

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Καλλιεργήσιμα βακτήρια σε βρόχινο νερό»

**Καλογήρη Ιωάννα
Μποζίκη Δήμητρα**

ΒΟΛΟΣ 2017

«Καλλιεργήσιμα βακτήρια σε βρόχινο νερό»

Διμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) Κωνσταντίνος Κορμάς**, Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.
- 2) Γκολομάζου Ελένη**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Ιχθυοπαθολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την ολοκλήρωση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε ιδιαίτερα τον Επιβλέποντα αυτής, κ. Κορμά Κωνσταντίνο για την καθοδήγηση, την υπομονή και την επιμονή που επέδειξε κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος αλλά και της συγγραφής της εργασίας.

Επίσης, ευχαριστούμε τον κ Μποζιάρη για την προμήθεια του εργαστηριακού χώρου, καθώς και την Νικούλη Ελένη για την καθοδήγησή της στο εργαστήριο.

Τέλος, σημαντική ήταν η στήριξη των οικογενειών μας, για την ενθάρρυνση και τη βοήθειά τους, όχι μόνο κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, αλλά καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εξετάσθηκε η βακτηριακή αφθονία όμβριου ύδατος από τις περιοχές του Βόλου (μέση ετήσια βροχόπτωση 41,7 mm) και της Αθήνας (μέση ετήσια βροχόπτωση 419.1 mm) τις χρονιές 2015-2016. Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις (4) δειγματοληψίες κατά τη διάρκεια βροχοπτώσεων με υδατοσυλλογή σε αποστειρωμένες λεκάνες και κατόπιν διήθηση των δειγμάτων και επίστρωση σε φίλτρα. Στη συνέχεια ακολούθησε η επώασή τους σε τριβλία με θρεπτικό υλικό και χωρίς. Κατά τη διάρκεια της επώασης έλαβε μέρος η λεπτομερής καταμέτρηση και παρακολούθηση της προόδου των βακτηριακών αποικιών από την ημέρα φιλτραρίσματος έως την ημέρα πλήρους εξασθένησής τους. Στα αποτελέσματα που κατεγράφησαν, σημειώθηκαν το χρώμα (πορτοκαλί, ροζ, αδιαφανείς), η πυκνότητα καθώς και το χρονικό διάστημα της άνθισης των αποικιών. Οι περισσότερες αποικίες σημειώθηκαν στην μεγαλύτερη θερμοκρασία (25°C), καθώς και στο υπόστρωμα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση θρεπτικού υλικού. Αυτές διήρκησαν και περισσότερες ημέρες, σε σχέση με τις αποικίες σε χαμηλότερη θερμοκρασία (8°C) και μικρότερη συγκέντρωση θρεπτικού, οι οποίες παρουσίασαν και καθυστέρηση. Τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων καταγράφηκαν και συγκρίθηκαν στη συνέχεια με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία.

Λέξεις κλειδιά: Βακτήρια, Θρεπτικό υλικό, Βρόχινο νερό, Επώαση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	4
3.1.	Πείραμα 1	4
3.2.	Πείραμα 2	5
3.3.	Πείραμα 3	5
3.4.	Πείραμα 4	7
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	9
4.1.	Πείραμα 1	9
3.2.	Πείραμα 2	10
3.3.	Πείραμα 3	10
3.4.	Πείραμα 4	15
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	20
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	34
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	35
7.	ABSTRACT	42

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αερομεταφερόμενοι μικροοργανισμοί κυριαρχούν στην ατμόσφαιρα, όπου μπορούν να παραμείνουν ζωντανοί και να μεταφέρονται σε μεγάλες αποστάσεις, αποικίζοντας έτσι νέα περιβάλλοντα. Παρά τη μεγάλη σημασία τους σε σχέση με τα οικολογικά και κοινωνικοοικονομικά ζητήματα (βιοτρομοκρατία, υγεία κ.λπ.), έχουν πραγματοποιηθεί πολύ λίγες μελέτες σε αυτόν τον τομέα (Brickner et al., 2003, Kowalski et al., 2003, Reshetin and Gerens, 2003, Agranovski et al., 2005, Fykse et al., 2008, Polymenakou et al., 2008, Dungan and Leytem, 2009, Orpliger et al., 2010). Το ατμοσφαιρικό νερό αντιπροσωπεύει, από ορισμένες απόψεις, ένα ακραίο περιβάλλον που χαρακτηρίζεται από χαμηλές θερμοκρασίες, σχετικά χαμηλό pH και πολύπλοκα μίγματα οργανικών και ανόργανων ενώσεων. Οι αερομεταφερόμενοι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι πιο σημαντικοί για τον σχηματισμό νεφών και την κατακρήμνιση από ότι αναμενόταν. Είναι σαφές ότι πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος τους στην ατμόσφαιρα. Οι μικροοργανισμοί είναι γνωστό ότι συμβάλλουν ενεργά στη γεωχημεία σε όλα τα ενδιαιτήματα της Γης, αλλά μπορεί να έχουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην βιοχημεία της ατμόσφαιρας και στον υδρολογικό κύκλο (Casareto et al., 1996, Amato et al., 2005, Ariya et al., 2009).

Το νερό της βροχής είναι ένας σημαντικός φυσικός πόρος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάφορους ευεργετικούς σκοπούς. Ωστόσο οι πληροφορίες που έχουμε για τους προκαρυωτικούς οργανισμούς στο νερό της βροχής είναι ελάχιστες (Choetal., 2014).

Τα βακτήρια είναι ένας από τους πολλούς τύπους βιογενών αερομεταφερόμενων σωματιδίων που κυριαρχούν στην ατμόσφαιρα (Jaenicke, 2005,

Jaenicke et al., 2007, Elbert et al., 2007). Λόγω του μεγέθους τους, έχουν μεγάλο χρόνο παραμονής στην ατμόσφαιρα (της τάξης αρκετών ημερών) και μπορούν να μεταφερθούν από τον άνεμο σε μεγάλες αποστάσεις. Οι μετρήσεις δείχνουν ότι οι μέσες συγκεντρώσεις στον αέρα είναι πιθανόν τουλάχιστον 1×10^4 κύτταρα/ m^3 πάνω από την ξηρά (Baueretal., 2002), ενώ οι συγκεντρώσεις πάνω από τη θάλασσα μπορεί να είναι χαμηλότερες από την ξηρά κατά ένα συντελεστή της τάξεως των 100-1000 (Prospero et al., 2005, Griffin et al., 2006).

Τα νέφη μπορούν να οριστούν ως μάζες ατμοσφαιρικού αέρα στις οποίες συμπυκνώνεται νερό γύρω από σωματίδια σε στερεά (κρυστάλλους πάγου) ή σε υγρή μορφή. Πρόκειται για υδάτινα περιβάλλοντα χαμηλής θερμοκρασίας που εμπλέκονται στις μεταφορές μεγάλης κλίμακας ύλης και ενέργειας και ως εκ τούτου συμμετέχουν στην εναέρια σύνδεση μεταξύ των οικοσυστημάτων, αν και δύσκολα μπορούν να θεωρηθούν ως οικοσυστήματα. Η δομή και η λειτουργία των μικροβιακών κοινοτήτων στα νέφη και τις βροχοπτώσεις παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστες. Το ατμοσφαιρικό νερό αντιπροσωπεύει, από ορισμένες απόψεις, ένα ακραίο περιβάλλον που χαρακτηρίζεται από χαμηλές θερμοκρασίες, σχετικά χαμηλό pH (από 3 έως 7), υψηλή οξειδωτική ικανότητα, παρουσία σύνθετων μιγμάτων οργανικών και ανόργανων, τοξικών και μη ενώσεων και υψηλή έκθεση φωτός (συμπεριλαμβανομένης της υπεριώδους ακτινοβολίας UV). Ταυτόχρονα, πολλά βακτηριακά στελέχη φαίνεται να είναι προσαρμοσμένα στις ακραίες συνθήκες που απαντώνται στο νερό των νεφών (pH, T, ακτινοβολίες UV, κλπ.)(Pratt et al., 2009).

Η μελέτη των αερομεταφερόμενων μικροοργανισμών έχει μια ιστορία που εκτείνεται εκατοντάδες χρόνια πίσω, με την πρώτη αναφορά το 1676 από τον Antony van Leeuwenhoek (Gregory, 1971). Ο Louis Pasteur ήταν ο πρώτος που παρατηρούσε

σκόπιμα το μικροβιακό περιεχόμενο του αέρα, μια προσπάθεια που οδήγησε σε σημαντικές εξελίξεις στην ιατρική και τον έλεγχο της νόσου, καθώς η διάδοση πολλών ασθενειών εντοπίστηκε στην εναέρια διασπορά βακτηρίων (Pasteur, 1860a, b). Σήμερα, είναι γνωστό ότι πολλές βακτηριακές ασθένειες μεταδίδονται μέσω του αέρα σε μικρές αποστάσεις. Στην περίπτωση της νόσου των Λεγεωνάριων, υπάρχουν στοιχεία αερομεταφερόμενης μετάδοσης έως και 6 χιλιόμετρα από μολυσμένους βιομηχανικούς πύργους ψύξης (Nguyen et al., 2006). Οι ερευνητές έχουν κάνει δειγματοληψίες για τους μικροβιακούς πληθυσμούς των ανώτερων στρωμάτων αέρος χρησιμοποιώντας μπαλόνια, αεροπλάνα και ρουκέτες και έχουν αποδείξει την παρουσία βακτηρίων που μπορούν να καλλιεργηθούν σε υψόμετρα έως και 80 km (Timmons et al., 1966, Imshenetsky et al., 1978, DeLeon-Rodriguez et al., 2013). Μέχρι πρόσφατα όμως, οι περισσότερες μετρήσεις των βακτηρίων στον αέρα ήταν σποραδικές, ποιοτικές και διερευνητικές, ενώ λίγες προσπάθειες έγιναν σε συστηματικές ή ποσοτικές μελέτες.

Η παρούσα μελέτη ασχολήθηκε με την αφθονία των καλλιεργήσιμων βακτηρίων στο βρόχινο νερό. Αρχικά χωρίς θρεπτικό για να διαπιστωθεί εάν οι συγκριμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχτούν χωρίς επιπλέον θρεπτικό στο βρόχινο νερό, δηλαδή αν επαρκή το οργανικό φορτίο της βροχής για την ανάπτυξή τους. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν πειράματα με θρεπτικό R2A, θρεπτικό γενικής χρήσης, για την μελέτη του αριθμού των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα συγκεκριμένα τριβλία.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συλλέχτηκε βρόχινο νερό σε τέσσερις δειγματοληψίες (Πίν. 1). Για τη συλλογή του νερού χρησιμοποιήθηκαν δύο αποστειρωμένες πλαστικές λεκάνες. Έπειτα με αποστειρωμένο χωνί το νερό αποθηκεύτηκε σε αποστειρωμένα πλαστικά μπουκάλια του 1,5L για την μεταφορά του στο εργαστήριο. Η αποστείρωση έγινε με αιθανόλη(EtOH) 70%.

Πίνακας 1: Δεδομένα δειγματοληψίας.

	Περιοχή	Ημερομηνία	Ώρα	Συνολικά L
Δειγματοληψία 1	Βόλος	25/11/2015	17.30-20.30	6,5 L
Δειγματοληψία 2	Αθήνα	7/1/2016	4.10-7.15	1 L
Δειγματοληψία 3	Βόλος	16/1/16-17/1/16	20.00-10.00	3 L
Δειγματοληψία 4	Βόλος	7/3/2016	18.00-21.30	1 L

3.1. Πείραμα 1

Επιστρώθηκαν 14 τριβλία με μίγμα βρόχινου νερού και 1,5% τελική συγκέντρωση άγαρ. Το μίγμα νερού και άγαρ είχε τοποθετηθεί από πριν στο αυτόκαυστο για αποστείρωση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση του νερού για 6 τρυβλία με συσκευή διήθησης στην οποία τοποθετήθηκαν φίλτρα: 0,22μm, WhiteGriddedGSWG, 47mm (Millipore, Bedford, MA, USA) και τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε επιστρωμένα πλαστικά τρυβλία. Για το κάθε διήθηση

χρησιμοποιήθηκαν 500ml βρόχινου νερού και 2 επιπλέον τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν ως τυφλά.

