



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
«Μικροβιακή Βιοτεχνολογία»

ΔΕΡΜΟΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ:
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΣΕ ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ
ΚΑΙ ΤΕΛΙΚΟ ΠΡΟΪΟΝ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ-ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Π. ΔΕΛΛΙΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Επιβλέπουσα
Αμαλία Δ. Καραγκούνη, Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ, 2013

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια Μικροβιολογίας του τομέα Βοτανικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τριμελής Επιτροπή Αξιολόγησης

Καθηγήτρια

Αμαλία Δ. Καραγκούνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Αδριανή Πανταζίδου

Επίκουρος Καθηγητής

Δημήτριος Χατζηνικολάου

Στην οικογένειά μου

Ευχαριστίες

Φτάνοντας στο τέλος αυτής της επίπονης αλλά ευχάριστης και εποικοδομητικής πορείας, θέλω να ευχαριστήσω όλους αυτούς που ο καθένας με τον τρόπο του συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Πρωτίστως θέλω να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα Αμαλία Δ. Καραγκούνη για την επίβλεψη και την επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε στην εργασία αυτή, καθώς και για τις συμβουλές και τις καίριες υποδείξεις της καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στα μέλη της τριμελούς επιτροπής Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Α. Πανταζίδου και Επίκουρο Καθηγητή κ. Δ. Χατζηνικολάου, για το χρόνο που αφιέρωσαν συμμετέχοντας στην εξεταστική επιτροπή και για τη θετική συμβολή τους στην τελική διαμόρφωση της εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στην ομάδα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και ιδιαίτερα στους Δρ. Ε. Κατσίφα και Δρ. Α. Σαββίδη, για την άριστη συνεργασία και την αμέριστη συμπαράσταση τους σε όλα τα στάδια της εργασίας αυτής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε φίλους και συνεργάτες και συγκεκριμένα στην Αγγελική Πουρνάρα, στην Σόφη Παρδαλάκη, στην Νικολίτσα Ταγαρούλια και στον Γιώργο Παράσχα για την συμπαράσταση, την πολύτιμη βοήθειά τους καθώς και για την υπομονή που επέδειξαν ακούγοντας τους επιστημονικούς μου προβληματισμούς, καθ' όλη τη διάρκεια τόσο του εργαστηριακού όσο και του συντακτικού τμήματος της εργασίας.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θέλω να μοιραστώ με την οικογένεια μου και τους επιστήθιους φίλους μου, για την ηθική υποστήριξη και το κουράγιο που μου έδωσαν για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής εργασίας. Τους ευχαριστώ για την κατανόηση και την υπομονή που επέδειξαν.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τον κ. Ι. Καλαντζή και την κα. Λ. Παναϊτέσκου από τη φαρμακοβιομηχανία, για την άριστη συνεργασία τους και την άμεση ανταπόκριση τους σε κάθε ερώτημα που ανέκυπτε.

Περίληψη

Η παρουσία μικροοργανισμών στα φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα εγκυμονεί κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών ενώ ταυτόχρονα η μικροβιακή ανάπτυξη επηρεάζει αρνητικά τα χαρακτηριστικά του προϊόντος που φτάνει στον καταναλωτή. Στις φαρμακοβιομηχανίες ο μικροβιολογικός έλεγχος πραγματοποιείται τόσο στις πρώτες ύλες όσο και στα τελικά προϊόντα, αλλά περιορίζεται στην ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και στον υπολογισμό του ολικού ετερότροφου πληθυσμού, και δεν επεκτείνεται στη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας κυρίως λόγω του εύρους των διαθέσιμων πρώτων υλών και των τελικών προϊόντων και λόγω της σύστασής τους. Τα μικροβιολογικά όρια που πρέπει να τηρούνται στις πρώτες ύλες και στα τελικά προϊόντα, καθώς και ο τρόπος υπολογισμού τους, καθορίζονται από τις εκάστοτε Εθνικές Νομοθεσίες ή από Οδηγίες και Κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας στις πρώτες ύλες και στο τελικό προϊόν (αντιηλιακό) μιας φαρμακευτικής βιομηχανίας. Μεγαλύτερη βαρύτητα δόθηκε στο νερό που αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό της σύνθεσης του αντιηλιακού και των υπόλοιπων προϊόντων της βιομηχανίας. Συγκεκριμένα το νερό της φαρμακοβιομηχανίας έχει υψηλό βαθμό καθαρότητας, κάτι που το κάνει αφιλόξενο ενδιαίτημα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, παρ' όλα αυτά όμως, τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που αφορούν στη διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας που εντοπίζεται στα συστήματα παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας σε φαρμακοβιομηχανίες, σε βιομηχανίες ημιαγωγών, σε βιομηχανίες τροφίμων κλπ. Το ενδιαίτημα αυτό παρουσιάζει ομοιότητες με άλλα ολιγότροφα περιβάλλοντα όπως το πόσιμο νερό, ενώ ομάδες μικροοργανισμών όπως τα υπερμικροβακτήρια, και τα βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια (VBNC) αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως ενδογενής πληθυσμός σε τέτοιο τύπο νερού.

Η μικροβιακή ποικιλότητα στις πρώτες ύλες και στο τελικό προϊόν, μελετήθηκε με χρήση κλασσικών μικροβιολογικών τεχνικών και μοριακών μεθόδων (genus specific PCR, BOX-PCR, ITS-PCR, DGGE, 16S rDNA sequencing). Οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν, ομαδοποιήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος GelCompar II και οι αλληλουχίες που προέκυψαν από τη μοριακή ταυτοποίηση επιλεγμένων στελεχών χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή φυλογενετικών δένδρων με τα προγράμματα BLAST και MEGA5. Η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας στο νερό εστιάστηκε στην απομόνωση α) του ετερότροφου και

ολιγότροφου μεσόφιλου πληθυσμού, β) του ψυχρόφιλου πληθυσμού και γ) των διηθητών βακτηρίων μέσω των μεμβρανών διαμέτρου πόρων 0,2 μm. Επιπροσθέτως διερευνήθηκε η επίδραση παραγόντων όπως τοθειοθειϊκό νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) και η θερμοκρασία τους δείγματος κατά τη διήθηση, στην ανάκτηση του μικροβιακού φορτίου. Στο τελικό προϊόν μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα των συντηρητικών που περιέχει, στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μικροοργανισμών κατά τη χρήση καθώς και έπειτα από στοχευμένη μόλυνση με γνωστά εμβόλια μικροοργανισμών.

Τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης ανέδειξαν δύο διακριτούς πληθυσμούς που επικρατούν στο νερό υψηλής καθαρότητας: τον ετερότροφο και τον ολιγότροφο πληθυσμό. Ο πρώτος αποτελείται από το φύλο Firmicutes και το γένος *Bacillus* με κυρίαρχα είδη τα *B. aquimaris*, *B. barbaricus*, *B. cibi* και *B. niabensis* ενώ το φύλο Actinobacteria συμμετέχει (γένη *Rhodococcus*, *Kocuria* και *Microbacterium*) σε μικρό ποσοστό. Η επικράτηση του γένους *Bacillus* υποδηλώνει την παρουσία μικροοργανισμών με ικανότητα σχηματισμού ανθεκτικών μορφών (ενδοσπόρια) και ικανότητα επιβίωσης στο ακραίο περιβάλλον του νερού υψηλής καθαρότητας. Ο ολιγότροφος πληθυσμός παρουσίασε διαφορετική δομή με κυρίαρχο φύλο τα Proteobacteria και συγκεκριμένα την τάξη των Rhizobiales των α-Proteobacteria (γένη *Methylobacterium*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium* και *Sphingomonas*). Τα συγκεκριμένα γένη έχουν απομονωθεί από μονάδες παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας και ειδικότερα το γένος *Sphingomonas*, θεωρείται ως ο οργανισμός που ευθύνεται για τη δημιουργία βιοϋμενίων στις επιφάνειες των μονάδων παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας ενώ στη συνέχεια προσκολλώνται τα α και β-Proteobacteria. Άλλα γένη που ταυτοποιήθηκαν είναι τα *Brevibacillus* (Firmicutes), *Ralstonia* (β-Proteobacteria), *Burkholderia* (β-Proteobacteria), *Acinetobacter* (γ-Proteobacteria) και *Paracoccus* (α-Proteobacteria). Ειδικότερα, τα γένη *Burkholderia* και *Paracoccus*, ανιχνεύτηκαν μόνο στον ψυχρόφιλο ετερότροφο πληθυσμό στις μεμβράνες των 0,1 μm και 0,2 μm αντίστοιχα.

Η μέθοδος της DGGE έδειξε παρόμοιο πρότυπο ζωνών σε όλες τις δειγματοληψίες ενώ πρέπει να αναφερθεί η ύπαρξη ζωνών στα δείγματα που ελέγχθηκαν για την ύπαρξη διηθητών βακτηρίων. Συγκεκριμένα στη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011, οι κλασσικές μέθοδοι καλλιέργειας σε υποστρώματα απέτυχαν να ανακτήσουν μικροοργανισμούς στις μεμβράνες των 0,1 μm, όπως ήταν το αναμενόμενο, όμως το αποτέλεσμα αυτό ήρθε σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μοριακής ανίχνευσης μέσω DGGE στην οποία ανιχνεύτηκαν 8-9 ριβότυποι

στα αντίστοιχα δείγματα. Η ανίχνευση ριβοτύπων στα δείγματα που αποτελούσαν το διήθημα από τις μεμβράνες των 0,2 μm υποδηλώνει την παρουσία διηθητών βακτηρίων τα οποία κάτω από άγνωστες συνθήκες μπορούν να μεταβάλλουν τον κυτταρικό τους όγκο σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα και να συγκρατούνται στις μεμβράνες με μεγαλύτερη διάμετρο πόρων.

Όσον αφορά την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό και στο τελικό προϊόν, κανένα από τα: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Enterococcus* sp., *Candida albicans* και κολίμορφα βακτήρια, δεν ανιχνεύτηκε σε εκλεκτικά υπόστρωμα ή δεν επιβεβαιώθηκε με εξειδικευμένες για το γένος PCR.

Εξαιρουμένου του νερού, από τις υπόλοιπες πρώτες ύλες που μελετήθηκαν, αυξημένη ποικιλότητα παρουσιάστηκε στις 3 χρωστικές – οξειδία του σιδήρου, στις οποίες ανιχνεύθηκαν οι μύκητες *Penicillium chrysogenum* και *Neosartorya hiratsukae*.

Τέλος διαπιστώθηκε ότι τα συντηρητικά του αντιηλιακού δρουν αποτελεσματικά έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων *E. coli* και *P. aeruginosa*, καταστρέφοντας τα κύτταρα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η αποτελεσματικότητά τους μετριάξετε στο Gram θετικό βακτήριο *Bacillus subtilis* το οποίο επιβιώνει και παραμένει ανιχνεύσιμο έπειτα από 28 μέρες σε αντιηλιακό. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό α) με το μοναδικό στέλεχος (*B. safensis*) που απομονώθηκε από κλειστό σωληνάριο αντιηλιακού και β) την ευρεία διασπορά ειδών του γένους *Bacillus* στο νερό (πρώτη ύλη αντιηλιακού), αποτελεί έναν παράγοντα που θα πρέπει να μελετηθεί περισσότερο.

Abstract

The presence of microorganisms in pharmaceuticals and cosmetic products, not only threatens consumers' health but affects negatively the product's characteristics, thus the pharmaceutical industries apply microbiological controls in raw materials and in finished products. These controls are limited in the detection of pathogens and in the total heterotrophic count, and don't expand in the study of microbial diversity mostly because of the variety of raw materials and finished products. National legislations and Guidelines or Regulations from the European Union, determine the microbiological limits which must be applied in the raw materials and finished products.

The aim of this study was the investigation of microbial diversity in raw materials and finished product (sunscreen) of a pharmaceutical industry. The study was focused mostly towards the water, which constitutes the basic ingredient in the formula of the sunscreen as well as in other pharmaceutical products. In particular, purified water, such as the water from pharmaceutical industries, has a great grade of purity and thus represents a hostile habitat for microorganisms. Nevertheless, during the last years, researchers have been investigating microbial diversity in purified and ultrapure water production systems in pharmaceutical, semiconductor, food and beverage industries. Studies in such oligotrophic aquatic ecosystems have shown the distribution of viable but non culturable bacteria (VBNC) or ultramicrocells. Furthermore, recent studies have concluded in the dominance of an endogenic community composed of Gram negative bacteria, mostly *Sphingomonas* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Ralstonia* sp. and *Pseudomonas* sp..

The microbial diversity in raw materials and finished product, was studied using a combination of culture dependent techniques and molecular methods, such as genus specific PCR, BOX-PCR, ITS-PCR, DGGE, 16S rDNA sequencing. Isolated microorganisms were clustered using program GelCompar II, while phylogenetic trees were designed using the programs BLAST and MEGA5. The study of microbial community in the purified water was focalized in the detection and isolation of: a) the heterotrophic and oligotrophic mesophilic community, b) the psychrophilic community, c) the filterable bacteria that penetrate the filter membranes with 0.2 μm diameter pores. Moreover, the effect of various factors, such as the addition of sodium thiosulfate and the temperature of the sample during the filtration, in the recovery of microbial

population, was investigated. Finally, preservatives' efficacy was tested during challenge tests with known inoculum of microorganisms and during regular use by consumers.

The results of this study demonstrate two discrete communities which prevail in purified pharmaceutical water: the heterotrophic and the oligotrophic community. The first one is mostly composed of the phylum Firmicutes and particularly from the genus *Bacillus* with dominant species *B. aquimaris*, *B. barbaricus*, *B. cibi* and *B. niabensis*, whereas the phylum Actinobacteria (genera *Rhodococcus*, *Kocuria* and *Microbacterium*) participate in the population but in much lower levels. The dominance of genus *Bacillus*, indicates the presence of bacteria capable of tolerating the extreme conditions in ultra pure water systems by producing resistant forms (endospores). The second community (the oligotrophic) had completely different structure. The dominant bacteria were grouped in the phylum Proteobacteria and specifically in the class of Rhizobiales (genera *Methylobacterium*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium* and *Sphingomonas*). These genera have been isolated in purified and ultrapure water production units during other studies, and particularly the genus *Sphingomonas* has been suggested to be the responsible microorganism to initiate the colonization and the formation of biofilms on the surface of these units. Later on, other α - and β - Proteobacteria attach the incipient biofilm. Other genera identified in this study, were *Brevibacillus*, *Ralstonia*, *Bulkhoderia*, *Acinetobacter* and *Paracoccus*. The genera *Burkholderia* and *Paracoccus*, were detected only in psychrophilic heterotrophic population in the membranes of 0.1 μm and 0.2 μm respectively.

The use of the DGGE method, revealed similar fingerprint patterns throughout the samplings but the most noticeable result was the detection of bands in the samples screened for filterable bacteria. In particular, during the sampling of February 2011, conventional cultured based techniques failed to recover the fraction of filterable bacteria in the membranes of 0.1 μm as it was expected. However, the same fraction was detected using molecular methods (PCR, DGGE). The detection of ribotypes in samples derived from the filtering of membranes 0.2 μm , suggest the occurrence of VBNC and filterable bacteria which under unknown circumstances, alter their cellular volume in a short period of time and thus permeate the membranes.

Regarding, the detection of pathogens in water and finished product, none of the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Enterococcus* sp., *Candida albicans* and coliforms, were detected in selective media or were confirmed using genus specific PCR.

Concerning the rest of the raw materials examined, only in 3 colorants (iron oxides) was observed increased microbial diversity and two fungi *Penicillium chrysogenum* and *Neosartorya hiratsukae* were identified.

Finally, it was found that sunscreen's preservatives are more effective against the Gram negative bacteria *E. coli* and *P. aeruginosa* by destroying the bacterial cells in a short time. They have though a moderate effect against the Gram positive bacterium *B. subtilis*, which survives and remains detectable even after 28 days within the sunscreen. This result in combination with a) the single strain (*B. safensis*) which was isolated from an unopened bottle of sunscreen and b) the wide dispersion in the water (sunscreen's raw material) of the species belonging to the *Bacillus* genus, constitutes a factor that needs to be studied more extensively.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	i
Περίληψη	ii-iv
Abstract	v-vii
Περιεχόμενα	viii-xv
Κεφάλαιο 1^ο Εισαγωγή	1-61
1.1. Ιστορική Αναδρομή Φαρμακευτικών και Καλλυντικών Προϊόντων	3
1.2. Νομοθετικό Πλαίσιο Φαρμακευτικών και Καλλυντικών Προϊόντων	5
1.3. Αντηλιακά Προϊόντα	12
1.4. Πρώτες ύλες φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων	16

1.5.	Μικροβιολογική Ποικιλότητα των φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων	21
1.6.	Μικροβιακή Ποικιλότητα στο νερό που προορίζεται για χρήση σε φαρμακευτικά προϊόντα	23
1.6.1.	Παραγωγή νερού υψηλής καθαρότητας	24
1.6.2.	Προβλήματα κατά την παραγωγή νερού υψηλής καθαρότητας	26
1.6.3.	Το νερό υψηλής καθαρότητας ως ενδιαίτημα για τους μικροοργανισμούς	29
1.6.4.	Μικροβιακή ποικιλότητα στο νερό	31
1.6.5.	Μικροοργανισμοί που έχουν εντοπιστεί σε συστήματα παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας	43
1.7.	Μεθοδολογική προσέγγιση για την εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας σε νερό υψηλής καθαρότητας	45
1.7.1.	Κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές	45
1.7.2.	Βιοφωταύγεια	47
1.7.3.	Μικροσκοπία φθορισμού προσπίπτουσας ακτινοβολίας	49
1.7.4.	Επιτόπια Υβριδοποίηση με Σημασμένους Ιχνηθέτες (FISH)	50
1.7.5.	Κυτταρομετρία ροής	52
1.7.6.	Μοριακές τεχνικές βασισμένες στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	54
1.7.6.1.	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με κλίση αποδιατακτικού παράγοντα (DGGE) ή με κλίση θερμοκρασίας (TGGE)	54

1.7.6.2. Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τελικών περιοριστικών θραυσμάτων (T-RFLP)	56
1.7.6.3. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP)	57
1.7.6.4. Μέθοδος rep-PCR	58
1.8. Σκοπός εργασίας	60
Κεφάλαιο 2^ο Υλικά και Μέθοδοι	63-146
2.1. Δειγματοληψία	65
2.1.1. Τρόπος συλλογής δειγμάτων και είδος δειγμάτων	66
2.1.1.1. Νερό	66
2.1.1.2. Λοιπές πρώτες ύλες	67
2.1.1.3. Αντιηλιακό	72
2.2. Επεξεργασία δειγμάτων	74
2.2.1. Νερό	74
2.2.1.1. Προσδιορισμός του Πληθυσμού των Μικροοργανισμών σε δείγματα νερού	75
2.2.1.2. Μοριακή ανάλυση σε δείγματα νερού	76
2.2.1.3. Γενικά στοιχεία για τα δείγματα νερού	76
2.2.2. Πρώτες ύλες	76
2.2.2.1. Προσδιορισμός του Πληθυσμού των Μικροοργανισμών	76
2.2.2.2. Μοριακή ανάλυση των πρώτων υλών	79
2.2.3. Αντιηλιακό	81

2.2.3.1.	Προσδιορισμός του Πληθυσμού των Μικροοργανισμών	81
2.2.3.2.	Προσδιορισμός του Μικροβιακού Φορτίου σε Αντιηλιακά έπειτα από καθορισμένη χρήση	82
2.2.3.3.	Έλεγχος της αποτελεσματικότητας των συντηρητικών του αντιηλιακού έπειτα από στοχευμένη επιμόλυνση με εμβόλιο γνωστής συγκέντρωσης μικροοργανισμών	84
2.3.	Θρεπτικά υποστρώματα	86
2.3.1.	Γενικού τύπου υποστρώματα	86
2.3.2.	Εκλεκτικά και Διαγνωστικά θρεπτικά υποστρώματα	87
2.3.3.	Ολιγότροφα θρεπτικά υποστρώματα	88
2.4.	Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα	89
2.4.1.	Διαλύματα συντήρησης και εναιώρησης κυττάρων	89
2.4.2.	Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα	90
2.4.3.	Διαλύματα για βιοχημικές δοκιμασίες	90
2.4.4.	Διαλύματα για μοριακή χρήση και ηλεκτροφόρηση	91
2.4.5.	Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	94
2.5.	Ποσοτική ανάλυση του μικροβιακού φορτίου των δειγμάτων νερού, πρώτων υλών και αντιηλιακού.	96
2.5.1.	Προσδιορισμός του Ολικού Πληθυσμού των Ετερότροφων Βακτηρίων	96
2.5.2.	Προσδιορισμός του Πληθυσμού των Ολιγότροφων Βακτηρίων	98
2.5.3.	Ανίχνευση και Απομόνωση του Πληθυσμού Ζυμών και Μυκήτων	99
2.5.4.	Ανίχνευση και Απομόνωση Ολικών Κολίμορφων Βακτηρίων και της <i>E. coli</i>	99

2.5.5.	Ανίχνευση και Απομόνωση Μικροοργανισμών <i>Salmonella</i> sp.	101
2.5.6.	Ανίχνευση και Απομόνωση Εντεροκόκκων	103
2.5.7.	Ανίχνευση και Απομόνωση <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	104
2.5.8.	Ανίχνευση και Απομόνωση <i>Staphylococcus</i> sp.	105
2.5.9.	Ανίχνευση και Απομόνωση <i>Candida albicans</i>	107
2.6.	Βιοχημικές δοκιμασίες	107
2.6.1.	Χρώση κατά Gram	108
2.6.2.	Καθορισμός της αντίδρασης Gram με τη εφαρμογή 3 % KOH	108
2.6.3.	Ενεργότητα οξειδάσης	109
2.6.4.	Ενεργότητα καταλάσης	110
2.6.5.	Δοκιμασία ινδόλης	110
2.6.6.	Σχηματισμός ενδοσπορίων - θερμικό σοκ	111
2.7.	Απομόνωση Νουκλεϊκών Οξέων (DNA)	112
2.7.1.	Απομόνωση Ολικού DNA από Καθαρή Καλλιέργεια Βακτηρίων	112
2.7.2.	Απομόνωση Ολικού DNA με CTAB	113
2.7.3.	Απομόνωση Ολικού DNA με CTAB και προκατεργασία με n-hexane	114
2.7.4.	Απομόνωση Ολικού DNA από καθαρή καλλιέργεια νηματοειδών μυκήτων	114
2.7.5.	Απομόνωση Ολικού DNA από Καθαρή Καλλιέργεια Βακτηρίων με Triton X-100	115
2.7.6.	Απομόνωση Ολικού DNA με ΚΙΤ εμπορίου	116

2.8.	Εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) στη μοριακή ανάλυση των απομονωμένων μικροοργανισμών	118
2.8.1.	Μέθοδος αντίδρασης BOX - PCR	118
2.8.2.	Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηριών	120
2.8.3.	Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου για χρήση στην τεχνική DGGE	120
2.8.4.	Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου με Fast Taq Polymerase για χρήση στην τεχνική DGGE.	122
2.8.5.	Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου για χρήση στην τεχνική DGGE με ένθετη PCR (nested PCR)	122
2.8.6.	Ανίχνευση του βακτηρίου <i>E.coli</i> με εξειδικευμένη για το γένος PCR αντίδραση (genus specific PCR)	123
2.8.7.	Ανίχνευση του βακτηρίου <i>Pseudomonas aeruginosa</i> με εξειδικευμένη για το γένος PCR αντίδραση (genus specific PCR)	123
2.8.8.	Ανίχνευση κολιμορφων βακτηρίων με εξειδικευμένη PCR αντίδραση	124
2.8.9.	Ενίσχυση της ITS περιοχής	125
2.9.	Ηλεκτροφόρηση DNA και προϊόντων PCR	126
2.10.	DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Ηλεκτροφόρηση με Κλίση Αποδιατακτικού Παράγοντα)	127
2.10.1.	Αρχή μεθόδου	127
2.10.2.	Ανάλυση ολικού βακτηριακού DNA σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με συγκέντρωση αποδιατακτικού παράγοντα υπό κλίση	128
2.10.3.	Στατιστική ανάλυση ριβοτύπων DGGE	131
2.11.	Μοριακή ταυτοποίηση απομονωμένων στελεχών	131

2.12.	Ανάλυση προτύπων BOX-PCR	134
	Κεφάλαιο 3^ο Αποτελέσματα	147-226
3.1.	Μικροβιακή Ποικιλότητα στο Νερό	149
3.1.1.	Παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών	150
3.1.2.	Ποσοτική Ανάλυση του Πληθυσμού των Βακτηρίων	153
3.1.2.1.	Προσδιορισμός ολικού ετερότροφου πληθυσμού	153
3.1.2.2.	Προσδιορισμός ολικού ετερότροφου πληθυσμού σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar.	154
3.1.2.3.	Επίδραση διαφόρων παραγόντων στην ανάκτηση των μικροοργανισμών	156
3.1.2.4.	Βακτήρια ικανά να διαπεράσουν τις μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm	157
3.1.2.5.	Ολιγότροφος πληθυσμός βακτηρίων στο νερό.	158
3.1.2.6.	Ψυχρόφιλα βακτήρια στο νερό.	160
3.1.2.7.	Επίδραση του θειοθειικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) στην ανάκτηση του πληθυσμού των βακτηρίων.	161
3.1.2.8.	Επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάκτηση του πληθυσμού των βακτηρίων.	162
3.1.2.9.	Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της επίδρασης διαφόρων παραγόντων στην ανάκτηση του μικροβιακού πληθυσμού.	164
3.1.2.10.	Διακύμανση ολικού ετερότροφου πληθυσμού σε σχέση με το χρόνο αλλαγής του ηθμού (της βιομηχανίας) διαμέτρου πόρων 0,2 μm	172
3.1.3.	Φυλογενετική ανάλυση βακτηριακών στελεχών βάσει του 16S rRNA γονιδίου	173

3.1.3.1. Αποτελέσματα Μεθοδολογίας Απομόνωσης Γενομικού DNA	174
3.1.3.2. Αποτελέσματα Ενίσχυσης 16S rRNA γονιδίου	175
3.1.3.3. Ευθυγράμμιση αλληλουχιών με κατατεθειμένες αλληλουχίες χρήση του αλγορίθμου BLAST	176
3.1.3.4. Φυλογενετικά δέντρα των ταυτοποιηθέντων μικροοργανισμών	181
3.1.4. Ποιοτική Ανάλυση - Ομαδοποίηση μέσω της τεχνικής BOX-PCR	185
3.1.4.1. Ποιοτική Ανάλυση Μικροβιακού Φορτίου Δειγματοληψίας Ιανουαρίου 2010	186
3.1.4.2. Ποιοτική Ανάλυση Μικροβιακού Φορτίου Δειγματοληψίας Μαρτίου 2010	189
3.1.4.3. Ποιοτική Ανάλυση Μικροβιακού Φορτίου Δειγματοληψίας Ιουλίου 2010	192
3.1.4.4. Ποιοτική Ανάλυση Μικροβιακού Φορτίου Δειγματοληψίας Φεβρουαρίου 2011	199
3.1.4.5. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ποιοτικής ανάλυσης του μικροβιακού φορτίου	206
3.1.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά στελεχών	208
3.1.6. Ανάλυση της ποικιλότητας των βακτηρίων με τη μέθοδο της DGGE	209
3.1.6.1. Παρουσία βακτηριακού DNA μέσω ενίσχυσης του 16S rDNA	209
3.1.6.2. Ανάλυση των ριβοτύπων DGGE	210
3.1.6.3. Προβλήματα στην ανίχνευση του βακτηριακού DNA μέσω nested – PCR	213
3.2. Μικροβιακή Ανάλυση στις Πρώτες ύλες Αντηλιακού προϊόντος	214

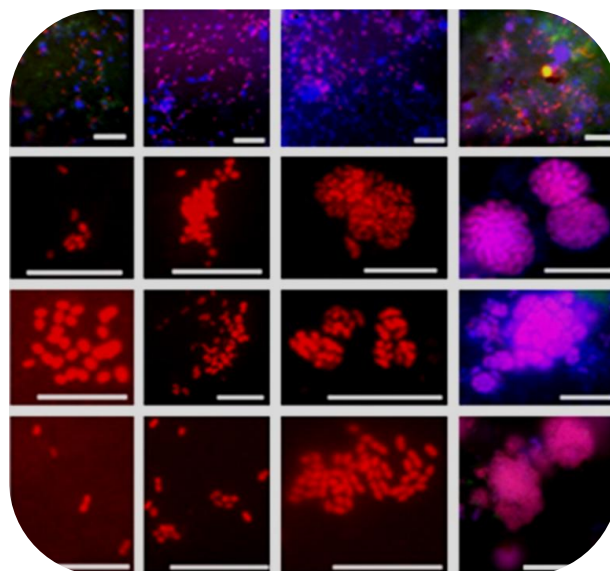
3.2.1.	Ανάλυση πληθυσμού βακτηρίων	214
3.2.2.	Ανάλυση πληθυσμού νηματοειδών μυκήτων	218
3.3.	Μικροβιακή Ανάλυση στο Τελικό Προϊόν	220
3.3.1.	Προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου στο αντιηλιακό	220
3.3.2.	Προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου σε αντιηλιακά έπειτα από καθορισμένη χρήση	221
3.3.3.	Έλεγχος της αποτελεσματικότητας των συντηρητικών του αντιηλιακού έπειτα από στοχευμένη επιμόλυνση με γνωστό εμβόλιο.	222
3.3.3.1.	Επιμόλυνση αντιηλιακού με 10^2 cfu/ml και 10^4 cfu/ml εμβολίου	222
3.3.3.2.	Επίδραση του αντιηλιακού στην ανάπτυξη των <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> .	223
	Κεφάλαιο 4^ο Συζήτηση	227-248
4.1.	Μικροβιακή ποικιλότητα στο Νερό	229
4.1.1.	Ποσοτική ανάλυση του μικροβιακού φορτίου στο νερό.	231
4.1.2.	Ποιοτική ανάλυση του μικροβιακού φορτίου στο νερό.	235
4.1.3.	Παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό	240
4.2.	Μικροβιακή Ανάλυση στις Πρώτες ύλες	241
4.2.1.	Ανάλυση πληθυσμού βακτηριών	241
4.2.2.	Ανάλυση πληθυσμού νηματοειδών μυκήτων	242
4.3.	Μικροβιακή Ανάλυση στο Τελικό Προϊόν	243
	Γενικά Συμπεράσματα	245
	Μελλοντική έρευνα	247

Βιβλιογραφία	249-270
---------------------	---------

Παράρτημα	271-281
------------------	---------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



(Bereschenko, και συν. 2010)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ιστορική Αναδρομή Φαρμακευτικών και Καλλυντικών Προϊόντων

Η επιθυμία του ανθρώπου να φαίνεται όμορφος είναι οικουμενική και διαχρονική. Αρχαιολογικά ευρήματα ανέδειξαν το πρώτο καλλυντικό προϊόν, ένα μακιγιάζ από ορυκτά και φυτά, προορισμένο για βασιλική χρήση, που τοποθετείται στο 4000 π.Χ. στην Αρχαία Αίγυπτο. Σύμφωνα με χειρόγραφα από την Αρχαία Αίγυπτο, υποδεικνύεται ο στενός δεσμός μεταξύ καλλυντικών και φαρμάκων από την αρχαιότητα καθώς γινόταν χρήση συστατικών μολύβδου τόσο για φαρμακευτική όσο και για καλλυντική χρήση (Lin 2010). Πρόσφατες χημικές αναλύσεις έδειξαν ότι ενώσεις του μολύβδου όπως ο γαληνίτης (PbS) και ο κερουσίτης (PbCO_3) μαζί με λαυριονίτη (Pb(OH)Cl) και φωσγενίτη ($\text{Pb}_2(\text{CO}_3)\text{Cl}_2$), χρησιμοποιούνταν ως καλλυντικά από τους Αρχαίους Αιγυπτίους ενώ σύμφωνα με αρχαία κείμενα χρησιμοποιούνταν σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα ως θεραπείες σε ασθένειες των ματιών και ως θρεπτικά συστατικά του δέρματος (Frost, και συν. 2003, Ribechini, και συν. 2011). Αρωματισμένα έλαια,

αλοιφές και κρέμες χρησιμοποιούνταν τόσο για τον καλλωπισμό των Αρχαίων Αιγυπτίων όπως για τον καθαρισμό και την καταπράυνση του δέρματος και για να την κάλυψη των σωματικών οσμών, όσο και για τη διατήρηση της υγιεινής και της υγείας τους παρέχοντάς τους προστασία από τον ήλιο και τους ζεστούς ανέμους. Για τόνωση των χρωμάτων και των χαρακτηριστικών στα πρόσωπα τους εφαρμόζαν παρασκευάσματα από γαληνίτη και μαλαχίτη σε συνδυασμό με οξειδωμένο χαλκό και άλλα πολύχρωμα μεταλλεύματα του χαλκού καθώς και στάχτη (Yu 2008). Οι θρησκευτικές τελετές υπαγόρευαν την παρασκευή αρωματικών ελαίων με βασικά συστατικά, εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών σμύrna, θυμάρι, μαντζουράνα, χαμομήλι, λεβάντα, κρίνο, δυόσμο, δεντρολίβανο, κέδρο, τριαντάφυλλο και αλόη καθώς και με το ελαιόλαδο, το σησαμέλαιο, και το αμυγδαλέλαιο.

Το 3000 π.Χ. οι Κινέζοι ξεκίνησαν να εφαρμόζουν χρώσεις στα νύχια με αραβικό κόμμι, ζελατίνη, κερί μελισσών και αυγό. Το χρώμα υποδείκνυε την κοινωνική τάξη. Αργότερα, οι Κινέζοι και οι Ιάπωνες χρησιμοποίησαν σκόνη από ρύζι, για να βάψουν τα πρόσωπά τους λευκά ενώ οι χρώσεις της χέννας εφαρμόστηκαν για τη χρώση των μαλλιών και του προσώπου (<http://www.cosmeticsinfo.org>).

Από αναφορές και από αρχαιολογικά ευρήματα είναι γνωστό ότι οι Αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι, χρησιμοποιούσαν καλλυντικά. Το 1000 π.Χ. οι γυναίκες στην Αρχαία Ελλάδα χρησιμοποιούσαν για να βελτιώσουν την απόχρωση της επιδερμίδας τους, λευκό μόλυβδο, λευκή άργιλο, γύψο ή κιμωλία και συνθλιμμένα μούρα ως πούδρα. Άργιλος στο χρώμα της ώχρας με προσθήκη κόκκινου σιδήρου ή με χρωστικές από φαιοφύκη (*Fucus* sp.), φυτά και φρούτα αποτελούσε ένα προϊόν για να δίνει κόκκινο χρώμα στα χείλη και στα μάγουλα (Elslande, και συν. 2008). Ενώσεις του μολύβδου χρησιμοποιούνταν και σε φαρμακευτικά προϊόντα της εποχής εκείνης όπως αναφέρουν οι Διοσκουρίδης και Πλίνιος και συγκεκριμένα περιγράφουν φαρμακευτικά προϊόντα για οφθαλμολογική χρήση που περιείχαν οξείδιο του μολύβδου αναμιγμένο με ορυκτό άλας και ανθρακικό νάτριο (Frost, και συν. 2003). Μερικούς αιώνες αργότερα, τον 2^ο



Εικόνα 1.1: Ρωμαϊκό φιαλίδιο που περιέχει ροζ καλλυντικό (1^{ος} αι. π.Χ.) (Elslande, και συν. 2008).

αιώνα μ.Χ. ο Κλαύδιος Γαληνός, ο δεύτερος σπουδαιότερος ιατρός της Αρχαιότητας μετά τον Ιπποκράτη εφηύρε μία κρύα κρέμα αποτελούμενη από γαλάκτωμα από κερί μελισσών, φυτικά έλαια και ροδόνηρο. Τα ίδια αυτά υλικά χρησιμοποιούνται και στη σημερινή εποχή για την περιποίηση του δέρματος (Lin 2010).

Τον Μεσαίωνα, στην Αγγλία, καλλυντικά όπως κρέμες και βαφές χρησιμοποιούνταν ευρέως. Ορισμένοι όμως υποστήριζαν ότι έπρεπε να απαγορευτούν και ότι αποτελούν κίνδυνο για την υγεία επειδή θεωρούσαν ότι παρεμποδίζουν τη σωστή κυκλοφορία του αίματος. Την ίδια εποχή στην Ιατρική Σχολή του Σαλέρνο, μία γυναίκα ιατρός συνέταξε βιβλία που περιείχαν οδηγίες για την παρασκευή καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων τόσο για καλλωπιστικούς σκοπούς όσο και για τη θεραπεία ασθενειών. Πρώτες ύλες στα σκευάσματα αυτά ήταν φυτά όπως το *Inula* sp., ο κόκκινος κισσός (*Bryonia dioica*) και το κρεμμύδι (*Allim cepa*) καθώς και παράγωγα και εκχυλίσματά τους όπως η αλόη από το φυτό *Aloe* sp., η μαστίχα από το φυτό *Pistacia lentiscus*, το ελαιόλαδο από το φυτό *Olea europea*, η καμφορά από το φυτό *Cinnamomum camphora* και η κανέλα από το φυτό *Cinnamomum zeylanicum*. Επίσης χρησιμοποιούνταν προϊόντα ζωικής προέλευσης όπως ζωικό λίπος (από αρκούδες, ελάφια, χοίρους και κατσίκες), μέλισσες, μέλι, κερί μελισσών, κόκκαλο σουπιάς, ελεφαντόδοντο, γάλα, αυγά (χήνας, κότας, μερμηγκιών) και σαύρες. Ορισμένες χρήσεις των σκευασμάτων αφορούσαν τη θεραπεία της ψωρίασης, της απώλειας μαλλιών, των εγκαυμάτων, της ακμής, την καταπολέμηση των συριγγίων και των παρασίτων του εντέρου, την αντιγήρανση, τη στοματική υγιεινή, την περιποίηση των μαλλιών και του δέρματος (μαλακτικές και ενυδατικές ουσίες, λευκαντικά), και τον καλλωπισμό του σώματος (πούδρες, βαφές μαλλιών) (Cavallo, και συν. 2008). Τα ορυκτά επίσης κατείχαν σημαντική θέση στην παρασκευή φαρμακευτικών και καλλυντικών σκευασμάτων τον Μεσαίωνα. Στον Πίνακα 1.1. παρουσιάζονται ορυκτά που είχαν ευρεία χρήση την εποχή εκείνη.

Προχωρώντας στην Αναγέννηση, στην Ευρώπη μόνο η αριστοκρατία χρησιμοποιούσε καλλυντικά προϊόντα, με την Ιταλία και τη Γαλλία να αναδεικνύονται σε κυρίαρχα κέντρα παρασκευής καλλυντικών. Ο μόλυβδος χρησιμοποιείται και την περίοδο αυτή, αλλά πολλές φορές εναλλάσσεται με το αρσενικό που χρησιμοποιούνταν σε πούδρες για το πρόσωπο. Στη δύση της Αναγέννησης, οι γυναίκες στην Ευρώπη, χρησιμοποιούν ποικιλία προϊόντων, περιλαμβανομένου και του λευκού μολύβδου ((PbCO₃)₂·Pb(OH)₂) για να κάνουν πιο ανοιχτόχρωμο το δέρμα τους. Η βασίλισσα Ελισάβετ Α΄ της Αγγλίας, χρησιμοποιούσε τη

λεγόμενη «Μάσκα της Νιότης» που αποτελούνταν από ενώσεις του θείου όπως το sulphur black ($C_6H_4N_2O_5$) και η στυπτηρία ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) και από μέλι. Οι ενώσεις αυτές μέχρι και σήμερα χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά και στα φαρμακευτικά προϊόντα.

Πίνακας 1.1: Ορυκτά που χρησιμοποιούνταν τον 11^ο αιώνα μ.Χ. και η χρήση τους (Cavallo, και συν. 2008).

Κοινή Ονομασία	Επιστημονική Ονομασία	Χρήση τον 11 ^ο αιώνα μ.Χ.	Σημερινή Χρήση
Στυπτηρία	Άλας καλίου του θεικού αργιλίου ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$)	Πούδρες προσώπου	Προϊόντα για την περιποίηση του δέρματος
Χαλαζιάς	Διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2)	Θεραπείες για αποκατάσταση του δέρματος	Απόξεση δέρματος
Λιθάργυρος	Μονοξείδιο του μολύβδου (PbO)	Σοβαρού βαθμού ψωρίαση στο πρόσωπο	Ακμή
Σεπιόλιθος	Άλας μαγνησίου του πυριτικού οξέος ($Mg_4Si_6O_{15}(OH)_2 \cdot 6H_2O$)	Επιτεφυκίτιδα	Αντιγήρανση
Υδράργυρος	Υδράργυρος	Σοβαρού βαθμού ψωρίαση δέρματος	-
Νάτρον	Ένυδρο ανθρακικό νάτριο ($Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$)	Παράγοντας ξήρανσης	Παράγοντας ξήρανσης
Σανδαράχη κίτρινη	Αρσενικό τρισουλφίδιο (As_2S_3)	Οριστική αποτρίχωση	Απολέπιση
Αιματίτης	Τρισθενής σίδηρος (Fe_2O_3)	Παρθενοποίηση	Καλλυντικά
Κίσσηρη	Σπογγώδες ηφαιστιογενές πέτρωμα	Λεύκανση δοντιών	-
Ασβέστης	Μονοξείδιο του ασβεστίου (CaO)	Αποχρωματισμός επιδερμίδας	Καλλυντικά
Σόδα	Ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3)	Λεύκανση δοντιών και επιδερμίδας	Λεύκανση δοντιών και επιδερμίδας
Θείο	Θείο	Καταπολέμηση άσχημης αναπνοής	Λιπαρό δέρμα
Τρυγία	Τρυγικό οξύ	Ακμή	Ακμή
Βόρακας	Βορικό Νάτριο ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)	Αλοιφή για την περιποίηση της επιδερμίδας	Διάταση των ραβδώσεων
Λευκός μολύβδος	Ανθρακικός μολύβδος ($(PbCO_3)_2 \cdot Pb(OH)_2$)	Έγκαυμα από ηλιακή ακτινοβολία	Αντιγήρανση
Λευκό μάρμαρο	Ανθρακικό Ασβέστιο ($CaCO_3$)	Λεύκανση δοντιών	Οδοντόκρεμα

Τον 19^ο αιώνα άρχισε η χρήση των οξειδίων του ψευδαργύρου στις πούδρες προσώπου, αντικαθιστώντας τις ενώσεις μολύβδου, χαλκού και αρσενικού που ήταν βλαβερές για τον

άνθρωπο. Η ένωση κερουσίτης (PbCO_3) που χρησιμοποιούταν και στην αρχαιότητα, βρέθηκε να προκαλεί ρίγος στο πρόσωπο, μυϊκή παράλυση ακόμα και θάνατο. Παρ' όλα αυτά, τοξικές ουσίες για τα μάτια και τα χείλη όπως ο μόλυβδος, το σουλφίδιο του αντιμονίου και το σουλφίδιο του υδραργύρου συνεχίστηκαν να χρησιμοποιούνται. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, αρχίζει η ευρεία χρήση των καλλυντικών από τις γυναίκες ως αποτέλεσμα της διαρκούς πίεσης να μοιάζουν νεότερες (<http://www.ardes.ro>). Η τεχνολογία παρασκευής καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων βελτιώνεται ενώ θεσπίζονται αυστηροί νόμοι για την ασφάλεια τους. Στον 21^ο αιώνα, ο δεσμός μεταξύ καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων ολοένα και ενδυναμώνεται εξαιτίας της αυξανόμενης ζήτησης καλλυντικών με φαρμακευτικές ιδιότητες που να παρέχουν ταυτόχρονα ασφάλεια και αποτελεσματικότητα. Τα καλλυντικά προϊόντα δε θεωρούνται πια πολυτέλεια για το μέσο καταναλωτή αλλά έχουν εξελιχθεί σε κοινωνικώς ευεργετικά και απαραίτητα προϊόντα που ικανοποιούν τις φυσικές και συναισθηματικές ανάγκες του σύγχρονου άνδρα και της σύγχρονης γυναίκας (Lin 2010).

1.2. Νομοθετικό Πλαίσιο Φαρμακευτικών και Καλλυντικών Προϊόντων

Ορισμοί

Στη σημερινή εποχή ο όρος δερμοκαλλυντικά (dermocosmetics/cosmeceuticals/dermoceuticals) αναφέρεται συχνά και αφορά τα προϊόντα «υβρίδια» μεταξύ φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων. Τα προϊόντα αυτά ενισχύουν την εμφάνιση όπως τα καλλυντικά αλλά ταυτόχρονα οι ενώσεις που περιέχουν επηρεάζουν τη βιολογική λειτουργία (Dureja, και συν. 2005). Ο όρος όμως δερμοκαλλυντικό δεν υφίσταται σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία της Ε.Ε. και του FDA (Castro 2011), και συνήθως τα προϊόντα αυτά χαρακτηρίζονται ως προϊόντα «borderline», καθώς ανάλογα με τη χώρα που διατίθενται μπορεί να χαρακτηριστούν ως καλλυντικά, φάρμακα, ήμι-φάρμακα (quasi-drug, Ιαπωνία) ή OTC προϊόντα (over the counter, Η.Π.Α.). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, τα «borderline» προϊόντα κατηγοριοποιούνται είτε ως φάρμακα είτε ως καλλυντικά και αναλόγως ακολουθούν την εκάστοτε κοινοτική νομοθεσία ή τις εθνικές νομοθεσίες (Vernon και Nwaogu 2004).

Η Ε.Ε. έχει εκδώσει Οδηγίες και Κανονισμούς που καθορίζουν το Νομικό Πλαίσιο των φαρμακευτικών και των καλλυντικών προϊόντων.

Συγκεκριμένα με την **Οδηγία 2001/83/ΕΚ** του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου περί κοινοτικού κώδικα για τα φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση, ισχύουν τα κάτωθι:

Άρθρο 1:

«...νοείται ως φάρμακο κάθε ουσία ή σύνθεση ουσιών ως έχουσα θεραπευτικές ή προληπτικές ιδιότητες έναντι ασθενειών ανθρώπων. Θεωρείται, ομοίως ως φάρμακο, κάθε ουσία ή σύνθεση ουσιών που δύναται να χορηγηθεί σε άνθρωπο, προς το σκοπό να γίνει ιατρική διάγνωση ή να αποκατασταθούν, να βελτιωθούν ή να τροποποιηθούν φυσιολογικές λειτουργίες στον άνθρωπο.»

«...νοείται ως ουσία, κάθε ουσία ανεξαρτήτως προέλευσης που μπορεί να είναι:

- ανθρώπινη, όπως: το ανθρώπινο αίμα και τα παράγωγα του ανθρώπινου αίματος.*
- ζωική, όπως: οι μικροοργανισμοί, ολόκληρα ζώα, τμήματα οργάνων, ζωικές εκκρίσεις, τοξίνες, ουσίες λαμβανόμενες δι' εκχυλίσματος, παράγωγα αίματος.*
- φυτική, όπως: μικροοργανισμοί, φυτά, τμήματα φυτών, φυτικές εκκρίσεις, ουσίες λαμβανόμενες δι' εκχυλίσεως.*
- χημική, όπως: χημικά στοιχεία, φυσικά, χημικές ύλες και χημικά προϊόντα λαμβανόμενα εκ μετατροπής και συνθέσεως »*

Άρθρο 70:

«Όταν οι αρμόδιες αρχές επιτρέπουν την κυκλοφορία ενός φαρμάκου στην αγορά, το κατατάσσουν ρητά στα:

- φάρμακα για τα οποία απαιτείται ιατρική συνταγή.*
- φάρμακα για τα οποία δεν απαιτείται ιατρική συνταγή.»*

Σύμφωνα με το Παράρτημα I της ίδιας οδηγίας, για τον έλεγχο των πρώτων υλών και του τελικού προϊόντος, ακολουθούνται οι διατάξεις των μονογραφιών της ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας ή της εθνικής φαρμακοποιίας όταν δεν υπάρχουν αντίστοιχες μονογραφίες στην ευρωπαϊκή. Η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία είναι υποχρεωτική για τα κράτη μέλη

Σύμφωνα με τον **Κανονισμό 1223/2009** του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για τα καλλυντικά προϊόντα (αναδιατύπωση της Οδηγίας 76/768/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθεσιών των κρατών μελών των αναφερόμενων στα καλλυντικά προϊόντα), ισχύουν τα κάτωθι:

«ως καλλυντικό προϊόν νοείται κάθε ουσία ή μείγμα που προορίζεται να έλθει σε επαφή με εξωτερικά μέρη του ανθρώπινου σώματος (επιδερμίδα, τριχωτά μέρη του σώματος και της κεφαλής, νύχια, χείλη και εξωτερικά γεννητικά όργανα) ή με τα δόντια και τους βλεννογόνους της στοματικής κοιλότητας, με αποκλειστικό ή κύριο σκοπό τον καθαρισμό τους, τον αρωματισμό τους, τη μεταβολής της εμφάνισής τους, την προστασία τους, τη διατήρησή τους σε καλή κατάσταση ή τη διόρθωση των σωματικών οσμών.»

«ως ουσία νοείται χημικό στοιχείο και οι ενώσεις αυτού σε φυσική κατάσταση ή έχοντας προκύψει από διαδικασία παρασκευής, συμπεριλαμβανομένων των αναγκαίων για τη σταθερότητά του προσθηκών και των προσμίξεων που προέκυψαν από τη διαδικασία αλλά εξαιρουμένων των εκχυλισμάτων που μπορούν να απομακρυνθούν χωρίς να θιγεί η σταθερότητα ή να αλλάξει η σύνθεση της ουσίας.»

Στον ίδιο κανονισμό αναφέρεται ότι:

«Στα καλλυντικά προϊόντα μπορούν να περιλαμβάνονται, μεταξύ άλλων, τα εξής: κρέμες, γαλακτώματα, λοσιόν, γέλες και λάδια για το δέρμα, μάσκες ομορφιάς, χρωματισμένες βάσεις (υγρά, πάστες, πούδρες), πούδρες για το μακιγιάζ, πούδρες για χρήση μετά το λουτρό, πούδρες για την υγιεινή του σώματος, σαπούνια για το μπάνιο, αποσμητικά σαπούνια, αρώματα, κολόνιες και ύδωρ Κολωνιάς, παρασκευάσματα για το μπάνιο και το ντους (άλατα, αφροί, λάδια, γέλες), αποτριχωτικά, αποσμητικά και αντιδρωτικά, χρωστικές μαλλιών, προϊόντα για το κατσάρωμα, το ίσιωμα και τη στερέωση των μαλλιών, προϊόντα για τη διευθέτηση των μαλλιών (φορμάρισμα), προϊόντα καθαρισμού των μαλλιών (λοσιόν, σκόνες, σαμπουάν), προϊόντα συντήρησης των μαλλιών (λοσιόν, κρέμες, λάδια), προϊόντα για την κόμμωση (λοσιόν, λακ, μπριγιαντίνες), προϊόντα ξυρίσματος (κρέμες, αφροί, λοσιόν), προϊόντα για το μακιγιάζ και προϊόντα για την αφαίρεση του μακιγιάζ (ντεμακιγιάζ), προϊόντα προοριζόμενα να χρησιμοποιηθούν στα χείλη, προϊόντα για την περιποίηση των δοντιών και του στόματος, προϊόντα για την περιποίηση και το βάψιμο των νυχιών, προϊόντα για την περιποίηση των ευαίσθητων περιοχών του σώματος, εξωτερικής χρήσης, προϊόντα αντιηλιακά, προϊόντα για το μαύρισμα χωρίς ήλιο, προϊόντα για τη λεύκανση του δέρματος και προϊόντα αντιρρυτιδικά.»

Μικροβιολογικός έλεγχος φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων

Τόσο τα φαρμακευτικά όσο και τα καλλυντικά προϊόντα ακολουθούν τις εθνικές νομοθεσίες καθώς και την ευρωπαϊκή νομοθεσία. Η Οδηγία 2001/83/EK και ο Κανονισμός 1223/2009 δεν ορίζουν συγκεκριμένα όρια και πρωτόκολλα για τον έλεγχο των προϊόντων, όμως παραπέμπουν στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία και στην Επιστημονική Επιτροπή για την Ασφάλεια των Καταναλωτών (Scientific Committee on Consumer Safety-SCCS) οι οποίες εκτός των άλλων, καθορίζουν αναλυτικά το μικροβιολογικό έλεγχο των προϊόντων και τα εκάστοτε όρια που πρέπει να τηρούνται.

Τα φαρμακευτικά σκευάσματα που προορίζονται για το δέρμα εμπίπτουν στην κατηγορία 2 της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας και πρέπει να έχουν ολικό βιώσιμο αερόβιο πληθυσμό μέχρι 10^2 μικροοργανισμούς (αερόβια βακτήρια και μύκητες) ανά 1g ή ανά ml καθώς και απουσία των *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* καθορισμένα στο 1 g ή στο 1 ml. Σύμφωνα με τα εναρμονισμένα πρότυπα που περιγράφονται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία τα κριτήρια για τα φαρμακευτικά σκευάσματα που προορίζονται για το δέρμα ορίζουν ότι: α) ο ολικός αριθμός αερόβιων μικροοργανισμών (TAMC) πρέπει να είναι 10^2 cfu/g ή ml, β) ο ολικός αριθμός ζυμών/μούχλας (TYMC) πρέπει να είναι 10^1 cfu/g ή ml και γ) να απουσιάζουν οι μικροοργανισμοί *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus aureus* καθορισμένα στο 1g ή στο 1ml. Για τις ουσίες που χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτική χρήση τα όρια διαμορφώνονται ως εξής: TAMC πρέπει να είναι 10^3 cfu/g ή ml και TYMC πρέπει να είναι 10^2 cfu/g ή ml. Τα επιτρεπτά όρια ερμηνεύονται ως εξής: 10^1 cfu/g μέγιστος επιτρεπτός αριθμός = 20, 10^2 cfu/g μέγιστος επιτρεπτός αριθμός = 200, 10^3 cfu/g μέγιστος επιτρεπτός αριθμός = 2000. Εκτός των ορίων αυτών κάθε πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται μπορεί να διαθέτει την αντίστοιχη μονογραφία της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας στην οποία μπορεί να ορίζονται διαφορετικά μικροβιολογικά όρια.

Επιπλέον μικροβιολογικός έλεγχος των φαρμακευτικών προϊόντων (τελικών) πραγματοποιείται με τις λεγόμενες δοκιμασίες πρόκλησης (challenge test) στις οποίες ελέγχεται η αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων που υπάρχουν στα σκευάσματα. Η βασική αρχή της διαδικασίας είναι η επιμόλυνση τους σκευάσματος με γνωστό εμβόλιο μικροοργανισμών (10^5 - 10^6 cfu/g ή ml) και καταμέτρηση των μικροοργανισμών σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι οι:

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* και *Aspergillus niger*, χωρίς όμως να αποκλείεται η χρήση άλλων μικροοργανισμών. Η αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων κρίνεται επαρκής όταν υπάρχει σημαντική μείωση ή μη αύξηση των μικροοργανισμών ακολουθώντας ταυτόχρονα τα όρια της κάθε κατηγορίας. Για σκευάσματα που εφαρμόζονται τοπικά ακολουθούνται οι τιμές του Πίνακα 1.2 (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008).

Πίνακας 1.2: Μείωση σε λογαριθμικές μονάδες που πρέπει να παρατηρηθεί κατά τις δοκιμασίες πρόκλησης. Το κριτήριο A εκφράζει την προτεινόμενη αποτελεσματικότητα που πρέπει να επιτευχθεί ενώ σε περιπτώσεις που υπάρχει αυξημένος κίνδυνος παρενεργειών (από τις αντιμικροβιακές ενώσεις) εφαρμόζεται το κριτήριο B. Όπου NI: όχι αύξηση.

		Μείωση Log			
		2 ημ.	7 ημ.	14 ημ.	28 ημ.
Βακτήρια	A	2	3	-	NI
	B	-	-	3	NI
Μύκητες	A	-	-	2	NI
	B	-	-	1	NI

Όσον αφορά τα καλλυντικά προϊόντα ο μικροβιολογικός έλεγχος πραγματοποιείται σε 3 φάσεις στο τελικό προϊόν, κατά τη διαδικασία παρασκευής του προϊόντος και μετά το άνοιγμα του προϊόντος.

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή SCCP (Scientific Committee of Consumer Products-2010) διακρίνει δύο κατηγορίες καλλυντικών προϊόντων. Η πρώτη αφορά τα προϊόντα που προορίζονται για παιδιά κάτω των 3 ετών, για την περιοχή των ματιών και για τους βλεννογόνους και τα προϊόντα που παραμένουν (leave-on products). Η δεύτερη κατηγορία περιέχει τα υπόλοιπα προϊόντα και αυτά που ξεπλένονται (rinse-off products).

Οι δύο αυτές κατηγορίες έχουν διαφορετικά μικροβιολογικά όρια. Στην πρώτη ο ολικός βιώσιμος πληθυσμός αερόβιων μεσόφιλων μικροοργανισμών δε πρέπει να υπερβαίνει τις 100 cfu/g ή ml σε 0,5 g ή 0,5 ml προϊόντος. Στη δεύτερη κατηγορία δε πρέπει να υπερβαίνει τις 1000 cfu/g σε 0,1 g ή 0,1 ml προϊόντος. Επίσης σε καμία από της δύο κατηγορίες, δεν πρέπει να ανευρίσκονται δυνητικά παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως *Staphylococcus aureus*,

Pseudomonas aeruginosa, *Candida albicans*. Βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae όπως η *E. coli*, αν και δεν αναφέρονται στην οδηγία της SSCP, οφείλουν να απουσιάζουν από τα προϊόντα.

Η μικροβιακή αντοχή των καλλυντικών προϊόντων εξαρτάται από τη σύσταση, το περιεχόμενο σε συντηρητικά, τις συνθήκες υγιεινής κατά την παρασκευή του, τη συσκευασία, τη μεταφορά και την αποθήκευση. Ιδιαίτερα τα προϊόντα με βάση το νερό είναι ευαίσθητα στην ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Η επιμόλυνση μπορεί να προκύψει τόσο κατά την παραγωγή ή κατά το γέμισμα των δοχείων του προϊόντος, όμως οι πρώτες ύλες είναι αυτές που συμμετέχουν κατά κύριο λόγο στην επιμόλυνση του τελικού προϊόντος. Ο έλεγχος των πρώτων υλών ειδικά αυτών φυσικής προέλευσης καθώς και του νερού είναι απαραίτητος για την αποφυγή επιμολύνσεων. Επιπλέον, επιμόλυνση μπορεί να συμβεί και μετά το άνοιγμα του προϊόντος καθώς υπόκειται σε συνεχή και διαφόρων βαθμών μόλυνση κατά την επαφή με το δέρμα ή το περιβάλλον. Η αποτελεσματικότητα των συντηρητικών ελέγχεται με τις δοκιμασίες πρόκλησης όπως αυτές περιγράφονται στις Φαρμακοποιίες με χρήση των μικροοργανισμών *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Candida albicans*. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των συντηρητικών είναι αποδεκτές, όταν παρατηρείται σημαντική μείωση ή καθόλου αύξηση (Scientific Committee on Consumer Safety 2010). Τέλος για το μικροβιολογικό έλεγχο των καλλυντικών προϊόντων προτείνεται η χρήση των πρωτοκόλλων ISO 16212:2008 (Enumeration of yeast and mold), ISO 22149:2006 (Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria), ISO 18416:2007 (Detection of *Candida albicans*), ISO 22717:2006 (Detection of *Pseudomonas aeruginosa*), ISO 22718:2006 (Detection of *Staphylococcus aureus*), ISO 21150 (Detection of *E. coli*) (Detmer, και συν. 2007).

1.3. Αντηλιακά Προϊόντα

Η προστασία από τον ήλιο και την επιβλαβή ακτινοβολία του, ανέκαθεν απασχολούσε τους ανθρώπους. Στην αρχαιότητα, ο ρουχισμός ήταν ανάλογος του τοπικού κλίματος και πολλές φορές σκοπό είχε την προστασία του δέρματος από τις επιπτώσεις του ήλιου. Χρησιμοποιούνταν ρούχα από βαμβάκι, μαλλί ή λινάρι που κάλυπταν μεγάλο τμήμα του σώματος, του κεφαλιού και του προσώπου. Ένας εναλλακτικός τρόπος για την προφύλαξη από τον ήλιο ήταν οι ομπρέλες οι

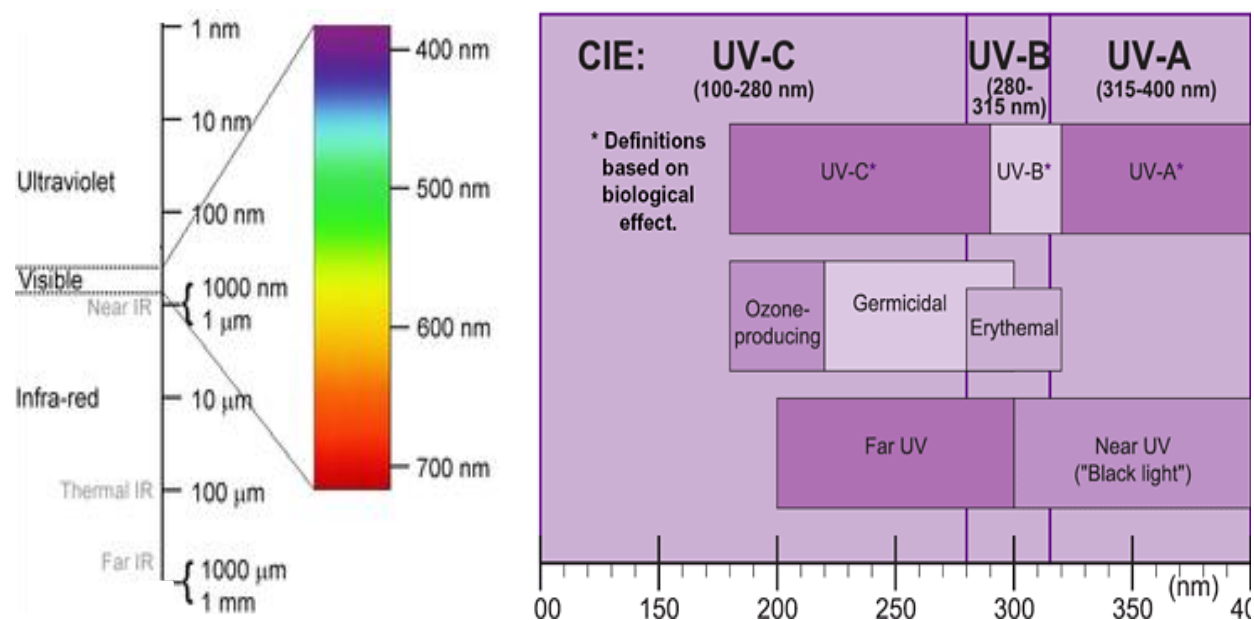
οποίες χρησιμοποιούνταν από την αρχαιότητα, για τη σκίαση σημαντικών προσωπικοτήτων, τόσο στην Αρχαία Αίγυπτο και στην Αρχαία Ελλάδα όσο και στη Μεσοποταμία, στην Ινδία και στην Κίνα και αποτελούσαν σημάδι δόξας και εξουσίας. Μόνο τον 18^ο αιώνα άρχισαν να κυκλοφορούν ομπρέλες μικρές για τον ήλιο, για τη σκίαση των κυριών. Η προφύλαξη από τον ήλιο σχετιζόταν και με την επιθυμία να έχουν ιδιαίτερα οι γυναίκες λευκό δέρμα, καθώς, όπως η ενδυμασία έτσι και το χρώμα του δέρματος αποτελούσε δείγμα της κοινωνικής τάξης που άνηκε κάποιος. Άλατα του αρσενικού αποτέλεσαν το πρώτο καλλυντικό προϊόν στην Αρχαία Αίγυπτο και στην Αρχαία Ελλάδα για το σκοπό αυτό. Αργότερα, το 2^ο αιώνα μ.Χ. ο Κέλσος συνιστούσε την κάλυψη του κεφαλιού και του σώματος με λάδι για την προστασία από τον ήλιο. Οι Θιβητιανοί, χρησιμοποιούσαν ένα είδος αντιηλιακού από πίσσα και βότανα ενώ οι Ινδιάνοι της Γουιάνας χρησιμοποιούσαν εκχυλίσματα φυτών (Khazaeli και Mehrabani 2008, Urbach 2001).

Στην πιο πρόσφατη ιστορία, σημαντικός σταθμός για την μετέπειτα εξέλιξη των σύγχρονων αντιηλιακών ήταν η ανακάλυψη της ακτινοβολίας εκτός του ορατού φάσματος. Το 1800 ο Herschel ανακάλυψε την υπέρυθρη ακτινοβολία (Ring 2007) και ένα χρόνο αργότερα ο Ritter ανακάλυψε την υπεριώδη ακτινοβολία (Hockberger 2002). Στο τέλος του 19^{ου} αιώνα επαληθεύτηκε πειραματικά από τον Widmark, η συσχέτιση της υπεριώδους ακτινοβολίας με την πρόκληση ερυθρημάτων στο δέρμα ενώ την ίδια περίοδο περιγράφηκαν πολλές ασθένειες φωτοευαισθησίας.

Ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως τα πρώτα αντιηλιακά ήταν ουσίες που απορροφούσαν την υπεριώδη ακτινοβολία όπως η όξινηθεική κινίνη, η εσκουλίνη, η κίτρινη βαζελίνη, η 2-ναφθολη-6,8-διθειικό νάτριο, η τανίνη, η προκαΐνη, η βενζιμιδαζόλη-θειικό οξύ, η κίτρινη παραφίνη και ο μεθυλικός εστέρας του σαλικυλικού οξέος (Urbach 2001). Αργότερα, ο βενζυλικός εστέρας του σαλικυλικού οξέος, ο βενζυλικός εστέρας του κινναμωμικού οξέος, ο φαινολικός εστέρας του σαλικυλικού οξέος και το αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA) χρησιμοποιήθηκαν στα πρώτα εμπορικά αντιηλιακά (Levy 2006).

Σήμερα οι κίνδυνοι της υπεριώδους ακτινοβολίας είναι γνωστοί προκαλώντας φωτοκαρκινογένεση, φωτογήρανση και φωτοευαισθησία, είτε λόγω γενετικών μεταλλαγών στο DNA των κύτταρων είτε λόγω της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (Lautenschlager, και συν. 2007). Η υπεριώδης ακτινοβολία (UVR) εκτείνεται από τα 10 nm έως τα 400 nm (Εικόνα 1.2), όμως τα μήκη κύματος που είναι βλαβερά για τον άνθρωπο είναι η UVA ακτινοβολία (320-400 nm) η οποία διαχωρίζεται στην UVA I (340-400 nm) και στη UVA II (320-340 nm) και η

UVB ακτινοβολία (290-320 nm) (Palm και O'Donoghue 2007). Έχει διαπιστωθεί ότι η UVB ακτινοβολία είναι υπεύθυνη για το ερύθημα που προκαλείται κατά την παραμονή στον ήλιο και για τις υπόλοιπες βλάβες στο δέρμα. Τα σημερινά αντιηλιακά προστατεύουν τόσο από την UVA όσο και από την UVB ακτινοβολία και οφείλουν τη δράση τους σε ουσίες που ονομάζονται φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας που παρεμποδίζουν την υπεριώδη ακτινοβολία να φτάσει στη στιβάδα του δέρματος. Τα φίλτρα υπεριώδους ακτινοβολίας διαχωρίζονται ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους, στους χημικούς (οργανικούς) απορροφητές και στους φυσικούς (ανόργανους) παρεμποδιστές. Οι πρώτες ενώσεις απορροφούν υψηλής έντασης υπεριώδη ακτινοβολία με διέγερση σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση και στη συνέχεια μεταπίπτουν στην αρχική ενεργειακή κατάσταση με ταυτόχρονη εκπομπή ακτινοβολίας μεγαλύτερου μήκους κύματος αλλά μικρότερης ενέργειας. Οι δεύτερες ενώσεις αντανακλούν ή σκεδάζουν την υπεριώδη ακτινοβολία (Levy 2006). Επιπλέον τα αντιηλιακά περιέχουν και αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως φλαβονοειδή και καροτενοειδή τα οποία καταστρέφουν τις ελεύθερες ρίζες (Gilaberte and Gonzáles 2010).



Εικόνα 1.2: Φάσμα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας όπου παρατηρούνται η υπέρυθη ακτινοβολία, το ορατό φάσμα και η υπεριώδης ακτινοβολία (<http://en.wikipedia.org>). Οι κυριότερες κατηγορίες της υπεριώδους ακτινοβολίας, UVA, UVB και UVC (<http://www.xps.org>).

Τα βασικότερα φίλτρα UVB είναι α) τα άλατα του κινναμωμικού οξέος τα οποία αντικατέστησαν τα παράγωγα του PABA, β) τα άλατα του σαλικυλικού οξέος τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως για ενίσχυση άλλων ουσιών που απορροφούν UVB, γ) τα παράγωγα της καμφοράς, δ) το οκτωκρυλένιο το οποίο παρέχει φωτοσταθερότητα στο αντιηλιακό και ανθεκτικότητα στο νερό, ε) το φαινυλοβενζιμιδαζόλιο που είναι υδατοδιαλυτή ένωση που απορροφάει τη UVB ακτινοβολία και στ) οι τριαζόνες όπως το Tinosorb M και το Tinosorb S.

Για προστασία από τη UVA ακτινοβολία χρησιμοποιούνται ουσίες όπως οι βενζοφαινόνες, ο μεθυλικός εστέρας του ανθρανιλικού οξέος, το βουτυλομεθοξυδιβενζυλομεθάνιο και η δικαφορική τετραφθαλιδίνη του θεικού οξέος. Φυσικοί παρεμποδιστές της UV ακτινοβολίας είναι το διοξείδιο του τιτανίου και το οξείδιο του ψευδαργύρου τα οποία εφαρμόζονται ως μικρο- ή νάνο- σωματίδια ώστε να έχουν καλή διασπορά στο δέρμα. Το TiO_2 παρέχει προστασία από ένα ευρύ φάσμα τις UV ακτινοβολίας και δεν προκαλεί δερματίτιδα εξ' επαφής. Επίσης μπορεί να παρέχεται ως αμφίφιλο ώστε να διαλύεται τόσο σε γαλακτώματα νερού όσο και σε λιπαρές φάσεις. Το μειονέκτημα του TiO_2 είναι ότι προκαλεί την λεύκανση της επιδερμίδας κατά την εφαρμογή του αντιηλιακού, χαρακτηριστικό το οποίο δε διαθέτει το ZnO το οποίο έχει δείκτη διαθλαστικότητας 1,9 σε αντίθεση με το TiO_2 που έχει 2,6. Επίσης το ZnO εξασθενεί περισσότερο την UV ακτινοβολία στο εύρος της UVA I, ενώ το TiO_2 είναι πιο δραστικό στο εύρος της UVB ακτινοβολίας (Levy 2006, Palm και O'Donoghue 2007).

Σύμφωνα με την Οδηγία 76/768/ΕΟΚ, τα αντιηλιακά προϊόντα θεωρούνται καλλυντικά προϊόντα. Η κοινοποιηθείσα υπ. αριθμ. E(2006) 4089 Σύσταση της Επιτροπής σχετικά με την αποτελεσματικότητα των αντιηλιακών ορίζει το εξής:

«ως αντιηλιακό προϊόν νοείται κάθε παρασκεύασμα (όπως κρέμα, έλαιο, ζελέ ή σπρέι) που προορίζεται να έρθει σε επαφή με το ανθρώπινο δέρμα με αποκλειστικό ή κύριο σκοπό να το προστατεύσει από την ακτινοβολία UV μέσω της απορρόφησης, της διασποράς ή της αντανάκλασης της ακτινοβολίας.»

Το μέτρο αποτελεσματικότητας της προστασίας που παρέχει ένα αντιηλιακό προσδιορίζεται από το δείκτη ηλιακής προστασίας (sun protection factor - SPF) ο οποίος αφορά την ακτινοβολία UVB καθώς αυτή προκαλεί ερύθημα (Palm και O'Donoghue 2007). Στην παραπάνω Σύσταση (E(2006) 4089) ορίζονται τα εξής:

«ως δείκτης ηλιακής προστασίας νοείται ο λόγος της ελάχιστης δόσης που προκαλεί ερύθημα σε δέρμα που προστατεύεται από αντιηλιακό προϊόν προς την ελάχιστη δόση που προκαλεί ερύθημα στο ίδιο δέρμα χωρίς προστασία»

«Η ελάχιστη δόση που προκαλεί ερύθημα νοείται η ποσότητα της ενέργειας που είναι ικανή να προκαλέσει ερύθημα» και

«ως δείκτης προστασίας UVA νοείται ο λόγος της ελάχιστης δόσης UVA που απαιτείται για να προκληθεί μόνιμη μελάγχρωση σε δέρμα προστατευμένο από αντιηλιακό προϊόν προς την ελάχιστη δόση UVA που απαιτείται για την πρόκληση ελάχιστης μελάγχρωσης στο ίδιο δέρμα χωρίς προστασία».

1.4. Πρώτες ύλες φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων

Οι πρώτες ύλες των δερμοκαλλυντικών προϊόντων μπορούν να είναι ζωικής, φυτικής, μικροβιακής ή χημικής προέλευσης και διαχωρίζονται με βάση τη δράση που επιτελούν στο τελικό προϊόν (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008).

Ανάλογα με την προέλευση τους διακρίνονται σε 3 κατηγορίες εξαιτίας της πιθανής επιμόλυνσης που μπορεί να έχουν. Οι κατηγορίες αυτές είναι: α) οι πρώτες ύλες με υψηλά επίπεδα μόλυνσης, β) οι πρώτες ύλες με ενδιάμεσα επίπεδα μόλυνσης και γ) οι πρώτες ύλες με χαμηλά επίπεδα μόλυνσης. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν ακατέργαστες πρώτες ύλες ζωικής, φυτικής ή ανόργανης προέλευσης οι οποίες δεν είναι αποστειρωμένες και μπορεί να περιέχουν μικροοργανισμούς (gram θετικά ή αρνητικά βακτήρια, μύκητες) που μπορούν να ευνοηθούν ή να αποικοδομήσουν την πρώτη ύλη. Αυτές οι πρώτες ύλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μη στείρα σκευάσματα. Στη δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνονται οι ήπια επεξεργασμένες πρώτες ύλες φυτικής ή χημικής προέλευσης και οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται είναι οι μύκητες και τα βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια. Οι πρώτες ύλες της κατηγορίας αυτής μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε στείρα προϊόντα που πρέπει να πληρούν κριτήρια στείροτητας και ενδοτοξινών. Τέλος στην τρίτη κατηγορία περιλαμβάνονται συνθετικά υλικά ή φυσικά εκχυλίσματα χημικώς καθαρισμένα, των οποίων η διαδικασία παρασκευής είναι ιδιαιτέρως ακραία για την επιβίωση των περισσότερων μικροοργανισμών όπως πχ. πολύ όξινο ή πολύ αλκαλικό pH, υψηλή θερμοκρασία και οσμωτική πίεση. Τέτοιες πρώτες ύλες περιλαμβάνουν

διαλυτές, οργανικές ενώσεις, άλατα, οξέα, αλκοόλες, αντιβιοτικά, αντιμικροβιακά συστατικά (Manu-Tawiah www.wmtpharmaconsultants.com).

Οι βασικές κατηγορίες που διαχωρίζονται οι πρώτες ύλες με βάση τη λειτουργία που επιτελούν στα δερμοκαλλυντικά είναι οι εξής: τα συντηρητικά, οι χρωστικές, οι μαλακτικές ενώσεις, τα φίλτρα UV, οι πηκτικοί παράγοντες, οι επιφανειοδραστικές ενώσεις και τα αντιοξειδωτικά συστατικά.

Τα συντηρητικά ή αντιμικροβιακοί παράγοντες χρησιμοποιούνται με κύριο σκοπό την παρεμπόδιση της ανάπτυξης μικροοργανισμών μέσα στο προϊόν πριν και κατά την χρήση του (White, και συν. 2011). Τα βασικά χαρακτηριστικά ενός ενεργού αντιμικροβιακού μορίου είναι α) ο συντελεστής καταμερισμού υδατικής-λιπαρής φάσης, καθώς οι μικροοργανισμοί εντοπίζονται στην υδατική φάση των προϊόντων και β) η μη απενεργοποίηση του από το pH ή τη διαδικασία παρασκευής. Επιπλέον, η απενεργοποίηση των μικροοργανισμών πρέπει να είναι γρήγορη ώστε να μην υπάρξει προσαρμογή ή αντίσταση στο μέσο συντήρησης. Το EDTA αποτελεί ένα διαδεδομένο συντηρητικό καθώς αποτελεί χηλικό παράγοντα και καταστρέφει την εξωτερική λιπιδική στιβάδα από την οποία εξαρτάται η μεταφορά ιόντων ασβεστίου και μαγνησίου και επιπλέον ευνοεί τη διείσδυση μέσα στο κύτταρο και άλλων αντιμικροβιακών παραγόντων. Άλλες ουσίες που μπορούν δράσουν ως σύστημα συντήρησης είναι οι υγραντικές ενώσεις όπως γλυκερόλη και σορβιτόλη, οι οποίες σε ποσοστά 10-12 % αυξάνουν την ανθεκτικότητα του προϊόντος λόγω μείωσης της διαθεσιμότητας του νερού. Οι αλκοόλες, τα κατιονικά απορρυπαντικά, τα συστατικά των αρωμάτων, τα λιπόφιλα οξέα (λαυρικό και μυριστικό), τα έλαια από φυτά (έλαια γερανιού και ευκαλύπτου) επίσης δρουν στην αυτό-συντήρηση του προϊόντος. Τέλος το pH αποτελεί ένα φυσικό παράγοντα, που μπορεί να παρεμποδίσει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Siquet και Devleeschouwer 2006). Ουσίες που χρησιμοποιούνται ευρέως στα δερμοκαλλυντικά προϊόντα και επιτελούν ταυτόχρονα αντιμικροβιακή δράση συντηρητικού είναι α) η καπριλική γλυκόλη, β) τα μεσαίου μεγέθους κορεσμένα λιπαρά οξέα (C7-C12) όπως επτανοϊκό, καπρυλικό, καπρικό και λαυρικό οξύ καθώς και οι εστέρες τους με γλυκερόλη ή προπυλένιο, τα οποία δρουν ενάντια ιών με φάκελο, βακτηρίων και μυκήτων, γ) η φαινεφυλική αλκοόλη η οποία δρα ως βακτηριοστατικός παράγοντας προκαλώντας γρήγορη και αναστρέψιμη κατάρρευση της διαπερατότητας της μεμβράνης του κυττάρου οδηγώντας στην παρεμπόδιση των ενδοκυτταρικών λειτουργιών, δ) η αιθυλ-εξυλ-γλυκερίνη η οποία είναι δραστική ενάντια στα κορυνοβακτήρια μειώνοντας την

επιφανειακή τάση και ευνοώντας την επαφή άλλων αντιμικροβιακών ενώσεων με τα βακτήρια, ε) οι χηλικοί παράγοντες όπως τα EDTA, λακτικό οξύ, κιτρικό οξύ και φυτικό οξύ, οι οποίοι αυξάνουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης αυξάνοντας την ευαισθησία των κυττάρων στους λοιπούς αντιμικροβιακούς παράγοντες ενώ ταυτόχρονα δεσμεύουν το σίδηρο που είναι απαραίτητος για το μεταβολισμό του κυττάρου, στ) τα φαινολικά αντιοξειδωτικά (καφεϊκό, κουμαρικό και φερουλικό οξύ) συμμετέχουν με μικρό ποσοστό στα σκευάσματα καθώς πέραν των αντιμικροβιακών ενεργιοτήτων τους συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξείδωσης, ζ) τα αιθέρια έλαια και εκχυλίσματα φυτών τα οποία έχουν αντιμικροβιακή δράση λόγω των φαινολικών ενώσεων που περιέχουν όπως θυμόλη και καβρακρόλη, οι οποίες διασπούν τη ροή πρωτονίων αποδιατάσσοντας μη ειδικά το κυτταρόπλασμα, το κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταρική μεμβράνη (Varvaresou, και συν. 2009).

Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις προστίθενται στα δερμοκαλλυντικά για να αναστείλουν τις αντιδράσεις οξείδωσης (96/335/EC, 1996) και να περιορίσουν τις βλαβερές συνέπειες των ριζών οξυγόνου (π.χ. περοξειδία). Επιτελούν δύο σκοπούς, πρώτον, εμποδίζουν την αποικοδόμηση των φυσικών συστατικών του προϊόντος (πρωτεΐνες, σάκχαρα, λιπίδια) και δεύτερον, προστατεύουν τα δερματικά κύτταρα από την καταστροφή και επιβραδύνουν τη διαδικασία της γήρανσης. Οι κυριότερες αντιοξειδωτικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται είναι η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, οι θειόλες και τα φλαβονοειδή (Weber, και συν. 2006). Πολλές αντιοξειδωτικές ενώσεις που προέρχονται από φυτικά εκχυλίσματα όπως η κουρκουμίνη, η σιλυμαρίνη, η ρεσβατρατρόλη, η γενιστεΐνη ή εκχυλίσματα από ρόδι, έχουν και επιπρόσθετες δράσεις, όπως αντιφλεγμονώδη και φωτοπροστατευτική δράση (Chanchal και Swarnlata 2008).

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις αποτελούν μόρια που διαθέτουν τόσο υδρόφιλο όσο και υδρόφοβο τμήμα και τροποποιούν τις ιδιότητες της επιφάνειας των υγρών στα οποία ενσωματώνονται. Διαχωρίζονται με βάση το υδρόφιλο τμήμα τους, σε ανιονικές, κατιονικές, αμφοτερικές και μη ιονικές επιφανειοδραστικές ενώσεις (Guertechin 2006). Οι φυσικές επιφανειοδραστικές ενώσεις μπορεί να είναι φυτικής, ζωικής ή μικροβιακής προέλευσης. Οι κυριότερες ομάδες επιφανειοδραστικών ουσιών που παράγονται κατά τη μικροβιακή ζύμωση είναι οι αλκυπολυόλες (π.χ. τρεχαλόζη) που αποτελούν εξωκυτταρικά συστατικά των ακτινομυκήτων *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium* και *Brevibacterium*, τα γλυκολιπίδια (π.χ. sophorolipids, rhamnolipids) που παράγονται από τα γένη *Candida* και *Pseudomonas* και από το βακτήριο *Serratia marcescens* και τα ακυλοπεπτίδια (π.χ.

surfactin, lichenysin) που παράγονται κυρίως από το βακτήριο *Bacillus licheniformis* (Holmberg 2001, Gautam και Tyagi 2006, Williams 2009). Τέλος ορισμένες επιφανειοδραστικές ενώσεις λειτουργούν ταυτόχρονα και ως γαλακτωματοποιητές και ως αντιμικροβιακοί παράγοντες (Guertechin 2006).

Οι μαλακτικές ουσίες (emollients) χρησιμοποιούνται στα προϊόντα για να κάνουν πιο μαλακό και πιο λείο το δέρμα και να βελτιώσουν την υγρασία του δέρματος είτε δημιουργώντας μία στιβάδα που εμποδίζει την απώλεια νερού από το δέρμα είτε δημιουργώντας μία υδατική στιβάδα που προσελκύει τα μόρια νερού (Zocchy 2006). Η φάση της μαλακτικής ένωσης αποτελεί ποσοστό 5-30% σε γαλακτώματα oil-in-water ενώ άνυδρα συστήματα ή γαλακτώματα water-in-oil περιέχουν μεγαλύτερα ποσοστά μαλακτικών ουσιών. Μαζί με τους γαλακτωματοποιητές και τις ενεργές ενώσεις αποτελούν τα βασικότερα συστατικά σε ένα δερμοκαλλυντικό προϊόν.

Οι μαλακτικές ενώσεις κατά κύριο λόγο διαχωρίζονται με βάση τη χημική σύσταση. Υπάρχουν τρεις βασικές κατηγορίες: α) οι ενώσεις βασισμένες σε υδρογονάνθρακες, β) οι ενώσεις βασισμένες εστέρες και γ) οι ενώσεις βασισμένες σε σιλικόνη. Περιλαμβάνουν τόσο φυσικές ενώσεις (φυτικής και ζωικής προέλευσης) όπως το σκουαλένιο (από ελαιόλαδο), την ολεϊλική αλκοόλη (*Simmondsia chinensis*), την παλμιτική αλκοόλη (από φοινικέλαιο) κήρους, πολυϋδρικούς εστέρες λιπών και ελαίων, λιπαρά οξέα από κοκοφοίνικα (λαυρικό και μυριστικό οξύ), από φοίνικα (παλμιτικό και ολεϊκό οξύ), από σόγια και ελαιοκράμβη (ολεϊκό, λινολεϊκό, λινολενικό και στεαρικό οξύ), όσο και ενώσεις από παράγωγα πετρελαίου και συνθετικές χημικές ενώσεις (Alander 2012). Οι κύριες πηγές φυτικών μαλακτικών ενώσεων αποτελούν το φοινικέλαιο, το σογιέλαιο, τα έλαια ελαιοκράμβης και τα έλαια από σπόρους ηλίανθου ενώ οι πρώτες ύλες ζωικής προέλευσης είναι από ξίγκι βοοειδών, από λαρδί χοίρων και από ιχθυέλαια (Hill 2000). Οι ενώσεις βασισμένες στη σιλικόνη περιλαμβάνουν πυρίτιο, οξυγόνο και υδρογονάνθρακες προσφέροντας διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τις άλλες δύο κατηγορίες. Στον Πίνακα 1.3 παρουσιάζονται μερικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως μαλακτικές ενώσεις στα δερμοκαλλυντικά προϊόντα. Τέλος οι ενώσεις αυτές μπορούν να διαχωριστούν και με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους όπως η πολικότητα, οι ρεολογικές τους ιδιότητες, η διαειδική και επιφανειακή τάση, οι θερμικές ιδιότητες, η διηλεκτρική σταθερά και ο συντελεστής διασποράς (Alander 2012).

Πίνακας 1.3: Μαλακτικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στα δερμοκαλλυντικά (Alander 2012).

Τύπος μαλακτικής ουσίας	Παράδειγμα	Μοριακή δομή
Υδρογονάνθρακες από ορυκτέλαιο	Παραφίνη	
Φυσικοί υδρογονάνθρακες	Σκουαλένιο	
Συνθετικοί υδρογονάνθρακες	Ισοεξαδεκάνιο	
Αλειφατικές αλκοόλες	Κετοστεαρινική αλκοόλη	
Οξο-αλκοόλες	2-οκτυλοδεκανόλη	
Φυτικά λιπαρά οξέα	Ολεϊκό οξύ	
Συνθετικά λιπαρά οξέα	Ισοστεαρικό οξύ	
Απλοί εστέρες	Ισοπροπυλικός μυριστικός εστέρας	
Φυσικά τριγλυκερίδια	Ελαιόλαδο	
Συνθετικά τριγλυκερίδια	Caprylic/capric τριγλυκερίδια	
Πολύπλοκοι εστέρες	Δι-ισοπροπυλικός αδιπικός εστέρας	

Οι πηκτικές ενώσεις αποτελούν ουσίες που αυξάνουν ή μειώνουν το ιξώδες του τελικού προϊόντος παρέχοντας μεγαλύτερη σταθερότητα στο προϊόν (96/335/EC, 1996). Μερικές πηκτικές ενώσεις έχουν ιδιότητες γαλακτωματοποιητών αλλά οι περισσότερες έχουν την ικανότητα να συγκρατούν την υγρασία του δέρματος. Οι πηκτικές ενώσεις περιλαμβάνουν πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, κηρούς, αλκοόλες ή σιλικόνες και μπορεί να είναι φυσικής, συνθετικής ή ημισυνθετικής προέλευσης. Από τις βασικότερες φυσικές πηκτικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται είναι το κόμμι ξανθάνης που αποτελεί έναν εξωπολυσακχαρίτη που παράγεται από τη ζύμωση της γλυκόζης, σακχαρόζης ή λακτόζης από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Xanthomonas campestris* (Rosalam και England 2009), η γλυκομανάννη που αποτελεί ένα πολυσακχαρίτη που παράγεται από το φυτό *Amorphophallus konjac* (Li and Xie 2006) και το αραβικό κόμμι που παράγεται από το φυτό *Acacia* sp. όταν αυτό βρίσκεται υπό συνθήκες καταπόνησης (Li, και συν. 2009).

Οι χρωστικές (colorants-pigments) αποτελούν ουσίες που προστίθενται για να χρωματίσουν το προϊόν και/ή για να μεταφέρουν το χρώμα στο δέρμα (96/335/EC, 1996). Οι φυσικές χρωστικές όπως τα καροτενοειδή ή οι ανθοκυανίνες παίζουν μικρό ρόλο ως χρωστικές των καλλυντικών προϊόντων με εξαίρεση μόνο την καρνίνη. Εν αντίθεση, οι ανόργανες χρωστικές χρησιμοποιούνται ευρέως και κυρίως αποτελούνται από διοξείδιο του τιτανίου και οξείδια ή υπεροξείδια του σιδήρου ενώ οι πιο σημαντικές χρωστικές είναι οργανικές ενώσεις όπως ανθρακινόνη, ξανθένιο και φθαλοκυανίνη. Ανεξάρτητα της χημικής σύστασης, οι χρωστικές διαχωρίζονται ανάλογα με τη διαλυτότητα τους στο μέσο που χρωματίζουν και στην υδατική φάση (Otterstatter 2006).

1.5. Μικροβιολογική ποικιλότητα των φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων

Η παρουσία μικροοργανισμών στα φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα εγκυμονεί κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών ενώ ταυτόχρονα η μικροβιακή ανάπτυξη επηρεάζει αρνητικά το προϊόν. Η μικροβιακή μόλυνση σε ένα προϊόν πριν τη χρήση, υποδεικνύει έλλειψη ελέγχου κατά την επεξεργασία και έλλειψη σωστών πρακτικών παρασκευής των προϊόντων. Επιπλέον το κάθε προϊόν από τη στιγμή που θα χρησιμοποιηθεί υπόκειται σε μία συνεχή και μεταβλητή μικροβιακή επιμόλυνση από το περιβάλλον και από τον χρήστη (Perry 2001).

Οι μολύνσεις των τελικών προϊόντων οφείλονται κατά κύριο λόγο σε επιμολυσμένες πρώτες ύλες που μπορεί να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες στους καταναλωτές. Περιστατικά με μολύνσεις καταναλωτών έχουν περιγραφεί όπως: μόλυνση από *Clostridium tetani* σε σκόνη ταλκ, μολύνσεις από *Salmonella*, βακτηριαμία από *Burkholderia cepacia*, δερματικές μολύνσεις από *Mycobacterium chelonae* στη χρώση βιολετί της γεντιανής και οφθαλμικές μολύνσεις από *Pseudomonas aeruginosa* σε αλοιφή υδροκορτιζόνης (Karanam, και συν. 2008). Τα πιο συχνά απομονωμένα γένη σε καλλυντικά προϊόντα είναι τα γένη *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* και *Aspergillus* (Lundon, και συν. 2009). Ορισμένα από τα βακτήρια που εντοπίζονται συχνά στις πρώτες ύλες και στα τελικά προϊόντα, όπως η *Burkholderia cepacia*, είναι δυνητικά παθογόνα και δεν ορίζονται συγκεκριμένα πρωτόκολλα απομόνωσης και ταυτοποίησης τους (Jimenez και Smalls 2000). Η αξιολόγηση όμως των φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων πραγματοποιείται με τις κλασσικές μεθόδους μικροβιολογίας οι οποίες είναι χρονοβόρες, ακριβές και απαιτούν πληθώρα θρεπτικών υποστρωμάτων, πράγμα που τις καθιστά μη συμφέρουσες (Jimenez, και συν. 1999). Για το λόγο αυτό, νέες γρήγορες μέθοδοι για την άμεση ταυτοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών έχουν αναπτυχθεί που βασίζονται στη βιοφωταύγεια μέσω του ATP (Kramer, και συν. 2008), στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), σε τεχνικές άμεσης καταμέτρησης των βιώσιμων κυττάρων και στην κυτταρομετρία ροής (Karanam, και συν. 2008). Με τη μέθοδο της PCR και τη χρήση εξειδικευμένων εκκινητών για τα γονίδια uidA (β-γλυκουρονιδάση - *E. coli*), oprL (λιποπρωτεΐνη μεμβράνης - *P. aeruginosa*) και 16S rRNA γονίδιο (*S. aureus* και *B. cepacia*), οι Jimenez, και συν. (1999) και οι Jimenez και Smalls (2000) ανίχνευαν τα αντίστοιχα παθογόνα και δυνητικά παθογόνα βακτήρια σε επιμολυσμένα τελικά φαρμακευτικά προϊόντα διαφορετικής σύστασης (π.χ. κρέμες, αλοιφές, χάπια, υγρά) σε χρονικό διάστημα 27-30 h σε αντίθεση με το χρόνο 4-5 ημερών που απαιτείται με τις συμβατικές τεχνικές. Επιπλέον, οι Jimenez, και συν. (2000) ανίχνευαν σε φαρμακευτικά δείγματα, με εξειδικευμένες PCR τους μικροοργανισμούς *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Aspergillus niger* σε πολύ χαμηλά επίπεδα της τάξης < 10 cfu/g.

Σε μία άλλη έρευνα, οι Karanam, και συν. (2008) χρησιμοποίησαν τη μέθοδο multiplex-PCR όπου με χρήση εξειδικευμένων εκκινητών ανίχνευαν ταυτόχρονα τα παθογόνα βακτήρια *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* και *Salmonella* sp. σε πρώτες ύλες και τελικά προϊόντα, με όριο ανίχνευσης 1 cfu/g ενώ με τις συμβατικές μεθόδους το όριο ανίχνευσης ήταν >2 cfu/g. Οι

Maiuta και Schwarzentruher (2011) μελέτησαν τη μικροβιακή ποικιλότητα σε σκόνη ανθρακικού ασβεστίου που χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη σε καλλυντικά με τη μέθοδο του pyrosequencing και ταυτοποίησαν ως κυρίαρχο πληθυσμό βακτήρια του γένους *Bacillus* και του φύλου *Actinobacteria*, τα οποία σχηματίζουν ενδοσπόρια και μπορούν αν ανταπεξέλθουν στις συνθήκες έλλειψης υγρασίας που επικρατούν στη σκόνη ανθρακικού ασβεστίου.

Εκτός του χαμηλού μικροβιακού φορτίου που πρέπει να έχουν τα προϊόντα κατά την παρασκευή τους, θα πρέπει να έχουν τέτοια σύσταση ώστε να μην επιτρέπουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών κατά τη χρήση από τον καταναλωτή. Έρευνες έχουν ανιχνεύσει σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα πριν το άνοιγμα και έπειτα από χρήση, βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* και *Corynebacterium* (Behravan, και συν. 2005, Campana, και συν. 2006, Ravita, και συν. 2009) και μύκητες όπως *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium canis* και *Penicillium* spp. (Hugbo, και συν. 2003).

1.6. Μικροβιακή Ποικιλότητα στο νερό που προορίζεται για χρήση σε φαρμακευτικά προϊόντα

Το νερό στις φαρμακοβιομηχανίες διακρίνεται σε 4 κατηγορίες και χρησιμοποιείται στην παρασκευή φαρμακευτικών προϊόντων όσο και για το πλύσιμο του εξοπλισμού. Το πόσιμο νερό εισέρχεται στα εργοστάσια και στη συνέχεια υφίσταται κατεργασίες ώστε να παραχθεί κεκαθαρμένο νερό (purified water), υπερκάθαρο νερό (ultrapure water) και νερό προς έγχυση (water for injection). Ο μικροβιολογικός έλεγχος του νερού είναι σημαντικός καθώς οι μικροοργανισμοί που μπορεί να επιβιώσουν στο υδατικό σύστημα του εργοστασίου μπορεί επιμολύνουν τα τελικά προϊόντα και να προκαλέσουν ανεπιθύμητες παρενέργειες στους καταναλωτές (WHO 2005).

Τα μικροβιολογικά όρια για την κάθε κατηγορία νερού διαφέρουν και ορίζονται στις μονογραφίες της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας. Στις μονογραφίες ορίζονται τα όρια δράσης που πρέπει να έχει το νερό ως εξής: το κεκαθαρμένο νερό έχει αριθμό βιώσιμων κυττάρων έως 100 cfu/ml, το υπερκάθαρο νερό και το νερό προς έγχυση έως 10 cfu/100 ml, με τη μέθοδο της ηθμομεμβράνης σε θρεπτικό υπόστρωμα R2A (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008).

1.6.1. Παραγωγή νερού υψηλής καθαρότητας

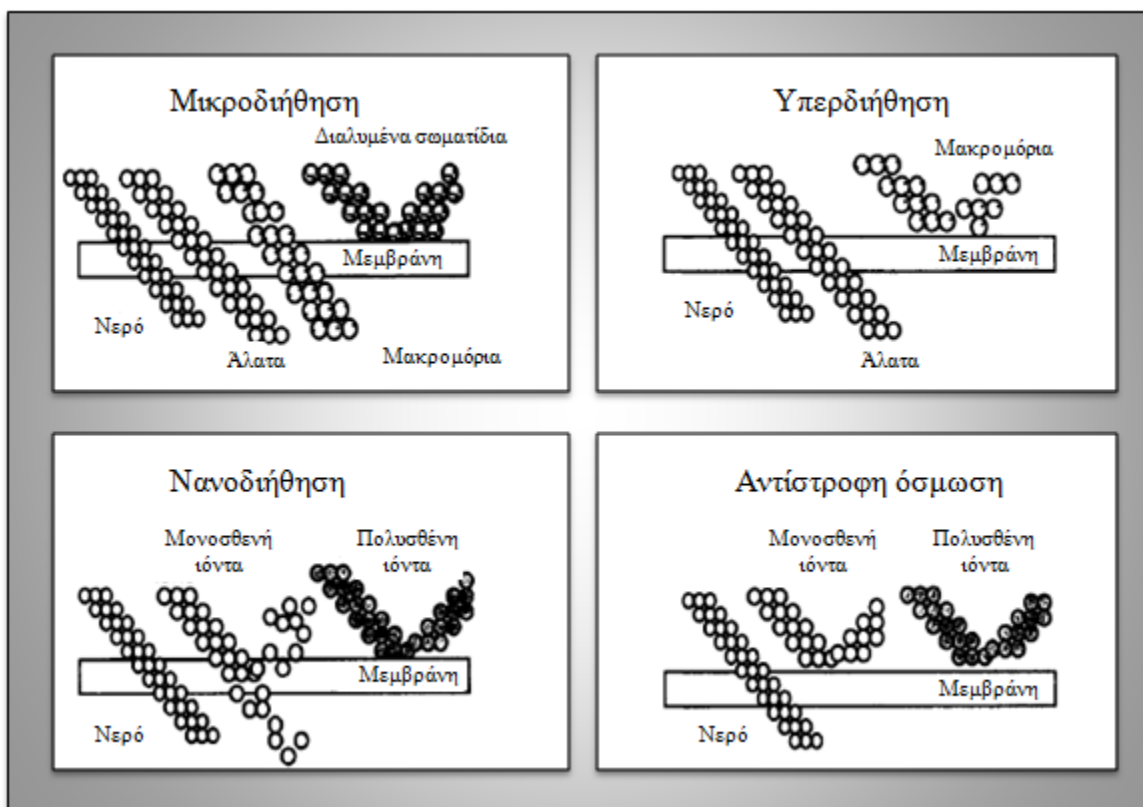
Οι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή υψηλής καθαρότητας νερού (κεκαθαρμένου και υπερκάθαρου) που θα χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικά προϊόντα είναι η απόσταξη, η ιοανταλλαγή, η αντίστροφη όσμωση, η υπερδιήθηση και ο απιονισμός (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008).

Επιπρόσθετες τεχνολογίες που εφαρμόζονται στα βιομηχανικά συστήματα παραγωγής υψηλής καθαρότητας νερού είναι η χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (254 nm), η θερμική επεξεργασία, και η προσθήκη όζοντος με σκοπό την παρεμπόδιση της μικροβιακής μόλυνσης του νερού. Στις περισσότερες μονάδες πραγματοποιείται διατήρηση του νερού σε δεξαμενές με χαμηλή θερμοκρασία με προσθήκη αζώτου αντί αέρα ώστε να παρεμποδιστεί η διάλυση του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα στο νερό και άρα να υπάρχει μειωμένο διαθέσιμο οξυγόνο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Kulakov, και συν. 2002).

Οι τεχνολογίες που βασίζονται στη χρήση ημιπερατών μεμβρανών έχουν ως βασική αρχή λειτουργίας την ροή του νερού διαμέσου μίας μεμβράνης και το διαχωρισμό του σε δύο κλάσματα, το συμπυκνωμένο διάλυμα που αποτελείται από τα συγκρατημένα σωματίδια στη μεμβράνη και το διήθημα. Η δύναμη που κατευθύνει τη διαδικασία είναι η διαφορά πίεσης ανάμεσα στην τροφοδοσία και στο διήθημα (Bruggen, και συν. 2003). Διακρίνονται 4 είδη τεχνολογιών που χρησιμοποιούν τη διήθηση μέσω μεμβράνης καθοδηγούμενη από την πίεση (Εικόνα 1.3): η μικροδιήθηση, η υπερδιήθηση, η νανοδιήθηση κι η αντίστροφη όσμωση (Mueller, και συν. 2012).

Η μικροδιήθηση έχει τη μεγαλύτερη διαπερατότητα με χρήση μικρής πίεσης και ενέργειας. Χρησιμοποιούνται μεμβράνες με διάμετρο πόρων από 0,1 μm έως 10 μm και σωματίδια ή διαλυμένα μακρομόρια μεγαλύτερα από 0,1 μm συγκρατούνται στις μεμβράνες αυτές. Με τη μικροδιήθηση απομακρύνονται ευκαρυωτικά κύτταρα και τα περισσότερα βακτήρια που υπάρχουν στο νερό. Η υπερδιήθηση έχει μικρότερη διαπερατότητα από τη μικροδιήθηση και πρέπει να ασκηθεί μεγαλύτερη πίεση ώστε να διέλθει το νερό της τροφοδοσίας διαμέσου της μεμβράνης. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται έχουν διάμετρο πόρων από 2 nm έως 100 nm και σε αυτές συγκρατούνται βακτήρια, μακρομόρια (2000-500000 Da) και μεγάλα οργανικά μόρια. Στη νανοδιήθηση, οι μεμβράνες έχουν πόρους με διάμετρο μικρότερη των 2 nm και σωματίδια ή μακρομόρια μεγαλύτερα από τα 2 nm (περίπου M.B.= 250 Da) συγκρατούνται. Η

νανοδιήθηση αποτελεί την κατάλληλη μέθοδο για την απομάκρυνση μικρών οργανικών ενώσεων ενώ μερικές μεμβράνες είναι φορτισμένες και απομακρύνουν ιόντα μικρότερα από τη διάμετρο των πόρων της μεμβράνης.



Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση των τεσσάρων τεχνολογιών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή νερού υψηλής καθαρότητας (Bruggen, και συν. 2003). Μικροδιήθηση: συγκρατούνται διαλυμένα σωματίδια μεγέθους $> 0,1 \mu\text{m}$. Υπερδιήθηση: συγκρατούνται μακρομόρια μεγέθους $> 2 \text{ nm}$. Νανόδιήθηση: συγκρατούνται μόρια και ιόντα μεγέθους $0,5 - 2 \text{ nm}$. Αντίστροφη όσμωση: συγκρατούνται ιόντα $< 0,5 \text{ nm}$ και διαχέεται μόνο το νερό.

Η αντίστροφη όσμωση χρησιμοποιεί μεμβράνες από πολυμερή που σχηματίζουν μία δομή δικτύου χωρίς όμως να διαθέτουν καθορισμένους διακριτούς πόρους. Η μεταφορά διαμέσου της μεμβράνης αντίστροφης όσμωσης είναι αργή και οφείλεται στο μηχανισμό της διάχυσης ενάντια στην οσμωτική πίεση. Τρία στάδια παρατηρούνται στην μεταφορά του νερού κατά την αντίστροφη όσμωση: απορρόφηση στην επιφάνεια της μεμβράνης, διάχυση διαμέσου της μεμβράνης και εκρόφηση από την επιφάνεια της μεμβράνης στο διήθημα (Greenlee, και συν. 2009). Η χαμηλή διαπερατότητα των μεμβρανών αντίστροφης όσμωσης απαιτεί υψηλές διαμεμβρανικές πιέσεις και κατανάλωση υψηλού ποσού ενέργειας. Με την αντίστροφη όσμωση

γίνεται διάχυση μόνο των μορίων του νερού ενώ τα ιόντα παραμένουν στη μεμβράνη. (Bruggen, και συν. 2003, Mueller, και συν. 2012). Στον Πίνακα 1.4 παρουσιάζονται τα γενικά χαρακτηριστικά των 4 τεχνολογιών.

Πίνακας 1.4: Χαρακτηριστικά των τεσσάρων τεχνολογιών διήθησης που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή νερού υψηλής καθαρότητας (Bruggen, και συν. 2003, Madaeni 1999).

	Μικροδιήθηση	Υπερδιήθηση	Νανοδιήθηση	Αντίστροφη Όσμωση
Διάμετρος πόρων (nm)	100 - 10000	2 - 100	0,5 - 2	Όχι καθορισμένοι πόροι
Διαπερατότητα (l/h*m ² *bar)	> 1000	10 - 1000	1,5 – 30	0,05 – 1,5
Πίεση (atm)	1 - 3	2 - 7	5 - 20	30 - 150
Απόρριψη				
Μονοσθενή Ιόντα	-	-	-	+
Πολυσθενή Ιόντα	-	-/+	+	+
Μικρά οργανικά μόρια	-	-	-/+	+
Μακρομόρια	-	+	+	+
Σωματίδια	+	+	+	+

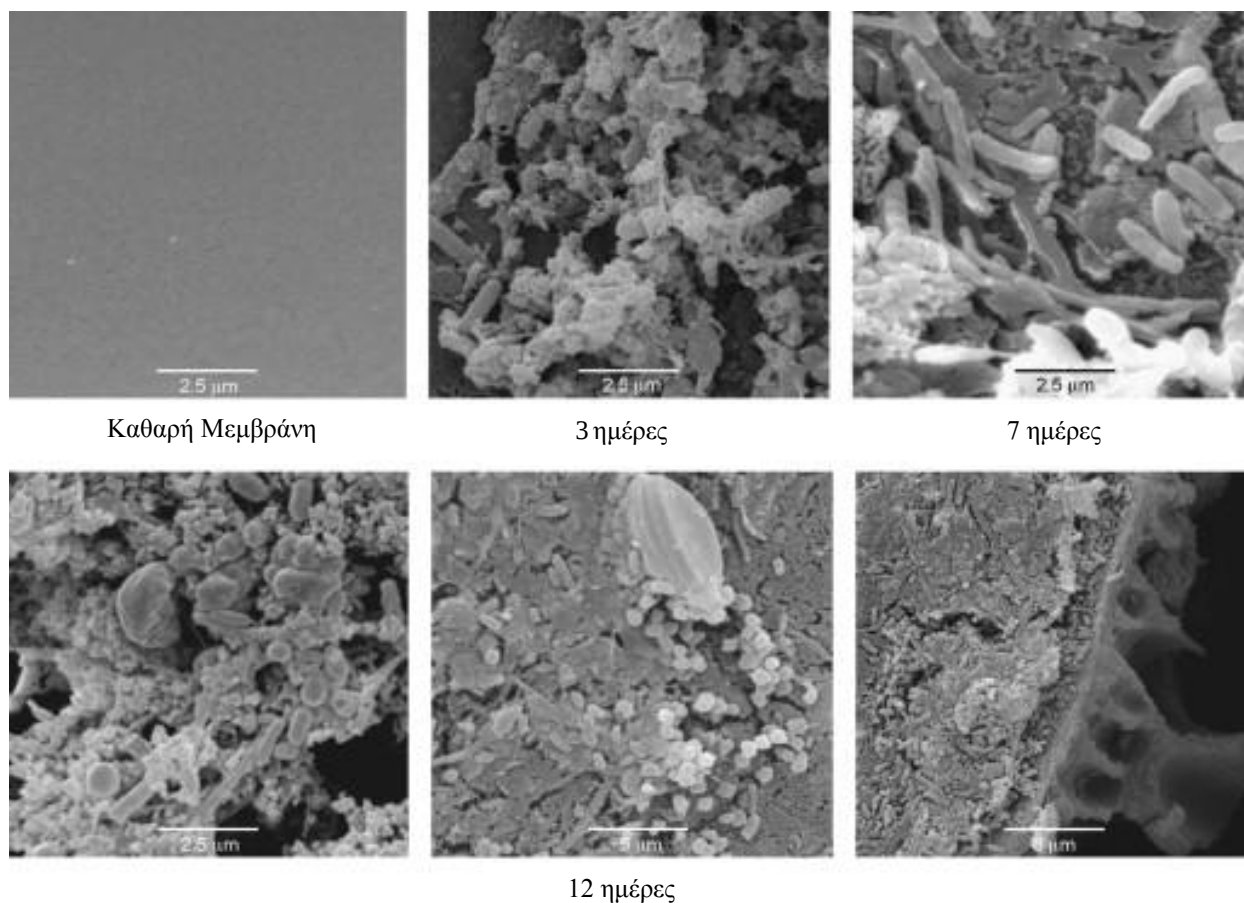
1.6.2. Προβλήματα κατά την παραγωγή νερού υψηλής καθαρότητας

Οι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την παραγωγή νερού υψηλής καθαρότητας παρουσιάζουν ένα σημαντικό μειονέκτημα που μειώνει την απόδοση τους, την έμφραξη (fouling) των μεμβρανών (Richardson, και συν. 2002).

Δύο μηχανισμοί έμφραξης των μεμβρανών παρατηρούνται στις τεχνολογίες που χρησιμοποιούν μεμβράνες: η επιφανειακή έμφραξη των μεμβρανών και η έμφραξη των πόρων. Στις μεμβράνες αντίστροφης όσμωσης όπου δεν υπάρχουν πόροι, παρατηρείται μόνο η επιφανειακή έμφραξη (Greenlee, και συν. 2009).

Η έμφραξη των μεμβρανών προκαλείται από φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς παράγοντες και διαχωρίζεται σε τέσσερις κατηγορίες. Η έμφραξη από ανόργανη ύλη (mineral fouling) προκαλείται από καταβυθίσεις ανόργανης ύλης στην επιφάνεια της μεμβράνης (Flemming

2002). Η έμφραξη από σωματίδια (particle's fouling) προκαλείται αρχικά από τη συσσώρευση των μεγαλύτερων σωματιδίων στην επιφάνεια της μεμβράνης και από μικρότερα σωματίδια μέσα στους πόρους της μεμβράνης και στη συνέχεια στο σχηματισμό μίας στιβάδας με προσθήκη περισσότερων σωματιδίων που διαθέτει υψηλή ανθεκτικότητα στη ροή του νερού. Η έμφραξη από οργανική ύλη (organic fouling) προκαλείται αρχικά από χαμηλού μοριακού βάρους οργανικές ενώσεις και στη συνέχεια από υψηλού μοριακού βάρους ενώσεις που φράζουν την επιφάνεια της μεμβράνης. Η υδροφοβικότητα παίζει ρόλο σε αυτόν τον τύπο έμφραξης όπως επίσης και η αδιάλυτη οργανική ύλη (Gao, και συν. 2011). Τέλος, η έμφραξη οφειλόμενη από βιολογικούς παράγοντες (bio-fouling) (Εικόνα 1.4.) προκαλείται από οργανισμούς που εντοπίζονται στο νερό και συγκεκριμένα από το σχηματισμό βιοϋμενίου εξαιτίας της εναπόθεσης εξωκυτταρικών συστατικών και της ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Vrouwenvelder, και συν. 2008).



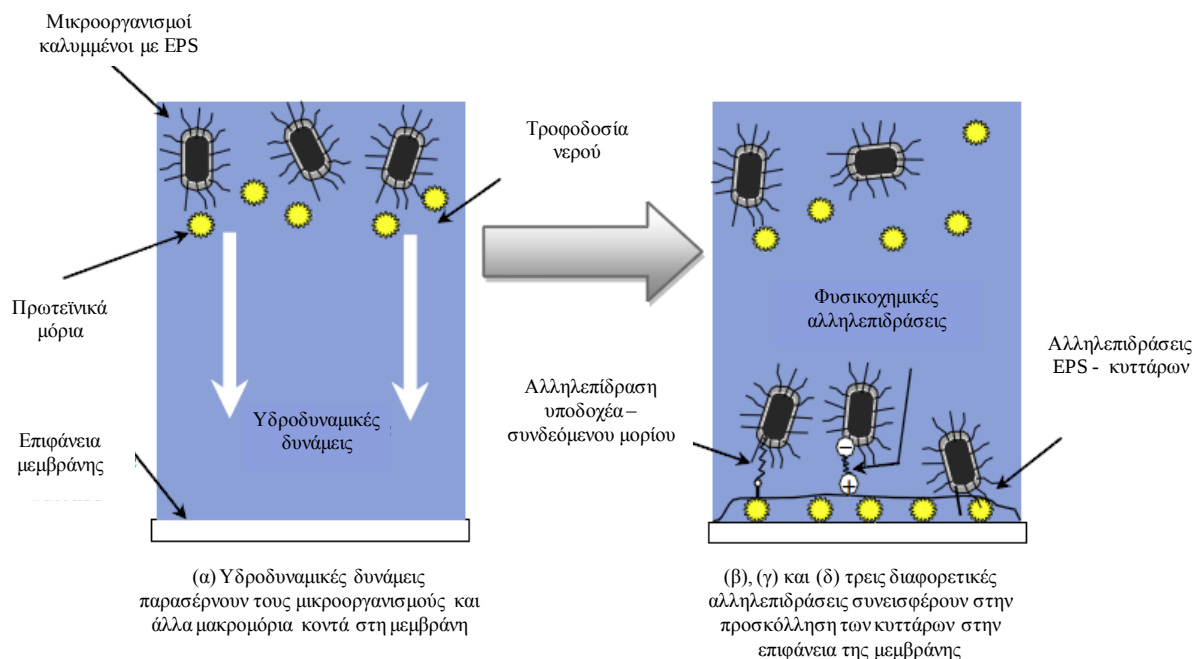
Εικόνα 1.4: Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης του αναπτυσσόμενου βιοϋμενίου σε μεμβράνη νανοδιήθησης (Ivnitsky, και συν. 2007).

Το φαινόμενο του biofouling διαφοροποιείται από το φαινόμενο του fouling (λόγω σωματιδίων, οργανικής και ανόργανης ύλης) επειδή υπάρχει μία συνεχής αύξηση της στιβάδας που δημιουργείται και όχι απλή συσσώρευση συστατικών πάνω στη μεμβράνη. Όλες οι βιομετατροπόμενες ουσίες θεωρούνται ως πιθανή βιομάζα περιλαμβανομένου και των ανόργανων συστατικών. Στο σχηματισμό του βιοϋμενίου μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο τα ετερότροφα βακτήρια αλλά και τα λιθότροφα (Flemming 2002).

Η έμφραξη οφειλόμενη σε βιολογικούς παράγοντες επηρεάζεται από τέσσερεις παράγοντες: α) τον τύπο της επιφάνειας που συμβαίνει η έμφραξη, β) τη δύναμη που προκαλεί την μικροβιακή προσκόλληση στην επιφάνεια, γ) τους μηχανισμούς που περιγράφουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροοργανισμών και επιφάνειας και δ) τους παράγοντες που επηρεάζουν της μικροβιακή προσκόλληση.

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να προσκολληθούν είτε σε μία επιφάνεια καθαρή (pristine) είτε σε επιφάνειες καλυμμένες με οργανική ύλη (conditioning film). Οι μηχανισμοί προσκόλλησης διαφέρουν για τις δύο επιφάνειες. Στην πρώτη περίπτωση ρυθμίζονται από μη ειδικές αλληλεπιδράσεις και συγκεκριμένα από τις μακροσκοπικές ιδιότητες της επιφάνειας όπως το φορτίο και η υδροφοβικότητα. Στη δεύτερη περίπτωση υπάρχουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ του υποδοχέα στο κύτταρο και του συνδεδεμένου μορίου που βρίσκεται προσκολλημένο στην επιφάνεια (π.χ. στη μεμβράνη αντίστροφης όσμωσης).

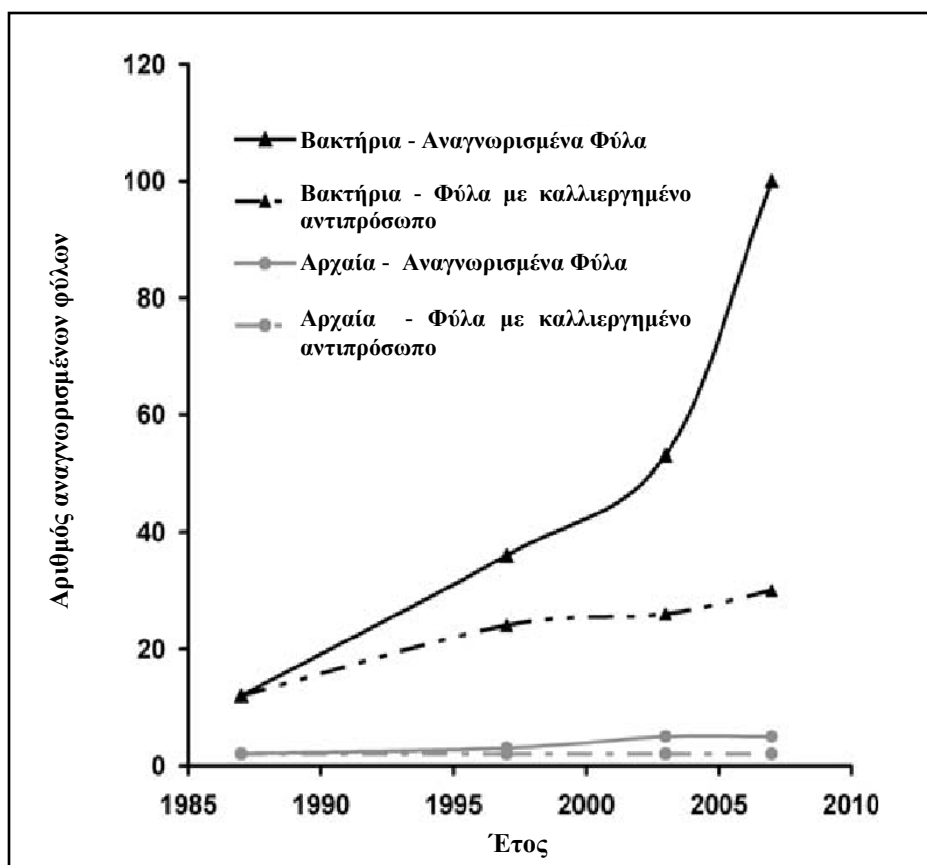
Κύριες δυνάμεις που δρουν στην προσκόλληση των μικροοργανισμών είναι: α) οι υδροδυναμικές δυνάμεις που οδηγούν τα κύτταρα και τα διάφορα μόρια και σωματίδια πλησίον της μεμβράνης, β) οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις (van der Waals, ιοντικές, ηλεκτροστατικές, δεσμοί υδρογόνου (Madaeni 1999) ανάμεσα στη μεμβράνη και στους μικροοργανισμούς (αρχική προσκόλληση) και ανάμεσα στους προσκολλημένους μικροοργανισμούς και στους αιωρούμενους μικροοργανισμούς (δεύτερη προσκόλληση), γ) αλληλεπιδράσεις υποδοχέα και συνδεδεμένου μορίου (πολωμένοι δεσμοί, φορτισμένες ή υδροξυλικές ομάδες) και δ) αλληλεπιδράσεις συγκόλλησης ως αποτέλεσμα της κολλώδους φύσεως των εξωπολυσακχαριτών (EPS) που βοηθούν τα κύτταρα να προσκολληθούν στην επιφάνεια της μεμβράνης. Στην Εικόνα 1.5 παρουσιάζονται οι δυνάμεις που δρουν στην προσκόλληση των μικροοργανισμών στη μεμβράνη (Al-Juboori και Yusaf 2012).



Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση των δυνάμεων που δρουν στην μικροβιακή προσκόλληση στην επιφάνεια της μεμβράνης (Al-Juboori και Yusaf 2012).

1.6.3. Το νερό υψηλής καθαρότητας ως ενδιαίτημα για τους μικροοργανισμούς

Μέχρι σήμερα 7031 είδη προκαρυωτικών οργανισμών έχουν περιγραφεί και επικυρωθεί από την ICSP (International Committee on Systematics of Prokaryotes) παρ' όλο που έχει διαπιστωθεί ότι τα βακτήρια αποτελούν την «αφανή πλειοψηφία». Η ανακριβή εικόνα της μικροβιακής ποικιλότητας προκαλείται από την έλλειψη προόδου στις τεχνικές καλλιέργειας των βακτηρίων ενώ αντιθέτως οι μοριακές μέθοδοι που έχουν σημειώσει αλματώδη εξέλιξη, αποκαλύπτουν τη μικροβιακή ποικιλότητα. Η αλληλούχιση του 16S rRNA και η περιβαλλοντική μεταγενωμική αποκαλύπτουν νέες ομάδες βακτηρίων αλλά ταυτόχρονα εκθέτουν το χάσμα ανάμεσα στα γνωστά φύλα και σε αυτά που κατέχουν αντιπροσώπους που έχουν καλλιεργηθεί. Σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί 100 προκαρυωτικά φύλα, αλλά μόνο 30 διαθέτουν κάποιον καλλιεργημένο αντιπρόσωπο (Alain και Querellou 2009). Στην Εικόνα 1.6 παρουσιάζεται ο αριθμός των αναγνωρισμένων φύλων που διαθέτουν ή όχι καλλιεργημένους αντιπροσώπους και η εξέλιξη του φαινομένου αυτού.



Εικόνα 1.6: Αριθμός φύλων που έχουν αναγνωρισθεί με ή χωρίς καλλιεργημένους αντιπροσώπους για το βασίλειο των Βακτηρίων και των Αρχαίων (Alain και Querellou 2009).

Η διαθεσιμότητα πηγής άνθρακα/ενέργειας και η θερμοκρασία είναι οι δύο περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη των ετερότροφων μικροοργανισμών. Η συγκέντρωση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα (DOC) στο νερό κυμαίνεται από 0,5-5 mg/l, αλλά μόνο μία συγκέντρωση της τάξεως των 10-100 μg/l είναι βιοδιαθέσιμη (AOC – assimilable organic carbon) για τους μικροοργανισμούς. Μέχρι πρόσφατα, οι επιστήμονες θεωρούσαν ότι τέτοια περιβάλλοντα αποτελούν «ερήμους» για τη ζωή και ότι τα περισσότερα μικροβιακά κύτταρα που εντοπίζονται είναι είτε νεκρά, είτε αδρανή, είτε βρίσκονται σε σοβαρή στέρηση τροφής. Παρ' όλα αυτά έχει διαπιστωθεί ότι ο μικροβιακός πληθυσμός στα ενδιαιτήματα αυτά, κυμαίνεται από 10^5 έως 10^6 cfu/ml και τα κύτταρα είναι ζωντανά, μεταβολικώς ενεργά και έτοιμα να αναπτυχθούν όταν βρεθούν στις κατάλληλες συνθήκες (Egli 2010). Εκτιμάται ότι από υδάτινα περιβάλλοντα μόνο το 1 % των βακτηρίων προσδιορίζονται ως βιώσιμα μέσω των κλασσικών μικροβιολογικών τεχνικών καλλιέργειας (Davey 2011). Εκτός των ετερότροφων βακτηρίων που αποτελούν την πιο μελετημένη ομάδα στο νερό, διακρίνονται υποομάδες

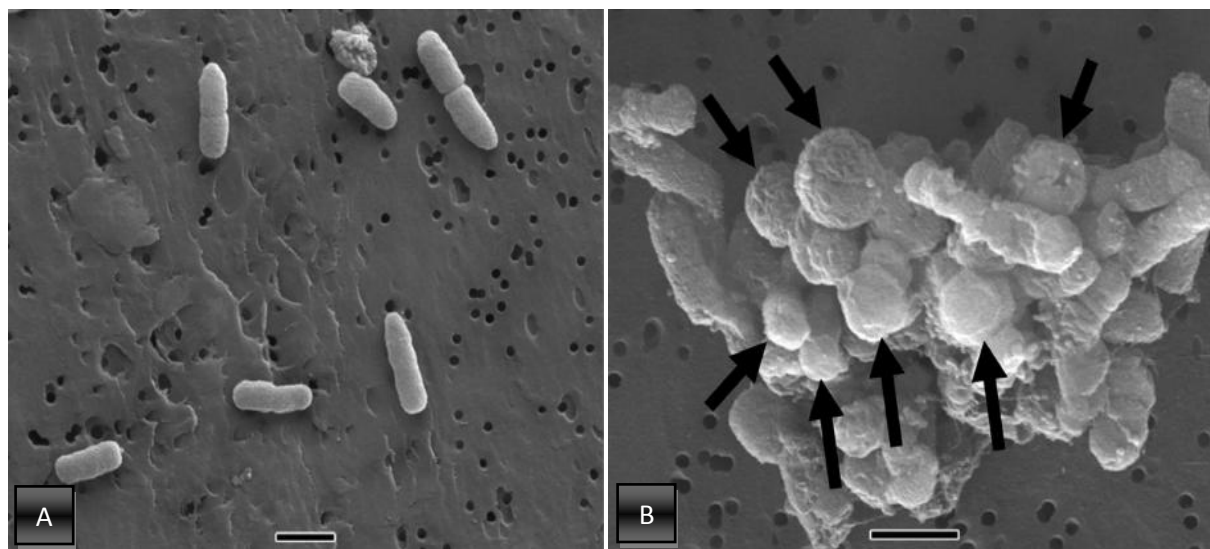
βακτηρίων όπως τα βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα (VBNC: viable but nonculturable bacteria), τα βακτήρια σε κατάσταση «πείνας» (starvation survival state), τα υπερμικροβακτήρια (ultramicrobacteria), τα νανοβακτήρια (nanobacteria) καθώς και τα ολιγότροφα βακτήρια.

1.6.4. Μικροβιακή ποικιλότητα στο νερό

Η είσοδος των βακτηρίων σε ένα νέο περιβάλλον, προκαλεί την αντιμετώπιση περιβαλλοντικών αλλαγών που περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση θρεπτικών, την αλατότητα, την οσμωτική πίεση και το pH. Τα βακτηριακά κύτταρα προσαρμόζονται στις μεταβολές αυτές χρησιμοποιώντας μία ποικιλία γενετικών μηχανισμών. Τα βακτήρια διαθέτουν μηχανισμούς που ρυθμίζουν ή επαναδρομολογούν τα μεταβολικά μονοπάτια τους σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών ώστε να μην προκληθεί δομική ασυνέχεια στο κύτταρο. Επιπλέον, συντονίζουν τους ρυθμούς αναβολισμού ώστε να διατηρήσουν την κυτταρική δομή και λειτουργία τους με σκοπό να ανταπεξέλθουν στις περιβαλλοντικές αλλαγές και να επιβιώσουν (Colwell 2000). Τα βακτήρια αυτά, πολλές φορές εισέρχονται σε μία κατάσταση κατά την οποία είναι βιώσιμα και μεταβολικώς ενεργά (χαμηλός μεταβολισμός) αλλά δε μπορούν να καλλιεργηθούν και δε παρουσιάζουν κυτταρική διαίρεση. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό με τον όρο βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια (VBNC: viable but nonculturable bacteria) και αποτελεί μία στρατηγική επιβίωσης για τα βακτήρια που δεν δημιουργούν σπόρια (Colwell 2000, Mizunoe, και συν. 2000, Barcina και Arana 2009). Απόρροια του φαινομένου αυτού είναι η αμφισβήτηση των αποτελεσμάτων από τον έλεγχο του νερού ή αποστειρωμένων φαρμακευτικών προϊόντων καθώς η κατάσταση VBNC μπορεί να αποκρύψει τον πραγματικό αριθμό των βιώσιμων κυττάρων (Barcina και Arana 2009).

Τα χαρακτηριστικά των κυττάρων που εισέρχονται στην κατάσταση VBNC είναι ο νανισμός, η μειωμένη μεταφορά θρεπτικών συστατικών, η μειωμένη αναπνοή και η μειωμένη σύνθεση μακρομοριών. Η βιοσύνθεση δεν σταματά, αλλά νέες πρωτεΐνες σχηματίζονται (starvation και cold shock proteins) ενώ τα επίπεδα του ATP παραμένουν υψηλά. Υπάρχει συνεχής έκφραση γονιδίων όπως τα *mobA*, *rfbE*, *stx1* και της σύνθεσης του 16S rRNA χωρίς απαραίτητα να σχετίζονται τα γονίδια αυτά με την κατάσταση VBNC (Oliver 2005). Παρατηρούνται εκτενείς τροποποιήσεις στη σύνθεση των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης ενώ από μελέτες στο βακτήριο *E. coli* βρέθηκε ότι το κυτταρικό τοίχωμα υφίσταται αλλαγές στην στιβάδα της

πεπτιδογλυκάνης με αύξηση των συνδέσεων μεταξύ των πολυμερών, αύξηση των συνδέσεων DAP-DAP (diaminopimelic acid), αύξηση των μουρεϊνοπεπτιδίων που βρίσκονταν ομοιοπολικά συνδεδεμένα με τις λιποπρωτεΐνες και μείωση του μήκους των αλυσίδων γλυκάνης (Signoretto, και συν. 2002). Τα κύτταρα εξαιτίας αυτών των τροποποιήσεων αποκτούν μορφή κόκκου (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7: Μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Yersinia pestis* όπως φαίνονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης α) φυσιολογικά κύτταρα (μεγέθυνση x5.000), β) VBNC κύτταρα με κοκκοειδή μορφολογία (μεγέθυνση x10.000). Τα κύτταρα εισήλθαν στην φάση VBNC έπειτα από 21 ημέρες σε μικρόκοσμο νερού βρύσης (Pawlowski, και συν. 2011).

Παρατηρείται επίσης αυξημένη αυτοκαταλυτική ικανότητα στα κύτταρα VBNC ενώ η παρουσία ή η απουσία των πλασμιδίων επηρεάζει σημαντικά την θερμική επαγωγή της κατάστασης VBNC. Πρόσφατες έρευνες υποστηρίζουν τη σχέση του φαινομένου της αναστολής της ανάπτυξης εξαρτώμενη από την επαφή (contact-dependent growth inhibition - Cdi) με την είσοδο στην κατάσταση VBNC. Στο φαινόμενο αυτό η κυτταρική ανάπτυξη ρυθμίζεται μέσω επαφής κύτταρο με κύτταρο διαμεσολαβούμενη από σύστημα έκκρισης (Two partner secretion system – TPS) CdiA-CdiB. Ομόλογες πρωτεΐνες του συστήματος CdiA-CdiB βρίσκονται σε πολλά είδη βακτηρίων. Το CdiB αποτελεί μία πρωτεΐνη στην εξωτερική μεμβράνη που απαιτείται για τη μεταφορά και τη συναρμολόγηση του CdiA στην επιφάνεια του κυττάρου. Ως υποδοχέας CDI έχει αναγνωρισθεί η συντηρημένη πρωτεΐνη BamA που απαιτείται για τη βιογένεση των πρωτεϊνών με δομή β-βαρέλι στα Gram αρνητικά βακτήρια. Το CDI επάγει

σημαντικές μειώσεις στην αναπνοή, στην κλίση πρωτονίων και στα επίπεδα ATP, επηρεάζοντας το μεταβολισμό και την ανάπτυξη (Hayes και Low 2009).

Ο αριθμός των ειδών που είναι γνωστό ότι εισέρχονται στη φάση VBNC ολοένα και αυξάνεται και περιλαμβάνει Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια, παθογόνα και μη παθογόνα βακτήρια. Μέχρι σήμερα 60 είδη έχουν αναφερθεί να εισέρχονται στην κατάσταση VBNC (Πίνακας 1.5) (Oliver 2005).

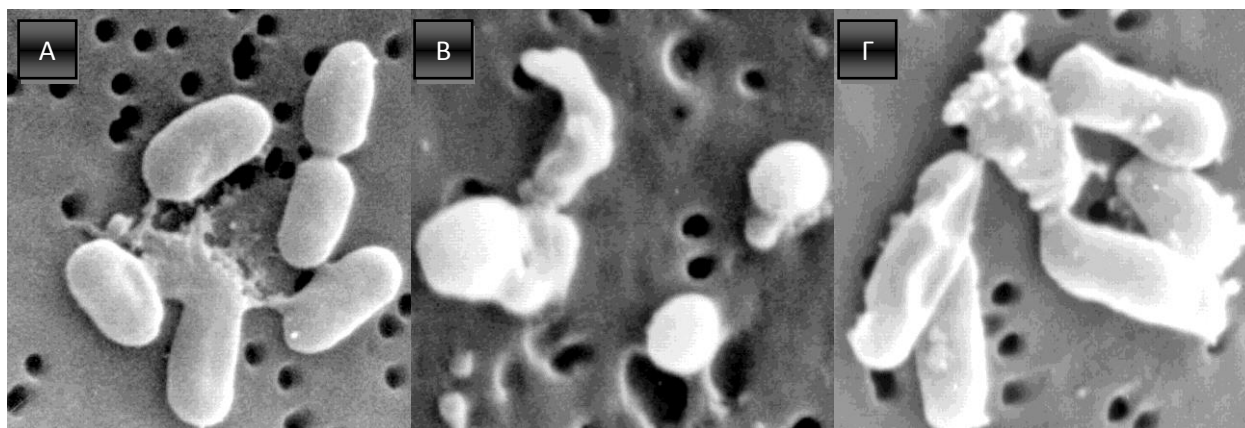
Πίνακας 1.5: Είδη βακτηρίων που εισέρχονται στην κατάσταση VBNC (Oliver 2005).

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>A. salmonicida</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>K. planticola</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>V. anguillarum</i>
<i>C. lari</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pasteurella piscicida</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>E. faecium</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>V. vulnificus</i> (types 1 & 2)
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Escherichia coli</i> (including EHEC)	<i>S. typhi</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. Citri

Παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν το φαινόμενο της μη καλλιεργησιμότητας των βακτηρίων, μπορεί να είναι η ίδια η μέθοδος της καλλιέργειας, καθώς υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών μπορεί να αποβούν τοξικές για τα κύτταρα, η δημιουργία ελευθέρων ριζών από τα μη αναπτυσσόμενα κύτταρα παρουσία υψηλής συγκέντρωσης θρεπτικών ή η τοξικότητα του H₂O₂ που σχηματίζεται στο υπόστρωμα (Oliver 2005). Μελέτες έχουν δείξει ότι κύτταρα του

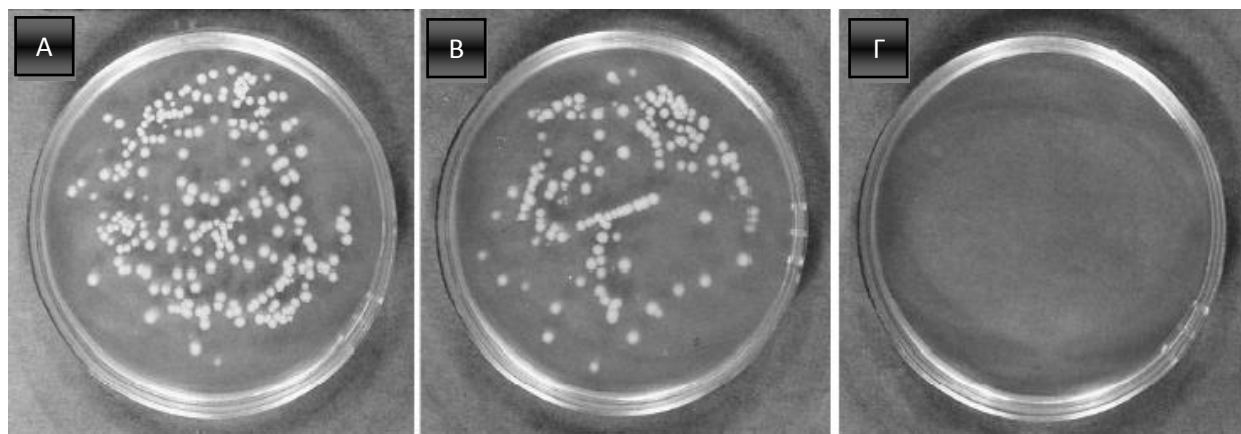
βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* μπορούν να εισέλθουν στην κατάσταση VBNC κάτω από την επίδραση χαμηλής θερμοκρασίας (4 °C) όμως η οξειδωτική καταπόνηση που υφίστανται, μειώνει την μολυσματικότητα τους και την ικανότητα παραμονής στην κατάσταση VBNC (Overbeek, και συν. 2004). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν εξαχθεί και για στελέχη του βακτηρίου *Vibrio* sp. το οποίο εισέρχεται στην κατάσταση VBNC κάτω από την επίδραση χαμηλής θερμοκρασίας και χαμηλής συγκέντρωσης θρεπτικών (Mizunoe, και συν. 2000).

Αναφορικά με την αναβίωση (resuscitation) κυττάρων από την φάση VBNC, έχει αποδειχθεί πειραματικά *in vivo*, *in situ* και *in vitro*, ενώ τα πλέον μελετημένα βακτήρια είναι τα *Vibrio vulnificus* και *Helicobacter pylori*.



Εικόνα 1.8: Μορφολογικά χαρακτηριστικά του *Edwardsiella tarda* όπως φαίνονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (μεγέθυνση x20.000) α) φυσιολογικά κύτταρα, β) VBNC κύτταρα με κοκκοειδή μορφολογία γ) αναβιωμένα κύτταρα. Τα κύτταρα εισήλθαν στην φάση VBNC έπειτα από 21 ημέρες, σε θερμοκρασία 4 °C και απέκτησαν κοκκοειδές σχήμα ενώ ταυτόχρονα χάσανε την καλλιεργησιμότητά τους. Κατά την αναβίωση δε σημειώθηκαν αλλαγές σε σχέση με την αρχική τους μορφολογία (Du, και συν. 2007).

Απομάκρυνση του περιοριστικού παράγοντα π.χ. αλλαγή της θερμοκρασίας κατά 10 μονάδες μπορεί να προκαλέσει την έξοδο από τη φάση VBNC σε σύντομο χρονικό διάστημα. Επιπλέον η παρουσία καταλάσης ή πυροσταφυλικού βελτιώνει την αναβίωση των κυττάρων (Εικόνα 1.9) (Oliver, και συν. 1997, Mizunoe, και συν. 2000). Παράγοντες όπως οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες Rpfs (resuscitation-promoting factors) που συνιστούν υδρολάσες πεπτιδογλυκάνης, επάγουν την αναβίωση των κυττάρων συμμετέχοντας στην πέψη του κυτταρικού τοιχώματος και άρα στην κυτταρική διαίρεση (Oliver 2010).



Εικόνα 1.9: Επίδραση καταλάσης και πυροσταφυλικού στην αναβίωση. Αποικίες του *Vibrio parahaemolyticus* που αναπτύχθηκαν έπειτα από αναβίωση από την κατάσταση VBNC στην οποία εισήλθαν μετά από παραμονή 12 ημερών σε μικρόκοσμο με θερμοκρασία 4 °C. Επώαση για 24h στους 37 °C σε α) θρεπτικό με προσθήκη καταλάσης, β) θρεπτικό με προσθήκη πυροσταφυλικού, γ) μάρτυρας (Mizunoe, και συν. 2000).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι η κατάσταση VBNC διαφέρει σημαντικά από την κατάσταση «πείνας» των κυττάρων (starvation survival state) όπου τα κύτταρα υφίστανται μεγάλη μείωση στο μεταβολισμό τους αλλά παραμένουν καλλιεργήσιμα (Oliver 2005). Πειραματικά δεδομένα των Heim και συνεργατών έδειξαν ότι το πρωτεϊνικό προφίλ των κυττάρων του *Enterococcus faecalis* που εισέρχονται στην κατάσταση VBNC διαφέρει σημαντικά από αυτό των κυττάρων που βρίσκονται στην εκθετική φάση και των κυττάρων που βρίσκονται στην κατάσταση «πείνας» (Heim, και συν. 2002).

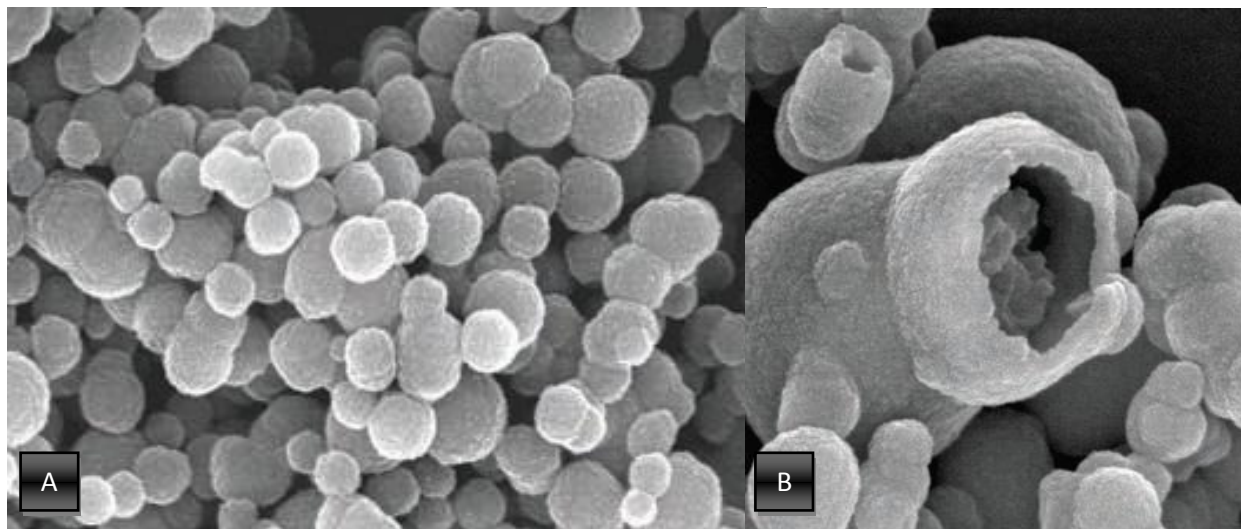
Τα βακτήρια σε κατάσταση πείνας (starvation forms) γίνονται σφαιρικά μέσω διαμερισματοποίησης και συνεχούς μείωσης του μεγέθους (αναγωγική διαίρεση) και επιβιώνουν για χρονικές περιόδους στη κλίμακα των μηνών και όχι ημερών και εβδομάδων. Το μέγεθός του ποικίλει από μικρότερο από 0,2 μm έως 0,3 μm. Ένα βακτήριο που στερείται θρεπτικά συστατικά, επιδεικνύει ένα συνεχές πρότυπο σύνθεσης μακρομορίων το οποίο ομοιάζει με τη διαφοροποίηση κατά το σχηματισμό των ενδοσπορίων, κάτι που υπονοεί την ύπαρξη ενός περίπλοκου μηχανισμού turn-on/turn-off της πρωτεϊνοσύνθεσης στα μη διαφοροποιούμενα βακτήρια με σκοπό την απόκριση σε συνθήκες πείνας. Τρεις φάσεις διακρίνονται σε αυτόν τον περίπλοκο μηχανισμό σύνθεσης/διάσπασης μακρομορίων. Το πρώτο στάδιο είναι ο αυστηρός έλεγχος στο οποίο πραγματοποιείται διακοπή της σύνθεσης των μακρομορίων, προσωρινή συσσώρευση του ppGpp, αυξημένη ενδοκυτταρική πρωτεόλυση, επαγωγή της υψηλής συγγένειας πρόσληψης της λευκίνης και αύξηση της ενεργότητας εξωπρωτεασών. Στη δεύτερη

φάση του μηχανισμού είναι η αναδιοργάνωση, κατά την οποία υπάρχει μείωση του ppGpp, μερική ανάκαμψη της σύνθεσης μακρομορίων, μεταβολές στη σύνθεση των λιπαρών οξέων και αποικοδόμηση των πλεονασμάτων, μερική de novo σύνθεση των αμινοξέων, χημειοτακτικές αποκρίσεις σε διάφορες διαλυμένες ουσίες και ανάπτυξη της ανθεκτικότητας σε ποικίλες καταπονήσεις. Στην 3^η φάση, υπάρχει προοδευτική μείωση του μεταβολισμού κυρίως στην αναπνοή και στη σύνθεση του RNA, της πεπτιδογλυκάνης και των πρωτεϊνών. Παρ' όλα αυτά όμως υπάρχει μία συνεχής ανάπτυξη ενός κυττάρου προσανατολισμένου στην στρατηγική της επιβίωσης (Velimirov 2001). Επιπλέον σύμφωνα με μελέτες σε εργαστηριακές συνθήκες, μπορούν να διακριθούν 4 στρατηγικές στη διαδικασία επιβίωσης μέσω πείνας (starvation-survival). Αυτές είναι: 1) τα κύτταρα μειώνονται γρήγορα και λίγα παραμένουν βιώσιμα, 2) τα κύτταρα αυξάνονται σε αριθμό (χωρίς προσθήκη ενέργειας) και ακολουθεί απότομη μείωσή τους, αφήνοντας ένα μικρό ποσοστό βιώσιμων κυττάρων, 3) τα κύτταρα αυξάνονται αλλά ποτέ δε μειώνονται, 4) τα κύτταρα ούτε αυξάνονται ούτε μειώνονται. Η 4^η στρατηγική έχει παρατηρηθεί στα χημειοαυτότροφο βακτήριο *Nitrosomonas cryotolerans* ενώ η δεύτερη στρατηγική παρατηρείται στα περισσότερα υπερμικροκύτταρα (ultramicrocells) που προκύπτουν κατά τη διάρκεια πείνας (Morita 1990).

Όπως προαναφέρθηκε, η είσοδος των βακτηρίων στην κατάσταση VBNC ή στην κατάσταση «πείνας» οφείλεται σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις και προκαλεί μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα οι οποίες όμως είναι αντιστρεπτές. Οι μορφολογικές αλλαγές περιορίζουν το μέγεθος και το σχήμα του κυττάρου σε βαθμό που τα κύτταρα να μπορούν να διέλθουν διαμέσου μεμβρανών με διάμετρο πόρων 0,45 μm, 0,2 μm ακόμα και 0,1 μm. Εκτός των παραπάνω καταστάσεων, στη βιβλιογραφία συχνά περιγράφονται τα υπερμικροβακτήρια και τα νανοβακτήρια, ως βακτήρια των υδάτινων οικοσυστημάτων που μπορούν να διαπερνάνε τις μεμβράνες αυτές καθώς έχουν πολύ μικρό μέγεθος. Η διάκριση δεν είναι πάντοτε ευκρινής, καθώς μέχρι σήμερα η έρευνα γύρω από τα πιο μικρά μεταβολικά βακτηρίδια δεν έχει καταλήξει σε σαφή συμπεράσματα (Velimirov 2001).

Τα νανοβακτήρια (nanobacteria ή nanobes) (Εικόνα 1.10) αποτελούν τη μεγαλύτερη αμφισβητήσιμη ανακάλυψη στη σύγχρονη μικροβιολογία (Raoult, και συν. 2008). Οι παρατηρήσεις που αντικρούουν την ύπαρξη των νανοβακτηρίων ως μορφές ζωής οφείλονται στις μετρήσεις του μεγέθους των νανοβακτηρίων και στο ελάχιστο μέγεθος που πρέπει ένα κύτταρο να έχει για να διατηρεί ζωή. Συγκεκριμένα το απαιτούμενο μέγεθος που χρειάζονται τα

DNA, RNA, ριβοσώματα, ένζυμα, λιπίδια κλπ, έχει υπολογιστεί σε $0,014 \mu\text{m}^3$ έως $0,06 \mu\text{m}^3$ με διάμετρο να ποικίλει από $0,14 \mu\text{m}$ έως $0,3 \mu\text{m}$ (Velimirov 2001).



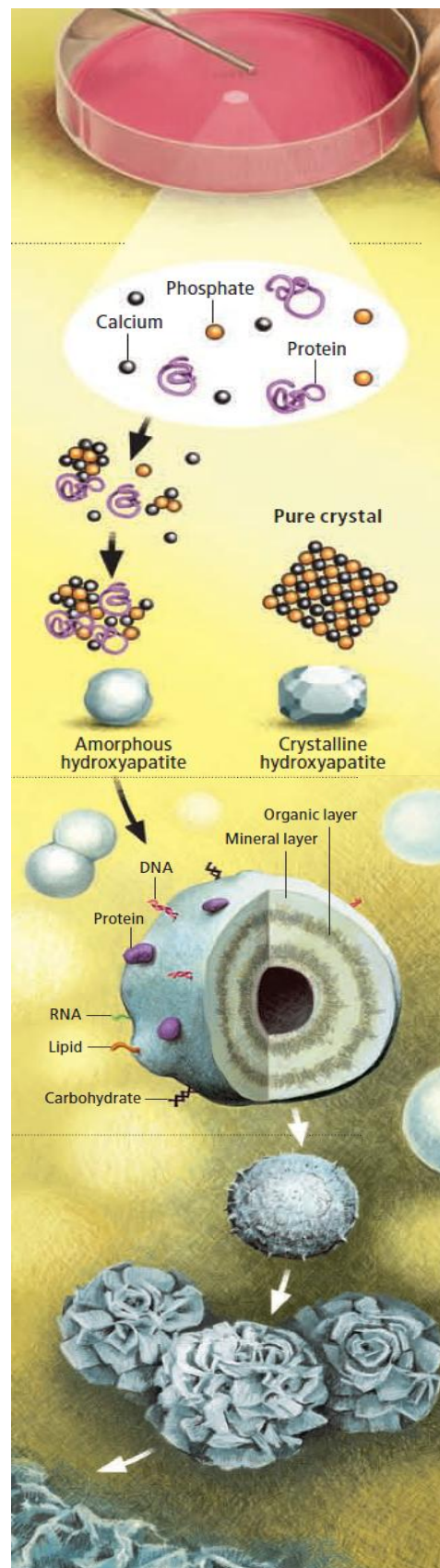
Εικόνα 1.10: α) Σωματίδια που μοιάζουν με τα «νανοβακτήρια», μεγέθους $100 - 500 \text{ nm}$ που προσομοιάζουν ζωντανά κύτταρα εξαιτίας του ομοιομόρφου μεγέθους τους. β) Καθώς τα σωματίδια αναπτύσσονται σχηματίζονται δομές που ομοιάζουν με τη διαίρεση των κυττάρων. (Young και Martel 2009)

Τα νανοβακτήρια περιγράφηκαν πρώτη φορά το 1993 από τον γεωλόγο R.L. Folk ο οποίος εντόπισε δομές μεγέθους $10\text{-}200 \text{ nm}$ που έμοιαζαν με βακτήρια. Το 1996 οι επιστήμονες της NASA ανακάλυψαν παρόμοιες δομές σε μετεωρίτη από τον Άρη. Το 1998 οι Kajander και Çiftçioglu απομόνωσαν το *Nanobacterium sanguineum*, το οποίο παρουσίαζε φυλογενετική ομοιότητα με τα γένη *Brucella* και *Bartonella*. Τα επόμενα χρόνια πληθώρα ασθενειών όπως πέτρες νεφρών, καρκίνος, αρτηριοσκλήρωση, αρθρίτιδα, νευροπάθεια, Alzheimer, πολλαπλή σκλήρυνση κλπ. συνδέθηκαν με την παρουσία νανοβακτηρίων στα σωματικά υγρά. Η πρώτη αμφισβήτηση για το αν τα νανοβακτήρια είναι βιώσιμες μορφές, προτάθηκε το 2000 από την ομάδα του Cisar, ο οποίος δε μπόρεσε να εντοπίσει νουκλεϊκά οξέα στα νανοβακτήρια. (Young και Martel 2009). Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του Cisar προήλθε από τους Raoult και συν. (2008) οι οποίοι κατέληξαν ότι τα νανοβακτήρια δεν αποτελούν ζωντανό οργανισμό αλλά αναπαραγόμενα συμπλέγματα ανόργανων συστατικών τα οποία περιέχουν την πρωτεΐνη φετουίνη.

Οι Young και Martel (2009) διερεύνησαν το σχηματισμό των νανοβακτηρίων επιβεβαιώνοντας ότι δεν αποτελούν ζωντανές μορφές ζωής χωρίς όμως να απορρίψουν την άποψη ότι μπορεί να αποτελούν παράγοντα πρόκλησης ασθενειών.

Σύμφωνα με την έρευνα τους, τα νανοβακτήρια σχηματίζονται από την πρόσδεση ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου που σχηματίζουν μεγαλύτερα σωματίδια φωσφορικού ασβεστίου (υδροξυαπατίτης) (Εικόνα 1.11). Ταυτόχρονα ορισμένες πρωτεΐνες προσδένονται στο ασβέστιο και παρεμβάλλονται στη διαδικασία κρυσταλοποίησης με αποτέλεσμα τα σωματίδια φωσφορικού ασβεστίου-πρωτεϊνών να έχουν μία άμορφη μοριακή δομή και όχι την καθαρή κρυσταλλική δομή του απατίτη. Καθώς τα σωματίδια αναπτύσσονται με συσσώρευση στιβάδων ανόργανης ύλης και πρωτεϊνών, μπορούν να συντηγθούν σε μεγαλύτερα σωματίδια και να αποκτήσουν διαφορετικά σχήματα. Επιπλέον τα σωματίδια εκτός από πρωτεΐνες ενσωματώνουν και άλλα οργανικά μόρια όπως λιπίδια, DNA και RNA τα όποια παρέχουν στήριξη στη δομή και στη συνεχόμενη αύξηση. Όταν εξαντληθούν οι πρωτεΐνες στο μέσο, τότε επικρατεί η κρυσταλλοποίηση προς απατίτη και παράγεται μία ακανθώδης δομή η όποια κάποια στιγμή καταρρέει και δημιουργεί ατρακτοειδή φύλλα στην επιφάνεια. Εάν συνεχιστεί η παροχή οργανικής ύλης τότε οι σχηματισμοί συνεχίζονται να αναπτύσσονται. Ορισμένες πρωτεΐνες που βρέθηκαν ότι συμμετέχουν είναι η αλβουμίνη και η φετουίνη Α, που εξηγεί το γεγονός ότι τα νανοβακτήρια μπορούσαν να εντοπιστούν με χρήση αντισωμάτων (Young και Martel 2009).

Εικόνα 1.11: Σχηματισμός νανοβακτηρίων σύμφωνα με τους Young και Martel (2009)

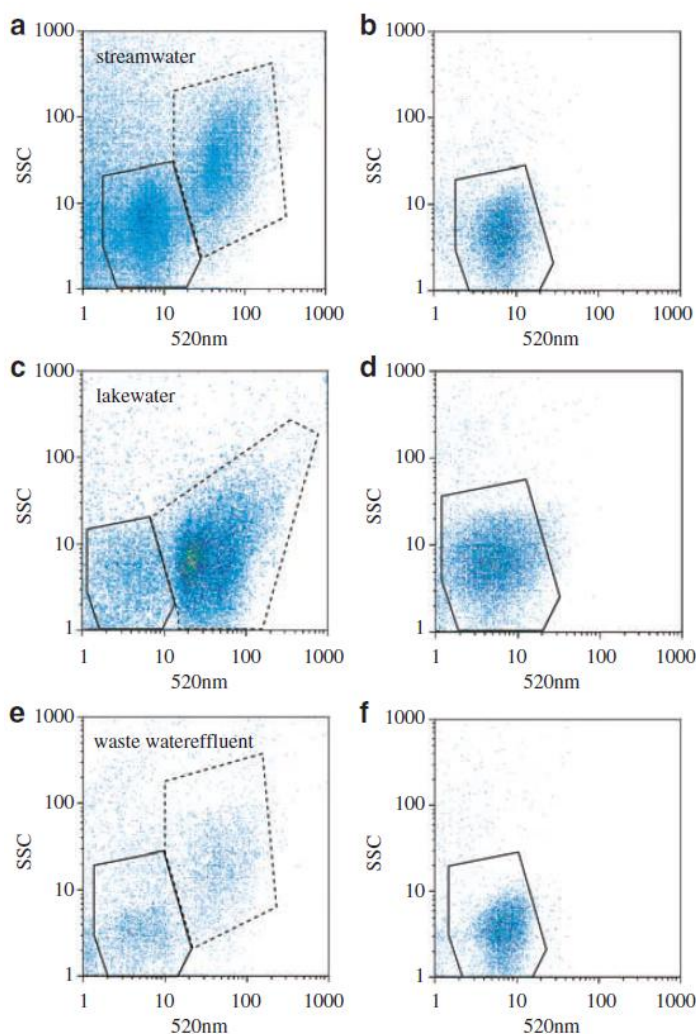


Τα υπερμικροβακτήρια (ultramicrobacteria-UMB) αποτελούν πολύ μικρές κοκκοειδείς μορφές (με διάμετρο μικρότερη από 0,3 μm), οι οποίες έχουν πολύ μικρό ρυθμό ανάπτυξης όταν εμβολιάζονται σε πλούσια θρεπτικά υποστρώματα και δεν επιδεικνύουν σημαντική αύξηση του κυτταρικού μεγέθους στο θρεπτικό αυτό. Επιπροσθέτως, για την ολοκλήρωση του ορισμού των UMB, προστέθηκε η ικανότητα να διαπερνούν μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm καθώς και το όριο των 0,1 μm^3 στον κυτταρικό όγκο. Το στοιχείο όμως που διαφοροποιεί τα UMB από τα βακτήρια σε κατάσταση πείνας είναι ότι διατηρούν το μικρό μέγεθος (0,05 – 0,09 μm^3) τους ακόμα και όταν εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών. Επιπλέον χαρακτηριστικά των UMB είναι τα εξής: α) απομονώνονται μέσω αραιώσης σε επίπεδο 1-2 κυττάρων, β) βρίσκονται σε υψηλούς αριθμούς, γ) έχουν μικρή συγκέντρωση DNA (1 έως 1,7 fg/κύτταρο), δ) είναι πλούσια σε πρωτεΐνες (>800 mg/ml κυτταρικού όγκου, >60% v/v), ε) έχουν χαμηλούς αριθμούς rRNA οπερονίων, στ) είναι υποχρεωτικά ολιγότροφα στην αρχή, αλλά μετά μπορεί να μετατραπούν σε δυνητικά ολιγότροφα, ζ) είναι προσαρμοσμένα στη ταυτόχρονη χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων και η) απουσία της τυπικής απόκρισης starvation-survival. Το καλύτερα χαρακτηρισμένο υπερμικροβακτήριο είναι το βακτήριο *Sphingomonas alaskensis* το οποίο έχει απομονωθεί από τη θαλάσσια περιοχή στον κόλπο της Αλάσκας και το *Pelagibacter ubique* (Velimirov 2001, Duda, και συν. 2012). Μορφές βακτηρίων που ομοιάζουν με τα υπερμικροβακτήρια είναι τα υπερμικροκύτταρα (ultramicrocells-UmC) τα οποία είναι βακτήρια που α) δεν πληρούν όλα τα κριτήρια των υπερμικροβακτηρίων ή β) είναι βακτήρια τα οποία βρίσκονται σε καταπόνηση και έχουν συρρικνωθεί (πχ starved cells). Αντιπρόσωποι των UmC (που παρουσιάζουν ομοιότητες με τα UMB) είναι τα *Kaistia adipata*, *Prochlorococcus marinus*, *Cycloclasticus oligotrophus*, *Chryseobacterium greenlandense*, *Herminiimonas glacieistrains*, στελέχη του γένους *Microbacterium* και στελέχη που ανήκουν στο φύλο Actinobacteria (Duda 2011).

Μέχρι τώρα, αναφερθήκαμε στα βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια (VBNC), στα βακτήρια σε κατάσταση πείνας (starvation forms), στα νανοβακτηρία (nanobacteria) και στα υπερμικροβακτήρια (ultramicrobacteria) τα οποία περιγράφουν ομάδες βακτηρίων που κυρίως εντοπίζονται σε υδάτινα οικοσυστήματα με κοινό γνώρισμά τους τη δυσκολία καλλιέργειάς τους σε πλούσια υποστρώματα (καθώς βρίσκονται σε ολιγότροφο περιβάλλον) και το μικρό μέγεθος τους και κατ' επέκταση την ικανότητα που έχουν να διαπερνάνε (υπό ορισμένες συνθήκες) τις

μεμβράνες των 0,45 μm και των 0,2 μm που χρησιμοποιούνται στη μικροβιολογική εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου καθώς και στην αποστείρωση διαλυμάτων.

Δύο επιπλέον κατηγορίες βακτηρίων (Εικόνα 1.12) έχουν προκύψει τα τελευταία χρόνια βασιζόμενες στο περιεχόμενο των βακτηρίων σε DNA και στην εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής (FCM – flow cytometry). Υπάρχουν τα βακτήρια με χαμηλό περιεχόμενο νουκλεϊκών οξέων (LNA – Low nucleic acid content bacteria) και τα βακτήρια με υψηλό περιεχόμενο νουκλεϊκών οξέων (HNA – High nucleic acid content bacteria). Τα HNA βακτήρια είναι συνήθως ο μεταβολικά ενεργός μικροβιακός πληθυσμός ενώ τα LNA ο ανενεργός. Τα LNA βακτήρια μέχρι πρόσφατα δεν είχαν καλλιεργημένους αντιπροσώπους και τα χαρακτηριστικά τους ήταν άγνωστα με αποτέλεσμα να ταυτίζονται με τα ολιγότροφα βακτήρια, τα υπερμικροβακτήρια και τα VBNC βακτήρια.



Εικόνα 1.12: Ιστογράμματα κυτταρομετρίας ροής α) για το σύνολο της μικροβιακής κοινότητας και β) για την καλλιέργεια εμπλουτισμού των LNA βακτηρίων από νερό ρυακιού, γ) για το σύνολο της μικροβιακής κοινότητας και δ) για την καλλιέργεια εμπλουτισμού των LNA βακτηρίων από νερό λίμνης, ε) για το σύνολο της μικροβιακής κοινότητας και στ) για την καλλιέργεια εμπλουτισμού των LNA βακτηρίων από νερό από εργοστάσιο επεξεργασίας αποβλήτων. Η συμπαγής γραμμή υποδεικνύει τα LNA βακτήρια και η διακεκομμένη γραμμή τα HNA βακτήρια. SSC: πλάγια σκέδαση, 520 nm: μήκος κύματος για τη πράσινη φθορίζουσα ακτινοβολία. Η εμπλουτισμένη καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε με το διήθημα από μεμβράνη με διάμετρο πόρων 0,45 μm και καλλιέργεια σε αποστειρωμένο νερό ρυακιού (Wang, και συν. 2009).

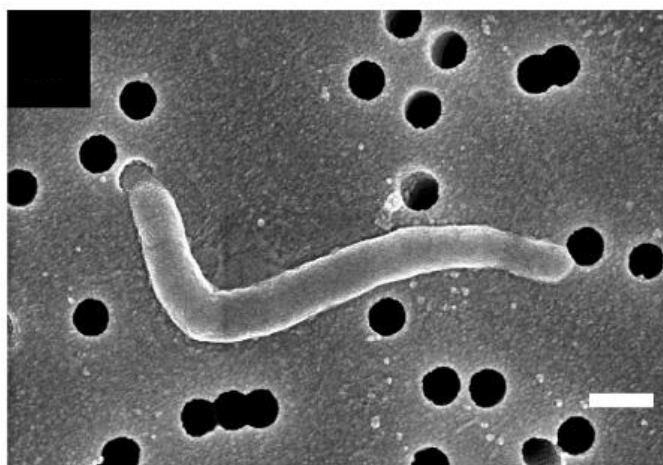
Η μελέτη των Wang και συνεργατών έδειξε ότι τα LNA αποτελούν σημαντικό πληθυσμό των υδάτινων μικροβιακών κοινοτήτων (νερό από λίμνη, ρυάκι, νερό βρύσης, υπόγεια ύδατα και νερό από εργοστάσιο επεξεργασίας αποβλήτων) και ότι αυτά μπορούν να καλλιεργηθούν. Στη συγκεκριμένη μελέτη απομονώθηκαν 3 στελέχη LNA βακτηρίων που παρουσίαζαν μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια με το πρωτεοβακτήριο *Polynucleobacter* sp., με χαρακτηριστικά αυστηρά ολιγότροφου μικροοργανισμού (δεν αναπτυχτήκαν σε πλούσια υποστρώματα) αλλά και υπερμικροβακτηρίου (είχαν μέγεθος 0,01-0,05 μm^3) (Wang, και συν. 2009).

Όλες οι προηγούμενες ομάδες βακτηρίων έχουν βρεθεί να διαπερνάνε τις μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,45 μm και 0,22/0,2 μm και κατηγοριοποιούνται κάτω από τον όρο διηθητά βακτήρια (filterable bacteria). Βακτήρια των α - και γ - Proteobacteria καθώς και βακτήρια των γενών *Cytophaga*, *Flavobacterium* και *Bacteroides* αποτελούν τη διηθητή μικροβιακή κοινότητα σε υδάτινα περιβάλλοντα. Η εύρεση των διηθητών βακτηρίων καθιστά τη χρήση της μικροδιήθησης προβληματική τόσο ως μέσο αποστείρωσης αλλά και ως μέσο καταμέτρησης των μικροοργανισμών σε τεχνικές που βασίζονται στη χρήση μεμβρανών. Παρ' όλα αυτά, όλες οι μεμβράνες με πόρους υπόκεινται σε αξιολόγηση της ικανότητας τους να συγκρατούν μικροοργανισμούς με χρήση του βακτηρίου *Brevundimonas diminuta* το οποίο έχει επιλεγεί επειδή έχει κυτταρικό όγκο 0,08 μm^3 , που είναι μία αρκετά χαμηλή τιμή για να θεωρηθεί το συγκεκριμένο βακτήριο ως υπερμικροβακτήριο. Ο έλεγχος της διαπερατότητας των μεμβρανών από βακτήρια με κριτήριο τον κυτταρικό τους όγκο, αποδείχθηκε ανεπαρκής από τους Wang και συνεργάτες (Wang, και συν. 2008). Η έρευνα τους έδειξε ότι το σχήμα του βακτηρίου και όχι το απόλυτο μέγεθος του καθορίζει το πέρασμα ενός βακτηρίου ή όχι από τους πόρους της μεμβράνης. Διαπιστώθηκε ότι το *Hylemonella gracilis* που είχε αναλογικά μεγάλο κυτταρικό όγκο, πλεονεκτούσε στο πέρασμα από όλες τις μεμβράνες (Πίνακας 1.6).

Εν αντιθέσει βακτήρια όπως το *Sphingopyxis alaskensis* (πρώην *Sphingomonas alaskensis*) και το *Brevundimonas diminuta* που έχουν το μικρότερο κυτταρικό όγκο και μικρές διαστάσεις, παρουσίασαν υψηλότερη διαπερατότητα στη μεμβράνη των 0,45 μm , αλλά στη συνέχεια παρουσίασαν παρόμοια διαπερατότητα με τα άλλα βακτήρια (εξάιρεση το (*Hylemonella gracilis*). Ο λόγος που το *Hylemonella gracilis* μπορεί να διαπερνάει τις μεμβράνες σε μεγαλύτερο ποσοστό είναι ότι συνδυάζει το κατάλληλο σχήμα (σπειρύλλιο) και τις σωστές διαστάσεις (μικρό πλάτος) καθώς και την ελαστικότητα (Εικόνα 1.13).

Πίνακας 1.6: Ποσοστό διέλευσης των βακτηρίων διαμέσου αποστειρωμένης μεμβράνης με διαφορετική διάμετρο πόρων (Wang, και συν. 2008).

	shape	smallest width (μm)	cell volume(μm^3)	passage percentage		
				0.45 μm	0.22 μm	0.1 μm
<i>Escherichia coli</i>	rod	0.60	0.47	$0.15\% \pm 0.01\%$	$0.03\% \pm 0.01\%$	ND
<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	rod	0.31	0.07	$3.48\% \pm 0.85\%$	$0.03\% \pm 0.01\%$	ND
<i>Brevundimonas diminuta</i>	short-rod	0.40	0.08	$1.47\% \pm 0.28\%$	$0.02\% \pm 0.03\%$	ND
<i>Vibrio cholerae</i>	rod	0.42	0.11	$0.22\% \pm 0.01\%$	$0.03\% \pm 0.02\%$	ND
<i>Legionella pneumophila</i>	long-rod	0.55	0.58	$1.04\% \pm 0.52\%$	$0.02\% \pm 0.01\%$	ND
<i>Hylemonella gracilis</i>	spirillum	0.20	0.12	$46.51\% \pm 0.81\%$	$7.33\% \pm 0.01\%$	$0.20\% \pm 0.002\%$



Εικόνα 1.13: Μικροφωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του *Hylemonella gracilis* σε πολυκαρβονική μεμβράνη με διάμετρο πόρων 0,2 μm . Η κλίμακα αντιστοιχεί σε 300 nm. (Wang, και συν. 2008).

Τέλος, στην έρευνα αυτή προέκυψαν εξίσου σημαντικά αποτελέσματα όσον αφορά την πειραματική πορεία που ακολουθείται για την αξιολόγηση της διαπερατότητας των μεμβρανών. Το βακτήριο *Brevundimonas diminuta* που χρησιμοποιείται, επωάζεται σε πλούσια θρεπτικά υποστρώματα με αποτέλεσμα τα κύτταρα να είναι μεγαλύτερα. Όμως στα περιβαλλοντικά υδατικά δείγματα, υπάρχει ένα ολιγότροφο περιβάλλον στο οποίο τα κύτταρα ακόμα και αν δε βρίσκονται σε κατάσταση πείνας παρουσιάζουν μικρότερο μέγεθος άρα μπορούν δυνητικά να διαπεράσουν τις μεμβράνες των 0,45 μm και των 0,2 μm που χρησιμοποιούνται ευρέως στην τεχνική της διήθησης σε μεμβράνες, και να υπάρξει υποεκτίμηση του πληθυσμού (Wang, και συν. 2008).

Όπως προαναφέρθηκε, τα υδατικά οικοσυστήματα αποτελούν oligότροφα περιβάλλοντα με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι oligότροφοι οργανισμοί που μεγαλώνουν σε αυτά τα περιβάλλοντα ταξινομούνται σε 4 κατηγορίες: α) οι οργανισμοί που καλλιεργούνται στο θρεπτικό υπόστρωμα, β) οι οργανισμοί που απομονώθηκαν αρχικά σε φτωχό θρεπτικό υπόστρωμα αλλά αναπτύσσονται στη συνέχεια σε πλούσιο υπόστρωμα, γ) οι οργανισμοί που καλλιεργούνται μόνο σε φτωχό υπόστρωμα και δ) οι οργανισμοί που δε μπορούν να καλλιεργηθούν και εντοπίζονται με τη χρήση άλλων τεχνικών. Το στοιχείο που διαφοροποιεί τα oligότροφα από τα κοπιότροφα βακτήρια είναι ότι τα πρώτα δε μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε πλούσιο σε θρεπτικά ενδιαίτημα ενώ τα δεύτερα δε μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ένα φτωχό ενδιαίτημα. Οι αιτίες που προκαλούν το θάνατο των oligότροφων βακτηρίων στα πλούσια θρεπτικά υποστρώματα είναι ποικίλες. Μερικές εξ' αυτών είναι: α) οι οσμωτικές αλλαγές λόγω μεταφοράς θρεπτικών συστατικών στο κύτταρο σε πιο γρήγορο ρυθμό από την κατανάλωση ή λόγω μεταφοράς θρεπτικών που δε μπορεί να χρησιμοποιηθούν από το κύτταρο, β) η ανισορροπία στην αύξηση του κύτταρου λόγω εξάντλησης του ATP/ροής πρωτονίων, λόγω χαμηλότερου ρυθμού μεγέθυνσης του τοιχώματος με αποτέλεσμα τη ρήξη του ή λόγω υψηλής αναλογίας μεμβρανικών πρωτεϊνών/λιπιδίων, γ) οι τοξικές ενώσεις όπως οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Στο αντίστροφο φαινόμενο δηλαδή στον θάνατο των κοπιότροφων βακτηρίων σε oligότροφα ενδιαίτημα έχουν προταθεί οι εξής λόγοι: α) έλλειψη ρυθμιστικών μηχανισμών για την προσαρμογή σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών, β) έλλειψη ικανοποιητικού χρόνου για να προσαρμοστεί, γ) συναγωνισμός με τα oligότροφα βακτήρια, δ) υψηλό κόστος διατήρησης του κυττάρου (Koch 2001).

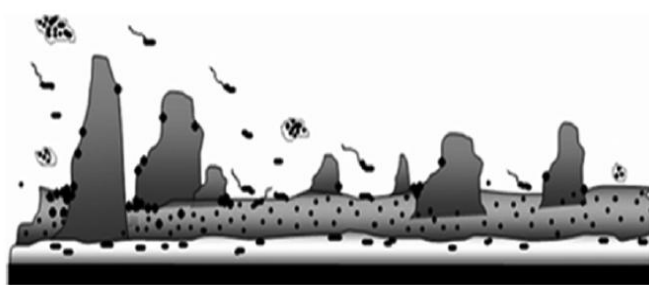
1.6.5. Μικροοργανισμοί που έχουν εντοπιστεί σε συστήματα παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας

Τα τελευταία χρόνια μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τη διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας του εντοπίζονται στα συστήματα παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας σε φαρμακοβιομηχανίες, σε βιομηχανίες ημιαγωγών, σε βιομηχανίες τροφίμων κλπ. Το ενδιαίτημα αυτό παρουσιάζει ομοιότητες με άλλα oligότροφα περιβάλλοντα όπως το πόσιμο νερό και οι ομάδες των μικροοργανισμών όπως τα υπερμικροβακτήρια, και βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως ενδογενής πληθυσμός του νερού υψηλής

καθαρότητας. Σε επίπεδο γένους και είδους, τα περισσότερα βακτήρια που έχουν απομονωθεί σε καλλιέργειες ή έχουν ταυτοποιηθεί με μοριακές τεχνικές (κλωνοποίηση, DGGE) ανήκουν στα Gram αρνητικά βακτήρια και στο φύλο Proteobacteria (Kulakov, και συν. 2002). Στην έρευνα των Kulakov και συν. (2002) απομονώθηκαν, σε έξι διαφορετικές βιομηχανικές μονάδες παραγωγής υπεκάθαρου νερού, τα βακτήρια *Ralstonia pickettii*, *Bradyrhizobium* sp., *Burkholderia* sp., *Flavobacterium* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas saccharophila* και *Sphingomonas* sp.. Επιπλέον, βακτήρια των γενών *Bradyrhizobium*, *Xanthomonas* και *Stenotrophomonas* έχουν ανιχνευτεί σε κεκαθαρμένο νερό προοριζόμενο για φαρμακευτική χρήση από τους Kawai και συν. (2002). Μία πληρέστερη έρευνα σε μονάδα παροχής υπερέκταρου νερού με χρήση κλασσικών μικροβιολογικών τεχνικών και μοριακής κλωνοποίησης, έδειξε μία αυξημένη ποικιλότητα με κυρίαρχους μικροοργανισμούς το φύλο Proteobacteria. Ορισμένα από τα γένη που απομονώθηκαν στην έρευνα αυτή ήταν τα: *Ralstonia*, *Delfia*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Bacillus* ενώ η ανάλυση των κλώνων ανέδειξε επιπρόσθετα γένη όπως τα *Sphingomonas*, *Rhodoferrax*, *Methylobacterium*, *Alcaligenes* κ.α. (Bohus, και συν. 2010). Σε μελέτη σε μονάδες επεξεργασίας νερού με αντίστροφη όσμωση, μικροοργανισμοί εντοπίστηκαν σε όλα τα τμήματα παραγωγής περιλαμβανομένων και της δεξαμενής μετά το στάδιο της υπερδιήθησης και στο παραγόμενο νερό μετά την αντίστροφη όσμωση. Οι κυρίαρχοι οργανισμοί ήταν το φύλο Proteobacteria με τα γένη *Burkholderia*, *Sphingomonas* και *Pseudomonas* (Bereschenko, και συν. 2008). Η επικράτηση του φύλου Proteobacteria πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι τα βακτήρια αυτά (κυρίως τα γένη *Burkholderia*, *Ralstonia* και *Sphingomonas*) αποτελούν τους κυρίαρχους οργανισμούς στη δημιουργία βιομεμβρανών πάνω στα φίλτρα ανεξάρτητα από το νερό που εισέρχεται (Ivnitsky, και συν. 2007) ενώ τα α-Proteobacteria φαίνεται ότι αποτελούν τους πρώτους επικοιστές των φίλτρων (Εικόνα 1.14) (Bereschenko, και συν. 2010, Gao, και συν. 2011).

Σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πόσιμο νερό, που αποτελεί την πρώτη ύλη της φαρμακοβιομηχανίας, έχει βρεθεί κατ' επανάληψη, ένα μεγάλος αριθμός βακτηρίων ικανών να διαπερνάνε τις μεμβράνες των 0,2 μm , που θεωρητικά παρέχει στείρο διήθημα. Στη μελέτη του Silbaq (2009) βακτήρια των φύλων Actinobacteria, Firmicutes και Proteobacteria απομονώθηκαν από πόσιμο νερό και διέθεταν την ικανότητα να διαπερνούν τους ηθμούς των 0,2 μm και σε κάποιες περιπτώσεις των 0,1 μm . Τα βακτήρια αυτά άνηκαν στα γένη: *Rhodococcus*,

Microbacterium, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas*, *Kocuria*, *Caulobacter*, *Nocardioides*, *Afipia* και *Aeromicrobium* (Silbaq 2009).



- Στοιβάδα με δομές σαν πύργοι σχηματισμένες από τα β-Proteobacteria.
- Στοιβάδα EPS + *Sphingomonas* & άλλα βακτήρια
- Στοιβάδα EPS + *Sphingomonas*
- Μembrάνη Αντίστροφης όσμωσης

Εικόνα 1.14: Σχηματική αναπαράσταση βιουμενίου στη μεμβράνη αντίστροφης όσμωσης. Αρχικά κύτταρα του *Sphingomonas* sp. προσκολλούνται στην επιφάνεια και παράγουν εξωπολυσακχαρίτες οι οποίοι ευνοούν την προσκόλληση των β- και γ-Proteobacteria (Bereschenko, και συν. 2010).

1.7. Μεθοδολογική προσέγγιση για την εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας σε νερό υψηλής καθαρότητας

Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται σήμερα για την ανίχνευση και την απομόνωση του μικροβιακού πληθυσμού στο νερό ποικίλουν. Οι κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές που ορίζονται από τις Φαρμακοποιίες, εφαρμόζονται τόσο σε αναλύσεις ρουτίνας όσο και σε επιστημονικές μελέτες σε συνδυασμό όμως, στην δεύτερη περίπτωση, με σύγχρονες μοριακές και ενζυμικές τεχνικές και με τεχνικές μικροσκοπίου. Η χρήση πολλών διαφορετικών τεχνικών αποτυπώνει τη δυσκολία ανίχνευσης και απομόνωσης ενός σημαντικού τμήματος της μικροβιακής κοινότητας σε υψηλής καθαρότητας νερό όπως επίσης και σε ενδαιτήματα που ο αναμενόμενος πληθυσμός είναι ιδιαίτερα χαμηλός.

1.7.1. Κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές

Σήμερα, οι κλασσικές μικροβιολογικές μέθοδοι εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού στο νερό υψηλής καθαρότητας όπως ορίζει η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία. Οι μέθοδοι αυτές βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε στερεά ή υγρά θρεπτικά υποστρώματα.

Η μέθοδος της ηθμομεμβράνης (membrane filtration - MF) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη, ειδικά όταν χρειάζεται να γίνει επεξεργασία μεγάλου όγκου δείγματος. Στη μέθοδο αυτή το δείγμα διηθείται υπό κενό μέσα από μεμβράνη (συνήθως εστέρων κυτταρίνης) κατάλληλης διαμέτρου πόρων (0,45 μm για την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία), προκειμένου να συγκρατηθούν οι μικροοργανισμοί και στη συνέχεια μεταφέρεται στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για ταυτοποίηση και αρίθμηση. Εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση παθογόνων όπως τα βακτήρια *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* κλπ. Ένα βασικό μειονέκτημα που έχει προκύψει από τη χρήση της μεθόδου της ηθμομεμβράνης, σε όλα τα δείγματα νερού, είναι η ικανότητα ορισμένων μικροοργανισμών να διαπερνάτε τις μεμβράνες αυτές. Βακτήρια τα οποία διαπερνάνε μεμβράνες των 0,2 μm και των 0,1 μm έχουν βρεθεί σε πόσιμο νερό σε έρευνα του Silbaq (2008) ενώ οι Jones και συν. απομόνωσαν σε φυσικό μεταλλικό νερό, κύτταρα που διαπερνάνε τις μεμβράνες των 0,45 μm και των 0,2 μm και έδειξαν ότι το υλικό κατασκευής της μεμβράνης επηρεάζει τη συγκράτηση των οργανισμών και συγκεκριμένα πολυκαρβονικές μεμβράνες συγκρατούν λιγότερους μικροοργανισμούς σε σχέση με τις μεμβράνες κυτταρίνης (Jones, και συν. 1999). Παρόμοια τα αποτελέσματα της έρευνας των Haller και συν. οι οποίοι διερεύνησαν την ύπαρξη διηθήσιμων βακτηρίων (από μεμβράνες των 0,2 μm) σε θαλασσινό νερό (Haller, και συν. 1999) και των Nakai και συν. οι οποίοι πραγματοποίησαν μεταγενωμική ανάλυση σε θαλάσσιους μικροοργανισμούς που διαπερνάνε τις μεμβράνες των 0,2 μm και συγκρατούνται στα 0,1 μm (Nakai, και συν. 2011). Τέλος σε έρευνα των Lillis και Bissonate έχουν ανιχνευτεί διηθητά βακτήρια από μεμβράνες των 0,4 μm και των 0,22 μm σε αποθέματα υπόγειου νερού (Lillis και Bissonette 2001).

Η μέθοδος του πιο πιθανού αριθμού (most probable number - MPN) χρησιμοποιείται μερικές φορές για την παρακολούθηση του μικροβιακού φορτίου σε δείγματα υψηλής καθαρότητας όπου η πιθανότητα ύπαρξης του μικροοργανισμού είναι μικρή. Οι σωλήνες στους οποίους παρατηρείται μικροβιακή ανάπτυξη καταγράφονται και με χρήση στατιστικών πινάκων υπολογίζεται ο αριθμός των μικροοργανισμών. Η μέθοδος αυτή είναι εύκολα εφαρμόσιμη σε όλα τα δείγματα, με φθηνά υλικά και γρήγορη ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Τα κυριότερα μειονεκτήματα της είναι ότι υστερεί σε ακρίβεια όταν λίγες επαναλήψεις χρησιμοποιούνται και όταν η εκλεκτικότητα του θρεπτικού δεν επαρκεί για την ανίχνευση του μικροοργανισμού στόχο.

Η μέθοδος καταμέτρησης σε τρυβλία (plate counting) διαχωρίζεται στην μέθοδο αραιώσης του εμβολίου με θρεπτικό (pour-plate method) και στη μέθοδο διασποράς του εμβολίου στο θρεπτικό (surface spread method). Δείγμα είτε αναμιγνύεται με το θρεπτικό και επιστρώνεται σε τρυβλίο Petri είτε διασπείρεται στην επιφάνεια ενός θρεπτικού. Η δεύτερη μέθοδος ευνοεί την ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών καθώς και την εύκολη απομόνωση τους. Τα μειονεκτήματα των δύο μεθόδων είναι α) χρησιμοποιείται μικρός όγκος του δείγματος (1 ml και 0,1 ml αντίστοιχα) εκτός και αν έχει προηγηθεί συμπύκνωση του δείγματος, β) χρονοβόρες και πολυέξοδες όταν πρόκειται για πολλά δείγματα και πολλές αραιώσεις και επαναλήψεις, γ) η καταμέτρηση των αποικιών δεν είναι πάντα εύκολη και δ) αναλύεται μικρός αριθμός κυττάρων (30-300/τρυβλίο).

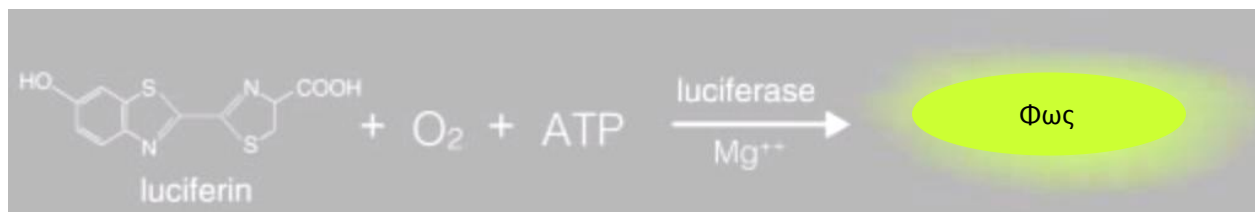
Συνοψίζοντας, όλες οι μέθοδοι που βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών παρουσιάζουν ορισμένα βασικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Πέραν το μειωμένου κόστους και της εύκολης εφαρμογής τους, μπορούν να δώσουν τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά αποτελέσματα, μπορεί να γίνει κάποια αρχική ταυτοποίηση των μικροοργανισμών και μπορεί να γίνει ανίχνευση βακτηρίων που βρίσκονται σε πολύ χαμηλούς αριθμούς (μέσω συμπύκνωσης με διήθηση). Τα βασικά μειονεκτήματα είναι ότι είναι χρονοβόρες μέθοδοι, και υποεκτιμούν το μικροβιακό φορτίο είτε επειδή δεν μπορούν να καλλιεργηθούν όλα τα βακτήρια (π.χ. εξαιτίας λανθασμένης επιλογής υποστρώματος) και είτε επειδή δεν ανιχνεύουν τα βακτήρια VBNC (Köster, και συν. 2003, Davey 2011).

1.7.2. Βιοφωταύγεια

Τα τελευταία χρόνια η μέθοδος της βιοφωταύγειας εφαρμόζεται για την ποσοτική ανίχνευση του μικροβιακού φορτίου (Venkateswaran, και συν. 2003, Duc, και συν. 2004) αλλά και για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών όπως τα κολίμορφα βακτήρια (Bastholm, και συν. 2008). Οι εξελίξεις στη μέθοδο αυτή, δίνουν τη δυνατότητα μέτρησης τόσο του ενδοκυτταρικού ATP (βιώσιμα κύτταρα) όσο και του εξωκυτταρικού ATP (ολικός πληθυσμός).

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση της υποστρώματος λουσιφερίνης με το ATP παρουσία του ενζύμου λουσιφεράσης με παραγωγή οξυλουσιφερίνης, AMP και φωτός (Εικόνα 1.15). Το φως μετριέται με λουμινόμετρο σε μονάδες σχετικές φωταύγειας (relative luminescence unit-RLU)

και στη συνέχεια αντιστοιχίζεται σε μία πρότυπη καμπύλη συγκεντρώσεων ATP. Το υπολογιζόμενο ATP αντιστοιχίζεται τέλος σε cfu με βάση μετρήσεις ενδοκυτταρικού ATP, από διάφορα είδη.



Εικόνα 1.15: Αντίδραση βιοφωταύγειας

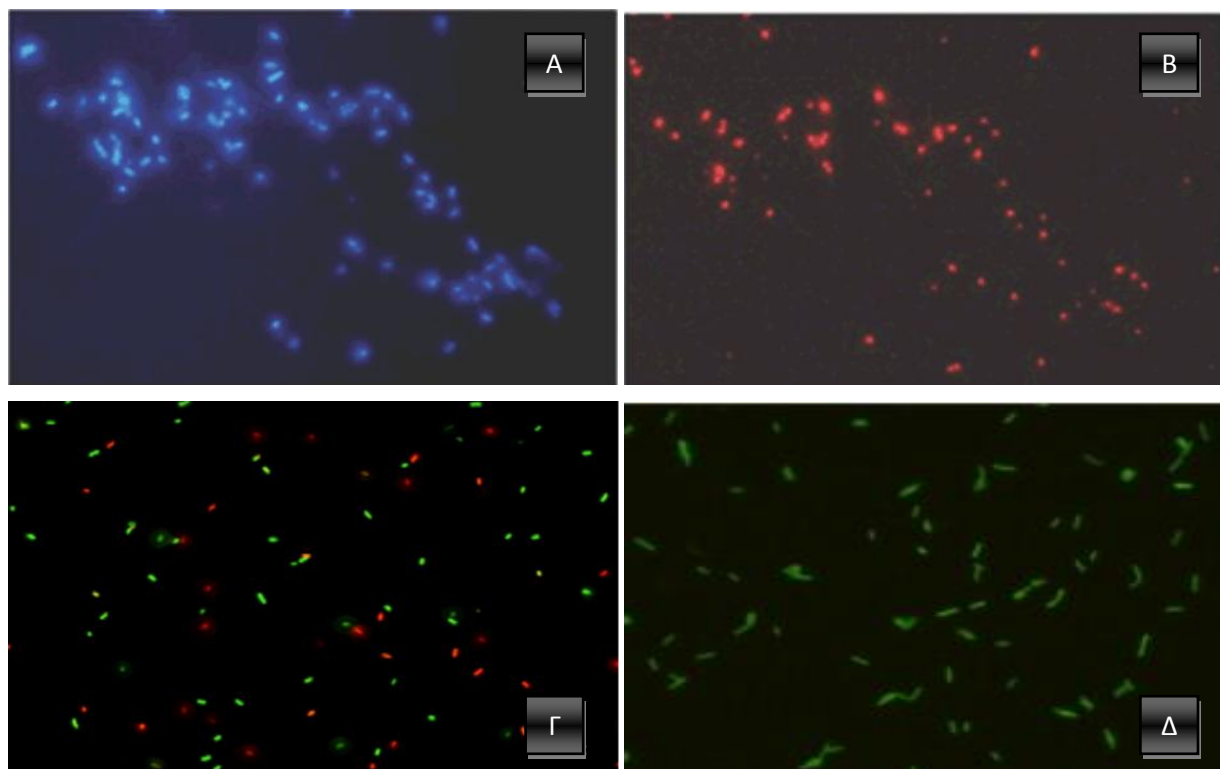
Στο σημείο αυτό παρατηρείται το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου καθώς το κάθε κύτταρο έχει διαφορετική ποσότητα ATP και συνεισφέρει διαφορετικά στην βιοφωταύγεια που προκαλείται. Ο κυτταρικός όγκος και το μέγεθος του κάθε βακτηρίου επηρεάζει την ποσότητα ATP με αποτέλεσμα το κάθε είδος να έχει διαφορετική συγκέντρωση ενδοκυτταρικού ATP. Από μετρήσεις, έχει παρατηρηθεί ότι τα ενδοσπόρια ως μεταβολικώς ανενεργά έχουν τη μικρότερη ποσότητα ATP ($0,003 \cdot 10^{-18}$ mol ATP/cfu), τα Gram αρνητικά βακτήρια έχουν συγκέντρωση ATP με τιμές $\approx 2 \cdot 10^{-18}$ mol ATP/cfu, τα Gram θετικά βακτήρια έχουν συγκέντρωση ATP με τιμές $\approx 8 \cdot 10^{-18}$ mol ATP/cfu και τέλος οι ζύμες έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση με τιμές $\approx 500 \cdot 10^{-18}$ mol ATP/cfu. Περίπου 3 RLU αντιστοιχούν σε κάθε βακτηριακό κύτταρο, ενώ σε κάθε ενδοσπόριο περίπου 1 RLU. Εξαιτίας αυτής της διαφοροποίησης στο ενδοκυτταρικό ATP, δε μπορεί να εξαχθεί με απόλυτη ακρίβεια ο πραγματικός μικροβιακός πληθυσμός, παρ' όλα αυτά η μέθοδος παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα, που ευνοούν την εφαρμογή της. Πρώτον, με τη μέθοδο αυτή μπορούν να προσμετρηθούν στον πληθυσμό τα VNBC βακτήρια, δεύτερον, δεν υποεκτιμάται ο πληθυσμός όπως συμβαίνει με τις κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές, τρίτον, μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα προερχόμενα από ενδιαιτήματα που στερούνται θρεπτικών συστατικών (π.χ. υπερκάθαρο νερό, περιβάλλοντα καθαρών δωματίων όπως σε διαστημόπλοια) και τα κύτταρα έχουν χαμηλό μεταβολισμό, τέταρτον, είναι μία μέθοδος γρήγορη, εύκολη με άμεσα αποτελέσματα (Duc, και συν. 2007).

Επιπλέον η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένδειξη παρουσίας ή απουσίας των κολίμορφων βακτηρίων στο νερό με χρήση της 6-ο-β-γαλακτοπυρανόξης-λουσιφερίνης, η οποία υδrolύεται από την παραγόμενη β-D-γαλακτοζιδάση των κολίμορφων βακτηρίων και στη

συνέχεια ακολουθείται η παραπάνω αντίδραση με παραγωγή φωτός. Η μέθοδος της βιοφωταύγειας βασισμένη στο ATP, συναγωνίζεται τις μεθόδους PCR που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου (Bastholm, και συν. 2008).

1.7.3. Μικροσκοπία φθορισμού προσπίπτουσας ακτινοβολίας

Η μικροσκοπία φθορισμού προσπίπτουσας ακτινοβολίας (epifluorescence microscopy) αποτελεί μία διαδεδομένη μέθοδο για την καταμέτρηση του μικροβιακού πληθυσμού σε υδάτινα οικοσυστήματα όπως αυτά του νερού υψηλής καθαρότητας (Kawai, και συν. 1999, Kulakov, και συν. 2002). Βασίζεται στην ιδιότητα του φθορισμού, δηλαδή στην εκπομπή ακτινοβολίας μεγαλύτερου μήκους κύματος και μικρότερης ενέργειας μετά από απορρόφηση ακτινοβολίας. Χρησιμοποιούνται φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται στα νουκλεϊκά οξέα, στις πρωτεΐνες, στα λιπίδια ή και στην κυτταρική μεμβράνη (Li, και συν. 2004, Lunau, και συν. 2005).



Εικόνα 1.16: Μικροφωτογραφίες βακτηριακών κύτταρων από μικροσκόπιο φθορισμού προσπίπτουσας ακτινοβολίας. α) κύτταρα με χρώση DAPI, β) κύτταρα με χρώση CTC, γ) κύτταρα με χρώση SYTO9/PI, δ) με χρώση 6CFDA (Mangoni, και συν. 2004, Miyanaga, και συν. 2007, Udart, και συν. 2011).

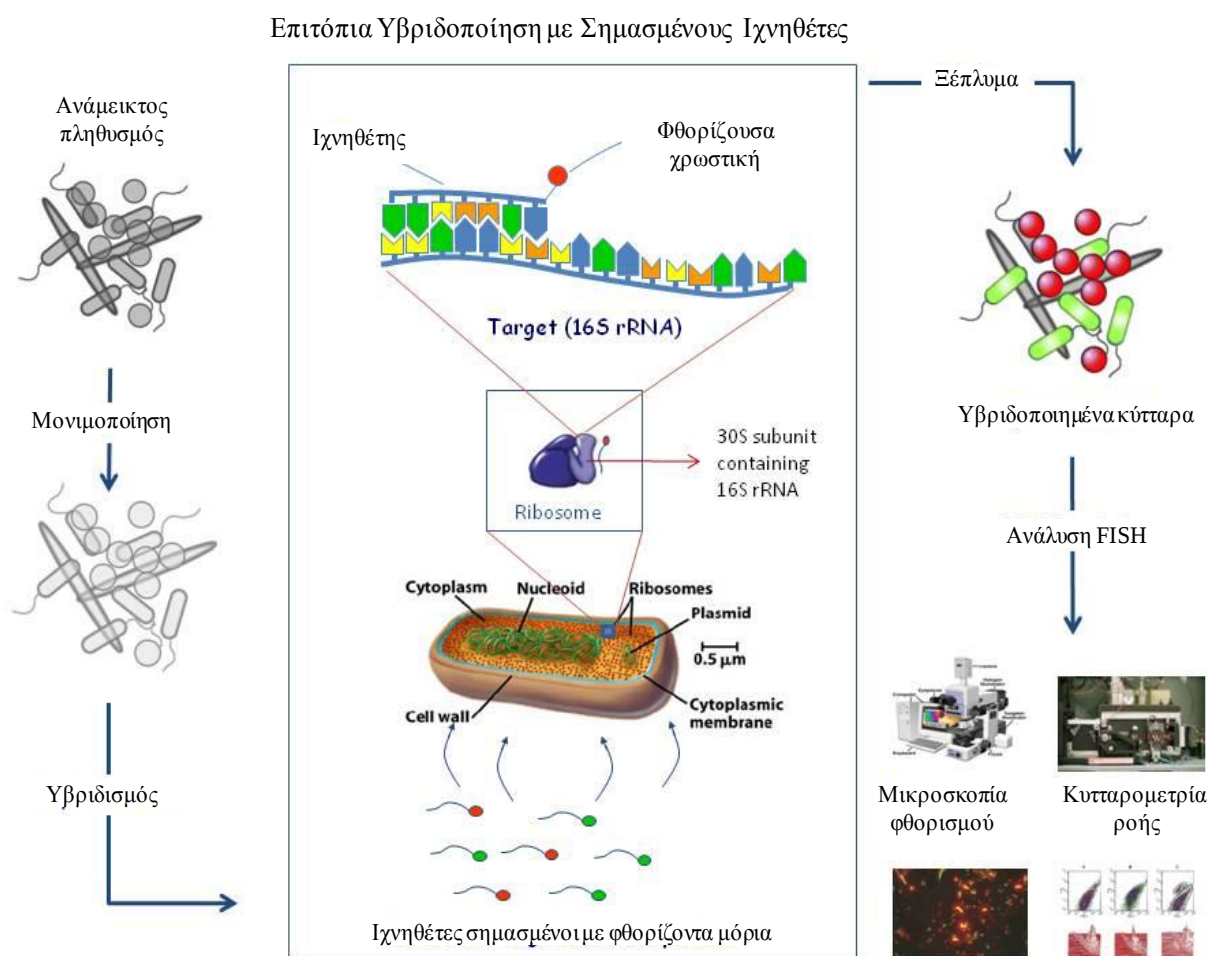
Ορισμένες από τις χρωστικές που χρησιμοποιούνται στη μικροβιολογία είναι: α) η DAPI που προσδένεται στο DNA όλων των κυττάρων και χρωματίζει τα κύτταρα ιώδη-μπλε (Εικόνα 1.16α), β) η DTAF που προσδένεται στις πρωτεΐνες και στους πολυσακχαρίτες και χρωματίζει τα κύτταρα κίτρινα-πράσινα, γ) η CPC η οποία είναι ανάγεται σε κόκκινο φθορίζον CTC άλας του φορμαζανίου συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά και υποδεικνύει τα μεταβολικώς ενεργά κύτταρα (Εικόνα 1.16β), δ) η SYTO 9 που προσδένεται στο DNA όλων των κυττάρων και τα χρωματίζει πράσινα, ε) η PI η οποία προσδένεται στο DNA των νεκρών κυττάρων και τα χρωματίζει κόκκινα (Εικόνα 1.16γ) και στ) η 6CFDA η οποία εισέρχεται στο κύτταρο και υδrolύεται από τις εστεράσες υποδεικνύοντας τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα (Εικόνα 1.16δ) (Kawai, και συν. 2002, Kulakov, και συν. 2002, Baba, και συν. 2009). Τα κύρια πλεονεκτήματα της μικροσκοπίας φθορισμού είναι α) με το σωστό συνδυασμό φθορίζουσων χρωστικών μπορούν να υπολογιστούν τα βιώσιμα κύτταρα (και τα VBNC βακτήρια) και να διακριθούν τα νεκρά κύτταρα, β) είναι μια μέθοδος γρήγορη με άμεσα αποτελέσματα, γ) μπορεί να αυτοματοποιηθεί με λογισμικά ανάλυσης της εικόνας και δ) αναλύονται από 100-500 κύτταρα ανά δείγμα σε αντίθεση με τα 30-300 κύτταρα στις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές. Τα μειονεκτήματα αφορούν κυρίως τη δυσκολία στη χρώση που μπορεί να έχουν κάποια κύτταρα καθώς και στο κόστος (Davey 2011).

1.7.4. Επιτόπια Υβριδοποίηση με Σημασμένους Ιχνηθέτες

Η επιτόπια υβριδοποίηση με ιχνηθέτες σημασμένους με φθορίζοντα μόρια (Fluorescent In Situ Hybridization-FISH) αποτελεί μία μοριακή μέθοδο που βασίζεται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων που στοχεύουν το 16S rRNA ή το 23S rRNA μονιμοποιημένων κυττάρων και κατόπιν στην ανίχνευση τους με χρήση είτε μικροσκοπία φθορισμού είτε κυτταρομετρίας ροής (Εικόνα 1.17) ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικοί ιχνηθέτες με διαφορετικά φθορίζοντα μόρια, οι οποίοι υβριδοποιούνται σε διαφορετικούς στόχους-κύτταρα (Πίνακας 1.7). Με τη τεχνική FISH μπορεί να υπολογιστεί η αφθονία της κάθε ομάδας μικροοργανισμών π.χ. α-Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes κλπ. χωρίς να είναι απαραίτητες η εφαρμογή χρονοβόρων τεχνικών (Araya, και συν. 2003, Cardinale, και συν. 2008). Επίσης παθογόνοι

μικροοργανισμοί όπως τα εντεροβακτήρια μπορούν να καταμετρηθούν με την τεχνική FISH σε δείγματα νερού (Baudart, και συν. 2002).

Το πλεονέκτημα λοιπόν της μεθόδου αυτής είναι ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο ποιοτική όσο και η ποσοτική ανίχνευση των μεταβολικά ενεργών μικροβιακών κοινοτήτων σε περιβαλλοντικά δείγματα (Pernthaler και Amann 2004), μπορεί να γίνει ανίχνευση των VBNC βακτηρίων (μέθοδος Direct Viable Count – FISH) και μπορεί να ανιχνεύσει μεμονωμένα κύτταρα. Τα βασικά μειονεκτήματα είναι ότι ο διαχωρισμός νεκρών/ζωντανών κυττάρων πολλές φορές είναι δύσκολος, μπορεί να συνυπάρχουν στο δείγμα βακτήρια που φθορίζουν ή να υπάρχει φθορισμός από τα σωματίδια που υπάρχουν στο δείγμα και τέλος υπάρχει ανάγκη συμπύκνωσης του δείγματος για να επιτευχθεί υψηλή ευαισθησία (Köster, και συν. 2003).



Εικόνα 1.17: Επιτόπια Υβριδοποίηση με Σημασμένους Ιχνηθέτες (<http://www.biovisible.com>).

Μία τροποποίηση της κλασικής μεθόδου FISH είναι η CARD-FISH (catalyzed reporter deposition, η οποία έχει αυξημένη ευαισθησία και μπορεί να ανιχνεύσει τους μικροοργανισμούς με μικρό περιεχόμενο σε ριβοσωμικό RNA όπως είναι τα ολιγότροφα βακτήρια σε νερό υψηλής καθαρότητας. Το ολιγονουκλεοτίδιο σημαίνεται με την υπεροξειδάση HRP (horseradish peroxidase) η οποία μετατρέπει την συζευγμένη με φθορίζοντα μόρια τυραμίνη σε τυραμίδη. Στην υπεροξειδάση μπορούν να προσδεθούν περισσότερα τους ενός μόρια τυραμίνης με αποτέλεσμα να ενισχύεται ο φθορισμός (Nielsen, και συν. 2006, Wilhartitz, και συν. 2007).

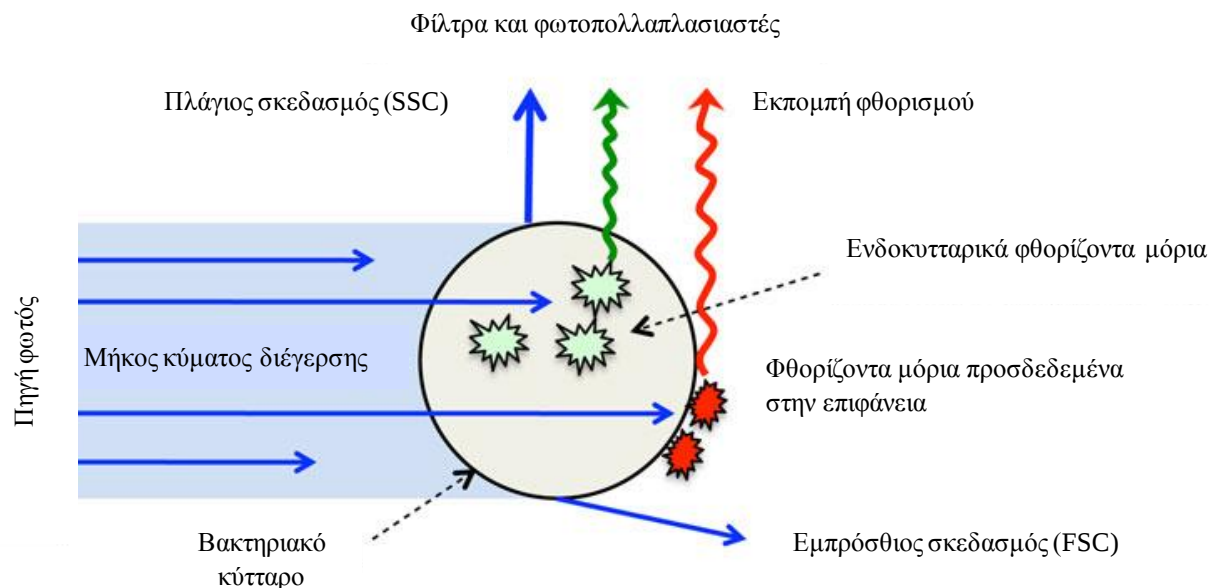
Πίνακας 1.7: Ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται στην τεχνική FISH (Baudart, και συν. 2002, Cardinale, και συν. 2008).

Ιχνηθέτης	Αλληλουχία	Στόχος
EUB338w	gctgcctcccgtaggagt	Βακτήρια
ALF968	ggtaaggttctgcgcgtt	Alphaproteobacteria, εκτός Rickettsiales
BET42aw	gccttcccacttcgtt	Betaproteobacteria
GAM42aw	gccttcccacatcgtt	Gammaproteobacteria
LGC354Aw	tggaagattccctactgc	Firmicutes (low GC Gram-positive bacteria)
HGC236	aacaagctgataggccgc	Actinobacteria (high G1C Gram-positive bacteria)
Burkho	accctctgttccgacct	<i>Burkholderia</i> spp.
ENT1	ccgcttgctctcgcgag	Εντεροβακτήρια
ARCH915	gtgctcccccgcgaattcct	Archaea
Univ-1390	gacgggcggtgtgtacaa	Όλοι οι οργανισμοί
NONEUB	actcctacgggaggcagc	-

1.7.5. Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την ανίχνευση βακτηρίων σε υδάτινα περιβάλλοντα και σε συνδυασμό με τη τεχνολογία των φθορίζοντων χρωστικών μπορεί να ανιχνεύσει 1 κύτταρο-στόχο, σε ρυθμό 1000 κύτταρα/s (Hoefel, και συν. 2003). Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνική που βασίζεται στη διέλευση των κυττάρων από ειδική

πηγή φωτός (π.χ. λέιζερ) και στην αλληλεπίδραση μεταξύ φωτός και των κυττάρων, η οποία προκαλεί σκεδασμό του φωτός και διέγερση των φθορίζοντων χρωστικών (Εικόνα 1.18). Το σκεδασμένο φως και η εκπεμπόμενη ακτινοβολία από τα φθορίζοντα μόρια ανιχνεύονται από τους φωτοπολλαπλασιαστές. Διακρίνονται ο πλάγιος σκεδασμός ο οποίος σχετίζεται με το περιεχόμενο του κυττάρου και ο εμπρόσθιος σκεδασμός ο οποίος σχετίζεται με το μέγεθος του κυττάρου.



Εικόνα 1.18: Η βασική αρχή της κυτταρομετρίας ροής. Η αλληλεπίδραση φωτός και σωματιδίων (κυττάρων) προκαλεί διαφορετικό σκεδασμό και φθορισμό (Hammes και Egli 2010).

Με την κυτταρομετρία ροής συλλέγονται πληροφορίες όσον αφορά τον αριθμό των κυττάρων, το μέγεθος τους και το περιεχόμενό τους σε DNA και RNA, τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Επιπλέον, μπορούν να ανιχνευτούν ειδικές ομάδες μικροοργανισμών όπως και παθογόνα μέσω πρόσδεσης σημασμένων αντισωμάτων στα κύτταρα. Με την ανοσοσήμανση έχουν ανιχνευτεί στο νερό παθογόνα βακτήρια όπως τα *Legionella*, *Campylobacter spp.*, *E. coli*, O157, μυκοβακτήρια, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.* και *Cryptosporidium*. Η διαφορά από την μικροσκοπία σκεδαζόμενου φωτός είναι ότι δεν παράγεται εικόνα των κυττάρων αλλά ιστογράμματα με μία ή δύο παραμέτρους. (Hammes και Egli 2010). Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ταχύτητα και η δυνατότητα ανάλυση 10.000 - 100.000 κυττάρων ανά δείγμα (Davey 2011).

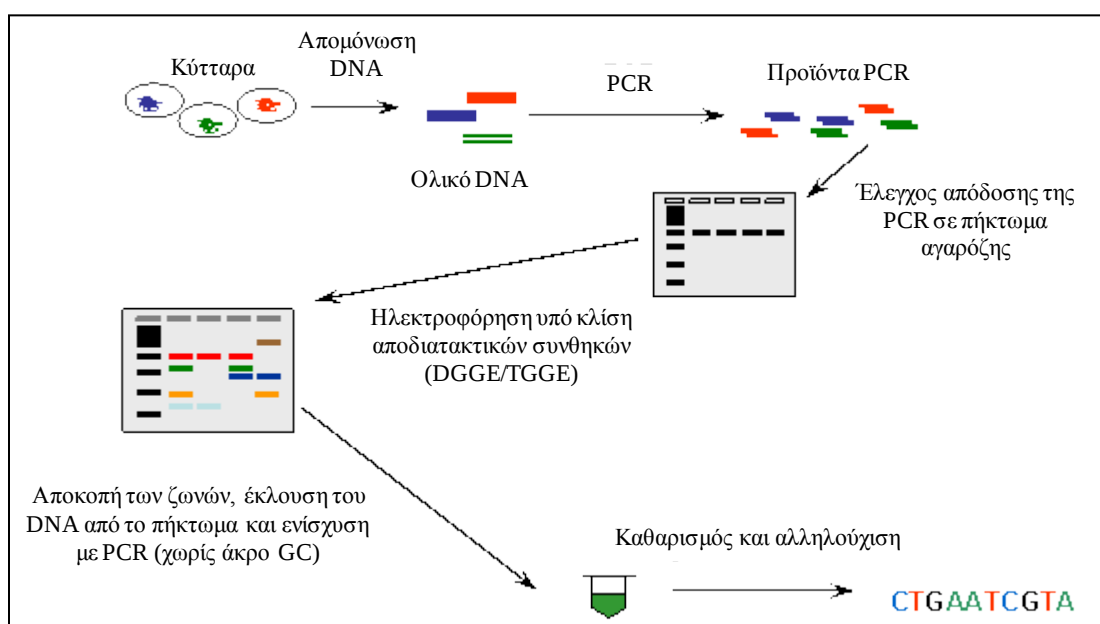
1.7.6. Μοριακές τεχνικές βασισμένες στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας σε νερό υψηλής καθαρότητας (π.χ. πόσιμο νερό, υπερκάθαρο νερό, νερό μετά από αντίστροφη όσμωση) με χρήση των κλασσικών μικροβιολογικών τεχνικών (καλλιέργεια) έχει διαπιστωθεί ότι είναι ανεπαρκής καθώς το μεγαλύτερο τμήμα των πληθυσμών σε τέτοια ενδιαιτήματα δεν μπορούν να καλλιεργηθούν. Οι μοριακές τεχνικές που βασίζονται στην ανάλυση του 16S rRNA γονιδίου έχουν αποδειχθεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την καταγραφή της μικροβιακής ποικιλότητας (Eichler, και συν. 2006). Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στις μελέτες της μικροβιακής ποικιλότητας σε τέτοια ενδιαιτήματα είναι οι τεχνικές αποτυπωμάτων όπως η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (DGGE, TGGE) (Kawai, και συν. 2004, Bereschenko, και συν. 2008, Baba, και συν. 2009, Burtscher, και συν. 2009), η T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) (Bohus, και συν. 2010) και ο πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP) (Ross, και συν. 2001, Eichler, και συν. 2006). Επιπλέον χρησιμοποιούνται και τεχνικές όπως η κλωνοποίηση (Bereschenko, και συν. 2008, Revetta, και συν. 2010) και το pyrosequencing (Williams, και συν. 2004, Kwon, και συν. 2011).

1.7.6.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με κλίση αποδιατακτικού παράγοντα (DGGE) ή με κλίση θερμοκρασίας (TGGE)

Στις τεχνικές DGGE/TGGE προϊόντα ενίσχυσης του 16S rRNA γονιδίου διαχωρίζονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης λόγω κλίσης αποδιατακτικών παραγόντων (ουρία & φορμαμίδιο-DGGE) ή λόγω κλίσης θερμοκρασίας (TGGE). Τα μίγματα των προϊόντων PCR περιέχει ενισχυμένα 16S rDNA ίδιου μεγέθους, από διαφορετικά είδη, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους στο ποσοστό GC το οποίο καθορίζει το T_m του δίκλωνου μορίου, έτσι αυτά διαχωρίζονται με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα καθώς αποδιατάσσονται λόγω των αυξημένων αποδιατακτικών συνθηκών που δημιουργούνται κατά τη φορά της κλίσης. Τα μόρια με υψηλό ποσοστό GC, αποδιατάσσονται παρουσία υψηλότερων συγκεντρώσεων αποδιατακτικών παραγόντων (DGGE) ή υψηλότερης θερμοκρασίας (TGGE) ενώ το άκρο GC που υπάρχει στον έναν εκκινητή, παρεμποδίζει την πλήρη αποδιάταξη του δίκλωνου DNA ώστε το ήμι-

αποδιατεταγμένο μόριο να παραμείνει στο πήκτωμα (Εικόνα 1.19) (Ercolini 2004, Nocker, και συν. 2007). Οι δύο αυτές τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως για την αποτύπωση της μικροβιακής ποικιλότητας και τη σύγκριση των μικροβιακών κοινοτήτων καθώς παρουσιάζουν ορισμένα πλεονεκτήματα όπως ότι είναι οικονομική μέθοδος και τα αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευτούν εύκολα. Το κυριότερο πλεονέκτημα είναι ότι μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί η αφθονία των ειδών (αριθμός ζωνών) και να διαπιστωθούν οι κυρίαρχοι πληθυσμοί (ένταση ζωνών) καθώς οι ζώνες που προκύπτουν μπορούν να κοπούν από το πήκτωμα και να ταυτοποιηθούν (Araujo και Schneider 2008, Malik, και συν. 2008).



Εικόνα 1.19: Ανάλυση της μικροβιακής ποικιλότητας με τη μέθοδο της DGGE/TGGE (<http://wiki.biomine.skelleftea.se>).

Τα μειονεκτήματα των τεχνικών αυτών είναι: α) τα προϊόντα της PCR που αναλύονται στα πηκτώματα είναι μικρού μεγέθους (<500 bp) με αποτέλεσμα τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης να μην παρέχουν επαρκή δεδομένα για την ακριβή φυλογενετική ταξινόμηση ενώ πολλές φορές διαφορετικά μόρια 16S rDNA εντοπίζονται στην ίδια θέση στο πήκτωμα με αποτέλεσμα οι αλληλουχίες να μην είναι καθαρές, β) η χαμηλή επαναληψιμότητα ανάμεσα στα διαφορετικά πηκτώματα, γ) ο δύσκολος χειρισμός των μεγάλων πηκτωμάτων, δ) η μειωμένη απόδοση της PCR λόγω του GC άκρου που ευνοεί τον σχηματισμό ετεροδιμερών και του διμερισμού του εκκινητή, ε) οι χρώσεις των πηκτωμάτων οι οποίες ανιχνεύουν με διαφορετική ευαισθησία τις

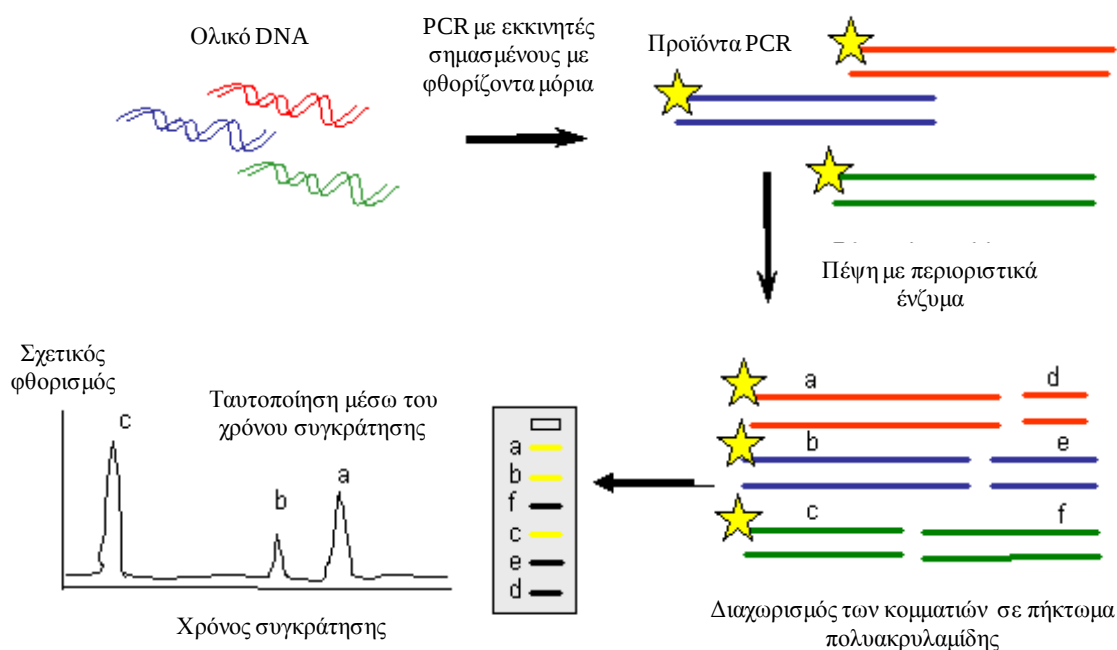
ζώνες, στ) η απεικόνιση του πηκτώματος και η οπτικοποίηση του καθώς ζώνες οι οποίες είναι αχνές, μπορεί να μη φανούν στην εικόνα, ενώ πληθυσμοί οι οποίοι δε βρίσκονται σε αφθονία, ανάλογα με τη χρώση δύναται να μην ανιχνευτούν (Nocker, και συν. 2007, Talbot, και συν. 2008). Ειδικότερα για τις χρώσεις που χρησιμοποιούνται, ο νιτρικός άργυρος ανιχνεύει μικροποσότητες DNA στην κλίμακα του pm αλλά δημιουργεί έντονο χρωματισμό του πηκτώματος με αποτέλεσμα κατά την αποτύπωση της εικόνας να μη φαίνονται οι αχνές ζώνες και επίσης προσδένεται ισχυρά στο DNA, και παρεμποδίζει ακόλουθες πειραματικές πορείες όπως PCR ή απ' ευθείας αλληλουχίση. Αντιθέτως το βρωμιούχο αιθίδιο δε δημιουργεί πρόβλημα με δευτερεύουσα χρώση του υπόλοιπου πηκτώματος ούτε και με τις μετέπειτα διεργασίες, ανιχνεύει όμως ποσότητες DNA στην κλίμακα του μm με αποτέλεσμα να εμφανίζονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στους πιο άφθονους πληθυσμούς. Νεότερες χρωστικές όπως η SYBR Green I, ανιχνεύουν με μεγάλη ευαισθησία το DNA χωρίς να δημιουργούν δευτερεύουσα χρώση στο πήκτωμα ενώ τελευταία χρησιμοποιούνται εκκινητές σημασμένοι με φθορίζοντα μόρια που αυξάνουν την ευαισθησία της τεχνικής και παρακάμπτουν τους περιορισμούς των συμβατικών χρώσεων (Ercolini 2004).

1.7.6.2. Ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τελικών περιοριστικών θραυσμάτων (T-RFLP)

Στην τεχνική T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) πραγματοποιείται ενίσχυση τμήματος του DNA (π.χ. 16S rRNA γονίδιο) με χρήση εκκινητών σημασμένων με φθορίζοντα μόρια, τα οποία στη συνέχεια υφίστανται πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και ακολουθεί επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε αυτόματη συσκευή ανάλυση της αλληλουχίας μέσω της οποίας το πρότυπο που προκύπτει απεικονίζεται και ποσοτικοποιείται (Εικόνα 1.20). Η T-RFLP βασίζεται στο διαφορετικό σημείο πέψης της κάθε αλληλουχίας και στο μέγεθος του σημασμένου τμήματος DNA που θα προκύψει καθώς στο μείγμα της αντίδρασης PCR υπάρχουν μόρια 16S rDNA που προέρχονται από διαφορετικούς οργανισμούς και έχουν διαφορετική νουκλεοτιδική σύσταση.

Το πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι η κάθε ζώνη-κορυφή αντιπροσωπεύει μία λειτουργικά ταξινομική μονάδα (OTU), ενώ η χρήση φθορίζοντων εκκινητών περιορίζει την ανάλυση στα τελικά τμήματα που προέκυψαν από την πέψη, περιορίζοντας έτσι την πολυπλοκότητα των προτύπων. Η αφθονία της κάθε OTU, υπολογίζεται από την ένταση του

φθορισμού της κάθε ζώνης ενώ με βάση το θεωρητικό φθορισμό των T-RFs από γνωστούς μικροοργανισμούς μπορεί να υπάρξει σύγκριση με βάσεις δεδομένων (Nocker, και συν. 2007). Επιπλέον η τεχνική αυτή παρέχει υψηλή ευαισθησία, καλή επαναληψιμότητα και δεν είναι χρονοβόρα (Muyzer 1999). Στα μειονεκτήματα της συγκαταλέγονται η υπερεκτίμηση της ποικιλότητας από ατελή πέψη και η ανάγκη για χρήση πολλαπλών (2-4) περιοριστικών ενζύμων, η εξάρτηση της τεχνικής από την απόδοση της PCR (Malik, και συν. 2008) και ότι είναι χρονοβόρα και ακριβή (Talbot, και συν. 2008). Η τεχνική αυτή ενδείκνυται σε δείγμα με αυξημένη ποικιλότητα και όταν υπάρχει απαίτηση για σύγκριση σε πολλά δείγματα.



Εικόνα 1.20: Αρχή της τεχνικής T-RFLP (<http://wiki.biomine.skelleftea.se>).

1.7.6.3. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP)

Στην περίπτωση της τεχνικής SSCP (single-strand chain polymorphism), η βασική ιδέα στηρίζεται στο γεγονός ότι μια αλλαγή σε μια βάση ενός μονόκλωνου μορίου DNA μπορεί να αλλάξει τη διαμόρφωση του μορίου σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (μη αποδιατακτικό), επηρεάζοντας την ταχύτητα κίνησης (Hayashi 1991). Κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες, το μονόκλωνο DNA λαμβάνει μία πτυχωτή δευτεροταγή δομή η οποία καθορίζεται από τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις που επηρεάζουν την τρισδιάστατη διαμόρφωσή του, οι οποίες

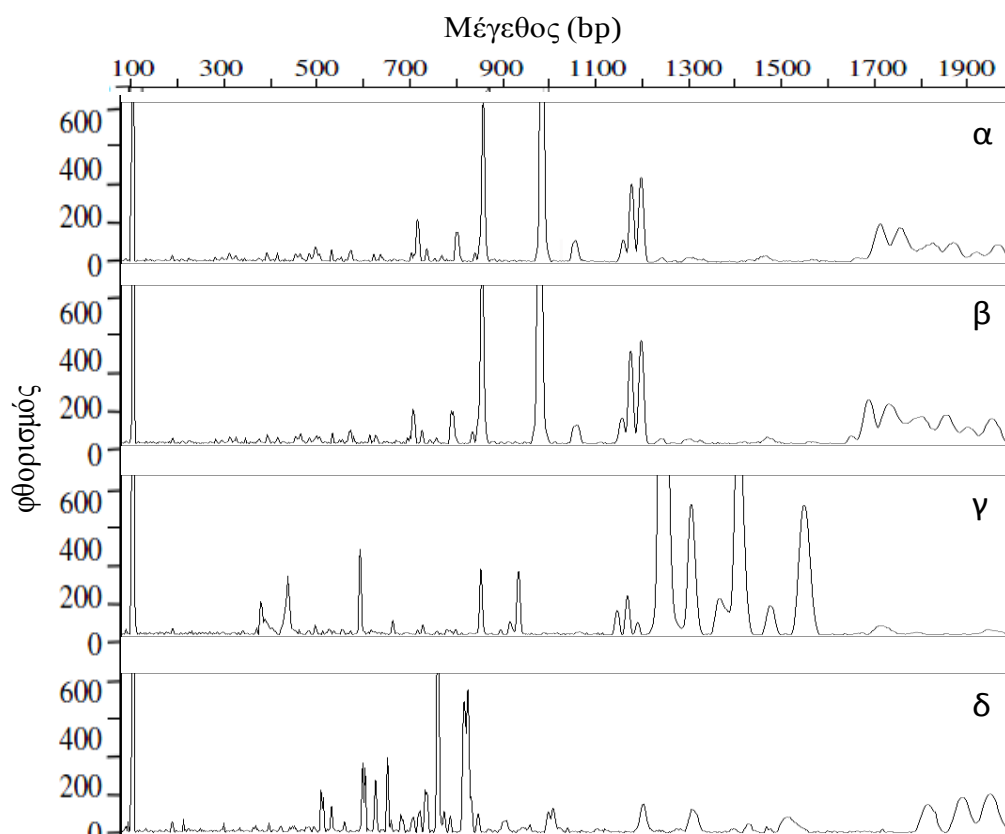
επηρεάζονται από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία και τις φυσικοχημικές μεταβλητές του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, ιοντική ισχύς). Οι αλλαγές αυτές, διαχωρίζουν τα μόρια DNA διαφορετικών φυλοτύπων παράγοντας διαφορετικά πρότυπα (Nocker, και συν. 2007). Βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι πολλαπλές ζώνες προκύπτουν από ένα μόνο είδος, επομένως τα αποτελέσματα που θα εξαχθούν από μια πολύπλοκη μικροβιακή κοινότητα θα είναι ιδιαίτερα δύσκολο να ερμηνευτούν και η τάση να αναδιατάσσονται ταμόνοκλωνα μόρια DNA μεταξύ τους δημιουργώντας επιπρόσθετες ζώνες (Dahllöf 2002, Talbot, και συν. 2008).

1.7.6.4. Μέθοδος rep-PCR

Τέλος σημαντική ομάδα μοριακών τεχνικών αποτελεί η rep-PCR η οποία βασίζεται σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που βρίσκονται στο γονιδίωμα των βακτηρίων σε ποσοστό μεγαλύτερο από 5%. Οι περισσότερες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες έχουν άγνωστο ρόλο και εντοπίζονται τόσο σε ενδογονιδιακές όσο και σε εξωγονιδιακές περιοχές. Τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία συνήθως αποτελούν αντίγραφα γονιδίων όπως αυτά που κωδικοποιούν το rRNA και το tRNA, μεταθετά στοιχεία, παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες, μικρές πολυνουκλεοτιδικές επαναλήψεις (3-7 bp), μωσαϊκά επαναλαμβανόμενα στοιχεία και παλίνδρομες αλληλουχίες. Το μέγεθος των αλληλουχιών μπορεί να είναι από 15 βάσεις έως εκατοντάδες βάσεις. Ορισμένες αλληλουχίες όπως τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία HRS1 και RLEP εντοπίζονται σε ορισμένα βακτήρια ενώ άλλες αλληλουχίες όπως η επαναλαμβανόμενη παλίνδρομη ενδογονιδιακή αλληλουχία (REP - repetitive extragenic palindrome sequence) εντοπίζεται στην πλειοψηφία των φυλογενετικών ομάδων.

Οι περισσότερες τεχνικές αποτυπώματος rep-PCR χρησιμοποιούν ως θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών μικρά πολυτρινουκλεοτίδια όπως το (GTG)₅, τις 35-40 bp αλληλουχίες REP, την 124-127 bp ενδογονιδιακή αλληλουχία ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) ή το στοιχείο BOX (154 bp). Η τεχνική της rep-PCR δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού ενός βακτηριακού πληθυσμού σε επίπεδο υποείδους και σε επίπεδο στελέχους σε αντίθεση με τις τεχνικές DNA:DNA υδριβισμού ή της αλληλούχισης του 16S rRNA γονιδίου που διαχωρίζει τα βακτήρια σε επίπεδο γένους και είδους (Ishii και Sadowsky 2009). Ειδικότερα η τεχνική της BOX-PCR παρέχει καλύτερη διαφοροποίηση σε επίπεδο στελέχους από τις τεχνικές RISA (ribosomal intergenic spacer analysis), RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP

(amplified fragment length polymorphism), και RAPD (random amplified polymorphic DNA) και τα πρότυπα δεν επηρεάζονται από την ηλικία τις καλλιέργειας και μπορούν αν επεξεργαστούν μέσω λογισμικών. Παρ' όλα αυτά η τεχνική αυτή έχει μειονεκτήματα όπως ότι δεν έχει καλή επαναληψιμότητα, υπάρχει κακός διαχωρισμός των ζωνών στο πήκτωμα αгарόζης και δεν μπορεί να υπάρξει καλή σύγκριση ανάμεσα σε διαφορετικά πηκτώματα. Για το λόγο αυτό, πρόσφατα εφαρμόστηκε μία παραλλαγή της BOX-PCR, η φθορίζουσα BOX-PCR (F-BOX-PCR) στην οποία ο εκκινητής BOXA1R είναι σημασμένος με κάποιο φθορίζων μόριο στο ένα άκρο του. Τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονται σε αυτόματο αναλυτή και προκύπτει ένα διάγραμμα όπου κάθε ζώνη αντιπροσωπεύεται ως κορυφή (Εικόνα 1.21) (Brusetti, και συν. 2008). Επιπλέον, στα μειονεκτήματα τις BOX-PCR προστίθενται και η ευαισθησία της τεχνικής σε αλλαγές στη συγκέντρωση του DNA, του ενζύμου Taq polymerase, στο MgCl₂, στον εκκινητή καθώς και σε διαφορές στον θερμικό κυκλοποιητή, στη μέθοδο απομόνωσης του DNA και στη θερμοκρασία αναδιάταξης, τα οποία προκαλούν διαφορετικά πρότυπα στο ίδιο στέλεχος (Tyler, και συν. 1997).



Εικόνα 1.21: Παραδείγματα διαγραμμάτων που λαμβάνονται κατά την εφαρμογή της F-BOX-PCR α) *Blastococcus* sp. CI2 13, β) *Blastococcus* sp. CI2 17, γ) *Modestobacter* sp. DS3, δ) *B. cereus* 360) (Brusetti, και συν. 2008).

1.8. Σκοπός εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας στις πρώτες ύλες και στο τελικό προϊόν μιας φαρμακευτικής βιομηχανίας. Το προϊόν που μελετήθηκε ήταν ένα αντιηλιακό για επιδερμίδες με λιπαρότητα και τάση ακμής του οποίου η σύσταση είναι περίπλοκη και για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν για μελέτη εκείνες οι πρώτες ύλες στις οποίες θα μπορούσε να υπάρξει μικροβιακή ανάπτυξη. Μεγάλη βαρύτητα δόθηκε στο νερό που αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό της σύνθεσης του αντιηλιακού καθώς επίσης και επειδή είναι η πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται τόσο στα φάρμακα όσο και στα δερμοκαλλυντικά προϊόντα της βιομηχανίας. Συγκεκριμένα το νερό της φαρμακοβιομηχανίας έχει υψηλό βαθμό καθαρότητας, κάτι που το κάνει αφιλόξενο ενδιαίτημα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, παρ' όλα αυτά στις λίγες έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε παρόμοιες μονάδες παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας, έχουν ταυτοποιηθεί μικροοργανισμοί που συνήθως δεν απομονώνονται με τις κλασσικές τεχνικές που ακολουθούνται.

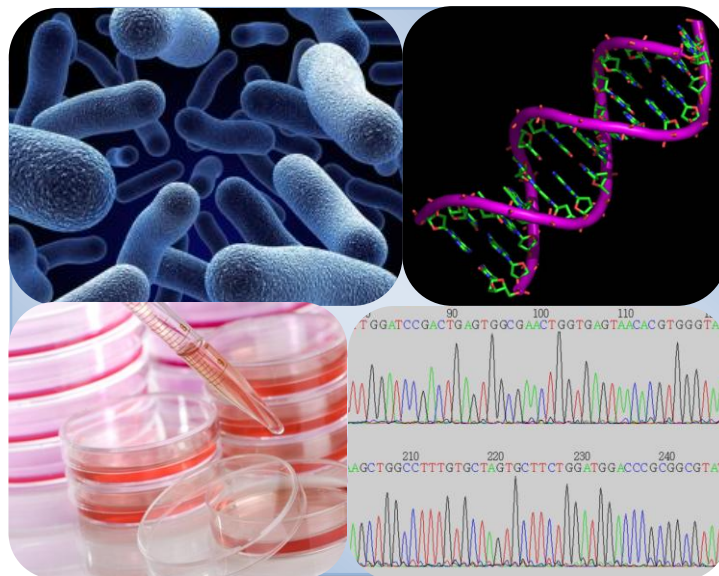
Η μικροβιακή ποικιλότητα στις πρώτες ύλες και στο τελικό προϊόν, μελετήθηκε με χρήση κλασσικών μικροβιολογικών τεχνικών και μοριακών μεθόδων (BOX-PCR, ITS-PCR, DGGE, 16S rRNA sequencing). Ειδικότερα στο νερό εφαρμόστηκαν τα πρωτόκολλα της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας για την απομόνωση του ετερότροφου μεσόφιλου πληθυσμού ενώ εφαρμόστηκαν μεθοδολογίες για την απομόνωση ολιγότροφων και ψυχρόφιλων μικροοργανισμών καθώς και μικροοργανισμών που μπορούν να διαπερνάνε τις μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm. Επιπροσθέτως διερευνήθηκε η επίδραση παραγόντων όπως το θειοθειικό νάτριο και η θερμοκρασία τους δείγματος κατά τη διήθηση, στην ανάκτηση του μικροβιακού φορτίου. Οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν, ομαδοποιήθηκαν με τη βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής όπως το GelCompar II και οι αλληλουχίες που προέκυψαν από τη μοριακή ταυτοποίηση επιλεγμένων στελεχών χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή φυλογενετικών δένδρων με τα προγράμματα BLAST και MEGA5.

Επιπλέον στην εργασία αυτή, διερευνήθηκε εάν οι πρώτες ύλες και το τελικό προϊόν πληρούσαν τα κριτήρια της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας αναφορικά με την ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών. Πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Salmonella* sp., *Candida albicans* και κολίμορφα βακτήρια, με χρήση εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων,

βιοχημικών δοκιμασιών και εξειδικευμένων για το γένος (genus specific) PCR. Ο έλεγχος για την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε στο νερό και στο τελικό προϊόν. Τέλος στο τελικό προϊόν μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα των συντηρητικών που περιέχει στην παρεμπόδιση ανάπτυξης μικροοργανισμών κατά τη χρήση καθώς και έπειτα από στοχευμένη μόλυνση με γνωστά εμβόλια μικροοργανισμών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Δειγματοληψία

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας πραγματοποιηθήκαν τέσσερεις δειγματοληψίες στις ημερομηνίες που αναγράφονται στον Πίνακα 2.1. Τα δείγματα προήλθαν από φαρμακευτική βιομηχανία που ειδικεύεται τόσο στην παρασκευή φαρμάκων αλλά και δερμοκαλλυντικών. Στην παρούσα εργασία τα δείγματα αφορούσαν τις πρώτες ύλες ενός αντιηλιακού και το τελικό προϊόν, το αντιηλιακό.

Πίνακας 2.1: Ημερομηνίες δειγματοληψίας

Ημερομηνίες	
1 ^η δειγματοληψία	Ιανουάριος 2010 (19/1)
2 ^η δειγματοληψία	Μάρτιος 20120 (18/3)
3 ^η δειγματοληψία	Ιούλιος 2010 (5/7)
4 ^η δειγματοληψία	Φεβρουάριος 2011 (18/2)

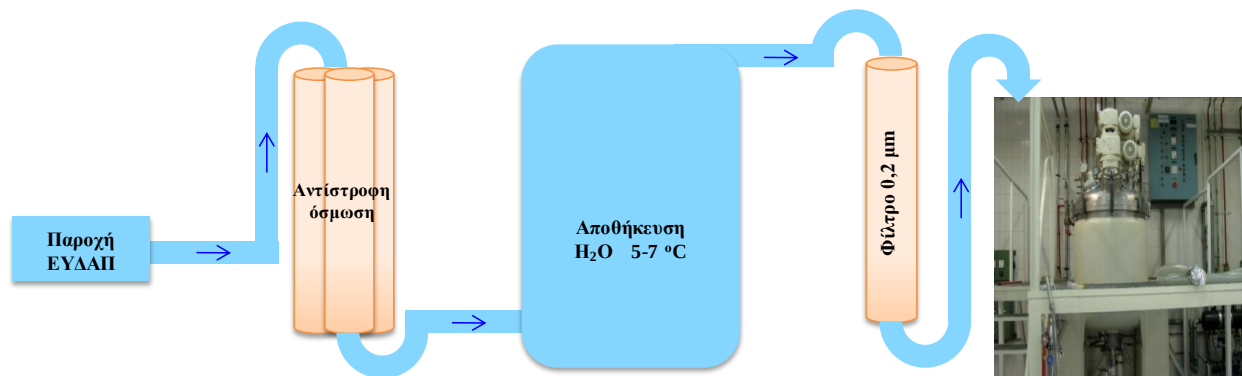
2.1.1. Τρόπος συλλογής δειγμάτων και είδος δειγμάτων

2.1.1.1. Νερό

Σε κάθε δειγματοληψία συλλέχθηκε όγκος νερού 24 - 30 λίτρων. Το σημείο δειγματοληψίας βρίσκεται στον χώρο όπου παρασκευάζεται το τελικό προϊόν και αποτελείται από μία μάνικα στην οποία βρίσκεται συνδεδεμένο φίλτρο Ultipore N66 Filter 0,2 μm (PALL). Πριν τη συλλογή του δείγματος, το στόμιο της μάνικας απολυμάνθηκε με χρήση διαλύματος αιθανόλης 70 % (V/V) και το νερό έτρεχε για 1 min, με σκοπό να εκπλυθούν τυχόν μικροοργανισμοί στο στόμιο της μάνικας.

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε πλαστικά δοχεία όγκου 7 ή 10 λίτρων που είχαν εκπλυθεί με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό στο εργαστήριο και είχαν απολυμανθεί με χρήση διαλύματος αιθανόλης 70 % (V/V) και ακτινοβολίας UV για 30 min. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 8 °C και αναλύθηκαν εντός 24 ωρών.

Το νερό που χρησιμοποιείται στη φαρμακευτική βιομηχανία είναι νερό δικτύου ΕΥΔΑΠ. Το νερό διοχετεύεται μέσω μεμβρανών αντιστροφής ώσμωσης σε δεξαμενές στις οποίες διατηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία 5 - 7 °C. Πριν την τελική χρήση το νερό διηθείται μέσω ενός ηθμού Ultipore N66 Filter 0,2 μm (PALL) στο στόμιο της μάνικας. Στην Εικόνα 2.1 φαίνεται η ροή του νερού στη φαρμακοβιομηχανία. Ο ηθμός των 0,2 μm αλλάζεται κάθε 6 μήνες (ημερομηνίες αλλαγής 20/12/2009, 19/6/2010 και 19/12/2010). Η επιθυμητή μέση θερμοκρασία του νερού στη βιομηχανία ήταν 11 °C - 15 °C.



Εικόνα 2.1: Ροή νερού στη φαρμακοβιομηχανία

Οι φυσικοχημικές και βιολογικοί παράμετροι του νερού, όπως αυτές ορίζονται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008), παρατίθενται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Φυσικοχημικές και βιολογικές παράμετροι κεκαθαρμένου νερού όπως ορίζονται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία

Παράμετρος	Μέγιστη επιτρεπτή τιμή
Ολικός οργανικός άνθρακας (TOC)	0,5 mg/l
Αγωγιμότητα στους 25 °C	5,1 μ S/cm
Νιτρικά	0,02 ppm
Αμμώνιο	0,2 ppm
Αργίλιο	10 ppb
Βαρέα μέταλλα	0,01 ppm
Ολικός ετερότροφος πληθυσμός	100 cfu/ml

2.1.1.2. Λοιπές πρώτες ύλες

Στις δύο δειγματοληψίες έγινε συλλογή 13 πρώτων υλών με χρήση αποστειρωμένου πλαστικού δοχείου διαμέτρου 5 εκατοστών. Συλλέχθηκαν δείγματα εις διπλούν. Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε εντός 1 εβδομάδας. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στην ίδια θερμοκρασία με εκείνη στην οποία βρίσκόντουσαν (ήτοι 21 - 24 °C) και σε υγρασία περιβάλλοντος.

Οι υπόλοιπες πρώτες ύλες που μελετήθηκαν, επιλέχθηκαν με βάση:

- α) την ποσότητα στην οποία εντοπίζονται μέσα στο αντιηλιακό
- β) εάν είναι φυτικής, ζωικής ή μικροβιακής προέλευσης
- γ) εάν μπορούν δυνητικά να αναπτυχθούν μικροοργανισμοί σε αυτές

Στη συνέχεια αναφέρονται οι πρώτες ύλες που μελετήθηκαν κατά την παρούσα εργασία και ορισμένα χαρακτηριστικά τους που σχετίζονται με τον τρόπο χειρισμού κατά τον μικροβιολογικό έλεγχο.

1. *CI 77491, Isopropyl Titanium Triisostearate* (οξείδιο του τρισθενούς σιδήρου Fe_2O_3).

Χρωστική καλλυντικών.

Μορφή: Σκόνη κόκκινου χρώματος. Αδιάλυτη στο νερό. (www.koboproducts.com)

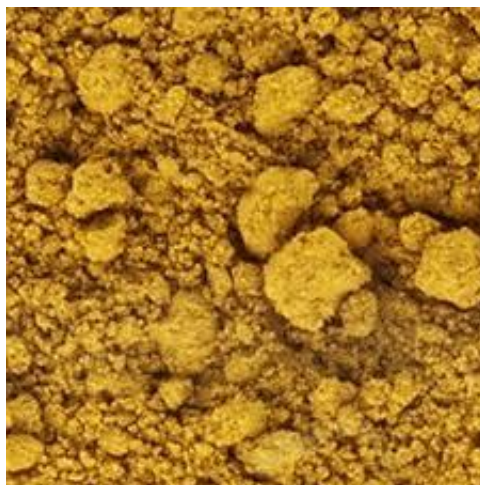


(<http://www.allcoloursupplies.com.au>)

2. *CI 77492, Isopropyl Titanium Triisostearate* (οξείδιο του δισθενούς σιδήρου FeO).

Χρωστική καλλυντικών.

Μορφή: Σκόνη κίτρινου χρώματος. Αδιάλυτη στο νερό. (www.koboproducts.com)



(<http://www.kremer-pigmente.de>)

3. *CI 77499, Isopropyl Titanium Triisostearate* (οξείδιο του δισθενούς - τρισθενούς σιδήρου Fe_3O_4).

Χρωστική καλλυντικών.

Μορφή: Σκόνη μαύρου χρώματος. Αδιάλυτη στο νερό. (www.koboproducts.com)



(<http://rndpigment.com>)

4. Κιτρικό οξύ

Χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικό διάλυμα και ως συντηρητικό. Μικροβιακής ή φυτικής προέλευσης.

Μορφή: Σκόνη λευκού χρώματος. Πλήρως διαλύτη στο νερό. (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008).



(<http://siachemistryworld.blogspot.com>)

5. Xanthan Gum (πολυσακχαρίτης)

Χρησιμοποιείται ως πηκτικό μέσο και ως σταθεροποιητής του γαλακτώματος. Μικροβιακής προέλευσης, από τη ζύμωση γλυκόζης ή σακχαρόζης από το *Xanthomonas campestris*.

Μορφή: Σκόνη λευκού χρώματος. Διαλυτή στο νερό σε μικρές ποσότητες γιατί αποτελεί πηκτικό μέσο. (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008).



(<http://www.tradekey.com>)

6. Γλυκομαννάνη (πολυσακχαρίτης)

Χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής και για τη πήξη του διαλύματος. Αποτελείται από D-μαννόζη και D-γλυκόζη ενωμένα με δεσμούς β (1→4) και σε αναλογία 1,6:1. Έχει μέγεθος 1 μm. Συνήθως φυτικής προέλευσης.

Μορφή: Κόκκοι κιτρινωποί. Πλήρως διαλυτή στο νερό. (Li and Xie 2006).



(<http://www.tradekorea.com>)

7. Γλυκερόλη

Χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής, ως μαλακτική ουσία και ως υλικό διατήρησης της υγρασίας. Προέρχεται από υδρόλυση ελαίων και λιπών ζωικής ή φυτικής προέλευσης καθώς και ως παραπροϊόν του βιοντίζελ.

Μορφή: Παχύρευστο υγρό άχρωμο. Πλήρως διαλυτή στο νερό. (Christoph, και συν., 2000)



(<http://fphoto.photoshelter.com>)

8. *Glyceryl Oleate Citrate, Caprylic/Capric Triglyceride* (Dracorin)

Χρησιμοποιείται ως ανιοντικός παράγοντα [oil in water (O/W)] γαλακτωματοποίησης.

Μορφή: Ημιστερεό λιπαρό κιτρινωπό υγρό. Αδιάλυτο στο νερό. (<http://products.symrise.com>)



(προσωπικό αρχείο)

9. *Glyceryl Stearate*

Χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής. Φυτικής προέλευσης.

Μορφή: Δισκία – κόκκοι λευκά. Λίγο διαλυτά στο νερό έπειτα από έντονη μηχανική ανάδευση. (<http://www.cosmeticsinfo.org>)



(<http://www.lulusoso.com>)

10. *Tocopheryl Acetate* (Βιταμίνη Ε)

Χρησιμοποιείται ως αντιοξειδωτικό καταστρέφοντας τις ελεύθερες ρίζες.

Μορφή: Παχύρευστο κιτρινωπό διαυγές ελαιώδες υγρό. Αδιάλυτο στο νερό. (Weber, και συν., 2006)



(<http://www.raps-industrieservice.de>)

11. *Water (And) Titanium Dioxide (And) Butylene Glycol (And) Silica (And) Glycerin*, (Kobo)

Χρησιμοποιείται ως UV φίλτρο.

Μορφή: Κρέμα παχύρευστη λεύκη. Μερικώς διαλυτή στο νερό. (www.koboproducts.com)



(προσωπικό αρχείο)

12. Sunflower Seed Oil Sorbitol Esters (Hostacerin)

Χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής. Φυτικής προέλευσης (*Helianthus Annuus*).

Μορφή: ημίρρευστο λιπαρό υγρό. Διαλυτό στο νερό.

Γίνεται γαλάκτωμα. (<http://www.clariant.com>)



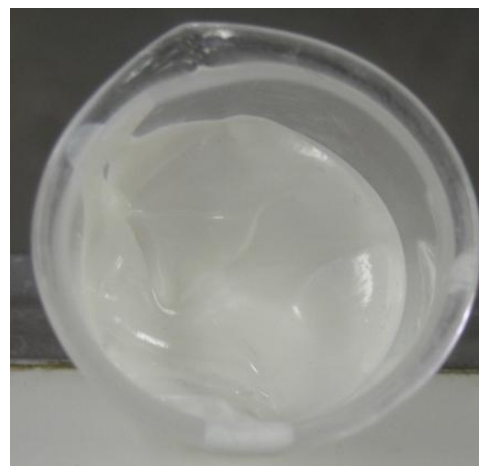
(προσωπικό αρχείο)

13. Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol (Tinosorb M)

Χρησιμοποιείται ως UV φίλτρο. pH 10,2 – 12.

Μορφή: Υγρό ημίρρευστο με ιδιάζουσα οσμή.

Πλήρως διαλυτό στο νερό. (<http://www.basf.com>)



(προσωπικό αρχείο)

**2.1.1.3. Αντιηλιακό**

Τα δείγματα του αντιηλιακού βρίσκονταν στην τελική συσκευασία τους σφραγισμένα. Τα δοχεία είχαν χωρητικότητα 40 ml και 100 ml. Τα δείγματα διατηρήθηκαν σφραγισμένα, σε θερμοκρασία και υγρασία περιβάλλοντος μέχρις ότου να αναλυθούν.

Μορφή: Κρέμα πορτοκαλί. Διαλυτή στο νερό χωρίς προσθήκη επιφανειοδραστικών παραγόντων.

Πίνακας 2.3: Συστατικά αντιηλιακού (<http://www.cosmeticsinfo.org>, <http://www.specialchem4cosmetics.com>)

Χημική Ένωση	Λειτουργία
Ammonium Acryloyldimethyltaurate/Beheneth-25 Methacrylate Copolymer	Σταθεροποιητής γαλακτώματος
Aqua	Διαλύτης
Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine	UV φίλτρο
C12-20 Acid PEG-8 Ester	Γαλακτωματοποιητής
Caprylyl Methicone	Βελτιωτικό για την καλύτερη επάλειψη του προϊόντος
Cetearyl Alcohol	Μαλακτική ουσία, γαλακτωματοποιητής, σταθεροποιητής γαλακτώματος, δημιουργία αφρού, επιφανειοδραστικός παράγοντας, έλεγχος ιξώδους
Cetyl Dimethicone	Μαλακτική ουσία
Cetyl Phosphate	Γαλακτωματοποιητής
CI 77491, Isopropyl Titanium Triisostearate	Χρωστική
CI 77492, Isopropyl Titanium Triisostearate	Χρωστική
CI 77499, Isopropyl Titanium Triisostearate	Χρωστική
Citric Acid	Ρυθμιστικό διάλυμα, συντηρητικό
Cyclopentasiloxane and Dimethicone Crosspolymer	Σταθεροποιητής, παράγοντας πήξης
Dibutyl Adipate	Μαλακτική ουσία
Disodium EDTA	Χηλικός παράγοντας, συντηρητικό, έλεγχος ιξώδους
Ethylhexyl Methoxycinnamate	UVB φίλτρο
Ethylhexyl Salicylate	UVB φίλτρο
Glucomannan	Γαλακτωματοποιητής, παράγοντας πήξης
Glycerin	Υγραντική ένωση, διαλύτης, μαλακτική ουσία
Glyceryl Oleate Citrate, Caprylic/ Capric Triglyceride	Ανιοντικός γαλακτωματοποιητής (O/W)
Glyceryl Stearate	Γαλακτωματοποιητής, μαλακτική ένωση
Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol	UV φίλτρο
Parfum	Αρώμα
Polyamide-3	Σχηματισμός μεμβράνης
Potassium Hydroxide	Ρυθμιστικό διάλυμα
Sunflower Seed Oil Sorbitol Esters	Επιφανειοδραστικός παράγοντας
Titanium Dioxide	UV φίλτρο
Tocopheryl Acetate	Αντιοξειδωτικός παράγοντας
Water (And) Titanium Dioxide (And) Butylene Glycol (And) Silica	UV φίλτρο
Xanthan Gum	Παράγοντας πήξης

Τα κύρια συστατικά του αντιηλιακού που συμμετέχουν σε μεγάλο ποσοστό είναι το νερό ($\approx 40\%$) και το Tinosorb M ($\approx 20\%$). Η ακριβής του σύσταση παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.3 όπου φαίνονται και οι λειτουργίες των ενώσεων. Κατά την παρασκευή του δεν γίνεται κανενός είδους αποστείρωση ούτε στο τελικό προϊόν ούτε στις πρώτες ύλες (εξαιρουμένου του νερού που διέρχεται από φίλτρο) και η μέγιστη θερμοκρασία της διαδικασίας δεν υπερβαίνει τους $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στην Εικόνα 2.2 φαίνεται ο χώρος παρασκευής του αντιηλιακού.



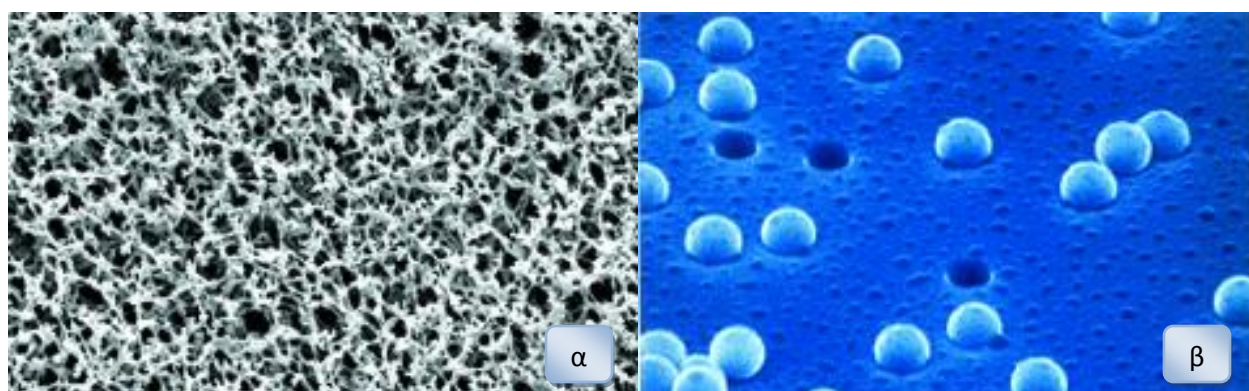
Εικόνα 2.2: Δοχεία παρασκευής αντιηλιακού

2.2. Επεξεργασία δειγμάτων

2.2.1. Νερό

Δείγματα νερού διηθήθηκαν υπό κενό, σε μεμβράνες κυτταρίνης (mixed cellulose esters membranes, Whatman) με διάμετρο πόρων $0,2\text{ }\mu\text{m}$ και $0,45\text{ }\mu\text{m}$ και σε πολυανθρακικές μεμβράνες (cyclopore polycarbonate membranes, Whatman) με διάμετρο πόρων $0,2\text{ }\mu\text{m}$ και $0,1\text{ }\mu\text{m}$ (Εικόνα 2.3).

Οι πρώτες αφήνουν το θρεπτικό να διαχυθεί διαμέσου αυτών ενώ επίσης συγκρατούν τους μικροοργανισμούς σε όλο το πάχος της μεμβράνης. Οι δεύτερες διαθέτουν αληθινούς πόρους που διασχίζουν κάθετα τη μεμβράνη και μικροοργανισμοί μεγαλύτεροι από τη διάμετρο του πόρου συγκρατούνται μόνο στην επιφάνεια της μεμβράνης. Οι συσκευές διήθησης πλύθηκαν με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό στο εργαστήριο και απολυμάνθηκαν με χρήση διαλύματος αιθανόλης 70 % (v/v) και ακτινοβολίας UV για 30 min. Οι κωνικές φιάλες αποστειρώθηκαν σε θερμοκρασία 121 °C και σε πίεση 1 atm για 30 λεπτά.



Εικόνα 2.3: α) Επιφάνεια μεμβράνης εστέρων κυτταρίνης (mixed cellulose esters membrane) και β) επιφάνεια πολυανθρακικής μεμβράνης (cyclopore polycarbonate membrane) στην οποία φαίνονται οι πραγματικοί πόροι που διασχίζουν τη μεμβράνη (<http://www.whatman.com>)

2.2.1.1. Προσδιορισμός του Πληθυσμού των Μικροοργανισμών σε δείγματα νερού

Ο προσδιορισμός του ολικού πληθυσμού πραγματοποιήθηκε με διήθηση δείγματος όγκου 4 λίτρων σε μία μεμβράνη (cellulose) με διάμετρο πόρου 0,2 μm και 2 λίτρων σε 2 μεμβράνες (cyclopore) με διάμετρο πόρου 0,1 μm . Οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε σωλήνα τύπου universal, ο οποίος περιείχε 10 ml διαλύματος $\frac{1}{4}$ Ringer. Ακολούθησε ανακίνηση σε παλινδρομικό αναδευτήρα για 60 λεπτά. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις σε διάλυμα $\frac{1}{4}$ Ringer από 10^0 έως 10^{-5} . Στη συνέχεια, ποσότητα ίση με 100 μl από κάθε αραιώση επιστρώθηκε σε επιλεγμένα θρεπτικά υποστρώματα (§2.3) (Brown 2001). Η ανάλυση κάθε δείγματος, σε κάθε αραιώση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν σε θερμοκρασίες 10 °C (δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011), 22 °C και 37 °C.

Ο προσδιορισμός του πληθυσμού σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα πραγματοποιήθηκε με διήθηση δείγματος όγκου 100 ml και 200 ml σε μεμβράνες εστέρων κυτταρίνης με διάμετρο πόρου 0,45 μm . Οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν πάνω στα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (§2.3) και ακολουθήθηκε το εκάστοτε πρωτόκολλο απομόνωσης των μικροοργανισμών. Η ανάλυση κάθε δείγματος για κάθε μικροοργανισμό πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

2.2.1.2. Μοριακή ανάλυση σε δείγματα νερού

Η μοριακή ανάλυση του νερού πραγματοποιήθηκε ως εξής: δείγμα όγκου 4 και 10 λίτρων διηθήθηκε σε μία μεμβράνη (cyclopore) με διάμετρο πόρου 0,2 μm και 2 λίτρων σε 2 μεμβράνες (cyclopore) με διάμετρο πόρου 0,1 μm . Οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία και διατηρήθηκαν για 3 μήνες στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι να γίνει απομόνωση ολικού DNA.

2.2.1.3. Γενικά στοιχεία για τα δείγματα νερού

Ως δείγμα για τη διήθηση στις μεμβράνες 0,1 μm (δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011) χρησιμοποιήθηκε το διήθημα από τις μεμβράνες 0,2 μm .

Στη δειγματοληψία Ιουλίου 2010 προστέθηκε σε ποσότητα δείγματος διάλυμα θειοθειικού νατρίου (§2.4) που καταστρέφει τα κατάλοιπα χλωρίου που μπορεί να βρίσκονται στο νερό. Δοκιμάστηκε επιπλέον η επίδραση της θερμοκρασίας στην επεξεργασία τους δείγματος. Για το λόγο αυτό το δείγμα επεξεργάστηκε τόσο σε θερμοκρασία $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ όσο και σε θερμοκρασία $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στη δειγματοληψία Ιουλίου 2010 έγιναν 2 επεξεργασίες του δείγματος για επαλήθευση των παραπάνω δεδομένων.

2.2.2. Πρώτες ύλες

2.2.2.1. Προσδιορισμός του Πληθυσμού των Μικροοργανισμών

α) Αναδιάλυση Πρώτων Υλών

Η αναδιάλυση των πρώτων υλών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη χημική σύστασή τους, κατά τα οριζόμενα από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποία (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008).

Οι πρώτες ύλες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία διακρίθηκαν τρεις ομάδες.

- 1^η ομάδα, υδατοδιαλυτές πρώτες ύλες:
 - α) κιτρικό οξύ,
 - β) xanthan gum,
 - γ) γλυκερόλη,
 - δ) γλυκομαννάνη,
 - ε) sunflower seed oil sorbitol esters (Hostacerin),
 - στ) *Water (And) Titanium Dioxide (And) Butylene Glycol (And) Silica (And) Glycerin*, (Kobo)
 - ζ) methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol (Tinosorb M)

Οι υδατοδιαλυτές πρώτες ύλες αναδιαλύθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB.

- 2^η ομάδα, μη λιπαρές ενώσεις, αδιάλυτες στο νερό:
 - α) CI 77491, Isopropyl Titanium Triisostearate
 - β) CI 77499, Isopropyl Titanium Triisostearate
 - γ) CI 77492, Isopropyl Titanium Triisostearate

Οι μη λιπαρές ενώσεις που είναι αδιάλυτες στο νερό αναδιαλύθηκαν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB με προσθήκη polysorbate 80 (1 g/l).

- 3^η ομάδα, λιπαρές ενώσεις, αδιάλυτες στο νερό:
 - α) Glyceryl Stearate
 - β) Tocopheryl Acetate (Βιταμίνη E)
 - γ) Glyceryl Oleate Citrate, Caprylic/Capric Triglyceride (Dracorin)

Οι λιπαρές ενώσεις αναδιαλύθηκαν στην ελάχιστη δυνατή ποσότητα polysorbate 80 (ή άλλου επιφανειοδραστικού παράγοντα) κατόπιν θέρμανσης σε θερμοκρασία μέχρι 40 °C. Στη συνέχεια αναμίχθηκαν με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB (T = 40 °C max) το οποίο περιείχε polysorbate 80. Η ανάμιξη έγινε σε όσο το δυνατόν πιο σύντομο χρονικό διάστημα διατηρώντας τη θερμοκρασία, μέχρι να προκύψει ένα γαλάκτωμα.

Και στις τρεις ομάδες πρώτων υλών, η αναδιάλυση πραγματοποιήθηκε ως εξής, η πρώτη ύλη τοποθετήθηκε σε σωλήνα τύπου universal, ο οποίος περιείχε 10 ml του ανάλογου διαλύματος και ακολούθησε ανακίνηση σε παλινδρομικό αναδευτήρα για 60 λεπτά. Από αυτή τη διαδικασία εξαιρέθηκαν τα δείγματα του κιτρικού οξέος, της γλυκερόλης και της γλυκομαννάνης τα οποία διαλύονται ταχύτατα σε υδατικά διαλύματα.

β) Προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου των πρώτων υλών

Η μελέτη του μικροβιακού φορτίου των πρώτων υλών έγινε ακολουθώντας 3 πορείες. Σε όλες τις περιπτώσεις οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε θερμοκρασίες 22 °C, 30 °C και 37 °C, η ανάλυση κάθε δείγματος, σε κάθε αραιώση και θερμοκρασία πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν και ο έλεγχος των καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκε σε χρόνους $t = 1, 2, 3, 5, 7, 14$ ημέρες. Χρησιμοποιήθηκαν γενικού τύπου υποστρώματα και όχι εκλεκτικά λόγω του αναμενόμενου χαμηλού μικροβιακού φορτίου και ως μία αρχική διερεύνηση ύπαρξης μικροοργανισμών σε αυτές τις πρώτες ύλες. Στην Εικόνα 2.4 φαίνονται σχηματικά οι τρεις πορείες που ακολουθήθηκαν.

- Αναδιάλυση και επίστρωση σε θρεπτικό υπόστρωμα

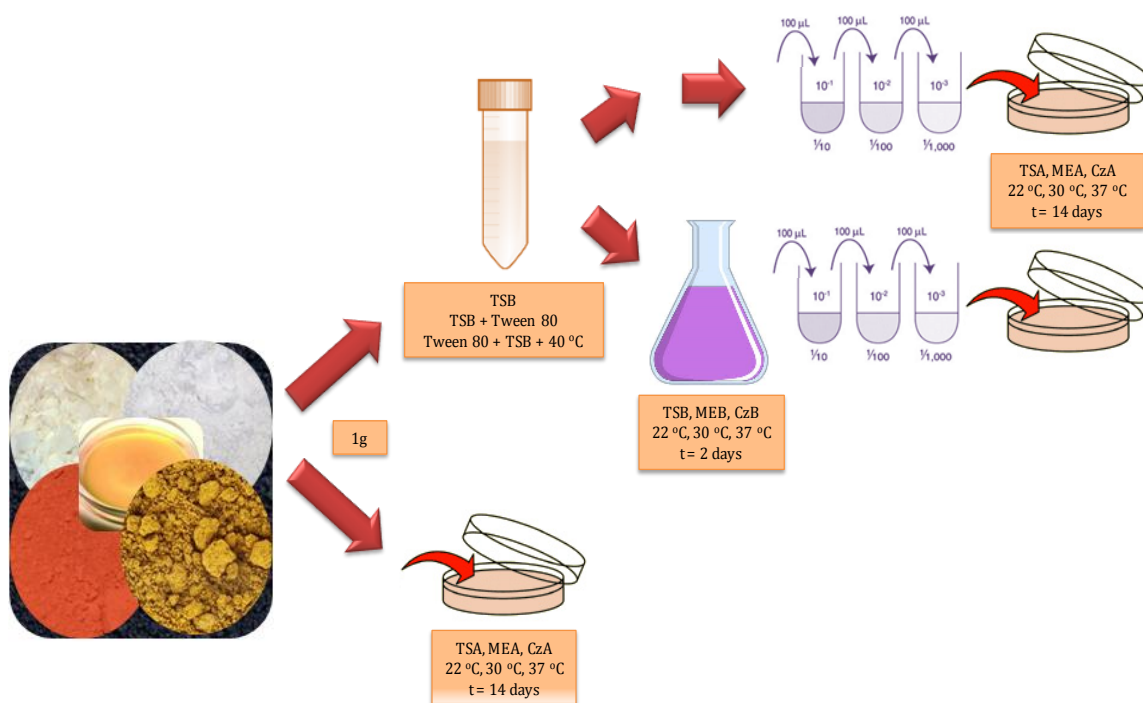
1 g από κάθε δείγμα ζυγίστηκε σε στείρες συνθήκες και αναδιαλύθηκε σύμφωνα με τα παραπάνω. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις έως 10^{-3} αραιώση και επίστρωση ποσότητας ίση με 100 μ l σε θρεπτικά υποστρώματα TSA, MEA και CzA (§2.3) (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008).

- Καλλιέργειες εμπλουτισμού και επίστρωση σε θρεπτικό υπόστρωμα

1 g από κάθε δείγμα ζυγίστηκε σε στείρες συνθήκες και αναδιαλύθηκε σύμφωνα με τα παραπάνω. Στη συνέχεια προστέθηκαν τα 10 ml σε κωνικές φιάλες με 90 ml θρεπτικό TSB, MEB και CzB (§2.3). Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν σε θερμοκρασίες 22 °C, 30 °C και 37 °C για χρονικό διάστημα 2 ημερών. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις έως 10^{-5} αραιώση και επίστρωση ποσότητας ίση με 100 μ l σε θρεπτικά υποστρώματα TSA, MEA και CzA (Prescott, και συν., 2002).

- Απευθείας επίστρωση ποσότητας δείγματος σε θρεπτικό υπόστρωμα

1 g από κάθε δείγμα ζυγίστηκε σε στείρες συνθήκες απευθείας σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα TSA, MEA και CzA με προσθήκη ποσότητας διαλύματος TSB (όπου η πρώτη ύλη ήταν σκόνη) για να διευκολυνθεί η διάλυση και η κάλυψη του τρυβλίου από την πρώτη ύλη.



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση των 3 πειραματικών πορειών που ακολουθήθηκαν για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου στις πρώτες ύλες του αντιηλιακού.

2.2.2.2. Μοριακή ανάλυση των πρώτων υλών

Τα δείγματα των πρώτων υλών λόγω της ιδιαίτερης σύστασης τους επεξεργάστηκαν με διαφορετικά πρωτόκολλα με σκοπό την απομόνωση του ολικού γενωμικού DNA (Miller, και συν. 1999, Roose-Amsaleg, και συν. 2001, Terry, και συν. 2002, Aguilera, και συν. 2006, Yang, και συν. 2007).

- 1^η μέθοδος – Power Water DNA kit (Mobio)

Διήθηση σε πολυανθρακικές μεμβράνες (cyclopore polycarbonate membranes, Whatman) με διάμετρο πόρου 0,2 μm . Στη συνέχεια απομόνωση ολικού DNA με Power Water DNA isolation kit (Mobio H.Π.Α.) που περιγράφεται στην παράγραφο 2.7.6.

Κιτρικό οξύ και γλυκερόλη

Ποσότητα δείγματος ίση με 10 g διαλύθηκε σε 1 λίτρο $\frac{1}{4}$ Ringer. Ακολούθησε διήθηση σε μεμβράνη με διάμετρο 0,2 μm . Οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία και διατηρήθηκαν για 3 μήνες στους -20°C μέχρι να γίνει απομόνωση ολικού DNA.

Χρωστικές CI 77491, CI 77492, CI 77499, Tinosorb M

Ποσότητα δείγματος ίση με 10 g διαλύθηκε αρχικά σε 10 ml και έπειτα σε 1 λίτρο $\frac{1}{4}$ Ringer. Ακολούθησε διήθηση σε ηθμούς κυτταρίνης (Qualitative Filter Papers, Whatman) βαθμού 4 (20-25 μm) και στη συνέχεια σε βαθμού 1 (12 μm) ώστε να κατακρατηθούν τα σωματίδια της χρωστικής. Το διήθημα διηθήθηκε σε μεμβράνες κυτταρίνης με διάμετρο πόρου 0,8 μm και έπειτα σε μεμβράνες με διάμετρο πόρου 0,2 μm . Οι μεμβράνες των 0,8 μm και των 0,2 μm τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία και διατηρήθηκαν για 3 μήνες στους -20°C μέχρι να γίνει απομόνωση ολικού DNA.

Γλυκομαννάνη

Ποσότητα δείγματος ίση με 2 g διαλύθηκε σε 1 λίτρο $\frac{1}{4}$ Ringer. Ακολούθησε διήθηση σε μεμβράνες κυτταρίνης με διάμετρο πόρου 0,8 μm (η γλυκομαννάνη έχει μέγεθος 1 μm , οπότε η μεμβράνη με διάμετρο πόρου 0,2 μm φράζει πιο γρήγορα) και έπειτα σε μεμβράνες με διάμετρο πόρου 0,2 μm . Οι μεμβράνες των 0,8 μm και των 0,2 μm τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία και διατηρήθηκαν για 3 μήνες στους -20°C μέχρι να γίνει απομόνωση ολικού DNA.

Xanthan gum

Έγινε προσπάθεια να διηθηθεί διάλυμα με συγκέντρωση 0,5 g/l, όμως εξαιτίας της ιδιότητας του δείγματος να λειτουργεί ως πηκτικό μέσο, η διήθηση στάθηκε αδύνατη.

- 2^η μέθοδος – Soil DNA kit (Mobio)

Απομόνωση ολικού DNA με Soil DNA isolation kit (Mobio H.Π.Α.) (§ 2.7.6). Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στις 3 χρωστικές (CI 77491, CI 77492, CI 77499).

Για την επιβεβαίωση ότι η απομόνωση δεν παρεμποδίζεται από το ίδιο το δείγμα χρησιμοποιήθηκαν θετικοί μάρτυρες, δηλαδή δείγματα χρωστικών επιμολυσμένα με 100 μl εναιώρημα κυττάρων *B. subtilis* της τάξεως 10⁹ cfu/ml.

- 3^η μέθοδος – CTAB

Η απομόνωση ολικού DNA από τις λιπαρές σύστασης πρώτες ύλες (tokopheryl acetate, Sunflower seed oil esters, glyceryl oleate citrate/triglyceride, glyceryl stearate) έγινε με τη μέθοδο του CTAB (§ 2.7.3) με προκατεργασία με n-hexane. Και στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν θετικοί μάρτυρες. (Busconi, και συν. 2003, Breton, και συν. 2004).

Απομόνωση ολικού DNA με τη μέθοδο του CTAB (§ 2.7.4) χωρίς προκατεργασία με h-hexane. Εφαρμόστηκε για τις πρώτες ύλες Kobo και Tinosorb M.

- 4^η μέθοδος – Power Plant DNA kit (Mobio)

Απομόνωση ολικού DNA με Power Plant DNA isolation kit (Mobio H.Π.Α.) (§ 2.7.6). Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε δοκιμαστικά στη γλυκομαννάνη και στο xanthan gum επειδή αυτές οι δύο ενώσεις αποτελούν πολυσακχαρίτες και επειδή στους φυτικούς ιστούς υπάρχουν υψηλά ποσοστά πολυσακχαριτών. Χρησιμοποιήθηκαν θετικοί μάρτυρες. (Angeles, και συν. 2005)

2.2.3. Αντιηλιακό

2.2.3.1. Προσδιορισμός του Πληθυσμού των Μικροοργανισμών

Η εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου του αντιηλιακού έγινε ακολουθώντας τις 3 πορείες της παραγράφου 2.2.2.1β. Η διαφορά στη διαδικασία αυτή ήταν ότι το αντιηλιακό αναδιαλύθηκε σε θρεπτικό Letheen Broth το οποίο απενεργοποιεί τυχόν παρεμποδιστές και επιπλέον εκτός των

προαναφερόμενων θρεπτικών χρησιμοποιήθηκε και το Lethen Agar. (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008).

2.2.3.2. Προσδιορισμός του Μικροβιακού Φορτίου σε Αντιηλιακά έπειτα από καθορισμένη χρήση

Η αποτελεσματικότητα των συντηρητικών που προστατεύσουν το αντιηλιακό κατά τη διάρκεια κανονικής χρήσης από τους καταναλωτές και η δυνατότητα επιμόλυνσης και ανάπτυξης μικροοργανισμών στο αντιηλιακό διερευνήθηκε ως εξής: δείγματα (σωληνάρια) αντιηλιακού χρησιμοποιήθηκαν από 5 καταναλωτές για χρονικό διάστημα ενός μήνα και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος του μικροβιακού φορτίου. Στον Πίνακα 2.4 φαίνονται τα δείγματα και η χρήση που πραγματοποιήθηκε. (Campana, και συν. 2006, Ravita, και συν. 2009)

Πίνακας 2.4: Δείγματα αντιηλιακών που χρησιμοποιήθηκαν από καταναλωτές

Δείγματα	Χρήση	% Αντιηλιακό που χρησιμοποιήθηκε
Δ1	Αραιή χρήση 3-4 φορές /μήνα	3,52
Δ2	Αραιή χρήση 7-8 φορές /μήνα	12,82
Δ3	Συχνή χρήση Όχι πλύσιμο χεριών πριν τη χρήση	καθημερινά 16,48
Δ4	Συχνή χρήση	καθημερινά 23,28
Δ5	Συχνή χρήση Όχι πλύσιμο χεριών πριν τη χρήση	καθημερινά 28,24
Δ6	Αρνητικός μάρτυρας	

Τρεις πειραματικές πορείες που φαίνονται στην Εικόνα 2.5 ακολουθήθηκαν για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου έπειτα από χρήση. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37 °C για διάστημα 2 εβδομάδων.

α) Καλλιέργειες εμπλουτισμού

Ποσότητα δείγματος 2 g ζυγίστηκε και αναδιλύθηκε σε 50 ml θρεπτικό υπόστρωμα Lethen Broth. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C και σε 100 rpm/min υπό αερόβιες συνθήκες για 24 h. Ποσότητα 100 μl από την καλλιέργεια εμπλουτισμού επιστρώθηκε σε θρεπτικά

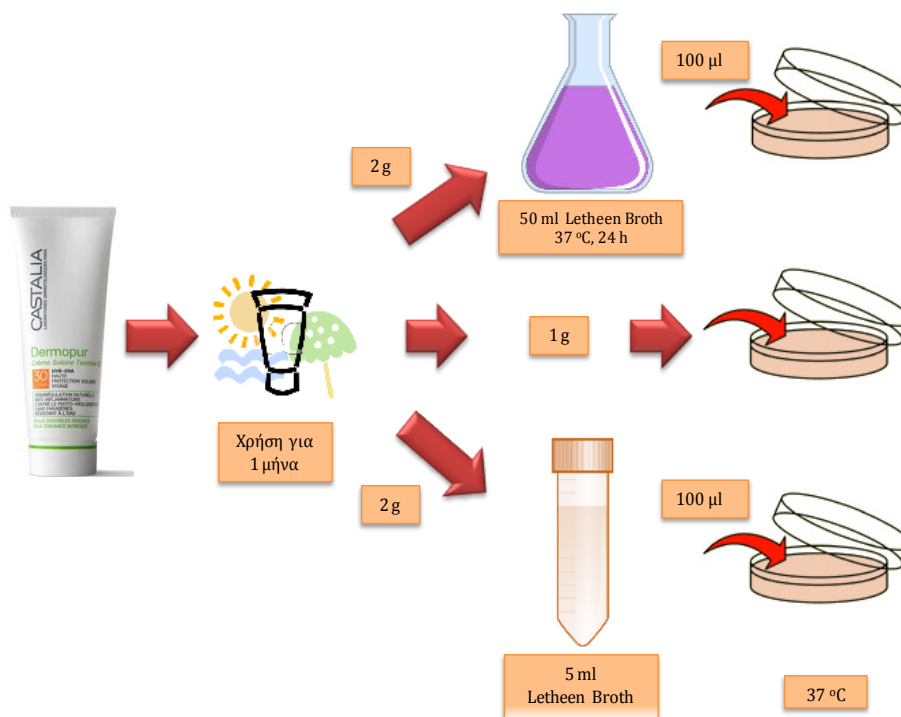
υποστρώματα γενικού τύπου (για βακτήρια, ζύμες, μύκητες) (§2.3.1) και σε εκλεκτικά (για *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Candida albicans*, κολίμορφα) (§2.3.2). Οι καλλιέργειες εμπλουτισμού χρησιμοποιήθηκαν για τον ποιοτικό προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου.

β) Καλλιέργειες χωρίς εμπλουτισμό

Ποσότητα δείγματος 2 g ζυγίστηκε και αναδιαλύθηκε σε 5 ml θρεπτικό υπόστρωμα Letheen Broth κατόπιν ανακίνησης σε παλινδρομικό αναδευτήρα για 60 λεπτά. Ποσότητα 100 μl από την μη εμπλουτισμού καλλιέργεια επιστρώθηκε σε θρεπτικά υποστρώματα γενικού τύπου και σε εκλεκτικά.

γ) Απευθείας επίστρωση ποσότητας δείγματος σε θρεπτικό υπόστρωμα

Ποσότητα δείγματος 1 g ζυγίστηκε και επιστρώθηκε σε θρεπτικά υποστρώματα γενικού τύπου και σε εκλεκτικά.



Εικόνα 2.5: Σχηματική αναπαράσταση των πειραματικών πορειών που ακολουθήθηκαν για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου σε αντιηλιακά έπειτα από καθορισμένη χρήση διάρκειας 1 μήνα.

2.2.3.3. Έλεγχος της αποτελεσματικότητας των συντηρητικών του αντιηλιακού έπειτα από στοχευμένη επιμόλυνση με εμβόλιο γνωστής συγκέντρωσης μικροοργανισμών (Hugbo, και συν. 2003, European Pharmacopoeia 6th Edition 2008).

Η επιμόλυνση του αντιηλιακού πραγματοποιήθηκε με εμβόλια τριών μικροοργανισμών, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Τα εμβόλια παρασκευάστηκαν με βάση τις μετρήσεις βιώσιμων μονάδων, οπτικής απορρόφησης και καταμέτρησης κυττάρων σε πλάκα Neubauer. Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες 24 h και ως μέσο εναιώρησης των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γλυκερόλης 30 %.

➤ Επιμόλυνση αντιηλιακού με 10^2 cfu/ml και 10^4 cfu/ml.

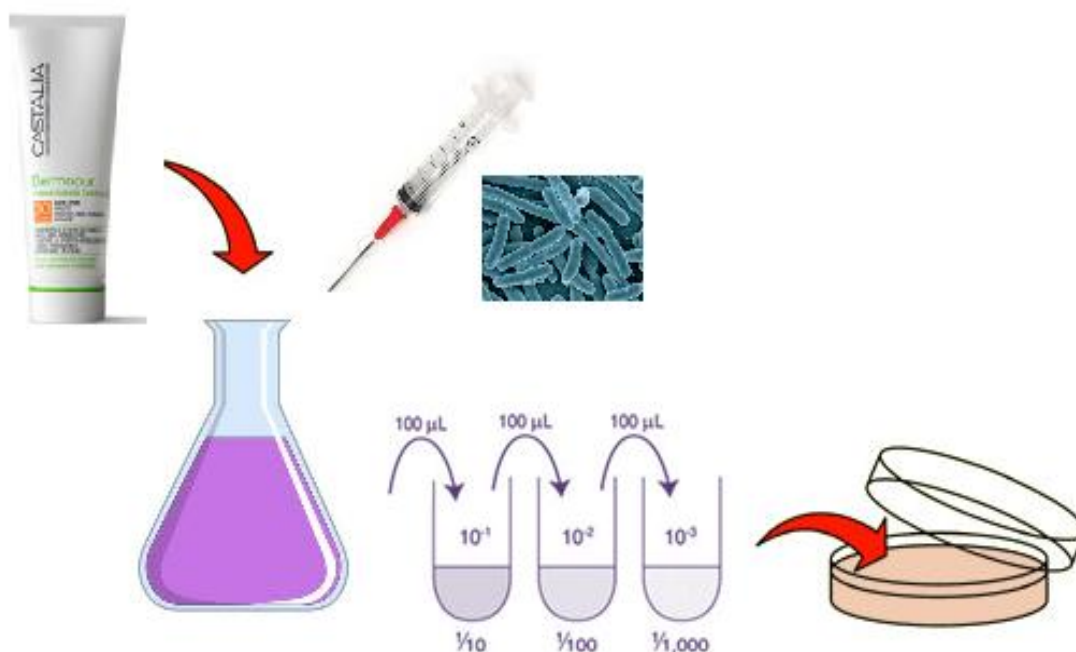
Σε σφραγισμένα σωληνάρια αντιηλιακού (Α και Β) προστέθηκαν τα εμβόλια των προαναφερόμενων μικροοργανισμών της τάξεως των 10^2 cfu/ml (στο Α) και 10^4 cfu/ml (στο Β). Τα σωληνάρια επώαστηκαν στους 37 °C και σε χρόνους $t = 0, 1, 2, 3, 4, 7, 14, 28$ μέρες πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις και ποσότητα δείγματος (1 g) επιστρώθηκε σε θρεπτικά υποστρώματα NA, TBX και Cetrimide. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37 °C. Στην Εικόνα 2.6 φαίνεται σχηματικά η πορεία που ακολουθήθηκε. Στα παραπάνω χρονικά διαστήματα συλλέχθηκαν δείγματα και για μοριακή ανάλυση και διατηρήθηκαν στους -20 °C.



Εικόνα 2.6: Σχηματική αναπαράσταση της πορείας που ακολουθήθηκε για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των συντηρητικών στο αντιηλιακό έπειτα από επιμόλυνση του αντιηλιακού με εμβόλιο 10^2 cfu/ml και 10^4 cfu/ml

- Έλεγχος της επίδρασης του αντιηλιακού στην ανάπτυξη των *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Πραγματοποιήθηκαν κλειστές καλλιέργειες σε Letheen Broth με προσθήκη αντιηλιακού σε ποσοστό 5%, 10% και 20%. Τρεις μικροοργανισμοί χρησιμοποιήθηκαν, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Οι κωνικές φιάλες εμβολιάστηκαν με ποσότητα εμβολίου του κάθε οργανισμού ξεχωριστά, της τάξης των 10^6 cfu/ml. Χρησιμοποιήθηκαν α) αρνητικοί μάρτυρες που περιείχαν μόνο θρεπτικό και το αντίστοιχο ποσοστό του αντιηλιακού, β) θετικοί μάρτυρες που περιείχαν μόνο τους μικροοργανισμούς και γ) μία κωνική που περιείχε μόνο θρεπτικό υπόστρωμα. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37 °C σε 150 rpm. Πραγματοποιήθηκαν 2 μετρήσεις σε χρόνους $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5$ και 6 μέρες, για υπολογισμό των cfu/ml και τη μέτρηση της Οπτικής Πυκνότητας. Η δεύτερη μέθοδος δε θεωρήθηκε αξιόπιστη καθώς τα δείγματα είχαν αυξημένη οπτική απορρόφηση λόγω της σύστασης του αντιηλιακού (ειδικά στα ποσοστά 10 % και 20 %). Επίσης στα παραπάνω χρονικά διαστήματα συλλέχθηκαν δείγματα και για μοριακή ανάλυση και διατηρήθηκαν στους -20 °C. Στην Εικόνα 2.7 παρουσιάζεται η πορεία που ακολουθήθηκε.



Εικόνα 2.7: Σχηματική αναπαράσταση της πορείας που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο της επίδρασης του αντιηλιακού στην ανάπτυξη των *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*.

2.3. Θρεπτικά υποστρώματα

2.3.1. Γενικού τύπου υποστρώματα

Nutrient Broth (NB) - Nutrient Agar (NA), για ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων (Atlas 1993). Περιείχε (g/l): πεπτόνη 5,0, εκχύλισμα κρέατος 1,0, εκχύλισμα ζύμης 2,0, NaCl 5,0 - άγαρ 15,0. pH $7,4 \pm 0,2$ στους 25 °C.

Tryptone Soya Broth (TSB) - Tryptone Soya Agar (TSA), για ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων από καλλυντικά προϊόντα και πρώτες ύλες (Atlas 1993). Περιείχε (g/l): τρυπτόνη 15,0, πεπτόνη σόγιας 5,0, NaCl 5,0 - άγαρ 15,0. pH $7,3 \pm 0,2$ στους 25 °C.

R2A Agar, για ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων από πόσιμο νερό (Reasoner και Geldreich 1985). Περιείχε (g/l): εκχύλισμα ζύμης 0,5, πεπτόνη προτεόζης 0,5, casamino acids 0,5, γλυκόζη 0,5, διαλυτό άμυλο 0,5, πυροσταφυλικό νάτριο 0,3, K_2HPO_4 0,3, $MgSO_4$ 0,05, άγαρ 15,0. pH $7,2 \pm 0,2$ στους 25 °C.

Lethen Broth - Lethen Agar, για ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων από καλλυντικά προϊόντα και πρώτες ύλες (Atlas 1993). Περιείχε (g/l): πεπτόνη 10,0, εκχύλισμα κρέατος 5,0, λεκιθίνη 0,7, NaCl 5,0 και Polysorbate 80 5,0 ml - άγαρ 15,0. pH $7,0 \pm 0,2$ στους 25 °C.

Malt extract Broth (MEB) - Malt extract Agar (MEA), για ανάπτυξη ζυμών (Atlas 1993). Περιείχε (g/l): γλυκόζη 20,0, εκχύλισμα βύνης 20,0, πεπτόνη 1,0 - άγαρ 15,0. pH $5,5 \pm 0,2$ στους 25 °C. Μετά την αποστείρωση, έγινε προσθήκη 1 ml αντιβιοτικού χλωραμφενικόλης 0,1 g/ml (§ 2.4.2).

Czapek-Dox Broth (CzB) - Czapek-Dox Agar (CzA), για ανάπτυξη μυκήτων (Atlas 1993). Περιείχε (g/l): γλυκόζη 30,0, διάλυμα βασικών αλάτων 100 ml (§ 2.4.2) - άγαρ 15,0. pH $7,3 \pm 0,2$ στους 25 °C. Μετά την αποστείρωση, έγινε προσθήκη 1 ml αντιβιοτικού χλωραμφενικόλης 0,1 g/ml.

2.3.2. Εκλεκτικά και Διαγνωστικά θρεπτικά υποστρώματα

Tergitol 7 Agar, εκλεκτικό υπόστρωμα για απομόνωση κολίμορφων βακτηρίων (ISO 9308 2000). Περιείχε (g/l): λακτόζη 10,0, πεπτόνη 5,0, εκχύλισμα ζύμης 3,0, μπλε της βρωμοθυμόλης (bromothymol blue), 0,025, sodium heptadecyl sulfate (Tergitol 7) 0,1, άγαρ 15,0. pH 6,9 στους 37 °C.

Cromocult TBX (Tryptone Bile X-glucuronide) Agar, εκλεκτικό υπόστρωμα για απομόνωση κολίμορφων και *E. coli* (ISO 9308 2000). Περιείχε (g/l): πεπτόνη 20,0, χολικά άλατα No,3, 1,5, X-D-glucuronide 0,075, άγαρ 10,0. pH 7,2 ± 0,2 στους 25 °C.

Tryptone Water, για ανακαλλιέργεια κολίμορφων για δοκιμασία παραγωγής ινδόλης (ISO 9308 2000). Περιείχε (g/l): τρυπτόνη 10,0, χλωριούχο νάτριο 5,0.

Cetrimide Agar Base, εκλεκτικό υπόστρωμα για απομόνωση *Pseudomonas aeruginosa* (Applichem, Γερμανία). Περιείχε (g/l): πεπτόνες 20,3, K₂SO₄ 10,0, MgCl₂ 1,4, cetrimide 0,3, άγαρ 13,0 και γλυκερόλη 10 ml. pH 7,2 ± 0,2 στους 25 °C.

Membrane Filter Enterococcus Selective Agar - Slanetz & Bartley Agar, εκλεκτικό υπόστρωμα για απομόνωση Εντεροκόκκων (ISO 7899 2000). Περιείχε (g/l): Τρυπτόζη 20,0, εκχύλισμα ζύμης 5,0, D (+) γλυκόζη 2,0, K₂HPO₄ 4,0, NaN₃ (αζίδιο του νατρίου) 0,4, 2,3,5 triphenyl-tertazolium chloride 0,1, άγαρ 10,0. pH 7,2 ± 0,2 στους 25 °C. Δεν αποστειρώνεται.

Baird Parker Agar Base, εκλεκτικό υπόστρωμα για απομόνωση *Staphylococcus* sp. (Applichem). Περιείχε (g/l): πεπτόνες 16,0, πυροσταφυλικό νάτριο 10,0, γλυκίνη 12,0, χλωριούχο λίθιο (LiCl) 5,0, άγαρ 17,0. pH 7,1 στους 25 °C. Μετά την αποστείρωση έγινε προσθήκη 50 ml αποστειρωμένου γαλακτώματος Egg Yolk Tellurite.

Egg Yolk Tellurite Sterile Emulsion, γαλάκτωμα για χρήση με το *Baird and Parker Base* για διαφοροποίηση παθογόνων Σταφυλόκοκκων (Applichem). Περιείχε: Κρόκο αυγού 50 %, Potassium tellurite 50 mg/25 ml. Διατηρείται στους 2 - 8 °C.

Staphylococcus Medium No.110, εκλεκτικό υπόστρωμα για απομόνωση *Staphylococcus* sp. (DSMZ, Γερμανία). Περιείχε (g/l): τρυπτόνη 10,0, εκχύλισμα ζυμής 2,5, D-μανιτόλη 10,0, λακτόζη 2,9, NaCl 75,0, K₂HPO₄ 5,0, ζελατίνη 30,0, άγαρ 15,0. pH 7,1 ± 0,2 στους 25 °C.

Mannitol Salt Agar, εκλεκτικό υπόστρωμα για απομόνωση *Staphylococcus* sp. (Atlas 1993). Περιείχε (g/l): πεπτόνη Προτεόζης No,3 10,0, εκχύλισμα βοδιού 1,0, D-μανιτόλη 10,0, NaCl 75,0, NaN₃ 0,05, κόκκινο της φαινόλης (phenol red) 0,025, άγαρ 15,0. pH 7,4 ± 0,2 στους 25 °C.

Deoxycholate Agar, εκλεκτικό υπόστρωμα για απομόνωση Gram αρνητικών μικροοργανισμών (Atlas 1993). Περιείχε (g/l): λακτόζη 10,0, πεπτόνη 10,0, NaCl 5,0, K₂HPO₄ 2,0, κιτρικός σίδηρος (C₆H₅FeO₇) 1,0, κιτρικό νάτριο (C₆H₇NaO₇) 1,0, Δεοξυχολικό νάτριο (C₂₄H₃₉NaO₄) 1,0, ουδέτερο ερυθρό (Neutral Red) 0,03, άγαρ 15,0. Δεν αποστειρώνεται. pH 7,3 ± 0,2 στους 25 °C.

Buffered Peptone Water, για το στάδιο προεμπλουτισμού κατά την απομόνωση *Salmonella* sp. (ISO 6340 1995). Περιείχε (g/l): πεπτόνη βακτηριολογική 10,0, NaCl 5,0, Na₂HPO₄·12H₂O 9,0 ή Na₂HPO₄·2H₂O 3,21, KH₂PO₄ 1,5 ή KH₂PO₄·3 H₂O 2,53. pH 7,0 ± 0,2 στους 25 °C.

Rappaport-Vassiliadis R10 Broth, εκλεκτικό υπόστρωμα ζυμού για το στάδιο εμπλουτισμού κατά την απομόνωση *Salmonella* sp. (ISO 6340 1995). Περιείχε (g/l): τρυπτόνη 4,54, NaCl 7,2, KH₂PO₄ 1,4, MgCl₂ 13,4, οξαλικό άλας πράσινο του μαλαχίτη (Malachite Green Oxalate) 0,036. pH 5,1 ± 0,2 στους 25 °C.

Candida Isolation Agar, εκλεκτικό υπόστρωμα για απομόνωση *Candida albicans* (Atlas 1993). Περιείχε (g/l): γλυκόζη 10,0, πεπτόνη 5,0, εκχύλισμα ζύμης 3/0, εκχύλισμα βύνης 3,0, μπλε της ανιλίνης (aniline blue) 0,1, άγαρ 15,0. pH 5,9 ± 0,2 στους 25 °C. Μετά την αποστείρωση, έγινε προσθήκη 1 ml αντιβιοτικού χλωραμφενικόλης 0,1 g/ml.

2.3.3. Ολιγότροφα θρεπτικά υποστρώματα

Tap Water Agar, για απομόνωση ολιγότροφων βακτηριών από νερό (Atlas 1993). Περιείχε: νερό βρύσης 1,0 l, άγαρ 15,0. pH 7,2 ± 0,2 στους 25 °C.

Nutrient Agar $^{1/2}$ strength, για απομόνωση ολιγότροφων βακτηριών από νερό. Περιείχε (g/l): Nutrient Broth (Scharlab) 7,5, άγαρ 15,0.

Nutrient Agar $^{1/10}$ strength, για απομόνωση ολιγότροφων βακτηριών από νερό. Περιείχε (g/l): Nutrient Broth (Scharlab) 1,6, άγαρ 15,0.

R2A $^{1/2}$ strength, για απομόνωση ολιγότροφων βακτηριών από νερό. Περιείχε (g/l): R2A (Difco) 9,2, άγαρ 7,5.

R2A $^{1/10}$ strength, για απομόνωση ολιγότροφων βακτηριών από νερό. Περιείχε (g/l): R2A (Difco) 1,82, άγαρ 13,5.

Alpha Agar, για απομόνωση ολιγότροφων βακτηριών από νερό (Silbaq 2008) Περιείχε ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$): πεπτόνη σόγιας 0,05, άγαρ 15,0, από τα διαλύματα της § 2.4.2 MMA 1,0 ml και MMB 0,1 ml. pH $7,2 \pm 0,2$ στους 25 °C.

Tryptone, Glycerol, Salts agar - TGS, για ανάπτυξη στρεπτομυκήτων (Δέλλιου 2008). Περιείχε (g/l): γλυκερόλη 12,5, τρυπτόνη 5,0, K_2HPO_4 1,0, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5, άγαρ 15,0 και 1 ml από τα διαλύματα $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 1,0M, CuSO_4 0,1M, ZnSO_4 0,1M, MnSO_4 0,1M (§ 2.4.2.). pH $7,0 \pm 0,2$ στους 25 °C.

2.4. Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα

2.4.1. Διαλύματα συντήρησης και εναιώρησης κυττάρων

Διάλυμα γλυκερόλης 30% $^w/v$, για συντήρηση μικροοργανισμών στους -20 °C (Wellington και Williams 1978). Περιείχε: 30,0 g γλυκερόλης σε τελικό όγκο αποσταγμένου νερού 100 ml.

Διάλυμα αλάτων Ringer $^{1/4}$, για εναιώρηση κυττάρων. (Wellington και συν., 1990). Περιείχε (g/l): NaCl 2,15, KCl 0,15, CaCl_2 0,075, K_2HPO_4 0,5.

Διάλυμα Θειοθειικού Νατρίου, για απενεργοποίηση καταλοίπων χλωρίνης στο νερό σε συγκέντρωση 1 ml/l δείγματος (Reasoner και Geldreich 1985). Περιείχε: Θειοθειικό Νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 10,0, dH_2O 100 ml.

2.4.2. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα

Διάλυμα βασικών αλάτων, προστίθεται στο θρεπτικό Czapek-Dox Agar (Καραγκούνη 2001). Περιείχε (g/l): NaNO_3 30,0, K_2HPO_4 10,0, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,0, KCl 5, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1, ZnSO_4 0,1, $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05.

Διάλυμα $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 1,0. Περιείχε (g/l): 1g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ σε 1 l αποσταγμένο νερό.

Διάλυμα CuSO_4 0,1. Περιείχε (g/l): 0,1g CuSO_4 σε 1 l αποσταγμένο νερό.

Διάλυμα ZnSO_4 0,1. Περιείχε (g/l): 0,1g ZnSO_4 σε 1 l αποσταγμένο νερό.

Διάλυμα MnSO_4 0,1. Περιείχε (g/l): 0,1g MnSO_4 σε 1 l αποσταγμένο νερό.

Minimal Media A - MMA (Silbaq 2008). Περιείχε (μmol/l): $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6,0, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10,0, Na_2CO_3 20,0, NaNO_3 14,0, NH_4Cl 10,0, K_2HPO_4 1,75, $\text{EDTA-Na}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,75, εκχύλισμα ζύμης 0,001 % $^w/v$, πεπτόνη 0,001 % $^w/v$.

Minimal Media B - MMB (Silbaq 2008). Περιείχε (mmol/l): κιτρικό οξύ ένυδρο 29,75, FeCl_3 21,48, $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7,1, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,85, $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,6, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,086.

Διάλυμα χλωραμφενικόλης. Περιείχε 0,1 g χλωραμφενικόλη σε 1 ml αιθανόλης 99,0 %.

2.4.3. Διαλύματα για βιοχημικές δοκιμασίες

Διάλυμα KOH 3 %. Περιείχε: 0,3 g KOH (Applichem) σε 10 ml αποσταγμένο νερό.

Διάλυμα Κρυσταλλικού Ιωδίου (Crystal Violet) (American Society for Microbiology 1957). Διάλυμα A: crystal violet 20,0 g, αιθανόλη 99 % 200 ml. Διάλυμα B: οξαλικό αμμώνιο 8,0 g, νερό 800 ml. Τα διαλύματα παραμένουν σταθερά για ένα χρόνο. Το διάλυμα εργασίας προέκυψε από ανάμιξη των δύο διαλυμάτων.

Διάλυμα Ιωδίου (American Society for Microbiology 1957). Περιείχε: ιώδιο 1,0 g, ιωδιούχο κάλιο (KI) 2,0 g, νερό 300 ml.

Διάλυμα αιθανόλης 99 %

Διάλυμα Σαφρανίνης (American Society for Microbiology 1957). Περιείχε: 100 ml κορεσμένου αλκοολικού διαλύματος σαφρανίνης (2,5 g χρωστικής σε 100 ml αιθανόλης) και 1000 ml νερό.

Bactident Oxidase Strips (Merck, Γερμανία). Περιείχε στη ζώνη αντίδρασης της λωρίδας: N,N-dimethyl-1,4-phenylene diammonium chloride 0,1 μ mol, 1-naphthol 1,0 μ mol.

Διάλυμα H_2O_2 3 %. Περιείχε 10 ml H_2O_2 30 % (Applichem) σε 90 ml αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

Αντιδραστήριο Kovacs (Merck). Περιείχε: n-Butanol; hydrochloric acid; 4-dimethylaminobenzaldehyde.

2.4.4. Διαλύματα για μοριακή χρήση και ηλεκτροφόρηση

Διάλυμα λύσης βακτηριακών κυττάρων – Lysis buffer (Hopwood, και συν.1985). Σύσταση: 25 mM Tris (MBG), 25 mM EDTA (MBG), 10,3 % w/v σακχαρόζη (MBG – Applichem Γερμανία) σε αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό. pH 8,0 στους 25 °C. Αποστείρωση 15 min. Η λυσοζύμη προστέθηκε ακριβώς πριν τη χρήση σε συγκέντρωση 10 mg/ml.

Διάλυμα Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (Cheng και Jiang 2006). Σύσταση: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό. pH 8,0 στους 25 °C. Αποστείρωση 15 min.

Διάλυμα STET (Sambrook, και συν. 2000). Σύσταση: 10 mM Tris - HCl, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 5 % w/v Triton X-100, αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό. pH 8,0 στους 25 °C. Το Triton X-100 δεν αποστειρώθηκε.

Διάλυμα Tris-EDTA-NaCl (TEN) pH 8,0 (Abd-Elsalam, και συν. 2003). Σύσταση: 200 mM Tris, 125 mM EDTA, NaCl 250 mM, αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό. pH 8,0 στους 25 °C. Αποστείρωση 15 min.

Διάλυμα CTAB extraction (cetyltrimethylammonium bromide) pH=8. Σύσταση: 2 % w/v CTAB, 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris-Base/HCl, 20 μ M Na₂EDTA, αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό. pH 8,0 στους 25 °C. Ρύθμιση pH με πυκνό HCl.

Διάλυμα λυσοζύμης. Περιείχε: 10 mg λυσοζύμη ($\approx$ 70000 Units, Fluca Analyticals) σε 1 ml αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό. Η μέγιστη τιμή ενεργότητας του ενζύμου είναι σε pH 8

Διάλυμα SDS 10%. Περιείχε: 10 g SDS (MBG – Fisher Bioreagents), αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml. Δεν αποστειρώθηκε.

Διάλυμα Χλωροφόρμιο:Ισοαμλική αλκοόλη 24:1 (MBG-Applichem). Περιείχε: 192 ml χλωροφόρμιο και 8 ml ισοαμλική αλκοόλη.

Διάλυμα οξικού καλίου 5M pH=9. Περιείχε: 49,075 g CH₃COOK (MBG – Applichem), αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml. Αποστείρωση 15 min

Διάλυμα οξικού καλίου 5M pH=5,4. Περιείχε: CH₃COOK 5 M 60,0 ml, κρυσταλλικό οξικό οξύ 11,5 ml, αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό 28,5 ml. Αποστείρωση 15 min. Το διάλυμα που προέκυψε έχει συγκέντρωση 3M όσον αφορά το κάλιο και 5M όσον αφορά το οξικό.

Διάλυμα οξικού νατρίου 3M pH=5,3. Περιείχε: 24,609 g CH₃COONa (MBG – Applichem), αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml. Ρύθμιση pH με κρυσταλλικό οξικό οξύ. Αποστείρωση 15 min.

Διάλυμα CTAB precipitation (cetyltrimethylammonium bromide) pH=8. Σύσταση: 0,5 % w/v CTAB, 0,04 M NaCl, αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό.

Διάλυμα NaCl 1 M και 1,2 M. Περιείχε: 5,84 g ή 7,01 g NaCl (MBG – Applichem), αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml. Αποστείρωση 15 min.

Διάλυμα Tris-HCl 1 M pH 8,0. Περιείχε: 12,114 g Tris Base (MBG – Fischer Bioreagents), αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml, πυκνό HCl για ρύθμιση pH = 8.0 στους 25 °C. Αποστείρωση 15 min.

Διάλυμα EDTA 0,5 M pH 8,0. Περιείχε: 146,12 g EDTA (MBG – Applichem) ή 187,13 g EDTA-Na₂·2H₂O, αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 500 ml, NaOH ≈ 20 g για ρύθμιση pH = 8,0 στους 25 °C. Αποστείρωση 15 min.

Διάλυμα NaOH 2N - 5N. Περιείχε (g/l): NaOH 80,0 – 200,0.

Ισοπροπανόλη 99,7 % (MBG – Applichem)

Διάλυμα αιθανόλης 70 %. Περιείχε σε 100 ml: 72,84 ml αιθανόλη 96,1 %, νερό 27,16 ml.

Rnase A (10 mg/ml) (Fermentas Ισπανία).

n-Hexane (Scharlab Ισπανία).

Διάλυμα Tris-Acetate-EDTA (TAE) 1x pH 8,0 (Sambrook, και συν. 2000). Σύσταση: 40 mM Tris-acetate/1 mM EDTA. Το διάλυμα TAE 1x παρασκευάστηκε πριν τη χρήση με ανάλογη αραιώση του πυκνού διαλύματος TAE 50x.

Διάλυμα Tris-Acetate-Edta (TAE) 50x pH 8,0. Σύσταση: 2 M Tris, 1 M κρυσταλλικό οξικό οξύ, 0.05 M EDTA. Περιείχε (ανά λίτρο): Tris 242,0 g, κρυσταλλικό οξικό οξύ 57,1 ml, EDTA 0,5 M 100,0 ml.

Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (Sigma-Aldrich). Περιείχε: 10 mg/ml βρωμιούχο αιθίδιο, dH₂O.

6x ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης σε πήκτωμα αγαρόζης (Sambrook, και συν. 2000). Περιείχε: 0,25 % w/v bromophenol blue, 0,25 % w/v xylene cyanol FF, 30 % w/v γλυκερόλη σε νερό. Χρησιμοποιήθηκαν 2 μl χρωστικής 6x για κάθε 10 μl δείγματος για πήκτωμα αγαρόζης.

Διάλυμα μοριακού δείκτη 1 kb και 100 bp (Fermentas). Περιείχε: 100 μl μοριακού δείκτη 1 kb ή 100 bp, 100 μl 6x ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης και 400 μl νερό για έγχυση.

Νερό προς έγχυση (Water for injection)

2.4.5. Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Φορμαμίδιο Απιονισμένο (Nobel 2000).

5g ρητίνης AG 501-X8 (D) Molecular Biology Grade ζυγίστηκαν για κάθε 100 ml φορμαμίδιο (extra pure). Το φορμαμίδιο είναι φωτοευαίσθητο. Ακολούθησε ανάδευση για 1 h, μέχρι να γίνει η ρητίνη από μπλε, χρυσή, οπότε τα ιόντα του φορμαμιδίου να έχουν δεσμευτεί στη ρητίνη και το φορμαμίδιο είναι χωρίς φορτίο (ουδέτερο). Φιλτράρισμα σε Whatman No 1. Διατήρηση σε σωλήνες τύπου Falcon, στους -20 °C

Διάλυμα 0 % αποδιατακτικού παράγοντα – 6 % ακρυλαμίδη (Bio-Rad 1996).

Περιείχε (100 ml): 20,0 ml 30 % Acrylamide/Bis Acrylamide, 2,0 ml TAE 50x, 78,0 ml dH₂O.

Διάλυμα 40 % αποδιατακτικού παράγοντα ουρία/φορμαμίδιο – 6 % ακρυλαμίδη.

Περιείχε (100 ml): 20,0 ml 30 % Acrylamide/Bis Acrylamide, 16,0 ml απιονισμένο φορμαμίδιο, 16,8 g ουρία, 2,0 ml TAE 50x, dH₂O μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

Διάλυμα 60 % αποδιατακτικού παράγοντα ουρία/φορμαμίδιο – 6 % ακρυλαμίδη

Περιείχε (100 ml): 20,0 ml 30 % Acrylamide/Bis Acrylamide, 24,0 ml απιονισμένο φορμαμίδιο, 25,2 g ουρία, 2,0 ml TAE 50x, dH₂O μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

Διάλυμα 100 % αποδιατακτικού παράγοντα ουρία/φορμαμίδιο – 6 % ακρυλαμίδη.

Περιείχε (100 ml): 20,0 ml 30 % Acrylamide/Bis Acrylamide, 40,0 ml απιονισμένο φορμαμίδιο, 42,0 g ουρία, 2,0 ml TAE 50x, dH₂O μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

Το 100% αποδιατακτικού παράγοντα αντιστοιχεί σε 40 % φορμαμίδιο, 7M ουρία.

Διάλυμα 10 % Ammonium persulfate. Περιείχε: 0,1 g ApS σε 1 ml dH₂O

TEMED (Applichem Γερμανία).

2x ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (Bio-Rad 1996). Περιείχε σε 10 ml: 0,25 ml 2,0 % bromophenol blue, 0,25 ml 2,0 % xylene cyanol, 7,0 ml 100 % γλυκερόλη, 2,5 ml dH₂O. Χρησιμοποιήθηκαν ίσοι όγκοι χρωστικής και δείγματος για πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Διάλυμα μονιμοποίησης (Heuer, και συν. 1997). Περιείχε: 10,0 % ^{v/v} αιθανόλη, 0,5% ^{v/v} κρυσταλλικό οξικό οξύ, dH₂O.

Διάλυμα χρώσης νιτρικού αργύρου (Heuer, και συν. 1997). Περιείχε: 0,1% ^{w/v} νιτρικός άργυρος (AgNO₃), dH₂O.

Διάλυμα ανάπτυξης χρώσης (Heuer, και συν. 1997). Περιείχε: 0,01% ^{w/v} sodium borohydride (NaBH₄), 0,15% ^{v/v} φορμαλδεΰδη σε 1,5% ^{w/v} NaOH, dH₂O.

Διάλυμα τερματισμού αντίδρασης (Amersham Biosciences 1999). Περιείχε: Na₂EDTA 1,5 % ^{w/v}, dH₂O.

Διάλυμα διατήρησης πηκτώματος (Amersham Biosciences 1999). Περιείχε: 40,0 % ^{v/v} αιθανόλη, 4,0 % ^{v/v} γλυκερόλη, dH₂O.

2.5. Ποσοτική ανάλυση του μικροβιακού φορτίου των δειγμάτων νερού, πρώτων υλών και αντιηλιακού.

2.5.1. Προσδιορισμός του Ολικού Πληθυσμού των Ετερότροφων Βακτηρίων

Σκοπός αυτής της διαδικασίας ήταν ο προσδιορισμός του αριθμού των καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών στο σύνολο των δειγμάτων, εκτιμώντας τις βιώσιμες μονάδες που σχηματίζουν αποικίες σε διάφορα γενικά θρεπτικά υποστρώματα, μετά από αερόβια επώαση στους 10 °C (μόνο για το νερό), στους 22 °C, στους 30 °C (μόνο για τις πρώτες ύλες) και στους 37 °C. Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε όπως περιγράφεται στις παραπάνω παραγράφους ανάλογα με το δείγμα.

Σε κάθε καλλιέργεια που περιείχε 30 - 300 αποικίες, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των αποικιών και μακροσκοπική παρατήρηση των μικροοργανισμών με στόχο την ομαδοποίηση των μικροβιακών αποικιών. Από κάθε πληθυσμιακή ομάδα μικροοργανισμών, σε καθένα από τα θρεπτικά υποστρώματα συλλέχθηκε το σύνολο των αποικιών και οι μεμονωμένες αποικίες καλλιεργήθηκαν σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα με σκοπό την απόκτηση καθαρής καλλιέργειας για διατήρηση του στελέχους σε διάλυμα γλυκερόλης και για την περαιτέρω μοριακή ανάλυση του.

➤ Νερό (ISO 6222, 1999, ISO 8199, 2005)

Χρησιμοποιήθηκαν τα γενικά θρεπτικά υποστρώματα NA, TSA και R2A. Το πρώτο αποτελεί ένα πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση του ολικού μικροβιακού πληθυσμού ενός δείγματος νερού. Το δεύτερο είναι παραπλήσιας σύστασης με το NA και επιλέχθηκε επειδή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του ολικού μικροβιακού φορτίου στα καλλυντικά προϊόντα και στις πρώτες ύλες και ορίζεται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008). Το τρίτο θρεπτικό, αποτελεί ένα πιο φτωχό θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο χρησιμοποιείται για την απομόνωση μικροοργανισμών από πόσιμο νερό καθώς το πυροσταφυλικό νάτριο που Περιείχε μειώνει την καταπόνηση των κυττάρων από τα κατάλοιπα χλωρίου του νερού. Επειδή το δείγμα μας προσομοιάζει τις

συνθήκες του πόσιμου νερού (είναι κατεργασμένο νερό δικτύου) επιλέχθηκε – δοκιμάστηκε και το R2A.

Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 10 °C για 3 μήνες, στους 22 °C για 7 ημέρες και στους 37 °C για 2-3 ημέρες. Στις καλλιέργειες των 22 °C και 37 °C, ανά 24 ώρες υπήρχε συνεχής παρακολούθηση της πορείας των καλλιεργειών και της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Οι υπολογισμοί έγιναν σύμφωνα με τον τύπο που περιέχεται στο ISO 8199 (2005):

$$Cs = \frac{Z}{V_{tot}} \times Vs$$

όπου: **Cs**: είναι ο υπολογιζόμενος αριθμός βιώσιμων μονάδων (cfu) στον όγκο αναφοράς **Vs** του δείγματος,

Z: είναι το σύνολο των αποικιών που καταμετρήθηκαν στο σύνολο των τρυβλίων ή των μεμβρανών στις διάφορες αραιώσεις,

Vs: είναι ο όγκος αναφοράς, που επιλέγεται για να εκφράσει τη συγκέντρωση των μικροοργανισμών στο δείγμα (π.χ. cfu / 1 ml ή cfu / 100 ml δείγματος),

Vtot: είναι ο υπολογισμένος συνολικός όγκος του δείγματος, συμπεριλαμβανομένων των όγκων που χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση ή το σύνολο των ξεχωριστών όγκων που χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες αραιώσεις, δηλαδή:

$$V_{tot} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i),$$

όπου: $n_1, n_2, \dots, n_i$ είναι ο αριθμός των τρυβλίων που καταμετρήθηκαν αντίστοιχα για τις αραιώσεις $d_1, d_2, \dots, d_i$,

$V_1, V_2, \dots, V_i$ είναι ο όγκος που επιστρώθηκε στην αντίστοιχη αραιώση $d_1, d_2, \dots, d_i$,

$d_1, d_2, \dots, d_i$ είναι η αραιώση από την οποία επιστρώθηκαν οι αντίστοιχοι όγκοι $V_1, V_2, \dots, V_i$ ($d=1$ για τη μηδενική αραιώση, $d=0,1$ για την αραιώση 10^{-1} κ.λ.π.).

➤ Πρώτες ύλες

Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα TSA. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 22 °C, στους 30 °C και στους 37 °C για διάστημα μέχρι 14 μέρες στο οποίο υπήρχε συνεχής παρακολούθηση της πορείας των καλλιεργειών και της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

➤ Αντιηλιακό

Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα TSA και το Lethen Agar το οποίο απενεργοποιεί τα συντηρητικά των αντιηλιακών. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37 °C για διάστημα μέχρι 14 μέρες στο οποίο υπήρχε συνεχής παρακολούθηση της πορείας των καλλιεργειών και της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

2.5.2. Προσδιορισμός του Πληθυσμού των Ολιγότροφων Βακτηρίων

➤ Νερό

Το νερό που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τόσο των καλλυντικών όσο και των υπόλοιπων προϊόντων της βιομηχανίας (π.χ. φάρμακα) αποτελεί ένα ολιγότροφο περιβάλλον επειδή είναι νερό έχει περάσει από μεμβράνες αντίστροφης όσμωσης, οπότε τα περισσότερα οργανικά και ανόργανα στοιχεία έχουν συγκρατηθεί στις μεμβράνες. Για το λόγο αυτό στη δειγματοληψία Ιουλίου 2010 δοκιμάστηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα $1/2$ NA, $1/10$ NA, $1/2$ R2A, $1/10$ R2A, Water Agar και Alpha Agar με σκοπό την απομόνωση ολιγότροφων μικροοργανισμών. Από αυτά επιλέχθηκε το Water Agar και χρησιμοποιήθηκε στη δειγματοληψία Φεβρουαρίου 2011.

Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 10 °C για 6 μήνες, στους 22 °C και στους 37 °C για 2 μήνες. Στις καλλιέργειες των 10 °C υπήρχε εβδομαδιαία παρακολούθηση της πορείας των καλλιεργειών και της ανάπτυξης των μικροοργανισμών ενώ στις καλλιέργειες των 22 °C και 37 °C ανά 48 ώρες.

Σε κάθε καλλιέργεια που περιείχε 30 - 300 αποικίες περίπου, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των αποικιών και μακροσκοπική παρατήρηση των μικροοργανισμών με στόχο την ομαδοποίηση των μικροβιακών αποικιών. Από κάθε πληθυσμιακή ομάδα μικροοργανισμών, σε καθένα από τα θρεπτικά υποστρώματα συλλέχθηκε το 25 % των αποικιών και οι μεμονωμένες αποικίες καλλιεργήθηκαν σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα $1/10$ NA με σκοπό την απόκτηση καθαρής καλλιέργειας για διατήρηση του στελέχους σε διάλυμα γλυκερόλης και για την περαιτέρω μοριακή ανάλυση του.

2.5.3. Ανίχνευση και Απομόνωση του Πληθυσμού Ζυμών και Μυκήτων

Χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα MEA και CzA για την απομόνωση ζυμών και νηματοειδών μυκήτων αντίστοιχα από τα δείγματα νερού, πρώτων υλών και αντιηλιακού. Στα θρεπτικά προστέθηκε αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη για την παρεμπόδιση ανάπτυξης βακτηριών. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν στους 10 °C για 3 μήνες (για το νερό μόνο) και στους 22 °C, 30 °C (για πρώτες ύλες μόνο) και 37 °C για 14 ημέρες. Στις καλλιέργειες των 22 °C, 30 °C και 37 °C, ανά 24 ώρες υπήρχε συνεχής παρακολούθηση της πορείας των καλλιεργειών και της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Επίσης στις καλλιέργειες εμπλουτισμού χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα θρεπτικά χωρίς άγαρ (MEB και CzB) και στη συνέχεια επιστρώθηκαν στα αντίστοιχα στερεά υποστρώματα.

Ειδικότερα για τα δείγματα του νερού πρέπει να σημειωθεί ότι η ανίχνευση ζυμών και νηματοειδών μυκήτων έγινε μόνο στα δείγματα που διηθήθηκαν μέσω μεμβρανών με διάμετρο πόρων 0,2 μm και όχι σε αυτά που διηθήθηκαν μέσω μεμβρανών με διάμετρο πόρων 0,1 μm επειδή τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι μεγαλύτερα από 0,2 μm οπότε ένα δείγμα που Περιείχε τέτοια κύτταρα, αυτά θα ανευρίσκονται στη μεμβράνη των 0,2 μm.

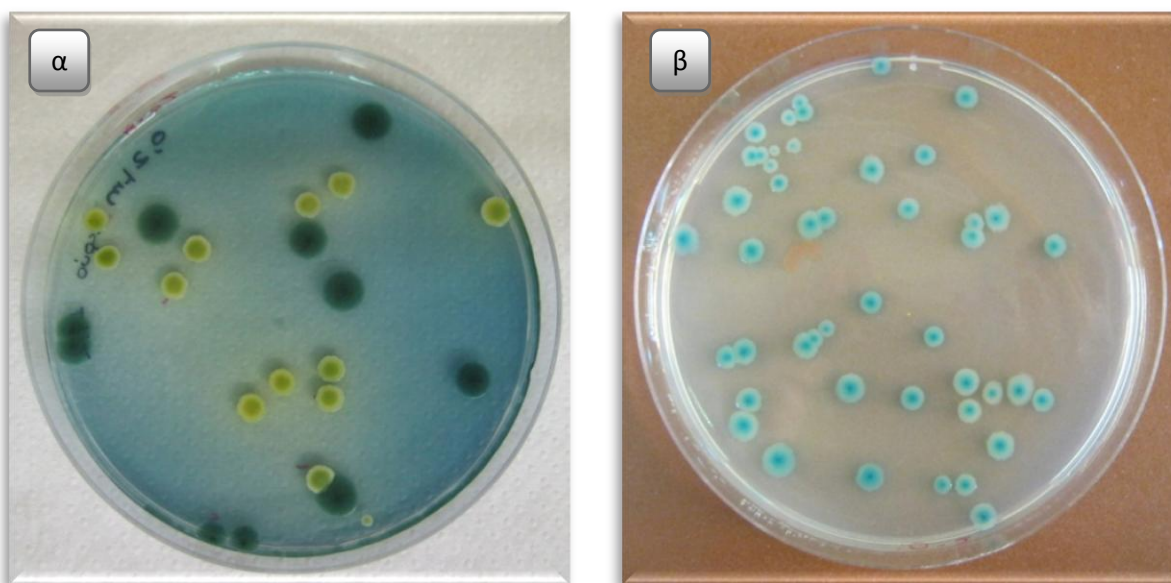
2.5.4. Ανίχνευση και Απομόνωση Ολικών Κολίμορφων Βακτηρίων και της *E. coli*

Αρχή λειτουργίας

Το Tergitol 7 Agar αποτελεί εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για την ανίχνευση κολίμορφων βακτηρίων. Επιτρέπει την ανάπτυξη των κολίμορφων βακτηρίων αναστέλλοντας παράλληλα τόσο την ανάπτυξη των αρνητικών κατά Gram που δημιουργούν ενδοσπόρια όσο και των θετικών κατά Gram μικροοργανισμών. Η διαγνωστική ικανότητα του θρεπτικού αυτού οφείλεται στον καταβολισμό της λακτόζης, ο οποίος επιφέρει μεταβολή της τιμής του pH προκαλώντας χρωματική αλλαγή στον δείκτη Bromothymol Blue. Τα ολικά κολίμορφα εμφανίζονται ως αποικίες κίτρινου χρώματος στην επιφάνεια του εκλεκτικού υποστρώματος (Εικόνα 2.8 α).

Προκειμένου να ανιχνευθεί η παρουσία του βακτηρίου *E. coli* χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Chromocult TBX. Στην περίπτωση αυτή η παρουσία του ενζύμου β-D-

γλυκουρονιδάση διαφοροποιεί τα βακτήρια *E. coli* spp. από τα υπόλοιπα κολίμορφα. Το βακτήριο *E. coli* απορροφά το χρωμογόνο υπόστρωμα 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X- β -D-glucuronide) και το ένζυμο β -γλυκουρονιδάση διασπά το δεσμό μεταξύ του χρωμοφόρου 5-bromo-4-chloro-3-indolyle- και του β -D-glucuronide. Το αποτέλεσμα είναι οι αποικίες της *E. coli* να βάφονται κυανές (Εικόνα 2.8 β). Η ανάπτυξη των θετικών κατά Gram οργανισμών αναστέλλεται με τη χρήση των χολικών αλάτων και την υψηλή θερμοκρασία επώασης (44 °C) (Merck, 2011).



Εικόνα 2.8: α) Αποικίες πιθανών κολίμορφων (κίτρινες) όπως φαίνονται στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Tergitol-7. β) Αποικίες *E. coli* (κυανές) όπως φαίνονται στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TBX (προσωπικό αρχείο).

➤ Νερό (ISO 9308 2000)

Όγκος 100 ml και 200 ml διηθήθηκε διαμέσου μεμβρανών (0,45 μ m) οι οποίοι στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια του εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος Tergitol-7 και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 37 °C. Οι αποικίες που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα (κίτρινες αποικίες) ανακαλλιεργήθηκαν σε NA και ακολούθησαν βιοχημικές δοκιμές οξειδάσης. Οι αποικίες που είναι αρνητικές στη δοκιμασία της οξειδάσης θεωρούνται πιθανές ως ολικά κολίμορφα και πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω μοριακά.

Όγκος 100 ml διηθήθηκε διαμέσου μεμβρανών (0,45 µm) οι οποίοι στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια του εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος TBX και ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 44 °C. Οι αποικίες που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα (κυανές αποικίες) ανακαλλιεργήθηκαν σε NA και ακολούθησαν βιοχημικές δοκιμές οξειδάσης και ινδόλης. Οι αποικίες που ήταν αρνητικές στη δοκιμασία της οξειδάσης και θετικές στην ινδόλη θεωρούνται πιθανώς ως *E. coli* και μελετήθηκαν περαιτέρω μοριακά.

➤ Αντιηλιακό

Η ανίχνευση και απομόνωση ολικών κολίμορφων βακτηρίων και της *E. coli* πραγματοποιήθηκε α) για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου σε αντιηλιακά έπειτα από καθορισμένη χρήση συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων μικροοργανισμών και β) για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των συντηρητικών του αντιηλιακού έπειτα από στοχευμένη επιμόλυνση με γνωστό εμβόλιο που περιείχε *E. coli* (§2.2.3). Στην πρώτη περίπτωση ακολούθηθηκε το πρωτόκολλο όπως αναφέρεται παραπάνω ενώ στη δεύτερη περίπτωση έγινε απλή καταμέτρηση των κυανών αποικιών στο θρεπτικό υπόστρωμα TBX για υπολογισμό των βιώσιμων μονάδων.

2.5.5. Ανίχνευση και Απομόνωση Μικροοργανισμών του γένους *Salmonella* sp.

Η ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella* sp. στο νερό και στο αντιηλιακό πραγματοποιείται συνολικά σε τέσσερα στάδια (ISO 6340 1995). Στα δείγματα της εργασίας αυτής εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο μέχρι το 2^ο στάδιο (Στάδιο εμπλουτισμού) το οποίο ήταν αρνητικό. Τα υπόλοιπα στάδια, όπως περιγράφονται στο ISO 6340, δεν πραγματοποιήθηκαν.

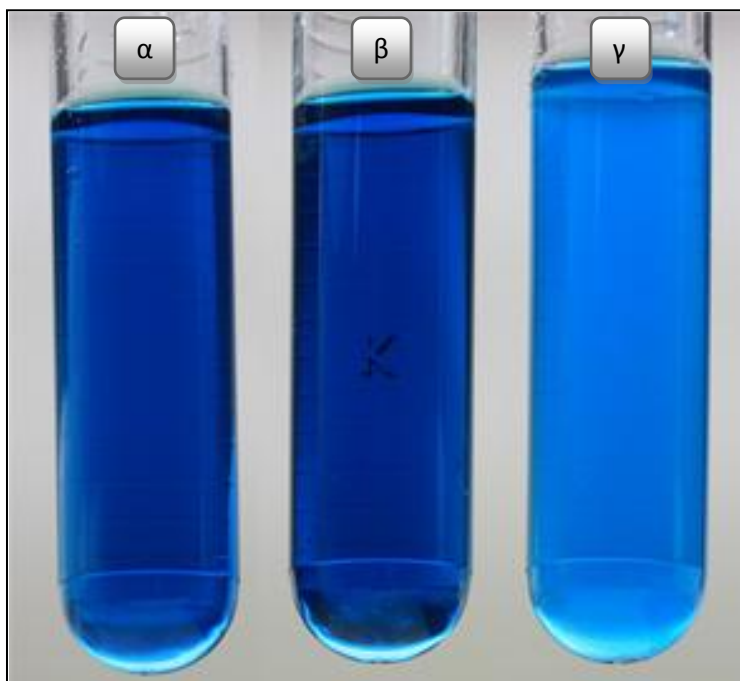
1^ο στάδιο – Προεμπλουτισμός δείγματος

Το στάδιο του προεμπλουτισμού ήταν απαραίτητο ώστε να αναπτυχθούν ακόμη και τα κύτταρα που υπέστησαν κάποιου τύπου «κακοποίηση» στο υδάτινο περιβάλλον ή κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Αρχικά έγινε διήθηση δείγματος όγκου 5 λίτρων σε μία μεμβράνη με διάμετρο πόρων 0,45 µm. Η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε κωνική φιάλη που περιείχε 50 ml Buffered Peptone Water. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 36 °C ± 2 °C για 16 - 20 ώρες.

Όσον αφορά στην ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella* sp. στα δείγματα αντιηλιακού έπειτα από χρήση, ποσότητα δείγματος αναδιαλύθηκε σε 50 ml Buffered Peptone Water και ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική πορεία όπως με το νερό.

2^ο στάδιο – Εμπλουτισμός δείγματος

Κατά το στάδιο του εμπλουτισμού έγινε προσπάθεια επαγωγής της αύξησης ώστε να αυξηθεί η αναλογία των κυττάρων σαλμονέλας σε σχέση με τον υπόλοιπο μικροβιακό πληθυσμό, μέσω ανακαλλιέργειας σε εκλεκτικό ζωμό Rappaport- Vassiliadis R10 Broth ή Selenite Cystine Enrichment Broth. Η επώαση σε υψηλή θερμοκρασία ($42^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) προωθεί την αύξηση των βακτηρίων του γένους *Salmonella*. Για το σκοπό αυτό, ποσότητες από την καλλιέργεια προεμπλουτισμού ίσες με 0,1 και 1 ml μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 ml των παραπάνω εκλεκτικών ζωμών αντίστοιχα και οι σωλήνες επώαστηκαν στους $42^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ για 18 - 24 ώρες και στους $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ για 24 ώρες αντίστοιχα. Αποχρωματισμός του θρεπτικού ζωμού αποτελεί ένδειξη παρουσίας βακτηρίων του γένους *Salmonella* (Εικόνα 2.9).



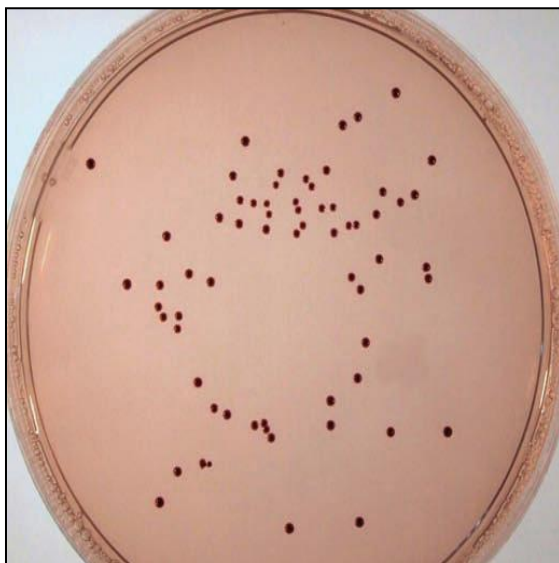
Εικόνα 2.9: Στάδιο προεμπλουτισμού για την ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella* sp. στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Rappaport - Vassiliadis R10 Broth. α) σωλήνας εμβολιασμένος με *E.coli*, δε παρατηρείται αποχρωματισμός καθώς δεν αναπτύσσει ο μικροοργανισμός, β) αρνητικός μάρτυρας (θρεπτικό όχι εμβολιασμένο με μικροοργανισμό), γ) σωλήνας εμβολιασμένος με *Salmonella* sp., παρατηρείται αποχρωματισμός καθώς αναπτύσσει ο μικροοργανισμός (www.oxid.com).

2.5.6. Ανίχνευση και Απομόνωση Εντεροκόκκων (ISO 7899 2000)

Αρχή λειτουργίας

Η εκλεκτικότητα του Membrane filter Enterococcus Selective Άγαρ (Slannetz & Bartley) οφείλεται στο αζίδιο του νατρίου, το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη των Gram αρνητικών μικροοργανισμών και στη χρωστική TTC, η οποία ανάγεται σε κόκκινο της φορμαζάνης από τον εντερόκοκκο. Στο θρεπτικό υλικό επιβεβαίωσης (Esculine Bile Άγαρ) ο εντερόκοκκος αναπτύσσεται υδρολύοντας την εσκουλίνη. Το τελικό προϊόν 6,7 διυδροξυκουμαρίνη αντιδρά με τα ιόντα του τρισθενούς σιδήρου και παράγεται μια ουσία χρώματος καφέ έως μαύρο, η οποία διαχέεται στο υλικό. Τυπικά θετικές αποικίες στο Membrane filter Enterococcus Selective Άγαρ μετά από επώαση στους 37 °C για 44 ± 4 ώρες, είναι οι αποικίες που έχουν κόκκινο, καφέ ή ροζ χρώμα στο κέντρο ή σε ολόκληρη των επιφάνεια της αποικίας (Εικόνα 2.10).

Στα δείγματα της παρούσης εργασίας δε πραγματοποιήθηκαν τα επόμενα βήματα όπως περιγράφονται στο ISO 7899 (δηλαδή το στάδιο της επιβεβαίωσης στο Esculine Bile Άγαρ) καθώς δεν αναπτύχθηκαν αποικίες στο πρώτο θρεπτικό υπόστρωμα (Slannetz & Bartley). Η ανίχνευση εντεροκόκκων πραγματοποιήθηκε στο νερό και στο αντιηλιακό (για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου σε αντιηλιακά έπειτα από καθορισμένη χρήση). Στο νερό όγκος 100 ml διηθήθηκε διαμέσου μεμβρανών (0,45 μm).

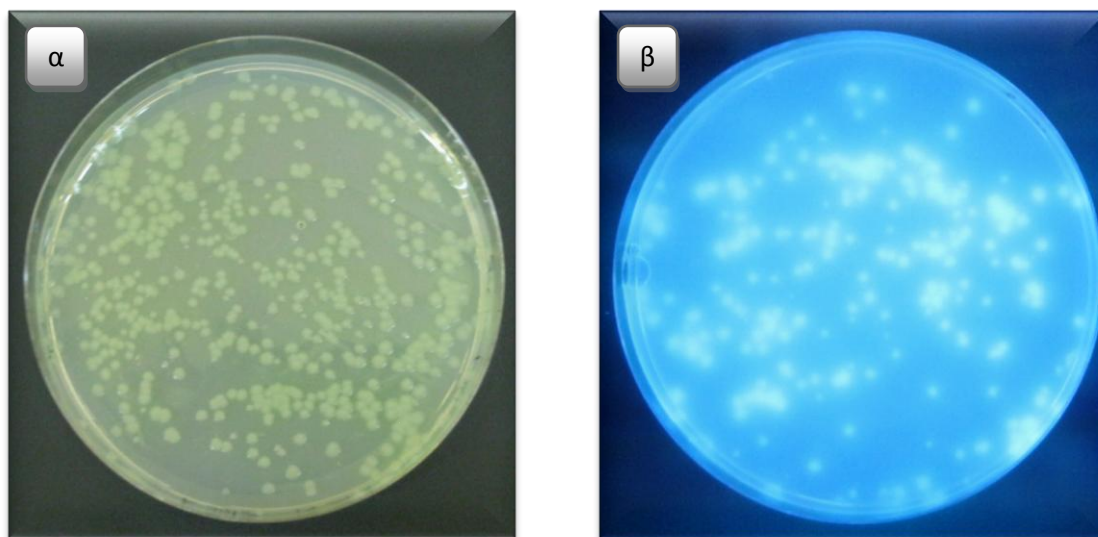


Εικόνα 2.10: Θετικές αποικίες εντεροκόκκων στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Membrane filter Enterococcus Selective Άγαρ (Slannetz & Bartley) (προσωπικό αρχείο).

2.5.7. Ανίχνευση και Απομόνωση *Pseudomonas aeruginosa*

Αρχή λειτουργίας

Το θρεπτικό Cetrimide Agar (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008) χρησιμοποιήθηκε για την εκλεκτική απομόνωση του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*. Τα στελέχη του μικροοργανισμού αυτού αναγνωρίζονται μέσα στο δείγμα από την παραγωγή της πυοκυανίνης, μια μπλε, υδατοδιαλυτή, μη φθορίζουσα χρωστική. Το βακτήριο *P. aeruginosa* είναι το μόνο είδος του γένους *Pseudomonas* που είναι γνωστό ότι εκκρίνει τη χρωστική αυτή. Η παραγωγή της πυοκυανίνης επάγεται από το χλωριούχο μαγνήσιο και το θειικό νάτριο που περιέχονται στο θρεπτικό υλικό. Το κιτραμίδιο αναστέλλει την ανάπτυξη ενός μεγάλου αριθμού βακτηριακών ειδών, συμπεριλαμβανομένων και ειδών του γένους *Pseudomonas* εκτός από την *Pseudomonas aeruginosa*. Οι αποικίες με κίτρινο-πράσινο χρώμα που περιβάλλονται από πράσινο-κυανή χρωστική και φθορίζουν σε υπεριώδη ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος (254 nm) μπορούν να ταυτοποιηθούν ως *Pseudomonas aeruginosa* (Εικόνα 2.11). Παρόλα αυτά μερικά στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* μπορεί να μην παράγουν τη χρωστική αυτή και συνεπώς χρειάζονται επιπλέον βιοχημικές δοκιμές για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος. Επίσης ορισμένα είδη *Pseudomonas* δεν παράγουν πυοκυανίνη αλλά φθορίζουν κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Τυπικά θετικές αποικίες για *Pseudomonas aeruginosa* πρέπει να ελέγχονται περαιτέρω μοριακά.



Εικόνα 2.11: Αποικίες *Pseudomonas aeruginosa* στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Cetrimide Agar α) σε φυσικό φωτισμό και β) κάτω από υπεριώδη ακτινβολία (προσωπικό αρχείο).

Η ανίχνευση του *Pseudomonas aeruginosa* πραγματοποιήθηκε στο νερό και όγκος 100 ml διηθήθηκε μέσω μεμβρανών με διάμετρο πόρων 0,45 μm, οι οποίοι στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια του εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 48 ώρες. Στις αποικίες που είχαν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά έγιναν βιοχημικές δοκιμές οξειδάσης και καταλάσης, καθώς και χρώση κατά Gram προκειμένου να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα. Το *Pseudomonas aeruginosa* είναι Gram αρνητικό βακτήριο, θετικό στη δοκιμασία οξειδάσης και καταλάσης.

Επίσης η ανίχνευση του *Pseudomonas aeruginosa* πραγματοποιήθηκε και στο αντιηλιακό α) για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου σε αντιηλιακά έπειτα από καθορισμένη χρήση και β) για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των συντηρητικών του αντιηλιακού έπειτα από στοχευμένη επιμόλυνση με γνωστό εμβόλιο. Στην πρώτη περίπτωση ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο όπως αναφέρεται παραπάνω ενώ στη δεύτερη περίπτωση έγινε απλή καταμέτρηση των αποικιών στο θρεπτικό υπόστρωμα Cetrimide για υπολογισμό των βιώσιμων μονάδων.

2.5.8. Ανίχνευση και Απομόνωση *Staphylococcus* sp.

Αρχή λειτουργίας

Το θρεπτικό Baird and Parker Agar Base (European Pharmacopoeia 6th Edition 2008) με προσθήκη γαλακτώματος κρόκου αυγού και τελλουρίτη (Egg Yolk Tellurite Emulsion) χρησιμοποιήθηκε ως εκλεκτικό και διαγνωστικό θρεπτικό υπόστρωμα για την απομόνωση του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* αλλά και άλλων ειδών του γένους *Staphylococcus* sp. καθώς επιτρέπει την καλή διαφοροποίηση των θετικών στη συγκόλληση (coagulase-positive) στελεχών. Θετικός στη δοκιμασία συγκόλλησης είναι ο *Staphylococcus aureus*.

Η υψηλή συγκέντρωση λιθίου και γλυκίνης καταστέλλουν την ανάπτυξη των υπόλοιπων βακτηρίων, ενώ ταυτόχρονα το πυροσταφυλικό νάτριο ενισχύει την ανάπτυξη των σταφυλοκόκκων. Η παρουσία τελλουρίτη και κρόκου αυγού, τα όποια προστίθενται μετά την αποστείρωση, επιτρέπει το διαχωρισμό των πιθανών παθογόνων σταφυλοκόκκων. Υπάρχει υψηλός βαθμός συσχέτισης μεταξύ της δοκιμασίας συγκόλλησης και την παρουσίας καθαρών ζωνών λιπόλυσης στο θρεπτικό, οι οποίες οφείλονται στην ενεργότητα λεκιθινάσης των σταφυλοκόκκων. Σχεδόν το 100 % των θετικών στη συγκόλληση σταφυλοκόκκων μπορούν να

ανάγουν τον τελλουρίτη και να παράγουν μαύρες αποικίες ενώ οι υπόλοιποι σταφυλόκοκκοι (όχι θετικοί στη συγκόλληση) δεν μπορούν να το κάνουν αυτό.

Η ανίχνευση του *Staphylococcus aureus* πραγματοποιήθηκε στο νερό και στο αντιηλιακό (για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου σε αντιηλιακά έπειτα από καθορισμένη χρήση). Για το νερό, όγκος 100 ml διηθήθηκε μέσω μεμβρανών με διάμετρο πόρων 0,45 μm, οι οποίοι στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια του εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος. Για το αντιηλιακό, 100 μl διαλυμένου δείγματος (1g/10 ml) επιστρώθηκε στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 24 ώρες.

Τυπικά θετικές αποικίες (που ταυτοποιούνται ως *Staphylococcus aureus*, θετικός στη συγκόλληση), είναι μαύρες, γυαλιστερές, κυρτές, με ομαλό περίγραμμα και περιβάλλονται από καθαρές ζώνες λιπόλυσης διαμέτρου 2 - 5 mm (Εικόνα 2.12). Στις θετικές αποικίες πραγματοποιούνται βιοχημικές δοκιμασίες. Ο *Staphylococcus aureus* είναι Gram θετικός κόκκος, θετικός στη δοκιμασία καταλάσης και αρνητικός στη δοκιμασία οξειδάσης. Επίσης δοκιμάστηκαν τα εκλεκτικά και διαγνωστικά υποστρώματα για σταφυλοκόκκους, Mannitol Salt Άγαρ και *Staphylococcus* Medium 110, τα οποία δεν επιλέχθηκαν για μετέπειτα χρήση.

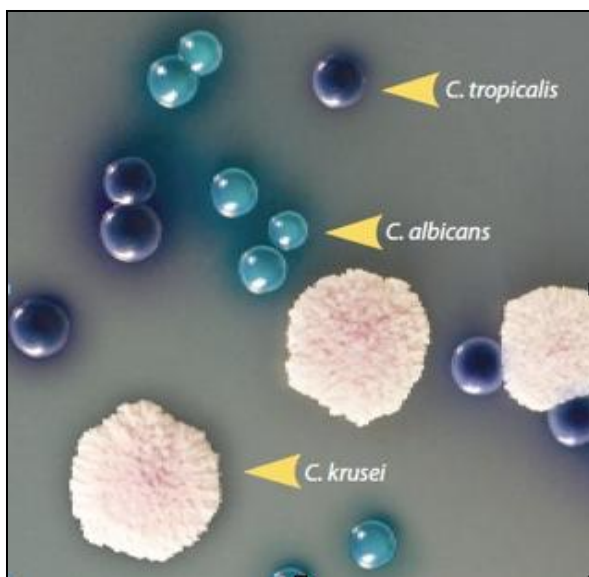


Εικόνα 2.12: Αποικίες *Staphylococcus aureus* στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Baird and Parker. Με βέλος επισημαίνεται η ζώνη λιπόλυσης που προκαλείται (<https://www.msu.edu>).

2.5.9. Ανίχνευση και Απομόνωση *Candida albicans*

Αρχή λειτουργίας

Το θρεπτικό Candida Isolation Άγαρ χρησιμοποιήθηκε ως εκλεκτικό για την ανίχνευση της *Candida albicans*. Το όξινο pH ευνοεί την ανάπτυξη των ζυμών και η χλωραμφενικόλη εμποδίζει την ανάπτυξη βακτηριών. Οι αποικίες χρώματος μπλε που κάνουν το θρεπτικό υπόστρωμα μπλε είναι πιθανές για *Candida albicans* (Εικόνα 2.13). Η ανίχνευση της *Candida albicans* πραγματοποιήθηκε στο νερό και στο αντιηλιακό (για την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου σε αντιηλιακά έπειτα από καθορισμένη χρήση).



Εικόνα 2.13: Αποικίες *Candida albicans* στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Candida Isolation Άγαρ (<http://ergastiriakos.gr>).

2.6. Βιοχημικές δοκιμασίες

Από τις καλλιέργειες που απομονώθηκαν από τα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα μελετήθηκαν περαιτέρω με μοριακές τεχνικές μόνο τα στελέχη των οποίων τα αποτελέσματα όλων των βιοχημικών δοκιμών υποδείκνυαν πως ανήκουν στην ομάδα μικροοργανισμών για την

οποία απομονώθηκαν. Επίσης τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα γενικά θρεπτικά υποστρώματα μελετήθηκαν ως προς τα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους.

2.6.1. Χρώση κατά Gram

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ταξινομήθηκαν σε ομάδες ανάλογα με τα αποτελέσματα της χρώσης Gram. Σύμφωνα με τη χρώση αυτή τα κύτταρα βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες και ιωδίο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός συμπλόκου κρυσταλλικού ιώδους-ιωδίου. Όταν ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο εκπλυθεί με αιθανόλη, αποσταθεροποιείται η εξωτερική του μεμβράνη και αυξάνεται η διαπερατότητά της. Έτσι, το σύμπλοκο της χρωστικής μπορεί να εκπλυθεί, αποχρωματίζοντας το αρνητικό κατά Gram βακτήριο (το οποίο στη συνέχεια χρωματίζεται ερυθρόχρωο από τη σαφρανίνη). Στα θετικά κατά Gram βακτήρια, η αιθανόλη προκαλεί τον σχηματισμό πόρων στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης, το οποίο συρρικνώνεται και εγκλωβίζει το σύμπλοκο κρυσταλλικού ιώδους-ιωδίου της χρωστικής εντός του κυττάρου (Καραγκούνη 1999). Η δοκιμασία της χρώσης Gram εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στο Βιβλίο Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας (Καραγκούνη 2001).

2.6.2. Καθορισμός της αντίδρασης Gram με τη εφαρμογή 3 % KOH

Σε ορισμένες περιπτώσεις η χρώση Gram, αποτυγχάνει να διαχωρίσει τα βακτήρια στις δύο βασικές κατηγορίες Gram θετικά και Gram αρνητικά και τα βακτήρια κατατάσσονται ως Gram μεταβλητά. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να προκληθεί όταν τα βακτήρια μεγαλώνουν γρήγορα σε πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα με αποτέλεσμα τα τοιχώματά τους να παραμένουν λεπτά και να μην ανταπεξέρχονται στην καταπόνηση κατά τη διαδικασία της χρώσης (Beveridge 2001). Πολλά είδη του γένους *Bacillus* είναι Gram μεταβλητά και διαθέτουν λεπτά τοιχώματα πεπτιδογλυκάνης και μία πρόσθετη στοιβάδα την λεγόμενη S-layer. Από τη φάση επώασης μέχρι και την αρχή της εκθετικής φάσης, η στιβάδα της πεπτιδογλυκάνης διατηρείται ενώ στη συνέχεια παρατηρείται συνεχής λέπτυνσή της. Στο τέλος της εκθετικής φάσης τα βακτήρια αυτά φαίνονται ως Gram αρνητικά (Beveridge 1990). Για τον καθορισμό των βακτηριών αυτών ως Gram θετικά ή αρνητικά, εφαρμόζεται μία μέθοδος κατά την οποία δεν πραγματοποιείται χρώση

των κυττάρων αλλά διάλυση τους σε KOH 3% w/v (Bucks 1982). Η μέθοδος βασίζεται στην αλκαλική λύση των κυττάρων. Το χαμηλό pH, προκαλεί στα Gram αρνητικά βακτήρια, λύση της κυτταρικής μεμβράνης και απελευθέρωση των κυτταρικών περιεχομένων με αποτέλεσμα το διάλυμα από ρευστό να γίνεται σαν πήκτωμα. Στα Gram θετικά βακτήρια δεν καταστρέφεται η μεμβράνη οπότε το διάλυμα παραμένει διαυγές και ρευστό.

Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες 24 h, μία σταγόνα 20 μ l τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Μικρό τμήμα της καλλιέργειας αναδιαλύθηκε για 60 sec στην σταγόνα του KOH 3%. Θετικό αποτέλεσμα σημειώνεται όταν η σταγόνα «πήζει» και όταν με απομάκρυνση του κρίκου εμβολιασμού προκληθεί μία ίνα (Εικόνα 2.14). Αρνητικό αποτέλεσμα σημειώνεται όταν το διάλυμα παραμένει ρευστό και διαυγές. Τα θετικά αποτελέσματα υποδηλώνουν Gram αρνητικά βακτήρια και τα αρνητικά αποτελέσματα Gram θετικά βακτήρια.



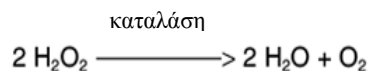
Εικόνα 2.14: Θετικό αποτέλεσμα από τη δοκιμασία διάλυμα KOH 3%

2.6.3. Ενεργότητα οξειδάσης

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ταξινομήθηκαν σε ομάδες ανάλογα με τα αποτελέσματα της δοκιμής για την ανίχνευση της παρουσίας ενεργότητας οξειδάσης σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των υπόλοιπων βιοχημικών δοκιμών. Η οξειδάση καθορίζει εάν ένας μικροοργανισμός είναι σε θέση να οξειδώσει κάποιες αρωματικές αμίνες (π.χ. ρ-αμινοδιμεθυλαμίνη) οπότε σχηματίζονται έγχρωμα προϊόντα. Η δοκιμασία εφαρμόστηκε ως εξής: με τον κρίκο εμβολιασμού μεταφέρθηκε μια αποικία του μικροοργανισμού από καλλιέργεια 24 ωρών στη λωρίδα που είναι εμποτισμένη με το αντιδραστήριο ρ-αμινοδιμεθυλαμίνη. Σε περίπτωση αλλαγής του χρώματος σε ιώδες – μπλε εντός 1 λεπτού, ο μικροοργανισμός θεωρείται θετικός στη δοκιμή ύπαρξης του ενζύμου οξειδάση (Καραγκούνη 2001).

2.6.4. Ενεργότητα καταλάσης

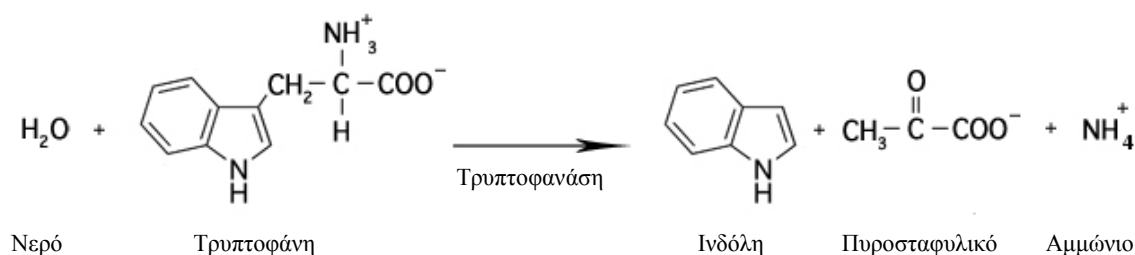
Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με σύγχρονη απελευθέρωση οξυγόνου.



Η παρουσία της δράσης του ενζύμου εκτιμάται απλά: πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα μεταφέρεται με τον κρίκο εμβολιασμού μια αποικία του μικροοργανισμού από καλλιέργεια 24 ωρών. Στη συνέχεια, πάνω στην ποσότητα των κυττάρων προσθέτονται μερικές σταγόνες διαλύματος H_2O_2 3 % (v/v). Εάν παρατηρηθεί δημιουργία φυσαλίδων, ο μικροοργανισμός είναι θετικός στη δοκιμή ύπαρξης του ενζύμου καταλάση (Καραγκούνη 2001).

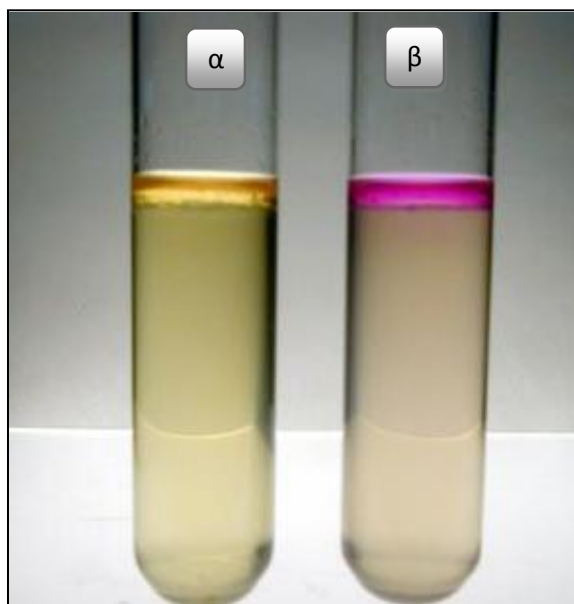
2.6.5. Δοκιμασία ινδόλης

Με τη δοκιμασία αυτή εκτιμάται η ύπαρξη του ενζύμου τρυπτοφανάση και η παραγωγή ινδόλης. Ορισμένα βακτήρια προκαλούν την απαμίνωση της τρυπτοφάνης με παραγωγή ινδόλης, πυροσταφυλικού οξέως και αμμωνίας. Η ινδόλη αντιδρά με το 4-dimethylaminobenzaldehyde και παράγεται μία κόκκινη χρωστική. Επειδή όμως και η τρυπτοφάνη αντιδρά με το 4-dimethylaminobenzaldehyde, πρέπει να υπάρχει διαχωρισμός της από την ινδόλη, το οποίο επιτυγχάνεται με την εκχύλιση της ινδόλης με βουτανόλη (MacWilliams, 2009, Merck, 2011)



Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε ως εξής: καθαρή καλλιέργεια του στελέχους αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό ζωμό τρυπτοφάνης ή πεπτόνης για 24 – 48 ώρες. Μετά την επώαση, 5 σταγόνες αντιδραστήριο Kovac's προστέθηκαν στην καλλιέργεια. Παρουσία κόκκινου-βιολετί χρώματος στην επιφάνεια της στιβάδας της αλκοόλης στο θρεπτικό υποδηλώνει θετικό αποτέλεσμα

(Εικόνα 2.15 β), κίτρινο χρώμα υποδηλώνει αρνητικό αποτέλεσμα (Εικόνα 2.15 α) και πορτοκαλί χρώμα υποδηλώνει παρουσία της ένωσης 3-methylindole, προϊόν αποδόμησης της τρυπτοφάνης.



Εικόνα 2.15: Αποτελέσματα δοκιμασίας ινδόλης. α) δείγμα αρνητικό στην ύπαρξη τρυπτοφάνης, β) δείγμα θετικό στην ύπαρξη τρυπτοφάνης, άρα στην ινδόλη. (<http://people.uleth.ca>)

2.6.6. Σχηματισμός ενδοσπορίων - θερμικό σοκ

Με τη δοκιμασία αυτή εκτιμάται η ικανότητα ορισμένων μικροοργανισμών να σχηματίζουν ανθεκτικές μορφές κυττάρων οι οποίες μπορούν να επιβιώνουν κάτω από δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος. Με τη δοκιμή του «θερμικού σοκ» γίνεται εκτίμηση του σχηματισμού ενδοσπορίων από τα βακτήρια. Η διαδικασία έχει ως εξής: 5 ml υγρής καλλιέργειας του βακτηρίου τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 80 °C για 15 λεπτά. Κάτω από αυτές τις συνθήκες όλα τα βλαστητικά κύτταρα καταστρέφονται, ενώ τα ενδοσπόρια επιβιώνουν. Σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα γίνεται εμβολιασμός με μία σταγόνα από κάθε καλλιέργεια που τοποθετήθηκε στους 80 °C και εν συνεχεία ακολουθεί επώαση στους 30 °C για 24 ώρες. Σχηματισμός αποικιών υποδηλώνει τον σχηματισμό ενδοσπορίων. (Καραγκούνη 2001).

2.7. Απομόνωση Νουκλεϊκών Οξέων (DNA)

Η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από καθαρές καλλιέργειες βακτηριών πραγματοποιήθηκε κυρίως με ένα πρωτόκολλο ενζυμικής και χημικής λύσης (§2.7.1.) ενώ από καθαρές καλλιέργειες μυκήτων εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα χημικής λύσης (§2.7.4.). Η καταβύθιση και ο καθαρισμός του DNA σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε με ισοπροπανόλη και αιθανόλη αντίστοιχα. Για την απομόνωση ολικού DNA από τα δείγματα εφαρμόστηκαν πρωτόκολλα βασισμένα στη χρήση KIT εμπορίου και στην απομόνωση με CTAB.

2.7.1. Απομόνωση Ολικού DNA από Καθαρή Καλλιέργεια Βακτηρίων

Η απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίου πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε από τους Haught και συν. (1994). Είναι ένα πρωτόκολλο ενζυμικής και χημικής λύσης των κυττάρων. Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με SDS και οξικό κάλιο, η καταβύθιση του DNA με ισοπροπανόλη και ο καθαρισμός του με αιθανόλη (Roose-Amsaleg και συν. 2001). Σημειώνεται ότι με το πρωτόκολλο αυτό υπάρχει ταυτόχρονη απομόνωση και RNA, το οποίο όμως δεν εντοπίζεται σε μεγάλες ποσότητες και δεν επηρεάζει την περαιτέρω μοριακή ανάλυση του δείγματος.

Η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Αρχικά τα κύτταρα συλλέχθηκαν από στερεή καλλιέργεια 24 ωρών και μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο εμβολιασμού σε φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου erpendorf που περιείχαν 500 μl διαλύματος αλάτων $\frac{1}{4}$ Ringer. Ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν σε 13000 rpm για 10 min. Στο ίζημα έγινε προσθήκη 500 μl διαλύματος λύσης (Lysis Buffer) και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 37 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 125 μl διαλύματος SDS 10 % ($^{w/v}$) και το μίγμα επώαστηκε στους 65 °C για 20 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 216 μl διαλύματος οξικού καλίου 5 M και επώαση στους 4 °C (πάγος) για 45 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν σε 13000 rpm για 10 min και έγινε μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρούς σωλήνες (το στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε δύο φορές). Ακολούθησε καταβύθιση του DNA με ισοπροπανόλη με όγκο ίσο με το 80 % του υπερκειμένου ($\approx$ 650 μl) για 15 min σε θερμοκρασία

δωματίου και φυγοκέντρωση για 20 min στις 13000 rpm. Ακολούθησε ο καθαρισμός του ιζήματος (DNA) με 500 μl διάλυμα αιθανόλης 70 % (v/v) στους 4 °C και φυγοκέντρωση σε 13000 rpm για 10 min (το στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε δύο φορές). Το ίζημα ξηράνθηκε στους 60 °C για 30 - 45 min και αναδιαλύθηκε σε 100 μl νερό προς έγχυση. Το DNA διατηρήθηκε στους - 20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στις μοριακές αναλύσεις.

2.7.2. Απομόνωση Ολικού DNA με CTAB

Το πρωτόκολλο αυτό εφαρμόστηκε στις πρώτες ύλες Kobo, Tinosorb και στους νηματοειδείς μύκητες.

Η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Αρχικά δείγμα βάρους 100 mg τοποθετήθηκε σε σωλήνες τύπου eppendorf 1,5 ml. Ακολούθησε 500 μl διαλύματος εκχύλισης CTAB και καλή ανάμιξη. Στη συνέχεια, τα δείγματα επώαστηκαν στους 65 °C για 1 h και ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 13000 rpm. Πραγματοποιήθηκε μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα και προσθήκη 200 μl χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1) με ανάμιξη για 30 s μέχρι να δημιουργηθεί ένα γαλάκτωμα. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 10 min και μεταφορά της υδατικής φάσης (άνω φάση) σε νέο σωλήνα (≈ 250 μl). Στην υδατική φάση έγινε προσθήκη 2 όγκων (≈500 μl) διαλύματος CTAB precipitation και καλή ανάμιξη. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 60 min που τερματίστηκε με φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο απορρίφτηκε και το ίζημα αναδιαλύθηκε σε 350 μl NaCl 1.2 M, με ανάδευση και επώαση στους 65 °C για 10 min. 350 μl χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1) προστέθηκαν και πραγματοποιήθηκε ανάμιξη 30 s. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρωση στις 13000 rpm για 10 min και μεταφορά της υδατικής φάσης (άνω φάση) σε νέο σωλήνα. Ακολούθησε καταβύθιση του DNA με ισοπροπανόλη με όγκο ίσο με το 80 % του υπερκειμένου για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 10 min στις 13000 rpm. Ακολούθησε ο καθαρισμός του ιζήματος (DNA) με 500 μl διάλυμα αιθανόλης 70 % (v/v) και φυγοκέντρωση σε 13000 rpm για 10 min (το στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε δύο φορές). Το ίζημα ξηράνθηκε στους 60 °C για 30 - 45 min και αναδιαλύθηκε σε 100 μl νερό προς έγχυση. Το DNA διατηρήθηκε στους - 20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στις μοριακές αναλύσεις.

2.7.3. Απομόνωση Ολικού DNA με CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) και προκατεργασία με n-hexane

Το πρωτόκολλο αυτό εφαρμόστηκε στις πρώτες ύλες λιπαρής σύστασης και σε δείγματα αντιηλιακού (Busconi, και συν. 2003).

Η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Αρχικά δείγμα βάρους 2 g τοποθετήθηκε σε σωλήνες τύπου Falcon 50 ml. Ακολούθησε προσθήκη 10 ml n-Hexane, 1 ml διάλυμα εκχύλισης CTAB και καλή ανάμιξη. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 min στα 4000 rpm για να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (οργανική και υδατική). Στην περίπτωση που οι δύο φάσεις δε διαχωρίστηκαν έγινε προσθήκη 500 μl διαλύματος εκχύλισης CTAB, ανάμιξη και φυγοκέντρωση. Στη συνέχεια, η υδατική φάση και η ενδιάμεση φάση (τουλάχιστον 500 μl) μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου erpendorf (2 ml) και έγινε προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και ανάμιξη. Ακολούθησε φυγοκέντρωση 10 min στα 13000 rpm, μεταφορά της πάνω υδατικής φάσης και προσθήκη 2 μl γλυκογόνου. Ακολούθησε καταβύθιση του DNA με ισοπροπανόλη με όγκο ίσο με το 80 % του υπερκειμένου για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 10 min στις 13000 rpm. Ακολούθησε ο καθαρισμός του ιζήματος (DNA) με 500 μl διάλυμα αιθανόλης 70 % (v/v) και φυγοκέντρωση σε 13000 rpm για 10 min (το στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε δύο φορές). Το ίζημα ξηράνθηκε στους 60 °C για 30 - 45 min και αναδιαλύθηκε σε 100 μl νερό προς έγχυση. Το DNA διατηρήθηκε στους - 20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στις μοριακές αναλύσεις.

2.7.4. Απομόνωση Ολικού DNA από καθαρή καλλιέργεια νηματοειδών μυκήτων

Η απομόνωση ολικού DNA από νηματοειδείς μύκητες, πραγματοποιήθηκε με 3 πρωτόκολλα που διαφοροποιούνται από τα συνήθως χρησιμοποιούμενα στο ότι δεν περιείχαν το στάδιο της μηχανικής θραύσης του τοιχώματος των μυκήτων παρουσία αζώτου. Επιπλέον οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε σωλήνες τύπου erpendorf των 1,5 ml και όχι σε κωνικές φιάλες των 100 ml. Και τα τρία πρωτόκολλα λειτούργησαν, παρ' όλα αυτά η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε είναι πολύ μικρή και μπορεί να έχει εφαρμογές μόνο σε τεχνικές που απαιτούν

μικροποσότητες όπως για παράδειγμα η PCR. Το πρώτο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε ήταν η μέθοδος του CTAB (§2.7.3.) (Jin, και συν. 2004), το δεύτερο και τρίτο πρωτόκολλο ήταν βασισμένα στο πρωτόκολλο απομόνωσης DNA από ζύμες και διαφοροποιούνται μόνο στη διάρκεια επώασης στους 65 °C και στο διάλυμα λύσης (Abd-Elsalam, και συν. 2003).

Αναλυτικά η πορεία που ακολουθήθηκε στο 2^ο και 3^ο πρωτόκολλο ήταν η εξής:

Το μυκήλιο συλλέχθηκε από υγρή καλλιέργεια 24 ωρών και φυγοκεντρήθηκε σε 13000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε προσεκτικά και τα μυκήλια διατηρήθηκαν στους - 20 °C μέχρι να γίνει η απομόνωση του DNA.

Στο μυκήλιο έγινε προσθήκη 500 μl διαλ/τος TE ή 500 μl διαλ/τος TEN και 500 μl SDS 10% και ακολούθησε. Ακολούθησε ανάδευση για επαναδιάλυση του μυκηλίου και επώαση του μίγματος στους 65 °C για 1 h. Ακολούθησε προσθήκη 216 μl διαλύματος οξικού καλίου 5 M και επώαση στους 4 °C (πάγος) για 45 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν σε 13000 rpm για 10 min και έγινε μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρούς σωλήνες (το στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε δύο φορές). Ακολούθησε καταβύθιση του DNA με ισοπροπανόλη με όγκο ίσο με το 80 % του υπερκειμένου ($\approx 720 \mu\text{l}$) για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρωση για 20 min στις 13000 rpm. Ακολούθησε ο καθαρισμός του ιζήματος (DNA) με 500 μl διάλυμα αιθανόλης 70 % (v/v) στους 4 °C και φυγοκέντρωση σε 13000 rpm για 10 min (το στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε δύο φορές). Το ίζημα ξηράθηκε στους 60 °C για 30 - 45 min και αναδιαλύθηκε σε 100 μl νερό προς έγχυση. Το DNA διατηρήθηκε στους - 20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί στις μοριακές αναλύσεις.

2.7.5. Απομόνωση Ολικού DNA από Καθαρή Καλλιέργεια Βακτηρίων με Triton X-100

Η απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίου πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε από τους Sambrook and Russell (2000). Το πρωτόκολλο αυτό εφαρμόστηκε δοκιμαστικά.

Η πορεία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Αρχικά τα κύτταρα συλλέχθηκαν από στερεή καλλιέργεια 24 ωρών και μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο εμβολιασμού σε φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου eppendorf που περιείχαν 500 μl διαλύματος αλάτων $\frac{1}{4}$ Ringer. Ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν σε 13000 rpm για 10 min.

Στο ίζημα έγινε προσθήκη 350 μl διαλύματος STET και 25 μl διαλύματος λυσοζύμης (10 mg/ml). Ακολούθησε ανάμιξη για 3 sec και επώαση για 40 sec στους 100 °C. Στη συνέχεια οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν σε 13000 rpm για 15 min και έγινε μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρούς σωλήνες. Ακολούθησε καταβύθιση των νουκλεϊκών οξέων με προσθήκη 40 μl διαλύματος οξικού νατρίου 3 M και 420 μl ισοπροπανόλης. Τα δείγματα επώαστηκαν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 min στις 13000 rpm και απόχυση του υπερκειμένου. Ακολούθησε ο καθαρισμός του ιζήματος (DNA) με 1 ml διάλυμα αιθανόλης 70 % (v/v) στους 4 °C. Το ίζημα ξηράνθηκε στους 60 °C για 30 min και αναδιαλύθηκε σε 50 μl νερό προς έγχυση με προσθήκη 1 μl RNase A. Ο αφρός που σχηματίζεται είναι το RNA που καταστρέφεται. Ακολούθησε επώαση στους 60 °C για 2 min και αποθήκευση του DNA στους -20 °C.

2.7.6. Απομόνωση Ολικού DNA με KIT εμπορίου

Εξαιτίας της περιπλοκότητας των πρώτων υλών και της δυσκολίας ανίχνευσης και ανάκτησης μικροοργανισμών με τις κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές, χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα KIT απομόνωσης DNA για την ανάκτηση του ολικού DNA. Λόγω της ιδιαιτερότητας των πρώτων υλών χρησιμοποιήθηκαν θετικοί μάρτυρες ώστε να γνωρίζουμε εάν τυχόν παρεμποδίζεται η αντίδραση απομόνωσης λόγω της χημικής σύστασης της ένωσης. Δηλαδή, για κάθε πρώτη ύλη έγινε απομόνωση του ολικού DNA από το δείγμα αλλά και από δείγμα επιμολυσμένο με γνωστό εμβόλιο μικροοργανισμού.

Χρησιμοποιήθηκαν τα KIT Power Water DNA Isolation Kit, Ultra Soil DNA Isolation Kit, Ultra Plant DNA Isolation Kit. Ακολουθήθηκαν τα πρωτόκολλα όπως αναγράφονται στα εγχειρίδια του κατασκευαστή. Ο τελικός όγκος έκλουσης προσαρμόστηκε στα 100 μl . Τα απομονωμένα DNA διατηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν στις μοριακές αναλύσεις. Στην Εικόνα 2.16 φαίνεται η βασική μεθοδολογία των KIT που χρησιμοποιήθηκαν, η οποία περιλαμβάνει χημική και μηχανική λύση, απομάκρυνση παρεμποδιστών, πρόσδεση DNA στη στήλη, καθαρισμός του DNA και έκλουση του DNA από τη στήλη λόγω αλλαγής την ιοντικής ισχύος του ηθμού.



Εικόνα 2.16: Μεθοδολογία που ακολουθείται στα Κιτ εμπορίου που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ολικού DNA από τις πρώτες ύλες.

2.8. Εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) στη μοριακή ανάλυση των απομονωμένων μικροοργανισμών

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιήθηκε α) για τη μοριακή μελέτη των απομονωμένων στελεχών από τα γενικά θρεπτικά υποστρώματα και την ομαδοποίηση τους, β) για τη μοριακή επιβεβαίωση των θετικών αποικιών που απομονωθήκαν από τα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (Tergitol, TBX, Cetrimide) ως κολίμορφα βακτηρία, *E. coli* και *Pseudomonas aeruginosa* γ) την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου επιλεγμένων στελεχών για μοριακή ταυτοποίηση, δ) την ενίσχυση των 16S rRNA γονιδίων από ολικό γενωμικό DNA για ανάλυση με την τεχνική DGGE, ε) τη μοριακή διεύρυνση ύπαρξης μικροοργανισμών στις πρώτες ύλες και στο αντιηλιακό μέσω ενίσχυσης του 16S rRNA γονιδίου από ολικό γενωμικό DNA.

2.8.1. Μέθοδος αντίδρασης BOX - PCR

Ένας μεγάλος αριθμός επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (rep) εντοπίζεται σε πολλαπλές θέσεις στο γονιδίωμα πολλών βακτηρίων. Η λειτουργία των περισσότερων επαναλαμβανόμενων στοιχείων είναι άγνωστη, παρ' όλα αυτά αποτελούν ένα σημαντικό εργαλείο για την μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας. Κάθε στέλεχος διαθέτει αυτές τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες σε διαφορετικές θέσεις στο γονιδίωμά του. Η χρήση των παραπάνω αλληλουχιών ως εκκινήτων για την PCR αντίδραση και ολόκληρου του γονιδιώματος του εκάστοτε στελέχους ως μήτρα, δημιουργεί πολλαπλά προϊόντα διαφορετικού μεγέθους τα οποία όταν διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης, σχηματίζουν ένα μοτίβο (ραβδωτό κώδικα-αποτύπωμα) μοναδικό για το κάθε στέλεχος (Rademaker, και συν. 2008). Οι περισσότερες μελέτες που βασίζονται σε τεχνικές rep-PCR χρησιμοποιούν τις μικρές τρινουκλεοτιδικές αλληλουχίες (GTG)₅, την 35 - 40 bp REP αλληλουχία (Repetitive Extragenic Palindromic sequence), την 124 - 127 bp ERIC αλληλουχία (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) και το 154 bp BOX στοιχείο.

Στην παρούσα μελέτη, τα απομονωμένα στελέχη διαχωρίστηκαν σε ομάδες με τη μέθοδο της BOX - PCR και τη χρήση του εκκινήτη BOXA1R που προσδένεται στην A υπομονάδα της αλληλουχίας BOX (Versalovic, και συν. 1994).

Η αλληλουχία του ολιγονουκλεοτιδίου BOXA1R είναι η εξής: 5'-CTACGGCAAGGCGAC GCTGACG-3', με ποσοστό GC 68,2 % και $T_m = 65,6$ °C.

Η σύσταση του μείγματος της PCR που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 25 μl ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 3,75 mM $MgCl_2$, 22,5 pmol BOXA1R, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 5 % v/v DMSO (μπορεί να παραληφθεί ανάλογα με την Taq πολυμεράση), 1 – 1,25 Unit Taq πολυμεράση (Biotools England - Hytest Finland, αντίστοιχα), 1,75 - 2 μl (≈ 40 ng) γενωμικό DNA, νερό προς έγχυση μέχρι όγκο 25 μl (Πίνακας 2.5). Το πρόγραμμα της αντίδρασης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.5. Το αναμενόμενο αποτέλεσμα είναι ένα μίγμα ζωνών διαφορετικού μεγέθους μέχρι 6000 bp.

Πίνακας 2.5: Σύσταση μείγματος και πρόγραμμα της BOX-PCR

Τελική συγκέντρωση		BOX-PCR			
Reaction Buffer	1x	Αρχική αποδιάταξη	95 °C	7 min	
MgCl ₂	3,75 mM				
BOXA1R	0,90 mM	Αποδιάταξη	94 °C	1 min	
dNTPs	0,25 mM το καθένα	Πρόσδεση εκκινήτων	x 35 cycles	53 °C	1 min
DMSO	5 % % _v	Επιμήκυνση αλυσίδων		65 °C	8 min
Taq πολυμεράση	1 - 1,25 Units				
Γενωμικό DNA		Τελική επιμήκυνση	65 °C	16 min	
Water	μέχρι 25 μl	10 °C			

Ένα δεύτερο πρόγραμμα για την ίδια αντίδραση δοκιμάστηκε, το οποίο είχε ως εξής: 95 °C για 5 min, 35 κύκλοι του 1 min στους 94 °C, 1 min στους 53 °C και 3 min στους 72 °C. Η αντίδραση τερματίστηκε με ένα στάδιο 5 min στους 72 °C. Το πρόγραμμα δεν εφαρμόστηκε γενικευμένα επειδή η απόδοση της αντίδρασης για τα περιβαλλοντικά δείγματα ήταν μικρότερη του αρχικού προγράμματος. Η βασική διαφορά με το αρχικό πρόγραμμα είναι ότι τα προϊόντα έχουν μικρότερο μέγεθος (μέχρι 3000 βάσεις max) επειδή ο χρόνος σχηματισμού των νέων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων είναι μικρότερος και συνεπώς το πρότυπο είναι διαφορετικό.

2.8.2. Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηριών

Γεωμικό DNA από επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμήματος του τμήματος 8 - 1510 (αρίθμηση κατά *E. coli*) του 16S rDNA με τη βοήθεια των εκκινητικών μορίων pA (Edwards, και συν. 1989) και R1492 (Heuer, και συν. 1997).

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων είναι οι ακόλουθες: pA 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3', ποσοστό GC 50 %, $T_{m_{basic}} = 51,8^{\circ}\text{C}$ και R1492 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3', ποσοστό GC 43.2 % και $T_{m_{basic}} = 51,1 - 53^{\circ}\text{C}$.

Η σύσταση του μείγματος της PCR που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 50 μl ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 2,5 mM MgCl_2 , 20 pmoles pA, 20 pmoles R1492, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 4 % v/v DMSO (μπορεί να παραληφθεί), 1,25 Unit Taq πολυμεράση (Biotools England), 2,5 μl (≈ 50 ng) γεωμικό DNA, νερό προς έγχυση μέχρι όγκο 50 μl (Πίνακας 2.6).

Το πρόγραμμα της αντίδρασης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.6. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι 1484 βάσεις.

Πίνακας 2.6: Σύσταση μείγματος και πρόγραμμα της 16S PCR

Τελική συγκέντρωση		16S-PCR		
Reaction Buffer	1x	Αρχική αποδιάταξη	95 $^{\circ}\text{C}$	3 min
MgCl_2	2,5 mM			
pA - R1492	0,40 mM ο καθένας	Αποδιάταξη	94 $^{\circ}\text{C}$	30 sec
dNTPs	0,25 mM το καθένα	Πρόσδεση εκκινητών	x 35 cycles	56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min
DMSO	4 % v/v	Επιμήκυνση αλυσίδων		72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 sec
Taq πολυμεράση	1,25 Units			
Γεωμικό DNA		Τελική επιμήκυνση	72 $^{\circ}\text{C}$	5 min
Water	μέχρι 50 μl		10 $^{\circ}\text{C}$	

2.8.3. Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου για χρήση στην τεχνική DGGE

Γεωμικό ολικό DNA από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμήματος του τμήματος 984 - 1378 (αρίθμηση κατά *E. coli*) του 16S rDNA με τη βοήθεια των εκκινητικών μορίων F984GC και R1378 (Heuer, και συν. 1997).

Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων είναι οι ακόλουθες: F984GC 5'-CGCCCCGGGGCGC GCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-AACGCGAAGAACCTTAC-3', ποσοστό GC 82,5 %, T_m = 99,8 °C και R1378 5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3', ποσοστό GC 66,7 % και T_m = 68,4 °C. Ο εκκινητής F984GC έχει στο 5' άκρο του εάν GC άκρο 40 νουκλεοτιδίων ώστε κατά την ηλεκτροφόρηση σε κλίση αποδιατακτικού παράγοντα (DGGE) να μην αποδιαταχθεί πλήρως το δίκλωνο μόριο του DNA. Εξαιτίας αυτού του GC άκρου στον εκκινητή η αντίδραση PCR παρεμποδίζεται, καθώς πέραν ότι έχει υψηλό T_m, έχει και συμπληρωματικότητα μεταξύ των τμημάτων του. Για τον λόγο αυτό γίνεται προσθήκη DMSO ή ακεταμίδιο, για την παρεμπόδιση μη ειδικών συνδέσεων.

Η σύσταση του μείγματος της PCR που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 50 μl ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 20 pmoles F984GC, 20 pmoles R1378, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 4 % ^{v/v} DMSO, 1,25 Unit Taq πολυμεράση (Biotools England), 3-5 μl (≈20 ng) γενωμικό DNA, νερό προς έγχυση μέχρι όγκο 50 μl (Πίνακας 2.7). Το πρόγραμμα της αντίδρασης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.7. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι 434 βάσεις.

Πίνακας 2.7: Σύσταση μείγματος και πρόγραμμα της 16S PCR - DGGE

Τελική συγκέντρωση		16S-PCR DGGE			
Reaction Buffer	1x	Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min	
MgCl ₂	2,5 mM				
F984GC - R1378	0,40 mM ο καθένας	Αποδιάταξη	} x 35 cycles	95 °C	1 min
dNTPs	0,25 mM το καθένα	Πρόσδεση εκκινητών		53 °C	1 min
DMSO	4 % ^v / _v	Επιμήκυνση αλυσίδων		72 °C	1 min
Taq πολυμεράση	1,25 Units				
Γενωμικό DNA		Τελική επιμήκυνση	72 °C	5 min	
Water	μέχρι 50 μl		10 °C		

2.8.4. Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου με Fast Taq Πολυμεράση για χρήση στην τεχνική DGGE.

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές της παραγράφου 2.8.5. Η σύσταση του μείγματος της PCR που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 50 μ l ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 2,8 mM $MgCl_2$, 20 pmoles F984GC, 20 pmoles R1378, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 4 % v/v DMSO, 1 Unit Taq πολυμεράση (Kapa 2G Fast DNA polymerase), 3-5 μ l ($\approx$ 20 ng) γενωμικό DNA, νερό προς έγχυση μέχρι όγκο 50 μ l (Πίνακας 2.8).

Το πρόγραμμα της αντίδρασης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.8. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι 434 βάσεις.

Πίνακας 2.8: Σύσταση μείγματος και πρόγραμμα της 16S-PCR για DGGE με Kapa 2G Fast DNA Πολυμεράση

Τελική συγκέντρωση		16S-PCR DGGE (Fast Taq)		
Reaction Buffer	1x	Αρχική αποδιάταξη	95 °C	2 min
$MgCl_2$	2,8 mM			
F984GC - R1378	0,40 mM ο καθένας	Αποδιάταξη	95 °C	15 sec
dNTPs	0,25 mM το καθένα	Πρόσδεση εκκινητών	x 40 cycles	53 °C 15 sec
DMSO	4 % v/v	Επιμήκυνση αλυσίδων		72 °C 3 sec
Taq πολυμεράση	1 Unit			
Γενωμικό DNA		Τελική επιμήκυνση	72 °C	1 min
Water	μέχρι 50 μ l		10 °C	

2.8.5. Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου για χρήση στην τεχνική DGGE με ένθετη PCR

Παρατηρήθηκε ότι η ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου από ολικό γενωμικό DNA, στα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν ελαττωμένη λόγω του γεγονότος ότι τα δείγματα είχαν χαμηλό μικροβιακό φορτίο άρα και DNA. Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκε ένθετη (nested) PCR με πρώτο ζεύγος εκκινητών το pA - R1492. Το προϊόν της αντίδρασης (1 μ l) ήταν η μήτρα για τη δεύτερη PCR με το ζεύγος εκκινητών F984GC - R1378. Ακολουθήθηκαν οι ίδιες συνθήκες για τις αντιδράσεις PCR που αναφέρονται στις παραγράφους 2.8.2 και 2.8.3.

2.8.6. Ανίχνευση του βακτηρίου *E.coli* με εξειδικευμένη για το γένος PCR αντίδραση (genus specific PCR)

Η μοριακή ανίχνευση του βακτηρίου *E. coli* πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών: 16E1 5'-GGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC-3' και 16E2 5'-TTCCCGAAGGCACATTCT-3' (Tsen και συν., 1998).

Η σύσταση του μείγματος της PCR που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 25 μl ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 2 mM MgCl₂, 10 pmoles 16E1, 10 pmoles 16E2, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 2,5 % v/v DMSO (ή ακεταμίδιο), 0,75 Unit Taq πολυμεράση (Biotools England), 1,5-2 μl (≈ 40 ng) γενωμικό DNA, νερό προς έγχυση μέχρι όγκο 25 μl (Πίνακας 2.9).

Το πρόγραμμα της αντίδρασης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.9. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι 584 βάσεις.

Πίνακας 2.9: Σύσταση μείγματος και πρόγραμμα της genus specific PCR για την *E. coli*

Τελική συγκέντρωση		PCR για <i>E. coli</i>		
Reaction Buffer	1x	Αρχική αποδιάταξη	94 °C	5 min
MgCl ₂	2,0 mM			
16E1 - 16E2	0,40 mM ο καθένας	Αποδιάταξη	94 °C	30 sec
dNTPs	0,25 mM το καθένα	Πρόσδεση εκκινητών	x 35 cycles	54 °C 30 sec
DMSO	2,5 % v/v	Επιμήκυνση αλυσίδων		72 °C 1 min
Taq πολυμεράση	0,75Units			
Γενωμικό DNA		Τελική επιμήκυνση	72 °C	4 min
Water	μέχρι 25 μl		10 °C	

2.8.7. Ανίχνευση του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* με εξειδικευμένη για το γένος PCR αντίδραση (genus specific PCR)

Με στόχο την ανίχνευση του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζεύγος εκκινητών: oprL1: 5'-CGGGCGTGCTGATGCTCGTAT-3' και oprL2: 5'-GCGCGAGGAACGTCAGGACAC-3' (Karanam και συν. 2008).

Η σύσταση του μείγματος της PCR που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 25 μ l ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 2 mM $MgCl_2$, 10 pmoles oprL1, 10 pmoles oprL2, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 2,5 % v/v DMSO, 0,75 Unit Taq πολυμεράση (Biotools England), 1,5-2 μ l ($\approx$ 40 ng) γενωμικό DNA, νερό προς έγχυση μέχρι όγκο 25 μ l (Πίνακας 2.10).

Το πρόγραμμα της αντίδρασης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.10. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι 709 βάσεις.

Πίνακας 2.10: Σύσταση μείγματος και πρόγραμμα της genus specific PCR για την *Pseudomonas aeruginosa*

Τελική συγκέντρωση		PCR για <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Reaction Buffer	1x	Αρχική αποδιάταξη	95 °C	5 min
MgCl₂	2,0 mM			
oprL1 - oprL2	0,40 mM ο καθένας	Αποδιάταξη	95 °C	30 sec
dNTPs	0,25 mM το καθένα	Πρόσδεση εκκινητών	x 35 cycles	55 °C 30 sec
DMSO	2,5 % v/v	Επιμήκυνση αλυσίδων		68 °C 1 min
Taq πολυμεράση	0,75Units			
Γενωμικό DNA		Τελική επιμήκυνση	68 °C	7 min
Water	μέχρι 25 μ l		10 °C	

2.8.8. Ανίχνευση κολιμορφων βακτηρίων με εξειδικευμένη PCR αντίδραση

Με στόχο την ανίχνευση κολιμορφων βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζεύγος εκκινητών: LZL389: 5'-ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC-3' και LZR653: 5'-GGTTT ATGCAGCAACGAGACGTC-3' (Bej, και συν. 1991). Οι εκκινητές αυτοί προσδένονται στο οπερονίο της λακτόζης στο lacZ γονίδιο.

Η σύσταση του μείγματος της PCR που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 25 μ l ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 2,5 mM $MgCl_2$, 10 pmoles oprL1, 10 pmoles oprL2, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 2 % v/v DMSO, 0,75 Unit Taq πολυμεράση (Biotools England), 1,5-2 μ l ($\approx$ 40 ng) γενωμικό DNA, νερό προς έγχυση μέχρι όγκο 25 μ l (Πίνακας 2.11).

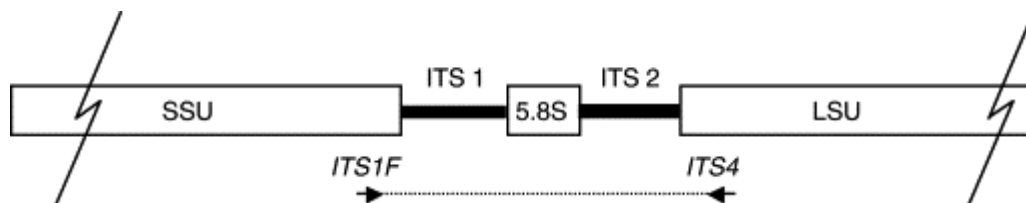
Το πρόγραμμα της αντίδρασης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.11. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι 264 βάσεις.

Πίνακας 2.11: Σύσταση μείγματος και πρόγραμμα της εξειδικευμένης PCR για τα κολίμορφα βακτήρια.

Τελική συγκέντρωση		PCR για κολίμορφα βακτήρια		
Reaction Buffer	1x	Αρχική αποδιάταξη	94 °C	10 min
MgCl ₂	2,5 mM			
LZL389 - LZR653	0,40 mM ο καθένας	Αποδιάταξη	94 °C	1 min, 30 sec
dNTPs	0,25 mM το καθένα	Πρόσδεση εκκινητών	x 30 cycles	58 °C 30 sec
DMSO	2,0 % _{v/v}	Επιμήκυνση αλυσίδων		72 °C 30 sec
Taq πολυμεράση	0,75Units			
Γενωμικό DNA		Τελική επιμήκυνση	72 °C	7 min
Water	μέχρι 25 μl		10 °C	

2.8.9. Ενίσχυση της ITS περιοχής

Με στόχο την ομαδοποίηση των μυκήτων και την ταυτοποίηση τους χρησιμοποιήθηκε έγινε ενίσχυση της εσωτερικής μεταγραφόμενης περιοχής ITS1-5,8S-ITS2 με το ζεύγος εκκινητών: ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACTGCGG-3' και ITS4: 3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC. (Bellemain E., και συν. 2010). Στην Εικόνα 2.17 παρουσιάζεται η ριβοσωμική περιοχή των μυκήτων.

**Εικόνα 2.17:** Απεικόνιση της ριβοσωμικής περιοχής (18S, internal transcribed spacer (ITS) regions, 5,8S, 25-28S) των μυκήτων και των περιοχών που ενισχύουν οι εκκινητές ITS1 και ITS4 (Burke, και συν. 2005).

Η σύσταση του μείγματος της PCR που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 50 μl ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 2,5 mM MgCl₂, 20 pmoles ITS1, 20 pmoles ITS4, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 1,25 Unit Taq πολυμεράση (Biotools England), 2,5 μl (≈50 ng) γενωμικό DNA, νερό προς έγχυση μέχρι όγκο 50 μl (Πίνακας 2.12). Το πρόγραμμα της αντίδρασης παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.12.

Πίνακας 2.12: Σύσταση μείγματος και πρόγραμμα ITS - PCR

Τελική συγκέντρωση		ITS - PCR			
Reaction Buffer	1x	Αρχική αποδιάταξη	94 °C	5 min	
MgCl ₂	2,5 mM				
ITS1-ITS4	0,40 mM ο καθένας	Αποδιάταξη	94 °C	1 min	
dNTPs	0,25 mM το καθένα	Πρόσδεση εκκινητών	x 35 cycles	53 °C	30 sec
Taq πολυμεράση	1,25	Επιμήκυνση αλυσίδων		72 °C	1 min
Γενωμικό DNA			72 °C	5 min	
Water	Μέχρι 50 μl	Τελική επιμήκυνση	10 °C		

2.9. Ηλεκτροφόρηση DNA και προϊόντων PCR

Οι ηλεκτροφορήσεις του DNA και των προϊόντων των PCR πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x. 10 μl από το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκε με προσθήκη 2 μl χρωστικής. Σε κάθε ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε μοριακός μάρτυρας 1 kb ή 100 bp.

- ❖ Το DNA αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8 % (w/v) με 12 μl EtBr (0,5 μg·ml⁻¹) και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συνθήκες 80 mA – 80 V για 45 min.
- ❖ Τα προϊόντα της BOX-PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) με 15 μl EtBr (0,5 μg·ml⁻¹) και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συνθήκες 50 mA - 50 V για 4 h.
- ❖ Τα προϊόντα της 16S PCR που προορίζονταν για μοριακή ταυτοποίηση αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8 % (w/v) με 8 μl EtBr (0,5 μg·ml⁻¹) και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συνθήκες 65 mA - 65 V για 1.5 h. Όλο το προϊόν της PCR (50 μl) ηλεκτροφορήθηκε.
- ❖ Τα προϊόντα των 16S PCR και 16 PCR-DGGE αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8 % (w/v) με 12 μl EtBr (0,5 μg·ml⁻¹) και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συνθήκες 70 mA - 70 V για 1 h.
- ❖ Τα προϊόντα των εξειδικευμένων PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) με 12 μl EtBr (0,5 μg·ml⁻¹) και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συνθήκες 70 mA - 70 V για 1 h.

Ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφιση σε υπεριώδη ακτινοβολία με το σύστημα Doc Print II της Vilbert Loumart. Οι φωτογραφίες των πηκτωμάτων της BOX-PCR αναλύθηκαν περαιτέρω με το πρόγραμμα GelCompar II της Applied-Maths.

2.10. DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Ηλεκτροφόρηση με Κλίση Αποδιατακτικού Παράγοντα)

2.10.1. Αρχή μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση με κλίση αποδιατακτικού παράγοντα (DGGE) είναι μία ηλεκτροφοριστική μέθοδος που χρησιμοποιεί αποδιατακτικούς παραγόντες για να μειώσει το T_m των δίκλωνων μορίων DNA και να διευκολύνει την αποδιάταξη του τμήματος DNA. Το T_m καθορίζεται από την αλληλουχία του DNA και αλλαγή σε ένα νουκλεοτίδιο μπορεί να προκαλέσει αλλαγή στο T_m του τμήματος.

Σε ένα πήκτωμα ακρυλαμίδης με κλίση αποδιατακτικού παράγοντα (φορμαμίδιο - ουρία), το δίκλωνο DNA υπόκειται σε ένα ολοένα αυξανόμενο κατακόρυφο αποδιατακτικό περιβάλλον παράλληλο με το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται (parallel DGGE). Το σύστημα ηλεκτροφόρησης βρίσκεται σε σταθερή θερμοκρασία (συνήθως 50 - 65 °C) χαμηλότερη από τα T_m όλων των περιοχών αποδιάταξης που περιέχονται στα προς μελέτη μόρια DNA. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα δίκλιωνα μόρια DNA αποκτούν διακλαδισμένη μορφή σε εκείνη τη θέση του πηκτώματος, όπου η συγκέντρωση του αποδιατακτικού παράγοντα σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία εξισώνεται με το χαμηλότερο T_m αλληλουχίας αποδιάταξης του κάθε μορίου. Κατά συνέπεια τα μόρια παγιδεύονται στους πόρους του πηκτώματος και η κίνησή τους σταμάτα σε διαφορετική θέση, δίνοντας μια διακριτή ζώνη στο πήκτωμα που καλείται ριβότυπος. Η προσθήκη ενός GC καταλοίπου στο 5' άκρο του μορίου που πρόκειται να αναλυθεί παρεμποδίζει την πλήρη αποδιάταξή του. Με επιλογή κατάλληλης κλίσης συγκέντρωσης του αποδιατακτικού παράγοντα δυο τμήματα DNA που διαφέρουν σε μια μόνο βάση, εφόσον έχουν διαφορετικά T_m , θα ακινητοποιηθούν σε διαφορετικά σημεία του πηκτώματος και θα διαχωριστούν κατά το τέλος της ηλεκτροφόρησης.

2.10.2. Ανάλυση ολικού βακτηριακού DNA σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με συγκέντρωση αποδιατακτικού παράγοντα υπό κλίση

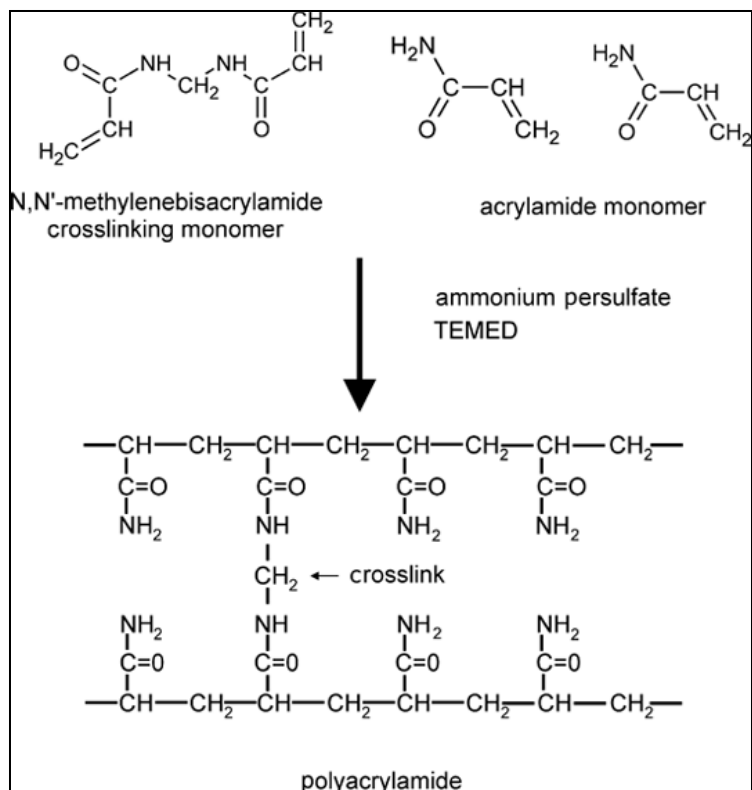
Η ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου έγινε χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών F984GC-R1378 όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.8.3 - 2.8.5. Οι δύο εκκινητές ενισχύουν την περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 968 και 1401 του γονιδίου για το 16S rRNA, που περιλαμβάνουν τις περιοχές υψηλής ποικιλομορφίας V6-V8. Μια GC ουρά 40 βάσεων προστέθηκε στο 5' άκρο του εκκινητή F984, ώστε να αποφευχθεί η πλήρης αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA κατά την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα ακρυλαμίδης παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα.

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR αναλύθηκαν αρχικά σε πήκτωμα αγαρόζης και όσα δείγματα έδωσαν θετικό αποτέλεσμα αναλύθηκαν περαιτέρω σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6 % (^{w/v}). Το ποσοστό Acrylamide/Bis Acrylamide (37,5:1) που χρησιμοποιείται σχετίζεται με το μέγεθος των πόρων που θα δημιουργηθούν στο πήκτωμα και το μέγεθος του τμήματος του DNA που χρειάζεται να αναλυθεί. Όσο μικρότερο το ποσοστό της ακρυλαμίδης τόσο μεγαλύτεροι οι πόροι στο πήκτωμα. Στον Πίνακα 2.13 φαίνονται ορισμένα ποσοστά acrylamide/bis acrylamide (37,5:1) που χρησιμοποιούνται και το μέγεθος του τμήματος DNA που μπορούν να διαχωρίσουν.

Πίνακας 2.13: Ποσοστό acrylamide/Bis acrylamide και διαχωριστική ικανότητα

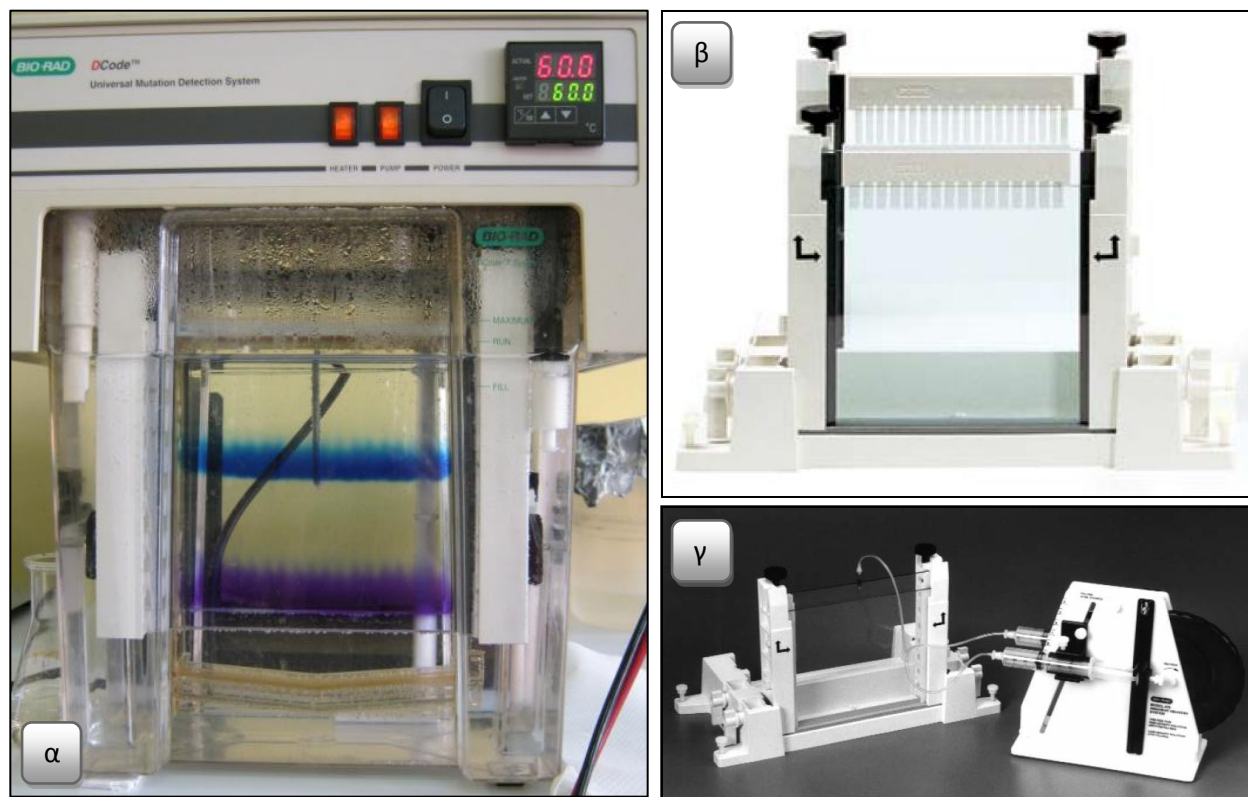
Ποσοστό πηκτώματος	Μέγεθος που διαχωρίζουν
6 %	300 - 1000 βάσεις
8 %	200 - 400 βάσεις
10 %	100 - 300 βάσεις

Οι χημικές ενώσεις που προκαλούν τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης (Εικόνα 2.18) είναι το TEMED (Tetramethylethylenediamine - $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) και το ammonium persulfate $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$.



Εικόνα 2.18: Πολυμερισμός ακρυλαμίδης

Η τεχνική της DGGE εφαρμόστηκε με το DCode Universal Mutation System της Biorad (Εικόνα 2.19 α, γ) και το κάθε πήκτωμα συναρμολογήθηκε σύμφωνα με το εγχειρίδιο του κατασκευαστή. Η κατακόρυφη κλίση αποδιατακτικού παράγοντα κατασκευάστηκε με τη συσκευή Model 475 Gradient Delivery System (Biorad) (Εικόνα 2.19 β) και το πήκτωμα πολυμερίστηκε για 1 h πάνω σε πολυεστερική μεμβράνη υποστήριξη (GEL-FIX™ for PAG, Serva Electrophoresis Γερμανία). Η κλίση αποδιατακτικού παράγοντα που εφαρμόστηκε ήταν 40 - 60 % όπου το όπου το 100 % του αποδιατακτικού παράγοντα αντιστοιχεί σε 40 % (v/v) απιονισμένο φορμαμίδιο και 7 M ουρία. Κατά την παρασκευή των πηκτώματων πολυακρυλαμίδης, για κάθε ml διαλύματος x % αποδιατακτικού παράγοντα - 6 % ακρυλαμίδη, προστέθηκαν 10 μl 10 % ammonium persulfate και 1 μl TEMED. Μετά τον πολυμερισμό του πηκτώματος, το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης και τα πηκτώματα προθερμάνθηκαν στους 60 °C (heater on, pump off, 60V, 1 h). Όταν επετεύχθη η επιθυμητή θερμοκρασία, “φορτώθηκαν” τα δείγματα. Για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας 20 μl προϊόντος PCR χρησιμοποιήθηκαν με προσθήκη ίσης ποσότητας χρωστικής 2x. Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ήταν 60 °C για 4 ώρες υπό τάση 180 V σε διάλυμα 1x TAE.



Εικόνα 2.19: α) DCode Universal Mutation System (Biorad) κατά την ηλεκτροφόρηση, β) πηκτώματα πολυακρυλαμίδης, γ) συσκευή Model 475 Gradient Delivery System (Biorad).

Στα πηκτώματα DGGE για την ανίχνευση του DNA χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο χρώσης νιτρικού αργύρου όπως περιγράφεται από τον Reisner και συν. (1989). Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν 2 κύκλοι μονιμοποίησης 3 λεπτών με διάλυμα μονιμοποίησης, ακολούθησε έκπλυση με αποσταγμένο νερό και χρώση για 15 λεπτά με διάλυμα χρώσης νιτρικού αργύρου και εμφάνιση του πηκτώματος με χρήση διαλύματος ανάπτυξης της χρώσης. Η αύξηση του pH σε τιμές περίπου 12 – 14, καταβυθίζουν τον νιτρικό άργυρο με αποτέλεσμα οι ζώνες του DNA που έχουν προσδέσει τον άργυρο να φαίνονται μαύρες. Το κίτρινο χρώμα που πηκτώματος προκαλείται από την φορμαλδεΰδη. Η αντίδραση τερματίστηκε με εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα Na_2EDTA 1,5 % για 10 min και τοποθέτηση σε διάλυμα διατήρησης. Το πηκτώμα στη συνέχεια φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και εν συνεχεία ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφιση σε υπεριώδη ακτινοβολία με το σύστημα Doc Print II της Vilbert Loumart. Στη δεύτερη περίπτωση το πηκτώμα φαίνεται λευκό ενώ οι ζώνες του DNA μαύρες. Δοκιμάστηκε και η χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο χωρίς όμως να διακριθούν κάποιες ζώνες. στο πηκτώμα αυτό στη συνέχεια εφαρμόστηκε επιτυχώς η χρώση νιτρικού αργύρου.

2.10.3. Στατιστική ανάλυση ριβοτύπων DGGE

Η συσχέτιση της σύνθεσης των μικροβιακών κοινοτήτων, όπως αυτές παριστάνονται στα DGGE πρότυπα, επιτεύχθηκε με τον υπολογισμό του συντελεστή ομοιότητας των ζωνών που είναι κοινές μεταξύ δύο δειγμάτων. Συγκεκριμένα, σε κάθε δείγμα εξετάζεται η παρουσία ζωνών-ριβοτύπων και το πρότυπό τους συγκρίθηκε με το αντίστοιχο πρότυπο καθενός από τα άλλα δείγματα. Ο συντελεστής ομοιότητας υπολογίζεται από το μαθηματικό τύπο:

$$C_s = 2j (a + b)$$

Όπου *a* είναι ο αριθμός των ζωνών στο δείγμα A, *b* ο αριθμός των ζωνών στο δείγμα B και *j* ο αριθμός των ζωνών που είναι κοινές στα δύο δείγματα. Για το ίδιο το δείγμα, ο συντελεστής παίρνει τιμή ίση με τη μονάδα, ενώ η απουσία κοινών ζωνών μηδενίζει το κλάσμα (Nakatsu και συν. 2000). Συνεπώς, δύο δείγματα είναι πιο όμοια όσο αυτός ο συντελεστής πλησιάζει τη μονάδα.

2.11. Μοριακή ταυτοποίηση απομονωμένων στελεχών

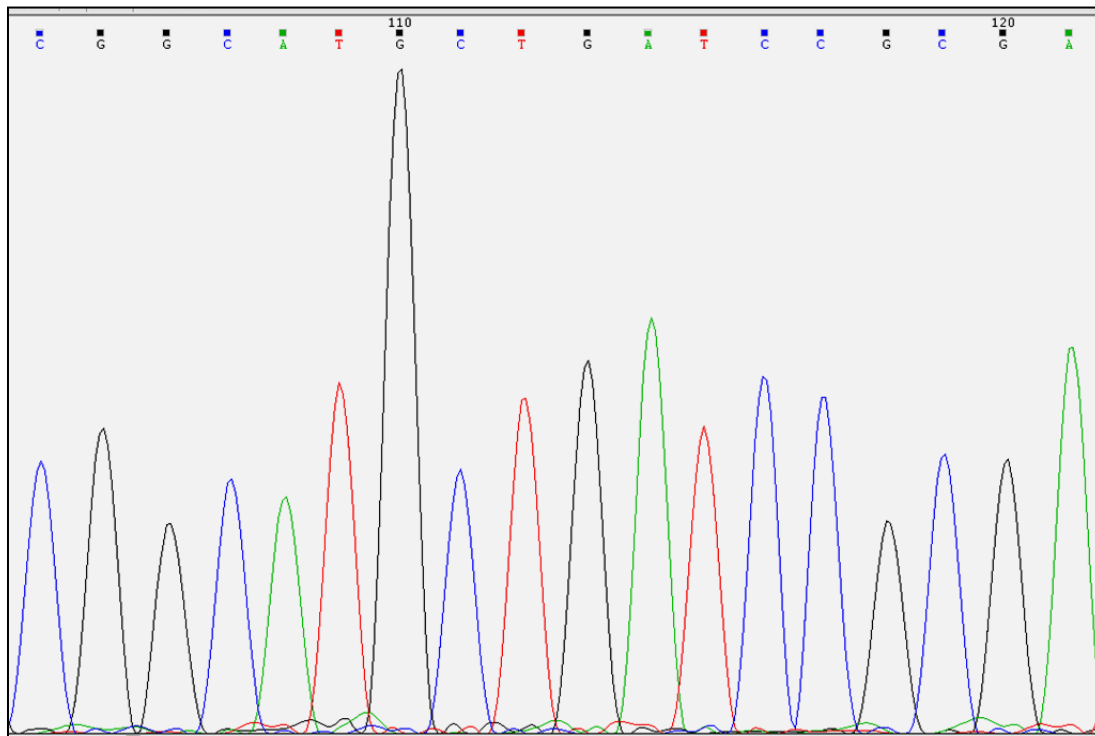
Η μοριακή ταυτοποίηση επιλεγμένων στελεχών έγινε με ενίσχυση του 16S rDNA στα βακτήρια (§2.8.2) και με ενίσχυση της εσωτερικής μεταγραφόμενης περιοχής ITS1-5,8S-ITS2 στους νηματοειδείς μύκητες (§2.8.9) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.9. Στη συνέχεια, κόπηκαν οι ζώνες με νυστέρι και τοποθετήθηκαν σε φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου eppendorf των 2 ml και στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους 4 °C μέχρι τη χρησιμοποίησή τους. Σημειώνεται ότι είναι επιθυμητό α) το πήκτωμα να περιέχει την ακριβώς απαιτούμενη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου καθώς η χρωστική αυτή προσδένεται στο DNA και μπορεί να παρεμποδίσει της μετέπειτα εφαρμογές, β) η ζώνη να κοπεί με όσον το δυνατόν λιγότερη αгарόζη (για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται 0,8 % πήκτωμα αгарόζης), γ) η παρατήρηση στην υπεριώδη ακτινοβολία να είναι σύντομη, καθώς παρατεταμένη ακτινοβολία του DNA προκαλεί διμερή θυμίνης και βλάβες στο DNA.

Η εκχύλιση του ενισχυμένου τμήματος DNA από το πήκτωμα αгарόζης έγινε με το Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Invitek, Αυστρία) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα

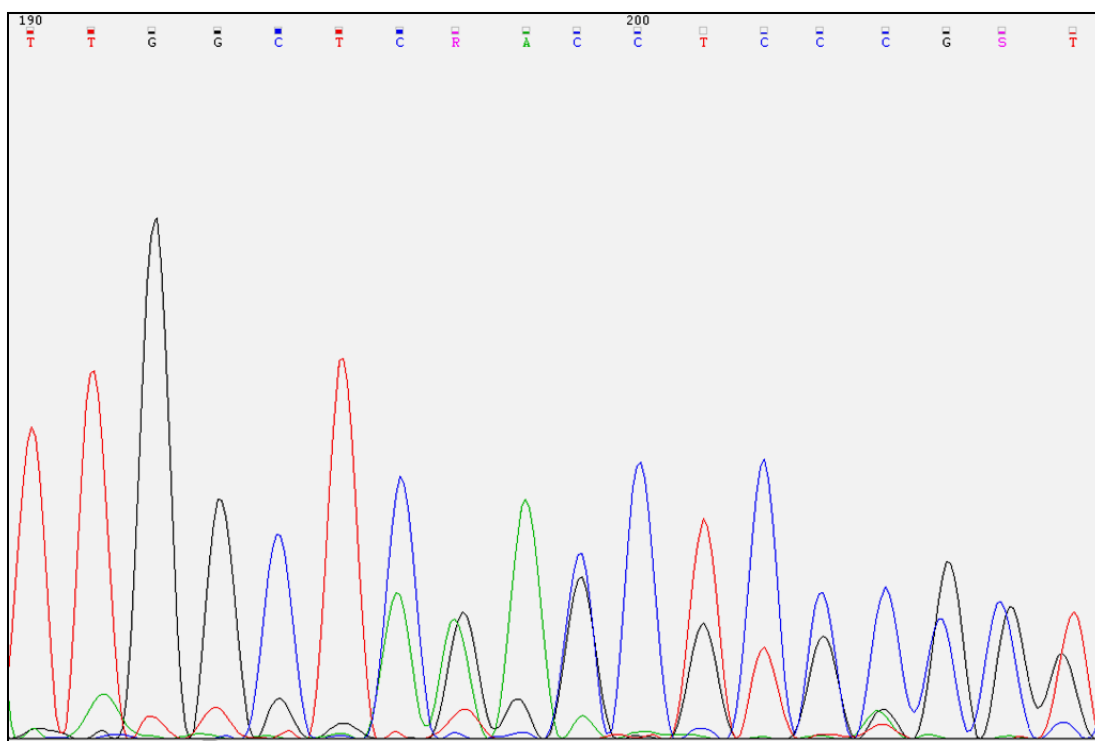
βασικά στάδια της εκχύλισης του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης είναι τα εξής: α) διαλυτοποίηση του πηκτώματος και απελευθέρωση DNA στο διάλυμα, β) πρόσδεση DNA στη στήλη, γ) καθαρισμός DNA από προσμίξεις όπως εκκινητικά μόρια, ένζυμα, άλατα, νουκλεοτίδια, αγαρόζη, χρωστική φόρτωσης και βρωμιούχο αιθίδιο, δ) έκλυση DNA. Η έκλυση DNA πραγματοποιήθηκε σε δύο κύκλους των 30 μl για μέγιστη απόδοση. 30 μl από το ενισχυμένο 16S DNA χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της αλληλουχίας. Τα υπόλοιπα 30 μl διατηρηθήκαν στους -20 °C, για μετέπειτα χρήση. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της 16S PCR για έλεγχο της καθαρότητας του.

Η ανάλυση της αλληλουχίας του 16S DNA έγινε με το εκκινητικό μόριο R1492 στην VBC-Bioetch (Αυστρία). Οι αλληλουχίες που προέκυψαν ήταν μήκους έως 900 - 1000 βάσεις και τα χρωματογραφήματα τους μελετήθηκαν ως προς την καθαρότητα των αλληλουχιών. Συγκεκριμένα, οι αυτόματες συσκευές προσδιορισμού των αλληλουχιών παράγουν ένα τετράχρωμο χρωματογράφημα (ένα χρώμα για κάθε βάση) στο οποίο η κάθε βάση της αλληλουχίας αντιπροσωπεύεται από μία κορυφή. Το πρόγραμμα καθορίζει τη βάση ανάλογα με το χρώμα της κορυφής. Οι αλληλουχίες χωρίς προσμίξεις έχουν καθαρές και έντονες κορυφές. Αλληλουχίες με προσμίξεις περιέχουν σε μία θέση ενός νουκλεοτιδίου 2 ή και περισσότερες ισοϋψείς, ή όχι, κορυφές με αποτέλεσμα το πρόγραμμα να μη μπορεί να καθορίσει το σωστό νουκλεοτίδιο (πχ τοποθετεί A αντί για C) ή να μη καθορίσει κάποιο νουκλεοτίδιο (συνήθως σημειώνεται ως K, W, Y, R, N). Οι αλληλουχίες που περιέχουν μικρό θόρυβο (Εικόνα 2.20) ο οποίος φαίνεται ως μικρές κορυφές στη βάση του χρωματογραφήματος, δεν επηρεάζουν το αποτέλεσμα της μετέπειτα ανάλυσης. Αλληλουχίες όμως, οι οποίες έχουν πολλαπλές κορυφές για κάθε νουκλεοτίδιο (Εικόνα 2.21, 2.22) δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αξιόπιστη ανάλυση.

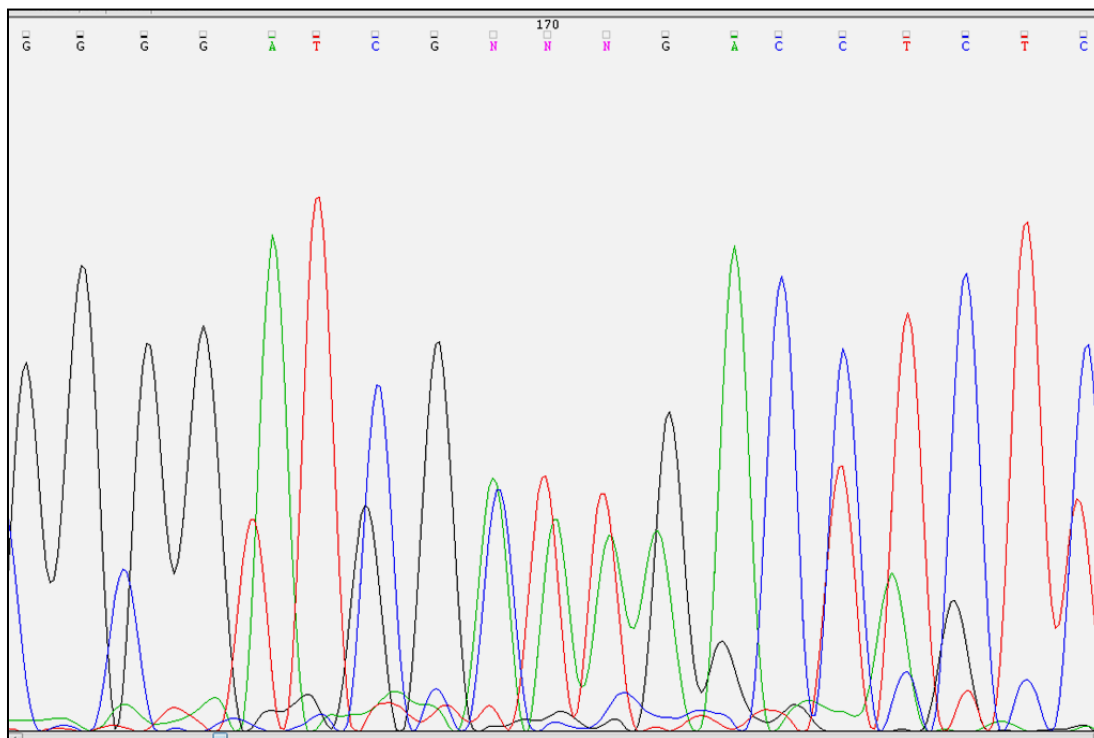
Οι αλληλουχίες εκείνες που διαπιστώθηκε ότι δεν έχουν προσμίξεις συγκρίθηκαν με κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων GenBank του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογίας των ΗΠΑ (National Center for Biotechnology Information-NCBI) με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST και στη συνέχεια κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο με το πρόγραμμα MEGA 5.05. Χρησιμοποιήθηκαν τόσο οι αλληλουχίες αναφοράς της συλλογής 16S ribosomal RNA sequences όσο και οι αλληλουχίες που εντοπίζονται στη συλλογή nucleotide collection. Είδη τα οποία έχουν πρόσφατα καταγραφεί δεν εντοπίζονται στη συλλογή των αλληλουχιών αναφοράς.



Εικόνα 2.20: Χρωματογράφημα αλληλουχίας. Διακρίνονται οι μεγάλες κορυφές και ο μικρός θόρυβος στη βάση.



Εικόνα 2.21: Χρωματογράφημα αλληλουχίας. Διακρίνονται οι καθαρές κορυφές μέχρι τη θέση 196. Από τη θέση 197 και μετά παρατηρούνται διπλές κορυφές για κάθε νουκλεοτίδιο. Το αποτέλεσμα αυτό προέκυψε από πρόσδεση του εκκινητή σε εσωτερικό σημείο του γονιδίου.

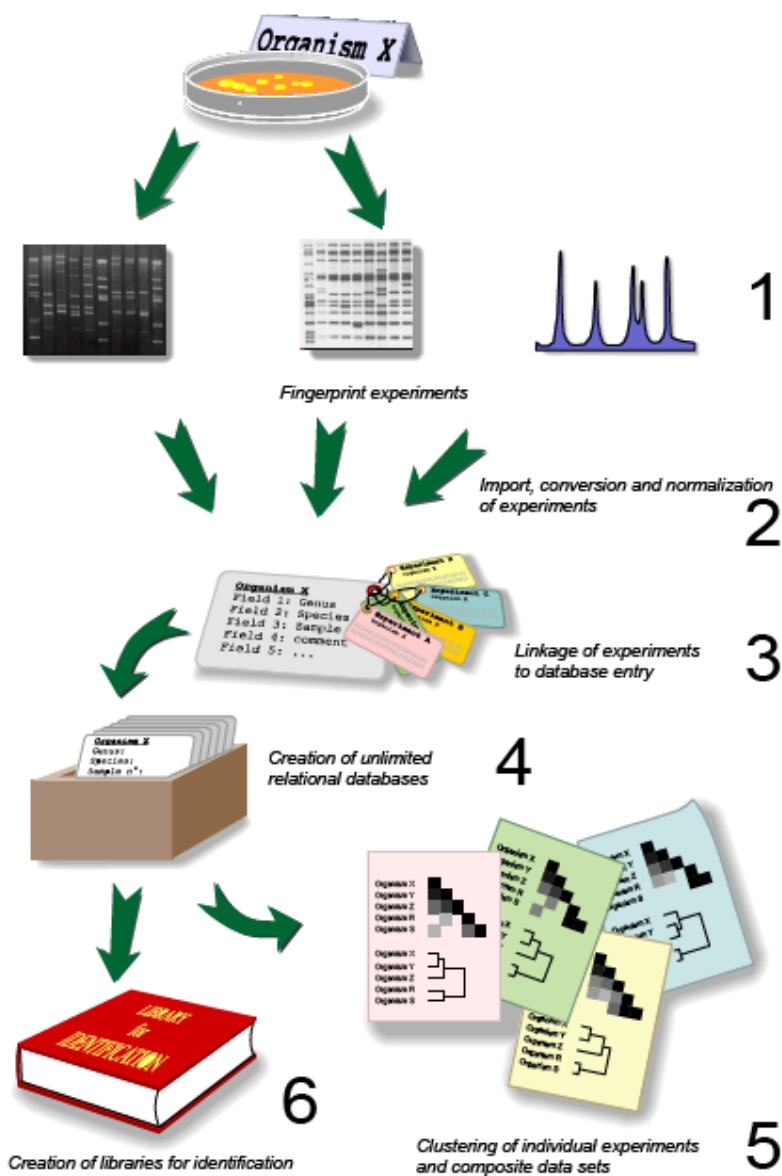


Εικόνα 2.22: Χρωματογράφημα αλληλουχίας. Διακρίνονται ο έντονος θόρυβος με τις πολλαπλές κορυφές για κάθε νουκλεοτίδιο και τον αδύνατο καθορισμό του σωστού νουκλεοτιδίου (N) σε πολλές θέσεις.

2.12. Ανάλυση προτύπων αντίδρασης BOX-PCR

Τα πρότυπα που προέκυψαν από την αντίδραση BOX-PCR αναλύθηκαν με το πρόγραμμα GelCompar II της Applied Maths. Με το λογισμικό αυτό γίνεται επεξεργασία των εικόνων ή των πυκνομετρικών προφίλ (πχ από HPLC), με ταυτόχρονη κανονικοποίηση (normalization) τους και ανίχνευση των ζωνών. Οι καταχωρίσεις στις βάσεις δεδομένων συνδέονται με τα κανονικοποιημένα μοτίβα στα οποία γίνεται υπολογισμός του μοριακού βάρους και ποσοτικοποίηση της έντασης της κάθε ζώνης. Ακολουθεί σύγκριση με διάφορους συντελεστές ομοιότητας βασισμένους είτε στις ζώνες είτε στις πυκνομετρικές καμπύλες και ομαδοποίηση (clustering) βασισμένη σε μεθόδους όπως UPGMA, Single Linkage, Complete Linkage, Neighbor-Joining, Ward και Parsimony και εξαγωγή των δενδρογραμμάτων. Τα σφάλματα και η αξιοπιστία σημειώνονται στους κλάδους των δενδρογραμμάτων. Επίσης με το λογισμικό αυτό μπορεί να γίνει μη-ιεραρχική ομαδοποίηση με το συντελεστή PCA και MDS, με δισδιάστατες και τρισδιάστατες απεικονίσεις. Βιβλιοθήκες μπορούν να δημιουργηθούν για την ταυτοποίηση

των οργανισμών (Applied-Maths 2010). Στην Εικόνα 2.23 φαίνονται τα βασικά βήματα για την ανάλυση δεδομένων από το πρόγραμμα GelCompar II.



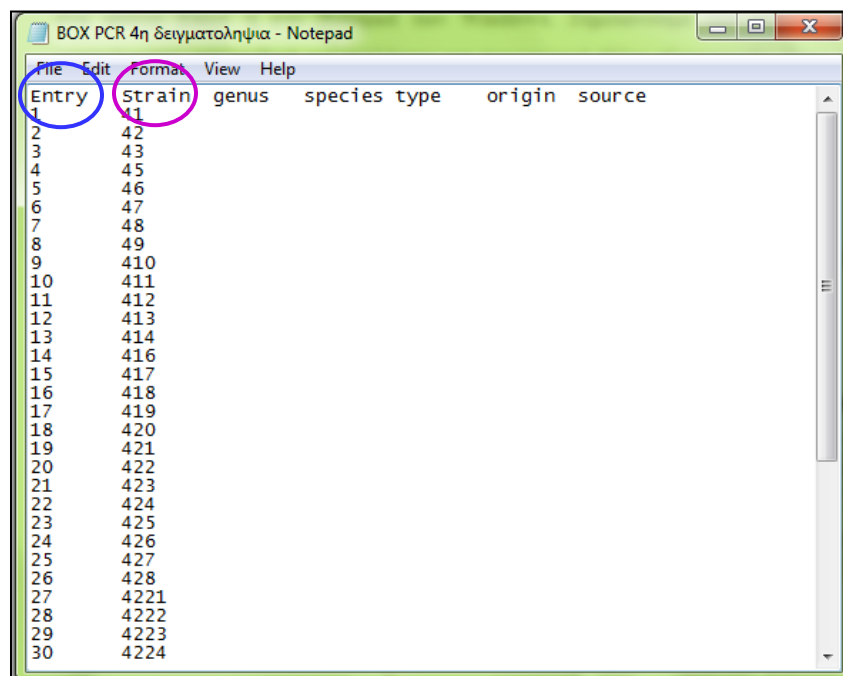
Εικόνα 2.23: Διάγραμμα ροής των βημάτων που ακολουθούνται στο GelCompar II

Το λογισμικό βασίζεται σε δύο αρχές, στις καταχωρήσεις στη βάση δεδομένων και στα πειραματικά δεδομένα. Η βάση δεδομένων Περιείχε καταχωρήσεις που αντιστοιχούν στα υπό εξέταση δείγματα πχ σε στελέχη μικροοργανισμών και για τα οποία μπορούν να παραχθούν δεδομένα αποτυπωμάτων (fingerprint data). Τα πειραματικά δεδομένα αφορούν αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων ή άλλα αποτυπώματα, τα οποία χρησιμοποιούνται για να υπολογιστεί η

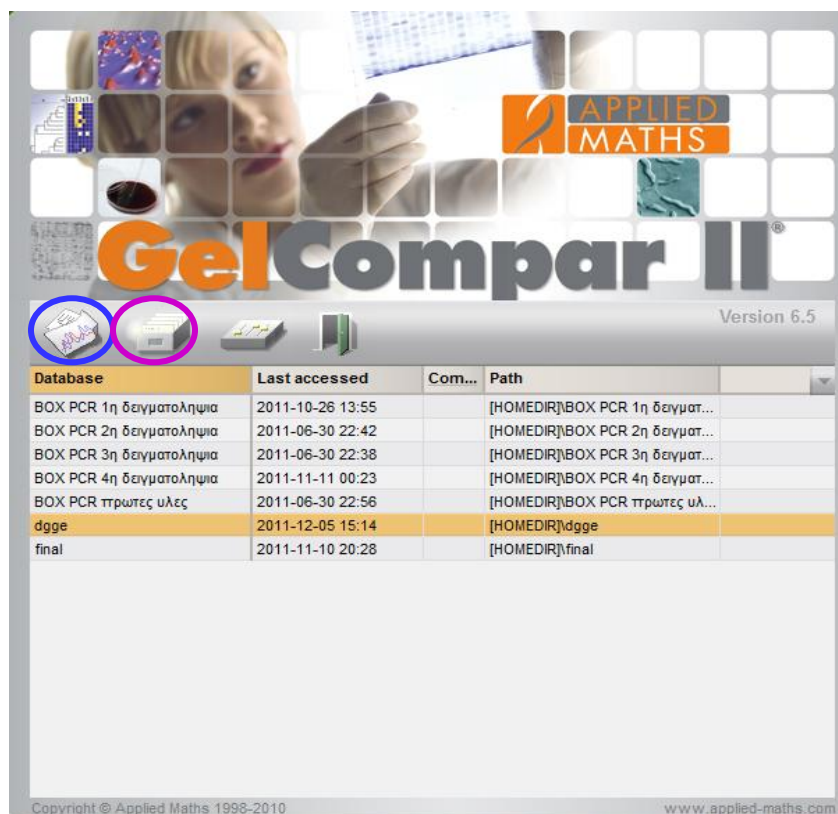
ομοιότητα μεταξύ των δειγμάτων. Το λογισμικό παρέχει τη δυνατότητα κάθε καταχώρηση στη βάση δεδομένων να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περισσότερα τους ενός πειράματα αποτυπωμάτων (fingerprint experiments) οπότε μπορούν ταυτόχρονα να μελετηθούν πολλαπλά δεδομένα αποτυπωμάτων. Για παράδειγμα, για μια ομάδα καταχωρήσεων (πχ δέκα απομονωμένα στελέχη) μπορεί να υπάρχουν δεδομένα ηλεκτροφόρησης με τις μεθόδους των REP-PCR, RFLP και ARDRA και να προκύψουν τρία ξεχωριστά πειράματα αποτυπωμάτων ένα για κάθε τεχνική. Με τον όρο δεδομένα αποτυπωμάτων εννοούμε οποιαδήποτε πυκνομετρική καταγραφή ως προφίλ κορυφών ή ζωνών πχ μοτίβα ηλεκτροφορήσεων ή πρότυπα αέριας χρωματογραφίας και HPLC, σπεκτροφωτομετρικές καμπύλες, πρότυπα MALDI και SELDI κ.α. Η επιτυχής δημιουργία βάσεων δεδομένων των ηλεκτροφορητικών προτύπων εξαρτάται από την ποιότητα και την αξιοπιστία της προεπεξεργασίας των εικόνων των ηλεκτροφορήσεων. Η προεπεξεργασία περιλαμβάνει 4 σημαντικά στάδια: α) ενίσχυση της εικόνας, που περιλαμβάνει ομαλοποίηση, βελτιστοποίηση αντίθεσης και φωτεινότητας των χρωμάτων, αφαίρεση κηλίδων και σημαδιών, αφαίρεση φόντου (θορύβου), β) ενίσχυση του πυκνογράμματος, που περιλαμβάνει αφαίρεση φόντου (θορύβου), εξομάλυνση θορύβου, αφαίρεση ακίδων, ομαλοποίηση, γ) κανονικοποίηση δηλαδή διόρθωση των προτύπων ώστε να ταιριάζουν μεταξύ τους ανάμεσα σε διαφορετικές ηλεκτροφορήσεις, δ) αυτόματη ανίχνευση ζωνών. Εξελεγχμένες λειτουργίες όπως ανάλυση του τόνου καμπύλης, φασματική ανάλυση και ανάλυση στρέβλωσης παρέχουν στον πιο έμπειρο χρήστη πολύτιμες πληροφορίες για την ποιότητα του πηκτώματος και τις βέλτιστες ρυθμίσεις. Τα πηκτώματα μπορούν να παρασταθούν και ως ανάγλυφες εικόνες ή και ως τρισδιάστατες φωτογραφίες με περιστροφή σε πραγματικό χρόνο.

Περίληπτικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Αρχικά δημιουργήθηκε ένα αρχείο με τα στελέχη προς ανάλυση, σε ένα φύλλο Excel ή στο Notepad των Windows (Εικόνα 2.24). Σημειώθηκε ο αύξων αριθμός της καταχώρησης, ο κωδικός του στελέχους και προαιρετικά μπορούν να καταχωρηθούν άλλες πληροφορίες όπως το γένος και το είδος του στελέχους (εφόσον είναι γνωστά τα δεδομένα), η προέλευση κ.α. Στη συνέχεια δημιουργήθηκε μία νέα βάση δεδομένων (Εικόνα 2.25) στον αρχικό πίνακα του προγράμματος GelComparII προσθέτοντας και πρόσθετες λειτουργίες όπως για παράδειγμα, αναφορές επεξεργασίας εικόνων, εργαλεία δένδρογραμμάτων κ.α.

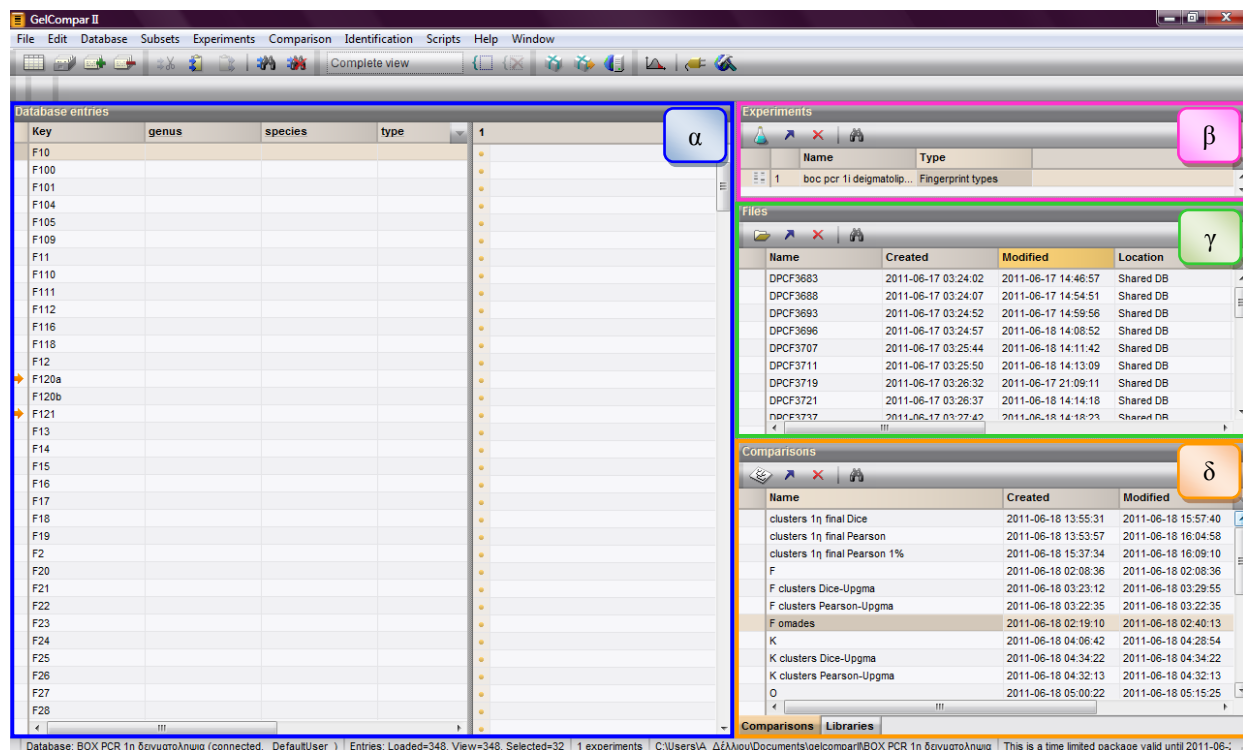


Εικόνα 2.24: Αρχείο κειμένου που χρησιμοποιήθηκε για εισαγωγή δεδομένων στο πρόγραμμα: **Αύζοντες αριθμοί καταχωρήσεων - Κωδικοί στελεχών.**



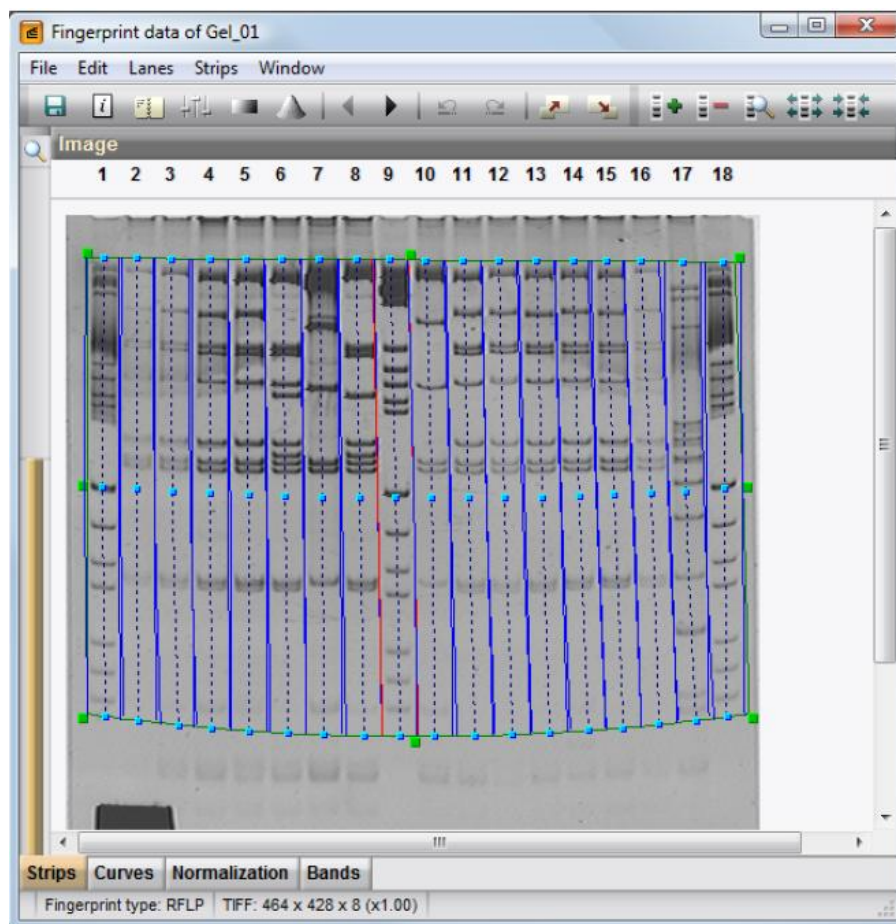
Εικόνα 2.25: Αρχική οθόνη προγράμματος: **Ανοιγμα βάσης δεδομένων - Δημιουργία βάσης δεδομένων.**

Το αρχείο με τις καταχωρήσεις εισήχθει στη βάση δεδομένων (Εικόνα 2.26α) και δημιουργήθηκε ένα πείραμα με βάση τα δεδομένα αποτυπωμάτων (fingerprint type experiments) (Εικόνα 2.26β). Στη συνέχεια προστέθηκαν οι εικόνες των ηλεκτροφορήσεων ως TIFF 8-bit αρχεία (Εικόνα 2.26γ) και με ανεστραμμένη χρώση δηλαδή οι ζώνες του DNA μαύρες και το πήκτωμα άσπρο. Τέλος επιλέχθηκαν τα στελέχη για τα οποία θέλαμε να δημιουργούμε συγκρίσεις μεταξύ τους (Εικόνα 2.26δ).



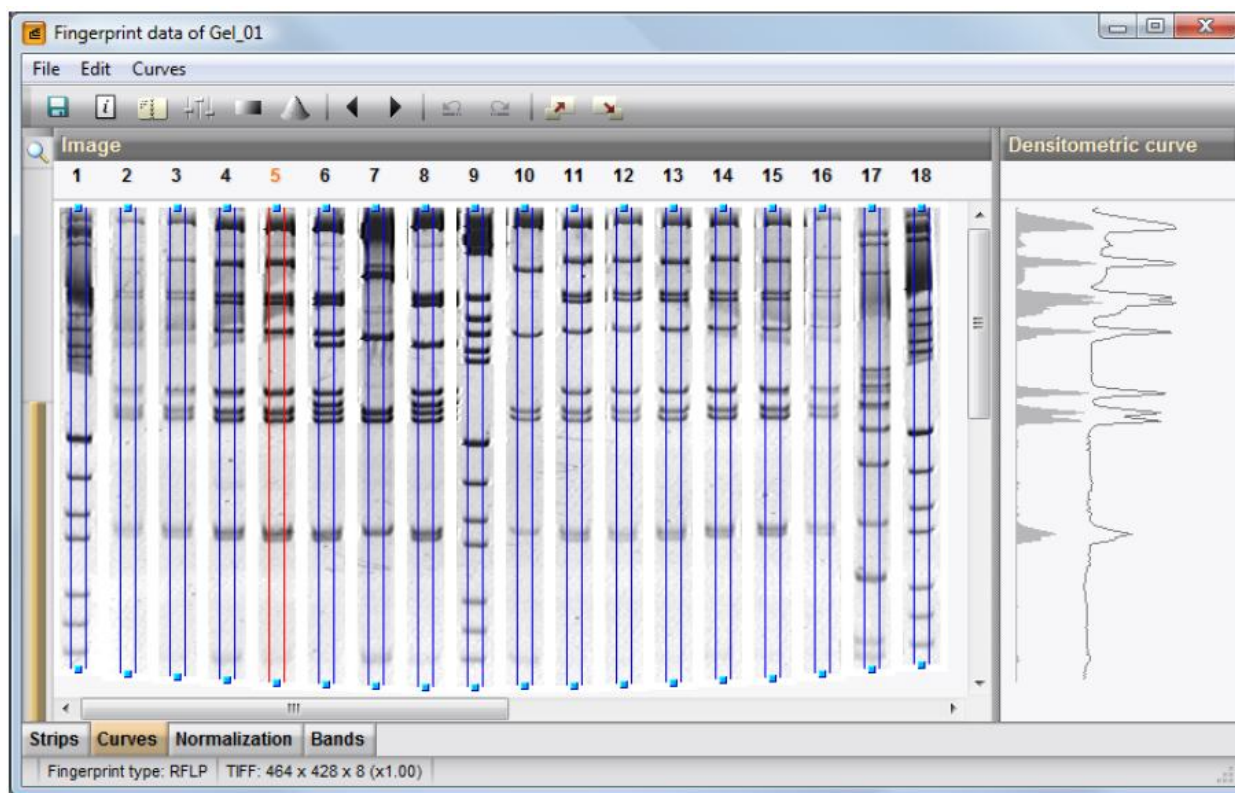
Εικόνα 2.26: Αρχική οθόνη βάσης δεδομένων στο πρόγραμμα GelCompar II. Περιλαμβάνει 4 διακριτά μέρη, α) το τμήμα όπου εισάγονται οι καταχωρήσεις των στελεχών, β) το τμήμα όπου δημιουργούνται τα πειράματα αποτυπωμάτων, γ) το τμήμα όπου εισάγονται οι εικόνες των ηλεκτροφορήσεων και δ) το τμήμα όπου δημιουργούνται οι συγκρίσεις.

Στη συνέχεια ακλούθησε η επεξεργασία των εικόνων των ηλεκτροφορήσεων, η οποία περιλαμβάνει 4 διακριτά στάδια. Το πρώτο στάδιο που φαίνεται στην Εικόνα 2.27, ήταν ο καθορισμός των γραμμών όπου είχαν «τρέξει» τα δείγματα. Στο στάδιο αυτό μπορούν να γίνουν διορθώσεις πχ εάν σε κάποιες γραμμές έχει τρέξει το δείγμα με κάποια κλίση, οι ζώνες να υπολογιστούν με βάση την κλίση αυτή ή να αποκοπούν οι ζώνες των εκκινητικών μορίων που βρίσκονται στο κάτω μέρος των πηκτωμάτων. Στο στάδιο αυτό επίσης ρυθμίζεται η φωτεινότητα, η αντίθεση, αφαιρείται ο θόρυβος, ενισχύονται οι αχνές ζώνες κ.λ.π..



Εικόνα 2.27: Καθορισμός γραμμών όπου έχει τρέξει το δείγμα.

Το δεύτερο στάδιο ήταν ο καθορισμός των πυκνομετρικών καμπύλων όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.28. Αρχικά καθορίστηκε το πλάτος της καθορισμένης γραμμής που θέλαμε να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της πυκνομετρικής καμπύλης. Όσο πιο μεγάλο το πλάτος της γραμμής τόσο περισσότερες ζώνες θα αποτυπωθούν στην καμπύλη και ειδικότερα οι πιο αχνές εξ' αυτών. Το λογισμικό αναγνωρίζει τη διαφορετική ένταση στο πήκτωμα ως πιθανή ζώνη και την αποτυπώνει ως κορυφή. Όσο πιο έντονη μία ζώνη τόσο πιο μεγάλη η κορυφή. Επειδή σε ένα πήκτωμα όμως υπάρχει ένας θόρυβος ο οποίος μπορεί να δώσει ψευδείς κορυφές οι οποίες όμως είναι μικρές, χρησιμοποιούνται μία σειρά παραμέτρων και φίλτρων που μειώνουν αυτό το θόρυβο. Ο θόρυβος αυξάνεται όσο μεγαλύτερο είναι το πλάτος της γραμμής που χρησιμοποιείται. Είναι σημαντικό οι πυκνομετρικές καμπύλες να καθοριστούν σωστά καθώς κατά την ομαδοποίηση χρησιμοποιούνται συντελεστές που βασίζονται είτε στις πυκνομετρικές καμπύλες είτε στον αριθμό των ζωνών.



Εικόνα 2.28: Καθορισμός πυκνομετρικών καμπύλων και αφαίρεση θορύβου.

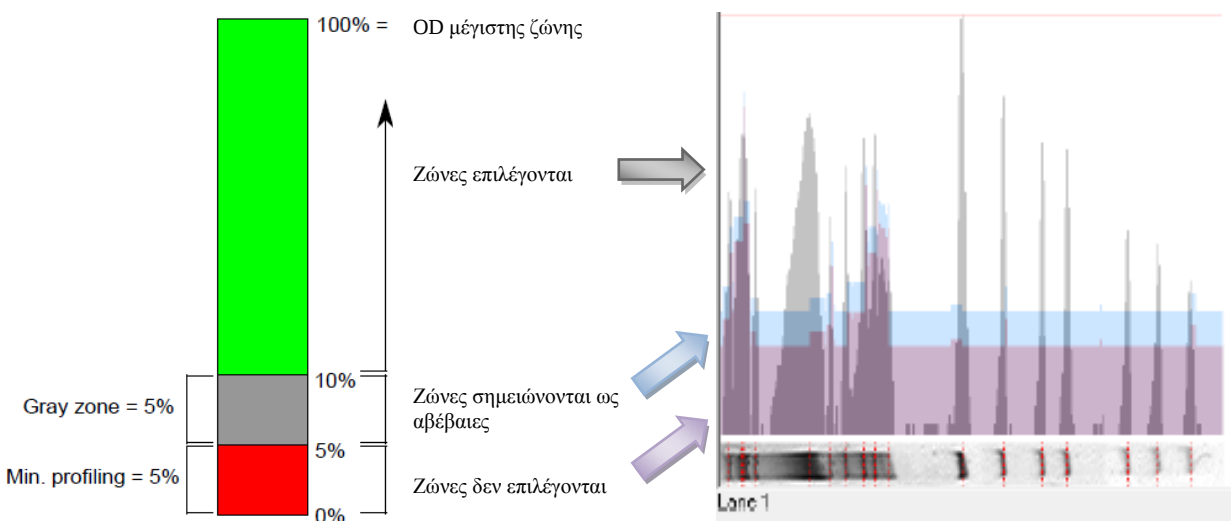
Το επόμενο βήμα ήταν η κανονικοποίηση του πηκτώματος. Αρχικά εισήχθησαν τα μοριακά βάρη του μοριακού δείκτη και ακολούθησε η σύνδεση με τις αντίστοιχες ζώνες στο πήκτωμα. Ο μοριακός δείκτης είναι το σταθερό στοιχείο σε όλα τα πηκτώματα, καθώς παρ' όλο που τα πηκτώμα ηλεκτροφορούνται κάτω από παρόμοιες συνθήκες παρουσιάζουν μικρές διαφοροποιήσεις. Για το λόγο αυτό τα πηκτώματα ρυθμίζονται και κανονικοποιούνται με βάση το μοριακό δείκτη.

Τα μοριακά βάρη του δείκτη που χρησιμοποιήθηκε είναι τα ακόλουθα: 10000 bp, 8000 bp, 6000 bp, 5000 bp, 4000 bp, 3500 bp, 3000 bp, 2500 bp, 2000 bp, 1500bp, 1000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp.

Το τελευταίο βήμα στην επεξεργασία των εικόνων των ηλεκτροφορήσεων ήταν ο εντοπισμός των ζωνών.

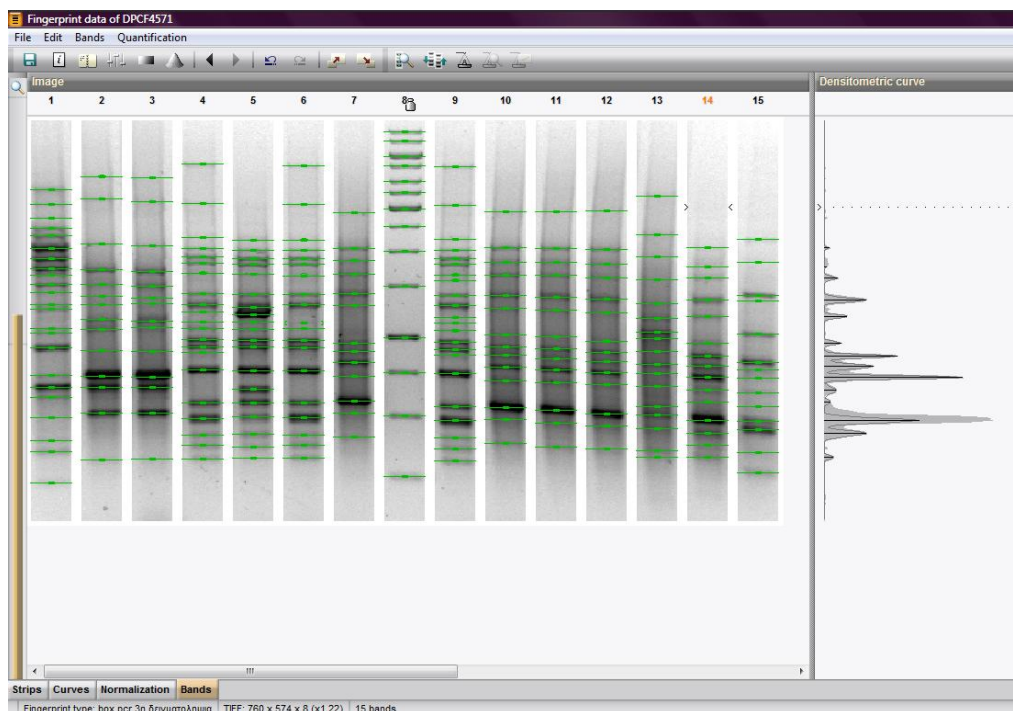
Ο εντοπισμός των ζωνών καθορίζεται από τις παραμέτρους “Minimum profiling” και “Gray zone”. Η πρώτη παράμετρος καθορίζει, με βάση τις πυκνομετρικές καμπύλες, το σημείο της

καμπύλης (σε %) που θεωρείται ότι δεν αντιστοιχεί σε πραγματική ζώνη. Εάν καθοριστεί στην παράμετρο αυτή μία τιμή π.χ. 5 %, κορυφές που είναι μικρές και δε ξεπερνάνε το 5 % της O.D. της μεγαλύτερης κορυφής, δε θα αποδοθούν ως ζώνες. Εάν βάλουμε τιμή 1 %, θα εμφανιστούν πάρα πολλές ζώνες μη αληθείς που οφείλονται στο θόρυβο του πηκτώματος. Η δεύτερη παράμετρος “Gray zone” αφορά τον εντοπισμό ζωνών ως αβέβαιες. Δηλαδή ένα τοποθετήσουμε στην παράμετρο αυτή τιμή 5 %, οι κορυφές που έχουν O.D. από 5 – 10 % της μεγαλύτερης κορυφής θα θεωρηθούν ως αβέβαιες και στην μετέπειτα ανάλυση δε θα ληφθούν υπόψη. Στην Εικόνα 2.29 φαίνεται σχηματικά η χρήση των δύο παραμέτρων.



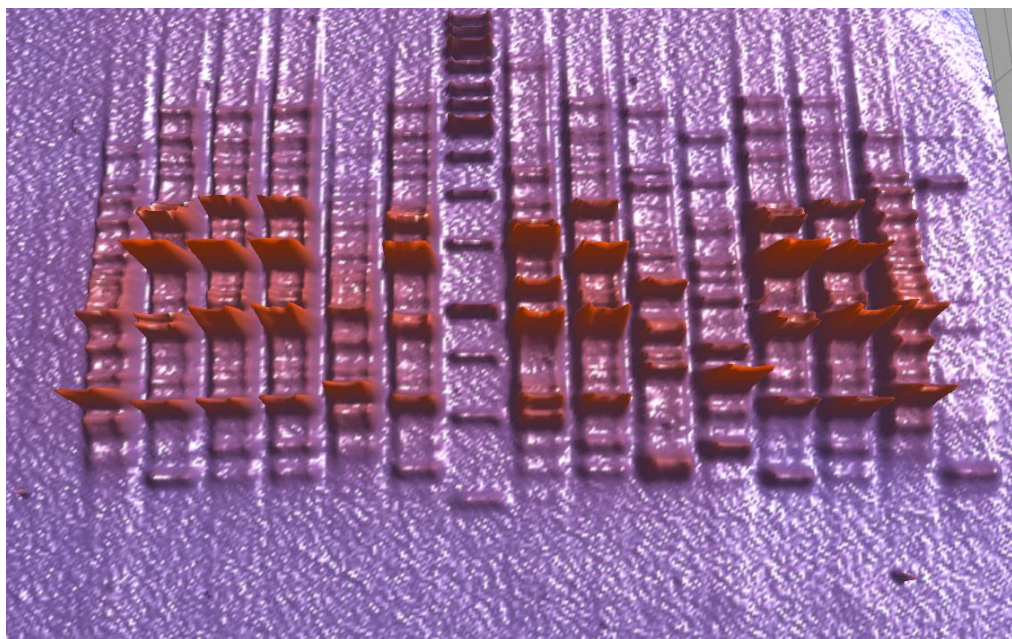
Εικόνα 2.29: Εντοπισμός ζωνών με βάση τις παραμέτρους “Minimum profiling” και “Gray zone”.

Ζώνες οι οποίες έχουν μεγάλη ένταση και βρίσκονται κοντά μεταξύ τους μπορεί να δώσουν στην πυκνομετρική καμπύλη μία κορυφή, η οποία όμως με εφαρμογή του συντελεστή “shoulder sensitivity” διαχωρίζονται σε περισσότερες. Ο εντοπισμός των ζωνών μπορεί να γίνει αυτόματα με βάση τα προαναφερόμενα αλλά ο χρήστης μπορεί να επέμβει και να διαγράψει τυχόν λανθασμένες ζώνες. Επίσης η γκρίζα ζώνη μπορεί να πάρει τιμή 0 % οπότε δεν υπάρχουν αβέβαιες ζώνες. Ζώνες που δεν έχουν εντοπιστεί αυτόματα μπορούν επίσης να προστεθούν από τον χρήστη. Η τελική εικόνα που λαμβάνει ο χρήστης μετά τον εντοπισμό των ζωνών και τις τυχόν διορθώσεις είναι αυτή που φαίνεται στην Εικόνα 2.30.



Εικόνα 2.30: Εντοπισμός ζωνών στο πρόγραμμα GelCompar II. Δεξιά φαίνεται η πυκνομετρική καμπύλη της γραμμής 14. Ο μοριακός μάρτυρας εντοπίζεται στην γραμμή 8.

Τέλος το πρόγραμμα παρέχει και τη δυνατότητα παρατήρησης του πηκτώματος σε τρισδιάστατη μορφή όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.31.



Εικόνα 2.31: Τρισδιάστατη απεικόνιση πηκτώματος. Στη μέση διακρίνεται ο μοριακός μάρτυρας και δεξιά και αριστερά του τα δείγματα.

Τα αποτελέσματα της επεξεργασίας των εικόνων εξήχθησαν ως αρχεία κειμένου (Εικόνα 2.32). Σε αυτά φαίνονται οι ζώνες σε κάθε γραμμή, η θέση των ζωνών, τα μοριακά βάρη τους βάρη, το ύψος της κορυφής και η επιφάνεια της κορυφής που δείχνει την ένταση (από την ποσοτικοποίηση της καμπύλης).

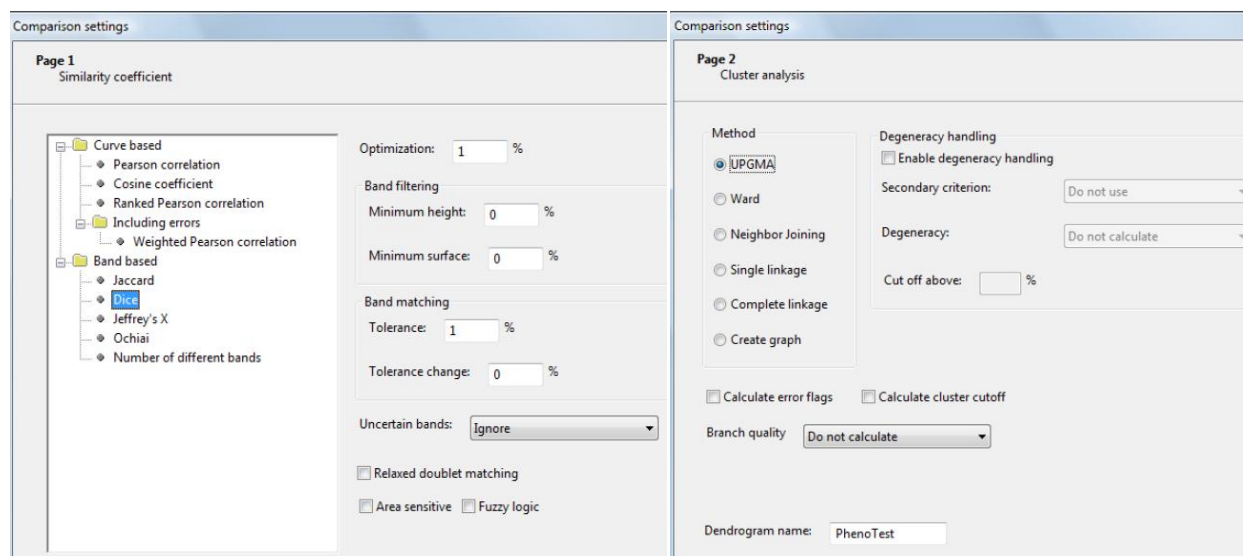
Pos	Norm pos	Metrics	Height	Rel ID surf
Lane 1				
129	32.32%	2.07 kb	20.0	8.66%
155	40.26%	1.60 kb	20.0	6.67%
179	47.44%	1.26 kb	0.0	0.00%
197	52.79%	1.04 kb	5.0	2.65%
214	57.65%	0.87 kb	14.0	6.09%
245	66.77%	0.60 kb	22.5	18.55%
252	68.84%	0.55 kb	73.5	39.82%
296	81.54%	0.29 kb	35.0	17.57%
Lane 2				
81	19.78%	3.28 kb	1.0	0.09%
96	23.44%	2.85 kb	5.0	1.14%
107	26.36%	2.53 kb	1.0	0.03%
116	28.75%	2.33 kb	24.0	5.16%
126	31.62%	2.12 kb	5.0	0.90%
140	35.68%	1.85 kb	33.9	6.65%
146	37.61%	1.74 kb	7.9	1.81%
156	40.69%	1.58 kb	30.9	7.56%
163	42.90%	1.47 kb	2.0	0.14%
168	44.35%	1.40 kb	2.0	0.02%
171	45.21%	1.36 kb	5.0	0.96%
172	45.38%	1.35 kb	5.0	0.74%
183	48.78%	1.20 kb	28.0	5.71%
189	50.41%	1.13 kb	13.0	3.00%
193	51.72%	1.08 kb	7.0	0.49%
208	55.85%	0.93 kb	102.0	23.44%
221	59.48%	0.81 kb	40.0	7.94%
234	63.26%	0.69 kb	22.9	5.01%
242	65.85%	0.63 kb	66.9	18.92%
287	78.99%	0.33 kb	45.0	10.30%
Lane 3				
95	23.18%	2.88 kb	2.0	0.32%
135	34.22%	1.94 kb	53.0	17.98%
149	38.55%	1.69 kb	3.0	0.48%
188	50.18%	1.14 kb	8.0	6.33%
200	53.51%	1.02 kb	49.9	22.14%
212	57.06%	0.89 kb	4.0	1.40%
225	60.80%	0.77 kb	51.9	20.27%
232	62.66%	0.71 kb	26.9	10.64%
238	64.63%	0.66 kb	6.0	4.41%
247	67.26%	0.59 kb	29.0	10.86%
256	70.19%	0.52 kb	1.0	0.14%
265	72.75%	0.46 kb	11.0	5.02%

Εικόνα 2. 32: Αποτελέσματα επεξεργασίας εικόνων.

Στη συνέχεια η κάθε γραμμή στα πηκτώματα αντιστοιχίστηκε με το αντίστοιχο στέλεχος στη βάση δεδομένων και ακολουθεί ανάλυση με σκοπό την ομαδοποίηση των στελεχών με βάση το πρότυπό τους.

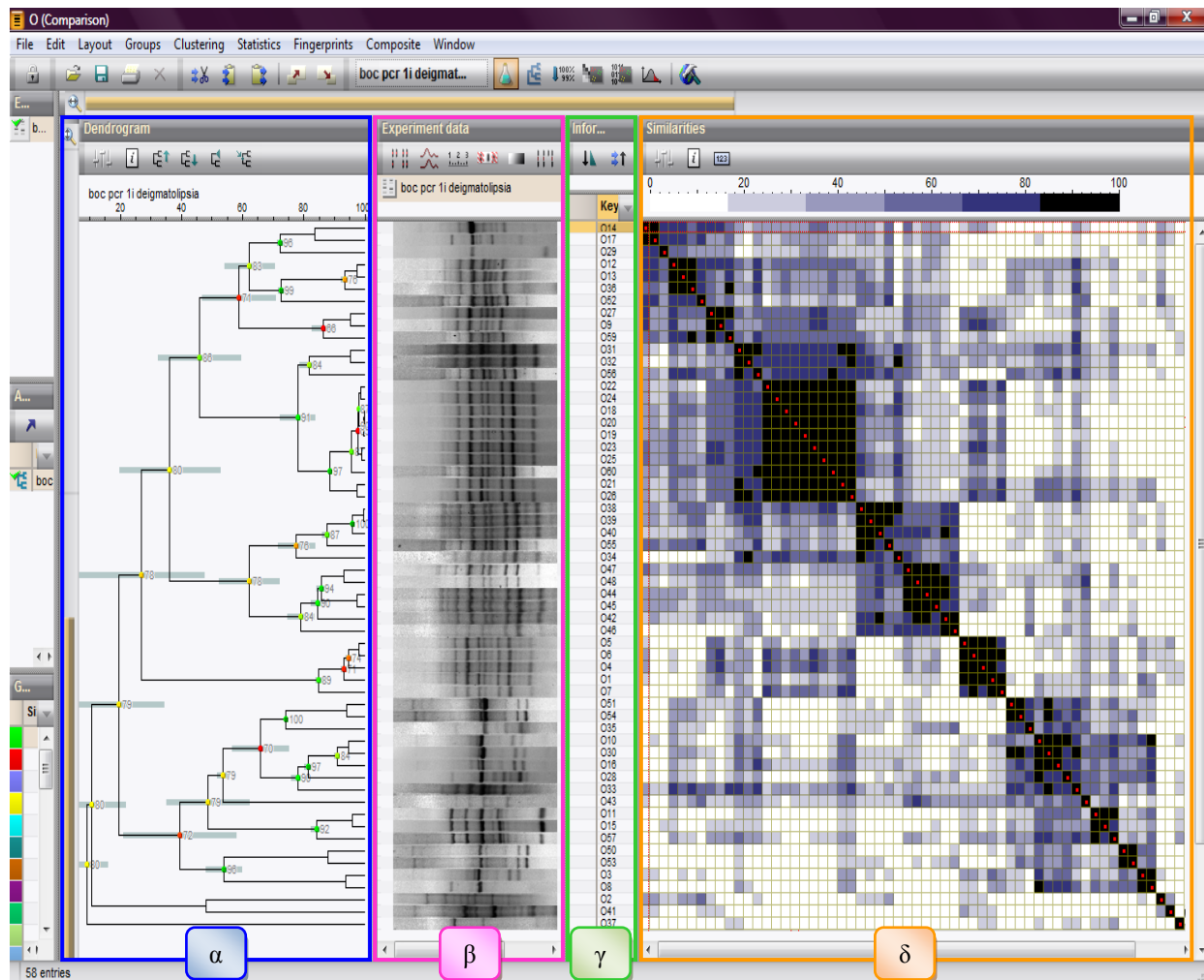
Αρχικά δημιουργήθηκε ένα πείραμα σύγκρισης (Εικόνα 2.26δ) και επιλέχθηκαν τα στελέχη που θέλαμε να αναλυθούν. Επιλέχθηκε στη συνέχεια η επιλογή cluster analysis. Οι ρυθμίσεις που επιλέγονται αφορούν αρχικά το συντελεστή ομοιότητας και οι δύο επιλογές είναι είτε να γίνει υπολογισμός με βάση τις πυκνομετρικές καμπύλες (curve based) είτε με βάση τις ζώνες (band

based) και φαίνονται στην Εικόνα 2.33α. Σε κάθε επιλογή υπάρχουν διαφορετικοί συντελεστές που μπορούν να επιλεγθούν. Ακολουθεί η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ομαδοποίησης (Εικόνα 2.33β). Στην παρούσα εργασία η ανάλυση έγινε με βάση το συντελεστή Pearson correlation και τις μεθόδους UPGMA και Neighbor-joining.

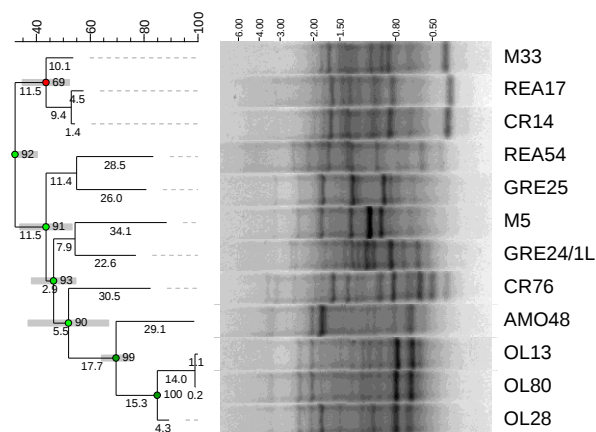


Εικόνα 2.33: α) Επιλογή συντελεστή ομοιότητας και ρυθμίσεις βελτιστοποίησής του, β) επιλογή μεθόδου ομαδοποίησης.

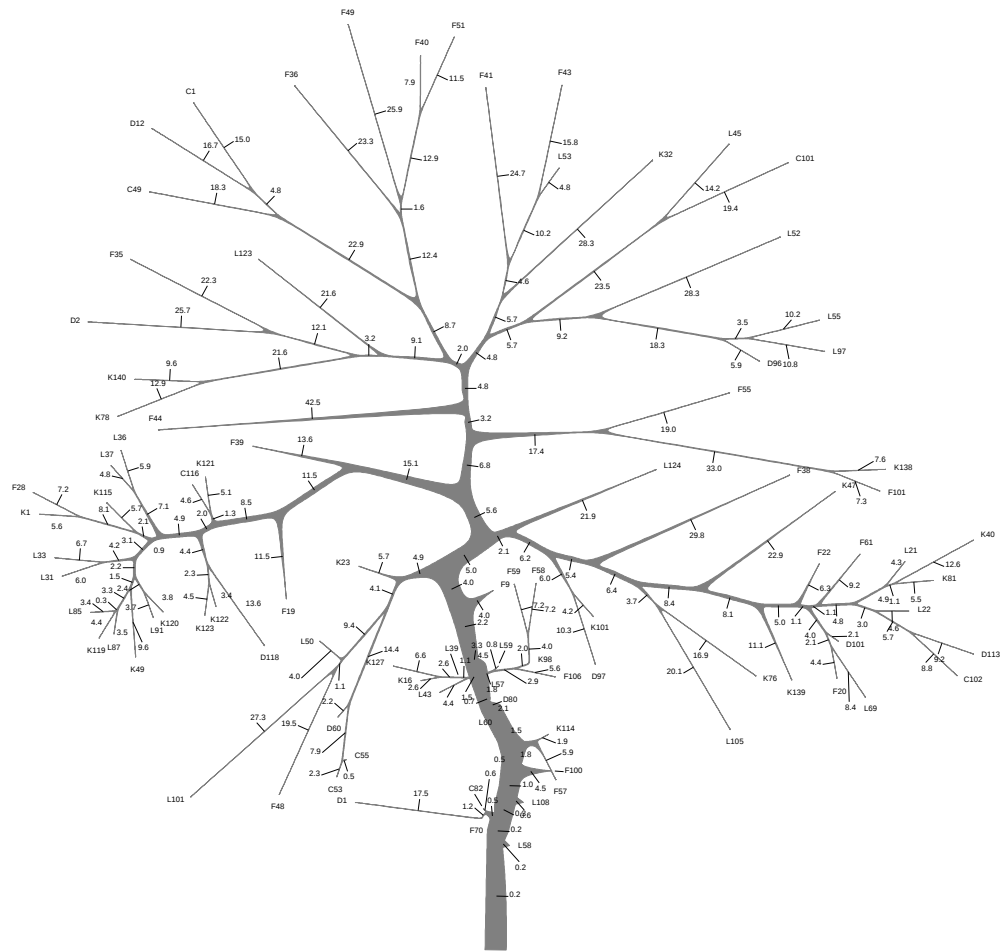
Τα αποτελέσματα της ομαδοποίησης φαίνονται στην Εικόνα 2.34. Στο πρώτο (α) τμήμα της εικόνας φαίνεται το δέντρο που έχει προκύψει από την ανάλυση, στο δεύτερο (β) τμήμα φαίνονται τα πρότυπα του κάθε στελέχους, στο τρίτο (γ) τμήμα φαίνονται τα στελέχη και στο δ τμήμα φαίνονται οι ομοιότητες των προτύπων. Στο πάνω μέρος του τέταρτου (δ) τμήματος φαίνεται η ράβδος που υποδηλώνει την ομοιότητα που έχουν τα πρότυπα μεταξύ τους και το ανάλογο χρώμα που αντιστοιχεί στα διάφορα ποσοστά. Τα αποτελέσματα της ομοιότητας των προτύπων μπορούν να εξαχθούν ως αρχεία κειμένου όπως επίσης και τα δενδρογράμματα ως εικόνες (Εικόνα 2.35). Στα δενδρογράμματα μπορούν να τοποθετηθούν οι αποστάσεις μεταξύ των στελεχών, μπορούν να συμπτυχθούν κλάδοι καθορίζοντας την απόσταση που θα ληφθεί υπόψη κ.λ.π.. Τέλος μπορούν να δημιουργηθούν δέντρα (rendered trees) είτε με ρίζα είτε χωρίς (Εικόνα 2.36) και μπορεί να γίνει μη ιεραρχική αποτύπωση των προτύπων στον χώρο, μέσω της τεχνικής PCA (Principal Components Analysis) και MDS (Multi-Dimensional Scaling) που διαφέρει από τα δενδρογράμματα (Εικόνα 2.37).



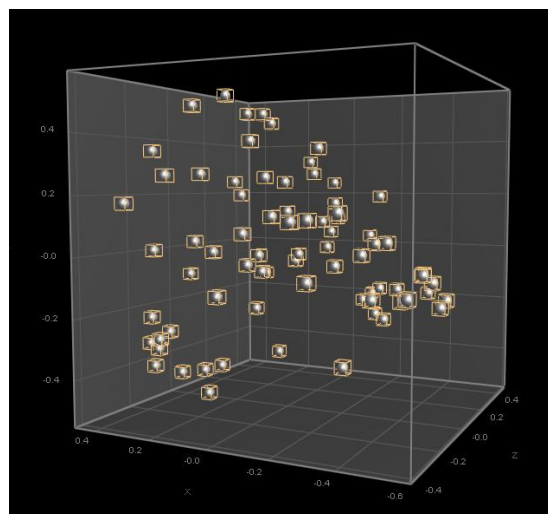
Εικόνα 2.34: Η οθόνη σύγκρισης στην οποία εμφανίζονται τα πρότυπα των στελεχών και η ομοιότητα τους (similarity matrix).



Εικόνα 2.35: Δενδρόγραμμα όπως προέκυψε με χρήση του προγράμματος GelCompar II.



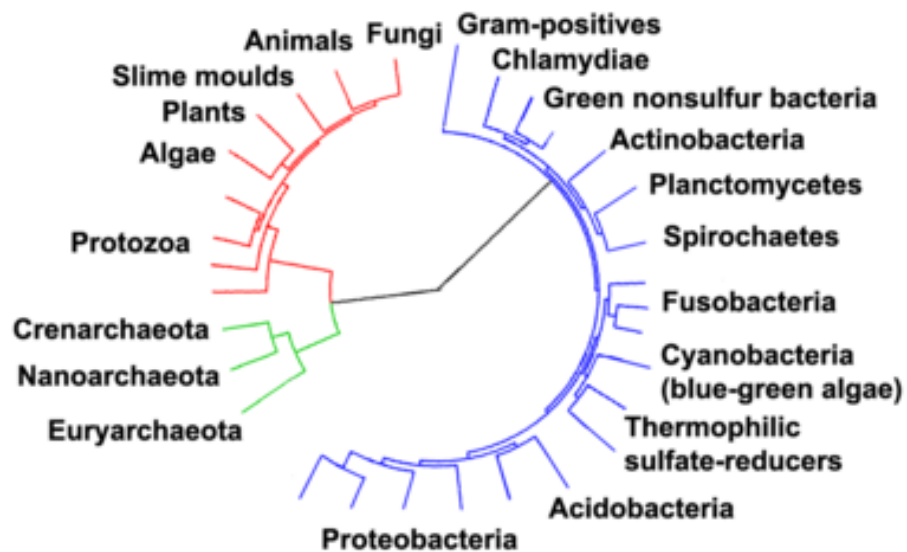
Εικόνα 2.36: Δενδρόγραμμα (rendered tree) χωρίς ρίζα όπως προέκυψε με χρήση του προγράμματος GelCompar II.



Εικόνα 2.37: Μη ιεραρχική απεικόνιση των προτύπων με την τεχνική MDS (Multi-Dimensional Scaling) με χρήση του προγράμματος GelCompar II.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



(Ciccarelli, και συν. 2006)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

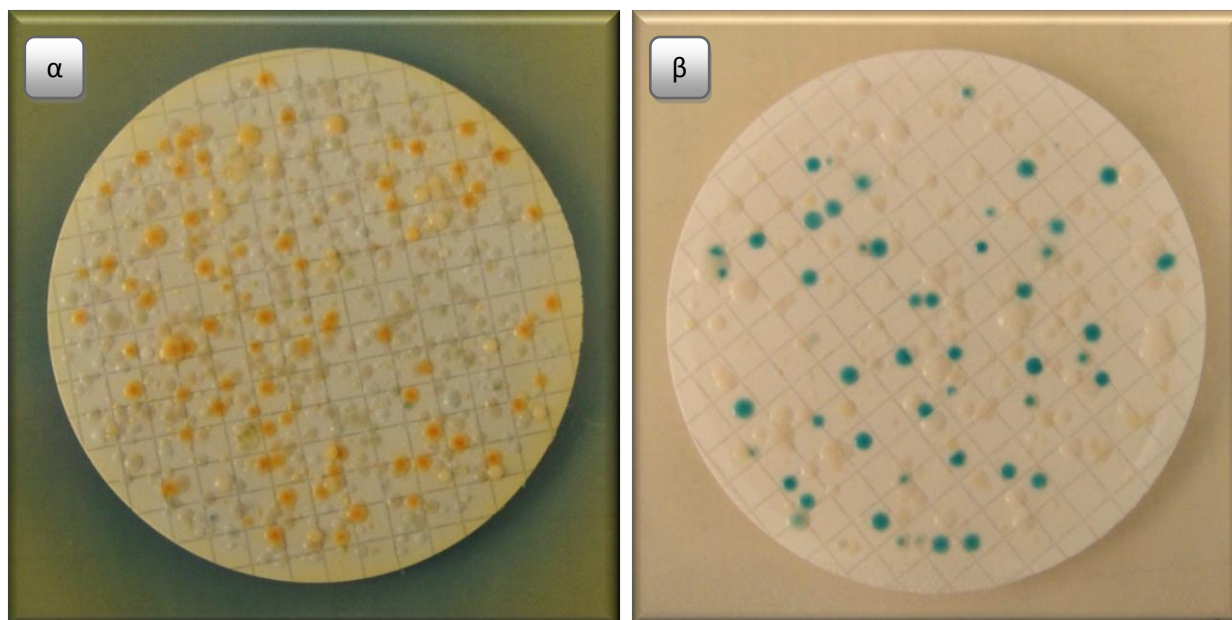
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μικροβιακή Ποικιλότητα στο Νερό

Εφαρμόζοντας τις μεθόδους ανάκτησης μικροοργανισμών μέσω καλλιιεργειών, όπως περιγράφονται στην παράγραφο 2.5, έγινε ποσοτική ανάλυση του μικροβιακού πληθυσμού των δειγμάτων του νερού με προσδιορισμό του ολικού πληθυσμού των καλλιεργήσιμων βακτηρίων και ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών μέσω εκλεκτικών υποστρωμάτων και βιοχημικών δοκιμασιών. Επίσης εφαρμόζοντας μοριακές τεχνικές, πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση του μικροβιακού φορτίου του νερού και μοριακή ανίχνευση - επαλήθευση των παθογόνων μικροοργανισμών μέσω εξειδικευμένων PCR (§2.8.). Τέλος έγινε σύγκριση της μικροβιακής ποικιλότητας στις διάφορες δειγματοληψίες μέσω της τεχνικής DGGE (§2.10).

3.1.1. Παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών

Από την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα, απομονώθηκαν 362 αποικίες που εμφάνιζαν τα απαιτούμενα μορφολογικά χαρακτηριστικά (§2.5.4) για το κάθε εκλεκτικό υπόστρωμα (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Αποικίες που ανιχνεύτηκαν στα εκλεκτικά υποστρώματα με τη μέθοδο της διήθησης σε μεμβράνες και θεωρούνται ως πιθανά κολίμορφα (κίτρινες) όπως φαίνονται στο υπόστρωμα Tergitol-7 και β) αποικίες που θεωρούνται ως πιθανές *E. coli* (κυανές) όπως φαίνονται στο υπόστρωμα TBX.

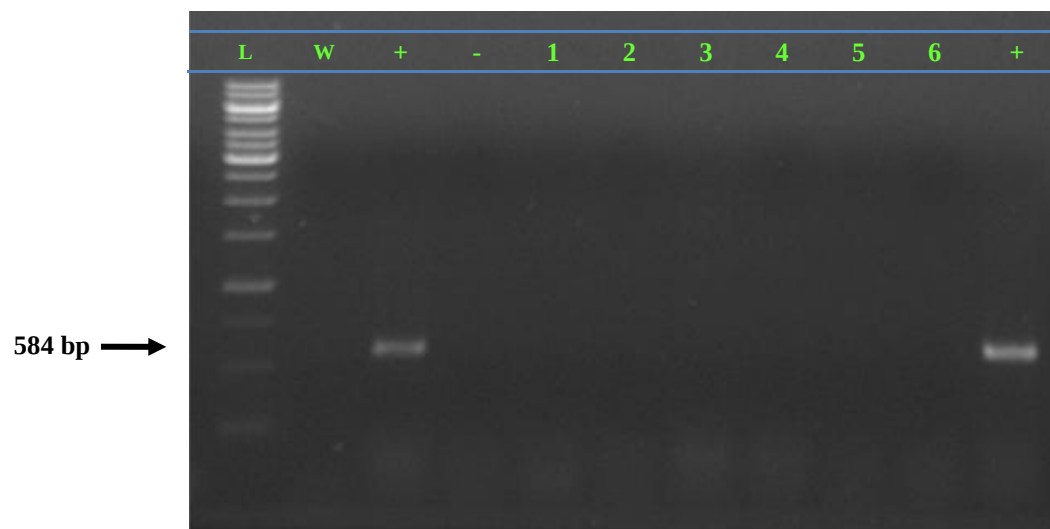
Μέρος μόνο αυτών των αποικιών (172 αποικίες) πληρούσαν τις βιοχημικές δοκιμασίες (§2.5.7) και απομονώθηκαν ως καθαρές καλλιέργειες ώστε να επιβεβαιωθούν με μοριακές τεχνικές ως κολίμορφα, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*.

Δεν ανιχνεύτηκαν στελέχη του γένους *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Enterococcus* sp. και *Candida albicans*. Ειδικότερα για την ανίχνευση της *Salmonella* sp. πραγματοποιήθηκαν τα δύο πρώτα στάδια καθώς στο δεύτερο στάδιο δεν υπήρχε αποχρωματισμός του υποστρώματος Rappaport - Vassiliadis R10 Broth (§2.5.5). Στον Πίνακα 3.1 φαίνεται η κατανομή των απομονωμένων στελεχών ανά δειγματοληψία.

Πίνακας 3.1: Στελέχη που απομονώθηκαν ως παθογόνα από εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα κατά τη διάρκεια των 4 δειγματοληψιών

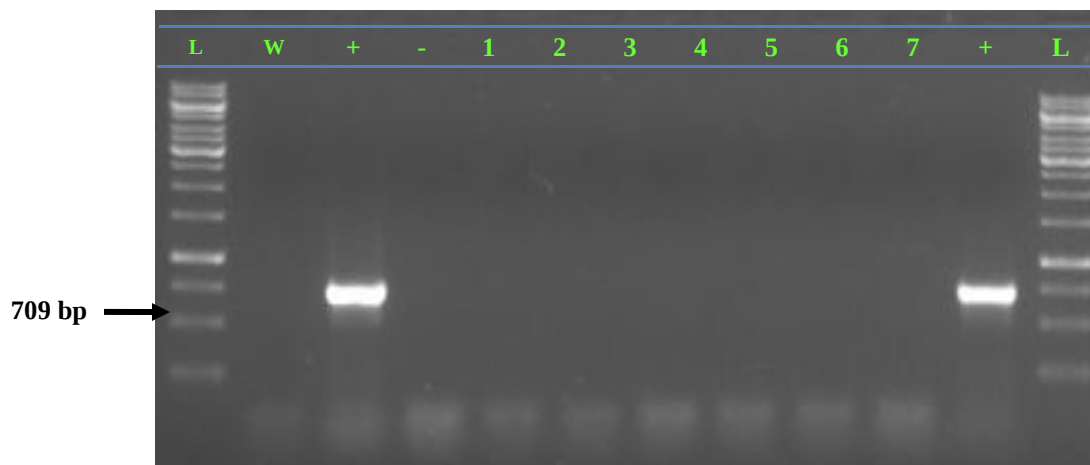
	Δειγματοληψίες			
	Ιανουάριος 2010	Μάρτιος 2010	Ιούλιος 2010	Φεβρουάριος 2011
Κολίμορφα βακτήρια	10	21	6	24
<i>Escherichia coli</i>	0	2	0	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	43	34	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> sp.	0	0	0	0
<i>Enterococcus</i> sp.	0	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0

Τα 172 στελέχη που απομονώθηκαν, αναλύθηκαν με τις εξειδικευμένες για το είδος PCR των παραγράφων 2.8.6 έως 2.8.8. Κανένα από τα 172 στελέχη που απομονώθηκαν ως κολίμορφα, *E. coli* και *Pseudomonas aeruginosa* δεν επιβεβαιώθηκε με τις εξειδικευμένες για το γένος PCR. Στην Εικόνα 3.2 φαίνεται η εξειδικευμένη για το γένος PCR για το βακτήριο *E. coli*. Τα δείγματα και ο αρνητικός μάρτυρας δεν έδωσαν προϊόντα PCR ενώ ο θετικός μάρτυρας έδωσε προϊόν 584 βάσεων.



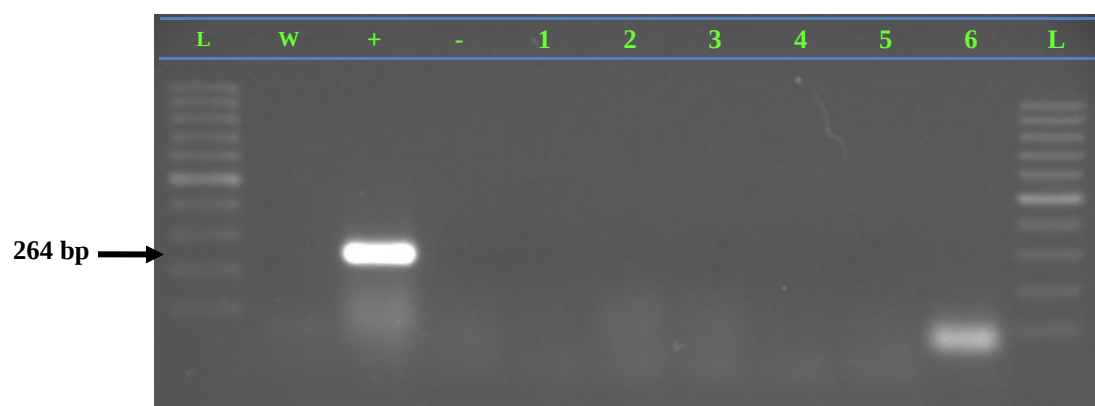
Εικόνα 3.2: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την ανίχνευση *E. coli*. Η θέση L αντιστοιχεί σε μοριακό μάρτυρα 1 kb, η θέση W αντιστοιχεί σε αρνητικό μάρτυρα (αντίδραση χωρίς DNA), οι θέσεις (+) αντιστοιχούν σε θετικό μάρτυρα (*E. coli*), η θέση (-) αντιστοιχεί σε αρνητικό μάρτυρα (*Pseudomonas aeruginosa*) και οι θέσεις 1 - 6 αντιστοιχούν σε δείγματα.

Στην Εικόνα 3.3 φαίνεται η εξειδικευμένη για το γένος PCR για το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*. Τα δείγματα και ο αρνητικός μάρτυρας δεν έδωσαν προϊόντα PCR ενώ ο θετικός μάρτυρας έδωσε προϊόν **709** βάσεων.



Εικόνα 3.3: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την ανίχνευση *Pseudomonas aeruginosa*. Οι θέσεις L αντιστοιχούν σε μοριακό μάρτυρα 1 kb, η θέση W αντιστοιχεί σε αρνητικό μάρτυρα (αντίδραση χωρίς DNA), οι θέσεις (+) αντιστοιχούν σε θετικό μάρτυρα (*Pseudomonas aeruginosa*), η θέση (-) αντιστοιχεί σε αρνητικό μάρτυρα (*E. coli*) και οι θέσεις 1 - 7 αντιστοιχούν σε δείγματα.

Στην Εικόνα 3.4 φαίνεται η εξειδικευμένη για το γένος PCR για τα κολίμορφα βακτήρια. Τα δείγματα και ο αρνητικός μάρτυρας δεν έδωσαν προϊόντα PCR ενώ ο θετικός μάρτυρας έδωσε προϊόν **264** βάσεων.



Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την ανίχνευση κολίμορφων βακτηρίων. Η θέση L αντιστοιχεί σε μοριακό μάρτυρα 100 bp, η θέση W αντιστοιχεί σε αρνητικό μάρτυρα (αντίδραση χωρίς DNA), οι θέσεις (+) αντιστοιχούν σε θετικό μάρτυρα (*E. coli*), η θέση (-) αντιστοιχεί σε αρνητικό μάρτυρα (*Pseudomonas aeruginosa*) και οι θέσεις 1 - 6 αντιστοιχούν σε δείγματα.

3.1.2. Ποσοτική Ανάλυση του Πληθυσμού των Βακτηρίων

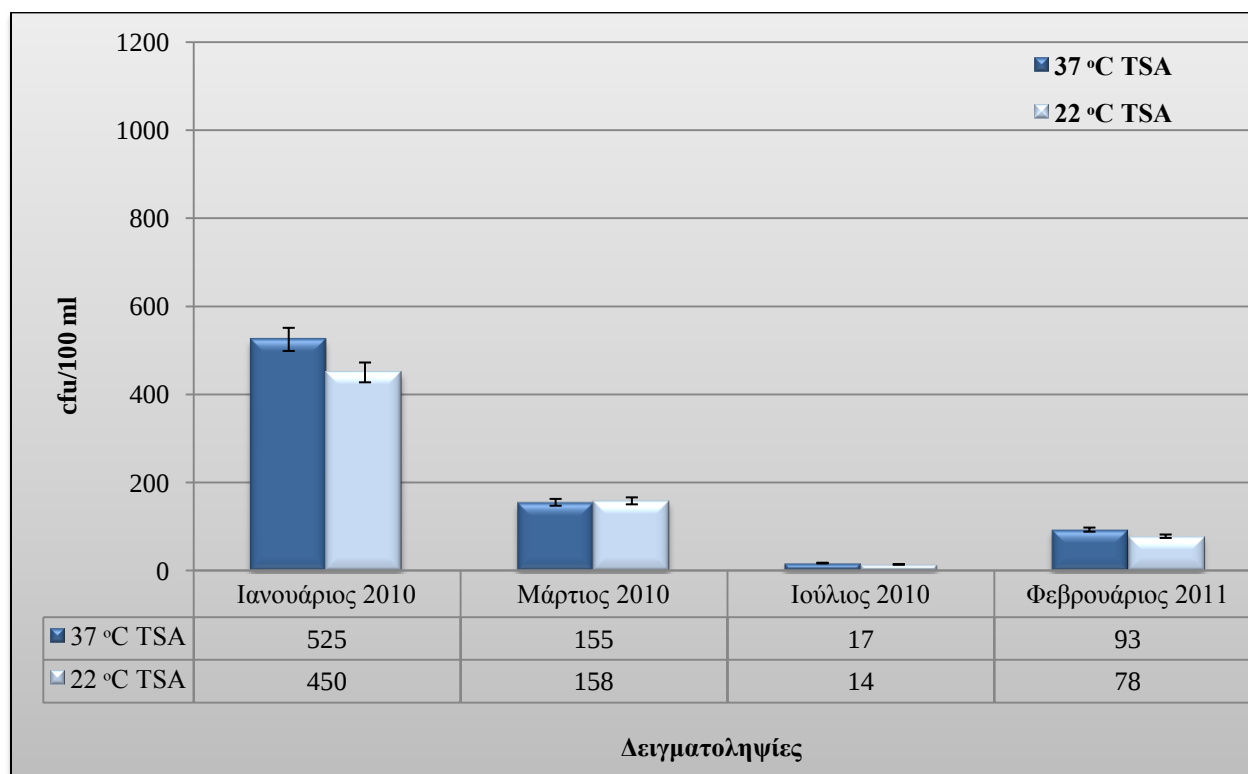
Η ποσοτική ανάλυση του πληθυσμού για τις 4 δειγματοληψίες μπορεί να διακριθεί σε 2 ομάδες. Στην πρώτη περίπτωση, μελετήθηκε ο ολικός μεσόφιλος ετερότροφος πληθυσμός, με ίδια μεθοδολογία να ακολουθείται και στις 4 δειγματοληψίες. Με βάση τα αποτελέσματα των δύο πρώτων δειγματοληψιών για τον προσδιορισμό του ολικού ετερότροφου μεσόφιλου πληθυσμού, σχεδιάστηκαν επιπλέον πειράματα που εφαρμόστηκαν στις δύο τελευταίες δειγματοληψίες (Ιούλιος 2010 και Φεβρουάριος 2011). Τα πειράματα αυτά, στόχευαν στην καλύτερη διερεύνηση του μικροβιακού φορτίου και πως η ανάκτηση του μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες. Στα πειράματα αυτά, μελετήθηκε: α) η ύπαρξη βακτηρίων που διαπερνούν τις μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm και τα οποία συγκρατούνται σε μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,1 μm , β) η ύπαρξη ψυχρόφιλων μικροοργανισμών, γ) η ύπαρξη ολιγότροφων μικροοργανισμών, δ) η επίδραση του θειοθειικού νατρίου (sodium thiosulfate) στην ανάκτηση των μικροοργανισμών και ε) η επίδραση της θερμοκρασίας του δείγματος πριν την κατεργασία του στην ανάκτηση των μικροοργανισμών.

3.1.2.1. Προσδιορισμός ολικού ετερότροφου πληθυσμού

Ο πληθυσμός των ετερότροφων βακτηρίων προσδιορίστηκε σύμφωνα με τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας, σε πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα TSA, με επώαση στους 37 °C και 22 °C για διάστημα 24-48 h. Στην Εικόνα 3.5 φαίνεται η διακύμανση του ολικού ετερότροφου πληθυσμού στο σύνολο των δειγματοληψιών που πραγματοποιήθηκαν.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο ολικός ετερότροφος μεσόφιλος πληθυσμός βρίσκεται και στις τέσσερις δειγματοληψίες κάτω από το όριο των 10^4 cfu/100 ml (ή 100 cfu/ml) που ορίζει η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία για την ποιοτική κατηγορία του νερού που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία. Σε όλες τις δειγματοληψίες ο πληθυσμός παρέμεινε σε πολύ χαμηλές τιμές. Ειδικότερα, μεγαλύτερος πληθυσμός (525 cfu/100 ml) παρατηρήθηκε στη δειγματοληψία του Ιανουαρίου 2010 ενώ στη δειγματοληψία του Ιουλίου 2010 ο πληθυσμός εμφανίστηκε ιδιαίτερα μικρός (14 cfu/100 ml). Στις δειγματοληψίες Μαρτίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011, ο πληθυσμός ήταν παραπλήσιος. Αναφορικά με τη θερμοκρασία επώασης των δειγμάτων, υψηλότερο μικροβιακό φορτίο (της τάξης του 19%) παρατηρήθηκε στους 37 °C με εξαίρεση τη δειγματοληψία του

Μαρτίου 2010, αλλά οι διακυμάνσεις ανάμεσα στις δύο θερμοκρασίες επώασης ήταν ιδιαίτερως μικρές και για τις τέσσερις δειγματοληψίες.



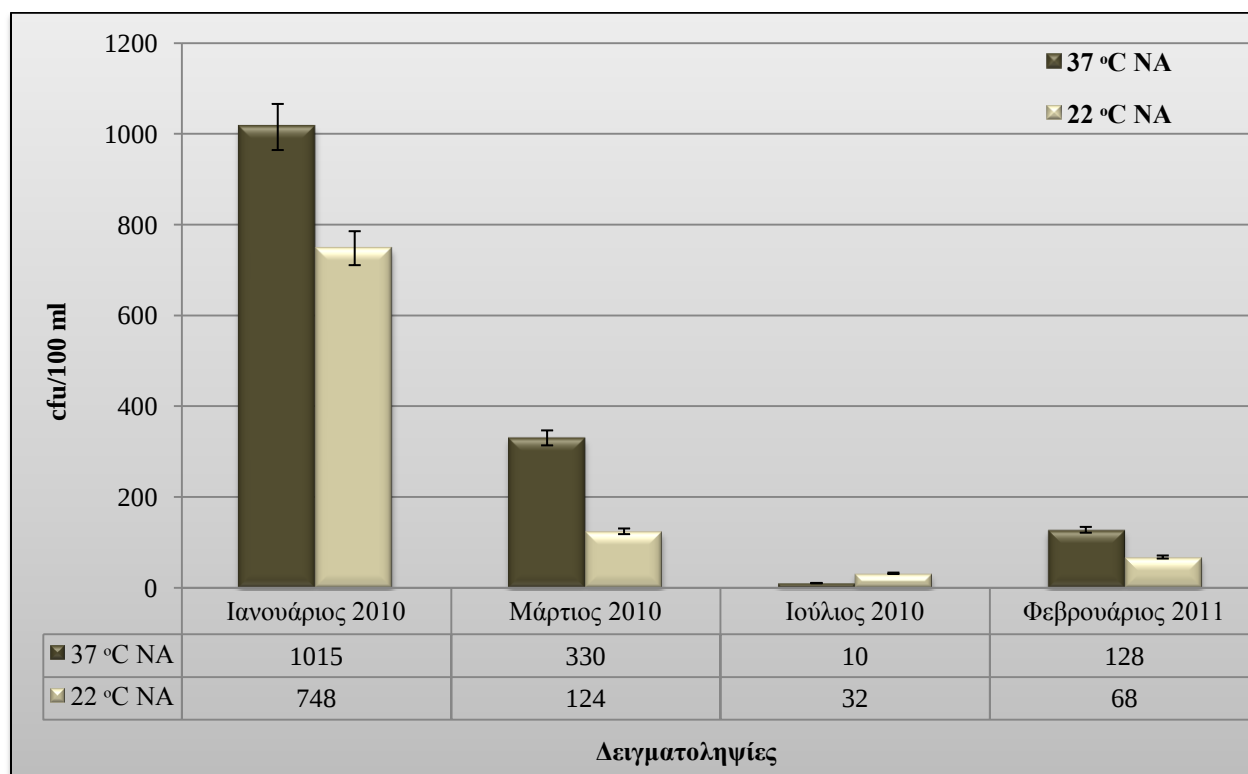
Εικόνα 3.5: Πληθυσμός (cfu/100 ml) ετερότροφων βακτηρίων που ανακτήθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA στους 37 °C και 22 °C.

3.1.2.2. Προσδιορισμός ολικού ετερότροφου πληθυσμού σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar

Στην παρούσα εργασία προσδιορίστηκε ο ολικός ετερότροφος πληθυσμός όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.1.2.1 και επιπλέον χρησιμοποιήθηκε στην ανάκτηση του μικροβιακού φορτίου και το θρεπτικό υπόστρωμα NA. Στον Πίνακα 3.4 και στην Εικόνα 3.6 παρουσιάζεται η διακύμανση του ολικού ετερότροφου μεσόφιλου πληθυσμού στο σύνολο των δειγματοληψιών που πραγματοποιήθηκαν στους 37 °C και στους 22 °C στο θρεπτικό υπόστρωμα NA.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, με χρήση του θρεπτικού υποστρώματος NA, ο ολικός ετερότροφος μεσόφιλος πληθυσμός βρίσκεται και στις τέσσερις δειγματοληψίες κάτω από το όριο των 10^4 cfu/100 ml (ή 100 cfu/ml) που ορίζει η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία για την ποιοτική κατηγορία του νερού που μελετήθηκε. Το υψηλότερο μικροβιακό φορτίο παρατηρήθηκε τον

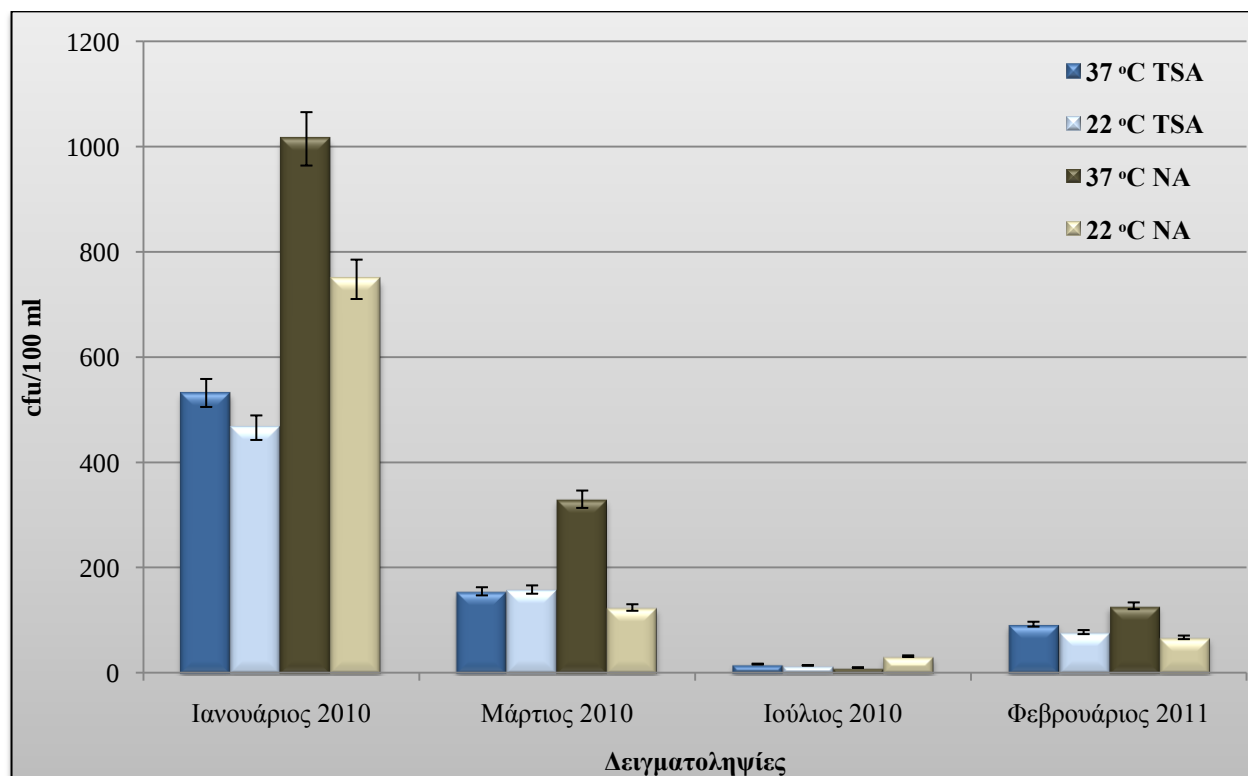
Ιανουάριο 2010 (1015 cfu/100 ml), το μικρότερο τον Ιούλιο 2010 (10 cfu/100 ml) ενώ στις δειγματοληψίες Μαρτίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011 υπήρχε ένα παραπλήσιο μικροβιακό φορτίο. Στους 37 °C παρατηρήθηκε μεγαλύτερος πληθυσμός (αύξηση 26-62 %) με εξαίρεση τη δειγματοληψία του Ιουλίου 2010 όπου μεγαλύτερος πληθυσμός βρέθηκε στους 22 °C.



Εικόνα 3.6: Πληθυσμός (cfu/100 ml) ετερότροφων βακτηρίων που ανακτήθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα NA στους 37 °C και 22 °C.

Στο διάγραμμα της Εικόνας 3.7 συγκρίνονται οι πληθυσμοί που ανακτήθηκαν στα δύο πλήρη θρεπτικά υποστρώματα TSA και NA στους 37 °C και στους 22 °C. Σε θερμοκρασία επώασης 37 °C παρατηρήθηκε ότι στις δειγματοληψίες του Ιανουαρίου 2010, Μαρτίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011, ο πληθυσμός των ετερότροφων βακτηρίων ήταν μεγαλύτερος στο NA, με αύξηση στο TSA 93 %, 112 % και 38 % αντίστοιχα, ενώ μόνο στη δειγματοληψία του Ιουλίου 2010 ήταν μικρότερος κατά 41 %. Σε θερμοκρασία επώασης 22 °C παρατηρήθηκε ότι τον Ιανουάριο 2010 ο πληθυσμός των ετερότροφων βακτηρίων ήταν 66 % υψηλότερος στο NA σε σχέση με το TSA, και τον Ιούλιο 2010 ήταν 129 % υψηλότερος στο NA. Στις δειγματοληψίες Μαρτίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011), ο πληθυσμός που ανακτήθηκε στο NA ήταν μικρότερος κατά 22 % και 13 % αντίστοιχα. Γενικά παρατηρήθηκε ότι στο υπόστρωμα NA ανακτήθηκε

υψηλότερο μικροβιακό φορτίο στις περισσότερες δειγματοληψίες με μεγάλη διαφορά σε σχέση με το θρεπτικό TSA. Όπου παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού στο NA σε σχέση με το TSA, αυτή συνήθως ήταν μικρή. Επιπλέον, με χρήση του θρεπτικού NA παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός των βακτηρίων που ανακτήθηκε στους 37 °C εμφανίστηκε αρκετά υψηλότερος σε όλες τις δειγματοληψίες, εκτός από αυτήν του Ιουλίου 2010, σε σχέση με αυτών στους 22 °C, ενώ αντιθέτως με χρήση του TSA οι διαφορές ήταν πολύ μικρές.



Εικόνα 3.7: Επίδραση θρεπτικού υποστρώματος NA στην ανάκτηση του ετερότροφου μεσόφιλου πληθυσμού στους 37 °C και 22 °C.

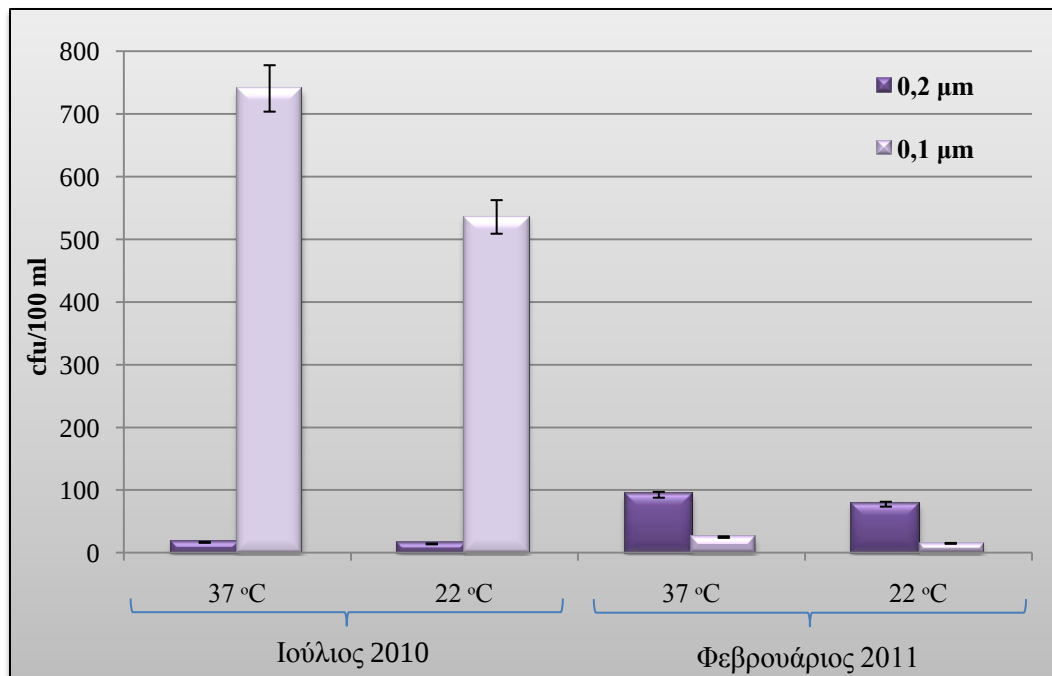
3.1.2.3. Επίδραση διαφόρων παραγόντων στην ανάκτηση των μικροοργανισμών σε δείγματα νερού

Στις παρακάτω παραγράφους αναλύονται τα αποτελέσματα των επιμέρους πειραμάτων για κάθε παράμετρο που μελετήθηκε ξεχωριστά και σε σύγκριση πάντα με τη κλασσική πειραματική πορεία που προτείνεται, δηλαδή άμεση διήθηση του δείγματος σε μεμβράνη με διάμετρο πόρων 0,2 μm και επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA και σε θερμοκρασίες 37 °C και 22 °C. Στην

παράγραφο 3.1.2.9 γίνεται ταυτόχρονη σύγκριση όλων των παραμέτρων που μελετήθηκαν. Οι παράμετροι είναι: α) τα διηθητά βακτήρια, β) οι ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί, γ) οι ολιγότροφοι μικροοργανισμοί, δ) η επίδραση του θειοθειικού νατρίου και ε) η επίδραση της θερμοκρασίας του δείγματος πριν την κατεργασία του στην ανάκτηση των μικροοργανισμών.

3.1.2.4. Βακτήρια ικανά να διαπεράσουν μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm

Η ανίχνευση βακτηρίων που μπορούν να διαπεράσουν τις μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm πραγματοποιήθηκε κατά τις δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής ανάλυσης στις δύο δειγματοληψίες όπως φαίνονται στην Εικόνα 3.8 ήταν αντιφατικά όσον αφορά στην ποσοτική ανάλυση, παρ' όλα αυτά και στις δυο δειγματοληψίες ανιχνεύτηκε ο συγκεκριμένος τύπος βακτηρίων. Αναλυτικότερα, τα βακτήρια που διαπερνάνε τις μεμβράνες 0,2 μm εντοπίστηκαν τον Ιούλιο 2010 σε πολύ μεγάλο πληθυσμό σε σχέση με αυτά που δεν τη διαπερνάνε, με τιμές μέχρι και 741 cfu/100 ml.



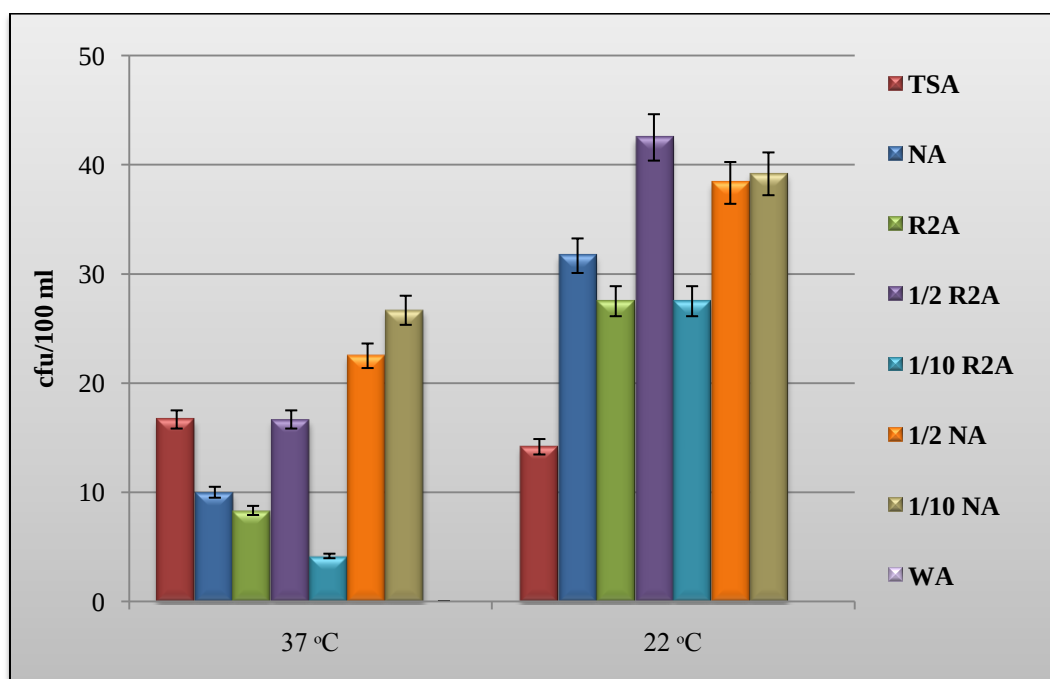
Εικόνα 3.8: Σύγκριση πληθυσμού βακτηρίων κατά δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011, που συγκρατούνται στις μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm και 0,1 μm (θρεπτικό υπόστρωμα TSA, επώαση στους 37 °C και 22 °C).

Αντιθέτως το Φεβρουάριο 2011 ο πληθυσμός τους ήταν πολύ χαμηλός με μέγιστη τιμή τις 25 cfu/100 ml και ταυτόχρονα ήταν μικρότερος και από τον πληθυσμό των βακτηρίων που δε διαπέρασαν τη μεμβράνη των 0,2 μm. Για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων η επεξεργασία του δείγματος του Ιουλίου 2010 επαναλήφθηκε και τα αποτελέσματα ήταν ταυτόσημα. Παρ' όλο τον πολύ χαμηλό έως μηδενικό πληθυσμό αυτών των βακτηρίων στη δειγματοληψία, του Φεβρουαρίου 2011, όπως θα αναφερθεί και παρακάτω, η ύπαρξή τους επιβεβαιώθηκε μέσω της μοριακής τεχνικής DGGE. Έχοντας υπ' όψη την Εικόνα 3.5 παρατηρείται ότι τον Ιούλιο 2010 με την κλασσική μεθοδολογία ανίχνευσης του ετερότροφου πληθυσμού, ο πληθυσμός των βακτηρίων είναι σχεδόν μηδενικός και είναι ο μικρότερος σε σχέση με τις υπόλοιπες δειγματοληψίες. Όμως με βάση και την Εικόνα 3.8 παρατηρείται ότι ο πληθυσμός που διαπέρασε τις μεμβράνες των 0,2 μm και συγκρατήθηκε σε αυτές των 0,1 μm είναι μεγαλύτερος από οποιονδήποτε άλλο πληθυσμό σε όλες τις δειγματοληψίες που ανιχνεύτηκε με την κλασσική μεθοδολογία για την αντίστοιχη θερμοκρασία επώασης.

3.1.2.5. Ολιγότροφος πληθυσμός βακτηρίων στο νερό

Επειδή το νερό αποτελεί ένα ολιγότροφο ενδιαίτημα στο οποίο οι μικροοργανισμοί βρίσκονται υπό συνθήκες καταπόνησης, στην δειγματοληψία του Ιουλίου 2010 δοκιμάστηκαν θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν μικρότερες ποσότητες θρεπτικών συστατικών από τα δύο πλήρη γενικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται συνήθως στην εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού, ώστε τα κύτταρα να εγκλιματιστούν καλύτερα σε συνθήκες παροχής θρεπτικών. Χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα 1/2 NA, 1/10 NA, 1/2 R2A, 1/10 R2A και WA (§2.3.3 & §2.5.2). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα R2A το οποίο ενδείκνυται για την απομόνωση μικροοργανισμών από πόσιμο νερό καθώς δεν είναι τόσο πλήρες όσο το TSA και το NA και ευνοεί την ανάπτυξη των καταπονημένων μικροοργανισμών και αυτών που αναπτύσσονται αργά. Με βάση τα αποτελέσματα της δειγματοληψίας του Ιουλίου 2010 (αναλύονται παρακάτω) επιλέχθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα WA για την εκτίμηση του ολιγότροφου πληθυσμού κατά τη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα διαγράμματα των Εικόνων 3.9 και 3.10 όπου συγκρίνονται οι πληθυσμοί στα φτωχά θρεπτικά υποστρώματα σε σχέση με τους πληθυσμούς που ανακτήθηκαν στα TSA και NA. Τον Ιούλιο 2010 (Εικόνα 3.9) παρατηρείται ότι στους 37 °C, ο υψηλότερος πληθυσμός

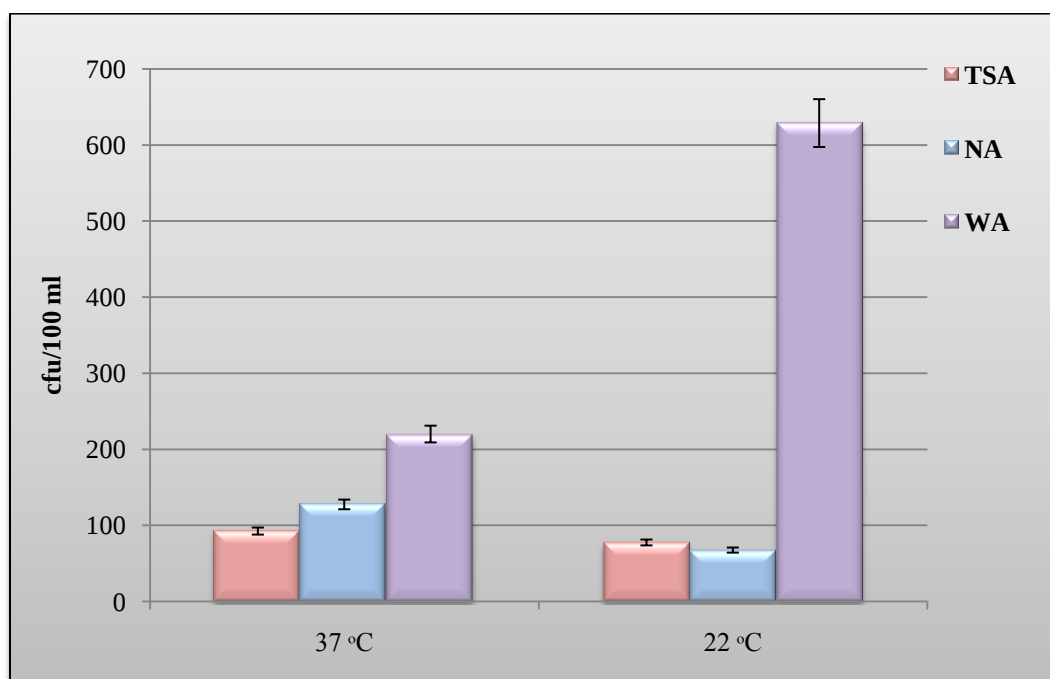
ανακτήθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα 1/10 NA όντας 60 % υψηλότερος από αυτόν στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA που υποδεικνύεται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία και τη βιβλιογραφία. Στα θρεπτικά υποστρώματα 1/2 NA και 1/2 R2A επίσης ανακτήθηκαν μεγαλύτεροι πληθυσμοί βακτηρίων. Αντιθέτως μικρή ανάκτηση βακτηρίων παρατηρήθηκε στο 1/10 R2A και στο R2A. Στους 22 °C, σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα ανακτήθηκε υψηλότερο μικροβιακό φορτίο σε σχέση με το TSA. Ιδιαίτερα στα θρεπτικά υποστρώματα 1/2 R2A, 1/2 NA και 1/10 NA ανακτήθηκε μέχρι και 150 % μεγαλύτερος πληθυσμός σε σχέση με το TSA.



Εικόνα 3.9: Πληθυσμός ολιγότροφων βακτηρίων κατά τη δειγματοληψία Ιουλίου 2010 στα θρεπτικά υποστρώματα TSA, NA, R2A, 1/2 R2A, 1/10 R2A, 1/2 NA, 1/10 NA και WA, σε θερμοκρασία επώασης 37 °C και 22 °C.

Στην Εικόνα 3.10 φαίνονται τα αποτελέσματα για τη δειγματοληψία τον Φεβρουάριο 2011. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στη δειγματοληψία αυτή χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα, το WA. Τόσο στους 37 °C όσο και στους 22 °C, ο ολιγότροφος πληθυσμός που ανακτήθηκε ήταν 2 και 8 φορές μεγαλύτερος, αντιστοίχως, από τον πληθυσμό στο πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα TSA. Και στις δύο δειγματοληψίες παρατηρήθηκε ότι τα ολιγότροφα θρεπτικά υποστρώματα ευνόησαν την ανάκτηση υψηλότερου μικροβιακού φορτίου σε σχέση με το συνιστώμενο θρεπτικό υπόστρωμα από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία και στις δύο θερμοκρασίες επώασης. Μεγαλύτερη ανάκτηση παρατηρήθηκε στα θρεπτικά υποστρώματα 1/2

NA, 1/10 NA και WA. Τέλος, αν και με το θρεπτικό TSA, στις δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011, το μικροβιακό φορτίο ήταν 70 % και 20 % (αντίστοιχα) υψηλότερο στους 37 °C σε σχέση με αυτό στους 22 °C, με χρήση ολιγότροφων θρεπτικών υποστρωμάτων το μικροβιακό φορτίο στους 22 °C υπολογίσθηκε 2-7 φορές υψηλότερο σε σχέση με αυτό στους 37 °C, υποδηλώνοντας ότι ο ολιγότροφος πληθυσμός έχει διαφορετική βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, χαμηλότερη από τους 37 °C, που ορίζουν τα πρωτόκολλα και πλησιέστερα στις θερμοκρασίες που επικρατούν στη μονάδα παραγωγής και διατήρησης του νερού.

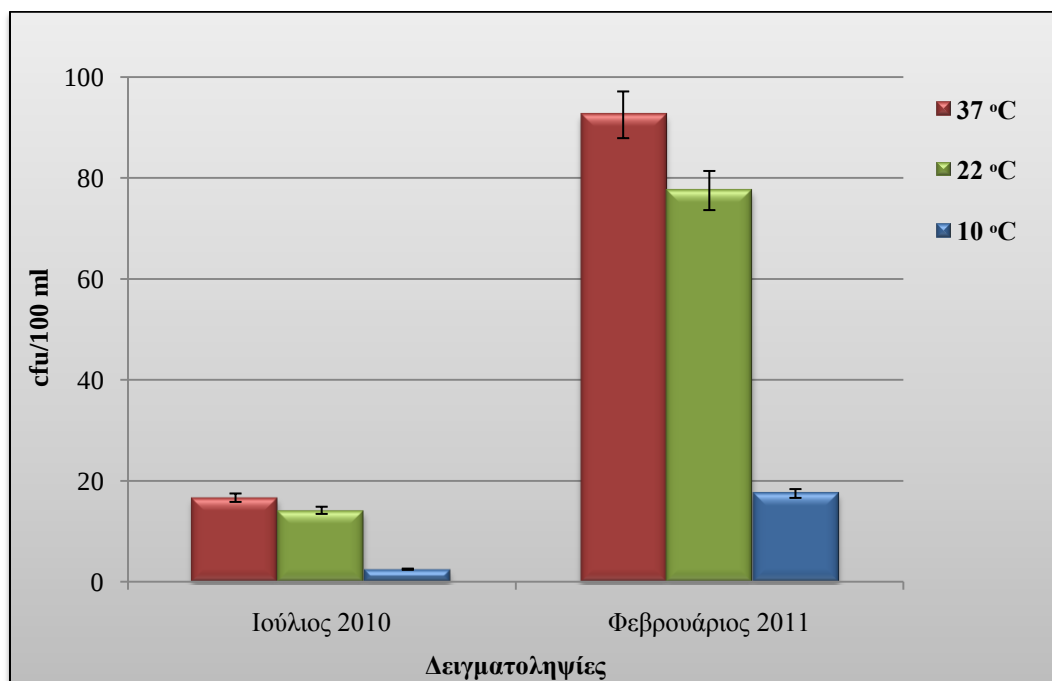


Εικόνα 3.10: Πληθυσμός ολιγότροφων βακτηρίων κατά την δειγματοληψία Φεβρουαρίου 2011 στα θρεπτικά υποστρώματα TSA, NA και WA, σε θερμοκρασία επώασης 37 °C και 22 °C.

3.1.2.6. Ψυχρόφιλα βακτήρια στο νερό

Σύμφωνα με τη μεθοδολογία που ακολουθείται για τον μικροβιακό έλεγχο του νερού, η εκτίμηση του ετερότροφου πληθυσμού πραγματοποιείται στους 37 °C και 22 °C. Παρ' όλα αυτά οι θερμοκρασίες αυτές είναι υψηλότερες από τη μέση θερμοκρασία που διατηρείται το νερό στη βιομηχανία (8-10 °C). Για το λόγο αυτό στις δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011 εκτιμήθηκε το μικροβιακό φορτίο στους 10 °C. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.11, και στις

δύο δειγματοληψίες ανιχνεύτηκε ένας χαμηλός πληθυσμός ψυχρόφιλων βακτηρίων της τάξεως των 3 cfu/100 ml και 18 cfu/100 ml αντίστοιχα για τις δύο αυτές δειγματοληψίες. Ο πληθυσμός των ψυχρόφιλων βακτηρίων ήταν κατά μέσο όρο 80 % μικρότερος από τον μεσόφιλο πληθυσμό.

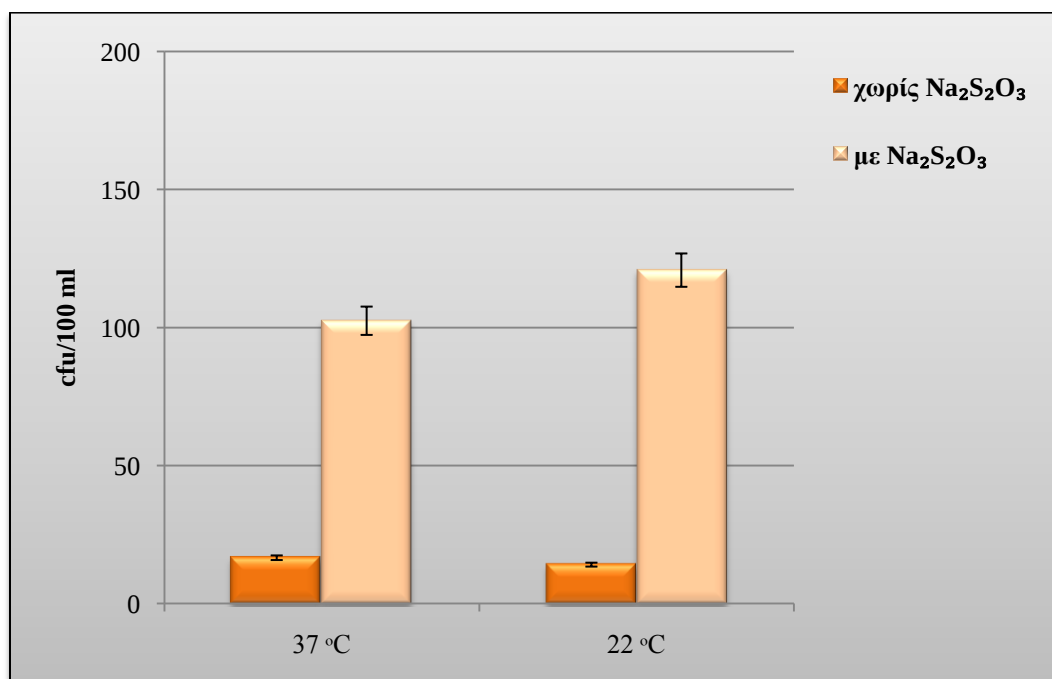


Εικόνα 3.11: Πληθυσμός μεσόφιλων και ψυχρόφιλων βακτηρίων κατά τις δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011 (θρεπτικό υπόστρωμα TSA, επώαση στους 37 °C, 22 °C και 10 °C).

3.1.2.7. Επίδραση του θειοθειικού νατρίου ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) στην ανάκτηση του πληθυσμού των βακτηρίων.

Η προσθήκη θειοθειικού νατρίου πριν τη διήθηση του δείγματος, σε συγκέντρωση 0,01 % (w/v), εξουδετερώνει τα κατάλοιπα χλωρίου στο νερό, οπότε ευνοείται η ανάκτηση υψηλότερου μικροβιακού φορτίου. Στην Εικόνα 3.12 φαίνονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν στη δειγματοληψία του Ιουλίου 2010 και παρατηρείται ότι με προσθήκη θειοθειικού νατρίου ανιχνεύτηκε δέκα φορές υψηλότερο μικροβιακό φορτίο σε σχέση με το δείγμα που διηθήθηκε απευθείας χωρίς την προσθήκη θειοθειικού νατρίου. Αν και το νερό έχει επεξεργαστεί μέσω μεμβρανών αντίστροφης όσμωσης, υπολείμματα χλωρίου μπορεί να έχουν παραμείνει σ' αυτό,

ιδιαίτερα εάν δεν υπάρχει προκατεργασία του νερού με φίλτρα ενεργού άνθρακα που απομακρύνουν τα κατάλοιπα της χλωρίωσης.



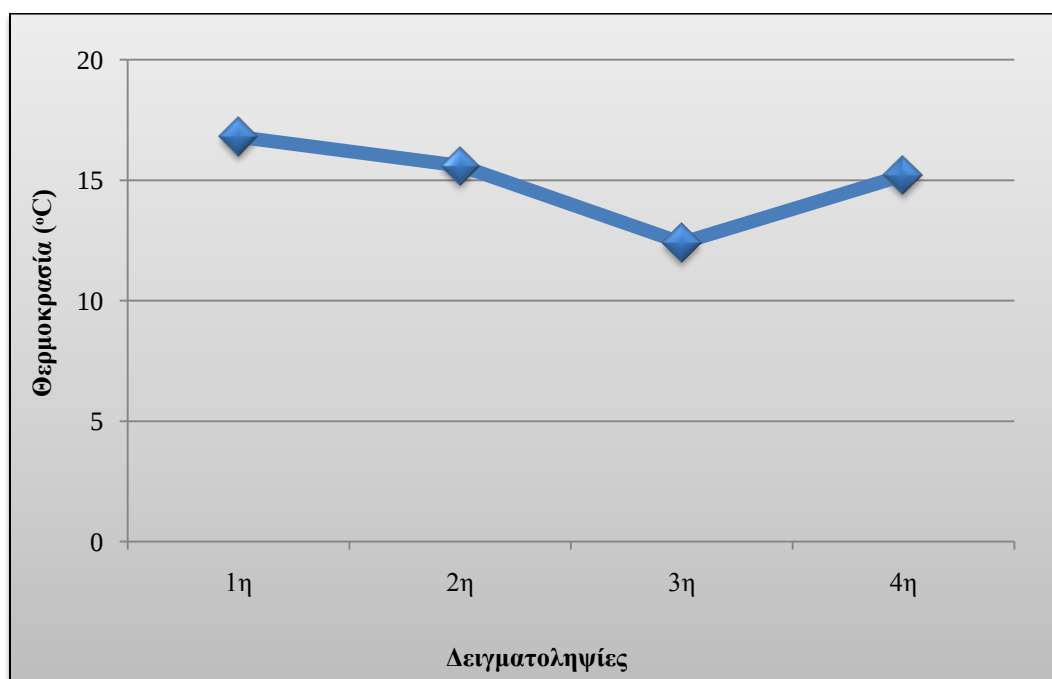
Εικόνα 3.12: Επίδραση 0,01 % (w/v) θειοθειικού νατρίου στο μικροβιακό φορτίο της δειγματοληψία Ιουλίου 2010 (υπόστρωμα TSA θερμοκρασία επώασης 37 °C και 22 °C).

3.1.2.8. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάκτηση του πληθυσμού των βακτηρίων.

Το νερό αποτελεί ένα oligότροφο ενδιαίτημα στο οποίο τα κύτταρα βρίσκονται υπό πίεση. Η χαμηλή θερμοκρασία αποτελεί έναν επιπλέον παράγοντα που μπορεί να προκαλέσει καταπόνηση στα κύτταρα και να ευνοήσει την είσοδο τους σε μία φάση αδράνειας κατά την οποία παραμένουν βιώσιμα αλλά τροποποιούν τον μεταβολισμό τους και το μέγεθός τους. Πολλά κύτταρα κάτω από αυτές τις πιέσεις μεταβάλλουν τόσο πολύ τον κυτταρικό τους όγκο ώστε να μπορούν να διαπεράσουν μεμβράνες με πόρους 0,2 μm. Αύξηση της θερμοκρασίας, μειώνει την καταπόνηση των κυττάρων τα οποία αντιδρούν ποικιλοτρόπως στη μεταβολή αυτή.

Σε όλες τις δειγματοληψίες, καταγραφόταν η θερμοκρασία του δείγματος πριν ακριβώς τη διήθηση όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.13. Όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν μέσα σε 2 ώρες στο εργαστήριο και διατηρήθηκαν στους 8 °C μέχρι να διηθηθούν. Η διήθηση για την εκτίμηση του

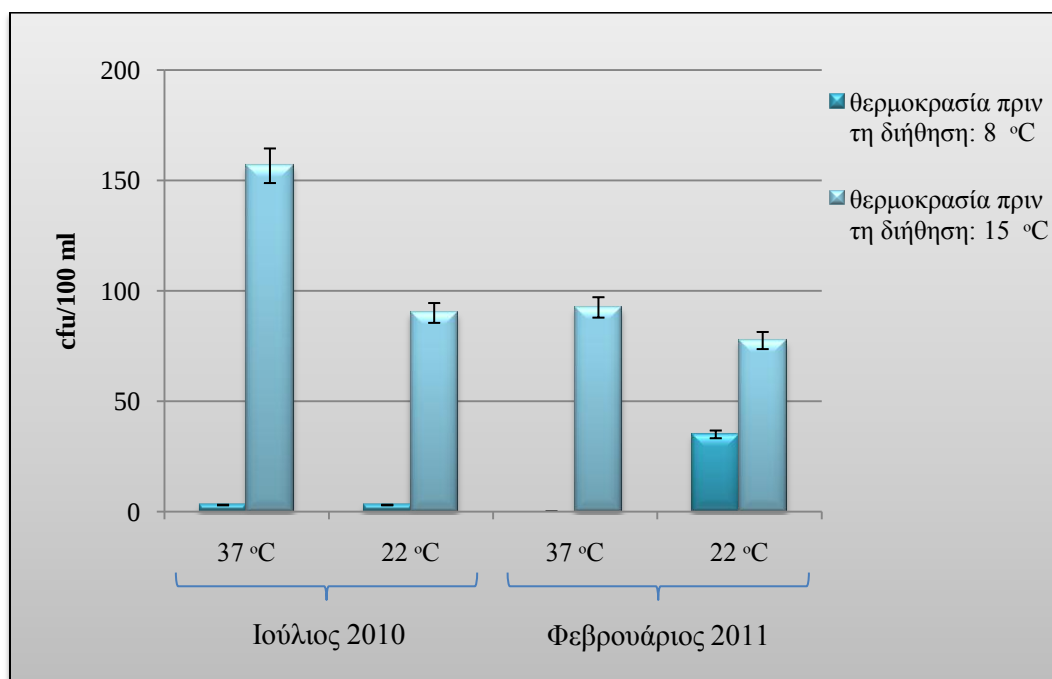
μικροβιακού φορτίου που συγκρατείται στις μεμβράνες 0,2 μm ολοκληρώθηκε εντός 1 ώρας. Παρατηρείται ότι στη δειγματοληψία Ιανουαρίου 2010 η θερμοκρασία του νερού ήταν η υψηλότερη (16,8 °C) ενώ στη δειγματοληψία Ιουλίου 2010 ήταν η χαμηλότερη (12,4 °C). Στις δειγματοληψίες Μαρτίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011 η θερμοκρασία ήταν περίπου 15 - 16 °C. Ανάλογη με τη διακύμανση της θερμοκρασίας ήταν και η διακύμανση του μικροβιακού φορτίου όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5, με χαμηλότερο πληθυσμό να παρατηρείται τον Ιούλιο 2010 όπου η θερμοκρασία του νερού όταν διηθήθηκε ήταν η χαμηλότερη.



Εικόνα 3.13: Διακύμανση της θερμοκρασίας του δείγματος πριν τη διήθηση

Στην Εικόνα 3.14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ανάκτηση του πληθυσμού κατά τις δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011. Παρατηρήθηκε ότι όσο πιο χαμηλή είναι η θερμοκρασία του νερού, τόσο χαμηλότερο είναι και το μικροβιακό φορτίο. Συγκεκριμένα, τον Ιούλιο 2010 το μικροβιακό φορτίο όταν το νερό διηθήθηκε με θερμοκρασία 8 °C ήταν σχεδόν μηδενικό με 3 και 2 cfu/100 ml, για θερμοκρασία επώασης 37 °C και 22 °C αντίστοιχα, ενώ όταν διηθήθηκε με θερμοκρασία 15 °C, ο πληθυσμός που ανακτήθηκε ήταν της τάξεως των 157 και 90 cfu/ 100 ml (για επώαση στους 37 °C και 22 °C αντίστοιχα) δηλαδή αύξηση 52 και 45 φορές αντιστοίχως. Τον Φεβρουάριο 20, όταν το δείγμα

είχε χαμηλή θερμοκρασία, ο πληθυσμός ήταν είτε μηδενικός είτε χαμηλότερος απ' ότι όταν η θερμοκρασία του δείγματος ήταν υψηλότερη.



Εικόνα 3.14: Επίδραση της θερμοκρασίας του δείγματος πριν τη διήθηση στην ανάκτηση του μικροβιακού φορτίου κατά τις δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011 (υπόστρωμα TSA θερμοκρασία επώασης 37 °C και 22 °C).

3.1.2.9. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της επίδρασης διαφόρων παραγόντων στην ανάκτηση του μικροβιακού πληθυσμού.

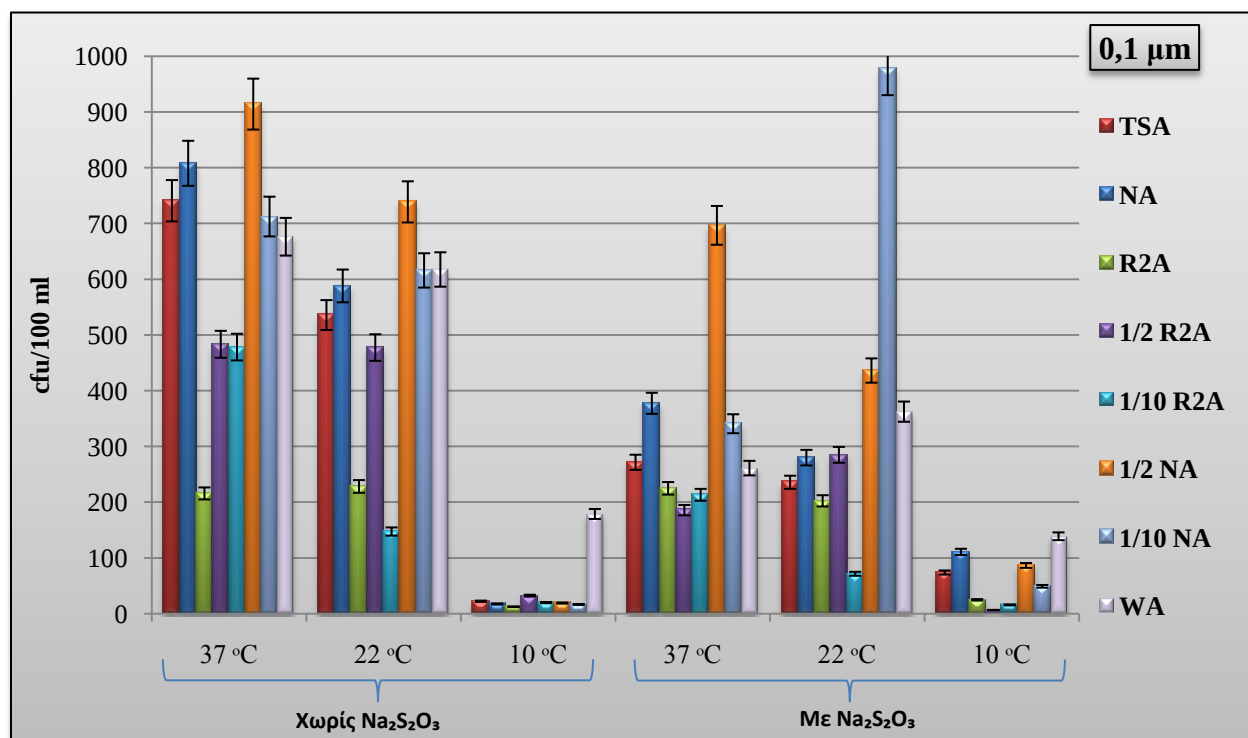
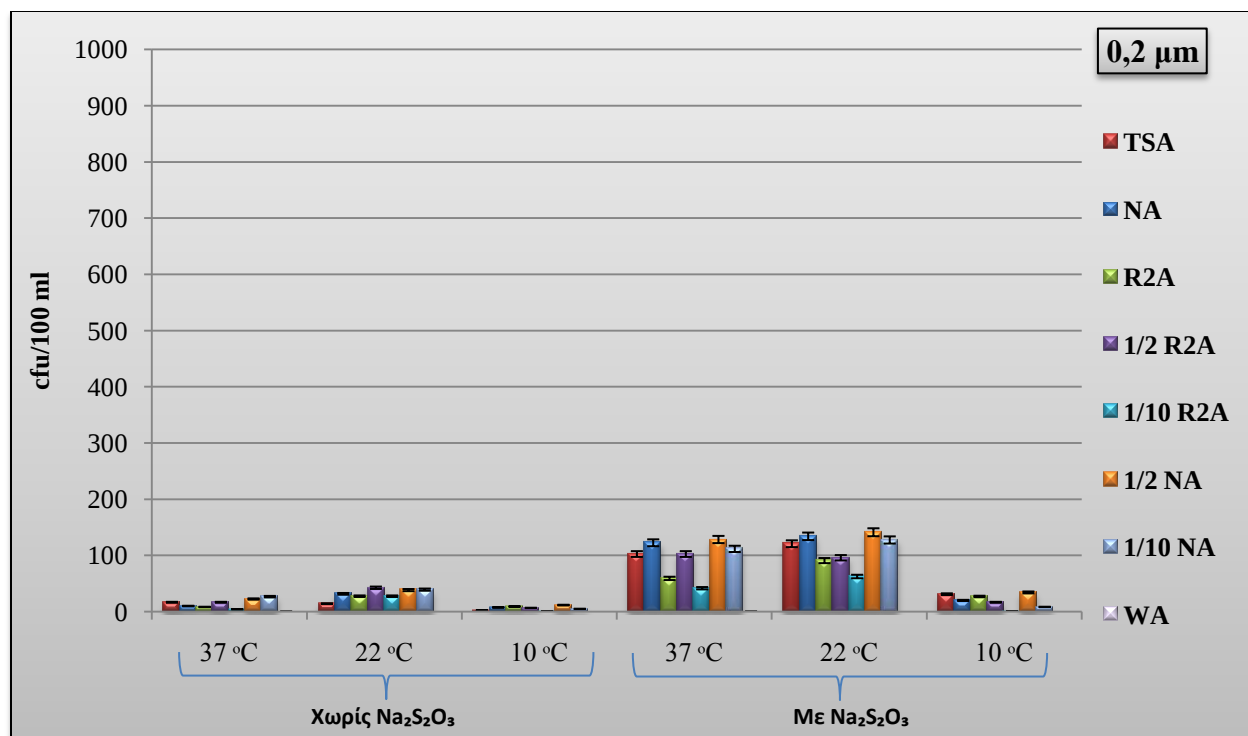
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στη δειγματοληψία του Ιουλίου 2010 πραγματοποιήθηκαν ορισμένα δοκιμαστικά πειράματα για να μελετηθεί η επίδραση διαφόρων παραγόντων στην εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου. Από τους παράγοντες που μελετήθηκαν, τρεις έδωσαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα και μελετήθηκαν στη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011. Οι παράγοντες αυτοί ήταν: η ανίχνευση βακτηρίων που διαπερνάνε τις μεμβράνες με πόρους 0,2 μm, τα ψυχρόφιλα βακτήρια και τα ολιγότροφα βακτήρια. Μελετήθηκε επιπλέον αλλά σε μικρή κλίμακα η επίδραση της θερμοκρασίας στο δείγμα αλλά τα αποτελέσματα ήταν διφορούμενα τόσο στη δειγματοληψία του Ιουλίου 2010 όσο και στη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011.

Στα διαγράμματα της Εικόνας 3.15 και στον Πίνακα 3.2 φαίνονται τα αποτελέσματα της σύγκρισης του μεσόφιλου και ψυχρόφιλου πληθυσμού των βακτηρίων που ανακτήθηκε στις μεμβράνες των 0,2 μm και των 0,1 μm αντίστοιχα, με επίδραση του θειοθειικού νατρίου σε πλήρη και φτωχά θρεπτικά υποστρώματα. Τα δεδομένα αφορούν τη δειγματοληψία του Ιουλίου 2010.

Πίνακας 3.2: Πληθυσμός βακτηρίων που συγκρατούνται στη μεμβράνη 0,2 μm και 0,1 μm , στους 37 °C, 22 °C και 10 °C και επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος και του θειοθειικού νατρίου στην ανάκτηση των βακτηρίων κατά τη δειγματοληψία Ιουλίου 2010.

cfu/100 ml												
Θερμοκρασία επώασης	37 °C				22 °C				10 °C			
Μεμβράνη Διήθησης	0,2 μm		0,1 μm		0,2 μm		0,1 μm		0,2 μm		0,1 μm	
		⁺ Na ₂ S ₂ O ₃		⁺ Na ₂ S ₂ O ₃		⁺ Na ₂ S ₂ O ₃		⁺ Na ₂ S ₂ O ₃		⁺ Na ₂ S ₂ O ₃		⁺ Na ₂ S ₂ O ₃
Θρεπτικό												
TSA	17	103	741	272	14	121	536	236	3	31	23	74
NA	10	123	808	378	32	134	588	280	8	20	18	111
R2A	8	59	216	225	28	91	228	203	9	27	13	25
1/2 R2A	17	103	483	186	43	96	478	285	7	17	33	7
1/10 R2A	4	42	478	213	28	63	148	72	1	1	20	16
1/2 NA	23	128	914	697	38	141	739	436	12	34	19	87
1/10 NA	27	112	713	341	39	128	616	979	5	8	17	49
WA			676	261			618	363			179	139

Στην Εικόνα 3.15 παραθέτονται τα διαγράμματα που αφορούν στα βακτήρια που συγκρατήθηκαν στη μεμβράνη με διάμετρο πόρων 0,2 μm . Απουσία θειοθειικού νατρίου, ο υψηλότερος πληθυσμός ανιχνεύτηκε στους 22 °C, στο υπόστρωμα 1/2 R2A με τιμή 43 cfu/100 ml. Ανιχνεύτηκαν επίσης ψυχρόφιλα βακτήρια, με μέγιστη τιμή 12 cfu/100 ml στο υπόστρωμα 1/2 NA. Στους 37 °C ο μέγιστος πληθυσμός ήταν 27 cfu/ 100 ml στο 1/10 NA. Παρατηρείται λοιπόν ότι απουσία θειοθειικού νατρίου, υψηλότερο μικροβιακό φορτίο ανιχνεύτηκε στα φτωχά θρεπτικά υποστρώματα τόσο στο μεσόφιλο όσο και στον ψυχρόφιλο πληθυσμό. Η προσθήκη θειοθειικού νατρίου ευνόησε την ανάπτυξη περισσότερων μικροοργανισμών. Ο πληθυσμός των βακτηρίων παρουσία θειοθειικού νατρίου στους 37 °C ήταν 4,7 φορές υψηλότερος σε σχέση με αυτόν που ανακτήθηκε απουσία θειοθειικού νατρίου, στους 22 °C 3,2 φορές υψηλότερος και στους 10 °C 2,8 φορές υψηλότερος. Παρουσία θειοθειικού νατρίου το υψηλότερο μικροβιακό φορτίο (141 cfu/100 ml) ανιχνεύτηκε στους 22 °C και στο υπόστρωμα 1/2 NA.



Εικόνα 3.15: Σύγκριση πληθυσμού βακτηρίων που συγκρατούνται στις μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm (άνω διάγραμμα) και 0,1 μm (κάτω διάγραμμα). Εκτίμηση του ολιγότροφου και του ψυχρόφιλου πληθυσμού στα θρεπτικά υποστρώματα TSA, NA, R2A, 1/2 R2A, 1/10 R2A, 1/2 NA, 1/10 NA και WA και σε θερμοκρασίες επώασης 37 °C, 22 °C και 10 °C, με επίδραση 0,01 % (w/v) θειοθειικού νατρίου. Τα δεδομένα αφορούν τη δειγματοληψία Ιουλίου 2010.

Ομοίως, σε θερμοκρασία επώασης 37 °C και 10 °C, ο υψηλότερος πληθυσμός (128 και 34 cfu/100 ml αντίστοιχα) ανιχνεύτηκε επίσης στο θεραπευτικό υπόστρωμα 1/2 NA. Παρατηρείται λοιπόν ότι ο πληθυσμός των βακτηρίων που συγκρατήθηκαν στη μεμβράνη με πόρους 0,2 μm είναι κυρίως μεσόφιλος, όμως υπάρχει ένα ποσοστό ψυχρόφιλου πληθυσμού. Τέλος το μικροβιακό φορτίο εμφανίζεται αυξημένο με χρήση φτωχών θεραπευτικών υποστρωμάτων και με προσθήκη θειοθειικού νατρίου.

Στην Εικόνα 3.15 παρατίθενται τα διαγράμματα που αφορούν στα βακτήρια που συγκρατήθηκαν στη μεμβράνη με διάμετρο πόρων 0,1 μm. Παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός που συγκρατήθηκε στις μεμβράνες των 0,1 μm ήταν σταθερά υψηλότερος από τον αντίστοιχο στα 0,2 μm, παρουσία ή απουσία θειοθειικού νατρίου. Συγκεκριμένα, ανεξαρτήτου των συνθηκών, ο μέγιστος πληθυσμός που μετρήθηκε στα 0,1 μm ήταν 979 cfu/100 ml (παρουσία θειοθειικού νατρίου, στους 22 °C και σε υπόστρωμα 1/10 NA) ενώ στα 0,2 μm ο μέγιστος πληθυσμός που μετρήθηκε ήταν μόλις 141 cfu/100 ml (παρουσία θειοθειικού νατρίου, στους 22 °C και σε υπόστρωμα 1/2 NA). Αναλυτικότερα, απουσία θειοθειικού νατρίου, ο υψηλότερος πληθυσμός ανιχνεύτηκε στους 37 °C, στο υπόστρωμα 1/2 NA με τιμή 914 cfu/100 ml δηλαδή 20 % υψηλότερος πληθυσμός από αυτόν που ανακτήθηκε στο TSA. Ανιχνεύθηκαν επίσης ψυχρόφιλα βακτήρια, με μέγιστη τιμή τις 179 cfu/100 ml στο υπόστρωμα WA, 5 έως 13 φορές υψηλότερη σε σχέση με τον ανακτημένο πληθυσμό στα υπόλοιπα θεραπευτικά υποστρώματα. Στους 22 °C ο μέγιστος πληθυσμός ήταν 739 cfu/ 100 ml στο 1/2 NA. Παρατηρείται λοιπόν ότι απουσία θειοθειικού νατρίου, υψηλότερο μικροβιακό φορτίο ανιχνεύτηκε στα φτωχά θεραπευτικά υποστρώματα τόσο στον μεσόφιλο όσο και στον ψυχρόφιλο πληθυσμό όπως συνέβη και στα βακτήρια που συγκρατήθηκαν στις μεμβράνες 0,2 μm.

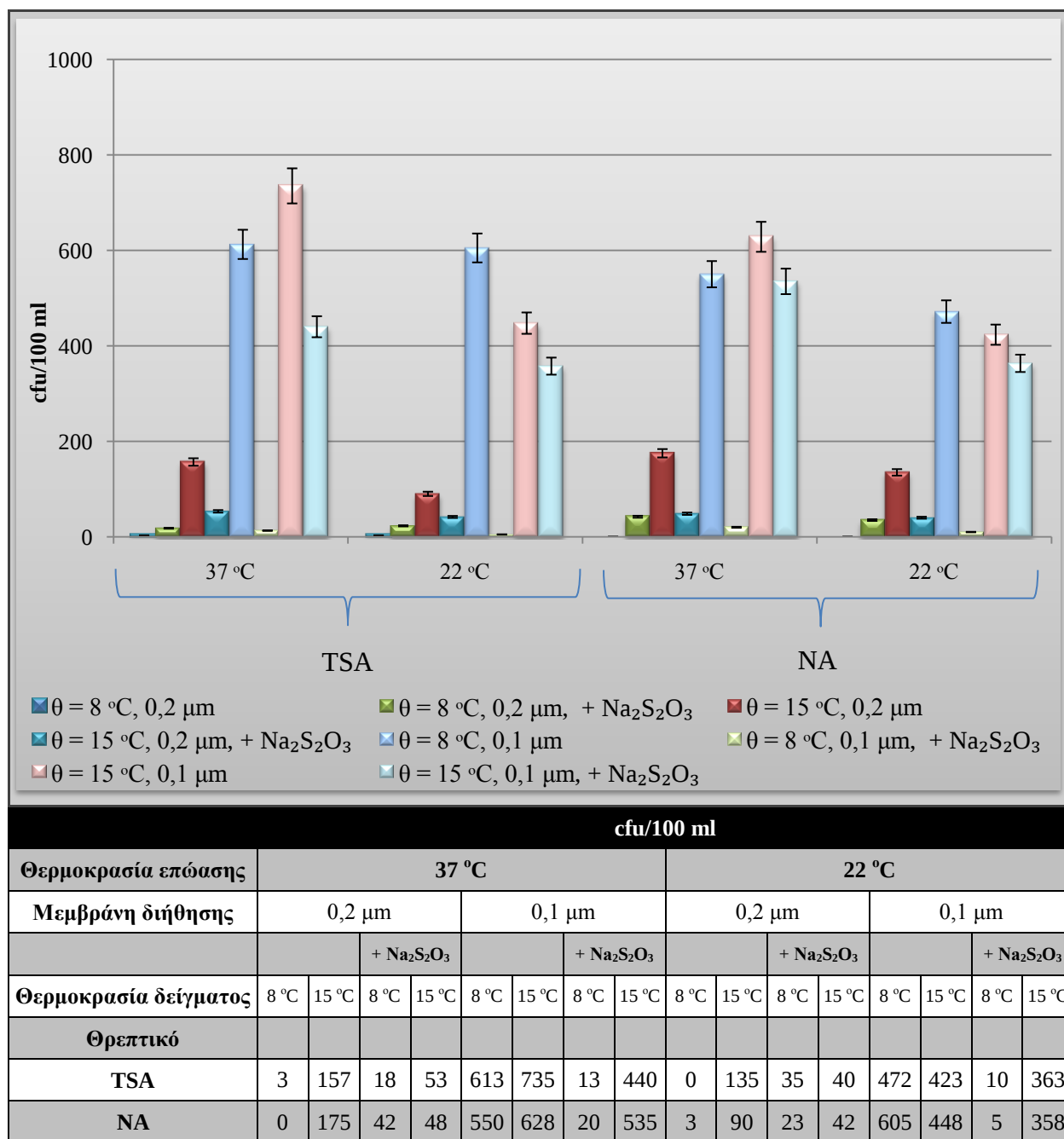
Η προσθήκη θειοθειικού νατρίου δεν ευνόησε την ανάπτυξη περισσότερων μικροοργανισμών σε όλα τα θεραπευτικά υποστρώματα και σε όλες τις θερμοκρασίες. Ο πληθυσμός των βακτηρίων παρουσία θειοθειικού νατρίου στους 37 °C ήταν 24% μικρότερος σε σχέση με αυτόν που ανακτήθηκε απουσία θειοθειικού νατρίου αλλά 25 % υψηλότερος στους 22 °C σε σχέση με αυτόν απουσία θειοθειικού νατρίου. Τέλος στους 10 °C τα αποτελέσματα ήταν ετερογενή με το μέγιστο πληθυσμό να παρουσιάζει μείωση μόνο στα θεραπευτικά υποστρώματα WA, 1/2 R2A και 1/10 R2A. Παρουσία θειοθειικού νατρίου το υψηλότερο μικροβιακό φορτίο (979 cfu/100 ml) ανιχνεύτηκε στους 22 °C και στο υπόστρωμα 1/10 NA. Σε θερμοκρασία επώασης 37 °C ο

υψηλότερος πληθυσμός ήταν 697 cfu/100 ml στο 1/2 NA και στους 10 °C 139 cfu/100 ml στο WA.

Παρατηρείται λοιπόν ότι ο πληθυσμός των βακτηρίων που συγκρατήθηκαν στη μεμβράνη με πόρους 0,1 μm παρουσιάζει ομοιότητες με αυτόν που ανακτήθηκε στις μεμβράνες των 0,2 μm. Πρώτον, ο πληθυσμός και στις δύο περιπτώσεις είναι κυρίως μεσόφιλος, με ένα μικρό ποσοστό ψυχρόφιλου και δεύτερον το υψηλότερο μικροβιακό φορτίο ανιχνεύτηκε στα φτωχά θρεπτικά υποστρώματα υποδεικνύοντας έναν oligότροφο πληθυσμό. Οι διαφορές που εντοπίζονται στους δύο πληθυσμούς είναι ότι ο πληθυσμός στα 0,2 μm είναι πιο χαμηλός (μέγιστη τιμή 141 cfu/100 ml) σε σχέση με αυτόν στα 0,1 μm (μέγιστη τιμή 979 cfu/100 ml). Επίσης η προσθήκη θειοθειικού νατρίου επηρεάζει διαφορετικά τα μικροβιακά φορτία στα 0,2 μm και στα 0,1 μm. Όσον αφορά τα θρεπτικά υποστρώματα, το TSA που συνιστάται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία και τη βιβλιογραφία φάνηκε ότι μειονεκτεί έναντι των άλλων θρεπτικών και ιδιαίτερα έναντι του NA, του 1/2 NA και το 1/10 NA, υποεκτιμώντας έτσι τον ολικό πληθυσμό των βακτηρίων. Τέλος διαπιστώνεται ότι η μεθοδολογία που ακολουθείται για την εκτίμηση του ολικού ετερότροφου πληθυσμού υποεκτιμά τον πραγματικό πληθυσμό που υπάρχει στο δείγμα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο πληθυσμός που ανιχνεύεται στα 0,1 μm είναι επιπρόσθετος αυτού των 0,2 μm καθώς το δείγμα μας στην περίπτωση των 0,1 μm είναι το διήθημα που προέκυψε από τα 0,2 μm.

Στην Εικόνα 3.16 φαίνονται τα αποτελέσματα της επίδρασης της θερμοκρασίας του δείγματος πριν τη διήθηση στην ανάκτηση του μεσόφιλου ετερότροφου πληθυσμού για τη δειγματοληψία του Ιουλίου 2010. Η επίδραση της θερμοκρασίας μελετήθηκε ταυτόχρονα στα δείγματα που διηθήθηκαν σε μεμβράνες 0,2 μm και 0,1 μm, με και χωρίς προσθήκη θειοθειικού νατρίου. Παρατηρήθηκε, στις περισσότερες περιπτώσεις όταν το δείγμα είχε χαμηλή θερμοκρασία, ο πληθυσμός που ανακτήθηκε ήταν μικρότερος από τον αντίστοιχο όταν το δείγμα είχε θερμοκρασία 15 °C. Αναλυτικά, απουσία θειοθειικού νατρίου, στα 0,2 μm το μικροβιακό φορτίο στους 8 °C ήταν σχεδόν μηδενικό, όμως παρατηρήθηκε ότι το μικροβιακό φορτίο στα 0,1 μm ήταν συγκριτικά πολύ υψηλό (420 – 530 cfu/100 ml). Δηλαδή ο μικροβιακός πληθυσμός δε συγκρατήθηκε στη μεμβράνη των 0,2 μm όταν το δείγμα είχε χαμηλή θερμοκρασία, αλλά τη διαπέρασε και συγκρατήθηκε στη μεμβράνη των 0,1 μm. Όταν το δείγμα διηθήθηκε με υψηλότερη θερμοκρασία παρατηρήθηκε ότι το μικροβιακό φορτίο που ανιχνεύτηκε στα 0,2 μm ήταν της τάξεως των 90 – 175 cfu/100 ml, δηλαδή πολύ υψηλότερο από αυτό που ανιχνεύτηκε

στους 8 °C. Όμως και στα 0,1 μm το μικροβιακό φορτίο ήταν μεγαλύτερο από αυτό στους 8 °C, αλλά μόνο σε θερμοκρασία επώασης 37 °C, ενώ στους 22 °C το φορτίο ήταν μικρότερο. Παρ' όλα αυτά αθροιστικά (δηλαδή στα 0,2 και 0,1 μm) το μικροβιακό φορτίο στο δείγμα που είχε θερμοκρασία 15 °C ήταν μεγαλύτερο από το αντίστοιχο φορτίο σε θερμοκρασία 8 °C.



Εικόνα 3.16: Επίδραση της θερμοκρασίας του δείγματος και της προσθήκης θειοθειικού νατρίου στην ανάπτυξη του ετερότροφου μεσόφιλου πληθυσμού των βακτηρίων που συγκρατούνται στις μεμβράνες των 0,2 μm και 0,1 μm, (σε θρεπτικά υποστρώματα TSA και NA) κατά τη δειγματοληψία Ιουλίου 2010.

Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι με αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος, ο μικροβιακός πληθυσμός που συγκρατήθηκε στις μεμβράνες ήταν υψηλότερος από όταν το δείγμα ήταν ψυχρό. Όμως, παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρξε «μετακίνηση» του πληθυσμού, δηλαδή αύξηση του πληθυσμού στα 0,2 μm και αντίστοιχη μείωση στα 0,1 μm . Δηλαδή τα κύτταρα ανάλογα με τη θερμοκρασία μεταβάλλουν το μέγεθος τους και με αυτόν τον τρόπο συγκρατούνται στις μεμβράνες ή όχι. Χαμηλότερη θερμοκρασία οδηγεί τα κύτταρα να μειώσουν τον μεταβολισμό τους άρα να μπουν σε μία μορφή που θα τα κάνει βιώσιμα αλλά θα έχουν μειωμένες μεταβολικές δυνατότητες και μέγεθος.

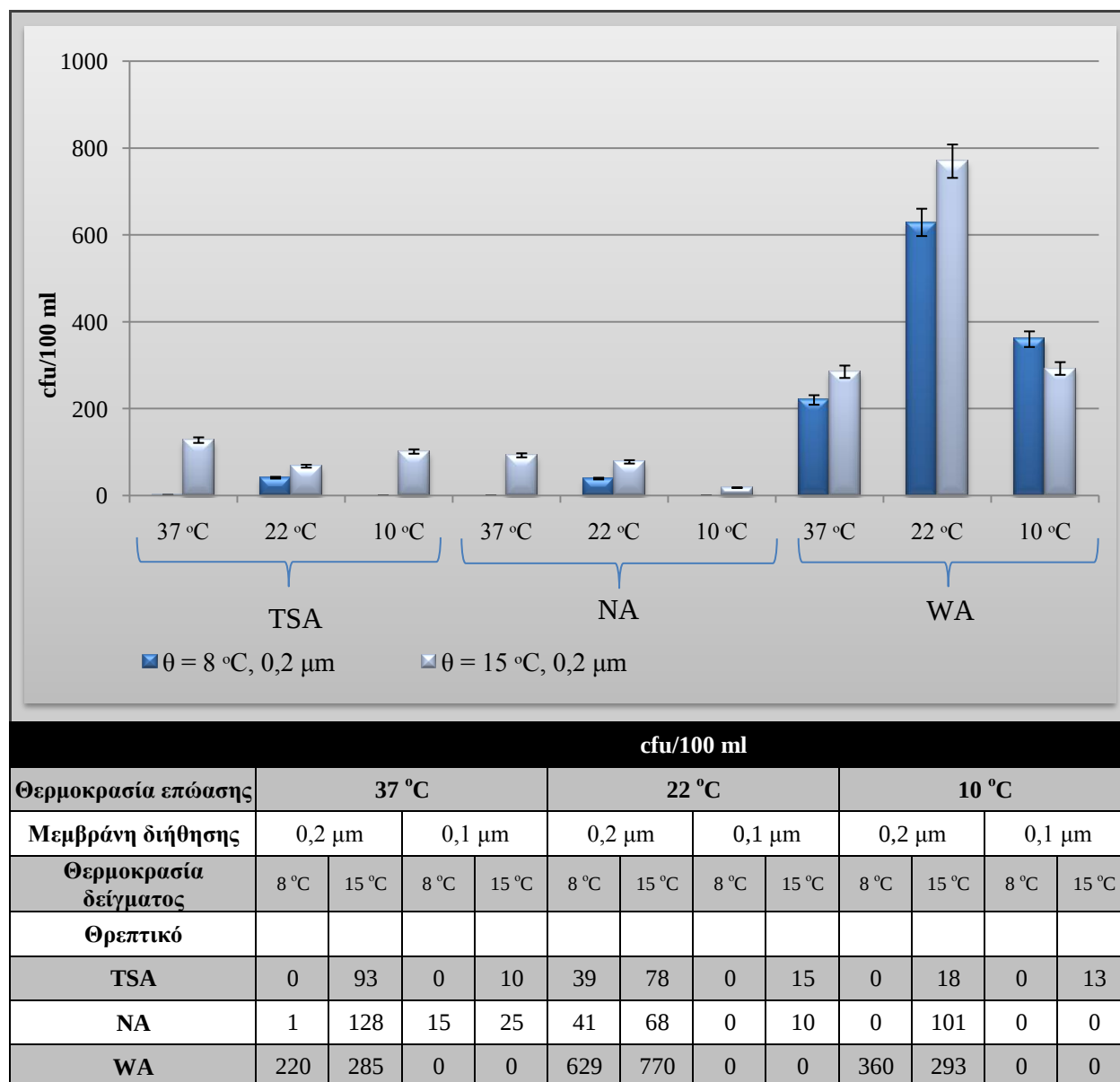
Παρόμοια αποτελέσματα εξήχθησαν και παρουσία θειοθειικού νατρίου. Στα 0,2 μm ο πληθυσμός που ανιχνεύτηκε όσο το δείγμα είχε θερμοκρασία 15 °C ήταν 13 % - 66 % υψηλότερος σε σχέση με τη θερμοκρασία 8 °C με τιμές από 40 – 53 cfu/100 ml. Η % αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν μικρότερη στο θεραπευτικό NA εξαιτίας του υψηλότερου μικροβιακού φορτίου που ανακτήθηκε όταν το δείγμα είχε χαμηλή θερμοκρασία. Στα 0,1 μm , στο δείγμα θερμοκρασία 8 °C δε μπόρεσαν να εξαχθούν αποτελέσματα λόγω σφάλματος. Στην υψηλότερη θερμοκρασία 15 °C ο πληθυσμός που ανιχνεύτηκε ήταν της τάξης των 360 – 440 cfu/100 ml στο TSA και 360 – 530 cfu/100 ml στο NA.

Από το διάγραμμα της Εικόνα 3.16 παρατηρείται λοιπόν ότι το μικροβιακό φορτίο που συγκρατήθηκε στα 0,2 μm όταν το δείγμα είχε θερμοκρασία 8 °C, ήταν μικρότερο από αυτό όταν το δείγμα ήταν στους 15 °C στις εξής συνθήκες: απουσία και παρουσία θειοθειικού νατρίου, στα υποστρώματα TSA και NA, σε θερμοκρασία επώασης 37 °C και 22 °C. Στα 0,1 μm τα αποτελέσματα ήταν διφορούμενα με το μικροβιακό φορτίο που συγκρατήθηκε στα 0,1 μm όταν το δείγμα είχε θερμοκρασία 8 °C, να είναι μικρότερο από αυτό όταν το δείγμα ήταν στους 15 °C στις εξής συνθήκες: απουσία θειοθειικού νατρίου, στα υποστρώματα TSA και NA και σε θερμοκρασία επώασης 37 °C και όχι 22 °C. Παρουσία θειοθειικού νατρίου δεν μπόρεσαν να εξαχθούν αποτελέσματα.

Τέλος, στην Εικόνα 3.16, παρατηρείται τα εξής: ο πληθυσμός στα 0,1 μm ήταν υψηλότερος από αυτόν στα 0,2 μm , στο υπόστρωμα NA οι πληθυσμοί που ανακτήθηκαν ήταν μεγαλύτεροι όπως επίσης και σε θερμοκρασία επώασης 37 °C. Το θειοθειικό νάτριο επέδρασε θετικά στην ανάκτηση υψηλότερου πληθυσμού μόνο στα 0,2 μm και όταν το δείγμα έχει θερμοκρασία 8 °C.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στη δειγματοληψία Φεβρουαρίου 2011 εκτός της κλασσικής μεθοδολογίας, μελετήθηκε επιπλέον, η ύπαρξη βακτηρίων που διαπερνάνε τις μεμβράνες των

0,2 μm , η ύπαρξη ολιγότροφου και ψυχρόφιλου πληθυσμού και η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάκτηση του πληθυσμού. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.17. Παρατηρήθηκε ότι στις περισσότερες περιπτώσεις, το μικροβιακό φορτίο είναι αυξημένο όταν η θερμοκρασία του δείγματος είναι 15 °C. Ο ολιγότροφος πληθυσμός που ανακτήθηκε στο υποστρώμα WA είναι ιδιαίτερα αυξημένος σε όλες τις θερμοκρασίες επώασης, φτάνοντας έως και τις 770 cfu/100 ml.



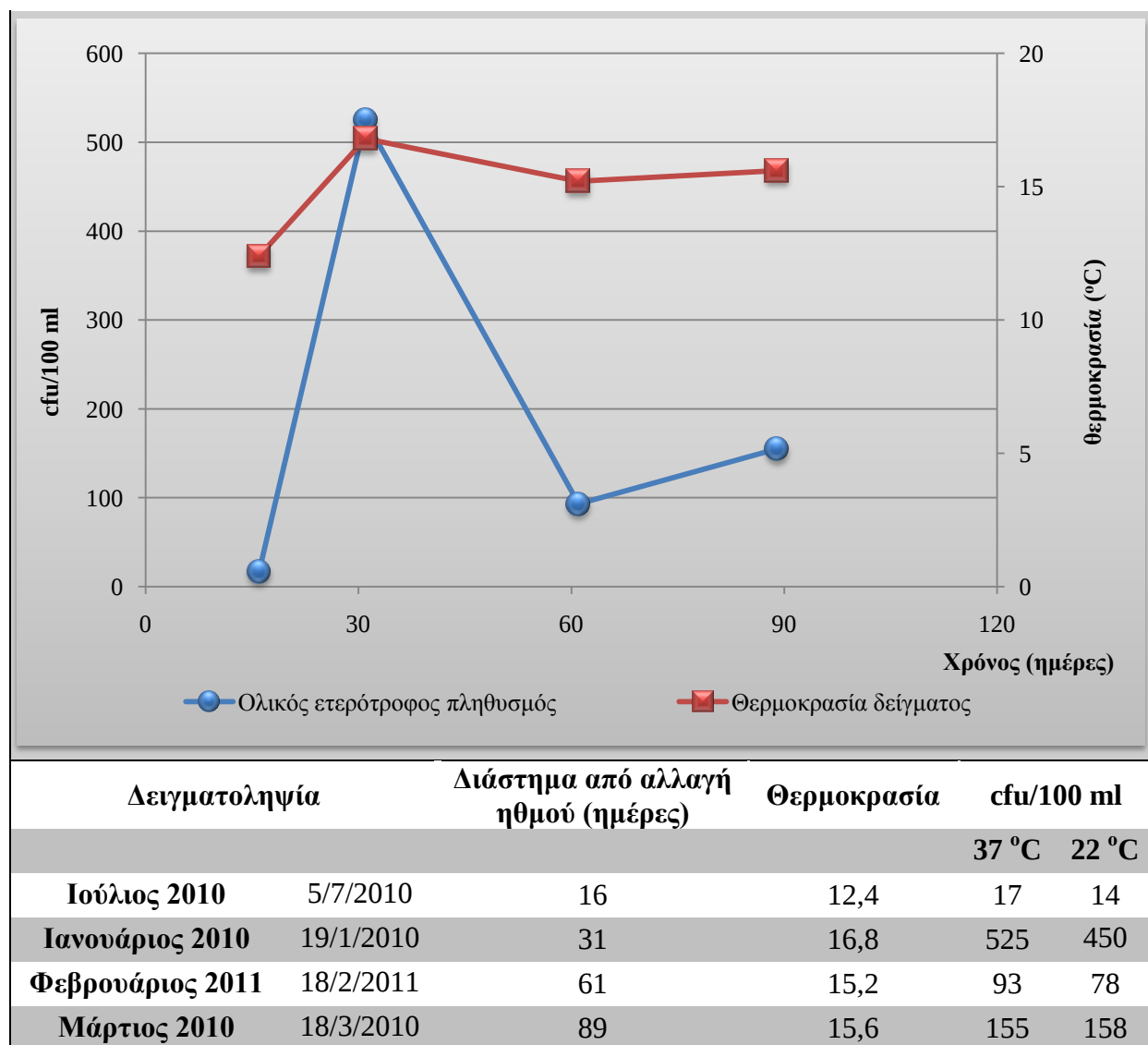
Εικόνα 3.17: Επίδραση της θερμοκρασίας του δείγματος στην ανάκτηση του μεσόφιλου και ψυχρόφιλου πληθυσμού των βακτηρίων που συγκρατούνται στις μεμβράνες των 0,2 μm , στα υποστρώματα TSA, NA και WA, κατά τη δειγματοληψία Φεβρουαρίου 2011.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο ολιγότροφος πληθυσμός υπερτερεί έναντι του πληθυσμού που ανιχνεύτηκε στα πλήρη θρεπτικά υποστρώματα ενώ θα πρέπει να τονιστεί ότι η επίδραση της χαμηλής θερμοκρασίας του δείγματος (8 °C) δε φαίνεται να επηρέασε σημαντικά τον ολιγότροφο πληθυσμό καθώς και στις δύο περιπτώσεις ανιχνεύτηκε σε πολύ μεγάλο μέγεθος, υποδηλώνοντας πιθανόν μία διαφοροποίηση από τον ετερότροφο πληθυσμό που ανιχνεύτηκε στα πλήρη υποστρώματα. Όσον αφορά τον ψυχρόφιλο πληθυσμό, αυτός ανιχνεύεται με διαφορετικό μέγεθος ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα.

3.1.2.10. Διακύμανση ολικού ετερότροφου πληθυσμού σε σχέση με τον χρόνο αλλαγής του ηθμού (της βιομηχανίας) διαμέτρου πόρων 0,2 μm

Η γραμμή επεξεργασίας του νερού στη βιομηχανία τερματίζεται με έναν ηθμό με διάμετρο πόρων 0,2 μm το οποίο αντικαθίσταται κάθε έξι μήνες. Στην Εικόνα 3.18 φαίνεται ο ολικός ετερότροφος πληθυσμός σε σχέση με το διάστημα που μεσολάβησε από την αλλαγή του ηθμού μέχρι τη δειγματοληψία. Οι αλλαγές του ηθμού πραγματοποιήθηκαν στις 20/12/2009, 19/6/2010 και 19/12/2010.

Παρατηρείται ότι σε διάστημα 17 ημερών από την αλλαγή του ηθμού (Ιούλιος 2010) ο ολικός ετερότροφος πληθυσμός είναι ιδιαίτερα μικρός ενώ σε διάστημα 89 ημερών ο πληθυσμός έχει αυξηθεί (Μάρτιος 2010). Σε διάστημα ενός μήνα μετά την αλλαγή του ηθμού (Ιανουάριος 2010) παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός είναι ιδιαίτερα αυξημένος, όμως όπως προαναφέρθηκε αυτή η αυξημένη τιμή μπορεί να οφείλεται στην επίδραση της θερμοκρασίας η οποία ήταν υψηλότερη (16,8 °C). Στο διάγραμμα της Εικόνας 3.18, αναφέρονται τα αποτελέσματα του ολικού ετερότροφου μεσόφιλου πληθυσμού που συγκρατήθηκε στις μεμβράνες των 0,2 μm . Ο πληθυσμός των βακτηρίων που συγκρατείται στα 0,1 μm , ο ψυχρόφιλος και ο ολιγότροφος πληθυσμός είχαν σημαντικό μέγεθος (προσδιορίστηκαν στις δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011) αλλά πιθανόν να μην επηρεάζονται από την αλλαγή του ηθμού της βιομηχανίας. Θα πρέπει να τονιστεί εδώ ότι το δείγμα μας αποτελεί το διήθημα του ηθμού της βιομηχανίας και ότι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται, έχουν περάσει μία φορά κάτω από ορισμένες συνθήκες από πόρους 0,2 μm άρα δύναται να ξαναπεράσουν εάν προσομοιαστούν οι συνθήκες και έτσι να υποεκτιμηθεί ο πληθυσμός.



Εικόνα 3.18: Ολικός ετερότροφος πληθυσμός σε σχέση με το διάστημα από την αλλαγή του φίλτρου της βιομηχανίας και με τη θερμοκρασία του δείγματος (υπόστρωμα TSA, 37 °C).

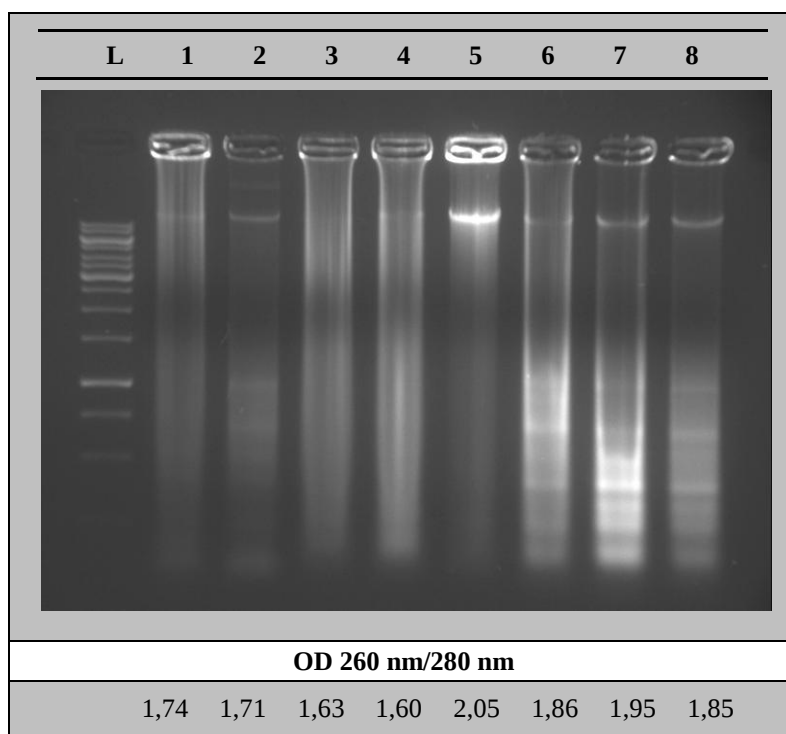
3.1.3. Φυλογενετική ανάλυση βακτηριακών στελεχών βάσει του 16S rRNA γονιδίου

Με στόχο την ταυτοποίηση επιλεγμένων, μέσω της τεχνικής BOX-PCR (§ 3.1.4), βακτηριακών στελεχών τα οποία απομονώθηκαν στις τέσσερις δειγματοληψίας, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενωμικού DNA του κάθε στελέχους (§ 2.7.1) και στη συνέχεια ενίσχυση της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου (§ 2.8.2). Οι αλληλουχίες που προέκυψαν συγκρίθηκαν με χρήση του αλγόριθμου BLAST με βακτηριακές αλληλουχίες αναφοράς (16S rRNA reference

sequences) καθώς και με όλες τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (nucleotide collection) που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων GenBank, ώστε να βρεθούν οι μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομολογία αλληλουχίας. Στη συνέχεια έγινε ευθυγράμμιση των αλληλουχιών των επιλεγμένων και ταυτοποιημένων στελεχών μαζί με αλληλουχίες αναφοράς μικροοργανισμών με τους οποίους παρουσίαζαν ομοιότητα, με χρήση του προγράμματος ClustalW2 και εν συνεχεία κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα με χρήση του προγράμματος MEGA 5.

3.1.3.1. Αποτελέσματα Μεθοδολογίας Απομόνωσης Γενωμικού DNA

Η απομόνωση του γενωμικού βακτηριακού DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 0,8 % όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.19. Η ζώνη που βρίσκεται πλησιέστερα στην αρχή της διαδρομής αποτελεί το γενωμικό DNA ενώ ο υπόλοιπος «θόρυβος» που υπάρχει αποτελεί προσμίξεις στο διαλυμένο DNA είτε από πρωτεΐνες είτε από ριβοσωμικό RNA. Επειδή η μέθοδος απομόνωσης DNA που χρησιμοποιήθηκε δεν αποφέρει υψηλής καθαρότητας DNA, ελέγχθηκε η καθαρότητα του με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 260 και 280 nm.

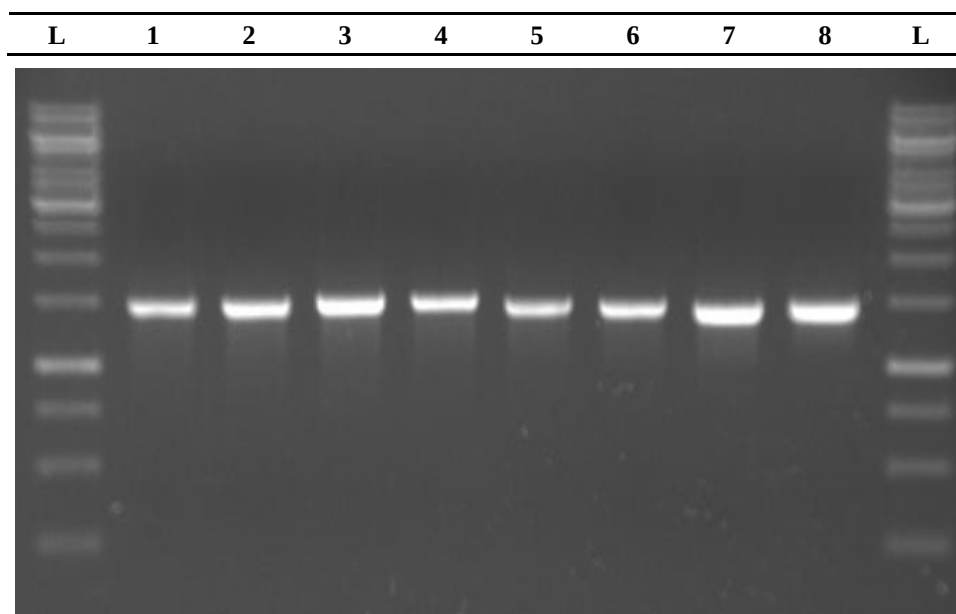


Εικόνα 3.19: Ηλεκτροφόρηση βακτηριακού DNA. Όπου L ο μοριακός μάρτυρας και 1 - 9 δείγματα και αποτελέσματα ελέγχου καθαρότητας DNA.

Διαπιστώθηκε ότι ο λόγος OD 260 nm/280 nm κυμαίνεται από 1,6 έως 2,05. Τιμές από 1,8 – 2 υποδηλώνουν υψηλή καθαρότητα χωρίς προσμίξεις από πρωτεΐνες. Χαμηλότερες τιμές υποδηλώνουν την ύπαρξη πρωτεϊνών που απορροφούν στα 280 nm. Συνεπώς ορισμένα από τα δείγματα μας είναι υψηλής καθαρότητας ενώ κάποια άλλα περιέχουν προσμίξεις πρωτεϊνών που οφείλεται στην ελλιπή απομάκρυνση κατά την απομόνωση του DNA. Με την τιμή της απορρόφησης στα 260 nm μπορεί να υπολογισθεί και η ποσότητα των νουκλεϊκών οξέων, τόσο το DNA όσο και το RNA, όμως με το πρωτόκολλο απομόνωσης που χρησιμοποιήθηκε δε γίνεται διάκριση στο DNA και το RNA, για το λόγο αυτό δεν υπολογίσθηκε ποσοτικά το DNA. Παρ' όλα αυτά, η ποσότητα του RNA δεν παρεμποδίζει μετέπειτα εφαρμογές.

3.1.3.2. Αποτελέσματα Ενίσχυσης 16S rRNA γονιδίου

50 στελέχη επιλέγησαν μετά από ομαδοποίηση με τη μέθοδο BOX-PCR (§ 3.1.4.) για να γίνει μοριακή ταυτοποίηση μέσω ανάλυσης της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου τους. Η ενίσχυση του γονιδίου πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος pA – R1492 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.21. Το προϊόν είχε το αναμενόμενο μέγεθος 1484 βάσεις.



Εικόνα 3.20: Ηλεκτροφόρηση καθαρισμένων προϊόντων PCR του 16S rRNA γονιδίου. Όπου (L) μοριακός μάρτυρας και (1 – 8) δείγματα.

3.1.3.3. Ευθυγράμμιση αλληλουχιών με κατατεθειμένες αλληλουχίες χρήση του αλγορίθμου BLAST

Οι αλληλουχίες των επιλεγμένων στελεχών συγκρίθηκαν με αλληλουχίες αναφοράς (16S rRNA reference sequences) καθώς και με όλες τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (nucleotide collection) που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων GenBank, εξαιρώντας όμως τις αλληλουχίες από μη καλλιεργημένα δείγματα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.

Πρέπει να αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι επειδή το 16S rRNA γονίδιο είναι 1500 βάσεις, χρειάζονται δύο αντιδράσεις αλληλούχισης για να αναγνωστεί όλο το γονίδιο. Στην παρούσα εργασία έγινε αντίδραση αλληλούχισης με χρήση του εκκινητή R1492 (reverse) και σε ορισμένες περιπτώσεις όπου το αποτέλεσμα από την ευθυγράμμιση με το BLAST δεν έδωσε με βεβαιότητα κάποιο αποτέλεσμα χρησιμοποιήθηκε και η αλληλούχιση με τον εκκινητή pA (forward). Εν συνεχεία οι δύο αλληλουχίες ενώθηκαν σχηματίζοντας την «consensus» αλληλουχία. Επίσης υπήρχαν στελέχη τα οποία κατά την ευθυγράμμιση παρουσίαζαν υψηλή ομοιότητα και max score με περισσότερες από μία αλληλουχίες και για το λόγο αυτό στον Πίνακα 3.3 στα στελέχη αυτά αναγράφονται περισσότεροι του ενός μικροοργανισμοί.

Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών με τον αλγόριθμο BLAST για τα στελέχη που απομονώθηκαν από δείγματα νερού στις 4 δειγματοληψίες.

Κωδικός στελέχους	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια ¹ (αριθμός κατάθεσης στην τράπεζα GenBank)	Max score	Μέγιστη ομοιότητα %	Αριθμός νουκλεοτιδίων ²
Φύλο Firmicutes				
Q15	<i>Bacillus aquimaris</i> (NR_025241.1)	1808	99,8	985
Q16	<i>Bacillus aquimaris</i> (NR_025241.1)	1834	99,8	999
X10	<i>Bacillus aquimaris</i> (NR_025241.1))	1823	99,7	997
X9	<i>Bacillus aquimaris</i> (NR_025241.1)	1831	99,7	997
FA1.40	<i>Bacillus aquimaris</i> (NR_025241.1)	1829	99,8	996
Q36	<i>Bacillus niabensis</i> (NR_043334.1)	1581	98,5	888

¹ Οι αλληλουχίες με αριθμούς κατάθεσης NR αποτελούν αλληλουχίες αναφοράς.

² Αριθμός νουκλεοτιδίων του 16S rDNA του στελέχους που χρησιμοποιήθηκαν στην ευθυγράμμιση αλληλουχιών.

Κωδικός στελέχους	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια (αριθμός κατάθεσης στην τράπεζα GenBank)	Max score	Μέγιστη ομοιότητα %	Αριθμός νουκλεοτιδίων
E43	<i>Bacillus niabensis</i> (NR_043334.1)	1685	97,3	979
22FA2h2.7	<i>Bacillus niabensis</i> (NR_043334.1)	1779	98,8	996
C104	<i>Bacillus niabensis</i> (NR_043334.1)	1587	98,3	898
L123	<i>Bacillus cibi</i> (NR_042974.1)	2519	98,5	1437
L64	<i>Bacillus cibi</i> (NR_042974.1)	2636	99,9	1429
K123	<i>Bacillus cibi</i> (NR_042974.1)	1832	99,8	1000
K120	<i>Bacillus cibi</i> (NR_042974.1)	1838	99,9	999
K118	<i>Bacillus cibi</i> (NR_042974.1)	1821	99,7	995
K106	<i>Bacillus cibi</i> (NR_042974.1)	1827	99,7	995
K33	<i>Bacillus cibi</i> (NR_042974.1)	1825	99,8	993
L5	<i>Bacillus cibi</i> (NR_042974.1)	1834	99,9	996
F732	<i>Bacillus cibi</i> (NR_042974.1)	1832	99,9	996
412	<i>Bacillus cibi</i> (NR_042974.1)	1834	99,9	997
411	<i>Bacillus cibi</i> (NR_042974.1)	1836	99,9	997
F41	<i>Bacillus arsenicus</i> (EU620414.1)	1799	100	975
	<i>Bacillus barbaricus</i> (NR_028967.1)	1772	99,8	975
F731	<i>Bacillus nanhaiensis</i> (JQ799090.1)	2643	99,9	1437
	<i>Bacillus arsenicus</i> (EU620414.1)	2643	99,9	1437
	<i>Bacillus barbaricus</i> (NR_028967.1)	2542	99,9	1437
D7	<i>Bacillus nanhaiensis</i> (JQ799090.1)	2641	99,9	1435
	<i>Bacillus arsenicus</i> (EU620414.1)	2641	99,9	1435
	<i>Bacillus barbaricus</i> (NR_028967.1)	2542	98,9	1435
FA1.13	<i>Bacillus arsenicus</i> (GQ304784.1)	1842	100	997
	<i>Bacillus nanhaiensis</i> (JQ799091.1)	1836	99,9	997
	<i>Bacillus barbaricus</i> (NR_028967.1)	1786	99,3	997

Κωδικός στελέχους	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια (αριθμός κατάθεσης στην τράπεζα GenBank)	Max score	Μέγιστη ομοιότητα %	Αριθμός νουκλεοτιδίων
FA1.8	<i>Bacillus nanhaiensis</i> (JQ799081.1)	1821	99,7	995
	<i>Bacillus barbaricus</i> (NR_028967.1)	1775	99,2	995
D17	<i>Bacillus arsenicus</i> (EU620414.1)	1810	99,4	1000
	<i>Bacillus nanhaiensis</i> (JQ799081.1)	1805	99,3	1000
	<i>Bacillus barbaricus</i> (NR_028967.1)	1749	98,8	1000
D8	<i>Bacillus nanhaiensis</i> (JQ799090.1)	2627	99,7	1440
	<i>Bacillus barbaricus</i> (NR_028967.1)	2529	98,7	1440
22FA1.12	<i>Bacillus nanhaiensis</i> (JQ799063.1)	1834	99,9	996
	<i>Bacillus barbaricus</i> (NR_028967.1)	1790	99,3	996
Q30	<i>Bacillus korlensis</i> (NR_044538.1)	1640	97,2	1000
K78	<i>Bacillus aryabhattai</i> (JQ799103.1)	2643	99,8	1441
	<i>Bacillus megaterium</i> (NR_043401.1)	2612	99,4	1441
W60	<i>Bacillus boroniphilus</i> (NR_041275.1)	1844	100	998
Q39	<i>Bacillus jeotgali</i> (NR_025060.1)	1823	99,7	996
J5	<i>Bacillus safensis</i> (NR_041794.1)	2507	99,3	1371
22FA1.58	<i>Bacillus safensis</i> (NR_041794.1)	2617	99,9	1429
FSD1.11	<i>Brevibacillus agri</i> (NR_040983.1)	2575	99,4	1415
	Φύλο Proteobacteria			
	α-Proteobacteria			
R1	<i>Methylobacterium tardum</i> (NR_041443.1)	1899	99,5	1042
R2	<i>Methylobacterium tardum</i> (NR_041443.1)	1821	99,7	996
AM1	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i> (NR_043037.1)	2501	99,5	1382
41021	<i>Sphingomonas echinoides</i> (NR_024700.1)	2446	98,8	1378
41022	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (NR_036865.1)	2462	99,1	1378
AS1	<i>Blastobacter denitrificans</i> (NR_041827.1)	2529	99,9	1383
X39	<i>Paracoccus marcusii</i> (NR_044922.1)	2484	100	1344

Κωδικός στελέχους	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια (αριθμός κατάθεσης στην τράπεζα GenBank)	Max score	Μέγιστη ομοιότητα %	Αριθμός νουκλεοτιδίων
	Φύλο Proteobacteria			
	β-Proteobacteria			
X36	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> (NR_041720.1)	2588	99,7	1416
43	<i>Ralstonia insidiosa</i> (NR_025242.1)	1834	99,9	996
49	<i>Ralstonia insidiosa</i> (NR_025242.1)	2614	99,9	1431
	γ-Proteobacteria			
Q28	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (HM854248.1)	1661	99,7	906
	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (NR_026207.1)	1622	98,8	906
	Φύλο Actinobacteria			
K86	<i>Microbacterium oxydans</i> (NR_044931.1)	2566	99,4	1412
K56	<i>Rhodococcus ruber</i> (NR_026185.1)	2590	99,9	1406
X38	<i>Kocuria turfanensis</i> (NR_043899.1)	2510	98,9	1407
	<i>Kocuria flava</i> (NR_044308.1)	1814	99,6	994
W49	<i>Kocuria flava</i> (NR_044308.1)	1820	99,6	997
42	<i>Kocuria rosea</i> (NR_044871.1)	2569	99,6	1416

Τα 50 στελέχη τα οποία ταυτοποιήθηκαν μοριακά βρέθηκαν να ανήκουν σε τρία φύλα και συγκεκριμένα στο φύλο Firmicutes, στο φύλο Actinobacteria και στο φυλο Proteobacteria.

Φύλο Firmicutes

Από τα 50 στελέχη, 34 ανήκουν στο φύλο Firmicutes και συγκεκριμένα 35 στην οικογένεια Bacillaceae και στο γένος *Bacillus* και ένα στέλεχος στην οικογένεια Paenibacillaceae και στο γένος *Brevibacillus*. Τα 33 στελέχη του γένους *Bacillus* διαχωρίστηκαν φυλογενετικά σε 9 διακριτές ομάδες οι οποίες διέφεραν στην αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου τους. Η 1^η ομάδα (5 στελέχη) είχε ομοιότητα σε ποσοστό άνω του 99,7 % με το *B. aquimaris*. Η 2^η ομάδα που περιλαμβάνει 4 στελέχη . παρουσίασε χαμηλότερη ομοιότητα από 97,3 – 98,8 με το *B. niabensis*, Η 3^η ομάδα που αποτελείται από 11 στελέχη τα οποία επιλέχθηκαν βάση του διαφορετικού προτύπου BOX, είχε μεγαλύτερη ομοιότητα με το *B. cibi*, παρ' όλα αυτά παρουσίασε εξίσου

μεγάλη ομοιότητα και με τα συγγενικά είδη *B. idriensis* και *B. indicus* όπως φαίνεται στο φυλογενετικό δένδρο της Εικόνας 3.22. Η 4^η ομάδα αποτελείται από 8 στελέχη και οι αλληλουχίες τους εμφάνιζαν ομοιότητες με την αλληλουχία αναφοράς του *B. barbaricus* και με τις αλληλουχίες στη νουκλεοτιδική βάση δεδομένων των *B. arsenicus* και *B. nanhaiensis*. Ειδικότερα το τελευταίο, με το οποίο οι αλληλουχίες των στελεχών έχουν την μεγαλύτερη ομοιότητα, αποτελεί ένα πρόσφατα καταγεγραμμένο είδος στη βάση δεδομένων των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών της GenBank χωρίς όμως να υπάρχει ακόμα αλληλουχία αναφοράς. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες αναφοράς και θεωρήθηκε ότι τα στελέχη έχουν τη μεγαλύτερη ομοιότητα ως προς το *B. barbaricus*, με ενδεχόμενο όμως την τροποποίηση του. Η 5^η ομάδα περιλαμβάνει 1 στέλεχος με ομοιότητα 97,2 % με το *B. korlensis*. Η 6^η ομάδα περιλαμβάνει 1 στέλεχος που εμφανίζει ομοιότητα με τα στελέχη *B. aryabhattai* και *B. megaterium*. Το πρώτο δεν περιλαμβάνεται στις αλληλουχίες αναφοράς καθώς πρόκειται για πρόσφατα καταγεγραμμένο είδος. Η 7^η ομάδα αντιπροσωπεύεται από 1 στέλεχος με ομοιότητα 100 % με το *B. boronophilus* ενώ παρουσιάζει και υψηλή ομοιότητα με το *B. selenatarsenatis*. Το στέλεχος της 8^{ης} ομάδας εμφανίζει ομοιότητα 99,7 % με το *B. jeotgali* ενώ στην 9^η ομάδα τα 2 στελέχη που την απαρτίζουν παρουσιάζουν ομοιότητα με το *B. safensis*. Τέλος, το στέλεχος που ανήκει στο γένος *Brevibacillus*, παρουσίασε ομοιότητα με το είδος *Brevibacillus agri* σε ποσοστό 99,4 %.

Φύλο Proteobacteria

Έντεκα στελέχη ταξινομήθηκαν στο φύλο Proteobacteria και συγκεκριμένα 7 στελέχη στην ομοταξία α-Proteobacteria, 3 στελέχη στα β-Proteobacteria και 1 στέλεχος στα γ-Proteobacteria. Αναλυτικότερα α-Proteobacteria διακρίθηκαν σε 3 τάξεις, στα Rhizobiales, στα Rhodobacterales και στα Sphingomonadales. Η τάξη Rhizobiales αντιπροσωπεύτηκε από 2 στελέχη που παρουσίαζαν υψηλή ομοιότητα με το είδος *Methylobacterium tardum* (Οικογένεια Methylobacteriaceae), 2 στελέχη που παρουσίαζαν ομοιότητα με το γένος *Bradyrhizobium* (Bradyrhizobiaceae) και συγκεκριμένα με τα είδη *B. pachyrhizi* και *B. japonicum* και τέλος από 1 στέλεχος που εμφάνισε ομοιότητα με το είδος *Blastobacter denitrificans* (Οικογένεια Bradyrhizobiaceae). Η τάξη Rhodobacterales αντιπροσωπεύτηκε από ένα στέλεχος με 100 % ομοιότητα με το είδος *Paracoccus marcusii* και στην τάξη Sphingomonadales ο μοναδικός αντιπρόσωπος εμφάνισε ομοιότητα 98,8 % με το *Sphingomonas echinoides*.

Στα β -Proteobacteria και συγκεκριμένα στην οικογένεια Burkholderiaceae, εμφανίστηκαν να ανήκουν 3 στελέχη. 1 στέλεχος παρουσίασε ομοιότητα 97,9 % με το είδος *Burkholderia vietnamiensis* και 2 στελέχη με το είδος *Ralstonia insidiosa* με ποσοστό ομοιότητας 99.9 %.

Τέλος, τα γ - Proteobacteria, αντιπροσωπεύτηκαν από 1 στέλεχος που ανήκει στην οικογένεια Moraxellaceae της τάξης Pseudomonadales και παρουσιάζει ομοιότητα με το γένος *Acinetobacter*.

Φύλο Actinobacteria

Πέντε στελέχη βρέθηκε να ανήκουν στην τάξη Actinomycetales. Από αυτά, 1 στέλεχος είχε ομοιότητα 99,9 % με το είδος *Rhodococcus ruber* της οικογένειας Nocardiaceae και 1 στέλεχος παρουσίασε ομοιότητα με το *Microbacterium oxydans* της οικογένειας Microbacteriaceae (υποτάξη Micrococcineae). Επιπλέον 3 στελέχη εμφάνισαν ομοιότητα με το γένος *Kocuria* (οικογένεια Micrococcaceae, υποτάξη Micrococcineae) και συγκεκριμένα με 1 στέλεχος με το είδος *Kocuria rosea*, 1 στέλεχος με το είδος *Kocuria flava* και 1 στέλεχος με το είδος *Kocuria turfanensis*.

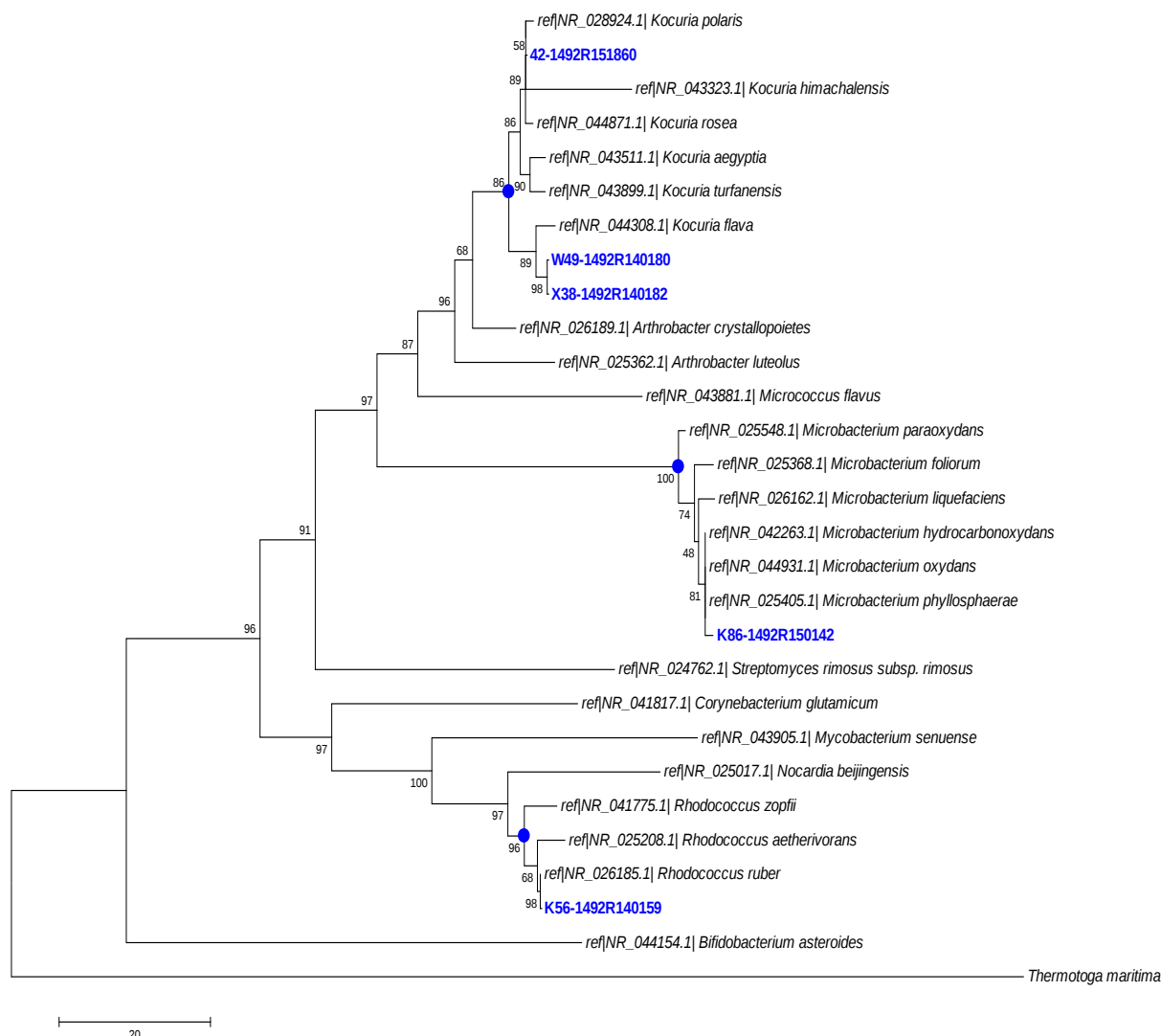
3.1.3.4. Φυλογενετικά δέντρα των ταυτοποιηθέντων μικροοργανισμών

Με το λογισμικό MEGA 5, σχεδιάστηκαν φυλογενετικά δέντρα για τα 3 φύλα στα οποία ανήκουν οι μικροοργανισμοί που εντοπίστηκαν στον νερό. Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σχεδίαση των φυλογενετικών δέντρων, ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων για τις αλληλουχίες αναφοράς. Οι αλληλουχίες των στελεχών είχαν μέγεθος 950-1000 βάσεις και επειδή η αντίδραση αλλούχισης έγινε με τον reverse εκκινητή (R1492), χρησιμοποιήθηκαν οι συμπληρωματικές και αντίστροφες (reverse complement) αλληλουχίες ώστε οι αλληλουχίες να έχουν τον προσανατολισμό 5'-3'.

Στην Εικόνα 3.21 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο για τα στελέχη που ανήκουν στο φύλο Firmicutes. Διακρίνονται οκτώ διακριτές ομάδες στο γένος *Bacillus*, σε αντίθεση με τις 9 που περιγράφηκαν παραπάνω, καθώς τα στελέχη Q39 και W60 εντάσσονται στην ίδια ομάδα που έχει δημιουργηθεί στο φυλογενετικό δέντρο. Παρατηρήθηκε ότι το Q30 βρίσκεται πιο μακριά εξελικτικά από το *B. korlensis* και λαμβάνοντας υπ' όψη το ποσοστό ομοιότητας τους που είναι 97,2 %, ενδέχεται το στέλεχος αυτό να αντιπροσωπεύει νέο είδος τους γένους *Bacillus*. Η ομάδα που παρουσιάζει ομοιότητα με το *B. niabensis* επίσης τοποθετείται πιο μακριά εξελικτικά.

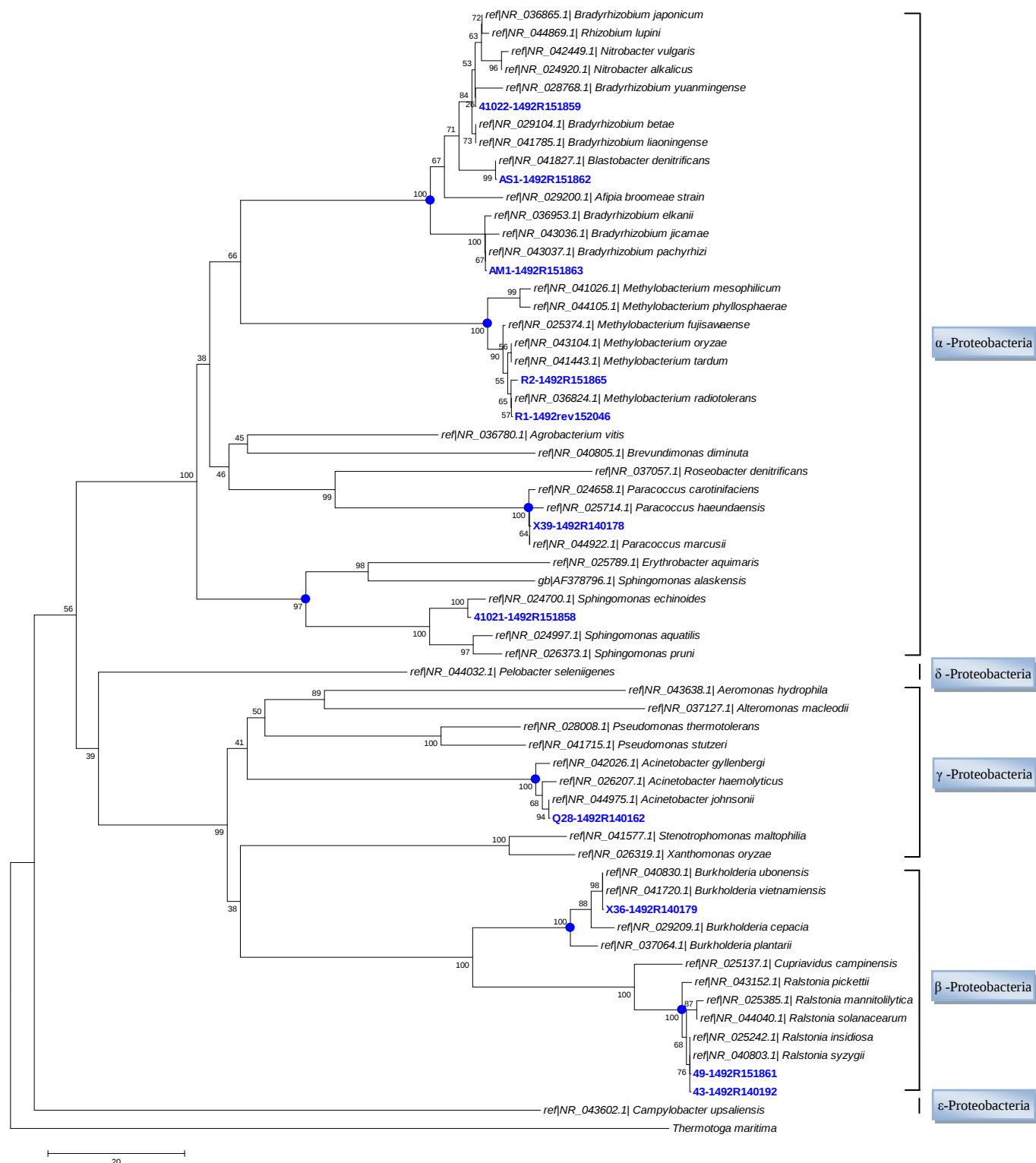


Εικόνα 3.21: Φυλογενετικό δέντρο του 16S rRNA γονιδίου για το φύλο Firmicutes βασισμένο στη μέθοδο του πλησιέστερου γείτονα, με τις αποστάσεις να προσδιορίζονται με βάση τον αριθμό των διαφορών που παρουσιάζουν δυο αλληλουχίες. Πραγματοποιήθηκαν 1000 αναλύσεις bootstrap (απόσταση). Το δέντρο ευθυγραμμίστηκε με την αλληλουχία του βακτηρίου *Thermotoga maritima*.



Εικόνα 3.22: Φυλογενετικό δέντρο του 16S rRNA γονιδίου για το φύλο Actinobacteria βασισμένο στη μέθοδο του πλησιέστερου γείτονα, με τις αποστάσεις να προσδιορίζονται με βάση τον αριθμό των διαφορών που παρουσιάζουν δυο αλληλουχίες. Πραγματοποιήθηκαν 1000 αναλύσεις bootstrap (απόσταση). Το δέντρο ευθυγραμμίστηκε με την αλληλουχία του βακτηρίου *Thermotoga maritima*.

Στην Εικόνα 3.22 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο για τα στελέχη που ανήκουν στο φύλο Actinobacteria. Τα 3 στελέχη που ανήκουν στο γένος *Kocuria*, τοποθετούνται ως πιο συγγενικά του *Kocuria flava* και του *Kocuria polaris*, που έρχεται σε μερική αντίθεση με τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών. Το στελέχος που ταυτοποιήθηκε να έχει μεγαλύτερη ομολογία στην αλληλουχία του με το *Microbacterium oxydans*, στο φυλογενετικό δέντρο που σχεδιάστηκε τοποθετήθηκε ως πιο συγγενικό στα είδη *M. hydrocarbonoxydans* και *M. phyllosphaerae*.



Εικόνα 3.23: Φυλογενετικό δέντρο του 16S rRNA γονιδίου για το φύλο Proteobacteria βασισμένο στη μέθοδο του πλησιέστερου γείτονα, με τις αποστάσεις να προσδιορίζονται με βάση τον αριθμό των διαφορών που παρουσιάζουν δυο αλληλουχίες. Πραγματοποιήθηκαν 1000 αναλύσεις bootstrap (απόσταση). Το δέντρο ευθυγραμμίστηκε με την αλληλουχία του βακτηρίου *Thermotoga maritima*.

Στην Εικόνα 3.23 παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο για τα στελέχη που ανήκουν στο φύλο Proteobacteria. Διακρίνονται οι κλάδοι των α , β και γ – Proteobacteria που αντιπροσωπεύονται από τα γένη των *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium* (α -Proteobacteria), *Ralstonia*, *Burkholderia* (β -Proteobacteria) και *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (γ -Proteobacteria). Παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος 41022 δεν τοποθετήθηκε σε μικρή εξελικτική απόσταση από το *Bradyrhizobium japonicum* με το οποίο είχε τα μεγαλύτερη ομοιότητα στην αλληλουχία αλλά με το *B. yuanmingense*. Επίσης στον κλάδο που περιέχονται τα είδη του γένους *Bradyrhizobium* εμπεριέχονται και άλλα γένη (*Afipia*, *Blastobacter*, *Nitrobacter*, *Rhizobium*) και τα οποία θα έπρεπε να σχηματίζουν εξελικτικά ένα άλλο συγγενικό κλάδο στο φυλογενετικό δέντρο με τον κλάδο του γένους *Bradyrhizobium*.

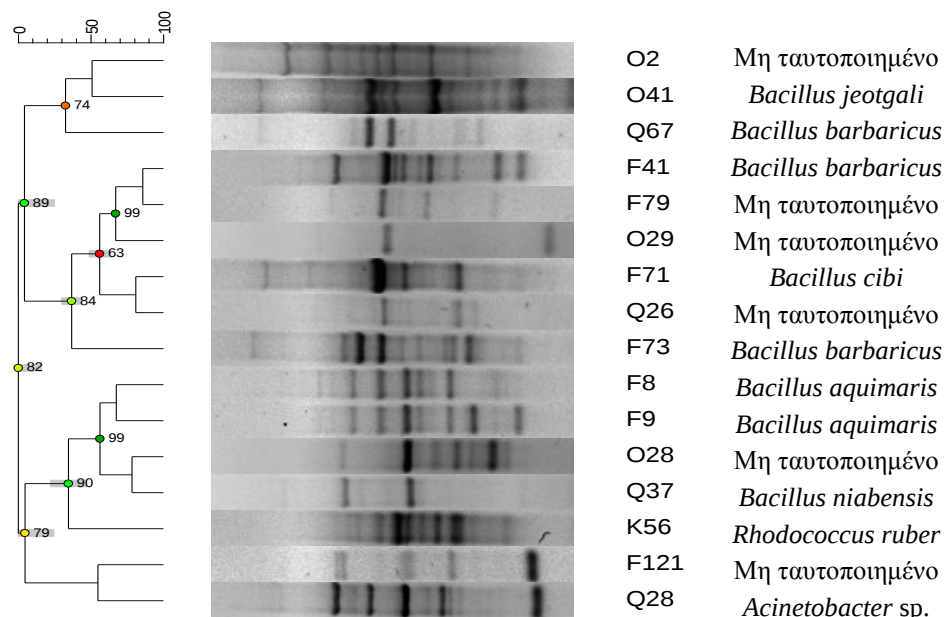
Συμπερασματικά, η φυλογενετική ανάλυση και η ταξινόμηση των στελεχών με βάση τις αλληλουχίες τους και σε σχέση με γνωστά είδη, έδειξε διαφοροποίηση ανάμεσα στο αποτέλεσμα που εξάγεται από την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών και από τη μελέτη του φυλογενετικού δέντρου. Ακόμα και όταν τα στελέχη εμφάνιζαν υψηλά ποσοστά ομολογίας με κάποιο είδος, η τοποθέτησή τους στο φυλογενετικό δέντρο μπορεί να έδειχνε εξελικτική συγγένεια με ένα άλλο είδος ή με περισσότερα του ενός. Παραδείγματος χάριν, τα στελέχη R1 και R2 παρουσίασαν ομοιότητα 99,5 και 99,7 με το *Methylobacterium tardum* ενώ στο φυλογενετικό δέντρο τοποθετήθηκαν εξελικτικά πλησιέστερα στο *Methylobacterium radiotolerans*.

3.1.4. Ποιοτική Ανάλυση - Ομαδοποίηση μέσω της τεχνικής BOX-PCR

Οι απομονώσεις που προέκυψαν από όλες τις δειγματοληψίες ομαδοποιήθηκαν με τη μέθοδο της BOX-PCR. Η μέθοδος αυτή είχε καλή διαχωριστική ικανότητα και επιτεύχθηκε διαχωρισμός των απομονωμένων στελεχών σε επίπεδο στελέχους. Τα πρότυπα που προέκυψαν είχαν συνήθως από 5 έως 20 ζώνες με μέγεθος από 200 bp έως 10 kb. Τα πρότυπα αναλύθηκαν με το πρόγραμμα GelCompar II της Applied Maths. Αντιπρόσωποι από τα πρότυπα που αντιστοιχούσαν στους κυρίαρχους πληθυσμούς, ταυτοποιήθηκαν μοριακά με ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA (§3.1.3). Αντιπρόσωποι από τα διαφορετικά πρότυπα τα οποία δεν ταυτοποιήθηκαν μοριακά μελετήθηκαν ως προς τα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους.

3.1.4.1. Ποιοτική Ανάλυση Μικροβιακού Φορτίου Δειγματοληψίας Ιανουαρίου 2010

Από το δείγμα νερού κατά τη δειγματοληψία του Ιανουαρίου 2010, 331 απομονωμένα στελέχη ομαδοποιήθηκαν σε 18 διαφορετικά πρότυπα με βάση την τεχνική BOX-PCR με χρήση του προγράμματος GelCompar II. Στην Εικόνα 3.24 φαίνεται το δενδρόγραμμα με τα κυριότερα πρότυπα BOX από τη δειγματοληψία του Ιανουαρίου 2010 και στην Εικόνα 3.25 παρουσιάζεται η μεταξύ τους ομοιότητα με χρήση του συντελεστή Pearson correlation. Διαχωρίζονται δύο κλάδοι στους οποίους κατανέμονται τα είδη του γένους *Bacillus*. Ενώ το πρωτεοβακτήριο *Acinetobacter* sp. αν και τοποθετείται στον ίδιο κλάδο με τα στελέχη του γένους *Bacillus*, η αξιοπιστία του κλάδου αυτή είναι μικρότερη.

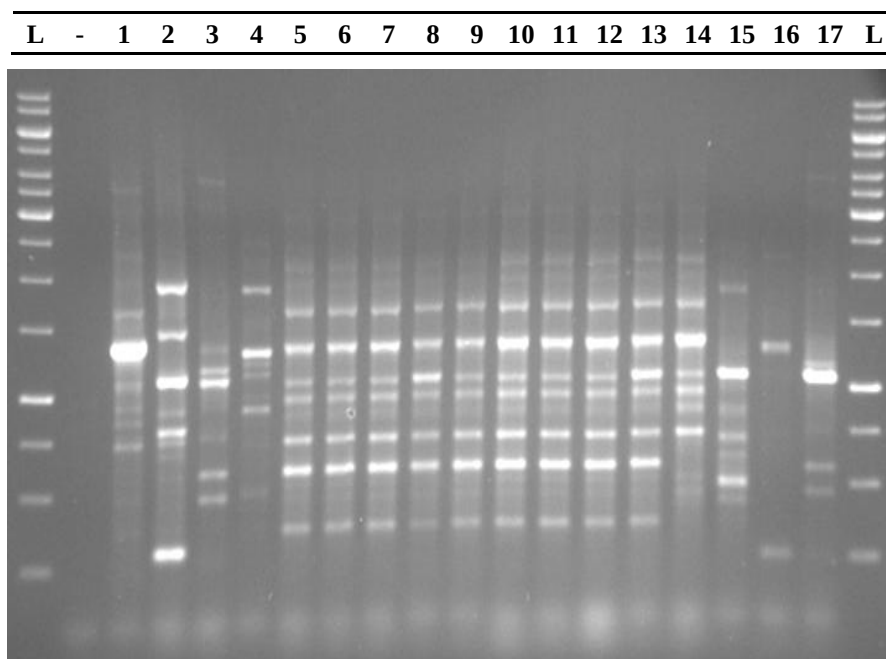


Εικόνα 3.24: Δενδρόγραμμα που προέκυψε από την σύνθετη ιεραρχική ανάλυση των κυριότερων προϊόντων BOX-PCR στη δειγματοληψία Ιανουαρίου 2010 με χρήση του συντελεστή ομοιότητας Pearson correlation και ομαδοποίηση με τη μέθοδο UPGMA.

[illegible]

Εικόνα 3.25: Ομοιότητα ανάμεσα στα διαφορετικά πρότυπα BOX, με βάση το συντελεστή Pearson correlation.

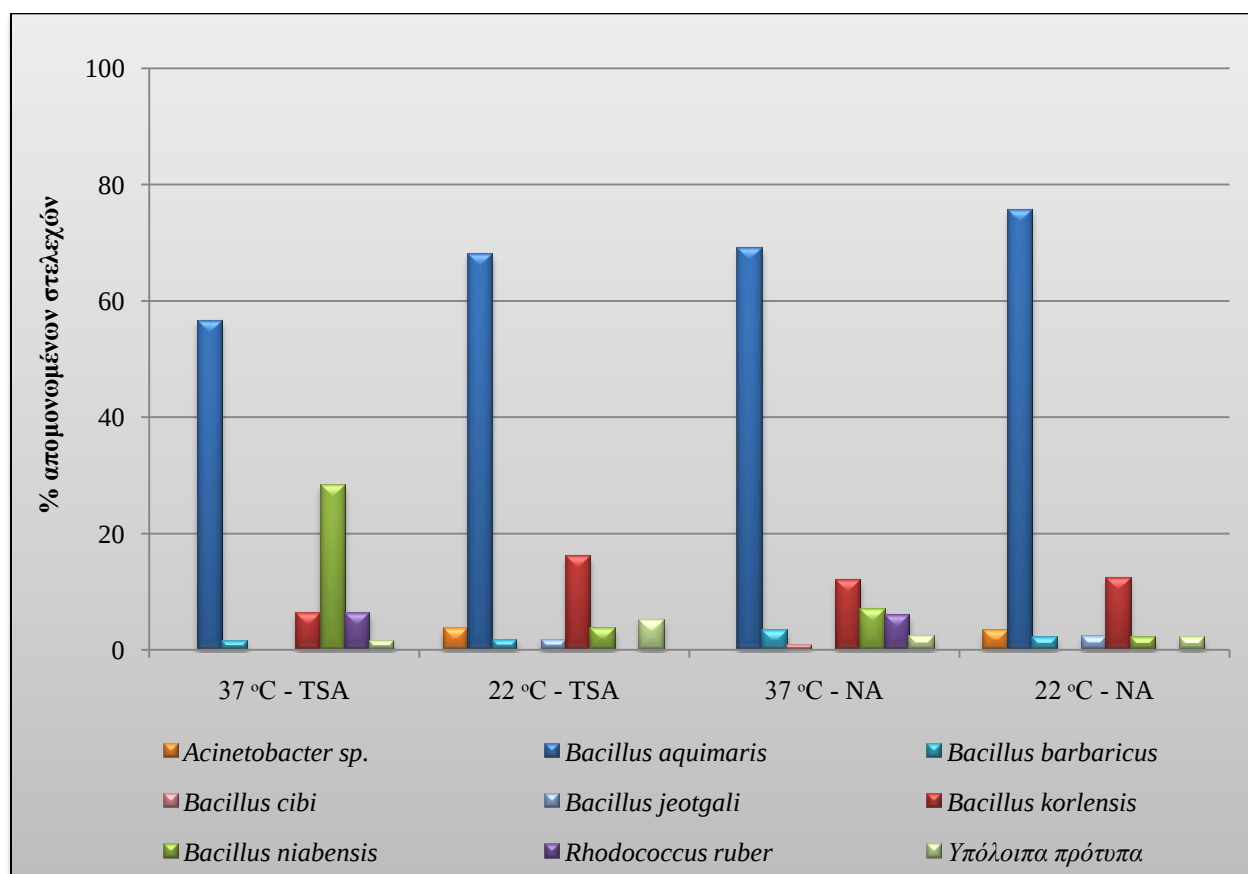
Από τα 18 διαφορετικά πρότυπα, αντιπρόσωποι 10 εξ' αυτών ταυτοποιήθηκαν και βρέθηκαν να έχουν ομοιότητα, με βάση την αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου, με 8 είδη. Αναλυτικότερα, απομονώθηκαν 8 στελέχη που ανήκαν στο γένος *Bacillus* και είχαν ομοιότητα με τα είδη *Bacillus aquimaris* (2 στελέχη), *B. korlensis* (1 στέλεχος), *B. niabensis* (1 στέλεχος), *B. barbaricus* (2 στελέχη), *B. cibi* (1 στέλεχος) και *B. jeotgali* (1 στέλεχος). Απομονώθηκαν επίσης 1 στέλεχος που ανήκε στο φύλο Actinobacteria και είχε ομοιότητα με το είδος *Rhodococcus ruber* και 1 στέλεχος που ανήκε στο φύλο Proteobacteria και συγκεκριμένα είχε ομοιότητα με το είδος *Acinetobacter* sp.. Τα υπόλοιπα 8 στελέχη που προέκυψαν από την ομαδοποίηση, δεν ταυτοποιήθηκαν λόγω του χαμηλού πληθυσμού τους στο δείγμα. Ορισμένα από τα πρότυπα αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.26.



Εικόνα 3.26: Πρότυπα προϊόντων BOX - PCR της δειγματοληψίας Ιανουαρίου 2010. Όπου (L) ο μοριακός μάρτυρας 1 kb, (-) αρνητικός μάρτυρας, (1) *Bacillus cibi*, (2) *Acinetobacter* sp., (3, 17) *Bacillus korlensis*, (4) *Bacillus barbaricus* strain 1, (5-13) *Bacillus aquimaris* strain 1, (14) *Bacillus aquimaris* strain 2, (15) Box 1_17, (16) Box 1_16

Στην Εικόνα 3.27 παρουσιάζεται η κατανομή % των απομονωμένων και ταυτοποιηθέντων στελεχών σε σχέση με τον ολικό ετερότροφο πληθυσμό ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης. Ο κυρίαρχος πληθυσμός παρουσίαζε ομοιότητα με το *Bacillus aquimaris*, με πληθυσμό 300 cfu/100 ml στο TSA στους 37 °C ενώ στο NA ο πληθυσμός ήταν 700 cfu/100 ml. Σημαντικό

πληθυσμό είχε και το στέλεχος που παρουσίαζε ομοιότητα με το *Bacillus korlensis*, ενώ το στέλεχος που παρουσίαζε ομοιότητα με το *Bacillus niabensis* είχε σημαντικό πληθυσμό μόνο στο υπόστρωμα TSA και ιδιαίτερα σε θερμοκρασία επώασης 37 °C. Το στέλεχος που παρουσίασε ομοιότητα με το *Rhodococcus ruber* εντοπίστηκε μόνο στους 37 °C ενώ τα στελέχη που είχαν ομοιότητα με τα *Acinetobacter* sp. και *Bacillus jeotgali* εντοπίστηκαν μόνο στους 22 °C. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα 2 στελέχη που είχαν ομοιότητα με το *B. aquimaris*, δε διέφεραν μορφολογικά και απομονώθηκαν ως ένα στέλεχος, παρ' όλα αυτά με την τεχνική της BOX-PCR διακρίθηκαν ως δύο διαφορετικά στελέχη καθώς στο πρότυπο του *Bacillus aquimaris* st. 2 απουσίαζαν δύο ζώνες (Εικόνα 3.26, δείγμα 13 και 14) ενώ επίσης παρουσίασαν διαφορετική μορφολογία αποικίας έπειτα από τη δοκιμασία για τον σχηματισμό ενδοσπορίων.

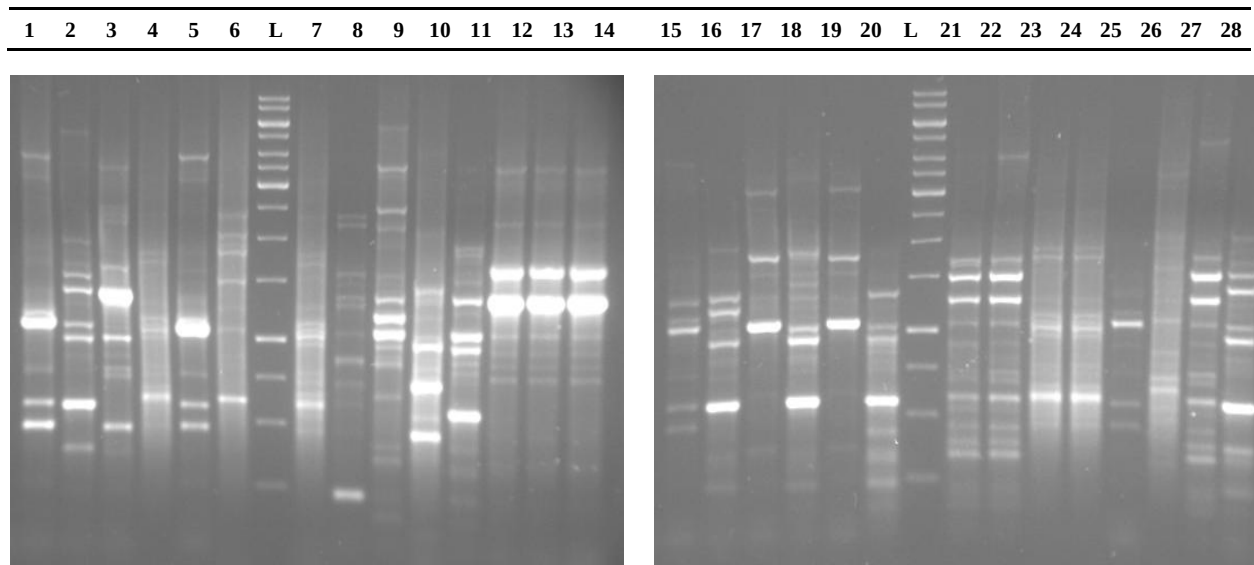


Εικόνα 3.27³: Ποσοστό % των απομονωμένων στελεχών σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό και κατανομή τους ανάλογα με τη θερμοκρασία επώασης και το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης.

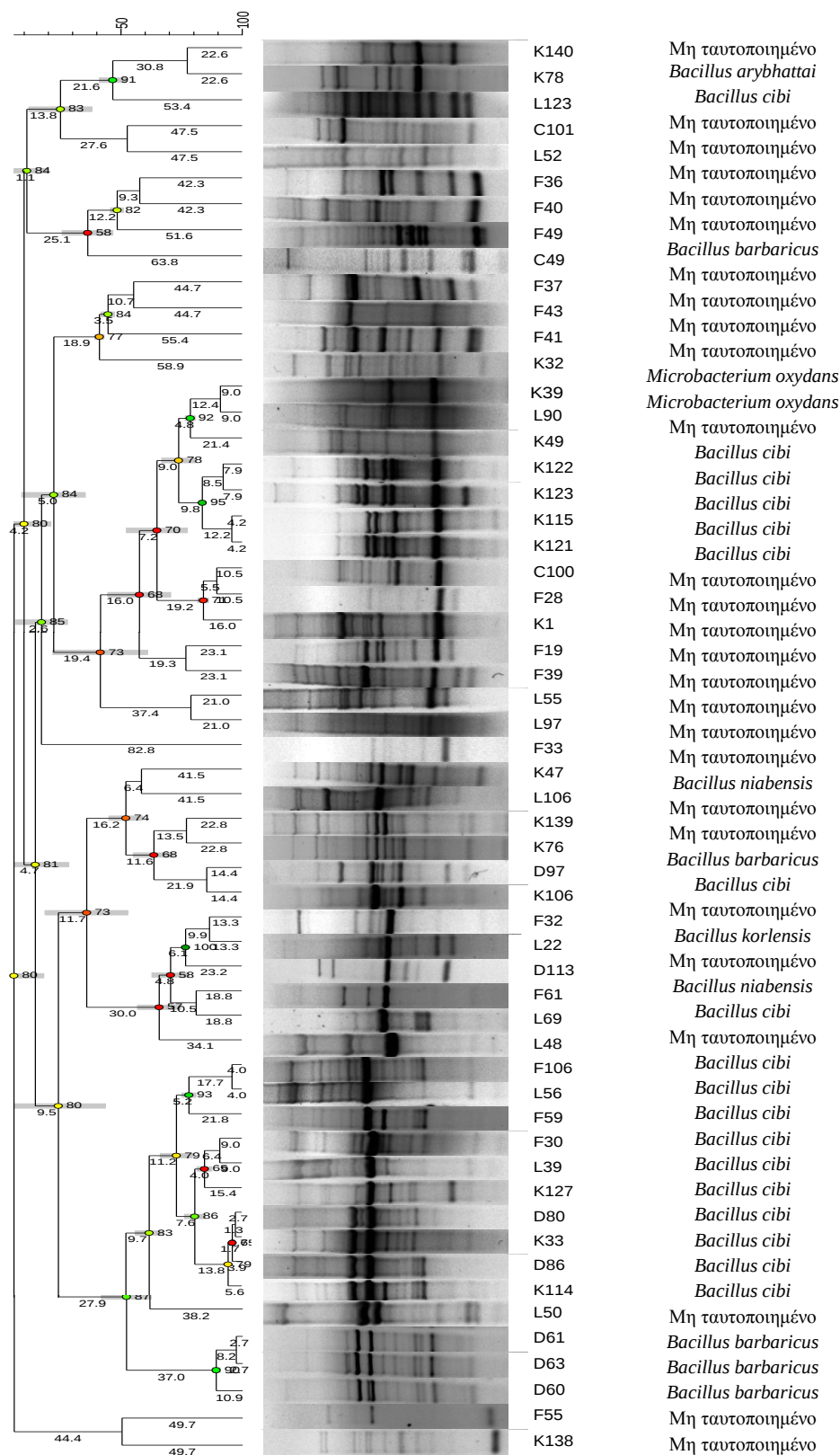
³Στον Πίνακα Π_1 του Παραρτήματος παρουσιάζεται η κατανομή του ετερότροφου πληθυσμού (cfu/100 ml) στα είδη που ταυτοποιήθηκαν μοριακά.

3.1.4.2. Ποιοτική Ανάλυση Μικροβιακού Φορτίου Δειγματοληψίας Μαρτίου 2010

Από το δείγμα νερού κατά τη δειγματοληψία του Μαρτίου 2010, 637 απομονωμένα στελέχη ομαδοποιήθηκαν σε 57 διαφορετικά πρότυπα με βάση την τεχνική BOX-PCR και με χρήση του προγράμματος GelCompar II. Ορισμένα από τα πρότυπα αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.28. Από τα 57 διαφορετικά πρότυπα, αντιπρόσωποι 15 εξ' αυτών ταυτοποιήθηκαν και βρέθηκαν να έχουν ομοιότητα, με βάση την αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου, με 6 είδη. Αναλυτικότερα, ταυτοποιήθηκαν 15 στελέχη που ανήκαν στο γένος *Bacillus* και είχαν ομοιότητα με τα ακόλουθα είδη: *Bacillus barbaricus* (3 στελέχη), *B. korlensis* (1 στέλεχος), *B. cibi* (8 στελέχη), *B. niabensis* (2 στελέχη), και *B. aryabhattai* (1 στέλεχος). Απομονώθηκε επίσης 1 στέλεχος που ανήκε στο φύλο Actinobacteria και είχε ομοιότητα με το *Microbacterium oxydans*. Διαπιστώθηκε ότι πρότυπα τα οποία ήταν παρόμοια και είχαν διαφορές σε 1-2 ζώνες, ανήκαν στο ίδιο είδος. Για το λόγο αυτό, 11 επιπλέον στελέχη ομαδοποιήθηκαν ως *B. cibi* και 1 επιπλέον ως *B. barbaricus*. Τα υπόλοιπα 30 πρότυπα που προέκυψαν από την ομαδοποίηση, δεν ταυτοποιήθηκαν λόγω του χαμηλού πληθυσμού τους στο δείγμα.



Εικόνα 3.28: Πρότυπα προϊόντων BOX - PCR δειγματοληψίας Μαρτίου 2010. Όπου (L) ο μοριακός μάρτυρας 1 kb, (1, 5, 15, 25) *Bacillus korlensis*, (2, 28) *Bacillus cibi* st. 16, (3) *Bacillus cibi* st. 4, (4, 7, 23, 24) *Microbacterium oxydans*, (6) Box 2_27, (8) Box 2_39, (9) Box 2_40, (10) Box 2_41, (11, 20) *Bacillus cibi* st. 15, (12-14) *Bacillus cibi* st. 3, (16) *Bacillus cibi* st. 11, (17, 19) *Bacillus niabensis* st.2, (18) *Bacillus cibi* st. 14, (21, 22, 27) *Bacillus barbaricus* st. 3, (26) Box 2_58.

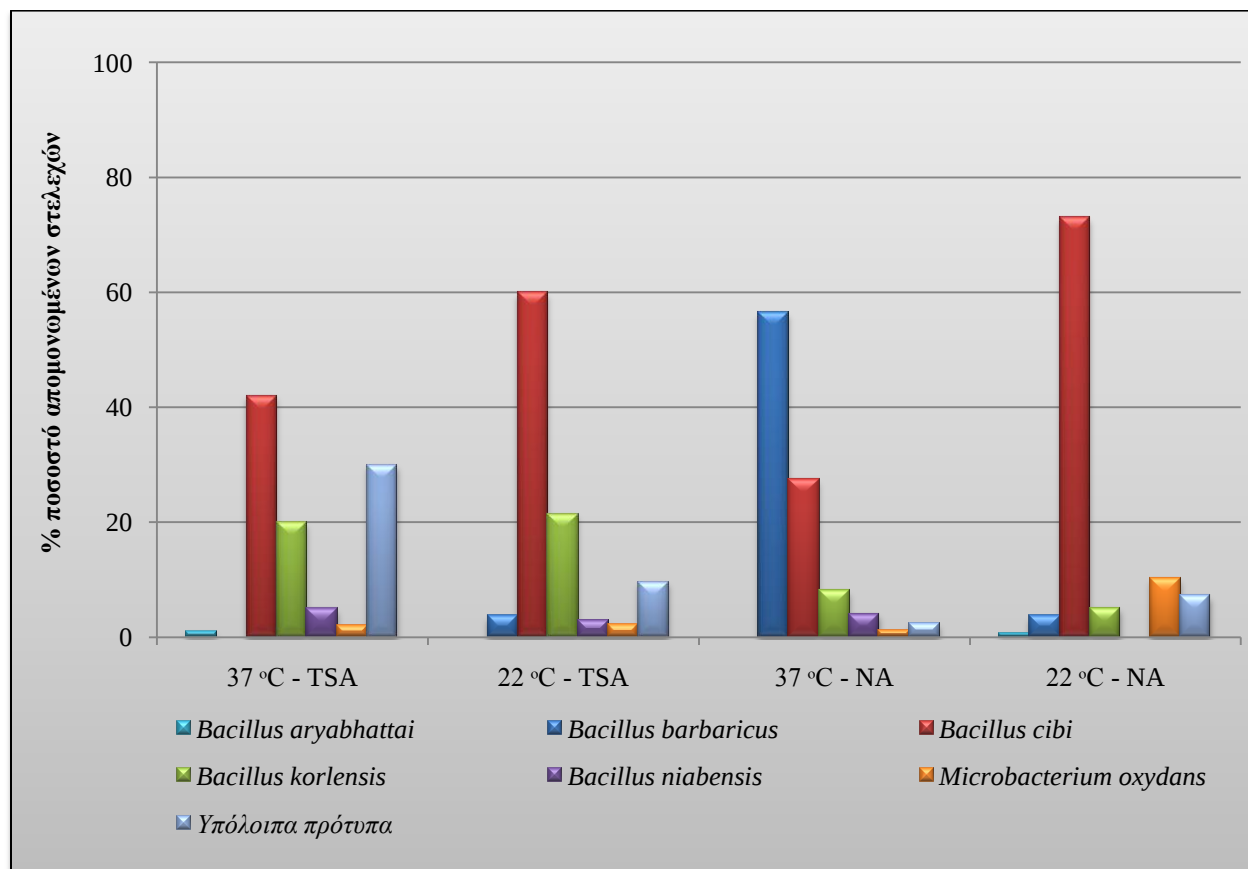


Εικόνα 3.29: Δενδρογράμμο που προέκυψε από την σύνθετη ιεραρχική ανάλυση των κυριότερων προϊόντων BOX – PCR της δειγματοληψίας Μαρτίου 2010 με χρήση του συντελεστή ομοιότητας Pearson correlation και με ομαδοποίηση με τη μέθοδο UPGMA.

Στην Εικόνα 3.29 παρουσιάζεται το δένδρογραμμα με τα κυριότερα πρότυπα που προέκυψαν από την τεχνική BOX-PCR για τη δειγματοληψία Μαρτίου 2010, με χρήση του συντελεστή Pearson correlation και ομαδοποίηση με τη μέθοδο UPGMA. Στο δένδρογραμμα σημειώνεται πάνω σε κάθε κλάδο η % ομοιότητα του κάθε προτύπου με το πλησιέστερο του πρότυπο, ενώ οι κλάδοι εκείνοι που σημαίνονται με πράσινο χρώμα αποτελούν αξιόπιστες ομάδες. Παρατηρείται ότι αρκετοί κλάδοι που έχουν υψηλά ποσοστά ομοιότητας μεταξύ τους ανήκουν στο ίδιο είδος παρ' όλα αυτά παρατηρείται ότι υπάρχουν και πολλοί κλάδοι που δεν είναι αξιόπιστοι και αυτό συμβαίνει επειδή ανάλυση με τον συντελεστή Pearson βασίζεται στις πυκνομετρικές καμπύλες (curved based) και όχι στις ζώνες (band based). Διαπιστώθηκε επίσης ότι, παρόμοια πρότυπα BOX που διέφεραν σε 1 ή 2 ζώνες, ομαδοποιήθηκαν μαζί, με υψηλό συντελεστή ομοιότητας. Τα στελέχη με τα πρότυπα αυτά βρέθηκαν να έχουν την ίδια αλληλουχία 16S rDNA (100 % ομοιότητα) χωρίς όμως είναι πάντα μορφολογικά ίδια, υποδηλώνοντας έτσι ενδοειδική ποικιλότητα και διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε κυρίως στα στελέχη που είχαν ομοιότητα με τα *Bacillus cibi* και *Bacillus barbaricus*.

Στην Εικόνα 3.30 παρουσιάζεται η % κατανομή των απομονωμένων και ταυτοποιηθέντων στελεχών σε σχέση με τον ολικό ετερότροφο πληθυσμό και ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης. Ο κυρίαρχος πληθυσμός που ανιχνεύτηκε με το TSA παρουσίαζε ομοιότητα με το *Bacillus cibi*, ενώ στο NA ο κυρίαρχος πληθυσμός σε θερμοκρασία επώασης 37 °C παρουσίαζε ομοιότητα με το *B. barbaricus*. Τα στελέχη που είχαν ομοιότητα με το *B. barbaricus* αποτελούσαν πάνω από το 50 % του συνολικού πληθυσμού που ανιχνεύτηκε στο NA στους 37 °C, ενώ στις άλλες συνθήκες αποτελούσαν το 4 % του πληθυσμού ή απουσίαζαν. Σημαντικό πληθυσμό είχε και το στέλεχος που παρουσίαζε ομοιότητα με το *Bacillus korlensis*, ενώ το στέλεχος που παρουσίαζε ομοιότητα με το *Bacillus niabensis* δεν εντοπίστηκε σε θερμοκρασία επώασης 22 °C στο θρεπτικό NA. Το στέλεχος που παρουσίαζε ομοιότητα με το *Microbacterium oxydans* εντοπίστηκε σε όλες τις περιπτώσεις αλλά με μεγαλύτερο πληθυσμό στο υπόστρωμα NA στους 22 °C. Τέλος, εντοπίστηκαν μεμονωμένες αποικίες στελεχών που είχε ομοιότητα με το *B. arybhatai*. Αναφορικά με το μεγάλο ποσοστό των μη ταυτοποιημένων στελεχών που ανακτήθηκαν στο TSA στους 37 °C, αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αποτελούσαν μοναδικά πρότυπα που δεν είχαν άλλους αντιπροσώπους, οπότε δεν επελέγησαν για ταυτοποίηση. Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, αξιοσημείωτη είναι και η ενδοειδική ποικιλότητα που ανιχνεύτηκε ιδιαίτερα στο είδος *B. cibi* και σε μικρότερο βαθμό στο *B. barbaricus* όπου μέσω

της τεχνικής BOX-PCR διαχωρίστηκαν 17 διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους τα οποία όμως αποτελούσαν 3 υποομάδες που διέφεραν μεταξύ τους.



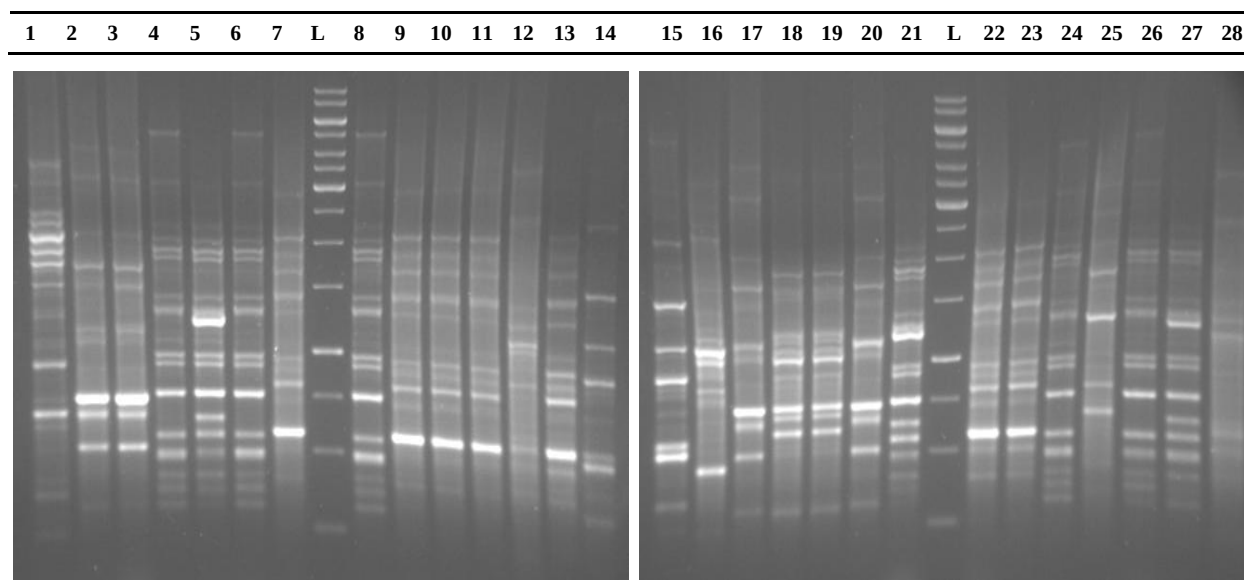
Εικόνα 3.30⁴: Ποσοστό % των απομονωμένων στελεχών σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό και κατανομή τους ανάλογα με τη θερμοκρασία επώασης και το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης.

3.1.4.3. Ποιοτική Ανάλυση Μικροβιακού Φορτίου Δειγματοληψίας Ιουλίου 2010

Από το δείγμα νερού κατά τη δειγματοληψία του Ιουλίου 2010, 617 απομονωμένα στελέχη ομαδοποιήθηκαν σε 110 διαφορετικά πρότυπα με βάση την τεχνική BOX-PCR με χρήση του προγράμματος GelCompar II. Τα πρότυπα αυτά αφορούν τόσο τον ολικό ετερότροφο πληθυσμό όπως αυτός εκτιμήθηκε με τα πρωτόκολλα που ορίζει η Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία, όσο και τον πληθυσμό που ανακτήθηκε στις διάφορες συνθήκες που μελετήθηκαν. Ορισμένα από τα

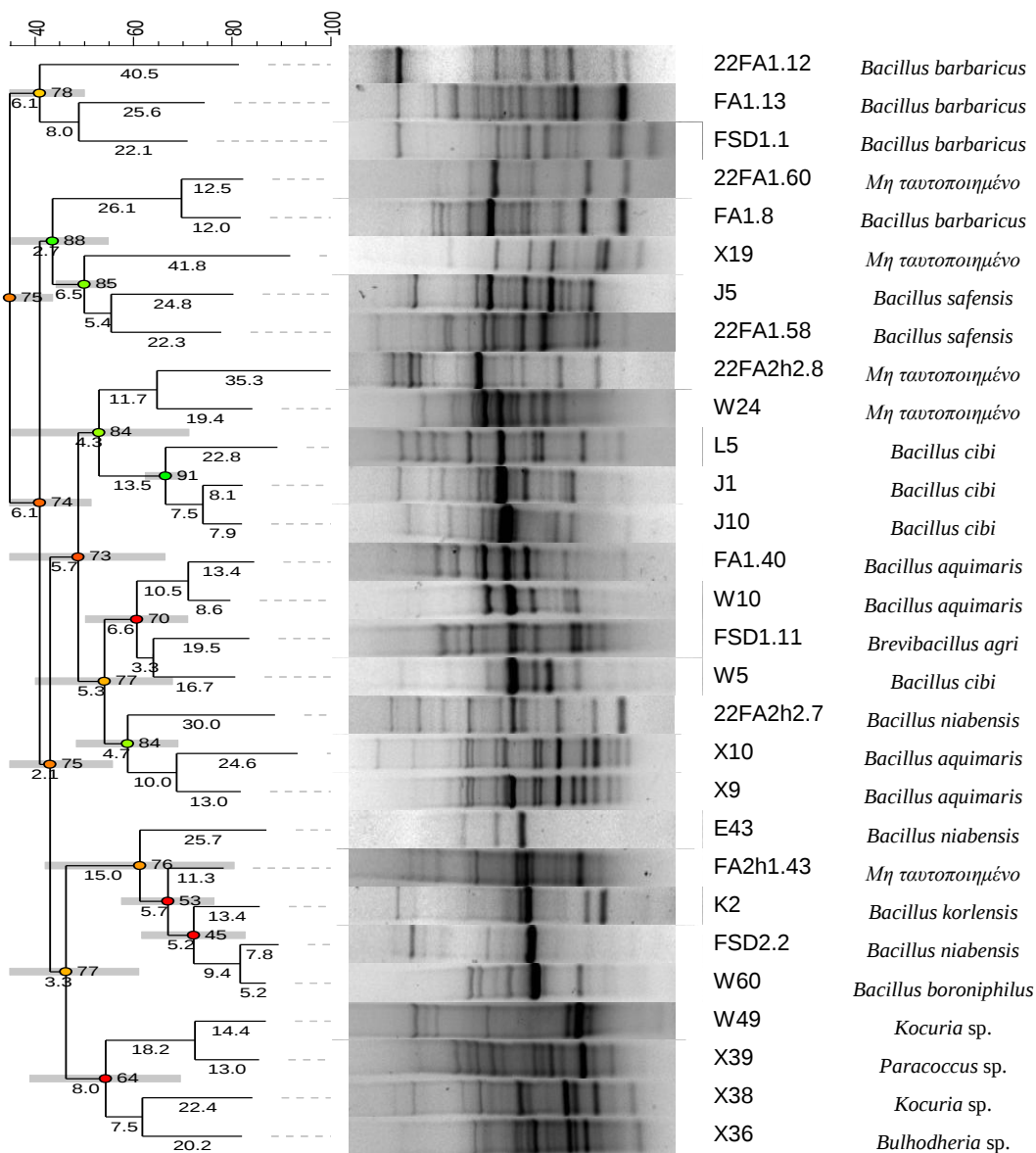
⁴Στον Πίνακα Π_2 του Παραρτήματος παρουσιάζεται η κατανομή του ετερότροφου πληθυσμού (cfu/100 ml) στα είδη που ταυτοποιήθηκαν μοριακά.

πρότυπα αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.31. Από τα 110 διαφορετικά πρότυπα, αντιπρόσωποι 26 εξ' αυτών ταυτοποιήθηκαν και βρέθηκαν να έχουν ομοιότητα με βάση την αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου, με 11 είδη. Αναλυτικότερα, ταυτοποιήθηκαν 22 στελέχη που ανήκαν στο φύλο Firmicutes και συγκεκριμένα 21 στελέχη ανήκαν στο γένος *Bacillus* και είχαν ομοιότητα με τα ακόλουθα είδη: *Bacillus barbaricus* (3 στελέχη), *B. korensis* (1 στέλεχος), *B. cibi* (5 στελέχη), *B. niabensis* (3 στελέχη), *B. aquimaris* (6 στελέχη), *B. boroniphilus* (1 στέλεχος) και *B. safensis* (2 στελέχη). Και ένα στέλεχος ανήκε στο γένος *Brevibacillus*. Ταυτοποιήθηκαν επίσης 2 στελέχη που ανήκαν στο φύλο Actinobacteria και είχαν ομοιότητα με το γένος *Kocuria*, 2 στελέχη που ανήκαν στο φύλο Proteobacteria και είχαν ομοιότητα με τα γένη *Paracoccus* και *Bulkhodheria*. 14 επιπλέον στελέχη τα οποία παρουσίαζαν αυξημένη ομοιότητα στο πρότυπο BOX με τα ταυτοποιημένα στελέχη, ομαδοποιήθηκαν ως εξής: *Bacillus barbaricus* (3 στελέχη), *B. cibi* (5 στελέχη), *B. niabensis* (3 στελέχη), *B. aquimaris* (1 στέλεχος), *B. safensis* (1 στέλεχος), *Kocuria* (1 στέλεχος). Τα υπόλοιπα 70 πρότυπα που προέκυψαν από την ομαδοποίηση, δεν ταυτοποιήθηκαν μοριακά.



Εικόνα 3.31: Πρότυπα προϊόντων BOX - PCR της δειγματοληψίας Ιουλίου 2010. Όπου (L) ο μοριακός μάρτυρας 1 kb, (1) Box 3_3, (2, 3, 17, 20) *Kocuria* sp., (4, 6, 8, 24, 26) *Bacillus aquimaris* st. 1, (5, 21, 27) *Bacillus aquimaris* st. 2, (7, 9-11, 13, 22, 23) *Paracoccus* sp., (12) Box 3_78, (14, 15) Box 3_50, (16) Box 3_51, (18, 19) *Bulkhodheria* sp., (25) Box 3_54, (28) Box 3_81.

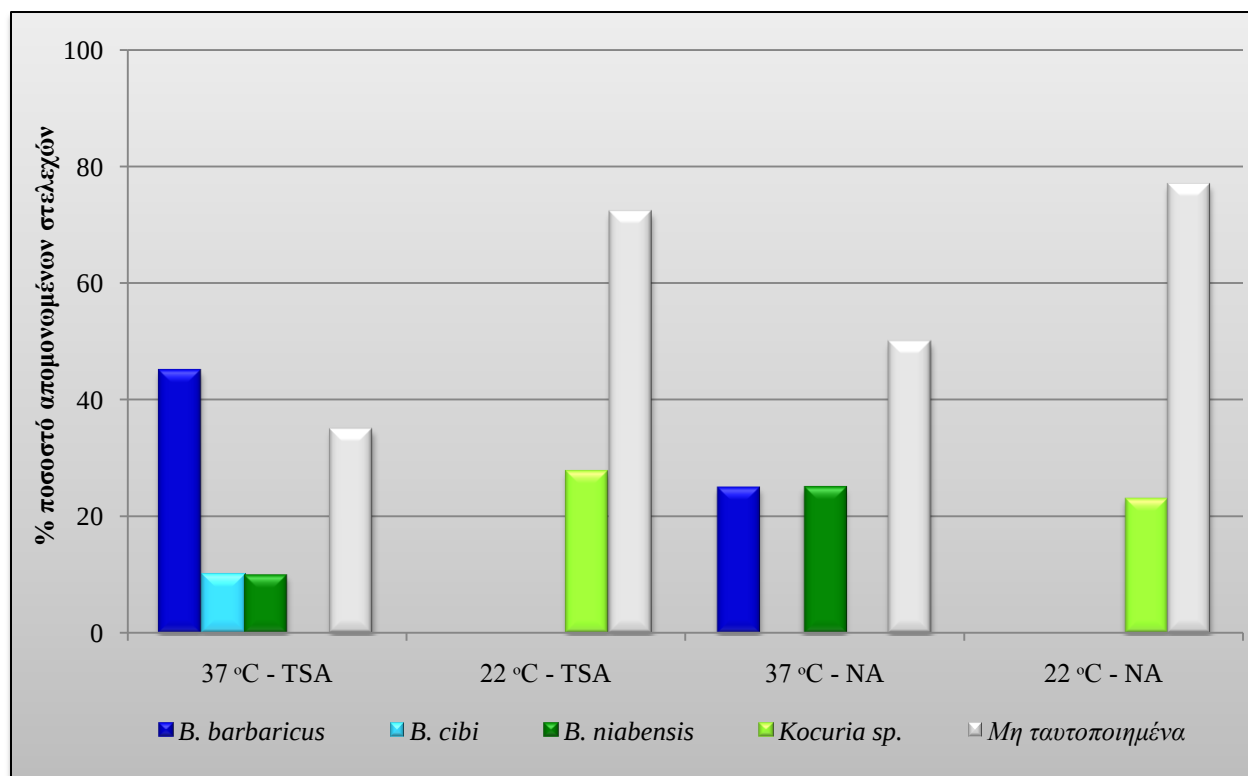
Στην Εικόνα 3.32 φαίνεται το δενδρόγραμμα με τα κυριότερα πρότυπα BOX που προέκυψαν κατά τη δειγματοληψία του Ιουλίου 2010 και η μεταξύ τους ομοιότητα με χρήση του συντελεστή Pearson correlation και ομαδοποίηση με τη μέθοδο Neighbor Joining.



Εικόνα 3.32: Δενδρόγραμμα που προέκυψε από την σύνθετη ιεραρχική ανάλυση των κυριότερων προϊόντων BOX - PCR της δειγματοληψίας Ιουλίου 2010, με χρήση του συντελεστή ομοιότητας Pearson correlation και με ομαδοποίηση με τη μέθοδο Neighbor Joining.

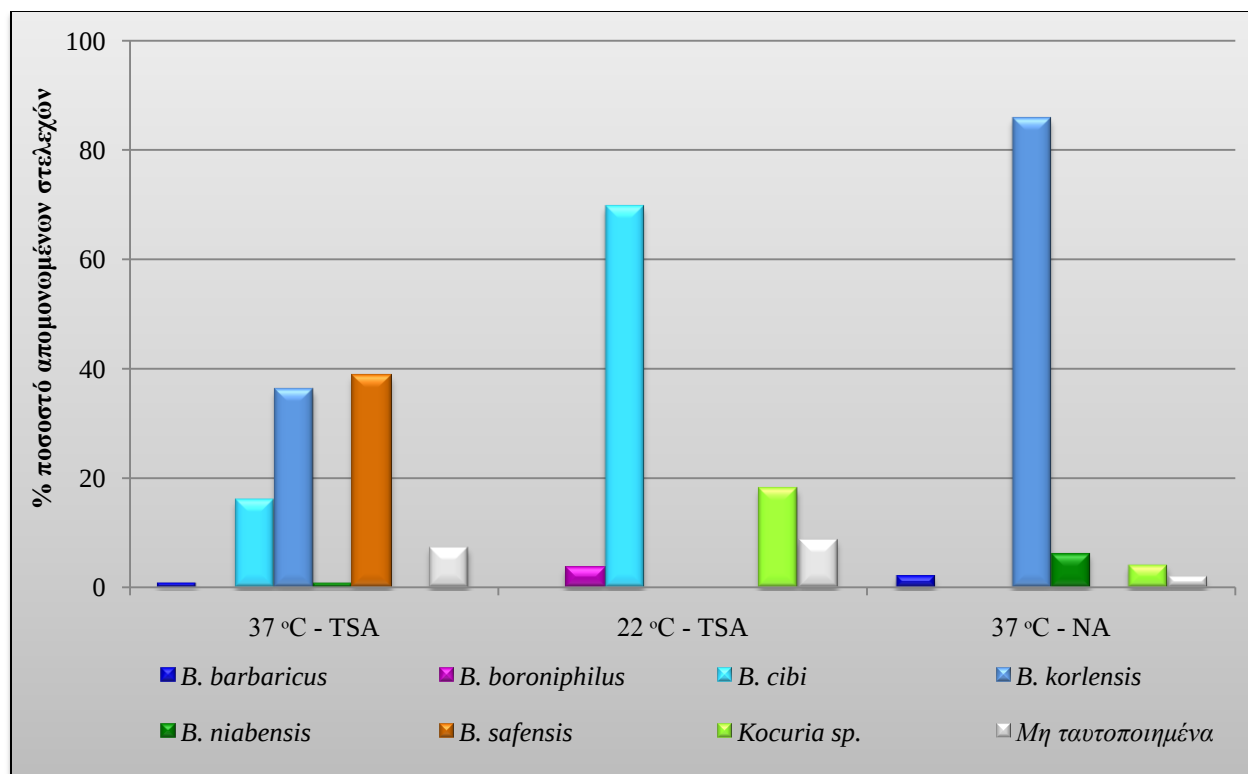
Στις Εικόνες 3.33 και 3.34 παρουσιάζεται η % κατανομή των απομονωμένων και ταυτοποιηθέντων στελεχών σε σχέση με τον ολικό ετερότροφο πληθυσμό με και χωρίς

προσθήκη θειοθειικού νατρίου. Ο ολικός ετερότροφος πληθυσμός στους 37 °C αποτελούνταν από στελέχη του γένους *Bacillus* και παρουσίαζαν ομοιότητα με τα είδη *B. barbaricus*, *B. niabensis* και *B. cibi*. Στους 22 °C το 20-30 % των απομονωμένων στελεχών παρουσίαζαν ομοιότητα με το γένος *Kocuria* το οποίο δεν ανιχνεύτηκε στους 37 °C. Στελέχη του γένους *Bacillus* δεν ανιχνεύτηκαν στους 22 °C, παρ' όλα αυτά δεν αποκλείεται η ύπαρξη τους καθώς ένα μεγάλο ποσοστό των απομονωμένων στελεχών δεν ταυτοποιήθηκε λόγω της ύπαρξης πολλών μοναδικών προτύπων με μικρή αντιπροσώπευση. Η προσθήκη θειοθειικού νατρίου τροποποίησε τη σύσταση του μικροβιακού πληθυσμού σε επίπεδο είδους. Συγκεκριμένα ο κυρίαρχος πληθυσμός στους 37 °C παρουσίαζε ομοιότητα με τα είδη *B. korlensis* και *B. safensis* ενώ στους 22 °C με το είδος *B. cibi*. Στελέχη του γένους *Kocuria* παρουσίασαν αύξηση στους 22 °C. Παρατηρείται λοιπόν ότι η προσθήκη θειοθειικού νατρίου ευνόησε α) την ανάκτηση υψηλότερου μικροβιακού φορτίου και β) την αύξηση της μικροβιακής ποικιλότητας.



Εικόνα 3.33⁵: Ποσοστό % των απομονωμένων στελεχών σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό και κατανομή τους ανάλογα με τη θερμοκρασία επώασης και το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης χωρίς την επίδραση θειοθειικού νατρίου (Δειγματοληψία Ιουλίου 2010).

⁵Στον Πίνακα Π_3 του Παραρτήματος παρουσιάζεται η κατανομή του ετερότροφου πληθυσμού (cfu/100 ml) στα είδη που ταυτοποιήθηκαν μοριακά ανά θερμοκρασία επώασης και θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης.

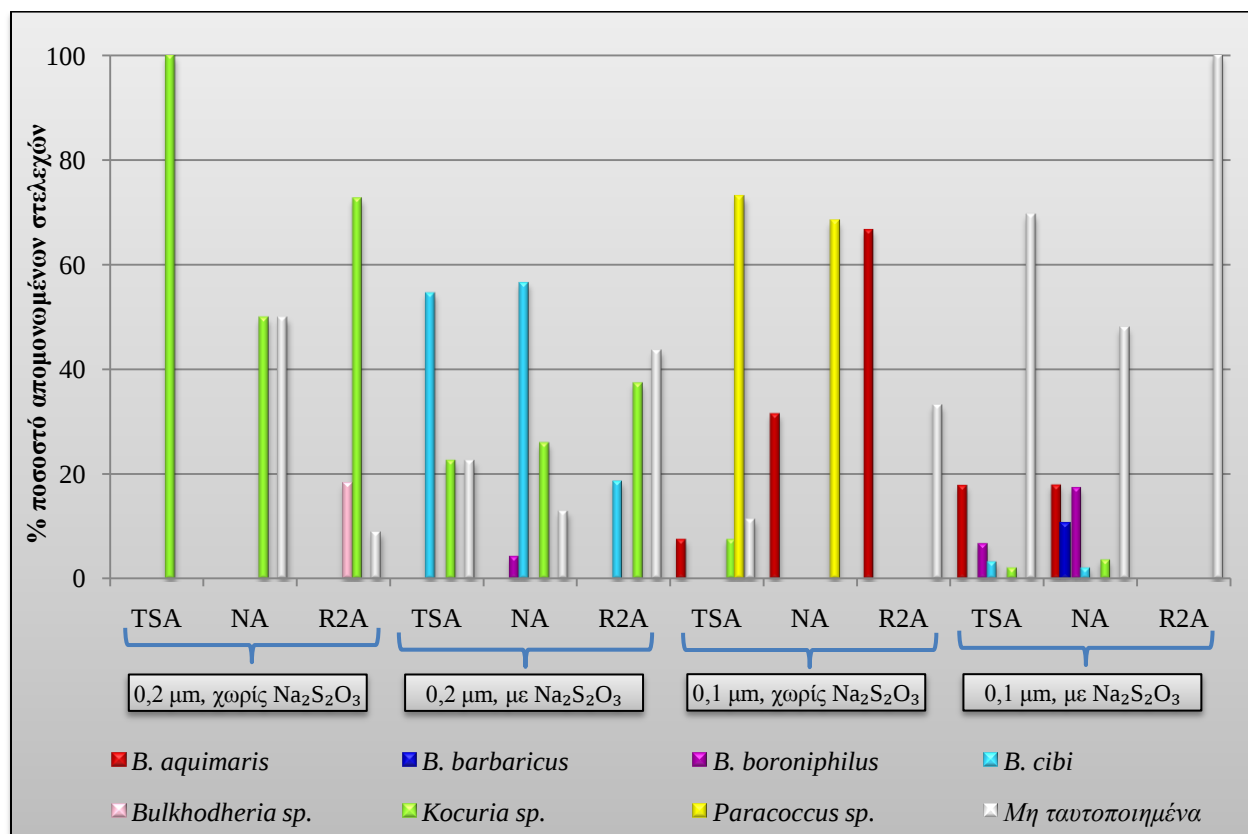


Εικόνα 3.34⁶: Ποσοστό % των απομονωμένων στελεχών σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό και κατανομή τους ανάλογα με τη θερμοκρασία επώασης και το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης υπό την επίδραση θειοθειικού νατρίου (Δειγματοληψία Ιουλίου 2010).

Στην Εικόνα 3.35 παρουσιάζεται η % κατανομή των στελεχών του ψυχρόφιλου πληθυσμού σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό, στα είδη που ταυτοποιήθηκαν μοριακά, ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης που εφαρμόστηκαν και η επίδραση του θειοθειικού νατρίου στην ανάκτηση του ψυχρόφιλου πληθυσμού. Κατά την ποιοτική μελέτη του ψυχρόφιλου πληθυσμού που ανιχνεύτηκε, παρατηρήθηκε ότι ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες μελετήθηκε το δείγμα, ο κυρίαρχος πληθυσμός διαφοροποιούνταν. Οι κυρίαρχοι πληθυσμοί ανά συνθήκη (όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.35) παρουσίαζαν ομοιότητα με τα *Kocuria sp.*, *B. cibi*, *B. aquimaris*, *Paracoccus sp.*. Στο δείγμα που διηθήθηκε σε μεμβράνες 0,2 μm ανιχνεύτηκαν στελέχη των γενών *Kocuria*, *Bacillus* και *Bulkhodheria* ενώ στο δείγμα που διηθήθηκε σε μεμβράνες 0,1 μm ανιχνεύτηκαν στελέχη των γενών *Kocuria*, *Bacillus* και *Paracoccus*. Παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη του γένους *Bulkhodheria* εντοπίστηκαν μόνο σε θερμοκρασία

⁶Στον Πίνακα Π_3 του Παραρτήματος παρουσιάζεται η κατανομή του ετερότροφου πληθυσμού (cfu/100 ml) στα είδη που ταυτοποιήθηκαν μοριακά ανά θερμοκρασία επώασης και θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης και υπό επίδραση του θειοθειικού νατρίου.

επώασης 10 °C, στο θρεπτικό υπόστρωμα R2A και στη μεμβράνη των 0,2 μm ενώ τα στελέχη του γένους *Paracoccus* εντοπίστηκαν μόνο σε θερμοκρασία επώασης 10 °C και στη μεμβράνη των 0,1 μm . Επίσης, τα στελέχη με ομοιότητα στα *B. barbaricus* και *B. aquimaris* δεν εντοπίστηκαν στις μεμβράνες των 0,2 μm .

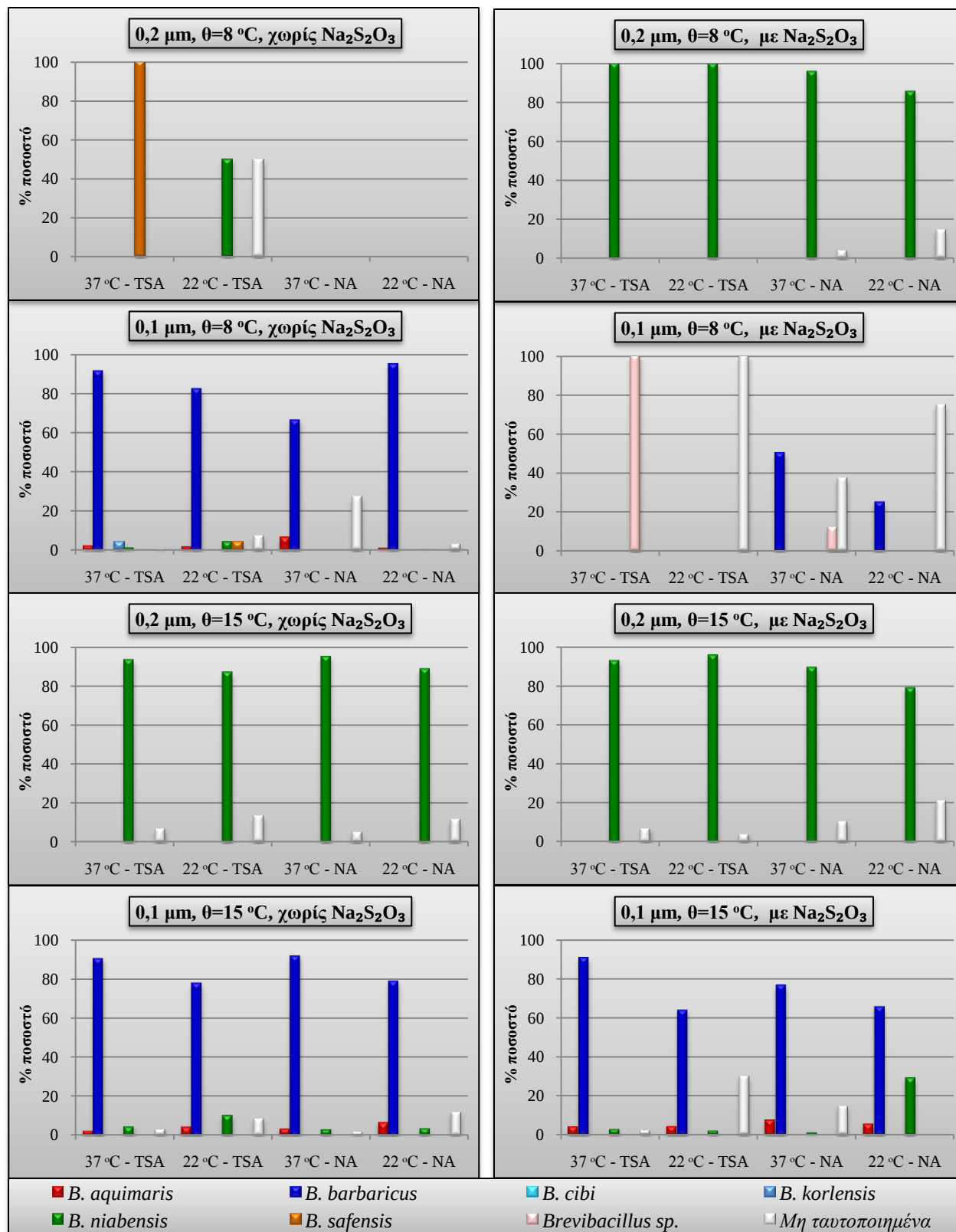


Εικόνα 3.35⁷: Ποσοστό % των απομονωμένων στελεχών σε σχέση με τον ολικό ψυχρόφιλο πληθυσμό και κατανομή τους ανάλογα με θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης (Δειγματοληψία Ιουλίου 2010).

Στην Εικόνα 3.36⁸ παρουσιάζεται η % κατανομή των στελεχών σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης που εφαρμόστηκαν και την επίδραση της θερμοκρασίας και του θειοθειικού νατρίου στην ανάκτηση του πληθυσμού. Παρατηρήθηκε μία επαναλαμβανόμενη εικόνα όσον αφορά τον κυρίαρχο πληθυσμό. Τόσο η θερμοκρασία όσο και το θειοθειικό νάτριο δεν επηρεάζει τον κυρίαρχο πληθυσμό. Ρυθμιστής αυτού όμως, αποτελεί η διάμετρος πόρων της μεμβράνης διήθησης.

⁷Στον Πίνακα Π_4 του Παραρτήματος παρουσιάζεται η κατανομή του ψυχρόφιλου πληθυσμού (cfu/100 ml).

⁸Στον Πίνακα Π_5 του Παραρτήματος παρουσιάζεται η κατανομή του πληθυσμού (cfu/100 ml), κατά τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας του δείγματος και του θειοθειικού νατρίου, σε δείγματα που διηθήθηκαν σε μεμβράνη με διάμετρο πόρων 0,2 μm και 0,1 μm .



Εικόνα 3.36: Ποσοστό % των απομονωμένων στελεχών σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό υπό την επίδραση της θερμοκρασίας και του θειοθειικού νατρίου (Δειγματοληψία Ιούλιος 2010).

Παρατηρείται λοιπόν ότι ενώ στα δείγματα που διηθήθηκαν σε μεμβράνη 0,2 μm , εντοπίζονται σε ποσοστό άνω του 80 % στελέχη με φυλογενετική ομοιότητα στο *B. niabensis*, στα δείγματα που διηθήθηκαν σε μεμβράνη 0,1 μm , εντοπίζονται σε ποσοστό άνω του 60 % στελέχη με φυλογενετική ομοιότητα στο *B. barbaricus*. Επιπλέον η μικροβιακή ποικιλότητα στα δείγματα που διηθήθηκαν σε μεμβράνη 0,1 μm είναι αυξημένη, με παρουσία στελεχών που έχουν φυλογενετική ομοιότητα με τα *B. aquimaris*, *B. niabensis*, *B. safensis*, *B. korlensis*, *B. cibi* και *Brevibacillus* sp.. Τέλος, στο δείγμα στο οποίο προστέθηκε θειοθειικό νάτριο και διηθήθηκε αρχικά στα 0,2 μm , ενώσω είχε θερμοκρασία 8 °C και εν συνεχεία διηθήθηκε στα 0,1 μm , ανιχνεύτηκαν σε μεγάλα ποσοστά στελέχη με ομοιότητα με το *Brevibacillus* sp, μόνο σε θερμοκρασία επώασης 37 °C.

3.1.4.4. Ποιοτική Ανάλυση Μικροβιακού Φορτίου Δειγματοληψίας Φεβρουαρίου 2011

Η ποιοτική ανάλυση του μικροβιακού φορτίου που ανιχνεύτηκε κατά τη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011 στο νερό αφορά α) τον ολικό ετερότροφο πληθυσμό όπως αυτός εκτιμήθηκε με τα πρωτόκολλα της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (TSA 37 °C - 22 °C, σύγκριση με NA), β) τον ολιγότροφο πληθυσμό, γ) το μικροβιακό φορτίο στα 0,1 μm , σε θερμοκρασία επώασης 10 °C και σε θερμοκρασία δείγματος 8 °C πριν τη διήθηση.

Συνολικά, 186 στελέχη ομαδοποιήθηκαν με τη μέθοδο της BOX-PCR σε 72 πρότυπα. Σε αντιπρόσωπους 11 εξ' αυτών έγινε ανάλυση της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου και βρέθηκε ότι οι κυρίαρχοι ετερότροφοι μικροοργανισμοί έχουν ομοιότητα με τα *Bacillus cibi*, *Ralstonia* sp. και *Kocuria* sp.. Ο ολιγότροφος πληθυσμός παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς η μικροβιακή κοινότητα που ανιχνεύτηκε ήταν εντελώς διαφορετική από αυτή που είχε εντοπιστεί έως τώρα. Συγκεκριμένα ανιχνεύτηκαν μικροοργανισμοί που είχαν ομοιότητα με τα γένη *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter* και *Methylobacterium*.

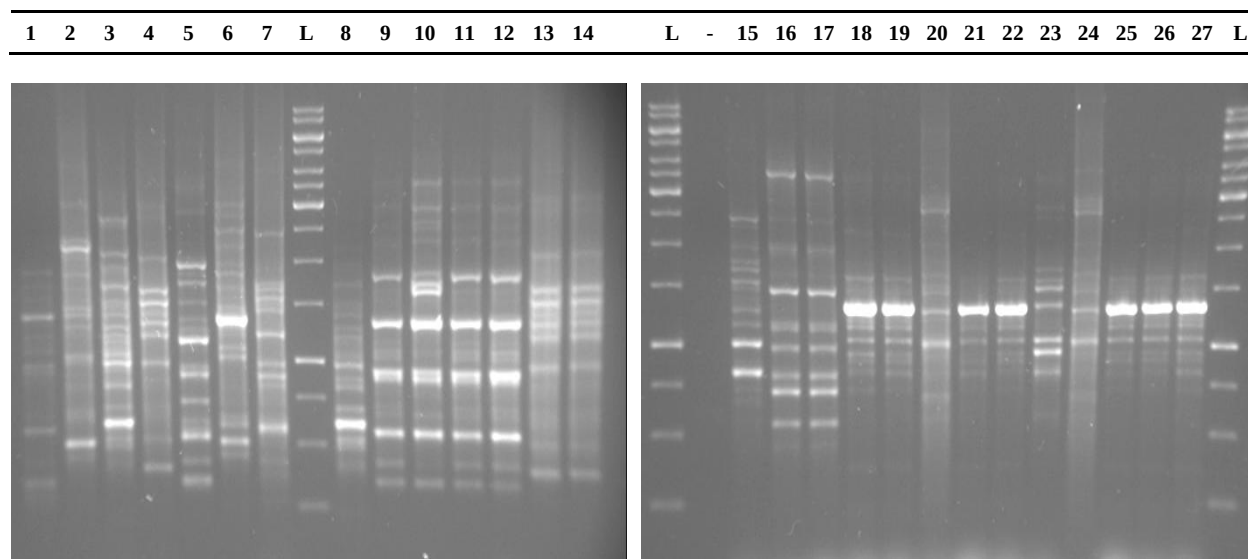
3.1.4.4.1. Ολικός ετερότροφος πληθυσμός

Για την ποιοτική ανάλυση του ολικού ετερότροφου πληθυσμού από το δείγμα νερού του Φεβρουαρίου 2011, απομονώθηκαν σε καθαρές καλλιέργειες 53 στελέχη τα οποία ομαδοποιήθηκαν σε 18 διαφορετικά πρότυπα με βάση την τεχνική BOX-PCR με χρήση του

προγράμματος GelCompar II. Εντοπίστηκαν 4 στελέχη με ομοιότητα στο *B. cibi* και 2 στελέχη με ομοιότητα στο γένος *Ralstonia*. Μεγαλύτερη ποικιλότητα σε επίπεδο στελέχους παρατηρήθηκε στους 37 °C και στο θρεπτικό υπόστρωμα ΝΑ.

Κατά τη μελέτη της επίδρασης χαμηλής θερμοκρασίας στην ανάκτηση του ολικού ετερότροφου πληθυσμού εξετάστηκαν 21 στελέχη τα οποία ομαδοποιήθηκαν σε 14 διαφορετικά πρότυπα BOX. Διαπιστώθηκε μια μεταβολή στη σύσταση του πληθυσμού με κυρίαρχους μικροοργανισμούς τα στελέχη που παρουσίασαν ομοιότητα με τα γένη *Kocuria* και *Ralstonia*. Επίσης όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 3.1.2.9. στη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011 δεν ανακτήθηκε υψηλό μικροβιακό φορτίο στις μεμβράνες των 0,1 μm . Παρ' όλα αυτά τα 13 στελέχη που απομονώθηκαν ομαδοποιήθηκαν σε 10 διαφορετικά πρότυπα με βάση την τεχνική BOX, όμως κανένα δεν ταυτοποιήθηκε μοριακά. Τέλος, 15 ψυχρόφιλα στελέχη ομαδοποιήθηκαν σε 3 πρότυπα BOX, με κυρίαρχο πληθυσμό σε ορισμένες περιπτώσεις το *B. cibi*.

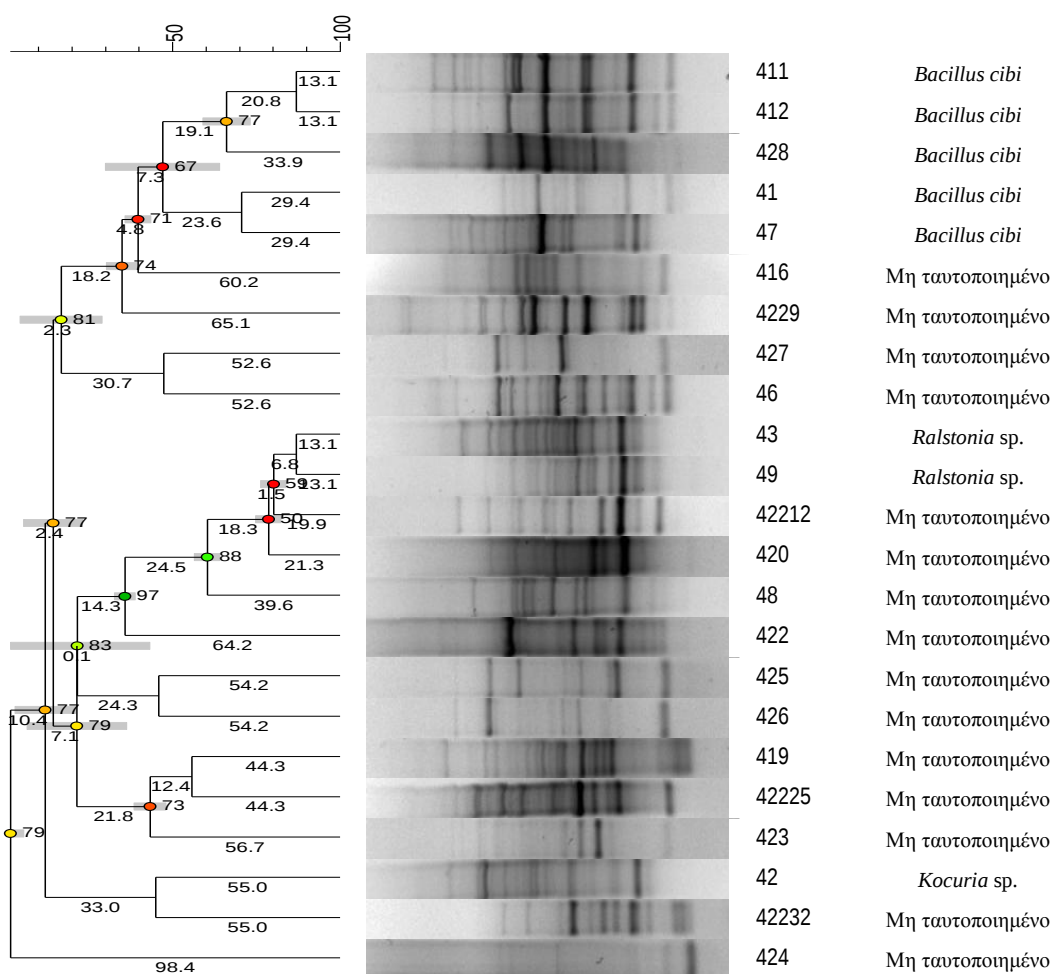
Στην Εικόνα 3.37 φαίνονται ορισμένα από τα πρότυπα που προέκυψαν από την BOX-PCR κατά την ποιοτική ανάλυση του ολικού ετερότροφου πληθυσμού και την ανάλυση του ψυχρόφιλου μικροβιακού πληθυσμού.



Εικόνα 3.37: Πρότυπα προϊόντων BOX - PCR δειγματοληψίας Φεβρουαρίου 2011, από τον ολικό ετερότροφο πληθυσμό (αριστερά) και από τον ψυχρόφιλο πληθυσμό (δεξιά). Όπου (L) ο μοριακός μάρτυρας 1 kb, (-) αρνητικός μάρτυρας, (1, 9-12, 18, 19, 21, 22, 25-26) *Bacillus cibi*, (2) *Kocuria* sp., (3,8) *Ralstonia* sp., (4, 13, 14) Box 4_5, (5) Box 4_6, (6) Box 4_7, (7) Box 4_8, (15) Box 4_28, (16, 17) Box 4_29, (20,24) Box 4_31.

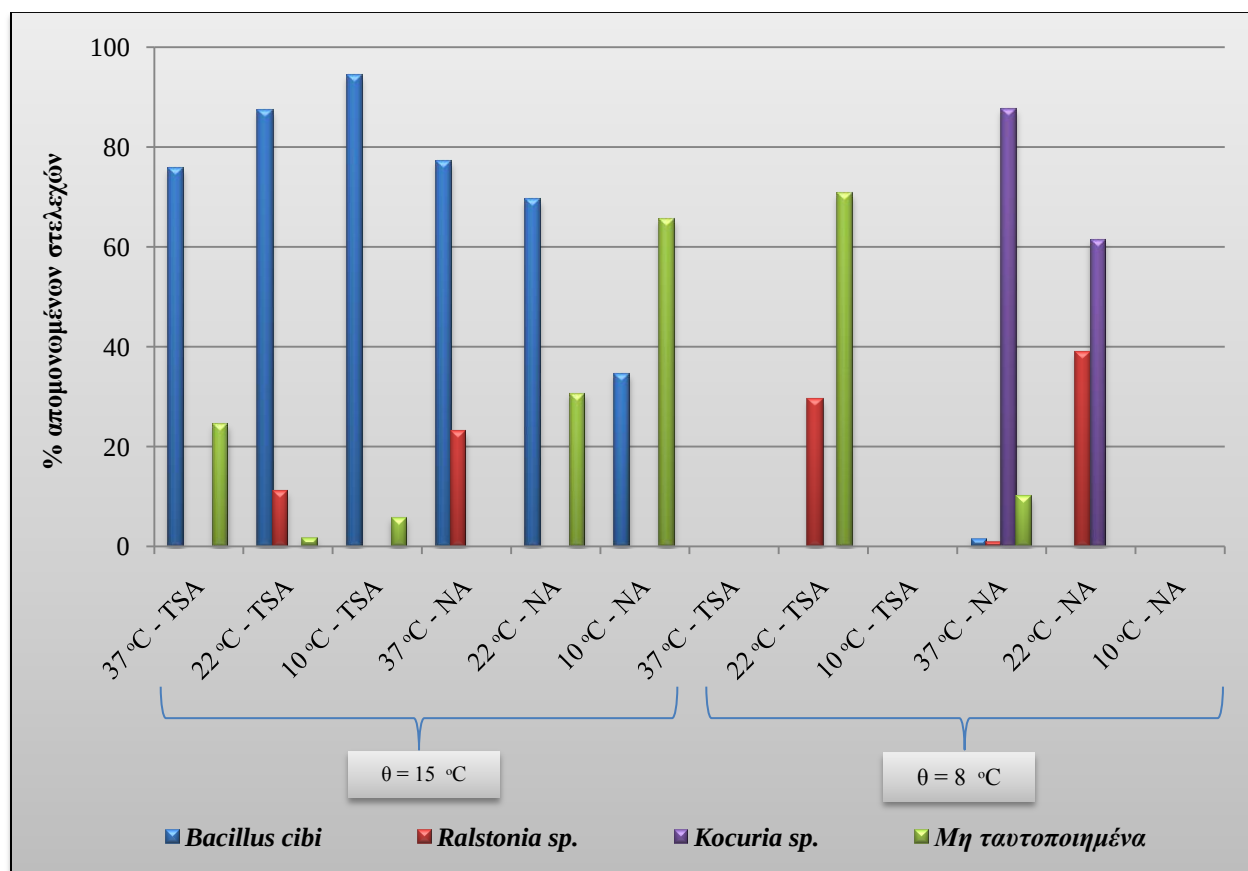
Παρατηρήθηκε ενδοειδική ποικιλότητα στο *Bacillus cibi* όπου συνολικά διαπιστώθηκαν 4 στελέχη. Παρομοίως το γένος *Ralstonia* αποτελούνταν από 2 στελέχη. Παρατηρείται ότι πολλές φορές στελέχη του ίδιου είδους, που παρουσιάζουν 100 % ομολογία στη 16S rDNA αλληλουχία, παρουσιάζουν εντελώς διαφορετικό πρότυπο BOX.

Στην Εικόνα 3.38 φαίνεται το δενδρόγραμμα με τα κυριότερα πρότυπα που προέκυψαν από την τεχνική BOX-PCR, για τη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011, με χρήση του συντελεστή Pearson correlation και ομαδοποίηση με τη μέθοδο UPGMA. Στελέχη που είχαν παραπλήσια πρότυπα, παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό ομοιότητας και τοποθετούνται στους ίδιους βασικούς κλάδους. 3 κύριοι κλάδοι σχηματίστηκαν με τον καθένα να καταλήγει σε ένα από τα 3 διαφορετικά γένη που αναγνωρίστηκαν.



Εικόνα 3.38: Δενδρόγραμμα που προέκυψε από την σύνθετη ιεραρχική ανάλυση των κυριότερων προϊόντων BOX - PCR της δειγματοληψίας Φεβρουαρίου 2011 με χρήση του συντελεστή ομοιότητας Pearson correlation και με ομαδοποίηση με τη μέθοδο UPGMA.

Στην Εικόνα 3.39 παρουσιάζεται η % κατανομή των απομονωμένων και ταυτοποιηθέντων στελεχών σε σχέση με τον εκάστοτε ολικό πληθυσμό ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης που εφαρμόστηκαν. Ο πληθυσμός του *Bacillus cibi* αποτέλεσε το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού όταν η θερμοκρασία του δείγματος ήταν 15 °C φτάνοντας σε τιμές 105 cfu/100 ml (NA - 37 °C) ενώ όταν το δείγμα διηθήθηκε με θερμοκρασία 8 °C ο πληθυσμός του δεν ήταν ανιχνεύσιμος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ανιχνεύτηκε το γένος *Kocuria* με 110 cfu/100 ml (NA - 37 °C). Εντύπωση προκαλεί ότι δεν ανιχνεύτηκε το συγκεκριμένο γένος στον ψυχρόφιλο πληθυσμό. Το γένος *Ralstonia* ανιχνεύτηκε σποραδικά μόνο στον μεσόφιλο πληθυσμό με τιμές 9 -31 cfu/100 ml.



Εικόνα 3.39⁹: Ποσοστό % των απομονωμένων στελεχών που συγκρατήθηκαν σε μεμβράνη 0,2 μm, σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό και κατανομή τους ανάλογα με τη θερμοκρασία του δείγματος (15 °C, 8 °C), τη θερμοκρασία επώασης (37 °C, 22 °C, 10 °C) και το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης (TSA, NA).

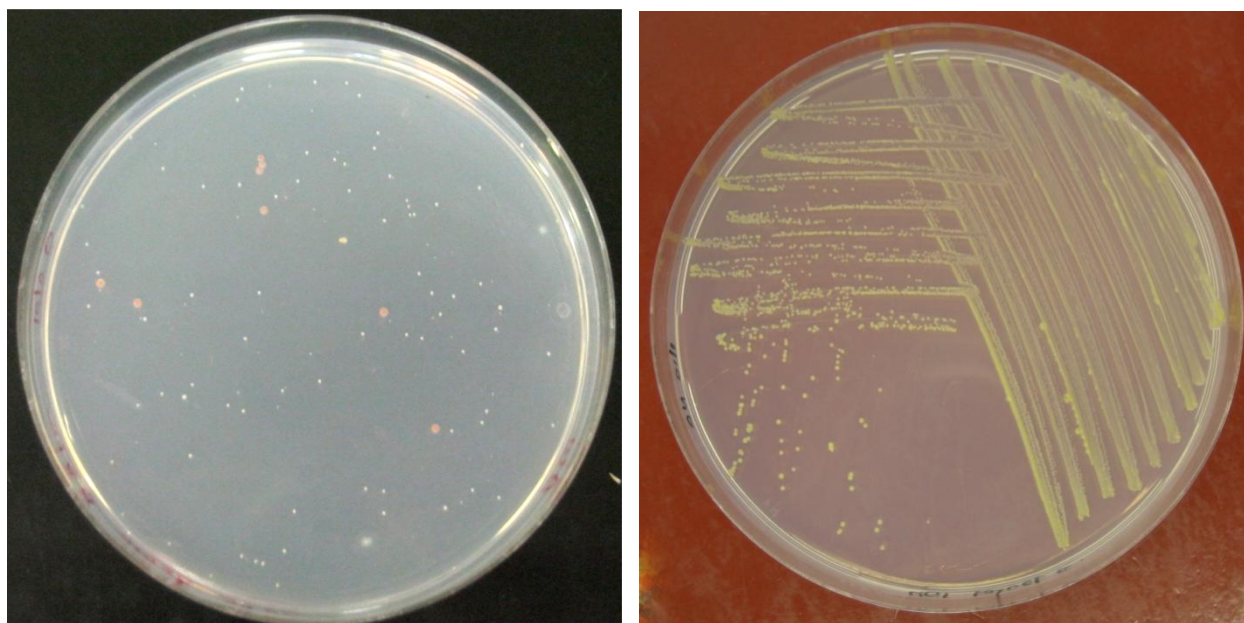
⁹Στον Πίνακα Π_6 του Παραρτήματος παρουσιάζεται η κατανομή του ολικού ετερότροφου πληθυσμού (cfu/100 ml), στα ταυτοποιηθέντα γένη και είδη, στις διαφορετικές συνθήκες.

3.1.4.4.2. Ολιγότροφος πληθυσμός

Όπως προαναφέρθηκε, στις δύο τελευταίες δειγματοληψίες (Ιούλιος 2010, Φεβρουάριος 2011) έγινε προσπάθεια ανίχνευσης βακτηρίων που αναπτύσσονται σε πολύ φτωχά υποστρώματα όπως το Water Agar (WA) ή το 1/10 NA (§ 2.5.2) και διαπιστώθηκε ότι ο πληθυσμός που ανιχνεύτηκε ήταν μεγαλύτερος από αυτόν στα πλήρη υποστρώματα TSA και NA (§ 3.1.2.5). Η ποιοτική ανάλυση του πληθυσμού αυτού έδειξε μια διαφορετική μικροβιακή κοινότητα από αυτή που ανιχνεύεται κατά την εκτίμηση του ολικού ετερότροφου πληθυσμού.

Γενικά χαρακτηριστικά

Όλες οι αποικίες που αναπτύχθηκαν είχαν μικρό μέγεθος, με διάμετρο από 0,5 έως 3 mm, ανεξαρτήτου θερμοκρασίας και διάρκειας επώασης αλλά εξαρτώμενου του θρεπτικού υποστρώματος. Στα θρεπτικά υποστρώματα Water Agar και Alpha Agar οι αποικίες ήταν οι πιο μικρές (0,5 – 1 mm), ακολουθούσαν τα 1/10 NA και 1/10 R2A με λίγο μεγαλύτερες αποικίες ενώ στα 1/2 NA και 1/2 R2A αναπτύχθηκαν αποικίες με μέγεθος έως και 3 mm. Στην Εικόνα 3.41 φαίνονται οι μικροσκοπικές αποικίες που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα WA και παρατηρείται ότι την μεγαλύτερη ανάπτυξη είχαν οι αποικίες χρώματος ροδόχρουν.



Εικόνα 3.40: Αποικίες που ανιχνεύτηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα Water Agar στη δειγματοληψία του Φεβρουάριου 2011 (αριστερά), καθαρή καλλιέργεια του *Sphingomonas* sp.(δεξιά).

Επειδή το θρεπτικό υπόστρωμα WA δεν ευνοεί την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, για τις ανακαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν τα υποστρώματα 1/10 NA και TGS. Στα πλήρη θρεπτικά υποστρώματα NA και TSA οι μικροοργανισμοί που περιγράφονται στον Πίνακα 3.4 και οι οποίοι αποτελούσαν τους κυρίαρχους πληθυσμούς δεν αναπτύχθηκαν, υποδηλώνοντας την ύπαρξη αυστηρά ολιγότροφων μικροοργανισμών.

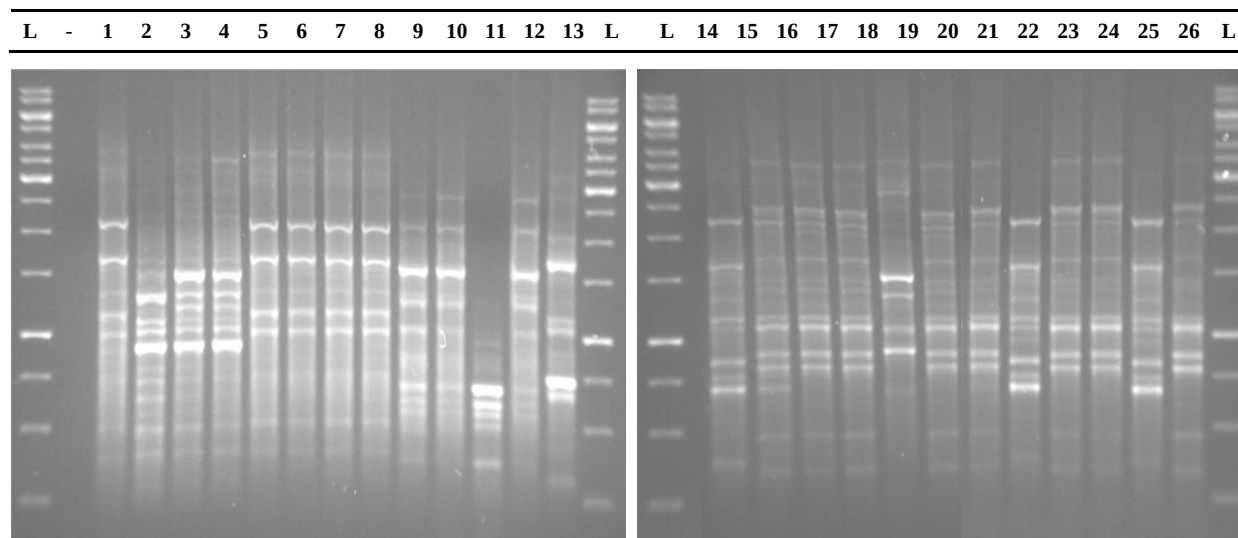
Μορφολογικά χαρακτηριστικά – Μοριακή ανάλυση

Στην δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011, οι αποικίες διακρίθηκαν σε 5 κύριες κατηγορίες με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους τα οποία φαίνονται στον Πίνακα 3.4. Από το σύνολο των ανακτημένων μικροοργανισμών επιλέχθηκαν και απομονώθηκαν σε αξενικές καλλιέργειες 81 στελέχη, τα οποία ομαδοποιήθηκαν σε 32 πρότυπα με βάση την τεχνική BOX-PCR.

Στην Εικόνα 3.41 φαίνονται ορισμένα από τα πρότυπα που προέκυψαν από την BOX-PCR. Εννέα αντιπρόσωποι των κυρίαρχων πληθυσμών, ταυτοποιήθηκαν και βρέθηκαν να έχουν ομοιότητα, με βάση την αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου με 6 γένη. Αναλυτικότερα, ταυτοποιήθηκαν 2 στελέχη του γένους *Bradyrhizobium*, 1 στέλεχος του γένους *Blastobacter*, 2 στελέχη του γένους *Methylobacterium*, 1 στέλεχος του γένους *Sphingomonas*, 2 στελέχη του γένους *Bacillus* και 1 στέλεχος του γένους *Ralstonia*. Επίσης αναγνωρίστηκε μορφολογικά 1 στέλεχος του γένους *Streptomyces*.

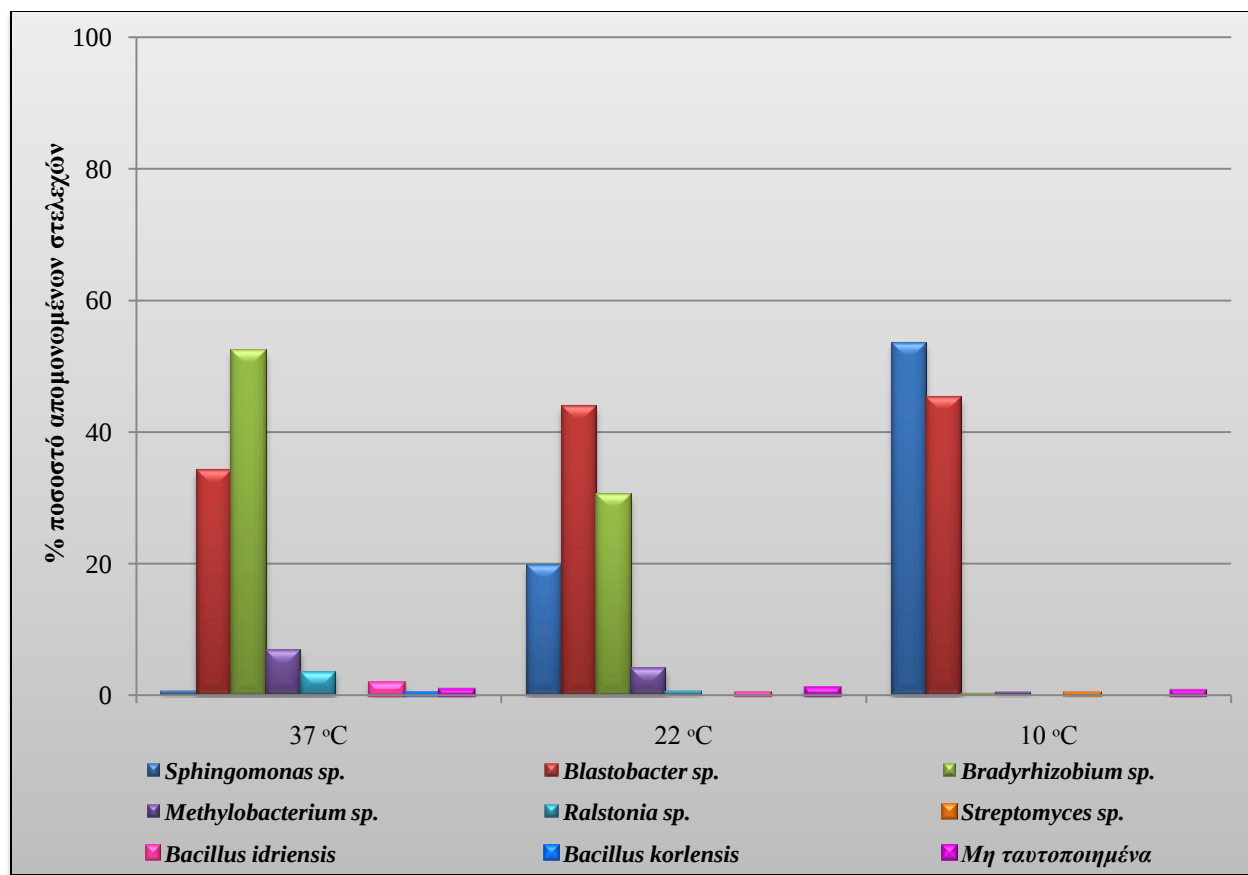
Πίνακας 3.4: Μορφολογικά χαρακτηριστικά αποικιών που αντιπροσωπεύουν τους κυρίαρχους πληθυσμούς στο θρεπτικό υπόστρωμα WA.

Ομάδα	Ταυτοποίηση	Χρώμα	Μορφή	Ανύψωση	Περιθώριο	Επιφάνεια	Υφή
1	<i>Methylobacterium</i> sp.	ροδόχρουν	κυκλική	επίπεδη	κυκλική	γυαλιστερή	μαλακή
2	<i>Blastobacter</i> sp.	λευκή	κυκλική	επίπεδη	κυκλική	γυαλιστερή	μαλακή
3	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	λευκή	κυκλική	υπερυψωμένη	κυκλική	ματ	σκληρή
4	<i>Sphingomonas</i> sp.	κίτρινη	κυκλική	επίπεδη	κυκλική	γυαλιστερή	μαλακή
5	<i>Ralstonia</i> sp.	άχρωμη	ακανόνιστη	διάχυτη	σγουρό	γυαλιστερή	μαλακή



Εικόνα 3.41: Πρότυπα προϊόντων BOX - PCR από απομονωμένα ολιγότροφα στελέχη. Όπου (L) ο μοριακός μάρτυρας 1 kb, (-) αρνητικός μάρτυρας, (1, 5 - 9) *Blastobacter* sp., (2 - 4) *Methylobacterium* sp. (9, 10, 12) *Bradyrhizobium* sp., (11) Box OL_35, (13) Box OL_37, (14, 22, 25) *Bradyrhizobium* sp., (15 - 17, 19 - 21, 23, 24, 26) *Sphingomonas* sp., (18) Box OL_2.

Στην Εικόνα 3.42 παρουσιάζεται η % αντιπροσώπευση των στελεχών επί του συνόλου των απομονωμένων στελεχών στις τρεις θερμοκρασίες επώασης. Παρατηρείται ότι υπάρχει εναλλαγή του κυρίαρχου πληθυσμού ανάλογα με τη θερμοκρασία επώασης. Στους 37 °C κυριαρχούν στελέχη που ανήκουν στο γένος *Bradyrhizobium* (52%), στους 22 °C το γένος *Blastobacter* (44%) και στους 10 °C το γένος *Sphingomonas* (54%). Ο πληθυσμός του *Sphingomonas* sp. παρουσιάζει φθίνουσα πορεία όσο αυξάνεται η θερμοκρασία επώασης ενώ το αντίθετο παρατηρείται στο *Methylobacterium* sp.. Σε θερμοκρασία επώασης 10 °C, τα γένη *Bradyrhizobium*, *Ralstonia* και *Bacillus* απουσιάζουν ή εντοπίζονται σε πολύ χαμηλό πληθυσμό. Τα στελέχη του γένους *Blastobacter* παρατηρείται ότι παρουσιάζουν ένα εύρος θερμοκρασιών που μπορούν να αναπτυχθούν ικανοποιητικά, με μέγιστο πληθυσμό 307 cfu/100 ml στους 22 °C, καθώς και στις 3 θερμοκρασίες αποτελούν ένα σημαντικό κομμάτι του μικροβιακού πληθυσμού. Τέλος, σε επίπεδο στελεχών, μεγαλύτερη ποικιλότητα παρατηρήθηκε στους 37 °C και 22 °C, με 19 διαφορετικά πρότυπα BOX και μικρότερη ποικιλότητα στους 10 °C με 10 διαφορετικά πρότυπα BOX. Τέσσερα πρότυπα ήταν κοινά και στις τρεις θερμοκρασίες. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι κατά το στάδιο της ανακαλλιέργειας, στα πλήρη θρεπτικά υποστρώματα τα στελέχη του γένους *Sphingomonas* και *Blastobacter* δεν αναπτύχθηκαν ενώ τα στελέχη του γένους *Bradyrhizobium* και *Methylobacterium* αναπτύχθηκαν σε πολύ μικρό βαθμό.



Εικόνα 3.42¹⁰: Ποσοστό % των απομονωμένων στελεχών που απομονώθηκαν από ολιγότροφο θρεπτικό υπόστρωμα (WA) σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό και κατανομή τους ανάλογα με τη θερμοκρασία επώασης (Δειγματοληψία Φεβρουαρίου 2011).

3.1.4.5. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ποιοτικής ανάλυσης του μικροβιακού φορτίου

Συνολικά στις 4 δειγματοληψίες, απομονώθηκαν σε καθαρές καλλιέργειες 1771 στελέχη και ομαδοποιήθηκαν με τη μέθοδο BOX-PCR σε 257 πρότυπα. Η μεγαλύτερη ποικιλότητα παρατηρήθηκε στις δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011, στις οποίες ανιχνεύτηκαν 110 και 72 διαφορετικά πρότυπα BOX, εξαιτίας των διαφορετικών συνθηκών που μελετήθηκαν. Η μικρότερη ποικιλότητα παρατηρήθηκε στη δειγματοληψία του Ιανουαρίου 2010 όπου ομαδοποιήθηκαν τα 331 στελέχη σε 18 πρότυπα BOX. Στη δειγματοληψία του Μαρτίου 2010 προέκυψαν 57 διαφορετικά πρότυπα από την ομαδοποίηση 637 στελεχών. Επίσης, η πολύ

¹⁰Στον Πίνακα Π_7 του Παραρτήματος παρουσιάζεται η κατανομή του ολιγότροφου πληθυσμού (cfu/100 ml), στα ταυτοποιηθέντα γένη και είδη.

χαμηλή ποικιλότητα στη δειγματοληψία του Ιανουαρίου 2010 οφείλεται στο υψηλό μικροβιακό φορτίο που υπήρχε και στο γεγονός ότι οι απομονωμένες αποικίες προήλθαν από την αραιώση 10^{-1} και άρα ανταποκρίνονται στον κυρίαρχο πληθυσμό και όχι σε μικροοργανισμούς που βρισκόντουσαν σε μικρή αφθονία. Τέλος, παρατηρήθηκε μεγάλη ενδοειδική ποικιλότητα κυρίως στα είδη του γένους *Bacillus*, όπως το *B. cibi*, και σε μικρότερο βαθμό στα είδη *B. barbaricus* και *B. aquimaris*, ενώ σταθερά πρότυπα σε όλες τις δειγματοληψίες επέδειξαν τα στελέχη των ειδών *B. korlensis* και *B. niabensis*. Γενικότερα τα κοινά πρότυπα στις τέσσερεις δειγματοληψίες ήταν λίγα και για το λόγο αυτό η σύγκριση των προτύπων ανάμεσα στις δειγματοληψίες ήταν δύσκολη.

Συμφώνα με τα αποτελέσματα της ποιοτικής ανάλυσης του μικροβιακού φορτίου με μοριακές μεθόδους, μπορούν να διακριθούν 2 κατηγορίες στις όποιες ομαδοποιούνται οι μικροοργανισμοί και οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5. Πρόκειται για τον ετερότροφο και τον ολιγότροφο πληθυσμό.

Πίνακας 3.5: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των ειδών που ανιχνεύτηκαν στο νερό

Ετερότροφος πληθυσμός		Ολιγότροφος πληθυσμός
Μεσόφιλος	Ψυχρόφιλος	
<i>Bacillus aquimaris</i>	<i>Bacillus aquimaris</i>	<i>Sphingomonas echinoides</i>
<i>Bacillus korlensis</i>	<i>Bacillus barbaricus</i>	<i>Blastobacter denitrificans</i>
<i>Bacillus niabensis</i>	<i>Bacillus boroniphilus</i>	<i>Bradurhizobium japonicum</i>
<i>Bacillus barbaricus</i>	<i>Bacillus cibi</i>	<i>Bradyrhizobium pachyrhizi</i>
<i>Bacillus cibi</i>	<i>Kocuria flava</i>	<i>Methylobacterium tardum</i>
<i>Bacillus jeotgali</i>	<i>Kocuria turfanensis</i>	<i>Ralstonia insidiosa</i>
<i>Bacillus arybhatai</i>	<i>Kocuria rosea</i>	<i>Bacillus cibi</i>
<i>Bacillus safensis</i>	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	<i>Bacillus korlensis</i>
<i>Bacillus boroniphilus</i>	<i>Ralstonia insidiosa</i>	<i>Streptomyces</i> sp.
<i>Kocuria flava</i>	<i>Paracoccus marcusii</i>	
<i>Kocuria turfanensis</i>		
<i>Kocuria rosea</i>		
<i>Microbacterium oxydans</i>		
<i>Rhodococcus ruber</i>		
<i>Acinetobacter</i> sp.		
<i>Ralstonia insidiosa</i>		

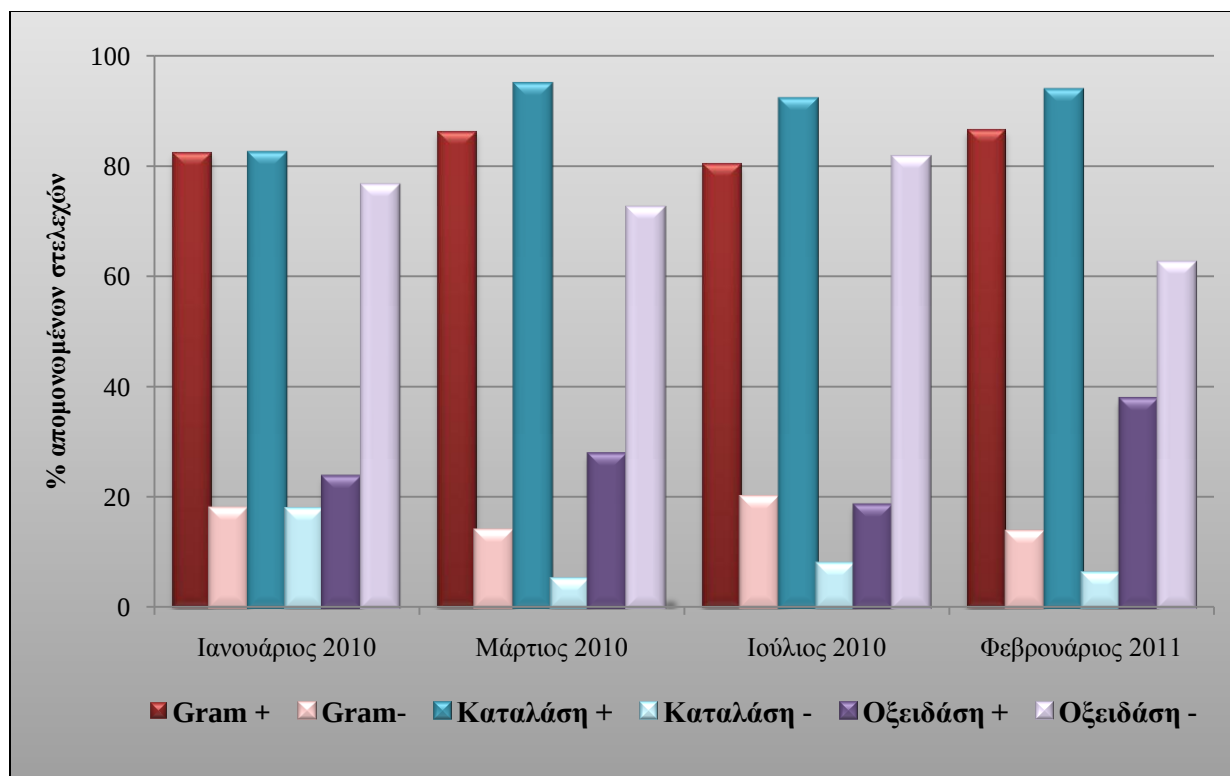
Η πρώτη κατηγορία αφορά τον ετερότροφο πληθυσμό και διακρίνεται στον μεσόφιλο και στον ψυχρόφιλο πληθυσμό. Ο πληθυσμός αυτός αναπτύσσεται σε πλήρη θρεπτικά υποστρώματα και σε θερμοκρασία 22 °C και 37 °C (μεσόφιλος) και σε θερμοκρασία 10 °C (ψυχρόφιλος). Ο μεσόφιλος πληθυσμός αποτελείται στο μεγαλύτερο ποσοστό από βακτήρια του γένους *Bacillus* και σε ένα μικρότερο ποσοστό από βακτήρια του φύλου *Actinobacteria* και *Proteobacteria*. Ο ψυχρόφιλος ετερότροφος πληθυσμός περιλαμβάνει ως κυρίαρχους πληθυσμούς, στελέχη με ομοιότητα στο *Bacillus cibi* και στελέχη που ανήκουν στα γένη *Kocuria* και *Paracoccus*.

Η δεύτερη κατηγορία αφορά τα ολιγότροφα βακτήρια που αναπτύσσονται σε εύρος θερμοκρασιών από 10 °C έως 37 °C και αποτελούνταν από στελέχη που ανήκουν στα α και β -*Proteobacteria* και στα γένη *Bacillus* και *Streptomyces*. Η ομάδα των ολιγότροφων βακτηριών αν και είχε μικρότερη ποικιλότητα σε σχέση με τον ετερότροφο πληθυσμό που αναπτύχθηκε στα πλήρη θρεπτικά υποστρώματα, εντούτοις, φάνηκε ότι ποσοτικώς αποτελεί τον κυρίαρχο πληθυσμό (Εικόνες 3.15 & 3.17) και επίσης η σύσταση της ήταν εντελώς διαφορετική σε σχέση με τον πληθυσμό στα πλήρη υποστρώματα.

3.1.5. Βιοχημικά χαρακτηριστικά στελεχών

Τα διαφορετικά στελέχη που προέκυψαν από την ομαδοποίηση μέσω της τεχνικής BOX-PCR, μελετήθηκαν ως προς τα βιοχημικά χαρακτηριστικά (χρώση κατά Gram, αντίδραση οξειδάσης και καταλάσης). Στην Εικόνα 3.43 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των βιοχημικών δοκιμασιών στις 4 δειγματοληψίες.

Από τα 247 διαφορετικά στελέχη που προέκυψαν από τις 4 δειγματοληψίες, 208 ήταν θετικά κατά Gram βακτήρια με το ποσοστό για κάθε δειγματοληψία να κυμαίνεται από 80 – 86 % του συνόλου. Το 28 % των στελεχών διαθέτουν το ένζυμο οξειδάση ενώ το μεγαλύτερο τμήμα των στελεχών δε διαθέτει το ένζυμο και άρα δε χρησιμοποιεί το οξυγόνο για παραγωγή ενέργειας. Τέλος το 93 % των στελεχών διαθέτουν τον ένζυμο καταλάση και μπορούν να διασπάσουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγοντας οξυγόνο.



Εικόνα 3.43: Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμασιών (χρώση κατά Gram, δοκιμασία καταλάσης και οξειδάσης) για τα δείγματα νερού.

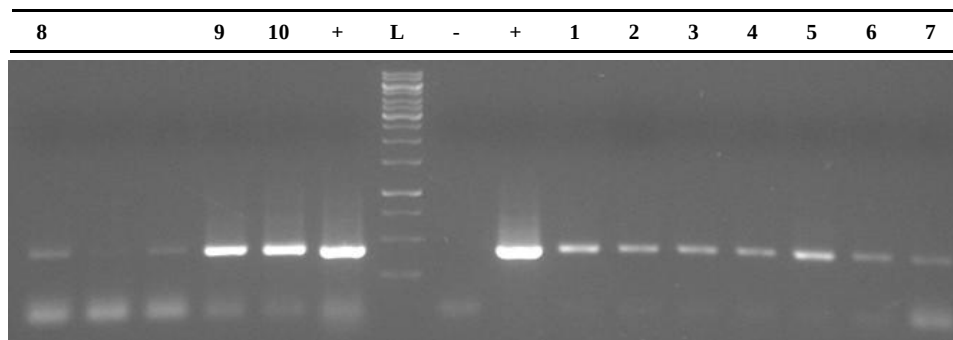
3.1.6. Ανάλυση της ποικιλότητας των βακτηρίων με τη μέθοδο της DGGE

3.1.6.1. Παρουσία βακτηριακού DNA μέσω ενίσχυσης του 16S rDNA

Σε κάθε δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ολικού γενωμικού DNA και ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου για ανίχνευση βακτηριακού DNA με το ζεύγος εκκινητών F984GC και R1378. Το προϊόν που προέκυψε είχε μέγεθος 434 bp και εν συνεχεία, διαχωρίστηκε σε πήκτωμα με κλίση αποδιατακτικού παράγοντα. Τα αποτελέσματα για τα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν με τη μέθοδο της DGGE παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6 και η ανάλυση των προϊόντων της PCR στην Εικόνα 3.44.

Παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύτηκε βακτηριακό DNA. Ειδικότερα και στις 4 δειγματοληψίες ανιχνεύτηκε βακτηριακό DNA όταν το νερό διηθήθηκε σε μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm . Στις δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011 ανιχνεύτηκε βακτηριακό DNA και όταν το διήθημα που προέκυψε από τη διήθηση σε μεμβράνες με διάμετρο

πόρων 0,2 μm , διηθήθηκε εκ νέου σε μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,1 μm . Τέλος ανιχνεύτηκε DNA στα δείγματα τα οποία είχαν διηθηθεί σε μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,45 μm (που χρησιμοποιούνται κατά την ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών), και εν συνεχεία σε μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,1 μm . Στην τελευταία περίπτωση, το προϊόν της PCR είχε μεγαλύτερη ένταση (ζώνες 9, 10 στην Εικόνα 3.44) που υποδηλώνει καλύτερη απόδοση της αντίδρασης οφειλόμενη κυρίως στην ποσότητα του DNA.



Εικόνα 3.44: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR που προέκυψαν κατά την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου με την 2G Fast Taq Polymerase (Kapa Biosystems). Όπου: (L) μοριακός μάρτυρας 1kb, (-) αρνητικός μάρτυρας, (+) θετικός μάρτυρας (*Bacillus subtilis*), (1-10) δείγματα όπως αναφέρονται στον Πίνακα 3.14.

Πίνακας 3.6: Αποτελέσματα ενίσχυσης του 16S rRNA γονιδίου

α/α	Δείγματα	Παρουσία βακτηριακού DNA
1	Ιανουάριος 2010 - 0,2 μm	+
2	Μάρτιος 2010 - 0,2 μm	+
3	Ιούλιος 2010 - 0,2 μm	+
4	Φεβρουάριος 2011 - 0,2 μm $\theta=8^\circ\text{C}$	+
5	Φεβρουάριος 2011 - 0,2 μm $\theta=15^\circ\text{C}$	+
6	Ιούλιος 2010 - 0,1 μm	+
7	Φεβρουάριος 2011 - 0,1 μm $\theta=8^\circ\text{C}$	+
8	Φεβρουάριος 2011 - 0,1 μm $\theta=15^\circ\text{C}$	+
9	Φεβρουάριος 2011 - διήθηση σε 0,1 μm από 0,45 μm $\theta=8^\circ\text{C}$	+
10	Φεβρουάριος 2011 - διήθηση σε 0,1 μm από 0,45 μm $\theta=15^\circ\text{C}$	+

3.1.6.2. Ανάλυση των ριβοτύπων DGGE

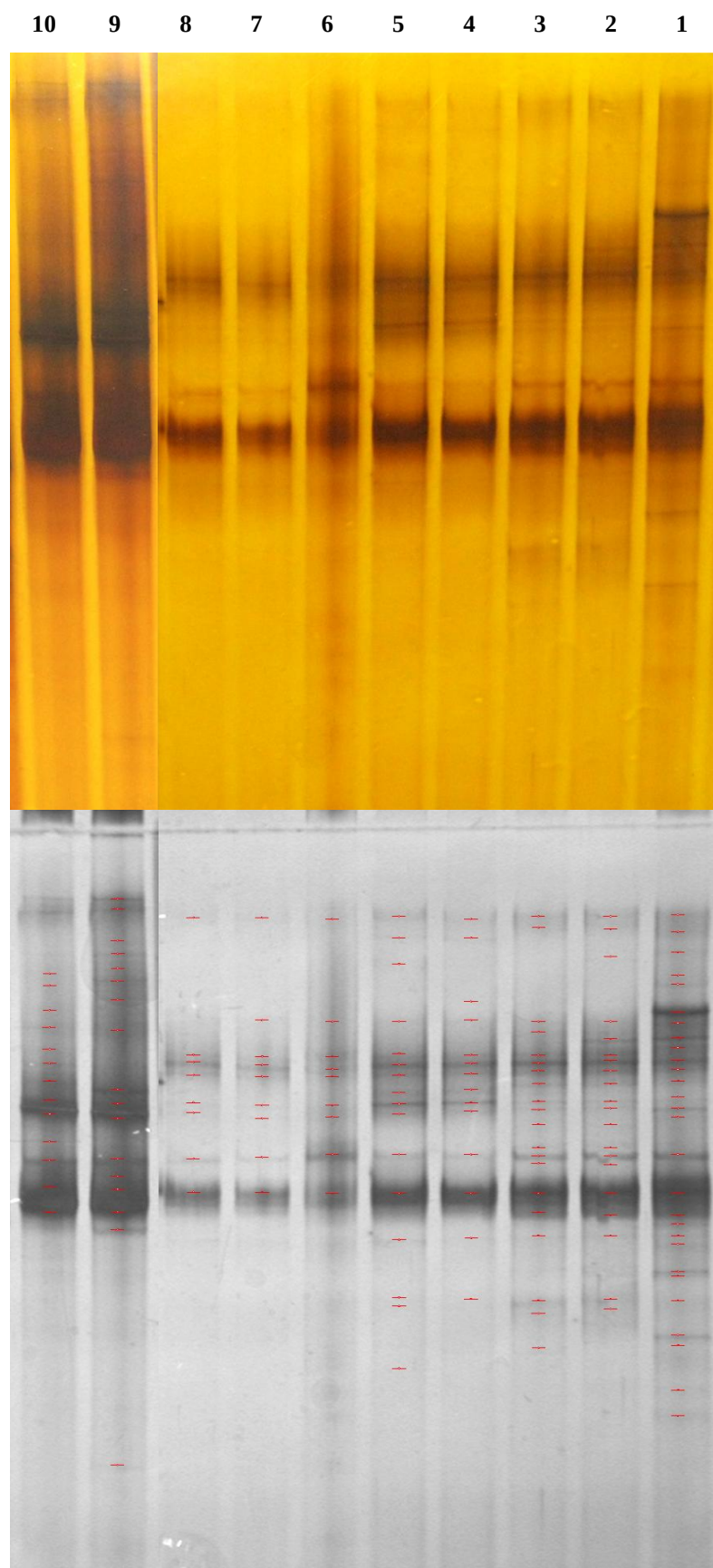
Η ανάλυση της ποικιλότητας των βακτηρίων μέσω ανάλυσης σε πήκτωμα με κλίση αποδιατακτικού παράγοντα ουρία - φορμαμίδιο σε ποσοστό 40 – 60 % παρουσιάζεται στην

Εικόνα 3.45 και έδειξε ότι εντοπίζονται κοινοί ριβότυποι σε όλες τις δειγματοληψίες και η ομοιότητα της μικροβιακής κοινότητας δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες μεταβολές. Οι περισσότεροι ριβότυποι εντοπίστηκαν στο άνω τμήμα του πηκτώματος δηλαδή είχαν χαμηλότερο GC περιεχόμενο και αποδιατάσσονταν σε μικρότερη συγκέντρωση αποδιατακτικού παράγοντα.

Αναλυτικότερα, στα δείγματα που διηθήθηκαν σε μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm (δείγματα 1 – 5), που είναι το συνηθισμένο μέγεθος που χρησιμοποιείται για τη συγκράτηση των βακτηριακών κυττάρων, εντοπίστηκαν 28 ριβότυποι στη δειγματοληψία του Ιανουαρίου 2010, στις δειγματοληψίες του Μαρτίου 2010 και Ιουλίου 2010 εντοπίστηκαν 20 ριβότυποι και στη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011 ανιχνεύτηκαν 14 και 16 ριβότυποι ανάλογα με τη θερμοκρασία που είχε το δείγμα πριν τη διήθηση (8 °C και 15 °C αντίστοιχα). Μεγαλύτερη ομοιότητα παρουσίασαν η μικροβιακή κοινότητα τον Μάρτιο 2010 και τον Ιούλιο 2010 με συντελεστή ομοιότητας $C_s = 0,9$ και 18 κοινούς ριβότυπους, ενώ η δειγματοληψία του Ιανουαρίου 2010 είχε τους χαμηλότερους συντελεστές ομοιότητας συγκρινόμενη με τις άλλες τρεις δειγματοληψίες όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.7. Τον Φεβρουάριο 2011 όπου μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάκτηση του μικροβιακού πληθυσμού και στη συγκράτησή του στις μεμβράνες των 0,2 μm υπολογίστηκε ο συντελεστής ομοιότητας σε $C_s=0,8$ δηλαδή 12 κοινοί ριβότυποι (δείγματα 4 και 5).

Πίνακας 3.7: Συντελεστής ομοιότητας (C_s) για του πληθυσμούς των βακτηρίων σε δείγματα νερού

Δείγματα		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Ιανουάριος 2010 – 0,2 μm	-									
2	Μάρτιος 2010 – 0,2 μm	0,63	-								
3	Ιούλιος 2010 – 0,2 μm	0,58	0,90	-							
4	Φεβρουάριος 2011 – 0,2 μm $\theta=8^\circ\text{C}$	0,57	0,71	0,65	-						
5	Φεβρουάριος 2011 – 0,2 μm $\theta=15^\circ\text{C}$	0,55	0,78	0,61	0,8	-					
6	Ιούλιος 2010 – 0,1 μm	0,49	0,62	0,62	0,35	0,72	-				
7	Φεβρουάριος 2011 – 0,1 μm $\theta=8^\circ\text{C}$	0,49	0,62	0,55	0,52	0,72	1	-			
8	Φεβρουάριος 2011 – 0,1 μm $\theta=15^\circ\text{C}$	0,44	0,57	0,50	0,46	0,67	0,94	0,94	-		
9	Φεβρουάριος 2011 – 0, 45 μm σε 0,1 μm $\theta=8^\circ\text{C}$	0,31	0,27	0,27	0,52	0,36	0,39	0,39	0,40	-	
10	Φεβρουάριος 2011 – 0, 45 μm σε 0,1 μm $\theta=15^\circ\text{C}$	0,32	0,39	0,39	0,40	0,50	0,40	0,40	0,50	0,67	-



Εικόνα 3.45: Ανάλυση DGGE της μικροβιακής κοινότητας των βακτηρίων σε δείγματα νερού. Φωτογραφία του πηκτώματος έπειτα από χρώση με νιτρικό άργυρο και φωτογράφιση α) σε ορατό φως, β) σε υπεριώδη ακτινοβολία και επεξεργασία με το πρόγραμμα GelComparII. Όπου 1-10 είναι τα δείγματα του Πίνακα 3.7.

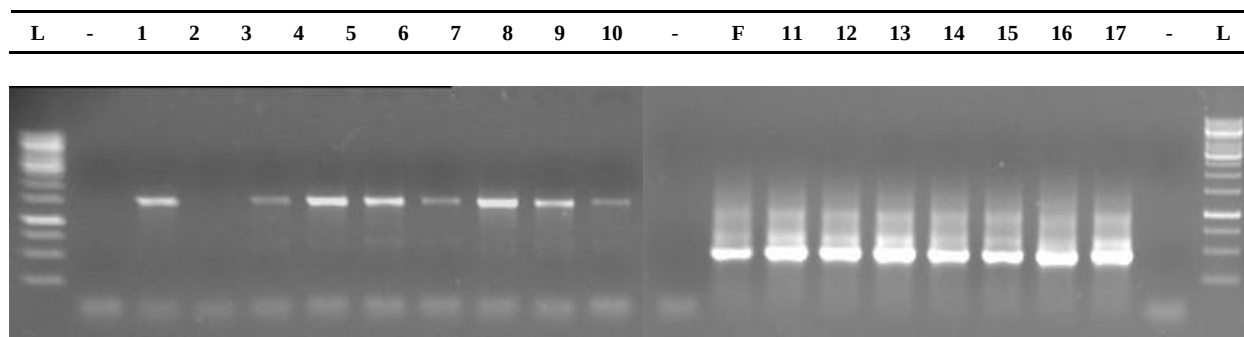
Στα δείγματα που διηθήθηκαν σε μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,1 μm (δείγματα 6 – 10) διακρίνονται δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά τα δείγματα 6 – 8 που αποτελούν το διήθημα από τις μεμβράνες των 0,2 μm . Παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα αυτά είχαν 50 % μικρότερη ποικιλότητα σε σχέση με το δείγμα των 0,2 μm . Συγκεκριμένα, τον Ιούλιο 2010 εντοπίστηκαν 9 ριβότυποι και τον Φεβρουάριο 2011 ανιχνεύτηκαν 9 και 8 ριβότυποι ανάλογα με τη θερμοκρασία του δείγματος πριν τη διήθηση (8 °C και 15 °C αντίστοιχα). Όλοι οι ριβότυποι που εντοπίστηκαν στα δείγματα των 0,1 μm , εντοπίστηκαν και στα 0,2 μm υποδηλώνοντας την ικανότητα ορισμένων μικροοργανισμών να διαπερνάνε τις μεμβράνες των 0,2 μm . Οι συντελεστές ομοιότητας της μικροβιακής κοινότητας ανάμεσα στα δείγματα των 0,2 μm και 0,1 μm ήταν χαμηλότεροι σε σχέση με τους συντελεστές ομοιότητας που εξήχθησαν συγκρίνοντας την μικροβιακή ποικιλότητα στα 0,2 μm και στα 0,1 μm χωριστά εξαιτίας της χαμηλότερης μικροβιακής ποικιλότητας.

Τέλος, τα δείγματα 9 και 10 παρουσίασαν αυξημένη μικροβιακή ποικιλότητα με 17 και 16 ριβότυπους αντίστοιχα που υποδεικνύει ότι περισσότερες διαφορετικές ταξινομικές μονάδες μπορούν να διέλθουν από μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,45 μm . Οι συντελεστές ομοιότητας των δύο αυτών δειγμάτων με τα υπόλοιπα δείγματα ήταν αρκετά χαμηλότεροι με τιμές από 0,3 έως 0,5.

3.1.6.3. Προβλήματα στην ανίχνευση του βακτηριακού DNA μέσω nested - PCR

Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκε η χρήση ένθετης PCR (nested-PCR) για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου για ανάλυση του σύμφωνα με τη μέθοδο της DGGE. Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών pA – R1492 στην πρώτη αντίδραση και προέκυψε το προϊόν μεγέθους 1450 bp όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.46. Στη συνέχεια το προϊόν της πρώτης PCR ενισχύθηκε με τους εκκινητές F984GC και R1378 και προέκυψε το προϊόν μεγέθους 434 bp το οποίο είχε μεγαλύτερη ένταση άρα και περισσότερα αντίγραφα του 16S rDNA. Οι αρνητικοί μάρτυρες στις δυο αντιδράσεις δεν έδωσαν κάποια ζώνη, που υποδεικνύει ότι η αντίδραση μας δεν επιμολύνθηκε από ξένο DNA. Διαπιστώθηκε όμως η ύπαρξη προϊόντος PCR ίσης περίπου έντασης με αυτή των δειγμάτων, όταν ο αρνητικός μάρτυρας της πρώτης αντίδρασης PCR ενισχύθηκε ως να ήταν δείγμα. Η εύρεση αυτή απέκλεισε τη χρήση των παραπάνω προϊόντων

PCR στην ανάλυση τους μέσω της DGGE καθώς τόσο ο αρνητικός μάρτυρας όσο και τα δείγματα είχαν ίσης έντασης προϊόντα.



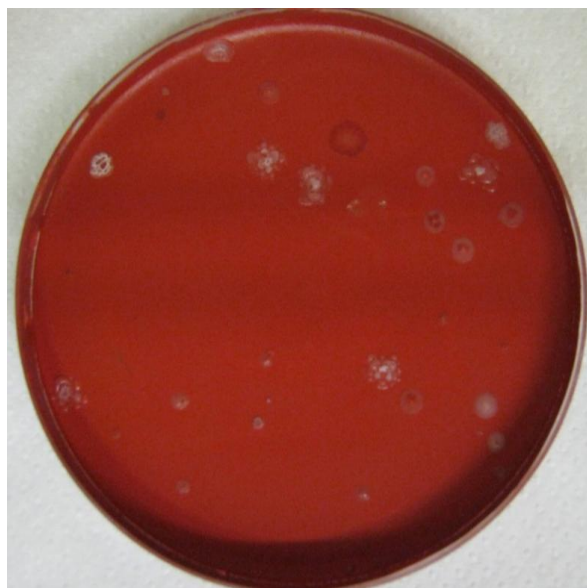
Εικόνα 3.46: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων nested - PCR που προέκυψαν κατά την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου με τους εκκινητές pA - R1492 και F984GC - R1378. Όπου: (L) μοριακός μάρτυρας 1kb, (-) αρνητικός μάρτυρας, (F) αρνητικός μάρτυρας 1^η αντίδρασης που ενισχύθηκε ξανά με το ζεύγος F984GC - R1378, (1-10) προϊόντα PCR με ζεύγος εκκινητών pA - R1492, (11-17) προϊόντα PCR με ζεύγος εκκινητών F984GC - R1378.

Τα αίτια του προβλήματος αυτού οφείλονταν στην ύπαρξη βακτηριακού DNA στο ένζυμο της πολυμεράσης λόγω μη επαρκούς καθαρισμού του κατά την παραγωγή, το οποίο ενισχυόταν από τους universal εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν. Η επιλογή ενός ενζύμου πολύ υψηλής καθαρότητας που ενδείκνυνται για ενίσχυση βακτηριακού DNA όπως η 2G Fast Taq Polymerase (Kapa Biosystems) απαλείφει τα προβλήματα επιμόλυνσης.

3.2. Μικροβιακή Ανάλυση στις Πρώτες ύλες Αντιηλιακού προϊόντος

3.2.1. Ανάλυση πληθυσμού βακτηρίων

Η εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 2.2.2. Σε χρόνο $t=0$ ο βακτηριακός πληθυσμός ανιχνεύτηκε μόνο μέσω καλλιέργειας εμπλουτισμού, οπότε είναι αδύνατος ο ποσοτικός προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου. Σε $t=1$ χρόνος από τη συλλογή του δείγματος και αφού το δείγμα είχε παραμείνει σε συνθήκες περιβάλλοντος, ανιχνεύτηκε βακτηριακός πληθυσμός στις 3 χρωστικές, στη γλυκομαννάνη και στο Kobo. Στην Εικόνα 3.47 φαίνονται αποικίες που αναπτύχθηκαν στην κόκκινη χρωστική ενώ στον Πίνακα 3.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για όλες τις πρώτες ύλες.



Εικόνα 3.47: Αποικίες βακτηρίων που αναπτύχθηκαν κατά τον μικροβιολογικό έλεγχο της κόκκινης χρωστικής, σε θρεπτικό υπόστρωμα ΝΑ, στους 37 °C.

Πίνακας 3.8: Αποτελέσματα μικροβιολογικού ελέγχου πρώτων υλών για την ανίχνευση βακτηρίων. Όπου EM: ανιχνεύτηκε με καλλιέργεια εμπλουτισμού και Δ.Α.: δεν ανιχνεύτηκε.

α/α	Πρώτες ύλες	Ανίχνευση βακτηρίων		
		t=0	t=1 χρόνος	
			cfu/g	
			37 °C	22 °C
1	CI 77491, Isopropyl Titanium Triisostearate (Κίτρινη χρωστική)	EM	5	8
2	CI 77492, Isopropyl Titanium Triisostearate (Μαύρη χρωστική)	EM	Δ.Α.	10
3	CI 77499, Isopropyl Titanium Triisostearate (Κόκκινη χρωστική)	EM	72	33
4	Citric Acid	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
5	Glyceryl Stearate	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
6	Sunflower Seed Oil Sorbitol Esters	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
7	Tocopheryl Acetate	EM	Δ.Α.	Δ.Α.
8	Xanthan Gum	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
9	Glucomannan	Δ.Α.	3	62
10	Glycerin	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
11	Glyceryl Oleate Citrate, Caprylic/ Capric Triglyceride	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.
12	Kobo	Δ.Α.	Δ.Α.	8
13	Tinosorb M	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.

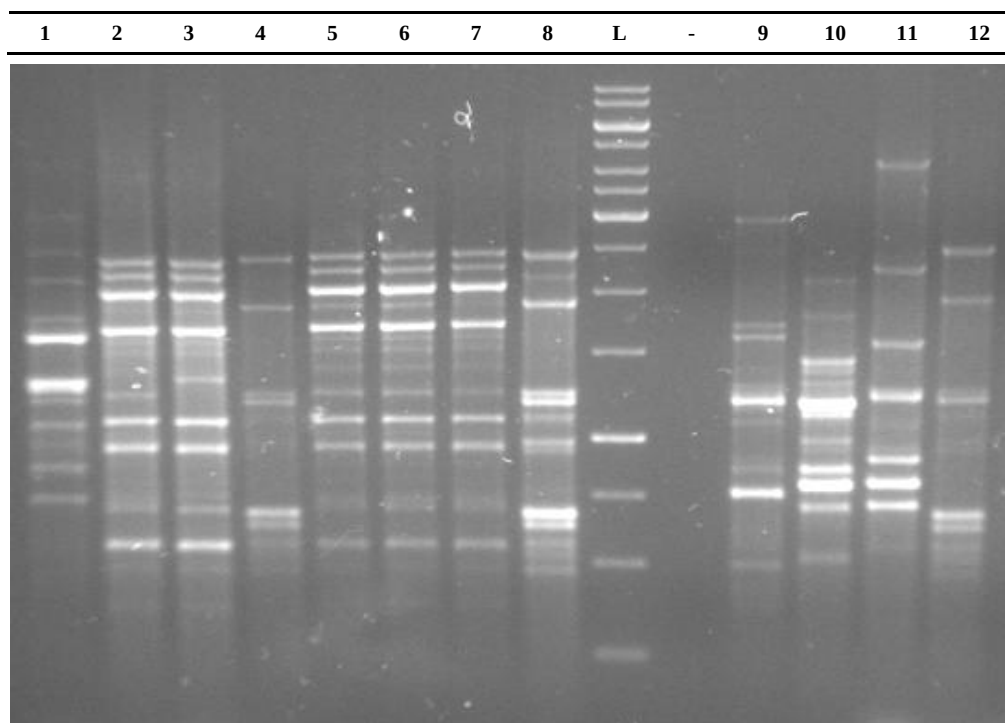
Συνολικά απομονώθηκαν 100 στελέχη τα οποία ομαδοποιήθηκαν σε 59 διαφορετικά πρότυπα BOX. Η κόκκινη χρωστική παρουσίασε τη μεγαλύτερη ποικιλότητα σε επίπεδο στελέχους με 27 διαφορετικά πρότυπα BOX. Η μαύρη χρωστική επίσης παρουσίασε υψηλή ποικιλότητα σε επίπεδο στελέχους. Στον Πίνακα 3.9 εμφανίζονται τα στελέχη που απομονώθηκαν και τα πρότυπα στα οποία ομαδοποιήθηκαν.

Πίνακας 3.9: Αριθμός στελεχών που απομονώθηκαν από τις πρώτες ύλες και αριθμός προτύπων στα οποία διαχωρίστηκαν έπειτα από την BOX-PCR

α/α	Πρώτες ύλες	Αριθμός στελεχών που απομονώθηκαν	Αριθμός προτύπων BOX
1	CI 77491, Isopropyl Titanium Triisostearate (Κίτρινη χρωστική)	16	9
2	CI 77492, Isopropyl Titanium Triisostearate (Μαύρη χρωστική)	24	15
3	CI 77499, Isopropyl Titanium Triisostearate (Κόκκινη χρωστική)	46	27
7	Tocopheryl Acetate	1	1
9	Glucomannan	10	9
12	Kobo	3	2

Ορισμένα από τα πρότυπα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.48. Αντιπρόσωποι των στελεχών αυτών χαρακτηρίστηκαν βιοχημικά και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.49. Τα 3/4 των στελεχών ήταν θετικά κατά Gram και αρνητικά στη δοκιμασία οξειδάσης και το 91 % αυτών εμφάνιζε θετική αντίδραση καταλάσης. Πάνω από το 50 % των στελεχών αυτών εμφάνισαν ταυτόχρονα τα εξής βιοχημικά χαρακτηριστικά, Gram θετικά, οξειδάση αρνητικά και καταλάση θετικά.

Τέλος αναγνωρίστηκε μορφολογικά (μακροσκοπικά και μικροσκοπικά) ένα στέλεχος του γένους *Streptomyces* από την πρώτη ύλη γλυκομαννάνη.



Εικόνα 3.48: Πρότυπα προϊόντων BOX - PCR από στελέχη που απομονώθηκαν από τις πρώτες ύλες. Όπου (L) ο μοριακός μάρτυρας 1 kb, (-) αρνητικός μάρτυρας, (1-12) δείγματα.



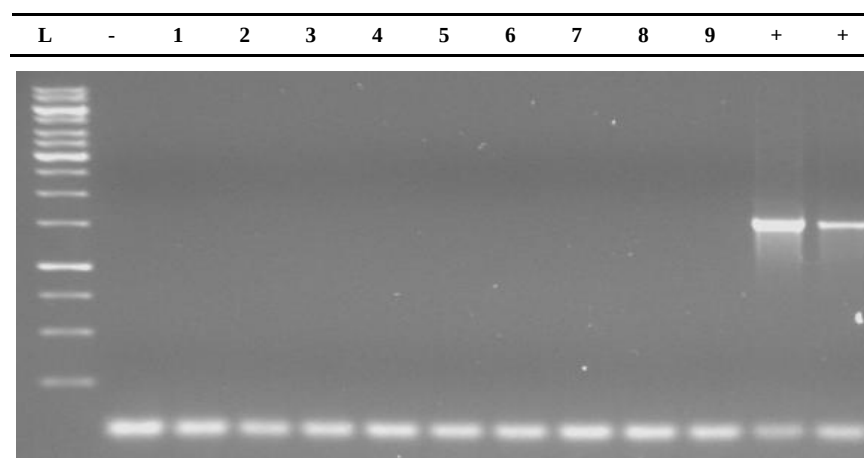
Εικόνα 3.49: Αποτελέσματα βιοχημικών δοκιμασιών για τα στελέχη που απομονώθηκαν από τις πρώτες ύλες

Απομόνωση ολικού DNA από τις πρώτες ύλες

Ακολουθήθηκε η μεθοδολογία της παραγράφου 2.2.2. Η απομόνωση του DNA επετεύχθη για 6 από τις 13 πρώτες ύλες: χρωστικές (κίτρινη, κόκκινη, μαύρη), γλυκερόλη, γλυκομανάνη, κιτρικό

οξύ. Για τις υπόλοιπες πρώτες ύλες τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν δεν έδωσαν αποτέλεσμα στο θετικό μάρτυρα οπότε θεωρήθηκε ότι απέτυχαν.

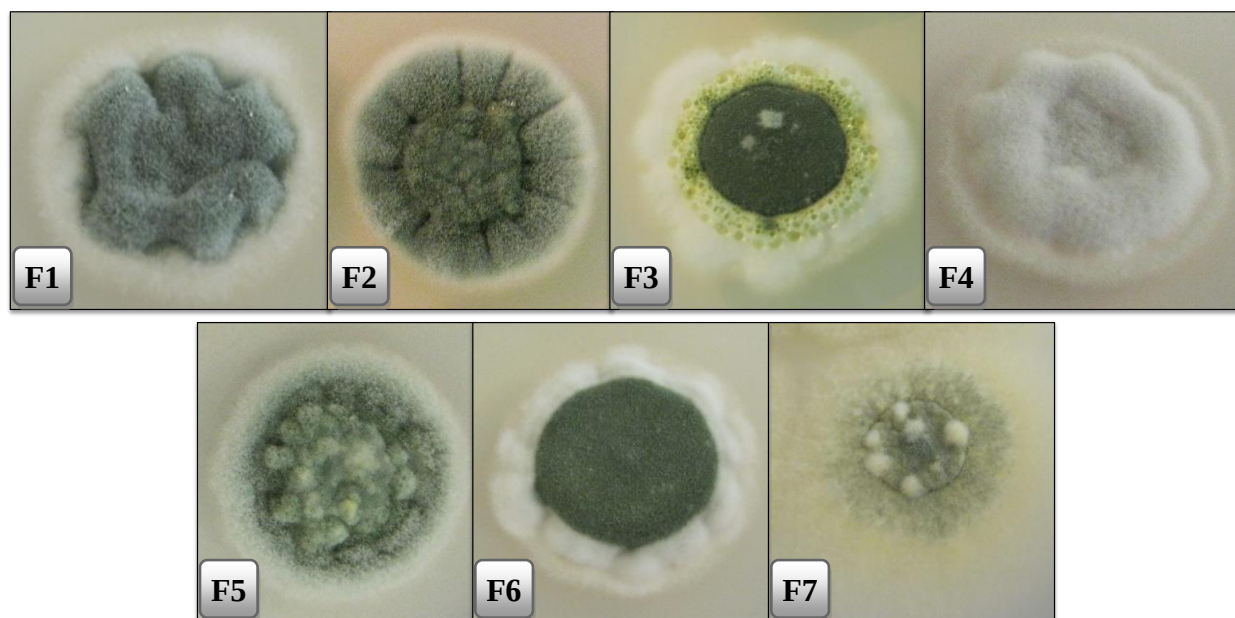
Το DNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε ηλεκτροφορητικά και το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό. Επειδή η χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο δεν είναι αρκετά ευαίσθητη και διακρίνει ποσότητες DNA στην κλίμακα του nm και επειδή το χαμηλό μικροβιακό φορτίο των πρώτων υλών θα οδηγήσει στην απομόνωση μικρής ποσότητας DNA, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.50. Οι πρώτες ύλες ήταν αρνητικές για βακτηριακό DNA, χωρίς όμως αυτό να υποδηλώνει την απουσία του αλλά περισσότερο την χαμηλή ευαισθησία της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε. Οι θετικοί μάρτυρες, που ήταν πρώτες ύλες επιμολυσμένες με γνωστό εμβόλιο μικροοργανισμού, έδωσαν θετικό αποτέλεσμα, επιβεβαιώνοντας την εγκυρότητα της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 3.50: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR που προέκυψαν κατά την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των πρώτων υλών Όπου: (L) μοριακός μάρτυρας 1kb, (-) αρνητικός μάρτυρας, (+) θετικοί μάρτυρες, (1-10) δείγματα.

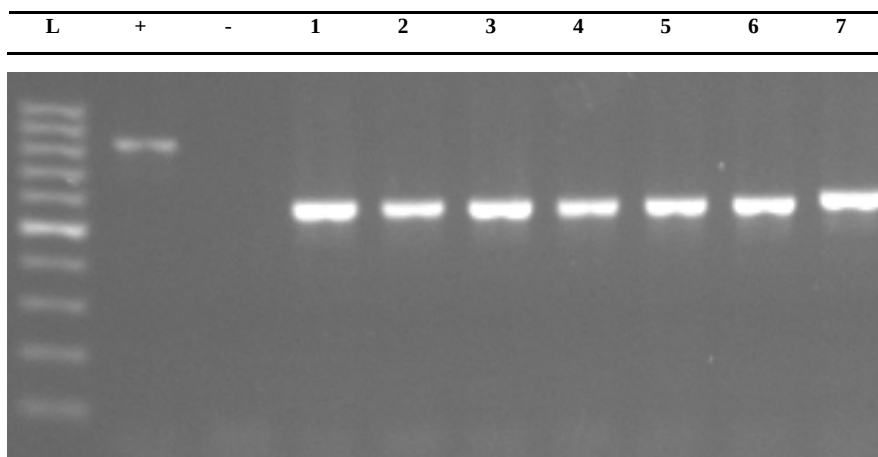
3.2.2. Ανάλυση πληθυσμού νηματοειδών μυκήτων

Στις πρώτες ύλες ανιχνεύθηκαν και απομονώθηκαν 7 στελέχη μυκήτων από το γενικό υπόστρωμα CzA σε θερμοκρασίες 30 °C και 22 °C. Συγκεκριμένα 3 στελέχη απομονώθηκαν από την κίτρινη χρωστική (F1, F2, F7), 2 στελέχη από την κόκκινη χρωστική (F5, F6), 1 στέλεχος από την μαύρη χρωστική (F4) και 1 στέλεχος από το glyceryl stearate (F4). Οι νηματοειδείς μύκητες που απομονώθηκαν φαίνονται στην Εικόνα 3.51.



Εικόνα 3.51: Νηματοειδείς μύκητες που απομονώθηκαν από τις πρώτες ύλες και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα CzA, σε θερμοκρασία επώασης 25 °C, για 7 ημέρες

Στα στελέχη αυτά, έγινε μοριακή ανάλυση και συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενετικού υλικού με 3 διαφορετικά πρωτόκολλα (§2.7.4 και 2.7.5), ITS-PCR και κατόπιν τα διαφορετικά πρότυπα που προέκυψαν ταυτοποιήθηκαν μοριακά. Τα 3 πρωτόκολλα απομόνωσης γενετικού υλικού από μύκητες ήταν επιτυχή, αλλά μεγαλύτερη απόδοση είχε το πρωτόκολλο με το CTAB. Στην Εικόνα 3.52 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ITS-PCR.



Εικόνα 3.52: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ITS-PCR. Όπου: (L) μοριακός μάρτυρας 100 bp, (+) θετικός μάρτυρας (*Saccharomyces cerevisiae*), (-) αρνητικός μάρτυρας, (1-6) ITS1, (7) ITS2

Από την ITS-PCR διακρίθηκαν 2 πρότυπα, τα ITS1 και ITS2. Στο ITS1 περιλαμβάνονται οι μύκητες F1 - F6, στα οποία η ζώνη που προέκυψε είχε μέγεθος 550 bp και στο ITS2 περιλαμβάνεται ο μύκητας F7, του οποίου η προκύψασα ζώνη είχε μέγεθος 580 bp. Τα δύο διαφορετικά πρότυπα που προέκυψαν από την ITS-PCR υποδηλώνουν διαφορετικό γένος και όχι είδος. Για το λόγο αυτό έγινε αλληλούχιση του τμήματος αυτού για τα δύο διαφορετικά πρότυπα. Τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.10. Η αλληλούχιση έγινε με τον reverse εκκινητή ITS4.

Πίνακας 3.10: Αποτελέσματα της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών των νηματοειδών μυκήτων

Κωδικός στελέχους	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια (αριθμός κατάθεσης στην τράπεζα GenBank)	Max score	Μέγιστη ομοιότητα %	Αριθμός νουκλεοτιδίων
F6	<i>Penicillium chrysogenum</i> (JF834167.1)	891	99,8	485
F7	<i>Neosartorya hiratsukae</i> (EU715611.1)	1003	98,6	569

3.3. Μικροβιακή Ανάλυση στο Τελικό Προϊόν

3.3.1. Προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου στο αντιηλιακό

Κατά τη μικροβιολογική ανάλυση του τελικού προϊόντος σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που ορίζονται (§2.2.3.1), ανιχνεύτηκε η ύπαρξη 1 cfu/g τελικού προϊόντος. Το στέλεχος απομονώθηκε σε γενικού τύπου θρεπτικό υπόστρωμα, στους 37 °C. Από καθαρή καλλιέργεια του στελέχους, έγινε απομόνωση γενωμικού υλικού, ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου και μοριακή ταυτοποίηση. Πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση της αλληλουχίας του στελέχους, με αλληλουχίες αναφοράς και βρέθηκε να υπάρχει 99,9 % ομοιότητα με το είδος *Bacillus safensis*. Αναλυτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.11.

Πίνακας 3.11: Αποτελέσματα της ευθυγράμμισης της αλληλουχίας του στελέχους που απομονώθηκε από το τελικό προϊόν.

Κωδικός στελέχους	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια (αριθμός κατάθεσης στην τράπεζα GenBank)	Max score	Μέγιστη ομοιότητα %	Αριθμός νουκλεοτιδίων
AN1	<i>Bacillus safensis</i> (NR_041794.1)	1831	99,9	1000

3.3.2. Προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου σε αντιηλιακά έπειτα από καθορισμένη χρήση

Η μικροβιολογική ανάλυση του τελικού προϊόντος έπειτα από καθορισμένη χρήση (§2.2.3.2), έδειξε την αδυναμία επιμόλυνσης του αντιηλιακού από τον χρήστη και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.12. Συγκεκριμένα σε κανένα από τα 5 δείγματα δεν ανιχνεύτηκαν παθογόνοι μικροοργανισμοί και συγκεκριμένα, *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Salmonella* sp., *E.coli* και κολιμόρφα με καμία από τις μεθοδολογίες που ακολουθηθήκαν.

Επιπλέον στα πλήρη θρεπτικά υποστρώματα γενικού τύπου περιλαμβανομένου και το Lethen Agar που απενεργοποιεί τα κατάλοιπα των συντηρητικών, δεν ανιχνεύτηκαν μικροοργανισμοί. Η μη ανίχνευση τους δεν υποδηλώνει την πλήρη απουσία τους αλλά την ανεπάρκεια των κλασσικών μικροβιολογικών τεχνικών.

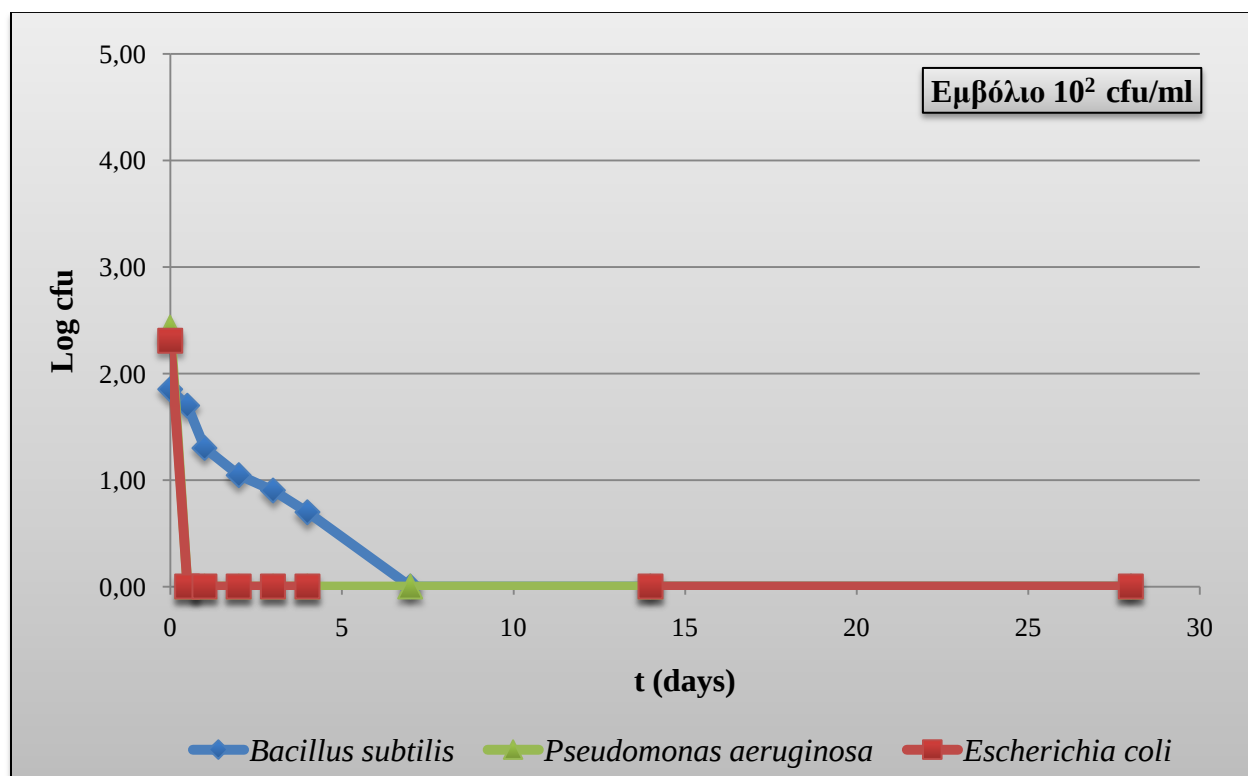
Πίνακας 3.12: Αποτελέσματα μικροβιολογικού ελέγχου του τελικού προϊόντος έπειτα από καθορισμένη χρήση.

Δείγματα	Χρήση		cfu/ml που ανιχνεύτηκαν	Παθογόνα που ανιχνεύτηκαν
Δ1	Αραιή χρήση	3- 4 φορές /μήνα	Μη ανιχνεύσιμα	Μη ανιχνεύσιμα
Δ2	Αραιή χρήση	7 - 8 φορές /μήνα	Μη ανιχνεύσιμα	Μη ανιχνεύσιμα
Δ3	Συχνή χρήση Όχι πλύσιμο χεριών πριν τη χρήση	καθημερινά	Μη ανιχνεύσιμα	Μη ανιχνεύσιμα
Δ4	Συχνή χρήση	καθημερινά	Μη ανιχνεύσιμα	Μη ανιχνεύσιμα
Δ5	Συχνή χρήση Όχι πλύσιμο χεριών πριν τη χρήση	καθημερινά	Μη ανιχνεύσιμα	Μη ανιχνεύσιμα

3.3.3. Έλεγχος της αποτελεσματικότητας των συντηρητικών του αντιηλιακού έπειτα από στοχευμένη επιμόλυνση με γνωστό εμβόλιο (σύμφωνα με την §2.2.3.3)

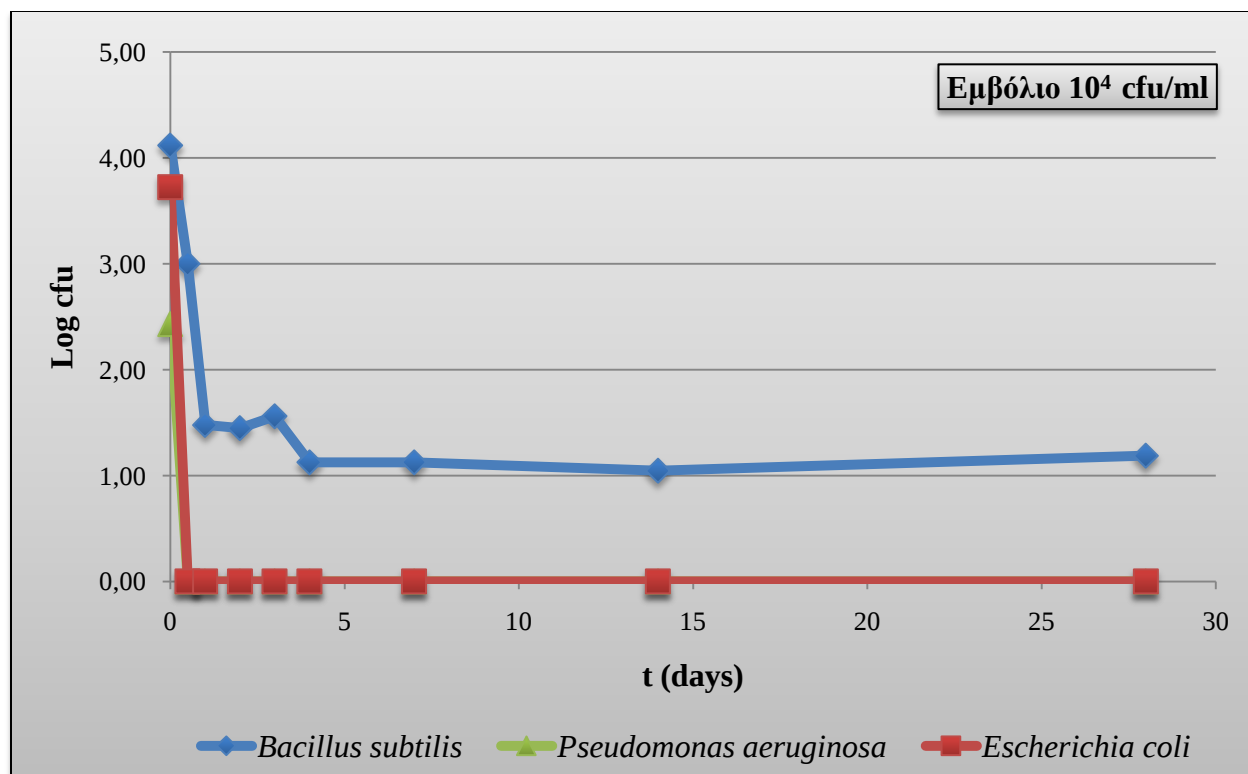
3.3.3.1. Επιμόλυνση αντιηλιακού με 10^2 cfu/ml και 10^4 cfu/ml εμβολίου

Η μελέτη του μικροβιακού φορτίου ύστερα από επιμόλυνση του αντιηλιακού με εμβόλιο που περιείχε από 10^2 cfu/ml και 10^4 cfu/ml των μικροοργανισμών *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa*, έδωσε τα παρακάτω αποτελέσματα όπως φαίνονται στις Εικόνες 3.53 και 3.54.



Εικόνα 3.53: Βιωσιμότητα μικροοργανισμών σε 100 % αντιηλιακό με εμβόλιο 10^2 cfu/ml

Κατά την επιμόλυνση με 10^2 cfu/ml, δεν ανιχνεύθηκαν μετά από 1 ημέρα *E. coli* στο υπόστρωμα TBX και *P. aeruginosa* στο υπόστρωμα Cetrimide ενώ το *B. subtilis* δεν ανιχνεύτηκε μετά τις 7 ημέρες. Κατά τη μοριακή ανάλυση των δειγμάτων, δεν ανιχνεύτηκε μέσω PCR βακτηριακό DNA (16S rDNA).



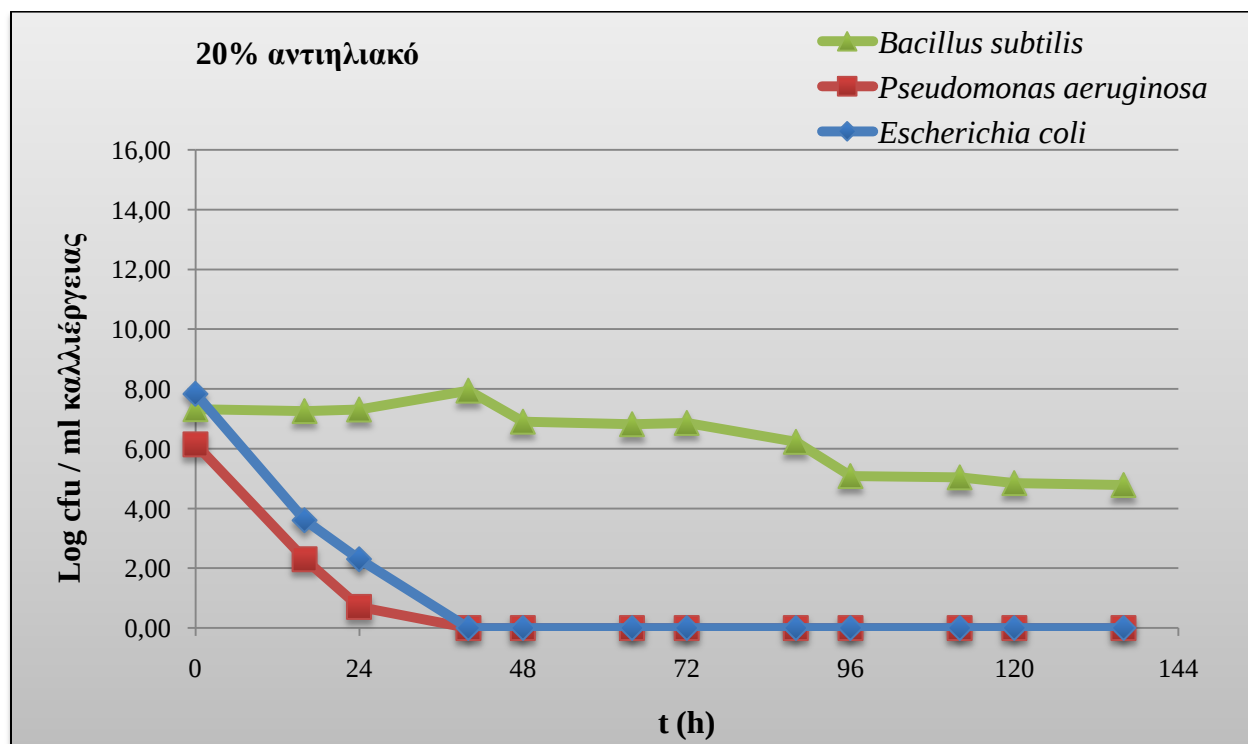
Εικόνα 3.54: Βιωσιμότητα μικροοργανισμών σε 100 % αντιηλιακό με εμβόλιο 10^4 cfu/ml

Κατά την επιμόλυνση με 10^4 cfu/ml, δεν ανιχνεύτηκαν μετά από 1 ημέρα *E. coli* στο υπόστρωμα TBX και *P. aeruginosa* στο υπόστρωμα Cetrimide ενώ το *B. subtilis* σημείωσε πτώση του πληθυσμού του στο διάστημα $t=0$ έως $t=4$ ημέρες, και έπειτα σταθεροποίηση του στις 10 - 15 cfu/ml. Με τη μοριακή ανάλυση των δειγμάτων, δεν ανιχνεύτηκε μέσω PCR βακτηριακό DNA (16S rDNA).

3.3.3.2. Επίδραση του αντιηλιακού στην ανάπτυξη των *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*.

Από τα αποτελέσματα που προαναφέρθηκαν, διαπιστώθηκε ότι οι μικροοργανισμοί με τους οποίους επιμολύνθηκε το αντιηλιακό παρουσιάζουν δυσκολία να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν στο περιβάλλον του αντιηλιακού. Για το λόγο αυτό, σχεδιάστηκε ένα πείραμα στο οποίο ελέγχθηκε η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών σε κλειστές υγρές καλλιέργειες με προσθήκη 5, 10 και 20 % (w/v) αντιηλιακού.

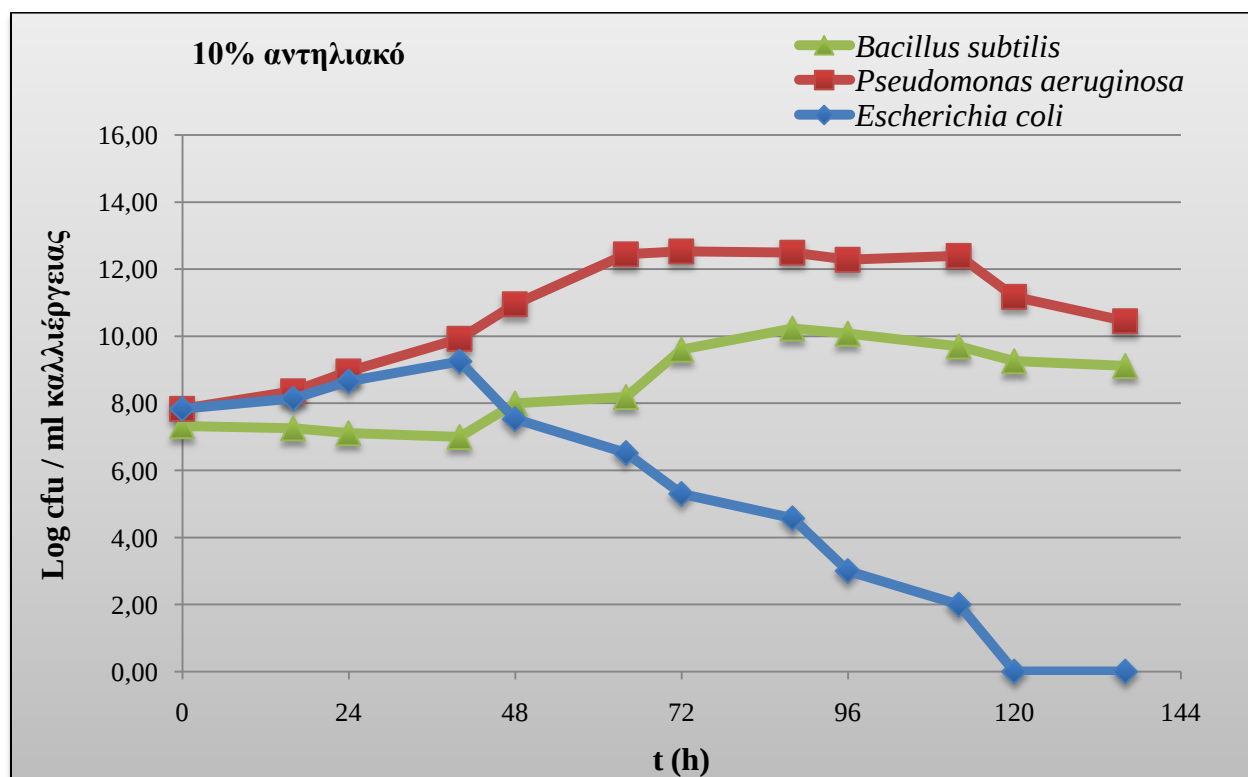
Στις καλλιέργειες με προσθήκη 20 % w/v αντιηλιακού παρατηρήθηκε ότι μόνο το *B. subtilis* επιβιώνει, ενώ τα *E. coli* και *P. aeruginosa* δεν ανιχνεύονται έπειτα από 38 ώρες. Ο πληθυσμός του *B. subtilis* σημειώνει μία αύξηση της τάξεως της μίας λογαριθμικής μονάδας σε χρόνο 38 ωρών, αλλά στη συνέχεια μειώνεται και σταθεροποιείται την 6^η μέρα στα 10^5 cfu/ml καλλιέργειας έχοντας υποστεί συνολική απώλεια της τάξεως του 99 % ήτοι δυο λογαριθμικές μονάδες. Στην Εικόνα 3.55 παριστάνονται γραφικά τα αποτελέσματα των κλειστών καλλιεργειών με την επίδραση 20 % w/v αντιηλιακού.



Εικόνα 3.55: Επίδραση αντιηλιακού σε ποσοστό 20% σε κλειστή καλλιέργεια των *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*

Στις καλλιέργειες με προσθήκη 10 % w/v αντιηλιακού παρατηρήθηκε ότι το *E. coli* παρουσίασε πτώση του πληθυσμού του που ξεκινάει από χρόνο $t = 38$ ώρες και καταλήγει στη μη ανίχνευση του πληθυσμού σε χρόνο $t = 120$ ώρες. Αντιθέτως, τα *B. subtilis* και *P. aeruginosa*, σημειώνουν αύξηση του πληθυσμού σε χρόνο $t = 38$ ώρες, η οποία στο πρώτο είναι μικρότερη και φτάνει μέχρι τις 3 λογαριθμικές μονάδες ενώ στο δεύτερο η αύξηση είναι πάνω από 4 λογαριθμικές μονάδες. Η αύξηση του πληθυσμού σταματάει στις 72 ώρες και στη συνέχεια υπάρχει ένα πλατό στο οποίο ο πληθυσμός παραμένει σταθερός. Σε χρόνο $t = 120$ ώρες παρατηρείται μείωση του

πληθυσμού. Στην Εικόνα 3.56 παριστάνονται γραφικά τα αποτελέσματα των κλειστών καλλιιεργειών με την επίδραση 10 % w/v αντιηλιακού.

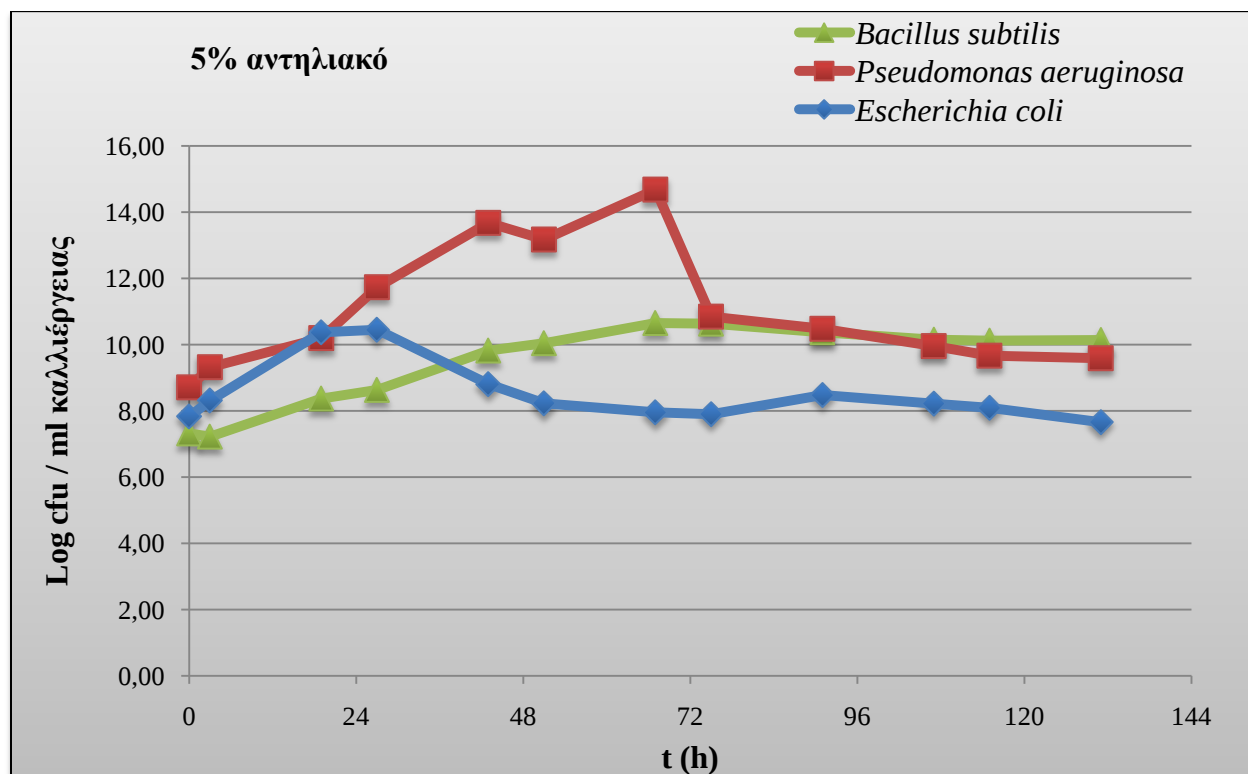


Εικόνα 3.56: Επίδραση αντιηλιακού σε ποσοστό 10% σε κλειστή καλλιέργεια των *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*

Στις καλλιέργειες με προσθήκη 5 % w/v αντιηλιακού παρατηρήθηκε ότι το *E. coli* παρουσίασε αύξηση του πληθυσμού κατά 2 λογαριθμικές μονάδες, στη συνέχεια μία μείωση του πληθυσμού και στο τέλος σε μία σταθεροποίηση του πληθυσμού στα αρχικά επίπεδα. Ο πληθυσμός του *P. aeruginosa* σημείωσε εντός 72 ωρών αύξηση κατά 7 λογαριθμικές μονάδες και στη συνέχεια παρουσίασε απότομη μείωση του πληθυσμού φτάνοντας στα αρχικά επίπεδα. Τέλος ο πληθυσμός του *B. subtilis*, παρουσίασε μία σταθερή αύξηση 3 λογαριθμικών μονάδων σε διάστημα 72 ωρών, ακολουθώντας μία περίοδο σταθεροποίησης και μικρής πτώσης. Στην Εικόνα 3.57 παριστάνονται γραφικά τα αποτελέσματα των κλειστών καλλιιεργειών με την επίδραση 5 % w/v αντιηλιακού.

Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι το *B. subtilis* ήταν ο μοναδικός μικροοργανισμός ο οποίος μπόρεσε να επιβιώσει παρουσία αντιηλιακού από ποσοστό 5 % έως 100 %. Η υψηλότερη συγκέντρωση αντιηλιακού παρεμπόδισε την αύξηση του πληθυσμού ενώ σε χαμηλότερες η ανάπτυξή του ήταν

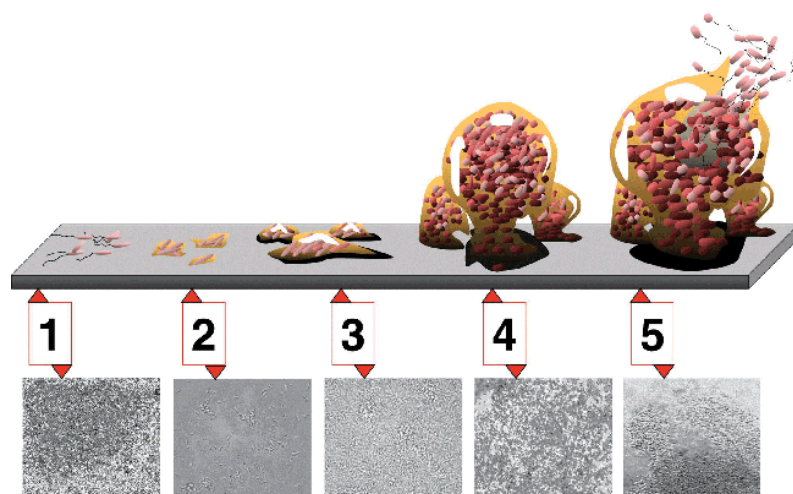
πιο αργή σε σχέση με τους άλλους δύο μικροοργανισμούς. Ο πληθυσμός όμως ακόμα και σε ποσοστό αντιηλιακού 100 % παρέμενε ανιχνεύσιμος. Το *E. coli*, διαπιστώθηκε ότι ήταν το πιο ευαίσθητο στα συστατικά του αντιηλιακού καθώς ποσοστό αντιηλιακού 10%, το καταστρέφει έπειτα από 6 ημέρες. Το *P. aeruginosa*, παρουσία 5 και 10 % αντιηλιακού αυξάνεται ενώ ποσοστό 20 % είναι τοξικό για αυτό και δεν ανιχνεύεται πληθυσμός τους σε διάστημα 1 ημέρας.



Εικόνα 3.57: Επίδραση αντιηλιακού σε ποσοστό 5% σε κλειστή καλλιέργεια των *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



(Monroe 2007)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Μικροβιακή ποικιλότητα στο Νερό

Μέχρι σήμερα λίγες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην έρευνα της μικροβιακής ποικιλότητας σε βιομηχανικές μονάδες παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας που προορίζεται για φαρμακευτική χρήση, για χρήση στη βιομηχανία των ημιαγωγών, για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων ή σε εργοστάσια ενέργειας (Bohus, και συν. 2010). Ειδικότερα, στις φαρμακοβιομηχανίες, η αναγκαιότητα για νερό υψηλής καθαρότητας είναι επιτακτική καθώς η οποιαδήποτε μόλυνση στο νερό είτε λόγω ύπαρξης μικροοργανισμών είτε λόγω μεταβολικών προϊόντων τους, μπορεί να μεταφερθεί στα τελικά προϊόντα επιδρώντας αρνητικά στην υγεία του καταναλωτή αλλά και στο ίδιο το προϊόν (Kawai, και συν. 2004).

Τα τελευταία 50 χρόνια ο μικροβιολογικός έλεγχος στις φαρμακοβιομηχανίες βασίζεται κυρίως στις μεθόδους καλλιέργειας, και παρ' όλο που η καταμέτρηση και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών παρέχουν σημαντικές πληροφορίες, ο σχηματισμός αποικιών εξαρτάται από

τους φυσικοχημικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη όπως το θρεπτικό υπόστρωμα, η θερμοκρασία επώασης κ.λ.π.. Επιπλέον, οι συμβατικές μέθοδοι αδυνατούν να ανιχνεύσουν τα βακτήρια VBNC, τα οποία πολλές φορές αφορούν παθογόνους μικροοργανισμούς (Kawai, και συν. 2002). Ένα ακόμη πρόβλημα στην αποτύπωση της μικροβιακής κοινότητας σε νερό υψηλής καθαρότητας είναι η ύπαρξη διηθητών βακτηρίων (υπερμικροβακτήρια, υπερμικροκύτταρα, βακτήρια σε κατάσταση ένδειας θρεπτικών - §1.6.4.) τα οποία διαπερνάνε τις μεμβράνες των 0,2 μm κατά το στάδιο της υπερδιήθησης ή κατά το στάδιο της αντίστροφης όσμωσης. Ειδικότερα κατά την αντίστροφη όσμωση είναι θεωρητικά αδύνατο να διέλθει κάτι διαμέσου της μεμβράνης αυτής (Bereschenko, και συν. 2008). Το περιβάλλον του νερού υψηλής καθαρότητας αποτελεί ένα υπερ-ολιγότροφο υδατικό οικοσύστημα που είναι ακραίο για την επιβίωση των οργανισμών και ο τρόπος προσαρμογής των μικροοργανισμών σε ένα τέτοιο ενδιαίτημα είναι ο σχηματισμός βιοϋμενίων πλούσιων σε θρεπτικά μεγαλύτερης συγκέντρωσης και στα οποία σχηματίζονται συνθήκες ετεροτροφικού περιβάλλοντος (Bereschenko, και συν. 2008, Bohus, και συν. 2010).

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε νερό (purified water) φαρμακοβιομηχανίας α) σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στις μονογραφίες της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας, για τη διερεύνηση παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών και για τον προσδιορισμό του ολικού ετερότροφου πληθυσμού και β) σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για την εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας με έμφαση στην ύπαρξη ολιγότροφων, ψυχρόφιλων και διηθητών βακτηρίων.

Επειδή σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας, οι τέσσερις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν θεωρούνται ως ανεξάρτητα γεγονότα που όμως μοιράζονται παραπλήσια μεθοδολογική προσέγγιση και σκοπό έχουν τη μέγιστη διερεύνηση του μικροβιακού πληθυσμού του ενδιαιτήματος. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με βάση το σκεπτικό της μικροβιακής ποικιλότητας, πως μπορεί αυτή να υποεκτιμηθεί από τα πρωτόκολλα που εφαρμόζονται στις βιομηχανίες και πως οι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται, έχουν καταφέρει να ξεπεράσουν θεωρητικά «αδιαπέραστους» φραγμούς (αντίστροφη όσμωση, υπερδιήθηση).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, θεωρητικά, στο δείγμα δε θα έπρεπε να εντοπίζονται μικροοργανισμοί καθώς το νερό έχει επεξεργαστεί μέσω μεμβρανών αντίστροφης όσμωσης οι οποίες σταματάνε από άλατα και μακρομόρια έως και μικροοργανισμούς. Η βιοσυσσώρευση πάνω στη μεμβράνη αντίστροφης όσμωσης μπορεί να προκαλέσει κάποια ασυνέχεια ή κάποια τοπική κατάρρευση της μεμβράνης και να οδηγήσει σε μικρή είσοδο μικροοργανισμών στο διήθημα όμως η

διατήρηση του νερού σε δεξαμενές με χαμηλή θερμοκρασία μειώνει τις μεταβολικές διεργασίες όσων μικροοργανισμών υπάρχουν στο στάδιο αυτό άρα εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό τους. Παρ' όλα αυτά μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη ψυχρόφιλων μικροοργανισμών. Ακόμη, η τελευταία μεμβράνη που υπάρχει στη διάταξη με διάμετρο πόρων 0,2 μm θα έπρεπε να δώσει ένα στείο διήθημα, καθώς το μέγεθος των βακτηρίων είναι μεγαλύτερο από 0,2 μm , με εξαίρεση τα γένη *Mycoplasma* και *Rickettsia*. Από τα αποτελέσματα όμως των δύο πρώτων δειγματοληψιών παρατηρήθηκε ότι εντοπίστηκαν κάποια βακτήρια. Προέκυψαν λοιπόν ερωτήματα μετά τα πρώτα αποτελέσματα σχετικά με το πώς οι μικροοργανισμοί κατάφεραν και διαπέρασαν αρχικά τη μεμβράνη της αντίστροφης όσμωσης και στη συνέχεια τη μεμβράνη με διάμετρο πόρων 0,2 μm η οποία βρισκόταν στο σημείο εξόδου του νερού πριν ακριβώς το σημείο δειγματοληψίας. Εξαιτίας αυτού του προβληματισμού και προς διερεύνησή του, σχεδιάστηκαν πειράματα τα οποία εφαρμόστηκαν στις δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011 και στα οποία μελετήθηκε α) η ύπαρξη βακτηρίων που διαπερνούν τις μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm και τα οποία συγκρατούνται σε μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,1 μm , β) η ύπαρξη ψυχρόφιλων μικροοργανισμών, γ) η ύπαρξη ολιγότροφων μικροοργανισμών, δ) η επίδραση του θείοθεικού νατρίου στην ανάκτηση των μικροοργανισμών και ε) η επίδραση της θερμοκρασίας του δείγματος πριν την κατεργασία του στην ανάκτηση των μικροοργανισμών.

4.1.1. Ποσοτική ανάλυση του μικροβιακού φορτίου στο νερό.

Με βάση τα πρωτόκολλα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Φαρμακοποιίας και τα βιβλιογραφικά δεδομένα, επιλέχθηκαν θρεπτικά υποστρώματα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη τόσο του ετερότροφου πληθυσμού όσο και του ολιγότροφου πληθυσμού. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν πλούσια θρεπτικά υποστρώματα όπως το TSA, το οποίο χρησιμοποιείται στο μικροβιολογικό έλεγχο φαρμάκων, καλλυντικών και πρώτων υλών, και το NA το οποίο αποτελεί ένα γενικού τύπου υπόστρωμα για την καταμέτρηση και την απομόνωση των μικροοργανισμών και χρησιμοποιείται ευρέως. Η διαφορά των δύο αυτών θρεπτικών υποστρωμάτων έγκειται α) στη χρήση τους καθώς το TSA χρησιμοποιείται σε πιο απαιτητικούς μικροοργανισμούς (σε θρεπτικά συστατικά) και β) στη ποσότητα πηγής αζώτου και άνθρακα, καθώς το NA έχει 8 g/1 l C-N ενώ το TSA έχει 20 g/1 l C-N (Zimbardo, και συν. 2009). Επιπλέον, με σκοπό την απομόνωση και την

καταμέτρηση ολιγότροφων μικροοργανισμών, χρησιμοποιήθηκαν φτωχά θρεπτικά υποστρώματα όπως α) το R2A το οποίο ενδείκνυται για χρήση κατά τον έλεγχο πόσιμου νερού καθώς περιέχει πυροσταφυλικό νάτριο και άμυλο που ευνοούν την ανάκτηση καταπονημένων κυττάρων (Reasoner και Geldreich 1985), β) τα 1/2 NA, 1/10 NA, 1/2 R2A και 1/10 R2A, τα οποία αποτελούν αραιώσεις των υποστρωμάτων NA και R2A (Silbaq 2009) και γ) το WA, το οποίο ως πηγή θρεπτικών συστατικών έχει νερό βρύσης με άγνωστη αλλά χαμηλή συγκέντρωση C και N και το οποίο προσομοιάζει το ενδιαίτημα στο οποίο επιβίωναν οι μικροοργανισμοί (Wang, και συν. 2009).

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού του μικροβιακού φορτίου έδειξαν ότι αυτό βρισκόταν εντός των ορίων που ορίζονται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Φαρμακοποιίας και στις τέσσερις δειγματοληψίες με πληθυσμούς που κυμαινόντουσαν από 17 cfu/100 ml (Ιούλιος 2010) έως 525 cfu/100 ml (Ιανουάριος 2010) (επώαση 37 °C - TSA), τιμές πολύ χαμηλότερες από το όριο των 10⁴ cfu/100 ml. Με χρήση του υποστρώματος NA, το μικροβιακό φορτίο που ανιχνεύτηκε ήταν αυξημένο σε σχέση με αυτό που ανακτήθηκε στο υπόστρωμα TSA, σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμα και 100 % (Ιανουάριος 2010) χωρίς όμως να ξεπερνάει το όριο της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Φαρμακοποιίας. Τόσο στο TSA όσο και στο NA, παρατηρήθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις στους πληθυσμούς στις τέσσερις δειγματοληψίες το οποίο μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική θερμοκρασία που διηθήθηκε το δείγμα (Εικόνα 3.18) και όχι τόσο στο διάστημα που απείχε η δειγματοληψία από την αλλαγή του ηθμού των 0,2 μm. Όσο πιο χαμηλή ήταν η θερμοκρασία, τόσο μικρότερο το φορτίο που ανακτήθηκε με την κλασσική μεθοδολογία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Φαρμακοποιίας (διήθηση σε μεμβράνη 0,2 μm, υπόστρωμα TSA και επώαση 37 °C και 22 °C) ενώ αύξηση στη θερμοκρασία διήθησης του νερού κατά 4,5 μονάδες (Ιανουάριος 2010) οδήγησε σε αύξηση του ανακτημένου φορτίου.

Στη μελέτη επίδρασης των διαφορετικών παραγόντων στην ανάκτηση του πληθυσμού (§ 3.1.2.9) διαπιστώθηκε ότι η χρήση φτωχών θρεπτικών υποστρωμάτων, η διήθηση σε μεμβράνες 0,1 μm, η επώαση στους 10 °C, η διήθηση του δείγματος σε μεγαλύτερη θερμοκρασία και η επεξεργασία με θειοθειικό νάτριο, ευνοούν την ανάκτηση υψηλότερου μικροβιακού πληθυσμού κατά περίπτωση και για το λόγο αυτό χρήζουν περεταίρω διερεύνησης.

Το σημαντικότερο που διαπιστώθηκε στην εργασία αυτή είναι ότι η χρήση φτωχών θρεπτικών υποστρωμάτων οδήγησε στην ανάκτηση υψηλότερου μικροβιακού φορτίου τόσο τον Ιούλιο 2010 όσο και τον Φεβρουάριο 2011 (Εικόνα 3.15, 3.17) και όπως θα αναφερθεί παρακάτω, η

μικροβιακή κοινότητα η οποία αναπτύχθηκε στο υπόστρωμα WA ήταν διαφορετικής σύστασης σε σχέση με αυτήν που αναπτύχθηκε στα πλούσια θρεπτικά υποστρώματα. Μεγαλύτερη ανάκτηση παρατηρήθηκε στα θρεπτικά υποστρώματα που είχαν βάση το NA και στο WA. Το R2A και οι αραιώσεις του δεν έδειξαν καλύτερη ανάκτηση των μικροοργανισμών παρ' όλο που περιέχει πυροσταφυλικό νάτριο που ευνοεί τα καταπονημένα κύτταρα.

Σημαντικό επίσης ήταν, το γεγονός ότι μικροοργανισμοί ανιχνεύθηκαν και απομονώθηκαν στις μεμβράνες των 0,1 μm σε τιμές πολύ υψηλότερες σε σχέση με τον πληθυσμό που ανιχνεύτηκε στις μεμβράνες των 0,2 μm αλλά μόνο κατά τη δειγματοληψία του Ιουλίου 2010. Στη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011, οι μέθοδοι καλλιέργειας σε υποστρώματα απέτυχαν να ανακτήσουν μικροοργανισμούς στις μεμβράνες των 0,1 μm, όπως ήταν το αναμενόμενο, όμως το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της μοριακής ανίχνευσης μέσω DGGE στην οποία ανιχνεύθηκαν 8-9 ριβότυποι στα αντίστοιχα δείγματα (§3.1.6.2.). Οι ίδιοι ριβότυποι εντοπίστηκαν και στα δείγματα που διηθήθηκαν σε μεμβράνες των 0,2 μm, υποδηλώνοντας ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, οι μικροοργανισμοί μπορούν να διέλθουν των μεμβρανών με διάμετρο πόρων 0,2 μm. Πρέπει να τονιστεί, στο σημείο αυτό, ότι τα δείγματα νερού, είχαν ήδη διηθηθεί από τη μεμβράνη με διάμετρο πόρων 0,2 μm στη βιομηχανία και οι μικροοργανισμοί που είχαν εντοπιστεί στα υποστρώματα είχαν ήδη διέλθει μέσω αυτής.

Ένα ακόμη στοιχείο που ανέδειξε η εργασία αυτή, είναι ο ψυχρόφιλος πληθυσμός που ανιχνεύτηκε τόσο στα πλούσια θρεπτικά υποστρώματα όσο και στα oligότροφα. Αν και μικρότερος σε σύγκριση με τον μεσόφιλο πληθυσμό, η ύπαρξή του υποδεικνύει την ικανότητα των μικροοργανισμών να επιβιώνουν αλλά και να αναπτύσσονται στις χαμηλές θερμοκρασίες που επικρατούν στη δεξαμενή όπου αποθηκεύεται το νερό της βιομηχανίας. Ποιοτικώς, ο πληθυσμός ήταν παρόμοιος με το μεσόφιλο πληθυσμό όπως θα αναφερθεί παρακάτω, ενώ το μικροβιακό φορτίο στα oligότροφα υποστρώματα ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με εκείνα των πλούσιων θρεπτικών υποστρωμάτων.

