



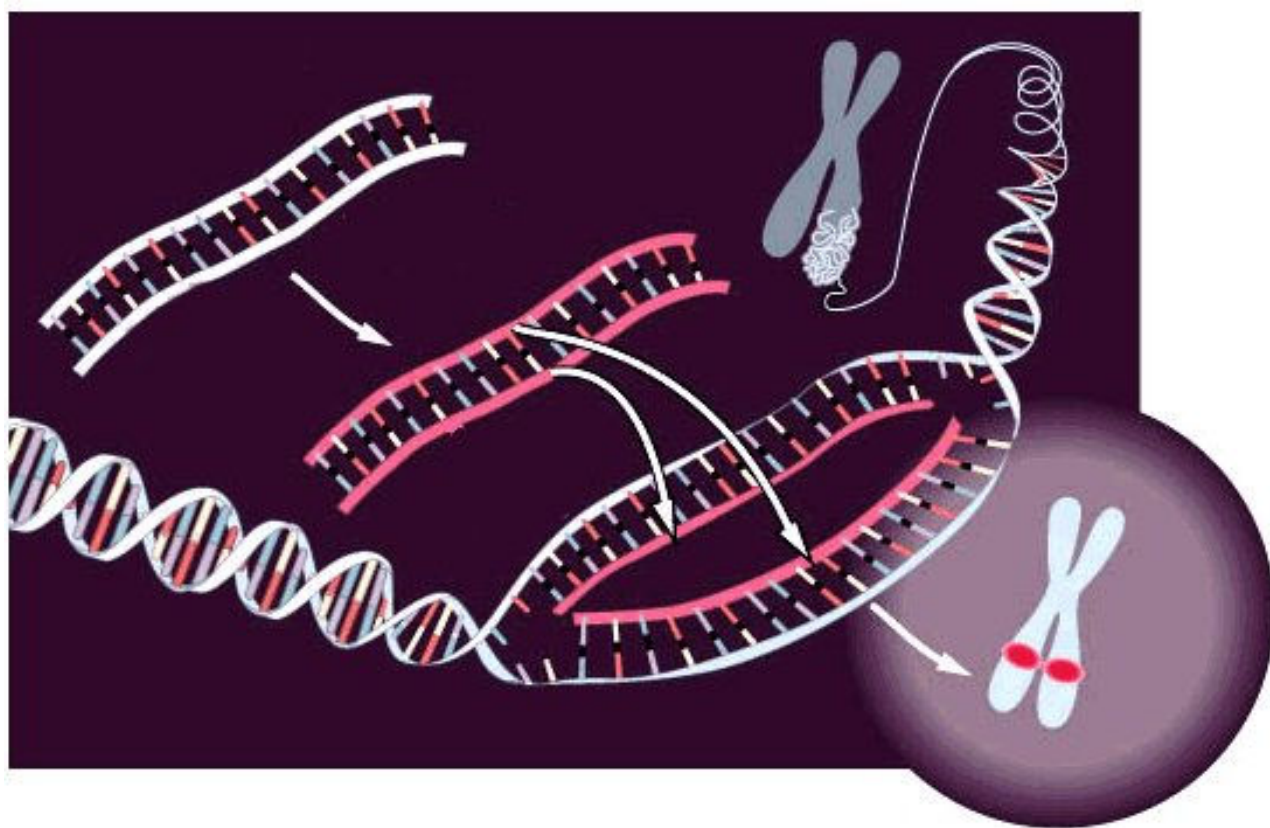
**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Περιβαλλοντική και Υγειονομική Μηχανική»**

Νίκος Πατενταλάκης

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**«ΜΕΤΡΗΣΗ ΒΙΟΑΕΡΟΖΟΛ ΣΕ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΛΥΜΑΤΩΝ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ
ΕΠΙΦΘΟΡΙΣΜΟΥ»**



**Επιβλέπων καθηγητής: Καλογεράκης Νικόλαος
Εξεταστική επιτροπή : Λαζαρίδης Μιχάλης
Μαντζαβίνος Διονύσης**

Περίληψη

Η μέτρηση των μικροοργανισμών που διαφεύγουν από την επιφάνεια του νερού (Βιοαεροζόλ) σε Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων είναι ένα αντικείμενο μελέτης που αποκτάει ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Οι λόγοι μέτρησης του επιπέδου συγκέντρωσης των μικροοργανισμών έχουν να κάνουν, εκτός από το καθαρά επιστημονικό ενδιαφέρον ως προς τη συμπεριφορά των εγκαταστάσεων και τις δυνατότητες βελτίωσης των διαδικασιών για καλύτερη λειτουργία, με την εύρεση των συνθηκών εργασίας κάτω από τις οποίες δουλεύουν οι εργαζόμενοι στις εγκαταστάσεις.

Η μέτρηση συγκεκριμένης κατηγορίας μικροοργανισμών για την ανίχνευση της παρουσίας μόλυνσης έχει καθιερωθεί στην βιβλιογραφία. Ένας από τους συνήθεις μετρούμενους μικροοργανισμούς, και για τον οποίο υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία είναι η *Escherichia coli*. Από τις διάφορες μεθόδους που είναι διαθέσιμοι για μέτρηση, θα γίνει εφαρμογή μεθόδων επιφθορισμού, και συγκεκριμένα της μεθόδου Fluorescence in Situ Hybridization και DAPI. Οι μέθοδοι αυτοί βασίζονται στην χρώση τμημάτων των μικροοργανισμών, συνήθως στην μεμβράνη, με ουσίες που δίνουν φθορισμό και μπορούν να μετρηθούν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Με την μέθοδο DAPI γίνεται ανίχνευση συγκέντρωσης του συνόλου των μικροοργανισμών που είναι παρών στο φίλτρο, ενώ η μέθοδος FISH είναι πιο εξειδικευμένη, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, με το κατάλληλο υλικό, για την ανίχνευση του συγκεκριμένου είδους μικροοργανισμών.

Με χρήση αυτών των δύο μεθόδων θα γίνει μια προσπάθεια ανίχνευσης των επιπέδων συγκέντρωσης των μικροοργανισμών *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae* στον αέρα σε μια Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων, από διάφορα σημεία της εγκατάστασης και να γίνει μια αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

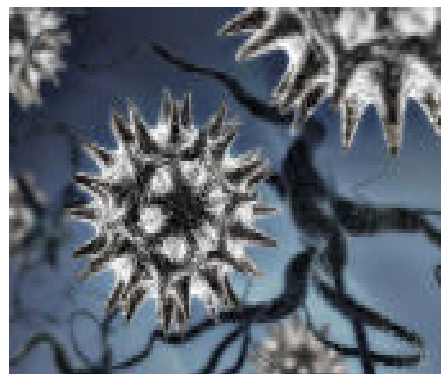
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Βιοαεροζόλ.....	1
1.1.1 Ορισμός του Βιοαεροζόλ.....	1
1.1.2 Προέλευση του Βιοαεροζόλ.....	2
1.1.3 Μεγέθη Βιοαεροζόλ.....	3
1.1.4 Αρχές κίνησης Βιοαεροζόλ.....	4
1.1.5 Βιωσιμότητα Βιοαεροζόλ.....	5
1.2 Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Αυμάτων.....	6
1.2.1 Παραγωγή και διάδοση σωματιδίων Βιοαεροζόλ σε Ε.Ε.Α.....	6
2. Υγεία και μέθοδοι προστασίας σε Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Αυμάτων.....	8
2.1 Κίνδυνοι υγείας εργαζομένων σε Ε.Ε.Α.....	8
2.1.1 Κατηγορίες κινδύνων.....	8
2.1.2 Τρόποι επαφής με τον άνθρωπο.....	9
2.1.3 Τρόποι δράσης κινδύνων στην υγεία.....	9
2.2 Βακτηριακή δράση.....	11
2.2.1 Κατηγορίες επικίνδυνων βακτηρίων.....	11
2.2.2 Βακτηριακοί κίνδυνοι.....	13
2.2.3 Κύρια συμπτώματα βακτηριακής μόλυνσης.....	14
2.2.4 Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	17
2.3 Αρχές προστασίας εργαζομένων σε Ε.Ε.Α.....	19
2.3.1 Μέθοδοι απολύμανσης.....	22
2.4 Νομοθεσία.....	23
3. Μέθοδοι μέτρησης μικροοργανισμών.....	24
3.1 Μέθοδοι συλλογής μικροοργανισμών.....	24
3.2 Μέθοδοι επεξεργασίας δειγμάτων.....	27
3.2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας.....	27
3.2.2. DAPI.....	30
3.2.3 F.I.S.H.....	32
3.2.4 Άλλες μέθοδοι μέτρησης.....	36
3.3 Προβλήματα και περιορισμοί.....	36
3.4 Ομάδες μετρούμενων μικροοργανισμών.....	39
4. Πειραματική διαδικασία.....	41
4.1 Αντικείμενο μελέτης.....	41
4.2 Χώρος μετρήσεων.....	42
4.3 Υλικά και μέθοδοι Ανάλυσης.....	46
4.3.1 Μέθοδος καλλιέργειας.....	46
4.3.2 DAPI.....	48
4.3.4 F.I.S.H.....	49
4.4 Παρουσίαση αποτελεσμάτων και σχολιασμός.....	53
4.4.1 Αποτελέσματα μεθόδου καλλιέργειας.....	53
4.4.2 Αποτελέσματα μεθόδου χρώσης DAPI.....	56
4.4.3 Αποτελέσματα μεθόδου F.I.S.H.....	60
4.4.4 Σχολιασμός και συμπεράσματα.....	66
Βιβλιογραφία.....	69

1. Εισαγωγή

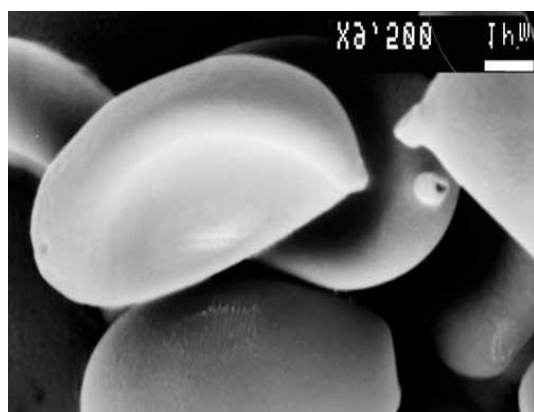
1.1 Βιοαεροζόλ

1.1.1 Ορισμός του Βιοαεροζόλ

Η διεθνής βιβλιογραφία περιέχει πληθώρα επιστημονικών ορισμών του όρου βιοαεροζόλ, με κάθε ορισμό να πηγάζει από το αντικείμενο έρευνας και την επιστημονική σκοπιά από την οποία αντιμετωπίζει ο εκάστοτε επιστήμονας το φαινόμενο. Ο γενικότερος ορισμός, σύμφωνα με τον C.S.Cox – Bioaerosols Handbook [21] δίνεται ως: “Βιοαεροζόλ είναι το αεροζόλ βιολογικής προέλευσης, και το οποίο ασκεί βιολογική δράση σε ζώα και φυτά, λόγω της βιωσιμότητάς του, της μολυσματικής του δράσης, της αλλεργιογόνου δράσης του, της τοξικότητάς του, της φαρμακολογικής ή άλλης βιολογικής ιδιότητάς του, με αεροδυναμική διάμετρο της τάξης των 0.5 ως 100 μm ”.



Ένας ακόμη περιεκτικότερος ορισμός δίνεται από τους B.Lighthart, A.J.Mohr – Atmospheric Microbial Aerosols [22] ως: “Βιοαεροζόλ ονομάζονται τα αιωρούμενα σωματίδια, μεγάλα μόρια ή πτητικά συστατικά που είναι ενεργά, περιέχουν ζώντες οργανισμούς ή ελευθερώθηκαν από ζωντανούς οργανισμούς. Το μέγεθος ενός σωματιδίου βιοαεροζόλ μπορεί να ποικίλει από 100 μικρά έως 0.01 μικρό. Η συμπεριφορά των βιοαεροζόλ καθορίζεται από τους νόμους της βαρύτητας, τους ηλεκτρομαγνητικούς νόμους, τη τύρβη και τη διάχυση. Τέλος, ένας



συμπληρωματικός ορισμός δίνεται από τους P.K.Morey, J.C.Feeley, J.A.Otten – Biological Contaminations in indoor Environments [30] ως: “ Βιοαεροζόλ είναι τα αιωρούμενα σωματίδια, στερεά ή υγρής μορφής. Μπορούν σε μέγεθος να είναι μεγάλα μόρια ή πτητικά συστατικά. Περιέχουν ζώντες οργανισμούς.

Διαφέρουν σε μέγεθος, κυμαινόμενα από το κλάσμα ενός μικρού μέχρι περίπου 100 μικρά. Όμοια με τα σωματίδια της αδρανούς σκόνης, όλα τα σωματίδια βιοαεροζόλ

υπακούουν στο νόμο της βαρύτητας και επηρεάζονται από τις κινήσεις του αέρα και μεταφέρονται με τις αναταράξεις και τη διάχυση”.

Στο σύνολο τους οι ορισμοί περιέχουν το ίδιο νόημα, και δίνουν τις ίδιες βασικές πηγές προέλευσης και σχηματισμού των βιοαεροζόλ, καθώς και τους νόμους που κυβερνούν την κίνηση, μεταφορά και μετάδοση των σωματιδίων αυτών.

1.1.2 Προέλευση του Βιοαεροζόλ

Η προέλευση του βιοαεροζόλ εντοπίζεται, γενικότερα, στο περιβάλλον καθ’ αυτό. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι με τους οποίους βιολογικά υλικά μπορούν να δώσουν βιοαεροζόλ: είτε μέσω φυσικών διεργασιών, είτε μέσω ατυχημάτων ή ακόμα και με εσκεμμένη εκπομπή τους στον αέρα. Κάθε ανθρώπινη ή ζωική δραστηριότητα μπορεί να δώσει Βιοαεροζόλ. Έτσι, Βιοαεροζόλ σχηματίζεται από τα κύτταρα (νεκρά ή ζωντανά) τα οποία ξεφεύγουν από την επιδερμίδα του ανθρώπου και των ζώων, ακόμα και σε περίπτωση που οι άνθρωποι είναι ντυμένοι. Ενέργειες όπως το φτάρνισμα και ο βήχας μπορούν να οδηγήσουν στην αεριοποίηση βακτηρίων [25]. Βιοαεροζόλ προκύπτει και από την επιφάνεια των φύλλων και του κορμού των φυτών, καθώς και από μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες, μούχλα κ.α) οι οποίοι προσκολλώνται σε αιρούμενα σωματίδια, τα οποία γίνονται ο φορέας τους, και με αυτούς ταξιδεύουν με την κίνηση του αέρα και άλλες μεθόδους που θα περιγραφούν παρακάτω. Η επίδραση του αέρα στο έδαφος, ανατάραξη του νερού και η πτώση των σταγόνων της βροχής στο έδαφος, είναι οι μεγαλύτερες πηγές βιοαεροζόλ. Η καλλιέργεια της γης και η επεξεργασία των λυμάτων και αποβλήτων είναι επίσης σημαντικοί παράγοντες. Συγκεκριμένα, η έκρηξη των φυσαλίδων του αέρα, που παρέχεται στις δεξαμενές αερισμού ως παροχή οξυγόνου στην διαδικασία της βιοαποικοδόμησης, μόλις αυτές φτάσουν στην επιφάνεια της δεξαμενής, είναι σημαντική πηγή βιοαεροζόλ για το περιβάλλον [26]. Τέλος, γεωργικές δραστηριότητες όπως η εκτροφή ζώων, διεργασίες επεξεργασίας τροφίμων, ιδιαίτερα γαλακτοκομικών προϊόντων παράγουν υψηλές τιμές βιοαεροζόλ [22].

Όσο αναφορά τους εσωτερικούς χώρους, ο σχηματισμός των βιοαεροζόλ οφείλεται, όπως περιγράφεται από τους Paul A. Jensen, Ph.D., PE, CIH και Millie P. Schafer, Ph.D., [23], στις συνθήκες που επικρατούν στους χώρους εργασίας σε θερμά κλίματα (κίνηση πολλών ατόμων, ύπαρξη φυτών και λειτουργία κλιματιστικών), σε συνδυασμό με τον ελλιπή αερισμό των κτηρίων αυτών και ανανέωση του εσωτερικού αέρα, που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις βιοαεροζόλ με εξωτερικό αέρα.

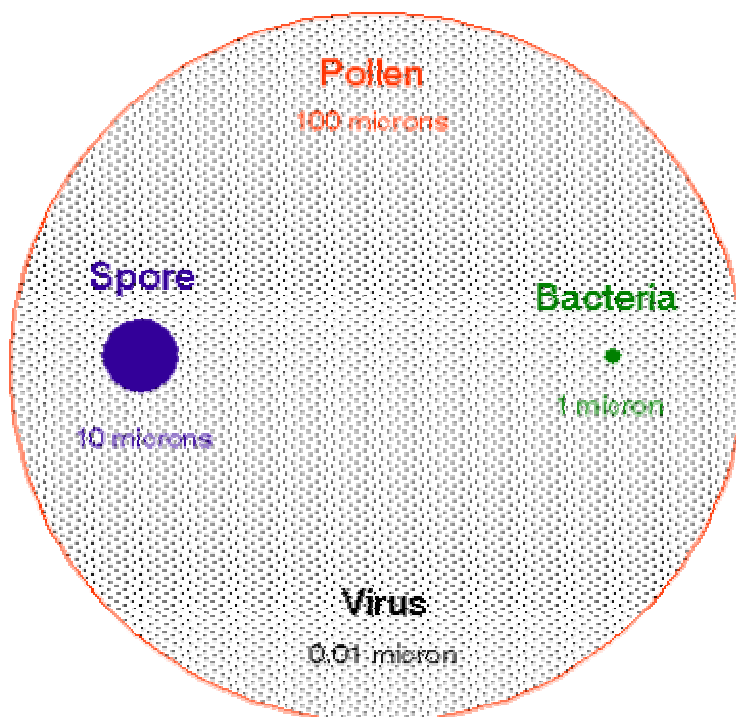
Παρομοίως, οι υδρατμοί, που σε άλλες περιπτώσεις θα είχαν εξαχθεί στο εξωτερικό περιβάλλον, συμπυκνώνονται σε ψυχρές επιφάνειες, με τον ίδιο τρόπο που συμβαίνει στα ελλιπώς μονωμένα κτήρια, χωρίς κλιματιστικά, και δημιουργούν συνθήκες για την μικροβιακή ανάπτυξη που σχετίζεται με τη δημιουργία βιοαεροζόλ [24]. Τέλος οι νοσοκομειακές εγκαταστάσεις και κέντρα περίθαλψης, που δεν αποτελούν απλά πηγές βιοαεροζόλ αλλά και χώρους που η παρουσία αυτών είναι βλαβερή, επομένως η μέτρηση και αντιμετώπιση της εκπομπής σε αυτούς τους χώρους είναι απαραίτητη [30]. Γενικότερα, στους εσωτερικούς χώρους η παραγωγή βιοαεροζόλ συνδέεται άμεσα με τη Νόσο του Νοσούντως Κτιρίου, που είναι νέο παρατηρηθέν φαινόμενο, και αντικείμενο ιατρικής έρευνας.

Αναφορικά, η ποσοστιαία κατανομή των όγκων της συνολικής αερόβιας μικροβιακής ύλης (Βιοαεροζόλ) που δημιουργείται από βιολογικό υλικό σε απομακρυσμένες περιοχές, κατοικημένες περιοχές και απομακρυσμένα θαλάσσια περιβάλλοντα είναι 28%, 22% και 10% αντίστοιχα [27]. Από αυτή τη παρατήρηση μπορούμε να συμπεράνουμε ότι ο σχηματισμός βιοαεροζόλ δεν είναι κάτι που οφείλεται στην ανθρώπινη δραστηριότητα, ή είναι ένα νέο φαινόμενο, αλλά ότι είναι μια φυσική διαδικασία. Ο σχηματισμός και η ύπαρξη του, όμως, σε κατοικημένες περιοχές και εσωτερικούς χώρους κτηρίων έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια.

1.1.3 Μεγέθη Βιοαεροζόλ

Τα μεγέθη των σωματιδίων του βιοαεροζόλ ποικίλουν ανάλογα με τον τρόπο σχηματισμού τους και την πηγή τους. Τα μεγέθη κυμαίνονται από 15 έως 400 nm για τους ιούς, σε 0.3 με 10 μm για τα βακτήρια, μέχρι και τα 1 με 100 μm για τα σπόρια των μυκήτων, τη γύρη, τη σκόνη από τις διεργασίες [28]. Συγκεκριμένες μετρήσεις, που έχουν γίνει σε μικροοργανισμούς, έχουν δείξει ότι: Για τη γύρη των ανεμόφυλλων φυτών οι τυπικές διάμετροι είναι 17 με 58 μm (Stanley and Linskins, 1974), στα μυκητοσπόρια 1 με 30 μm (Gregory, 1973), τα βακτήρια κυμαίνονται από .025 έως 8 μm (Thompson, 1981) ενώ οι ιοί έχουν διάμετρο μικρότερη από 0.3 μm (Taylor, 1988) [27].

Στην ακόλουθη εικόνα φαίνεται η αναλογία της τάξης των μεγεθών των σωματιδίων που αποτελούν το βιοαεροζόλ.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της αναλογίας των μεγεθών των σωματιδίων που αποτελούν το βιοαεροζόλ. Χαρακτηριστική είναι η διαφορά της τάξης μεγεθών του ιού με τα βακτήρια (10^2), με το δεύτερο να είναι μια απλή τελεία, που δείχνει πόσο μικρό μέγεθος έχει ένας ιός.

Η τυπική πυκνότητα των σωματιδίων βιοαεροζόλ κυμαίνεται μεταξύ 0.9 και 1.3 g/cm^3 , ενώ η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη τιμή για τους υπολογισμούς είναι τα 1.1 g/cm^3 [21].

1.1.4 Αρχές κίνησης Βιοαεροζόλ

Το κοινό χαρακτηριστικό όλων των αεροζόλ είναι η αεροδυναμική τους συμπεριφορά, και συγκεκριμένα για τα βιοαεροζόλ συμπεριλαμβάνονται και οι νόμοι που αφορούν τις βιολογικές τους ιδιότητες (π.χ βιωσιμότητα) [21]. Η συμπεριφορά οποιουδήποτε σωματιδίου στην ατμόσφαιρα θα εξαρτηθεί από το μέγεθος του, την πυκνότητα του και το σχήμα του. Επίσης, οι αντιδράσεις στις οποίες θα συμμετέχει ένα χημικό συστατικό (ρύπος) είναι μια σημαντική πλευρά της τύχης του στο περιβάλλον [29]. Η αεροδυναμική διάμετρος ενός σωματιδίου ορίζεται ως η διάμετρος ενός ισοδύναμου σωματιδίου, που συμπεριφέρεται με τον ίδιο τρόπο με το σωματίδιο υπό εξέταση, αλλά είναι σφαιρικό και έχει πυκνότητα ενός γραμμαρίου ανά κυβικό εκατοστό [27].

1.1.5 Βιωσιμότητα Βιοαεροζόλ

Η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών στο περιβάλλον εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Οι σημαντικότεροι από αυτούς περιγράφονται παρακάτω:

- Δομή: Ένας πρώτος λόγος επηρεασμού της βιωσιμότητας των μικροβίων και των αλλεργιογόνων είναι η ίδια τους η θερμοδυναμική σταθερότητα, με τις μεμβράνες τους να είναι ελάχιστα σταθερές και τα νουκλεϊκά οξέα ακόμη περισσότερο. Επομένως, οι περισσότεροι μικροοργανισμοί επηρεάζονται από λόγους που σχετίζονται με την επίδραση πιεστικών (stressing) συνθηκών σε αυτούς. Λόγω της διαφοράς στην ενέργεια που ασκεί κάθε παράγοντας επηρεασμού στο σωματίδιο, κάθε παράγοντας πίεσης, μικροοργανισμοί διαφορετικής σταθερότητας ενδέχεται να επιβιώνουν υπό διαφορετικές συνθήκες (ξήρανση, ακτίνες UV, σχετική υγρασία, θερμοκρασία κ.α).
- Σχετική υγρασία και θερμοκρασία: Πολλά βιολογικά υλικά είναι υγροσκοπικά και επιδεικνύουν υστέρηση στις ισόθερμες απορρόφησης νερού. Μετά την δημιουργία του βιοαεροζόλ, οι συνθήκες ανταλλαγής νερού μεταξύ μικροοργανισμού και περιβάλλοντος εξαρτώνται από την επικρατούσα σχετική υγρασία, αλλά λόγω της υστέρησης, η ισορροπία νερού εξαρτάται από τη διεύθυνση της ροής του νερού. Η αποθήκευση σε μια τιμή σχετικής υγρασίας, επομένως, δίνει στην πράξη, μεγαλύτερες σταθερές ισορροπίας νερού για την αφυδάτωση, παρά για την εφίδρωση.
- Οξυγόνο: Η τοξικότητα του οξυγόνου στο βιοαεροζόλ που αποτελείται από φυτικά βακτήρια παρατηρείται μόνο σε περιβάλλοντα με σχετική υγρασία μικρότερη του 70% και αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου, μέχρι την τάξη του 30%.
- Ακτινοβολία: Η επίδραση της ακτινοβολίας στα σωματίδια του βιοαεροζόλ τείνει να ακολουθήσει αυτές που παρατηρούνται σε υδατικά περιβάλλοντα ή όταν επιδράει με την στερεή επιφάνεια, αλλά αυξάνεται λόγω της ξήρανσης και του οξυγόνου. Η πιο δυνατή ενεργειακά ακτινοβολία (ακτίνες γ, ακτίνες χ, UV) επιφέρει ενδιάμεσες αντιδράσεις ελεύθερων ριζών, καταστρέφοντας έτσι τα νουκλεϊκά οξέα, τις πρωτεΐνες, τα σάκχαρα, τα λιπίδια και τις μεμβράνες, συμπεριλαμβάνοντας και το σχηματισμό διμερών δεσμών θυμίνης-θυμίνης, σπάσιμο του νήματος του DNA και των αλληλένδετων δεσμών των πρωτεϊνών, τη διάσπαση και το

πολυμερισμό. Η πολύ υψηλή ακτινοβολία σπάει τους ομοιοπολικούς δεσμούς απευθείας [21].

1.2 Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων

Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, ή όπως είναι γνωστές ‘Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Αστικών Λυμάτων’, είναι μονάδες οι οποίες έχουν ως στόχο την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων που παράγονται από αστικές ή βιομηχανικές περιοχές, μέσω φυσικών και μηχανικών διεργασιών, με σκοπό την αφαίρεση των μολυσματικών και ρυπαντικών παραγόντων που έχουν περιέλθει στα νερά αυτά μέσω της χρήσης τους για την κάλυψη των αστικών ή βιομηχανικών αναγκών. Τα υγρά απόβλητα μεταφέρονται μέσω των αγωγών του δικτύου λυμάτων της πόλης στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, όπου είτε επεξεργάζονται κατάλληλα και γίνεται η επαναδιάθεση τους σε φυσικούς αποδέκτες είτε γίνεται επαναχρησιμοποίηση τους, για αρδευτικούς σκοπούς ή εμπλουτισμό υδροφορέων [17].

Ο σχεδιασμός τους γίνεται, σε γενικό βαθμό, για την αφαίρεση του βιολογικού φορτίου (Biological Oxygen Demand) και των θρεπτικών υλικών από τα λύματα, αλλά πολύ σπάνια έχουν ως σχεδιαστικό στόχο την αφαίρεση των παθογόνων. Η συμβατική επεξεργασία μειώνει τον αριθμό των εντερικών μικροβίων, αλλά ο βαθμός μείωσης κυμαίνεται σε διάφορα επίπεδα, και η εκροή μπορεί να περιέχει υψηλές τιμές συγκέντρωσης κολοβακτηριδίων. Μια φυσικοχημική διεργασία που λειτουργεί σε ικανοποιητικό βαθμό, μπορεί να αφαιρέσει το 90-99% των μικροβίων, αλλά σε μερικές περιπτώσεις η απομάκρυνση είναι πολύ μικρή. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί έχει βρεθεί ότι μπορούν ακόμα και να πολλαπλασιαστούν στα λύματα ή τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων [7].

1.2.1 Παραγωγή και διάδοση σωματιδίων Βιοαεροζόλ σε Ε.Ε.Λ

Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων αποτελούν μια σημαντική πηγή βιοαεροζόλ, ειδικά εκείνα τα στάδια που περιέχουν κινούμενους μηχανισμούς, και στα σημεία που γίνεται αερισμός των λυμάτων (δεξαμενές αερισμού). Τα σταγονίδια που παράγονται περιέχουν, επομένως, σημαντικές ποσότητες μιας ποικιλίας μικροοργανισμών, που περιλαμβάνουν παθογόνους μικροοργανισμούς, ικανούς να μολύνουν τον άνθρωπο μέσω του αναπνευστικού συστήματος, της επαφής ή της κατάποσης.

Όπως αναφέρθηκε, η διάδοση και μεταφορά των σωματιδίων του βιοαεροζόλ επηρεάζεται από διάφορες ατμοσφαιρικές παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία, η ταχύτητα του ανέμου και η σχετική υγρασία, που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με διάφορους τρόπους, ανάλογα με τις τοπικές ατμοσφαιρικές συνθήκες (Butelli, 1988; Bitton, 1994) [5]. Η μεταφορά στον αέρα διάφορων παθογόνων είναι πολύ δύσκολο να ελεγχθεί. Η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών κάτω από ξηρές συνθήκες, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, είναι το κύριο χαρακτηριστικό που θα επηρεάσει την διάδοση τους. Τα Gram-negative βακτήρια έχει βρεθεί ότι χάνουν την βιωσιμότητα τους πιο γρήγορα από τα Gram-positive. Παρ' όλα αυτά, έχει προταθεί (Musa et al.) ότι τα *Acinetobacter calcoaceticus* μπορούν να επιβιώσουν παρατεταμένες περιόδους σε ξηρό ξύλο ή στις άκρες των δακτύλων. Η βιωσιμότητα στο σύνολο των μικροοργανισμών που μεταφέρονται στον αέρα σε Ε.Ε.Λ είναι, προς το παρόν, άγνωστη [13].

2. Υγεία και μέθοδοι προστασίας σε Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων

Το αντικείμενο απασχόλησης των εργαζομένων σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων είναι η αφαίρεση των επικίνδυνων παραγόντων μόλυνσης από τα αστικά και βιομηχανικά απόβλητα, έτσι ώστε αυτά να καταστούν ασφαλή για την επαναδιάθεση τους σε φυσικό αποδέκτη ή ακόμα και την επαναχρησιμοποίηση τους. Στο σύνολο του προσωπικού που εργάζεται σε μια Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων περιλαμβάνονται, εκτός από τους εργάτες φυσικά, και το προσωπικό που είναι υπεύθυνο για τις μετρήσεις της σύστασης των λυμάτων (χημικοί, μικροβιολόγοι) αλλά και το διοικητικό προσωπικό, με μόνη διαφορά τα εργασιακά καθήκοντα. Σε γενικές γραμμές, το προσωπικό περιλαμβάνει: τους χημικούς, τους μηχανικούς, τους τεχνικούς του εργαστηρίου, τους τεχνικούς επισκευών, τους βοηθούς, υπεύθυνους διαχείρισης και διευθυντές [17].

