



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης
«Μικροβιακή Βιοτεχνολογία»

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ
ΤΩΝ ΠΑΡΑΚΤΙΩΝ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΜΜΟΥ ΤΗΣ
ΠΑΡΑΛΙΑΣ ΒΑΡΚΙΖΑΣ-ΑΤΤΙΚΗ**

Επιβλέπουσα
Αμαλία Δ. Καραγκούνη, Καθηγήτρια

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΑΡΑΣΧΑΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

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
---------------------	-------------------------

Ευχαριστίες

Φτάνοντας στο τέλος αυτής της επίπονης αλλά 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 τον 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 συμπαράστασή τους σε όλα τα στάδια της εργασίας αυτής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε φίλους και συνεργάτες και συγκεκριμένα στην Αγγελική Πουρνάρα, στη Νικολίτσα Ταγαρούλια, στην Αναστασία Δέλλιου και στη Μαρία Μπουρμπούλη 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.

Τέλος, ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους επιστήθιους φίλους μου, για την ηθική υποστήριξη και το κουράγιο που μου έδωσαν για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής εργασίας

Περίληψη

Η μικροβιακή κοινότητα του νερού αλλάζει δραστικά μετά από βροχοπτώσεις και αυτό μπορεί να επιφέρει πιθανούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία. Τα περιττωματικά βακτήρια δείκτες χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό έλεγχο των θαλασσίων υδάτων, καθώς έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με ασθένειες που προκαλούνται με την κολύμβηση. Η παραλία της Βάρκιζας (22 χλμ νότια της Αθήνας) επελέγη για την παρούσα μελέτη λόγω του μεγάλου αριθμού λουομένων που συγκεντρώνει ετησίως, της γειννίας με την Αθήνα και του βραβείου 'Γαλάζια σημαία' που έχει κερδίσει.

Η μελέτη αυτή είναι μια πρώτη αξιολόγηση των μικροβιακών δεικτών και των παθογόνων βακτηρίων στην παραλία της Βάρκιζας, καθώς και των επιπτώσεων της βροχόπτωσης στη μικροβιακή κοινότητα.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν τον Ιούλιο του 2010, τον Φεβρουάριο του 2011 και τον Ιούλιο του 2011 από βάθος περίπου 30 εκατοστών σε συνθήκες ξηρασίας και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση. Τα δείγματα της άμμου συλλέχθηκαν πάνω από το επίπεδο της θάλασσας. Τρία διαφορετικά σημεία της παραλίας επιλέχθηκαν για τη συλλογή των δειγμάτων. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για καλλιέργεια των βακτηρίων αρχικά διηθήθηκαν, ενώ στη συνέχεια τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα και επωάστηκαν σύμφωνα με τυποποιημένα διεθνή πρωτόκολλα. Τα δείγματα για ανάλυση νουκλεϊκών οξέων διηθήθηκαν και έγινε απομόνωση DNA. Οι βακτηριακές συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν σε αποικίες (CFU) ανά 100 ml νερού ή αποικίες (CFU) ανά γραμμάριο ξερής άμμου. Οι ειδικοί εκκινητές PCR για το 16S rDNA ήταν οι F984GC και R1378, ενώ τα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με κλίση αποδιατακτικού παράγοντα (DGGE).

Αν και ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός δεν επηρεάστηκε από τη βροχόπτωση, τα περιττωματικά κολίμορφα βακτήρια, καθώς και οι μικροβιακοί δείκτες αυξήθηκαν 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση κατά τις θερινές δειγματοληψίες. Παρόμοια αύξηση εντοπίστηκε και κατά τις χειμερινές δειγματοληψίες αν και οι βακτηριακοί πληθυσμοί ήταν πολύ μικρότεροι.

Η ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella* ήταν θετική και στις 6 δειγματοληψίες. Στα δείγματα άμμου εμφανίστηκε σημαντική παρουσία *Enterococcus* sp. και *Candida* spp. σε συνθήκες ξηρασίας κατά τις θερινές δειγματοληψίες.

Τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών των ριβοτύπων της DGGE, έδειξαν ότι οι κυρίαρχοι βακτηριακοί πληθυσμοί στα δείγματα του νερού που αναλύθηκαν έχουν τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια με τα εξής είδη: *Glaciacola pallidula*, *Glaciacola nitratireducens*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Alteromonas genovensis*, *Novosphingobium capsulatum*, *Nereida ignava*, *Ralstonia solanacearum*, *Oceanicola pacificus*, *Pseudoalteromonas espejiana*, *Alteromonas macreodii*, *Aestuariibacter halophilus*.

Abstract

Variations in water quality at recreational bathing beaches can have significant impacts with respect to compliance with related water quality standards. The beach of Varkiza (22 km south of Athens) was selected for this study due to the large number of bathers it gathers, its proximity to Athens and its 'Blue Flag' award. The microbial water quality of beaches drastically changes after rainstorms and this may have potential risks for public health. Research suggests that sand may act as a bacterial reservoir, providing a source of faecal indicators to adjacent waters; therefore, there is growing concern that public exposure to human pathogens may be underestimated.

This study is an initial evaluation of the presence of indicator microbes and pathogens at the recreational marine beach of Varkiza and the effects of rainfall in microbial community.

Samples were collected in July 2010, February 2011 and July 2011 from knee-deep water both in dry weather and 24 h after the rainfall. Sand was collected above the high water mark. Concentrations of bacteria were calculated in terms of colony forming units (CFU) per 100 ml of water or CFU per gram of dry sand. The specific PCR primers used for 16S rDNA were F984GC and R1378 and the PCR products were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The separated DNA fragments were sequenced to identify the corresponding microbial species.

Although the abundance of total bacteria seems not affected by precipitation, faecal coliform and indicator bacteria concentration was significantly higher after the rainfall (*Staphylococcus* spp. 168 %, *enterococci* 71 %, *E. coli* 70 % increase) in summertime. Similar results occurred in the winter samplings (*Staphylococcus* spp. 116 %, *Enterococcus* sp. 208 %, *E. coli* 14.6 % increase) although their population size was much lower. The detection of *Salmonella* was positive in all of the 6 samplings. The sand samples showed a strong presence of *Enterococcus* sp. and *Candida* spp. in dry conditions only in summer. Finally, 16S rDNA DGGE sequence analysis revealed species affiliated with: *Glaciecola pallidula*, *Glaciecola nitratreducens*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Alteromonas genovensis*, *Novosphingobium capsulatum*, *Nereida ignava*, *Ralstonia solanacearum*, *Oceanicola pacificus*, *Pseudoalteromonas espejiana*, *Alteromonas macreodii*, *Aestuariibacter halophilus*.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	ii
Περίληψη	iii-iv
Abstract	v
Περιεχόμενα	vi-x
Κεφάλαιο 1^ο Εισαγωγή	1-36
1.1 Βακτήρια, ιοί και πρωτόζωα σε παράκτια ύδατα	2
1.2 Ανθρώπινα παθογόνα σε αμμώδη παραλιακή ζώνη	5
1.3 Ο ρόλος της βροχόπτωσης στην καθαρότητα των παράκτιων υδάτων	7
1.4 Η ανθρωπογενής επίδραση στη μόλυνση των υδάτων	9
1.5 Μικροβιακοί Δείκτες	10
1.5.1 Καθιερωμένοι μικροβιακοί δείκτες	11
1.5.2 Εναλλακτικοί δείκτες μόλυνσης	14
1.6 Σχέση μικροβιακών δεικτών και κινδύνου νόσησης	17
1.7 Μέθοδοι Ανίχνευσης Μικροβιακών δεικτών και παθογόνων μικροοργανισμών	18
1.7.1 Μέθοδοι ποιοτικής ανίχνευσης μικροοργανισμών	18
1.7.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (DGGE)	21
1.7.3 Μέθοδοι ποσοτικής ανίχνευσης μικροοργανισμών	23

1.8	Νομικά πλαίσια ελέγχου της ποιότητας των κολυμβητικών υδάτων	25
1.8.1	Ευρωπαϊκή Ένωση και Νομικό Πλαίσιο	27
1.9	Οικονομικές επιπτώσεις της μόλυνσης των υδάτων	30
1.10	Ο κόλπος της Βάρκιζας	31
1.11	Σκοπός της εργασίας	35
	Κεφάλαιο 2^ο Υλικά και Μέθοδοι	37-54
2.1	Δειγματοληψία	38
2.2	Θρεπτικά υποστρώματα και διαλύματα	40
2.3	Ποσοτικός προσδιορισμός των υδάτινων δειγμάτων	43
2.3.1	Εκτίμηση του ολικού πληθυσμού των μικροοργανισμών από τα δείγματα νερού	43
2.3.2	Εκτίμηση και απομόνωση ολικών μικροοργανισμών από δείγματα άμμου.	44
2.3.3	Ανίχνευση και Απομόνωση <i>Staphylococcus</i> sp.	45
2.3.4	Ανίχνευση και απομόνωση του ολικού πληθυσμού των εντεροκόκκων	46
2.3.5	Απομόνωση και επιλογή των βακτηρίων του γένους <i>E. coli</i>	46
2.3.6	Ανίχνευση και Απομόνωση Μικροοργανισμών <i>Salmonella</i> sp.	47
2.3.7	Ανίχνευση και Απομόνωση <i>Candida albicans</i>	48
2.4	Ανάλυση ολικού προκαρυωτικού DNA με τη μέθοδο DGGE	49

2.4.1	Αρχή της μεθόδου	49
2.4.2	Ανάλυση ολικού βακτηριακού DNA σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με συγκέντρωση αποδιατακτικού παράγοντα υπό κλίση	49
2.4.3	Στατιστική ανάλυση ριβοτύπων DGGE	51
2.4.4	Απομόνωση και ενίσχυση DNA από πήκτωμα ακρυλαμίδης	51
2.4.5	Μοριακή ταυτοποίηση ριβοτύπων από πήκτωμα ακρυλαμίδης	53

Κεφάλαιο 3^ο Αποτελέσματα **55-95**

3.1	Καταγραφή του μικροβιακού φορτίου σε δείγματα θαλασσίου νερού στην περιοχή της Βάρκιζας	56
3.1.1	Εποχιακή διακύμανση του μικροβιακού πληθυσμού στο νερό	59
3.1.2	Διακύμανση στον μικροβιακό πληθυσμό του νερού με βάση τη θέση δειγματοληψίας	61
3.1.3	Επίδραση της βροχόπτωσης στον μικροβιακό πληθυσμό του νερού	64
3.2	Ποσοτικός προσδιορισμός του μικροβιακού πληθυσμού της άμμου	69
3.2.1	Εποχιακή διακύμανση του ολικού μικροβιακού πληθυσμού στην άμμο	74
3.2.2	Διακύμανση του μικροβιακού πληθυσμού της άμμου με βάση τη θέση δειγματοληψίας	77

3.2.3	Επίδραση της βροχόπτωσης στον μικροβιακό πληθυσμό της άμμου	79
3.3	Ποιοτικός προσδιορισμός βακτηρίων του γένους <i>Salmonella</i>	86
3.4	Μελέτη της ποικιλότητας των βακτηρίων στα δείγματα νερού με τη μέθοδο της DGGE	87
3.4.1	Παρουσία βακτηριακού DNA μέσω ενίσχυσης του 16S rDNA των δειγμάτων νερού από τις 3 θέσεις δειγματοληψίας	87
3.4.2	Παρουσία βακτηρίων στα δείγματα νερού μέσω μοριακής ανάλυσης ριβοτύπων σε DGGE	92
	Κεφάλαιο 4^ο Συζήτηση	96-110
4.1	Μικροβιακή ποικιλότητα στο νερό	97
4.1.1	Εποχιακή διακύμανση του μικροβιακού πληθυσμού στο νερό	98
4.1.2	Διακύμανση του μικροβιακού πληθυσμού του νερού βάση της θέσης δειγματοληψίας	99
4.1.3	Επίδραση της βροχόπτωσης στον μικροβιακό πληθυσμό του νερού	100
4.2	Μικροβιακή ποικιλότητα στην άμμο	103
4.2.1	Εποχιακή διακύμανση του ολικού μικροβιακού πληθυσμού στην άμμο	104
4.2.2	Διακύμανση του μικροβιακού πληθυσμού της άμμου με βάση τη θέση δειγματοληψίας	105
4.2.3	Επίδραση της βροχόπτωσης στον μικροβιακό πληθυσμό της άμμου	105

4.3	Ποιοτικός προσδιορισμός βακτηρίων του γένους <i>Salmonella</i>	106
4.4	Βακτηριακή ποικιλότητα νερού μέσω DGGE	107
	Γενικά συμπεράσματα	109
	Κεφάλαιο 5° Βιβλιογραφία	111-122
	Παράρτημα	123-127

ΚΑΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οικιστική ανάπτυξη σε παράκτιες περιοχές αυξάνεται χρόνο με το χρόνο σχηματίζοντας μεγάλα αστικά κέντρα κοντά στα υδάτινα θαλάσσια οικοσυστήματα. Υπολογίζεται ότι ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού που κατοικεί σε παράκτιες περιοχές είναι διπλάσιος του ρυθμού αύξησης του παγκόσμιου πληθυσμού (Henrickson *et al.*, 2001). Η έντονη αυτή αστικοποίηση επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα των παρακείμενων υδάτων, καθώς διάφορα απόβλητα από τις ανθρώπινες δραστηριότητες καταλήγουν συχνά σε αυτά ρυπαίνοντάς τα.

Η υποβάθμιση αυτή της ποιότητας μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τόσο την ισορροπία του θαλάσσιου οικοσυστήματος, όσο και την υγεία των λουόμενων. Η ύπαρξη παρατεταμένης μόλυνσης μπορεί να καταστρέψει το ενδιαίτημα, να επηρεάσει την επιβίωση ή κάποια στάδια του κύκλου ζωής των θαλάσσιων οργανισμών οδηγώντας τους σταδιακά σε εξαφάνιση. Επιπλέον, η παρουσία ανθρώπινων παθογόνων μικροοργανισμών σε κολυμβητικά ύδατα θέτει σε κίνδυνο την υγεία όσων έρθουν σε επαφή με αυτά. Για το λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορα προγράμματα εκτίμησης και διαχείρισης της ποιότητας των παράκτιων υδάτων, ενώ τα περισσότερα κράτη πραγματοποιούν τακτικούς ελέγχους και λαμβάνουν μέτρα για την αντιμετώπιση φαινομένων μόλυνσης.

1.1 Βακτήρια, ιοί και πρωτόζωα σε παράκτια ύδατα

Το 1982 ένα ξέσπασμα γαστρεντερικής λοίμωξης επηρέασε δύτες της αστυνομίας και της πυροσβεστικής της Νέας Υόρκης, οι οποίοι είχαν κάνει κατάδυση στα μολυσμένα με απόβλητα ποτάμια Hudson και East. Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών ανέφερε ότι οι μικροοργανισμοί *Entamoeba histolytica* ή *Giardia lamblia* (Εικ. 1Α) απομονώθηκαν τόσο από το νερό όσο και από το 60% των δυτών που εμφάνισαν συμπτώματα. Στις αρχές του 21^{ου} αιώνα, περιπτώσεις εμφάνισης τύφου συσχετίστηκαν με κολύμβηση στα λιμάνια New York και New Heaven στις ΗΠΑ, ενώ διάφορες μελέτες αναφέρουν μόλυνση από θαλάσσια βακτήρια του γένους *Vibrio*. Περιπτώσεις λοίμωξης του γαστρεντερικού και του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, μολύνσεις πληγών, οφθαλμών, αυτιών, του νευρικού συστήματος, ακόμη και περιπτώσεις οστεομυελίτιδας και γάγγραινας έχουν αναφερθεί ύστερα από κολύμβηση σε μολυσμένα αλμυρά νερά (Henrickson *et al.*, 2001).

Αρκετές δεκαετίες πριν είχε αρχίσει να γίνεται αρκετά σαφές πως η άποψη ότι τα εντερικά παθογόνα καταστρέφονται γρήγορα στο θαλασσινό νερό ίσως να μην είναι ακριβής. Γενικά, οι παράγοντες που καθορίζουν την ανάπτυξη και επιβίωση των βακτηρίων στα θαλάσσια

οικοσυστήματα είναι η αλατότητα, η θερμοκρασία, η θήρευση, η ηλιακή ακτινοβολία, τα τοξικά χημικά και τα θρεπτικά στοιχεία. Οι υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών που υπάρχουν σε ορισμένα παράκτια ύδατα μπορεί να υπερκεράσουν την καταπόνηση που προκαλείται από συνθήκες υψηλής αλατότητας ή/και θερμοκρασίας, οδηγώντας σε παρατεταμένη επιβίωση των βακτηρίων.

Ακόμη, κάτω από μη ευνοϊκές συνθήκες τα βακτήρια μπορούν να εισέλθουν σε κατάσταση λήθαργου. Για παράδειγμα, σαν απόκριση στη χαμηλή θερμοκρασία ή στην έλλειψη θρεπτικών ουσιών, το βακτήριο *Vibrio cholerae* μπορεί να συρρικνωθεί στο 1/300 του αρχικού του μεγέθους και να επιβιώσει σε ληθαργική κατάσταση για παρατεταμένες περιόδους, αναπτυσσόμενο ξανά όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος γίνουν ευνοϊκές (Henrickson *et al.*, 2001).

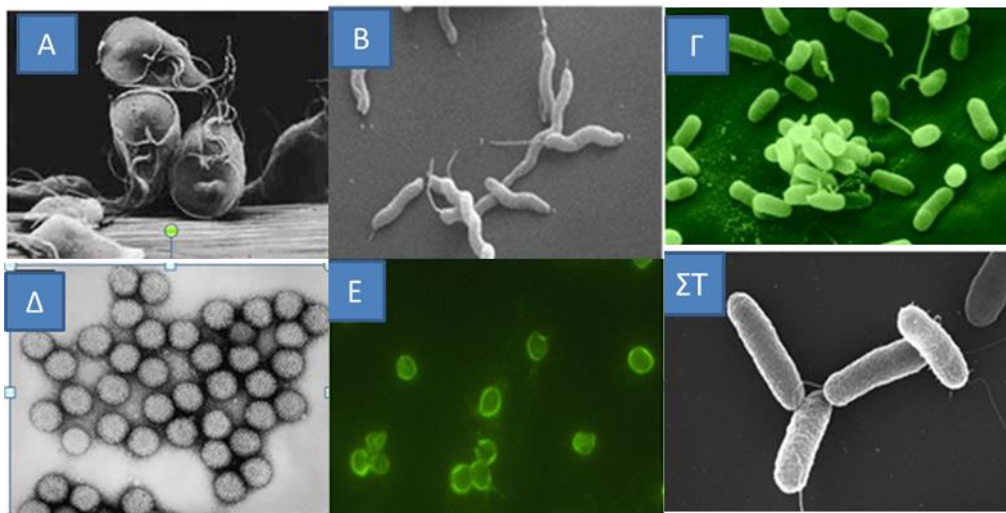
Πίνακας 1.1. Παθογόνοι μικροοργανισμοί και ασθένειες (WHO 2003)

Παθογόνα	Ασθένεια
Βακτήρια <i>Campylobacter</i> spp. <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp.	Γαστρεντερίτιδα Γαστρεντερίτιδα Βακιλιακή δυσεντερία
Ιοί Πολιοϊοί Ροταϊοί Αδενοϊοί Norwalk - like viruses Ιός της Ηπατίτιδας Α	Πολιομυελίτιδα Διάρροια, έμετος Λοίμωξη του αναπνευστικού, γαστρεντερίτιδα Διάρροια, έμετος Ηπατίτιδα
Πρωτόζωα <i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i>	Διάρροια Αμοιβαδοειδής δυσεντερία Διάρροια

Έχει ανιχνευθεί η ύπαρξη μιας σειράς παθογόνων μικροοργανισμών σε επιφανειακά ύδατα, καθώς βακτήρια, ιοί και πρωτόζωα μπορούν να επιβιώνουν τόσο σε γλυκά όσο και σε αλμυρά νερά και να διατηρούν τη μολυσματικότητά τους (Πίνακας 1.1). Πέντε περιπτώσεις μόλυνσης από το βακτήριο *E.coli* O157:H7 αναφέρθηκαν σε άτομα που επισκέφθηκαν την ίδια παραλία τον Αύγουστο του 1999 στο Wisconsin των ΗΠΑ. Μολύνσεις από

Campylobacter jejuni (Εικ. 1.B), *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* (Εικ. 1.1 Γ), *Legionella pneumophila* και *Leptospira interrogans* έχουν επίσης αναφερθεί μετά από επαφή με μολυσμένα κολυμβητικά ύδατα (Barwick et al.,2000).

Κοινοί παθογόνοι ιοί που απαντώνται στα ύδατα αναψυχής είναι ο ιός της Ηπατίτιδας Α, οι ροταϊοί (rotaviruses) (Εικ. 1.1 Δ), νοροϊοί (noroviruses), οι αδενοϊοί και οι εντεροϊοί. Αυτοί μπορεί να προκαλέσουν διάφορες ασθένειες ύστερα από επαφή ή κατάποση, όπως γαστροεντερίτιδα, διάρροια, οφθαλμικές μολύνσεις, αλλά και πιο σοβαρές, όπως ηπατίτιδα, παράλυση, μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού και μυοκαρδίτιδα (Fong & Lipp, 2005). Έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις λοίμωξης από ιούς ύστερα από επαφή με μολυσμένα κολυμβητικά ύδατα. Στο Wisconsin 9 άτομα μολύνθηκαν το 2000 από Norwalk-like virus μετά από κολύμβηση σε πισίνα ξενοδοχείου, ενώ από το 1999 έως το 2000 έχουν αναφερθεί στις ΗΠΑ τρεις επιδημίες από NLV (Calicivirus) που επηρέασαν 202 άτομα (Barwick et al.,2000).



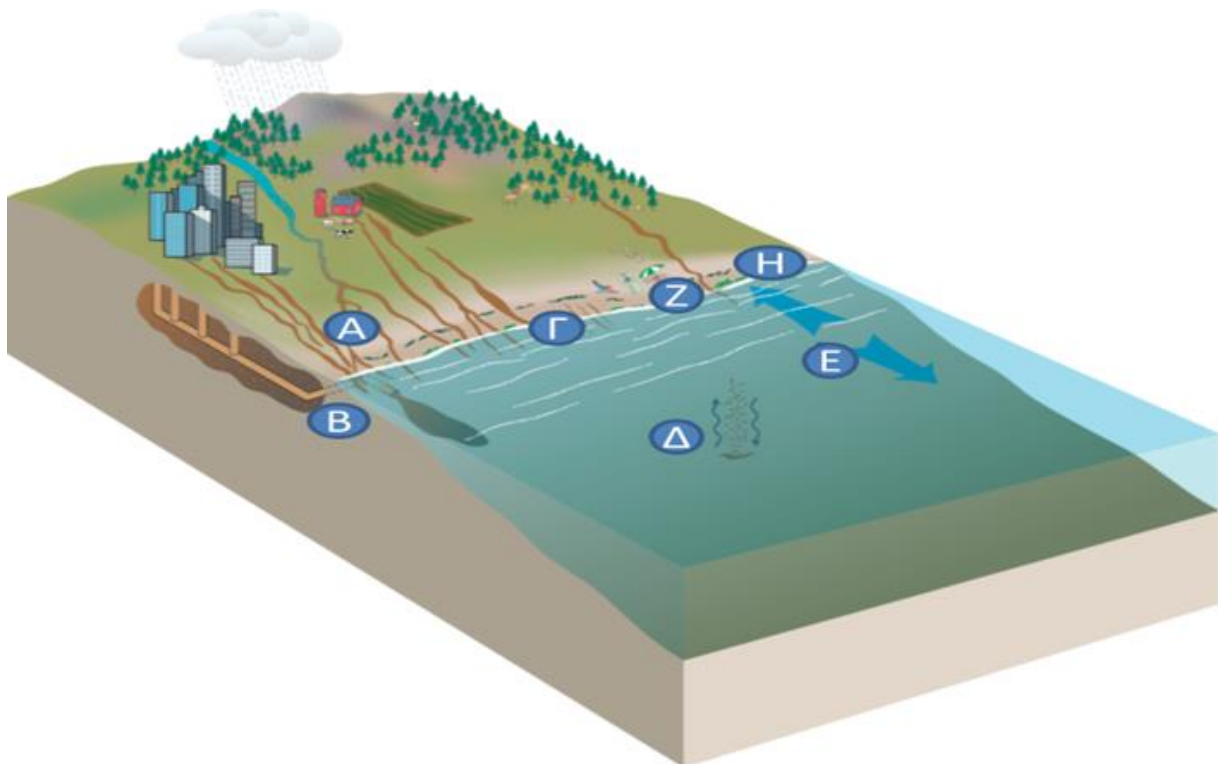
Εικόνα 1.1 **A.** *Giardia lamblia* (www.hsc.sca.nsw.gov.au), **B.** *Campylobacter jejuni* (www.microbelibrary.org) , **Γ.** *Pseudomonas aeruginosa* (<http://lisando.com>), **Δ.** Ροταϊοί (www2.vet-lyon.fr) **E.** *Cryptosporidium parvum* (www.epa.gov), **ΣΤ.** *Salmonella typhimurium* (www.commonswikimedia.org)

Μολύνσεις από τα πρωτόζωα *Cryptosporidium parvum* (Εικ. 1.1 E), *Giardia lamblia* (Εικ. 1.1 A) και *Naegleria fowleri* έχουν επίσης αναφερθεί μετά από επαφή με ύδατα αναψυχής. Ο τρόπος μόλυνσης είναι κυρίως μέσω κατάποσης νερού και ενώ η πιθανότητα να μολυνθεί κάποιος με αυτό τον τρόπο είναι υπαρκτή, λίγες μελέτες συσχετίζουν την εμφάνιση γαστρεντερικών λοιμώξεων με την έκθεση σε νερό μολυσμένο με παθογόνα πρωτόζωα (Barwick et al., 2000, Henrickson et al., 2001).

1.2 Ανθρώπινα παθογόνα σε αμμώδη παραλιακή ζώνη

Η δημοσίευση της πρώτης επιδημιολογική μελέτης που αφορά στην άμμο παραλίας (Heaney *et al.*, 2009) έδειξε ότι οι δραστηριότητες κατά τις οποίες έρχεται κάποιος σε επαφή με την άμμο, όπως σκάψιμο ή θάψιμο στην άμμο, συνδέονται άμεσα με την εμφάνιση εντερικών διαταραχών. Το γεγονός αυτό φανέρωσε το ότι οι δραστηριότητες στην άμμο ενδέχεται να είναι ένας σημαντικός και υποτιμημένος τρόπος έκθεσης των ανθρώπων σε παθογόνους μικροοργανισμούς.

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες μελέτες που ερευνούν τα ανθρώπινα παθογόνα στην άμμο παραλιών είτε δεν έχουν επιδιώξει να προσδιορίσουν μια ευδιάκριτη συσχέτιση της αφθονίας των μικροβιακών δεικτών με αυτή των παθογόνων μικροοργανισμών στην άμμο, είτε έχουν αποτύχει στην προσπάθεια, σε αντίθεση με το νερό, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι κλασσικές μέθοδοι με τη χρήση μικροβιακών δεικτών δεν επαρκεί για τον πλήρη έλεγχο της καταλληλότητας της άμμου.



Εικόνα 1.2 Μονοπάτια εισροής περιττωματικών βακτηριακών δεικτών (Fecal Indicator Bacteria - FIBs) στην άμμο και στη θάλασσα. (Α) Υδάτινες απορροές (Β) Αποχετευτικό σύστημα (Γ) Κύματα (Δ) Περιοδική παλίρροια (Ε) Θαλάσσια ρεύματα (Ζ) Άνθρωποι και ζώα (Η) Αγροτικές απορροές.

Η διαπίστωση ότι η άμμος μπορεί να αποτελέσει «δεξαμενή» παθογόνων μικροοργανισμών έχει οδηγήσει στη διεξαγωγή πολλών σχετικών ερευνών για την απομόνωση και ταυτοποίησή τους (Εικ. 1.2). Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο αριθμός των παθογόνων μικροοργανισμών ανθρώπινης προέλευσης που μπορούν όχι μόνο να επιβιώσουν αλλά και να αναπτυχθούν στην άμμο είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν που είχε εκτιμηθεί στο παρελθόν σε πολλές μελέτες.

Σε πειράματα προσομοίωσης των συνθηκών ιζήματος γλυκού νερού, καλλιεργήσιμα στελέχη *Escherichia coli* και τα παθογόνα *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas aeruginosa* επιβίωσαν για εβδομάδες, παρόλο που οι πληθυσμοί τους μειώνονταν με γραμμικό ρυθμό (Burton *et al.*, 1987). Σε πειράματα με δείγματα νερού και άμμου στο Ισραήλ, το στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* βρέθηκε σε μεγαλύτερο πληθυσμό στην άμμο απ' ότι στο νερό (Ghinsberg *et al.*, 1995) καθώς, επίσης, το συγκεκριμένο είδος έχει απομονωθεί από άμμο παραλίας στην Πορτογαλία (Mendes *et al.*, 1993).

Το παθογόνο βακτήριο *Staphylococcus aureus* έχει βρεθεί ότι εμπλουτίζεται περισσότερο στην άμμο απ' ότι στη θάλασσα, ενώ η ύπαρξή του έχει συνδεθεί με την παρουσία ζυμομυκήτων ανθρώπινης προέλευσης και επηρεάζεται άμεσα από τον αριθμό των λουομένων κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, υποδηλώνοντας ότι αυτοί αποτελούν τη βασική πηγή αυτών των βακτηρίων (Paradakis *et al.*, 1997).

Η άμμος των παραλιών στη λωρίδα της Γάζας, η ακτογραμμή της οποίας είναι μολυσμένη με επεξεργασμένα, μερικώς επεξεργασμένα και ακατέργαστα λύματα, περιέχει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις περιττωματικών βακτηριακών δεικτών και δυνητικά παθογόνων στελεχών του γένους *Salmonella* και *Vibrio* απ' ότι στη θάλασσα (Elmanama *et al.*, 2005). Τέλος, το παθογόνο ανθρωπογενούς προέλευσης βακτήριο *Aeromonas Hydrophila* έχει ανακτηθεί από άμμο σε περιοχή της Μεσογείου (Ghinsberg *et al.*, 1995).

Επιπλέον, δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια μελέτης για την ποιότητα του νερού σε παραλία της Φλόριντας έδειξαν παρουσία των παθογόνων *Vibrio vulnificus* και του ιού Polyomavirus (PVD), τόσο στην άμμο, όσο και στο νερό, ενώ αποκλειστικά η άμμος έδειξε θετικά αποτελέσματα για στελέχη των πρωτοζώων του γένους *Cryptosporidium* και το νερό για το γένος *Giardia* (Abdelzaher *et al.*, 2010).

Έρευνα που διεξήχθη σε παραλίες λουομένων σε αγγλικές ακτές ανέδειξε τα παθογόνα *Campylobacter jejuni* και *Salmonella* στην άμμο των παραλιών (Bolton *et al.*, 1999) Στη

Βραζιλία, δυνητικά παθογόνα στελέχη εντεροβακτηρίων (*Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium*) έχουν βρεθεί σε μεγαλύτερους πληθυσμούς στην ξηρή άμμο απ' ότι στην υγρή άμμο και στα δείγματα του νερού. Επίσης στην ίδια έρευνα παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό των ανθεκτικών σε αντιβιοτικά εντεροβακτηριακών στελεχών ήταν αυξημένο στην άμμο των πολύ μολυσμένων παραλιών σε σχέση με την άμμο που βρίσκεται σε σχετικά καθαρές παραλίες (de Oliveira & Pinhata, 2008).

Πρόσφατα, η απομόνωση στελεχών του είδους *Staphylococcus aureus* ανθεκτικών στη μεθικιλίνη (MRSA) από άμμο και θαλάσσιο νερό στη νότια Καλιφόρνια και στην περιοχή της Ουάσιγκτον, πυροδότησε συζητήσεις για τη σημασία των δημόσιων παραλιών ως δεξαμενές για τη συντήρηση και μετάδοση των στελεχών MRSA (Soge *et al.*, 2009).

Τέλος, βρέθηκε ότι οι εντεροϊοί βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε εκβολές ποταμών απ' ότι μέσα στο νερό (Halliday & Gast, 2011).

1.3 Ο ρόλος της βροχόπτωσης στην καθαρότητα των παράκτιων υδάτων

Σε ολόκληρο τον κόσμο το κλείσιμο παραλιών λόγω μικροβιακής μόλυνσης του νερού έχει προκαλέσει την ενδελεχή έρευνα προκειμένου να βρεθεί η αιτία αύξησης της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένες πηγές μόλυνσης, όπως η υπερχειλίση υπονόμων, γεωργικές απορροές, το νερό της βροχής και τα ρέματα, έχουν συνδεθεί με την αύξηση του μικροβιακού φορτίου σε παραλίες αναψυχής (McLellan, 2004).

Τα περιττωματικά βακτήρια που απομονώνονται απ' το νερό, προέρχονται από ανθρώπινη ή ζωική δραστηριότητα και εισέρχονται στις παραλίες με πολλούς τρόπους (Kinzelman *et al.*, 2004). Τα νερά της βροχής που περνούν από επιφάνειες όπως, δρόμοι, στέγες, χλοοτάπητες και εργοτάξια έχουν αναγνωριστεί ως τη μεγαλύτερη πηγή μόλυνσης που μπορεί να προκαλέσει το κλείσιμο των παραλιών (Dorfman & Stoner, 2007). Οι δρόμοι και οι χώροι στάθμευσης είναι υπεύθυνοι για το 54 % του συνολικού όγκου απορροής σε κατοικημένες περιοχές και το 80 % του συνολικού όγκου απορροής σε εμπορικές περιοχές (Bannerman *et al.*, 1993). Καθώς το νερό της βροχής ρέει σε αυτές τις επιφάνειες συγκεντρώνει ρύπους, όπως πετρέλαιο, γράσο, θρεπτικά υλικά, φυτοφάρμακα, φώσφορο, χαλκό, ψευδάργυρο και περιττωματικά βακτήρια (Papiri *et al.*, 2003). Τα περιττωματικά βακτήρια των όμβριων υδάτων μπορεί να προέρχονται από οικόσιτα ζώα, όπως βοοειδή, άλογα, σκυλιά και γάτες ή από άγρια ζώα, όπως ελάφια και υδρόβια πτηνά.

Τελικά, αυτά τα μολυσμένα νερά φθάνουν σε φυσικά επιφανειακά ύδατα και αν αυτά βρίσκονται κοντά σε παραλίες αναψυχής δύναται να οδηγήσουν σε αύξηση του βακτηριακού φορτίου και κατά συνέπεια να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία των λουόμενων (Dorfman & Stoner, 2007).

Η ισχυρή βροχόπτωση έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με την αύξηση της βακτηριακής μόλυνσης των παραλιών σε πολλές ακτογραμμές (Ackerman & Weisberg, 2003). Στη νότια Καλιφόρνια οι παραλίες κλείνουν αυτόματα μετά από βροχόπτωση όταν η στάθμη του νερού υπερβαίνει τα 2,5 mm, χωρίς καν να προηγηθεί μικροβιολογικός έλεγχος του νερού (Εικ. 1.3) (Noble *et al.*, 2003). Αν και οι καταιγίδες είναι ένα σχετικά σπάνιο φαινόμενο στη νότια Καλιφόρνια, οι συνέπειες της εκάστοτε βροχής στην αύξηση του μικροβιακού φορτίου είναι σημαντικές λόγω του ότι προκαλείται υπερχειλίση των όμβριων υδάτων (Schiff *et al.*, 2003).



Εικόνα 1.3 Οι κυριότερες αιτίες κλεισίματος των παραλιών στις Η.Π.Α. κατά το 2011 (National Resources Defense Council, 2011)

Αύξηση της βακτηριακής συγκέντρωσης παρατηρείται στις περισσότερες από τις βροχοπτώσεις όπου η στάθμη του νερού είναι μεγαλύτερη από 6 mm και σε όλες όπου η στάθμη είναι μεγαλύτερη από 25 mm. Βροχόπτωση μικρότερη των 2,5 mm έχει αμελητέα επίδραση στο μικροβιακό φορτίο των παραλιών, όπως παρατηρήθηκε μετά από έρευνα που έλαβε χώρα στη νότια Καλιφόρνια στον κόλπο της Σάντα Μόνικα (Ackerman & Weisberg, 2003).

Ελάχιστες έρευνες έχουν διεξαχθεί σε αστικοποιημένες ακτογραμμές για τη μόλυνση των θαλασσών, τόσο από βροχοπτώσεις όσο και από μη σημειακές πηγές απορροής (Noble *et*

al., 2003). Οι αστικές παραλίες του νοτιοανατολικού Ουισκόνσιν στις Η.Π.Α. κλείνουν αυτόματα μετά από κάθε βροχόπτωση, καθώς έρευνες που διεξήχθησαν στη γύρω περιοχή έδειξαν ότι ο πληθυσμός του βακτηρίου *Escherichia coli* υπερέβαινε κατά πολύ τα επιτρεπτά όρια (Kleinheinz *et al.*, 2009).

Αίσθηση έχει προκαλέσει πρόσφατη έρευνα που διεξήχθη πριν την έναρξη της τουριστικής περιόδου (Απρίλιος 2012), σε δημοφιλείς παραλίες του Ηνωμένου Βασιλείου και έδειξε ότι το ένα τρίτο των 750 παραλιών δεν κατάφεραν να καλύψουν τα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί για την ποιότητα του νερού, όσον αφορά στη συγκέντρωση των περιττωματικών βακτηρίων. Αυτό οφείλεται κατά κύριο λόγο στην υπερχείλιση των υπονόμων, τα αυξημένα λύματα από φάρμες και σπίτια ή και δρόμους όπου τα απεκκρίματα των σκύλων συνιστούν ένα σημαντικό πρόβλημα μετά από έντονη βροχόπτωση (The Guardian, 3 Μαΐου 2012).

Το πρόβλημα επιδεινώθηκε κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (Ιούνιος -Ιούλιος 2012), όπου η βροχόπτωση ήταν πολύ αυξημένη σε σχέση με τις προηγούμενες χρονιές, με απόρροια 43 παραλίες να χάσουν το βραβείο «Γαλάζια Σημαία» και να υπάρχει μεγάλη οικονομική συνέπεια για τις γύρω περιοχές. Υπό τις νέες Ευρωπαϊκές Οδηγίες που θα εισαχθούν το 2015, στις παραλίες με μολυσμένα νερά θα είναι υποχρεωτική η ανάρτηση προειδοποιητικής πινακίδας και το κλείσιμο της εκάστοτε παραλίας που δεν πληροί τα κατώτερα όρια καθαριότητας (The Sunday Times, 22 Ιουλίου 2012).

1.4 Η ανθρωπογενής επίδραση στη μόλυνση των υδάτων

Τα περιττωματικά κολλίμορφα βακτήρια που βρίσκονται σε νερά αναψυχής μπορεί να προέρχονται από την επαναιώρηση του ιζήματος στον βυθό (Steets & Holden, 2003), καθώς και από τους ίδιους τους λουόμενους (Craun *et al.*, 2005), εφόσον οι πολυπληθείς παραλίες έχουν μεγαλύτερους πληθυσμούς των συγκεκριμένων βακτηρίων (Elmir *et al.*, 2007). Μια πλειάδα δημοσιεύσεων έχουν αναφέρει την επαναιώρηση των δεσμευμένων στο ίζημα κολλίμορφων, ως αποτέλεσμα της διατάραξης του ιζήματος και της άμμου από τους λουόμενους, την κίνηση των βαρκών, τις καταιγίδες, την παλίρροια και την βυθοκόρηση (Ackerman & Wisberg, 2003, Steets & Holden, 2003). Ανθρώπινα παθογόνα μπορεί να διασπαρθούν άμεσα από άτομα με γαστρεντερίτιδα, βρέφη και ηλικιωμένους (Steward *et al.*, 2002). Κατά μέσο όρο, 6×10^6 βιώσιμες μονάδες (CFUs) εντεροκόκκων απελευθερώνονται από κάθε λουόμενο σε 15 min κολύμβησης (Elmir *et al.*, 2007) και για τον λόγο αυτό οι γαστρεντερικές ασθένειες έχουν συσχετιστεί άμεσα με τον αυξημένο αριθμό λουομένων (Johnson *et al.*, 2008).

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν θετική σχέση μεταξύ της πυκνότητας των λουομένων και των πληθυσμών του γένους *Cryptosporidium*, *Giardia* και μικροσποριδίων στις παραλίες

αναψυχής (Graczyk *et al.*, 2007β, 2007γ, Sunderland *et al.*, 2007). Οι έρευνες αυτές υποδεικνύουν ότι η ανακίνηση του ιζήματος στον βυθό από τους λουόμενους μπορεί να αύξηση τους πληθυσμούς τόσο των περιττωματικών κολλίμορφων βακτηρίων όσο και των θαλασσίων παρασίτων.

1.5 Μικροβιακοί Δείκτες

Παθογόνοι μικροοργανισμοί εμφανίζονται συχνά στη φύση και τις περισσότερες φορές σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση καθενός από αυτούς αποτελεί μια επίπονη διαδικασία και είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί στις περισσότερες περιπτώσεις. Για το λόγο αυτό, οι καθιερωμένες μικροβιολογικές αναλύσεις για τον έλεγχο της καταλληλότητας των υδάτων βασίζονται στην ανίχνευση μικροοργανισμών δεικτών που εποικούν τα ίδια ενδιαιτήματα με τους παθογόνους και συνεπώς μπορούν να προβλέψουν την παρουσία των τελευταίων (Savichtcheva & Okabe, 2006).

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά που πρέπει να φέρει ένας μικροοργανισμός ώστε να αποτελέσει ιδανικό δείκτη είναι:

- Να μην μπορεί να αναπτυχθεί στο περιβάλλον
- Να μπορεί να απομονωθεί εύκολα και το ίδιο εύκολα να μπορεί να γίνει και προσδιορισμός του πληθυσμού του
- Να μπορεί να απομονωθεί από όλους τους τύπους του νερού
- Να βρίσκεται μόνο σε απόβλητα
- Η συγκέντρωσή του πρέπει να σχετίζεται με τον βαθμό της μόλυνσης
- Η συγκέντρωσή του πρέπει να σχετίζεται με τους κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και με τον τύπο της μόλυνσης
- Να είναι πάντα παρών συγχρόνως με τους παθογόνους μικροοργανισμούς και η πυκνότητα του πληθυσμού του να σχετίζεται άμεσα με την πυκνότητα του πληθυσμού των παθογόνων
- Πρέπει να επιβιώνει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο νερό απ' ότι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και να εξαφανίζεται γρήγορα με την εξαφάνιση των παθογόνων
- Πρέπει να απουσιάζει τελείως από το νερό που είναι ασφαλές για χρήση (Griffin *et al.*, 2001, Καραγκούνη *et al.*, 2007).

Στον Πίνακα 1.2 απεικονίζονται οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται σαν δείκτες σήμερα.