Για την επώαση χρησιμοποιήθηκαν 2 θάλαμοι επώασης ρυθμισμένα στους 25 °C και στους 8 °C αντίστοιχα. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ως εξής (Πίν. 2):

Πίνακας 2: Συνθήκες επώασης δειγμάτων 1^{ου} πειράματος.

Θερμοκρασίες	8° C	25° C
Τρυβλία	R1-10a	R1-20a
	R1-10b	R1-20b
	R1-10c	R1-20c
Τυφλά	Τυφλό: 8	Τυφλό: 10

2.2. Πείραμα 2

Με το νέο δείγμα πραγματοποιήθηκαν 2 διηθήσεις των 500ml και τα φίλτρα τοποθετήθηκαν στα τρυβλία που είχαν ήδη προετοιμαστεί. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους θαλάμους επώασης ως εξής (Πίν. 3):

Πίνακας 3: Συνθήκες επώασης δειγμάτων 2^{ου} πειράματος.

Θερμοκρασίες	8° C	25° C
Τρυβλία	Ra-8	Ra-25

2.3. Πείραμα 3

Παρασκευάστηκαν 10 τρυβλία τα οποία επιστρώθηκαν με FullStrengthR2Abroth για την προετοιμασία του οποίου χρησιμοποιήθηκαν 80ml απιονισμένο νερό, 0,26g R2A

broth και 0,96g άγαρ. Άλλα 10 τρυβλία επιστρώθηκαν με 1/5 R2A broth για την προετοιμασία του οποίου χρησιμοποιήθηκαν 80ml απιονισμένο νερό, 0,052g R2A broth και 0,96g άγαρ. Οι ποσότητες μετρήθηκαν με ζυγό ακριβείας και ογκομετρικό κύλινδρο. Τα μίγματα αναδεύτηκαν σε συσκευή ανάδευσης και τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο για αποστείρωση πριν την επίστρωσή τους. Τα περιεχόμενα του θρεπτικού μέσου R2A όπως περιέχονται στο λίτρο, αναγράφονται στον Πίνακα 4:

Πίνακας 4: Συνταγή θρεπτικού μέσου R2A.

Yeast Extract	0.5 g
Proteose Peptone No. 3	0.5 g
Casamino Acids	0.5 g
Dextrose	0.5 g
Soluble Starch	0.5 g
Sodium Pyruvate	0.3 g
Dipotassium Phosphate	0.3 g
Magnesium Sulfate	0.05 g

Πραγματοποιήθηκαν 12 διηθήσεις των 25ml βρόχινου νερού και τα φίλτρα τοποθετήθηκαν στα τρυβλία που είχαν προετοιμαστεί ως εξής: 6 φίλτρα σε τρυβλία με FullStrength R2A και 6 φίλτρα σε τρυβλία 1/5 R2A. Ως τυφλά χρησιμοποιήθηκαν 2 επιπλέον τρυβλία από κάθε συγκέντρωση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 6 φιλτραρίσματα των 360ml βρόχινου νερού και τα φίλτρα τοποθετήθηκαν στα τρυβλία που είχαν προετοιμαστεί με μίγμα βρόχινου νερού και 1,5% τελική συγκέντρωση άγαρ.

Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους θαλάμους επώασης ως εξής: τρυβλία με FullStrength R2A (Πίν. 4), τρυβλία με 1/5 R2A (Πίν. 5), τρυβλία χωρίς θρεπτικό (Πίν. 6).

Πίνακας 5: Συνθήκες επώασης δειγμάτων 3^{ου} πειράματος (θρεπτικό: FullStrength R2A).

Θερμοκρασίες	8°C	25°C
Τρυβλία	R2A(FS)-8a	R2A(FS)-25a
	R2A(FS)-8b	R2A(FS)-25b
	R2A(FS)-8c	R2A(FS)-25c
Τυφλά	R2A(FS)-8M	R2A(FS)-25M

Πίνακας 6: Συνθήκες επώασης δειγμάτων 3^{ου} πειράματος (θρεπτικό: 1/5 R2A).

Θερμοκρασίες	8°C	25°C
Τρυβλία	R2A(1/5)-8a	R2A(1/5)-25a
	R2A(1/5)-8b	R2A(1/5)-25b
	R2A(1/5)-8c	R2A(1/5)-25c
Τυφλά	R2A(1/5)-8M	R2A(1/5)-25M

Πίνακας 7: Συνθήκες επώασης δειγμάτων 3^{ου} πειράματος (χωρίς θρεπτικό).

Θερμοκρασίες	8°C	25°C
Τρυβλία	R2-8a	R2-25a
	R2-8b	R2-25b
	R2-8c	R2-25c

2.4. Πείραμα 4

Πραγματοποιήθηκαν 4 διηθήσεις των 80ml βρόχινου νερού και τα φίλτρα τοποθετήθηκαν στα τρυβλία που είχαν προετοιμαστεί ως εξής: 2 φίλτρα σε τρυβλία με FullStrength R2A και 2 φίλτρα σε τρυβλία 1/5 R2A.

Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους θαλάμους επώασης ως εξής: τρυβλία με FullStrength R2A (Πίν. 7), τρυβλία με 1/5 R2A (Πίν. 8).

Πίνακας 8: Συνθήκες επώασης δειγμάτων 4^{ου} πειράματος (θρεπτικό: FullStrength R2A).

Θερμοκρασίες	8°C	25°C
Τρυβλία	*R2A(FS)-8	*R2A(FS)-25

Πίνακας 9: Συνθήκες επώασης δειγμάτων 4^{ου} πειράματος (θρεπτικό: 1/5 R2A).

Θερμοκρασίες	8°C	25°C
Τρυβλία	*R2A(1/5)-8	*R2A(1/5)-25

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 10: Συνολικά στοιχειά δειγματοληψιών.

Πείραμα	Περιοχή	Ημερομηνία	Ωρα	Συνολικά L	Φύτρα		ml/φίλτρο	Θρεπτικό
					Θερ/σία 8	Θερ/σία 25		
1	Βόλος	25/11/2015	17.30-20.30	Σύνολο 6,5L	R1-10a	R1-20a	500ml	Χωρίς θρεπτικό
					R1-10b	R1-20b	0ml	
					R1-10c	R1-20c		
					τυφλό:8	τυφλό:10		
2	Αθήνα	7/1/2016	4.10-7.15	Σύνολο 1L	Ra-8	Ra-25	500ml	Χωρίς θρεπτικό
3	Βόλος	16/1/16-17/1/16	20.00-10.00	Σύνολο 3L	R2A(FS)-8a	R2A(FS)-25a	25ml	Full Strength R2A
					R2A(FS)-8b	R2A(FS)-25b	0ml	1/5 R2A
					R2A(FS)-8c	R2A(FS)-25c	25ml	Χωρίς θρεπτικό
					R2A(FS)-8M	R2A(FS)-25M	0ml	
					R2A(1/5)-8a	R2A(1/5)-25a	360ml	
					R2A(1/5)-8b	R2A(1/5)-25b		
					R2A(1/5)-8c	R2A(1/5)-25c		
					R2A(1/5)-8M	R2A(1/5)-25M		
					R2-8a	R2-25a		
					R2-8b	R2-25b		
R2-8c	R2-25c							
4	Βόλος	7/3/2016	18.00-21.30	Σύνολο 1L	*R2A(FS)-8	*R2A(FS)-25	80ml	Full Strength R2A
					*R2A(1/5)-8	*R2A(1/5)-25		1/5 R2A

4.1. Πείραμα 1

Πίνακας 4: Σημαντικές ημερομηνίες 1^{ου} πειράματος.

25/11/2015	Δειγματοληψία
26/11/2015	Επίστρωση
27/11/15-20/12/15 (25 ημέρες)	Παρατήρηση αποτελεσμάτων

Στο πείραμα 1 (Πίν. 10), στο οποίο επιστρώθηκαν τρυβλία χωρίς θρεπτικό μέσο, με νερό που συλλέχτηκε στην περιοχή του Βόλου, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών.

3.2. Πείραμα 2

Πίνακας 12:Σημαντικές ημερομηνίες 2^ο πειράματος.

7/1/2016	Δειγματοληψία
12/1/2016	Επίστρωση
14/01/16-22/01/16 (9 ημέρες)	Παρατήρηση αποτελεσμάτων

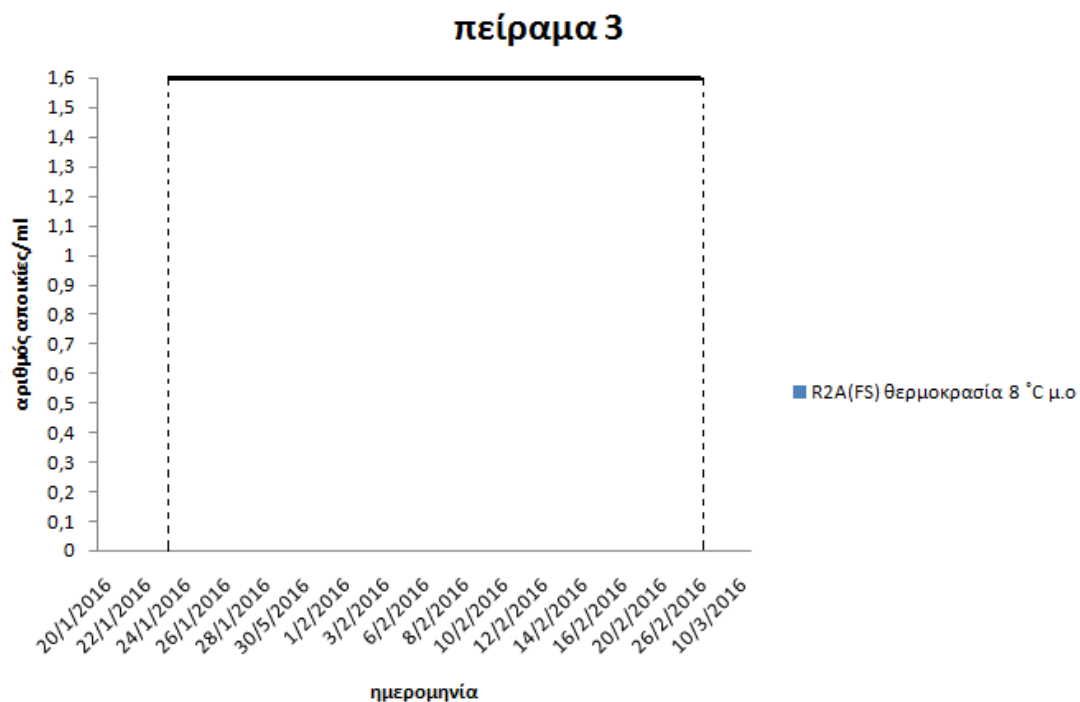
Στο πείραμα 2(Πίν. 11), στο οποίο επίσης δεν χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο, το νερό συλλέχθηκε από την Αθήνα και δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών.

3.3. Πείραμα 3

Πίνακας 13:Σημαντικές ημερομηνίες 3^ο πειράματος.

