ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΝΕΡΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΑΝΑΠΤΥΧΘΟΥΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΠΗΓΩΝ-ΓΕΩΤΡΗΣΕΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ ΓΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΖΗΣΗ ΜΑΡΙΑ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Απρίλιος 2023

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΟ ΝΕΡΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΑΝΑΠΤΥΧΘΟΥΝ ΣΕ ΝΕΡΟ ΠΗΓΩΝ-ΓΕΩΤΡΗΣΕΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ ΓΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Δημητρέλλου Δήμητρα

Το όνομα του επιβλέποντος εδώ

Σακαντάνη Ελένη

Το όνομα του μέλους της επιτροπής εδώ

Ηρειώτου Ευφημία

Το όνομα του μέλους της επιτροπής εδώ

«Δηλώνω υπεύθυνα ότι η διπλωματική εργασία είναι εξ' ολοκλήρου δικό μου έργο και κανένα μέρος της δεν είναι αντιγραμμένο από έντυπες ή ηλεκτρονικές πηγές, μετάφραση από ξενόγλωσσες πηγές και αναπαραγωγή από εργασίες άλλων ερευνητών ή φοιτητών. Όπου έχω βασιστεί σε ιδέες ή κείμενα άλλων, έχω προσπαθήσει με όλες μου τις δυνάμεις να τα προσδιορίσω σαφώς μέσα από την καλή χρήση αναφορών ακολουθώντας την ακαδημαϊκή δεοντολογία και την αποφυγή λογοκλοπής».

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Δημητρέλλου Δήμητρα για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές που μου έδωσε, καθώς και για την κατανόηση και τον χρόνο που αφιέρωσε μέχρι να ολοκληρωθεί η πτυχιακή μου. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον Παναγιώτη Βελλή, Διευθυντής Χημείου στο εργοστάσιο Κορπη, για όλη την βοήθεια που μου πρόσφερε δίνοντας μου υλικό για να πραγματοποιήσω την πειραματική μου εργασία. Ακόμα, ευχαριστώ το προσωπικό του εργαστηρίου της εταιρείας για την εμπιστοσύνη που μου έδωσαν αφήνοντας με να πραγματοποιήσω εκεί την πειραματική διαδικασία της πτυχιακής μου, χωρίς να φύγουν στιγμή από δίπλα μου και με βοήθησαν να ολοκληρώσω το πείραμα με επιτυχία. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την συμπαράσταση και την υπομονή τους σε όλη τη διάρκεια αυτή της εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το θέμα της παρούσας πτυχιακής εργασίας αφορά τους μικροοργανισμούς που είναι πιθανό να αναπτυχθούν στο νερό ανθρώπινης κατανάλωσης, καθώς και τους τρόπους ταυτοποίησής τους. Αφορμή για την πτυχιακή αυτή υπήρξε η εκπόνηση της πρακτικής μου άσκησης στο εργοστάσιο νερού της Κορπή. Αρχικά αναφέρονται γενικές πληροφορίες για το νερό, τα χαρακτηριστικά του και τον ρόλο του στη Γη. Επίσης, αναγράφονται οι κατηγορίες του νερού και συγκεκριμένα του πόσιμου νερού, όπου επικεντρώνεται στο εμφιαλωμένο νερό. Στη συνέχεια επισημαίνονται οι κατηγορίες που χωρίζεται σύμφωνα με τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης το εμφιαλωμένο νερό, δίνοντας προσοχή στο φυσικό μεταλλικό νερό. Ακόμα αναφέρονται τα χαρακτηριστικά του φυσικού μεταλλικού νερού, καθώς και οι παράγοντες που τα επηρεάζουν. Για τον λόγο αυτό αναφέρονται οι κατηγορίες μικροοργανισμών που μπορεί να βρεθούν στο πόσιμο νερό, όπως και οι μικροβιολογικοί έλεγχοι που πραγματοποιούνται σε αυτό για την εγκυρότητα της καθαρότητάς του. Στη συνέχεια περιγράφονται οι αναλύσεις που γίνονται στο νερό μιας πηγής, για να ελέγξουν την πιθανότητα μόλυνσής του. Τέλος, στο πειραματικό μέρος αυτής της πτυχιακής αναλύονται οι μέθοδοι Pour-plate και διήθησης μέσω μεμβρανών, περιγράφεται ο εξοπλισμός και οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν καθώς και τα αποτελέσματα.

Λέξεις – κλειδιά: Νερό, Πόσιμο νερό, Εμφιαλωμένο νερό, Φυσικό μεταλλικό νερό, Κατηγορίες μικροοργανισμών, Μέθοδος Pour-plate, Μέθοδος διήθησης μέσω μεμβράνης

ABSTRACT

This thesis is about the microorganisms that are likely to found in water for human consumption, as well as their identification. Motive of this thesis was my practical training at the Korpi. At first general information about water, its characteristics and its role on Earth are mentioned. Also, the categories of water, specifically drinking water, where it focused on bottled water are listed. Then is pointing out the categories into which bottled water is divided according to European Union legislation, giving preference to natural mineral water. Furthermore, the characteristics of natural mineral water, as well as the factors that affect them are mentioned. Thence the categories of microorganisms that can be found in the water, as well as the microbiological tests carried out are mentioned. Subsequently, there is a description of the analysis that are carried out on a spring water. Finally, the experimental part of this thesis is elaborated the Pour-plate and membrane filtration methods that were used, the equipment is described and the results are presented.

Keywords: Water, Drinking water, Bottled water, Natural mineral water, Microorganisms, Pour-plate method, Membrane filtration method

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο Σελίδα

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ……..1
ΕΝΟΤΗΤΑ 1: Νερό……3
1.1.Ορισμός νερού 3
1.2.Μόριο νερού 3
1.3.Μορφές του νερού 5
1.4.Υδρολογικός κύκλος.....6
1.5.Πόσιμο νερό……...8
1.6.Υδροφόροι ορίζοντες……...10
1.7.Τα υδάτινα συστήματα και οι υδρόβιοι μικροοργανισμοί……...11
ΕΝΟΤΗΤΑ 2: Κατηγορίες πόσιμου νερού……15
2.1.Νερό δικτύου……15
2.2.Εμφιαλωμένο……15
2.2.1.Επιτραπέζιο νερό……...15
2.2.2.Νερό πηγής……16
2.2.3.Φυσικό μεταλλικό νερό……16
ΕΝΟΤΗΤΑ 3: Τα χαρακτηριστικά του φυσικού μεταλλικού νερού…….17
ΕΝΟΤΗΤΑ 4: Παράγοντες που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά του φυσικού μεταλλικού νερού……...19
4.1.Τοξικές ουσίες……..19
4.2.Φυσικοχημικοί παράμετροι……..20
4.3.Μικροβιολογικές παράμετροι……...21
ΕΝΟΤΗΤΑ 5: Παθογόνοι μικροοργανισμοί……..22
5.1.Βακτήρια……..22
5.2.Ιοί……..24
5.3.Μύκητες……25
5.4.Πρωτόζωα…….....27
ΕΝΟΤΗΤΑ 6: Μέθοδοι ανίχνευσης και καταμέτρησης μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν στο νερό……28
6.1.Μικροβιολογικός έλεγχος……29

II. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ……32
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ……..32
Σκοπός και σχεδιασμός έρευνας……32
Μεταχείριση δειγμάτων πριν την εφαρμογή των μεθόδων απομόνωσης και καταμέτρησης των μικροοργανισμών……32
ΕΝΟΤΗΤΑ 7……..34
7.1.Εξοπλισμός και απαραίτητα υλικά……...34
7.1.1.Εξοπλισμός……34
7.1.2.Προετοιμασία δειγμάτων……...35
7.1.3.Υλικά και αντιδραστήρια……..36

7.2.Πειραματική διαδικασία……...36
7.2.1.Παρασκευή θρεπτικού υλικού……...36
7.2.2.Δημιουργία καλλιεργειών……37
7.2.3.Επώαση……39
7.2.4.Καταμέτρηση αποικιών……39
7.3.Χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων……...40
7.3.1.Y.E.A. [Yeast Extract Agar]……40
7.3.2.O.G.A. [Oxytetracycline Glucose Agar]……...41
7.3.3.P.S.A. [Pseudomonas Selective Agar]……..42
7.3.4.Slanetz and Bartley Medium agar……44
7.3.5.C.C.A. [Chromogenic Coliform Agar]……..45
7.3.6.T.S.C. [Tryptoe Sulfite Cycloserine agar]……46

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ……...49

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ 56
ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ……...58
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 59

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας Σελίδα

Πίνακας 1. Επιτρεπτά όρια φυσικοχημικών παραμέτρων 20
Πίνακας 2. Επιτρεπτά όρια μικροβιολογικών παραμέτρων σύμφωνα με την Ε.Ε. 21
Πίνακας 3. Αποτελέσματα μετρήσεων Coliforms 49
Πίνακας 4. Αποτελέσματα μετρήσεων Escherichia coli 49
Πίνακας 5. Αποτελέσματα μετρήσεων Enterococci..... 50
Πίνακας 6. Αποτελέσματα μετρήσεων Pseudomonas aeruginosa 51
Πίνακας 7. Αποτελέσματα μετρήσεων Moulds……...52
Πίνακας 8. Αποτελέσματα μετρήσεων Yeasts……53
Πίνακας 9. Αποτελέσματα μετρήσεων Total Count 36 ºC (1 mL)……..53
Πίνακας 10. Αποτελέσματα μετρήσεων Total Count 22 ºC (1 mL)……54
Πίνακας 11. Αποτελέσματα μετρήσεων Total Count 36 ºC (100 mL)……54
Πίνακας 12. Αποτελέσματα μετρήσεων Clostridium……..55
Πίνακας 13. Όρια μικροοργανισμών από το P-test……57

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα Σελίδα

Εικόνα 1. Το μόριο του νερού....3
Εικόνα 2. Υδρολογικός κύκλος....6
Εικόνα 3. Επωαστές....35
Εικόνα 4. Εστία θέρμανσης....37
Εικόνα 5. Χωνιά μικροβιολογίας....38
Εικόνα 6. Εσοχή στα χωνιά μικροβιολογίας....38
Εικόνα 7. Λαβίδα μέσα σε οινόπνευμα....38
Εικόνα 8. Μεμβράνη νιτρικής κυτταρίνης....38
Εικόνα 9. Υδατόλουτρο 25 ºC....46
Εικόνα 10. Υδατόλουτρο 72 ºC....46
Εικόνα 11. Αποικία Escherichia coli σε μικροσκόπιο....50
Εικόνα 12. Αποικίες Pseudomonas υπό φθορισμό....51
Εικόνα 13. Αποικίες Total Count....54

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως είναι γνωστό σε όλους μας, το νερό είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για κάθε ζωντανό οργανισμό στον πλανήτη μας. Κυρίως οι ζωικοί και φυτικοί μικροοργανισμοί που εξαρτώνται ολοκληρωτικά από το νερό. Ο τρόπος που επιδρά το νερό είναι καθοριστικός ακόμα και στη διαμόρφωση του καιρού, καθώς και στην τελική μορφή του εδαφικού ανάγλυφου της Γης μέσω διεργασιών, όπως η διάβρωση [Χαντζόπουλος, 2020].

Ακόμα το νερό είναι βασικός συντελεστής στην οικονομία μιας χώρας, διότι το νερό είναι αναγκαίο για τη ζωή ανθρώπων και ζώων, για τη γεωργική παραγωγή, τη βιομηχανική και τουριστική ανάπτυξη. Αναλόγως τον πληθυσμό, το κλίμα και από το επίπεδο της οικονομικής και κοινωνικής ανάπτυξης που την χαρακτηρίζει, αλλάζουν και οι ανάγκες κάθε περιοχής για νερό. Η γεωργική δραστηριότητα στην Ελλάδα έχει την περισσότερη κατανάλωση νερού, ενώ η οικιστική ανάπτυξη ακολουθεί μετά. Επίσης πρώτη σε ποσοστά κατανάλωσης νερού έρχεται η γεωργία και στις νότιες χώρες της Ευρώπης. Στην κεντρική Ευρώπη μεγάλα ποσοστά νερού καταναλώνονται για παραγωγή ενέργειας και στις περισσότερες βόρειες ευρωπαϊκές χώρες μεγάλα ποσοστά νερού χρησιμοποιούνται από την βιομηχανία. Η συνολική κατανάλωση του νερού ξεκινά από 200 m^3 ανά κάτοικο ανά έτος και φτάνει σε περισσότερα από 800 m^3 ανά κάτοικο ανά έτος [Λαζαράκη & Νεντέλκε, 2008]].

Όμως όπως αναφέραμε το νερό είναι απαραίτητο για την επιβίωση των ζωντανών οργανισμών, όπου σε αυτούς ανήκει και ο άνθρωπος. Το νερό ο άνθρωπος το καταναλώνει, είτε μέσω των τροφίμων, είτε στην υγρή του κατάσταση. Όταν το

παραλαμβάνει ως πόσιμο νερό, υπάρχει περίπτωση να έχει κάποια επιμόλυνση. Σπάνια λοιπόν το πόσιμο νερό, ανάλογα με το περιβάλλον που βρίσκεται, μπορεί να μολυνθεί από μικροοργανισμούς, οι οποίοι είναι μη παθογόνοι και δεν εγκυμονούν κάποιον κίνδυνο για τον άνθρωπο, αλλά μπορεί να είναι και παθογόνοι και να έχουν επιπτώσεις στην υγεία του [Λαζαράκη & Νεντέλκε, 2008].

Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με τους μικροοργανισμούς που μπορούν να ~~αναπτυχθούν~~ υπάρχουν στα νερά και συγκεκριμένα στο φυσικό μεταλλικό νερό Κορπή που βρίσκεται στα Ακαρνανικά Βουνά, έναν τόπο πλούσιο σε υδάτινους πόρους.

Τέλος να σημειωθεί ότι στο εμφιαλωμένο νερό συνήθως δεν υπάρχει κάποια επιμόλυνση από το ίδιο το νερό, αλλά μπορεί να αποκτήσει από διάφορους παράγοντες κατά την εμφιάλωση του μέχρι και την αποθήκευση του πριν καταναλωθεί.

ΕΝΟΤΗΤΑ 1

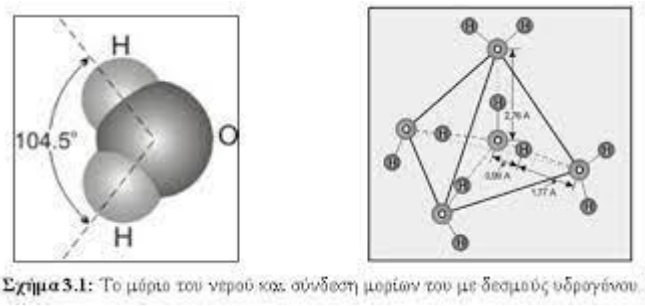
Νερό

1.1. Ορισμός νερού

Η τυπική ονομασία, σύμφωνα με την IUPAC, είναι «(μον)οξειδάνιο», όμως μπορεί να χρησιμοποιείται κανονικά και η λέξη «νερό» ή η αντίστοιχη λέξη κάθε γλώσσας. Βέβαια η ονομασία οξειδάνιο χρησιμοποιείται κυρίως για «μητρικό» μονοπυρηνικό «μονοξείδιο του διυδρογόνου» παρόλο που διευρύνεται θεωρητικά και σε «θυγατρικές» ενώσεις. Αυτή η ονομασία δεν μπορεί να δοθεί στο νερό, γιατί ονομάζεται ήδη έτσι το τετραϋδροπυράνιο [Βικιπαίδεια, 2018].

Έτσι για το νερό δίνεται μια πιο απλή συστηματική ονομασία και είναι «οξείδιο του υδρογόνου», όπως και «μονοξείδιο του διυδρογόνου», χωρίς όμως η δεύτερη να ανήκει στις ονομασίες που δίνονται από την IUPAC [Βικιπαίδεια, 2018].

1.2. Μόριο νερού



Εικόνα 1. Το μόριο νερού (πηγή 3-1.gif (500×226) (auth.gr))

Αρχικά ο μοριακός τύπος του νερού είναι H_2O. Σε ένα μόριο νερού, τα έξι ηλεκτρόνια σθένους του οξυγόνου υβριδοποιούνται σε τέσσερα sp^3 τροχιακά, τα οποία είναι μεγεθυμένα στις γωνίες ενός εικονικού, παραμορφωμένου τετράεδρου. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί O-H σχηματίζονται από δύο υβριδικά τροχιακά, με γωνία δεσμού 105 μοίρες για H-O-H, που συγκρατούν τα αδεσμικά ζεύγη ηλεκτρονίων. Οι

ομοιοπολικοί δεσμοί O-H έχουν μερικό (40%) ιοντικό χαρακτήρα, λόγω του ιδιαιτέρως ηλεκτραρνητικού οξυγόνου [Belitz, Grosch & Schrieberle, 2018].