Η επίδραση της θερμοκρασίας του δείγματος κατά τη διήθηση, φάνηκε να επηρεάζει το μικροβιακό φορτίο που ανιχνεύεται. Σε υψηλότερη θερμοκρασία (15 °C) ο πληθυσμός που ανακτήθηκε στα 0,2 μm αυξήθηκε υποδηλώνοντας ότι οι μικροοργανισμοί με σύντομη επώαση σε θερμοκρασία δωματίου μπόρεσαν να βγουν από την κατάσταση θερμοκρασιακής καταπόνησης στην οποία βρίσκονταν και να γίνουν καλλιεργήσιμα. Εργασίες με βακτήρια των

γενών *Ralstonia*, *Vibrio*, *Aeromonas* έχουν δείξει ότι κύτταρα καταπονημένα λόγω επίδρασης χαμηλής θερμοκρασίας μπόρεσαν να γίνουν ξανά καλλιεργήσιμα και να αναβιωθούν όταν εκτέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για μικρό χρονικό διάστημα. (Imazaki και Nakaho 2009).

Τέλος, η κατεργασία των δειγμάτων με θειοθειικό νάτριο, έδωσε διφορούμενα αποτελέσματα. Ενώ στα δείγματα που διηθήθηκαν σε μεμβράνες των 0,2 μm ευνοήθηκε η ανάκτηση υψηλότερου μικροβιακού φορτίου, στα δείγματα που αποτελούσαν το διήθημα από τις μεμβράνες των 0,2 μm (Εικόνα 3.15), το αποτέλεσμα ήταν αντίθετο. Αυτό μπορεί να οφειλόταν στο μεγαλύτερο χρονικό διάστημα που παρέμεινε το θειοθειικό νάτριο στο δείγμα και στην πιθανή τοξική δράση που μπορεί να είχε μετά από κάποιο σημείο, καθώς η διήθηση σε μεμβράνες των 0,1 μm είναι πιο αργή σε σχέση με τη διήθηση σε μεμβράνες των 0,2 μm.

Συμπερασματικά, η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού στο νερό υψηλής καθαρότητας, φάνηκε να υποεκτιμά το μικροβιακό φορτίο κυρίως λόγω μη ανίχνευσης του ολιγότροφου πληθυσμού. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί και στην έρευνα των Kawai και συν. (2002), όπου διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, ανίχνευσαν τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά διαφορετικούς πληθυσμούς. Επιπλέον ο ποσοτικός προσδιορισμός του μικροβιακού φορτίου βασιζόμενος μόνο σε τεχνικές καλλιέργειας έχει βρεθεί ότι υποεκτιμά σημαντικά τον πληθυσμό σε σχέση με τεχνικές μικροσκοπίας φθορισμού που εκτός των άλλων μπορούν να διακρίνουν τόσο τον ολικό αριθμό κυττάρων όσο και τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων (DAPI/CTC χρώση). Σε μελέτη των Kulakov και συνεργατών (2002) σε νερό υψηλής καθαρότητας, οι πληθυσμοί που ανιχνεύθηκαν με τεχνικές καλλιέργειας ήταν της τάξης 1 cfu/ml ενώ με τη μικροσκοπία φθορισμού προσδιορίστηκε ο μεταβολικά ενεργός πληθυσμός στα 20 κύτταρα/ml και ο συνολικός αριθμός κυττάρων στα 50 κύτταρα/ml, υποδεικνύοντας την υστέρηση των συμβατικών τεχνικών στην ανίχνευση του πραγματικού μικροβιακού φορτίου. Διαπιστώνεται δηλαδή η λεπτή ισορροπία που υπάρχει ανάμεσα στους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στην κατάσταση VBNC και σε αυτούς που μπορούν να καλλιεργηθούν άμεσα. Με μικρές αλλαγές όπως π.χ. αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος πριν τη διήθηση, παρατηρήθηκε ότι η ισορροπία αυτή αλλάζει, χωρίς αυτή η αλλαγή να οφείλεται σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων αλλά κυρίως στην έξοδο τους από την κατάσταση VBNC, η οποία συνεπάγεται πιθανή αύξηση του κυτταρικού όγκου και άρα συγκράτηση σε μεμβράνες με μεγαλύτερη διάμετρο πόρων ή πιθανή ενεργοποίηση του μεταβολισμού των κυττάρων. Η αύξηση που παρατηρήθηκε στον ανακτημένο πληθυσμό π.χ. με

χρήση των φτωχών υποστρωμάτων, οφειλόταν στη μικρότερη οσμωτική καταπόνηση που υφίστανται τα κύτταρα σε ένα τέτοιο υπόστρωμα σε σύγκριση με τα πλούσια. Το φαινόμενο αυτό δε, φάνηκε και στη χρήση του NA το οποίο αν και πλούσιο θρεπτικό, συγκριτικά με το TSA παρέχει στους μικροοργανισμούς τη μισή ποσότητα συστατικών, άρα οι μικροοργανισμοί καταπονούνται λιγότερο.

4.1.2. Ποιοτική ανάλυση του μικροβιακού φορτίου στο νερό.

Η ποιοτική ανάλυση των απομονωμένων στελεχών, έδωσε πολύτιμα αποτελέσματα για την εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας στο νερό υψηλής καθαρότητας που μελετήθηκε. Τα βακτήρια που απομονώθηκαν στις τέσσερις δειγματοληψίες ανήκουν σε τρία φύλα, Firmicutes, Actinobacteria και Proteobacteria και μπορούν να διαχωριστούν σε δύο βασικές ομάδες: α) στον ολιγότροφο και β) στον ετερότροφο πληθυσμό ο οποίος διακρίνεται στον μεσόφιλο και στον ψυχρόφιλο πληθυσμό. Στην παρούσα εργασία, ο ολιγότροφος πληθυσμός φαίνεται να αποτελεί τη βασική δομή της μικροβιακής κοινότητας στο νερό υψηλής καθαρότητας, ενώ διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός σημαντικού αριθμητικά πληθυσμού που αποτελούνταν κυρίως από στελέχη του γένους *Bacillus* ο οποίος όμως δεν έχει βρεθεί να αποτελεί κυρίαρχο πληθυσμό σε τέτοια ενδιαιτήματα.

Σε σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας εμφάνισαν κοινά στοιχεία καθώς ο ολιγότροφος πληθυσμός που εντοπίστηκε παρουσίασε παρόμοια δομή με αυτή που περιγράφεται σε έρευνες σε παρόμοιο ενδιαιτήμα. Κυρίαρχοι μικροοργανισμοί ήταν το φύλο Proteobacteria και συγκεκριμένα η ομάδα των α -Proteobacteria με τα γένη *Sphingomonas*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium* να αποτελούν τα επικρατή γένη ενώ τα γένη *Methylobacterium* και *Ralstonia* (β -Proteobacteria) συμμετείχαν σε μικρότερο βαθμό στη δομή της κοινότητας η οποία διέφερε σε σχέση με τον μεσόφιλο και τον ψυχρόφιλο ετερότροφο πληθυσμό. Είναι πλέον γνωστό ότι σε συστήματα παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας, υπάρχει ένας ενδογενής πληθυσμός ο οποίος σχηματίζει βιοϋμένια στις επιφάνειες των σωληνώσεων και στις επιφάνειες των φίλτρων που χρησιμοποιούνται ενώ συνήθως οι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται αποτελούν τα πλαγκτονικά βακτήρια που έχουν αποχωριστεί από το βιοϋμένιο (Bohus, και συν. 2010). Αν και το νερό που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία αποτελεί ένα μέσο που παρέχει μικρή συγκέντρωση θρεπτικών υποστρωμάτων, εν

τούτους μικροοργανισμοί εντοπίστηκαν. Τα περισσότερα βακτήρια που έχουν απομονωθεί σε νερό υψηλής καθαρότητας που έχει προκύψει είτε από αντίστροφη όσμωση είτε από υπερδιήθηση ανήκουν στα Gram αρνητικά βακτήρια και στο φύλο Proteobacteria (Kulakov, και συν. 2002). Στην έρευνα των Kulakov και συν. (2002) απομονώθηκαν, σε έξι διαφορετικές βιομηχανικές μονάδες παραγωγής υπεκάθαρου νερού, τα βακτήρια *Ralstonia pickettii*, *Bradyrhizobium* sp., *Burkholderia* sp., *Flavobacterium* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Bacillus* sp., *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas saccharophilia* και *Sphingomonas* sp.. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στα γένη *Ralstonia* και *Bradyrhizobium* τα οποία σε μεγάλο ποσοστό διέθεταν γονίδια *nif H* και μπορούσαν να χρησιμοποιούν το N για να ανάγουν το O₂ και το CO₂. Η παρουσία του γένους *Bradyrhizobium* έχει διαπιστωθεί και σε κεκαθαρμένο νερό προοριζόμενο για φαρμακευτική χρήση από τους Kawai και συν. (2002). Στην παρούσα εργασία, διαπιστώθηκε επίσης η ύπαρξη υψηλού πληθυσμού του γένους *Bradyrhizobium* και μάλιστα παρουσίαζε ομοιότητα με δυο στελέχη, τα *B. japonicum* και *B. pachyrhizi*. Επιπλέον σε έρευνα των Bohus, και συν. (2010) εκτός των παραπάνω γενών απομονώθηκαν και τα γένη *Delfia*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Rhodoferrax*, *Methylobacterium*, *Alcaligenes* κ.α. Από αυτά τα γένη, το *Sphingomonas*, το οποίο ανιχνεύτηκε και στην παρούσα εργασία θεωρείται ως ο οργανισμός που ευθύνεται για τη δημιουργία βιοϋμενίων στις επιφάνειες στις μονάδες παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας (Ivnitsky, και συν. 2007, Bereschenko, και συν. 2010, Gao, και συν. 2011) ενώ στη συνέχεια προσκολλώνται τα β-Proteobacteria (Εικόνα 1.14). Διαπιστώθηκε επίσης, η διαφορετική κατανομή των μικροοργανισμών ανάλογα με τη θερμοκρασία επώασης. Στους 37 °C επικρατούσαν τα γένη *Blastobacter* sp. και *Bradyrhizobium* sp., ενώ στους 22 °C παρατηρήθηκε μία μεταβολή με αύξηση του γένους *Sphingomonas* και του γένους *Blastobacter* και μείωση του *Bradyrhizobium* sp.. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η επικράτηση, στους 10 °C, κυρίως του *Sphingomonas* sp. και λιγότερο του *Blastobacter* sp.. καθώς θα πρέπει να υπάρξει συνεκτίμηση του ευρήματος αυτού με την ύπαρξη χαμηλής θερμοκρασίας στο νερό της φαρμακοβιομηχανίας και του γεγονότος ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός θεωρείται υπεύθυνος για τη δημιουργία βιοϋμενίων. Ταυτόχρονη παρουσία των 3 μικροοργανισμών διαπιστώθηκε σε θερμοκρασία επώασης 22 °C ενώ τα στελέχη του γένους *Methylobacterium* και *Ralstonia*, παρατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 37 και 22 °C και τα στελέχη του γένους *Bacillus*, απομονώθηκαν μεμονωμένα στις διάφορες συνθήκες επώασης.

Γενικότερα, η ποικιλότητα στον oligότροφο πληθυσμό ήταν αυξημένη με τα 9 είδη που απομονώθηκαν να ανήκουν σε 7 διαφορετικά γένη.

Όσον αφορά στον ετερότροφο πληθυσμό, μεγαλύτερη ποικιλότητα σε επίπεδο είδους παρατηρήθηκε στον μεσόφιλο ετερότροφο πληθυσμό όπου ανιχνεύτηκαν 16 διαφορετικά είδη που ανήκαν στα γένη *Bacillus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter* και *Ralstonia*. Σε όλες τις δειγματοληψίες κυρίαρχοι πληθυσμοί ήταν στελέχη με ομοιότητα με τα είδη του γένους *Bacillus* και συγκεκριμένα τα είδη *B. aquimaris*, *B. cibi*, *B. barbaricus* (*B. arsenicus* / *B. nanhaiensis*) και *B. niabensis*. Μικρότερη συμμετοχή στη μικροβιακή κοινότητα είχαν τα στελέχη που παρουσίασαν ομοιότητα με τα είδη *B. korlensis*, *B. jeotgali*, *B. arybhatai*, *B. safensis* και *B. boronophilus*. Η επικράτηση του γένους *Bacillus* υποδηλώνει την επικράτηση μικροοργανισμών με ικανότητα σχηματισμού ανθεκτικών μορφών (ενδοσπόρια) και ικανότητα επιβίωσης στο ακραίο περιβάλλον του νερού υψηλής καθαρότητας. Επίσης παρατηρήθηκε στη δειγματοληψία του Ιουλίου 2010 ότι τα στελέχη με ομοιότητα στο *B. barbaricus* είχαν την τάση υπό συγκεκριμένες συνθήκες να εντοπίζονται στις μεμβράνες των 0,1 μm ενώ αυτά με ομοιότητα στο *B. niabensis*, ανιχνεύτηκαν στις μεμβράνες των 0,2 μm. Η παρουσία υψηλού αριθμού στελεχών του γένους *Bacillus* μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι περισσότερες μελέτες για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας σε ένα τέτοιο oligότροφο ενδιαίτημα πραγματοποιούνται με βάση μοριακές τεχνικές όπως κλωνοποίηση ή DGGE, και σε μικρότερο βαθμό με τεχνικές καλλιέργειας που δεν ευνοούν την ανάπτυξη των oligότροφων βακτηρίων αλλά ευνοούν την απομόνωση μικροοργανισμών σε πλούσια θρεπτικά υποστρώματα.

Τα είδη *Rhodococcus ruber* και *Acinetobacter johnsonii*, εντοπίστηκαν μόνο στη δειγματοληψία του Ιανουαρίου 2010, ενώ το γένος *Microbacterium* ανιχνεύτηκε μόνο τον Μάρτιο 2010. Το γένος *Kocuria* ανιχνεύτηκε στις δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011, ενώ στελέχη που παρουσίασαν ομοιότητα με τα είδη *Brevibacillus agri* και *Ralstonia insidiosa* εντοπίστηκαν μόνο στις δειγματοληψίες Ιουλίου 2010 και Φεβρουαρίου 2011 αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση παρατηρήθηκε ότι ο μεσόφιλος ετερότροφος πληθυσμός αντιπροσωπεύεται από το φύλο Firmicutes και δευτερευόντως από το φύλο Actinobacteria και το φύλο Proteobacteria.

Αναφορικά με τον ψυχρόφιλο ετερότροφο πληθυσμό, αποτελούνταν κυρίως από στελέχη που παρουσίασαν ομοιότητα με τα είδη *B. cibi*, *Kocuria* sp. και *Paracoccus marcusii*. Ειδικότερα, μόνο στον ψυχρόφιλο ετερότροφο πληθυσμό απομονώθηκαν στελέχη του γένους *Burkholderia* και το γένους *Paracoccus*, το οποίο ανιχνεύτηκε μόνο στις μεμβράνες των 0,1 μm και όχι στα

0,2 μm . Η ποικιλότητα ήταν μικρότερη σε σύγκριση με τον μεσόφιλο πληθυσμό, τόσο σε επίπεδο είδους (10 διαφορετικά είδη) όσο και σε επίπεδο γένους (5 διαφορετικά γένη).

Ένα ακόμη θέμα, που διερευνήθηκε στην παρούσα εργασία, ήταν η ικανότητα ορισμένων βακτηρίων να διέρχονται από τις μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm . Πολλά από τα γένη που απομονώθηκαν στην παρούσα εργασία έχουν παρατηρηθεί να διαπερνάνε τις μεμβράνες των 0,2 μm . Στη μελέτη του Silbaq (2009) βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Kocuria* απομονώθηκαν από πόσιμο νερό και διέθεταν την ικανότητα να διαπερνούν τους ηθμούς των 0,2 μm και σε κάποιες περιπτώσεις των 0,1 μm ενώ στην μελέτη των Miteva και Brenchley (2005) απομονώθηκαν τα γένη *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Methylobacterium*, *Bacillus* και *Brevibacillus* με ικανότητα να σχηματίζουν υπερμικροκύτταρα και να διαπερνάνε τους ηθμούς με διάμετρο πόρων 0,2 μm . Το *Sphingomonas* έχει επίσης απομονωθεί από διήθημα νερού διαμέσου μεμβράνης 0,2 μm (Haller, και συν. 1999).

Η χρήση των τεχνικών BOX-PCR και 16S rRNA PCR για την ποιοτική ανάλυση, διαπιστώθηκε ότι δεν ήταν η πιο αποτελεσματική για τη διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας καθώς η τεχνική BOX-PCR διαχώρισε τα απομονωμένα βακτήρια σε επίπεδο στελέχους ενώ η αλληλούχιση του συντηρημένου γονιδίου 16S rRNA ταξινομήσε τα βακτήρια σε επίπεδο γένους και είδους. Διαπιστώθηκε ότι πολλά στελέχη που άνηκαν στο ίδιο είδος, σύμφωνα με την αλληλούχιση του 16S DNA και είχαν 100 % ομοιότητα στις αλληλουχίες τους, παρουσίαζαν φαινοτυπικές διαφορές ενώ τα στελέχη αυτά άνηκαν κυρίως στο γένος *Bacillus* όπως τα είδη *B. barbaricus* και *B. cibi*. Η τεχνική της BOX-PCR διαθέτει υψηλή διακριτικότητα ανάμεσα στο επίπεδο του είδους και του στελέχους και θεωρείται μία αξιόπιστη τεχνική για τη διερεύνηση της μικροποικιλότητας καθώς προσφέρει τη δυνατότητα διάκρισης των απομονωόμενων μικροοργανισμών σε ενδοειδικό επίπεδο με βάση τον γονότυπό τους και όχι μόνο το 16S rRNA γονίδιο (Schloter, και συν. 2000, Ishii και Sadowsky 2009). Η υψηλή διακριτικότητα της τεχνικής αυτής την καθιστά μία ιδανική τεχνική για το γρήγορο καθορισμό της ταξινομικής ποικιλότητας και της φυλογενετικής δομής του βακτηριακού πληθυσμού καθώς μπορεί να διακρίνει της γονοτυπικές, φυλογενετικές και ταξινομικές σχέσεις των οργανισμών (Rademaker, και συν. 2000, Vaz-Moreira, και συν. 2012). Παρ' όλα αυτά στην παρούσα εργασία, ο διαχωρισμός σε επίπεδο στελέχους από την τεχνική της BOX-PCR δεν ήταν επιθυμητός καθώς σκοπός της εργασίας ήταν η διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας σε επίπεδο γένους-είδους και η ανάλυση της δομής της μικροβιακής κοινότητας και ο πιθανός ρόλος των κυριάρχων

μικροοργανισμών. Πιο κατάλληλες τεχνικές για τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας είναι αυτές που βασίζονται στο 16S rRNA γονίδιο όπως οι τεχνικές RFLP, DGGE/TGGE, ARDRA και η κλωνοποίηση (Wintzingerode, και συν. 1997, Adiguzel, και συν. 2009, Binde, και συν. 2009, Jin, και συν. 2011).

Όπως έχει αναφερθεί, η ανάλυση του μικροβιακού φορτίου με βάση τις κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές έχει διαπιστωθεί ότι υποεκτιμά τη μικροβιακή ποικιλότητα κυρίως επειδή οι μικροοργανισμοί είναι καταπονημένοι και δε μπορούν να αναπτυχθούν στα θρεπτικά υποστρώματα. Οι μοριακές τεχνικές εν αντιθέσει, δεν έχουν αυτό τον περιορισμό. Για τη μελέτη ολιγότροφων ενδαιτημάτων όπως αυτό του νερού υψηλής καθαρότητας, χρησιμοποιείται ευρέως η τεχνική της DGGE. Στην παρούσα εργασία, η τεχνική χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη και τη σύγκριση της ποικιλότητας στις 4 δειγματοληψίες. Η μεγαλύτερη ποικιλότητα παρατηρήθηκε στη δειγματοληψία Ιανουαρίου 2010, με 28 διαφορετικούς ριβότυπους, το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των καλλιεργειών στα οποία παρατηρήθηκε μικρότερη ποικιλότητα σε επίπεδο είδους με 8 διαφορετικά είδη να αναγνωρίζονται. Θα πρέπει να τονιστεί ότι κάθε ριβότυπος δεν αντιπροσωπεύει πάντοτε διαφορετικό είδος καθώς το τμήμα DNA που αναλύεται είναι πολύ μικρό και μικρές διαφορές ανάλογα με την κλίση του πηκτώματος μπορεί να μη διακριθούν. Τον Μάρτιο 2010 και τον Ιούλιο 2010 παρατηρήθηκαν 20 ριβότυποι, ποικιλότητα αυξημένη σε σχέση με τα 6 και 8 είδη που ανιχνεύτηκαν με τις κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές. Στη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011, αν και μέσω της DGGE εντοπίστηκαν 14-16 ριβότυποι, η ποικιλότητα ήταν παραπλήσια με αυτήν που ανιχνεύτηκε με χρήση των θρεπτικών υποστρωμάτων (11 είδη αναγνωρίστηκαν). Το πιο σημαντικό εύρημα, κατά την εφαρμογή της DGGE, ήταν η ανίχνευση ριβοτύπων στα δείγματα που αποτελούσαν το διήθημα από τις μεμβράνες των 0,2 μm . Τόσο Ιούλιο 2010 όσο και τον Φεβρουάριο 2011 εντοπίστηκαν ζώνες στο πήκτωμα της DGGE και μάλιστα στην ίδια θέση με τις ζώνες των δειγμάτων που είχαν διηθηθεί σε μεμβράνες 0,2 μm . Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει την παρουσία διηθητών βακτηρίων τα οποία κάτω από άγνωστες συνθήκες μπορούν να μεταβάλλουν τον κυτταρικό τους όγκο σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα και να συγκρατούνται στις μεμβράνες με μεγαλύτερη διάμετρο πόρων. Επίσης, η ύπαρξη περισσότερων ριβοτύπων από τα απομονωθέντα και ταυτοποιηθέντα είδη μέσω των κλασσικών μικροβιολογικών τεχνικών, υποδηλώνει, την υπεροχή των μοριακών τεχνικών στην καταγραφή της μικροβιακής ποικιλότητας, παρ' όλο τους όποιους περιορισμούς μπορούν να διαθέτουν (§1.7).

Ένα βασικό μειονέκτημα που προέκυψε κατά την εφαρμογή της τεχνικής DGGE, ήταν η παρουσία προϊόντος PCR στον αρνητικό μάρτυρα δηλαδή στην αντίδραση στην οποία δεν έχει προστεθεί DNA. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάστηκε πιο έντονο κατά την ένθετη PCR, στην οποία αν και ο αρνητικός μάρτυρας της πρώτης αντίδρασης PCR δεν είχε κάποια επιμόλυνση, με ενίσχυσή του στη δεύτερη αντίδραση, προέκυπτε προϊόν PCR του αναμενόμενου μεγέθους αλλά και ίδιας έντασης με αυτή των δειγμάτων, καθιστώντας τη χρήση της ένθετης PCR απαγορευτική. Η παρουσία προϊόντων PCR στους αρνητικούς μάρτυρες έχει διαπιστωθεί ότι προκύπτει από επιμόλυνση του ενζύμου Taq πολυμεράση με βακτηριακό DNA (Hughes, και συν. 1994, Wintzingerode, και συν. 1997) το οποίο ενισχύεται με χρήση εκκινητών γενικής ευρύτητας για το 16S rRNA γονίδιο. Καμία μέθοδος καθαρισμού του ενζύμου Taq πολυμεράση δεν εξασφαλίζει πλήρη απουσία βακτηριακού DNA και συγκεκριμένα μικρές ποσότητες βακτηριακού DNA εντοπίζονται σε τιμές 10-10.000 αντίγραφα / Unit ενζύμου (Spangler, και συν. 2009). Οι περισσότερες προσπάθειες για απομάκρυνση ή καταστροφή του DNA από το ένζυμο με φυσικούς, χημικού ή ενζυμικούς μηχανισμούς (π.χ. με UV ακτινοβολία, με περιοριστικά ένζυμα) δεν έχουν αποδώσει καθώς υπάρχει μείωση της αποτελεσματικότητας του ενζύμου ενώ μόνο οι προσεγγίσεις με χρήση DNAάσης I ή μονοαζίδιο του αιθιδίου έχουν αποδώσει κάποια θετικά αποτελέσματα (Harris και Hartley 2003, Muhl, και συν. 2010, Philipp, και συν. 2010). Το πρόβλημα της μόλυνσης του ενζύμου Taq πολυμεράση επηρεάζει εντονότερα τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR όταν α) το DNA-στόχος βρίσκεται σε μικρή ποσότητα και β) όταν η αντίδραση δεν είναι ειδική (π.χ. ενίσχυση του 16S rDNA) και γ) όταν οι συνθήκες της αντίδρασης είναι βέλτιστες (Philipp, και συν. 2010). Για την αποφυγή παρουσίας ζωνών στους αρνητικούς μάρτυρες χρησιμοποιήθηκε ένζυμο πολύ υψηλής καθαρότητας (Kapa 2G Fast DNA polymerase) και δεν εφαρμόστηκε η προσέγγιση της ένθετης PCR καθώς το συγκεκριμένο ένζυμο είχε καλύτερη απόδοση σε σύγκριση με τη “συμβατική” πολυμεράση.

4.1.3. Παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό

Εκτός της μικροβιακής ποικιλότητας που μελετήθηκε στην εργασία αυτή, πραγματοποιήθηκε μικροβιολογικός έλεγχος για την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών. Κανένας από τους παθογόνους μικροοργανισμούς *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Enterococcus* sp., *Candida albicans* και κολίμορφα βακτήρια, δεν

ανιχνεύτηκε ή δεν επιβεβαιώθηκε. Ειδικότερα για τα κολίμορφα βακτήρια, την *E. coli* και την *P. aeruginosa*, τα μηδενικά ποσοστά επιβεβαίωσης στις μοριακές τεχνικές είναι πιθανό να οφείλονται στη μειωμένη ειδικότητα ορισμένων εκλεκτικών υποστρωμάτων και στη ικανότητα κάποιων ειδών του γένους *Bacillus* να αναπτύσσονται π.χ σε πηγή άνθρακα λακτόζη που περιέχεται στο εκλεκτικό υπόστρωμα για την ανίχνευση της *E. coli* και να δίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

4.2. Μικροβιακή Ανάλυση στις Πρώτες ύλες

Μέχρι σήμερα, η έρευνα γύρω από τους μικροοργανισμούς που εντοπίζονται στις πρώτες ύλες των φαρμακευτικών προϊόντων, περιορίζεται στην ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών με κλασσικές μικροβιολογικές τεχνικές και εφαρμογή μοριακών τεχνικών για ταχύτερα αποτελέσματα και όχι στη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας. Οι λόγοι αφορούν τόσο στον αριθμό των πρώτων υλών που υπάρχουν διαθέσιμες όσο και το εύρος στη σύστασή τους, που κάνει το εγχείρημα της μελέτης της μικροβιακής ποικιλότητας δύσκολο καθώς οι βιβλιογραφικές αναφορές είναι ελάχιστες ή μηδενικές. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η μικροβιακή ποικιλότητα σε 13 πρώτες ύλες με έμφαση στους νηματοειδής μύκητες που απομονώθηκαν και λιγότερο στις βακτηριακές απομονώσεις.

4.2.1. Ανάλυση πληθυσμού βακτηρίων

Η μικροβιακή ανάλυση στις πρώτες ύλες σύμφωνα με τις κλασσικές μικροβιολογικές μεθόδους, έδειξε ότι αυτές πληρούν τα όρια της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Φαρμακοποιίας όπως περιγράφονται στην παρ. 1.2 τόσο σε χρόνο $t=0$ από τη συλλογή του δείγματος όσο και μετά από χρονικό διάστημα ενός έτους, σε συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας και υγρασίας. Αναλυτικότερα στις 13 πρώτες ύλες που μελετήθηκαν, μόνο σε έξι ανιχνεύτηκε μικροβιακό φορτίο. Σε $t=0$ μικροοργανισμοί εντοπίστηκαν μόνο μέσω καλλιέργειας εμπλουτισμού σε 4 πρώτες ύλες (3 χρωστικές και tocopheryl acetate) ενώ σε $t=1$ έτος μικροοργανισμοί εντοπίστηκαν σε 5 πρώτες ύλες (3 χρωστικές, γλυκομαννάνη, Kobo).

Το υψηλότερο μικροβιακό φορτίο ανιχνεύτηκε στην κόκκινη χρωστική, η οποία αποτελεί οξείδιο τρισθενούς σιδήρου (Fe_2O_3), και όπως και οι άλλες δύο χρωστικές (Fe_3O_4 , FeO), δεν αποτελούν ευνοϊκά υποστρώματα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών με εξαίρεση τα οξειδοαναγωγικά βακτήρια, χωρίς όμως τα αποτελέσματά να υποδηλώνουν ότι τα βακτήρια που απομονώθηκαν από τις χρωστικές των οξειδίων του σιδήρου διαθέτουν ικανότητα οξείδωσης και αναγωγής τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι έρευνα έχει δείξει ότι νανοσωματίδια του Fe_3O_4 διαθέτουν βακτηριοστατική δράση έναντι της *E. coli* (Chatterjee, και συν. 2011), εμποδίζοντας την εκθετική φάση του μικροοργανισμού ενώ στον αντίποδα, η έρευνα των Parikh και Chorover (2006) έδειξε ότι στα οξείδια του σιδήρου μπορεί να υπάρξει προσκόλληση βακτηρίων στην επιφάνειά τους τα *Geobacter* sp., *Shewanella* sp. και *Bacillus* sp.. Η υψηλότερη ποικιλότητα σε επίπεδο στελέχους εμφανίστηκε στην κόκκινη χρωστική, η οποία ήταν και η πρώτη ύλη που εμφάνιζε το υψηλότερο μικροβιακό φορτίο. Το γεγονός ότι εντοπίστηκαν μικροοργανισμοί σε αυτές τις πρώτες ύλες, δεν αποτελεί μη αναμενόμενο γεγονός, καθώς οι ουσίες αυτές δεν είναι αποστειρωμένες (από τον προμηθευτή) αλλά περιέχουν ως 100 cfu/g. Η γλυκομαννάνη, στην οποία ανιχνεύτηκε μικροβιακό φορτίο, αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη με μονομερή D-γλυκόζης και D-μαννόζης, και ο οποίος μπορεί να υδρολυθεί με τα ένζυμα μαννάσες και κυτταρινάσες, και να αποτελέσει πηγή άνθρακα για τα βακτήρια (Al-Ghazzewi και Tester 2012). Τέλος στις πρώτες ύλες Kobo και tocopheryl acetate (Βιταμίνη E), το μικροβιακό φορτίο που ανιχνεύτηκε ήταν χαμηλό, και αυτό πιθανότατα οφείλεται στη σύστασή τους.

Τέλος η μελέτη των πρώτων υλών με μοριακές τεχνικές αν και αποτελεί ταχύτερη μέθοδο δεν ήταν εφικτή σε όλες τις πρώτες ύλες. Συγκεκριμένα, κανένα δείγμα δεν έδωσε θετικό σήμα στην αντίδραση PCR, γεγονός που υποδεικνύει ότι το μικροβιακό φορτίο ήταν πολύ χαμηλότερο από το όριο ευαισθησίας της μεθόδου το οποίο υπολογίστηκε στις 10^4 cfu/g. Πολλές έρευνες για τη βελτίωση της μοριακής ανίχνευσης μέσω PCR, χρησιμοποιούν το στάδιο της καλλιέργειας εμπλουτισμού για την ανίχνευση ακόμα και 1 cfu/g (Jimenez, και συν. 2000, Karanam, και συν. 2008) αντί να γίνει άμεση απομόνωση γενετικού υλικού από το δείγμα.

4.2.2. Ανάλυση πληθυσμού νηματοειδών μυκήτων

Εκτός του πληθυσμού των βακτηρίων που ανιχνεύτηκε, απομονώθηκαν από τις πρώτες ύλες 7 διαφορετικά στελέχη μυκήτων που ανήκουν σε δύο γένη (*Penicillium* και *Neosartorya*). Αν και

μορφολογικά τα στελέχη αυτά διέφεραν ευκρινώς, με εφαρμογή της αντίδρασης ITS-PCR προέκυψαν δύο πρότυπα που αντιστοιχούσαν στα δύο γένη. Τα 6 στελέχη ανήκουν στο γένος *Penicillium* και συγκεκριμένα το F6 στέλεχος εμφάνισε ομοιότητα με το *Penicillium chrysogenum*. Στελέχη του γένους *Penicillium* και του γένους *Aspergillus* έχουν βρεθεί σε πρώτες ύλες φαρμακευτικών σκευασμάτων (Obuekwe και Eichie 2006). Το στέλεχος F7 εμφάνισε ομοιότητα με το είδος *Neosartorya hiratsukae*, το οποίο αποτελεί τελομορφή του γένους *Aspergillus* και το οποίο έχει απομονωθεί πρώτη φορά από χυμό αλόης, ενώ εντοπίζεται στο έδαφος, σε εσωτερικούς χώρους ενώ υπάρχουν και καταγραφές για παθογένεια στον άνθρωπο (Samson, και συν. 2007).

4.3. Μικροβιακή Ανάλυση στο Τελικό Προϊόν

Το αντιηλιακό αποτελεί το τελικό προϊόν το οποίο καταλήγει στον καταναλωτή και οφείλει να πληρεί τα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί από τις αρμόδιες αρχές. Όπως αναφέρεται και στην Παράγραφο 1.4 της Εισαγωγής, πολλά από τα συστατικά που περιέχουν οι φόρμουλες των προϊόντων, παρέχουν αντιμικροβιακή δράση, η οποία όμως δεν επαρκεί πάντοτε. Η μικροβιακή μόλυνση στα προϊόντα μπορεί να προέλθει από τις πρώτες ύλες, από τη διαδικασία παρασκευής, από το προσωπικό, από τις συνθήκες αποθήκευσης ή από τα υλικά συσκευασίας. Ειδικότερα, οι πρώτες ύλες ανάλογα με τις θρεπτικές ιδιότητες τους, συνήθως υποστηρίζουν κάποιου είδους μικροβιακή ανάπτυξη (Kamil και Lupuliasa 2011). Επίσης, μόλυνση στο προϊόν μπορεί να προκύψει από τον καταναλωτή κατά τη χρήση. Έρευνες έχουν ανιχνεύσει σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα πριν το άνοιγμα και έπειτα από χρήση, βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* και *Corynebacterium* (Behravan, και συν. 2005, Campana, και συν. 2006, Ravita, και συν. 2009) και μύκητες όπως *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium canis*, *Penicillium spp*, *Phoma sp.*, *Aspergillus sp.*, *Chaetomium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Cladosporium sp.* (Hugbo, και συν. 2003, Nasser 2008).

Από το αντιηλιακό που μελετήθηκε απομονώθηκε ένα στέλεχος με ομοιότητα με το είδος *Bacillus safensis*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στελέχη με ομοιότητα στο *B. safensis* απομονώθηκαν από το νερό την ίδια περίοδο που συλλέχθηκαν και τα δείγματα του τελικού

προϊόντος. Η παρουσία του ίδιου είδους τόσο στην πρώτη ύλη του νερού όσο και στο τελικό προϊόν υποδηλώνει την ικανότητα του *B. safensis* να επιβιώνει στο αντιηλιακό. Τα αποτελέσματα της επιμόλυνσης του αντιηλιακού με τους μικροοργανισμούς *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, ενδυναμώνουν τη θεωρία ότι το *B. safensis* μπορεί να επιβιώνει στο τελικό προϊόν παρ' όλα τα συντηρητικά που υπάρχουν. Διαπιστώθηκε ότι έπειτα από επιμόλυνση με εμβόλιο 10^4 cfu/ml, ενώ οι δυο παθογόνοι μικροοργανισμοί δεν ανιχνεύονται μετά από μία μέρα, το βακτήριο *B. subtilis*, διατηρεί σταθερό πληθυσμό στις 10-15 cfu/ml μέχρι τις 28 μέρες. Η ικανότητα του γένους *Bacillus* να σχηματίζει ενδοσπόρια, το ευνοεί να ανταπεξέλθει στις συνθήκες που επικρατούν στο προϊόν και να ανιχνεύεται μέχρι και 1 μήνα σχεδόν. Επίσης στελέχη των γενών *Bacillus*, *Micrococcus* και *Staphylococcus* έχουν βρεθεί να είναι ανθεκτικά στα συντηρητικά που χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά προϊόντα (Flares, και συν. 1997). Όσον αφορά τους δύο παθογόνους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν στην επιμόλυνση του αντιηλιακού, διαπιστώθηκε ότι σε μία ημέρα δεν ανιχνεύονται. Για τον λόγο αυτό ελέγχθηκε η βιωσιμότητα τους σε υγρές καλλιέργειες με προσθήκη 5, 10 και 20 % αντιηλιακού. Σε ποσοστό αντιηλιακού 20 % τόσο η *E. coli* όσο και η *P. aeruginosa*, σημείωσαν απότομη μείωση του πληθυσμού τους και δεν ανιχνεύτηκαν έπειτα από 38 ώρες. Ο πληθυσμός του *B. subtilis*, αν και μειώθηκε κατά 2 λογαριθμικές μονάδες έδειξε ότι μπορεί να επιβιώσει καλύτερα σε σχέση με τους άλλους δύο μικροοργανισμούς. Τα πειράματα στα οποία επιμολύνθηκε το αντιηλιακό, έδειξαν την αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων καθώς ακόμα και 20 % των παραγόντων κατέστρεψαν τα δύο Gram αρνητικά βακτήρια (*E. coli* και *P. aeruginosa*). Η ικανότητα αυτή των αντιμικροβιακών παραγόντων του προϊόντος, εξηγεί τη μη ανίχνευση μικροβιακού φορτίου, έπειτα από χρήση του προϊόντος από καταναλωτές. Ανακεφαλαιώνοντας, η σύσταση του αντιηλιακού παρέχει την απαιτούμενη προστασία του προϊόντος από επιμόλυνση κατά τη χρήση. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα του είναι πιο ισχυρή στα Gram αρνητικά βακτήρια (*E. coli* και *P. aeruginosa*), ενώ το γένος *Bacillus* μπορεί και επιβιώνει στο προϊόν. Η επιβίωση του *Bacillus*, θα πρέπει να συσχετισθεί και με την παρουσία πολλών ειδών του γένους *Bacillus* στο ετερότροφο μεσόφιλο πληθυσμό που ανιχνεύτηκε στο νερό.

Γενικά Συμπεράσματα

- 1) Τόσο οι πρώτες ύλες όσο και το τελικό προϊόν πληρούσαν τα μικροβιολογικά όρια της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Φαρμακοποιίας αναφορικά με τον ολικό αερόβιο πληθυσμό βακτηρίων, μυκήτων/ζυμών και παθογόνων μικροοργανισμών.
- 2) Η μικροβιακή ποικιλότητα σε νερό υψηλής καθαρότητας φαρμακοβιομηχανίας παρουσίασε μία περίπλοκη δομή με δύο διακριτούς πληθυσμούς: τα oligότροφα βακτήρια και τα κοπιότροφα βακτήρια.
- 3) Στο νερό ταυτοποιήθηκαν μικροοργανισμοί που παρουσίαζαν ομοιότητα με αντιπροσώπους τριών φύλων. Φύλο Firmicutes: *Bacillus aquimaris*, *B. niabensis*, *B. cibi*, *B. barbaricus*, *B. korlensis*, *B. aryabhattai*, *B. megaterium*, *B. boronophilus*, *B. jeotgali*, *B. safensis*, *Brevibacillus agri*. Φύλο Proteobacteria: *Methylobacterium tardum*, *Bradyrhizobium pachyrhizi*, *B. japonicum*, *Blastobacter denitrificans*, *Paracoccus marcusii*, *Sphingomonas echinoides*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Ralstonia insidiosa*, *Acinetobacter jonsonii*. Φύλο Actinobacteria: *Rhodococcus ruber*, *Microbacterium oxydans*, *Kocuria turfanensis*, *K. flava*, *K. rosea*.
- 4) Ο oligότροφος πληθυσμός στον οποίο επικρατούσαν τα α-Proteobacteria και συγκεκριμένα το γένος *Sphingomonas* και η τάξη των Rhizobiales (*Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Methylobacterium*), έχει βρεθεί ότι αποτελεί ενδογενή πληθυσμό σε τέτοια συστήματα και ειδικότερα το *Sphingomonas* sp. έχει θεωρηθεί ως ο πρώτος επικοιστής στις επιφάνειες, με σκοπό τη δημιουργία βιοϋμενίων. Ο πληθυσμός αυτός αποτελεί ένα σημαντικό τμήμα της μικροβιακής κοινότητας, το οποίο όμως είναι δύσκολο να ανιχνευτεί με τις κλασικές μικροβιολογικές τεχνικές. Ο ετερότροφος πληθυσμός που αναπτύχθηκε σε πλούσια θρεπτικά υποστρώματα, αποτελούνταν κυρίως από στελέχη του γένους *Bacillus* και η αφθονία του γένους αυτού, αποτελεί απόρροια της ικανότητας σχηματισμού ενδοσπορίων. Επίσης, τα βακτήρια αυτά ως κοπιότροφα, πιθανότατα βρίσκουν θρεπτικά στα σχηματισμένα βιοϋμένια ή και προσκολλώνται ασθενώς σε αυτά.

- 5) Διαπιστώθηκε η ύπαρξη διηθητών βακτηρίων με ικανότητα να διαπερνάνε μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm , με ανίχνευση τόσο σε θρεπτικά υποστρώματα όσο και με μοριακές μεθόδους (PCR-DGGE). Το κλάσμα των διηθητών βακτηρίων δε παρουσίασε διαφορές στη μικροβιακή ποικιλότητα (ριβότυπους) υποδηλώνοντας τη δυνατότητα των βακτηρίων αυτών να αυξάνουν τον κυτταρικό τους όγκο όταν βρεθούν σε πιο ευνοϊκές συνθήκες και να εξέλθουν από την κατάσταση VBNC. Στην περίπτωση των διηθητών βακτηρίων φάνηκε η αδυναμία των κλασσικών τεχνικών μικροβιολογίας να ανιχνεύσουν τον πληθυσμό αυτό (Φεβρουάριος 2011) και η καλύτερη εκτίμηση της ποικιλότητας μέσω της τεχνικής DGGE.
- 6) Παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την ανάκτηση του μικροβιακού φορτίου σε δείγματα παρόμοιο ενδιαιτήματος είναι η χρήση πλούσιων και φτωχών θρεπτικών υποστρωμάτων, η επώαση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, η χρήση μεμβρανών με μικρότερη διάμετρο πόρων, η θερμοκρασία του δείγματος κατά τη διήθηση.
- 7) Από τις υπόλοιπες πρώτες ύλες (Χρωστικές CI 77491, CI 77492, CI 77499, κιτρικό οξύ, xanthan gum, γλυκομαννάνη, γλυκερόλη, glyceryl oleate citrate/triglyceride, glyceryl stearate, tokopheryl acetate, Kobo, sunflower seed oil esters, Tinosorb M) που μελετήθηκαν παρουσίασαν μία αυξημένη ποικιλότητα οι 3 χρωστικές που είναι οξείδια του σιδήρου. Σε αυτές ανιχνεύτηκαν οι μύκητες *Penicillium chrysogenum* και *Neosartorya hiratsukae*.
- 8) Τα συντηρητικά του αντιηλιακού έδρασαν αποτελεσματικά έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων *E. coli* και *P. aeruginosa*, καταστρέφοντας τα κύτταρα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η αποτελεσματικότητά τους μετριάστηκε στο Gram θετικό βακτήριο *Bacillus subtilis* το οποίο επιβίωσε και παραμένει ανιχνεύσιμο έπειτα από 28 μέρες σε αντιηλιακό. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό α) με το μοναδικό στέλεχος (*B. safensis*) που απομονώθηκε από κλειστό σωληνάριο αντιηλιακού και β) την ευρεία διασπορά ειδών του γένους *Bacillus* στο νερό (πρώτη ύλη αντιηλιακού), αποτελεί έναν παράγοντα που θα πρέπει να μελετηθεί περισσότερο.

Μελλοντική Έρευνα

Η εργασία αυτή ανέδειξε ενδιαφέροντα αποτελέσματα, ιδιαίτερα όσον αφορά τη μικροβιακή ποικιλότητα στο νερό υψηλής καθαρότητας που χρησιμοποιείται σε όλα τα προϊόντα της φαρμακοβιομηχανίας.

Τα ευρήματα αυτά χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης καθώς όπως διαπιστώθηκε τόσο η μικροβιακή ποικιλότητα όσο και η ανάκτηση του μικροβιακού φορτίου επηρεάζονται άμεσα από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία και τα θρεπτικά συστατικά. Επίσης το νερό υψηλής καθαρότητας αποτελεί ένα ανεπαρκώς μελετημένο ενδιαίτημα όσον αφορά την μικροβιακή ποικιλότητα.

Η παρούσα εργασία αυτή θα μπορούσε να συνεχιστεί κυρίως με αλλαγή στην προσέγγιση της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε. Πιο συγκεκριμένα θα πρέπει να γίνει:

α) Μελέτη του μικροβιακού φορτίου όχι βασιζόμενοι σε μεθόδους καλλιέργειας που υποεκτιμούν τον πληθυσμό αλλά σε μεθόδους μικροσκοπίας που μετράνε τον αριθμό των βιώσιμων και των μεταβολικά ενεργών κυττάρων όπως αναφέρθηκε και στις παραγράφους 1.7.2-1.7.5 της Εισαγωγής. Οι μέθοδοι αυτές, χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού στα ολιγότροφα ενδιαιτήματα καθώς παρέχουν μεγάλη ακρίβεια και ταχύτητα.

β) Μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας με τεχνικές ανεξάρτητες από την καλλιέργεια όπως για παράδειγμα μέσω κλωνοποίησης ή ταυτοποίησης των ζωνών που προκύπτουν από την τεχνική DGGE και σύγκριση των αποτελεσμάτων με τις ταυτοποιήσεις των απομονωμένων μικροοργανισμών στα θρεπτικά υποστρώματα.

γ) Μελέτη των απομονωθέντων βακτηρίων ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους και συγκεκριμένα τον κυτταρικό τους όγκο και της διαστάσεις τους σε συνθήκες καταπόνησης όπως έλλειψη θρεπτικών συστατικών ή επίδραση χαμηλής θερμοκρασίας και μελέτη της ικανότητας να διαπερνάνε μεμβράνες με διάμετρο πόρων 0,2 μm.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

- Abd-Elsalam, K., Schnieder, F., & Guo, J. (2003). A modified DNA extraction miniprep protocol for *Fusarium* isolates. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*.
- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., & Sahin, F. (2009). Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods*, 79, 321–328.
- Aguilera, A., Gomez, F., Lospitao, E., & Amils, R. (2006). A molecular approach to the characterization of the eukaryotic communities of an extreme acidic environment: Methods for DNA extraction and denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 593-605.
- Alain, K., & Querellou, J. (2009). Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges. *Extremophiles*, 13, 583-594.

- Alander, J. (2012). Chemical and Physical Properties of Emollients. In Springer (Ed.), *Treatment of Dry Skin Syndrome* (p. 399-417). M. Loden, H.I. Maibach.
- Al-Ghazzewi, F., & Tester, R. (2012). Efficacy of cellulase and mannanase hydrolysates of konjac glucomannan to promote the growth of lactic acid bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2394-2396.
- Al-Juboori, R., & Yusaf, T. (2012). Biofouling in RO system: Mechanisms, monitoring and controlling. *Desalination*, in press.
- American Society for Microbiology (1957). *Manual of Microbiological Methods*. (H. Conn, Ed.) McGraw - Hill.
- Amersham Biosciences. (1999). *Protein Electrophoresis Technical Manual*.
- Angeles, J., Laurena, A., & Tecson-Mendoza, E. M. (2005). Extraction of Genomic DNA From the Lipid-, Polysaccharide-, and Polyphenol-Rich Coconut (*Cocos nucifera* L.). *Molecular Biology Reporter*, 23, 297a-297i.
- Applied-Maths. (2010). *Gel Compar II Quick Guide Version 6.5*.
- Araujo, J., & Schneider, R. (2008). DGGE with genomic DNA: Suitable for detection of numerically important organisms but not for identification of the most abundant organisms. *Water research*, 42, 5002-5010.
- Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N., & Nasu, M. (2003). Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *Fems Microbiology Ecology*, 43, 111-119.
- Atlas, R. (1993). *Handbook of microbiological media* (3rd ed.). (L. Parks, Ed.) CRC Press, Boca Raton, USA.
- Baba, T., Matsumoto, R., Yamaguchi, N., & Nasu, M. (2009). Bacterial Popoulation Dynamics in a Reverse-Osmosis Wtaer Purification System Determined by Fluorescent Staining and PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Microbes and Environments*, 24, 163-167.
- Barcina, I., & Arana, I. (2009). The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 8, 245-255.

- Bastholm, S., Wahlstrøm, L., Bjergbæk, L., & Roslev, P. (2008). A simple bioluminescence procedure for early warning detection of coliform bacteria in drinking water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2323-2330.
- Baudart, J., Coallier, J., Laurent, P., & Prevost, M. (2002). Rapid and Sensitive Enumeration of Viable Diluted Cells of Members of the Family Enterobacteriaceae in Freshwater and Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5057-5063.
- Behravan, J., Bazzaz, B. F., & Malaekheh, P. (2005). Survey of bacteriological contamination of cosmetic creams in Iran. *International Journal of Dermatology*, 44, 482-485.
- Bej, A.K., McCarty, S.C. & Atlas, R.M. (1991). Detection of coliform bacteria and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2429- 2432
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet P. & Kauserud H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10, 189.
- Bereschenko, L., Heilig, G., Nederlof, M., Loosdrecht, M. v., Stams, A., & Euverink, G. (2008). Molecular Characterization of the Bacterial Communities in the Different Compartments of a Full-Scale Reverse-Osmosis Water Purification Plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5297-5304.
- Bereschenko, L., Stams, A., Euverink, G., & Loosdrecht, M. v. (2010). Biofilm Formation on Reverse Osmosis Membranes Is Initiated and Dominated by *Sphingomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* , 76, 2623-2632.
- Beveridge, T. (1990). Mechanism of Gram Variability in Select Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 172, 1609-1620.
- Beveridge, T. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic and Histochemistry*, 76, 111-118.
- Binde, D.R., Menna, P., Bangel, E.V., Barcellos, F.G., Hungria, M. (2009). rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* 83, 897-908.
- Bio-Rad, L. *Model 485 Gradient Former Instruction Manual*.
- Bio-Rad, L. (1996). *The DCode Universal Mutation Detection System Instruction Manual*.

- Bohus, V., Toth, E., Szekely, A., Makk, J., Baranyi, K., Patek, G., Schunk, J. & Marialigeti, K. (2010). Microbiological investigation of an industrial ultra pure supply water plant using cultivation-based and cultivation-independent methods. *Water Research* , 44, 6124-6132.
- Breton, C., Claux, D., Metton, I., Skorski, G., & Bervilleä, A. (2004). Comparative Study of Methods for DNA Preparation from Olive Oil Samples to Identify Cultivar SSR Alleles in Commercial Oil Samples: Possible Forensic Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 531-537.
- Brown, A. (2001). *Benson's Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology* (8 ed.). McGraw-Hill Companies.
- Bruggen, B., Vandecasteele, C., Gestel, T., Doyenb, W., & Leysenb, R. (2003). A Review of Pressure-Driven Membrane Processes in Wastewater Treatment and Drinking Water Production. *Environmental Progress*, 22, 46-56.
- Brusetti, L., Malkhazova, I., Gtari, M., Tamagnini, I., Borin, S., Merabishvili, M., Chanishvili, N., Mora, D., Cappitelli, F. & Daffonchio, D. (2008). Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography. *BMC Microbiology* 2008, 8, 220.
- Bucks, J. (1982). Nonstaining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 992-993.
- Burke, D., Martin, K., Rygiewicz, P., & Topa, M. (2005). Ectomycorrhizal fungi identification in single and pooled root samples: terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) and morphotyping compared. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1683-1694.
- Burtscher, M., Zibuschka, F., Mach, R., & Li, G. (2009). Heterotrophic plate count vs. in situ bacterial 16S rRNA gene amplicon profiles from drinking water reveal completely different communities with distinct spatial and temporal allocations in a distribution net. *Water SA*, 35, 495-504.
- Busconi, M., Foroni, C., Corradi, M., Bongiorno, C., Cattapan, F., & Fogher, C. (2003). DNA extraction from olive oil and its use in the identification of the production cultivar. *Food chemistry*, 83, 127-134.
- Campana, R., Scesa, C., Patrone, V., Vittoria, E., & Baffone, W. (2006). Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 301-306.

- Cardinale, M., Castro, J. V., Muller, H., Berg, G., & Grube, M. (2008). In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of Alphaproteobacteria. *Fems Microbiolgy Ecology*, 1-9.
- Castro, M. L. (2011). Cosmetobolomics as an incipient ‘-omics’ with high analytical involvement . *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 1365-1371.
- Cavallo, P., Proto, M. C., Patruno, C., Sorbo, A. D., & Bifulco, M. (2008). The first cosmetic treatise of history. A female point of view. *International Journal of Cosmetic Science*, 30, 79-86.
- Chanchal, D., & Swarnlata, S. (2008). Novel approaches in herbal cosmetics. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 7, 89-95.
- Chatterjee, S., & Sarkar, A. B. (2011). Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. *Journal of Nanobiotechnology*, 9, 34.
- Cheng, H.-R., & Jiang, N. (2006). Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*, 28, 55-59.
- Christoph, R., Schmidt, B., Steinberner, U., & Dilla, W. (2000). Glycerol. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Ciccarelli, F.D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C.J., Snel, B., & Bork, P. (2007). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, 311, 1283-1287.
- Colwell, R. (2000). Viable but non culturable bacteria: a survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6, 121-125.
- Dahllöf, I. (2002). Molecular community analysis of microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 213-217.
- Davey, H. (2011). Life, Death, and In-Between: Meanings and Methods in Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 5571-5576.
- Detmer, A., Jørgensen, C., & Nylén, D. (2007). *A guidance document on microbiological control of cosmetic products*. Danish Environmental Protection Agency .
- Du, M., Chen, J., Zhang, X., Li, A., Li, Y., & Wang, Y. (2007). Retention of Virulence in a Viable but Nonculturable *Edwardsiella tarda* Isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1349-1354.

- Duc, M. L., Dekas, A., Osman, S., Moissl, C., Newcombe, D., & Venkateswaran, K. (2007). Isolation and Characterization of Bacteria Capable of Tolerating the Extreme Conditions of Clean Room Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2600–2611.
- Duc, M. L., Kern, R., & Venkateswaran, K. (2004). Microbial Monitoring of Spacecraft and Associated Environments. *Microbial Ecology*, 47, 150-158.
- Duda, V. (2011). Ultramicrobacteria. *eLS*, Wiley, 1-15.
- Duda, V., Suzina, N., Polivtseva, V., & Boronin, A. (2012). Ultramicrobacteria: Formation of the Concept and Contribution of Ultramicrobacteria to Biology. *Microbiology*, 81, 379-390.
- Dureja, H., Kaushik, D., Gupta, M., Kumar, V., & Lather, V. (2005). Cosmeceuticals: An emerging concept. *Indian Journal of Pharmacologie*, 37, 155-159.
- Edwards, U., Rogall, T., Blockerl, H., Emde M. & Bottger E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17, 7843-7853.
- Egli, T. (2010). How to live at very low substrate concentration. *Water research*, 44, 4826-4837.
- Eichler, S., Christen, R., Holtje, C., Westphal, P., Botel, J., Brettar, I., Mehling, A. & Hofle1, M.G. (2006). Composition and Dynamics of Bacterial Communities of a Drinking Water Supply System as Assessed by RNA- and DNA-Based 16S rRNA Gene Fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1858-1872.
- Elslande, E., Guérineau, V., Thirioux, V., Richard, G., Richardin, P., Laprévote, O., Hussle, G. & Walter, P. (2008). Analysis of ancient Greco–Roman cosmetic materials using laser desorption ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 1873-1879.
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 297-314.
- European Commission. (1996). 96/335/EC: Commission Decision of 8 May 1996 establishing an inventory and a common nomenclature of ingredients employed in cosmetic products. *Official Journal L* 132.
- European Commission. (2008). *European Pharmacopoeia 6th Edition*. Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare of the Council of Europe.

- Flares, M., Morillo, M., & Crespo, M. L. (1997). Deterioration of Raw Materials and Cosmetic Products by Preservative Resistant Microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 40, 157-160.
- Flemming, H.-C. (2002). Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 629 - 640.
- Frost, R., Martens, W., & Williams, P. (2003). Raman spectroscopy of the minerals boléite, cumengéite, diaboléite and phosgenite – implications for the analysis of cosmetics of antiquity. *Mineralogical Magazine*, 61, 103-111.
- Gao, W., Liang, H., Ma, J., Han, M., Chen, Z., Han, Z. & Li., G. (2011). Membrane fouling control in ultrafiltration technology for drinking water production: A review. *Desalination*, 272, 1-8.
- Gautam, K., & Tyagi, V. (2006). Microbial Surfactants: A Review. *Journal of OLEO Science*, 55, 155-166.
- Gilaberte, Y., & Gonzáles, S. (2010). Update on Photoprotection. *Actas Dermosifiliograficas*, pp. 659-672.
- Greenlee, L., Lawler, D., Freemana, B., B.Marrot, & Moulin, P. (2009). Reverse osmosis desalination: Water sources, technology, and today's challenges. *Water Research*, 43, 2317 – 2348.
- Guertechin, L. d. (2006). Classification of Surfactants. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. M., Paye, A., Barel, H., Maibach (Editors).
- Haller, C., Rolleke, S., Vybiral, D., Witte, A., & Velimirov, B. (1999). Investigation of 0.2 fillterable bacteria from the Western Mediterranean Sea using a molecular approach: dominance of potential starvation forms. *FEMS Microbiology Ecology*, 31, 153-161.
- Hammes, F., & Egli, T. (2010). Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. *Analytical and Chemical*, 397, 1083-1095.
- Harris, K., & Hartley, J. (2003). Development of broad-range 16S rDNA-PCR for use in routine diagnostic clinical microbiology service. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 685-691.
- Haught, C., Wilkinson, D.L., Zgafas, K. & Harrison, R.G. (1994). A method to insert a DNA fragment into a double-stranded plasmid. *Biotechniques*, 16, 46-48.
- Hayashi, K. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in a genomic DNA. *PCR methods and applications*, 1, 34-38.

- Hayes, C., & Low, D. (2009). Signals of growth regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 12, 667-673.
- Heim, S., Lleo, M., Bonato, B., Guzman, C., & Canepari., P. (2002). The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *Journal of Bacteriology*, 184, 6739-6745.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., & Wellington, E. (1997). Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Applied And Environmental Microbiology*, 63, 3233-3241.
- Hill, K. (2000). Fats and oils as oleochemical raw materials. *Pure and Applied Chemistry*, 72, 1255-1264.
- Hockberger, P. E. (2002). History of Ultraviolet Photobiology for Humans, Animals and Microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*, 76, 561-579.
- Hoefel, D., Grooby, W., Monis, P., Andrews, S., & Saint, C. (2003). Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 585-597.
- Holmberg, K. (2001). Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6, 148-15 Hopwood, D.A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M. & Schrempf, H. (1985) *Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory manual*. John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Hugbo, P., Onyekweli, A., & Igwe, I. (2003). Microbial contamination and preservative capacity of some brands of cosmetic creams. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 229-234.
- Hughes, M., Beck, L., & Skuce, R. (1994). Identification and Elimination of DNA Sequences in Taq DNA Polymerase. M.S. Hughes, L.A. Beck, R.A. Skuce, *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2007-2008.
- Imazaki, I., & Nakaho, K. (2009). Temperature-upshift-mediated revival from the sodium-pyruvate recoverable viable but nonculturable state induced by low temperature in *Ralstonia solanacearum*: linear regression analysis. *Journal of General Plant Pathology*, 75, 213-226.
- Ishii, S., & Sadowsky, M. (2009). Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental Microbiology*, 11, 733-740.

- ISO 6222. (1999). Water quality - Enumeration of culturable micro-organisms - Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium. *International Organization for Standardization*, Geneva, Switzerland.
- ISO 6340. (1995). Water quality-Detection and enumeration of *Salmonella*. *International Organization for Standardization*, Geneva, Switzerland.
- ISO 7899. (2000). Water quality-Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2: Membrane filtration method. *International Organization for Standardization*, Geneva, Switzerland.
- ISO 8199. (2005). Water quality-General guidance on the enumeration of microorganisms by culture. *International Organization for Standardization*, Geneva, Switzerland.
- ISO 9308. (2000). Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method. *International Organization for Standardization*, Geneva, Switzerland.
- Ivnitsky, H., Katz, I., Minz, D., Volvovic, G., Shimonic, E., Kesselman, E., Semiat, R. & Dosoretz, C.G. (2007). Bacterial community composition and structure of biofilms developing on nanofiltration membranes applied to wastewater treatment. *Water Research*, 41, 3924-3935.
- Jimenez, L., Ignar, R., D'Aiello, R., & Grech, P. (2000). Use of PCR Analysis for Sterility Testing in Pharmaceutical Environments. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 8, 11-20.
- Jimenez, L., Ignar, R., Smalls, S., Grech, P., Hamilton, J., Bosko, Y. & English, D. (1999). Molecular detection of bacterial indicators in cosmetic/pharmaceuticals and raw materials. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22, 93-95.
- Jimenez, L., & Smalls, S. (2000). Molecular Detection of *Burkholderia cepacia* in Toiletry, Cosmetic, and Pharmaceutical Raw Materials and Finished Products. *Journal of AOAC International*, 83, 963-966.
- Jimenez, L., Smalls, S., & Ignar, R. (2000). Use of PCR analysis for detecting low levels of bacteria and mold contamination in pharmaceutical samples. *Journal of Microbiological Methods*, 41, 259-265.
- Jin, D., Wang, P., Bai, Z., Wang, X., Peng, H., Qi, R., Yu, Z., Zhuang, G. (2011). Analysis of bacterial community in bulking sludge using culture-dependent and -independent approaches. *Journal of Environmental Sciences* 2011, 23, 1880-1887.

- Jin, J., Lee, Y.-K., & Wickes, B. (2004). Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 2004, 42, 4293-4296.
- Jones, C., Chamberlain, A., & Adams, M. (1999). An investigation of the presence of ultramicrocells in natural mineral water. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 275-279.
- Kamil, O., & Lupuliasa, D. (2011). Modern Aspects Regarding the Microbial Spoilage of Pharmaceutical Products. *Farmacia*, 59, 133-146.
- Karanam, V. R., Reddy, H., B.V.S.Raju, & Rao, J. (2008). Detection of indicator pathogens from pharmaceutical Finished products and raw materials using multiplex PCR and comparison with conventional microbiological methods. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 1007-1018.
- Kawai, M., Matsutera, E., Kanda, H., Yamaguchi, N., Tani, K., & Nasu, M. (2002). 16S Ribosomal DNA-Based Analysis of Bacterial Diversity in Purified Water Used in Pharmaceutical Manufacturing Processes by PCR and DGGE. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 699-704.
- Kawai, M., Yamaguchi, N., & Nasu, M. (1999). Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 496-504.
- Kawai, M., Yamagishi, J., Yamaguchi, N., Tani, K., & Nasu, M. (2004). Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1123-1131.
- Khazaeli, P., & Mehrabani, M. (2008). Screening of Sun Protective Activity of the Ethyl Acetate Extracts of Some Medical Plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9, 5-9.
- Koch, A. (2001). Oligotrophs versus copiotrophs. *BioEssays*, 23, 657-661.
- Köster, W., Egli, T., Ashbolt, N., Botzenhart, K., Burlion, N., Endo, T., Grimont, P., Guillot, E., Mabilat, C., Newport, L., Niemi, M., Payment, P., Prescott, A., Renaud, P. & Rust, A. (2003). Analytical Methods For Microbiological Water Quality Testing. Στο *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving approaches and methods*. WHO & OECD
- Kramer, M., Šuklje-Debeljak, H., & Kmetec, V. (2008). Preservative Efficacy Screening of Pharmaceutical Formulations Using ATP Bioluminescence. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34, 547-557.

- Kulakov, L., McAlister, M., Ogden, K., Larkin, M., & O'Hanlon, J. (2002). Analysis of Bacteria Contaminating Ultrapure Water in Industrial Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1548-1555.
- Kwon, S., Moon, E., Kim, T., Hong, S., & Park, H. (2011). Pyrosequencing Demonstrated Complex Microbial Communities in a Membrane Filtration System for a Drinking Water Treatment Plant. *Microbes and Environments*, 26, 149-155.
- Lautenschlager, S., Wulf, H., & Pittelkow, M. (2007). Photoprotection. *Lancet*, 528-537.
- Levy, S. (2006). UV Filters. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. Taylor & Francis Group.
- Li, B., & Xie, B. (2006). Single molecular chain geometry of konjac glucomannan as a high quality dietary fiber in East Asia. *Food Research International*, 39, 127-132.
- Li, X., Fang, Y., Al-Assaf, S., Phillips, G., Nishinari, K., & Zhang, H. (2009). Rheological study of gumarabic solutions: Interpretation based on molecular self association. *Food Hydrocolloids*, 23, 2394-2402.
- Li, Y., Dick, W., & Tuovinen, O. (2004). Fluorescence microscopy for visualization of soil microorganisms—a review. *Biology and Fertility of Soils*, 39, 301-311.
- Lillis, T., & Bissonette, G. (2001). Detection and characterization of filterable heterotrophic bacteria from rural groundwater supplies. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 268-272.
- Lin, T. (2010). Evolution of Cosmetics: Increased Need for Experimental Clinical Medicine. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 2, 49-52.
- Lunau, M., Lemke, A., Walther, K., Martens-Habbena, W., & Simon, M. (2005). An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy. *Environmental Microbiology*, 7, 961-968.
- Lundov, M., L.MoesbY, Zachariae, C., & Johansen, J. (2009). Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis*, 60, 70-78.
- MacWilliams, M. P. (2009). Indole Test Protocol. *Microbelibrary*.
- Madaeni, S. (1999). The application of membrane technology for water disinfection. *Water Research*, 33, 301 - 308.

- Maiuta, N. D., & Schwarzentruher, P. (2011). Molecular detection of bacteria in calcium carbonate powder used in cosmetic formulations. *International Journal of Cosmetic Science*, 1-6.
- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., & Naidu, R. (2008). The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water 34 (2008) 265–276. *Environment International*, 34, 265-276.
- Mangoni, M., Papo, N., Barra, D., Simmaco, M., BozzI, A., Giulio, A. & Rinaldi, A.C. (2004). Effects of the antimicrobial peptide temporin L on cell morphology, membrane permeability and viability of *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 380, 859–865, 859–865.
- Manu-Tawiah, W. *Microbiological Evaluation of Raw Materials Used in Pharmaceutical Applications*. Retrieved from www.wmtpharmaconsultants.com.
- Merck. (2011). *Merck Microbiology Manual*. Γερμανία.
- Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L., & Ghiorse, W. C. (1999). Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4715-4724.
- Miteva, V., & Brenchley, J. (2005). Detection and Isolation of Ultrasmall Microorganisms from a 120,000-Year-Old Greenland Glacier Ice Core. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7806-7818.
- Miyanagaq, K., Takano, S., Morono, Y., Hori, K., Unno, H., & Tanji, Y. (2007). Optimization of distinction between viable and dead cells by fluorescent staining method and its application to bacterial consortia. *Biochemical Engineering Journal*, 37, 56-61.
- Mizunoe, Y., Wai, S., Ishikawa, T., Takade, A., & Yoshida, S. (2000). Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. *FEMS Microbiology Letters*, 186, 115-120.
- Monroe, D. (2007). Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biology*, 5.
- Morita, R. (1990). The starvation-survival state of microorganisms in nature and its relationship to the bioavailable energy. *Experientia*, 46, 813-817.
- Muhl, H., Kochem, A., Disque, C., & Sakka, S. (2010). Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction for the universal 16S rDNA real-time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 66, 41-49.

- Mueller, N., Bruggen, B., Keuter, V., Luis, P., Melin, T., Pronk, W., Reisewitz, R., Rickerby, D., Rios, G.M., Wennekes, W. & Nowack., B. (2012). Nanofiltration and nanostructured membranes—Should they be considered nanotechnology or not? *Journal of Hazardous Materials*, 211-212, 275-280.
- Muyzer, G. (1999). Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspectives. *Methods of Microbial Community Analysis Microbial Biosystems: New Frontiers, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*.
- Nakai, R., Abe, T., Takeyama, H., & Naganuma, T. (2011). Metagenomic Analysis of 0.2-μm-Passable Microorganisms in Deep-Sea Hydrothermal Fluid R. Nakai, T. Abe, H. Takeyama, T. Naganuma. *Marine Biotechnology*, 13, 900-908.
- Nakatsu, C.H., Torsvik, V. & Øvreås, L. (2000). Soil community analysis using DGGE of the 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 1382-1388.
- Nasser, L. (2008). Fungal Profiles Isolated from Open and Used Cosmetic Products Collected from Different Localities in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 15, 121-128.
- Nielsen, J., Klausen, C., Nielsen, P., Burford, M., & Jørgensen, N. (2006). Detection of activity among uncultured Actinobacteria in a drinking water reservoir. *Fems Microbiology Ecology*, 55, 432-438.
- Nobel, A. (2000). *AG® 501-X8 and Bio-Rex® MSZ 501(D) Mixed Bed Resin Instruction Manual*. Bio-Rad Laboratoires.
- Nocker, A., Burr, M., & Camper, A. (2007). Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. *Microbial Ecology*, 54, 276-289.
- Obuekwe, I., & Eichie, F. (2006). The presence of microorganisms in some common excipients used in tablet formulation. *Acta Poloniae Pharmaceutica, Drug Research*, Vol. 63. 2006, 2, 124., 63, 124-146.
- Oliver, J. (2005). The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology*, 43, 93-100.
- Oliver, J. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 415-425.

- Oliver, J., Hite, F., McDougald, D., Andon, N., & Simpson, L. (1997). Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 2624-2630.
- Otterstatter, G. (2006). Colorants. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. M., Paye, A., Barel, H., Maibach (Editors).
- Overbeek, L. v., Bergervoet, J., Jacobs, F., & Elsas, J. v. (2004). The Low-Temperature-Induced Viable-But-Nonculturable State Affects the Virulence of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2. *Ecology and Epidemiology*, 94, 463-469.
- Palm, M., & O'Donoghue, M. (2007). Update on photoprotection. *Dermatologic Therapy*, pp. 360-376.
- Parikh, S., & Chorover, J. (2006). ATR-FTIR Spectroscopy Reveals Bond Formation During Bacterial Adhesion to Iron Oxide. *Langmuir*, 22, 8492-8500.
- Pawlowski, D., Metzger, D., Raslawsky, A., Howlett, A., Siebert, G., Karalus, R., Garrett, S., & Whitehouse, C.A. (2011). Entry of *Yersinia pestis* into the Viable but Nonculturable State in a Low-Temperature Tap Water Microcosm. *Plos one*, 6, e17585.
- Pernthaler, A., & Amann, R. (2004). Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5426-5433.
- Perry, B. (2001). Cosmetic microbiology. *Microbiology Today*, 28, 185-187.
- Philipp, S., Huemer, H., Irschich, E., & Gassner, C. (2010). Obstacles of Multiplex Real-Time PCR for Bacterial 16s rDNA: Primer Specificity and DNA Decontamination of Taq Polymerase. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 37, 21-28.
- Prescott, L., Harley, J., & Klein, D. (2002). *Microbiology* (5^η εκδ.). McGraw-Hill.
- Rademaker, J.L.W., Hoste, B., Louws, F., Kersters, K., Swings, I., Vauterin, L., Vauterin, P. (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 665-677.
- Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., Versalovic, J.V., & De Bruijn, F.J. (2008) Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kowalchuck, G.A., De Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L., and Van Elsas, J.D. (eds). Dordrecht, the Netherlands: Springer, pp. 611-644.

- Raoult, D., Drancourt, M., Azza, S., Nappiez, C., Guieu, R., Rolain, J., Fourquet, P., Campagna, B., Scola, B., Mege, J., Mansuelle, P., Lechevalier, E., Berland, Y., Gorvel, J. & Renesto, P. (2008). Nanobacteria Are Mineral Fetuin Complexes. *PLoS Pathogens*, 4, e41.
- Ravita, T., Tanner, R., Ahearn, D., Arms, E., & Crockett, P. (2009). Post-consumer use efficacies of preservatives in personal care and topical drug products: relationship to preservative category. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, 35-38.
- Reasoner, D., & Geldreich, E. E. (1985). A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1-7.
- Reisner, D., Steger, G., Zimmat, R., Owens, R.A., Wagenhofer, M., Hillen, W., Vollbach, S. & Henco, K. (1989). Temperature - gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformational transitions, sequence variations and protein - nucleic acid interactions. *Electrophoresis*, 10, 377-389.
- Revetta, R., Pemberton, A., Lamendella, R., Iker, B., & Domingo, J. S. (2010). Identification of bacterial populations in drinking water using 16S rRNA-based sequence analyses. *Water research*, 44, 1353-1360.
- Ribechini, E., Modugno, F., Pérez-Arantegui, J., & Colombini, M. P. (2011). Discovering the composition of ancient cosmetics and remedies: analytical techniques and materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 1727-1738.
- Richardson, J., Harke, J., & Backhurst, J. (2002). Particle Technology and Separation Processes. *Coulson and Richardson's Chemical Engineering* (Τόμος 2, σελ. 464). Butterworth-Heinemann.
- Ring, E. (2007). The historical development of temperature measurement in medicine. *Infrared Physics & Technology*, 49, 297–301.
- Roose-Amsaleg, C., Garnier-Sillam, E., & Harry, M. (2001). Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*, 18, 47-60.
- Rosalam, S., & England, R. (2009). Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestis* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 39.
- Ross, N., Villemur, R., Marcandella, E., & Deschne, L. (2001). Assessment of Changes in Biodiversity when a Community of Ultramicrobacteria Isolated from Groundwater Is Stimulated to Form a Biofilm. *Microbial Ecology*, 42, 56-68.
- Sambrook, J., MacCallum, P., & Russell, D. (2000). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Samson, R., Hong, S., Peterson, S., Frisvad, J., & Varga, J. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology*, 59, 147-203.
- Scientific Committee on Consumer Safety. (2010). *The SCCS'S Notes Of Guidance For The Testing Of Cosmetic Ingredients And Their Safety Evaluation*. European Commission, Directorate-General for Health Consumers.
- Schlöter, M., Leubner, M., Heulin, T., & Hartmann, A. (2000). Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 647-660.
- Signoretto, C., Lleò, M., & Canepari, P. (2002). Modification of the peptidoglycan of *Escherichia coli* in the viable but nonculturable state. *Current Microbiology*, 44, 125-131.
- Silbaq, F. (2008). Viable ultramicrocells in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 106-117.
- Siquet, F., & Devleeschouwer, M. (2006). Antibacterial Agents and Preservatives. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. M., Paye, A., Barel, H., Maibach (Editors).
- Smalla, K. (2004). Culture-independent Microbiology. *Microbial Diversity and Bioprospecting* (σελ. 88-89). Bull A.T.ASM Press, Washington, D.C.
- Spangler, R., Goddard, N., & Thaler, D. (2009). Optimizing Taq Polymerase Concentration for Improved Signal-to-Noise in the Broad Range Detection of Low Abundance Bacteria. *PLoS ONE*, 4, e7010.
- Talbot, G., Topp, E., Palin, M., & Masse, D. (2008). Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water research*, 42, 513-537.
- Terry, C., Harris, N., & Parkes, H. (2002). Detection of Genetically Modified Crops and Their Derivatives: Critical Steps in Sample Preparation and Extraction. *Journal of AOAC International*, 85, 768-774.
- Tyler, F. A., Wang, G., Tyler, S. D., & Johnson, W. M. (1997). Factors Affecting Reliability and Reproducibility of Amplification-Based DNA Fingerprinting of Representative Bacterial Pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 339-346.
- Udart, M., Stock, K., Graser, R., & Hibst, R. (2011). Inactivation of bacteria by high-power 940nm laser irradiation. *Medical Laser Application*, 26, 166-171.

- Urbach, F. (2001). The historical aspects of sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 64, 99-104.
- Varvaresou, A., Papageorgiou, S., Tsirivas, E., Protopapa, E., Kintziou, H., Kefala, V., & Demetzos, C. (2009). Self-preserving cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, 31, 163-1.
- Vaz-Moreira, I., Egas, C., Nunes, O., Manaia, C. (2012) Bacterial diversity from the source to the tap: a comparative study based on 16S rRNA gene-DGGE and culture-dependent methods. *FEMS Microbial Ecology*, 1–14.
- Velimirov, B. (2001). Nanobacteria, Ultramicrobacteria and Starvation Forms: A search for the Smallest Metabolizing Bacteria. *Microbes and Environments*, 16, 67-77.
- Venkateswaran, K., Hattori, N., Duc, M. L., & Kern, R. (2003). ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *Journal of Microbiological Methods*, 52, 367–377.
- Vernon, J., & Nwaogu, T. (2004). *Comparative Study on Cosmetics Legislation in the EU and Other Principal Markets with Special Attention to so-called Borderline Products*. Risk & Policy Analysts Limited.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. & Lupski, J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Methods in Cell and Molecular Biology*, 5, 25-40.
- Vrouwenvelder, J., Manolarakis, S., Hoek, J. v., Paassen, J. v., Meer, W. v. & Agtmaal, J. v.. (2008). Quantitative biofouling diagnosis in full scale nanofiltration and reverse osmosis installations. *Water research*, 42, 4856-4868.
- Wang, Y., Hammes, F., Boon, N., Chami, M., & Egli, T. (2009). Isolation and characterization of low nucleic acid (LNA)-content bacteria. *The ISME Journal*, 3, 889-902.
- Wang, Y., Hammes, F., Duggelin, M., & Egli, T. (2008). Influence of Size, Shape, and Flexibility on Bacterial Passage through Micropore Membrane Filters. *Environmental Science and Tehnology*, 42, 6749-6754.
- Weber, S., Saliou, C., Packer, L., & Lodge, J. (2006). Antioxidants. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. M., Paye, A., Barel, H., Maibach (Editors).
- Wellington, E., Cresswell, N., & Saunders, V. (1990). Growth and survival of streptomycetes inoculants and extent of plasmid transfer in sterile and non-sterile soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1413-1419.

- Wellington, E., & Williams, S. (1978). Preservation of actinomycetes inoculum in frozen glycerol. *Microbiology Letters*, 6, 151-157.
- White, J., Groot, A. d., & White, I. (2011). Cosmetics and Skin Care Products . In S. B. Heidelberg (Ed.), *Contact Dermatitis* (pp. 591-605). J. D. Johansen, P.J. Frosch, J-P. Lepoittevin (Editors).
- Wilhartitz, I., Mach, R., Teira, E., Reinthaler, T., Herndl, G., & Farnleitner, A. (2007). Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultra-oligotrophic ground- and drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 871-881.
- Williams, K. (2009). Biosurfactants for cosmetic application: Overcoming production challenges. *Basic Biotechnology*, 5, 78-83.
- Williams, M., Domingo, J., Meckes, M., Kelty, C., & Rochon, H. (2004). Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 954-964.
- Wintzingerode, F., Gobel, U., & Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 213-229.
- World Health Organization. (2005). *WHO Good Manufacturing Practices: water for pharmaceutical use..*
- Yang, Z., Xiao, Y., Zeng, G., Xu, Z., & Liu, Y. (2007). Comparison of methods for total community DNA extraction and purification from compost. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 918-925.
- Young, J., & Martel, J. (2009). The rise and Fall of Nanobacteria. *Scientific American*, 302, 52-59.
- Yu, H. (2008). Nanotechnology Platforms And Sectoral Diffusion Patterns In Drug, Cosmetics. *5th International Ph.D Schooll on National Systems of Innovation and Economic Development Globelics Academy*. Tampere, Finland.
- Zimbro, M., Power, D., Miller, S., Wilson, G., & Johnson, J. (2009). *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media* (2 εκδ.). Becton, Dickinson and Company.
- Zocchy, G. (2006). Skin Feel Agents. *Handbook of Cosmetic Science and Technolog.* M., Paye, A., Barel, H., Maibach (Editors).

Ελληνική Βιβλιογραφία

Δέλλιου Α.Α. (2008). Μελέτη των στελεχών της μικροβιακής συλλογής, του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας, του Πανεπιστημίου Αθηνών, με στόχο τη διερεύνηση παραγωγής βιοενεργών ουσιών *Διπλωματική εργασία, τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών*.

Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, (2006) *Σύσταση της Επιτροπής της 22ας Σεπτεμβρίου 2006 σχετικά με την αποτελεσματικότητα των αντιηλιακών προϊόντων και των σχετικών ισχυρισμών [κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό E(2006) 4089] (Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ) (2006/647/EK)*.

Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο & Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, (2001). *Οδηγία 2001/83/EK περί κοινοτικού κώδικα για τα φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση που*.

Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο & Συμβούλιο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, (2009). *Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 1223/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 30ής Νοεμβρίου 2009 για τα καλλυντικά προϊόντα*.

Καραγκούνη, Α. (2001). *Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενικής Μικροβιολογίας*. Εκδόσεις Σταμούλης.

Καραγκούνη, Α. (1999). *Μικροβιολογία*. Εκδόσεις Σταμούλης.

Συμβούλιο των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, (1976). *Οδηγία 76/768/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 27ης Ιουλίου 1976 περί προσεγγίσεως των νομοθεσιών των κρατών μελών των αναφερομένων στα καλλυντικά προϊόντα*.

Ηλεκτρονικές Διευθύνσεις

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Electromagnetic-Spectrum.png>

<http://ergastiriakos.gr>

<http://fphoto.photoshelter.com>

<http://people.uleth.ca/~selibl/Biol3200/BiochTests/Indole.html>

<http://products.symrise.com>

<http://rndpigment.com>
<http://siachemistryworld.blogspot.com>
<http://wiki.biomine.skelleftea.se>
<http://www.allcoloursupplies.com.au>
http://www.ardes.ro/en/product_history.html
<http://www.applichem.com>
<http://www.basf.com>
<http://www.biovisible.com>
<http://www.clariant.com>
<http://www.cosmeticsinfo.org>
<http://www.dsmz.de>
<http://www.fermentas.com>
<http://www.henan-eastar.com/prolist.asp?id=87>
<http://www.koboproducts.com>
<http://www.kremer-pigmente.de>
<http://www.lulusoso.com>
<http://www.oxid.com>
<http://www.raps-industrieservice.de>
<http://www.tradekey.com>
<http://www.tradekorea.com>
<http://www.scharlab.com>
<http://www.sigmaaldrich.com>
<http://www.specialchem4cosmetics.com>
<http://www.whatman.com>
<http://www.xps.org>
<https://www.msu.edu>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παράρτημα 1

Πίνακας Π_1: Κατανομή πληθυσμού (cfu/100 ml) δειγματοληψίας Ιανουαρίου 2010, στα είδη που ταυτοποιήθηκαν, ανά θερμοκρασία επώασης και θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης.

Πρότυπο BOX	Στέλεχος με τη μέγιστη ομοιότητα	cfu/ 100ml			
		TSA		NA	
		37 °C	22 °C	37 °C	22 °C
1_8	<i>Acinetobacter sp.</i>	0	17	0	25
1_1, 1_2	<i>Bacillus aquimaris</i>	300	317	700	566
1_6, 1_7	<i>Bacillus barbaricus</i>	8	8	33	16
1_10	<i>Bacillus cibi</i>	0	0	8	0
1_9	<i>Bacillus jeotgali</i>	0	8	0	17
1_3	<i>Bacillus korlensis</i>	33	75	120	92
1_4	<i>Bacillus niabensis</i>	150	17	70	16
1_5	<i>Rhodococcus ruber</i>	33	0	60	0
1_11 - 1_18	Μη ταυτοποιημένα	8	24	24	16

Πίνακας Π_2: Κατανομή πληθυσμού (cfu/100 ml) δειγματοληψίας Μαρτίου 2010, στα είδη που ταυτοποιήθηκαν, ανά θερμοκρασία επώασης και θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης.

Πρότυπο BOX	Στέλεχος με τη μέγιστη ομοιότητα	cfu/ 100ml			
		TSA		NA	
		37 °C	22 °C	37 °C	22 °C
2_38	<i>Bacillus arybhattai</i>	1	0	0	1
2_1 - 2_3, 2_29, 2_30	<i>Bacillus barbaricus</i>	0	6	173	4
2_5 - 2_20, 2_46	<i>Bacillus cibi</i>	53	101	84	83
2_4	<i>Bacillus korlensis</i>	25	36	25	6
2_21	<i>Microbacterium oxydans</i>	3	4	4	12
2_23 - 2_28, 2_31 - 2_37, 2_39 - 2_44, 2_47 - 2_60	Μη ταυτοποιημένα	38	16	8	8

Παράρτημα

Πίνακας Π_3: Κατανομή ολικού ετερότροφου πληθυσμού (cfu/100 ml) για τη δειγματοληψία Ιουλίου 2010 στα είδη που ταυτοποιήθηκαν, ανά θερμοκρασία επώασης και θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης και επίδραση του θειοθειικού νατρίου στον πληθυσμό αυτό (θερμοκρασία δείγματος 11,2 °C).

	Στέλεχος με τη μέγιστη ομοιότητα	cfu/ 100ml							
		χωρίς Na ₂ S ₂ O ₃				με Na ₂ S ₂ O ₃			
		TSA		NA		TSA		NA	
		37 °C	22 °C	37 °C	22 °C	37 °C	22 °C	37 °C	22 °C
3_36, 3_37, 3_77, 3_97	<i>Bacillus barbaricus</i>	8		1		1		2	
3_106	<i>Bacillus boroniphilus</i>						4		
3_25, 3_60	<i>Bacillus cibi</i>	2				16	70		
3_68	<i>Bacillus korlensis</i>					36		86	
3_64, 3_73, 3_90, 3_98	<i>Bacillus niabensis</i>	2		1		1			
3_101	<i>Bacillus safensis</i>					39		6	
3_11, 3_53, 3_94, 3_96, 3_104	<i>Kocuria sp.</i>		4		8		18	4	
3_3, 3_27, 3_28, 3_30, 3_31, 3_33, 3_38, 3_39, 3_41, 3_45, 3_58, 3_68, 3_76, 3_88, 3_95, 3_99, 3_103, 3_117	Μη ταυτοποιημένα	6	11	2	25	7	9	2	

Πίνακας Π_4: Κατανομή του ψυχρόφιλου πληθυσμού (cfu/100 ml) (10 °C) στη δειγματοληψία Ιουλίου 2010.

Πρότυπο BOX	Στέλεχος με τη μέγιστη ομοιότητα	cfu/ 100ml											
		0,2 μm						0,1 μm					
		χωρίς Na ₂ S ₂ O ₃			με Na ₂ S ₂ O ₃			χωρίς Na ₂ S ₂ O ₃			με Na ₂ S ₂ O ₃		
		TSA	NA	R2A	TSA	NA	R2A	TSA	NA	R2A	TSA	NA	R2A
3_15, 3_16, 3_46, 3_47	<i>B. aquimaris</i>							2	5	8	13	20	
3_37, 3_77	<i>B. barbaricus</i>											12	
3_106	<i>B. boroniphilus</i>					1					5	19	
3_1, 3_4, 3_25, 3_59, 3_60, 3_134	<i>B. cibi</i>				20	11	5				3	3	
3_52	<i>Bulkhodheria sp.</i>			2									
3_11, 3_53	<i>Kocuria sp.</i>	3	4	7	8	5	10	2			2	4	
3_48	<i>Paracoccus sp.</i>							16	11				
3_3, 3_5, 3_7 – 3_10, 3_12, 3_17, 3_21, 3_23, 3_42, 3_44, 3_45, 3_50 3_51, 3_70, 3_75, 3_76, 3_78, 3_81, 3_133, 3_134, 3_140, 3_141, 3_142, 3_145	Μη ταυτοποιημένα		4	1	8	3	12	3		4	52	53	23

Παράρτημα

Πίνακας Π_5: Κατανομή του μικροβιακού φορτίου στη δειγματοληψία Ιουλίου 2010, κατά τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας του δείγματος και του θειοθειικού νατρίου, σε δείγματα που διηθήθηκαν σε μεμβράνη με διάμετρο πόρων 0,2 μm και 0,1 μm .

Πρότυπο BOX	Στέλεχος με τη μέγιστη ομοιότητα	cfu/ 100ml															
		0,2 μm															
		Θερμοκρασία δείγματος = 8 °C								Θερμοκρασία δείγματος = 15 °C							
		χωρίς Na ₂ S ₂ O ₃				με Na ₂ S ₂ O ₃				χωρίς Na ₂ S ₂ O ₃				με Na ₂ S ₂ O ₃			
		TSA		NA		TSA		NA		TSA		NA		TSA		NA	
	Θερμοκρασία επώασης →	37	22	37	22	37	22	37	22	37	22	37	22	37	22	37	22
3_64, 3_71, 4_73	<i>B. niabensis</i>		2			18	23	40	30	142	78	160	118	45	40	43	32
3_62	<i>B. safensis</i>	3															
3_70,3_81, 3_88, 3_121 3_129, 3_130, 3_131	Μη ταυτοποιημένα		2					2	5	10	12	8	15	3	2	5	8
		0,1 μm															
		Θερμοκρασία δείγματος = 8 °C								Θερμοκρασία δείγματος = 15 °C							
		χωρίς Na ₂ S ₂ O ₃				με Na ₂ S ₂ O ₃				χωρίς Na ₂ S ₂ O ₃				με Na ₂ S ₂ O ₃			
		TSA		NA		TSA		NA		TSA		NA		TSA		NA	
	Θερμοκρασία επώασης →	37	22	37	22	37	22	37	22	37	22	37	22	37	22	37	22
3_46, 3_47, 3_69	<i>B. aquimaris</i>	13	10	33	5					15	18	18	25	18	15	40	20
3_36, 3_37, 3_65, 3_77, 3_97, 3_118	<i>B. barbaricus</i>	560	500	367	450			10	3	670	355	570	333	390	225	410	238
3_82	<i>B. cibi</i>											2					
3_68	<i>B. korlensis</i>	25															
3_64, 3_71, 3_73	<i>B. niabensis</i>	8	25		2					33	45	18	15	13	8	7	105
3_62	<i>B. safensis</i>		25														
3_72	<i>Brevibacillus</i> sp.					13		3									
3_44, 3_70, 3_75, 3_76, 3_78, 3_83, 3_80,3_88, 3_120, 3_122 - 3_126, 3_128, 3_129	Μη ταυτοποιημένα	5	45	150	15		5	8	8	23	38	12	48	10	105	78	

Παράρτημα

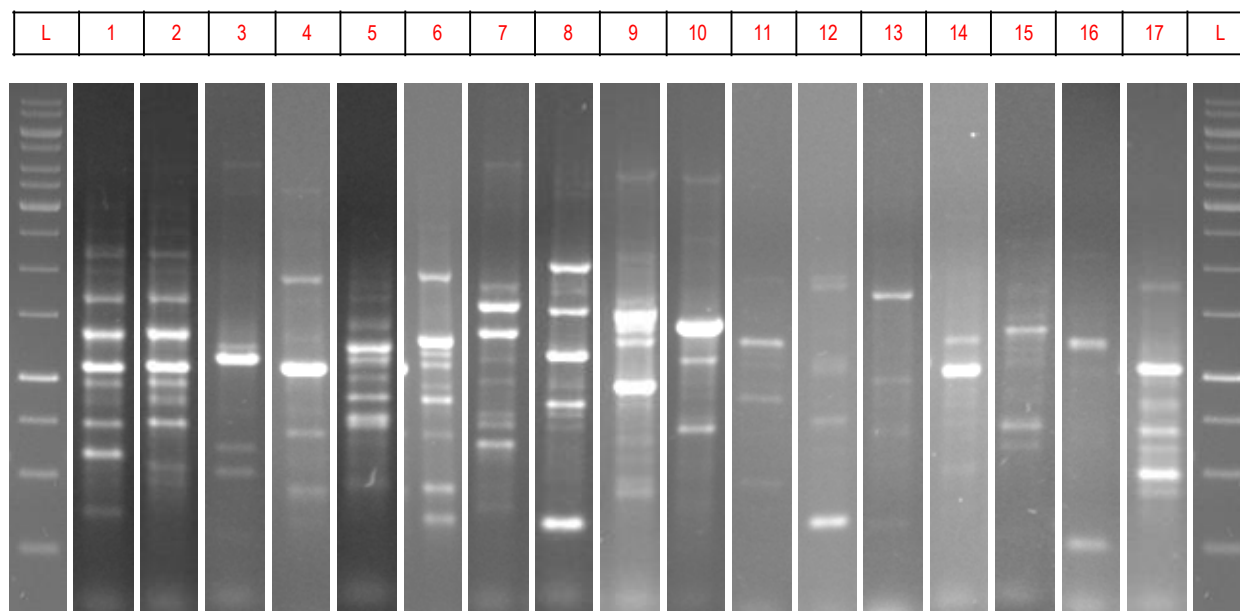
Πίνακας Π_6: Κατανομή ολικού ετερότροφου πληθυσμού (cfu/100 ml), στα ταυτοποιηθέντα γένη και είδη, στις διαφορετικές συνθήκες κατά τη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011.

Πρότυπο BOX	Στέλεχος με τη μέγιστη ομοιότητα	cfu/ 100 ml											
		0,2 μm											
		Θερμοκρασία δείγματος = 8 °C						Θερμοκρασία δείγματος = 15 °C					
		TSA			NA			TSA			NA		
		37 °C	22 °C	10 °C	37 °C	22 °C	10 °C	37 °C	22 °C	10 °C	37 °C	22 °C	10 °C
4_1, 4_30	<i>Bacillus cibi</i>	0	0	0	2	0	0	70	69	16	105	51	35
4_3, 4_9	<i>Ralstonia sp.</i>	0	13	0	1	15	0	23	9	0	31	0	0
4_2	<i>Kocuria sp.</i>	0	0	0	110	24	0	0	0	0	0	0	0
4_4- 4_8, 4_11, 4_12, 4_15, 4_18 - 4_21, 4_24 - 4_27, 4_31 - 4_36, 4_37 - 4_39	Μη ταυτοποιημένα	0	30	0	13	0	0	0	1	1	0	23	66
		0,1 μm											
4_12 - 4_17, 4_22, 4_23, 4_27, 4_28	Μη ταυτοποιημένα	0	0	0	15	0	0	10	15	13	25	10	0

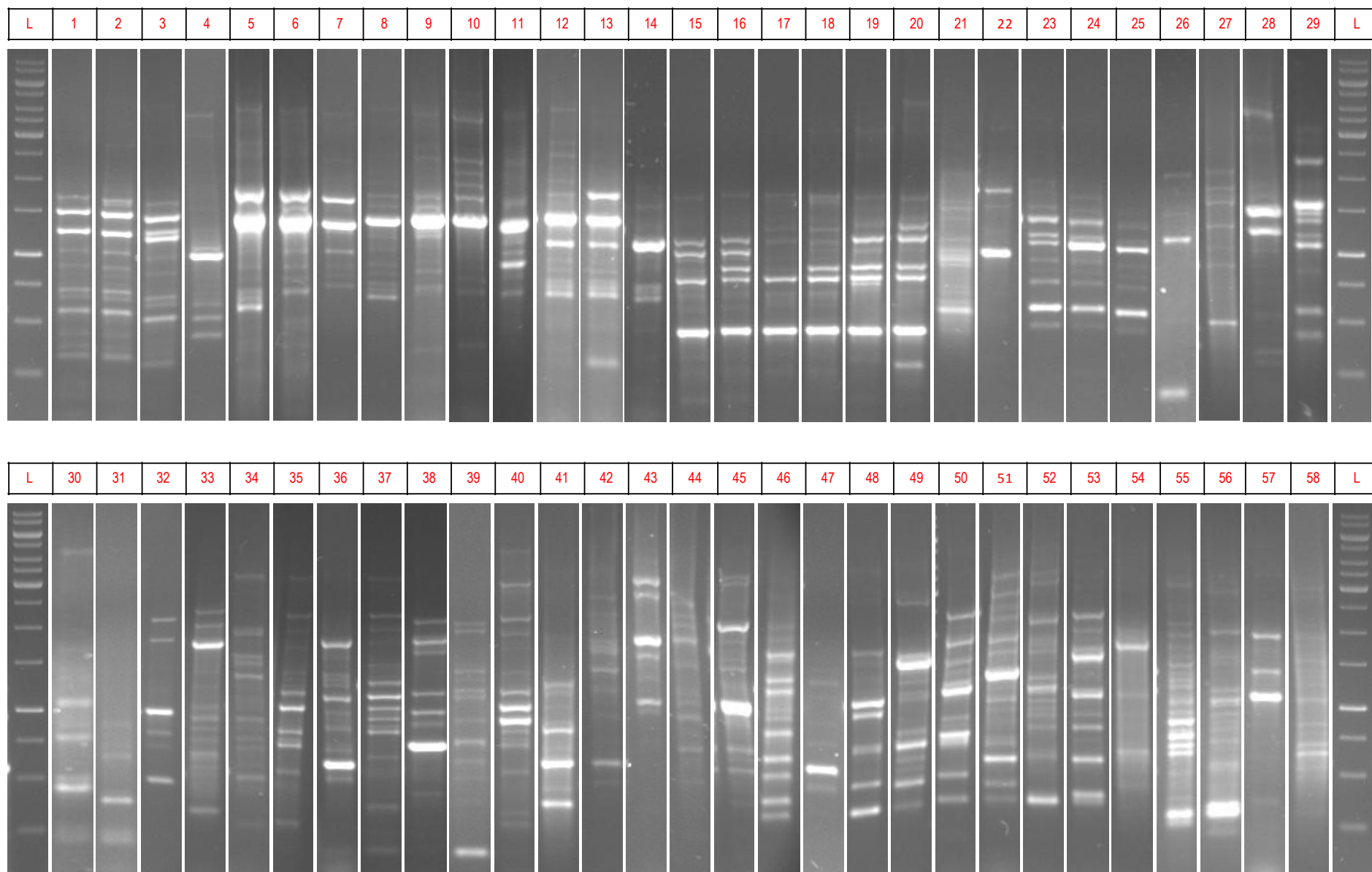
Πίνακας Π_7: Κατανομή του ολιγότροφου πληθυσμού συνθήκες κατά τη δειγματοληψία του Φεβρουαρίου 2011 στα ταυτοποιηθέντα γένη και είδη, ανάλογα με τη θερμοκρασία επώασης (θρεπτικό υπόστρωμα: WA).

Πρότυπο BOX	Στέλεχος με μέγιστη ομοιότητα	Θερμοκρασία Επώασης		
		37 °C	22 °C	10 °C
OL_8, OL_33	<i>Bacillus cibi</i>	5	3	0
OL_6	<i>Bacillus koralensis</i>	1	0	0
OL_11, OL_12, OL_31	<i>Blastobacter sp.</i>	86	307	148
OL_3, OL_7, OL_13, OL_16, OL_17, OL_18, OL_19, OL_22, OL_29, OL_30	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	133	213	1
OL_10, OL_14, OL_20, OL_21, OL_23, OL_25, OL_26, OL_27, OL_28	<i>Methylobacterium sp.</i>	17	29	1
OL_9, OL_15	<i>Ralstonia sp.</i>	9	4	0
OL_1, OL_2, OL_5	<i>Sphingomonas sp.</i>	1	139	175
OL_24	<i>Streptomyces sp.</i>	0	0	1
OL_4, OL_32	Μη ταυτοποιημένα	2	7	2

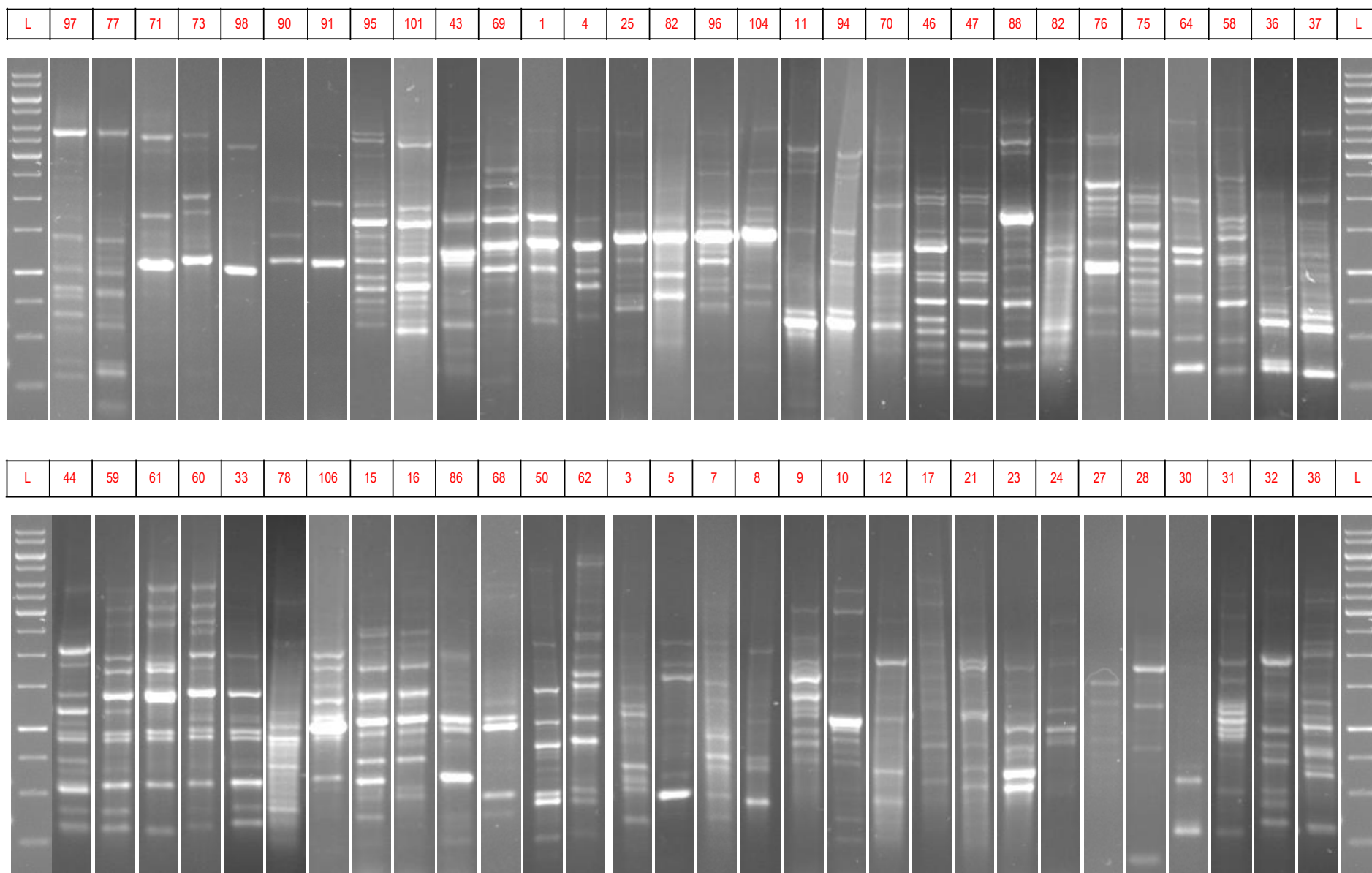
Παράρτημα 2



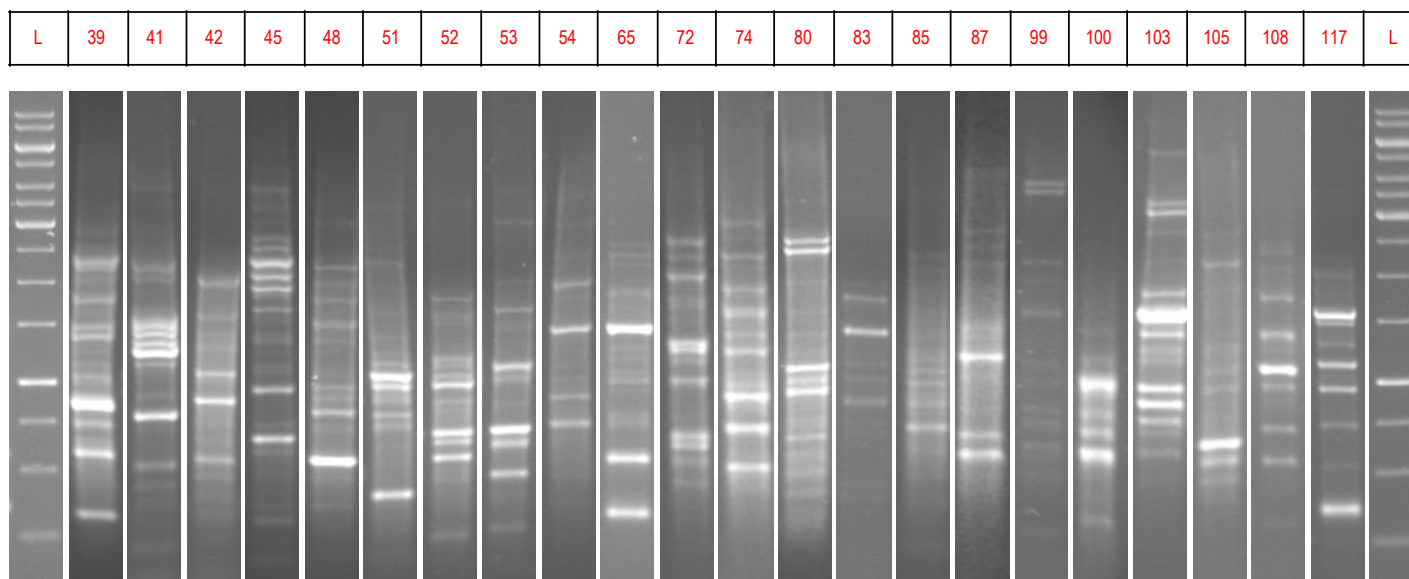
Εικόνα Π_1: Πρότυπα BOX για τον ολικό ετερότροφο πληθυσμό στη δειγματοληψία Ιανουαρίου 2010.



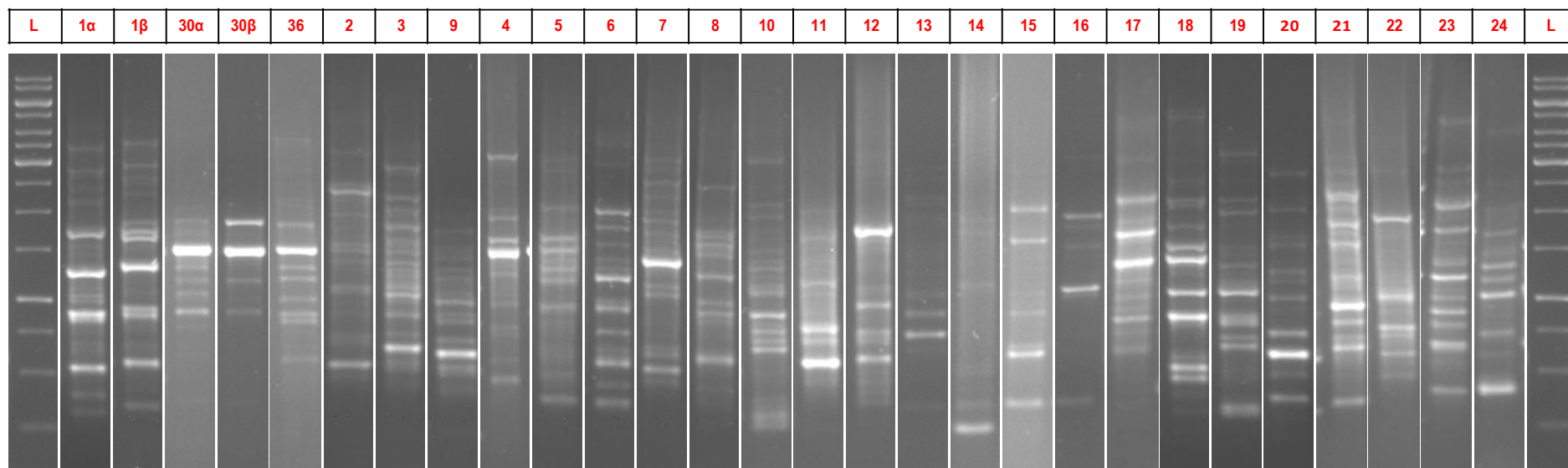
Εικόνα Π_2: Πρότυπα BOX για τον ολικό ετερότροφο πληθυσμό στη δειγματοληψία Μαρτίου 2010.



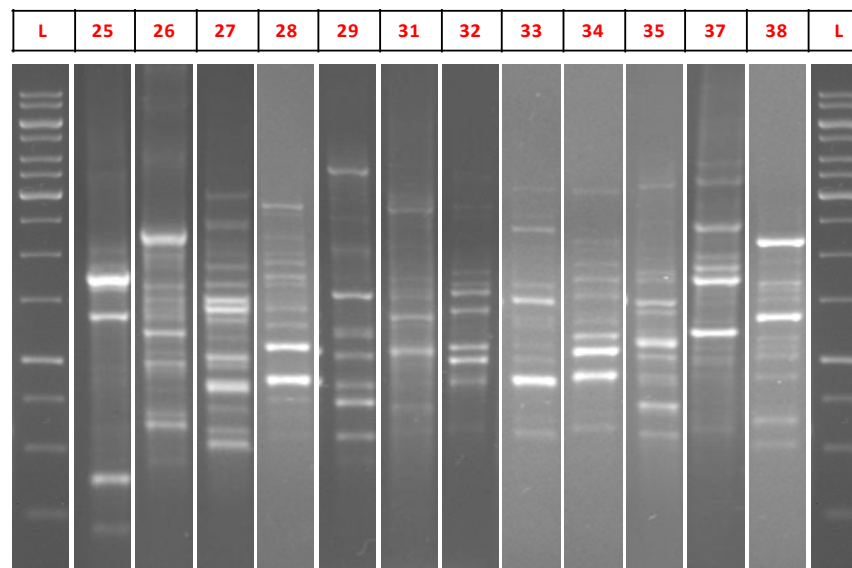
Εικόνα Π_3: Πρότυπα BOX για τον ολικό ετερότροφο πληθυσμό στη δειγματοληψία Ιουλίου 2010.



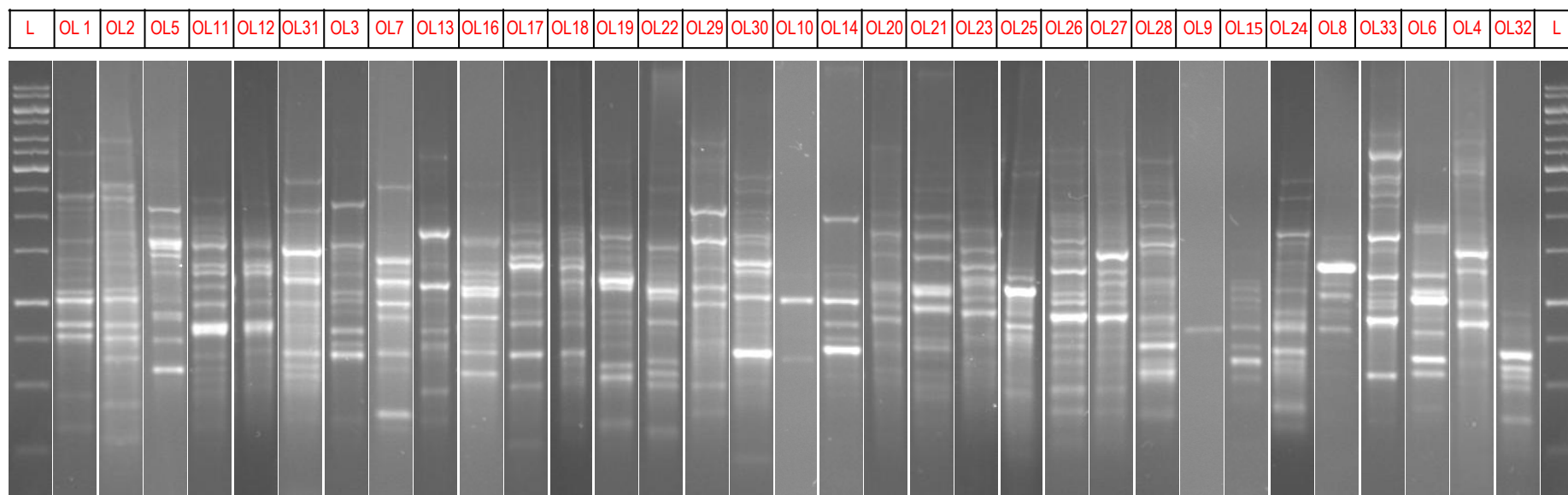
Εικόνα Π_3 (συνέχεια)



Εικόνα Π_4: Πρότυπα BOX για τον ολικό ετερότροφο πληθυσμό στη δειγματοληγία Φεβρουαρίου 2011.



Εικόνα Π_4 (συνέχεια)



Εικόνα Π_5: Πρότυπα BOX για τον ολιγότροφο πληθυσμό στη δειγματοληψία Φεβρουαρίου 2011