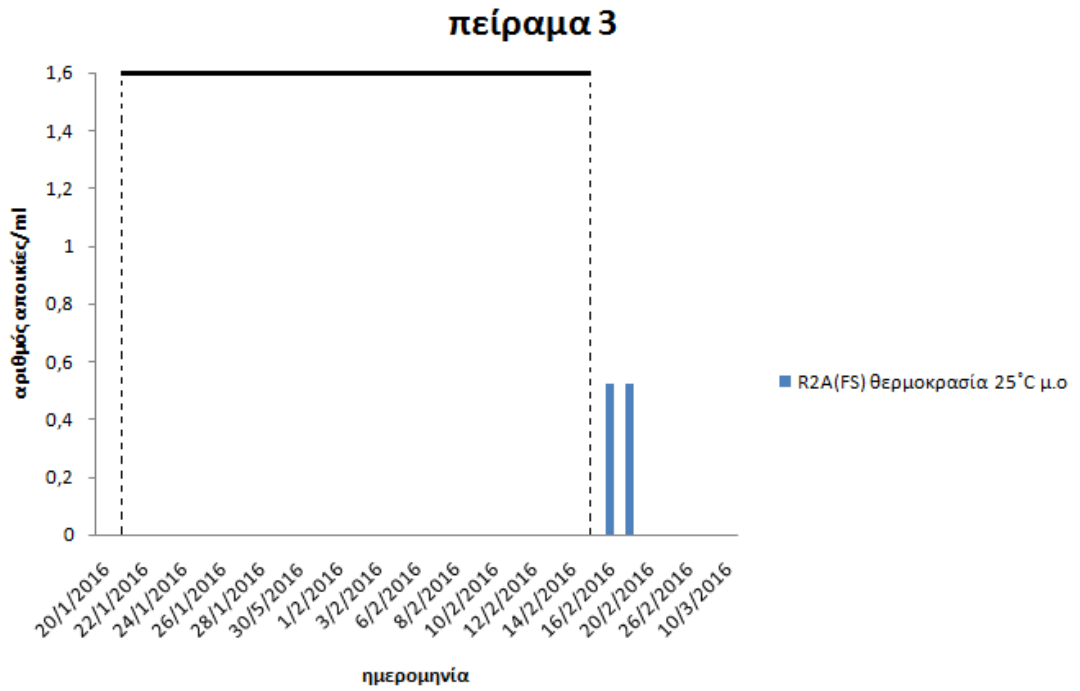
16/1/2016	Δειγματοληψία
19/1/2016	Επίστρωση
20/01-10/03/16 (51 ημέρες)	Παρατήρηση αποτελεσμάτων

Σε αυτό το πείραμα και στη θερμοκρασία των 8°C με θρεπτικό R2A FullStrength (Πίν. 12), την 4η ημέρα της επώασης παρατηρήθηκαν άπειρες αποικίες, που παραμέναν έως την 39η ημέρα (Εικ. 1).



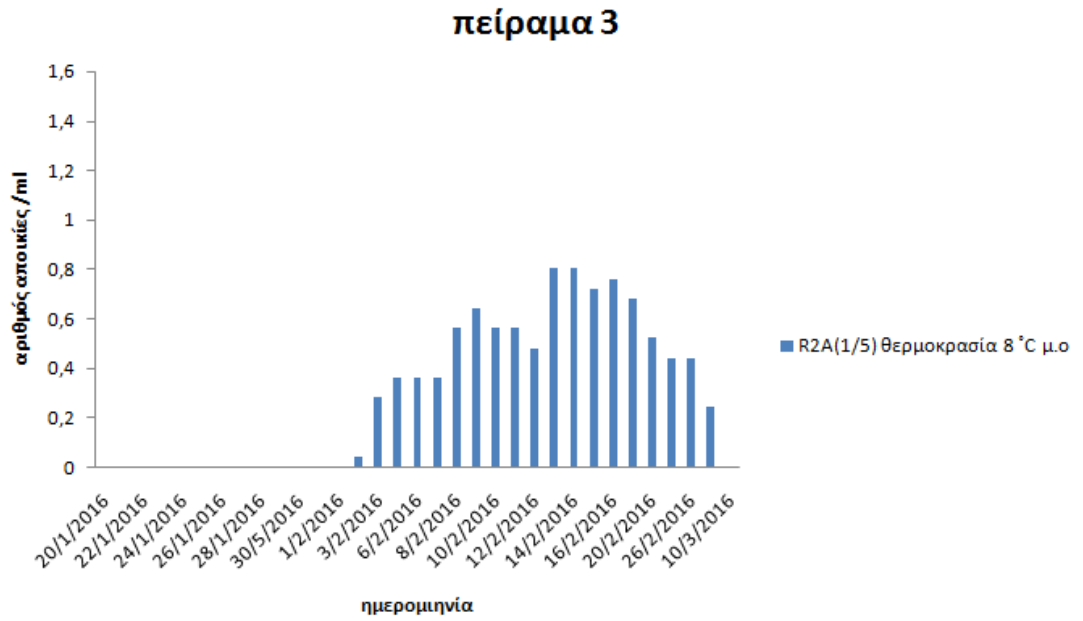
Εικόνα 1: Διάγραμμα ανάπτυξης αποικιών 3^{ου} πειράματος σε FullStrengthθρεπτικό στη θερμοκρασία των 8°C.

Στα τρυβλία με ίδιο θρεπτικό αλλά στην θερμοκρασία των 25°C, παρατηρήθηκαν άπειρες αποικίες από την 2η έως την 26η ημέρα. Την 28η, ο αριθμός των αποικιών μειώθηκε στις 0,52 αποικίες/ml (Εικ. 2).



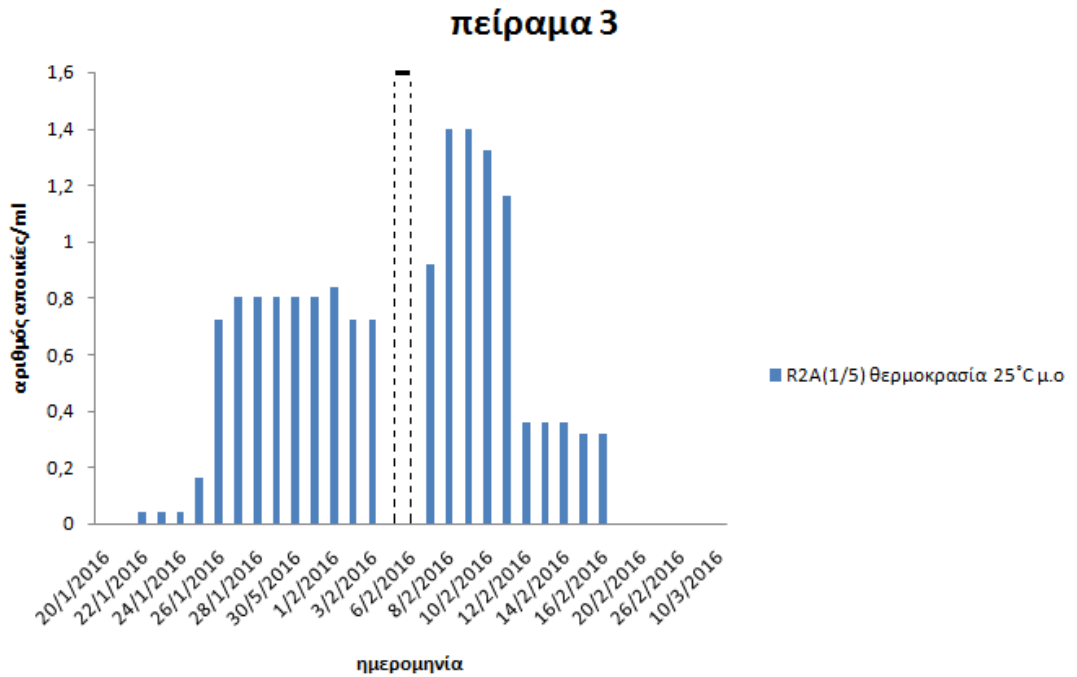
Εικόνα 2: Διάγραμμα ανάπτυξης αποικιών 3^{ου} πειράματος σε FullStrengthθρεπτικό στη θερμοκρασία των 25°C.

Στα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκε το 1/5 της προηγούμενης συγκέντρωσης θρεπτικού και στους 8°C, παρατηρήθηκε αύξηση των αποικιών της τάξεως των 0,04 αποικιών/ml την 14η ημέρα της επώασης. Το μέγιστο πλήθος αποικιών υπήρξε την 25ημε 0,8 αποικίες/ml (Εικ. 3).



Εικόνα 3: Διάγραμμα ανάπτυξης αποικιών 3^{ου} πειράματος στο 1/5 της συγκέντρωσης θρεπτικού R2A και στη θερμοκρασία των 8°C.

Τα τρυβλία της ίδιας συγκέντρωσης θρεπτικού που επώαστηκαν στους 25°C, εμφάνισαν 0,04 αποικίες/ml την 3η ημέρα, μέγιστο άπειρες αποικίες την 16η και 17η ημέρα (Εικ. 4).

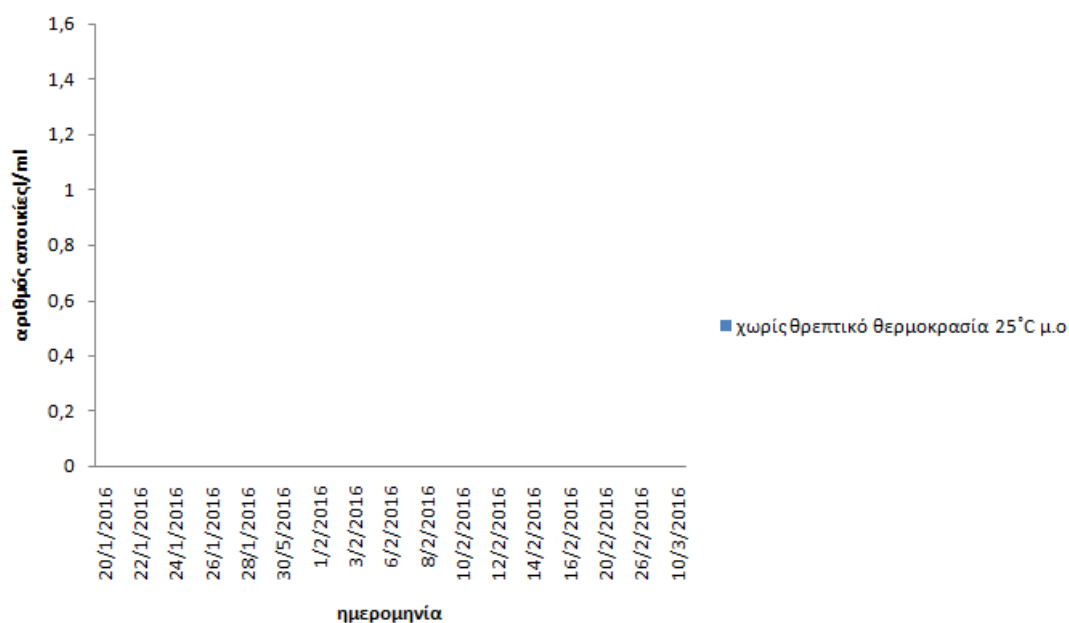


Εικόνα 4: Διάγραμμα ανάπτυξης αποικιών 3^{ου} πειράματος στο 1/5 της συγκέντρωσης θρεπτικού R2A και στη θερμοκρασία των 25°C.

Στα τρυβλία χωρίς θρεπτικό που επώαστηκαν στους 8°C δεν εμφανίστηκε καμία αποικία καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Στα αντίστοιχα τρυβλία χωρίς θρεπτικό που επώαστηκαν στους 25°C, εμφανίστηκαν την 26η ημέρα της επώασης 0,003 αποικίες/ml και διήρκεσαν για 3 ημέρες (Εικ. 5).

πείραμα 3



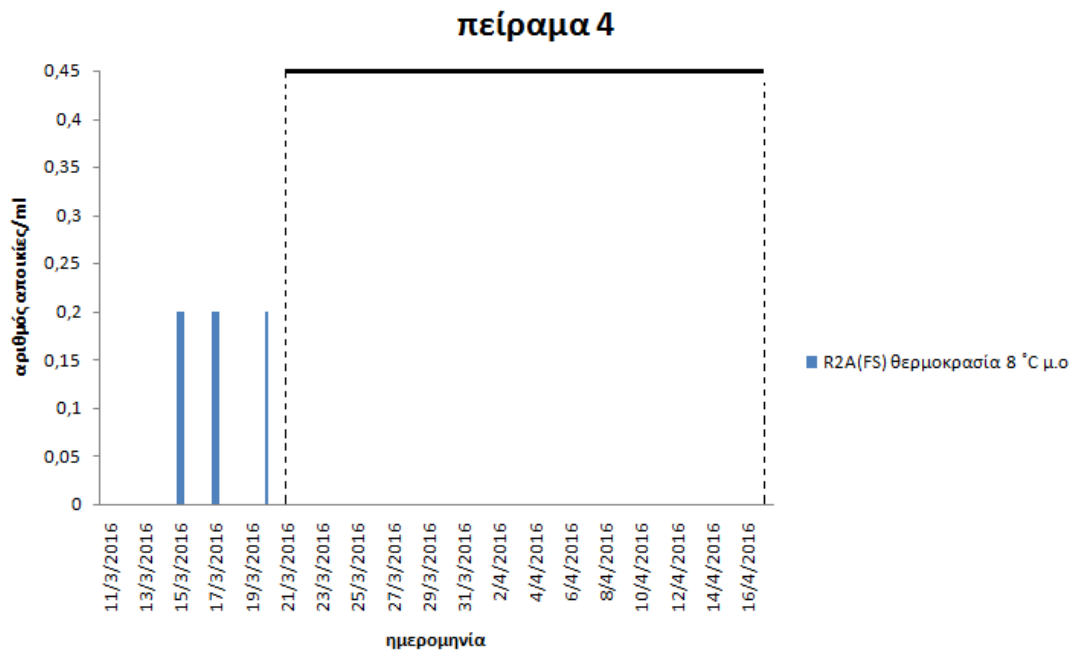
Εικόνα 5: Διάγραμμα ανάπτυξης αποικιών 3^{ου} πειράματος χωρίς θρεπτικό και στη θερμοκρασία των 25°C.

