

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Ιωάννης Κούτλας
του Αθανασίου
Α.Μ.: 1819108

Πτυχιακή Εργασία

«Ανάλυση πληθυσμών λεγεωνέλλας σε περιβαλλοντικά δείγματα με μοριακές και ανοσολογικές μεθόδους»

"Analysis of legionella populations in environmental samples by molecular and immunological methods"



Λάρισα, Φεβρουάριος 2024

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων καθηγητής:

Σωτήριος Βασιλειάδης, Επίκουρος καθηγητής Μοριακής Μικροβιακής Οικολογίας-Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλη:

Δημήτριος Καρπούζας, Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας και πρόεδρος του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σταματία Παπουτσοπούλου, Επίκουρος καθηγήτρια Μοριακής Ανοσοβιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες	4
Περίληψη.....	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή.....	7
1.1 <i>Legionella</i> ως επιδημιολογικό πρόβλημα.....	7
1.1.1 <i>Legionella</i>	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
1.1.2 <i>Legionella pneumophila</i>	10
1.1.3 <i>Legionella</i> σε περιβαλλοντικά ύδατα.....	11
1.2 Μέθοδοι μελέτης της λεγεωνέλλας	11
1.2.1 Καλλιεργητικές μέθοδοι.....	12
1.2.2 Μη καλλιεργητικές μέθοδοι.....	12
1.2.2.1 Μοριακές μέθοδοι.....	12
1.2.2.2 Ανοσολογικές μέθοδοι	18
1.2.2.3 Καινοτόμες μέθοδοι.....	19
1.3 Σκοπός της εργασίας	22
2. Υλικά και μέθοδοι.....	23
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	23
2.2 Υλικά	24
2.2.1 Στελέχη και θρεπτικά	24
2.2.2 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου	25
2.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα Αγαρόζης (Electrophoresis Agarose Gel)	27
2.2.4 Kit Απομόνωσης DNA (DNA extraction).....	28
2.2.5 Διήθηση και διαλυτοποίηση κυττάρων	29
2.2.6 Ανοσοκατακρήμνιση.....	29
2.2.7 Ανάλυση ποικιλότητας στα περιβαλλοντικά δείγματα που εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο	29
2.3 Μέθοδοι	30
2.3.1 Δειγματοληψία-Γενικό πρωτόκολλο	30
2.3.2 Διήθηση	30
2.3.3 Κλωνοποίηση	31
2.3.4 Ανοσοκατακρήμνιση.....	32
2.3.5 Ανάλυση ποικιλότητας οργανισμών	32
3. Αποτελέσματα.....	33
3.1 Τελικό πρωτόκολλο.....	33
3.1.1 Τεχνικής Διήθησης.....	33

3.2	Ποσοτικής PCR (qPCR)	34
3.3	Ανάλυσης ποικιλότητας.....	37
4.	Συζήτηση και συμπερασματικά σχόλια.....	39
4.1	Αποτελεσματικότητα μεθόδων.....	39
4.2	Παρουσία των <i>Legionella</i> spp. και <i>L. pneumophila</i> στη λίμνη Κάρλα.....	40
4.3	Σχόλια για την ανάλυση ποικιλότητας.....	41
5.	Μελλοντική εργασία.....	43
6.	Βιβλιογραφία.....	44
7.	Παράρτημα.....	61

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, πρωτίστως, τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Σωτήριο Βασιλειάδη για την ανοχή που μου επέδειξε, τη στήριξή του, καθώς και την εμπειρία και γνώσεις που μου μετέδωσε. Η συνεργασία μας θα είναι ένας σταθμός στη ζωή μου που θα θυμάμαι πάντοτε.

Φυσικά τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Δημήτριο Καρπούζα που με δέχτηκε στο εργαστήριό του, όπου επιτέλεσα την πτυχιακή μου εργασία και την κ. Σταματία Παπουτσοπούλου για την αμέριστη στήριξη και υπομονή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Βεβαίως, το συνεργάτη και φίλο μου Ιωάννη-Μάριο Νασόπουλο για την απρόσκοπτη συνεργασία μας, τη βοήθεια και στήριξη που μου προσέφερε.

Ακόμη, όλους όσους αμέσως ή εμμέσως συνέβαλαν στο να ολοκληρωθεί αυτό το έργο, συγγενείς, φίλους, καθηγητές και συμφοιτητές μου.

Τέλος, όλα τα μέλη του εργαστηρίου, των οποίων η συμπεριφορά ήταν άριστη, η αποδοχή τους θερμή και το όλο κλίμα συνεργασία μας μοναδικό.

Περίληψη

Το βακτήριο *Legionella pneumophila* και συγγενικά είδη *Legionella* spp αποτελούν ευκαιριακά παθογόνα που αναπτύσσονται σε υδάτινα, δομημένα και φυσικά, περιβάλλοντα. Στα πλαίσια της βαθύτερης κατανόησης της οικολογίας και του επιδημιολογικού προφίλ τους, είναι απαραίτητη η επιστράτευση μεθόδων που παρέχουν ολοκληρωμένη πληροφορία ως προς την ποσότητα και τη γενετική τους ποικιλομορφία. Ως γνωστό οι μοριακές, ελεύθερες καλλιέργειας, μέθοδοι αποτελούν σύγχρονα εργαλεία στις περιβαλλοντικές επιδημιολογικές μελέτες, με τεχνολογίες αιχμής όπως η μεταγονιδιωματική ή/και η μεταταξινομική ανάλυση να αποτελούν προμετωπίδες στον τομέα αυτόν. Παρόλα αυτά, και αυτές αδυνατούν να καλύψουν την περιβαλλοντική ποικιλομορφία σε τέτοιο βαθμό που να είναι δυνατή η ανίχνευση λιγότερο άφθονων μικροοργανισμών *in situ* όπως η λεγεωνέλλα. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η απόπειρα ανάπτυξης μίας τέτοιας μεθόδου που βασίζεται σε ανοσολογικό εμπλουτισμό κυττάρων λεγεωνέλλας για τη μελέτη του γενετικού τους υλικού σε περιβαλλοντικά δείγματα, καθώς και η μελέτη των πληθυσμών της λεγεωνέλλας και των ολικών προκαρυωτών σε δείγματα νερού που προέρχονται από τον εξαιρετικά ενδιαφέροντα βιότοπο της τεχνητής λίμνης Κάρλα. Η ανάπτυξη του πρωτοκόλλου βασιζόταν στα βήματα του εμπλουτισμού των κυττάρων από το περιβάλλον με μεθόδους διήθησης, ακολουθούμενη από περαιτέρω εμπλουτισμό με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό. Παρόλο που αναπτύχθηκε επιτυχώς στο εργαστήριο η μέθοδος εμπλουτισμού με διήθηση, δυστυχώς, λόγω εκτεταμένης επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων της ανοσοκατακρήμνισης σύμφωνα με αρνητικούς μάρτυρες, το βήμα αυτό εγκαταλείφθηκε από το πρωτόκολλο της παρούσας εργασίας. Τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν αύξηση της αφθονίας των ολικών βακτηρίων με την πάροδο του χρόνου και την αύξηση της περιβαλλοντικής θερμοκρασίας από τους 28 °C στους 33 °C μέγιστη σε διάστημα δύο περίπου μηνών, χωρίς όμως να παρατηρηθούν διαφορές ως προς την αφθονία τόσο μελών του γένους της λεγεωνέλλας, όσο και της *L. pneumophila* ειδικά. Τέλος η ανάλυση της ποικιλομορφίας δύο διαδοχικών δειγματοληψιών (διαφορά μίας εβδομάδας) του γονιδίου 16S rRNA έδωσε ενδείξεις δραματικής επίπτωσης των παραμέτρων του χρόνου και της θερμοκρασίας τόσο στην α- όσο και στη β-ποικιλομορφία. Η α-ποικιλομορφία ελαττώθηκε, ενώ παρατηρήθηκε επιλογή αναερόβιων κυρίως μικροοργανισμών, που συνδέονται με την παραγωγή αερίων του φαινομένου του θερμοκηπίου, κατά την δεύτερη και τρίτη δειγματοληψία (με διάστημα δύο εβδομάδων μεταξύ τους). Συλλογικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η θερμοκρασία και η εποχικότητα αποτελούν βασικούς παράγοντες διαμόρφωσης των μικροβιακών πληθυσμών της λίμνης Κάρλα, ενώ το προφίλ των πληθυσμών λεγεωνέλλας κατά την περίοδο αναφοράς παρέμεινε σταθερό.

Abstract

Legionella pneumophila and affiliate *Legionella* spp are opportunistic pathogens of aquatic, built and natural environments. In the context of the deeper understanding of their ecology and epidemiological profile, it is necessary to employ methods that provide holistic information concerning their quantities and genetic variation. To this end, molecular culture-independent methods comprise modern tools in environmental epidemiological studies, employing state of the art tools like metagenomics and metataxonomics. Yet, due to their inherent current inability to provide deep coverage of the environmental genetic diversity they are unable to uncover less frequent events like legionellae in the microbially highly diverse environments. The current study aimed at attempting to develop a method based on the immunological enrichment of *Legionella* spp cells for studying their genetic diversity in environmental samples, and also the studying of legionella populations and total bacteria in aquatic samples of the very interesting habitat of Karla Lake. The method development was based on the steps of enrichment via filtering-based cell concentration and magnetic immunoprecipitation. Even though the first step of these two was successfully developed, the second step was accompanied by reagent contamination and was therefore abandoned from the protocol of the present study. qPCR results showed the increase in abundance of total bacteria during time progression and daily maximum temperature increase from of 28 °C to 33 °C at a period of approximately two months, without showing any differences between the legionella counts. Total 16S rRNA gene diversity analysis for the second and third sampling has shown a reduction of the α -diversity accompanied by an increase in relative abundance of anaerobic taxa commonly associated with elevated greenhouse gas emissions. Overall, our results show that temperature and seasonal changes shape the microbial community patterns of lake Karla, while the legionella profiles remained stable along the tested period.

1. Εισαγωγή

1.1 Λεγεωνέλλα ως επιδημιολογικό πρόβλημα

Ο κόσμος στον οποίο ζούμε έχει γνωρίσει αρκετές φορές κατά τη ροή της ιστορίας έξαρση διαφόρων ασθενειών, είτε σε παγκόσμιο (πανδημίες), είτε σε περιορισμένο τοπικό πλαίσιο (επιδημίες), όπως η ευλογιά, η χολέρα, το σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS), ο COVID-19 [(Sánchez Vallejo, 2021)]. Κατά καιρούς, όμως, έκαναν την εμφάνισή τους και μικρότερης έκτασης, αλλά καθόλου ασήμαντες ασθένειες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, η περίπτωση της Νόσου των Λεγεωναρίων (legionnaire's disease-LD), μία μορφή πνευμονίας που 'χτύπησε' μέλη της Αμερικανικής Λεγεώνας κατά τη διάρκεια ενός συνεδρίου, στη Φιλαδέλφεια των ΗΠΑ, το 1976, οδηγώντας 221 ανθρώπους στο νοσοκομείο με βαριά συμπτώματα πνευμονίας και 34 στο θάνατο. [(Johnny Denenea, 2023)] (Εικόνα 1).

Legionnaires' Disease Outbreak Caused by Endemic Strain of *Legionella pneumophila*, New York, New York, USA, 2015

Pascal Lapierre, Elizabeth Nazarian, Yan Zhu, Danielle Wroblewski, Amy Saylor,
Teresa Passaretti, Scott Hughes, Anthony Tran, Ying Lin, John Kornblum,
Shatavia S. Morrison, Jeffrey W. Mercante, Robert Fitzhenry, Don Weiss, Brian H. Raphael,
Jay K. Varma, Howard A. Zucker, Jennifer L. Rakeman, Kimberlee A. Musser

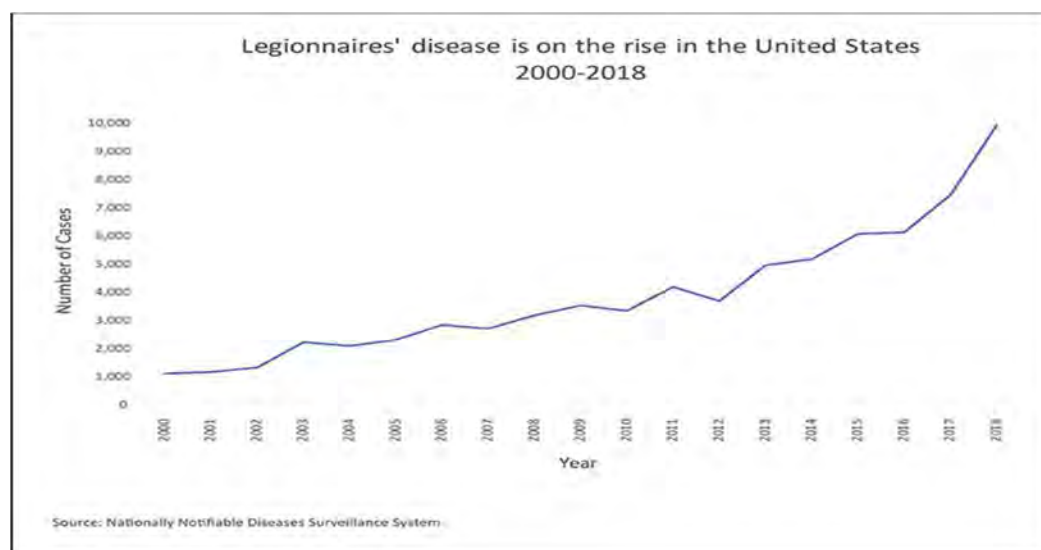
Εικόνα 1. Τίτλος άρθρου το Νοέμβριο του 2017 όπου αναφέρεται άλλο ένα ξέσπασμα της νόσου των Λεγεωναρίων στη Νέα Υόρκη των ΗΠΑ [(Lapierre et al., 2017)]

Παρότι ανακαλυφθείσα μόλις πριν από 67 χρόνια, φαίνεται να υπήρχε προϊστορία της νόσου, πρωτοεμφανισθείσης το 1976 ως μία άγνωστη μορφή πνευμονίας, ενώ το 1968 ως πυρετός Pontiac, προκαλώντας ηπιότερα και μη θανατηφόρα συμπτώματα στους ασθενείς [(Johnny Denenea, 2023)] (Πίνακας 1). Το γεγονός ανάδυσής της στο 2^ο μισό του 20^{ου} αιώνα συνδέεται με την ανθρώπινη ανάπτυξη, όπως την εξάπλωση των πύργων ψύξης, κλιματιστικών συστημάτων κ.α., καθώς ο τρόπος μετάδοσής της είναι τα αερολύματα (σταγονίδια) [(Borella et al., 2005; Khodr et al., 2016)].

Πίνακας 1. Σύγκριση των δύο μορφών ασθενειών που προκαλούνται από είδη του βακτηρίου *Legionella* [(Nazarian et al., 2015; Percival & Williams, 2014)]

	Νόσος Λεγεωναρίων	Πυρετός Pontiac
Προέλευση ονομασίας	Επιδημία στη Φιλαδέλφεια των ΗΠΑ	Επιδημία στην περιοχή Pontiac των ΗΠΑ
Περίοδος επώασης (μέρες)	2-14	1-3
Πρόκληση πνευμονίας	Ναι	Όχι
Κλινικά συμπτώματα (κοινά)	Πυρετός, βήχας, πονοκέφαλος, σύγχυση, πόνος στο στήθος, δυσφορία	
Κλινικά συμπτώματα (πνευμονίας)	Δύσπνοια, αιμόπτυση, μόλυνση ανώτερου αναπνευστικού, παραγωγή πτυέλου	-
Ποσοστό θνησιμότητας (%)	0-30	0

Έκτοτε τα περιστατικά ανθρώπων που νοσούν αυξάνονται κάθε χρόνο, σε ΗΠΑ και Ευρώπη, σύμφωνα με δεδομένα του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (CDC) (Εικόνα 2) και του Παγκοσμίου Οργανισμού Υγείας (WHO) [(Graham et al., 2022), (*Legionnaires' Disease - Annual Epidemiological Report 2021*, 2021; Nisar et al., 2020)], πλήττοντας κατά κύριο λόγο άνδρες ηλικίας άνω των 50 ετών, χρόνια καπνιστές ή ανοσοκατεσταλμένους [(World Health Organization (WHO), 2022)].



Εικόνα 2. Ποσοστό αναφερόμενων περιπτώσεων της νόσου των Λεγεωναρίων από το 2000 έως το 2018 [(Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2021)].

Η ανερχόμενη αυτή νόσος χαρακτηρίστηκε από τους επιστήμονες ως λεγεωνέλλωση, υποδεικνύοντας μόλυνση από το βακτήριο λεγεωνέλλα (*legionella*), το οποίο μας ενδιαφέρει και μελετούμε στην παρούσα πτυχιακή [(World Health Organization (WHO), 2022)].

1.1.1 Λεγεωνέλλα

Η λεγεωνέλλα είναι Gram-αρνητικό βακτήριο, μη σποριοτικό και υποχρεωτικώς αερόβιο, το οποίο ανήκει στην κλάση των γ-πρωτεοβακτηρίων. Το γένος *Legionella* απαρτίζεται από 60 είδη, υποδιαιρείται σε 80 διακριτές οροομάδες και είναι μοναδικό στην οικογένεια των *Legionellaceae*, ενώ γύρω στο 50% όλων των ειδών της έχουν συσχετιστεί με κάποια ασθένεια που προσβάλλει τον άνθρωπο (Πίνακας 2) [(Nisar et al., 2020)]. Επιβιώνει σε υδάτινα κυρίως περιβάλλοντα (γλυκά ή αλμυρά), όπως λίμνες, ποτάμια, πύργους ψύξεις, υπόγεια ή και πόσιμα νερά ενώ εκμεταλλεύεται τα βιοϋμένια όπως και ξενιστές (κύτταρα θηλαστικών και πρωτόζωα) για την επιβίωσή του σε αυτά. Έχει ασυνήθιστες απαιτήσεις σε θρεπτικά, όπως σίδηρο και αμινοξέα, παρά σε υδατάνθρακες, γεγονός που εξηγεί και την επιλογή του θρεπτικού μέσου ανάπτυξής του (βλ. Στελέχη και Θρεπτικά) [(European Center for Disease prevention and Control (ECDC), 2011; Nazarian et al., 2015; Percival & Williams, 2014)].

Πίνακας 2. Είδη λεγεωνέλλας και παθογονικότητα στον άνθρωπο [(Carney, 2020; Nazarian et al., 2015)]

	Είδη λεγεωνέλλας που έχουν συνδεθεί με παθογονικότητα στον άνθρωπο	Είδη λεγεωνέλλας που δεν έχουν συνδεθεί με παθογονικότητα στον άνθρωπο
1	<i>L. anisa</i>	<i>L. adelaidensis</i>
2	<i>L. birminghamensis</i>	<i>L. beliardensis</i>
3	<i>L. bozemaniae</i>	<i>L. brunensis</i>
4	<i>L. cardiaca</i>	<i>L. busanensis</i>
5	<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. cherrii</i>
6	<i>L. clemsonensis</i>	<i>L. drancourtii</i>
7	<i>L. donaldsonii</i>	<i>L. dresdenensis</i>
8	<i>L. dumoffii</i>	<i>L. drozanskii</i>
9	<i>L. feeleeii</i>	<i>L. erythra</i>
10	<i>L. gormanii</i>	<i>L. fairfieldensis</i>
11	<i>L. hackeliae</i>	<i>L. fallonii</i>
12	<i>L. jordanis</i>	<i>L. geestiana</i>
13	<i>L. langsingensis</i>	<i>L. gratiana</i>
14	<i>L. longbeachae</i>	<i>L. gresilensis</i>
15	<i>L. lytica</i>	<i>L. impletisoli</i>
16	<i>L. maceachernii</i>	<i>L. israelensis</i>
17	<i>L. micdadei</i>	<i>L. jamestowniensis</i>
18	<i>L. nagasakiensis</i>	<i>L. londiniensis</i>
19	<i>L. oakridgensis</i>	<i>L. massiliensis</i>
20	<i>L. parisiensis</i>	<i>L. moravica</i>
21	<i>L. pittsburghensis</i>	<i>L. nautarum</i>
22	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. quateirensis</i>
23	<i>L. quinlivanii</i>	<i>L. rowbothamii</i>
24	<i>L. rubrilucens</i>	<i>L. santicrucis</i>
25	<i>L. sainthelensi</i>	<i>L. shakespearei</i>
26	<i>L. steelei</i>	<i>L. spiritensis</i>
27	<i>L. tucsonensis</i>	<i>L. steigerwaltii</i>
28	<i>L. wadsworthii</i>	<i>L. taurinensis</i>
29	<i>L. waltersii</i>	<i>L. tunisiensis</i>
30	<i>L. worsleiensis</i>	<i>L. yabuuchiae</i>

1.1.3 Λεγεωνέλλα σε περιβαλλοντικά ύδατα

Η συμβίωση της λεγεωνέλλας με άλλους μικροοργανισμούς (κυρίως πρωτόζωα των φύλων *Amoebozoa*, *Ciliophora* και *Percolozoa* με κυριότερα είδη τα *Acanthamoebae*, *Tetrahymena* και *Naegleria* αντίστοιχα) (Πίνακας 4), όπως προαναφέρθηκε, φαίνεται να είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωσή της σε υδάτινα (και εδαφικά) περιβάλλοντα, καθώς είναι ο μόνος τρόπος πολλαπλασιασμού της [(Abu Kwaik et al., 1998; Atlas, 1999; Carney, 2020; Newton et al., 2010)]. Ταυτόχρονα, διατηρείται η παθογονικότητά της, ενώ η ανοχή της σε αντίξοες συνθήκες φαίνεται να αυξάνεται δραματικά, όπως σε εύρος θερμοκρασιών, ωσμωτικές αλλαγές, διακύμανση pH, οξειδωτικούς παράγοντες, ακόμη και σε βιοκτόνα [(Abu Kwaik et al., 1998; Borella et al., 2005)]. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά υποδηλώνουν έναν εξαιρετικά ενδιαφέροντα μικροοργανισμό προς έρευνα.

Πίνακας 4. Ταξινομική περιγραφή πρωτόζωων που έχουν αναφερθεί ως ξενιστές για λεγεωνέλλες [(Nisar et al., 2020)]

Ταξινομική περιγραφή δυνητικών πρωτόζωων ξενιστών λεγεωνέλλας

Νοσοκομειακές εγκαταστάσεις	Συστήματα πόσιμου νερού
Φύλο: Amoebozoa Τάξη: Tubulinea Γένη: <i>Vermamoeba</i> , <i>Echinamoeba</i> , <i>Hartmannella</i> , <i>Filamoeba</i> Τάξη: Discosea Γένη: <i>Acanthamoeba</i> , <i>Cormandonia</i> , <i>Mayorella</i> , <i>Vanella</i> Τάξη: Heterolobosea Γένη: <i>Vahlkampfia</i> , <i>Paravahlkampfia</i>	Φύλο: Amoebozoa Τάξη: Tubulinea Γένη: <i>Vermamoeba</i> , <i>Echinamoeba</i> Τάξη: Discosea Γένη: <i>Acanthamoeba</i> , <i>Neoparamoeba</i>
Φύλο: Percolozoa Τάξη: Heterolobosea Γένη: <i>Naegleria</i>	
Φύλο: Ciliophora Τάξη: Oligohymenophorea Γένη: <i>Tetrahymena</i>	

1.2 Μέθοδοι μελέτης της λεγεωνέλλας

Έχοντας υπόψιν τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτή η δυσκολία μελέτης ενός τέτοιου βακτηρίου, η οποία υφίσταται ακόμη - παρόλες τις προσπάθειες βελτίωσης που έχουν επιχειρηθεί – εξαιτίας της επικινδυνότητάς της και του υδατικού περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσεται, καθιστώντας το τόσο ‘απαιτητικό’ στις ανάγκες του [(Boczek, et al., 2021)]. Τα πιο πρόσφατα δεδομένα μας παρουσιάζουν μία ποικιλία μεθόδων, καλλιεργητικών και μη, οι οποίες έχουν δοκιμαστεί ως τώρα.

1.1.2 *Legionella pneumophila*

Το πιο αντιπροσωπευτικό είδος λεγεωνέλλας είναι αυτό της πνευμονίας (*L. pneumophila*), η οποία περιλαμβάνει 15 ορομάδες εκ των οποίων η 1 είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας για τη λεγεωνέλλωση, σε ποσοστό 70% των περιπτώσεων (Πίνακας 3). Είναι ένα ευκαιριακό υδατοφερόμενο παθογόνο, το οποίο επιβιώνει στο νερό παρασιτώντας σε πρωτόζωα (όπως αμοιβάδες), νηματώδη ή αποικίζοντας βιοφίλμ (Εικόνα 4). Το εύρος θερμοκρασιών ανάπτυξης της είναι 25°C-42°C, με βέλτιστη τους 35°C, ενώ έρευνες έδειξαν θερμοανθεκτικότητα έως 60°C [(Nazarian et al., 2015; Nisar et al., 2020; Percival & Williams, 2014; Steinert et al., 1998)]. Η ανάλυση του γονιδιώματός της έχει επιτευχθεί με τη βοήθεια τεσσάρων κλινικών στελεχών, τα οποία συνδέονται με ανά τον κόσμο ξεσπάσματα της νόσου [(Newton et al., 2010)], η οποία αποκάλυψε μία πρωτεΐνη 24k-Da, Mip (macrophage infectivity potentiator), στην οποία οφείλει και την επιτυχία της προσβολής άλλων μικροοργανισμών ή κυττάρων (μακροφάγων και μονοκυττάρων) [(Nazarian et al., 2015; H. J. Newton et al., 2010; Rittig et al., 1998)].

Πίνακας 3. Ταξινόμηση της λεγεωνέλλας πνευμονόφιλης [(Gonçalves et al., 2021)].

Φυλογενετική Ταξινόμηση	
Βασίλειο	Βακτήρια
Φύλο	Πρωτεοβακτήρια
Ομοταξία	γ-Πρωτεοβακτήρια
Συνομοταξία	Legionellales
Οικογένεια	Legionellaceae
Γένος	Legionella
Είδος	Legionella pneumophila



Εικόνα 4. Πρωτόζωο *T. pyriformis* βαριά μολυσμένο από κύτταρα *L. pneumophila*, τα οποία φαίνονται διαταγμένα αλυσιδωτά στο κυτταρόπλασμα του [(Fields et al., 1984)]

1.2.1 Καλλιεργητικές μέθοδοι

Οι πρώτες μέθοδοι/θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εξαιρετικά χαμηλής ευαισθησίας και εφαρμόσιμες στο γένος *Rickettsia* [(Greaves, 1980)]. Το Mueller Hinton agar (MH) ανήκει στις πρώτες προσπάθειες των ερευνητών για κατασκευή ενός ιδανικού θρεπτικού. Με τις κατάλληλες μελέτες, κατέληξαν σε δύο πιο εξειδικευμένα θρεπτικά: 1) το FG (Feeley Gorman) agar και 2) το BCYE (Broth Charcoal Yeast Extract) agar. Τα θρεπτικά αυτά είναι πλούσια σε σίδηρο και κυστεΐνη, ευνοώντας την ανάπτυξη λεγεωνέλλας, σε συνδυασμό με την ιδανική θερμοκρασία (35-42°C), υγρασία (υψηλά ποσοστά) και οξυγόνου (καθώς είναι μικροαερόφιλα βακτήρια). [(Feeley et al., 1978; Greaves, 1980)]. Ο χρόνος επώασης μπορεί να φτάσει έως και τις 14 μέρες, ενώ παράλληλα απαιτείται έλεγχος των καλλιεργειών ανά 2-3 μέρες. Το κύριο πλεονέκτημά της είναι η ικανότητα ανίχνευσης όλων των ειδών λεγεωνέλλας, ενώ ο μεγάλος χρόνος επώασης, η χαμηλή ευαισθησία (σε περίπτωση επιμόλυνσης καθίσταται αδύνατος ο διαχωρισμός από άλλες αποικίες βακτηρίων) και τα εκλεκτικά υλικά καθιστούν τη μέθοδο δύσχρηστη για επιδημιολογικές μελέτες [(Φράγκου, 2012)].

