



«ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ»

«Χημική και βιομοριακή ανάλυση»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«Σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης
μικροοργανισμών σε επεξεργασμένα και μη, αστικά υγρά
απόβλητα»

Γιαμάκης Ε. Ανδρέας

Επιβλέποντες:

Α' επιβλέπων ΤΣΟΥΜΑΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

Β' επιβλέπων ΛΑΓΟΥΜΙΝΤΖΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Πάτρα, ΙΟΥΛΙΟΣ 2026

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του Γιαμάκη Ε. Ανδρέα, που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίας στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του δημιουργού. Ο δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

«Σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης
μικροοργανισμών σε επεξεργασμένα και μη, αστικά υγρά
απόβλητα»

Γιαμάκης Ε. Ανδρέας

Επιτροπή Κρίσης

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:
Τσουμάνη Κωνσταντίνα

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής :
Λαγουμιντζής Γεώργιος

Πάτρα, ΙΟΥΛΙΟΣ 2026

«Ευχαριστίες»

Θέλω να ευχαριστήσω την Δρ Τσουμάνη Κωνσταντίνα για την υποστήριξη, ανατροφοδότηση και ουσιαστική καθοδήγηση, που μου παρείχε. Ένα υπέροχο ταξίδι γνώσης, που ξεκίνησε από τις εξαμηνιαίες θεματικές ενότητες και τις δύο εργαστηριακές θεματικές ενότητες της χημικής και βιομοριακής ανάλυσης, ολοκληρώνεται με τη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Η εργασία μου αφιερώνεται στα παιδιά μου Εμμανουέλα και Παύλο και στον εξαιρετικό φίλο Αυδή Γεώργιο.

Περίληψη

Η ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών στα αστικά υγρά απόβλητα αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας, καθώς συνδέεται άμεσα με τη δημόσια υγεία, την προστασία του περιβάλλοντος και τη βιώσιμη διαχείριση των υδατικών πόρων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση και αξιολόγηση των κυριότερων σύγχρονων μεθόδων που εφαρμόζονται για τον προσδιορισμό της μικροβιακής σύστασης και την εκτίμηση της μικροβιακής επιβάρυνσης των αστικών υγρών αποβλήτων πριν και μετά την επεξεργασία τους.

Αρχικά παρουσιάζονται οι συμβατικές καλλιεργητικές τεχνικές, οι οποίες, παρά την αξιοπιστία τους, εμφανίζουν περιορισμούς ως προς τον χρόνο ανάλυσης και την ανίχνευση μη καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών. Στη συνέχεια αναλύονται οι μοριακές μέθοδοι, όπως η PCR και οι παραλλαγές της, καθώς και οι σύγχρονες τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS), που επιτρέπουν την ταχεία και ολοκληρωμένη μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων. Παρουσιάζονται επίσης ανοσολογικές τεχνικές, όπως η ELISA, καθώς και νεότερες τεχνολογίες, όπως οι βιοαισθητήρες και η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS.

Η γνώση της μικροβιακής σύστασης των λυμάτων συμβάλλει στην επιδημιολογική επιτήρηση, στη βελτίωση των διεργασιών επεξεργασίας και στην αξιολόγηση της ποιότητας των επεξεργασμένων εκροών. Η αποτελεσματική παρακολούθηση σύνθετων περιβαλλοντικών δειγμάτων, όπως τα αστικά υγρά απόβλητα, απαιτεί τον συνδυασμό διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων, ώστε να επιτυγχάνεται πιο ολοκληρωμένη, ακριβής και αξιόπιστη εκτίμηση της μικροβιακής τους σύστασης.

Λέξεις – Κλειδιά

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης,

Αστικά υγρά απόβλητα,

Βιολογικός καθαρισμός,

Μικροβιακή ανάλυση,

Μικροβιακή σύσταση,

Νερό.

“Advanced methods for the detection and identification of microorganisms in treated and untreated municipal wastewater”

Giamakis E. Andreas

Abstract

The detection and identification of microorganisms in municipal wastewater constitute an important field of research, as they are directly related to public health protection, environmental sustainability, and water resource management. The aim of this study is to investigate and evaluate the principal contemporary methods used to determine the microbial composition and assess the microbial load of municipal wastewater before and after treatment.

Initially, conventional culture-based techniques are presented, which, despite their reliability, exhibit limitations regarding analysis time and the detection of non-culturable microorganisms. Subsequently, molecular methods, such as polymerase chain reaction (PCR) and its variants, as well as advanced technologies such as Next-Generation Sequencing (NGS), are discussed, as they enable rapid, sensitive, and comprehensive characterization of microbial communities. Immunological techniques, such as ELISA, together with emerging technologies including biosensors and MALDI-TOF MS, are also examined.

Knowledge of the microbial composition of wastewater contributes to epidemiological surveillance, the optimization of wastewater treatment processes, and the assessment of the quality of treated effluents. Effective microbial monitoring of complex environmental samples, such as municipal wastewater, requires the integration of different analytical methods in order to achieve a more comprehensive, accurate and reliable characterization of their microbial composition.

Keywords

Polymerase chain reaction,

Municipal wastewater,

Wastewater treatment,

Microbial analysis,

Microbial composition,

Water.

Περιεχόμενα

Περίληψη	v
Abstract.....	vii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων.....	xi
Κατάλογος Πινάκων	xii
Συνοτομογραφίες & Ακρωνύμια.....	xiii
1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Το νερό και η σημασία του	1
1.2 Ο κύκλος του νερού σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα	3
1.3 Χρήση του νερού και δημιουργία αποβλήτων.....	5
1.3.1 Τα γεωργικά απόβλητα.....	6
1.3.2 Τα οικιακά απόβλητα	6
1.3.3 Τα βιομηχανικά απόβλητα.....	6
1.3.4 Τα αποχετευτικά δίκτυα	7
1.4 Στάδια επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων	7
1.4.1 Προκαταρκτική επεξεργασία	8
1.4.2 Πρωτοβάθμια επεξεργασία	8
1.4.3 Δευτεροβάθμια ή βιολογική επεξεργασία	9
1.4.4 Τριτοβάθμια ή προχωρημένη επεξεργασία	10
1.4.5 Επεξεργασία στερεών υπολειμμάτων	11
1.4.6 Προβλήματα στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων	13
1.5 Τα μικρόβια	13
1.5.1 Τα βακτήρια.....	14
1.5.2 Οι μύκητες	17
1.5.3 Τα πρωτόζωα	18
1.5.4 Οι ιοί	20
1.6 Η σημασία της ανίχνευσης και ταυτοποίησης παθογόνων και μη μικροβίων σε επεξεργασμένα και μη υγρά αστικά απόβλητα.....	22
2 Μεθοδολογία.....	25
3 Μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών.....	27
3.1 Μικροβιολογικές μέθοδοι.....	27
3.1.1 Μικροσκοπική παρατήρηση	27
3.1.2 Κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)	31
3.1.3 Μέθοδος μεμβρανών διήθησης	33
3.1.4 Μικροβιακές καλλιέργειες	35
3.2 Μοριακές μέθοδοι	38
3.2.1 Μέθοδος FISH (Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization)	39
3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	39
3.2.3 Απόλυτη και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR).....	43
3.2.4 Πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (multiplex PCR).....	45
3.2.5 Ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (digital PCR).....	47
3.2.6 Ισοθερμική ενίσχυση DNA.....	50
3.2.7 Αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS).....	53
3.2.8 16s r RNA αλληλούχηση	57

3.2.9	Μεταγονιδιωματική αλληλούχηση ολικού γονιδιώματος (Whole Metagenome Sequencing – WMS) και Μεταγραφωμική ανάλυση.	60
3.2.10	Μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays).....	63
3.3	Βιοχημικές μέθοδοι	65
3.3.1	Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA	65
3.3.2	Ο ανοσοφθορισμός IF	69
3.4	Άλλες μέθοδοι.....	72
3.4.1	Βιοαισθητήρες	72
3.4.2	Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF	75
4	Συμπεράσματα	79
5	Βιβλιογραφία	88

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1: Μόρια νερού	1
Εικόνα 2: Το νερό στη γη μας.....	2
Εικόνα 3: Ο κύκλος του νερού	3
Εικόνα 4: Στόματα φυτικού φύλλου.....	4
Εικόνα 5: Επεξεργασία αστικών υγρών αποβλήτων με τη μέθοδο ενεργού ιλύος	8
Εικόνα 6: Σχηματισμός διμερών θυμίνης	11
Εικόνα 7: Προκαρυωτικό και ευκαρυωτικό κύτταρο	13
Εικόνα 8: Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια	15
Εικόνα 9: Το σύστημα ταξινόμησης Baltimore	21
Εικόνα 10: Οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	28
Εικόνα 11: Κυτταρομετρία ροής	31
Εικόνα 12: Στάδια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης	40
Εικόνα 13: Εκθετική αύξηση αριθμού αντιγράφων της αρχικής αλληλουχίας.....	41
Εικόνα 14: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα κλασικής PCR.....	42
Εικόνα 15: Μη ειδικοί και ειδικοί ανιχνευτές στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ..	44
Εικόνα 16: Καμπύλες ενίσχυσης στην Real-Time PCR.....	44
Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της βασικής αρχής της ψηφιακής PCR.....	48
Εικόνα 18: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της ψηφιακής PCR	49
Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση της βασικής αρχής της LAMP	51
Εικόνα 20: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ισοθερμικής ενίσχυσης μέσω βρόχου (LAMP).....	52
Εικόνα 21: Βασική αρχή της αλληλούχησης επόμενης γενιάς	53
Εικόνα 22: Συγκριτική απεικόνιση των μεθόδων αλληλούχησης Sanger και NGS	55
Εικόνα 23: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα αλληλούχησης επόμενης γενιάς NGS	56
Εικόνα 24: Δομή του 16S rRNA	58
Εικόνα 25: Συγκριτική απεικόνιση προσεγγίσεων αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) για την ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων	63
Εικόνα 26: DNA microarrays	63
Εικόνα 27: Τύποι ELISA	67
Εικόνα 28: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ELISA	68
Εικόνα 29: Έμμεσος ανοσοφθορισμός	70
Εικόνα 30: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ανοσοφθορισμού	71
Εικόνα 31: Δομή και αρχή λειτουργίας ενός βιοαισθητήρα	73
Εικόνα 32: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοαισθητήρων	74
Εικόνα 33: Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών	76
Εικόνα 34: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τεχνικής MALDI-TOF MS	78

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Παθογόνα βακτήρια, που βρίσκονται στα ανεπεξέργαστα αστικά απόβλητα. .	16
Πίνακας 2: Παθογόνα πρωτόζωα, που βρίσκονται στα ανεπεξέργαστα αστικά απόβλητα.	
.....	19
Πίνακας 3: Ιοί, που βρίσκονται στα ανεπεξέργαστα αστικά απόβλητα.....	20
Πίνακας 4: Ενδεικτικές συγκεντρώσεις μικροβίων σε μη επεξεργασμένα απόβλητα ανά ml.....	23
Πίνακας 5: Χρόνος ζωής (ημέρες) παθογόνων μικροβίων (20-30 βαθμοί Κελσίου) σε υγρά απόβλητα.....	23
Πίνακας 6: Σύγκριση μεταγονιδιατικής και μεταμεταγραφωμικής ανάλυσης.	62
Πίνακας 7: Ομοιότητες και διαφορές ανάμεσα σε ELISA και IF.	70
Πίνακας 8: Σύγκριση τεχνικών ανίχνευσης μικροοργανισμών.....	83

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

BIP	Backward Inner Primer
CFU	Colony Forming Unit
CPE	Cytopathic Effect
Ct	Cycle threshold
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dPCR	Digital PCR
dsDNA	Double-Stranded DNA
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCM	Flow cytometry
FIP	Forward Inner Primer
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
IF	Immunofluorescence
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MPN	Most Probable Number
NGS	Next-Generation Sequencing
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	πολυαιθυλενογλυκόλη
PFU	Plaque Forming Units
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
rt PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RT PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SEM	Scanning Electron Microscopy
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Side Scatter
ssDNA	Single-Stranded DNA

STRs Short Tandem Repeats

Taq *Thermus aquaticus*

TEM Transmission Electron Microscopy

T_m Melting Temperature

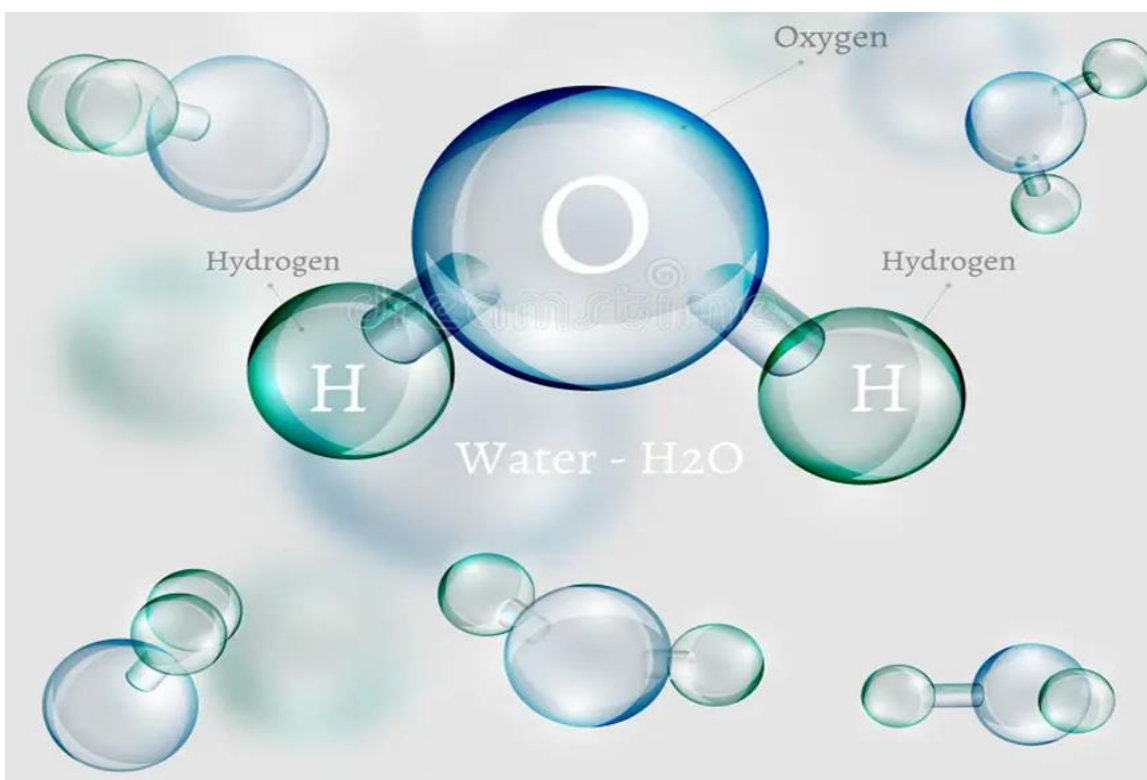
WGS Whole Genome Sequencing

WMS Whole Metagenome Sequencing

1. Εισαγωγή

1.1 Το νερό και η σημασία του

Το νερό H_2O (Εικόνα 1), αποτελεί μία θεμελιώδη χημική ένωση για την ύπαρξη και τη διατήρηση της ζωής στον πλανήτη μας. Καλύπτει περίπου τα 2 / 3 της επιφάνειας της Γης και συμμετέχει σε πλήθος φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών, οι οποίες καθορίζουν τη λειτουργία των οικοσυστημάτων. Για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς το νερό είναι απαραίτητο, καθώς συμμετέχει σε βασικές λειτουργίες, όπως η διάλυση και μεταφορά θρεπτικών ουσιών, η ρύθμιση της θερμοκρασίας και οι μεταβολικές διεργασίες. Δεν είναι τυχαίο ότι περισσότερο από το 70% της μάζας του σώματος των ζωντανών οργανισμών είναι νερό.



Εικόνα 1: Μόρια νερού
(Πηγή: <https://thumbs.dreamstime.com>)

Παράλληλα, έχει καθοριστική σημασία για την ανθρώπινη κοινωνία, καθώς συνδέεται άμεσα με την υγεία, τη γεωργία, τη βιομηχανία, την παραγωγή ενέργειας και την οικονομική ανάπτυξη. Από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα, οι ανθρώπινοι πολιτισμοί αναπτύχθηκαν κυρίως κοντά σε πηγές νερού, γεγονός που καταδεικνύει τον καθοριστικό του ρόλο στη διαμόρφωση της ανθρώπινης ιστορίας και του πολιτισμού.

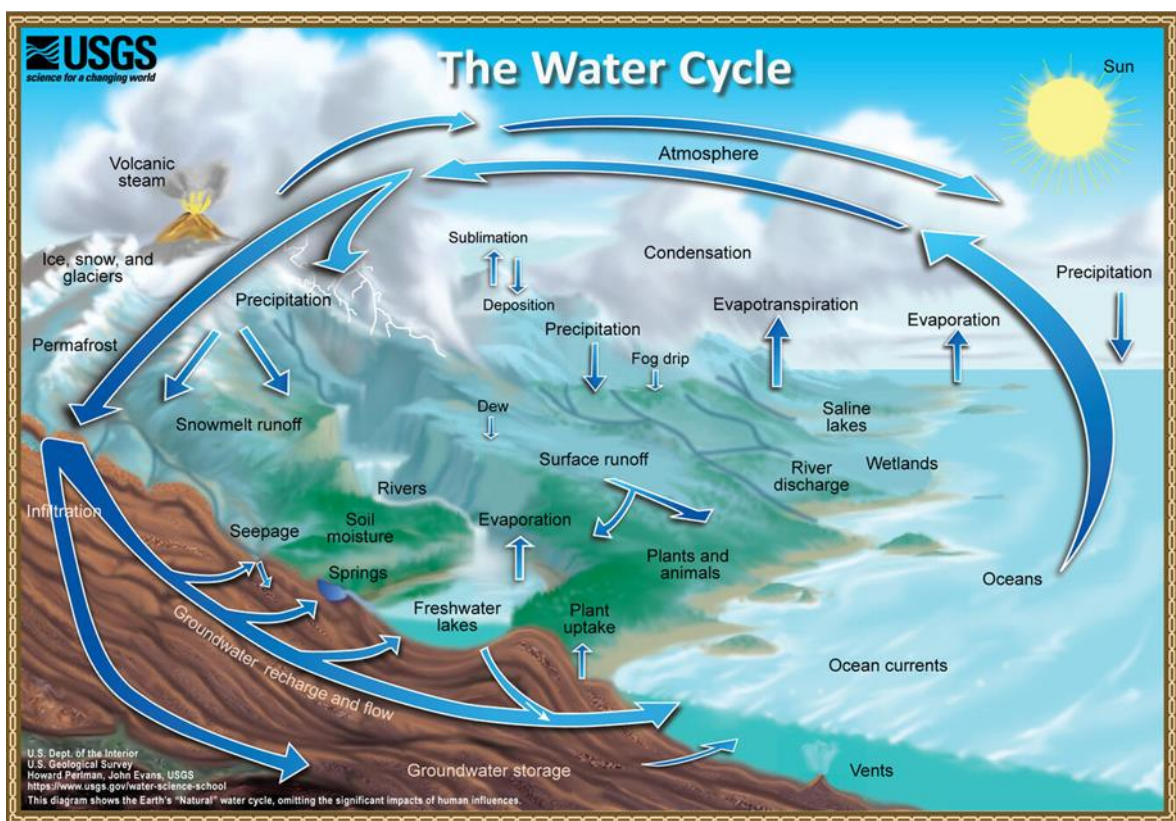
Ωστόσο, παρά την αφθονία του στον πλανήτη, το νερό, το οποίο είναι κατάλληλο για ανθρώπινη χρήση, αποτελεί ένα πολύ μικρό ποσοστό των συνολικών υδάτινων πόρων (Εικόνα 2). Το 2020 το παγκόσμιο ποσοστό άντλησης «γλυκού» νερού ήταν περίπου 4000 δισεκατομμύρια κυβικά μέτρα, εκ των οποίων περίπου το 72% χρησιμοποιήθηκε για τη γεωργία, το 15% για τη βιομηχανία και το 13% για δημοτική χρήση (Jacque et al., 2024). Η αύξηση του πληθυσμού, η κλιματική αλλαγή, η ρύπανση και η υπερεκμετάλλευση των υδάτινων πόρων δημιουργούν σημαντικές προκλήσεις για τη βιώσιμη διαχείριση του νερού. Για τον λόγο αυτό, η κατανόηση της σημασίας του νερού και η ανάπτυξη πρακτικών ορθολογικής χρήσης του αποτελούν βασικές προϋποθέσεις για τη διασφάλιση της ζωής και της περιβαλλοντικής ισορροπίας στο μέλλον.



Εικόνα 2: Το νερό στη γη μας
(Πηγή: <https://chem.noesis.edu.gr/to-nero-yparchei-pantou>)

1.2 Ο κύκλος του νερού σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα

Ο κύκλος του νερού (υδρολογικός κύκλος) αποτελεί μία από τις βασικότερες φυσικές διεργασίες για τη διατήρηση της ισορροπίας των οικοσυστημάτων στη Γη. Πρόκειται για μια συνεχή κυκλοφορία του νερού μεταξύ της ατμόσφαιρας, της επιφάνειας της Γης και του υπεδάφους, μέσω διαδικασιών όπως η εξάτμιση, η συμπύκνωση, η κατακρήμνιση και η απορροή. Ο κύκλος αυτός διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο τόσο στα χερσαία, όσο και στα υδάτινα οικοσυστήματα, επηρεάζοντας τη διαθεσιμότητα του νερού, τη λειτουργία των οργανισμών και τη δομή των οικολογικών συστημάτων (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Ο κύκλος του νερού

(Πηγή: <https://www.usgs.gov/media/images/natural-water-cycle-jpg>)

Σε ένα **χερσαίο οικοσύστημα**, όπως ένα δάσος, μια πεδιάδα ή ένας αγρός, ο κύκλος του νερού ξεκινά κυρίως από την κατακρήμνιση, δηλαδή τη βροχή, το χιόνι ή το χαλάζι, που φτάνει στην επιφάνεια της Γης. Ένα μέρος του νερού απορροφάται από το έδαφος μέσω της διαδικασίας της διήθησης και εμπλουτίζει τα υπόγεια νερά. Ένα άλλο μέρος παραμένει στο ανώτερο στρώμα του εδάφους και δεσμεύεται από τα φυτά μέσω των ριζών τους. Τα φυτά, με τη διαδικασία της διαπνοής, απελευθερώνουν νερό στην

ατμόσφαιρα με τη μορφή υδρατμών, μέσω των στομάτων στα φύλλα τους (Εικόνα 4). Παράλληλα, νερό εξατμίζεται απευθείας από το έδαφος. Η συνδυασμένη διαδικασία εξάτμισης και διαπνοής ονομάζεται εξατμισοδιαπνοή και αποτελεί βασικό μηχανισμό επιστροφής του νερού στην ατμόσφαιρα. Τέλος, μέρος του νερού ρέει επιφανειακά προς λίμνες ή θάλασσες (επιφανειακή απορροή).



Εικόνα 4: Στόματα φυτικού φύλλου
(Πηγή: <http://votaniki.gr/orologia/stomata/>.)

Σε ένα **υδάτινο οικοσύστημα**, όπως μια λίμνη, ένα ποτάμι ή ένας ωκεανός, ο κύκλος του νερού παρουσιάζει ορισμένες διαφοροποιήσεις, αν και βασίζεται στις ίδιες θεμελιώδεις διαδικασίες. Η κύρια διεργασία που κυριαρχεί είναι η επιφανειακή εξάτμιση, ιδιαίτερα στις θάλασσες και τους ωκεανούς, οι οποίοι αποτελούν τη μεγαλύτερη πηγή υδρατμών στην ατμόσφαιρα. Οι υδρατμοί αυτοί ανέρχονται στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας, όπου ψύχονται και συμπυκνώνονται σχηματίζοντας σύννεφα. Όταν οι σταγόνες του νερού μεγαλώσουν αρκετά, πέφτουν ξανά στη γη με τη μορφή κατακρημνίσεων. Σε υδάτινα οικοσυστήματα, το νερό μπορεί να προέρχεται τόσο από άμεση βροχόπτωση, όσο και από την απορροή των γύρω χερσαίων περιοχών.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ χερσαίων και υδάτινων οικοσυστημάτων είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διατήρηση του υδρολογικού κύκλου. Τα ποτάμια, για παράδειγμα, μεταφέρουν νερό από τις ηπειρωτικές περιοχές προς τις θάλασσες, ενώ η εξάτμιση από τους ωκεανούς τροφοδοτεί με υδρατμούς την ατμόσφαιρα, συμβάλλοντας στον σχηματισμό βροχοπτώσεων πάνω από τη στεριά. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα συνεχές σύστημα κυκλοφορίας του νερού, το οποίο διατηρεί τη λειτουργία των οικοσυστημάτων και υποστηρίζει τη ζωή στον πλανήτη.

Συνολικά, ο κύκλος του νερού αποτελεί έναν δυναμικό και αλληλεξαρτώμενο μηχανισμό, συνδέοντας τη στεριά, τις υδάτινες εκτάσεις και την ατμόσφαιρα. Η κατανόηση των διαδικασιών του είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη διαχείριση των υδάτινων πόρων, την προστασία των οικοσυστημάτων και την αντιμετώπιση σύγχρονων περιβαλλοντικών προκλήσεων, όπως η κλιματική αλλαγή και η λειψυδρία (Allan, et al., 2020).

1.3 Χρήση του νερού και δημιουργία αποβλήτων

Το νερό, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους φυσικούς πόρους για τη λειτουργία των ανθρώπινων κοινωνιών και των οικοσυστημάτων. Χρησιμοποιείται σε πλήθος δραστηριοτήτων, όπως στην ύδρευση, τη γεωργία, τη βιομηχανία, την παραγωγή ενέργειας και τις καθημερινές οικιακές ανάγκες. Η παραγωγή υγρών αποβλήτων συνδέεται άμεσα με ζητήματα περιβαλλοντικής προστασίας και βιώσιμης διαχείρισης των υδάτινων πόρων. Η ανεπαρκής επεξεργασία ή η ανεξέλεγκτη διάθεση αποβλήτων μπορεί να οδηγήσει σε υποβάθμιση της ποιότητας των υδάτων, απώλεια βιοποικιλότητας και κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία. Η μετάδοση παθογόνων μικροοργανισμών μέσω μολυσμένου νερού είναι μια σημαντική αιτία ασθένειας παγκοσμίως. Έχει υπολογιστεί ότι το ένα τρίτο των γαστρεντερικών ασθενειών προκαλούνται από μολυσμένο πόσιμο νερό και το 4% όλων των θανάτων παγκοσμίως οφείλονται σε μολυσμένο πόσιμο νερό και κακή αποχέτευση (Shaw, et al., 2015). Επίσης περιέχουν σημαντικές συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών, όπως άζωτο και φώσφορο, που μπορούν να επιταχύνουν την ανάπτυξη υδρόβιων φυτών και να προκαλέσουν φαινόμενα ευτροφισμού στα επιφανειακά ύδατα (Naidoo & Olaniran, 2014). Επιπλέον, είναι δυνατόν να περιέχουν τοξικές ουσίες με μεταλλαξογόνο - καρκινογόνο δράση, γεγονός που καθιστά την ανεξέλεγκτη διάθεσή τους ιδιαίτερα επικίνδυνη για τη δημόσια υγεία και τα οικοσυστήματα. Για τον λόγο αυτό, η ανάπτυξη αποτελεσματικών συστημάτων επεξεργασίας λυμάτων, η εξοικονόμηση νερού και η υιοθέτηση βιώσιμων πρακτικών χρήσης του, αποτελούν βασικές προϋποθέσεις για την προστασία των υδάτινων πόρων και των οικοσυστημάτων. Συνεπώς, η ορθολογική χρήση του νερού και η σωστή διαχείριση των αποβλήτων αποτελούν κρίσιμους παράγοντες για τη διατήρηση της περιβαλλοντικής ισορροπίας και τη βιώσιμη ανάπτυξη των ανθρώπινων κοινωνιών.

Ιδιαίτερη σημασία αποκτά η επαναχρησιμοποίηση των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων ιδιαίτερα σε περιοχές, όπου οι διαθέσιμες πηγές γλυκού νερού δεν επαρκούν

για την κάλυψη των αναγκών σε πόσιμο νερό (Abdel Raouf et al., 2012). Στις περιπτώσεις αυτές, το χρησιμοποιημένο νερό δεν πρέπει να αντιμετωπίζεται ως άχρηστο απόβλητο, αλλά ως εναλλακτικός υδάτινος πόρος ο οποίος μπορεί να αξιοποιηθεί, για παράδειγμα, στην άρδευση γεωργικών εκτάσεων. Παράλληλα, κατά τη διαδικασία επεξεργασίας παράγονται στερεά υπολείμματα (ιλύς), αποτελούμενα κυρίως από οργανικά υλικά. Αυτά μπορούν να αξιοποιηθούν μετά από κατάλληλη σταθεροποίηση μέσω διεργασιών, όπως η αναερόβια χώνευση και η κομποστοποίηση. Η αναερόβια χώνευση οδηγεί στην παραγωγή αξιοποιήσιμου ενεργειακά βιοαερίου και στη μείωση του όγκου και της παθογένειας της ιλύος, ενώ η κομποστοποίηση επιτρέπει τη μετατροπή της σε σταθεροποιημένο εδαφοβελτιωτικό υλικό.

1.3.1 Τα γεωργικά απόβλητα

Η γεωργία αποτελεί τον μεγαλύτερο καταναλωτή νερού παγκοσμίως, κυρίως για σκοπούς άρδευσης των καλλιεργειών (Okut et al., 2025). Κατά τη διαδικασία αυτή, μέρος του νερού απορροφάται από τα φυτά ή εξατμίζεται, ενώ ένα άλλο μέρος απορρέει από τα χωράφια μεταφέροντας μαζί του λιπάσματα, φυτοφάρμακα και άλλες χημικές ουσίες, με τελικό αποδέκτη κάποια λίμνη ή θάλασσα, συμβάλλοντας στη ρύπανση των υδάτινων οικοσυστημάτων και σε φαινόμενα, όπως ο ευτροφισμός.

1.3.2 Τα οικιακά απόβλητα

Στον οικιακό τομέα, το νερό χρησιμοποιείται κυρίως για πόση, μαγείρεμα, προσωπική υγιεινή, καθαριότητα και πλύσιμο ρούχων και πιάτων. Μετά τη χρήση του, μετατρέπεται σε απόβλητο, το οποίο περιέχει οργανικές ουσίες, απορρυπαντικά, λίπη, μικροοργανισμούς και διάφορες χημικές ενώσεις. Διοχετεύεται συνήθως σε δίκτυα αποχέτευσης και εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, όπου υποβάλλεται σε κατάλληλη επεξεργασία.

1.3.3 Τα βιομηχανικά απόβλητα

Σημαντική είναι επίσης η χρήση του νερού στη βιομηχανία, όπου χρησιμοποιείται σε διαδικασίες παραγωγής, ψύξης, καθαρισμού και μεταφοράς υλικών. Η σύσταση των βιομηχανικών υγρών αποβλήτων εξαρτάται από το είδος της βιομηχανικής δραστηριότητας (Derco et al., 2024). Τα απόβλητα αυτά μπορεί να περιέχουν βαρέα μέταλλα, οργανικούς ρύπους, χημικές ουσίες ή άλλες επιβλαβείς ενώσεις. Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους, τα απόβλητα αυτά μπορεί να διοχετεύονται απευθείας στο αποχετευτικό δίκτυο ή να απαιτούν προεπεξεργασία ή ειδική διαχείριση πριν από την

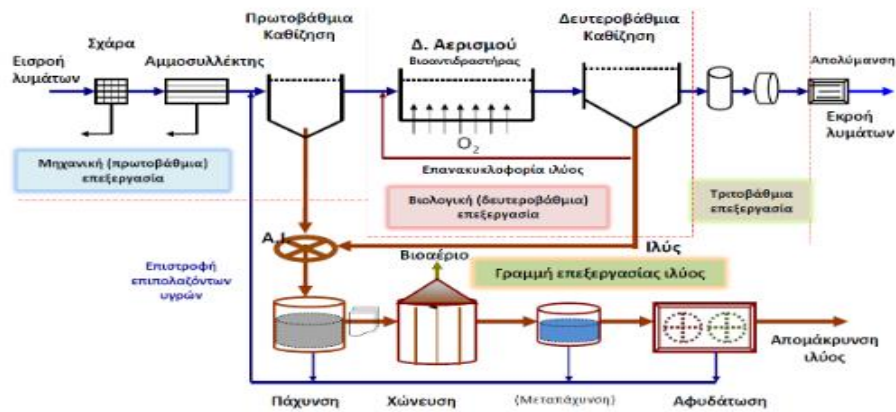
τελική διάθεσή τους, ώστε να μειωθούν οι επιπτώσεις τους στα οικοσυστήματα και στη δημόσια υγεία.

1.3.4 Τα αποχετευτικά δίκτυα

Τα αποχετευτικά δίκτυα συλλέγουν και μεταφέρουν τα υγρά απόβλητα. Διακρίνονται σε χωριστικά και παντοροϊκά. Στα χωριστικά, τα οικιακά και βιομηχανικά λύματα συλλέγονται και μεταφέρονται ξεχωριστά από τα όμβρια ύδατα, επιτρέποντας την αποτελεσματικότερη επεξεργασία και μειώνοντας τον κίνδυνο υπερφόρτωσης των εγκαταστάσεων (Rashid & Liu, 2020). Αξίζει να αναφερθεί ότι στη συνολική ροή συνεισφέρουν και τα εισρέοντα ύδατα, τα οποία εισέρχονται στο αποχετευτικό σύστημα μέσω ρωγμών, αστοχιών ή ανοιγμάτων των σωληνώσεων, όπως συμβαίνει με τα όμβρια ύδατα. Αντίθετα, στα παντοροϊκά όλα τα ρεύματα (οικιακά, βιομηχανικά και όμβρια) συλλέγονται από κοινού, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές διακυμάνσεις της παροχής και της σύστασης των αποβλήτων, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια έντονων βροχοπτώσεων.

1.4 Στάδια επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων

Η επεξεργασία των αστικών υγρών αποβλήτων (λυμάτων), στην οποία θα εστιάσουμε την προσοχή μας στην παρούσα διπλωματική εργασία, αποτελεί μια σημαντική διαδικασία για την προστασία της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος. Τα λύματα που προέρχονται από οικιακές δραστηριότητες, περιέχουν οργανικές ουσίες, αιωρούμενα στερεά, μικροοργανισμούς και διάφορες χημικές ενώσεις. Για τον λόγο αυτό, πριν από την απόρριψή τους στο φυσικό περιβάλλον, υποβάλλονται σε μια σειρά από στάδια επεξεργασίας σε ειδικές εγκαταστάσεις. Ο βασικός στόχος της επεξεργασίας αυτής είναι η απομάκρυνση των βιοαποικοδομήσιμων οργανικών ουσιών, η απομάκρυνση διαφόρων θρεπτικών συστατικών, όπως τα νιτρικά και φωσφορικά άλατα, η καταστροφή παθογόνων και η πρόληψη της ρύπανσης των υδάτων για την προστασία των υδρόβιων οργανισμών (Koul et al., 2022). Τα βασικά στάδια είναι η προκαταρκτική, η πρωτοβάθμια, η δευτεροβάθμια και η τριτοβάθμια επεξεργασία (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Επεξεργασία αστικών υγρών αποβλήτων με τη μέθοδο ενεργού υλός
(Πηγή: https://www.enerchem.gr/WastewaterSystems/WWTP_General/WWTP_General.php)

1.4.1 Προκαταρκτική επεξεργασία

Η **προκαταρκτική επεξεργασία**, κατά την οποία απομακρύνονται τα μεγάλα στερεά αντικείμενα, που βρίσκονται στα λύματα, όπως χαρτιά, πλαστικά, ξύλα και άλλα απορρίμματα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση κατάλληλων σχαρών. Η εσχάρωση λοιπόν αποτελεί μια φυσική διεργασία κατά την οποία συγκρατούνται τα ευμεγέθη στερεά, τα οποία θα μπορούσαν να προκαλέσουν φθορές στον εξοπλισμό των επόμενων σταδίων. Τα εσχάρσματα υφίστανται τεμαχισμό ή συμπίεση για μείωση του όγκου τους και απομάκρυνση του νερού και στη συνέχεια οδηγούνται συνήθως σε χώρους διάθεσης ή αποτέφρωσης. Την εσχάρωση ακολουθεί η εξάμμωση, κατά την οποία απομακρύνονται άμμος και χαλίκια, που αν παρέμεναν θα προκαλούσαν τριβές, αποθέσεις και λειτουργικά προβλήματα (Kolosovska & Bauer, 2022).