Πίνακας 1.2. Βακτηριακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα (Griffin *et al.*, 2001)

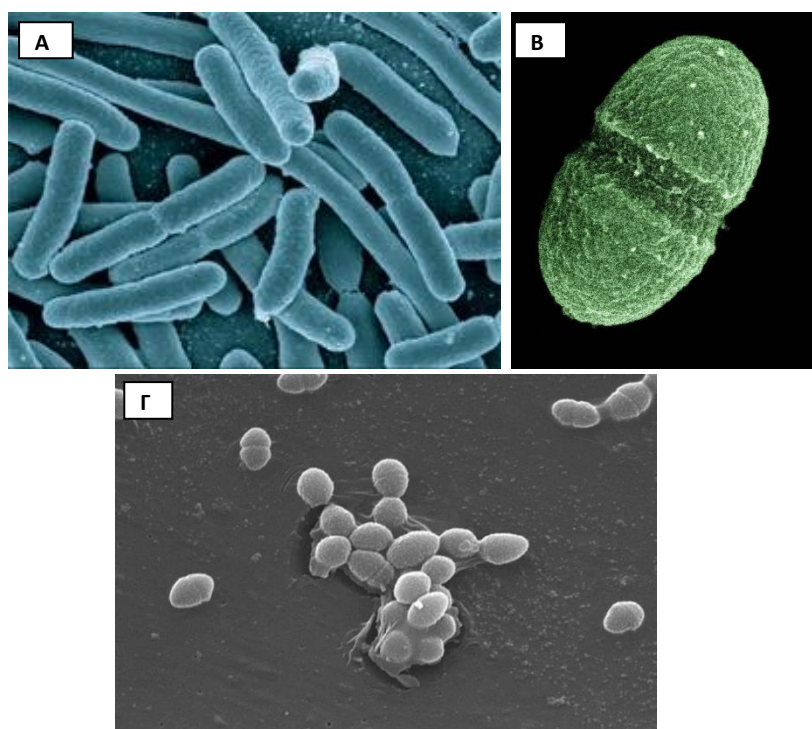
Βακτηριακοί Δείκτες
Ολικά κολίμορφα
Περιττωματικά κολίμορφα
<i>Escherichia coli</i>
Εντερόκοκκοι
<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Klebsiella</i> spp.
<i>Shigella</i> spp.
<i>Salmonella</i> spp.
<i>Yersinia</i> spp.

1.5.1 Καθιερωμένοι μικροβιακοί δείκτες

Οι καθιερωμένοι και ευρύτερα χρησιμοποιούμενοι μικροβιακοί δείκτες στις περισσότερες χώρες σήμερα είναι τα ολικά και περιττωματικά κολίμορφα, η *Escherichia coli* και τα βακτήρια του γένους *Enterococcus*, καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει καλός συσχετισμός μεταξύ του πληθυσμού τους και της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών (Πιν. 1.3).

Ολικά κολίμορφα: Τα ολικά κολίμορφα χρησιμοποιούνταν ως μικροβιακός δείκτης για πολλά χρόνια για την εκτίμηση της ποιότητας των επιφανειακών αλλά και των κολυμβητικών υδάτων εν γένει. Τα τελευταία χρόνια, όμως, διαπιστώθηκε ότι η εξάπλωση, η παρουσία καθώς και η αντοχή των συγκεκριμένων βακτηρίων σε καταστάσεις καταπόνησης διαφέρει από εκείνη των παθογόνων μικροοργανισμών την παρουσία των οποίων θα πρέπει να προβλέπουν (Scott *et al.*, 2002).

***Escherichia coli*:** Το βακτήριο *E. coli* (Εικ. 1.4Α) χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια ως δείκτης περιττωματικής μόλυνσης. Φέρει αρκετά από τα απαραίτητα χαρακτηριστικά των μικροβιακών δεικτών, όπως το γεγονός ότι συνήθως δεν αποτελεί ανθρώπινο παθογόνο και βρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από τα παθογόνα την παρουσία των οποίων γίνεται προσπάθεια να προβλέψει. Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι μπορεί να μην αποτελεί αξιόπιστο δείκτη σε τροπικά ή υποτροπικά περιβάλλοντα εξαιτίας της ικανότητάς του να πολλαπλασιάζεται σε μολυσμένα εδάφη (Scott *et al.*, 2002).



Εικόνα 1.4 **A** Κύτταρα *E. coli* (www.answersingenesis.org), **B**. *Enterococcus faecalis* (www.genome.gov), **Γ**. Κύτταρα εντεροκόκκων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) (<http://www.cdc.gov>)

***Enterococcus* sp.:** Η ομάδα των εντεροκόκκων αποτελεί υποσύνολο των στρεπτόκοκκων περιττωματικής προέλευσης και περιλαμβάνει τουλάχιστον πέντε είδη: *Enterococcus faecalis* (Εικ. 1.4B), *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum* και *Enterococcus avium*. Ξεχωρίζουν από τους άλλους στρεπτόκοκκους λόγω της ικανότητας ανάπτυξής τους σε 6,5 % NaCl, υψηλό pH (9,6) και υψηλή θερμοκρασία (45 °C). Τα βακτήρια *E. faecalis* και *E. faecium* είναι τα πιο συχνά απαντώμενα είδη στους ανθρώπους.

Οι εντερόκοκκοι έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως δείκτες περιττωματικής μόλυνσης και είναι ιδιαίτερα αξιόπιστοι σαν δείκτες εκτίμησης του κινδύνου μόλυνσης σε θαλάσσια οικοσυστήματα και ύδατα αναψυχής. Παρόλα αυτά είναι γνωστό ότι στο περιβάλλον υπάρχουν «δεξαμενές» εντεροκόκκων και ότι είναι δυνατή η επανάκαμψη του πληθυσμού τους μετά από πιθανή είσοδό τους σε αυτό (Scott *et al.*, 2002).

Πίνακας 1. 3. Χαρακτηριστικά βακτηριακών δεικτών (Savichtcheva & Okabe, 2006)

Χαρακτηριστικά	Βακτηριακοί Δείκτες		
	Ολικά και περιττωματικά κολίμορφα	<i>E. coli</i>	Περιττωματικοί στρεπτόκοκκοι και εντερόκοκκοι
Παρουσία στα περιττώματα και τα περιβαλλοντικά ύδατα	Παρόντα στα περιττώματα θερμόαιμων ζώων, θετικός συσχετισμός με περιττωματικό υλικό, όμως μπορεί να είναι μη περιττωματικής προέλευσης σε τροπικές περιοχές	Παρόντα σε περιττώματα θερμόαιμων ζώων, πιο ειδικοί δείκτες περιττωματικής μόλυνσης, όμως μπορεί να είναι μη περιττωματικής προέλευσης σε τροπικές περιοχές	Παρόντα σε περιττώματα θερμόαιμων ζώων, όχι απαραίτητα περιττωματικής προέλευσης
Ικανότητα πολλαπλασιασμού και επιβίωσης στο νερό	Ανάπτυξη σε υδάτινα περιβάλλοντα, περιορισμένη επιβίωση στο νερό	Ποικίλη ικανότητα επιβίωσης σε περιβάλλοντα εκτός του ξενιστή, πιθανότητα ανάπτυξης σε τροπικά και temperate περιβάλλοντα	Γρήγορη απενεργοποίηση κατά την πρώτη επαφή με το περιβάλλον, ανάπτυξη σε ιζήματα και εδάφη που επηρεάζονται από την παλίρροια
Συσχετισμός με παθογόνα ή υδατογενείς λοιμώξεις	Κακός συσχετισμός με εντερικά παθογόνα	Παρόντα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα παθογόνα	Παρόμοια επιβίωση με μερικά παθογόνα, υψηλός συσχετισμός με λοιμώξεις του γαστρεντερικού
Μέθοδοι ανίχνευσης	Χρονοβόρες μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών με καλλιέργειες, ανικανότητα προσδιορισμού της πηγής της μόλυνσης	Συνήθως δεν αποτελούν ανθρώπινα παθογόνα, ικανότητα προσδιορισμού της πηγής της μόλυνσης με φαινοτυπικές και μοριακές μεθόδους	Ανικανότητα κατασκευής ενός θρεπτικού υποστρώματος για όλους τους οργανισμούς που περιλαμβάνονται στην κατηγορία αυτή, ικανότητα προσδιορισμού της πηγής της μόλυνσης με φαινοτυπικές μεθόδους

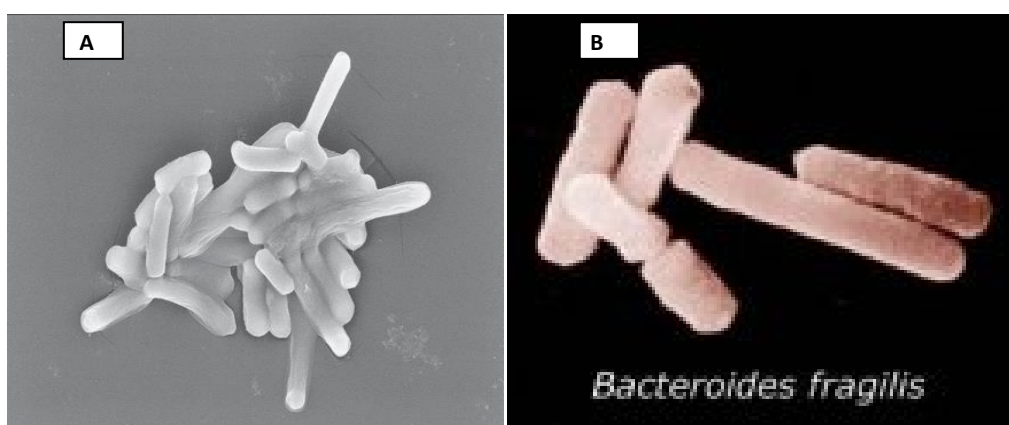
1.5.2 Εναλλακτικοί δείκτες μόλυνσης

Τις τελευταίες δεκαετίες και μετά την ανάπτυξη της Μοριακής Βιολογίας είναι γνωστό ότι ο πληθυσμός των ήδη καθιερωμένων μικροβιακών δεικτών, *E. coli* και *Enterococcus sp.*, ίσως να μην αντιπροσωπεύει πάντα την ύπαρξη μόλυνσης στην υπό εξέταση περιοχή. Τα περιπτωματικά κολίμορφα, το βακτήριο *E. coli* και οι εντερόκοκκοι μπορεί να βρεθούν στο περιβάλλον απουσία κάποιας γνωστής πηγής μόλυνσης και έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε θερμά τροπικά περιβάλλοντα. Πιο συγκεκριμένα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2004 (Shibata *et al.*, 2004) έδειξαν ότι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι βακτηριακοί δείκτες, *E. coli* και εντερόκοκκοι μπορούν να πολλαπλασιαστούν εύκολα στην άμμο και ειδικά σε περιπτώσεις που αυτή επηρεάζεται από την παλίρροια. Επίσης, η ικανότητα μέσω των βακτηριακών δεικτών να προβλέπεται ο κίνδυνος λοίμωξης από ιούς που προσβάλουν τον άνθρωπο άρχισε να αμφισβητείται πριν από περίπου 30 χρόνια εξαιτίας της έλλειψης συσχετισμού των ιών και των μικροβιακών δεικτών. Αυτή η έλλειψη σχέσης μπορεί να οφείλεται στις μορφολογικές και φυσικοχημικές διαφορές, οι οποίες ίσως να επιτρέπουν στους ιούς να είναι ενεργοί για μεγαλύτερες περιόδους στο νερό, κάτω από ένα ευρύτερο φάσμα φυσικοχημικών συνθηκών (Silva *et al.*, 2010).

Το γεγονός αυτό οδήγησε τα τελευταία χρόνια στην αυξημένη χρήση εναλλακτικών μικροβιακών δεικτών για την ανίχνευση περιπτωματικής μόλυνσης. Σαν εναλλακτικοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί περιπτωματικά αναερόβια βακτήρια, ιοί και οργανικές ουσίες περιπτωματικής προέλευσης. Αποτελέσματα διαφόρων μελετών δείχνουν ότι ο συνδυασμός καθιερωμένων και εναλλακτικών δεικτών θα μπορούσε να προβλέψει με μεγαλύτερη επιτυχία την ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό και θα βοηθούσε στον καλύτερο προσδιορισμό της πηγής της μόλυνσης (Savichtcheva & Okabe, 2006).

Τα αναερόβια περιπτωματικά βακτήρια που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς ως μικροβιακοί δείκτες είναι αυτά του γένους *Bacteroides* και *Bifidobacterium* καθώς επίσης και το *Clostridium perfringens* (Εικ. 1.5Α). Λίγα στοιχεία υπάρχουν για την επιβίωση των οργανισμών αυτών στο νερό, ενώ ο καλύτερα μελετημένος ως δείκτης είναι το βακτήριο *C. perfringens*. Μελέτη που διεξήχθη το 2006 έδειξε ότι το βακτήριο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μικροβιακός δείκτης, καθώς μπορεί να προβλέπεται με επιτυχία η ύπαρξη περιπτωματικής μόλυνσης (Wiedenmann *et al.*, 2006). Το *C. perfringens* δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε αερόβιες συνθήκες, οπότε

περιορίζεται ο πολλαπλασιασμός του στο περιβάλλον, το σημαντικό του όμως, μειονέκτημα είναι ότι επιβιώνει για μεγάλες χρονικές περιόδους, οπότε η ανίχνευσή του μπορεί να είναι δείκτης παλαιότερης μόλυνσης. Παρά τον περιορισμό αυτό, η πολιτεία της Χαβάης έχει ήδη ενσωματώσει το βακτήριο αυτό στους μικροβιακούς δείκτες για την ανίχνευση της ποιότητας των υδάτων (Shibata *et al.*, 2004). Έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2009 έδειξε ότι και το βακτήριο *Bacteroides theaiotamicron* μπορεί επίσης να προβλέψει την ύπαρξη περιττωματικής μόλυνσης ανθρώπινης προέλευσης στο νερό, αλλά όσον αφορά στην επιτυχία των *Bacteroides* ως μικροβιακοί δείκτες τα πειραματικά στοιχεία είναι ελάχιστα (Griffith *et al.*, 2009).

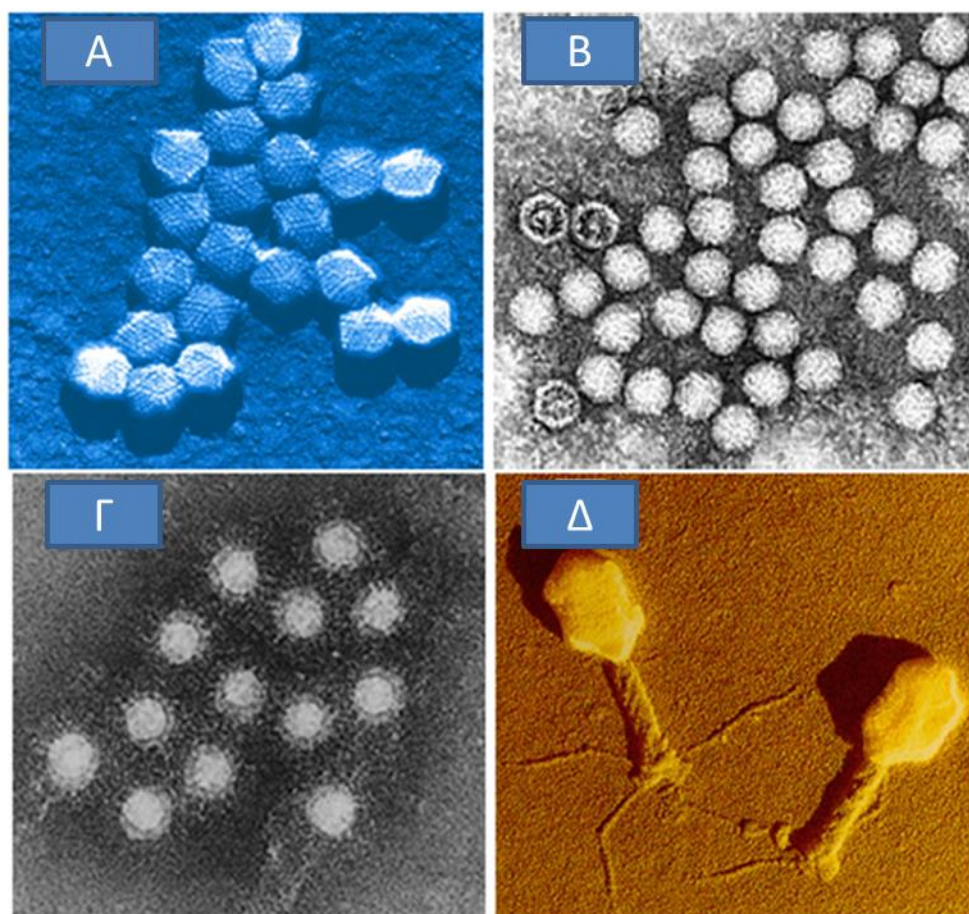


Εικόνα 1.5 A. *Clostridium perfringens* (<http://iai.asm.org>) B. *Bacteroides fragilis* (www.giorgiobertin.wordpress.com)

Ως εναλλακτικοί δείκτες μόλυνσης έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια και οι ιοί. Η εισαγωγή των ιών στη λίστα των παραγόντων των οποίων η ύπαρξη πρέπει να εξετάζεται κατά τον έλεγχο της ποιότητας των υδάτων έχει προταθεί πολλές φορές, ενώ σε ορισμένες χώρες η ανίχνευση της παρουσίας τους είναι υποχρεωτική. Παλαιότερα είχε προταθεί ως δείκτης ο βακτηριοφάγος που μολύνει το *Bacteroides fragilis* HSP40 (Εικ. 15B) (Dutka *et al.*, 1987), αλλά τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ενδιαφέρον γύρω από τη χρήση των κολιφάγων σαν δείκτες περιττωματικής μόλυνσης. Τα κολιφάγα είναι βακτηριοφάγοι που μολύνουν το βακτήριο *E.coli* και η ανίχνευσή τους έχει σχετισθεί σε μια σειρά από μελέτες με την παρουσία μόλυνσης περιττωματικής προέλευσης (Sinton *et al.*, 2002, Savichtcheva & Okabe, 2006). Μια διαφορετική προσέγγιση αφορά στην ανίχνευση κατευθείαν παθογόνων ιών στο νερό, όπως είναι οι εντεροϊοί, οι αδενοϊοί και ο ιός της Ηπατίτιδας Α (Εικ. 1.6), οι οποίοι βρίσκονται στα περιττώματα.

Πολλές μελέτες προτείνουν την άμεση ανίχνευση παθογόνων ιών, αλλά μέχρι σήμερα υπάρχει ασάφεια ως προς το είδος και τις μεθόδους προσδιορισμού των ιών.

Λόγω του ότι απαιτούνται καλύτερες και πιο ευέλικτες τεχνικές για τον προσδιορισμό των μικροβιακών δεικτών στο νερό, έχει προταθεί αρκετές φορές η χρήση συγκεκριμένων οργανικών ενώσεων περιττωματικής προέλευσης, όπως οι περιττωματικές στερόλες, ως δεικτών μόλυνσης. Παράδειγμα αποτελεί η ουσία κοπροστανόλη, η οποία εκκρίνεται από ανθρώπους και ζώα. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε γλυκά νερά τροπικών περιοχών της Ιαπωνίας έδειξε ότι η ένωση αυτή μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο στην εκτίμηση της ποιότητας των υδάτων (Savichtcheva και Okabe 2006).



Εικόνα 1.6. **A.** Αδενοϊοί (www.allstarhealth.com), **B.** Εντεροϊοί (www.clinical-virology.org), **Γ.** Ιοί της Ηπατίτιδας Α (<http://ecdc.europa.eu>), **Δ.** Κολιφάγα (www.technoinhome.com)

Παρόλα αυτά χρειάζεται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης μια χημική ουσία, καθώς δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία για την πρόελευση, την ευαισθησία της μεθόδου ανίχνευσης και τον συσχετισμό της με την παρουσία παθογόνων οργανισμών.

1.6 Σχέση μικροβιακών δεικτών και κινδύνου νόσησης

Μια σειρά από μελέτες έχει δείξει την άμεση σχέση της εμφάνισης γαστρεντερικών συμπτωμάτων με την ποιότητα των υδάτων αναψυχής όπως αυτή εκτιμάται μέσω της χρήσης των μικροβιακών δεικτών. Ανασκόπηση των μέχρι τότε επιδημιολογικών μελετών που πραγματοποιήθηκε από τους Wade *et al.*, το 2003 έδειξε ότι μέσω των οργανισμών που χρησιμοποιούνται ως μικροβιακοί δείκτες μπορεί να προβλεφτεί η πιθανότητα νόσου, αλλά φάνηκε επίσης ότι μόνο με έναν μικροβιακό δείκτη δεν μπορεί να προβλεφτεί η πιθανότητα αυτή σε όλα τα περιβάλλοντα και σε κάθε χρονική στιγμή. Αυτό ίσως να οφείλεται στο ευρύ φάσμα των παθογόνων που έχουν σχετισθεί με την εμφάνιση ασθενειών ύστερα από επαφή με μολυσμένα ύδατα αναψυχής ή στην ποικιλιότητα των σχέσεων μεταξύ παθογόνων και δεικτών. Για παράδειγμα, τόσο οι βακτηριακοί όσο και οι ιικοί δείκτες ίσως να μην συσχετίζονται αρκετά καλά με την παρουσία παθογόνων πρωτόζωων, όπως είναι το *Cryptosporidium parvum* που αποτελεί βασική αιτία εμφάνισης γαστρεντερικών λοιμώξεων στα γλυκά νερά (Wade *et al.*, 2003). Οι Wiedenmann *et al.*, (2006) σε μελέτη που πραγματοποίησαν σε γλυκά νερά στη Γερμανία συσχέτισαν τον πληθυσμό των μικροβιακών δεικτών με τον κίνδυνο νόσησης, αλλά έδειξαν ότι οι τιμές των δεικτών θα έπρεπε να είναι μικρότερες από τις ήδη καθιερωμένες προκειμένου να διασφαλιστεί ακόμα περισσότερο η υγεία των λουόμενων.

Σε αντίστοιχη ανασκόπηση που είχε πραγματοποιηθεί παλαιότερα, οι 19 από τις 22 επιδημιολογικές μελέτες που αφορούσαν ύδατα αναψυχής έδειξαν ότι ο ρυθμός εμφάνισης συγκεκριμένων συμπτωμάτων ή ομάδας συμπτωμάτων σχετίζονταν σημαντικά με τον πληθυσμό των βακτηριακών δεικτών περιττωματικής προέλευσης. Φάνηκε, επίσης, ότι υπήρχε συμφωνία ανάμεσα στις διάφορες μελέτες και πως η εμφάνιση γαστρεντερικών λοιμώξεων ήταν η πιο συχνή επίπτωση για την οποία αναφέρονταν συσχετισμός μεταξύ του πληθυσμού των δεικτών και της εμφάνισης των συμπτωμάτων (Prüss, 1998).

Οι μελέτες που οδήγησαν στην έκδοση των κατευθυντήριων τιμών για τον πληθυσμό των μικροβιακών δεικτών από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 2000 είναι αυτές

που πραγματοποιήθηκαν από τους Kay *et al.*, (1994) και Fleisher *et al.*, (1996) σε θαλάσσια ύδατα στο Ηνωμένο Βασίλειο. Αυτές οι μελέτες έδειξαν με ακρίβεια τη σχέση μεταξύ του βαθμού έκθεσης στο νερό, της ποιότητας του νερού και της εμφάνισης ασθενειών. Παρόλα αυτά, πρέπει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα αναφέρονται σε υγιείς πληθυσμούς ενηλίκων που είχαν έρθει σε επαφή με μολυσμένα από απόβλητα θαλάσσια ύδατα σε ήπια κλίματα. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν ελεγχθεί από την Prüss (1998) δείχνουν ότι η πιθανότητα εμφάνισης συμπτωμάτων είναι μεγαλύτερη σε μικρότερες ηλικιακά ομάδες και συνεπώς είναι πιθανό οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο να υποεκτιμούν τον κίνδυνο που διατρέχουν τα παιδιά.

1.7 Μέθοδοι Ανίχνευσης Μικροβιακών Δεικτών και Παθογόνων μικροοργανισμών

Διάφορες μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών σε δείγματα νερού έχουν αναπτυχθεί και επιτρέπουν τόσο τον ποιοτικό όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπό εξέταση οργανισμών. Οι ποιοτικές μέθοδοι ανίχνευσης χρησιμοποιούνται κυρίως για τον άμεσο προσδιορισμό της παρουσίας ή μη, παθογόνων μικροοργανισμών στο δείγμα. Στις μεθόδους αυτές ανήκει η ανίχνευση συγκεκριμένων οργανισμών με απλή αντίδραση πολυμεράσης (conventional PCR) και η τεχνική των μικροσυστοιχιών. Οι ποσοτικές μέθοδοι ανίχνευσης επιτρέπουν τον προσδιορισμό του πληθυσμού των υπό εξέταση οργανισμών και χρησιμοποιούνται τόσο για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών όσο και για την ανίχνευση των μικροβιακών δεικτών. Ποσοτικές μέθοδοι ανίχνευσης είναι για παράδειγμα η μέθοδος ζύμωσης σε σωλήνες, η μέθοδος διήθησης μέσω ηθμών και η αντίδραση QPCR (Lazcka *et.al.*, 2007).

1.7.1 Μέθοδοι ποιοτικής ανίχνευσης μικροοργανισμών

Η ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών οδήγησε στη χρήση τους για την άμεση ανίχνευση συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών σε επιφανειακά ύδατα. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), σύμφωνα με την οποία η εκτίμηση της παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών γίνεται με την ανίχνευση είτε συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την παθογονικότητα του εκάστοτε οργανισμού είτε γονιδίων του ριβοσωμικού RNA της μικρής υπομονάδας (SSU rRNA) (Savichtcheva & Okabe, 2006). Η τεχνολογία που βασίζεται στη χρήση της αντίδρασης PCR δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης τόσο μη καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών όσο και εκείνων που δεν αναπτύσσονται εύκολα σε εργαστηριακές συνθήκες. Η συγκεκριμένη τεχνική

έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των βακτηρίων *Salmonella spp.* (Fukushima *et al.*, 2002, Malorny *et al.*, 2003, Lofstrom *et al.*, 2004), *Shigella spp.* (Fukushima *et al.*, 2002, Horman *et al.*, 2004), *Campylobacter spp.* (Lubeck *et al.*, 2003 a,b), *Vibrio vulnificus* (Panicker *et al.*, 2004), καθώς και παθογόνων πρωτοζώων (Horman *et al.*, 2004) σε ποικίλα περιβαλλοντικά ύδατα.

Παραλλαγές της συμβατικής αντίδρασης PCR (conventional PCR) αποτελούν η πολλαπλή αντίδραση PCR (multiplex PCR) και η αντίδραση PCR αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription (RT) - PCR). Η πολλαπλή αντίδραση PCR επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών μικροοργανισμών και χρησιμοποιήθηκε το 2002 από τους Fukushima *et al.*, για την ανίχνευση των βακτηρίων *Salmonella*, *Shigella* και *E.coli*. Η RT- PCR σε περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιείται συνήθως για την ανίχνευση ιών που έχουν ως γενετικό υλικό RNA (Donaldson *et al.*, 2002, Muscillo *et al.*, 2001), ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και για την ανίχνευση RNA βακτηριακής προέλευσης (Fey *et al.*, 2004). Οι Silva *et al.*, χρησιμοποίησαν το 2010 την τεχνική αυτή προκειμένου να ανιχνεύσουν την ύπαρξη νοροϊών και ιού της Ηπατίτιδας Α σε δείγματα θαλασσινού νερού.

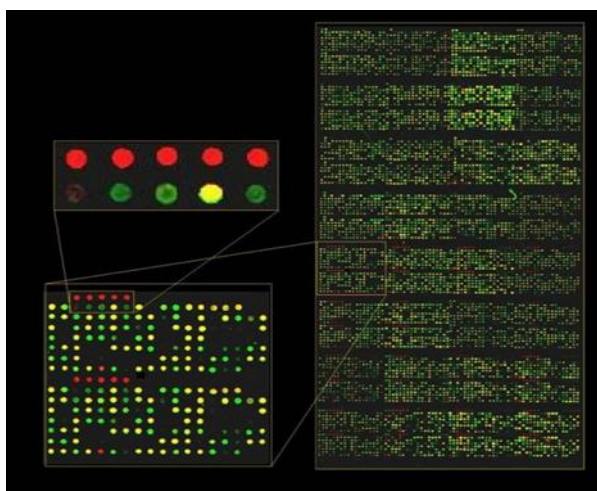
Μια ακόμη παραλλαγή της συμβατικής PCR που έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων είναι η βασισμένη σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (repetitive sequence-based (rep)-PCR) που δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού σε επίπεδο είδους ή ακόμη και στελέχους ενός βακτηριακού πληθυσμού. Βασίζεται στο διαφορετικό πρότυπο ζωνών που προκύπτει μεταξύ διαφορετικών ειδών/στελεχών μετά από την ενίσχυση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο γονιδίωμα, ενώ υπάρχουν διάφοροι τύποι της τεχνικής αυτής ανάλογα με το είδος των αλληλουχιών που ενισχύονται. Οι Rep-PCR (Repetitive extragenic palindromic-PCR) και ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- PCR) αποτελούν δύο τύπους Rep-PCR που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον διαχωρισμό τόσο παθογόνων μικροοργανισμών όσο και μικροβιακών δεικτών, ενώ τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται και για τον εντοπισμό της πηγής μόλυνσης σε περιβαλλοντικά δείγματα (Johnson *et al.*, 2008).

Μια τεχνική που έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα στην Μικροβιακή Οικολογία είναι η RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), η οποία βασίζεται στο διαφορετικό πρότυπο ζωνών που προκύπτει από την πέψη διαφορετικών αλληλουχιών με περιοριστικά ένζυμα. Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής σε δείγματα νερού οδήγησε στην ταυτόχρονη ανίχνευση των βακτηρίων *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Salmonella spp.*, ενώ μια παραλλαγή της, η T-RFLP

(Terminal Restriction Fragment Polymorphism), έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τύπους δειγμάτων οδηγώντας στην επιτυχημένη ανίχνευση τόσο των υπό εξέταση μικροοργανισμών όσο και της πηγής της μόλυνσης (Iannelli *et al.*, 2012).

Η τεχνική των μικροσυστοιχιών (microarrays) έχει χρησιμοποιηθεί, επίσης, για την ανίχνευση μιας σειράς μικροοργανισμών σε αρκετές περιβαλλοντικές μελέτες (Wu *et al.*, 2004, Brodie *et al.*, 2006). Βασίζεται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων ως ιχνηθετών οι οποίοι προσδένονται σε μία πλάκα και στη συνέχεια υβριδίζονται με συμπληρωματικές αλληλουχίες-στόχους. Οι αλληλουχίες-στόχοι είναι σημασμένες με φθορίζουσες χρωστικές και η χρωματική αλλαγή που προκύπτει είναι ενδεικτική της παρουσίας της συγκεκριμένης αλληλουχίας (Noble & Weisberg, 2005) (Εικ. 1.7).

Η τεχνική αυτή δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης χιλιάδων μικροοργανισμών ταυτόχρονα, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην ανίχνευση των βακτηρίων *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* και *Escherichia coli* (Järvinen *et al.*, 2009, Tissari *et al.*, 2010).



Εικόνα 1.7 Μικροσυστοιχίες με χρήση δύο φθορίζουσών χρωστικών για την ανίχνευση διαφορετικών αλληλουχιών (www.poultryhub.org)

1.7.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (DGGE)

Η τεχνική βασίζεται στον διαχωρισμό μορίων DNA, που ενισχύονται σε αντίδραση PCR και έχουν το ίδιο μέγεθος, αλλά διαφορετική σύσταση σε βάσεις.

Το DNA που απομονώνεται από ένα οικοσύστημα, ενισχύεται με ειδικό ζεύγος καθολικών μορίων εκκινητών. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι να δημιουργηθεί ένα μίγμα προϊόντων της αντίδρασης PCR που περιέχει μόρια DNA με το ίδιο μοριακό βάρος, αλλά με διαφορετική σύσταση σε βάσεις. Κάθε διαφορετικό ενισχυμένο τμήμα της περιοχής του γονιδίου 16S rDNA αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό είδος και έχει διαφορετική ικανότητα κίνησης σε ένα πήκτωμα που περιέχει αποδιατακτικό παράγοντα, π.χ. ουρία. Μόρια με διαφορετική σύσταση σε βάσεις θα αποδιαταχθούν και η κίνησή τους θα σταματήσει σε διαφορετικό σημείο του πηκτώματος ακρυλαμίδης, οπότε και θα σχηματισθεί μια διακριτή ζώνη στο πήκτωμα, η οποία καλείται ριβότυπος. Θα δημιουργηθεί κατ' αυτόν τον τρόπο ένα πρότυπο ζωνών (ριβοτύπων) για κάθε δείγμα, όπου ο αριθμός τους θα αντικατοπτρίζει το μέγεθος της μικροβιακής ποικιλότητας (Muyzer *et al.*, 1996) (Εικ. 1.8).



Εικόνα 1.8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδης παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (DGGE)

Η μέθοδος DGGE χρησιμοποιείται ευρέως για την καταγραφή της μικροβιακής ποικιλότητας συναρτήσει των περιβαλλοντικών αλλαγών, αλλά και για τη μελέτη της δομής μικροβιακών κοινωνιών σε επίπεδο χωρικό (οικοθέσης), αλλά και σε χρονικό επίπεδο (Tang *et al.*, 2013).

Το μόριο του 16S rDNA γονιδίου εμφανίζει περιορισμούς λόγω της συντηρητικής φύσης του, οπότε η ανάγκη για τη χρήση νέων γονιδίων και συνήθως περισσότερων του ενός για την εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας καθίσταται επιτακτική. Σε κάθε περίπτωση όπου ένα νέο γονίδιο χρησιμοποιείται σε μελέτες εκτίμησης της μικροβιακής ποικιλότητας, η σύγκριση γίνεται πάντα με το γονίδιο 16S rDNA το οποίο μέχρι σήμερα θεωρείται από την επιστημονική κοινότητα ως ο πλέον αξιόπιστος φυλογενετικός δείκτης για τους προκαρυωτικούς οργανισμούς.

Βάσει των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στη διεθνή βιβλιογραφία, προκύπτει ότι η μέθοδος DGGE είναι οικονομική, γρήγορη και με μεγάλη επαναληψιμότητα στα αποτελέσματα και συνεπώς επιτρέπει τον ταυτόχρονο χειρισμό μεγάλου αριθμού δειγμάτων, γεγονός που αποτελεί συγκριτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τη διαδικασία της κλωνοποίησης (Muyzer & Smalla, 1998, Dong & Redd, 2010).

Ωστόσο, η μέθοδος παρουσιάζει και μια σειρά προβλημάτων, πέραν του γεγονότος ότι πρόκειται για μία τεχνική που στηρίζεται στην αντίδραση PCR και με όσα μειονεκτήματα μπορεί το γεγονός αυτό να επιφέρει. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται μια σειρά περιορισμών που σχετίζονται αποκλειστικά με τη διαδικασία της μεθόδου και έχουν να κάνουν με τον διαχωρισμό μόνο μικρών τμημάτων ενισχυμένων περιοχών του DNA (περίπου έως 500 βάσεις), την αδυναμία διαχωρισμού αλληλουχιών που διαφέρουν σε δυο ή τρεις βάσεις σε ορισμένες περιπτώσεις, σε συγκεκριμένες συνθήκες ηλεκτροφόρησης (Vallaey *et al.*, 1997), το γεγονός ότι ένα μικροβιακό είδος μπορεί να δίνει 1-12 διαφορετικούς ριβότυπους, λόγω της παρουσίας του γονιδίου που ενισχύεται σε περισσότερα του ενός αντίγραφα (κυρίως του 16S rDNA γονιδίου, για το οποίο γίνεται πάντα η παραδοχή ότι απαντάται σε ένα μόνο αντίγραφο, χωρίς όμως αυτό να ισχύει πάντα) (Nübel *et al.*, 1996) και τέλος και κατά κύριο λόγο το γεγονός ότι η μέθοδος DGGE αποκαλύπτει κυρίως τις επικρατείς μικροβιακές ομάδες που είναι παρούσες σε ένα οικοσύστημα (Muyzer και Smalla 1998). Ο παραπάνω περιορισμός συνήθως ξεπερνιέται απομονώνοντας κάθε ζώνη σε ένα πρότυπο και τρέχοντάς την εκ νέου σε νέο πήκτωμα, μόνη της και υπό τις ίδιες αρχικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης που απομονώθηκε. Εάν πρόκειται για μοναδική ζώνη, τότε αυτή μπορεί να αλληλουχηθεί απευθείας. Εάν ωστόσο εμφανίσει δύο ή περισσότερες ζώνες, τότε συνίσταται να κλωνοποιηθεί, προκειμένου

να αποκαλυφθεί ο πραγματικός αριθμός των ριβοτύπων - στελεχών που εμπεριέχει (Drees *et al.*, 2006).

1.7.3 Μέθοδοι ποσοτικής ανίχνευσης μικροοργανισμών

Η ανίχνευση και ο προσδιορισμός του πληθυσμού των μικροβιακών δεικτών πραγματοποιείται εδώ και αρκετά χρόνια είτε με τη μέθοδο ζύμωσης σε σωλήνες (multiple tube fermentation) είτε με τη μέθοδο διήθησης διαμέσου ηθμών (membrane filtration). Η τελευταία δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού του πληθυσμού των βακτηριακών δεικτών μέσω της ανάπτυξης αποικιών στην επιφάνεια εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων. Αντίθετα, με τη μέθοδο ζύμωσης σε σωλήνες υπολογίζεται η μεταβολική δραστηριότητα των μικροβιακών δεικτών μέσω της ικανότητας ζύμωσης και παραγωγής αερίου (Noble *et al.*, 2003).

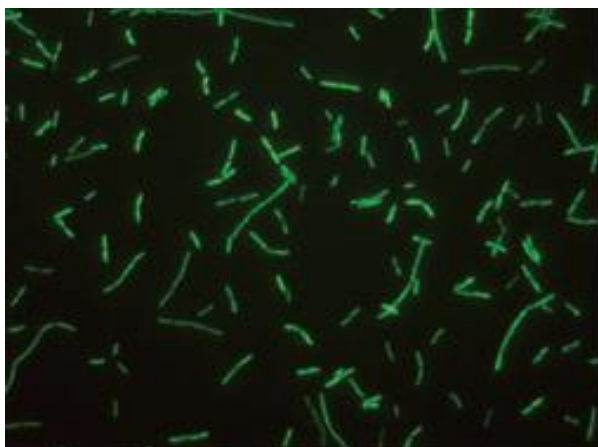
Διάφορες μελέτες έχουν συγκρίνει τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων και έχουν δείξει ότι υπάρχει σχετική συμφωνία ανάμεσά τους. Οι περισσότερες, όμως, από αυτές τις μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί κάτω από συνθήκες σχετικής ξηρασίας και συνεπώς μπορεί τα αποτελέσματα να διαφέρουν κάτω από διαφορετικές καιρικές συνθήκες. Για παράδειγμα, τα ρεύματα όμβριων υδάτων που δημιουργούνται μετά από ένα φαινόμενο έντονης βροχόπτωσης περιέχουν υψηλά επίπεδα διαλυμένων σωματιδίων τα οποία είναι δυνατόν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της μεθόδου διήθησης διαμέσου ηθμών (Noble *et al.*, 2004).

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της μεθοδολογίας που χρησιμοποιείται σήμερα για την εκτίμηση του πληθυσμού των μικροβιακών δεικτών είναι η μεγάλη χρονική περίοδος που μεσολαβεί από τη λήψη του δείγματος μέχρι την έκδοση των αποτελεσμάτων. Με τη μέθοδο ανάκτησης μικροοργανισμών μέσω καλλιιεργειών χρειάζονται 24 με 72 ώρες για να γίνει ανίχνευση της ποιότητας των υδάτων, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η άμεση εκτίμηση του κινδύνου μόλυνσης και να τίθεται έτσι σε κίνδυνο η υγεία των λουόμενων. Για τον λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδων γρήγορης ανίχνευσης της μόλυνσης, ώστε να μπορούν να εκδοθούν εγκαίρως οδηγίες για ενδεχόμενο κλείσιμο της μολυσμένης παραλίας.

Οι μέθοδοι γρήγορης ανίχνευσης έχουν σαν σκοπό να μειώσουν τον χρόνο μεταξύ δειγματοληψίας και έκδοσης αποτελεσμάτων και ορίζονται ως αυτές που απαιτούν λιγότερο από 6 ώρες για τη λήψη των αποτελεσμάτων. Μια σειρά από τέτοιες

μεθόδους έχει αναπτυχθεί και μερικές είναι φθορισμομετρικές (πχ. FISH), άλλες ανοσολογικές, ενώ άλλες βασίζονται στη χρήση της αντίδρασης PCR (Polymerase Chain Reaction).

Η τεχνική FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) αποτέλεσε αρκετά νωρίς ένα σημαντικό εργαλείο στον τομέα της Μικροβιακής Οικολογίας (Head *et al.*, 1998, Okabe *et al.*, 1999). Βασίζεται στη χρήση ειδικών ιχνηθετών οι οποίοι προσδένονται σε συμπληρωματικές rRNA αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή τόσο η ποιοτική όσο και η ποσοτική ανίχνευση μεταβολικά ενεργών μικροβιακών κοινοτήτων σε περιβαλλοντικά δείγματα (Pernthaler & Amann, 2004). Χρησιμοποιώντας την τεχνική FISH, Ιταλοί επιστήμονες κατάφεραν να ανιχνεύσουν την παρουσία του βακτηρίου *Campylobacter spp.* σε δείγματα νερού (Mantia *et al.*, 2008) (Εικ. 1.9).



Εικόνα 1.9 *Legionella pneumophila* με την τεχνική FISH (Dutil *et al.*, 2005)

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες ανοσολογικές προσεγγίσεις για τη γρήγορη ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και μικροβιακών δεικτών. Οι De Marco και Lim (2002) χρησιμοποίησαν πολυκλωνικά αντισώματα σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική έναντι του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 προκειμένου να ανιχνεύσουν τον μικροοργανισμό αυτό σε τρόφιμα, ενώ οι Lee και Deininger το 2004 ανέπτυξαν μία μέθοδο γρήγορης ανίχνευσης του βακτηρίου *E. coli* σε δείγμα νερού. Στην τελευταία περίπτωση απομόνωσαν με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό το συγκεκριμένο μικροοργανισμό από το δείγμα και στη συνέχεια υπολόγισαν τη συγκέντρωσή του προσδιορίζοντας τα επίπεδα του ATP με βιοφωταύγεια.