1.2.2 Μη καλλιεργητικές μέθοδοι

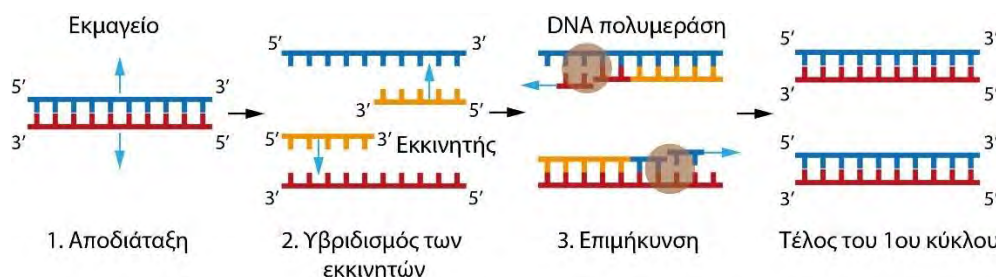
Η ανάγκη εύρεσης μίας ταχύτερης, ακριβέστερης (μεγαλύτερης ευαισθησίας) και πιο πρακτικής μεθόδου εντοπισμού κυττάρων λεγεωνέλλας, ήταν επιτακτική. Επιπλέον, η απομόνωση λεγεωνέλλας από περιβαλλοντικά δείγματα είναι αρκετά δύσκολη, λόγω της συν-ανάπτυξης με άλλα είδη αλλά και της μικρής αναλογίας της εν συγκρίσει με τους υπόλοιπους πληθυσμούς βακτηρίων στα ενδιαστήματα αυτά [(Eble et al., 2021; Greaves, 1980)]. Έτσι, πολλά εργαστήρια πρόταξαν μη καλλιεργητικές τεχνικές βασισμένες στην PCR (μοριακές) ή στη χρήση αντισωμάτων (ανοσοχημικές).

1.2.2.1 Μοριακές μέθοδοι

a. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης στοχευμένων τμημάτων του γενετικού υλικού *in vitro*, στοχεύοντας στην εξαγωγή ενός ποιοτικού αποτελέσματος, μέσω της περαιτέρω επεξεργασίας και ανάλυσής τους [(Kaunitz, 2015)]. Περιλαμβάνει τα εξής τρία επαναλαμβανόμενα στάδια (Εικόνα 5):

- i) Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται με την εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (95°C) για χρονικό διάστημα μεταξύ 30sec-1 min.
- ii) Υβριδισμός εκκινητών: Εξειδικευμένοι εκκινητές (μικρά μόρια DNA 18-30 βάσεων) υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες μειώνοντας τη θερμοκρασία της αντίδρασης (55-65°C).
- iii) Επιμήκυνση: Με τη χρήση μίας θερμοανεκτικής πολυμεράσης (Taq polymerase) και ταυτόχρονη αύξηση θερμοκρασίας (72°C) επιμηκώνονται οι εκκινητές, με την προσθήκη νέων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων με ταχύτητα της τάξεως 1000 βάσεων/λεπτό.



Εικόνα 5. Απεικόνιση βημάτων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης [(Παλαιολόγου et al., 2015)]

b. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)

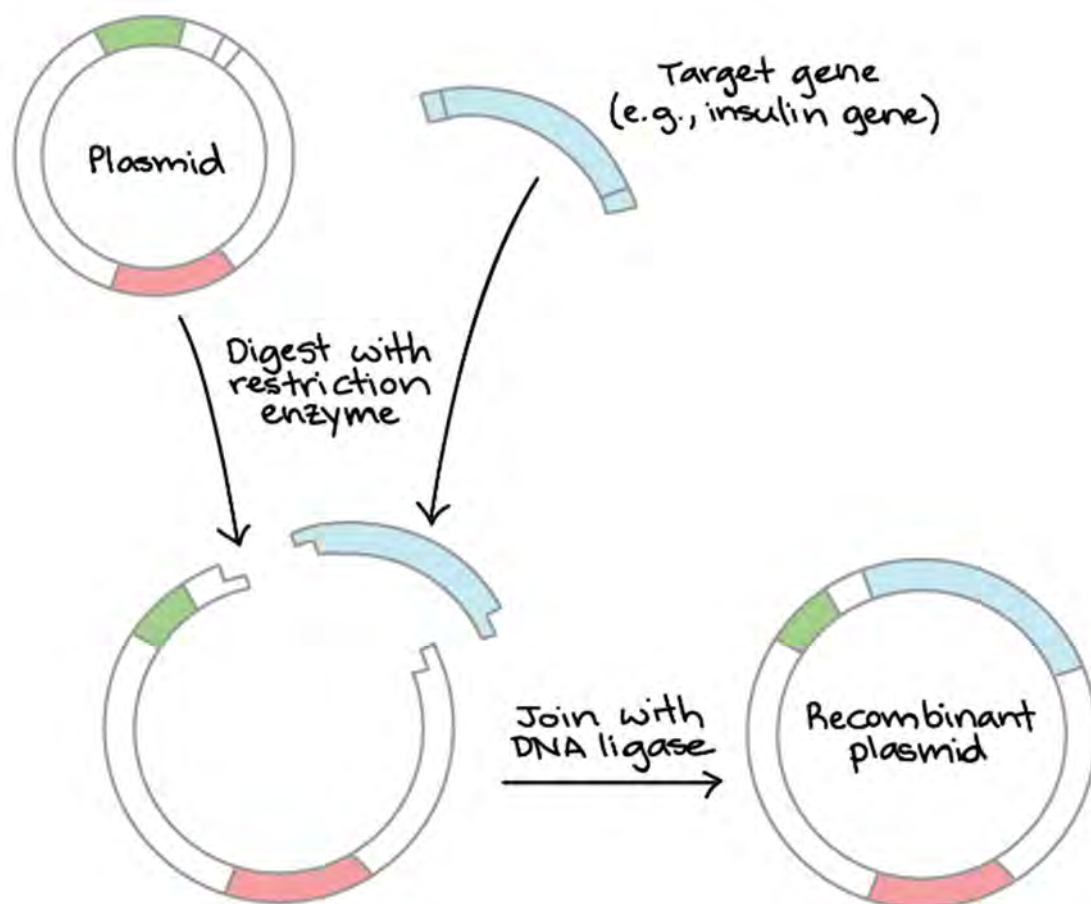
Ως συμπλήρωμα στη φαρέτρα των επιστημόνων, έρχεται μετά ολίγων χρόνων να προστεθεί η ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time quantitative PCR - qPCR), ακριβώς για τον ποσοτικό χαρακτηρισμό των δειγμάτων DNA προς ανάλυση, όπως δηλώνεται από το όνομά της [(Παλαιολόγου et al., 2015)]. Η μοναδική διαφορά με την κλασική PCR είναι ο χρόνος κατά τον οποίο εξάγονται τα αποτελέσματα της αντίδρασης, στη μεν πρώτη στη φάση πλατώ, αφού ολοκληρωθούν όλα τα στάδια της αντίδρασης, ενώ στη δεύτερη στην εκθετική φάση, δίνοντας τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας της σε πραγματικό χρόνο [(Παλαιολόγου et al., 2015)].

Οι περισσότερες δημοσιεύσεις αναφερόμενες στις παραπάνω τεχνικές, κατά κύριο λόγο στοχεύουν στα γονίδια 5S και 16S rRNA της λεγεωνέλλας και στον παράγοντα μολυσματικότητας μακροφάγων (macrophage infectivity potentiator, mip) για το στοχευμένο εντοπισμό της πνευμονόφιλης λεγεωνέλλας (*L. pneumophila*) [(Eble et al., 2021)].

- Κλωνοποίηση (DNA cloning)

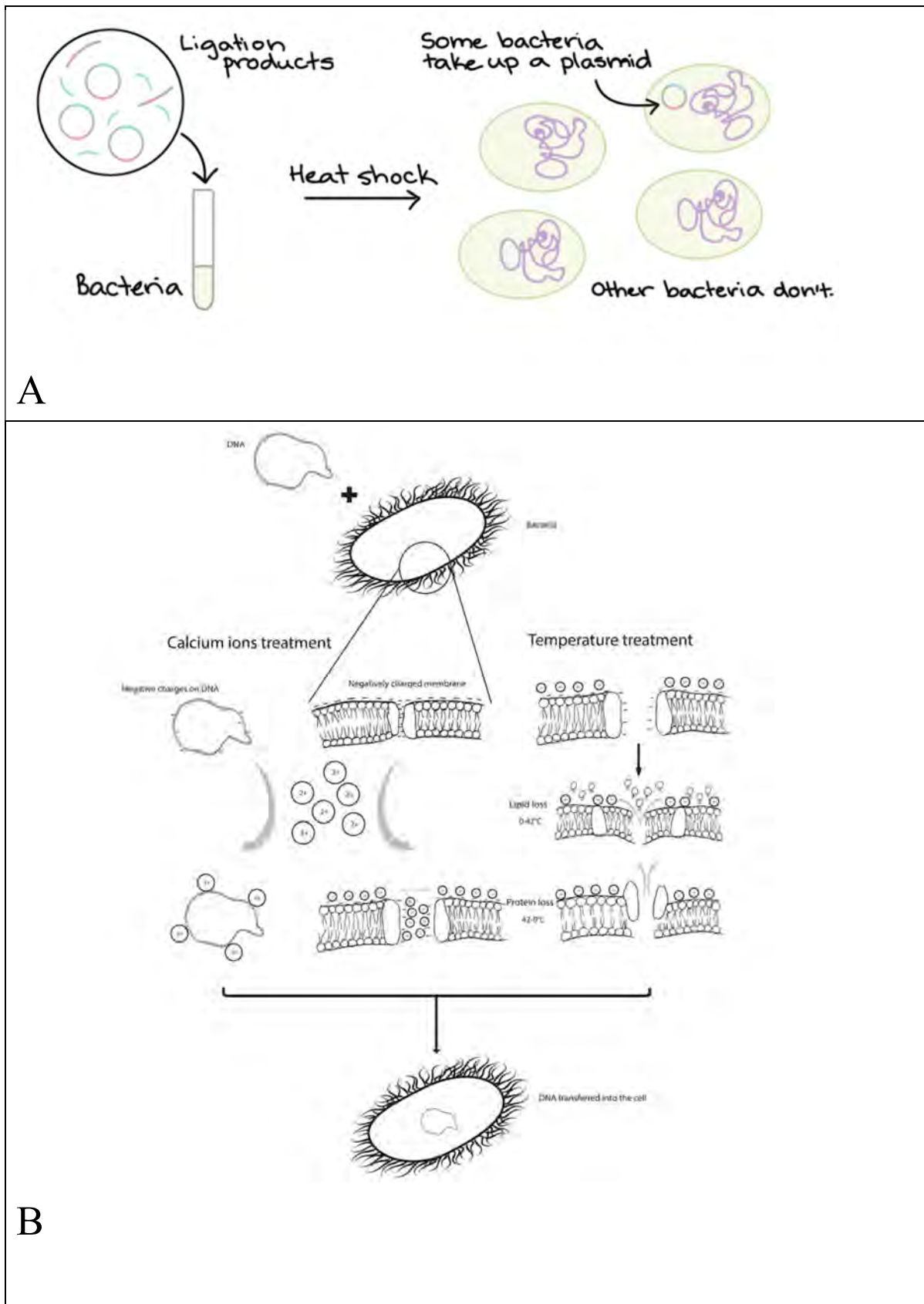
Για την ποσοτικοποίηση των κυττάρων στα ληφθέντα δείγματα, μέσω της qPCR, κρίνεται απαραίτητη η ετοιμασία τυπικής καμπύλης χρησιμοποιώντας θετικά δείγματα λεγεωνέλλας σε διάφορες συγκεντρώσεις [(Bilodeau, 2022)]. Για την κατασκευή αυτών, απαιτείται μία διαδικασία, γνωστή ως κλωνοποίηση, η οποία στηρίζεται στην απομόνωση μίας ακολουθίας DNA ενδιαφέροντος με στόχο την ανάκτηση πολλαπλών αντιγράφων in vitro [(Sharma et al., 2014)]. Εν ολίγοις, η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής [(Asif et al., 2017)]:

- Προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου-στόχου ενσωματώνεται σε ένα κυκλικό κομμάτι DNA (φορέα), το πλασμίδιο, με τη βοήθεια i) περιοριστικών ενζύμων, τα οποία κόβουν τμήματα DNA σε συγκεκριμένα σημεία και δημιουργούν κατάλληλα άκρα στον φορέα, και ii) DNA λιγάσης, η οποία ενώνει τα τμήματα DNA πλασμιδίου και προϊόντος (Εικόνα 6).



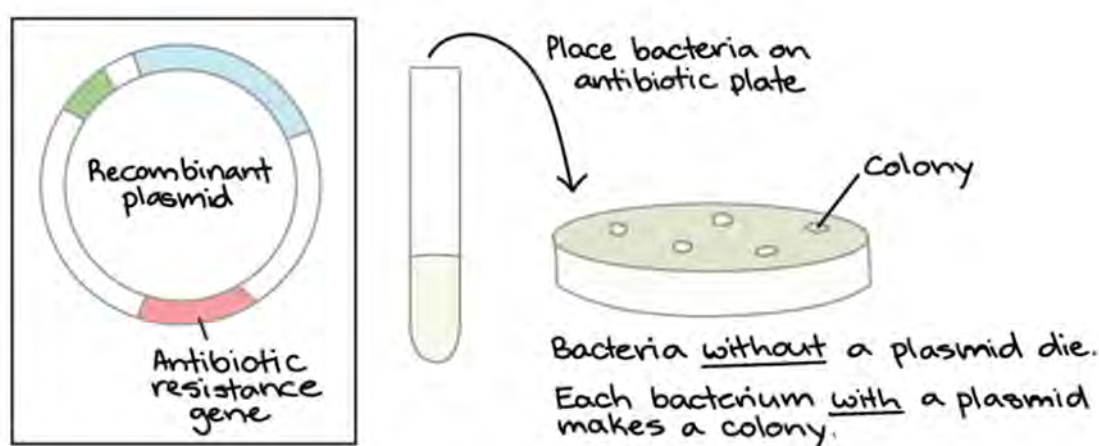
Εικόνα 6. Απεικόνιση του πρώτου βήματος, στη διαδικασία της κλωνοποίησης [(Khan Academy, 2008)].

- ii. Στη συνέχεια, αυτό εισάγεται σε δεκτικά (competent) βακτηριακά κύτταρα με τη διαδικασία της φυσικοχημικής μεθόδου μετασχηματισμού: Μετά από προσθήκη δισθενών κατιόντων (π.χ. ιόντων ασβεστίου) εξουδετερώνονται τα αρνητικά φορτία της βακτηριακής μεμβράνης και του DNA ενώ με την πρόκληση θερμικού σοκ και σε συνδυασμό με την παρουσία των κατιόντων διευκολύνεται η πρόσληψη ξένου DNA από το περιβάλλον μέσω της επίδρασης του θερμικού σοκ στις μεμβράνες (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Α) Απεικόνιση διαδικασίας πρωτοκόλλου μετασχηματισμού [(Khan Academy, 2008)]. Β) Επίδραση φυσικοχημικής μεταχείρισης σε κυτταρικά επίπεδα κατά τον μετασχηματισμό του DNA σε βακτηριακό ξενιστή [(Asif et al., 2017)].

- iii. Ακολουθεί η επιλογή των βακτηρίων που έχουν λάβει πλασμίδια (μετασχηματισμένα). Αυτό επιτυγχάνεται με την καλλιέργειά τους σε στερεό θρεπτικό υλικό, το οποίο περιέχει κάποιο αντιβιοτικό (όπως αμπικιλίνη ή καρβενικιλίνη) και μόνο τα κύτταρα που έχουν λάβει το πλασμίδιο, το οποίο περιέχει το αντίστοιχο γονίδιο επιλογής, μπορούν να επιβιώσουν (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Απεικόνιση του τρίτου βήματος στη διαδικασία της κλωνοποίησης [(Khan Academy, 2008)].

- iv. Τέλος, τα βακτήρια με το πλασμίδιο και το γονίδιο ενδιαφέροντος σε αυτό θα αναγνωριστούν μέσω της τεχνικής 'blue-white screening' (μπλε-άσπρη διαλογή), καθώς θα δημιουργήσουν χαρακτηριστικές άσπρες αποικίες (Εικόνα 9). Αυτό οφείλεται στη μη δράση του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση, το οποίο με την ένθεση του προϊόντος PCR που μας ενδιαφέρει, απενεργοποιείται και δεν παράγεται, άρα δεν υδρολύεται το X-gal (χρωμογενές υπόστρωμα) και δεν χρωματίζονται οι αποικίες μπλε [(Padmanabhan et al., 2011; Sambrook et al., 1989)]. Έτσι, τα βακτήρια αυτά επιλέγονται για την απομόνωση του πλασμιδίου με τη χρήση κατάλληλου kit (βλ. υλικά και μέθοδοι, kit απομόνωσης DNA).



Εικόνα 9. Απεικόνιση εφαρμογής του blue-white screening σε ένα πιάτο με άγαρ [(Walkowski, 2009)].

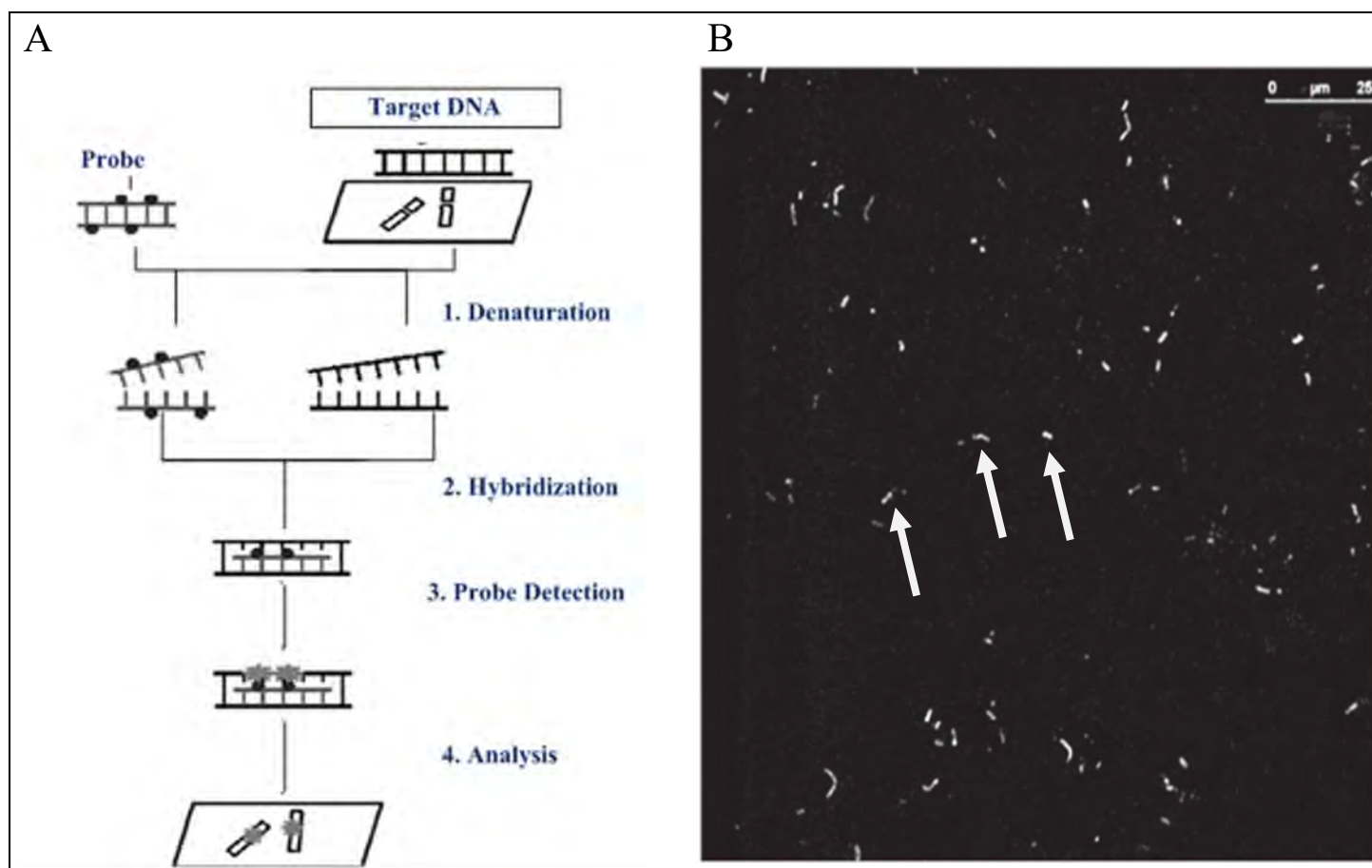
c. Φθορίζουσα υβριδοποίηση in situ (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)

Μία ακόμη πλεονεκτικότερη τεχνική, είναι αυτή της FISH, η οποία παρέχει πληροφορίες όχι μόνο για την ύπαρξη αλλά και τον αριθμό κυττάρων λεγεωνέλλας (κι όχι μόνο αυτού του είδους) σε ένα δείγμα [(Douterelo et al., 2014; Whiley et al., 2011)].

Είναι μία μοριακή τεχνική που επιτρέπει τον προσδιορισμό/εντοπισμό μίας ακολουθίας DNA ή και RNA (π.χ. συχνή επιλογή αποτελεί το ριβοσωμικό RNA λόγω της υψηλής αφθονίας του που συμβάλλει σε ισχυρό σήμα φθορισμού όπως εξηγείται στην συνέχεια) σε ένα κύτταρο και στηρίζεται στον υβριδισμό μέσω φθορισμού με τη χρήση ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών ιχνηθετών DNA (DNA probes, συνήθως 15-25 βάσεων) [(Amann et al., 1990; Douterelo et al., 2014; Dutra, 2023)].

Περιλαμβάνει τα εξής βήματα (Εικόνα 10) [(Amann et al., 1990; Ratan et al., 2017)]:

- i. Σχεδιασμό και κατασκευή των κατάλληλων ιχνηθετών, συνήθως φθοροφόρων ουσιών
- ii. Σταθεροποίηση και διάτρηση των κυττάρων του δείγματος
- iii. Αποδιάταξη των στόχων νουκλεϊκών οξέων και των ιχνηθετών
- iv. Υβριδοποίηση, λόγω συμπληρωματικότητας
- v. Παρατήρηση αποτελεσμάτων με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού
- vi. Ανάλυση των αποτελεσμάτων



Εικόνα 10. Α) Απεικόνιση βημάτων της FISH [(Ratan et al., 2017)]. Β) Σημασμένα κύτταρα λεγεωνέλλας μετά εφαρμογής της τεχνικής FISH [(Whiley et al., 2011)].

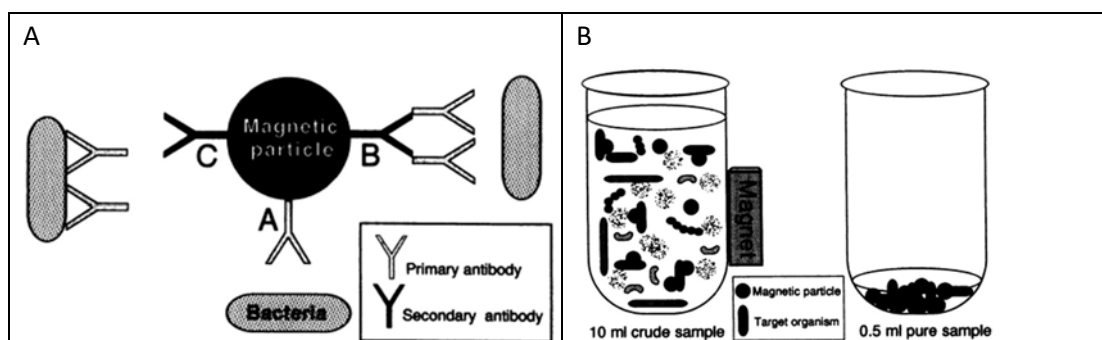
Η μέθοδος FISH δύναται να συνδυαστεί με κυτταροδιαχωρισμό προκειμένου να ληφθούν κύτταρα πληθυσμών ενδιαφέροντος για περαιτέρω μοριακές μελέτες [(Kalyuzhnaya et al., 2006)].

1.2.2.2 Ανοσολογικές μέθοδοι

Ακόμη και οι μοριακές μέθοδοι συχνά δεν είναι τόσο ακριβείς ώστε να έχουν διακριτική ικανότητα σε χαμηλά ταξινομικά επίπεδα (π.χ. είδους), ή ακόμη και σε οροομάδες/ορότυπους [(Díaz-Flores et al., 2015)], ενώ οι αναστολές της PCR στα περιβαλλοντικά δείγματα είναι εξαιρετικά πολυπληθείς [(Whiley et al., 2011)]. Στο πλαίσιο αυτό έχουν προταθεί οι παρακάτω ανοσολογικές τεχνικές.

- Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (ImmunoMagnetic Separation, IMS)

Η τεχνική του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού (IMS) είναι μία γρήγορη μέθοδος διαχωρισμού ενός μεγάλου εύρους στόχων, όπως κυττάρων, από ένα εναιώρημα (όπως αίμα) με τη χρήση μαγνητικών σφαιριδίων και ενός μαγνήτη (Εικόνα 11) [(E. C. Y. Wang et al., 1992)]. Τα μαγνητικά σφαιρίδια είναι πολυμερή σωματίδια επικαλυμμένα με μία υδροφοβική επιφάνεια, ώστε να διευκολύνεται η φυσική προσκόλληση μορίων, όπως αντισωμάτων αλλά και ομάδων υδροξυλίου που επιτρέπουν την ομοιοπολική σύνδεση βιοενεργών μορίων, όπως η στρεπταβιδίνη [(Wang et al., 1992)]. Αρχικά, εφαρμοζόταν σε ευκαρυωτικά κύτταρα σε κλινικές δοκιμές, ενώ την τελευταία εικοσαετία έχει δοκιμαστεί σε βακτήρια και ιούς με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα [(Olsvik et al., 1994)].



Εικόνα 11. Α) Τεχνικές χρήσης των μαγνητικών σφαιριδίων σε συνδυασμό με αντισώματα. Παρατηρούμε ότι μπορούν να υπάρχουν δύο ομάδες αντισωμάτων, πρωτογενών ή δευτερογενών, τα οποία είτε είναι προσκολλημένα αποκλειστικά στο μαγνήτη ή μοιράζονται και στο μόριο στόχο [(Olsvik et al., 1994)]. Β) Διαχωρισμός κυττάρων μετά την εφαρμογή της μεθόδου [(Olsvik et al., 1994)]

Χαρακτηρίζεται ως μία ταχύτατη, φθηνή και εύκολα εφαρμόσιμη μέθοδος υπό ασηπτικές συνθήκες, προσφέροντας τη δυνατότητα χαρακτηρισμού της βιωσιμότητας των κυττάρων που απομονώνονται από κάποιο δείγμα [(Díaz-Flores et al., 2015; Wang et al., 1992)].

Μία εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου είναι και η δοκιμή αντιγόνου στα ούρα (Urinary Antigen Test, UAT), με τη βοήθεια της οποίας γίνεται διάγνωση της νόσου των λεγεωναρίων στα ούρα ασθενών ή μη [(Peci et al., 2016)].

