβαλλοντικών συνθηκών)	1 κύστη	2-4 εβδομάδες	Γαστρεντερίτιδες, ηπατίτιδα
<i>Endamoeba histolytica</i>	-	1 κύστη	2-4 εβδομάδες	Διάρροια δύσοσμη, καταβολή επιγαστρία αλγη
<i>Cryptosporidium</i> spp.	-	> 10 ωοκύστες	-	Γαστρεντερίτιδα (ήπια έως οξεία)
				Διάρροια κυρίως σε μικρά παιδιά και σε ανοσοκατασταλμένα άτομα

CFU = Colony Forming Units



Στις ΗΠΑ το διάστημα 1991-1992 αναφέρθηκαν 34 υδατογενείς επιδημίες με 17.464 κρούσματα. Από αυτές οι επτά οφείλονταν σε πρωτόζωα (*G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp), οι τέσσερεις στον ιό της ηπατίδας Α, στην *Shigella sonnei* και σε ανεπιθύμητες χημικές ουσίες, ενώ οι υπόλοιπες ήταν αγνώστου αιτιολογίας. Στις περισσότερες περιπτώσεις η αιτία της πρόκλησης των επιδημιών ήταν η πλήρης απουσία επεξεργασίας ή η ελλιπής επεξεργασία του νερού (Moore και συν., 1994).

Η επιδημιολογική διερεύνηση των υδατογενών επιδημιών απαιτεί την συνεργασία πολλών επιστημόνων (κλινικών γιατρών, μικροβιολόγων, υγιεινολόγων, επιδημιολόγων, εποπτών Δημόσιας Υγείας, μηχανικών, μηχανολόγων, χημικών) για τον εντοπισμό του αιτίου και της πηγής προέλευσης του, την λήψη κατάλληλων μέτρων προστασίας της υγείας των καταναλωτών και την αποκατάσταση του δικτύου παροχής υγιεινού νερού (Hunter, 1997).

## **1.8. Λοιμώξεις από κολύμβηση σε μολυσμένα φυσικά νερά αναψυχής (θάλασσες, ποταμοί, λίμνες)**

Το φυσικό υδάτινο περιβάλλον (θάλασσες, λίμνες, ποταμοί) μολύνεται από μικροοργανισμούς, οι οποίοι εισέρχονται σε αυτό κυρίως με λύματα αστικής ή βιομηχανικής προέλευσης (ανθρωπογενής ρύπανση). Όμως το φυσικό υδάτινο περιβάλλον μπορεί να μολυνθεί και από μικροοργανισμούς της ατμόσφαιρας. Υποστηρίζεται ότι οι άνεμοι που φυσούν από τις Ηπείρους προς τη θάλασσα μεταφέρουν βακτήρια, ιούς και παράσιτα και ότι η βροχή διευκολύνει την μεταφορά τους στους ποταμούς και ωκεανούς. Επίσης οι κολυμβητές μπορεί να μολύνουν τα νερά αναψυχής ιδιαίτερα σε ακτές όπου προσέρχονται πολλοί λουόμενοι (δημοτικές πλαζ, τουριστικές παραλίες). Οι κυριότερες λοιμώξεις που αποδίδονται σε ρύπανση των παράκτιων νερών από τους κολυμβητές είναι οι ιογενείς λοιμώξεις και οι μυκητιάσεις.



Η πρώτη αναφορά λοίμωξης που συνδέεται με μικροβιακή ρύπανση των νερών της θάλασσας ανακοινώθηκε από τον Reese το 1909. Ο Reese περιέγραψε μια επιδημία τυφοειδούς πυρετού στη Νότια Αγγλία, η οποία εκδηλώθηκε σε άτομα που κολυπούσαν σε πισίνα που γέμιζε περιοδικά με θαλασσινό νερό. Για την επιδημία αυτή είχε ενοχοποιηθεί η ρύπανση της θάλασσας από τα λύματα ενός γειτονικού δημοσίου νοσοκομείου. Ωστόσο, σύμφωνα με τον Mosely (1974) η πρώτη επιδημία τυφοειδούς πυρετού προήλθε από στρεΐδια και εμφανίσθηκε στη Γαλλία το 1816. Ο μηχανισμός όμως της πρόκλησης της νόσου παρέμεινε άγνωστος μέχρι το 1900. Την επιβεβαίωση ότι τα μαλάκια μπορούν να προκαλέσουν τυφοειδή πυρετό και χολέρα, έδωσε η εμφάνιση επιδημίας χολέρας στην Ιταλία. (Cavalieri d'Oro και συν., 1999, Rizzo G, De Vito D. 2003).

Οι προσπάθειες των ερευνητών να τεκμηριωθεί ο συσχετισμός του επιπέδου ρύπανσης των θαλασσινών νερών με την εκδήλωση διαφόρων νόσων σε κολυμβητές οδήγησαν συχνά σε αντικρουόμενα και αμφισβητούμενα αποτελέσματα.

Έτσι, ορισμένες μελέτες διαπιστώνουν διαφορές στην εκδήλωση διαφόρων νόσων μεταξύ κολυμβητών και μη κολυμβητών, ενώ άλλες μελέτες καταλήγουν στη διαπίστωση πως ο κίνδυνος για εντερική νόσο από την κολύμβηση σε νερά, που ρυπαίνονται από απόβλητα υπονόμων είναι πολύ μικρός έως ανύπαρκτος (Saliba & Helmer, 1990). Εκτός της ρύπανσης σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση μιας λοίμωξης φαίνεται να παίζουν πολλοί παράγοντες καθώς και οι συνθήκες των κολυμβητών.

1) Η διάρκεια επαφής με το νερό: σε παρατεταμένη έκθεση στο νερό αυξάνεται ο κίνδυνος των λοιμώξεων.

2) Το βύθισμα της κεφαλής στο νερό: σύμφωνα με την Π.Ο.Υ. κολυμβητής θεωρείται μόνο αυτός που εμβαπτίζει το κεφάλι του στο νερό. Στην περίπτωση εμβάπτισης της κεφαλής στο νερό αυξάνονται οι πιθανότητες λοίμωξης των ώτων, ρινοφάρυγγα, επιπεφυκότα.





- 3) Η ηλικία: παιδιά 0-4 ετών εμφανίζουν αυξημένο αριθμό λοιμώξεων από το εντερικό σύστημα (Fattal and Shuval, 1988), ενώ οι ηλικίες 15-24 ετών είναι οι πλέον ευαίσθητες σε λοιμώξεις ώτων και ανωτέρου αναπνευστικού (Kay and Weyer, 1992).
- 4) Ο όγκος του νερού που καταπίνουμε: ο μέσος όγκος της ποσότητας νερού που καταπίνουν οι κολυμβητές είναι 10-50 ml. Ο όγκος αυτός θεωρείται μικρός για να περιέχει την απαιτούμενη μολυσματική δόση, εκτός των περιπτώσεων σιγκελλών, ιών και ορισμένων οροτύπων σαλμονελλών. Μεγαλύτερος κίνδυνος υφίσταται όταν η κολύμβηση γίνεται κοντά σε εκβολή αγωγού αποβλήτων, όπου η συγκέντρωση των παθογόνων μικροοργανισμών είναι μεγάλη (Efstratiou, 2001, Zmirou και συν., 2003).
- 5) Η ανοσοποίηση του οργανισμού: Οι κάτοικοι παράκτιων περιοχών είναι λιγότερο ευαίσθητοι στις θαλασσογενείς γαστρεντερίτιδες απ' ότι οι επισκέπτες των περιοχών αυτών (Παπαπετροπούλου 1998). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι οι έγκυες γυναίκες, τα βρέφη, τα υπερήλικα και τα ανοσοκατασταλμένα άτομα είναι πιο ευαίσθητα στις υδατογενείς λοιμώξεις (Gerba et al 1996).
- 6) Η χωρίς προστασία επαφή με την βρεγμένη άμμο: η άμμος συγκεντρώνει σταφυλοκόκκους και μύκητες, με πιθανό αποτέλεσμα τη δημιουργία δερματοπαθειών, οι οποίες όμως μπορεί να αποδοθούν στην κολύμβηση.
- 7) Η κατανάλωση έτοιμου φαγητού από το σπίτι ή από καντίνες: εάν το φαγητό έχει παραμείνει εκτός ψυγείου για πολλές ώρες μπορεί η κατανάλωσή του να προκαλέσει γαστρεντερίτιδα, οι οποία κακώς θα αποδοθεί στην κολύμβηση.
- 8) Περισσότερες λοιμώξεις παρατηρούνται στους αθλητές θαλασσιών αθλημάτων (θαλάσσιο σκι, καταδύσεις, κωπηλασία) από τους κοινούς κολυμβητές.
- 9) Περισσότερες λοιμώξεις παρατηρούνται όταν η άθληση γίνεται σε νερά με κύματα ή ισχυρό άνεμο.



Έχει παρατηρηθεί πως η συχνότητα των λοιμώξεων που αναφέρθηκαν, ποικίλλει ευρέως (1 έως 22%) και εξαρτάται κυρίως από την ηλικία των κολυμβητών. Επίσης εξαρτάται από την συχνότητα κολύμβησης. Σύμφωνα με τον Mujeriego (1982) οι κολυμβητές παρουσιάζουν, σε σχέση με τους μη κολυμβητές, 4% περισσότερες λοιμώξεις. Οι λοιμώξεις αυτές οφείλονται σε διαταραχή των αμυντικών μηχανισμών του σώματος (ξέπλυμα των προστατευτικών βλεννών των ματιών και του ρινοφαρυγγικού συστήματος, της λίπανσης του δέρματος κ.τ.λ.), οπότε ο κολυμβητής είναι εκτεθειμένος σε μολυσματικούς παράγοντες, οποιασδήποτε προέλευσης.

Οι λοιμώξεις, που αποδίδονται στην επαφή με το νερό θαλασσών- λιμνών- ποταμών κατατάσσονται στις παρακάτω κατηγορίες (Saliba LJ, Helmer, 1990, Shuval, 2003,).

**A. Εντερικές λοιμώξεις (γαστρεντερίτιδες) προερχόμενες από κατάποση ύδατος κατά την διάρκεια της κολύμβησης.** Στις ΗΠΑ το 1991-92, 11 επιδημίες γαστρεντερίτιδας αποδόθηκαν σε κατάποση νερού κατά την διάρκεια κολύμβησης, έξι από τις οποίες οφειλόταν σε *Cryptosporidium* (Moore και συν., 1994, Kramer 1996).

**B. Λοιμώξεις από αυτόχθονους ευκαιριακά παθογόνους μικροοργανισμούς του υδάτινου περιβάλλοντος.** Οι λοιμώξεις αυτές συμβαίνουν κυρίως σε άτομα με προβλήματα του ανοσοποιητικού (ανοσοκατεσταλμένοι, διαβητικοί, κ.τ.λ.), σε παιδιά ηλικίας έως 4 ετών, και σε υγιείς ενήλικες, οι οποίοι όμως παρουσιάζουν προβλήματα δέρματος ή λύση συνέχειας του δέρματος, πληγές αλλά και νοσήματα ώτων και οφθαλμών.

**Γ. Ανθρωπογενείς λοιμώξεις.** Κατά την διάρκεια των δραστηριοτήτων αναψυχής στο υδάτινο περιβάλλον, ένας μεγάλος αριθμός μικροοργανισμών της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου εισέρχεται στο νερό. Στις περιπτώσεις, που μεγάλος αριθμός ατόμων συνωστίζεται σε περιορισμένη έκταση, ο αριθμός αυτών των μικροοργανισμών είναι αρκετά μεγάλος και είναι πιθανόν να προκαλέσει λοιμώξεις (π.χ. σταφυλοκοκκικές λοιμώξεις). Επιπλέον κατά την διάρκεια καταδύσεων, παρασύρονται μικροοργανισμοί από και προς την ρινοφαρυγγική



κοιλότητα ή τον έξω ακουστικό πόρο των κολυμβητών με αποτέλεσμα την δημιουργία λοιμώξεων στις περιοχές αυτές.

#### A. Εντερικές λοιμώξεις (γαστρεντερίτιδες)

Οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι ενοχοποιούνται για τις προαναφερθείσες λοιμώξεις αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω : (Shuval, 1988)

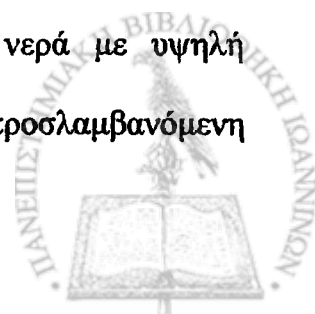
##### A.1) Αίτια Βακτηριακών γαστρεντερίτιδων.

Τα παθογόνα βακτήρια, τα οποία ενοχοποιούνται για πρόκληση γαστρεντερίτιδων οφειλόμενων σε κολύμβηση είναι τα εξής :

##### *Salmonella* spp

Στο θαλασσινό νερό μπορεί να επιβιώσουν τα είδη των σαλμονελλών, που προκαλούν τυφοειδή πυρετό (*S. typhi*) ή παρατυφικές λοιμώξεις (*S. paratyphi* A και B), όμως η επιβιώσή τους στο θαλασσινό νερό είναι βραχυχρόνια (περίπου 16 ώρες) (Wheeler, 1990). Παρ'όλο που έχουν αναφερθεί επιδημίες γαστρεντερίτιδας από σαλμονέλλες, σε ελάχιστες έχει τεκμηριωθεί ότι η προέλευσή τους ήταν η επαφή με το νερό (Bonde, 1981). Μεγάλος αριθμός σαλμονελλών έχει απομονωθεί στα σημεία εκβολής αγωγών μη επεξεργασμένων λυμάτων, ενώ στο νερό των ακτών κολύμβησης η πυκνότητά τους ανά μονάδα όγκου είναι χαμηλή λόγω της σημαντικής αραιώσης. Αν ληφθεί υπ'όψιν η υψηλή λοιμογόνος δόση ( $>10^4$  cfu) (Παπαδοπουλου, 2001b) των περισσότερων ειδών σαλμονελλών και η μικρή ποσότητα του νερού που τυχαίως καταπίνουν οι κολυμβητές (10-50 ml) κατά την διάρκεια της κολύμβησης, γίνεται αντιληπτό πόσο δύσκολο είναι να προκληθούν γαστρεντερίτιδες από σαλμονέλλες κατά την κολύμβηση.

Αντιθέτως, η κατανάλωση οστρακοειδών, που αλιεύονται σε νερά με υψηλή μικροβιολογική ρύπανση οδηγεί συχνά σε σαλμονελλώσεις, επειδή η προσλαμβανόμενη



ποσότητα των σαλμονελλών είναι μεγαλύτερη από την λοιμογόνο δόση ( $10^5$ /cfu). Τούτο οφείλεται στο γεγονός ότι τα οστρακοειδή δρουν ως διηθητικοί ηθμοί κατακρατώντας μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών. Οι γαστρεντερίτιδες από σαλμονέλλες έχουν ελαττωθεί ακόμη περισσότερο τα τελευταία χρόνια λόγω του βιολογικού καθαρισμού των αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων. Οι τυφοπαρατυφικές λοιμώξεις προκαλούνται συνήθως από την κατανάλωση θαλασσινών τροφίμων, τα οποία περιέχουν τουλάχιστον 50 φορές περισσότερα βακτήρια απ' ό τι το θαλασσινό νερό (UNEP/WHO/IAEA, 1988).

### *Shigella spp*

Στο θαλασσινό νερό υπάρχουν διάφορα είδη *Shigella spp* τα οποία είναι δυνατόν να προκαλέσουν γαστρεντερίτιδες. Η επιβίωση των σιγγελών στο θαλασσινό νερό είναι περίπου 22 ώρες.

Στις γαστρεντερίτιδες από *Shigella spp* η λοιμογόνος δόση είναι εξαιρετικά χαμηλή (10-100 μικροοργανισμοί), σε αντίθεση π.χ με τις σαλμονέλλες που η λοιμογόνος δόση είναι υψηλή ( $>10^4$ cfu). Τεκμηριωμένες γαστρεντερίτιδες από *Shigella spp* έχουν αναφερθεί μόνο σε κολυμβητές ποταμών (UNEP/WHO/IAEA/1988, Herwaldt, 1991).

### *Campylobacter spp*

Σήμερα είναι το συχνότερο αίτιο γαστρεντερίτιδων στην Ευρώπη και τις ΗΠΑ. Έχει απομονωθεί πολλές φορές από νερό κολύμβησης, με μεγαλύτερη συχνότητα το καλοκαίρι. Δεν έχει ενοχοποιηθεί άμεσα για πρόκληση γαστρεντερίτιδας εξαιτίας κολύμβησης. Όμως η μικρή μολυσματική δόση (500 κύτταρα) καθιστά το καμπυλοβακτήριο πιθανό αίτιο γαστρεντερίτιδων από νερά, που έχουν ρυπανθεί με λύματα ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης. (Schonberg-Norio D και συν., 2004)

### *Vibrio spp*

Στο θαλασσινό νερό υπάρχουν δύο ομάδες *Vibrio*



Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει αυτόχθονους μικροοργανισμούς του θαλασσινού περιβάλλοντος, οι οποίοι δεν συσχετίζονται με την μόλυνση της θάλασσας και την ρύπανση με απόβλητα. Στα αυτόχθονα *Vibrio* περιλαμβάνονται:

α) το *Vibrio parahaemolyticus*, το οποίο προκαλεί γαστρεντερίτιδες μετά από κατανάλωση οστρακοειδών (στα οποία βρίσκεται σε πολλαπλάσιες συγκεντρώσεις απ' ότι στο θαλασσινό νερό) ή επιμολύνσεις τραυμάτων μετά από επαφή με το θαλασσινό νερό. Η παρουσία του στο θαλασσινό νερό δεν συσχετίζεται με την πρόκληση γαστρεντερίτιδων εξαιτίας κατάποσης νερού, διότι δεν βρίσκεται σε επαρκή συγκέντρωση ώστε να προκαλέσει λοίμωξη. (Παπαδοπούλου, 2001c)

β) το *Vibrio alginolyticus*, το οποίο προκαλεί ωτίτιδες και λοιμώξεις τραυμάτων μετά από επαφή με το θαλασσινό νερό και τα ιζήματα.

-Στη δεύτερη ομάδα περιλαμβάνονται αλλόχθονα *Vibrio*, τα οποία βρίσκονται στα απόβλητα, που μολύνουν τις θάλασσες. Σε αυτά περιλαμβάνονται α) το *V. cholerae*, που προκαλεί χολέρα, κυρίως μετά από κατανάλωση οστρακοειδών β) τα *Vibrio non cholerae*, που απομονώνονται σπανίως γ) τα NAG *Vibrio* (Non agglutinable), τα οποία προκαλούν γαστρεντερίτιδες μετά από κατανάλωση μολυσμένων οστρακοειδών. Ο χρόνος επιβίωσης των *Vibrio* είναι περίπου 10 ώρες, η δε λοιμογόνος δόση τους είναι υψηλή ( $10^3$ - $10^{11}$  cfu). Τα *Vibrio* spp είναι ευαίσθητα σε χαμηλές θερμοκρασίες και δεν απομονώνονται σε θερμοκρασίες κάτω των 13-15°C (Παπαδοπούλου 2001d, Tsai YH, 2004, Soomro AL, 2004).

#### A. 2) Αίτια Ιογενών γαστρεντερίτιδων

Στα κόπρανα του ανθρώπου υπάρχουν διάφοροι τύποι ιών, οι οποίοι με τα αστικά απόβλητα ρυπαίνουν τις θάλασσες (Rao και συν., 1986). Οι ιοί, που έχουν βρεθεί στο θαλάσσιο περιβάλλον ανήκουν στις παρακάτω ομάδες :

- Enterο-ιοί (*Polio*, *Coxsackie* – A και B, *Echo*).



- . Reo-ιοί
- . Adeno-ιοί
- . Parvo-ιοί
- . Hepatitis A
- . Ιοί Noro

Οι ιοί, οι οποίοι ανιχνεύονται στα απόβλητα (εκτός από τους ιούς Polio, που υπάρχουν λόγω εμβολιασμών) είναι οι ίδιοι, που υπάρχουν στην ανθρώπινη κοινότητα της πόλης, της οποίας τα λύματα φθάνουν στη θάλασσα (Sellwood και συν., 1981). Η παρουσία εντεροϊού στο νερό της θάλασσας θεωρείται επικίνδυνη για την δημόσια υγεία, διότι η λοιμογόνος δόση είναι πολύ χαμηλή (Pallin, 1997, Wetz JJ και συν., 2004).

Ο ιός της ηπατίτιδας A και ο ιός Noro μεταδίδονται κυρίως με τα οστρακοειδή (Shumway & Hurst, 1991). Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται γαστρεντερικά νοσήματα που οφείλονται σε κατανάλωση οστρακοειδών, τα οποία αποδίδονται σε μη ταυτοποιήσιμους ιούς, που αποικίζουν τα οστρακοειδή.

Οι παθογόνοι ιοί (*Enteric viruses, Polioviruses, HPV-A*) επιβιώνουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο θαλασσινό νερό από ότι τα βακτήρια. Οι εντεροϊοί επιβιώνουν από λίγες ώρες έως 130 ημέρες στο θαλασσινό νερό. Η επιβίωσή τους εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την αλατότητα, το είδος του ιού, τον βακτηριακό ανταγωνισμό, τα αιωρούμενα στερεά και την ρύπανση (Wheeler, 1990).

Οι ιογενείς λοιμώξεις, που αποδίδονται σε θαλασσινά νερά (κολύμβηση) δεν είναι ασυνήθεις. Θεωρείται όμως εξαιρετικά δύσκολο να τεκμηριωθεί ότι μια ιογενής γαστρεντερίτιδα οφείλεται σε κατάποση θαλασσινού νερού, που έχει ρυπανθεί με ιούς, αφενός διότι ο αιτιολογικός παράγων δύσκολα απομονώνεται από το υδάτινο περιβάλλον και αφ'ετέρου διότι τα επιδημιολογικά στοιχεία δεν τεκμηριώνουν πάντοτε την υδατογενή μετάδοση. Οι ιοί, που συχνότερα ενοχοποιούνται για γαστρεντερίτιδες είναι οι *Coxsackie A*



και Β, οι *Noro* και οι *Rota-Ioi*, οι οποίοι προσβάλλουν κυρίως παιδιά και έφηβους και εμφανίζονται συχνότερα σε κολυμβητές ποταμών και λιμνών. Τα συμπτώματα των ιογενών γαστρεντερίτιδων είναι συνήθως ήπια, βραχείας διάρκειας και χαρακτηρίζονται από διάρροια, ναυτία, έμετο και πυρετό (Priemer 1999). Ο χρόνος επώασης ποικίλλει μεταξύ 24-48 ωρών. Ο ιός *HIV* δεν μεταδίδεται με την κολύμβηση.

### A.3) Αίτια Παρασιτικών γαστρεντερίτιδων

Τα ωά ορισμένων παρασίτων όπως *Ascaris* spp., *Oxyurus* spp., *Trichiuris* spp και *Toxoplasma gondii* μπορούν να ζήσουν για μήνες στο θαλασσινό νερό. Η κατάποση ενός και μόνον ωού είναι αρκετή για να προκαλέσει νόσο. Τα ωά φθάνουν στη θάλασσα με τα αστικά αποβλήτα και αν καταποθούν τυχαία με το νερό στη διάρκεια της κολύμβησης ή άθλησης στο νερό, μπορεί να μολύνουν τον άνθρωπο. (UNEP/WHO/LAEA, 1988).

-Τα πρωτόζωα που υπάρχουν στα θαλασσινά νερά και ενοχοποιούνται για γαστρεντερίτιδες είναι συνήθως, η *G. lablia*, το *Balantidium coli*, το *Cryptosporidium* spp και σπάνια η *Entamoeba histolytica*. Τα πρωτόζωα αυτά ρυπαίνουν τη θάλασσα. όταν απορρίπτονται αστικά ή κτηνοτροφικά απόβλητα. Ο κίνδυνος μεταδοσής τους υπάρχει όταν καταναλώνονται οστρακοειδή, που βρίσκονται κοντά σε σημεία αποβολής ανεπεξεργαστων, αλλά και επεξεργασμένων λυμάτων.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι περισσότερες τεκμηριωμένες γαστρεντερίτιδες πρωτοζωικής προέλευσης που αποδίδονται σε μόλυνση μετά από κολύμβηση οφείλονται σε *Giardia* ή *Cryptosporidium* (Lipp EK και συν., 2001).



**Β. Λοιμώξεις απο αυτόχθονους ευκαιριακά παθογόνους μικροοργανισμούς του υδάτινου περιβάλλοντος**

και

**Γ. Ανθρωπογενείς λοιμώξεις**

**Β.1. Δερματίτιδες**

Η επαφή με νερό προκαλεί συχνά λοιμώξεις του δέρματος. Οι λοιμώξεις αυτές συσχετίζονται συνήθως με λύση της συνέχειας του δέρματος, η οποία είναι αποτέλεσμα ατυχήματος κατά τη διάρκεια διαφόρων δραστηριοτήτων αναψυχής στο νερό και έτσι είναι συνήθως περιορισμένης έκτασης. Οι μικροοργανισμοί, που ενοχοποιούνται για δερματίτιδες λόγω της κολύμβησης αναφέρονται παρακάτω :

**Vibrio spp.** Τα είδη *Vibrio*, που είναι δυνατόν να προκαλέσουν δερματίτιδες είναι το *V. alginolyticus* και το *V. vulnificus* και σπανιότερα το *V. parahaemolyticus*.

**Aeromonas spp.** Για δερματικές λοιμώξεις έχει κυρίως ενοχοποιηθεί η *A. hydrophila* και λιγότερο η *A. sobria*. Επιπλέον η *A. hydrophila* προκαλεί διάρροιες και πνευμονίες, ενώ σε ανοσοκατασταλαμένους δυνατόν να προκαλέσει σηψαιμία. Μεταδίδεται στον άνθρωπο εξ επαφής, με κατάποση νερού και με κατανάλωση θαλασσινών τροφίμων.

**Staphylococcus spp.** Οι παθογόνοι σταφυλόκοκκοι και κυρίως ο *S. aureus*, είναι ανθεκτικοί σε υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου και γι' αυτό επιβιώνουν καλύτερα από τα άλλα βακτήρια στο θαλασσινό νερό και συμπεριλαμβάνονται στους δείκτες μικροβιολογικής ρύπανσης των θαλασσών. Οι σταφυλόκοκκοι είναι δυνητικά παθογόνοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι προκαλούν δερματίτιδες, αποστήματα δέρματος, επιμολύνσεις τραυμάτων κ.τ.λ. μετά από κολύμβηση. Πηγή ρύπανσης του νερού είναι και οι ίδιοι οι λουόμενοι. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σταφυλοκόκκων υπάρχουν στις πολυπληθείς ακτές (Yosphe-Purer & Coldertman, 1987) και στην άμμο των ακτών κολύμβησης (Μαυρίδου και συν., 1989, Begier,





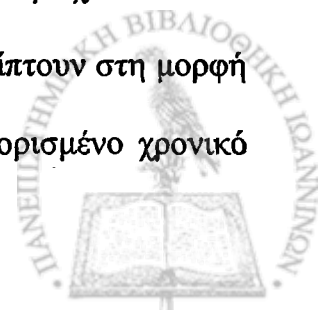
2005). Σταφυλόκοκκοι συσσωρεύονται και στα οστρακοειδή. Η ύπαρξη *S. aureus* >100 cfu/ml στα οστρακοειδή δυνατόν να προκαλέσει τροφικές λοιμώξεις (UNEP/WHO, 1987, Παπαδοπούλου, 2001e).

**Mycobacterium spp.** Αναφέρονται λοιμώξεις δέρματος μετά από επαφή με νερό (κυρίως θαλασσινό και σπανιότερα γλυκό νερό), οι οποίες οφείλονται κυρίως σε άτυπα μυκοβακτηρίδια (Winthrop, 2002). Οι δερματικές αυτές λοιμώξεις προϋποθέτουν κακώσεις κυρίως των άκρων, οι οποίες συμβαίνουν συνήθως κατά τη διάρκεια της κολύμβησης ή άλλων αθλημάτων (Gira, 2004). Το συχνότερα απομονούμενο μυκοβακτηρίδιο από αυτές τις δερματικές αλλοιώσεις είναι το *M. marinum* (Collis και συν., 1984, Sniezek, 2003) και σε μικρότερη συχνότητα το *M. fortuitum* και *M. chelonae*.

**Pseudomonas spp.** Η *P. aeruginosa* φθάνει στο υδάτινο περιβάλλον μέσω των αποβλήτων. Το συγκεκριμένο είδος ψευδομονάδας προκαλεί δερματίτιδες μετά από επαφή με το μολυσμένο νερό (Bertouane, 2000). Η παρουσία της συμβαδίζει συνήθως με την ύπαρξη αυξημένου αριθμού των μικροβιολογικών δεικτών ρύπανσης της θάλασσας (Ολικά κολοβακτηριοειδή, κοπρανάδη κολοβακτηριοειδή) (Paparetropoulou και Rodopoulou, 1994, Hollyoak & Boyd 1995).

**Μύκητες.** Ορισμένα είδη μυκήτων, που είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο προκαλούν δερματίτιδες. Το συχνότερο είδος μύκητα, που σχετίζεται με άμεση επαφή κυρίως με την άμμο και λιγότερο με το νερό της θάλασσας είναι η *Candida albicans*. Κατά καιρούς διάφορα είδη *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* και *Rhizopus* έχουν επίσης απομονωθεί από το θαλασσινό νερό και έχουν συσχετιστεί με δερματίτιδες (Arvanitidou, 2000).

**Schistosoma spp.** Η σχιστοσωμιακή δερματίτιδα είναι κυρίως μια αλλεργική αντίδραση στην παρουσία του παρασίτου στο δέρμα. Το νερό, ρυπαίνεται με κόπρανα, που περιέχουν ωά του παρασίτου, τα οποία μεταπίπτουν σε νύμφες, οι οποίες στη συνέχεια μεταπίπτουν στη μορφή των σποροζώων μέσα στον ενδιάμεσο ξενιστή (σαλιγκάρια). Μετά από ορισμένο χρονικό



διάστημα ελευθερώνεται στο νερό η κερκάρια, η οποία καταναλώνεται από τις πάπιες και ο κύκλος επαναλαμβάνεται πάλι (Παπαδοπούλου 1990). Ο άνθρωπος είναι τυχαίος ξενιστής του σταδίου της κερκάρια του παρασίτου. Η σχιστοσωμιακή δερματίτιδα είναι ενδημική στον Καναδά, στη Μινεσότα και κατά μήκος του ποταμού Μισσισιπή. Η νόσος έχει παγκόσμια διασπορά και έχει αναφερθεί στην Ευρώπη, Αφρική, Ινδία, Μαλαισία, Μεξικό (Graun, 1986).

## B.2. Ωτίτιδες

Η συχνότερη λοίμωξη του ωτός, που συνδέεται με την κολύμβηση είναι η εξωτερική ωτίτιδα. Προδιαθεσιακοί παράγοντες για την εμφάνιση αυτής της ωτίτιδας είναι η ηλικία, ο χρόνος έκθεσης στο υγρό περιβάλλον, η θερμοκρασία του νερού, ο τραυματισμός του ιστού, η λύση της συνέχειας του εξωτερικού πόρου, καθώς και η ύπαρξη κυψελίδας, η οποία διατηρεί την περιοχή του εξωτερικού πόρου υγρή (Fallon, 1995).

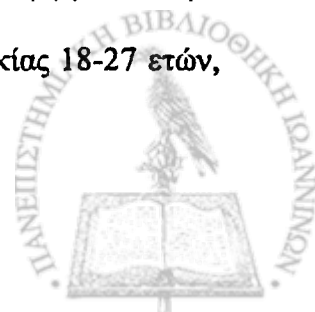
Οι ωτίτιδες αυτές οφείλονται σε Gram αρνητικά βακτήρια και κυρίως στην *P. aeruginosa* και σε κόκκους Gram θετικούς όπως π.χ. *S. aureus*. Επίσης τα *Vibrio* spp, έχουν ενοχοποιηθεί για ωτίτιδες των λουομένων στη θάλασσα. Τα *Vibrio* spp που έχουν ενοχοποιηθεί είναι το *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* (Graun 1986). Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών, που προκαλούν ωτίτιδες προκαλούν και δερματίτιδες.

## B.3. Επιπεφυκίτιδες – Ρινοφαρυγγίτιδες

Η φαρυγγοεπιπεφυκίτιδα η συνοδευόμενη με πυρετό οφείλεται κυρίως σε αδενοϊούς. Όμως επιπεφυκίτιδα μπορεί να προκαλέσει και η *P. aeruginosa* (Hollyoak & Freeman, 1995).

## B.4. Πρωτοπαθής Μηνιγγοεγκεφαλίτιδα-Μηνιγγίτιδες

Το συνηθέστερο αίτιο που προκαλεί μηνιγγοεγκεφαλίτιδα με την επαφή με το νερό είναι η αμοιβάδα *Naegleria fowleri*. Προσβάλλει συνήθως νεαρά άτομα ηλικίας 18-27 ετών,



που κολυμπούν σε γλυκά νερά, όπου υπάρχει αυτή η αμοιβάδα, η οποία εισέρχεται με το νερό δια της ρινικής οδού και φτάνει στις μήνιγγες (Παπαδοπουλου, 1990). Η *N. fowleri* έχει απομονωθεί από κολυμβητικές δεξαμενές (Dejonkheere, 1979), αλλά και από νερό δικτύου (Anderson & Jamieson, 1972). Ο πολλαπλασιασμός της ευνοείται από το ζεστό κλίμα. Τα περιστατικά ανά τον κόσμο είναι λίγα, αλλά συνήθως η πρόγνωση είναι κακή και η εξέλιξη θανατηφόρα (Wellings, 1977).

Σοβαρή μηνιγγίτιδα, σε συνδυασμό με ηπατονεφρική ανεπάρκεια προκαλείται από την *Leptospira icterohaemorrhagiae* (νόσος του Weil). Η λεπτοσπείρωση έχει συχνά συσχετισθεί με κολύμβηση και αθλητισμό κυρίως σε γλυκά νερά (Ferguson, 1990).

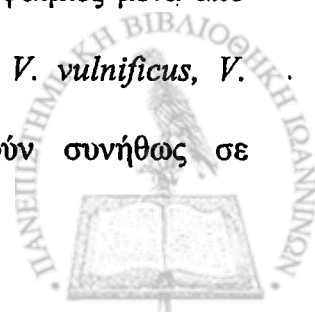
#### B.5. Πνευμονίες

Οι συγκεντρώσεις των δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών στα φυσικά νερά συνήθως δεν είναι επαρκείς για να προκαλέσουν πνευμονίες με εισπνοή μολυσμένων σταγονιδίων. Όμως, σε εγκαταστάσεις ιαματικών λουτρών, έχουν καταγραφεί πνευμονίες από *Legionella pneumophila* και μυκοβακτηρίδια. Η *L. pneumophila* συχνά ενδημεί στα ιαματικά νερά και όταν οι συνθήκες υγιεινής δεν είναι ικανοποιητικές, αποικίζει τις εγκαταστάσεις και προκαλεί άτυπες πνευμονίες. Οι λεγιονελλώσεις είναι συχνότερες σε λουτρά ρινοθεραπείας ή θεραπείας με νερά υπό ανάδευση (Alexiu , 1994, Martinelli, 2001, Παπαδοπούλου, 2002)

Άλλοι μικροοργανισμοί που έχουν ανεβρεθεί σε πύελα ασθενών με πνευμονία μετά από είσοδο μεγάλης ποσότητας νερού στο βρογχικό δένδρο (π.χ. σε περιπτώσεις πνιγμού) είναι οι *P. aeruginosa*, *Legionella bozemanii* και *A. hydrophila* (Green, 2000, Ruimi, 2001).

#### B.6. Σηψαιμία

Οι συνηθέστεροι μικροοργανισμοί που μπορεί να προκαλέσουν σηψαιμίες μετά από επαφή με το νερό είναι η *A. hydrophila*, *Chromobacterium violaceum*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* και *V. alginolyticus*. Οι σηψαιμίες αυτές αφορούν συνήθως σε



ανοσοκατεσταλμένα άτομα, σε άτομα με πνευμονία ή σε άτομα με βαριά υποκείμενη νόσο (Graun, 1986, Dryden, 1989, Chang, 1994, Rotz, 1996, Clement, 2004, Tsai, 2004).

### B.7. Ουρολοιμώξεις – Κολπίτιδες

Συχνά η εμφάνιση ουρολοιμώξεων και κολπίτιδων το καλοκαίρι αποδίδεται σε επαφή με μικροβιολογικά ακατάλληλο θαλασσινό νερό. Οι ουρολοιμώξεις όμως και οι κολπίτιδες δεν συσχετίζονται άμεσα με την κολύμβηση σε μολυσμένα θαλασσινά νερά, διότι έχει δειχθεί η ανικανότητα των βακτηριδίων να προσκολώνονται σε επιθηλιακά κύτταρα μέσα στο θαλασσινό νερό και να προκαλούν λοιμώξεις (Sassi AB και συν., 2004).

## 1.9. Λοιμώξεις από κολύμβηση σε μολυσμένο τεχνητό υδάτινο περιβάλλον (κολυμβητήρια, υδάτινα πάρκα αναψυχής, spa, jakouzi κ. ά)

Η μετάδοση λοιμωδών νοσημάτων με την κολύμβηση σε τεχνητό υδάτινο περιβάλλον έχει επιβεβαιωθεί με πολλές επιδημιολογικές μελέτες. Η καταβύθιση του σώματος στο νερό δίνει την ευκαιρία σε παθογόνους μικροοργανισμούς να προσβάλλουν τον οργανισμό του ανθρώπου μέσω του γαστρεντερικού συστήματος, του αναπνευστικού, του ουρο-γεννητικού, διαφόρων επιθηλίων, των οφθαλμών των ωτών και λύσεων της συνέχειας του δέρματος.

Η κολύμβηση όμως σε πισίνες δίνει πρόσφορο έδαφος και σε λοιμώξεις, που μεταδίδονται από τον ένα κολυμβητή στον άλλο. Το γεγονός ότι ο άνθρωπος δεν είναι υδρόβιος οργανισμός έχει σαν αποτέλεσμα ο αμυντικός του μηχανισμός να εξασθενεί μετά από παρατεταμένη έκθεση στο νερό. Η παρατεταμένη έκθεση στο νερό ξεπλένει τα προστατευτικά βλεννώδη στρώματα των οφθαλμών και της ρινός, και εξαλείφει την φυσική λίπανση του δέρματος, το κερατοποιημένο περίβλημα των πληγών και την κυψελίδα των



ώτων (Springer, 1985, Fields, 2001, Hajjartabar, 2004). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνει η ευαισθησία του ανθρώπου στις λοιμώξεις, ακόμα και από μικροοργανισμούς του ίδιου του σώματος (Grabow, 1991).

Η μελέτη της μετάδοσης λοιμώξεων μέσω των κολυμβητηρίων είναι σε συνεχή εξέλιξη και εξαρτάται από το είδος των κολυμβητηρίων, που κατά καιρούς προτιμά το κοινό. Τα τελευταία χρόνια η προσέλευση είναι αυξημένη σε κλειστά κολυμβητήρια, σε κολυμβητήρια με ζεστό νερό και σε κολυμβητήρια με υδρομασάζ (CDC, 2004). Τα είδη των μικροοργανισμών, που συνήθως απομονώνονται από υδρομασάζ και spa είναι κυρίως ψευδομονάδες, λεγιονέλλες και μυκοβακτηρίδια (Hopkins et al. 1981; Vogt et al. 1982; Ratnam et al. 1986; Holmes and Kozinn 1986; Price και Ahearn 1988; Fallon και Rowbotham 1990; Nakatade et al 1999; Berrouane 2000; Benin et al. 2002; Fields et al. 2001; Vugia et al. 2005). Το 2004 εκδηλώθηκε επιδημία από ανθεκτικό στην μεθισιλίνη σταφυλόκοκκο (MRSA) στους παίκτες μιας ποδοσφαιρικής ομάδας κολεγίου του Connecticut, οι οποίοι έκαναν χρήση πισίνας υδρομασάζ και εμφάνισαν όλοι δερματικές αλλοιώσεις (κντταρίτιδα, αποστήματα) από τις οποίες απομονώθηκε το ίδιο στέλεχος MRSA (Begier et al. 2004). Πρόσφατα στις ΗΠΑ στην διάρκεια επιδημίας πυρετού Pontiac, που αφορούσε 31 θαμώνες μεγάλου ξενοδοχείου, οι οποίοι χρησιμοποίησαν τις εγκαταστάσεις spa του ξενοδοχείου απομονώθηκαν από τα φίλτρα νερού του spa *Legionella dumoffii*, *L. maceachernii* και *L. micdadei* (Huhn et al 2005). Επίσης υπάρχουν πρόσφατες αναφορές για μόλυνση με μυκοβακτηρίδια (*M. fortuitum*, *M. mageritense*) μετά από καλωπισμό ονύχων (μανικιούρ-πεντικιούρ) με χρήση μικρών συσκευών υδρομασάζ άκρων (Gira et al., 2004; Vugia et al., 2005)

Επίσης, παράγοντες όπως η παρατεταμένη παραμονή στο νερό, η κολύμβηση τον χειμώνα, η παρατεταμένη συνύπαρξη στο νερό με άλλους κολυμβητές κλπ, διαφοροποιούν το



είδος των παθογόνων μικροοργανισμών, που είναι πιθανό να προσβάλουν τους κολυμβητές ((Moore, 1993; Benin, 2002).

Μια νέα παράμετρος, η οποία έχει προκαλέσει ιδιαίτερη προσοχή είναι η δημιουργία σταγονιδίων από το υδρομασάζ, από τους βατήρες κατάδυσης ή από άλλες δραστηριότητες (π.χ. ντουζ). Τα υδατοσταγονίδια αυτά μπορούν να μεταδώσουν μικροοργανισμούς, που προκαλούν πνευμονίες (π.χ. *L. pneumophila*). (Boshuizen, 2001, Ishikawa, 2004).

Υπολογίζεται ότι κάθε κολυμβητής απελευθερώνει στο νερό της πισίνας  $2 \times 10^8$  μικροοργανισμούς, που προέρχονται από το δέρμα του. Η πλειονότητα των μικροοργανισμών αυτών ανήκουν στα γένη *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Sarscina*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, τα οποία είναι δυνητικά παθογόνα. Ορισμένοι κολυμβητές, οι οποίοι νοσούν ή είναι φορείς παθογόνων μικροοργανισμών, αποβάλλουν στο νερό παθογόνα βακτήρια, ιούς, μύκητες και πρωτόζωα, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν λοιμώξεις σε άλλους κολυμβητές.

Η *A. hydrophila* έχει ενοχοποιηθεί για λοιμώξεις των οφθαλμών και για ουρολοιμώξεις. Ορισμένα άτυπα μυκοβακτηρίδια έχουν ενοχοποιηθεί για λοιμώξεις του δέρματος μετά από κολύμβηση σε χλωριωμένες κολυμβητικές δεξαμενές, κυρίως το *M. marinum* (Fisher, 1988 Leoni 1999).

Επίσης προκαλούν λοιμώξεις στους κολυμβητές και μικροοργανισμοί, οι οποίοι δεν περιλαμβάνονται καθόλου στη σχετική υγειονομική διάταξη για την μικροβιολογική ποιότητα του νερού κολυμβητηρίων. Στην περίπτωση αυτή οι υποχρεωτικά ελεγχόμενοι μικροβιακοί δείκτες δεν δίνουν καμία ένδειξη για την παρουσία ή απουσία αυτών των μικροοργανισμών στο νερό της πισίνας. Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι οι ιοί, οι μύκητες και τα πρωτόζωα,

Κατά καιρούς πολλοί ιοί έχουν ενοχοποιηθεί για λοιμώξεις κολυμβητών όπως οι ιοί *Polio*, *Echo*, *Coxsackie A & B*, *Enterovirus*, *Hepatitis A*, *Noro*, *Rota*, *Reo*, *Adenoϊ-ιοί*. Οι ιοί αυτοί προκαλούν διάφορα νοσήματα όπως, ηπατίτιδα A, γαστρεντερίτιδες, αναπνευστικές λοιμώξεις κλπ. (Jorgensen και συν., 1985, Van Heerden 2005).



Μύκητες οι οποίοι ενοχοποιούνται για λοιμώξεις των κολυμβητών είναι κυρίως ορισμένα είδη δερματοφύτων, όπως *Trichosporon*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, και βλαστομυκήτων όπως η *C. albicans*, τα οποία προσβάλλουν το δέρμα, τις τρίχες, τα νύχια και τα γεννητικά όργανα. Επίσης και ορισμένα είδη περιβαλλοντικών μυκήτων είναι δυνητικά παθογόνα, όπως η *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Acremonium*, *Phialophora*, τα οποία συχνά απομονώνονται από νερό κολυμβητικών δεξαμενών (Riethl, 1985, Μαρσέλου, 1986).

Πρωτόζωα, όπως η *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Giardia*, *Cryptosporidium* έχουν ανιχνευθεί συχνά σε κολυμβητικές δεξαμενές (Jonckheere, 1985, Jose και συν., 1991).

Πολλοί από τους παραπάνω παθογόνους μικροοργανισμούς, κυρίως αυτοί που προκαλούν δερματοπάθειες, εκτός της μετάδοσής τους με την κολύμβηση μεταδίδονται και από τους γύρω από τη δεξαμενή χώρους (αποδυτήρια, λουτρά, χώροι που περιβάλλουν τη δεξαμενή κλπ.). Οι μικροοργανισμοί αυτοί, κυρίως οι μύκητες και οι σταφυλόκοκκοι, έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται σε χώρους με αυξημένη υγρασία.

### Κίνδυνοι για την υγεία των κολυμβητών από την χλωρίωση

Η υγεία των χρηστών των κολυμβητικών δεξαμενών δεν κινδυνεύει μόνο από τους παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά και από τη μη σωστή χλωρίωση του νερού. Η χλωρίωση νερού πλούσιου σε οργανικές ουσίες πρέπει να γίνεται με προσοχή ώστε να αποφεύγεται ο σχηματισμός χλωραμινών και τριαλομεθανίων. Η σημασία της σωστής και συνεχούς χλωρίωσης του νερού έχει επισημανθεί πολλές φορές (HMSO, 1979, Jolley και συν., 1984, Morris, 1985, Cliver and Newman, 1987, Καμιζούλης, 1990). Η αντοχή των μικροοργανισμών στη χλωρίωση ποικίλει, με ανθεκτικότερους κατά σειρά προτεραιότητας τους σκώληκες, τις αμοιβάδες, τους μύκητες, τους ιούς, τους βακτηριοφάγους, και τέλος τα βακτήρια (Cliver και Newman, 1987, Shang και συν., 2001, Hajjartabar, 2004, Tachikawa και συν., 2005).



Η αντοχή αυτή επηρεάζεται από το είδος των επιφανειών, την ηλικία του βιολογικού υμενίου (biofilm), που συχνά καλύπτει τις επιφάνειες των κολυμβητηρίων, και την ικανότητα των μικροοργανισμών να παράγουν προστατευτικές για την επιφάνεια του κυττάρου τους ουσίες. (LeChevallier και συν., 1988). Οι σταφυλόκοκκοι και οι εντερόκοκκοι εμφανίζουν 5-20 φορές μεγαλύτερη αντοχή στην χλωρίωση από τα εντεροβακτηριοειδή (Grabow, 1991 Begier, 2005). Για το λόγο αυτό η χρησιμοποίηση μόνο των βακτηρίων ως δεικτών καταλληλότητας του νερού δεν αποτελεί ασφαλή ένδειξη για τυχόν απουσία άλλων ομάδων μικροοργανισμών, κυρίως αυτών, που είναι ανθεκτικότεροι στη χλωρίωση. Μια πλήρης μικροβιολογική εξέταση του νερού είναι συχνά πολύ απαραίτητη για τη σωστή χλωρίωσή του. Μελέτη των Havelaar και συνεργατών του έχει δείξει ότι η μείωση των αποικιών των *P. aeruginosa* κατά 4 λογαρίθμους σε 30 sec είναι ένας πρακτικός τρόπος για να κρίνει κανείς αν η χλωρίωση μιάς δεξαμενής νερού είναι επαρκής (Hollyoak, 1995, Havelaar και συν., 1985).

Η υπερβολική χλωρίωση του νερού, μπορεί να είναι ενοχλητική (τσούξιμο ματιών, ναυτία, τάση προς έμετο) έως και επικίνδυνη για την υγεία των κολυμβητών. Επιπλέον μπορεί να έχει τοξική, αλλά και μεταλλαξιογόνο επίδραση σε διάφορα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού. Επίσης κίνδυνοι εγκυμονούνται και από την μη εφαρμογή των κανόνων υγειονομικής ασφάλειας στην εγκατάσταση της χλωρίωσης (Lisby, 1992). Οι χλωριωτές πρέπει να βρίσκονται σε χωριστό δωμάτιο, με καλό αερισμό και να βρίσκονται σε απόσταση ασφαλείας από την δεξαμενή κολύμβησης. (Douglas 1986, Jolley και συν. 1984, Decker 1988, Manjanatha 2005).

### **1.10. Λοιμώξεις από εισπνοή σταγονιδίων μολυσμένου ύδατος**

Η δημιουργία μικροσταγονιδίων (aerosol) στην ατμόσφαιρα από το νερό είναι μια σημαντική οδός μετάδοσης λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος. Η αυξημένη σχετική





υγρασία στον αέρα παρατείνει την επιβίωση πολλών ειδών μικροοργανισμών και ευνοεί τη βλάστηση των σπόρων των μυκήτων.

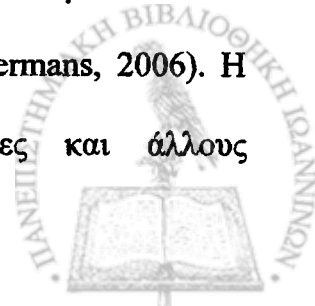
Τα σημαντικότερα παθογόνα βακτήρια, τα οποία μπορεί να εγκατασταθούν στους πνεύμονες με εισπνοή μολυσμένου νερού είναι η *L. pneumophila* και τα είδη του γένους *Mycobacterium*.

#### α. *L. pneumophila*

Η *L. pneumophila* είναι Gram αρνητικό βακτήριο, το οποίο προκαλεί τη νόσο των Λεγεωνάριων. Η νόσος των λεγεωναρίων είναι μια πολυσυστηματική νόσος με κύριες εκδηλώσεις από το αναπνευστικό σύστημα (ρίγος, πυρετός, κλινική και ακτινολογική εικόνα πνευμονίας). Οι εξωπνευμονικές εκδηλώσεις είναι ποικίλες και αφορούν κυρίως το γαστρεντερικό και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Ο χρόνος επώασης της νόσου είναι 2-10 ημέρες ενώ η μολυσματική δόση είναι  $>10$  CFU. Η θνητότητα της νόσου είναι δυνατόν να φτάσει το 10% στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και το 30-40 % στους νοσοκομειακούς ασθενείς (Tsaï και συν., 1989 Boshuizen, 2001), ενώ ποικίλει ανάλογα και με την ηλικία από 5% στους νέους άνδρες έως 15% στους ηλικιωμένους. Προδιαθεσιακοί παράγοντες είναι η ηλικία ( $>50$ ετών), το φύλο (κυρίως άνδρες), το κάπνισμα, ο αλκοολισμός και οι σοβαρές υποκείμενες νόσοι. Η θεραπεία γίνεται με ερυθρομυκίνη. Άλλα είδη *Legionella* προκαλούν μη πνευμονικές λοιμώξεις, οι οποίες αυτοϊώνονται και δεν είναι θανατηφόρες. (Charalampopoulos, 1987, Alexiou-Daniil 1994, Philippe, 2006)

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 14 ορολογικές ομάδες *L. pneumophila* (Brenner, 1985, Leoni, 2005). Στις περισσότερες περιπτώσεις λεγιονελλώσεων απομονώνεται η *L. pneumophila* ορότυπος 1 (Benin 2002).

Ο μικροοργανισμός είναι ευρέως διαδεδομένος στη φύση και έχει απομονωθεί από νερά λιμνών και ποταμών (Harison and Taylor, 1988, Suzuki, 2002, Fliermans, 2006). Η επιβίωσή της διευκολύνεται από τον παρασιτισμό σε αμοιβάδες και άλλους



μικροοργανισμούς (Anand και συν., 1983, Kuroki, 1998, Guerrieri, 2005). Κατ' εξοχήν όμως απομονώνεται από το τεχνητό περιβάλλον του ανθρώπου, όπως είναι τα υδρόψικτα συστήματα κλιματισμού και τα συστήματα παροχής ζεστού και κρύου νερού μεγάλων κτιρίων, ειδικά ξενοδοχείων και νοσοκομείων (Colbourne και Dennis, 1989, Den Boer, 2002, Nguyen, 2006). Η εγκατάσταση και ο πολλαπλασιασμός της στο δίκτυο ευνοείται από θερμοκρασίες νερού που κυμαίνονται από 20-55 °C. Η μετάδοση γίνεται με εισπνοή μικροσταγονιδίων (aerosol), τα οποία δημιουργούνται από τα κλιματιστικά μηχανήματα, από τους καταιονιστήρες των λουτρών, τους υγραντές δωματίων, την τεχνητή βροχή για άρδευση καλλιέργειών και τα συντριβάνια (Brooks, 2004

Μετά την αρχική μεγάλη επιδημία της Φιλαδέλφειας το 1967 (Fraser, 1977), οπότε και ταυτοποιήθηκε η *L. pneumophila*, επιδημίες και σποραδικά κρούσματα της νόσου έχουν περιγραφεί σε όλα σχεδόν τα μέρη του κόσμου, κυρίως σε συνδυασμό με την παραμονή των ατόμων σε νοσοκομεία και ξενοδοχεία (Huhn, 2005). Η νόσος έχει περιγραφεί και στην Ελλάδα έχει δε διαγνωσθεί τόσο σε Έλληνες ασθενείς, όσο και σε αλλοδαπούς τουρίστες, ενώ μικροοργανισμοί του γένους *Legionella* έχουν απομονωθεί από δείγματα ύδατος συστημάτων ύδρευσης και κλιματισμού ξενοδοχειακών συγκροτημάτων της χώρας μας (Alexiou και συν., 1994, Nakadate, 1999).

Η διάγνωση πολλών περιστατικών γίνεται στη χώρα καταγωγής των τουριστών, ενώ ορισμένα από αυτά τα περιστατικά είναι και θανατηφόρα (Mavridou και συν., 1994 Gotz, 2001). Ο αντίκτυπος αυτών των περιστατικών στην τουριστική βιομηχανία, αλλά και την κοινή γνώμη των Ευρωπαϊκών χωρών είναι εντυπωσιακή και έντονη. Στην Βρετανία, η είδηση θανατηφόρου κρούσματος λεγιονέλλωσης τουρίστα που προσβλήθηκε σε Ελληνικό νησί έμεινε στις πρώτες σελίδες των εφημερίδων για αρκετές μέρες.

Η κακή κατασκευή και συντήρηση των κτιριακών εγκαταστάσεων των ξενοδοχείων αποτελεί την κύρια οδό εξάπλωσης της νόσου (Fallen, 1994, Benkel, 2000). Πολύπλοκα



συστήματα ύδρευσης λόγω επέκτασης παλαιών κτιρίων δημιουργούν τυφλά σημεία στις σωληνώσεις, οι κακοτεχνίες (γειτονία σωλήνων ζεστού και ψυχρού νερού) βοηθούν στη μείωση της θερμοκρασίας του θερμού νερού και η κακή ανακυκλοφορία στους θερμοσίφωνες δημιουργεί θερμική στρωμάτωση. Επίσης διακοπές της παροχής νερού κατά τη διάρκεια έργων έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία στάσιμου νερού για πολλές ώρες.

Η *Legionella* είναι πιο ανθεκτική στη χλωρίωση από τα κολοβακτηριοειδή, ενώ είναι ευαίσθητη στο όζον. (Dominique και συν., 1988, Luttichau, 1998). Τα συστήματα κλιματισμού είναι πολλές φορές τοποθετημένα σε σημεία τα οποία ευνοούν τη μεταφορά μολυσμένων σταγονιδίων μέσα στα δωμάτια. Επίσης οι πύργοι ψύξης των συσκευών κλιματισμού μπορεί να δημιουργούν aerosols, που μολύνουν τις γύρω περιοχές και είναι δυνατόν να προκαλέσουν ενδημίες στον πληθυσμό των γειτονικών περιοχών. (Kuroki, 1998).

Όλες αυτές οι καταστάσεις, οι οποίες προκαλούνται λόγω άγνοιας της βιολογίας και της οικολογίας της *Legionella*, ευνοούν την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό της στο δίκτυο του νερού (Edelstein, 1993 Jernigan, 1996).

Η απομόνωση της *L. pneumophila* από το περιβάλλον είναι δύσκολη και χρονοβόρος, διότι απαιτείται διήθηση μεγάλων όγκων νερού (10 L), δεδομένου ότι υπάρχει σε αυτό σε πολύ μικρούς αριθμούς. Η καλλιέργεια της μεμβράνης διαμέσου της οποίας πραγματοποιείται η διήθηση, γίνεται σε εκλεκτικά υλικά. Πρόσφατα οι μοριακές τεχνικές (PCR, Real time PCR) έχουν απλοποιήσει την ανίχνευση της *L. pneumophila* σε δείγματα νερών. (Dourman, 1988 Luttichau, 1999 Fiume, 2005).