Παρόλα αυτά, τα μέχρι σήμερα δεδομένα δείχνουν ότι η πιο πολλά υποσχόμενη μέθοδος από όσες έχουν δοκιμαστεί είναι η αντίδραση QPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction). Πρόκειται για μια μοριακή τεχνική που βασίζεται στη χρήση εκκινητικών μορίων και συνδυάζει την ειδικότητα της συμβατικής αντίδρασης PCR με τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης της έντασης του φθορισμού για την ανίχνευση της παρουσίας συγκεκριμένων νουκλεϊκών οξέων σε περιβαλλοντικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή έχει δώσει θετικά αποτελέσματα στην ανίχνευση των βακτηριακών δεικτών *E. coli* και εντεροκόκκων σαν μέρος του καθιερωμένου προγράμματος διαχείρισης της ποιότητας των υδάτων (Haugland *et al.*, 2005, He & Jiang, 2005).

Επίσης, σε μελέτη που διεξήχθη το 2006 παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός των εντεροκόκκων που εκτιμήθηκε με αντίδραση QPCR σε δείγματα γλυκών νερών μπορεί να προβλέψει με επιτυχία την πιθανότητα γαστρεντερικών λοιμώξεων (Wade *et al.*, 2006). Διαφορετικό όμως ήταν το αποτέλεσμα όταν χρησιμοποιήθηκαν ως εναλλακτικοί δείκτες τα βακτήρια του γένους *Bacteroides*, τα οποία δεν εμφάνισαν τον ίδιο συσχετισμό. Παρόλα αυτά γίνονται συνεχείς προσπάθειες για να βελτιωθεί η μέθοδος προσδιορισμού των *Bacteroides* ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν και αυτά σαν δείκτες.

Η μέθοδος αυτή έχει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Βασικά πλεονεκτήματα είναι ότι απαιτεί 2 με 3 ώρες για να πραγματοποιηθεί και πως υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης διαφόρων μικροοργανισμών ταυτόχρονα (multiplex QPCR). Αντίθετα, ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα είναι η δυσκολία συσχετισμού των κυτταρικών ισοδύναμων με τα καλλιεργήσιμα κύτταρα. Σαν κυτταρικό ισοδύναμο ορίζεται η ποσότητα του DNA που περιέχεται σε ένα κύτταρο.

Η αντίδραση QPCR μπορεί να ανιχνεύσει εκτός από το DNA των ζώντων κυττάρων και το εξωκυττάριο, καθώς και αυτό των νεκρών κυττάρων αλλοιώνοντας έτσι την πραγματική τιμή του κυτταρικού ισοδύναμου. (Lavender & Kinzelman, 2009). Παρά τα όποια μειονεκτήματα, η Αρχή Προστασίας Περιβάλλοντος στις ΗΠΑ έχει ήδη ενσωματώσει τη χρήση της μεθόδου αυτής σε δύο επιδημιολογικές μελέτες, ενώ γενικότερα σχεδιάζει να εκδώσει οδηγίες βασισμένες σε μεθόδους γρήγορης ανίχνευσης μολύνσεων για παραλίες με μεγάλο αριθμό λουόμενων.

1.8 Νομικά πλαίσια ελέγχου της ποιότητας των κολυμβητικών υδάτων

Η διακύμανση της ποιότητας του νερού στις παραλίες αναψυχής μπορεί να επιφέρει σημαντικές επιπτώσεις όσον αφορά στα όρια που έχουν θεσπιστεί για την ποιότητα και εφαρμόζονται αυτή τη στιγμή στην Ευρώπη, όπως η Οδηγία 76/160/EEC (CEC, 1976). Συμμόρφωση με τη συγκεκριμένη Οδηγία οδηγεί σε διακρίσεις, όπως το βραβείο της «Γαλάζιας Σημαίας» που δίνεται από το Ίδρυμα Περιβαλλοντικής Εκπαίδευσης (FEE) και λειτουργεί σε 41 χώρες ανά την υφήλιο. Η απώλεια τέτοιων διακρίσεων μπορεί να επιφέρει σημαντικές συνέπειες όσον αφορά στην τοπική τουριστική οικονομία.

Το 1976 η Αρχή Προστασίας Περιβάλλοντος στις ΗΠΑ εξέδωσε την πρώτη Οδηγία που αφορούσε στον έλεγχο της ποιότητας των υδάτων βάσει της οποίας απαιτούνταν γεωμετρικός μέσος όρος μικρότερος των 200 περιττωματικών κολίμορφων οργανισμών ανά 100 ml νερού και λιγότερο από το 10% των δειγμάτων να περιέχει πάνω από 400 περιττωματικά κολίμορφα ανά 100 ml. Η Οδηγία αυτή βασίστηκε στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Stevenson το 1953 και έδειξε την ύπαρξη συσχετισμού μεταξύ της ποιότητας των υδάτων και της εμφάνισης ασθενειών στους λουόμενους.

Παρόλα αυτά στα τέλη της δεκαετίας του '70, (Cabelli *et al.*, 1975) αμφισβήτησαν τις τιμές των ορίων της προηγούμενης Οδηγίας, με αποτέλεσμα να αρχίσει ένας νέος κύκλος μελετών, οι οποίες κατέληξαν το 1986 στη θέσπιση νέων κριτηρίων για τον χαρακτηρισμό της ποιότητας των υδάτων. Με τη νέα αυτή Οδηγία δόθηκε μεγαλύτερη έμφαση στη χρήση των εντεροκόκκων αντί των περιττωματικών κολίμορφων για την εκτίμηση της ποιότητας των θαλάσσιων υδάτων.

Στο ίδιο πλαίσιο κινήθηκε και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, ο οποίος βασιζόμενος σε μια ανασκόπηση των μέχρι τότε επιδημιολογικών μελετών που δημοσιεύθηκε από την Prüss το 1998, εξέδωσε το 2000 την Οδηγία για Ασφαλή Ύδατα Αναψυχής. Σε αυτή παρουσιάζονται οι πιθανοί κίνδυνοι μετά από επαφή με μολυσμένα ύδατα, οι καταλληλότεροι μικροβιακοί δείκτες, καθώς επίσης και τρόποι διαχείρισης της ποιότητας των υδάτων.

Σαν καταλληλότερος δείκτης για την εκτίμηση της ποιότητας των θαλάσσιων υδάτων προτείνεται η συγκέντρωση των εντεροκόκκων, ενώ με βάση τις επιδημιολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν από τους Kay *et al.*, (1994) και Fleisher *et al.*, (1996), γίνεται συσχετισμός μεταξύ του πληθυσμού τους και της εμφάνισης

λοιμώξεων του γαστρεντερικού και του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (WHO 2003).

Στην Ευρώπη η πρώτη Οδηγία εκδόθηκε το 1976 και οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της ποιότητας των ευρωπαϊκών κολυμβητικών υδάτων. Δεν είναι σαφές αν τα κριτήρια που θεσπίστηκαν τότε βασίζονταν σε αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών, αν και μια Βρετανική μελέτη που είχε προηγηθεί έδειξε ότι η κολύμβηση σε ύδατα στα οποία ο πληθυσμός των ολικών κολίμορφων βακτηρίων ξεπερνούσε τις 10000 cfu/100 ml μπορεί να είχε σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία των λουόμενων. Μερικά χρόνια αργότερα άρχισε να αμφισβητείται η αποτελεσματικότητα των κριτηρίων της Οδηγίας αυτής και από το 1997 μέχρι το 2000 η Ευρωπαϊκή Ένωση με μια σειρά από ανακοινώσεις ζητούσε την αναθεώρηση της προηγούμενης Οδηγίας. Τελικά, μετά από μια σειρά μελετών, θεσπίστηκε το 2006 μια νέα Οδηγία (2006/7/ΕΚ), η οποία βρίσκεται σε ισχύ μέχρι και σήμερα (Kay *et al.*, 2004).

1.8.1 Ευρωπαϊκή Ένωση και Νομικό Πλαίσιο

Σύμφωνα με πρόσφατες στατιστικές μελέτες του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου, το 20% των επιφανειακών υδάτων στην Ευρωπαϊκή Ένωση απειλείται σημαντικά από μολύνσεις. Το γεγονός ότι τα επιφανειακά ύδατα είναι ιδιαίτερος επιρρεπής σε διάφορους τύπους μικροβιακών μολύνσεων οδήγησε την Ευρωπαϊκή Ένωση στη λήψη μέτρων και την έκδοση αντίστοιχων οδηγιών προς τα κράτη – μέλη, ώστε να διασφαλιστεί η ποιότητά τους. Όσον αφορά στα κολυμβητικά ύδατα όρισε ως «ρύπανση» την παρουσία μικροβιολογικής μόλυνσης ή άλλων μικροοργανισμών ή αποβλήτων που επηρεάζουν την ποιότητα των υδάτων κολύμβησης και παρουσιάζουν κίνδυνο για την υγεία των λουόμενων και έδωσε τις απαραίτητες κατευθυντήριες γραμμές για τον έλεγχο και τη διαχείριση της ποιότητάς τους.

Η Οδηγία του 1976 ανέφερε ότι όλα τα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης πρέπει να μεριμνήσουν για την ποιότητα των κολυμβητικών υδάτων και να λάβουν τα αναγκαία μέτρα ώστε αυτή να είναι σύμφωνη με τις οριακές τιμές που περιγράφονταν στην Οδηγία. Προκειμένου να γίνει εκτίμηση της ποιότητας, απαιτούνταν ο έλεγχος 19 παραμέτρων, τόσο φυσικοχημικών όσο και μικροβιολογικών, ενώ ταυτόχρονα αναφέρονταν οι προτεινόμενες και υποχρεωτικές τιμές των παραμέτρων αυτών. Απαιτούνταν η λήψη μιας σειράς δειγμάτων κατά τη διάρκεια της κολυμβητικής περιόδου και η τελική εκτίμηση γίνονταν βάσει του συνόλου των αποτελεσμάτων τους. Σαν μικροβιολογικές παράμετροι είχαν οριστεί ο πληθυσμός των ολικών

κολίμορφων βακτηρίων, του βακτηρίου *Escherichia coli* και των στρεπτοκόκκων περιττωματικής προέλευσης και τα επιτρεπόμενα όρια φαίνονται στον Πίνακα 1.4.

Πίνακας 1.4. Όρια δεικτών σύμφωνα με 76/160/ΕΚ. Οι τιμές εκφράζονται σε cfu / 100 ml και στην παρένθεση φαίνεται το ποσοστό των δειγμάτων που δεν θα πρέπει να ξεπερνάει τις προτεινόμενες τιμές

Παράμετρος	Όρια	
	Υποχρεωτικό	Προτεινόμενο
Ολικά κολίμορφα	10 ⁴ (95 %)	500 (80 %)
<i>E. coli</i>	0,2x10 ⁴ (95 %)	100 (80 %)
Περιττωματικοί στρεπτόκοκκοι		100 (80 %)

Η κατανόηση της διακύμανσης της ποιότητας του νερού και η πρόβλεψη σε πραγματικό χρόνο των περιττωματικών μικροβιακών δεικτών (FIOs) σε παραλίες αναψυχής αποτελεί το σημαντικότερο σημείο της αναθεωρημένης Ευρωπαϊκής Οδηγίας 2006/7/EC (CEU, 2006) και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO Guidelines for recreational waters 2003). Μελέτες των συγκεντρώσεων FIO σε επιφανειακά δείγματα νερού έδειξαν συνεχή και σημαντική αύξηση των πληθυσμών τους ως συνέπεια της βροχόπτωσης (Kay *et al.*, 2008).

Παρόλα αυτά, η φυσική σύνδεση της εισροής νερού και των επιπτώσεων που επιφέρει στην ποιότητα των υπό εξέταση παραλιών δεν έχει καθοριστεί πλήρως, αν και είναι απαραίτητη σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 'Programmes of Measures' Water Framework Directive, Article 11 (CEC, 2000), καθώς η Οδηγία αυτή απαιτεί τον σχεδιασμό του μέγιστου ημερήσιου φορτίου απορροών που μπορεί να δεχθεί η εκάστοτε παραλία.

Με την έκδοση της Οδηγίας 2006/7/ΕΚ οι εξεταζόμενες παράμετροι μειώθηκαν από 19 σε 2. Αφαιρέθηκε τόσο ο έλεγχος των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των υδάτων όσο και ο έλεγχος για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των ολικών κολίμορφων βακτηρίων, ενώ παράλληλα μειώθηκαν και τα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια. Οι μόνες παράμετροι που εξετάζονται σήμερα είναι μικροβιολογικές και πιο συγκεκριμένα ο πληθυσμός του βακτηρίου *E.coli* και αυτός των βακτηρίων του γένους *Enterococcus* (Πίνακας 1.5).

Βάσει των συγκεντρώσεων των μικροβιακών δεικτών μπορεί να γίνει χαρακτηρισμός των υδάτων ως Εξαιρετικής, Καλής ή Επαρκούς ποιότητας, αλλά και στην περίπτωση αυτή απαιτείται η συλλογή ενός αριθμού δειγμάτων προκειμένου να γίνει η τελική εκτίμηση.

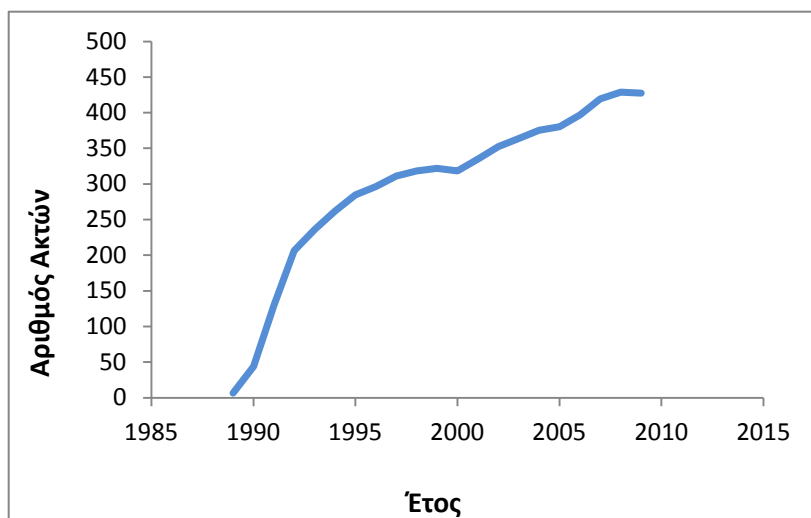
Πίνακας 1.5 Επιτρεπόμενα όρια σύμφωνα με 2006/7/ΕΚ (*Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 95^ο εκατοστημόριο, **Βάσει αξιολόγησης σύμφωνα με το 90^ο εκατοστημόριο)

Παράμετρος	Εξαιρετικής ποιότητας	Καλής ποιότητας	Επαρκούς ποιότητας
Εντερόκοκκοι (CFU / 100 ml)	100*	200*	185**
<i>Escherichia coli</i> (CFU / 100 ml)	250*	500*	500**

Στην Ευρώπη έχει καθιερωθεί, επίσης, ο θεσμός της ‘Γαλάζιας Σημαίας’. Πρόκειται για ένα εθελοντικό πρόγραμμα βράβευσης των καθαρότερων ακτών και μαρίνων, το οποίο ξεκίνησε το 1987 από στη Γαλλία και διευθύνεται από το Ίδρυμα Περιβαλλοντικής Εκπαίδευσης (FEE).

Αμέσως επεκτάθηκε σε όλες τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ενώ σήμερα συμμετέχουν σε αυτό 41 χώρες συνολικά σε όλο τον κόσμο. Έχουν θεσπιστεί 29 αυστηρά κριτήρια βάσει των οποίων γίνεται η αξιολόγηση των ακτών και ένα από τα βασικότερα είναι ο έλεγχος της μικροβιολογικής ποιότητας του νερού. Στην περίπτωση αυτή, για την απονομή της Γαλάζιας Σημαίας πρέπει το νερό της εξεταζόμενης παραλίας να χαρακτηρίζεται ως Εξαιρετικής ποιότητας σύμφωνα με την ισχύουσα Οδηγία της Ε.Ε.

Το 2012 στην Ελλάδα βραβεύτηκαν με Γαλάζια Σημαία 394 Ελληνικές ακτές και 9 μαρίνες, όταν τα αντίστοιχα νούμερα το 1988, οπότε και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το πρόγραμμα αυτό, ήταν 7 και 8 αντίστοιχα (Εικ. 1.10).



Εικόνα 1.10 Διακύμανση του αριθμού των ελληνικών ακτών που έχουν βραβευτεί με Γαλάζια Σημαία κατά τα έτη 1988-2012

1.9 Οικονομικές επιπτώσεις της μόλυνσης των υδάτων

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι η έκθεση σε μολυσμένα με απόβλητα ύδατα αναφυχής μπορεί να οδηγήσει σε διάφορους τύπους ασθενειών, όπως είναι αυτές του γαστρεντερικού και του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, των οφθαλμών, των αυτιών και του δέρματος. Η πλειονότητα αυτών των λοιμώξεων είναι αυτοπεριοριζόμενη και δεν επιβαρύνει σημαντικά το σύστημα υγείας, ένα ποσοστό όμως έχει σοβαρές συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία προκαλώντας και την αντίστοιχη οικονομική επιβάρυνση (Remoundou & Koundouri, 2009). Αρκετοί ερευνητές έχουν επισημάνει ότι οι ασθένειες που οφείλονται σε μολυσμένα παράκτια ύδατα μπορεί να έχουν σημαντικές επιπτώσεις τόσο στην υγεία όσο και στην οικονομική κατάσταση της κοινωνίας. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον Shuval το 2003 έδειξε ότι τα μολυσμένα παράκτια ύδατα προκαλούν παγκοσμίως 120 εκατομμύρια επεισόδια γαστρεντερικών λοιμώξεων και 50 εκατομμύρια λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού ετησίως, επιβαρύνοντας το σύστημα υγείας με 12 δισεκατομμύρια δολάρια κάθε χρόνο. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Σκωτία έδειξε ότι το όφελος από τη μείωση του ποσοστού των λοιμώξεων που

προκαλείται από κολύμβηση σε μολυσμένα ύδατα ανέρχεται σε 348.000 ευρώ ετησίως (Johnson *et al.*, 2008).

Στο Orange County της Βόρειας Καλιφόρνια, οι υπεύθυνοι αντιμετώπιζαν με σκεπτικισμό την εφαρμογή ενός προγράμματος διαχείρισης αστικών απορροών κατά τους καλοκαιρινούς μήνες κόστους 350.000 δολαρίων. Οι ανεπεξέργαστες αστικές απορροές που καταλήγουν στις παραλίες της περιοχής έχειδειχθεί ότι αποτελούν την κύρια πηγή μόλυνσης των παράκτιων υδάτων αναψυχής κατά τη διάρκεια του έτους. Έρευνα που διεξήχθη στη συγκεκριμένη περιοχή έδειξε ότι αν στην περίπτωση αυτή το ποσοστό των λοιμώξεων μειώνονταν έστω και λίγο μέσω της διαχείρισης των απορροών, τότε το ετήσιο δημόσιο οικονομικό όφελος θα ανέρχονταν σε εκατομμύρια δολάρια. Έδειξαν, επίσης, ότι και όταν ακόμη τα επίπεδα των βακτηριακών δεικτών είναι κάτω από τα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια, ο απορρέων κίνδυνος για την υγεία μπορεί να αποτελέσει μεγάλο βάρος στην υγεία και την οικονομία. Για το λόγο αυτό πρότειναν αναθεώρηση της μέχρι σήμερα αποδεκτής πιθανότητας νόσου από την οποία απορρέουν και τα επιτρεπόμενα όρια των μικροβιακών δεικτών (Dwight *et al.*, 2005).

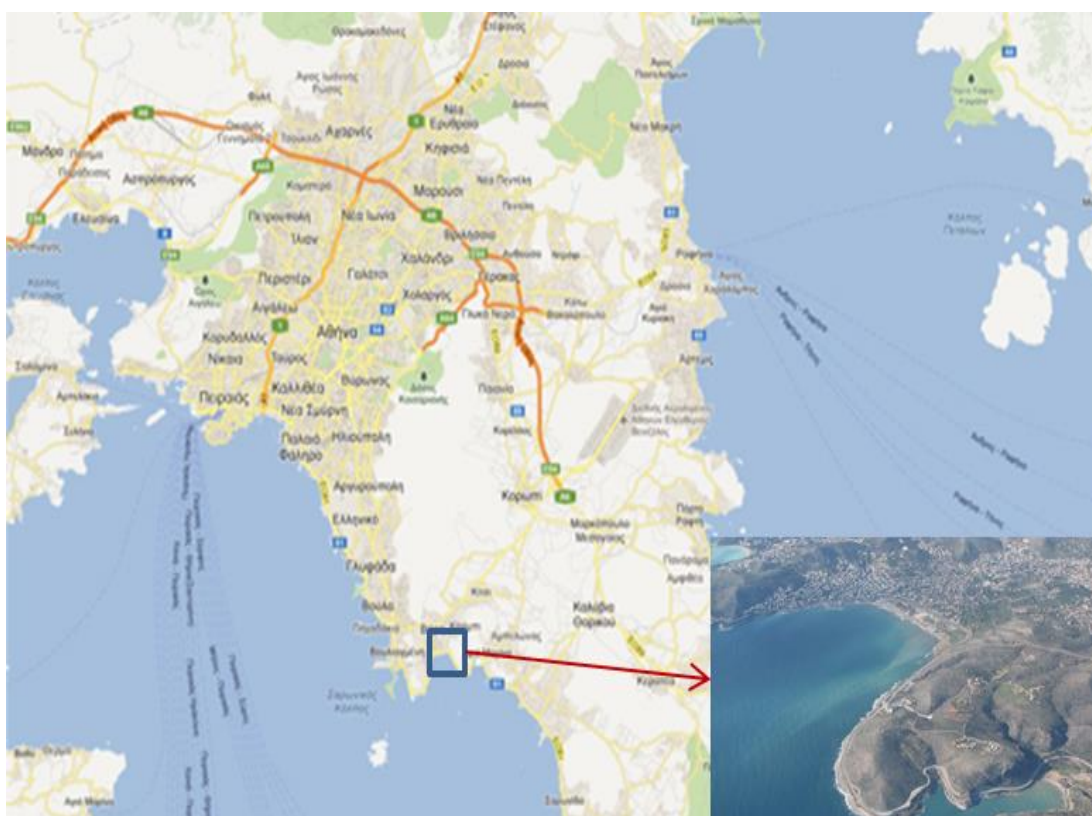
Παρόλα αυτά, περισσότερες μελέτες χρειάζονται προκειμένου να υπάρξει μια πιο καθαρή εικόνα της οικονομικής επιβάρυνσης ως αποτέλεσμα των υδατογενών λοιμώξεων. Η οικονομική κατάσταση, η φορολογία, το σύστημα υγείας διαφοροποιούνται από περιοχή σε περιοχή, γεγονός που οδηγεί σε διαφορετικό βαθμό επιβάρυνσης σε κάθε περιοχή. Επίσης, ελάχιστες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί που να ελέγχουν εάν η εφαρμογή νέων, ακριβέστερων, αλλά και πιο δαπανηρών μεθόδων μπορεί να έχει μικρότερο κόστος από αυτό που προκύπτει τελικά από την κολύμβηση σε μολυσμένα ύδατα.

1.10 Ο κόλπος της Βάρκιζας

Ο κόλπος της Βάρκιζας βρίσκεται σε απόσταση 28 χιλιομέτρα νοτιοανατολικά από το κέντρο της Αθήνας (Εικ. 1.11). Η παραλία της Βάρκιζας χωρίζεται σε δύο τμήματα, το δυτικό που απλώνεται σε έκταση 100 στρεμμάτων και έχει δοθεί από τον Δήμο για εκμετάλλευση σε ιδιώτες και το ανατολικό, όπου αποτελεί μια μεγάλη σε μήκος και έκταση (140 στρέμματα) αμμώδη ελεύθερη παραλία κατά μήκος της παραλιακής λεωφόρου.

Η Ελεύθερη Πλάζ Βάρκιζας καταλαμβάνει το ανατολικό ήμισυ της ακτής Βάρκιζας του νέου πλέον Καλλικρατικού Δήμου Βούλας Βάρης Βουλιαγμένης. Ο χώρος οριοθετείται βόρεια από την παραλιακή οδό, η οποία είναι κατασκευασμένη σε

ανάχωμα, ανατολικά από τους βραχώδεις λόφους της Βάρης που καταλήγουν στη θάλασσα και δυτικά από την περιφραγμένη παραλία Βάρκιζας. Η έκτασή του είναι 140 στρ, εκ των οποίων: 28 στρ. είναι αραιό δάσος, 13 στρ. χώρος στάθμευσης και δρόμοι, 21 στρ. ζώνη αμμουδιάς και 66 στρ. χέρσα ζώνη. Η περιοχή χωρίζεται στις ακόλουθες ζώνες:



Εικόνα 1.11 Χάρτης της Αττικής, όπου φαίνεται ο κόλπος της Βάρκιζας κάτω δεξιά.

Ανατολικά, βραχώδεις λόφοι με αραιή φυτοκάλυψη και καθόλου δόμηση. Βορειοανατολικά επίπεδες εκτάσεις με έντονη φυτοκάλυψη, δέντρα και ελάχιστη δόμηση. Βορειοδυτικά, έντονη φυτοκάλυψη, δέντρα και αραιή δόμηση. Δυτικά, πυκνή δόμηση.

Στο χώρο βρίσκονται διάσπαρτες κατασκευές και υποδομές: Γήπεδο ποδοσφαίρου, κερκίδες, ασφαλτοστρωμένος δρόμος, χώρος στάθμευσης που χρησιμοποιείται από λεωφορεία, χώρος στάθμευσης που χρησιμοποιείται από το λούνα πάρκ, το ίχνος της παλιάς παραλιακής οδού, οι εγκαταστάσεις του Ναυτικού Ομίλου Βάρης-

Βάρκιζας, ίχνη παλαιών κτιρίων, αγωγός παροχέτευσης όμβριων υδάτων, παραλιακές καντίνες αλλά και ίχνη αρχαίου τοίχους.

Λόγω της υδροχαρούς του βλάστησης, αποτελεί ενδιαίτημα για πολλά είδη χλωρίδας και πανίδας, καθώς και στάση για αποδημητικά πουλιά. Στην περιοχή εκβάλλει το ρέμα Βάρης. Έχουν κατασκευαστεί δύο κλειστοί αγωγοί όμβρίων. Ο δυτικός διέρχεται κάτω από το γήπεδο ποδοσφαίρου και σταματά περίπου 50 μέτρα από την θάλασσα, ο δε ανατολικός διασχίζει διαγώνια το χώρο και εκβάλλει δίπλα στο ρέμα της Βάρης, όπου και δημιουργείται ένα αμμόδες δέλτα, το οποίο καταλήγει στη θάλασσα.

Η Ανατολική παραλία της Βάρκιζας (Εικ. 1.12Α), όπου πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες είναι περιοχή με έντονη τουριστική δραστηριότητα προσελκύοντας μεγάλο αριθμό λουόμενων κάθε χρόνο, λόγω της εγγύτητας με την Αθήνα και της ευκολίας πρόσβασης του κοινού μέσω του οδικού δικτύου. Εκτιμάται ότι ο αριθμός των λουομένων ανέρχεται από 1990 μέχρι και 3.225 άτομα την ημέρα (Οργανισμός Ρυθμιστικού Σχεδίου και Προστασίας Περιβάλλοντος Αθήνας, 2011), σύμφωνα με μετρήσεις κατά τους θερινούς μήνες (Ιούλιος 2011).

Λόγω της παρουσίας στο κέντρο της παραλίας του Ναυτικού Αθλητικού Ομίλου Βάρης- Βάρκιζας (Ν.Α.Ο.Β.Β.) οι επισκέπτες δεν περιορίζονται μόνο στους θερινούς μήνες αλλά υπάρχουν λουόμενοι σε όλη τη διάρκεια του χρόνου.

Η παραλία της Βάρκιζας βρίσκεται σε πλήρως αστική περιοχή με μεγάλες ξενοδοχειακές μονάδες, εστιατόρια, μεγάλα κέντρα διασκέδασης καθώς και σκάφη αναψυχής, με αποτέλεσμα να είναι ευάλωτη σε πιθανούς κινδύνους μόλυνσης.

Η Ελληνική Εταιρία Προστασίας της Φύσης (Ε.Ε.Π.Φ.) μετά από έρευνες έχει αποφανθεί ότι η παραλία πληροί τα κριτήρια και της έχει αποδώσει, ως εθνικός διαχειριστής, το βραβείο 'Γαλάζια Σημαία'.

Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με αντίστοιχες έρευνες (Μάιος 2012) που έχουν διεξαχθεί από Πανελλήνιο Κέντρο Οικολογικών Ερευνών (ΠΑΚΟΕ) που είναι ένας ανεξάρτητος περιβαλλοντικός φορέας και έδειξαν παρουσία εντεροκόκκων πάνω από τα προβλεπόμενα όρια που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση για την καταλληλότητα των υδάτων.

A.



B.



Εικόνα 1.12 Η παραλία της Βάρκιζας **A.** Ανατολικό τμήμα **B.** Δυτικό τμήμα

1.11 Σκοπός της εργασίας

Την τελευταία δεκαετία, διεθνώς, παρατηρείται έντονος προβληματισμός σχετικά με την ποιότητα των παράκτιων υδάτων που βρίσκονται κοντά σε αστικά κέντρα καθώς, η οικιστική ανάπτυξη σε παράκτιες περιοχές αυξάνεται χρόνο με το χρόνο. Η έντονη αστικοποίηση επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα των παρακείμενων υδάτων, καθώς διάφορα απόβλητα από τις ανθρώπινες δραστηριότητες καταλήγουν συχνά σε αυτά ρυπαίνοντάς τα.

Η εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου μιας παραλίας και πως αυτό επηρεάζεται σε διαφορετικές συνθήκες ή χρονικές περιόδους δεν έχει μελετηθεί ποτέ στον Ελλαδικό χώρο. Σε παγκόσμια κλίμακα παρεμφερείς έρευνες διενεργούνται τα τελευταία 5 χρόνια και τα μέχρι τώρα αποτελέσματα σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία δείχνουν ότι υπάρχει επιτακτική ανάγκη για τη διεξαγωγή ερευνών σε κάθε πολυσύχναστη παραλία για την προστασία των λουομένων.

Οι έρευνες αυτές έχουν οδηγήσει στο κλείσιμο πολλών παραλιών για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, καθώς και στην ανάρτηση προειδοποιητικών πινακίδων για την ενημέρωση των επισκεπτών, όσον αφορά στην επικινδυνότητα των παρακείμενων θαλασσίων υδάτων. Για τον λόγο αυτόν, προέκυψε το ερώτημα για την καταλληλότητα των υδάτων των πολυσύχναστων ελληνικών παραλιών και επιλέχθηκε για μελέτη η παραλία της Βάρκιζας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να γίνει εκτίμηση της διακύμανσης της ποιότητας των υδάτων στην περιοχή της παραλίας της Βάρκιζας σε διαφορετικές χρονικές περιόδους (Καλοκαίρι 2010, Χειμώνας 2011 και Καλοκαίρι 2011) και διαφορετικές καιρικές συνθήκες (ξηρασία και βροχόπτωση). Η παραλία της Βάρκιζας προσελκύει μεγάλο αριθμό λουομένων κάθε χρόνο και για τον λόγο αυτό η διατήρηση της καλής ποιότητας των υδάτων είναι μέγιστης σημασίας. Επίσης, βασική επιδίωξη στη συγκεκριμένη έρευνα αποτέλεσε ο έλεγχος δειγμάτων άμμου από την ίδια περιοχή και η εκτίμηση της συνεισφοράς της στην κατακράτηση τόσο μικροβιακών δεικτών, όσο και παθογόνων μικροοργανισμών που θα μπορούσαν δυνητικά να επηρεάσουν αρνητικά την υγεία των λουομένων.

Ο έλεγχος της ποιότητας των υδάτων και της παρακείμενης άμμου αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί με χρήση μεθόδων κλασσικής μικροβιολογίας για τον προσδιορισμό του πληθυσμού των θεσπισμένων από την Ευρωπαϊκή Ένωση μικροβιακών δεικτών, *Escherichia coli* και *Enterococcus* sp. Για να εξεταστεί η σχέση μεταξύ μικροβιακών δεικτών και παθογόνων μικροοργανισμών έγινε έλεγχος για την

ανίχνευση δύο παθογόνων μικροοργανισμών, των βακτηρίων *Salmonella* sp. και *Staphylococcus* sp.. Το βακτήριο *Salmonella* sp. μπορεί να προκαλέσει σοβαρές λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος, ενώ το βακτήριο *Staphylococcus* sp. προκαλεί πυαιμία και μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση Πομφολυγώδους Μολυσματικού Κηρίου (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome) λόγω των εξωτοξινών που παράγει και διοχετεύονται στην κυκλοφορία του αίματος. Στα δείγματα της άμμου, πραγματοποιήθηκε επιπλέον έλεγχος για την ανίχνευση του ολικού πληθυσμού των μυκήτων καθώς και συγκεκριμένα του μύκητα *Candida albicans* που προκαλεί καντιντίαση στους ανθρώπους. Συνεπώς, η ανίχνευση της παρουσίας ή μη των παθογόνων αυτών οργανισμών έχει μεγάλη σημασία για την προστασία της υγείας των λουόμενων.

Στη συνέχεια, αποφασίστηκε να εξεταστεί η ετήσια διακύμανση των παραπάνω βακτηριακών πληθυσμών με δειγματοληψίες που θα λάβουν χώρα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, η χωρική διακύμανση ανάμεσα στα τρία διαφορετικά σημεία δειγματοληψίας, η συνεισφορά των λουομένων στην αύξηση του μικροβιακού φορτίου κατά τους θερινούς μήνες και τέλος η σημασία της βροχόπτωσης ως ενός από τους βασικότερους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ποιότητα των εξεταζόμενων υδάτων.

Εκτός από τον ποσοτικό έλεγχο του νερού και της άμμου, πραγματοποιήθηκε και ποιοτικός προσδιορισμός των επικρατέστερων βακτηριακών ομάδων που εμφανίζονται στο νερό σε διαφορετικές συνθήκες και χρονικές περιόδους. Για να επιτευχθεί η ποιοτική ανάλυση έγινε χρήση απλής αντίδρασης PCR και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA σε πήκτωμα ακρυλαμίδης παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα (DGGE) και τέλος, ταυτοποίηση των εμφανιζόμενων μικροβιακών ομάδων με αλληλούχιση του γονιδίου του 16S rDNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Τα δείγματα νερού και άμμου συλλέχθηκαν από την παραλία της Βάρκιζας (Εικ. 2.1) σε 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους τον Ιούλιο του 2010, τον Φεβρουάριο του 2011 και τον Ιούλιο του 2011. Οι συγκεκριμένες ημερομηνίες δειγματοληψίας φαίνονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1: Ημερομηνίες και συνθήκες δειγματοληψιών

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ
1 ^η δειγματοληψία	20/06/2010	Ξηρασία
2 ^η δειγματοληψία	30/06/2010	Βροχόπτωση
3 ^η δειγματοληψία	25/01/2011	Βροχόπτωση
4 ^η δειγματοληψία	07/02/2011	Ξηρασία
5 ^η δειγματοληψία	22/06/2011	Ξηρασία
6 ^η δειγματοληψία	27/06/2011	Βροχόπτωση

Κάθε χρονική περίοδο πραγματοποιήθηκαν 2 ξεχωριστές δειγματοληψίες, η μία σε συνθήκες ξηρασίας, όπου είχαν προηγηθεί τουλάχιστον 10 μέρες χωρίς βροχόπτωση και η επόμενη 24 ώρες ακριβώς μετά τη βροχόπτωση στο ίδιο σημείο δειγματοληψίας.



Εικόνα 2.1. Η ανατολική παραλία της Βάρκιζας

Τρία διαφορετικά σημεία της παραλίας σε απόσταση 100 μέτρων μεταξύ τους επιλέχθηκαν για τη συλλογή των δειγμάτων. Τα δείγματα νερού συλλέχθηκαν από βάθος 40 εκατοστών, ενώ τα δείγματα άμμου συλλέχθηκαν από τα τρία αντίστοιχα σημεία της παραλίας ακριβώς πάνω από το επίπεδο της θάλασσας (Εικ. 2.2).



Εικόνα 2.2 Οι τρεις περιοχές δειγματοληψίας στην ανατολική παραλία της Βάρκιζας. Το σημείο **A** αποτελεί το πιο ανατολικό σημείο της ανατολικής παραλίας της Βάρκιζας και την περιοχή στην οποία καταλήγει το ρέμα της Βάρης. Το σημείο **B** βρίσκεται στο μέσο της ανατολικής παραλίας, ακριβώς κάτω από τον Ναυτικό Αθλητικό Όμιλο Βάρης- Βάρκιζας (Ν.Α.Ο.Β.Β.) και το σημείο **Γ** αποτελεί το πλέον πολυσύχναστο σημείο της ανατολικής παραλίας και συνορεύει με τη δυτική (ιδιωτικών συμφερόντων) παραλία της Βάρκιζας.

Από κάθε επιλεγμένη περιοχή δειγματοληψίας συλλέχθηκε όγκος ύδατος 20 λίτρων. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε πλαστικά δοχεία όγκου 20 λίτρων που είχαν αποστειρωθεί με χρήση διαλύματος αιθανόλης 70 % (v/v) και ακτινοβολίας UV και εκπλυθεί με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό στο εργαστήριο. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικούς θαλάμους των 4 °C κατά τη μεταφορά και αναλύθηκαν εντός 24 ωρών στο εργαστήριο.

Αντίστοιχα, από κάθε περιοχή δειγματοληψίας της παραλίας συλλέχθηκε άμμος με τη χρήση αποστειρωμένων πλαστικών δοχείων χωρητικότητας 100 ml και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικούς θαλάμους των 4 °C κατά τη μεταφορά και αναλύθηκαν εντός 24 ωρών στο εργαστήριο.

2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Θρεπτικό Άγαρ (NA), (Atlas, 1993). Περιέχει (g/l): Πεπτόνη 5, Εκχύλισμα Κρέατος (μόσχου) 3, NaCl 8, Άγαρ 30.

Tryptone Water, (MERCK).

Περιέχει (g/l): Πεπτόνη καζεΐνης 10,0, χλωριούχο νάτριο 5,0.

Chromocult TBX Agar, (MERCK)

Περιέχει (g/l): Πεπτόνη 20,0, χολικά άλατα No 3 1,3, X-β-D-glucuronide 0,075, άγαρ-άγαρ 10,0.

Baird Parker Agar Base, (Applichem). Περιέχει (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

Czaprek-Dox Agar – CzA (Atlas 1993)

Περιέχει (g/l): γλυκόζη 30,0, διάλυμα βασικών αλάτων 100 ml, άγαρ 15,0, pH 7,3

Candida Isolation Agar (Atlas 1993)

Περιέχει (g/l): γλυκόζη 10,0, πεπτόνη 5,0, εκχύλισμα ζύμης 3,0, μπλε της ανιλίνης 0,1, άγαρ 15,0 pH 5,9 ± 0,2 στους 25 °C. Μετά την αποστείρωση προσθέτουμε 1ml αντιβιοτικού χλωραμφενικόλης 0,1 g/ml

Buffered Peptone Water. (MERCK).

Περιέχει (g/l): πεπτόνη βακτηριολογική 10,0, NaCl 5,0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$ 9,0 ή $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ 3,21, KH_2PO_4 1,5 ή $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 2,53, pH 7,2.

Rappaport-Vassiliadis R10 Broth, (Bridson 2006).

Περιέχει (g/l): βακτηριολογική τρυπτόνη 4,54, NaCl 7,2, φωσφορικό κάλιο 1,4, άνυδρο χλωριούχο μαγνήσιο 13,4, οξαλικό άλας πράσινο του μαλαχίτη 0,036.

Selenite Cysteine Enrichment Broth, (MERCK).

Περιέχει (g/l): πεπτόνη καζεΐνης 5,0, L(-) κυστίνη 0,01, λακτόζη 4,0, φωσφορικό ρυθμιστικό 10,0, όξινο σεληνωειδές νάτριο 4,0.

Brilliant Green Άγαρ, (Bridson 2006).

Περιέχει (g/l): “Lab-Lemco” powder 5,0, πεπτόνη 10,0, εκχύλισμα μυκήτων 3,0, μονόξινο φωσφορικό νάτριο 1,0, δισόξινο φωσφορικό νάτριο 0,6, λακτόζη 10,0, σουκρόζη 10,0, κόκκινο φαινόλης 0,09, brilliant green 0,0047, άγαρ 12,0, pH $6,9 \pm 0,2$.

Bismuth Sulphite Άγαρ, (Bridson 2006).

Περιέχει (g/l): πεπτόνη 5,0, “Lab-Lemco” powder 5,0, γλυκόζη 5,0, φωσφορικό νάτριο 4,0, θειικό σίδηρο 0,3, δείκτης θειώδους βισμούθιου 8,0, brilliant green 0,016, άγαρ 12,7, pH $7,6 \pm 0,2$.

Salmonella Shigella Άγαρ, (Bridson 2006).

Περιέχει (g/l): “Lab-Lemco” powder 5,0, πεπτόνη 5,0, λακτόζη 10,0, άλατα χολής 5,5, κιτρικό νάτριο 10,0, θειοθειϊκό νάτριο 8,5, κιτρικός σίδηρος 1,0, brilliant green 0,00033, ουδέτερο ερυθρό 0,025, άγαρ 12,0, pH $7,3 \pm 0,2$.

Klinger Iron Άγαρ, (Bridson 2006).

Περιέχει (g/l): “Lab-Lemco” powder 3,0, εκχύλισμα μυκήτων 3,0, πεπτόνη 20,0, χλωριούχο νάτριο 5,0, λακτόζη 10,0, γλυκόζη 1,0, κιτρικός σίδηρος 0,3, θειοθειϊκό νάτριο 0,3, κόκκινο φαινόλης 0,05, άγαρ 12,0, pH $7,4 \pm 0,2$.

Membrane Filter Enterocococcus Selective Agar - Slannetz & Bartley Agar, (MERCK). Περιέχει (g/l): Πεπτόνη καζεΐνης 15,0, πεπτόνη σόγιας 5,0, εκχύλισμα μυκήτων 5,0, D(+) γλυκόζη 2,0, μονόξινο φωσφορικό κάλιο 4,0, αζίδιο του νατρίου 0,4, 2,3,5 triphenyl-tertzolium chloride 0,1, άγαρ 10,0.

Esculin Bile Agar, (MERCK).

Περιέχει (g/l): εκχύλισμα κρέατος 3,0, πεπτόνη κρέατος 5,0, χολή βοδιού 40,0, εσκουλίνη 1,0, κιτρικός σίδηρος 0,5, άγαρ 14,5.

Διάλυμα Αλάτων Ringer (1/4), (Wellington και συνεργάτες 1990).

Περιέχει (g/l): NaCl 2,15, KCl 0,15, CaCl₂ 0,075, K₂HPO₄ 0,5.

Διάλυμα Ινδόλης KOVACS, (MERCK).

Σαφρανίνη: 100 ml κορεσμένου αλκοολικού διαλύματος σαφρανίνης (2,5 g χρωστικής ανά 100 ml αιθανόλης) προστέθηκαν σε 1 λίτρο αποσταγμένου νερού.

