

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΗΣ ΘΑΛΑΣΣΑΣ

**Σχολή Περιβάλλοντος
Πανεπιστήμιο Αιγαίου**

Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παράκτιων Περιοχών»



Διατριβή Εξειδίκευσης

**Διαχείριση Ποιότητας Νερών Κολύμβησης :
Επιβίωσης *Enterococcus faecium* σε περιβαλλοντικές
συνθήκες διαφορετικών περιοχών της Ευρωπαϊκής Ένωσης.**

Χονδρογιάννης Ευάγγελος

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Μ.Α. Ευστρατίου

Μυτιλήνη 2006

Αφιερώνεται στους γονείς μου
Αντώνη και Μαριάννα
με Σεβασμό και Αγάπη!!!!

**Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Ολοκληρωμένη Διαχείριση Παράκτιων Περιοχών»**

Διατριβή Εξειδίκευσης

**Διαχείριση Ποιότητας Νερών Κολύμβησης :
Επιβίωσης *Enterococcus faecium* σε περιβαλλοντικές συνθήκες διαφορετικών
περιοχών της Ευρωπαϊκής Ένωσης.**

Ευχαριστίες

*Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια απόκτησης μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών και εξειδίκευσης στην ολοκληρωμένη διαχείριση των παρακτίων περιοχών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέδραμαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας και ιδιαίτερα την **Κα Αδαμαντία Ευστρατίου** για την κατάθεση του πολυτίμου χρόνου της στην εκπόνηση της πειραματικής διαδικασίας, την καθοδήγηση της καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά της σε όλους τους τομείς.*

*Την Διευθύντρια των εργαστηρίων της Κλινικής Μικροβιολογίας **Κα Α. Ζέρβα** του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου «ΑΤΤΙΚΟΝ» για την συμβολή της σε εργαστηριακές δοκιμές της ταυτοποίησης και αντιβιογράμματος του μικροοργανισμού.*

*Την **Κα Ν. Αλεξίου** για την βοήθεια της στις εργαστηριακές δοκιμές και την **Κα Γ. Βουρλή** για την συμβολή της στην ολοκλήρωση της στατιστικής επεξεργασίας.*

*Τους **Κο Ι. Μπατζάκα** και **Κο Γ. Τσιρτσή** για τις επισημάνσεις τους και την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή.*

*Τους φίλους (**Χριστίνα, Θάνο, Κώστα, Άννα**) που ο καθένας με το δικό του γνωστικό αντικείμενο παρείχε την απαιτούμενη πληροφόρηση, καθώς και την **οικογένεια του Ε. Παλαιολόγου** που στο σύντομο διάστημα του ενός έτους γνωριμίας, στάθηκαν δίπλα μου κάθε στιγμή της παραμονής μου στη Λέσβο σαν γονείς.*

Περίληψη

Ο εντερόκοκκος (βακτήριο δείκτης κοπρανόδους προέλευσης που χρησιμοποιείται ευρύτατα στις μικροβιολογικές αναλύσεις θαλασσιών υδάτων) όταν καταλήξει στο θαλάσσιο περιβάλλον αντιμετωπίζει πλήθος από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες που συντελούν στην ελάττωση του. Η βαθμός επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας, της αλατότητας και της θερμοκρασίας στον εντερόκοκκο, εξετάστηκε εργαστηριακά για δυο διαφορετικά παράκτια περιβάλλοντα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Ο ρυθμός μείωσης εμφάνισε διαφορετική συμπεριφορά των βακτηρίων με καλύτερη επιβίωση στις συνθήκες Β. Θάλασσας από αυτές της Ανατολικής Μεσογείου. Σε συνθήκες Ανατολικής Μεσογείου ($T=24^{\circ}\text{C}$, $P=14$ ώρες φωτοπερίοδο, $S=39\text{ ‰}$) η επιβίωση του εντερόκοκκου διήρκησε 20 ημέρες σε αντίθεση με τις συνθήκες Βορείου Θαλάσσης ($T=17^{\circ}\text{C}$, $P=16$ ώρες φωτοπερίοδο, $S=33\text{ ‰}$) όπου η επιβίωσή του ξεπέρασε τις 30 ημέρες. Η στατιστική επεξεργασία έδειξε η θερμοκρασία να είναι ισχυρός ανασταλτικός παράγοντας της επιβίωσης του εντερόκοκκου στο θαλασσινό νερό. Η Ενιαία Ευρωπαϊκή πολιτική στον έλεγχο των νερών κολύμβησης πιθανόν να μην ανταποκρίνεται στις πραγματικές συνθήκες που επικρατούν στις θάλασσες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, διότι η επιβίωση των λυματικής προέλευσης βακτηριδίων έδειξε να διαφέρει.

Abstract

When enterococci (fecal indicator bacteria, which are commonly employed in marine microbiological analysis) come to marine environment, they face a number of biotic and abiotic factors which contribute to the diminishment of their population. The effect of enterococci exposure to solar radiation, salinity and temperature was examined in laboratory conditions simulating two widely different coastal environments of the European Union. Die-off rates from log-linear survival curves indicated a different bacterial behavior with a longer survival at North Sea conditions compared to Eastern Mediterranean Sea conditions. In Eastern Mediterranean conditions (T=24° C, P=14 hours of sunlight, S=39‰) the enterococci survived for 20 days in contrast to North Sea conditions (T=17° C, P=16 hours of sunlight, S=33‰) where their survival exceeded a period of 30 days. Statistical analysis indicated that temperature is an important factor affecting enterococci survival in sea water. Uniform European policy as far as bathing water management is concerned, appears not to have taken into account the actual sea water conditions, in bathing beaches of different countries of the European Union.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

1	Εισαγωγή	7
1.1	<u>Μικροοργανισμοί δείκτες - Εντερόκοκκος</u>	
1.1.1	Μικροοργανισμοί δείκτες	10
1.1.2	Περιγραφή του εντερόκοκκου	11
1.1.3	Προέλευση του εντερόκοκκου στον παράκτιο χώρο	11
1.1.4	Παθογόνα εντεροβακτήρια και επιπτώσεις στην υγεία των λουομένων	12
1.2	<u>Επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στον εντεροκόκκο</u>	13
1.2.1	Φυσικοί παράγοντες	13
1.2.1 α	Ηλιακή ακτινοβολία	13
1.2.1 β	Θερμοκρασία	14
1.2.2	Χημικοί παράγοντες	15
1.2.2 α	Αλατότητα	15
1.2.2 β	PH	15
1.2.2 γ	Διαλυμένο Οξυγόνο	15
1.3	<u>Περιβαλλοντικά στοιχεία περιοχών μελέτης</u>	16
1.3.1	Βόρειος Θάλασσα	16
1.3.2	Μεσόγειος	17
1.4	<u>Νομοθετικό Πλαίσιο</u>	18
1.4.1	Ευρωπαϊκή Νομοθεσία	18
1.4.2	Ελληνική Νομοθεσία	21
1.5	<u>Σκοπός της παρούσας εργασίας</u>	21

2	Υλικά και Μέθοδοι	23
2.1	<u>Περιοχή Μελέτης</u>	23
2.2	<u>Πειραματικό μέρος</u>	25
2.1.1	Δημιουργία μικρόκοσμου στο εργαστήριο	25
2.1.2	Πειραματική διαδικασία	28
2.1.3	Ταυτοποίηση οργανισμού	32
2.1.4	Αντιβιόγραμμα	34
2.3	<u>Στατιστική Επεξεργασία</u>	35
3	Αποτελέσματα	36
4	Συζήτηση	54
5	Βιβλιογραφία	
6.1	<u>Διεθνής</u>	58
6.2	<u>Ελληνική</u>	65
6.3	<u>Ιστοσελίδες</u>	65
6	Παράρτημα	66

1 Εισαγωγή

Το περιβάλλον φαίνεται να απασχολεί όλο και περισσότερο την διεθνή κοινότητα. Η ανθρωπογενής ρύπανση της ατμόσφαιρας, της χέρσου αλλά και των υδάτινων πόρων του πλανήτη κυρίως μετά την βιομηχανική επανάσταση, ανέδειξε διαχειριστικά λάθη με αρνητικά αποτελέσματα τόσο στο φυσικό περιβάλλον όσο τελικά και στην παγκόσμια υγεία. Τα προβλήματα αναδειχθήκαν με το καιρό και ταυτόχρονα επιστημονικές μελέτες τεκμηρίωσαν την εσφαλμένη προσέγγιση του περιβαλλοντικού ζητήματος. Το περιβάλλον (φυσικό, πολιτιστικό, ανθρώπινο) όπως αυτό χρησιμοποιείται στα οικεία νομοθετικά κείμενα, είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την κεντρική έννοια της βιώσιμης ανάπτυξης (αειφορίας) και αποτελεί προτεραιότητα για τα περισσότερα έθνη τα τελευταία χρόνια.

Η ρύπανση και μόλυνση του υδάτινου πλούτου του πλανήτη με αστικά λύματα, βιομηχανικά απόβλητα, γεωργικά φάρμακα, προϊόντα και παραπροϊόντα πετρελαϊκής προέλευσης και λιπαντικά πάσης φύσεως οχημάτων φαίνεται ότι είναι το σημαντικότερο οικολογικό πρόβλημα και ταυτόχρονα πρόβλημα υγείας σε παγκόσμια κλίμακα (Μαλεφάκης, 1998). Οι ωκεανοί μέχρι πριν κάποια χρόνια θεωρούνταν υδάτινες μάζες τεραστίου όγκου ικανές να δεχθούν και να αφομοιώσουν την ανθρωπογενή ρύπανση χωρίς να υποστούν ουσιαστική υποβάθμιση. Η θεώρηση αυτή αποδείχθηκε εσφαλμένη διότι οι υδάτινες μάζες είναι πεπερασμένου όγκου και αποτελούν τον τελικό αποδέκτη της ρύπανσης και του αέρα και του εδάφους (Φυτιανός, 1996). Ωστόσο την μεγαλύτερη επιβάρυνση δεν την δέχεται ο ανοιχτός ωκεανός αλλά η παράκτια ζώνη που αποτελεί την περιοχή που θα προσελκύσει πλήθος ανθρωπογενών δραστηριοτήτων.

Η παράκτια ζώνη είναι αναμφίβολα πόλος έλξης για τους ανθρώπους καθώς αποτελεί χώρο ψυχαγωγίας αλλά και έδαφος μεγάλου οικονομικού ενδιαφέροντος. Αποτελεί μία ιδιαίτερα δυναμική ζώνη που περιλαμβάνει ένα χερσαίο και ένα θαλάσσιο τμήμα (υδάτινο και βυθός) και στην οποία οι χερσαίες διεργασίες επηρεάζουν κατά τρόπο άμεσο τις θαλάσσιες διεργασίες και χρήσεις και αντίστροφα. Έχει μεταβλητό εύρος και ορίζεται συχνά ως η ζώνη μεταβίβασης (interface) από την ξηρά στη θάλασσα. Από οικολογική άποψη, αποτελεί μία περιοχή με έντονες βιοχημικές διεργασίες. Τα δυο τρίτα του παγκόσμιου πληθυσμού κατοικούν στη παράκτια ζώνη και παρατηρείται μια τάση προς την αύξηση της μετανάστευσης των

ανθρώπων προς τις παράκτιες περιοχές (UNEP, 2001). Η Ευρωπαϊκή Ένωση ειδικότερα περιστοιχίζεται από θάλασσα και το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού καταγράφεται στις παράκτιες περιοχές. Η προστασία των υδάτων κολύμβησης ήταν ένα από τα πρώτα και επιτυχέστερα στοιχεία της ευρωπαϊκής πολιτικής για το νερό. Δεν είναι δυνατό να υποτιμηθεί η σπουδαιότητα των υδάτων κολύμβησης υψηλής ποιότητας τόσο για τη δημόσια υγεία όσο και για τον τουρισμό.

Η τουριστική βιομηχανία είναι ένας από τους σημαντικότερους οικονομικούς κλάδους σε παγκόσμια κλίμακα. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση συνιστά το 5% των εσόδων από εξαγωγές και το 6% των θέσεων εργασίας. Η αγορά αυτή αυξάνεται ακόμη περισσότερο από ότι κατά το παρελθόν, πράγμα που, όπως είναι φυσικό, συνεπάγεται τη σαφή αύξηση των στερεών και υγρών αποβλήτων στις τουριστικές παράκτιες περιοχές. (EU, 2002).

Η αύξηση των υγρών αποβλήτων μέσω του τουρισμού, δηλαδή των αστικών λυμάτων, έχει άμεσο αντίκτυπο στην παράκτια ζώνη καθώς αυτά περιέχουν μεγάλες συγκεντρώσεις κοπρανωδών βακτηρίων και μικροοργανισμών. Τα κοπρανώδους προέλευσης βακτήρια αποτελούν δείκτη μόλυνσης και τα όρια ασφαλούς παρουσίας τους στα ύδατα καθορίζονται σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας. Η παρουσία τους στα ύδατα κολύμβησης σε μεγάλες συγκεντρώσεις συνδέεται με επιβλαβείς συνέπειες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Η παγκόσμια οικονομική επίπτωση από τέτοιες ασθένειες έχει υπολογιστεί σε πάνω από 10 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως. (UNEP, 2001).

Οι εντερόκοκκοι φυσιολογικά αποικίζουν την γαστρεντερική οδό των ανθρώπων και βρίσκονται σε σχετική αφθονία στα ανθρώπινα περιττώματα (10^5 - 10^7 οργανισμοί ανά γραμμάριο) (Hancock & Gilmore, 1998). Η παροχή των ακαθάρτων λυμάτων ποικίλει ανάλογα με το βιοτικό επίπεδο και τις καταναλωτικές συνήθειες μιας κοινωνίας. Η ποσότητα των περιττωμάτων που παράγονται ανά άτομο ανά ημέρα κυμαίνεται από 100 έως 200 γραμμάρια την ημέρα στη Ευρώπη και την Βόρεια Αμερική. (Gerba, 2000). Οι παράκτιες περιοχές οι οποίες γειτνιάζουν με αστικά κέντρα φορτίζονται από μεγάλες ποσότητες λυμάτων προερχόμενες από τα κέντρα αυτά, με αποτέλεσμα την αύξηση της βακτηριακής πανίδας ιδιαίτερα κατά τους θερινούς μήνες όπου υπερδιπλασιάζεται ο πληθυσμός. Στις περιοχές αυτές τις περισσότερες φορές δεν υπάρχουν τα κατάλληλα έργα υποδομής και έτσι δημιουργείται επίπτωση στην τουριστική βιομηχανία

Τα όργανα της Ευρωπαϊκής Ένωσης έχουν αντιληφθεί την σπουδαιότητα του παράκτιου χώρου και την ευθύνη τους να προστατευτούν τα ύδατα κολύμβησης ώστε να διατηρηθούν σε όσο το δυνατόν άριστες συνθήκες, τόσο για την ψυχαγωγία όσο και για την προάσπιση της υγείας των λουομένων. Η ποιοτική ταξινόμηση των υδάτων κολύμβησης εξαρτάται από τον κίνδυνο νόσησης μετά από κολύμβηση σε μολυσμένα ύδατα. Τα αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών καταλήγουν ότι η αναλογία μόλυνσης και ασθένειας των λουομένων αυξάνεται σταθερά με την αύξηση της περιεκτικότητας του νερού της θάλασσας σε μικροοργανισμούς δείκτες. Η μόλυνση η οποία προέρχεται από τα κόπρανα των θερμόαιμων οργανισμών εκφράζεται σαν σχέση δόσης-αποτελέσματος. (UNEP, 2001).

Η καλύτερη δυνατή συσχέτιση περιττωματικής ρύπανσης και επιπτώσεων στην υγεία των λουομένων παρακολουθείται μέσω δύο παραμέτρων που διατηρούνται ως δείκτες στην Οδηγία 2006/7/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Αυτοί είναι οι εντερόκοκκοι (Intestinal enterococci/IE) και τα κοπρανώδη κολοβακτηρίδια (*Escherichia coli*/EC). (EU, 2006). Οι δύο παράμετροι είναι αντιπροσωπευτικές των επεισοδίων μόλυνσης με τη μεγαλύτερη συχνότητα και συσχετίζονται με προβλήματα υγείας. Η αξιολόγηση και των δύο αυτών δεικτών σε παράκτια και γλυκά νερά συμβάλει στον καθορισμό των πηγών μόλυνσης.

Σημαντική παράμετρος κρίνεται η επιβίωση των εντεροβακτηρίων συνεπώς η χρονική διάρκεια παραμονής τους στο θαλάσσιο περιβάλλον. Τα εντεροβακτήρια με την εισαγωγή τους στο θαλάσσιο περιβάλλον υφίστανται σοκ με την απότομη αλλαγή των περιβαλλοντικών παραμέτρων. Η διαθεσιμότητα των θρεπτικών υλικών, η αλατότητα, η θερμοκρασία, το PH, η μικροβιακή παρουσία, η ηλιακή ακτινοβολία είναι μερικοί από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επιδρούν πάνω στα βακτήρια με άμεση συνέπεια την δημιουργία συνθηκών ακατάλληλων για την ανάπτυξη τους και τη σταδιακή θανάτωσή τους (Sinton *et.al*, 1999).

Η παρούσα εργασία ασχολήθηκε με την επιβίωση ενός στελέχους *Enterococcus faecium* (μονοκαλλιέργεια) σε εργαστηριακές συνθήκες. Η μελέτη έγινε σε σχέση με τη θερμοκρασία, την αλατότητα, και την ηλιακή ακτινοβολία για θαλάσσια οικοσυστήματα με προσομοιασμένες συνθήκες Βόρειας Θάλασσας και Μεσογείου κατά τους θερινούς μήνες όταν η κολυμβητική δραστηριότητα είναι σε έξαρση.

1.1 Μικροοργανισμοί δείκτες - Εντερόκοκκος

1.1.1 Μικροοργανισμοί δείκτες

Οι οργανισμοί δείκτες, όπως συνεπάγεται και από την ονομασία τους, χρησιμοποιούνται για "να αναδείξουν" την παρουσία άλλων οργανισμών που έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν ασθένεια. Μέσω διάφορων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί από την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος (USEPA) και άλλων φορέων, έχουν καθοριστεί επίπεδα ορισμένων οργανισμών δεικτών στα ύδατα αναψυχής που αντιπροσωπεύουν μια ενδεχόμενη απειλή στη δημόσια υγεία. Η χρήση των οργανισμών δεικτών για την αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης έχει εδραιωθεί καθώς :

- α. Υπάρχει μεγάλος αριθμός παθογόνων βακτηρίων και ιών που ενδεχόμενα βρίσκονται στα λύματα που καταλήγουν στο παράκτιο χώρο
- β. Ο έλεγχος για κάθε παθογόνο βακτήριο και ιό ξεχωριστά δεν είναι πρακτικά υλοποιήσιμος
- γ. Οι μέθοδοι καταμέτρησης για μερικά από τα σημαντικότερα παθογόνα δεν είναι εφικτοί ενώ για κάποια άλλα παρουσιάζουν αρκετές δυσκολίες
- δ. Τα στοιχεία της πυκνότητας των παθογόνων πολλές φορές είναι δύσκολο να ερμηνευθούν επειδή η μεθοδολογία είναι γενικά ανακριβής ενώ γίνεται ακόμα πιο ανακριβής λόγω των πενιχρών διαθέσιμων στοιχείων όσο αφορά τη σχέση δόσης-αντίδρασης.
- ε. Σε θεωρητική βάση η πρόθεση δεν είναι να καταγραφεί η παρουσία παθογόνων, αλλά μάλλον η ενδεχόμενη ύπαρξη τους σε τέτοιο βαθμό ώστε να γίνουν αιτία πρόκλησης νόσησης.

Οι οργανισμοί δείκτες που περιέχονται στα ύδατα κολύμβησης που συλλέγονται με δειγματοληπτικές μεθόδους είναι βακτηρίδια που ονομάζονται εντερόκοκκοι και *E. coli*. Ο εντερόκοκκος έχει αποδειχθεί ο πιο αξιόπιστος βακτηριακός δείκτης για τον καθορισμό της έκτασης της περιττωματικής μόλυνσης στα παράκτια θαλάσσια ύδατα, ενώ η *E. coli* σε συνθήκες γλυκού νερού. Μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη είναι ότι οι οργανισμοί δείκτες από μόνοι τους μπορεί να μην είναι επιβλαβείς. Δεδομένου ότι αποτελούν οργανισμούς που απαντώνται στη γαστρεντερική οδό πολλών θερμόαιμων ζώων, η παρουσία τους επιδεικνύει την ενδεχόμενη ύπαρξη άλλων επιβλαβών οργανισμών και ιών που επίσης απαντώνται στη γαστρεντερική οδό θερμόαιμων ζώων (συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων)

και μπορεί να είναι παθογόνοι. Εάν οι επιβλαβείς οργανισμοί και ιοί είναι παρόντες λαμβάνονται ακούσια κολυμπώντας, και μπορούν να προκαλέσουν ποικίλες ασθένειες. Η συνηθέστερη ασθένεια είναι μια ήπια γαστρεντερίτιδα με συμπτώματα παρόμοια με αυτά μιας γρίπης. Αλλά ακόμη και οι ηπιότερες ασθένειες είναι ικανές να δημιουργήσουν πρόβλημα στους ανοσοκατεσταλμένους λουόμενους.

1.1.2 Περιγραφή του εντερόκοκκου

Οι εντερόκοκκοι αποτελούν ένα ξεχωριστό γένος που αναγνωρίστηκε και αποσπάστηκε από το γένος των *Streptococcus* το 1984. Οι παλιές ονομασίες των χαρακτηριστικών ειδών, όπως *Streptococcus faecalis* και *S. faecium* άλλαξαν και έγιναν *Enterococcus faecalis* και *E. faecium*. Οι βασικοί χαρακτήρες του γένους αυτού που το διαχωρίζουν από τους στρεπτόκοκκους είναι ότι δίνουν θετική δοκιμασία **PYR** (παραγωγή πυρρολινοδάσης), αναπτύσσονται παρουσία 6,5% NaCl και χολής καθώς και στις ακραίες θερμοκρασίες των 10° - 45° C, και υδρολύουν την εσκουλίνη. Στο γένος αυτό ανήκουν τουλάχιστον 19 είδη. Δυο εξ' αυτών έχουν απομονωθεί μόνο από ζώα. Τα υπόλοιπα απομονώνονται από τη φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπου. Οι δυο συχνότερα απαντώμενοι εντερόκοκκοι είναι ο *Enterococcus faecalis* και *E. faecium*. Οι εντερόκοκκοι είναι Gram θετικοί κόκκοι. Είναι μικρόβια της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων. Απελευθερώνεται από τα κόπρανα αυτών και απαντώνται στο έδαφος, το νερό, τα φυτά και στις τροφές του ανθρώπου (Αρσένη, 2000)

1.1.3 Προέλευση του εντερόκοκκου στον παράκτιο χώρο

Παλαιότερα τα νερά των αποχετεύσεων οδηγούνταν ακαθάριστα στα ποτάμια, στις λίμνες και κατ' επέκταση στην παράκτια ζώνη και τα επιφανειακά νερά τα οποία ήταν σε θέση να αυτοκαθαρίζονται μέσω βιολογικών διεργασιών. Η αύξηση των αποχετευμένων νερών, καθώς και ο βαθμός ρυπάνσεώς τους οδήγησαν στο σημείο να μην επαρκεί το οξυγόνο, που με φυσικό τρόπο εισέρχεται στα νερά αυτά και συντηρεί τα φυτά και τους μικροοργανισμούς. Έτσι δεν είναι εξασφαλισμένος ο αυτοκαθαρισμός των αποβλήτων σε πλήρη έκταση. Ακόμη, το αυξημένο ποσοστό σε μικρόβια των αποβλήτων (Πίνακας 1.α, σελ 20) προκαλεί ασθένειες όπως χολέρα, τύφο, δυσεντερία. Σε αυτό το λόγο οφείλεται το γεγονός ότι τα ύδατα λυματικής

προέλευσης, πριν καταλήξουν στους αποδέκτες τους, οδηγούνται μέσα από δίκτυο αποχετεύσεως σε εγκαταστάσεις βιολογικού καθαρισμού, μέσα στα πλαίσια της εξουδετέρωσης των παθογόνων μικροοργανισμών ακάθαρτων υδάτων. Η εγκατάσταση αποχέτευσης δεν είναι μόνο αναγκαία για την αποφόρτιση των υδάτων, του περιβάλλοντος, αλλά εκπληρώνει ταυτόχρονα μια πολύ σπουδαία αποστολή υγείας. (Βούλγαρης, 2000).