1.4.2 Πρωτοβάθμια επεξεργασία

Το επόμενο στάδιο είναι η **πρωτοβάθμια επεξεργασία**, όπου τα λύματα οδηγούνται σε δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης. Εκεί τα αιωρούμενα στερεά καθιζάνουν στον πυθμένα λόγω βαρύτητας και σχηματίζουν την πρωτοβάθμια ιλύ. Η πρωτοβάθμια καθίζηση επιτρέπει την απομάκρυνση βαριών οργανικών στερεών, επιτυγχάνοντας μείωση των αιωρούμενων στερεών έως και 70%. Σε ορισμένες περιπτώσεις εφαρμόζεται και επίπλευση, όπου φυσαλίδες αέρα παρασύρουν προς την επιφάνεια ελαφρά σωματίδια, που καθιζάνουν αργά (Rubio et al., 2002). Τα ελαφρύτερα υλικά, όπως τα λίπη και τα έλαια, επιπλέουν επίσης στην επιφάνεια και απομακρύνονται. Με τη διαδικασία αυτή

αφαιρείται σημαντικό ποσοστό των αιωρούμενων στερεών και μέρος του οργανικού φορτίου των λυμάτων.

1.4.3 Δευτεροβάθμια ή βιολογική επεξεργασία

Ακολουθεί η *δευτεροβάθμια ή βιολογική επεξεργασία*, η οποία στοχεύει κυρίως στην απομάκρυνση των διαλυμένων οργανικών ουσιών. Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί, κυρίως βακτήρια, τα οποία διασπών τις οργανικές ενώσεις των λυμάτων. Η διαδικασία πραγματοποιείται συνηθέστερα σε δεξαμενές αερισμού, όπου παρέχεται οξυγόνο για τη δράση των μικροοργανισμών. Στη συνέχεια, το μίγμα οδηγείται σε δευτεροβάθμιες δεξαμενές καθίζησης. Εκεί η βιολογική ιλύς καθιζάνει και διαχωρίζεται από το καθαρισμένο νερό. Αναλυτικότερα, στην αεριζόμενη δεξαμενή, μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, πρωτόζωα και μύκητες διασπών την οργανική ύλη, παράγοντας διοξείδιο του άνθρακα, νερό και νέα βιομάζα. Η βιομάζα αυτή σχηματίζει μικροβιακά συσσωματώματα (κροκίδες) μεγέθους 50 έως 200 μm , τα οποία καθιζάνουν στη δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης (Kosar, et al., 2022), που ακολουθεί. Μέρος της ενεργού ιλύος ανακυκλώνεται στη δεξαμενή αερισμού, ενώ το πλεόνασμα απομακρύνεται. Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται απομάκρυνση κολλοειδών, διαλυμένων και αιωρούμενων οργανικών, καθώς και μετατροπές του αζώτου. Συγκεκριμένα, η νιτροποίηση πραγματοποιείται σε αερόβιες συνθήκες από αυτότροφα βακτήρια, όπως τα *Nitrosomonas* και *Nitrobacter*, μετατρέποντας την αμμωνία σε νιτρώδη και στη συνέχεια σε νιτρικά (Madeira & Calábria de Araújo, 2021). Αντίθετα, σε ανοξικές συνθήκες λαμβάνει χώρα η απονιτροποίηση, κατά την οποία ετερότροφα βακτήρια, όπως τα *Pseudomonas*, ανάγουν τα νιτρικά σε ελευθερωμένο στην ατμόσφαιρα αέριο άζωτο (N_2), συμβάλλοντας στην απομάκρυνση του αζώτου και στην αποφυγή ευτροφισμού.

Επιπρόσθετα, η απομάκρυνση φωσφόρου επιτυγχάνεται βιολογικά μέσω φωσφοροβακτηρίων, όπως το *Acinetobacter* (Chen, et al., 2021), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις εφαρμόζονται και χημικές μέθοδοι. Οι βιολογικές διεργασίες διακρίνονται σε αερόβιες και αναερόβιες, με τη βιομάζα να εμφανίζεται είτε σε αιωρούμενη μορφή, όπως στο σύστημα ενεργού ιλύος, είτε προσκολλημένη σε επιφάνειες, όπως στα βιολογικά φίλτρα και τους περιστρεφόμενους βιολογικούς δίσκους. Η αναερόβια επεξεργασία περιλαμβάνει διαδοχικά στάδια υδρόλυσης, οξεογένεσης και μεθανογένεσης, με τη συμμετοχή μικροοργανισμών όπως τα *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Methanobacterium* και οδηγεί στην παραγωγή μεθανίου, προσφέροντας ενεργειακά οφέλη και μειωμένη

παραγωγή βιομάζας (η αναερόβια επεξεργασία παράγει έως και δέκα φορές λιγότερη βιομάζα, γεγονός που σχετίζεται με πολύ χαμηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά και ενέργεια με τη μορφή βιοαερίου). Η περίσσεια ιλύος δεν χρειάζεται περαιτέρω σταθεροποίηση, κάτι που αποτελεί απαραίτητο μέρος της αερόβιας επεξεργασίας (Vítězová et al., 2020).

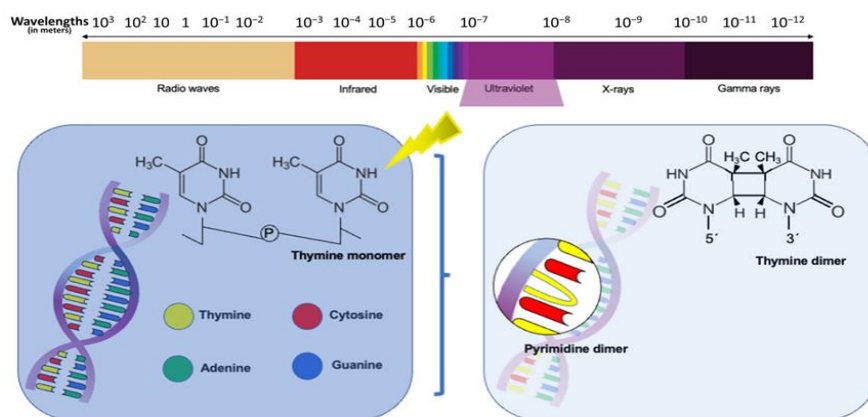
1.4.4 Τριτοβάθμια ή προχωρημένη επεξεργασία

Το τελικό στάδιο είναι η **τριτοβάθμια ή προχωρημένη επεξεργασία**, η οποία εφαρμόζεται όταν απαιτείται υψηλότερος βαθμός καθαρισμού του νερού, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις επαναχρησιμοποίησης ή διάθεσης σε ευαίσθητα υδάτινα οικοσυστήματα. Στο στάδιο αυτό επιδιώκεται η περαιτέρω απομάκρυνση οργανικών ουσιών, η μείωση των θρεπτικών στοιχείων, κυρίως αζώτου και φωσφόρου, καθώς και η απομάκρυνση επικίνδυνων ουσιών, όπως τα βαρέα μέταλλα. Η απομάκρυνση των υπολειπόμενων οργανικών επιτυγχάνεται με διεργασίες όπως η διήθηση (άμμου ή μεμβρανών) και η προσρόφιση σε ενεργό άνθρακα, ενώ η απομάκρυνση των θρεπτικών πραγματοποιείται μέσω βιολογικών διεργασιών, δηλαδή νιτροποίηση - απονιτροποίηση για το άζωτο και βιολογική (*Acinetobacter lwoffii*) ή χημική απομάκρυνση φωσφόρου. Για την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων εφαρμόζονται εξειδικευμένες τεχνικές, όπως η ιοντοανταλλαγή, η χημική κατακρήμνιση και η χρήση μεμβρανών (π.χ. αντίστροφη ώσμωση).

Η απολύμανση αποτελεί κρίσιμο στάδιο στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων και αφορά τη θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών, διαφοροποιούμενη σαφώς από την αποστείρωση, η οποία στοχεύει στην πλήρη εξάλειψη όλων των μικροοργανισμών. Στα υγρά απόβλητα, οι σημαντικότεροι παθογόνοι οργανισμοί, που σχετίζονται με την πρόκληση ασθενειών, είναι τα βακτήρια, τα πρωτόζωα και οι ιοί. Η απολύμανση μπορεί να επιτευχθεί μέσω χημικών ή φυσικών μεθόδων (Fava, et al., 2026). Η χημική απολύμανση πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση οξειδωτικών παραγόντων, όπως το χλώριο και το όζον. Το χλώριο, σε μορφές όπως Cl_2 , NaOCl , Ca(OCl)_2 και ClO_2 , δρα απενεργοποιώντας ένζυμα και παρουσιάζει υπολειμματική δράση, η οποία αν και συμβάλλει στην παρατεταμένη απολυμαντική ικανότητα, μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στους υδρόβιους οργανισμούς κατά την απόρριψη των επεξεργασμένων αποβλήτων (Collivignarelli et al., 2017). Το όζον, το οποίο είναι μπλε αέριο με χαρακτηριστική οσμή, παράγεται από αέρα ή καθαρό οξυγόνο μέσω εφαρμογής υψηλής

τάσης σε ηλεκτρόδια μικρής απόστασης και διασπάται ταχύτατα σε οξυγόνο, με χρόνο ζωής στο νερό της τάξης λίγων λεπτών. Είναι ισχυρό οξειδωτικό μέσο χωρίς υπολειμματική δράση, το οποίο προκαλεί καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος και βλάβες στα νουκλεϊκά οξέα των μικροβίων, αλλά χαρακτηρίζεται από υψηλή αστάθεια, ιδιαίτερα στο υδάτινο περιβάλλον.

Η απολύμανση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας, η αποτελεσματικότητα της οποίας εξαρτάται από τη διείδυση της ακτινοβολίας στο μέσο. Μικροοργανισμοί, που βρίσκονται σε εσωτερικές ή προστατευμένες θέσεις, ενδέχεται να διαφύγουν της δράσης της. Η υπεριώδης ακτινοβολία επιδρά στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών, προκαλώντας σχηματισμό διμερών θυμίνης (ή ουρακίλης στους RNA ιούς), γεγονός που παρεμποδίζει την αντιγραφή τους (Εικόνα 6). Η απολύμανση με UV είναι πιο αποτελεσματική στις κύστες των πρωτόζωων από τη χλωρίωση. Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης είναι απαραίτητη και πραγματοποιείται μέσω μοριακών, βιοχημικών και μικροβιολογικών μεθόδων, διασφαλίζοντας την επαρκή μείωση των παθογόνων και την προστασία της δημόσιας υγείας και των υδάτινων οικοσυστημάτων.



Εικόνα 6: Σχηματισμός διμερών θυμίνης (González et al., 2023)

1.4.5 Επεξεργασία στερεών υπολειμμάτων

Η επεξεργασία των στερεών, που προκύπτουν στα διάφορα στάδια της επεξεργασίας των υγρών αστικών αποβλήτων, αποτελεί βασικό στάδιο για την περιβαλλοντικά ορθή διάθεσή τους. Όπως έχει ήδη αναφερθεί κατά τα αρχικά στάδια της επεξεργασίας των αστικών υγρών αποβλήτων απομακρύνονται τα χονδρόκοκκα στερεά μέσω σχαρών,

καθώς και η άμμος και τα επιπλέοντα υλικά, προστατεύοντας τον εξοπλισμό και βελτιώνοντας την απόδοση των επόμενων διεργασιών. Άμμος και εσχαρίσματα αφυδατώνονται και διατίθενται σε χώρους ελεγχόμενης απόθεσης. Γενικά, η λάσπη (ιλύς) λυμάτων μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε πρωτογενή και δευτερογενή, που παράγονται ως παραπροϊόντα σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Η πρωτογενής αποτελείται κυρίως από καθιζάνουσα οργανική ύλη ακατέργαστων λυμάτων και η δευτερογενής αποτελείται κυρίως από μικροβιακές κροκίδες. Η οργανική ύλη στην πρωτογενή λάσπη είναι πιο εύκολα αποικοδομήσιμη από αυτή στη δευτερογενή (Azarmanesh et al., 2020). Τα προκύπτοντα στερεά και τα βιοστερεά από την πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια επεξεργασία αντίστοιχα, αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό του όγκου των στερεών αποβλήτων και συγκροτούν την ιλύ, η οποία χαρακτηρίζεται από ημιστερεή μορφή με περιεκτικότητα περίπου 12% σε στερεά κατά βάρος. Η επεξεργασία της ιλύος ξεκινά με πύκνωση, με στόχο τη μείωση του όγκου και τη διευκόλυνση της περαιτέρω διαχείρισης και ακολουθεί η σταθεροποίησή της, η οποία αποσκοπεί στη μείωση των παθογόνων μικροοργανισμών, την εξάλειψη των οσμών και την αποτροπή φαινομένων σήψης. Η σταθεροποίηση της ιλύος μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με αναερόβια, είτε με αερόβια διεργασία. Στην αναερόβια χώνευση, απουσία οξυγόνου, η οργανική ύλη αποικοδομείται με παραγωγή βιοαερίου, που αποτελείται περίπου από 70% μεθάνιο και 30% διοξείδιο του άνθρακα, προσφέροντας δυνατότητες ενεργειακής αξιοποίησης. Εκτός από το βιοαέριο, η αναερόβια χώνευση έχει ως αποτέλεσμα ένα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά χωνεμένο υπολείμμα, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα στη γεωργία. Το 2017, στη Σουηδία παρήχθησαν περισσότερο από 2,7 εκατομμύρια μετρικοί τόνοι χωνεμένου υπολείμματος, εκ των οποίων το 83% χρησιμοποιήθηκε ως λίπασμα (Nordell, et al., 2021). Αντίθετα, στην αερόβια σταθεροποίηση απαιτείται συνεχής παροχή οξυγόνου, οδηγώντας σε σταθεροποίηση της οργανικής ύλης με μικρότερη παραγωγή οσμών. Η κομποστοποίηση αποτελεί επίσης σημαντική μέθοδο, κατά την οποία η ιλύς μετατρέπεται σε σταθεροποιημένο εδαφοβελτιωτικό προϊόν κατάλληλο για γεωργική χρήση. Για την περαιτέρω υγειονομική ασφάλεια, εφαρμόζονται μέθοδοι απολύμανσης, όπως η παστερίωση σε θερμοκρασία 70°C για περίπου 30 λεπτά, με στόχο την εξουδετέρωση παθογόνων μικροοργανισμών.

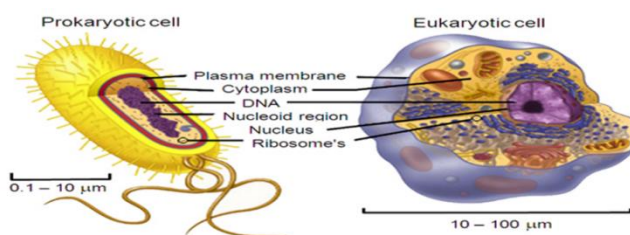
1.4.6 Προβλήματα στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών υγρών αποβλήτων

Στις εγκαταστάσεις ενεργού ιλύος παρατηρούνται συχνά λειτουργικά προβλήματα, που επηρεάζουν την απόδοση της διεργασίας και την ποιότητα της εκροής. Ένα από τα σημαντικότερα είναι η διόγκωση της ιλύος, η οποία οφείλεται στην ανάπτυξη νηματοειδών μικροοργανισμών (π.χ. μυκήτων και νηματοειδών βακτηρίων), οδηγώντας στον σχηματισμό συσσωματωμάτων με φτωχή καθιζησιμότητα και κατ' επέκταση σε ανεπαρκή διαχωρισμό στερεών - υγρών στη δεξαμενή δευτεροβάθμιας καθίζησης. Το φαινόμενο αυτό συνδέεται συνήθως με δυσμενείς λειτουργικές συνθήκες, όπως χαμηλή συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, ανισορροπία θρεπτικών ή υψηλό οργανικό φορτίο. Ένα επιπλέον συχνό πρόβλημα είναι ο αφρισμός στην επιφάνεια των δεξαμενών, που προκαλείται κυρίως από την ανάπτυξη βακτηρίων όπως τα *Nocardia* και *Microthrix* (Li, et al., 2020), τα οποία ευνοούνται από την παρουσία λιπών και ελαίων. Ο αφρισμός μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια βιομάζας, λειτουργικές δυσκολίες και υποβάθμιση της ποιότητας της εκροής.

Τέλος, τονίζεται ότι η θερμοκρασία υγρών αποβλήτων είναι μεγαλύτερη από αυτή του πόσιμου νερού λόγω προσθήκης ζεστού νερού από οικιακές και βιομηχανικές δραστηριότητες. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες για βιολογική δράση είναι από 25 έως 35 °C. Τονίζεται ότι η αερόβια χώνευση και η νιτροποίηση σταματούν, όταν η θερμοκρασία φτάσει τους 50 °C και σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 15 °C τα μεθανοπαραγωγά βακτήρια γίνονται ανενεργά.

1.5 Τα μικρόβια

Οι μικροοργανισμοί ή μικρόβια έχουν μέγεθος μικρότερο από 1/10 του χιλιοστού (mm) και συνεπώς δεν είναι ορατοί με γυμνό μάτι. Μπορούμε να τα παρατηρήσουμε μόνο με τη χρήση οπτικού ή ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Ως προς την κυτταρική τους οργάνωση (Εικόνα 7) διακρίνονται σε προκαρυωτικά (π.χ. βακτήρια), ευκαρυωτικά (μύκητες, πρωτόζωα) και ακυτταρικά (ιοί).



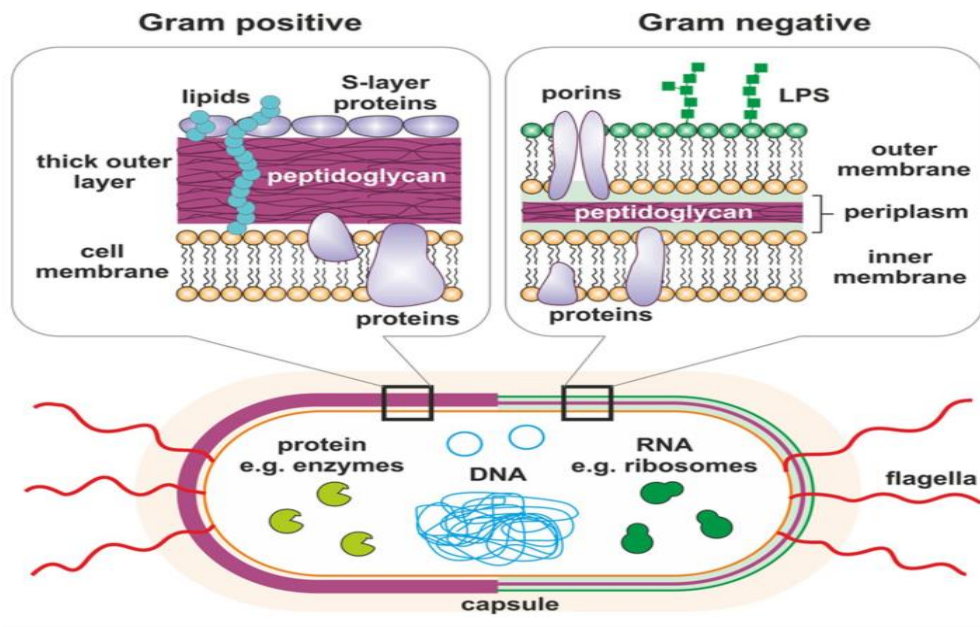
Εικόνα 7: Προκαρυωτικό και ευκαρυωτικό κύτταρο
(Πηγή: <https://nptel.ac.in/courses/104102016>)

1.5.1 Τα βακτήρια

Τα βακτήρια έχουν συνήθως μέγεθος μεταξύ 0,5 και 5 μm . Είναι μονοκύτταροι προκαρυωτικοί οργανισμοί, δηλαδή δεν διαθέτουν οργανωμένο πυρήνα ούτε μεμβρανώδη οργανίδια. Το γενετικό τους υλικό είναι ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA και βρίσκεται σε μια κυτταροπλασματική περιοχή, ονομαζόμενη πυρηνοειδές. Σε μερικά βακτήρια μπορεί να υπάρχουν ένα ή περισσότερα μικρότερα δίκλωνα κυκλικά μόρια DNA τα πλασμίδια. Αυτά εύκολα μετακινούνται από βακτηριακό κύτταρο σε βακτηριακό κύτταρο. Στα πλασμίδια συναντάμε γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Έχουν τη δυνατότητα γενετικής ανταλλαγής μέσω μηχανισμών όπως η σύζευξη, η μεταγωγή και η μετασχηματισμός, γεγονός που συμβάλλει στην εξέλιξη και στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά.

Στο βακτηριακό κύτταρο υπάρχει κυτταρική μεμβράνη και κυτταρικό τοίχωμα από πεπτιδογλυκάνη, το οποίο τους δίνει συγκεκριμένο σχήμα και αντοχή. Μπορούν να ταξινομηθούν είτε ως θετικά κατά Gram, είτε ως αρνητικά κατά Gram ανάλογα με την αρχιτεκτονική και το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος. Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την εφαρμογή της πρωτογενούς χρωστικής κρυσταλλικού ιώδους στο παρασκεύασμα, ακολουθούμενη από την προσθήκη διαλύματος ιωδίου (Lugol), το οποίο λειτουργεί ως σταθεροποιητικός παράγοντας της χρωστικής. Στη συνέχεια πραγματοποιείται αποχρωματισμός με αλκοόλη ή ακετόνη, κατά τον οποίο τα Gram-αρνητικά βακτήρια αποχρωματίζονται, ενώ τα Gram-θετικά διατηρούν τη χρωστική. Τέλος, εφαρμόζεται αντίχρωση με σαφρανίνη, με αποτέλεσμα τα Gram-θετικά βακτήρια να εμφανίζονται ιώδη και τα Gram-αρνητικά ροζ ή ερυθρά κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση.

Η εξωτερική λιπιδική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων περιέχει επίσης λιποπολυσακχαρίτες (LPS), οι οποίοι δρουν ως τοξίνες και προκαλούν ισχυρή ανοσολογική απόκριση στον άνθρωπο. Το παχύ τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης, που περιβάλλει τα θετικά κατά Gram βακτήρια, περιέχει επιπλέον συστατικά όπως λιπίδια, επιφανειακές πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια
(Ahmed et al., 2014)

Τα παθογόνα Gram- βακτήρια περιλαμβάνουν *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella*, *Haemophilis influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* και *Neisseria meningitides*. Παραδείγματα παθογόνων Gram+ βακτηρίων περιλαμβάνουν τον στρεπτόκοκκο, τον σταφυλόκοκκο και το κλωστρίδιο. Σε ορισμένα βακτήρια υπάρχει και κάψα, η οποία τα προστατεύει από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή τους. Μια ποικιλία επιφανειακών αντιγόνων, που παρουσιάζονται στα κυτταρικά περιβλήματα ολόκληρων βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, γλυκοπρωτεϊνών, λιποπολυσακχαριτών και πεπτιδογλυκάνης, μπορούν να λειτουργήσουν ως στόχοι για βιοαναγνώριση (Ahmed et al., 2014). Τα βακτήρια εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία μορφών. Τα βασικά σχήματα είναι οι κόκκοι (σφαιρικά), οι βάκιλοι (ραβδοειδή) και τα σπειρύλλια (ελικοειδή), ενώ μπορούν να σχηματίζουν αποικίες (μορφή αλυσίδας ή συσσωματώματα). Πολλά βακτήρια διαθέτουν μαστίγια για κίνηση. Ορισμένα έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ενδοσπόρια, δηλαδή ανθεκτικές δομές, επιτρέποντάς τους να επιβιώνουν σε ακραίες συνθήκες, όπως υψηλές θερμοκρασίες ή έλλειψη θρεπτικών ουσιών.

Ο μεταβολισμός των βακτηρίων είναι εξαιρετικά ποικίλος. Μπορεί να είναι αυτότροφα ή ετερότροφα, αερόβια ή αναερόβια και να χρησιμοποιούν διαφορετικές πηγές ενέργειας και άνθρακα. Αναπαράγονται κυρίως με διχοτόμηση, μια ταχεία διαδικασία, επιτρέποντας τον γρήγορο πολλαπλασιασμό τους. Το αρχικό βακτηριακό κύτταρο διχοτομείται, αφού πρώτα γίνει αντιγραφή του γενετικού υλικού του και έτσι προκύπτουν δύο θυγατρικά κύτταρα. Η διαδικασία αυτή, όπως προαναφέρθηκε, είναι σύντομη (μερικά βακτήρια διαιρούνται κάθε 15 λεπτά) και επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Τέλος, τα βακτήρια παίζουν καθοριστικό ρόλο στη φύση και στον άνθρωπο. Πολλά από αυτά είναι ωφέλιμα αφού συμμετέχουν σε βιογεωχημικούς κύκλους, όπως του αζώτου και του άνθρακα, βοηθούν στη διάσπαση της οργανικής ύλης και είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού (π.χ. η *Escherichia coli* ζει στο παχύ έντερο του ανθρώπου και παράγει τη βιταμίνη Κ). Ορισμένα όμως είναι παθογόνα και προκαλούν ασθένειες (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Παθογόνα βακτήρια, που βρίσκονται στα ανεπεξέργαστα αστικά απόβλητα. (Zhang et al., 2021, Singh et al., 2024)

Παθογόνο Βακτήριο	Πάθηση	Συμπτώματα
<i>Campylobacter jejuni</i>	Γαστρεντερίτιδα	Διάρροια
<i>Escherichia coli</i>	Γαστρεντερίτιδα	Διάρροια
<i>Legionella pneumophila</i>	Νόσος Λεγεωνάριων	Πυρετός, πονοκέφαλος, μυαλγία, αναπνευστικό
<i>Leptospira spp</i>	Λεπτοσπείρωση	Ίκτερος
<i>Salmonella</i> (2100 τύποι)	Σαλμονέλωση	Τροφική δηλητηρίαση
<i>Salmonella typhi</i>	Τυφοειδής πυρετός	Πυρετός, διάρροια
<i>Shigella</i>	Σιγκέλλωση	Δυσεντερία
<i>Vibrio cholera</i>	Χολέρα	Βαριά διάρροια, αφυδάτωση
<i>Yesivria enterocolitica</i>	Υεσινρίωση	Διάρροια

Ιδιαίτερη σημασία έχουν τα κοπρανώδη κολοβακτηριδοειδή, τα οποία αποτελούν δείκτες μικροβιακής ρύπανσης (Aghalari et al., 2020). Το ανθρώπινο έντερο φιλοξενεί μεγάλο αριθμό ραβδοειδών βακτηρίων, κυρίως Gram αρνητικών, που ανήκουν σε διάφορα γένη και είδη. Εκτιμάται ότι κάθε άνθρωπος αποβάλλει ημερησίως της τάξης των 10^{11} έως 4×10^{11} μικροοργανισμών, γεγονός που εξηγεί την υψηλή μικροβιακή φόρτιση των αστικών αποβλήτων.

Τα βακτήρια παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επεξεργασία υγρών αστικών αποβλήτων, καθώς είναι υπεύθυνα για τη βιολογική αποικοδόμηση των οργανικών ρύπων. Στα

συστήματα βιολογικού καθαρισμού (όπως η ενεργός ιλύς), τα βακτήρια χρησιμοποιούν την οργανική ύλη των λυμάτων ως πηγή ενέργειας και θρεπτικών συστατικών, μετατρέποντάς την σε απλούστερες και λιγότερο επιβλαβείς ενώσεις, όπως διοξείδιο του άνθρακα, νερό και βιομάζα. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται σημαντικά το οργανικό φορτίο των αποβλήτων.

Επιπλέον, ειδικές ομάδες βακτηρίων συμβάλλουν κατά την τριτοβάθμια επεξεργασία στην απομάκρυνση θρεπτικών στοιχείων, όπως το άζωτο και ο φώσφορος. Για παράδειγμα, τα νιτροποιητικά βακτήρια μετατρέπουν την αμμωνία σε νιτρικά (νιτροποίηση), ενώ τα απονιτροποιητικά βακτήρια μετατρέπουν τα νιτρικά σε άζωτο (απονιτροποίηση), το οποίο απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα (Kim et al., 2013). Αντίστοιχα, ορισμένα βακτήρια συμβάλλουν στη βιολογική απομάκρυνση του φωσφόρου μέσω της συσσώρευσής του στα κύτταρά τους.

Τέλος, τα βακτήρια βοηθούν και στη σταθεροποίηση της ιλύος, δηλαδή των στερεών υπολειμμάτων της επεξεργασίας. Μέσω αναερόβιων διεργασιών, διασπούν την οργανική ύλη της ιλύος και παράγουν βιοαέριο (κυρίως μεθάνιο), το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί ενεργειακά. Συνολικά, χωρίς τη δράση των βακτηρίων, η αποτελεσματική και οικονομική επεξεργασία των αστικών λυμάτων δεν θα ήταν δυνατή.

1.5.2 Οι μύκητες

Οι μικροβιακοί μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, δηλαδή τα κύτταρά τους διαθέτουν πυρήνα και μεμβρανώδη οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο κ.α. Το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται κυρίως από χιτίνη και γλυκάνες, κάτι που τους διαφοροποιεί από τα βακτήρια και τα φυτά. Διακρίνονται κυρίως σε ζύμες (μονοκύτταροι οργανισμοί) και νηματοειδείς μύκητες ή μούχλες (πολυκύτταροι), οι οποίοι σχηματίζουν υφές. Οι υφές συνενώνονται και δημιουργούν το μυκήλιο, δηλαδή το κύριο σώμα του μύκητα (Moneý, 2016). Ορισμένοι μύκητες είναι διμορφικοί, δηλαδή μπορούν να εμφανίζονται είτε ως ζύμες, είτε ως νηματοειδείς μορφές ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Οι μύκητες είναι ετερότροφοι, δηλαδή δεν φωτοσυνθέτουν, αλλά εκκρίνουν ένζυμα στο περιβάλλον τους για να διασπάσουν σύνθετες οργανικές ενώσεις (όπως κυτταρίνη, λιγνίνη και πρωτεΐνες) σε απλούστερα μόρια, τα οποία στη συνέχεια απορροφούν. Ο μεταβολισμός τους είναι κυρίως αερόβιος, αν και ορισμένες ζύμες μπορούν να

αναπτυχθούν και αναερόβια. Προτιμούν υγρά περιβάλλοντα, σχετικά όξινο pH και μπορούν να αναπτυχθούν σε υποστρώματα με χαμηλή διαθέσιμη υγρασία, κάτι που τους επιτρέπει να επιβιώνουν σε συνθήκες, όπου άλλα μικρόβια δεν αναπτύσσονται εύκολα.

Η αναπαραγωγή τους μπορεί να είναι αγενής ή εγγενής. Η αγενής αναπαραγωγή περιλαμβάνει εκβλάστηση (στις ζύμες), κατακερματισμό των υφών και παραγωγή αγενών σπορίων. Η εγγενής αναπαραγωγή περιλαμβάνει τη δημιουργία εξειδικευμένων σπορίων μετά από σύζευξη κυττάρων και γενετικό ανασυνδυασμό. Οι σπόροι αυτοί είναι ανθεκτικοί και διασπείρονται εύκολα μέσω αέρα, νερού ή επαφής. Τέλος, οι μικροβιακοί μύκητες έχουν μεγάλη σημασία, αφού συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της οργανικής ύλης και στους βιογεωχημικούς κύκλους, χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία (π.χ. παραγωγή ψωμιού, μπύρας και αντιβιοτικών). Όμως κάποιοι μύκητες είναι παθογόνοι, αφού προκαλούν μυκητιάσεις σε ζώα και φυτά.

Οι μικροβιακοί μύκητες έχουν σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία υγρών αστικών αποβλήτων, ιδιαίτερα ως συμπληρωματικοί οργανισμοί των βακτηρίων στα συστήματα βιολογικού καθαρισμού. Συμβάλλουν στην αποδόμηση οργανικών ρύπων, κυρίως σύνθετων και δύσκολα βιοδιασπώμενων ενώσεων, όπως λιγνίνη, φαινόλες και άλλες ανθεκτικές οργανικές ουσίες. Χάρη στην ικανότητά τους να εκκρίνουν ισχυρά εξωκυτταρικά ένζυμα, μπορούν να διασπών ενώσεις, που τα βακτήρια δεν αποικοδομούν εύκολα. Επιπλέον, οι μύκητες είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως χαμηλό pH, υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών ουσιών και περιορισμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών. Αυτό τους επιτρέπει να λειτουργούν αποτελεσματικά σε στάδια επεξεργασίας, όπου άλλοι μικροοργανισμοί δυσκολεύονται να επιβιώσουν. Σε ορισμένα συστήματα, όπως οι βιοαντιδραστήρες με μύκητες, αξιοποιούνται ειδικά για την απομάκρυνση χρωστικών, βαρέων μετάλλων και οργανικών ρύπων. Όμως κάποιοι μύκητες μπορεί να προκαλέσουν πρόβλημα στην καθίζηση της ιλύος, καθώς οι υφές τους εμποδίζουν τον σχηματισμό συσσωματωμάτων (flocs), δυσκολεύοντας τον διαχωρισμό στερεών και υγρών στις δεξαμενές δευτεροβάθμιας καθίζησης (Sharaf et al., 2019).

1.5.3 Τα πρωτόζωα

Τα πρωτόζωα είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, δηλαδή διαθέτουν οργανωμένο πυρήνα και μεμβρανώδη οργανίδια, όπως μιτοχόνδρια, ενδοπλασματικό δίκτυο κ.α. Το κύτταρό τους εκτελεί όλες τις βασικές λειτουργίες της ζωής (θρέψη, αναπνοή, απέκκριση και αναπαραγωγή). Δεν έχουν κυτταρικό τοίχωμα, γεγονός που τους

προσδίδει ευελιξία στο σχήμα, αν και ορισμένα διαθέτουν εξωτερικές δομές στήριξης ή προστασίας. Ζουν κυρίως σε υγρά περιβάλλοντα, όπως γλυκά και θαλάσσια νερά, υγρό έδαφος ή στο εσωτερικό άλλων οργανισμών.

Τα πρωτόζωα παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ως προς τη μορφή και την κίνηση. Διακρίνονται σε ομάδες ανάλογα με τον τρόπο μετακίνησής τους: αμοιβάδες (με ψευδοπόδια), μαστιγοφόρα (με μαστίγια), βλεφαριδοφόρα (με βλεφαρίδες). Η θρέψη τους είναι κυρίως ετερότροφη, δηλαδή προσλαμβάνουν τροφή με φαγοκυττάρωση ή πινοκυττάρωση και τη διασπούν ενδοκυτταρικά. Ορισμένα μπορούν να παρουσιάζουν και μεικτό τρόπο θρέψης (μειξοτροφία), συνδυάζοντας χαρακτηριστικά φυτών και ζώων.

Η αναπαραγωγή των πρωτόζωων γίνεται κυρίως αγενώς με διχοτόμηση, αλλά σε ορισμένα είδη παρατηρείται και εγγενής αναπαραγωγή ή ανταλλαγή γενετικού υλικού (π.χ. σύζευξη). Πολλά πρωτόζωα έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν κύστες (ανθεκτικές μορφές), επιτρέποντάς τους να επιβιώνουν σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως έλλειψη τροφής ή ξηρασία.

Τα πρωτόζωα έχουν σημαντικό ρόλο στα οικοσυστήματα και στις ανθρώπινες δραστηριότητες. Συμμετέχουν στις τροφικές αλυσίδες ως καταναλωτές βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών. Στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων βοηθούν στη βελτίωση της ποιότητας του νερού, καταναλώνοντας βακτήρια και οργανικά σωματίδια. Ωστόσο, ορισμένα είναι παθογόνα και προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο και τα ζώα, γεγονός που καθιστά σημαντική τη μελέτη τους στη μικροβιολογία και την ιατρική (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Παθογόνα πρωτόζωα, που βρίσκονται στα ανεπεξέργαστα αστικά απόβλητα. (Dalas & Altae, 2021, Singh et al., 2024)

Παθογόνο πρωτόζωο	Πάθηση	Συμπτώματα
<i>Balantidium parvum</i>	Βαλαντίαση	Διάρροια, δυσεντερία
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Κρυπτοσποριδίαση	Διάρροια
<i>Cyclospora cayentensis</i>	Κυκλοσπόρωση	Εμετός, βαριά διάρροια, σπασμοί στομάχου
<i>Entamoeba histolytica</i>	Αμοιβαδοειδή δυσεντερία	Διάρροια με αιμορραγία
<i>Gardia lamblia</i>	Γιαρδίαση	Ναυτία, διάρροια, δυσπεψία

1.5.4 Οι ιοί

Οι ιοί είναι εξαιρετικά μικροσκοπικοί, δεν έχουν κυτταρική οργάνωση και αποτελούνται βασικά από γενετικό υλικό (DNA ή RNA) και ένα πρωτεϊνικό περίβλημα, ονομαζόμενο καψίδιο. Σε ορισμένους ιούς (ζωικούς) υπάρχει και εξωτερικός φάκελος (έλυτρο) από λιπίδια και πρωτεΐνες, που τους βοηθά να εισέρχονται στα κύτταρα ξενιστές. Σε αντίθεση με τα βακτήρια, τους μύκητες και τα πρωτόζωα, οι ιοί δεν διαθέτουν κυτταρική δομή, ούτε δικό τους μεταβολισμό και δεν μπορούν να αναπαραχθούν αυτόνομα.

Ένα βασικό χαρακτηριστικό των ιών είναι ότι είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα. Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να πολλαπλασιαστούν μόνο μέσα σε ζωντανά κύτταρα, χρησιμοποιώντας τον μηχανισμό (ένζυμα και υλικά) του ξενιστή. Η διαδικασία μόλυνσης περιλαμβάνει την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο, την είσοδο του γενετικού του υλικού και την «εκμετάλλευση» των κυτταρικών μηχανισμών για τη σύνθεση νέων ιικών σωματιδίων. Στη συνέχεια, οι νέοι ιοί απελευθερώνονται, συχνά καταστρέφοντας το κύτταρο.