Διάλυμα οξικού Νατρίου 3 M, pH 5,0

Διάλυμα ιωδίου: Σε 300 ml αποσταγμένου νερού διαλύθηκαν 1 g κρυσταλλικού ιωδίου, 2 g KI, και 3 g NaHCO₃.

Διάλυμα Καθαρής Αιθανόλης 99 % (v/v).

Αντιδραστήριο Οξειδάσης (Biomerieux, Γαλλία).

Διάλυμα Κρυσταλλικού Ιωδίου (Crystal Violet), (Μεϊντάνης 2005): Τέσσερις όγκοι κορεσμένου αλκοολικού διαλύματος Crystal Violet (20 g χρωστικής ανά 100 ml αιθανόλης) αναμίχθηκαν με ένα όγκο υδατικού διαλύματος 1 % (v/v) οξαλικού αμμωνίου και το μίγμα διηθήθηκε. Η πλήρης διάλυση του οξαλικού αμμωνίου επιτεύχθηκε είτε με ελαφρά θέρμανση του διαλύματος και με παραμονή για 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα TAE (1x), (Μεϊντάνης 2005): 0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA, pH 8,0. Το διάλυμα παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 50 φορές μεγαλύτερη (50x) από το διάλυμα εργασίας (1x) και φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα εργασίας παρασκευάστηκε λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με ανάλογη αραίωση του 50x πυκνού διαλύματος.

Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου, (Μεϊντάνης 2005): 10 mg/ml βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma) σε αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό. Το φιαλίδιο όπου φυλάχθηκε το διάλυμα καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και το διάλυμα φυλάχθηκε στους 4 °C.

2.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΔΑΤΙΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Σκοπός αυτής της διαδικασίας ήταν ο προσδιορισμός του συνολικού αριθμού καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών στο σύνολο των δειγμάτων, εκτιμώντας τις βιώσιμες μονάδες που σχηματίζουν αποικίες σε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα, μετά από αερόβια επώαση στους 36 ± 2 °C.

2.3.1 Εκτίμηση του ολικού πληθυσμού των μικροοργανισμών από τα δείγματα νερού

Ποσότητα 4 λίτρων δείγματος διηθήθηκε μέσω ηθμού με διάμετρο πόρου 0,22 μm. Ο ηθμός τοποθετήθηκε σε σωλήνα τύπου universal, ο οποίος περιείχε 10 ml διαλύματος Ringer. Ακολούθησε ανακίνηση σε παλινδρομικό αναδευτήρα για 60 λεπτά και μικρή ποσότητα του εναιωρήματος (100 μl) επιστρώθηκε σε τρυβλία με Θρεπτικό Άγαρ (NA), τα οποία επωάστηκαν σε θερμοκρασίες 36 ± 2 °C για 44 ± 4 ώρες.

Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις στο δείγμα των σωλήνων τύπου universal μέχρι αραιώσης ίσης με 10^{-6} . Στη συνέχεια, 100 μl από κάθε αραιώση επιστρώθηκαν στο παραπάνω στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και τα τρυβλία επωάστηκαν σε θερμοκρασίες 36 ± 2 °C για 44 ± 4 ώρες. Επιστρώθηκαν 3 τρυβλία από κάθε αραιώση για κάθε θερμοκρασία.

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 x 1 ml^{-1} ή cfu x 100 ml^{-1} 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.).

2.3.2 Εκτίμηση και απομόνωση ολικών μικροοργανισμών από δείγματα άμμου.

Ποσότητα 10 γραμμαρίων άμμου διαλύθηκε σε 90 ml διαλύματος Ringer. Ακολούθησε ανακίνηση σε παλινδρομικό αναδευτήρα για 60 λεπτά και μικρή ποσότητα του εναιωρήματος (100 μl) επιστρώθηκε σε τρυβλία με διάφορα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για την απομόνωση της εκάστοτε μικροβιακής ομάδας, τα οποία επωάστηκαν σε θερμοκρασίες $36 \pm 2^\circ\text{C}$ για 44 ώρες.

Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις σε δείγματα σωλήνων τύπου universal μέχρι αραιώσης ίσης με 10^{-4} . Στη συνέχεια από κάθε αραιώση έγινε επίστρωση ποσότητας 100 μl στα παραπάνω στερεά θρεπτικά υποστρώματα και τα τρυβλία επωάστηκαν σε θερμοκρασίες $36 \pm 2^\circ\text{C}$ για 44 ώρες. Επιστρώθηκαν 3 τρυβλία από κάθε αραιώση, σε κάθε θρεπτικό υπόστρωμα, για κάθε θερμοκρασία.

2.3.3 Ανίχνευση και Απομόνωση *Staphylococcus* sp.

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. Θετικό στη δοκιμασία συγκόλλησης είναι το *Staphylococcus aureus*.

Η υψηλή συγκέντρωση λιθίου και γλυκίνης καταστέλλουν την ανάπτυξη των υπόλοιπων βακτηρίων, ενώ ταυτόχρονα το πυροσταφυλικό νάτριο ενισχύει την ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων. Η παρουσία τελλουρίτη και κρόκου αυγού, τα όποια προστίθενται μετά την αποστείρωση, επιτρέπει τον διαχωρισμό των πιθανών παθογόνων σταφυλοκόκκων. Υπάρχει υψηλός βαθμός συσχέτισης μεταξύ της δοκιμασίας συγκόλλησης και της παρουσίας καθαρών ζωνών λιπόλυσης στο θρεπτικό υπόστρωμα, οι οποίες οφείλονται στην ενεργότητα λεκιθινάσης των σταφυλοκόκκων. Σχεδόν το 100 % των θετικών στη συγκόλληση σταφυλόκοκκων 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 στην άμμο. Στα δείγματα του νερού, όγκος 50, 100 και 200 ml διηθήθηκε μέσω μεμβρανών με διάμετρο πόρων 0,45 μm, οι οποίοι στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια του εκλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος. Στα δείγματα της άμμου, 100 μl διαλυμένου δείγματος (0,1 g/ml) επιστρώθηκε στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 24 ώρες.

Τυπικά θετικές αποικίες (που ταυτοποιούνται ως *Staphylococcus aureus*, θετικό στη συγκόλληση), είναι μαύρες, γυαλιστερές, κυρτές, με ομαλό περίγραμμα και περιβάλλονται από καθαρές ζώνες λιπόλυσης διαμέτρου 2 – 5 mm.

2.3.4 Ανίχνευση και απομόνωση του ολικού πληθυσμού των εντεροκόκκων

Όγκοι 50, 100 και 200 ml δείγματος νερού διηθήθηκαν μέσω ηθμού με διάμετρο πόρου 0,45 μm και οι ηθμοί τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια τρυβλίου που περιείχε εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Membrane filter Enterococcus Selective Άγαρ (Slannetz & Bartley, 1957) και ακολούθησε επώαση στους 36 °C για 44 $\pm$ 4 ώρες. Στη συνέχεια οι ηθμοί μεταφέρθηκαν στο διαγνωστικό για τους εντερόκοκκους υπόστρωμα Esculine Bile Άγαρ και επωάστηκαν στους 44 $\pm$ 0,5 °C για 2 ώρες. Η διαδικασία ήταν ίδια και για τα δείγματα άμμου όπου 100 μl διαλυμένου δείγματος (0,1 g/ml) επιστρώθηκε στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για επώαση.

Η εκλεκτικότητα του πρώτου υλικού οφείλεται στο αζίδιο του νατρίου, το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη των Gram - μικροοργανισμών και στη χρωστική TTC, η οποία ανάγεται σε κόκκινο της φορμαζάνης από τον εντερόκοκκο. Στο θρεπτικό υλικό επιβεβαίωσης 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 υπόστρωμα.

2.3.5. Απομόνωση και επιλογή των βακτηρίων του γένους *E. coli*

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 περισσότερα 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. Η ανάπτυξη των θετικών κατά Gram οργανισμών αναστέλλεται με τη χρήση των χολικών αλάτων και την υψηλή θερμοκρασία επώασης (44 °C).

Όγκος 50, 100 και 200 ml διηθήθηκε διαμέσου ηθμών, οι οποίοι στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια των εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων. Ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 44 °C για το βακτήριο *E. coli*. Στους οργανισμούς που έδωσαν θετικά αποτελέσματα στα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα έγιναν βιοχημικές δοκιμές οξειδάσης και ινδόλης.

2.3.6 Ανίχνευση και Απομόνωση Μικροοργανισμών *Salmonella* sp.

1^ο στάδιο – Προεμπλουτισμός

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

2^ο στάδιο – Εμπλουτισμός

Κατά το στάδιο του εμπλουτισμού γίνεται 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 °C ± 0,5 °C) προωθεί την αύξηση των βακτηρίων του γένους *Salmonella*.

Για τον σκοπό αυτό, ποσότητες από την καλλιέργεια προεμπλουτισμού ίσες με 0,1 και 1 ml μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 10 ml των παραπάνω εκλεκτικών ζωμών αντίστοιχα και οι σωλήνες επωάστηκαν στους 42 °C ± 0,5 °C για 18 - 24 ώρες και στους 36 °C ± 2 °C για 24 ώρες αντίστοιχα. Αποχρωματισμός του θρεπτικού ζωμού αποτελεί ένδειξη παρουσίας βακτηρίων του γένους *Salmonella*.

3^ο στάδιο – Καλλιέργεια σε στερεό εκλεκτικό υπόστρωμα

Το βήμα αυτό αποσκοπεί στην ανίχνευση και απομόνωση όλων των πιθανών στελεχών σαλμονέλας. Για το λόγο αυτό εμβολιάζονται περισσότερα του ενός εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα (Brilliant Green Άγαρ, Bismuth Sulfate Άγαρ και *Salmonella Shigella* Άγαρ), με δείγματα από τους δοκιμαστικούς σωλήνες του προηγούμενου βήματος, με τη βοήθεια κρίκου εμβολιασμού και με τη μέθοδο των

παραλλήλων γραμμών. Η επώαση πραγματοποιείται στους $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ για 24 ώρες.

Θετικές αποικίες του 3^{ου} σταδίου είναι για το Brilliant Green Άγαρ οι κόκκινες – ροζ αποικίες με φωτεινό το υλικό γύρω τους, για το Bismuth Sulfate Άγαρ οι μαύρες μεταλλικές αποικίες και για το *Salmonella Shigella* Άγαρ οι άχρωμες αποικίες με μαύρο κέντρο.

4^ο στάδιο - Επιβεβαίωση

Οι τυπικά θετικές αποικίες του 3^{ου} σταδίου δεν αποτελούν βεβαιότητα παρουσίας του βακτηρίου *Salmonella* sp. Οπότε ακολούθησε επιβεβαίωση σε υπό κλίση εκλεκτικό θρεπτικό υλικό (Klinger Iron Agar), εμβολιάζοντας με τη μέθοδο των παραλλήλων γραμμών, με τις θετικές αποικίες του προηγούμενου σταδίου και βυθίζοντας τη βελόνα στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ για 18 - 24 ώρες.

Αποτέλεσμα

Στο Klinger Iron Agar θεωρείται τυπικά θετικό αποτέλεσμα όταν αναπτυχθεί αέριο, με κεκλιμένη επιφάνεια να κοκκινίζει και με κίτρινο άκρο (θετική ζύμωση γλυκόζης) και μαύρο άγαρ που υποδηλώνει παραγωγή υδρόθειου. Θετικά αποτελέσματα στο Klinger Iron Agar ελέγχονται περαιτέρω μοριακά.

2.3.7 Ανίχνευση και Απομόνωση *Candida albicans*

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 εμφανίζονται, ανήκουν πιθανά στον μικροοργανισμό *Candida albicans*.

Μακροσκοπική παρατήρηση πραγματοποιήθηκε στις θετικές αποικίες. Η ανίχνευση της *Candida albicans* πραγματοποιήθηκε στην άμμο όπου 100 μl διαλυμένου δείγματος (0,1 g/ml) επιστρώθηκαν στο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για επώαση.

2.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ DGGE

2.4.1 Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει την ηλεκτροφόρηση μίγματος μορίων DNA σε πήκτωμα ακρυλαμίδης, το οποίο περιέχει κατακόρυφα αυξανόμενη κλίση ενός αποδιατακτικού παράγοντα (φορμαμίδιο και ουρία). Το σύστημα ηλεκτροφόρησης βρίσκεται σε θερμοκρασία χαμηλότερη από τα T_m όλων των περιοχών αποδιάταξης που περιέχεται στα προς μελέτη μόρια DNA.

Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα δίκλινα μόρια DNA αποκτούν διακλαδισμένη μορφή σε εκείνη τη θέση του πηκτώματος, όπου η συγκέντρωση του αποδιατακτικού παράγοντα σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία εξισώθηκε με τη χαμηλότερη θερμοκρασία τήξεως (T_m) 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.

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

Η ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου έγινε χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος εκκινητικών μορίων με κωδικές ονομασίες F984GC και R1378 (Heuer *et al.*, 1997). Τα δυο εκκινητικά μόρια ενισχύουν την περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων 968 και 1401 του γονιδίου για το 16S rDNA, που περιλαμβάνουν τις περιοχές υψηλής ποικιλομορφίας V6-V8. Μια GC ουρά 40 βάσεων προστέθηκε στο 5' άκρο του εκκινητικού μορίου F984, ώστε να αποφευχθεί η πλήρης αποδιάταξη του δίκλινου μορίου DNA κατά την ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα ακρυλαμίδης παρουσία αποδιατακτικού παράγοντα.

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) DNA template, water for injection μέχρι όγκο 50 μ l.

Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης των αλυσίδων του DNA στους 95 °C για 2 min που ακολουθήθηκε από 40 κύκλους των 15 s στους 95 °C (αποδιάταξη), 15 s στους 53 °C (πρόσδεση των εκκινητών στο DNA) και 3 s στους 72 °C (σχηματισμός νέων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων). Η αντίδραση τερματίστηκε με ένα στάδιο 1 min στους 72 °C. Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR είναι 434 βάσεις. Τελικά τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6 % (w/v). Συγκεκριμένα το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης περιείχε 0,17 % (v/v) TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine), 0,03 % (v/v) ammonium persulfate, acrylamide–*N,N'*-methylenebisacrylamide (60:1), 1X TAE buffer, 2 % (v/v) γλυκερόλη, και αποδιατακτικούς παράγοντες από 40 έως 60 %, όπου το 100 % του αποδιατακτικού παράγοντα αντιστοιχεί σε 7 M ουρία και 40 % (v/v) φορμαμίδιο, απιονισμένο με AG501-X8 ρητίνη (Bio-Rad, Munich, Germany). Η κατακόρυφη κλίση αποδιατακτικού παράγοντα κατασκευάστηκε με συσκευή MSE (Loughborough, Leicestershire, United Kingdom) και το πήκτωμα αφέθηκε να πολυμεριστεί για 16 ώρες πάνω σε μία μεμβράνη υποστήριξης (FMC, Vallensbaek Strand, Denmark). Οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης ήταν 60 °C για 4 ώρες υπό τάση 180 V σε διάλυμα 1x TAE (Μεϊντάνης, *Διδακτορική Διατριβή*, 2005). Στα πηκτώματα DGGE για την ανίχνευση του DNA χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο χρώσης νιτρικού αργύρου (Reisner *et al.*, 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 τη φορμαλδεΰδη.

Η αντίδραση τερματίστηκε με εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα Na_2CO_3 1,5 % για 10 min και τοποθέτηση σε διάλυμα Το χρωματισμένο πήκτωμα αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος έως να αφυδατωθεί πλήρως και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

2.4.3 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. Είναι προφανές ότι για το ίδιο το δείγμα, ο συντελεστής παίρνει τιμή ίση με τη μονάδα, ενώ η απουσία κοινών ζωνών μηδενίζει το κλάσμα (Nakatsu *et al.*, 2000). Συνεπώς, δύο δείγματα είναι πιο όμοια όσο αυτός ο συντελεστής πλησιάζει τη μονάδα.

2.4.4 Απομόνωση και ενίσχυση DNA από πήκτωμα ακρυλαμίδης

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του DNA των ζωνών που προέκυψαν από τη μέθοδο DGGE απαιτεί όσο το δυνατό μεγαλύτερη ποσότητα από τα προϊόντα της αντίδρασης PCR στο πήκτωμα ακρυλαμίδης (≈ 20 μl προϊόντος PCR με προσθήκη ίσης ποσότητας χρωστικής 2x).

Εφαρμόστηκαν δυο διαφορετικά πρωτόκολλα για την εμφάνιση των ζωνών όσον αφορά στη χρώση του πηκτώματος που αναφέρονται παρακάτω.

- χρώση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με το πρωτόκολλο χρώσης **νιτρικού αργύρου** όπως παρουσιάστηκε στην προηγούμενη παράγραφο, χωρίς το τελευταίο στάδιο της προσθήκης διαλύματος Na_2CO_3 1,5 %

- χρώση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με την προσθήκη 100 ml **βρωμιούχου αιθιδίου** (συγκέντρωσης 1 µg/ml) για 20 λεπτά και στη συνέχεια μεταφορά και ξέπλυμα του πηκτώματος με TAE 1X 20 επιπλέον λεπτά. Η επιθυμητή ζώνη DNA εντοπίστηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία και κόπηκε με νυστέρι. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε ώστε να αποσπαστεί όσο το δυνατόν λιγότερη ποσότητα πολυακρυλαμίδης. Οι ζώνες που εμφανίστηκαν ήταν σημαντικά λιγότερες αυτές που εμφανίστηκαν στο πήκτωμα μετά από χρώση με νιτρικό άργιλο που έχει 2-5 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία σε μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA σε σχέση με το βρωμιούχο αιθίδιο.

Μετά το κόψιμο των ζωνών, η επεξεργασία για την απομόνωση του DNA από αυτές ήταν η ίδια και για τα δύο πρωτόκολλα χρώσης που αναφέρθηκαν.

Εφαρμόστηκαν 2 διαφορετικές διαδικασίες για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας απομόνωσης του DNA με εξίσου καλά αποτελέσματα.

A. Απομόνωση DNA με QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)

B. Άμεση απομόνωση DNA χωρίς τη χρήση kit

1. Ζύγισμα της κάθε ζώνης
2. Προσθήκη **diffusion buffer** στο erpendorf που περιέχει την κάθε ζώνη (2 όγκοι buffer για κάθε όγκο ζώνης $\approx 70 - 80$ µl buffer)
3. Χρησιμοποιώντας το ρύγχος της πιπέτας έγινε κατάτμηση της ζώνης σε όσο το δυνατόν περισσότερα κομμάτια για τη διευκόλυνση της διάχυσης του DNA από τη ζώνη στο διάλυμα του buffer.
4. Τοποθέτηση των erpendorfs σε ψυχόμενο αναδευτήρα (4 °C) για 10-12 ώρες (overnight) με ανακίνηση σε χαμηλή ταχύτητα.
5. Μεταφορά του διαλύματος σε καθαρό erpendrf προσεχτικά για να μην μεταφερθούν υπολείμματα του πηκτώματος.

Στη συνέχεια δοκιμάστηκε η ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου από το DNA που απομονώθηκε από την κάθε ζώνη χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών F984 (χωρίς την ουρά GC)-R1378.

Έγινε φωτομέτρηση του DNA στα 260 και 280 nm για τον έλεγχο της καθαρότητας και της ποσότητας. Λόγω των διαφορετικών πρωτοκόλλων που ακολουθήθηκαν καθώς και της διαφορετικής καθαρότητας αλλά και ποσότητας του απομονωμένου

DNA στην κάθε ζώνη, η ενίσχυση του 16S rDNA απαιτούσε συνεχή παραμετροποίηση του προγράμματος της PCR για τη βελτιστοποίηση της.

Τα δείγματα που απεργάστηκαν με QIAEX II Gel Extraction Kit είχαν πολύ μεγάλη ποσότητα DNA με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η αντίδραση PCR και γι αυτό έγινε αραιώση 1:20 και τα αραιωμένα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν στην PCR.

Η σύσταση του μείγματος της PCR που χρησιμοποιήθηκε για κάθε αντίδραση των 50 μ l ήταν η εξής: 1x Reaction Buffer, 2,5 mM $MgCl_2$, 20 pmoles F984, 20 pmoles R1378, 0,25 mM dNTPs (το καθένα), 4 % v/v DMSO, 1,25 Unit Taq πολυμεράση (Fermentas), 1-3 μ l ($\approx$ 20 ng) DNA template, water for injection μέχρι όγκο 50 μ l

Το πρόγραμμα της αντίδρασης περιελάμβανε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης των αλυσίδων του DNA στους 95 °C για 3 min που ακολουθήθηκε από 30 κύκλους των 15 s στους 95 °C (αποδιάταξη), 30 s στους 50,4 °C (πρόσδεση των εκκινητών στο DNA) και 45 s στους 72 °C (σχηματισμός νέων πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων). Η αντίδραση τερματίστηκε με ένα στάδιο 7 min στους 72 °C. Τελικά τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

2.4.5 Μοριακή ταυτοποίηση ριβοτύπων από πήκτωμα ακρυλαμίδης

Οι ζώνες που προέκυψαν από την αντίδραση PCR κόπηκαν 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 τις μετέπειτα εφαρμογές, β) η ζώνη να κοπεί με όσον το δυνατόν λιγότερη αγαρόζη (για το λόγο αυτό χρησιμοποιούμε 0,8 % πήκτωμα αγαρόζης), 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 αγαρόζης έγινε με το QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) 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) έκλουση DNA.

Η έκλουση 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 R1378 στη VBC-Biotech (Αυστρία). Οι αλληλουχίες που προέκυψαν ήταν μήκους περίπου 400 βάσεων και τα χρωματογραφήματά 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, 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 δεν 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.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΚΑΤΑΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΝΕΡΟΥ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΒΑΡΚΙΖΑΣ

Τα δείγματα νερού επεξεργάστηκαν εφαρμόζοντας τις μεθόδους ανάκτησης μικροοργανισμών από καλλιέργειες (βλέπε § 2.3) και στη συνέχεια έγινε ποσοτική ανάλυση των δεδομένων για τον προσδιορισμό του συνολικού πληθυσμού των καλλιεργήσιμων βακτηρίων, καθώς και των παθογόνων βακτηρίων σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα.

Η ανάκτηση των δειγμάτων νερού έγινε από 3 διαφορετικές θέσεις δειγματοληψίας (Α, Β και Γ) της ανατολικής παραλίας στη Βάρκιζα, σε 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους (Καλοκαίρι 2010, Χειμώνας 2011 και Καλοκαίρι 2011). Για την κάθε χρονική περίοδο που εξετάστηκε, πραγματοποιήθηκαν 2 δειγματοληψίες σε διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες (ξηρασία και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση) (βλέπε § 2.1).

Τα ποσοτικά δεδομένα των βακτηρίων που ανακτήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.1, 3.2, 3.3 και 3.4.

Πίνακας 3.1 Εκτίμηση του συνολικού αριθμού των καλλιεργήσιμων βακτηρίων στα δείγματα νερού.

Δειγματοληψίες	cfu/ml		
	Θέση δειγματοληψίας		
	A	B	Γ
Ιούλιος 2010 (ξηρασία)	$22 \cdot 10^2$	$38 \cdot 10^2$	$30 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2010 (μετά τη βροχή)	$4,9 \cdot 10^2$	$6,7 \cdot 10^2$	$6,4 \cdot 10^2$
Φεβρουάριος 2011 (ξηρασία)	$5,7 \cdot 10^2$	$5,3 \cdot 10^2$	$5,9 \cdot 10^2$
Φεβρουάριος 2011 (μετά τη βροχή)	$6,3 \cdot 10^2$	$6,3 \cdot 10^2$	$6,5 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2011 (ξηρασία)	$9 \cdot 10^2$	$14 \cdot 10^2$	$13 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2011 (μετά τη βροχή)	$6,7 \cdot 10^2$	$7,4 \cdot 10^2$	$6,9 \cdot 10^2$

Πίνακας 3.2 Εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων γένους *Staphylococcus* sp. στα δείγματα νερού.

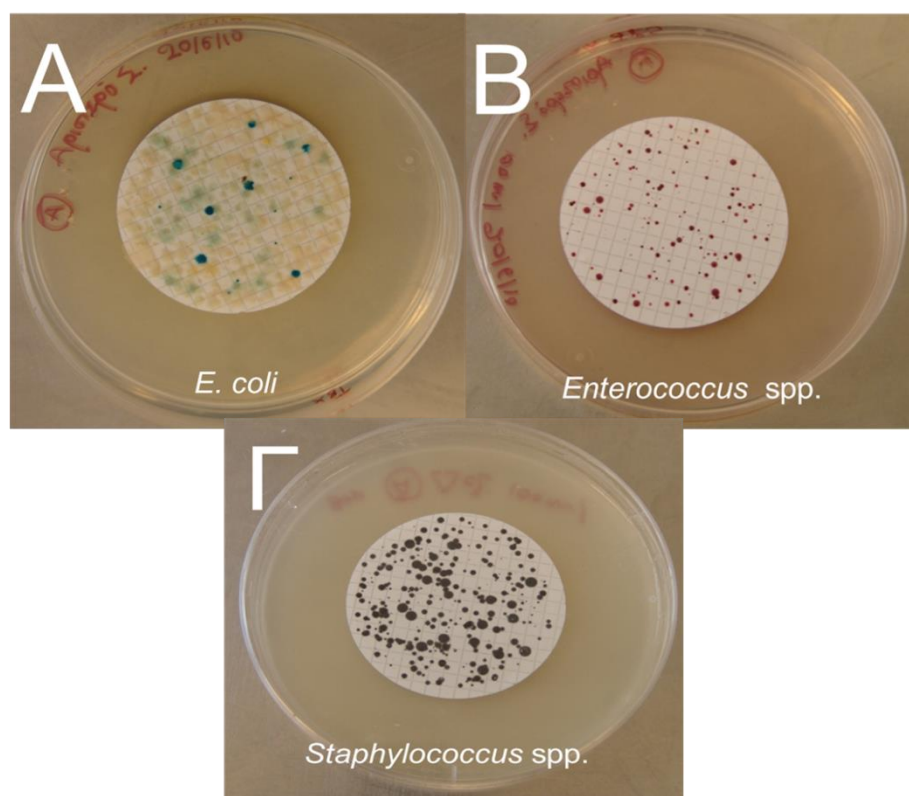
Δειγματοληψίες	cfu/100 ml		
	Θέση δειγματοληψίας		
	A	B	Γ
Ιούλιος 2010 (ξηρασία)	$3,3 \cdot 10^2$	$4,50 \cdot 10^2$	$4,20 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2010 (μετά τη βροχή)	$10,02 \cdot 10^2$	$11,66 \cdot 10^2$	$11,32 \cdot 10^2$
Φεβρουάριος 2011 (ξηρασία)	$0,94 \cdot 10^2$	$0,98 \cdot 10^2$	$1,12 \cdot 10^2$
Φεβρουάριος 2011 (μετά τη βροχή)	$2,74 \cdot 10^2$	$3,14 \cdot 10^2$	$2,52 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2011 (ξηρασία)	$6,13 \cdot 10^2$	$6,69 \cdot 10^2$	$6,38 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2011 (μετά τη βροχή)	$9,86 \cdot 10^2$	$9,78 \cdot 10^2$	$9,84 \cdot 10^2$

Πίνακας 3.3 Εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων του γένους *Enterococcus* sp. στα δείγματα νερού.

Δειγματοληψίες	cfu/100 ml		
	Θέση δειγματοληψίας		
	A	B	Γ
Ιούλιος 2010 (ξηρασία)	$0,32 \cdot 10^2$	$0,50 \cdot 10^2$	$0,38 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2010 (μετά τη βροχή)	$1,15 \cdot 10^2$	$1,32 \cdot 10^2$	$1,27 \cdot 10^2$
Φεβρουάριος 2011 (ξηρασία)	$0,28 \cdot 10^2$	$0,30 \cdot 10^2$	$0,25 \cdot 10^2$
Φεβρουάριος 2011 (μετά τη βροχή)	$1,80 \cdot 10^2$	$1,83 \cdot 10^2$	$1,76 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2011 (ξηρασία)	$0,94 \cdot 10^2$	$1,22 \cdot 10^2$	$1,14 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2011 (μετά τη βροχή)	$2,01 \cdot 10^2$	$2,20 \cdot 10^2$	$2,09 \cdot 10^2$

Πίνακας 3.4 Εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων του γένους *E. coli*. στα δείγματα νερού.

Δειγματοληψίες	cfu/100 ml		
	Θέση δειγματοληψίας		
	A	B	Γ
Ιούλιος 2010 (ξηρασία)	$0,14 \cdot 10^2$	$0,32 \cdot 10^2$	$0,20 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2010 (μετά τη βροχή)	$0,35 \cdot 10^2$	$0,43 \cdot 10^2$	$0,36 \cdot 10^2$
Φεβρουάριος 2011 (ξηρασία)	$0,28 \cdot 10^2$	$0,24 \cdot 10^2$	$0,23 \cdot 10^2$
Φεβρουάριος 2011 (μετά τη βροχή)	$0,37 \cdot 10^2$	$0,37 \cdot 10^2$	$0,38 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2011 (ξηρασία)	$0,22 \cdot 10^2$	$0,40 \cdot 10^2$	$0,43 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2011 (μετά τη βροχή)	$0,57 \cdot 10^2$	$0,71 \cdot 10^2$	$0,70 \cdot 10^2$



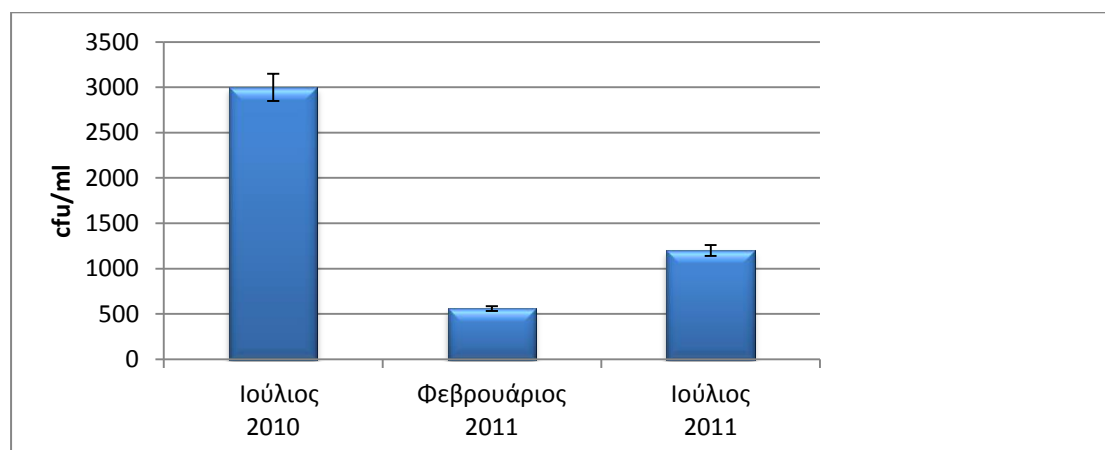
Εικόνα 3.1 Αποικίες βακτηρίων που ανιχνεύτηκαν σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα τον Ιούλιο του 2010 στην παραλία της Βάρκιζας (Α) *E.coli* (Β) *Enterococcus* spp. (Γ) *Staphylococcus* spp.

Στον Πίνακα 3.1 παρατηρείται αυξημένος ολικός μικροβιακός πληθυσμός κατά τις θερινές δειγματοληψίες, σε συνθήκες ξηρασίας, ενώ στις υπόλοιπες δειγματοληψίες ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός εμφανίζεται να είναι μικρότερος, με μικρές διακυμάνσεις ανάλογα τη χρονική περίοδο και τις συνθήκες της εκάστοτε δειγματοληψίας.

Στους Πίνακες 3.2, 3.3, 3.4 παρουσιάζονται οι πληθυσμοί των επιμέρους μικροβιακών δεικτών (*Enterococcus* sp. και *E. coli*) και παθογόνων βακτηρίων (*Staphylococcus* sp.) που ανιχνεύτηκαν στα δείγματα νερού. Το κοινό χαρακτηριστικό που προκύπτει από τους 3 αυτούς Πίνακες είναι η αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων αυτών αμέσως μετά τη βροχόπτωση, η ραγδαία μείωση του πληθυσμού κατά τις χειμερινές δειγματοληψίες και οι μικρές διακυμάνσεις του μικροβιακού φορτίου που εντοπίστηκαν ανάμεσα στις 3 θέσεις δειγματοληψίας.

3.1.1. Εποχιακή διακύμανση του μικροβιακού πληθυσμού στο νερό

Ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός εμφανίστηκε ιδιαίτερα αυξημένος τον Ιούλιο του 2010 ($30 \cdot 10^2$ cfu/ml) (Πιν. 3.1), ενώ παρουσίασε μείωση 81,4 % τον Φεβρουάριο του 2011. Η ετήσια διακύμανση των ολικών βακτηρίων ήταν ιδιαίτερα σημαντική καθώς, η δειγματοληψία τον Ιούλιο του 2011 αντιστοιχούσε στο 40 % της ίδιας δειγματοληψίας ένα χρόνο πριν (Ιούλιος 2010) (Εικ. 3.2).



Εικόνα 3.2 Εκτίμηση της εποχιακής διακύμανσης του πληθυσμού των ολικών βακτηρίων στα δείγματα του νερού (cfu/ml).

Το παθογόνο βακτήριο *Staphylococcus* sp. εμφάνισε τον μεγαλύτερο πληθυσμό τον Ιούλιο του 2011 ($6,4 \cdot 10^2$ cfu/100 ml) ενώ ένα χρόνο πριν ο πληθυσμός του ήταν του $4,01 \cdot 10^2$ cfu/100 ml (αύξηση 59,6 %). Τον χειμώνα ο πληθυσμός του μειώθηκε αισθητά ($1 \cdot 10^2$ cfu/100 ml, μείωση 75 % και 85,4 % αντίστοιχα) σε σχέση με τους θερινούς μήνες (Εικ. 3.3α).

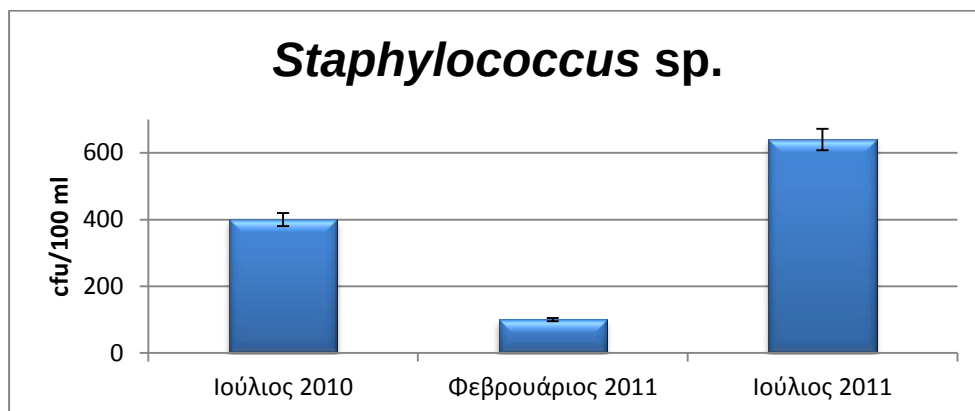
Οι εντερόκοκκοι ως μικροβιακοί δείκτες ακολούθησαν πληθυσμιακά την ίδια πορεία με το *Staphylococcus* sp. Εμφάνισαν τον μεγαλύτερο πληθυσμό τον Ιούλιο του 2011 ($1,1 \cdot 10^2$ cfu/100 ml) ενώ ένα χρόνο πριν ο πληθυσμός τους ήταν $0,4 \cdot 10^2$ cfu/100 ml (αύξηση 275 %). Τον χειμώνα αναμενόμενα ο πληθυσμός τους μειώθηκε αισθητά ($0,28 \cdot 10^2$ cfu/100 ml, μείωση 30 % και 74,55 % αντίστοιχα) σε σχέση με τους θερινούς μήνες (Εικ. 3.3β).

Ο πληθυσμός του μικροβιακού δείκτη *E. coli* παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια του χρόνου. Εμφάνισε τον μεγαλύτερο πληθυσμό τον Ιούλιο του 2011 ($0,35 \cdot 10^2$ cfu/100 ml) ενώ εμφανίστηκε μειωμένος τον Ιούλιο του 2010 ($0,22 \cdot 10^2$ cfu/100 ml, μείωση 37,2 %) και τον Φεβρουάριο του 2011 ($0,25 \cdot 10^2$ cfu/100 ml, μείωση 29,6 %) (Εικ. 3.3γ).

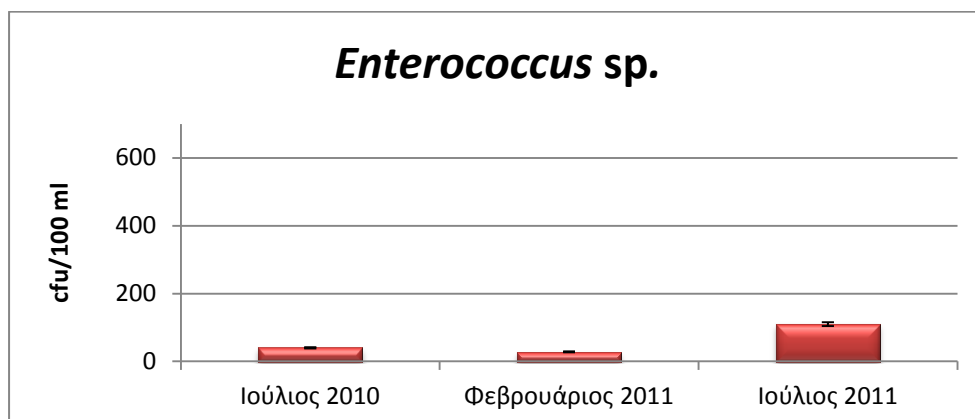
3.1.2. Διακύμανση στον μικροβιακό πληθυσμό του νερού με βάση τη θέση δειγματοληψίας

Από τις τρεις θέσεις δειγματοληψίας η θέση Β έχει, κατά μέσο όρο, την υψηλότερη μέση ημερήσια πυκνότητα λουομένων (έντονη) ακολουθεί η θέση Γ (έντονη), ενώ η θέση Α έχει τη μικρότερη πυκνότητα λουομένων (μέτρια).

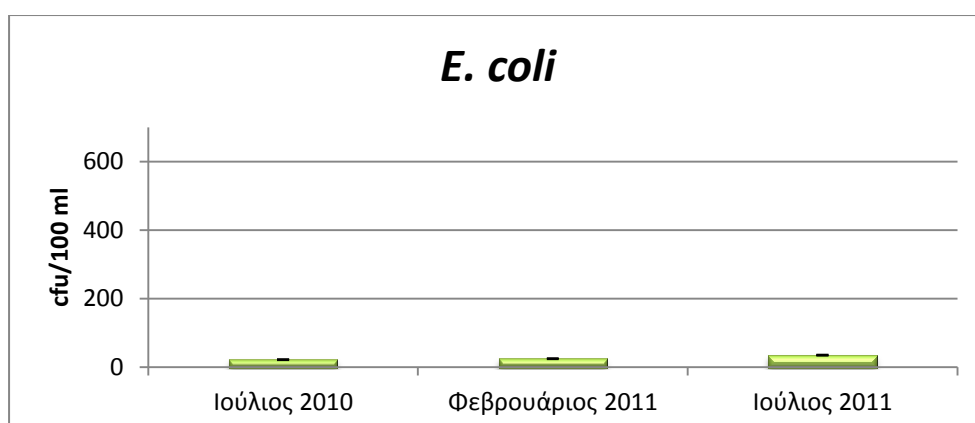
α.



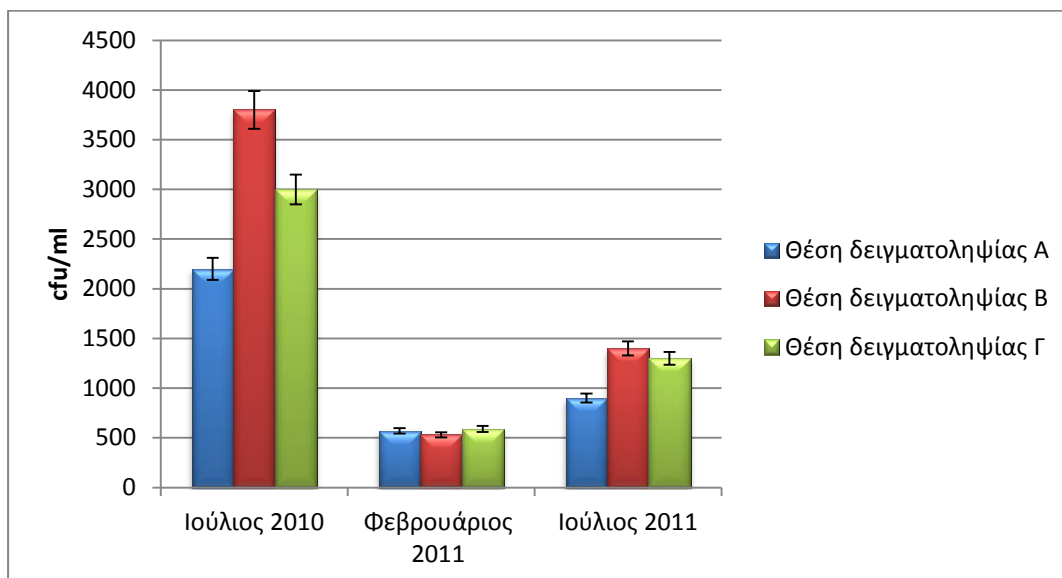
β.



γ.



Εικόνα. 3.3 Εκτίμηση της εποχιακής διακύμανσης του πληθυσμού των βακτηρίων του γένους (α) *Staphylococcus* (β) *Enterococcus* και (γ) *E.coli* στα δείγματα του νερού (cfu/ 100 ml).

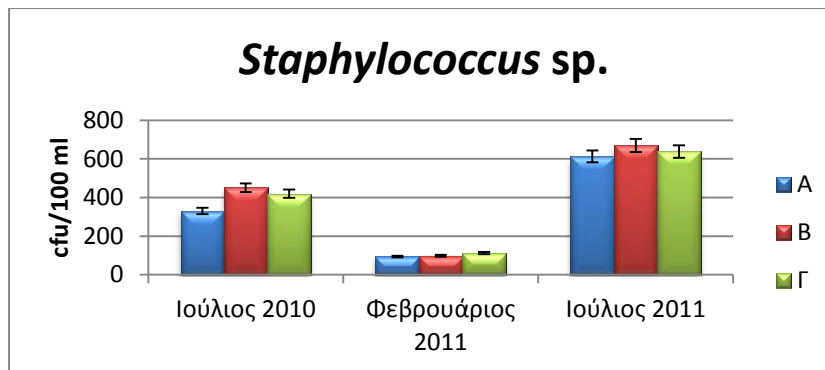


Εικόνα 3.4 Εκτίμηση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού σε κάθε θέση δειγματοληψίας (cfu/ml).