2.1 Κίνδυνοι υγείας εργαζομένων σε Ε.Ε.Λ

Η απασχόληση στον τομέα της επεξεργασίας λυμάτων μπορεί να αποδειχθεί αρκετά επικίνδυνη. Κατά κύριο λόγο, οι ασθένειες που προκύπτουν από την μόλυνση του νερού είναι ο βασικός τομέας επικέντρωσης του ενδιαφέροντος για τους εργάτες σε Ε.Ε.Λ [2]. Σύμφωνα με το Εθνικό Συμβούλιο Ασφαλείας των Ηνωμένων Πολιτειών (1996), οι εργαζόμενοι σε Ε.Ε.Λ υπόκεινται σε σοβαρά ατυχήματα και ασθένειες, με ρυθμό σχεδόν πέντε φορές μεγαλύτερο από το μέσο όρο ατυχημάτων των εργατών βιομηχανίας. Το νούμερο αυτό δεν δίνει την πλήρη εικόνα του κινδύνου που υφίστανται οι εργάτες των Ε.Ε.Λ, καθώς δεν περιλαμβάνουν περιπτώσεις που το ατύχημα αποφευχθεί την τελευταία στιγμή [17].

2.1.1 Κατηγορίες κινδύνων

Οι βασικότερες κατηγορίες που εκφράζουν τους κινδύνους της υγείας του εργαζομένου σε μια Ε.Ε.Λ δίνονται συνοπτικά στον ακόλουθο πίνακα:

Χημικοί	Βιολογικοί	Σωματικοί	Ορθοπεδικοί	Ψυχολογικοί
Χλωρίνη	HIV/AIDS	Θόρυβος	Ανύψωση βαρών	Βάρδιες
Χλωριούχος Σίδηρος	Ηπατίτιδα Α, Β, C	Κρύο ή ζέστη	Καθορισμένες κινήσεις	Υπερβολικά ωράρια
Διοξειδία του Θείου	Entamoeba histolytic	Δόνηση	Άτεχνη στάση	Παρενόχληση

Πίνακας 1 Συνοπτικός πίνακας κινδύνων υγείας, σύμφωνα με την Αρχή Επαγγελματικής υγείας και ασφάλειας των Ηνωμένων Πολιτειών (Occupational Safety and Health Association) [19]

2.1.2 Τρόποι επαφής με τον άνθρωπο

Υπάρχουν τέσσερις βασικοί τρόποι με τους οποίους οι μολυσματικοί παράγοντες εισέρχονται στο ανθρώπινο σώμα:

- **Αναπνοή:** Ένας εργαζόμενος μπορεί να εισπνεύσει χημικά, μερικά μάλιστα τα οποία δεν μπορεί να δει, ούτε να μυρίσει την παρουσία τους.
- **Κατάποση:** Οι εργαζόμενοι μπορεί να καταπιούν χημικά, με διάφορους τρόπους. Μπορεί να καταπιούν χημικά μαζί με το φαγητό τους, αν δεν πλένουν καλά τα χέρια τους μετά από την χρήση χημικών. Σε σκονισμένες περιοχές, μπορεί να καταπιούν χημικά, όπως σωματίδια μόλυβδου ή αμιάντου, τα οποία βρίσκονται στον αέρα ή τα οποία προσγειώνονται στο φαγητό και το ποτό (νερό, καφές κ.ο.κ.). Συγκεκριμένα, μερικές ασθένειες, όπως η ηπατίτιδα Α, μεταδίδονται με την κατάποση φαγητού ή υγρού το οποίο έχει μολυνθεί με τον ιό της ηπατίτιδως Α.
- **Δερματική επαφή (απορρόφηση):** Πολλά χημικά, και διάφορα είδη ακτινοβολίας, μπορούν να περάσουν μέσα από τη δερματική επιφάνεια. Ακόμα, μερικά είδη χημικών, μικροβίων ή ακτινοβολίας μπορούν να προκαλέσουν ασθένεια ακόμα και με την παραμικρή επαφή με το δέρμα.
- **Αμυχές (έγχυση):** Μερικά χημικά ή βακτήρια μπορούν επίσης να περάσουν μέσα στο δέρμα, αν ο εργαζόμενος τρυπηθεί ή κοπεί με ένα αιχμηρό αντικείμενο [19].

2.1.3 Τρόποι δράσης κινδύνων στην υγεία

Κάθε κίνδυνος με τον οποίο έρχεται σε επαφή ένας εργαζόμενος μπορεί να έχει διαφορετικό τρόπο με τον οποίο δρα πάνω στο ανθρώπινο σώμα, και με τον οποίο εκδηλώνεται. Παρακάτω παρουσιάζονται διάφοροι τρόποι με τους οποίους ένας κίνδυνος είναι πιθανό να δράσει πάνω στον άνθρωπο:

- Οξύς δράση: Μερικοί παράγοντες επιδρούν στους εργαζόμενους απ' ευθείας ή αμέσως μετά από την έκθεση τους. Τα συμπτώματα που εμφανίζονται αμέσως λέγονται οξέα συμπτώματα. Για παράδειγμα, η έκθεση στο χλώριο καθιστά την αναπνοή δύσκολη, επιφέρει ναυτία και πόνους και αίσθηση καψίματος στα μάτια, τη μύτη και το λαιμό.
- Χρόνια δράση: Πολλά προβλήματα υγείας είναι μακρόχρονα, και δεν εμφανίζονται αμέσως μετά από την έκθεση. Τα συμπτώματα, ή η ασθένεια, εμφανίζεται πολύ μετά την έκθεση, ή από την έκθεση σε μικροποσότητες για

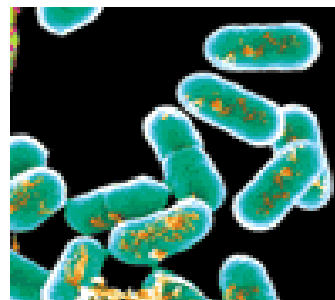
μεγάλη χρονική διάρκεια. Αυτά τα καθυστερημένα συμπτώματα ονομάζονται χρόνια συμπτώματα. Ο καρκίνος, για παράδειγμα, είναι μια ασθένεια που εμφανίζεται μετά από μακροχρόνια έκθεση.

- iii. Τοπική δράση: Μια επίδραση στην υγεία ονομάζεται τοπική όταν επηρεάζει μόνο ένα συγκεκριμένο σημείο του σώματος. Ένα σπασμένο δάχτυλο, ή ένα κομμένο δάχτυλο, καθώς και τα εγκαύματα, εντάσσονται σε αυτή τη κατηγορία.
- iv. Συστηματική δράση: Συστηματική δράση ενός κινδύνου ονομάζεται όταν ο παράγων εισέρχεται στο σώμα και δημιουργεί προβλήματα σε άλλα μέρη του σώματος. Μια πληγή που μολύνεται και δημιουργεί πυρετό και άλλα συμπτώματα είναι συστηματική. Η εισπνοή χημικών που κάνουν το άτομο να αισθάνεται ζαλάδα ή ‘παραισθήσεις’ μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του νεφρού ή του συκωτιού, αν εκτεθεί για μεγάλη χρονική περίοδο, ακόμα και αν δεν έχει οξεία ή τοπική δράση.
- v. Καρκίνος: Ο καρκίνος είναι ένας όρος που περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές ασθένειες. Σε όλες τις μορφές του καρκίνου υπάρχει μια μη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων. Αυτά τα κύτταρα μπορεί να σχηματίσουν ένα ανάπτυγμα, που λέγεται όγκος. Ο όγκος μπορεί να μείνει σε ένα μέρος ή να διαδοθεί (μετάσταση) σε άλλα μέρη του σώματος. Η ανάπτυξη του καρκίνου μπορεί να γίνει αν ο εργαζόμενος εκτίθεται σε ουσίες στο χώρο που προκαλούν καρκίνο, συχνά μετά από μια περίοδο χαμηλών εκθέσεων. Η πιθανότητα να αποκτήσει κανείς καρκίνο αυξάνεται με την έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες. Παρ’ όλα αυτά, δεν υπάρχει συγκεκριμένο ποσό γνωστό, το οποίο να θεωρείται ασφαλές.
- vi. Αναπαραγωγικοί κίνδυνοι: Οι αναπαραγωγικοί κίνδυνοι είναι αποτέλεσμα των χημικών, ή της ακτινοβολίας ή ακόμα άλλων παραγόντων, που εμποδίζουν την ικανότητα του ατόμου να αποκτήσει παιδιά. Οι αναπαραγωγικοί κίνδυνοι αφορούν και τα δύο φύλλα, και δρουν με διάφορους τρόπους, είτε στη διάρκεια της πράξης αναπαραγωγής, είτε καταστρέφοντας την ικανότητα των ουσιών που συμμετέχουν (ορμόνες, σπέρμα) να δράσουν αποτελεσματικά.
- vii. Ευαισθητοποίηση: Μερικοί εργαζόμενοι μπορεί να γίνουν πολύ ευαίσθητοι ή αλλεργικοί σε παράγοντες που βρίσκονται στο χώρο εργασίας. Η ανάπτυξη της ευαισθητοποίησης μπορεί να γίνει με τη πάροδο του χρόνου. Μπορεί ένα άτομο να εργάζεται για πολλά χρόνια χωρίς να αποκτήσει πρόβλημα, και ξαφνικά να αναπτύξει ένα σοβαρό, και πολλές φορές επίφοβο για την υγεία, πρόβλημα

αντίδρασης του οργανισμού του, ακόμα και σε μικροέκθεση στον παράγοντα. Μερικά άτομα γίνονται τόσο αλλεργικά, που δεν μπορούν να συνεχίσουν την εργασία τους, αν δεν εκληφθούν οι αλλεργιογόνοι παράγοντες [19].

2.2 Βακτηριακή δράση

Τα βακτήρια χρειάζονται ζέστη και υγρασία για να μεγαλώσουν. Αναπαράγονται με διχοτόμηση, οπότε ένα βακτήριο αποδίδει δύο, εκείνα τέσσερα κ.ο.κ. Σε ιδανικές συνθήκες, ένα βακτήριο μπορεί να γίνει αρκετά εκατομμύρια σε 8 ώρες, και χιλιάδες εκατομμύρια σε 12 ώρες.



Εισέρχονται στο σώμα, κατά βάση, μέσω του πεπτικού συστήματος. Έτσι, αν το φαγητό μολυνθεί με βακτήρια, και αφεθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ένα βράδυ, τότε μέχρι την επόμενη μέρα μπορεί να έχει μολυνθεί σοβαρά. Από εκεί και πέρα, μια μόνο μπουκιά μπορεί να καταστήσει κάποιον άρρωστο.

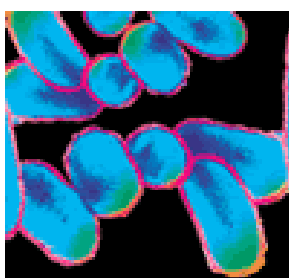
Τα βακτήρια κολλάνε στο εσωτερικό του εντέρου και καταστρέφουν τα κύτταρα με τα οποία έρχονται σε επαφή, ή λόγω καθαρής υπεραρίθμησης τους πληθυσμιακά, είτε μέσω των τοξινών (δηλητηρίου) που παράγουν. Μερικές φορές αυτές οι τοξίνες απορροφώνται και δημιουργούν βλάβη και σε άλλα μέρη του σώματος. Μερικά βακτήρια παράγουν τις τοξίνες τους ενώ μεγαλώνουν ακόμα στην επιφάνεια του φαγητού. Επειδή οι τοξίνες από μόνες τους είναι επιβλαβείς, τα βακτήρια δεν χρειάζεται να αναπτυχθούν για να καταστήσουν κάποιον άρρωστο, οπότε τα συμπτώματα είναι άμεσα εμφανή [20].

2.2.1 Κατηγορίες επικίνδυνων βακτηρίων

Τα επικίνδυνα βακτήρια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν, ανάλογα με το γένος στο οποίο ανήκουν. Τα βασικότερα γένη (οικογένεια) βακτηρίων παρουσιάζονται παρακάτω:

- Κλωστρίδιο perfringens: Το *Clostridium perfringens* μπορεί να βρεθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε πολλά είδη φαγητού, ειδικά στο κρέας και το κοτόπουλο και τα προϊόντα τους. Επίσης μπορεί να βρεθεί στο έδαφος, στα έντερα του ανθρώπου και των ζώων, σε υπονόμους και κοπριά ζώων.

- Salmonella: Η *Salmonella* είναι ο πιο συχνός παράγοντας για δηλητηρίαση από φαγητό, μετά τα *campylobacter*. Έχει βρεθεί σε μη παστεριωμένο γάλα, αυγά και προϊόντα από ωμά αυγά, κρέας και πουλερικά. Μπορεί να επιβιώσει στο φαγητό, αν αυτό δεν μαγειρευτεί σωστά.
- Listeria: Η *Listeria monocytogenes* είναι παρών παντού γύρω στο περιβάλλον. Έχει βρεθεί, επίσης, σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε πολλά φαγητά. Σε συγκεκριμένα φαγητά, όπως τα τυριά που ωριμάζουν σε φόρμα και ζυμαρικά, μπορεί να είναι παρών σε μεγάλους αριθμούς. Η κατανάλωση φαγητών που περιέχουν μεγάλες ποσότητες *listeria monocytogenes* είναι γενικά αιτία ασθένειας.
- Escherichia coli: Τα περισσότερα είδη του *E.coli* είναι ακίνδυνα, αλλά αυτά που παράγουν την τοξίνη verocytotoxin (τα οποία ονομάζονται και verocytotoxin παράγον βακτήρια ή VTEC), τα οποία μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες. Στην Αγγλία, το πιο παρατηρημένο είδος είναι το *E. coli* O157.



Το *E. coli* O157 μεταδίδεται συχνά μέσω του ελαφρώς ψημένου κιμά, και του ωμού γάλατος, ή που δεν έχει υποστεί σωστή παστερίωση ή μολύνθηκε ύστερα από την παστερίωση. Τα πιο συχνά συμπτώματα περιλαμβάνουν την αιματώδη διάρροια, και κράμπες στην κοιλιακή χώρα. Η ασθένεια μπορεί, επίσης, να έχει πολύ σοβαρές επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένου της υπολειτουργίας του νεφρού (νεφρική ανεπάρκεια), σοβαρή αναιμία και νευρολογικά προβλήματα. Μερικές φορές, η μόλυνση με *E. coli* O157 μπορεί να οδηγήσουν στο θάνατο [20].

- Campylobacter: Τα *Campylobacter* είναι ένα είδος που ευθύνεται κυρίως για τις ασθένειες που προκύπτουν από τρόφιμα. Έχει βρεθεί κυρίως στα πουλερικά, το κόκκινο κρέας και το μη παστεριωμένο γάλα, καθώς και το μη επεξεργασμένο νερό. Παρ' όλο που δεν μεγαλώνει στο φαγητό, εξαπλώνεται εύκολα, ώστε μερικά μόνο



βακτήρια σε ένα κομμάτι μη καλώς ψημένου κοτόπουλου να μπορεί να δημιουργήσει ασθένεια [20].

- *Cryptosporidium*: Το *Cryptosporidium* είναι ένα παράσιτο που μολύνει κυρίως τον άνθρωπο, και μια μεγάλη ποικιλία οικόσιτων και άγριων ζώων. Προκαλεί την ασθένεια cryptosporidiosis, η οποία σε περίπτωση υγιών ενήλικων ατόμων, προκαλεί μια δυσάρεστη διάρροια, που κρατάει μέχρι και δυο εβδομάδες. Προς το παρόν δεν υπάρχει θεραπεία για αυτό, και η περίπτωση μπορεί να είναι σοβαρή, και να αποβεί θανάσιμη, για ανοσο-συμβιβασμένα άτομα, που λαμβάνουν, για παράδειγμα, χημειοθεραπεία ή άτομα με AIDS. Παρ' όλα αυτά, η Cryptosporidiosis θεωρείται μια σπάνια ασθένεια. Μπορεί να μεταδοθεί από άνθρωπο σε άνθρωπο μέσω επαφής, από μολυσμένο φαγητό, πισίνες με κακή διαχείριση, και μολυσμένο πόσιμο νερό. Το περιβαλλοντικά ανθεκτικό παράγωγο του παράσιτου, το ζυγωτό (ή ωοκίστη) έχει βρεθεί στα περιττώματα μολυσμένων ζώων και ατόμων. Ο λόγος που καθιστά το *cryptosporidium* σοβαρό πρόβλημα στην διαχείριση των υγρών αποβλήτων είναι το μικρό του μέγεθος και η αντίσταση του στις τεχνικές απολύμανσης [20].

2.2.2 Βακτηριακοί κίνδυνοι

Σε αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την υγεία των εργαζομένων σε Ε.Ε.Λ γίνεται λόγος για μια ιδιαίτερη μορφή ασθένειας, πιθανότατα ιικής προέλευσης, που μολύνει την συγκεκριμένη κατηγορία εργαζομένων, και έχει ονομαστεί ανάλογα: “σύνδρομο εργαζομένων επεξεργασίας λυμάτων” (“Sewage worker’s syndrome”) (Rylander et al., 1976; Clark, 1987; Fannin et al., 1985). Χαρακτηρίζεται από γενική αδιαθεσία, αδυναμία, οξεία ρινίτιδα, και πυρετό. Άλλες μελέτες έχουν δείξει μια σημαντική σχέση μεταξύ της έκθεσης σε αυτού του τύπου αεροζόλ (σ.σ μικροβιακής σύνθεσης) και περιπτώσεων αναπνευστικών και εντερικών παθήσεων, καθώς και θετική απόκριση σε μόλυνση από συγκεκριμένα είδη ιών που περιέχονται στα λύματα, για τους εργαζόμενους και τους κατοίκους περιοχών πλησίον βιολογικών καθαρισμών (Clark and Linneman, 1986; Clark, 1987; Proust and Boutin, 1989; Frolich and Zeller, 1993; Heng, 1994 [5]

Ο κίνδυνος ιικής μόλυνσης σε εργαζομένους εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων δεν θα πρέπει να παραβλέπεται. Αν σκεφτούμε ότι ένα μέσο άτομο, με μέση

χωρητικότητα πνευμόνων, αναπνέει 7.5 λίτρα το λεπτό, σε ένα περιβάλλον με μια συγκέντρωση της τάξης του ενός ιού ανά κυβικό μέτρο (Ward and Akin, 1984) [5] (concentration: $1/m^3$) θα αναπνέει συνολικά:

$$7.5 \left[\frac{\text{litre}}{\text{min}} \right] \times 60 \left[\frac{\text{min}}{\text{hour}} \right] \times 8 \left[\frac{\text{hour}}{\text{βάρδια}} \right] \times 1 \cdot 10^{-3} \left[\frac{\text{ιικά_κύτταρα}}{\text{litre}} \right] = 3.6 \left[\frac{\text{ιικά_κύτταρα}}{\text{βάρδια}} \right]$$

Επιπλέον, τα σωματίδια του βιοαεροζόλ αποτελούνται συχνά από εντερικούς ιούς. Ανάμεσα σε αυτούς, συγκεκριμένοι έντερο-ιοί ανθρώπινης προέλευσης αποτελούν ένα σημαντικό κίνδυνο για την υγεία, καθώς μπορούν να μεταδοθούν μέσω της αναπνευστικής οδού, και είναι γνωστό ότι προκαλούν σημαντικές έξω-εντερικές παθήσεις (για παράδειγμα οι ιοί Cocksackievirus B, μυοκαρδίτης ή μηνιγγίτιδα) (Davis et al., 1993). [5]

Για το λόγο αυτό, το Εθνικό Κέντρο για την Ασφάλεια και την Υγεία στην Εργασία (National Institute for Occupational Safety and Health - NIOSH) των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής τονίζει ότι οι εργαζόμενοι σε Ε.Ε.Λ, όπως πολλοί ενήλικες, πρέπει να φροντίζουν να εμβολιάζονται τακτικά με το εμβόλιο τέτανου-διφθέρας, για λόγους ανοσίας. Επίσης, βασική προϋπόθεση είναι και ο εμβολιασμός με το εμβόλιο της ηπατίτιδας Α, το οποίο βρίσκεται υπό συνεχή έρευνα. Η καλύτερη, όμως, προτεινόμενη πρακτική για την αποφυγή της μόλυνσης από τα παθογόνα που υπάρχουν στο χώρο εργασίας των Ε.Ε.Λ είναι η καλή προσωπική υγιεινή και η καθαριότητα στους χώρους εργασίας, αλλά και στους τόπους κατοικίας τους [18].

2.2.3 Κύρια συμπτώματα βακτηριακής μόλυνσης

Εφόσον η βασική είσοδος των βακτηρίων είναι μέσω του πεπτικού συστήματος τα συμπτώματα, όπως ναυτία, τάση για έμετο, κράμπες στην κοιλιακή χώρα και διάρροια, συνήθως παρουσιάζονται σε εκείνο το μέρος του σώματος. Όταν κάποιος καταπιεί βακτήρια, τα οποία προκαλούν τροφική δηλητηρίαση, υπάρχει μια καθυστέρηση (περίοδος εκκόλαψης) πριν ξεκινήσουν τα συμπτώματα. Αυτό συμβαίνει επειδή τα περισσότερα βακτήρια που προκαλούν τροφική δηλητηρίαση χρειάζονται χρόνο για να πολλαπλασιαστούν στα έντερα. Το χρονικά απαιτούμενο διάστημα της εκκόλαψης εξαρτάται από το είδος των βακτηρίων και την ποσότητα που έχει καταποθεί. Μπορεί να κυμανθεί από ώρες μέχρι μέρες [20].

Σε μελέτη που διεξήχθη από το Institute of Medicine (IOM, 2004) βρέθηκε ότι υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ της υγρασίας σε ένα χώρο, της ανάπτυξης μυκήτων και συγκεκριμένων παθήσεων (όπως συμπτώματα του άνω μέρους του αναπνευστικού, άσθμα σε ήδη ευαισθητοποιημένα άτομα και υπερευαίσθητη πνευμονία) και ενδείξεις για άλλα συμπτώματα (νόσος του κάτω μέρους του αναπνευστικού σε κατά τα άλλα υγιή άτομα). Αυτές οι αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία μπορούν να προκύψουν από την έκθεση σε διάφορα σωματίδια βιοαεροζόλ, μέσω μιας αρκετά μεγάλης ποικιλίας μηχανισμών, που συμπεριλαμβάνουν την ερεθιστική ή φλεγμονώδη αντίδραση στα σπόρια και δράση μυκοτοξινών (Portnoy et al., 2005). Η ανησυχία για τις επιπτώσεις στην υγεία των εργαζομένων έχει οδηγήσει σε θεώρηση ορίων έκθεσης για μικροοργανισμούς στον αέρα. Προς το παρόν, όμως, δεν υπάρχουν συγκεκριμένα όρια έκθεσης σε μικροοργανισμούς ή μύκητες (USDOL, 2006; CDC, 2006; USEPA, 2001) [16].

Οι βασικότερες κατηγορίες ασθενειών που προκαλούνται στον άνθρωπο από την έκθεση του σε σωματίδια βιοαεροζόλ συνοψίζονται παρακάτω:

Α) Μολυσματικές ασθένειες:

Οι μολυσματικές ασθένειες προκύπτουν από τους ιούς, τα βακτήρια, τα πρωτόζωα και τους εντερικούς σκώληκες (έλμινς), και περιλαμβάνουν διάδοση ενός μολυσματικού παράγοντα από ένα φορέα σε ένα πιθανό δέκτη, μέσω της απευθείας επαφής, αέριας διάδοσης κ.α. Οι μολυσματικές ασθένειες που σχετίζονται με σωματίδια βιοαεροζόλ είναι: (1) Ειδικές επαγγελματικές συνθήκες, όπως αυτές μπορεί να προκύψουν, για παράδειγμα, στους εργαζόμενους ενός νοσοκομείου (φυματίωση, στομαχικοί πόνοι, ιλαρά), στους αγρότες, εργάτες σφαγείων, κτηνιάτρους (Q-fever, γρίπη χοίρων, άνθρακας) και εργάτες δασών (tularemia) (2) Ασθένειες που προκύπτουν από συσπείρωση ατόμων σε χώρους εργασίας (ειδικά σε περιπτώσεις γραφείων, στρατού ή χώρων αερομεταφοράς), όπως γρίπη, φυματίωση, στομαχικοί πόνοι. Επιπλέον, η νόσος των Λεγεωνάριων και ο Pontiac fever είναι υψηλής σημασίας μεταδιδόμενες ασθένειες που σχετίζονται με την παρουσία σωματιδίων βιοαεροζόλ, και προκύπτουν από εργασιακή ή μη έκθεση σε *Legionellae*. Η *Legionellae* είναι Gram-negative βακτήριο και βρίσκεται σε υδατικό περιβάλλον, όπως τα κατασκευασμένα από τον άνθρωπο συστήματα νερού (Βιόφιλτρα, πύργοι ψύξης, air condition κ.α), και μπορεί να προκαλέσει πνευμονία που μπορεί να αποβεί μοιραία, ιδιαίτερα σε ευπαθείς ομάδες (ηλικιωμένοι, παιδιά). Η *Legionellae* περνάει σε αιωρούμενη φάση κατά τη διάρκεια τέτοιων διεργασιών, όπως οι διεργασίες

ανάδευσης του νερού σε δεξαμενές καθίζησης και το στάδιο του αερισμού. Περιπτώσεις ξεσπάσματος ασθένειας σχετικής με αυτό το είδος μικροοργανισμού έχουν αναφερθεί σε μπάνια νοσοκομείων, σε συσκευαστήρια κρέατος και εργατικούς χώρους με υψηλή υγρασία (όπως πρατήρια φρούτων και λαχανικών, πισίνες και χώροι με ψεκαστήρες).

Επομένως, επαγγέλματα υψηλού κινδύνου για μολυσματικές ασθένειες που σχετίζονται με έκθεση σε βιοαεροζόλ είναι οι αγρότες, οι κτηνίατροι, οι εργαζόμενοι στον τομέα της υγείας και οι βιοφαρμακευτικοί εργάτες, που μελετάνε τους μολυσματικούς παράγοντες [31].

B) Αναπνευστικές ασθένειες

Οι παθήσεις του αναπνευστικού συστήματος και η εξασθένηση της λειτουργίας του πνεύμονα είναι πιθανότατα τα πιο μελετημένα συμπτώματα μεταξύ των ασθενειών που σχετίζονται με την οργανική σκόνη. Ποικίλουν από οξείες μέσες επιδράσεις που, τουλάχιστον αρχικά δεν έχουν επιπτώσεις στην καθημερινή ζωή, μέχρι σοβαρές χρόνιες αναπνευστικές ασθένειες, που χρειάζονται ειδική φροντίδα. Γενικά, τα συμπτώματα που σχετίζονται με την υγεία προκύπτουν από φλεγμονή της αναπνευστικής οδού, που δημιουργείται από συγκεκριμένη έκθεση σε τοξίνες, προφλεγμονικούς παράγοντες και αλλεργιογόνα. Βασίζόμενοι στους υποστρωματικούς μηχανισμούς φλεγμονής και τα επακόλουθα συμπτώματα, μπορεί να γίνει μια διαφοροποίηση ανάμεσα στα αλλεργιογόνα και τους μη αλλεργιογόνα συμπτώματα. Τα μη αλλεργιογόνα αναπνευστικά συμπτώματα αντικατοπτρίζουν μια μη ανοσοσυγκεκριμένη φλεγμονή της αναπνευστικής οδού, ενώ τα αλλεργιογόνα συμπτώματα δίνουν μια ανοσοσυγκεκριμένη φλεγμονή, στην οποία τα διάφορα αντισώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίδραση του οργανισμού. Στην επαγγελματική νοσολογία έχει αναγνωριστεί από καιρό ότι ένα βάσιμο ποσοστό περιπτώσεων άσθματος οφείλεται σε μη αλλεργιογόνους παράγοντες. Ο τύπος αυτός του άσθματος αναφέρεται ως: ‘Asthma-like disorder or syndrome’ ή ‘irritant-reduced asthma’, και είναι υψηλά παρουσιαζόμενο σε αγρότες και επαγγέλματα που σχετίζονται με την αγροτική, και με επαγγέλματα που υποθέτεται ότι παράγουν σωματίδια βιοαεροζόλ. Παρόλο που οι ασθένειες που προκύπτουν από την παρουσία βιοαεροζόλ έχουν όλες τις ενδείξεις για δημιουργία άσθματος, έχει βρεθεί σε μερικούς πληθυσμούς, ότι αυτά τα συμπτώματα δεν σχετίζονται μόνο με την αναστρέψιμη ασθένεια των πνευμόνων (cross-shift reversible decrease in lung function), αλλά και με την ταχεία χρονική μείωση της λειτουργίας των πνευμόνων

(COPD, chronic obstructive pulmonary diseases). Πρόκειται για μια τελείως διαφορετική κατηγορία άσθματος. Προϋπάρχων αναπνευστικές δυσλειτουργίες μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο της ανάπτυξης επαγγελματικού άσθματος. Τέλος, επιπλέον με τις άλλες ασθένειες, οι εργάτες μπορεί να αναπτύξουν υπερευαίσθητη πνευμονίτιδα (Hypersensitive pneumonitis HP) και τοξικά σύνδρομα οργανικής σκόνης (organic dust toxic syndrome - ODTS) [31].

Γ) Καρκίνος

Η εμφάνιση καρκίνου μπορεί να προκύψει από μια ποικιλία παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου των οργανικών ιών και άλλων βιολογικών παραγόντων. Μέχρι σήμερα, το μόνο καθαρά αναγνωρισμένο, μη ιικό βιολογικό επαγγελματικό καρκινογόνο θεωρείται οι μυκοτοξίνες. Αυτές εμφανίζονται σε βιομηχανίες όπου υλικά που έχουν μολυνθεί με μούχλα επεξεργάζονται. Η πιο γνωστή καρκινογόνος μυκοτοξίνη είναι η αφλοτοξίνη *Aspergillus flavus*, που είναι ένα γνωστό καρκινογόνο για τον άνθρωπο, και ιδιαίτερα με τον καρκίνο του ήπατος. Ένα άλλο καρκινογόνο είναι η *Ochratoxin A*. Η πιο σχετική οδός έκθεσης σε αυτά είναι η κατάποση, αλλά έκθεση μπορεί να γίνει και με εισπνοή σε βιομηχανίες, όπως η επεξεργασία φιστικιών και ξύλου, όπου συμβαίνει δημιουργία σωματιδίων σκόνης. Οι εργάτες στην επεξεργασία ξύλου έχουν αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ήπατος, καθώς και καρκίνους της ηπατικής χολής (biliary tract), σιελογόνου αδένα και πολλαπλού μυελόματος. Οι αγρότες έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης αιματολογικού καρκίνου, χελικό καρκίνο, στομαχικό, προστάτη, ιστών και εγκεφάλου. Οι λόγοι είναι κυρίως το βιοαεροζόλ από φυτοφάρμακα, οργανικούς ιούς και βιολογικούς παράγοντες που προκύπτουν στον αέρα σε φάρμες [31].