Όμως οι πηγές των παθογόνων βακτηριδίων δεν περιορίζονται μόνο στα αστικά λύματα, τα οποία είναι η κύρια πηγή κοπρανώδους μόλυνσης των υδάτων στις παράκτιες περιοχές κοντά σε αστικά κέντρα, αλλά προέρχονται και από τις εκπλύσεις των ηπειρωτικών περιοχών λόγω των βροχοπτώσεων. Οι εκπλύσεις των περιττωμάτων των κτηνοτροφικών μονάδων, της άγριας πανίδας και των πουλιών, μεταφέρονται μέσω των ποταμών στην παράκτια ζώνη. Επίσης η οικιστική ανάπτυξη κατά μήκος της ακτογραμμής και της παράκτιας ζώνης γενικότερα, η συλλογή των αποβλήτων και το ποσοστό καθαρισμού αυτών, οι βόθροι, οι δραστηριότητες εκτροφής ζώων, τα αστικά λύματα, η διάθεση αποβλήτων από τα σκάφη και τους λουόμενους, όλα μαζί συμβάλουν στην κοπρανώδη μόλυνση των νερών κολύμβησης (Benedict & Neumann, 2004).

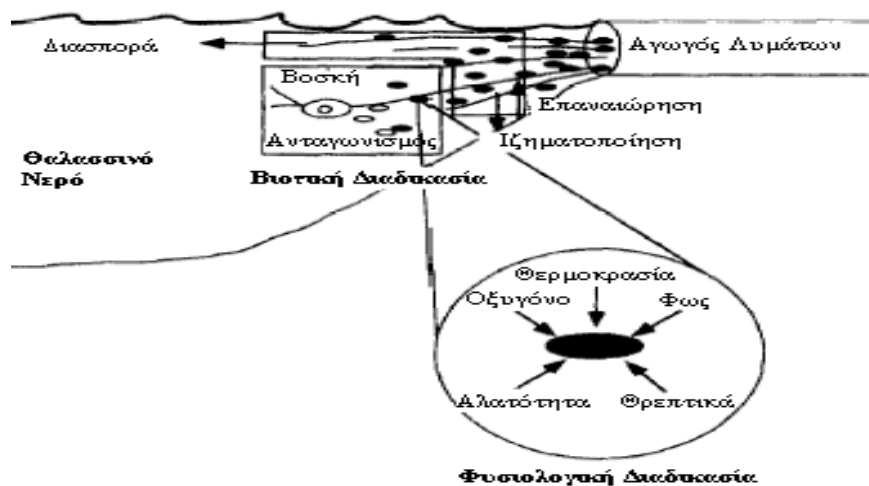
1.1.4 Παθογόνα εντεροβακτήρια και επιπτώσεις στην υγεία των λουομένων

Επιδημιολογικά στοιχεία αναδεικνύουν ότι εντερικές και αναπνευστικές ασθένειες μπορούν να προκληθούν από την κολυμβητική δραστηριότητα στις θαλάσσιες παράκτιες περιοχές μολυσμένες με παθογόνους μικροοργανισμούς που προήλθαν μέσω αστικών αποβλήτων (UNEP, 2001).

Τα παθογόνα εντεροβακτήρια είναι υπεύθυνα για ασθένειες όπως γαστρεντερίτιδες, ηπατίτιδα και χολέρα. Από αυτές η πιο συνήθης νόσος η οποία εμφανίζεται από κολυμβητικές δραστηριότητες είναι η γαστρεντερίτιδα της οποίας τα συμπτώματα είναι τάσεις προς εμετό, διάρροια, πονοκέφαλοι, πυρετός, και συμπτώματα παρόμοια με αυτά της γρίπης. Μπορούν όμως να προκαλέσουν ασθένειες σοβαρότερες όπως αυτή της μηνιγγίτιδας. Η υψηλή συγκέντρωση βακτηρίων μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα υγείας ιδιαίτερα σε μικρά παιδιά και ηλικιωμένους ανθρώπους ή ακόμα και σε αυτούς με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα. (www.guamepa.govguam.net/programs/emas/faq, 2003).

1.2 Επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στον εντερόκοκκο

Η επιβίωση των χερσαίας προέλευσης μικροοργανισμών στο θαλάσσιο περιβάλλον επηρεάζεται από μεγάλη ποικιλία φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων (Εικόνα 1). Οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν το μέγεθος και τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας καθώς και τη μορφολογία και φυσιολογία των βακτηρίων. Στο φυσικό θαλάσσιο περιβάλλον υπάρχουν πολυάριθμοι παράγοντες που επιδρούν στα έμβια όντα και δρουν σε συνεργία ή ανταγωνιστικά μεταξύ τους.



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης των περιβαλλοντικών παραγόντων στον εντερόκοκκο *E. faecium*.

1.2.1 Φυσικοί παράγοντες

1.2.1.α Ηλιακή ακτινοβολία

Η επιβίωση των μικροοργανισμών κοπρανώδους προέλευσης στο θαλασσινό νερό εξαρτάται από την ηλιοφάνεια, την αλατότητα, τη θερμοκρασία, καθώς και τα διαθέσιμα τροφικά στοιχεία. Με την επίδραση του φωτός η μείωση του αριθμού των βακτηρίων είναι 50-100 φορές ταχύτερη από όταν είναι στο σκοτάδι. Το φως δρα συνεργιστικά με την αλατότητα και μερικώς με την υψηλή θερμοκρασία (Παπαπετροπούλου & Μαυρίδου, 1995)

Σε πειράματα (Rozen and Belkin, 2001) που έχουν πραγματοποιηθεί φαίνεται πως ηλιακή ακτινοβολία αποτελεί έναν βασικό παράγοντα στην επιβίωση των

εντερόκοκκων. Οι προσομοιώσεις όλες έχουν γίνει με βάση τους καλοκαιρινούς μήνες όπου η κολυμβητική περίοδος βρίσκεται σε έξαρση. Κατά τη διάρκεια της θερινής περιόδου το φως του ηλίου διαχέεται καθ' όλη τη μέρα (περιορισμένη νεφοκάλυψη) και για αρκετές ώρες, σε σύγκριση με τους χειμερινούς μήνες που και η φωτοπερίοδος είναι μικρότερη και μπορεί κάλλιστα να επηρεαστεί από διάφορες μετεωρολογικές συνθήκες. Η διαπερατότητα του ηλιακού φωτός στο νερό της θάλασσας μειώνεται καθώς μειώνεται το μήκος κύματος του (Sinton *et.al.*, 1999). Σε μήκη κύματος πάνω από 329 nm, οι φωτοχημικοί μηχανισμοί γίνονται πιο σημαντικοί, λόγω του ότι είναι φωτοευαίσθητοι με αποτέλεσμα να προκαλείται ζημιά στην κυτταρική τους μεμβράνη και έτσι βλάπτονται οι οργανισμοί στην παρουσία οξυγόνου (Sinton *et.al.*, 1999).

1.2.1.β Θερμοκρασία

Για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών η καταλληλότερη θερμοκρασία είναι οι 37° C. Η θερμοκρασία της θάλασσας αποτελεί στρεσογόνο παράμετρο για αυτούς τους μικροοργανισμούς για τους οποίους η θερμοκρασία επιβίωσης δεν είναι απαραίτητα ίδια με αυτή της ανάπτυξης. Προγενέστερες έρευνες έχουν δείξει ότι ευνοείται μια σταθερότητα στην επιβίωση τους στις χαμηλότερες θερμοκρασίες. Για παράδειγμα οι Lessard και Sieburth (1983) μέτρησαν την βιωσιμότητα (CFU) των φυσικών αποβλήτων σε πληθυσμούς *E. coli* και εντεροκόκκων από το Φεβρουάριο έως τον Αύγουστο, με πειραματικές θερμοκρασίες οι οποίες κυμαίνονταν από 0° C έως 20° C. Παρατήρησαν ότι τα εντεροβακτήρια παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα στις χαμηλές θερμοκρασίες από ότι στις υψηλότερες. Μολονότι άλλες περιβαλλοντικές αλλαγές μπορεί να συνέβαλαν στην επιβίωση των βακτηρίων, αυτή ήταν σημαντικά υψηλότερη στις χαμηλότερες θερμοκρασίες (Rozen & Belkin, 2001).

Κατά συνέπεια η θερμοκρασία αποτελεί μια παράμετρος η οποία οφείλει να εξεταστεί καθώς οι θερμοκρασίες των θαλασσιών νερών κολύμβησης την ίδια εποχιακή περίοδο δεν είναι κοινές σε όλη την επικράτεια της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

1.2.2 Χημικοί παράγοντες

1.2.2.α Αλατότητα

Κατά την απελευθέρωση τους στο θαλασσινό νερό, τα εντερικά βακτήρια υποβάλλονται σε μια κατάσταση οσμωτικού σοκ, και η ικανότητα τους να το ξεπεράσουν οδηγεί ότι στην ενεργοποίηση πολλών οσμωρυθμιστικών λειτουργιών οι οποίες επηρεάζουν καθοριστικά την επακόλουθη επιβίωσή τους στο θαλάσσιο περιβάλλον. Με την αύξηση της αλατότητας τα κύτταρα των βακτηρίων αντιδρούν στην οσμωτική διαφορά και ή συμπιέζονται ή συνθέτουν συγκεκριμένα οσμωρυθμιστικά μόρια έτσι ώστε να εξισώσουν την οσμωτική πίεση και να αποφύγουν την δραστική απώλεια νερού από το κυτταρόπλασμα τους (Rozen & Belkin, 2001).

Σε αναφορά τους οι Anderson *et.al.* (1979), οι οποίοι παρακολούθησαν την επιβίωση απομονωμένων στελεχών *E. coli* στο θαλασσινό νερό για 8 ημέρες σε επιλεγμένες αλατότητες, κατέληξαν ότι η μείωση της αλατότητας συνοδεύεται με αύξηση της επιβίωσης.

1.2.2.β Το pH

Τα φυσιολογικά όρια του pH στο θαλασσινό νερό κυμαίνονται μεταξύ 7.5 και 8.5. Το pH επηρεάζεται από την θερμοκρασία, την πίεση, την πρωτογενή παραγωγή και την αναπνευστική λειτουργία των μικροοργανισμών (Harvey H.W., 1955). Το όξινο pH βρέθηκε ότι είναι πιο ευνοϊκό στην επιβίωση των εντερικών βακτηρίων (σε ένα εύρος από 5.0 έως 7.0) ενώ η ευαισθησία αυτών αυξάνεται με την αύξησή του (Rozen & Belkin, 2001).

Στην παρούσα εργασία το pH δεν μελετήθηκε όσο αφορά στην επίδραση του στους εντερόκοκκους απλά ρυθμίστηκε με τρόπο τέτοιο ώστε να ανταποκρίνεται στα περιβαλλοντικά πρότυπα των περιοχών που προσομοιώθηκαν εργαστηριακά.

1.2.2.γ Διαλυμένο Οξυγόνο (DO)

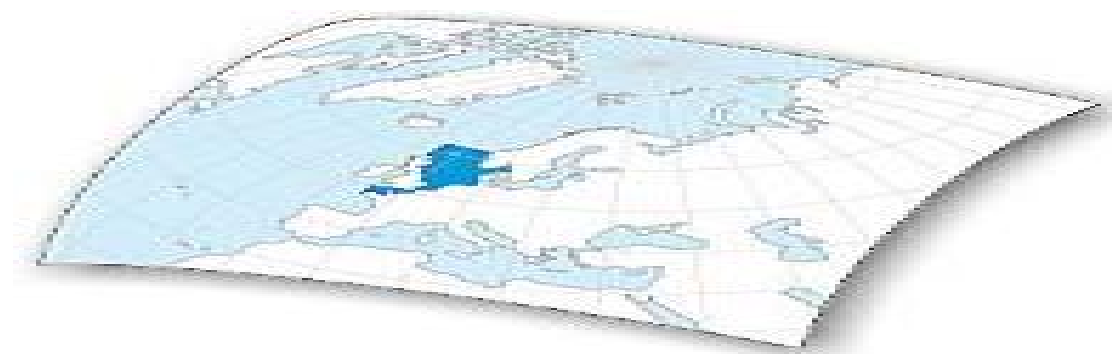
Το οξυγόνο είναι παρόν στο θαλάσσιο περιβάλλον και ανανεώνεται μέσω των κυματισμών και τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των οργανισμών. Το επιφανειακό οξυγόνο ανανεώνεται στην εύρωτη ζώνη από τους φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς και συχνά παράγεται περισσότερο απ' ότι καταναλώνεται. Το διαλυμένο οξυγόνο που από μόνο του περιέχεται στο θαλασσινό νερό βρέθηκε ότι έχει αρνητική

συσχέτιση στην σταθερότητα των κοπρανώδους προέλευσης κολοβακτηριδίων (Burkhardt *et.al.*, 1999).

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο μόνο για βιολογικές διεργασίες και γι' αυτό χρησιμοποιείται ευρύτατα στην επεξεργασία των αστικών λυμάτων στις εγκαταστάσεις των βιολογικών καθαρισμών. Στο πειραματικό μέρος αυτής της εργασίας λόγω του ότι έγινε μονοκαλλιέργεια εντερόκοκκου, το οξυγόνο δεν είχε καμία επίδραση στην επιβίωση του και επομένως χρησιμοποιήθηκε μόνο για την ανάδευση των δειγμάτων, δηλαδή την αποφυγή καθίζησης των βακτηρίων και την κατά το δυνατόν ομογενή κατανομή αυτών στο νερό.

1.3 Περιβαλλοντικά στοιχεία περιοχών μελέτης

1.3.1 Βόρειος Θάλασσα



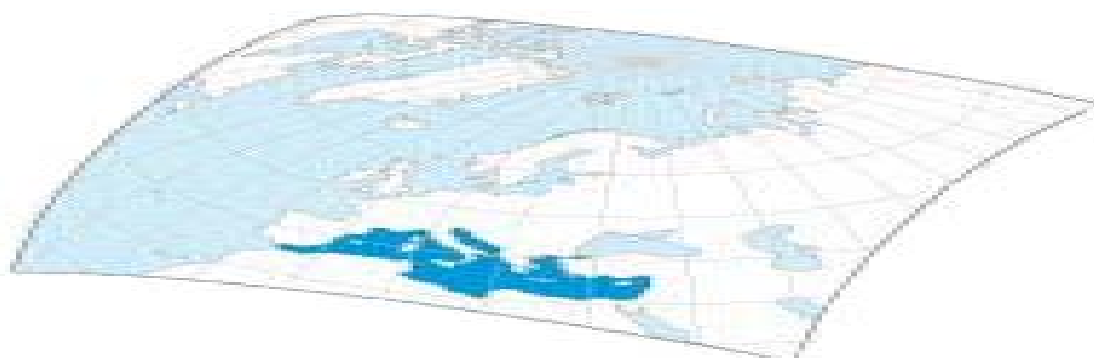
Η Βόρειος Θάλασσα ήταν γνωστή ως Γερμανικός Ωκεανός μέχρι τις αρχές του 20ου αιώνα. Οι εχθροπραξίες μεταξύ Γερμανίας και Αγγλίας έκαναν πολιτικά αναπόδεκτο αυτό το όνομα για την Αγγλία και έτσι μετονομάστηκε σε Βόρειο Θάλασσα. Η Βόρειος Θάλασσα αποτελεί ένα ρηχό, σχετικά νέο οικοσύστημα το οποίο δημιουργήθηκε από την καταβύθιση και πλημμύρα μεγάλης έκτασης γης πριν από 20.000 χρόνια (*Πίνακας 1*). Πρόκειται για μια πλατιά ημίκλειστη θαλάσσια περιοχή στην ηπειρωτική υφαλοκρηπίδα της βόρειο-δυτικής Ευρώπης. Περιστοιχίζεται από τις ακτογραμμές της Αγγλίας, της Σκωτίας, της Νορβηγίας, της Σουηδίας, της Δανίας, της Γερμανίας, της Ολλανδίας, του Βελγίου και της Γαλλίας, και οροθετείται από τις νοητές γραμμές νότιο-δυτικά έως τα στενά του Ντόβερ όπου

ενώνεται με το κανάλι της Αγγλίας (5° W), το βόρειο Ατλαντικό μεταξύ Σκωτίας και Νορβηγίας (62° N, 5°W), και τη Βαλτική στα στενά της Δανίας. Η έκταση της είναι 750.000 τετραγωνικά χιλιόμετρα (Km²). Η θαλάσσια περιοχή είναι ρηχή στο νότιο τμήμα της και το βάθος της αυξάνεται προς το βορρά (Walday & Kroglund, 2001).

Πίνακας 1 Γενικά χαρακτηριστικά της Β. θάλασσας

Έκταση Θαλ. Περιοχής Km ²	Όγκος νερού Km ³	Μέσο Ββάθος m	Επιφανειακή θερμοκρασία °C	Αλατότητα ‰
750 000	94 000	90 max 725	Αύγουστος 12-20 Φεβρουάριος 0-8	25-35

1.3.2 Μεσόγειος Θάλασσα



Η Μεσόγειος αποτελεί την μεγαλύτερη ημίκλειστη Ευρωπαϊκή θάλασσα. Έχει έκταση 2,5 εκατομμύρια τετραγωνικά χιλιόμετρα και ενώνεται με τον Ατλαντικό Ωκεανό μέσω του στενού του Γιβραλτάρ δυτικά, νότιο-ανατολικά με την Ερυθρά Θάλασσα μέσω της διώρυγας του Σουέζ και βόρειο-ανατολικά με τη θάλασσα του Μαρμαρά και τελικά τη Μαύρη Θάλασσα από το στενό του Βοσπόρου. Πρόκειται για μια ολιγότροφη θαλάσσια περιοχή. Η κυκλοφορία των νερών πραγματοποιείται με πάρα πολύ αργό ρυθμό. Τα ύδατα εισρέουν από το στενό του Γιβραλτάρ, διαγράφουν μια πορεία αντίστροφη από αυτή των δεικτών του ρολογιού και επιστρέφουν μετά από 80 με 100 χρόνια ξανά στον Ατλαντικό (Turley, 1999). Στη Μεσογειακή θαλάσσια λεκάνη απορρέουν σχετικά λίγοι μεγάλοι ποταμοί. Οι κυριότεροι είναι ο

Ροδανός της Γαλλίας, ο Πάδος της Ιταλίας , ο Έβρος της Ισπανίας και ο Νείλος της Αιγύπτου. Έχει υπολογιστεί ότι το γλυκό νερό που καταλήγει στη λεκάνη είναι 2 500 κυβικά χιλιόμετρα Km³ το χρόνο όχι ιδιαίτερα μεγάλο νούμερο για τον όγκο των νερών της (Πίνακας 2). Ως εκ τούτου προκύπτει η Μεσόγειος να έχει αυξημένη αλατότητα σε σχέση με άλλες ημίκλειστες θαλάσσιες περιοχές (Zenetos *et.al.*, 2001).

Πίνακας 2 Γενικά χαρακτηριστικά της Μεσογείου

Έκταση Θαλ. Περιοχής Km ²	Μήκος Ακτογραμμής Km	Μέσο Βάθος m	Επιφανειακή Θερμοκρασία °C (W-E)	Μέση Αλατότητα ‰ (W-E)
2 500 000	46 000	1 500	15-21	25-35

1.4 Νομοθετικό Πλαίσιο

Η ασφαλής χρήση των υδάτων κολύμβησης από τους λουόμενους υποστηρίζεται από νομοθετικές διατάξεις που καθορίζουν τα όρια στη συγκέντρωση παθογόνων μικροοργανισμών. Οι οριακές αυτές τιμές έχουν οριστεί σε σχέση με επιστημονικές μελέτες και καθορίζουν το βαθμό ασφαλούς ή μη έκθεσης των λουομένων στα κολυμβητικά ύδατα.

1.4.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

Το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο έχει επιλέξει ορισμένους στόχους ως γενική κατεύθυνση για τη μελλοντική ανάπτυξη σε τομείς προτεραιότητας, όπως είναι οι φυσικοί πόροι και η δημόσια υγεία, λαμβάνοντας ως βάση την ανακοίνωση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για την αειφόρο ανάπτυξη. Το νερό είναι φυσικός πόρος που δεν υπάρχει σε αφθονία και η ποιότητα του οποίου πρέπει να προστατεύεται, να διαφυλάσσεται, να αποτελεί αντικείμενο διαχείρισης και να αντιμετωπίζεται αναλόγως. Τα επιφανειακά ύδατα ιδίως, αποτελούν ανανεώσιμους πόρους με περιορισμένες δυνατότητες ανάκαμψης από αρνητικές επιπτώσεις ανθρώπινων δραστηριοτήτων. Η κοινοτική πολιτική για το περιβάλλον αποσκοπεί σε προστασία υψηλού επιπέδου και συμβάλλει στην επίδιωξη των στόχων της διαφύλαξης, της προστασίας και της

βελτίωσης της ποιότητας του περιβάλλοντος καθώς και της προστασίας της ανθρώπινης υγείας.

Σε κάθε κολυμβητική περίοδο καθίσταται προφανές ότι η ύπαρξη κοινοτικής πολιτικής για τα ύδατα κολύμβησης παραμένει σημαντική, δεδομένου ότι προστατεύει το κοινό από περιστασιακή και χρόνια ρύπανση που απορρίπτεται σε κοινοτικά ύδατα κολύμβησης ή κοντά σε αυτά. Η ποιότητα των υδάτων κολύμβησης έχει συνολικά βελτιωθεί σημαντικά από τότε που τέθηκε σε ισχύ η οδηγία 76/160/ΕΟΚ. Ωστόσο, η εν λόγω οδηγία αντικατοπτρίζει τη γνώση και την πείρα των αρχών της δεκαετίας του 1970. Έκτοτε έχουν μεταβληθεί οι χρήσεις των υδάτων κολύμβησης, όπως επίσης και το επίπεδο των επιστημονικών και τεχνικών γνώσεων.

Το Δεκέμβριο του 2000, η Επιτροπή εξέδωσε ανακοίνωση προς το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το Συμβούλιο με θέμα την ανάπτυξη νέας πολιτικής για τα ύδατα κολύμβησης και άρχισαν ευρείας κλίμακας διαβουλεύσεις με όλα τα ενδιαφερόμενα και εμπλεκόμενα μέρη. Το κύριο αποτέλεσμα των εν λόγω διαβουλεύσεων ήταν η γενική υποστήριξη για την κατάρτιση νέας οδηγίας που να βασίζεται στα πιο πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα και να δίνει ιδιαίτερο βάρος στην ευρύτερη συμμετοχή του κοινού. Η απόφαση αριθ. 1600/2002/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Ιουλίου 2002, για τη θέσπιση του έκτου κοινοτικού προγράμματος δράσης για το περιβάλλον, περιέχει δέσμευση για την εξασφάλιση υψηλού επιπέδου προστασίας των υδάτων κολύμβησης, μεταξύ άλλων με την αναθεώρηση της οδηγίας 76/160/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 8ης Δεκεμβρίου 1975, σχετικά με την ποιότητα των υδάτων κολύμβησης. Για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα και να προαχθεί η συνετή αξιοποίηση των πόρων, η οδηγία 2006/7/ΕΚ συντονίζεται στενά με άλλα κοινοτικά νομοθετήματα που αφορούν τα ύδατα, όπως οι οδηγίες 91/271/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 21ης Μαΐου 1991, για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων, και 91/676/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 12ης Δεκεμβρίου 1991, για την προστασία των υδάτων από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης, και η οδηγία 2000/60/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 23ης Οκτωβρίου 2000, για τη θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων.

Στις 17 Φεβρουαρίου 2005, η Κοινότητα επικύρωσε τη σύμβαση της Οικονομικής Επιτροπής του ΟΗΕ για την Ευρώπη σχετικά με την πρόσβαση σε πληροφορίες, τη συμμετοχή του κοινού στη λήψη των αποφάσεων και την πρόσβαση στη δικαιοσύνη σε θέματα σχετικά με το περιβάλλον (σύμβαση του Århus). Η οδηγία 2006/7/ΕΚ

(Πίνακας 3β) συμπεριλαμβάνει διατάξεις σχετικά με την πρόσβαση του κοινού στις πληροφορίες και προβλέπει τη συμμετοχή του κοινού στην εφαρμογή της προκειμένου να συμπληρωθούν η οδηγία 2003/4/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 28ης Ιανουαρίου 2003, σχετικά με την πρόσβαση στην περιβαλλοντική πληροφόρηση, και η οδηγία 2003/35/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 26ης Μαΐου 2003, για τη δημόσια συμμετοχή κατά την εκπόνηση ορισμένων σχεδίων και προγραμμάτων που έχουν σχέση με το περιβάλλον.

Σύμφωνα με το Άρθρο 2 της οδηγίας 76/160/ΕΟΚ οι μικροβιολογικές παράμετροι που εφαρμόζονται επί των υδάτων κολύμβησης φαίνονται στον Πίνακα 3α

Πίνακας 3α: Μικροβιολογικά όρια ποιότητας νερών κολύμβησης οδηγίας 76/160/ΕΟΚ

<i>Μικροβιολογικές Παράμετροι</i>	<i>Επιθυμητό όριο</i>	<i>Ανώτατο επιτρεπόμενο όριο</i>
Ολικά κολοβακτηρίδια		
/100 ml	500	10000
Κολοβακτηρίδια κοπράνων		
/100 ml	100	500
Στρεπτόκοκκοι κοπράνων		
/100 ml	100	-

Σύμφωνα με το Άρθρο 5 της οδηγίας 2006/7/ΕΚ οι μικροβιολογικές παράμετροι που εφαρμόζονται επί των υδάτων κολύμβησης στο εξής φαίνονται στον Πίνακα 1.β

Πίνακας 3β: Μικροβιολογικά όρια ποιότητας νερών κολύμβησης οδηγίας 2006/7/ΕΚ

Παράμετρος	Εξαιρετική ποιότητα	Καλή ποιότητα	Επαρκής ποιότητα	Μέθοδοι Ανάλυσης
Εντερόκοκκοι				ISO 7899-1
<i>(cfu/100 ml)</i>	100 (*)	200 (*)	185 (**)	ISO 7899-2
Κολοβακτηρίδια				ISO 9308-3
<i>(cfu/100 ml)</i>	250 (*)	500 (*)	500 (**)	ISO 9308-1

(*) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 95ο εκατοστημόριο.