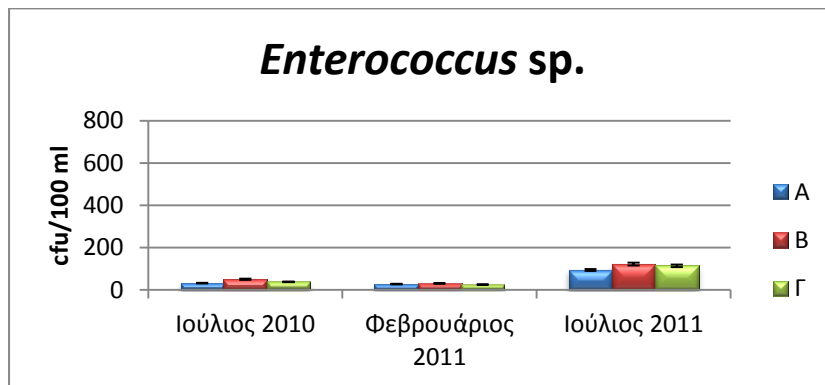
Ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός είναι μεγαλύτερος και στις δύο δειγματοληψίες που έλαβαν χώρα κατά τους θερινούς μήνες στη θέση B ($38 \cdot 10^2$ cfu/ml και $14 \cdot 10^2$ cfu/ml αντίστοιχα). Στη θέση Γ, ο πληθυσμός εμφανίζεται μειωμένος στις θερινές δειγματοληψίες (μείωση 21,1 % και 8,15 % αντίστοιχα). Στη θέση A, ο βακτηριακός πληθυσμός είναι ακόμα περισσότερο μειωμένος σε σχέση με τη θέση B (μείωση 42,1 % και 35,64 % αντίστοιχα). Αντίθετα, ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τη θέση δειγματοληψίας κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Εικ. 3.4).

Ο πληθυσμός του βακτηρίου *Staphylococcus* κατά τους θερινούς μήνες είναι μεγαλύτερος στη θέση B ($4,5 \cdot 10^2$ cfu/100 ml Ιούλιος 2010 και $6,69 \cdot 10^2$ cfu/100 ml Ιούλιος 2011). Στη θέση Γ εμφανίζεται μικρή μείωση (6,6 % και 4,6 % αντίστοιχα) και στη θέση A ακόμα μεγαλύτερη μείωση (26,6 % και 8,37 % αντίστοιχα). Ο πληθυσμός του *Staphylococcus* δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τη θέση δειγματοληψίας κατά τους χειμερινούς μήνες (Εικ. 3.5α).

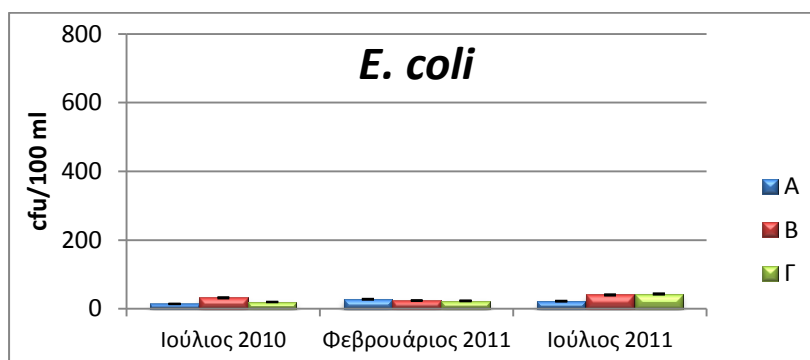
α.



β.



γ.



Εικόνα 3.5 Εκτίμηση του πληθυσμού των βακτηρίων του γένους (α) *Staphylococcus* (β) *Enterococcus* και (γ) *E.coli* ανά θέση δειγματοληψίας (Α, Β, Γ).

Ο πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *Enterococcus* εμφανίζει τη μεγαλύτερη πυκνότητα στη θέση δειγματοληψίας Β κατά τις θερινές δειγματοληψίες ($0,5 \cdot 10^2$ cfu/100 ml Ιούλιος 2010 και $1,22 \cdot 10^2$ cfu/100 ml Ιούλιος 2011). Στη θέση Γ εμφανίζεται μικρή μείωση (24 % και 6,6 % αντίστοιχα) και τέλος, στη θέση Α μείωση 36 % και 23 % αντίστοιχα (Εικ. 3.5β).

Το *E. coli* εμφανίζει τον μεγαλύτερο πληθυσμό στη θέση Β τον Ιούλιο του 2010 ($0,32 \cdot 10^2$ cfu/100 ml) και στη θέση Γ τον Ιούλιο του 2011 ($0,43 \cdot 10^2$ cfu/100 ml). Στις δύο αυτές δειγματοληψίες ο μικρότερος πληθυσμός εντοπίστηκε στη θέση Α ($0,14 \cdot 10^2$ και $0,22 \cdot 10^2$ cfu/100 ml αντίστοιχα). Αντίθετα, τον Φεβρουάριο του 2011 ο μεγαλύτερος πληθυσμός του βακτηρίου εντοπίστηκε στη θέση Α ($0,28 \cdot 10^2$ cfu/100 ml) (Εικ. 3.5γ).

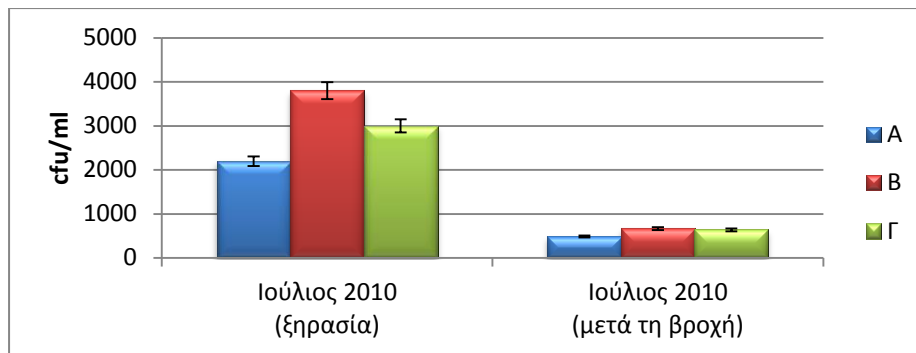
3.1.3 Επίδραση της βροχόπτωσης στον μικροβιακό πληθυσμό του νερού

Στις 4 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά τους θερινούς μήνες τα αποτελέσματα έδειξαν μία σαφή μείωση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση. Η μείωση αυτή (82,3 %) ήταν μεγαλύτερη τον Ιούλιο του 2010, αλλά ήταν εμφανής και ένα χρόνο αργότερα τον Ιούλιο του 2011 (47,1 %).

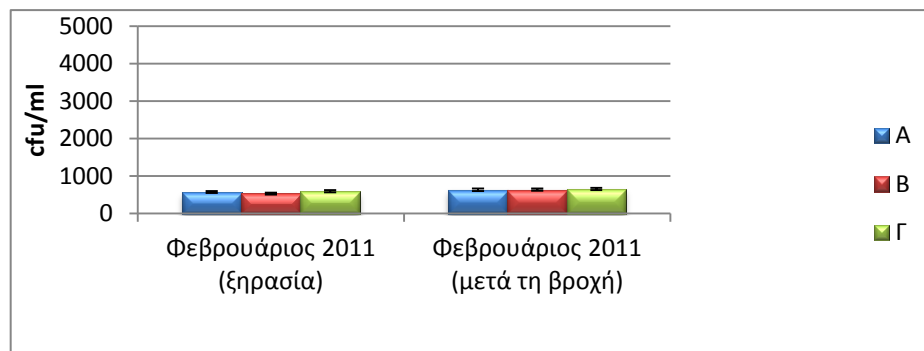
Παρόμοια μείωση παρατηρήθηκε και στις 3 διαφορετικές θέσεις δειγματοληψίας (Α, Β, Γ) γεγονός που δείχνει ότι η ελάττωση του μικροβιακού πληθυσμού ήταν προϊόν της βροχόπτωσης και όχι κάποιου τυχαίου γεγονότος τοπικού χαρακτήρα (Εικ. 3.6α, 3.6γ).

Τα αποτελέσματα ήταν αντίθετα στις 2 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά τη χειμερινή περίοδο όπου ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός παρουσίασε μικρή αύξηση (19,2 %) αμέσως μετά τη βροχόπτωση και στις 3 διαφορετικές θέσεις δειγματοληψίας (Εικ. 3.6β).

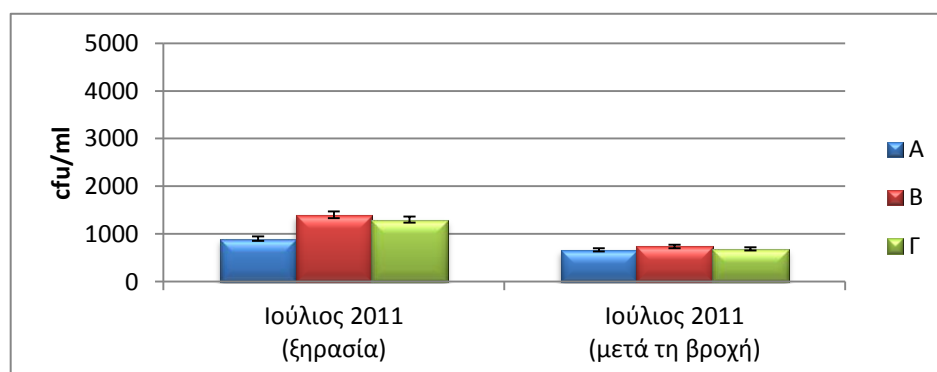
α.



β.

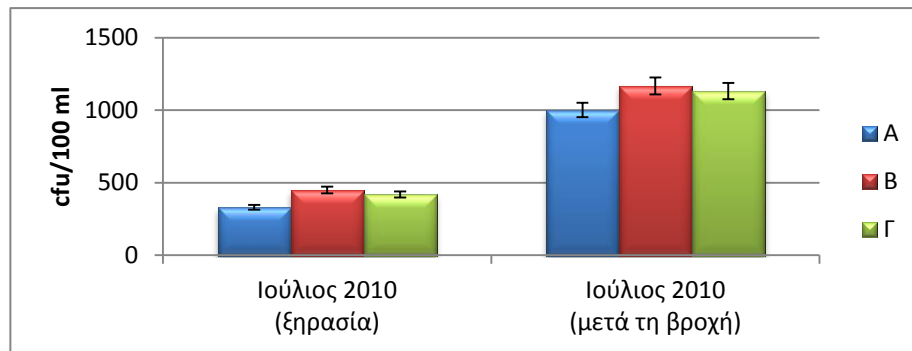


γ.

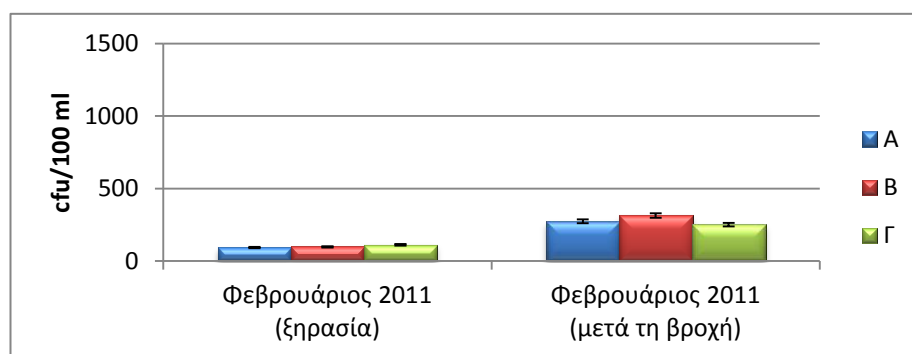


Εικόνα 3.6 Πληθυσμός των ολικών βακτηρίων (cfu/ml) σε συνθήκες ξηρασίας και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση σε 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους: (α) Ιούλιος 2010 (β) Φεβρουάριος 2011 και (γ) Ιούλιος 2011, ανά θέση δειγματοληψίας (A, B, Γ).

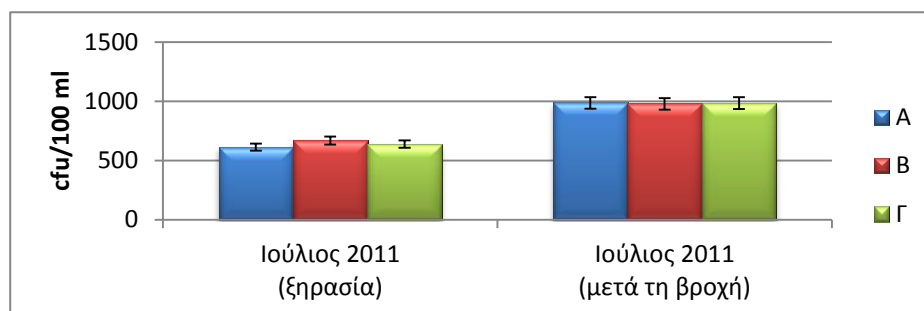
α.



β.



γ.



Εικόνα 3.7 Πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* (cfu/100 ml) σε συνθήκες ξηρασίας και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση σε 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους: (α) Ιούλιος 2010 (β) Φεβρουάριος 2011 και (γ) Ιούλιος 2011.

Ο πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus* sp. αυξήθηκε δραματικά 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση. Η μεγαλύτερη τιμή του ανιχνεύτηκε στη θέση Β, τον Ιούλιο του 2010, 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση ($11,66 \cdot 10^2$ cfu/100 ml) και είναι αυξημένη κατά 259 % σε σχέση με τη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στην ίδια θέση σε συνθήκες ξηρασίας. Στις δύο άλλες θέσεις η αύξηση ήταν αντίστοιχου μεγέθους (θέση Α 303 % και θέση Γ 269 %)(Εικ. 3.7α).

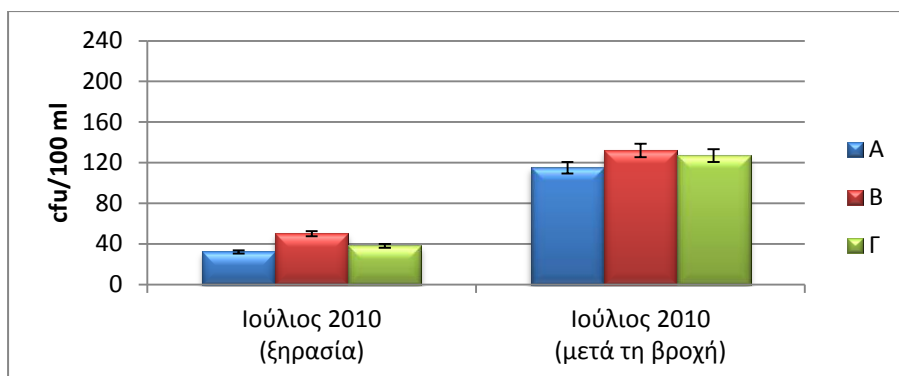
Παρόμοια αύξηση στον πληθυσμό του *Staphylococcus* sp. μετά τη βροχόπτωση ανιχνεύτηκε και τον Ιούλιο του 2011 και στις 3 θέσεις δειγματοληψίας με μικρές διακυμάνσεις ανάμεσά τους (θέση Α: 60,8 %, θέση Β: 46 %, θέση Γ: 54,23 %) (Εικ. 3.7γ).

Ο πληθυσμός του *Staphylococcus* sp. ήταν αναμενόμενα πολύ μικρότερος τη χειμερινή περίοδο όπου η υψηλότερη τιμή που ανιχνεύτηκε ήταν $3,14 \cdot 10^2$ cfu/100 ml (Φεβρουάριος 2011 θέση Β 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση). Ανιχνεύτηκε αύξηση του πληθυσμού και στις 3 θέσεις δειγματοληψίας (θέση Α: 291 %, θέση Β: 320 % και θέση Γ: 225 %) αμέσως μετά τη βροχόπτωση (Εικ. 3.7β).

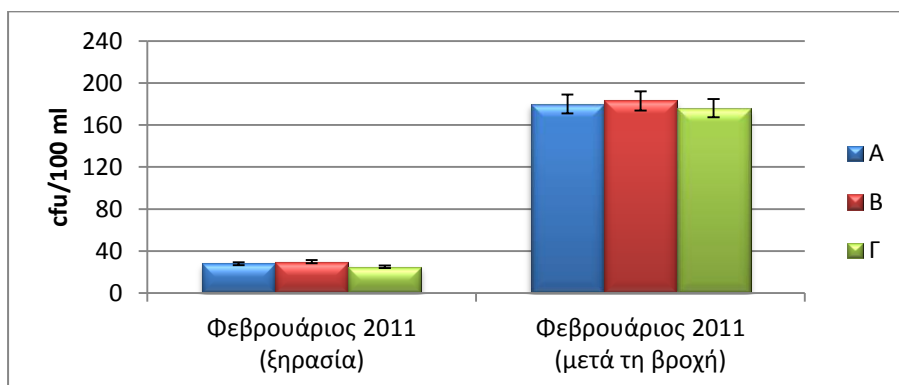
Ο πληθυσμός των εντεροκόκκων εμφάνισε αύξηση και στις 3 διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση. Η υψηλότερη τιμή ανιχνεύτηκε στη θέση Β, τον Ιούλιο του 2011, 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση ($2,2 \cdot 10^2$ cfu/100 ml) υπερβαίνοντας κατά πολύ τα θεσπισμένα όρια για ασφαλή κολύμβηση. Αν και ο πληθυσμός των εντεροκόκκων κυμάνθηκε σε σχετικά χαμηλά νούμερα σε συνθήκες ξηρασίας, εντούτοις, η αύξηση που εμφανίστηκε μετά τη βροχόπτωση ήταν υψηλή.

Τον Ιούλιο του 2010, η αύξηση αυτή ήταν 359 %, 264 %, 334 % στις θέσεις Α, Β και Γ αντίστοιχα. Τον χειμώνα του 2011, η αύξηση ήταν 642 %, 610 % και 704 % στις θέσεις Α, Β και Γ αντίστοιχα. Τέλος, τον Ιούλιο του 2011 όπου οι εντερόκοκκοι εμφάνισαν την υψηλότερη τιμή, η αύξηση λόγω της βροχόπτωσης ήταν 213 %, 180 % και 183 % στις θέσεις Α, Β και Γ αντίστοιχα (Εικ. 3.8α, 3.8γ).

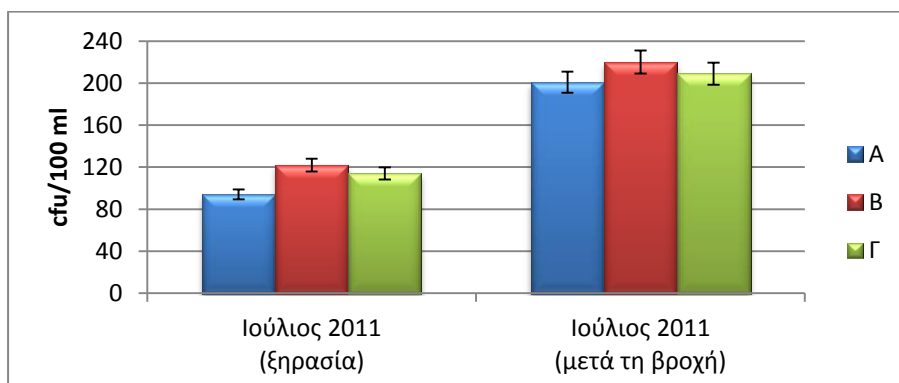
α.



β.



γ.



Εικόνα 3.8 Πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *Enterococcus* (cfu/100 ml) σε συνθήκες ξηρασίας και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση σε 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους: (α) Ιούλιος 2010 (β) Φεβρουάριος 2011 και (γ) Ιούλιος 2011, ανά θέση δειγματοληψίας (Α, Β, Γ).

Ο μικροβιακός δείκτης *E. coli* εμφάνισε την υψηλότερη τιμή του στη θέση Β, τον Ιούλιο του 2011 ($0,71 \cdot 10^2$ cfu/100 ml). Παρουσιάστηκε αύξηση του πληθυσμού και στις 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους των δειγματοληψιών αμέσως μετά τη βροχόπτωση, αν και η αύξηση αυτή ήταν μικρότερη συγκρινόμενη με την αύξηση που εμφανίστηκε στις υπόλοιπες μικροβιακές ομάδες που μελετήθηκαν.

Συγκεκριμένα, τον Ιούλιο του 2010 η αύξηση μετά τη βροχόπτωση ήταν 150 %, 34 % και 80 %, στις θέσεις Α, Β και Γ, αντίστοιχα. Τον Φεβρουάριο του 2011 η αύξηση ήταν 32,14 %, 54,16 % και 65,21 %, στις θέσεις Α, Β και Γ, αντίστοιχα (Εικ. 3.9α, 3.9β).

Τέλος, τον Ιούλιο του 2011 η αύξηση του πληθυσμού λόγω βροχόπτωσης ήταν 159 %, 77,5 % και 62,79 %, στις θέσεις Α, Β και Γ, αντίστοιχα (Εικ. 3.9γ).

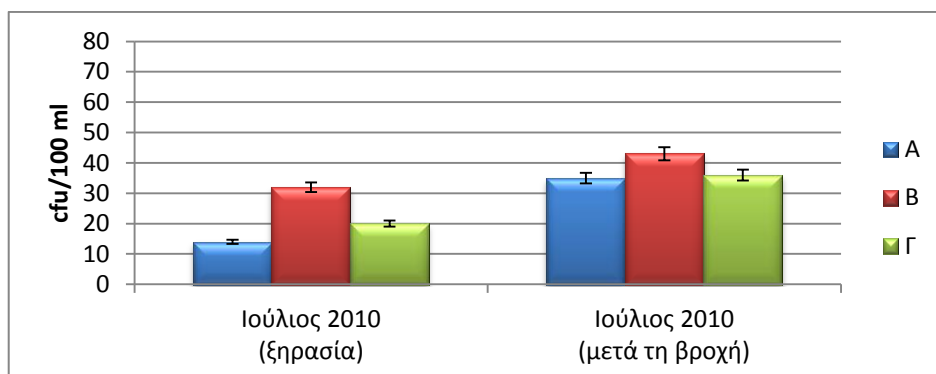
3.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΜΜΟΥ

Τα δείγματα άμμου απομονώθηκαν ακριβώς πάνω από το επίπεδο της θάλασσας στις αντίστοιχες θέσεις δειγματοληψίας (Α, Β, Γ) όπου απομονώθηκαν και τα αντίστοιχα δείγματα νερού (βλ. Υλικά και Μέθοδοι).

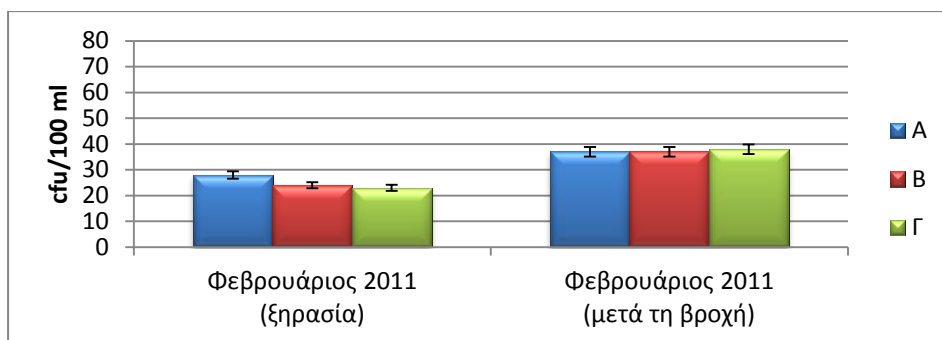
Στη συνέχεια, τα δείγματα άμμου επεξεργάστηκαν εφαρμόζοντας τις μεθόδους ανάκτησης μικροοργανισμών από καλλιέργειες (βλ. Υλικά και Μέθοδοι) και έπειτα έγινε ποσοτική ανάλυση των δεδομένων για τον προσδιορισμό του συνολικού πληθυσμού των καλλιεργήσιμων μικροβιακών δεικτών, καθώς και των παθογόνων βακτηρίων σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα.

Τα ποσοτικά δεδομένα που ανακτήθηκαν παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 και 3.10.

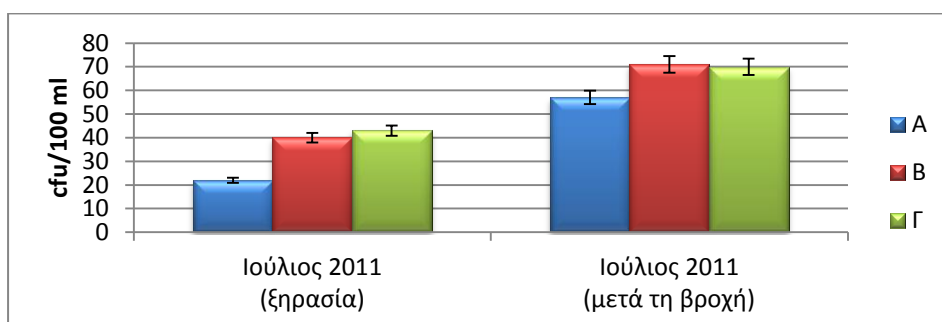
α.



β.



γ.



Εικόνα 3.9 Πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *E. coli* (cfu/100 ml) σε συνθήκες ξηρασίας και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση, σε 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους: (α) Ιούλιος 2010 (β) Φεβρουάριος 2011 και (γ) Ιούλιος 2011, ανά θέση δειγματοληψίας (A, B, Γ).

Πίνακας 3.5 Εκτίμηση του συνολικού αριθμού των καλλιεργήσιμων βακτηρίων σε δείγματα άμμου

Δειγματοληψίες	cfu/g		
	Θέση δειγματοληψίας		
	A	B	Γ
Ιούλιος 2010 (ξηρασία)	$40,0 \cdot 10^4$	$36,0 \cdot 10^4$	$30,0 \cdot 10^4$
Ιούλιος 2010 (μετά τη βροχή)	$3,6 \cdot 10^4$	$9,2 \cdot 10^4$	$14,4 \cdot 10^4$
Φεβρουάριος 2011 (ξηρασία)	$4,0 \cdot 10^4$	$0,053 \cdot 10^4$	$0,059 \cdot 10^4$
Φεβρουάριος 2011 (μετά τη βροχή)	$6,8 \cdot 10^4$	$0,5 \cdot 10^4$	$0,12 \cdot 10^4$
Ιούλιος 2011 (ξηρασία)	$34,0 \cdot 10^4$	$44,0 \cdot 10^4$	$33,0 \cdot 10^4$
Ιούλιος 2011 (μετά τη βροχή)	$6,4 \cdot 10^4$	$5,5 \cdot 10^4$	$8,7 \cdot 10^4$

Πίνακας 3.6 Εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων γένους *Staphylococcus* sp. σε δείγματα άμμου.

Δειγματοληψίες	cfu/g		
	Θέση δειγματοληψίας		
	A	B	Γ
Ιούλιος 2010 (ξηρασία)	$0,6 \cdot 10^2$	$0,2 \cdot 10^2$	$0,2 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2010 (μετά τη βροχή)	0	0	0
Φεβρουάριος 2011 (ξηρασία)	0	0	0
Φεβρουάριος 2011 (μετά τη βροχή)	$1,6 \cdot 10^2$	0	0
Ιούλιος 2011 (ξηρασία)	$0,78 \cdot 10^2$	$0,83 \cdot 10^2$	$0,34 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2011 (μετά τη βροχή)	$0,07 \cdot 10^2$	$0,02 \cdot 10^2$	0

Πίνακας 3.7 Εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων γένους *Enterococcus* sp. σε δείγματα άμμου.

Δειγματοληψίες	cfu/g		
	Θέση δειγματοληψίας		
	A	B	Γ
Ιούλιος 2010 (ξηρασία)	$4,5 \cdot 10^3$	$0,9 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$
Ιούλιος 2010 (μετά τη βροχή)	0	0	0
Φεβρουάριος 2011 (ξηρασία)	0	0	0
Φεβρουάριος 2011 (μετά τη βροχή)	$0,068 \cdot 10^3$	0	0
Ιούλιος 2011 (ξηρασία)	$2,7 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$
Ιούλιος 2011 (μετά τη βροχή)	0	0	0

Πίνακας 3.8 Εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων γένους *E. coli* σε δείγματα άμμου.

Δειγματοληψίες	cfu/g		
	Θέση δειγματοληψίας		
	A	B	Γ
Ιούλιος 2010 (ξηρασία)	$0,68 \cdot 10^2$	$0,24 \cdot 10^2$	$0,3 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2010 (μετά τη βροχή)	0	0	0
Φεβρουάριος 2011 (ξηρασία)	0	0	0
Φεβρουάριος 2011 (μετά τη βροχή)	0	0	0
Ιούλιος 2011 (ξηρασία)	$0,54 \cdot 10^2$	$0,52 \cdot 10^2$	$0,33 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2011 (μετά τη βροχή)	0	0	0

Πίνακας 3.9 Εκτίμηση του συνολικού αριθμού των καλλιεργήσιμων μυκήτων σε δείγματα άμμου

Δειγματοληψίες	cfu/g		
	Θέση δειγματοληψίας		
	A	B	Γ
Ιούλιος 2010 (ξηρασία)	$2,51 \cdot 10^2$	$1,65 \cdot 10^2$	$1,32 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2010 (μετά τη βροχή)	$1,0 \cdot 10^2$	$0,60 \cdot 10^2$	$0,40 \cdot 10^2$
Φεβρουάριος 2011 (ξηρασία)	0	0	0
Φεβρουάριος 2011 (μετά τη βροχή)	0	0	0
Ιούλιος 2011 (ξηρασία)	$1,21 \cdot 10^2$	$0,84 \cdot 10^2$	$1,01 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2011 (μετά τη βροχή)	$0,97 \cdot 10^2$	$1,43 \cdot 10^2$	$0,68 \cdot 10^2$

Πίνακας 3.10 Εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού των μυκήτων του γένους *Candida* σε δείγματα άμμου.

Δειγματοληψίες	cfu/g		
	Θέση δειγματοληψίας		
	A	B	Γ
Ιούλιος 2010 (ξηρασία)	$0,7 \cdot 10^2$	$0,22 \cdot 10^2$	$0,27 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2010 (μετά τη βροχή)	0	0	0
Φεβρουάριος 2011 (ξηρασία)	0	0	0
Φεβρουάριος 2011 (μετά τη βροχή)	0	0	0
Ιούλιος 2011 (ξηρασία)	$0,65 \cdot 10^2$	$0,46 \cdot 10^2$	$0,49 \cdot 10^2$
Ιούλιος 2011 (μετά τη βροχή)	$0,18 \cdot 10^2$	0	0

Στον Πίνακα 3.5 το σημαντικό στοιχείο που προκύπτει είναι ο αυξημένος ολικός βακτηριακός πληθυσμός σε συνθήκες ξηρασίας στα δείγματα της άμμου κατά τις θερινές δειγματοληψίες ($\approx 40,0 \cdot 10^4$ cfu/g).

Στον Πίνακα 3.6, εντύπωση προκαλεί η πολύ μεγάλη μείωση που παρατηρείται στον πληθυσμό των βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* μετά τη βροχόπτωση στα δείγματα της άμμου.

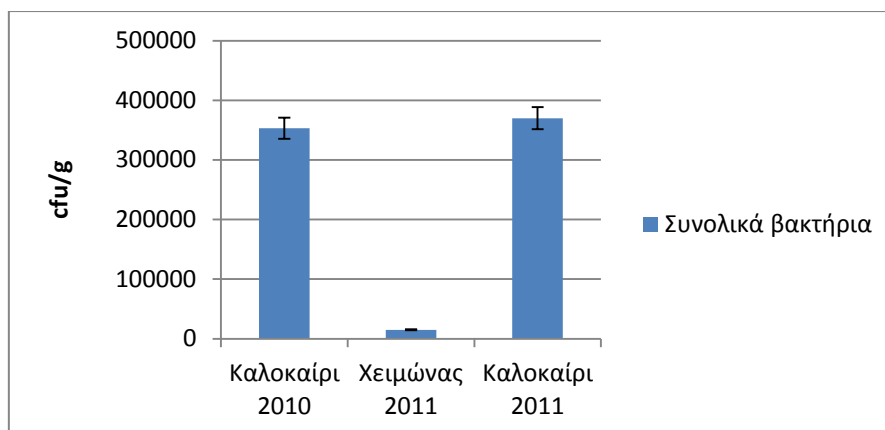
Στον Πίνακα 3.7 εντύπωση προκαλεί η μεγάλη ανθεκτικότητα του βακτηρίου *Enterococcus* sp. στην άμμο, με πληθυσμό που ξεπερνά κατά πολύ αυτόν του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus* (μέγιστη τιμή που παρατηρήθηκε $4,5 \cdot 10^3$ cfu/g).

Αντίθετα, στον Πίνακα 3.8 παρατηρείται ότι ο πληθυσμός του *E. coli* δεν δείχνει τόσο μεγάλη ανθεκτικότητα στα δείγματα της άμμου, όπως το *Enterococcus* sp., και ακολουθεί ακριβώς τις πληθυσμιακές διακυμάνσεις του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus* sp.

Στον Πίνακα 3.9 και 3.10 το σημαντικό στοιχείο που εντοπίζεται είναι ότι η παρουσία των ολικών μυκήτων, καθώς και των μυκήτων του γένους *Candida* εμφανίζεται αυξημένος στη θέση δειγματοληψίας Α, κατά τους θερινούς μήνες, σε συνθήκες ξηρασίας, όπου και η πυκνότητα των λουομένων ήταν μέγιστη, δείχνοντας έτσι μία σαφή σύνδεση της αύξησης του πληθυσμού των μυκήτων, αναλογικά με τον αριθμό των λουομένων.

3.2.1. Εποχιακή διακύμανση του ολικού μικροβιακού πληθυσμού στην άμμο

Ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός παρέμεινε πρακτικά αμετάβλητος το καλοκαίρι του 2010 και 2011. Παρουσιάστηκε μείωση μίας τάξης μεγέθους κατά τη χειμερινή δειγματοληψία όπου ο πληθυσμός των ολικών βακτηρίων είχε τη χαμηλότερη ετήσια τιμή ($14,9 \cdot 10^2$ cfu/g) (Εικ. 3.10).



Εικόνα 3.10 Εκτίμηση της εποχιακής διακύμανσης του πληθυσμού των ολικών βακτηρίων στα δείγματα της άμμου (cfu/g)

Ο πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* στην άμμο, κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές κατά τις θερινές δειγματοληψίες παρουσιάζοντας αύξηση 97 % το καλοκαίρι του 2011 σε σχέση με το προηγούμενο καλοκαίρι, ενώ εξαφανίστηκε κατά τη χειμερινή δειγματοληψία (Εικ. 3.11α).

Αντίθετα, τα στελέχη του γένους *Enterococcus* εντοπίστηκαν σε μεγάλους πληθυσμούς στα δείγματα της άμμου κατά τις θερινές δειγματοληψίες με ουσιαστικά αμελητέα ετήσια διακύμανση, ενώ ο πληθυσμός τους εξαφανίστηκε πλήρως κατά τη χειμερινή περίοδο (Εικ. 3.11β).

Το μέγεθος του πληθυσμού των βακτηρίων *E. coli* κυμάνθηκε αντίστοιχα με αυτόν του *Staphylococcus* με χαμηλά επίπεδα κατά τις θερινές δειγματοληψίες παρουσιάζοντας αύξηση 12,2 % το καλοκαίρι του 2011 σε σχέση με το προηγούμενο καλοκαίρι, ενώ εξαφανίστηκε κατά τη χειμερινή δειγματοληψία (Εικ. 3.11γ).

Οι μύκητες μειώθηκαν το καλοκαίρι του 2011 σε σχέση με το έτος 2010 κατά 43,95 %, ενώ ο πληθυσμός τους μηδενίστηκε κατά τη χειμερινή δειγματοληψία. Τέλος, τα στελέχη του γένους *Candida* εμφανίστηκαν αυξημένα κατά 97 % το καλοκαίρι του 2011, ενώ όπως και στις προηγούμενες μικροβιακές ομάδες, ο πληθυσμός τους μηδενίστηκε κατά τη χειμερινή περίοδο (Εικ. 3.11δ, 3.11ε).

α.



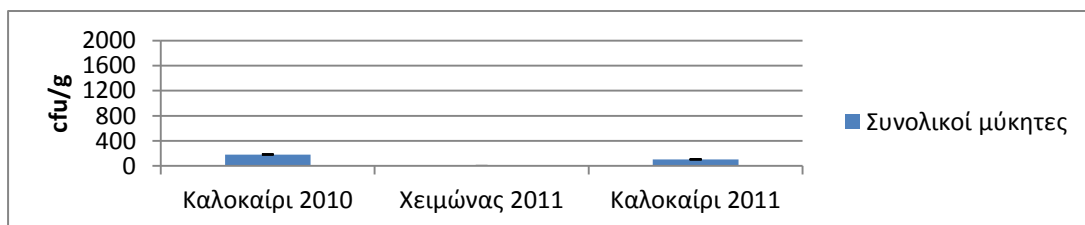
β.



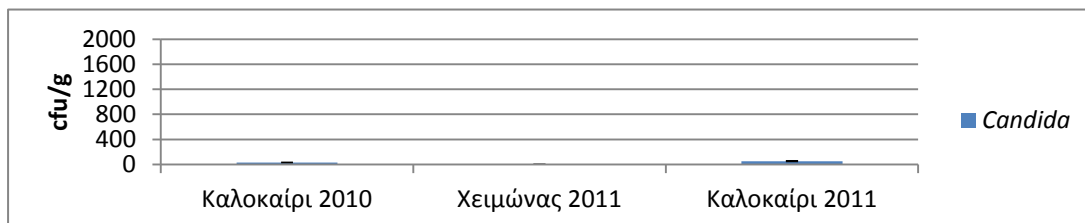
γ.



δ.



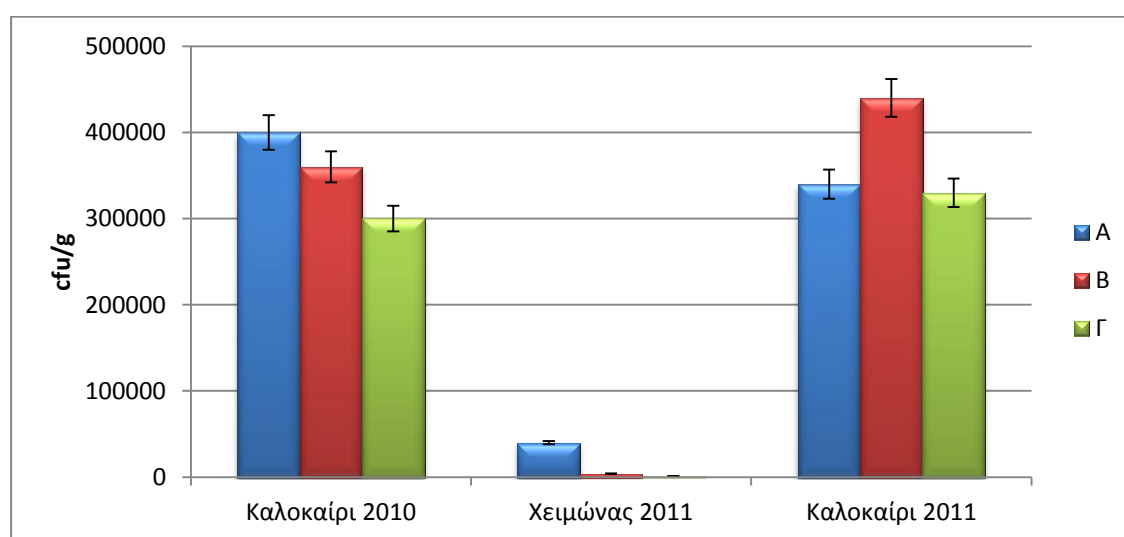
ε.



Εικόνα 3.11 Εκτίμηση της εποχιακής διακύμανσης του πληθυσμού (cfu/g) των βακτηρίων του γένους (α) *Staphylococcus* (β) *Enterococcus* (γ) *E. coli*, καθώς και του πληθυσμού (δ) των ολικών μυκήτων και των μυκήτων του γένους *Candida* (ε) από δείγματα άμμου.

3.2.2. Διακύμανση του μικροβιακού πληθυσμού της άμμου με βάση τη θέση δειγματοληψίας

Ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός στα δείγματα της άμμου ήταν αυξημένος κατά τις θερινές δειγματοληψίες. Το καλοκαίρι του 2010 η υψηλότερη τιμή βρέθηκε στη θέση Α, ενώ η χαμηλότερη στη θέση Γ (μείωση 25 %). Το χειμώνα του 2011 η υψηλότερη τιμή εντοπίστηκε στη θέση Α, ενώ το καλοκαίρι του 2011 στη θέση Β (Εικ. 3.12).



Εικόνα 3.12 Εκτίμηση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού σε κάθε θέση δειγματοληψίας (cfu/g) των δειγμάτων άμμου στις 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους που εξετάστηκαν.

Ο πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* παρουσίασε έντονη εποχιακή διακύμανση. Η υψηλότερη τιμή ($0,6 \cdot 10^2$ cfu/g) εμφανίστηκε το καλοκαίρι του 2010 στη θέση Α, ενώ ο πληθυσμός του εξαφανίστηκε στη χειμερινή δειγματοληψία και από τις 3 θέσεις δειγματοληψίας. Το καλοκαίρι του 2011 πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* εμφάνισε τη μεγαλύτερη τιμή στη θέση Β ($0,83 \cdot 10^2$ cfu/g) και στη θέση Α ($0,78 \cdot 10^2$ cfu/g) (Εικ. 3.13α).

Τα στελέχη του γένους *Enterococcus* το καλοκαίρι του 2010 εμφάνισαν επίσης, τον μεγαλύτερο πληθυσμό στη θέση Α ($45 \cdot 10^2$ cfu/g) και τον μικρότερο στη θέση Β ($9,0 \cdot 10^2$ cfu/g). Το γεγονός αυτό εμφανίστηκε και το επόμενο καλοκαίρι, όπου στη θέση Α παρουσιάστηκε ο μεγαλύτερος πληθυσμός τους με τιμή ($27 \cdot 10^2$ cfu/g) και στη

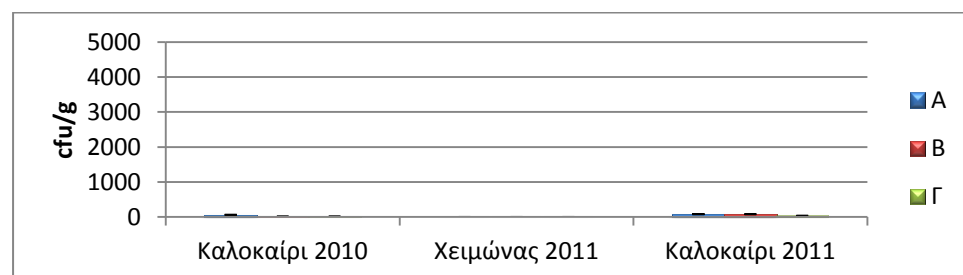
θέση Β ο μικρότερος ($15 \cdot 10^2$ cfu/g) με μικρή απόκλιση μεταξύ των 2 θέσεων (μείωση 45,5 %) (Εικ.3.13β).