Παρ' όλα αυτά, μια αποτελεσματική μέθοδος που να υπολογίζει την σχέση μεταξύ της εργασιακής έκθεσης στο Βιοαεροζόλ και επιπτώσεις στην υγεία δεν έχει ακόμα καθοριστεί [26].

2.2.4 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Παρά την πρόοδο στις μεθόδους διαχείρισης της ποιότητας του νερού, η διαφυγή παθογόνων μικροοργανισμών από την επιφάνεια του νερού παραμένει ένας από τους σημαντικότερους κινδύνους στην ανθρώπινη υγεία [6]. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που απομονώνονται από το βιοαεροζόλ από διαφορετικά σημεία μέσα σε μια εγκατάσταση, βρέθηκαν ότι είναι μη παθογόνοι εντερικά είδη και σαπρόφυτα. Ωστόσο, οι παθογόνοι εντερικής προέλευσης, όπως η *S. enteritis* και η

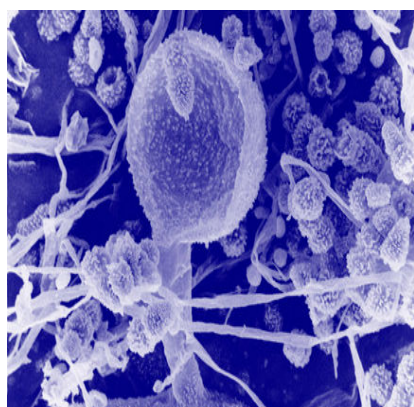
Shigella boydii βρέθηκαν στο σύνολο των μετρήσεων. Παρ' όλο που αυτά τα είδη δεν μεταδίδονται στον άνθρωπο μέσω του αέρα, η ικανότητα των σωματιδίων βιοαεροζόλ να μολύνουν το περιβάλλον δεν μπορεί να παραβλεφθεί, καθώς μπορούν να κατακάτσουν σε κτιριακές εγκαταστάσεις, μηχανήματα συντήρησης, σε παραπετάσματα και παρόμοια κτίσματα, θέτοντας έτσι έναν πιθανό κίνδυνο στην υγεία του προσωπικού, μέσω της επαφής ή απορρόφησης από την επιφάνεια του δέρματος [5].

Η αποτελεσματική αφαίρεση των παθογόνων μικροοργανισμών είναι ένα κρίσιμο στάδιο, καθώς οι εκροές των Ε.Ε.Λ μπορεί να αυξήσει την μόλυνση από παθογόνα στην επιφάνεια των νερών, που θα οδηγήσει σε ασθένειες από το νερό [7].

Τα κύρια είδη παθογόνων μικροοργανισμών που μπορούν να βρεθούν σε μια Ε.Ε.Λ παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω:

A) Μύκητες και βακτήρια

Οι μύκητες και τα θερμοφιλα βακτήρια είναι οι πιο γνωστές πηγές αλλεργιογόνων που παίζουν ρόλο στη δημιουργία Hypersensitive pneumonitis (HP). Αυτά τα είδη περιλαμβάνουν τα συνήθη *Penicillium* και *Aspergillus*, που παράγονται σε χώρους εργασίας με βιολογικά συστατικά, σε υψηλές συγκεντρώσεις. Αλλά και άχυρα που έχουν μολυνθεί με θερμοφιλα βακτήρια, όπως η *Saccharopolyspora rectivirgula* ή οι *Thermoactinomyces vulgaris* είναι πηγές HP. Παρόμοιες δυσλειτουργίες έχουν προκύψει σε μανηταροκαλλιεργητές και σε εργάτες compost.



Τα περισσότερα βακτήρια ή παράγοντες βακτηρίων δεν είναι πολύ ισχυρά αλλεργιογόνα, με εξαίρεση τους ακτινομύκητες που παράγουν σπόρια. Τα συστατικά των τοιχωμάτων των βακτηρίων, όπως η ενδοτοξίνη και τα πεπτιδογλυκάνια είναι παράγοντες με προφλεγμονώδεις ιδιότητες, που μπορούν να προκαλέσουν αναπνευστικές παθήσεις [31].

B) Ενδοτοξίνες

Οι ενδοτοξίνες αποτελούνται από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και είναι μη αλλεργικοί παράγοντες τοιχωμάτων του κυττάρου των Gram-negative βακτηρίων με ισχυρές προφλεγμονώδεις ιδιότητες. Είναι συνήθως παρών σε πολλούς εργασιακούς χώρους, αλλά και γενικότερα στο περιβάλλον, και ειδικά στη σπιτική σκόνη. Η ενδοτοξίνη έχει αναγνωριστεί σαν σημαντικός παράγοντας στην αιτιολόγηση των

επαγγελματικών ασθενειών του πνεύμονα, συμπεριλαμβανομένου και του άσθματος και του ODS. Τα υποκείμενα που εκτίθενται στην ενδοτοξίνη σε πειράματα εισπνοής παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα, όπως πυρετό, σπασμούς, αρθραλγία, συμπτώματα γρίπης, λεύκωση αίματος, φλεγμονή της αναπνευστικής οδού, συμπτώματα άσθματος, όπως βήχας, πόνοι στο στήθος, φράξιμο των βρόγχων, καθώς και ανεπάρκεια της λειτουργίας των πνευμόνων και μειωμένη ικανότητα εξάπλωσης των πνευμόνων [31].

Γ) Μυκοτοξίνες

Οι μυκοτοξίνες ή τοξίνες των μυκήτων είναι χαμηλού μοριακού βάρους βιομόρια, που παράγονται από τους μύκητες και είναι τοξικά, σε ανθρώπους και ζώα. Μερικά είδη είναι πιθανά καρκινογόνα. Πολλές άλλες μυκοτοξίνες έχουν κατηγοριοποιηθεί ως κατέχοντες ξεχωριστές χημικές δομές και αντιδραστικές ομάδες λειτουργίας, συμπεριλαμβανομένου των πρωτεΐων και δευτερέων αμινών και οξέων. Για τις μυκοτοξίνες λίγα είναι γνωστά για τα συμπτώματα που επιφέρει η έκθεση σε εργασιακούς χώρους. Αυτό που είναι γνωστό είναι ότι είναι παρών στη σκόνη από σιτηρά, στη σκόνη από βαμβάκι και στη σκόνη από στάχυ [31].

Δ) Αλλεργιογόνα

Τα αλλεργιογόνα αποτελούνται από μια μεγάλη ποικιλία μακρομοριακών δομών, και κυμαίνονται από μικρά έως μεγάλα μοριακά βάρη, που συνήθως είναι πρωτεΐνες βιολογικής προέλευσης. Τα πιο δυνατά αλλεργιογόνα σε χώρους εργασίας περιλαμβάνουν ένζυμα που παράγονται από μύκητες και βακτήρια που παράγονται από βιοτεχνολογικές εταιρίες, για χρήση σε σκόνες πλυντηρίων και βιομηχανία ανθρώπινων και ζωικών τροφών. Επομένως, οι πληθυσμοί που κινδυνεύουν δεν είναι μόνο οι εργάτες στην παραγωγή των ενζύμων, αλλά και στην παραγωγή τροφίμων [31].



2.3 Αρχές προστασίας εργαζομένων σε Ε.Ε.Λ

Για την πρόληψη από έκθεση σε κινδύνους υγείας, είναι πολύ σημαντικό να γίνεται, αρχικά, αντιληπτός ο τρόπος με τον οποίο τα παθογόνα εισέρχονται στο σώμα του εργαζόμενου. Αυτό είναι πολύ βασικό, καθώς ο τρόπος με τον οποίο ένας παράγοντας εισέρχεται στο σώμα μπορεί να κάνει την διαφορά στην επίπτωση που έχει αυτός

στην υγεία του εργαζόμενου [19]. Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, οι βασικότεροι τρόποι είναι: Εισπνοή, κατάποση, Δερματική επαφή (απορρόφηση) και αμυχές στο δέρμα.

Μετά από την ανεύρεση των πιθανών σημείων και διαδικασιών που μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο σε μια Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων, το επόμενο βήμα είναι να διορθωθεί το πρόβλημα. Πολλές από τις επικίνδυνες συνθήκες στις οποίες εκτίθενται οι εργαζόμενοι σε Ε.Ε.Λ μπορούν να απαλειφθούν Άλλοι παράγοντες μπορούν να ελαττωθούν σημαντικά. Σε γενικές γραμμές πρέπει να ληφθούν μέτρα ώστε οι εργαζόμενοι να είναι εκπαιδευμένοι και με τα απαραίτητα σύνεργα, και πως όλα τα απαραίτητα μέτρα έχουν ληφθεί για να είναι ο χώρος εργασίας ασφαλής. Μερικοί εργοδότες προσπαθούν να κάνουν οικονομία, μειώνοντας τα έξοδα ασφαλείας. Είναι σημαντικό για τους εργαζόμενους να προστατεύονται από το νόμο, να ξέρουν για τα δικαιώματά τους και να προσπαθούν να κάνουν το χώρο που δουλεύουν ασφαλή [19].

Οι βασικότερες οδηγίες για την προστασία των εργαζομένων δίνονται ακολούθως:

- Ο καλύτερος τρόπος για την προστασία ενάντια στην μόλυνση είναι να αποφεύγεται η άμεση επαφή με τα λύματα, τα σταγονίδια και το βιοαεροσόλ. Η διοίκηση θα πρέπει να εγκαταστήσει μηχανικό έλεγχο της παραγωγής του αφρού στην μονάδα αερισμού, και το πιτσίλισμα του νερού γύρω από τις δεξαμενές. Επαρκής αερισμός πρέπει να υπάρχει στους θαλάμους εξάμμιωσης, στις μονάδες εσχάρωσης και τις περιοχές όπου βρίσκεται η λάσπη.
- Οι εργαζόμενοι αρρωσταίνουν, συνήθως, όταν γίνεται σύνδεση των γραμμών παροχής νερού της εγκατάστασης και των γραμμών των λυμάτων. Η διοίκηση θα πρέπει να ελέγχει τις γραμμές του πόσιμου νερού για την αποφυγή ξεσπασμάτων μόλυνσης.
- Οι εργάτες θα πρέπει να είναι εκπαιδευμένοι για την φύση των μολυσματικών ασθενειών. Τέτοια εκπαίδευση πρέπει να περιλαμβάνει τη φύση του κινδύνου, μεθόδους που οι κίνδυνοι εισέρχονται στο σώμα, συμπτώματα και περιοχές γύρω από την εγκατάσταση όπου μπορεί να υπάρχει υψηλό ρίσκο έκθεσης σε βιολογικούς κινδύνους.

Όταν οι εργαζόμενοι δεν μπορούν να αποφύγουν την επαφή με τα λύματα, η διοίκηση θα πρέπει να παρέχει τα ακόλουθα προστατευτικά εφόδια και υπηρεσίες:

- Προστατευτικά γάντια από λάστιχο, που να φτάνουν μέχρι τον αγκώνα

- Παντελόνια και περιβλήματα από καουτσούκ
- Προστατευτικά γυαλιά
- Μάσκες μιας χρήσης, για την χρήση σε περιοχές που υπάρχει σκόνη από τη λάσπη ή μεγάλες ποσότητες βιοαεροζόλ και τέλος
- Πλυντήρια υψηλής θερμοκρασίας (160 °C) για τα ρούχα της δουλειάς, καθώς μόνο αυτές οι θερμοκρασίες μπορούν να σκοτώσουν τις κίστες

Οι εργαζόμενοι θα πρέπει, επίσης, να παίρνουν τις ακόλουθες προφυλάξεις:

- Να πλένουν τα γάντια πριν από την αφαίρεση τους. Οι νιπτήρες θα πρέπει να ελέγχονται με πετάλια ποδιού
- Να πλένουν τα χέρια τους πριν από το κάπνισμα και το φαγητό. Ένα απολυμαντικό σαπούνι θα πρέπει να χρησιμοποιείται.
- Να κρατάνε τα προστατευτικά ρούχα και εξοπλισμό μακριά από τις περιοχές φαγητού
- Να φυλάνε τα ρούχα της εργασίας και τα προσωπικά τους ρούχα σε διαφορετικά ντουλάπια
- Να κάνουν μπάνιο και να φοράνε τα ατομικά τους ρούχα πριν επιστρέψουν σπίτι
- Να πλένουν τα ρούχα της εργασίας τους στην εγκατάσταση και να μην τα μεταφέρουν σπίτι.
- Να θεωρούν ότι κάθε πληγή ή αμυχή είναι μολυσμένη. Να ξεπλένουν με μεγάλες ποσότητες καθαρού, φρέσκου νερού και αντισηπτικού σαπουνιού, και να τα δένουν με έναν αποστειρωμένο επίδεσμο.
- Οι εργάτες θα πρέπει να κάνουν αντιτετανικό ορό κάθε 10 χρόνια, και οι εργαζόμενοι που δεν έχουν εμβολιαστεί για polio ιό, πρέπει να συμβουλευτούν τον ιατρό τους για τον εμβολιασμό. Η διοίκηση θα πρέπει να είναι ενήμερη σχετικά με τις αλλαγές στη δημόσια υγεία, σε περίπτωση που εμβόλια έναντι του τύφου, παρατυφοειδών, λεπτοσπύρωσης, ή διφθέρια είναι απαραίτητα
- Οι εργαζόμενοι θα πρέπει να λαμβάνουν το εμβόλιο για την ηπατίτιδα Α. Οι εργάτες που δουλεύουν μέσα σε έναν υπόνομο που μπορεί να περιέχει φρέσκο αίμα ή να έρθουν σε επαφή με σύριγγες πρέπει να κάνουν και το εμβόλιο για ηπατίτιδα Β
- Βυτία τα οποία μεταφέρουν υλικά που έχουν μολυνθεί από λύματα πρέπει να πλένονται συχνά

- Πρέπει να κρατούνται αρχεία σχετικά με τις παθήσεις των εργαζομένων, τις ενοχλήσεις και τα παράπονα τους σχετικά με την κατάσταση της υγείας τους
- Οι εργαζόμενοι πρέπει να ζητάν ιατρική βοήθεια όποτε είναι άρρωστοι ή παρουσιάζουν συμπτώματα διάρροιας. Επειδή τις περισσότερες φορές οι γιατροί δεν γνωρίζουν την σχέση μεταξύ επαγγέλματος και ασθένειας, πρέπει να ενημερώνουν το γιατρό για την έκθεση τους στους παράγοντες που περιέχουν τα λύματα.

Ένα παράδειγμα περίπτωσης είναι από έναν εργαζόμενο σε Ε.Ε.Λ που πέθανε στην Νέα Υόρκη από μόλυνση με ιστολυτική αμοιβάδα. Η αιτία της ασθένειας του δεν ανακαλύφθηκε, μέχρι την ώρα που ήταν στο χειρουργικό τραπέζι, λίγο πριν πεθάνει. Εκείνη την ώρα ο γιατρός σκέφτηκε να ρωτήσει αν έχει έρθει σε επαφή με φρέσκα λύματα. Η ζωή του εργαζομένου θα μπορούσε να είχε σωθεί, αν οι γιατροί είχαν ρωτήσει αργότερα που εργάζεται. Πολλοί γιατροί δεν γνωρίζουν να θεραπεύουν μολύνσεις από παράσιτα. Οι εργαζόμενοι θα πρέπει πάντα να συμβουλευονται και τα κέντρα υγείας και ελέγχου [19].

2.3.1 Μέθοδοι απολύμανσης

Η απολύμανση αποτελεί βασικό στάδιο στην επεξεργασία λυμάτων, καθώς είναι το στάδιο το οποίο απομακρύνει τους παθογόνους μικροοργανισμούς (στο μεγαλύτερο ποσοστό τους) πριν τη διάθεση του επεξεργασμένου λύματος στον υδάτινο αποδέκτη, ή ακόμα και την επαναχρησιμοποίησή του. Επιπλέον, όμως, η απολύμανση αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στην δημιουργία του φαινομένου του βιοαεροζόλ, με τη μείωση της συγκέντρωσης των παθογόνων μικροοργανισμών στην δεξαμενή, και επομένως τη μείωση των ποσοτήτων εκπομπής τους από το τελικό στάδιο, αλλά και μετά τη διάθεση των λυμάτων στον αποδέκτη.

Οι μέθοδοι απολύμανσης που χρησιμοποιούνται είναι, κυρίως, η χλωρίωση, η χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας αλλά και οι νεότερα διαδεδομένες διαδικασίες προχωρημένης οξειδωσης (Advanced Oxidation Procedures – AOP's). Η χλωρίωση είναι η παραδοσιακή και πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος απολύμανσης νερού που χρησιμοποιείται σε όλο τον κόσμο. Είναι “αρκετά αποτελεσματική ενάντια σε πολλά εντερικά βακτήρια, αλλά έχει μειωμένη δράση εναντίων των ιών, των βακτηριδιακών σποριδίων και σε κύστες από πρωτόζωα” (Tyrrell et al., 1995; Veschetti et al., 2003). Η χρήση της χλωρίωσης έχει αρχίσει να μειώνεται, κυρίως

“λόγω της τοξικής, μεταλλαξιογόνου και/ή καρκινογόνου δράσης των παραπροϊόντων της απολύμανσης (Disinfection by-products –DBPs) και των υπολειμμάτων της χλωρίνης που σχηματίζονται κατά την απολύμανση” (Oppenheimer et al., 1997; Veschetti et al., 2003). Η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) είναι μια σημαντική φυσική διαδικασία για την απολύμανση του νερού και των λυμάτων. Ο αριθμός των Ε.Ε.Λ που χρησιμοποιούν UV στο στάδιο της απολύμανσης έχει αρχίσει και αυξάνεται τα τελευταία χρόνια. Η απολύμανση με UV, τυπικά, “εξοντώνει αποτελεσματικά τα βακτήρια, τους ιούς, τους σπόρους των βακτηρίων και τις κύστες από τα παράσιτα, χωρίς να παράγει DBPs ή άλλα χημικά υπολείμματα” (Oppenheimer et al., 1997; Lazarova et al., 1998; Liberti and Notarnicola, 1999; Collivignarelli et al., 2000; Liberti et al., 2000; Rajala et al., 2003). Τέλος, νεώτερη είναι η χρήση των AOPs, για την απολύμανση του νερού. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρήση δευτερογενών οξειδωτικών, όπως οι ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου (dOH), που τυπικά παράγονται κατά την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας με απολυμαντικούς παράγοντες, ικανό να παράγει ρίζες. Οι ρίζες του υδροξυλίου θεωρούνται ως οι πιο ενεργοί παράγοντες, με το μεγαλύτερο βαθμό αντίδρασης στην επεξεργασία νερού, και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την οξείδωση οργανικών και ανόργανων συστατικών, ή για λόγους απολύμανσης [10].

2.4 Νομοθεσία

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει νόμους σχετικά με την ασφάλεια και υγιεινή σε χώρους εργασίας (89/391/CEE; 89/655/CEE; 89/656/CEE; 90/269/ CEE; 90/270/CEE, 90/679/CEE), με βάση την επικινδυνότητα του κάθε χώρου. Λόγω της πιθανότητας πρόκλησης ασθενειών από την διάδοση των αερόβιων μικροοργανισμών, οι Ε.Ε.Λ έχουν οριστεί ως χώροι εργασίας με υψηλό και άμεσο κίνδυνο μόλυνσης για τον εργαζόμενο. Για τον καθορισμό της επικινδυνότητας της εγκατάστασης πρέπει να γίνεται εκτενής έρευνα και ανάλυση επικινδυνότητας για μόλυνση. Οι μελέτες αυτές πρέπει να περιλαμβάνουν, πρώτον καθορισμό των κύριων πηγών σωματιδίων και δεύτερον την προσεκτική εκτίμηση της πιθανότητας μετάδοσης και διάδοσης ασθένειας, τόσο σε ποσοτικό όσο και σε ποιοτικό βαθμό, με βάση τα παθογόνα που έχουν απομονωθεί από τέτοιες εγκαταστάσεις [5].

3. Μέθοδοι μέτρησης μικροοργανισμών

Για την μέτρηση του επιπέδου συγκέντρωσης των μικροοργανισμών στο περιβάλλον, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι, ανάλογα με το είδος του προς μέτρηση μικροοργανισμού, τη φάση στην οποία βρίσκεται (υγρή ή αέρια) και τον τύπο της μέτρησης (ποιοτική ή ποσοτική). Οι μέθοδοι αυτές διαφέρουν ως προς την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, την ταχύτητα παραγωγής αποτελεσμάτων αλλά και την επιλεκτικότητα, κυμαινόμενες μεταξύ αποτελεσμάτων, από επίπεδο ομάδας μικροοργανισμών, σε επίπεδο ταύτισης συγκεκριμένου μικροοργανισμού, και η χρησιμότητα της κάθε μεθόδου έγκειται στα αναμενόμενα αποτελέσματα. Οι μέθοδοι που δίνουν αποτελέσματα σε επίπεδο ομάδας μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται, συνήθως, για την ανίχνευση της ύπαρξης της συγκεκριμένης ομάδας στην περιοχή και του επιπέδου των συγκεντρώσεων αυτής, ενώ οι ειδικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση της παρουσίας συγκεκριμένου είδους μικροοργανισμού στην περιοχή.

3.1 Μέθοδοι συλλογής μικροοργανισμών

Για την συλλογή των δειγμάτων χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, συνήθως ανάλογα με τον τύπο της ανάλυσης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια. Σε κάθε δειγματοληψία, όμως, πρέπει να ακολουθούνται κάποιες βασικές αρχές:

- Ασφάλεια: Οι μελετητές πρέπει να παίρνουν ορισμένα μέτρα, όσο αναφορά την ασφάλεια τους κατά την διεξαγωγή των μετρήσεων. Τέτοια μέτρα είναι ο κατάλληλος εξοπλισμός (μάσκα, γάντια, κράνος και ειδική στολή, ανάλογα με το χώρο μέτρησης), η σωστή διαδικασία προσωπικής υγιεινής (πλύσιμο του εκτιθέμενου δέρματος, καλή πλύση των ρούχων και μη χρήση φαγητού και ποτού κατά τη διάρκεια της λήψης των δειγμάτων).
- Μέτρηση παραμέτρων: Σε κάθε δειγματοληψία θα πρέπει να μετρούνται και να καταγράφονται ορισμένες περιβαλλοντικές παράμετροι, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Τέτοιες παράμετροι είναι: η υγρασία, η θερμοκρασία και η ροή του μετρούμενου αέρα. Η γνώση των τιμών των παραμέτρων αυτών είναι σημαντική, καθώς μπορούν να μεταβάλουν σημαντικά το επίπεδο των μετρούμενων μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, υψηλά ποσοστά υγρασίας μπορούν να ξηράνουν

μικροοργανισμούς, και να δώσουν μικρότερες τιμές για τα επίπεδα τους, ενώ υψηλές τιμές ροής του αέρα μπορούν να δημιουργήσουν μεγαλύτερη διασπορά των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται μικρότερες συγκεντρώσεις [23].

- Συνθήκες αποστείρωσης: Ένα τελευταίο, αλλά πολύ σημαντικό για την ακρίβεια και εγκυρότητα της μέτρησης βήμα, είναι η τήρηση των συνθηκών αποστείρωσης καθ' όλη τη διάρκεια προετοιμασίας, συλλογής, χειρισμού και μέτρησης του δείγματος. Λόγω της φύσης της μέτρησης, δεδομένου ότι οι μικροοργανισμοί που μετρούνται βρίσκονται σε μικρές ποσότητες, και μπορούν να παραχθούν και από τον ίδιο τον άνθρωπο, πρέπει να γίνει σαφές ότι το δείγμα δεν θα πρέπει, όσο αυτό είναι δυνατόν, να έρχεται σε επαφή με εξωτερικούς παράγοντες, πλην της ίδιας της μέτρησης. Έτσι, θα πρέπει να γίνεται αποστείρωση του μέσου συλλογής πριν και μετά από κάθε μέτρηση, με ένα μέσο (για παράδειγμα ισοπροπανόλη), να μην αφήνεται το δείγμα σε επαφή με τον αέρα, να φυλάσσεται σε ειδικά δοχεία κατά τη διάρκεια συλλογής, αλλά και μετά από αυτή. Συγκεκριμένα, δείγματα τα οποία περιλαμβάνουν ζώντες οργανισμούς πρέπει να φυλάσσονται σε σκιερούς και δροσερούς χώρους (π.χ φορητό ψυγείακι), ώστε να μην γίνεται ανάπτυξη τους λόγω της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, που μπορούν να δώσουν λάθος συμπεράσματα.

Οι βασικότερες μέθοδοι συλλογής μικροοργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην περίπτωση της συλλογής σωματιδίων βιοαεροζόλ είναι:

1. Συστήματα πρόσκρουσης

Η αρχή της συλλογής με σύγκρουση (impaction) βασίζεται στην τάση των σωματιδίων να αποκλίνουν από το ρεύμα αέρος, λόγω της αδράνειας, όταν οι γραμμές ροής του αέρα κλίνουν για να παρακάμψουν μια στερεή ή ημιστερεή επιφάνεια. Τα σωματίδια που θα παρεκκλίνουν είναι αυτά που συλλέγονται στην επιφάνεια του μέσου. Οι μετρητές του τύπου αυτού χωρίζονται σε μετρητές με είσοδο σε μορφή κόσκινου, με σχισμές ή σειριακής πρόσκρουσης [21]. Πάνω σε αυτή τη μέθοδο βασίζονται διάφορες συσκευές μέτρησης και συλλογής βιοαεροζόλ, που ανάλογα με τον τρόπο λειτουργίας τους, δίνουν διαφορετικά ποσοτικά και ποιοτικά αποτελέσματα μετρήσεων. Τέτοιες συσκευές είναι: Οι παγίδες σπορίων (spore traps), οι δειγματολήπτες περιστρεφόμενου βραχίονα (rotating arm samplers), οι δειγματολήπτες που

χρησιμοποιούν θρεπτικό άγαρ ως μέσο πρόσκρουσης και οι συσκευές διαδοχικής πρόσκρουσης (cascade impactors) [21].

2. Συλλέκτες βαρύτητας

Οι συλλέκτες βαρύτητας είναι η πιο απλή μέθοδος συλλογής αερόβιων βιολογικών σωματιδίων. Το μέσο συλλογής αφήνεται ελεύθερο σε επαφή με τον αέρα που γίνεται η δειγματοληψία, και συλλέγει σωματίδια με τη βοήθεια της βαρύτητας. Αυτή η μέθοδος δεν χρειάζεται ειδικά όργανα, καθώς είναι πολύ απλή και χρησιμοποιείται συχνά, δίνοντας επιπρόσθετες πληροφορίες. Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος αυτή δεν δίνει πληροφορίες για τον μετρούμενο όγκο αέρα, δίνει αποτελέσματα κυρίως για τα μεγαλύτερα σωματίδια (καθώς αυτά είναι που κατακάθονται ευκολότερα), και επηρεάζεται πολύ από την κίνηση του αέρα (αναταράξεις) [21].

3. Συλλέκτες εμβύθισης (impingers)

Σε ένα συλλέκτη εμβύθισης ο αέρας ροφάται, μέσω μιας αντλίας κενού, και διέρχεται μέσα από έναν όγκο υγρού. Τα σωματίδια που βρίσκονται στον αέρα αφήνουν το ρεύμα του αέρα και εμβυθίζονται στο υγρό. Το σύστημα αυτό εισήχθη από τους Greenburg και Smith, ως σύστημα συλλογής σκόνης, και αργότερα χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή βιοαεροζόλ. Οι περισσότεροι συλλέκτες κατασκευάζονται από γυαλί, έχουν ένα θάλαμο συλλογής και η ροή του αέρα γίνεται μέσω ενός πλευρικού σχηματισμού για εφαρμογή της αντλίας. Ο αέρας εισάγεται μέσω μιας κοίλου σωλήνα εισροής, ακολουθούμενος από ένα jet εμβύθισης, το οποίο λειτουργεί ως κρίσιμη είσοδος, και καθορίζει την ταχύτητα εισόδου του αέρα, και επομένως καθορίζει και τη ροή του.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής σε σχέση με τους άλλους συλλέκτες είναι ότι είναι ικανοί να συλλέγουν δείγματα ακόμα και σε αέρα με υψηλές συγκεντρώσεις σωματιδίων, καθώς τα υγρά δείγματα μπορούν να διαλυθούν έπειτα στο επιθυμητό επίπεδο, για ανάλυση και επεξεργασία τους. Αντίθετα, οι υπόλοιπες μέθοδοι εύκολα υπερχειλίζουν τις επιφάνειες συλλογής τους, υπό τέτοιες συνθήκες. Ταυτόχρονα, τα δείγματα που λαμβάνονται με αυτή τη μέθοδο μπορούν εύκολα να αναλυθούν χημικά, βιολογικά, ανοσοποιητικά, και μοριακά. Βασικά προβλήματα της μεθόδου είναι η απώλεια σωματιδίων από τις προκύπτουσες φυσαλίδες, κατά την ροή του αέρα στο εσωτερικό του υγρού[21].

4. Συστήματα φίλτρων

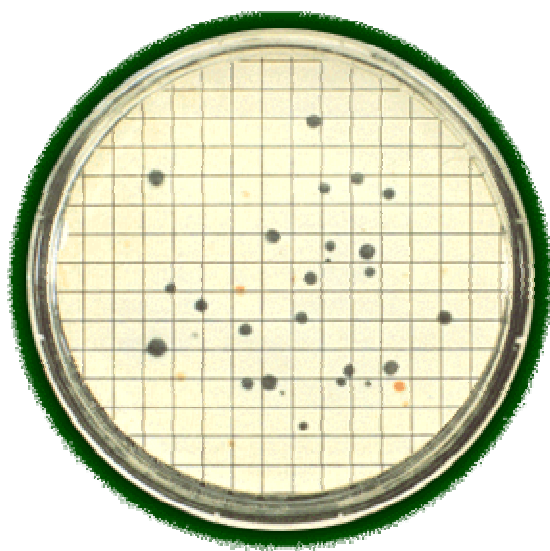
Τα πιο κοινώς χρησιμοποιούμενα, και από τις παλαιότερες μεθόδους, είναι οι αντλίες που λειτουργούν με μπαταρία, οι οποίες ενσωματώνουν στο άκρο τους ένα φίλτρο. Από αυτό περνάει το ρεύμα του αέρα, συγκρατώντας τους οργανισμούς και τα σωματίδια που είναι μεγαλύτερα από τους πόρους του. Το δείγμα έπειτα μπορεί να επεξεργαστεί και να αναλυθεί ανάλογα. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι τα φίλτρα προσφέρουν μικρή προστασία στους μικροοργανισμούς, τους οποίους η ροή του αέρα μπορεί να ξηράνει. Η διαδικασία του ξεπλύματος απομακρύνει από την επιφάνεια του φίλτρου τους μικροοργανισμούς, ώστε να πάρουμε μετρήσεις ως προς το σύνολο των μικροοργανισμών, και όχι μόνο των ζώντων. Το μέγεθος των πόρων των φίλτρων είναι, συνήθως, 5 μm και συλλέγουν σωματίδια μεγέθους 0.3 μm με ακρίβεια περίπου 95%.