1.2.2.3 Καινοτόμες μέθοδοι

Όπως γίνεται αντιληπτό, καμία από τις προαναφερθείσες τεχνικές δεν κατάφερε να προσφέρει ουσιαστική πληροφορία, όσον αφορά το γενετικό περιεχόμενο των κυττάρων ή την ταξινομική τους ομάδα. Σε αυτό το πρόβλημα, έρχονται να δώσουν λύση νέες προσεγγίσεις στη μελέτη των μικροοργανισμών, η μεταγενωμική (metagenomics) μέσω της ανάλυσης του συλλογικού περιβαλλοντικού DNA όλων των μικροβιακών γονιδιωμάτων (metagenome) ενός δείγματος με αλληλούχηση τυχαίας προσπέλασης (shotgun sequencing) και η μεταταξινομική (metataxonomics), η οποία ορίζεται ως η μαζική ανάλυση των PCR-ενισχυμένων γενετικών τόπων (που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ταξινομικοί ραβδοκώδικες) των μικροοργανισμών ενός δείγματος με αλληλούχηση υψηλής απόδοσης. [(Carney, 2020; Marchesi & Ravel, 2015; Zhang et al., 2021)]. Με τη συμβολή αυτών καθίσταται δυνατή:

- a. η ανακάλυψη γενετικών πληροφοριών μικροοργανισμών που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν, όπως γονίδια μολυσματικότητας/βιοαντοχής, ενζυμικά συστήματα, μεταβολικά μονοπάτια κ.α.
- b. η ταξινόμησή τους σε ταξινομικά επίπεδα, φύλου έως και είδους
- c. η εύρεση νέων γονιδίων παθογονικότητας και η βελτίωση των διαγνωστικών τεστ και τέλος
- d. η ταχύτερη αντιμετώπιση πιθανών αναδυόμενων μολυσματικών ασθενειών με το γρηγορότερο εντοπισμό του στόχου των παθογόνων

Για την επίτευξη των παραπάνω, η μεταγενωμική αλληλούχηση τυχαίας προσπέλασης (ή shotgun sequencing metagenomics), όπως και ορίζεται, απαιτεί ολόκληρο το γονιδίωμα του μικροοργανισμού, ενώ η μεταταξινομική (ή amplicon sequencing metagenomics) έναν γενετικό τόπο, τον οποίο χρησιμοποιεί ως φυλογενετικό δείκτη (phylogenetic marker). Ειδικότερα, αξιοποιείται ως εργαλείο ταξινόμησης των μικροοργανισμών, όπως μέρος της 16S μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας για βακτήρια, καθώς περιέχει: 1) εξελικτικά υψηλά διατηρημένες περιοχές (conserved areas), κατάλληλες για σχεδιασμό εκκινητών PCR και 2) υπερμεταβλητές περιοχές (hypervariable regions), κατάλληλες για να διακρίνουν εξελικτικά διαφοροποιημένους μικροοργανισμούς. Άλλοι τέτοιοι δείκτες είναι το 18S rRNA για ευκαρυωτικά κύτταρα ή το ITS (internal transcribed region) για μύκητες [(Dunlap, 2001; Nam et al., 2023)]. Η αναγκαιότητα χρήσης αυτών των δεικτών φανερώνεται από τον ορισμό του είδους στην περίπτωση των ανώτερων οργανισμών, ενός αναπαραγωγικά απομονωμένου πληθυσμού ατόμων, ο οποίος αναπαράγεται ή μελλοντικά μπορεί να διασταυρωθεί και να δώσει γόνιμους απογόνους. Στα βακτήρια δεν μπορεί να εφαρμοστεί κάτι ανάλογο, δεδομένης της μη διασταυρούμενης αναπαραγωγής τους αλλά και της ελλείψεως διακριτών μορφολογικών χαρακτηριστικών. Αντ' αυτού, ο νεοεισαχθείς όρος 'φυλογενετικό είδος', ο οποίος ορίζεται ως μία ομάδα ατόμων για τα οποία η φυλογενετική ανάλυση έδειξε πως μοιράζονται μία γενεαλογική σχέση, φαίνεται να ικανοποιεί τους μικροβιολόγους [(Dunlap, 2001)].

Δεδομένων των δυσκολιών της ανάθεσης του προκαρυωτικού είδους, , κατά την ανάλυση των μεταταξινομικών μελετών χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι ομαδοποίησης των αλληλουχιών σε βιολογικές οντότητες ή γενετικές παραλλαγές, οι λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (Operational Taxonomic Units, OTUs) και οι παραλλαγές των

προϊόντων ενίσχυσης (Amplicon Sequence Variant, ASVs) [(Jeske & Gallert, 2022)]. Η πρώτη στηρίζεται στη θεώρηση πως σχετιζόμενοι/παρόμοιοι μικροοργανισμοί θα μοιράζονται παρόμοιες αλληλουχίες του γονιδίου σε ποσοστό που είναι καθορισμένο και καλείται ‘κατώφλι ομοιότητας’ (similarity threshold). Σύμφωνα με αυτό, οργανισμοί με >97% ομοιότητα προσεγγίζουν και συχνά ταξινομούνται (are assigned) στο ίδιο ‘είδος’, αυτοί με >95% στο ίδιο ‘γένος’ κι αυτοί με >80% στο ίδιο ‘φύλο’, όπου και συσταδοποιούνται (clustered) είτε de novo είτε με τη χρήση κάποιας βάσης αναφοράς [(Schloss & Handelsman, 2005; Zymo Research, 2020)]. Αντίθετα, τα ASVs είναι υποκατηγορία των OTUs με κάθε συστάδα (cluster) να περιλαμβάνει ακριβή αντίγραφα (100% ομοιότητα ή 0% διαφορά) αλληλουχιών, οι οποίες, σύμφωνα με την κυρίαρχη μέθοδο ανάλυσής τους, φιλτράρονται μέσω ενός μοντέλου αναγνώρισης λαθών για το αν είναι αποτέλεσμα σφάλματος ή όχι [(Callahan et al., 2016)].

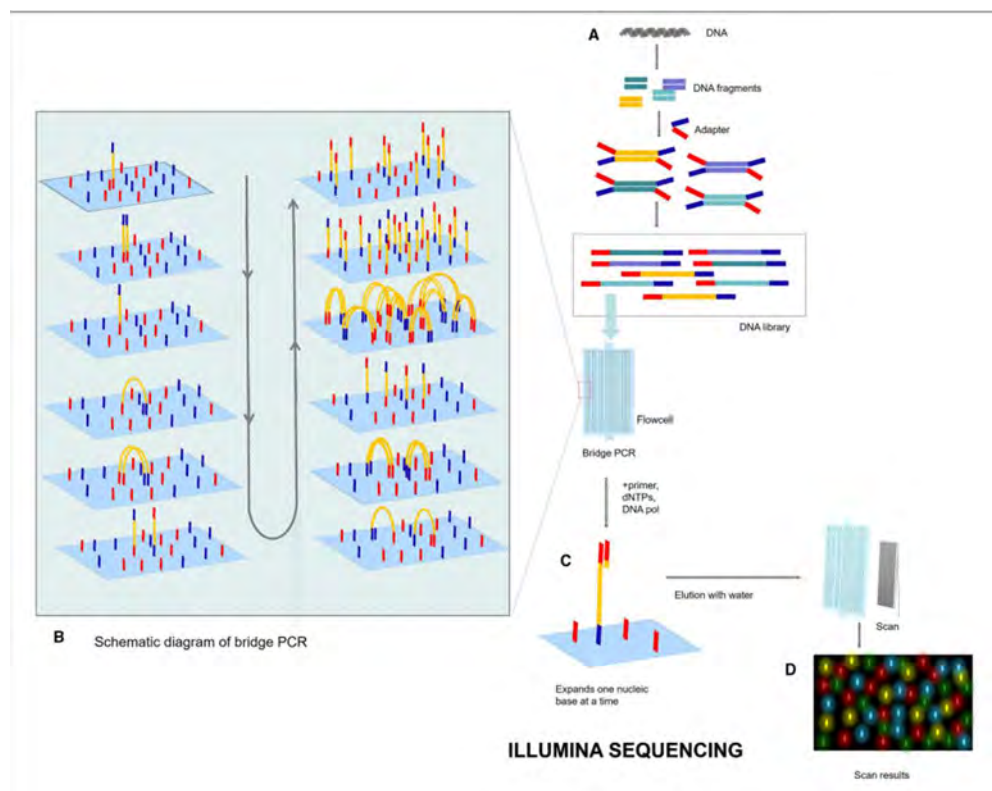
Η εφαρμογή των μελετών αυτών συνοψίζεται σε τρία κυρίως βήματα [(Thomas et al., 2012)]:

- i) τη δειγματοληψία, ακολουθούμενη συνήθως από πρωτόκολλα εξαγωγής DNA ή διήθησης σε υδάτινα δείγματα, τα οποία παρουσιάζουν μικρότερη αφθονία σε μικροοργανισμούς κι απαιτούνται μεγάλες ποσότητές τους καθώς και την ενίσχυση του φυλογενετικού δείκτη
- ii) την επιλογή κάποιας τεχνολογίας αλληλούχησης, όπως Sanger, PacBio, Nanopore, Ion Torrent και Illumina, εκ των οποίων η τελευταία είναι πιο συχνά χρησιμοποιούμενη, εξαιτίας του χαμηλού κόστους και επιτυχίας εφαρμογής της. Συγκεκριμένα:

- Αλληλούχηση 2^{ης} γενιάς (Illumina)

Η τεχνική αλληλούχησης Illumina ανήκει στις αποκαλούμενες 2^{ης} γενιάς και επιτρέπει την ταχεία, μαζική και υψηλής πιστότητας αλληλούχηση πολλαπλών τμημάτων DNA μέσω της τεχνικής ‘αλληλούχηση μέσω σύνθεσης’ (Sequencing-By-Synthesis, SBS) και της χρήσης αντίστροφων τερματιστών σημασμένων με φθοροφόρα (Εικόνα 12) [(Illumina Sequencing Technology, 2010)]. Της εκπομπής των σημάτων φθορισμού και ανίχνευσής των από τη συσκευή, προηγείται η κλωνική ενίσχυση γεφυρών (bridge amplification), η δημιουργία συστάδων κλωνικών αντιγράφων με χρήση αντίδρασης πολυμερισμού του DNA με τη βοήθεια ισοθερμικών πολυμερασών για να εξασφαλιστεί ισχυρό σήμα ανά συστάδα (προερχόμενη από ατομικό τμήμα DNA) στις μετέπειτα αντιδράσεις ανάγνωσης του DNA. Κατά την ανάγνωση του DNA συντίθεται ο συμπληρωματικός κλώνος κάθε τμήματος DNA με την προσθήκη μίας εκ των 4 βάσεων (κάθε διαφορετική βάση από αυτές φέρει διαφορετικό φθοροφόρο και τερματιστή) κατά συμπληρωματικό τρόπο, η αντίδραση τερματίζεται λόγω τερματιστή, οι φθοροφόροι διεγείρονται από φωτόνια, εκπέμπουν φθορισμό και καταγράφεται για κάθε μία από τις συστάδες από ανιχνευτές και ο κύκλος της αντίδρασης ολοκληρώνεται. Μετά το πέρας του, γίνεται έκπλυση των νουκλεοτιδίων, ενζυμική απομάκρυνση φθοροφόρων ουσιών και του καταστολέα ενσωμάτωσης (τερματιστή), προστίθενται νέα νουκλεοτίδια και αντιδραστήρια και προχωρά η αντίδραση στον επόμενο κύκλο. Τέλος, η Illumina προσφέρει και τη δυνατότητα πολυπλεξίας, δηλαδή τη δημιουργία βιβλιοθηκών από παράλληλη αλληλούχηση πολλαπλών αλληλουχιών,

προερχόμενων από διαφορετικά δείγματα με την κατάλληλη προσθήκη αλληλουχιών προσαρμοστών [(Hu et al., 2021; *Review on Illumina Sequencing Technology*, 2022)].



Εικόνα 12. Σύντομη περιγραφή της τεχνολογίας αλληλούχησης Illumina. Α) βιβλιοθήκη DNA. Σπάζεται το γονιδίωμα του DNA σε θραύσματα ή ενισχύονται στοχευμένα τμήματα DNA με PCR (όπως στην περίπτωση ανάλυσης μικροβιωμάτων με τη βοήθεια φυλογενετικών δεικτών), προστίθενται προσαρμοστές και στα δύο άκρα (είτε με αντίδραση λιγάσης ή με PCR) και κατασκευάζονται μονόκλωνες αλυσίδες, οι οποίες προστίθενται και προσκολλώνται σε πλακάκι αλληλούχησης (ή κυψέλη ροής). Β) Ακολουθεί κλωνική ενίσχυση κάθε αλυσίδας, η οποία δημιουργεί και τη δική της συστάδα σε ορισμένη θέση. Γ) Όπως αναφέρθηκε, εφαρμόζεται η τεχνική αλληλούχηση μέσω σύνθεσης (SBS), γι' αυτό προστίθενται τα απαραίτητα μέσα, πολυμεράση, εκκινητές και τέσσερις ομάδες δεοξυριβονουκλεοτιδίων με ορισμένο φθορισμό, τα οποία όταν προστίθενται στην αλυσίδα που αλληλουχείται εκπέμπουν ορισμένο χρώμα και σταματά η διαδικασία, γιατί περιέχουν μία ομάδα αζιδίου στο 3' άκρο που εμποδίζει την ενσωμάτωση επόμενης βάσης. Ακολουθεί ο επόμενος κύκλος μετά ξεπλύματος με νερό και προσθήκης νέων dNTPs. Δ) Παραγόμενο σήμα φθορισμού [(Zhang et al., 2021)].

- iii) Τη βιοπληροφορική ανάλυση, η οποία περιλαμβάνει τέσσερα στάδια [(Nam et al., 2023)]:
- Ποιοτικό έλεγχο αναγνώσεων (quality control of reads)
 - Συναρμολόγηση ή/και ανασυναρμολόγηση τμημάτων DNA (assembly/binning)
 - Ταξινομικό/λειτουργικό χαρακτηρισμό (taxonomic profiling)
 - Οπτικοποίηση δεδομένων

Η μεταγενωμική έχει να προσφέρει πολλά στους τομείς της βιοχημείας, βιοτεχνολογίας και μικροβιακής ποικιλότητας με τα μέσα που διαθέτει. Παρά ταύτα, όπως καμία θεραπεία δεν μπορεί να θεωρηθεί πανάκεια στην ιατρική. Έτσι και καμία μέθοδος στη μικροβιολογία δεν αντιμετωπίζει όλα τα προβλήματα. Π.χ. κατά την χρήση τέτοιων μεθόδων, 1) η οριζόντια μεταφορά μεταθετών γενετικών στοιχείων τα

οποία, εξεταζόμενα εκτός βιολογικού πλαισίου και έχοντας χαμηλό ή και καθόλου φυλογενετικό σήμα, δυσκολεύουν την κατάταξή τους σε μικροβιακά είδη, ή 2) η χαμηλή αφθονία ορισμένων ειδών στα περιβαλλοντικά και δη υδάτινα δείγματα, κάτω από τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου, όπως είναι οι λεγεωνέλλες, οδηγεί σε αδυναμία ικανότητας ανάλυσής τους σε τέτοιες μεθόδους αλληλούχησης τυχαίας προσπέλασης του ολικού περιβαλλοντικού DNA [(Nam et al., 2023; Zhang et al., 2021)]. Πιθανή εφαρμογή λύσεων, όπως ο εμπλουτισμός των δειγμάτων από κύτταρα του επιθυμητού πληθυσμού προς μελέτη και η συνεργασία με τις προαναφερθείσες τεχνικές, ιδίως της FISH ή της ανοσοκατακρήμνισης υπόσχεται σημαντικά αποτελέσματα, ιδίως για χρήση ως διαγνωστικό εργαλείο για το γενετικό περιεχόμενο περιβαλλοντικών δειγμάτων [(Estrela et al., 2021)].

1.3 Σκοπός της εργασίας

Μία από τις πιο μεγάλες απαιτήσεις της μεταγονιδιωματικής ανάλυσης είναι η αναγνώριση ολόκληρου του γενετικού περιεχομένου (χρωμοσωμικού και εξωχρωμοσωμικού DNA) των ταξινομικών κατηγοριών που μας ενδιαφέρουν. Οι μέθοδοι αλληλούχησης ενός κυττάρου (single-cell) μπορούν να δώσουν λύση σε αυτό το πρόβλημα, παρόλα αυτά είναι αρκετά κοστοβόρες (αρκετά περισσότερο από 10.000\$ ανά δείγμα για ανάλυση, με βάθος 1.000-1.200 κύτταρα). Στην παρούσα εργασία προτείνουμε μία εναλλακτική μέθοδο εμπλουτισμού περιβαλλοντικού δείγματος από έναν μόνο πληθυσμό κυττάρων, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να πραγματοποιηθεί μεταγενωμική ανάλυση πληθυσμών. Στόχος της παρούσης εργασίας, λοιπόν, ήταν η χρήση μοριακών μεθόδων για εύρεση και ποσοτικοποίηση του συγκεκριμένου πληθυσμού κυττάρων λεγεωνέλλας, η ανάπτυξη ανοσολογικής μεθόδου εμπλουτισμού της και η μοριακή ανάλυση της αφθονίας των πληθυσμών των μικροοργανισμών αυτών και της αφθονίας και ποικιλομορφίας των πληθυσμών των ολικών βακτηρίων στη λίμνη Κάρλα κατά την περίοδο του καλοκαιριού.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Εν ολίγοις, η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία με στόχο την πραγματοποίηση της μελέτης των πληθυσμών λεγεωνέλλας και την ανάπτυξη του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού και μεταταξινομικής ανάλυσής τους, περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- i) Επαναληπτικές δειγματοληψίες από υδάτινα περιβάλλοντα (ποταμού Πηνειού και λίμνης Κάρλα) κατά το μήνα Ιούνιο ανά χρονικά διαστήματα 1-2 εβδομάδων.
- ii) Κατάλληλη διαχείριση των δειγμάτων, ώστε να καθαρισθούν όσο το δυνατόν καλύτερα από μακρο-ύλη που θα δημιουργούσε προβλήματα σε ακόλουθα στάδια του πρωτοκόλλου.
- iii) Διήθηση των δειγμάτων, μέσω ειδικών φίλτρων, για απομόνωση βακτηρίων/μικροοργανισμών που υπάρχουν στο ληφθέν δείγμα.
- iv) Επεξεργασία των φίλτρων για συγκέντρωση των κυττάρων σε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα.
- v) Ταυτοποίηση βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Legionella* στα δείγματα με χρήση ειδικών εκκινητών και της τεχνικής PCR.
- vi) Έλεγχος και επιλογή θετικών δειγμάτων με τη χρήση πηκτώματος αгарόζης.
- vii) Ποσοτικοποίηση των κυττάρων στα θετικά δείγματα μέσω μεθόδου qPCR.
- viii) Δοκιμή της τεχνικής ανοσοκατακρήμνισης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Thermo Fischer Scientific.
- ix) Ενίσχυση γονιδίων λεγεωνέλλας μέσω ειδικών εκκινητών, με τη μέθοδο PCR.
- x) Έλεγχος των αποτελεσμάτων μέσω πηκτώματος αгарόζης.
- xi) Αλληλούχηση δειγμάτων με την τεχνική της Illumina.
- xii) Επιβεβαίωση αποτελεσμάτων μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης.

2.2 Υλικά

2.2.1 Στελέχη και θρεπτικά

Δύο βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες μας:

A) *Escherichia coli* (στέλεχος DH5a)

Χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά προς μετασχηματισμό και βιοτεχνολογικά βελτιστοποιημένα κύτταρα [με γονότυπο F-, Δ(argF-lac)169, φ80dlacZ58(M15), ΔrhoA8, glnX44(AS), deoR481, rfbC1, gyrA96(NalR), recA1, endA1, thiE1, hsdR17, λ⁻] [(Hanahan, 2016)] [(<https://cgsc2.biology.yale.edu/Strain.php?ID=150015>)], τα οποία φέρουν ορισμένες μεταλλάξεις οι οποίες καθιστούν επιθυμητή τη χρήση τους στο εργαστήριο. Συγκεκριμένα, η μετάλλαξη φ80dlacZ58(M15) επιτρέπει την επιλογή μπλε-άσπρων αποικιών, η recA1 αποτρέπει τον ομόλογο ανασυνδυασμό από τη ρεκομπινάση RecA, εξασφαλίζοντας τη σταθερότητα του ενθέματος κατά την κλωνοποίηση του πλασμιδιακού φορέα ενώ η endA1 αναστέλλει τη δράση της ενδονουκλεάσης EndA και έτσι ενισχύεται η απόδοση αντιγραφής του φορέα [(Selvarasu et al., 2009)].

Η προετοιμασία των κυττάρων, ώστε να καταστούν δεκτικά και βιοτεχνολογικά βελτιστοποιημένα, πραγματοποιήθηκε από μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος, τμήματος βιοχημείας και βιοτεχνολογίας, πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

B) *Legionella pneumophila* (serogroup 1 NCTC 11192) [Lot No: 472201]

Αξιοποιήθηκαν κύτταρα από την εταιρεία LGC easi-tab™ για καλλιέργεια, μελέτη και χρήση του μικροοργανισμού στην κατασκευή τυπικής καμπύλης στα πειράματα qPCR.

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε μας δόθηκε αδεία των υπευθύνων του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας του τμήματος ιατρικής, του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κυρίου Χρήστου Χατζηχριστοδούλου, δ/ντου του εργαστηρίου και Μαρίας Κυρίτση, επιμελητρίδας Β'.

Τα στελέχη αυτά καλλιεργήθηκαν στα εξής θρεπτικά μέσα, αντίστοιχα:

A) Luria Bertani Broth agar (NEOGEN Cat# NCM0088A)

Η καλλιέργεια έγινε με επώαση στους 37°C για 24h ή στον πάγκο, θερμοκρασία δωματίου για 3 μέρες. (<https://microbiologie-clinique.com/lb-broth.html>)

Πίνακας 5. Συστατικά για την προετοιμασία θρεπτικού LB agar.

Συστατικά	Gm/L
Πεπτόνη	10.0gm
Εκχύλισμα μαγιάς	5.0gm
Χλωριούχο νάτριο	5.0gm
Άγαρ	12.0gm

B) Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) άγαρ (Thermo Scientific Cat# PO5072A)

Θρεπτικό εκλεκτικό για είδη λεγεωνέλλας, των οποίων τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 5-10 μέρες. Η σύνθεσή του είναι η εξής: (<https://microbiologynote.com/el/bcye-agar-composition/>)

Πίνακας 6. Συστατικά για την προετοιμασία θρεπτικού BCYE.

Συστατικά	Gm/L
Εκχύλισμα ζύμης	10.0gm
ACES Buffer	10.0gm
Ενεργός άνθρακας	2.0gm
Υδροξείδιο του καλίου	2.8gm
Άλφα-κετογλουταρικό	1.0gm
L-κυστεΐνη	0.4gm
Πυροφωσφορικό σίδηρο	0.25gm
Άγαρ	12.0gm

2.2.2 Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω:

Πίνακας 7. Εκκινητές, αλληλουχίες και συνθήκες εφαρμογής τους κατά την πειραματική διαδικασία [(Barbosa et al., 2016; Collins et al., 2015; Liu et al., 2017; Qin et al., 2012)]

Εκκινητές	Αλληλουχία	Συνθήκες (PCR)
Γενικοί – ολικών βακτηρίων:		
338f	CCTACGGGAGGCAGCAG	Αποδιάταξη με θέρμανση στους 95°C για 3min, ακολουθούμενη από 35 κύκλους με την αποδιάταξη στους 95°C για 30s, τον υβριδισμό των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο στους 55°C για 30s και την επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA στους 72°C για 40s. Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10min.
518r [(Liu et al., 2017)]	ATTACGCGGCTGCTGG	
8f	CACGGATCCAGACTTTGATYMTGGCTCAG	Αποδιάταξη με θέρμανση στους 95°C για 3min, ακολουθούμενη από 35 κύκλους με την αποδιάταξη στους 95°C για 30s, τον υβριδισμό των εκκινητών με την αλληλουχία-στόχο στους 55°C για 30s και την επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας DNA στους 72°C για 90s. Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10min.
1512r [(Barbosa et al., 2016)]	GTGAAGCTTACGGYTAGCTTGTTACGAC	
Ειδικοί λεγεωνέλλας-		

1° ζεύγος:		
LEG-225	AAGATTAGCCTGCGTCCGAT	Αποδιάταξη στους 94°C για 5min, 30 κύκλοι με αποδιάταξη στους 94°C για 30s, τον υβριδισμό στους 56°C για 1min και επιμήκυνση στους 72°C για 40s. Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5min.
LEG-858 [(Qin et al., 2012)]	GTCAACTTATCGCGTTTGCT	
2° ζεύγος:		
L5SL9	ACTATAGCGATTGGAACCA	Αποδιάταξη στους 95°C για 5min, 40 κύκλοι με αποδιάταξη στους 95°C για 10s, τον υβριδισμό στους 60°C για 20s και επιμήκυνση στους 72°C για 40s. Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5min.
L5SR93 [(Qin et al., 2012)]	GCGATGACCTACTTTCGCAT	
3° ζεύγος:		
mipF	TTGTCTTATAGCATTGGTGCCG	Αποδιάταξη στους 95°C για 10min, 40 κύκλοι με αποδιάταξη στους 95°C για 15s, τον υβριδισμό στους 60°C για 1min και επιμήκυνση στους 72°C για 40s. Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 5min.
mipR [(Collins et al., 2015)]	CCAATTGAGCGCCACTCATAG	

Οι συνθήκες που ακολουθήθηκαν για τις αντιδράσεις της ποσοτικής PCR (qPCR) είναι, όπως αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα, εξαιρουμένης της τελικής επιμήκυνσης στους 72°C.

Για την πραγματοποίηση μίας αντίδρασης PCR χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα 8. Για περισσότερες αντιδράσεις, σε κάθε κύκλο, πολλαπλασιάσαμε, αναλόγως με τον επιθυμητό αριθμό, τις ποσότητές τους. Οι αντιδράσεις με όγκο 50 ή 100 μl ετοιμάζονταν γιατί θα επακολουθούσε εκχύλιση DNA, άρα και απαιτούνταν μεγάλες ποσότητες γενετικού υλικού.