Αντίστοιχα, ήταν τα αποτελέσματα και όσον αφορά στο βακτήριο *E. coli*. Η υψηλότερη τιμή του πληθυσμού και τα δύο καλοκαίρια εμφανίστηκε στη θέση Α, ενώ η μικρότερη στη θέση Β το καλοκαίρι του 2010 ($0,24 \cdot 10^2$ cfu/g) και στη θέση Γ το καλοκαίρι του 2011 ($0,33 \cdot 10^2$ cfu/g) αντίστοιχα (Εικ. 3.13γ).

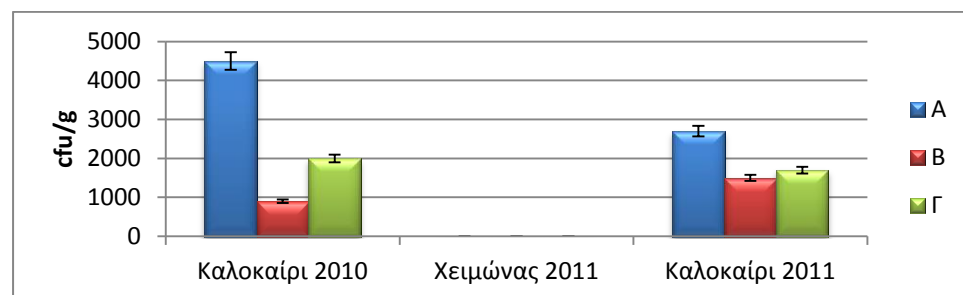
Οι συνολικοί μύκητες εμφάνισαν τη μεγαλύτερη τιμή τους στη θέση Α και στις 2 θερινές δειγματοληψίες του 2010 και του 2011 ($2,51 \cdot 10^2$ cfu/g και $1,21 \cdot 10^2$ cfu/g αντίστοιχα) ενώ ο μικρότερος μυκητιακός πληθυσμός εμφανίστηκε στη θέση Γ το καλοκαίρι του 2010 (μείωση 47,5 %) και στη θέση Β το καλοκαίρι του 2011 (19,8 % μείωση) (Εικ.3.13δ)

Οι μύκητες του γένους *Candida* εμφάνισαν τον μεγαλύτερο πληθυσμό τους στη θέση δειγματοληψίας Α και τα δύο καλοκαίρια, ενώ τον μικρότερο στη θέση δειγματοληψίας Β (μείωση 68,6 % και 24,6 % αντίστοιχα) (Εικ. 3.13ε).

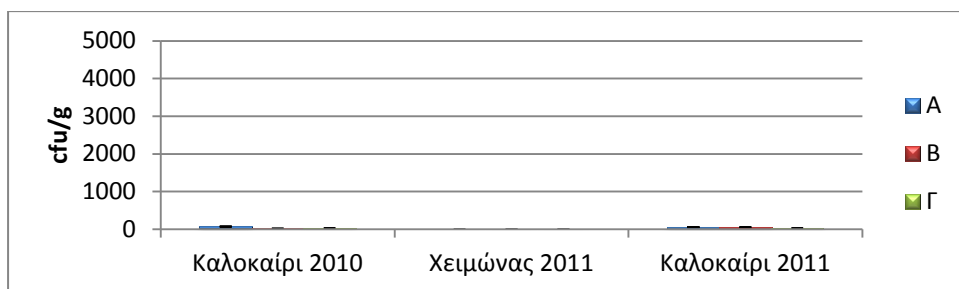
α.



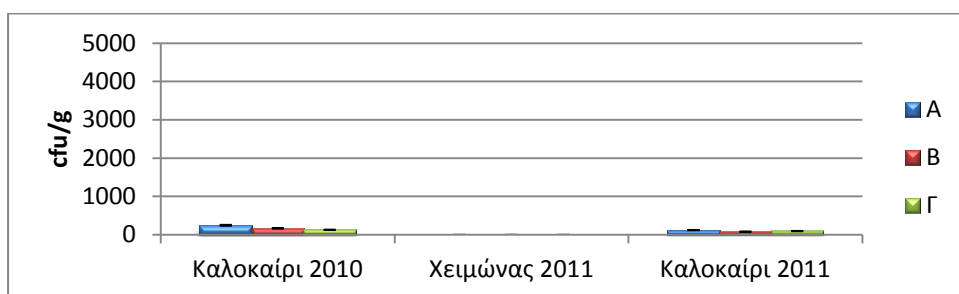
β.



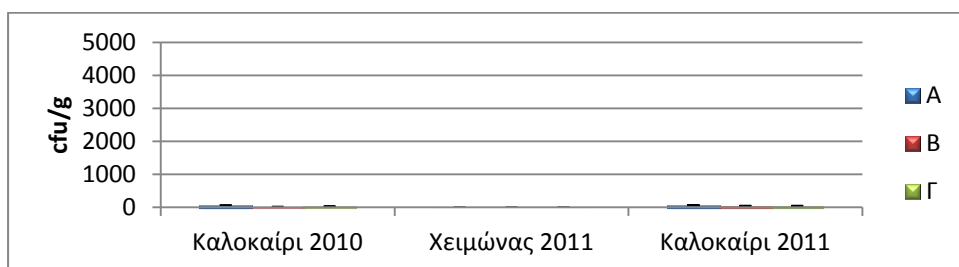
Υ.



Δ.



Ε.



Εικόνα 3.13 Εκτίμηση του πληθυσμού (cfu/g) των μικροοργανισμών του γένους α) *Staphylococcus* (β) *Enterococcus* και (γ) *E.coli* (Δ) ολικών μυκήτων (ε) *Candida* ανά θέση δειγματοληψίας (A, B, Γ) των δειγμάτων άμμου στις 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους που εξετάστηκαν.

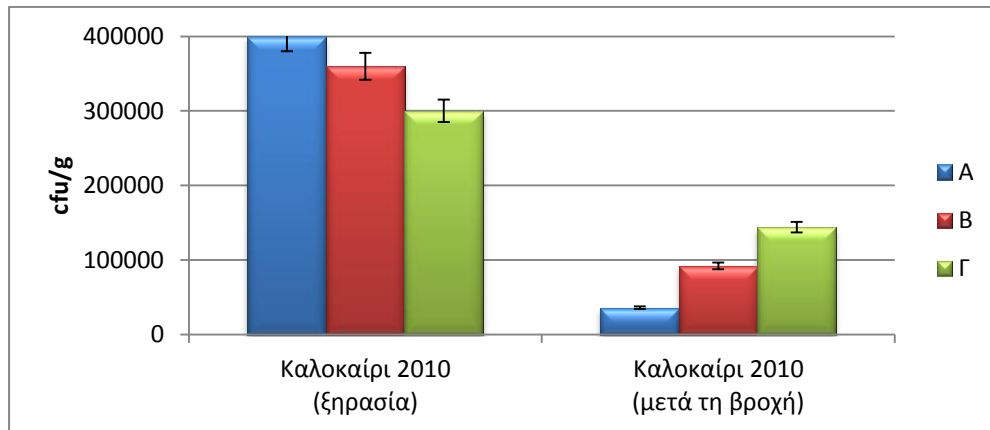
3.2.3 Επίδραση της βροχόπτωσης στον μικροβιακό πληθυσμό της άμμου

Στις 4 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά τους θερινούς μήνες τα αποτελέσματα έδειξαν μία σαφή μείωση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση στα δείγματα της άμμου.

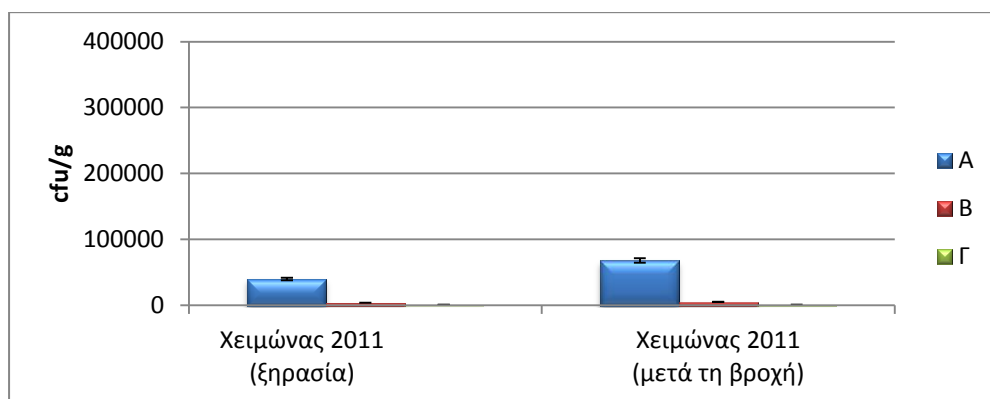
Το καλοκαίρι του 2010 η μείωση του βακτηριακού πληθυσμού μετά τη βροχόπτωση ήταν 74,5 % και το επόμενο καλοκαίρι η μείωση έφτασε το 81,1 %. Το αποτέλεσμα

ήταν αντίστροφο κατά τη χειμερινή δειγματοληψία, όπου ο συνολικός βακτηριακός πληθυσμός αυξήθηκε μετά τη βροχόπτωση κατά 70 % (Εικ. 3.14α, 3.14β, 3.14γ).

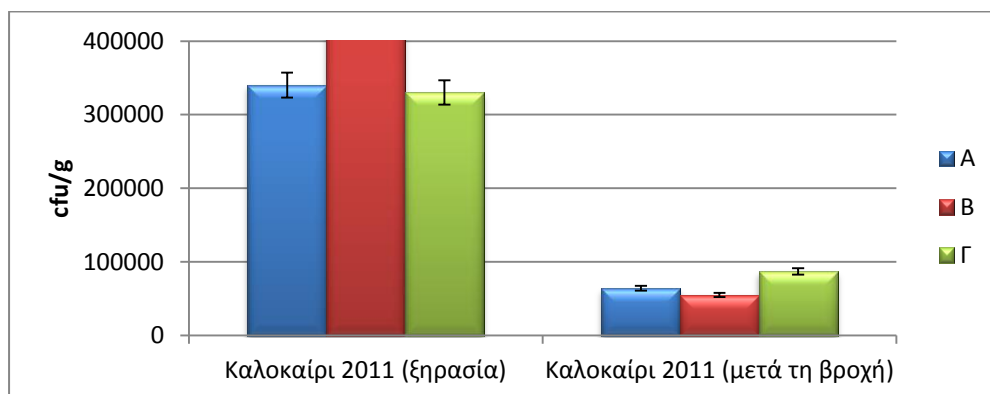
α.



β.



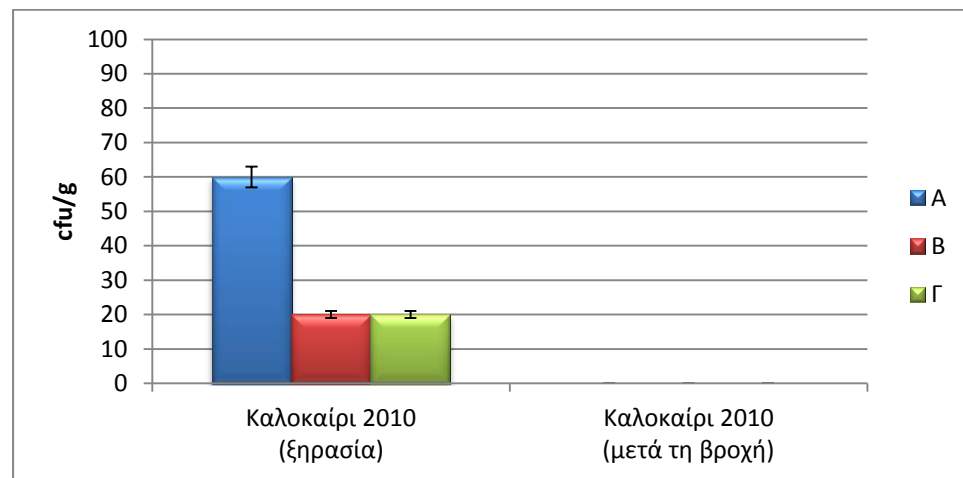
γ.



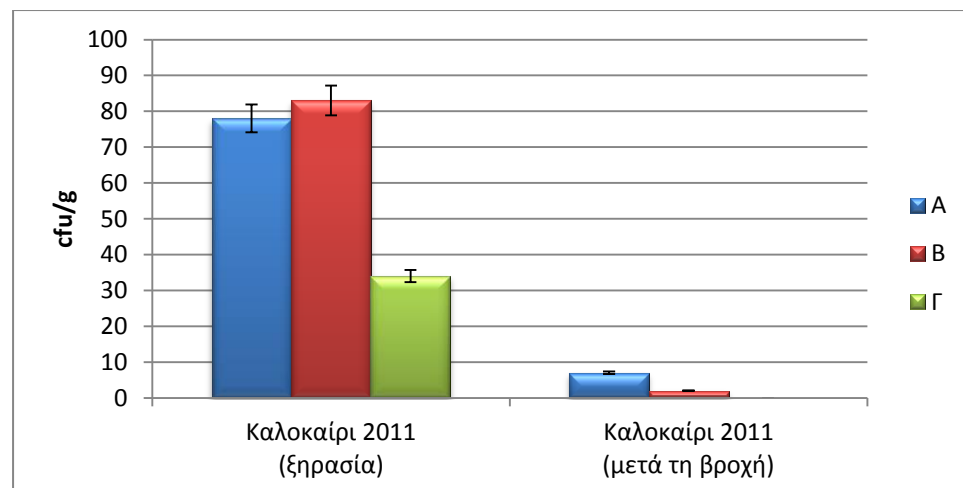
Εικόνα 3.14 Πληθυσμός των ολικών βακτηρίων (cfu/g) στα δείγματα άμμου, σε συνθήκες ξηρασίας και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση σε 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους: (α) Ιούλιος 2010 (β) Φεβρουάριος 2011 και (γ) Ιούλιος 2011, ανά θέση δειγματοληψίας (Α, Β, Γ).

Τα στελέχη του γένους *Staphylococcus* εμφάνισαν σημαντική μείωση μετά τη βροχόπτωση. Το καλοκαίρι του 2010 ο πληθυσμός τους ουσιαστικά μηδενίστηκε μετά τη βροχόπτωση, ενώ αντίστοιχα το επόμενο καλοκαίρι ο πληθυσμός τους μειώθηκε κατά 89,5 %. Κατά τις χειμερινές δειγματοληψίες δεν εντοπίστηκε στέλεχος του γένους *Staphylococcus* σε καμία από τις υπό εξέταση συνθήκες περιβάλλοντος (ξηρασία και μετά τη βροχόπτωση) (Εικ. 3.15α, 3.15β).

α.



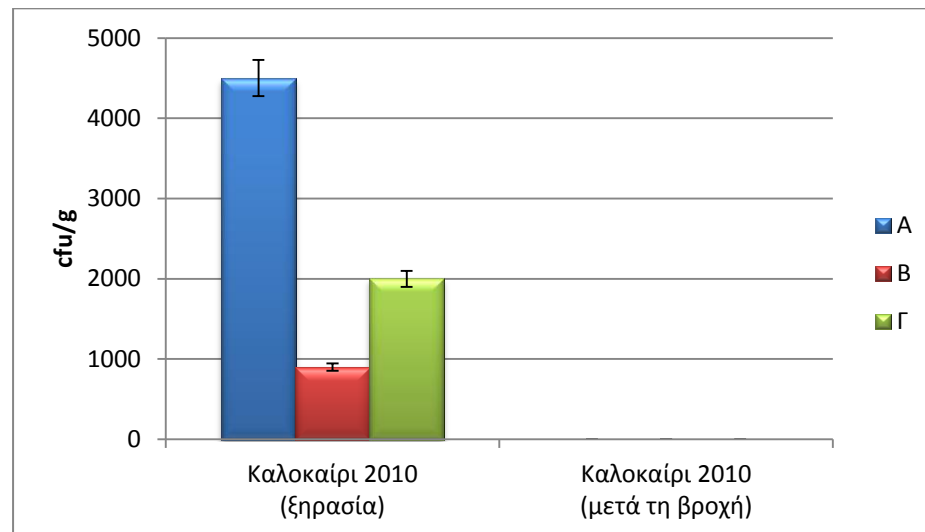
β.



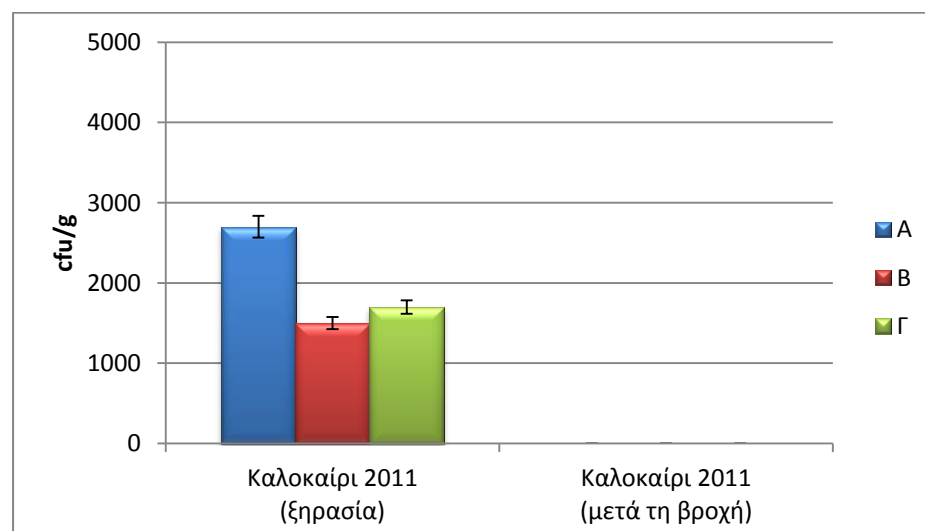
Εικόνα 3.15 Πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* (cfu/g) στα δείγματα άμμου σε συνθήκες ξηρασίας και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση σε διαφορετικές χρονικές περιόδους: (α) Ιούλιος 2010 (β) Ιούλιος 2011, ανά θέση δειγματοληψίας (Α, Β, Γ).

Τα στελέχη του γένους *Enterococcus* εμφανίστηκαν μόνο στις δειγματοληψίες σε συνθήκες ξηρασίας κατά τους θερινούς μήνες, ενώ ο πληθυσμός τους εξαφανίστηκε στις δειγματοληψίες που έλαβαν χώρα 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση. Κατά τις χειμερινές δειγματοληψίες δεν εντοπίστηκε στέλεχος του γένους *Enterococcus* σε καμία από τις υπό εξέταση συνθήκες περιβάλλοντος (ξηρασία και μετά τη βροχόπτωση) (Εικ. 3.16α, 3.16β).

α.



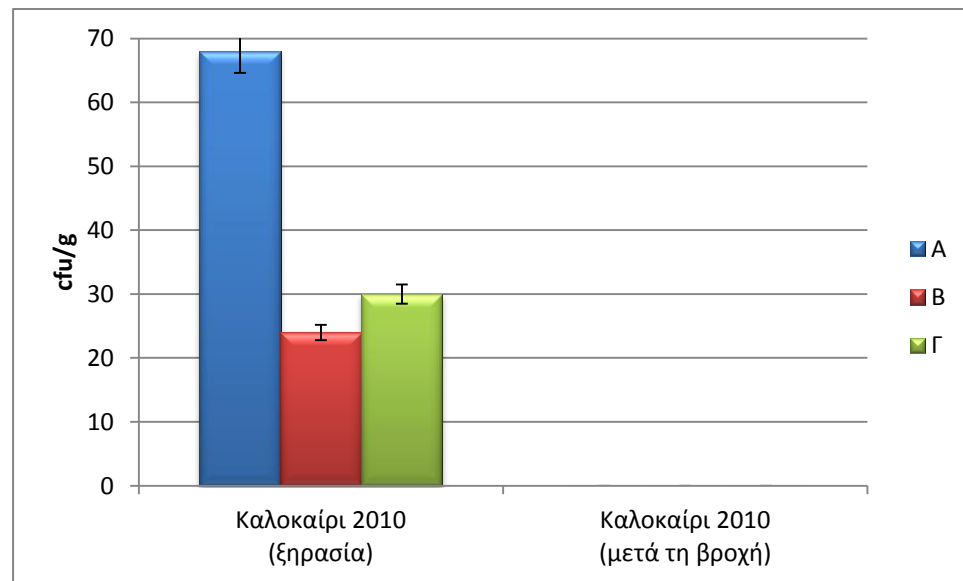
β.



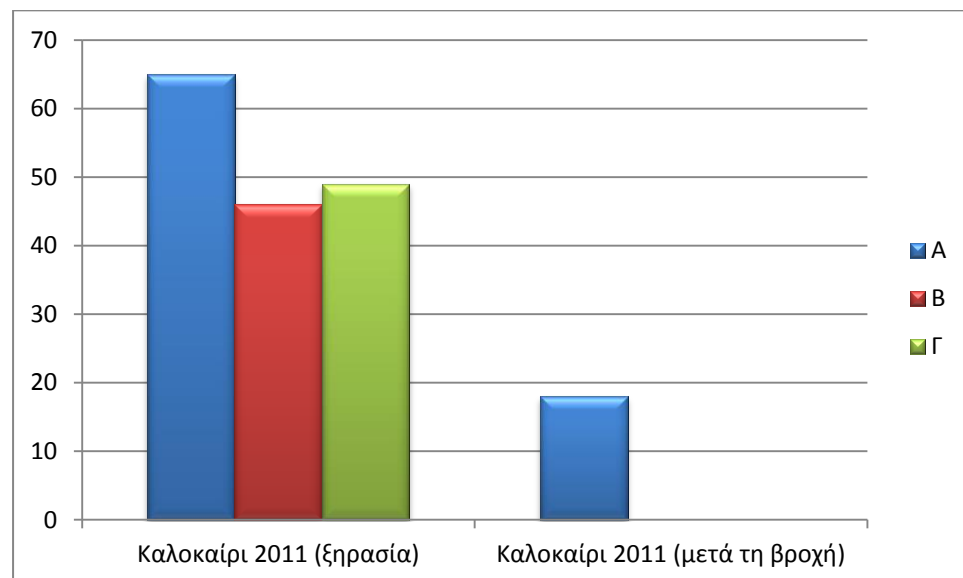
Εικόνα 3.16 Πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *Enterococcus* (cfu/g) στα δείγματα άμμου σε συνθήκες ξηρασίας και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση σε διαφορετικές χρονικές περιόδους: (α) Ιούλιος 2010 (β) Ιούλιος 2011 ανά θέση δειγματοληψίας (A, B, Γ).

Ο πληθυσμός των στελεχών του γένους *E. coli* εξαφανίστηκε 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση το καλοκαίρι του 2010, ενώ εμφανίστηκε μόνο στη θέση Α το καλοκαίρι του 2011 (18 cfu/g). Στις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν τους χειμερινούς μήνες ο πληθυσμός των *E. coli* παρέμεινε μηδενικός (Εικ. 3.17α, β).

α.



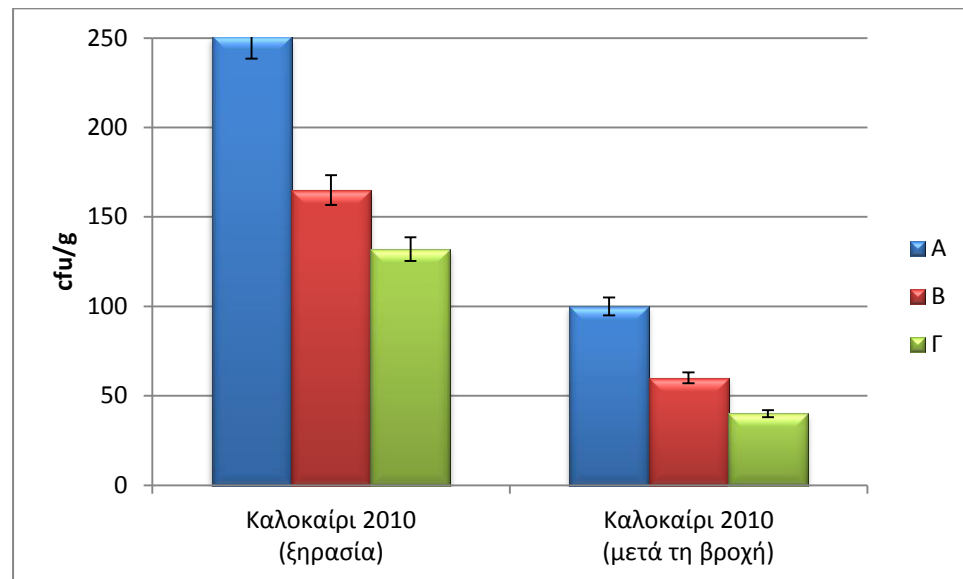
β.



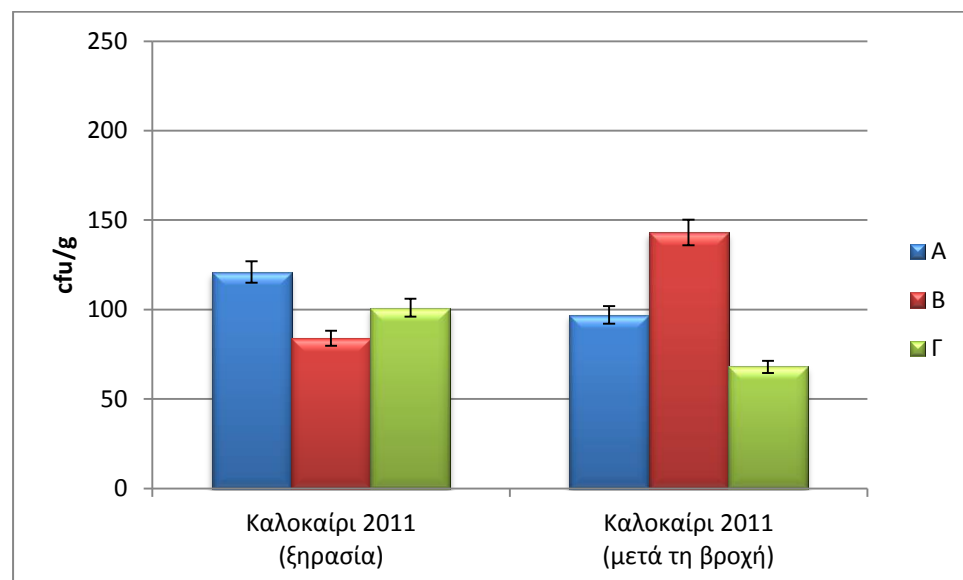
Εικόνα 3.17 Πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *E. coli* (cfu/g) σε συνθήκες ξηρασίας και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση σε διαφορετικές χρονικές περιόδους: (α) Ιούλιος 2010 (β) Ιούλιος 2011, ανά θέση δειγματοληψίας (Α, Β, Γ).

Οι συνολικοί μύκητες εμφάνισαν σαφή μείωση του πληθυσμού τους το καλοκαίρι του 2010, 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση (μείωση 63,6 %). Αντίθετα, το επόμενο καλοκαίρι, ο πληθυσμός τους έμεινε ουσιαστικά ίδιος μετά τη βροχόπτωση (αύξηση 0,6 %). Κατά τις χειμερινές δειγματοληψίες δεν εντοπίστηκε πληθυσμός μυκήτων σε καμία από τις υπό εξέταση συνθήκες περιβάλλοντος (ξηρασία και μετά τη βροχόπτωση) (Εικ. 3.18α, 3.18β).

α.



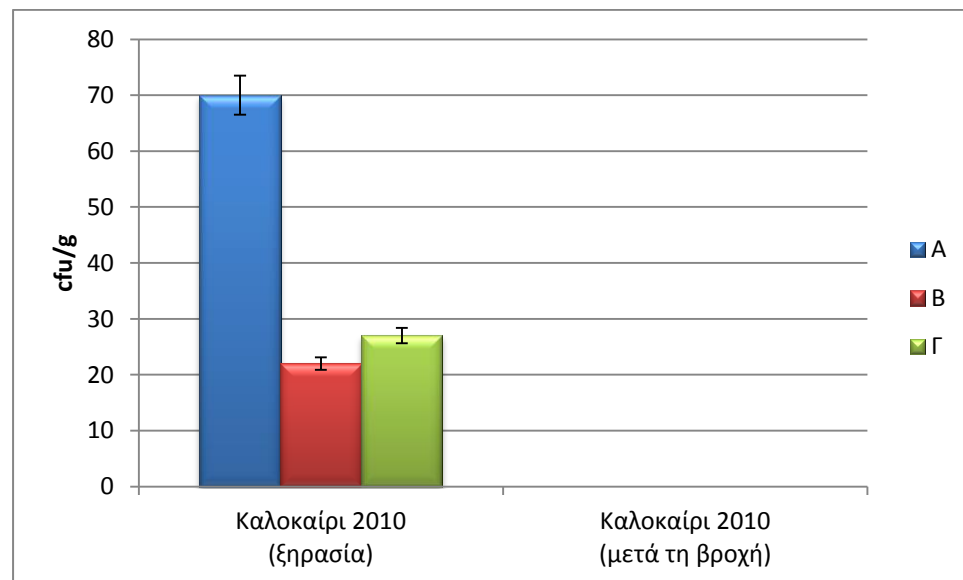
β.



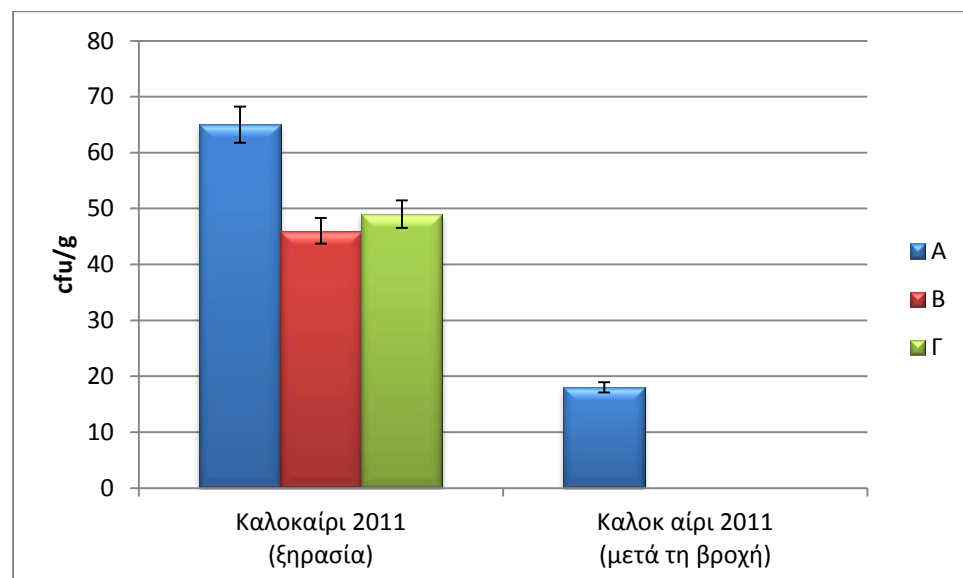
Εικόνα 3.18 Πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *Enterococcus* (cfu/g) σε συνθήκες ξηρασίας και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση σε διαφορετικές χρονικές περιόδους: (α) Ιούλιος 2010 (β) Ιούλιος 2011, ανά θέση δειγματοληψίας (Α, Β, Γ).

Ο πληθυσμός του μύκητα *Candida* εξαφανίστηκε μετά τη βροχόπτωση το καλοκαίρι του 2010, ενώ εμφανίστηκε μόνο στη θέση Α το καλοκαίρι του 2011 μετά τη βροχόπτωση (μείωση 72,3 %). Τέλος, δεν εντοπίστηκε κανένα στέλεχος του μύκητα *Candida* κατά τις χειμερινές δειγματοληψίες σε συνθήκες ξηρασίας και μετά τη βροχόπτωση (Εικ. 3.19α, β).

α.



β.



Εικόνα 3.19 Πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *E.coli* (cfu/g) σε συνθήκες ξηρασίας και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση σε διαφορετικές χρονικές περιόδους: (α) Ιούλιος 2010 (β) Ιούλιος 2011, ανά θέση δειγματοληψίας (Α, Β, Γ).

3.3 Ποιοτικός προσδιορισμός βακτηρίων του γένους *Salmonella*

Η παρουσία βακτηρίων του γένους *Salmonella* ήταν θετική τόσο κατά τη διάρκεια των θερινών, όσο και των χειμερινών δειγματοληψιών. Η παρουσία τους δεν επηρεάστηκε από τις υπό εξέταση διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες (ξηρασία και 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση), καθώς και από την παρουσία ή απουσία λουομένων στις 3 θέσεις δειγματοληψίας.

Η ανίχνευση στελεχών του βακτηρίου *Salmonella* δεν κατέστη δυνατή μόνο στη θέση δειγματοληψίας Α κατά τον Φεβρουάριο του 2011, τόσο στη δειγματοληψία που έλαβε χώρα σε συνθήκες ξηρασίας, όσο και στη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση (Πίνακας 3.11).

Πίνακας 3.11 Ανίχνευση βακτηρίων του γένους *Salmonella*. Το θετικό σήμα αποτελεί ένδειξη μόλυνσης των υδάτων από αστικά λύματα, (+) θετικό, (-) αρνητικό.

Θέση δειγματοληψίας	Ιούλιος 2010		Φεβρουάριος 2011		Ιούλιος 2011	
	Ξηρασία	Μετά τη βροχή	Ξηρασία	Μετά τη βροχή	Ξηρασία	Μετά τη βροχή
A	+	+	-	-	+	+
B	+	+	+	+	+	+
Γ	+	+	+	+	+	+

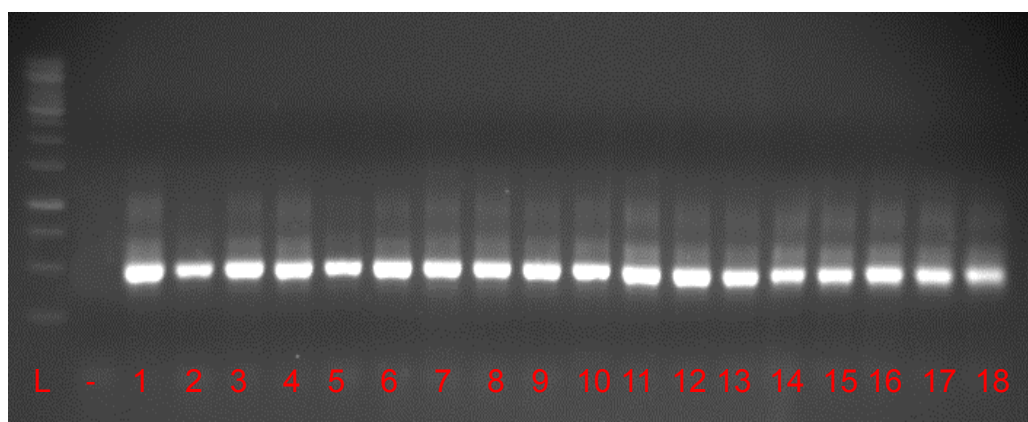
3.4 Μελέτη της ποικιλότητας των βακτηρίων στα δείγματα νερού με τη μέθοδο της DGGE.

Όπως περιγράφηκε στην § 2.4 Υλικά και Μέθοδοι, η τεχνική βασίζεται στον διαχωρισμό μορίων DNA, που ενισχύονται σε αντίδραση PCR και έχουν το ίδιο μέγεθος, αλλά διαφορετική σύσταση σε βάσεις. Το DNA που απομονώνεται από ένα οικοσύστημα, ενισχύεται με ειδικό ζεύγος καθολικών μορίων εκκινητών. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι να δημιουργηθεί ένα μίγμα προϊόντων της αντίδρασης PCR που περιέχει μόρια DNA με το ίδιο μοριακό βάρος, αλλά με διαφορετική σύσταση σε βάσεις. Μόρια με διαφορετική σύσταση σε βάσεις θα αποδιαταχθούν και η κίνησή τους θα σταματήσει σε διαφορετικό σημείο του πηκτώματος ακρυλαμίδης, οπότε και θα σχηματισθεί μια διακριτή ζώνη στο πηκτώμα, η οποία καλείται ριβότυπος. Θα δημιουργηθεί κατ' αυτόν τον τρόπο ένα πρότυπο ζωνών (ριβοτύπων) για κάθε δείγμα, όπου ο αριθμός τους θα αντικατοπτρίζει το μέγεθος της μικροβιακής ποικιλότητας.

3.4.1 Έλεγχος παρουσίας βακτηριακού DNA μέσω ενίσχυσης του 16S rDNA των δειγμάτων νερού από τις 3 θέσεις δειγματοληψίας.

Για κάθε δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε, αρχικά έγινε απομόνωση του ολικού γενωμικού DNA και ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου για την ανίχνευση βακτηριακού DNA με το ζεύγος εκκινητών F984GC και R1378.

Το προϊόν που προέκυψε είχε μέγεθος 434 bp και στη συνέχεια διαχωρίστηκε σε πηκτώμα με κλίση αποδιατακτικού παράγοντα. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης PCR για τα δείγματα φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.12 και στην Εικόνα 3.20.



Εικόνα 3.20 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR που προέκυψαν κατά την ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου με το ζεύγος εκκινητών F984GC-R1378. Όπου: (L) μοριακός μάρτυρας 1kb, (-) αρνητικός μάρτυρας (1-18) δείγματα όπως αναφέρονται στον Πίνακα 3.10.

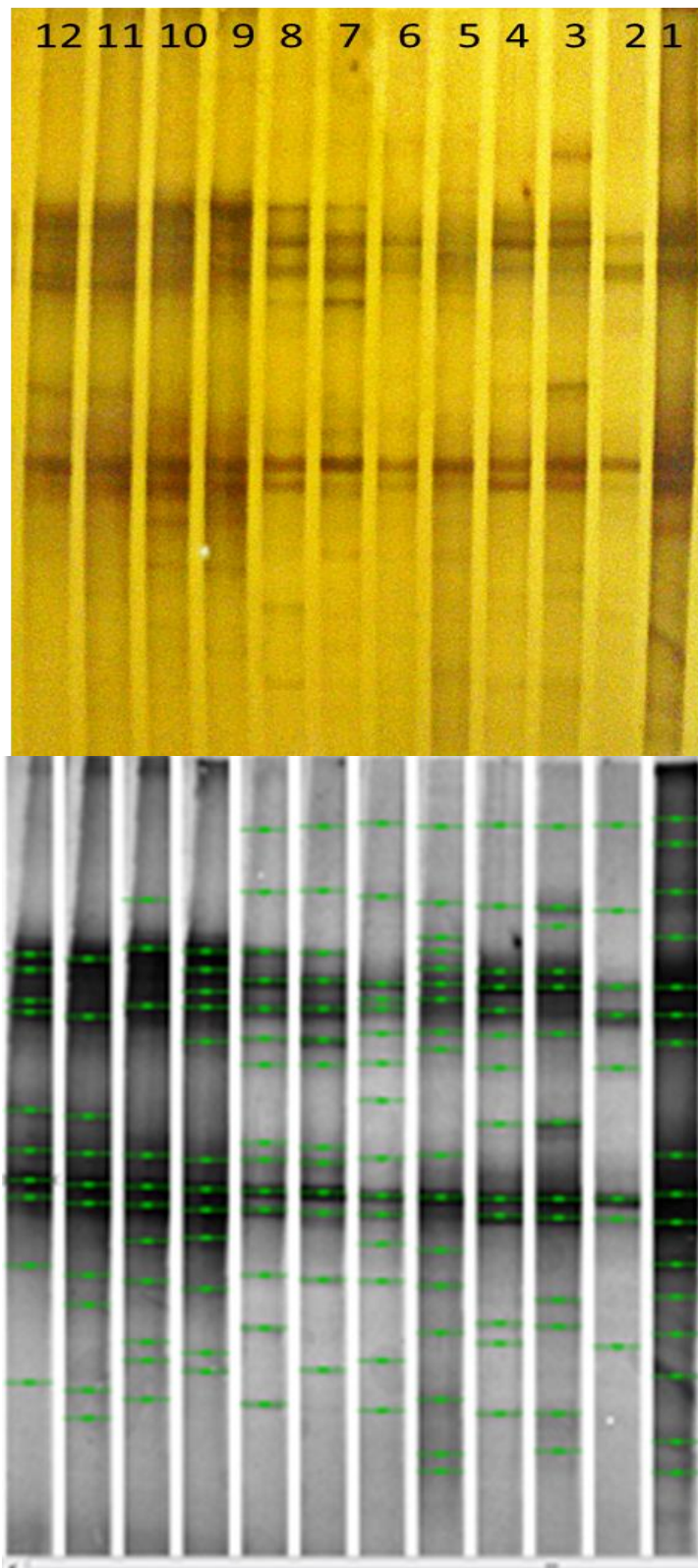
Πίνακας 3.12 Δείγματα νερού για ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου μέσω αντίδρασης PCR.

α/α Δειγμάτων	Δειγματοληψίες	Συνθήκες δειγματοληψιών	Θέση Δειγματοληψίας
1	1 ^η Δειγματοληψία 20/06/2010	Ξηρασία	A
2	1 ^η Δειγματοληψία 20/06/2010	Ξηρασία	B
3	1 ^η Δειγματοληψία 20/06/2010	Ξηρασία	Γ
4	2 ^η Δειγματοληψία 30/06/2010	Βροχόπτωση	A
5	2 ^η Δειγματοληψία 30/06/2010	Βροχόπτωση	B
6	2 ^η Δειγματοληψία 30/06/2010	Βροχόπτωση	Γ
7	3 ^η Δειγματοληψία 25/01/2011	Βροχόπτωση	A
8	3 ^η Δειγματοληψία 25/01/2011	Βροχόπτωση	B
9	3 ^η Δειγματοληψία 25/01/2011	Βροχόπτωση	Γ
10	4 ^η Δειγματοληψία 07/02/2011	Ξηρασία	A
11	4 ^η Δειγματοληψία 07/02/2011	Ξηρασία	B
12	4 ^η Δειγματοληψία 07/02/2011	Ξηρασία	Γ
13	5 ^η Δειγματοληψία 22/06/2011	Ξηρασία	A
14	5 ^η Δειγματοληψία 22/06/2011	Ξηρασία	B
15	5 ^η Δειγματοληψία 22/06/2011	Ξηρασία	Γ
16	6 ^η Δειγματοληψία 27/06/2011	Βροχόπτωση	A
17	6 ^η Δειγματοληψία 27/06/2011	Βροχόπτωση	B
18	6 ^η Δειγματοληψία 27/06/2011	Βροχόπτωση	Γ

Από τα 18 διαφορετικά προϊόντα PCR που προέκυψαν μετά την ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου (Εικ. 3.21) επιλέχθηκαν τα 12 (λόγω περιορισμού των θέσεων στο πήκτωμα ακρυλαμίδης) που αντιστοιχούσαν στα δείγματα που λήφθηκαν από τις θέσεις δειγματοληψίας Α και Γ για την κάθε δειγματοληψία, προκειμένου να εισαχθούν στο πήκτωμα ακρυλαμίδης για την DGGE. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα της DGGE παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.13 και στην Εικόνα 3.21.

Πίνακας 3.13 Καταγραφή των 12 δειγμάτων νερού από τις θέσεις δειγματοληψίας Α και Γ που χρησιμοποιήθηκαν για την DGGE μετά την ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου με το ζεύγος εκκινητών F984GC και R1378.