Μέσω των δεσμών υδρογόνου κάθε μόριο νερού συνδέεται σε τετράεδρο με άλλα τέσσερα μόρια νερού. Τα δύο μη κοινά ηλεκτρονιακά ζεύγη του οξυγόνου έχουν τον ρόλο του δέκτη του δεσμού υδρογόνου (δεσμού-Η) και τα τροχιακά του δεσμού Η-Ο έχουν το ρόλο του δότη του δεσμού-Η. Η ενέργεια που χρειάζεται για να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός αυτού του δεσμού-Η είναι περίπου 25 KJ*mole^{n} [Belitz, Grosch & Schrieberle, 2018].

Η διασύνδεση σε ένα τρισδιάστατο δίκτυο, το οποίο σταθεροποιείται από γέφυρες-Η γίνεται επιτρεπτή εξαιτίας της ταυτόχρονης παρουσίας δύο περιοχών δέκτη και δύο περιοχών δότη. Για άλλα μικρότερα μόρια αυτή η δομή που εξηγεί τις ειδικές φυσικές ιδιότητες του νερού είναι ασυνήθιστη. Για παράδειγμα οι αλκοόλες και οι ενώσεις με ισοηλεκτρικά δίπολα σχεδόν ίδια με εκείνα του νερού πραγματοποιούν μόνο γραμμικές ή δυσδιάστατες διασυνδέσεις [Belitz, Grosch &Schrieberle, 2018].

Μέσω των δεσμών υδρογόνου μεταφέρεται η πόλωση των δεσμών Η-Ο και εκτείνεται σε πολλούς δεσμούς. Οπότε όσο συνδέονται περισσότερα μόρια αυξάνεται η διπολική ροπή ενός συμπλόκου, το οποίο αποτελείται από μεγάλο αριθμό μορίων νερού και είναι πολύ πιο υψηλή από την διπολική ροπή ενός μεμονωμένου μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διηλεκτρική σταθερά του νερού να είναι υψηλή και να ξεπερνά την τιμή που υπολογίζεται σύμφωνα με την διπολική ροπή ενός μεμονωμένου μορίου. Κατά μήκος των γεφυρών-Η πραγματοποιείται η μεταφορά πρωτονίων. Το πρωτόνιο θα καταπέσει στο τροχιακό του μη κοινού ζεύγους ηλεκτρονίων του νερού, είτε αυτό προέρχεται από την διάσπαση νερού είτε από ένα οξύ [Belitz, Grosch & Schrieberle, 2018].

Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα ενυδατωμένο ιόν H_3O^+ με έναν ισχυρό δεσμό-Η. Ένας αντίστοιχος μηχανισμός ισχύει και στις μεταφορές ιόντων OH^-, οι οποίοι πραγματοποιούνται επίσης κατά μήκος των γεφυρών-Η [Belitz, Grosch & Schrieberle, 2018].

Με δεδομένο ότι η κίνηση ενός πρωτονίου από ένα οξυγόνο στο επόμενο γίνεται πολύ γρήγορα, η κινητικότητα των πρωτονίων αυτών είναι 4-5 φορές πιο μεγάλη από την κινητικότητα όλων των άλλων ιόντων, εκτός από την σταδιακή μεταφορά OH^- μέσα στη δομή, της οποίας η ταχύτητα ανταλλαγής είναι μικρότερη από αυτή ενός πρωτονίου κατά 40% [Belitz, Grosch & Schrieberle, 2018].

Οι γέφυρες-Η εκτείνονται σε μεγαλύτερη σφαίρα στον πάγο σε σχέση με το νερό και η κινητικότητα των πρωτονίων είναι κατά 100 φορές υψηλότερη στον πάγο απ' ότι στο νερό [Belitz, Grosch & Schrieberle, 2018].

1.3. Μορφές του νερού

Το νερό στη φύση βρίσκεται με διαφορετικές μορφές. Οι μορφές αυτές είναι τρεις και συγκεκριμένα είναι η υγρή, η στερεή και η αέρια. Το νερό σε υγρή φάση βρίσκεται στους ωκεανούς, στις λίμνες, στα ποτάμια και στα ρυάκια. Τα νέφη και οι υδρατμοί είναι η αέρια μορφή του νερού στο περιβάλλον. Ακόμη το νερό σε στερεή μορφή βρίσκεται στο χιόνι, στο χαλάζι και γενικότερα στον πάγο, όπου το νερό παίρνει αυτή τη μορφή όταν βρίσκεται σε θερμοκρασία 0 ºC. Η βροχή, το χιόνι και το χαλάζι ανήκουν στις κατακρημνίσεις, όπου συμβάλουν στην αλλαγή κατάστασης του νερού. Όλες αυτές οι μορφές του νερού καταλήγουν να επηρεάζουν η μία την άλλη και να συνδέονται μεταξύ τους ανάλογα τις συνθήκες θερμοκρασίας του περιβάλλοντος. Τέλος αυτή η σχέση μεταξύ τους εξηγείται μέσα από τον κύκλο του νερού.

1.4. Υδρολογικός κύκλος

Εικόνα 2. Υδρολογικός κύκλος (πηγή water-cycle-natural-greek_0.jpg (2155×1500) (amazonaws.com))

Η ατμόσφαιρα δεν αποτελείται από μεγάλη ποσότητα νερού. Παρόλα αυτά, εξαιτίας της κινητικότητας του το νερό, μέσω του υδρολογικού κύκλου, είναι διαθέσιμο στα οικοσυστήματα και σε όλους τους οργανισμούς. Οι διαδικασίες που ευθύνονται για την κυκλοφορία του νερού είναι κυρίως η εξάτμιση, η διαπνοή των φυτών, οι κατακρημνίσεις και η συμπύκνωση [Αδαμαντίδου, Γεωργάτου, Γιαπιτζάκης, Λάκκα, Νοταράς, Φλορεντίν, Χατζηγεωργίου & Χαντηκωντή, χ.χ].

Με τη διαδικασία της συμπύκνωσης το νερό με την μορφή υδρατμών μεταφέρεται στην ατμόσφαιρα. Οι υδρατμοί είναι ο βασικός απορροφητής μικροκυμάτων και μακροκυμάτων ακτινοβολίας στην ατμόσφαιρα. Μέσω της συμπύκνωσης των υδρατμών απελευθερώνεται μεγάλη ποσότητα λανθάνουσας θερμότητας, με αποτέλεσμα να θερμαίνεται η ατμόσφαιρα και να επηρεάζεται η ατμοσφαιρική κυκλοφορία. Τα σύννεφα επηρεάζουν τις ροές ακτινοβολίας τόσο στην ατμόσφαιρα όσο και στην επιφάνεια της Γης [Oki, Entekhabi & Harrold, 2020].

Κατά τη διαδικασία της εξάτμισης πραγματοποιείται η απομάκρυνση του νερού από οποιαδήποτε επιφάνεια με τη μορφή υδρατμών. Όταν το νερό απομακρύνεται από την επιφάνεια των φυτών (συγκεκριμένα των φύλλων τους), η διαδικασία αυτή ονομάζεται επιδερμική εξάτμιση και διακρίνεται από τη διαπνοή. Με τη διαπνοή απομακρύνεται το νερό από την επιδερμίδα των φύλλων, μέσω των στομάτων τους (των πόρων τους) [Αδαμαντίδου, Γεωργάτου, Γιαπιτζάκης, Λακκά, Νοταράς, Φλορεντίν, Χατζηγεωργίου & Χαντηκωντή, χ.χ.].

Το νερό βρίσκεται επίσης στο έδαφος. Το νερό αυτό είναι πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία και απορροφάται από τα φυτά με τη βοήθεια των ριζών τους, καθώς περνάει και κυκλοφορεί στο εσωτερικό τους. Αφού το νερό φθάσει στα φύλλα τους, αυτό απομακρύνεται από τους πόρους τους με τη διαπνοή [Αδαμαντίδου, Γεωργάτου, Γιαπιτζάκης, Λακκά, Νοταράς, Φλορεντίν, Χατζηγεωργίου & Χαντηκωντή, χ.χ.].

Όπως έχει αναφερθεί, η βροχή, το χιόνι, το χαλάζι ανήκουν στις κατακρημνίσεις και είναι διαφορετικές μορφές που απομακρύνεται το νερό από την ατμόσφαιρα και διατίθεται στα υδάτινα και χερσαία οικοσυστήματα [Αδαμαντίδου, Γεωργάτου, Γιαπιτζάκης, Λακκά, Νοταράς, Φλορεντίν, Χατζηγεωργίου & Χαντηκωντή, χ.χ.].

Με τις διαδικασίες της εξάτμισης και των κατακρημνίσεων ανταλλάσσεται επίσης νερό μεταξύ των ωκεανών και της ατμόσφαιρας. Αυτή είναι μια απλή μεταφορά νερού συγκριτικά με αυτή που γίνεται μέσω της ξηράς. Αυτό οφείλεται κυρίως στους ποικίλους τρόπους που μπορεί να αξιοποιηθεί το νερό από το έδαφος. Οι τρόποι είναι οι εξής: α) να εξατμιστεί, β) να εισχωρήσει στο υπέδαφος και στο σύστημα των υπόγειων υδάτων, γ) να προσληφθεί από τα φυτά και να απομακρυνθεί με τη διαπνοή και δ) να απομακρυνθεί με την επιφανειακή απορροή και το χερσαίο περιβάλλον [Αδαμαντίδου, Γεωργάτου, Γιαπιτζάκης, Λακκά, Νοταράς, Φλορεντίν, Χατζηγεωργίου & Χαντηκωντή, χ.χ.].

Η απορρόφηση του νερού από το έδαφος γίνεται κυρίως από τα φυτά. Σε μικρές λεκάνες απορροής, αφού είχαν αφαιρεθεί όλα τα δέντρα, αυξήθηκε κατά ένα μεγάλο ποσοστό ή ποσότητα του επιφανειακού νερού, το οποίο κατέληξε στη θάλασσα. Διαφορετικά αν το νερό είχε εισχωρήσει στο έδαφος θα επέστρεφε στην ατμόσφαιρα μέσω της διαπνοής. Τα επιφανειακά νερά απομακρύνουν τα θρεπτικά συστατικά, τα οποία διατίθενται στους οργανισμούς μετά από μακροχρόνιες διαδικασίες. Τέλος τα συστατικά αυτά καταλήγουν σε υδάτινους αποδέκτες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να έχουν υψηλή παραγωγικότητα τα δέλτα των ποταμών [Αδαμαντίδου, Γεωργάτου, Γιαπιτζάκης, Λακκά, Νοταράς, Φλορεντίν, Χατζηγεωργίου & Χαντηκωντή, χ.χ.].

1.5. Πόσιμο νερό

Σύμφωνα με την Οδηγία 98|83|ΕΚ ο ορισμός που δίνεται για το «νερό ανθρώπινης κατανάλωσης» είναι ο εξής: «*Το νερό, είτε στη φυσική του κατάσταση είτε μέσα από επεξεργασία, που προορίζεται για πόση, μαγείρεμα, προπαρασκευή τροφής ή άλλες οικιακές χρήσεις, ανεξάρτητα από την προέλευση του και από το εάν παρέχεται από δίκτυο διανομής, από βιτύο, ή σε φιάλες ή δοχεία. Το νερό που χρησιμοποιείται στις επιχειρήσεις παραγωγής τροφίμων για την παρασκευή, επεξεργασία, συντήρηση ή εμπόριο προϊόντων ή ουσιών που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, εκτός αν οι αρμόδιες εθνικές αρχές κρίνουν ότι η ποιότητα του νερού δεν μπορεί να επηρεάσει την υγιεινή των τροφίμων στην τελική του μορφή*» [Ευρωπαϊκή Ένωση, 2020].

Συγκεκριμένα πόσιμο ορίζεται το νερό, το οποίο είναι καθαρό από φυσική, χημική, βιολογική και μικροβιολογική άποψη και μπορεί να καταναλωθεί, χωρίς να διακινδυνέψει η υγεία του ανθρώπου. Το νερό για να θεωρείται πόσιμο πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά: να είναι διαυγές, δροσερό, άχρωμο και άοσμο, απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς, άριστο σχετικά με την γεύση, να μην προκαλεί

διάβρωση των μετάλλων και να περιέχει μικρή ποσότητα από διαλυτές ενώσεις και ανόργανα άλατα με χαμηλότερες από 1 g/L συγκεντρώσεις. Συνήθως η θερμοκρασία του νερού πρέπει να παραμείνει σταθερή στους 10-15 ºC. Η σκληρότητα του δεν πρέπει να είναι υψηλή, γιατί μπορεί να προκαλέσει δυσκολίες στην καθημερινή αλλά και την βιομηχανική του χρήση [Belitz, Grosch & Schrieberle, 2018].

Με τον όρο ολική σκληρότητα νερού εννοείται η ολική συγκέντρωση αλκαλικών γαιών σε mmol/L. Οι συγκεντρώσεις του στροντίου και του βαρίου δεν υπολογίζονται σε αυτή, αλλά συνήθως οι τιμές είναι χαμηλές. Τα όξινα ανθρακικά που είναι διαλυμένα στο νερό, με τη θέρμανση, μετατρέπονται σε ανθρακικά. Κατά τη διάρκεια του βρασμού, προκαλείται καθίζηση σε ένα μέρος των αλάτων ασβεστίου, ως ελάχιστο διαλυτό $CaCO_3$. Το αποτέλεσμα αυτό ονομάζεται ανθρακική σκληρότητα [Belitz, Grosch & Schrieberle, 2018].

Από την νομοθεσία της κάθε χώρας ρυθμίζονται τα όρια για την ποιότητα του πόσιμου νερού, περιορίζοντας ιδιαίτερα τα επιτρεπόμενα όρια που αφορούν μικροοργανισμούς και μολύνσεις [Belitz, Grosch & Schrieberle, 2018]. Συγκεκριμένα στην Ευρωπαϊκή Ένωση ανάλογα με την κατηγορία που ανήκει το νερό έχει και τα ανάλογα όρια σκληρότητας. Αυτά είναι τα εξής: α) για το νερό με πολύ χαμηλή σκληρότητα πρέπει να είναι < 50 mg/L, β) για το νερό με χαμηλή σκληρότητα πρέπει να είναι 50-500 mg/L, γ) για το νερό με μερική σκληρότητα πρέπει να είναι 500-1500 mg/L και δ) για το νερό με υψηλή σκληρότητα πρέπει να είναι > 1500 mg/L [Quatrini, Pampaloni & Brandi, 2016].

Το πόσιμο νερό μπορεί να ληφθεί από πηγές, από υπόγεια και επιφανειακά νερά. Σε περιοχές που είναι αραιοκατοικημένες, το νερό που παρέχουν οι πηγές και τα ρέματα μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς να υποστεί κάποια επεξεργασία. Παρόλα

αυτά το διαθέσιμο νερό συνήθως δεν πληροί τις προδιαγραφές και πρέπει να διυλιστεί [Belitz, Grosch &Schrieberle, 2018].

Σε ξηρές περιοχές, το πόσιμο νερό ανακτάται με την αφαλάτωση γλυφών ή θαλάσσιων νερών. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι αντίστροφη ώσμωση, με τη χρήση ημιπερατών μεμβρανών για ελαφρώς αλμυρό νερό, γλυφό νερό και η πολυβάθμια εξάτμιση, κυρίως με ακαριαία εξάτμιση για το θαλασσινό νερό [Belitz, Grosch & Schrieberle. 2018].