(**) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 90ό εκατοστημόριο.

1.4.2 Ελληνική Νομοθεσία

Το νερό δεν γνωρίζει σύνορα, ούτε διοικητικά ούτε πολιτικά, συνεπώς ούτε και η ρύπανση αυτού. Έτσι λοιπόν τα μέτρα προστασίας, για να είναι ενδεδειγμένα, θα πρέπει να βασίζονται σε κοινά ποιοτικά πρότυπα που θα εγγυώνται υψηλό επίπεδο προστασίας (άρθρο 174 της συνθήκης). Ενώ πλαίσιο και πρότυπα θα πρέπει να παρέχονται σε επίπεδο ΕΕ κατά τρόπο συνεκτικό, πρέπει παράλληλα να υπάρχει επαρκής ευελιξία σε τοπικό και περιφερειακό επίπεδο. Σε αυτό ακριβώς το επίπεδο μπορούν να ακολουθούνται σωστές διαχειριστικές προσεγγίσεις και μάλιστα με μεγάλη αποτελεσματικότητα.

Η ελληνική νομοθεσία έχει εναρμονίσει την οδηγία 76/160/ΕΟΚ. Πρόκειται για την υπουργική απόφαση 463//1986/Β-438 (ΕΟΚ) η οποία αναφέρεται στην ποιότητα υδάτων ποσίμου νερού, νερού κολύμβησης και υδάτων καλλιέργειας και αλιείας. Ο νόμος ορίζει την κολυμβητική περίοδο, την περιοχή κολύμβησης, την συχνότητα των δειγματοληπτικών διαδικασιών καθώς και τα επιτρεπόμενα μικροβιολογικά όρια τα οποία είναι πλήρως συμμορφωμένα στις Ευρωπαϊκές απαιτήσεις (παράρτημα).

Πολύ πρόσφατα, στις 4.3.2006, στην Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, δημοσιεύτηκε η Οδηγία 2006/7/ΕΚ (ΕΥ, 2006) του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 15^{ης} Φεβρουαρίου 2006, σχετικά με τη διαχείριση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης και την κατάργηση της οδηγίας 76/160/ΕΟΚ (πίνακας 1.α).

Λόγω του ότι προς το παρόν κανένα από τα κράτη μέλη δεν έχει προχωρήσει σε εφαρμογή των νέων τρόπων παρακολούθησης της ποιότητας των επιφανειακών υδάτων και λόγω του ότι η κολυμβητική περίοδος δεν έχει ουσιαστικά ξεκινήσει, η παρούσα οδηγία δεν έχει ακόμα τεθεί σε εφαρμογή και δεν έχει ενσωματωθεί στο εσωτερικό δίκαιο κάθε κράτους-μέλους

1.5 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να μελετηθεί η ορθότητα της χρήσης των ιδίων προδιαγραφών (συγκέντρωση μικροοργανισμών – δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης) για την εξέταση της καταλληλότητας των παρακτίων νερών αναψυχής σε όλη την έκταση της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Δηλαδή εάν δικαιολογείται ενοποιημένη προσέγγιση στη χάραξη πολιτικής διαχείρισης της μικροβιολογικής ποιότητας νερών της παράκτιας ζώνης για σκοπούς αναψυχής.

Στόχος επομένως ήταν να επιτευχθούν εργαστηριακά οι περιβαλλοντικές συνθήκες δυο διαφορετικών θαλασσιών περιοχών της Ευρωπαϊκής Ένωσης και να εξεταστεί η συμπεριφορά ενός βακτηρίου δείκτη σύμφωνα με τις απαιτήσεις της ευρωπαϊκής νομοθεσίας σε αυτές. Στην περίπτωση που το βακτήριο (εντερόκοκκος) ακολουθεί κοινούς ρυθμούς μείωσης στις συνθήκες και των δυο προσομοιασμένων θαλασσιών περιοχών, έχει νόημα η ενιαία ευρωπαϊκή πολιτική πάνω σε αυτό το θέμα. Στην αντίθετη περίπτωση ενδέχεται να απαιτείται αναμόρφωση των πολιτικών αποφάσεων και την χάραξη τομεακής στρατηγικής.

Για αυτό το λόγο η παρούσα διατριβή είχε σαν αντικείμενο τη μελέτη της επιβίωσης του εντερόκοκκου, προσομοιώνοντας εργαστηριακά με τη δημιουργία μικρόκοσμου δύο περιοχές που αποτελούν πόλο έλξης πλήθους τουριστών κάθε χρόνο. Οι θαλάσσιες περιοχές ήταν αυτές της Ανατολικής Μεσογείου (Μυτιλήνη) και των ανατολικών ακτών του Ατλαντικού (Blackpool), περιοχές που παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές όσον αφορά στις περιβαλλοντικές τους συνθήκες. Για την πραγματοποίηση του πειράματος επιλέχθηκαν τρεις διαφορετικοί παράγοντες δυο φυσικοί και ένας χημικός ώστε να γίνει ο έλεγχος στην επιβίωση του εντερόκοκκου στο θαλάσσιο περιβάλλον. Οι φυσικοί παράγοντες ήταν αυτοί της ηλιακής ακτινοβολίας και της θερμοκρασίας ενώ ο χημικός η αλατότητα. Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ελέγχθηκε επίσης το pH ώστε να μην εκτρέπεται από τα όριά του στο θαλασσινό νερό (8 – 8,5) ενώ παράλληλα εξασφαλίστηκε και η διατήρηση του διαλυμένου οξυγόνου σε υψηλά επίπεδα μέσω αεραντλίας. Οι δυο τελευταίοι παράγοντες ήταν κοινοί για όλα τα δείγματα.

Οι βιολογικοί παράγοντες και οι αλληλεπιδράσεις των εντερόκοκκων με άλλους μικροοργανισμούς δεν εξετάστηκαν καθώς στο πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκε μονοκαλλιέργεια εντερόκοκκου σε εργαστηριακές συνθήκες ώστε να ελεγχθούν διαφορές στην επιβίωση που αφορούν διαφορετικά γεωγραφικά πλάτη. Έτσι δόθηκε έμφαση στους φυσικοχημικούς παράγοντες, παραβλέποντας τους υπόλοιπους.

2 Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Περιοχή Μελέτης

Δεδομένου ότι σκοπός της διατριβής εξειδίκευσης ήταν να πραγματοποιηθεί σύγκριση του χρόνου επιβίωσης των κοπρανωδών στρεπτόκοκκων (FS) σε θαλάσσιες περιοχές με διαφορετικές συντεταγμένες, που αποτελούν πόλο έλξης επισκεπτών κατά τις τουριστικές περιόδους, οι συνθήκες που επιλέχθηκαν είναι αυτές που επικρατούν στη θαλάσσια περιοχή της πόλης της Μυτιλήνης και στην παραθαλάσσια περιοχή της πόλης Blackpool, που βρίσκεται στην Αγγλία (Πίνακας 2). Η ανεύρεση των απαραίτητων για την πραγματοποίηση του πειράματος στοιχείων της κάθε περιοχής έγινε με τη βοήθεια του διαδικτύου (<http://aa.navy.mil> (US National Observatory Astronomical Appl Dept), <http://sci.fi/~benefon/sol.html> (Solar photoperiod calculator)) και με δεδομένα του Υπουργείου Γεωργίας της Αγγλίας (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1981). Οι τιμές των παραμέτρων του πειράματος είναι αυτές που καταγράφηκαν για την 1.8.2005, αφού κατά την περίοδο του Αυγούστου παρατηρείται η μεγαλύτερη τουριστική κίνηση (Πίνακας 4).

Πίνακας 4 Χαρακτηριστικά στοιχεία των περιοχών μελέτης

Χαρακτηριστικά	Μυτιλήνη	Blackpool
Γεωγραφικές	39,03 N	53,5 N
Συντεταγμένες	26,36 E	3,07 W
Ανατολή 1.8.2005	06:47	04:27
Δύση 1.8.2005	20:58	20:11
Φωτοπερίοδος	14h 11'~ 14h	15h 44'~16h
Επιφ θερμοκρ υδάτων	24 ⁰ C	17 ⁰ C
Αλατότητα S (‰)	38-39 ‰	33 ‰

Το πειραματικό μέρος της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε σε εξολοκλήρου εργαστηριακές συνθήκες. Για τη Βόρεια Θάλασσα οι συνθήκες της πειραματικής διαδικασίας ρυθμίστηκαν αντίστοιχα με τα περιβαλλοντικά δεδομένα της παραλίας

του Blackpool της Αγγλίας που επικρατούν τους θερινούς μήνες. Για συνθήκες Μεσογείου επιλέχθηκαν οι συνθήκες που επικρατούν τους θερινούς μήνες στο στενό Λέσβου – Τουρκίας. Τα περιβαλλοντικά δεδομένα ανταποκρίνονται σε αυτά που επικρατούν κατά τους καλοκαιρινούς μήνες τότε δηλαδή που η κολυμβητική δραστηριότητα μεγιστοποιείται. Για την προσομοίωση της θερμοκρασίας χρησιμοποιήθηκε ένα δωμάτιο σταθερών συνθηκών όπου ένας θερμοστάτης διατηρούσε τη θερμοκρασία σταθερή στους 17° C για τις συνθήκες Βορείου θάλασσας ενώ ένα υδατόλουτρο διατηρούσε σταθερή τη θερμοκρασία στους 24 ° C για τις συνθήκες Μεσογείου.

Για τη φωτοπερίοδο χρησιμοποιήθηκαν λάμπες προσομοίωσης του ηλιακού φωτός Philips MASTER SON-T PIA, Agro 400 W. Η φωτοπερίοδος σύμφωνα με τα περιβαλλοντικά δεδομένα ρυθμίστηκε μέσω χρονοδιακοπών για συνθήκες Μεσογείου στις 14 ώρες. Για συνθήκες Βορείου Θάλασσας η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε στις 16 ώρες.

Ο χώρος του υδατόλουτρου απομονώθηκε από τον υπόλοιπο χώρο με αδιαφανή μαύρη μεμβράνη ώστε να μην επηρεάζει η μια φωτοπερίοδος του ενός μικρόκοσμου τα δείγματα του άλλου. Η αλατότητα ρυθμιστική να είναι 33 ‰ στις δύο από τις τέσσερις κωνικές φιάλες των συνθηκών Μεσογείου ενώ στις άλλες δύο κωνικές φιάλες των ιδίων συνθηκών η αλατότητα ρυθμίστηκε να είναι 39 ‰ με τη βοήθεια αλατόμετρου. Η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε και για τις τέσσερις κωνικές φιάλες που εκτεθήκαν στις συνθήκες της Βόρειας Θάλασσας με την αλατότητα των νερών μέσα στις κωνικές να ρυθμίζεται σε 33 ‰ για τις δύο από αυτές και 39 ‰ για τις άλλες δύο. Όλα τα δείγματα αναδεύονταν με τη βοήθεια φυσαλίδων αέρα οι οποίες τροφοδοτούνταν μέσω μιας αεραντλίας. Η χρήση αεραντλίας και η τροφοδότηση με φυσαλίδες αέρα στα δείγματα επέφερε δύο πρακτικές ωφέλειες. Η πρώτη ήταν η αποφυγή καθίζησης των μικροοργανισμών στον πάτο των κωνικών φιαλών και η δεύτερη ήταν η επαρκής οξυγόνωση των δειγμάτων κάτι που ούτως ή άλλως συμβαίνει στο θαλάσσιο περιβάλλον μέσω των κυματισμών και της πρωτογενούς παραγωγικότητας.

2.2 Πειραματικό μέρος

2.2.1 Δημιουργία μικρόκοσμου στο εργαστήριο

Για την εφαρμογή της πειραματικής διαδικασίας δημιουργήθηκαν οχτώ μικρόκοσμοι σε κωνικές φιάλες των 500 ml. Για τη δημιουργία των μικρόκοσμων αυτών χρειάζονταν θαλασσινό νερό οπότε συλλέχθηκαν περίπου 30 λίτρα θαλασσινού νερού από το Στενό Μυτιλήνης ανοιχτά της περιοχής του Μολύβου. Η επιλογή της συγκεκριμένης περιοχής για την συλλογή θαλασσινού νερού κρίθηκε κατάλληλη για την αποφυγή αλλοίωσης των μικρόκοσμων με μικροοργανισμούς που ενδεχομένως εμπεριέχονται σε ύδατα της παράκτιας ζώνης. Στόχος ήταν να δημιουργηθεί μια μονοκαλλιέργεια εντερόκοκκου ώστε να παρατηρηθεί ο ρυθμός μείωσης του στις διάφορες τεχνητές περιβαλλοντικές συνθήκες. Το νερό διηθήθηκε με αποστειρωμένη αντλία κενού της Millipore με ηθμό διαμέτρου σπής 0.22 μm . Σε οχτώ αποστειρωμένες κωνικές φιάλες μοιράσθηκαν από 400 ml διηθημένου θαλασσινού νερού. Στους τέσσερις μικρόκοσμους η αλατότητα ρυθμίστηκε στα 33 ‰ ώστε να ανταποκρίνεται στις συνθήκες της Β. θάλασσας (Εικόνα 2α), ενώ στους άλλους τέσσερις μικρόκοσμους στα 39 ‰, για την προσομοίωση της αλατότητας της Μεσογείου (Εικόνα 2β). Οι κωνικές φιάλες εμβολιάστηκαν με το στέλεχος του εντερόκοκκου και οι μικρόκοσμοι μεταφέρθηκαν σε θάλαμο σταθερών τεχνητών συνθηκών θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου ώστε να υποβληθούν στις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στην Β. θάλασσα και την Μεσόγειο.



Εικόνα 2α. Συνθήκες Βορείου Θαλάσσης



Εικόνα 2β. Συνθήκες Μεσογείου

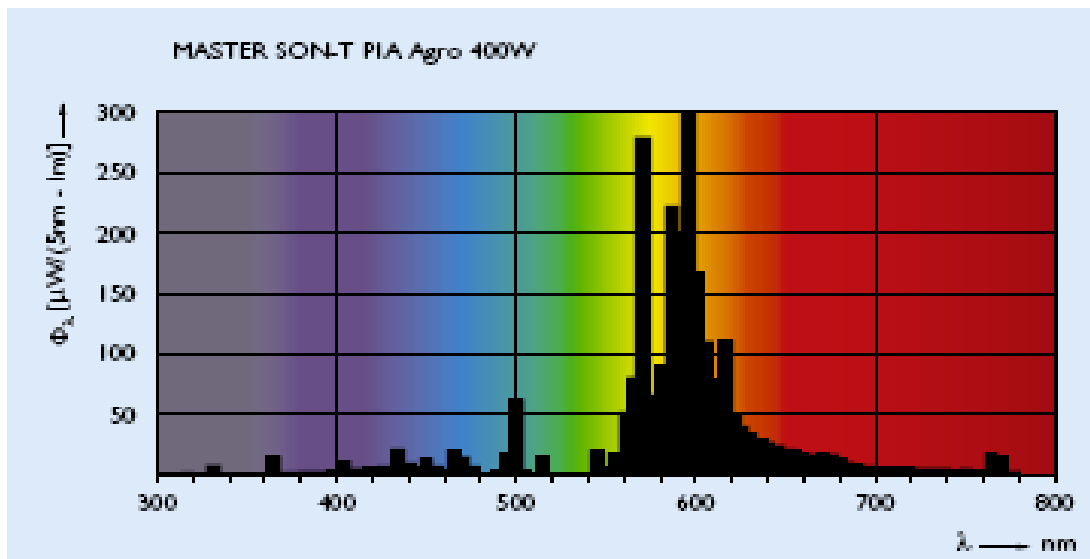
Για τον εμβολιασμό και τη δημιουργία των μικρόκοσμων χρησιμοποιήθηκε στέλεχος *Enterococcus faecium* που είχε απομονωθεί από θαλασσινό νερό. Οι μικρόκοσμοι συνδέθηκαν με αυτοσχέδιο σύστημα ανάδευσης και οξυγόνωσης μέσω αεραντλίας. Επισημαίνεται ότι οτιδήποτε χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα είχε πρωτίστως αποστειρωθεί σε κλίβανο ούτως ώστε να αποφευχθεί μια ενδεχόμενη επιμόλυνση με κάποιο ανεπιθύμητο εξωτερικό μικρόβιο δημιουργώντας ενδεχόμενα μια ανταγωνιστική σχέση με το υπό εξέταση στέλεχος και μην επιτρέποντας την ανάδειξη ασφαλών συμπερασμάτων.

Οι τέσσερις κωνικές φιάλες διαφορετικής αλατότητας ανά δύο, τοποθετήθηκαν σε συνθήκες Β. θάλασσας, δηλαδή θερμοκρασία 17° C και φωτοπερίοδο 14 ωρών. Οι άλλες τέσσερις εκ των οποίων δύο με αλατότητα 33 ‰ και δύο με αλατότητα 39 ‰ τοποθετήθηκαν μέσα σε υδατόλουτρο ώστε να διατηρηθεί μια σταθερή θερμοκρασία της τάξεως των 24 ° C ενώ η φωτοπερίοδος τους ρυθμίστηκε με χρονοδιακόπτη στις 16 ώρες. Στον Πίνακα 5 φαίνονται αναλυτικότερα οι συνθήκες οι οποίες υποβλήθηκαν οι μικρόκοσμοι.

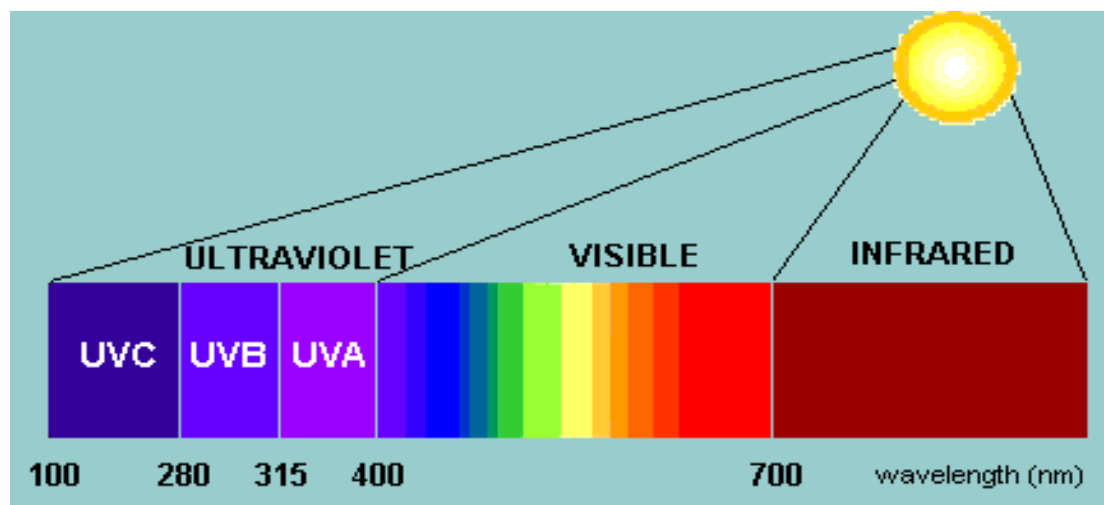
Πίνακας 5 Εργαστηριακές περιβαλλοντικές συνθήκες των δειγμάτων.

Περιοχή	B. Θάλασσα				Μεσόγειος			
	Σ ₁	Σ ₂	Σ ₃	Σ ₄	Σ ₅	Σ ₆	Σ ₇	Σ ₈
Δείγματα →								
Παράμετροι ↓								
Αλατότητα (‰)	39	39	33	33	39	39	33	33
Θερμοκρασία (°C)	17	17	17	17	24	24	24	24
Φωτοπερίοδος (ώρες)	16	16	16	16	14	14	14	14

Για την προσομοίωση της ηλιακής ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκαν 2 λαμπτήρες νατρίου ιδίων προδιαγραφών και τεχνικών χαρακτηριστικών. Η μια τοποθετήθηκε στο χώρο με τις συνθήκες Βορείου Θαλάσσης και θερμοκρασίας 17° C και η άλλη στις συνθήκες Μεσογείου με θερμοκρασία 24° C. Οι λαμπτήρες αυτές ήταν Philips MASTER SON-T PIA, Agro 400 W και η κατανομή της φασματικής ενέργειας παρουσιάζεται στο Σχήμα 2. Στόχος ήταν η προσομοίωση μέρους της ηλιακής ακτινοβολίας.



Σχήμα 2 Κατανομή φασματικής ενέργειας από τις λάμπες Philips MASTER SON-T PIA, Agro 400 W



Σχήμα 3 Φάσμα ηλιακής ακτινοβολίας

Η ηλιακή ακτινοβολία (Σχήμα 3) αποτελείται από το υπεριώδες φάσμα (UVC, UVB, UVA), το ορατό φάσμα και το υπέρυθρο. Η UV-C ακτινοβολία έχει μήκος κύματος από 100 έως 290, η UV-B 290 έως 320 nm, η UV-A 320 με 400 nm, το ορατό φως από 400 έως 800 nm και το υπέρυθρο από 800 έως πολλές χιλιάδες nm. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, είναι μικρό το ποσοστό της UV-B ακτινοβολίας που τελικά φτάνει στην επιφάνεια της γης. Τα μήκη κύματος της υπέρυθρης ακτινοβολίας έχουν ουδέτερη επίδραση στη βακτηριοκτόνο δράση του ηλιακού φωτός τόσο στο φυσικό όσο και στο προσομοιασμένο (Kay *et.al.*, 2004). Σύμφωνα με τους S. Lester *et.al.*, (2002) οι εντερόκοκκοι αδρανοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα μήκους κύματος, γεγονός που αποτελεί ένδειξη φωτοοξειδωτικής βλάβης. Οι λαμπτήρες που χρησιμοποιήθηκαν εξέπεμπαν σε μήκος κύματος από 560 nm έως 635 nm (Σχήμα 1) επομένως εξετάστηκε η επίδραση του φωτός για ένα τμήμα του ορατού φάσματος.

2.1.2 Πειραματική διαδικασία

Το πείραμα ξεκίνησε την 21 Νοεμβρίου και έληξε στις 21 Δεκεμβρίου δηλαδή διήρκησε 31 ημέρες. Για τον προσδιορισμό της αρχικής συγκέντρωσης του βακτηρίου στους μικρόκοσμους, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία αμέσως μετά τον εμβολιασμό του στελέχους του εντερόκοκκου στο θαλασσινό νερό. Η παρακολούθηση της μείωσης των εντεροκόκκων εντός των δειγμάτων ήταν καθημερινή για τις πρώτες δέκα ημέρες μέχρι να ομαλοποιηθούν τα αποτελέσματα των καταμετρούμενων πληθυσμών τους. Ο ρυθμός μείωσης του εντερόκοκκου αρχικά ήταν υψηλός ενώ μετά τις δέκα πρώτες μέρες ομαλοποιήθηκαν τα αποτελέσματα και δεν ήταν απαραίτητη η καθημερινή παρακολούθηση. Από τις δέκα πρώτες μέρες όπου επαναλαμβάνονταν καθημερινά δειγματοληψίες και μετά πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες κάθε δύο ημέρες και επαναλαμβάνονταν ενδιάμεσα μόνο στην περίπτωση εξαγωγής αναξιόπιστων ή αδύνατων αποτελεσμάτων.

Ο αρχικός πληθυσμός των μικρόκοσμων μέσα στα δείγματα δεν ήταν γνωστός επομένως για την πρώτη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις της τάξεως του 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , ώστε σε κάθε περίπτωση να είναι δυνατή η καταμέτρηση των αποικιών και να μη χαθούν πολύτιμα δεδομένα.

Κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνταν αποστειρώνονταν πρωτίστως σε κλίβανο και όλες οι εργασίες γίνονταν παρουσία

φλόγιστρου. Οι αραιώσεις πραγματοποιούνταν με τη μέθοδο της διήθησης μέσω φίλτρου και τη μέθοδο της επάλειψης απευθείας στο θρεπτικό υπόστρωμα. Για τη διήθηση χρησιμοποιούνταν ηθμός διαμέτρου οπής 0,44 μm. Ο ηθμός στη συνέχεια τοποθετούνταν σε τρυβλίο Petri το οποίο περιείχε θρεπτικό υπόστρωμα Slanets & Bartley medium και επωάζονταν σε κλίβανο στους 36° C για 48 ώρες ώστε να αναπτυχθούν οι εντερόκοκκοι. Με τη μέθοδο της επάλειψης στο τρυβλίο με το θρεπτικό υπόστρωμα τοποθετούνταν απευθείας χωρίς διήθηση ποσότητα δείγματος και επαναλαμβάνονταν η ίδια τακτική της επώασης . Τα τρυβλία και πάλι τοποθετούνταν στον κλίβανο και επωάζονταν στους 36° C για 48 ώρες ώστε να αναπτυχθούν οι εντερόκοκκοι πάνω στο θρεπτικό υλικό.

