



334

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Σ. ΛΕΒΕΙΔΙΩΤΟΥ - ΣΤΕΦΑΝΟΥ

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΔΙΑΘΛΑΣΤΙΚΟΥ
(CLOSTRIDIUM PERFRINGENS) ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

- 2

Αρσένης Ι. Τσιότσιας

ΤΣΙΟΤΣΙΑΣ ΑΡΣΕΝΗΣ Ι.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2002





334

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Σ. ΛΕΒΕΙΔΙΩΤΟΥ - ΣΤΕΦΑΝΟΥ

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΔΙΑΘΛΑΣΤΙΚΟΥ
(CLOSTRIDIUM PERFRINGENS) ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

2

Αρσένης Ι. Τσιότζιας

ΤΣΙΟΤΣΙΑΣ ΑΡΣΕΝΗΣ Ι.

1

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2002



334



334

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
Σ. ΛΕΒΕΙΔΙΩΤΟΥ - ΣΤΕΦΑΝΟΥ

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΔΙΑΘΛΑΣΤΙΚΟΥ
(CLOSTRIDIUM PERFRINGENS) ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

-2

Αρσένης Ι. Τσιότζιας

ΤΣΙΟΤΣΙΑΣ ΑΡΣΕΝΗΣ Ι.

↓

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2002



334

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000118470

13/2002



ΔΔ

610

729

2000



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»

Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2



Η ημερομηνία αιτήσεως του υποψηφίου Αρσένη Τσιότσια είναι η 08-09-1999. Η ημερομηνία ορισμού της τριμελούς επιτροπής είναι η 12-10-1999. Τα μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής είναι:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΥΓΕΝΙΑ ΜΠΕΖΙΡΤΖΟΓΛΟΥ
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ, ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

ΜΑΡΙΑ ΠΑΠΑΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ, ΜΕΛΟΣ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΑΛΦΑΚΑΚΟΥ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ, ΜΕΛΟΣ

Η ημερομηνία ορισμού του θέματος είναι η 15-10-1999. Η ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής είναι η 13-11-2002

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΣΧΟΛΗΣ: ΝΙΚΗ ΑΓΝΑΝΤΗ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΥΓΕΝΙΑ ΜΠΕΖΙΡΤΖΟΓΛΟΥ
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΜΑΡΙΑ ΠΑΠΑΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΠΑΤΡΩΝ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΑΛΦΑΚΑΚΟΥ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΜΙΧΑΛΗΣ ΚΟΝΤΟΜΗΝΑΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΑΓΓΕΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΝΙΚΟΣ ΑΝΔΡΙΚΟΠΟΥΛΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΜΑΡΙΑ ΚΑΝΕΛΛΑΚΗ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΠΑΤΡΩΝ

Η διδακτορική διατριβή έγινε ομόφωνα αποδεκτή με τον βαθμό «άριστα».



Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται
στην οικογένεια μου.

Σας ευχαριστώ.



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Ευχαριστώ θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια Ε.Μπεζιρτζόγλου αφ'ενός για την ηθική της συμπαράσταση και αφ'ετέρου για τις υποδείξεις που μου έκανε έτσι ώστε η διατριβή αυτή να γίνει όσο το δυνατόν καλύτερη. Επίσης ευχαριστώ θερμά όλους όσους με βοήθησαν, είτε εμπνέοντας με, είτε ενθαρρύνοντας με, είτε με την συνεργασία τους κατά την ενασχόληση μου με την διατριβή αυτήν.

Κλείνοντας θα ήθελα να πω ότι κατά την διάρκεια της διατριβής αυτής αποκόμισα πολύτιμα συμπεράσματα για τη δυσκολία αλλά και την ομορφιά που έχει η ερευνητική και συγγραφική δραστηριότητα. Άλλοτε όλα φαίνονται μπερδεμένα και άλλοτε ξεκάθαρα. Όσο πιο πολύ εμβαθύνεις σε κάτι τόσο πιο πολλές ανησυχίες έχεις για αυτό.