#### β. *Mycobacterium* spp.

Είναι γνωστό ότι στα νερά απομονώνονται άτυπα μυκοβακτηρίδια, τα οποία είναι ευκαιριακά παθογόνα. Στα άτυπα μυκοβακτηρίδια περιλαμβάνονται τα: *M. kansasii*, *M. xenopi*, *MAC-complex* (*M. avium-intracellulare-scrofulaceum*), *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* και *M. malmoense*. Τα άτυπα μυκοβακτηρίδια προκαλούν πνευμονικές λοιμώξεις



κυρίως σε ενήλικες, όμως η παθογένεση της πνευμονικής νόσου δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη. Πιθανόν να οφείλεται στην εισπνοή μολυσμένων σταγονιδίων, που αιωρούνται και στη συνέχεια εγκαθίστανται και πολλαπλασιάζονται στον πνεύμονα (Vugia, 2005 Collins και συν., 1984). Τα *MAC* εμφανίζουν υψηλή συχνότητα στους ασθενείς με AIDS προκαλώντας πνευμονικές νόσους.

Τα περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια μπορεί να προκαλέσουν λεμφαδενίτιδα κυρίως σε μικρά παιδιά. Η μόλυνση εκδηλώνεται με διόγκωση των τραχηλικών λεμφαδένων, χωρίς γενικά συμπτώματα. Πύλες εισόδου θεωρούνται οι αμυγδαλές και τα τραυματισμένα ούλα μετά από οδοντιατρική θεραπεία (Gira, 2004, Jenkins, 1991) από όπου η μόλυνση μεταδίδεται δια των λεμφαγγείων στους λεμφαδένες της περιοχής (υπογνάθιους, τραχηλικούς και υπερκλείδιους).



## 2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

### 2.1. Μέθοδοι ελέγχου της μικροβιολογικής ποιότητας των υδάτων

Ο έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας των υδάτων (πόσιμων, κολυμβητικών, επιφανειακών) γίνεται σύμφωνα με την διεθνή και ελληνική νομοθεσία με δύο μεθόδους (standard methods), όπως αυτές καθορίζονται από την Αμερικανική Εταιρεία Δημόσιας Υγείας (American Public Health Association- APHA) (APHA, 1998).

#### 2.1.1. Μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων

Η μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων (Most Probable Numbers-MPN) για την καταμέτρηση βακτηρίων στο νερό βασίζεται στην εξής αρχή:

Καθορισμένες ποσότητες νερού (π.χ. 10 ml, 1 ml κ.τ.λ.) μιας ή περισσοτέρων αραιώσεων προστίθεται σε σειρές σωλήνων οι οποίες περιέχουν ένα θρεπτικό ζωμό. Συνήθως έχουμε τόσες σειρές σωλήνων (3, 5, 10 κ.τ.λ.) όσες και οι δεκαδικές αραιώσεις τις οποίες κάνουμε. Κάθε σειρά σωλήνων εμβολιάζεται με δείγμα της ίδιας αραιώσης. Θεωρείται ότι κατά τον εμβολιασμό κάθε σωλήνας θα δεχθεί, μαζί με το δείγμα του νερού, τον μικροοργανισμό-στόχο της ανάλυσης. Ο μικροοργανισμός αυτός θα επιφέρει χαρακτηριστικές αλλοιώσεις της όψης του ζωμού (π.χ. θολερότητα, αλλαγή χρώματος, παραγωγή αερίου κ.τ.λ.). Για να καθορίσουμε τον Πιο Πιθανό Αριθμό (MPN) μικροοργανισμών-στόχων ανά μονάδα όγκου (συνήθως ανά 100 ml) πρέπει ο μικροβιολογικός έλεγχος να δείξει θετικούς και αρνητικούς σωλήνες. Τα αποτελέσματα της εξέτασης συνήθως επιβεβαιώνονται με ανακαλλιέργεια του υλικού των θετικών σωλήνων σε επιβεβαιωτικά, υγρά ή στερεά, θρεπτικά υποστρώματα. Τα αποτελέσματα των αρχικών και



των επιβεβαιωτικών δοκιμών ανάγονται στους πίνακες πολλαπλών σωλήνων και υπολογίζεται το MPN ανά μονάδα όγκου του δείγματος.

Ο πιθανός αριθμός στα 100 ml δείγματος, που εξετάζεται δίνεται από την εξίσωση:

$$\text{MPN}/100\text{ml} = \frac{\text{Αριθμ. Θετικών σωλήνων} \times 100}{\text{ml δειγμ. στους αρνητ. σωλήνες} \times \text{ml δειγμ. σε όλους τους σωλήνες}}$$

Η μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων έχει ένα μεγάλο "σφάλμα δείγματος". Για παράδειγμα όταν χρησιμοποιούνται 11 σωλήνες (1x50, 5x10, 5x1) ή 9 σωλήνες (3x10, 3x1, 3x0,1) ή 15 σωλήνες (5x10, 5x1, 5x0,1) ή περισσότεροι τα όρια αξιοπιστίας της μεθόδου διαφέρουν και όσο λιγότεροι είναι οι σωλήνες τόσο το σφάλμα μεγαλώνει. Επίσης είναι πιθανόν ο πραγματικός αριθμός των μικροοργανισμών να μην περιέχεται στα όρια αξιοπιστίας. Οι πίνακες στηρίζονται στην αποδοχή ότι οι μικροοργανισμοί μέσα στο δείγμα είναι κατανεμημένοι ομοιογενώς, δηλαδή έχει γίνει μια τέλεια ανάμιξη του δείγματος. Γι αυτό το λόγο η μέθοδος δεν είναι ευαίσθητη σε μεγάλες αραιώσεις. Άλλα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ο μικρός όγκος του εξεταζόμενου νερού και τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που οφείλονται κυρίως στην κάλυψη της παραγωγής αερίου από τον τροφικό ανταγωνισμό των μη κολοβακτηριοειδών (ΑΡΗΑ, 1998).

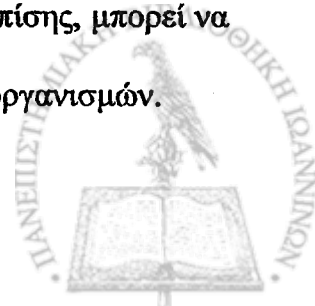


### 2.1.2. Μέθοδος διήθησης διά μικροβιοκρατών μεμβρανών

Με την μέθοδο της διήθησης δια μικροβιοκρατών μεμβρανών (φίλτρων), διηθείται ικανή ποσότητα νερού δια μεμβράνης κατασκευασμένης από διάφορα υλικά (π.χ. εστέρες κυτταρίνης, νάilon κλπ) με διάμετρο πόρων τόση, ώστε να παρακρατεί τους προς εξέταση μικροοργανισμούς (0,2 - 0,45μm). Τα χρησιμοποιούμενα φίλτρα θα πρέπει να είναι σταθερά στη χρήση και να μην αναστέλλουν ούτε να προάγουν τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων. Το φίλτρο μετά την διήθηση τοποθετείται επάνω σε στερεό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα, όπου μετά από επώαση καταμετρώνται οι χαρακτηριστικού χρώματος και μορφολογίας αποικίες του αναζητούμενου βακτηρίου. Οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί είτε δεν αναπτύσσονται στο συγκεκριμένο υπόστρωμα, είτε εμφανίζουν διαφορετική μορφολογία και χρώμα αποικιών.

Όταν ο αριθμός των αποικιών, που αναπτύχθηκαν στην μεμβράνη είναι >80, η εξέταση θα πρέπει να επαναλαμβάνεται μετά από αραιώση ανάλογη της ρύπανσης. Ο καταμετρούμενος αριθμός αποικιών στη μεμβράνη είναι πάντα μικρότερος του πραγματικού, δεδομένου ότι ένα ποσοστό των μικροοργανισμών, που έχουν υποστεί μεταβολικές ή ενζυμικές αλλαγές, δεν αναπτύσσονται στα χρησιμοποιούμενα εκλεκτικά υλικά.

Για την ανάπτυξη των ταλαιπωρημένων στο oligοτροφικό υδάτινο περιβάλλον μικροοργανισμών συνιστάται είτε η επώαση να γίνεται αρχικά σε θερμοκρασίες πλησιέστερες προς την θερμοκρασία του περιβάλλοντος (στάδιο αναζωογόνησης) και στη συνέχεια να γίνεται επώαση σε υψηλότερες θερμοκρασίες, είτε τα αρχικά χρησιμοποιούμενα θρεπτικά υποστρώματα να είναι oligοτροφικά και η μεμβράνη διήθησης να επωάζεται σ' αυτά για 4-5 ώρες, ώστε να δίνεται η δυνατότητα στους μικροοργανισμούς να προσαρμοστούν σταδιακά και στη συνέχεια να τοποθετείται σε πλουσιότερα θρεπτικά υποστρώματα. Επίσης, μπορεί να γίνει και συνδυασμός των δύο ανωτέρω μεθόδων αναζωογόνησης των μικροοργανισμών.



Ο αριθμός των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στις μεμβράνες ακολουθεί την κατανομή κατά Poisson, αν το δείγμα είναι σωστά προετοιμασμένο. Το 95% των ορίων αξιοπιστίας για αριθμό C αποικιών στην επιφάνεια της μεμβράνης δίνεται από τον τύπο:  $\sqrt{C+2} \pm 2, \sqrt{C+1}$

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου των μικροβιοκρατών μεμβρανών είναι η ταχύτητα της εξαγωγής των αποτελεσμάτων (π.χ 24 ώρες για την *E. coli*, ενώ με την μέθοδο MPN απαιτούνται 4 ημέρες) και της εφαρμογής της σε σχέση με την MPN και ο μικρότερος αριθμός ψευδώς θετικών δειγμάτων. Στα μειονεκτήματα είναι ο χρόνος και η εργασία, που απαιτείται για την επιβεβαίωση των αποικιών, που αναπτύσσονται στην επιφάνεια των μεμβρανών, η αδυναμία εκδήλωσης ενζυμικών ή βιοχημικών αντιδράσεων (π.χ. παραγωγή αερίου) και η μικρή αποτελεσματικότητα σε δείγματα με υψηλή θολερότητα. (ΑΡΗΑ, 1998)

## 2. 2. Μικροβιολογικοί δείκτες

Η μικροβιολογική καταλληλότητα των υδάτων, είτε αυτά είναι πόσιμα (δικτύου, εμφιαλωμένα, μεταλλικά), είτε νερά αναψυχής (κολυμβητικά), είτε επιφανειακά νερά (ποταμοί, λίμνες, θάλασσες), καθορίζεται με την καταμέτρηση συγκεκριμένων μικροοργανισμών, των μικροβιακών δεικτών. Οι μικροβιακοί δείκτες είναι αλλόχθονοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι διαβιούν παροδικά μέσα στο υδάτινο περιβάλλον προερχόμενοι συνήθως από το γαστρεντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων. Οι κυριότεροι μικροβιακοί δείκτες ρύπανσης των υδάτων είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή, τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή και οι εντερόκοκκοι, ενώ υπάρχουν και συμπληρωματικοί δείκτες ρύπανσης οι οποίοι διαφέρουν ανάλογα με την κατηγορία των υδάτων, που ελέγχεται (ΑΡΗΑ, 1998).





A. Ολικά κολοβακτηριοειδή (Total coliforms): περιλαμβάνονται όλα τα αερόβια και προαιρετικά αναερόβια μη σπορογόνα Gram-αρνητικά βακτήρια τα οποία ζυμώνουν τη λακτόζη με παραγωγή αερίου μετά από επώαση 48 h στους  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

B. Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή ή κολοβακτηριοειδή κοπρανώδους προέλευσης (Faecal coliforms): έχουν τις ίδιες ιδιότητες με τα κολοβακτηριοειδή, αλλά μπορούν να πολλαπλασιαστούν στους  $44,5\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  μετά από επώαση 48 h (θερμοανθεκτικοί μικροοργανισμοί). Η *E. coli* είναι το πιο τυπικό είδος της ομάδας των κοπρανωδών κολοβακτηριοειδών και παράγει ινδόλη από την τρυπτοφάνη στους  $44,5\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . Τόσο τα κολοβακτηριοειδή κοπράνων όσο και οι εντερόκοκκοι βρίσκονται στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων και η παρουσία τους στο νερό υποδεικνύει ρύπανση κοπρανώδους προέλευσης και πιθανή παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών. Η επιβίωσή τους στο νερό ποικίλλει από ώρες έως και εβδομάδες (Wiggins, 1996).

Γ. Εντερόκοκκοι ή κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι (Faecal streptococci): είναι Gram-θετικοί, καταλάση-αρνητικοί κόκκοι, που απαντούν ανά ζεύγη ή μικρές αλυσίδες, ανήκουν σε ορισμένα είδη του γένους *Streptococcus* (*S. faecalis*, *S. faecium*, *S. avium*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. gallinarum*) και διαθέτουν το αντιγόνο της ομάδας D κατά Lancefield. Ορισμένα είδη εντεροκόκκων (π.χ. *S. faecalis*) απαντώνται συχνότερα στα κόπρανα του ανθρώπου, ενώ άλλα είδη είναι συχνότερα στα κόπρανα των ζώων.

### 2.2.1. Μικροβιακοί δείκτες και Νομοθεσία για τα πόσιμα νερά

Η Ελληνική νομοθεσία καθορίζει νομοθετικά την ποιότητα του νερού με αντίστοιχες Υγειονομικές διατάξεις ή με Προεδρικά Διατάγματα, τα οποία είναι προσαρμογή της Νομοθεσίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Η ισχύουσα νομοθεσία χωρίζει το νερό σε τέσσερις κατηγορίες : 1) Πόσιμο νερό δικτύου ύδρευσης, 2) Εμφιαλωμένο νερό, το οποίο νομοθετικά



διαχωρίζεται σε φυσικό μεταλλικό νερό και σε επιτραπέζιο νερό, 3) Νερό κολυμβητηρίων και 4) Επιφανειακό νερό αναψυχής.

Σύμφωνα με την κοινή υπουργική απόφαση του 2001 (ΚΥΑ Υ2/2600/2001) ως πόσιμο νερό χαρακτηρίζεται το νερό που χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση είτε στη φυσική κατάστασή του, είτε μετά από επεξεργασία, ανεξάρτητα από το εάν παρέχεται από δίκτυο διανομής, από βυτίο, σε φιάλες ή δοχεία. Το πόσιμο νερό χρησιμοποιείται για την παρασκευή, κατεργασία, συντήρηση και εμπορία προϊόντων προοριζομένων για ανθρώπινη κατανάλωση. Η μικροβιολογική ποιότητα του πόσιμου νερού επηρεάζει την υγιεινή των τροφίμων και των ποτών.

Η πρόσφατη ελληνική νομοθεσία [Κ.Υ.Α. Υ2/2600/2001 (ΦΕΚ 892/11.7.2001)], η οποία έγινε σε συμμόρφωση με την Οδηγία 98/83 Ε.Ε και είναι αναπροσαρμογή της Υ.Α Α5/288/86 που είχε γίνει σε συμμόρφωση με την Οδηγία 80/778 Ε.Ο.Κ, που ίσχυε μέχρι τις 25/12/03 βασίζεται στα εξής: 1) Τις πρόσφατες καθοδηγητικές τιμές της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (Π.Ο.Υ.) 2) Τις γνωμοδοτήσεις της συμβουλευτικής επιτροπής της Ε.Ε. 3) Την επιστημονική γνώση, εξέλιξη και εμπειρία στον τομέα της μικροβιολογίας υδάτων και υδατογενών λοιμώξεων.

Στην νέα νομοθεσία προστέθηκαν νέες παράμετροι, τροποποιήθηκαν τα ανώτατα επιτρεπτά όρια για ορισμένες παραμέτρους, ενώ καταργήθηκε ένας αριθμός παραμέτρων. Επίσης άλλαξε ο τρόπος κατάταξης των παραμέτρων και δημιουργήθηκαν πίνακες με: 1) Υποχρεωτικές παραμέτρους 2) Ενδεικτικές παραμέτρους και 3) Παραμέτρους δοκιμαστικής παρακολούθησης.

Οι υποχρεωτικές παράμετροι έχουν άμεση σχέση με την προστασία της υγείας, περιλαμβάνουν μη παθογόνους μικροοργανισμούς, όμως η ανεύρεσή τους σημαίνει ενδεχόμενη παρουσία ή δυνατότητα παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών. Οι ενδεικτικές παράμετροι από μόνες τους δεν εμφανίζουν κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία. Η παρουσία



τους όμως παρέχει σαφείς ενδείξεις μεταβολών στην ποιότητα του νερού και την ενδεχόμενη ανάγκη επανορθωτικών δράσεων.

Ακόμη καθιερώθηκαν τρία επίπεδα ελέγχου της μικροβιολογικής ποιότητας των πόσιμων υδάτων: 1) Δοκιμαστική παρακολούθηση (check monitoring), που έχει σκοπό την παροχή σε τακτική βάση στοιχείων για την ποιότητα του νερού και για αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας (χλωρίωση, άλλη επεξεργασία). 2) Ελεγκτική παρακολούθηση (audit monitoring), που έχει σκοπό την παροχή στοιχείων για τη διαπίστωση της τήρησης των παραμετρικών τιμών και 3) Συμπληρωματική παρακολούθηση, η οποία κατά περίπτωση αποσκοπεί στην αναζήτηση μικροοργανισμών περιλαμβανομένων και των παρασίτων που αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία.

Στον πίνακα 3 αναφέρονται τα όρια των μικροβιολογικών παραμέτρων των πόσιμων νερών.-

### **2.2.2. Μικροβιακοί δείκτες και Νομοθεσία για τα επιφανειακά και τα νερά αναψυχής (κολυμβητικά νερά).**

Ο μικροβιολογικός έλεγχος των επιφανειακών και των νερών αναψυχής στηρίζεται στους ίδιους δείκτες, που ελέγχουν την μικροβιολογική ποιότητα του πόσιμου νερού. Στη βιβλιογραφία προτείνεται η χρήση διαφορετικών θρεπτικών ζωμών και υποστρωμάτων για τον έλεγχο της ποιότητας του θαλάσσιου νερού λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του (αλατότητα-αντιμικροβιακές ουσίες) σε σχέση με το πόσιμο νερό ή τα γλυκά νερά αναψυχής (ποτάμια-λίμνες). Ωστόσο τα περισσότερα εργαστήρια προτιμούν να χρησιμοποιούν τα ίδια θρεπτικά υποστρώματα για όλες τις κατηγορίες των δειγμάτων. Οι συγκεντρώσεις των βακτηριακών δεικτών ρύπανσης, που θεωρούνται ως όρια για τα νερά αναψυχής στα διάφορα κράτη ποικίλλουν και βασίζονται σε επιδημιολογικές μελέτες, αλλά και σε κοινωνιολογικά,



**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.** Μικροβιολογικές παραμέτροι–Αντικατάσταση παραμέτρων, πόσιμων νερών. (Πηγή:ΥΑ.Α5/288/86/ΦΕΚ53/Β/1986 και ΚΥΑ Υ2/2600/2001).

Παράμετροι	Παραμετρική Τιμή	
	ΥΑ Α5/288/86	ΚΥΑ Υ2/2600/01
ΟΜΧ 22 °C	100 /1 ml	Ανευ ασυνήθου μεταβολής (ενδεικτική)
ΟΜΧ 37 °C	10 /1 ml	
Ολικά κολοβακτηριοειδή	0 / 100 ml	0 / 100 ml (ενδεικτική)
Κολοβακτηριοειδή κοπράνων	0 / 100 ml	
<i>E. coli</i>	–	0 / 100 ml
Στρεπτόκοκκοι κοπράνων	0 / 100 ml	
Εντερόκοκκοι	–	0 / 100 ml
Κλωστηρίδια θειοαναγωγικά	0 / 20 ml	
<i>Clostridium perfringens</i> + σπόροι*	–	0 / 100 ml
*Όταν το νερό προέρχεται ή επηρεάζεται από επιφανειακά νερά		

οικονομικά και πολιτικά κριτήρια. Ομοφωνία για τον καλύτερο δείκτη ρύπανσης των νερών αναψυχής δεν υπάρχει.

Ένα θέμα που δεν έχει διευκρινισθεί ακόμη είναι η εκτίμηση των κινδύνων υγείας από την κολύμβηση. Οι μικροβιακοί δείκτες κοπρανώδους ρύπανσης που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα απλώς υποδεικνύουν την πιθανότητα παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών. Ο εξατομικευμένος κίνδυνος ποικίλλει ανάλογα με την εγγενή ή επίκτητη ανοσία καθώς και με την παθογόνο δράση του μικροοργανισμού. Επομένως δεν αναμένεται καμία σταθερότητα στην πρόβλεψη του κινδύνου, ανεξάρτητα από το ποιο δείκτες τελικά θα προταθούν.



Ίσως θα ήταν αναγκαίο να απαντηθούν κάποια βασικά ερωτήματα πριν θεσπιστούν τα όρια της μικροβιακής ρύπανσης των νερών αναψυχής. Μερικά από αυτά τα ερωτήματα είναι:

α) ποιοι είναι οι πραγματικοί κίνδυνοι από τα νερά κολύμβησης β) ποιο είναι το αποδεκτό όριο επικινδυνότητας αφού δεν είναι δυνατόν να υπάρχει πλήρης πρόληψη όλων των κινδύνων γ) ποιος δείκτης συσχετίζεται καλύτερα με τους κινδύνους της υγείας δ) ποιες είναι οι πιο αξιόπιστες μικροβιολογικές τεχνικές για τον έλεγχο δειγμάτων νερού ε) ποιοι είναι οι κίνδυνοι από τις άλλες, πλην της κολύμβησης, αθλητικές δραστηριότητες (θαλάσσιο σκι, ιστιοσανίδα κλπ), που συχνά εκθέτουν τον αθλητή σε μεγαλύτερους κινδύνους.

Πολλά Προγράμματα της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Γαλάζιες Σημαίες, Χρυσός Αστερίας), αλλά και ορισμένα ανεξάρτητα κράτη όπως η Βρετανία δίνουν μεγάλη σημασία και στην αισθητική ποιότητα των νερών και των ακτών κολύμβησης. Η παρουσία σκουπιδιών, νεκρών ψαριών, κηλίδων πετρελαίου, πλαστικών μπουκαλιών, γυαλιών, μεταλλικών κουτιών κλπ συσχετίστηκε με την εμφάνιση ατυχημάτων (εκδορές, μικροτραυματισμοί κλπ), τα οποία ευνοούν τις λοιμώξεις.



**ΠΙΝΑΚΑΣ 4.** Μικροβιολογικοί παράμετροι νερού κολυμβητηρίων (Πηγή: Γ1/443/ΦΕΚ87/Β/1973 και ΑΡΗΑ 1998)

Μικροβιολογικοί Παράμετροι	Αποδεκτά όρια σε cfu
ΟΜΧ 35-37°C (48 h)	<200/ml
ΟΜΧ 20-25 °C (72h)	500/ml
Ολικά Κολοβακτηριοειδή	<15/100ml
Κολοβακτηριοειδή κοπράνων	Απουσία /100ml
<i>Streptococcus faecalis</i>	0/100ml
<i>Staphylococcus spp.</i>	0/100ml
<i>Pseudomonas spp.</i>	0/100ml
<i>Mycobacterium spp.</i>	0/1
Μύκητες παθογόνοι	0/100ml

**ΠΙΝΑΚΑΣ 5.** Μικροβιολογικοί παράμετροι νερών κολύμβησης (Πηγή: 46399/1352/ΦΕΚ438 Β'Β/86)

Μικροβιολογικοί Παράμετροι	Επιθυμητό όριο σε cfu	Ανώτατο επιτρεπόμενο όριο σε cfu
ΟΜΧ 35-37°C (48 h)	-	-
ΟΜΧ 20-25 °C (72h)	-	-
Ολικά Κολοβακτηριοειδή	500/100ml	10.000/100 ml
Κολοβακτηριοειδή κοπράνων	100/100ml	500/100ml
<i>Streptococcus faecalis</i>	100/100ml	-
Σαλμονέλλες	0/1000ml	0/1000ml
Εντεροϊοί, PFU	0/10ml	0/10ml
<i>Mycobacterium spp.</i>		
Μύκητες παθογόνοι		



### 3. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Οι φαρμακευτικές ουσίες που χορηγούνται στον άνθρωπο και στα ζώα, αποβάλλονται με τα κόπρανα και τα ούρα, καταλήγοντας στους υπονόμους ή στους βόθρους, δηλαδή στα αστικά λύματα. Επίσης συχνά τα αχρησιμοποίητα φάρμακα απορρίπτονται στις αποχετεύσεις των κατοικιών και καταλήγουν ακέραια στα λύματα. Εκτός των φαρμακευτικών ουσιών, που χορηγούνται για θεραπευτικούς σκοπούς, υπάρχουν και άλλες ουσίες, που έχουν διάφορες ιατρικές χρήσεις (απολυμαντικά, αντισηπτικά, χρωστικές, ακτινογραφικές-σκιαγραφικές ουσίες, διαγνωστικά αντιδραστήρια κτλ), οι οποίες επίσης καταλήγουν στα αστικά λύματα. Πολλά φάρμακα μετά την εφαρμογή τους αποβάλλονται χωρίς να μεταβολιστούν, ενώ ειδικά τα απολυμαντικά είναι εξαιρετικά πολύπλοκα προϊόντα ή μίγματα πολύ δραστικών ουσιών. Και οι δύο αυτές κατηγορίες καταλήγουν μέσω των αποχετεύσεων στα λύματα. Τα αστικά λύματα, είτε επεξεργασμένα (μετά από βιολογικό καθαρισμό), είτε ανεπεξέργαστα συνήθως καταλήγουν στο πλησιέστερο υδάτινο περιβάλλον (ποτάμι, λίμνη, θάλασσα) (Kummerer, 2001).

Οι φαρμακευτικές αγωγές, ειδικά οι αυξητικοί παράγοντες που χορηγούνται στα παραγωγικά ζώα, αλλά και στα ψάρια των ιχθυοκαλλιεργειών και τα απολυμαντικά κτηνιατρικής χρήσης (χώρων κτηνοτροφικών μονάδων, σφαγείων κτλ) επίσης καταλήγουν στο περιβάλλον με τα λύματα των εκτροφών και με την κοπριά των ζώων. Επιπλέον με το νερό της βροχής (και μάλιστα το νερό των καταιγίδων), που «ξεπλένει» τα χωράφια, στα οποία έχει χρησιμοποιηθεί κοπριά ή λιπάσματα οι ουσίες αυτές μέσω του εδάφους καταλήγουν στους υπόγειους υδροφόρους ορίζοντες και δυστυχώς μολύνουν και τα υπόγεια νερά (Kummerer, 2001).



Για πρώτη φορά ανιχνεύθηκαν φαρμακευτικές ουσίες στο υδάτινο περιβάλλον την δεκαετία του '70 (Tabak και Brunch 1970, Norpoth και συν., 1973, Garrison και συν., 1976), ενώ άρχισαν να ανιχνεύονται σε επεξεργασμένα λύματα μετά από βιολογικό καθαρισμό την δεκαετία του '80 κυρίως στην Βρετανία (Fieldin και συν. 1981, Richardson και Bowton 1985). Έκτοτε έχουν ανιχνευθεί διάφορες φαρμακευτικές ουσίες σε επιφανειακά νερά, κυρίως σε ποταμούς όπως ο Ρήνος, ο Δούναβης, ο Έλβας, κ.ά (Terners 1998, Zuccato και συν., 2001), στις Ελβετικές λίμνες (Poiger και συν., 2001), σε υπόγεια νερά (Heberer και συν. 1995, Scheytt και συν., 2000), στην Βόρεια Θάλασσα και στην Αδριατική (Buser και Muller, 1998, Zuccato και συν. 2001) και σε νερά που αποβάλλονται μετά την τελική επεξεργασία από τα συστήματα βιολογικών καθαρισμών (Kummerer, 2001).

Οι ουσίες που έχουν ανιχνευθεί περιλαμβάνουν: ορμόνες, ρυθμιστές λιπιδίων, παυσίπονα, αντιβιοτικά, αντιεπιληπτικά, αντικαταθλιπτικά, αντιυπερτασικά, αντικαρκινικά φάρμακα και άλλες κυτταροτοξικές ουσίες (Clara, 2005 Boxall, 2004, D'Ascenzo, 2003). Klinger και Brauch, 2000). Στον Πίνακα (6) αναφέρονται οι φαρμακευτικές ουσίες που έχουν ανιχνευθεί κατά καιρούς από διάφορα υδάτινα περιβάλλοντα. Σύμφωνα με τις σημερινές γνώσεις, η εκτίμηση της επικινδυνότητας για τις περισσότερες από αυτές τις φαρμακευτικές ουσίες γίνεται όπως και με τα φυτοφάρμακα. Για την εκτίμηση του κινδύνου (risk assessment) λαμβάνεται υπόψη ο τρόπος δράσης τους στους ζωντανούς οργανισμούς με τις κλασικές δοκιμές σε πειραματόζωα (standard tests). Για τον λόγο αυτό ορισμένες ομάδες φαρμακευτικών ουσιών τυχάνουν ιδιαίτερης προσοχής: τα κυτταροστατικά και τα ανοσοκατασταλτικά εξαιτίας της συχνά μεταλλαξιογόνου ή εμβρυοτοξικής δράσης τους, τα αντιβιοτικά και τα απολυμαντικά εξαιτίας της δυνατότητας να ενισχύσουν τις αντοχές των μικροοργανισμών, τα ηρεμιστικά και ιδιαίτερα τα βαρβιτουρικά έχουν αναφερθεί ότι επηρεάζουν τον μεταβολισμό των ψαριών, μεταβάλλουν την συμπεριφορά τους μειώνοντας την κολυμβητική ταχύτητα και τις αντιδράσεις των ψαριών με σοβαρές συνέπειες στην



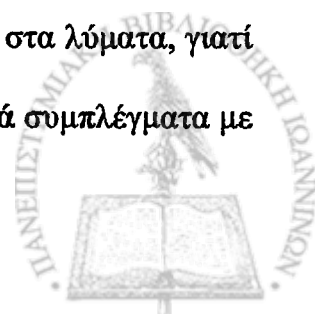


ικανότητα επιβιώσής τους εξαιτίας της αλλαγής της σχέσης θύτη και θηράματος (Kummerer, 1998a). Και βέβαια το πιο ανησυχητικό είναι ότι όλες αυτές οι ουσίες παραμένουν ως κατάλοιπα στα τρόφιμα, που προέρχονται από το υδάτινο περιβάλλον (πόσιμο νερό, ιχθυηρά) και καταναλώνονται από τον άνθρωπο.

### **3.1. Η παρουσία αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον**

Στην Ευρώπη καταναλώνονται περίπου 10.000 τόνοι αντιβιοτικών ετησίως (Παπαδοπούλου, 2001f, ΕΜΕΑ, 2002). Από αυτούς οι 5000 τόνοι είναι για ιατρική χρήση και 5000 τόνοι είναι για κτηνιατρική χρήση (περίπου 3500 τόνοι για προφύλαξη και περίπου 1500 τόνοι για αύξηση του βάρους). Σύμφωνα με μελέτη Γερμανών επιστημόνων το 1999 υπολογίστηκε ότι χρησιμοποιήθηκαν μόνον για νοσοκομειακή νοσηλεία 105 τόνοι αντιβιοτικών. Λαμβάνοντας υπόψη τον ρυθμό μεταβολισμού και αποβολής τους από τον ανθρώπινο οργανισμό, ο όγκος των αντιβιοτικών στα λύματα των νοσοκομείων υπολογίστηκε ότι έφθασε τους 86 τόνους το 1999 (Kummerer 2001). Στην Δανία, μια μικρή χώρα με πληθυσμό 5.200.000 κατοίκους, υπολογίστηκε ότι μόνον το 1995 καταναλώθηκαν για ανθρώπινη χρήση 37,7 τόνοι αντιβιοτικών (Halling-Sorensen και συν., 1998, Stuer-Lauridsen, 2000). Επίσης υπολογίζεται ότι οι συγκεντρώσεις αντιβιοτικών στα λύματα των νοσοκομείων ισοδυναμούν με την μέγιστη ανασταλτική δόση ( $MIC_{50}$ ). Για τις β-λακτάμες έχει μετρηθεί σε νοσοκομειακά λύματα συγκέντρωση 20-80  $\mu\text{g/L}$  (Cerovec, 2000) και για την ciprofloxacin 2-83  $\mu\text{g/L}$  (Hartmann και συν., 1998). Μελέτες που αφορούν την ανίχνευση αντιβιοτικών σε κόπρανα ανθρώπων μετά από δήμερη κανονική χορήγηση, έδειξαν συγκεντρώσεις τριμεθοπρίμης και δοξυκυκλίνης 3-40  $\text{mg/kg}$  κοπράνων και ερυθρομυκίνης 200-300  $\text{mg/kg}$  κοπράνων (Hoeverstadt και συν., 1986).

Ορισμένα αντιβιοτικά όπως οι τετρακυκλίνες σπάνια αποβάλλονται στα λύματα, γιατί έχουν μεγάλο μεταβολικό ρυθμό και επιπλέον σχηματίζουν σχετικά σταθερά συμπλέγματα με



τα ιόντα ασβεστίου. Σημαντικές ομάδες αντιβιοτικών όπως οι κινολόνες, σουλφοναμίδες και νιτρο-ιμιδαζόλες υφίστανται ελάχιστη βιοδιάσπαση καταλήγοντας σχεδόν ακέραιες στο περιβάλλον (Ahmad και συν., 1999, Kumpfer και συν., 2000). Επίσης αρκετές αντιβιοτικές ουσίες προσροφώνται από την λάσπη των συστημάτων βιολογικών καθαρισμών, με αποτέλεσμα να διαταράσσουν την όλη διαδικασία της μικροβιολογικής διάσπασης των λυμάτων και να υποβοηθούν στην δημιουργία αντιβιοαντοχής (Hirsch και συν., 1999).

Στα επιφανειακά ύδατα η αποδόμηση των αντιβιοτικών ουσιών εξαρτάται κατά πολύ μεγάλο μέρος από τη θολερότητα των υδάτων, το βάθος τους και τις εποχικές μεταβολές του ηλιακού φωτός, δεδομένου ότι η αποδόμησή τους είναι κυρίως φωτοχημική. Όμως όταν οι αντιμικροβιακές ουσίες απορροφώνται από διάφορα ιζήματα, τότε η φωτοχημική διάσπασή τους δεν είναι εφικτή. Η ημι-περίοδος ζωής των τετρακυκλινών και των κινολονών σε υδάτινα περιβάλλοντα είναι αρκετές εκατοντάδες ημερών (Holtem-Lutzhoff, 2000), ενώ για τις β-λακτάμες αναφέρεται ότι είναι 200 ημέρες (Christensen 1998). Έχει βρεθεί ότι ορισμένα βακτήρια έχουν την ικανότητα να κατακρατούν το συστατικό, που δεν μεταβολίστηκε μετά την απελευθέρωση του αντιβιοτικού στο υδάτινο περιβάλλον (Moehle και συν., 1999). Όπως προαναφέρθηκε μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική πράξη (προφύλαξη, θεραπεία, αύξηση σωματικού βάρους) (Witte, 2000). Η πιο σημαντική ομάδα μέχρι σήμερα, που κατά κόρον χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς και προφυλακτικούς σκοπούς, είναι οι τετρακυκλίνες (FEDESA, 1997), ενώ οι σημαντικότεροι αυξητικοί παράγοντες (growth promoters), είναι η μονενσίνη, η τυλοζίνη, η βιρτζινιαμικίνη και η σπυραμικίνη, ουσίες που δεν χρησιμοποιούνται στην ιατρική του ανθρώπου, για τις οποίες όμως πιστεύεται ότι προκαλούν διασταυρούμενες αντοχές (cross-resistances) έναντι άλλων αντιβιοτικών (Hirsch και συν., 1999). Οι περισσότεροι από τους αυξητικούς παράγοντες χρησιμοποιούνται για την πάχυνση των πουλερικών και των χοίρων, ενώ πολύ μικρότερο ποσοστό χρησιμοποιείται για την πάχυνση των βοοειδών και άλλων παραγωγικών ζώων



**Πίνακας 6. Ανίχνευση διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών στο υδάτινο περιβάλλον**

Ομάδα δραστικής ουσίας	Λύματα μg/l	Επιφανειακά ύδατα μg/l	Υπόγεια ύδατα (ΥΥ) Πόσιμα ύδατα (ΠΥ) μg/l	Συγγραφείς
Αναλγητικά/ αντιρευματικά	2,4 – 20	έως 0,5	0-0,006 (ΠΥ)	UBA (1997) Ternes (1198) Heberer and Stan (1997)
Αντιβιοτικά	0,1-1,7	έως 1		Hirsch και συν. (1999) UBA (1997) Ternes (1998) Richardson and Bowron(1985)
Παράγοντες που μειώνουν τα λιπίδια	έως 1,7	έως 0,55	έως 0,17 (ΠΟΥ) έως 7,5 (ΥΥ)	Stan and Linkerhagner (1992) Ternes (1198) Heberer and Stan (1996) Heberer and Stan (1997) Kosjek, (2005), Boyd,(2001), Kolpin, (2002)
Ψυχοφάρμακα	έως 6,1			UBA (1997) Ternes (1998)
Κυτταροστατικά	έως 5	έως 4		Aherne και συν. (1990) Kummerer και συν. (1997) Kummerer (1998b) Steger-Hartmann και συν. (1997))
Ακτινο-σκιαγραφικές ουσίες		έως 100		Steger-Hartmann και συν. (1999) Steger-Hartmann και συν. (2002) Hirsch και συν. (2000)

(Winckler και Grafe, 2000). Στις Η.Π.Α. το ποσοστό των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες ξεπερνάει το 70% της κατανάλωσης αντιβιοτικών, ενώ στην Γερμανία υπολογίζεται ότι αποτελεί περίπου το 50% (Kummerer, 1998b). Σε σχετική μελέτη που έγινε στην Δανία υπολογίστηκε ότι στην χώρα αυτή το έτος 1995 χρησιμοποιήθηκαν 94 τόνοι αυξητικών παραγόντων (βλέπε αντιβιοτικών) μόνο για την εκτροφή χοιρινών (Halling-Sorensen και συν., 1998).

Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστό πόση ποσότητα από αυτά τα αντιβιοτικά κτηνιατρικής χρήσης καταλήγει στα επιφανειακά και στα υπόγεια ύδατα μέσω των βροχοπτώσεων, που παρασύρουν τις ουσίες αυτές από τις βιολογικές ή οικολογικές υποτίθεται καλλιέργειες, όπου ως λίπασμα χρησιμοποιείται η «οικολογική» κοπριά των ζώων. Σε σχετική μελέτη που αφορούσε τον χρόνο αποδόμησης των τετρακυκλινών σε κοπριά βρέθηκε ότι οι τετρακυκλίνες παρέμεναν αναλλοίωτες μετά από αποθήκευση της κοπριάς για δύο μήνες (Winckeler και Graffe, 2000), ενώ σουλφοναμίδες όπως η σουλφαδιμεθοξίνη διατηρούνταν σταθερές στην κοπριά καθόλη την διάρκεια χρήσης της ως λιπάσματος στους αγρούς (Migliore και συν., 1995, Boehm, 1996).

Όμως αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται εκτεταμένα και στις ιχθυοκαλλιέργειες από τις οποίες καταλήγουν είτε στον πυθμένα των υδατοσυλλογών (δεξαμενών, λιμνών, ποταμών, θαλασσών), είτε αργά-αργά διαλύονται στο περιβάλλον νερό (Beckert 2004, Lai και συν., 1995, Smith και Samulsen, 1996). Οι κύριες ομάδες αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι οι τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες και γλωραμφαινικόλη, οι οποίες προστίθενται είτε απευθείας στην τροφή των ψαριών, είτε ρίπτονται απευθείας στο νερό (Hirsch και συν., 1999).



### **3.2. Οι επιπτώσεις για την δημόσια υγεία από την παρουσία αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον**

Υπάρχουν σαφείς υποψίες ότι τα κατάλοιπα αντιβιοτικών στο περιβάλλον επάγουν αντοχές στα βακτηριακά στελέχη αποτελώντας ένα σοβαρό κίνδυνο για την δημόσια υγεία, δεδομένου ότι όλο και περισσότερες λοιμώξεις δεν μπορούν πλέον να αντιμετωπιστούν με τα υπάρχοντα αντιβιοτικά. Μελέτες που αφορούν στην ευαισθησία βακτηριακών στελεχών, τα οποία απομονώνονται από τα απόβρατα των συστημάτων βιολογικών καθαρισμών (Sewage Treatment Plants –STP), δείχνουν ότι τα βακτήρια που επιβιώνουν της επεξεργασίας στα STP εμφανίζουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Μάλιστα, το 70% αυτών των βακτηρίων είναι ανθεκτικά τουλάχιστον σε ένα αντιβιοτικό, ενώ πολλά είναι πολυανθεκτικά (Malik και Ahmad, 1994, Hirsch και συν., 1999). Τα αντιβιοτικά ως προς τα οποία είναι ανθεκτικά αυτά τα στελέχη βακτηρίων είναι κυρίως η πενικιλίνη, αμπικιλίνη, βασιτρασίνη, ερυθρομυκίνη και τετρακυκλίνη και στις περισσότερες περιπτώσεις η αντοχή αποδίδεται σε πλασμίδια.

Άλλοι ερευνητές έχουν εξετάσει στελέχη βακτηρίων από λίμνες, ποτάμια και υπόγεια νερά και έχουν βρει ότι εμφανίζουν παρόμοια αντοχή με εκείνη των στελεχών, που απομονώθηκαν απευθείας από λύματα STP (Alvero, 1987, Al-Ghazali και συν., 1988, Campeau και συν., 1996, Arvanitidou και συν., 1997b, Hirsch και συν., 1999). Ακόμη και όταν εξετάστηκαν πόσιμα νερά βρέθηκαν παρόμοιες αντοχές και αυτό αποδόθηκε σε επιμόλυνση με βακτήρια κοπρανώδους προέλευσης (Pathak και συν., 1993, Pandey και Musarrat, 1993, Papandreou και συν., 2000).



### 3.3. Διασπορά μικροβιακής αντοχής δια του υδάτινου περιβάλλοντος

Το υδάτινο περιβάλλον αποτελεί δεξαμενή, που περιέχει βακτήρια που εμφανίζουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Η αυξημένη αντοχή στα αντιβιοτικά των διαφόρων βακτηρίων, που απομονώνονται από το υδάτινο περιβάλλον οφείλεται: 1) στην αυξημένη απόρριψη ακατέργαστων αποβλήτων, ο όγκος των οποίων καθημερινά αυξάνει 2) στην μεγαλύτερη επιβίωση ορισμένων στελεχών στα υδάτινα συστήματα, η οποία φαίνεται να έχει σχέση με την αντοχή σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως π.χ. στο φως και τα μέταλλα (Jobling και συν., 1988) και 3) στην διαδικασία μεταφοράς αντοχής, στην οποία συμμετέχει η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών.

Ερευνητές, που μελετούν την αντοχή των αλλόχθονων μικροοργανισμών του υδάτινου περιβάλλοντος, όπως π.χ. της *E. coli*, η οποία αποτελεί και δείκτη ρύπανσής του, αναφέρουν ότι το υδάτινο περιβάλλον (νερά πόσιμα, νερά αναψυχής κ.τ.λ.) αποτελεί μια σημαντική δεξαμενή ανθεκτικών βακτηρίων (Woegerbauer, 2002). Έτσι ο Antai (1987) αναφέρει ότι το 27,8% των κολοβακτηριδίων που απομονώθηκαν από πηγάδια ήταν ανθεκτικά σε 3 ή περισσότερα αντιβιοτικά, ενώ οι Ibiebele και Sokari (1989) αναφέρουν ότι ποσοστό 33 % των κολοβακτηριδίων που απομονώθηκαν επίσης από πηγάδια, ήταν ανθεκτικά σε 2 ή περισσότερα αντιβιοτικά. Οι παραπάνω ερευνητές υποθέτουν ότι η μεταφορά αντοχής έγινε με πλασμίδια ή μεταθετά στοιχεία. Σε βακτήρια που απομονώνονται από το υδάτινο περιβάλλον βρίσκονται πλασμίδια σε συχνότητα 23-46% (Sizemore & Colwell 1977, Burton και συν., 1982, Trevors και συν., 1987). Στην μεταφορά των πλασμιδίων οφείλεται η αντοχή στα αντιβιοτικά των βακτηρίων του περιβάλλοντος (Davey & Reaney, 1980 Park, 2003). Το ενδιαφέρον για τη μελέτη της μεταφοράς των βακτηριακών γονιδίων δια του υδατινού περιβάλλοντος έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια (Trevors και συν., 1987, Saye & Miller, 1989). Η διασπορά της



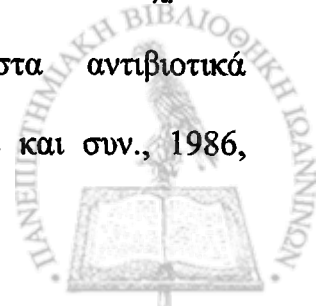
αντοχής των αντιβιοτικών από τη χρήση τους στην ιατρική και στην κτηνιατρική, καθώς και η χρήση μικροοργανισμών που είχαν υποστεί επέμβαση γενετικής μηχανικής έχει οδηγήσει σε "γενετική ρύπανση", η οποία σε αντίθεση με άλλες μορφές ρύπανσης όταν εγκατασταθεί σε ένα οικοσύστημα έχει την ικανότητα της αυτοδιάδοσης.

Τα ανθεκτικά στελέχη του πόσιμου νερού αποικίζουν τον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου κατά τη διάρκεια διέλευσής τους από αυτόν. Τα βακτήρια αυτά δρουν σαν δότες γονιδίων αντοχής στους μικροοργανισμούς της χλωρίδας του εντέρου, με αποτέλεσμα η εντερική χλωρίδα να αποτελεί δεξαμενή γονιδίων αντοχής για τα παθογόνα βακτήρια (Amyes και συν., 1992, Cordoba, 2001).

Μεταξύ των προτάσεων για τον έλεγχο της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού είναι και ο έλεγχος της πολυαντοχής του δείκτη κολοβακτηριδίου, που απομονώθηκε από αυτό με σκοπό την ανεύρεση διαφόρων πηγών κοπρανόδους ρυπάνσεως του νερού.

Ο δείκτης αντοχής του κολοβακτηριδίου δίνεται από το πηλίκο του αριθμού των αντιβιοτικών, στα οποία το στέλεχος ήταν ανθεκτικό δια του ολικού αριθμού των ελεγχθέντων αντιβιοτικών, ενώ ο δείκτης πολυαντοχής του κολοβακτηριδίου για κάθε περιοχή προσδιορίστηκε ως ο αριθμός των αντιβιοτικών, στον οποίο όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά δια του ολικού αριθμού των αντιβιοτικών που εξετάστηκαν επί του συνολικού αριθμού των στελεχών. Ο δείκτης πολυαντοχής χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των κολοβακτηριδίων, που προέρχονται από πηγές υψηλού κινδύνου (π.χ. ανθρώπους, πουλερικά και κύκνους), από αυτά, που προέρχονται από άλλες πηγές (Krupertman, 1983 Kelsey, 2003).

Στις ανεπτυγμένες χώρες το πόσιμο νερό σπάνια αποτελεί σημαντική πηγή ανθεκτικών γονιδίων. Το γενικότερο ωστόσο, υδάτινο περιβάλλον αποτελεί μια πηγή γονιδίων αντοχής. Διάφορες μελέτες στην Ευρώπη, Αφρική και Ασία τα τελευταία χρόνια έχουν αποδείξει το αυξανόμενο ποσοστό των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά κολοβακτηριοειδών, που απομονώνονται από τα νερά αναψυχής (Jones και συν., 1986,



Απαγο και συν., 1988). Παλαιότερα επικρατούσε η άποψη ότι τα κολοβακτηριοειδή και άλλα αλλόχθονα βακτήρια διέρχονται περιοδικά από το περιβάλλον, στο οποίο η παραμονή ή επιβίωση ήταν πολύ σύντομη και έτσι περιοριζόταν η σημασία τους σαν δεξαμενές γόνων αντοχής. Ωστόσο έχει πλέον αποδειχθεί, ότι πολλοί από τους παραπάνω μικροοργανισμούς, όταν εισέλθουν στο υδάτινο περιβάλλον δεν πεθαίνουν, αλλά μεταπίπτουν σε μια μη καλλιεργήσιμη φάση (φάση ληθαργική) (Grimes & Colwell, 1986). Αποδείχθηκε επίσης, ότι κατά τη διάρκεια υποσιτισμού τους στο υδάτινο περιβάλλον, πολλά βακτήρια διατηρούν και εκφράζουν τους πλασμιδιακούς γόνους τους (Caldwell και συν., 1989).

Αν και οι εισερχόμενοι στο υδάτινο περιβάλλον μικροοργανισμοί αποτελούν ένα σημαντικό κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία, εξίσου σημαντικός θεωρείται και ο ρόλος των αυτόχθονων μικροοργανισμών του υδατίνου περιβάλλοντος. Η δυνατότητα των αυτόχθονων μικροοργανισμών του υδατίνου περιβάλλοντος να λειτουργούν ως δεξαμενές κλινικών γονιδίων αντοχής οφείλεται στην ικανότητά τους να αποκτούν επίκτητα γονίδια αντοχής από άλλους αυτόχθονες ή παθογόνους οργανισμούς, που εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον. Οι αυτόχθονες αυτοί μικροοργανισμοί δρουν σαν δότες γενετικών πληροφοριών, οι οποίοι επανεισέρχονται σε βακτήρια ανθρώπινης προέλευσης. Οι αυτόχθονες μικροοργανισμοί που απέκτησαν τα γονίδια αντοχής παραμένουν στο "ασφαλές" υδάτινο περιβάλλον αναμένοντας την ευκαιρία να τους επαναμεταφέρουν στον ανθρώπινο οργανισμό (Venter, 2004, Rojas, Charana, 2005).

Φαίνεται ότι και στο υδάτινο περιβάλλον η μεταφορά αντοχής γίνεται με τρεις κλασικούς τρόπους: 1) σύζευξη 2) μεταγωγή 3) μεταμόρφωση. Ο κυρίαρχος τρόπος μεταφοράς γονιδίων αντοχής στο υδάτινο περιβάλλον είναι η σύζευξη αλλοχθόνων και αυτοχθόνων υδατινών στελεχών (Coughter και Steward, 1989, Myeong 1999).





### α) Σύζευξη

Η σύζευξη αποτελεί τον περισσότερο μελετημένο μηχανισμό μεταφοράς γονιδίων αντοχής στο υδάτινο περιβάλλον. Σε ύδατα με ρύπανση από απόβλητα, τα απομονούμενα Gram αρνητικά βακτήρια περιέχουν πλασμίδια αντοχής στα αντιβιοτικά (Saye και Miller, 1989, Czyz, 2000). Η *in situ* μεταφορά πλασμιδίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά μεταξύ περιβαλλοντικών και εργαστηριακών στελεχών κολοβακτηριδίου δια σύζευξης έχει αποδειχθεί από τους Altherr & Kasweck (1982). Δέκτες για μεταφορά R-πλασμιδίων έχουν επίσης ανεβρεθεί σε λύματα και άλλα υδάτινα περιβάλλοντα (McPherson & Gealt, 1986, Genthner και συν., 1988).

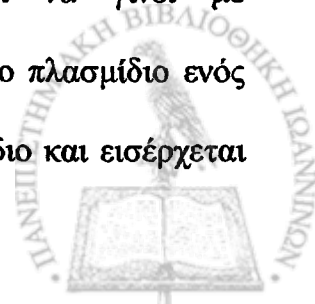
Επίσης πλασμίδια έχουν μεταφερθεί δια σύζευξης σε αυτόχθονα υδάτινα βακτήρια από εργαστηριακά στελέχη, αλλά και μεταξύ αυτοχθόνων και αλλοχθόνων βακτηρίων (Shaw & Cabelli, 1980).

Τα πλασμίδια μεταφέρονται δια σύζευξης εντός ευρέων ορίων αλλαγής συνθηκών ακόμα και σε απουσία θρεπτικών συστατικών ή χαμηλής θερμοκρασίας, δηλαδή οι αβιοτικές συνθήκες δεν αποτελούν εμπόδιο για τη μεταφορά πλασμιδίων. Ωστόσο, η περιορισμένη συχνότητα μεταβίβασης της αντοχής απουσία θρεπτικών ουσιών δείχνει ότι η παρουσία τους αποτελεί ένα παράγοντα που επηρεάζει πολύ τη συχνότητα μεταφοράς.

Μέχρι σήμερα δεν έχει περιγραφεί *in situ* μεταφορά δια συζεύξεως των R-πλασμιδίων μεταξύ βακτηρίων σε θαλάσσιο περιβάλλον αν και υπάρχουν ενδείξεις από *in vitro* μελέτες ότι η σύζευξη μπορεί να συμβεί σε διάφορες συνθήκες οσμωτικού stress, pH, θερμοκρασίας και τροφικών περιορισμών (Dahlberg, 1998, Fernandez-Astorge και συν., 1992).

### β) Μεταγωγή

Η μεταβίβαση γενετικού υλικού μεταξύ μικροβίων μπορεί να γίνει με βακτηριοφάγους. Ο βακτηριοφάγος ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα ή στο πλασμίδιο ενός κυττάρου και στη συνέχεια αποκολλάται από το χρωμόσωμα ή το πλασμίδιο και εισέρχεται



σε άλλο κύτταρο, το οποίο αποκτά ιδιότητες, που δεν είχε προηγουμένως. Οι ελεύθεροι φάγοι έχουν περιορισμένο χρόνο ζωής στο περιβάλλον και αρκετοί χάνουν την παθογόνο δράση τους γρήγορα (Saye και συν., 1987). Σε oligοτροφικό περιβάλλον ένας μεγάλος αριθμός φάγων δεν προκαλεί λύση του βακτηρίου, με αποτέλεσμα την εγκατάσταση του γονιδιώματος του φάγου στον ξενιστή βακτήριο (προφάγος). Είναι γεγονός ότι οι προφάγοι είναι συχνοί στο υδάτινο περιβάλλον. Τα πραγματικά επίπεδα μεταγωγής μεταξύ των ειδών δεν είναι γνωστά. Ωστόσο η μεταγωγή ως μηχανισμός μεταφοράς γονιδίων στο υδάτινο περιβάλλον είναι σημαντική (Day, 2004, Miller, 2001).

### γ) Μεταμόρφωση

Οι πληροφορίες όσον αφορά τη μεταφορά γονιδίων με μεταμόρφωση στο υδάτινο περιβάλλον είναι περιορισμένες.

Οι Karl και Bailiff (1989), ερευνώντας τη συχνότητα και τη φύση του ελευθέρου DNA στο υδάτινο περιβάλλον απέδειξαν, ότι στο υδάτινο περιβάλλον (θάλασσες, λίμνες, ποτάμια) της Βόρειας Αμερικής υπάρχουν βιολογικά σημαντικές πυκνότητες διαλελυμένου DNA. Η ανάλυση αυτού του ανωτέρου απομονωθέντος DNA έδειξε, ότι υπάρχουν αρκετά μεγάλα τμήματα, που κωδικοποιούν ολόκληρο ή μέρος της γενετικής ακολουθίας, αποδεικνύοντας τη δυνατότητα παρουσίας μιας γενετικής δεξαμενής στο υδάτινο περιβάλλον.

Οι DeFlaun και Paul (1989) μελέτησαν την σταθερότητα των εξωκυττάρων γονιδίων στα φυσικά νερά και απέδειξαν, ότι παρά το γεγονός ότι το πλασμιδιακό DNA στη θάλασσα υπόκειται σε άμεση αποικοδόμηση, μπορεί να ανιχνευθεί άθικτο πλασμιδιακό DNA για τουλάχιστον 4 ώρες. Οι ίδιοι ερευνητές απέδειξαν ότι DNA υβριδιοποιήσιμο σε ένα 2kD ειδικό γονίδιο-ανιχνευτή υπήρχε και μετά 24 ώρες, αποδεικνύοντας ότι μετρήσιμο DNA κατάλληλο για μεταμόρφωση παραμένει στο νερό για ένα χρόνο και είναι ικανό να επιτρέψει να συμβεί η μεταμόρφωση.