3.4. Πείραμα 4

Πίνακας 14: Σημαντικές ημερομηνίες 4^{ου} πειράματος.

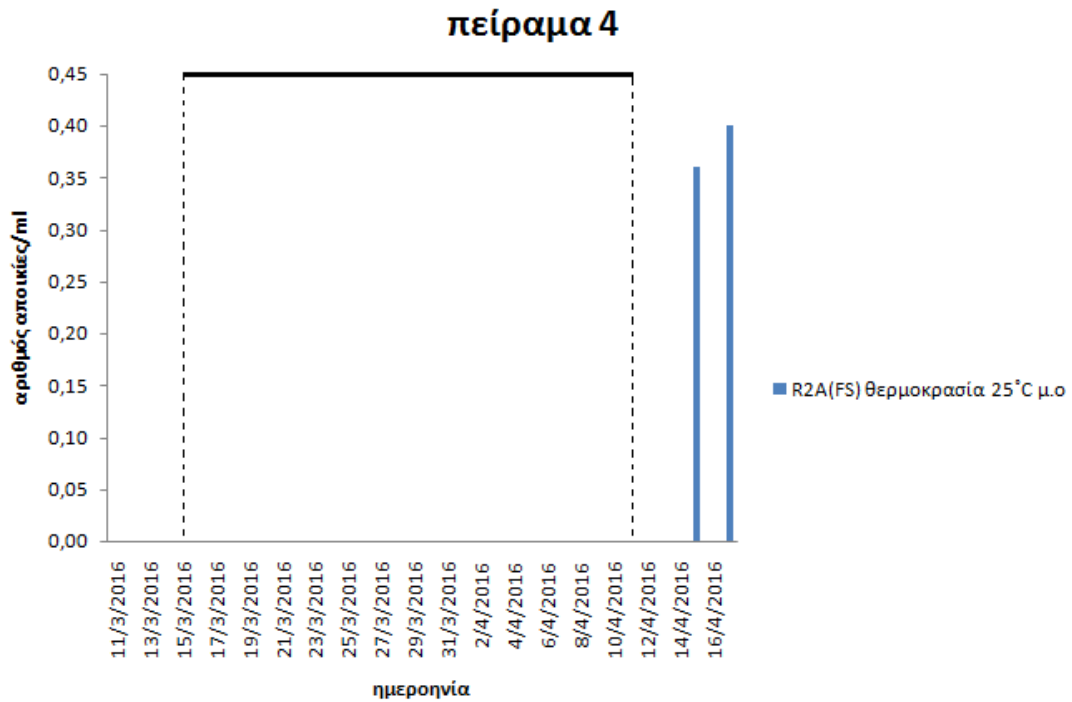
7/3/2016	Δειγματοληψία
10/3/2016	Επίστρωση
11/03-20/05/16 (61 ημέρες)	Παρατήρηση αποτελεσμάτων

Στο πείραμα 4 και με θρεπτικό FullStrength, τα τρυβλία που επώαστηκαν στη θερμοκρασίας των 8°C εμφάνισαν 0,2 αποικίες/ml την 5η ημέρα της επώασης. Την 11η ημέρα έφτασαν τις άπειρες (Εικ. 6).



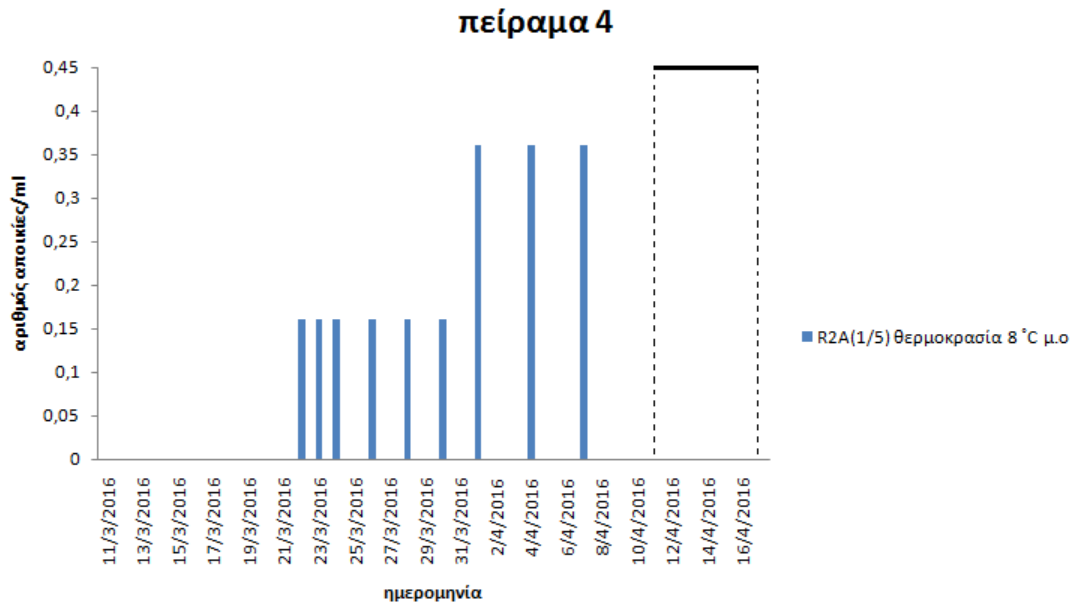
Εικόνα 6: Διάγραμμα ανάπτυξης αποικιών 4^{ου} πειράματος σε θρεπτικό FullStrength και σε θερμοκρασία 8°C.

Στα τρυβλία που επώαστηκαν στους 25°C, την 5η ημέρα εμφανίστηκαν άπειρες αποικίες (Εικ. 7).



Εικόνα 7: Διάγραμμα ανάπτυξης αποικιών 4^{ου} πειράματος σε θρεπτικό FullStrength και σε θερμοκρασία 25°C.

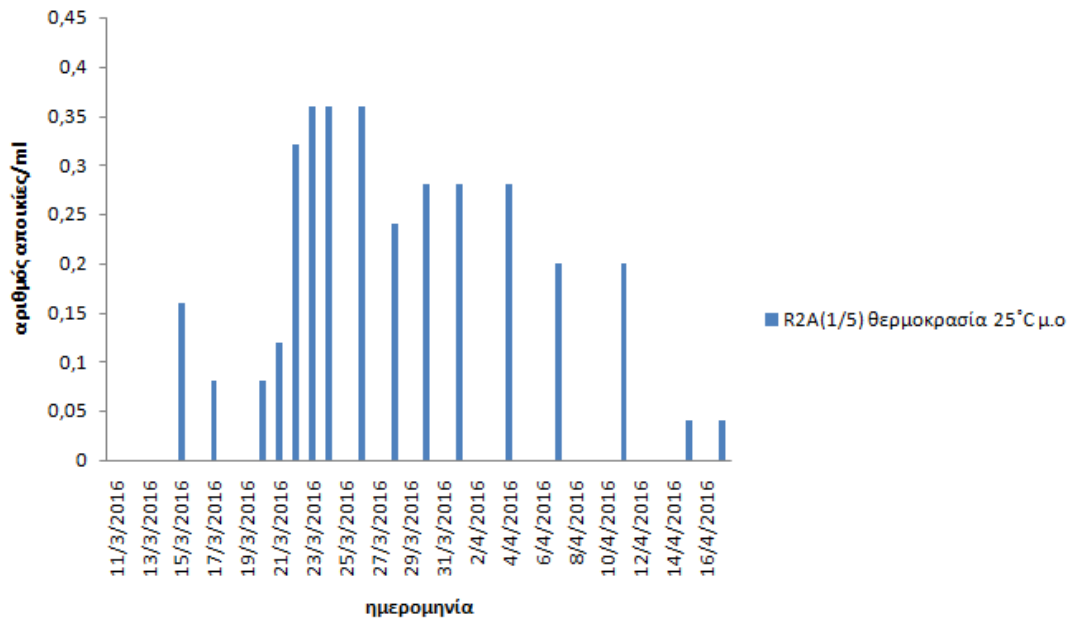
Στο 1/5 της συγκέντρωσης του FullStrength, στα τρυβλία των 8°C, εμφανίστηκαν την 12η ημέρα επώασης 0,16 αποικίες/ml και την 32η ημέρα εμφανίστηκαν άπειρες αποικίες (Εικ. 8).



Εικόνα 8: Διάγραμμα ανάπτυξης αποικιών 4^{ου} πειράματος στο 1/5 της συγκέντρωσης θρεπτικού R2Ακαι σε θερμοκρασία 8°C.

Στα αντίστοιχα τρυβλία των 25°C, την 5η ημέρα εμφανίστηκαν 0,16 αποικίες/ml και το μέγιστο των 0,36 αποικιών/ml την 13η ημέρα (Εικ. 9).

πείραμα 4



Εικόνα 9: Διάγραμμα ανάπτυξης αποικιών 2^{ου} πειράματος στο 1/5 της συγκέντρωσης θρεπτικού R2A και σε θερμοκρασία 25°C.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία βακτηρίων στην ατμόσφαιρα μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη νεφών, την ατμοσφαιρική χημεία και τη μικροβιακή βιογεωγραφία. Η πληρέστερη γνώση των βακτηριακών συγκεντρώσεων και κατανομών στην ατμόσφαιρα είναι απαραίτητη για την αξιολόγηση αυτών των ισχυρισμών. Η υδατική/παγωμένη φάση του χαμηλότερου στρώματος της ατμόσφαιρας περιέχει εδαφικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι παραδοσιακά θεωρούνται αδρανείς. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το βρόχινο νερό περιέχει ενεργές μικροβιακές κοινότητες είτε με τη μέτρηση της μακρομοριακής τους σύνθεσης (Sattler et al., 2001) ή με την αναγωγή των τεχνητών τερματικών αποδεκτών ηλεκτρονίων (Hill et al., 2007). Αυτές οι μικροβιακές κοινότητες μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά πολλές διαδικασίες των χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων. Τα μικρόβια στην ατμόσφαιρα μπορούν να χρησιμεύσουν ως πυρήνες σχηματισμού νεφών ή πάγου (Delort et al., 2010, Hoose et al., 2010, Savvides et al., 2011). Τα μεταβολικώς ενεργά κύτταρα θα μπορούσαν να μεταβάλουν τη χημεία των νεφών, για παράδειγμα μετασχηματίζοντας οργανικό άνθρακα (Amato et al., 2007a, Amato et al., 2007b) ή μορφές αζώτου (Hill et al., 2007). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί στην κατώτερη ατμόσφαιρα μπορούν να μεταφερθούν μέσω αερολυμάτων και σταγονιδίων νεφών, στα οποία παραμένουν βιώσιμοι, αντιπροσωπεύοντας ένα ζήτημα δημόσιας υγείας ειδικά σε αστικά περιβάλλοντα (Peccia and Hernandez, 2006). Αυτή η μεταφορά μικροοργανισμών μέσω της βροχής αναμένεται να έχει επηρεάσει και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, στην οποία βρέθηκαν άπειρες αποικίες μικροοργανισμών σε μικρό όγκο νερού.