1.6. Υδροφόροι ορίζοντες

Οι υδροφόροι ορίζοντες είναι γεωλογικοί σχηματισμοί στους οποίους υπάρχει υλικό κορεσμένο με νερό και ως αποτέλεσμα τροφοδοτούν πηγάδια και πηγές. Το νερό αποθηκεύεται σε χώρους που δημιουργούνται από χαλίκια μικρού μεγέθους, άμμο και άργιλο, τα οποία ανήκουν στους γεωλογικούς ορίζοντες. Με την επίδραση της βαρύτητας και της άντλησης από τα πηγάδια το νερό ρέει μέσα στον υδροφόρο ορίζοντα, εμπλουτίζοντας τον με φυσικό ή τεχνητό τρόπο. Οι υδροφόροι ορίζοντες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τους ελεύθερους και τους αρτεσιανούς. Η διαφορά τους είναι ότι στους ελεύθερους υδροφόρους ορίζοντες υπάρχει ελεύθερη υδροστατική φρεάτια επιφάνεια, ενώ οι αρτεσιανοί βρίσκονται υπό πίεση. Ένα ακόμη φαινόμενο που συμβάλλει στην αποθήκευση νερού είναι αυτό της επιφανειακής απορροής στην επιφάνεια του εδάφους, που παρατηρείται μετά από έντονη βροχόπτωση με μεγάλη διάρκεια. Το νερό που αποθηκεύεται κατά αυτόν τον τρόπο δημιουργεί, καθώς και εμπλουτίζει, τα ποτάμια και τις λίμνες ή καταλήγει στη θάλασσα. Ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες, την παρουσία και το είδος βλάστησης, το μορφολογικό ανάγλυφο και την πετρολογική σύσταση της περιοχής, επηρεάζεται το ποσοστό του νερού που εξατμίζεται, ρέει επιφανειακά ή διεισδύει στο

έδαφος. Το νερό καθώς κινείται διαλύει μεγάλο αριθμό χημικών ουσιών. Πλήθος ιόντων και οργανικών οξέων βρίσκονται στα ατμοσφαιρικά κατακρημνίσματα, από τα οποία προκαλείται η όξινη βροχή. Η προέλευση των ιόντων συνήθως είναι διαφορετικές φυσικές διεργασίες, όπως το SO_2 από ηφαιστειακή δραστηριότητα, το H_2S από σήψη φυτών και ζώων, τα άλατα που προέρχονται από την θάλασσα, καθώς και το CO_2 από καύσεις δασών ή ανθρωπογενείς δράσεις (το καυσαέριο αυτοκινήτων και βιομηχανικών μονάδων). Κατά την επαφή του βρόχινου νερού με το έδαφος αλλάζει η χημική του σύσταση, το οποίο συμβαίνει εξαιτίας των φυσικοχημικών διεργασιών ή των ανθρωπογενών ρύπων [Λαζαράκη & Νεντέλκε, 2008].

1.7. Τα υδάτινα συστήματα και οι υδρόβιοι μικροοργανισμοί

Στον πλανήτη Γη το νερό και τα υδάτινα συστήματα είναι ύψιστης σημασίας για τους ζωντανούς οργανισμούς, καθώς είναι απαραίτητα για την βιοποικιλότητα και τη διατήρηση ευαίσθητων οικοσυστημάτων και των βιολογικών κύκλων. Το νερό περιβάλει την Γη σε διαφορετικές μορφές και περιβάλλοντα. Τα υδάτινα συστήματα εξαρτώνται από τον υδρολογικό κύκλο, καθώς μέσω αυτού εκφράζονται, συνδέονται και αλληλοεξαρτώνται. Ακόμη τα υδάτινα συστήματα περιλαμβάνουν αρκετές χωριστές υδάτινες μάζες, που διακρίνονται σύμφωνα με τα φυσικά τους χαρακτηριστικά σε: ωκεανούς, θάλασσες, λίμνες, ποταμούς, χείμαρρους, λιμνοθάλασσες, παράκτιες περιοχές, υγρότοπους, υδρατμούς της ατμόσφαιρας και υπόγεια νερά. Ανάμεσα στην Λιθόσφαιρα και την Υδρόσφαιρα υπάρχει σημαντική σύνδεση. Επεμβάσεις σε αυτές ή μετατροπές τους έχουν ως συνέπεια την μείωση της εξάτμισης νερών, επηρεάζοντας έτσι το μικροκλίμα της περιοχής. Ως αποτέλεσμα πραγματοποιείται η διάβρωση των εδαφών, συσσώρευση ιζημάτων και αλλαγή των

χημικών και βιολογικών χαρακτηριστικών των υδάτινων συστημάτων [Λαζαράκη & Νεντέλκε, 2008].

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού προέρχονται από ποικίλες διαδικασίες. Κάποια από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του είναι η οξύτητα και η αλκαλικότητα, οι οποίες καθορίζονται από την διάλυση αλάτων διαφόρων οξέων και βάσεων, συμπλόκων μετάλλων και μεταλλοειδών. Μέρος αυτών των συμπλόκων αποτελούνται από οργανικές ουσίες με πολύπλοκη δομή, όπως για παράδειγμα τα χουμικά οξέα. Επίσης, διάφορες οργανικές τοξικές ύλες μπορούν να διακινηθούν εντός του νερού με τη μορφή κολλοειδών, ενώ εντοπίζονται και διαφόρων ειδών ιζήματα αποτελούμενα από συσσωματώματα στερεών και βιογεωχημικών υλικών. Η οργανική ύλη που εμπεριέχεται σε αυτά τα ιζήματα αποτελεί το υπόστρωμα αναερόβιων ζυμώσεων από βακτήρια του νερού, οδηγώντας στην παραγωγή μεθανίου [Λαζαράκη & Νεντέλκε, 2008].

Ανάμεσα στο νερό, την ατμόσφαιρα και τα εδάφη υπάρχει διάδραση, τα υδάτινα συστήματα, σύμφωνα με τις επιστήμες της χημείας του νερού, της ωκεανογραφίας και άλλες εξειδικευμένες περιβαλλοντικές επιστήμες, χαρακτηρίζονται από μεταβολικές και φυσικοχημικές αλλαγές, ανάλογα με την αλατότητα των νερών, τα θρεπτικά υλικά και την θερμοκρασία [Λαζαράκη & Νεντέλκε, 2008]

Στα υδάτινα συστήματα συναντάται μεγάλη ποικιλία υδρόβιων οργανισμών, από μονοκύτταρους μικροοργανισμούς έως και τεράστια κητώδη είδη. Οι οργανισμοί που ζουν στα υδρόβια οικοσυστήματα διακρίνονται σε τρεις σημαντικές κατηγορίες, τους **αυτότροφους,** τους **ετερότροφους** και τους **αποικοδομητές** [Λαζαράκη & Νεντέλκε, 2008]:

- Οι **αυτότροφοι** οργανισμοί ονομάζονται έτσι, καθώς ως πηγή ενέργειας τους χρησιμοποιούν την ηλιακή ή χημική ενέργεια, ώστε να δημιουργήσουν

σύμπλοκα οργανικών μορίων, όπως π.χ. γλυκόζη, που είναι απαραίτητα για την επιβίωσή τους. Τα οργανικά μόρια αυτά ονομάζονται παράγωγα.

- **Ετερότροφοι** οργανισμοί ονομάζονται αυτοί που ως πηγή ενέργειας τους χρησιμοποιούν κυρίως οργανικές ουσίες που παράγονται από αυτότροφους οργανισμούς, καθώς επίσης και ανόργανα υλικά για την παραγωγή της βιομάζας τους. Για αυτό το λόγο ονομάζονται καταναλωτές,
- **Αποικοδομητές** ή αποσυνθέτες ονομάζονται βακτήρια και μύκητες, μια υποομάδα των ετερότροφων, που αποικοδομούν υλικά βιολογικής προέλευσης σε απλές ουσίες, έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν αργότερα από τους αυτότροφους οργανισμούς.

Επιπροσθέτως, τα βακτήρια, οι μύκητες και τα φύκη ανήκουν στους υδρόβιους μικροοργανισμούς, εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία και παίζουν σημαντικό ρόλο στον βιογεωχημικό κύκλο της ζωής. Πιο συγκεκριμένα, ο σημαντικότερος ρόλος των φυκών και των φωτοσυνθετικών βακτηρίων είναι η δέσμευση του ανόργανου άνθρακα μέσω της φωτοσυνθετικής αντίδρασης [$CO_2 + H_2O \rightarrow CH_2O + O_2$] και η μετατροπή του σε βιομάζα, στην οποία στηρίζεται η τροφική αλυσίδα των υδρόβιων οργανισμών. Επίσης οι μικροοργανισμοί καταλύουν χημικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στο νερό, διασπούν την βιομάζα και παράγουν άλατα του αζώτου και του φωσφόρου, που αποτελούν βασικά θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη και επιβίωση των υδρόβιων οργανισμών. Όσον αφορά την συμμετοχή τους στους βιογεωχημικούς κύκλους, οι υδρόβιοι μικροοργανισμοί και ιδίως τα υδρόβια βακτήρια αποτοξινώνουν και απομακρύνουν από την Υδρόσφαιρα τοξίνες και ξενοβιοτικούς ρύπους. Ακόμη, οι υδρόβιοι μύκητες, οι οποίοι είναι μη φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, μέσω του ένζυμου κυτταρινάση διασπούν τα ξύλα και την φυτική ύλη, συμβάλλοντας έτσι στη σύνθεση των φυσικών νερών. Ένα παραπροϊόν που παράγεται κατά την διάσπαση της φυτικής

ύλης από τους υδρόβιους μύκητες είναι τα χουμικά οξέα, τα οποία συμπλοκοποιούν μεταλλικά ιόντα και έχουν σημαντική επίδραση στην ποιότητα και την συνεκτικότητα των εδαφών. Επιπλέον, να σημειωθεί ότι στη δράση των βακτηρίων, πέραν των όσων αναφέρθηκαν παραπάνω περιλαμβάνονται και [Λαζαράκη & Νεντέλκε , 2008]:

- η δέσμευση του αζώτου της Ατμόσφαιρας (αζωτοδέσμευση) μέσω της μετατροπής του σε αμμωνιακά άλατα
- η νιτροποίηση, δηλαδή η μετατροπή των αμμωνιακών σε νιτρικά και η αναγωγή των νιτρικών προς νιτρώδη
- η απονίτρωση, που είναι ο μηχανισμός με τον οποίο το δεσμευμένο άζωτο ξανά εισέρχεται στην ατμόσφαιρα
- η συμμετοχή στο βιογεωχημικό κύκλο του θείου, αφού συμβάλλουν στην αναγωγή θειικών αλάτων προς υδρόθειο και μετά την οξείδωση του προς θειικά
- η βιοδιάσπαση του φωσφόρου, που καθιστά διαθέσιμα τα θρεπτικά υλικά ανόργανου φωσφόρου
- και τέλος η απενεργοποίηση τοξικών οργανοφωσφορικών ενώσεων.

ΕΝΟΤΗΤΑ 2

Κατηγορίες πόσιμου νερού

Το πόσιμο νερό διακρίνεται σε δύο κατηγορίες, το εμφιαλωμένο νερό και το νερό δικτύου.

2.1. Νερό δικτύου

Ως νερό δικτύου αναφέρεται το νερό, το οποίο μεταφέρεται μέσω του δικτύου κάθε περιοχής, σύμφωνα με τον δήμο στον οποίο ανήκει. Το νερό του δικτύου είναι υποχρεωτικό να τηρεί τους όρους της νομοθεσίας για την «Ποιότητα Νερού Ανθρώπινης Κατανάλωσης». Σύμφωνα με την νομοθεσία μπορεί να πραγματοποιηθεί επεξεργασία για την απολύμανση του νερού με διάφορους τρόπους, μεταξύ των οποίων είναι και η χλωρίωση, ο οζονισμός και η απομάκρυνση επιβλαβών προσμείξεων [ΣΕΦΥΜΕΝ, 2022].

2.2. Εμφιαλωμένο

Στην κατηγορία του εμφιαλωμένου νερού ανήκουν όσα νερά πωλούνται σε φιάλες. Το εμφιαλωμένο νερό ανάλογα με την υδροληψία του και την προέλευσή του, χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες. Αυτές είναι οι εξής [ΣΕΦΥΜΕΝ,2022]:

- επιτραπέζιο νερό
- νερό πηγής
- φυσικό μεταλλικό νερό

2.2.1. Επιτραπέζιο νερό

Σύμφωνα με τον ΕΦΕΤ ο όρος «επιτραπέζιο νερό» δίνεται στο εμφιαλωμένο πόσιμο νερό ή παρασκευασμένο νερό. Συγκεκριμένα ως «επιτραπέζιο νερό» ορίζεται «*το νερό το οποίο μπορεί να είναι διαφόρων προελεύσεων, μεταξύ άλλων από*

επιφανειακά ύδατα ή από δημοτικό σύστημα υδροδότησης. Το ΕΠΝ (εμφιαλωμένο πόσιμο νερό) τυγχάνει εν γένει επεξεργασίας και απολύμανσης, καθώς και αποϊονισμού και εμπλουτισμού με ανόργανα άλατα κατά περίπτωση. Το ΕΜΠ διέπεται από την Οδηγία 98|83|ΕΚ, της 3ης Νοεμβρίου 1998, σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης» [ΕΦΕΤ, 2012].

2.2.2.Νερό πηγής

Σύμφωνα με την Οδηγία 80/777/ΕΟΚ: «*ο όρος νερό πηγής χρησιμοποιείται αποκλειστικά για το νερό προς ανθρώπινη κατανάλωση στη φυσική του μορφή, το οποίο έχει εμφιαλωθεί στην πηγή και πρέπει να πληροί τα πρότυπα υψηλής ποιότητας. Πρέπει να είναι ασφαλές προς πόση στην έξοδο και μπορεί να μην έχει υποστεί απολύμανση. Ωστόσο το νερό πηγής δεν χρειάζεται να έχει την ίδια περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα με το φυσικό μεταλλικό νερό και η χημική σύνθεση του δεν χρειάζεται να αναφέρεται στην ετικέτα*» [Ευρωπαϊκή Ένωση, 2009].

2.2.3. Φυσικό μεταλλικό νερό

Σύμφωνα με την Οδηγία 80/777/ΕΟΚ ως φυσικό μεταλλικό νερό ορίζεται: «*το μικροβιολογικά υγιεινό νερό που προέρχεται από ένα υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα ή ένα υπόγειο στρώμα και αναβλύζει από πηγή που υπόκειται σε εκμετάλλευση μια ή περισσότερες φυσικές ή τεχνικές μετά από γεώτρηση, εξόδους μιας πηγής*». Επίσης «*το φυσικό μεταλλικό νερό διακρίνεται από το σύνηθες πόσιμο νερό, δηλαδή από τη φυσιολογική του σύσταση, που χαρακτηρίζεται από την περιεκτικότητα του σε ανόργανα άλατα, ιχνοστοιχεία ή άλλα συστατικά και από τη φυσική καθαρότητά του. Τα χαρακτηριστικά αυτά έχουν διατηρηθεί ανέπαφα λόγω της υπόγειας προέλευσης αυτού του νερού, το οποίο είναι προστατευμένο από κάθε κίνδυνο ρυπάνσεως*» [Ευρωπαϊκή Ένωση, 2009].

ΕΝΟΤΗΤΑ 3

Τα χαρακτηριστικά του φυσικού μεταλλικού νερού

Τα χαρακτηριστικά του φυσικού μεταλλικού νερού που του προσδίδουν τις ευεργετικές ιδιότητες του για την ανθρώπινη υγεία υπόκεινται σε κάποιους ελέγχους. Οι έλεγχοι αυτοί είναι οι εξής [Quatrini, Pampalom & Brandi, 2016]:

i. Γεωλογικοί και υδρολογικοί
ii. Φυσικοί, χημικοί και φυσικοχημικοί
iii. Μικροβιολογικοί
iv. Φαρμακολογικοί, φυσιολογικοί και κλινικοί, εφόσον είναι απαραίτητο

Όλοι οι έλεγχοι αυτοί πραγματοποιούνται ανάλογα με το αποτέλεσμα των βασικών ελέγχων και σύμφωνα με τις επιστημονικές μεθόδους που έχουν εγκρίνει οι αρχές [Ευρωπαϊκή Ένωση, 2009].

Τα ουσιώδη χαρακτηριστικά του φυσικού μεταλλικού νερού, όπως η σύσταση και η θερμοκρασία του, πρέπει να παραμένουν σταθερά εντός του πλαισίου των φυσικών διακυμάνσεων. Σημαντικό είναι να μην μεταβάλλονται από τις ενδεχόμενες διακυμάνσεις της παροχής [Ευρωπαϊκή Ένωση, 2009].

Σύμφωνα με την παράγραφο 1 του άρθρου 5 [Οδηγία 2009|54|ΕΚ], σε ένα φυσικό μεταλλικό νερό ως φυσιολογικός αριθμός των αποικιών των μικροβίων θεωρείται η σταθερή μικροβιολογική χλωρίδα του νερού στην έξοδο της πηγής, πριν πραγματοποιηθεί κάποια επεξεργασία. Η ποιοτική και ποσοτική σύσταση της μικροβιολογικής χλωρίδας που έχει ληφθεί υπόψη για την αναγνώριση αυτού του νερού εξετάζεται με περιοδικές αναλύσεις.