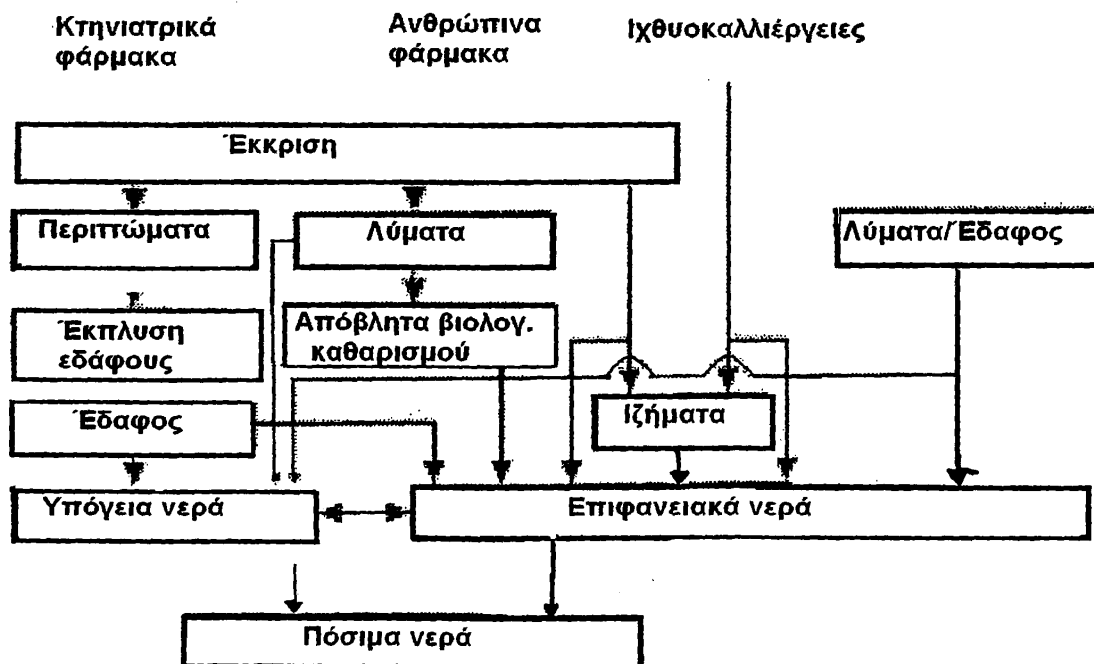


Οι Stewart & Sinigalliano (1990) κατάφεραν την *in vitro* πρόσληψη με μεταμόρφωση, του ανθεκτικού στην rifampicin DNA από βακτήρια προερχόμενα από τη θάλασσα, τα οποία έβαλαν σε τεχνητά περιβάλλοντα, που περιείχαν αποστειρωμένο και μη αποστειρωμένο ίζημα.

Οι Romanowski και συν., (1991) απέδειξαν ότι η προσρόφηση του πλασμιδιακού DNA σε μεταλλικές επιφάνειες επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση ιόντων σε πυκνότητες που απαντώνται σε φυσικά υδάτινα περιβάλλοντα, όπως τα υπόγεια νερά, και ότι η προσρόφηση αυξάνει την αντοχή στην αποικοδόμηση της DNAάσης αυξάνοντας τη δυνατότητα της πρόσληψης του DNA με μεταμόρφωση.

## Σχήμα 2. Πιθανές διαδρομές αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον.

Πηγή :Hirsch και συν., 1999



#### 4. ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ

##### ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ ΤΡΟΦΙΜΑ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.

Η απομόνωση ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων από διάφορα τρόφιμα ζωικής προέλευσης αποτελεί ένα αναδυόμενο πρόβλημα δημόσιας υγείας. Τα στελέχη αυτά μπορούν να εξαπλωθούν μέσω της τροφικής αλυσίδας πάρα πολύ εύκολα στον ανθρώπινο πληθυσμό και να προκαλέσουν επιδημικές εξάρσεις, ειδικά σε περιοχές όπου το υγειονομικό επίπεδο δεν είναι άριστο. Σε περιπτώσεις τέτοιου είδους επιδημιών εκφράζονται φόβοι ότι η θεραπευτική αντιμετώπιση θα είναι πάρα πολύ δύσκολη (Ruiz και συν., 1999, Schmidt και συν., 2000).

Σύμφωνα με την υπάρχουσα διεθνή βιβλιογραφία ανθεκτικά στελέχη βακτηρίων έχουν απομονωθεί από ιχθυηρά αλμυρών και γλυκών υδάτων. Στελέχη *S. typhimurium*, τα οποία απομονώθηκαν από ψάρια αλιευμένα στην Ινδία, εμφάνιζαν αντοχή στην αμπικιλίνη, γλωραμφαινικόλη και κινολόνες (Ruiz και συν., 1999).

Στελέχη *A. hydrophila* τα οποία απομονώθηκαν από πέστροφες στην Πορτογαλία ήταν ανθεκτικά στις β-λακταμάσες και μάλιστα αναφέρεται ως εντυπωσιακή η αντοχή τους στην μιπενέμη, ένα αντιβιοτικό που είναι αποκλειστικά για ανθρώπινη χρήση (Saavedra και συν., 2004).

Στην Ισπανία πολυανθεκτικά στελέχη βακτηρίων απομονώθηκαν από άγριες πέστροφες και από πέστροφες ιχθυοκαλλιεργειών (Alcaide, 2005, Esteve, 1996). Στην Κροατία απομονώθηκε από ψάρια λίμνης *A. hydrophila*, η οποία ήταν ανθεκτική στην πενικιλίνη G και στην νοβομπιοσίνη (Porović και συν., 2000).



Σε έρευνα που αφορούσε θαλασσινά ψάρια ελεύθερης αλιείας στην Μαλαισία στελέχη *Aeromonas* spp. εμφάνισαν πολλαπλές αντοχές στα αντιβιοτικά αμπικιλίνη, καρμπενικιλίνη, ερυθρομυκίνη και στρεπτομυκίνη (Radu και συν., 2003). Στην Μαλαισία πάλι σε άλλη έρευνα που αφορούσε ψάρια ιχθυοκαλλιιεργειών απομονώθηκαν στελέχη *A. hydrophila*, τα οποία ήταν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη, στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη και ερυθρομυκίνη (Radu, 2003).

Σε μελέτη που έγινε στην Ινδονησία σε ψάρια, γαρίδες και καλαμάρια, απομονώθηκαν στελέχη *Vibrio alginolyticus* και *V. parahaemolyticus*, τα οποία εμφάνιζαν αντοχή στην αμπικιλίνη, λινκομυκίνη, μεθισιλίνη, ναφσιλίνη, πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη και καναμυκίνη (Liu et al, 1997).

Σε έρευνα που έγινε στην Κίνα σε ψάρια ιχθυοκαλλιιεργειών απομονώθηκαν στελέχη *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. logei*, *V. pelagius*, *V. fluvialis*, *V. mediterranei*), τα οποία ήταν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη, κεφουραξίμη, αμικασίνη, καναμυκίνη και τριμεθοπρίμη (Li και συν., 1999).

Στην Χιλή απομονώθηκαν από θαλασσινά ψάρια βακτηριακά στελέχη ανθεκτικά στην αμπικιλίνη, στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη και νιτροφουραντοίνη (Miranda και Zemelman, 2001).



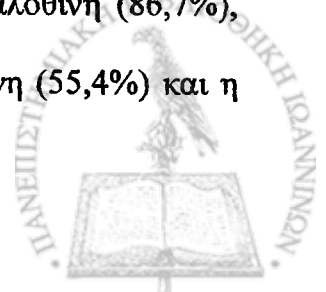
## 5. ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ

### ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Οι μελέτες που έχουν γίνει στην Ελλάδα και αφορούν στην μικροβιολογική ποιότητα του υδάτινου περιβάλλοντος είναι πολύ λίγες (Παπαδοπούλου 1983, Παπαδοπούλου και Παπαδόπουλος, 1989, Arvanitidou και συν., 1995, Arvanitidou και συν., 1997a,b, Papadopoulou και συν., 1999a,b,c,d, Karanis και συν., 2002, Karanis και συν., 2005) Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία στην Ελλάδα έχουν γίνει τρεις μελέτες που αφορούν την αντιβιοαντοχή βακτηριακών στελεχών από το φυσικό και τεχνητό υδάτινο περιβάλλον. Από τις μελέτες αυτές μια αφορά τα επιφανειακά ύδατα (Arvanitidou και συν., 1997b), μία τα πόσιμα νερά (Papandreou και συν., 2000) και μια τα νερά κολυμβητηρίων (Papadopoulou και συν., 1999d).

Το χρονικό διάστημα 1989-1994, οι Αρβανιτίδου και συνεργάτες, απομόνωσαν από τέσσερις ποταμούς (Αξιός, Αλιάκμων, Νέστος, Στρυμόνας) και μια λίμνη (Βόλβη) της Βόρειας Ελλάδας 79 στελέχη σαλμονελλών τα οποία έλεγξαν ως προς την ευαισθησία τους σε 20 αντιβιοτικά. Από τα 79 στελέχη τα 19 εμφάνισαν αντοχή σε περισσότερα το ενός αντιβιοτικά. Η πιο συχνή αντοχή αφορούσε την στρεπτομυκίνη και ακολουθούσαν η σπεκτινομυκίνη, η αμπικιλίνη και η τικαρσιλίνη (Arvanitidou και συν., 1997b).

Το Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών σε έρευνα που αφορούσε δείγματα πόσιμων υδάτων, έλεγξε την ευαισθησία σε 20 αντιβιοτικά 239 στελεχών Gram-αρνητικών βακτηρίων, κοπρανόδους και μη κοπρανόδους προέλευσης, τα οποία είχε απομονώσει από το παλιό υδραγωγείο της πόλης των Πατρών. Η μεγαλύτερη αντοχή παρατηρήθηκε στα αντιβιοτικά κεφαλοθίνη (86,7%), αμπικιλίνη (77,5%), καρμπενικιλίνη (71%) και ακολουθούσαν η κεφοξίτινη (55,4%) και η



κεφουροξίμη (51,2%), ενώ ενδιάμεση αντοχή εμφάνισαν στην τικαρκιλίνη (31,3%), κεφτιζοξίμη (31,2%), γλωραμφαινικόλη (30,3%) και κεφοτετάνη (25,2%) (Papandreou και συν., 2000).

Το Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε έρευνα που αφορούσε τρία κολυμβητήρια κλειστού τύπου της πόλης των Ιωαννίνων, απομόνωσε 108 βακτηριακά στελέχη από τα οποία 14 στελέχη των ειδών *Pseudomonas alcaligenes*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus aureus*, *Chryseobacterium indologenes*, *Ochrobactrum anthropi*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *E. cloacae* και *Klebsiella pneumonia* εμφάνιζαν αντοχή σε περισσότερα του ενός αντιβιοτικά. (Papadopoulou και συν., 1999d).







## 1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της μικροβιολογικής ρύπανσης του υδάτινου περιβάλλοντος στην ΒΔ. Ελλάδα και η μελέτη της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των βακτηριακών στελεχών, που απομονώθηκαν από αυτό το περιβάλλον. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η ευαισθησία των βακτηριακών στελεχών, τα οποία απομονώθηκαν από πόσιμα νερά και από νερά διαφόρων οικοσυστημάτων (ποταμών, λιμνών, θάλασσας), καθώς και από ψάρια των αντίστοιχων υδάτινων οικοσυστημάτων. Παράλληλα έγινε συγκριτική μελέτη της ευαισθησίας των στελεχών που απομονώθηκαν από ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών και από ψάρια ελεύθερης αλιείας.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### 2.1. ΥΛΙΚΑ

#### 2.1.1. Δειγματοληψία υδάτων

Συλλέχθηκαν:

240 δείγματα πόσιμου νερού από δήμους και κοινότητες των νομών Ιωαννίνων, Άρτας και Πρεβέζης.

50 δείγματα επιφανειακών υδάτων που προερχόταν από τις λίμνες Παμβώτιδα και Ζηρού .

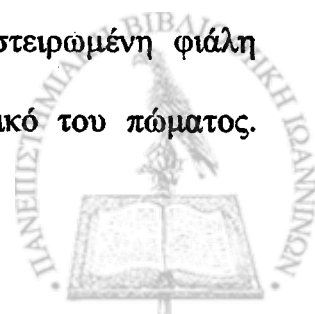
400 δείγματα επιφανειακών υδάτων που προερχόταν από τους ποταμούς Άραχθο, Λούρο, Αχέροντα, Καλαμά, Αώο και Βοϊδομάτη.

450 δείγματα επιφανειακών θαλασσινών υδάτων από τον Αμβρακικό κόλπο και από παράκτιες περιοχές του Ιονίου.

Όλα τα δείγματα τοποθετούνταν σε φορητό ψυγείο και μεταφέρονταν στους 4°C στο εργαστήριο αμέσως μετά την δειγματοληψία ( $\leq 2$  ώρες).

#### Δειγματοληψία πόσιμου νερού δικτύου ύδρευσης

Οι φιάλες δειγματοληψίας ήταν γυάλινες με εσφυρισμένο πώμα αποστειρωμένες περιεκτικότητας 500 ml. Για την για την εξουδετέρωση του χλωρίου στο νερό, στις φιάλες προσθέτονταν 0,5 ml διαλύματος θειο-θειικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0,5 %. Πριν από τη δειγματοληψία αποστειρώνονταν (με φλόγα) το στόμιο της βρύσης, ώστε τυχόν μικροοργανισμοί που υπήρχαν σ' αυτό να μη μεταφερθούν στο δείγμα. Στη συνέχεια αφήναμε να τρέξει νερό για μερικά λεπτά από τη βρύση, ώστε να καθαρίσει ο σωλήνας από το στάσιμο νερό και τυχόν ακαθαρσίες και μετά ανοίγαμε την αποστειρωμένη φιάλη δειγματοληψίας χωρίς να έρθει το χέρι μας σε επαφή με το εσωτερικό του πώματος.



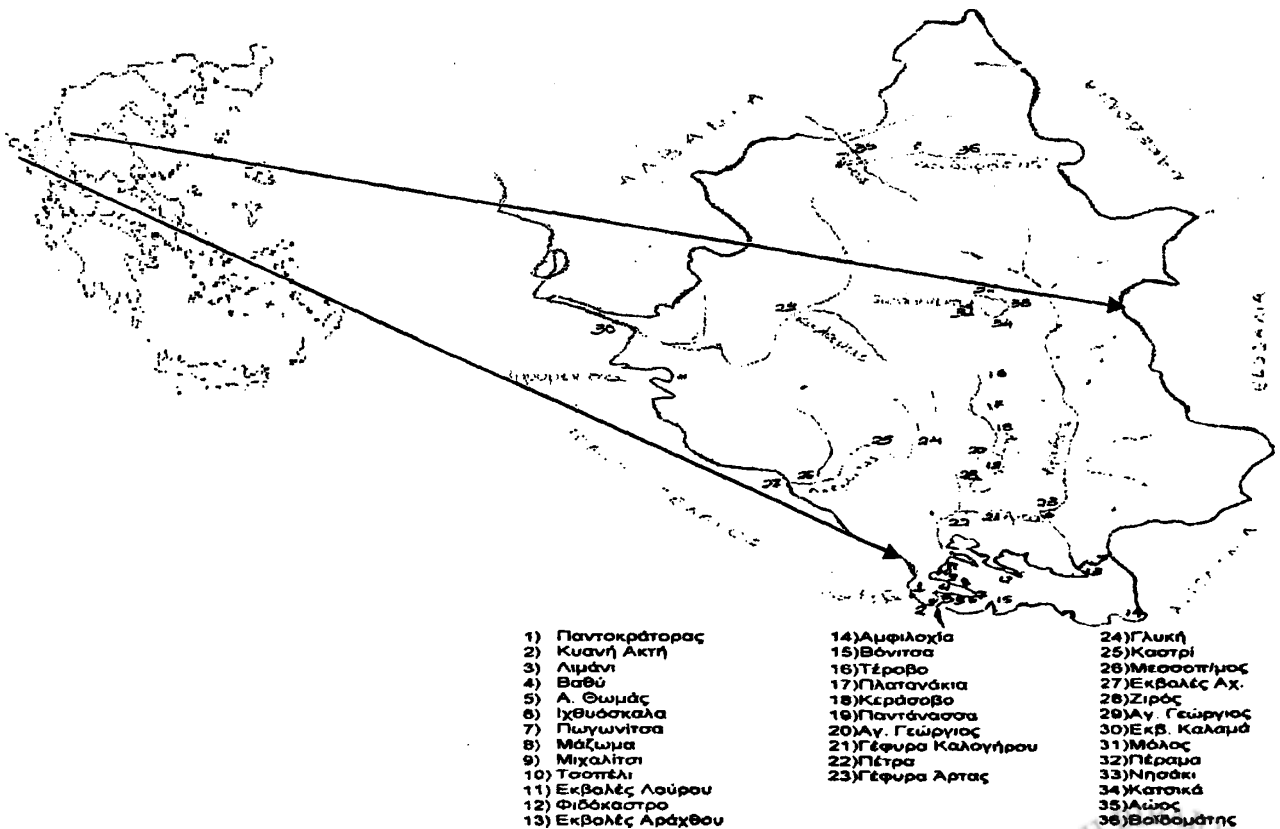
Τοποθετούσαμε τη φιάλη κάτω από τη βρύση, αλλά χωρίς να έρχεται σε επαφή με αυτή και την γεμίζαμε με νερό. Μόλις συλλέγονταν ο απαραίτητος όγκος νερού, πωματίζαμε αμέσως τη φιάλη. Όλη η διαδικασία γινόταν δίπλα σε φλόγα και με τη χρήση γαντιών, για να εξασφαλιστούν στείρες συνθήκες.

### Δειγματοληψία νερού από θάλασσα, λίμνες, ποταμούς.

Λαμβάνονταν δείγμα από βάθος  $\approx 50$  cm από την επιφάνεια. Η μεταφορά του δείγματος στο εργαστήριο γινόταν αμέσως μετά την δειγματοληψία, ώστε να εξασφαλίζεται η διατήρηση των χαρακτηριστικών του δείγματος και να αποκλείεται η αλλοίωσή του. Έτσι κατά τη μεταφορά, οι φιάλες με τα δείγματα τοποθετούνταν σε ισοθερμικό δοχείο (φορητό ψυγείο), με παγοκυψέλες ώστε η θερμοκρασία να διατηρούνταν στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

Τα σημεία δειγματοληψιών (σταθμοί δειγματοληψίας) σημειώνονται στον χάρτη 1.

### Χάρτης 1. Σταθμοί δειγματοληψίας



### 2.1.2. Δειγματοληψία ψαριών

Τα δείγματα προέρχονταν από υδατοκαλλιεργητικές μονάδες της Πρέβεζας και Θεσπρωτίας και από ελεύθερη αλιεία στις ίδιες περιοχές.

Συλλέχθηκαν 230 δείγματα θαλασσινών ψαριών ελεύθερης αλιείας των ειδών που ακολουθούν: *Boops boops* (γόπα), *Atherina hepsetus* (αθερίνα), *Solea vulgaris* (γλώσσα), *Merluccius merluccius* (μπακαλιάρος), *Engraulis encrasicolus* (γαύρος), *Scomber scomber* (σκουμπρί), *Scomber colias*, *Sardina pilchardus* (σαρδέλα), *Alosa fallax* (σαρδελομάνα) και *Mugil cephalus* (κέφαλος).

Επίσης συλλέχθηκαν 210 δείγματα ψαριών από μονάδες εντατικής προπάχυνσης και πάχυνσης ψαριών των ειδών *Sparus auratus* (Τσιπούρα) και *Dicentrarchus labrax* (Λαυράκι).

Όλα τα δείγματα τοποθετούνταν σε φορητό ψυγείο με παγοκουψέλες και μεταφέρονταν στο εργαστήριο αμέσως ( $T \approx 4^{\circ}\text{C}$ , μεταφορά  $\leq 2$  ώρες).



### 3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

#### 3.1. Μικροβιολογικός έλεγχος υδάτων

##### 3.1.1 Μέθοδος

Ο μικροβιολογικός έλεγχος έγινε με τη μέθοδο διήθησης του νερού διαμέσου μικροβιοκρατών μεμβρανών (47 mm, 0,45 μm, Millipore HAWG 047S1) κατά ΑΡΗΑ/ΑWWA. Οι μικροβιακοί δείκτες, που ελέγχθηκαν ήταν: Ολική μικροβιακή χλωρίδα, *Total coliforms*, *Fecal coliforms*, *Fecal Streptococci*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio spp.* και *Listeria spp.* Η βιοχημική ταυτοποίηση, έως το επίπεδο του είδους των βακτηρίων που απομονώθηκαν έγινε με τα ταυτοποιητικά συστήματα API (BioMerieux, Marcy – 1 Etoile, France). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το API 20E (20 100), για την ταυτοποίηση των Εντεροβακτηριακών, το API 20 NE (20 050) για την ταυτοποίηση των άλλων Gram αρνητικών βακτηρίων, το API STAPH (20 500) για την ταυτοποίηση των σταφυλοκόκκων, το API STREP (20 600) για την ταυτοποίηση των στρεπτοκόκκων και το API LISTERIA (10 300) για την ταυτοποίηση των λιστεριών.

Η μέθοδος της διήθησης δια μικροβιοκρατών μεμβρανών (Membrane Filtration) βασίζεται στη διήθηση κατάλληλου όγκου νερού μέσω μεμβράνης κατασκευασμένης από διάφορα υλικά (εστέρες κυτταρίνης, νάιλον κ.τ.λ.) με διάμετρο πόρων τόση, ώστε να κατακρατεί τους προς έλεγχο μικροοργανισμούς. (ΑΡΗΑ, 2001).

Η συσκευή διήθησης Holder (Millipore), που χρησιμοποιήθηκε είναι κατάλληλη για διήθηση τριών δειγμάτων ταυτόχρονα, αποτελείται από τρία μεταλλικά χωνιά σε σειρά και είναι συνδεδεμένη με αντλία κενού (δημιουργείται κενό 70 kPa περίπου). Οι μεμβράνες τοποθετούνται επάνω στα φίλτρα, που βρίσκονται στο κάτω μέρος των χωνιών. Για τις ψευδομονάδες χρησιμοποιούνται μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,22 μm, ενώ για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς η διάμετρος των πόρων είναι 0,45 μm.



Στα χωνιά, τα οποία αποστειρώνονταν κάθε φορά που ελέγχονταν διαφορετικό δείγμα, τοποθετούνταν ο απαιτούμενος όγκος δείγματος (250 ml για τις ψευδομονάδες, 1 L για το *Vibrio* και *Listeria* και 100 ml για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς) και γινόταν η διήθηση υπό κενό. Στη συνέχεια αφαιρούνταν το πάνω μέρος του χωνιού και με αποστειρωμένη λαβίδα μεταφέρονταν η μεμβράνη σε τρυβλίο Petri που περιείχε το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του υπό ανίχνευση μικροοργανισμού. Κατόπιν τα τρυβλία με τις μεμβράνες τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο κατάλληλης θερμοκρασίας (22 °C, 37 °C, 44 °C) και αφήνονταν για επώαση για συγκεκριμένο χρόνο (24h, 48h, 72h).

Για τον προσδιορισμό της ολικής μικροβιακής χλωρίδας του νερού στους 37°C και 22°C διηθήθηκε από 1 ml δείγματος, οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό Plate Count Agar (PCA) και τα τρυβλία επώασθηκαν στους 37°C και 22°C αντίστοιχα. Οι αποικίες μετρήθηκαν μετά από 48 και 72 ώρες αντίστοιχα. Δεδομένου ότι η κάθε αποικία αντιστοιχεί σε ένα βακτηριακό κύτταρο, το αποτέλεσμα εκφράζεται σε αποικίες ανά όγκο δείγματος (colony forming units ή cfu/ml) (Διάγραμμα 1).

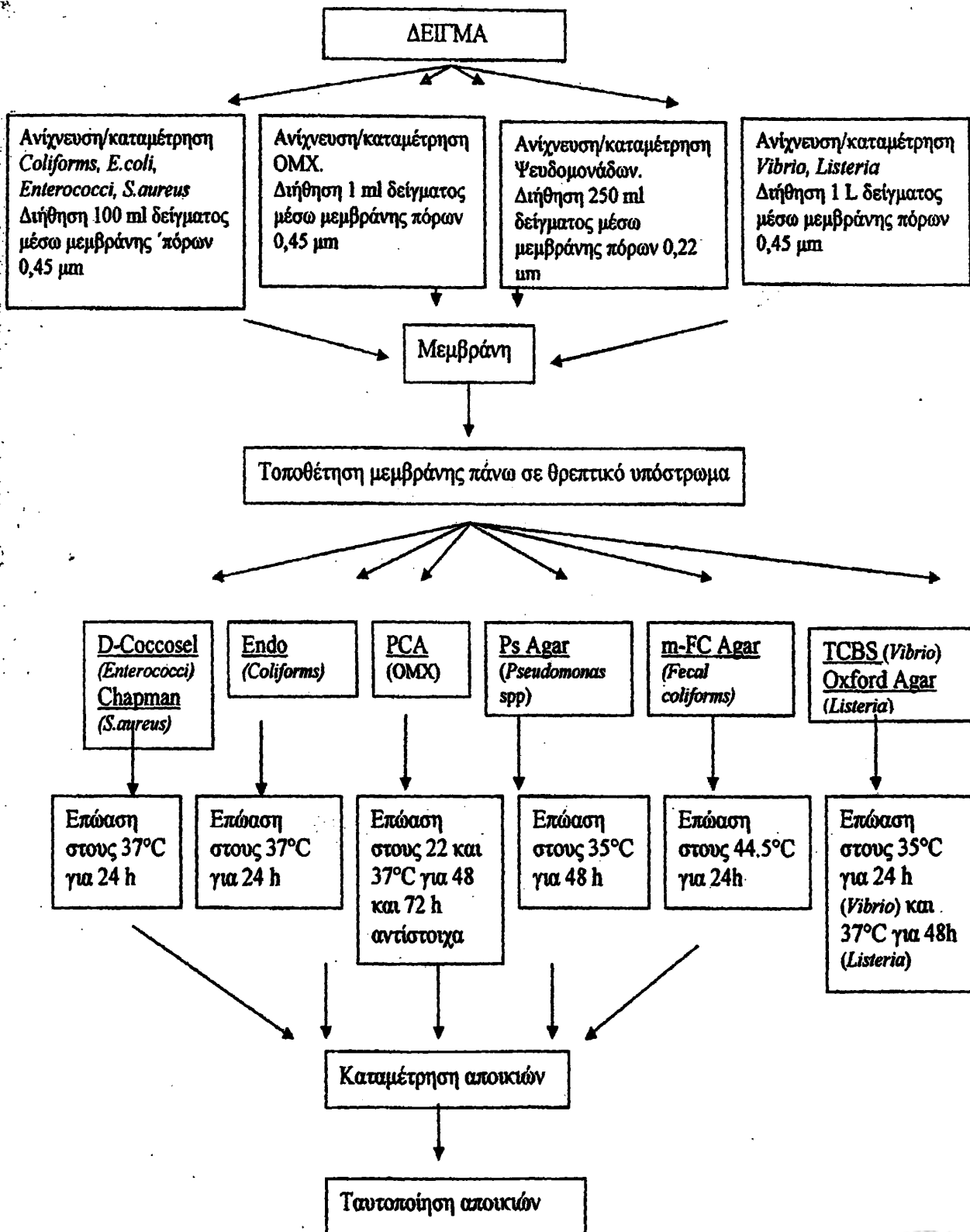
Για τον προσδιορισμό των Coliforms, *E. coli*, *Streptococcus* και *Staphylococcus* διηθούνταν από 100 ml νερού και οι μεμβράνες τοποθετούνταν σε ειδικά εκλεκτικά υποστρώματα m-Endo Agar LES, mFC Agar, D-Coccosel και Chapman Agar αντίστοιχα. Τα τρυβλία επωάζονταν σε κλίβανο των 37 °C για 24 ώρες. (Διάγραμμα 1).

Για τον προσδιορισμό των ψευδομονάδων διηθούνταν 250 ml νερού, η μεμβράνη τοποθετούνταν σε υπόστρωμα *Pseudomonas Selective Agar Base* και τα τρυβλία επωάζονταν σε κλίβανο στους 35 °C για 48 ώρες. Όλη η παραπάνω διαδικασία γινόταν δίπλα σε φλόγα και με χρήση γαντιών (Διάγραμμα 1).



# Διάγραμμα 1. Πρωτόκολλο μικροβιολογικής εξέτασης νερού

(μέθοδος των μικροβιοκρατών μεμβρανών)



Για τον προσδιορισμό των *Vibrio* spp και *Listeria* spp διηθούνταν 1 L νερού, η μεμβράνη τοποθετούνταν σε υπόστρωμα T.C.B.S άγαρ. (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose άγαρ) και Oxford Listeria Selective Agar Base αντίστοιχα, ενώ τα τρυβλία επωάζονταν σε κλίβανο στους 35°C για 24 ώρες για το *Vibrio* spp και στους 37°C για 48 ώρες για την *Listeria* spp. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, καταμετρούνταν οι αποικίες, οι οποίες είχαν αναπτυχθεί πάνω στις μεμβράνες και ακολουθούσε ταυτοποίησή τους βάση των βιοχημικών χαρακτηριστικών τους. (Διάγραμμα 1)

### 3.1.2 Στερεά υποστρώματα

Τα στερεά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των βακτηρίων που κατακρατήθηκαν στις μεμβράνες μετά την διήθησή του υπό εξέταση δείγματος νερού αναφέρονται παρακάτω:

1. Plate Count Agar (PCA) (Cat. No. 1.05463, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

Το στερεό αυτό γενικό υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της OMX και είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Πεπτόνη από καζεΐνη 5,0

yeast extract 2,5

D(+) glucose 1,0

Άγαρ 14,0

Το pH του υποστρώματος ήταν  $7,1 \pm 0,2$ . Για την παρασκευή ενός λίτρου από το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα προσθέτονταν 22,5 gr έτοιμης σκόνης σε 1 L αποσταγμένου νερού και ακολουθούσε θέρμανση υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης και αποστείρωση





σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο μέχρι η θερμοκρασία του να πέσει στους 50°C και διαμοιραζόνταν σε τρυβλία

2. D-Coccosel (Bile Esculin Agar Selective isolation of enterococci) (N51 025, BioMerieux, Marcy – l Etoile, France)

Το στερεό αυτό εκλεκτικό υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των εντεροκόκκων και είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Πεπτόνη από καζεΐνη 17,0

Πεπτόνη από κρέας 3,0

Yeast extract 5,0

Beef bile 10,0

Sodium chloride 5,0

Sodium citrate 1,0

Esculin 1,0

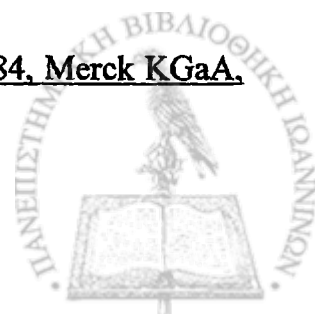
Ammonium iron citrate 0,5

Sodium azide 0,25

Άγαρ 13,5

Το pH του υποστρώματος ήταν 7,1±0,2. Για την παρασκευή ενός λίτρου από το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα προσθέτονταν 56 g έτοιμης σκόνης σε 1 L αποσταγμένου νερού και ακολουθούσε θέρμανση υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης και αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά, στη συνέχεια τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο μέχρι η θερμοκρασία του να πέσει στους 50°C και διανέμονταν σε τρυβλία. Το χρώμα του υποστρώματος είναι ανοιχτό πράσινο, ενώ οι αποικίες των εντεροκόκκων εμφανίζονται μαύρες.

3. Pseudomonas Selective Agar Base. Cetrinide Agar (Cat. No. 1.05284, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)



Το στερεό αυτό εκλεκτικό υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των Ψευδομονάδων και είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Πεπτόνη από ζελατίνη 20,0

magnesium chloride 1,4

potassium sulfate 10,0

N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide (cetrimide) 0,3

Άγαρ 13,0.

Το pH του υποστρώματος ήταν  $7,1 \pm 0,2$ . Για την παρασκευή ενός λίτρου από το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα προσθέτονταν 44,5 g έτοιμης σκόνης και 10 ml γλυκερόλης σε 1 L αποσταγμένου νερού και ακολουθούσε θέρμανση υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης και αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους  $121^\circ\text{C}$  για 15 λεπτά, στη συνέχεια τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο μέχρι η θερμοκρασία του να πέσει στους  $50^\circ\text{C}$  και ακολουθούσε μοίρασμα σε τρυβλία. Το χρώμα του υποστρώματος είναι ανοιχτό κίτρινο και οι αποικίες της *P. aeruginosa* και *P. fluorescens* εμφανίζονται πράσινες και φθορίζουν σε λάμπα UV στα 360 nm. Η επώαση γινόταν στους  $35^\circ\text{C}$  για 48 ώρες.

4. Chapman Agar. Staphylococcus Selective Agar (Cat. No. 1.05469, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

Το στερεό αυτό εκλεκτικό υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του *S. aureus* και είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Πεπτόνη από καζεΐνη 10,0

Yeast extract 2,5

Di-potassium hydrogen phosphate 5,0

Gelatin 30,0

Lactose 2,0

D(-)mannitol 10,0



Sodium chloride 75,0

Άγαρ 12,0.

Το pH του υποστρώματος ήταν  $7,0 \pm 0,7$ . Για την παρασκευή ενός λίτρου από το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα προσθέτονταν 146,5 g έτοιμης σκόνης σε 1 L αποσταγμένου νερού και ακολουθούσε θέρμανση υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης και αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους  $121^\circ\text{C}$  για 15 λεπτά, στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο μέχρι η θερμοκρασία του να πέσει στους  $55^\circ\text{C}$  και διανεμόταν στα τρυβλία. Το χρώμα του υποστρώματος είναι ροζ κόκκινο, ενώ οι αποικίες των *S. aureus* εμφανίζονται κίτρινες. Η επώαση γινόταν στους  $37^\circ\text{C}$  για 24 h.

5. m-FC Agar (Cat. No. 1.11278, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

Το στερεό αυτό εκλεκτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των *Fecal coliforms* και είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Proteose peptone 5,0

Tryptose 10,0

Yeast extract 3,0

Sodium chloride 5

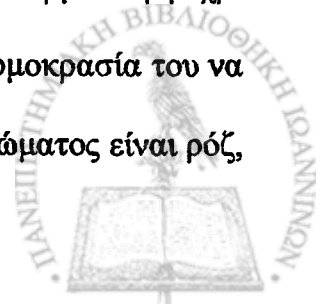
Bile salts 1,5

Lactose 12,5

Methyl blue 0,1

Άγαρ 15,0

Το pH του υποστρώματος ήταν 7,4. Για την παρασκευή ενός λίτρου από το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα προσθέτονταν 52 g σκόνης σε 1 L απεσταγμένου νερού που περιείχε 10ml 1% ροσολικού οξέος σε 0,2 N NaOH και ακολουθούσε θέρμανση μέχρι πλήρους διάλυσης. Το διάλυμα τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο μέχρι η θερμοκρασία του να πέσει στους  $50^\circ\text{C}$  και διανεμόταν στα τρυβλία πετρί. Το χρώμα του υποστρώματος είναι ροζ,



ενώ οι αποικίες των Faecal coliforms εμφανίζονται μλε. Η επώαση γινόταν στους  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες.

6. m-ENDO Agar LES (Cat. No 11.11277, (Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

Το στερεό αυτό εκλεκτικό υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια και καταμέτρηση των εντεροβακτηριοειδών και είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Yeast extract 1,2

Casein hydrolysate 3,7

Peptone from meat 3,7

Tryptose 7,5

Tactose 9,4

Di-potassium hydro-genphosphate 3,3

Potassium hydrogenphosphate 1,0

Sodium chloride 3,7

Sodium deoxycholate 0,1

Sodium lauryl sulfate 0,05

Sodium sulfite 1,6

Basic fuchsin 0,8

Άγαρ 15,0

Το pH του υποστρώματος ήταν  $7,2 \pm 0,2$  στους  $25^{\circ}\text{C}$ . Για την παρασκευή ενός λίτρου από το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα προσθέτονταν 51 g σκόνης σε 1 L απεσταγμένου νερού που περιείχε 20 ml αιθανόλη 96% και ακολουθούσε θέρμανση μέχρι πλήρους διάλυσης και διανεμόταν στα τρυβλία πετρί. Το χρώμα του υποστρώματος είναι κόκκινο, ενώ οι αποικίες εμφανίζονται σκούρες πράσινες με μεταλλική λάμψη. Η επώαση γινόταν στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 24 ώρες.



7. T.C.B.S άγαρ. Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose άγαρ (θειοθειικό, κιτρικά, άλατα χολής, σουκρόζη) (Cat. No.1.20263, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

Το στερεό αυτό εκλεκτικό υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση *Vibrio* spp. και είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Εκχύλισμα ζύμης 5,0

Διπεπτόνη 10,0

Χολή βοδιού 5,0.

Θειοθειικό νάτριο 10,0 .

Κιτρικό νάτριο 10,0

Χολικό νάτριο 5 ,0

Σουκρόζη 20 ,0

Χλωριούχο νάτριο 10,0

Κιτρικός σίδηρος 1,0

Βρωμο-θύμολ-μπλε 0,04

Κυανούν της θυμόλης 0,04 .

Άγαρ 14,0

Το pH του υποστρώματος ήταν 8,6. Για την παρασκευή ενός λίτρου από το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα προσθέτονταν 88 g σκόνης σε 1 L αποσταγμένου νερού και ακολουθούσε θέρμανση υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης και αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά, στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο μέχρι η θερμοκρασία του να πέσει στους 55°C και διανεμόταν στα τρυβλία πετρί. Το χρώμα του υποστρώματος είναι πράσινο, ενώ οι αποικίες των *Vibrio* εμφανίζονται πράσινες και κίτρινες. Η επώαση γινόταν στους 35 °C για 18-24 ώρες.

8. Oxford Listeria Selective Agar Base (Cat. No. 1.07004, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)



Το στερεό αυτό εκλεκτικό υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση της *Listeria* και είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Πεπτόνη 23,0

Starch 1,0

Sodium chloride 5,0

Άγαρ 13,0 (Columbia agar)

Esculin 1,0

Ammonium iron(III) citrate 0,5

Lithium chloride 15,0

Το pH του υποστρώματος ήταν  $7,1 \pm 0,2$ . Για την παρασκευή 500 ml από το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα προσθέτονταν 29,25 g έτοιμης σκόνης σε 500 ml αποσταγμένου νερού και ακολουθούσε θέρμανση υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης και αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους  $121^\circ\text{C}$  για 15 λεπτά. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη του Oxford *Listeria* Selective Supplement\* μετά την προσθήκη σε αυτό 5 ml μείγματος αιθανόλης και αποστειρωμένου απεσταγμένου 1:1 νερού και ακολουθούσε ανάδευση. Το περιεχόμενο προσθέτονταν στο υπόστρωμα το οποίο, είχε προηγουμένως ψυχθεί στους  $50^\circ\text{C}$  και τέλος διανέμοταν στα τρυβλία. Το χρώμα του υποστρώματος είναι γαλάζιο-καφέ ανοιχτό, ενώ οι αποικίες της *Listeria* spp εμφανίζονται καφεπράσινες με μαύρη άλω. Η επώαση γινόταν για 48 ώρες στους  $37^\circ\text{C}$ .

\*Oxford *Listeria* Selective Supplement (Cat. No. 1.07006, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

Η σύσταση του Supplement ανα φιάλίδιο 218,0 mg ήταν:

Cycloheximide 200,0 mg

Colistin sulfat 10,0 mg

Acriflavin 2,5 mg



Cefotetan 1,0 mg

Fosfomycin 5,0 mg

9. Mueller Hinton Agar (51075, BioMerieux, Marcy – l'Etoile, France)

Το στερεό αυτό γενικής χρήσεως υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε για τα τεστ ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν (καταμέτρηση των ζωνών αναστολής) και είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Beef (infusion from) 300

Bio-Case 17,5

Starch 1,5

Agar 17,5

Το pH του υποστρώματος ήταν 7,3 στους 25°C, Για την παρασκευή ενός λίτρου από το παραπάνω θρεπτικό υπόστρωμα προσθέτονταν 38 g σκόνης σε 1 L αποσταγμένου νερού και ακολουθούσε θέρμανση υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης και αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 116°C για 15 λεπτά, στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο μέχρι η θερμοκρασία του να πέσει στους 55°C και διανεμόταν στα τρυβλία πετρί. (Η παρασκευή έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες NCCLS 2001).

## 3.2. Μικροβιολογικός έλεγχος ψαριών

### 3.2.1. Μέθοδος

Στα δείγματα ψαριών αναζητήθηκαν οι ίδιοι μικροοργανισμοί με τα δείγματα των νερών. Οι καλλιέργειες έγιναν σύμφωνα με τις τυποποιημένες μεθόδους μικροβιολογικού ελέγχου τροφίμων (ISO) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε cfu/gr. Τα απομονωθέντα βακτήρια ταυτοποιήθηκαν έως το επίπεδο του είδους με τα βιοχημικά συστήματα API (API



20E, API 20 NE, API STAPH, API STREP, API Listeria), (BioMerieux, Marcy – l'Etoile, France).

Από κάθε δείγμα λαμβάνονταν με άσηπτο τρόπο (αποστειρωμένο νυστέρι και λαβίδα) 25 gr ιστού (σάρκα) και γινόταν ομογενοποίηση του δείγματος του ψαριού σε 225ml πεπτονούχου ύδατος (Peptone Water) (PW) με stomacher (BAGMIXER® 400, Interscience, 78860 St. Nom-France). Από το ομογενοποίημα λαμβάνονταν 1ml, το οποίο επιστρωνόταν σε τρυβλία με διαφορετικά υλικά. Ακολουθούσε προσπάθεια απομόνωσης των διαφορετικών στελεχών βακτηρίων, με ανακαλλιέργειες από τα αρχικά τρυβλία σε νέα τρυβλία με διάφορα θρεπτικά υλικά (ειδικά και μη ειδικά), στα οποία γινόταν παρατήρηση τυχόν ανάπτυξης στις 24 και 48 ώρες.

Για την απομόνωση της *Listeria* τοποθετούνταν σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher 25gr δείγματος σάρκας ψαριού και αφού προσθέτονταν 225ml Half-Fraser broth γινόταν ομογενοποίηση με το stomacher και ακολουθούσε επώαση στους 30°C για 24h αεροβίως. Από το ομογενοποιημένο διάλυμα μεταφέρονταν με αυτόματη ρυθμιζόμενη πιπέτα 0,1ml σε 10ml Fraser broth, το οποίο ήταν τοποθετημένο σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα. Γινόταν καλή ανάδευση σε vortex και επώαση του Fraser broth στους 37°C για 48h. Με κρικοφόρο στυλέο, μεταφερόταν ποσότητα δείγματος από το Fraser broth, σε Oxford agar και πραγματοποιούνταν επιφανειακή επίστρωση. Το ενοφθαλμισμένο θρεπτικό υπόστρωμα επωάζονταν στους 37°C για 18-24h, σε αερόβιες συνθήκες.

Για την απομόνωση του *Vibrio* τοποθετούνταν σε σακούλα stomacher 25gr δείγματος ψαριού και αφού προσθέτονταν 225ml Peptone Water (PW), γινόταν ομογενοποίηση με stomacher. Ακολουθούσε επώαση στους 37°C για 24h αεροβίως. Με κρικοφόρο στυλέο, μεταφερόταν ποσότητα δείγματος από το Peptone Water, σε T.C.B.S άγαρ και πραγματοποιούνταν επιφανειακή επίστρωση. Το ενοφθαλμισμένο θρεπτικό υπόστρωμα επωάζονταν στους 37°C για 18-24h, σε αερόβιες συνθήκες.





Στη συνέχεια έγινε βιοχημική ταυτοποίηση του είδους των αποικιών που απομονώθηκαν με API (API 20E, API 20 NE, API STAPH, API STREP, API Listeria), (BioMerieux, Marcy – l'Etoile, France).

### 3.2.2. Θρεπτικά υλικά

#### 3.2.2.1. Ζωμοί

FRASER Listeria Selective Enrichment Broth (Cat. No 1.10398, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

Ο ζωμός αυτός, χρησιμοποιήθηκε για τον εκλεκτικό εμπλουτισμό της *Listeria* είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Πεπτόνη 5,0

Πεπτόνη από καζεΐνη 5,0

yeast extract 5,0

meat extract 5,0

sodium chloride 20,0

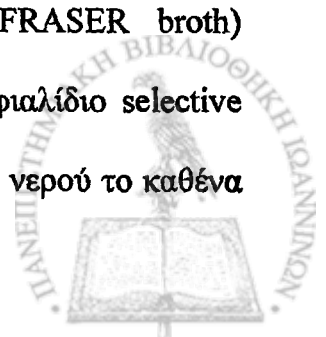
di-sodium hydrogen phosphate 12,0

potassium dihydrogen-phosphate 1,35

esculin 1,0

Lithium chloride 3,0.

Το pH του ζωμού ήταν  $7,0 \pm 0,2$  στους  $25^{\circ}\text{C}$  και για την παρασκευή του αναμιγνύονταν 57,4 g σκόνης σε 1 L αποσταγμένου νερού. Ακολουθούσε θέρμανση υπό ανάδευση και αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους  $121^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά. Στη συνέχεια για να παρασκευάσουμε το ζωμό μέσης συγκέντρωσης (half-concentrated FRASER broth) προσθέταμε 1 φιαλίδιο που περιείχε 1ml ammonium iron citrate και 1 φιαλίδιο selective FRASER supplement (Cat. No. 1.10399) διαλυμένα σε 1 ml απεσταγμένου νερού το καθένα



από αυτά. Ακολουθούσε ανάμιξη γινόταν ομογενοποίηση με το αρχικό διάλυμα FRASER Broth, αφού πρώτα αυτό τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο μέχρι η θερμοκρασία του να πέσει στους 50°C. Το Fraser broth, παρασκευαζόταν όπως και το half-Fraser broth, με τη διαφορά ότι στο διάλυμα γινόταν προσθήκη ενός δεύτερου φιαλιδίου με selective supplement.

Peptone Water BPW (Cat. No. 1.07228, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, German

Ο ζωμός αυτός, χρησιμοποιήθηκε ως μη εκλεκτικός, προεμπλουτιστικός ζωμός για την ανίχνευση των παθογόνων εντεροβακτηριοειδών και είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Διάφορες πεπτόνες 10,0

sodium chloride 5,0

Di-sodium hydrogen phosphate 9,0

Potassium dihydrogen phosphate 1,5

Το pH του ζωμού ήταν  $7,2 \pm 0,2$  στους 25°C. Για την παρασκευή του αναμιγνύονταν 25,5 g έτοιμης σκόνης σε 1 L αποσταγμένου νερού, ακολουθούσε θέρμανση υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διαλύσεως και αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά.

Tryptic Soy Broth TSB (N51019, BioMerieux, Marcy – l'Etoile, France))

Ο ζωμός αυτός, χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του βακτηριακού εναιωρήματος που χρησιμοποιούνται στο τεστ ευαισθησίας και είχε την παρακάτω σύσταση (σε g/L):

Πεπτόνη από καζεΐνη 17,0

Πεπτόνη από σόγια 3,0

D+ Γλυκόζη 2,5

Χλωριούχο νάτριο 5,0

Όξινο φωσφορικό κάλιο 2,5



Το pH του ζωμού ήταν  $7,3 \pm 0,2$  στους  $25^{\circ}\text{C}$ . Για την παρασκευή του αναμιγνύονταν 30 g έτοιμης σκόνης σε 1 L αποσταγμένου νερού, ακολουθούσε θέρμανση υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διαλύσεως και αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους  $121^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά.

### 3.2.2.2 Στερεά υποστρώματα

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω στερεά υποστρώματα τα οποία έχουν περιγραφεί προηγουμένως

Plate Count Agar (PCA) (Cat. No. 1.05463, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

D-Coccosel (Bile Esculin Agar Selective isolation of enterococci) (BioMerieux, Marcy – l'Etoile, France)

Pseudomonas Selective Agar Base. Cetrimide Agar (Cat. No. 1.05284, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

CHAPMAN Agar Staphylococcus Selective Agar (Cat. No. 1.05469, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

m-FC Agar (Cat. No. 1.11278, rck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

m-ENDO Agar LES (Cat. No 11.11277, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

T.C.B.S άγαρ. Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose άγαρ (θειοθειικό, κιτρικά, άλατα χολής, σουκρόζη) (Cat. No.1.20263, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

Oxford Listeria Selective Agar Base (Cat. No. 1.07004, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

Oxford Listeria Selective Supplement (Cat. No. 1.07006, Merck KGaA, 64271, Darmstadt, Germany)

Mueller Hinton Agar (51075, BioMerieux, Marcy – l Etoile, France)



### 3.3. Ελεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά

#### 3.3.1. Μέθοδος

Για τον έλεγχο της ευαισθησίας και αντοχής των μικροβίων στα αντιβιοτικά, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διαχύσεως σε άγαρ από δισκία χαρτιού εμποτισμένα με αντιβιοτικά (Kirby-Bauer1996, Αρσένη 1994, Λεβειδιώτου 2004, Quinn, 1994, Varnam, 1996)

##### α. Παρασκευή του μικροβιακού εναιωρήματος-ενοφθαλμίσματος

Από καθαρό καλλιέργημα του υπό εξέταση βακτηρίου σε άγαρ λαμβάνονταν μία η δύο αποικίες και εναιωρούνταν σε 10 ml ισότονου διαλύματος NaCl. Το εναιώρημα αυτό είχε την ίδια θολρότητα με τη θολρότητα 0,5 της θολομετρικής κλίμακας Mc Farland.

##### β. Παρασκευή των τρυβλίων

Το στερεό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το άγαρ Muller-Hinton (MH) σε τριβλίο. Το pH του θρεπτικού υλικού ρυθμιζόταν ώστε να είναι 7,2-7,4, επειδή αυτό παίζει σημαντικό ρόλο στη διάχυση του αντιβιοτικού, το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών, αλλά και σε αυτή καθαυτή τη δράση των αντιβιοτικών (λ.χ. το ναλιδιξικό οξύ είναι πιο δραστικό σε όξινο pH, ενώ οι αμινογλυκοσίδες σε αλκαλικό).

Κατά την παρασκευή των τρυβλίων με MH άγαρ καταβάλλονταν κάθε προσπάθεια ώστε η επιφάνεια τους να είναι ομοιόμορφη και το πάχος του υλικού να είναι περίπου 4 mm. Για τρυβλία εσωτερικής διαμέτρου 9 cm απαιτούνται 25 ml υλικού και για τρυβλία εσωτερικής διαμέτρου 14 cm απαιτούνται 60 ml. Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν κυρίως τα τριβλία διαμέτρου 14cm. Το πάχος του άγαρ στα τρυβλία είναι καθοριστικός παράγοντας για την διαμόρφωση της ζώνης αναστολής, διότι η διάχυση του αντιβιοτικού γίνεται σε 3 διευθύνσεις, εκτός αν το πάχος του υλικού είναι πολύ μικρό οπότε πολύ γρήγορα γίνεται σε 2 διευθύνσεις, με αποτέλεσμα να διαμορφώνεται τελικά ζώνη αναστολής με



μεγαλύτερη διάμετρο. Αντίθετα όταν το πάχος του θρεπτικού υλικού είναι μεγαλύτερο από 4 mm γίνεται μεγαλύτερη διάχυση του αντιβιοτικού προς το βάθος, με αποτέλεσμα μικρότερες ζώνες αναστολής.

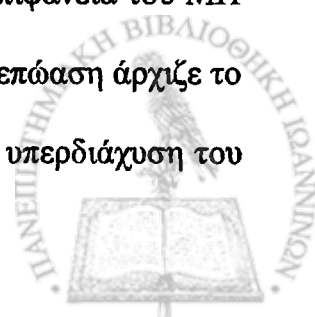
Επίσης ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε ώστε ο πυθμένας των τρυβλίων να είναι τελείως επίπεδος και γιαυτό τα τελευταία να τοποθετούνταν κατά την παρασκευή σε οριζόντια επιφάνεια, ώστε να εξασφαλίζεται το επίπεδο της επιφάνειάς τους. Τα τρυβλία αφήνονταν να στεγνώσουν στους 37°C με ανοικτό το σκέπασμα για 10-30 λεπτά και στην συνέχεια φυλάσσονταν στο ψυγείο (4 °C) μέχρι 7 ημέρες. Πριν τα τη χρήση τα τρυβλία στεγνώνονταν στον κλίβανο, ώστε να μην έχουν σταγονίδια υγρασίας στο θρεπτικό υλικό ή στο σκέπασμα του τρυβλίου.

#### γ. Επίστρωση

Βαμβακοφόρος στυλεός βυθιζόταν στο προπαρασκευασθέν ως παραπάνω μικροβιακό εναιώρημα και αφού το βύσμα αποστραγγιζόταν πιέζοντάς το κατ' επανάληψη στα τοιχώματα του σωληναρίου, επιστρωνόταν σε όλη την επιφάνεια του τριβλίου κατά τρεις διευθύνσεις.

#### δ. Τοποθέτηση δισκίων

Οι δίσκοι των αντιβιοτικών τοποθετούνταν με αποστειρωμένη λαβίδα μετά την παρέλευση 5 έως 15 λεπτών από τον ενοφθαλμισμό, ώστε να απορροφηθεί η υγρασία. Επίσης δίνονταν ιδιαίτερη προσοχή ώστε οι δίσκοι να τοποθετούνται σε απόσταση όχι μικρότερη από 24 mm μεταξύ τους (από κέντρο σε κέντρο των δίσκων), ώστε να μην επικαλύπτονται οι ζώνες αναστολής. Επίσης οι δίσκοι τοποθετούνταν πάντα σε απόσταση μεγαλύτερη από 10-15 mm από το τοίχωμα του τρυβλίου. Στη συνέχεια οι δίσκοι πιέζονταν ελαφρά με τη λαβίδα, ώστε να εξασφαλισθεί απόλυτη επαφή τους με την επιφάνεια του ΜΗ άγαρ και ακολούθως το τριβλίο επωαζόταν στους 35° C για 18-24 ώρες. Η επώαση άρχιζε το αργότερο 15 λεπτά μετά την τοποθέτηση των δίσκων για να αποφευχθεί η υπερδιάχυση του



αντιβιοτικού και σε αερόβια ατμόσφαιρα (χωρίς CO<sub>2</sub>). Το τελευταίο έχει μεγάλη σημασία, καθόσον οι ερμηνευτικοί πίνακες έχουν συνταχθεί με βάση την αερόβια επώαση. Το CO<sub>2</sub> μπορεί ν' αλλάξει το pH της επιφάνειας του θρεπτικού υλικού και να επηρεασθεί η δραστηριότητα μερικών αντιμικροβιακών φαρμάκων.

#### ε. Ανάγνωση

Μετά την λήξη της επώασης γινόταν μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής ανάπτυξης γύρω από το κάθε δισκίο με την πιο δυνατή ακρίβεια. Από την διάμετρο της ζώνης καθοριζόνταν ο χαρακτηρισμός του βακτηρίου ως ευαίσθητο, μέτρια ευαίσθητο και ανθεκτικό, βάσει των πινάκων, που προτείνονται από την NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) των Η.Π.Α .

Οι αντιβιοτικές ουσίες επιλέχθηκαν με βάση τις διεθνώς αποδεκτές οδηγίες της National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2001) ως ακολούθως :

A) Penicillin G (P, 10 UT) Erythromycin (E, 15 µg), Ciprofloxacin (CIP, 5 µg), Teicoplanin (TEC 30 µg), Vancomycin (VA 30 µg), Gentamicin (GN 10 µg) και Oxacillin (OX 1µg) για τα στελέχη *S. aureus*.

B) Ampicillin (AMP 10µg) Ciprofloxacin, Teicoplanin, Erythromycin και Vancomycin για τα στελέχη εντεροκόκκων.

Γ) Ampicillin, Amikacin (AK 30µg), Gentamicin, Cefuroxime (CMX 30µg), Cefazidime (KZ 30µg) και Ciprofloxacin για τα είδη των εντεροβακτηριοειδών.

Δ) Amikacin, Gentamicin, Cefazidime και Ciprofloxacin για τις ψευδομονάδες.

Τα τρυβλία επωάζονταν για 18-24 ώρες στους 37° C και η ανάγνωση του αποτελέσματος γινόταν με τη μέτρηση των ζωνών αναστολής. Τα στελέχη χαρακτηρίζονταν ως ευαίσθητα, μέτρια ευαίσθητα ή ανθεκτικά σύμφωνα με αυτά που προτείνονται από την NCCLS 2001.



## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην διάρκεια της μελέτης απομονώθηκαν συνολικά 756 στελέχη βακτηρίων από 1580 δείγματα νερών και ψαριών. Όλα τα δείγματα προέρχονταν από διάφορες περιοχές της ΒΔ Ελλάδας.

### 4.1. Είδη μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα δείγματα υδάτων

Από τα 240 δείγματα πόσιμων υδάτων από διάφορες περιοχές της Ηπείρου, απομονώθηκαν συνολικά 30 στελέχη βακτηρίων. Αναλυτικότερα, απομονώθηκαν 14 στελέχη *E. coli*, 8 στελέχη *Pseudomonas fluorescens*, 4 στελέχη *Enterobacter cloacae* και 4 στελέχη *Pseudomonas putida*.