Οι ιοί παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ως προς το σχήμα (ελικοειδές, εικοσαεδρικό, σύνθετο) και το είδος του γενετικού υλικού τους (μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA ή RNA). Είναι εξαιρετικά ειδικοί ως προς τον ξενιστή και τον τύπο κυττάρου που προσβάλλουν. Επιπλέον, έχουν υψηλό ρυθμό μεταλλάξεων, ιδιαίτερα οι RNA ιοί, γεγονός που τους επιτρέπει να προσαρμόζονται γρήγορα σε νέες συνθήκες και να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα.

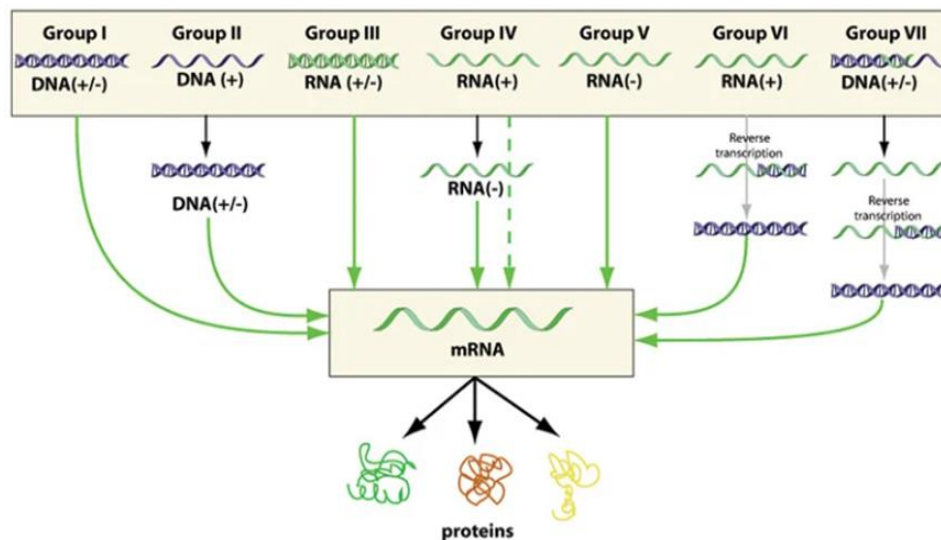
Τέλος, οι ιοί έχουν σημαντική επίδραση στον άνθρωπο και στα οικοσυστήματα. Προκαλούν ασθένειες μερικές από αυτές είναι πολύ σοβαρές (Πίνακας 3), αλλά ταυτόχρονα χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογία και την ιατρική (π.χ. στην γονιδιακή θεραπεία). Στο περιβάλλον συμβάλουν στη ρύθμιση των μικροβιακών πληθυσμών.

Πίνακας 3: Ιοί, που βρίσκονται στα ανεπεξέργαστα αστικά απόβλητα. (Osuolale & Okoh 2017, Singh et al., 2024)

Ιός	Πάθηση	Συμπτώματα
Αδενοιοί (31 τύποι)	Ασθένειες αναπνευστικού	Καταρροή, βήχας, πονόλαιμος, πυρετός
Εντεριοιοί >100 τύποι)	Γαστρεντερίτιδα	Διάρροια, έμετος, κοιλιακό άλγος, αφυδάτωση
Ηπατίτιδας Α	Ηπατίτιδα	Ίκτερος, πυρετός
Παρβοιοί	Γαστρεντερίτιδα	Διάρροια, έμετος, κοιλιακό άλγος,

		αφυδάτωση
Ιοί <i>Rota</i>	Γαστρεντερίτιδα	Διάρροια, έμετος, κοιλιακό άλγος, αφυδάτωση

Η μελέτη τους εντάσσεται στον επιστημονικό κλάδο της Ιολογίας και είναι ιδιαίτερα σημαντική για την κατανόηση της εξάπλωσης και της αντιμετώπισης λοιμωδών ασθενειών. Η ανάγκη συστηματικής κατηγοριοποίησης των ιών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφορετικών συστημάτων ταξινόμησης, με σημαντικότερο το σύστημα Baltimore.



Εικόνα 9: Το σύστημα ταξινόμησης Baltimore
(Πηγή: <https://microbenotes.com/classification-of-virus/>)

Το σύστημα ταξινόμησης Baltimore (Εικόνα 9) βασίζεται στον τρόπο με τον οποίο οι ιοί συνθέτουν το αγγελιαφόρο RNA (mRNA), το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση των πρωτεϊνών τους. Σύμφωνα με αυτό, οι ιοί κατατάσσονται σε επτά διακριτές ομάδες (Koonin et al., 2021), λαμβάνοντας υπόψη το είδος και τη δομή του γενετικού τους υλικού, καθώς και τον μηχανισμό αντιγραφής.

Η Ομάδα I περιλαμβάνει τους ιούς δίκλωνου DNA (dsDNA), οι οποίοι χρησιμοποιούν άμεσα το DNA τους για τη σύνθεση mRNA μέσω των μηχανισμών του κυττάρου ξενιστή. Οι ιοί αυτοί είναι συνήθως γενετικά σταθεροί. Η Ομάδα II αποτελείται από ιούς μονόκλωνου DNA (ssDNA), οι οποίοι απαιτούν τη σύνθεση συμπληρωματικού κλώνου DNA πριν τη μεταγραφή σε mRNA. Στην Ομάδα III εντάσσονται οι ιοί δίκλωνου RNA (dsRNA), οι οποίοι φέρουν ειδικά ένζυμα για τη σύνθεση mRNA, καθώς τα κύτταρα ξενιστές δεν μπορούν να μεταγράψουν απευθείας RNA διπλής έλικας. Η Ομάδα IV περιλαμβάνει τους ιούς μονόκλωνου RNA θετικής πολικότητας (+ssRNA), των οποίων το γονιδίωμα λειτουργεί απευθείας ως mRNA. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν ιοί που προκαλούν σημαντικές ασθένειες, όπως ο ιός που σχετίζεται με τη νόσο COVID-19. Η Ομάδα V περιλαμβάνει ιούς μονόκλωνου RNA αρνητικής πολικότητας (-ssRNA). Στην Ομάδα VI ανήκουν οι ρετροϊοί, οι οποίοι διαθέτουν μονόκλωνο RNA αλλά χρησιμοποιούν το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση για να συνθέσουν DNA, το οποίο ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή. Τέλος, η Ομάδα VII περιλαμβάνει ιούς με δίκλωνο DNA, που πολλαπλασιάζονται μέσω ενδιάμεσου RNA. Οι ιοί αυτοί χρησιμοποιούν επίσης μηχανισμούς αντίστροφης μεταγραφής, παρουσιάζοντας χαρακτηριστικά τόσο DNA όσο και RNA ιών. Η ύπαρξη αυτής της ομάδας καταδεικνύει την πολυπλοκότητα και την εξελικτική ποικιλογένεση των ιών. Συνολικά, το σύστημα Baltimore παρέχει ένα λειτουργικό και εξελικτικά σημαντικό πλαίσιο κατανόησης των ιών, συνδέοντας τη δομή του γενετικού υλικού με τη βιολογική τους συμπεριφορά. Η κατανόηση των επτά αυτών ομάδων είναι καθοριστική για την ανάπτυξη αντικών θεραπειών και εμβολίων, καθώς και για την πρόβλεψη της εξέλιξης νέων ιογενών ασθενειών.

1.6 Η σημασία της ανίχνευσης και ταυτοποίησης παθογόνων και μη μικροβίων σε επεξεργασμένα και μη υγρά αστικά απόβλητα

Η μελέτη των μικροοργανισμών στα αστικά υγρά απόβλητα έχει ιδιαίτερο επιδημιολογικό ενδιαφέρον (Πίνακας 4), καθώς τα λύματα αποτελούν έναν «καθρέφτη» της υγείας του πληθυσμού. Μέσα σε αυτά ανιχνεύονται παθογόνα μικρόβια, που αποβάλλονται από τον άνθρωπο μέσω κοπράνων ή ούρων, ακόμα και όταν τα άτομα είναι ασυμπτωματικά. Έτσι, η ανάλυση των λυμάτων επιτρέπει την έγκαιρη ανίχνευση παρουσίας ασθενειών σε μια κοινότητα, πριν αυτές διαγνωστούν μαζικά στο σύστημα υγείας. Επιπλέον, η επιδημιολογική παρακολούθηση μέσω λυμάτων δίνει τη δυνατότητα

εκτίμησης της εξάπλωσης λοιμώξεων σε πραγματικό χρόνο. Για παράδειγμα, η ανίχνευση ιών στα λύματα μπορεί να δείξει την αύξηση ή μείωση ενός νοσήματος στον πληθυσμό. Αυτό βοηθά τις αρχές να λάβουν έγκαιρα μέτρα πρόληψης και ελέγχου, όπως ενημερώσεις, εμβολιασμούς ή περιορισμούς. Επίσης, η μελέτη των μικροβίων στα λύματα συμβάλλει και στην παρακολούθηση της αντοχής στα αντιβιοτικά. Η παρουσία ανθεκτικών βακτηρίων ή γονιδίων αντοχής στα λύματα αποτελεί ένδειξη της διασποράς τους στην κοινότητα. Έτσι, οι επιστήμονες μπορούν να αξιολογήσουν την έκταση του προβλήματος και να σχεδιάσουν στρατηγικές για τον περιορισμό της μικροβιακής αντοχής, που αποτελεί σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία. Με αυτόν τον τρόπο, οι αρμόδιες αρχές μπορούν να σχεδιάσουν καλύτερες στρατηγικές διαχείρισης και να προστατεύσουν τόσο τη δημόσια υγεία, όσο και το περιβάλλον.

Πίνακας 4: Ενδεικτικές συγκεντρώσεις μικροβίων σε μη επεξεργασμένα απόβλητα ανά ml. (Gerba & Pepper, 2019)

Βακτήρια	
Ολικά κολοβακτηρίδια	10^5-10^6
Κολοβακτηρίδια κοπράνων	10^4-10^5
Εντερόκοκκοι	10^2-10^3
<i>Salmonella</i>	10^0-10^2
<i>Clostridium perfringens</i>	10^1-10^3
Πρωτόζωα	
<i>Cryptosporidium</i> (κύστεις)	$10^{-1}-10^1$
<i>Giardia lamblia</i> (κύστεις)	$10^{-1}-10^2$
Ιοί	
Εντεροϊοί	10^1-10^2

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο Πίνακας 5, αναδεικνύοντας πόσες μέρες μπορούν να επιβιώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μερικά από τα παθογόνα μικρόβια, που εντοπίζονται στα υγρά απόβλητα.

Πίνακας 5: Χρόνος ζωής (ημέρες) παθογόνων μικροβίων (20-30 βαθμοί Κελσίου) σε υγρά απόβλητα.

Βακτήρια	
<i>Salmonella</i>	<30
<i>Shigella</i>	<10
<i>Vibrio cholerae</i>	<10
Πρωτόζωα	
<i>Entamoeba histolytica</i>	<15
Ιοί	
Εντεροϊοί	<50

Παράλληλα, η κατανόηση των μη παθογόνων μικροοργανισμών είναι εξίσου σημαντική, καθώς αυτοί αποτελούν τη «βάση» των βιολογικών διεργασιών επεξεργασίας (δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια). Μικρόβια, όπως τα βακτήρια και ορισμένοι μύκητες και πρωτόζωα, συμβάλλουν στην αποικοδόμηση της οργανικής ύλης και στην απομάκρυνση ρύπων. Γνωρίζοντας ποια είδη υπάρχουν και σε τι συγκεντρώσεις, μπορούμε να βελτιστοποιήσουμε τη λειτουργία των μονάδων βιολογικού καθαρισμού, να αυξήσουμε την αποδοτικότητα και να μειώσουμε το κόστος λειτουργίας.

Επιπλέον, η γνώση της μικροβιακής σύστασης βοηθά στον έλεγχο της ποιότητας των επεξεργασμένων εκροών πριν αυτές απορριφθούν στο περιβάλλον ή επαναχρησιμοποιηθούν. Η παρουσία συγκεκριμένων μικροοργανισμών (π.χ. δείκτες κοπρανώδους ρύπανσης) χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της υγιεινής κατάστασης του νερού. Έτσι, διασφαλίζεται ότι δεν θα υπάρξει ρύπανση υδάτινων αποδεκτών, όπως ποτάμια και θάλασσες, ούτε κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία και τα οικοσυστήματα.

2 Μεθοδολογία

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, με τίτλο «Σύγχρονες μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών σε επεξεργασμένα και μη αστικά υγρά απόβλητα», βασίστηκε σε συστηματική βιβλιογραφική ανασκόπηση με στόχο τη συγκέντρωση, αξιολόγηση και σύνθεση σύγχρονων επιστημονικών δεδομένων στον τομέα της περιβαλλοντικής μικροβιολογίας. Η αναζήτηση της βιβλιογραφίας πραγματοποιήθηκε μέσω διεθνώς αναγνωρισμένων επιστημονικών βάσεων δεδομένων και μηχανών αναζήτησης, κυρίως μέσω των πλατφορμών Scopus και Google Scholar, οι οποίες παρέχουν πρόσβαση σε μεγάλο αριθμό επιστημονικών άρθρων, συνεδριακών εργασιών και ανασκοπήσεων.

Η στρατηγική αναζήτησης βασίστηκε στη χρήση κατάλληλων λέξεων-κλειδιών στην αγγλική γλώσσα, ώστε να διασφαλιστεί η κάλυψη της διεθνούς βιβλιογραφίας. Παράλληλα, εφαρμόστηκαν φίλτρα αναζήτησης ως προς το έτος δημοσίευσης, δίνοντας έμφαση κυρίως σε επιστημονικές εργασίες της τελευταίας δεκαετίας, προκειμένου να αποτυπωθούν οι πιο πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα των σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών.

Η επιλογή των βιβλιογραφικών πηγών βασίστηκε σε συγκεκριμένα κριτήρια, τα οποία περιλάμβαναν τη συνάφεια με το αντικείμενο της μελέτης, την επιστημονική εγκυρότητα και αξιοπιστία του περιοδικού δημοσίευσης, καθώς και τη σαφή περιγραφή των μεθοδολογικών προσεγγίσεων. Αντίθετα, αποκλείστηκαν πηγές που δεν σχετίζονταν άμεσα με το αντικείμενο της εργασίας ή δεν παρείχαν επαρκή επιστημονική τεκμηρίωση.

Η επεξεργασία και ανάλυση της βιβλιογραφίας πραγματοποιήθηκε με συγκριτική και συνθετική προσέγγιση, με στόχο την ανάδειξη των βασικών χαρακτηριστικών, των πλεονεκτημάτων και των περιορισμών κάθε μεθόδου. Οι πληροφορίες οργανώθηκαν θεματικά, ώστε να παρουσιαστούν διακριτά οι διαφορετικές κατηγορίες τεχνικών ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών, καθώς και η εφαρμογή τους τόσο σε μη επεξεργασμένα, όσο και σε επεξεργασμένα αστικά λύματα. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε διασταύρωση δεδομένων από διαφορετικές πηγές, προκειμένου να διασφαλιστεί η αξιοπιστία των συμπερασμάτων και να αποφευχθούν πιθανές μεροληψίες.

Για την οργάνωση και διαχείριση της βιβλιογραφίας χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλα εργαλεία διαχείρισης αναφορών, τα οποία συνέβαλαν στη συστηματική καταγραφή των

πηγών και στη σωστή ενσωμάτωσή τους στο κείμενο της εργασίας σύμφωνα με τα πρότυπα ακαδημαϊκής γραφής. Η συνολική μεθοδολογική προσέγγιση, που ακολουθήθηκε επιτρέπει την ολοκληρωμένη και τεκμηριωμένη παρουσίαση των σύγχρονων μεθόδων ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών, συμβάλλοντας στην κατανόηση του ρόλου τους στην παρακολούθηση της ποιότητας των αστικών υγρών αποβλήτων.

3 Μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών

Τα αστικά υγρά απόβλητα, όπως έχει προαναφερθεί, αποτελούν ένα σύνθετο μικροβιολογικό περιβάλλον, στο οποίο συνυπάρχουν πολυάριθμοι παθογόνοι και μη παθογόνοι μικροοργανισμοί. Η συνεχής εμφάνιση νέων μικροοργανισμών, η επανεμφάνιση παλαιότερων παθογόνων στελεχών και οι επιδημικές εξάρσεις, που ενδέχεται να προκύψουν, καθιστούν τη συστηματική παρακολούθηση και τον εντοπισμό τους πρωταρχικής σημασίας για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας. Παράλληλα, η αναγνώριση των μικροοργανισμών στα υγρά απόβλητα είναι απαραίτητη για την προστασία του προσωπικού των εγκαταστάσεων επεξεργασίας, αλλά και για την κατανόηση του λειτουργικού ρόλου πολλών μικροβίων στις βιολογικές διεργασίες επεξεργασίας. Υπάρχει μεγάλο πλήθος μικροβιολογικών, μοριακών και βιοχημικών μεθόδων, που η επιλογή της καταλληλότερης ή συνδυασμού αυτών, συμβάλει στην αξιόπιστη ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση μικροοργανισμών στα επεξεργασμένα και μη επεξεργασμένα υγρά απόβλητα.

3.1 Μικροβιολογικές μέθοδοι

Η μικροβιολογική διερεύνηση των αστικών υγρών αποβλήτων βασίζεται σε ένα σύνολο κλασικών και σύγχρονων τεχνικών, επιτρέποντας την ανίχνευση και την ταυτοποίηση μικροοργανισμών. Οι κυριότερες μικροβιολογικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τις καλλιεργητικές τεχνικές σε θρεπτικά υποστρώματα, την καταμέτρηση αποικιών ή πλακών (για ιούς), καθώς και τη μικροσκοπία για την παρατήρηση μορφολογικών και δομικών χαρακτηριστικών των μικροοργανισμών. Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για την ταχεία καταμέτρηση και χαρακτηρισμό μικροβιακών πληθυσμών σε υδατικά δείγματα, παρέχοντας ποσοτικά δεδομένα σε πραγματικό χρόνο. Οι μέθοδοι αυτές αποτελούν βασικά εργαλεία για την εκτίμηση της μικροβιακής σύστασης των αποβλήτων σε επεξεργασμένη και μη μορφή.

3.1.1 Μικροσκοπική παρατήρηση

Οι ρίζες της μικροβιολογίας συνδέονται σταθερά με το μικροσκόπιο. Η πρώτη καταγραφή ενός ανθρώπου, που είδε ένα βακτηριακό κύτταρο, είναι το 1663. Ο Antonie van Leeuwenhoek παρακολούθησε βακτήρια, τα οποία ανέκτησε από τα δόντια του, μέσω του αυτοσχέδιου μικροσκοπίου του. Ήταν οξυδερκής παρατηρητής και εξαιρετικός κατασκευαστής μικροσκοπίων και οι παρατηρήσεις του και οι λεπτομερείς απεικονίσεις της μικροβιακής ζωής ώθησαν πολλούς άλλους παρατηρητές (επιστήμονες και μη) να

ενδιαφερθούν για τον μικροσκοπικό κόσμο (Handelsman , 2004). Η μικροσκοπική ανάλυση αποτελεί μία από τις θεμελιώδεις τεχνικές της μικροβιολογίας, επιτρέποντας την άμεση παρατήρηση και μελέτη μικροοργανισμών, που δεν είναι ορατοί με γυμνό μάτι. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση, την ταξινόμηση και τη μελέτη μορφολογικών και δομικών χαρακτηριστικών βακτηρίων, μυκήτων και άλλων μικροβίων. Μέσω της χρήσης διαφόρων τύπων μικροσκοπίων και τεχνικών χρώσης, η μικροσκοπική ανάλυση παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τη σύσταση και τη λειτουργία των μικροβιακών κυττάρων (Rohde, 2011).

Η βασική αρχή της μικροσκοπικής παρατήρησης στηρίζεται στη μεγέθυνση και την ανάλυση της εικόνας ενός δείγματος μέσω οπτικών ή ηλεκτρονικών συστημάτων (Εικόνα 10). Το οπτικό μικροσκόπιο αποτελεί το πιο διαδεδομένο εργαλείο στη μικροβιολογία και λειτουργεί με τη χρήση ορατού φωτός και φακών, οι οποίοι επιτρέπουν τη μεγέθυνση του δείγματος έως και 1000 φορές ή περισσότερο με τη χρήση καταδυτικού φακού. Αντίθετα, τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια, όπως το μικροσκόπιο διέλευσης TEM (Winey et al., 2017) και το μικροσκόπιο σάρωσης SEM, χρησιμοποιούν δέσμες ηλεκτρονίων και παρέχουν πολύ υψηλότερη ανάλυση, επιτρέποντας τη μελέτη υπερμικροσκοπικών δομών.



Εικόνα 10: Οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
(Πηγή: <https://microbiologyinfo.com/differences-between-light-microscope-and-electron-microscope/>)

Η προετοιμασία του δείγματος αποτελεί κρίσιμο στάδιο για τη μικροσκοπική ανάλυση. Συνήθως περιλαμβάνει τη δημιουργία επιχρίσματος πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, τη σταθεροποίηση του δείγματος, ώστε να διατηρηθεί η μορφολογία των κυττάρων και σε πολλές περιπτώσεις, τη χρώση. Η σταθεροποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με θερμότητα ή με χημικές ουσίες και έχει ως στόχο την ακινητοποίηση και τη διατήρηση των κυττάρων. Η χρήση θαλάμου καταμέτρησης Petroff-Hausser επιτρέπει την καταμέτρηση κυττάρων, ωστόσο παρουσιάζει περιορισμούς ως προς τη διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών μικροοργανισμών. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος εφαρμόζονται χρωστικές, όπως η πορτοκαλί ακριδίνη, που διευκολύνουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων με βάση τη βιωσιμότητά τους.

Οι τεχνικές χρώσης αποτελούν βασικό εργαλείο για τη διάκριση και την ταυτοποίηση μικροοργανισμών. Η απλή χρώση χρησιμοποιεί μία μόνο χρωστική ουσία για την ανάδειξη του σχήματος και της διάταξης των κυττάρων. Αντίθετα, οι διαφορικές χρώσεις, όπως η χρώση κατά Gram, επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών ομάδων βακτηρίων με βάση τη δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος. Επιπλέον, ειδικές χρώσεις χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση συγκεκριμένων δομών, όπως τα ενδοσπόρια, οι κάψες και τα μαστίγια.

Η μικροσκοπική ανάλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί και χωρίς χρώση, μέσω τεχνικών όπως η μικροσκοπία φάσης αντίθεσης και η μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου, οι οποίες επιτρέπουν την παρατήρηση ζωντανών κυττάρων. Η μικροσκοπία φθορισμού αποτελεί επίσης μία σημαντική μέθοδο, κατά την οποία χρησιμοποιούνται φθορίζουσες ουσίες ή αντισώματα για την ειδική ανίχνευση μορίων-στόχων μέσα στα κύτταρα (Renz, 2013).

Η ερμηνεία των μικροσκοπικών ευρημάτων βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά όπως το σχήμα των κυττάρων (κοκκοειδές, ραβδοειδές, σπειροειδές), το μέγεθός τους, τη διάταξή τους (αλυσίδες, συσσωματώματα) και την παρουσία ειδικών δομών. Η μικροσκοπική ανάλυση μπορεί να παρέχει άμεσες ενδείξεις για την ταυτότητα ενός μικροοργανισμού, ωστόσο συχνά συνδυάζεται με άλλες μεθόδους, όπως καλλιέργεια ή μοριακές τεχνικές, για την επιβεβαίωση. Η ανίχνευση ιών παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες λόγω του μικρού τους μεγέθους (0,02–0,08 μm), γεγονός που καθιστά απαραίτητη τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου για την παρατήρησή τους.

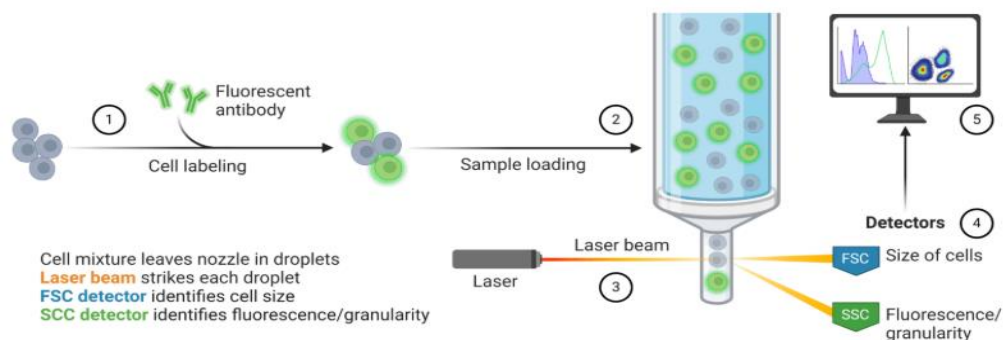
Η εφαρμογή της μικροσκοπίας στην ανάλυση επεξεργασμένων και μη αστικών υγρών αποβλήτων αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την εκτίμηση της μικροβιακής τους σύστασης και της αποδοτικότητας των διεργασιών επεξεργασίας. Στα ακατέργαστα λύματα, η μικροσκοπική παρατήρηση επιτρέπει την άμεση ανίχνευση και μορφολογική αναγνώριση μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, πρωτόζωα, μύκητες και ιοί, καθώς και την εκτίμηση του συνολικού μικροβιακού φορτίου. Αντίστοιχα, στα επεξεργασμένα απόβλητα, η μικροσκοπία χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ποιότητας της εκροής, μέσω της παρατήρησης της παρουσίας ή απουσίας παθογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, η τεχνική συμβάλλει στην παρακολούθηση της δομής και της «υγείας» των μικροβιακών συσσωματωμάτων (flocs), τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματική απομάκρυνση οργανικού φορτίου και αιωρούμενων στερεών. Στη σύγχρονη μικροβιολογική ανάλυση αστικών υγρών αποβλήτων, τόσο το οπτικό όσο και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαδραματίζουν σημαντικό αλλά διακριτό ρόλο στην ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών. Το οπτικό μικροσκόπιο χρησιμοποιείται ευρέως για την άμεση παρατήρηση ζωντανών ή χρωματισμένων δειγμάτων, επιτρέποντας την εκτίμηση της μορφολογίας, της κινητικότητας και της σχετικής αφθονίας μικροοργανισμών σε μη επεξεργασμένα ή επεξεργασμένα λύματα. Τεχνικές όπως η χρώση κατά Gram ή η μικροσκοπία φθορισμού συμβάλλουν στη διάκριση βασικών ομάδων βακτηρίων. Ωστόσο, η περιορισμένη διακριτική ικανότητα του οπτικού μικροσκοπίου καθιστά δύσκολη την ακριβή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους. Αντιθέτως, το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και ειδικότερα η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και διέλευσης (TEM), προσφέρει πολύ υψηλότερη ανάλυση, επιτρέποντας την παρατήρηση δομικών χαρακτηριστικών, όπως κυτταρικά τοιχώματα και λεπτομέρειες οργανιδίων. Επίσης με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι δυνατή και η παρατήρηση των ιών. Παρά τα πλεονεκτήματά του, η χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου περιορίζεται από την ανάγκη εκτεταμένης προετοιμασίας δειγμάτων, το υψηλό κόστος και την αδυναμία παρατήρησης ζωντανών οργανισμών. Συνεπώς, τα μικροσκοπικά εργαλεία χρησιμοποιούνται κυρίως συμπληρωματικά με σύγχρονες μοριακές τεχνικές (όπως PCR και αλληλούχηση DNA), παρέχοντας μορφολογική επιβεβαίωση και ποιοτική εκτίμηση της μικροβιακής κοινότητας στα αστικά λύματα.

3.1.2 Κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)

Η κυτταρομετρία ροής (FCM) αναπτύχθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1960 και εφαρμόστηκε αμέσως στον ιατρικό τομέα για την ανάλυση κυττάρων θηλαστικών. Οι μικροβιολόγοι άρχισαν να χρησιμοποιούν αυτό το εργαλείο μόλις στα τέλη της δεκαετίας του 1970 (Wang et al., 2010). Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μία προηγμένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική ανάλυσης κυττάρων, η οποία επιτρέπει τη γρήγορη και ποσοτική μελέτη φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών μεμονωμένων κυττάρων ή σωματιδίων σε αιώρημα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη διέλευση των κυττάρων μέσα από μία στενή ροή υγρού, κατά την οποία διεγείρονται από μία ή περισσότερες δέσμες λέιζερ, επιτρέποντας την καταγραφή πολλαπλών παραμέτρων ταυτόχρονα.

Η βασική αρχή της κυτταρομετρίας ροής στηρίζεται στην υδροδυναμική εστίαση (hydrodynamic focusing), μέσω της οποίας τα κύτταρα ευθυγραμμίζονται σε μία στενή ροή, ώστε να διέρχονται μεμονωμένα από το σημείο ανίχνευσης. Κατά τη διέλευση αυτή, κάθε κύτταρο αλληλοεπιδρά με τη δέσμη λέιζερ και προκαλεί σκέδαση του φωτός καθώς και εκπομπή φθορισμού, εφόσον έχει σημειωθεί με φθορίζουσες ουσίες. Τα παραγόμενα σήματα συλλέγονται από ανιχνευτές και μετατρέπονται σε ηλεκτρονικά δεδομένα, τα οποία αναλύονται με εξειδικευμένο λογισμικό.

Δύο βασικές παράμετροι, που μετρούνται είναι η πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter, FSC) και η πλευρική σκέδαση (Side Scatter, SSC). Η FSC σχετίζεται με το μέγεθος του κυττάρου, ενώ η SSC αντανακλά την εσωτερική πολυπλοκότητα ή κοκκώδη δομή του. Οι παράμετροι αυτές επιτρέπουν τον αρχικό διαχωρισμό των κυτταρικών πληθυσμών (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Κυτταρομετρία ροής

(Πηγή: <https://www.rapidnovor.com/antibody-flow-cytometry/>)

Πέρα από τη σκέδαση φωτός, η κυτταρομετρία ροής αξιοποιεί ευρέως τη χρήση φθορίζοντων δεικτών (fluorochromes), οι οποίοι συνδέονται με συγκεκριμένα μόρια στόχους, όπως επιφανειακές ή ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα ή άλλα κυτταρικά συστατικά. Τα φθορίζοντα αντισώματα επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αντιγόνων σε ένα μόνο κύτταρο (πολυπαραμετρική ανάλυση), παρέχοντας λεπτομερή πληροφορία.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής είναι η δυνατότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού κυττάρων σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, συχνά χιλιάδων κυττάρων ανά δευτερόλεπτο. Επιπλέον, η κυτταρομετρία ροής μπορεί να συνδυαστεί με συστήματα διαχωρισμού κυττάρων (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS), επιτρέποντας την απομόνωση συγκεκριμένων κυτταρικών υποπληθυσμών με υψηλή καθαρότητα για περαιτέρω μελέτη.

Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιείται μέσω γραφημάτων διασποράς και ιστογραμμάτων, όπου απεικονίζονται οι μετρούμενες παράμετροι. Ο ερευνητής μπορεί να επιλέξει συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς και να μελετήσει τα χαρακτηριστικά τους με ακρίβεια.

Η εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής στην ανάλυση επεξεργασμένων και μη αστικών υγρών αποβλήτων αποτελεί μία σύγχρονη και ιδιαίτερα αποδοτική προσέγγιση για τη μελέτη της μικροβιακής κοινότητας και την αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων (Deera et al., 2025). Στα ακατέργαστα λύματα, η τεχνική επιτρέπει την ταχεία ποσοτικοποίηση του συνολικού μικροβιακού φορτίου, καθώς και τη διάκριση μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων μέσω χρήσης ειδικών φθορίζοντων δεικτών. Παράλληλα, παρέχει πληροφορίες για τη δομή και την ετερογένεια των μικροβιακών πληθυσμών, συμβάλλοντας στην κατανόηση της μικροβιακής δυναμικής σε περιβαλλοντικά δείγματα υψηλής πολυπλοκότητας. Στα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα, η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των διεργασιών επεξεργασίας, μέσω της αξιολόγησης της μείωσης του μικροβιακού φορτίου και της ανίχνευσης υπολειμματικών μικροοργανισμών.

Παρά τα σημαντικά της πλεονεκτήματα, η κυτταρομετρία ροής παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς. Απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και έμπειρο προσωπικό, ενώ η προετοιμασία των δειγμάτων και η επιλογή των κατάλληλων φθορίζοντων δεικτών

μπορεί να είναι πολύπλοκη διαδικασία. Επιπλέον, η επικάλυψη των φασμάτων εκπομπής των φθοροχρωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα, καθιστώντας απαραίτητη τη χρήση κατάλληλων διορθώσεων.

Συμπερασματικά, η κυτταρομετρία ροής αποτελεί ένα ισχυρό και ευέλικτο εργαλείο για την ανάλυση κυττάρων σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο. Η δυνατότητα ταυτόχρονης μέτρησης πολλαπλών παραμέτρων σε μεγάλο αριθμό κυττάρων, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα διαχωρισμού τους, την καθιστά απαραίτητη τόσο στην ερευνητική όσο και στην κλινική πρακτική. Με τη συνεχή εξέλιξη της τεχνολογίας και των φθορίζοντων δεικτών, οι δυνατότητες της τεχνικής αναμένεται να διευρυνθούν περαιτέρω στο μέλλον (Wang et al., 2010).

3.1.3 Μέθοδος μεμβρανών διήθησης

Η μέθοδος των μεμβρανών (φίλτρων) διήθησης αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές στη μικροβιολογία για την ανίχνευση και των ποσοτικό προσδιορισμό μικροοργανισμών σε υγρά δείγματα. Χρησιμοποιείται ευρέως στον έλεγχο ποιότητας νερού, τροφίμων, φαρμακευτικών προϊόντων και άλλων βιολογικών υλικών. Η βασική αρχή της μεθόδου βασίζεται στη διήθηση ενός συγκεκριμένου όγκου υγρού μέσω μιας ειδικής μεμβράνης (φίλτρου), η οποία συγκρατεί τους μικροοργανισμούς στην επιφάνειά της, επιτρέποντας την περαιτέρω καλλιέργεια και ανίχνευσή τους.

Οι μεμβράνες διήθησης, που χρησιμοποιούνται συνήθως, είναι κατασκευασμένες από υλικά όπως νιτροκυτταρίνη, οξική κυτταρίνη ή άλλα συνθετικά πολυμερή. Τα φίλτρα αυτά διαθέτουν προκαθορισμένο μέγεθος πόρων, συνήθως 0,45 μm ή 0,22 μm , το οποίο επιτρέπει τη συγκράτηση των περισσότερων βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών. Το κατάλληλο μέγεθος πόρων επιλέγεται ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών, που επιδιώκεται να ανιχνευθούν.

Η διαδικασία της μεθόδου ξεκινά με τη συλλογή και την προετοιμασία του δείγματος. Το δείγμα, διηθείται μέσω της μεμβράνης φίλτρου χρησιμοποιώντας ειδική συσκευή διήθησης υπό κενό. Κατά τη διάρκεια της διήθησης, τα μικρόβια παγιδεύονται στην επιφάνεια της μεμβράνης, ενώ το υγρό διαπερνά το φίλτρο και απομακρύνεται (Mulvaney, 1969).

Μετά την ολοκλήρωση της διήθησης, η μεμβράνη φίλτρου μεταφέρεται με αποστειρωμένες λαβίδες πάνω σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (άγαρ), το οποίο

επιτρέπει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που έχουν συγκρατηθεί. Η επιλογή του θρεπτικού υλικού εξαρτάται από το είδος των μικροοργανισμών που επιδιώκεται να ανιχνευθούν. Για παράδειγμα, διαφορετικά θρεπτικά μέσα χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση κολοβακτηριοειδών, εντερόκοκκων ή άλλων μικροβιακών ομάδων (Messer & Dufour, 1998).

Ακολουθεί η επώαση των τρυβλίων σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου, ώστε να επιτραπεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ορατές αποικίες. Συνήθως, οι αποικίες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια της μεμβράνης καταμετρώνται μετά από 24 έως 48 ώρες επώασης, ανάλογα με τον μικροοργανισμό και το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο. Η μέτρηση των αποικιών επιτρέπει τον υπολογισμό του αριθμού των μικροοργανισμών στο αρχικό δείγμα, ο οποίος εκφράζεται συνήθως ως μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά όγκο δείγματος (CFU / mL ή CFU / 100 mL).

Ένα από τα σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου των μεμβρανών διήθησης είναι η δυνατότητα ανάλυσης μεγάλων όγκων δείγματος, γεγονός που αυξάνει σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου, ιδιαίτερα όταν οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, η τεχνική επιτρέπει την άμεση καταμέτρηση των αποικιών και τη χρήση εκλεκτικών ή διαφοροποιητικών θρεπτικών μέσων για την ταυτοποίηση συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων.