3.2 Μέθοδοι επεξεργασίας δειγμάτων

Για την επεξεργασία ενός δείγματος και την λήψη αποτελεσμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι, που μπορούν να χωριστούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες: τις μεθόδους βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών και σε εκείνες που χρησιμοποιούν διαδικασίες που δεν χρειάζονται ανάπτυξη των μικροοργανισμών προκειμένου να δώσουν αποτελέσματα. Το βασικό χαρακτηριστικό των μεθόδων καλλιέργειας είναι η μέτρηση μόνο των ζωντανών μικροοργανισμών, και η απαίτηση μεγάλης χρονικής διάρκειας προκειμένου να δώσουν αποτελέσματα. Αντίθετα, οι άλλες μέθοδοι δίνουν αποτελέσματα πιο γρήγορα, και με μεγαλύτερη ακρίβεια. Το κόστος, όμως, των μεθόδων αυτών είναι πολλές φορές πολλαπλάσιο εκείνο της καλλιέργειας, και τα αποτελέσματα είναι πιο δύσκολο να μετρηθούν, και χρειάζονται πιο ειδικές γνώσεις πάνω στην μορφολογία και τον διαχωρισμό των ειδών των μικροοργανισμών.

3.2.1 Μέθοδοι καλλιέργειας

Η μέθοδος της καλλιέργειας χρησιμοποιείται για περισσότερο από 100 χρόνια, με κύριο χαρακτηριστικό την απομόνωση αερόβιων μικροοργανισμών σε καθαρές καλλιέργειες, το οποίο είναι αναγκαίο βήμα για την διαδικασία αναγνώρισης τους [25].



Για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα είδη θρεπτικού υλικού, που μπορούν να διαχωριστούν σε στερεά ή ημιστερεά, ανάλογα με την υφή, και σε γενικά ή ειδικά, ανάλογα με την επιλεκτικότητα τους ως προς το είδος του μετρούμενου μικροοργανισμού. Στα στερεά θρεπτικά το δείγμα απλώνεται στην επιφάνεια του, ενώ στα ημιστερεά το δείγμα, που συνήθως είναι ένα φίλτρο στο οποίο έχει

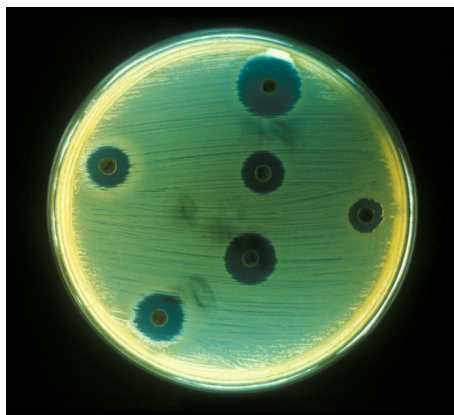
γίνει η συλλογή των μικροοργανισμών, καλύπτεται από το θρεπτικό υλικό. Τα γενικά θρεπτικά υλικά δίνουν αποτελέσματα για κατηγορίες μικροοργανισμών (π.χ. την ύπαρξη μυκήτων ή βακτηρίων), ενώ τα ειδικά μπορούν να δώσουν πληροφορίες για την ύπαρξη συγκεκριμένου είδους μικροοργανισμού (π.χ. *Enterococci*). Η μέτρηση των μικροοργανισμών γίνεται με μορφολογικά κριτήρια και χαρακτηριστικά ανάπτυξης, ενώ συνήθως χρησιμοποιούνται ειδικά υποστρώματα, που αναστέλλουν την ανάπτυξη όλων των υπόλοιπων ειδών ή ευνοούν το συγκεκριμένο είδος, με αποτέλεσμα οι αποικίες που σχηματίζονται να είναι χαρακτηριστικές του μικροοργανισμού.

Διαδικασία μεθόδου

Τα συλλεγόμενα δείγματα πρέπει να εκκολαφθούν στην κατάλληλη θερμοκρασία, για διάστημα που ποικίλει από ώρες έως μέρες, ανάλογα με τον μικροοργανισμό και το θρεπτικό μέσο, μέχρι να σχηματίσουν αποικίες [23]. Μια αποικία είναι μια μακροσκοπικά ορατή (με το γυμνό μάτι) ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ένα σταθερό μέσο καλλιέργειας

Οι απαιτήσεις για ανάπτυξη μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από μικροοργανισμό σε μικροοργανισμό, και δεν υπάρχει μέσο τέτοιο που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για όλα τα είδη. Για παράδειγμα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις για την ανάπτυξη των μυκήτων δίνει το θρεπτικό υλικό που παράγεται από κόκκους (συνήθως κριθαριού) (malt extract agar). Για τα βακτήρια και τους ακτινομύκητες οι υψηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν στο tryptic soy agar και half-strength nutrient agar [32].

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μπορεί να καταπιεστεί ή να βοηθηθεί με την παρουσία άλλων ειδών. Αναστολείς ανάπτυξης συχνά προστίθενται στο θρεπτικό υλικό για να αναστείλουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Επίσης, αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται για να καταπιέσουν την ανάπτυξη των βακτηρίων σε θρεπτικό μέσο για



μύκητες, και το θρεπτικό μέσο για βακτήρια περιέχει αντιμυκητικά συστατικά. Τέλος, διάφορα άλλα υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί για να περιορίσουν την ανάπτυξη των ταχέως αναπτυσσόμενων *Mucor* και *Rhizopus*, που μπορεί να καλύψουν βραδύτερα αναπτυσσόμενους μύκητες [32].

Το μέγεθος των αποικιών και η πυκνότητα αποικιών στην επιφάνεια των τριβλίων μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια, λόγω της συνένωσης των κοντινών αποικιών. Οι μέτρηση μπορεί να είναι υποκειμενική, ακόμα και όταν οι αποικίες είναι μέσα στο πλήθος των προτεινόμενων 30 με 300 αποικιών σε ένα στάνταρ τριβλίο. Το άνω όριο της μέτρησης αποικιών μπορεί να αυξηθεί, μετρώντας με ένα μικροσκόπιο τις αποικίες, πριν αυτές συνενωθούν [32].

Αποτελέσματα της μεθόδου

Τα αποτελέσματα της μέτρησης εκφράζονται σε μονάδες σχηματισμού αποικίας (Colony Forming Units – CFU) ανά όγκο μετρούμενου αέρα. Το CFU είναι ο αριθμός των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπαραχθούν για να δημιουργήσουν αποικίες, και καθορίζεται από τις αποικίες που σχηματίζονται. Για τον υπολογισμό της ολικής συγκέντρωσης των αναπτυσσόμενων μικροοργανισμών, διαιρούμε τον όγκο του μετρούμενου αέρα με τον ολικό αριθμό των αποικιών που μετρήσαμε στο τριβλίο [23].

Καθώς τα βακτήρια εν αιώρηση μπορεί να στρεσαριστούν, ο αριθμός των CFU που λαμβάνουμε είναι, πιθανότατα, ένα μη ισχύον μέσο βιωσιμότητας. Η μόνη πληροφορία που προκύπτει από τη μέτρηση αποικιών είναι το ποσοστό από το δειγματοληπτικό πληθυσμό που έχει την ικανότητα να σχηματίσει αποικίες στο μέσο που έχει επιλεγεί από το εργαστήριο, και κάτω από τις συνθήκες ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν [25].

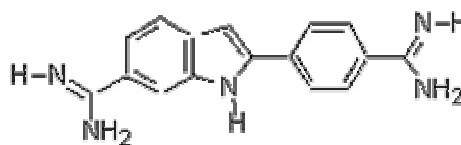
Σε ότι αναφορά τη σύνδεση των μετρήσεων με την πραγματικότητα, η χρήση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την καλλιέργεια των μικροοργανισμών μπορεί

να οδηγήσει σε σημαντική υποεκτίμηση της συγκέντρωσης των κυττάρων στο δείγμα. Αυτό που είναι σημαντικό για την έρευνα, είναι το σύνολο των σωματιδίων που είναι ικανά να διαπεράσουν την άμυνα του οργανισμού του ανθρώπου. Έτσι, όταν μετράμε αερόβιους μικροοργανισμούς για λόγους υγείας, ένας ή ένας μικρός αριθμός ειδών μικροοργανισμών μπορεί να μας ενδιαφέρουν. Μπορεί να είναι πολύ δύσκολο να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν μικροοργανισμοί ενός είδους, μέσα σε ένα σύνολο, χρησιμοποιώντας τη μέτρηση αποικιών. Ο αριθμός των μικροοργανισμών που βρίσκονται στο φόντο σε ένα δείγμα, ή και η αυξημένη τους ανταγωνιστικότητα, μπορεί να πνίξει τα είδη που μας ενδιαφέρουν, κάνοντας το αδύνατο να τα παρατηρήσουμε και να τα μετρήσουμε [25].

3.2.2. DAPI

DAPI ή 4',6-diamidino-2-phenylindole ονομάζεται η φθορίζουσα χρωστική με την ιδιότητα να δημιουργεί ισχυρούς δεσμούς με το DNA. Η DAPI είναι γνωστό ότι σχηματίζει φθορίζον σύμπλοκα με τα φυσικά δίκλωνα μόρια του DNA, παρουσιάζοντας φθορισμό ιδιαίτερα στις ομάδες της AT, AU και IC. Λόγω της ιδιότητας της αυτής, η χρωστική DAPI είναι ένα χρήσιμο εργαλείο σε πολλές κύτταρο-χημικές μετρήσεις.

Όταν το μόριο της DAPI σχηματίζει δεσμό με το DNA, ο φθορισμός της αυξάνεται σημαντικά, το οποίο έχει ερμηνευτεί ως μια υψηλής κινητικής και παρεμβάλλουσας μορφής αντίδραση, αν και υπάρχει επίσης ένδειξη ότι η DAPI δημιουργεί δεσμούς και με τα χαμηλότερα σημεία ένωσης της αλυσίδας, σταθεροποιούμενη με δεσμούς υδρογόνου με τα ζεύγη δεκτών των βάσεων AT, AU και IC. Η στερεοχημική δομή της 4',6-Diamidino-2-phenylindole φαίνεται στην εικόνα δεξιά [33].

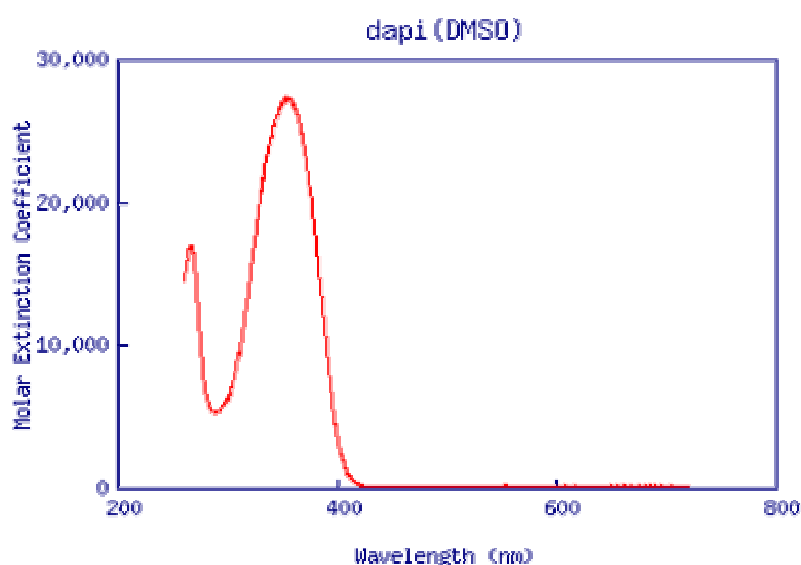


Εικόνα 2: Στερεοχημική δομή 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) ή διμέθυλσουλφοξιδίου

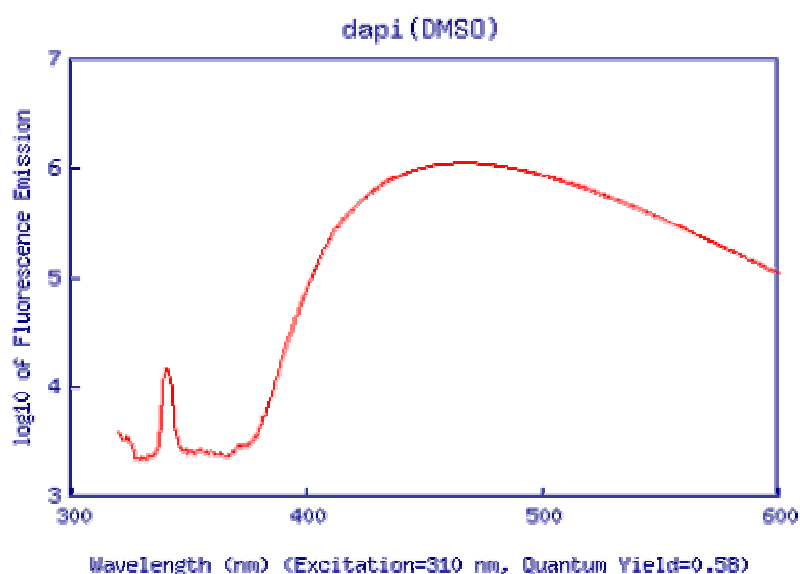
Η χρωστική DAPI χρησιμοποιείται ευρύτατα στην μέτρηση δειγμάτων με χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού. Χάρη στην ιδιότητα της να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, μπορεί να κάνει χρώση τόσο ζωντανών όσο και σταθεροποιημένων κυττάρων. Η εκπομπή της ουσίας σε μπλε χρώμα είναι βολική για την έρευνα, καθώς μπορεί να συνδυαστεί και με άλλες χρωστικές, πάνω στο ίδιο δείγμα. Έτσι, υπάρχει

μικρή σχετικά επικάλυψη όταν συνδυάζεται με πράσινες ουσίες χρώσης, όπως η fluorescein και η πράσινη φθορίζον πρωτεΐνη (green fluorescent protein – GFP) ή με κόκκινες χρωστικές, όπως η Texas Red. Τέλος, πέραν της χρήσης της ως χρωστική ουσία, η DAPI χρησιμοποιείται και στην ανίχνευση μυκοπλάσματος ή DNA ιών σε καλλιέργειες κυττάρων. Λόγω της ικανότητας της DAPI να εισέρχεται σε ζωντανά κύτταρα και να δημιουργεί δεσμούς με το DNA, είναι ιδιαίτερα τοξική και δημιουργεί μεταλλάξεις. Επομένως πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά την χρήση της [34].

Τα διαγράμματα απορρόφησης και εκπομπής φθορισμού φαίνονται παρακάτω:



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα απορρόφησης της χρωστικής 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)



Διάγραμμα 2: Διάγραμμα εκπομπής φθορισμού της χρωστικής 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)

Για τη χρήση σε μικροσκόπια φθορισμού, η DAPI διεγείρεται σε υπεριώδες φως. Όταν έχει δημιουργήσει δεσμούς με δίκλωνο DNA, το μέγιστο της απορρόφησης της είναι στα 358 nm και το μέγιστο της εκπομπής της είναι στα 461 nm. Το φάσμα της εκπομπής αυτής είναι αρκετά φαρδύ, και φαίνεται στο μπλε / ιώδες. Η DAPI δημιουργεί δεσμούς, ομοίως, και με τους κλώνους του RNA, αν και δεν παρουσιάζει τα ίδια επίπεδα φθορισμού. Η εκπομπή, σε περίπτωση του RNA, κυμαίνεται στα 400 nm περίπου.

3.2.3 F.I.S.H

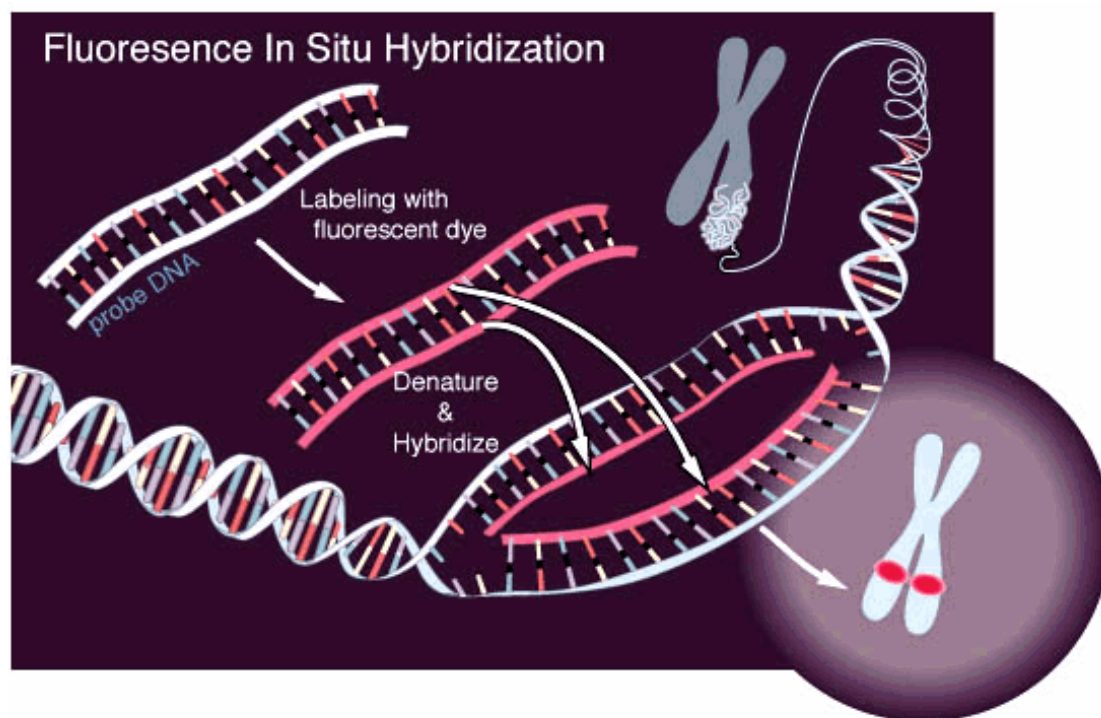
Τα αιωρούμενα σωματίδια (αεροζόλ) είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην διασπορά των μικροοργανισμών. Στο σύνολο τους, οι διαθέσιμες μέθοδοι μέτρησης των επιπέδων βιοαεροζόλ στον αέρα βασίζονται στην καλλιέργεια των μικροοργανισμών, και είναι σχετικά χρονοβόρες, δίνοντας αποτελέσματα μόνο για το καλλιεργήσιμο τμήμα του πληθυσμού των μικροοργανισμών. Επομένως, υπήρχε γενικότερα ανάγκη για την ανάπτυξη μιας μεθόδου για την ποιοτική και ποσοτική μέτρηση των σωματιδίων του βιοαεροζόλ.

Στην περασμένη δεκαετία βρέθηκε ότι “ο υβριδισμός με probes νουκλεϊκών οξέων (“gene probes”) ανοίγει μια μοναδική προοπτική για το συγκεκριμένο, ακριβή και γρήγορο προσδιορισμό των μικροοργανισμών και των γενετικών τους μεταλλάξεων” (Schleifer et al.,1993; Pickup,1991; Sayler and Layton, 1990). Καθώς η διαδικασία της μεταφοράς στον αέρα και της δειγματοληψίας μπορούν να αποτελέσουν παράγοντες στρες για τους μικροοργανισμούς, το μη καλλιεργήσιμο τμήμα του συνόλου θα αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του δείγματος. Επιπλέον, “ακόμα και τα θρεπτικά υλικά που αναπτύσσουν γενικότερες ομάδες είναι ειδικευμένα σε συγκεκριμένα σύνολο μικροοργανισμών, και επομένως δεν μπορούν να δώσουν μια αντικειμενική προοπτική της φυσικής συχνότητας των διαφορετικών οργανισμών” (Wagner et al., 1993) [4].

Αρχή λειτουργίας F.I.S.H

Ο φθορίζων υβριδισμός in situ (Fluorescent In Situ Hybridization – FISH) είναι μια σχετικά πρόσφατη τεχνολογία, που χρησιμοποιεί probes DNA τα οποία έχουν υποστεί χρώση για την ανίχνευση ή επιβεβαίωση γονιδιακών ή χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Το δείγμα του DNA αρχικά μετουσιώνεται, μια μέθοδος που διαχωρίζει τους καλά σχηματισμένους δεσμούς στην δίκλωνη αλυσίδα του DNA. Το probe που θα

χρησιμοποιηθεί στην διεργασία, αφού υποστεί χρώση με φθορίζουσα ουσία, προστίθεται στο παραπάνω δείγμα και δημιουργεί υβριδισμό με τη δίκλωνη αλυσίδα του DNA, καθώς επανασυντίθεται (ή επανασυντάσσεται) σε δίκλωνη αλυσίδα. Το σήμα που εκπέμπεται από το probe μπορεί έπειτα να ανιχνευθεί με χρήση ενός μικροσκοπίου φθορισμού, δίνοντας την δυνατότητα μέτρησης συγκεκριμένου μικροοργανισμού μέσα σε ένα γενικό σύνολο [3].



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου λειτουργίας της διαδικασίας F.I.S.H. Το κατάλληλο probe για τη διεργασία δημιουργεί υβριδισμό με την αλυσίδα του DNA του δείγματος, η οποία μετά επανασυντίθεται. Το αποτέλεσμα είναι το DNA υπό μελέτη να εκπέμπει φθορίζουσα ακτινοβολία, και να μπορεί να ανιχνευθεί με ένα μικροσκόπιο φθορισμού.

Η διαδικασία της χρώσης με FISH παρέχει στους μελετητές ένα τρόπο να κάνουν ορατό και να χαρτογραφήσουν το γενετικό υλικό σε ένα μεμονωμένο κύτταρο, συμπεριλαμβανομένου των ειδικών γονιδίων ή τμημάτων αυτών. Αυτό είναι σημαντικό στην κατανόηση την ποικιλία των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και άλλων γενετικών αλλαγών. Επιπλέον, σε αντίθεση με άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την μελέτη των χρωμοσωμάτων, η διαδικασία του FISH δεν χρειάζεται να εφαρμοστεί σε κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε φάση διχοτόμησης. Αυτό την καθιστά μια πολύ ευπροσάρμοστη διαδικασία.

Χρήση FISH

Η χρώση με FISH είναι πολύ χρήσιμη, ιδιαίτερα σε περιπτώσει που γίνεται έρευνα για την χρήση ενός γονιδίου μέσα στα χρωμοσώματα ενός ατόμου. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η προετοιμασία ενός μονόκλωνου DNA, το οποίο να ταιριάζει με ένα κομμάτι του γονιδίου υπό μελέτη. Αυτά τα τμήματα ονομάζονται probes. Το επόμενο βήμα είναι το μαρκάρισμα του, με χρήση μιας εκ του συνόλου της σειράς από χρωστικές φθορίζων ουσίες.

Η αλυσίδα του DNA αποτελείται από δύο κλώνους συμπληρωματικών μορίων, που ενώνονται μεταξύ τους σαν χημικοί μαγνήτες. Εφόσον οι κλώνοι που θα χρησιμοποιηθούν είναι μονοί, είναι ικανοί να προσκολληθούν στη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA, οπουδήποτε και αν αυτή βρίσκεται στο χρωμόσωμα. Όταν ένα probe δημιουργεί δεσμό με ένα χρωμόσωμα, η φθορίζουσα σήμανση του δίνει τη δυνατότητα στον μελετητή να το εντοπίσει [3].

Χρώση των probes

Οι ακολουθίες των probes μπορούν να σημειωθούν με χρήση ισοτόπων, αν και η μη-ισοτοπική διαδικασία φθορισμού έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται ευρύτατα, καθώς είναι σημαντικά γρηγορότερη, συνήθως δίνει σήμα μεγαλύτερης ισχύος στο μικροσκόπιο, και παρέχει πολλές επιλογές για την προβολή διαφορετικών στόχων, μέσω του συνδυασμού διαφορετικών μεθόδων. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη probes που περιγράφονται παρακάτω:

- Τα probes συγκεκριμένης θέσης χρωμοσώματος (locus specific probes) δημιουργούν δεσμούς με μια ειδική περιοχή του χρωμοσώματος. Αυτός ο τύπος των probes είναι πολύ χρήσιμος όταν γίνεται απομόνωση ενός μικρού τμήματος γονιδίου, και πρέπει να καθοριστεί πάνω σε ποιο χρωμόσωμα βρίσκεται το συγκεκριμένο γονίδιο.
- Τα αλφοειδή ή κεντρομετρικά (alphoid or centromeric) επαναληπτικά probes παράγονται με επαναληπτικές ακολουθίες που βρίσκονται στο κέντρο κάθε χρωμοσώματος. Η χρήση τους γίνεται για τον καθορισμό εάν ένα άτομο έχει τον σωστό αριθμό χρωμοσωμάτων. Αυτά τα probes μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με τα “locus specific probes”, για τον καθορισμό αν σε ένα άτομο υπολείπεται γενετικό υλικό από συγκεκριμένο χρωμόσωμα.
- Τα probes που αποτελούν ολόκληρο χρωμόσωμα είναι, στην ουσία, συλλογές από probes μικρότερου μεγέθους, το κάθε ένα από τα οποία δημιουργεί δεσμούς με διαφορετικές ακολουθίες κατά μήκος ενός χρωμοσώματος. Με την χρήση

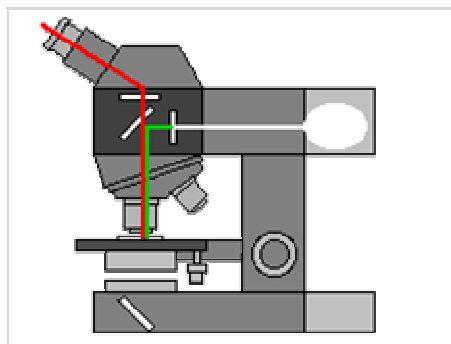
πολλαπλών probes, σημανσμένων με μια ποικιλία διαφορετικών χρωστικών, είναι δυνατή η σήμανση κάθε χρωμοσώματος με το δικό του ξεχωριστό χρώμα. Το προκύπτων αποτέλεσμα είναι ένας ‘χρωματικός χάρτης’ των χρωμοσωμάτων είναι γνωστό και ως ‘φασματικός καρυότυπος’. Οι ολόκληρες χρωμοσωμικές ακολουθίες είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στην εξέταση των χρωμοσωμικών ανωμαλιών, για παράδειγμα, όταν ένα χρωμόσωμα έχει προσκολληθεί στο τέλος άλλου χρωμοσώματος [3].

Η εξειδίκευση του probe στην δημιουργία δεσμού στο επιθυμητό σημείο εξαρτάται από την διαδικασία του υβριδισμού, και τις συνθήκες του ξεπλύματος. Τα probes υβριδισμού εισάγονται σε ένα σταθεροποιητικό διάλυμα σε συγκεντρώσεις κορεσμού ($5 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$), προκειμένου να αυξήσουν τη δημιουργία δεσμού των probe. Κατά την διάρκεια του υβριδισμού, τα δείγματα επωάζονται σε υψηλές θερμοκρασίες, σε αεροστεγής θαλάμους, κορεσμένους με ατμούς νερού και φορμαμιδίου (formamide) του επιπλέον διαλύματος υβριδισμού, προκειμένου να αποφευχθούν αλλαγές στα επίπεδα της συγκέντρωσης λόγω εξάτμισης. Το στάδιο του πλυσίματος γίνεται σε ελαφρά υψηλότερη θερμοκρασία, και εξυπηρετεί κυρίως στο ξέβγαλμα των επιπλέον μορίων του probe, σε συνθήκες που δεν επιτρέπουν την δημιουργία μη ειδικών δεσμών.

Χρήση του FISH για περιβαλλοντικά δείγματα σε φίλτρα μεμβράνης

Στην διάρκεια των περασμένων ετών, η χρώση με FISH έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη μελέτη του πόσιμου νερού, του παράκτιου και ενδότερου περιβάλλοντος πλαγκτόν, καθώς και στα παράκτια ιζήματα. Έχει βρεθεί, δε, ότι “το τμήμα των βακτηρίων που μπορούν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο FISH αντιστοιχεί σε ικανοποιητικό βαθμό με το πλήθος των ζωντανών κυττάρων που προσδιορίζονται με μικρό-αυτόματη ραδιογραφία στο βακτηριοπλαγκτόν των ακτών” (Karner and Fuhrman, 1997).

Κατηγορίες probes που είναι εξειδικευμένα για συγκεκριμένα είδη, σε διάφορες υποκατηγορίες έχουν χρησιμοποιηθεί, για παράδειγμα, στην “μελέτη της σύνθεσης του χιονιού σε λίμνες” (Weiss et al., 1996) και για την “ανίχνευση μικροβιακών σχηματισμών στο πλαγκτόν και την χιονοκάλυψη ορεινών λιμνών” (Alfreider et al., 1996) ή ακόμα και για να δείξει την “διαφορά στο πλαγκτόν των βακτηρίων που



Εικόνα 4: Αρχή λειτουργίας μικροσκοπίου φθορισμού

αναπτύσσεται στο παράκτιο περιβάλλον σε σχέση με εκείνο του πόσιμου νερού” (Glöckner et al., 1999) [1].

3.2.4 Άλλες μέθοδοι μέτρησης

Παράλληλα με τις παραπάνω μεθόδους, εμφανίζονται στη βιβλιογραφία και άλλες μέθοδοι, που είτε είναι συνδυασμοί άλλων μεθόδων, είτε είναι τροποποιημένες διαδικασίες πρότυπων μεθόδων, με σκοπό να βελτιώσουν ή να ενισχύσουν την ικανότητα ανίχνευσης της μεθόδου πάνω στο αντικείμενο έρευνας.

Για την άμεση ανάλυση των φυλογενετικών δεσμών και της μεταβολικής κατάστασης των μονοκύτταρων οργανισμών στο νερό, μπορεί να γίνει συνδυασμός της μεθόδου FISH με μεθόδους που χαρακτηρίζουν την φυσιολογική κατάσταση των βακτηριών, σε επίπεδο κυττάρου, ως άμεση μέτρηση ζωντανών κυττάρων (direct viable count – DVC), που έχει χρησιμοποιηθεί από τους Kogure et al., 1979, ή η μέθοδος CTC, από τους Rodriguez et al., 1992. Οι Regnault et al. (2000a,b) πρότειναν τη μέθοδο του DVC ως πρόσθετη στη διαδικασία της μεθόδου FISH, με τα probe να στοχεύουν το 16 s rRNA του *E. coli*. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την έκθεση των βακτηριακών κυττάρων σε ένα μέσο επανα-ζωογόνοσης (revivification medium), το οποίο περιέχει αντιβιοτικά, που θα αποτρέψουν την διαδικασία της κυτταρικής διχοτόμησης. Τα επιμήκη κύτταρα προσμετρούνται ως ζωντανά κύτταρα [9].