Από τα 50 δείγματα επιφανειακών υδάτων, τα οποία συλλέχθηκαν από τις λίμνες Ζιρού και Παμβώτιδα απομονώθηκαν συνολικά 32 στελέχη βακτηρίων. Αναλυτικότερα απομονώθηκαν 12 στελέχη *E. faecalis*, 6 στελέχη *S. aureus*, 4 στελέχη *Enterococcus faecium*, 3 στελέχη *E. cloacae*, 2 στελέχη *E. coli*, 2 στελέχη *P. putida*, 2 στελέχη *P. fluorescens* και 1 στέλεχος *P. aeruginosa*.

Από τα 400 δείγματα επιφανειακών υδάτων, που προέρχονταν από ποταμούς απομονώθηκαν συνολικά 220 στελέχη βακτηρίων. Αναλυτικότερα, απομονώθηκαν 42 στελέχη *S. aureus*, 33 στελέχη *E. faecalis*, 24 στελέχη *P. luteola*, 18 στελέχη *E. coli*, 16 στελέχη *P. aeruginosa*, 11 στελέχη *E. faecium*, 10 στελέχη *P. ceracia*, 3 στελέχη *Pantoea* spp, 9 στελέχη *E. cloacae*, 3 στελέχη *Citrobacter freundii*, 6 στελέχη *Citrobacter youg*, 10 στελέχη *Plesiomonas shigelloides*, 9 στελέχη *P. putida*, 9 στελέχη *P. fluorescens*, 1 στέλεχος *Aeromonas sobria*, 3 στελέχη *Enterobacter amnigenus*, 2 στελέχη *Salmonella arizonae*, 2



στελέχη *Hafnia alvei*, 1 στέλεχος *Klebsiella pneumoniae*, 2 στελέχη *Klebsiella oxytoca*, 2 στελέχη *Klebsiella ornithinolytica* και 4 στελέχη *A. hydrophila*.

Από 450 δείγματα επιφανειακών θαλασσινών υδάτων, απομονώθηκαν συνολικά 246 βακτηριακά στελέχη. Αναλυτικότερα απομονώθηκαν, 60 στελέχη *S. aureus*, 41 στελέχη *E. coli*, 29 στελέχη *P. fluorescens*, 29 στελέχη *E. faecalis*, 26 στελέχη *E. faecium*, 23 στελέχη *E. cloacae*, 11 στελέχη *P. luteola*, 8 στελέχη *P. aeruginosa*, 4 στελέχη *Plesiomonas shigelloides*, 4 στελέχη *A. sobria*, 2 στελέχη *Pantoea* spp, 2 στελέχη *Sihgella* spp, 5 στελέχη *P. ceracia* και 2 στελέχη *K. oxytoca* (Πίνακας 1α, Γράφημα 1, 2, 3, 4, 7, 8).

## 4.2. Είδη μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα δείγματα ψαριών

Από τα 230 δείγματα ιχθύων ελευθέρης αλιείας απομονώθηκαν συνολικά 98 στελέχη βακτηρίων. Αναλυτικότερα απομονώθηκαν 17 στελέχη *E. cloacae*, 15 στελέχη *E. coli*, 15 στελέχη *E. faecalis*, 15 στελέχη *S. aureus*, 11 στελέχη *P. fluorescens*, 7 στελέχη *E. faecium*, 6 στελέχη *P. aeruginosa*, 5 στελέχη *P. luteola*, 4 στελέχη *P. ceracia*, και 3 στελέχη *Plesiomonas shigelloides*.

Από τα 210 δείγματα ιχθύων που συλλέχθηκαν από ιχθυοκαλλιέργειες απομονώθηκαν συνολικά 130 στελέχη βακτηρίων. Αναλυτικότερα, απομονώθηκαν 24 στελέχη *S. aureus*, 17 στελέχη *E. faecalis*, 14 στελέχη *E. coli*, 13 στελέχη *P. luteola*, 11 στελέχη *P. aeruginosa*, 10 στελέχη *P. ceracia*, 8 στελέχη *E. cloacae*, 7 στελέχη *E. faecium*, 6 στελέχη *Plesiomonas shigelloides*, 3 στελέχη *C. freundii*, 3 στελέχη *C. youngae*, 6 στελέχη *P. putida*, 3 στελέχη *A. hydrophila*, 2 στελέχη *A. sobria*, και 3 στελέχη *P. fluorescens* (Πίνακας 1α, Γραφήματα 5, 6, 7, 8).



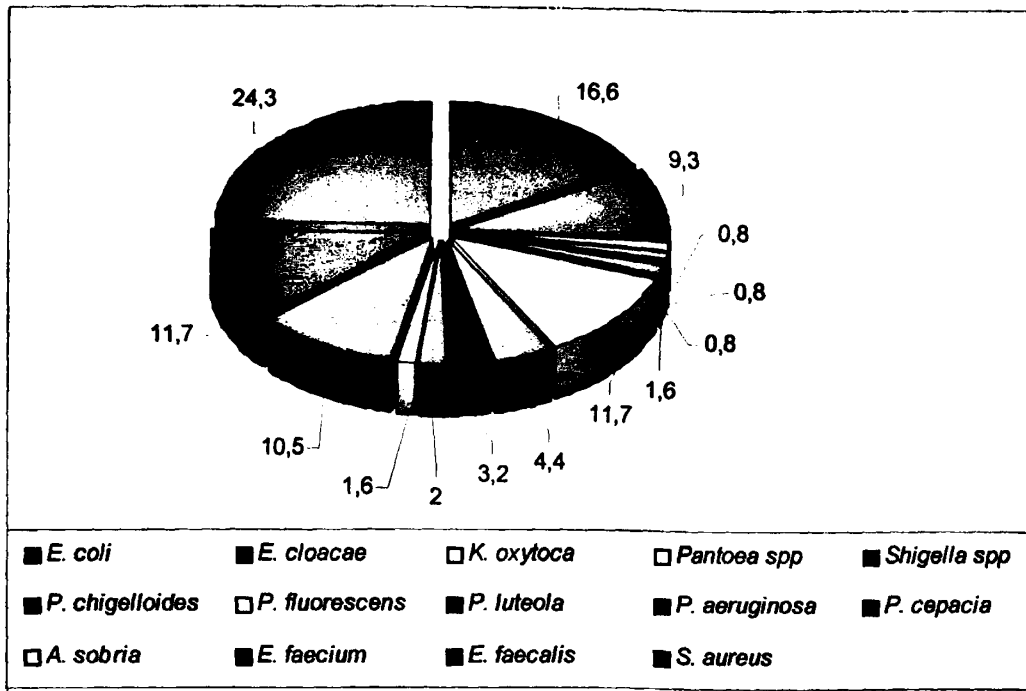


**Πίνακας 1α.** Αναλυτικός πίνακας του αριθμού και του είδους των βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν ανά κατηγορία δειγμάτων (N= αριθμός απομονωθέντων στελεχών του είδους).

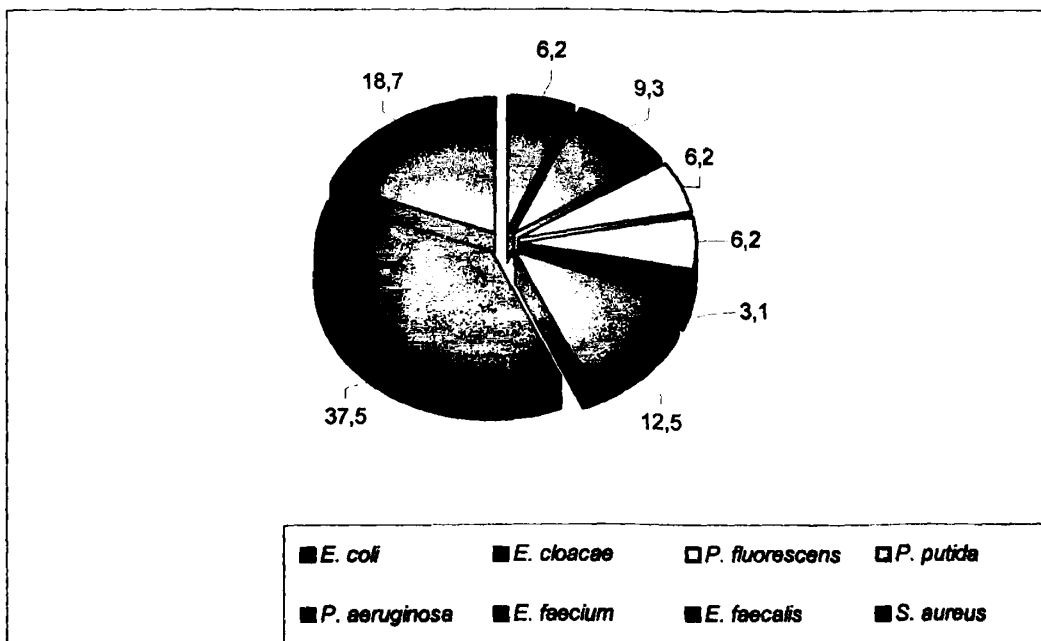
ΣΤΕΛΕΧΗ	Εξετασθέντα δείγματα											
	Ψάρια Ελεύθερης Αλιείας		Ψάρια Ιχθυοκαλ- λιεργειών		Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
<i>E. coli</i>	15	15,3	14	10,7	41	16,6	2	6,2	18	8,1	14	46,6
<i>E. Cloacae</i>	17	17,3	8	6,1	23	9,3	3	9,3	9	4,0	4	13,3
<i>E. amnigenus</i>									3	1,3		
<i>K. ornitholitica</i>									2	0,9		
<i>K. pneumoniae</i>									1	0,4		
<i>K. oxytoca</i>					2	0,8			2	0,9		
<i>Pantoea spp</i>					2	0,8			3	1,3		
<i>S. arizonae</i>									2	0,9		
<i>Sigella spp</i>					2	0,8						
<i>C. freundii</i>			3	2,3					3	1,3		
<i>C. youngae</i>			3	2,3					6	2,7		
<i>H. alvei</i>									2	0,9		
<i>P. chigelloides</i>	3	3,0	6	4,6	4	1,6			10	4,5		
<i>P. fluorescens</i>	11	11,2	3	2,3	29	11,7	2	6,2	9	4,0	8	26,6
<i>P. putida</i>			6	4,6			2	6,2	9	4,0	4	13,3
<i>P. luteola</i>	5	5,1	13	10,0	11	4,4			24	10,9		
<i>P. aeruginosa</i>	6	6,1	11	8,4	8	3,2	1	3,1	16	7,2		
<i>P. cepacia</i>	4	4,0	10	7,6	5	2,0			10	4,5		
<i>A. sobria</i>			2	1,5	4	1,6			1	0,4		
<i>A. hydrofila</i>			3	2,3					4	1,8		
<i>E. francium</i>	7	7,1	7	5,3	26	10,5	4	12,5	11	5,0		
<i>E. faecalis</i>	15	15,3	17	13,0	29	11,7	12	37,5	33	15,0		
<i>S. aureus</i>	15	15,3	24	18,4	60	24,3	6	18,7	42	19,0		
Σύνολο	98		130		246		32		220		30	



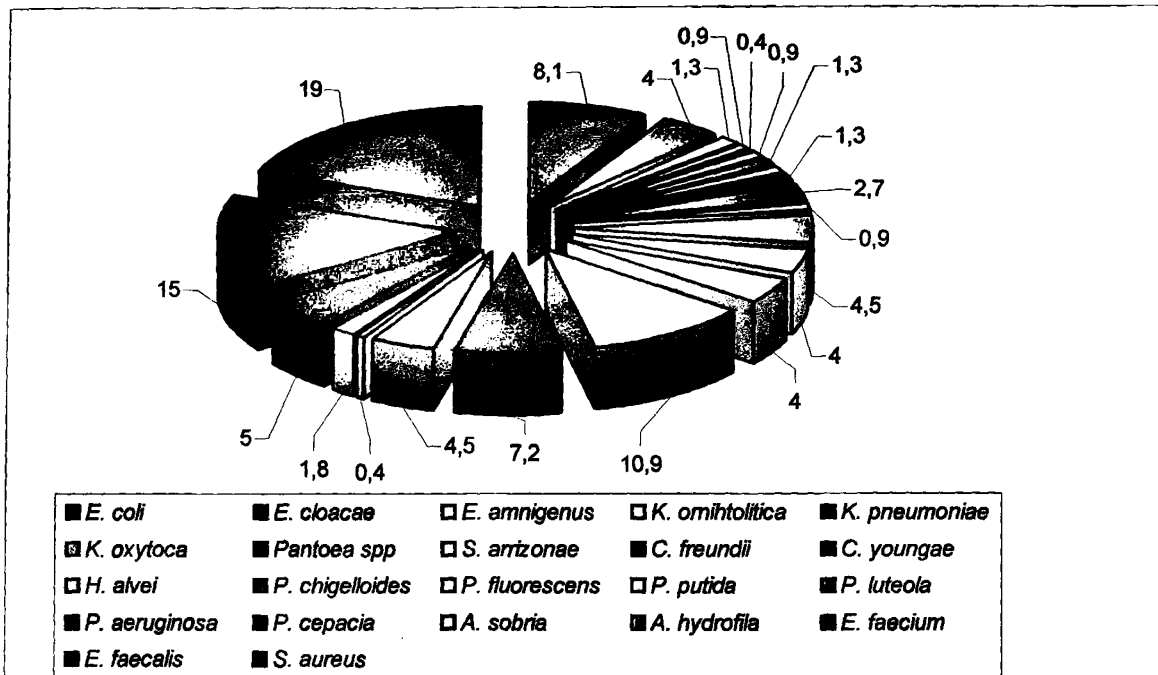
**Γράφημα 1.** Απεικόνιση ποσοστού βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν σε δείγματα θαλασσινού νερού.



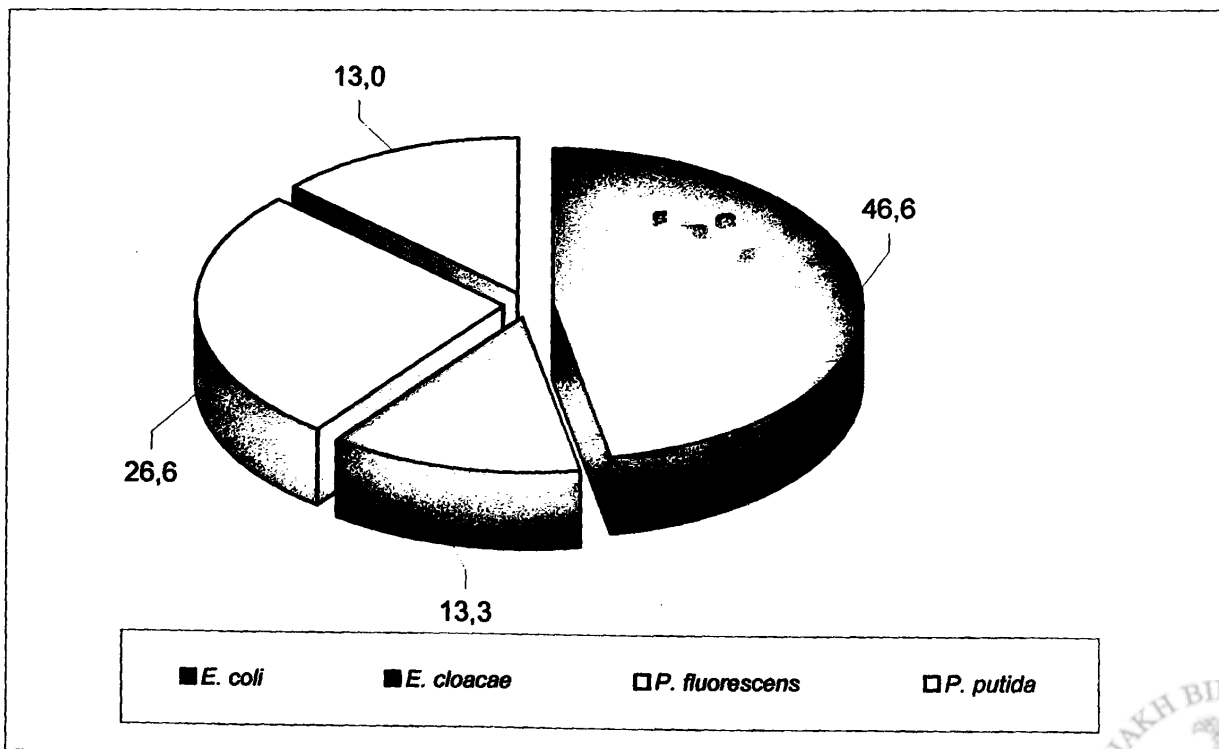
**Γράφημα 2.** Απεικόνιση ποσοστού βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν σε δείγματα νερού λίμνης.



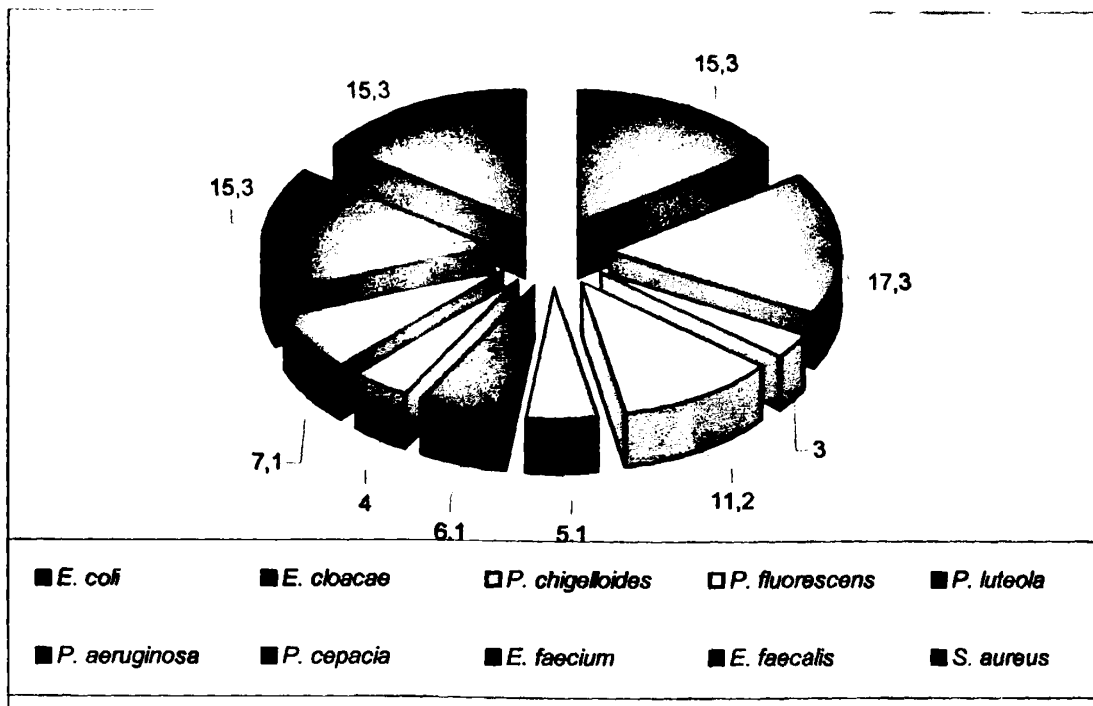
**Γράφημα 3.** Απεικόνιση ποσοστού βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν σε δείγματα νερού ποταμών.



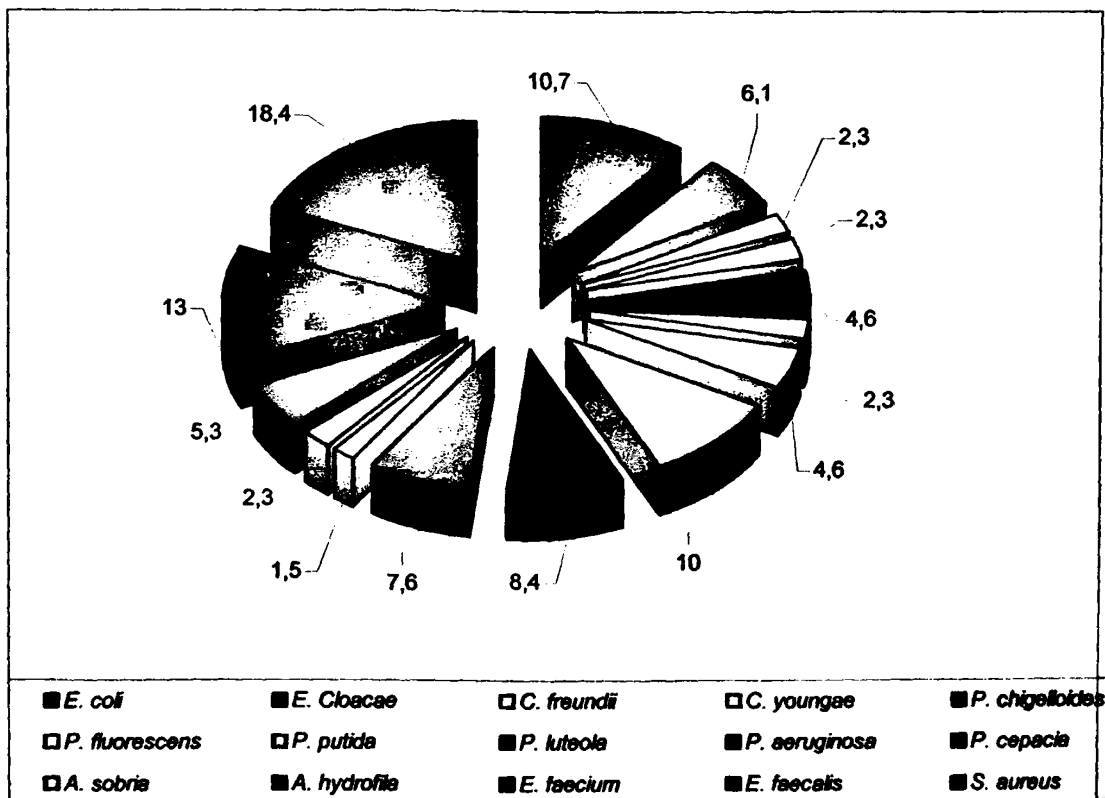
**Γράφημα 4.** Απεικόνιση ποσοστού βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν σε δείγματα πόσιμων νερών.



**Γράφημα 5.** Απεικόνιση ποσοστού βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν σε δείγματα ψαριών ελεύθερης αλιείας.



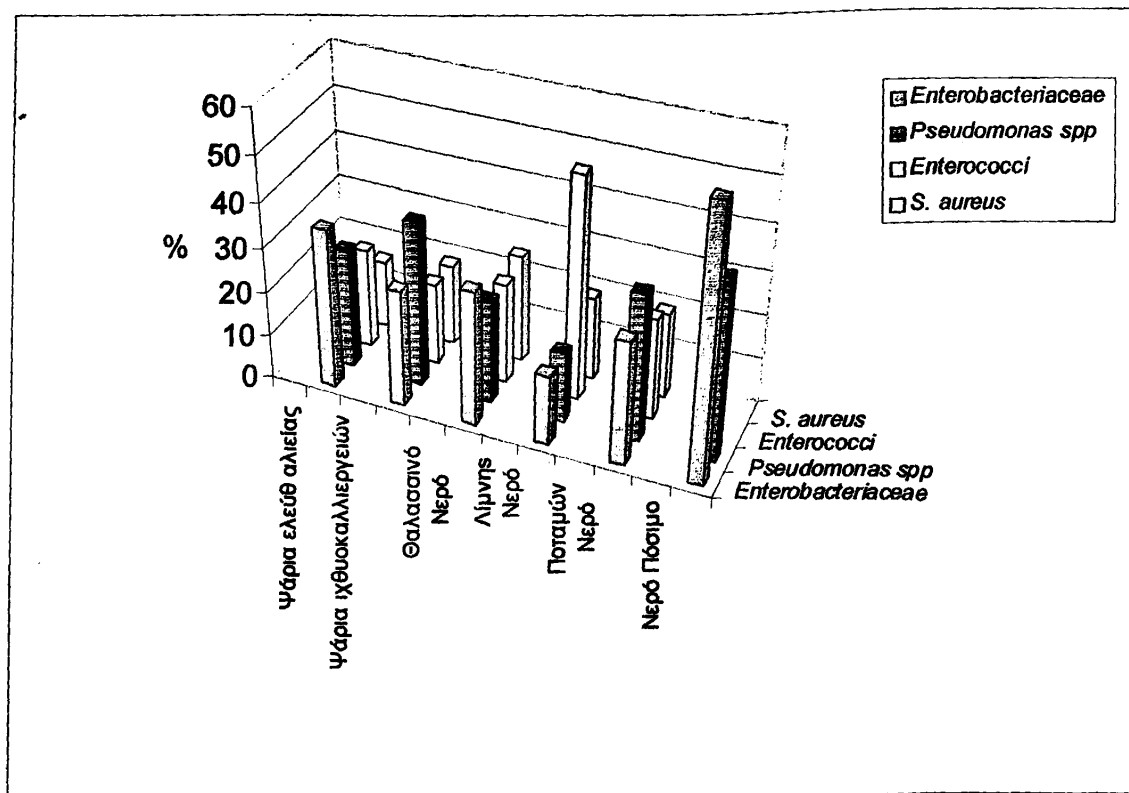
**Γράφημα 6.** Απεικόνιση ποσοστού βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν σε δείγματα ψαριών ιχθυοκαλλιεργειών.



**Πίνακας 1β.** Συνοπτικός πίνακας του αριθμού και του είδους των βακτηριακών στελεχών, που απομονώθηκαν ανά κατηγορία δειγμάτων (N= αριθμός απομονωθέντων στελεχών του είδους).

ΣΤΕΛΕΧΗ	Ψάρια Ελεύθερης Αλιείας		Ψάρια Ιχθυοκαλ- λιεργειών		Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
<i>Enterobacteriaceae</i>	35	35,7	34	26,1	74	30,0	5	15,6	61	27,7	18	60,0
<i>Pseudomonas spp</i>	26	26,5	48	36,9	57	23,1	5	15,6	73	33,1	12	40,0
<i>Enterococci</i>	22	22,4	24	18,4	55	22,3	16	50,0	44	22,7		
<i>S. aureus</i>	15	15,3	24	18,4	60	24,3	6	18,7	42	19,0		
Σύνολο	98		130		246		32		220		30	

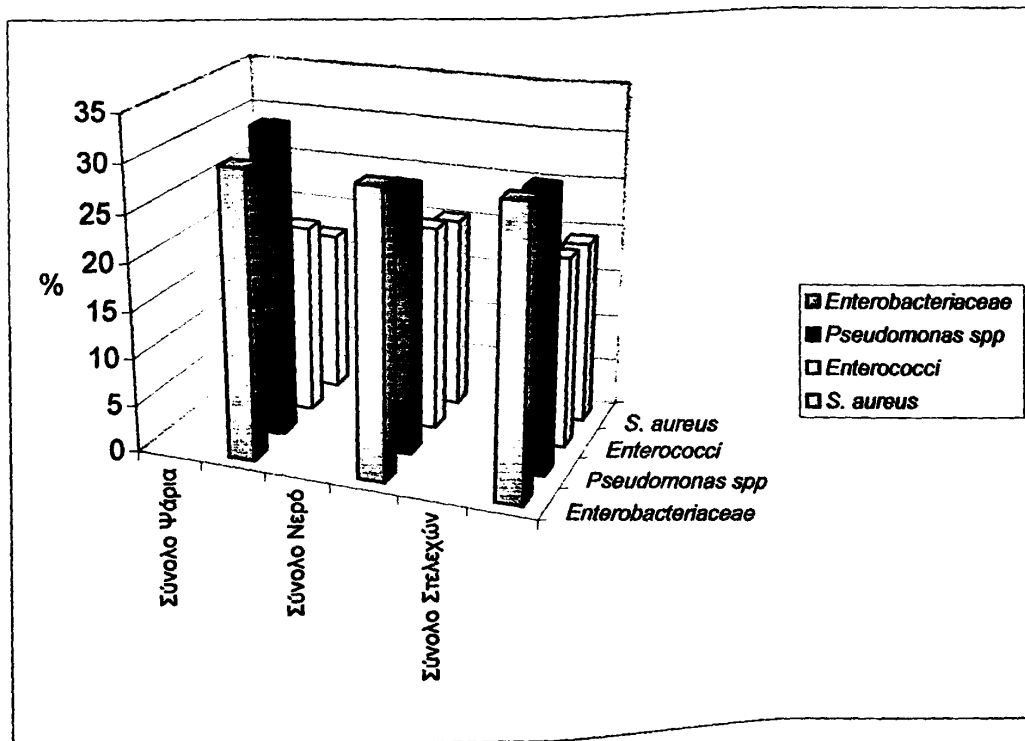
**Γράφημα 7.** Απεικόνιση ποσοστού βακτηριακών στελεχών, που απομονώθηκαν σε κάθε κατηγορία δειγμάτων



**Πίνακας 1γ.** Συνοπτικός πίνακας του αριθμού και του είδους των βακτηριακών στελεχών, που απομονώθηκαν από τα ψάρια και τα νερά (N= αριθμός απομονωθέντων στελεχών του είδους).

ΣΤΕΛΕΧΗ	Σύνολο Ψάρια		Σύνολο Νερό		Σύνολο Στελεχών	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
<i>Enterobacteriaceae</i>	69	30,2	158	29,9	227	30,0
<i>Pseudomonas spp</i>	74	32,4	147	27,8	221	29,2
<i>Enterococci</i>	46	20,1	115	21,7	161	20,2
<i>S. aureus</i>	39	17,1	108	20,4	147	19,4
Σύνολο	228		528		756	

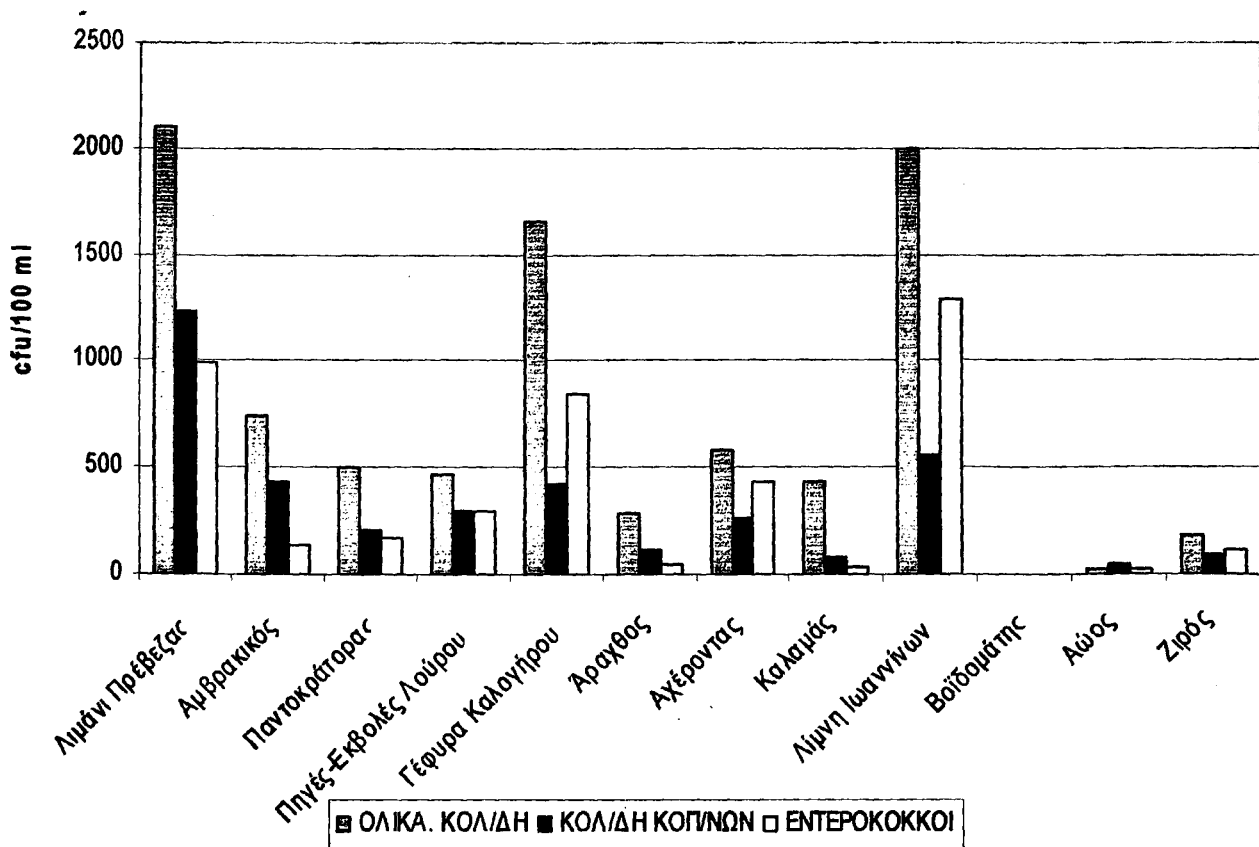
**Γράφημα 8.** Απεικόνιση ποσοστού απομόνωσης βακτηριακών στελεχών, σε νερά, ψάρια, και στο συνολικό αριθμό βακτηριακών στελεχών



**Πίνακας 1δ.** Βαθμός μικροβιολογικής ρύπανσης στα δείγματα νερού. \*cfu/ml= αποικίες ανά όγκο δείγματος. (Colony Forming Units ).

ΣΤΑΘΜΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΟΛΙΚΑ. ΚΟΛ/ΔΗ cfu/100ml	ΚΟΛ/ΔΗ ΚΟΠ/ΝΩΝ cfu/100ml	ΕΝΤΕΡΟ- ΚΟΚΚΟΙ cfu/100ml	ΟΜΧ 37°C cfu/1ml	ΟΜΧ 22°C cfu/1ml	PS cfu/250ml
Λιμάνι Πρέβεζας	2100	1230	990	1300	448	2000
Αμβρακικός	740	432	139	1500	110	1030
Παντοκράτορας	500	200	170	220	135	20
Πηγές-Εκβολές Λούρου	465	300	301	20	383	30
Γέφυρα Καλογήρου	1650	420	850	1200	309	800
Άραχθος	280	110	50	20	135	65
Αχέροντας	580	260	435	80	109	70
Καλαμάς	429	84	36	74	101	69
Λίμνη Ιωαννίνων	2000	562	1295	900	305	800
Βοϊδομάτης	0	5	1	5	35	1
Αώος	20	40	20	10	69	4
Ζιρός	185	90	109	36	100	19

**9α.** Απεικόνιση του βαθμού μικροβιολογικής ρύπανσης στα δείγματα νερού.

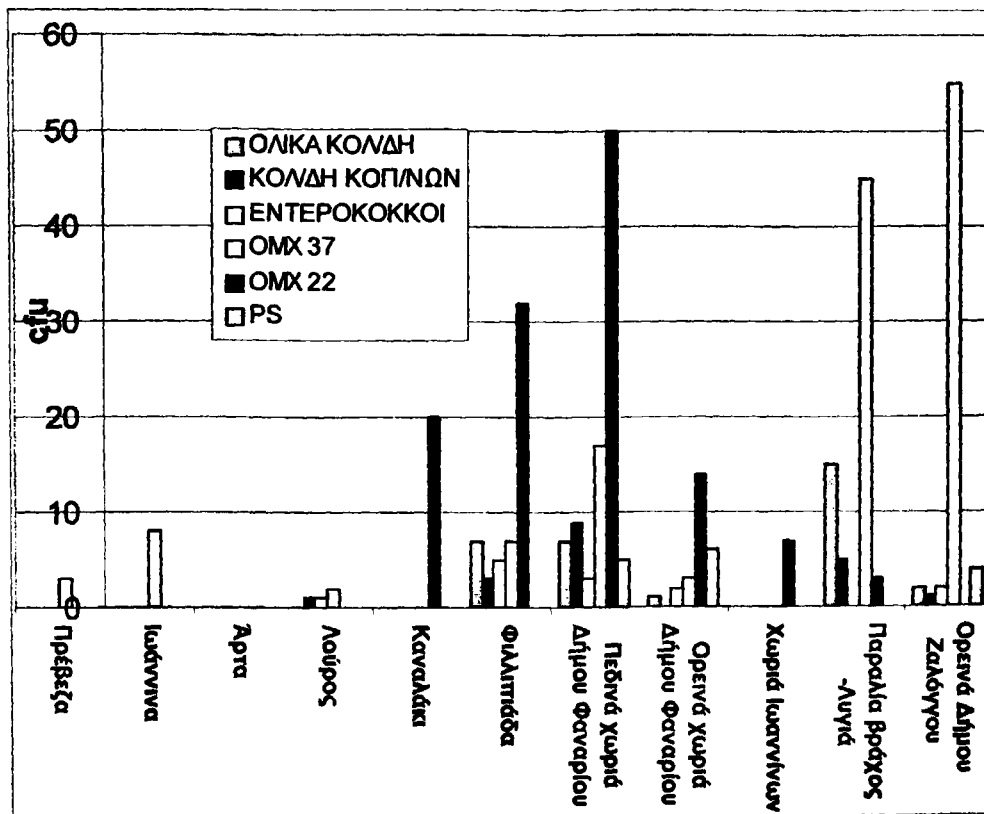


\*Οριακές τιμές οδηγίας 76/160/ΕΟΚ (Επιθυμητή-Επιτρεπτή): fecal Coliform:  $10^2$ - $2 \times 10^3$  Total Coliform:  $5 \times 10^2$ - $10^4$  enterococci:



**Πίνακας 1ε.** Μικροβιολογική ποιότητα πόσιμου νερού.

ΣΤΑΘΜΟΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΟΛΙΚΑ ΚΟΛ/ΔΗ cfu/100ml	ΚΟΛ/ΔΗ ΚΟΠ/ΩΝ cfu/100ml	ΕΝΤΕΡΟ- ΚΟΚΚΟΙ cfu/100ml	ΟΜΧ 37°C cfu/1ml	ΟΜΧ 22°C cfu/1ml	PS cfu/250ml
Πρέβεζα	0	0	0	3	0	0
Ιωάννινα	0	0	0	8	0	0
Άρτα	0	0	0	0	0	0
Λούρος	0	1	1	2	0	0
Καναλάκι	0	0	0	0	20	0
Φιλιπιάδα	7	3	5	7	32	0
Πεδινά χωριά Δήμου Φαναρίου	7	9	3	17	100	5
Ορεινά χωριά Δήμου Φαναρίου (Αηδονιά)	1	0	2	3	14	6
Χωριά Ιωαννίνων (Τέροβο)	0	0	0	0	7	0
Παραλία βράχος -Λυγιά	15	5	0	45	3	0
Ορεινά Δήμου Ζαλόγγου	2	1	2	55	-	4
Χώρια φιλιπιάδας	4	7	3	20	26	3

**Γράφημα 9β.** Απεικόνιση του βαθμού μικροβιολογικής ποιότητας των πόσιμων υδάτων περιοχών Άρτας Πρέβεζας Ιωαννίνων.

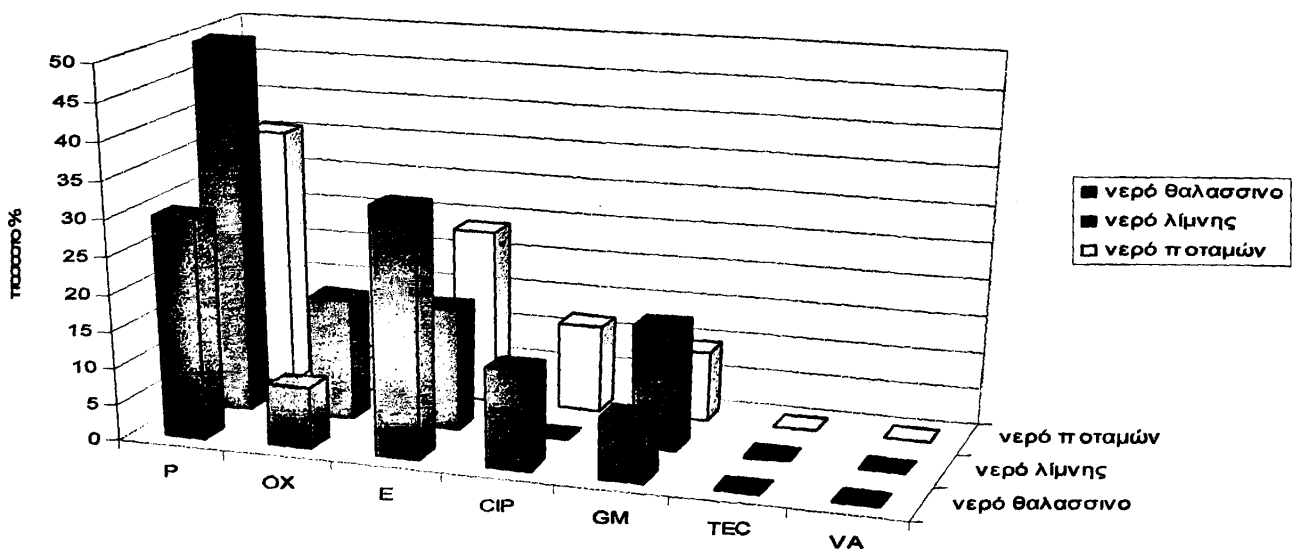


### 4.3. Αποτελέσματα των δοκιμών ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των βακτηριακών στελεχών, που απομονώθηκαν από δείγματα υδάτων

**Πίνακας 2.** Ανθεκτικότητα των 108 στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N = ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *S. aureus* και N<sub>0</sub> = ο συνολικός αριθμός στελεχών *S. aureus*.

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης.		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	0	0.0	N/N <sub>0</sub>	(%)
P	18/60	30,0	3/6	50,0	15/42	35,7	0	0,0	36/108	33,3
OX	5/60	8,3	1/6	16,6	2/42	4,7	0	0,0	8/108	7,4
E	20/60	33,3	1/6	16,6	10/42	23,8	0	0,0	31/108	28,7
CIP	8/60	13,3	0/6	0,0	5/42	11,9	0	0,0	13/108	12,0
GM	5/60	8,3	1/6	16,6	4/42	9,5	0	0,0	10/108	9,2
TEC	0/60	0,0	0/6	0,0	0/42	0,0	0	0,0	0/108	0,0
VA	0/60	0,0	0/6	0,0	0/42	0,0	0	0,0	0/108	0,0

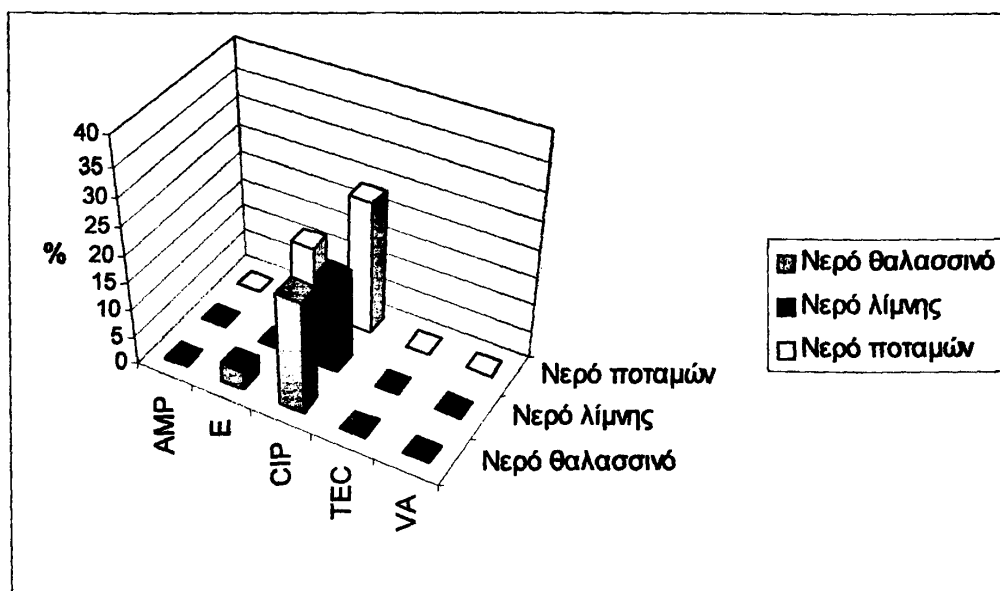
**Γράφημα 10.** Απεικόνιση ανθεκτικότητας των στελεχών *S. aureus* σε δείγματα νερού



**Πίνακας 3.** Ανθεκτικότητα των 74 στελεχών *E. faecalis* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N = ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *E. faecalis* και N<sub>0</sub> = ο συνολικός αριθμός στελεχών *E. faecalis*.

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AMP	0/29	0,0	0/12	0,0	0/33	0,0	0	0,0	0/74	0,0
E	1/29	3,4	0/12	0,0	4/33	12,2	0	0,0	8/74	10,8
CIP	6/29	20,6	2/12	16,6	8/33	24,2	0	0,0	16/74	21,6
TEC	0/29	0,0	0/12	0,0	0/33	0,0	0	0,0	0/74	0,0
VA	0/29	0,0	0/12	0,0	0/33	0,0	0	0,0	0/74	0,0

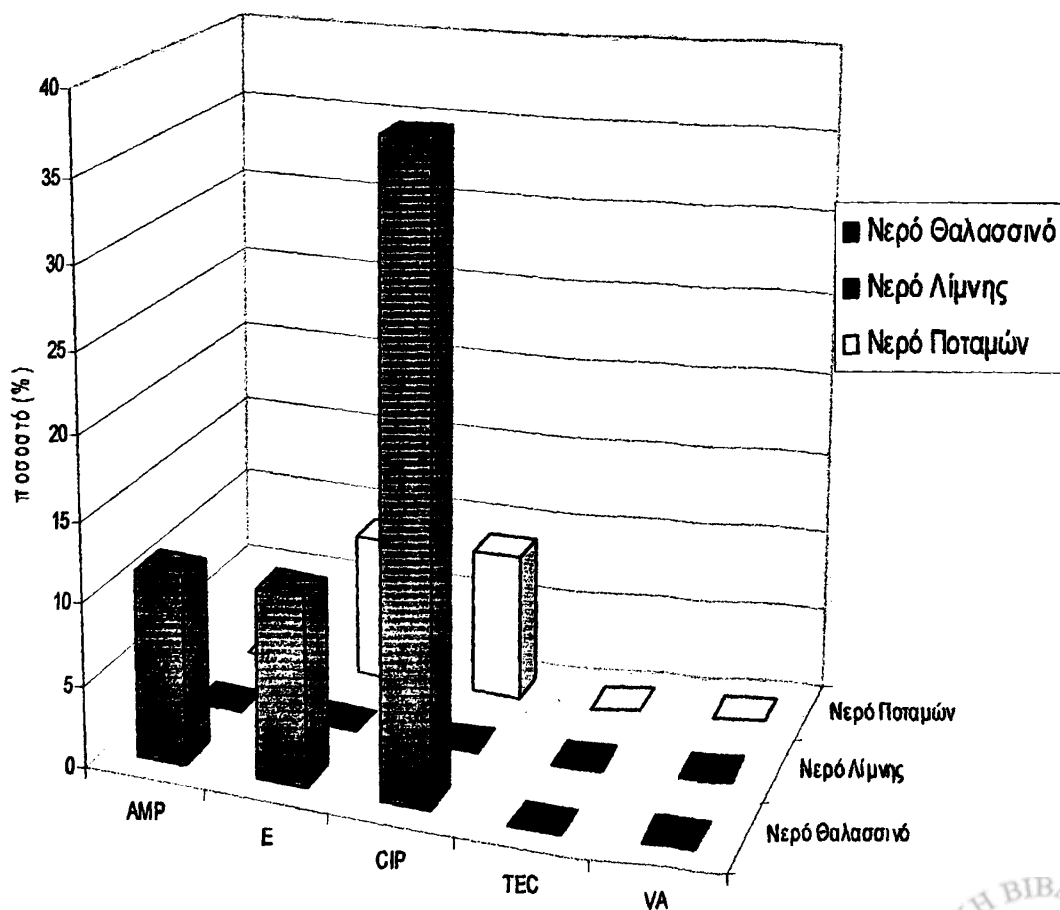
**Γράφημα 11.** Απεικόνιση ανθεκτικότητας των στελεχών *E. faecalis* σε δείγματα νερού



**Πίνακας 4.** Ανθεκτικότητα 41 στελεχών *E. faecium* που απομονώθηκαν απο δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *E. faecium* και No = ο συνολικός αριθμός στελεχών *E. faecium*

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/No	(%)	N/No	(%)	N/No	(%)	N/No	(%)	N/No	(%)
AMP	3/26	11,5	0/4	0,0	0/11	0,0	0	0,0	3/41	7,3
E	3/26	11,5	0/4	0,0	1/11	9,0	0	0,0	4/41	9,7
CIP	10/26	38,4	0/4	0,0	1/11	9,0	0	0,0	11/41	26,8
TEC	0/26	0,0	0/4	0,0	0/11	0,0	0	0,0	0/41	0,0
VA	0/26	0,0	0/4	0,0	0/11	0,0	0	0,0	0/41	0,0

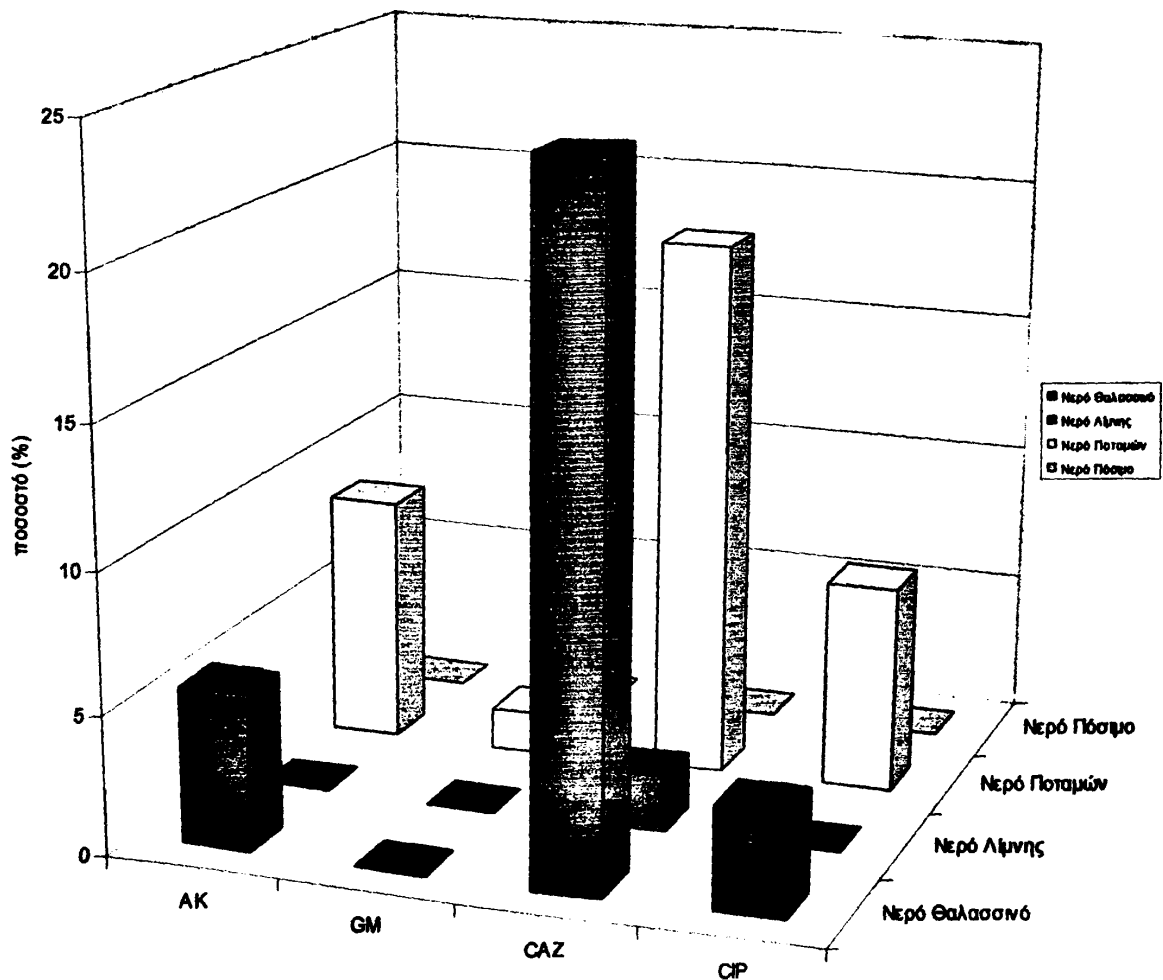
**Γράφημα 12.** Απεικόνιση ανθεκτικότητας των στελεχών *E. faecium* σε δείγματα νερού



**Πίνακας 5.** Ανθεκτικότητα των 138 στελεχών *Pseudomonas* spp. που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *Pseudomonas* spp και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός στελεχών *Pseudomonas* spp.

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	3/53	5,6	0/5	0,0	6/68	8,8	0/12	0,0	9/138	6,5
GM	0/53	0,0	0/5	0,0	1/68	1,5	0/12	0,0	1/138	0,7
CAZ	13/53	24,5	1/5	2,0	13/68	19,1	0/12	0,0	27/138	19,5
CIP	2/53	3,7	0/5	0,0	5/68	7,4	0/12	0,0	7/138	5,7

**Γράφημα 13.** Απεικόνιση ανθεκτικότητας των στελεχών *Pseudomonas* spp σε δείγματα νερού



**Πίνακας 6.** Ανθεκτικότητα των 25 στελεχών *P. aeruginosa* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *P. aeruginosa* και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός στελεχών *P. aeruginosa*.

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	0/8	0,0	0/1	0,0	1/16	6,0	0	0,0	1/25	4,0
GM	0/8	0,0	0/1	0,0	0/16	0,0	0	0,0	0/25	0,0
CAZ	4/8	50,0	0/1	0,0	4/16	25,0	0	0,0	8/25	32,0
CIP	0/8	0,0	0/1	0,0	0/16	0,0	0	0,0	0/25	0,0

**Πίνακας 7.** Ανθεκτικότητα των 48 στελεχών *P. fluorescens* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *P. fluorescens* και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός στελεχών *P. fluorescens*.

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	0/29	0,0	0/2	0,0	0/9	0,0	0/8	0,0	0/48	0,0
GM	0/29	0,0	0/2	0,0	0/9	0,0	0/8	0,0	0/48	0,0
CAZ	5/29	17,2	1/2	50,0	2/9	22,2	0/8	0,0	8/48	16,6
CIP	0/29	0,0	0/2	0,0	0/9	0,0	0/8	0,0	0/48	0,0

**Πίνακας 8.** Ανθεκτικότητα 15 στελεχών *P. pudita* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *P. pudita* και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός στελεχών *P. pudita*.

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	0	0,0	0/2	0	1/9	11,1	0/4	0	1/15	6,6
GM	0	0,0	0/2	0	1/9	11,1	0/4	0	1/15	6,6
CAZ	0	0,0	0/2	0	1/9	11,1	0/4	0	1/15	6,6
CIP	0	0,0	0/2	0	2/9	22,2	0/4	0	2/15	13,3



**Πίνακας 9.** Ανθεκτικότητα των 35 στελεχών *P. luteola* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *P. luteola* και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός στελεχών *P. luteola*.

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	2/11	18,1	0	0,0	3/24	12,5	0	0,0	5/35	14,2
GM	0/11	0,0	0	0,0	0/24	0,0	0	0,0	0/35	0,0
CAZ	0/11	0,0	0	0,0	0/24	0,0	0	0,0	0/35	0,0
CIP	2/11	18,1	0	0,0	3/24	12,5	0	0,0	5/35	14,2

**Πίνακας 10.** Ανθεκτικότητα των 15 στελεχών *P. ceracia* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *P. ceracia* και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός στελεχών *P. ceracia*.