Παρά τα πλεονεκτήματα, η μέθοδος παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς. Σε δείγματα με υψηλό φορτίο αιωρούμενων σωματιδίων, υπάρχει πιθανότητα απόφραξης των πόρων της μεμβράνης, γεγονός που δυσχεραίνει τη διαδικασία διήθησης. Επιπλέον, ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορεί να καταστραφούν κατά τη διαδικασία ή να μην αναπτύσσονται επαρκώς στα χρησιμοποιούμενα θρεπτικά μέσα, οδηγώντας σε υποεκτίμηση του μικροβιακού φορτίου, δηλαδή περιορίζεται στην ανίχνευση καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών και ενδέχεται να υποεκτιμά την πραγματική μικροβιακή ποικιλότητα, καθώς δεν ανιχνεύει ζωντανούς αλλά μη καλλιεργήσιμους μικροοργανισμούς. Τέλος, η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη για την ανίχνευση ιών ή πολύ μικρών μικροοργανισμών χωρίς ειδική προεπεξεργασία. Για τον λόγο αυτό, συχνά συνδυάζεται με μοριακές τεχνικές, ενισχύοντας την αξιοπιστία και την πληρότητα της μικροβιολογικής ανάλυσης.

Συνοψίζοντας, η μέθοδος διήθησης μεμβρανών αποτελεί μία αξιόπιστη και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στη μικροβιολογική ανάλυση υγρών δειγμάτων. Η απλότητα, η ευαισθησία και η δυνατότητα ποσοτικής εκτίμησης των μικροοργανισμών την καθιστούν ιδιαίτερα σημαντική σε εφαρμογές ελέγχου ποιότητας και δημόσιας υγείας. Με την κατάλληλη επιλογή φίλτρων, θρεπτικών μέσων και συνθηκών επώασης, η μέθοδος μπορεί να προσαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα μικροβιολογικών αναλύσεων.

3.1.4 Μικροβιακές καλλιέργειες

Η μέθοδος των μικροβιακών καλλιεργειών αποτελεί μία από τις πλέον καθιερωμένες και αξιόπιστες τεχνικές για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε υγρά απόβλητα, τόσο επεξεργασμένα όσο και μη. Η βασική αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ικανότητα των μικροοργανισμών να αναπτύσσονται σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα υπό ελεγχόμενες συνθήκες, επιτρέποντας έτσι την ποσοτική και ποιοτική τους ανάλυση (Lagier, et al., 2015). Στα υγρά απόβλητα, όπου το μικροβιακό φορτίο μπορεί να είναι ιδιαίτερα υψηλό και ποικίλο, η χρήση καλλιεργητικών τεχνικών δίνει τη δυνατότητα απομόνωσης συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών, όπως κολοβακτηριοειδή, εντερόκοκκοι και παθογόνα βακτήρια, τα οποία αποτελούν δείκτες υγειονομικής επικινδυνότητας και περιβαλλοντικής επιβάρυνσης.

Η διαδικασία ξεκινά με τη δειγματοληψία, η οποία πρέπει να πραγματοποιείται με αυστηρά αποστειρωμένες συνθήκες, ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση. Τα δείγματα συλλέγονται από διάφορα στάδια της επεξεργασίας των λυμάτων (π.χ. πρωτοβάθμια, δευτεροβάθμια, τριτοβάθμια επεξεργασία), καθώς και από μη επεξεργασμένα αστικά απόβλητα. Ακολουθεί η κατάλληλη προετοιμασία των δειγμάτων, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει αραιώσεις, ώστε να επιτευχθεί μετρήσιμος αριθμός αποικιών. Οι αραιώσεις αυτές είναι κρίσιμες για την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, καθώς επιτρέπουν τον υπολογισμό του αριθμού των μικροοργανισμών ανά μονάδα όγκου (CFU / mL).

Στη συνέχεια, τα δείγματα εμβολιάζονται σε επιλεγμένα θρεπτικά υλικά, τα οποία μπορεί να είναι γενικής χρήσης ή εκλεκτικά. Τα εκλεκτικά μέσα επιτρέπουν την ανάπτυξη συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών, καταστέλλοντας την ανάπτυξη άλλων, ενώ είναι δυνατή και η διάκριση μεταξύ ειδών βάσει μορφολογικών ή βιοχημικών χαρακτηριστικών, όπως η παραγωγή ενζύμων ή η ζύμωση σακχάρων. Για παράδειγμα, η χρήση άγαρ MacConkey επιτρέπει τη διαφοροποίηση των λακτόζη-θετικών από τα λακτόζη-αρνητικά βακτήρια, ενώ άλλα μέσα, όπως το m-Endo agar, χρησιμοποιούνται

ειδικά για την ανίχνευση κολοβακτηριοειδών σε υδάτινα δείγματα (Grabow & Preez, 1979).

Μετά τον εμβολιασμό, τα τρυβλία επωάζονται σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες και χρονικά διαστήματα, ανάλογα με τον τύπο των αναζητούμενων μικροοργανισμών. Συνήθως, η επώαση πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες μεταξύ 35–37°C για τα περισσότερα μεσόφιλα βακτήρια, ενώ για ειδικές κατηγορίες μπορεί να απαιτούνται διαφορετικές συνθήκες. Κατά τη διάρκεια της επώασης, οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σχηματίζοντας ορατές αποικίες, οι οποίες μπορούν να καταμετρηθούν και να μελετηθούν μορφολογικά (μέγεθος, χρώμα, σχήμα, υφή).

Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών βασίζεται σε συνδυασμό μορφολογικών, βιοχημικών και σε ορισμένες περιπτώσεις, μοριακών χαρακτηριστικών. Αρχικά, πραγματοποιείται μικροσκοπική παρατήρηση μετά από χρώση (π.χ. κατά Gram), η οποία παρέχει βασικές πληροφορίες για τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος και το σχήμα των βακτηρίων. Στη συνέχεια, εφαρμόζονται βιοχημικές δοκιμές, όπως η δοκιμή καταλάσης, οξειδάσης, καθώς και η ικανότητα ζύμωσης συγκεκριμένων υποστρωμάτων. Οι δοκιμές αυτές επιτρέπουν την περαιτέρω διάκριση και ταξινόμηση των μικροοργανισμών σε γένη και είδη.

Μία εναλλακτική προσέγγιση αποτελεί η μέθοδος των πολλαπλών σωλήνων ζύμωσης, η οποία βασίζεται σε διαδοχικές αραιώσεις και στην παρατήρηση παραγωγής αερίου ως ένδειξη μικροβιακής δραστηριότητας. Η μέθοδος αυτή οδηγεί στον υπολογισμό του πιθανού αριθμού μικροοργανισμών (Most Probable Number, MPN), ο οποίος αποτελεί στατιστική εκτίμηση της συγκέντρωσης των μικροβίων, βασισμένη στην κατανομή Poisson, και όχι στην ακριβή καταμέτρηση (Some, et al., 2021).

Στην περίπτωση των υγρών αποβλήτων, ιδιαίτερη σημασία δίνεται στην ανίχνευση δεικτών κοπρανώδους ρύπανσης, όπως τα ολικά και τα θερμοανθεκτικά κολοβακτηριοειδή και οι εντερόκοκκοι. Επιπλέον, η σύγκριση των μικροβιακών φορτίων πριν και μετά την επεξεργασία επιτρέπει την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των μονάδων επεξεργασίας λυμάτων.

Παρά τα πλεονεκτήματα της μεθόδου των καλλιιεργειών, όπως η απλότητα, το χαμηλό κόστος και η δυνατότητα απομόνωσης ζωντανών μικροοργανισμών, υπάρχουν και περιορισμοί. Ένας σημαντικός περιορισμός είναι ότι δεν μπορούν να ανιχνευθούν

μικροοργανισμοί, οι οποίοι βρίσκονται σε βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση (Handelsman , 2004), γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση του πραγματικού μικροβιακού φορτίου. Επιπλέον, η διαδικασία είναι σχετικά χρονοβόρα, καθώς απαιτεί χρόνο επώασης, ενώ η ακρίβεια των αποτελεσμάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την επιλογή των κατάλληλων μέσων και συνθηκών καλλιέργειας.

Οι ιοί, σε αντίθεση με τα βακτήρια, δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε απλά θρεπτικά υποστρώματα, καθώς αποτελούν υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα και απαιτούν ζωντανά κύτταρα για τον πολλαπλασιασμό τους. Για τον λόγο αυτό, η «καλλιέργεια» ιών βασίζεται στη χρήση κυτταροκαλλιιεργειών, δηλαδή καλλιιεργειών ευκαρυωτικών κυττάρων (ζωικών ή ανθρώπινων), τα οποία λειτουργούν ως ξενιστές. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ιών σε υγρά απόβλητα, όπου μπορεί να υπάρχουν εντεροϊοί, αδενοϊοί ή άλλοι παθογόνοι ιοί, σχετιζόμενοι με τη δημόσια υγεία.

Αρχικά, τα δείγματα υγρών αποβλήτων υφίστανται προεπεξεργασία, η οποία περιλαμβάνει απομάκρυνση στερεών σωματιδίων μέσω φυγοκέντρωσης ή διήθησης, καθώς και συμπύκνωση των ιών, επειδή συνήθως βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Μέθοδοι όπως η υπερδιήθηση ή η καθίζηση με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) χρησιμοποιούνται για τη συγκέντρωση των ιικών σωματιδίων. Στη συνέχεια, το συμπυκνωμένο δείγμα μπορεί να υποστεί κατεργασία με αντιβιοτικά, ώστε να περιοριστεί η βακτηριακή επιμόλυνση πριν από την επώαση με τα κύτταρα ξενιστές.

Η καλλιέργεια πραγματοποιείται με εμβολιασμό του δείγματος σε μονοστρωματικές καλλιέργειες κυττάρων, όπως κύτταρα Vero, HeLa ή άλλες δεκτικές κυτταρικές σειρές. Τα κύτταρα αυτά καλλιεργούνται σε ειδικά θρεπτικά υλικά (π.χ. MEM ή DMEM) εμπλουτισμένα με ορό και αυξητικούς παράγοντες. Μετά τον εμβολιασμό, τα κύτταρα επωάζονται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας (συνήθως 35 με 37°C) και ατμόσφαιρας (με παρουσία CO₂), ώστε να διατηρείται το κατάλληλο pH και να υποστηρίζεται η κυτταρική ανάπτυξη.

Η παρουσία και ο πολλαπλασιασμός των ιών ανιχνεύονται κυρίως μέσω της εμφάνισης κυτταροπαθολογικού αποτελέσματος (Cytopathic Effect, CPE). Το CPE περιλαμβάνει μορφολογικές αλλοιώσεις των κυττάρων, όπως στρογγυλοποίηση, αποκόλληση από το υπόστρωμα, συγχώνευση κυττάρων (σχηματισμός συγκυτίων) ή λύση των κυττάρων. Η

παρατήρηση αυτών των αλλαγών γίνεται μικροσκοπικά και αποτελεί ένδειξη ότι ο ιός έχει μολύνει και πολλαπλασιάζεται στα κύτταρα. Για την καλλιέργειά των ιών απαιτείται αρχικά φιλτράρισμα του δείγματος και στη συνέχεια ανάπτυξη σε κυτταροκαλλιέργειες, με την ποσοτικοποίηση να πραγματοποιείται μέσω καταμέτρησης σχηματιζόμενων πλακών (Plaque Forming Units, PFU). Σημαντική κατηγορία αποτελούν και οι βακτηριοφάγοι, δηλαδή ιοί που μολύνουν βακτήρια, όπως οι κολιφάγοι οι οποίοι χρησιμοποιούν ως ξενιστή το βακτήριο *Escherichia coli* (Truchado, et al., 2021). Η παρουσία τους στα απόβλητα χρησιμοποιείται ως δείκτης ιικής ρύπανσης και ανιχνεύεται μέσω σχηματισμού πλακών σε καλλιέργειες του αντίστοιχου βακτηριακού ξενιστή.

Για την ταυτοποίηση των ιών, η καλλιέργεια συχνά συνδυάζεται με άλλες τεχνικές. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν ανοσολογικές μέθοδοι, όπως η μέθοδος του ανοσοφθορισμού, όπου ειδικά αντισώματα συνδέονται με ιικά αντιγόνα μέσα στα κύτταρα, επιτρέποντας την ανίχνευσή τους. Επιπλέον, μοριακές τεχνικές όπως η PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) εφαρμόζονται για την επιβεβαίωση και τον ακριβή προσδιορισμό του ιού σε επίπεδο είδους ή στελέχους.

Ωστόσο, η καλλιέργεια ιών παρουσιάζει σημαντικές δυσκολίες και περιορισμούς. Δεν μπορούν όλοι οι ιοί να καλλιεργηθούν εύκολα σε εργαστηριακές συνθήκες, ενώ η διαδικασία απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό, αυστηρές συνθήκες ασηψίας και υψηλό επίπεδο τεχνικής κατάρτισης. Επιπλέον, είναι πιο χρονοβόρα σε σύγκριση με τις μοριακές μεθόδους και ενδέχεται να μην ανιχνεύει ιούς, που είναι παρόντες αλλά δεν είναι μολυσματικοί.

Συνολικά, η καλλιέργεια ιών σε κυτταροκαλλιέργειες αποτελεί μία κρίσιμη αλλά απαιτητική μέθοδο για τη μελέτη της ιικής παρουσίας σε υγρά απόβλητα. Παρότι έχει περιορισμούς, παραμένει σημαντική, καθώς επιτρέπει την ανίχνευση μολυσματικών ιικών σωματιδίων και τη μελέτη της βιολογικής τους συμπεριφοράς, κάτι που δεν μπορεί να επιτευχθεί αποκλειστικά με μοριακές τεχνικές.

3.2 Μοριακές μέθοδοι

Τα τελευταία 40 χρόνια, οι μοριακές βιολογικές μέθοδοι έχουν συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση των οικοσυστημάτων και των λειτουργιών τους. Στον τομέα της αξιολόγησης της μικροβιακής ποιότητας του νερού, οι μέθοδοι ανίχνευσης, που στοχεύουν τα νουκλεϊκά οξέα, έχουν διευρύνει σημαντικά την κατανόησή μας για τη δομή

και την ποικιλότητα των μικροβιακών κοινοτήτων, επιτρέποντας τη μελέτη μικροοργανισμών που δεν είναι καλλιεργήσιμοι με τις συμβατικές μικροβιολογικές τεχνικές (Vierheilig, et al., 2015).

3.2.1 Μέθοδος FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization)

Η μέθοδος FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) αποτελεί μια μοριακή τεχνική που βασίζεται στον επιτόπου υβριδισμό ειδικών φθορίζοντων ανιχνευτών (probes) με συμπληρωματικές αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων. Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή η ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων μικροοργανισμών απευθείας στο δείγμα, χωρίς να απαιτείται καλλιέργεια. Η παρατήρηση μπορεί να γίνει με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού (Kuo, et al., 2021).

Η μέθοδος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάλυση πολύπλοκων μικροβιακών κοινοτήτων, όπως αυτές που απαντώνται σε ενεργό ιλύ και σε διάφορα στάδια επεξεργασίας λυμάτων, καθώς επιτρέπει τον χωρικό εντοπισμό και τη σχετική αφθονία συγκεκριμένων λειτουργικών ομάδων μικροοργανισμών (π.χ. νιτροποιητικά ή απονιτροποιητικά βακτήρια). Παρά τα σημαντικά της πλεονεκτήματα, η FISH απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό, προσεκτικό σχεδιασμό ανιχνευτών, ενώ η απόδοσή της μπορεί να επηρεαστεί από τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων. Συνεπώς, η εφαρμογή της συχνά συνδυάζεται με άλλες μοριακές και μικροσκοπικές τεχνικές, συμβάλλοντας σε μια ολοκληρωμένη και αξιόπιστη αξιολόγηση της μικροβιακής σύστασης των αστικών υγρών αποβλήτων (Sanz & Köchling, 2007).

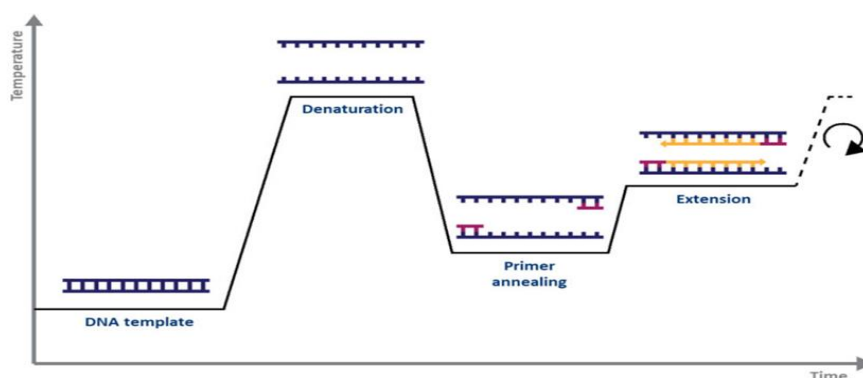
3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η κλασική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μία θεμελιώδη εργαστηριακή τεχνική της μοριακής βιολογίας που επιτρέπει την επιλεκτική και εκθετική ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA *in vitro*. Η μέθοδος εισήχθη το 1983 από τον Kary Mullis και έκτοτε έχει μετασχηματίσει ριζικά πεδία όπως η γενετική, η ιατρική διάγνωση, η εξελικτική βιολογία και η εγκληματολογία. Η βασική της αρχή βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή μιας καθορισμένης περιοχής DNA, αξιοποιώντας τη συμπληρωματικότητα των βάσεων και τη δράση μιας θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης.

Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε ελεγχόμενο θερμικό περιβάλλον μέσω μιας συσκευής γνωστής ως θερμοκυκλοποιητής, ο οποίος επιτρέπει ταχεία και ακριβή

εναλλαγή θερμοκρασιών. Το μίγμα της αντίδρασης περιλαμβάνει: (α) το αρχικό DNA, το οποίο περιέχει την αλληλουχία στόχο, (β) δύο ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (forward και reverse primers), οι οποίοι ορίζουν τα όρια της περιοχής προς ενίσχυση, (γ) τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), που αποτελούν τα δομικά συστατικά της νέας αλυσίδας DNA, (δ) ρυθμιστικό διάλυμα, που διασφαλίζει το κατάλληλο pH και περιέχει ιόντα Mg^{2+} απαραίτητα για τη δράση του ενζύμου, και (ε) μία θερμοσταθερή DNA πολυμεράση, όπως η Taq πολυμεράση, η οποία απομονώθηκε από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki, et al., 1988). Η επιλογή θερμοσταθερού ενζύμου είναι κρίσιμη, καθώς η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενη θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες, που θα οδηγούσαν σε αποδιάταξη κοινών πρωτεϊνών.

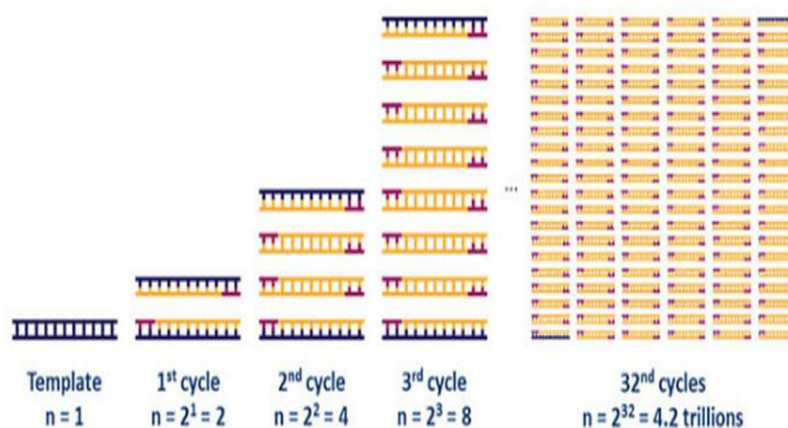
Η PCR βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους θερμικών μεταβολών, κάθε ένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια (Εικόνα 12). Στο πρώτο στάδιο, την αποδιάταξη, το δίκλωνο DNA θερμαίνεται συνήθως στους 94–95°C, προκαλώντας τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων και τον διαχωρισμό των δύο αλυσίδων. Στο δεύτερο στάδιο, την υβριδοποίηση, η θερμοκρασία μειώνεται σε ένα εύρος 50 με 65°C, επιτρέποντας στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν ειδικά στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο αρχικό DNA. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται από τη σύσταση των εκκινητών (μήκος, περιεκτικότητα σε GC) και αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την ειδικότητα της αντίδρασης. Στο τρίτο στάδιο, την επιμήκυνση, η θερμοκρασία αυξάνεται συνήθως στους 72°C, που είναι η βέλτιστη για τη δράση της Taq πολυμεράσης. Το ένζυμο προσθέτει διαδοχικά νουκλεοτίδια στο 3' άκρο των εκκινητών, συνθέτοντας νέες συμπληρωματικές αλυσίδες DNA.



Εικόνα 12: Στάδια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

(Πηγή: <https://www.lubio.ch/blog/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr>)

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 25 έως 40 κύκλους, οδηγώντας σε εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας (Εικόνα 13). Θεωρητικά, κάθε κύκλος διπλασιάζει τον αριθμό των μορίων DNA, με αποτέλεσμα την παραγωγή περίπου 2^n αντιγράφων (όπου n ο αριθμός των κύκλων). Στην πράξη, ωστόσο, η απόδοση της αντίδρασης μειώνεται στους τελευταίους κύκλους λόγω εξάντλησης των αντιδραστηρίων, αναστολής του ενζύμου και συσσώρευσης παραπροϊόντων, οδηγώντας σε μία φάση κορεσμού (πλατώ).

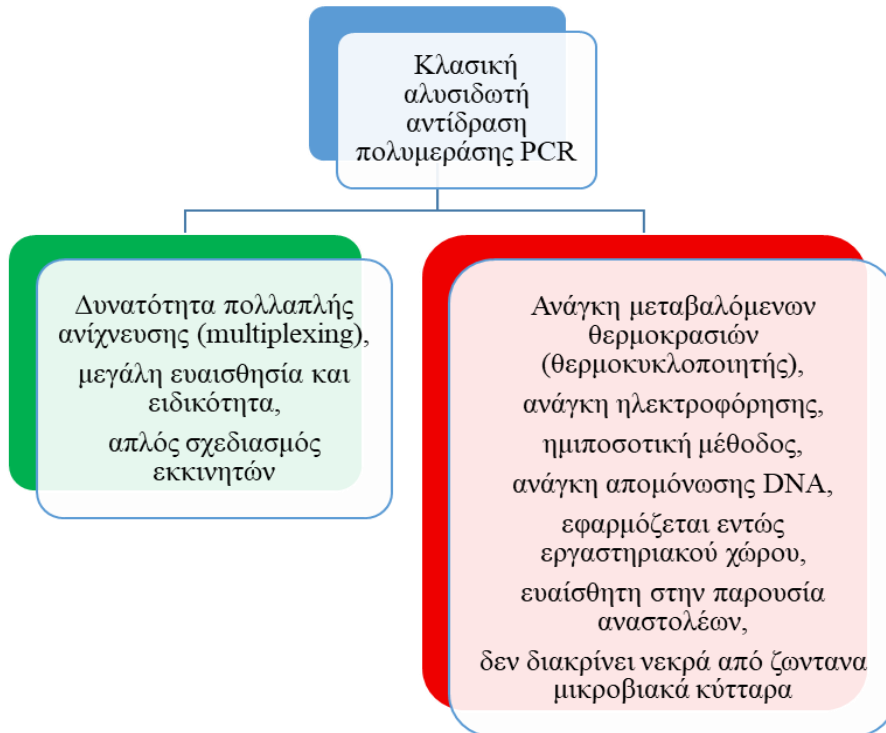


Εικόνα 13: Εκθετική αύξηση αριθμού αντιγράφων της αρχικής αλληλουχίας
(Πηγή: <https://www.lubio.ch/blog/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr>)

Η ειδικότητα της PCR καθορίζεται κυρίως από τον σχεδιασμό των εκκινητών, οι οποίοι πρέπει να είναι μοναδικοί ως προς την αλληλουχία στόχο και να αποφεύγουν τη δημιουργία δευτεροταγών δομών ή διμερών (primer dimers). Επιπλέον, η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{2+} , η καθαρότητα του αρχικού DNA και η ακρίβεια της θερμοκρασιακής ρύθμισης επηρεάζουν σημαντικά την επιτυχία της αντίδρασης. Λανθασμένες συνθήκες μπορούν να οδηγήσουν σε μη ειδικά προϊόντα ενίσχυσης ή πλήρη αποτυχία της αντίδρασης.

Σημαντικό χαρακτηριστικό της κλασικής PCR είναι ότι τα προϊόντα της ανιχνεύονται συνήθως στο τελικό στάδιο της αντίδρασης, συχνά μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης. Η τεχνική αυτή επιτρέπει τον ποιοτικό έλεγχο της παρουσίας ή απουσίας της στοχευμένης αλληλουχίας, αλλά δεν παρέχει ακριβή ποσοτικά δεδομένα (ημιποσοτική), σε αντίθεση με πιο σύγχρονες παραλλαγές, όπως η πραγματικού χρόνου PCR (Real Time PCR). Η συμβατική PCR χρησιμοποιείται έχοντας σαν αφετηρία όχι μόνο DNA, αλλά και

RNA (Reverse Transcription PCR) με την προσθήκη της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής, η οποία πραγματοποιείται με χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση.



Εικόνα 14: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα κλασικής PCR

Συνοψίζοντας, η κλασική PCR αποτελεί μία εξαιρετικά ισχυρή και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική, η οποία συνδυάζει την εκθετική ενίσχυση DNA με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία (Εικόνα 14). Αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε αστικά υγρά απόβλητα, τόσο σε μη επεξεργασμένα, όσο και σε επεξεργασμένα δείγματα. Η εφαρμογή της επιτρέπει την ανίχνευση και την ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών, δεικτών κοπρανώδους ρύπανσης, καθώς και λειτουργικών μικροβιακών πληθυσμών, που συμμετέχουν στις διεργασίες της επεξεργασίας των αστικών υγρών αποβλήτων. Η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση ακόμη και χαμηλών συγκεντρώσεων μικροβιακού DNA, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των συστημάτων επεξεργασίας λυμάτων. Επιπλέον, μπορεί να εφαρμοστεί σε συνδυασμό με τεχνικές ανάλυσης προϊόντων, όπως ηλεκτροφόρηση ή αλληλούχηση, για την περαιτέρω επιβεβαίωση της ταυτότητας των μικροοργανισμών. Ωστόσο, η παρουσία αναστολέων στα λύματα μπορεί να επηρεάσει την απόδοση της μεθόδου, ενώ η τεχνική δεν

διαφοροποιεί απαραίτητα μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Επίσης δεν πετυχαίνει απόλυτη ποσοτικοποίηση. Για τον λόγο αυτό, η χρήση της συχνά συνδυάζεται με άλλες συμπληρωματικές μεθόδους, συμβάλλοντας σε μια πιο ολοκληρωμένη και αξιόπιστη μικροβιολογική αξιολόγηση των αστικών υγρών αποβλήτων (Toze, 1999).

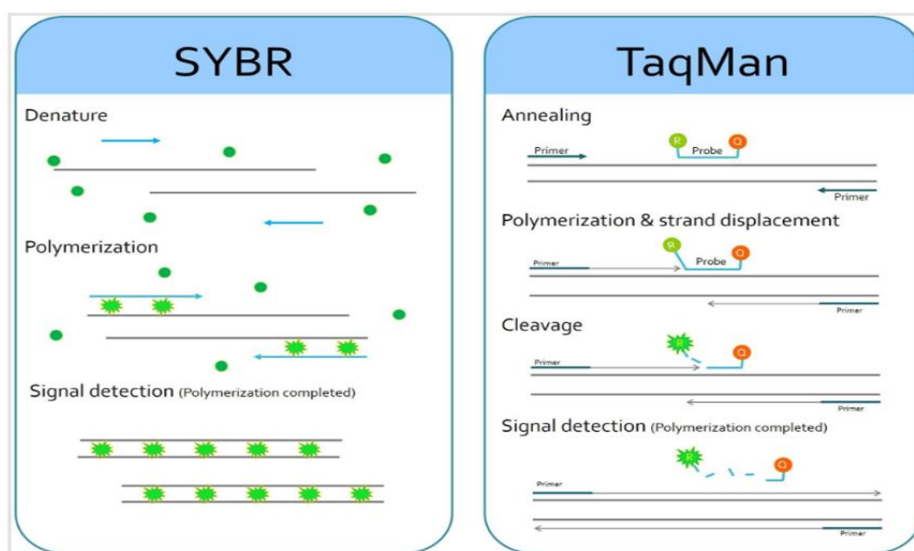
3.2.3 Απόλυτη και ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η απόλυτη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (absolute Real-Time PCR) και η ποσοτική real-time PCR (quantitative Real-time PCR, qPCR) ουσιαστικά αναφέρονται στην ίδια τεχνολογία, με τον όρο qPCR να τονίζει τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης του DNA με χρήση πρότυπης καμπύλης (ταυτόχρονη ενίσχυση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA). Σε αντίθεση με την κλασική PCR, όπου η ανίχνευση των προϊόντων πραγματοποιείται στο τελικό στάδιο της αντίδρασης, η Real-Time PCR επιτρέπει την παρακολούθηση της ενίσχυσης σε κάθε κύκλο, παρέχοντας ακριβή και αξιόπιστα ποσοτικά δεδομένα. Βασίζεται στην ίδια θεμελιώδη αρχή με την κλασική PCR, δηλαδή την εκθετική ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής DNA (κατά προτίμηση 70 έως 120 bp) μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων αποδιάταξης, υβριδοποίησης εκκινητών και επιμήκυνσης. Ωστόσο, η βασική διαφοροποίηση έγκειται στη χρήση φθοριζόντων μορίων, τα οποία επιτρέπουν την ανίχνευση του παραγόμενου DNA σε πραγματικό χρόνο (Smith & Osborn, 2009). Καθώς αυξάνεται η ποσότητα του προϊόντος ενίσχυσης, αυξάνεται και το φθορίζον σήμα, το οποίο καταγράφεται από ειδικούς ανιχνευτές. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της ποσότητας του DNA, το οποίο παράγεται. Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες συστημάτων ανίχνευσης (Εικόνα 15):

Μη ειδικές χρωστικές. Η πιο γνωστή είναι η SYBR Green. Η χρωστική αυτή συνδέεται με το δίκλωνο DNA και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν είναι δεσμευμένη. Καθώς η ποσότητα του δίκλωνου DNA αυξάνεται κατά την PCR, αυξάνεται και το φθορίζον σήμα. Τα πλεονεκτήματα των μη ειδικών χρωστικών είναι η απλότητα και η οικονομία, ενώ μειονεκτούν στο γεγονός ότι ανιχνεύουν και μη ειδικά προϊόντα και διμερή εκκινητών.

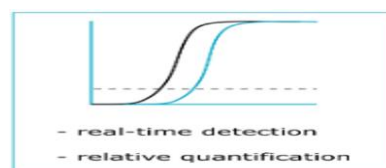
Ειδικοί ανιχνευτές. Οι πιο διαδεδομένοι είναι οι TaqMan ανιχνευτές. Πρόκειται για ολιγονουκλεοτίδια, που υβριδοποιούνται ειδικά στην αλληλουχία στόχο και φέρουν ένα φθορίζον μόριο (reporter) και έναν αποσβέστη (quencher). Σε έναν άθικτο ανιχνευτή

TaqMan, όπου δύο χρωστικές βρίσκονται σε κοντινή απόσταση, ο φθορισμός αναφοράς «απορροφάται» από το μόριο απόσβεσης μέσω μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού FRET (Kim et al., 2013). Κατά την επιμήκυνση, η DNA πολυμεράση διασπά τον ανιχνευτή, απομακρύνοντας το φθορίζον μόριο από τον αποσβέστη, γεγονός που επιτρέπει την εκπομπή φθορισμού. Τα πλεονεκτήματα των ειδικών ανιχνευτών είναι η υψηλή ειδικότητα και η δυνατότητα πολλαπλής ανίχνευσης (multiplexing), ενώ τα μειονεκτήματα είναι το υψηλότερο κόστος και η πιο πολύπλοκη διαδικασία για το σχεδιασμό τους.



Εικόνα 15: Μη ειδικοί και ειδικοί ανιχνευτές στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Πηγή: <https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/>)

Η καμπύλη Real-Time PCR (Εικόνα 16) χωρίζεται σε τέσσερις κύριες φάσεις. Στα αρχικά στάδια, το φθορίζον σήμα είναι χαμηλό και δεν διακρίνεται από τον θόρυβο (φάση έναρξης). Στη συνέχεια παρατηρείται εκθετική αύξηση του προϊόντος και του φθορισμού (εκθετική φάση). Ακολουθεί επιβράδυνση της αντίδρασης λόγω εξάντλησης αντιδραστηρίων (γραμμική φάση). Τελικά η ενίσχυση σταματά και το σήμα σταθεροποιείται (φάση κορεσμού).



Εικόνα 16: Καμπύλες ενίσχυσης στην Real-Time PCR (Πηγή: <https://www.stemgenomics.com/about/technologies-stemcell-characterization/digital-pcr-high-precision-and-speed/>)

Η σημαντικότερη παράμετρος της Real Time - PCR είναι η τιμή Ct. Ορίζεται ως ο αριθμός κύκλων που απαιτείται, ώστε το φθορίζον σήμα να ξεπεράσει ένα προκαθορισμένο όριο. Χαμηλή τιμή Ct συνεπάγεται υψηλή αρχική συγκέντρωση DNA, ενώ υψηλή τιμή Ct συνεπάγεται χαμηλή αρχική συγκέντρωση DNA. Η Ct χρησιμοποιείται για απόλυτη ποσοτικοποίηση (μέσω πρότυπης καμπύλης) ή σχετική ποσοτικοποίηση (π.χ. μέθοδος $\Delta\Delta Ct$)

Η τεχνική έχει ευρύτατη χρήση σε πολλούς τομείς, όπως ιατρική διάγνωση (ανίχνευση μικροβίων), γενετική ανάλυση (μελέτη γονιδιακής έκφρασης), ογκολογία (ανίχνευση μεταλλάξεων και βιοδεικτών), βιοτεχνολογία (έλεγχος γενετικά τροποποιημένων οργανισμών), δικαστική επιστήμη (ταυτοποίηση DNA). Στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αστικών αποβλήτων χρησιμοποιείται για εντοπισμό συγκεκριμένων μικροβίων ενδιαφέροντος τόσο πριν όσο και μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας (Shannon et al., 2007).

Πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, η ποσοτικοποίηση σε πραγματικό χρόνο, ο μικρός χρόνος ανάλυσης, ο μειωμένος κίνδυνος επιμόλυνσης (κλειστό σύστημα). Περιορισμοί της τεχνικής είναι η απαίτηση για εξειδικευμένο εξοπλισμό, το υψηλό κόστος αντιδραστηρίων, η ευαισθησία σε αναστολές της PCR και η ανάγκη σωστού σχεδιασμού εκκινητών και ανιχνευτών.

Συμπερασματικά η Real-Time PCR και qPCR αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο στη σύγχρονη μοριακή βιολογία, προσφέροντας ταχεία, αξιόπιστη και ποσοτική ανάλυση νουκλεϊκών οξέων. Η δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, σε συνδυασμό με την υψηλή ευαισθησία και τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης, τις καθιστούν αναντικατάστατες σε ερευνητικές και διαγνωστικές εφαρμογές.

3.2.4 Πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (multiplex PCR)

Η πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (multiplex PCR) αποτελεί μία εξελιγμένη παραλλαγή της συμβατικής PCR, η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλαπλών στόχων DNA ταυτόχρονα σε μία μόνο αντίδραση. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη χρήση περισσότερων του ενός ζευγών εκκινητών, καθένα από τα οποία είναι ειδικά σχεδιασμένο για την ενίσχυση διαφορετικών αλληλουχιών στόχων. Η δυνατότητα ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών γενετικών περιοχών καθιστά τη multiplex PCR

ιδιαίτερα χρήσιμη σε εφαρμογές, όπου απαιτείται εξοικονόμηση χρόνου, κόστους και δείγματος.

Η βασική αρχή λειτουργίας της multiplex PCR δεν διαφέρει ουσιαστικά από εκείνη της κλασικής PCR. Περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης του DNA, υβριδοποίησης των εκκινητών και επιμήκυνσης των νέων αλυσίδων από την DNA πολυμεράση. Ωστόσο, η παρουσία πολλαπλών ζευγών εκκινητών στο ίδιο μίγμα αντίδρασης εισάγει σημαντικές τεχνικές προκλήσεις, καθώς απαιτείται προσεκτική βελτιστοποίηση των συνθηκών, ώστε να επιτυγχάνεται ταυτόχρονη και αποδοτική ενίσχυση όλων των στόχων, χωρίς μη ειδικά προϊόντα.

Κρίσιμος παράγοντας για την επιτυχία της multiplex PCR είναι ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών. Οι εκκινητές πρέπει να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης (T_m), να μην σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές ή διμερή μεταξύ τους και να παρουσιάζουν υψηλή ειδικότητα προς τις αλληλουχίες στόχους. Επιπλέον, το μέγεθος των ενισχυμένων προϊόντων θα πρέπει να διαφέρει επαρκώς, ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός και η αναγνώρισή τους, συνήθως μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης.

Η βελτιστοποίηση της αντίδρασης αποτελεί μία από τις σημαντικότερες και πιο απαιτητικές διαδικασίες στη multiplex PCR. Παράγοντες όπως η συγκέντρωση των εκκινητών, η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου (Mg^{2+}), η ποσότητα του DNA και οι συνθήκες θερμοκρασίας επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση της αντίδρασης. Συχνά απαιτείται πειραματική προσέγγιση με διαδοχικές δοκιμές, προκειμένου να επιτευχθεί ισορροπημένη ενίσχυση όλων των στόχων, καθώς διαφορετικά ζεύγη εκκινητών μπορεί να ανταγωνίζονται μεταξύ τους για τα διαθέσιμα αντιδραστήρια.

Η multiplex PCR μπορεί να συνδυαστεί και με τεχνικές ανίχνευσης σε πραγματικό χρόνο (multiplex real-time PCR), όπου χρησιμοποιούνται διαφορετικοί φθορίζοντες ανιχνευτές για κάθε στόχο (ειδικοί). Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατή όχι μόνο η ταυτόχρονη ανίχνευση, αλλά και η ποσοτικοποίηση πολλαπλών γονιδίων σε μία αντίδραση (Henegariu et al., 1997). Η χρήση διαφορετικών φθοροχρωμάτων επιτρέπει τη διάκριση των προϊόντων με βάση τα φάσματα εκπομπής τους, αυξάνοντας σημαντικά την πληροφορία, που μπορεί να εξαχθεί από ένα μόνο δείγμα (Wittwer et al., 2001).

Οι εφαρμογές της multiplex PCR είναι εκτεταμένες και καλύπτουν πολλούς επιστημονικούς και διαγνωστικούς τομείς. Στην ιατρική μικροβιολογία χρησιμοποιείται

για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών παθογόνων μικροοργανισμών σε ένα δείγμα, γεγονός που επιταχύνει σημαντικά τη διάγνωση λοιμώξεων. Στη γενετική ανάλυση εφαρμόζεται για την ανίχνευση μεταλλάξεων, πολυμορφισμών και γενετικών δεικτών. Επιπλέον, στη δικαστική επιστήμη χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση ατόμων μέσω της ανάλυσης πολλαπλών γενετικών περιοχών (STRs), ενώ στη βιοτεχνολογία συμβάλλει στον έλεγχο γενετικά τροποποιημένων οργανισμών. Η multiplex PCR αποτελεί ένα ιδιαίτερα ισχυρό εργαλείο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλαπλών μικροβιακών στόχων σε σύνθετα περιβαλλοντικά δείγματα, όπως τα επεξεργασμένα και μη αστικά υγρά απόβλητα. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την ενίσχυση διαφορετικών γενετικών περιοχών σε μία μόνο αντίδραση, μειώνοντας σημαντικά τον χρόνο, το κόστος και τον απαιτούμενο όγκο δείγματος σε σύγκριση με τις συμβατικές μονοπλεκτικές μεθόδους PCR. Στο πλαίσιο της περιβαλλοντικής παρακολούθησης, η multiplex PCR διευκολύνει την ταυτόχρονη ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων, πρωτόζωων και ιών, συμβάλλοντας στην ταχεία αξιολόγηση της μικροβιακής ποιότητας των υδάτων και της αποτελεσματικότητας των μονάδων επεξεργασίας. Επιπλέον, η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου την καθιστούν ιδιαίτερα κατάλληλη για την ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων μικροοργανισμών, που συχνά παρατηρούνται σε επεξεργασμένα απόβλητα. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή της multiplex PCR ενισχύει σημαντικά τις σύγχρονες προσεγγίσεις στη δημόσια υγεία και την περιβαλλοντική διαχείριση, παρέχοντας αξιόπιστα και ταχύτατα αποτελέσματα για την παρακολούθηση μικροβιακών κινδύνων.

Παρά τα σημαντικά της πλεονεκτήματα, η multiplex PCR παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς. Η αυξημένη πολυπλοκότητα της αντίδρασης μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ευαισθησία για ορισμένους στόχους, ιδιαίτερα όταν αυτοί υπάρχουν σε χαμηλή συγκέντρωση. Επιπλέον, η πιθανότητα μη ειδικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των εκκινητών αυξάνεται με τον αριθμό τους, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Για τον λόγο αυτό, η επιτυχής εφαρμογή της τεχνικής απαιτεί εμπειρία και προσεκτικό πειραματικό σχεδιασμό.

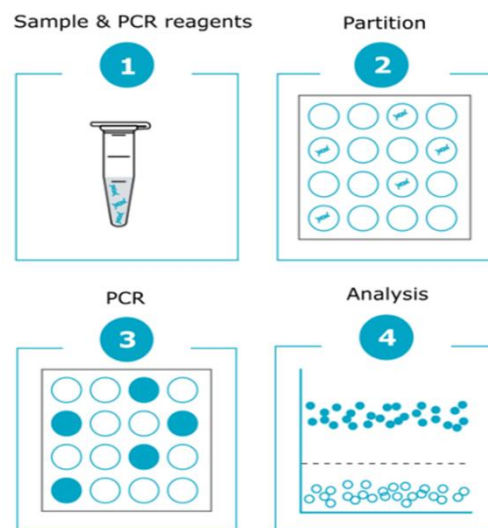
3.2.5 Ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (digital PCR)

Η ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (digital PCR, dPCR) αποτελεί μία σύγχρονη και ιδιαίτερα ακριβή τεχνική ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων, η οποία βασίζεται στην αρχή του διαχωρισμού του δείγματος σε μεγάλο αριθμό ανεξάρτητων μικροαντιδράσεων (Bonadonna et al., 2019). Σε αντίθεση με την κλασική PCR και την

qPCR, όπου η ποσοτικοποίηση βασίζεται σε σχετικές μετρήσεις ή πρότυπες καμπύλες, η dPCR επιτρέπει την απόλυτη ποσοτικοποίηση του DNA ή RNA χωρίς την ανάγκη εξωτερικών προτύπων (Cao et al., 2015).

Η βασική αρχή της digital PCR στηρίζεται στον διαμοιρασμό του αρχικού δείγματος σε μεγάλο αριθμό ανεξάρτητων μικροδιαμερισμάτων. Ιδανικά, κάθε διαμέρισμα περιέχει είτε μηδέν είτε ένα μόριο του στόχου DNA. Μετά την ενίσχυση μέσω PCR, κάθε αντίδραση που πραγματοποιείται στα μικροδιαμερίσματα ταξινομείται ως «θετική» (presence of amplification) ή «αρνητική» (absence of amplification), ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι προϊόντος ενίσχυσης (δυναδικό αποτέλεσμα 1 ή 0).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων βασίζεται στη στατιστική κατανομή Poisson, η οποία επιτρέπει τον υπολογισμό της αρχικής συγκέντρωσης του στόχου στο δείγμα, λαμβάνοντας υπόψη την πιθανότητα περισσότερων του ενός μορίων σε ένα διαμέρισμα (Basu, 2017). Με τον τρόπο αυτό, η dPCR παρέχει υψηλής ακρίβειας και ευαισθησίας απόλυτη ποσοτικοποίηση, ακόμη και σε δείγματα με πολύ χαμηλή αρχική συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων (Εικόνα 17).

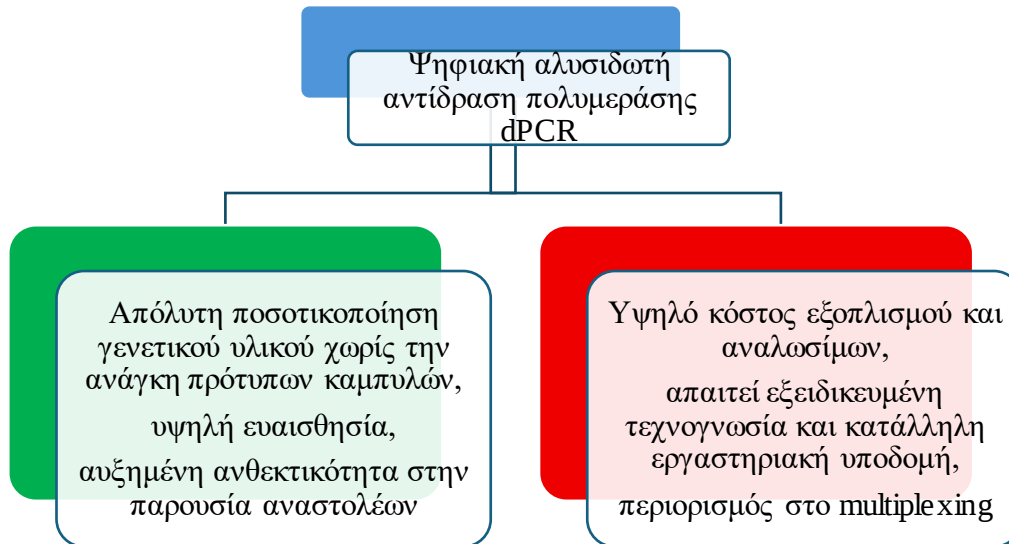


Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της βασικής αρχής της ψηφιακής PCR

(Πηγή: <https://www.stemgenomics.com/about/technologies-stemcell-characterization/digital-pcr-high-precision-and-speed/>)

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες digital PCR, η droplet digital PCR (ddPCR) και η chip-based digital PCR. Στην ddPCR, το δείγμα διαχωρίζεται σε χιλιάδες νανοσταγονίδια μέσω μικρορευστομηχανικών συστημάτων (Cao et al., 2015), ενώ στην chip-based προσέγγιση, το δείγμα κατανέμεται σε προκαθορισμένα μικροφρεάτια πάνω σε ειδικές

μικροσυστοιχίες. Και στις δύο περιπτώσεις, η ενίσχυση του γενετικού στόχου πραγματοποιείται ταυτόχρονα σε όλα τα μικροδιαμερίσματα, ενώ η ανίχνευση βασίζεται συνήθως στην καταγραφή φθορίζοντος σήματος, το οποίο επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ θετικών και αρνητικών μικροδιαμερισμάτων.



Εικόνα 18: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της ψηφιακής PCR

Η εφαρμογή της ψηφιακής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης στην ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε αστικά υγρά απόβλητα, τόσο επεξεργασμένα όσο και μη, έχει αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια ως ιδιαίτερα αξιόπιστη και υψηλής ακρίβειας προσέγγιση (Chai, et al., 2024). Η dPCR παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι συμβατικών μεθόδων, όπως αυξημένη ευαισθησία στην ανίχνευση μικροοργανισμών χαμηλής αφθονίας και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε αναστολείς, οι οποίοι συχνά υπάρχουν σε πολύπλοκα περιβαλλοντικά δείγματα, όπως τα λύματα. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιείται ευρέως στην παρακολούθηση παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ. βακτήρια εντερικής προέλευσης και ιοί) και στην επιδημιολογική επιτήρηση μέσω λυμάτων, παρέχοντας ταχεία και αξιόπιστα ποσοτικά δεδομένα ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Παρά τους περιορισμούς, σχετιζόμενους με το κόστος και τον εξειδικευμένο εξοπλισμό, η dPCR θεωρείται μία από τις πλέον υποσχόμενες τεχνικές για τη σύγχρονη μικροβιολογική ανάλυση υδατικών συστημάτων (Εικόνα 18). Παρά τις τεχνικές και οικονομικές προκλήσεις, η τεχνολογία αυτή αναμένεται να αποκτήσει ευρύτερη εφαρμογή στο μέλλον, καθώς οι σχετικές πλατφόρμες γίνονται ολοένα πιο προσιτές και οι δυνατότητές τους βελτιώνονται διαρκώς.

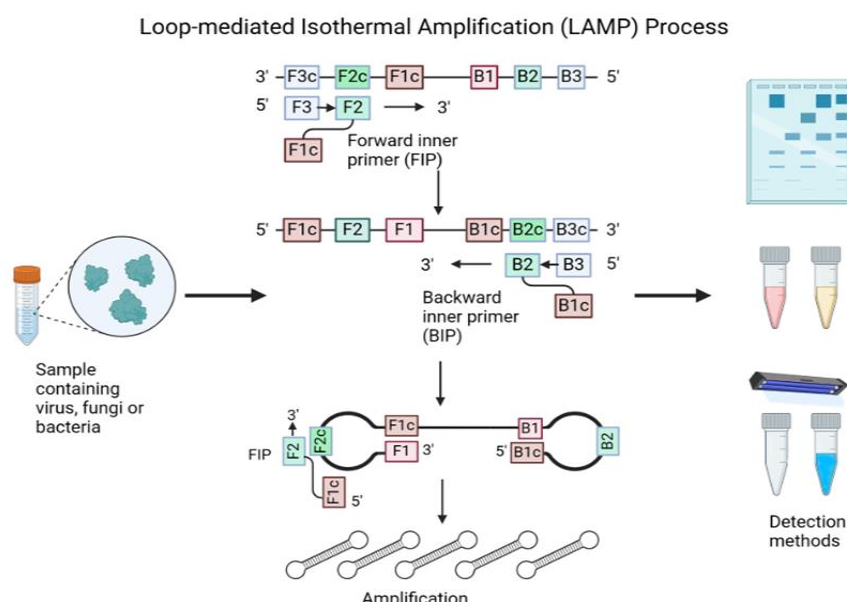
3.2.6 Ισοθερμική ενίσχυση DNA

Η ισοθερμική ενίσχυση DNA αποτελεί μια σύγχρονη και ταχέως εξελισσόμενη τεχνολογία της μοριακής βιολογίας, η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA σε σταθερή θερμοκρασία. Σε αντίθεση με την κλασική μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), η οποία απαιτεί επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους, οι ισοθερμικές τεχνικές πραγματοποιούνται, χωρίς την ανάγκη θερμοκυκλοποιητή, γεγονός που τις καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλες για εφαρμογές πεδίου και διαγνωστικά περιβάλλοντα με περιορισμένους πόρους. Πρέπει να τονιστεί επίσης ότι σε σχέση με την PCR παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στην παρουσία αναστολέων και μπορεί να γίνει, χωρίς προηγούμενη απομόνωση νουκλεϊκού οξέος. Έτσι γίνεται εξοικονόμηση χρόνου, χρημάτων και δεν απαιτείται εργαστηριακός χώρος.

Η βασική αρχή της ισοθερμικής ενίσχυσης στηρίζεται στη δράση εξειδικευμένων ενζύμων, όπως οι DNA πολυμεράσες με ικανότητα εκτόπισης κλώνου, οι οποίες επιτρέπουν τη συνεχή σύνθεση νέων αλυσίδων DNA, χωρίς την ανάγκη θερμικής αποδιάταξης της διπλής έλικας DNA. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές προσδένονται σε συγκεκριμένες περιοχές του στόχου DNA.

Η Loop mediated isothermal Amplification (LAMP) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες και ευρύτερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές ισοθερμικής ενίσχυσης DNA, η οποία αναπτύχθηκε με στόχο την ταχεία, αξιόπιστη και υψηλής ειδικότητας ανίχνευση γενετικού υλικού. Για πρώτη φορά παρουσιάστηκε από τους Notomi et al. το 2000. Σε αντίθεση με τις συμβατικές τεχνικές ενίσχυσης, η LAMP πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία (χρήση θερμομπλόκ ή υδατόλουτρου), συνήθως μεταξύ 60 και 65°C, εξαλείφοντας την ανάγκη για πολύπλοκο θερμικό εξοπλισμό και καθιστώντας τη μέθοδο κατάλληλη για εφαρμογές σε περιβάλλοντα περιορισμένων υποδομών.

Η λειτουργία της LAMP βασίζεται στη χρήση μιας ειδικής DNA πολυμεράσης (Bst) με ικανότητα εκτόπισης κλώνου (Notomi, et al., 2000), σε συνδυασμό με ένα σύνολο τεσσάρων έως έξι εκκινητών, οι οποίοι αναγνωρίζουν διακριτές περιοχές της αλληλουχίας-στόχου. Οι εξωτερικοί εκκινητές (F3 και B3) δρουν σε συνδυασμό με τους εσωτερικούς εκκινητές (FIP και BIP), ενώ σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται επιπλέον «loop primers» για την επιτάχυνση της αντίδρασης. Ο σύνθετος αυτός σχεδιασμός επιτρέπει τη δημιουργία χαρακτηριστικών δομών τύπου «βρόχου» (Εικόνα 19), οι οποίες διευκολύνουν τη συνεχή και εκθετική ενίσχυση του DNA.



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση της βασικής αρχής της LAMP

(Πηγή: <https://www.biorender.com/template/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp-process>)

Η διαδικασία της ενίσχυσης στη LAMP εξελίσσεται μέσω διαδοχικών σταδίων επιμήκυνσης και εκτόπισης κλώνων, οδηγώντας στη δημιουργία μεγάλου αριθμού προϊόντων DNA με ποικίλα μήκη και δομές. Τα παραγόμενα προϊόντα έχουν χαρακτηριστική μορφή, αποτέλεσμα της επαναλαμβανόμενης κυκλικής ενίσχυσης. Η υψηλή αποδοτικότητα της μεθόδου επιτρέπει την εκθετική ενίσχυση του DNA-στόχου, με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων προϊόντος (ενίσχυση 10^9 έως 10^{10} φορές) μέσα σε χρονικό διάστημα μικρότερο της μίας ώρας, συχνά ακόμη και σε 20 με 30 λεπτά. Η μέθοδος μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση RNA στόχων, μετά από μετατροπή του RNA σε cDNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφής.

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της LAMP είναι η δυνατότητα απλής και άμεσης ανίχνευσης των προϊόντων ενίσχυσης. Η παρακολούθηση της αντίδρασης μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με φθορισμομετρικές μεθόδους, που βασίζονται στη χρήση παρεμβαλλόμενων φθορίζουσών χρωστικών, είτε με άμεση οπτική εκτίμηση της θολερότητας που προκαλείται από την κατακρήμνιση πυροφωσφορικού μαγνησίου ως παραπροϊόν της αντίδρασης. Αυτό καθιστά τη μέθοδο ιδιαίτερα χρήσιμη για διαγνωστικές εφαρμογές εκτός εργαστηρίου.

Η υψηλή ειδικότητα της LAMP οφείλεται στον μεγάλο αριθμό εκκινητών, που χρησιμοποιούνται, οι οποίοι αναγνωρίζουν πολλαπλές περιοχές του στόχου DNA. Παράλληλα, η ευαισθησία της μεθόδου είναι ιδιαίτερα υψηλή, επιτρέποντας την ανίχνευση πολύ μικρών ποσοτήτων γενετικού υλικού. Ωστόσο, ο πολύπλοκος σχεδιασμός των εκκινητών αποτελεί μία από τις βασικές προκλήσεις της τεχνικής, καθώς απαιτεί εξειδικευμένα εργαλεία και εμπειρία για τη βέλτιστη επιλογή τους (Εικόνα 20).



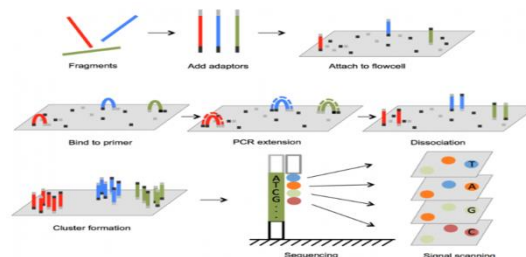
Εικόνα 20: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ισοθερμικής ενίσχυσης μέσω βρόχου (LAMP)

Η εφαρμογή της LAMP στην ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε αστικά υγρά απόβλητα, τόσο επεξεργασμένα όσο και μη, έχει προσελκύσει αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια (Lass, et al., 2017). Η μέθοδος αξιοποιείται για την ταχεία και αξιόπιστη ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε σύνθετα περιβαλλοντικά δείγματα, συμβάλλοντας ουσιαστικά στην παρακολούθηση της μικροβιακής ποιότητας και στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των διεργασιών επεξεργασίας. Η χρήση της σε λύματα έχει αναδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη σε εφαρμογές περιβαλλοντικής και επιδημιολογικής επιτήρησης (Martzy, et al., 2017), επιτρέποντας τον έγκαιρο εντοπισμό μικροβιακών φορτίων ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Παράλληλα, η δυνατότητα εφαρμογής της σε συνθήκες πεδίου και η σχετικά χαμηλή απαίτηση σε εξοπλισμό την καθιστούν ελκυστική επιλογή για ευρεία χρήση σε συστήματα διαχείρισης υδατικών αποβλήτων. Συνολικά, η LAMP αποτελεί ένα υποσχόμενο εργαλείο για τη σύγχρονη μικροβιολογική ανάλυση αστικών υγρών αποβλήτων.

3.2.7 Αλληλούχηση επόμενης γενιάς (Next Generation Sequencing - NGS)

Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς αποτελεί μία από τις σημαντικότερες τεχνολογικές εξελίξεις στον τομέα της μοριακής βιολογίας και της γονιδιοματικής. Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές μεθόδους αλληλούχησης, όπως η μέθοδος Sanger, η NGS επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση εκατομμυρίων θραυσμάτων DNA, καθιστώντας δυνατή τη μαζική και ταχύτατη αποκωδικοποίηση γενετικού υλικού με υψηλή ακρίβεια και χαμηλότερο κόστος ανά βάση.

Η βασική αρχή της NGS στηρίζεται στη μαζικά παράλληλη αλληλούχηση πολλών μορίων DNA ταυτόχρονα. Η διαδικασία περιλαμβάνει διαδοχικά στάδια, τα οποία ξεκινούν με την προετοιμασία της βιβλιοθήκης, ακολουθούνται από την ενίσχυση των θραυσμάτων και ολοκληρώνονται με την αλληλούχηση (Εικόνα 21) και τη βιοπληροφορική ανάλυση των παραγόμενων δεδομένων.



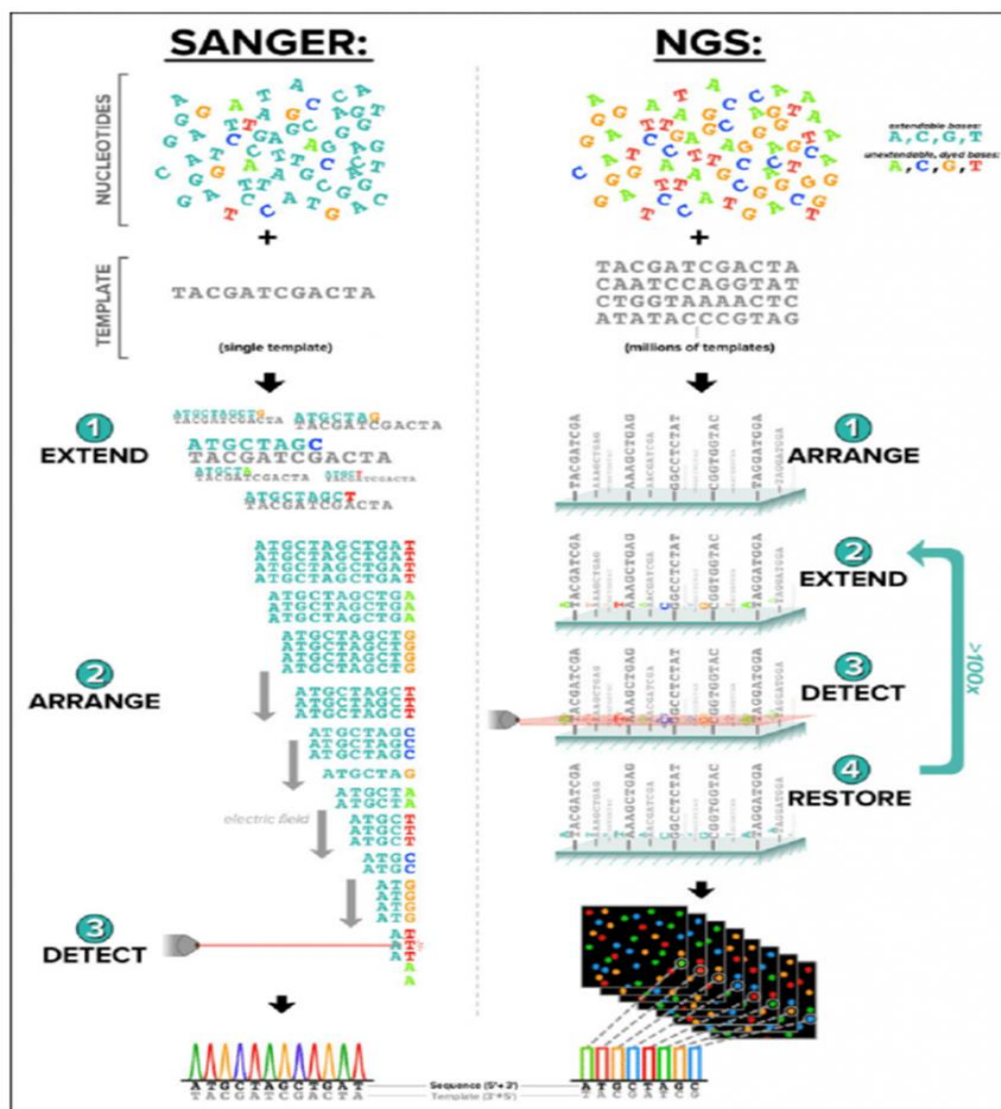
Εικόνα 21: Βασική αρχή της αλληλούχησης επόμενης γενιάς
(Πηγή: <https://praxilabs.com/en/blog/2021/02/08/dna-sequencing-definition-importance-methods-facts-and-more/>)

Το πρώτο στάδιο, η προετοιμασία της βιβλιοθήκης, περιλαμβάνει τον κατακερματισμό του DNA σε μικρότερα θραύσματα και την προσθήκη ειδικών προσαρμογέων (adapters) στα άκρα τους. Οι adapters επιτρέπουν την πρόσδεση των θραυσμάτων σε στερεές επιφάνειες ή μικροσφαιρίδια, καθώς και την αναγνώρισή τους κατά τη διάρκεια της αλληλούχησης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι προσαρμογείς περιλαμβάνουν επίσης μοναδικές αλληλουχίες αναγνώρισης (barcodes ή indexes), οι οποίες καθιστούν δυνατή την ταυτόχρονη αλληλούχηση πολλαπλών δειγμάτων στο ίδιο πείραμα και τον μεταγενέστερο διαχωρισμό τους μέσω της διαδικασίας του multiplexing.

Ακολουθεί το στάδιο της ενίσχυσης των θραυσμάτων, το οποίο πραγματοποιείται συνήθως μέσω τεχνικών όπως η bridge amplification ή η emulsion PCR. Στην πρώτη περίπτωση, η ενίσχυση λαμβάνει χώρα επί στερεής επιφάνειας, ενώ στη δεύτερη τα μόρια DNA ενισχύονται εντός μικροσταγονιδίων γαλακτώματος. Σκοπός του σταδίου αυτού είναι η δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων κάθε θραύσματος, ώστε να εξασφαλιστεί επαρκές σήμα για την ανίχνευσή του κατά την αλληλούχηση. Η τοπική ενίσχυση οδηγεί στον σχηματισμό συστάδων (clusters) πανομοιότυπων μορίων DNA.

Η διαδικασία της αλληλούχησης διαφέρει ανάλογα με την τεχνολογική πλατφόρμα, που χρησιμοποιείται, ωστόσο μία από τις πλέον διαδεδομένες προσεγγίσεις είναι η αλληλούχηση με σύνθεση (sequencing by synthesis). Στη μέθοδο αυτή, νουκλεοτίδια που έχουν σημειωθεί με φθορίζοντα μόρια, ενσωματώνονται διαδοχικά στον νεοσυντιθέμενο κλώνο DNA και κάθε γεγονός ενσωμάτωσης καταγράφεται από οπτικά συστήματα ανίχνευσης. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται η αλληλουχία των βάσεων του υπό μελέτη μορίου DNA (Higuchi et al., 2011).

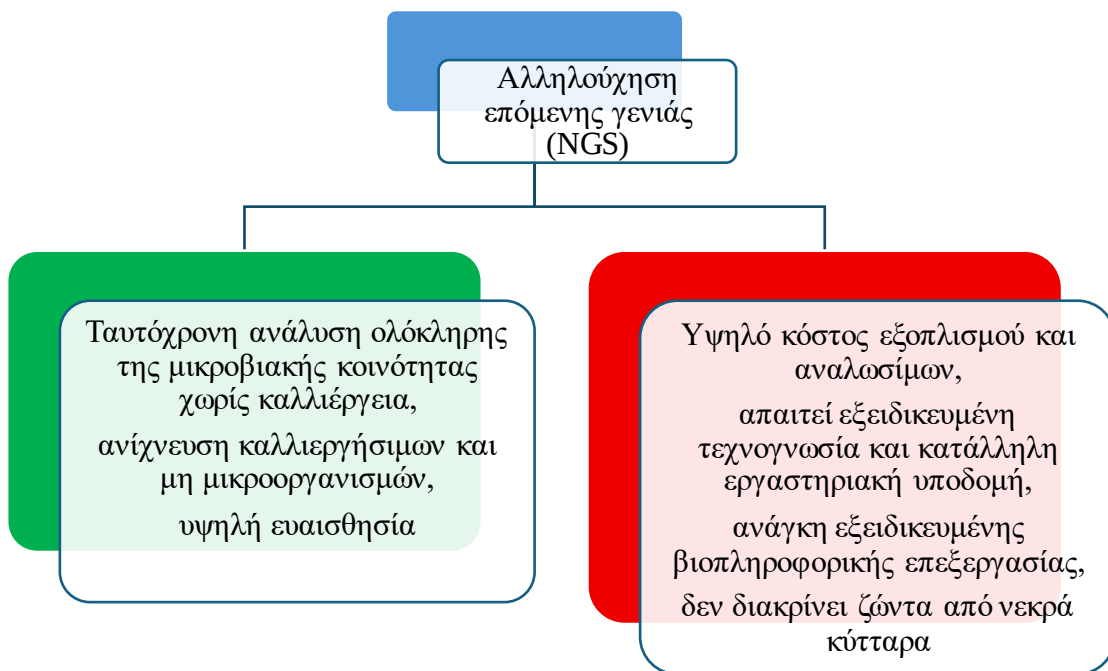
Μετά την ολοκλήρωση της αλληλούχησης, παράγεται ένας τεράστιος όγκος δεδομένων, τα οποία απαιτούν εξειδικευμένη βιοπληροφορική ανάλυση (Εικόνα 22). Τα δεδομένα αυτά αποτελούνται από σύντομες αλληλουχίες DNA (reads), οι οποίες είτε ευθυγραμμίζονται με ένα γονιδίωμα αναφοράς είτε συναρμολογούνται *de novo* για την ανακατασκευή της αρχικής αλληλουχίας. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η ανίχνευση γενετικών παραλλαγών, όπως μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs), εισαγωγές και διαγραφές, καθώς και μεγαλύτερες δομικές παραλλαγές του γονιδιώματος.



Εικόνα 22: Συγκριτική απεικόνιση των μεθόδων αλληλούχησης Sanger και NGS

(Πηγή: <https://praxilabs.com/en/blog/2021/02/08/dna-sequencing-definition-importance-methods-facts-and-more/>)

Η τεχνολογία NGS αποτελεί σήμερα ένα από τα πλέον ισχυρά εργαλεία για τη μελέτη της μικροβιακής γενετικής ποικιλότητας σε δείγματα νερού. Η εφαρμογή της στην ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε αστικά υγρά απόβλητα, τόσο επεξεργασμένα όσο και μη, έχει διευρύνει σημαντικά τις δυνατότητες της μικροβιολογικής ανάλυσης, παρέχοντας ολοκληρωμένη εικόνα της σύνθεσης και της δυναμικής των μικροβιακών κοινοτήτων (Tan, et al., 2015).



Εικόνα 23: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα αλληλούχησης επόμενης γενιάς NGS

Η χρήση της τεχνολογίας αυτής επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ιών και ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, χωρίς την ανάγκη καλλιέργειας, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάλυση πολύπλοκων περιβαλλοντικών δειγμάτων, όπως τα λύματα. Μέσω της NGS μελετάται η μικροβιακή ποικιλότητα (καθιστώντας δυνατή την αναγνώριση σπάνιων ή χαμηλής αφθονίας ειδών), γίνεται αναγνώριση παθογόνων μικροοργανισμών και παρακολούθηση της παρουσίας γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, συμβάλλοντας στην περιβαλλοντική και επιδημιολογική επιτήρηση. Παράλληλα, η εφαρμογή της σε επεξεργασμένα απόβλητα επιτρέπει την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των συστημάτων επεξεργασίας ως προς την απομάκρυνση μικροβιακών φορτίων (Garner, et al., 2021). Ωστόσο, παρά τα σημαντικά της πλεονεκτήματα, η NGS συνοδεύεται από υψηλό κόστος, ανάγκη εξειδικευμένης βιοπληροφορικής ανάλυσης (απαιτεί ισχυρή υπολογιστική υποδομή και εξειδικευμένη γνώση) και προκλήσεις στην ερμηνεία των δεδομένων, ιδιαίτερα όσον αφορά τη διάκριση μεταξύ ζώντων και μη μικροοργανισμών (Εικόνα 23).

Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) αποτελεί τη βασική τεχνολογία, που επιτρέπει τη μαζική και ταχεία ανάλυση γενετικού υλικού (DNA ή RNA). Πάνω σε αυτή την τεχνολογία βασίζονται διαφορετικές προσεγγίσεις μελέτης μικροβιακών κοινοτήτων, οι

οποίες αναλύονται στη συνέχεια. Η **αλληλούχηση 16S rRNA** αξιοποιεί την τεχνολογία NGS για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση προκαρυωτικών μικροοργανισμών, παρέχοντας πληροφορίες για τη σύσταση της κοινότητας, δηλαδή «ποιοι μικροοργανισμοί υπάρχουν». Η **μεταγονιδιωματική αλληλούχηση ολικού γονιδιώματος (WMS)** βασίζεται επίσης στην NGS για την ανάλυση του συνόλου του γενετικού υλικού ενός δείγματος, επιτρέποντας τη διερεύνηση του γενετικού δυναμικού και των πιθανών λειτουργιών της κοινότητας, δηλαδή «τι μπορούν να κάνουν οι μικροοργανισμοί». Τέλος, η **μεταγραφωμική** ανάλυση εφαρμόζει την τεχνολογία NGS σε μόρια RNA, με σκοπό την καταγραφή των γονιδίων που εκφράζονται σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή, παρέχοντας πληροφορίες για τη λειτουργική δραστηριότητα της κοινότητας, δηλαδή «τι κάνουν πραγματικά». Συνεπώς, η NGS αποτελεί την κοινή τεχνολογική πλατφόρμα πάνω στην οποία βασίζονται συμπληρωματικές προσεγγίσεις για τη μελέτη της δομής, του γενετικού δυναμικού και της λειτουργικής δραστηριότητας των μικροβιακών κοινοτήτων.

3.2.8 16s rRNA αλληλούχηση

Η αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες μοριακές μεθόδους για την ανίχνευση και ταυτοποίηση βακτηρίων, ιδιαίτερα σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως τα υγρά απόβλητα (Sanz & Köchling, 2007). Το γονίδιο αυτό απαντάται σε όλα τα βακτήρια και περιλαμβάνει τόσο συντηρημένες περιοχές, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ομοιότητας μεταξύ διαφορετικών ειδών, όσο και υπερμεταβλητές περιοχές, οι οποίες διαφοροποιούνται μεταξύ των ταξινομικών ομάδων και επιτρέπουν τη διάκρισή τους.

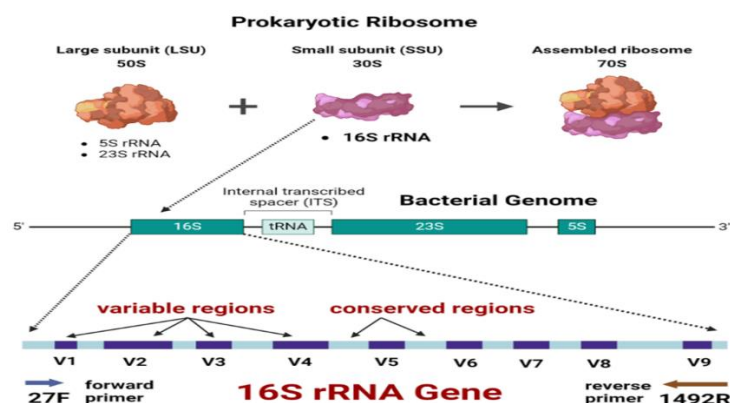
Η διαδικασία ξεκινά με την απομόνωση του γενετικού υλικού (DNA) από το δείγμα. Στην περίπτωση των υγρών αποβλήτων, το δείγμα μπορεί να περιέχει πολύπλοκες μικροβιακές κοινότητες, οπότε γίνεται αρχικά συλλογή και συγκέντρωση των μικροβιακών κυττάρων, συνήθως μέσω διήθησης ή φυγοκέντρωσης. Στη συνέχεια, τα κύτταρα λύονται, ώστε να απελευθερωθεί το DNA τους, και ακολουθεί ο καθαρισμός του DNA από ουσίες που ενδέχεται να παρεμποδίσουν τα επόμενα στάδια της ανάλυσης.