- <u>Συμπληρωματικά χαρακτηριστικά σχετικά με τα αναβράζοντα μεταλλικά νερά:</u>

Κατά την έξοδο ή μετά από την εμφιάλωση, τα αναβράζοντα φυσικά μεταλλικά νερά εκλύουν αυθόρμητα διοξείδιο του άνθρακα σε κανονικές συνθήκες

θερμοκρασίας και πίεσης. Αυτό το είδος νερού διακρίνεται σε τρεις κατηγορίες, οι οποίες βρίσκονται μόνο με τις εξής ονομασίες [Ευρωπαϊκή Ένωση, 2009]:

1. «Φυσικό μεταλλικό νερό, φυσικώς αεριούχο». Σύμφωνα με την Οδηγία 2009|54|ΕΚ ο όρος αυτός «*δηλώνει ένα νερό του οποίου η περιεκτικότητα σε διοξείδιο του άνθρακα προερχόμενο από την πηγή, έπειτα από ενδεχόμενο καθαρισμό με καθίζηση και εμφιάλωση, είναι η ίδια με εκείνη που διαπιστούται στην έξοδο αφού ληφθεί υπόψη, όπου τούτο συμβαίνει, η εκ νέου εισπίεση μιας ποσότητας αερίου προερχόμενου από τον ίδιο υδροφόρο ορίζοντα ή υπόγειο στρώμα, ποσοτικά ισοδύναμης με εκείνη του αερίου που ελευθερώθηκε κατά τη διάρκεια των προαναφερθεισών διαδικασιών και λαμβανομένων υπόψη των συνήθων τεχνικών ανοχών*».
2. «Φυσικό μεταλλικό νερό ενισχυμένο με αέριο πηγής». Σύμφωνα με την Οδηγία 2009|54|ΕΚ ο όρος αυτός δηλώνει «*ένα νερό του οποίου η περιεκτικότητα σε διοξείδιο του άνθρακα προερχόμενου από τον ίδιο υδροφόρο ορίζοντα ή υπόγειο στρώμα, έπειτα από ενδεχόμενο καθαρισμό με καθίζηση και εμφιάλωση είναι ανώτερη από εκείνη που διαπιστώνεται στην έξοδο*».
3. «Φυσικό μεταλλικό νερό με προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα». Σύμφωνα με την Οδηγία 2009|54|ΕΚ ο όρος αυτός δηλώνει «*ένα νερό στο οποίο έχει προστεθεί διοξείδιο του άνθρακα προελεύσεως άλλης από εκείνη του υδροφόρου ορίζοντα του υπογείου στρώματος από τον οποίο προέρχεται το νερό*».

ΕΝΟΤΗΤΑ 4

Παράγοντες που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά του φυσικού μεταλλικού νερού

Τα βασικά χαρακτηριστικά του φυσικού μεταλλικού νερού είναι το χρώμα, η γεύση, η οσμή και η θολότητα. Για να θεωρείται το νερό κατάλληλο για κατανάλωση, αυτά τα χαρακτηριστικά πρέπει να παραμένουν σταθερά. Όμως υπάρχουν κάποιοι παράγοντες που τα επηρεάζουν. Αυτοί οι παράγοντες είναι κυρίως χημικοί και μικροβιολογικοί, αλλά μπορεί να είναι και τοξικοί [Λαζαράκη & Νεντέλκε, 2008].

4.1. Τοξικές ουσίες

Τοξικές ουσίες είναι αυτές που έχουν τοξική επίδραση στους οργανισμούς που τις προσλαμβάνουν, είτε αυτές οι ουσίες είναι φυσικές είτε συνθετικές. Το αποτέλεσμα που θα έχει η δράση μιας τοξικής ουσίας σε έναν οργανισμό εξαρτάται από τη συγκέντρωση της ουσίας, τη φύση της και τη χημική σύσταση του περιβάλλοντος αλλά και από τα γενετικά χαρακτηριστικά του οργανισμού, το στάδιο ανάπτυξής του, καθώς και τη φυσιολογία του συγκεκριμένου ατόμου. Οι τοξικές ουσίες που είναι υδατοδιαλυτές μεταφέρονται σε μεγάλο αριθμό κυττάρων των οργανισμών που τις προσλαμβάνουν, αλλά συνήθως ο χρόνος παραμονής τους σε αυτά είναι μικρός εξαιτίας της απέκκρισής τους. Ωστόσο υπάρχουν και οι λιποδιαλυτές χημικές ουσίες, οι οποίες συγκεντρώνονται σε ορισμένα σημεία του οργανισμού, όπως σε συγκεκριμένους ιστούς ή όργανα, και μπορούν να παραμείνουν εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα. Κατά την μεταβίβαση των τοξικών αυτών ουσιών από ένα τροφικό επίπεδο στο επόμενο δημιουργείται το φαινόμενο της βιοσυσσώρευσης, όπου πραγματοποιείται σταδιακά η αύξηση της συγκέντρωσης της τοξικής ουσίας στους καταναλωτές ανώτερης τάξης [Λαζαράκη & Νεντέλκε, 2008]. Σύμφωνα με την Οδηγία 2015|1787 της Ευρωπαϊκής Ένωσης τα ανώτερα επιτρεπτά όρια των

συγκεντρώσεων τοξικών ουσιών σε πόσιμα νερά είναι τα εξής: α) Αρσενικό (50 mg/L), β) Κάδμιο (5 mg/L), γ) Κυανιούχα άλατα (50 mg/L), δ) Χρώμιο (50 mg/L), ε) Υδράργυρος (1 mg/L), στ) Νικέλιο (50 mg/L), ζ) Μόλυβδος (50 mg/L), η) Αντιμόνιο (10 mg/L), θ) Σελήνιο (10mg/L), ι) Παρασιτοκτόνα (0.1 mg/L) και εξομοιωμένα προϊόντα (0.5 mg/L) και κ) Αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες (0.2 mg/L).

4.2. Φυσικοχημικοί παράμετροι

Σύμφωνα με την φυσική του σύσταση, τα επιτρεπόμενα όρια των φυσικοχημικών παραμέτρων του νερού είναι τα εξής (Πίνακας 1) [Οδηγία 80|777|ΕΟΚ] .

Πίνακας 1. Επιτρεπτά όρια φυσικοχημικών παραμέτρων.

ΕΠΙΤΡΕΠΤΑ ΟΡΙΑ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ	
Φυσικοχημικοί παράμετροι	**Επιτρεπτά όρια**
Θερμοκρασία	15 - 25 ºC
pH	6,5 – 9,5
Αγωγιμότητα	2500 μS*cm^{n}
Χλώριο	έως 250 mg/L
Θειικά	έως 250 mg/L
Ασβέστιο	περισσότερα από 150 mg/L
Μαγνήσιο	έως 125 mg/L
Νάτριο	έως 120 mg/L
Κάλιο	έως 12 mg/L
Αργίλιο	έως 0,2 mg/L
Ολική σκληρότητα	60 – 150 mg/L
Ξηρό υπόλειμμα	έως 1500 mg/L
Διαλυμένο οξυγόνο	ενδεικτικά >75%, εκτός υπόγειων νερών
Ελεύθερο CO_2	Το νερό δεν πρέπει να είναι δραστικό

4.3 Μικροβιολογικές παράμετροι

Τα νερά που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση είναι υποχρεωτικό να μην περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς. Για να πραγματοποιηθεί η μικροβιολογική εξέταση του πόσιμου νερού είναι αναγκαίο να ερευνηθούν, ανάλογα με τις ανάγκες, τόσο τα μη παθογόνα βακτήρια όσο και τα παθογόνα βακτήρια και κυρίως: α) Σαλμονέλες, β) Παθογόνοι σταφυλόκοκκοι, γ) Βακτηριοφάγοι των κοπράνων και δ) Παρασιτικοί οργανισμοί, φύκια ή άλλα μορφοποιημένα στοιχεία [Ευρωπαϊκή Ένωση, 2020].

Οι κύριοι δείκτες μικροβίων που προβλέπεται να εξετάζονται σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση είναι [Σπυλιοπούλου, 2021]: α) Ολικά κολοβακτηριοειδή, β) Κολοβακτηριοειδή κοπράνων, γ) Στρεπτόκοκκοι κοπράνων, δ) Κλωστρίδια αναγωγικά θειωδών αλάτων και ε) Καταμέτρηση των συνολικών βακτηριδίων για το πόσιμο νερό. Τα όρια που είναι επιτρεπτά από την νομοθεσία είναι τα εξής: [Ευρωπαϊκή Ένωση, 2009].

Πίνακας 2. Επιτρεπτά όρια μικροβιολογικών παραμέτρων σύμφωνα με την Ε.Ε.

ΟΡΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ	
Μικροβιακοί παράμετροι	**Επιτρεπτά όρια**
Escherichia coli	0/250 mL
Εντερόκοκκοι	0/250 mL
Pseudomonas aeruginosa	0/250 mL
Αριθμός αποικιών στους 22 ºC	100/1 mL
Αριθμός αποικιών στους 37 ºC	20/1 mL

ΕΝΟΤΗΤΑ 5

Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Η επαφή του νερού με ακαθαρσίες και απεκκρίσεις ευνοεί την εμφάνιση και τον πολλαπλασιασμό διάφορων μικροοργανισμών, οι οποίοι πολύ συχνά είναι παθογόνοι. Ορισμένοι παθογόνοι μικροοργανισμοί που μπορούν να βρεθούν στο νερό είναι: α) τα βακτήρια, β) οι ιοί, γ) τα πρωτόζωα και δ) οι μύκητες [Λαζαράκη & Νεντέλκε , 2008].

5.1. Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι οργανισμοί που μπορούν να σχηματίσουν ευδιάκριτες αποικίες και τα κύτταρά τους είναι απύρηνα (προκαρυωτικά). Το βακτηριακό κύτταρο περιβάλλεται από ένα δύσκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο του προσδίδει το σχήμα του. Αναλόγως το είδος των βακτηρίων το σχήμα αυτό ποικίλλει, π.χ. κόκκοι, βάκιλοι, κοκκοβάκιλοι, σπειρύλλια και δονάκια. Το βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος είναι μια ετεροπολυμερής ουσία γνωστή ως πεπτιδογλυκάνη. Τα βακτήρια χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Οι κατηγορίες αυτές είναι τα θετικά και τα αρνητικά Gram [Μπαλατσούρας, 2006].

Ο Christian Gram ανακάλυψε μια διαφορική χρώση που βασίζεται στην ικανότητα ή την ανικανότητα των βακτηρίων να κατακρατούν το σύμπλοκο crystal violet-ιώδιο, μετά από έκπλυση με έναν ανόργανο διαλύτη, όπως ακετόνη ή αιθανόλη. Όσα βακτήρια κατακρατούν το σύμπλοκο χρώμα είναι θετικά κατά Gram, ενώ όσα το αποβάλλουν με την έκπλυση ονομάζονται αρνητικά κατά Gram. Η ιδιότητα αυτή συγκράτησης ή μη του συμπλόκου οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των κυτταρικών τοιχωμάτων αυτών των δύο ομάδων βακτηρίων [Μπαλατσούρας, 2006].

- *Θετικά κατά Gram βακτήρια*

Μέχρι και 40 επάλληλα στρώματα πεπτιδογλυκάνης συγκροτούν το κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων και ολόκληρο το κυτταρικό τοίχωμα μπορεί να θεωρηθεί ως μακρομόριο πεπτιδογλυκάνης [Μπαλατσούρας, 2006].

Χάρη στο κυτταρικό τους τοίχωμα, τα θετικά κατά Gram βακτήρια αντέχουν περισσότερο στην υψηλή πίεση και σε άλλες αντιξοότητες του περιβάλλοντος σε σχέση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια [Μπαλατσούρας, 2006].

Εκτός από πεπτιδογλυκάνη, το κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων αποτελείται και από δύο οξέα, το τειχοϊκό και το τειχουρονικό. Το ποσοστό συμμετοχής αυτών των οξέων στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος είναι 50-90% και συνιστούν συμπληρωματικά πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος. Μέσω ομοιοπολικών δεσμών συνδέονται τόσο το πλέγμα της πεπτιδογλυκάνης όσο και με την κυτταροπλασματική μεμβράνη και έτσι το κυτταρικό τοίχωμα στηρίζεται πάνω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το τειχοϊκό και τειχουρονικό οξύ είναι τα δύο κύρια αντιγόνα επιφάνειας των θετικών κατά Gram βακτηρίων [Μπαλατσούρας, 2006].

- *Αρνητικά κατά Gram βακτήρια*

Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια το κυτταρικό τοίχωμα έχει πιο πολύπλοκη σύνθεση από αυτό των θετικών κατά Gram βακτηρίων, παρόλο που έχει μικρότερη αντοχή. Το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται από μέσα προς τα έξω από την κυτταροπλασματική μεμβράνη ή εσωμεμβράνη, τον περιπλασμικό χώρο, ένα λεπτό πλέγμα πεπτιδογλυκάνης και την εξωτερική μεμβράνη ή εξωμεμβράνη [Μπαλατσούρας, 2006].

Στον περιπλασμικό χώρο συσσωρεύονται συστατικά, όπως τα ένζυμα, οι πρωτεΐνες, οι μεταβολίτες και άλλα, τα οποία έχουν μια σύσταση ζελέ. Μέσω αυτού του χώρου ρυθμίζεται η σχέση του περιεχόμενου του κυττάρου με το

άμεσο περιβάλλον του. Ενώ τα θετικά κατά Gram χάνουν συνεχώς πρωτεΐνες στο περιβάλλον, τα αρνητικά κατά Gram κατακρατούν τις περισσότερες αποβαλλόμενες πρωτεΐνες στον περιπλασματικό χώρο [Μπαλατσούρας, 2006].

Το πλέγμα πεπτιδογλυκάνης στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια έχει ίδια σύσταση με αυτό των θετικών κατά Gram βακτηρίων, όμως αποτελείται μόνο από ένα ή δύο στρώματα. Αυτό το πλέγμα συνδέεται και στηρίζεται στην εξωμεμβράνη μέσω γεφυρών λιποπρωτεΐνης. Η εξωμεμβράνη, όπως όλες οι βιολογικές μεμβράνες, είναι διστρώματη, με τη διαφορά ότι τα φωσφολιπίδια έχουν αντικατασταθεί από λιποπολυσακχαρίτες. Τα μοριακά υπόλοιπα των πολυσακχαριτών του εξωτερικού στρώματος της εξωμεμβράνης είναι το κύριο σωματικό αντιγόνο των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Τέλος οι λιποπολυσακχαρίτες αποτελούν το 40% της επιφανειακής δομής του κυτταρικού τοιχώματος. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι αυτοί οι λιποπολυσακχαρίτες είναι τοξικοί για τους ζωικούς οργανισμούς και έχουν τη γενική ονομασία ενδοτοξίνη [Μπαλατσούρας, 2006].

Επιπλέον, στην εξωμεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων υπάρχουν πρωτεϊνικοί αγωγοί. Κάποιοι από αυτούς επιτρέπουν την είσοδο σε ορισμένα συστατικά και άλλοι επιτρέπουν την δίοδο προς το περιπλασματικό χώρο μιας ποικιλίας συστατικών. Οι αγωγοί ή πόροι περνούν μέσω πρωτεϊνών που αναφέρονται ως πορίνες ή πρωτεΐνες της εξωμεμβράνης [Μπαλατσούρας, 2006].

5.2. Ιοί

Οι ιοί ανήκουν στα υποχρεωτικά ενδοκυττάρια παράσιτα, καθώς δεν έχουν τους μηχανισμούς που είναι απαραίτητοι, π.χ. ένζυμα, για να αναπαραχθούν και εξαρτώνται πλήρως από τους ξενιστές τους, συχνά μάλιστα από πολύ συγκεκριμένες

οικογένειες και είδη οργανισμών-ξενιστών. Τέτοιοι ξενιστές μπορούν να είναι από σπονδυλωτά ως πρωτόζωα και από μύκητες και φύκια ως βακτήρια. Το γενετικό υλικό των ιών συχνά μεταβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο και μπορεί να είναι είτε DNA είτε RNA, μονόκλωνο ή δίκλωνο. Οι ιοί έχουν συνήθως μεγέθη από 20 ως 1000 nm και η ταξινόμησή τους γίνεται σύμφωνα με τη μορφολογία τους, τη χημική τους σύνθεση και τον τρόπο αντιγραφής τους. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί και κατηγοριοποιηθεί 21 οικογένειες ιών που μπορούν να προσβάλλουν τους ανθρώπους και αυτό είναι μόνο ένα μικρό ποσοστό του πλήθους των διαφορετικών οικογενειών των ιών [Καλιακάτσος, 2021].