Μετά το πέρας των 48 ωρών κάθε δειγματοληψίας ακολουθούσε η καταμέτρηση των αποικιών πάνω στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η καταμέτρηση των αποικιών πραγματοποιούνταν με φωτογράφιση των τρυβλίων μέσω ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής και μέτρηση των αριθμημένων αποικιών σε ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω του σχεδιαστικού προγράμματος Microsoft Paint.

Στον πίνακα 6 και 7 παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των βακτηρίων σε κάθε μικρόκοσμο.

Δείγματα	Αριθμός αποικιών / ml		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
	Συνθ. Δειγμάτων		21.11	22.11	23.11	24.11	25.11	26.11	27.11	28.11	29.11	30.11	2.12
Σ ₁	S	39 ‰	1,9 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	1,7 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	-	1,2 x 10 ⁵	6,2 x 10 ⁵	8,4 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵
	T	17°C											
	P	16 ώρες											
Σ ₂	S	39 ‰	1,4 x 10 ⁶	7,2 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	-	2,0 x 10 ⁴	9,1 x 10 ⁴	7,9 x 10 ⁴	2,8 x 10 ⁴
	T	17°C											
	P	16 ώρες											
Σ ₃	S	39 ‰	1,2 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁶	1,2 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵	7,1 x 10 ⁴	7,4 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁴
	T	24°C											
	P	14 ώρες											
Σ ₄	S	39 ‰	1,8 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	2,3 x 10 ⁶	3,6 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	-		6,3 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁴
	T	24°C											
	P	14 ώρες											
Σ ₅	S	33 ‰	1,4 x 10 ⁶	6,7 x 10 ⁵	6,0 x 10 ⁵	9,6 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁶	8,8 x 10 ⁵	-		4,2 x 10 ⁵	3,3 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵
	T	17°C											
	P	16 ώρες											
Σ ₆	S	33 ‰	2,0 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁶	7,8 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁶	9,4 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁶	-		4,7 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁵	5,1 x 10 ⁴
	T	17°C											
	P	16 ώρες											
Σ ₇	S	33 ‰	2,7 x 10 ⁶	8,8 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶	9,6 x 10 ⁵	-		2,0 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵	5,2 x 10 ⁴
	T	24°C											
	P	14 ώρες											
Σ ₈	S	33 ‰	1,2 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	9,0 x 10 ⁵	3,4 x 10 ⁵	5,1 x 10 ⁴	6,0 x 10 ⁴	4,6 x 10 ⁴	6,1 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴
	T	24°C											
	P	14 ώρες											

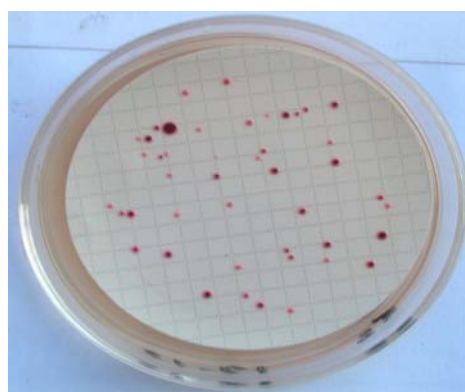
Δείγματα	Αριθμός αποικιών / ml		XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	IXX	XX	XXI
	Συνθ. Δειγμάτων		5.12	6.12	8.12	9.12	11.12	12.12	14.12	16.12	19.12	21.12
Σ ₁	S	39 ‰	4,0 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁴	1,5 x 10 ³	3,6 x 10 ²	2,4 x 10 ²	1,1 x 10 ²	3,4 x 10	2,7 x 10	0,6 x 10	0,5 x 10
	T	17° C										
	P	16 ώρες										
Σ ₂	S	39 ‰	4,1 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁴	3,7 x 10 ³	2,7 x 10 ³	5,7 x 10 ²	2,4 x 10 ²	1,3 x 10 ²	9,8 x 10	4,6 x 10	3,1 x 10
	T	17° C										
	P	16 ώρες										
Σ ₃	S	39 ‰	1,3 x 10 ³	1,0 x 10 ²	4,0 x 10	0	0,1 x 10	0	0	0	0	0
	T	24° C										
	P	14 ώρες										
Σ ₄	S	39 ‰	2,2 x 10 ³	3,2 x 10 ²	4,0 x 10	0	0,2 x 10	0	0	0	0	0
	T	24° C										
	P	14 ώρες										
Σ ₅	S	33 ‰	3,4 x 10 ⁴	3,4 x 10 ³	2,5 x 10 ³	2,5 x 10 ³	6,4 x 10 ²	2,6 x 10 ²		1,4 x 10 ²	3,4 x 10	2,2 x 10
	T	17° C										
	P	16 ώρες										
Σ ₆	S	33 ‰	3,0 x 10 ⁴	6,7 x 10 ³	4,9 x 10 ³	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	8,3 x 10 ²		1,5 x 10 ²	1,6 x 10	0,3 x 10
	T	17° C										
	P	16 ώρες										
Σ ₇	S	33 ‰	2,4 x 10 ³	5,7 x 10 ²	1,0 x 10 ²	1,0 x 10	0,2 x 10	0	0	0	0	0
	T	24° C										
	P	14 ώρες										
Σ ₈	S	33 ‰	8,0 x 10 ²	5,2 x 10 ²	7,0 x 10	3,0 x 10	0	0	0	0	0	0
	T	24° C										
	P	14 ώρες										

Πίνακες 6 και 7: Αποτελέσματα καταμέτρησης αποικιών εντεροκόκκων στο εργαστηριακό περιβάλλον. Τα αποτελέσματα έχουν αναχθεί στο ml.

2.1.3 Ταυτοποίηση οργανισμού

Το στέλεχος του εντεροκόκκου που μελετήθηκε ήταν ο *Enterococcus faecium*. Από το τρυβλίο της κωνικής φιάλης με την κωδική ονομασία Σ₁ απομονώθηκε και ένας βάκιλος του είδους *Bacillus circulans* που ενδεχομένως έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της πειραματικής διαδικασίας και αλλοίωσε τα αποτελέσματα. Παρόλο της άσηπτες συνθήκες που φροντίστηκε να επικρατούν σε όλη την πειραματική διαδικασία προφανώς μια επιμόλυνση δεν αποφεύχθηκε που όμως περιορίστηκε σε ένα δείγμα μόνο.

Για την ταυτοποίηση του είδους ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία ώστε να διαπιστωθεί το είδος και κάποια ενδεχόμενη ανεπιθύμητη επιμόλυνση κατά την πειραματική διαδικασία. Στην Εικόνα 1. φαίνεται η εικόνα που παρουσίαζαν τα τρυβλία στις τελευταίες δειγματοληψίες. Ξεχωρίζονται αποικίες διαφορετικής διαμέτρου και χρώματος. Από τα τελευταία τρυβλία έγινε ανακαλλιέργεια των αποικιών με τα ίδια χαρακτηριστικά. Ο λόγος που επιλέχθηκαν τα τελευταία τρυβλία ήταν για να γίνει ένας τελικός απολογισμός της μικροβιακής κατάστασης των δειγμάτων. Η ανακαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό αιματούχο άγαρ TSA (Tryptone Soy Agar) με 5% Horse Blood. Για την καλλιέργεια αερόβιων βακτηρίων και την ταυτοποίηση των αιμολυτικών Gram (+) κόκκων η ανακαλλιέργεια επώασθη σε κλίβανο στους 37° C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών δημιουργήθηκε εναιώρημα 0,5 της κλίμακας Mac Farlan



α. Τρυβλίο από τις πρώτες ημέρες του πειράματος β. Τρυβλίο τελευταίων ημερών του πειράματος
Εικόνα 3α και β. Εντεροκόκκοι προερχόμενοι από το ίδιο δείγμα Σ₂ διαφορετικών δειγματοληπτικών ημερών

Από την *Εικόνα 3α και β* φαίνεται η διαφορά στην διάμετρο και το χρώμα τις πρώτες ημέρες του πειράματος και τις τελευταίες. Η εικόνα που παρουσιάζουν οι αποικίες στην εικόνα α. είναι ομογενής δείγμα του ότι έχουμε μονοκαλλιέργεια. Στην εικόνα β. που έχει ληφθεί κατά τις τελευταίες ημέρες της πειραματικής διαδικασίας, παρατηρείται μια ανομοιογένεια στην εμφάνιση των αποικιών. Αυτό ενδεχόμενα σημαίνει πως το δείγμα έχει υποστεί επιμόλυνση.

Τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης αποδεικνύουν ότι πρόκειται για τον ίδιο οργανισμό *Enterococcus faecium* και η διαφορά στη μορφολογία των αποικιών οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στις στρατηγικές επιβίωσης που ανέπτυξαν οι οργανισμοί για να ανταπεξέλθουν στις εχθρικές προς αυτούς συνθήκες.

Η ταυτοποίηση του εντεροκόκκου πραγματοποιήθηκε με αυτοποιημένο σύστημα Phoenix, Bekton-Dikenson (B-D) (*Πίνακας 8*).

Πίνακας 8. Συμπεριφορά του οργανισμού στα διάφορα βιοχημικά δοκιμαζόμενα αντιδραστήρια του αυτοματοποιημένου συστήματος Phoenix, Bekton-Dikenson (B-D).

Τύπος Τεστ: ID/AST Combo

Ονομασία Τεστ: PMIC/ID-53

Ονομασία Οργανισμού: *Enterococcus faecium*

Instrument ID Results

Confidence Value

Enterococcus faecium

99%

Biochemical	Instr	Expected	Biochemical	Instr	Expected	Biochemical	Instr	Expected
	Result	Result		Result	Result		Result	Result
		<u>1 2 3</u>			<u>1 2 3</u>			<u>1 2 3</u>
A_ARARR	-	±	A_GLPRB	-	-	A_LALT	+	±
A_LARGH	-	±	A_LHIST	-	-	A_LISO	-	-
A_LLEUH	-	-	A_LPHET	+	+	A_LPROB	-	-
A_LPYR	+	±	A_LTRY	+	+	A_META	+	-
C_3MGA	-	-	C_CLST	+	±	C_DFRU	+	±
C_DGUA	-	-	C_DMNT	-	-	C_IMN	-	-
C_KGA	-	-	C_MAA	-	-	C_PXB	+	±
C_THY	-	±	M_ADGLU	-	-	M_BDCEL	+	+
M_BDGAL	-	±	M_BDGLC	-	-	M_BDGLU	+	+
M_NAG	-	±	M_PHOS	-	-	M_PHOT	-	-
N_ALALH	-	-	N_LPROT	-	-	N_VAALA	-	-
P_ADGLU	-	-	P_PHOL	-	-	R_BGEN	-	-

2.1.4 Αντιβιογράμμα

Παράλληλα με την ταυτοποίηση του οργανισμού πραγματοποιήθηκε και αντιβιογράμμα (Πίνακας 9). Το στέλεχος του εντερόκοκκου απομονώθηκε από το περιβάλλον και παρουσίασε μεγάλη ευαισθησία σε όλα τα δοκιμαζόμενα αντιβιοτικά. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του αντιβιογράμματος.

Πίνακας 9 Αποτελέσματα αντιβιογράμματος αυτοματοποιημένου συστήματος Phoenix, Bekton-Dikenson (B-D).

Αποτελέσματα AST

Antimicrobial	MIC or Concentration	Interp	Expert SIR	Final SIR	Rule Number	Drug Test Group
Amoxicillin/Clavulanate	<=1/0.5					N
Ampicillin	<=0.25	S		S		A
Cefazolin	8					N
Cefoxitin	8					N
Chloramphenicol	4	S		S		C
Ciprofloxacin	<=0.5	S		S		U
Clindamycin	<=0.5					N
Erythromycin	<=0.25	S		S		C
Fosfomycin w/G6PD	64	S		S		U
Fusidic Acid	<=2					N
Gentamicin	<=2					N
Gentamicin-Syn	<=500	S		S		C
Levofloxacin	<=1	S		S		U
Linezolid	2	S		S		B
Mupirocin High level	<=256					N
Nitrofurantoin	64	I		I		U
Oxacillin	2					N
Quinupristin/dalfopristin	1	S	X	X	320	B
Streptomycin-Syn	<=1000	S		S		C
Teicoplanin	<=1	S		S		I
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	<=0.5/9.5					N
Vancomycin	<=1	S		S		B

2.3 Στατιστική Επεξεργασία

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό υπολογιστικό πρόγραμμα ηλεκτρονικού υπολογιστή S-Plus. Οι μεθοδολογία που εφαρμόστηκε ήταν παρόμοια με αυτή των Sinton *et.al.*, (1994), μετασχηματίζοντας τα αποτελέσματα σε λογαριθμική μορφή και εκτελώντας τη μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης. Οι συντελεστές προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

3 Αποτελέσματα

A. Μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων με το χρόνο.

Μετά το πέρας 16 ωρών από την πρώτη δειγματοληψία, με την πραγματοποίηση της δεύτερης δειγματοληψίας εμφανίστηκε μείωση στον αριθμό των καταμετρούμενων αποικιών εντερόκοκκου στους μικρόκοσμους. Ο αριθμός των αποικιών του βακτηρίου που εμβολιάσθηκαν στους μικρόκοσμους, ήταν της τάξεως μεγέθους 10^6 . Σε κάθε ακολουθούμενη δειγματοληψία στη διάρκεια του 31 ημερών πειράματος ο αριθμός των εντεροκόκκων κατά μέσο όρο μειώνονταν με μικρές αυξομειώσεις, ώσπου σε κάποια δείγματα εξαφανίστηκε ενώ σε κάποια καταμετρούνταν μόνο λίγες αποικίες.

Ο πληθυσμός των λυματικών βακτηρίων που καταλήγουν στο υδάτινο περιβάλλον μειώνεται σταθερά με το χρόνο. Ο χρόνος (T) που απαιτείται για την εξουδετέρωση του 90% του αρχικού πληθυσμού των βακτηρίων έχει οριστεί ως T_{90} (Μαυρίδου & Παπαπετροπούλου, 1995).

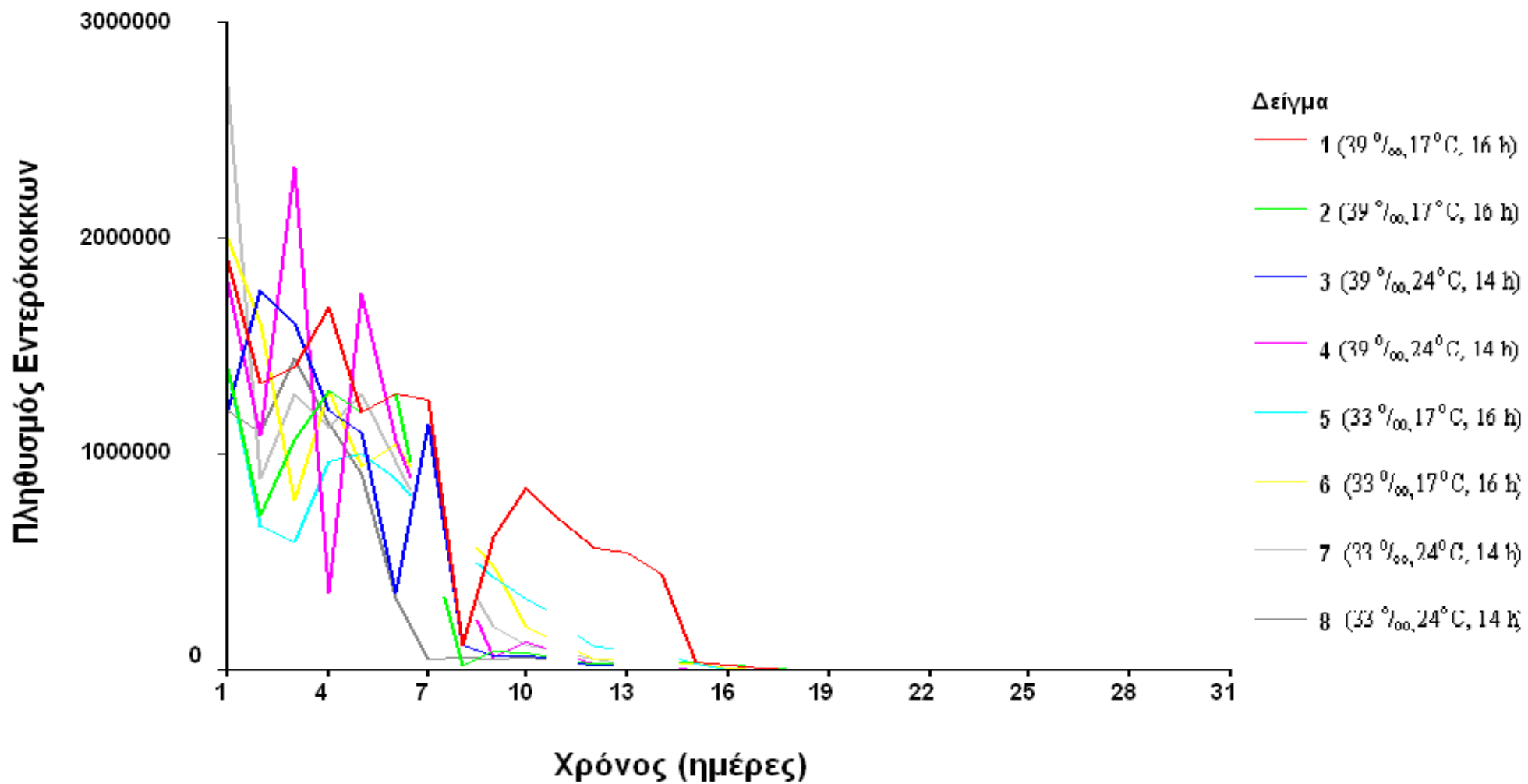
Θεωρήθηκε ότι ο πληθυσμός της πρώτης δειγματοληψίας ήταν το 100%. Στον Πίνακα 10 σημειώνεται η μεταβολή του αρχικού πληθυσμού με το χρόνο. Επίσης επισημαίνεται με έντονο χρώμα η ημέρα που οι οργανισμοί έχουν φτάσει περίπου στο 90% του αρχικού πληθυσμού.

Πίνακας 10 Ποσοστιαία μεταβολή του πληθυσμού εντεροκόκκου στα δείγματα. Με έντονους χαρακτήρες σημειώνεται το 10% του αρχικού πληθυσμού. ⁽¹⁾

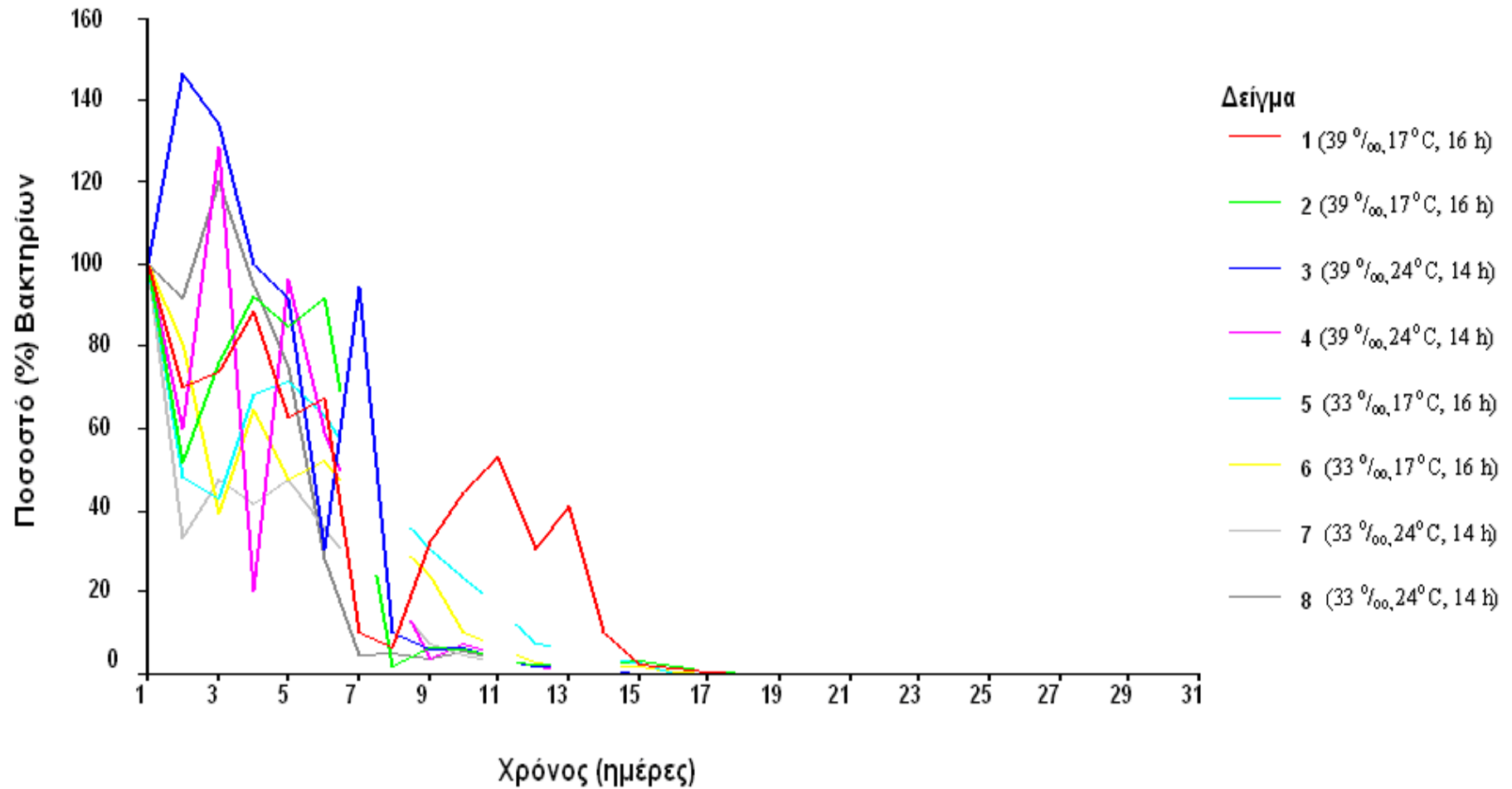
Ημέρα	Ποσοστό (%) βακτηρίων ανά ημέρα παρατήρησης							
	Συνθ. Β. Θάλασσας (Θ=17° C, P=16 h)				Συνθ. Μεσογείου (Θ=24° C, P=14 h)			
	S=39 ‰		S=33 ‰		S=39 ‰		S=33 ‰	
Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 5	Δείγμα 6	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 7	Δείγμα 8	
1	100	100	100	100	100	100	100	100
2	70	51,43	47,86	80,5	146,67	60	32,59	91,67
3	73,68	75,71	42,86	39	134,17	128,89	47,41	120
4	88,42	92,14	68,57	64,5	100	20	41,48	95
5	62,63	85	71,43	47	91,67	96,67	47,41	75
6	67,37	91,43	62,86	52	30	58,89	35,56	28,33
7					94,17			4,25
8	6,32	1,43			10			5
9	32,47	6,5	30,21	23,75	5,92	3,5	7,3	3,83
10	44,21	5,64	23,57	10	6,17	7,22	4,44	5,08
12	30	2	7,64	2,55	1,58	1,39	1,93	2,08
15	2,11	2,94	2,43	1,5	0,11	0,12	0,09	0,07
16	0,88	1,63	0,25	0,34	0,01	0,02	0,02	0,04
18	0,08	0,26	0,19	0,24	0	0	0	0,01
19	0,02	0,19	0,18	0,06	0	0	0	0
21	0,01	0,04	0,05	0,06	0	0	0	0
22	0,01	0,02	0,03	0,04	0	0	0	0
24	0	0,01	0,03	0,03				
26	0	0,01	0,01	0,01				
29	0	0	0	0				
31	0	0	0	0				

(1) Σε περίπτωση που δεν φαίνεται σε ποια μέτρηση έχουμε το 10%, σημειώνονται δυο τιμές όπου ενδιάμεσά τους βρίσκεται ο T₉₀

Γράφημα 1 Πληθυσμός εντερόκοκκων / ml στους μικρόκοσμους ανά ημέρα παρατήρησης



Γράφημα 2 Ποσοστό (%) βακτηρίων / ml στους μικρόκοσμους σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό ανά ημέρα παρατήρησης



A. Έλεγχος κοινής συμπεριφοράς για τα δείγματα ανά δύο.

Αρχικά ελέγχθηκε αν ο πληθυσμός ανά δύο δείγματα που εκτέθηκαν σε κοινές συνθήκες ακολουθούν κοινό ρυθμό μεταβολής. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο μετασχηματισμός \ln (λογάριθμο με βάση το e) για τον πληθυσμό κάθε δείγματος και προσαρμόστηκε μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης για τις παρατηρήσεις από την ημέρα 9 και μετά. Εξαιρέθηκαν οι παρατηρήσεις μέχρι την 8^η ημέρα, πρώτον διότι ο ρυθμός μεταβολής του \ln του πληθυσμού ομαλοποιούνται μετά από αυτό το χρονικό διάστημα και δεύτερον επειδή τα δείγματα διαφοροποιούνται από αυτό το χρονικό σημείο και έπειτα.

Οι μεταβλητές που συμπεριλήφθηκαν στο μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης είναι ο χρόνος (με χρόνο έναρξης την ημέρα 9), ο αριθμός του δείγματος (στην περίπτωση της σύγκρισης ανά δύο η μεταβλητή παίρνει τις τιμές 0 και 1, με το μηδέν να αντιστοιχεί στο πρώτο δείγμα κάθε ζεύγους) και η αλληλεπίδραση δείγματος με το χρόνο. Έτσι, ο λογάριθμος του πληθυσμού περιγράφεται από τη σχέση:

$$\begin{aligned} \ln(\text{πληθυσμού}) &= \alpha + [\beta \times (\text{χρόνος})] + [\gamma \times (\text{δείγμα})] + [\delta \times (\text{χρόνος}) \times (\text{δείγμα})] \\ \Rightarrow \text{Πληθυσμός} &= e^{\alpha + [\beta \times (\text{χρόνος})] + [\gamma \times (\text{δείγμα})] + [\delta \times (\text{χρόνος}) \times (\text{δείγμα})]} \end{aligned}$$

Για κάθε μοντέλο παρουσιάζεται ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 . Ο συντελεστής προσδιορισμού παίρνει τιμές από 0 μέχρι 1 και δείχνει το ποσοστό της μεταβλητότητας της εξαρτημένης μεταβλητής ($\ln(\text{πληθυσμού})$) από τις ανεξάρτητες μεταβλητές (χρόνος, δείγμα). Η στάθμη σημαντικότητας για όλα τα μοντέλα θεωρήθηκε το $\alpha=0.05$.

1. Συνθήκες Β. Θάλασσας

α) Δείγματα 1 και 2 ($S=39\%$, $\Theta=17^\circ C$, $P=16$ ώρες)

Στην περίπτωση των δειγμάτων 1 και 2 το γραμμικό μοντέλο έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 11. Όπως φαίνεται από τον πίνακα, τα δείγματα έχουν διαφορετική συμπεριφορά με το χρόνο, διότι ο παράγοντας της αλληλεπίδρασης δείγματος με χρόνο είναι στατιστικά σημαντικός ($p<0.001$).

Πίνακας 11 Μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης για τα δείγματα 1 και 2. $R^2= 0.951$

	Συντελεστής	Τυπικό Σφάλμα	T	p
Σταθερά	13.65	0.44	30.67	<0.001
Χρόνος	-0.62	0.04	-17.14	<0.001
Δείγμα	-1.82	0.63	-2.89	0.009
Δείγμα × Χρόνος	0.21	0.05	4.03	<0.001

Συγκριμένα, για το δείγμα 1 η εξίσωση δίνει:

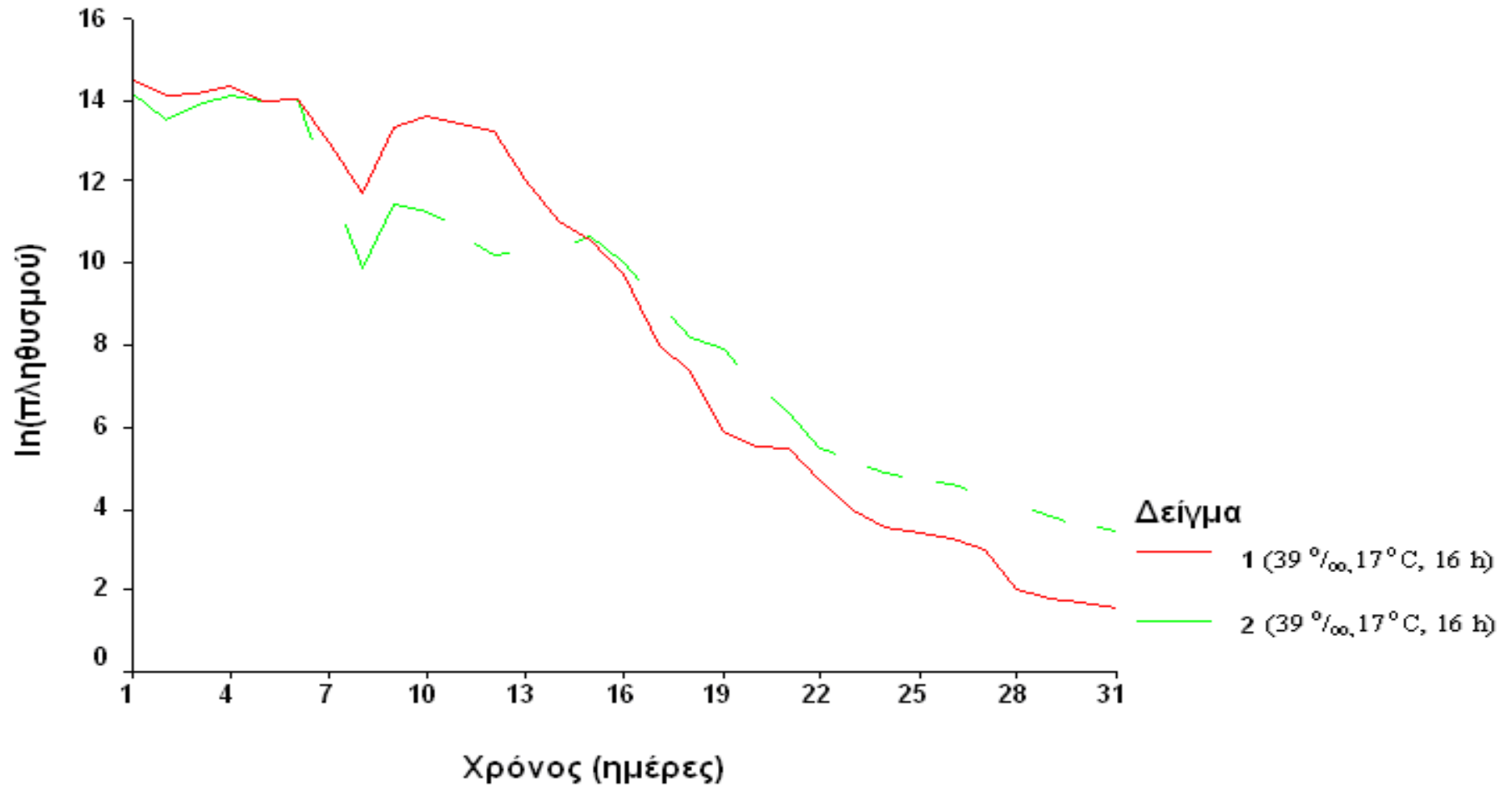
$$\begin{aligned} \text{Ln}(\text{πληθυσμού}) &= \alpha + [\beta \times (\text{χρόνος})] + [\gamma \times (\text{δείγμα})] + [\delta \times (\text{χρόνος}) \times (\text{δείγμα})] = \\ &= 13.65 - (0.62 \times \text{χρόνος}) - (1.82 \times 0) + (0.21 \times 0 \times \text{χρόνος}) = \\ &= 13.65 - (0.62 \times \text{χρόνος}) \end{aligned}$$

Ενώ για το δείγμα 2, έχουμε:

$$\begin{aligned} \text{Ln}(\text{πληθυσμού}) &= \alpha + [\beta \times (\text{χρόνος})] + [\gamma \times (\text{δείγμα})] + [\delta \times (\text{χρόνος}) \times (\text{δείγμα})] = \\ &= 13.65 - (0.62 \times \text{χρόνος}) - (1.82 \times 1) + (0.21 \times 1 \times \text{χρόνος}) = \\ &= 13.65 - (0.62 \times \text{χρόνος}) - 1.82 + (0.21 \times \text{χρόνος}) = \\ &= 11.83 - (0.41 \times \text{χρόνος}) \end{aligned}$$

Στην προκειμένη περίπτωση λοιπόν, δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι ο λογάριθμος του πληθυσμού (και κατά συνέπεια ο πληθυσμός) των δύο δειγμάτων μεταβάλλεται με τον ίδιο ρυθμό με την πάροδο του χρόνου. Ο λογάριθμος του πληθυσμού του δεύτερου δείγματος μειώνεται με σημαντικά μικρότερο ρυθμό, αφού η κλίση της γραμμής είναι -0.41 , έναντι -0.62 της γραμμής που περιγράφει το λογάριθμο του πληθυσμού του 1^{ου} δείγματος (Γράφημα 3). Αυτό μπορεί να οφείλεται και στο βάκιλο που εντοπίστηκε στο δείγμα 1 και να αλλοίωσε σημαντικά τα αποτελέσματα. Σε μια πειραματική διαδικασία είναι αναμενόμενα τα σφάλματα, για το λόγο αυτό από τον προγραμματισμό της συμπεριλήφθηκαν επιπλέον δείγματα για την ασφαλή έκβαση αποτελεσμάτων.

Γράφημα 3 Μεταβολή του λογαρίθμου του πληθυσμού των εντερόκοκκων στους μικρόκοσμους 1 και 2 με το χρόνο.



β) Δείγματα 5 και 6 ($S = 33\%$, $\Theta = 17^\circ C$, $P = 16$ ώρες)

Εφαρμόζοντας την ίδια μέθοδο για τα δείγματα 5 και 6 λαμβάνονται τα παρακάτω αποτελέσματα του Πίνακα 12.

Πίνακας 12 Μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης για τα δείγματα 5 και 6. $R^2 = 0.972$

	Συντελεστής	Τυπικό Σφάλμα	T	p
Σταθερά	12.61	0.30	41.50	<0.001
Χρόνος	-0.46	0.02	-18.73	<0.001
Δείγμα	1.19	0.43	0.43	0.668
Δείγμα × Χρόνος	- 0.03	0.03	-0.95	0.353

Ομοίως με την προηγούμενη περίπτωση, για τα δείγματα 5 και 6, η υπόθεση του κοινού ρυθμού μείωσης του πληθυσμού ισχύει. Ο παράγοντας της αλληλεπίδρασης του δείγματος με το χρόνο δεν είναι στατιστικά σημαντικός ($p = 0.353$).

Σύμφωνα με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης, οι σχέσεις του $\ln(\text{πληθυσμού})$ με το χρόνο, το δείγμα και την αλληλεπίδραση μεταξύ τους είναι οι παρακάτω:

Για το δείγμα (5):

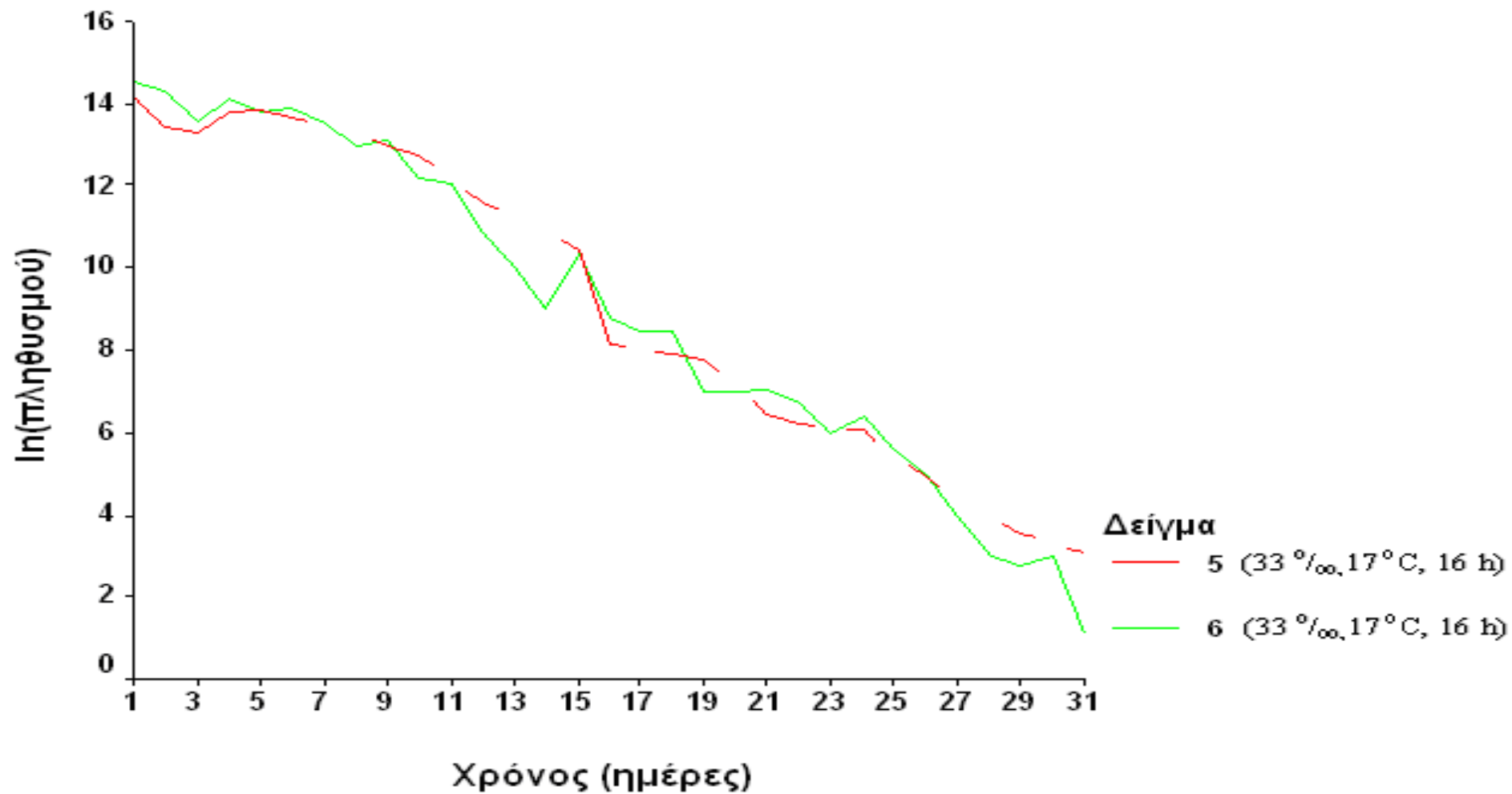
$$\begin{aligned} \ln_{(\text{πληθυσμού})} &= \alpha + [\beta \times (\text{χρόνος})] + [\gamma \times (\text{δείγμα})] + [\delta \times (\text{χρόνος}) \times (\text{δείγμα})] = \\ &= 12.61 - (0.46 \times \text{χρόνος}) + (1.19 \times 0) - (0.03 \times 0 \times \text{χρόνος}) = \\ &= 12.61 - (0.46 \times \text{χρόνος}) \end{aligned}$$

Και για το δείγμα (6):

$$\begin{aligned} \ln_{(\text{πληθυσμού})} &= \alpha + [\beta \times (\text{χρόνος})] + [\gamma \times (\text{δείγμα})] + [\delta \times (\text{χρόνος}) \times (\text{δείγμα})] = \\ &= 12.61 - (0.46 \times \text{χρόνος}) + (1.19 \times 1) - (0.03 \times 1 \times \text{χρόνος}) = \\ &= 13.80 - (0.43 \times \text{χρόνος}) \end{aligned}$$

Παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός μεταβολής του λογαρίθμου του πληθυσμού είναι πολύ παρόμοιος για τα δύο δείγματα (- 0.46 για το δείγμα 5 έναντι - 0.43 για το δείγμα 6) και η μικρή αυτή διαφορά που φαίνεται στις εξισώσεις δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Άρα φαίνεται ότι πράγματι τα δείγματα 5 και 6 έχουν κοινή συμπεριφορά με το χρόνο (Γράφημα 4).

Γράφημα 4 Μεταβολή του λογαρίθμου του πληθυσμού των εντερόκοκκων στους μικρόκοσμους 5 και 6 (συνθήκες B. Θάλασσας) με το χρόνο.



2. Συνθήκες Μεσογείου

α) Δείγματα 3 και 4 ($S = 39\text{‰}$, $\Theta = 24^\circ\text{C}$, $P = 14$ ώρες)

Για την περίπτωση των δειγμάτων 3 και 4 τα αποτελέσματα του γραμμικού μοντέλου αναγράφονται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13 Μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης για τα δείγματα 3 και 4. $R^2 = 0.965$

	Συντελεστής	Τυπικό Σφάλμα	T	p
Σταθερά	12.05	0.61	19.82	<0.001
Χρόνος	-0.96	0.09	-10.73	<0.001
Δείγμα	0.58	0.84	0.68	0.506
Δείγμα × Χρόνος	-0.07	0.12	-0.56	0.586

Για τα δείγματα 3 και 4, Η υπόθεση του κοινού ρυθμού μείωσης του πληθυσμού ισχύει. Ο παράγοντας της αλληλεπίδρασης του δείγματος με το χρόνο δεν είναι στατιστικά σημαντικός ($p = 0.586$).

Σύμφωνα με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης, οι σχέσεις του $\text{Ln}(\text{πληθυσμού})$ με το χρόνο, το δείγμα και την αλληλεπίδραση μεταξύ τους είναι οι παρακάτω:

Για το δείγμα (3):

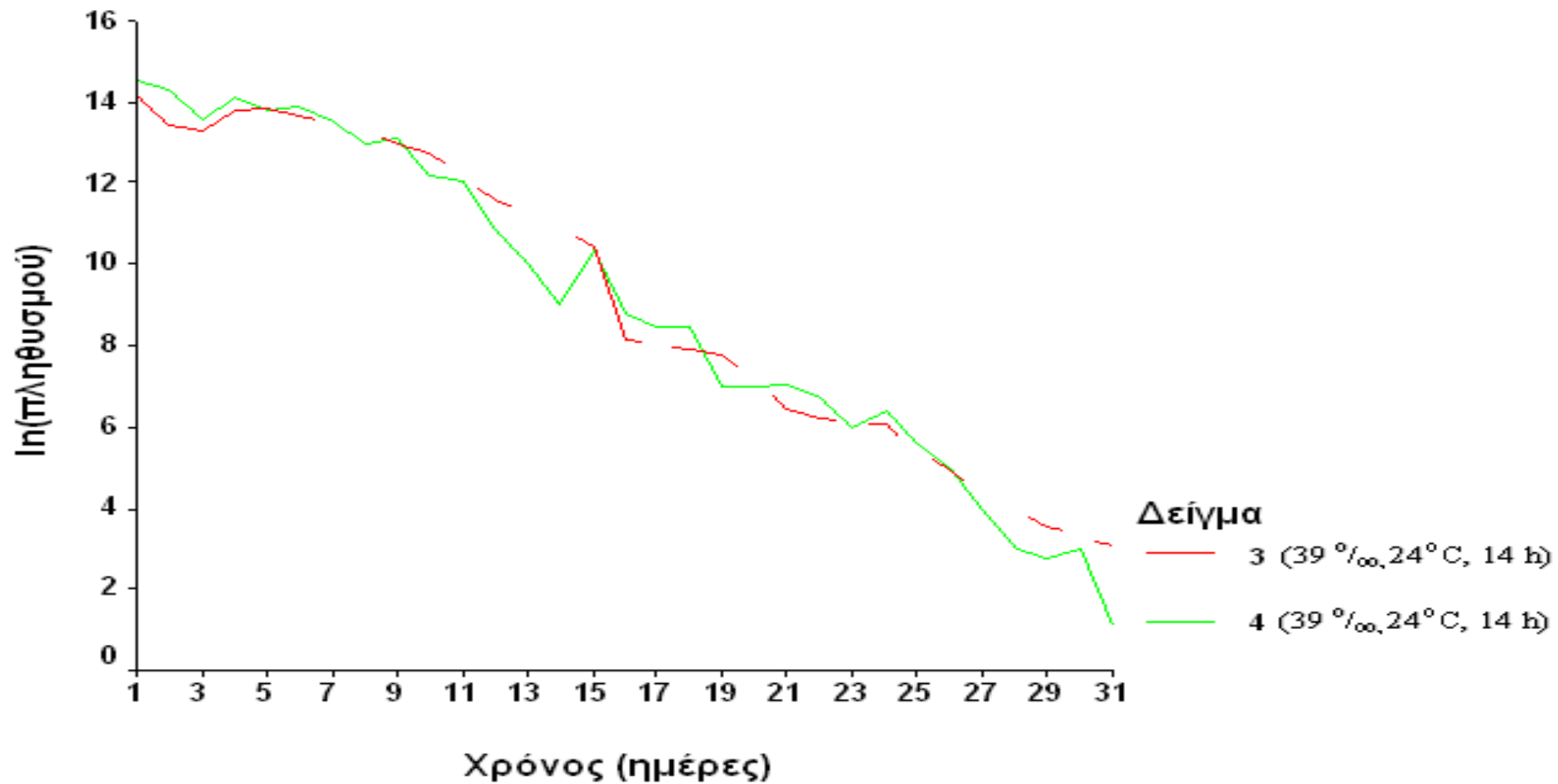
$$\begin{aligned}\text{Ln}_{(\text{πληθυσμού})} &= \alpha + [\beta \times (\text{χρόνος})] + [\gamma \times (\text{δείγμα})] + [\delta \times (\text{χρόνος}) \times (\text{δείγμα})] = \\ &= 12.05 - (0.96 \times \text{χρόνος}) + (0.58 \times 0) - (0.07 \times 0 \times \text{χρόνος}) = \\ &= 12.05 - (0.96 \times \text{χρόνος})\end{aligned}$$

Και για το δείγμα (4):

$$\begin{aligned}\text{Ln}_{(\text{πληθυσμού})} &= \alpha + [\beta \times (\text{χρόνος})] + [\gamma \times (\text{δείγμα})] + [\delta \times (\text{χρόνος}) \times (\text{δείγμα})] = \\ &= 12.05 - (0.96 \times \text{χρόνος}) + (0.58 \times 1) - (0.07 \times 1 \times \text{χρόνος}) = \\ &= 12.05 - (0.96 \times \text{χρόνος}) + 0.58 - (0.07 \times \text{χρόνος}) = \\ &= 12.63 - (1.03 \times \text{χρόνος}).\end{aligned}$$

Παρατηρείται ότι ο ρυθμός μεταβολής του λογαρίθμου του πληθυσμού είναι πολύ παρόμοιος για τα δείγματα και η μικρή αυτή διαφορά που φαίνεται στις εξισώσεις δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Αυτό σημαίνει πως στη συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε από τα δύο δείγματα (Γράφημα 5).

Γράφημα 5 Μεταβολή του λογαρίθμου του πληθυσμού των εντεροκοκκων στους μικροκοσμούς 3 και 4 (συνθήκες Αν. Μεσογείου) με το χρόνο.



β) Δείγματα 7 και 8 ($S = 33\%$, $\Theta = 24^\circ C$, $P = 14$ ώρες)

Το τελευταίο ζεύγος δειγμάτων που ελέγχθηκαν είναι τα δείγματα (7) και (8). Οι συντελεστές και η σημαντικότητά τους φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 14)

Πίνακας 14 Μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης για τα δείγματα 7 και 8. $R^2 = 0.962$

	Συντελεστής	Τυπικό Σφάλμα	T	p
Σταθερά	13.13	0.60	21.90	<0.001
Χρόνος	-1.03	0.07	-13.85	<0.001
Δείγμα	-0.96	0.85	-1.12	0.283
Δείγμα × Χρόνος	0.06	0.11	0.57	0.578

Όπως φαίνεται από τον πίνακα, η κλίση της γραμμής που περιγράφει το λογάριθμο του πληθυσμού δεν διαφέρει σημαντικά για τα δείγματα 7 και 8, αφού ο παράγοντας της αλληλεπίδρασης του δείγματος με το χρόνο δεν είναι στατιστικά σημαντικός ($p = 0.578$).