Πίνακας 8. Αναλογίες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την PCR [Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA]

Reagent	1	1	1
H ₂ O	12.92	33.8	64.6
10Xbuffer A (contains MgCl 25mM)	2	5	10
dNTPs (200mM έκαστο)	0.4	1	2
Taq (5 U/μl)	0.08	0.2	0.4
Forward primer (10μM)	0.8	2	4
Reverse primer (10μM)	0.8	2	4
Template	2	5	10
BSA (10μg/μl)	1	1	5
Total volume (μl)	20	50	100

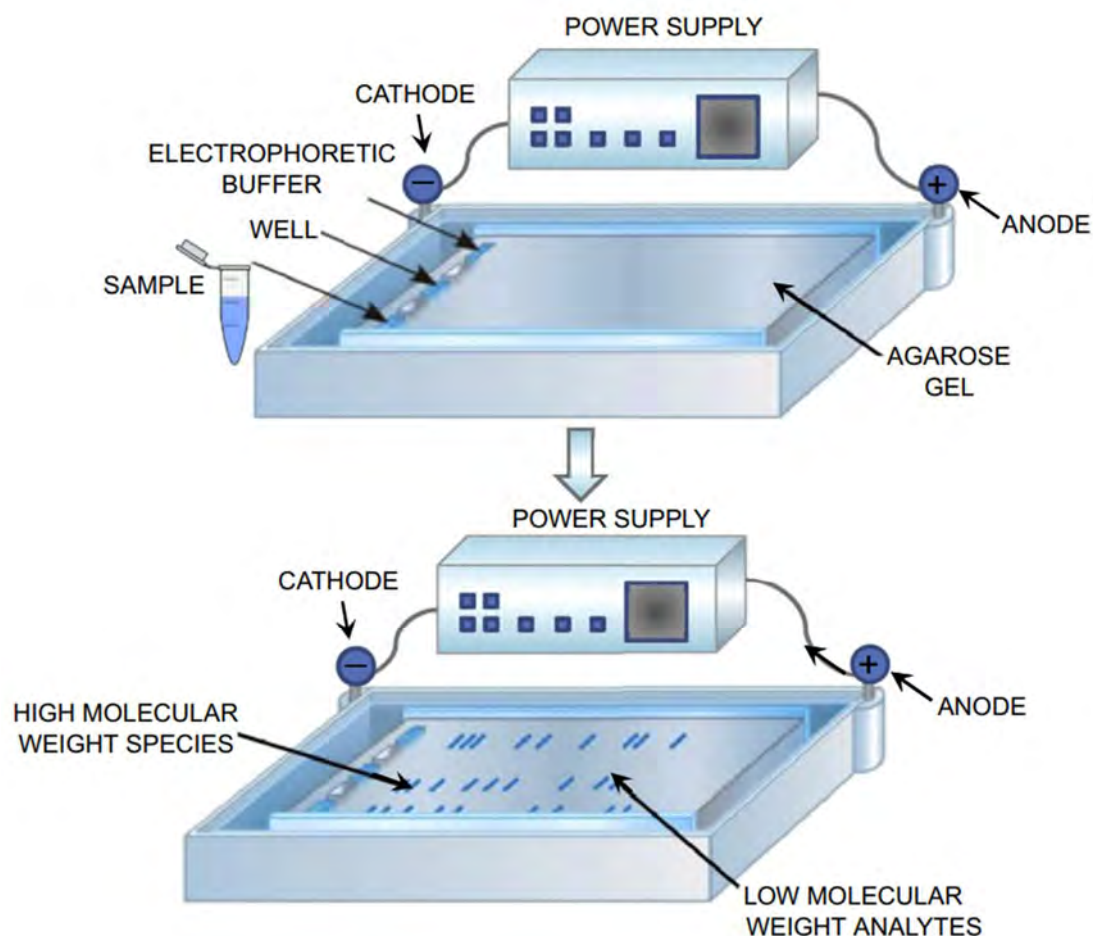
2.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα Αγαρόζης (Electrophoresis Agarose Gel)

Η ηλεκτροφόρηση με πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, χαρακτηρισμό και απομόνωση μορίων DNA ή RNA με βάση το μοριακό τους βάρος, το οποίο μπορεί να κυμαίνεται από 20bp-60kbp [(Φράγκου, 2012)]. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης που παράγεται από κόκκινη άλγη (φύκη) και κατά την προετοιμασία του πηκτώματος δημιουργεί πόρους από όπου περνούν τα μόρια DNA/RNA, ενώ ρεύμα διαπερνά το σύστημα με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δύο πόλοι, ένας αρνητικός κι ένας θετικός, κατευθύνοντας τα αρνητικά φορτισμένα μόρια από τον πρώτο στο δεύτερο [(Agarose Gel Preparation Protocol, 2018; Drabik et al., 2016)]. Η διαδικασία είχε ως εξής:

1. Σε μία κυλινδρική φιάλη τοποθετείται η επιθυμητή ποσότητα άγαρος που ζυγίστηκε. Η τελική συγκέντρωσή του κυμαίνεται στο 1.5% (αναλόγως και τα προϊόντα της PCR). Για προϊόντα μικρού μοριακού μεγέθους η συγκέντρωση μπορεί να είναι και 1%.
2. Ζυγίζεται και προστίθεται η επιθυμητή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος (1.0X TAE).
3. Θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η ποσότητα της σκόνης (για περίπου 1-1.5 λεπτό).
4. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), μετά τη μερική ψύξη του διαλύματος, λόγω πιθανής καρκινικής δράσης σε περίπτωση εισπνοής του και μερική ανακίνηση. Η συγκέντρωσή του είναι 1:10.000 (10μl σε 100mL).
5. Το διάλυμα προστίθεται σε κατάλληλο καλούπι, όπου έχουν τοποθετηθεί και τα ανάλογα πηγαδάκια.
6. Αφαιρούνται τυχόν φυσαλίδες με τη βοήθεια ενός ακροστομίου πιπέτας.
7. Κατά την αναμονή πλήρους ψύξης του, ετοιμάζονται τα δείγματα που πρόκειται να φορτωθούν στο πήκτωμα. Προστίθενται 5μl προϊόντος PCR και 1μl βαφής (συγκέντρωση 1/6). Για την εφαρμογή πρωτοκόλλου απομόνωσης (βλ. παρακάτω) μπορεί να προστεθεί κι όλη η παραχθείσα ποσότητα της αντίδρασης.
8. Φορτώνονται τα δείγματα και η κατάλληλη κλίμακα (100 bp ladder, <https://www.neb.com/en/products/n3231-100-bp-dna-ladder#Product%20Information>).
9. Ρύθμιση της τάσης (10 volts/cm πηκτώματος) (Εικόνα 13).

Τα μήκη των αλληλουχιών που εμφανίζονται ως ζώνες στην ηλεκτροφόρηση, για κάθε ένα από τα μελετώμενα γονίδια αναμένονται να είναι:

- 656 ζεύγη βάσεων για το γονίδιο *LEG* (*16S rRNA*)
- 104 ζεύγη βάσεων για το *LS* (*5S rRNA*) και
- 115 ζεύγη βάσεων για το *mip* (*macrophage infectivity potentiator*) (βλ. παράρτημα C)



Εικόνα 13. Σύστημα ηλεκτροφόρησης πηκτώματος αгарόζης. Παρατηρούμε τον παροχέα ενέργειας και το δίπολο που δημιουργείται, με τον αρνητικό πόλο (cathode) στα αριστερά όπου 'φορτώνονται' τα δείγματα (samples) στα πηγαδάκια (wells) και ξεκινούν την 'πορεία' προς το δεξιό θετικό πόλο (anode) ευρισκομένων μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer). [(Drabik et al., 2016)]

2.2.4 Kit Απομόνωσης DNA (DNA extraction)

Για την απομόνωση DNA από πηκτωμα αгарόζης χρησιμοποιήθηκε το *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit* (Macherey-Nagel, Düren, Nordrhein-Westfalen, Germany).

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτήρια E.coli του στελέχους DH5a χρησιμοποιήθηκε το *NucleoSpin® Plasmid isolation kit* (Macherey-Nagel, Düren, Nordrhein-Westfalen, Germany).

Για την απομόνωση DNA από φίλτρα διήθησης μετά τη συγκέντρωση κυττάρων από τα περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιήθηκε το *DNeasy® PowerSoil Pro Kit* (Qiagen, Hilden, Germany).

2.2.5 Διήθηση και διαλυτοποίηση κυττάρων

Για την πειραματική διαδικασία της διήθησης χρησιμοποιήθηκαν:

- a. Συσκευή *Elmasonic S30* (*Elma*, Watzikon, Switzerland) για την εφαρμογή των υπερήχων
- b. Φίλτρα *Whatman®* filter papers (*Whatman*, Maidstone, UK) (8μm) για την πρώτη διήθηση
- c. Φίλτρα *MF-Millipore™* Membrane Filter (*Merk Millipore*, Burlington, MA, USA), 0.22 μm pore size για τη δεύτερη διήθηση
- d. Ειδική ευρεσιτεχνία για τη μέθοδο ‘back-flash’ (βλ. παράρτημα Α)

2.2.6 Ανοσοκατακρήμνιση

Για την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκαν τα βιοτινυλιωμένα πολυκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν στελέχη του *Legionella pneumophila* (αρ. κατ. PA1-73142, Invitrogen – Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) σε συνδυασμό με τα μαγνητικά σφαιρίδια με επικάλυψη στρεπταβιδίνης *Magnisort™ Streptavidin Positive Selection Beads* (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.2.7 Ανάλυση ποικιλότητας στα περιβαλλοντικά δείγματα που εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο

Για τη βιοπληροφορική ανάλυση των δειγμάτων που αλληλουχήθηκαν με τη μέθοδο Illumina, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο DADA2, το οποίο εξάγει ASVs από δεδομένα αλληλούχησης υψηλής απόδοσης. Συγκεκριμένα, μέσω ενός αλγορίθμου, μοντελοποιεί τα λάθη που εισάγονται κατά τη διαδικασία της αλληλούχησης και χρησιμοποιεί αυτό το μοντέλο για να εξάγει την πραγματική σύσταση των δειγμάτων [(Callahan et al., 2016)].

2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Δειγματοληψία-Γενικό πρωτόκολλο

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 4 δειγματοληψίες στη λίμνη Κάρλα σε χρονικές περιόδους που απείχαν μεταξύ τους 1-2 εβδομάδες (βλ. παράρτημα D), εκ των οποίων προέκυψαν 12 δείγματα, τα οποία και αναλύθηκαν. Για τη διαδικασία αυτών δεν απαιτείται κάποια ειδική μέθοδος, παρά ασφάλεια υγιεινής, δηλαδή χρήση γαντιών μίας χρήσης και κατάλληλα μέσα συλλογής των περιβαλλοντικών υδάτινων δειγμάτων, όπως πλαστικά μπουκάλια 500mL, τα οποία έχουν απολυμανθεί προηγουμένως με σαπούνι και αποιονισμένο νερό.

Αρχικά, στα δείγματα έγινε επεξεργασία με διήθηση (βλ. μέθοδοι, διήθηση) και εξετάστηκε σε αυτά η ύπαρξη του βακτηρίου *L. pneumophila* με τη μέθοδο της PCR και στη συνέχεια της qPCR για ποσοτικοποίηση των κυττάρων. Όσα αποδείχθηκαν θετικά, υποβλήθηκαν σε περαιτέρω ανάλυση με βάση το πρωτόκολλο της ανοσοκατακρήμνισης. Τέλος, ενισχύθηκαν τα δείγματα με ειδικούς εκκινητές για την επίτευξη πολυπλεξίας και στάλθηκαν για αλληλούχηση και περαιτέρω βιοπληροφορική ανάλυση.

Παράλληλα με τα προαναφερθέντα δείγματα, δημιουργήθηκε και μία δεύτερη σειρά δειγμάτων τα οποία είχαν υποβληθεί σε περαιτέρω θερμική επεξεργασία στους 65°C για 30 min, δεδομένης της ενδοσυμβίωσης των κυττάρων σε πρώιμα ξενιστές (βλ. 1.1.2 *Legionella pneumophila* και 1.1.3 *Legionella* σε περιβαλλοντικά ύδατα), ώστε να επιχειρηθεί η απελευθέρωσή τους από το εσωτερικό των τελευταίων.

2.3.2 Διήθηση

Ως διήθηση καλούμε τη διαδικασία κατά την οποία στερεά σωματίδια απομακρύνονται από υγρά ή αέρια ρευστά με τη βοήθεια ενός μέσου διήθησης (φίλτρου), το οποίο επιτρέπει τη διέλευση του ρευστού αλλά όχι του στερεού μέσου [(Editors of Encyclopedia Britannica, 2023)]. Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει κάποιο κοινώς-αποδεκτό πρωτόκολλο, με βάση τη βιβλιογραφία, εξήχθη ως τεχνική χρησιμοποιούμενη σε μία γενικότερη μέθοδο [(El Boujnouni et al., 2022; Kim & Oh, 2019)]. Με βάση αυτές τις πληροφορίες αξιοποιήθηκαν αρκετές παραλλαγές, ακόμη και ευρεσιτεχνίες (βλ. παράρτημα A), καταλήγοντας στην εξής διαδικασία:

1. Επεξεργασία των δειγμάτων μέσω υπερήχων (37kHz) 4x15sec, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από φύκη, βιοκροκύδες κι άλλα στερεά και ταυτόχρονα να μην βλαφθούν, εξαιτίας της υψηλής συχνότητας.
2. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 25°C για 3 λεπτά στα 2000g για απομάκρυνση βαρέων συστατικών τους, όπως λάσπη, φύκη κ.α.
3. Διήθηση μέσω φίλτρων διαμέτρου 8μm, ώστε να απομακρυνθεί η μακρο-ύλη.
4. Διήθηση μέσω φίλτρων διαμέτρου 0.22μm, ώστε να συγκεντρωθούν τα κύτταρα.
5. 'Back-flash' για αποκόλληση των κυττάρων σε 1xPBS.

2.3.3 Κλωνοποίηση

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν, τα αντιδραστήρια και οι αναλογίες τους κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου φαίνονται παρακάτω:

➤ Πρώτο βήμα (ligation):

Πίνακας 9. Αναλογίες αντιδραστηρίων για την προετοιμασία αντίδρασης ligation.

Reagents	Quantity (μl)	
Στόχος	LEG	LS/mip
Ρυθμιστικό διάλυμα Buffer x2	5	5
Φορέας p-Gem	0.5	0.5
Λιγάση T4	1	1
Προϊόν PCR	1	0.2
H ₂ O	2.5	3.3
Συνολικός όγκος	10	10

➤ Δεύτερο βήμα-Μετασχηματισμός (transformation):

- Ρύθμιση του heatblock στους 42°C.
- Απόψυξη κυττάρων DH5a και μεταφορά 50μl σε 1.5mL eppendorf
- Προσθήκη επιθυμητής ποσότητας του μίγματος από το πρώτο βήμα (ligation mix), συνήθως 2μl
- Επώαση στον πάγο για 20 λεπτά
- Εφόσον έχει θερμανθεί το heatblock, πρόκληση θερμικού σοκ, ώστε να ανοίξουν πόροι στις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων (για 45-50 sec)
- Επανατοποθέτηση στον πάγο για 2 λεπτά
- Προσθήκη 450μl υγρού θρεπτικού (SOC medium)
- Επώαση στους 37°C στα 150rpm για 1.5 ώρα

➤ Τρίτο βήμα-Επιλογή μετασχηματισμένων βακτηρίων

Μετά την επώαση στους 37°C ακολουθεί η εξής διαδικασία σε στείρο περιβάλλον για τις υγρές καλλιέργειες που παρατηρήθηκε ανάπτυξη των βακτηρίων:

- Φυγοκέντρηση στα 4.000g για 1 λεπτό και επαναδιάλυση κυττάρων σε 50μl υγρού θρεπτικού (SOC medium)
- Προσθήκη 10μl IPTG (επαγωγέας έκφρασης β-γαλακτοσιδάσης) και 40μl X-gal στο θρεπτικό
- Προσθήκη των κυττάρων (η ποσότητα μοιράζεται σε 2-3 πιατάκια)
- Ασφαλίζουμε με τη χρήση parafilm
- Επώαση στους 37°C O/N

➤ Τέταρτο βήμα-Παρατήρηση χρώματος αποικιών και απομόνωση DNA

Μετά την επώαση, επιλέχθηκαν οι λευκές αποικίες για κάθε ένα από τα 3 γονίδια που μελετήθηκαν (βλ. παράρτημα Β) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο

απομόνωσης DNA από πλασμίδια (βλ. υλικά, kit απομόνωσης DNA). Στη συνέχεια, στάλθηκαν για αλληλούχηση Sanger, ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των γονιδίων (βλ. παράρτημα C) και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή τους με τη βοήθεια του Qubit. Τέλος, υπολογίστηκαν τα αντίγραφα του γονιδίου στο δείγμα, μέσω της ιστοσελίδας ‘<https://www.technologynetworks.com/tn/tools/copynumbercalculator>’ και ετοιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις για την τυπική καμπύλη (από 10^9 έως 10^2).

2.3.4 Ανοσοκατακρήμνιση

Η τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος εμπλουτισμού των δειγμάτων μας με βακτήρια του γένους *Legionella* απαραλλάκτως, όπως περιγράφεται στο εγχειρίδιο που παρέχεται από τον προμηθευτή (βλ. υλικά και μέθοδοι, πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης και παράρτημα G).

2.3.5 Ανάλυση ποικιλότητας οργανισμών

Τα βήματα της μεθοδολογίας που ακολουθείται στο πακέτο DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm) είναι η εξής [(Callahan et al., 2016, 2023)]:

- Διήθηση (filtering) και ‘ψαλίδισμα’ (trimming) των αλληλουχιών βάσει ποιοτικών χαρακτηριστικών. Συγκεκριμένα, προηγείται της επεξεργασίας τους η ποιοτική αποτίμηση ανά βάση για πρόσθια (forward) και ανάστροφα (reverse) αναγνώσματα, η οποία μεταφράζεται σε τιμές Phred Q και αντικατοπτρίζουν την πιθανότητα λάθους ανά βάση, σύμφωνα με τον τύπο $Q = -10\log_{10}P$. Στη συνέχεια, τμήματα DNA που χαρακτηρίζονται με ποιότητα ίσης ή χαμηλότερης του επιτρεπτού ορίου αφαιρούνται.
- Προσμέτρηση αντιγράφων (dereplication), στο οποίο γίνεται εξαγωγή και αντιστοίχιση κάθε ξεχωριστής αλληλουχίας με την αφθονία με την οποία εμφανίζεται, το οποίο μειώνει τον υπολογιστικό χρόνο εργασίας.
- Εντολή dada, η οποία καταγράφει και διορθώνει συστηματικά λάθη της Illumina και απομακρύνει σπάνιες αλληλουχίες, οι οποίες καταγράφονται ως πιθανά σφάλματα.
- Συναρμολόγηση αναγνωσμάτων που προέρχονται από το ίδιο προϊόν ενίσχυσης (merging of paired-end reads), δηλαδή των πρόσθιων και ανάστροφων αναγνωσμάτων, μετά την οποία σχηματίζονται οι πίνακες των ASVs και
- Αναγνώριση χιμαιρικών δομών (chimera identification), η οποία επιτυγχάνεται με τον αλγόριθμο Uchime και απομακρύνονται από τις ακολουθίες των ASVs.

Οι πίνακες που προέκυψαν αναλύθηκαν ως προς τη σύστασή τους σε μικροβιακές ταξινομικές ομάδες βάσει της βάσης δεδομένων αναφοράς Silva v138 [(Quast et al., 2012; Yilmaz et al., 2014)].

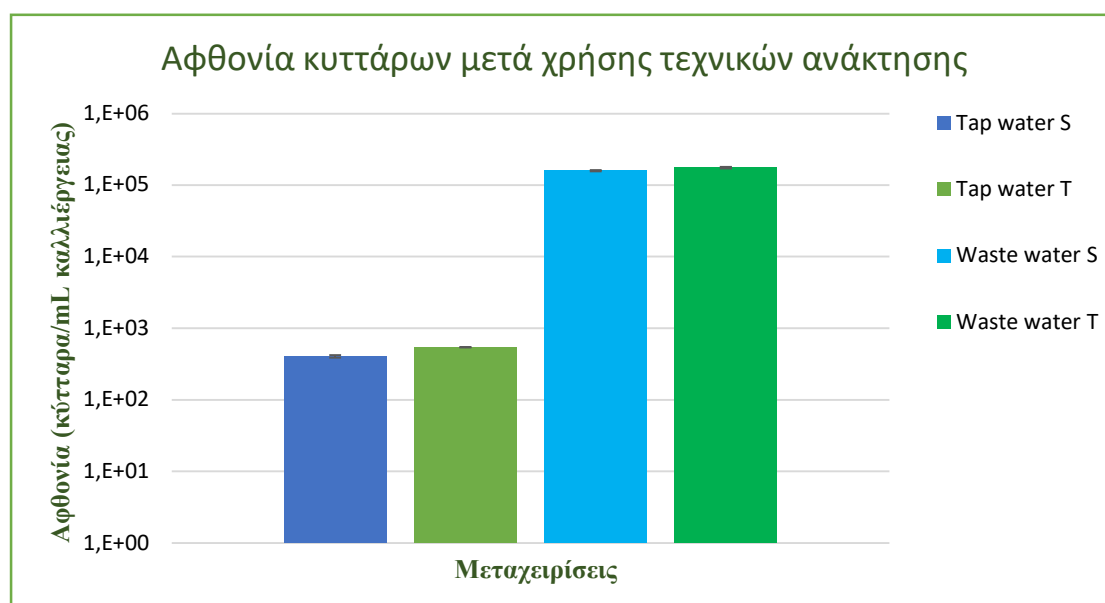
3. Αποτελέσματα

Όπως προαναφέρθηκε, στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε απόπειρα ανάπτυξης πρωτοκόλλου μελέτης των *Legionella* spp και *L. pneumophila* σε περιβαλλοντικά δείγματα με καινοτόμα μέθοδο μοριακής περιβαλλοντικής επιδημιολογίας. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον εμπλουτισμό των μικροοργανισμών αυτών με διήθηση και ανοσοκατακρήμνιση. Παρόλο που η μέθοδος διήθησης προς συγκέντρωση των κυττάρων έδωσε καλά αποτελέσματα, δυστυχώς κατά τη δοκιμή της ανοσοκατακρήμνισης διαπιστώθηκε εκτεταμένη επιμόλυνση στους αρνητικούς μάρτυρες και, τελικά εγκαταλείφθηκε η περαιτέρω προσπάθεια ενώ τα σχετικά αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται στο κείμενο της παρούσας εργασίας. Ο δεύτερος στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη των πληθυσμών των μικροοργανισμών αυτών ως προς την αφθονία τους στη λίμνη Κάρλα, όπως και η αφθονία και η ποικιλομορφία των ολικών βακτηρίων στα σχετικά δείγματα. Τα αποτελέσματα, πέραν αυτών της ανοσοκατακρήμνισης παρουσιάζονται παρακάτω.

3.1 Τελικό πρωτόκολλο

3.1.1 Τεχνικής Διήθησης

Κατά την τεχνική της διήθησης, με βάση και τη βιβλιογραφία, υπήρχαν δύο πιθανά πρωτόκολλα αποκόλλησης/ανάκτησης των κυττάρων μετά το πέρασμα από τα φίλτρα των 0.22μm (βλ. μέθοδοι, διήθηση, βήμα 4), η χρήση υπερήχων (sonication, S) ή με ελαφρό χτύπημα του δακτύλου στο φίλτρο (tapping, T). Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, πειραματικός έλεγχος για να εξεταστεί αν οι δύο μεταχειρίσεις είχαν κάποια σημαντική διαφορά στην ανάκτηση των δύο διαφορετικών πληθυσμών κυττάρων *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν για την αποτίμηση της μεθόδου σε βακτήρια. Η μεν ‘tap water’ αντικατοπτρίζει το βακτηριακό φορτίο στο πόσιμο νερό βρυσών (χαμηλή συγκέντρωση), η δε ‘waste water’ στα λύματα (υψηλή συγκέντρωση). Όπως αναδεικνύεται από το διάγραμμα δεν υπήρχε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των τεχνικών.



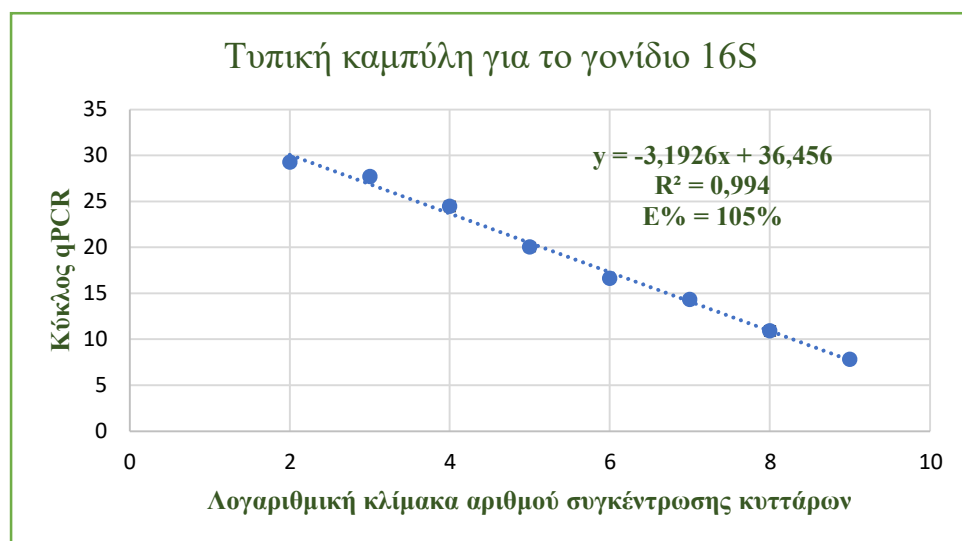
Εικόνα 14. Διάγραμμα αφθονίας κυττάρων, τα οποία ανακτήθηκαν από τα φίλτρα αφότου ολοκληρώθηκε η διαδικασία της διήθησης και μετά την επεξεργασία με δύο διαφορετικές τεχνικές, μέσω υπερήχων και 'tapping', και σύγκριση των τελευταίων. Η πειραματική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε δεν ανέδειξε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο, γι' αυτό επιλέχθηκε και η πιο εύκολη και άμεση τεχνική, αυτή του 'tapping'.

3.2 Ποσοτικής PCR (qPCR)

Οι αντιδράσεις της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, οι οποίες είχαν αποδεκτά όρια τιμών R^2 και απόδοσης ($E\%$) χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων ποσοτικοποίησης κυττάρων ολικών βακτηρίων ή αποκλειστικά λεγεωνέλλας στα περιβαλλοντικά δείγματα, ενώ σχεδιάστηκαν και τα κατάλληλα διαγράμματα για τη σύγκριση αυτών μεταξύ των διαφορετικών δειγματοληψιών. Συγκεκριμένα, όπως προαναφέρθηκε, ελέγχθηκαν 3 γονίδια των οποίων οι λεπτομέρειες ακολουθούν:

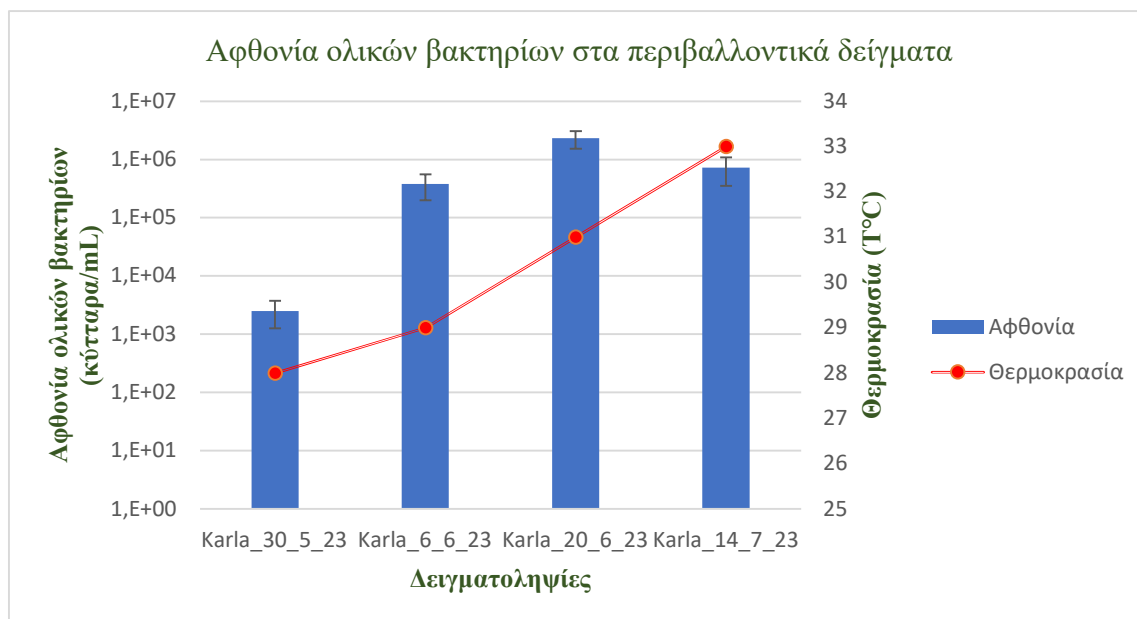
➤ Γονίδιο 16S rRNA (ολικών βακτηρίων)

Οι αντιδράσεις με γνωστή συγκέντρωση ολικών βακτηρίων (χρησιμοποιήθηκαν ως standards) απέδωσαν την παρακάτω τυπική καμπύλη:



Εικόνα 15. Διάγραμμα τυπικής καμπύλης για το γονίδιο 16S rRNA ολικών βακτηρίων. Οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 10^9 - 10^2 , παράλληλα τα R^2 και $E\%$ είναι στα αποδεκτά όρια.