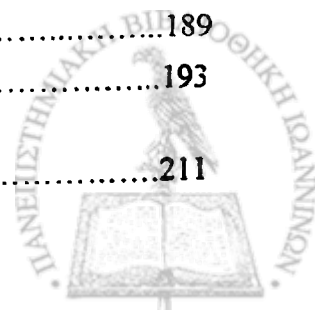
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ C. PERFRINGENS	1
1.1. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	1
1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και επιβίωση του C. perfringens	8
1.2.α). Θερμοκρασία	8
1.2.β). Ενεργός οξύτητα (pH)	9
1.3. Ενεργοποίηση και βλάστηση των σπόρων	12
1.4. Τοξίνες και ένζυμα	14
1.4.α). Τρόπος δράσης της εντεροτοξίνης	16
1.5. Θερμοαντοχή των σπόρων	16
2. ΥΠΑΡΞΗ ΤΟΥ C. PERFRINGENS ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	18
2.1. Υδάτινο οικοσύστημα- Ροή της ενέργειας	24
2.2. Ρύπανση – Μόλυνση – Ευτροφισμός	28
2.2.1. Ρύπανση	28
2.2.2. Περιβάλλον και Ανθρώπινη Υγεία	30
2.2.2.1. Περιβάλλον	30
2.2.2.2. Περιβάλλον και Υγεία	31
3. ΠΗΓΕΣ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΡΥΠΑΝΣΗΣ	32
3.1 Πηγές ρύπανσης	32
3.2 Φύση των ρύπων	33
3.3 Προέλευση των ρύπων	34
3.4 Ρύποι, επιπτώσεις	35
3.5 Ειδικές κατηγορίες πηγών ρύπανσης	37
4. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΝΕΡΩΝ	38
4.1. Θερμοκρασία νερών (T)	38
4.2. Αγωγιμότητα (Spc)	38
4.3. Αιωρούμενα στερεά (TDS)	39
4.4. Οξύτητα (pH)	39
4.5. Διαλυμένο οξυγόνο (DO)	40
4.6. Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD)	41
4.7. Ενώσεις του αζώτου	42
4.8. Αμμωνία, Αμμωνιακά ιόντα	43
4.9. Νιτρικά ιόντα	43



5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	45
5.1 Ο φθορισμός και ο επιτόπου υβριδισμός (FISH) για απ'ευθείας παρατήρηση των μικροοργανισμών	47
5.1.1.Ιστορική αναδρομή	49
5.1.2.Διαδικασία	50
5.1.3.Το ριβοσωμικό RNA (rRNA) ως στόχος στην FISH	53
5.1.4.Μονιμοποίηση(Fixation)	54
5.1.5.Μη ακριβή αποτελέσματα.(Αυτοφθορισμός)	56
5.1.6.Η επιλογή της σωστής εξειδίκευσης	57
5.1.7. Μη ακριβή αρνητικά αποτελέσματα	58
5.1.8.Δειγματοληψία νερού και κατεργασία δειγμάτων	60
5.1.9. Λήψη αποτελεσμάτων	62
5.2ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ	65
5.3 ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ- ΣΗΜΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	66
5.3.1.ΠΕΡΙΟΧΗ ΛΙΜΝΗΣ ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ	67
5.3.2.ΠΕΡΙΟΧΗ ΛΙΜΝΗΣ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	71
5.3.3.ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΟΤΑΜΟΥ ΑΩΟΥ ΚΑΙ ΒΟΙΔΟΜΑΤΗ	75
5.3.4 ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΟΤΑΜΟΥ ΛΟΥΡΟΥ	78
5.3.5.ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΟΤΑΜΟΥ ΚΑΛΑΜΑ	80
5.3.6.ΠΕΡΙΟΧΗ ΡΕΜΑΤΟΣ ΣΟΥΛΟΥ ΠΤΟΛΕΜΑΙΔΑΣ	83
6.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	85
6.1. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΛΙΜΝΗΣ ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ	86
6.2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΛΙΜΝΗΣ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ	96
6.3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΟΤΑΜΟΥ ΑΩΟΥ	106
6.4. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΟΤΑΜΟΥ ΒΟΙΔΟΜΑΤΗ	114
6.5. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΟΤΑΜΟΥ ΚΑΛΑΜΑ	122
6.6. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΟΤΑΜΟΥ ΛΟΥΡΟΥ	131
6.7. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΡΕΜΑΤΟΣ ΣΟΥΛΟΥ(ΠΤΟΛΕΜΑΙΔΑ)	140
6.8.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΕΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ FISH	149
6.9.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ	158
7.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	166
8. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΓΓΛΙΚΗ	189
9.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	193
10.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	211



1. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ C. PERFRINGENS

1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το *Clostridium perfringens* είναι ακίνητο βακτήριο θετικό κατά Gram, διαστάσεων 0,8-1,5 x 2-9 μm, με στρογγυλεμένα άκρα. Οι σπόροι, όταν υπάρχουν, είναι ωοειδείς, συνήθως παραπολικοί μη παραμορφωτικοί (Bergey's Manual, 1974· Duncan, 1976). Οι σπόροι είναι συνήθως παραπολικοί, αλλά η θέση τους μέσα στο σποριάγγειο δεν είναι πάντα σταθερή.

Οι διαστάσεις του *Clostridium perfringens* εξαρτώνται από το στέλεχος, την ηλικία της καλλιέργειας και τη φύση του θρεπτικού υποστρώματος. Κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης τα κύτταρα είναι δυνατόν να έχουν πολύ μικρό μήκος. Σε επιχρίσματα από καλλιέργειες εμφανίζεται στο μικροσκόπιο συνήθως με μορφή μοναχικών κυττάρων ή μικρών αλυσίδων 2-4 κυττάρων.

Καλλιέργειες, ηλικίας μικρότερης των 12 ωρών, εμφανίζονται στο μικροσκόπιο μορφολογικά ίδιες. Γηραιότερες όμως καλλιέργειες έχουν τάση ανακύκλωσης, δηλαδή εμφανίζουν βλάστηση των σπόρων και πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επιπλέον ορισμένα στελέχη έχουν τάση να σχηματίζουν πρωτοπλάστες, οι οποίοι φαίνονται στο οπτικό πεδίο σαν μεγάλα σφαιρικά μορφώματα. Η ηλικιωμένη καλλιέργεια δυνατόν να εμφανίζεται, στον άπειρο μικροβιολόγο, σαν επιμολυσμένη, λόγω της ποικιλίας των κυτταρικών μορφών που παρατηρούνται (Duncan, 1976).



Η προσθήκη αλανίνης, γλουταμινικού οξέος και λευκίνης υποβοηθάει τη βλάστηση των σπόρων (Vaqueiro Garibay, 1980)

Το *C. perfringens* είναι αναερόβιο. Δεν είναι όμως τόσο ευαίσθητο στο οξυγόνο όσο είναι τα μη σπορογόνα αναερόβια, από δε τα σπορογόνα αναερόβια είναι το λιγότερο ευαίσθητο στην επίδραση του οξυγόνου (Duncan, 1976).

Αναερόβια βακτήρια είναι τα βακτήρια που δεν μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία οξυγόνου. Η ύπαρξη όμως πολλών παραγόντων, που καθορίζουν την ανάπτυξη των αερόβιων, δεν επιτρέπει να διατυπωθεί με ασφάλεια ένας μόνο ορισμός. Γενικώς θεωρείται ότι εκτός από την απουσία του οξυγόνου, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό έχει κεφαλιώδη σημασία για την ανάπτυξη των αναερόβιων.

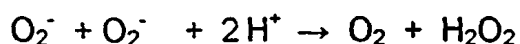
Υπάρχουν διάφορες θεωρίες που προσπαθούν να εξηγήσουν την τοξικότητα του οξυγόνου στα αναερόβια. Τα αναερόβια βακτήρια κατά το πλείστο δεν περιέχουν κυτοχρώματα και καταλάση, ενώ φέρουν φλαβινονουκλεοτίδια. Όταν υπάρχει οξυγόνο, τα ελευθερούμενα από τις βιολογικές οξειδώσεις ηλεκτρόνια μεταφέρονται με τα φλαβινονουκλεοτίδια σε αυτό που μετατρέπεται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου. Αυτό αθροίζεται και σαν δηλητήριο καταστρέφει τα κύτταρα.



Ο μηχανισμός αυτός, για πολλά χρόνια, εθεωρείτο ότι εξηγούσε την αδυναμία των αναερόβιων να αναπτύσσονται παρουσία οξυγόνου. Πολλά όμως είδη αναερόβιων βακτηρίων περιέχουν καταλάση και αντίθετα πολλά αερόβια βακτήρια όπως οι Στρεπτόκοκκοι, Πνευμονιόκοκκοι, Γαλακτοβάκιλοι δεν περιέχουν καταλάση.