α/α Δειγμάτων	Δειγματοληψίες	Συνθήκες δειγματοληψιών	Θέση Δειγματοληψίας
1	1 ^η Δειγματοληψία 20/06/2010	Ξηρασία	Α
2	1 ^η Δειγματοληψία 20/06/2010	Ξηρασία	Γ
3	2 ^η Δειγματοληψία 30/06/2010	Βροχόπτωση	Α
4	2 ^η Δειγματοληψία 30/06/2010	Βροχόπτωση	Γ
5	3 ^η Δειγματοληψία 25/01/2011	Βροχόπτωση	Α
6	3 ^η Δειγματοληψία 25/01/2011	Βροχόπτωση	Γ
7	4 ^η Δειγματοληψία 07/02/2011	Ξηρασία	Α
8	4 ^η Δειγματοληψία 07/02/2011	Ξηρασία	Γ
9	5 ^η Δειγματοληψία 22/06/2011	Ξηρασία	Α
10	5 ^η Δειγματοληψία 22/06/2011	Ξηρασία	Γ
11	6 ^η Δειγματοληψία 27/06/2011	Βροχόπτωση	Α
12	6 ^η Δειγματοληψία 27/06/2011	Βροχόπτωση	Γ



Εικόνα 3.21 Ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας των βακτηρίων σε δείγματα νερού με τη μέθοδο DGGE. 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 1-12 είναι τα δείγματα του Πίνακα 3.11.

Η μελέτη της βακτηριακής ποικιλότητας μέσω ανάλυσης σε πήκτωμα με κλίση αποδιατακτικού παράγοντα ουρία - φορμαμίδιο σε ποσοστό 40 – 60 % που παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.22, έδειξε ότι εντοπίζονται κοινοί ριβότυποι σε όλες τις δειγματοληψίες και η ομοιότητα της μικροβιακής κοινότητας παρουσιάζει μικρές μεταβολές.

Οι περισσότεροι ριβότυποι εντοπίστηκαν στο μέσο του πηκτώματος γεγονός που υποδηλώνει ότι το GC περιεχόμενο των βακτηρίων κυμαινόταν σε μεσαία επίπεδα.

Όπως ήταν αναμενόμενο τα δείγματα με τη μεγαλύτερη ομοιότητα ήταν αυτά που προήλθαν από την ίδια δειγματοληψία, αλλά από διαφορετική θέση δειγματοληψίας με συντελεστή ομοιότητας $C_s=0,9$ (δείγματα 11-12), $C_s=0,87$ (δείγματα 9-10), $C_s=0,88$ (δείγματα 8-7), $C_s=0,6$ (δείγματα 6-5), $C_s=0,8$ (δείγματα 3-4), $C_s=0,58$ (δείγματα 1-2).

Κατά την 1^η δειγματοληψία (Καλοκαίρι 2010, ξηρασία) στη θέση Α εντοπίστηκαν 16 διαφορετικοί ριβότυποι, ενώ στη θέση Γ, 8.

Στα δείγματα της 2^{ης} δειγματοληψίας (Καλοκαίρι 2010, βροχόπτωση) στη θέση Α εντοπίστηκαν 12 ριβότυποι, ενώ στη θέση Γ, 13.

Στα δείγματα της 3^{ης} δειγματοληψίας (Χειμώνας 2011, βροχόπτωση) που αντιστοιχούσαν στη θέση Α εντοπίστηκαν 18 διαφορετικοί ριβότυποι, ενώ στη θέση Γ 15 ριβότυποι.

Στην 4^η δειγματοληψία (Χειμώνας 2011, ξηρασία) εντοπίστηκαν στη θέση Α, 13 ριβότυποι και στη θέση Γ, 14.

Στην 5^η δειγματοληψία (Καλοκαίρι 2011, ξηρασία) εντοπίστηκαν 12 διαφορετικοί ριβότυποι στη θέση Α και 11 στη θέση Γ.

Τέλος, στα δείγματα της 6^{ης} δειγματοληψίας (Καλοκαίρι 2011, βροχόπτωση) εντοπίστηκαν 10 διαφορετικοί ριβότυποι, τόσο στη θέση Α, όσο και στη θέση Γ.

Ο μικρότερος συντελεστής ομοιότητας εμφανίστηκε ανάμεσα στη 2^η και 6^η δειγματοληψία ($C_s=0,36$) οι οποίες διενεργήθηκαν σε δύο διαδοχικά καλοκαίρια (2010 και 2011) 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση. Αντίστοιχα χαμηλός συντελεστής ομοιότητας εντοπίστηκε μεταξύ της 5^{ης} και της 3^{ης} δειγματοληψίας ($C_s=0,37$).

Αντίθετα, υψηλός συντελεστής ομοιότητας εμφανίστηκε ανάμεσα στην 1^η και 2^η δειγματοληψία ($C_s=0,76$) που διενεργήθηκαν το Καλοκαίρι του 2010 σε συνθήκες

ξηρασίας και μετά τη βροχόπτωση αντίστοιχα, όπως και ανάμεσα στην 5^η και 6^η δειγματοληψία που διενεργήθηκαν ένα χρόνο αργότερα (Καλοκαίρι 2011) σε παρόμοιες συνθήκες ($C_s=0,76$) (Πίνακας 3.14).

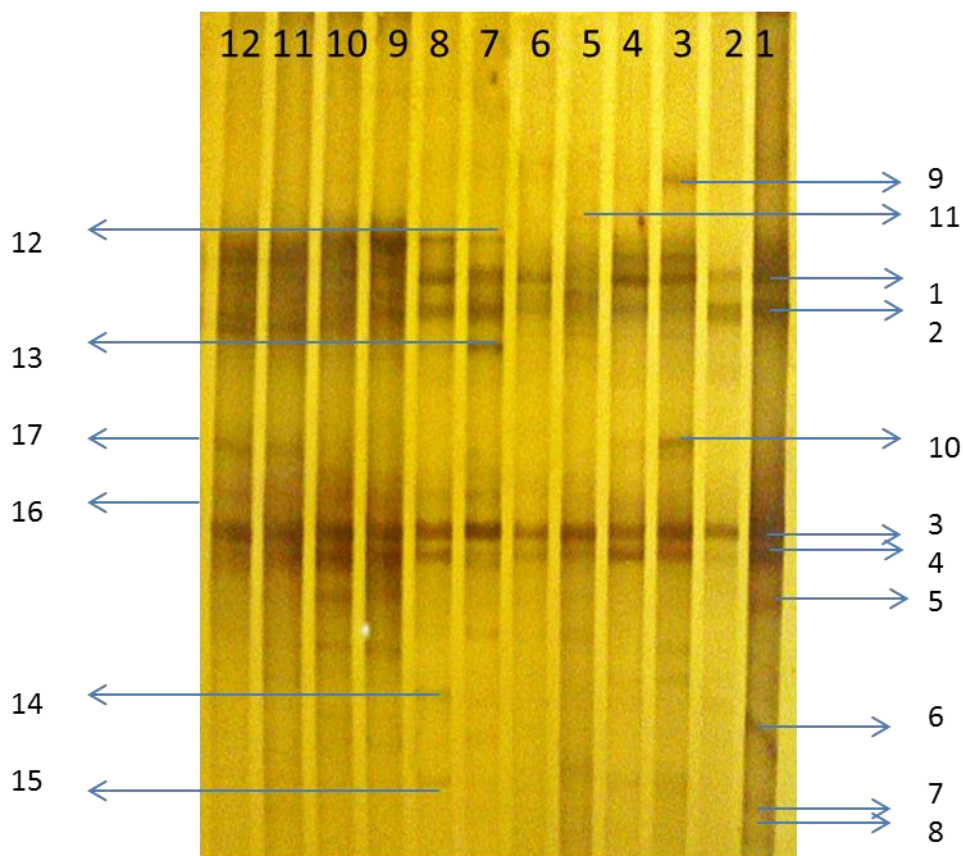
Πίνακας 3.14 Συντελεστής ομοιότητας (C_s) για τους πληθυσμούς των βακτηρίων σε δείγματα νερού.

Δείγματα	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-											
2	0,58	-										
3	0,43	0,5	-									
4	0,48	0,76	0,8	-								
5	0,53	0,5	0,53	0,45	-							
6	0,52	0,52	0,44	0,57	0,60	-						
7	0,62	0,47	0,4	0,46	0,45	0,64	-					
8	0,69	0,54	0,53	0,68	0,75	0,69	0,88	-				
9	0,57	0,67	0,5	0,4	0,53	0,37	0,56	0,46	-			
10	0,66	0,63	0,61	0,5	0,75	0,77	0,66	0,72	0,87	-		
11	0,38	0,55	0,54	0,52	0,5	0,56	0,61	0,66	0,45	0,47	-	
12	0,54	0,44	0,36	0,43	0,57	0,64	0,61	0,5	0,66	0,76	0,9	-

3.4.2 Έλεγχος παρουσίας βακτηρίων στα δείγματα νερού μέσω μοριακής ανάλυσης ριβοτύπων σε DGGE.

Από το πηκτώμα της ακρυλαμίδης μετά την ανάλυση με κλίση αποδιατακτικού παράγοντα ουρία – φορμαμίδιο 40 – 60 % και τη χρώση του με νιτρικό άργυρο (Κεφ. 2.4.2.) εντοπίστηκαν και αφαιρέθηκαν με νυστέρι 17 διαφορετικοί ριβότυποι.

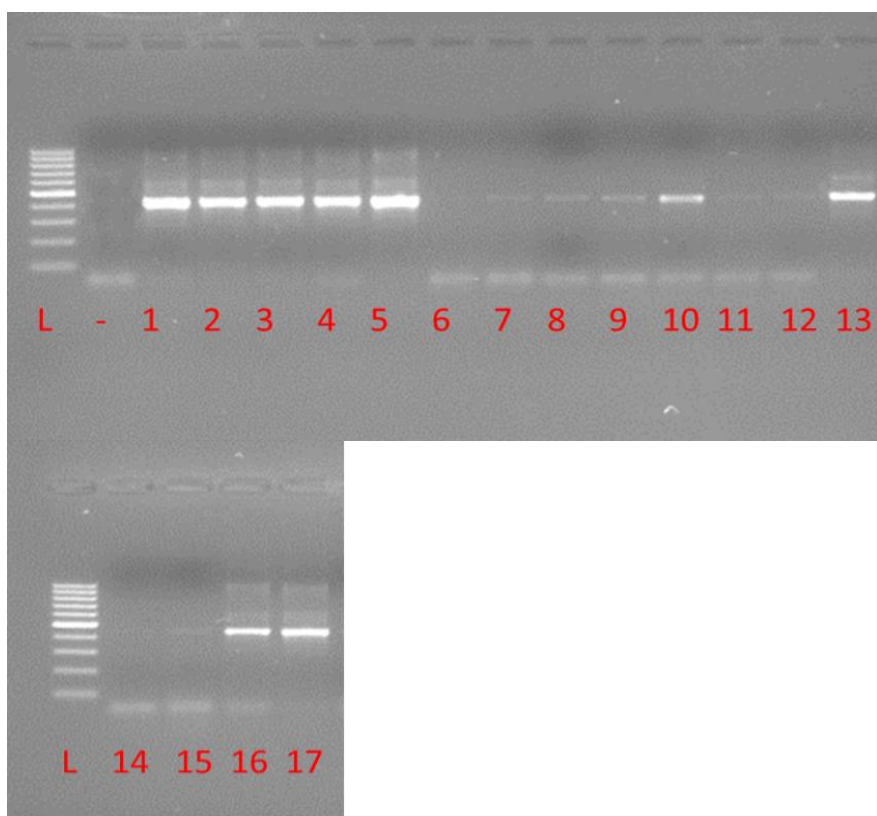
Η επιλογή των ριβοτύπων έγινε με βάση τη συχνότητα εμφάνισής στους στα δείγματα νερού που εξετάστηκαν, για να βρεθούν οι κυριότεροι βακτηριακοί εκπρόσωποι των συγκεκριμένων δειγμάτων, καθώς και με βάση την ένταση της χρωστικής, αφού αυτή υποδηλώνει την ποσότητα βακτηριακού DNA που υπάρχει σε κάθε ριβότυπο (Εικ. 3.22).



Εικόνα 3.22 Πήκτωμα ακρυλαμίδης όπου φαίνονται οι 17 διαφορετικοί ριβοτύποι που αφαιρέθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για μοριακή ταυτοποίηση.

Στη συνέχεια, ακολούθησε απομόνωση DNA των 17 ριβοτύπων (Κεφ. 2.4.4.) και ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου από το DNA που απομονώθηκε από την κάθε ζώνη χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών F984 (χωρίς την ουρά GC)-R1378 (Εικ. 3.23).

Έγινε φωτομέτρηση του DNA στα 260 και 280 nm για τον έλεγχο της καθαρότητας και της ποσότητας. Λόγω των διαφορετικών πρωτοκόλλων που ακολουθήθηκαν καθώς και της διαφορετικής καθαρότητας αλλά και ποσότητας του απομονωμένου DNA στην κάθε ζώνη, η ενίσχυση του 16S rDNA απαιτούσε συνεχή παραμετροποίηση του προγράμματος της PCR για τη βελτιστοποίηση της. Στην Εικόνα 3.24 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μετά την ενίσχυση του γονιδίου 16S rDNA των 17 διαφορετικών ριβοτύπων.



Εικόνα 3.23 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR που προέκυψαν κατά την ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου με τους εκκινητές F984-R1378. Όπου: (L) μοριακός μάρτυρας 100bp (1-17) προϊόντα PCR των 17 ριβοτύπων που αφαιρέθηκαν.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.24 θετική αντίδραση PCR έδωσαν οι ριβότυποι που βρίσκονται στο μέσο του πηκτώματος ακρυλαμίδης λόγω ικανής ποσότητας DNA. Τα προϊόντα PCR των ριβοτύπων που ήταν θετικά στην ύπαρξη DNA κατά την ηλεκτροφόρηση, αναλύθηκαν με βάση την αλληλουχία του του 16s rDNA γονιδίου (βλ. § 2.4.5 Υλικά και Μέθοδοι).

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν συγκρίθηκαν με χρήση του αλγορίθμου BLAST με βακτηριακές αλληλουχίες αναφοράς(16s rDNA 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 τη μεγαλύτερη ομολογία αλληλουχίας (Πιν. 3.15).

Πίνακας 3.15 Αποτελέσματα της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών με τον αλγόριθμο BLAST για τους ριβοτύπους της DGGE που έδωσαν θετικό σήμα στην ηλεκτροφόρηση μετά την PCR που προηγήθηκε.

Ριβότυπος	Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια (αριθμός κατάθεσης στην τράπεζα GenBank)	Max score	Μέγιστη ομοιότητα	Αριθμός νουκλεοτιδίων
1	<i>Glaciecola pallidula</i> (NR 026056.1)	414	83 %	388
2	<i>Glaciecola nitratireducens</i> (NR 074628.1)	601	94 %	390
3	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> (NR 074761.1)	612	95 %	395
4	<i>Alteromonas genovensis</i> (NR 043274.1)	220	88 %	396
5	<i>Novosphingobium capsulatum</i> (NR 025838.1)	180	93 %	393
6	<i>Nereida ignava</i> (NR 042283.1)	662	99 %	366
7	<i>Ralstonia solanacearum</i> (NR 074551.1)	305	81 %	366
10	<i>Oceanicola pacificus</i> (NR 043915.1)	250	82 %	392
13	<i>Pseudoalteromonas espejiana</i> (NR 029285.1)	708	99%	388
16	<i>Alteromonas macrodii</i> (CP 003917.1)	3287	97 %	391
17	<i>Aestuariibacter halophilus</i> (NR 025721.1)	612	95 %	384

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Μικροβιακή ποικιλότητα στο νερό

Τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες παγκοσμίως έχουν επικεντρωθεί στη διερεύνηση της μικροβιακής ποικιλότητας σε πολυσύχναστες παραλίες, που βρίσκονται κοντά σε μεγάλα αστικά κέντρα και προσελκύουν αυξημένο αριθμό λουομένων, καθώς αποτελεί αντικείμενο έντονου ενδιαφέροντος και προβληματισμού για λόγους δημόσιας υγείας. Σχεδόν, όμως, όλες οι προηγούμενες έρευνες επικεντρώθηκαν στη σταθερή ετήσια λήψη δειγμάτων από ένα προκαθορισμένο σημείο της εκάστοτε παραλίας χωρίς να εξετάζονται άλλοι παράγοντες που μπορούν δυνητικά να επηρεάσουν αρνητικά την ποιότητα των παράκτιων περιοχών.

Αυτός ο τρόπος έρευνας θεωρείται πλέον μη ικανοποιητικός για τον ποιοτικό έλεγχο μιας αστικής παραλίας, η οποία δέχεται μεγάλο όγκο αστικών λυμάτων και αριθμό επισκεπτών, με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη διακύμανση της ποιότητας των υδάτων ανάλογα με την επίδραση των διαφόρων εξωτερικών παραγόντων που διαμορφώνεται σε καθημερινή βάση. Κάθε χρόνο, η κολύμβηση σε νερά αναψυχής μολυσμένα με περιττωματικά βακτήρια είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση 120 εκατομμυρίων κρουσμάτων γαστρεντερικών διαταραχών και 50 εκατομμυρίων αναπνευστικών ασθενειών παγκοσμίως (Halliday *et al.*, 2011).

Ο έλεγχος των διαφόρων σημειακών ή μη πηγών απορροής, η επίδραση των λουομένων, η χωρική και χρονική διακύμανση της μικροβιακής ποικιλότητας, καθώς και η ποιότητα της παρακείμενης άμμου αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες που πρέπει να εξετάζονται προκειμένου να διαπιστωθεί αν και πότε μία παραλία είναι ασφαλής για να δεχθεί επισκέπτες.

Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε αρχικά η ικανότητα των δύο θεσπισμένων από την Ευρωπαϊκή Ένωση μικροβιακών δεικτών (*E. coli* και *Enterococcus* sp.) να προβλεφθεί η ύπαρξη και διακύμανση δυνητικά παθογόνων βακτηρίων (*Salmonella* και *Staphylococcus* sp) σε δείγματα άμμου και νερού. Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η τοπική διακύμανση του μικροβιακού φορτίου σε 3 καθορισμένα σημεία δειγματοληψίας νερού και άμμου, καθώς και η χρονική μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού κατά τη διάρκεια ενός ημερολογιακού έτους. Ταυτόχρονα, ελέγχθηκε η επίδραση του αριθμού των λουομένων, καθώς και της βροχόπτωσης στη μικροβιακή ποιότητα των παράκτιων υδάτων. Τέλος, ελέγχθηκε μοριακά η μικροβιακή ποικιλότητα του νερού για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των κυρίαρχων βακτηριακών πληθυσμών που εμφανίζονται στις διαφορετικές συνθήκες που εξετάστηκαν.

4.1.1 Εποχιακή διακύμανση του μικροβιακού πληθυσμού στο νερό της περιοχής Βάρκιζας.

Η εποχιακή διακύμανση του ολικού μικροβιακού πληθυσμού στο νερό ήταν αναμενόμενη. Τα ολικά βακτήρια εμφανίστηκαν αυξημένα τον Ιούλιο του 2010, ενώ μειώθηκαν δραματικά (81,4 % μείωση) στη διάρκεια του χειμώνα. Ο πληθυσμός των ολικών βακτηρίων επανήλθε το επόμενο καλοκαίρι (2011) δείχνοντας έτσι την επίδραση της θερμοκρασίας στη βιωσιμότητα των βακτηρίων (23 °C Ιούλιος 2010, 15 °C Φεβρουάριος 2011, 22 °C Ιούλιος 2011). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς η θερμοκρασία αποτελεί τον κυριότερο περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των βακτηρίων σε θαλάσσια οικοσυστήματα, σημαντικότερο ακόμα και από την παρουσία θρεπτικών συστατικών (Lindh *et al.*, 2013).

Ο θαλάσσιος ελλαδικός χώρος, λόγω του μεσογειακού κλίματος, brίθεται από μεσόφιλα βακτήρια τα οποία δεν μπορούν να επιβιώσουν στις χαμηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα να υπάρχει έντονη μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά τη διάρκεια του χειμώνα σε σχέση με τους θερινούς μήνες, σε αντίθεση με πιο ψυχρές θάλασσες όπου τα βακτήρια είναι ψυχρόφιλα και κατ' επέκταση προσαρμοσμένα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, οπότε και η ετήσια διακύμανσή τους είναι χαμηλότερης έντασης (Marschall *et al.*, 2010).

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των ολικών βακτηρίων εμφανίστηκαν και στους πληθυσμούς των βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* και *Enterococcus*. Ο πληθυσμός τους εμφάνισε τη μεγαλύτερη τιμή τον Ιούλιο του 2011, ενώ μειώθηκαν αισθητά κατά τη διάρκεια του χειμώνα (85,4 % και 74,55 % αντίστοιχα). Οι εντερόκοκκοι αποδείχτηκαν ικανοί μικροβιακοί δείκτες καθώς ακολούθησαν ακριβώς την πληθυσμιακή διακύμανση των παθογόνων βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* σε κάθε δειγματοληψία ανεξάρτητα από τις κλιματολογικές συνθήκες και αποτέλεσαν ένδειξη της παρουσίας των παθογόνων. Είναι γνωστό ότι οι αβιοτικοί παράγοντες, όπως η αυξημένη αλατότητα, δεν επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την ανάπτυξή τους.

Αντίθετα, τα στελέχη του γένους *E. coli* διατηρήθηκαν σε χαμηλά επίπεδα σε όλη τη διάρκεια του έτους, ενώ η μείωση που παρουσιάστηκε κατά τη χειμερινή δειγματοληψία ήταν μόλις 29,6 %. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το βακτήριο *E. coli* δεν αποτελεί αξιόπιστο μικροβιακό δείκτη για την εκτίμηση της παρουσίας παθογόνων βακτηρίων σε θαλάσσια επιφανειακά νερά.

Αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι το *E. coli* είναι ευαίσθητο σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας και για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιείται συνήθως ως

μικροβιακός δείκτης σε γλυκά νερά, όπου η παράμετρος αυτή δεν λαμβάνεται υπόψη. Επιπλέον, το *E. coli* απενεργοποιείται πιο γρήγορα από τους εντερόκοκκους παρουσία φωτός (light inactivation) (Jin *et al.*, 2005) γεγονός που μπορεί να εξηγήσει τον χαμηλό πληθυσμό *E. coli* που εμφανίστηκε κατά τις θερινές δειγματοληψίες.

Τέλος, μόνο σε μία δειγματοληψία σε συνθήκες ξηρασίας υπήρξε υπέρβαση των ανώτατων ορίων που έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για την καταλληλότητα των υδάτων αναψυχής (*Enterococcus* 100 cfu/100 ml και *E. coli* 250 cfu/ 100 ml). Η υψηλότερη τιμή μικροβιακού δείκτη που καταγράφηκε ήταν 110 cfu/100 ml του βακτηρίου *Enterococcus* τον Ιούλιο του 2011, μέγεθος που ξεπερνά το όριο για τον χαρακτηρισμό των υδάτων ως 'εξαιρετικής ποιότητας' που είναι και το όριο για το βραβείο 'Γαλάζια Σημαία' αλλά δεν αποτελεί κίνδυνο για την υγεία των λουομένων.

4.1.2 Διακύμανση του μικροβιακού πληθυσμού του νερού βάση της θέσης δειγματοληψίας.

Από τις 3 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους (Ιούλιος 2010, Φεβρουάριος 2011 και Ιούλιος 2011), οι 2 που έλαβαν χώρα κατά τους θερινούς μήνες έγιναν σε μέρα και ώρα όπου η επισκεψιμότητα της παραλίας ήταν μεγάλη. Στα σημεία δειγματοληψίας Α και Γ βρίσκονταν κατά μέσο όρο 20 λουόμενοι ανά 25 m², ενώ στο σημείο δειγματοληψίας Β η συγκέντρωση των λουομένων έφτανε τα 10 άτομα ανά 25 m², λόγω της ύπαρξης του Ναυτικού Αθλητικού Ομίλου Βάρης- Βάρκιζας (Ν.Α.Ο.Β.Β.) στο σημείο αυτό δυσχεραίνοντας έτσι την πρόσβαση από τους λουόμενους στο συγκεκριμένο σημείο.

Παρότι υπήρξε διαφορά στη συγκέντρωση των επισκεπτών στα 3 σημεία της δειγματοληψίας, τα αποτελέσματα από τη μέτρηση των ολικών βακτηρίων αλλά και των επιμέρους δυνητικά παθογόνων βακτηρίων (*Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp.), αλλά και των μικροβιακών δεικτών (*Enterococcus* sp. και *E. coli*) έδειξαν ότι δεν υπήρξε ειδοποιός διαφορά στους βακτηριακούς πληθυσμούς ανάμεσα σε αυτές τις 3 θέσεις. Η μικρή διαφορά που εντοπίστηκε ανάμεσα στις τρεις θέσεις δειγματοληψίας είναι μέσα στα όρια του στατιστικού σφάλματος και αποτελεί στοχαστικό φαινόμενο.

Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι λόγω της φύσης του νερού, της παρουσίας θαλασσίων ρευμάτων, αλλά και της κινητικότητας των λουομένων υπάρχει εμφανής διασπορά των μικροοργανισμών. Η απόσταση των 100 μέτρων που χωρίζει τις 3

θέσεις δειγματοληψίας και η έλλειψη κάποιου φυσικού εμποδίου που να εμποδίζει την είσοδο του νερού από το ένα σημείο στο άλλο είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ουσιαστικών διαφορών στην ποιότητα του νερού στα 3 αυτά σημεία δειγματοληψίας.

4.1.3 Επίδραση της βροχόπτωσης στον μικροβιακό πληθυσμό του νερού

Όλες οι έρευνες που έχουν διεξαχθεί τα τελευταία χρόνια και επικεντρώνονται στην επίδραση της βροχόπτωσης όσον αφορά στην ποιότητα των υδάτων αναψυχής έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι αυτή αποτελεί τον πιο επικίνδυνο παράγοντα υποβάθμισης των θαλασσίων υδάτων, ειδικά σε παραλίες που βρίσκονται δίπλα σε μεγάλα αστικά κέντρα (Kleinheinze *et al.*, 2009).

Τα νερά της βροχής περνούν από επιφάνειες όπως, δρόμοι, στέγες, χλοοτάπητες και εργοτάξια. Καθώς το νερό της βροχής ρέει σε αυτές τις επιφάνειες συγκεντρώνει ρύπους, όπως πετρέλαιο, γράσο, θρεπτικά υλικά, φυτοφάρμακα, φώσφορο, χαλκό, ψευδάργυρο και περιττωματικά βακτήρια (Papiri *et al.*, 2003). Τελικά, αυτά τα μολυσμένα νερά φθάνουν σε φυσικά επιφανειακά ύδατα και αν αυτά βρίσκονται κοντά σε παραλίες αναψυχής δύναται να οδηγήσουν σε αύξηση του βακτηριακού φορτίου και κατά συνέπεια να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία των λουόμενων (Dorfman & Stoner, 2007) (βλ. §1.3).

Στην παρούσα εργασία τα αποτελέσματα συμφωνούσαν απόλυτα με τη διεθνή βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* αυξήθηκε δραματικά 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση. Στις 3 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν μετά τη βροχόπτωση (Ιούλιος 2010, Φεβρουάριος 2011, Ιούλιος 2011) παρουσιάστηκε αύξηση των σταφυλόκοκκων σε σχέση με τις αντίστοιχες δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν τις ίδιες χρονικές περιόδους αλλά σε συνθήκες ξηρασίας (προηγήθηκαν τουλάχιστον 10 μέρες χωρίς βροχόπτωση). Η μεγαλύτερη τιμή του ανιχνεύτηκε στη θέση Β τον Ιούλιο του 2010 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση (1166 cfu/100 ml) ήταν αυξημένη περίπου 260 % σε σχέση με τη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε στην ίδια θέση σε συνθήκες ξηρασίας. Η τιμή των σταφυλοκόκκων ήταν υψηλή (≈ 1000 cfu/100 ml) και το επόμενο καλοκαίρι (Ιούλιος 2011) μετά τη βροχόπτωση και στις 3 θέσεις δειγματοληψίας.

Όπως είναι γνωστό οι σταφυλόκοκκοι είναι ανθρώπινο παθογόνο και σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις αποτελούν άμεσο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, ιδιαίτερα

στελέχη *Staphylococcus aureus* που προκαλούν μολύνσεις δέρματος, οστών, πνευμών, πνευμονία και σηψαιμία. Πρόσφατα, η απομόνωση στελεχών του είδους *Staphylococcus aureus* ανθεκτικών στη μεθικιλίνη (MRSA) από άμμο και θαλάσσιο νερό στη νότια Καλιφόρνια και στην περιοχή της Ουάσιγκτον, πυροδότησε συζητήσεις για τη σημασία των δημόσιων παραλίων ως δεξαμενές για τη συντήρηση και μετάδοση των στελεχών MRSA (Soge *et al.*, 2009).

Οι σταφυλόκοκκοι είναι ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης και εμφανίζονται σε μεγάλο πληθυσμό μέσα σε αστικά λύματα. Για τον λόγο αυτό, η αύξησή τους μετά τη βροχόπτωση οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στην υπερχείλιση των ομβρίων υδάτων και στην απορροή των επιφανειακών υδάτων με μεγάλο μικροβιακό φορτίο προς τη θάλασσα.

Αντίστοιχα, και ο πληθυσμός των εντεροκόκκων εμφάνισε αύξηση και στις 3 διαφορετικές περιόδους δειγματοληψίας 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση. Η υψηλότερη τιμή ανιχνεύτηκε στη θέση Β τον Ιούλιο του 2011, 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση (220 cfu/100 ml), υπερβαίνοντας κατά πολύ τα θεσπισμένα όρια για ασφαλή κολύμβηση (100 cfu/100 ml) σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2006/7/EC (CEU, 2006). Αν και ο πληθυσμός των εντεροκόκκων κυμάνθηκε σε σχετικά χαμηλά επίπεδα σε συνθήκες ξηρασίας, εντούτοις, η αύξηση που εμφανίστηκε μετά τη βροχόπτωση ήταν υψηλή.

Τον Ιούλιο του 2010 η αύξηση αυτή ήταν 360 %, 264 %, 334 % στις θέσεις Α, Β και Γ αντίστοιχα. Αντίστοιχα, τον χειμώνα του 2011 η αύξηση ήταν 642 %, 610 % και 704 % στις θέσεις Α, Β και Γ αντίστοιχα. Τέλος, τον Ιούλιο του 2011 όπου οι εντερόκοκκοι εμφάνισαν την υψηλότερη τιμή, η αύξηση λόγω της βροχόπτωσης ήταν 213 %, 180 % και 183 % στις θέσεις Α, Β και Γ αντίστοιχα. Ο πληθυσμός των εντεροκόκκων, μετά τη βροχόπτωση, ξεπέρασε και στις 3 δειγματοληψίες τα θεσπισμένα από την Ευρωπαϊκή Ένωση όρια για ασφαλή ύδατα. Θετική διαπίστωση, επίσης, προκαλεί η ακρίβεια με την οποία ο συγκεκριμένος μικροβιακός δείκτης ακολούθησε την αύξηση των παθογόνων βακτηρίων επιβεβαιώνοντας τη σημαντική θέση που κατέχει στον έλεγχο της ποιότητας των παράκτιων υδάτων (Jin *et al.*, 2005).

Ο πληθυσμός των εντεροκόκκων όταν υπερβαίνει τα επιτρεπτά όρια μπορεί να προκαλέσει μια πλειάδα σοβαρών ασθενειών, όπως λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, βακτηριαιμία, βακτηριδιακή ενδοκαρδίτιδα, εκκολπωματίτιδα και μηνιγγίτιδα. Η κοπρανώδης προέλευση των εντεροκόκκων μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η παραλία της Βάρκιζας μετά τη βροχόπτωση δέχεται αστικά

λύματα μέσω των ομβρίων υδάτων και των επιφανειακών νερών που καταλήγουν στη θάλασσα, με αποτέλεσμα να υπονομεύεται άμεσα η υγεία των λουομένων.

Ο μικροβιακός δείκτης *E. coli* εμφάνισε την υψηλότερη τιμή του στη θέση Β τον Ιούλιο του 2011 (71 cfu/100 ml). Παρουσιάστηκε αύξηση του πληθυσμού και στις 3 διαφορετικές χρονικές περιόδους των δειγματοληψιών αμέσως μετά τη βροχόπτωση, αν και η αύξηση αυτή ήταν μικρότερη συγκρινόμενη με την αύξηση που εμφανίστηκε στις υπόλοιπες μικροβιακές ομάδες που μελετήθηκαν.

Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο και σε πλήρη ταύτιση με τη διεθνή βιβλιογραφία που αναφέρει ότι το βακτήριο *E. coli* δεν αποτελεί αξιόπιστο μικροβιακό δείκτη για δειγματοληψίες θαλασσίου επιφανειακού νερού, αλλά είναι καλύτερος δείκτης σε μελέτες που περιλαμβάνουν δείγματα από γλυκά νερά. Το βακτήριο *E. coli* είναι πιο ευαίσθητο σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας και επιπλέον, απενεργοποιείται πιο γρήγορα από τους εντερόκοκκους παρουσία φωτός (light inactivation) (Jin *et al.*, 2005) γεγονός που μπορεί να εξηγήσει τον χαμηλό πληθυσμό *E. coli* που εμφανίστηκε. Παρόλα αυτά η αύξηση του πληθυσμού του *E. coli* λόγω της βροχόπτωσης ήταν εμφανής και έφτασε ακόμα και το 160 %, το μέγεθος, όμως, του πληθυσμού σε καμία περίπτωση δεν ξεπέρασε τα θεσπισμένα όρια για την καταλληλότητα των υδάτων (250 cfu/100 ml).

Παρόλο που τα εξεταζόμενα παθογόνα βακτήρια και μικροβιακοί δείκτες εμφάνισαν σαφή πληθυσμιακή αύξηση ως αποτέλεσμα της βροχόπτωσης, ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός δεν ακολούθησε παρόμοια αύξηση.

Στις 4 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά τους θερινούς μήνες τα αποτελέσματα έδειξαν μία σαφή μείωση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση. Η μείωση αυτή (82,3 %) ήταν μεγαλύτερη τον Ιούλιο του 2010, αλλά ήταν εμφανής και ένα χρόνο αργότερα τον Ιούλιο του 2011 (47,1 %). Παρόμοια μείωση παρατηρήθηκε και στις 3 διαφορετικές θέσεις δειγματοληψίας (Α, Β, Γ) γεγονός που δείχνει ότι η ελάττωση του μικροβιακού πληθυσμού ήταν προϊόν της βροχόπτωσης και όχι κάποιου τυχαίου γεγονότος τοπικού χαρακτήρα. Αυτό φαίνεται αρχικά να έρχεται σε σύγκρουση με τα προηγούμενα αποτελέσματα, αλλά εξηγείται από την ανθρωπογενή επίδραση στον ολικό βακτηριακό πληθυσμό. Οι θερινές δειγματοληψίες που έλαβαν χώρα σε περίοδο ξηρασίας, πραγματοποιήθηκαν παρουσία πολύ υψηλού αριθμού λουομένων, οι οποίοι όπως έχει αναφερθεί (βλ. § 1.4) συμβάλουν ουσιαστικά στην αύξηση του ολικού μικροβιακού φορτίου. Κατά μέσο όρο, 6×10^6 βιώσιμες μονάδες (CFUs) βακτηρίων απελευθερώνονται από κάθε λουόμενο σε 15 λεπτά κολύμβησης

(Elmir *et al.*, 2007), ενώ υπάρχει θετική σχέση μεταξύ της πυκνότητας των λουομένων και των πληθυσμών του γένους *Cryptosporidium*, *Giardia* και μικροσποριδίων στις παραλίες αναψυχής (Graczyk *et al.*, 2007β, γ; Sunderland *et al.*, 2007).

Αντίθετα, οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση, έγιναν απουσία του μεγαλύτερου μέρους των λουομένων λόγω των δυσμενών κλιματικών συνθηκών μετά τη βροχή στην παραλία, αλλά και λόγω της ώρας διεξαγωγής των δειγματοληψιών (19:00- 21:00). Για τον λόγο αυτό αν και ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός μειώθηκε λόγω της απουσίας λουομένων μετά τη βροχόπτωση, τα περιττωματικά βακτήρια που βρίσκονται σε αφθονία στα όμβρια ύδατα και στα μολυσμένα επιφανειακά νερά αυξήθηκαν 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της χειμερινής δειγματοληψίας όπου υπήρξε απουσία λουομένων. Στις 2 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά τη χειμερινή περίοδο φάνηκε ότι ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός παρουσίασε μικρή αύξηση (19,2 %) αμέσως μετά τη βροχόπτωση και στις 3 διαφορετικές θέσεις δειγματοληψίας, σε σχέση με τη δειγματοληψία που διεξήχθη σε συνθήκες ξηρασίας. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει ότι η επίδραση των λουομένων ήταν η ειδοποιός διαφορά που συντέλεσε στον αυξημένο ολικό βακτηριακό πληθυσμό σε συνθήκες ξηρασίας κατά τις θερινές δειγματοληψίες.

4.2 Μικροβιακή ποικιλότητα στην άμμο

Μέχρι σήμερα, οι έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε δείγματα άμμου από νερά αναψυχής ήταν λίγες και σποραδικές. Εντύπωση προκαλεί ότι μέχρι πριν μερικά χρόνια υπήρχε η υπόθεση ότι η επιβίωση των εντεροβακτηρίων στην ξηρή άμμο ήταν μηδαμινή, λόγω παραγόντων καταπόνησης, όπως η έλλειψη υγρασίας και θρεπτικών συστατικών (World Health Organization, 2003).

Τα τελευταία χρόνια, όμως, τα αποτελέσματα των ερευνών έχουν αντιστρέψει εντελώς αυτή την υπόθεση καθώς βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των περιττωματικών βακτηριακών δεικτών (FIB) είναι μεγαλύτερη στην άμμο απ' ότι στη θάλασσα (Goodwin & Pobuda, 2009).

Επιπλέον, μεγαλύτερη συγκέντρωση περιττωματικών μικροβιακών δεικτών και παθογόνων βακτηρίων βρέθηκε στην ξηρή άμμο που βρέχεται σπάνια (high tidal line) και αποτελεί το σημείο που επιλέγουν οι επισκέπτες της παραλίας, απ' ότι στην

υγρή άμμο. Η αυξημένη συγκέντρωση των βακτηρίων στην άμμο φαίνεται να οφείλεται στη μείωση που προκαλεί σε παράγοντες καταπόνησης, όπως, η υπερϊώδης ακτινοβολία, η υψηλή αλατότητα, η υψηλή θερμοκρασία και η δραστηριότητα των κυμάτων (Yamahara *et al.*, 2007).

4.2.1 Εποχιακή διακύμανση του ολικού μικροβιακού πληθυσμού στην άμμο

Ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός στην άμμο παρέμεινε πρακτικά αμετάβλητος το καλοκαίρι του 2010 και 2011. Παρουσιάστηκε μείωση μίας τάξης μεγέθους κατά τη χειμερινή δειγματοληψία όπου ο πληθυσμός των ολικών βακτηρίων είχε τη χαμηλότερη ετήσια τιμή (περίπου $15 \cdot 10^2$ cfu/g). Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο λόγω της απουσίας λουομένων στην παραλία κατά τη χειμερινή δειγματοληψία.

Ο πληθυσμός των βακτηρίων του γένους *Staphylococcus* στην άμμο, κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές κατά τις θερινές δειγματοληψίες παρουσιάζοντας αύξηση 97% το καλοκαίρι του 2011 σε σχέση με το προηγούμενο καλοκαίρι. Αντίθετα, τα στελέχη του γένους *Enterococcus* εντοπίστηκαν σε μεγάλους πληθυσμούς στα δείγματα της άμμου κατά τις θερινές δειγματοληψίες με ουσιαστικά αμελητέα ετήσια διακύμανση, το μέγεθος του πληθυσμού των βακτηρίων *E. coli* κυμάνθηκε αντίστοιχα με αυτόν του *Staphylococcus* με χαμηλά νούμερα κατά τις θερινές δειγματοληψίες παρουσιάζοντας αύξηση 12,2 % το καλοκαίρι του 2011 σε σχέση με το προηγούμενο. Οι μύκητες μειώθηκαν το καλοκαίρι του 2011 σε σχέση με το έτος 2010 κατά 44 %, ενώ τέλος, τα στελέχη του γένους *Candida* εμφανίστηκαν αυξημένα κατά 97 % το καλοκαίρι του 2011.

Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι οι πληθυσμοί όλων των μικροβιακών ομάδων που εξετάστηκαν, μειώθηκαν σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα κατά τη χειμερινή δειγματοληψία στα δείγματα της ξηρής άμμου, αν και στα δείγματα του νερού από την αντίστοιχη χρονικά δειγματοληψία ο πληθυσμός τους, αν και μειωμένος ήταν αρκετά υψηλός (§4.1.1). Αυτό, οφείλεται στην απουσία ανθρωπογενούς επίδρασης κατά τη χειμερινή περίοδο αποδεικνύοντας ότι ο ανθρώπινος παράγοντας είναι το βασικότερο αίτιο για την αύξηση του μικροβιακού φορτίου στην άμμο παραλιών

αναψυχής, όσον αφορά στους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν (*Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp., *E. coli*).

Το βακτήριο του γένους *Enterococcus* έδειξε μεγάλη ανθεκτικότητα στα δείγματα άμμου και ανιχνεύτηκε σε πληθυσμό πολύ μεγαλύτερο από αυτόν του παθογόνου βακτηρίου *Staphylococcus*. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι οι εντερόκοκκοι δεν αποτελούν αξιόπιστο μικροβιακό δείκτη για τα δείγματα της άμμου καθώς μπορεί να υποδείξει λανθασμένα την ύπαρξη μεγάλης συγκέντρωσης παθογόνων βακτηρίων (Boehm *et al.*, 2004).

Αντίθετα, το βακτήριο *E. coli* αποδείχτηκε καλύτερος μικροβιακός δείκτης στα δείγματα της άμμου, καθώς ο πληθυσμός του κυμάνθηκε σε επίπεδα παρόμοια με αυτά των παθογόνων μικροοργανισμών. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα διεθνώς που αφορούν στην καταλληλότητα του *E. coli* ως μικροβιακού δείκτη σε δείγματα άμμου είναι αντικρουόμενα, καθώς υπάρχουν έρευνες στη διεθνή βιβλιογραφία, οι οποίες υπέδειξαν ότι δεν υπάρχει σαφής σύνδεση των βακτηρίων *E. coli* και των παθογόνων βακτηρίων και άρα, η ανάγκη για εύρεση διαφορετικού μικροβιακού δείκτη για τον έλεγχο ποιότητας της άμμου είναι προφανής (Sampson *et al.*, 2006).