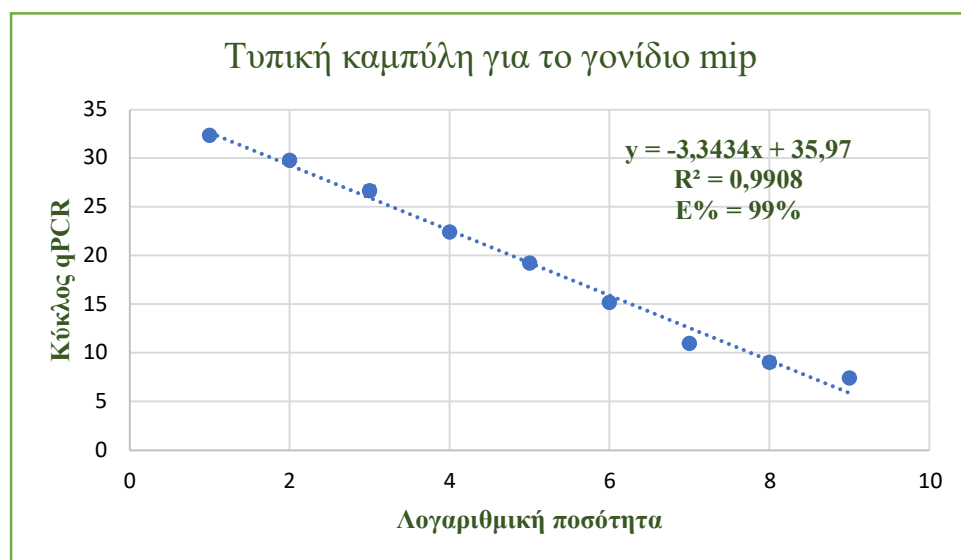
Ομοίως, από τα περιβαλλοντικά δείγματα προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα, στο οποίο απεικονίζεται η αφθονία των δειγμάτων σε βακτήρια (εκφραζόμενη ως μέσος όρος αριθμού κυττάρων ανά δειγματοληπτική περίοδο) σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος τις μέρες των δειγματοληψιών.



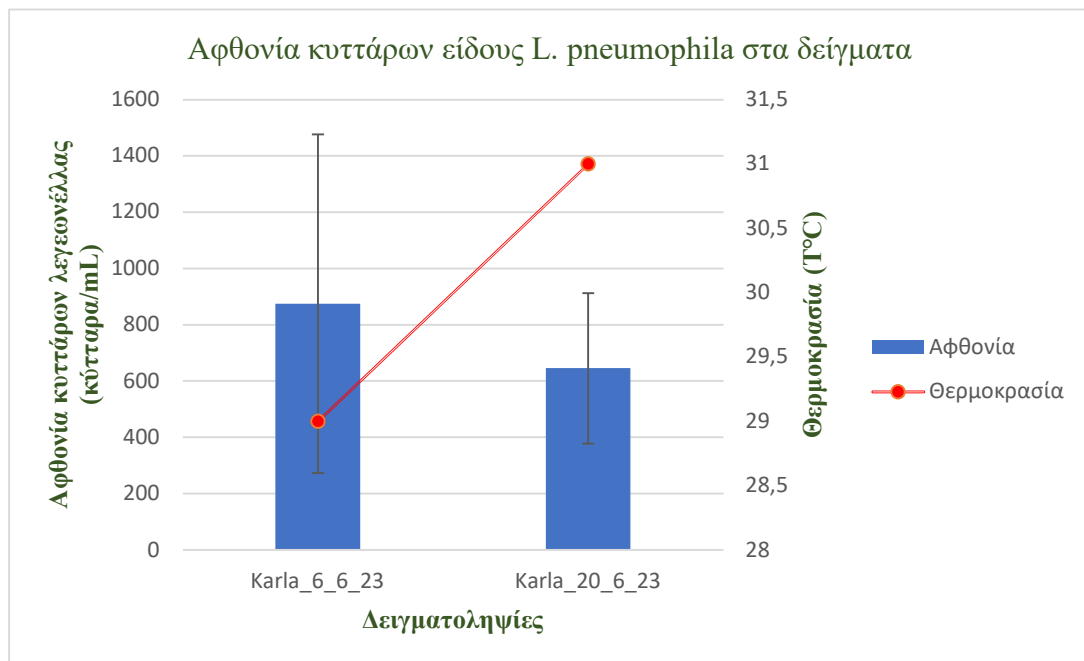
Εικόνα 16. Ραβδόγραμμα μέσων όρων αφθονίας κυττάρων ολικών βακτηρίων, εξαγόμενων από τα περιβαλλοντικά δείγματα που εξετάστηκαν σε συνάρτηση με τις μέσες θερμοκρασίες του περιβάλλοντος των ημερομηνιών των δειγματοληψιών.

➤ Γονίδιο *mip* (για το είδος *L. pneumophila*)

Οι αντιδράσεις με γνωστή συγκέντρωση κυττάρων λεγεωνέλλας (χρησιμοποιήθηκαν ως standards) απέδωσαν την παρακάτω τυπική καμπύλη:



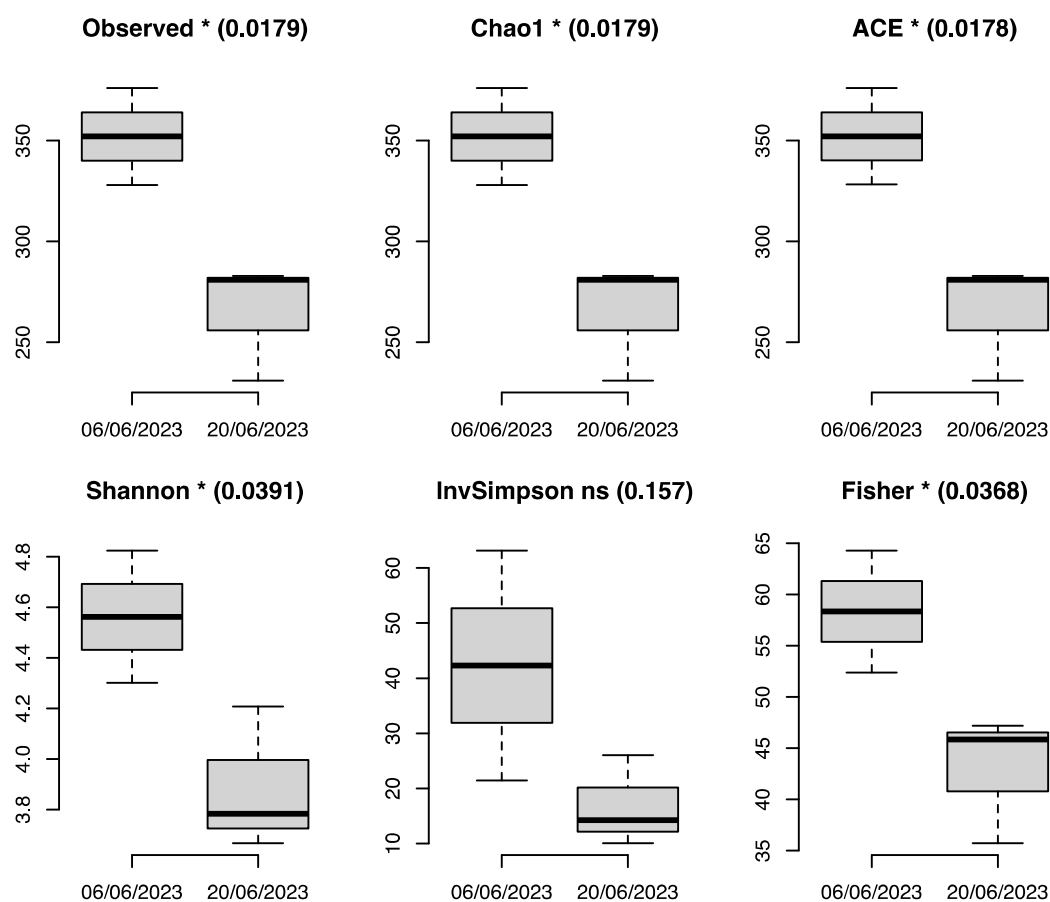
Εικόνα 17. Διάγραμμα τυπικής καμπύλης για το γονίδιο *mip* λεγεωνελλών. Οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται μεταξύ 10^9 - 10^1 , παράλληλα τα R^2 και $E\%$ είναι στα αποδεκτά όρια.



Εικόνα 18. Ραβδόγραμμα μέσων όρων αφθονίας κυττάρων είδους *L. pneumophila*, εξαγόμενων από τα περιβαλλοντικά δείγματα που εξετάστηκαν και αποδείχθηκαν θετικά στην ύπαρξη λεγεωνελλών (μέσω PCR και πηκτώματος αναρόζης, βλ. παράρτημα F) σε συνάρτηση με τις μέσες θερμοκρασίες του περιβάλλοντος των ημερομηνιών των δειγματοληψιών.

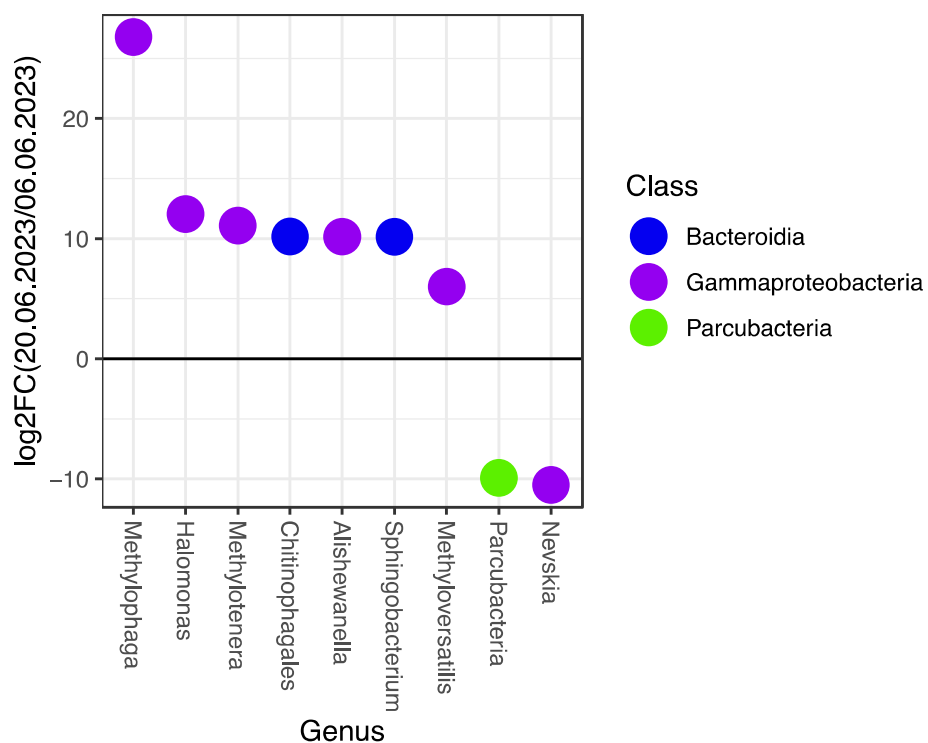
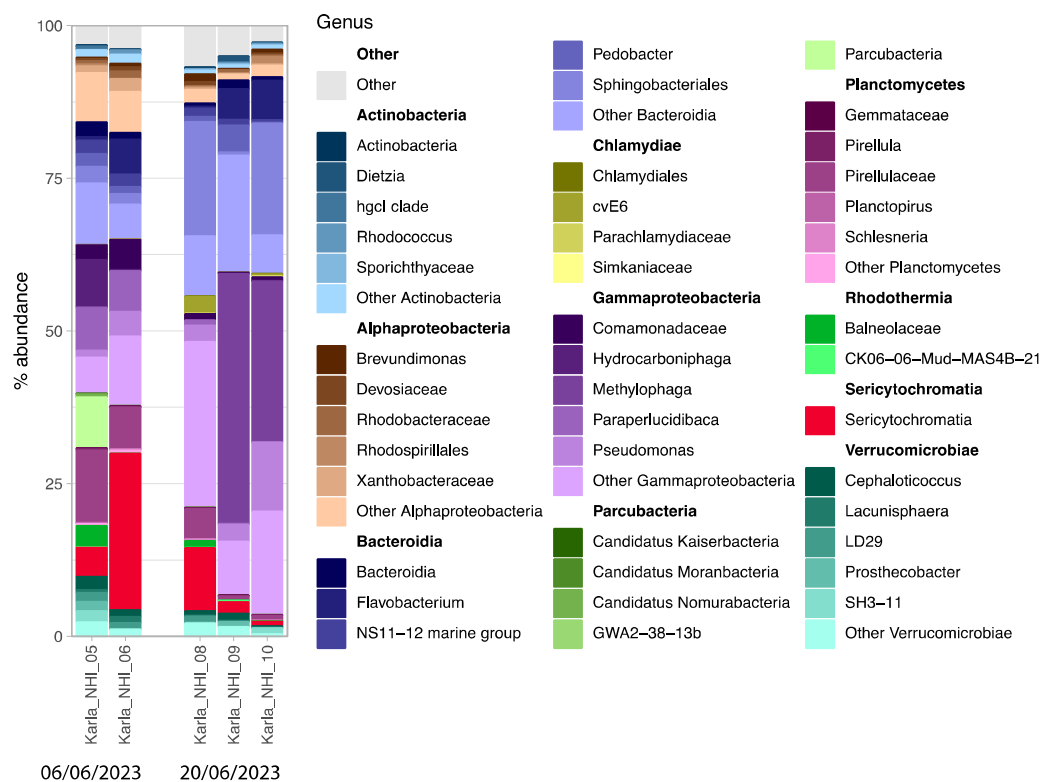
3.3 Ανάλυσης ποικιλότητας

Το χρονοεξαρτώμενο μοτίβο ήταν εμφανές και στη μικροβιακή ποικιλομορφία της λίμνης Κάρλα. Πιο συγκεκριμένα η ποικιλομορφία τύπου α έδειξε πτώση με το πέρασμα του χρόνου κατά τον ίδιο τρόπο σε όλους τους δείκτες της (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Θηκογραφήματα δεικτών ποικιλομορφίας τύπου α: (Observed) παρατηρούμενος πλούτος, (Chao1) εκτιμώμενος πλούτος, (ACE) εκτιμώμενος πλούτος, Shannon) δείκτης ποικιλομορφίας χαμηλής κυριαρχίας, (InvSimpson) δείκτης ποικιλομορφίας ενδιάμεσης κυριαρχίας, (Fisher) δείκτης ποικιλομορφίας υψηλής κυριαρχίας. Εντός παρένθεσης παρατίθενται και οι τιμές P των δοκιμών Student's t. Επιπρόσθετα σημαντικές διαφορές αναδεικνύονται με το σύμβολο «*».

Αντιστοίχως, και η σύσταση των δειγμάτων έδειξε χρονοεξάρτηση (Εικόνα 20). Π.χ. η ομοταξία *Sericytochromatia* έδειξε μερική αύξηση ακολουθούμενη από πτώση στη σχετική αφθονία τους και εκτοπισμό τους από τους *Bacteroidetes* και τα γ -*Proteobacteria*. Πιο συγκεκριμένα, τα γένη *Sphingobacterium*, *Methylophaga*, *Halomonas*, *Methylothena*, *Chitinophagales*, *Alishewanella*, *Methyloversatilis* των δύο ομοταξιών αντίστοιχα, έδειξαν αυξητικές τάσεις προς το τέλος της περιόδου δειγματοληψίας, σε αντίθεση με τα γένη *Nevskia* και *Parcubacteria* των ομοταξιών γ -*Proteobacteria* και *Parcubacteria* αντίστοιχα, τα οποία εμφάνισαν φθίνουσες τάσεις.



Εικόνα 20. Στοιβαγμένο ραβδόγραμμα των σχετικών αφθονιών των μικροοργανισμών των δειγμάτων (πάνω) και διάγραμμα τύπου MA (δυσδικός λογάριθμος του λόγου των αφθονιών στις 20/6/2023 προς τις αφθονίες στις 6/6/2023) για τα στατιστικά σημαντικά ($\alpha = 0.01$) διαφορετικά γένη ως προς την αφθονία τους μεταξύ των δειγματοληψιών. Δείγματα: Karla NHI 05-10: v/vi/viii/ix/x, χρονοσειρών 06/06/23-20/06/23.

4. Συζήτηση και συμπερασματικά σχόλια

Στην παρούσα εργασία στοχεύαμε τόσο στην ανάπτυξη πρωτοκόλλου εμπλουτισμού των πληθυσμών *Legionella* spp. και *L. pneumophila*, αλλά και της μοριακής ανάλυσης της αφθονίας των πληθυσμών των μικροοργανισμών αυτών και της αφθονίας και ποικιλομορφίας των πληθυσμών των ολικών βακτηρίων στη λίμνη Κάρλα κατά την περίοδο του καλοκαιρού.

4.1 Αποτελεσματικότητα μεθόδων

Όπως προαναφέρθηκε, οι μέθοδοί μας ήταν επιτυχείς ως προς τη συγκέντρωση των κυττάρων μέσω διήθησης, την απελευθέρωση των κυττάρων λεγεωνέλλας από τους ευκαρυωτικούς ξενιστές τους, την ποσοτικοποίηση των διαφόρων ομάδων λεγεωνέλλας που στοχεύθηκαν και την ανάλυση της ποικιλομορφίας του φυλογενετικού δείκτη ολικών προκαρυωτών, του γονιδίου 16S rRNA, κατά τα ακόλουθα.

Αφότου πραγματοποιήθηκε η λήψη των προς μελέτη περιβαλλοντικών δειγμάτων και η διαδικασία καθαριότητάς τους ακολούθησε:

- Απομόνωση κυττάρων

Διήθηση μέσω φίλτρων, ικανών να συγκρατήσουν τα βακτήρια που στοχεύουμε να μελετήσουμε και συγκέντρωσή τους σε αρκετά χαμηλότερο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος (όπως 1,5mL) για ευκολότερη μελέτη τους με την ‘ανάπτυξη’ ειδικής ευρεσιτεχνίας.

- ✓ Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήσαμε φίλτρα 0,22μm, ιδανικά για κύτταρα λεγεωνέλλας διαμέτρου 2-20μm, ενώ η διατήρηση των κυττάρων μας σε εναιώρημα PBS ρυθμιστικού δ/τος 1,5mL ήταν αρκετά πρακτικό. Επιπλέον, σύμφωνα με τα δεδομένα μας η τεχνική ‘tapping’, για το ‘back-flash’ μετά τη διήθηση, αποδείχτηκε αποτελεσματική και εύκολη, γιατί δεν υπάρχει ανάγκη κάποιας συσκευής αποκόλλησης κυττάρων.
- Δοκιμασίες (q)PCR και μεταχειρίσεις

Επιβεβαίωση ύπαρξης και υπολογισμός αφθονίας των επιθυμητών βακτηρίων με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών, όσο το δυνατόν πιο εξειδικευμένων στο γένος ή είδος ιδανικότερα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε δοκιμή μεταχείρισης των δειγμάτων, όπως θέρμανση ή χλωρίωση, η λεγεωνέλλα είναι γνωστός ενδοσυμβιώτης των πρωτίστων, άρα συνίσταται να χρησιμοποιηθεί κάποιο μέσο απελευθέρωσής τους.

- ✓ Στην περίπτωση μας, οι εκκινητές είχαν όλοι επιβεβαιωθεί για την εξειδίκευσή τους από τη βιβλιογραφία και δοκιμαστεί στο εργαστήριό μας με θετικά δείγματα λεγεωνέλλας. Ειδικότερα, στο στάδιο αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές για το γονίδιο 16S rRNA του γένους *Legionella* (LEG, βλ. παράρτημα F) κατά την PCR, καθώς βρίσκονται σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, άρα αυξάναμε την πιθανότητα θετικού αποτελέσματος, και παράλληλα τα υδάτινα δείγματα δυσχέραιναν τον εντοπισμό τους, ενώ οι εκκινητές για τα γονίδια *mip* είδους *L. pneumophila* και 16S ολικών βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των θετικών δειγμάτων. Η θερμική

μεταχείριση που δοκιμάστηκε δεν αποδείχθηκε αποτελεσματική, πιθανόν λόγω λανθασμένης εφαρμογής, καθώς υπάρχει πληθώρα αναφορών που φανερώνει το αντίθετο (βλ. παράρτημα Ι) [(Cervero-Aragó et al., 2014; Chang et al., 2009; Dietersdorfer et al., 2016; Storey et al., 2004)].

- Αλληλούχηση και βιοπληροφορική ανάλυση

Το πρωτόκολλο ολοκληρώνεται με την εφαρμογή αλληλούχησης Illumina των προϊόντων PCR με εκκινητές 515f/806r προς ενίσχυση των ολικών βακτηρίων, είτε απ' ευθείας σε περιβαλλοντικά δείγματα DNA, είτε σε DNA μετά από εμπλουτισμό με ανοσοκατακρήμνιση ακολουθούμενη από βιοπληροφορική ανάλυση.

- ✓ Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Illumina, ως η πιο φθηνή και αξιόπιστη μέθοδος αλληλούχησης σύμφωνα με την μεγάλη εμπειρία του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος.

4.2 Παρουσία των *Legionella* spp. και *L. pneumophila* στη λίμνη Κάρλα

Η λίμνη Κάρλα έχει προσελκύσει το επιδημιολογικό ενδιαφέρον αρκετών ερευνητών τα τελευταία χρόνια. Η θεματολογία των σχετικών ερευνητικών εργασιών περιλαμβάνει την αντιβιοαντοχή των μικροοργανισμών της λίμνης [(Anagnostopoulos et al., 2022)], είδη κυανοβακτηρίων που σχετίζονται με τον ευτροφισμό της λίμνης [(Papadimitriou et al., 2021)], τις τοξικές μικροκυστίνες που παράγονται από κυανοβακτήρια της λίμνης κατά τα φαινόμενα ευτροφισμού [(Oikonomou et al., 2012; Petrou et al., 2020)] και άλλα. Βασικό λόγο για τον οποίο παρουσιάζεται αυτό το έντονο ενδιαφέρον αποτελεί, πέρα από ένα ιδιόμορφο ιστορικά τεχνητό οικοσύστημα [(Trakala et al., 2023)], και υδατικό πυλώνα της γεωργίας μίας περιοχής με αρκετά μεγάλες απαιτήσεις σε άρδευση, του Θεσσαλικού κάμπου, που υποφέρει κατά τους θερινούς μήνες από λειψυδρία [(Papanastasiou et al., 2023)]. Επιπρόσθετα, οι πλημμύρες του Σεπτεμβρίου του 2023 άλλαξαν άρδην τα προσωρινά όρια της λίμνης σύμφωνα με το σύστημα Copernicus EMS Risk & Recovery Mapping [(e-GEOS, ITHACA, 2024)], της σειράς προγραμμάτων παρακολούθησης πλημμυρικών φαινομένων Sentinel & Landsat [(DeVries et al., 2020)]. Οδήγησαν έτσι σε επιδημιολογικές ανησυχίες, κυρίως λόγω της ανάμειξης των ομβρίων υδάτων με διαφόρων ειδών λυμάτων, συμπεριλαμβανομένων σηπτικών προϊόντων ζωικής προέλευσης [(www.aftodioikisi.gr, 11.02.2024)]. Παρόλη τη σημασία της λίμνης για το γεωργικό και οικολογικό γίνεσθαι της Θεσσαλίας, κατά τη γνώση μας, δεν υπάρχει προηγούμενη καταγραφή του φορτίου της σε *Legionella*, με εξαίρεση πρόσφατης διπλωματικής που αφορά τη σχετική αφθονία τους στο πλαίσιο των ολικών βακτηρίων σε πεπτικούς σωλήνες ψαριών [(Τζιόγκα, 2018)].

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήσαμε δειγματοληψίες την περίοδο περί τα τέλη της άνοιξης (30/5/2023) ως και τα μέσα καλοκαιριού (14/7/2023) (βλ. Παράρτημα D). Τα αποτελέσματα έδειξαν μία θερμοκρασιακά εξαρτώμενη αύξηση των ολικών βακτηρίων, με βέλτιστη περιβαλλοντική θερμοκρασία τους 31 °C. Το φαινόμενο της

εποχικής αύξησης της μικροβιακής βιομάζας σε λιμναία οικοσυστήματα είναι συχνά παρατηρούμενο με τη βέλτιστη θερμοκρασία να κυμαίνεται γύρω στους 30 °C [(Kritzberg & Bååth, 2022)]. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών της *Legionella* spp και της *L. pneumophila* ειδικότερα, έδειξε να μην επηρεάζεται κατά τον ίδιο τρόπο όπως τα ολικά βακτήρια και να ακολουθεί μία πιο σταθερή κατανομή κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης. Δυστυχώς η ανάλυση με ειδικούς εκκινητές, λόγω χρονικών περιορισμών, δεν πραγματοποιήθηκε για την τελευταία δειγματοληψία, ενώ, επιπροσθέτως, το εύρος των δειγματοληψιών δεν αντιστοιχούσε σε μεγάλο εποχικό εύρος. Εργασίες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχέτιση της θερμοκρασίας με τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της λεγεωνέλλωσης σε ένα περιβάλλον που υπόκειται στην κλιματική αλλαγή [(Han, 2021)]. Από την άλλη, δεδομένης της συμβιωτικής σχέσης των βακτηρίων της *Legionella* με πρώτιστα προκειμένου να εξασφαλιστεί η αναπαραγωγή των βακτηρίων αυτών, ο πολλαπλασιασμός τους εξαρτάται από το φυσιολογικό εύρος των ξενιστών τους. Συνεπώς, σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, η πρόγνωση των επιδημιολογικών χαρακτηριστικών των βακτηρίων *Legionella* σε ένα δυναμικό περιβάλλον όπως αυτό της λίμνης Κάρλα δεν αποτελεί εύκολο έργο.