Ακολουθεί η ενίσχυση (πολλαπλασιασμός) του γονιδίου 16S rRNA με τη μέθοδο PCR. Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιούνται ειδικοί εκκινητές, οι οποίοι αναγνωρίζουν συντηρημένες περιοχές του γονιδίου και επιτρέπουν την αντιγραφή του από όλα σχεδόν τα υπάρχοντα στο δείγμα βακτήρια. Έτσι, δημιουργούνται πολλά αντίγραφα του συγκεκριμένου γονιδίου, τα οποία είναι απαραίτητα για την επόμενη φάση της ανάλυσης.

Η επόμενη φάση είναι η ίδια η αλληλούχηση των ενισχυμένων τμημάτων του γονιδίου 16S rRNA, κατά την οποία προσδιορίζεται η σειρά των νουκλεοτιδίων (Α, Τ, Γ και C) του DNA. Το αποτέλεσμα είναι ένα σύνολο αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα βακτήρια που περιέχονται στο δείγμα. Οι παραγόμενες αλληλουχίες συγκρίνονται με βάσεις δεδομένων αναφοράς και με βάση τον βαθμό ομοιότητάς τους με γνωστές αλληλουχίες, προσδιορίζονται οι βακτηριακές ομάδες που υπάρχουν στο δείγμα και η σχετική συμμετοχή τους στη μικροβιακή κοινότητα.

Οι υπερμεταβλητές περιοχές του γονιδίου 16S rRNA αποτελούν βασικό στοιχείο για την ταυτοποίηση και διαφοροποίηση των βακτηρίων σε μοριακό επίπεδο. Το γονίδιο 16S rRNA έχει μήκος περίπου 1.500 βάσεων και περιλαμβάνει εναλλασσόμενες περιοχές συντηρημένες και υπερμεταβλητές. Οι συντηρημένες περιοχές είναι σχεδόν ίδιες σε όλα τα βακτήρια και επιτρέπουν τον σχεδιασμό εκκινητών για την ενίσχυση του γονιδίου μέσω PCR. Αντίθετα, οι υπερμεταβλητές περιοχές παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών και αποτελούν το «διαγνωστικό αποτύπωμα» για την αναγνώριση των μικροοργανισμών.

Συνολικά, έχουν περιγραφεί εννέα υπερμεταβλητές περιοχές στο γονίδιο 16S rRNA (Guo et al., 2013), οι οποίες συμβολίζονται V1 έως V9 (Εικόνα 24). Κάθε μία από αυτές τις περιοχές διαφέρει ως προς το μήκος, τη μεταβλητότητα και την ικανότητά της να διαχωρίζει τα βακτηριακά είδη. Ορισμένες περιοχές, όπως οι V3 και V4, χρησιμοποιούνται συχνότερα σε αναλύσεις, καθώς προσφέρουν καλή ισορροπία μεταξύ μήκους αλληλουχίας και διακριτικής ικανότητας. Άλλες περιοχές, όπως οι V1–V2 ή V4–V5, επιλέγονται ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών, που αναμένεται να υπάρχουν στο δείγμα και τον τύπο της ανάλυσης.



Εικόνα 24: Δομή του 16S rRNA
(Πηγή: <https://microbenotes.com/16s-rna-gene-sequencing/>)

Η σημασία των υπερμεταβλητών περιοχών έγκειται στο γεγονός ότι οι διαφορές στην αλληλουχία τους αντανακλούν εξελικτικές αποκλίσεις μεταξύ των βακτηρίων. Έτσι, με την ανάλυση αυτών των περιοχών, είναι δυνατόν να γίνει ταξινομική κατάταξη των μικροοργανισμών, συχνά μέχρι το επίπεδο του γένους και σε ορισμένες περιπτώσεις, του είδους. Στην πράξη, επιλέγονται συγκεκριμένα ζεύγη εκκινητών, τα οποία υβριδοποιούνται σε συντηρημένες περιοχές που πλαισιώνουν μία ή περισσότερες υπερμεταβλητές περιοχές του γονιδίου 16S rRNA. Με τον τρόπο αυτό ενισχύεται και αλληλουχείται μόνο το επιθυμητό τμήμα του γονιδίου, μειώνοντας το κόστος και τον χρόνο της ανάλυσης.

Στα περιβαλλοντικά δείγματα, όπως τα υγρά απόβλητα, η επιλογή της κατάλληλης υπερμεταβλητής περιοχής είναι ιδιαίτερα κρίσιμη. Διαφορετικές περιοχές μπορεί να δίνουν διαφορετική εικόνα της μικροβιακής κοινότητας, καθώς ορισμένα βακτηριακά είδη ανιχνεύονται πιο αποτελεσματικά με συγκεκριμένες περιοχές. Για τον λόγο αυτό, σε πολλές μελέτες χρησιμοποιούνται συνδυασμοί περιοχών (π.χ. V3–V4), ώστε να επιτευχθεί πιο ολοκληρωμένη και αξιόπιστη ανάλυση της βιοποικιλότητας (Numberger, et al., 2019).

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δεν απαιτεί καλλιέργεια των μικροοργανισμών, πράγμα που σημαίνει ότι μπορούν να ανιχνευθούν και βακτήρια, που δεν καλλιεργούνται εύκολα στο εργαστήριο. Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τα υγρά απόβλητα, όπου υπάρχει μεγάλη ποικιλία μικροβιακών ειδών. Επιπλέον, η μέθοδος επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση ολόκληρης της μικροβιακής κοινότητας, παρέχοντας μια συνολική εικόνα της βιοποικιλότητας.

Παρά τα πλεονεκτήματα, υπάρχουν και περιορισμοί. Ένα σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι αφορά μόνο τα βακτήρια, τα οποία αποτελούν τα περισσότερα αλλά όχι όλα τα μικρόβια, που μπορεί κάποιος να εντοπίσει στα αστικά υγρά απόβλητα. Επιπλέον, οι υπερμεταβλητές περιοχές δεν παρουσιάζουν την ίδια διακριτική ικανότητα για όλες τις βακτηριακές ομάδες, με αποτέλεσμα ορισμένα στενά συγγενικά είδη να μην μπορούν να διαχωριστούν με ακρίβεια. Η επιλογή διαφορετικών εκκινητών μπορεί να εισάγει μεροληψία, ευνοώντας την ενίσχυση ορισμένων ομάδων μικροοργανισμών έναντι άλλων. Η μέθοδος δεν παρέχει άμεσες πληροφορίες για το αν τα βακτήρια είναι ζωντανά ή νεκρά. Επίσης, απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και ανάλυση δεδομένων, καθώς τα αποτελέσματα πρέπει να υποβληθούν σε βιοπληροφορική επεξεργασία.

3.2.9 Μεταγονιδιωματική αλληλούχηση ολικού γονιδιώματος (Whole Metagenome Sequencing – WMS) και Μεταγραφωμική ανάλυση.

Η μεταγονιδιωματική αλληλούχηση ολικού γονιδιώματος (WMS) αποτελεί μια προηγμένη μοριακή μέθοδο για τη μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων, η οποία επιτρέπει την ανάλυση όλου του υπάρχοντος γενετικού υλικού σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα. Με απλά λόγια, σε αντίθεση με την ανάλυση ενός συγκεκριμένου γονιδίου-δείκτη όπως το 16S rRNA (Nieuwenhuijse & Koopmans, 2017), η WMS αναλύει το σύνολο των γονιδιωμάτων όλων των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε ένα σύνθετο δείγμα, προσφέροντας μια πολύ πιο ολοκληρωμένη εικόνα της μικροβιακής σύστασης και των λειτουργιών της σε επίπεδο δυνατοτήτων και όχι πραγματικής δραστηριότητας. Η διαφορά της από την Whole Genome Sequencing (WGS) έγκειται στο γεγονός ότι η WGS επικεντρώνεται στην αλληλούχηση ολόκληρου του γονιδιώματος ενός μεμονωμένου οργανισμού, ενώ η WMS αφορά την αλληλούχηση του συνόλου των γονιδιωμάτων όλων των μικροοργανισμών, που συνυπάρχουν σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα.

Η διαδικασία στην WMS ξεκινά με τη συλλογή και προετοιμασία του δείγματος. Οι μικροοργανισμοί συγκεντρώνονται μέσω διήθησης ή φυγοκέντρωσης και στη συνέχεια απομονώνεται το συνολικό γενετικό υλικό (DNA) της μικροβιακής κοινότητας. Το εξαγόμενο DNA περιλαμβάνει γενετικό υλικό από το σύνολο των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο δείγμα, όπως βακτήρια, ιούς, μύκητες και πρωτόζωα. Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του, το DNA υποβάλλεται σε τεμαχισμό, ώστε να παραχθούν θραύσματα κατάλληλου μεγέθους για ανάλυση. Στη συνέχεια ακολουθεί η προετοιμασία της βιβλιοθήκης αλληλούχησης (sequencing library preparation), κατά την οποία στα άκρα των θραυσμάτων προστίθενται ειδικοί προσαρμογείς (adapters). Οι προσαρμογείς αυτοί επιτρέπουν την αναγνώριση, την ενίσχυση και την προσάρτηση των θραυσμάτων στις πλατφόρμες αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS). Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική και αξιόπιστη αλληλούχηση του γενετικού υλικού και την επακόλουθη βιοπληροφορική ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων του δείγματος.

Στο στάδιο της αλληλούχησης, τα θραύσματα DNA αλληλουχούνται μαζικά με τη χρήση σύγχρονων τεχνολογιών υψηλής απόδοσης (NGS). Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ενός τεράστιου όγκου δεδομένων, που αποτελείται από εκατομμύρια μικρές αλληλουχίες DNA (reads). Αυτές οι αλληλουχίες στη συνέχεια αναλύονται με εξειδικευμένα βιοπληροφορικά εργαλεία, τα οποία τις συγκρίνουν με βάσεις δεδομένων,

επιτρέποντας την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών από τους οποίους προέρχονται και την αναγνώριση των γονιδίων και των πιθανών λειτουργιών που κωδικοποιούν (Sohn & Nam, 2018).

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της WMS είναι ότι δεν περιορίζεται μόνο στην ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, αλλά παρέχει και πληροφορίες για τις λειτουργίες τους. Για παράδειγμα, μπορούμε να εντοπίσουμε γονίδια, που σχετίζονται με την αποικοδόμηση οργανικών ρύπων, την αντοχή σε αντιβιοτικά ή την παραγωγή τοξινών. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την αξιολόγηση της ποιότητας των υγρών αποβλήτων και της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών επεξεργασίας. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την ανακάλυψη νέων ή μη καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών, καθώς και την ανακατασκευή ολόκληρων γονιδιωμάτων από περιβαλλοντικά δείγματα.

Σε σύγκριση με την αλληλούχηση 16S rRNA, η WMS προσφέρει πολύ υψηλότερη ανάλυση, φτάνοντας συχνά μέχρι το επίπεδο του είδους ή και του στελέχους. Επιπλέον, επιτρέπει την ανίχνευση και άλλων μικροοργανισμών πέρα από τα βακτήρια, όπως ιών, πρωτόζωων και μυκήτων, κάτι που δεν είναι εφικτό με τη μέθοδο 16S. Έτσι, παρέχει μια πιο ολοκληρωμένη και ρεαλιστική εικόνα της μικροβιακής κοινότητας.

Ωστόσο, η μέθοδος παρουσιάζει και ορισμένες προκλήσεις. Είναι πιο δαπανηρή και απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και ισχυρή υπολογιστική υποστήριξη για την ανάλυση των δεδομένων. Επιπλέον, η επεξεργασία και ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι πιο πολύπλοκη, ενώ μπορεί να υπάρξουν δυσκολίες στη σύνδεση των γονιδίων με συγκεκριμένους οργανισμούς σε πολύπλοκα δείγματα.

Συνολικά, η μεταγονιδιωματική αλληλούχηση WMS αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τη σε βάθος μελέτη των μικροβιακών κοινοτήτων. Η μέθοδος επιτρέπει την ανάλυση του συνολικού γενετικού περιεχομένου ενός δείγματος, παρέχοντας πληροφορίες τόσο για τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας όσο και για το λειτουργικό της δυναμικό. Η προσέγγιση αυτή είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στην περιβαλλοντική μικροβιολογία και τη διαχείριση υγρών αποβλήτων.

Μία περαιτέρω εξέλιξη των μεταγονιδιωματικών τεχνικών αποτελεί η μεταμεταγραφωμική (metatranscriptomics), η οποία επικεντρώνεται στην ανάλυση του εκφραζόμενου RNA (Πίνακας 6). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη διερεύνηση της ενεργής λειτουργικής κατάστασης των μικροβιακών κοινοτήτων, καθώς ανιχνεύει τα γονίδια που

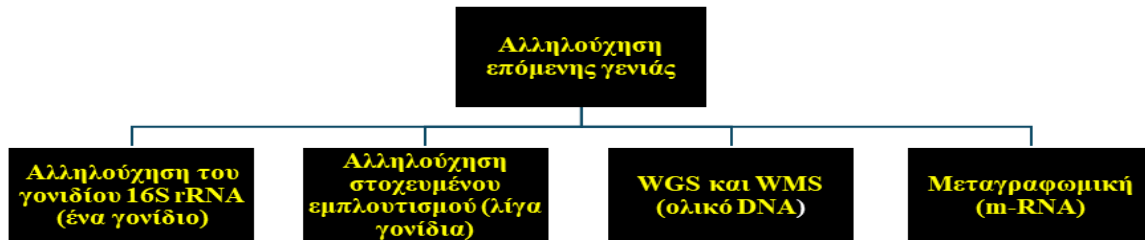
εκφράζονται σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή (Mahajna, et al., 2025). Με τον τρόπο αυτό παρέχει πληροφορίες για τις βιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα απόβλητα και συμβάλλει στην κατανόηση της πραγματικής μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών.

Πίνακας 6: Σύγκριση μεταγονιδιωματικής και μεταμεταγραφωμικής ανάλυσης.

Μεταγονομική	Μεταμεταγραφωμική
Αναλύεται DNA	Αναλύεται mRNA
Αφορά όλα τα υπάρχοντα γονίδια	Αφορά τα εκφραζόμενα (ενεργά) γονίδια
Δεν διαχωρίζει ζωντανούς από νεκρούς μικροοργανισμούς	Διαχωρίζει ζωντανούς από νεκρούς μικροοργανισμούς
Ταξινομική ανάλυση πολύ υψηλή	Ταξινομική ανάλυση υψηλή
Υψηλή σταθερότητα δείγματος (DNA σταθερό)	Χαμηλή σταθερότητα δείγματος (mRNA ασταθές)
Τεχνική δυσκολία και κόστος υψηλό	Τεχνική δυσκολία και κόστος υψηλότερο

Η τεχνική **Target Enrichment Sequencing** βασίζεται επίσης στην αλληλούχηση νέας γενιάς (NGS) και χρησιμοποιείται για την ανάλυση συγκεκριμένων γονιδίων ή περιοχών του DNA (Εικόνα 25). Σε αντίθεση με τη μεταγονιδιωματική αλληλούχηση ολικού γονιδιώματος (WMS), όπου αναλύεται το συνολικό γενετικό υλικό ενός δείγματος, η συγκεκριμένη τεχνική επικεντρώνεται σε επιλεγμένα γονίδια ή σε προκαθορισμένες αλληλουχίες που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον (Baba et al., 2023). Έχει αναπτυχθεί για την αύξηση της ευαισθησίας ανίχνευσης μικροοργανισμών ή γενετικών στόχων που εμφανίζονται σε χαμηλή αφθονία μέσα σε ένα σύνθετο μικροβιακό υπόβαθρο (Kantor & Jiang, 2024). Βασίζεται στη χρήση ειδικών ανιχνευτών (probes), που υβριδοποιούνται στις επιθυμητές γενετικές αλληλουχίες, επιτρέποντας την επιλεκτική ενίσχυσή τους (επιλεκτικός εμπλουτισμός) πριν την αλληλούχηση. Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά, την απομόνωση του DNA από το βιολογικό δείγμα και στη συνέχεια τον τεμαχισμό του σε μικρότερα θραύσματα. Ακολουθεί το στάδιο του εμπλουτισμού, όπου οι ανιχνευτές δεσμεύονται στις περιοχές-στόχους και επιτρέπουν την απομόνωση των αντίστοιχων θραυσμάτων. Τα επιλεγμένα τμήματα συλλέγονται και πολλαπλασιάζονται (εμπλουτισμός), ώστε να υπάρχουν σε επαρκή ποσότητα για αλληλούχηση. Τέλος, πραγματοποιείται η αλληλούχηση μέσω τεχνολογιών NGS και η ανάλυση των παραγόμενων δεδομένων με βιοπληροφορικά εργαλεία. Η ενσωμάτωση προηγμένων βιοπληροφορικών και υπολογιστικών εργαλείων, συμπεριλαμβανομένων

τεχνικών μηχανικής μάθησης και τεχνητής νοημοσύνης, έχει συμβάλει στη βελτίωση της επεξεργασίας και ερμηνείας των δεδομένων που προκύπτουν από τις παραπάνω μεθόδους.

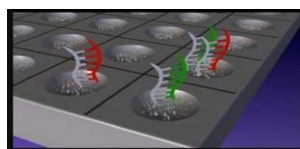


Εικόνα 25: Συγκριτική απεικόνιση προσεγγίσεων αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) για την ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι είναι πιο οικονομική και γρήγορη σε σχέση με την πλήρη αλληλούχιση γονιδιώματος, αφού επικεντρώνεται μόνο σε περιοχές ενδιαφέροντος. Ωστόσο, η τεχνική παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς π.χ. ο σχεδιασμός των ανιχνευτών απαιτεί καλή γνώση του γονιδιώματος και μπορεί να είναι χρονοβόρος.

3.2.10 Μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays)

Οι μικροσυστοιχίες DNA (DNA microarrays) αποτελούν μια μοριακή τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για την ταυτόχρονη ανίχνευση και ταυτοποίηση πολλών μικροοργανισμών ή γονιδίων σε ένα δείγμα (Εικόνα 26). Πρόκειται για μια στερεή επιφάνεια πάνω στην οποία είναι διατεταγμένες χιλιάδες μικροσκοπικές θέσεις (spots), καθεμία από τις οποίες περιέχει ακινητοποιημένους ανιχνευτές DNA (DNA probes) ειδικούς για συγκεκριμένες αλληλουχίες-στόχους. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων του DNA, δηλαδή στην ικανότητα δύο μονόκλωνων αλληλουχιών να υβριδοποιούνται μεταξύ τους όταν παρουσιάζουν συμπληρωματική αλληλουχία. Όταν το γενετικό υλικό του δείγματος περιέχει την αντίστοιχη αλληλουχία-στόχο, αυτή δεσμεύεται στον κατάλληλο ανιχνευτή, επιτρέποντας την ανίχνευση και ποσοτική εκτίμησή της (Srinivasan, et al., 2017).



Εικόνα 26: DNA microarrays

(Πηγή: <https://www.avensonline.org/blog/wp-content/uploads/2016/04/Micro-array.jpg>)

Η διαδικασία ξεκινά με την απομόνωση του DNA από το υπό μελέτη δείγμα, όπως για παράδειγμα από υγρά απόβλητα. Το συνολικό DNA, που λαμβάνεται, περιέχει γενετικό υλικό από όλους τους μικροοργανισμούς του δείγματος. Στη συνέχεια, το DNA αυτό υφίσταται ενίσχυση (συνήθως με PCR) και σημαίνεται με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες, ώστε τα παραγόμενα σήματα υβριδοποίησης να μπορούν να ανιχνευθούν μέσω της πλατφόρμας DNA microarray.

Ακολουθεί το στάδιο της υβριδοποίησης, το οποίο αποτελεί το βασικό βήμα της μεθόδου. Το σημασμένο DNA του δείγματος τοποθετείται πάνω στη μικροσυστοιχία και εφόσον περιέχει αλληλουχίες συμπληρωματικές με αυτές των ανιχνευτών που βρίσκονται ακινητοποιημένες στα spots της πλακέτας, θα υβριδοποιηθούν μαζί τους. Επομένως, η παρουσία ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού ή γονιδίου στο δείγμα οδηγεί στη δέσμευση του αντίστοιχου γενετικού στόχου στο συγκεκριμένο σημείο της μικροσυστοιχίας (Vale, 2016).

Μετά την ολοκλήρωση της υβριδοποίησης, η μικροσυστοιχία υποβάλλεται σε διαδοχικά στάδια έκπλυσης για την απομάκρυνση των μη ειδικά ή μη δεσμευμένων μορίων DNA. Στη συνέχεια, αναλύεται με ειδικό σαρωτή φθορισμού, ο οποίος ανιχνεύει και καταγράφει την εκπεμπόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία από τους υβριδοποιημένους ανιχνευτές. Η εμφάνιση φθορίζοντων σημάτων σε συγκεκριμένες θέσεις της μικροσυστοιχίας τεκμηριώνει την παρουσία των αντίστοιχων μικροοργανισμών ή γονιδιακών αλληλουχιών στο εξεταζόμενο δείγμα. Επιπλέον, η ένταση του φθορισμού συσχετίζεται με την ποσότητα του υβριδοποιημένου γενετικού υλικού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ημιποσοτική εκτίμηση της σχετικής αφθονίας των ανιχνευόμενων στόχων. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των DNA microarrays είναι ότι επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση μεγάλου αριθμού στόχων σε μία μόνο δοκιμή, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα για την παρακολούθηση πολύπλοκων μικροβιακών κοινοτήτων. Στην περίπτωση των υγρών αποβλήτων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών, γονιδίων αντοχής σε αντιβιοτικά ή γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοαποικοδόμηση ρύπων.

Ωστόσο, η μέθοδος έχει και περιορισμούς. Μπορεί να ανιχνεύσει μόνο τα γονίδια ή τους μικροοργανισμούς, για τους οποίους υπάρχουν ήδη γνωστές αλληλουχίες στη μικροσυστοιχία, επομένως δεν είναι κατάλληλη για την ανακάλυψη νέων ή άγνωστων οργανισμών. Επιπλέον, απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και προσεκτικό σχεδιασμό, ώστε

να αποφεύγονται μη ειδικές υβριδοποιήσεις, που μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένα αποτελέσματα.

Συνολικά, τα DNA microarrays αποτελούν μια γρήγορη και αποδοτική μέθοδο για την ανίχνευση και ταυτοποίηση γνωστών μικροοργανισμών και γονιδίων σε σύνθετα περιβαλλοντικά δείγματα. Επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση και ταυτοποίηση μεγάλου αριθμού μικροβιακών στόχων σε ένα μόνο δείγμα, μέσω παράλληλων αντιδράσεων υβριδοποίησης. Η δυνατότητα αυτή παρέχει μια ολοκληρωμένη εικόνα της μικροβιακής κοινότητας και των λειτουργικών γονιδίων που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα, συμβάλλοντας ουσιαστικά στη μελέτη της μικροβιακής σύστασης, της βιοποικιλότητας και των βιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων.

3.3 Βιοχημικές μέθοδοι

3.3.1 Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA

Η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) αποτελεί μία από τις πλέον διαδεδομένες ανοσολογικές τεχνικές για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση βιολογικών μορίων, όπως αντιγόνα και αντισώματα. Στον τομέα της περιβαλλοντικής μικροβιολογίας, η ELISA χρησιμοποιείται εκτενώς για την ανίχνευση μικροοργανισμών ή μικροβιακών προϊόντων σε αστικά λύματα, τόσο πριν όσο και μετά από διαδικασίες επεξεργασίας. Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής συμβάλλει σημαντικά στην αξιολόγηση της μικροβιακής ποιότητας των υδάτων και στην προστασία της δημόσιας υγείας.

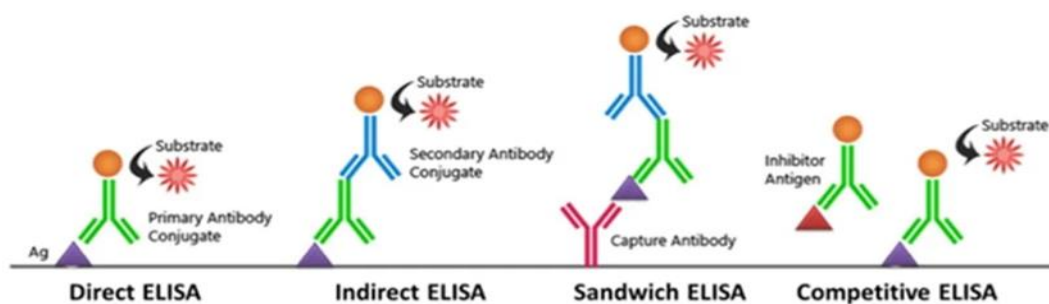
Η βασική αρχή της ELISA στηρίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος. Στην περίπτωση ανίχνευσης μικροοργανισμών, στόχος είναι συνήθως κάποιο αντιγόνο, που προέρχεται από τον μικροοργανισμό (π.χ. επιφανειακές πρωτεΐνες ή τοξίνες). Τα χρησιμοποιούμενα αντισώματα είναι ειδικά για το συγκεκριμένο αντιγόνο και συνδέονται με αυτό με υψηλή εκλεκτικότητα. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται μέσω ενός ενζύμου συζευγμένου συνηθέστερα με το αντίσωμα και το οποίο καταλύει μία χρωμογόνο αντίδραση, παράγοντας μετρήσιμο σήμα.

Η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA περιλαμβάνει τέσσερις κύριες μορφές (Εικόνα 27), οι οποίες διαφοροποιούνται ως προς τη μεθοδολογία ανίχνευσης και την εφαρμογή τους. Η άμεση ELISA (Direct ELISA) βασίζεται στην προσρόφηση του αντιγόνου στην επιφάνεια της μικροπλάκας και στην ανίχνευσή του μέσω ενός πρωτογενούς αντισώματος

συζευγμένου άμεσα με ένζυμο, προσφέροντας απλότητα και ταχύτητα, αλλά συχνά περιορισμένη ευαισθησία. Η έμμεση ELISA (Indirect ELISA) χρησιμοποιεί μη σημασμένο πρωτογενές αντίσωμα και ένα δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ένζυμο για την ανίχνευση, γεγονός που αυξάνει την ευαισθησία. Η **sandwich ELISA** αποτελεί μια ιδιαίτερα ειδική και ευαίσθητη παραλλαγή της ELISA, στην οποία το αντιγόνο παγιδεύεται μεταξύ δύο αντισωμάτων (αντίσωμα σύλληψης και αντίσωμα ανίχνευσης), καθιστώντας τη μέθοδο κατάλληλη για ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών ή βιοδεικτών σε σύνθετα βιολογικά δείγματα, όπως είναι τα περιβαλλοντικά. Αναλυτικότερα, ένα αντίσωμα σύλληψης (capture antibody) ακινητοποιείται στην επιφάνεια μιας μικροπλάκας. Με την προσθήκη του δείγματος, εφόσον υπάρχει το υπό ανίχνευση αντιγόνο, αυτό δεσμεύεται ειδικά από το αντίσωμα. Στη συνέχεια προστίθεται το αντίσωμα ανίχνευσης (detection antibody), το οποίο αναγνωρίζει και συνδέεται σε διαφορετική περιοχή του ίδιου αντιγόνου. Το αντίσωμα ανίχνευσης είναι συζευγμένο με ένζυμο το οποίο παρουσία κατάλληλου υποστρώματος προκαλεί χρωματική αντίδραση ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιγόνου. Τέλος η ανταγωνιστική μέθοδος ELISA (**Competitive ELISA**) αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη ανοσοενζυμική τεχνική για την ποσοτική ανίχνευση αντιγόνων χαμηλού μοριακού βάρους. Η αρχή της βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ του αντιγόνου, που περιέχεται στο προς εξέταση δείγμα και ενός σημασμένου αντιγόνου γνωστής συγκέντρωσης για έναν περιορισμένο αριθμό θέσεων σύνδεσης σε ειδικά αντισώματα (το αντίσωμα λειτουργεί ειδικός παράγοντας δέσμευσης σε σταθερή επιφάνεια, επί του οποίου ανταγωνίζονται το σημασμένο και το μη σημασμένο αντιγόνο). Κατά τη διαδικασία, όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αντιγόνου στο δείγμα, τόσο μικρότερη ποσότητα σημασμένου αντιγόνου δεσμεύεται, οδηγώντας σε μειωμένο ενζυμικό σήμα. Συνεπώς, η ένταση του παραγόμενου χρώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη, γεγονός που διαφοροποιεί την ανταγωνιστική ELISA από άλλες μορφές της μεθόδου. Οι τέσσερις αυτές μορφές αποτελούν τις βασικότερες παραλλαγές της ELISA και επιλέγονται ανάλογα με τις απαιτήσεις ευαισθησίας, ειδικότητας και το είδος του υπό εξέταση δείγματος (Aydin, 2015).

Στην τεχνική ELISA, τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται ως δείκτες ανίχνευσης είναι συνδεδεμένα με αντισώματα ή αντιγόνα και επιτρέπουν την ανίχνευση μέσω παραγωγής μετρήσιμου σήματος. Τα συνηθέστερα ένζυμα είναι η υπεροξειδάση HRP και η αλκαλική

φωσφατάση, λόγω της υψηλής καταλυτικής τους δραστηριότητας και σταθερότητας. Τα ένζυμα αυτά δρουν πάνω σε ειδικά υποστρώματα, όπως το TMB (3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη) για την HRP ή το pNPP (p-νιτροφαινυλοφωσφορικό) για την αλκαλική φωσφατάση, οδηγώντας σε ανάπτυξη χρώματος. Η ένταση του παραγόμενου χρωματικού σήματος είναι ανάλογη ή αντίστροφη της συγκέντρωσης του αναλύτη, ανάλογα με τον τύπο της ELISA και προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά, επιτρέποντας την ποσοτική ανάλυση του δείγματος.



Εικόνα 27: Τύποι ELISA

(Πηγή: <https://microbiologynotes.org/elisa-principle-types-uses-advantages-and-disadvantages/>)

Η εφαρμογή της ELISA σε αστικά λύματα απαιτεί κατάλληλη προετοιμασία των δειγμάτων. Τα λύματα αποτελούν πολύπλοκα δείγματα με υψηλό φορτίο οργανικών και ανόργανων ουσιών, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την απόδοση της μεθόδου. Συνήθως προηγείται στάδιο προεπεξεργασίας, το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει διήθηση, φυγοκέντρηση και συμπύκνωση των μικροοργανισμών, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της ανίχνευσης. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτείται λύση των κυττάρων για την απελευθέρωση ενδοκυττάρων αντιγόνων.

Στα μη επεξεργασμένα αστικά λύματα, η ELISA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, μύκητες, ιοί και πρωτόζωα, καθώς και για την ανίχνευση τοξινών, παραγόμενων από αυτά. Η υψηλή μικροβιακή επιβάρυνση αυτών των δειγμάτων καθιστά τη μέθοδο ιδιαίτερα χρήσιμη για την επιδημιολογική παρακολούθηση και την εκτίμηση της δημόσιας υγείας (Wang et al., 2007). Στα επεξεργασμένα λύματα, η εφαρμογή της ELISA έχει ως στόχο την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των διεργασιών επεξεργασίας, όπως η βιολογική επεξεργασία και η απολύμανση. Η ανίχνευση υπολειμματικών παθογόνων μικροοργανισμών μετά την

επεξεργασία αποτελεί σημαντικό δείκτη για την ασφάλεια της επαναχρησιμοποίησης των υδάτων ή της απόρριψής τους στο περιβάλλον.

Η ELISA παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα ως μέθοδος ανίχνευσης. Είναι σχετικά γρήγορη, ευαίσθητη και επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Επιπλέον, δεν απαιτεί καλλιέργεια μικροοργανισμών, γεγονός που μειώνει τον χρόνο ανάλυσης και επιτρέπει την ανίχνευση μη καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών. Η δυνατότητα ποσοτικοποίησης μέσω μέτρησης της απορρόφησης καθιστά τη μέθοδο ιδιαίτερα χρήσιμη για συγκριτικές μελέτες.

Ωστόσο, η μέθοδος παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς. Η παρουσία ανασταλτικών ουσιών στα λύματα μπορεί να επηρεάσει την ειδικότητα και την ευαισθησία της ανίχνευσης. Επιπλέον, η ELISA ανιχνεύει αντιγόνα και όχι απαραίτητα ζωντανούς μικροοργανισμούς, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε υπερεκτίμηση του μικροβιακού κινδύνου (Kfir & Genthe, 1993). Τέλος, η ανάγκη για ειδικά αντισώματα περιορίζει την εφαρμογή της σε γνωστούς και καλά χαρακτηρισμένους μικροοργανισμούς (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ELISA

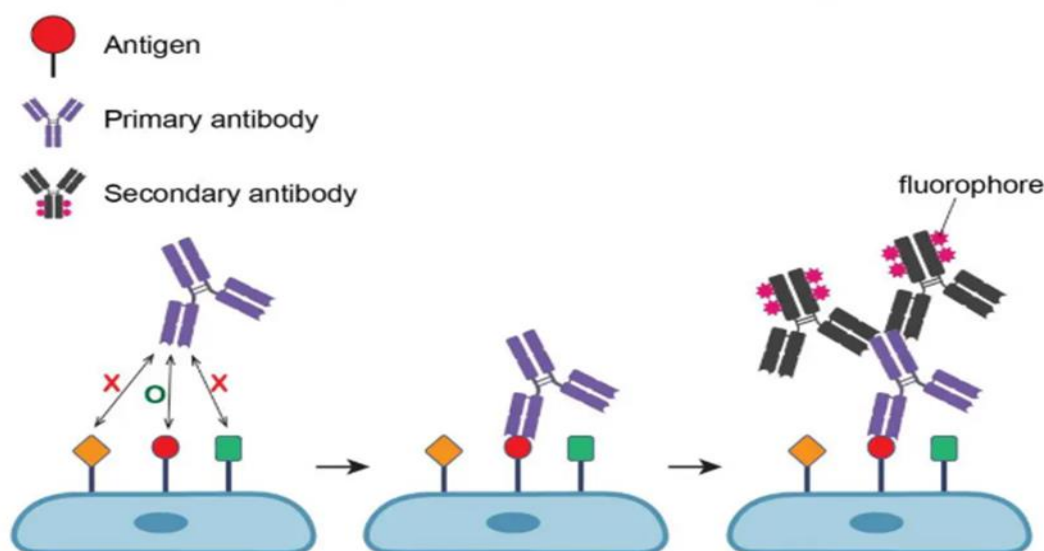
Συμπερασματικά, η μέθοδος ELISA αποτελεί ένα αξιόπιστο και αποτελεσματικό εργαλείο για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε αστικά λύματα, τόσο σε ακατέργαστη όσο και σε επεξεργασμένη μορφή. Η ευαισθησία, η ταχύτητα και η ευκολία εφαρμογής της την καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμη για περιβαλλοντική παρακολούθηση και έλεγχο ποιότητας υδάτων, συμβάλλοντας σημαντικά στην προστασία της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος.

3.3.2 Ο ανοσοφθορισμός IF

Ο ανοσοφθορισμός (Immunofluorescence) αποτελεί μία σύγχρονη και ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση μικροοργανισμών, η οποία βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου με αντίσωμα και στη χρήση φθορίζουσών χρωστικών ουσιών. Η τεχνική αυτή αξιοποιεί την ικανότητα των αντισωμάτων να αναγνωρίζουν και να συνδέονται με συγκεκριμένα αντιγόνα, τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των μικροβιακών κυττάρων (Joshi & Yu, 2017), επιτρέποντας έτσι την επιλεκτική ανίχνευση συγκεκριμένων ειδών μικροοργανισμών μέσα σε σύνθετα δείγματα, όπως τα υγρά απόβλητα.

Η βασική αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει τη σήμανση αντισωμάτων με φθορίζουσες ουσίες (φθοριοχρώματα), όπως η φλουορεσκεΐνη (FITC) ή η ροδαμίνη. Όταν τα σημασμένα αντισώματα συνδεθούν με το αντίστοιχο αντιγόνο στόχο και το δείγμα εκτεθεί σε κατάλληλο μήκος κύματος φωτός (συνήθως υπεριώδες), τα φθοριοχρώματα εκπέμπουν ορατό φως, το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί με τη βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού. Έτσι, τα μικρόβια, που φέρουν το συγκεκριμένο αντιγόνο εμφανίζονται φωτεινά σε σκοτεινό υπόβαθρο, επιτρέποντας την άμεση οπτική τους αναγνώριση.

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι ανοσοφθορισμού ο άμεσος και ο έμμεσος (Wheatley & Wang, 1998). Στον άμεσο ανοσοφθορισμό, το πρωτογενές αντίσωμα, που συνδέεται με το αντιγόνο είναι ήδη σημασμένο με φθοριοχρώμα. Η μέθοδος αυτή είναι ταχύτερη και απλούστερη, αλλά ενδέχεται να έχει χαμηλότερη ευαισθησία. Αντίθετα, στον έμμεσο ανοσοφθορισμό (Εικόνα 29) χρησιμοποιείται ένα μη σημασμένο πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο αναγνωρίζει το αντιγόνο και στη συνέχεια ένα δευτερογενές αντίσωμα σημασμένο με φθοριοχρώμα συνδέεται με το πρωτογενές. Η προσέγγιση αυτή ενισχύει το σήμα, καθώς πολλαπλά δευτερογενή αντισώματα μπορούν να συνδεθούν με ένα πρωτογενές, αυξάνοντας την ευαισθησία της ανίχνευσης.



Εικόνα 29: Έμμεσος ανοσοφθορισμός
(Πηγή: <https://rsscience.com/fluorescence-microscope/>)

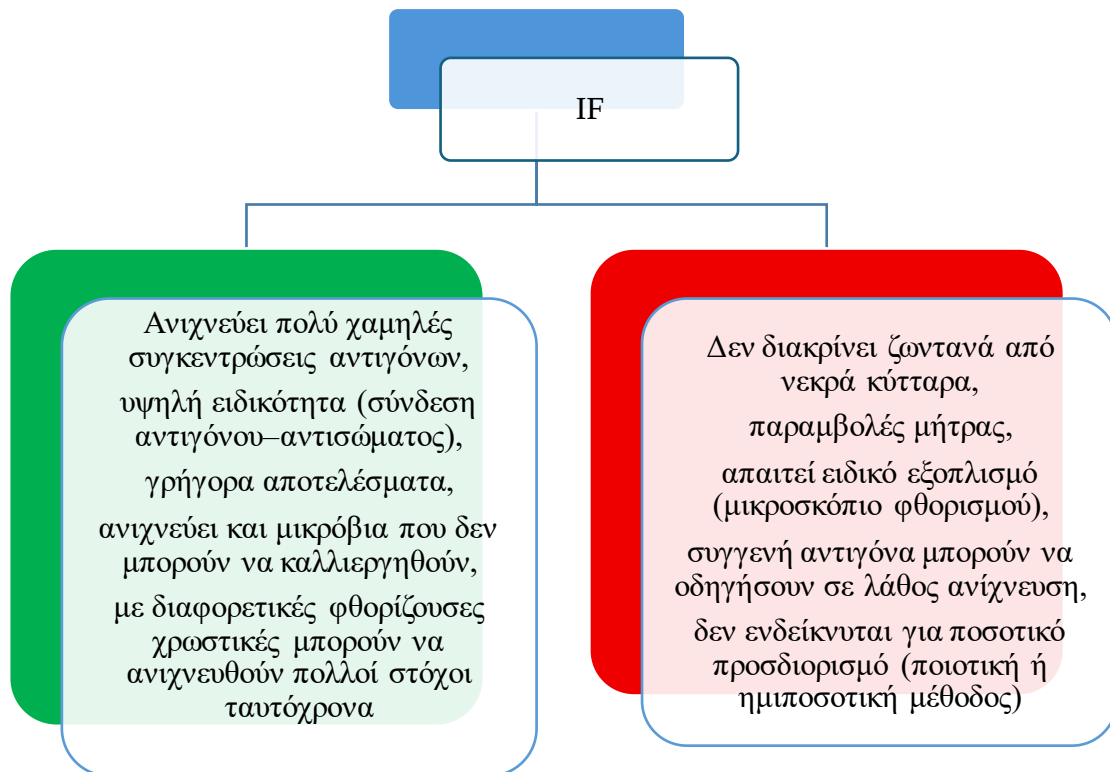
Η εφαρμογή της μεθόδου στα υγρά απόβλητα απαιτεί αρχικά κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει συγκέντρωση μικροοργανισμών μέσω διήθησης και στερέωσή τους σε αντικειμενοφόρες πλάκες. Ακολουθεί η επώαση με τα κατάλληλα αντισώματα υπό ελεγχόμενες συνθήκες, η απομάκρυνση των μη δεσμευμένων αντισωμάτων μέσω πλύσεων και τέλος, η παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Ο Πίνακας 7 δείχνει μερικές ομοιότητες και διαφορές ανάμεσα σε ELISA και IF.

Πίνακας 7: Ομοιότητες και διαφορές ανάμεσα σε ELISA και IF.

ELISA	IF
Βασίζεται σε σύνδεση αντιγόνου με αντίσωμα	Βασίζεται σε σύνδεση αντιγόνου με αντίσωμα
Υψηλή ειδικότητα	Υψηλή ειδικότητα
Ενζυμική αντίδραση για παραγωγή χρώματος	Φθορίζουσα χρωστική
Ποσοτική	Ημιποσοτική, ποιοτική
Μικροπλάκες (συνήθως 96 θέσεων) και φασματοφωτομετρο	Αντικειμενοφόρες πλάκες και μικροσκόπιο φθορισμού

Ο ανοσοφθορισμός παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως υψηλή ειδικότητα και ταχύτητα, καθώς δεν απαιτεί καλλιέργεια των μικροοργανισμών και μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και μη καλλιεργήσιμες μορφές. Επιπλέον, παρέχει τη δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλαπλών στόχων με τη χρήση διαφορετικών φθοριοχρωμάτων. Ωστόσο,

υπάρχουν και περιορισμοί, όπως η ανάγκη για εξειδικευμένο εξοπλισμό και αντισώματα υψηλής ποιότητας, καθώς και το ενδεχόμενο μη ειδικών δεσμεύσεων, που μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα (Εικόνα 30).



Εικόνα 30: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ανοσοφθορισμού

Συμπερασματικά, ο ανοσοφθορισμός αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο στη μικροβιολογική ανάλυση, ιδιαίτερα χρήσιμο για την ταχεία και αξιόπιστη ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε περιβαλλοντικά δείγματα. Σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους, όπως οι καλλιέργειες και οι μοριακές τεχνικές, συμβάλλει ουσιαστικά στη συνολική αξιολόγηση της μικροβιακής ποιότητας και της υγιεινομικής ασφάλειας των υδάτινων πόρων.

3.4 Άλλες μέθοδοι

3.4.1 Βιοαισθητήρες

Οι βιοαισθητήρες (biosensors) εμφανίστηκαν τη δεκαετία του 1960 από τους πρωτοπόρους Clark και Lyons (Mehrotra, 2016). Οι βιοαισθητήρες μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με το είδος του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης ή τον τρόπο με τον οποίο μετατρέπουν το βιολογικό σήμα σε μετρήσιμο αποτέλεσμα. Η κατηγοριοποίηση αυτή είναι σημαντική, καθώς κάθε τύπος παρουσιάζει διαφορετικά πλεονεκτήματα και εφαρμογές, ιδιαίτερα στη μικροβιολογική ανάλυση και στην παρακολούθηση υγρών αποβλήτων.

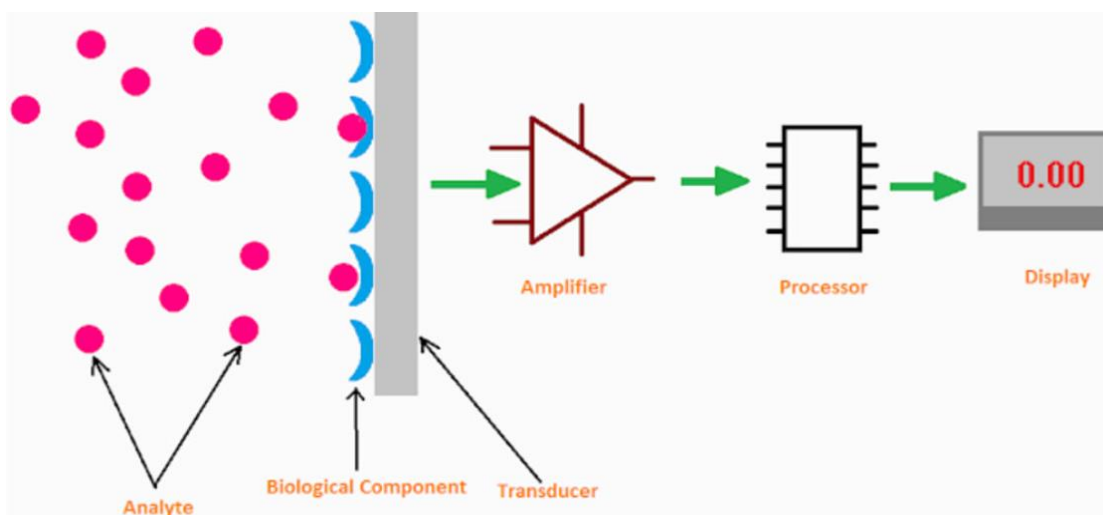
Μία βασική κατηγορία είναι οι βιοαισθητήρες με βάση το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι ανοσοαισθητήρες, οι οποίοι βασίζονται στην αλληλεπίδραση αντιγόνου–αντισώματος και χαρακτηρίζονται από υψηλή ειδικότητα για την ανίχνευση μικροοργανισμών ή βιομορίων. Μια άλλη κατηγορία είναι οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι βασίζονται στη δράση ενζύμων και χρησιμοποιούνται συχνά για την ανίχνευση οργανικών ενώσεων ή μεταβολικών προϊόντων. Επιπλέον, υπάρχουν και βιοαισθητήρες, που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα (Skládal, 2016), οι οποίοι μπορούν να ανιχνεύσουν συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA ή RNA.

Μια δεύτερη βασική κατηγοριοποίηση αφορά τον τύπο του μετατροπέα, δηλαδή τον τρόπο με τον οποίο το βιολογικό σήμα μετατρέπεται σε μετρήσιμο. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες είναι από τους πιο διαδεδομένους και βασίζονται στη μέτρηση ηλεκτρικών παραμέτρων, όπως η ένταση, η τάση ή η αγωγιμότητα. Οι οπτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται σε οπτικά φαινόμενα, όπως ο φθορισμός, η απορρόφηση ή η διάθλαση του φωτός. Οι πιεζοηλεκτρικοί (ή μαζικοί) βιοαισθητήρες ανιχνεύουν μεταβολές στη μάζα που προσροφάται στην επιφάνειά τους (Ahmed et al., 2014), ενώ υπάρχουν και θερμικοί βιοαισθητήρες, που μετρούν αλλαγές στη θερμοκρασία λόγω βιοχημικών αντιδράσεων.

Επιπρόσθετα, οι βιοαισθητήρες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση το πεδίο εφαρμογής τους. Για παράδειγμα, υπάρχουν περιβαλλοντικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση ρύπων και μικροοργανισμών σε νερό και λύματα, ιατρικοί βιοαισθητήρες, που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση ασθενειών, καθώς και βιοαισθητήρες τροφίμων για τον έλεγχο της ασφάλειας και της ποιότητας των προϊόντων.

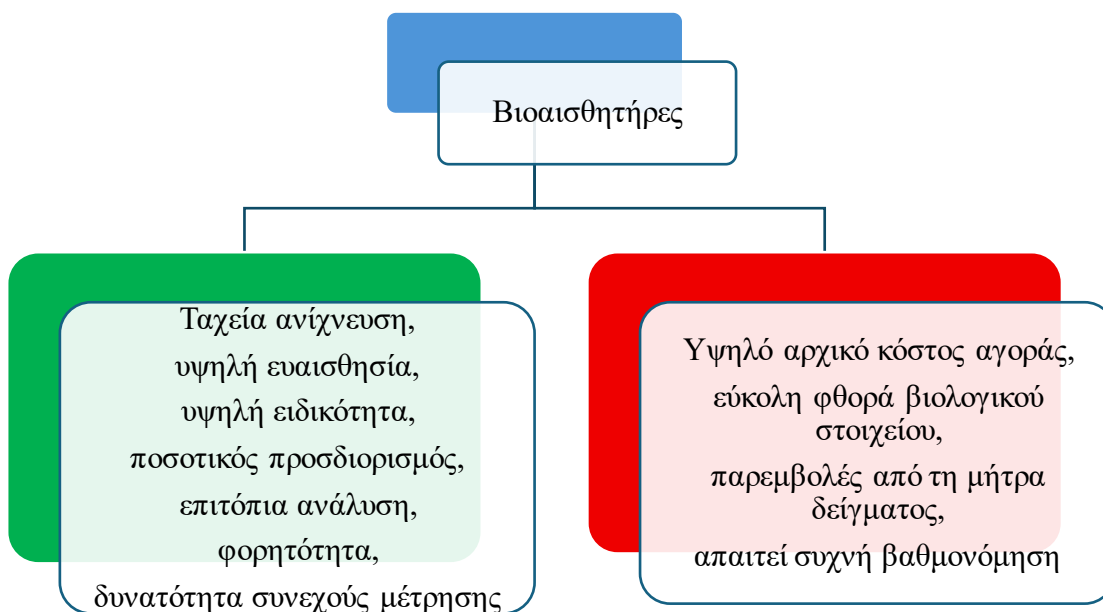
Τέλος, μια πιο σύγχρονη κατηγορία περιλαμβάνει τους βιοαισθητήρες νέας γενιάς, όπως οι νανοβιοαισθητήρες, οι οποίοι αξιοποιούν νανοϋλικά για αυξημένη ευαισθησία και ακρίβεια, καθώς και οι φορητοί και «έξυπνοι» βιοαισθητήρες, που συνδέονται με ψηφιακές συσκευές και επιτρέπουν την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο.

Ανεξάρτητα από τον τύπο τους, οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από τρία βασικά μέρη. Το πρώτο είναι το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης, το οποίο μπορεί να είναι ένα αντίσωμα, ένα ένζυμο, ένα τμήμα DNA ή ακόμα και ένα κύτταρο. Αυτό το στοιχείο είναι υπεύθυνο για την ειδική αναγνώριση του στόχου προς ανίχνευση. Το δεύτερο μέρος είναι ο μετατροπέας, ο οποίος μετατρέπει την αλληλεπίδραση μεταξύ του στόχου και του βιολογικού στοιχείου σε ένα φυσικό σήμα. Το τρίτο μέρος είναι το σύστημα καταγραφής και επεξεργασίας του παραγόμενου σήματος (Karunakaran et al., 2015), το οποίο παρουσιάζει το αποτέλεσμα σε μορφή κατανοητή για τον χρήστη, όπως αριθμητική ένδειξη ή γραφική απεικόνιση σε οθόνη (Εικόνα 31).



Εικόνα 31: Δομή και αρχή λειτουργίας ενός βιοαισθητήρα
(Πηγή: <https://vocal.media/education/biosensors>)

Η λειτουργία ενός βιοαισθητήρα είναι σχετικά απλή. Όταν στο δείγμα (π.χ. υγρά απόβλητα) υπάρχει ο μικροοργανισμός στόχος, αυτός συνδέεται ειδικά με το βιολογικό στοιχείο του αισθητήρα. Αυτή η σύνδεση προκαλεί μια αλλαγή (π.χ. στην αγωγιμότητα, στο pH ή στην ένταση του φωτός), η οποία ανιχνεύεται από τον μετατροπέα και μετατρέπεται σε μετρήσιμο σήμα. Το σήμα αυτό συσχετίζεται με την παρουσία και σε ορισμένες περιπτώσεις, τη συγκέντρωση του μικροοργανισμού.



Εικόνα 32: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες αποτελούν μια σύγχρονη και ταχέως αναπτυσσόμενη τεχνολογία για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών, προσφέροντας γρήγορα και συχνά επιτόπια (*in situ*) αποτελέσματα. Πρόκειται για αναλυτικές διατάξεις που συνδυάζουν ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης με έναν μετατροπέα σήματος, επιτρέποντας τη μετατροπή μιας βιολογικής αλληλεπίδρασης σε μετρήσιμο ηλεκτρικό, οπτικό ή άλλο φυσικό σήμα. Στον τομέα της περιβαλλοντικής παρακολούθησης και ειδικότερα στην ανάλυση υγρών αποβλήτων, οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται για την ταχεία ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών, τοξινών ή γονιδίων αντοχής σε αντιβιοτικά. Ένα σημαντικό πλεονέκτημά τους είναι ότι μπορούν να παρέχουν αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο, χωρίς την ανάγκη πολύπλοκων και χρονοβόρων εργαστηριακών διαδικασιών, όπως οι καλλιέργειες. Επιπλέον, πολλοί βιοαισθητήρες είναι φορητοί και μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας στο πεδίο.

Ωστόσο, η τεχνολογία αυτή βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη και παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς. Η ευαισθησία και η ειδικότητά τους μπορεί να επηρεάζονται από την πολυπλοκότητα του δείγματος, όπως συμβαίνει στα υγρά απόβλητα, τα οποία περιέχουν μεγάλο αριθμό οργανικών και ανόργανων ουσιών που ενδέχεται να παρεμβαίνουν στη διαδικασία ανίχνευσης. Επίσης, η σταθερότητα των βιολογικών στοιχείων και το κόστος

ανάπτυξης και εγκατάστασης ορισμένων συστημάτων μπορεί να αποτελούν παράγοντες που περιορίζουν την ευρεία εφαρμογή τους (Εικόνα 32).

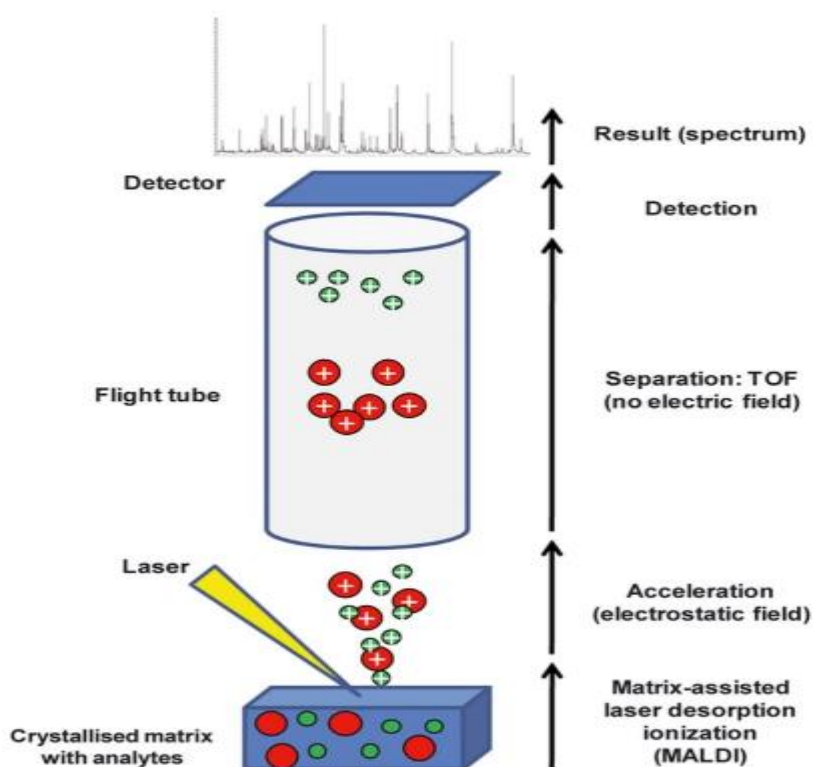
Συνολικά, οι βιοαισθητήρες αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη νέα τεχνολογία για την ταχεία, αξιόπιστη και αυτοματοποιημένη ανίχνευση μικροοργανισμών, που τους καθιστά πολύτιμα εργαλεία για τη διαχείριση και τον έλεγχο της ποιότητας των υγρών αποβλήτων, συμβάλλοντας παράλληλα στην προστασία της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος.

3.4.2 Φασματομετρία μάζας MALDI-TOF

Η φασματομετρία μάζας (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry, MS) είναι μια αναλυτική τεχνική, η οποία βασίζεται στον ιονισμό χημικών ενώσεων και στη μέτρηση του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) των παραγόμενων ιόντων. Ανακαλύφθηκε στις αρχές του 1900 και το πεδίο εφαρμογής της περιοριζόταν στις χημικές επιστήμες. Ωστόσο, η ανάπτυξη του ιονισμού με «ψεκασμό» ηλεκτρονίων (ESI) και του ιονισμού με εκρόφηση λέιζερ με υποβοήθηση μήτρας (MALDI) τη δεκαετία του 1980 επέκτεινε την εφαρμογή της MS σε μεγάλα βιολογικά μόρια, όπως οι πρωτεΐνες. Τόσο στην τεχνική ESI όσο και στην MALDI, τα πεπτίδια μετατρέπονται σε ιόντα με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ή περισσότερων πρωτονίων. Και οι δύο βασίζονται σε μεθόδους «ήπιου ιονισμού», όπου ο σχηματισμός ιόντων δεν οδηγεί σε σημαντική απώλεια της ακεραιότητας του δείγματος. Η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF έχει ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι της ESI. Συγκεκριμένα, παράγει μονοφορτισμένα ιόντα, διευκολύνοντας την ερμηνεία των δεδομένων. Επιπλέον, για ανάλυση με ESI, απαιτείται προηγούμενος διαχωρισμός με χρωματογραφία, ο οποίος δεν είναι απαραίτητος για την ανάλυση MALDI-TOF. Συνεπώς, η υψηλή απόδοση και η ταχύτητα έχουν καταστήσει το φασματόμετρο μάζας MALDI-TOF μία από τις σημαντικότερες τεχνικές στην πρωτεωμική και τη μικροβιολογική ταυτοποίηση.

Το δείγμα για ανάλυση με MALDI-TOF παρασκευάζεται με ανάμειξη ή επικάλυψη με μια ενεργειακά απορροφητική οργανική ένωση, την μήτρα. Όταν η μήτρα κρυσταλλώνεται κατά την ξήρανση, το παγιδευμένο δείγμα μέσα στη μήτρα, επίσης κρυσταλλώνεται. Το δείγμα μέσα στη μήτρα ιονίζεται με δέσμη λέιζερ. Η εκρόφηση και ο ιονισμός με τη δέσμη λέιζερ παράγουν μεμονωμένα πρωτονιωμένα ιόντα από τους αναλύτες στο δείγμα. Τα πρωτονιωμένα ιόντα στη συνέχεια επιταχύνονται σε ένα σταθερό δυναμικό, όπου αυτά διαχωρίζονται μεταξύ τους με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z). Η αναλογία m/z ενός ιόντος μετριέται προσδιορίζοντας τον απαιτούμενο

χρόνο, για να διανύσει το μήκος του σωλήνα πτήσης. Οι φορτισμένοι αναλύτες ανιχνεύονται και μετρώνται χρησιμοποιώντας διαφορετικούς τύπους αναλυτών μάζας, όπως τετραπολικούς αναλυτές μάζας, αναλυτές παγίδευσης ιόντων, αναλυτές χρόνου πτήσης (TOF) κ.λπ. Για μικροβιολογικές εφαρμογές χρησιμοποιούνται κυρίως αναλυτές μάζας TOF. Με βάση τις πληροφορίες TOF, δημιουργείται ένα χαρακτηριστικό φάσμα, ονομαζόμενο δακτυλικό αποτύπωμα μάζας πεπτιδίων (PMF) για τους αναλύτες στο δείγμα (Singhal et al., 2015). Το «μοριακό αποτύπωμα» του μικροοργανισμού συγκρίνεται με αντίστοιχα φάσματα από βάσεις δεδομένων, οδηγώντας στην ταυτοποίησή του με υψηλή ακρίβεια (Εικόνα 33).



Εικόνα 33: Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών

(Πηγή: <https://cloverbiosoft.com/using-of-maldi-tof-in-hospitals/>)

Η παρακολούθηση της μικροβιακής σύστασης των αστικών υγρών αποβλήτων αποτελεί σημαντική παράμετρο για την προστασία της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος. Τα αστικά λύματα, τόσο στην πρωτογενή τους μορφή, όσο και μετά από διαδικασίες επεξεργασίας, περιέχουν μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών, μεταξύ των οποίων

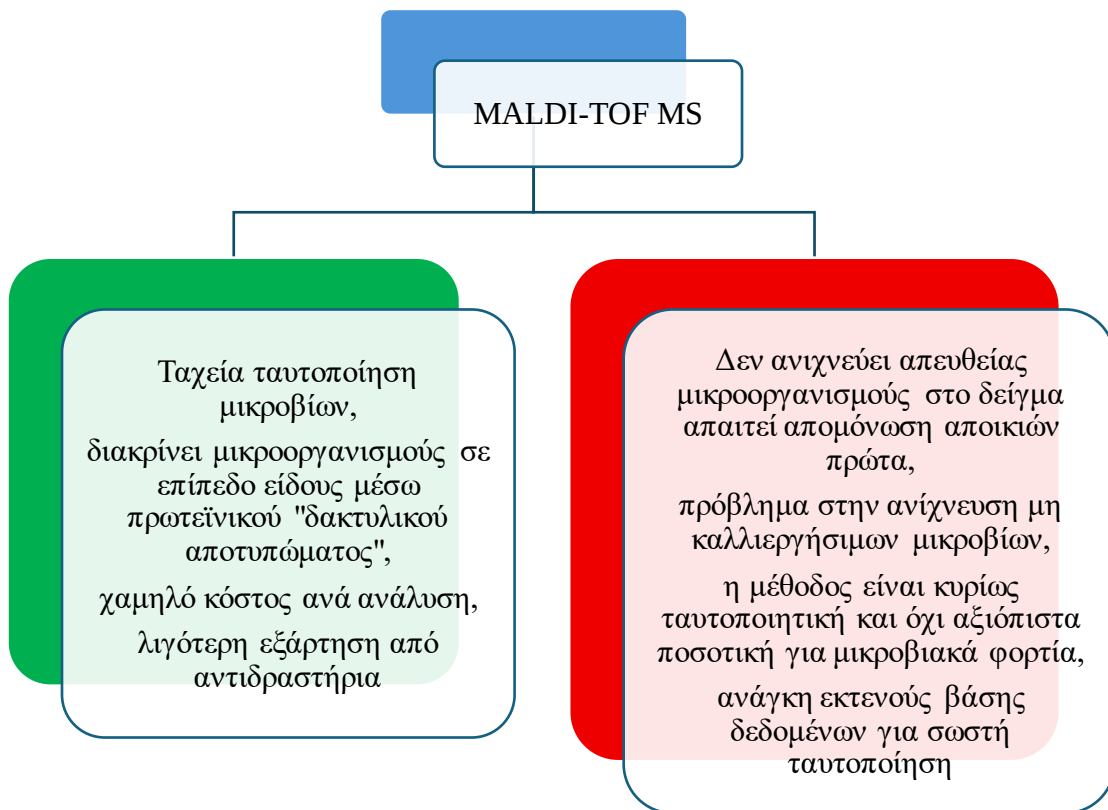
περιλαμβάνονται παθογόνα βακτήρια, ιοί, πρωτόζωα και μύκητες. Η παρουσία αυτών των μικροοργανισμών καθιστά απαραίτητη την ανάπτυξη αξιόπιστων και ταχέων μεθόδων για την ανίχνευση και ταυτοποίησή τους. Οι συμβατικές μικροβιολογικές τεχνικές βασίζονται κυρίως σε καλλιεργητικές και βιοχημικές μεθόδους, οι οποίες είναι συχνά χρονοβόρες και ενδέχεται να παρουσιάζουν περιορισμούς ως προς την ακρίβεια και την ικανότητα ανίχνευσης συγκεκριμένων ειδών. Στο πλαίσιο αυτό, η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS έχει αναδειχθεί ως μια σύγχρονη και αποτελεσματική τεχνική για ταχεία ταυτοποίηση μικροοργανισμών.

Η εφαρμογή της MALDI-TOF MS στην ανάλυση αστικών λυμάτων προϋποθέτει συνήθως την απομόνωση μικροοργανισμών μέσω καλλιέργειας, ώστε να εξασφαλίζεται η λήψη καθαρών αποικιών για ανάλυση. Παρόλο που η απαίτηση αυτή περιορίζει εν μέρει την ταχύτητα της διαδικασίας, η συνολική διάρκεια ταυτοποίησης παραμένει σημαντικά μικρότερη σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί προσεγγίσεις, οι οποίες επιδιώκουν την άμεση ανάλυση μικτών μικροβιακών κοινοτήτων, χωρίς προηγούμενη καλλιέργεια, ωστόσο οι εφαρμογές αυτές βρίσκονται ακόμη σε ερευνητικό στάδιο. Η MALDI-TOF MS επιτρέπει την αξιόπιστη ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών και σε ορισμένες περιπτώσεις, τη διάκριση μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Αυτό την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών και την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών επεξεργασίας.

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η ταχύτητα ανάλυσης, καθώς η ταυτοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα σε λίγα λεπτά από τη στιγμή της προετοιμασίας του δείγματος (Suzuki et al., 2018). Επιπλέον, η μέθοδος χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια, χαμηλό κόστος ανά ανάλυση μετά την αρχική επένδυση σε εξοπλισμό και δυνατότητα αυτοματοποίησης, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για εφαρμογές ρουτίνας. Σε σύγκριση με μοριακές τεχνικές, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, η MALDI-TOF MS δεν απαιτεί εκτεταμένη προετοιμασία γενετικού υλικού απλοποιώντας σημαντικά τη διαδικασία ανάλυσης.

Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, η τεχνική παρουσιάζει και ορισμένους περιορισμούς. Η προαναφερόμενη ανάγκη για καλλιέργεια μικροοργανισμών αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα, ιδιαίτερα για μη καλλιεργήσιμους εύκολα μικροοργανισμούς σε εργαστηριακές συνθήκες. Επιπλέον, οι υπάρχουσες βάσεις δεδομένων είναι συχνά

προσανατολισμένες σε κλινικά στελέχη, περιορίζοντας την αποτελεσματικότητα της ταυτοποίησης σε περιβαλλοντικά δείγματα. Η πολυπλοκότητα της σύστασης των αστικών λυμάτων, καθώς και η παρουσία μικτών μικροβιακών κοινοτήτων, δυσχεραίνουν την άμεση ανάλυση και μπορεί να επηρεάσουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Επίσης, η ευαισθησία της μεθόδου μειώνεται σε περιπτώσεις χαμηλού μικροβιακού φορτίου, γεγονός που μπορεί να περιορίσει την ικανότητα ανίχνευσης σπάνιων ή χαμηλής αφθονίας μικροοργανισμών (Εικόνα 34).



Εικόνα 34: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τεχνικής MALDI-TOF MS

Οι μελλοντικές εξελίξεις στον τομέα της MALDI-TOF MS αναμένεται να επικεντρωθούν στη βελτίωση των βάσεων δεδομένων, ώστε να περιλαμβάνουν μεγαλύτερο εύρος περιβαλλοντικών μικροοργανισμών, καθώς και στην ανάπτυξη τεχνικών που θα επιτρέπουν την άμεση ανάλυση δειγμάτων, χωρίς προηγούμενη καλλιέργεια. Επιπλέον, η συνδυαστική χρήση της με μοριακές μεθόδους μπορεί να ενισχύσει την ακρίβεια και την πληρότητα των αποτελεσμάτων.

4 Συμπεράσματα

Η γνώση της ποιοτικής και ποσοτικής μικροβιακής σύστασης των αστικών υγρών αποβλήτων τόσο πριν, όσο και μετά την επεξεργασία τους, αποτελεί θεμελιώδους σημασίας ζήτημα για την προστασία της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος. Η ανάλυση των ανεπεξέργαστων λυμάτων παρέχει πολύτιμες πληροφορίες με επιδημιολογικό ενδιαφέρον, καθώς η έγκαιρη ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών βοηθά στην λήψη μέτρων από την πολιτεία, ώστε να περιοριστεί η εξάπλωση λοιμωδών νοσημάτων, περιορίζοντας έτσι μελλοντικά την ασκούμενη πίεση στο σύστημα υγείας. Επιπλέον, ιδιαίτερη σημασία έχει η συστηματική παρακολούθηση των μη παθογόνων μικροοργανισμών που συμμετέχουν στις βιολογικές διεργασίες επεξεργασίας των αστικών υγρών αποβλήτων, καθώς η παρουσία και η δυναμική τους αποτελούν κρίσιμους δείκτες της ορθής λειτουργίας και της αποδοτικότητας του συστήματος. Η έγκαιρη ανίχνευση μεταβολών στη μικροβιακή κοινότητα επιτρέπει την εφαρμογή κατάλληλων διορθωτικών παρεμβάσεων, συμβάλλοντας στην πρόληψη λειτουργικών προβλημάτων και στη διασφάλιση της επιτυχούς έκβασης της επεξεργασίας.

Μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας το ενδιαφέρον εστιάζεται κυρίως στην παρουσία παθογόνων με σκοπό την ασφαλή για τη δημόσια υγεία διάθεση των εκροών είτε σε υδάτινους, είτε σε χερσαίους αποδέκτες. Η άρδευση καλλιεργειών για παράδειγμα αποτελεί μια σημαντική εφαρμογή αξιοποίησης-επαναχρησιμοποίησης κατάλληλα επεξεργασμένων υγρών αστικών αποβλήτων (Pedrero et al., 2010), συμβάλλοντας στην εξοικονόμηση νερού, ιδιαίτερα σε περιοχές με πρόβλημα λειψυδρίας.

Η συγκριτική αξιολόγηση των τεχνικών ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών, που παρουσιάζει ο Πίνακας 8, καταδεικνύει ότι σαφώς ότι δεν υπάρχει μία καθολικά βέλτιστη μέθοδος για όλα τα είδη δειγμάτων αστικών υγρών αποβλήτων. Αντίθετα, η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής εξαρτάται από τον σκοπό της ανάλυσης (ποιοτικός ή ποσοτικός προσδιορισμός), το απαιτούμενο επίπεδο ευαισθησίας, τη διαθεσιμότητα εξοπλισμού, καθώς και τη φύση του δείγματος (επεξεργασμένο ή μη επεξεργασμένο λύμα).

Οι συμβατικές μέθοδοι, όπως η μικροσκοπική παρατήρηση και οι καλλιεργητικές τεχνικές, εξακολουθούν να αποτελούν βασικά εργαλεία, κυρίως λόγω της απλότητας και του χαμηλού κόστους τους. Ωστόσο, η μικροσκοπία παρουσιάζει περιορισμούς ως προς

την ευαισθησία και ειδικότητα, αφού η αποτελεσματικότητά της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εμπειρία-παρατηρητικότητα του χειριστή. Επίσης η οπτική μικροσκοπία παρουσιάζει περιορισμένες περιορισμένη διακριτική ικανότητα (τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια, τα οποία επιτυγχάνουν μεγάλες μεγεθύνσεις είναι πολύ ακριβά και παρουσιάζουν δυσκολίες στη δημιουργία παρασκευασμάτων). Στις καλλιεργητικές μεθόδους η αδυναμία ανίχνευσης μη καλλιεργήσιμων μικροοργανισμών και ο μεγάλος χρόνος ανάλυσης, περιορίζουν τη χρησιμότητά τους σε σύγχρονες εφαρμογές περιβαλλοντικής παρακολούθησης. Η διεθνής βιβλιογραφία επιβεβαιώνει ότι μεγάλο ποσοστό μικροοργανισμών σε περιβαλλοντικά δείγματα δεν μπορεί να καλλιεργηθεί με συμβατικές τεχνικές, οδηγώντας σε υποεκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας.

Αντίθετα, οι μοριακές τεχνικές, με κυρίαρχη την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και τις παραλλαγές της (qPCR, multiplex PCR, ψηφιακή PCR), έχουν μετασηματίσει τη μικροβιολογική ανάλυση. Οι μέθοδοι αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, επιτρέποντας την ανίχνευση ακόμη και πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων μικροβιακού φορτίου, όπως συχνά συμβαίνει στα επεξεργασμένα αστικά λύματα. Ιδιαίτερα η ποσοτική και η ψηφιακή PCR παρέχουν αξιόπιστη ποσοτικοποίηση, με την τελευταία να προσφέρει απόλυτη μέτρηση, χωρίς την ανάγκη χρήσης πρότυπων καμπυλών. Ωστόσο, παρά τα πλεονεκτήματά τους, οι τεχνικές αυτές χαρακτηρίζονται από την αδυναμία διάκρισης μεταξύ ζωντανών και νεκρών μικροοργανισμών και είναι ευάλωτες στην παρουσία αναστολέων, που συχνά υπάρχουν στα περιβαλλοντικά δείγματα, όπως τα αστικά υγρά απόβλητα.

Η ισοθερμική ενίσχυση LAMP είναι μια σύγχρονη τεχνική, που επιτρέπει την ταχεία αντιγραφή DNA σε σταθερή θερμοκρασία, χωρίς την ανάγκη θερμικού κυκλοποιητή, όπως στην PCR. Βασικά της πλεονεκτήματα είναι η ταχύτητα και η απλότητα, καθώς μπορεί να δώσει αποτελέσματα σε λιγότερο από μία ώρα και να εφαρμοστεί ακόμη και σε περιορισμένα εργαστηριακά περιβάλλοντα ή στο πεδίο, καθώς και η υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Ωστόσο, η πολύπλοκη σχεδίαση των εκκινητών και ο αυξημένος κίνδυνος ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων αποτελούν παράγοντες, που περιορίζουν τη χρήση της σε ορισμένες εφαρμογές.

Οι τεχνολογίες αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS), συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης 16S rRNA (μόνο για βακτήρια), της μεταγονιδιωμικής και μεταγραφωμικής προσέγγισης, παρέχουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της μικροβιακής κοινότητας.

Ιδιαίτερα στα αστικά υγρά απόβλητα, όπου συνυπάρχει μεγάλος αριθμός διαφορετικών μικροοργανισμών, οι μέθοδοι αυτές επιτρέπουν την ανίχνευση άγνωστων ή μη καλλιεργήσιμων ειδών και τη μελέτη της μικροβιακής ποικιλότητας σε βάθος. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η μεταγονιδιωματική ανάλυση έχει αναδειχθεί ως κρίσιμο εργαλείο για την επιδημιολογική επιτήρηση, ιδιαίτερα για την παρακολούθηση ιών ή γονιδίων αντοχής σε αντιβιοτικά σε λύματα. Παρόλα αυτά, το υψηλό κόστος, η ανάγκη εξειδικευμένης βιοπληροφορικής ανάλυσης και η πολυπλοκότητα ερμηνείας των δεδομένων περιορίζουν την ευρεία εφαρμογή τους σε αναλύσεις ρουτίνας.