Σήμερα πιστεύεται ότι το H_2O_2 είναι δηλητηριώδης ουσία για τα βακτήρια, αλλά στις περιπτώσεις που λείπει η καταλάση δεν αθροίζεται σε σημαντικό βαθμό στα κύτταρα γιατί διαχέεται από αυτά προς το θρεπτικό υλικό.

Σαν δηλητήριο των κυττάρων πιθανόν να δρα η υψηλής δραστηριότητας ελεύθερη ρίζα του οξυγόνου (O_2^-), που σχηματίζεται κατά την οξειδωση του φλαβινοουκλεοτιδίου παρουσία του μοριακού οξυγόνου (McCord και συν. 1971). Η δισμουτάση του υπεροξειδίου που διασπά την ελεύθερη ρίζα του οξυγόνου κατά το σχήμα:



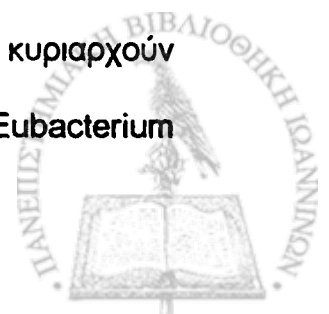
ανευρίσκεται στα αερόβια και δυνητικώς αναερόβια βακτήρια, ενώ λείπει από τα αναερόβια βακτήρια. Φαίνεται ότι η δράση του ενζύμου αυτού είναι μοναδικής σημασίας, καθόσον επιτρέπει στα κύτταρα να επιβιώνουν παρουσία μοριακού οξυγόνου. Ορισμένα αυστηρώς αναερόβια βακτήρια, όπως το *Clostridium oroticum*, *Eubacterium limosum* και *Bacteroides fragilis*, συνθέτουν σημαντική ποσότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (Carlsson και συν. 1977β), γεγονός που τους επιτρέπει να αντέχουν στην παρουσία οξυγόνου για αρκετές ημέρες (Loesche 1969, Tally και συν. 1977).



Εκτός από την έλλειψη της δισμουτάσης του υπεροξειδίου και άλλοι παράγοντες συμβάλλουν στην ανικανότητα των αναερόβιων να αναπτύσσονται παρουσία μοριακού οξυγόνου. Το οξυγόνο ανυψώνει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, αναστέλλοντας κατά αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη των αναερόβιων. Επίσης έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ορισμένα ένζυμα υφίστανται αυτοοξειδωση και κατά συνέπεια αδρανοποίηση από το μοριακό οξυγόνο. Επιπροσθέτως τα ακόρεστα λιπαρά οξέα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης αυτοοξειδώνονται και γίνονται μη λειτουργικά παρουσία μοριακού οξυγόνου, γεγονός που συμβάλλει στην κατάργηση της λειτουργίας της μεμβράνης.

Τα αναερόβια βακτήρια είναι μια ανομοιογενής ομάδα από την άποψη της ευαισθησίας τους στο οξυγόνο και από την άποψη των απαιτήσεών τους σε αυτό, διαχωρίζονται δε βασικά σε δύο ομάδες. Η μία ομάδα περιλαμβάνει τα βακτήρια που έχουν μέτρια ευαισθησία στο οξυγόνο, όπως το *Bacteroides fragilis*, *B. melaninogenicus*, *B. oralis*, *Fusobacterium nucleatum*, πολλά στελέχη στρεπτόκοκκων και το *Clostridium perfringens*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται σε ατμόσφαιρα οξυγόνου 2-8% και επιζούν κατά την εκθεσή τους σε ατμοσφαιρικό αέρα από 90' μέχρι μερικές μέρες. Σημαντικό ρόλο για την επιβίωση των βακτηρίων αυτών σε αερόβιες συνθήκες παίζει η χαμηλή θερμοκρασία και η υγρασία (Hoffmann και Justesen 1980). Τα βακτήρια της ομάδας αυτής αποτελούν κυρίως τα αίτια των αναερόβιων λοιμώξεων.