Η αυξανόμενη διαθεσιμότητα των 16S και 23S ακολουθιών ριβοσομικών ριβονουκλεϊκών οξέων (rRNA) στις βάσεις δεδομένων, και η πρόσβαση στην τεχνολογία των ακολουθιών, έχει επιτρέψει την χρήση του rRNA ως στόχου για τα probes των ολιγονουκλεοτιδίων. Εφόσον η παρουσία των rRNA μορίων αμβλύνεται λόγω της παρουσίας τους σε 30000 ριβοσώματα για κάθε κύτταρο, η χρήση τους ως στόχο για τα probes έχει επιτρέψει την διεύρυνση των δυνατοτήτων του in situ υβριδισμού [14].

3.3 Προβλήματα και περιορισμοί

Παρ’ όλη την πρόοδο στις μεθόδους ανίχνευσης και μέτρησης των σωματιδίων του βιοαεροζόλ στην ατμόσφαιρα, η διαδικασία παραμένει περίπλοκη, σε αντίθεση με την περίπτωση της μέτρησης μη βιολογικών αεροζόλ. Οι κύριοι λόγοι που καθιστούν τα οργανικά σωματίδια αεροζόλ, ή αλλιώς βιοαεροζόλ, δύσκολα στη μέτρηση είναι, σε γενικές γραμμές: α) Η ζωτικότητα των μικροοργανισμών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι τα επίπεδα της υγρασίας στην ατμόσφαιρα, η θερμοκρασία

του περιβάλλοντος, τα επίπεδα μόλυνσης, το φυσικό στρες αλλά και οι μεταβολές στις περιβαλλοντικές συνθήκες. β) Τα χαρακτηριστικά και η συμπεριφορά τους μπορούν να επηρεαστούν από τη διαδικασία ανάπτυξης και σχηματισμού του αεροζόλ, τη μετάβαση τους στην αέρια κατάσταση, κατά τη διαδικασία συλλογής τους από τους δειγματολήπτες, κατά την αποθήκευση, χειρισμό ή ανάλυση. γ) Ένα άλλο βασικό στοιχείο που πρέπει να σημειωθεί είναι ότι δεν υπάρχουν ακόμη αναγνωρισμένα, ως προς την λειτουργικότητα τους, καθορισμένα πρωτόκολλα σχετικά με τη μέτρηση βιοαεροζόλ, και οι αρχές που χρησιμοποιούνται είναι, κατά βάση, ίδιες με εκείνες της συλλογής σκόνης. Έτσι, ο αριθμός των δειγμάτων που θα ληφθούν, η χρονική διάρκεια λήψης και η θέση του δειγματολήπτη καθορίζονται από τον μελετητή, ανάλογα με το περιβάλλον και τη δραστηριότητα μέτρησης [25].

Προβλήματα μέτρησης

Η συλλογή και καθίζηση των σωματιδίων του βιοαεροζόλ επηρεάζονται από παράγοντες που έχουν σχέση με το μέγεθος των σωματιδίων. Αυτοί συμπεριλαμβάνουν την επίδραση της δύναμης αδράνειας, της καθίζησης, καθώς και της κίνησης Brown. Σε ιδανικές συνθήκες, τα σωματίδια θα πρέπει να συλλέγονται ποσοτικά, ασχέτως του μεγέθους τους, πράγμα δύσκολο στην πράξη. Μερικές φορές είναι χρήσιμη η γνώση του μεγέθους των σωματιδίων, ώστε να υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις στο καθοδικό ρεύμα αέρα, και να μπορεί να υπολογιστεί η καθίζηση, πράγμα επίσης δύσκολο να επιτευχθεί. Το αποτέλεσμα της συμμετοχής της αδράνειας στη συλλογή βιοαεροζόλ, συνήθως παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδοτικότητα των μετρητών, είτε μέσω των απωλειών στο σημείο εισαγωγής, είτε με την υπερσυλλογή ή υποσυλλογή των σωματιδίων λόγω της εισόδου. Οι επιπτώσεις της αδράνειας αυξάνουν σημαντικά με την αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων, και υπάρχουν σε κάθε σύστημα όπου υπάρχει διατάραξη του αέρα. Επομένως, η ποσοτική συλλογή σωματιδίων σε εξωτερικούς χώρους, λαμβάνοντας υπ' όψιν τις αλλαγές στην ροή του ανέμου και την ταχύτητα αυτού, είναι αρκετά δύσκολη υπόθεση. Σε ιδανικές συνθήκες, η ροή του ανέμου δεν θα πρέπει να διαταράσσεται και η ταχύτητα του μετρούμενου αέρα, όταν μπαίνει σε ένα χώρο ή στο δειγματολήπτη, θα πρέπει να είναι ίση με την ταχύτητα στην γύρω περιοχή. Τέτοια δείγματα ονομάζονται ισοκινητικά, και είναι οι ιδανικές περιπτώσεις δειγματοληψίας. Στο εξωτερικό περιβάλλον τέτοια δείγματα είναι σχεδόν αδύνατο να επιτευχθούν, αφού σύμφωνα με τις μελέτες πολλών ερευνητών με χρήση ειδικών οργάνων αυτόματης διατήρησης διεύθυνσης και αυτόματου υπολογισμού ροής, τα αποτελέσματα ήταν απογοητευτικά,

και έπρεπε να εφαρμοστούν οι διορθωτικοί συντελεστές για ανισοκινητικά δείγματα [21].

Βιωσιμότητα των δειγμάτων

Ο επόμενος σημαντικός παράγοντας που δημιουργεί πρόβλημα στη διαδικασία συλλογής και μέτρησης του βιοαεροζόλ είναι η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών. Στο βαθμό που οι μικροοργανισμοί μπορούν να θεωρηθούν ζωντανοί οργανισμοί, είναι απαραίτητο να καθοριστεί τι εννοούμε βιωσιμότητα και επιβίωση τους. Στην αέρια βιολογία αυτό συνήθως σχετίζεται με την ιδιότητα του μικροοργανισμού να δημιουργήσει αποικία σε ένα θρεπτικό μέσο. Στην πραγματικότητα, αυτό είναι μέτρο μόνο της ικανότητας του μικροοργανισμού να δημιουργήσει αποικίες, κάτω από τις δοσμένες συνθήκες. Αυτή η ανάλυση δεν μπορεί, όμως, να δώσει στοιχεία για την ικανότητα του μικροοργανισμού να δημιουργήσει αποικία ή να προσβάλει έναν δέκτη. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν παραδείγματα μικροοργανισμών που είναι πολύ δύσκολο να καλλιεργηθούν, αλλά είναι πολύ εύκολο να αποδειχθεί η συμμετοχή τους στη πρόκληση ασθενειών σε πραγματικές συνθήκες (*Legionella pneumophilla*). Σε γενικές γραμμές, ένα σύνολο από διαφορετικούς παράγοντες επηρεάζει την βιωσιμότητα των μικροοργανισμών που αποτελούν το βιοαεροζόλ. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να δρουν μαζί και να στρεσάρουν τον οργανισμό. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες είναι: το είδος του μικροοργανισμού, οι συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας, η μέθοδος παραγωγής του βιοαεροζόλ, ο δειγματολήπτης και το περιβάλλον αιώρησης. Η ξήρανση, ακτινοβολία, το οξυγόνο και το όζον είναι ακόμα μερικοί λόγοι που επηρεάζουν την βιωσιμότητα των σωματιδίων [25].

Βιωσιμότητα *E. coli*

Τα προβλήματα που έχουν παρατηρηθεί στην διαδικασία προσδιορισμού των *E. coli* είναι σε σχέση με τα αποτελέσματα που δίνουν για τον πληθυσμό τους σε ένα δείγμα, σε σχέση με εκείνο των κολοβακτηριδίων. Σε αντίθεση με το λογικά αναμενόμενο αποτέλεσμα, της μεγαλύτερης συγκέντρωσης των κολοβακτηριδίων σε σχέση με τα *E. coli*, αφού τα δεύτερα είναι υποκατηγορία των πρώτων, τα *E. Coli* δίνουν μεγαλύτερα ποσοστά πληθυσμού. Σε μελέτη που έγινε, από τις 1326 αποικίες που φαίνονταν ως τυπικοί σχηματισμοί *E. Coli* πάνω σε Petrifilmk EC plates (μπλε αποικίες με δημιουργία αερίων), το 93.4% βρέθηκε βιοχημικά να είναι *E. coli*, ενώ μόνο το 91.6% επιβεβαιώθηκε ότι είναι κοπρανώδη κολοβακτηρίδια. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί αν θεωρήσουμε ότι το ποσοστό που μετρήθηκε ως *E. coli* αλλά δεν αναγνωρίστηκε ως κολοβακτηρίδιο, ανήκει σε μια ομάδα αναερόβιων *E. coli* που

έχουν το πρότυπο IMViC [+ + - -], αλλά δεν παράγουν αέρια σε θρεπτικό υλικό Lauryl/EC broth [8].

3.4 Ομάδες μετρούμενων μικροοργανισμών

Για τον έλεγχο της μικροβιακής καταλληλότητας του πόσιμου νερού έχει οριστεί η χρήση συγκεκριμένων ειδών μικροοργανισμών, που αποκαλούνται μικροβιακοί δείκτες. Οι δείκτες είναι αλλόχθονοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι περνούν παροδικά μέσα στο υδάτινο οικοσύστημα, και προέρχονται συνήθως από το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου. Η χρησιμότητα των δεικτών είναι ότι υποδηλώνουν την παρουσία άλλων εντερικών παθογόνων.

Για να χρησιμοποιηθεί ένας μικροοργανισμός ως δείκτης ποιότητας του νερού πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις:

- Να είναι μετρήσιμος στα περιβαλλοντικά δείγματα με εύκολες και μη δαπανηρές τεχνικές που ωστόσο πρέπει να είναι ακριβείς και να έχουν επαναληψιμότητα.
- Να είναι ανθεκτικός στις περιβαλλοντικές πιέσεις.
- Να υπάρχει σε ικανό αριθμό στο περιβαλλοντικό δείγμα, χωρίς να πολλαπλασιάζεται ή να υφίσταται σημαντικές γενετικές αλλαγές ώστε να επιτυγχάνεται ικανοποιητικά η εκτίμησή του.
- Να έχει σταθερή και αποκλειστική σχέση με την πηγή των παθογόνων.
- Να έχει σταθερά χαρακτηριστικά

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται συνήθως ως δείκτες περιλαμβάνονται στις εξής κατηγορίες:

Ολικά κολοβακτηριοειδή

- Περιλαμβάνουν όλα τα αερόβια και προαιρετικώς αναερόβια gram αρνητικά μη σπορογόνα βακτηρίδια τα οποία ζυμώνουν την λακτόζη και παράγουν αέριο όταν επωασθούν στους 35 °C για 48 ώρες
- Περιλαμβάνουν τα είδη *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* και *Enterobacter*
- Όλοι αυτοί οι μικροοργανισμοί δεν αποικίζουν απαραίτητως τον γαστρεντερικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων γι αυτό ο δείκτης αυτός έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση και αρκετοί ερευνητές δεν τον χρησιμοποιούν πλέον για τον έλεγχο της κοπρανώδους ρύπανσης των νερών

Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή

- Αποτελούν υποομάδα των ολικών κολοβακτηριοειδών και ευρίσκονται κυρίως στον γαστρεντερικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων

- Διαφέρουν από τα ολικά κολοβακτηριοειδή από την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες
- Το συχνότερο μέλος αυτής της ομάδας είναι το *E. coli* αλλά είναι δυνατόν να περιλαμβάνονται και διάφορα είδη *Klebsiella* ή *Enterobacter*

Κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι

- Η ύπαρξή τους στο νερό σημαίνει την ρύπανσή του από κόπρανα των θερμόαιμων ζώων
- Οι *S.faecalis* και *S.faecium* φαίνεται να προέρχονται κυρίως από τα ανθρώπινα κόπρανα
- Ο *S.bovis*, *S.equinus* και *S.avium* υπάρχουν σε μεγάλες πυκνότητες στα κόπρανα ζώων
- Οι εντερόκοκκοι αποτελούν σημαντικό βακτηριακό δείκτη για τον έλεγχο της κοπρανώδους ρύπανσης των επιφανειακών νερών.

Επί χρόνια, τα ολικά κολοβακτηρίδια και τα κοπρανώδη κολοβακτηρίδια ήταν εκείνα που χρησιμοποιούνταν ως δείκτες, αλλά πρόσφατα η άφθονη παρουσία της *Escherichia coli* έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται περισσότερο με τον κίνδυνο στην υγεία, σε σχέση με τα κολοβακτήρια [9], το οποίο έχει στρέψει το ενδιαφέρον της έρευνας, ως προς την ανίχνευσης παρουσίας μόλυνσης σε χώρους, στην μελέτη και έρευνα για την παρουσία *E. coli*. Η εύρεση της παρουσίας *E. coli* δείχνει κίνδυνο μόλυνσης από άλλους κοπρανώδεις παθογόνους μικροοργανισμούς (π.χ. *Salmonella*, *Shigella*, εντερικοί ιοί) ακόμα και αν, τις περισσότερες φορές, τα ίδια δεν είναι παθογόνα [14].

4. Πειραματική διαδικασία

4.1 Αντικείμενο μελέτης

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να ανιχνευθεί η παρουσία και να μετρηθεί η συγκέντρωση επιλεγμένων ειδών μικροοργανισμών που περιλαμβάνονται στο σύνολο των σωματιδίων που αποτελούν το βιοαεροζόλ, στον επιλεγμένο χώρο μελέτης, ο οποίος είναι η Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων του Δήμου Χανίων, με χρήση μεθόδων επιφθορισμού, και συγκεκριμένα της μεθόδου χρωστικής DAPI και της μεθόδου F.I.S.H.

Το αντικείμενο μέτρησης σε αυτή την εργασία επιλέχθηκε να είναι το είδος *Escherichia coli*, που αποτελεί μέλος της γενικής ομάδας των εντεροβακτηριδίων (ή κοπρανωδών κολοβακτηριδίων), καθώς και η *Klebsiella pneumoniae*, που επίσης ανήκει στην κατηγορία των κοπρανωδών κολοβακτηριδίων. Ένας από τους βασικότερους λόγους επιλογής των συγκεκριμένων είναι ότι και οι δύο αυτοί μικροοργανισμοί αποτελούν χαρακτηριστικούς δείκτες εντερικής μόλυνσης, και η ανίχνευση της παρουσίας τους στον αέρα σημαίνει ότι υπάρχει διαφυγή παθογόνων μικροοργανισμών από το υδάτινο περιβάλλον στον αέρα της περιοχής.

Χαρακτηριστικά *Escherichia coli*

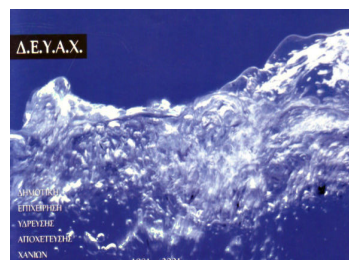
Η *Escherichia coli* είναι πιθανότατα το πιο γνωστό μέλος της οικογένειας των Enterobacteriaceae. Ο λόγος για αυτό είναι η εκτενής χρήση των παραγώγων του είδους *E. coli* 12 σε μελέτες σε εργαστήρια ανά τον κόσμο. Παρ' όλα αυτά, τα *E. coli* που απαντώνται στη φύση είναι ανθεκτικοί και πιθανώς επιθετικοί μικροοργανισμοί, που έχουν αναπτύξει την ικανότητα να αποικίζουν πλήρως το εντερικό σύστημα των θηλαστικών ζώων, να επιβιώνουν σε ελεύθερη μορφή στο περιβάλλον, και σε ορισμένες περιπτώσεις να δημιουργούν κλινικές ασθένειες. Τα φυσικά *E. coli* βρίσκονται σε έντονο ανταγωνισμό με άλλα βακτήρια για την κατάληψη μιας θέσης στο οικοσύστημα. Η ικανότητα τους να αποικίσουν το εντερικό σύστημα των θηλαστικών ήταν εκείνη που διευκόλυνε την διάδοση και την επιβίωση τους. Έτσι, σε αντίθεση με οργανισμούς που έχουν εξειδικευμένο ξενιστή, ή τα υποχρεωτικά παράσιτα, τα *E. coli* είναι μικροοργανισμοί που προσαρμόζονται εύκολα, με μια εκτενή γκάμα μεταβολικών και λειτουργικών γονιδίων, που επιτρέπουν στο είδος να αποικεί ικανοποιητικά ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών συστημάτων και ξενιστών. Ο λόγος για την ευκολία αυτή στην προσαρμοστικότητα τους είναι, κυρίως, η ικανότητα

να αποσπούν δείγματα του DNA του ξενιστή, μέσω διάφορων μηχανισμών λήψης, όπως είναι η γενετική μεταλλαγή ή η σύζευξη [11].

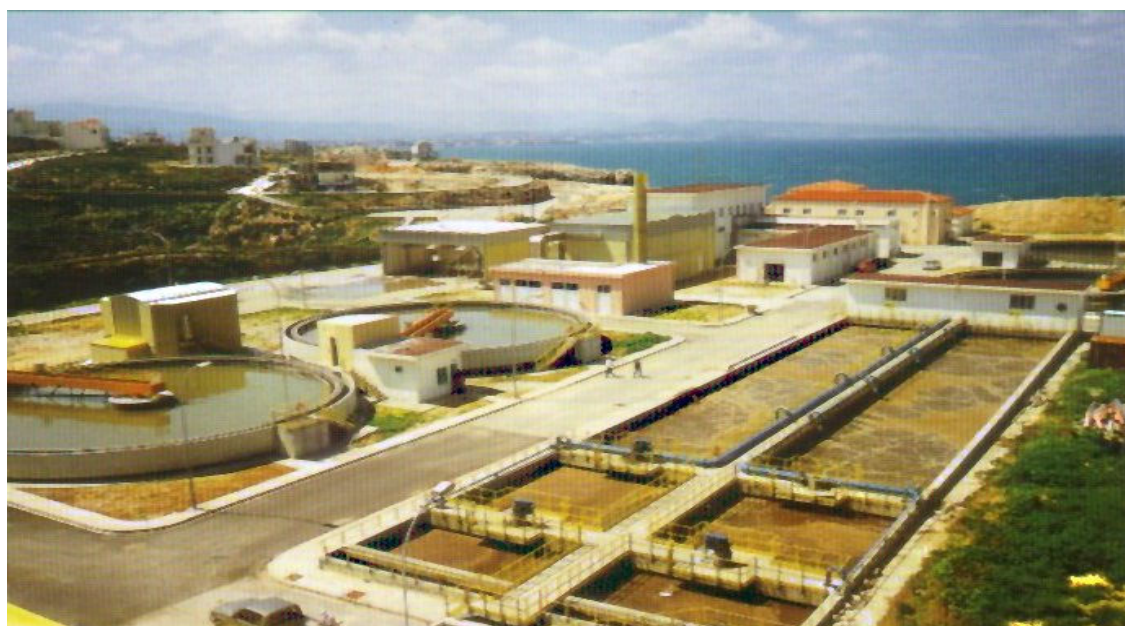
Εφόσον η παρουσία των *E. coli* στο νερό και το φαγητό είναι αποτέλεσμα κοπρανώδους μόλυνσης, η εύρεση σημαντικών ποσοτήτων είναι ενδεικτική αυτού του είδους μόλυνσης στο περιβάλλον, ασχέτως των παθογόνων ιδιοτήτων των ειδών που παίρνουν μέρος. Αυτός είναι και ο βασικός λόγος που τα *E. coli* χρησιμοποιούνται ως δείκτες, και επιλέχθηκαν και σε αυτή τη μελέτη. Η μέτρηση των επιπέδων του *E. coli* στο περιβάλλον θεωρείται ενδεικτική του επιπέδου μόλυνσης: με την παρούσα νομοθεσία, το πόσιμο νερό πρέπει να περιέχει λιγότερο του ενός κυττάρου ανά 100 mL [14].

4.2 Χώρος μετρήσεων

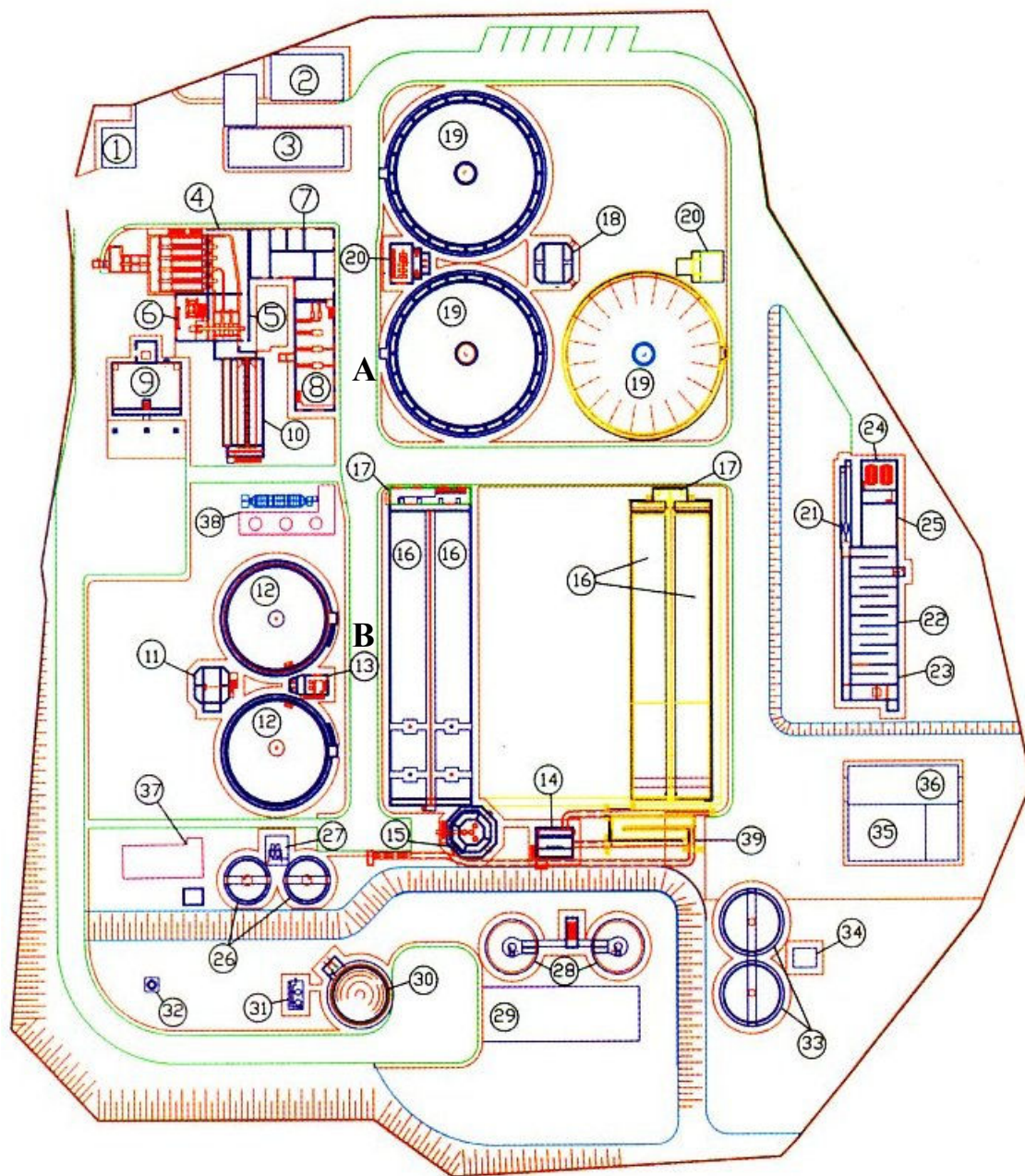
Για την διεξαγωγή των μετρήσεων επιλέχθηκε η Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων του Δήμου Χανίων, που βρίσκεται πλησίον των Δημοτικών Σφαγείων στην περιοχή του Άγιου Ονούφριου Χανίων. Η εγκατάσταση λειτουργεί μερικώς από το 1995, ενώ η πλήρης λειτουργία του έργου ξεκίνησε το 1998, με τα έργα αύξησης της δυναμικότητας της να έχουν ολοκληρωθεί από το 2001, και δέχεται τόσο αστικά λύματα όσο και βοθρολύματα. Οι μετρήσεις έγιναν με την άδεια της Δημοτικής Επιχείρησης Ύδρευσης Αποχέτευσης Χανίων.



Παρακάτω φαίνεται μια άποψη της εγκατάστασης από τα νότια:



Αναλυτικά το σχεδιάγραμμα της εγκατάστασης έχει ως εξής:



Σχήμα 1: Σχεδιάγραμμα Εγκαταστάσεως Επεξεργασίας Λυμάτων του Δήμου Χανίων

1	Φυλάκιο Εισόδου	20	Αντλιοστάσιο επανακυκλοφορίας αεριζόμενου μείγματος
2	Κατοικία Φύλακα	21	Μετρητής παροχής (Verturi)
3	Διοικητήριο - Χημικό και μικροβιολογικό εργαστήριο	22	Δεξαμενή χλωρίωσης
4	Αίθουσα κινητήριων κοχλιών Αρχιμήδη	23	Δεξαμενή αναρίθμησης φρεάτιο φόρτισης υποθαλάσσιου
5	Αίθουσα εσχάρων	24	Κτίριο χλωρίωσης
6	Κτίριο πλύσης άμμου και συλλογής εσχαρωμάτων	25	Κτίριο βιομηχανικού νερού
7	Κτίριο ηλεκτροστασίου	26	Δεξαμενή προπάχυνσης
8	Κτίριο Αεροσυμπιεστών	27	Αντλιοστάσιο προπάχυνσης

9	Δεξαμενή και αντλιοστάσιο Βοθρολυμάτων	28	Χωνευτής Ιλύος
10	Δεξαμενή Αμμοσυλογής Λιποσυλλογής	29	Κτίριο ενέργειας
11	Μεριστής ροής προς Α καθίζηση	30	Αεροφυλάκιο
12	Δεξαμενή Α καθίζησης	31	Εγκατάσταση αποθείωσης
13	Αντλιοστάσιο Α' βάθμιας λάσπης	32	Δαυλός καύσης
14	Προμεριστής Αερισμού	33	Δεξαμενή μεταπάχυνσης
15	Μεριστής αερισμού	34	Αντλιοστάσιο μεταπάχυνσης
16	Δεξαμενή αερισμού	35	Κτίριο αφυδάτωσης
17	Αντλιοστάσιο επανακυκλοφορίας αεριζόμενου μείγματος	36	Κτίριο συνεργείου οχημάτων μηχανημάτων
18	Μεριστής ροής Β καθίζησης	37	Συγκρότημα μηχανικής πάχυνσης
19	Δεξαμενή Β καθίζησης	38	Κτίριο απόσμησης

Επιλογή σημείων δειγματοληψίας

Από προηγούμενη μελέτη [35] έχειδειχθεί ότι τα σημεία μιας εγκατάστασης που φαίνεται ότι παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες ποσότητες συγκέντρωσης μικροοργανισμών στον αέρα είναι οι δεξαμενές αερισμού, οι δεξαμενές δευτεροβάθμιας καθίζησης, καθώς και τα κτήρια εξάμμωσης. Γενικότερα, περιοχές πλησίον μηχανημάτων με κινούμενα μηχανικά μέρη (πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια καθίζηση) ή μηχανήματα που εκτελούν διεργασίες αερισμού, παράγουν μέσες με υψηλές συγκεντρώσεις βακτηρίων (Delia et al., 1984; Fannin et al., 1985; Butelli, 1988; Colombi et al., 1991a; Carducci et al., 1995a).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα σημεία που είναι πιθανότερο να έχουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και που θα πρέπει να ελεγχθούν για τα επίπεδα βιοαεροζόλ είναι η δεξαμενή αερισμού και η δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης. Στο παραπάνω σχεδιάγραμμα της εγκατάστασης παρουσιάζονται τα δύο σημεία όπου έγιναν οι μετρήσεις. Ο δειγματολήπτης ήταν σε απόσταση 1 μέτρου από τις δεξαμενές και στο ύψος της αναπνοής του ατόμου, σε προσπάθεια να προσομοιώσει όσο το δυνατόν περισσότερο τις συνθήκες εργασίας στις Ε.Ε.Λ.

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα δυο σημεία δειγματοληψίας στην Ε.Ε.Λ



Εικόνα 5: Σημείο Α της δειγματοληψίας. Από το σημείο αυτό έγινε η λήψη των δειγμάτων του νερού για την δεξαμενή της δευτεροβάθμιας καθίζησης, ενώ για τα δείγματα αέρα ο δειγματολήπτης βρισκόταν σε απόσταση 1 μέτρου από το σημείο.



Εικόνα 6: Σημείο Β δειγματοληψίας. Το δείγμα νερού για την δεξαμενή του αερισμού λήφθηκε από το σημείο αυτό, ενώ τα δείγματα αέρα λήφθηκαν από 1 μέτρο απόσταση.

4.3 Υλικά και μέθοδοι Ανάλυσης

Παρακάτω παρουσιάζονται τα υλικά και τα μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, καθώς και η μεθοδολογία της ανάλυσης των συλλεγόμενων δειγμάτων.

4.3.1 Μέθοδος καλλιέργειας

Η μέθοδος καλλιέργειας, όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια στον τομέα της μελέτης των μικροοργανισμών. Με χρήση κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος μπορεί να γίνει ανίχνευση της ύπαρξης και της συγκέντρωσης του μικροοργανισμού υπό μελέτη. Σε αυτή τη μελέτη, η μέθοδος της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε ως ενδεικτική μέθοδος, προκειμένου να βεβαιωθεί η παρουσία των ειδών *E. coli* και *Klebsiella pneumoniae* στα σημεία μελέτης, και να βρεθούν τα επίπεδα συγκέντρωσης τους.

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για καλλιέργεια επιστρώθηκαν κατάλληλα στο θρεπτικό υλικό, μετά την απαραίτητη αραίωση τους. Για τα δείγματα νερού από την δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης έγινε μέτρηση σε δύο αραιώσεις, σε 1:10 και σε 1:100. Από τις πρώτες ενδείξεις των αποτελεσμάτων βρέθηκε ότι τα δείγματα με αραιώση 1:100 παρουσίαζαν πολύ μικρούς αριθμούς αποικιών, και δεν μπορούσαν να αποτελέσουν αξιόπιστη πηγή για την διεξαγωγή συμπεράσματος όσο αναφορά τον σχηματισμό αποικιών. Επομένως, στις επόμενες μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε μόνο η αραιώση του 1:10, που έδινε ικανοποιητικά αποτελέσματα και μετρήσιμες συγκεντρώσεις αποικιών. Για τα δείγματα που λήφθηκαν από την δεξαμενή αερισμού, οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ήταν της τάξης του 1:100 και 1:1000. Από τα πρώτα αποτελέσματα, ομοίως με την δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για τις επόμενες μετρήσεις η αραιώση 1:100, ως πιο έγκυρη.

Η ποσότητα του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια ήταν 0.1 ml, και η ανάπτυξη των αποικιών έγινε στους 36.5 °C για 24 ώρες.