Οι μικροσυστοιχίες αποτελούν μια ισχυρή τεχνολογία στη μοριακή βιολογία, επιτρέποντας την ταυτόχρονη ανάλυση πλήθους αλληλουχιών DNA σε ένα μόνο πείραμα. Χαρακτηρίζονται από καλή ευαισθησία και ειδικότητα, απαιτούν μικρή ποσότητα δείγματος και επιτρέπουν γρήγορη και αυτοματοποιημένη ανάλυση. Ένα ακόμη πλεονέκτημα τους είναι το σχετικά χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με νεότερες τεχνικές, όπως η αλληλούχηση επόμενης γενιάς. Ωστόσο, περιορίζονται στην ανίχνευση γνωστών αλληλουχιών για τις οποίες έχουν σχεδιαστεί ειδικοί ανιχνευτές, περιορίζοντας τη δυνατότητα ανακάλυψης νέων μικροοργανισμών, ενώ η πιθανότητα μη ειδικής υβριδοποίησης μπορεί να επηρεάσει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Τέλος, απαιτείται πολύ καλή ποιότητα δείγματος και προσεκτικός σχεδιασμός πειράματος, καθώς διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Τεχνικές όπως η κυτταρομετρία ροής και οι ανοσολογικές μέθοδοι (ELISA και ανοσοφθορισμός) προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε επίπεδο ταχύτητας. Η κυτταρομετρία ροής, επιτρέπει τη γρήγορη ποσοτικοποίηση και χαρακτηρισμό μικροβιακών κυττάρων, καθώς και την εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους. Ωστόσο, απαιτεί υψηλό κόστος εξοπλισμού και εξειδικευμένο προσωπικό. Οι ανοσολογικές μέθοδοι είναι πιο προσιτές, αλλά εξαρτώνται έντονα από την ποιότητα και την ειδικότητα των χρησιμοποιούμενων αντισωμάτων, δεν βοηθούν στον εντοπισμό νέων μικροβίων, αφού τα χρησιμοποιούμενα αντισώματα προορίζονται για συγκεκριμένους προκαθορισμένους μικροβιακούς στόχους και δεν διακρίνουν νεκρά από ζωντανά κύτταρα.

Οι βιοαισθητήρες αποτελούν σημαντικά εργαλεία ανίχνευσης μικροοργανισμών, με κύρια πλεονεκτήματα την υψηλή ευαισθησία, την ταχύτητα απόκρισης και τη δυνατότητα άμεσης ανάλυσης, χωρίς πολύπλοκη προετοιμασία δείγματος. Χρησιμοποιούνται ευρέως στην περιβαλλοντική παρακολούθηση. Πολλοί βιοαισθητήρες είναι φορητοί και

εύχρηστοι, επιτρέποντας επιτόπιες μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο. Ωστόσο, η περιορισμένη σταθερότητα των βιολογικών στοιχείων αναγνώρισης (π.χ. ενζύμων), η πιθανότητα παρεμβολών από άλλες ουσίες, λόγω της σύνθετης σύστασης των περιβαλλοντικών δειγμάτων και το σχετικά υψηλό κόστος ανάπτυξης και κατασκευής εξακολουθούν να αποτελούν προκλήσεις για την ευρύτερη εφαρμογή τους.

Τέλος, τεχνικές όπως η MALDI-TOF MS γεφυρώνουν το χάσμα μεταξύ κλασικών και σύγχρονων μοριακών προσεγγίσεων, προσφέροντας ταχεία και αξιόπιστη ταυτοποίηση μικροοργανισμών, κυρίως σε καθαρές καλλιέργειες. Παρότι δεν εφαρμόζονται άμεσα σε σύνθετα περιβαλλοντικά δείγματα χωρίς προεπεξεργασία, αποτελούν πολύτιμο εργαλείο για επιβεβαίωση ταυτοποίησης σε εργαστηριακό επίπεδο. Σε σύγκριση με άλλες τεχνικές, η MALDI-TOF MS προσφέρει έναν συνδυασμό ταχύτητας και αξιοπιστίας, με σχετικά χαμηλό λειτουργικό κόστος, καθιστώντας την ιδιαίτερα ελκυστική. Οι καλλιεργητικές μέθοδοι, όπως προαναφέρθηκε, αν και απλές και οικονομικές είναι χρονοβόρες, ενώ οι μοριακές τεχνικές προσφέρουν υψηλή ευαισθησία, αλλά συνοδεύονται από αυξημένο κόστος και ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού. Οι τεχνικές αλληλούχησης επόμενης γενιάς παρέχουν ολοκληρωμένη εικόνα του μικροβιώματος, ωστόσο το κόστος και η πολυπλοκότητά τους, περιορίζουν τη χρήση τους σε εφαρμογές ρουτίνας.

Συνολικά, τα συμπεράσματα, που προκύπτουν, καταδεικνύουν ότι η βέλτιστη στρατηγική για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε αστικά υγρά απόβλητα βασίζεται σε έναν συνδυασμό τεχνικών. Οι κλασικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά, ενώ οι μοριακές αποτελούν τον πυρήνα της σύγχρονης μικροβιολογικής ανάλυσης. Παράλληλα, άλλες προσεγγίσεις, όπως οι βιοαισθητήρες, οι ανοσολογικές μέθοδοι και η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF MS, προσφέρουν πρόσθετες δυνατότητες ταχείας και εξειδικευμένης ανίχνευσης. Η σύγχρονη τάση στη διεθνή βιβλιογραφία συγκλίνει προς την υιοθέτηση ολοκληρωμένων και πολυπαραμετρικών προσεγγίσεων, οι οποίες συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα διαφορετικών τεχνολογιών και επιτρέπουν πιο αξιόπιστη, ευαίσθητη και ολοκληρωμένη εκτίμηση της μικροβιακής σύστασης. Η προσέγγιση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για σύνθετα περιβαλλοντικά δείγματα, όπως τα αστικά υγρά απόβλητα, όπου η υψηλή μικροβιακή ποικιλότητα και η παρουσία ποικίλων παρεμβαλλόμενων ουσιών καθιστούν αναγκαία τη χρήση πολλαπλών αναλυτικών εργαλείων. Ως εκ τούτου, η συνδυαστική αξιοποίηση συμβατικών και σύγχρονων μεθόδων αναμένεται να διαδραματίσει

καθοριστικό ρόλο στη μελλοντική παρακολούθηση της μικροβιακής ποιότητας των αστικών λυμάτων και στην προστασία της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος.

Πίνακας 8: Σύγκριση τεχνικών ανίχνευσης μικροοργανισμών.

Μέθοδος	Τρόπος λειτουργίας	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Μικροσκοπική παρατήρηση	Η μικροσκοπία βασίζεται στη διέλευση ή αλληλεπίδραση φωτός (συνηθέστερα) ή ηλεκτρονίων με δείγμα, επιτρέποντας μεγέθυνση και απεικόνιση μικροσκοπικών δομών με λεπτομέρεια.	Απλό μικροσκόπιο: Άμεση παρατήρηση μορφολογίας, ταχύτητα, χαμηλό κόστος, απλότητα, δυνατότητα εκτίμησης βιωσιμότητας, χωρίς περίπλοκη προετοιμασία ή ειδικά αντιδραστήρια και εξειδικευμένο εξοπλισμό εργαστηρίου.	Απλό μικροσκόπιο: Χαμηλή ευαισθησία, περιορισμένη ειδικότητα, αδυναμία ακριβούς ταυτοποίησης, δυσκολία ανίχνευσης σπάνιων μικροοργανισμών, εξάρτηση από εμπειρία παρατηρητή.
Κυτταρομετρία ροής	Κύτταρα σε ρευστό διέρχονται μεμονωμένα από λέιζερ, ανιχνεύεται σκέδαση και φθορισμός, επιτρέποντας ταυτόχρονη ποσοτική και ποιοτική ανάλυση χαρακτηριστικών τους.	Υψηλή ταχύτητα, ανάλυση κυττάρων σε πραγματικό χρόνο, πολυπαραμετρική μέτρηση, υψηλή ευαισθησία, ποσοτικοποίηση, αυτοματοποίηση, ελάχιστη προετοιμασία δείγματος.	Ακριβός εξοπλισμός, ανάγκη εξειδικευμένου προσωπικού, περιορισμένη μορφολογική πληροφορία, απαιτητική βαθμονόμηση, ευαισθησία σε θόρυβο, ανάγκη μονοκυτταρικών εναιωρημάτων, περίπλοκη ανάλυση δεδομένων.
Μεμβράνες φίλτρα	Φιλτράρισμα με μεμβράνες χαρακτηριστικού μεγέθους πόρων	Ανίχνευση μικροοργανισμών χαμηλής συγκέντρωσης π.χ. στα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα.	Απώλεια μικροοργανισμών κατά τη διαδικασία του φιλτραρίσματος, φράξιμο πόρων φίλτρου.
	Ανάπτυξη σε	Απλή διαδικασία	Χρονοβόρα

Μικροβιακές καλλιέργειες	θρεπτικό μέσο (ή σε κυτταροκαλλιέργεια για ιούς)	με χαμηλό κόστος	διαδικασία. Μερικά μικρόβια δεν μπορούν να καλλιεργηθούν
Κλασική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	Επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης, υβριδοποίησης εκκινητών και επιμήκυνσης DNA με πολυμεράση οδηγούν σε εκθετική ενίσχυση συγκεκριμένης αλληλουχίας στόχου <i>in vitro</i> .	Υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα, ταχεία ανίχνευση DNA μικροβίων, σχετικά χαμηλό κόστος εξοπλισμού, δυνατότητα ανίχνευσης δύσκολα καλλιεργήσιμων μικροβίων.	Δεν ποσοτικοποιεί άμεσα, ευαίσθητη σε αναστολές, απαιτεί σχεδιασμό εκκινητών, δεν διακρίνει ζωντανά από νεκρά μικρόβια.
Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	Μετρά σε πραγματικό χρόνο την ενίσχυση DNA μέσω φθορισμού, επιτρέποντας ακριβή ποσοτικοποίηση αρχικού γενετικού υλικού δείγματος.	Υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα, ποσοτικοποίηση σε πραγματικό χρόνο, ταχύτητα, αυτοματοποίηση.	Υψηλότερο κόστος, εξάρτηση από καμπύλες, αναστολές επηρεάζουν αποτελέσματα, απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό εκκινητών.
Πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	Επιτρέπει ταυτόχρονη ενίσχυση πολλαπλών στόχων DNA χρησιμοποιώντας διαφορετικά ζεύγη εκκινητών σε μία αντίδραση.	Ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών στόχων, εξοικονόμηση χρόνου, χαμηλότερο κόστος, λιγότερο δείγμα.	Πολύπλοκος σχεδιασμός εκκινητών, πιθανές αλληλεπιδράσεις, μειωμένη ευαισθησία ανά στόχο, αυξημένος κίνδυνος μη ειδικών προϊόντων, απαιτεί εμπειρία.
Ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	Διαχωρίζει το δείγμα σε πολλά διαμερίσματα, ανιχνεύει ή όχι σήματα και υπολογίζει απόλυτο αριθμό μορίων DNA στόχου.	Υπερυψηλή ευαισθησία, ακριβής απόλυτη ποσοτικοποίηση, χωρίς πρότυπα, ανθεκτικότητα σε αναστολές, υψηλή επαναληψιμότητα, ιδανική για χαμηλό φορτίο DNA.	Υψηλό κόστος εξοπλισμού και αντιδραστηρίων, περιορισμένη διαθεσιμότητα, πολύπλοκη ανάλυση δεδομένων, απαιτεί εξειδίκευση προσωπικού και χρήση υπολογιστών.

Ισοθερμική ενίσχυση	Πολλαπλασιάζει DNA ή RNA σε σταθερή θερμοκρασία, χρησιμοποιώντας ειδικά ένζυμα, χωρίς θερμικούς κύκλους, προσφέροντας γρήγορη και απλή ανίχνευση.	Γρήγορη ενίσχυση, ισοθερμική διαδικασία, χωρίς θερμικό κυκλοποιητή, υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα, απλότητα, χαμηλό κόστος, ανίχνευση επί τόπου, κατάλληλη για πεδίου εφαρμογές.	Πολύπλοκος σχεδιασμός εκκινητών, δυσκολία πολλαπλής ανίχνευσης, μη ειδικές αντιδράσεις, περιορισμένη ποσοτικοποίηση, χαμηλότερη ευελιξία συγκριτικά με PCR τεχνικές.
Αλληλούχηση επόμενης γενιάς	Ταυτόχρονη αλληλούχηση εκατομμυρίων μικρών τμημάτων DNA. Για πλήρη γονιδιωματική ή στοχευμένη αλληλουχία.	Μαζική παράλληλη ανάλυση, ανίχνευση άγνωστων μικροβίων, ταυτόχρονη μελέτη γονιδιωμάτων, μεγάλη πληροφορία δεδομένων.	Υψηλό κόστος, πολύπλοκη ανάλυση δεδομένων, ανάγκη βιοπληροφορικής, χρονοβόρα διαδικασία, εξειδικευμένος εξοπλισμός, δυσκολία ερμηνείας.
16s RNA αλληλούχηση	Απομόνωση DNA, PCR ενίσχυση 16S rRNA γονιδίου, αλληλούχηση, σύγκριση βάσεων δεδομένων, ταυτοποίηση βακτηρίων.	Ταυτοποίηση βακτηρίων χωρίς καλλιέργεια, ανίχνευση άγνωστων ειδών, φυλογενετική ανάλυση, ευρεία εφαρμογή, υψηλή ευαισθησία, ειδικότητα, χρήσιμη σε μικροβιακές κοινότητες μελέτη.	Χαμηλή διακριτική ικανότητα ειδών, δεν ανιχνεύει εκτός από βακτήρια άλλα μικρόβια, περιορισμένη ποσοτικοποίηση, εξάρτηση από βάσεις δεδομένων.
Μεταγονιδιωματική αλληλούχηση ολικού γονιδιώματος	Απομόνωση συνολικού DNA, αλληλούχηση, βιοπληροφορική συναρμολόγηση, σύγκριση βάσεων για πλήρη	Ανίχνευση όλων των μικροοργανισμών, χωρίς καλλιέργεια, αναγνώριση άγνωστων.	Υψηλό κόστος, πολύπλοκη ανάλυση, ανάγκη βιοπληροφορικής, χρονοβόρα, δύσκολη ερμηνεία, απαιτεί

	ταυτοποίηση μικροοργανισμών.		εξειδίκευση και υποδομές.
Μικροσυστοιχίες DNA	Χρησιμοποιούν ανιχνευτές, που υβριδοποιούνται με συμπληρωματικές αλληλουχίες μικροοργανισμών, παράγουν φθορισμό και επιτρέπουν ταυτόχρονη, ειδική ανίχνευση πολλών ειδών.	Ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών μικροβίων, υψηλή ειδικότητα, αυτοματοποίηση, ταχύτητα.	Ανιχνεύει μόνο τα γονίδια ή τους μικροοργανισμούς, που υπάρχουν ήδη γνωστές αλληλουχίες στη μικροσυστοιχία (όχι νέων ή άγνωστων). Απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό και προσεκτικό σχεδιασμό για αποφυγή μη ειδικών υβριδοποιήσεων.
Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA	Χρησιμοποιεί αντισώματα, που δεσμεύουν αντιγόνα μικροοργανισμών, ένζυμο παράγει χρώμα μετά την προσθήκη υποστρώματος, επιτρέποντας την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση.	Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, ποσοτικά αποτελέσματα, σχετικά χαμηλό κόστος, δυνατότητα μαζικού ελέγχου, απλή εκτέλεση, δεν απαιτεί πολύπλοκο εξοπλισμό.	Πιθανές διασταυρούμενες αντιδράσεις, εξάρτηση από ποιότητα αντισωμάτων, δεν ξεχωρίζει ζωντανούς-νεκρούς μικροοργανισμούς.
Ανοσοφθορισμός	Χρησιμοποιεί αντισώματα με συνδεδεμένη φθορίζουσα χρωστική, που δεσμεύουν αντιγόνα μικροοργανισμών, εκπέμπουν φως, επιτρέποντας την ανίχνευση με μικροσκόπιο φθορισμού.	Υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, άμεση οπτική ανίχνευση αντιγόνων.	Απαιτεί ειδικά αντισώματα, πιθανές διασταυρούμενες αντιδράσεις, εξάρτηση από ποιότητα αντισωμάτων, ανάγκη εξειδικευμένου εξοπλισμού και εμπειρίας χρήστη.
	Χρησιμοποιούν βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης που δεσμεύει	Ταχεία ανίχνευση, υψηλή ευαισθησία, φορητότητα,	Περιορισμένη ειδικότητα, ευαισθησία σε παρεμβολές,

Βιοαισθητήρες	μικροοργανισμούς, μετατροπéας μετατρέπει σήμα σε ηλεκτρικό, επιτρέποντας γρήγορη, ευαίσθητη ανίχνευση.	δυνατότητα επιτόπιας χρήσης, αυτοματοποίηση, άμεση απόκριση, μικρή κατανάλωση δείγματος, χωρίς εκτεταμένη προετοιμασία, δυνατότητα παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο.	ανάγκη βαθμονόμησης, υψηλό αρχικό κόστος, περιορισμένη ευρεία εφαρμογή.
MALDI TOF MS	Χρησιμοποιεί λείζερ για ιονισμό πρωτεϊνών, μετρά χρόνο πτήσης ιόντων, συγκρίνει φάσματα και ταυτοποιεί μικροοργανισμούς γρήγορα.	Ταχεία ταυτοποίηση μικροβίων, χαμηλό κόστος ανά δείγμα, υψηλή ακρίβεια, απλή προετοιμασία, μεγάλα databases, ελάχιστα αναλώσιμα, αξιόπιστη επαναληψιμότητα.	Υψηλό αρχικό κόστος εξοπλισμού, ανάγκη ενημερωμένης βάσης δεδομένων, απαιτεί καθαρές καλλιέργειες, μειωμένη απόδοση σε άγνωστα είδη μικροοργανισμών.

5 Βιβλιογραφία

- Abdel Raouf, N., Al Homaidan, A., & Ibraheem, I. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), pp. 257-275.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Aghalari, Z., Dahms, H., Sillanpää, M., Hernandez, E., & Parra, R. (2020). Effectiveness of wastewater treatment systems in removing microbial agents: a systematic review. *Globalization and Health*, 16. doi:<https://doi.org/10.1186/s12992-020-0546-y>
- Ahmed, A., Rushworth, J., Hirst, N., & Millner, P. (2014). Biosensors for Whole -Cell Bacterial Detection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3).
doi:<https://doi.org/10.1128/cmr.00120-13>
- Allan, R., Barlow, M., Byrne, M., Cherchi, A., Douville, H., Fowler, H., . . . Zolina, O. (2020). Advances in understanding large-scale responses of the water cycle to climate change. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1472(1), pp. 49-75.
doi:<https://doi.org/10.1111/nyas.14337>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, pp. 4-15.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Azarmanesh, R., Zonoozi, M., & Ghiasinejad, H. (2020). Characterization of food waste and sewage sludge mesophilic anaerobic co-digestion under different mixing ratios of primary sludge, secondary sludge and food waste. *Biomass and Bioenergy*, 139. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105610>
- Baba, H., Kuroda, M., Sekizuka, T., & Kanamor, H. (2023). Highly sensitive detection of antimicrobial resistance genes in hospital wastewater using the multiplex hybrid capture target enrichment. *Clinical Microbiology*, 8(4).
doi:<https://doi.org/10.1128/msphere.00100-23>
- Basu, A. (2017). Digital Assays Part I: Partitioning Statistics and Digital PCR. *Journal of Laboratory Automation*, 22(4). doi:<https://doi.org/10.1177/2472630317705680>
- Bonadonna, L., Briancesco, R., & La Rosa, G. (2019). Innovative analytical methods for monitoring microbiological and virological water quality. *Microchemical Journal*, 150. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104160>
- Cao, Y., Raith, M., & Griffith, J. (2015). Droplet digital PCR for simultaneous quantification of general and human-associated fecal indicators for water quality assessment. *Water Research*, 70, pp. 337-349.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.008>
- Chai, X., Liu, S., Liu, C., Bai, J., Meng, J., & Tian, H. (2024). Surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater by quantitative PCR and digital PCR: a case study in Shijiazhuang city, Hebei province, China. *Emerging Microbes & Infections*, 13(1).
doi:<https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2324502>
- Chen, H., Zhou, W., Zhu, S., Liu, F., Qin, L., Xu, C., & Wang, Z. (2021). Biological nitrogen and phosphorus removal by a phosphorus-accumulating bacteria *Acinetobacter* sp. strain C-13 with the ability of heterotrophic nitrification-aerobic denitrification. *Bioresource Technology*, 322.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124507>

- Collivignarelli, M., Abbà, A., Benigna, I., Sorlini, S., & Torretta, V. (2017). Overview of the Main Disinfection Processes for Wastewater and Drinking Water Treatment Plants. *Sustainability*, 10(1). doi:<https://doi.org/10.3390/su10010086>
- Dalas, I., & Altae, M. (2021). Pathogenic organisms in sewage: a review. *Science Archives*, 2(3), pp. 258-266. doi:<http://dx.doi.org/10.47587/SA.2021.2318>
- Deepa, A., Mastan, A., & Buddolla, V. (2025). Advances in imaging techniques for real-time microbial visualization in wastewater treatment reactors: Challenges, applications, and process optimization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 188. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2025.118227>
- Derco, J., Guľašová, P., Legan, M., Zakhar, R., & Gotvajn, A. (2024). Sustainability Strategies in Municipal Wastewater Treatment. *Sustainability*, 16(20). doi:<https://doi.org/10.3390/su16209038>
- Fava, N., Cunha, M., Garcia, L., Maciel, P., Silva, F., Colombo-Corbi, V., . . . Sabogal-Paz, L. (2026). Overview of waterborne protozoa in Latin American water samples, detection methods and water treatment. *The Microbe*, 10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100650>
- Garner, E., Davis, B., Milligan, E., Blair, M., Keenum, I., Moskowicz, A., . . . Liguori, K. (2021). Next generation sequencing approaches to evaluate water and wastewater quality. *Water Research*, 194. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.116907>
- Gerba, C., & Pepper, I. (2019). Chapter 22 - Municipal Wastewater Treatment. *Environmental and Pollution Science (Third Edition)*, pp. 393-418. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814719-1.00022-7>
- González, Y., Gómez, G., Moeller-Chávez, G., & Vidal, G. (2023). UV Disinfection Systems for Wastewater Treatment: Emphasis on Reactivation of Microorganisms. *Sustainability*, 15(14). doi:<https://doi.org/10.3390/su151411262>
- Grabow, W., & Preez, M. (1979). Comparison of m-Endo LES, MacConkey, and Teepol media for membrane filtration counting of total coliform bacteria in water. *ASM Journals Applied and Environmental Microbiology*, 38(3). doi:<https://doi.org/10.1128/aem.38.3.351-358.1979>
- Guo, F., Ju, F., Cai, L., & Zhang, T. (2013). Taxonomic Precision of Different Hypervariable Regions of 16S rRNA Gene and Annotation Methods for Functional Bacterial Groups in Biological Wastewater Treatment. *PLOS One*. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076185>
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4). doi:<https://doi.org/10.1128/mmbr.68.4.669-685.2004>
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G., & Vogt, P. (1997). Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, 23(3), pp. 504-511. doi:<https://doi.org/10.2144/97233rr01>
- Higuchi, R., Gyllenstein, U., & Persing, D. (2011). Next-Generation DNA Sequencing and Microbiology. *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, Second Edition*. doi:<https://doi.org/10.1128/9781555816834.ch19>
- Jacque, H., Mozafari, B., Dereli, R., & Cotterill, S. (2024). Implications of water conservation measures on urban water cycle: A review. *Sustainable Production and Consumption*, 50, pp. 571-586. doi:<https://doi.org/10.1016/j.spc.2024.08.026>

- Joshi, S., & Yu, D. (2017). Chapter 8 - Immunofluorescence. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, pp. 135-150. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00008-4>
- Kantor, R., & Jiang, M. (2024). Considerations and Opportunities for Probe Capture Enrichment Sequencing of Emerging Viruses from Wastewater. *Environmental Science & Technology*, 58(19), p. 8161–8168. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.est.4c02638>
- Karunakaran, C., Rajkumar, R., & Bhargava, K. (2015). Chapter 1 - Introduction to Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, pp. 1-68. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>
- Kfir, R., & Genthe, B. (1993). Advantages and Disadvantages of the Use of Immunodetection Techniques for the Enumeration of Microorganisms and Toxins in Water. *Water Science & Technology*, 27(3-4). doi:<https://doi.org/10.2166/wst.1993.0353>
- Kim, J., Lim, J., & Lee, C. (2013). Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances*, 31(8), pp. 1358-1373. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.010>
- Kolosovska, T., & Bauer, S. (2022). Evaluation of grit properties at a medium-capacity wastewater treatment plant: A case study. *Resources, Conservation & Recycling*, 14. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rcradv.2022.200080>
- Koonin, E., Krupovic, M., & Agol, V. (2021). The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution? *ASM Journals Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(3). doi:<https://doi.org/10.1128/mmbr.00053-21>
- Kosar, S., Isik, O., Cicekalan, B., Gulhan, H., Kurt, E., Atli, E., . . . Ersahin, M. (2022). Impact of primary sedimentation on granulation and treatment performance of municipal wastewater by aerobic granular sludge process. *Journal of Environmental Management*, 315. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115191>
- Koul, B., Yadav, D., Singh, S., Kumar, M., & Song, M. (2022). Insights into the Domestic Wastewater Treatment (DWWT) Regimes: A Review. *Water*, 14(21). doi:<https://doi.org/10.3390/w14213542>
- Kuo, J.-T., Chang, L.-L., Yen, C.-Y., Tsai, T.-H., Chang, Y.-C., Huang, Y.-T., & Chung, Y.-C. (2021). Development of Fluorescence In Situ Hybridization as a Rapid, Accurate Method for Detecting Coliforms in Water Samples. *Biosensors*, 11(1). doi:<https://doi.org/10.3390/bios11010008>
- Lagier, C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *ASM Journals Clinical Microbiology Reviews*, 28(1). doi:<https://doi.org/10.1128/cmr.00110-14>
- Lass, A., Guerrero, M., Li, X., Karanis, G., Ma, L., & Karanis, P. (2017). Detection of Acanthamoeba spp. in water samples collected from natural water reservoirs, sewages, and pharmaceutical factory drains using LAMP and PCR in China. *Science of The Total Environment*, 584-585, pp. 489-494. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.046>

- Li, B., Peng, Z., Zhi, L., Li, H., Zheng, K., & Li, J. (2020). Distribution and diversity of filamentous bacteria in wastewater treatment plants exhibiting foaming of Taihu Lake Basin, China. *Environmental Pollution*, 267. doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115644
- Madeira, C., & Calábria de Araújo, J. (2021). Inhibition of anammox activity by municipal and industrial wastewater pollutants: A review. *Science of The Total Environment*, 799. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149449
- Mahajna, A., Geurkink, B., Gacesa, R., Keesman, K., Euverink, G., & Jayawardhana, B. (2025). Metatranscriptomes of activated sludge microbiomes from saline wastewater treatment plant. *Scientific Data*, 12. doi:https://doi.org/10.1038/s41597-025-04682-w
- Martzy, R., Kolm, C., Brunner, K., Mach, R., Krska, R., Šinkovec, H., . . . Reischer, G. (2017). A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of *Enterococcus* spp. in water. *Water Research*, 122, pp. 62-69. doi:https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.023
- Mehrotra, P. (2016). Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), pp. 153-159. doi:https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002
- Messer, J., & Dufour, A. (1998). A Rapid, Specific Membrane Filtration Procedure for Enumeration of Enterococci in Recreational Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2). doi:https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.678-680.1998
- Money, N. (2016). Chapter 2 - Fungal Cell Biology and Development. *The Fungi (Third Edition)*, pp. 37-66. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00002-5
- Mulvany, J. (1969). Membrane Filter Techniques in Microbiology. *Methods in Microbiology*, 1, pp. 205-253. doi:https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70138-7
- Naidoo, S., & Olaniran, A. (2014). Treated Wastewater Effluent as a Source of Microbial Pollution of Surface Water Resources. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(1), pp. 249-270. doi:https://doi.org/10.3390/ijerph110100249
- Nieuwenhuijse, D., & Koopmans, M. (2017). Metagenomic Sequencing for Surveillance of Food- and Waterborne Viral Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00230
- Nordell, E., Moestedt, J., Österman, J., Yekta, S., Björn, A., Sun, L., & Schnürer, A. (2021). Post-treatment of dewatered digested sewage sludge by thermophilic high-solid digestion for pasteurization with positive energy output. *Waste Management*, 119, pp. 11-21. doi:https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.028
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Hase, T., & Amino, N. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12). doi:https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63
- Numberger, D., Ganzert, L., Zoccarato, L., Mühldorfer, K., Sauer, S., Grossart, H., & Greenwood, A. (2019). Characterization of bacterial communities in wastewater with enhanced taxonomic resolution by full-length 16S rRNA sequencing. *Scientific Reports*. doi:https://doi.org/10.1038/s41598-019-46015-z

- Okut, N., Hamzat, A., Rajakaruna, R., & Asmatulu, E. (2025). Agricultural wastewater treatment and reuse technologies: A comprehensive review. *Journal of Water Process Engineering*, 69. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.106699>
- Osuolale, O., & Okoh, A. (2017). Human enteric bacteria and viruses in five wastewater treatment plants in the Eastern Cape, South Africa. *Journal of Infection and Public Health*, 10(5), pp. 541-547. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.11.012>
- Pedrero, F., Kalavrouziotis, I., Alarcón, J., Koukoulakis, P., & Asano, T. (2010). Use of treated municipal wastewater in irrigated agriculture — Review of some practices in Spain and Greece. *Agricultural Water Management*, 97(9), pp. 1233-1241. doi:<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2010.03.003>
- Rashid, S. S., & Liu, Y. Q. (2020). Assessing environmental impacts of large centralized wastewater treatment plants with combined or separate sewer systems in dry/wet seasons by using LCA. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, pp. 15674–15690. doi:<https://doi.org/10.1007/s11356-020-08038-2>
- Renz, M. (2013). Fluorescence microscopy — A historical and technical perspective. *Cytometry*, 83(9), pp. 767-779. doi:<https://doi.org/10.1002/cyto.a.22295>
- Rohde, M. (2011). Microscopy. *Methods in Microbiology*, 38, pp. 61-100. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00004-8>
- Rubio, J., Souza, M., & Smith, R. (2002). Overview of flotation as a wastewater treatment technique. *Minerals Engineering*, 15(3), pp. 139-155. doi:[https://doi.org/10.1016/S0892-6875\(01\)00216-3](https://doi.org/10.1016/S0892-6875(01)00216-3)
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffe, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., . . . Erlich, H. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239, pp. 487-491. doi:[10.1126/science.2448875](https://doi.org/10.1126/science.2448875)
- Sanz, J., & Köchling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry*, 42(2), pp. 119-133. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.10.003>
- Sanz, J., & Köchling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry*, 42(2), pp. 119-133. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.10.003>
- Shannon, K., Lee, D., Trevors, J., & Beaudette, L. (2007). Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 382(1), pp. 121-129. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.039>
- Sharaf, A., Guo, B., & Liu, Y. (2019). Impact of the filamentous fungi overgrowth on the aerobic granular sludge process. *Bioresource Technology Reports*, 7. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100272>
- Shaw, J., Monis, P., Weyrich, L., Sawade, E., Drikas, M., & Cooper, A. (2015). Using Amplicon Sequencing To Characterize and Monitor Bacterial Diversity in Drinking Water Distribution Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18). doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.01297-15>
- Singh, S., Ahmed, A., Almansoori, S., Alameri, S., Adlan, A., Odivilas, G., . . . Elamin, W. (2024). A narrative review of wastewater surveillance: pathogens of concern, applications, detection methods, and challenges. *Frontiers in Public Health*, 12. doi:<https://doi.org/10.3389/fpubh.2024.1445961>

- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, K., & Viridi, J. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Skládal, P. (2016). Piezoelectric biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79, pp. 127-133. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.12.009>
- Smith, C., & Osborn, M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), pp. 6–20. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>
- Sohn, J., & Nam, J. (2018). The present and future of de novo whole-genome assembly. *Briefings in Bioinformatics*, 19(1), pp. 23–40. doi:<https://doi.org/10.1093/bib/bbw096>
- Some, S., Mondal, R., Mitra, D., Jain, D., Verma, D., & Das, S. (2021). Microbial pollution of water with special reference to coliform bacteria and their nexus with environment. *Energy Nexus*, 1. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nexus.2021.100008>
- Srinivasan, V., Stedtfeld, R., Turlousse, D., Baushke, S., Xin, Y., Miller, S., . . . Hashsham, S. (2017). Diagnostic microarray for 14 water and foodborne pathogens using a flatbed scanner. *Journal of Microbiological Methods*, 139, pp. 15-21. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.04.009>
- Suzuki, Y., Niina, K., Matsuaki, T., Nukazawa, K., & Iguchi, A. (2018). Bacterial flora analysis of coliforms in sewage, river water, and ground water using MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health*, 53(2), pp. 160-173. doi:<https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1383128>
- Tan, B., Ng, C., Nshimiyimana, J., Loh, L., Gin, K., & Thompson, J. (2015). Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01027>
- Toze, S. (1999). PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research*, 33(17), pp. 3545-3556. doi:[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00071-8)
- Truchado, P., Garre, A., Gil, M., Simón-Andreu, P., Sánchez, G., & Allende, A. (2021). Monitoring of human enteric virus and coliphages throughout water reuse system of wastewater treatment plants to irrigation endpoint of leafy greens. *Science of The Total Environment*, 782. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146837>
- Vale, F. (2016). Microarrays/DNA Chips for the Detection of Waterborne Pathogens. *Methods in Molecular Biology*, 1452, pp. 143–153. doi:10.1007/978-1-4939-3774-5_9
- Vierheilig, J., Savio, D., Ley, R., Mach, R., Farnleitner, A., & Reischer, G. (2015). Potential applications of next generation DNA sequencing of 16S rRNA gene amplicons in microbial water quality monitoring. *Water Science & Technology*, 72(11), pp. 1962–1972. doi:<https://doi.org/10.2166/wst.2015.407>
- Vítězová, M., Kohoutová, A., Vitez, T., Hanišáková, N., & Kushkevych, I. (2020). Methanogenic Microorganisms in Industrial Wastewater Anaerobic Treatment. *Processes*, 8(12). doi:<https://doi.org/10.3390/pr8121546>
- Wang, N., He, M., & Shi, H. (2007). Novel indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method to detect Total E. coli in water environment. *Analytica Chimica Acta*, 590(2), pp. 224-231. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.03.041>

- Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K., Verstraete, W., & Boon, N. (2010). Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in Biotechnology*, 28(8), pp. 416-424.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.04.006>
- Wheatley, S., & Wang, Y. (1998). Chapter 18 Indirect Immunofluorescence Microscopy in Cultured Cells. *Methods in Cell Biology*, 57, pp. 313-332.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61588-5](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61588-5)
- Winey, M., Meehl, J., O'Toole, E., & Giddings, T. (2017). Conventional transmission electron microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, 25(3).
doi:<https://doi.org/10.1091/mbc.e12-12-0863>
- Wittwer, C., Herrmann, M., Gundry, C., & Johnson, K. (2001). Real-Time Multiplex PCR Assays. *Methods*, 25(4), pp. 430-442.
doi:<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1265>
- Zhang, S., Li, X., Wu, J., Coin, L., O'Brien, J., Hai, F., & Jiang, G. (2021). Molecular Methods for Pathogenic Bacteria Detection and Recent Advances in Wastewater Analysis. *Water*, 13(24). doi:<https://doi.org/10.3390/w13243551>

Ιστοσελίδες

<https://thumbs.dreamstime.com>
<https://chem.noesis.edu.gr/to-nero-yparchei-pantou>
<https://www.usgs.gov/media/images/natural-water-cycle-jpg>
<http://votaniki.gr/orologia/stomata/>
https://www.enerchem.gr/WastewaterSystems/WWTP_General/WWTP_General.php
<https://nptel.ac.in/courses/104102016>
<https://microbenotes.com/classification-of-virus/>
<https://microbiologyinfo.com/differences-between-light-microscope-and-electron-microscope/>
<https://www.rapidnovor.com/antibody-flow-cytometry/>
<https://www.lubio.ch/blog/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr>
<https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/>
<https://www.stemgenomics.com/about/technologies-stemcell-characterization/digital-pcr-high-precision-and-speed/>
<https://www.biorender.com/template/loop-mediated-isothermal-amplification-lamp-process>
<https://microbenotes.com/16s-rrna-gene-sequencing/>
<https://praxilabs.com/en/blog/2021/02/08/dna-sequencing-definition-importance-methods-facts-and-more/>
<https://microbiologynotes.org/elisa-principle-types-uses-advantages-and-disadvantages/>
<https://www.avensonline.org/blog/wp-content/uploads/2016/04/Micro-array.jpg>
<https://praxilabs.com/en/blog/2021/02/08/dna-sequencing-definition-importance-methods-facts-and-more/>
<https://rsscience.com/fluorescence-microscope/>
<https://vocal.media/education/biosensors>
<https://cloverbiosoft.com/using-of-maldi-tof-in-hospitals/>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.