Η άλλη ομάδα περιλαμβάνει τα «εξαιρετικής ευαισθησίας στο οξυγόνο βακτήρια» (extremely oxygen sensitive, EOS). Τα βακτήρια αυτά κυριαρχούν στη φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπου και περιλαμβάνουν τα: *Eubacterium*



aerofaciens, ορισμένα υποείδη *B. fragilis*, ορισμένα είδη *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium adolescentis* και τις σπειροχαίτες (τρεπονήματα) και δεν επιζούν αν αφεθούν εκτεθειμένα στον ατμοσφαιρικό αέρα περισσότερο από 10 λεπτά. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως, ότι εκτός από τους *Peptostreptococci*, τα βακτήρια της ομάδας αυτής σπάνια απομονώνονται από λοιμώξεις του ανθρώπου.

Χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό πετυχαίνεται, όταν αφαιρεθεί το οξυγόνο και υπάρχουν στο υλικό αναγωγικές ουσίες. Σαν αναγωγικές ουσίες χρησιμοποιούνται η κυστεΐνη, τοθειογλυκονικό οξύ, η διθειοθρεϊτόλη και η διθειοερυθρίτολη. Η κυστεΐνη και τοθειογλυκονικό οξύ οξειδώνονται μερικά από το οξυγόνο του αέρα σε υπεροξειδία που επιδρούν βλαπτικά στα κύτταρα. Αντίθετα η διθειοθρεϊτόλη και η διθειοερυθρίτολη δεν αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο και επιπλέον εμποδίζουν την οξείδωση της κυστεΐνης και τουθειογλυκονικού οξέος από το μοριακό οξυγόνο. Για το λόγο αυτό κατά τη μελέτη των αυστηρώς αναερόβιων βακτηρίων, παρασκευάζονται θρεπτικά υλικά που περιέχουν μίγμα αναγωγικών ουσιών. Συνήθως χρησιμοποιείται η κυστεΐνη σε τελική συγκέντρωση 0,05%.

Η ύπαρξη ενός ελαχίστου E_h θεωρείται τελείως απαραίτητη για την ανάπτυξη των αναερόβιων. Το επίπεδο αυτό εξαρτάται από το στέλεχος του βακτηρίου, το pH του υλικού, το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος και την μεταβολική του κατάσταση. Το ανώτερο λ.χ. ανεκτό επίπεδο E_h για το *Clostridium sporogenes* σε pH 7,0 είναι +150mV, δηλαδή κατά 30 mV μικρότερο από το E_h του αίματος. Το ανώτερο ανεκτό όριο για το *C. perfringens* +130 mV σε pH 7,8 ή +250 mV σε pH 6,0. Δεδομένου ότι μερικά στελέχη του *C. perfringens* μπορούν να αναπτυχθούν και παρουσία μικρών



συγκεντρώσεων οξυγόνου, λογικά ο μικροοργανισμός αυτός θα μπορούσε να θεωρηθεί σαν δυνητικώς αναερόβιος, αλλά με αυξημένη ευαισθησία στο οξυγόνο.

Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Eh) εξαρτάται επίσης από την σύσταση της ατμόσφαιρας που αναπτύσσονται τα αναερόβια. Το Eh του θρεπτικού υλικού Reinforced Clostridial Medium είναι -325mV , όταν το υλικό είναι σε ατμόσφαιρα υδρογόνου (Futter και Richardson, 1970).

Το Eh στους περισσότερους ιστούς του σώματος του ανθρώπου κυμαίνεται μεταξύ $+126\text{mV}$ και $+246\text{mV}$ και εξαρτάται από την αιμάτωση και το κατά πόσο η μέτρηση γίνεται κοντά σε θέσεις υψηλού (αρτηριακού) ή χαμηλού (φλεβικού) κορεσμού με οξυγόνο. Σε αυτά τα επίπεδα Eh, δεν ευνοείται η ανάπτυξη των αναερόβιων βακτηρίων, που τα περισσότερα απαιτούν Eh από -100mV έως -250mV για να αναπτυχθούν in vitro. Όταν όμως σε μια περιοχή του σώματος δεν γίνεται καλή κυκλοφορία και ελαττώνεται το Eh (χειρουργική επέμβαση, τραυματισμός, αρτηριοσκλήρωση, ισχαιμική νέκρωση από κακοήγη όγκο, κ.α.), τότε ευνοείται η εγκατάσταση και ανάπτυξη των αερόβιων βακτηρίων.