Τα δείγματα αέρα συλλέχθηκαν με την αντλία συλλογής

AirChek²⁰⁰⁰ της SKC Inc. Οι συλλεγόμενοι όγκοι ήταν 4, 8 και 16 λίτρα. Έπειτα από



Εικόνα 7: Η αντλία μέτρησης AirChek²⁰⁰⁰ της SKC

τις πρώτες αναλύσεις των μετρούμενων φίλτρων βρέθηκε ότι οι όγκοι των 8 λίτρων έδιναν τα καλύτερα αποτελέσματα στα φίλτρα, καθώς οι όγκοι των 4 λίτρων αέρα ήταν αρκετά μικροί για να δώσουν μια ικανοποιητική μέτρηση σε ένα πεδίο φίλτρου, ενώ οι όγκοι των 16 λίτρων ήταν πολύ μεγάλοι, και δημιουργούσαν υπερπλήρωση του φίλτρου, καθιστώντας τη μέτρηση αδύνατη.

Για την ανάπτυξη και θρέψη των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα θρεπτικά υλικά, ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού που ήταν υπό παρατήρηση:

MacCONKEY Agar: Επιλεκτική μέθοδος καλλιέργειας για την απομόνωση των ειδών *Salmonella*, *Shigella* και των κοπρανωδών κολοβακτηριδίων σε κόπρανα, ουρία, απορρίμματα φαγητού, υγρά απόβλητα κ.α. σύμφωνα με το πρότυπο MacCONKEY (1950). Η δράσης λειτουργίας του υλικού ακολουθεί την εξής διαδικασία: Η λακτόζη και ο δείκτης του pH σε κόκκινο χρώμα χρησιμοποιούνται για να ανιχνεύσουν την διάσπαση της λακτόζης, ενώ χολικά άλατα και κρυσταλλικό ιώδες χρησιμοποιούνται για την αποτροπή της ανάπτυξης Gram θετικών μικροβιακής χλωρίδας. Ανάλογα με τον μικροοργανισμό που αναπτύσσεται, με βάση το μηχανισμό ανάπτυξης του, παράγονται διαφορετικές χημικές ουσίες, που δίνουν διαφορετικό χρώμα στην αποικία, μέσω του οποίου γίνεται ο διαχωρισμός των ειδών των αποικιών. Παρακάτω δίνεται ο πίνακας με τα χρώματα που προκύπτουν ανάλογα με την αποικία, όπως δίνονται από το βιβλίο καταλόγου της Merk® 2000.

Εμφάνιση των αποικιών	Μικροοργανισμοί
Colourless, translucent	Salmonella, Shigella and others
Large, red, surrounded by turbid zone	Escherichia coli
Large, pink, mucoid	Enterobacter, Klebsiella
Very small, opaque, isolated colonies	Enterococci, Staphylococci

Πίνακας 2: Πίνακας με τις αποχρώσεις που αποκτούν οι καλλιέργειες στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού MacConkey, ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών (Merks Microbiology Manual 2000)

Peptone Yeast Agar: Μη επιλεκτική μέθοδος καλλιέργειας για την ανίχνευση και απομόνωση των ολικών βακτηριδίων (εντεροβακτηριδίων) από τρόφιμα και άλλα υλικά. Το αμυλοσάκχαρο ευνοεί την ανάπτυξη των εντεροβακτηριδίων. Η ισχυρή

ικανότητα ουδετεροποίησης του μέσου καλλιέργειας εμποδίζει τα σχηματιζόμενα οξέα από το να θανατώσουν την αποικία.

4.3.2 DAPI

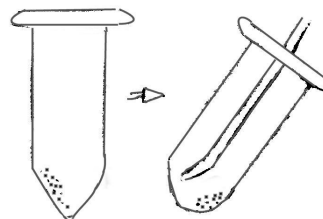
Έπειτα από την μέτρηση με την μέθοδο καλλιέργειας, και αφού έχει γίνει επιβεβαίωση της ύπαρξης των μετρούμενων μικροοργανισμών στην περιοχή, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος χρώσης με DAPI, σε δείγματα αέρα και νερού, με σκοπό την ανίχνευση των ολικών μικροοργανισμών στο δείγμα, με την χρήση μικροσκοπίου. Η βασική διαφορά της χρήσης της μεθόδου από εκείνης της καλλιέργειας είναι ότι στις μεθόδους καλλιέργειας, ενώ σε θεωρητικό επίπεδο κάθε ζωντανός οργανισμός θα πρέπει να παράγει αποικία και να προσμετρηθεί, στην πράξη λόγω της ισχυρής επίδρασης στην ικανότητα των κυττάρων να σχηματίσουν αποικία μέσα στον αναμενόμενο χρόνο, από τις διάφορες παραμέτρους του περιβάλλοντος, πολλοί μικροοργανισμοί δεν παράγουν αποικίες και έτσι δεν προσμετρούνται. Έτσι διαφορετικά χρονικά δείγματα μπορεί να δώσουν διαφορετικά αποτελέσματα. Ακόμη και ο χρόνος εκκόλαψης που χρησιμοποιείται μπορεί να δώσει διαφορετικά αποτελέσματα, αφού ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορεί να μην προλάβουν να αναπτυχθούν μέσα στο διάστημα των 24 ωρών που δίνεται για εκκόλαψη [14]. Αντίθετα, η μέθοδος χρώση με DAPI, που βάφει συγκεκριμένα το DNA των μικροοργανισμών, δίνει αποτελέσματα ανεξάρτητα από την φυσική τους κατάσταση και των παραμέτρων δειγματοληψίας. Επομένως, μια μέθοδος που μπορεί να μετράει την συγκέντρωση των μικροοργανισμών και η οποία θα δίνει σταθερά και γρήγορα αποτελέσματα, μπορεί να θεωρηθεί πιο αξιόπιστη.

Διαδικασία της μεθόδου

Για την μέτρηση με DAPI, το πρώτο βήμα που πρέπει να γίνει είναι η σταθεροποίηση και η 'διάτρηση' (διάνοιξη κενών στην μεμβράνη των κυττάρων, permeabilization), προκειμένου να εισαχθεί η χρωστική. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται fixing του δείγματος. Τα βήματα που ακολουθούνται προκειμένου να γίνει το fixing του δείγματος είναι η ακόλουθη:

1. Από το δείγμα λαμβάνεται ποσότητα 1.5 ml σε μια Microcentrifuge capsule και συμπληρώνεται με 0.5 ml 4% particle-free formaldehyde. Η προσθήκη της φορμαλδεΰδης σταθεροποιεί και προκαλεί διάτρηση στα κύτταρα. Το δείγμα αφήνεται για fixing σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα (μέγιστο 24 ώρες)

2. Το μίγμα τοποθετείται σε μηχανή φυγοκέντρισης (Vortex) για 10 λεπτά στις 13000 στροφές (rpm).
3. Έπειτα από την φυγοκέντριση γίνεται αφαίρεση του υπερκείμενου, της ουσίας δηλαδή που περιέχεται στο φιαλίδιο, από την οποία έχει απομακρυνθεί το σύνολο των αιωρούμενων σωματιδίων (μαζί με τα μετρούμενα κύτταρα) και έχει ‘κολλήσει’ στον πάτο της κάψουλας. Για το λόγο αυτό πρέπει να δίνεται προσοχή κατά το στάδιο της αφαίρεσης του υπερκείμενου υγρού, προκειμένου να μην αφαιρεθούν μαζί και οι μικροοργανισμοί προς μελέτη. Χρήσιμο είναι να κρατείται η κάψουλα με φορά τέτοια που να μην έρχεται σε επαφή με την πιπέτα αναρρόφησης, όπως φαίνεται στην εικόνα.
4. Έπειτα γίνεται προσθήκη 1 ml PBS (phosphate buffer Saline) και επαναιώρηση του μίγματος.
5. Στη συνέχεια, ξανά φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 13000 στροφές.
6. Τα βήματα 3, 4 και 5 (αφαίρεση υπερκείμενου, επαναιώρηση και προσθήκη PBS) επαναλαμβάνονται 2 φορές.
7. Μετά και την τελευταία αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού γίνεται προσθήκη 1 ml PBS και 1 ml αιθανόλης, και το δείγμα επαναιωρείται, ακολουθούμενο από χρήση υπερήχων, για την αφαίρεση των κυττάρων από τα τοιχώματα και επαναιώρηση τους στο διάλυμα.



Έπειτα από την διαδικασία της σταθεροποίησης, το δείγμα μπορεί να κρατηθεί σε φύλαξη για μετέπειτα χρήση, η μπορεί να γίνει η βαφή του με τη χρωστική DAPI.

Για την χρώση του δείγματος, χρησιμοποιούνται 40 μ l DAPI (5 μ g/l), 100 μ l δείγματος και 1860 μ l MilliQ. Το διάλυμα ύστερα φιλτράρεται σε όργανο φίλτρανσης (Millipore), σε κυψέλες που έχουν καλυφθεί με φίλτρο Polycarbonate Track – Etch Membrane (Sartorius) διαμέτρου 25 mm. Το φίλτρο έπειτα τοποθετείται σε ένα slide μικροσκοπίου και καλύπτεται με επικαλυπτρίδα. Το έτοιμο φίλτρο μπορεί να μετρηθεί σε μικροσκόπιο επιφθορισμού

4.3.4 F.I.S.H

Μετά τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ολικών μικροοργανισμών στο φίλτρο με τη μέθοδο του DAPI, μπορεί να γίνει η χρήση της μεθόδου FISH, προκειμένου να

βρεθεί η συγκέντρωση των μετρούμενων μικροοργανισμών. Με τη βοήθεια του DAPI, μπορεί να γίνει σύγκριση της μετρούμενης συγκέντρωσης στο φίλτρο και να εκφραστεί το ποσοστό συγκέντρωσης των μικροοργανισμών ως μέρος του συνόλου. Η έκφραση της συγκέντρωσης ως ποσοστό επί του συνόλου των μικροοργανισμών είναι κάτι που χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία, καθώς έτσι αποφεύγεται το σφάλμα της μέτρησης και της αδυναμίας μέτρησης όλων των πιθανών πεδίων ενός φίλτρου, καθώς και ο παράγοντας της ατομικής άποψης στον χαρακτηρισμό ενός σήματος ως μικροοργανισμού, κάτι που είναι πολύ υποκειμενικό και δίνει μεγάλες διαφορές στα μετρούμενα αποτελέσματα μεταξύ μελετητών.

Υλικά της μεθόδου

Για την μέθοδο του FISH πρέπει αρχικά να γίνει επιλογή του μετρούμενου μικροοργανισμού, προκειμένου να κατασκευαστούν τα αντίστοιχα απαιτούμενα probes που θα χρησιμοποιηθούν στην διαδικασία χρώσης του δείγματος. Στην παρούσα μελέτη, οι μετρούμενοι μικροοργανισμοί είναι η *Escherichia coli* και η *Klebsiella pneumoniae*. Για την εύρεση των αναγκαίων probes έγινε χρήση της probeBase, βάσης δεδομένων για probes στο διαδίκτυο.

Το χρησιμοποιούμενο probe για την ανίχνευση της *Escherichia coli* κατασκευάστηκε με διαδικασία που περιγράφεται από τους Loy, A., Horn, M., Wagner, M. (2003) [36]. Το αντίστοιχο probe για την ανίχνευση της *Klebsiella pneumoniae* στα δείγματα δίνεται από τους ίδιους αντίστοιχα στην ιστοσελίδα της probeBase.

Τα χαρακτηριστικά στοιχεία για κάθε probe που χρησιμοποιήθηκε δίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

μ/ο	Ακολουθία	Fluorochrome	Target module	Position	MW [g/mol]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5'- CCTACACACCAGCGTGCC -3'	CY3	23s rRNA	1707-1729	5388
<i>E.Coli</i>	5'-GAGACTCAAGATTGCCAGTATCAG-3'	CY3	23s rRNA	1161-1178	5496

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των probes που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μικροοργανισμών

Διαδικασία της μεθόδου

Για την εκτέλεση της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο για υβριδισμό κυττάρων σε φίλτρα μεμβράνης, όπως αυτό περιγράφεται από τους Jakob Pernthaler, Frank Oliver Glöckner, Wilhelm Schönhuber, Rudolf Amann (2000) [1]. Παρακάτω

παρουσιάζεται η ακολουθία των βημάτων για την διαδικασία του υβριδισμού των κυττάρων. Σημειώνεται ότι πριν τον υβριδισμό πρέπει να έχει γίνει σταθεροποίηση των κυττάρων (fixation).

1. Προετοιμασία 2 ml hybridization buffer σε ένα microfuge tube. Τα συστατικά που αποτελούν τον buffer δίνονται στον ακόλουθο πίνακα. Η ποσότητα του φορμαμίδιου που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το probe. Για τον υβριδισμό του *E. coli* χρησιμοποιήθηκε 40% επί του συνολικού όγκου, ενώ για την *K. pneumoniae* χρησιμοποιήθηκε 30% επί του συνολικού όγκου.

Stock Reagent	Όγκος	Τελική συγκέντρωση στο hybridization buffer
5M NaCl	360 μl	900 mM
1 M Tris/HCl	40 μl	20 mM
formamide	% ανάλογα το probe	
Απιονισμένο H ₂ O	συμπλήρωση μέχρι 2 ml	
10% SDS*	2 μl	0.01 %

Πίνακας 4: Συστατικά που αποτελούν το hybridization buffer [1]

*Το SDS προστίθεται τελευταίο για να αποφευχθεί η καθίζηση

2. Για το μίγμα του υβριδισμού προσθέτουμε 2 μl από το probe working solution (κατασκευασμένο probe) μαζί με 18 μl hybridization buffer. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στη διατήρηση των δειγμάτων του probe solution σε χαμηλές θερμοκρασίες (με χρήση κυψελίδων πάγου), και στην αποφυγή έκθεσης σε φως.
3. Κόβουμε τα κομμάτια της μεμβράνης του φίλτρου που θα χρησιμοποιήσουμε. Για κάθε δείγμα είναι αναγκαίο μόνο ένα μικρό κομμάτι του φίλτρου. Κάθε τμήμα φίλτρου που θα χρησιμοποιηθεί σημειώνεται στην άκρη του με απαλό μολύβι, για την αναγνώριση του αργότερα.
4. Τα φίλτρα τοποθετούνται σε πλακίδια, με την πλευρά των μικροοργανισμών προς τα πάνω. Σε κάθε φίλτρο ρίχνεται από πάνω το σχηματισμένο 20 μl διάλυμα από το βήμα 2.
5. Τοποθετούμε ένα κομμάτι απορροφητικό χαρτί σε ένα φιαλίδιο και το βρέχουμε με το εναπομένων hybridization buffer.
6. Τοποθετούμε το πλακίδιο στο φιαλίδιο σε οριζόντια θέση και κλείνουμε.
7. Τα δείγματα τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης για 90 λεπτά στους 46 °C.

8. Όσο ετοιμάζονται τα δείγματα, προετοιμάζουμε 50 ml buffer απόπλυσης σε ένα tube. Τα συστατικά για το buffer απόπλυσης δίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Stock Reagent	Όγκος	Τελική συγκέντρωση στο buffer
5M NaCl	Ανάλογα το % formamide**	900 mM
1 M Tris/HCl	1 ml	20 mM
0.5 EDTA	500 μ l	5 mM
Απιονισμένο H ₂ O	συμπλήρωση μέχρι 500 ml	
10% SDS*	50 μ l	0.01%

Πίνακας 5: Συστατικά που αποτελούν το buffer απόπλυσης[1]

*Το SDS προστίθεται τελευταίο για να αποφευχθεί η καθίζηση

** Ο πίνακας με τις αναλογίες δίνεται στο παράρτημα

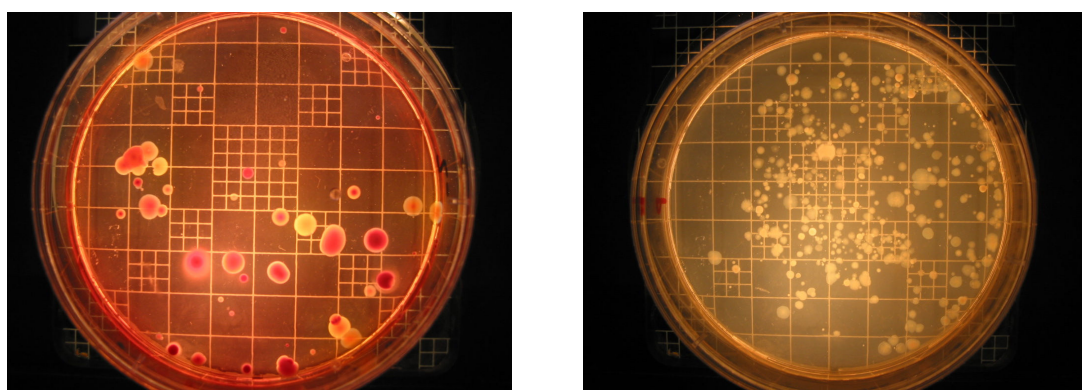
9. Προετοιμάζουμε το υδατόλουτρο στους 48 °C και τοποθετούμε το buffer απόπλυσης μέσα για να αποκτήσει τη θερμοκρασία.
10. Μετά τη λήξη του χρόνου επώασης, τα φίλτρα μεταφέρονται γρήγορα στο προθερμασμένο buffer απόπλυσης, και αφήνονται στο υδατόλουτρο στους 48 °C για 15 λεπτά.
11. Το buffer απόπλυσης αδειάζεται σε ένα Petri dish. Τα φίλτρα τοποθετούνται σε ένα δεύτερο φιαλίδιο με απιονισμένο νερό για ένα λεπτό, και αναδεύονται. Το νερό αδειάζεται σε ένα δεύτερο Petri dish και συλλέγονται τα φίλτρα.
12. Τοποθετούμε τα φίλτρα σε απορροφητικό χαρτί και περιμένουμε μέχρι να στεγνώσουν.
13. Για καλύτερη σύγκριση των μετρήσεων μας, μπορούμε να κάνουμε παράλληλη βαφή του δείγματος με χρωστική DAPI. Χρησιμοποιούμε DAPI stain συγκέντρωσης 1 μ g/ml.
14. Τοποθετούμε μια σταγόνα DAPI stain σε ένα πλακίδιο μικροσκοπίου, και έπειτα τοποθετούμε πάνω τα φίλτρα, προσθέτοντας μια σταγόνα σε κάθε φίλτρο, με τη βοήθεια ενός tip.
15. Τα φίλτρα καλύπτονται με καλυπτρίδα και γίνεται προσπάθεια απομάκρυνσης των φυσαλίδων που έχουν σχηματιστεί μεταξύ πλακιδίου και καλυπτρίδας.
16. Τα φίλτρα αφήνονται για λίγο χρονικό διάστημα για να γίνει η χρώση. Έπειτα μπορεί να γίνει η μέτρηση. Τα δείγματα με τη μέθοδο του FISH φαίνονται σε κόκκινο χρώμα, με το φίλτρο CY3.

4.4 Παρουσίαση αποτελεσμάτων και σχολιασμός

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα γραφήματα που προκύπτουν από τις μετρήσεις των συγκεντρώσεων των δειγμάτων, από τα πειράματα με τη μέθοδο καλλιέργειας, τη μέθοδο χρώσης με DAPI καθώς και την διαδικασία υβριδισμού FISH. Τα γραφήματα εκφράζουν κυρίως τη διακύμανση της συγκέντρωσης σε σχέση με το σημείο μέτρησης, και το μετρούμενο είδος μικροοργανισμού.

4.4.1 Αποτελέσματα μεθόδου καλλιέργειας

Η μέθοδος καλλιέργειας δίνει αποτελέσματα για την ύπαρξη μικροοργανισμών μέσω της ανάπτυξης αποικιών. Τα αποτελέσματα που παίρνουμε έπειτα από την εκκόλαψη των μικροοργανισμών για μια μέρα στους 36.5 °C είναι ορατά με γυμνό μάτι και οι αποικίες μετρούνται κάτω από φακό και με βοήθεια προβολέα. Μια εικόνα τυπικών αποτελεσμάτων μετά την εκκόλαψη φαίνονται παρακάτω:



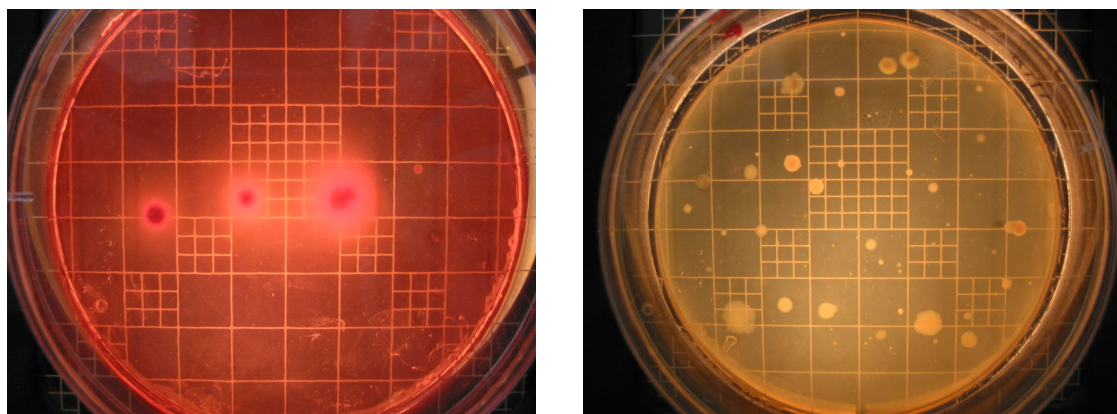
Εικόνα 8: Δείγματα νερού από την δεξαμενή αερισμού, σε αραιώση 1:100. Αριστερά φαίνεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε θρεπτικό υλικό MacConkey Agar, το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη των ειδών *E. coli* και *Klebsiella*. Ο διαχωρισμός των αποικιών σε κατηγορίες γίνεται με βάση το χρωματισμό της αποικίας. Στα αριστερά φαίνεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε θρεπτικό υλικό Peptone Yeast Agar, το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη των ολικών βακτηριδίων.

Από ότι φαίνεται από τις εικόνες, η καταμέτρηση των μικροοργανισμών στα τριβλία δίνει γρήγορα αποτελέσματα, τα οποία όμως είναι υποκειμενικά, αφού είναι στην κρίση του μελετητή αν μια αποικία ανήκει ή όχι στο μετρούμενο είδος, ή ακόμα αν αυτό που φαίνεται είναι μια καλά σχηματισμένη αποικία ή κάτι διαφορετικό.

Στις αποικίες που σχηματίζονται στο MacConkey Agar είναι σημαντικό να γίνεται προσεκτική παρατήρηση του τριβλίου για την σωστή κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών. Οι μεγάλες κόκκινες αποικίες είναι αποικίες του είδους *Escherichia coli*, ενώ οι μεγάλες ροζ αποικίες είναι *Klebsiella* ή *Enterobacter*.

Στην περίπτωση του Peptone Yeast Agar προσοχή πρέπει να δίνεται στον πληθυσμό που μετράται. Οι τιμές που προτείνονται στην βιβλιογραφία για ένα τριβλίο, όσο αναφορά τις αποικίες, κυμαίνονται από 30 έως 300. Τιμές μικρότερες θεωρείται ότι δεν δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα ώστε να μπορεί να δοθεί άποψη για το πλήθος των μικροοργανισμών, ενώ τιμές μεγαλύτερες θεωρείται ότι δημιουργούν υπερκάλυψη στο τριβλίο, και ο μετρούμενος αριθμός δεν είναι αντικειμενικός, αφού υπάρχουν αποικίες που θα έχουν επικαλυφθεί από άλλες μεγαλύτερες ή θα έχουν συνενωθεί διαφορετικές αποικίες, δίνοντας λάθος εντύπωση για το σύνολο.

Παρακάτω φαίνονται φωτογραφίες από αποικίες που σχηματίστηκαν από τα δείγματα στην δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης, σε αραιώση 1:10.

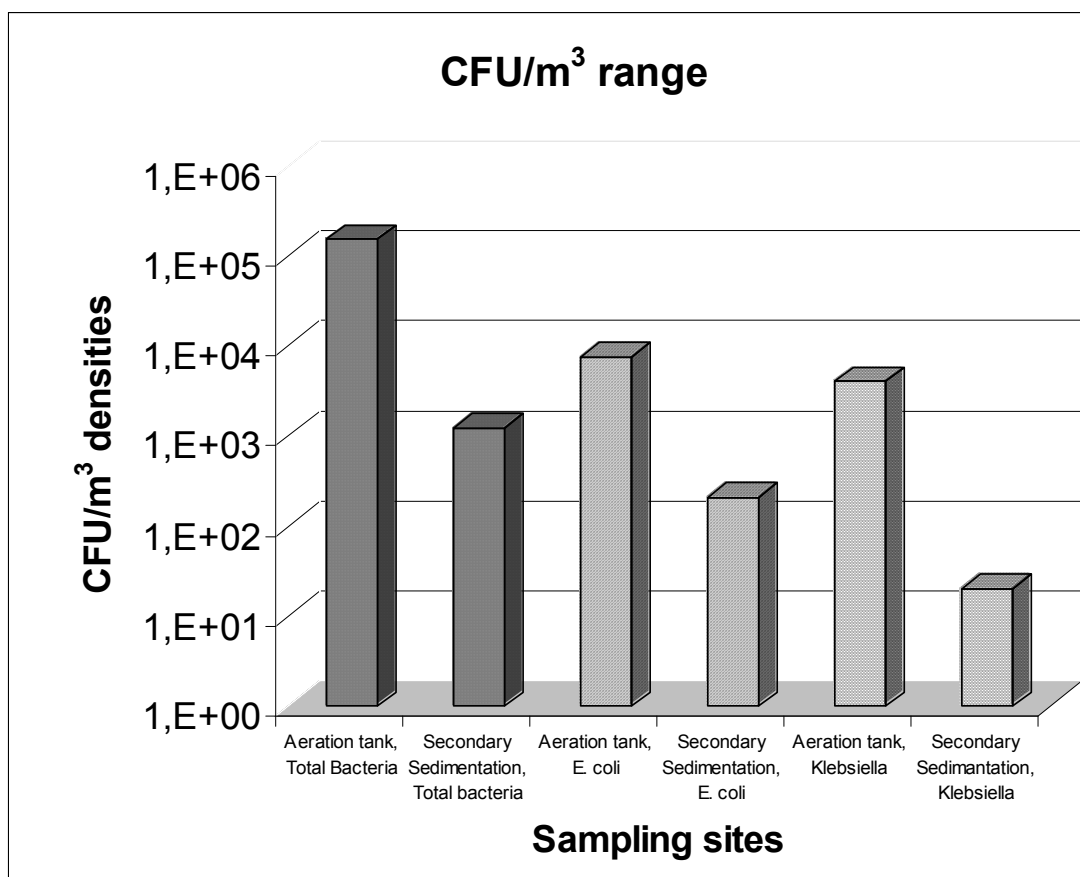


Εικόνα 9: Δείγματα νερού από την δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης, σε αραιώση 1:10. Στα αριστερά φαίνεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε θρεπτικό μέσο MacConkey Agar, ενώ στα δεξιά η ανάπτυξη σε μέσο Peptone Yeast Agar.

Η πρώτη παρατήρηση από τις παραπάνω εικόνες, σε σχέση με τις προηγούμενες, είναι ότι οι συγκεντρώσεις των μικροοργανισμών που παίρνουμε από την δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης είναι πολύ μικρότερες εκείνης της δεξαμενής αερισμού. Στην περίπτωση του MacConkey Agar, έχουμε μόνο μια αποικία για *Escherichia coli*, σε αντίθεση με την προηγούμενη εικόνα που είχε περίπου 4-6. Το ίδιο ισχύει και για την ανάπτυξη στο θρεπτικό μέσο Peptone Yeast Agar των ολικών βακτηρίων.

Το αποτέλεσμα αυτό κρίνεται λογικό, καθώς κατά την διαδικασία του αερισμού γίνεται κατανάλωση μεγάλου ποσού της οργανικής ύλης από τους μικροοργανισμούς και αύξηση της θερμοκρασίας, με παράλληλη μείωση της συγκέντρωσης των παθογόνων μικροοργανισμών. Επίσης, στην δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης γίνεται επιπλέον κατακάθιση των σωματιδίων, που προκαλεί απομάκρυνση μέρους των μικροοργανισμών.

Από την μέτρηση των αποικιών που σχηματίστηκαν στο σύνολο των δειγμάτων που λήφθηκαν και από τα δύο σημεία μέτρησης δημιουργούμε το ακόλουθο διάγραμμα, που παρουσιάζει την διακύμανση των τιμών συγκέντρωσης σε CFU/m³ ως προς το σημείο μέτρησης.



Διάγραμμα 3: Διάγραμμα μεταβολής συγκεντρώσεων ως προς το σημείο μέτρησης, σε σχέση με την ομάδα μετρούμενων μικροοργανισμών, για τα δείγματα του νερού. Οι συγκεντρώσεις εκφράζονται ως σχηματιζόμενες αποικίες ανά κυβικό μέτρο.

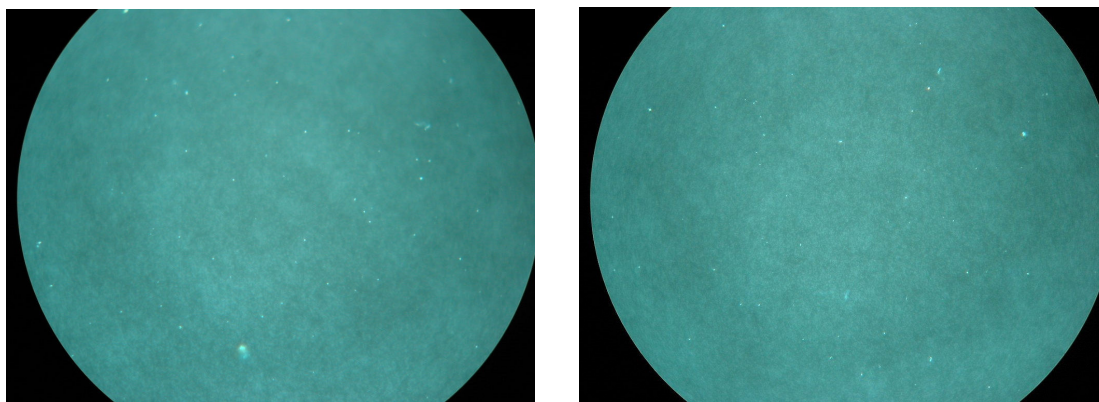
Από μια πρώτη παρατήρηση του παραπάνω διαγράμματος είναι προφανής η διαφορά στις συγκεντρώσεις, σε όλα τα είδη των μετρούμενων μικροοργανισμών, μεταξύ των δειγμάτων που λήφθηκαν από την δεξαμενή αερισμού και εκείνων που λήφθηκαν από την δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης. Η διαφορά κυμαίνεται περίπου στις δύο τάξεις μεγέθους. Μια δεύτερη παρατήρηση είναι η σχέση των τιμών των συγκεντρώσεων μεταξύ των μικροοργανισμών. Το σύνολο των μετρούμενων ολικών κολοβακτηριδίων είναι κατά πολύ μεγαλύτερο εκείνου των *E. coli*, το οποίο με τη σειρά του είναι μεγαλύτερο της τιμής για την *Klebsiella*. Η πρώτη παρατήρηση είναι μάλλον προφανής, αφού στο σύνολο των ολικών περιλαμβάνονται και τα *E. coli*,

όπως και η *Klebsiella*. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση των *E. coli* σε σχέση με την *Klebsiella* μπορεί να ερμηνευτεί, αν παρατηρήσουμε ότι το πρώτο είναι μικροοργανισμός που ανθίζει στο εντερικό σύστημα του ανθρώπου σε μεγάλους πληθυσμούς, και εφόσον οι μετρήσεις γίνονται σε χώρο όπου επεξεργάζονται λύματα, η ενισχυμένη παρουσία τους είναι λογική.