Σύμφωνα με το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης, οι σχέσεις του $\ln(\text{πληθυσμού})$ με το χρόνο, το δείγμα και την αλληλεπίδραση μεταξύ τους είναι οι παρακάτω:

Για το δείγμα (7):

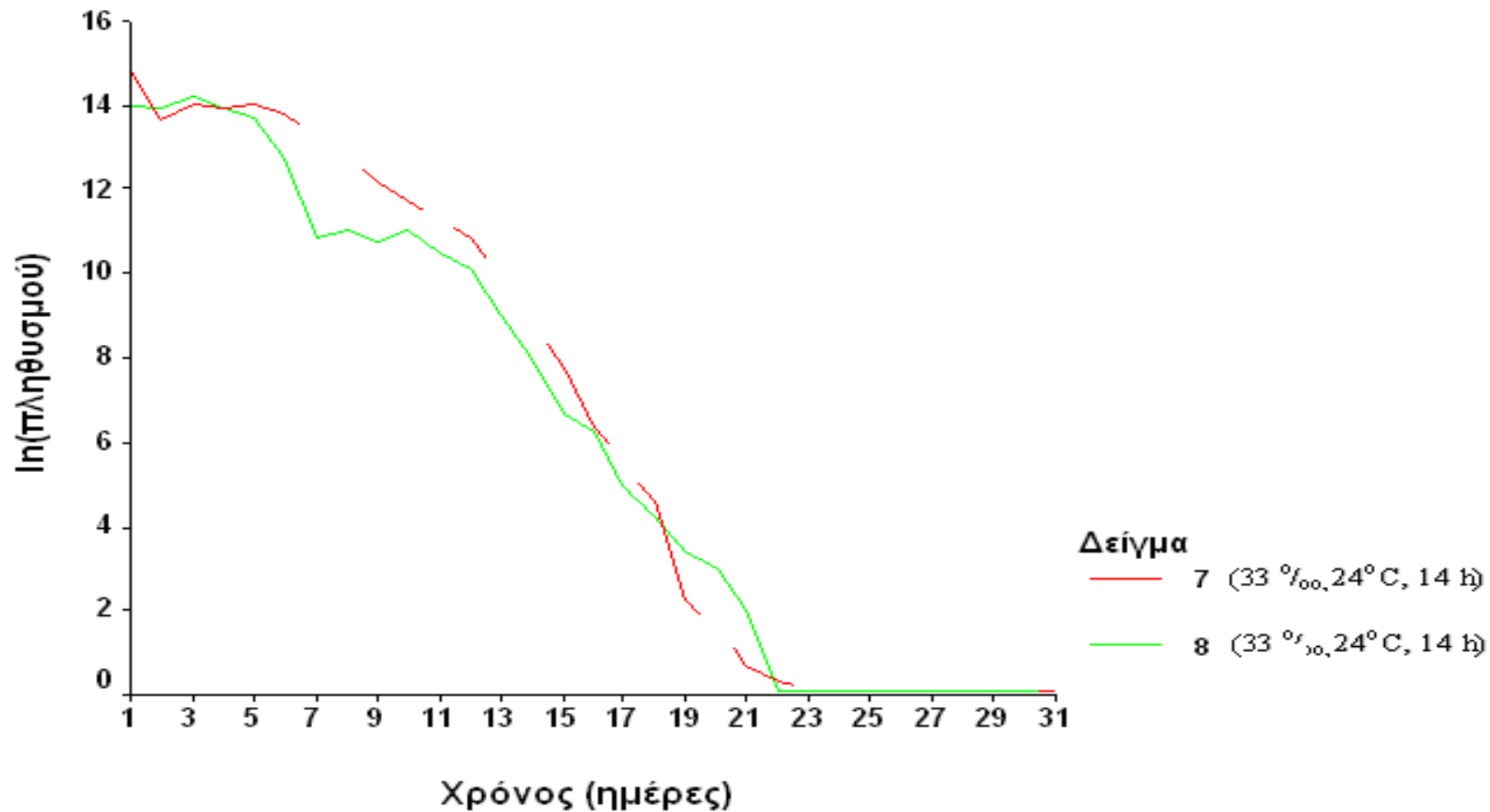
$$\begin{aligned} \ln(\text{πληθυσμού}) &= \alpha + [\beta \times (\text{χρόνος})] + [\gamma \times (\text{δείγμα})] + [\delta \times (\text{χρόνος}) \times (\text{δείγμα})] = \\ &= 13.13 - (1.03 \times \text{χρόνος}) - (0.96 \times 0) - (0.06 \times 0 \times \text{χρόνος}) = \\ &= 13.13 - (1.03 \times \text{χρόνος}) \end{aligned}$$

Και για το δείγμα (8):

$$\begin{aligned} \ln(\text{πληθυσμού}) &= \alpha + [\beta \times (\text{χρόνος})] + [\gamma \times (\text{δείγμα})] + [\delta \times (\text{χρόνος}) \times (\text{δείγμα})] = \\ &= 13.13 - (1.03 \times \text{χρόνος}) - (0.96 \times 1) - (0.06 \times 1 \times \text{χρόνος}) = \\ &= 12.17 - (1.09 \times \text{χρόνος}) \end{aligned}$$

Παρατηρούμε ότι ο ρυθμός μεταβολής του λογαρίθμου του πληθυσμού είναι πολύ παρόμοιος για τα δύο δείγματα και η μικρή αυτή διαφορά που φαίνεται στις εξισώσεις δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Συνεπώς, πράγματι τα δείγματα 7 και 8 έχουν κοινή συμπεριφορά με το χρόνο (Γράφημα 6).

Γράφημα 6 Μεταβολή του λογαρίθμου του πληθυσμού των εντερόκοκκων στους μικρόκοσμους 7 και 8 με το χρόνο.



B. Σύγκριση της επιβίωσης στις διαφορετικές συνθήκες αλατότητας, θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου.

Εφόσον στην προηγούμενη παράγραφο δείχθηκε ότι ο πληθυσμός των βακτηρίων στα δείγματα ανά ζεύγη έχουν κοινό ρυθμό μεταβολής, κρατιέται ένα δείγμα από κάθε ζεύγος και εφαρμόζεται ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης ώστε να διερευνηθεί ποιες συνθήκες προκαλούν διαφορά στο ρυθμό μεταβολής του πληθυσμού των βακτηρίων.

Τα δείγματα που επιλέχθηκαν να κρατηθούν για τη συνέχεια, είναι τα δείγματα 2 και 6 για τις θαλάσσιες περιβαλλοντικές συνθήκες Β. Θάλασσας, και τα δείγματα 4 και 8 για τις προσομοιασμένες περιβαλλοντικές συνθήκες της Α. Μεσογείου. Ως κατηγορία αναφοράς χρησιμοποιούμε το δείγμα 2.

Από τον πίνακα 15 φαίνεται ότι ο ρυθμός μεταβολής του πληθυσμού στα δείγματα 4 και 8, δηλαδή σε συνθήκες Α. Μεσογειακών νερών, διαφέρει σημαντικά συγκριτικά με το δείγμα 2 των συνθηκών Β. Θάλασσας ($p < 0.001$ και στις δύο περιπτώσεις), ενώ ο ρυθμός μεταβολής του πληθυσμού στο δείγμα 6 δε διαφέρει σημαντικά συγκριτικά με το δείγμα 2 ($p = 0.114$) και τα δυο συνθηκών Β. Θάλασσας με διαφορετικές αλατότητες.

Πίνακας 15 Μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης. Η κατηγορία αναφοράς είναι το δείγμα 2. $R^2 = 0.958$

	Συντελεστής	Τυπικό Σφάλμα	T	p
Σταθερά	11.83	0.44	26.82	<0.001
Χρόνος	-0.41	0.04	-11.54	<0.001
Δείγμα (4)	0.80	0.69	1.16	0.254
Δείγμα (6)	0.97	0.62	1.55	0.130
Δείγμα (8)	0.34	0.69	0.49	0.62
Δείγμα (4) × Χρόνος	-0.62	0.08	-8.11	<0.001
Δείγμα (6) × Χρόνος	-0.08	0.05	-1.62	0.114
Δείγμα (8) × Χρόνος	-0.55	0.08	-6.90	<0.001

Η εξίσωση που περιγράφει τη σχέση του λογαρίθμου του πληθυσμού ανάλογα με το δείγμα και το χρόνο είναι η παρακάτω:

$$\ln_{(\text{πληθυσμού})} = 11.83 - (0.41 \times \text{χρόνος}) + (0.80 \times \text{δείγμα 4}) + (0.97 \times \text{δείγμα 6}) + (0.34 \times \text{δείγμα 8}) - [0.62 \times (\text{χρόνος} \times \text{δείγμα 4})] - [0.08 \times (\text{χρόνος} \times \text{δείγμα 6})] - [0.55 \times (\text{χρόνος} \times \text{δείγμα 8})]$$

Για το δείγμα 4 έναντι του δείγματος 2, η σχέση γίνεται:

$$\begin{aligned} \ln_{(\text{πληθυσμού})} &= 11.83 - (0.41 \times \text{χρόνος}) + (0.80 \times 1) + (0.97 \times 0) + (0.34 \times 0) - [0.62 \times (\text{χρόνος} \times 1)] - [0.08 \times (\text{χρόνος} \times 0)] - [0.55 \times (\text{χρόνος} \times 0)] = \\ &= 12.63 - (1.03 \times \text{χρόνος}) \end{aligned}$$

Για το δείγμα 6 έναντι του δείγματος 2, η σχέση γίνεται:

$$\begin{aligned} \ln_{(\text{πληθυσμού})} &= 11.83 - (0.41 \times \text{χρόνος}) + (0.80 \times 0) + (0.97 \times 1) + (0.34 \times 0) - [0.62 \times (\text{χρόνος} \times 0)] - [0.08 \times (\text{χρόνος} \times 1)] - [0.55 \times (\text{χρόνος} \times 0)] = \\ &= 12.80 - (0.49 \times \text{χρόνος}) \end{aligned}$$

Τέλος, για το δείγμα 8 έναντι του δείγματος 2, η σχέση γίνεται:

$$\begin{aligned} \ln_{(\text{πληθυσμού})} &= 11.83 - 0.41 \times \text{χρόνος} + 0.80 \times 0 + 0.97 \times 0 + 0.34 \times 1 - [0.62 \times (\text{χρόνος} \times 0)] - [0.08 \times (\text{χρόνος} \times 0)] - [0.55 \times (\text{χρόνος} \times 1)] = \\ &= 12.17 - (0.96 \times \text{χρόνος}) \end{aligned}$$

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε το ίδιο μοντέλο (Πίνακας 16), χρησιμοποιώντας ως κατηγορία αναφοράς το δείγμα 8, των συνθηκών Α. Μεσογείου με αλατότητα $S = 33 \text{ ‰}$ για να διαπιστωθεί αν ο ρυθμός μεταβολής στο δείγμα 4 συνθηκών Α. Μεσογείου αλατότητας $S = 39 \text{ ‰}$ και δείγμα 6 συνθηκών Β. Θάλασσας αλατότητας $S = 33 \text{ ‰}$ διαφέρει σε σχέση με το ρυθμό μεταβολής στο δείγμα 8 (Γράφημα 7 και 8).

Όπως ήταν αναμενόμενο, η κλίση της γραμμής για τα δείγματα 2 και 8, αντιθέτων συνθηκών ακόμα και στην αλατότητα, διαφέρει (<0.001 , όπως στο προηγούμενο μοντέλο όπου συγκρίθηκε το δείγμα 8 με το δείγμα 2). Ο ρυθμός μεταβολής στο δείγμα 4 δε διαφέρει με το ρυθμό μεταβολής στο δείγμα 8 ($p=0.505$) και τα δυο συνθηκών Α. Μεσογείου. Αντίθετα, ο ρυθμός μεταβολής στο δείγμα 6 συνθηκών Β. Θάλασσας αλατότητας $S = 33 \text{ ‰}$ διαφέρει σημαντικά από το ρυθμό μεταβολής στο

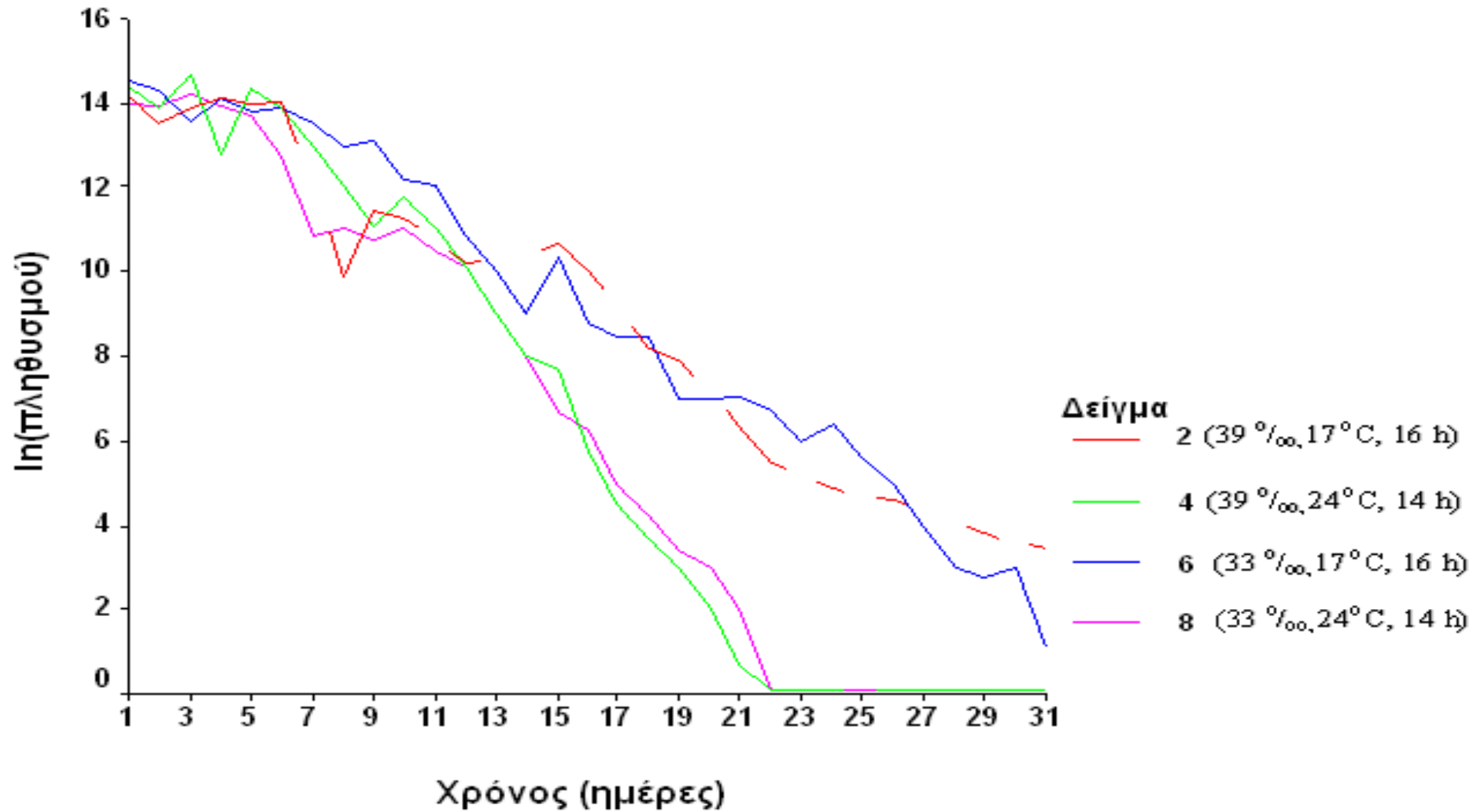
δείγμα 8 συνθηκών Α. Μεσογείου ίδιας αλατότητας $S = 33 ‰$ ($p < 0.001$) (Πίνακας 16).

Από τα προηγούμενα, φαίνεται ότι ο λογάριθμος του πληθυσμού στα δείγματα 2 και 6, μεταβάλλεται με τον ίδιο ρυθμό. Επίσης, ότι ο λογάριθμος του πληθυσμού των δειγμάτων 4 και 8 ακολουθεί τον ίδιο ρυθμό μεταβολής.

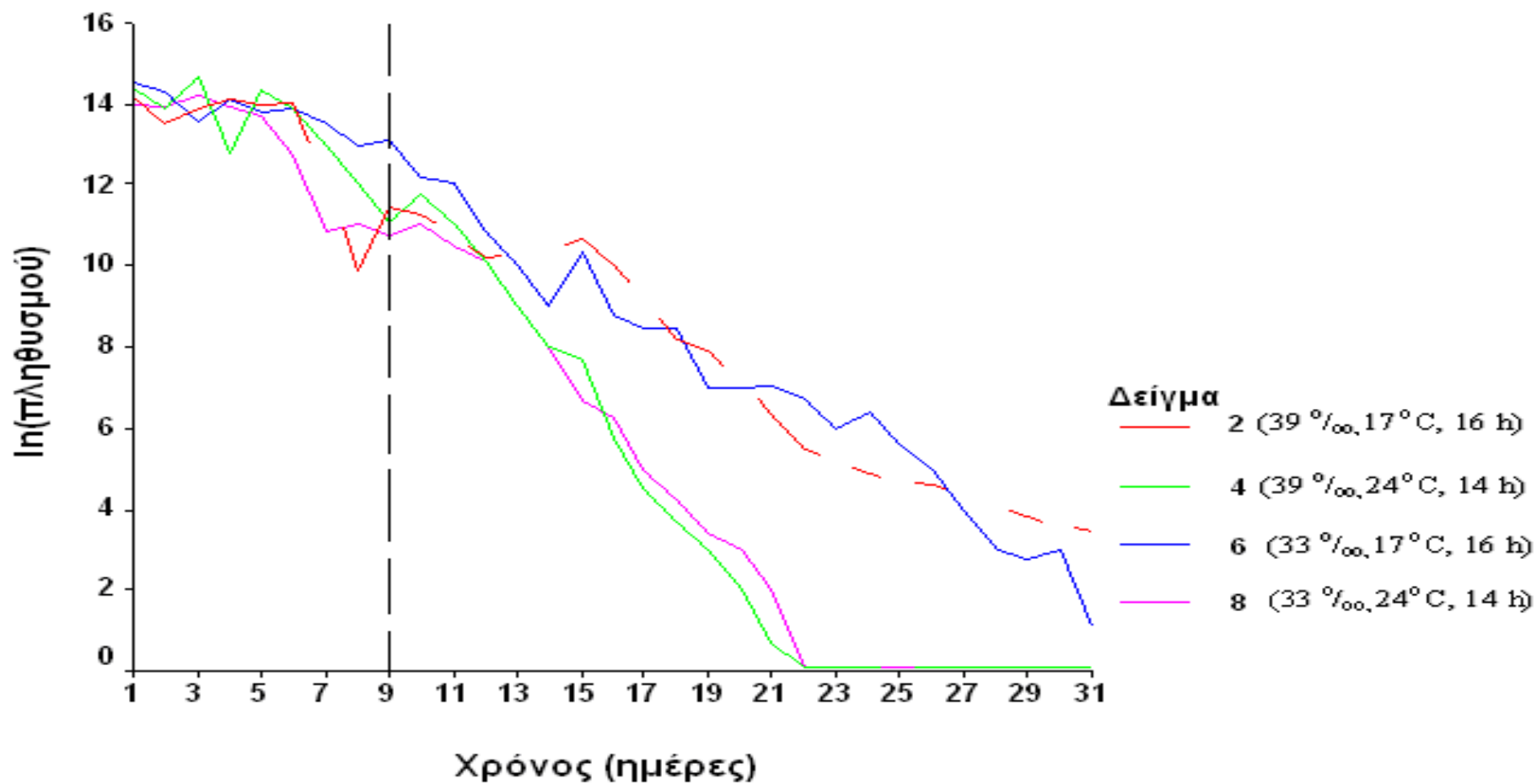
Πίνακας 16 Μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης. Η κατηγορία αναφοράς είναι το δείγμα 8. $R^2 = 0.958$

	Συντελεστής	Τυπικό Σφάλμα	T	p
Σταθερά	12.18	0.53	22.77	<0.001
Χρόνος	-0.96	0.07	-13.44	<0.001
Δείγμα (2)	-0.34	0.69	-0.49	0.624
Δείγμα (4)	0.45	0.75	0.60	0.548
Δείγμα (6)	0.62	0.69	0.90	0.37
Δείγμα (2) × Χρόνος	0.55	0.08	6.90	<0.001
Δείγμα (4) × Χρόνος	-0.07	0.10	-0.67	0.505
Δείγμα (6) × Χρόνος	0.47	0.08	5.87	<0.001

Γράφημα 7 Μεταβολή του λογαρίθμου του πληθυσμού των εντερόκοκκων στους μικρόκοσμους διαφορετικών συνθηκών με το χρόνο.



Γράφημα 8 Μεταβολή του λογαρίθμου του πληθυσμού των εντερόκοκκων στους μικρόκοσμους διαφορετικών συνθηκών με το χρόνο. Η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης εφαρμόστηκε από την ημέρα 9 και μετά (διακεκομμένη γραμμή)



4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι σε συνθήκες Ανατολικής Μεσογείου ($T=24^{\circ}\text{C}$, $P=14$ ώρες φωτοπερίοδο, $S=39\text{ ‰}$) η επιβίωση του εντερόκοκκου διήρκησε 20 ημέρες σε αντίθεση με τις συνθήκες Βορείου Θαλάσσης ($T=17^{\circ}\text{C}$, $P=16$ ώρες φωτοπερίοδο, $S=33\text{ ‰}$) όπου η επιβίωσή του ξεπέρασε τις 30 ημέρες.

Παρατηρήθηκε αισθητή διαφοροποίηση στους ρυθμούς μείωσης των βακτηρίων στους μικρόκοσμους από την ένατη ημέρα παρατήρησης. Αυτό άλλωστε υποστηρίζεται και από το γεγονός ότι περίπου αυτή την ημέρα εμφανίζουν τη τιμή T_{90} (χρόνος που χρειάζεται για να μειωθεί ο αρχικός πληθυσμός κατά 90%). Αυτό σημαίνει ότι ο πληθυσμός των εντερόκοκκων μειώνεται με τους ίδιους ρυθμούς αρχικά και όταν ο αρχικός πληθυσμός μειωθεί κατά 90 % οι περιβαλλοντικές συνθήκες επιταχύνουν την θανάτωση των εντερόκοκκων.

Κατά την πειραματική διαδικασία της παρούσης εργασίας, η μεγάλη διαφορά μεταξύ των θερμοκρασιών των δυο περιοχών που μελετήθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικός παράγοντας της επιβίωσης των εντερόκοκκων σε αντίθεση με τη φωτοπερίοδο που η δυο ώρες επιπλέον ηλιακής ακτινοβολίας στη Β. Θάλασσα δεν έδειξε να αποτελεί στατιστικά σημαντικό παράγοντα επιβίωσης. Η **θερμοκρασία** έδειξε να αποτελεί ένα βασικό παράγοντα όσο αφορά την επιβίωση των εντερόκοκκων στην παρούσα πειραματική διαδικασία σε σχέση με τη φωτοπερίοδο.

Παρατηρήθηκε ότι αυξανόμενης της τιμής της από τους 17°C στους 24°C ο χρόνος επιβίωσης μειώνεται, δηλαδή ο αριθμός των καταμετρημένων βακτηριδίων με το χρόνο ελαττώνεται. Αντιθέτως η διαφορά δύο ωρών στη φωτοπερίοδο δε επηρέασε τη διάρκεια επιβίωσης των εντερόκοκκων σε συνθήκες Βορείου Θαλάσσης, παρόλο που η θερμοκρασία ήταν χαμηλότερη.

Μια παρόμοια μελέτη διεξήγαγαν οι Lleó *et.al.*, (2005), οι οποίοι μελέτησαν τις στρατηγικές επιβίωσης διαφόρων ειδών κοπρανόδους προέλευσης εντεροκόκκων σε υδάτινα περιβάλλοντα. Παρατήρησαν ότι ανάλογα με το είδος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες οι κοπρανόδους προέλευσης εντερόκοκκοι αναπτύσσουν άμυνες και στρατηγικές επιβίωσης στα υδάτινα οικοσυστήματα. Εξετάστηκαν οι παράμετροι της θερμοκρασίας της αλατότητας και της φωτοπερίόδου στις διάφορες στρατηγικές επιβίωσης. Η στρατηγική της λιμοκτονίας και της κατάστασης VBNC

(viable but nonculturable), μετατρέπουν τη βιωσιμότητα και κατά αυτήν την έννοια μπορεί να υποτιμηθεί ή να μην ανιχνευθεί η πραγματική βακτηριακή φόρτιση των νερών, εκτός αν χρησιμοποιηθούν μοριακές μέθοδοι βασισμένες στην ανίχνευση με νουκλεϊκό οξύ. Παρατηρήθηκε ότι ο *E. faecalis* και *E. faecium* χρειάζονταν τον ίδιο χρόνο και στο θαλασσινό και στο γλυκό νερό για να φτάσουν στην VBNC κατάσταση. Τα υπόλοιπα 10 εξεταζόμενα είδη εντερόκοκκων έχαναν την ανακαλλιεργητική ικανότητα 10 μέρες νωρίτερα στο θαλασσινό νερό από ότι στο γλυκό.

Η διαφορετική **αλατότητα** μεταξύ των δυο περιοχών (33 ‰ και 39 ‰) δεν έδωσε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στην επιβίωση των εντερόκοκκων. Στο πείραμα όταν διατηρήθηκαν οι άλλοι δύο παράγοντες (θερμοκρασία και φωτοπερίοδος) σταθεροί και μεταβλήθηκε μόνο η αλατότητα, η επιβίωση δεν διαφοροποιήθηκε.

Το πειραματικό μέρος της διαδικασίας υπογραμμίζει τη σημαντική επίδραση που έχουν μόνο κάποιοι αβιοτικοί παράγοντες επάνω στην επιβίωση των εντεροκόκκων. Από το Γράφημα 7 εξάγεται εύκολα το συμπέρασμα πως η παράμετρος της αλατότητας δεν επιφέρει σημαντική διαφορά, σε τιμές μεταξύ 33 ‰ και 39 ‰, στις λογαριθμικές καμπύλες μείωσης των πληθυσμών των βακτηρίων. Έτσι τα δείγματα που βρίσκονταν σε συνθήκες Ανατολικής Μεσογείου (24° C θερμοκρασία και 14 h φωτοπερίοδος) παρουσίαζαν κοινή συμπεριφορά ανεξαρτήτως της τιμής της αλατότητας. Τα δείγματα που βρίσκονταν σε συνθήκες Β. Θάλασσας (17° C θερμοκρασία και 16 h φωτοπερίοδο) παρουσίαζαν κοινή συμπεριφορά μεταξύ τους ανεξαρτήτως της αλατότητας. Παράλληλα στα δείγματα αυτά παρατηρήθηκε διαφορετική συμπεριφορά από αυτήν των δειγμάτων της θάλασσας της Ανατολικής Μεσογείου (24° C θερμοκρασία και 14 ωρες φωτοπερίοδο) ακόμα και όταν η αλατότητα ήταν η ίδια.