4.3 Σχόλια για την ανάλυση ποικιλότητας

Τα δεδομένα που προήλθαν από την ανάλυση ποικιλότητας ανέδειξαν κυριαρχία βακτηρίων των ομοταξιών *Gammaproteobacteria*, *Sericytochromatia* και του φύλου *Bacteroidia* ενώ σε μικρότερο ποσοστό υπήρχαν και τα *Alphaproteobacteria*, *Planctomycetes*, *Chlamydiae* και *Verrucomicrobiae*, γεγονός λογικό, αφού όλες οι προαναφερόμενες ομάδες συναντώνται σε υδάτινα οικοσυστήματα, όπως η λίμνη Κάρλα [(Mandal, n.d.; Yu et al., 2019)]. Ειδικότερα, με την πάροδο του χρόνου, παρατηρούμε αύξηση της αφθονίας των *Bacteroidia* και *Gammaproteobacteria*, ιδιαιτέρως των γενών *Sphingobacterium*, *Chitinophagales*, *Methylophaga*, *Halomonas*, *Methylothermus*, *Alishewanella* και *Methyloversatilis* σε αντίθεση με τη μειούμενη αφθονία των υπολοίπων, *Parcubacteria* και *Nevskia*. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, κάθε μία παρουσιάζει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, αν και παραμένουν ορισμένες ελλειπώς μελετημένες. Στα *Bacteroidia* ανήκουν Gram αρνητικά βακτήρια, εμφανίζουν στενή σχέση με ξενιστές ζώων και ανθρώπων, με τους οποίους λειτουργούν συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά, φαίνεται να επιτελούν σημαντικό ρόλο στην αποδόμηση σύνθετων πολυμερών και παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στα τέλη άνοιξης-αρχές καλοκαιριού εξαρτώμενα από την 'άνθηση των κυανοβακτηρίων' και ύπαρξης οργανικής ύλης [(R. J. Newton et al., 2011; Pan et al., 2023)]. Το *Sphingobacterium* εμφανίζει χημειοτακτισμό προς φωσφορικά και νιτρικά, παρομοίως με τα *Chitinophagales*, τα οποία έχουν και τη δυνατότητα αποδόμησης πολυμερών όπως κυτταρίνης ή οργανικών υποστρωμάτων [(Betiku et al., 2021; Dennis et al., 2013)]. Τα *Gammaproteobacteria* εντοπίζονται σε γλυκά νερά, αν και θεωρούνται μεταδιδόμενα από ανθρωπογενείς ή ζωονοσογόνες πηγές, καθώς αρέσκονται σε αλμυρά κυρίως περιβάλλοντα (π.χ. ωκεανοί) [(W. Liu et al., 2018; R. J. Newton et al., 2011)]. Βακτήρια της ομοταξίας αυτής (*Methylophaga*, *Halomonas*, *Methylothermus*, *Alishewanella*, *Methyloversatilis*, *Nevskia*) χαρακτηρίζονται ως Gram αρνητικά, μεθυλότροφα (διασπούν ενώσεις με ένα άτομο C), αλοαλκαλόφιλα (αναπτύσσονται σε αλατούχα και ουδέτερα προς αλκαλικά περιβάλλοντα) και απονιτροποιητές (παραγωγή αζώτου (N_2) με την βοήθεια ενδιάμεσων ενώσεων ως δεκτών ηλεκτρονίων, όπως τα

νιτρώδη ιόντα (NO_2^-)), συμβάλλοντας στον κύκλο του αζώτου, ενώ παρουσιάζουν και ικανότητα διάσπασης οργανικής ύλης [(Boltianskaya et al., 2007; Cui et al., 2019; Doronina et al., 2014; Idomeh et al., 2021; Kalyuzhnaya et al., 2012; Leandro et al., 2012; W. Liu et al., 2016; Mustakhimov et al., 2013; Sisinthy et al., 2017; Smalley et al., 2015; Tarhriz et al., 2012)]. Τα *Sericytochromatia* είναι Gram αρνητικά μη φωτοσυνθετικά, αν και αδελφός κλάδος των κυανοβακτηρίων, των οποίων οι λειτουργικός, περιβαλλοντικός και μεταβολικός ρόλοι δεν είναι πλήρως γνωστοί [(Monchamp et al., 2019; Nwosu et al., 2021)]. Τέλος, βακτήρια του γένους *Parcubacteria* φαίνεται να επιτελούν συνεργιστικά με άλλα γένη βακτηρίων (πχ *Chitinophagales*) διαδικασίες, όπως απονιτροποίηση, αναγωγή θείου και διάσπαση ενώσεων βενζολίου και προτιμούν αναερόβιες κυρίως συνθήκες [(Fujii et al., 2022; Nelson & Stegen, 2015)].

Παράλληλα, το φαινόμενο του ευτροφισμού (υπερσυσσώρευση θρεπτικών σε ένα υδάτινο περιβάλλον), το οποίο είναι σε έξαρση ήδη από τον 20^ο αιώνα [(Bonsdorff, 2021)], έχει προκαλέσει αύξηση οργανικής ύλης στα υδάτινα περιβάλλοντα, όπως οι λίμνες, εξαιτίας αποικοδόμησης άλγεων, υδρόβιων φυτών και του ανθρώπινου παράγοντα με αποτέλεσμα τη μείωση του διαθέσιμου οξυγόνου στο νερό, λόγω των μικροβιακών διεργασιών διάσπασής της και την αύξηση θρεπτικών στοιχείων, όπως ο φώσφορος ή ιόντων, όπως τα νιτρώδη [(Coulier, 2021; S. Wang et al., 2020; Xu et al., 2023)]. Ταυτόχρονα, η συνέχιση της διάσπασης, λόγω υπερβολικά μεγάλων ποσοτήτων οργανικής ύλης, πραγματοποιείται αναερόβια, με αποτέλεσμα την έκλυση επικίνδυνων για το φαινόμενο του θερμοκηπίου αερίων (CO_2 και CH_4) [(The Global Methane Budget 2000-2017 (2020), 2020)].

Σύμφωνα με πρόσφατες δημοσιεύσεις που αφορούν μελέτες στη λίμνη Κάρλα [(Anagnostopoulos et al., 2022; Chamoglou et al., 2014)], το φαινόμενο του ευτροφισμού 'οργιάζει' και τα αποτελέσματά του είναι εμφανή. Όπως αναλύθηκε, η αύξηση μικροοργανισμών που καταναλώνουν οργανική ύλη σχετίζεται με φαινόμενα ευτροφισμού και χαμηλού υδάτινου οξυγόνου, γεγονός που αποδεικνύεται κι από την αύξηση μικροοργανισμών που σχετίζονται με αναερόβιες διεργασίες (όπως η απονιτροποίηση). Με την εκπόνηση αυτής της εργασίας προσπαθήσαμε να προσφέρουμε ένα επιπλέον επίπεδο κατανόησης της οικολογικής διαδοχής και σχετικών μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα σε περιπτώσεις πλημμυρών, όπως η πρόσφατη. Εν ολίγοις, όλοι αυτοί οι μηχανισμοί που σχετίζονται με αναερόβιες συνθήκες οδηγούν και στην παραγωγή παραπροϊόντων και επικίνδυνων για το φαινόμενο του θερμοκηπίου αερίων, τα οποία ανατροφοδοτούν και εντείνουν τέτοιου είδους φαινόμενα.

5. Μελλοντική εργασία

Όπως είναι αναμενόμενο τα στενά χρονικά πλαίσια μίας πτυχιακής εργασίας αλλά και η αρχική απειρία που χαρακτηρίζει το φοιτητή, δεν επιτρέπει την επίτευξη μίας ολοκληρωμένης ερευνητικής εργασίας. Η προσπάθεια κατοχύρωσης ενός πρωτοκόλλου για τη γενωμική μελέτη πληθυσμών βακτηρίων (population genomics protocol) κατέστη αξιόλογη και αρκετά απαιτητική, αφήνοντας ανεξερεύνητα σημαντικά και ίσως καθοριστικά κομμάτια για το μέλλον της εργασίας, ενώ αναπάντητα παραμένουν ερωτήματα που αναμένουν να διαλευκανθούν. Συνοπτικά παρουσιάζουμε όσα εκκρεμούν:

- ❖ Δοκιμή και εύρεση τρόπων μεταχείρισης των περιβαλλοντικών δειγμάτων για τον αποτελεσματικότερο εμπλουτισμό πληθυσμών επιθυμητών κυττάρων, όπως η θέρμανση/χλωρίωση/διακύμανση pH, τα οποία δεν εξετάσαμε.
- ❖ Περαιτέρω διερεύνηση του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού του DNA μετά την ανοσοκατακρήμνιση.
- ❖ Συλλογική βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου εμπλουτισμού της *Legionella*.
- ❖ Μελέτη των πληθυσμών *Legionella* στη λίμνη Κάρλα σε μεγαλύτερο εύρος συνθηκών και σε περισσότερους δειγματοληπτικούς σταθμούς ιδιαίτερα μετά τα λυπηρά γεγονότα των πλημμυρών της περιοχής.
- ❖ Μελέτη των πληθυσμών *Legionella* σε συνδυασμό με τους πληθυσμούς πρωτίστων της λίμνης Κάρλα.

6. Βιβλιογραφία

- Abu Kwaik, Y., Gao, L.-Y., Stone, B. J., Venkataraman, C., & Harb, O. S. (1998). Invasion of Protozoa by *Legionella pneumophila* and Its Role in Bacterial Ecology and Pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3127–3133.
<https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3127-3133.1998>
- Agarose Gel Preparation Protocol*. (2018).
- Amann, R. I., Krumholz, L., & Stahl, D. A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 762–770.
<https://doi.org/10.1128/jb.172.2.762-770.1990>
- Anagnostopoulos, D. A., Parlapani, F. F., Natoudi, S., Syropoulou, F., Kyritsi, M., Vergos, I., Hadjichristodoulou, C., Kagalou, I., & Boziaris, I. S. (2022). Bacterial Communities and Antibiotic Resistance of Potential Pathogens Involved in Food Safety and Public Health in Fish and Water of Lake Karla, Thessaly, Greece. *Pathogens*, 11(12), 1473.
<https://doi.org/10.3390/pathogens11121473>
- Asif, A., Mohsin, H., Tanvir, R., & Rehman, Y. (2017). Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2169. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02169>
- Atlas, R. M. (1999). *Legionella*: From environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology*, 1(4), 283–293.
<https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00046.x>
- Azinheiro, S., Roumani, F., Costa-Ribeiro, A., Prado, M., & Garrido-Maestu, A. (2022). Application of MinION sequencing as a tool for the rapid detection and characterization of *Listeria monocytogenes* in smoked salmon. *Frontiers in Microbiology*, 13, 931810. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.931810>

- Barbosa, M. S., Todorov, S. D., Ivanova, I. V., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona, H., Chobert, J.-M., Haertlé, T., & Franco, B. D. G. M. (2016). Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami. *Food Control*, 60, 103–112.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.029>
- Betiku, O. C., Sarjeant, K. C., Ngatia, L. W., Aghimien, M. O., Odewumi, C. O., & Latinwo, L. M. (2021). Evaluation of microbial diversity of three recreational water bodies using 16S rRNA metagenomic approach. *Science of The Total Environment*, 771, 144773.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144773>
- Bilodeau, S. (2022, June 20). *The qPCR Standard Curve: The Key to Good qPCR Data*. BiteSizeBio: Wisdom and Tools for Bioscientists.
<https://bitesizebio.com/31470/obligate-qpcr-standard-curve/>
- Boczek, L. A., Tang, M., Formal, C., Lytle, D., & Ryu, H. (2021). Comparison of two culture methods for the enumeration of *Legionella pneumophila* from potable water samples. *Journal of Water and Health*, 19(3), 468–477.
<https://doi.org/10.2166/wh.2021.051>
- Boltysanskaya, Yu. V., Kevbrin, V. V., Lysenko, A. M., Kolganova, T. V., Tourova, T. P., Osipov, G. A., & Zhilina, T. N. (2007). *Halomonas mongoliensis* sp. Nov. And *Halomonas kenyensis* sp. Nov., new haloalkaliphilic denitrifiers capable of N₂O reduction, isolated from soda lakes. *Microbiology*, 76(6), 739–747.
<https://doi.org/10.1134/S0026261707060148>
- Bonsdorff, E. (2021). *Eutrophication: Early warning signals, ecosystem-level and societal responses, and ways forward*.
- Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M., & Messi, P. (2005). Water ecology of *Legionella* and protozoan: Environmental and public health perspectives. In

Biotechnology Annual Review (Vol. 11, pp. 355–380). Elsevier.

[https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11011-4](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11011-4)

Callahan, B., McMurdie, P., & Holmes, S. (2023, October 24). Introduction to dada2.

Bioconductor.

<https://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/dada2/inst/doc/dada2-intro.html>

Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., & Holmes, S. (2016). *DADA2*:

High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nature Methods(13), 581–583. <https://doi.org/doi:10.1038/nmeth.3869>.

Carney, S. M. (2020). *Developing Metagenomic Methods for Legionella Detection* (p. 375).

National Heart & Lung Institute, Imperial College London & Public Health England; pdf. <https://spiral.imperial.ac.uk/handle/10044/1/92078>

Center for Disease Control and Prevention (CDC). (2021). *Legionella: History, Burden and Trends*. <https://www.cdc.gov/legionella/about/history.html>

Cervero-Aragó, S., Sommer, R., & Araujo, R. M. (2014). Effect of UV irradiation (253.7 nm) on free *Legionella* and *Legionella* associated with its amoebae hosts. *Water Research*, 67, 299–309. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.023>

Chamoglou, M., Papadimitriou, T., & Kagalou, I. (2014). Key-Descriptors for the Functioning of a Mediterranean Reservoir: The Case of the New Lake Karla-Greece. *Environmental Processes*, 1(2), 127–135. <https://doi.org/10.1007/s40710-014-0011-0>

Chang, C.-W., Kao, C.-H., & Liu, Y.-F. (2009). Heterogeneity in chlorine susceptibility for *Legionella pneumophila* released from *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 97–105. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03980.x>

- Collins, S., Jorgensen, F., Willis, C., & Walker, J. (2015). Real-time PCR to supplement gold-standard culture-based detection of *Legionella* in environmental samples. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 1158–1169. <https://doi.org/10.1111/jam.12911>
- Coulier, A. (2021). *Multiscale Modeling in Systems Biology: Methods and Perspectives* (Vol. 2051). Acta Universitatis Upsaliensis. <https://doi.org/10.33063/diva-442412>
- Cui, Y., Chun, S.-J., Cho, A.-R., Wong, S. K., Lee, H.-G., Oh, H.-M., & Ahn, C.-Y. (2019). Nevskia lacus sp. Nov., a gammaproteobacterium isolated from a eutrophic lake. *Antonie van Leeuwenhoek*, 112(5), 723–729. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1206-6>
- Dennis, P. G., Seymour, J., Kumbun, K., & Tyson, G. W. (2013). Diverse populations of lake water bacteria exhibit chemotaxis towards inorganic nutrients. *The ISME Journal*, 7(8), 1661–1664. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.47>
- DeVries, B., Huang, C., Armston, J., Huang, W., Jones, J. W., & Lang, M. W. (2020). Rapid and robust monitoring of flood events using Sentinel-1 and Landsat data on the Google Earth Engine. *Remote Sensing of Environment*, 240, 111664. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2020.111664>
- Díaz-Flores, Á., Montero, J. C., Castro, F. J., Alejandres, E. M., Bayón, C., Solís, I., Fernández-Lafuente, R., & Rodríguez, G. (2015). Comparing methods of determining *Legionella* spp. in complex water matrices. *BMC Microbiology*, 15(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0423-7>
- Dietersdorfer, E., Cervero-Aragó, S., Sommer, R., Kirschner, A. K., & Walochnik, J. (2016). Optimized methods for *Legionella pneumophila* release from its *Acanthamoeba* hosts. *BMC Microbiology*, 16(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0691-x>
- Doronina, N. V., Kaparullina, E. N., & Trotsenko, Y. A. (2014). *Methyloversatilis* thermotolerans sp. Nov., a novel thermotolerant facultative methylotroph isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_1), 158–164. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.055046-0>

- Doutereelo, I., Boxall, J. B., Deines, P., Sekar, R., Fish, K. E., & Biggs, C. A. (2014). Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. *Water Research*, 65, 134–156.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.008>
- Drabik, A., Bodzoń-Kuśakowska, A., & Silberring, J. (2016). Gel Electrophoresis. In *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry* (pp. 115–143). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63688-1.00007-0>
- Dunlap, P. V. (2001). Microbial Diversity. In *Encyclopedia of Biodiversity* (pp. 280–291). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00435-4>
- Dutra, A. (2023, December 19). *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)*.
<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Fluorescence-In-Situ-Hybridization>
- Eble, D., Gehrig, V., Schubert-Ullrich, P., Köppel, R., & Fuchsli, H. P. (2021). Comparison of the culture method with multiplex PCR for the confirmation of *Legionella* spp. And *Legionella pneumophila*. *Journal of Applied Microbiology*, 131(5), 2600–2609.
<https://doi.org/10.1111/jam.15103>
- Editors of Encyclopedia Britannica. (2023). Filtration. In *Britannica*.
<https://www.britannica.com/science/filtration-chemistry/Filter-types>
- e-GEOS, ITHACA. (2024). *TECHNICAL REPORT EMSN184: Flood in Thessaly Region, Greece* (p. 22).
- El Boujnouni, H., Nait Balla, K., Belkadi, B., & Rahouti, M. (2022). Comparison between the recovery rate of three concentration protocols of water samples intended for analysis by Molecular Biology: Membrane filtration, filtration on gauze pad and centrifugation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(3), 1592–1597.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.004>

- Estrela, S., Sánchez, Á., & Rebolleda-Gómez, M. (2021). Multi-Replicated Enrichment Communities as a Model System in Microbial Ecology. *Frontiers in Microbiology*, 12, 657467. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.657467>
- European Center for Disease prevention and Control (ECDC). (2011). *Legionella in the environment*. <https://legionnaires.ecdc.europa.eu/?pid=102>
- Feeley, J. C., Gorman, G. W., Weaver, R. E., Mackel, D. C., & Smith', H. W. (1978). Primary Isolation Media for Legionnaires Disease Bacterium. *J. CLIN. MICROBIOL.*, 8.
- Fields, B. S., Shotts, E. B., Feeley, J. C., Gorman, G. W., & Martin, W. T. (1984). Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(3), 467–471. <https://doi.org/10.1128/aem.47.3.467-471.1984>
- Forghani, F., Li, S., Zhang, S., Mann, D. A., Deng, X., Den Bakker, H. C., & Diez-Gonzalez, F. (2020). *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in Wheat Flour: Detection and Serotyping by a Quasimetagenomic Approach Assisted by Magnetic Capture, Multiple-Displacement Amplification, and Real-Time Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(13), e00097-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00097-20>
- Fujii, N., Kuroda, K., Narihiro, T., Aoi, Y., Ozaki, N., Ohashi, A., & Kindaichi, T. (2022). Metabolic Potential of the Superphylum *Patescibacteria* Reconstructed from Activated Sludge Samples from a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Microbes and Environments*, 37(3), n/a. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME22012>
- Gonçalves, I. G., Simões, L. C., & Simões, M. (2021). *Legionella pneumophila*. *Trends in Microbiology*, 29(9), 860–861. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.04.005>
- Graham, F. F., Finn, N., White, P., Hales, S., & Baker, M. G. (2022). Global Perspective of *Legionella* Infection in Community-Acquired Pneumonia: A Systematic Review and

- Meta-Analysis of Observational Studies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3), 1907. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031907>
- Gray, N. D., & Head, I. M. (2008). Microbial Ecology. In *Encyclopedia of Ecology* (pp. 2357–2368). Sven Erik Jørgensen, Brian D. Fath. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00519-X>
- Greaves, P. W. (1980). New methods for the isolation of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Pathology*, 33(6), 581–584. <https://doi.org/10.1136/jcp.33.6.581>
- Han, X. Y. (2021). Effects of climate changes and road exposure on the rapidly rising legionellosis incidence rates in the United States. *PLOS ONE*, 16(4), e0250364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250364>
- Hanahan, D. (2016). *Strain DH5a*. UCSF School of Medicine. <https://cgsc2.biology.yale.edu/Strain.php?ID=150015>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Hyeon, J.-Y., Mann, D. A., Townsend, A. M., & Deng, X. (2018). Quasi-metagenomic Analysis of *Salmonella* from Food and Environmental Samples. *Journal of Visualized Experiments*, 140, 58612. <https://doi.org/10.3791/58612>
- Idomeh, J. E., Shittu, O. B., Oyedepo, J. A., Bada, B. S., Balogun, S. A., Idomeh, F. A., & Ezenweani, R. S. (2021). Petroleum Hydrocarbon Impacted Aquatic Ecosystem Reveals *Methylothermobacter* as the Dominant Genera in the Niger Delta Region of Nigeria. *Geomicrobiology Journal*, 38(10), 879–894. <https://doi.org/10.1080/01490451.2021.1973614>
- Illumina Sequencing Technology*. (2010).

- Jeske, J. T., & Gallert, C. (2022). Microbiome Analysis via OTU and ASV-Based Pipelines—A Comparative Interpretation of Ecological Data in WWTP Systems. *Bioengineering*, 9(4), 146. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9040146>
- Johnny Denenea. (2023). *The History of Legiannaires' Disease*.
<https://thelegionnaireslawyer.com/history-legionnaires-disease/>
- Kalyuzhnaya, M. G., Beck, D. A. C., Vorobev, A., Smalley, N., Kunkel, D. D., Lidstrom, M. E., & Chistoserdova, L. (2012). Novel methylotrophic isolates from lake sediment, description of *Methylotenera versatilis* sp. Nov. And emended description of the genus *Methylotenera*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(1), 106–111. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.029165-0>
- Kalyuzhnaya, M. G., Zabinsky, R., Bowerman, S., Baker, D. R., Lidstrom, M. E., & Chistoserdova, L. (2006). Fluorescence In Situ Hybridization-Flow Cytometry-Cell Sorting-Based Method for Separation and Enrichment of Type I and Type II Methanotroph Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4293–4301. <https://doi.org/10.1128/AEM.00161-06>
- Kaunitz, J. D. (2015). The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(8), 2230–2231. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3747-0>
- Khan Academy. (2008). Overview: DNA cloning. In *AP/College Biology: Vol. Biotechnology*.
<https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/overview-dna-cloning>
- Khodr, A., Kay, E., Gomez-Valero, L., Ginevra, C., Doublet, P., Buchrieser, C., & Jarraud, S. (2016). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. *Infection, Genetics and Evolution*, 43, 108–122. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.033>
- Kim, J., & Oh, S. (2019). Optimization of Bacterial Concentration by Filtration for Rapid Detection of Foodborne *Escherichia coli* O157:H7 Using Real-Time PCR Without

- Microbial Culture Enrichment. *Journal of Food Science*, 84(11), 3241–3245.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14836>
- Kritzberg, E., & Bååth, E. (2022). Seasonal variation in temperature sensitivity of bacterial growth in a temperate soil and lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 98(10), fiac111.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiac111>
- Lapierre, P., Nazarian, E., Zhu, Y., Wroblewski, D., Saylors, A., Passaretti, T., Hughes, S., Tran, A., Lin, Y., Kornblum, J., Morrison, S. S., Mercante, J. W., Fitzhenry, R., Weiss, D., Raphael, B. H., Varma, J. K., Zucker, H. A., Rakeman, J. L., & Musser, K. A. (2017). Legionnaires' Disease Outbreak Caused by Endemic Strain of *Legionella pneumophila*, New York, New York, USA, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 23(11), 1784–1791.
<https://doi.org/10.3201/eid2311.170308>
- Leandro, T., França, L., Nobre, M. F., Schumann, P., Rosselló-Móra, R., & Da Costa, M. S. (2012). *Nevskia aquatilis* sp. Nov. And *Nevskia persephonica* sp. Nov., isolated from a mineral water aquifer and the emended description of the genus *Nevskia*. *Systematic and Applied Microbiology*, 35(5), 297–301.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.05.001>
- Legionnaires' disease—Annual Epidemiological Report 2021*. (2021).
- Liu, T., Jia, T., Chen, J., Liu, X., Zhao, M., & Liu, P. (2017). Analysis of microbial diversity in Shenqu with different fermentation times by PCR-DGGE. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(2), 246–250. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.002>
- Liu, W., Jiang, H., Yang, J., & Wu, G. (2018). Gammaproteobacterial Diversity and Carbon Utilization in Response to Salinity in the Lakes on the Qinghai–Tibetan Plateau. *Geomicrobiology Journal*, 35(5), 392–403.
<https://doi.org/10.1080/01490451.2017.1378951>

- Liu, W., Zhang, G., Xian, W., Yang, J., Yang, L., Xiao, M., Jiang, H., & Li, W.-J. (2016). *Halomonas xiaochaidanensis* sp. Nov., isolated from a salt lake sediment. *Archives of Microbiology*, 198(8), 761–766. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1235-3>
- Mandal, S. D. (n.d.). *Chapter 12—Microbial diversity and functional potential in wetland ecosystems*.
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: A proposal. *Microbiome*, 3(1), 31, s40168-015-0094–0095. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>
- Monchamp, M.-E., Spaak, P., & Pomati, F. (2019). Long Term Diversity and Distribution of Non-photosynthetic Cyanobacteria in Peri-Alpine Lakes. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3344. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03344>
- Mustakhimov, I., Kalyuzhnaya, M. G., Lidstrom, M. E., & Chistoserdova, L. (2013). Insights into Denitrification in *Methylobacterium mobilis* from Denitrification Pathway and Methanol Metabolism Mutants. *Journal of Bacteriology*, 195(10), 2207–2211. <https://doi.org/10.1128/JB.00069-13>
- Nam, N. N., Do, H. D. K., Loan Trinh, K. T., & Lee, N. Y. (2023). Metagenomics: An Effective Approach for Exploring Microbial Diversity and Functions. *Foods*, 12(11), 2140. <https://doi.org/10.3390/foods12112140>
- Nazarian, E. J., De Jesus, M., & Musser, K. A. (2015). *Legionella*. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 1611–1625). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00090-1>
- Nelson, W. C., & Stegen, J. C. (2015). The reduced genomes of *Parcubacteria* (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00713>

- Newton, H. J., Ang, D. K. Y., Van Driel, I. R., & Hartland, E. L. (2010). Molecular Pathogenesis of Infections Caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 274–298. <https://doi.org/10.1128/CMR.00052-09>
- Newton, R. J., Jones, S. E., Eiler, A., McMahon, K. D., & Bertilsson, S. (2011). A Guide to the Natural History of Freshwater Lake Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 14–49. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-10>
- Nisar, M. A., Ross, K. E., Brown, M. H., Bentham, R., & Whiley, H. (2020). Legionella pneumophila and Protozoan Hosts: Implications for the Control of Hospital and Potable Water Systems. *Pathogens*, 9(4), 286. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040286>
- Nwosu, E. C., Brauer, A., Kaiser, J., Horn, F., Wagner, D., & Liebner, S. (2021). Evaluating sedimentary DNA for tracing changes in cyanobacteria dynamics from sediments spanning the last 350 years of Lake Tiefer See, NE Germany. *Journal of Paleolimnology*, 66(3), 279–296. <https://doi.org/10.1007/s10933-021-00206-9>
- Oikonomou, A., Katsiapi, M., Karayanni, H., Moustaka-Gouni, M., & Kormas, K. Ar. (2012). Plankton Microorganisms Coinciding with Two Consecutive Mass Fish Kills in a Newly Reconstructed Lake. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–14. <https://doi.org/10.1100/2012/504135>
- Olsvik, R., Hornes, E., Ugelstad, J., & Uhlen, M. (1994). Magnetic Separation Techniques in Diagnostic Microbiology. *CLIN. MICROBIOL. REV.*, 7.
- Padmanabhan, S., Banerjee, S., & Mandi, N. (2011). Screening of Bacterial Recombinants: Strategies and Preventing False Positives. In G. G. Brown (Ed.), *Molecular Cloning—Selected Applications in Medicine and Biology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/22140>

- Pan, X., Raaijmakers, J. M., & Carrión, V. J. (2023). Importance of Bacteroidetes in host–microbe interactions and ecosystem functioning. *Trends in Microbiology*, 31(9), 959–971. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.03.018>
- Papadimitriou, T., Katsiapi, M., Stefanidou, N., Paxinou, A., Poulimenakou, V., Laspidou, C. S., Moustaka-Gouni, M., & Kormas, K. A. (2021). Differential Effect of Hydroxyl Peroxide on Toxic Cyanobacteria of Hypertrophic Mediterranean Waterbodies. *Sustainability*, 14(1), 123. <https://doi.org/10.3390/su14010123>
- Papanastasiou, D. K., Keppas, S., Melas, D., & Katsoulas, N. (2023). Estimation of Crops Future Irrigation Water Needs in a Mediterranean Plain. *Sustainability*, 15(21), 15548. <https://doi.org/10.3390/su152115548>
- Peci, A., Winter, A.-L., & Gubbay, J. B. (2016). Evaluation and Comparison of Multiple Test Methods, Including Real-time PCR, for Legionella Detection in Clinical Specimens. *Frontiers in Public Health*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00175>
- Pelczar, M. J., & Pelczar, R. M. (2023). Microbiology. In *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/microbiology>
- Percival, S. L., & Williams, D. W. (2014). Legionella. In *Microbiology of Waterborne Diseases* (pp. 155–175). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00008-1>
- Petrou, M., Karas, P. A., Vasileiadis, S., Zafiriadis, I., Papadimitriou, T., Levizou, E., Kormas, K., & Karpouzas, D. G. (2020). Irrigation of radish (*Raphanus sativus* L.) with microcystin-enriched water holds low risk for plants and their associated rhizospheric and epiphytic microbiome. *Environmental Pollution*, 266, 115208. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115208>
- Qin, T., Tian, Z., Ren, H., Hu, G., Zhou, H., Lu, J., Luo, C., Liu, Z., & Shao, Z. (2012). Application of EMA-qPCR as a complementary tool for the detection and monitoring of Legionella in different water systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 1881–1890. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0986-x>

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O.