Από την χρήση της μεθόδου της καλλιέργειας σχηματίζουμε μια πρώτη άποψη για την συγκέντρωση των μετρούμενων μικροοργανισμών, αν και οι τιμές που πήραμε αντιστοιχούν μόνο στο τμήμα εκείνο των μικροοργανισμών που μπορεί να σχηματίσει αποικία (ενεργά κύτταρα).

4.4.2 Αποτελέσματα μεθόδου χρώσης DAPI

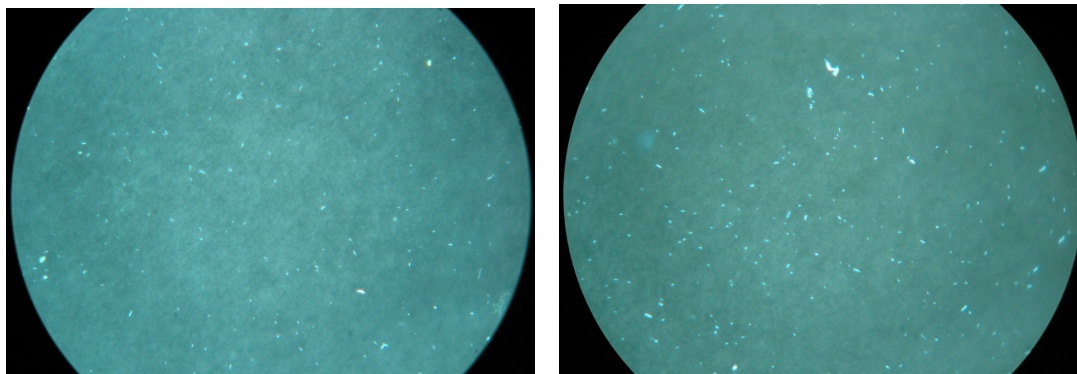
Με τη μέθοδο της χρώσης DAPI έγινε ανάλυση δειγμάτων νερού και αέρα, και τα αποτελέσματα μετρήθηκαν με μικροσκόπιο. Οι μικροοργανισμοί που μετρούνται στα φίλτρα φαίνονται σε μπλε απόχρωση, με τα φωτεινά και κυκλικά σημεία μπλε χρώματος να αποτελούν μικροοργανισμούς. Παρακάτω παρουσιάζεται η εικόνα που λαμβάνουμε από το μικροσκόπιο κατά την μέτρηση δειγμάτων που έχουν υποστεί χρώση με DAPI.



Εικόνα 9: Φωτογραφίες της ένδειξης του μικροσκοπίου, για τα δείγματα αέρα από την δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης. Ο όγκος του μετρούμενου δείγματος είναι 8 λίτρα αέρα.

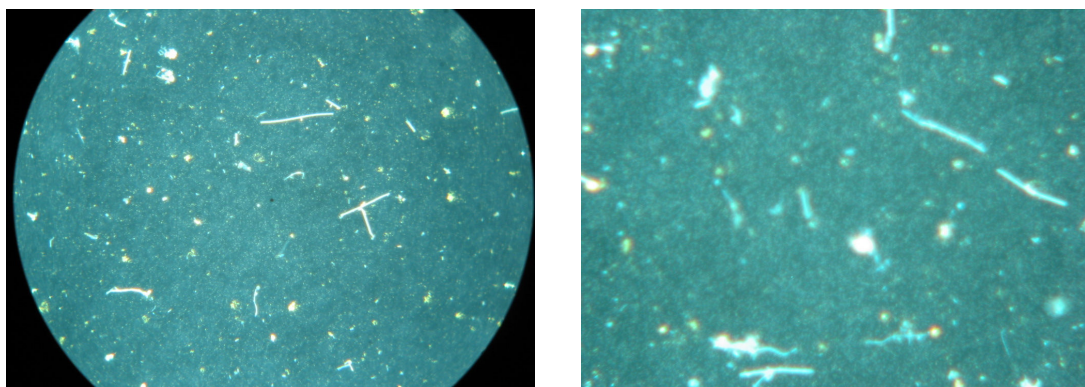
Στις φωτογραφίες παρατηρούμε ότι το σήμα που φαίνεται από τα κύτταρα που έχουν υποστεί χρώση είναι ασθενές και δύσκολο να καθοριστεί αν ένα σήμα προέρχεται από μικροοργανισμό ή από άλλο σωματίδιο, το οποίο έχει υποστεί επίσης χρώση. Το βασικό κριτήριο για την επιλογή ενός σήματος ως κύτταρο είναι το σχήμα του, και η ομοιότητα του με τα υπόλοιπα. Συνήθως οι μικροοργανισμοί δίνουν ένα ασθενές

σήμα, το οποίο είναι, όμως, πιο εμφανές στο μικροσκόπιο από αυτό που εμφανίζεται στην φωτογραφία.



Εικόνα 10: Φωτογραφίες της ένδειξης του μικροσκοπίου, για τα δείγματα νερού από την δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης, σε αραιώση 1:10.

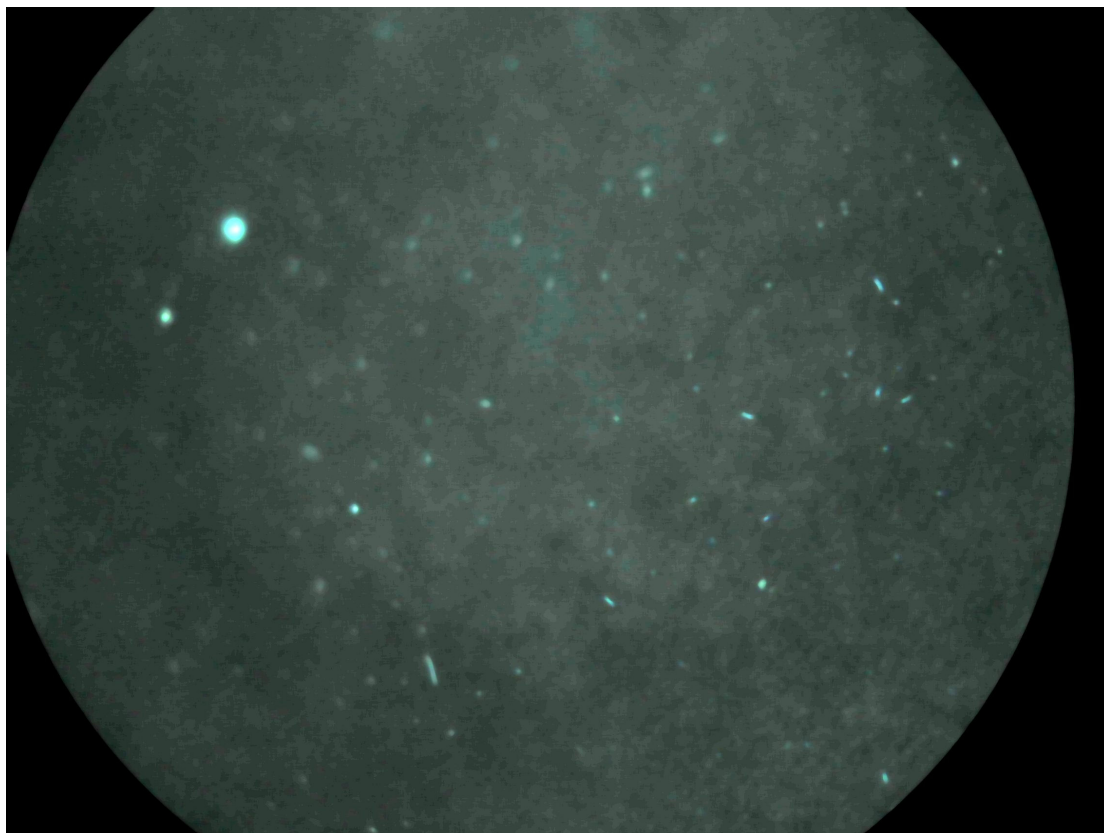
Από τις παραπάνω φωτογραφίες φαίνεται ότι το πλήθος των μετρούμενων οργανισμών είναι μεγαλύτερο στην περίπτωση των δειγμάτων του νερού. Αυτό είναι φυσικό και αναμενόμενο, καθώς μόνο ένα μικρό ποσοστό περνάει από την φάση του νερού στην αέρια φάση, και ένα τμήμα αυτού επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και χάνει τη βιωσιμότητα του.



Εικόνα 11: Φωτογραφίες της ένδειξης του μικροσκοπίου, για τα δείγματα νερού από την δεξαμενή αερισμού, σε αραιώση 1:100.

Όπως παρατηρούμε, στην περίπτωση της δεξαμενής αερισμού η μέτρηση είναι ακόμα πιο δύσκολη, καθώς το πεδίο έχει γεμίσει με μικροοργανισμούς και άχρηστα σωματίδια, που καλύπτουν άλλους μικροοργανισμούς, και κάνουν τον χαρακτηρισμό και προσδιορισμό ενός σήματος ως κύτταρο ιδιαίτερα δύσκολο. Όπως φαίνεται και από την δεξιά φωτογραφία, σε μεγέθυνση, υπάρχουν διάφοροι σχηματισμοί, σε διάφορα σχήματα και, στο μέγιστο ποσοστό, πρόκειται για μη μετρούμενα σωματίδια. Επομένως, αυτά τα φίλτρα χρειάζονται ιδιαίτερη προσοχή κατά τη διάρκεια της μέτρησης, προκειμένου να γίνεται σύγκριση μεταξύ των μορφών των μετρούμενων

σημάτων και να μετρούνται μόνο τα κύτταρα των μικροοργανισμών, και όχι σωματίδια τα οποία έχουν υποστεί χρώση.

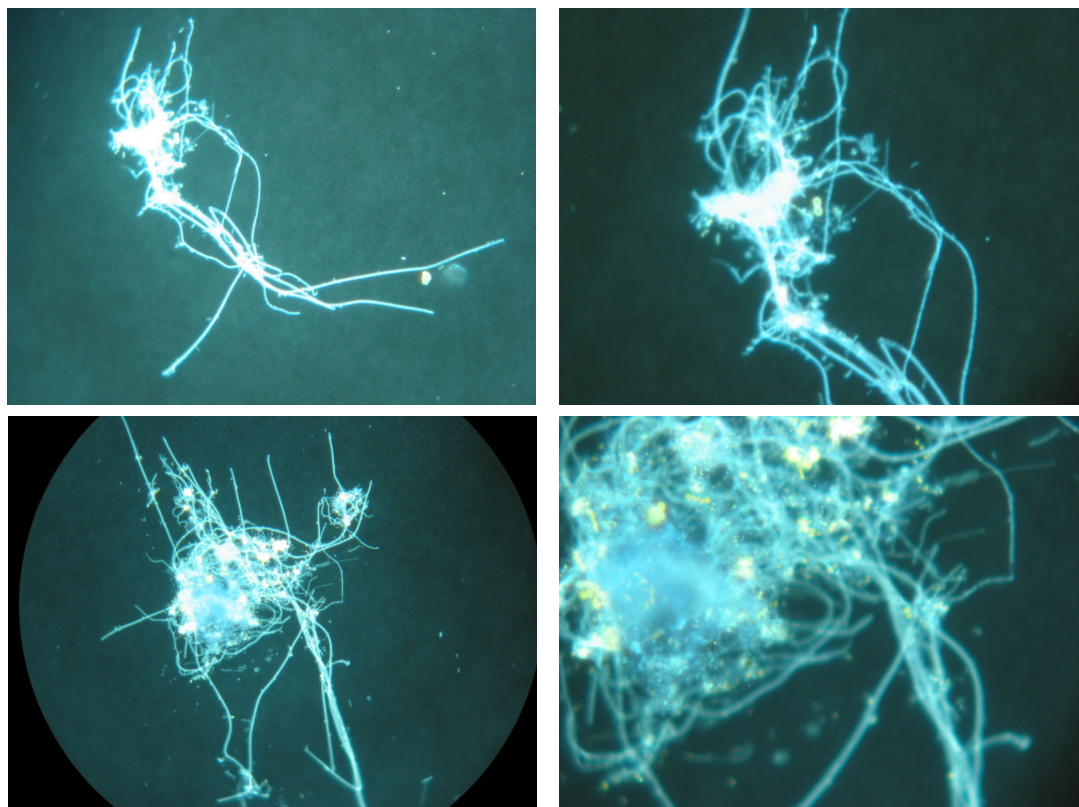


Εικόνα 12: Φωτογραφία της ένδειξης του μικροσκοπίου για δείγμα αέρος από την δεξαμενή αερισμού, με όγκο μέτρησης 8 λίτρα.

Στην περίπτωση του δείγματος αέρα από την δεξαμενή αερισμού φαίνεται ότι η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη από της αντίστοιχης του αέρα πάνω από την δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης. Αυτό είναι λογικό, αρχικά λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης των μικροοργανισμών στη δεξαμενή αερισμού σε σχέση με εκείνη της δεξαμενής δευτεροβάθμιας καθίζησης, και έπειτα γιατί από τη δεξαμενή αερισμού παράγονται γενικότερα περισσότερα σωματίδια βιοαεροζόλ, ειδικά στην περίπτωση του συγκεκριμένου είδους αερισμού, που είναι της διάχυσης αέρα, και δημιουργεί ένα πίδακα με φυσαλίδες στην επιφάνεια της δεξαμενής.

Τέλος, παρουσιάζονται μερικές χαρακτηριστικές φωτογραφίες από το μικροσκόπιο, οι οποίες παρουσιάζουν σχηματισμούς σωματιδίων, οι οποίοι περιέχουν στο εσωτερικό τους μικροοργανισμούς. Σε αυτήν την περίπτωση οι μικροοργανισμοί είναι αδύνατο να μετρηθούν, και τα πεδία αυτά παραλείπονται ως μη μετρήσιμα. Ο συνηθέστερος λόγος παρουσίας τέτοιων σωματιδίων και σχηματισμών στα φίλτρα προέρχεται από μη σωστές συνθήκες μέτρησης, αλλά στην συγκεκριμένη περίπτωση

τα δείγματα είναι περιβαλλοντικά και μάλιστα από δεξαμενές λυμάτων, που καθιστά αδύνατη την απαλοιφή των σχηματισμών αυτών.

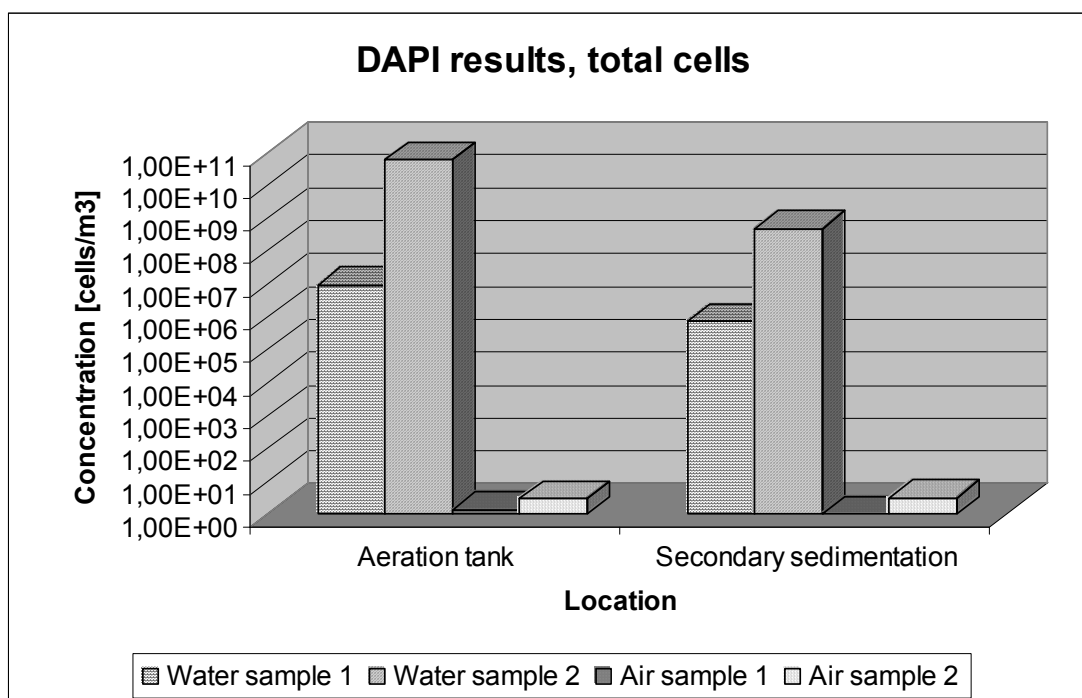


Εικόνα 13: Ενδεικτικές φωτογραφίες των σχηματισμών που δημιουργούνται μεταξύ σωματιδίων και μικροοργανισμών, οι οποίοι καθιστούν δύσκολη την μέτρησή τους

Στις παραπάνω εικόνες παρουσιάζονται δυο περιπτώσεις σχηματισμών μεταξύ σωματιδίων και μικροοργανισμών. Και στο πάνω ζεύγος, αλλά και στο κάτω ζεύγος εικόνων μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι ο σχηματισμός περιέχει στο εσωτερικό του έναν αριθμό μικροοργανισμών, που είναι πρακτικά αδύνατο να μετρηθούν, πρώτον επειδή υπάρχει κάλυψη μεταξύ τους, και επειδή πρόκειται για έναν τρισδιάστατο σχηματισμό, που θα πρέπει να παρατηρηθεί από διαφορετικές γωνίες προκειμένου να δώσει αποτέλεσμα. Περιπτώσεις σαν αυτές καθιστούν την μέτρηση δύσκολη, και αποτελούν το λόγο για τον οποίο οι μετρήσεις σε περιβαλλοντικά δείγματα δεν δίνουν σαφή αποτελέσματα, και ιδιαίτερα στην περίπτωση του βιοαεροζόλ, δεν έχει σχηματιστεί μια έγκυρη διεθνής βιβλιογραφία που να δίνει τιμές για τους μετρούμενους μικροοργανισμούς.

Από την μέτρηση των φίλτρων προκύπτει το ακόλουθο διάγραμμα που παρουσιάζει τις συγκεντρώσεις για τα δείγματα αέρος και δείγματα νερού, για τα δύο σημεία μέτρησης. Οι συγκεντρώσεις εκφράζονται σε αποικίες ανά κυβικό μέτρο (νερού και

αέρα αντίστοιχα), και παρουσιάζουν την μέγιστη και την ελάχιστη τιμή των μετρήσεων, προκειμένου να φανούν τα ακρότατα των μετρούμενων τιμών.



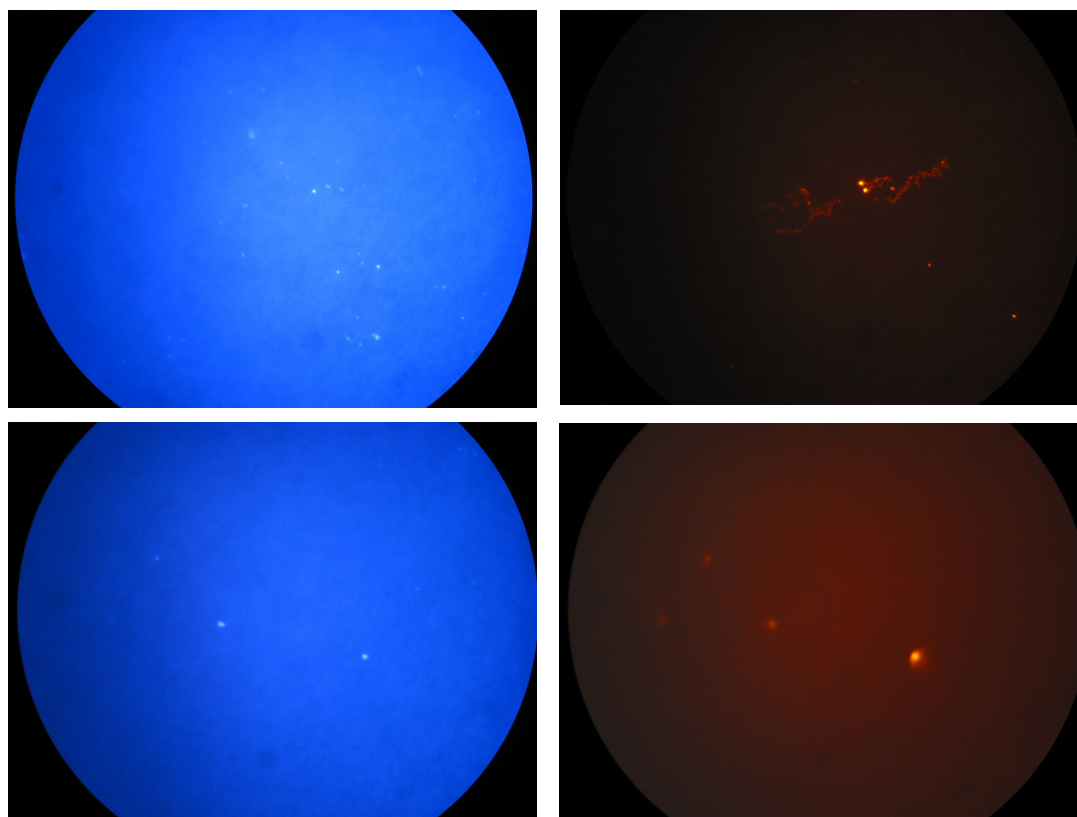
Διάγραμμα 4: Διάγραμμα μεταβολής συγκεντρώσεων ως προς το σημείο μέτρησης για τη μέθοδο χρώσης DAPI. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι τιμές των ακρότατων μετρήσεων, προκειμένου να φανεί το εύρος των τιμών μετρήσεων.

Από το διάγραμμα φαίνεται χαρακτηριστικά η μεγάλη διαφορά που έχει το δείγμα νερού με το δείγμα αέρος, αλλά και το επίπεδο διακύμανσης των τιμών μέτρησης για τον ίδιο μικροοργανισμό, που εμφανίζουν αρκετές τάξεις μεγεθών διαφορά μεταξύ τους. Αν και αυτή η μεγάλη διαφορά παρουσιάζει πρόβλημα αξιοπιστίας, η μεγάλη μεταβολή των μετρούμενων παραμέτρων και συνθηκών κατά την διάρκεια της μέτρησης, καθώς και το γεγονός ότι δεν υπάρχουν καθορισμένες διαδικασίες μέτρησης, καθιστούν τις τιμές αποδεκτές με το ενδεχόμενο σφάλματος.

4.4.3 Αποτελέσματα μεθόδου F.I.S.H

Η μέθοδος μέτρησης με FISH δίνει αποτελέσματα πιο ακριβή όσο αναφορά την συγκέντρωση των μικροοργανισμών στόχων στο δείγμα, της *Escherichia coli* και της *Klebsiella pneumoniae*. Κατά την παρατήρηση των μικροοργανισμών στο μικροσκόπιο φθορισμού γίνεται παράλληλη σύγκριση με το φίλτρο για DAPI, εφόσον στο δείγμα έχει γίνει χρώση DAPI. Η χρησιμότητα της παράλληλης σύγκρισης είναι, κυρίως, η δυνατότητα να επιβεβαιώνεται ο χαρακτηρισμός των μετρούμενων

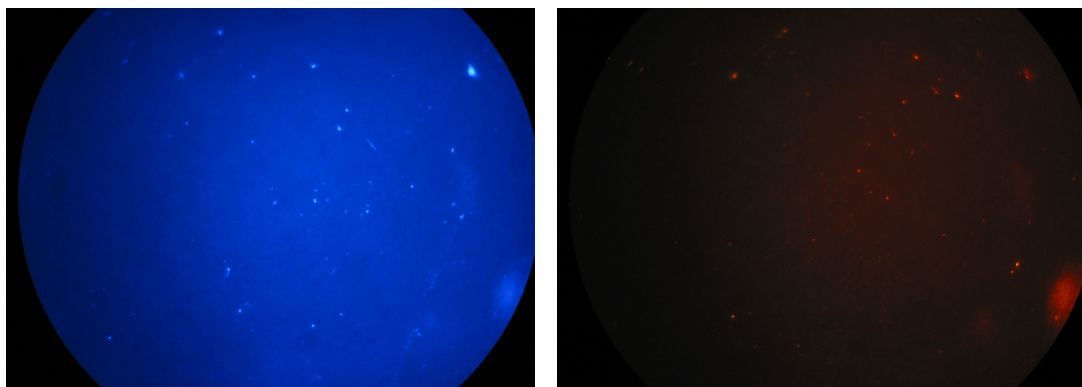
κυττάρων. Ένα κύτταρο το οποίο εμφανίζεται στο φίλτρο του CY3 της μεθόδου FISH και ταυτόχρονα φαίνεται και στο φίλτρο DAPI είναι σχεδόν σίγουρο ότι ανήκει στην κατηγορία του μετρούμενου μικροοργανισμού. Παρακάτω παρατίθενται φωτογραφίες από τον τρόπο με τον οποίο φαίνονται τα αποτελέσματα της μεθόδου στο μικροσκόπιο φθορισμού.



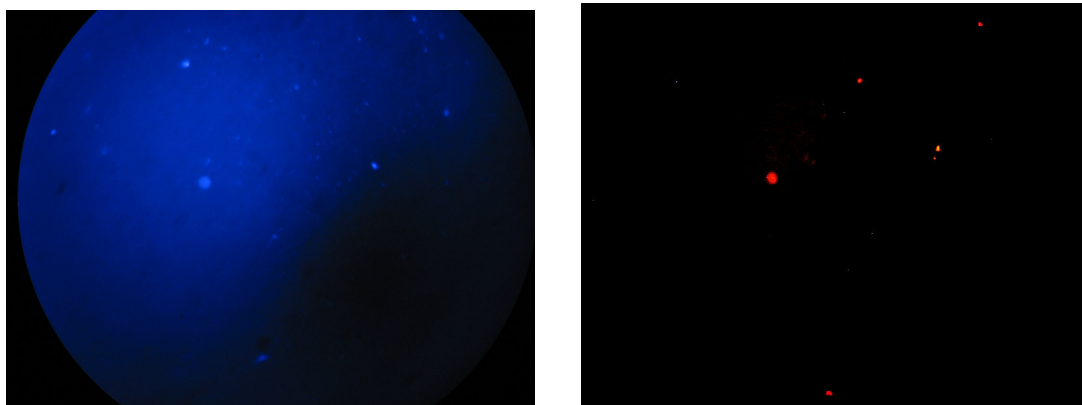
Εικόνα 14: Φωτογραφίες μικροσκοπίου για την περίπτωση του δείγματος αέρα από την δεξαμενή αερισμού για το probe που στοχεύει την *Escherichia coli*. Οι φωτογραφίες στα αριστερά είναι με την μέθοδο χρώσης DAPI ενώ οι φωτογραφίες στα δεξιά με την μέθοδο FISH

Στις παραπάνω φωτογραφίες φαίνεται καθαρά η διπλή ένδειξη των σημείων που έχουν μετρηθεί ως μικροοργανισμοί *Escherichia coli* με την μέθοδο FISH με το φίλτρο CY3 για FISH και τη μπλε απόχρωση του DAPI. Με τον τρόπο αυτό της παράλληλης σύγκρισης είναι πιο αξιόπιστες οι μετρήσεις, αφού επιβεβαιώνεται η μέτρηση μιας ένδειξης ως μικροοργανισμός, αφού έχει βαφεί και με τη χρωστική DAPI. Αυτό που μπορούμε να παρατηρήσουμε είναι ότι στο φίλτρο DAPI ανιχνεύουμε λίγους μικροοργανισμούς, εκ των οποίων οι περισσότεροι είναι *E. coli*, ενώ θα περιμέναμε την εμφάνιση μεγαλύτερου συνολικού αριθμού.

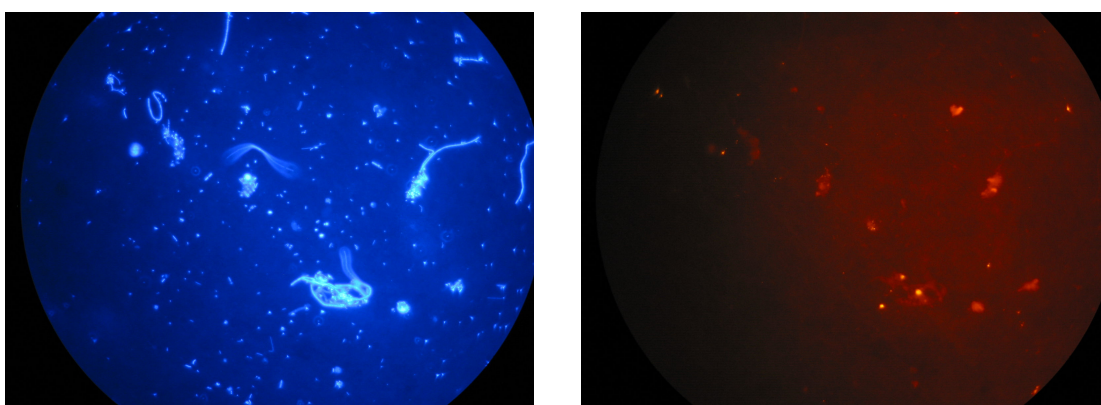
Ομοίως με τις παραπάνω, μπορούμε να παραθέσουμε και τα αποτελέσματα που παίρνουμε από το δείγμα νερού, καθώς και τα δείγματα από την δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης.