Η διαφορά της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας έναντι των άλλων ερευνητικών διατριβών είναι στο εύρος των τιμών των αβιοτικών παραμέτρων. Από τη βιβλιογραφία για παρόμοιες ερευνητικές μετρήσεις των οποίων τα αποτελέσματα στηρίχθηκαν με δείγματα ελέγχου αναγνωρίζεται ότι αύξηση στην τιμή οποιουδήποτε περιβαλλοντικού παράγοντα από αυτούς της αλατότητας, της ηλιακής ακτινοβολίας και της θερμοκρασίας, επιδρά αρνητικά στην επιβίωση του εντεροκόκκου. Τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος έδειξαν ότι από τις προσομοιωμένες περιβαλλοντικές συνθήκες που εξετάστηκαν, η αλατότητα που

κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 33 και 39 ‰ δεν είναι στατιστικά σημαντικός παράγοντας επιβίωσης του πληθυσμού των εντερόκοκκων στα δείγματα. Αντιθέτως η επίδραση της θερμοκρασίας είναι στατιστικά σημαντικός παράγοντας για την επιβίωση του οργανισμού. Για την φωτοπερίοδο δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα καθώς η επίδραση της ακτινοβολίας για 2 ώρες επιπλέον καθημερινώς δεν αντισταθμίζει την επίδραση της θερμοκρασίας.

Σχετικά με την επίδραση της αλατότητας οι Davies και Evison (1991) συμπέραναν ότι η επίδραση της στα εντερικής προέλευσης βακτήρια δεν είναι σημαντική επίδραση για την επιβίωσή τους απουσία ηλιακής ακτινοβολίας. Για να καταλήξουν εκεί χρησιμοποίησαν θαλασσινό νερό καθώς και γλυκό νερό, δημιούργησαν μικρόκοσμους με βακτήρια εντερικής προέλευσης και παρατήρησαν τη συμπεριφορά τους παρουσία ή απουσία ακτινοβολίας του ηλίου

Για τον παράγοντα της **ηλιακής ακτινοβολίας**, αναμενόταν ανάλογα με την αύξηση του χρόνου επίδρασης της ακτινοβολίας στους μικρόκοσμους, αντίστοιχη αύξηση στο ρυθμό μείωσης των βακτηρίων. Αυτό δεν παρατηρήθηκε με τη διαφορά επίδρασης των δύο επιπλέον ωρών για τις συνθήκες της Β. Θάλασσας. Ενδεχομένως να επιβαλλόταν να εξεταστεί η επίδραση της ακτινοβολίας σε σχέση με τη θερμοκρασία διατηρώντας τη φωτοπερίοδο σταθερή και μεταβάλλοντας την τιμή της θερμοκρασίας και το αντίθετο κάτι το οποίο στο συγκεκριμένο πείραμα δεν πραγματοποιήθηκε. Παράλληλα για να υπήρχε η δυνατότητα ελέγχου της επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας και του μήκους κύματος στην επιβίωση, απαραίτητη προϋπόθεση θα αποτελούσε η χρήση φίλτρων μήκους κύματος. Έτσι θα εξαγόταν αποτελέσματα για διαφορετικά εύρη τιμών ηλιακής ακτινοβολίας και θα μπορούσε να καταλήξει το πείραμα αυτό σε σαφέστερα, συμπεράσματα. Στην παρούσα διατριβή αλλάζοντας την παράμετρο της θερμοκρασίας, αλλάζονταν ταυτόχρονα και η τιμή της φωτοπεριόδου. Επομένως δεν δύναται να διαπιστωθεί η ακριβής αλληλεπίδραση των δύο αυτών παραγόντων στα βακτήρια.

Οι Kay *et.al.*, (2005) πραγματοποίησαν ένα πείραμα ώστε να διαπιστώσουν την μείωση της συγκέντρωσης των εντεροβακτηρίων σε παράκτια περιβάλλοντα και εκβολικά συστήματα. Έλαβαν δείγματα από το Bristol Channel και τις εκβολές του Severn της Αγγλίας. Βασική παράμετρος του πειράματός τους απεδείχθει η ηλιακή ακτινοβολία σε συνδυασμό με την αλατότητα, την θολερότητα και τα αιωρούμενα στερεά. Χρησιμοποίησαν λαμπτήρες προσομοίωσης του ηλιακού φωτός και παρακολούθηθηκε ο χρόνος T_{90} στις διαφορετικές συνθήκες. Παρατήρησαν ότι η

ηλιακή ακτινοβολία αποτελεί στρεσογόνο παράγοντα κρίσιμης σημασίας για τα εντεροβακτήρια καθώς υπό συνθήκες πλήρους σκότους ο χρόνος T_{90} για τα υψηλής θολερότητας εκβολικά συστήματα έφτανε τις 65,1 ώρες. Ενώ παρατήρησαν ότι σε συνθήκες με ηλιακή ακτινοβολία για τα ίδια νερά ο χρόνος T_{90} έπεφτε στις 39,5 ώρες. Για τα παράκτια ύδατα χαμηλότερης θολερότητας και αυξημένης αλατότητας ο χρόνος T_{90} σε συνθήκες πλήρους σκότους άγγιζε τις 24,8 ώρες ενώ υπό συνθήκες επίδρασης της ηλιακής ακτινοβολίας δεν ξεπερνούσε τις 6,6 ώρες.

Οι Sinton *et al.*, (2002) πραγματοποίησαν πειράματα επιβίωσης ολικών κολοβακτηριδίων, εντερόκοκκων, *E. coli* και άλλων βακτηρίων, προερχόμενα από βιολογικό καθαρισμό αποβλήτων όταν αυτά εκτεθούν στην ηλιακή ακτινοβολία, και στην επίδραση της αλατότητας. Υπογράμμισαν ότι ο ρυθμός μείωσης των βακτηρίων ήταν 10 φορές ταχύτερος υπό την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου, που βρίσκονταν σε συνθήκες σκότους. Επίσης διαπιστώθηκε ότι η θανατηφόρος επίδραση του ηλιακού φωτός αυξάνεται με την αύξηση της αλατότητας. Το χειμώνα ο ρυθμός αδρανοποίησης των ολικών κολοβακτηρίων και των εντεροκόκκων ήταν παρόμοιος σε αντίθεση με το καλοκαίρι που οι εντερόκοκκοι αδρανοποιούνται πολύ πιο γρήγορα.

Τα πειραματικά ευρήματα οδηγούν στο συμπέρασμα πως η Ενιαία Ευρωπαϊκή πολιτική σε ότι αφορά στην καταμέτρηση των εντεροκόκκων στα ύδατα κολύμβησης ως δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης, ενδεχομένως να μην είναι ικανοποιητική. Σε εργαστηριακά περιβάλλοντα αποδείχθηκε πως η επιβίωση των μικροοργανισμών σε συνθήκες όπως αυτές της Β. θάλασσας και της Μεσογείου δεν παρουσιάζει την ίδια συμπεριφορά. Σε συνθήκες Βορείου Θάλασσας είναι πιθανό να απαιτείται αυστηρότερη νομοθεσία όσον αφορά στις πηγές φόρτισης των παράκτιων περιοχών με κοπρανώδους προέλευσης απόβλητα ώστε να προασπισθεί η υγεία των λουομένων. Αντίθετα στις εύκρατες περιοχές της Μεσογείου οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν ευνοούν την μακρόχρονη επιβίωση του εντεροκόκκου και την ταχύτερη απαλλαγή των παρακτίων υδάτων από τους παθογόνους μικροοργανισμούς.

5 Βιβλιογραφία

5.1 Διεθνής:

1. Abbott S., B. Caughley, G. Scott, (1998), «Evaluation of Enterolert for the enumeration of enterococci in the marine environment», *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, Vol. 32: 505-513
2. Alkan U., Eliot D.J., Evison L.M., (1994), «Survival of enteric bacteria in relation to simulated solar radiation and other environmental factors in marine waters», *Water Research*, 29 (12) 1861-1876
3. Anderson I.C., Rhodes M.W., Kator H.I., (1983), «Seasonal variation in survival of Escherichia coli exposed in situ in membrane diffusion chambers containing filtered and nonfiltered estuarine waters». *Applied Environmental Microbiology*. 45 (6) 1877-1883.
4. Anderson I.C., Rhodes M.W., Kator H.I., (1979), «Sublethal stress in Escherichia coli in seawater: a function of salinity», *Applied Environmental Microbiology*, 38, 1147-1152
5. Benedict T.R., Neumann M.C., (2004), «Assessing Oregon's twenty-six coastal beach areas for recreational water quality standards», *Marine Pollution Bulletin* 49, 624-629
6. Boehm A.B., D.P. Keymer, G.G. Shellenbarger, (2005), «An analytical model of enterococci inactivation, grazing, and transport in the surf zone of a marine beach», *Water Research* 39, 3565-3578
7. Boehm A.B., S.B. Grant, J.H. Kim, S.L. Mowbray, C.D. McGee, C.D. Clark, D.M. Foley, D.E. Wellman, (2002), «Decadal and shorter period variability of surf zone water quality at Huntington beach, California», *Environmental Science and Technology*, Vol.36, No 18, 3885-3892
8. Boehm A.B., B.F. Sanders, C.D. Winant, (2002) «Cross-Shelf transport at Huntington beach. Implications for the fate of sewage discharged through an offshore ocean outfall» *Environmental Science and Technology*, Vol.36, 1899-1906
9. Bonnefont J.L., Martin Y.P., Guiennet B., (1990) «Experimental studies on the survival of fecal bacteria from urban sewage in sea water», *Water Research*, 24 (3) 287-273.
10. Burkhardt W., Calci K.R., (2000), «Inactivation of indicator microorganisms in estuarine waters», *Water Research* Vol. 34, No 8, 2207-2214

11. Carrillo M., Estrada E., Hazen T.C., (1985), «Survival and enumeration of Faecal Indicators Bifidobacterium adolescentis and Escherichia coli in a tropical rain forest watershed», *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (2), 468-476
12. Davies, C.M., Evison L.M., (1991), «Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters» *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 70, Issue 3, 265-274
13. Donna S., Francy A., R.and A.Darner, (1998) « Factors affecting Escherichia coli concentration at Lake Erie Public Bathing Beaches» *Water Resources Investigation, Report 98-4241*
14. EC (European Commission), (1976), «Council Directive of 8 December 1975 concerning the quality of bathing waters (76/160/EEC) », *Official Journal of the European Communities L31, 1-4*
15. EC (European Commission), (1994), «Proposal for a Council Directive concerning the quality of bathing water, Document COM (94) 36 final», *Commission of the European Communities, Brussels.*
16. EU (European Union), (2002), «Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council concerning the quality of bathing water», *Document 2002/0254, European Union, Brussels.*
17. EU (European Union), (2006), «Οδηγία του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 15^{ης} Φεβρουαρίου του 2006 σχετικά με τη διαχείριση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης και την κατάργηση της οδηγίας 76/160/ΕΚ», *Επίσημη εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, L64, 37-51*
18. Efstratiou, M.A., (2001), «Managing Coastal Bathing Water Quality: The contribution of Microbiology and Epidemiology», *Marine Pollution Bulletin*, 42 (6) 424-431
19. Ferguson D.M., D.F. Moore, M.A. Getrich, M.H. Zhouwandai, (2005), «Enumeration and Specification of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California», *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 99, 598-608
20. Garcia-Lara J., Martinez J., Vilamn M., Vives-Rego J., (1993), «Effect of previous growth condition on the starvation-survival of Escherichia coli in seawater», *Journal of General Microbiology*, 139 (7), 1425-1431.
21. Genthner F. J., J. B. James, D. F. Yates, S. D. Friedman, (2005), «Use of composite data sets for source-tracking enterococci in the water column and shoreline interstitial waters on Pensacola Beach, Florida», *Marine Pollution Bulletin* 50, 724–732

22. Gerba P.C., (2000), «Assessment of Enteric Pathogen Shedding by Bathers during Recreational Activity and its Impact on Water Quality», *Quantitative Microbiology* 2, 55-68
23. GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection) and Advisory Committee on Protection of the Sea. (2001), «Protecting the oceans from land-based activities - Land-based sources and activities affecting the quality and uses of the marine, coastal and associated freshwater environment». *Rep. Stud. GESAMP No. 71*, 162
24. Hancock E.L. and Gilmore S.M., (1998), «Pathogenicity of Enterococci», *Department of Microbiology and Immunology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Gram-Positive Pathogens, ASM Publications*
25. Harvey H.W., (1955), «The chemistry and fertility of sea waters», *Cambridge University Press, London*
26. Henrickson S.E., Wong T., Allen P., Ford T., Epstein P.R., (2001), «Marine swimming-related illness: implication for monitoring and environmental policy», *Environmental Health Perspectives*, 109 (7)
27. Henry E., Droser T., (2001) «Ecology proposes changes to the state's bacterial standards», *Puget Sound*
28. Hughes K.A., (2003), «Influence of Seasonal Environmental Variables on the Distribution of Presumptive Fecal Coliforms around an Antarctic Research Station» *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No 8, 4884–4891
29. Johnson D. C., C. E. Enriquez, I. L. Pepper, T. L. Davis, C. P. Gerba, J. B. Rose, (1997), «Survival of giardia, cryptosporidium, poliovirus and salmonella in marine waters», *Water Science and Technology*, Vol 35 No 11-12, 261–268
30. Kapuscinski R.B. and R. Mitchell, (1981), «Solar radiation induces sublethal injury in *Escherichia coli* in seawater», *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 41, No 8, 670–674
31. Kay D., M. D. Wyera, J. Crowther, J. Wilkinson, C. Stapleton, P. Glass, (2005), «Sustainable reduction in the flux of microbial compliance parameters from urban and arable land use to coastal bathing waters by a wetland ecosystem produced by a marine flood defence structure», *Water Research* 39, 3320–3332
32. Kay D., C. M. Stapleton, M.D. Wyer, A. T. McDonald, J. Crowther, N. Paul, K. Jones, C. Francis, J. Watkins, J. Wilkinson, N. Humphrey, B. Lin, L. Yang, R. A. Falconer, S. Gardner, (2004), «Decay of intestinal enterococci concentrations in high-energy estuarine and coastal waters: towards real-time T₉₀ values for modeling fecal indicators in recreational waters», *Water Research* 39, 655-667.

33. Lleo H., Bonato B., Benedetti D., Conepari P., (2005), «Survival of enterococcal species in aquatic environments», *Fems Microbiology Ecology*, 54 (2), 189-196.
34. Mezrioui N., B. Baleux and M. Troussellier, (1995), «A microcosm study of the survival of Escherichia coli and Salmonella typhimurium in brackish water» *Water Research Vol. 29, No. 2, 159—465*
35. Reynolds K.A., (2003), «Coliform Bacteria: A Failed Indicator of Water Quality?», *Water Conditioning and Purification Magazine, Volume 45, No. 9*
36. Rozen Y. & Belkin S., (2001), «Survival of enteric Bacteria in seawater», *FEMS Microbiology Reviews 25, 513-529*
37. Sinton L.W., Hall C.H., Lynch P.A., Davies-Colley R.J., (2002), « Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters», *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (3), 1122-1131.
38. Sinton L.W., R. K. Finlay, P.A. Lynch, (1999), «Sunlight Inactivation of Fecal Bacteriophages and Bacteria in Sewage-Polluted Seawater», *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 8, 3605-3613
39. Sinton L.W., R.J. Davies-Colley, R.G. Bell, (1994), «Inactivation of Enterococci and Fecal Coliforms from Sewage and Meatworks Effluents in Seawater Chambers» *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 60, No. 6, 2040-2048
40. Sinton L.W., A.M. Donnison, (1994), «Characterization of fecal streptococci from some New Zealand effluents and receiving waters», *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, Vol. 28, 145-158
41. Slanetz L.W., Bartley C.H. (1957), «Number of enterococci in water, sewage and faeces determined with an improved medium». *Journal of bacteriology*, 74, 591-595.
42. Smith J.J., Howington J.P., McFeters G.A., (1994), « Survival physiological response and recovery of enteric bacteria exposed to a polar marine environment», *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (8) , 2977- 2984
43. Solic M. and N. Krstulovic, (1992), «Separate and Combined Effects of Solar Radiation, Temperature, Salinity, and pH on the Survival of Faecal Coliforms in Seawater», *Marine Pollution Bulletin*, Vol 24, No 8, 411-416
44. Solo-Gabriele H.M., M.A. Wolfert, T.R. Desmarais, C.J. Palmer, (2000), «Sources of Escherichia coli in a Coastal Subtropical Environment», *Applied and Environmental Microbiology*, p. 230-237, Vol. 66, No. 1
45. Troussellier M., J.L. Bonnefont, C. Courties, A. Derrien, E. Dupray, M. Gauthier, M. Gourmelon, F. Joux, P. Lebaron, Y. Martin, M. Pommepuy,

- (1998), «Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater»
OCEANOLOGICA ACTA, VOL. 21, N° 6, 965-981
46. Tubow D.J., Osgood D.N., Jiang C.S., (2003) «Evaluation of recreational health risk in coastal waters based on Enterococcus densities and bathing patterns», *Environmental Health Perspect*, 111: 598-603
47. Turley C.M., (1999), «The changing Mediterranean Sea- a sensitive ecosystem», *Pergamon, Progress in Oceanography* 44, 387-400
48. UNEP (United Nations Environment Programme), (1975), «Report of the Intergovernmental Meeting on the Protection of the Mediterranean, Barcelona, 28 January – 4 February 1975», *Document UNEP/WG.2/5, United Nations Environment Programme, Geneva*
49. UNEP (United Nations Environment Programme), (1978), «Mediterranean Action Plan and the Final Act of the Conference of Plenipotentiaries of the Coastal States of the Mediterranean Region for the Protection of the Mediterranean Sea», *United Nations, New York*
50. UNEP (United Nations Environment Programme), (1980), «Conference of Plenipotentiaries of the Coastal States of Mediterranean Region for the Protection of the Mediterranean Sea against Pollution from Land-based Sources», *May 1980, Final Act and Protocol, United Nations, New York*
51. UNEP (United Nations Environment Programme), (1981), «Report of the Second Meeting of the Contracting Parties to the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against Pollution and its related Protocols, Cannes», 2 – 7 March 1981, *Document UNEP/IG.23/11, United Nations Environment Programme, Geneva*
52. UNEP (United Nations Environment Programme), (1983), «Long-term Programme of Pollution Monitoring and Research in the Mediterranean, UNEP Regional Seas Reports and Studies» No. 28, *United Nations Environment Programme, Geneva*
53. UNEP (United Nations Environment Programme), (1985), «Report of the Fourth Ordinary Meeting of the Contracting Parties to the Convention for the protection of the Mediterranean Sea against Pollution and its related protocols, Genoa», 9 – 13 September 1985, *Document UNEP/IG.56/5, United Nations Environment Programme, Athens*
54. UNEP (United Nations Environment Programme), (1996a), «Proposals for MED POL-related activities», *Document UNEP(OCA)/MED WG.104/3, United Nations Environment Programme, Athens*
55. UNEP (United Nations Environment Programme), (1996b), «Report of the Contracting Parties to the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against Pollution and its Protocols, Montpellier», 1 – 4 July 1996,

Document UNEP(OCA)/MED IG.8/7, United Nations Environment Programme, Athens

56. UNEP/MAP (United Nations Environment Programme/Mediterranean Action Plan), (2001), «Protecting the Mediterranean from land-based pollution», *Athens*
57. UNEP/WHO (United Nations Environment Programme/World Health Organization), (1985), «Assessment of the present state of microbial pollution in the Mediterranean Sea and proposed control measures», *Document UNEP/WG.118/6, United Nations Environment Programme, Athens*
58. UNEP/WHO (United Nations Environment Programme/World Health Organization), (1991), «Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by pathogenic microorganisms», *Document UNEP(OCA)/MED WG.25/Inf.7, United Nations Environment Programme, Athens*
59. UNEP/WHO (United Nations Environment Programme/World Health Organization), (1996), «Assessment of the state of microbiological pollution of the Mediterranean Sea», *Document UNEP(OCA)/MED WG.104/Inf.9, United Nations Environment Programme, Athens*
60. Vasconcelos G.J., Swartz R.G., (1976), «Survival of bacteria in seawater using a diffusion chamber apparatus in situ », *Applied Environmental Microbiology, Vol.31, 913-920*
61. Wait D.A. and Sobsey M.D., (2001), «Comperative survival of enteric viruses and bacteria in Atlantic Ocean seawater», *Water Science and Technology, Vol 43, No 12, 139-142*
62. Walday M. and T. Kroglund, (2001), «The North Sea- bottom trawling and oil/gas exploitation», *European Environment Agency, Norwegian Institute for Water Research (NIVA)*
63. Wheeler E., J. Burke, A. Spain, (2003), «Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches», *Water Research 37, 3978–3982*
64. Whitlock J. E., D. T. Jones, V. J. Harwood, (2002), «Identification of the sources of fecal coliforms in an urban watershed using antibiotic resistance analysis», *Water Research 36, 4273–4282*
65. Whitman L.R., Nevers M.B., Korinek G.C., Byappanahalli M.N., (2004), «Solar and temporal effects on Escherichia coli concentration at a lake Michigan Swimming Beach», *Applied & Environmental Microbiology, 70 (7) 4276-4285*
66. WHO (World Health Organization), (1975), «Guides and criteria for recreational quality of beaches and coastal waters», *Report on a working*

group, Bilthoven, 28 October – 1 November 1974, Document EURO 3125 (1), WHO Regional Office for Europe, Copenhagen

67. WHO (World Health Organization), (1997), «Health impacts of recreational water and bathing beach quality», *Report of a WHO expert consultation, Bad Elster, Germany, 20-22 June 1996, Document EUR/ICP/EHRM 07 02 02, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen*
68. WHO (World Health Organization), (1998), «Guidelines for safe recreational water environments». *Coastal and Freshwater, vol. 1. Consultation draft, WHO/EOS/Draft/98.14. Geneva: World Health Organization, p. 124*
69. WHO (World Health Organization), (1999), «Health-based monitoring of recreational waters: the feasibility of a new approach (the "Annapolis Protocol")», *WHO/SDE/WSH/99.1. Geneva: World Health Organization, p. 50*
70. WHO (World Health Organization), (2003), «Guidelines for safe recreational – water environments» *Coastal and fresh – waters, World Health Organization, : Vol. 1 Geneva*
71. WHO/UNEP (World Health Organization/United Nations Environment Programme), (1977), «Health Criteria and Epidemiological studies relating to coastal water pollution» *Report of a Group of Experts jointly convened by WHO and UNEP, Athens, 1 – 4 March 1977, Document ICP/RCE 206 (5), WHO Regional Office for Europe, Copenhagen*
72. WHO/UNEP (World Health Organization/United Nations Environment Programme), (1980), «Third report on coastal quality monitoring of recreational and shellfish area (MED VII) », *Report of a meeting of principal investigators jointly convened by WHO and UNEP, Rome, 20 – 23 November 1979, Document ICP/RCE 206 (10), WHO regional Office for Europe, Copenhagen*
73. WHO/UNEP (World Health Organization/United Nations Environment Programme), (1994), «Microbiological quality of coastal recreational waters», *Report of a joint WHO/UNEP meeting, Athens, Greece, 9 – 12 June 1993, Document EUR/ICP/CEH 039 (1), WHO Regional Office for Europe, Copenhagen*
74. WHO/UNEP (World Health Organization/United Nations Environment Programme), (1995), «Health risks from marine pollution in the Mediterranean, Part II: Review of hazards and health risks», *Document EUR/ICP/EHAZ.94.01/MT01 (2), WHO Regional Office for Europe, Copenhagen*
75. Wyer M. D., D. Kay, J. M. Fleisher, R. L. Salmon, F. Jones, A. F. Godfree, G. Jackson and A. Rogers, (1999), «An experimental health-related classification for marine waters» *Water Research Vol. 33, No. 3, 715 – 722*

76. Zenetos A., I. Siokou-Frangou, O. Gotsis-Skretas, S. Groom, (2001), «The Mediterranean Sea- blue oxygen-rich, nutrient-poor waters» *European Environment Agency, National Centre for Marine Research, Greece (NCMR)*

5.2 Ελληνική:

1. Αρσένη Α., (2000), «Κλινική μικροβιολογία και εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων», *Εκδόσεις ΖΗΤΑ*
2. Βούλγαρης Μ., (2000), «Υδρευση και θέρμανση πόσιμου νερού, αποχετεύσεις και εγκαταστάσεις υγιεινής», *Verlag Europa Lehrmittel Nourney, Vollmer GmbH & Co.*
3. Μαλεφάκης Ι., (1998),), «Ποιότητα επιφανειακών και υπογείων νερών», *Εκδόσεις Γρ. Λαμπράκη.*
4. Παπαϊωάννου Τ.& Φερεντίνος Κ., (2000), «Ιατρική στατιστική και στοιχεία βιομαθηματικών», *Τεύχος Α, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλη*
5. Παπαετροπούλου Μ. & Μαυρίδου Α., (1995), «Μικροβιολογία του υδάτινου περιβάλλοντος», *Βασικές αρχές, Εκδόσεις Τραυλός.*
6. Φυτιάνος Κ. (1996), «Η ρύπανση των θαλασσών», *University studio Press, Θεσσαλονίκη*

5.3 Ιστοσελίδες:

1. P. Krottje, R. Tuden, (2005), «Total Maximum Daily Load for Pathogens in the Napa River Watershed»,
<http://www.waterboards.ca.gov/sanfranciscobay/napariverpathogentmdl.htm>
2. Solar Photoperiod Calculator
<http://sci.fi/~benefon/sol.html>
3. US National Observatory Astronomical Appl.Dept.
<http://aa.navy.mil>
4. Επίσημη ιστοσελίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης
<http://www.europa.eu.int>
5. Υπουργείο Περιβάλλοντος, Χωροταξίας και Δημ. Έργων, Τμήμα Νερών
<http://minenv.gr>

6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Α. Τα βασικότερα Άρθρα και τα σημαντικότερα σημεία της Πρότασης για την Οδηγία του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου 2002/0254 (COD)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Τα βασικότερα άρθρα της Οδηγίας του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου 2002/0254 (COD) είναι τα εξής:

Άρθρο 1

Στόχοι

Για τον σκοπό της διαφύλαξης, προστασίας και βελτίωσης της ποιότητας του περιβάλλοντος καθώς και προστασίας της υγείας του ανθρώπου, η παρούσα οδηγία θεσπίζει διατάξεις για την παρακολούθηση και ταξινόμηση των υδάτων κολύμβησης από πλευράς ποιότητας καθώς και την ενημέρωση του ευρύτερου πληθυσμού σχετικά.