Στη μελέτη των Amato et al. (2007) διερευνήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών και του χημικού περιβάλλοντος που παρέχεται από το βρόχινο νερό. Το διάλυμα του νερού των νεφών μπορεί να προσφέρει θρεπτικό υλικό για τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, λόγω των οργανικών ενώσεων που προσφέρει. Κατά συνέπεια, η πρόσληψη χημικών ενώσεων από μικροοργανισμούς θα μπορούσε να έχει επίδραση στη σύνθεση των νεφών, που θεωρείται ότι έχουν πρωταρχική σημασία στην ατμοσφαιρική χημεία. Οι δοκιμές βιοαποικοδόμησης σε 60 μικροβιακά στελέχη (βακτήρια και ζυμομύκητες), έδειξαν υψηλή δραστηριότητα σε οξικό, μυρμηκικό, L-γαλακτικό και φορμαλδεΐδη.

Αναφορικά με τον ρόλο των μικροοργανισμών στα νέφη, έχει προταθεί ότι η παρουσία βακτηριδίων στον αέρα θα μπορούσε να επηρεάσει τον σχηματισμό νέφους ενεργώντας ως πυρήνες πάγου και πυρήνες συμπύκνωσης νέφους, με συνέπειες για την παγκόσμια κατανομή των νεφών και των βροχοπτώσεων αλλά και το κλίμα γενικότερα (Sunand and Ariya, 2006, Mohler et al., 2007, Christner et al., 2008, Mohler et al., 2008).

Οι μικροοργανισμοί στη βροχή μπορούν να έχουν διάφορες συμπεριφορές προς τις χημικές ενώσεις που υπάρχουν στην ατμόσφαιρα. Μπορούν να αντιπροσωπεύουν καταβόθρα ή πηγή οργανικού άνθρακα και ίσως θα έπρεπε να θεωρηθούν παράγοντες της χημείας των νεφών. Όπως υποδεικνύουν οι Ariya και Amyot (2004), η μικροβιακή συνιστώσα των νεφών θα μπορούσε να συγκρούεται με τις χημικές διεργασίες που εμφανίζονται στα σταγονίδια και τελικά να έχει αμελητέα επίδραση στη χημική σύνθεση τους.

Τα βακτηρίδια, οι μύκητες, οι ζύμες και τα πρωτόζωα δεν μπορούν μόνο να επιβιώσουν σε ακραίες συνθήκες (Matthias-Maser and Jaenicke, 1995, Matthias-Maser et al., 1995, 2000, Fuzzi et al., 1997) αλλά ορισμένα από αυτά μπορούν να

αναπτύξουν και να τροποποιήσουν ενδεχομένως τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του νέφους και της βροχής. Αυτό οφείλεται καταρχήν στις υγροσκοπικές ιδιότητες των πυρήνων (Szyrmer and Zawadzki, 1997, Cochet and Widehem, 2000). Δεύτερον, οι μικροοργανισμοί μπορούν να θεωρηθούν ως βιοκαταλύτες που μπορούν να μετασχηματίζουν οργανικές και ανόργανες ενώσεις σε νεροπυρήνες. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι βακτηρίδια και μύκητες που μεταφέρονται με αέρα μπορούν να μετασχηματίζουν και δικαρθοξυλικά οξέα (Ariya et al., 2002).

Τα βακτηριακά και μυκητιακά κύτταρα είναι παρόντα σε συγκεντρώσεις περίπου $\sim 10^4$ και $\sim 10^3$ κύτταρα/ m^{-3} αντίστοιχα, σε μια απομακρυσμένη θέση κάτω από ατμοσφαιρικές συνθήκες υποβάθρου (Katial et al., 1997, Bauer et al., 2002a, Harrison et al., 2004). Περίπου 10^2 από αυτά τα κύτταρα μπορούν να ανακτηθούν με αερόβια καλλιέργεια, τόσο για τα βακτηρίδια όσο και για τους μύκητες (Shaffer and Lighthart, 1997). Τα βακτήρια, οι μύκητες, οι ζυμομύκητες και τα πρωτόζωα όχι μόνο μπορούν να επιβιώσουν σε τέτοια μέσα (Matthias-Maser and Jaenicke, 1995, Fuzzi et al., 1997), αλλά μερικά από αυτά μπορούν να αναπτύξουν και να τροποποιήσουν ενδεχομένως τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του νέφους και της βροχής. Αυτό οφείλεται από τη μία στις υγροσκοπικές και ιδιότητες σχηματισμού πάγου των πυρήνων, που μπορούν να επηρεάσουν το σχηματισμό σταγονιδίων και κρυστάλλων (Szyrmer and Zawadzki, 1997, Cochet and Widehem, 2000) και από την άλλη στο ότι οι μικροοργανισμοί μπορούν να θεωρηθούν ως βιοκαταλύτες που μπορούν να μετασχηματίζουν οργανικές και ανόργανες ενώσεις στο νερό των νεφών. Επιπλέον, οι Sattler et al., (2001), έδειξαν ότι οι μικροοργανισμοί που συλλέγονται από τα υπερψυχθέντα σταγονίδια νέφους είναι ικανοί να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες (≤ 0 °C), έχοντας έτσι έναν ενεργό μεταβολισμό κάτω από συνθήκες παρόμοιες με εκείνες των νεφών.

Θεωρείται ότι οι αερομεταφερόμενοι μικροοργανισμοί είναι λιγότεροι σε μεγάλο υψόμετρο απ' ό τι κοντά στο έδαφος (Amato et al., 2007), ενώ η σχετική συμβολή των βακτηρίων (σε σχέση με τα μυκητιακά κύτταρα) αυξάνεται με το υψόμετρο (Timmons et al., 1966, Fulton and Mitchell, 1966) πιθανόν λόγω του μικρότερου μεγέθους τους και της συνακόλουθης μικρότερης ταχύτητας διαχωρισμού (Shaffer and Lighthart, 1997, Jones and Harrison, 2004).

Αναφέρετε επίσης η ύπαρξη ημερήσιου κύκλου, με μέγιστο περίπου το μεσημέρι (Lighthart and Shaffer, 1995, Lighthart et al., 1999). Επιπλέον, οι μάζες των αερίων που επηρεάζονται από την αστική περιοχή έχουν γενικά περισσότερα βακτήρια από τα αγροτικά και παράκτια (Fulton and Mitchell, 1966, Bovallius et al., 1978b, Shaffer and Lighthart, 1997). Από τους Mancinelli and Shulls, (1978) παρατηρήθηκε αρνητικός συνδυασμός μεταξύ της ανθρωπογενούς επίδρασης στις μάζες του αέρα και της ποσοτικής τους περιεκτικότητας σε μικροοργανισμούς. Σύμφωνα με τους Garnaud et al., (1999), η μόλυνση των όμβριων υδάτων με ίχνη μετάλλων είναι μόνο ελαφρώς μεγαλύτερη στο κέντρο του Παρισιού από ότι στο Fontainebleau, η οποία απεικονίζει την εμφάνιση μεταφοράς μεσαίας εμβέλειας ατμοσφαιρικής ρύπανσης.

Η συγκέντρωση των βακτηρίων είναι μία τάξη μεγέθους μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση των μυκητιακών κυττάρων, με αντίστοιχες τιμές περίπου $8,1 \times 10^4$ και $5,9 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$. Οι μετρήσεις ATP δείχνουν ότι μια μεγάλη πλειοψηφία των βακτηριδίων είναι ζωντανή και ενεργή στα νέφη (Amato et al., 2007). Επομένως στην αστική περιοχή του Βόλου, αναμένεται αυξημένο μικροβιακό φορτίο στην ατμόσφαιρα πάνω από την πόλη. Ακόμα μεγαλύτερη υπολογίζεται η επιβάρυνση των αέριων μαζών στην ατμόσφαιρα της Αθήνας. Στην παρούσα μελέτη δεν χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό στο νερό που συλλέχθηκε στην Αθήνα, επομένως

δεν υπήρξε δημιουργία αποικιών. Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε αντίστοιχη επώαση σε θρεπτικό θα αναμενόταν μεγάλη πληθυσμιακή διαφορά.

Σύμφωνα με τους Amato et al., (2007), οι υψηλότερες συγκεντρώσεις καλλιεργούμενων βακτηρίων και μυκητιακών κυττάρων στο PuyDeDôme της Γαλλίας εντοπίζονται το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Η συγκέντρωση των μικροοργανισμών που καλλιεργούνται σε θερμοκρασία 15 °C σε σχέση με εκείνες που καλλιεργούνται σε 27 °C αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ψυχρότερης εποχής και αντιμετωπίζει ποιοτικές μεταβολές της σύνθεσης. Αυτό το συμπέρασμα έρχεται σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά τους χειμερινούς μήνες Νοέμβριο - Μάρτιο, όπου τα δείγματα που επώασθηκαν στους 25°C εμφάνισαν περισσότερες αποικίες απ' ό,τι αυτά των 8°C. Από αυτό προκύπτουν διάφορες υποθέσεις. Εφόσον οι μικροοργανισμοί που επώασθηκαν πολλαπλασιάστηκαν περισσότερο στην πιο υψηλή θερμοκρασία (25°C), ίσως να μην κατατάσσονται σε αυτούς που επικρατούν στην ατμόσφαιρα πιο κρύων περιοχών τους χειμερινούς μήνες. Το κλίμα της Μεσογείου χαρακτηρίζεται από ζεστά, ξηρά καλοκαίρια και κρύους και υγρούς χειμώνες. Τη δεδομένη χρονιά (2015-2016) η βροχόπτωση ήταν πολύ περιορισμένη και ασθενής και η θερμοκρασία δεν έφτασε σε πολύ χαμηλές τιμές για τα δεδομένα της εποχής. Επομένως, είναι πιθανό να μην αναπτύχθηκαν αρκετοί ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί, όπως ήταν αναμενόμενο για την εποχή.

Οι μικροοργανισμοί που προέρχονται από τους ωκεανούς είναι προενσωματωμένοι σε σταγονίδια νέφους σε σύγκριση με εκείνους που προέρχονται από ηπειρωτικές πηγές και ως εκ τούτου ο ωκεανός αποτελεί σημαντική πηγή μικροοργανισμών για τα νέφη. Μπορούν να δοθούν πολλές εκτιμήσεις για να υποστηριχθεί αυτή η ιδέα, όπως η ευνοούμενη αερομεταφορά από τις επιφάνειες του

νερού, η υψηλή υγρασκοπία και το μέγεθος των ωκεάνιων αερολυμάτων. Επομένως στην παρούσα μελέτη, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η παραθαλάσσια θέση των πόλεων του Βόλου και της Αθήνας, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για το είδος των μικροοργανισμών, που μέσω της εξάτμισης καταλήγουν στην ατμόσφαιρα.

Όσον αφορά τους παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του συλλεγμένου σε δεξαμενές βρόχινου νερού, τα αποτελέσματα των Evans et al. (2006) έδειξαν ότι ήταν σημαντική η συμβολή των αερομεταφερόμενων μικροοργανισμών στο βακτηριακό φορτίο της οροφής, καθώς επίσης ότι το συνολικό φορτίο επηρεάστηκε από τις ταχύτητες του ανέμου, ενώ η σύνθεση του άλλαξε με την κατεύθυνση του ανέμου. Αυτό συνέβη πιθανώς λόγω της μεγαλύτερης ανόδου των οργανισμών από πηγές και της άφιξης περισσότερων οργανισμών στην επιφάνεια απορροής ανά μονάδα του χρόνου. Από μικροβιολογικής άποψης, δύο διαφορετικές φάσεις μόλυνσης του βρόχινου νερού που καταλήγει στις στέγες είναι πιθανές: είτε μέσω δραστηριοτήτων εντόμων, πουλιών και μικρών θηλαστικών, ή μέσω ατμοσφαιρικής εναπόθεσης περιβαλλοντικών οργανισμών. Μεγάλη έμφαση έχει δοθεί στην πρώτη και πιθανότερη διαδικασία εισαγωγής παθογόνων οργανισμών στο σύστημα αποθήκευσης βρόχινου νερού, μέσω δηλαδή της μόλυνσης με κόπρανα των επιφανειών, της αναπαραγωγής εντόμων ή της αποσύνθεσης νεκρών οργανισμών και άλλων οργανικών υπολειμμάτων (Jones and Harrison, 2004). Αντιστρόφως, οι εκθέσεις σχετικά με την ποιότητα αυτών των υδάτων δεν έδωσαν ιδιαίτερη έμφαση στους αερομεταφερόμενους μικροοργανισμούς. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αεροβιολογικές μελέτες οι οποίες εξετάστηκαν από τους Lighthart (2000) και Jones and Harrison (2004), έχουν επανειλημμένα δείξει εποχιακές και μετεωρολογικές επιρροές στις ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις βακτηριδίων και σπορίων μυκήτων. Η επίδειξη της επίδρασης των καιρικών συνθηκών στη βακτηριακή σύνθεση

καταδεικνύει ότι οι αερομεταφερόμενοι μικροοργανισμοί συμβάλλουν σημαντικά στο βακτηριακό φορτίο της στέγης. Επομένως μπορούμε να υποθέσουμε ότι μέρος του βακτηριακού φορτίου του παρόντος πειράματος, είναι πιθανόν να προέρχεται από τέτοιου είδους αέριες μεταφορές. Όπως προαναφέρθηκε, στο 3^ο πείραμα, σε ένα από τα τριβλία χωρίς θρεπτικό, που επώαστηκαν στους 25°C, εμφανίστηκαν την 26η ημέρα της επώασης 3 αποικίες και διήρκεσαν για 3 ημέρες (διάγραμμα 5). Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι είναι πιθανόν να υπάρχει βιολογικό υλικό, με την μορφή γύρης, σπόρια μυκήτων, βακτηρίων, ιών ή θραυσμάτων φυτικής και ζωικής ύλης (Alan and Harrison, 2004), το οποίο λειτούργησε ως θρεπτικό υλικό για την –έστω και καθυστερημένα- ανάπτυξη των αποικιών.

Σύμφωνα με τους Amato et al., (2005), το pH μπορεί να αποτελέσει μείζονα παράγοντα που ελέγχει τη δομή της προσαρμοσμένης κοινότητας βακτηρίων που επιβιώνει στα νέφη: ένα όξινο pH (π.χ. 4,9) ευνοεί την παρουσία μυκήτων και βακτηρίων σχηματισμού σπορίων. Περισσότερο ουδέτερο pH (π.χ. ¼ 5, 8) ευνοεί μεγαλύτερη βιοποικιλότητα.

Οι Savvides et al., (2011) πραγματοποίησαν επιλεκτική απομόνωση των ιθαγενών στελεχών *Pseudomonas syringae* με ιδιότητες πύκνωσης πυρήνων από ένα χιονοδρομικό κέντρο, συμφωνώντας με τους Bauer et al. (2003) και μπορούν να παράγουν βιοδραστικές ουσίες που θα μπορούσαν να δράσουν επίσης ως πυρήνες συμπύκνωσης (Delort et al., 2010).

Στα αποτελέσματά τους, μόνο 7 από τα 147 βακτηριακά προϊόντα απομόνωσης χαρακτηρίστηκαν ως *P. syringae* σύμφωνα με το βιοχημικό τους προφίλ, εκ των οποίων μόνο 3 παρουσίασαν δραστηριότητα σχηματισμού πυρήνων πάγου. Όπως αναμενόταν, τα 7 στελέχη απομονώθηκαν από τη φυλόσφαιρα, έναν κοινό βιότοπο για τα στελέχη του *Pseudomonas* (Hirano and Upper, 2000). Τα

περισσότερα στελέχη του *Pseudomonas* ανακτήθηκαν από την θέση που είχε τα περισσότερα φυτικά είδη τα οποία, μεταξύ άλλων παραγόντων όπως οι ημερήσιοι κύκλοι, η θερμοκρασία, η ακτινοβολία, η υγρασία, η ταχύτητα του ανέμου και η υγρασία των φύλλων, επηρεάζουν το μέγεθος του πληθυσμού *Pseudomonas* (Hirano and Uppel, 1995).

Σύμφωνα με τους Genitsaris et al. (2017), οι υψηλότερες τιμές βακτηριακής αφθονίας στην αστική περιοχή της Θεσσαλονίκης καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, με τιμές που υπερβαίνουν τις αφθονίες που καταγράφηκαν σε άλλες αστικές περιοχές σε ολόκληρη την Ευρώπη, φθάνοντας τα 41×10^4 κύτταρα/ m^{-3} . Από τις βασικές μετεωρολογικές παραμέτρους, διαπιστώθηκε ότι μόνο η θερμοκρασία του αέρα επηρεάζει σημαντικά την αφθονία και τη βιομάζα των αερομεταφερόμενων βακτηρίων. Όσον αφορά την ταξινομική σύνθεση της αερομεταφερόμενης βακτηριακής κοινότητας, η ομάδα των *Proteobacteria* ήταν η πιο ποικιλόμορφη, με το 47% του συνολικού αριθμού των λειτουργικών ταξινομικών μονάδων να τους ανήκουν, ακολουθούμενες από τις συνομοταξίες των *Firmicutes*, *Actinobacteria* και *Bacteroidetes*. Τα *Actinobacteria* είναι ποικιλόμορφη ομάδα κυρίως αερόβιων βακτηρίων, τα οποία βρίσκονται συνήθως στο έδαφος και στα φυτά. Ορισμένα γένη των *Actinobacteria*, όπως το *Corynebacterium*, περιέχουν είδη τα οποία είναι παθογόνα για ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Η κυρίαρχη λειτουργική ταξινομική μονάδα ανήκε στα γ -*Proteobacteria* τα οποία είναι στενά συνδεδεμένα με το *Pseudomonas sp.*, που για ακόμη μια φορά συμμετείχε ενεργά στο σχηματισμό πυρήνων πάγου στην ατμόσφαιρα. Έχει διαπιστωθεί ότι τα γ -*Proteobacteria*, τα πιο αποτελεσματικά γνωστά βακτήρια συμπύκνωσης πυρήνων πάγου, αποτελούν αναλογικά μικρό μέρος των τροποσφαιρικών κοινοτήτων σε σύγκριση με τις κοινότητες που έχουν μελετηθεί κοντά στην επιφάνεια (Brodie et al., 2007).

Η πλειοψηφία των ταξινομικών μονάδων που εντοπίστηκαν σε όλες τις εποχές συνδέονταν με γένη από την προέλευση του εδάφους και των λυμάτων, ενώ αρκετές συνδέονταν με γένη που περιλαμβάνουν γνωστά ή ευκαιριακά παθογόνα. Ωστόσο, μόνο οι σπάνιες ταξινομικές μονάδες συνδέθηκαν με είδη πιθανούς θαλάσσιας προέλευσης (π.χ. *Synechococcus* spp.). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ατμόσφαιρα της περιοχής μελέτης φιλοξενεί μια ποικιλόμορφη και άφθονη βακτηριακή κοινότητα.

Στην έρευνα των Amato et al., (2005) απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν ετερότροφα βακτήρια από νέφη με κυμαινόμενη θερμοκρασία από -2°C έως 5°C. Από την δειγματοληψία αυτή ταυτοποιήθηκαν 17 διαφορετικά είδη βακτηρίων από διάφορες συνομοταξίες. Βασισμένοι σε άμεσες μικροσκοπικές παρατηρήσεις, οι συγγραφείς ανέφεραν ότι λιγότερο από το 1% του συνολικού συλλεγμένου πληθυσμού των βακτηρίων μπορούσε να καλλιεργηθεί. Τα αποτελέσματά τους συμφωνούν με των Genitsaris et al. (2017), καθώς και των Despres et al. (2007), στον οποίων τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε αλληλούχιση για τον χαρακτηρισμό αερομεταφερόμενων βακτηρίων που συλλέχθηκαν σε αστικό, αγροτικό και περιβάλλον με μεγάλο υψόμετρο. Οι πλειοψηφία των αλληλουχιών που ανακτήθηκαν ανήκουν στα *Proteobacteria* (42 από τα 53), ενώ μια μικρότερη αναλογία αλληλουχιών ταυτοποιήθηκαν με τα *Actinobacteria* και τα *Firmicutes*. Όπως έχει αποδειχθεί και από τους (Hill et al., 2007) έως και το 70% των κυττάρων σε ένα σύννεφο βροχής μπορεί να είναι μεταβολικά ενεργά, η ακριβής ποικιλομορφία (καλλιεργήσιμων και μη μικροβίων) των οποίων υπολογίζεται ότι ήταν πιθανά πολύ μεγαλύτερη. Αργότερα οι Amato et al. (2007) απέδειξαν ότι η πλειοψηφία των βακτηρίων στα δείγματα από νέφη με σχετικά χαμηλή θερμοκρασία ήταν ενεργά. Στο Κολοράντο, οι Bowers et al. (2009), συνέλεξαν δείγματα από νέφη σε μεγάλο υψόμετρο. Η μέθοδος αλληλούχισης Sanger και η μέθοδος απευθείας αλληλούχισης

της πυροαλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν για την διαπίστωση των βακτηριακών κοινοτήτων που κυριαρχούσαν στην περιοχή. Αυτές συμφωνούν με τις προηγούμενες μελέτες, προσθέτοντας τις συνομοταξίες των *Acidobacteria* και *Actibacteria*. Η δυνητική σημασία του μικροβιακού μεταβολισμού στα συστήματα νεφών συζητήθηκε από τους Delort et al. (2010). Σε ποικιλία οικοτόπων εντοπίζονται τα για ακόμη μια φορά τα *Proteobacteria*. Για μια σειρά νεκρωτικών φυτικών ασθενειών είναι υπεύθυνα τα είδη *Xanthomonas* τα οποία κατά κύριο λόγο είναι φυτοπαθογόνα (Kourtev, 2011). Τα είδη *Arthrobacter spp.* είναι γνωστά για την ικανότητά τους να αντέχουν σε ακραία ξηρασία και ελλείψεις σε θρεπτικό, συνθήκες που θα μπορούσαν ενδεχομένως να είναι συνηθισμένες σε περιβάλλοντα νεφών. Ένα σχετικά μικρό ποσοστό των ακολουθιών σχετίζονταν με τα *Firmicutes*. Ορισμένα *Firmicutes* (για παράδειγμα μέλη του γένους *Bacillus*) έχουν βρεθεί ότι παράγουν βιοδραστικές ουσίες που θα μπορούσαν να δράσουν επίσης ως πυρήνες συμπύκνωσης (Delort et al., 2010). Τα *Clostridia* απαντώνται συνήθως στο έδαφος και στις εντερικές οδούς των θηλαστικών και αναερόβια ζυμωτικά βακτήρια.

Σε μετέπειτα έρευνα των Amato et al., (2007), οι περισσότεροι από τους μύκητες που απομονώθηκαν ήταν του γένους *Cladosporium* ή *Trametes* και οι ζύμες του γένους *Cryptococcus*. Τα βακτήρια που βρέθηκαν συμφωνούσαν με την προηγούμενη έρευνα των ίδιων, αλλά και με αυτή των Genitsaris et al. που ακολούθησε το 2011. Οι Kourtev et al. (2011) αργότερα εντόπισαν και μέλη των *Cyanobacteria*. Ο αριθμός των Gram- αρνητικών βακτηρίων είναι μεγαλύτερος το καλοκαίρι από ότι το χειμώνα. Τα μισά από τα δοκιμασθέντα στελέχη είχαν την ικανότητα να αναπτυχθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες (5 °C): τα περισσότερα από αυτά είναι Gram- αρνητικά βακτήρια και μερικά φαίνεται να είναι ψυχρόφιλα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ένα μεγάλο μέρος των βακτηρίων που υπάρχουν

στα νέφη έχουν την ικανότητα να είναι μεταβολικά ενεργά εκεί. Οι Gould (1999) και Lye (2002) έχουν ταυτοποιήσει διάφορα παθογόνα όπως τα *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Clostridium*, *Legionella*, *Campylobacter*, *Cryptosporidium* και *Giardiaspp.* σε δείγματα που λήφθηκαν από δεξαμενές όμβριου ύδατος.

Περίπου το 85% των ολικών αλληλουχιών του γονιδίου rRNA SSU που ανακτήθηκαν από τα δείγματα των DeLeon- Rodriguez et al. (2017) και λήφθηκαν από ένα φυσικό και γήινο περιβάλλον, αντιπροσωπεύουν θαλάσσια είδη. Αυτό συμβαδίζει με προηγούμενες μελέτες (Amato et al., 2007). Η μελέτη των DeLeon- Rodriguez et al. (2017) υποδηλώνει ότι τα OTUs αντιπροσωπεύουν οργανισμούς που έχουν αναπτύξει μηχανισμούς - αντιμετώπισης της υπερϊόδους ακτινοβολίας και των συγκεντρώσεων οξειδωτικών (OH, O₃, H₂O₂) - που τους επιτρέπουν να επιβιώσουν μεγάλες περιόδους στην ατμόσφαιρα. Η προηγούμενη βιβλιογραφία στηρίζει αυτή την υπόθεση. Για παράδειγμα, η *Afiplia* sp. ήταν η πιο άφθονη ομάδα πυρήνων στα δείγματα των DeLeon- Rodriguez et al. (2017) η οποία επιβιώνει στα σύννεφα χρησιμοποιώντας τις διαθέσιμες ενώσεις άνθρακα που υπάρχουν στην ατμόσφαιρα. Γενικότερα, σε προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι τα μέλη της οικογένειας *Bradyrhizobiaceae* (στα οποία ανήκει η *Afiplia* sp.) συνθέτουν περίπου το 10% της συνολικής κοινότητας σε δείγματα που συλλέγονται από το βρόχινο νερό. Παρόμοια με την *Afiplia* sp., τα *Oxalobacteraceae* και *Methylobacterium*, δύο άλλες ομάδες πυρήνωσης, μπορούν επίσης να χρησιμοποιήσουν ενώσεις C1-C4 που είναι άφθονες στην ατμόσφαιρα και συμπυκνώνονται (σε κλάσεις χιλιοστόμετρων) σε νεροπυρήνες.

Από τα παραπάνω μπορούμε να υποθέσουμε ότι στα γένη που θα μπορούσαν να εντοπιστούν στα δείγματά μας συμπεριλαμβάνονται τα *Pseudomonas*, *Xanthococcus*, *Carynebacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Shigella*,

Vibrio, Clostridium, Legionella, Campylobacter, Cyptosporidium, Giardia, Afipia, Methylobacterium.

Οι Harrison et al. (2004) εκτιμούν ότι η μέση συγκέντρωση βακτηριδιακών κυττάρων στον αέρα πάνω από τα παράκτια οικοσυστήματα είναι $7,6 \times 10^4$ κύτταρα m^{-3} (Harrison et al. 2005). Οι DeLeon-Rodriguez et al. (2017) μέτρησαν διπλάσια συγκέντρωση στο δείγμα χωρίς σύννεφα και σε υψηλό υψόμετρο (8 km στην τροπόσφαιρα). Οι μικροβιακές κοινότητες παρουσίαζαν περισσότερες ομοιότητες με αυτές του αέρα και του χιονιού που συλλέχθηκαν στην κορυφή των ψηλών βουνών, σε αντίθεση με τις ωκεάνιες ή τις εδαφικές κοινότητες. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο αέρας από τον οποίο συλλέγονται δείγματα στην κορυφή των βουνών ή το χιόνι στο έδαφος μπορεί να αντικατοπτρίζει τη μέση προς την άνω τροπόσφαιρα. Έτσι είναι προφανές ότι δεν μπορούν όλα τα μικροβιακά κύτταρα να φτάσουν ή να επιβιώσουν σε συνθήκες υψηλού υψομέτρου (DeLeon- Rodriguez et al., 2017).

Οι αέριες μάζες που υποβλήθηκαν σε δειγματοληψία στην περίπτωση των τυφώνων (DeLeon-Rodriguez et al., 2017), επηρεάστηκαν κυρίως από θαλάσσιες και όχι ηπειρωτικές μεταφορές. Παρατηρήθηκε υψηλή ομοιότητα στη σύνθεση της κοινότητας μεταξύ σχετικών δειγμάτων (στον ίδιο τυφώνα), αλλά όχι μεταξύ μη σχετικών κοινοτήτων (μεταξύ διαφορετικών τυφώνων). Οι τροπικοί τυφώνες αερολύουν μεγάλο αριθμό νέων κυττάρων και ταξινομικών κατηγοριών, επηρεάζοντας δραματικά τη σύνθεση των τροποσφαιρών κοινοτήτων για μέρες μετά το πέρασμά τους, κυρίως λόγω της μεγάλης εμβέλειας μεταφορά βιώσιμων βακτηρίων από τη μια ήπειρο στην άλλη, με δυνητικά σημαντικές επιπτώσεις στη βιογεωγραφία των βακτηριδίων.

Μεγάλη σημασία δίνεται για τις χημικές ενώσεις στο όμβριο νερό. Τα καρβοξυλικά οξέα, τα οποία προέρχονται και από ανθρωπογενείς και από

περιβαλλοντικές πηγές, επικρατούν και αντιπροσωπεύουν μεταξύ 10% και περισσότερο από 70% του συνολικού διαλυμένου άνθρακα που υπάρχει στα νέφη της βροχής (Loflund et al., 2002, Marinoni et al., 2004). Τα υψηλά επίπεδα συγκεντρώσεων αλδεΐδης συνδέονται στενά με τις ανθρώπινες δραστηριότητες (Granby et al., 1997) και με τη φωτοχημεία (Riedel et al., 1999). Οι αλκοόλες, αν και σπάνια μετριοούνται λόγω προβλημάτων ανάλυσης, έχουν ανιχνευθεί σε μολυσμένο νερό ομίχλης χρησιμοποιώντας πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR) (Suzuki et al., 1998). Όλες αυτές οι ενώσεις σχετίζονται με την οξείδωση των υδρογονανθράκων, που προέρχονται κυρίως από τις ανθρωπογενείς δραστηριότητες. Επιπλέον είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους λόγω της ατμοσφαιρικής χημείας. Τα παραπάνω αποτελούν μια παρατήρηση για την πιθανότητα να αποτελεί το νερό στα νέφη θρεπτικό περιβάλλον για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Αυτή η υπόθεση μπορεί να αποτελέσει έναν ακόμη ισχυρισμό για την προέλευση των 3 αποικιών που προαναφέρθηκαν. Με άλλα λόγια, θα μπορούσε η ανάπτυξή τους να αποδοθεί στις οργανικές ενώσεις της ατμόσφαιρας, οι οποίες δρουν ως θρεπτικό υλικό.

Σύμφωνα με τους Amato et al., (2007), αρκετοί μεταβολίτες έχουν ανιχνευθεί, όπως το πυροσταφυλικό από οξείδωση γαλακτικού οξέος ή το φουμαρικό άλας. Αυτές οι ενώσεις εντοπίστηκαν στην πραγματικότητα σε δείγματα νέφους και έτσι η παρουσία τους θα μπορούσε να αποδοθεί σε μια τέτοια μικροβιακή δραστηριότητα. Εκτός από το καθαρά βιοχημικό ενδιαφέρον, αυτό δείχνει σαφώς ότι τα κύτταρα μπορούν να αντιπροσωπεύσουν μια καταβόθρα, αλλά και πηγή οργανικών ενώσεων στο νερό των νεφών. Τόσο η οξείδωση όσο και η αναγωγή της φορμαλδεΐδης μπορούν να καταλυθούν μικροβιολογικά από τα μικρόβια που βρίσκονται στο νερό των νεφών. Οι έρευνές μας κατέδειξαν ότι οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στα νέφη έχουν μια ενζυματική δεξαμενή που θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά την

ατμοσφαιρική οργανική χημεία. Η ανθρωπογενής ρύπανση είναι γνωστό ότι παρατείνει τη διάρκεια ζωής των νεφών και επομένως τα μικροβιακά αποτελέσματα πρέπει να είναι μεγαλύτερα κάτω από αυτές τις συνθήκες. Πολλά βακτηριακά στελέχη φαίνεται να είναι προσαρμοσμένα στις ακραίες συνθήκες που απαντώνται στο νερό των νεφών (pH, T1, ακτινοβολίες UV, κλπ.). Το pH μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας που ελέγχει τη δομή αυτής της κοινότητας: ένα όξινο pH ευνοεί την παρουσία μυκήτων και σποριογόνων βακτηρίων, ενώ ένα πιο ουδέτερο pH ευνοεί τη μεγαλύτερη βιοποικιλότητα. Τα περισσότερα από τα απομονωμένα βακτήρια είναι ικανά να αποικοδομούν διάφορα οργανικά υποστρώματα, όπως μυρμηκικό, οξικό, γαλακτικό, μεθανόλη και φορμαλδεΰδη, τα οποία αντιπροσωπεύουν τις κύριες οργανικές ενώσεις που υπάρχουν στο νερό των νεφών.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια απλή καταγραφή των διακυμάνσεων των βακτηριακών αποικιών στο όμβριο νερό. Ωστόσο αυτή η καταγραφή υπήρξε λεπτομερής και η παρακολούθηση του μεγέθους, της διάρκειας και της έντασης της επώασης καθημερινή. Δεν ακολούθησε κάποια μοριακή τεχνική ταυτοποίησης των ειδών που εντοπίστηκαν, αλλά τα συμπεράσματά μας βασίστηκαν στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Εκτός από την πειραματική διαδικασία, αυτή η εργασία αποτελεί περιγραφή του ρόλου των αέριων σωματιδίων στο σχηματισμό της βροχής, οδηγό ταυτοποίησης των μικροοργανισμών στα νέφη, καθώς καλύπτει και τυχών άλλου είδους επιρροές της φύσης στην ατμόσφαιρα (τυφώνες, θαλάσσια εξάτμιση κ.λπ.). Αν υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω έρευνες, θα πρέπει να επικεντρωθεί στην χαρτογράφηση του παγκόσμιου εναέριου σωματιδιακού φορτίου, στις επιπτώσεις αυτού στη φύση αλλά και τις υδατοσυλλογές, καθώς και στην αναζήτηση μεθόδων εκμετάλλευσης αυτών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ariya, P. A., Nepotchatykh, O., Ignatova, O., & Amyot, M. (2002). Microbiological degradation of atmospheric organic compounds. *Geophysical Research Letters*, 29(22).
- Ariya, P. A., Sun, J., Eltouny, N. A., Hudson, E. D., Hayes, C. T., & Kos, G. (2009). Physical and chemical characterization of bioaerosols—Implications for nucleation processes. *International Reviews in Physical Chemistry*, 28(1), 1-32.
- Bauer, H., Fuerhacker, M., Zibuschka, F., Schmid, H., & Puxbaum, H. (2002). Bacteria and fungi in aerosols generated by two different types of wastewater treatment plants. *Water Research*, 36(16), 3965-3970.
- Bauer, H., Giebl, H., Hitzenberger, R., Kasper-Giebl, A., Reischl, G., Zibuschka, F., & Puxbaum, H. (2003). Airborne bacteria as cloud condensation nuclei. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 108(D21).
- Bauer, H., Kasper-Giebl, A., Löflund, M., Giebl, H., Hitzenberger, R., Zibuschka, F., & Puxbaum, H. (2002). The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. *Atmospheric Research*, 64(1), 109-119.
- Bovallius, A., Bucht, B., Roffey, R., & Anäs, P. (1978). Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in Sweden. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(5), 847-852.
- Bowers, K. D., Juels, A., & Oprea, A. (2009, November). HAIL: A high-availability and integrity layer for cloud storage. In *Proceedings of the 16th ACM conference on Computer and communications security* (pp. 187-198). ACM.

- Brickner, P. W., Vincent, R. L., First, M., Nardell, E., Murray, M., & Kaufman, W. (2003). The application of ultraviolet germicidal irradiation to control transmission of airborne disease: bioterrorism countermeasure. *Public Health Reports*, 118(2), 99-114.
- Brodie, E. L., DeSantis, T. Z., Parker, J. P. M., Zubieta, I. X., Piceno, Y. M., & Andersen, G. L. (2007). Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(1), 299-304.
- Casareto, B. E., Suzuki, Y., Okada, K. and Morita, M. (1996) 'Biological micro-particles in rain water', *Geophysical Research Letters*, 23(2), pp. 173–176. doi: 10.1029/95GL03785.
- Cho, B. C. and Jang, G. Il (2014) 'Active and diverse rainwater bacteria collected at an inland site in spring and summer 2011', *Atmospheric Environment*. Elsevier Ltd, 94, pp. 409–416. doi: 10.1016/j.atmosenv.2014.05.048.
- Christner, B. C., Morris, C. E., Foreman, C. M., Cai, R., & Sands, D. C. (2008). Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall. *Science*, 319(5867), 1214-1214.
- Cochet, N., & Widehem, P. (2000). Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(2), 153-161.
- DeLeon-Rodriguez, N., Lathem, T. L., Rodriguez-R, L. M., Barazesh, J. M., Anderson, B. E., Beyersdorf, A. J., Ziemba, L. D., Bergin, M., Nenes, A. and Konstantinidis, K. T. (2013) 'Microbiome of the upper troposphere: Species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(7), pp. 2575–2580. doi: 10.1073/pnas.1212089110.
- Delort, A. M., Väitilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Parazols, M., Mailhot, G., Laj, P. and Deguillaume, L. (2010) 'A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes',

- Atmospheric Research. Elsevier B.V., 98(2–4), pp. 249–260. doi: 10.1016/j.atmosres.2010.07.004.
- Despres, V., Nowoisky, J., Klose, M., Conrad, R., Andreae, M. O., & Poeschl, U. (2007). ‘Genetic analysis and diversity of primary biogenic aerosol particles.’ In *Geophysical Research Abstracts* (Vol. 9, p. 08969).
- Dungan, R. S., & Leytem, A. B. (2009). Qualitative and quantitative methodologies for determination of airborne microorganisms at concentrated animal-feeding operations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1505-1518.
- Evans, C. A., Coombes, P. J. and Dunstan, R. H. (2006) ‘Wind, rain and bacteria: The effect of weather on the microbial composition of roof-harvested rainwater’, *Water Research*, 40(1), pp. 37–44. doi: 10.1016/j.watres.2005.10.034.
- Fukuda, Y., Hayakawa, T., Ichihara, E., Inoue, K., Ishihara, K., Ishino, H., ... & Kobayashi, K. (1998). Evidence for oscillation of atmospheric neutrinos. *Physical Review Letters*, 81(8), 1562.
- Fulton, J. D., & Mitchell, R. B. (1966). Microorganisms of the upper atmosphere II. Microorganisms in two types of air masses at 690 meters over a city. *Applied microbiology*, 14(2), 232-236.
- Fuzzi, S., Mandrioli, P., & Perfetto, A. (1997). Fog droplets—an atmospheric source of secondary biological aerosol particles. *Atmospheric Environment*, 31(2), 287-290.
- Fykse, E. M., Langseth, B., Olsen, J. S., Skogan, G., & Blatny, J. M. (2008). Detection of bioterror agents in air samples using real-time PCR. *Journal of applied microbiology*, 105(2), 351-358.
- Garnaud, S., Mouchel, J. M., Chebbo, G. and Thévenot, D. R. (1999) ‘Heavy metal concentrations in dry and wet atmospheric deposits in Paris district: Comparison with

- urban runoff', *Science of the Total Environment*, 235(1–3), pp. 235–245. doi: 10.1016/S0048-9697(99)00199-0.
- Garnaud, S., Mouchel, J. M., Chebbo, G., &Thévenot, D. R. (1999). Heavy metal concentrations in dry and wet atmospheric deposits in Paris district: comparison with urban runoff. *Science of the Total Environment*, 235(1), 235-245.
- Genitsaris, S., Stefanidou, N., Katsiapi, M., Kormas, K. A., Sommer, U. and Moustaka-Gouni, M. (2017) 'Variability of airborne bacteria in an urban Mediterranean area (Thessaloniki, Greece)', *Atmospheric Environment*. Elsevier Ltd, 157, pp. 101–110. doi: 10.1016/j.atmosenv.2017.03.018.
- Gould, J. (1999, July). Is rainwater safe to drink? A review of recent findings. In 9th International Rainwater Catchment Systems Conference.
- Granby, K., Christensen, C. S., & Lohse, C. (1997). Urban and semi-rural observations of carboxylic acids and carbonyls. *Atmospheric Environment*, 31(10), 1403-1415.
- Harrison, R. M., Jones, A. M., Biggins, P. D., Pomeroy, N., Cox, C. S., Kidd, S. P., ... & Beswick, A. (2005). Climate factors influencing bacterial count in background air samples. *International Journal of Biometeorology*, 49(3), 167-178.
- Hill, K. A., Shepson, P. B., Galbavy, E. S., Anastasio, C., Kourtev, P. S., Konopka, A., &Stirm, B. H. (2007). Processing of atmospheric nitrogen by clouds above a forest environment. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 112(D11).
- Hirano, S. S., & Upper, C. D. (2000). Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(3), 624-653.
- Hirano, S. S., Rouse, D. I., Clayton, M. K., & Upper, C. D. (1995). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and bacterial brown spot of snap bean: A study of epiphytic phytopathogenic bacteria and associated disease. *Plant Disease*, 79(11), 1085-1093.

- Hoose, C., Kristjánsson, J. E., Chen, J. P., & Hazra, A. (2010). A classical-theory-based parameterization of heterogeneous ice nucleation by mineral dust, soot, and biological particles in a global climate model. *Journal of the Atmospheric Sciences*, 67(8), 2483-2503.
- Imshenetsky, A. A., Lysenko, S. V., & Lach, S. P. (1978). Microorganisms of the upper layer of the atmosphere and the protective role of their cell pigments. *Life sciences and space research*, 17, 105-110.
- Jones, A. M. and Harrison, R. M. (2004) 'The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations - A review', *Science of the Total Environment*, 326(1-3), pp. 151-180. doi: 10.1016/j.scitotenv.2003.11.021.
- Junge, K., & Swanson, B. D. (2008). High-resolution ice nucleation spectra of sea-ice bacteria: implications for cloud formation and life in frozen environments. *Biogeosciences*, 5(3), 865-873.
- Katial, R. K., Zhang, Y., Jones, R. H., & Dyer, P. D. (1997). Atmospheric mold spore counts in relation to meteorological parameters. *International Journal of Biometeorology*, 41(1), 17-22.
- Kourtev, P. S., Hill, K. A., Shepson, P. B. and Konopka, A. (2011) 'Atmospheric cloud water contains a diverse bacterial community', *Atmospheric Environment*. Elsevier Ltd, 45(30), pp. 5399-5405. doi: 10.1016/j.atmosenv.2011.06.041.
- Kowalski, W., Bahnfleth, W., & Musser, A. (2003). Modeling immune building systems for bioterrorism defense. *Journal of Architectural Engineering*, 9(2), 86-96.
- Lighthart, B., & Shaffer, B. T. (1995). Airborne bacteria in the atmospheric surface layer: temporal distribution above a grass seed field. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1492-1496.

- Löflund, M., Kasper-Giebl, A., Schuster, B., Giebl, H., Hitzenberger, R., & Puxbaum, H. (2002). Formic, acetic, oxalic, malonic and succinic acid concentrations and their contribution to organic carbon in cloud water. *Atmospheric Environment*, 36(9), 1553-1558.
- Lye, D. J. (2002). Health risks associated with consumption of untreated water from household roof catchment systems. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 38(5), 1301-1306.
- Mancinelli, R. L., & Shulls, W. A. (1978). Airborne bacteria in an urban environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(6), 1095-1101.
- Marinoni, A., Laj, P., Sellegri, K., & Mailhot, G. (2004). Cloud chemistry at the Puy de Dôme: variability and relationships with environmental factors. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 4(3), 715-728.
- Matthias-Maser, S., & Jaenicke, R. (1995). The size distribution of primary biological aerosol particles with radii > 0.2 μm in an urban/rural influenced region. *Atmospheric Research*, 39(4), 279-286.
- Möhler, O., Benz, S., Saathoff, H., Schnaiter, M., Wagner, R., Schneider, J., ... & Wagner, S. (2008). The effect of organic coating on the heterogeneous ice nucleation efficiency of mineral dust aerosols. *Environmental Research Letters*, 3(2), 025007.
- Möhler, O., DeMott, P. J., Vali, G., & Levin, Z. (2007). Microbiology and atmospheric processes: the role of biological particles in cloud physics. *Biogeosciences*, 4(6), 1059-1071.
- Oppliger, A., Masclaux, F. G., & Nicolita-Hirzel, H. (2010). Assessment of airborne microorganisms by real-time PCR: optimistic findings and research challenges. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 3, 445-453.

- Peccia, J., & Hernandez, M. (2006). Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: a review. *Atmospheric Environment*, 40(21), 3941-3961.
- Polymenakou, P. N., Mandalakis, M., Stephanou, E. G., & Tselepidis, A. (2008). Particle size distribution of airborne microorganisms and pathogens during an intense African dust event in the eastern Mediterranean. *Environmental Health Perspectives*, 116(3), 292.
- Pratt, K. A., DeMott, P. J., French, J. R., Wang, Z., Westphal, D. L., Heymsfield, A. J., ... & Prather, K. A. (2009). In situ detection of biological particles in cloud ice-crystals. *Nature Geoscience*, 2(6), 398-401.
- Reshetin, V. P., & Regens, J. L. (2003). Simulation modeling of anthrax spore dispersion in a bioterrorism incident. *Risk Analysis*, 23(6), 1135-1145.
- Riedel, K., Weller, R., & Schrems, O. (1999). Variability of formaldehyde in the Antarctic troposphere. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 1(24), 5523-5527.
- Sattler, B., Puxbaum, H., & Psenner, R. (2001). Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophysical Research Letters*, 28(2), 239-242.
- Savvides, A. L., Andriopoulos, C. P., Kormas, K. K., Hatzinikolaou, D. G., Katsifas, E. A. and Karagouni, A. D. (2011) 'Selective isolation of indigenous *Pseudomonas syringae* strains with ice nucleation activity properties from a ski resort', *Journal of Biological Research*, 15, pp. 67-73.
- Sun, J., & Ariya, P. A. (2006). Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): A review. *Atmospheric Environment*, 40(5), 795-820.
- Szyrmer, W., & Zawadzki, I. (1997). Biogenic and anthropogenic sources of ice-forming nuclei: A review. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 78(2), 209-228.

Timmons, D. E., Fulton, J. D., & Mitchell, R. B. (1966). Microorganisms of the upper atmosphere I. Instrumentation for isokinetic air sampling at altitude. Applied microbiology, 14(2), 229-231.

Wardeh, A. J., Knook, A. H. M., Kay, I. P., Sabate, M., van der Giessen, W. J., Lighthart, J. M. R., ... & Serruys, P. W. (1999, September). The European P-32 dose response trial. The Rotterdam contribution. In AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY (Vol. 84, No. 6 A, pp. 84P-84P). 245 West 17th Street, New York, NY 10011 USA: Excerpta Medica INC.

Δεν έχεις καμία ελληνική βιβλιογραφία δική του ή με πρωτο το δικό του όνομα????

ABSTRACT

Title: «Spatial Culturable Bacteria from rainwater»

The purpose of this research was to medidatethe substantial bacterial growth in rainwater samples as well as the connection of that growth with the incubational temperature and nutritional concentration. Overall, four rainwater samplings took place; and the water was collected from rooftops in urban sites. Three of the samplings took place in Volos and and one in Athens.

The bacterial strains exhibited growth accordingly to the concentration of nutrients (R2A agar broth) and temperature. The samples that (which) were cultivated in higher temperature (25°C), exhibited increasingstrain survivability compared to the ones in lower temperature (8°C). We could not make anycomparison between Athens and Volos samples, because the sample from Athens was not cultivated in nutrient.

The collected data was recorded, although statistical analysis was not possible to be made, as the use of a molecular analysis is imperative to identify the bacterial species.

Keywords: bacteria, nutrients, rainwater, incubation