Εικόνα 15: Φωτογραφίες μικροσκοπίου για την περίπτωση του δείγματος νερού από την δεξαμενή αερισμού για το probe που στοχεύει την *Escherichia coli*



Εικόνα 16: Φωτογραφίες μικροσκοπίου για την περίπτωση του δείγματος αέρα από την δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης για το probe που στοχεύει την *Escherichia coli*

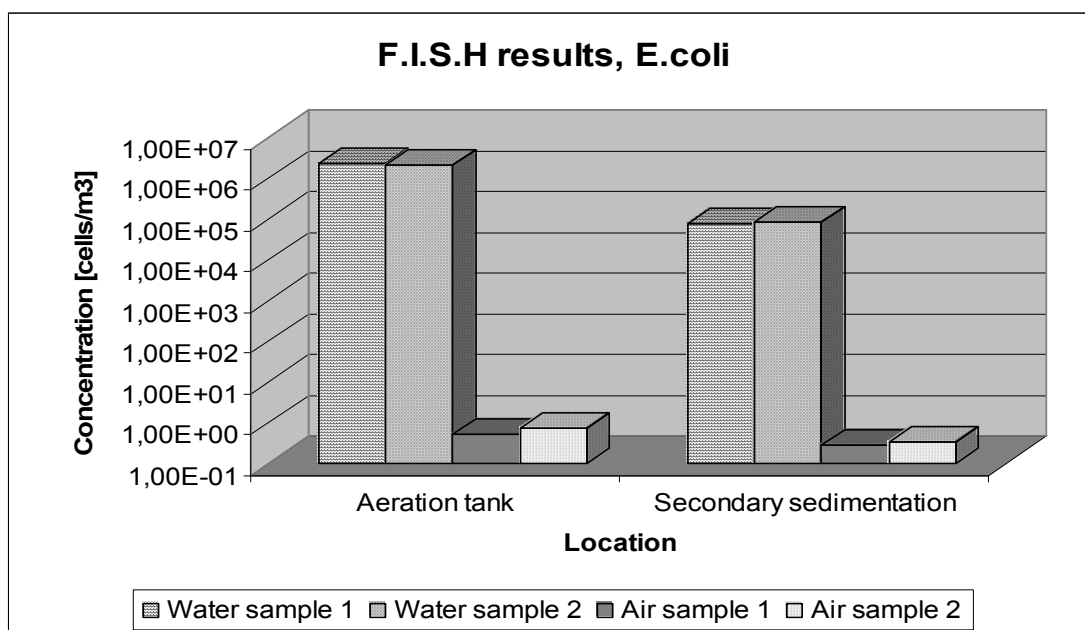


Εικόνα 17: Φωτογραφίες μικροσκοπίου για την περίπτωση του δείγματος νερού από την δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης για το probe που στοχεύει την *Escherichia coli*

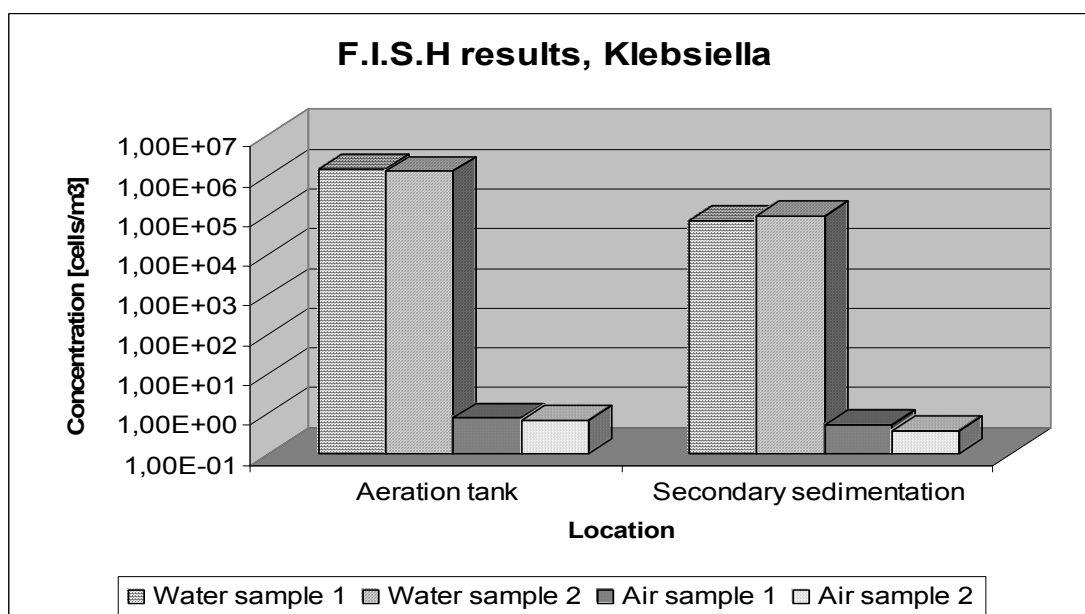
Στις παραπάνω φωτογραφίες φαίνεται η αντιστοιχία μεταξύ των δύο φίλτρων, όπως και η σχετική ευκολία με την οποία μπορεί να γίνει η μέτρηση του ζητούμενου

μικροοργανισμού, σε σχέση με το δύσκολο χαρακτηρισμό των κυττάρων από την μέθοδο DAPI.

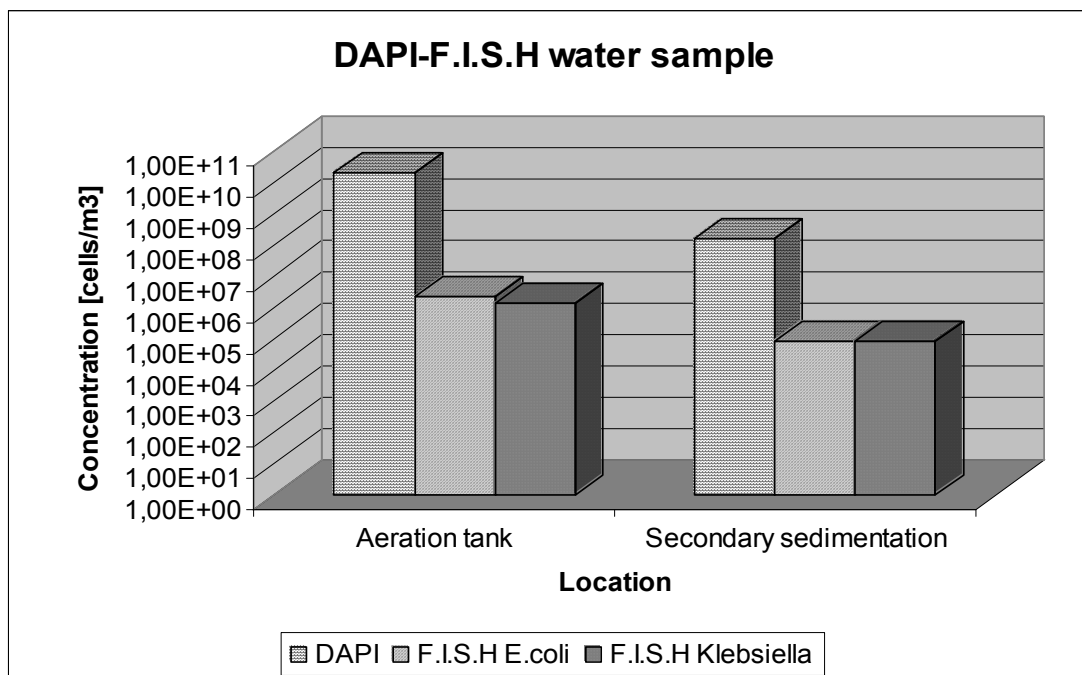
Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα που προέκυψαν από τις μετρήσεις, και εκφράζουν τις συγκεντρώσεις των μικροοργανισμών σε κύτταρα ανά κυβικό μέτρο μέσου, σε σχέση με το μετρούμενο σημείο. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για τα *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae* έχουν παρατεθεί μαζί με τις συγκεντρώσεις του DAPI, προκειμένου να γίνεται αναφορά τους ως μέρος επί του συνόλου.



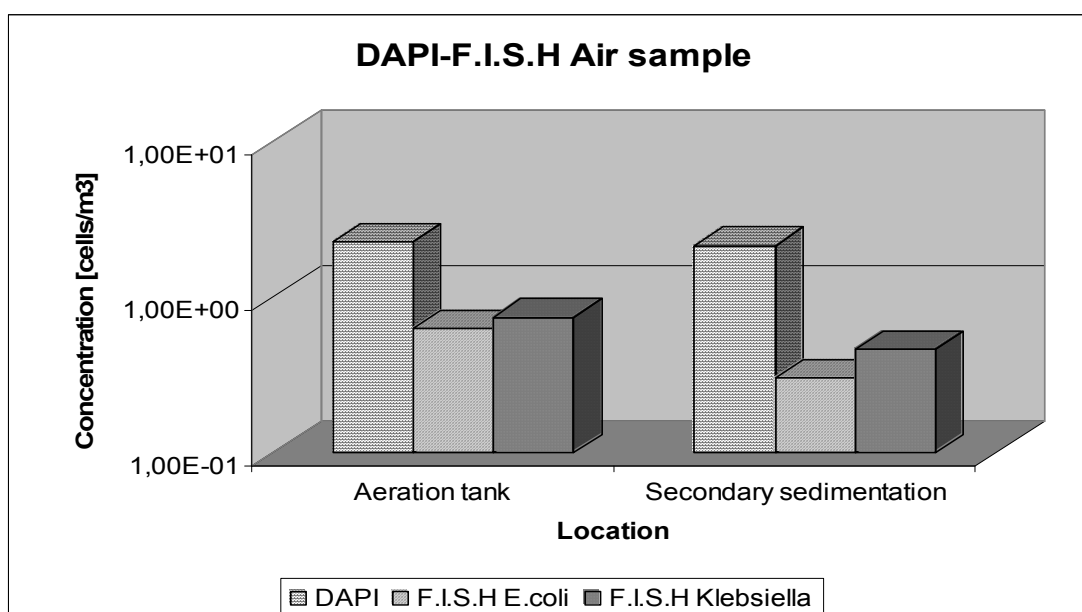
Διάγραμμα 5: Διάγραμμα μεταβολής συγκεντρώσεων ως προς το σημείο μέτρησης για τη μέθοδο FISH. Στα διαγράμματα έχουν χρησιμοποιηθεί οι δύο ακραίες τιμές των μετρήσεων, προκειμένου να φανεί το εύρος των μετρήσεων.



Από τα διαγράμματα αυτά φαίνεται ότι τα αποτελέσματα που παίρνουμε από τη μέθοδο FISH είναι σταθερά και με μικρότερη διακύμανση ως προς το μέγιστο και το ελάχιστο, σε σχέση με εκείνα της μεθόδου DAPI. Τα αποτελέσματα για την *E. coli* και τη *K. pneumoniae* φαίνονται ότι κυμαίνονται σε ίδια επίπεδα, με την δεύτερη να έχει ελαφρώς μικρότερες συγκεντρώσεις. Ακόμη, οι μετρήσεις σε δείγματα του νερού σε σχέση με τις μετρήσεις που έγιναν στα δείγματα αέρα παρουσιάζουν αρκετές τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, όπως είναι αναμενόμενο.



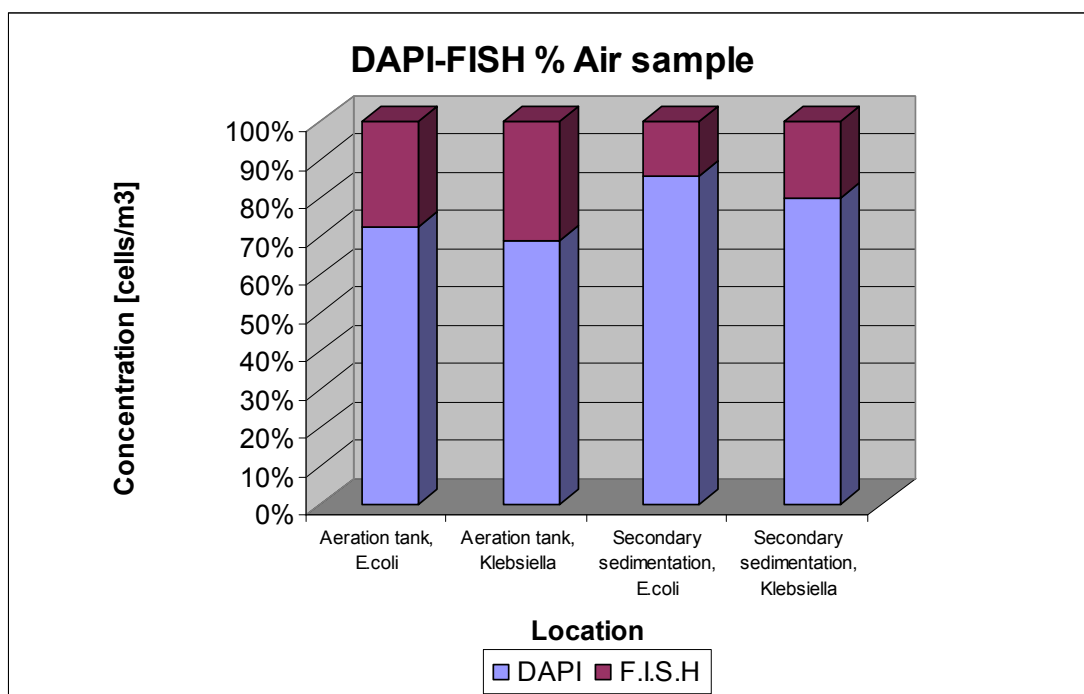
Διάγραμμα 6: Διαγράμματα μεταβολής συγκεντρώσεων ως προς το σημείο μέτρησης για τη μέθοδο FISH σε σχέση με τα αποτελέσματα για τη συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων της χρώσης DAPI.



Παραπάνω παρουσιάζονται διαγράμματα τα οποία εκφράζουν τις συγκεντρώσεις των μικροοργανισμών σε σχέση με εκείνες των συνολικών βακτηριδίων που μετρήθηκαν στα ίδια φίλτρα, με τη μέθοδο της χρώσης DAPI.

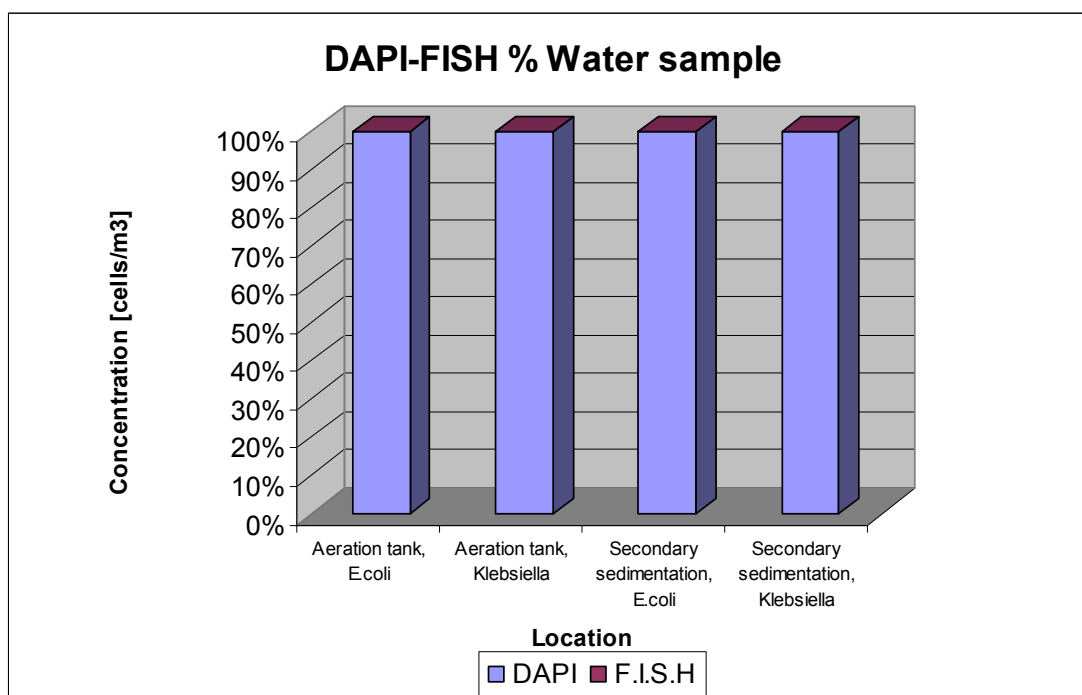
Στα διαγράμματα αυτά φαίνεται καθαρά η διαφορά στο επίπεδο της συγκέντρωσης μεταξύ των ολικών βακτηρίων σε μια δεξαμενή αερισμού και εκείνης για τα *E. coli* και *K. Pneumoniae*. Οι διαφορές είναι σε αρκετές τάξεις μεγέθους, όπως περιμένουμε, αφού η DAPI ανιχνεύει το σύνολο των ολικών βακτηρίων, που περιλαμβάνει τις άλλες κατηγορίες. Το ίδιο, με λιγότερες τάξεις μεγέθους διαφορά, συμβαίνει και για τη δεξαμενή δευτεροβάθμια καθίζησης. Αντίθετα, στα δείγματα του αέρα, οι συγκεντρώσεις είναι σε πολύ μικρά επίπεδα, και η διαφορά τάξεων μεταξύ ολικών βακτηρίων και των μικροοργανισμών στόχων είναι ελάχιστη. Όπως παρατηρούμε, οι εκπεμπόμενες συγκεντρώσεις στον αέρα, σε σχέση με τις ποσότητες που υπάρχουν στο νερό είναι αμελητέες.

Τέλος, παρουσιάζονται τα διαγράμματα που απεικονίζουν το ποσοστό του συνόλου για τις συγκεντρώσεις των μικροοργανισμών στόχων σε σχέση με τα ολικά βακτηρίδια.



Διάγραμμα 7: Διαγράμμα σύγκρισης του ποσοστού της συγκέντρωσης των ολικών βακτηρίων στο δείγμα αέρα που ανιχνεύθηκαν με την χρωστική DAPI, σε σχέση με την συγκέντρωση των μικροοργανισμών που ανιχνεύθηκαν με την χρήση των probes.

Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνουμε ότι για τον αέρα, το σύνολο των μικροοργανισμών αποτελεί ένα σημαντικό ποσοστό, σε σχέση με το πλήθος των ειδών που περιλαμβάνονται στο σύνολο. Αυτό πιθανότατα οφείλεται, στην περίπτωση του *E. coli* στην αυξημένη συγκέντρωση που αυτό παρουσιάζει στις δεξαμενές λόγω των λυμάτων, που περιέχουν αυξημένες συγκεντρώσεις, καθώς πρόκειται για μικροοργανισμό ο οποίος αποικίζει το εντερικό σύστημα του ανθρώπου. Στη συνέχεια δίνεται και το διάγραμμα με την ποσοστιαία αναλογία στην περίπτωση του δείγματος νερού.



Διάγραμμα 8: Διαγράμμα σύγκρισης του ποσοστού της συγκέντρωσης των ολικών βακτηρίων στο δείγμα νερού που ανιχνεύθηκαν με την χρωστική DAPI, σε σχέση με την συγκέντρωση των μικροοργανισμών που ανιχνεύθηκαν με την χρήση των probes.

Στην περίπτωση των δειγμάτων νερού, τα ποσοστά φαίνεται ότι είναι μηδαμινά, όπως φάνηκε και από τα διαγράμματα των συγκεντρώσεων. Το αποτέλεσμα είναι φυσιολογικό, καθώς στο νερό υπάρχουν πολλά είδη μικροοργανισμών που ανήκουν στην κατηγορία των ολικών βακτηρίων και προσμετρούνται στη χρώση DAPI.

4.4.4 Σχολιασμός και συμπεράσματα

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών στο νερό όσο και στον αέρα, όσο αναφορά τα περιβαλλοντικά δείγματα, διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από τον

προσδιορισμό που γίνεται σε εργαστηριακά κατασκευασμένους μικροοργανισμούς, τόσο ως προς την ευκολία λήψης ενός σωστού (από ερευνητικής απόψεως) δείγματος, με τις σωστές προϋποθέσεις και γνώση των παραμέτρων της δειγματοληψίας, όσο και στην παραγωγή αποτελεσμάτων, αφού τα μετρούμενα δείγματα περιλαμβάνουν την τεράστια ποικιλία των μικροοργανισμών που μπορούν να βρεθούν στη φύση, αλλά και στοιχεία (όπως σκόνη, σωματίδια) τα οποία εμποδίζουν σε μεγάλο βαθμό τη σωστή διεξαγωγή της μελέτης και το χαρακτηρισμό του αποτελέσματος.

Οι υπάρχουσες μέθοδοι ανίχνευσης, πέραν της μεθόδου καλλιέργειας που βρίσκεται σε χρήση πολλές δεκάδες χρόνια, λειτουργούν σωστά και αποδίδουν όσο αναφορά το ερευνητικό επίπεδο, αλλά σε επίπεδο μελέτης περιβαλλοντικών δειγμάτων βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στην κρίση του μελετητή, τόσο στη διαδικασία, αλλά πιο σημαντικό, στην κρίση του αποτελέσματος. Η δυσκολία που υπάρχει στο να χαρακτηριστεί ένα σήμα στο μικροσκόπιο ως μικροοργανισμός και να ταυτιστεί με το είδος, και η υποκειμενικότητα της μέτρησης με βάση τα κριτήρια του κάθε μελετητή (ακόμα και της ορατικής του ικανότητας), δίνει αποτελέσματα τα οποία δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως απολύτως αξιόπιστα, και πολλές φορές διαφέρουν σε σημαντικό βαθμό μεταξύ τους. Η ανάγκη, όμως, εύρεσης αποτελέσματος και εκτίμησης τουλάχιστον του βαθμού στον οποίο κυμαίνεται η μετρούμενη τιμή, κάνει αυτές τις μεθόδους απαραίτητες και αναγκαίες στη χρήση.

Η μέθοδος της καλλιέργειας δίνει αργά και γενικά αποτελέσματα, τα οποία είναι όμως φθηνά σε κόστος, και μπορούν να βοηθήσουν στον προσδιορισμό της γενικής εικόνας της μέτρησης, δείχνοντας τα επίπεδα στα οποία κυμαίνεται η μετρούμενη ποσότητα. Οι άλλες μέθοδοι, που είναι πιο εξειδικευμένες και χρησιμοποιούν μέσα γενετικού προσδιορισμού των κυττάρων δίνουν αποτελέσματα καλύτερης ακρίβειας και σε μικρότερο χρόνο, τα οποία όμως είναι υποκειμενικά και διαφέρουν ανάλογα τον μελετητή. Η λήψη περιβαλλοντικών δειγμάτων, με όλα τα προβλήματα που παρουσιάζουν, περιπλέκουν ακόμα περισσότερο την μέτρηση, κάνοντας την λήψη του αποτελέσματος ακόμα πιο υποκειμενική και πολλές φορές αδύνατη, όταν στο δείγμα παρεμβάλλονται σωματίδια που εμποδίζουν την καταμέτρηση του πληθυσμού.

Από τη μελέτη αυτή βρέθηκαν ορισμένες συγκεντρώσεις για δυο χαρακτηριστικούς μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος, που αποτελούν οργανισμούς δείκτες για την ποιότητα του νερού και έχουν άμεση σχέση με την παρουσία του ανθρώπου στην περιοχή, και μπορούν να αποτελέσουν δυνητικά παθογόνους πυρήνες και να

δημιουργήσουν προβλήματα στην υγεία του εργαζομένου ή των κατοίκων της περιοχής γύρω από την εγκατάσταση. Η έλλειψη, όμως, των απαραίτητων ορίων τα οποία μπορούν να θεωρηθούν ως επικίνδυνα για την υγεία του ανθρώπου δεν επιτρέπει την διεξαγωγή συμπερασμάτων σε σχέση με την επικινδυνότητα των επιπέδων αυτών. Για τον χαρακτηρισμό της κατάστασης του περιβάλλοντος σε μια περιοχή, όπως είναι οι Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων, πρέπει να γίνουν πρώτα εκτενείς έρευνες πάνω στον τομέα του βιοαεροζόλ, και των επιπέδων αυτού στον αέρα της εγκατάστασης. Είναι απαραίτητη η συλλογή δεδομένων για το σύνολο των μικροοργανισμών που κινούνται στον αέρα, τα επίπεδα τους και τις διακυμάνσεις τους ανάλογα με τη χρονική περίοδο και τις περιβαλλοντικές παραμέτρους της περιοχής, αλλά και της ικανότητας τους να μεταφέρονται σε γύρω περιοχές χωρίς να έχουν πρώτα νεκρωθεί από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Κρίσιμη είναι και η έρευνα από την πλευρά της υγείας, προκειμένου να βρεθούν τα κρίσιμα επίπεδα έκθεσης στους μικροοργανισμούς αυτούς, αλλά και τα αποτελέσματα που μπορεί να έχει η συνέργια των μικροοργανισμών στην υγεία του ανθρώπου.

Η απαραίτητη παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπ' όψη είναι η διαδικασία της πρόληψης από την πλευρά των εργαζομένων σε αυτές τις εγκαταστάσεις, και να γίνεται μέριμνα ώστε να τηρούνται όλες οι απαραίτητες συνθήκες υγιεινής και μέτρα προστασίας, όπως μάσκες, γάντια και στολές, προκειμένου να αποφεύγεται όσο το δυνατόν η επαφή του ανθρώπινου οργανισμού με τους μικροοργανισμούς που κυκλοφορούν τόσο στο υδάτινο αλλά και στο αέριο περιβάλλον της περιοχής.

Από την χρήση των μεθόδων επιφθορισμού βρέθηκε ότι δίνουν αποτελέσματα που είναι όσο το δυνατόν πιο ακριβή. Η μέθοδος F.I.S.H, με χρήση της γενετικής σύνδεσης του κυττάρου με την χρωστική δίνει καθαρά και γρήγορα αποτελέσματα για τον ακριβή προσδιορισμό του μετρούμενου είδους. Απαραίτητη είναι όμως και η χρήση της μεθόδου DAPI ταυτόχρονα με τη FISH, προκειμένου να γίνεται επιβεβαίωση ότι ο μετρούμενος μικροοργανισμός είναι όντως κύτταρο, και όχι σωματίδιο στο οποίο έγινε κατά λάθος χρώση. Σε σύγκριση των μεθόδων επιφθορισμού με εκείνη της καλλιέργειας, είναι φανερό η ανωτερότητα τους σε επίπεδο ταχύτητας και ακριβούς προσδιορισμού, θα πρέπει όμως να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τις μεθόδους καλλιέργειας, προκειμένου να σώζεται χρόνος από την διαδικασία προσδιορισμού της γενικής κατάστασης των επιπέδων συγκέντρωσης των μικροοργανισμών στο περιβάλλον.

Βιβλιογραφία

1. Jakob Pernthaler, Frank Oliver Glöckner, Wilhelm Schönhuber, Rudolf Amann 'Fluorescence in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes' **Methods in Microbiology: Marine Microbiology**, vol. 30
2. Minna Tanner, David Gancberg, Angelo Di Leo, Denis Larsimont, Ghizlane Rouas, Martine J. Piccart and Jorma Isola (2000) 'Chromogenic in Situ Hybridization: A Practical Alternative for Fluorescence in Situ Hybridization to Detect HER-2/neu Oncogene Amplification in Archival Breast Cancer Samples' **American Journal of Pathology** Vol.157, pp. 1467-1472
3. National Human Genome Research Institute March 2005
4. Alexander Neef, Rudolf Amann and Karl-Heinz Schleifer (1995) 'Detection of Microbial Cells in Aerosols Using Nucleic Acid Probes' **Systemic Applied Microbiology** vol. 18, pp113-122
5. A. Carducci, E. Tozzi, E. Rubulotta, B. Casini, L. Cantiani, E. Rovini, M. Muscillo and R. Pacini (2000) 'Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment' **Water Research**, Vol. 34, pp. 1173-1178
6. Dae-Young Lee, Kelly Shannon, Lee A. Beaudette (2005) 'Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR' **Journal of Microbiological Methods**, (In press)
7. Jari Koivunen, Anja Siitonen, Helvi Heinonen-Tanski (2003) 'Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units' **Water Research**, Vol. 37, pp. 690-698
8. H. Schraft, L.A. Watterworth (2005) 'Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3Mk Petrifilm plates with standard plating procedures' **Journal of Microbiological Methods**, Vol. 60, pp. 335-342
9. Tamara Garcia-Armisen, Pierre Servais (2004) 'Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridization' **Journal of Microbiological Methods**, Vol. 58, pp. 269-279
10. J. Koivunen, H. Heinonen-Tanski (2005) 'Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments' **Water Research**, Vol. 39, pp. 1519-1526
11. Gordon Dougan, Ashraful Haque, Derek Pickard, Gad Frankel, Peadar O'Goara and John Wain (2001) 'The *Escherichia coli* gene pool' **Current Opinion in Microbiology**, Vol. 4, pp. 90-94
12. M.H. Green, C.W Vermeulen (1994) 'Fever and the control of Gram-negative bacteria' **Research in Microbiology**. Vol. 145, pp. 269-272
13. Y. Hirai (1991) 'Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection' **Journal of Hospital Infection**, Vol. 19, pp.191-200
14. Béatrice Regnault, Sylvie Martin-Delautre, Monique Lejay-Collin, Martine Lefèvre, Patrick A.D. Grimont (2000) 'Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli*/*Escherichia fergusonii* cells by in situ hybridization: specificity and potential applications' **Research in Microbiology**, Vol. 151, pp. 521-533
15. Singh A., McFeters G.A., (1992) 'Detection methods for waterborne pathogens' **Environmental Microbiology** pp. 125-156
16. Feng C. Tsai, Janet M. Macher, Yun-Yi Hung 'Concentrations of Airborne Culturable Fungi and Fungal Spores in Large U.S Office Buildings from the BASE study'

17. Bureau of Labor Statistics, U.S. Department of Labor, *Occupational Outlook Handbook, 2006-07 Edition*, Water and Liquid Waste Treatment Plant and System Operators, on the Internet at <http://www.bls.gov/oco/ocos229.htm> (visited May 03, 2006).
18. The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)
19. American Federation of State, County and Municipal Employees, AFL-CIO (AFSCME), '**An AFSCME Health & Safety Guide for Water and Wastewater Treatment Plant Workers**'
20. ©Crown copyright. This article was reproduced with the kind permission of the Food Standards Agency - www.foodstandards.gov.uk
21. C.S.Cox, C.M.Wathes, **Bioaerosols Handbook**, CRC Press, 1995
22. B.Lighthart, A.J.Mohr (1994) **Atmospheric Microbial Aerosols**, Chapman & Hall
23. Paul A. Jensen, Ph.D, PE, Millie P. Schafer, Ph.D '**Sampling and Characterization of bioaerosols**', NIOSH/DPSE
24. Brian Flannigan '**Air sampling for fungi in indoor environments**'
25. W.D. Griffiths, G.A.L. DeCosemo, '**The assessment of bioaerosols: A critical review**'
26. M. Orsini, P. Laurenti, F. Boniti, D. Arzani, A. Ianni, V. Romano-Spica, '**A molecular typing approach for evaluating bioaerosol exposure in wastewater treatment plant workers**'
27. Alan M. Jones, Roy M. Harris, '**The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations – a review**'
28. K. Wittmaack, H. Wehnes, U. Heinzmann, R. Agerer, '**An overview on bioaerosols viewed by scanning electron microscopy**' (in Press)
29. Jerald L. Schnoor '**Περιβαλλοντικά μοντέλα Τύχη και Μεταφορά Ρύπων στον Αέρα, Νερό και έδαφος**'
30. P.K.Morey, J.C.Feeley, J.A.Otten, **Biological Contaminants in indoor Environments**
31. **Bioaerosol Health effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects**
32. Wijnand Eduard, Dick Heederick '**Methods for Quantitative Assessment of Airborne levels of non-infectious Microorganisms in Highly Contaminated Work Environments**'
33. <http://omlc.org.edu>
34. www.Wikkipedia.com
35. Πατενταλάκης Νίκος (2005) '**Μέτρηση Βιοαεροζόλ σε Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων**', Πολυτεχνείο Κρήτης
36. Loy, A., Horn, M., Wagner, M. (2003) **probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes**. *Nucleic Acids Res.* 31, 514-516.