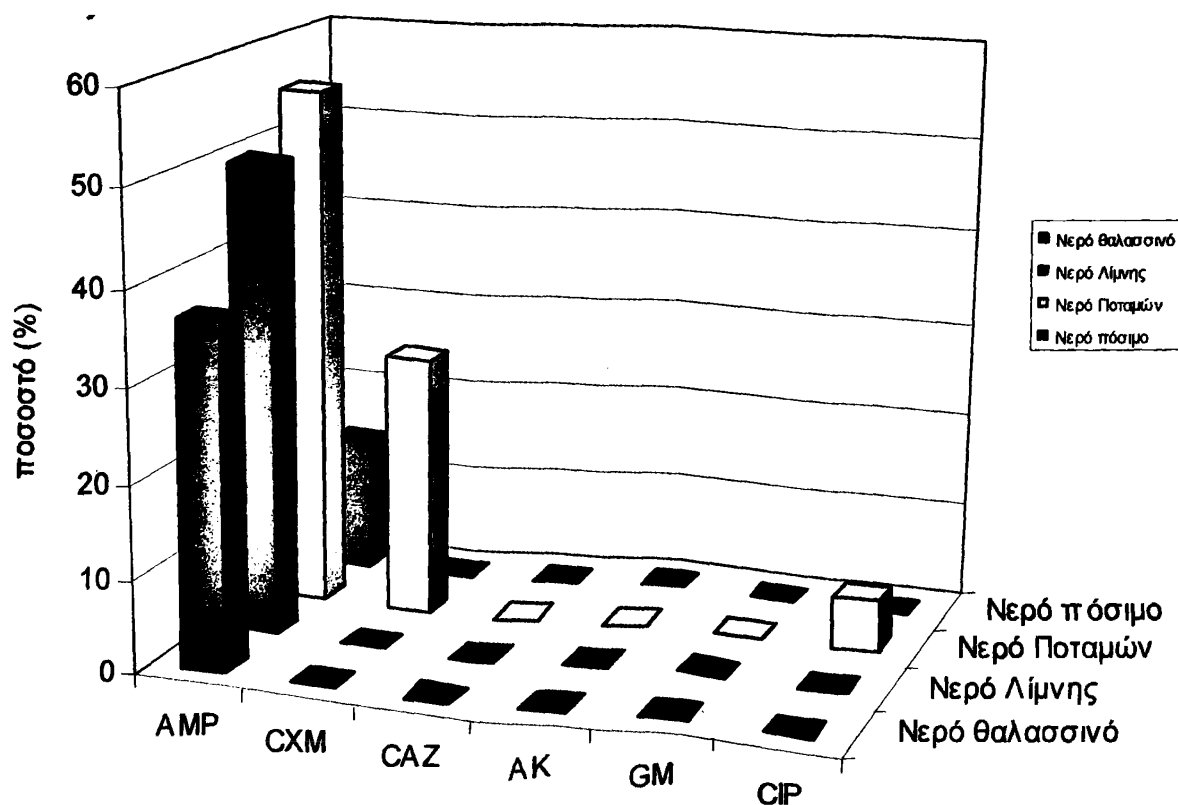
Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	1/5	20,0	0	0,0	1/10	10,0	0	0,0	2/15	13,3
GM	0/5	0,0	0	0,0	0/10	0,0	0	0,0	0/15	0,0
CAZ	4/5	80,0	0	0,0	6/10	60,0	0	0,0	10/15	66,6
CIP	0/5	0,0	0	0,0	0/10	0,0	0	0,0	0/15	0,0



**Πίνακας 11.** Ανθεκτικότητα των 75 στελεχών *E. coli* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *E. coli* και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός στελεχών *E. coli*.

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AMP	15/41	36,5	1/2	50,0	10/18	55,5	2/14	14,2	28/75	37,3
CXM	0/41	0,0	0/2	0,0	5/18	27,7	0/14	0,0	5/75	6,0
CAZ	0/41	0,0	0/2	0,0	0/18	0,0	0/14	0,0	0/75	0,0
AK	0/41	0,0	0/2	0,0	0/18	0,0	0/14	0,0	0/75	0,0
GM	0/41	0,0	0/2	0,0	0/18	0,0	0/14	0,0	0/75	0,0
CIP	0/41	0,0	0/2	0,0	1/18	5,5	0/14	0,0	1/75	1,3

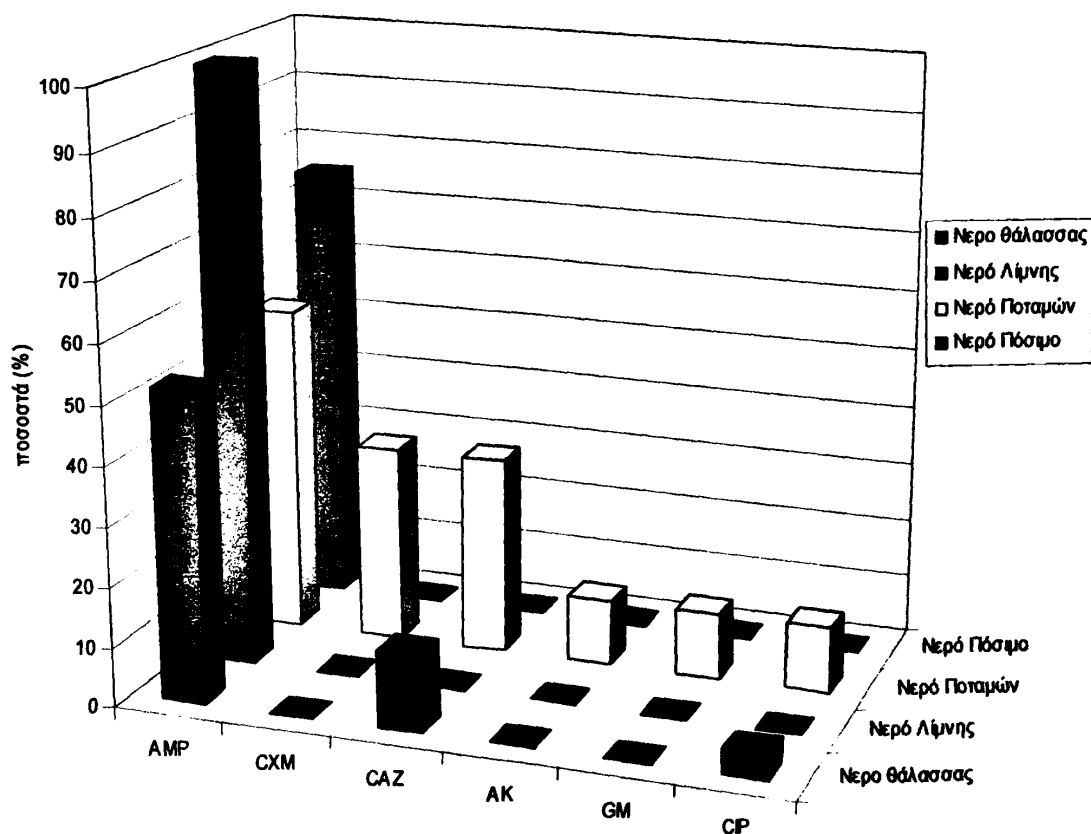
**Γράφημα 14.** Απεικόνιση ανθεκτικότητας των στελεχών *E. coli* σε δείγματα νερού



**Πίνακας 12.** Ανθεκτικότητα των 39 στελεχών *E. cloacae* που απομονώθηκαν απο δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *E. cloacae* και Nο= ο συνολικός αριθμός στελεχών *E. cloacae*.

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό		Νερό Λίμνης		Νερό Ποταμών		Νερό Πόσιμο		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/Nο	(%)	N/Nο	(%)	N/Nο	(%)	N/Nο	(%)	N/Nο	(%)
AMP	12/23	52,1	3/3	100	5/9	55,5	3/4	75	23/39	58,9
CXM	0/23	0,0	0/3	0,0	3/9	33,3	0/4	0,0	3/39	7,6
CAZ	3/23	13,0	0/3	0,0	3/9	33,3	0/4	0,0	7/39	18,0
AK	0/23	0,0	0/3	0,0	1/9	11,1	0/4	0,0	1/39	2,5
GM	0/23	0,0	0/3	0,0	1/9	11,1	0/4	0,0	1/39	2,5
CIP	1/23	4,3	0/3	0,0	1/9	11,1	0/4	0,0	2/39	5,2

**Γράφημα 15.** Απεικόνιση ανθεκτικότητας των στελεχών *E. cloacae* σε δείγματα νερού





**Πίνακας 13.** Ανθεκτικότητα των 9 στελεχών *C. yougae*, *C. freundii* που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *C. yougae*, *C. freundii* και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός στελεχών *C. yougae*, *C. Freundii*.

Αντιβιοτικά	Νερό Ποταμών <i>C. freundii</i>		Νερό Ποταμών <i>C. yougae</i>		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AMP	2/3	66,6	4/6	66,6	5/9	55,5
CXM	1/3	33,3	1/6	16,6	2/9	22,2
CAZ	0/3	0,0	0/6	0,0	0/9	0,0
AK	0/3	0,0	0/6	0,0	0/9	0,0
GM	0/3	0,0	0/6	0,0	0/9	0,0
CIP	0/3	0,0	0/6	0,0	0/9	0,0

**Πίνακας 14.** Ανθεκτικότητα των 7 στελεχών *Klebsiella* spp που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *Klebsiella* spp και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός στελεχών *Klebsiella* spp.

Αντιβιοτικά	Νερό Ποταμών <i>K. ornitholytica</i>		Νερό Ποταμών <i>K. pneumoniae</i>		Νερό Ποταμών <i>K. oxytoca</i>		Νερό Θαλασσινό <i>K. oxytoca</i>		Σύνολο K. ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
CXM	0/2	0,0	0/1	0,0	0/2	0,0	0/2	0,0	0/7	0,0
CAZ	0/2	0,0	0/1	0,0	0/2	0,0	0/2	0,0	0/7	0,0
AK	0/2	0,0	0/1	0,0	0/2	0,0	0/2	0,0	0/7	0,0
GM	0/2	0,0	0/1	0,0	0/2	0,0	0/2	0,0	0/7	0,0
CIP	0/2	0,0	0/1	0,0	0/2	0,0	0/2	0,0	0/7	0,0

**Πίνακας 15.** Ανθεκτικότητα στελεχών *Shigella* spp, *E. amnigenus*, *S. arizonae*, *Hafnia alvei* σε δείγματα νερού, όπου N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό <i>Shigella</i> spp		Νερό Ποταμών <i>E. amnigenus</i>		Νερό Ποταμών <i>S. arizonae</i>		Νερό Ποταμών <i>Hafnia alvei</i>	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AMP	2/2	100,0	3/3	100,0	2/2	0,0	0/2	0,0
CXM	0/2	0,0	0/3	0,0	0/2	0,0	1/2	50,0
CAZ	0/2	0,0	0/3	0,0	0/2	0,0	0/2	0,0
AK	0/2	0,0	1/3	33,3	0/2	0,0	0/2	0,0
GM	0/2	0,0	1/3	33,3	0/2	0,0	0/2	0,0
CIP	0/2	0,0	0/3	0,0	0/2	0,0	0/2	0,0



**Πίνακας 16.** Ανθεκτικότητας 5 στελεχών *Pantoea* spp. που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *Pantoea* spp. και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός στελεχών *Pantoea* spp.

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό <i>Pantoea</i> spp		Νερό Ποταμών <i>Pantoea</i> spp		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
	AMP	2/2	100,0	2/3	66,6	4/5
CXM	0/2	0,0	2/3	66,6	2/5	40,0
CAZ	0/2	0,0	0/3	0,0	0/5	0,0
AK	0/2	0,0	0/3	0,0	0/5	0,0
GM	0/2	0,0	0/3	0,0	0/5	0,0
CIP	0/2	0,0	0/3	0,0	0/5	0,0

**Πίνακας 17.** Ανθεκτικότητα των 14 στελεχών *Plesiomonas shigelloides*. που απομονώθηκαν από δείγματα νερού, N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *P. shigelloides*. και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός στελεχών *P. shigelloides*.

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλασσινό ν/ν <sub>0</sub> (%)		Νερό Ποταμών ν/ν <sub>0</sub> (%)		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
	AK	0/4	0,0	0/10	0,0	0/14
GM	0/4	0,0	0/10	0,0	0/14	0,0
CAZ	3/4	75,0	0/10	0,0	3/14	21,4
CIP	0/4	0,0	0/10	0,0	0/14	0,0
P 10	4/4	100,0	10/10	100,0	14/14	100,0

**Πίνακας 18.** Ανθεκτικότητα στελεχών *Aeromonas sobria* και *A. hydrofila* σε δείγματα νερού, όπου N= ο αριθμός ανθεκτικών στελεχών *A. sobria* και *A. hydrofila* και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός στελεχών *A. sobria* και *A. hydrofila*.

Αντιβιοτικά	Νερό Θαλ/σινό <i>A. sobria</i>		Νερό Ποταμών <i>A. sobria</i>		Νερό Ποταμών <i>A. hydrofila</i>		Νερό Ποταμών <i>Aeromonas</i> spp.	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
	AK	0/4	0,0	0/1	0,0	0/4	0,0	0/10
GM	2/4	50,0	0/1	0,0	0/4	0,0	2/10	20,0
CAZ	0/4	0,0	0/1	0,0	0/4	0,0	0/10	0,0
CIP	0/4	0,0	0/1	0,0	0/4	0,0	0/10	0,0

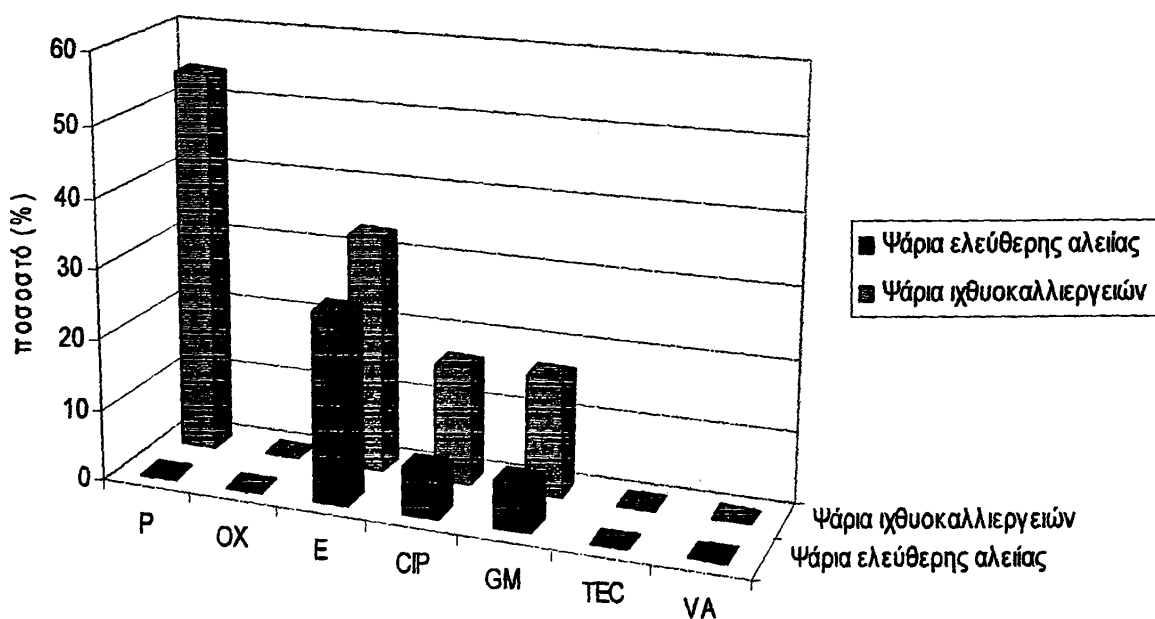


#### 4.4. Αποτελέσματα των δοκιμών ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από δείγματα ψαριών

**Πίνακας 19.** Ανθεκτικότητα των 39 στελεχών *S. aureus* που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και No= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Αντιβιοτικά	Ψάρια ελεύθερης αλειίας		Ψάρια Ιχθυοκαλλιιεργειών		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/No	(%)	N/No	(%)	N/No	(%)
P	0/15	0,0	13/24	54,1	13/39	33,3
OX	0/15	0,0	0/24	0,0	0/39	0,0
E	4/15	26,6	8/24	33,3	12/39	30,7
CIP	1/15	6,6	4/24	16,6	5/39	12,8
GM	1/15	6,6	4/24	16,6	5/39	12,8
TEC	0/15	0,0	0/24	0,0	0/39	0,0
VA	0/15	0,0	0/24	0,0	0/39	0,0

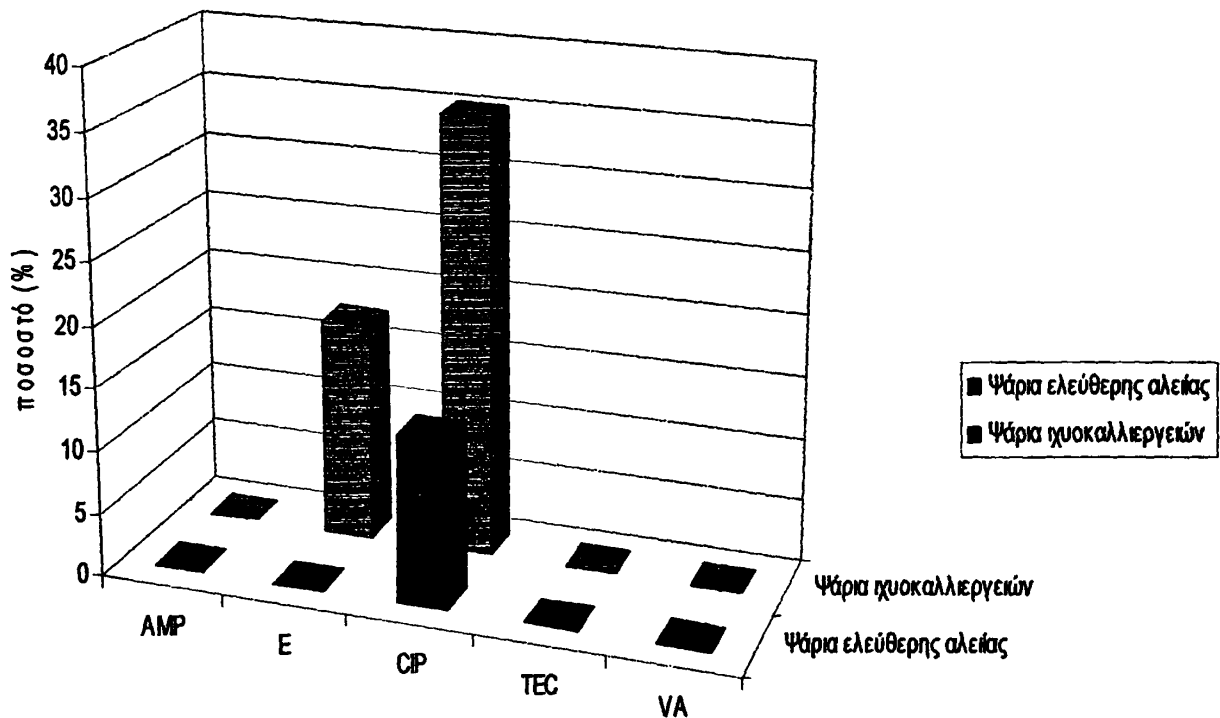
**Γράφημα 16.** Απεικόνιση ανθεκτικότητας των στελεχών *S. aureus* σε δείγματα ψαριών



**Πίνακας 20.** Ανθεκτικότητα των 32 στελεχών *E. faecalis* που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Αντιβιοτικά	Ψάρια ελεύθερης αλιείας		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AMP	0/15	0,0	0/17	0,0	0/32	0,0
E	0/15	0,0	3/17	17,6	3/32	9,3
CIP	2/15	13,3	6/17	35,2	8/32	25,0
TEC	0/15	0,0	0/17	0,0	0/32	0,0
VA	0/15	0,0	0/17	0,0	0/32	0,0

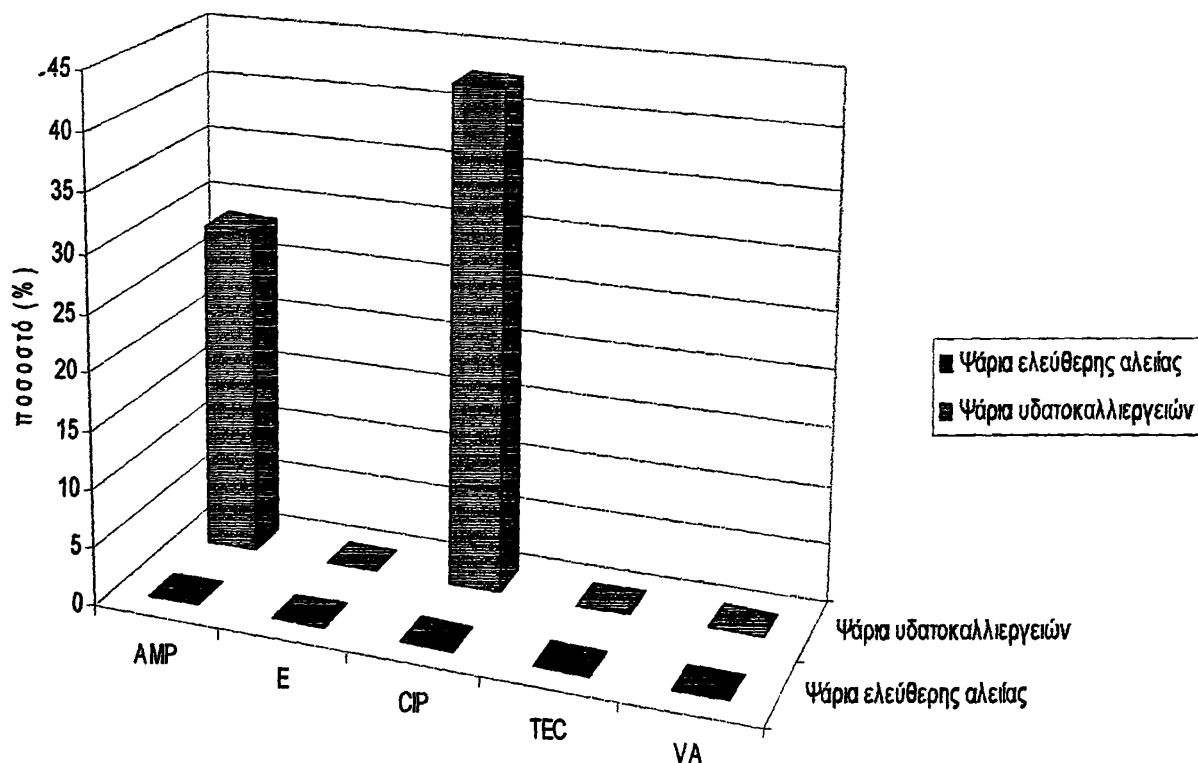
**Γράφημα 17.** Απεικόνιση ανθεκτικότητας των στελεχών *E. faecalis* σε δείγματα ψαριών



**Πίνακας 21.** Ανθεκτικότητα των 14 στελεχών *E. faecium* που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και No= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Αντιβιοτικά	Ψάρια ελεύθερης αλιείας		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/No	(%)	N/No	(%)	N/No	(%)
AMP	0/7	0,0	2/7	28,5	2/14	14,2
E	0/7	0,0	0/7	0,0	0/14	0,0
CIP	0/7	0,0	3/7	42,8	3/14	21,4
TEC	0/7	0,0	0/7	0,0	0/14	0,0
VA	0/7	0,0	0/7	0,0	0/14	0,0

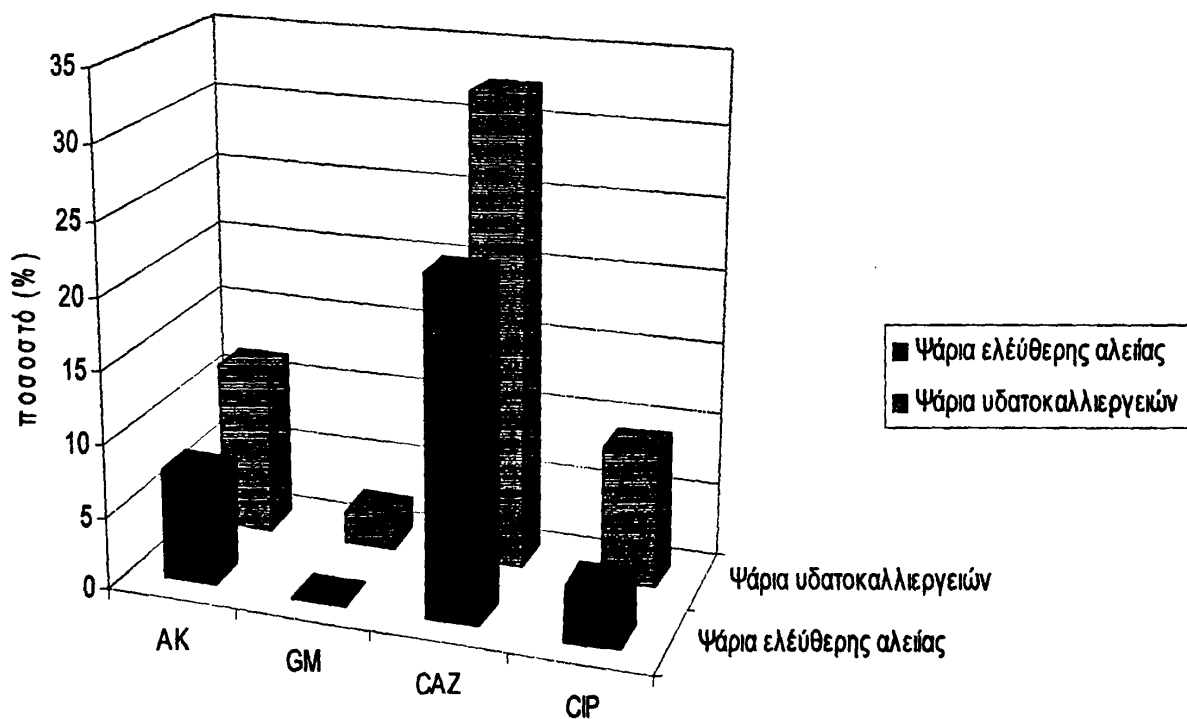
**Γράφημα 18.** Απεικόνιση ανθεκτικότητας των στελεχών *E. faecium* σε δείγματα ψαριών



**Πίνακας 22.** Ανθεκτικότητα των 69 στελεχών *Pseudomonas* spp. που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και No= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Αντιβιοτικά	Ψάρια ελεύθερης αλιείας		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/No	(%)	N/No	(%)	N/No	(%)
AK	2/26	7,6	5/43	11,6	7/69	10,1
GM	0/26	0,0	1/43	2,3	1/69	1,4
CAZ	6/26	23,0	14/43	32,5	20/69	28,9
CIP	1/26	3,8	4/43	9,3	5/69	7,2

**Γράφημα 19.** Απεικόνιση ανθεκτικότητας των στελεχών *Pseudomonas* spp σε δείγματα ψαριών



**Πίνακας 23.** Ανθεκτικότητα των 17 στελεχών *P. aeruginosa* που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν

Αντιβιοτικά	Ψάρια ελεύθερης αλιείας		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	0/6	0,0	1/11	9,0	1/17	5,8
GM	0/6	0,0	0/11	0,0	0/17	0,0
CAZ	1/6	16,6	4/11	36,3	5/17	29,4
CIP	0/6	0,0	0/11	0,0	0/17	0,0

**Πίνακας 24.** Ανθεκτικότητα των 14 στελεχών *P. fluorescens* που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Αντιβιοτικά	Ψάρια ελεύθερης αλιείας		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	0/11	0,0	0/3	0,0	0/14	0,0
GM	0/11	0,0	0/3	0,0	0/14	0,0
CAZ	1/11	9,0	2/3	0,6	3/14	21,4
CIP	0/11	0,0	0/3	0,0	0/14	0,0

**Πίνακας 25.** Ανθεκτικότητα των 6 στελεχών *P. rudita* που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν

Αντιβιοτικά	Ψάρια ελεύθερης αλιείας		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	0	0,0	1/6	16,6	1/6	16,6
GM	0	0,0	1/6	16,6	1/6	16,6
CAZ	0	0,0	2/6	33,3	2/6	33,3
CIP	0	0,0	1/6	16,6	1/6	16,6



**Πίνακας 26.** Ανθεκτικότητα των 18 στελεχών *P. luteola* που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Αντιβιοτικά	Ψάρια ελεύθερης αλιείας		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	1/5	20,0	2/13	15,3	3/18	16,6
GM	0/5	0,0	0/13	0,0	0/18	0,0
CAZ	0/5	0,0	0/13	0,0	0/18	0,0
CIP	1/5	20,0	3/13	23,0	3/18	16,6

**Πίνακας 27.** Ανθεκτικότητα των 14 στελεχών *P. ceracia* που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Αντιβιοτικά	Ψάρια ελεύθερης αλιείας		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	1/4	25,0	1/10	10	2/14	14,2
GM	0/4	0,0	0/10	0,0	0/14	0,0
CAZ	3/4	75,0	6/10	60,0	9/10	64,2
CIP	0/4	0,0	0/10	0,0	0/10	0,0

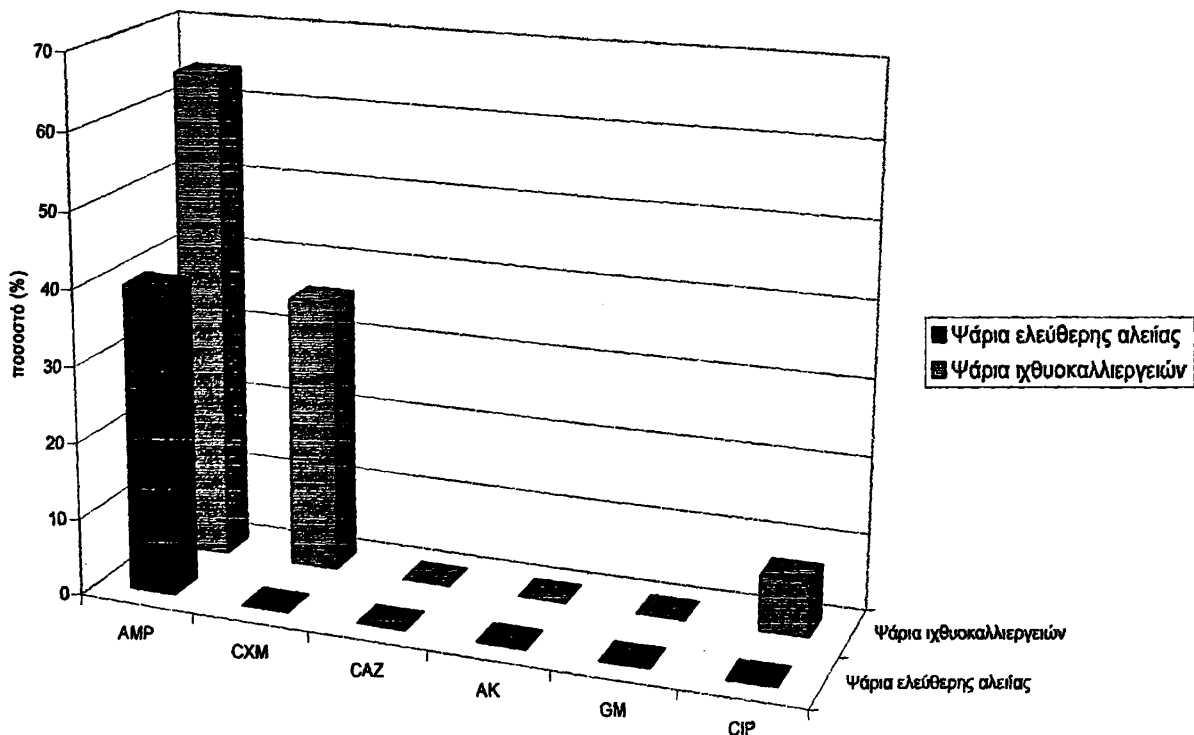




**Πίνακας 28.** Ανθεκτικότητα των 29 στελεχών *E. coli* που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Αντιβιοτικά	Ψάρια ελεύθερης αλιείας		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AMP	6/15	40,0	9/14	64,2	15/29	51,7
CXM	0/15	0,0	5/14	35,7	5/29	17,2
CAZ	0/15	0,0	0/14	0,0	0/29	0,0
AK	0/15	0,0	0/14	0,0	0/29	0,0
GM	0/15	0,0	0/14	0,0	0/29	0,0
CIP	0/15	0,0	1/14	7,1	1/29	3,4

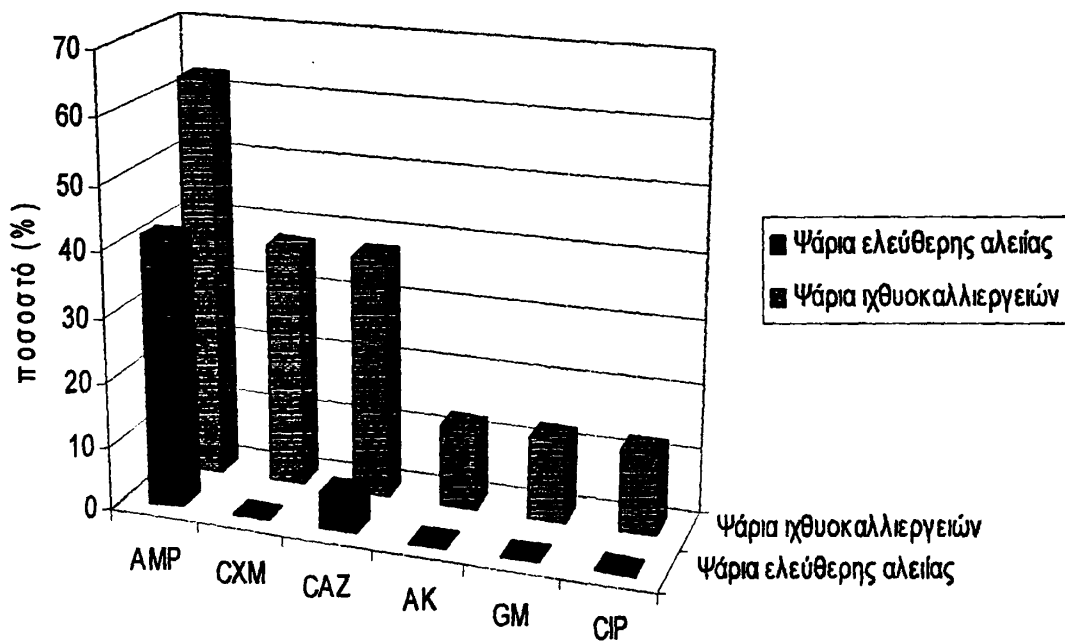
**Γράφημα 20.** Απεικόνιση ανθεκτικότητας των στελεχών *E. coli* σε δείγματα ψαριών



**Πίνακας 29.** Ανθεκτικότητα των 25 στελεχών *E. cloacae* που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και No= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Αντιβιοτικά	Ψάρια ελεύθερης αλειίας		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/No	(%)	N/No	(%)	N/No	(%)
AMP	7/17	41,7	5/8	62,5	12/25	48,0
CXM	0/17	0,0	3/8	37,5	3/25	12,0
CAZ	1/17	5,8	3/8	37,5	4/25	8,0
AK	0/17	0,0	1/8	12,5	1/25	4,0
GM	0/17	0,0	1/8	12,5	1/25	4,0
CIP	0/17	0,0	1/8	12,5	1/25	4,0

**Γράφημα 21.** Απεικόνιση ανθεκτικότητας των στελεχών σε *E. cloacae* δείγματα ψαριών



**Πίνακας 30.** Ανθεκτικότητα των 6 στελεχών *Citrobacter yougae*, *Citrobacter freundii* που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Αντιβιοτικά	Ψάρια ιχθυοκαλλιεργείων <i>C. freundii</i>		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργείων <i>C. Yougae</i>		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AMP	2/3	66,6	2/3	66,6	4/6	66,6
CXM	1/3	33,3	1/3	33,3	2/6	33,3
CAZ	0/3	0,0	0/3	0,0	0/6	0,0
AK	0/3	0,0	0/3	0,0	0/6	0,0
GM	0/3	0,0	0/3	0,0	0/6	0,0
CIP	0/3	0,0	0/3	0,0	0/6	0,0

**Πίνακας 31.** Ανθεκτικότητα των 9 στελεχών *P. shigelloides* που απομονώθηκαν από ψάρια, όπου N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Αντιβιοτικά	Ψάρια ελεύθερης αλιείας		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργείων		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	0/3	0.0	0/6	0.0	0/9	0.0
GM	0/3	0.0	0/6	0.0	0/9	0.0
CAZ	0/3	0.0	0/6	0.0	0/9	0.0
CIP	0/3	0.0	0/6	0.0	0/9	0.0
P 10	0/3	0.0	0/6	0.0	0/9	0.0

**Πίνακας 32.** Ανθεκτικότητα των 5 στελεχών *Aeromonas* spp που απομονώθηκαν από ψάρια, N= ο αριθμός των ανθεκτικών στελεχών και N<sub>0</sub>= ο συνολικός αριθμός των στελεχών που απομονώθηκαν.

Αντιβιοτικά	Ψάρια ιχθυοκαλλιεργείων <i>A. hydrophyla</i>		Ψάρια ιχθυοκαλλιεργείων <i>A. sobria</i>		Σύνολο ανθεκτικών στελεχών	
	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)	N/N <sub>0</sub>	(%)
AK	0/3	0,0	0/2	0,0	0/5	0,0
GM	1/3	33,3	0/2	0,0	1/5	20,0
CAZ	0/3	0,0	0/2	0,0	0/5	0,0
CIP	0/3	0,0	0/2	0,0	0/5	0,0



## 5. Συζήτηση

Την τελευταία 10ετία το πρόβλημα της ρύπανσης (μικροβιολογικής και χημικής) του υδάτινου περιβάλλοντος απασχολεί ολοένα και περισσότερο την διεθνή επιστημονική κοινότητα, αλλά και τους αρμόδιους φορείς (WHO\*, UNEP, USEPA, WWF, UNESCO, EU, AWWA, APHA κ.ά). Το υδάτινο περιβάλλον είναι απαραίτητο για την επιβίωση των ζωντανών οργανισμών στην γη και ως εκ τούτου είναι πολύ σημαντική η διατήρησή του σε επίπεδα, που να επιτρέπουν την διατήρηση της ζωής. Για τον λόγο αυτό εξάλλου δίνεται ιδιαίτερη προσοχή και οικονομική υποστήριξη από κρατικούς και διεθνείς οργανισμούς για την διατήρηση των υδροβιοτόπων, αλλά και όλων των υδάτινων συλλογών (λίμνες, ποτάμια, θάλασσα) που χρησιμοποιούνται για ύδρευση, άρδευση, καλλιέργεια ή/και συλλογή τροφής και ψυχαγωγία του ανθρώπου.

Ο αριθμός των δημοσιευμένων μελετών, που αφορούν την μικροβιολογική ποιότητα των διάφορων υδάτινων περιβαλλόντων, αυξάνεται συνεχώς σε μια προσπάθεια καλύτερης παρακολούθησης, επιτήρησης, αλλά και επισήμανσης των παραμέτρων εκείνων που επιδρούν στην ποιότητα των υδάτων και άμεσα ή έμμεσα επιδρούν στην δημόσια υγεία. Όμως οι μελέτες αυτές συνήθως αφορούν ένα είδος υδάτινου περιβάλλοντος π.χ. μόνον ποτάμια ή μόνον λίμνες, ή μόνον θαλασσινά νερά ή μόνον πόσιμα νερά. Η ταυτόχρονη μελέτη της μικροβιολογικής ποιότητας του συνόλου του υδάτινου περιβάλλοντος (ποταμοί, λίμνες, θάλασσα, πόσιμα νερά, ψάρια) γίνεται για πρώτη φορά τόσο στην Ελλάδα όσο και σε διεθνές επίπεδο. Επιπλέον, για πρώτη φορά γίνεται στην Ελλάδα διερεύνηση της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των βακτηριακών στελεχών, που απομονώνονται από τα διάφορα είδη νερών και από τα τρόφιμα του υδάτινου περιβάλλοντος.

\* WHO=World Health Organization  
 UNEP=United Nations Environmental Protection  
 USEPA=United States Environmental Protection Agency  
 APHA=American Public Health Association

WWF= World Wildlife Foundation  
 EU=European Union  
 AWWA=American Water Works Association



## 5. 1. Μικροβιολογική ποιότητα υδάτων

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης η μικροβιολογική ποιότητα των πόσιμων υδάτων στην περιοχή της έρευνας μας διατηρείται σε σχετικά ικανοποιητικά επίπεδα από πλευράς μικροβιακού φορτίου. Οι μικροβιολογικές παράμετροι που εξετάστηκαν, βρέθηκαν εντός των αποδεκτών ορίων, που ορίζει η οδηγία ΕΕ 98/83 σε ποσοστό (79,5%), ξεπερνώντας τα μόνον σε ορισμένες περιπτώσεις (20,5%), που αφορούσαν τις μικρότερες σε πληθυσμό κοινότητες. Θα πρέπει όμως να αναφερθεί ότι στις περισσότερες κοινότητες (83,4%) γινόταν χλωρίωση του νερού, πολλές φορές όμως όχι συστηματικά. Γενικά παρατηρήθηκε ότι όσο μικρότερη σε πληθυσμό είναι μια κοινότητα, τόσο χειρότερη είναι η ποιότητα του νερού και ότι τα συχνότερα απομονούμενα είδη βακτηρίων ήταν Εντεροβακτηριακά και *Pseudomonas* spp., ενώ δεν απομονώθηκαν καθόλου στελέχη *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. aureus* και *Aeromonas* spp (Πίνακας 1α, 1β, 1ε, Γράφημα 4, 9β).

Οι αντίστοιχες ή παρόμοιες δημοσιευμένες εργασίες που έχουν γίνει στην χώρα μας είναι πολύ λίγες, αλλά τα αποτελέσματα τους είναι αντίστοιχα με τα δικά μας. Το 1998 η Αρβανητίδου και οι συνεργάτες της όταν εξέτασαν 255 δείγματα πόσιμου νερού βρύσης, και επεξεργασμένου νερού από 85 ελληνικά κέντρα αιμοδιάλυσης βρήκαν ότι το 80,7% των δειγμάτων πόσιμου νερού βρύσης πληρούσε τα όρια καταλληλότητας. Οι ίδιοι ερευνητές σε άλλη εργασία τους, που αφορούσε πόσιμα νερά βρύσης πάλι από μονάδες αιμοδιάλυσης αναφέρουν ότι απομόνωσαν 141 στελέχη Gram αρνητικών βακτηρίων στα οποία η συχνότητα απομόνωσης για την *P. aeruginosa* ήταν 22,7%, για την *E. coli* 2,8% και για το *E. cloacae* 7,8% (Αρβανιτίδου και συν., 2003).

Οι Παπανδρέου και συνεργάτες, όταν εξέτασαν δείγματα πόσιμου νερού από το παλιό δίκτυο ύδρευσης της Πάτρας απομόνωσαν 239 Gram αρνητικά στελέχη βακτηρίων,



από τα οποία ανήκαν στα Εντεροβακτηριοειδή 62 (26,0%), στις Ψευδομονάδες 145 (60,0%), στα Δονάκια 24 (10,0%) και τα υπόλοιπα σε άλλα είδη (Parandreu και συν., 2000).

Οι Παπαδοπούλου και συνεργάτες σε αντίστοιχη μελέτη 960 δειγμάτων πόσιμων νερών, για ολικά κολοβακτηριοειδή, κολοβακτηριοειδή κοπράνων, σταφυλοκόκκους, εντεροκόκκους, σαλμονέλλες, σιγκέλλες και ψευδομονάδες, σε κοινότητες της ΒΔ Ελλάδας (νομοί Ιωαννίνων, Άρτας, Πρέβεζας, Θεσπρωτίας), με πληθυσμούς, που κυμαίνονταν από 50 έως 2000 κατοίκους, χαρακτήρισαν ως ακατάλληλα τα 143 (14,9%), ως οριακά κατάλληλα τα 115 (11,9%) και τα 702 (73,1%) ως κατάλληλα (Παπαδοπούλου και συν. 2004).

Οι Γιαννούλης και συνεργάτες σε μελέτη τους, που αφορά μόνον τα κολοβακτηριοειδή κοπράνων, η οποία έγινε το διάστημα 1996-1999 και αφορούσε 38 δείγματα νερού από τις πηγές Αγίου Γεωργίου, που προμηθεύουν με πόσιμο νερό πόλεις και χωριά της Ηπείρου (Νομοί Άρτας, Πρέβεζας, Λευκάδας), βρήκαν ότι το 63,2% δεν πληρούσε τα όρια καταλληλότητας για τον συγκεκριμένο μικροβιολογικό δείκτη (Giannoulis και συν., 2005).

Οι Παπαπετροπούλου και συνεργάτες σε 150 δείγματα εμφιαλωμένων πόσιμων νερών ελληνικής παραγωγής απομόνωσαν περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια σε 23 δείγματα (15,6%) με καταμετρήσεις που κυμαίνονταν από 1 έως  $10^3$  cfu/L. Τα είδη των μυκοβακτηριδίων που απομονώθηκαν ήταν *M. chelonae* (14 στελέχη), *M. phlei* (3 στελέχη), *M. gordonae* (4 στελέχη) και *M. flavescens* (2 στελέχη) (Parapetrovou 1997).

Παρόμοιες μελέτες, που έχουν γίνει στον δυτικοευρωπαϊκό χώρο, στις ΗΠΑ, Καναδά, Αυστραλία και Ν. Ζηλανδία, δίνουν διάφορα αποτελέσματα, από τα οποία άλλα είναι παρόμοια με τα δικά μας, ενώ άλλα δείχνουν υψηλότερα επίπεδα μικροβιολογικής ρύπανσης.

Σε μελέτη που αφορούσε μόνον τα ολικά κολοβακτηριοειδή σε πόσιμα νερά στην Δαλματία την περίοδο 1998-2002, βρήκαν ότι σε 24 από τις 42 περιοχές που έλεγξαν ο μέσος



όρος των κολοβακτηριοειδών ήταν  $<150/100\text{ml}$ , ενώ σε 9 περιοχές ξεπερνούσε τα  $1000/100\text{ml}$ . (Stambuk-Giljanovic 2005).

Στην Β.Α. Ισπανία σε μελέτη που αφορούσε βακτηριακούς δείκτες και βακτηριοφάγους σε πόσιμα νερά (πηγών, βρύσες κατοικιών, πηγάδια, δεξαμενές ύδρευσης πόλεων), βρέθηκε ότι οι βακτηριακοί δείκτες απομονώνονταν συχνότερα στα νερά πηγών, πηγαδιών και δεξαμενών αγροτικών περιοχών, ενώ οι βακτηριοφάγοι συχνότερα στα νερά των μεγάλων πόλεων (Mendez και συν., 2004).

Στην Ιταλία, σε έρευνα που αφορούσε τα πόσιμα νερά στην Μεσσήνα, βρέθηκε ότι πριν την είσοδο στις δεξαμενές (δηλαδή πριν την χλωρίωση) το 12,5% ήταν εντός των νομοθετημένων ορίων, όμως μετά την έξοδο η ποιότητα χειροτέρευε και μόνον το 7,5% ήταν εντός των ορίων. Στο νερό των σωληνώσεων του συστήματος ύδρευσης τα ποσοστά θετικότητας για τα ολικά και τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή και για τους εντερόκοκκους ήταν 34,1%, 15,9% και 59,1% αντίστοιχα, ενώ η *Pseudomonas aeruginosa* ήταν σχεδόν πάντα παρούσα (93,7%) στο νερό του δικτύου (Seoglio και συν., 1989).

Στις Η.Π.Α., σε μελέτη των αιτιών 31 υδατογενών επιδημιών και σποραδικών κρουσμάτων που συνέβησαν σε 19 πολιτείες το διάστημα 2001-2002, βρέθηκε ότι το 79,2% οφειλόταν σε παθογόνους μικροοργανισμούς του πόσιμου νερού και το 20,8% σε χημικές ουσίες που περιέχονταν στο πόσιμο νερό (Blackburn και συν., 2004). Σε άλλη έρευνα που έγινε από το Πανεπιστήμιο της Loma Linda, σε 7 δείγματα πόσιμου νερού βρύσης οι καταμετρήσεις της ολικής μικροβιακής χλωρίδας ήταν μεταξύ 4 και 95 cfu/ml, δηλαδή πολύ πιο κάτω από το ανώτατο επιτρεπτό όριο (Kettering ., 2002).

Σε συγκριτική μελέτη πόσιμων και εμφιαλωμένων νερών, η οποία έγινε στο Cleveland, οι καταμετρήσεις της ολικής μικροβιακής χλωρίδας στα μεν εμφιαλωμένα νερά κυμαίνονταν από 0,01 cfu/ml έως 1000 cfu/ml, ενώ στα πόσιμα νερά βρύσης από 0,2 έως 2,7 cfu/ml, επειδή δε στην μέτρηση της περιεκτικότητας σε φθόριο μόνον το 5,0% των



εμφιαλωμένων ήταν εντός των απαιτούμενων ορίων, ενώ το 100,0% των πόσιμων νερών βρύσης περιείχαν το σωστό επίπεδο φθορίου, οι ερευνητές κατέληξαν ότι τα εμφιαλωμένα νερά κάθε άλλο παρά καθαρά και υγιεινά είναι (Lalumandier και Avers, 2000).

Στον Καναδά, σε δείγματα εμφιαλωμένων πόσιμων νερών που έπιναν οι μαθητές ενός δημοτικού σχολείου στην πόλη Calgary της πολιτείας Alberta, οι καταμετρήσεις των ολικών κολοβακτηριοειδών ήταν εκτός ορίων στο 13,3% των δειγμάτων, ενώ τα κολοβακτηριοειδή κοπρανώδους προέλευσης και η ολική μικροβιακή χλωρίδα ήταν εκτός των ορίων στο 8,9% και στο 64,4% των δειγμάτων αντίστοιχα (Oliphant και συν., 2002).

Στο Μεξικό σε έρευνα (2000-2001), που αφορούσε την μικροβιολογική ποιότητα των πόσιμων νερών στην μητροπολιτική περιοχή της πόλης του Μεξικού απομονώθηκαν 84 είδη βακτηρίων από 9 είδη που συσχετίζονται με μόλυνση κοπρανώδους προέλευσης, ενώ στο 10,0% των δειγμάτων απομονώθηκε *Helicobacter pylori* (Mazari-Hiriat και συν., 2005).

Στην Αργεντινή σε μικροβιολογικό έλεγχο των νερών του δικτύου ύδρευσης της πόλης La Plata βρήκαν ότι όταν το νερό προερχόταν από γεώτρηση το ποσοστό των Gram αρνητικών βακτηρίων ήταν 54,0%, ενώ όταν προέρχονταν από ποτάμι έφθανε το 72,0%. Μάλιστα στα δείγματα από το νερό των γεωτρήσεων απομονώθηκαν *K. oxytoca*, *E. agglomerans* και *E. aerogenes*, ενώ από το νερό που προερχόταν από το ποτάμι απομονώθηκαν *K. oxytoca*, *E. agglomerans* και *E. cloacae* (Basualdo και συν., 2001).

Στην Ν. Ζηλανδία σε έρευνα της ποιότητας 125 δειγμάτων πόσιμων νερών που προέρχονταν από συλλογή του βρόχινου νερού στις οροφές των κατοικιών, τα 22 δείγματα (17,6%) ξεπερνούσαν τα αποδεκτά όρια καταλληλότητας σε μια ή περισσότερες μικροβιολογικές παραμέτρους, ενώ τα 70 (56,0%) ξεπερνούσαν το όριο κολοβακτηριοειδών κοπρανώδους προέλευσης και σε 20 δείγματα (16,0%) απομονώθηκε *Aeromonas* spp. (Simmons και συν., 2001).





Στην Αυστραλία στο Μητροπολιτικό Σύστημα Ύδρευσης της πόλης Perth απομονώθηκε *Aeromonas* spp. σε δείγματα που λήφθηκαν τόσο πριν όσο και μετά την χλωρίωση και το γεγονός συσχετίστηκε με τις απομονώσεις αερομονάδων από τα κόπρανα ασθενών με γαστρεντερίτιδες που είχαν παρατηρηθεί στην ίδια πόλη (Burke και συν., 1984).

Σημαντική διαφορά όσον αφορά τα δικά μας αποτελέσματα για την μικροβιολογική ποιότητα των πόσιμων υδάτων, παρατηρούμε σε μελέτες που αφορούν την ποιότητα των πόσιμων υδάτων σε χώρες της Ασίας και της Αφρικής. Τα αποτελέσματα αντίστοιχων μελετών στις χώρες αυτές είναι ενδεικτικά του χαμηλού υγειονομικού επιπέδου που επικρατεί εκεί.

Στο Πακιστάν σε μελέτη για την μικροβιολογική ποιότητα των πόσιμων υδάτων στην αστική περιοχή της Lahore και στην αγροτική περιοχή της Punjab παρατηρήθηκε ότι μεγαλύτερη μικροβιακή επιβάρυνση υπήρχε στα δείγματα των αγροτικών περιοχών (91,3% ακατάλληλα) σε σχέση με τα δείγματα των αστικών περιοχών (42,8% ακατάλληλα) (Anwar και συν., 1999). Σε παρόμοιο συμπέρασμα καταλήξαμε και στην δική μας έρευνα αν και τα ποσοστά ακατάλληλων δειγμάτων ήταν κατά πολύ μικρότερα. Σε άλλη μελέτη που αφορούσε έλεγχο 2160 δειγμάτων πόσιμων νερών του δικτύου ύδρευσης της Lahore τα 446 (20,64%) ήταν μικροβιολογικά ακατάλληλα (Anwar και συν., 2004).

Στελέχη που απομονώθηκαν από πόσιμο νερό αγροτικών περιοχών στην Ινδία εμφάνισαν συχνότητα απομόνωσης της *E. coli* 11,7% επί 235 συνολικών κολοβακτηριδίων, 20,4% για το *Citrobacter* spp. και 50,9% για *Klebsiella* spp. (Ramteke και συν., 1992). Στην ίδια χώρα σε 300 δείγματα πόσιμων νερών (60 από το δίκτυο ύδρευσης, 240 από φυσικές πηγές) από την περιοχή της Shimla, οι καταμετρήσεις της OMX των 37°C και των 22°C στα νερά του δικτύου κυμαίνονταν από  $0,5 \times 10^3$  έως  $15 \times 10^3$  cfu/ml, ενώ στα νερά των πηγών από  $0,1 \times 10^3$  έως  $>150 \times 10^3$  cfu/ml. Στα νερά φυσικών πηγών οι καταμετρήσεις των κολοβακτηριοειδών, της *E. coli* και του *S. faecalis* κυμαίνονταν από 3 έως και  $>1800$  cfu/100



ml, από 0 έως και >1800 cfu/100 ml και από 0 έως 540 cfu/100 ml αντίστοιχα, ενώ το 1/3 των δειγμάτων ήταν θετικό για *Clostridium perfringens* και ποσοστό 1,25% ήταν θετικό για *Salmonella typhi* (Grover και Thakur, 2001). Σε μελέτη που έγινε στην πόλη Madras το 37,9% των δειγμάτων νερών οικιακής χρήσης περιείχε Αερομονάδες με συχνότερα είδη την *A. sobria* (13,7%), *A. caviae* (11,6%) και *A. hydrophila* (9,5%) (Alavandi και συν., 1999).

Στην Ταϊλάνδη σε έλεγχο της μικροβιολογικής ποιότητας 76 δειγμάτων «ιερών υδάτων» (αγιασμών) από τους λατρευτικούς ναούς, οι καταμετρήσεις της ολικής μικροβιακής χλωρίδας κυμαίνονταν  $6,5 \times 10$  έως  $1,6 \times 10^5$  cfu/ml, ενώ των ολικών κολοβακτηριοειδών από <2 έως >1600 MPN/100 ml και από 22 δείγματα απομονώθηκε *E. coli*. (Phattharangong και συν., 1998).

Στην Ν. Αφρική έρευνα, που έγινε σε 125 δείγματα πόσιμου νερού από τις φτωχικές κατοικίες της πόλης Vhuswa στην περιοχή Venda έδειξε ότι η συχνότητα απομόνωσης *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* και *C. jejuni* ήταν αντίστοιχα 70,0%, 5,0%, 5,0% και 2,0%. (Potgieter και συν., 2005).

Σε μελέτη που αφορούσε την μικροβιολογική ποιότητα των πόσιμων νερών στην Κένυα βρέθηκε ότι το 95,0% των δεξαμενών φύλαξης του νερού μέσα στα σπίτια ήταν μολυσμένο με κολοβακτηριοειδή κοπρανώδους προέλευσης, το 61,7% ήταν μολυσμένο με εντερόκοκκους κοπράνων και το 50,0% με *E. coli* (Chemuliti και συν., 2002).

Όσον αφορά την μικροβιολογική ποιότητα του υδάτινου περιβάλλοντος που μελετήσαμε (λίμνες, ποτάμια, θάλασσα) από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι ο μεγαλύτερος βαθμός μικροβιολογικής ρύπανσης παρατηρείται στα δείγματα θαλασσινού νερού από λιμάνια πόλεων (Πρέβεζας, Αμφιλοχίας) και στα δείγματα νερού της Παμβώτιδας Λίμνης Ιωαννίνων και πολύ λιγότερο στα ποτάμια. Η μεγάλη μικροβιολογική επιβάρυνση αυτών των οικοσυστημάτων φαίνεται να οφείλεται στις εισροές αστικών, βιομηχανικών και



κτηνοτροφικών λυμάτων, τα οποία στην πλειονότητά τους ρίπτονται ανεπεξέργαστα ή ατελώς επεξεργασμένα (Πίνακας 1δ και 9α).

Στο Βόρειο τμήμα του Αμβρακικού (Βαθύ, λιμνοθάλασσα Βαθύ, Άγιος Θωμάς, Ιχθυόσκαλα, Πωγωνίτσα, Μάζωμα, Μιχαλίτσι, Τσοπέλι, Λουγαρού εκβολές Λούρου και εκβολές Αράχθου), όπου λειτουργούν μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, οι τιμές των μικροβιολογικών δεικτών δεν ξεπέρασαν τις ισχύουσες επιθυμητές. Φαίνεται ότι οι κινήσεις και οι ταχύτητες των ρευμάτων είναι τόσο έντονες, που επιτρέπουν τη συνεχή ανάμιξη και ανανέωση των νερών και δεν επηρεάζονται από τα λιμάνια Αμφιλοχίας, Πρέβεζας και Βόνιτσας. Ο διάυλος Ακτίου (Κυανή Ακτή), όπου η απόσταση του από το λιμάνι της Πρέβεζας είναι μικρότερη του 1km, επηρεάζεται πολύ από τη διεύθυνση των ρευμάτων. Διαπιστώθηκε ότι όταν η διεύθυνση των ρευμάτων είναι από το Ιόνιο προς τον Αμβρακικό το σημείο έχει πολύ καθαρά νερά από μικροβιολογική άποψη. Σε όλους τους σταθμούς δειγματοληψίας κατά μήκος των ακτών του Ιονίου, ο βαθμός μικροβιολογικής ρύπανσης ήταν μικρός (με αντιπροσωπευτικότερο τον σταθμό του Παντοκράτορα).