Η παρούσα οδηγία, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στο περιβάλλον και την υγεία, έρχεται να συμπληρώσει τους στόχους και τα μετρά που προβλέπονται στην οδηγία 2000/60/ΕΚ.

Άρθρο 3

Ορισμοί

Για τους σκοπούς της παρούσας οδηγίας ισχύουν οι ακόλουθοι ορισμοί:

(1) Ύδατα κολύμβησης: όλα τα ρέοντα ή ακίνητα επιφανειακά ύδατα της ενδοχώρας, μεταβατικά ύδατα και παράκτια ύδατα (ή μέρη αυτών

- α) όπου δεν απαγορεύεται η κολύμβηση και όπου κατά παράδοση συχνάζει μεγάλος αριθμός λουομένων, ή
- β) όπου η κολύμβηση προωθείται ενεργά από φορείς δημόσιων ή ιδιωτικών συμφερόντων.

(2) Κολυμβητική περίοδος: η περίοδος κατά την οποία αναμένεται η προσέλευση λουομένων, βάσει των τοπικών συνηθειών και κανόνων και αναλόγως των κλιματολογικών και τοπογραφικών συνθηκών.

(3) Διαχειριστικά μέτρα για τα ύδατα κολύμβησης:

- α) καθορισμός και διατήρηση φυσιογνωμικών χαρακτηριστικών για τα ύδατα κολύμβησης

- β) καθορισμός διαγράμματος παρακολούθησης
- γ) παρακολούθηση των υδάτων κολύμβησης
- δ) αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης
- ε) ταξινόμηση των υδάτων κολύμβησης
- στ) εκτίμηση επικινδυνότητας σε συσχέτιση με τις πηγές ρύπανσης
- ζ) εκπόνηση σχεδίων για την αντιμετώπιση έκτακτων αναγκών και συστημάτων επιτήρησης
- η) ενημέρωση του ευρύτερου κοινού για την ποιότητα των υδάτων κολύμβησης
- θ) υλοποίηση δράσεων για την αποτροπή της έκθεσης του ανθρώπου στη ρύπανση
- ι) υλοποίηση δράσεων για τη μείωση των κινδύνων ρύπανσης και μόλυνσης

(4) Άλλες δραστηριότητες αναψυχής: δραστηριότητες όπως η κυματοδρομία, η ιστιοσανίδα και το καγιάκ, κατά τις οποίες η μετακίνηση στο νερό γίνεται με ορισμένο εξοπλισμό και κατά τις οποίες υπάρχει μεγάλος κίνδυνος κατάποσης νερού

(5) Τα μεταβατικά νερά και τα παράκτια νερά νοούνται όπως και στην οδηγία 2000/60/EK

(6) Συνθήκες έκτακτης ανάγκης: έκτακτες συνθήκες που επιδρούν στην ποιότητα των υδάτων και οι οποίες δεν είναι αποτέλεσμα συνήθων μετεωρολογικών συνθηκών, όπως βροχοπτώσεις ή μεταβολές του ρου ενός ποταμού, που παρατηρούνται σε κανονικά διαστήματα μικρότερα των πέντε ετών.

(7) Σύνολο ποιοτικών δεδομένων για το νερό: το σύνολο των δεδομένων που προκύπτουν από την παρακολούθηση.

(8) Αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης: η διαδικασία αξιολόγησης της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης βάσει της μεθόδου υπολογισμού που περιγράφεται στα παραρτήματα II και III.

Άρθρο 8

Αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης

1. Βάσει των αποτελεσμάτων της παρακολούθησης των παραμέτρων 1 και 2 της στήλης Α του παραρτήματος II, τα κράτη μέλη καταρτίζουν σειρές δεδομένων που αφορούν στην ποιότητα των υδάτων.

2. Η αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης γίνεται με βάση τις σειρές δεδομένων που ελήφθησαν κατά τις τρεις προηγούμενες κολυμβητικές περιόδους και σύμφωνα με τη διαδικασία του παραρτήματος III.

3. Η πρώτη αξιολόγηση γίνεται το αργότερο τρία χρόνια μετά την ημερομηνία που προβλέπεται στο άρθρο 22 παράγραφος 1.

4. Η αξιολόγηση επαναλαμβάνεται κάθε χρόνο με τη λήξη της κολυμβητικής περιόδου, βάσει των δεδομένων της εν λόγω κολυμβητικής περιόδου καθώς και των δεδομένων των δύο προηγούμενων ετών.

5. Σε περίπτωση κατά την οποία στην περιοχή που γειτνιάζει με τα ύδατα κολύμβησης κατασκευάστηκαν δομικά έργα ή έγιναν μετατροπές σε έργα υποδομής που ενδέχεται να επηρεάσουν την ποιότητα και συνεπώς την ταξινόμηση των υδάτων κολύμβησης, πρέπει να συγκεντρωθούν νέα δεδομένα για την ποιότητα των υδάτων και να γίνει νέα αξιολόγηση χωρίς να ληφθούν υπόψη τα προ της ολοκλήρωσης των έργων δεδομένα.

Άρθρο 9

Ποιοτική ταξινόμηση των υδάτων κολύμβησης

Με βάση την ετήσια αξιολόγηση των σειρών δεδομένων που αφορούν την ποιότητα των υδάτων, τα κράτη μέλη ταξινομούν τα ύδατα κολύμβησης ως ανεπαρκούς ποιότητας, ικανοποιητικής ποιότητας ή εξαιρετικής ποιότητας, σύμφωνα με τα κριτήρια του παραρτήματος III. Η πρώτη ταξινόμηση θα γίνει το αργότερο τρία χρόνια μετά την ημερομηνία που προβλέπεται στο άρθρο 22 παράγραφος 1.

Άρθρο 10

Μελέτες και αναλύσεις μετά την ταξινόμηση

1. Για ύδατα κολύμβησης που έχουν ταξινομηθεί ως ανεπαρκούς ποιότητας, πραγματοποιούνται διεξοδικές μελέτες και αναλύσεις όλων των πηγών και περιστάσεων που ενδέχεται να οδηγήσουν ή να συμβάλουν σε μόλυνση ή ρύπανση αυτών. Οι μελέτες και αναλύσεις επαναλαμβάνονται περιοδικώς, όχι όμως με συχνότητα μικρότερη από μία φορά κάθε χρόνο. Σκοπός είναι η αναπροσαρμογή της ταυτότητας των υδάτων κολύμβησης κατά την έννοια του άρθρου 6 και του παραρτήματος IV, καθώς επίσης και η κατανόηση των κινδύνων ως βάση για τη λήψη στοχοθετημένων μέτρων διαχείρισης όπως αυτά ορίζονται στο άρθρο 3 παράγραφος 3 σημεία στ) έως ι).

2. Για ύδατα κολύμβησης που έχουν ταξινομηθεί ως ικανοποιητικής ποιότητας πραγματοποιείται ανάλυση δύο φορές κάθε χρόνο για όλες τις πηγές και περιστάσεις που ενδέχεται να οδηγήσουν ή να συμβάλουν σε μόλυνση ή ρύπανση αυτών. Η ανάλυση αποσκοπεί σε προσαρμογή της ταυτότητας των υδάτων κολύμβησης κατά την έννοια του άρθρου 6 και του παραρτήματος IV, καθώς και σε κατανόηση των κινδύνων ως βάση για τη λήψη στοχοθετημένων προληπτικών μέτρων διαχείρισης.

3. Η ταυτότητα υδάτων κολύμβησης που έχουν ταξινομηθεί ως εξαιρετικής ποιότητας επανεξετάζεται με αναλύσεις τρεις φορές κάθε χρόνο, με σκοπό την πληρέστερη κατανόηση όλων των πιθανών πηγών και κινδύνων ρύπανσης και μόλυνσης και τη λήψη ενδεδειγμένων μέτρων καταπολέμησης.

4. Οι μελέτες και αναλύσεις για τις οποίες γίνεται λόγος στις παραγράφους 1, 2 και 3 αξιοποιούν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τα δεδομένα που προκύπτουν από την παρακολούθηση και τις αξιολογήσεις οι οποίες προβλέπονται στην οδηγία 2000/60/ΕΚ, και περιέχουν μία τουλάχιστον αξιολόγηση:

α) των συνθηκών που επικρατούν κατά τα ανάντη, για την περίπτωση ρεόντων υδάτων της ενδοχώρας, και

β) των συνθηκών περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένων των συνθηκών που επικρατούν στην περιοχή της λεκάνης απορροής, για την περίπτωση ακίνητων υδάτων της ενδοχώρας και για την περίπτωση παράκτιων υδάτων.

Άρθρο 12

Σχέδιο αντιμετώπισης έκτακτων καταστάσεων

1. Τα κράτη μέλη εκπονούν σχέδια αντιμετώπισης έκτακτων καταστάσεων (π.χ. πλημμυρών, ατυχημάτων ή καταστροφών σε έργα υποδομής) οι οποίες ενδέχεται να έχουν ως αποτέλεσμα υποβάθμιση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης. Τα σχέδια αυτά προσδιορίζουν πιθανές αιτίες και κινδύνους, καθιερώνουν συστήματα επιτήρησης ή/και έγκαιρης προειδοποίησης και παρέχουν κατευθύνσεις για πρόληψη ή μετριασμό των ζημιών.

2. Τα κράτη μέλη μεριμνούν για τη δημιουργία, βελτίωση ή συντήρηση εθνικής ή/και τοπικής εμβέλειας συστημάτων επιτήρησης και έγκαιρης προειδοποίησης, μέσω των οποίων:

α) εντοπίζονται περιστατικά ρύπανσης ή σοβαρούς κινδύνους για τέτοια περιστατικά, συμπεριλαμβανομένων ακραίων καιρικών συνθηκών, που ενδέχεται να οδηγήσουν σε υποβάθμιση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης·

β) ειδοποιούνται χωρίς καθυστέρηση και με απόλυτη σαφήνεια οι αρμόδιες κρατικές αρχές για τέτοια περιστατικά ή κινδύνους·

γ) σε περίπτωση επικείμενου κινδύνου για τη δημόσια υγεία, γνωστοποιούνται στα τμήματα εκείνα του πληθυσμού που ενδέχεται να θιγούν όλες οι σχετικές πληροφορίες που έχει στην κατοχή της μια κρατική αρχή και οι οποίες θα μπορούσαν να βοηθήσουν τον πληθυσμό να προλάβει ή να μετριάσει τη ζημιά·

δ) υποβάλλονται συστάσεις προς τις αρμόδιες κρατικές αρχές και, κατά περίπτωση, προς το ευρύ κοινό για προληπτικές και διορθωτικές δράσεις.

3. Τα κράτη μέλη μεριμνούν ώστε οι αρμόδιες κρατικές αρχές να διαθέτουν το δυναμικό που απαιτείται ώστε να ανταποκρίνονται σε τέτοια περιστατικά ή κινδύνους σύμφωνα με το αντίστοιχο σχέδιο αντιμετώπισης έκτακτων καταστάσεων.

4. Συστήματα επιτήρησης και έγκαιρης προειδοποίησης, σχέδια αντιμετώπισης έκτακτων καταστάσεων και το δυναμικό ανταπόκρισης σε περιστατικά και κινδύνους που απειλούν την ποιότητα των υδάτων κολύμβησης μπορούν να συνδυάζονται με αντίστοιχα άλλων καταστάσεων.

Άρθρο 14

Αξιολόγηση αποικιών φυτοπλαγκτού και αλγών καθώς και φυσικοχημικών παραμέτρων

1. Για ύδατα κολύμβησης που αποδεδειγμένα είναι φυσικώς ευάλωτα σε ειδικές τοξικές αποικίες φυτοπλαγκτού και στον πολλαπλασιασμό των αλγών, πραγματοποιούνται μετρήσεις για να εξακριβωθεί η κατάσταση των υδάτων κολύμβησης σε συσχέτιση με τις μικροβιολογικές παραμέτρους της στήλης Α του παραρτήματος ΙΙ. Εάν για την εν λόγω παράμετρο οι δοκιμές που περιγράφονται στη στήλη Δ του παραρτήματος ΙΙ δώσουν θετικά αποτελέσματα, τότε θα χρειαστεί περαιτέρω έρευνα καθώς και λήψη διορθωτικών μέτρων κατά περίπτωση, συμπεριλαμβανομένης της συμμετοχής του κοινού κατά την έννοια του άρθρου 15.
2. Για να εξακριβωθεί το καθεστώς των υδάτων κολύμβησης σε συσχέτιση με τις φυσικοχημικές παραμέτρους 4 έως 6 του παραρτήματος ΙΙ, θα χρειαστεί να γίνουν μακροσκοπική/οπτική εξέταση και αναλυτικές μετρήσεις σύμφωνα με τις δοκιμές που περιγράφονται στη στήλη Δ του παραρτήματος ΙΙ. Εάν για τις εν λόγω παραμέτρους τα αποτελέσματα των δοκιμών αποκλίνουν από τις προδιαγραφές της στήλης Γ του παραρτήματος ΙΙ, τότε θα χρειαστεί περαιτέρω έρευνα καθώς και λήψη διορθωτικών μέτρων κατά περίπτωση, συμπεριλαμβανομένης της συμμετοχής του κοινού κατά την έννοια του άρθρου 15.

Άρθρο 15

Συμμετοχή του κοινού

Τα κράτη μέλη μεριμνούν ώστε να ζητείται η γνώμη όλων των ενδιαφερόμενων μερών, στα οποία και να δίδεται η δυνατότητα συμμετοχής στην κατάρτιση, επανεξέταση και αναπροσαρμογή του πίνακα υδάτων κολύμβησης, της ταυτότητας των υδάτων κολύμβησης και των διαχειριστικών μέτρων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Παράμετροι για την ποιότητα των υδάτων κολύμβησης

	A	B	Γ	Δ
	Μικροβιολογικές παράμετροι	Εξαιρετική ποιότητα	Ικανοποιητική ποιότητα	Μέθοδοι ανάλυσης
1	Intestinal Enterococci (I.E.) εντερόκοκκοι σε cfu/100 ml	100 ¹	200 ¹	ISO 7899-
2	Κολοβακτηρίδια Escherischia coli (E.C.) σε cfu/100 ml	250 ¹	500 ¹	ISO 9308-1
3	Αποικίες φυτοπλαγκτού/αλγών ²		Αρνητικά αποτελέσματα στις δοκιμές	Μικροσκοπική Παρακολούθηση ³ και δοκιμές τοξικότητας ⁴
	Φυσικοχημικές παράμετροι	Εξαιρετική ποιότητα	Ικανοποιητική ποιότητα	Μέθοδοι επιθεώρησης
4	Πετρελαιοειδή	-	Δεν πρέπει να υπάρχει ορατό υμένιο στην επιφάνεια του νερού ούτε και οσμές	Μακροσκοπική (οπτική) και οσφρητική επιθεώρηση
5	Πισσώδη κατάλοιπα και επιπλέοντα υλικά όπως ξύλο, πλαστικά αντικείμενα, γυαλί, λάστιχα, και άλλα απόβλητα.	-	Απουσία	Μακροσκοπική (οπτική) επιθεώρηση
6	pH ⁵	-	6 έως 9 Δεν πρέπει να παρουσιάζονται ανεξήγητες διακυμάνσεις	Ηλεκτρομετρία με βαθμονόμηση για pH 7 και pH 9

πηγή: 2002/0254 (COD)

¹ Βάσει της στατιστικής μεθόδου του 95ου εκατοστημορίου

² Μόνο για τοποθεσίες που αποδεδειγμένα παρουσιάζουν φυσική ευαισθησία σε ειδικές τοξικές αποικίες (π.χ. dinophysis, alexandrium, blue algae)

³ προσδιορισμός και καταμέτρηση κυττάρων

⁴ δοκιμή σε πειραματόζωα, πρόχειρη δοκιμή ή με άμεση εφαρμογή τοξίνης σε κύτταρα πλαγκτού ή στο νερό

⁵ μόνο για γλυκά νερά

Η τιμή του 95ου εκατοστημορίου υπολογίζεται όπως περιγράφεται παρακάτω.

Ακολουθείται η στατιστική μέθοδος του 95ου εκατοστημορίου για τον δεκαδικό λογάριθμο (\log_{10}) της κανονικής συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας μικροβιολογικών δεδομένων που προέρχονται από μια περιοχή υδάτων κολύμβησης· η τιμή του 95ου εκατοστημορίου προκύπτει ως εξής:

(i) λαμβάνεται ο δεκαδικός λογάριθμος (\log_{10}) όλων των συνόλων βακτηριδίων της προς αξιολόγηση σειράς δεδομένων·

(ii) υπολογίζεται ο αριθμητικός μέσος όρος μ των δεκαδικών λογαρίθμων (\log_{10}),

(iii) υπολογίζεται η τυπική απόκλιση σ των δεκαδικών λογαρίθμων (\log_{10}).

Η τιμή 95ου εκατοστημορίου της συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας των δεδομένων προκύπτει από την εξίσωση:

95ο εκατοστημόριο = $\text{antilog} ((\mu) + (1,65 \times \sigma))$ (2002/0254 (COD)).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Αξιολόγηση και ταξινόμηση υδάτων κολύμβησης

Ταξινομούνται ως ανεπαρκούς ποιότητας, ύδατα κολύμβησης των οποίων οι τιμές 95^{ου} εκατοστημορίου των βακτηριακών απαριθμήσεων, βάσει των ποιοτικών δεδομένων που συγκεντρώθηκαν κατά την προηγούμενη τριετία, είναι χειρότερες (που σημαίνει υψηλότερες συγκεντρώσεις εκφραζόμενες σε cfu/100 ml) από τις τιμές της στήλης Γ του παραρτήματος ΙΙ για τις μικροβιολογικές παραμέτρους 1 ή 2 (2002/0254 (COD)).

Ταξινομούνται ως ικανοποιητικής ποιότητας, ύδατα κολύμβησης των οποίων οι τιμές 95^{ου} εκατοστημορίου των βακτηριακών απαριθμήσεων, βάσει των ποιοτικών δεδομένων που συγκεντρώθηκαν κατά την προηγούμενη τριετία, είναι ίσες ή καλύτερες από τις τιμές της στήλης Γ του παραρτήματος ΙΙ για τις μικροβιολογικές παραμέτρους 1 και 2 (2002/0254 (COD)).

Τα κράτη μέλη μπορούν να ταξινομήσουν ύδατα κολύμβησης ως εξαιρετικής ποιότητας εφόσον

- οι τιμές 95ου εκατοστημορίου των βακτηριακών απαριθμήσεων, βάσει των ποιοτικών δεδομένων που συγκεντρώθηκαν κατά την προηγούμενη τριετία, είναι ίσες ή καλύτερες (που σημαίνει χαμηλότερες συγκεντρώσεις εκφραζόμενες σε cfu/100 ml) από τις τιμές της στήλης Α του παραρτήματος ΙΙ για τις μικροβιολογικές παραμέτρους 1 και 2, και
- η διάρκεια της κολυμβητικής περιόδου και τα διαχειριστικά μέτρα δείχνουν ότι αναπτύσσονται και άλλες δραστηριότητες αναψυχής (2002/0254 (COD)).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Η ταυτότητα των υδάτων κολύμβησης

Σε συσχέτιση με το άρθρο 6, η ταυτότητα των υδάτων κολύμβησης περιλαμβάνει τις κάτωθι συνιστώσες:

α) Περιγραφή των φυσικών, γεωγραφικών και υδρολογικών χαρακτηριστικών των υδάτων κολύμβησης.

β) Ταυτοποίηση - ποσοτική και ποιοτική - όλων των δυνητικών πηγών ρύπανσης.

γ) Αξιολόγηση του ρυπαντικού δυναμικού των εν λόγω πηγών που θα επιβάρυνε την υγεία των λουομένων. Η αξιολόγηση αυτή θα πρέπει να γίνεται με παραμέτρους αφενός τον χρόνο - τυχαία ή χρόνια επικινδυνότητα - και αφετέρου το είδος και τον όγκο όλων των ρυπογόνων και δυνάμει ρυπογόνων απορριπτόμενων υλών και των επιπτώσεων αυτών σε συσχέτιση με την απόσταση από τα ύδατα κολύμβησης.

Για τις συνιστώσες α) και β) θα πρέπει επίσης να υποβάλλεται και λεπτομερής χάρτης.

Αναλόγως, επισυνάπτονται ή περιλαμβάνονται και άλλες σχετικές πληροφορίες.

δ) Περιγραφή των σημείων παρακολούθησης.

ε) Αξιολόγηση του κατά πόσον από την παρακολούθηση μπορεί να προκύψουν αντιπροσωπευτικές πληροφορίες για άλλες δραστηριότητες αναψυχής (π.χ. ιστιοσανίδα, καγιάκ) κατά τις οποίες ο κίνδυνος κατάποσης νερού είναι ανάλογος εκείνου κατά την κολύμβηση.

στ) Η ταυτότητα των υδάτων κολύμβησης επανεξετάζεται και αναπροσαρμόζεται σύμφωνα με το χρονοδιάγραμμα που ακολουθεί.

Ταξινόμηση των υδάτων κολύμβησης	Εξαιρετική	Ικανοποιητική	Ανεπαρκής
Επανεξέταση της ταυτότητας των υδάτων κολύμβησης	Κάθε 3 χρόνια	Κάθε 2 χρόνια	Προσδιορίζεται στην αρχή της κολυμβητικής περιόδου σε σχέση με τη φύση και τη σοβαρότητα του κινδύνου, όχι όμως με συχνότητα μικρότερη από μία φορά το χρόνο.
Συνιστώσες προς επανεξέταση	α), β) και ε)	α), β) και γ)	α), β) και γ)

πηγή: 2002/0254 (COD)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

Β. Οδηγία του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 15^{ης} Φεβρουαρίου του 2006 σχετικά με τη διαχείριση της ποιότητας των υδάτων κολύμβησης και την κατάργηση της οδηγίας 76/160/ΕΚ

Για τα παράκτια ύδατα και τα μεταβατικά ύδατα

Παράμετροι	Εξαιρετική ποιότητα	Καλή ποιότητα	Επαρκής ποιότητα
Εντερόκοκκοι (cfu/100ml)	100 (*)	200 (*)	185 (**)
Κολοβακτηρίδια (cfu/100ml)	250 (*)	500 (*)	500 (**)

(*) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 95^ο εκατοστημόριο. Βλ. Παράρτημα III

(**) Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 95^ο εκατοστημόριο. Βλ. Παράρτημα III

πηγή: 2006/7/ΕΚ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ VI

Γ. Κεντρική Υπουργική απόφαση 46399/4352/86 για την ποιότητα των επιφανειακών νερών που προορίζονται για κολύμβηση

Πρότυπα ποιότητας νερών κολύμβησης

Παράμετροι	Επιθυμητό όριο	Ανώτατο επιτρεπόμενο όριο
Σύνολο κολοβακτηριοειδών/100ml	500	10000
Κολοβακτηρίδια/100ml	100	500
Εντερόκοκκοι/100ml	100	-
Σαλμονέλλες/1000ml	-	0
Εντεροϊοί PFU/10lt	-	0

πηγή: ΚΥΑ 46399/4352/86 (ΦΕΚ 438Β/3-7-86)