5.3. Μύκητες

Οι μύκητες είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που σχηματίζουν αποικίες. Δεν φωτοσυνθέτουν, καθώς δεν έχουν πλαστίδια και λιποδιαλυτές χρωστικές και επομένως ανήκουν στους ετερότροφους μικροοργανισμούς. Το πολυστρώματο κυτταρικό τους τοίχωμα είναι δύσκαμπτο και συντίθεται κατά κύριο λόγο από χιτίνη και πολυσακχαρίτες, ενώ κυτταρίνη συναντάται μόνο σε συγκεκριμένες οικογένειες μυκήτων, οι πολυσακχαρίτες που συνθέτουν το κυτταρικό τοίχωμα απαντούν με την μορφή μικροϊνιδίων μέσα σε άμορφη μάζα και καλύπτουν το 80% του τοιχώματος, ενώ το υπόλοιπο 20% καλύπτεται από ίσες αναλογίες πρωτεϊνών και λιπιδίων. Η σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος εξαρτάται από τον τύπο του μύκητα, αν θα είναι δηλαδή ευρώτας ή ζύμη. Στις μούχλες συνήθως το βασικό ινώδες συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος είναι η χιτίνη, ενώ η άμορφη μάζα αποτελείται από γλυκάνη [Μπαλατσούρας, 2006].

Οι αποικίες που σχηματίζουν οι μύκητες δεν είναι εύκολο να απαριθμηθούν για την παρακολούθηση της αναπτυξιακής τους πορείας, σε αντίθεση με αυτές των

βακτηρίων, γιατί μέσα στα τρυβλία αναπτύσσονται υπό τη μορφή συνεχούς πέπλου. Γι' αυτό το λόγο προτάθηκε από τους Weng και Hotchkiss (1991) να παρακολουθείται η πορεία της ανάπτυξης τους και να γίνεται μέτρηση σε διάφορα στάδια της συντιθέμενης χιτίνης στο υπόστρωμα ανάπτυξης του μύκητα [Μπαλατσούρας, 2006].

- *Ζύμες*

Οι ζύμες έχουν δύσκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα συντιθέμενο κυρίως από τους πολυσακχαρίτες γλυκάνη και μαννάνη, σε μικρότερο ποσοστό από πρωτεΐνες (6-8%), λιπαρές ουσίες (8.5-13.5%) και ανόργανα συστατικά (~1%, συνήθως ενώσεις φωσφόρου). Σε ορισμένα μόνο γένη ζυμών συμμετέχει και η χιτίνη σε ποσοστό 1-2%. Η γλυκάνη είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης και αποτελεί το 30-35% του βάρους του κυτταρικού τοιχώματος, και η μαννάνη, που είναι πολυμερές της μαννόζης, αποτελεί περίπου το 30% του βάρους του. Στα κύτταρα των ζυμών υπάρχουν ο πυρήνας, τα μιτοχόνδρια, τα ριβοσώματα τάξεως μεγέθους από 30 S ως 120 S, το χυμοτόπιο, διάφορα εγκλείσματα κ.ά [Μπαλατσούρας, 2006].

- *Ακτινομύκητες*

Το κύτταρο των ακτινομυκήτων μοιάζει μορφολογικά με τους μύκητες, διαθέτει δηλαδή υφές, σπόρια-κονίδια υπό μορφή αλύσων στα άκρα των υφών ή σπόρια από κατάτμηση των υφών. Ταυτόχρονα, όμως μοιράζεται πολλά κοινά χαρακτηριστικά και με το κύτταρο των τυπικών βακτηρίων, όπως για παράδειγμα τις διαστάσεις και τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος. Έχει δύσκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα εξαιτίας της πεπτιδογλυκάνης, η οποία αποτελείται μεταξύ άλλων από N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη, μουραμικό οξύ, αλανίνη και γλουταμινικό οξύ [Μπαλατσούρας, 2006].

5.4. Πρωτόζωα

Το κύτταρο των πρωτόζωων περιέχει έναν διακριτό πυρήνα, καθώς και συσταλτό χυμοτόπιο, ενώ δεν έχει κυτταρικό τοίχωμα. Κάποια είδη πρωτόζωων φέρουν στην επιφάνεια τους μαστίγια, με τα οποία εξασφαλίζεται η κίνησή τους. Με το χυμοτόπιο ελέγχεται η πίεση στο εσωτερικό του κυττάρου για να αποφεύγεται η διάρρηξή του. Στο εξωτερικό μέρος του κυττάρου της Αμοιβάδας υπάρχει μια ελαφρά διαφοροποιημένη στρώση πρωτοπλάσματος, η οποία είναι γνωστή ως εκτόπλασμα και έχει υαλώδης σύσταση. Το κύτταρο των μαστιγοφόρων πρωτόζωων καλύπτεται με επιδερμίδα, ενώ στους Μυξομύκητες, οι οποίοι έχουν χαρακτήρες και από φυτά και από ζώα, η πολυπύρηνη μάζα του πρωτοπλάσματος, καλύπτεται από πηκτώδη στρώση [Μπαλατσούρας, 2006].

ΕΝΟΤΗΤΑ 6

Μέθοδοι ανίχνευσης και καταμέτρησης μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν στο νερό

Στο φυσικό νερό υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις από διάφορους μικροοργανισμούς οι οποίοι είτε ανήκουν στη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα του είτε έχουν εισέρθει σε αυτό μέσω της βροχόπτωσης ή μέσω των λυμάτων [Παπαντωνίου, 2011].

Όταν απορυθμίζεται η ικανότητα αυτοκαθαρισμού του φυσικού νερού εξαιτίας της παρουσίας μικροοργανισμών, το νερό χαρακτηρίζεται ως μολυσμένο. Αν κάποιος καταναλώσει το μολυσμένο νερό, τότε υπάρχουν δύο ενδεχόμενα. Το ένα είναι οι μικροοργανισμοί να βλάψουν την υγεία του, ενώ το άλλο είναι να μπορέσουν οι μικροοργανισμοί να επιβιώσουν στον ανθρώπινο οργανισμό και να ενταχθούν στη φυσιολογική του μικροχλωρίδα. Τα προβλήματα που μπορεί να προκληθούν στην υγεία του ανθρώπου ποικίλουν. Αυτά μπορεί να είναι από ήπια έως πολύ σοβαρά, όπως είναι γαστρεντερίτιδα, δυσεντερίτιδα, ηπατίτιδα Α, τυφοειδής πυρετός και χολέρα. Στις αναπτυγμένες χώρες, χάρη στο σύστημα διανομής νερού, ο τύφος και η χολέρα έχουν εξαλειφθεί, όμως εξακολουθούν να υπάρχουν σε πληθυσμούς των μη ανεπτυγμένων ή αναπτυσσόμενων χωρών. Όπως προαναφέρθηκε, εάν το νερό που προορίζεται για κατανάλωση έρθει σε επαφή με κόπρανα και απεκκρίσεις λόγω ακατάλληλου συστήματος ύδρευσης και ελέγχου, τότε υπάρχουν σε αυτό μεγάλοι αριθμοί μικροβίων που προκαλούν εντερικές ασθένειες [Παπαντωνίου, 2011].

Όταν υπάρχει μεγάλος αριθμός κολοβακτηριδίων στο νερό, τότε είναι πολύ πιθανό η πηγή από την οποία προήρθε να είναι μολυσμένη. Αν και η ανίχνευση τους δεν είναι εύκολη, κατά τη διενέργεια μικροβιολογικών ελέγχων δεν επιτρέπεται να εντοπίζονται κολοβακτηρίδια στη διανομή πόσιμου νερού [Παπαντωνίου, 2011].

6.1.Μικροβιολογικός έλεγχος

Ο μικροβιολογικός έλεγχος του νερού είναι πολύ σημαντικός και πρέπει να γίνεται συστηματικά. Κατά τον έλεγχο των μικροβιολογικών χαρακτηριστικών του νερού πραγματοποιείται απομόνωση και προσδιορισμός των παθογόνων μικροοργανισμών που ανιχνεύονται σε αυτό [Λαζαράκη & Νεντέλκε, 2008].

Στους μικροβιολογικούς ελέγχους ένα πρόβλημα που συναντάται συχνά είναι το πολύ μικρό μέγεθος των μικροοργανισμών, το οποίο δυσκολεύει την αναγνώρισή τους. Έτσι χρησιμοποιούνται κυρίως μέθοδοι αναγνώρισής που ελέγχουν τη βιοχημική και μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών [Ρίτκος, 2013].

Εάν πρόκειται για μια ποσότητα νερού που υπάρχει πιθανότητα να είναι μολυσμένη, χρησιμοποιούνται οι μικροβιολογικοί δείκτες για τον προσδιορισμό αυτό. Οι δείκτες αυτοί είναι μικροοργανισμοί, οι οποίοι αν βρεθούν στο νερό μετά από μικροβιολογικό έλεγχο αυτό θεωρείται μολυσμένο. Μάλιστα αυτοί οι δείκτες μπορεί να συνοδεύονται από παθογόνους μικροοργανισμούς, χωρίς όμως να είναι οι ίδιοι υποχρεωτικά παθογόνοι [Ρίτκος, 2013].

Οι δείκτες που είναι απαραίτητοι για τον μικροβιολογικό έλεγχο είναι τα ολικά κολοβακτηρίδια και τα εντερικά κολοβακτηρίδια. Σύμφωνα με μελέτες για τον έλεγχο μόλυνσης κοπράνων και την πιθανή παρουσία εντερικών παθογόνων, ο καλύτερος δείκτης είναι το βακτήριο *Escherichia coli* [Παπαντωνίου, 2011].

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και καταμέτρηση των μικροοργανισμών, εφόσον αυτή είναι εφικτή, είναι α) η μέτρηση αποικιών με μέθοδο εμβολιασμού σε θρεπτικό υλικό agar και β) η μέθοδος διήθησης μέσω μεμβρανών.

Πιο συγκεκριμένα, για την καταμέτρηση αποικιών αερόβιων βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων χρησιμοποιείται η μέθοδος μέτρησης αποικιών με εμβολιασμό σε

θρεπτικό υλικό agar υπό συγκεκριμένες συνθήκες επώασης, αναλόγως τις απαιτήσεις του κάθε μικροοργανισμού [Σπηλιοπούλου, 2014].

Όσον αφορά τη μέθοδο διήθησης μέσω μεμβράνης, αυτή χρησιμοποιείται για την απομόνωση και την καταμέτρηση πολλών διαφορετικών ειδών μικροβίων, σε συνδυασμό κάθε φορά με το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και τις επωαστικές συνθήκες. Πιο αναλυτικά [Σπηλιοπούλου, 2014]:

- Με τη χρήση Lactose TTC agar μπορούν να ανιχνευτούν τα βακτηρίδια που είναι θετικά στη λακτόζη, τα κολοβακτηριοειδή που είναι θετικά στη λακτόζη και αρνητικά στην οξειδάση και το *Escherichia coli*.
- Επίσης, σε νερά χαμηλής βακτηριακής χλωρίδας όπως το πόσιμο νερό, τα κολοβακτηριοειδή που ανήκουν στα εντεροβακτηριοειδή που εκφράζουν τη β-D-γλυκοσιδάση, καθώς και το *Escherichia coli* απομονώνονται και καταμετρώνται σε τρυβλία που περιέχουν χρωμογόνο άγαρ κολοβακτηριοειδών (Chromogenic coliform agar - CCA).
- Με τη χρήση θρεπτικού υποστρώματος Slanetz & Bartley agar μπορεί να γίνει η ανίχνευση και η αρίθμηση κοπρανωδών εντεροκόκκων. Δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης είναι οι *E. faecalis, E. faecium, E. durans* και *E. hirae*.
- Με τη χρήση του θρεπτικού υλικού *Clostridium Perfrigens* (m-CP agar) γίνεται η ανίχνευση και η καταμέτρηση των αποικιών του *Clostridium perfrigens*, το οποίο ανήκει στα θετικά κατά Gram σπορογόνα βακτήρια και αναπτύσσεται αναερόβια.
- Ακόμη, για την ανίχνευση και καταμέτρηση *Clostridium perfrigens,* συμπεριλαμβανομένων των σπορίων του, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και θρεπτικό υπόστρωμα TSC agar (Tryptose sulfite cycloserine agar)

- Τέλος, με τη χρήση του θρεπτικού υλικού PSA (Pseudomonas agar base + supplement CN) μπορούμε να ανιχνεύσουμε το *Pseudomonas aeruginosa*.

Οι μέθοδοι μέτρησης αποικιών με εμβολιασμό σε θρεπτικό υλικό agar και διήθησης μέσω μεμβράνης αξιοποιήθηκαν και στην παρούσα πειραματική μελέτη για την απομόνωση και καταμέτρηση μικροοργανισμών σε νερό ανθρώπινης κατανάλωσης και θα αναλυθούν πιο διεξοδικά στο Πειραματικό Μέρος που ακολουθεί.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- **Σκοπός και σχεδιασμός έρευνας**

Σκοπός αυτής της έρευνας είναι η απομόνωση και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που είναι πιθανό να αναπτυχθούν σε νερό πηγών-γεωτρήσεων. Συγκεκριμένα, εδώ γίνεται αναφορά στα νερά εργοστασίου Κορπή Nestle, όπου η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται στα πλαίσια του P-test. Το P-test είναι ένας έλεγχος που έχει οριστεί από τα κεντρικά της Nestle. Η ονομασία του είναι Proficiency Test και πραγματοποιείται δύο φορές το χρόνο. Είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται μόνο στα εργοστάσια της Nestle, με σκοπό να ελέγξει την γνώση του προσωπικού αν επαρκεί για να εντοπίσει τους μικροοργανισμούς στο νερό, καθώς και αν τα μέσα που χρησιμοποιούνται βοηθούν στον σκοπό αυτό. Για την πραγματοποίηση αυτού του ελέγχου δίνονται επιμολυσμένες ταμπλέτες και οδηγίες διαχείρισης που αντιστοιχεί για κάθε μια. Κάθε ταμπλέτα έχει διαφορετικούς μικροοργανισμούς και είναι γνωστές εξαρχής οι ομάδες μικροοργανισμών που είναι πιθανό να αναπτυχθούν και να ταυτοποιηθούν. Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Pour plate και η μέθοδος διήθησης μέσω μεμβράνης.

- **Μεταχείριση δειγμάτων πριν την εφαρμογή των μεθόδων απομόνωσης και καταμέτρησης των μικροοργανισμών**

Για την πραγματοποίηση του P-test χρησιμοποιούνται τρεις επιμολυσμένες ταμπλέτες. Με τη χρήση απιονισμένου νερού παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά επιμολυσμένα δείγματα νερού, 1 L το καθένα. Συγκεκριμένα: α) η ταμπλέτα No1 περιείχε κολοβακτηρίδια, τα οποία έπρεπε να εντοπιστούν, να ταυτοποιηθούν και να

καταμετρηθούν (ολικά κολοβακτηρίδια, *Escherichia coli*, εντερικοί εντερόκοκκοι), β) η ταμπλέτα No2 περιείχε *Pseudomonas aeruginosa*, ζύμες και μύκητες, τα οποία έπρεπε να καταμετρηθούν και τέλος, γ) η ταμπλέτα No3 περιείχε διαφόρων ειδών βακτήρια, καθώς και βακτήρια γένους Clostridium, και έπρεπε να γίνει καταμέτρηση όλων των διαφορετικών αποικιών που μπορούν να αναπτυχθούν στους 22 ºC και 36 ºC (Total count). Οι μικροοργανισμοί που προέρχονταν από αυτά τα επιμολυσμένα δείγματα καλλιεργήθηκαν με τη βοήθεια των κατάλληλων για την ανάπτυξη τους θρεπτικών υλικών.