4.2.2 Διακύμανση του μικροβιακού πληθυσμού της άμμου με βάση τη θέση δειγματοληψίας

Ο μικροβιακός πληθυσμός στα δείγματα της άμμου εμφάνισε μεγαλύτερη διακύμανση ανάμεσα στις 3 θέσεις δειγματοληψίας από ότι τα δείγματα του νερού στις αντίστοιχες θέσεις. Αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς λόγω της φύσης της άμμου η διασπορά των βακτηρίων στον χώρο είναι πιο δύσκολη σε σχέση με το νερό και οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά σε ανθρώπινη παρέμβαση.

Ο ολικός μικροβιακός πληθυσμός, καθώς και τα εξεταζόμενα βακτήρια και μύκητες εμφάνισαν τον μεγαλύτερο πληθυσμό στη θέση δειγματοληψίας Α όπου και υπήρχε η μεγαλύτερη συγκέντρωση λουομένων (≈ 20 λουόμενοι ανά 25 m^2), ενώ σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις ο μικρότερος πληθυσμός εμφανίστηκε στη θέση Β, όπου η συγκέντρωση των λουομένων ήταν σημαντικά μικρότερη (≈ 10 λουόμενοι ανά 25 m^2).

4.2.3 Επίδραση της βροχόπτωσης στον μικροβιακό πληθυσμό της άμμου

Στις 4 δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά τους θερινούς μήνες τα αποτελέσματα έδειξαν μία σαφή μείωση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση στα δείγματα της άμμου. Το καλοκαίρι του 2010 η μείωση του βακτηριακού πληθυσμού μετά τη βροχόπτωση ήταν περίπου 75 % και το επόμενο καλοκαίρι η μείωση έφτασε το 81 %. Ο πληθυσμός των επιμέρους βακτηρίων που εξετάστηκαν μειώθηκε σε ουσιαστικά μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, κατά τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση.

Το γεγονός αυτό δείχνει το μέγεθος της επίδρασης της βροχόπτωσης στη μείωση του βακτηριακού φορτίου στην άμμο, αντίθετα με τα αποτελέσματα στα δείγματα του νερού όπου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του μικροβιακού φορτίου μετά τη βροχόπτωση. Έρευνα που διεξήχθη το 2011 αναφορικά με την επίδραση της βροχόπτωσης στους μικροβιακούς περιττωματικούς δείκτες σε δείγματα άμμου έδειξε ότι η μείωση που προκαλείται στους δείκτες αυτούς, οφείλεται στη μεταφορά των βακτηρίων μέσω υδάτινων καναλιών που δημιουργούνται στην άμμο και αποκολλούνται τα βακτήρια τα οποία τελικά καταλήγουν στη θάλασσα (Phillips et al., 2011).

Η δραματική μείωση του πληθυσμού των βακτηριακών ομάδων μετά τη βροχόπτωση εντείνεται και από την απουσία των λουομένων μετά τη βροχόπτωση, οι οποίοι αποτελούν όπως αναφέρθηκε παραπάνω το βασικότερο αίτιο αύξησης του μικροβιακού φορτίου στην άμμο.

4.3 Ποιοτικός προσδιορισμός βακτηρίων του γένους *Salmonella*

Βακτήρια του γένους *Salmonella* εντοπίστηκαν σε όλες τις δειγματοληψίες ανεξαρτήτως χρονικής περιόδου και περιβαλλοντικών συνθηκών (βροχόπτωση ή ξηρασία). Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό, κυρίως για μια παραλία όπως αυτή της Βάρκιζας που δέχεται μεγάλο αριθμό επισκεπτών.

Η ανίχνευση βακτηρίων *Salmonella* δείχνει πόσο εκτεθειμένη είναι η συγκεκριμένη παραλία σε αστικά λύματα που αποτελούν και την πηγή αυτού του βακτηρίου. Η παρουσία σαλμονέλας σε επιφανειακά ύδατα μπορεί να προκαλέσει σοβαρούς κινδύνους για την υγεία των λουομένων, καθώς προκαλεί ποικίλες ασθένειες στα έντερα και το στομάχι (σαλμονέλλωση).

Έρευνες που έχουν διεξαχθεί τα τελευταία χρόνια δείχνουν παρουσία βακτηρίων του γένους *Salmonella* ακόμα και σε παραλίες που έχουν λάβει το βραβείο "Γαλάζια Σημαία" και έχουν πληθυσμούς περιττωματικών βακτηρίων μέσα στα όρια που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση (Mansilha *et al.*, 2010). Το γεγονός αυτό δείχνει τη μη καταλληλότητα των υπάρχοντων μικροβιακών δεικτών στην ανίχνευση της σαλμονέλας, με ενδεχόμενες συνέπειες για την υγεία των λουομένων.

4.4 Βακτηριακή ποικιλότητα νερού μέσω DGGE

Η ανάλυση των ριβοτύπων που προέκυψαν με τη μέθοδο της DGGE έδωσε αρκετά ενδιαφέροντα στοιχεία. Όπως ήταν αναμενόμενο τα δείγματα με τη μεγαλύτερη ομοιότητα ριβοτύπων ήταν αυτά που προήλθαν από την ίδια δειγματοληψία, αλλά από διαφορετική θέση δειγματοληψίας. Δεν προέκυψαν ιδιαίτερες μεταβολές στον αριθμό των ριβοτύπων ανάμεσα στις θερινές και στις χειμερινές δειγματοληψίες, γεγονός που δείχνει ότι οι κυρίαρχες βακτηριακές ομάδες παραμένουν αριθμητικά τουλάχιστον ίδιες, ενώ παρατηρήθηκε η εξαφάνιση κάποιων ριβοτύπων κατά τη χειμερινή περίοδο, με την ταυτόχρονη εμφάνιση άλλων που απουσίαζαν από τις θερινές δειγματοληψίες.

Όσον αφορά στην επίδραση της βροχόπτωσης στον αριθμό των ριβοτύπων τα αποτελέσματα ήταν αντικρουόμενα. Κατά τις θερινές δειγματοληψίες παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των ριβοτύπων στα δείγματα νερού μετά τη βροχόπτωση. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην απουσία λουομένων μετά τη βροχόπτωση, οι οποίοι συμβάλλουν στην αύξηση της μικροβιακής ποικιλότητας στις δειγματοληψίες που έγιναν σε συνθήκες ξηρασίας.

Διαφορετικά ήταν τα αποτελέσματα κατά τις χειμερινές δειγματοληψίες, όπου δεν υπήρχε ο ανθρώπινος παράγοντας. Στη δειγματοληψία που έλαβε χώρα μετά τη βροχόπτωση εντοπίστηκαν 18 διαφορετικοί ριβότυποι στη θέση Α, ενώ στη θέση Γ 15. Στη δειγματοληψία σε συνθήκες ξηρασίας εντοπίστηκαν στη θέση Α, 13 ριβότυποι και στη θέση Γ, 14. Ο αυξημένος αριθμός ριβοτύπων μετά τη βροχόπτωση υποδηλώνει και μεγαλύτερη μικροβιακή ποικιλότητα. Το γεγονός αυτό δείχνει, όπως και αναμενόταν ότι απουσία του ανθρώπινου παράγοντα, η βροχόπτωση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μικροβιακής ποικιλότητας στο νερό.

Ο μικρός αριθμός διαφορετικών ριβοτύπων που ανιχνεύθηκαν σε σχέση με παρόμοιες έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε παρόμοια περιβάλλοντα είναι ενδεικτικός της χαμηλής ποιότητας των υδάτων και της μόλυνσης που υπάρχει στην παραλία της Βάρκιζας, καθώς είναι γνωστό ότι σε περιβάλλοντα με αυξημένη μόλυνση μειώνεται η μικροβιακή ποικιλότητα (Iannelli *et al.*, 2012).

Η χρώση με νιτρικό άργυρο (silver staining) αν και εμποδίζει την περαιτέρω ανάλυση των ζωνών που εμφανίζονται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης με υβριδισμό (Heuer & Smalla, 1997) δεν κατέστρεψε πλήρως το DNA με αποτέλεσμα να σταθεί εφικτή η απομόνωση DNA από το πήκτωμα ακρυλαμίδης, η ενίσχυση του 16S rDNA γονιδίου με τους εκκινητές F984-R1378 και η μοριακή ταυτοποίηση των ριβοτύπων που περιείχαν τη μεγαλύτερη ποσότητα DNA (§ 3.4.3).

Τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών με τον αλγόριθμο BLAST για τους ριβοτύπους της DGGE που έδωσαν θετικό σήμα στην ηλεκτροφόρηση μετά την PCR που προηγήθηκε, έδειξαν ότι οι κυρίαρχοι βακτηριακοί πληθυσμοί στα δείγματα του νερού που αναλύθηκαν έχουν τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια με τα εξής είδη: *Glaciecola pallidula*, *Glaciecola nitratireducens*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Alteromonas genovensis*, *Novosphingobium capsulatum*, *Nereida ignava*, *Ralstonia solanacearum*, *Oceanicola pacificus*, *Pseudoalteromonas espejiana*, *Alteromonas macreodii*, *Aestuariibacter halophilus*.

Τα στελέχη του γένους *Glaciecola* είναι ραβδόμορφα, αρνητικά κατά Gram, μη σποριογόνια βακτήρια. Είναι αποκλειστικά αερόβια χημειοετερότροφα βακτήρια, ψυχρόφιλα, ελαφρώς αλόφιλα και χρειάζονται θαλασσινό νερό για να αναπτυχθούν.

Το είδος *Pseudoalteromonas atlantica* ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά από ένα θαλάσσιο φύκος σε επιφανειακά παραλιακά ύδατα. Όπως και το *Pseudoalteromonas espejiana* που ανιχνεύτηκε πρώτη φορά το 1978, πρόκειται για ραβδόμορφα, αρνητικά κατά Gram χημειοοργανότροφα βακτήρια που εμφανίζονται σε ωκεανούς παγκοσμίως. Δημιουργεί βιομεμβράνες, ενώ αν και είναι παθογόνο για τα καβούρια, καθώς εκκρίνει εξωτοξίνες και τα καταστρέφει, δεν υπάρχει κάποια έρευνα που να δείχνει ότι είναι επιβλαβές για τον άνθρωπο.

Το *Alteromonas genovensis* πρόκειται για ένα νέο είδος (Vandecandelaere *et al.*, 2008). Τα στελέχη του είδους αυτού είναι ραβδόμορφα, αρνητικά κατά Gram, αρκετά αλόφιλα και ψυχροανθεκτικά, ενώ λίγα χρόνια πριν είχε χαρακτηριστεί ως ίδιο είδος με το *Alteromonas macreodii* καθώς εμφανίζουν πολλά κοινά στοιχεία στη φυσιολογία τους.

Το *Novosphingobium capsulatum* πρόκειται για αποκλειστικά θαλάσσιο αερόβιο είδος. Είναι ψυχρόφιλο, αρνητικό κατά Gram και παράγει μία κίτρινη χρωστική.

Το *Nereida ignava* πρόκειται για ένα θαλάσσιο αερόβιο α-πρωτεοβακτήριο που ανιχνεύτηκε πρώτη φορά το 2005 σε μία ισπανική παραλία κοντά στη Βαλένσια (Pujalte *et al.*, 2005). Είναι αρνητικό κατά Gram, αποκλειστικά αερόβιο, αλόφιλο και χημειοοργανότροφο είδος, που απαιτεί πολύπλοκα θρεπτικά υποστρώματα για να αναπτυχθεί σε καλλιέργεια.

Το *Ralstonia solanacearum* είναι αερόβιο, μη σποριογόνο, αρνητικό κατά Gram, φυτοπαθογόνο βακτήριο.

Το *Oceanicola pacificus* είναι ένα νέο είδος που ανιχνεύτηκε πρώτη φορά το 2009 από μεγάλο βάθος στον Ειρηνικό ωκεανό. Πρόκειται για ραβδόμορφα, αλόφιλα και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, θετικά σε αντίδραση καταλάσης και ελάχιστα θετικά σε οξειδάση (Yuan *et al.*, 2009).

Το *Aestuariibacter halophilus* είναι αρνητικό κατά Gram, θετικό στην αντίδραση οξειδάσης και καταλάσης βακτηριακό είδος. Τα στελέχη του είδους αυτού είναι ραβδόμορφα, αποκλειστικά αερόβια, χημειοτερότροφα, αλόφιλα και μεσόφιλα, ενώ ανιχνεύτηκε πρώτη φορά το 2004 σε παλιρροιακά νερά στην Κορέα (Yi *et al.*, 2004).

Γενικά Συμπεράσματα

1. Το βακτήριο του γένους *Enterococcus* αποδείχτηκε ο καλύτερος μικροβιακός δείκτης για τα δείγματα θαλασσίου νερού, ενώ το βακτήριο *E. coli* καλύτερος μικροβιακός δείκτης για τα δείγματα άμμου.
2. Μεγάλη ανθεκτικότητα του βακτηρίου *Enterococcus* sp. στην άμμο, γεγονός που το καθιστά αναξιόπιστο μικροβιακό δείκτη για τα δείγματα άμμου.
3. Σε συνθήκες ξηρασίας (απουσία βροχόπτωσης για 10 τουλάχιστον μέρες) ο βακτηριακός πληθυσμός στην παραλία της Βάρκιζας, σχεδόν πάντα, δεν ξεπερνά τα όρια της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την καταλληλότητα των υδάτων

4. Μείωση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού και των επιμέρους βακτηρίων που εξετάστηκαν, στα δείγματα άμμου, 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση.
5. Μεγάλη αύξηση του πληθυσμού των παθογόνων βακτηρίων (*Staphylococcus* sp.) και των μικροβιακών δεικτών (*E. coli*, *Enterococcus* sp.) στο νερό, 24 ώρες μετά τη βροχόπτωση, που ξεπέρασε κατά πολύ τα θεσπισμένα όρια από την Ευρωπαϊκή Ένωση για την καταλληλότητα των υδάτων.
6. Αμελητέα διακύμανση του μικροβιακού φορτίου ανάμεσα στις 3 θέσεις δειγματοληψίας στα δείγματα του νερού. Εντονότερη ήταν η διακύμανση στα δείγματα της άμμου.
7. Αύξηση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού στο νερό, παρουσία μεγάλου αριθμού λουομένων, κατά τις θερινές δειγματοληψίες.
8. Ο ανθρώπινος παράγοντας αποτελεί το βασικότερο αίτιο για την αύξηση του μικροβιακού φορτίου στην άμμο παραλιών αναψυχής
9. Μείωση του ολικού βακτηριακού φορτίου και του πληθυσμού τόσο των μικροβιακών δεικτών, όσο και των παθογόνων βακτηρίων κατά τους χειμερινούς μήνες στην άμμο και στο νερό.
10. Παρουσία του βακτηρίου *Salmonella* σε όλες τις δειγματοληψίες ανεξαρτήτως χρονικής περιόδου και περιβαλλοντικών συνθηκών (βροχόπτωση ή ξηρασία), με ενδεχόμενες συνέπειες για την υγεία των λουομένων.
11. Περιορισμένη η βακτηριακή ποικιλότητα στην παραλία της Βάρκιζας.
12. Οι κυρίαρχοι βακτηριακοί πληθυσμοί στα δείγματα του νερού που αναλύθηκαν έχουν τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια με τα εξής είδη: *Glaciecola pallidula*, *Glaciecola nitratireducens*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Alteromonas genovensis*, *Novosphingobium capsulatum*, *Nereida ignava*, *Ralstonia solanacearum*, *Oceanicola pacificus*, *Pseudoalteromonas espejiana*, *Alteromonas macreodii*, *Aestuariibacter halophilus*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdelzaher A.M., Wright M.E., Ortega C., Solo-Gabriele H.M., Miller G., Elmir S., Newman, X., Shih, P., Alfredo Bonilla, J., Bonilla, T. (2010) Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (3), 724–732.

Ackerman D. and S.B. Weisberg (2003) “Relationship between rainfall and beach bacterial concentrations on Santa Monica Bay beaches,” *Journal of Water & Health*, vol. 1, no. 2, pp. 85–89.

Bannerman R.T., Owens D.W., Dodds R.B., Hornewer N.J., (1993) “Sources of pollutants in Wisconsin stormwater,” *Water Science and Technology*, vol. 28, no. 3–5, pp. 241–259,.

Barwick R.S., Levy D.A., Craun G.F., Beach M.J., Calderon R.L. (2000) Surveillance for waterborne-disease outbreaks—United States, 1997–1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49: 1–37

Boehm A.B., Shellenbarger G.G., Paytan A. (2004) Groundwater discharge: Potential association with fecal indicator bacteria in the surf zone. *Environ. Sci. Technol.*, 8 (13), 3558–3566.

Bolton F.J., Surman S.B., Martin K., Wareing D.R.A., Humphrey T.J. (1999) Presence of *Campylobacter* and *Salmonella* in sand from bathing beaches. *Epidemiol. Inf.*, 122 (01), 7–13.

Brodie E.L., DeSantis T.Z., Joyner D.C., Baek S.M., Larsen J.T., Andersen G.L., Hazen T.C., Richardson P.M., Herman D.J., Tokunaga T.K., Wan J.M., Firestone M.K. (2006). Application of a high-density oligonucleotide microarray approach to study bacterial population dynamics during uranium reduction and reoxidation. *Appl Environ Microbiol* 72: 6288–6298

Burton G.A., Gunnison D., Lanza G.R. (1987) Survival of pathogenic bacteria in various freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (4), 633–638.

Cabelli V.J., Levin M.A., Dufour A.P., McCabe L.J. (1975) The development of criteria for recreational waters. In: Gameson ALH, editor. *Discharge of sewage from sea outfalls*. Oxford: Pergamon; 63-74

Craun G.F., Calderon R.F, Craun M.F. (2005) Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int J Environ Health Res* 15:243–262

de Oliveira A.J.F.C., Pinhata, J.M.W. (2008) Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Res.*, 42 (8-9), 2242–2250.

DeMarco D.R., Lim D.V. (2002) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in 10- and 25-Gram Ground Beef Samples with an Evanescent-Wave Biosensor with Silica and Polystyrene Waveguides. *J. Food Protection* 65: 596-602

Donaldson K.A., Griffin D.W., Paul J.H. (2002) Detection, quantitation and identification of enteroviruses from surface waters and sponge tissue from the Florida Keys using real-time RT-PCR. *Water Research* 36: 2505-2514

Dong X., Redd G. (2010) Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique *Bioresource Technology* 101: 1175–1182

Dorfman M. and Stoner N., (2007) *Testing the Waters: A Guide to Water Quality at Vacation Beaches*, Natural Resources Defense Council, New York, NY, USA,

Drees K.P., Neilson J.W., Betancourt J.L., Quade J., Henderson D.A. Pryor B.M. & Maier R.M. (2006) Bacterial Community Structure in the Hyperarid Core of the Atacama Desert, Chile. *Applied & Environmental Microbiology* 72, 7902-7908.

Dutka B.J., Shaarawi A.E., Martins M.T. (1987) North and South American studies on the potential of coliphage as a water quality indicator. *Water Research* 21: 1127-1134

Elmanama A. A., Fahd M. I., Afifi S., Abdallah S., Bahr, S. (2005) Microbiological beach sand quality in Gaza Strip in comparison to seawater quality. *Environ. Res.*, 99 (1), 1–10

Elmir S.M., Wright M.W., Abdelzaher A., Solo-Gabriele H.M., Fleming L.E., Miller G., Ribolovic M., Shih M.P., Pillai S.P., Cooper J.A., Quaye E.A. (2007) Quantitative evaluation of bacteria released by bathers in a marine water. *Water Res* 41:3–11

Fey A., Eichler S., Flavier S., Christen R., Hofle M.G., Guzman C.A. (2004) Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3618-3623

Fleisher J.M., Kay D., Salmon R.L., Jones F., Wyer M.D., Godfree A.F. (1996) Marine Waters Contaminated with Domestic Sewage: Nonenteric Illnesses Associated with Bather Exposure in the United Kingdom. *Am J Public Health.* Sept; 86(9): 1228-1234

Fong T., Lipp E.K. (2005) Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiol Mol Biol Rev.* Jun;69 (2): 357-371

Fukushima M., Kakinuma K., Kawaguchi R. (2002) Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *E. coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2779-2785

Ghinsberg R.C., Drasinover V., Sheinberg Y., Nitzan Y. (1995) Seasonal distribution of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio* species in Mediterranean coastal water and beaches: a possible health hazard. *Biomed. Lett.*, 51 (203), 151–159.

Goodwin K.D., Pobuda M. Performance of CHROMagar™ (2009) *Staph aureus* and CHROMagar™ MRSA for detection of *Staphylococcus aureus* in seawater and beach sand-Comparison of culture, agglutination, and molecular analyses. *Water Res.*, 43 (19), 4802–4811.

Graczyk T.K., Sunderland D., Tamang L., Shields T.M., Lucy F.E., Breysse N.P. (2007α) Quantitative evaluation of the impact of bather density on levels of human-virulent microsporidian spores in recreational water. *Appl Environ Microbiol* 73:4095–4099

Graczyk T.K., Sunderland D., Tamang L., Lucy F.E., Breysse P.N. (2007β) Bather density and levels of *Cryptosporidium*, *Giardia*, and human-virulent microsporidian spores in recreational bathing water. *Parasitol Res* 101:1729–1731

Griffin D.W., Lipp E.K., McLaughlin M.R., Rose J.B. (2001) Marine Recreation and Public Health Microbiology: Quest for the Ideal Indicator. *Bioscience* Oct; 51(10): 817-825

Griffith J.F., Cao Y., McGee C.D., Weisberg S.B. (2009) Evaluation of rapid methods and novel indicators for assessing microbiological beach water quality. *Water Research* 43: 4900-4907

Halliday, E., Gast R.J. (2011) Bacteria in Beach Sands: An Emerging Challenge in Protecting Coastal Water Quality and Bather Health *Environ. Sci. Technol.*, 45, 370–379

Haugland R., Sieftring S., Wymer L., Brenner K., Dufour A. (2005) Comparison of *Enterococcus* measurements in fresh water at two recreation beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. *Water Research* 39 (4): 559-568

He J., Jiang S. (2005) Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 71 (5): 2250-2255

Head I.M., Saunders J.R., Pickup R.W. (1998) Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microb Ecol.* Jan;35(1):1-21

Heaney, C. D., Sams, E., Wing, S., Marshall, S., Brenner, K., Dufour, A. P., Wade, T. J. Contact with beach sand among beachgoers and risk of illness. *Am. J. Epidemiol.* (2009), 170 (2), 164–172.

Henrickson S.E., Wong T., Allen P., Ford T., Epstein P.R. (2001) Marine Swimming-Related Illness: Implications for Monitoring and Environmental Policy. *Environ Health Perspect.* Jul;109(7): 645-650

Horman A., Rimhanen-Finne R., Maunula L., von Bonsdorff C.H., Torvela N., Heikinheimo A., Hanninen M.L. (2004) *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses, and indicator organisms in surface water in south-western Finland, 2000-2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 87-95

Iannelli R, Bianchi V, Macci C, Peruzzi E, Chiellini C, Petroni G, Masciandaro G. (2012) Assessment of pollution impact on biological activity and structure of seabed bacterial communities in the Port of Livorno (Italy). *Sci Total Environ.* 426:56-64

Järvinen A.K., Laakso S., Piiparinen P., Aittakorpi A., Lindfors M., Huopaniemi L., Piiparinen H., Mäki M. (2009) Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay. *BMC Microbiology* 9:161

Jin G, Jeng H.W., Bradford H., Englande A.J. (2005) Comparison of *E. coli*, enterococci, and fecal coliform as indicators for brackish water quality assessment. *Water Environment Research*, Volume 76, Number 3, pp. 245-255

Johnson E.K., Moranb D., Vinten A.J.A. (2008) A framework for valuing the health benefits of improved bathing water quality in the River Irvine catchment. *J. Environ. Manage.* 87: 633-638

Kay D., Fleisher J.M., Salmon R.L., Wyer M.D., Godfree A.F., Zelenauch-Jacquotte Z., Shore R. (1994) Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing; results from randomized exposure. *Lancet* 344(8927): 905–909

Kay, D., Crowther, J., Stapleton, C.M., Wyer, M.D., Fewtrell, L., Anthony, S., Bradford, M., Edwards, A., Francis, C.A., Hopkins, M., Kay, C., McDonald, A.T., Watkins, J., Wilkinson, J., (2008) Faecal indicator organism concentrations and catchment export coefficients in the UK. *Water Research* 42 (10-11), 2649-2661.

Kinzelman J., McLellan S.L., Daniels A.D., (2004) “Nonpoint source pollution: determination of replication versus persistence of *Escherichia coli* in surface water and sediments with correlation of levels to readily measurable environmental parameters,” *Journal of Water & Health*, vol. 2, no. 2, pp. 103–114.

Kleinheinz G.T., McDermott C.M., Hughes S., Brown A. (2009) Effects of Rainfall on *E. coli* Concentrations at Door County, Wisconsin Beaches *International Journal of Microbiology* Volume 2009, 9 pages

La Mantia R., Masciopinto C., Levantesi C., Tandoi D.(2008) Fate and transport of faecal contamination microbial indicators, pathogenic protozoa and *Campylobacter* in the artificially recharged fractured aquifer of Salento, Italy *Water Science & Technology* Vol 57 No 6 pp 849–856

Lavender J.S., Kinzelman J.L. (2009) A cross comparison of QPCR to agar-based on defined substrate test methods for the determination of *Escherichia coli* and enterococci in municipal water quality monitoring programs. *Water Research* 43: 4967-4979

Lee J., Deininger R.A. (2004) Detection of *E. coli* in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence. *Luminescence* 19: 31–36

Lee K., Veeranagouda Y. (2009) Ultramicrocells form by reductive division in macroscopic *Pseudomonas* aerial structures. *Environ Microbiol.* May;11 (5): 1117-1125.

Lindh, M. V., Riemann, L., Baltar, F., Romero-Oliva, C., Salomon, P. S., Granéli, E. and Pinhassi, J. (2013), Consequences of increased temperature and acidification on bacterioplankton community composition during a mesocosm spring bloom in the Baltic Sea. *Environmental Microbiology Reports*, 5: 252–262

Lofstrom C., Knutsson R., Axelsson C.E., Radstrom P. (2004) Rapid detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 69-75

Lubeck P.S., Wolffs P., On S.L.W., Ahrens P., Radstrom P., Hoorfar J. (2003α) Toward an international standards for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters*: assay development and analytical validation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5664-5669

Lubeck P.S., Cook N., Wagner M., Fach P., Hoorfar J. (2003β) Toward an international standards for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters*: validation in a multicenter collaborative trial. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5670-5672

Malorny B., Hoorfar J., Bunge C., Helmuth R. (2003) Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standards. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 290-296

Mansilha C.R., Coelho C.A., Reinas A., Moutinho A., Ferreira S., Pizarro C., Tavares A. (2010) *Salmonella*: The forgotten pathogen: Health hazards of compliance with European Bathing Water Legislation. *Marine Pollution Bulletin.* 60 (6): 819-826.

Marschall E., Jogler M., Henßge U. and Overmann J. (2010), Large-scale distribution and activity patterns of an extremely low-light-adapted population of green sulfur bacteria in the Black Sea. *Environmental Microbiology*, 12: 1348–1362

McLellan S. L., (2004) “Genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from urban rivers and beach water,” *Applied & Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 8, pp. 4658–4665.

Mendes B., Urbano P., Oliviera J.S. (1993) Preliminary characterization and proposal of microbiological quality standard of sand beaches. *Water Sci. Technol.*, 35 (11-12), 147–150.

Muscillo M., La Rosa G., Marianelli C., Zaniratti S., Capobianchi M.R., Cantiani L., Carducci A. (2001) A new RT-PCR method for the identification of reoviruses in seawater samples. *Water Res.* Feb; 35 (2): 548-556.

Muyzer G., Smalla K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 127-141.

Muyzer G., Hottenträger S., Teske A., Wawer C. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities (pp. 1-23). In: *Molecular Microbial Ecology Manual*.

Noble R.T., Weisberg S.B., Leecaster M.K. (2003) "Storm effects on regional beach water quality along the southern California shoreline," *Journal of Water & Health*, vol. 1, no. 1, pp. 23–31.

Noble R.T., Weisberg S.B. (2005) A review of technologies for rapid detection of bacteria in recreational waters. *J Water Health* Dec;3(4): 381-392

Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaird J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W. & Backhaus H. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 19, 5636-43.

Okabe S., Satoh H., Watanabe Y. (1999) In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* Jul;65(7):3182-3191

Panicker G., Myers M.L., Bej A.K. (2004) Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and gulf of Mexico water by real-time PCR. . *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 498-507

Papadakis J.A. Mavridou A., Richardson S.C., Lampiri M., Marcelou U. (1997) Bather-related microbial and yeast populations in sand and seawater. *Water Res.*, 31 (4), 799–804

Papiri S., Ciaponi C., Capodaglio A. (2003) "Field monitoring and evaluation of innovative solutions for cleaning storm water runoff," *Water Science and Technology*, vol. 47, no. 7-8, pp. 327–334,.

Pernthaler A., Amann R. (2004) Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Appl Environ Microbiol.* Sep;70(9):5426-5433.

Phillips M.C., Solo-Gabriele H.M., Reniers A.J.H.M., Wang J.D., Kiger R.T., Abdel-Mottaleb N. (2011) Pore water transport of enterococci out of beach sediments. *Marine Pollution Bulletin.*; 62(11):2293–2298.

Prüss A. (1998) Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. *Int J Epidemiol.* 27: 1-9

Pujalte M.J., Macián M.C., Arahal D.R., Ludwig W., Schleifer K.H., Garay E. (2005) *Nereida ignava* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic marine alpha-proteobacterium that is closely related to uncultured *Prionitis* (alga) gall symbionts *Int J Syst Evol Microbiol.* 55 (Pt 2):631-6.

Remoundou K., Koundouri P. (2009) Environmental Effects on Public Health: An Economic Perspective. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6: 2160-2178

Sampson R.W., Swiatnicki S.A., Osinga V.L., Supita J.L., McDermott C.M., Kleinheinz G.T. (2006) Effects of temperature and sand on *E. coli* survival in a northern lake water microcosm. *J. Water Health*, 4 (3), 389–394

Savichtcheva O., Satoshi O. (2006) Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. *Water Research* 40: 2463-2476

Schiff K.C., Morton J., Weisberg S. B. (2003) "Retrospective evaluation of shoreline water quality along Santa Monica Bay beaches," *Marine Environmental Research*, vol. 56, no. 1-2, pp. 245–253,

Scott T.M., Rose J.B., Jenkins T.M., Farrah S.R., Lukasik J. (2002) Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. *Appl Environ Microbiol.* Dec; 68(12): 5796-5803

Shibata T., Solo-Gabriele H.M., Fleming L.E., Elmir S. (2004) Monitoring marine recreational water quality using multiple microbial indicators in an urban tropical environment. *Water Research* 38: 3119-3131

Shuval H. (2003) Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. *J Water Health*. 1: 53-64

Silva A.M., Vieira H., Martins N., Granja A.T.S., Vale M.J., Vale F.F. (2010) Viral and bacterial contamination in recreational waters: a case study in the Lisbon bay area. *J Appl Microbiol*. 108: 1023-1031

Sinton L.W., Hall C.H., Lynch F.A., Davies-Colley R.J. (2002) Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *App. Environ. Microbiol*. 68: 1122-1131

Soge O.O., Meschke J.S., No D.B., Roberts M.C. (2009) Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from US West Coast public marine beaches. *J. Antimicrob. Chemother.*, 64 (6), 1148–1155.

Steets B.M., Holden A.P. (2003) A mechanistic model of runoff-associated fecal coliform fate and transport through a coastal lagoon. *Water Res* 37:589–608

Stevenson A.H. (1953) Studies of Bathing Water Quality and Health. *Am J Public Health* May; 43: 529-538

Steward M.H., Yates M.V., Anderson M.A., Gerba C.P., Rose J.B., DeLeon R., Wolfe R.L. (2002) Predicted public health consequences of body contact recreation on a potable water reservoir. *J Am Water Works Assoc* 94:84–97

Sunderland D., Graczyk T.K., Tamang L., Breysee P.N. (2007) Impact of bathers on levels of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* cysts in recreational beach water. *Water Res* 41:3483–3489

Tang C., Madigan M., Lanoil B. (2013) Bacterial and Archaeal Diversity in Sediments of West Lake Bonney, McMurdo Dry Valleys, Antarctica *Applied and Environmental Microbiology* 79:1034 –1038

Tissari P., Zumla A., Tarkka E., Mero S., Savolainen L., Vaara M., Aittakorpi A., Laakso S., Lindfors M., Piiparinen H., Mäki M., Carder C., Huggett J., Gant V. (2010) Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet* 375: 224–230

Vallaeyys T., Top E., Muyzer G., Macheret V., Laguerre G., Rigaud A. & Soulas G. (1997) Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in rhizobia and methanotrophs. *FEMS Microbial Ecology* 24, 279-285.

Vandecandelaere I., Nercessain O., Segaeert E., Achouack W., Mollica A., Faimali M., De Vos P. (2008). *Alteromonas genovensis* sp. nov., isolated from a marine electroactive biofilm and emended description of *Alteromonas macleodii* Baumann et al. 1972 (Approved Lists 1980). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(11), 2589–2596

Wade T.J., Calderon R.L., Sams E., Beach M., Brenner K.P., Williams A.H., Dufour A.P. (2006) Rapidly Measured Indicators of Recreational Water Quality Are Predictive of Swimming-Associated Gastrointestinal Illness. *Environ Health Perspect.* Jan; 114(1): 24-28

Wade T.J., Pai N., Eisenberg N.S., Colford Jr J.M. (2003) Do U.S. Environmental Protection Agency Water Quality Guidelines for Recreational Waters Prevent Gastrointestinal Illness? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect.* Jun;111(8):1102-9

Wiedenmann A., Krüger P., Dietz K., López-Pila J.M., Szewzyk R., Botzenhart K. (2006) A Randomized Controlled Trial Assessing Infectious Disease Risks from Bathing in Fresh Recreational Waters in Relation to the Concentration of *Escherichia coli*, Intestinal Enterococci, *Clostridium perfringens*, and Somatic Coliphages. *Environ Health Perspect.* Feb;114 (2): 228-236

World Health Organization. (2003). Guidelines for safe recreational water environments. Vol.1, Coastal and Fresh Waters. World Health Organization, Geneva, Switzerland

Wu C.F., Valdes J.J., Bentley W.E., Sekowski J.W. (2003) DNA microarray for discrimination between pathogenic 0157:H7 EDL933 and non-pathogenic *Escherichia coli* strains. *Biosensors and Bioelectronics* 19 (1): 1-8

Yamahara K.M., Layton B.A., Santoro A.E., Boehm A.B. (2007). Beach sands along the California coast are diffuse sources of fecal bacteria to coastal waters. *Environ. Sci. Technol.* 41:4515-4521.

Yi H., Bae K.S., Chun J. (2004). *Aestuariibacter salexigens* gen. nov., sp. nov. and *Aestuariibacter halophilus* sp. nov., isolated from tidal flat sediment, and emended description of *Alteromonas macleodii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* . 54:571-576.

Yuan J., Lai Q., Wang B., Sun F., Liu X., Du Y., Li G., Gu L., Zheng T., Shao Z. (2009). *Oceanicola pacificus* sp. nov., isolated from a deepsea pyrene-degrading consortium. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1158–1161.

Zhou J., Liu X., (2009). Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol.* 26 (8): 770-5.

Μεϊντάνης Χ.Κ. (2005) Μελέτη ποικιλότητας προκαρυωτικών οργανισμών (Αρχαίων και Βακτηριακών προκαρυωτικών οργανισμών) στη Σαντορίνη. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1A-F984

GAGATRAATAGTTCCCTTCGGGGACCYAGAKACAGGTGCTGCATGGCTG
TCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCCTTWCCTTKGGCACTYYWATGAAACYG
GCSSKGRMTAACCGGAAGAAAGKGGKGACKAMSTCCAGTCMTCMTGGC
CCTTAMSAGTATGGCTACMCACGTGSTACAATGGATGGTACMAAGGGAT
GCAASCCTGCRAAGGTWATCGGACCCCTTARAGCCMTTCGTATYCCGG
ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCKSTAGTAATCGTA
RGTCASCATACTACKGTGAATACSGTCCCGGGCCTTGTACACACCG

1B-F984

GGASYCGTSGTGCWTATTTAGAGWAGATAGTTCCCTTCGGGGACGCAG
TGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTGAGTCTCGTGTCTGTGAGATGTTCCGT
TAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACATCCCTAGTTGCCAGCAGTTCGG
CTGGGGCACTCTATGGAACTGCCCCGTGATAAGCGGGAGGAAGGTGTGG
ATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGTTGGGCTACACACGTGCTA
CAATGGTAGTGACAATGGGTAAATCCCAAAAAGCTATCTCAGTTCGGATT
GGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTA
ACAGCATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGACC

2A-F984

GAGATGAATAGTGTCCCTTCGGGAACCTAGATACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCCTTAAGTTGGGCACTCTAAGGAGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCMAGTCATCATGG
CCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGA
TGCAAGCCTGCGAAGGTAAGCGGACCCCTTAAAGCCATTCGTAKTCCGG
ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTA
RGTCAGCATACTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGA

2B-F984

GGATAGGAAGTTTTMGAGATGAGTKGTGCCTTCGGGAACCYGTGAGACA
GGTGCTGCATGGCTGTCTGTGAGTCTCGTGTGAAATGTTGGGTAAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGG
GAACTCAAAGGARACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAA
AGTGCGTCTGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG
GAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGA

3A-f984

TTTTCAGAGATGAATTGGTGCCTTCGGGAATCTAGATACAGGTGCTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCCAGCCTTAAGTTGGGCACTCTAAGGA
GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATC
ATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAA
GGGATGCAAGCCTGCGAAGGTAAGCGGACCCCTTAAAGCCATTCGTAGT
CCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAA
TCGTAGGTCAGCATACTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGA

3B-F984

CCGGCGGACTATTTAGAGWGATTATGTGCCTTCGGGAACCTGWGWGAC
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTYGTGAAATGTTGGGTAAAG
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTRTCCTTWGTTGCCAGCSKTCCGKYSGG
GAACTYAAAGGAAACKGCCGKGATAAACTGRAGRAAGGKGGGRATRAC
KTCAAGTCTTCWTGGCCCTTACAACMAGGGYTACMCACKTGCTACAATG
GYGSATACAAAGRWRACCRACCTCCCAAGAGKAACCGAACCYYTTAAAG
TGKYCTAATYCCGRATTGAAKTCTGCAMCTCAACTCCTTGAATYCGAAW
TCSYTAGWAWTCKWGGATMACAWTGYCMCGGKAAAWMCTTTCCCGGS
CYTTGTACMCCCGRA

4A-F984

TTCTAGAGATRGATAGTTCCCTTCGGGAACTCAGAGACAGGTGCTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTRTCCTTAKTTGCCAGCATTTTCGKKTGGGMACTCMATGG
AAACTGCCCCGGGSTAAACGGRAGGAAGGGGGGRATGAMSYCAGTYCTT
CMGGGCCTTTAMWGKTTGGGTTACCCCRKGGCTYMAAGGGTAGMAACA
AKGGGTAAATCCCYTTGAGSTATCTCGSAAWCCATWAAGRRTGCKYAT
CCCCCCTTGAARTCGGAATCCCTATCCATCGAGTKYCAAAATGWCGWG
ATSAMTASKTTCCCARGYCTTGTA AAAACCGTYCCSGGSCTTGTGYACAC
CGGGA

5A-F984

TTCAGAGATRGATAGTTCCCTTCGGGGAYCCAGAGACAGGTGCTGCATG
GCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTSGGTAAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCTTGTCCYTAGTTGCCAGCMTTWCGKTKGGSMYYCWATGA
AAMYGGCCCKGRATAACCGGAAGAAAGGGGKGAMTGA CTCCARTCCTC
CTGGSCCTTTACAGTATGGCTWCCCMCCTGSTWMMATGGATGGTAMMA
AKGGATKMAWCCCTGCAAASKWTMTCRGACCCCWWTWGAGCCCTTCRTA
TYCCSGATTGGARTCYGCAAYTCCWCTCCATGAAGTCGGAATCKGTAGY
RATCRWAAGTCWCCMKACTACGGTGAATACSGTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGA

6A-F984

GATCCGTGGTTCCCTTCGGGRACGCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTCGWGAGATGTTCCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCA
ACCCACACCCCTAGTTGCCAGCAGTTCGGCTGGGCACTCTATGGGAACT
GCCCCGTGATAAGCGGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCTTCATGG
CCCTTACGGGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAAGTACAGTGGGT
TAATCCCCAAAAC TTGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCC
CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGAACAGCATGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGA

7A-F984

CATTAKTTGCTCGAAAGAGATMGRGGACACRGGTGCTGCGTGTGTGTCS
YCATCTCKSGTCGWGAGATGTGKGGKTTAARYCCCMCMMGAGCGCACC
CCTTGTCTCTATTTGCTACKAAAGGGCACTCTARAGAGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCWTGKCCCTTATT
WTAGGGCTTCWACMTCATACMYTGSTGCR TTCGTAGGGTTGCCWAGCC
SCGAGGTGKAGCTAATCWCMTAAAATGCATCMKATYCCGGATTYAGTCT
GCWACTCSACTACRYSWGCTGGAATYTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCCG
WGKTGAATTWGTTCCTGGTCCTTG

10A-F984

GATGGATAGTGTCCCTTCGGGAACTCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTATCCTTATTTGCCAGCAKTTMGKYTGGMAMTYTATGGAAAMTG
SCCGGGATAAACGGGARGAAGGGGGGGGATGA ASTCAAGTCCTCTTGGC
CCTTAMSGATTGGGKTAACCCCSGGSTACAAKGGKYGTGAMAATGGGTS
AATCCCCTTGATCTATCTCATTTCS CATWGAGATCGGCWCMTCSYCCCS
TTGAAASCGYAAWCCCCARCACTCKGGTAACAGAATGKCKMGRTGAATK
CWTTCCCGGGCCTTGTAMACAWACTTTCCCGYSYTTTGMACACMCCGG
GW

13A-F984

ATGGTTTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGATACAGGTGCTGCATGGCTGTCTG
TCAGCTCGTGTTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CCTATCCTTAGTTGCTAGCAGGTAATGCTGAGAACTCTAAGGAGACTGC
CGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCC
CTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGTGCTG
CGAACTCGCGAGAGTAAGCGAATCACTTAAAGTGCGTCTAGTCCGGAT
TGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCRT
ATCAGAATGAYGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGA

16A-F984

AGATGGATTAGGTGTCTTCGGGACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTGTCTTAGTTGCCAKCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCC
GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCC
TTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGSATGTACAGAGGGAAGC
GAGACYGTGAWGTGGAGCGGACCCCTTAAAGMMTGTCGTAGTCCGGAT
TGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAG
GTCAGAATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGARAA

17A-F984

ATGGRTTGGTGCTTCGGGACTCWGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTG
CAGCTYGTGCCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTGTCCTTAGTTGCCAKCATTTAGTTGGGCACTYTAAGGAGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTT
ACGTGYAGGGCTACACACGTGCTACAATGGKAGGTACAGAGGGKSGCG
AGACCGTGARGTGGAGCGRACCCCTTAAAGCMTGTCTAGTCCGGATT
GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGG
TCAGAATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGA