

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

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Διερεύνηση της ποσοτικής σύστασης βακτηριακών ειδών σε εγκατάσταση  
επεξεργασίας νερού εταιρείας εμφιάλωσης»**

**Ελένη Ναλμπαντίδου**  
**Κωνσταντίνα – Αποστολία Παπαευσταθίου**

**ΒΟΛΟΣ, 2019**

**«Διερεύνηση της ποσοτικής σύστασης βακτηριακών ειδών σε εγκατάσταση  
επεξεργασίας νερού εταιρείας εμφιάλωσης»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

- 1) **Κωνσταντίνος Κορμάς**, Καθηγητής, Μικροβιακή Οικολογία Υδάτινου Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- 2) **Ελισάβετ Βαρδάκα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Βιολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών με έμφαση στα Τοξικά Φωτοσυνθετικά Βακτήρια, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης. **Μέλος**
- 3) **Γεώργιος Μιχαήλ**, Επίκουρος Καθηγητής, Φαρμακολογία Αγροτικών Ζώων και Ζώων Εργαστηρίου με Έμφαση στη Μικροβιακή Αντοχή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ειλικρινείς μας ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρουμε σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Κωνσταντίνο Κορμά, για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή της έρευνας όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μας, αποτελούμενη από την Ελισάβετ Βαρδάκα και τον Γεώργιο Μιχαήλ, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Τέλος, θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας στις οικογένειες μας για την αμέριστη συμπαράσταση, κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα προπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την διερεύνηση της ποσοτικής σύστασης βακτηριακών ειδών σε εγκατάσταση επεξεργασίας νερού εταιρείας εμφιάλωσης. Η βακτηριακή ποικιλότητα προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της πυραλληλούχισης. Η δειγματοληψία έγινε από τρία διαφορετικά περιβάλλοντα της μονάδας παραγωγής εμφιαλωμένου νερού, κάθε ένα από τα οποία αντικατοπτρίζει και ένα στάδιο της διαδικασίας εμφιάλωσης. Τα στάδια αυτά είναι: το στάδιο πριν την αποθήκευση (Before Storage, BS), το στάδιο αποθήκευσης του νερού (Storage, S), και μετά την αποθήκευση του (After Storage, AS). Βρέθηκαν 683 είδη βακτηρίων στα δείγματα αυτά, εκ των οποίων τα 71 υπήρχαν στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας εμφιάλωσης. Οι 71 αυτοί οργανισμοί μελετήθηκαν ως προς την αφθονία τους στο στάδιο αυτό. Οι 16 από τους 71 αυτούς οργανισμούς που αποτελούν το 75% της βακτηριακής σύστασης του νερού στο πρώτο στάδιο εμφιάλωσης, μελετήθηκαν ως προς την αφθονία τους στα επόμενα δύο στάδια της διαδικασίας εμφιάλωσης του νερού. Παρατηρήθηκε πως η πλειονότητα των ειδών αυτών μειώθηκαν ή εξαφανίστηκαν στα δυο τελευταία στάδια της διαδικασίας. Εξαιρέση του κανόνα αυτού αποτέλεσαν οι μικροοργανισμοί *Rhizobium* spp., *Pseudomonas* sp. και *Acinetobacter junii*, των οποίων η αφθονία και το μικροβιολογικό ενδιαφέρον μελετήθηκε εκτενέστερα. Από την μελέτη αυτή, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ροή του νερού μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο για την μικροβιολογική του σύσταση καθώς παρατηρείται πως στα στάδια αποθήκευσης του νερού, στα οποία δεν υπάρχει ροή, υπάρχουν οργανισμοί των οποίων ο πληθυσμός διατηρείται ή ακόμα και αυξάνεται.

Λέξεις κλειδιά: Βακτηριακή ανάλυση, Εμφιαλωμένο νερό, Πυραλληλούχιση, *Acinetobacter junii*, *Rhizobium* spp., *Pseudomonas* sp.,

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
1.1 Πόσιμο νερό.....	1
1.1.1 Πηγές πόσιμου νερού.....	1
1.1.2 Ποιοτικά χαρακτηριστικά πόσιμου νερού.....	2
1.2 Εμφιαλωμένο νερό .....	3
1.2.1 Κατηγορίες εμφιαλωμένου νερού.....	5
1.2.2 Μικροβιολογική σύσταση εμφιαλωμένου νερού.....	7
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	
2.1 Δειγματοληψία.....	9
2.2 Πυραλληλούχιση.....	10
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	
3.1 Αποτελέσματα μελέτης.....	12
3.2 Μικροοργανισμοί.....	20
3.2.1 <i>Rhizobium</i> spp.....	20
3.2.2 <i>Pseudomonas</i> sp.....	20
3.2.3 <i>Acinetobacter junii</i> .....	22
<b>4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>25</b>
<b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>27</b>
<b>6. ABSTRACT.....</b>	<b>31</b>

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 Πόσιμο Νερό**

Ως πόσιμο νερό ορίζεται το νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση ή χρήση, Δεν πρέπει να περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς ή μικροοργανισμούς δείκτες μόλυνσης με περιττωματικές ουσίες ή συγκεντρώσεις χημικών ουσιών που μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στην υγεία του ανθρώπου (ΚΥΑ Α2/2003).

Χρειάστηκε πολύς χρόνος μέχρι να φτάσει ο άνθρωπος στην αναγνώριση των προβλημάτων ρύπανσης και ακόμα περισσότερος για να γίνουν οι απαραίτητες μετρήσεις και οι έλεγχοι. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες η φυσική ποιότητα των υδατικών πόρων μεταβλήθηκε σημαντικά εξ' αιτίας των διαφόρων ανθρώπινων δραστηριοτήτων και χρήσεων του νερού. Οι περισσότερες περιπτώσεις ρύπανσης αναπτύχθηκαν βαθμιαία μέχρις ότου έγιναν φανερές και μετρήσιμες (Αντωνόπουλος, 2001).

Το φυσικό νερό συγκεντρώνεται σε τεχνητές λίμνες και από εκεί διοχετεύεται στις δεξαμενές καθίζησης όπου προστίθεται θειικό αργίλιο που βοηθά στην καθίζηση αιωρούμενων σωματιδίων μετατρέποντας τα σε λάσπη. Ακολούθως οδηγείται στα φίλτρα διήθησης που είναι κατασκευασμένα από στρώματα χαλικιών και άμμου. Το πάχος των στρωμάτων αυτών είναι μεγάλο προκειμένου να είναι αποτελεσματικότερη η διήθηση του νερού. Στη συνέχεια, το νερό διοχετεύεται στις δεξαμενές χλωρίωσης όπου προστίθεται στο νερό χλώριο με σκοπό την καταστροφή των μικροοργανισμών (Τσακίρης, 2004).

Το πόσιμο νερό με τη βοήθεια αντλιών διοχετεύεται στις δεξαμενές ύδρευσης, οι οποίες είναι κατασκευασμένες σε θέσεις με αρκετό υψόμετρο. Στη συνέχεια, το νερό μέσα από αγωγούς που συνδέονται με το δίκτυο ύδρευσης φτάνει στις βρύσες των κατοικιών (αρχή των συγκοινωνούντων δοχείων) (Μπαντάκου, 2014).

#### **1.1.1 Πηγές πόσιμου νερού**

Οι πηγές νερού είναι το θαλασσίνο νερό, το υπόγειο νερό και το επιφανειακό νερό. Παρόλο που το νερό θεωρείται άφθονο, το κατάλληλο πόσιμο νερό περιορίζεται από τη γεωγραφία, τη δημογραφία και την οικονομία (Bates, 2000).

Αναλυτικότερα, το θαλασσινό νερό δεν είναι πόσιμο αν δεν προβούμε σε τεράστιες δαπάνες με σκοπό την δημιουργία εγκαταστάσεων επεξεργασίας. Η χρήση υφάλμυρου ή θαλάσσιου νερού είναι συνήθως η τελευταία λύση όταν εξαντληθεί ή αμφισβητηθεί η ποιότητα όλων των άλλων πηγών σε μια κοινότητα. Το θαλάσσιο νερό αποτελεί επιλογή μόνο όταν βρίσκεται σε μια σχετικά κοντινή απόσταση από την ακτή, διαφορετικά οι δαπάνες μεταφοράς προσθέτουν ένα ανεπιθύμητο φορτίο στο ήδη υψηλό κόστος επεξεργασίας (Bates,2000).

Το υπόγειο νερό αποτελείται από τα βαθιά υδροφόρα στρώματα και από τις ανανεώσιμες πηγές. Το πρώτο, αν και άφθονο σε μερικές περιοχές, είναι μετρήσιμο με τον ίδιο τρόπο όπως τα αποθέματα πετρελαίου. Τέτοιες πηγές έχουν μια σχετικά σταθερή σύνθεση, αλλά θα μπορούσαν να περιέχουν ανεπιθύμητα συστατικά όπως το αρσενικό, το ουράνιο, το ραδόνιο, κ.λπ. Το δεύτερο μπορεί εξίσου να περιέχει έμφυτα ανεπιθύμητα συστατικά αλλά μπορεί επίσης να είναι επιρρεπές σε ρύπανση από τις δραστηριότητες στην επιφάνεια του εδάφους όπως τη βιομηχανία, την καλλιέργεια, κ.λπ. (Bates, 2000). Στα υπόγεια νερά δεν γίνεται ιδιαίτερη επεξεργασία, γιατί είναι πολύ πιο καθαρά από τα επιφανειακά. Ουσίες που συναντώνται στα υπόγεια νερά και πρέπει να ελαττωθούν ή να απομακρυνθούν είναι ο σίδηρος, η σκληρότητα (εάν ξεπερνά τα 300 mg/L) και το CO<sub>2</sub>. Ουσίες που καταλήγουν στα υπόγεια νερά λόγω ανθρωπογενούς δράσης και πρέπει να απομακρυνθούν είναι τα νιτρικά, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και ίχνη οργανικών ενώσεων όπως τα παρασιτοκτόνα (Κουϊμτζής et al., 1998).

Τέλος, το επιφανειακό νερό προέρχεται από προσιτές και επιφανειακές πηγές, όπως είναι τα ποτάμια και οι φυσικές λίμνες. Αυτές οι πηγές χρησιμοποιούνται οπουδήποτε είναι δυνατόν (Bates, 2000).

### **1.1.2 Ποιοτικά χαρακτηριστικά πόσιμου νερού**

Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του πόσιμου νερού κυμαίνονται μεταξύ ορισμένων αποδεκτών ορίων, τα οποία αποτελούν τα πρότυπα ποιότητας και θεσπίζονται νομοθετικά. Τα πρότυπα ποιότητας αυτά, στην Ελλάδα, καθορίζονται με την Κοινή Υπουργική Απόφαση Υ2/2600/2001 που αποτελεί συμμόρφωση της Ελληνικής Νομοθεσίας προς την Οδηγία 98/83 Ε.Ε. (Μπούφα, 2003). Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά



του νερού ταξινομούνται συνήθως σε φυσικοχημικά, χημικά και μικροβιολογικά και η καταλληλότητα του νερού αξιολογείται από τη διαύγεια, το χρώμα, την οσμή, τη γεύση και τη θερμοκρασία.

Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού σύμφωνα με την ΚΥΑ Υ2/2600/01 σε εναρμόνιση προς την οδηγία 98/83/ΕΚ, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1** Μικροβιολογικές παράμετροι πόσιμου νερού

	Παραμετρική τιμή (αριθμός/100 ml)
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. Coli</i> )	0
Εντερόκοκκοι	0

Σκοπός των διάφορων μικροβιολογικών αναλύσεων του νερού είναι η απομόνωση και ο προσδιορισμός των παθογόνων μικροοργανισμών που βρίσκονται σε αυτό. Όμως ο αριθμός των παθογόνων μικροοργανισμών σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς είναι πολύ μικρός και επιπλέον η αναγνώριση του κάθε μικροοργανισμού παρουσιάζει τεχνικές δυσκολίες. Για τους παραπάνω λόγους προκειμένου να προσδιοριστεί η πιθανότητα που έχει το νερό να μεταδώσει ασθένειες και συνεπώς η μικροβιακή καταλληλότητα του νερού, αναζητούνται μικροοργανισμοί που ονομάζονται μικροβιακοί δείκτες. Οι δείκτες αυτοί είναι αλλόχθονοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι περνούν παροδικά μέσα στο υδάτινο οικοσύστημα, προερχόμενοι συνήθως από το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων. Οι δείκτες ενδέχεται να συνοδεύονται από παθογόνους μικροοργανισμούς, οι ίδιοι όμως δεν είναι απαραίτητα παθογόνοι (Παπαετροπούλου & Μαυρίδου, 2010). Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι δείκτες είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή, το *Escherichia coli*, οι Εντερόκοκκοι, το *Clostridium. perfringens*, οι κοινοί μεσόφιλοι μικροοργανισμοί και το *Pseudomonas aeruginosa* (Μπούφα, 2005).

## 1.2 Εμφιαλωμένο Νερό

Στην κατηγορία του πόσιμου νερού συγκαταλέγεται και το εμφιαλωμένο νερό. Σύμφωνα με την Υγειονομική Διάταξη ΥΔ.Α1β/4871/79 (ΦΕΚ 696/β'/21-8-79 «Περί ποιότητας του εμφιαλωμένου νερού») που ισχύει και σήμερα, ως εμφιαλωμένο νερό

ορίζεται το νερό που παρέχεται στο εμπόριο συσκευασμένο αεροστεγώς εντός γυάλινων ή πλαστικών φιαλών ή πλαστικών δοχείων και προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση.

Τα εμφιαλωμένα νερά κατά κανόνα περιέχουν απαραίτητα για τη θρέψη χημικά στοιχεία σε κατάλληλες συγκεντρώσεις. Επίσης, δεν περιέχουν αιωρούμενα στερεά σωματίδια ορατά με το γυμνό μάτι και συνήθως έχουν άριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Δεν περιέχουν υπολειμματικό χλώριο, αφού για την απολύμανσή τους χρησιμοποιείται υπεριώδης ακτινοβολία ή συνήθως το όζον, το κυριότερο πλεονέκτημα του οποίου είναι ότι καταστρέφει σχεδόν όλους τους μικροοργανισμούς. Παρά ταύτα, το σοβαρότερο πρόβλημα των εμφιαλωμένων νερών είναι η μικροβιακή τους μόλυνση. Συνήθως υπεύθυνες για τη μόλυνση του νερού είναι τόσο οι ανεπαρκείς συνθήκες εμφιάλωσης, όσο και οι ακατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης. Οι θερμοκρασιακές μεταβολές (συστολή-διαστολή), ειδικά στις φιάλες που δεν κλείνουν αεροστεγώς, δημιουργούν επαφή του περιεχομένου με τον περιβάλλοντα αέρα, οπότε η επιμόλυνση είναι μοιραία και η υποβάθμιση του προϊόντος αναπόφευκτη (Παπαντωνίου, 2011).

Η νομοθεσία προβλέπει ότι τα εμφιαλωμένα νερά (εκτός από τα φυσικά μεταλλικά), πρέπει να έχουν συγκεκριμένη ποιότητα (όρια στον αριθμό μικροβίων), η οποία όμως διατηρείται μόνο όταν η αποθήκευση και η μεταφορά τους γίνεται σε θερμοκρασίες που δεν ξεπερνούν τους 18 βαθμούς Κελσίου. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες μπορεί να αναπτυχθούν παθογόνοι μικροοργανισμοί ή ακόμα και να αλλοιωθεί η πλαστική συσκευασία, με αποτέλεσμα να μεταφέρονται τοξίνες στο νερό, οι οποίες σε πολλές περιπτώσεις ευθύνονται για την πρόκληση στομαχικών προβλημάτων, ακόμη και καρκινογένεσεων (Μήτρακας, 1996).

Το εμφιαλωμένο νερό είναι δυνατόν να μολυνθεί με χημικές ουσίες ή παθογόνους μικροοργανισμούς. Η παρουσία των χημικών ουσιών μπορεί να προέρχεται από παραπροϊόντα απολύμανσης του εξοπλισμού (παρουσία ιόντων βρωμίου, υπολειμματικό χλώριο κ.α.), από κακό σχεδιασμό του εξοπλισμού ή κακής συντήρησης του όπως για παράδειγμα ενδεχόμενη διαρροή λαδιού από κάποιο μηχανικό μέρος, από τη χρήση ακατάλληλων ή ακάθαρτων υλικών συσκευασίας, από το περιβάλλον κατά την διάρκεια της αποθήκευσης, από ελλιπή προστασία της πηγής υδροληψίας κ.α. Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών οφείλεται κυρίως στα υλικά συσκευασίας (ελλιπής πλύση

γυάλινων φιαλών), στον εξοπλισμό (μη υγιεινού τύπου σχεδιασμός με πολλά νεκρά σημεία και δυσκολία κατά τον καθαρισμό και την απολύμανση), στο προσωπικό (ελλιπής εκπαίδευση και ενημέρωση σε θέματα υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων) και στον περιβάλλοντα χώρο. Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών είναι δυνατόν να οφείλεται επίσης σε μολυσμένη πηγή υδροληψίας ή σε μολυσμένο υδροφόρο ορίζοντα. Τέλος, κίνδυνο επιμόλυνσης μπορεί να αποτελέσει κάθε ξένο σώμα όπως, θραύσματα γυαλιού, πλαστικού, μετάλλου, σκόνης και ακαθαρσιών (Παπαντωνίου, 2011).

### 1.2.1 Κατηγορίες εμφιαλωμένου νερού

Όπως αναφέρει ο ΕΦΕΤ (2003), υπάρχουν τρεις κατηγορίες εμφιαλωμένου νερού αναγνωρισμένες από την Ευρωπαϊκή Ένωση:

- το επιτραπέζιο ή εμφιαλωμένο πόσιμο νερό
- το φυσικό μεταλλικό νερό και
- το νερό πηγής.

Το επιτραπέζιο ή εμφιαλωμένο πόσιμο νερό

Σύμφωνα με τη νομοθεσία, και πιο συγκεκριμένα με την Υ.Α. Α5/288/23.01.86 (ΦΕΚ 379/Β/86-53/Β86 και όπως αυτή τροποποιήθηκε από την Υ2/2600/2001 (ΦΕΚ 892/Β/11- 7-01), το επιτραπέζιο νερό επιτρέπεται να είναι οποιασδήποτε προέλευσης, όπως για παράδειγμα από γεώτρηση, από λίμνη, από ποτάμι, ακόμη και αφαλατωμένο νερό θάλασσας. Επιτρέπεται να γίνει οποιαδήποτε διαδικασία απολύμανσης κρίνεται απαραίτητη, έτσι ώστε η σύστασή του να είναι σύμφωνη με τις απαιτήσεις της Οδηγίας 98/1983 που αφορά το εμφιαλωμένο πόσιμο νερό. Συνήθως για την απολύμανση των επιτραπέζιων νερών εφαρμόζεται η διαδικασία της μικροδιήθησης και του οζονισμού (απολύμανση με χρήση όζοντος) (ΕΦΕΤ 2003).

Το επιτραπέζιο νερό είναι πόσιμο, προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση και βρίσκεται συσκευασμένο στο εμπόριο αεροστεγώς (σε γυάλινες ή πλαστικές φιάλες).

Οι φυσικοχημικές του παράμετροι είναι σύμφωνες με εκείνες του κοινού πόσιμου νερού, κοινώς πρόκειται για νερά με τα ίδια ποιοτικά χαρακτηριστικά, με τη διαφορά ότι το επιτραπέζιο νερό είναι εμφιαλωμένο, ενώ της βρύσης τρεχούμενο. Σε ένα επιτραπέζιο νερό στο οποίο χρησιμοποιείται όζον για απολύμανση του νερού ο χημικός κίνδυνος από ιόντα βρωμίου είναι κίνδυνος με μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης και μεγάλη σοβαρότητα. Η απόλυτα ελεγχόμενη προσθήκη όζοντος διασφαλίζει αποτελεσματικά τον έλεγχο του σχηματισμού ιόντων βρωμίου (Εμβλωματής & Μήτρακας, 2008).

### Το φυσικό μεταλλικό νερό

Πρόκειται για νερό που έχει αποκλειστικά υπόγεια προέλευση και εμφιαλώνεται απευθείας στην πηγή προέλευσής του, που συνήθως είναι γεώτρηση. Ως «φυσικό μεταλλικό νερό» θεωρείται το μικροβιολογικά υγιεινό νερό, που προέρχεται από ένα υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα ή ένα υπόγειο στρώμα και αναβλύζει από πηγή μέσω μίας ή περισσοτέρων φυσικών ή τεχνητών εξόδων μετά από γεώτρηση, οπότε και υπόκειται τελικά σε εκμετάλλευση.

Το φυσικό μεταλλικό νερό διακρίνεται σαφώς από το σύννηθες πόσιμο νερό:

- από τη φυσιολογική του σύσταση, που χαρακτηρίζεται από την περιεκτικότητά του σε ανόργανα άλατα, ιχνοστοιχεία ή άλλα συστατικά
- από τη φυσική καθαρότητά του, χαρακτηριστικά που και τα δύο έχουν διατηρηθεί ανέπαφα λόγω της υπόγειας προέλευσης αυτού του νερού, το οποίο είναι προστατευμένο από κάθε κίνδυνο ρυπάνσεως (Οδηγία 2009/54/EK).

Σε αντίθεση με το επιτραπέζιο νερό, το φυσικό μεταλλικό νερό δεν πρέπει να υπόκειται σε καμία κατεργασία ή απολύμανση, που έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του μικροβιακού φορτίου. Η υπόγεια προέλευση του φυσικού μεταλλικού νερού, καθώς και η απαγόρευση οποιασδήποτε δραστηριότητας σε ικανοποιητική απόσταση γύρω από τη γεώτρηση (η απόσταση εξαρτάται από το είδος των πετρωμάτων της περιοχής), εξασφαλίζουν την προστασία του από τυχόν μικροβιακό φορτίο. Πρακτικά η σύσταση του φυσικού μεταλλικού νερού μπορεί να διαφέρει από αυτήν του επιτραπέζιου, με το πρώτο να είναι συνήθως πιο πλούσιο σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία όπως μαγνήσιο, ασβέστιο και κάλιο. Αντίθετα στην περίπτωση του φυσικού μεταλλικού νερού δεν

λαμβάνει χώρα χημική απολύμανση αλλά μικροδιήθηση για την απομάκρυνση των υπαρχόντων μικροοργανισμών. Η μόνη χημική επεξεργασία που επιτρέπεται στο φυσικό μεταλλικό νερό είναι η αφαίρεση ή η προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα, οπότε το νερό χαρακτηρίζεται «φυσικά ανθρακούχο», «με προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα» ή «ενισχυμένο με αέριο της πηγής», ανάλογα με την περίπτωση. Τέλος επιτρέπεται η επεξεργασία για απομάκρυνση περιορισμένου αριθμού χημικών στοιχείων (ΕΦΕΤ 2003).

Το νερό πηγής

Πρόκειται για μια κατηγορία που κατατάσσεται κάπου ανάμεσα στο επιτραπέζιο και στο φυσικό μεταλλικό νερό. Το νερό πηγής μοιάζει με το φυσικό μεταλλικό νερό ως προς το ότι έχει οπωσδήποτε υπόγεια προέλευση, σταθερή σύσταση, δεν υφίσταται καμία διαδικασία απολύμανσης και εμφιαλώνεται πάντα στην πηγή προέλευσής του. Διαφέρει όμως, από το φυσικό μεταλλικό νερό καθώς το νερό πηγής δεν είναι πλούσιο σε κάποιο μεταλλικό στοιχείο (ασβέστιο ή μαγνήσιο για παράδειγμα) έτσι ώστε να χαρακτηριστεί ασβεστούχο ή μαγνησιούχο. (Παπαντωνίου, 2011).

### **1.2.2 Μικροβιολογική σύσταση του εμφιαλωμένου νερού**

Η ποιότητα του νερού που προορίζεται για εμφιάλωση ακολουθεί συγκεκριμένα πρότυπα που ως στόχο έχουν να διασφαλίσουν ότι το νερό αυτό θα είναι απαλλαγμένο από τους μολυσματικούς παράγοντες. Ο στόχος είναι το εμφιαλωμένο νερό να είναι όσο το δυνατόν καλύτερης ποιότητας για να προστατευθεί το κοινό από την πρόκληση ασθενειών που σχετίζονται με την κατανάλωση νερού. Η μικροβιολογική ποιότητα του εμφιαλωμένου νερού καθορίζεται από την ελληνική νομοθεσία σε εναρμόνιση με την σχετική Ευρωπαϊκή νομοθεσία (Venieri et al., 2006).

Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του εμφιαλωμένου νερού σύμφωνα με την ΚΥΑ Υ2/2600/01 σε εναρμόνιση προς την οδηγία 98/83/ΕΚ, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

**Πίνακας 2** Μικροβιολογικές παράμετροι για το νερό που πωλείται σε φιάλες ή δοχεία

Παράμετρος	Παραμετρική τιμή
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. Coli</i> )	0/250 ml
Εντερόκοκκοι	0/250 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/250 ml
Αριθμός αποικιών σε 22 ο C	100/ml
Αριθμός αποικιών σε 37 ο C	20/ml

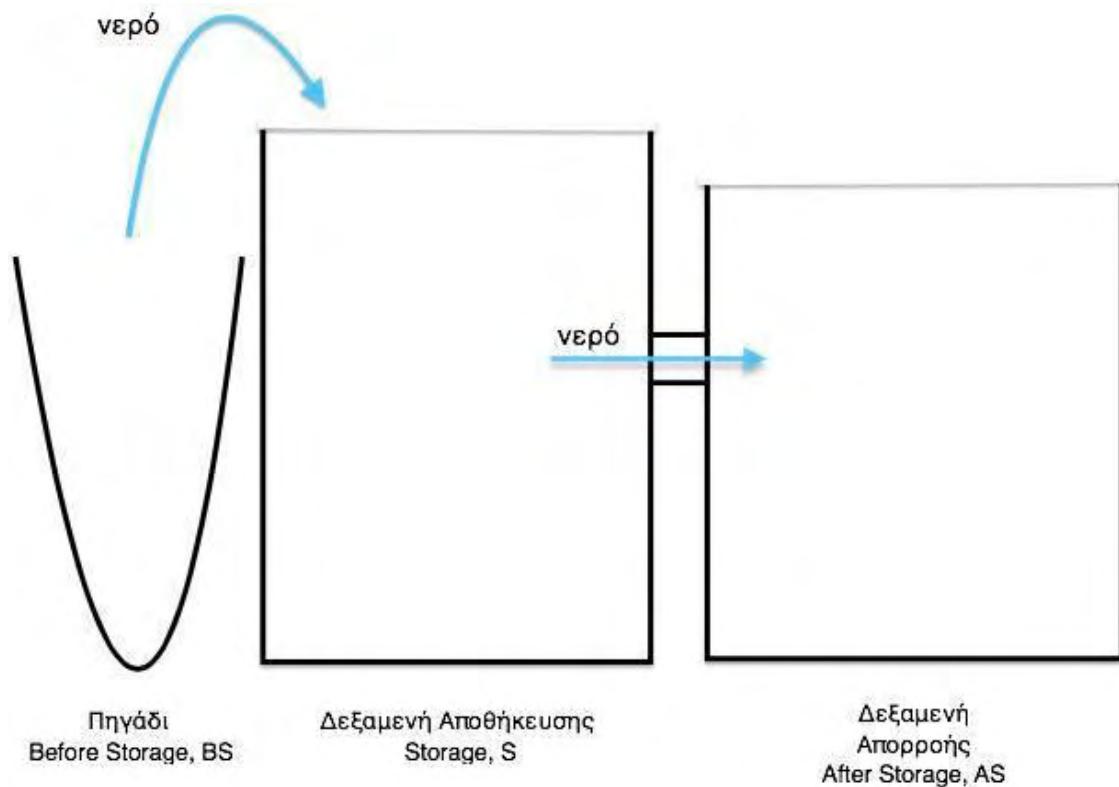
Η Αρχή Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drug Administration), για το εμφιαλωμένο νερό επιτρέπει την παρουσία κολοβακτηριοειδών σε ποσοστό ένα στα δέκα μπουκάλια νερού (όταν η απομόνωση γίνεται χρησιμοποιώντας την μέθοδο φίλτρων μεμβρανών). Όσον αφορά την Ευρωπαϊκή Ένωση, οι κανονισμοί της είναι πολύ πιο αυστηροί και απαιτούν την απουσία των μικροβιακών ομάδων OMX (ολική μεσόφιλη χλωρίδα), Κολοβακτηριοειδή ή *Escherichia coli* ή Εντερόκοκκοι, σποριογόνα θειαναγωγικά κλωστρίδια και τέλος την απουσία αερογενούς ψευδομονάδας (*Pseudomonas aeruginosa*) (Rosenberg, 2003).

Τέλος, είναι μικρό το ποσοστό των ανθρώπων που θεωρούν ότι το εμφιαλωμένο νερό μπορεί να προκαλέσει βλάβες στον ανθρώπινο οργανισμό. Παρά ταύτα έχουν υπάρξει περιστατικά λοιμώξεων τα οποία όμως δεν αναφέρθηκαν (Rosenberg, 2003). Ένα εμφιαλωμένο νερό θα μπορούσε να προκαλέσει ασθένεια σε περίπτωση που δεν επεξεργάστηκε σωστά ή η απολύμανσή του ήταν ανεπαρκής και δεν έχει πλήρως απομακρυνθεί το μικροβιακό φορτίο (Health Canada, 2009).

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Δειγματοληψία

Για την πραγματοποίηση της μελέτης μας, η δειγματοληψία έγινε από τρία διαφορετικά περιβάλλοντα της μονάδας παραγωγής εμφιαλωμένου νερού. Κάθε ένα από αυτά τα περιβάλλοντα αντικατοπτρίζει ένα στάδιο της διαδικασίας εμφιάλωσης του νερού, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Το πρώτο στάδιο αφορά το νερό πριν την αποθήκευση του (Before Storage, BS), δηλαδή το νερό που συλλέξαμε από την πηγή, που στην δική μας περίπτωση ήταν πηγάδι. Στο δεύτερο στάδιο έχουμε το νερό κατά την διαδικασία της αποθήκευσης του (Storage, S), στην δεξαμενή αποθήκευσης. Τέλος, στο τρίτο στάδιο έχουμε το νερό που συλλέχθηκε μετά την αποθήκευση του (After Storage, AS), δηλαδή το νερό που υπήρχε στην δεξαμενή απορροής.



**Εικόνα 1** Τα στάδια της δειγματοληψίας.

## 2.2 Πυραλληλούχιση

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την πραγματοποίηση της έρευνας ήταν η μέθοδος της πυραλληλούχισης.

Η πυραλληλούχιση είναι μια διαδικασία αλληλούχισης του DNA η οποία βασίζεται στην ανίχνευση της πυροφωσφατάσης που απελευθερώνεται κατά την σύνθεση του DNA. Κατά τη διάρκεια των διαδοχικών ενζυματικών αντιδράσεων παράγεται ορατό φως, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με τον αριθμό των νουκλεοτιδίων που ενσωματώνονται. Η διαδικασία της πυραλληλούχισης αρχίζει με την αντίδραση πολυμερισμού του νουκλεϊκού οξέος και την ενσωμάτωση του εκάστοτε συμπληρωματικού νουκλεοτιδίου, κατά την οποία απελευθερώνεται ανόργανη πυροφωσφατάση ως αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων από την πολυμεράση. Στη συνέχεια, η πυροφωσφατάση μετατρέπεται από την ATP σουλφουριλάση σε ATP. Το ATP παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια από την λουσιφεράση για να γίνει η οξείδωση της λουσιφερίνης, η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή φωτός. Σε θερμοκρασία δωματίου, η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται σε 3 έως 4 δευτερόλεπτα. Η ποσότητα του φωτός που έχει παραχθεί μπορεί εύκολα να εντοπιστεί από μια φωτοδίοδο, από έναν σωλήνα φωτοπολλαπλασιαστή ή από αισθητήρες CCD (Charge-Coupled Device).

Οι τρόποι πυραλληλούχισης είναι δυο: η πυραλληλούχιση στερεής φάσης και η πυραλληλούχιση υγρής φάσης. Η πρώτη κάνει χρήση τριών ενζύμων ως υπόστρωμα πάνω στο οποίο ακινητοποιείται το DNA. Τα ένζυμα αυτά είναι η πολυμεράση, η πυροφωσφατάση και η λουσιφεράση. Μετά την προσθήκη κάθε νουκλεοτιδίου ακολουθεί έκπλυση του υποστρώματος. Στην πυραλληλούχιση υγρής φάσης δημιουργείται ένα σύστημα τεσσάρων ενζύμων με την εισαγωγή απυράσης. Η απυράση είναι ένα ένζυμο που αποικοδομεί τα νουκλεοτίδια. Προσθέτοντας την απυράση η ανάγκη χρήσης στερεού υποστρώματος και ενδιάμεσης έκπλυσης εξαλείφεται, επιτρέποντας έτσι την χρήση ενός μόνο σωλήνα για την πραγματοποίηση της πυραλληλούχισης (Ronaghi, 2001). Πρόσφατα έγινε προσθήκη της πρωτεΐνης SSB, η οποία είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται σε μονόκλωνο DNA. Με τη προσθήκη αυτής της πρωτεΐνης ενισχύεται η ποιότητα των αλληλουχιών που λαμβάνονται μέσω πυραλληλούχισης. Η πρωτεΐνη SSB καθιστά δυνατή την ανάγνωση αλληλουχιών



μεγάλου μήκους και αυξάνει την ευελιξία στο σχεδιασμό των εκκινητών (Ahmadian et al., 2006).

Η πυραλληλούχιση αποτελεί μια γρήγορη, αξιόπιστη και οικονομικά συμφέρουσα μέθοδο αλληλούχισης του DNA που βασίζεται στην παρακολούθηση της σύνθεσης DNA σε πραγματικό χρόνο, μέσω ανίχνευσης βιοφωταύγειας. Συγκεκριμένα, δεν απαιτείται κλωνοποίηση, και κατά συνέπεια αλληλουχίες που κλωνοποιούνται δύσκολα ή που είναι ασταθείς μπορούν να αλληλουχηθούν χωρίς πρόβλημα. Επιπλέον, δεν χάνονται οι αλληλουχίες μικρού μήκους οι οποίες συνήθως απομακρύνονται κατά τον διαχωρισμό ανά μέγεθος στην κατασκευή cDNA βιβλιοθηκών. Τέλος, η διαδικασία είναι πολύ γρήγορη και πολύ πιο οικονομική από τις συμβατικές μεθόδους αλληλούχισης (Weber et al., 2007).

### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 3.1 Αποτελέσματα Πειράματος

Μετά τις αναλύσεις εντοπίστηκαν 683 είδη μικροοργανισμών οι οποίοι μελετήθηκαν στα τρία κύρια στάδια της διαδικασίας εμφιάλωσης τα οποία ήταν το στάδιο πριν την αποθήκευση (Before Storage, BS), το στάδιο αποθήκευσης του νερού (Storage, S), και μετά την αποθήκευση του (After Storage, AS).

Στο πρώτο στάδιο (BST), εντοπίστηκαν 71 είδη μικροοργανισμών εκ των οποίων οι 23 εμφανίστηκαν σε αφθονία 1-10%, ένας σε αφθονία >10% και 47 είδη σε αφθονία <1%.

Η κατανομή των οργανισμών έχει ως εξής:

#### Μικροοργανισμοί σε αφθονία 1-10% :

- *Comamonas* spp.
- *Planifilum* spp.
- *Pseudomonas* sp.
- *Mycobacterium mucogenicum*
- *Pseudomonas proteolytica*
- *Pseudomonas veronii*
- *Cloacibacterium normanense*
- *Acinetobacter junii*
- *Acidovorax* sp.
- *Bacteroides* spp.
- *Sphingomonas* sp.
- *Imtechium assamiensis*
- *Propionibacterium acnes*
- *Pseudomonas marginalis*
- *Sphingopyxis witflariensis*
- *Methylobacterium adhaesivum*
- *Hydrogenophaga* spp.
- *Acinetobacter parvus*

- *Cytophaga* spp.
- *Perlucidibaca* spp.
- *Pelomonas puraquae*
- *Prochlorococcus* spp.
- *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

**Μικροοργανισμοί σε αφθονία >10% :**

- *Rhizobium* spp.

**Μικροοργανισμοί σε αφθονία <1% :**

- *Acinetobacter haemolyticus*
- *Sphingopyxis macrogoltabida*
- *Atopostipes* spp.
- *Sphingopyxis chilensis*
- *Sporobacterium* sp.
- *Thermomonas hydrothermalis*
- *Sphingomonas* spp.
- *Acidovorax* spp.
- *Mycobacterium* sp.
- *Staphylococcus* sp.
- *Rhodoplanes* spp.
- *Acinetobacter* sp.
- *Escherichia coli*
- *Marinobacter flavimaris*
- *Enterobacter hormaechei*
- *Massilia* spp.
- *Delftia* spp.
- *Pseudoalteromonas tetraodonis*
- *Pseudomonas poae*

- *Sphingomonas dokdonensis*
- *Desulfosporosinus meridiei*
- *Mycobacterium gordonae*
- *Ruminococcus albus*
- *Diaphorobacter* spp.
- *Dethiobacter* spp.
- *Massilia* sp.
- *Pseudomonas migulae*
- *Acidovorax caeni*
- *Bosea* sp.
- *Delftia tsuruhatensis*
- *Elusimicrobium* spp.
- *Mycobacterium immunogenum*
- *Pseudomonas balearica*
- *Pseudomonas* spp.
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Staphylococcus pasteurii*
- *Symbiobacterium* spp.
- *Acinetobacter* spp.
- *Duganella* spp.
- *Malikia* spp.
- *Novosphingobium* spp.
- *Pseudomonas borealis*
- *Pseudomonas putida*
- *Schlegelella caenibacterium* sp.
- *Sphingomonas paucimobilis*
- *Staphylococcus equorum*
- *Staphylococcus* spp.

Στο πρώτο στάδιο εμφιάλωσης, από τα 71 είδη μικροοργανισμών οι 16 αποτελούν περίπου το 75% της βακτηριακής σύστασης του δείγματος και είναι οι εξής:

- *Rhizobium* spp.
- *Comamonas* spp.
- *Planifilum* spp.
- *Pseudomonas* sp.
- *Mycobacterium mucogenicum*
- *Pseudomonas proteolytica*
- *Pseudomonas veronii*
- *Cloacibacterium normanense*
- *Acinetobacter junii*
- *Acidovorax* sp.
- *Bacteroides* spp.
- *Sphingomonas* sp.
- *Imtechium assamiensis*
- *Propionibacterium acnes*
- *Pseudomonas marginalis*
- *Sphingopyxis witflariensis*

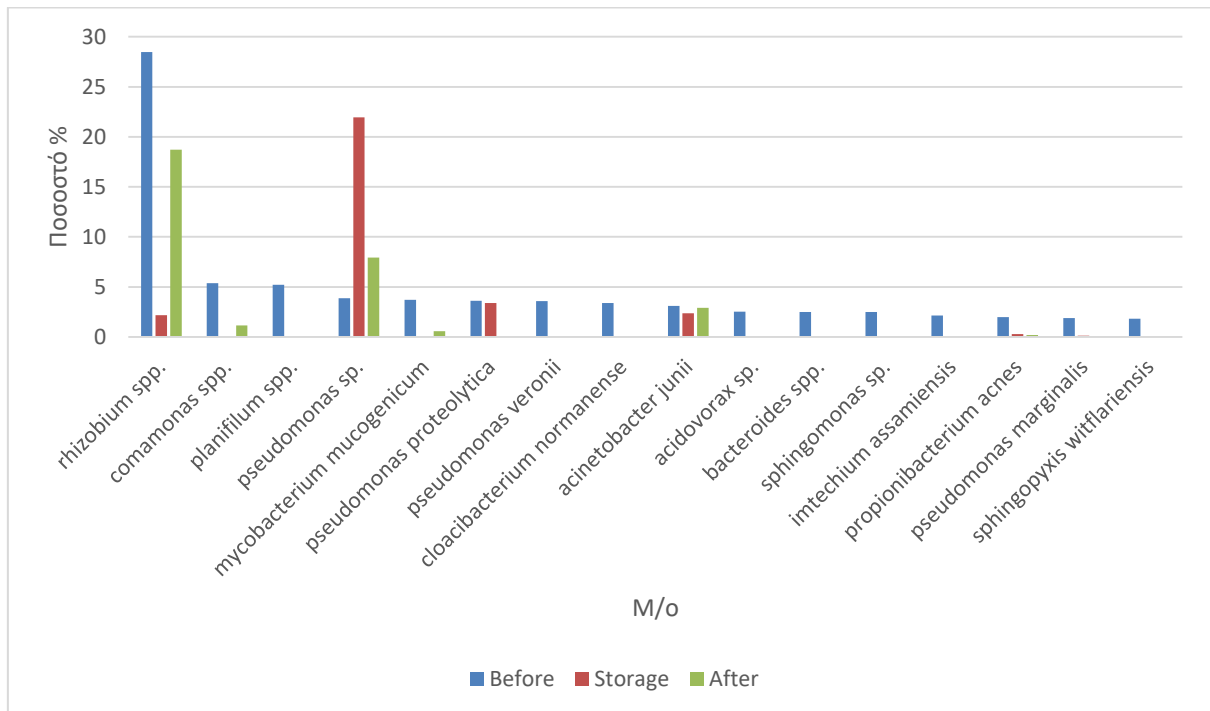
Στην συνέχεια, μελετήθηκε η αφθονία των οργανισμών αυτών στα επόμενα στάδια της διαδικασίας εμφιάλωσης. Τις μεταβολές αυτές περιγράφει ο παρακάτω πίνακας (Πίνακας 3) και το διάγραμμα (Διάγραμμα 1).

**Πίνακας 3** Η αφθονία του 75 % των οργανισμών που υπάρχουν στο πρώτο στάδιο και η εξέλιξή τους στα επόμενα στάδια

~75% των μ/ο στο before	Before Storage	Μεταβολή (%)	Storage	Μεταβολή (%)	After Storage	Μεταβολή (%)
<i>Rhizobium</i> spp.	663	28,47	96	2,18	97	18,73
<i>Comamonas</i> spp.	125	5,37	0	0,00	6	1,16
<i>Planifilum</i> spp.	121	5,20	0	0,00	0	0,00

<i>Pseudomonas</i> sp.	90	3,86	965	21,96	41	7,92
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	86	3,69	0	0,00	3	0,58
<i>Pseudomonas proteolytica</i>	84	3,61	149	3,39	0	0,00
<i>Pseudomonas veronii</i>	83	3,56	3	0,07	0	0,00
<i>Cloacibacterium normanense</i>	79	3,39	0	0,00	0	0,00
<i>Acinetobacter junii</i>	72	3,09	104	2,37	15	2,90
<i>Acidovorax</i> sp.	59	2,53	0	0,00	0	0,00
<i>Bacteroides</i> spp.	58	2,49	0	0,00	0	0,00
<i>Sphingomonas</i> sp.	58	2,49	0	0,00	0	0,00
<i>Imtechium assamiensis</i>	50	2,15	0	0,00	0	0,00
<i>Propionibacterium acnes</i>	46	1,98	12	0,27	1	0,19
<i>Pseudomonas marginalis</i>	44	1,89	6	0,14	0	0,00

<i>Sphingopyxis witflariensis</i>	42	1,80	0	0,00	0	0,00
-----------------------------------	----	------	---	------	---	------



**Διάγραμμα 1** Το ποσοστό των μικροοργανισμών που αποτελούν το 75% στο πρώτο στάδιο εμφιάλωσης, σε κάθε στάδιο.

Από το διάγραμμα προκύπτει ότι οι περισσότεροι από τους οργανισμούς που εμφανίζονται στο πρώτο στάδιο, στα επόμενα στάδια δεν εμφανίζονται καθόλου ή εμφανίζονται σε πολύ μικρό ποσοστό.

Αναλυτικότερα οι οργανισμοί *Planifilum* spp., *Cloacibacterium normanense*, *Acidovorax* sp., *Bacteroides* spp., *Sphingomonas* sp. και *Imtechium assamiensis* εξαφανίστηκαν και στο δεύτερο και στο τρίτο στάδιο.

Η αφθονία των οργανισμών *Pseudomonas proteolytica*, *Pseudomonas veronii* και *Pseudomonas marginalis* μειώθηκε από το πρώτο στο δεύτερο στάδιο και εξαφανίστηκαν

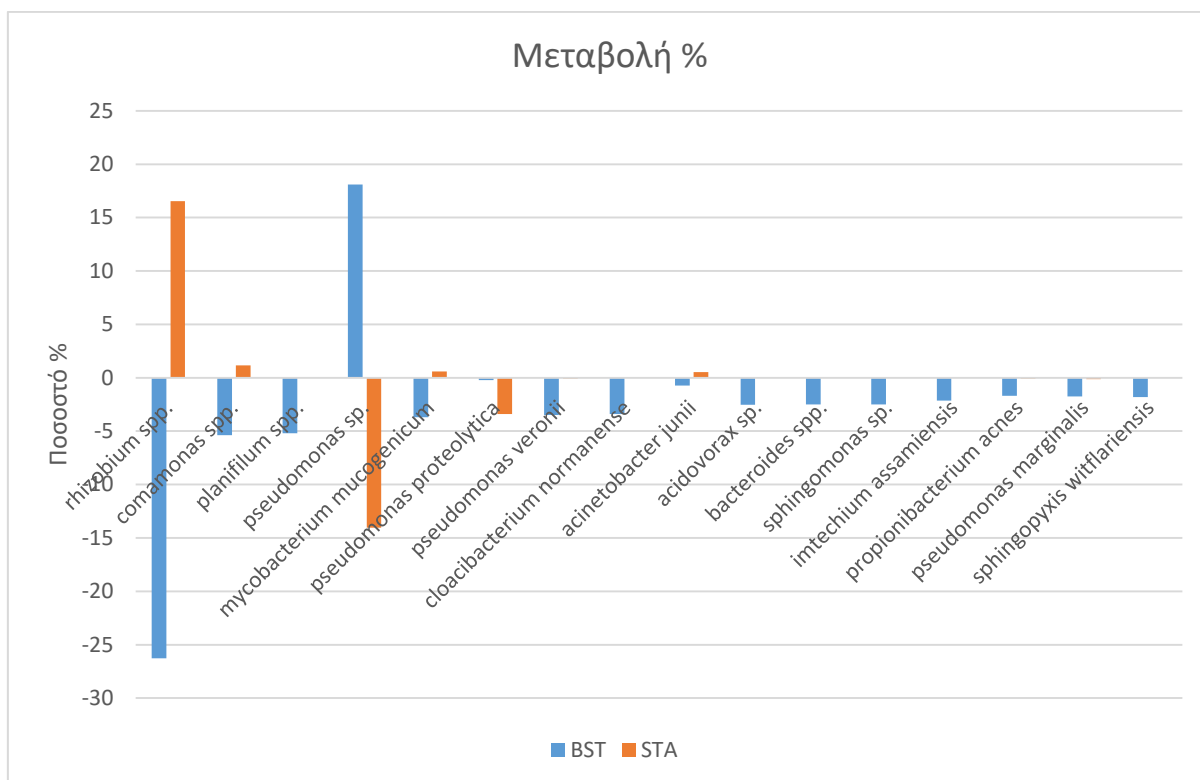
στο τρίτο. Πιο συγκεκριμένα, το είδος *Pseudomonas proteolytica* εμφανίζεται σε αφθονία 3,61% και στο δεύτερο στάδιο σε αφθονία 3,39%. Το είδος *pseudomonas veronii* στο πρώτο στάδιο εμφανίζεται σε αφθονία 3,56% ενώ η αφθονία του μειώνεται σε 0,07% στο δεύτερο στάδιο. Τέλος, το είδος *Pseudomonas marginalis* εμφανίζεται σε αφθονία 1,89% στο πρώτο στάδιο και σε αφθονία 0,14% στο δεύτερο στάδιο. Και τα τρία είδη εξαφανίζονται στο τρίτο στάδιο.

Στην συνέχεια, τα είδη *Comamonas* spp. και *Mycobacterium mucogenicum* ενώ εξαφανίζονται στο δεύτερο στάδιο εμφανίζονται και πάλι στο τελικό στάδιο. Ειδικότερα, οι οργανισμοί *Comamonas* spp. εμφανίζονται σε αφθονία 5,37% στο πρώτο στάδιο, εξαφανίζονται στο δεύτερο στάδιο και εμφανίζονται πάλι στο τρίτο στάδιο σε αφθονία 1,16%. Το είδος *Mycobacterium mucogenicum* εμφανίζεται στο πρώτο στάδιο σε αφθονία 3,69%, εξαφανίζεται στο δεύτερο στάδιο και ξαναεμφανίζεται σε αφθονία 0,58% στο τρίτο στάδιο.

Η αφθονία των οργανισμών *Acinetobacter junii* και *Propionibacterium acnes* παρουσιάζει μια φθίνουσα τάση. Το *Acinetobacter junii* εμφανίζεται σε αφθονία 3,09% στο πρώτο, 2,37% στο δεύτερο και 2,89% στο τρίτο στάδιο. Ενώ το *Propionibacterium acnes* σε αφθονία 1,97%, 0,27% και 0,19% αντίστοιχα.

Ωστόσο, οι οργανισμοί *Rhizobium* spp., *Pseudomonas* sp. και *Acinetobacter junii* αποτελούν εξαίρεση σε αυτούς τους κανόνες. Πιο αναλυτικά, το είδος *Rhizobium* spp. εμφανίζεται σε μεγάλη αφθονία (28,47%) στο πρώτο στάδιο (BST), στο δεύτερο στάδιο (ST) μειώνεται σε μεγάλο βαθμό (2,2%) ενώ στο τρίτο στάδιο (AST) η αφθονία του αυξάνεται κατά πολύ (18,72%). Το είδος *Pseudomonas* sp. ενώ στο πρώτο στάδιο (BST) εμφανίζεται σε αφθονία μόλις 3,86% , στο δεύτερο στάδιο (ST) η αφθονία του αυξάνεται στο 21,96% και στο τρίτο στάδιο (AST) μειώνεται στο 7,91%. Τέλος, το είδος *Acinetobacter junii* εμφανίζεται σε αφθονία 3,09% στο πρώτο στάδιο (BST) ενώ στο δεύτερο (ST) και τρίτο στάδιο (AST) μειώνεται ελάχιστα σε ποσοστά 2,37% και 2,89% αντίστοιχα. Οι μεταβολές αυτές φαίνονται αναλυτικότερα στο επόμενο διάγραμμα.





**Διάγραμμα 2** Τα ποσοστά της μεταβολής των μικροοργανισμών. Before Storage προς Storage (Μπλέ), Storage προς After Storage (Πορτοκαλί)

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε τις επί τις εκατό μεταβολές της αφθονίας των ειδών ανάμεσα στα τρία στάδια που μελετάμε. Πιο συγκεκριμένα, για τα τρία είδη που εξετάζουμε από το διάγραμμα 2 προκύπτει πως η αφθονία του μικροοργανισμού *Rhizobium spp.* μειώνεται περίπου κατά 26% από το πρώτο (BST) προς το δεύτερο στάδιο (ST), ενώ αυξάνεται κατά 16,5% από το δεύτερο (ST) προς το τρίτο στάδιο (AST). Η αφθονία του *Pseudomonas sp.* αυξάνεται κατά 18% από το πρώτο (BST) στο δεύτερο στάδιο (ST) και μειώνεται κατά 14% από το δεύτερο (ST) στο τρίτο στάδιο (AST). Τέλος το είδος *Acinetobacter junii* έχει μικρές μεταβολές, με την αφθονία του να μειώνεται από το πρώτο (BST) στο δεύτερο στάδιο (ST) κατά 0,7% και να αυξάνεται 0,53% από το δεύτερο (ST) στο τρίτο στάδιο (AST), διατηρώντας έτσι την αφθονία του σε περίπου ίδιο επίπεδο σε όλα τα στάδια που μελετώνται.

## 3.2 Μικροοργανισμοί

### 3.2.1 *Rhizobium spp*

Οι οργανισμοί *Rhizobium spp.* είναι ένα γένος αρνητικών κατά Gram οργανισμών, κινητών βακτηρίων των οποίων τα μέλη είναι τα πιο αξιόλογα για την ικανότητα τους να αναπτύσσουν μία συμβιωτική σχέση με ψυχανθή (όσπρια), όπως μπιζέλια, σόγια, αλφάλαφα. Αυτή η σχέση οδηγεί στην ανάπτυξη εξειδικευμένων δομών που αποκαλούνται όζοι. Σε αυτές τις δομές, τα βακτήρια είναι ικανά να μετατρέψουν το άζωτο (N) της ατμόσφαιρας σε αμμωνία. Η δέσμευση N από συμβιωτικά συστήματα μεταξύ φυτών και μικροοργανισμών είναι η σημαντικότερη μορφή φυσικού εμπλουτισμού των εδαφών με άζωτο. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αζωτοδέσμευση ή καθήλωση αζώτου ή δέσμευση αζώτου, δηλαδή η χρήση του αέριου αζώτου (N<sub>2</sub>) ως πηγής κυτταρικού αζώτου. Η αμμωνία χρησιμοποιείται από τα φυτά ως πηγή αζώτου. Τα βακτήρια *Rhizobium* περιέχουν όλο το γενετικό υλικό για να δεσμεύουν N<sub>2</sub> και στην ελεύθερη τους μορφή αλλά μπορούν να δεσμεύσουν N<sub>2</sub> μόνο σε συμβιωτικά συστήματα. Στα συμβιωτικά συστήματα οι αζωτοδεσμευτικοί μικροοργανισμοί παρέχουν στο φυτό περίσσεια N υπό την μορφή NH<sub>3</sub> που την ενσωματώνουν σε οργανικές ενώσεις ενώ τα φυτά παρέχουν στους μικροοργανισμούς άνθρακα για την επιβίωση τους. Άλλα γένη οργανισμών, όπως τα *Azorhizobium* και *Bradyrhizobium* απαντώνται σε οζώδη ψυχανθή φυτά και μαζί με το *Rhizobium*, τα οποία αναφέρονται ως rhizobia. Μέλη του γένους των *Rhizobium spp.* ειδικά σχηματίζουν ριζικά φυμάτια, αλλά σε άλλα είδη rhizobia μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό ογκιδίων σε στελέχη φυτών (Parker, 2001). Οι ευεργετικές ιδιότητες αυτών των μικροοργανισμών για τα φυτά μπορούν να αξιοποιηθούν για τη βελτίωση των καλλιεργειών. Έχουν αναπτυχθεί βιοπροστατευτικά, βίο-διεγέρτες και βίο-λιπάσματα τα οποία διεγείρουν την άμυνα των φυτών, βελτιώνουν τις διαδικασίες όπως τη ριζοβολία και την ανθοφορία και παρέχουν ορισμένα θρεπτικά συστατικά ή βοηθούν στην αφομοίωση αυτών.

### 3.2.2 *Pseudomonas sp.*

Οι ψευδομονάδες είναι από τα παλαιότερα βακτηριακά γένη. Μέχρι το 1960 εντοπίστηκαν σχεδόν 150 είδη και διατηρήθηκαν περισσότερα από 90 είδη στους εγκεκριμένους καταλόγους βακτηριδιακών ονομάτων. Κατά τα τελευταία 30 χρόνια, ο αριθμός αυτός έχει αυξηθεί σε περισσότερα από 200 είδη.

Τα είδη *Pseudomonas* είναι πολυφατικά και παρουσιάζουν ποικίλα χαρακτηριστικά, και έτσι οι φαινοτυπικές και μοριακές αναλύσεις έχουν προκαλέσει εκτεταμένες ταξινομικές αναθεωρήσεις (David, 2015). Ωστόσο τα *Pseudomonas* sp. ανήκουν στην οικογένεια Pseudomonadaceae της τάξης pseudomonadales των γ-πρωτεοβακτηρίων. Το είδος *Pseudomonas* sp. είναι λεπτοί, ραβδοειδείς, αρνητικοί κατά Gram βάκιλοι με περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη 57-68 mol % αντίστοιχα. Είναι αυστηρά αερόβια, ποτέ ζυμωτικά βακτήρια, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατή η αναερόβια ανάπτυξη εάν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια πηγή νιτρικού άλατος. Μερικοί *Pseudomonas* spp. (*P. fluorescens*, *P. putida*) έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες έως 4 ° C (39 ° F), αλλά οι περισσότεροι αναπτύσσονται μεταξύ 28 και 42 ° C (82 και 108 ° F), επιτυγχάνοντας ορατή ανάπτυξη εντός 24 έως 48 ωρών (Wisplinghoff, 2017).

Το *Pseudomonas* sp. είναι οργανισμοί ύδατος και εδάφους σχετικά χαμηλής μολυσματικότητας που παράγουν καταλάση. Οι ψευδομονάδες είναι κινητικές και θετικές στην παρουσία τόσο της ινδοφαινόλης όσο και της οξειδάσης. Πολλοί παράγουν πυοβεδίνες ή άλλες ορατές ή φθορίζουσες χρωστικές ουσίες. (Burns, 2012). Τα είδη του γένους *Pseudomonas* μπορούν να αποικοδομήσουν πολύπλοκες ή τοξικές ενώσεις φυσικής ή συνθετικής προελεύσεως. Οι ψευδομονάδες είναι από πλευράς οικολογίας σημαντικοί οργανισμοί στο έδαφος και στο νερό, πιθανότατα υπεύθυνες για την αποικοδόμηση πολλών διαλυτών ενώσεων που προέρχονται από τη διάσπαση φυτικής και ζωικής ύλης σε οξυγονούχα ενδοναίματα (Madigan et al., 2014). Κάποια είδη είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα για τους ανθρώπους και τα ζώα και προσβάλλουν τον οργανισμό, όταν αυτός είναι στρεσαρισμένος, ενώ άλλα όπως τα φυτοπαθογόνα είναι σημαντικά για τον αγροτικό τομέα. Τα άτομα του γένους *Pseudomonas* spp., είναι γενικά μια ομάδα με μεγάλη ετερογένεια και βιοποικιλότητα ανάμεσα στα είδη αλλά και υποείδη (Tryfinopoulou et al., 2002).

Το είδος *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί δείκτη ελέγχου μικροβιολογικής ποιότητας νερού. Βρίσκεται στα κόπρανα των ανθρώπων, αλλά σε μικρότερη ποσότητα από ότι τα κωλοβακτηριοειδή. Είναι ευκαιριακά παθογόνος μικροοργανισμός και δεν συνιστάται η αναζήτηση του σε επίπεδο ρουτίνας. Έχει σημασία όμως για τα εμφιαλωμένα νερά και για νερά ειδικών περιπτώσεων (νοσοκομειακά, παραγωγή φαρμάκων, κολυμβητικές δεξαμενές, spa κ.λπ.) (Μπούφα, 2005). Το *Pseudomonas*

*aeruginosa* γίνεται όλο και περισσότερο αναγνωρισμένη ως ευκαιριακό παθογόνο. Όλο και περισσότερες επιδημιολογικές έρευνες δείχνουν ότι πρόκειται για ένα νοσοκομειακό παθογόνο του οποίου η αντιβιοτική αντίσταση αυξάνεται στις κλινικές απομονώσεις (Παπαντωνίου, 2011). Το βακτήριο αυτό προκαλεί μολύνσεις του ουροποιητικού και του αναπνευστικού συστήματος, γαστρεντερικές μολύνσεις και δερματίτιδες, ιδιαίτερα στις ευπαθείς ομάδες, και σε ασθενείς στους οποίους εφαρμόζεται θεραπεία κατά σοβαρών εγκαυμάτων ή άλλων τραυμάτων του δέρματος και σε άτομα που υποφέρουν από κυστική ίνωση (Παπαντωνίου, 2011). Στα προαναφερθέντα περιστατικά, το ποσοστό θνησιμότητας αγγίζει το 50% των ασθενών. Έχει απλές θρεπτικές απαιτήσεις, ενώ συχνά έχει παρατηρηθεί η αύξησή του σε απεσταγμένο νερό. Είναι βακτήριο ανθεκτικό σε φυσικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, οι υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και χρωστικών ουσιών, ήπιων αντισηπτικών και άλλων συνηθισμένων αντιβιοτικών ευρείας χρήσης. Παρουσιάζει επίσης μια προτίμηση για αύξηση σε περιβάλλοντα υγρού χαρακτήρα (Παπαντωνίου, 2011).

### 3.2.3 *Acinetobacter junii*

Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες ταξινομικές μελέτες, το γένος *Acinetobacter* ανήκει στην υποκατηγορία γ-Πρωτεοβακτήρια, στην οικογένεια *Moraxellaceae* και είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Επίσης, είναι μη κινητικά, μη ζυμωτικά στη γλυκόζη και αυστηρά αερόβια (Rossau et al., 1991). Τα κύτταρα του έχουν μήκους περίπου 1,5 μm και το σχήμα τους ποικίλλει από κοκκοειδές σε κοκκοβακτηριδιακό, ανάλογα με τη φάση ανάπτυξης. Τα περισσότερα είδη *Acinetobacter* είναι μεταβολικά ευπροσάρμοστα και μπορούν να αναπτυχθούν εύκολα σε απλά μικροβιολογικά μέσα, σχηματίζοντας θολές, ομαλές αποικίες διαμέτρου περίπου 2 mm με ορισμένα είδη να είναι χρωματισμένα ανοιχτά κίτρινα ή γκρίζα. Το εύρος θερμοκρασιών είναι χαρακτηριστικό των μεσόφιλων βακτηρίων, κλινικά συναφή είδη αναπτύσσονται βέλτιστα στους ~ 37 ° C, ενώ τα περιβαλλοντικά είδη μπορεί να προτιμούν χαμηλότερες θερμοκρασίες (Visca et al., 2011).

Πιο συγκεκριμένα, τα *Acinetobacter* spp. απαντώνται σε πολλές περιβαλλοντικές πηγές, όπως το νερό, το έδαφος και τα τρόφιμα καθώς μπορούν να επιβιώσουν σε ξηρές επιφάνειες πολύ περισσότερο από άλλα βακτήρια που προκαλούν λοιμώξεις, οι οποίες

συνδέονται με την υγιεινομική περίθαλψη. Αντίθετα με τα άλλα αρνητικά κατά Gram βακίλια, τα βακτήρια *Acinetobacter* μπορούν να αποικίσουν σε ξηρές και υγρές περιοχές υγιούς ανθρώπινου δέρματος.

Το *Acinetobacter junii* είναι μια σπάνια αιτία της νόσου στους ανθρώπους, είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο που επηρεάζει κυρίως τους ασθενείς που είχαν προηγουμένως αντιμικροβιακή θεραπεία, επεμβατικές διαδικασίες ή κακοήθεια (Linde et al., 2002, Hung et al., 2009).

Τα *Acinetobacter* spp. είναι συνήθως συμβιωτικοί οργανισμοί, αλλά προκαλούν περιστασιακά μολύνσεις, κυρίως σε ευαίσθητους ασθενείς στα νοσοκομεία. Μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, πνευμονία, βακτηραιμία, δευτερογενή μηνιγγίτιδα και λοιμώξεις από πληγές. Οι ασθένειες αυτές είναι προδιατεθειμένες από παράγοντες όπως κακοήθεια, εγκαύματα, σοβαρή χειρουργική επέμβαση και αποδυναμωμένο ανοσοποιητικό σύστημα, όπως τα νεογνά και ηλικιωμένα άτομα.

Ενώ το *Acinetobacter* spp. συχνά ανιχνεύονται σε επεξεργασμένο πόσιμο νερό, συσχετίσεις μεταξύ της παρουσίας *Acinetobacter* spp. σε πόσιμο νερό και κλινικές ασθένειες δεν έχουν επιβεβαιωθεί. Ωστόσο η κατάποση δεν αποτελεί συνηθισμένη πηγή μόλυνσης καθώς δεν υπάρχουν ενδείξεις γαστρεντερικής μόλυνσης μέσω της κατάποσης του. Ωστόσο, η μετάδοση μη γαστρεντερικών λοιμώξεων από το πόσιμο νερό μπορεί να είναι δυνατή σε ευπαθή άτομα, ιδιαίτερα σε χώρους όπως οι εγκαταστάσεις υγιεινομικής περίθαλψης και τα νοσοκομεία..

Τα *Acinetobacter* spp. είναι ευαίσθητα σε απολυμαντικά όπως το χλώριο, και τα ποσοστά ύπαρξης τους θα είναι χαμηλά παρουσία απολυμαντικού υπολείμματος. Τα μέτρα ελέγχου που μπορούν να περιορίσουν την ανάπτυξη των βακτηρίων στα συστήματα διανομής περιλαμβάνουν τη θεραπεία για τη βελτιστοποίηση της απομάκρυνσης οργανικού άνθρακα, περιορισμού του χρόνου παραμονής του νερού στα συστήματα διανομής και τη συντήρηση των υπολειμμάτων απολυμαντικών (World Health Organization, 2011).

Σε μια μελέτη του δέρματος και των βλεννογόνων μεμβρανών, ποσοστό 43% των μη νοσηλευόμενων ασθενών αποικίστηκε με *Acinetobacter* spp. και οι *Acinetobacter*

*lwoffii*, *Acinetobacter johnsonii* και *Acinetobacter junii* ήταν τα πιο συνηθισμένα είδη που ανιχνεύθηκαν. Σε μια αμερικανική και ευρωπαϊκή μελέτη, το *Acinetobacter* spp. ήταν ο όγδοος πιο κοινός οργανισμός που απομονώθηκε από ασθενείς που νοσηλεύτηκαν με πνευμονία μεταξύ του 2009 και του 2012 (Erdem & Leber, 2018). Τα *Acinetobacter* spp. θεωρούνται παθογόνα βακτήρια χαμηλής μολυσματικότητας. Προκαλούν ευκαιριακές μολύνσεις μόνο σε άτομα με διαταραγμένη ανοσοποιητική κατάσταση. Από τους 10 κορυφαίους οργανισμούς που προκάλεσαν λοιμώξεις στο αίμα στα νοσοκομεία των ΗΠΑ από το 1995 έως το 2002, το *Acinetobacter* spp. κατέλαβε την 10η θέση (0,6 στις 10.000 εισαγωγές), αλλά την δεύτερη σε ποσοστά θνησιμότητας (34%) (Erdem & Leber, 2018).

#### 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μετά τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε παρατηρήθηκε πως κατά την διαδικασία της εμφιάλωσης οι περισσότεροι από τους οργανισμούς που αποτελούν το 75% της μικροβιολογικής σύστασης του νερού μειώνονται σε μεγάλο βαθμό ή εξαφανίζονται. Υπάρχουν όμως κάποια είδη μικροοργανισμών των οποίων η αφθονία παραμένει σταθερή ή ακόμη και αυξάνεται κατά την πάροδο της διαδικασίας εμφιάλωσης του νερού. Η διατήρηση της αφθονίας των μικροοργανισμών ή η αυξητική τάση της θεωρείται αναμενόμενη γιατί κατά την διαδικασία της εμφιάλωσης η ροή του νερού μεταβάλλεται. Παρατηρείται λοιπόν πως στο δεύτερο στάδιο, που πρόκειται για την φάση αποθήκευσης το νερού, υπάρχουν είδη που διατηρούν ή αυξάνουν την αφθονία τους. Αυτό πιθανώς συμβαίνει γιατί το νερό αποθηκεύεται σε μεγάλες δεξαμενές και παραμένει στάσιμο για κάποιο χρονικό διάστημα, ανάλογα με την διαδικασία που ακολουθεί η κάθε μονάδα παραγωγής εμφιαλωμένου νερού. Συνεπώς μπορούμε να συσχετίσουμε την ένταση της ροής που έχει το νερό με την μικροβιολογική του σύσταση και την τάση των μικροοργανισμών να αυξάνουν ή να μειώνουν σε πληθυσμό. Έτσι, μπορούμε να συμπεράνουμε πως όταν το νερό είναι αποθηκευμένο σε δεξαμενή χωρίς να υπάρχει κίνηση, δηλαδή ροή του νερού, είναι πιθανόν να υπάρξει αύξηση του μικροβιολογικού φορτίου.

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο βακτηριακός πληθυσμός στο εμφιαλωμένο νερό, αυξάνει μετά την εμφιάλωση, μεταξύ της πρώτης και δεύτερης εβδομάδας, ενώ στη συνέχεια τείνει να παραμένει σταθερός για περίπου έξι μήνες (Gonzalez *ét al.*, 1987).

Ο πληθυσμός των βακτηρίων τείνει να αυξάνεται συνεχώς μέχρι όμως να εξαντληθεί η διαθέσιμη οργανική ύλη που εμπεριέχεται στο εκάστοτε δοχείο. Επιπλέον, αν το νερό είναι αποθηκευμένο σε θερμοκρασία δωματίου, όπως και συνηθίζεται, δε θα χρειαστούν παρά μόνο λίγες ημέρες για να φτάσει η συγκέντρωση IO4 και IO5 cfus/ml. Η ψύξη επηρεάζει τη διαδικασία της αύξησης, επιβραδύνοντάς την. Άλλωστε δεν θα πρέπει να ξεχνάμε ότι το μπουκάλι ή η φιάλη λειτουργεί ως ένα κλειστό σύστημα (Παπαντωνίου, 2011).

Το εμφιαλωμένο νερό είναι σπάνια απολύτως καθαρό και απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς. Μετά την εμφιάλωση ο πληθυσμός των βακτηρίων που υπάρχουν στον περιέκτη, αυξάνουν με γρήγορους ρυθμούς, εις βάρος της οργανικής ύλης που

περιέχεται στο νερό. Η αύξηση αυτή τείνει να είναι πιο ραγδαία σε νερά μη ανθρακούχα και σε νερά που βρίσκονται σε πλαστικές φιάλες (Παπαντωνίου, 2011).



## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **1) ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Αντωνόπουλος Β. (2001) Ποιότητα και Ρύπανση Υπόγειων Νερών. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, σελ. 355.
- Βανταράκης Α. (2013) Πόσιμο νερό. <https://docplayer.gr/12273582-Posimo-nero-apostolos-vantarakis-avanta-upatras-gr-mon-perivallontikis-mikroviologias-ergastirio-ygieinis-tmima-iatrikis-pan-mio-patron.html> (Τελευταία Πρόσβαση: 11-05-2019).
- Εμβαλωμάτης Α., Μήτρακας Μ. (2008) Εφαρμογή των αρχών HACCP και των απαιτήσεων του προτύπου ΕΛΟΤ EN ISO 22000 στη βιομηχανία εμφιάλωσης νερού. <http://docplayer.gr/29679867-En-iso-euvalouatis-antonis-ae.html> (Πρόσβαση: 10-05-2019).
- ΕΦΕΤ (2003) Οδηγός Υγιεινής για τις επιχειρήσεις εμφιάλωσης νερού (Οδηγός Υγιεινής Νο 5). ΕΦΕΤ, Αθήνα. (<http://www.aphic.org/downloads/odigosygieinis-no05.pdf>).
- Κουϊμτζής Θ., Φυτιάνος Κ., Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κ.. (1998) Χημεία Περιβάλλοντος. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Μήτρακας Μ. (1996) Ποιοτικά χαρακτηριστικά και Επεξεργασία νερού. Έκδοση από τον συγγραφέα, Θεσσαλονίκη.
- Μπαντάκου Θ. Ι. (2014) Μικροβιολογική και χημική ποιότητα νερού που προέρχεται από πηγές. Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Μπούφα Π. (2003) Μικροβιολογικές παράμετροι για το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης [http://library.tee.gr/digital/ml914/ml914\\_mroufa.pdf](http://library.tee.gr/digital/ml914/ml914_mroufa.pdf). (Τελευταία πρόσβαση 11-05-2019).
- Μπούφα Π. (2005) Ποιότητα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης – Σχετική νομοθεσία [http://library.tee.gr/digital/m2077/m2077\\_georgiou.pdf](http://library.tee.gr/digital/m2077/m2077_georgiou.pdf) (Τελευταία πρόσβαση 10-05-2019).
- Μυλόπουλος Γ. (2002) Σημειώσεις ΠΜΣ "Προστασία Περιβάλλοντος και Βιώσιμη Ανάπτυξη»: Βιώσιμη Διαχείριση των υδατικών Πόρων. Θεσσαλονίκη.

Οδηγία αριθ. 2009/54/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 18ης Ιουνίου 2009 σχετικά με την εκμετάλλευση και τη θέση στο εμπόριο των φυσικών μεταλλικών νερών. <http://eur-lex.europa.eu/LjexUriServ/LexUriServ.do?Liri=QI: L: 2009: 164:0045:0058: Fi: PDF>.

Παπαντωνίου Β. (2011) Μικροβιολογικά κριτήρια και έλεγχος μικροβιακής ποιότητας εμφιαλωμένου νερού. Πτυχιακή Εργασία, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας.

Παπαετροπούλου Μ., Μαυρίδου Α. (2010) Μικροβιολογία του Υδάτινος Περιβάλλοντος Βασικές Αρχές. Εκδόσεις Τραυλός, Αθήνα.

Τσακίρης (2004) Σημειώσεις-Ε.Μ.Π. ΠΜΣ: «Επιστήμη και Τεχνολογία Υδατικών Πόρων»-Μάθημα: «Διαχείριση Υδατικών Πόρων». Αθήνα.

## 2) ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahmadian A., Ehn M., Hober S. (2006) Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*, 363:83-94.

Alexander D. C., Levett P. N., Turenne C. Y. (2015) Molecular Taxonomy. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, Pages 369-379.

Bates A. J. (2000) Water as Consumed and Its Impact on the Consumer - do we Understand the Variables?. *Food and Chemical Toxicology* 38 (1 Suppl):S29-36.

Burns J. L. (2012) Etiologic Agents of Infectious Diseases. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fourth Edition)*.

David C.Alexander, Paul N.Levett, Christine Y.Turenne (2015) *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, Chapter 21 - Molecular Taxonomy, Volume 1, 2015, Pages 369-379.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00021-4>.

- Erdem G., Leber A. (2018) *Acinetobacter* species. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases, pp 1688. ISBN 978-0-323-40181-4  
DOI: <https://doi.org/10.1016/C2013-0-19020-4>.
- Gonzalez C., Ramirez C. and Pereda M (1987) Multiplication and survival of *Pseudomonas aeruginosa* in uncarbonated natural mineral water. *Microbiology Alimentarius Nutrition*, 4, 111-115.
- Health Canada. (2009). [http://www.hc-sc.gc.ca/fr/Har/securit/iacts-faits/iaqs\\_bottle\\_watereau\\_emboutei\\_11\\_ee-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/fr/Har/securit/iacts-faits/iaqs_bottle_watereau_emboutei_11_ee-eng.php). (Τελευταία πρόσβαση 11-05-2019).
- Hung Y.T., Lee Y.T., Huang L.J., Chen T.L., Yu K.W., Fung C.P., Cho W.L., Liu C.Y. (2009) Clinical characteristics of patients with *Acinetobacter junii* infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 42(1):47-53.
- Kulakov L. A., McAlister M. B., Ogden K. L., Larkin M. J., O’Hanlon J. F. (2002) Analysis of Bacteria Contaminating Ultrapure Water in Industrial Systems *Applied Environmental Microbiology*, 68(4): 1548–1555.  
DOI: [10.1128/AEM.68.4.1548-1555.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1548-1555.2002).
- Linde H.J., Hahn J., Holler E., Reischl U., Lehn N. (2002) Septicemia Due to *Acinetobacter junii*. *Journal of clinical Microbiology*, 40(7):2696-7.
- Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. (2014) *BROCK Βιολογία των μικροοργανισμών Τόμος I, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης* ISBN: 978-960-524-200-8.
- Narciso-da-Rocha C., Vaz-Moreira I., Svensson-Stadler L., Moore E. R. B., Manaia C. M. (2013) Diversity and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. in water from the source to the tap. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 97, Issue 1, pp 329–340.
- Parker J. (2001) *Rhizobium*. *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press, Pages 1715-1716.  
<https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.1122>.
- Ronaghi M. (2001) Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research*, 11:3-11.

- Rosenberg F. (2003) The microbiology of bottled water. *Clinical Microbiology Newsletter* 25(6):41-44.
- Rossau, R., Van Landschoot, A., Gillis, M., De Ley J. (1991) Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov, a new bacterial family to accomodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *International journal of systematic of systematic bacteriology* 41, 310– 319.
- Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Nychas GJ. (2002) Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Applied Environmental Microbiology* 2002 Jan; 68(1):65-72.
- Venieri D., Vantarakis A., Korminou G. and Papapetropoulou M (2006) Microbiological valuation of bottled non-carbonated (still) water from domestic brands in Greece. *International Journal of Food Microbiology* 107' 68-72.
- Visca P., Seifert H., Towner K. J. (2011) *Acinetobacter* infection- an emerging threat to human health. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 1048-1054.
- Weber A.P.M., Weber K.L., Carr K., Wilkerson C., Ohlrogge J. (2007) Sampling the *Arabidopsis* Transcriptome with Massively Parallel Pyrosequencing. *Plant Physiology*, 144:32-42.
- Wisplinghoff H. (2017) *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*.
- World Health Organization (2011) *Guidelines for drinking-water quality - 4th edition*. ISBN 978 92 4 154815 1.

**ABSTRACT**

«Quantitative investigation of the bacterial species composition in a drinking water bottling plant»

The aim of this study was to investigate the quantitative composition of bacteria in a bottled water processing plant. The bacterial diversity was determined by pyrosequencing of the 16S rRNA gene. Samples were taken from three different environments of the bottling company, each one of them reflecting a major stage of the bottling process. These stages were: before storage (BS), storage tank (S), outflow of the stage tank (AS). In these samples, a total of 683 bacteria species were found, with 71 of them occurring in BS. Sixteen of these 71 organisms, comprising 75% of the water bacterial composition BS, were also investigated regarding their abundance in the next two stages. We observed that the most of these species decreased or disappeared in the S and AS stages, except from was the microorganisms *Rhizobium* spp., *Pseudomonas* sp., and *Acinetobacter junii*. This study suggests, that the water flow can play an important role for its microbiological composition as it was observed in the S stage, where there is no flow, where the micro-organisms are maintained or even increase their abundance.

Key words: Bacterial analysis, Bottled water, Pyrosequencing, *Acinetobacter junii*, *Rhizobium* spp., *Pseudomonas* sp.