ΕΝΟΤΗΤΑ 7

7.1. Εξοπλισμός και απαραίτητα υλικά

7.1.1. Εξοπλισμός

α) Για την προετοιμασία δειγμάτων

- Κλίβανος
- Μηχάνημα απιονισμένου νερού
- Πιπέτα (10 mL)
- Πουάρ
- Εστία φλόγας
- 4 γυάλινες φιάλες (1 L)
- Ηλεκτρονικό θερμόμετρο

β) Για την προετοιμασία υποστρωμάτων

- Υλικό παρασκευής Y.E.A.
- Υλικό παρασκευής O.G.A.
- Υλικό παρασκευής P.S.A.
- Υλικό παρασκευής C.C.A
- Εστία θέρμανσης
- Ζυγός ακριβείας
- Κουτάλα
- Σπάτουλα
- Χωνί
- CN supplement

γ) Για την καλλιέργεια μικροοργανισμών

- Μικρά τρυβλία Petri
- Μεγάλα τρυβλία Petri

- Πιπέτα 1 mL (Εικόνα 12)
- Επωαστές (22 ºC, 36 ºC, 44 ºC), (Εικόνα 3)
- Λαβίδα
- Χωνιά μικροβιολογίας
- Υδατόλουτρο (45 ºC, 72 ºC)
- Μεμβράνες νιτρικής κυτταρίνης
- Αναερόβιο δοχείο

Εικόνα 1. Επωαστές.

δ) Για την καταμέτρηση και την ταυτοποίηση αποικιών

- Μηχάνημα UV ακτινοβολίας
- Αντιδραστήριο Nessler
- Τεστ οξειδάσης
- Μέσο καλλιέργειας King B
- Κρίκος μικροβιολογικός
- Μικροσκόπιο
- Σταγόνες υπεροξειδίου του υδρογόνου

7.1.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε ξεχωριστή γυάλινη φιάλη (1 L). Σε αυτές προστέθηκε απιονισμένο νερό και αποστειρώθηκαν στους 121 ºC για 15 min. Μόλις

τελείωσε η αποστείρωση και το νερό έφτασε στους, 25 ºC ξεκίνησε η παραγωγή των δειγμάτων. Αρχικά με τη χρήση πιπέτας (10 mL) παίρνεται μια ποσότητα αποστειρωμένου νερού και τοποθετείται στο φιαλίδιο που βρίσκεται η ταμπλέτα. Για να γίνει όμως σωστή μεταφορά περιεχομένου της ταμπλέτας στο απιονισμένο νερό, πραγματοποιείται με την ίδια πιπέτα ανταλλαγή υγρών από το ένα φιαλίδιο στο άλλο τρεις φορές. Αυτό γίνεται και για τα τρία δείγματα εξίσου, όπου για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται διαφορετική πιπέτα (10 mL). Τέλος αφού παραχθεί το δείγμα, ανακινούνται καλά οι φιάλες για να έχει γίνει σίγουρα σωστή ομογενοποίηση..

7.1.3. Υλικά και αντιδραστήρια

Εκτός από τα δείγματα προετοιμάσαμε και τα υλικά που θα χρησιμοποιήσουμε για το πείραμα αυτό. Ως υλικά αναφέρονται τα θρεπτικά υποστρώματα που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Αυτά είναι το Y.E.A. [Yeast Extract Agar], O.G.A [Oxytetracycline Glucose Agar], P.S.A. [Pseudomonas Selective Agar], Slanetz and Bartley Medium Agar, C.C.A. [Chromogenic Coliform Agar] και T.S.C. [Tryptose Sulfite Cycloserine agar].

Το CN supplement είναι ένα συμπλήρωμα για το θρεπτικό υπόστρωμα P.S.A. και χρησιμοποιείται είναι η διευκόλυνση ανίχνευσης της *Pseudomonas aeruginosa*.

7.2. Πειραματική διαδικασία

7.2.1. Παρασκευή θρεπτικού υλικού

Για την παρασκευή θρεπτικού υλικού γίνεται η παρακάτω διαδικασία:

Αρχικά τοποθετείται κατσαρόλα με κατάλληλο όγκο απιονισμένου νερού σε αναμμένη εστία θέρμανσης. Ταυτόχρονα ζυγίζεται η ποσότητα θρεπτικού υλικού, η οποία συλλέγεται με μια σπάτουλα. Όταν το νερό είναι χλιαρό προστίθεται σε αυτό η ποσότητα υλικού που ζυγίστηκε ανακατεύοντας καλά το μίγμα μέχρι να

ομογενοποιηθεί σωστά. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα ανακατεύεται το μίγμα για να μην κολλήσει, μέχρι να αρχίσει να βράζει. Τότε απομακρύνεται από την εστία θέρμανσης και με την βοήθεια ενός χωνιού τοποθετείται σε γυάλινες φιάλες. Στις γυάλινες φιάλες υπάρχουν ετικέτες που αναφέρεται το όνομα και η ημερομηνία παραγωγής του θρεπτικού υποστρώματος. Εφόσον έχει μοιραστεί όλο το θρεπτικό υλικό στις φιάλες, τοποθετούνται στον κλίβανο για αποστείρωση στους 121 ºC για 15 min. Τέλος μετά την αποστείρωση, το θρεπτικό υλικό αποθηκεύεται στους 5 ºC ± 3 ºC με διάρκεια δυνατής χρήσης του ένα μήνα, εκτός αν μοιραστεί σε τρυβλία που η διάρκεια αποθήκευσής του είναι 15 ημέρες.

Εικόνα 2. Εστία θέρμανσης

7.2.2. Δημιουργία καλλιεργειών

Όπως έχουμε αναφέρει ήδη οι τρόποι απομόνωσης και καταμέτρησης μικροοργανισμών που χρησιμοποιήσαμε στο πείραμα αυτό είναι η μέθοδος διήθησης μέσω μεμβράνης και η μέθοδος Pour plate (εμβολιασμού).

A. <u>Μέθοδος διήθησης:</u> Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για ανίχνευση μικροοργανισμών σε όγκους δειγμάτων (>1 mL) και πραγματοποιείται σύμφωνα με το LI 10.102 «Membrane filtration method». Στη διαδικασία αυτή αποστειρώνονται καλά τα χωνιά μικροβιολογίας (Εικόνα 5), στα οποία τοποθετείται το δείγμα, με χρήση φλόγιστρου και εστία φλόγας. Στη συνέχεια με μια λαβίδα (Εικόνα 7), η οποία πρώτα έχει εκπλυθεί με οινόπνευμα και έχει περαστεί από τη φωτιά ώστε να μην επιμολυνθεί το

δείγμα, τοποθετείται η μεμβράνη στην εσοχή του χωνιού (Εικόνα 6). Συγκεκριμένα μια στείρα μεμβράνη νιτρικής κυτταρίνης με μέγεθος πόρων 0.45 μm (Εικόνα 8). Ακολουθεί η προσθήκη του δείγματος στα χωνιά και πραγματοποιείται η διήθηση. Αφού έχει περάσει όλη η ποσότητα δείγματος μέσω της μεμβράνης, με τη λαβίδα πιάνεται η μεμβράνη και τοποθετείται σε τρυβλίο Petri με το θρεπτικό υπόστρωμα που αντιστοιχεί στον μικροοργανισμό που είναι επιθυμητό να ανιχνευτεί..

Εικόνα 5. Χωνιά μικροβιολογίας

Εικόνα 6. Εσοχή στα χωνιά μικροβιολογίας

Εικόνα 7. Λαβίδα μέσα σε οινόπνευμα

Εικόνα 8. Μεμβράνη νιτρικής κυτταρίνης

Β. <u>Μέθοδος Pour plate (εμβολιασμός):</u> Αρχικά η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για ανίχνευση μικροοργανισμών σε όγκους δειγμάτων (<1 mL). Στη διαδικασία αυτή χρειάζεται μια πιπέτα (1 mL), θρεπτικό υπόστρωμα Y.E.A (Yeast Extract Agar) και δύο τρυβλία Petri. Με τη πιπέτα, λαμβάνεται η ποσότητα δείγματος που χρειάζεται και τοποθετείται

σε ένα άδειο τρυβλίο Petri. Όλη αυτή η διαδικασία είναι απαραίτητο να γίνεται δίπλα στην εστία φωτιάς. Αφού χρησιμοποιηθεί διαφορετική πιπέτα για κάθε τρυβλίο, προστίθεται σε αυτά το θρεπτικό υλικό Υ.Ε.Α. (15-20 mL), το οποίο βρίσκεται σε υγρή μορφή, και ανακατεύεται προσεκτικά με απαλή περιστροφή. Προτού προστεθεί το Υ.Ε.Α., προκειμένου να υγροποιηθεί, τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο (45 ºC ± 1 ºC) (Εικόνα 10), για λιγότερο από 4 ώρες. Ο εμβολιασμός μπορεί να πραγματοποιηθεί όταν το θρεπτικό υπόστρωμα έχει φτάσει στους 25 ºC. Τέλος, αφού γίνει ο εμβολιασμός, αφήνετε το τρυβλίο να στερεοποιηθεί κοντά στην εστία φωτιάς ώστε να μην επιμολυνθεί.

7.2.3. Επώαση

Αφού πραγματοποιηθούν οι παραπάνω διαδικασίες, όλα τα τρυβλία τοποθετούνται στους επωαστές. Το κάθε ένα χρειάζεται τη δική του θερμοκρασία και χρονική περίοδο για να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί που περιέχει. Αυτό συμβαίνει γιατί κάθε μικροοργανισμός χρειάζεται συγκεκριμένες συνθήκες για να μπορέσει να αναπτυχθεί με το βέλτιστο τρόπο, αξιοποιώντας τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος του.

7.2.4. Καταμέτρηση αποικιών

Η καταμέτρηση αποικιών που έχουν δημιουργηθεί είναι το τελικό μέρος της πειραματικής διαδικασίας. Σε κάθε θρεπτικό υπόστρωμα αναπτύσσονται διαφορετικά είδη μικροοργανισμών. Εδώ μας ενδιαφέρει να βρεθεί και να ταυτοποιηθεί στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα αν υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη ή είναι μόνο ένα συγκεκριμένο. Όλες οι αποικίες που παράγονται διαφέρουν η μία από την άλλη, είτε χρωματικά είτε μορφολογικά. Αυτό διακρίνεται ιδιαίτερα στο θρεπτικό υπόστρωμα Υ.Ε.Α., καθώς σε αυτό μπορούν να αναπτυχθούν τα πάντα και είναι ένας δείκτης τι

να περιμένει κάποιος στα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνται για πιο συγκεκριμένες ομάδες.

7.3. Χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων

7.3.1. Y.E.A. [Yeast Extract Agar]

Αρχικά στο κεφάλαιο 7.2.1. έχει αναφερθεί ακριβώς η διαδικασία παραγωγής θρεπτικών υποστρωμάτων. Για το θρεπτικό υπόστρωμα Y.E.A. παρασκευάστηκαν 6 L περιεκτικότητας 19 g/L. Πριν γίνει η χρήση του, πραγματοποιείται μέτρηση pH, του οποίου οι τιμές πρέπει να 7.2 ± 0.2.

Το θρεπτικό υπόστρωμα Y.E.A. χρησιμοποιείται και στις δύο μεθόδους. Κατά τη μέθοδο εμβολισμού πρέπει να βρίσκεται σε υγρή μορφή, έτσι ώστε να προστεθεί στο τρυβλίο και να αναμιχθεί με το 1 mL δείγματος όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.2.2-β. Η ποσότητα θρεπτικού που προστίθεται είναι περίπου 15-20 mL. Στη μέθοδο διήθησης μέσω μεμβράνης, όπως εξηγείται στο κεφάλαιο 7.2.2-α το Y.E.A. θα πρέπει να βρίσκεται σε τρυβλία Petri και να είναι στερεό. Σε αυτή τη διαδικασία σύμφωνα με το πρότυπο ISO 6222:1999 χρησιμοποιούνται 100 mL δείγματος για την διήθηση και πιάνεται η μεμβράνη προσεκτικά και τοποθετείται στο τρυβλίο με την όψη που έχει έρθει σε επαφή με το νερό προς τα πάνω.

Αφού έχουν ολοκληρωθεί και οι δύο μέθοδοι ακολουθεί τοποθέτηση των τρυβλίων στους επωαστές. Στην πρώτη μέθοδο έχουν χρησιμοποιηθεί δύο σειρές τρυβλίων, όπου η μία σειρά τοποθετείται στους 36 ºC ± 2 ºC για 44 h ± 2 h και η άλλη σειρά στους 22 ºC ± 2 ºC για 68 h ± 4 h. Μέσα στον επωαστή όλα τα τρυβλία τοποθετούνται με τη φορά προς τα κάτω.

Τέλος μετά τη διαδικασία της επώασης ακολουθεί η καταμέτρηση αποικιών που έχουν αναπτυχθεί στα τρυβλία. Στο θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται

μεμβράνη γίνεται μέτρηση όσων βρίσκονται μόνο πάνω στη μεμβράνη σε αντίθεση με το αποτέλεσμα της μεθόδου εμβολιασμού, όπου μετρούνται όλες οι αποικίες που έχουν αναπτυχθεί στο θρεπτικό υπόστρωμα. Απορρίπτονται οι αποικίες με συρρέουσα ανάπτυξη. Ο μέγιστος αριθμός αποικιών που μπορεί να απαριθμηθεί με ακρίβεια είναι 300 αποικίες με τη μέθοδο εμβολιασμού, ενώ 100 αποικίες με τη μέθοδο διήθησης.

7.3.2. O.G.A [Oxytetracycline Glucose Agar]

Η παρασκευή O.G.A. πραγματοποιείται επίσης με τη διαδικασία που αναφέρεται στο κεφάλαιο 7.2.1.. Για το θρεπτικό υπόστρωμα O.G.A. παρασκευάστηκαν 2 L περιεκτικότητας 20 g/L. Πριν τοποθετηθεί στον κλίβανο για αποστείρωση μετράμε το pH, του οποίου η τιμή πρέπει να είναι 6.6 ± 0.2.

Το O.G.A. χρησιμοποιείται μόνο στη μέθοδο διήθησης μέσω μεμβράνης και πρέπει να είναι ήδη μοιρασμένο σε τρυβλία Petri. Για τη χρήση του O.G.A. ακολουθείται η διαδικασία που αναφέρεται στο κεφάλαιο 7.2.2-α. Η ποσότητα δείγματος που χρειάζεται για αυτή την καλλιέργεια είναι 250 mL..Στη συνέχεια το τρυβλίο επωάζεται στους 22 ºC ± 2 ºC για 5 ημέρες, τοποθετώντας το με φορά το καπάκι προς τα πάνω.

Σύμφωνα με το πρότυπο ISO 7954:1988, που χρησιμοποιείται για την απαρίθμηση ζυμομυκήτων και μούχλας στο νερό, μετά το πέρας τριών ημερών επώασης πρέπει να γίνει καταμέτρηση αποικιών που έχουν δημιουργηθεί. Συγκεκριμένα από την τρίτη έως την τελική ημέρα επώασης γίνεται η μέτρηση των αποτελεσμάτων.

Για την μέτρηση αποικιών ζυμών μετράμε όλες τις τυπικές αποικίες που έχουν μια λαμπερή όψη, μια κρεμμώδη λευκή ή ροζ-κόκκινη μελάγχρωση, με μια τακτοποιημένη ή ακανόνιστη άκρη, και είναι είτε κοίλες ή κυρτές.

Για την μέτρηση αποικιών μούχλας πρέπει να μετρηθούν όλες οι τυπικές αποικίες που έχουν μια χνουδωτή υφή, συχνά με έγχρωμες δομές σπόγγου.

Όταν περάσουν οι 5 ημέρες επώασης κρατώνται τα τρυβλία που έχουν αναπτύξει λιγότερες από 150 αποικίες. Εάν είναι δύσκολο να μετρηθούν οι αποικίες τότε λαμβάνονται οι μετρήσεις που έγιναν στις 3 ή και 4 ημέρες επώασης.

7.3.3. P.S.A [Pseudomonas Selective Agar]

Η παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος P.S.A. πραγματοποιείται σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στο κεφάλαιο 7.2.1..Για το θρεπτικό υπόστρωμα P.S.A. παρασκευάστηκαν 3 L περιεκτικότητας 48.36 g/L. Η τιμή pH αυτού του θρεπτικού υποστρώματος πρέπει να είναι 7.1 ± 0.2 και μετριέται δύο φορές, η πρώτη είναι πριν μπει για αποστείρωση και η δεύτερη πριν μοιραστεί στα τρυβλία.