Από τα 246 βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από θαλασσινό νερό, την μεγαλύτερη συχνότητα (30.0%) εμφάνιζαν τα Εντεροβακτηριακά, ακολουθούμενα από *S. aureus* (24,0%), *Pseudomonas* spp (21,5%), *E. faecalis* (12,0%), *E. faecium* (11,0%) και *Aeromonas* spp (1,6%) (Πιν. 1α ,1β, Γράφημα 1,7).

Σε αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε διάφορα νομαρχιακά διαμερίσματα στη Βόρεια Ελλάδα, από 1670 δείγματα νερού κολύμβησης ένα από τα συχνότερα απομονωθέντα στελέχη ήταν το *E. faecium* (Arvanitidou και συν., 2001).

Σε πανευρωπαϊκή μελέτη που αφορούσε βακτηριοφάγους της *E. coli* και των εντεροκόκκων στα κολυμβητικά νερά ακτών της Βόρειας, Νότιας, Δυτικής και Ανατολικής Ευρώπης, οι καταμετρήσεις της *E. coli* κυμάνθηκαν από 100 έως 500 cfu/100 ml (Contreras-Coll και συν., 2002).



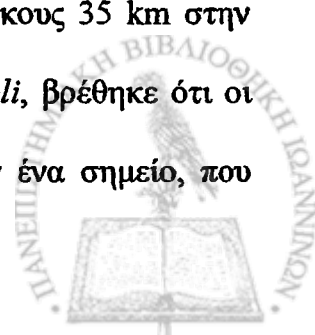
Στην Ιταλία σε έρευνα που έγινε το καλοκαίρι του 1997 στις ακτές όπου εκβάλλει ο ποταμός Τίβερης, εξετάστηκαν 58 δείγματα θαλασσινού νερού από 19 σταθμούς δειγματοληψίας για κολοβακτηριοειδή, στρεπτόκοκκους, σαλμονέλλες, εντεροϊούς, ψευδομονάδες, αερομονάδες, δονάκια, μύκητες και κολιφάγους. Σαλμονέλλες απομονώθηκαν από 3 δείγματα και ρεοϊοί από 2, ενώ ψευδομονάδες, αερομονάδες και δονάκια απομονώθηκαν από όλα τα δείγματα σε αριθμούς που κυμαίνονταν από  $10$  έως  $10^6$ ,  $10$ - $10^6$  και  $0$ - $10^6$  αντίστοιχα (Aulicino και συν., 2001).

Στην Μεσσήνα της Ιταλίας, μονοετής μελέτη (1996-97) της μικροβιολογικής ρύπανσης των παράκτιων υδάτων βάσει των κολοβακτηριοειδών κοπρανώδους προέλευσης, έδειξε ότι ο υψηλότερος βαθμός μόλυνσης παρατηρήθηκε στις περιοχές με την μικρότερη αλατότητα και την υψηλότερη συγκέντρωση αμμωνίας (εκβολές ποταμών, λιμάνια) (Caruso και συν., 2000). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν την αρνητική επίδραση των εισροών αστικής και αγροτικής προέλευσης στην μικροβιολογική ποιότητα των παράκτιων θαλασσινών νερών, πράγμα που παρατηρήσαμε και στην δική μας μελέτη.

Στην Βρετανία σε έρευνα της μικροβιολογικής ποιότητας των κολυμβητικών ακτών που μολύνονται με αστικά λύματα, οι καταμετρήσεις των εντεροκόκκων κοπρανώδους προέλευσης και των εντεροβακτηριοειδών κοπρανώδους προέλευσης ξεπερνούσαν τα 60 cfu/100ml και τα 100 cfu/100ml αντίστοιχα (Fleisher και συν., 1996).

Σε μελέτη που αφορούσε την ποιότητα των κολυμβητικών υδάτων στις ακτές της Καλιφόρνια (Η.Π.Α.) οι τιμές των μικροβιολογικών δεικτών που μετρήθηκαν ήταν  $>400$  cfu/100ml για τα κολοβακτηριοειδή κοπρανώδους προέλευσης και  $>10000$  cfu/1ml για την ολική μικροβιακή χλωρίδα (Noble και συν., 2003).

Στην Ν. Αμερική σε μελέτη που έγινε το 1981-1983 σε ακτές μήκους 35 km στην περιοχή της Mar del Plata (Αργεντινή) με βάση μόνον τον δείκτη *E. coli*, βρέθηκε ότι οι καταμετρήσεις δεν ξεπερνούσαν τα 240 cfu/100 ml με εξαίρεση μόνον ένα σημείο, που



βρισκόταν μισό χιλιόμετρο από την έξοδο λυμάτων, το οποίο σε όλες τις δειγματοληψίες ήταν εκτός των διεθνώς αποδεκτών ορίων καταλληλότητας για κολύμβηση (Cabezali και συν., 1986).

Σε έρευνα που αφορούσε την ποιότητα των παράκτιων υδάτων στην Αλεξάνδρεια της Αιγύπτου, εξετάστηκαν 24 δείγματα για παρουσία *E. coli*, ολικών κολοβακτηριοειδών, εντεροκόκκων, γερσινιών, σιγγελών, σαλμονελλών, βακτηριοφάγων και εντεροϊών. *E. coli* απομονώθηκε στο 65% των δειγμάτων, ενώ σε 12 από τα 24 δείγματα ξεπερνούσε το αποδεκτό όριο. Επίσης σε 15 από τα 24 δείγματα οι εντερόκοκκοι ήταν εκτός των ορίων καταλληλότητας, σε ένα δείγμα απομονώθηκε σαλμονέλλα, σε κανένα δεν απομονώθηκε γερσίνια ή σιγκέλα, τρία δείγματα ήταν θετικά για εντεροϊούς, ενώ η ανάλυση των βακτηριοφάγων έδειξε ποικίλες τιμές ρύπανσης (Divizia και συν., 1997).

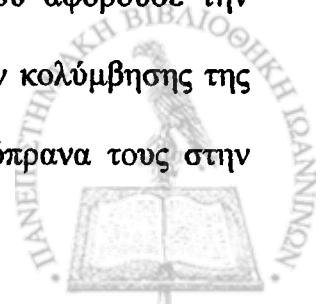
Στη λίμνη Παμβώτιδα οι μικροβιολογικές καταμετρήσεις ήταν ιδιαίτερα αυξημένες και συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες του λιμανιού της Πρέβεζας. Πρώτιστο ρόλο στη μεταφορά μικροβιακού φορτίου στην λίμνη έχουν τα αστικά λύματα και τα οικιακά απορρίμματα, οι ποσότητες των οποίων φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα μεγάλες σε σχέση με τον όγκο των νερών της λίμνης. Τα σφαγεία πουλερικών, παραγωγικών ζώων και τα χοιροστάσια, παρά την λειτουργία συστημάτων βιολογικών καθαρισμών φαίνεται πως επίσης συμβάλλουν κατά ένα ποσοστό στην μικροβιολογική επιβάρυνση και ακολουθούν τα απόβλητα των νοσηλευτικών μονάδων. Η λίμνη Ζιρού φαίνεται ότι παρουσιάζει ικανότητα αυτοκαθαρισμού αφού η συνολική μικροβιολογική εικόνα της ποιότητας των νερών της κρίνεται πολύ ικανοποιητική. (Πιν.1δ, 9α). Από τις δύο λίμνες (Παμβώτιδα, Ζιρού), απομονώθηκαν 32 βακτηριακά στελέχη, από τα οποία την μεγαλύτερη συχνότητα (37,5%) εμφάνιζαν τα στελέχη *E. faecalis*, ακολουθούσαν τα στελέχη *S. aureus* (18,7%), *Pseudomonas spp* (15,6%), Εντεροβακτηριακά (15,6%) και *E. faecium* (12,5%) (Πίνακες 1α, 1β, Γράφημα 2,7).



Αντίστοιχες ή παρόμοιες δημοσιευμένες εργασίες που έχουν γίνει στην χώρα μας και αφορούν την ποιότητα νερών λιμνών είναι σπάνιες. Σε παλαιότερη μικροβιολογική έρευνα (1980-82) των νερών της Παμβώτιδας Λίμνης είχε απομονωθεί ένα στέλεχος *Salmonella gallinarum* (Παπαδοπούλου 1983). Σε πρόσφατη έρευνα που αφορούσε αναζήτηση πρωτοζώων (*Cryptosporidium* and *Giardia*) στα νερά της Παμβώτιδας είχαν καταμετρηθεί από 3 κύστεις/100L (τους θερμούς μήνες) και 357 κύστεις/100L (τους ψυχρούς μήνες), γεγονός που δείχνει υψηλό βαθμό μικροβιολογικής ρύπανσης με λύματα ανθρώπινης και ζωικής προέλευσης (Karanis και συν., 2002).

Και στην διεθνή βιβλιογραφία οι μελέτες σχετικά με την μικροβιολογική ποιότητα των νερών λιμνών είναι ελάχιστες. Σε παρόμοια μελέτη που αφορούσε την μικροβιολογική ποιότητα των λιμνών στην Sierra Nevada (Η.Π.Α), αναζητήθηκαν εντεροβακτηριακά και άλλα παθογόνα βακτήρια. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν συχνότερα ήταν τα εντεροβακτηριακά (45%), τα οποία ταυτοποιήθηκαν ως *E. coli*. Επίσης απομονώθηκε ένα στέλεχος *Yersinia enterocolitica*, ενώ σε όλα τα δείγματα απομονώθηκαν *Pseudomonas* spp, *Serratia* spp, και άλλα μη παθογόνα είδη (Derlet και συν., 2004).

Στις Η.Π.Α. έχει γίνει μια σειρά μελετών, που αφορά την λίμνη του Michigan, η οποία χρησιμοποιείται για κολύμβηση και ψυχαγωγικούς σκοπούς και η οποία συχνά υπόκειται σε περιορισμούς χρήσης εξαιτίας υπέρβασης των ορίων καταλληλότητας των υδάτων της. Σε έρευνα που αφορούσε την ποιότητα των κολυμβητικών υδάτων στην ακτή Grand Traverse Bay της λίμνης Michigan βρέθηκε ότι συχνά οι καταμετρήσεις της *E. coli* και ιδίως των εντεροκόκκων, ξεπερνούσαν το όριο καταλληλότητας και αυτό το απέδωσαν στην επιμόλυνση με κόπρανα υδρόβιων πτηνών, νερό καταιγίδων και νερό παρακείμενων ποταμών που χύνονταν στην λίμνη (Haack και συν., 2003). Σε άλλη έρευνα που αφορούσε την παρουσία αυξημένου αριθμού *E. coli* στο νερό και στην άμμο των ακτών κολύμβησης της λίμνης Michigan βρέθηκε ότι οι γλάροι συνέβαλαν κατά πολύ με τα κόπρανα τους στην



μόλυνση του νερού και ότι η άμμος των ακτών εξαιτίας της εύκρατης θερμοκρασίας που επικρατεί στην περιοχή, διατηρούσε τους πληθυσμούς της *E. coli* για όλο το διάστημα των θερινών μηνών (Whitman και Nevers, 2003). Σε μελέτη διερεύνησης των αιτιών που προκαλούν την έκδοση απαγορευτικών οδηγιών κολύμβησης και άλλων αθλοπαιδιών στην λίμνη Michigan, παρατηρήθηκε ότι όταν τα δείγματα λαμβάνονταν σε απόσταση 10-150m από την ακτή οι καταμετρήσεις της *E. coli* δεν ξεπερνούσαν τα 235cfu/100ml, όταν όμως λαμβάνονταν κοντά στην ακτή τότε ξεπερνούσαν το παραπάνω όριο (McLellan και Salmore, 2003).

Σε μελέτη που αφορούσε την ποιότητα των κολυμβητικών υδάτων σε 10 ακτές των λιμνών του Ontario (Καναδάς) βρέθηκε ότι στο επιφανειακό νερό ο μέσος όρος των εντεροβακτηριακών ήταν εντός των αποδεκτών ορίων. Αντίθετα στα δείγματα από την λάσπη του πυθμένα οι τιμές ήταν δέκα φορές μεγαλύτερες. Επίσης στην διάρκεια της μελέτης τους οι ερευνητές παρατήρησαν ότι οι λοιμώξεις των κολυμβητών από σταφυλοκόκκους και εντεροκόκκους συσχετιζόνταν πάντα από αντίστοιχα αυξημένους αριθμούς των δύο αυτών βακτηριακών δεικτών μόλυνσης (Seyfied και συν., 1985).

Ο μεγαλύτερος βαθμός μικροβιολογικής ρύπανσης στα δείγματα ποταμών σημειώθηκε στο Λούρο, όπου η μικροβιολογική ρύπανση ξεκινά από τη θέση «Παντάνασσα» και στη συνέχεια δεν παρουσιάζει σημαντική μεταβολή μέχρι το σταθμό «Γέφυρα Καλογήρου», όπου παρατηρήθηκε αύξηση του μικροβιακού φορτίου. Αυτή η αύξηση φαίνεται να προέρχεται από μονάδες χοιροτροφίας, που λειτουργούν στην περιοχή και ενισχύεται με πρόσθετο μικροβιολογικό φορτίο από διάφορες άλλες γεωργικές, κτηνοτροφικές και βιομηχανικές δραστηριότητες, ενώ μειώνεται σημαντικά κοντά στις εκβολές. Η μείωση κοντά στις εκβολές οφείλεται στην αφομοιωτική ικανότητα των νερών και στη σημαντική ελάττωση του αριθμού των μονάδων κατά το τέλος της διαδρομής (Πίνακες 1δ, 9α).



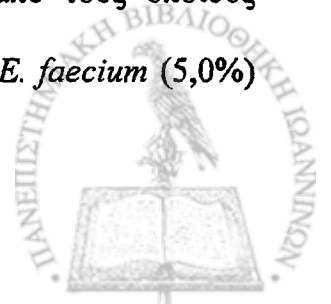
**Στον Αχέροντα** παρατηρήθηκε μια αύξηση του μικροβιακού φορτίου κατά μήκος της ροής του ποταμού ξεκινώντας από τον πρώτο σταθμό (Γλυκή). Η αύξηση που παρατηρείται φαίνεται ότι προέρχεται από τις έντονες ανθρωπογενείς δραστηριότητες και τη μεγάλη πυκνότητα πληθυσμού που συγκεντρώνεται σε μικρή απόσταση γύρω από τον ποταμό. Η περιοχή εκτός από τα αστικά λύματα έχει και έντονο γεωργικό χαρακτήρα. Επίσης στην ρύπανση του ποταμού πιθανόν να συμβάλλουν και οι αγροτικού τύπου βιοτεχνίες (ελαιουργεία, μεταποιητήρια βάμβακος, εργοστάσια ζωοτροφών) (Πίνακες 1δ, 9α).

**Στον Άραχθο** οι μετρήσεις έδειξαν χαμηλό μικροβιακό φορτίο και αυτό έχει να κάνει με την λειτουργία του σταθμού επεξεργασίας των λυμάτων της Άρτας (Πίνακες 1δ, 9α).

**Στον Καλαμά** μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι εμφανίζεται μια αυξομείωση του μικροβιακού φορτίου. Πρέπει να σημειώσουμε ότι ο Καλαμάς αποτελεί τον τελικό αποδέκτη των αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων της περιοχής των Ιωαννίνων τα τελευταία χρόνια. Το σύνολο των αποβλήτων υφίσταται βιολογική επεξεργασία γεγονός που έχει προστατέψει την ποιότητα των υδάτων του ποταμού όπως φαίνεται από τις καταμετρήσεις των μικροβιολογικών παραμέτρων που εξετάστηκαν. Οι σχετικά αυξημένες συγκεντρώσεις μικροβιακού φορτίου, που παρατηρούνται στο φράγμα της Σαγιάδας φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της στασιμότητας των νερών (Πίνακες 1δ, 9α).

**Τα ποτάμια Αώος, Βοΐδομάτης** έχουν μικροβιολογικά πολύ καθαρά νερά. Η καλή τους ποιότητα φαίνεται ότι οφείλεται στην απουσία ανθρώπινων δραστηριοτήτων στις γύρω περιοχές και στην λήψη μέτρων προστασίας τους. (Πίνακες 1δ, 9α).

Συγκεκριμένα στο νερό των ποταμών από τα 220 βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν, την μεγαλύτερη συχνότητα (33,1%) εμφάνιζαν οι ψευδομονάδες, ακολουθούσαν τα εντεροβακτηριακά (27,7%), οι εντερόκοκκοι(22,7), από τους οποίους συχνότερα απομονώθηκε ο *E. faecalis* (15,0%) ακολουθούμενος από τον *E. faecium* (5,0%)





και τέλος οι σταφυλόκοκκοι (*S. aureus*) με ποσοστό απομόνωσης (19,0%) (Πίνακες 1α ,1β, Γράφημα 3,7).

Σε πρόσφατη μελέτη, που αφορούσε την μικροβιολογική ποιότητα πέντε ποταμών της Μακεδονίας και της Θεσσαλίας (Αλιάκμονας, Αξιός, Λουδίας, Μαυρονέρι, Πηνειός) την περίοδο Ιούνιος 2002-Μάρτιος 2003), οι καταμετρήσεις της ολικής μικροβιακής χλωρίδας κυμαίνονταν από 35 έως 1000 cfu/ml, τα ολικά κολοβακτηριοειδή από 0 έως  $6 \times 10^2$  cfu/100ml, τα κολοβακτηριοειδή κοπρανόδους προέλευσης, οι εντερόκοκκοι, οι ψευδομονάδες και οι σταφυλόκοκκοι από 0 έως 1000 cfu/100ml (Karanis και συν., 2005).

Στην Ισπανία σε μελέτη που αφορούσε την μικροβιολογική ποιότητα του ποταμού Riato, οι καταμετρήσεις των εντεροβακτηριοειδών και των κολοβακτηριοειδών κοπρανόδους προέλευσης κυμαίνονταν από  $10^3$  έως  $10^6$  cfu/100ml, οι εντερόκοκκοι ήταν λιγότεροι από 10cfu/100ml και σε όλα τα δείγματα απομονώθηκαν *E. coli* και *Pseudomonas aeruginosa* (Fernandez και συν., 1991).

Στην Γερμανία σε έρευνα της βακτηριολογικής ποιότητας του ποταμού Ρήνου στην περιοχή Rhine-Neckar, οι ολικές μικροβιακές καταμετρήσεις κυμαίνονταν από μερικές εκατοντάδες έως και  $1,8 \times 10^6$  μικροοργανισμούς ανά 1 ml νερού. Εντεροβακτηριοειδή απομονώθηκαν από όλα τα δείγματα και συνολικά απομονώθηκαν 549 στελέχη. *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia liquefaciens* και *Citrobacter freundii* ήταν τα είδη με απομονώθηκαν συχνότερα. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το νερό του Ρήνου στην συγκεκριμένη περιοχή είναι μια «ανεξέλεγκτη δεξαμενή» βακτηρίων και δεν πρέπει να χρησιμοποιείται για κολύμβηση, ύδρευση και άρδευση (Mersch-Sundermann και Wundt, 1987).

Στη Σκωτία (Βρετανία) διερευνήθηκε η συγκέντρωση των κολοβακτηριοειδών κοπρανόδους προέλευσης ως δείκτη της υγειονομικής κατάστασης των παραπόταμων του ποταμού Don στην περιοχή του Aberdeen. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν ότι οι



αριθμοί των κολοβακτηριοειδών κοπρανόδους προέλευσης αυξάνονταν δραματικά στα δείγματα από τους παραπόταμους, που περνούσαν από περιοχές με έντονη γεωργο-κτηνοτροφική δραστηριότητα (π.χ. κτηνοτροφικές μονάδες, αγροί που χρησιμοποιούσαν κοπριά για λίπασμα). Μάλιστα μετά από βροχές και καταιγίδες, η συγκέντρωση του συγκεκριμένου μικροβιακού δείκτη ήταν ακόμη μεγαλύτερη εξαιτίας της απορροής προς τους παραπόταμους των νερών, που «ξέπλεναν» τα χωράφια και τα λύματα των μονάδων. Σύμφωνα με τους ερευνητές η μικροβιολογική επιβάρυνση των παραπόταμων επιβάρυνε την ποιότητα του νερού του ποταμού Don, ο οποίος χρησιμοποιείται για ύδρευση των παρακείμενων πόλεων και χωριών και για ψυχαγωγία (κολύμβηση, κωπηλασία κτλ) (Rodgers και συν., 2003).

Η αξιολόγηση των μικροβιακών δεικτών μόλυνσης στο νερό των ποταμών της πολιτείας του Oregon (Η.Π.Α) που έγινε το διάστημα 1997-98, έδειξε ότι οι βακτηριακοί δείκτες (ολική μικροβιακή χλωρίδα, ολικά κολοβακτηριοειδή, κολοβακτηριοειδή κοπράνων, *E. coli*) επηρεάζονται από τις ανθρώπινες δραστηριότητες της παρακείμενης περιοχής (Pennington και συν., 2001).

Σε 2ετή έρευνα που αφορούσε την ποιότητα των υδάτων του ποταμού Oldman στην νότια Αλμπέρτα, του Καναδά, μια περιοχή όπου ασκούνται εντατικές γεωργο-κτηνοτροφικές πρακτικές και εκδηλώνονται συχνά εντερίτιδες στον πληθυσμό, απομονώθηκαν από τα νερά του *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* spp σε ποσοστό 0,9% και 6,2% αντίστοιχα (Johnson και συν., 2003).

Στην Γκάνα (Αφρική), εξέτασαν επί ένα χρόνο τους συνήθεις δείκτες μικροβιολογικής ρύπανσης σε δείγματα νερού από τον ποταμό Subin, ο οποίος περνάει από μια μεγάλη πόλη και χρησιμοποιείται για ύδρευση. Οι καταμετρήσεις των ολικών κολοβακτηριοειδών κυμαίνονταν από  $1,6 \times 10^9$  έως  $4,06 \times 10^{13}$  cfu/100ml, των κολοβακτηριοειδών κοπρανόδους



προέλευσης από  $9,75 \times 10^8$  έως  $8,98 \times 10^{12}$  και των εντεροκόκκων από  $1,01 \times 10^2$  έως  $6,57 \times 10^6$  cfu/100ml (Obiri-Danso και συν., 2005).

Σε δείγματα νερών από τρεις ποταμούς στο Μαρακές (Μαρόκο) οι καταμετρήσεις των αερομονάδων κυμαίνονταν από  $2,5 \times 10^3$  έως  $2,1 \times 10^6$  cfu/100ml και τα είδη που απομονώθηκαν συχνότερα ήταν *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. sobria* (Imzili 2001).

Σε μελέτη 572 δειγμάτων νερών από τις εκβολές ποταμών στη Νιγηρία, απομονώθηκαν 157 (27,4%) στελέχη *Pseudomonas* spp, 133 (23,5%) στελέχη *E. coli* και 282 (47,0%) στελέχη άλλων βακτηρίων (Sokari και συν. 1988).

Μελέτη της μικροβιολογικής ποιότητας των ποταμών που υδρεύουν κοινότητες της περιοχής Venda της Β. Αφρικής έδειξε την παρουσία παθογόνων βακτηρίων όπως *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Plesiomonas*, *Aeromonas* και *Vibrio*. Οι καταμετρήσεις των μικροβιακών δεικτών, ήταν όλες εκτός των ορίων καταλληλότητας και κυμαίνονταν από  $2,9 \times 10^2$  έως  $6,3 \times 10^4$  cfu/100ml για τα κολοβακτηριοειδή κοπρανόδους προέλευσης, από  $6 \times 10^2$  έως  $3,7 \times 10^4$  cfu/100ml για τα ολικά κολοβακτηριοειδή, από  $1 \times 10^1$  έως  $3,7 \times 10^4$  cfu/100ml για τους εντεροκόκκους, από  $1,8 \times 10^2$  έως  $1,3 \times 10^6$  cfu/1ml για την ολική μικροβιακή χλωρίδα (Obi και συν., 2003).

## 5.2. Μικροβιολογική ποιότητα των ιχθυηρών

Από τα θαλασσινά ψάρια ελεύθερης αλιείας απομονώθηκαν 98 στελέχη βακτηρίων. Από τα είδη βακτηρίων που απομονώθηκαν, πρώτα σε συχνότητα ήταν τα Εντεροβακτηριακά (35,7%) και ακολουθούσαν τα *Pseudomonas* spp (26,5%), *E. faecalis* (15,3%), *S. aureus* (15,3%) και *E. faecium* (7,1%) (Πίνακες. 1α, 1β, Γράφημα 5,7).

Από τα θαλασσινά ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών απομονώθηκαν 130 στελέχη. Πρώτο σε συχνότητα ήταν η *Pseudomonas* spp (33%), και ακολουθούσαν τα Εντεροβακτηριακά



(26,0%), *E. faecalis* (13,0%), *S. aureus* (18,0%), *E. faecium* (5,0%) και *Aeromonas* spp (4,0%) (Πίνακες 1α ,1β Γράφημα 6,7).

Οι δημοσιευμένες μελέτες σχετικά με την μικροβιολογική ποιότητα των ψαριών δεν είναι πολλές και δεν διαχωρίζουν τα ελεύθερης αλιείας από τα καλλιεργημένα ψάρια. Επίσης με εξαίρεση μια ευρωπαϊκή πολυκεντρική μελέτη και μια ανακοίνωση σε ελληνικό συνέδριο, που αναφέρονται παρακάτω δεν υπάρχουν άλλες δημοσιευμένες αναφορές για την μικροβιολογική ποιότητα των ψαριών στην Ελλάδα.

Σε ανακοίνωση των Παπαδοπούλου και συν. (1996) αναφέρεται ότι από 92 δείγματα φρέσκων και καταψυγμένων ιχθυηρών γλυκών και αλμυρών υδάτων, απομονώθηκαν *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter agglomerans*, *Acinetobacter* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas hydrophila* και μύκητες των ειδών *Candida quilliermondi*, *Debaryomyces quilliermondi*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium italicum*, *Epidermophyton* spp.

Σε πολυκεντρική μελέτη που αφορούσε την μόλυνση των ψαριών με παθογόνους μικροοργανισμούς σε διάφορες ευρωπαϊκές χώρες (Γαλλία, Βρετανία, Ολλανδία, Πορτογαλία και Ελλάδα), απομονώθηκε από όλα τα δείγματα και από όλες τις χώρες *A. hydrophila* με συχνότητα 40%, ενώ *V. parahaemolyticus* απομονώθηκε μόνον από την Πορτογαλία (35%) και την Ελλάδα (14%). *Yersinia enterocolitica* και *Listeria monocytogenes* απομονώθηκαν από πέστροφα και σολωμό αντίστοιχα μόνον στην Βρετανία, ενώ άλλα είδη λιστεριών (*L. innocua*, *L. seeligeri*) απομονώθηκαν σε δείγματα από την Βρετανία και Πορτογαλία (Davies και συν., 2001).

Στη Βραζιλία σε 175 δείγματα φρέσκων ψαριών και γαρίδων που συλλέχθηκαν από τις αγορές, απομονώθηκε *S. aureus* με συχνότητα 20 % (Ayulo και συν 1994).



Σε έρευνα που αφορούσε την συχνότητα μόλυνσης των ψαριών σε Ευρώπη και Ασία με *Clostridium botulinum*, βρέθηκε ότι η συχνότητα απομόνωσης του μικροοργανισμού διέφερε σημαντικά ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή. Η συχνότητα απομόνωσης του *C. botulinum* στις διάφορες χώρες κυμαίνονταν από 0 έως 100%, με τα μικρότερα ποσοστά να αναφέρονται από τις Ευρωπαϊκές και Ασιατικές χώρες, παρά από τις ΗΠΑ. (Dodds, 1993).

Η συχνότητα απομόνωσης *A. hydrophila* σε ψάρια ποικίλλει, π.χ. στην Βρετανία είναι 19% (Fricker και Tompsett, 1989), στην Νέα Ζηλανδία είναι 28% (Hudson και συν., 1992), στην Ελβετία φθάνει το 90% (Gobat και Jemmi, 1993), ενώ στην Ταϊβάν είναι 22% (Tsai και Chen, 1996). Επίσης ποικίλλει και η συχνότητα απομόνωσης λιστεριών σε θαλασσινά τρόφιμα και εξαρτάται από την γεωγραφική περιοχή. Στις εύκρατες περιοχές η συχνότητα απομόνωσης της *L. monocytogenes* στα ψάρια κυμαίνεται από 4 έως 12%, ενώ στις τροπικές από 0 έως 2% (Embarek 1994). Το ίδιο έχει παρατηρηθεί για την *Yersinia enterocolitica*, που απομονώνεται από τα ψάρια με συχνότητα που κυμαίνεται από 0 έως 22%, όμως όλα τα στελέχη δεν είναι πάντα παθογόνα (Nedoluha, 2001, Pullela, 1998, Kamat, 1998, Davies, 1995, Garcia, 1995. Hudson, 1993)

### **5.3. Αντοχή στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματα υδάτων**

Τα τελευταία χρόνια άρχισαν να εμφανίζονται στην διεθνή βιβλιογραφία αναφορές σχετικά με την εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων, τα οποία απομονώνονται από το υδάτινο περιβάλλον (γλυκά και αλμυρά νερά, ψάρια, οστρακοειδή κτλ). Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε τις αντοχές στα συνήθη αντιβιοτικά των παθογόνων βακτηρίων που απομονώσαμε τόσο από τα δείγματα των νερών (πόσιμα, θαλασσινά, λίμνης, ποταμών), όσο και από δείγματα των ψαριών (ελεύθερης αλιείας και ιχθυοκαλλιέργειας).



Από τα στελέχη *S. aureus*, που απομονώθηκαν και από τις τέσσερις κατηγορίες δειγμάτων νερού, που εξετάσαμε, εμφάνισαν αντοχές στην penicillin το 33,3%, στην erythromycin το 28,7%, στην ciprofloxacin το 12,3%, στην gentamicin το 9,2% και στην oxacillin το 7,4% (Πίνακας 2, Γράφημα 10). Αναλυτικότερα όσον αφορά τον *S. aureus* το 35,7% των στελεχών, που απομονώθηκαν από τα δείγματα των νερών ποταμών, ήταν ανθεκτικά στην penicillin και το 23,8% στην erythromycin, ενώ από τα στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από δείγματα νερών θάλασσας, το 30,0% ήταν ανθεκτικά στην penicillin και το 33,3% στην erythromycin. Επίσης από τα στελέχη *S. aureus*, που απομονώθηκαν από τα νερά λιμνών, το 50,0% ήταν ανθεκτικά στην penicillin, το 16,6% ήταν ανθεκτικά στην ciprofloxacin στην erythromycin, και στην oxacillin ενώ στα υπόλοιπα αντιβιοτικά εμφάνισαν ευαισθησία. Από τα πόσιμα νερά δεν απομονώθηκαν ανθεκτικά στελέχη *S. aureus* (Πίνακας 2, Γράφημα 10).

Τα στελέχη *E. faecalis* και *E. faecium*, που απομονώθηκαν από το σύνολο των νερών δεν παρουσίασαν μεταξύ τους σημαντική διαφορά ως προς την αντοχή τους στην ciprofloxacin (26,8% και 21,6% αντίστοιχα,  $p > 0,05$ ) και erythromycin (9,7% και 10,8% αντίστοιχα,  $p > 0,05$ ), ενώ διέφεραν ως προς την αντοχή τους στην ampicillin (7,3% και 0% αντίστοιχα  $p < 0,05$ ). Το σύνολο των εντεροκόκκων βρέθηκε ευαίσθητο στην vancomycin και στην teicoplanin (Πίνακας 3, 4 και Γραφήματα 11,12). Αναλυτικότερα όσον αφορά τον *E. faecalis*, το 24,2% των στελεχών, που απομονώθηκαν από τα δείγματα των νερών ποταμών, ήταν ανθεκτικά στην ciprofloxacin και το 12,2% στην erythromycin, ενώ από τα στελέχη *E. faecalis*, που απομονώθηκαν από δείγματα νερών θάλασσας, το 20,6% ήταν ανθεκτικά στην ciprofloxacin και μόνον το 3,4% στην erythromycin. Επίσης από τα στελέχη *E. faecalis*, που απομονώθηκαν από τα νερά λιμνών, το 16,6% ήταν ανθεκτικά στην ciprofloxacin, ενώ στα υπόλοιπα αντιβιοτικά εμφάνισαν ευαισθησία. Από τα πόσιμα νερά δεν απομονώθηκαν ανθεκτικά στελέχη *E. faecalis* (Πίνακας 3, Γράφημα 11).



Όσον αφορά τον *E. faecium*, μόνον το 9,0% των στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερών ποταμών, ήταν ανθεκτικά στην ciprofloxacin και στην erythromycin, ενώ όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην ampicillin. Επίσης τα στελέχη *E. faecium* που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερών λιμνών, ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν. Αντίθετα από τα στελέχη, που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερών θάλασσας, το 38,4% ήταν ανθεκτικά στην ciprofloxacin και το 11,5% στην erythromycin και στην ampicillin, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στα θαλασσινά κολυμβητικά νερά παρατηρούνται πιο ανθεκτικά στελέχη εντεροκόκκων σε σχέση με εκείνα που απομονώνονται από τα ποτάμια και τις λίμνες (Πίνακας 4, 12).

Σε παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε διάφορα νομαρχιακά διαμερίσματα της Βόρειας Ελλάδας, η οποία όμως αφορούσε μόνον θαλασσινά κολυμβητικά νερά, από 1670 δείγματα νερού, τα συχνότερα απομονωθέντα στελέχη ήταν *E. faecium*, *E. avium*, *E. raffinosus*. Μονοαντοχή, διπλοαντοχή και πολυαντοχή παρατηρήθηκε σε ποσοστό 22,8%, 33,5% και 22,8% αντίστοιχα, ενώ η αντοχή τους στην ερυθρομυκίνη έφτανε το 57,3%, ενώ πολλά από αυτά τα στελέχη βρέθηκαν επίσης ανθεκτικά στην ciprofloxacin, rifampicin, kanamycin και streptomycin. Οι ερευνητές (Αρνανιτίδου και συν., 2001) κατέληξαν ότι τα κολυμβητικά νερά μπορεί να συμβάλλουν στην διασπορά ασυνήθιστων αντιβιοανθεκτικών στελεχών εντεροκόκκων, παρατήρηση η οποία συμφωνεί με τα δικά μας αποτελέσματα.

Σε προγενέστερη μελέτη της ίδιας ομάδας ερευνητών (Αρνανιτίδου και συν., 1999), η οποία αφορούσε την απομόνωση ανθεκτικών στην στρεπτομυκίνη εντεροκόκκων από τις ελληνικές μονάδες αιμοκάθαρσης, απομονώθηκαν 11 στελέχη *E. faecium*, 8 στελέχη *E. raffinosus* και 6 άλλα είδη εντεροκόκκων από δείγματα νερού βρύσης και επεξεργασμένου νερού αιμοδιάλυσης. Από τα στελέχη εντεροκόκκων που απομονώθηκαν τα 22 εμφάνιζαν αντοχή στην στρεπτομυκίνη, τα 16 στην ριφαμπικίνη και ένα στην ερυθρομυκίνη. Οι ερευνητές διατυπώνουν την ανησυχία τους μήπως το νερό που χρησιμοποιείται στις μονάδες



νεφρού αποτελεί πηγή μεταφοράς ανθεκτικών στελεχών εντεροκόκκων στους ασθενείς που υποβάλλονται σε αιμοκάθαρση.

Από τα στελέχη *Pseudomonas spp.*, που απομονώθηκαν από όλα τα δείγματα νερών (θαλασσών, λιμνών ποταμών και πόσιμων), το 19,5% ήταν ανθεκτικά στην ceftazidime, το 6,5% στην amicacin, το 5,7% στην ciprofloxacin και το 0,7% στην gentamicin (Πίνακας 5, Γράφημα .13). Αναλυτικότερα από τα στελέχη *Pseudomonas spp.* που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερών θάλασσας, το 24,5% ήταν ανθεκτικά στην ceftazidime, το 5,6% στην amicacin, το 3,7% στην ciprofloxacin, ενώ όλα τα στελέχη είναι ευαίσθητα στην gentamicin. Από τα στελέχη *Pseudomonas spp.* που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερών ποταμών, το 19,1% ήταν ανθεκτικά στην ceftazidime, το 8,8% στην amicacin, το 7,4% στην ciprofloxacin και το 1,5% στην gentamicin. Από τα στελέχη που απομονώθηκαν από νερά λιμνών μόνον ένα ήταν ανθεκτικό στην ceftazidime, ενώ από τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα δείγματα πόσιμων νερών κανένα δεν εμφάνισε αντοχή στα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν (Πίνακας 5, Γράφημα 13).

Στην Ελλάδα, σε έρευνα του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών, η οποία αφορούσε την ευαισθησία στα αντιβιοτικά, 194 στελεχών ψευδομονάδας, που απομονώθηκαν από το πόσιμο νερό, βρέθηκαν όλα τα στελέχη ανθεκτικά στην erythromycin, αλλά ευαίσθητα στην ciprofloxacin και ceftazidime. Οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν μεγάλη αντοχή στους 20°C και 30°C, ενδιάμεση στους 37°C και πολύ μεγάλη ευαισθησία στους 42°C έναντι της gentamicin και σε μικρότερο βαθμό έναντι της amikacin σε στελέχη των ειδών *P. maltophilia*, *P. ceracia* και *P. fluorescens*. Τα στελέχη *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. putida* και *P. picketii* δεν εμφάνισαν διαφορά όσον αφορά την ευαισθησία στους 20°C, 30°C, 37°C και 42°C. (Papapetropoulou και σύν., 1994).





Σε πολυκεντρική έρευνα του Εργαστηρίου Υγιεινής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, που αφορούσε την αντιβιοαντοχή 141 βακτηρίων (*P. aeruginosa*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Sternotrophomonas maltophilia*, *E. coli*, *E. cloacae*) που απομονώθηκαν από 255 δείγματα νερών (πόσιμων δικτύου και νερά των 85 Ελληνικών Κέντρων Αιμοδιάλυσης) βρέθηκε ότι το συχνότερα απομονούμενο είδος ήταν η *P. aeruginosa* (71,6%) και ότι το 19% των απομονωθέντων L+ που διασπούν την λακτόζη εντεροβακτηριακών και το 35% των L- που δεν διασπούν την λακτόζη εμφάνιζαν αντοχή σε τρία ή περισσότερα αντιβιοτικά (Αργανιτιδου και συν., 2003).

Στην διεθνή βιβλιογραφία είναι αρκετές οι αναφορές σχετικά με την απομόνωση ανθεκτικών στελεχών ψευδομονάδων από τα νερά δικτύου των νοσοκομείων, σε πολλά από τα οποία η ανεύρεσή τους γίνεται -δυστυχώς- μετά από εμφάνιση περιστατικών ενδοноσοκομειακών λοιμώξεων.

Στην Γαλλία στην διάρκεια μιας ενδοноσοκομειακής επιδημίας ουρολοιμώξεων στην Παιδιατρική Κλινική του Νοσοκομείου Hopital Necker-Enfants Malades (Παρίσι), απομονώθηκαν από τα νερά βρύσης της κλινικής καθώς και από άλλους χώρους του νοσοκομείου στελέχη *P. aeruginosa*, από τα οποία τα δύο ήταν ίδια με τα στελέχη που είχαν απομονωθεί από δύο μικρούς ασθενείς (Ferroni και συν., 1998). Στην ίδια χώρα στο νοσοκομείο Hopital Beaujon του Clichy απομονώθηκε πολυανθεκτικό στέλεχος *P. aeruginosa* O11, μετά από ενδοноσοκομειακή επιδημία, η οποία εκδηλώθηκε στους ασθενείς της εντατικής μονάδας της νευροχειρουργικής κλινικής. Το στέλεχος ήταν ανθεκτικό στην ticarcillin, ceftazidime, imipenem, gentamicin και ciprofloxacin (Bert και συν., 1998).

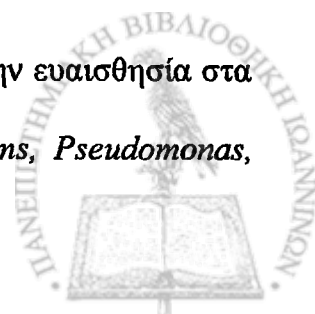
Σε ενδοноσοκομειακή επιδημία αναπνευστικής λοίμωξης, η οποία εκδηλώθηκε στην εντατική μονάδα νεογνών στο Βέλγιο απομονώθηκε το ίδιο στέλεχος *P. aeruginosa* από τα νεογνά και από το νερό ενός υδατόλουτρου, που το χρησιμοποιούσαν για ξεπάγωμα καταψυγμένου πλάσματος (Muyldermans και συν., 1998).



Από τα στελέχη *E. coli*, που απομονώθηκαν από το σύνολο των δειγμάτων νερού (ποταμών θαλασσών λιμνών και πόσιμων), βρέθηκαν ανθεκτικά στην ampicillin το 37,3%, στην cefuroxime το 6,6% και στην Ciprofloxacin το 1,3%, ενώ όλα τα στελέχη ανεξάρτητα από την προέλευση τους βρέθηκαν ευαίσθητα στην gentamicin, ceftazidime και ampicillin. Αναλυτικότερα από τα στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερών ποταμών, το 55,5%, ήταν ανθεκτικά στην ampicillin, το 27,7% στην cefuroxime και το 5,5% στην ciprofloxacin, ενώ από τα στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερών θαλασσών μόνο 36,5% ήταν ανθεκτικά στην ampicillin, ενώ όλα τα στελέχη είναι ευαίσθητα στα υπόλοιπα αντιβιοτικά. Επίσης από τα στελέχη, που απομονώθηκαν από τα νερά λιμνών, το 50,0% ήταν ανθεκτικά στην ampicillin ενώ όλα τα στελέχη είναι ευαίσθητα στα υπόλοιπα αντιβιοτικά. Από τα στελέχη *E. coli*, που απομονώθηκαν από τα πόσιμα νερά μόνο το 14,2% ήταν ανθεκτικά στην ampicillin. (Πίνακας 11, Γράφημα 14).

Οι Παπανδρέου και συν., απομόνωσαν 239 Gram αρνητικά βακτήρια (*Enterobacteriaceae* 62, *Pseudomonas* 145, *Vibrionaceae* 24 κ.ά) από το παλιό δίκτυο ύδρευσης της Πάτρας, τα οποία μελέτησαν ως προς την αντοχή τους σε 20 αντιβιοτικά. Τα υψηλότερα επίπεδα αντοχής παρατηρήθηκαν ως προς τα αντιβιοτικά cephalothin (86,7%), ampicillin (77,5%) και carbenicillin (71,0%), ακολουθούμενα από την cefoxitin (55,4%) και την cefuroxime (51,2%), ενώ ενδιάμεση ήταν η ευαισθησία όλων των στελεχών ως προς την ticarcillin (31,3%), ceftizoxime (31,2%), chloramphenicol (30,3%) και cefotetan (25,2%). Τέλος όλα τα στελέχη τους ήταν ευαίσθητα σε ceftazidime, imipenem, aztreonam, αμινογλυκοσίδες και κινολόνες, αλλά οι ερευνητές εκφράζουν έντονη ανησυχία για την παρουσία πολυανθεκτικών βακτηρίων στο πόσιμο νερό της Πάτρας (Papandreou και συν., 2000).

Σε μεγάλη έρευνα που έγινε στο Oregon (Η.Π.Α) και αφορούσε την ευαισθησία στα αντιβιοτικά 2445 στελεχών βακτηρίων Gram-αρνητικών (*Faecal coliforms*, *Pseudomonas*,



*Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium-Cytophaga*), τα οποία απομονώθηκαν από τέσσερις ποταμούς και από την θάλασσα, βρέθηκε ότι τα στελέχη των εντεροβακτηριοειδών κοπρανόδους προέλευσης, που απομονώθηκαν από τα θαλασσινά νερά εμφάνιζαν μεγαλύτερες αντοχές από εκείνα που απομονώνονταν από τα επιφανειακά νερά των ποταμών. Οι ερευνητές κατέληξαν ότι τα αντιβιοανθεκτικά εντεροβακτηριοειδή κοπρανόδους προέλευσης φαίνεται να επιβιώνουν καλύτερα στο θαλασσινό νερό από ότι τα άλλα ευαίσθητα βακτήρια των επιφανειακών γλυκών υδάτων (Kelch και Lee, 1978).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στις Η. Π. Α σε 16 ποταμούς, το 40,0% των Gram-αρνητικών βακτηρίων βρέθηκαν ανθεκτικά στην ampicillin. Οι πιο κοινοί ανθεκτικοί οργανισμοί ανήκαν στα ακόλουθα γένη: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, και *Serratia* (Ash και συν., 2002).

Οι Dancer, Shears και Platt (1997) απομόνωσαν εντεροβακτηριακά των γενών *Serratia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia* κ.ά, από 100 δείγματα νερού από μικρούς ποταμούς και λίμνες του Ellesmere, το βορειότερο νησί στο Καναδικό Αρκτικό αρχιπέλαγος και διαπίστωσαν αντοχή στην ampicillin στο 80% των στελεχών, ενώ γενικά παρουσίαζαν μεγάλη ευαισθησία σε άλλα αντιβιοτικά.

Στον Καναδά σε μελέτη, που αφορούσε την επίδραση στο υδάτινο περιβάλλον της απόρριψης αστικών λυμάτων σε ποτάμια, βρέθηκαν εντυπωσιακές διαφορές ως προς την αντιβιοαντοχή μεταξύ των εντεροβακτηριοειδών κοπρανόδους προέλευσης που απομονώθηκαν από τον ποταμό Slave River, που δεν δέχεται αστικά λύματα και εκείνων που απομονώθηκαν από τον ποταμό Red River που δέχεται αστικά λύματα. Συγκεκριμένα μόνον το 7,1% των στελεχών εντεροβακτηριοειδών κοπρανόδους προέλευσης του Slave River ήταν πολυανθεκτικά, ενώ από τα αντίστοιχα στελέχη του Red River πολυανθεκτικά ήταν το 52,9% (Bell και συν., 1983).

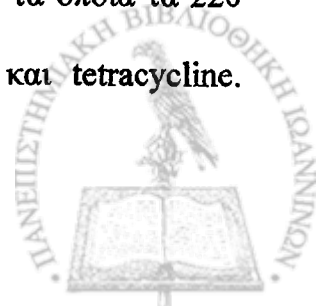


Στην Φινλανδία οι Niemi και συνεργάτες (1983) παρατήρησαν σημαντικές διαφορές ως προς την αντιβιοαντοχή μεταξύ των εντεροβακτηριακών, που απομόνωσαν από δείγματα νερών θαλάσσης, ποταμών και λυμάτων. Όμως δεν μπόρεσαν να συσχετίσουν τις διαφορές ως προς την αντιβιοαντοχή με την διαφορετική πηγή προέλευσης των δειγμάτων τους, ούτε με το επίπεδο μικροβιολογικής μόλυνσης των δειγμάτων. Το υψηλό ποσοστό αντιβιοαντοχής (48,0%) του συνόλου των στελεχών που απομόνωσαν αποδόθηκε κυρίως στα στελέχη *Klebsiella pneumoniae* και *Enterobacter cloacae*, τα οποία εμφάνιζαν μεγάλη συχνότητα αντιβιοαντοχής (80,0%).

Σε δείγματα νερού από το ποταμό Arga στην Pamplona της Ισπανίας απομόνωσαν 110 στελέχη *Enterobacteriaceae* και 118 στελέχη *Aeromonas* spp. Τα περισσότερα στελέχη (70,0%) *Aeromonas* και πολλά (20,0%) από τα *Enterobacteriaceae* ήταν ανθεκτικά σε nalidixic acid. Επιπλέον τα στελέχη *Enterobacteriaceae* παρουσίαζαν αντοχή στην tetracycline (23,4%) και τις β-λακτάμες (20,5%) και τα στελέχη *Aeromonas* στην tetracycline (27,5%) και co-trimoxazole (26,6%). Οι ερευνητές εικάζουν ότι η αντοχή στις κινολόνες πιθανόν να οφειλόταν σε απόρριψη αστικών λυμάτων επιβεβαρυμένων με μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών (π.χ. νοσοκομειακά λύματα). (Goni-Urriza και συν., 2000).

Στην Ινδία σε έρευνα που αφορούσε την κατανομή ανθεκτικών στελεχών *E. coli* κατά μήκος του ποταμού Bhavani, παρατηρήθηκε ότι πολυανθεκτικά στελέχη απομονώνονταν σε όλο το μήκος του ποταμού και οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο ποταμός μολυνόταν από ανεπεξέργαστα αστικά και κτηνοτροφικά λύματα σε όλη την διαδρομή του και δεν έπρεπε να χρησιμοποιείται για πόση (Gomathinayagam και συν., 1994).

Στην Ινδία οι Gaug συν, (1992)., απομόνωσαν από το πόσιμο νερό τεσσάρων αγροτικών περιοχών 231 στελέχη θερμοάντοχων εντεροβακτηριοειδών από τα οποία τα 220 παρουσίαζαν αντίσταση στα ampicillin, chloramphenicol, streptomycin και tetracycline.



Πολυαντοχή, διπλοαντοχή και μονοαντοχή παρατηρήθηκε σε ποσοστό 31,4%, 48,6% και 13,7% των στελεχών αντίστοιχα.

Στην Κίνα το διάστημα 1990-91 διεξήχθη μια μελέτη σχετικά με την ποιότητα νερού του ποταμού Kao Ping και την αντοχή των απομονούμενων στελεχών *E. coli* στα αντιβιοτικά και σε βαρέα μέταλλα. Από τα 185 απομονωθέντα στελέχη *E. coli* το 46,5% εμφάνιζαν αντοχή στην τομπραμυκίνη, το 79,5% στο μόλυβδο, το 73,5% στο αρσενικό και το 71,4% στον υδράργυρο. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι τα περισσότερα από τα αντιβιοανθεκτικά στελέχη εμφάνιζαν ταυτόχρονα και αντοχή στα βαρέα μέταλλα (Lee και Chen 1991).

Δείγματα νερού από τις εκβολές του ποταμού Bonny, από τα λύματα της πόλης και από πηγάδια γύρω από το λιμάνι Harcourt στη Νιγηρία, εξετάστηκαν ως προς την μικροβιολογική ποιότητά τους κατά τη διάρκεια μιας περιόδου εννέα μηνών. Συνολικά απομονώθηκαν 157 στελέχη *Pseudomonas* spp., 133 *E. coli* και 282 άλλα εντεροβακτηριακά. Όλα τα στελέχη των ψευδομονάδων ήταν ανθεκτικά σε ένα τουλάχιστον από τα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν, ενώ το 96,2% ήταν ανθεκτικά σε δύο ή περισσότερα. Το μεγαλύτερο ποσοστό των στελεχών *E. coli* (83,5%) και των άλλων εντεροβακτηριακών (91,8%) ήταν ανθεκτικό, σε ένα τουλάχιστον αντιβιοτικό, ενώ όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα στην gentamicin (Sokari και συν. 1988).

Σε μελέτη που αφορούσε την αντιβιοαντοχή 841 μεσόφιλων στελεχών *A. sobria*, *A. caviae* και *A. hydrophila*, που απομονώθηκαν από επιφανειακά νερά τριών ποταμών του Μαρακές (Μαρόκο), καταγράφηκε αντοχή 100,0% στην ampicillin και amoxicillin, 96,0% στην novobiocin, 81,0% στην colistin, 72,0% στην sulfamethoxazole, 40,0% στην cefamandole, 37,0% στην polymyxin B, 23,0% στην trimethoprim, 17,0% στην erythromycin, 15,0% στην streptomycin και 8,0% στην amoxicillin-clavulanate (Imzili 2001).



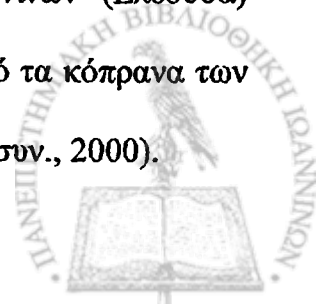
Από τα στελέχη *E. cloacae*, που απομονώθηκαν από το συνολικό αριθμό δειγμάτων νερού (ποταμών θαλασσών λιμνών και πόσιμων) βρέθηκαν ανθεκτικά στην ampicillin το 58,9%, στην ceftazidime το 18,0%, στην cefuroxime το 7,6%, στην gentamicin, και ampicacin το 2,5% και στην ciprofloxacin το 5,2%. Αναλυτικότερα από τα στελέχη *E. cloacae* που απομονώθηκαν από δείγματα θαλασσινού νερού βρέθηκαν ανθεκτικά στην ampicillin το 52,1%, στην ceftazidime το 13,0% και στην ciprofloxacin το 4,3%, ενώ ήταν ευαίσθητα στην cefuroxime, στην gentamicin, και στην ampicacin. Αντίθετα τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα ποτάμια εμφάνισαν αντοχή σε όλα τα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν. Τα στελέχη *E. cloacae* που απομονώθηκαν από πόσιμα νερά και νερά λίμνης, εμφάνισαν αντοχή μόνον στην ampicillin (Πίνακας 12, Γράφημα 15).

Από τα στελέχη *Citrobacter spp.*, που απομονώθηκαν από δείγματα νερού ποταμών το 55,5% εμφάνισαν αντοχή στην ampicillin και το 22,2% στην cefuroxime, ενώ ήταν ευαίσθητα σε όλα τα υπόλοιπα αντιβιοτικά (Πίνακας 13).

Όλα τα στελέχη *Klebsiella spp.*, που απομονώθηκαν, ήταν ευαίσθητα σε όλα τα αντιβιοτικά (Πίνακας 14).

Στελέχη *Shigella spp.*, απομονώθηκαν στην διάρκεια της παρούσας έρευνας μόνον από δείγματα θαλασσινών νερών και βρέθηκαν ανθεκτικά μόνον στην ampicillin, ενώ ήταν ευαίσθητα σε όλα τα υπόλοιπα αντιβιοτικά (Πίνακας 15).

Απομονώσεις *Shigella spp.* από νερά αναφέρονται στην Ελλάδα μόνον μετά από εμφάνιση υδατογενών επιδημιών. Συγκεκριμένα στην Κρήτη μετά από υδατογενή επιδημία σιγγέλωσης σε 1479 κατοίκους ενός χωριού, απομονώθηκαν 35 στελέχη *Shigella sonnei* από τα οποία τα 34 ήταν ευαίσθητα στην αμικικιλίνη και μόνον ένα ανθεκτικό (Samonis και συν., 1994). Στον νομό Ιωαννίνων σε χωριό κοντά στην πόλη των Ιωαννίνων (Ελεούσα) εκδηλώθηκε υδατογενής επιδημία γαστρεντερίτιδας σε 2213 άτομα και από τα κόπρανα των ασθενών και το νερό δικτύου απομονώθηκε *Shigella sonnei* (Alamanos και συν., 2000).



Στη Γαλλία τα στελέχη *Shigella flexneri* που απομόνωσαν από ασθενείς που είχαν καταναλώσει μύδια και μαλάκια, ήταν ανθεκτικά στην ampicillin, αλλά ευαίσθητα στις αμινογλυκοσίδες στη ερυθρομυκίνη και στις κινολόνες (Cheftel, 1997).

Στην παρούσα μελέτη δεν απομονώθηκαν στελέχη σαλμονελλών από τα δείγματα νερών ώστε να γίνει μελέτη της αντιβιοαντοχής τους. Οι Αρβανιτίδου και συνεργάτες σε έρευνα τους (Β. Ελλάδα), που αφορούσε την αντοχή στα αντιβιοτικά 79 στελεχών σαλμονελλών, τα οποία απομόνωσαν από τέσσερις ποταμούς (Αξιός, Αλιάκμων, Νέστος, Στρυμών) και μια λίμνη (Βόλβη), βρήκαν ότι τα 19 (24,1%) εμφάνιζαν αντοχή σε ένα ή περισσότερα αντιβιοτικά, με συχνότερη την αντοχή στην στρεπτομυκίνη (Αρβανιτίδου και συν., 1997b).

Τα στελέχη *E. amnigenus* που απομονώθηκαν από δείγματα ποταμών ήταν ανθεκτικά στην ampicillin, amicacin και gentamicin, αλλά ευαίσθητα σε όλα τα υπόλοιπα αντιβιοτικά. Επίσης τα στελέχη *Hafnia alvei* που απομονώθηκαν από δείγματα ποταμών εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην ampicillin, και στην cefuroxime, ενώ ήταν ευαίσθητα σε όλα τα υπόλοιπα αντιβιοτικά (Πίνακας 15).