(2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596.

<https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

Ratan, Z. A., Zaman, S. B., Mehta, V., Haidere, M. F., Runa, N. J., & Akter, N. (2017).

Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science. *Cureus*.

<https://doi.org/10.7759/cureus.1325>

Review on Illumina Sequencing Technology. (2022).

Rittig, M. G., Jagoda, J. C., Wilske, B., Murgia, R., Cinco, M., Repp, R., Burmester, G. R., &

Krause, A. (1998). Coiling Phagocytosis Discriminates between Different Spirochetes and Is Enhanced by Phorbol Myristate Acetate and Granulocyte- Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Infection and Immunity*, 66(2), 627–635.

<https://doi.org/10.1128/IAI.66.2.627-635.1998>

Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.

<https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/technical-article/genomics/cloning-and-expression/blue-white-screening>

Sánchez Vallejo, G. (2021). Epidemias y pandemias: Una aproximación histórica. *Acta Médica*

Colombiana, 46(3). <https://doi.org/10.36104/amc.2021.2247>

Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2005). Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining

Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1501–1506.

<https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1501-1506.2005>

Selvarasu, S., Ow, D. S.-W., Lee, S. Y., Lee, M. M., Oh, S. K.-W., Karimi, I. A., & Lee, D.-Y. (2009).

Characterizing *Escherichia coli* DH5α growth and metabolism in a complex medium

- using genome-scale flux analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(3), 923–934. <https://doi.org/10.1002/bit.22119>
- Sharma, K., Mishra, A. K., Mehraj, V., & Duraisamy, G. S. (2014). Advances and applications of molecular cloning in clinical microbiology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 30(1), 65–78. <https://doi.org/10.1080/02648725.2014.921501>
- Shelton, D. R., & Karns, J. S. (2001). Quantitative Detection of *Escherichia coli* O157 in Surface Waters by Using Immunomagnetic Electrochemiluminescence. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2908–2915. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2908-2915.2001>
- Sisinthy, S., Chakraborty, D., Adicherla, H., & Gundlapally, S. R. (2017). Emended description of the family Chromatiaceae, phylogenetic analyses of the genera Alishewanella, Rheinheimera and Arsukibacterium, transfer of Rheinheimera longhuensis LH2-2T to the genus Alishewanella and description of Alishewanella alkalitolerans sp. Nov. From Lonar Lake, India. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(9), 1227–1241. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0896-5>
- Skjerve, E., Rørvik, L. M., & Olsvik, O. (1990). Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(11), 3478–3481. <https://doi.org/10.1128/aem.56.11.3478-3481.1990>
- Smalley, N. E., Taipale, S., De Marco, P., Doronina, N. V., Kyrpides, N., Shapiro, N., Woyke, T., & Kalyuzhnaya, M. G. (2015). Functional and genomic diversity of methylotrophic Rhodocyclaceae: Description of *Methyloversatilis discipulorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt_7), 2227–2233. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000190>
- Smith, R. L., & Pimm, S. L. (2023). Ecology. In *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/ecology>

- Steinert, M., Ockert, G., Lück, C., & Hacker, J. (1998). *Regrowth of Legionella pneumophila in a heat-disinfected plumbing system*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9861677/>
- Storey, M. V., Winiecka-krusnell, J., Ashbolt, N. J., & Stenström, T. (2004). The Efficacy of Heat and Chlorine Treatment against Thermotolerant Acanthamoebae and Legionellae. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 36(9), 656–662.
<https://doi.org/10.1080/00365540410020785>
- Tarhriz, V., Nematzadeh, G., Zununi Vahed, S., Hejazi, M. A., & Hejazi, M. S. (2012). Alishewanella tabrizica sp. Nov., isolated from Qurugöl Lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt_8), 1986–1991.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.031567-0>
- The Global Methane Budget 2000-2017 (2020)*. (2020).
www.globalcarbonproject.org/methanebudget
- Thermo Fisher Scientific. (2018). *MagniSort™ Streptavidin Positive Selection Beads Protocol*.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/MSPB-6003-74>
- Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). *Metagenomics—A guide from sampling to data analysis*.
- Townsend, A., Li, S., Mann, D. A., & Deng, X. (2020). A quasimetagenomics method for concerted detection and subtyping of Salmonella enterica and E. coli O157:H7 from romaine lettuce. *Food Microbiology*, 92, 103575.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103575>
- Trakala, G., Tsiroukis, A., & Martinis, A. (2023). Eco-Cultural Development of a Restored Lake Environment: The Case Study of Lake Karla (Thessaly, Greece). *Land*, 12(6), 1227.
<https://doi.org/10.3390/land12061227>
- Walkowski, S. (2009). *An LB agar plate showing the result of a blue-white screening*.
https://en.wikipedia.org/wiki/Blue%E2%80%93white_screen#/media/File:Blue-white_test.jpg

- Wang, E. C. Y., Borysiewicz, L. K., & Weetman, A. P. (1992). Cell Sorting Using Immunomagnetic Beads. In M. M. Manson, *Immunochemical Protocols* (Vol. 10, pp. 347–358). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-204-3:347>
- Wang, S., Wang, W., Chen, J., Zhang, B., Zhao, L., & Jiang, X. (2020). Characteristics of Dissolved Organic Matter and Its Role in Lake Eutrophication at the Early Stage of Algal Blooms—A Case Study of Lake Taihu, China. *Water*, 12(8), 2278. <https://doi.org/10.3390/w12082278>
- Whiley, H., Taylor, M., & Bentham, R. (2011). Detection of *Legionella* species in potting mixes using fluorescent in situ hybridisation (FISH). *Journal of Microbiological Methods*, 86(3), 304–309. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.05.023>
- World Health Organization (WHO). (2022). *Legionellosis*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/legionellosis>
- Xu, X., Wu, C., Xie, D., & Ma, J. (2023). Sources, Migration, Transformation, and Environmental Effects of Organic Carbon in Eutrophic Lakes: A Critical Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(1), 860. <https://doi.org/10.3390/ijerph20010860>
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Priesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Yu, H., Khan, A. U., Subramanian, S., Vesper, D., & Van Aken, B. (2019). Microbial Communities in Chesapeake & Ohio Canal National Historical Park and Their Function as Indicators of Water Quality. *Geomicrobiology Journal*, 36(8), 673–682. <https://doi.org/10.1080/01490451.2019.1612969>
- Zhang, L., Chen, F., Zeng, Z., Xu, M., Sun, F., Yang, L., Bi, X., Lin, Y., Gao, Y., Hao, H., Yi, W., Li, M., & Xie, Y. (2021). Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental

Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 12, 766364.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364>

Zymo Research. (2020, December 28). MICROBIOME INFORMATICS: OTU VS. ASV. *Zymo*

Research: The Beauty of Science Is to Make Things Simple.

<https://zymoresearch.eu/blogs/blog/microbiome-informatics-otu-vs-asv>

Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε., & Παπανικολάου, Γ. (2015). *Κεφάλαιο 7: Αλυσιδωτή*

Αντίδραση Πολυμεράσης.

Τζιόγκα, Λ. (2018). *Μοριακή ταυτοποίηση τοξικών μικροοργανισμών σε περιβαλλοντικά*

δείγματα της λίμνης Κάρλα [MSc]. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Φράγκου. (2012). *Παρουσία και Επιδημιολογική διερεύνηση και μελέτη της διασποράς της*

Λεγιονέλλας στη Δυτική Ελλάδα. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

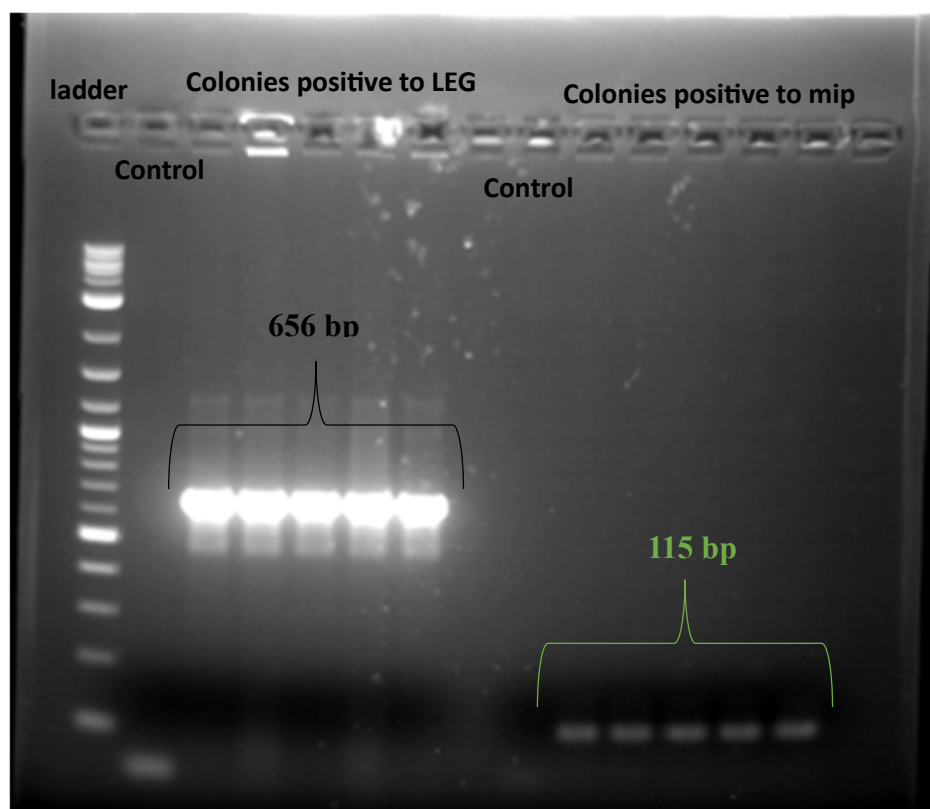
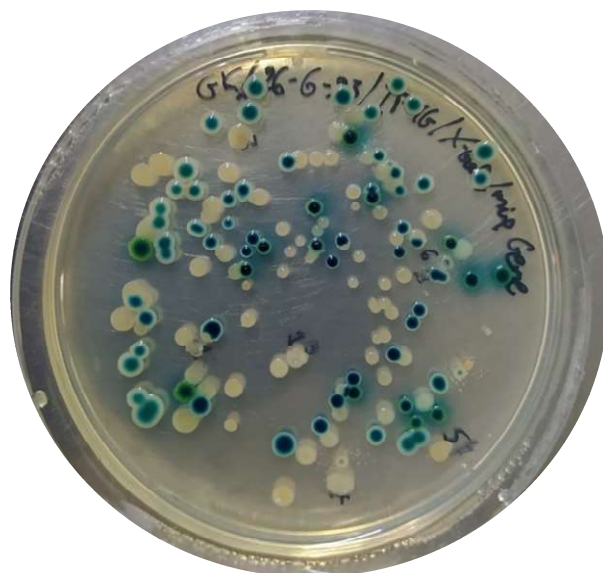
ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ.

7. Παράρτημα

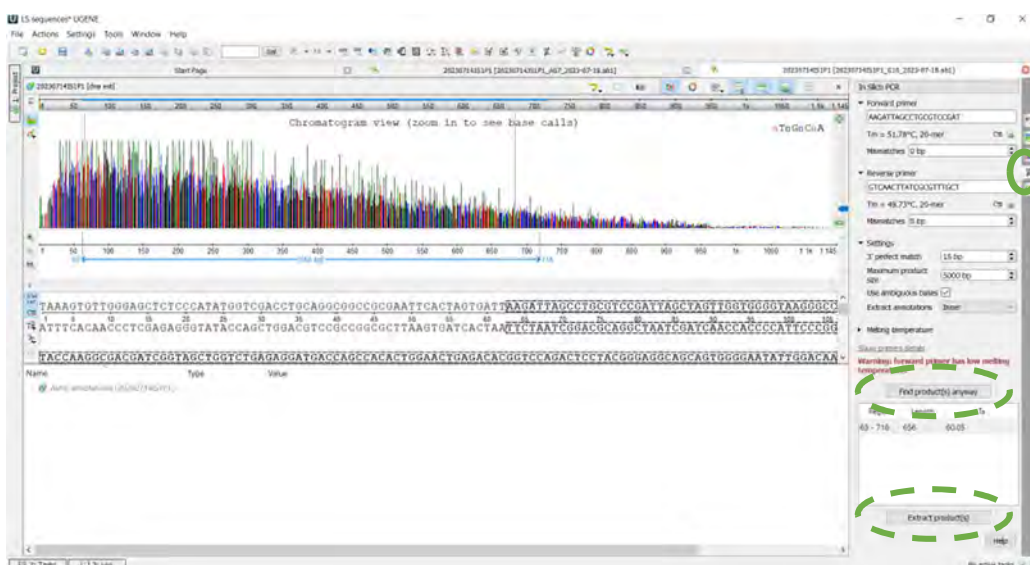
- Α. Στις εικόνες του παραρτήματος Α που ακολουθούν απεικονίζεται η ευρεσιτεχνία που δημιουργήθηκε για την τεχνική ‘back-flash’, στο τελευταίο στάδιο της διήθησης, για τη συγκέντρωση των κυττάρων σε 1xPBS.



Β. Στις εικόνες του παραρτήματος Β που ακολουθεί απεικονίζονται, κατά σειρά, μία καλλιέργεια *E. coli* κυττάρων, μετά τη διαδικασία της κλωνοποίησης του γονιδίου *mir* της λεγεωνέλλας και αποτελέσματα πηκτώματος αгарόζης, όπου εξετάστηκαν κύτταρα των κλωνοποιημένων αποικιών για την ύπαρξη των επιθυμητών γονιδίων. Ομοίως, χρησιμοποιήθηκαν και για τα δύο υπόλοιπα γονίδια, LEG και LS.



- C. Στις εικόνες του παραρτήματος C που ακολουθεί περιγράφονται με τη βοήθεια εικόνων τα βήματα ελέγχου της επιτυχίας της κλωνοποίησης μετά τη λήψη των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης Sanger. Αρχικά, εκκινείται η εφαρμογή 'UniPro Gene', επιλέγονται τα επιθυμητά αρχεία με τα δεδομένα αλληλούχησης στο 'Open file(s)' και το σημειωμένο σύμβολο DNA στην εικόνα 2. Στη συνέχεια, συμπληρώνονται οι εκκινήτες (πρόσθιος και ανάστροφος), επιλέγεται το 'find product(s) anyway' και 'extract product' και αντιγράφεται η αλληλουχία στο νέο ανοιχθέν παράθυρο. Τέλος, στο πρόγραμμα περιήγησης αναζητείται η ιστοσελίδα 'BLAST', επιλέγεται το 'Nucleotide BLAST', επικολλάται η αντιγραφείσα αλληλουχία στο κενό παράθυρο κειμένου και BLAST. Τα αποτελέσματα (hits) αντιστοίχισης της αλληλουχίας με οργανισμούς εμφανίζεται σε νέο παράθυρο, ο πιο όμοιος εκ των οποίων είναι στην πρώτη θέση. Παρατηρούμε ότι η Λεγιωνέλλα πνευμονιακή είναι πρώτη στην αναζήτηση, ενώ το μέγεθος της αλληλουχίας που εντοπίστηκε συμπίπτει με αυτό του γονιδίου, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (βλ. υλικά και μέθοδοι, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης). Ομοίως, πραγματοποιήθηκε και για τα υπόλοιπα γονίδια.




National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Log in

BLAST®

Home Recent Results Saved Strategies Help

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance. [Learn more](#)

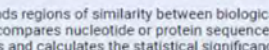
BLAST+ 2.15.0 is here!

We have included two exciting new features in the latest BLAST+ release

Tue, 28 Nov 2023

[More BLAST news...](#)

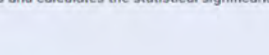
What's New in BLAST



Nucleotide BLAST
nucleotide ► nucleotide

blastx
translated nucleotide ► protein

tblastn
protein ► translated nucleotide



Protein BLAST
protein ► protein

Job Title

Nucleotide Sequence...

RID

C0AGKE6T013 Search expires on 07-27 04:01 am

Program

BLASTN

Database

nt

Query ID

lcl|Query_131047

Description

None

Molecule type

dna

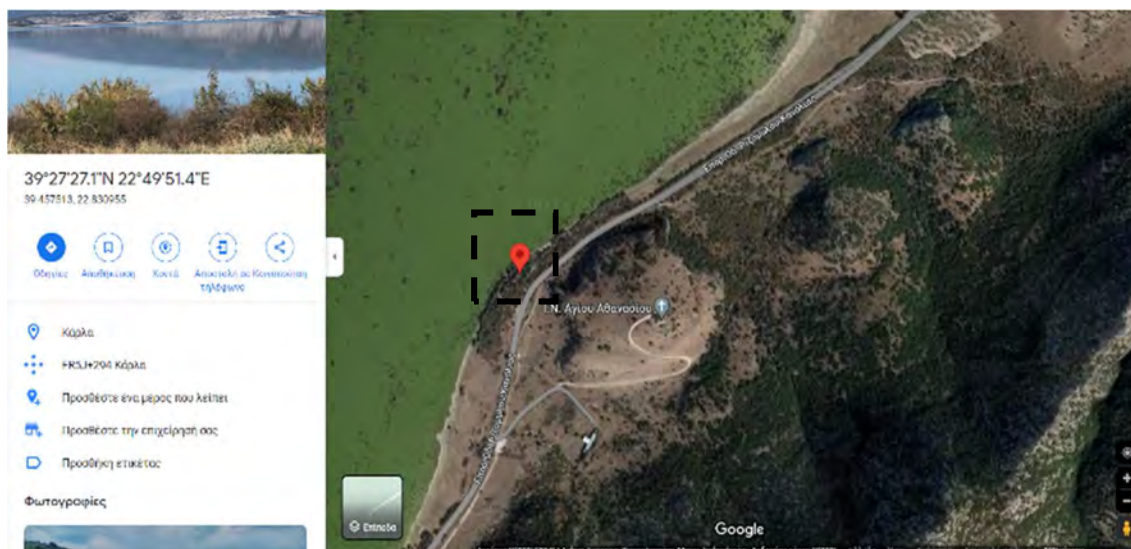
Query Length

656

Descriptions

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Legionella pneumophila strain ERS1305867 chromosome, complete genome	Legionella pneumophila	1212	3637	100%	0.0	100.00%	3405863	CP046618.1
Legionella pneumophila strain AUSM0000010536 isolate 681741 chromosome, complete genome	Legionella pneumophila	1212	3637	100%	0.0	100.00%	3453356	CP045974.1
Legionella pneumophila strain FDAARGOS_779 chromosome, complete genome	Legionella pneumophila	1212	3637	100%	0.0	100.00%	3409192	CP049987.1
Legionella pneumophila strain NGTC12180 genome assembly, chromosome_1	Legionella pneumophila	1212	3637	100%	0.0	100.00%	3369585	LR133933.1
Legionella pneumophila strain NGTC11193 genome assembly, chromosome_1	Legionella pneumophila	1212	3637	100%	0.0	100.00%	3445473	LR134332.1
Legionella pneumophila subsp. pneumophila strain Albuquerque 1 (D-7474) chromosome, complete genome	Legionella pneumophila subsp. pneumophila	1212	3626	100%	0.0	100.00%	3508676	CP021286.1
Legionella pneumophila subsp. pneumophila strain Flint 2 (D-7477) chromosome, complete genome	Legionella pneumophila subsp. pneumophila	1212	3626	100%	0.0	100.00%	3588028	CP021281.1
Legionella pneumophila subsp. pneumophila strain Birmingham 1 (D-7470) chromosome, complete genome	Legionella pneumophila subsp. pneumophila	1212	3637	100%	0.0	100.00%	3436658	CP021268.1
Legionella pneumophila subsp. pneumophila strain Burlington 1 (D-7941) chromosome, complete genome	Legionella pneumophila subsp. pneumophila	1212	3637	100%	0.0	100.00%	3404198	CP021267.1
Legionella pneumophila strain NGTC11965 genome assembly, chromosome_1	Legionella pneumophila	1212	3632	100%	0.0	100.00%	3514596	LT096452.1
Legionella pneumophila strain F4468, complete genome	Legionella pneumophila	1212	3620	100%	0.0	100.00%	3439438	CP014759.1
Legionella pneumophila strain Philadelphia-1 isolate AE chromosome, complete genome	Legionella pneumophila	1212	3637	100%	0.0	100.00%	3409143	CP013742.1
Legionella pneumophila strain F4468, complete genome	Legionella pneumophila	1212	3620	100%	0.0	100.00%	3439440	CP014760.1
Legionella pneumophila strain ST37 genome assembly, chromosome_1	Legionella pneumophila	1212	3637	100%	0.0	100.00%	3474638	LT632616.1
Legionella pneumophila strain ST23 genome assembly, chromosome_1	Legionella pneumophila	1212	3637	100%	0.0	100.00%	3505986	LT632615.1
Legionella pneumophila strain ST62 genome assembly, chromosome_1	Legionella pneumophila	1212	3637	100%	0.0	100.00%	3530817	LT632614.1
Legionella pneumophila strain E9, O, complete genome	Legionella pneumophila	1212	3637	100%	0.0	100.00%	3367205	CP015596.1

D. Στην εικόνα του παραρτήματος D που ακολουθεί απεικονίζονται οι συντεταγμένες και το σημείο των δειγματοληψιών που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης πτυχιακής, στη λίμνη Κάρλα, κοντά στην περιοχή Αρμένιο της Λαρίσης, ενώ στον πίνακα αναγράφονται οι ημερομηνίες και διάφορα δειγματοληπτικά στοιχεία, όπως μέσες θερμοκρασίες περιβάλλοντος, αριθμός δειγμάτων κτλ.



Στοιχεία δειγματοληψίας			
Ημερομηνίες	Μέσες θερμοκρασίες περιβάλλοντος		Ληφθέντα δείγματα
	Χαμηλές	Υψηλές	
30/05/2023	13°C	28°C	Δείγματα i/ii/iii
06/06/2023	14°C	29°C	Δείγματα iv/v/vi/vii
20/06/2023	16°C	31°C	Δείγματα viii/ix/x
14/07/2023	17°C	33°C	Δείγματα xi/xii/xiii

Ε. Οι εικόνες του παραρτήματος Ε του ακολουθούν αφορούν το φύλλο υποβολής που παρέχεται από την εταιρεία αλληλούχησης με την τεχνολογία Illumina και συμπληρώθηκε για την αποστολή των δειγμάτων προς αλληλούχηση.

Integrated Microbiome Resource (IMR) Submission Template v.19 (Oct.2022)

Submitter Name:
Submitter Email:

Project PI (payer):
Project PI Email:
Bill to Address:

Short Project Description:
 for our Academic Reporting:
 (and any sample notes)

MisSeq Short Amplicons

Put 3X or 2X below for depth

16Sx18S Sequencing Target(s): ☐ UNIVERSAL - V4-V5

16S Sequencing Target(s): ☐ 16S BACTERIA - V6-V8
☐ 16S ARCHAEA - V6-V8
☐ 16S BACTERIA - V3-V4
☐ 16S CYANO - V3-V4

18S Sequencing Target(s): ☐ 18S EUKARYOTES - V4

ITS Sequencing Target(s): ☐ ITS2 FUNGI

Custom Sequencing Target(s): ☐ CUSTOM (specify in notes)

Use the color coding at left, and below for multiplex. Do not color your samples in the plates below (using the Format Painter) if you are doing more than one target per submission. Put 3X or 2X in the boxes of choice to indicate depth.

Popular Combos:

BactV6/B=UniV4/V5	BactV6/B=EuK	UniV4/V5=ArchV6/B	UniV4/V5=Fungi	BactV6/B=EuK-Fungi
(separate PCR)	BactV6/B=Fungi	UniV4/V5=Cyano	UniV4/V5=CuK	UniV4/V5=CuK-Fungi
BactV6/B=Cyano				

Instructions:

- Organize samples **down columns** (not across rows), starting with Plate 1-A1. **avoid empty wells in between samples**, but always leave the **ITS2 last position empty** for control reactions (ie: max. 95 samples/plate).
- If you are submitting for more than one type of amplicon, you can use the above corresponding color shading (see blue + red for a plate of 16S V6-V8 + 18S V4) in the cells to indicate mixed plates (using the Format Painter).
- If you are submitting for more than one type of amplicon, **group samples in blocks together by amplicon** (ie: not interspersed throughout the plate[s]).
- Fill in (**unique**) sample names in this sheet - **no special characters, periods or spaces allowed** (underscores "_" are OK) - and insert DNA concentrations below (optional). Names can be larger than box/cell boundaries.
- Seal your plates using sealing film (**use a cuke or heat-seal**) so that there is no cross-contamination between wells. Label the plates with your **name and plate #**, and indicate which corner is A1 (if changed).

Sample Names and Layouts in Submitted Plate(s) (or Tubes)

Plate 1 **strip #**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	515										
B	512										
C	513										
D	514										
E	515										
F	516										
G	517										
H											

Plate 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample96										
B	Sample97										
C	Sample98										
D	Sample99										
E	etc...										
F	Sample93										
G	Sample94										
H	Sample95										
	control										

Plate 3

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											

Plate 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B											
C											
D											
E											
F											
G											
H											

You may copy the above layout (row/column names) to add additional plates here below if needed...