Για να είναι έτοιμο προς χρήση το θρεπτικό υπόστρωμα P.S.A. και να μοιραστεί σε τρυβλία Petri χρειάζεται να προστεθεί σε αυτό CN supplement. Ανάλογα με τον όγκο του θρεπτικού υποστρώματος προσθέτουμε αντίστοιχη ποσότητα CN supplement. Στην ποσότητα θρεπτικού υποστρώματος P.S.A. που παράχθηκε αναλογούν 4 ml CN supplement περιεκτικότητας 4% v/v. Όμως για να προστεθεί το CN supplement, το θρεπτικό υπόστρωμα πρέπει να είναι σε υγρή φάση και να βρίσκεται σε 45 ºC. Οπότε αν ήταν αποθηκευμένο στους 5 ºC ± 3 ºC, τοποθετείται στον κλίβανο για λιώσιμο στους 112 ºC για 30 min και στη συνέχεια σε υδατόλουτρο στους 45 ºC ± 1 ºC για να παραμείνει λιωμένο. Αν αντιθέτως έχει μόλις παραχθεί και αποστειρωθεί τοποθετείται στο υδατόλουτρο για να παραμείνει στην υγρή του. Μόλις προστεθεί η ποσότητα CN supplement γίνεται η δεύτερη μέτρηση pH και μοιράζεται σε τρυβλία.

Το P.S.A. χρησιμοποιείται μόνο για την μέθοδο διήθησης μέσω μεμβράνης και πρέπει να είναι ήδη μοιρασμένο σε τρυβλία Petri, καθώς για την χρήση του

ακολουθείται η ίδια διαδικασία που αναφέρεται στο κεφάλαιο 7.2.1. Η μέθοδος αυτή ακολουθεί το πρότυπο ISO 16266:2006 που περιγράφει τη μέθοδο για την απαρίθμηση της *Pseudomonas aeruginosa* στο νερό. Οπότε χρησιμοποιούνται 250 mL δείγματος τα οποία διηθούνται μέσω μιας μεμβράνης. Μόλις ολοκληρωθεί η διήθηση, μεταφέρεται η μεμβράνη από τα χωνιά μικροβιολογίας σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα P.S.A. Τότε αυτό τοποθετείται στον επωαστή με φορά το καπάκι προς τα κάτω στους 36 ºC ± 2 ºC για 44 h ± 2 h.

Αφού περάσει η χρονική περίοδος επώασης ακολουθεί η καταμέτρηση των αποικιών που έχουν αναπτυχθεί. Σε αυτό το θρεπτικό υπόστρωμα αναπτύσσονται όλα τα είδη ψευδομονάδας, αλλά μπορεί να επιβεβαιωθεί συγκεκριμένα η *Pseudomonas aeruginosa*. Όταν παράγονται αποικίες με μπλε/πράσινο χρώμα, τότε μετράμε τις αποικίες ως επιβεβαιωμένη *Pseudomonas aeruginosa*. Όσες αποικίες δεν είναι γαλαζοπράσινες τις μετράμε υπό υπεριώδη ακτινοβολία στα 360 nm ± 20 nm ως πιθανή *Pseudomonas aeruginosa*. Αυτές που έχουν κοκκινοκαφέ χρώμα και δεν είναι φθορίζουσες, δεν θεωρούνται ως επιβεβαιωμένες *Pseudomonas aeruginosa*, οπότε χρειάζεται να επιβεβαιωθούν. Τέλος άλλοι τύποι με χρώμα κίτρινο ή λευκό που δεν φθορίζουν υπό υπεριώδη ακτινοβολία στα 360 nm ± 20 nm, δεν θεωρούνται *Pseudomonas aeruginosa*.

Αφού στην πειραματική διαδικασία χρειάζεται να βρεθεί ο αριθμός αποικιών *Pseudomonas aeruginosa* θα γίνουν οι εξής περεταίρω δοκιμές επιβεβαίωσης. Αρχικά απομονώνεται 1 αποικία από κάθε τύπο με ένα κρίκο εμβολιασμού μιας χρήσης σε τρυβλία Petri με Yeast extract agar, όπως υποδεικνύεται στο LI-00.700 <<Microbiological techniques>>. Γυρίζουμε τα τρυβλία με το καπάκι προς τα κάτω στους 36 ºC ± 2 ºC για 22 h ± 2 h. Ακολούθως εμβολιάζεται ένα σωληνάριο θρεπτικού ζωμού ακεταμίδης με μια καλά απομονωμένη αποικία από το Υ.Ε.Α. και

στη συνέχεια επωάζεται στους 36 ºC ± 2 ºC για 22 h ± 2 h. Τέλος με την προσθήκη 1 ή 2 σταγόνες αντιδραστηρίου Nessler στην καλλιέργεια εξετάζεται για παραγωγή αμμωνίας μετά την επώαση. Παρατηρείται αμέσως αντίδραση. Η παραγωγή αμμωνίας χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη μιας κίτρινης έως κόκκινης κεραμιδί χρωστικής. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται για τις αρχικές αποικίες προς επιβεβαίωση που είχαν γαλαζοπράσινο χρώμα και ήταν φθορίζουσες και για τις καστανέρυθρες που είναι θετικές την οξειδάση.

Ταυτόχρονα, για τις κοκκινοκαφέ αποικίες πραγματοποιείται δοκιμή οξειδάσης. Αρχικά τοποθετούνται 2 ή 3 σταγόνες αντιδραστηρίου οξειδάσης σε διηθητικό χαρτί. Με τη βοήθεια ενός κρίκου εμβολιασμού απλώνεται μέρος της καλλιέργειας στο διηθητικό χαρτί. Αν εμφανιστεί ένα σκούρο ιώδες-μπλε χρώμα μέσα σε 10-30 sec,το αποτέλεσμα είναι θετικό στην οξειδάση και επομένως πρόκειται για *Pseudomonas aeruginosa*. Για τις κοκκινοκαφέ αποικίες μπορεί να πραγματοποιηθεί και η δοκιμή κατά την οποία μεταφέρεται μια καλά απομονωμένη αποικία από το Υ.Ε.Α. σε μέσο King B με κλίση, κάνοντας μόνο μια μεσαία λωρίδα στην επιφάνεια κλίσης. Αυτό επωάζεται στους 36 ºC ± 2 ºC για 3 έως 5 ημέρες και μόλις συμβεί η ανάπτυξη, εξετάζεται η καλλιέργεια υπό υπεριώδες φως στα 360 nm ± 20 nm και σημειώνεται η παρουσία φθορισμού. Αν το σωληνάριο δεν παρουσιάσει φθορισμό παρατείνεται η επώαση έως 5 ημέρες. Εφόσον εντοπιστεί φθορισμός επιβεβαιώνεται η αποικία ως *Pseudomonas aeruginosa*.

7.3.4. Slanetz and Bartley Medium agar

Η παραγωγή Slanetz and Bartley Medium Agar ακολουθεί την ίδια διαδικασία με αυτή που αναφέρεται στο κεφάλαιο 7.2.1.,όμως έχει μια σημαντική διαφορά. Τοποθετείται από την αρχή της παρασκευής το απιονισμένο νερό που χρειάζεται στη γυάλινη φιάλη (3 L) και το βάζουμε να αποστειρωθεί στους 121 ºC για 15 min. Αφού

έχει αποστειρωθεί το αφήνετε στον πάγκο εργαστηρίου μέχρι να έχει θερμοκρασία δωματίου (25 ºC). Τότε τοποθετείται η γυάλινη φιάλη στην εστία θέρμανσης. Για το θρεπτικό υπόστρωμα Slanetz and Bartley Medium agar παρασκευάστηκαν 350 mL περιεκτικότητας 42 g/L. Μόλις είναι έτοιμο μετράτε το pH του οποίου η τιμή πρέπει να είναι 7.2 ± 0.2.

Το θρεπτικό υπόστρωμα Slanetz and Bartley agar αξιοποιείται στη μέθοδο διήθησης, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 7.2.2.-α, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 7899-2:2000, για την ανίχνευση και την απαρίθμηση των εντερικών εντεροκόκκων στο νερό. Η ποσότητα δείγματος που χρειάζεται για την ανίχνευση αυτή είναι 250 mL. Αφού πραγματοποιηθεί η διήθηση, με την λαβίδα πιάνεται η μεμβράνη και τοποθετείται σε τρυβλίο Petri με συμπαγές υλικό Slanetz and Bartley agar, διασφαλίζοντας ότι δεν παγιδεύονται φυσαλίδες ανάμεσα στην μεμβράνη και το μέσο. Μετά ακολουθεί η επώαση στους 36 ºC ± 2 ºC για 44 h ± 4 h.

Τέλος πραγματοποιείται καταμέτρηση των αποικιών που έχουν σχηματιστεί, συγκεκριμένα υπολογίζονται οι αποικίες που παρουσιάζουν κόκκινο, βυσσινί ή ροζ χρώμα.

7.3.5. C.C.A. [Chromogenic Coliform Agar]

Η παρασκευή C.C.A. είναι αντίστοιχη με αυτή του Slanetz and Bartley Medium agar, καθώς προστίθεται απιονισμένο νερό σε γυάλινη φιάλη (3L) και αποστειρώνεται. Αφού ολοκληρωθεί η αποστείρωση αφήνετε για να πέσει η θερμοκρασία του στους 25 ºC. . Για το θρεπτικό υλικό C.C.A. παρασκευάστηκαν 850 mL περιεκτικότητας 32.35 g/L.Μόλις είναι έτοιμο μετριέται η τιμή pH του, η οποία πρέπει να είναι 6.8 ± 0.2.

Το θρεπτικό υπόστρωμα C.C.A χρησιμοποιείται μόνο στη μέθοδο διήθησης σύμφωνα με τη διαδικασία όπως έχει περιγραφεί στο 7.2.1.-α. Η ποσότητα που

χρησιμοποιούμε για αυτή τη διήθηση είναι 250 mL, σύμφωνα με το πρότυπο ISO 9308-2:2012, το οποίο είναι κατάλληλο για την ανίχνευση κολοβακτηριοειδών και της *Escherichia coli*. Αφού πραγματοποιηθεί η διήθηση μεμβράνης, πιάνεται η μεμβράνη με μια λαβίδα και τοποθετείται σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα C.C.A.. Στη συνέχεια αυτό επωάζεται στους 36 ºC ± 2 ºC για 18 h ± 4 h. Μόλις περάσει το απαραίτητο χρονικό διάστημα επώασης γίνεται καταμέτρηση των αποικιών που έχουν σχηματιστεί. Συγκεκριμένα όσες έχουν αναπτυχθεί και έχουν κίτρινο χρώμα ανήκουν στα κολοβακτηριοειδή, ενώ όσες έχουν αναπτυχθεί και έχουν κίτρινο χρώμα και φθορισμό είναι *Escherichia coli*.

Εικόνα 9. Υδατόλουτρο 25 ºC

Εικόνα 10. Υδατόλουτρο 72 ºC

7.3.6. T.S.C. [Tryptose Sulfite Cycloserine agar]

Το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα ήταν έτοιμο και αποθηκεύτηκε στους 5 ºC ± 3 ºC. Για τη χρήση του ακολουθείται η ίδια διαδικασία με τα υπόλοιπα θρεπτικά υποστρώματα. Αρχικά το δείγμα που θα περνούσε από ανάλυση τοποθετήθηκε σε γυάλινα δοχεία των 50 mL, τα οποία μπήκαν σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 75 ºC ± 5 ºC (Εικόνα 11). Όταν το θερμόμετρο που τοποθετήθηκε σε ένα δεύτερο δοχείο με το απιονισμένο νερό φτάσει στους 70 ºC, διατηρούνται τα δοχεία στους 75 ºC ± 5 ºC για 15 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρονται σε τρεχούμενο νερό.

Στη συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία της διήθησης, όπως αναφέρεται στο 7.2.1.-α. Σύμφωνα με το πρότυπο ISO 6461-2:1986, που αναφέρεται στην ανίχνευση και καταμέτρηση του γένους *Clostridium*, τοποθετούνται 50 mL δείγματος από το

γυάλινο φιαλίδιο στα αποστειρωμένα χωνιά και πραγματοποιείται η διήθηση. Με τη λαβίδα τοποθετείται η μεμβράνη σε τρυβλίο Petri με το συμπαγές υλικό T.S.C., διασφαλίζοντας ότι δεν παγιδεύονται φυσαλίδες αέρα ανάμεσα στη μεμβράνη και το μέσο. Ακολουθεί η επώαση των τρυβλίων, η οποία όμως γίνεται στους 36 ºC ± 2 ºC για 20 h ± 4 h και 44 h ± 4 h αντίστοιχα υπό αναερόβιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας αναερόβιο δοχείο, στο οποίο εκτός από τα τρυβλία τοποθετείται σύστημα αναερόβιας γεννήτριας και έναν αναερόβιο δείκτη.

Αφού περάσουν 20 h ± 4 h επώασης γίνεται η πρώτη καταμέτρηση και μετά από 44 h ± 4 h επώασης γίνεται η δεύτερη. Κάθε μαύρη αποικία θεωρείται ότι προέρχεται από ένα σπόρο αναερόβιο που μειώνει τα θειώδη και άρα ανήκει στο γένος *Clostridium*. Ορισμένες αποικίες μπορεί να είναι μπεζ/γκρι χρώματος και απαιτούν περεταίρω δοκιμή επιβεβαίωσης.

Για να πραγματοποιηθεί η επιβεβαίωση γένους *Clostridium* επιλέγονται αρκετές αποικίες. Κάθε αποικία απλώνεται σε δύο τρυβλία άγαρ T.S.C., όπου το ένα επωάζεται στους 37 ºC ± 1 ºC σε αερόβιες συνθήκες για 20 h ± 4 h και το άλλο επωάζεται στους 37 ºC ± 1 ºC σε αναερόβιες συνθήκες για 20 h ± 4 h. Αυτή η δοκιμή χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση του γένους *Clostridium* (αναερόβια αυστηρώς) και του γένους *Bacillus* (αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο).

Τέλος πραγματοποιείται το τεστ καταλάσης, όπου με τη βοήθεια μιας πιπέτας τοποθετείται μια σταγόνα 3% υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου. Με αποστειρωμένο πλαστικό βρόχο αναμειγνύεται ποσότητα κυτταρικού υλικού μιας απομονωμένης καθαρής αποικίας μέσα σε αυτή τη σταγόνα υπεροξειδίου του υδρογόνου. Εάν δημιουργηθεί γαλάκτωμα, τότε το δείγμα είναι θετικό στην καταλάση και άρα πρόκειται για αποικία γένους *Clostridium*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν γι' αυτό το πείραμα ήταν τρία (3 ταμπλέτες). Στο πρώτο δείγμα μπορούσαν να αναπτυχθούν τα *Total Coliforms*, *Escherichia coli* και *Enterococci*. Στο δεύτερο δείγμα μπορούσαν να αναπτυχθούν η *Pseudomonas aeruginosa*, Moulds και Yeast. Στο τρίτο δείγμα μπορούσαν να αναπτυχθούν Total Count και *Clostridium*. Σε όλα τα δείγματα έγιναν διπλοί έλεγχοι χωρίς να υπάρξει αραίωση.

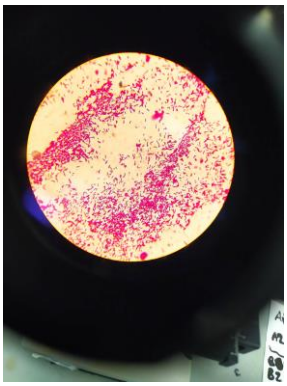
- Αποτελέσματα 1ου δείγματος

Πίνακας 3. Αποτελέσματα μετρήσεων *Coliforms*

Total Coliforms		
Θρεπτικό υπόστρωμα	1η μέτρηση	2η μέτρηση
C.C.A	40 cfu/250 mL	40 cfu/250 mL
C.C.A	40 cfu/250 mL	41 cfu/250 mL

Πίνακας 4. Αποτελέσματα μετρήσεων *Escherichia coli*

Escherichia coli		
Θρεπτικό υπόστρωμα	1η μέτρηση	2η μέτρηση
C.C.A.	35 cfu/250 mL	35 cfu/250 mL
C.C.A.	39 cfu/250 mL	39 cfu/250 mL



Εικόνα 3. Αποικία *Escherichia coli* σε μικροσκόπιο

Για τα Total coliforms και *Escherichia coli* ο έλεγχος έγινε σε 2 τρυβλία C.C.A.. Στο ένα αναπτύχθηκαν 40 αποικίες. Οι 35 από αυτές έχουν έντονο χρώμα μπλε, οπότε θεωρούνται επιβεβαιωμένη *E. coli*. Οι υπόλοιπες 5 έχουν άσπρο χρώμα. Η κάθε μία απομονώθηκε σε ξεχωριστό τρυβλίο με θ.υ. Y.E.A. και επωάστηκε στους 36 ºC για 24 ώρες. Μετά πραγματοποιήθηκε oxidase test για κάθε αποικία ξεχωριστά, όπου και οι 5 ήταν αρνητικές. Στο δεύτερο τρυβλίο αναπτύχθηκαν αρχικά 40 αποικίες από τις οποίες οι 39 ήταν επιβεβαιωμένες *E. coli* και η μια χρειάστηκε επιβεβαίωση χωρίς να είναι τελικά E. coli. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων της 2ης μέτρησης. Συγκεκριμένα 37 cfu/250 mL *E. coli* και 40 cfu/250 mL Total coliforms.