Από τα στελέχη *Pantoea* spp που απομονώθηκαν από δείγματα ποταμών και θαλασσών το 80,0% βρέθηκαν ανθεκτικά στην ampicillin, το 40,0% στην cefuroxime, ενώ ήταν ευαίσθητα σε όλα τα υπόλοιπα αντιβιοτικά (Πίνακας 16). Τα στελέχη *P. shigelloides* spp που απομονώθηκαν από τα ίδια δείγματα εμφάνισαν αντοχές μόνον στην penicillin και στην cefazidime, (Πίνακας 17), ενώ τα στελέχη *Aeromonas* spp. που απομονώθηκαν από δείγματα ποταμών και θαλασσών, εμφάνισαν αντοχή μόνον στην gentamicin (20,0%), (Πίνακας 18).

Στο Rio de Janeiro ο de Mondino και συνεργάτες (1995) διαπίστωσαν την παρουσία της *P. shigelloides* σε δείγματα θαλασσινού νερού, νερού λιμνών και ρυακιών, που προορίζονταν για ύδρευση. Τα 46 στελέχη *P. shigelloides* που απομονώθηκαν ήταν

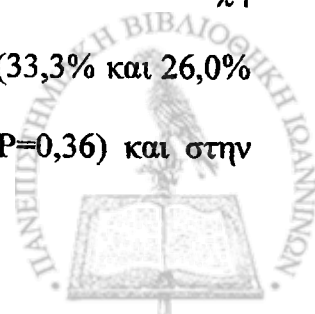


ευαίσθητα στις αμινογλυκοσίδες, κεφαλοσπορίνες, μιπενέμη, γλωραμφαινικόλη, τετρακυκλίνες, τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη, αλλά ανθεκτικά στην πενικιλίνη.

#### **5.4. Αντοχή στα αντιβιοτικά των στελεχών που απομονώθηκαν από τα δείγματα ιχθυερών**

Η εμφανής αύξηση της αντιβιοαντοχής των βακτηρίων, που απομονώνονται από τρόφιμα ζωικής προέλευσης, έχει οδηγήσει πολλές χώρες στην παρακολούθηση και καταγραφή των αντοχών των στελεχών, που απομονώνονται από παραγωγικά ζώα. Στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών, η χορήγηση αντιβιοτικών για θεραπεία ή πρόληψη λοιμώξεων και ταχύτερη αύξηση του βάρους των ψαριών, έχει ήδη δημιουργήσει περιβαλλοντικά προβλήματα (εκτός των θεραπευτικών προβλημάτων), εξαιτίας της απελευθέρωσης αντιμικροβιακών ουσιών στο πέριξ υδάτινο περιβάλλον. Η επίδραση αυτών των ουσιών στην ενδογενή και εξωγενή μικροβιακή χλωρίδα των υδάτινων οικοσυστημάτων είναι δύσκολο να εκτιμηθεί, όπως είναι δύσκολο να συνεκτιμηθούν οι όποιες επιπτώσεις στους μεγαλοοργανισμούς εξαιτίας της πολυπλοκότητας του υδάτινου περιβάλλοντος. Όμως οι αντοχές των βακτηριακών στελεχών που απομονώνονται από τα ψάρια των ιχθυοκαλλιεργειών και μάλιστα των θαλασσινών καλλιεργειών, μαρτυρούν ότι και σε αυτόν τον παραγωγικό τομέα γίνεται κατάχρηση των αντιβιοτικών.

Στην δική μας μελέτη τα στελέχη *S. aureus*, που απομονώθηκαν από ψάρια εκτροφής, συγκρινόμενα με τα στελέχη από τα δείγματα των υδάτων, εμφάνισαν σε μεγαλύτερο ποσοστό αντοχή στην penicillin (54,15% και 33,3% αντίστοιχα,  $p > 0,05$ ) και gentamicin (16,6% και 9,2% αντίστοιχα,  $p > 0,05$ ). Επίσης, συγκρινόμενα με τα στελέχη που απομονώθηκαν από ψάρια ελεύθερης αλιείας εμφάνισαν σε μεγαλύτερο ποσοστό αντοχή στην penicillin (54,1% και 0,0% αντίστοιχα,  $p < 0,05$ ), στην erythromycin (33,3% και 26,0% αντίστοιχα,  $p > 0,05$ ), στην ciprofloxacin (16,6% και 0,0% αντίστοιχα,  $P = 0,36$ ) και στην





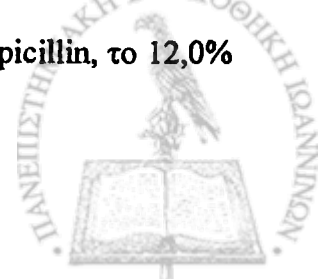
gentamicin (16,6% και 6,0% αντίστοιχα,  $p > 0,05$ ), ενώ κανένα στέλεχος *S. aureus* από το σύνολο των δειγμάτων των ψαριών δεν εμφάνισε ανθεκτικότητα στην vancomycine και στην teicoplanine (Πίνακας 2, 19, Γραφήματα 10,16).

Επίσης αποκλίσεις παρατηρήθηκαν στη αντοχή μεταξύ των στελεχών *E. faecalis* που προερχόταν από ψάρια εκτροφής και αυτών που προερχόταν από ψάρια ελεύθερης αλιείας στην ciprofloxacin (35,2% και 13,3% αντίστοιχα,  $p > 0,05$ ) και erythromycin (17,6% και 0,0% αντίστοιχα,  $p > 0,05$ ) (Πίνακας 20, γράφημα 17). Το ίδιο παρατηρήσαμε και με τα στελέχη *E. faecium*, αυτά που προερχόταν από ψάρια εκτροφής ήταν ανθεκτικά στην ciprofloxacin (42,8%) και στην ampicillin (28,5%) σε αντίθεση εκείνα, που προερχόταν από ελεύθερη αλιεία όπου ήταν ευαίσθητα στα παραπάνω αντιβιοτικά ( $p = 0,05$ ,  $p > 0,05$  αντίστοιχα) (Πίνακας 21, Γράφημα 18).

Αλλά και τα στελέχη *Pseudomonas spp.*, που απομονώθηκαν από ψάρια εκτροφής, εμφάνιζαν μεγαλύτερη αντοχή απ' ότι τα στελέχη, που προερχόταν από ψάρια ελεύθερης αλιείας στην ceftazidime (32,5% και 23,0% αντίστοιχα,  $p > 0,05$ ), στην amicacin (11,6% και 7,6% αντίστοιχα,  $p > 0,05$ ), στην ciprofloxacin (9,3% και 3,8% αντίστοιχα,  $p > 0,05$ ) και στην gentamicin (2,3% και 0% αντίστοιχα,  $p > 0,05$ ) (Πίνακας 22, Γράφημα 19). Όμως από τα πέντε στελέχη *Aeromonas spp.*, που απομονώθηκαν από ψάρια μόνον ένα βρέθηκε ανθεκτικό στην gentamicin, ενώ όλα ήταν ευαίσθητα σε όλα τα υπόλοιπα αντιβιοτικά (Πίνακας 32).

Τα στελέχη της *E. coli* που προέρχονταν από ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών βρέθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικά στην ampicillin (64,2%) στην cefuroxime (35,7%) και στην ciprofloxacin (7,1%), έναντι των στελεχών από ψάρια ελεύθερης αλιείας, που βρέθηκαν ανθεκτικά μόνον στην ampicillin (40,0%), ενώ ήταν ευαίσθητα στην cefuroxime και στην ciprofloxacin ( $p > 0,05$ ,  $p < 0,05$ ,  $p > 0,05$  αντίστοιχα) (Πιν. 28).

Από τα στελέχη *E. cloacae*, που απομονώθηκαν από όλα τα δείγματα ψαριών (ελεύθερης αλιείας, ιχθυοκαλλιεργειών), το 48,0% ήταν ανθεκτικά στην ampicillin, το 12,0%



στη cefuroxime, το 8,0% στην ceftazidime και το 4,0% στην ampicillin, ciprofloxacin και gentamicin. Παρατηρήθηκαν όμως διαφορές ως προς τις αντοχές των στελεχών που απομονώθηκαν από ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών στην ampicillin, ceftazidime, cefuroxime, ampicillin gentamicin και ciprofloxacin και των στελεχών που απομονώθηκαν από ψάρια ελεύθερης αλιείας ( $p>0,05$ ,  $p<0,05$ ,  $p>0,05$ ,  $p>0,05$  αντίστοιχα) (Πίνακας 29, Γράφημα 21).

Τα στελέχη *Citrobacter* spp., που απομονώθηκαν από το σύνολο των ψαριών βρέθηκαν ανθεκτικά στην ampicillin τέσσερα (66,6%) και στην cefuroxime δύο (33,3%), ενώ στα υπόλοιπα αντιβιοτικά ήταν όλα ευαίσθητα (Πίνακας 30).

Στην βιβλιογραφία δεν αναφέρονται εργασίες σχετικά με αντοχές βακτηριακών στελεχών που απομονώνονται από ψάρια στην Ελλάδα, υπάρχουν όμως μερικές αναφορές από άλλες χώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλες αυτές οι αναφορές είναι πολύ πρόσφατες και έχουν αρχίσει να δημοσιεύονται από το 1999.

Στην Δανία σε σχετική έρευνα που αφορούσε πέστροφες εκτροφής, παρατηρήθηκε μονοαντοχή και πολυαντοχή των στελεχών *Aeromonas* spp και *Flavobacterium* spp στα αντιβιοτικά oxolonic acid, amoxicillin, oxytetracycline, sulfadiazine-trimethoprim και florfenicol (Schmidt και συν., 2000).

Στην Ισπανία από τα 60 στελέχη *A. hydrophila* που απομονώθηκαν από ψάρια, οστρακοειδή και νερά μόνο δύο ήταν ευαίσθητα σε όλους τους αντιμικροβιακούς παράγοντες, ενώ υψηλότερη (91,7%) συχνότητα αντοχής παρατηρήθηκε στην ampicillin (Borrego 1991). Στην ίδια χώρα σε ψάρια εισαγωγής από την Ινδία απομόνωσαν πέντε πολυανθεκτικά στελέχη *Salmonella typhimurium*, από τα οποία τα τέσσερα ήταν ανθεκτικά στην chloramphenicol, tetracycline, nalidixic acid, co-trimoxazole, gentamicin και στις b-lactams, ενώ το εναπομείναν πέμπτο στέλεχος ήταν ευαίσθητο στις b-lactams και στην co-trimoxazole, αλλά ανθεκτικό σε όλα τα υπόλοιπα αντιβιοτικά (Ruiz και συν., 1999).



Στην Πορτογαλία από 20 πέστροφες απομόνωσαν 51 στελέχη *Aeromonas spp.*, τα οποία εμφάνισαν αντοχή στην amoxicillin, carbenicillin, ticarcillin και απροσδόκητη αντοχή στην imipenem, αντιβιοτικό που είναι αποκλειστικά ανθρώπινης χρήσης. Σύμφωνα με τους ερευνητές το γεγονός της αντοχής στην ιμιπενέμη αποδίδεται σε μεταφορά παραγόντων αντοχής από το υδάτινο περιβάλλον στα στελέχη των αερομονάδων που αποικίζουν τις πέστροφες (Saavedra και συν., 2004).

Στην Κροατία απομονώθηκαν 26 στελέχη *A. hydrophila* από ψάρια της λίμνης Vrana, που βρίσκεται πάνω στο νησί Cres. Ο έλεγχος της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έδειξε αντοχή των στελεχών στην novobiocin και penicillin G (Porovic και συν., 2000).

Στη Βραζιλία οι Teophilo και συν. (2002) απομόνωσαν 32 στελέχη *E. coli* από ψάρια και από γαρίδες. Τέσσερα στελέχη που απομονώθηκαν έδειξαν χαμηλή ευαισθησία σε κάποια αντιβιοτικά, δύο στελέχη ήταν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη, αμπικιλίνη και σουλφαμεθοξαζόλη-τριμεθοπρίμη και δύο ήταν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη και νιτροφουραντοίνη.

Στην Χιλή απομονώθηκαν ανθεκτικά στελέχη βακτηρίων από ψάρια του βυθού και του πελάγους, τα οποία αλιεύτηκαν στην ακτή Concepcion. Τα στελέχη που απομονώθηκαν ανήκαν στα εντεροβακτηριακά και στα δονάκια και εμφάνιζαν μονοαντοχή ή πολυαντοχή στην ampicillin, streptomycin, tetracycline και nitrofurantoin, ενώ ήταν ευαίσθητα στην gentamicin, amikacin και cotrimazole (Miranda και Zemelman, 2001). Επίσης, υψηλό ήταν το ποσοστό των ανθεκτικών στην αμπικιλίνη και ερυθρομυκίνη στελεχών ψευδομονάδων, που απομονώθηκαν από ψάρια εκτροφής στη Χιλή, ενώ αρκετά χαμηλό ήταν το αντίστοιχο ποσοστό αντοχής στην gentamicin (Miranda και Zemelman, 2002). Στην ίδια χώρα απομονώθηκαν από καλλιεργημένους σολωμούς 25 στελέχη Gram-αρνητικών βακτηρίων, τα οποία ήταν όλα ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη παρά το γεγονός ότι δεν είχε γίνει πρόσφατη χρήση αντιβιοτικών στην συγκεκριμένη μονάδα εκτροφής (Miranda και συν., 2003).



Στην Κίνα απομόνωσαν από καλλιεργημένους σπάρους 51 στελέχη παθογόνων δονακίων (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. logei*, *V. pelagius*, *V. fluvialis*, *V. mediterranei*). Τα περισσότερα στελέχη ήταν ανθεκτικά στην ampicillin (60,8%), cefuroxime (66,7%), amikacin (55%), kanamycin (58,8%) και trimethoprim (76,5%) (Li και συν., 1999).

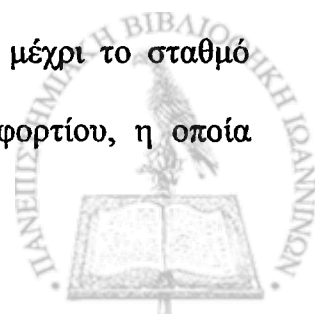
Στη Μαλαισία απομονώθηκαν από δείγματα ψαριών που συλλέχτηκαν από την ψαροαγορά 60 στελέχη *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* και εξετάστηκαν για την ευαισθησία τους σε 10 αντιμικροβιακούς παράγοντες. Όλα τα στελέχη ήταν ανθεκτικά στην ampicillin και ευαίσθητα στο gentamycin, ενώ τα περισσότερα ήταν επίσης ανθεκτικά στην streptomycin (57,0%), tetracycline (48,0%) και την erythromycin (43,0%) (Radu και συν., 2002).



## 6. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μικροβιολογική ποιότητα των πόσιμων υδάτων που ελέγχθηκαν από δήμους και κοινότητες των νομών Ιωαννίνων, Άρτας και Πρεβέζης στην διάρκεια αυτής της μελέτης διατηρείται σε ικανοποιητικά επίπεδα από πλευράς μικροβιακού φορτίου.
- Ο μεγαλύτερος βαθμός μικροβιολογικής ρύπανσης παρατηρείται στα δείγματα νερού της Παμβώτιδας Λίμνης Ιωαννίνων και στα δείγματα θαλασσινού νερού από τα λιμάνια της Πρέβεζας, της Αμφιλοχίας και της Βόνιτσας. Η μεγάλη μικροβιολογική επιβάρυνση αυτών των οικοσυστημάτων φαίνεται να οφείλονται στις εισροές αστικών, βιομηχανικών και κτηνοτροφικών λυμάτων, τα οποία στην πλειονότητά τους ρίπτονται ανεπεξέργαστα ή ελλιπώς επεξεργασμένα
- Στο Βόρειο τμήμα του Αμβρακικού (Βαθύ, λιμνοθάλασσα Βαθύ, Άγιος Θωμάς, Ιχθυόσκαλα, Πωγωνίτσα, Μάζωμα, Μιχαλίτσι, Τσοπέλι, Λουγαρού εκβολές Λούρου και εκβολές Αράχθου), όπου λειτουργούν μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας, οι καταμετρήσεις των μικροβίων δεν ξεπέρασαν τις ισχύουσες επιθυμητές. Φαίνεται ότι οι κινήσεις και οι ταχύτητες των ρευμάτων είναι τόσο έντονες, που επιτρέπουν τη συνεχή ανάμιξη και ανανέωση των νερών και δεν επηρεάζονται από τα λιμάνια Αμφιλοχίας Πρέβεζας και Βόνιτσας.
- Σε όλους τους σταθμούς δειγματοληψίας κατά μήκος των ακτών του Ιονίου, ο βαθμός μικροβιολογικής ρύπανσης ήταν μικρός (με αντιπροσωπευτικότερο τον σταθμό του Παντοκράτορα).
- Ο μεγαλύτερος βαθμός μικροβιολογικής ρύπανσης στα δείγματα ποταμών σημειώθηκε στο Λούρο, όπου η μικροβιολογική ρύπανση ξεκινά από τη θέση «Παντάνασσα» και στη συνέχεια δεν παρουσιάζει σημαντική μεταβολή μέχρι το σταθμό «Γέφυρα Καλογήρου», όπου παρατηρήθηκε αύξηση του μικροβιακού φορτίου, η οποία



πιθανώς προέρχεται από τις χοιροτροφικές μονάδες, που λειτουργούν στην περιοχή και ενισχύεται με πρόσθετο μικροβιακό φορτίο από διάφορες άλλες γεωργικές/κτηνοτροφικές και βιομηχανικές δραστηριότητες, ενώ μειώνεται σημαντικά κοντά στις εκβολές. Η μείωση κοντά στις εκβολές οφείλεται στην αφομοιωτική ικανότητα των νερών και στη σημαντική ελάττωση του αριθμού των μονάδων κατά το τέλος της διαδρομής.

- **Στον Αχέροντα** παρατηρήθηκε μια αύξηση του μικροβιακού φορτίου κατά μήκος της ροής του ποταμού ξεκινώντας από τον πρώτο σταθμό δειγματοληψίας στη Γλυκή. Η αύξηση που παρατηρείται φαίνεται ότι προέρχεται από τις έντονες ανθρωπογενείς δραστηριότητες και τη μεγάλη πυκνότητα πληθυσμού που συγκεντρώνεται σε μικρή απόσταση γύρω από τον ποταμό. Η περιοχή εκτός από τα αστικά λύματα έχει και έντονο γεωργικό χαρακτήρα. Επίσης στην ρύπανση του ποταμού πιθανόν να συμβάλλουν και οι αγροτικού τύπου βιοτεχνίες (παραγωγής ζωοτροφών, ελαιουργεία, μεταποιητήρια βάμβακος).
- **Στον Άραχθο** οι μικροβιολογικές καταμετρήσεις δείχνουν χαμηλό μικροβιακό φορτίο και αυτό αποδίδεται στην λειτουργία του βιολογικού σταθμού επεξεργασίας των λυμάτων της Άρτας.
- **Στον Καλαμά** μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι εμφανίζεται μια αυξομείωση του μικροβιακού φορτίου. Πρέπει να σημειώσουμε ότι ο Καλαμάς αποτελεί τον τελικό αποδέκτη των αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων της περιοχής των Ιωαννίνων τα τελευταία χρόνια. Το σύνολο των αποβλήτων υφίσταται βιολογική επεξεργασία γεγονός που έχει προστατέψει την ποιότητα των υδάτων του ποταμού όπως φαίνεται και από τις μικροβιολογικές καταμετρήσεις μας. Οι σχετικά αυξημένες ποσότητες μικροβιακού φορτίου που παρατηρούνται στο φράγμα της Σαγιάδας φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της στασιμότητας των νερών.



- Τα ποτάμια Αώος και Βοϊδομάτης έχουν τα καλύτερα νερά από μικροβιολογικής άποψης. Η καλή τους ποιότητα φαίνεται ότι οφείλεται στην απουσία ανθρώπινων δραστηριοτήτων.
- Στη λίμνη Παμβώτιδα η κατάσταση είναι πολύ επιβαρημένη μικροβιολογικά και συγκρίσιμη με την αντίστοιχη του λιμανιού της Πρέβεζας. Πρώτιστο ρόλο στη μεταφορά μικροβιακού φορτίου στη λίμνη έχουν τα αστικά λύματα, οι ποσότητες των οποίων είναι μεγάλες σε σχέση με τον όγκο των νερών της λίμνης. Τα σφαγεία πουλερικών και παραγωγικών ζώων, οι κτηνοτροφικές μονάδες του λεκανοπεδίου Ιωαννίνων, τα απόβλητα των νοσηλευτικών μονάδων και η καθυστερημένη εγκατάσταση και λειτουργία των συστημάτων βιολογικών καθαρισμών φαίνεται ότι συμβάλλουν καθοριστικά στην μικροβιολογική επιβάρυνση της Λίμνης.
- Η λίμνη Ζιρού φαίνεται ότι παρουσιάζει ικανότητα αυτοκαθαρισμού αφού η συνολική μικροβιακή εικόνα της ποιότητας των νερών της κρίνεται πολύ ικανοποιητική.
- Τα συχνότερα γένη βακτηρίων που απομονώθηκαν στο σύνολο των δειγμάτων των νερών ήταν τα Εντεροβακτηριακά και ακολουθούσαν οι ψευδομονάδες, οι εντερόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι.
- Στα νερά των ποταμών συχνότερα απομονώθηκαν οι ψευδομονάδες και ακολουθούσαν τα εντεροβακτηριακά, οι εντερόκοκκοι, από τους οποίους συχνότερα απομονώθηκε ο *E. faecalis* ακολουθούμενος από τον *E. faecium* και οι σταφυλόκοκκοι (*S. aureus*).
- Στο θαλασσινό νερό, συχνότερα απομονώθηκαν τα Εντεροβακτηριακά, ακολουθούμενα από *S. aureus*, *Pseudomonas* spp, *E. faecalis*, *E. faecium* και *Aeromonas* spp.



- Από τα 240 δείγματα πόσιμων υδάτων από δήμους και κοινότητες των νομών Ιωαννίνων, Άρτας και Πρεβέζης απομονώθηκαν συνολικά 30 στελέχη βακτηρίων.
- Στα θαλασσινά ψάρια ελεύθερης αλιείας απομονώθηκαν με σειρά συχνότητας Εντεροβακτηριακά, *Pseudomonas* spp, *E. faecalis*, *S. aureus* και *E. faecium*
- Στα θαλασσινά ψάρια ιχθυοκαλλιέργειών απομονώθηκαν με σειρά συχνότητας η *Pseudomonas* spp, και ακολουθούσαν τα Εντεροβακτηριακά, *E. faecalis*, *S. aureus* , *E. faecium* και *Aeromonas* spp .
- Ανθεκτικά στελέχη βακτηρίων (*E. coli*, *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *Pseudomonas* spp., *E. cloacae*) απομονώθηκαν από το υδάτινο περιβάλλον (θάλασσα, λίμνες και ποτάμια), αλλά και από τα πόσιμα νερά.
- Μεγαλύτερη αντοχή στα αντιβιοτικά παρατηρήθηκε στα στελέχη, που απομονώθηκαν από ψάρια εκτροφής, σε σύγκριση με τα στελέχη από ψάρια ελεύθερης αλιείας και από νερά και το γεγονός αυτό αποδίδεται στην χρήση αντιβιοτικών στις ιχθυοκαλλιέργειες.





## 7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ευρεία χρήση αντιβιοτικών τόσο στην ιατρική όσο και στην κτηνιατρική πράξη έχει οδηγήσει σε αυξημένη συγκέντρωση των αντιβιοτικών ουσιών στο φυσικό περιβάλλον μας, το οποίο με την σειρά του έχει οδηγήσει τους παθογόνους, αλλά και τους μη παθογόνους μικροοργανισμούς στην ανάπτυξη εξαιρετικών μηχανισμών αντοχής με αποτέλεσμα την ανησυχητική αύξηση των αντιβιοανθεκτικών στελεχών βακτηρίων.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της μικροβιολογικής ρύπανσης του υδάτινου περιβάλλοντος και η μελέτη της διασποράς ανθεκτικών στελεχών βακτηρίων στο φυσικό υδάτινο περιβάλλον. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η ευαισθησία των βακτηριακών στελεχών, τα οποία απομονώθηκαν από πόσιμα νερά και από το υδάτινο περιβάλλον (ποταμοί, λίμνες, θάλασσα), καθώς και από ψάρια των αντίστοιχων υδάτινων οικοσυστημάτων της ΒΔ. Ελλάδας.

Οι μικροβιακοί δείκτες, που ελέγχθηκαν ήταν: Ολική μικροβιακή χλωρίδα, *Total coliforms*, *Fecal coliforms*, *Fecal Streptococci*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio spp.*, *Listeria spp.* Ο μικροβιολογικός έλεγχος των δειγμάτων υδάτων έγινε με τη μέθοδο της διήθησης διαμέσου μικροβιοκρατών μεμβρανών και των δειγμάτων ψαριών με τις καθιερωμένες μεθόδους μικροβιολογικού ελέγχου τροφίμων (ISO methods), ενώ ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά έγινε με τη μέθοδο Kirby-Bauer.

Στην διάρκεια της μελέτης συλλέχθηκαν 1580 δείγματα νερών και ψαριών και απομονώθηκαν συνολικά 756 στελέχη βακτηρίων. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν 240 δείγματα πόσιμου νερού από δήμους και κοινότητες των νομών Ιωαννίνων, Άρτας και Πρεβέζης, 50 δείγματα επιφανειακών υδάτων που προερχόταν από τις λίμνες Παμβώτιδα και Ζηρού, 400 δείγματα επιφανειακών υδάτων που προερχόταν από τους ποταμούς Άραχθο, Λούρο,



Αχέροντα, Καλαμά, Αώο και Βοϊδομάτη και 450 δείγματα θαλασσινού νερού από τον Αμβρακικό κόλπο και από παράκτιες περιοχές του Ιονίου.

Από το σύνολο των δειγμάτων των νερών απομονώθηκαν 528 στελέχη, από τα οποία τα περισσότερα (29,9%) ανήκαν στα Εντεροβακτηριακά, το 27,8% στις Ψευδομονάδες, το 21,7% στους Εντεροκόκκους και το 20,4% στους Σταφυλοκόκκους.

Από τα 230 δείγματα ψαριών ελεύθερης αλιείας απομονώθηκαν 98 στελέχη από τα οποία τα περισσότερα (35,7%) ανήκαν στα Εντεροβακτηριακά, το 26,5% *Pseudomonas* spp, το 15,3% *E. faecalis*, το 15,3% *S. aureus* και το 7,1% *E. faecium*.

Από τα 210 δείγματα ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας απομονώθηκαν 130 στελέχη, από τα οποία τα περισσότερα (33,0%) ανήκαν στα είδη *Pseudomonas* spp, και ακολουθούσαν τα Εντεροβακτηριακά (26,0%), *E. faecalis* (13,0%), *S. aureus* (18,0%), *E. faecium* (5,0%) και *Aeromonas* spp (4,0%).

Όσον αφορά την ευαισθησία στα αντιβιοτικά τα στελέχη *S. aureus* που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερών βρέθηκαν ανθεκτικά στην penicillin (33,3%), στην erythromycin (28,7%), στην ciprofloxacin (12,3%), στην gentamicin (9,2%) και στην oxacillin (7,4%) και ευαίσθητα στην vancomycine και teicoplanine. Τα στελέχη *S. aureus*, που απομονώθηκαν από ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών εμφάνισαν μεγαλύτερες αντοχές στα αντιβιοτικά σε σύγκριση με τα στελέχη που απομονώθηκαν από ψάρια ελεύθερης αλιείας. Συγκεκριμένα το 54,1% βρέθηκαν ανθεκτικά στην penicillin, το 33,3% στην erythromycin, το 16,6% στην ciprofloxacin και στην gentamicin, ενώ από τα στελέχη που απομονώθηκαν από ψάρια ελεύθερης αλιείας κανένα δεν ήταν ανθεκτικό στην penicillin, 26,0% ήταν ανθεκτικά στην erythromycin, 6,0% στην gentamicin και στην ciprofloxacin.

Από τα στελέχη *E. faecium* και *E. faecalis* που απομονώθηκαν από τα νερά το 26,8% και 21,6% αντίστοιχα εμφάνιζαν αντοχή στην ciprofloxacin, και το 9,7% και 10,8% αντίστοιχα στην erythromycin, ενώ το 7,3% των στελεχών *E. faecium* βρέθηκαν ανθεκτικά



και στην ampicillin. Όμως αποκλίσεις ( $p>0,05$ ,  $p>0,05$ ) παρατηρήθηκαν στη αντοχή μεταξύ των στελεχών *E. faecalis* που προερχόταν από ψάρια

ιχθυοκαλλιεργειών και από ψάρια ελεύθερης αλιείας στην ciprofloxacin (35,2% και 13,3% αντίστοιχα) και erythromycin (17,6% και 0,0%). Επίσης τα στελέχη *E. faecium* που προερχόταν από ψάρια εκτροφής ήταν ανθεκτικά στην ciprofloxacin (42,8%) και στην ampicillin (28,5%) ενώ τα στελέχη που προερχόταν από ψάρια ελεύθερης αλιείας, ήταν ευαίσθητα στα παραπάνω αντιβιοτικά. Όλα τα στελέχη εντεροκόκκων ήταν ευαίσθητα στην vancomycin και teikoplanin.

Από τα 138 στελέχη *Pseudomonas spp.* που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερών, 19,5% ήταν ανθεκτικά στην ceftazidime, 6,5% στην ampicacin, 5,7% στην ciprofloxacin και 0,7% στην gentamicin. Τα στελέχη που προερχόταν από ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών, βρέθηκαν ανθεκτικά σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι τα στελέχη που προέρχονταν τα νερά. Επίσης τα στελέχη που προερχόταν από ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών, ήταν σε μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικά στην ceftazidime (32,5%) στην ampicacin (11,6%) στην ciprofloxacin (9,3%) και στην gentamicin (2,3%) από τα στελέχη που προέρχονταν από ψάρια ελεύθερης αλιείας που ήταν ανθεκτικά στην ceftazidime (23,0%) στην ampicacin (7,6%) στην ciprofloxacin (3,8%) και στην gentamicin (0,0%) και από τα νερά

Τα στελέχη της *E. coli* που προέρχονταν από ψάρια ιχθυοκαλλιεργειών βρέθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικά στην ampicillin (64,28%) στην cefuroxime (35,71%) και στην ciprofloxacin (7,14%), από τα στελέχη που προέρχονταν από ψάρια ελεύθερης αλιείας που βρέθηκαν ανθεκτικά μόνον στην ampicillin (40,0%). Επίσης πολύ λιγότερα ήταν τα ανθεκτικά στην ampicillin (37,3%), στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερών.

Από τα υπόλοιπα εντεροβακτηριοειδή απομονώθηκε σε μεγαλύτερη συχνότητα το *E. cloacae*, του οποίου το 37,5% των στελεχών που προερχόταν από ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας



ήταν ανθεκτικό στην cefuroxime και το 12,5% στην ciprofloxacin, ampicillin και gentamicin σε αντίθεση με τα ψάρια ελεύθερης αλιείας που ήταν ανθεκτικά μόνον στην ampicillin (54,7%).

Τα στελέχη *Shigella* spp, *Citrobacter* spp, *E. amnigenus*, *Klebsiella* spp, *S. arizonae*, *Hafnia alvei*, *Pantoea* spp που απομονώθηκαν από δείγματα νερών (ποταμών και θαλασσών) βρέθηκαν ανθεκτικά στην ampicillin, ενώ εμφάνισαν μικρό μόνον ποσοστό αντοχής στα υπόλοιπα αντιβιοτικά. Επίσης όλα τα στελέχη *P. shigelloides* που απομονώθηκαν από δείγματα ποταμών και θάλασσας βρέθηκαν ανθεκτικά στην penicillin, ενώ από τα 15 στελέχη *Aeromonas* spp. που απομονώθηκαν από όλα δείγματα, τα 12 ήταν ανθεκτικά στην gentamicin, ενώ στα υπόλοιπα αντιβιοτικά όλα τα στελέχη ήταν ευαίσθητα.

Η μελέτη της μικροβιολογικής ποιότητας του συνόλου του υδάτινου περιβάλλοντος στην Ήπειρο γίνεται για πρώτη φορά. Επιπλέον για πρώτη φορά γίνεται στην Ελλάδα διερεύνηση της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά των βακτηριακών στελεχών, που απομονώνονται από το νερό και από τα τρόφιμα του υδάτινου περιβάλλοντος. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι ο μεγαλύτερος βαθμός μικροβιολογικής ρύπανσης στα δείγματα νερού, σημειώθηκε στα λιμάνια της Πρέβεζας, Αμφιλοχίας, Βόνιτσας και στη Λίμνη των Ιωαννίνων, ενώ ο μικρότερος βαθμός μικροβιολογικής ρύπανσης παρατηρήθηκε στα ποτάμια Αώο και Βοϊδομάτη. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δυστυχώς η περιβαλλοντική ρύπανση στην χώρα μας ακολουθεί το μοντέλο της αντίστοιχης ρύπανσης των άλλων αναπτυγμένων χωρών, αν και σε μικρότερο βαθμό ακόμη, πράγμα που σημαίνει ότι υπάρχει ακόμη χρόνος για διορθωτικά μέτρα και προστασία του περιβάλλοντος.

Οι φαρμακευτικές αγωγές, ειδικά η χρήση αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων στα ψάρια των ιχθυοκαλλιεργειών και τα απολυμαντικά κτηνιατρικής χρήσης, φαίνεται να συμβάλλουν στην παρατηρούμενη αντοχή των στελεχών που απομονώθηκαν από ψάρια εκτροφής. Η ρύπανση του υδάτινου περιβάλλοντος με λύματα αστικής και κτηνοτροφικής ή



βιομηχανικής προέλευσης φαίνεται ότι επιβαρύνει την μόλυνση του υδάτινου περιβάλλοντος και με ανθεκτικά στελέχη βακτηρίων.

Η απομόνωση ανθεκτικών βακτηρίων στο υδάτινο περιβάλλον, δείχνει ότι ήδη έχει δημιουργηθεί στο περιβάλλον μια δεξαμενή αντιβιοανθεκτικών βακτηρίων, από τα οποία οι αντοχές θα μπορούσαν να μεταφερθούν μέσω της τροφικής αλυσίδας σε βακτήρια που προκαλούν νόσο στον άνθρωπο και στα ζώα.



**A SURVEY ON THE MICROBIAL POLLUTION OF THE AQUATIC ENVIRONMENT IN NORTHWESTERN GREECE AND STUDY OF THE ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM WATER AND FISH**

**PhD Thesis  
By**

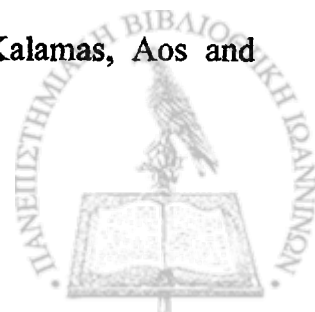
**George Zakas  
BSc Biology**

## **8. SUMMARY**

The plentiful use of antibiotics in human and veterinary medicine, accelerated the concentration of residual antimicrobial substances in the environment, resulting in the implementation of resistant environmental bacterial strains. The objective of the present thesis was the study of the microbiological quality of the aquatic environment in correlation with the distribution of resistant bacterial strains in the natural aquatic environment.

The sensitivity of bacterial strains isolated from drinking water, fresh and marine waters and from free living and cultured fish to several routinely used antibiotics was studied. The microbiological examination included *Total Microbial counts*, *Total coliforms*, *Fecal coliforms*, *Fecal Streptococci*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp. and *Listeria* spp. For the microbiological examination of water and fish samples the membrane filtration technique and the ISO methods were used respectively, while the Kirby-Bauer method was employed for the sensitivity tests.

A total number of 756 bacterial strains were isolated out of 1580 water and fish samples. More specifically there were examined: 240 samples of drinking water from the Ioannina, Arta and Preveza prefectures, 50 samples of water from the Pamvotis and Zirou lakes, 400 samples of water from the Arachthos, Louros, Acheron, Kalamas, Aos and

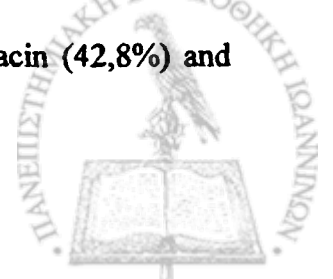


Voidomatis rivers and 450 samples of marine water from Amvrakikos and other Ionian coast stations and 440 fish samples (230 free living and 210 cultured fish).

There were 528 bacterial strains isolated from all the water samples, the majority (29,9%) belonging to the family Enterobacteriaceae, and the rest to Pseudomonadaceae (27,8%), Enterococci (21,7%) and Staphylococci (20,4%). There were 98 bacterial strains isolated from the free living marine fish samples, the majority (35,7%) belonging to the family Enterobacteriaceae, and the rest to Pseudomonadaceae (26,5%), *E. faecalis* (15,3%), *S. aureus* (15,3%) and *E. faecium* (7,1%). Also there were 130 strains isolated from cultured fish, the majority (33%) belonging to *Pseudomonas* spp, and the rest to Enterobacteriaceae (26,0%), *E. faecalis* (13,0%), *S. aureus* (18,0%), *E. faecium* (5,0%) and *Aeromonas* spp (4,0%).

The *S. aureus* strains isolated from the water samples were found resistant to penicillin (33,3%), erythromycin (28,7%), ciprofloxacin (12,3%), gentamicin (9,2%) and oxacillin (7,4%) and sensitive to vancomycine and teicoplanine. The *S. aureus*, strains isolated from cultured fish were found more resistant compared to the strains isolated from free living fish. Specifically 54,1% were resistant to penicillin, 33,3% to erythromycin, 16,6% to ciprofloxacin and to gentamicin, while the strains from free living fish were sensitive to penicillin, 26,0% were resistant to erythromycin, 6,0% to gentamicin and to ciprofloxacin.

From the *E. faecium* and *E. faecalis* strains isolated from the water samples 26,8% and 21,6% respectively were resistant to ciprofloxacin, and 9,7% and 10,8% respectively were resistant to erythromycin, while 7,3% of the *E. faecium* strains were found resistant to ampicillin. However, significant differences ( $p > 0,05$ ,  $p > 0,05$ ) were observed in the resistance among the *E. faecalis* strains isolated from cultured fish and the isolates from free living fish towards ciprofloxacin (35,2% and 13,3% respectively) and erythromycin (17,6% and 0,0%) Also the *E. faecium* strains from cultured fish were resistant to ciprofloxacin (42,8%) and



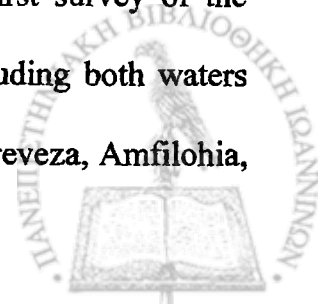
ampicillin (28,5%), while the strains from free living fish were sensitive to those antibiotics. All Enterococci strains were found sensitive to vancomycin and teikoplanin.

From the *Pseudomonas* spp strains isolated from water samples, 19,5% were resistant to ceftazidime, 6,5% to ampicillin, 5,7% to ciprofloxacin and 0,7% to gentamicin. The strains isolated from cultured fish were significantly more resistant to the above antibiotics when compared to the water samples. Also the strains isolated from cultured fish were found more resistant to ceftazidime (32,5%), ampicillin (11,6%), ciprofloxacin (9,3%) and gentamicin (2,3%), compared to the free living fish isolates which were resistant to ceftazidime (23,0%), ampicillin (7,6%), ciprofloxacin (3,8%) and gentamicin (0,0%)

The *E. coli* strains isolated from cultured fish were found more resistant to ampicillin (64,28%) cefuroxime (35,71%) and ciprofloxacin (7,14%), compared to the free living fish isolates which were resistant only to ampicillin (40,0%). Also less were the ampicillin resistant (37,3%) *E. coli* strains isolated from the various water samples. From the rest Enterobacteria, 37,5% of *E. cloacae* strains isolated from cultured fish were resistant to cefuroxime and 12,5% to ciprofloxacin, ampicillin and gentamicin, while the isolates from free living fish were only resistant to ampicillin (54,7%).

*Shigella* spp, *Citrobacter* spp, *E. amnigenus*, *Klebsiella* spp, *S. arizonae*, *Hafnia alvei*, and *Pantoea* spp. strains isolated from river and marine water samples were resistant to ampicillin. All *P. shigelloides* spp. isolated from river and marine water samples were resistant to penicillin, while 12 out of the 15 *Aeromonas* spp strains isolated from all samples were resistant to gentamicin.

The study of the microbiological quality of total aquatic environment in Greece and particularly in Epirus area is contacted for first time. Also this is the first survey of the distribution of antibiotic resistant strains in the aquatic environment, including both waters and fish. The results show great microbiological pollution in the Ports of Preveza, Amfilohia,





Vonitsa and to the Pamvotis Lake and to a lesser extent in the rivers, with the Aos and Voidomatis rivers having almost nil pollution. However, the isolation of resistant strains from the aquatic environment indicates that a reservoir of antibiotic resistant bacteria already exists in this environment, and there are good chances of transmission to humans through the food chain.



## 9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 9.1. Διεθνής Βιβλιογραφία

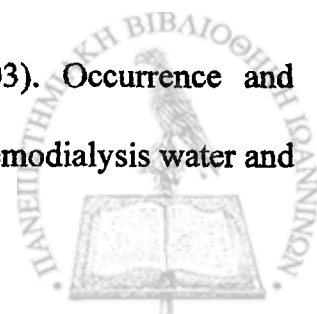
1. Aherne G.W., Hardcastle A., Nield A.H. (1990). Cytotoxic drugs and the aquatic environment. Estimation of bleomycin in river and water samples. *L. Pharm. Pharmacol.* 42:741-742.
2. Al Ahmad A., Daschner F.D., Kummerer K. (1999). Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37:158-163.
3. Alavandi S., Sabashini MS., Anathan S. (1999). Occurrence of haemolytic and cytotoxic *Aeromonas* species in domestic water supplies in Chennai. *Indian J. Med. Res.*, Aug (110):50-55.
4. Alamanos Y., Maipa V., Levidiotou S., Gessouli E. (2000). A community waterborne outbreak of gastro-enteritis attributed to *Shigella sonnei*. *Epidemiol. Infect.* 125 (3): 499-503.
5. Alcaide E., Blasco MD., Esteve C (2005). Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eelfarms. *Appl Environ Microbiol.* 71(6):334850.
6. Anwar M.S., Chaudry N.A., Tayyib M. (1999). Bacteriological quality of drinking water in Punjab: evaluation of H<sub>2</sub>S strip test. *J. Pak. Med. Assoc.* 49 (10):237-241.
7. Anwar M.S., Chaudry N.A., Tayyib M. (2004). Qualitative assessment of bacteriological quality and chlorination status of drinking water in Lahore. *J Coll. Physicians Surg. Pak.* 14 (3):157-160.
8. Aulicino F.A., Orsini P., Carere M., Mastrantonio A. (2001). Bacteriological and virological quality of seawater bathing areas along the Tyrrhenian coast. *Int. J. Environ. Health Res.* 11(1):5-11.



9. Alexiou Daniils. (1994). The occurrence of atypical pneumonia causing agents in Greece. EWGLI Meeting, Proceedings. pp. 155-162.
10. Al-Ghazali M.R., Jazrawi S.F., Al Doori Z.A. (1988). Antibiotic resistance among pollution indicator bacteria isolated from Al-Khair River, Baghdad. Water Res. 22:641-644.
11. Altherr M.R., Kasweck K.L. (1982). In situ studies with membrane diffusion chambers of antibiotic resistance transfer in *E. coli*. Appl. Environ. Microbiol. 44:838-843.
12. Alvero C.C. (1987). Antibiotic resistance of heterotrophic bacterial flora of two lakes. System Appl. Microbiol. 9:169-172.
13. Amaro C., Aznar R., Garay E., Alcaide E. (1988). R-plasmids in environmental *V. cholerae* non-01 strains. Appl. Environ. Microbiol. 54:2771-2776.
14. Amyes S.G.B., Tait S., Thomson C.J. και συν. (1992). The incidence of antibiotic resistance in aerobic faecal flora in South India. J. Antimicrob. Chemother. 29:415-425.
15. Anand C.M. και συν. (1983). Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba. J. Hyg. Cambridge 91:167-78.
16. Anderson K., Jamieson A. (1972). Primary amoebic meningoencephalitis. Lancet 1:902.
17. Antai S.P. (1987). Incidence of *Staph. aureus*, coliforms and antibiotic resistant strains of *E. coli* in rural water supplies in Port Harcourt. J. Appl. Bacteriol. 62:371-375.
18. APHA (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20<sup>th</sup> edition. American Public Health Association. Washington DC., USA.



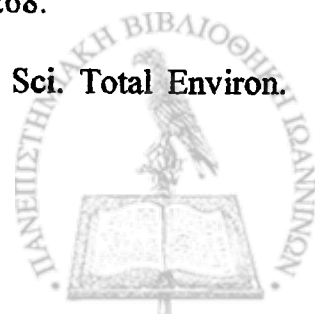
19. Arvanitidou M., Vayona A., Pigadas A., Tsakris A. (1999). Recovery of high-level streptomycin-resistant Enterococci from hemodialysis water and dialysate in 85 Greek renal units. *Infect Control Hosp. Epidemiol.* 20(10):686-689.
20. Arvanitidou M., Katsouyannopoulos V., Tsakris A. (2001). Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. *J. Med. Microbiol.* 50(11):1001-5.
21. Arvanitidou M., Papa A., Constantinidis T. C., Danielides V., Katsouyannopoulos V. (1997a). The occurrence of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. in surface waters. *Microbiol. Res.* 152(4):395-397.
22. Arvanitidou M., Spaia S., Katsinas C., Pangidis P., Constantinidis T., Katsouyannopoulos V., Vayonas G. (1998). Microbiological quality of water and dialysate in all haemodialysis centers of Greece. *Nephrol. Dial. Transplant* 13(4):949-954.
23. Arvanitidou M., Spaia S., Velegraki A., Pazarloglou M., Kanetidis D., Pangidis P., Askepidis N., Katsinas C., Vayonas G., Katsouyannopoulos V. (2000). High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. *J Hosp. Infect.* 45(3):225-330.
24. Arvanitidou M., Stathopoulos G.A., Constantinidis T. C., Katsouyannopoulos V. (1995). The occurrence of *Salmonella*, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. in river and lake waters. *Microbiol. Res.* 150(2):153-158.
25. Arvanitidou M., Tsakris A., Constantinidis C., Katsouyannopoulos V.C. (1997b). Transferable antibiotic resistance among *Salmonella* strains isolated from surface waters. *Wat. Res.* 31(5):1112-1116.
26. Arvanitidou M., Vayona A., Spanakis N., Tsakris A. (2003). Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and



- dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. *J. Appl. Microbiol.* 95(1):180-5
27. Ash R.J., Mauck B., Morgan M. (2002). Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerg. Infect Dis.* 8(7):713-6.
28. Ayulo A.M., Machado R.A., Scussel V.M. (1994). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 24(1-2):171-8.
29. Basualdo J.A., Cordoba M.A., De Luca M.M., Roccia I.L., Pezzani B.C., Vay C., Ageron E., Grimont P.A. (2001). Isolation and characterization of injured coliforms from the drinking water distribution network of La Plata, Argentina. *Rev Argent. Microbiol.* 33 (1):9-14.
30. Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Truck K.M. (1996). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493.
31. Bell J.B., Elliott G.E., Smith D.W. (1983). Influence of sewage treatment and urbanization on selection of multiple resistance in fecal coliform populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 46 (1):227-232.
32. Bert F., Maubec E., Bruneau B., Berry P., Lambert-Zechovsky N. (1998). Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. *J. Hospit. Infect.* 39:53-62.
33. Burke V., Robinson J., Gracey M., Peterson D., Partridge K. (1984). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a Metropolitan Water Supply: Seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (2):361-366.
34. Beckert BW., Puckett CL., Concannon MJ. 2004. Analysis of freshwater pathogens: a guide to rational empiric antibiotic coverage. *Mo Med.* 101:219-221.



35. Begier EM., Frenette K., Barrett NL., Mshar P., Petit S., Boxrud DJ., Watkins-Colwell K., Wheeler S., Cebelinski EA., Glennen A., Nguyen D., Hadler JL. (2005). A high-morbidity outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among players on a college football team, facilitated by cosmetic body shaving and turf burns. Clin. Infect. Dis. 40(6):906-7.
36. Benin AL., Benson RF., Arnold KE., Fiore AE., Cook PG., Williams LK., Fields B., Besser RE. (2002). An outbreak of travel-associated Legionnaires disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. Infect Dis. 185(2):259-61.
37. Benkel DH., McClure EM., Woolard D., Rullan JV., Miller GB Jr., Jenkins SR., Hershey JH., Benson RF., Pruckler JM., Brown EW., Kolczak MS., Hackler RL., Rouse BS., Breiman RF. (2000) Outbreak of Legionnaires' disease associated with a display whirlpool spa. Int. J. Epidemiol. 29(6):1092-8.
38. Berrouane YF., McNutt LA., Buschelman BJ., Rhomberg PR., Sanford MD., Hollis RJ., Pfaller MA., Herwaldt LA. (2000). Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* infections caused by a contaminated drain in a whirlpool bathtub. Clin Infect Dis 31(6): 1331-7.
39. Blackburn B.G., Craun G.F., Yoder J.S., Hill V., Calderon R.L., Chen N., Lee S.H., Levy D.A., Beach M.H. (2004). Surveillance for water borne-disease outbreaks associated with drinking water-United States, 2001-2002. MMWR Surveill. Summ. 53 (8):23-45.
40. Boehm R. (1996). Effects of residues of antiinfectives in animal excrements upon slurry management and upon soil. Dtsch Tierrztl Wschr 103:264-268.
41. Boende G.J. (1981). *Salmonella* and other pathogenic bacteria. Sci. Total Environ. 18:1-11.



42. Boyd GR., Grimm DA.. Related. (2001). Occurrence of pharmaceutical contaminants and screening of treatment alternatives for southeastern Louisiana. *Ann N Y Acad Sci*;948:80-9.
43. Borrego J., Morinigo M.A., Martinez-Manzanares E., Bosca M., Castro D., Barja JL., Toranzo AE. (1991). Plasmid associated virulence properties of environmental isolates of *Aeromonas hydrophila*. *Med Microbiol.* 35(5):264-9
44. Boshuizen HC., Neppelenbroek SE., van Vliet H., Schellekens JF., den Boer JW., Peeters MF., Conyn-van Spaendonck MA. (2001). Subclinical Legionella infection in workers near the source of a large outbreak of Legionnaires disease. *Infect Dis.* 184(4):515-8.
45. Boxall AB., Fogg LA., Blackweil PA., Kay P., Pemberton EJ., (2004). Links Croxford A. Veterinary medicines in the environment. *Rev Environ Contain Toxicol.*; 180:1 - 91.
46. Bradley D.J. (1987). Health problems of water management. *J. Trop. Med. Hyg.* 73:286-289
47. Brenner D.J. και συν. (1985). Ten new species of *Legionella*. *Int.J. Systematic Bacteriology.* 35:50-51.
48. Brooks T., Osicki R., Springthorpe V., Sattar S., Filion L., Abrial D., Riffard S. (2004). Detection and identification of Legionella species from groundwaters. *Toxicol Environ Health A.* 67(20-22): 1845-59
49. Burton N.F., Day M.J., Bull A.T. (1982). Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in a S. Wales river. *Appl. Environm. Microbiol.* 44:1026-1029.
50. Buser H.R., Muller M.D. (1998). Occurrence of the pharmaceutical drug clofibrac acid and the herbicide mecoprop in various Swiss lakes and in the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* 32:188-192.



51. Cabelli V.J. (1983). Health effects criteria for marine recreational waters. R & D report No EPA-600/1-80-031, U.S.E.P.A., Research Triangle Park, N.C.
52. Cabezali C.B., Darian L.A., Pezzani S., Serra S. (1986). Bacterial fluctuations in the recreational waters of the Mar del Plata area. *Rev Argent Microbiol.* 18 (34):105-113.
53. Caldwell C.A., Ye C., Griffiths R.P., Moyer C.L., Morita R.Y. (1989). Plasmid expression and maintainance during long-term starvation survival of bacteria in well water. *Appl. Environm. Microbiol.* 55:1860-1864.
54. Campeau R.C., Gulli L.F., Graves J.F. (1996). Drug resistance in Detroit River Gram-negative bacilli. *Microbios* 88:205-212.
55. Caruso G., Zaccone R., Monticelli L., Crisafi E., Zampino D. (2000). Bacterial pollution of Messina coastal waters a one year study. *New Microbiol.* 23(3):297-304.
56. Cavalieri d'Oro και συν. (1999). *V. cholerae* outbreak in Italy. *Emerg. Infect. Diseas.* 5:2.
57. CDC (Center for Disease Control and Prevention) (2004). An outbreak of norovirus gastroenteritis at a swimming club-Vermont, 2004. *MMWR.* 2004 Sep 3;53(34):793-5
58. Cerovec C. (2000). Entwicklung und Anwendung von HPLC-Methoden für die Analyse von Antibiotika in verschiedenen Testsystemen. Thesis.
59. Chang JJ., Sheen IS., Peng SM, Chen PC., Wu CS., Leu HS. (1994). *Vibrio vulnificus* infection-report of 8 cases and review of cases in Taiwan. *Changgeng. Yi Xue Za Zhi.* 17(4):339-46
60. Charalampopoulos K. et al, (1984). Legionnaires disease in north-western Greece. *Eur. J. Clin Microbiol.* 3(5):445-6.
61. Chemuliti J.K., Gathura P.B., Kyule MM., Njeruh FM. (2002). Bacteriological qualities of indoor and outdoor drinking water in the sub-location of Nairobi, Kenya. *East Afr Med J.* May. 79 (5):271-273.

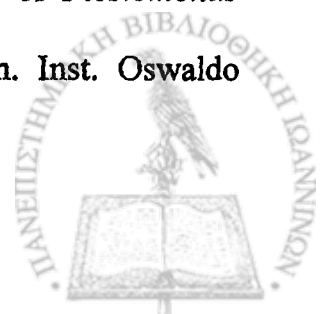




62. Cheftel E., Spiegel A., Borell E, Michel. A, Buisson Y. (1997). Toxic food infection caused by *Shigella flexneri* in a military unit Sante. 7(5):295-9.
63. Christensen F.M. (1998). Pharmaceuticals in the environment-a human risk. Regul. Toxicol. Pharmacol. 28:212-221.
64. Clara M., Kreuzinger N., Strenn B., Cans O., Kroiss H. (2005). The solids retention time-a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants. Water Res. 39(1):97-106.
65. Clement LF., Gallet C., Perron J., Lesueur A. (2004). Infectious cellulitis and *Shewanella alga* septicemia in an immunocompetent patient. Ann Dermatol Venereol 131(12): 1095-7.
66. Cliver D.O., Newman R.A. (1987). Drinking water microbiology. J. Environm. Pathol. Toxicol. Oncol. 7:5-6.
67. Colbourne J.S., Dennis P.J.L. (1989). The ecology and survival of *Legionella pneumophila*. J. of the Institute of Water and Environm. 3:345-350.
68. Collins C.H., Grange J.M., Yates M.D. (1984). Mycobacteria in water J. Appl. Bacteriol. 57:193-211.
69. Contreras-Coll N., Lucena F., Mooijman K., Havelar A., Pierz V., Boque M., Gawlere A., Holler C., Lambiri M., Mirolo G., Moreno B., Niemi M., Sommer R., Valentin B., Wiedenmann A., Young V., Jofre J. (2002). Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. Water. Res. 36 (20) 4963-4974.
70. Cordoba MA., Roccia IL., De Luca MM., Pezzani BC., Basualdo JA. 2001. Resistance of antibiotics in injured coliforms isolated from drinking water. Microbiol. Immunol. 45:383-386.
71. Coughter J.P., Stewart G.J. (1989). Genetic exchange in the environment. Antoine van Leeuwenhoek. 55:15-22.



72. Craun G.F. (1986). *Waterborne Diseases in the United States*, CRC Press, Boca Raton, FL. 39(1):1-13
73. Czyz A., Jasiocki J., Bogdan A., Szpilewska H., Wegrzyn G. (2000). Modified *Vibrio harveyi* strains as potential bioindicators of mutagenic pollution of marine environments. *Appl Environ Microbiol.* 66(2):599-605.
74. Dahlberg C, Bergstrom M, Hermansson M. 1998. In situ detection of high levels of horizontal plasmid transfer in marine bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2670-2675.
75. Dancer S.J., Shears P, Platt D.J. (1997). Isolation and characterization of coliforms from glacial ice and water in Canadas. *High Arctic. J. Appl Microbiol.* 82(5):597-609
76. Davey R.B., Reaney D.C. (1980). Extrachromosomal genetic elements and the adaptive evolution of bacteria, in *Evolutionary biology.* (Hecht M.R., Steere W.C., Wallace B., eds), Plenum Press N.Y.13:113-147.
77. Davies AR., Slade A. (1995). Fate of *Aeromonas* and *Yersinia* on modified-atmosphere-packaged (MAP) cod and trout. *Lett Appl Microbiol.* 21(6):354-8.
78. Davies AR., Capell C., Jehanno D., Nychas GJE., Kirby RM. (2001). Incidence of foodborne pathogens in European fish. *Food Control* 12:67-71.
79. Day M. (2004). Bacterial sensitivity to bacteriophage in the aquatic environment. *Sci Prog.* 87(3):179-91.
80. D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A, Mancimi R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi R. (2003). Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci Total Environ.* 20:302(1 -3): 199-209.
81. De Mondino S.S, Nunes M.P, Ricciardi I.D. (1995). Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in water environments of Rio de Janeiro city. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*90(1):1-4.