Sample Concentrations (ng/ul) Matching Above Layout (optional, but useful if some are included in case troubleshooting of PCRs is required)

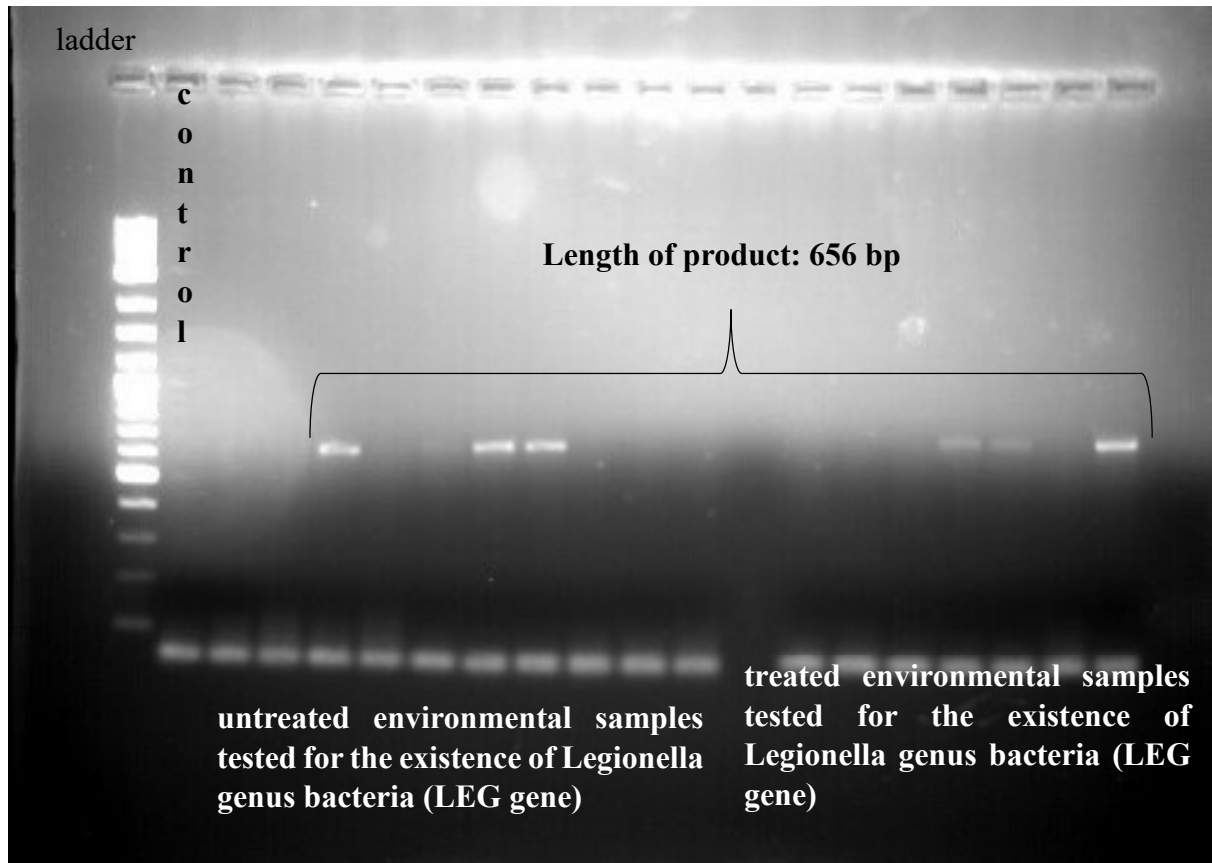
Plate 1 **strip #**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.32										
B	1.98										
C	9.13										
D	2.02										
E	8.005										
F	2.63										
G	1.82										
H											

Plate 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											

- F. Στην εικόνα του παραρτήματος F απεικονίζονται σε πήκτωμα ηλεκτροφόρησης τα εξεταζόμενα περιβαλλοντικά δείγματα (θερμασμένα ή μη) για την ύπαρξη σε αυτά λεγεωνελλών, όπως επίσης και το μήκος των αλληλουχιών των παραγόμενων προϊόντων.



G. Στο παράρτημα G παρουσιάζεται συνοπτικά το πρωτόκολλο της ανοσοκατακρήμνισης, όπως ακολουθήθηκε για την περάτωση των πειραμάτων μας, αλλά και περιγράφεται στο αντίστοιχο εγχειρίδιο του kit [(Thermo Fisher Scientific, 2018)].

❖ Ανάπτυξη πρωτοκόλλου για κατακρήμνιση βακτηρίων

Ρυθμιστικό διάλυμα κυτταρικού διαχωρισμού: PBS + 3% FBS + 10mM EDTA

1. Επώση δειγμάτων με το αντίσωμα και ταυτόχρονη ανακίνηση για 10min σε RT.
2. Ξέπλυμα κυττάρων με αύξηση όγκου στα 1.5mL με την προσθήκη του ρυθμιστικού δ/τος και φυγοκέντρηση στα 300g για 5min.
3. Απόρριψη του υπερκείμενου και επιμελώς/προσεκτικά επαναδιάλυση των κυττάρων στον αρχικό τους όγκο με την προσθήκη του ρυθμιστικού δ/τος.

Σημείωση: Τα κύτταρα πρέπει να βρίσκονται σε αιώρημα μοναδιαίων κυττάρων. Απαιτείται έλεγχος των δειγμάτων και αφαίρεση/διάλυση συστάδων/συσσωματωμάτων μέσω πιπεταρίσματος ή vortexing (δίνης).

4. Προσθήκη βέλτιστης/προτεινόμενης ποσότητας σφαιριδίων (10μl ανά 100μl δείγματος, εξαιτίας της χαμηλής συγκέντρωσης των επιθυμητών κυττάρων).
5. Καλή ανάμιξη με vortex 5 φορές και επώση σε θερμοκρασία δωματίου για 10min.

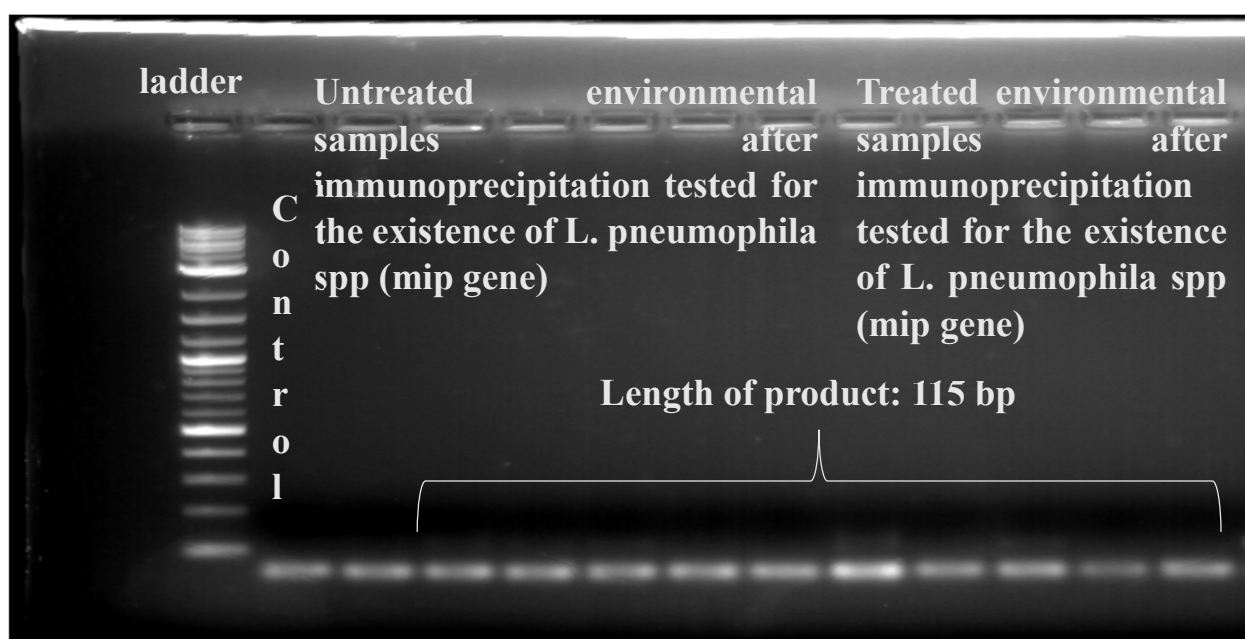
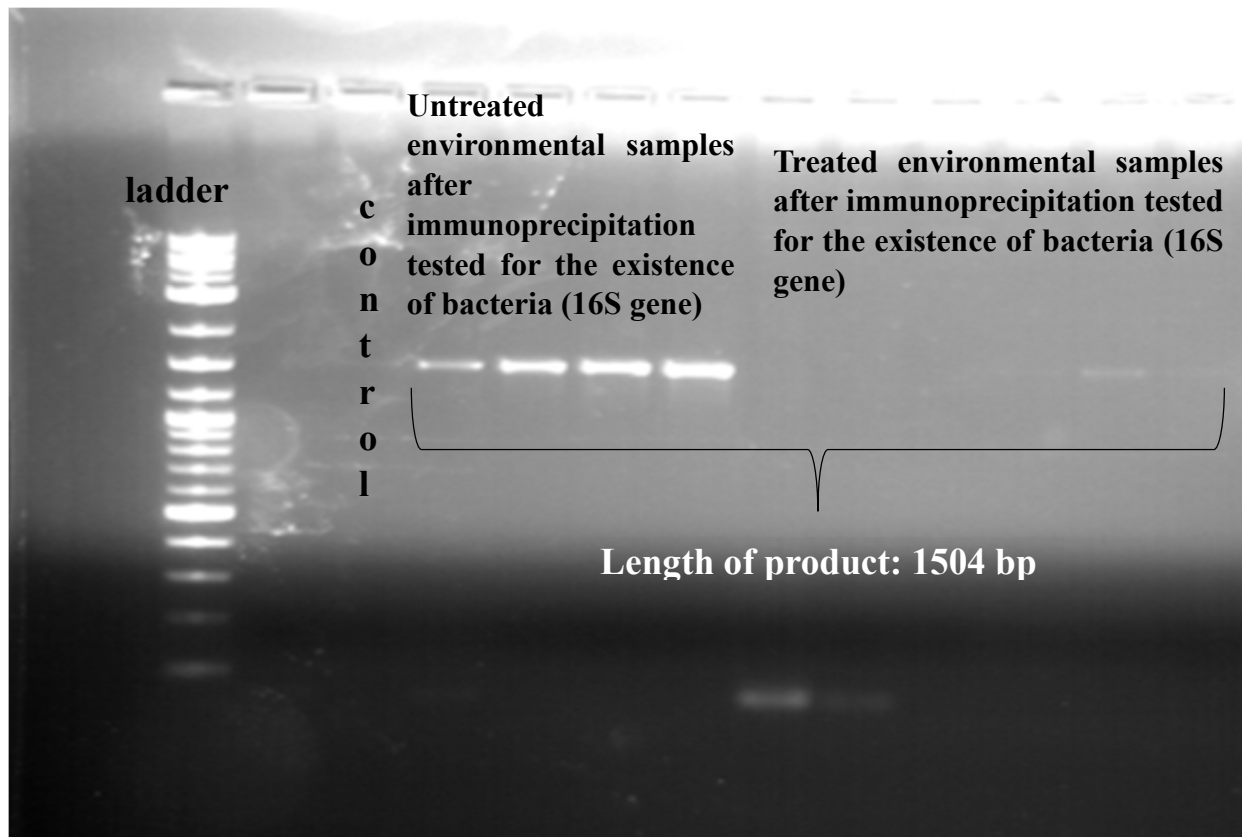
Σημείωση: τα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης θετικής επιλογής πρέπει να επαναδιαλυθούν ομοιόμορφα μέσω πιπεταρίσματος (πάνω κάτω 5 φορές με πιπέτα P1000 ρυθμισμένη στο 1mL, ή μέσω vortex) πριν προστεθούν στα κύτταρα για βέλτιστη απόδοση.

6. Ρύθμιση όγκου στα 1.5mL με προσθήκη ρυθμιστικού δ/τος και ανάμιξη με πιπετάρισμα 3 φορές (πάνω κάτω, με πιπέτα P1000 ρυθμισμένη στο 1mL), αποφεύγοντας το vortex.
7. Τοποθέτηση του φιαλιδίου στο μαγνήτη. Insert the tube into the magnet until the bottom of the tube is touching the bench top through the hole in the bottom of the magnet.
8. Επώση σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
9. Απομάκρυνση του υπερκειμένου με τη βοήθεια πιπέτας (P1000 ρυθμισμένη στο 1mL) και απόρριψή του, διότι εκεί υπάρχουν τα ανεπιθύμητα κύτταρα (μη συνδεδεμένα με το αντίσωμα και τα σφαιρίδια). Το φιαλίδιο παραμένει στο μαγνήτη κατά τη διαδικασία αφαίρεσης του υπερκειμένου.

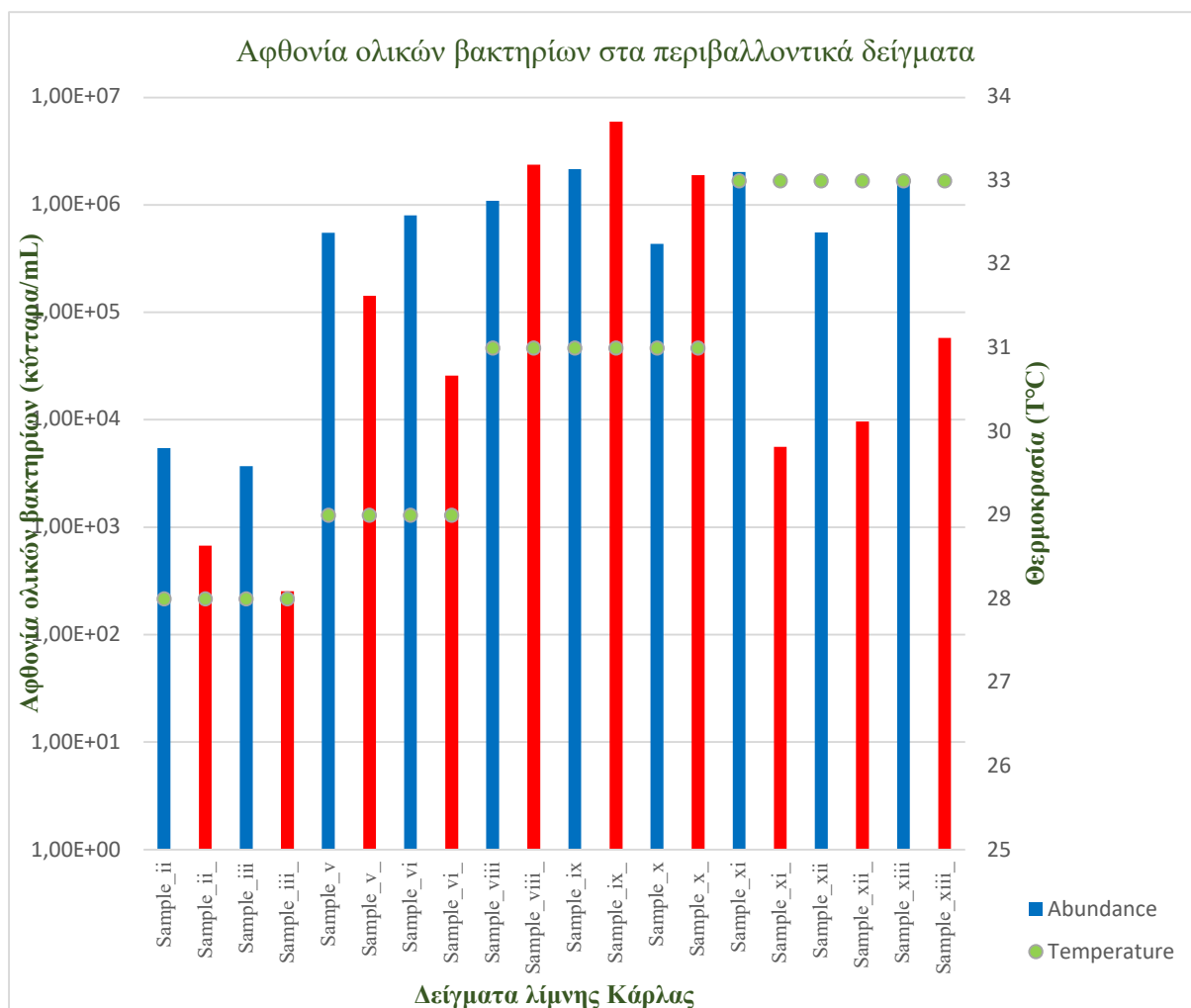
Σημείωση: αποφυγή ανακίνησης του φιαλιδίου, διότι μπορεί να μειωθεί ο βαθμός ανάκτησης των κυττάρων. Τα μη συνδεδεμένα κύτταρα μπορούν να συλλεχθούν, αν απαιτείται.

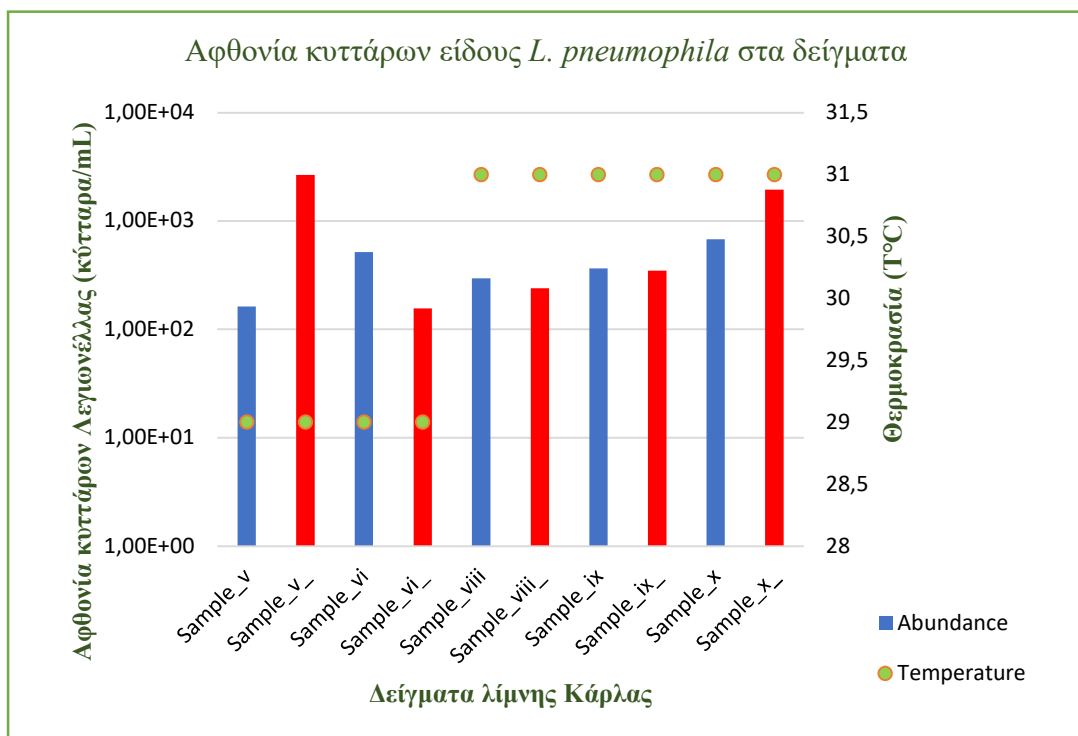
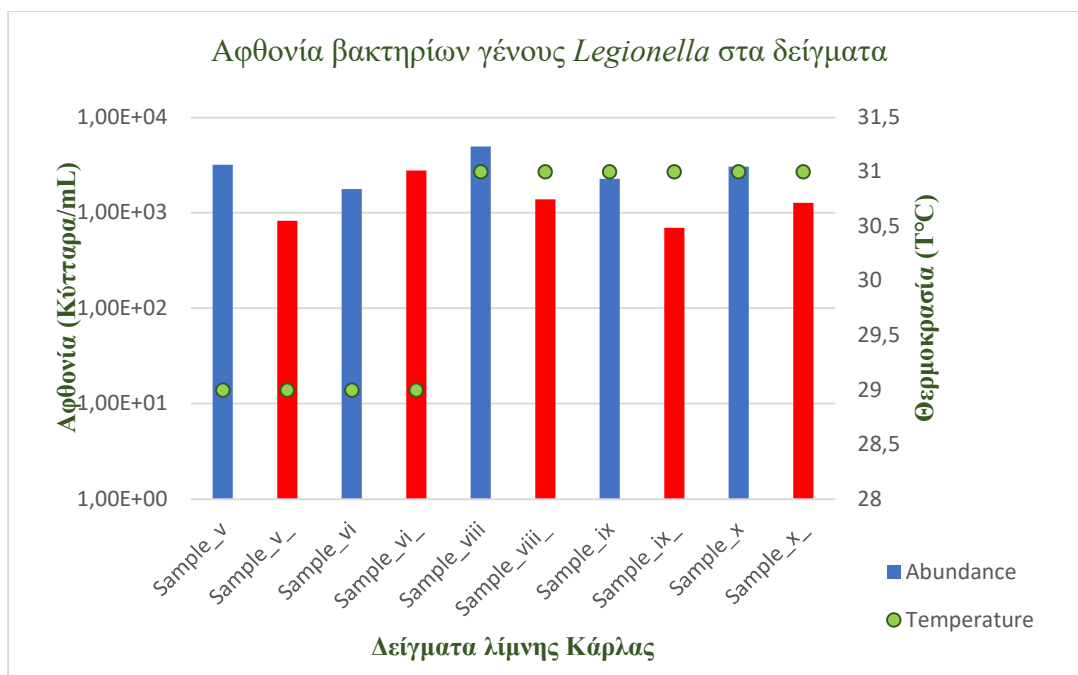
10. Απομάκρυνση του φιαλιδίου από το μαγνήτη και επανάληψη βημάτων 7-9 2 επιπλέον φορές με σύνολο τις 3 πλύσεις.
11. Απομάκρυνση του φιαλιδίου από το μαγνήτη και προσθήκη 100μl ρυθμιστικού δ/τος. Ξέπλυμα των τοιχωμάτων του πιπετάροντας το δ/μα προς τα κάτω πλευρικά. Τα επιλεγμένα κύτταρα είναι έτοιμα για χρήση.

Η. Στις εικόνες του παραρτήματος Η απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης πηκτώματος αгарόζης από δείγματα που υποβλήθηκαν στο πρωτόκολλο της ανοσοκατακρήμνισης (θερμασμένα και μη) και εξετάστηκαν για την ύπαρξη σε αυτά DNA ολικών βακτηρίων και *L. pneumophila* με την τεχνική της PCR. Με αυτό τον τρόπο, είχαμε μία πρώτη ιδέα επιτυχίας της μεθόδου.

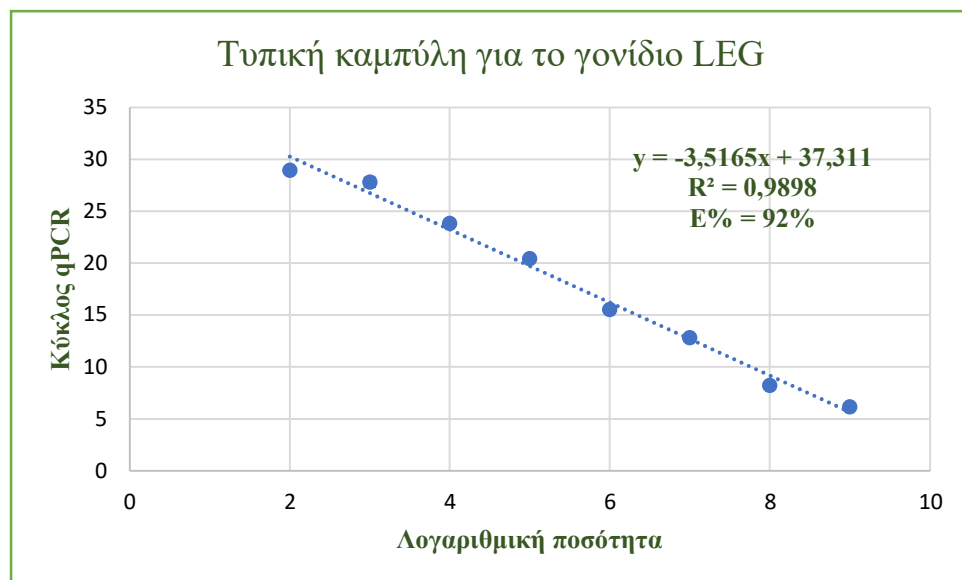


- I. Στα ραβδογράμματα του παραρτήματος I απεικονίζονται λεπτομερώς η αφθονία σε βακτήρια (ολικά, γένους *Legionella* και είδους *L. pneumophila* αντίστοιχα) ανά περιβαλλοντικό δείγμα που ελέγχθηκε σε συνάρτηση με τη μέση θερμοκρασία του περιβάλλοντος τις αντίστοιχες ημέρες των δειγματοληψιών. Στα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν οι μέσοι όροι αυτών ανά δειγματοληπτική περίοδο.

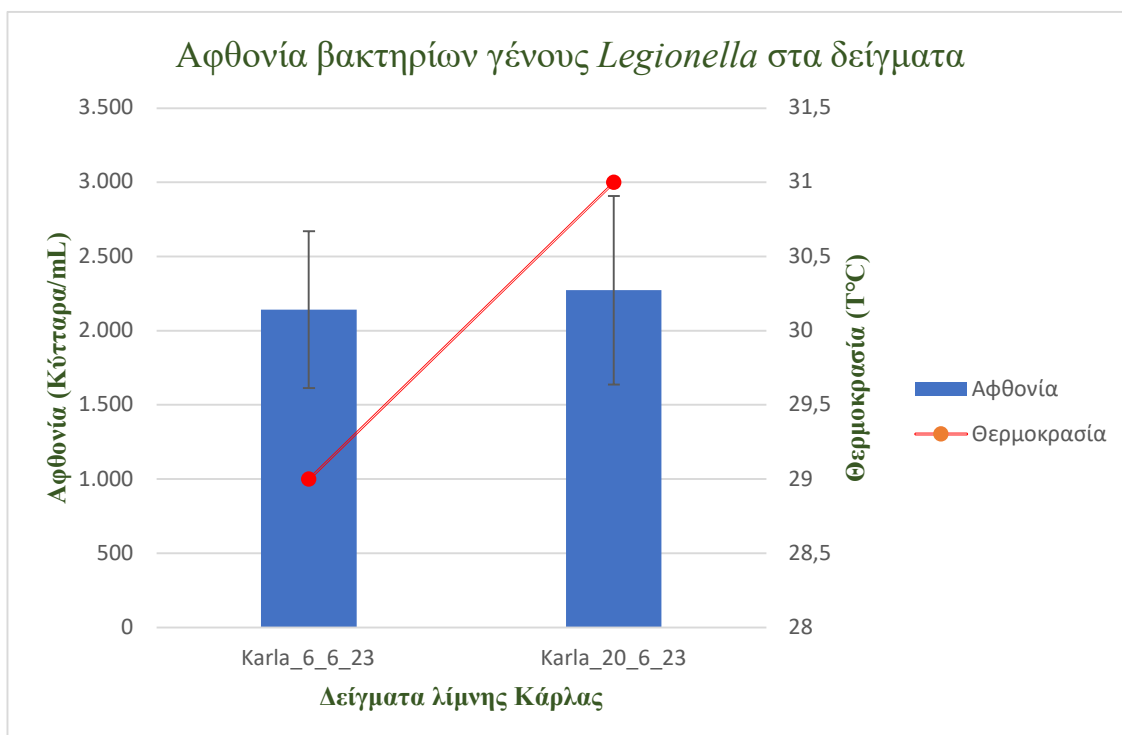




- J. Στο παράρτημα J που ακολουθεί, παρουσιάζονται η υπολογισθείσα τυπική καμπύλη για το γονίδιο LEG και οι μέσοι όροι αφθονίας κυττάρων γένους *Legionella* των περιβαλλοντικών δειγμάτων ανά περίοδο σε συνάρτηση με την θερμοκρασία, το οποίο επιλέχθηκε να μην παρουσιαστεί στα αποτελέσματα αλλά εξετάστηκε κατά την πειραματική διαδικασία.



Εικόνα 14. Διάγραμμα τυπικής καμπύλης για το γονίδιο 16S rRNA (LEG) λεγεωνελλών. Οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται μεταξύ 10^9 - 10^2 , παράλληλα τα R^2 και $E\%$ είναι στα αποδεκτά όρια.



Εικόνα 15. Ραβδόγραμμα μέσων όρων αφθονίας κυττάρων γένους *Legionella*, εξαγόμενων από τα περιβαλλοντικά δείγματα που εξετάστηκαν και αποδείχθηκαν θετικά στην ύπαρξη λεγεωνελλών (μέσω ανάλυσης των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης, βλ. παράρτημα F) σε συνάρτηση με τις μέσες θερμοκρασίες του περιβάλλοντος των ημερομηνιών των δειγματοληψιών.

- Κ. Στην εικόνα του παραρτήματος Κ φαίνονται οι δείκτες ποικιλομορφίας τύπου α: Observed) παρατηρούμενος πλούτος, Chao1) εκτιμώμενος πλούτος, ACE) εκτιμώμενος πλούτος, Shannon) δείκτης ποικιλομορφίας χαμηλής κυριαρχίας, Simpson/InvSimpson) δείκτης ποικιλομορφίας ενδιάμεσης κυριαρχίας, Fisher) δείκτης ποικιλομορφίας υψηλής κυριαρχίας. Δείγματα: Karla NHI 05-10: v/vi/viii/ix/x χρονοσειρών 06/06/23-20/06/23.