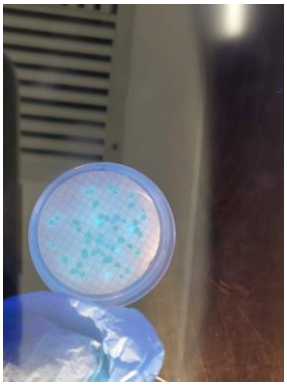
Πίνακας 5. Αποτελέσματα μετρήσεων Enterococci

Enterococci		
Θρεπτικό υπόστρωμα	1η μέτρηση	2η μέτρηση
Slanetz and Bartley Medium agar	0 cfu/250 mL	0 cfu/250 mL
Slanetz and Bartley Medium agar	0 cfu/250 mL	0 cfu/250 mL

- Αποτελέσματα 2ου δείγματος

Πίνακας 6. Αποτελέσματα μετρήσεων *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa		
Θρεπτικό υπόστρωμα	1η μέτρηση	2η μέτρηση
P.S.A.	57-58 cfu/250 mL	58 cfu/250 mL
P.S.A.	55 cfu/250 mL	55 cfu/250 mL



Εικόνα 12. Αποικίες Pseudomonas υπό φθορισμό

Για την *Pseudomonas aeruginosa* έγινε έλεγχος σε δύο τρυβλία. Στο πρώτο αναπτύχθηκαν 55 αποικίες, οι οποίες είχαν μπλε-πράσινο χρώμα με φθορισμό οπότε θεωρούνται επιβεβαιωμένη *Pseudomonas aeruginosa*. Στο δεύτερο τρυβλίο αναπτύχθηκαν 58 αποικίες. Οι 54 είχαν μπλε-πράσινο χρώμα με φθορισμό οπότε θεωρούνται επιβεβαιωμένη *Pseudomonas aeruginosa*. Η 1 αποικία είχε χρώμα κίτρινο-μπεζ με φθορισμό και απομονώθηκε σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα Υ.Ε.Α.. Οι υπόλοιπες 3 αποικίες είχαν χρώμα κίτρινο με πράσινο, η κάθε μια από αυτές απομονώθηκε επίσης σε ξεχωριστό τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα Υ.Ε.Α. Τα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Υ.Ε.Α. επωάστηκαν για 24 ώρες στους 36 ^{o}C. Στη συνέχεια από κάθε τρυβλίο εμβολιάστηκε μια καλά απομονωμένη αποικία

σε διαφορετικό σωληνάριο θρεπτικού ζωμού ακεταμίδης η κάθε μια. Τα σωληνάρια αυτά επωάστηκαν στους 36 ºC για 24 ώρες. Όταν προστέθηκαν στο κάθε σωληνάριο 2-3 σταγόνες αντιδραστηρίου Nessler παρατηρήθηκε ανάπτυξη κόκκινης κεραμιδί χρωστικής. Οπότε θεωρούνται επιβεβαιωμένες *Pseudomonas aeruginosa*. Παράλληλα με τη χρήση θρεπτικού ζωμού ακεταμίδης πραγματοποιήθηκε τεστ οξειδάσης για κάθε απομονωμένη αποικία σε θρεπτικό υπόστρωμα Y.E.A., όπου όλες βγήκαν θετικές στην οξειδάση. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων της 2ης μέτρησης. Συγκεκριμένα 57 cfu/250 mL *Pseudomonas aeruginosa*.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα μετρήσεων Moulds

Moulds				
Θρεπτικό υπόστρωμα	1η μέτρηση	2η μέτρηση	3η μέτρηση	4η μέτρηση
O.G.A.	0 cfu/250 mL	0 cfu/250 mL	0 cfu/250 mL	0 cfu/250 mL
O.G.A.	0 cfu/250 mL	0 cfu/250 mL	0 cfu/250 mL	0 cfu/250 mL

Πίνακας 8. Αποτελέσματα μετρήσεων Yeasts

Yeasts				
Θρεπτικό υπόστρωμα	1η μέτρηση	2η μέτρηση	3η μέτρηση	4η μέτρηση
O.G.A.	10 cfu/250 mL	13 cfu/250 mL	13 cfu/250 mL	13 cfu/250 mL
O.G.A.	15 cfu/250 mL	19 cfu/250 mL	19 cfu/250 mL	19 cfu/250 mL

- Αποτελέσματα 3ου δείγματος

Πίνακας 9. Αποτελέσματα μετρήσεων Total Count 36 ºC (1 mL)

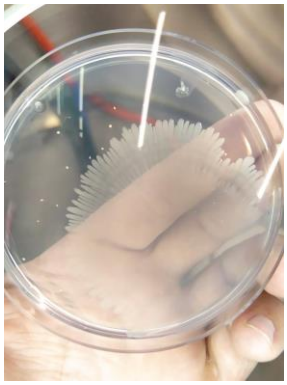
Ολική Μικροχλωρίδα (36 ºC)		
Θρεπτικό υπόστρωμα	1η μέτρηση	2η μέτρηση
Y.E.A.	40 cfu/1 mL	40 cfu/1 mL
Y.E.A.	36 cgu/1 mL	36 cfu/1 mL

Πίνακας 10. Αποτελέσματα μετρήσεων Total Count 22 ºC (1 mL)

Ολική Μικροχλωρίδα (22 ºC)		
Θρεπτικό υπόστρωμα	1η μέτρηση	2η μέτρηση
Υ.Ε.Α.	40 cfu/1 mL	42 cfu/1 mL
Υ.Ε.Α.	38 cgu/1 mL	40 cfu/1 mL

Πίνακας 11. Αποτελέσματα μετρήσεων Total Count 22 ºC (100 mL)

Ολική Μικροχλωρίδα (22 ºC)		
Θρεπτικό υπόστρωμα	1η μέτρηση	2η μέτρηση
Υ.Ε.Α.	41 cfu/100 mL	48 cfu/100 mL
Υ.Ε.Α.	39-40 cfu/100 mL	48-51 cfu/100 mL



Εικόνα 4. Αποικίες Total Count

Τα τελικά αποτελέσματα του 3ου δείγματος είναι τα εξής. Για τα Total Count 36 ºC (1 mL) είναι 38 cfu/1 mL. Για τα Total Count 22 ºC (1 mL) είναι 40 cfu/1 mL. Τέλος για τα Total Count 22 ºC (100 mL) είναι 48 cfu/100 mL.

Πίνακας 12. Αποτελέσματα μετρήσεων *Clostridium*

Clostridium		
Θρεπτικό υπόστρωμα	1η μέτρηση	2η μέτρηση
T.S.C.	0 cfu/50 mL	0 cfu/50 mL
T.S.C.	0 cfu/50 mL	0 cfu/50 mL

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως προαναφέρθηκε το P-test είναι μία διαδικασία που πραγματοποιείται στα εργαστήρια της Nestle, με σκοπό να εξετάσει τις γνώσεις και την ικανότητα του προσωπικού. Για το λόγο αυτό ζητήθηκε στις ταμπλέτες να γίνουν οι αντίστοιχοι έλεγχοι που θα πραγματοποιούνταν στα προϊόντα παραγωγής του κάθε εργοστασίου.

Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν ακολούθησαν το πρωτόκολλο που ακολουθεί το εργαστήριο μικροβιολογίας του εργοστασίου Κορπή.

- Η κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε ανά 24 ώρες.
- Κατά την πραγματοποίηση του πειράματος βρέθηκε πως σε αυτά τα δείγματα υπήρχαν αποικίες *E. Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, Total Coliforms, Yeasts, Total Count (22 ºC, 36 ºC).
- Σύμφωνα με τις παραπάνω μετρήσεις δεν αναπτύχθηκαν καθόλου αποικίες *Enterococci*, *Clostridium* και Moulds.
- Παρατηρήθηκε, πως δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά ανάπτυξης από το ένα τρυβλίο στο άλλο για κάθε δείγμα.
- Επίσης η ανάπτυξη αποικιών από τη μία μέτρηση στην άλλη δεν είναι μεγάλη. Σε κάποιες περιπτώσεις όπως τα Total Coliforms δεν υπήρχε καμία επιπλέον ανάπτυξη.
- Η αρμόδια εταιρεία που δημιούργησε το P-test, έστειλε στον υπεύθυνο του εργαστηρίου τα αποτελέσματα για κάθε μικροοργανισμό που

υπήρχε σε κάθε ταμπλέτα, αναφέροντας τα όρια μικροοργανισμών που θεωρούνταν έγκυρα να αναπτυχθούν. Τα όρια για το κάθε μικροοργανισμό αναγράφονται παρακάτω στον Πίνακα 13.

- Συγκρίνοντας τα όρια που στάλθηκαν από την αρμόδια εταιρεία και τα αποτελέσματα που βρέθηκαν, το πείραμά πραγματοποιήθηκε με επιτυχία.
- Το νερό είναι χαμηλής επικινδυνότητας σαν προϊόν συγκριτικά με τις άλλες εταιρείες που ανήκουν στην Nestle, οπότε αυτός είναι και ο λόγος που μπορεί να υπάρχει μεγάλη απόκλιση στα αποτελέσματα, παρόλο που είναι εντός ορίων.
- Άρα η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για το P-test ήταν αποτελεσματική και εφαρμόστηκε σωστά από το προσωπικό στις εγκαταστάσεις της εταιρείας.

Επιτρεπτά όρια εύρεσης μικροοργανισμών	
Μικροοργανισμοί	**Αριθμός αποικιών**
Coliforms	9~92
Escherichia coli	7~66
Pseudomonas aeruginosa	17~171
Enterococci	0
Moulds	0
Yeasts	8~82
Clostridium	0
Total Count 22 ºC (1 mL)	19~142
Total Count 36ºC (1 mL)	14~136
Total Count 22 ºC (100 mL)	15~149

Πίνακας 13. Όρια μικροοργανισμών από το P-test

ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

- Η έρευνα αυτή είναι χρήσιμη για να μάθει κανείς τις αναλύσεις που πραγματοποιούνται για τον έλεγχο μικροβιολογικής καθαρότητας του εμφιαλωμένου νερού καθώς και τον απαραίτητο εξοπλισμό για την υλοποίησή αυτού.
- Μπορεί κανείς να μάθει πληροφορίες τόσο για το νερό όσο και για τον τρόπο που μπορούμε να το βρούμε και να το αξιοποιήσουμε.
- Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε σε αυτή την έρευνα μπορεί να είναι χρήσιμη για κάποιον που θέλει να πραγματοποιήσει μικροβιακό έλεγχο σε εμφιαλωμένο νερό για ανίχνευση παθογόνων και μη παθογόνων μικροοργανισμών.
- Επίσης μαθαίνει κανείς τους παράγοντες που επηρεάζουν και αλλοιώνουν την ποιότητα και τα χαρακτηριστικά του νερού. Συγκεκριμένα τους μικροοργανισμούς που είναι πιθανό να υπάρχουν σε αυτό, καθώς και τα όρια που ορίζει η νομοθεσία για αυτά έτσι ώστε να μην αποτελούν επικίνδυνο για τον άνθρωπο να το καταναλώσει.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική βιβλιογραφία

1. [Αδαμαντίδου, Σμ., Γεωργάτου, Μ., Γιαπιτζάκης, Χ., Λακκά, Λ., Νοταράς, Δ., Φλορεντίν, Ν., Χατζηγεωργίου, Γ., Χαντηκωντή, Ολ. (χ.χ.). ΒΙΟΛΟΓΙΑ Γενικής Παιδείας Β' Γενικού Λυκείου: ΒΙΟΓΕΩΧΗΜΙΚΟΙ ΚΥΚΛΟΙ. ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ]
2. [Βικιπαίδεια, 2018]
3. [Ε.Ε L 164/56 της 26.6.2009, σ.7]
4. [Ε.Ε L 435/58 της 23.12.2020, σ.14]
5. [ΕΦΕΤ (2012). ΟΔΗΓΟΣ ΟΡΘΩΝ ΠΡΑΚΤΙΚΩΝ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΣΚΕΥΑΣΜΕΝΑ ΝΕΡΑ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΗ. Αναθεωρημένη έκδοση, σ.10]
6. [Καλιάτσος Α. (2021). Αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών και ιών και απομάκρυνση γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά από λύματα τεχνητών υδροβιότοπων, Πολυτεχνείο Κρήτης, Πτυχιακή εργασία]
7. [Λαζαράκη, Μ., Νεντέλκε, Τζ. (2008). Διερεύνηση της ποιότητας του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης και των παραμέτρων που την επηρεάζουν, Κρήτη, Πτυχιακή εργασία]
8. [Μπαλατσούρας, Γ. (2006). Μικροβιολογία Τροφίμων, Αθήνα, Εκδόσεις Έμβρυο]

9. [Παπαντωνίου, Β. (2011). Μικροβιολογικά κριτήρια και έλεγχος μικροβιακής ποιότητας εμφιαλωμένου νερού: Η ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΕΜΦΙΑΛΩΜΕΝΟΥ ΝΕΡΟΥ, Καλαμάτα, Πτυχιακή εργασία, σ. 38-40]
10. [Παρασκευαΐδου, Ε. (2022). Μέθοδοι Διασφάλισης Ποιότητας στη Χημική και Μικροβιολογική Ανάλυση Ύδατος, Θεσσαλονίκη, Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας Διαχείριση και Τεχνολογία Ποιότητας, Διπλωματική εργασία]
11. [Ρίτκος, Π. (2013). Ανίχνευση και μοριακός χαρακτηρισμός της Pseudomonas aeruginosa σε εμφιαλωμένα και πόσιμα νερά: μικροοργανισμοί-δείκτες μόλυνσης νερού, Λάρισα, Μεταπτυχιακή Διατριβή, σ. 14]
12. [ΣΕΦΥΜΕΝ (2022). Κατηγορίες Νερού, Άρθρο]
13. [Σπηλιοπούλου, Ι. (2014). Μεθοδολογίες ISO αναλύσεις μικροβίων-δεικτών μόλυνσης νερού, ΕΣΔΥ, σ. 9-53]
14. [Σπηλιοπούλου, Ι. (2021). Οι απαιτήσεις για τον μικροβιολογικό έλεγχο στο νερό ανθρώπινης κατανάλωσης, ΕΟΔΥ]
15. [Χαντζόπουλος, Β. (2022). <<ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΛΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΞΥΠΝΕΣ ΠΟΛΕΙΣ>>, Πάτρα, Διπλωματική εργασία, σ.1]
16. [Belitz, H.D., Grosch, W. & Schrieberle, P. (2018). Χημεία Τροφίμων, Εκδόσεις Τζιόλα]

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

17. [ISO 6222:1999 (1999). Enumeration of culturable micro-organisms- Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium, 2nd Edition, the International Organization for Standardization]

18. [ISO 7954:1988 (1987). Microbiology- General guidance for enumeration of yeasts and mould- Colony count technique at 25 degrees C, 1st Edition, the International Organization for Standardization]
19. [ISO 16266:2006 (2006). Water quality- Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa- Method by membrane filtration, 1st Edition, the International Organization for Standardization]
20. [ISO 7899-2:2000 (2000). Water quality- Detection and enumeration of intestinal enterococci- Part 2: Membrane filtration method, 2nd Edition, the International Organization of Standardization]
21. [ISO 9308-2:2012 (2012). Water quality. Enumeration of Escherichia and coliforms bacteria- Part 2: Most probable number method, 2nd Edition, the International Organization of Standardization]
22. [ISO 6461-2:1986 (1986). Water quality- Detection and enumeration of the spores of sulfite- reducing anaerobes (Clostridia)- Part 2: Method by membrane filtration, 1st Edition, the International Organization of Standardization]
23. [Quattrini, S., Pampaloni, B. & Brandi, M.L. (2016). Natural Mineral Waters: Chemicals Characteristics and Health Effects, CIC Edizioni Internazionali]
24. [Oki, T., Entekhabi, D. & Harrold, T.I. (2020). The Global Water Cycle: Components of the Global Water Cycle, Article, p.3]