82. Decker W.J. (1988). Chlorine poisoning at the swimming pool revisited: anatomy of two minidisasters. *Vet.Hum. Toxicol.* 30(6):584-5.
83. DeFlaun M.F., Paul J.H. (1989). Detection of exogenous gene sequences in dissolved DMA from aquatic environments. *Microb. Ecol.* 18:21-28.
84. DeJonckheere J.F. (1979). Studies on pathogenic free-living amoebae in swimming pools. *Bull. Inst. Pasteur.* 77:385.
85. Den Boer JW., Yzerman EP., Schellekens J., Lettinga KD., Boshuizen HC., Van Steenberghe JE., Bosman A., Van den Hof S., Van Vliet HA., Peeters MF., Van Ketel RJ., Speelman P., Kool JL., Conyn-Van Spaendonck MA, (2002). A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg Infect* 8(2): 180.
86. Derlet RW., Carlson JR., Noponen MN. (2004). Coliform and pathogenic bacteria in Sierra Nevada national forest wilderness area lakes and streams. *Wilderness Environ. Med.* 15(4):245-249.
87. Divizia M., Ruscio V., Donia D., el Ghazzawi E., Elcherbini E., Gabrieli R., Gamil F., Kader O., Zaki A., Renganathan E., Pana A. (1997). Microbiological quality of coastal sea water of Alexandria, Egypt. *Ann Ig* 9(4):289-294.
88. Dodds K.L. (1993). *Clostridium botulinum* in Foods. *Clostridium botulinum*, Ecology and Control in foods New York., In. A.H.W. Hauschild and KL Dodds Marcel Dekker. 53-68.
89. Dominique E.L., Tyndall R.L., Mayberry W.R., Pancorbo O.C. (1988). Effects of three oxidising biocides on *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Appl. Environ. Microbiol.* 5(4):741-747.
90. Douglas G.R., Nestmann E.R., Lebel G. (1986). Contribution of chlorination to the mutagenic activity of drinking water extracts in *Salmonella* and Chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect.* 69:81-87.



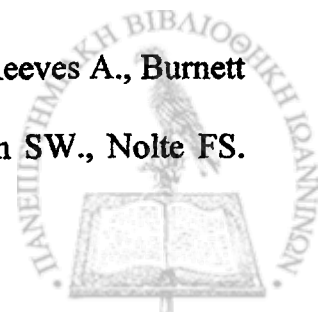
91. Dourman E., Bibb W.F., Rajagopalan P. και συν. (1988). Monoclonal antibody reactivity as a virulence marker for *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. J. Infect. Dis. 157:496-501.
92. Dryden M., Munro R. (1989). *Aeromonas* septicemia: relationship of species and clinical features. Pathology. 1989 Apr;21(2):111-4
93. Edelstein P.M. (1993). Legionnaires Disease. State-of-the art clinical article. Clinic. Infect. Dis. 16:741-749.
94. EMEA, (2002). Informal consolidation of the annexes I to VI to Council Regulation (EEC) No 2777/90 of the European Agency for the Evaluation of Medical Products. Veterinary Medicines Evaluation Unit.
95. Efstratiou M.A. (2001). Managing coastal bathing water quality: the contribution of microbiology and epidemiology. Mar Pollut Bull. 42(6):425-432.
96. Esteve C., Gutierrez MC., Ventosa A. (1996). *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from European eels. Int J Syst Bacteriol 46(1):366.
97. Fallen R.J. (1994). How to prevent an outbreak of legionnaires disease. J. Hosp. Inf. 27:247-256.
98. Fallen RJ, Rowbotham TJ. (1990). Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool: Clin Pathol. 43(6):479-83.
99. Fallon RJ. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* and whirlpool baths. Lancet. 346(8978):841.
100. Fattal B., Shuval H.I. (1988). Epidemiological research on the relationship between the microbial quality of coastal seawater and morbidity among bathers on Israeli Mediterranean beaches. M.A.P. Technical Report Series. No 46, UNEP, Athens.



101. FEDESA (European Federation of Animal Health). (1997). Press release, September 1997. Brussels.
102. Ferguson I.R. (1990). Human Leptospirosis. Stat. Veterinar. Journal 44(125):131-134
103. Fernandez-Alvarez R.M., Carballo-Cuervo S., de la Rosa-Jorge M.C., Rodriguez-de Lecea J. (1991). The influence of agricultural run off on bacterial populations in a river. J Appl Bacteriol 70 (5):437-442.
104. Fernandez-Astorga A., Muela A., Cisterna R., Iriberry J., Barcina I. (1992). Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *E. coli* strains. Appl. Environm. Microbiol. 58:392-398.
105. Ferroni A., Nguyen L., Pron B., Quesne G., Brusset M.C., Berche P. (1998). Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination. J Hospital Inf. 39:301-307.
106. Fielding M., Gibson T.M., James H.A., McLoughlin K., Steel C.P. (1981). Organic micro-pollutants in drinking water. WRC Report No. TR 159.
107. Fields BS., Haupt T., Davis JP., Arduino MJ., Miller PH., Butler JC (2001). Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial toxin. Infect Dis. 184(10): 1289-92.
108. Fisher A.A. (1988). Swimming pool granulomas due to *Mycobacterium marinum*: an occupational hazard of lifeguards. Cutis 6:397-8.
109. Fiume L., Bucca Sabattini MA., Poda G. (2005). Detection of *Legionella pneumophila* in water samples by species-specific real-time and nested PCR assays. Lett Appl Microbiol.;41(6):470-5.
110. Fleisher J.M., Kay D., Salmon R.L., Jones F., Wyer M.D., Godfree A.F. (1996). Marine waters contaminated with domestic sewage: nonenteric illness associated with bather exposure in the United Kingdom. Am J Public Health 36 (9):1228-1234.



111. Fliermans CB., Cherry WB., Orrison LH., Smith SJ., Tison DL., Pope DH. (2006). Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol.* Jan;41(1):9-16.
112. Fraser DW. (1977). Legionnaires disease. Description of an epidemic pneumonia. *NEMJ.*,1189-97
113. Fricker C.R., Tompsett S. (1989). *Aeromonas* spp. in foods: a significant cause of food poisoning. *Int J Food Microbiol* 9:17-23.
114. Garrison A.W., Pope J.D., Allen F.R. (1976). In: Kech, CH (ED). Identification and analysis of organic pollutants in water. *Ann Arbor Science MI* 517-566.
115. Garcia de Fernando GD., Mano SB., Lopez D., Ordonez JA. (1995). Effectiveness of modified atmospheres against psychrotrophic pathogenic microorganisms in proteinaceous food. *Microbiologia Marll (I)*:7-22. Spanish.
116. Gaur A., Ramteke P.W., Pathak S.P., Bhattacharjee J.W. (1992). Transferable antibiotic resistance among thermotolerant coliforms from rural drinking water in India. *Epidemiol Infect.* 109(1):113-120.
117. Genthner F.J., Chatterjee P., Barkay T., Bourquin A.W. (1988). Capacity of aquatic bacteria to act as recipients of plasmid DMA. *Appl. Environm. Microbiol.* 54:115-117.
118. Gerba CP., Rose JB., Haas CN. (1996). Sensitive Populations: who is at the greatest risk? *Int. J. Food Microbiol.* 30:113-123.
119. Giannoulis N., Maipa V., Konstantinou I., Albanis T., Dimoliatis I. (2005). Microbiological risk assessment of Agios Georgios source supplies in Northwestern Greece based on faecal coliforms determination and sanitary inspection survey. *Chemosphere* 58 (9):1269-76.
120. Gira AK., Reisenauer AH., Hammock L., Nadiminti U., Macy JT., Reeves A., Burnett C., Yakus MA., Toney S., Jensen BJ., Blumberg HM., Caughman SW., Nolte FS.



- (2004). Furunculosis due to *Mycobacterium mageritense* associated with footbaths at a nail salon. Clin. Microbiol. 42(4):1813-7.
121. Gobat P., Jemmi T. (1993). Distribution of mesophilic *Aeromonas* species in raw and ready to eat fish and meat products in Switzerland. Int. J Food Microbiol 20:117-120.
122. Gomathinayagam P., Davis A.S., Hatha A.A., Lakshmanaperumalsamy P. (1994). The risk assessment of faecal contamination of MAR indexing of *Escherichia coli*. Zentralbl Hyg. Umweltmed 196(3):279-283.
123. Goni-Urriza M., Capdepuuy M., Arpin C., Raymond N., Caumette P., Quentin C. (2000). Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66(1):125-32.
124. Gonzalez C.J., Lopez-Diaz T.M., Garcia-Lopez M.L., Prieto M., Otero A. (1999). Bacterial microflora of wild trout (*Salmo trutta*), wild pike (*Esox lucius*) and aquacultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Food Prot. 62 (11):1270-1277.
125. Gotz HM., Tegnell A., De Jong B., Brohohn KA., Kuusi M., Kallings I., Ekdahl K. (2001). A whirlpool associated outbreak of Pontiac fever at a hotel in Northern Sweden. Epidemiol. Infect. 126(2):241-7.
126. Grabow W.O.K. (1991). New trends in infections associated with swimming pools. Water SA. 17(2):173-177.
127. Graun G.F. (1986). Waterborne Diseases in the United States, CRC Press, Boca, Raton, (LF).
128. Green JJ. (2000) Localized whirlpool folliculitis in a football player. Cutis 65(6):359-62.
129. Grimes D.J. (1991). Ecology of estuarine bacteria capable of causing human disease: a review. Estuaries 14:345-360.



130. Grimes D.J., Colwell R.R. (1986). Viability and virulence of *E. coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean-water. *FEMS Microbiol. Lett.* 34:161-165.
131. Grover P.S., Thakur K. (2001). Shima drinking water-a bacteriological analysis. *J. Commun. Dis.* 33 (1):44-52.
132. Guerrieri E., BontiM., Ciancio C., Borella P., Messi P. (2005). Micro-and macromethod assays the ecological study of *Legionella pneumophila* .*FEMS Microbiol. Lett.* 1:113-9
133. Embarek P.K.B. (1994). Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *Int. J. Food .Microbiol.* 23:17-34.
134. Hajjartabar MP. (2004). Quality water in swimming pools associated with a substantial risk of otitis externa due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci. Technol.* 2004; 50(1):63-7.
135. Halling-Sorensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lutzhoft H.C., Jorgensen S.E. (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review. *Chemosphere* 36:357-393.
136. Harison and TG., Taylor AG. (1988). Alaboratory manual for *Legionella*. John Wiley and sons, Chichester.
137. Hartmann A., Alder A.C., Koller T., Widmer R. (1998). Identification of fluoroquinolone antibiotics ast he main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environ. Toxicol. Chem.* 17:383-393.
138. Havelaar A.H., During M., Delfgou-Van Asch H.M. (1985). Comparative study of membrane filtration and enrichment media for the isolation and enumeration of *P.aeruginosa* from sewage, surface water, and swimming pools. *Can. J. Microbiol.* 31:686-692.





139. Haack S.K., Fogarty L.R., Wright C. (2003). *Escherichia coli* and Enterococci at beaches in the Grand Traverse bay, Lake Michigan: sources, characteristics and environmental pathways. *Environ. Sci. Technol.* 37 (15):3275-3282.
140. Heberer T., Butz S., Stan H.J. (1995). Analysis of phenoxy carboxylic acids and other acidic compounds in tap, ground, surface and sewage water at low ppt level. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 58:43-54.
141. Heberer T., Stan H.J. (1996). Vorkommen von olaren organischen Kontaminanten im Berliner Trinkwasser. *Vom Wasser.* 86:19-31
142. Heberer T., Stan H.J. (1997). Vorkommen und Bestimmung von Arzneimittelruekstanden im Berliner Oberflachen-und Grundwasser. In. *Fachgruppe Wasserchemie der GDCh Proceedings, Jahrestagung, Lindau* 103-106
143. Herwaldt BL, Craun GF, Stokes SL, Juranek DD. (1991). Waterborne-disease outbreaks, 1989-1990. *MMWR CDC Surveill* 40(3):1-21.
144. Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 225:109-118.
145. Hirsch R., Ternes T., Lindart A., Haberer K., Wilken R.D. (2000). Sensitive method for determination of iodine containing diagnostic agents in aqueous matrices using LC electrospray-tandem-MS detection. *Fresenius J. Anal.Chem.* 366:835-841
146. HMSO (1979). Department of the Environment Water Concil Swimming pool disifection systems using chlorine gas. London.
147. Hoeverstadt T., Carlstedt-Duke B., Lingaas E. και συν (1986). Influence of oral intake of seven different antibiotics on faecal short-chain fatty acid excretion in healthy subjects. *Scand. J. Gastreterol.* 21:997-1003.



148. Hollyoak V., AUison D., Summers J. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* wound infection associated with a nursing home's whirlpool bath. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* 5(7): 100-2.
149. Hollyoak V., Boyd P., Freeman R.(1995). Whirlpool baths in nursing homes: use, maintenance, and contamination with *Pseudomonas aeruginosa*. *Commun. Dis. Rep. CDR.* 5(7):R102-4.
150. Hollyoak VA, Freeman R. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* and whirlpool baths. *Lancet.* 346(8975):644.
151. Holtern-Lutzhof H.C. (2000). Environmental risk assessment of antimicrobials. Thesis, University of Copenhagen, Denmark.
152. Huhn GD., Adam B., Ruden R., Hilliard L., Kiikpatrick P., Todd J., Crafts W., Passaro D., Dworkin MS. (2005). Outbreak of travel-related pontiac fever among hotel guests illustrating the need for better diagnostic tests. *Travel Med.* 15:173-9.
153. Hunter P.R (1995). Investigating outbreaks of drinking-water-borne disease. *Microbiol. Eur.* 2:10-14
154. Hunter P.R. (1997). Drinking water and waterborne diseases. In Hunter PR, editor. *Waterborne Disease: Epidemiology and Ecology.* New York.Wiley:27-41.
155. Hurst C. (1997). Introduction to Environmental Microbiology. In: *Manual of Environmental Microbiology* 1:3-4.
156. Hurst C.J, Murphy P.A. (1998). The Transmission and Prevention of Infectious Disease, Modelling Disease Transmission and Its Prevention by Disinfection. In Cambridge University UK:3-54.
157. Hudson J.A., Mott S.J., Delacy K.M., Edridge A.L. (1992). Incidence and coincidence of *Listeria* spp., motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready to eat fleshfoods. *Int. J. Food Microbiol.* 16:99



158. Hudson JA., Avery SM. (1993). Presence and coincidence of *Listeria* spp., motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* in a cold-smoked salmon processing and packing plant. *N Z Vet* 41(2):78-81.
159. Ibiebele D.D., Sokari T.G. (1989). Occurrence of drug-resistant bacteria in communal well water around Port Harcourt, Nigeria. *Epidemiol. Infect.* 103:193-202.
160. Imzilin B. (2001). Occurrence and antibiotic resistance of mesophilic *Aeromonas* in three riverine freshwaters of Marrakech, Morocco. *Scientific World Journal* 1(1):796-807.
161. Ishikawa A., Okada J., Kondo H., Takayama Y., Sunagawa K., Enari T., Ishii Y. (2004). *Legionella pneumonia* which occurred in a private whirlpool bath user. *Kansenshogaku Zasshi*. 8(10):898-904
162. Jenkins PA., Mark J. (1991). Transient colonization from soil. *Can. J. Microbiol.*, 11 127-133
163. Jernigan DB., Hofmann J., Cetron MS., Genese CA., Nuorti JP., Fields BS., Benson RF., Carter RJ., Edelstein PH., Guerrero C., Paul SM., Lipman HB., Breiman R. (1996). Outbreak of Legionnaires disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. *Lancet*. 347(9000):494-9.
164. Jobling M.G., Peters S.E., Ritchie D.A. (1988). Plasmid borne mercury resistance in aquatic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 49:31-37.
165. Joce R.E., Bruce E., Kiely D., Noah N.D., Dempster W.B., Stalker R., Gurnsley P., Chapman P.A., Norman P., Watkins J. (1991). An outbreak of cryptosporidiasis associated with a swimming pool. *Epidemiol. Infect.* 107:407-508
166. Johnson J.Y., Thomas J.E., Graham T.A., Townshend I., Byrne J., Selinger L.B., Gannon V.P. (2003). Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp in



- surface waters of southern Alberta and its relation to manure sources. *Can J. Microbiol* 49 (5):326-335.
167. Jolley R.L. (1984). *Water chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Lewis Publishers., Williamsburg, Virginia Inc V 5..
168. Jonckheere J.F., (1985). Aemoebae in public swimming pools. *International Seminar on technical, hygienic and health problems in the issue of public health swimming pools*. Herning, Denmark.
169. Jones J.G., Gardener S., Simon B.M., Pickup R.W. (1986). Antibiotic resistant bacteria in Windermere and two remote upland tarns in the English Lake District. *J. Appl. Bacteriol.* 60:443-453.
170. Jorgensen .P.H. (1985). Transmission of viruses in public swimming pools. *International Seminar on technical, hygienic and health problems in the issue of public health swimming pools*. Herning, Denmark.
171. Kamat A., Thomas P. (1998). Radiation inactivation of some food-borne pathogens in fish as influenced by fat levels. *J Appl Microbiol.* 84(4):478-84.
172. Karanis P., Chronis I., Zakas G., Kourenti C., Sotiriadou I., Papadopoulou C. (2005). A Preliminary survey of the level of microbiological pollution of major rivers in Northern Greece. *Acta Hydroch Hydrobiol.* 33 (4):346-354.
173. Karanis P., Papadopoulou C., Kimura A., Economou E., Kourenti C., Sakkas H. (2002). *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural, drinking, and recreational water of northwestern Greece. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 30(1)49-58 .
174. Karl D.M., Bailiff M.D. (1989). The measurement and distribution of dissolved nucleic acids in aquatic environments. *Limnol. Oceanogr.* 34:543-558.



175. Kattering JD., Stephens JA., Monoz-Viveros CA., Naylor WP. (2002). Reducing bacterial counts in dental unit waterlines: tap water versus distilled water contemp Dent Pract. 15;3(3):1-9
176. Kay D., Wyer M. (1992). Recent epidemiological research leading to standards, in Recreational Water Quality Management, vol 1. Coastal Waters. Ellis Norwood LTD. Chichester.
177. Kelsey RH., Scott GI., Porter DE., Thompson B., Webster L. 2003. Using multiple antibiotic resistance and land use characteristics to determine sources of fecal coliform bacterial pollution. Environ Monit Assess. 81:337-348.
178. Kelch W.J., Lee J.S. (1978). Antibiotic resistance Patterns of Gram-negative bacteria isolated from environmental sources. Appl. Environ Microbiol. 36 (3):450-456.
179. Klinger J., Brauch H.J. (2000). Water quality of the rivers Danaube and its tributaries. Poste presented at the Annual meeting of the German Society of Water Chemistry, Weimar, Proceedings.
180. Kolpin DW., Furlong ET., Meyer MT., Thurman EM., Zaugg SD., Barber LB., Buxton H.T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. Environ. Sci. Technol. 36(6): 1202-11.
181. Kosjek T., Heath E., Krbavcic A. (2005). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. Environ. Int. 31(5):679-85
182. Kramer MH., Herwaldt BL., Craun GF., Calderon RL., Juranek DD(1996). Surveillance for waterborne-disease outbreaks—United States, 1993-1994. MMWR CDC Surveill 45(1):1-33



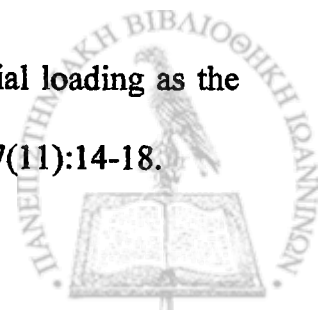
183. Krumperman P.H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *E. coli* to identify high risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:165-170.
184. Kummerer K. (1998b). Eintrag von Pharmaka, diagnostika und Desinfektionsmitteln aus Krankenhausern in die aquatische Umwelt. Habilitationsschrift. Universitat Freiburg.
185. Kummerer K. (2001). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources. *Chemosphere* 45:957-969.
186. Kummerer K., Al-Ahmad Bertram B., Wiebler M. (2000). Biodegradability of antineplastic compounds in screening test: influence of glucosidation and of stereochemistry. *Chemosphere* 40:767-773.
187. Kummerer K., Eitel A., Braun U., Hubner P., Daschner F., Mascart G., Milandri M., Reinthaler F., Verhuf J. (1997). Analysis of benzalkonium chloride in the effluent from European hospital by solid phase extraction and HPLC with post column ion-pairing for fluorescence detection. *J. Chromatogr.A* 774:281-286.
188. Kummerer K., Erbe T., Gartiser S., Brinker L. (1998a). AOX emissions from hospitals into municipal wastewater. *Chemosphere*. 36:2437-2445.
189. Kuroki T., Sata S., Yamai S., Yagita K., Katsube Y., Endo T. (1998). Occurrence of free-living amoebae and *Legionella* in whirlpool bathes. *Kansenshogaku Zasshi.* 72(10): 1056-63.
190. Lai H.T., Liu S.M., Chien Y.H. (1995). Transformation of chloramphenicol and oxytetracycline in aquaculture pond sediments. *J. Environ. Sci. Health A* 30:1897-1923.



191. Lalumandier J.A., Avers L.W. (2002). Fluoride and bacterial content of bottled water vs tap water. Arch Fam Med 9 (3):246-250.
192. LeChevallier M.W., Cawthon C.D., Lee R.G.(1988). Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. Appl. Environm. Microbiol. 54(3):649-654.
193. Lee WL., Chen CP. (1991). Bacteriological quality and *Escherichia coli* resistance from downstream water source of Kao-Ping river in the period September 1990-January 1991. Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi 7 (3):98-106.
194. Leoni E., De Luca G.,Legnani P., Sacchetti R., Stampi S., Zanetti F (2005). Legionella waterline colonization: detection of Legionella species in domestic, hotel and hospital hot water systems. J. Appl. Microbiol 98(2):373-9 -
195. Leoni E., Legnani P., Mucci MT., Pinari R. (1999). Prevalence of mycobacteria in a swimming pool environment. J. Appl. Microbiol. Nov;87(5):683-8.
196. Li J., Yie J., Fu W., Foo R.W., Hu Y., Woo N.Y., Xu H. (1999). Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured Sparus sarba. Wei Sheng Wu Xue Bao 39(5):461-468. (article in Chinese, English abstract Pubmed).
197. Lipp E.K., Farrah S.A., Rose J.B. (2001). Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. Mar. Pollut. Bull. 42(4):286-93.
198. Lisby M., Sorensen ND., Lorentsen A., Staehr P, Steensberg J. (1992). Whirlpool baths and hygiene Ugeskr Laeger.154(52):3768-9.
199. Luttichau HR., Vinther C., Uldum SA., Moller J., Faber M., Jensen JS. (1998). An outbreak of Pontiac fever among children following use of a whirlpool. Clin. Infect. Dis. 26(6): 1374-8.
200. Liu PC., Lee KK., Chen SN (1997). Susceptibility of different isolates of *Vibrio harveyi* to antibiotics. Microbios. 91(368-369):175-80.



201. Luttichau HR., Vinther CC., Uldum SA., Moller JS., Faber M., Jensen JS (1999). An outbreak of Pontiac fever among children and adults following a whirlpool bath. *Ugeskr Laeger*. 161(23):3458-62.
202. Mac Kenzie W.R., Hoxie N.J., Proctor M.E., Gradus M.S., Blair K.A., Peterson D.E., Kazmierczak J.J., Addiss D.G., Fox K.R. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331(15):1035.
203. Manjanatha M.G., Aidoo A., Shelton S.D., Bishop M.E., McDaniel L.P., Lyn-Cook L.E., Doerge D.R. (2005). Genotoxicity of acrylamide and its metabolite glycidamide administered in drinking water to male and female Big Blue mice. *Environ Mol Mutagen*. [E-pub ahead of print].
204. Martinelli F., Carasi S., Scarcella C., Speziani F. (2001). Detection of *Legionella pneumophila* at thermal spas. *New Microbiol*. 24(3):259-64.
205. Mavridou A., Papadakis J.A., Marcelou U., Tsakris A., Lambiri M. (1989). Seasonal and anthropogenic influence in the microbial flora of sea water and sand in swimming areas around Athens. *Environmental Science and Technology*. Mytilini. Proceedings 161-170.
206. Malik A., Ahmad M. (1994). Incidence of drug and metal resistance in *E. coli* strains from sewage water and soil. *Chem. Environ. Res*. 3:3-11.
207. Mazari-Hiriat M., Lopez-Vidal Y., Ponce-de-Leon S., Calva J.J., Rojo-Callejas F., Castillo-Rojas G. (2005). Longitudinal study of microbial diversity and seasonality in the Mexico city metropolitan area water supply system. *Appl. Environ. Microbiol*. 71(9):129-137.
208. McLellan S.L., Salmore A.K. (2003). Evidence for localized bacterial loading as the source of chronic beach closings in fresh water marina. *Water Res*. 37(11):14-18.

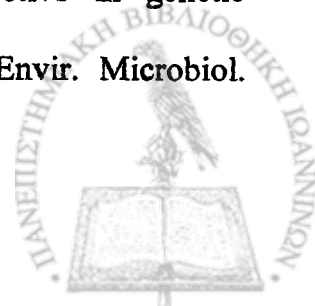




209. Mendez J., Audicana A., Cancer M., Isern A., Llaneza J., Moreno B., Navarro M., Tarancon ML., Valero F., Ribas F., Jofre J., Lucena F.(2004). Assessment of drinking water quality using indicator bacteria and bacteriophages. *J. Water Health* 2(3):201-214.
210. Miranda C.D., Kehrenberg C., Ulep C., Schwarz S., Roberts M.C. (2003). Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(3):883-888.
211. McPherson P., Gealt M.A. (1986). Isolation of indigenous wastewater bacterial strains capable for mobilizing plasmid pBR325. *Appl. Environm. Microbiol.* 51:904-909.
212. Mersch-Sundermann V., Wundt W. (1987). Bacteriological quality of water from the Rhine and its tributaries in the Rhine-Neckar region. I. Bacterial counts and Enterobacteriaceae of the current status of pollution. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg.* 184(6):459-469.
213. Migliore L., Brambilla G., Gozzolino S., Gaudio L. (1995). Effect on plants of sulfadimethoxine used in intensive farming *Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*. *Agric. Ecosys. Environ.* 52:103-110.
214. Miller RV. (2001). Environmental bacteriophage-host interactions: factors contribution to natural transduction. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 79(2):141-7.
215. Miranda C.D., Zemelman (2002). Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Sci. Total. Environ.* 293(13):207-18
216. Miranda C.D., Zemelman R. (2001). Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepcion Bay, Chile. *Mar. Pollut. Bull.* 42(11):1096-102.
217. Moe C.L. (1997). Waterborne transmission of infectious agents. In. *Manual of Environmental Microbiology* 3(15):136-152.



218. Moehle E., Kempter C., Kern A., Metzger J.W. (1999). Untersuchungen zum Abbau von Pharmaka in Kommunalen Klaranlagern mit HPLC-Electrospray - Massenspektrometrie. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 27:470-436.
219. Molitoris E., Joseph S.W., Krichevsky M.I., Sindhuhardia W., Colwell R.R. (1985). Characterisation and distribution of *Vibrio alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* isolated in Indonesia. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(6):1388-1394.
220. Moore A.C., Herwaldt B.C., Craun G.F, Calderon R.L., Highsmith A.K., Juranek D.D. (1994). Waterborne disease in the United States 1991-1992. *Journal AWWA.* February 1994:87- 89.
221. Moore AC., Herwaldt BL., Craun GF., Calderon RL., Highsmith AK., Juranek DD. (1993). Surveillance for waterborne disease outbreaks--United States, 1991-1992. *MMWR CDC Surveill* 42(5): 1-22.
222. Morris J.C. (1985). The use of chlorine as a disinfectant for public swimming pools. International Seminar on technical, hygienic and health problems in the issue of public health swimming pools. Herning, Denmark.
223. Mujeriego R., Bravo J.M., Feliv M.T. (1982). Recreation in coastal waters - Public Health implications. *Vies Journees Etud. Pollutions, Cannes, 585-594, C.I.E.S.M.*
224. Muyldermans G., De Smet F., Pierard D., Steenssens L., Stevens D., Bougatef A., Lauwers S. (1998). Neonatal infections with *Pseudomonas aeruginosa* associated with a water-bath used to thaw fresh frozen plasma. *J. Hospital Infection* 39:309-314.
225. Myeong S., Lee Brian A., Dougherty A.C. Madeo., Donald A. Morrison (1999). Construction and analysis of a library for random insertional mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: Use for recovery of mutants defective in genetic transformation and for identification of essential genes. *Appl. Envir. Microbiol.* 65:1883-1890.



226. Nakadate T., Yamauchi K., Inoue H. (1999). An outbreak of Legionnaire's disease associated with a Japanese spa. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 37(8):601-7.
227. NCCLS (2001). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 10<sup>th</sup> informational supplement M100-s11. Wayne PA
228. Nedoluha PC, Owens S, Russek-Cohen E, Westhoff DC. (2001). Effect of sampling method on the representative recovery of microorganisms from the surfaces of aquacultured finfish. *J. Food Prot.* 64(10):1515-20.
229. Neidecken H.W. (1984). Swimming pool granuloma- an atypical mycobacterial infection. *Hautarzt* 35(7):373-376.
230. NguyennTm., Ilef D., Jarraud S., Rouil L., Che D. (2006). A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread. *J Infect Dis.* 1;193(1):102-11.
231. Niemi M., Sibakov M., Niemela S. (1983). Antibiotic resistance among different species of fecal coliforms isolated from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(1):79-81.
232. Noble R.T., Moore D.F., Leecaster M.K., McGee C.D., Weisberg S.B. (2003). Comparison of coliform, fecal coliform and *Enterococcus faecalis* indicator response for ocean recreational water testing. *Water Res.* 37(7):1637-1643.
233. Norpoth Y., Nehr Korn, A., Kirchner, M., Holsen H., Teipel H. (1973). Untersuchungen zur Frage der Löslichkeit und Stabilität ovulationshemmender Steroide in Wasser, Abwasser und Belebtschlamm. *Zbl Bakt Mikrobiol. Hyg I. Abt. Orig. B* 156:500-511.
234. Okeke I.N. et al., (2005). Antimicrobial resistance in developing countries. Part II: strategies for containment. *Lancet. Infect. Dis.* 5(9):568-80.



235. Oliphant J.A., Ryan M.C., Chu A.(1993). Bacterial water quality in the personal water bottles of elementary students. *Can. J. Public Health* 93(5):366-377.
236. Obi CL., Potgieter N., Bessong P.O., Matsaung G. (2003). Scope of potential bacterial agents of diarrhoea and microbial assessment of quality of river water sources in rural Venda communities in South Africa. *Water Sci. Technol.* 47(3):59-64.
237. Obiri-Danso K., Weobong C.A., Jones K. (2005). Aspects of health related microbiology of the Subin, an urban river in Kumasi, Ghana. *J. Water Health* 3 (1):69-76.
238. Pallin R, Wyn-Jones A.P, Place B.M, Lightfoot N.F. (1997). The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 67(1):57-67
239. Pandey S., Musarrat J. (1993). Antibiotic resistant coliform bacteria in drinking water. *J. Environ. Biol.* 14:267-274.
240. Papadopoulou C., Dimitriou D., Antoniadis G. (1999a). Microbiological quality of drinking water supplies in small communities in northwestern Greece. A five year survey. Abstract book of the 1st Balkan Conference on Microbiology. Plovdiv, Bulgaria October, 1999.
241. Papadopoulou C., Dimitriou D., Panagiou A., Antoniadis G. (1999b). Experimental study on death rates of *E. coli* strains in lake water. Abstract book of the 1st Balkan Conference on Microbiology. Plovdiv, Bulgaria October.
242. Papadopoulou C., Economou V., Dotoru K., Sakkas H., Filiouis G, Albanis T. (1999c). The protozoan infestation of different aquatic systems in northwestern Greece. Abstract book of the 1st Balkan Conference on Microbiology. Plovdiv, Bulgaria October, 1999



243. Papadopoulou C., Economou V., Brett M., Kansouzidoou A., Filioussis G., Gharalambopoulos K. Diarrheic shellfish poisoning due to toxic mussel consumption: first recorded outbreak in Greece. *Food Addit. Contam.* (Υπό εκτύπωση)
244. Papadopoulou C., Levidiotou S., Dotorou C., Filioussis G., Economou V., Sakkas H., Antoniadis G. (1999d). Antibiotic resistance of bacterial strains isolated from swimming pools in Greece. *Clinical Microbiol. Infect. Dis (CIMID)* 5(3): 241.
245. Papandreou S., Pagonopoulou O., Vantarakis A., Papapetropoulou M. (2000). Multiantibiotic resistance of gram-negative bacteria isolated from drinking waters samples in southwestern Greece. *J. Chemother* 12(4):267-273.
246. Papapetropoulou M., Iliopoulou J., Rodopoulou G., Detorakis J., Paniara O. (1994). Occurrence and antibiotic-resistance of *Pseudomonas* species isolated from drinking water in southern Greece. *Environ. Microbiol.* 6(2):111-6.
247. Papapetropoulou M., Tsintzou A., Vantarakis A. (1997). Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece. *Can. J. Microbiol.* 43(5):499-502.
248. Park JC., Lee JC., Oh JY., Jeong YW., Cho JW., Joo HS., Lee WK., Lee WB. 2003. Antibiotic selective pressure for the maintenance of antibiotic resistant genes in coliform bacteria isolated from the aquatic environment. *Water Sci. Technol.* 47:249-253.
249. Pathak S.P., Gautam A.R., Gaur A., Gopal K., Ray P.K. (1993). Incidence of transferable antibiotic resistance among enterotoxigenic *E.coli* in urban drinking water. *J. Environ Sci. Health PartA* 28:1445-1455.
250. Pennington A.T., Harding A.K., Hendricks C.W., Campbell H.M. (2001). Evaluating microbial indicators of environmental condition in Oregon rivers. *Environ. Manage* 28(6):833-841.



251. Phattharangong N., Chantratong N., Jitsurong S. (1998). Bacteriological quality of holywater from Thai temples in Songkhha Province, southern Thailand. *J. Med. Assoc. Thail.* 81(7):547-550.
252. Philippe C., Blech MF., Harteman P. (2006). Intra-amoebal development of *Legionella pneumophila* and the potential role of amoebae in the transmission of Legionnaires' disease. *Med Mal Infect.* Feb 2; [Epub ahead of print] in French.
253. Poiger T., Buser, H.R., Muller M.D. (2001). Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: pathway, field measurements and mathematical modelling. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:253-256.
254. Popovic T., Teskeredzic E., Strunjak-Perovic I., Coz-Rakovac R. (2000). A hydrophila isolated from wild freshwater fish in Croatia. *Vet. Res. Commun.* 24 (6):371-377.
255. Porter J.D., Ragazzoni H.P., Buchanon J.D., Waskin H.A., Juranek D.D., Parkin W.E. (1988). Giardia transmission in a swimming pool. *American Journal of Public Health* 7(6):659-62.
256. Potgieter N., Obi CL., Bessong P.O., Igumbor E.O., Samie A., Nengobela R. (2005). Bacterial contamination of Vhuswa- a local weaning food and stored drinking water in impoverished households in the Venda region of south Africa. *J. Health Popul. Nutr.* 23(2):150-155.
257. Priemer F., Keil W., Kandolf (1999). Hydrocution in a case of Coxsackie virus infection. *Int. J. Legal Med.*; 12(6):368-71.
258. Pullela S, Fernandas CF, Flick GJ, Libey GS, Smith SA, Coale CW. (1998). Indicative and pathogenic microbiological quality of aquacultured fish grown in different production systems. *Food Prot.* 61(2):205-10.



259. Radu S., Ahmad N., Ling F.H., Reezal A. (2003). Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species isolated from retail fish in Malaysia. *Int. J. Food Microbiol.* 25(3):261-266.
260. Ramteke P.W., Bhattacharje J.W., Pathak S.P., Kalra N. (1992). Evaluation of coliforms as indicators of water quality in India. *Appl. Bacteriol.* 72(4):352-6
261. Rao V.C., Metcalf T.G., Melnick J.L. (1986). Human viruses in sediments, sludges and soils. *Bulletin of the World Health Organization* 64(1):1-14.
262. Richardson M. L., Bowron J.M. (1985). The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J. Pharm. Pharmacol.* 37:1-12.
263. Rieth H. (1985). Mycological problems in public swimming pools. *International Seminar on technical, hygienic and health problems in the issue of public health swimming pools.* Herning, Denmark.
264. Rizzo G., De Vito D. (2003). Typhoid fever and environmental contamination in Apulia Region, Italy. *National Librari of Medicine (NLM)* 15(5):487-92.
265. Rochelle P.A., Fry J.C., Day M.J. (1989). Factors affecting conjugal transfer of plasmids encoding mercury resistance from pure cultures and mixed natural suspensions of epilithic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 135:409-424.
266. Rodgers P., Soulsby C., Hunter C., Petry J. (2003). Spatial and temporal bacterial quality of a lowland agricultural stream in northeast Scotland. *Sci Total Environ.* 1:314-316:289-302.
267. Rojas-Chapana J., Troszczyńska J., Firkowska I., Morszeck C., Giersig M. (2005). Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *Escherichia coli* cells. *Lab. Chip.* 5(5):536-9.



268. Romanowski G., Lorenz M.G., Wackernagel W. (1991). Absorption of plasmid DMA to mineral surfaces and protection against DNAase I. *Appl. Environm. Microbiol.* 57:1057-1061.
269. Ruimy R., Geneuzeau E., Barnabe C., Beaulieu a., Tibayrene M., Antremont A. (2001). Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteremia, and environmental water. *Infect Immun.* Jan;69(1):584-8
270. Ruiz J., Capitano L., Nunez L., Castro D., Sierra J.M., Hatha M., Borrego J.J., Vila J. (1999). Mechanisms of resistance to ampicillin, chloramphenicol and quinolones in multiresistant *S. typhimurium* strains isolated from fish. *J Antimicrob. Chemother* 43:699-702.
271. Rotz LD., Buckley DP., Fine DP. (1996). Overwhelming sepsis with *Vibrio vulnificus*: a coastal pathogen in Oklahoma. *J Okla State Med. Assoc.* 89(10):349-52
272. Saavedra M.J., Guedes-Novais S., Alves A., Rema P., Tacyo M., Correia A., Martinez-Murcia A. (2004). Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *A. hydrophila* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. Microbiol.* 7:207-211.
273. Saliba L.J., Helmer R. (1990). Health risks associated with pollution of coastal bathing waters. *Wld Hlth Statist. Quart.*, 43:177-187.
274. Samonis G., Elting L., Skoulika E., Maraki S., Tselentis Y. (1994). An outbreak of diarrhoeal disease attributed to *Shigella sonnei*. *Epidemiol. Infect.* 112(2):235-245.
275. Sassi A.B., McCullough K.D., Cost M.R., Hillier S.L., Rohan L.C. (2004). Permeability of tritiated water through human cervical and vaginal tissue. *J. Pharm. Sci.* 93(8):2009-16.





276. Saye D.J., Miller R.V. (1989). The aquatic environment: consideration of horizontal gene transmission in a diversified habitat. In *Gene Transfer in the Environment* 223-229, McGraw Hill, N.Y.
277. Saye D.J., Ogunseitan O., Saylor G.S., Miller R.V. (1987). Potential for transduction of plasmids in a natural freshwater environment: effect of plasmid donor concentration and a natural microbial community on transduction in *Ps. aeruginosa*. *Appl. Environm. Microbiol.* 53:987-995.
278. Scheytt T., Heberer T., Stan H.J. (2000). Vorkommen und Verhalten von Arzneimittelwirkstoffen im Grundwasser. Schriftenreihe Wasserforschung. In: Weigert B., Steinberg C., Bruggemann R (Eds). *Schriftenreihe Wasserforschung e.C.* vol 6. Chemische Stressfaktoren in aquatischen Systemen, Berlin. Pp. 13-22.
279. Schlech W.F., Simonsen N., Sumarah R., Martin R.S. (1986). Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis associated with a physiotherapy pool. *Can. Med. Assoc. Journ.* 134(8): 909-913.
280. Schmidt A., Bruun M., Dalsgaard I., Pedersen K., Larsen J. (2000). Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish Rainbow Trout Farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11):4908-4915.
281. Schonberg-Norio D, Takkinen J, Hanninen M.L., Katila M.L., Kaukoranta S.S., Mattila L., Rautelin H. (2004). Swimming and *Campylobacter* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 10(8):1474-7.
282. Sellwood J., Dadswell J., Slade J. (1981). Viruses in sewage as an indicator of their presence in the community. *J. Hyg.* 86:217-225.
283. Seoglio M.E., Grillo O.C., Munao F., Di Pietro A., Squeri L. (1989). Water quality and microbiological status of the distribution system: traditional parameters and emerging parameters. *Ann. Ig.* 1(5):1243-1254.



284. Seyfried PL., Tobin RS., Brown NE., Ness PF. (1985). A prospective study of swimming-related illness. II. Morbidity and microbiological quality of water. *Am. J. Public Health* Sept(9):1071-1075.
285. Shang C., Blatchley E.R. (2001). Chlorination of pure bacterial cultures in aqueous solution. *Water Res.* 35(1):244.
286. Shaw D.R., Cabelli V.J. (1980). R-plasmid transfer frequencies from environmental isolates of *E. coli* to laboratory and fecal trains. *Appl. Environm. Microbiol.* 40: 756-764.
287. Shumway S.S., Hurst J.W.Jr, (1991). *Mussels and Public Health In Gosling, EM The Mussel (Mytilus)*. Elsevier Science Publishers.
288. Wellings F.M. (1977). Amoebic meningoencephalitis. *J. Fla. Med. Assoc.* 64:327
289. Shuval H. Estimating (2003). The global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. *J. Water Health* 1(2):53-64.
290. Shuval H.I. (1988). The transmission of virus disease by the marine environment. *Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg* 78:7-23.
291. Simmons G., Hope V., Lewis G., Whitmore J., Gao W. (2001). Contamination of potable roof-collected rainwater in Auckland, New Zealand. *Water Res* 35(6):1518-1524.
292. Simohen E., Franklin D., Shuval H.I. (1985). Swimmers ear among children of kindergarden age and water quality of swimming pools on 11 kibbutzim. *Israel Journal of Medical Sciences* 7:584-588.
293. Sizemore R.K., Colwell R.R. (1977). Plasmids carried by antibiotic-resistant marine bacteria. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 12:373-382.



294. Smith P., Samulsen O.B. (1996). Estimates of the significance of outwashing of oxytetracyclin from sediments under Atlantic salmon sea-cages. *Aquaculture* 144:17-26.
295. Sniezek PJ., Graham BS., Busch HB., Lederman ER., Lim ML., Poggemyer K., Kao A., Mizrahi M., Washabaugh G., Yakus. M., Winthrop K. (2003). Rapidly growing mycobacterial infections after pedicures. *Arch Dermatol.* 139(5):629-34.
296. Sokari TG, Ibiebele D.D., Ottih R.M. (1989). Antibiotic resistance among coliforms and *Pseudomonas* spp. from bodies of water around Port Harcourt, Nigeria. *J. Appl. Bacteriol.*64(4): 355-9.
297. Son R., Rusul G., Sahilah A.M., Zainuri A., Raha A.R., Salmah I. (1997). Antibiotic resistance and plasmid profile of *A. hydrophila* from cultured fish, *Telapia (Telapia mossambica)*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24(6):479-482.
298. Soomro A.L., Junejo N. (2004). *Vibrio cholerae* in the environment. *J. Coll Physicians Surg Pak.* 14(8):509-12.
299. Spriger GL, Shapiro ED (1985). Fresh water swimming as a risk factor for otitis externa: a case-control study. *Arch Environ Health.* Jul-Aug;40(4):202-6.
300. Stambuk-Giljanovic N. (2005). The quality of water sources in Dalmatia. *Environ. Monit. Assess.* 104(1-3):235-268.
301. Stan H.J., Linkerhagnger M. (1992). Identifizierung von 2-(4-Chlorphenoxy)-2-methylpropionsäure im Grundwasser mittels Kapillardgascromatographie mit atomemissionsdetektion und Massen-spektrometrie. *Vom Wasser.* 79:85-88
302. Steger-Hartmann, Kümmerer K., Hartmann A. (1997). "Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water ". *Ecotoxic. Environ. Saf.* 36:174-179.



303. Steger-Harttmann, Lange R., Schweinfurth H. (1999). Environmental risk assessment for the widely used iodinated X-ray contrast agent iopromide (Ultravist). *Ecotoxic. Environ. Saf.* 42(3):274-81.
304. Steger-Harttmann, Lange R., Schweinfurth H., Tschampel M., Rehmenn I. (2002). Investigations into the environmental fate and effects of iopromide (Ultravist), a widely used iodinated X-ray contrast medium. *Water Res.* 36(1):266-74.
305. Stewart G.J., Sinigalliano C.D. (1990). Detection of horizontal gene transfer by natural transformation in native and introduced species of bacteria in marine and synthetic sediments. *Appl. Environm. Microbiol.* 56:1818-1824.
306. Stuer-Lauridsen F., Birkved M., Hansen LP., Holten-Lutzhof HC, Halling-Sorensen B. 2000. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere* 40:783-793.
307. Suzuki A., Ichinose M., Matsue T., Amano Y., Terayama T., Izumiyama S., Endo T. (2002). Occurrence of Legionella bacteria in a variety of environmental waters-from April, 1996 to November, 2000. *Kansenshogaku Zasshi.* 76(9):703-10.
308. Tabak H.H., Brunch R.L. (1970). Steroid hormones as water pollutants I. Metabolism of natural and synthetic ovulation inhibiting hormones by micro-organisms of activated sludge and primary settled sludge. *Develop. Ind. Microbiol.* 11:367-376.
309. Tachikawa M. και συν. (2005). Occurrence and production of chloramines in the chlorination of creatinine in aqueous solution. *Water Res.* 39(23):371-9.
310. Teophilo GN., dos Fernandes Vieira RH., dos Prazeres Rodrigues D., Msanezes FG. (2002). Escherichia coli isolated from seafood: toxicity and plasmid profiles. *Int Microbiol.* 5(1):11-4.
311. Terners T. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32:3245-3260.



312. Thomas P., Moore M., Bell E., Friedman S., Decker J., Shayegani M., Martin K. (1985). *Pseudomonas dermatitis* associated with a swimming pool. *JAMA* 253(8):1156-1159.
313. Tosti E., Volterra L. (1988). Water hygiene of two swimming pools. *J. App. Bacteriol.* 65:87-91.
314. Trevors J.T., Barkey T., Bourquin A.W. (1987). Gene transfer among bacteria in soil and aquatic environments: a review. *Can. J. Microbiol.* 33:191-198.
315. Tsai G.J., Chen T.H. (1996). Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 31:121-131.
316. Tsai Y.H, Hsu R.W, Huang K.C., Chen C.H., Cheng C.C., Peng K.T., Huang T.J. (2004). Systemic *Vibrio* infection presenting as necrotizing fasciitis and sepsis. A series of thirteen cases. *J Bone Joint Surg Am.* 86-A(11):2497-502.
317. Turnes M., Istre G.R., Beauchamp H., Baum., Arnold S. (1988). Community outbreak of adenovirus type 7 a infections associated with a swimming pool. *Southern Medical Journal*, 80(6):712-715.
318. UBA, (1997). Jahresbericht des Umweltbundesamtes. Berlin
319. UNEP/WHO/IAEA, (1987). Assesment of the state of microbial pollution of shellfish water in the Mediterranean sea and proposed control measures UNEP WG 160/10 Athens.
320. UNEP/WHO/IAEA, (1988). Guidelines for monitoring the quality of coastal recreational and shellfish areas, Reference Methods for Marine pollution studies, No 1. Rev 1, UNEP, Nairobi
321. Van Heerden J., Ehlers MM., Grabow WO.(2005). Detection and risk assessment of adenoviruses in swimming pool water. *J. Appl. Microbiol.* 99(5):1256-64.



322. Van Leewenhoek A. (1677). Observations communicated to the publisher by Mr. Antony van Leewenhoek, in a Dutch letter of the 9th of October, 1676. «Concerning little animals observed in rain- well- sea- and snow water; as also in water wherein pepper had lain infused». Philos. Trans. R. Soc. Lond. 1677 11:821-831.
323. Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu D., Paulsen I., Nelson K.E., Nelson W., Fouts D.E., Levy S., Knap A.H., Lomas M.W., Neelson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y.H., Smith H.O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. Science 304(5667):66-74
324. Vugia DJ., Jang Y., Zizek C., Ely J., Winthrop KL., Desmond E. (2005). Mycobacteria in nail salon whirlpool footbaths, California. Emerg. Infect. Dis. 11(4):616-8
325. Wellings F.M. (1977). Amoebic meningoencephalitis, J. Fla. Assoc. 64,327
326. Wetz J.J., Lipp E.K., Griffin D.W., Lukasik J., Wait D., Sobsey M.D., Scott T.M., Rose J.B. (2004). Presence infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. Mar Pollut Bull. 48(7-8):698-704.
327. Wheeler D. (1990). The real risks of bathing in water contaminated by sewage. Environ. Health 98(10):285-287.
328. Whitman RL., Nevers MB. (2003). Foreshore sand as a source of *Eschericia coli* in nearshore water of a Lake Michigan beach. Appl. Environ. Microbiol. 69(9):5555-5562.
329. Wiggins BA.1996. Discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. Appl. Environ. Microbiol. 62:3997-4002.



330. Winckler C., Grafe R. (2000). Characterisation and utilisation of waters from intensive animal production with regard to soil. Texte 44/00, Umweltbundesamt, Berlin, Germany.
331. Winthrop KL., Abrams M., Yakus M., Schwartz L, Ely J., Gillies D., Vugia DJ. (2002). An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon. *N Engl. J. Med.* 346(18): 1366-71.
332. Witte W. 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14:321-325.
333. Woegerbauer M., Jenni B., Thalhammer F., Graninger W., Burgmann H. 2002. Natural genetic transformation of clinical isolates of *Escherichia coli* in urine and water. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 440-443
334. Yospe-Purer Y., Colderman (1987). The occurrence of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in coastal waters in Israel. *Applied Environ. Microbiol.* 53(5):1138-1141.
335. Zmirou D., Pena L., Ledrans M., Letertre (2003). Risks associated with the microbiological quality of bodies of fresh and marine water used for recreational purposes: summary estimates based on published epidemiological studies. *Arch Environ. Health.* 58(11):703-11.
336. Zuccato E., Bagnatir R., Fioretti F., Natangeleio M., Calamari D., Fanelli R. (2001). Environmental Loads and Detection of Pharmaceuticals in Italy. In Kummerer K. (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environmental Sources, Fate, Effects and Risks.* Springer, Heidelberg.



## 9.2. Ελληνική Βιβλιογραφία

1. Αρσένη Α. (1994). Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διαγνωση Λοιμώξεων, Τομος 1 και 2, 4<sup>η</sup> εκδοση
2. Καμιζούλης Γ. (1990). Προβλήματα που προκύπτουν από την μη εφαρμογή των υγειονομικών διατάξεων για την λειτουργία των κολυμβητικών δεξαμενών. Σεμινάριο για την κατασκευή λειτουργία των κολυμβητικών δεξαμενών. Πανελλήνιος Σύλλογος Χημικών Μηχανικών, Αθήνα.
3. Κούππαρη Γ. και συν., (1997). Επίπτωση στελεχών *Pseudomonas* spp σε μονάδα εντατικής νοσηλείας νεογνών και αντοχή τους στα αντιβιοτικά. Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 42 (4): 534-539.
4. Λεβειδιώτου-Στεφάνου (2004). Μέθοδοι ελέγχου ευαισθησίας στα αντιβιοτικά. Σημειώσεις Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας: Έκδοση Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Μαρσέλου –Κίνητη Ο. (1986). Ιατρική Μυκητολογία, Αθήνα, 1986.
6. Οικονόμου Ε. (2006). Μελέτη μικροβιακών τοξινών σε θαλασσινά τρόφιμα. Πανεπιστημιακό τυπογραφείο Ιωαννίνων Ιωάννινα 2006.
7. Παπαδοπούλου Χ. (1983.) Συμβολή στη μελέτη της επιδημιολογίας των σαλμονελλώσεων στην περιοχή Ηπείρου. Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
8. Παπαδοπούλου Χ., Παπαδόπουλος Ο. (1989). Αναζήτηση Σαλμονελλών και άλλων εντεροβακτηριοειδών σε νοσοκομειακούς ασθενείς, παραγωγικά ζώα, ζωοτροφές και λύματα σφαγείων στην περιοχή Ιωαννίνων. Δελτίον Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας 34:611-617.
9. Παπαδοπούλου Χ. (1990). Σημειώσεις Παρασιτολογίας. Έκδοση Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.





10. Παπαδοπούλου Χ. (1998). Υδατογενείς παρασιτώσεις του γαστρεντερικού συστήματος. *Μικροβιολογικά Χρονικά* 14:175-188.
11. Παπαδοπούλου Χ. (1999). Κρυπτοσπορίδια στα νερά. *Δελτίον Εθνικού Κέντρου Επιδημιολογικής Παρακολούθησης και παρέμβασης (ΕΚΕΠΑΠ)* 2 (9):55-56
12. Παπαδοπούλου Χ. (2000a). Παρασιτικές γαστρεντερίτιδες. *Μικροβιολογικά Χρονικά* 16:223-240.
13. Παπαδοπούλου Χ. (2000b). Τροφογενείς και υδατογενείς ιώσεις. *Ελληνική Ιολογία* 5(1): 3-9.
14. Παπαδοπούλου Χ. (2001a). Τροφικές δηλητηριάσεις οφειλόμενες σε κατανάλωση τοξικών ιχθυηρών. σελ 144-150. *Μικροβιολογία Τροφίμων. Θεωρία, Μεθοδολογία και Υγιεινή. Ιωάννινα.*
15. Παπαδοπούλου Χ. (2001b). Τα βακτήρια ως αίτια τροφιμογενών λοιμώξεων. σελ 37-38. *Μικροβιολογία Τροφίμων. Θεωρία, Μεθοδολογία και Υγιεινή. Ιωάννινα.*
16. Παπαδοπούλου Χ. (2001c). Τα βακτήρια ως αίτια τροφιμογενών λοιμώξεων. σελ. 55-58 *Μικροβιολογία Τροφίμων. Θεωρία, Μεθοδολογία και Υγιεινή. Ιωάννινα.*
17. Παπαδοπούλου Χ. (2001d). Τα βακτήρια ως αίτια τροφιμογενών λοιμώξεων. σελ 57. *Μικροβιολογία Τροφίμων. Θεωρία, Μεθοδολογία και Υγιεινή. Ιωάννινα.*
18. Παπαδοπούλου Χ. (2001e). Τα βακτήρια ως αίτια τροφιμογενών λοιμώξεων. σελ 66-70. *Μικροβιολογία Τροφίμων. Θεωρία, Μεθοδολογία και Υγιεινή. Ιωάννινα.*
19. Παπαδοπούλου Χ. (2001f). Κατάλυτα Αντιβιοτικά. σελ 156-159. *Μικροβιολογία Τροφίμων. Θεωρία, Μεθοδολογία και Υγιεινή. Ιωάννινα.*
20. Παπαδοπούλου Χ. (2002). Σημειώσεις Μικροβιολογίας περιβάλλοντος. ΠΣΕ *Αγροοικολογία Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Έκδοση Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.*
21. Παπαδοπούλου Χ., Δημητρίου Δ., Λεβειδιώτου Σ., Πανάγιου Α., Σαββαΐδης Ι., Γολεγού Σ., Αντωνιάδης Α. (1996). Μικροβιακή χλωρίδα ιχθυηρών γλυκών και αλμυρών



υδάτων. Τόμος Περιλήψεων 1ου Πανελληνίου Συνεδρίου Δημόσιας Υγείας & Υπηρεσιών Υγείας, Αθήνα 18-20 Μαρτίου.

22. Παπαδοπούλου Χ., Δημητρίου Δ., Πανάγιου Α., Φιλιούσης Γ., Χαραλαμπίδης Κ., Αντωνιάδης Γ. (2004). Μικροβιολογική ποιότητα πόσιμων υδάτων στην Ήπειρο. 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο συμπόσιο υγιεινής και τεχνολογίας τροφίμων. Α' τόμος Πρακτικών, XV-12: 525-526.
23. Παπαπετροπούλου Μ., Μαυρίδου Α. (1995). Μικροβιολογία του υδάτινου περιβάλλοντος. 1<sup>η</sup> έκδοση. Εκδόσεις Τραυλός.
24. Παπαπετροπούλου Μ., Μαυρίδου Α. (1998). Μικροβιολογία του υδάτινου περιβάλλοντος. 2<sup>η</sup> έκδοση. Εκδόσεις Τραυλός.
25. Τζαννέτης Σ.Ε, Βασιλοπούλου Ε.Κ. 1993. Έρευνα της υγειονομολογικής και μικροβιολογικής κατάστασης του θαλασσίου ύδατος κολυμβητικών παραλιών της Αττικής. Δελτίο Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας. 38:383-400