Το κατάλληλο δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh) για την ανάπτυξη του *C. perfringens* εξαρτάται από το στέλεχος, το pH, το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος και τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων. Το άριστο δυναμικό οξειδοαναγωγής για την ανάπτυξη του *C. perfringens* είναι -200mV (Hobbs, 1979). Το *C. perfringens* προφανώς είναι ικανό να ελέγχει το Eh στο μικροπεριβάλλον του, αυτό δε εξηγεί και την ικανότητά του να αναπτύσσεται σε τρόφιμα με Eh όχι σαφώς αρνητικό (Genigeorgis και Rieman, 1979). Το ανώτερο δυναμικό οξειδοαναγωγής,



ανάπτυξης του *C. perfringens*, είναι δυνατό να κυμαίνεται από +31 mV μέχρι +230 mV σε pH 7,74 μέχρι 6,0 (Barnes και Ingram 1956). Οι Tabatabai και Walker (1970) αναφέρουν ότι στέλεχος *C. perfringens* αναπτυσσόταν καλύτερα σε Eh +200mV παρά σε +40 mV, όταν το pH του υποστρώματος ήταν 7,0.

Το *C. perfringens* είναι σακχαρολυτικό και αντλεί την απαιτούμενη ενέργεια κυρίως από τους υδατάνθρακες τους οποίους ζυμώνει με κύρια τελικά προϊόντα μεταβολισμού τα οξέα γαλακτικό, οξικό και βουτυρικό, όπως επίσης την αιθανόλη, το CO₂ και το υδρογόνο. Ινδόλη δεν παράγεται. Η δοκιμή καταλάσης είναι αρνητική. Το κυανούν του μεθυλενίου δεν ανάγεται. Είναι θειοαναγωγικό και από τις θειούχες ενώσεις παράγει H₂S. Η αναγωγή των νιτρικών δεν είναι πάντα σίγουρη για δεδομένο στέλεχος (Duncan, 1976· Hobbs, 1979).

Το *C. perfringens* ζυμώνει πολλούς υδατάνθρακες, όπως είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η γαλακτόζη, η ξυλόζη, η τρεαλόζη, το άμυλο, η δεξτρίνη και το γλυκογόνο. Η ζύμωση της σαλικίνης και της γλυκερόλης δεν είναι σταθερή. Η μαννιτόλη δεν ζυμώνεται. Η ανάπτυξη είναι πολύ γρηγορότερη, όταν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η γλυκόζη, η μαννόζη ή η ριβόζη (Duncan, 1976). Αναπτύσσεται καλά σε υποστρώματα που περιέχουν πηγή πρωτεϊνικού αζώτου (κυρίως καζεΐνη) και σάκχαρο (Duncan, 1975).



1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και επιβίωση του *C.perfringens*

α) Θερμοκρασία

Το *C. perfringens* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 15° C μέχρι και 50° C. Άριστη όμως θερμοκρασία ανάπτυξης είναι η μεταξύ 43° C και 47° C (Collee και συν., 1961· Hobbs, 1974· Hobbs, 1979). Σε θερμοκρασία 45° C πολλά στελέχη υφίστανται λύση πολύ σύντομα μετά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Εξαιρετική ανάπτυξη παρατηρείται σε θερμοκρασία 37° C, αφού όμως προηγηθεί φάση αδράνειας 2 - 4 ωρών (Rey και συν., 1975· Duncan, 1976). Σε θερμοκρασίες 15° C μέχρι 20° C παρατηρείται φάση αδράνειας 4-24 ωρών (Duncan, 1976). Μεγαλύτερη διακύμανση στο ρυθμό ανάπτυξης υπάρχει μεταξύ των διαφόρων στελεχών σε χαμηλές θερμοκρασίες παρά σε υψηλές. Κάτω από άριστες συνθήκες ο ρυθμός ανάπτυξης είναι εξαιρετικά γρήγορος. Ο χρόνος αναδιπλασιασμού κάθε γενεάς σε θερμοκρασία 45° C και σε pH 7,0 είναι 10 min, ενώ σε θερμοκρασία 25° C είναι 100 min (Smith, 1971).

Σε θερμοκρασίες 5° C μέχρι 15° C παρατηρείται στασιμότητα ή και θάνατος βλαστικών μορφών (Duncan, 1976). Στασιμότητα παρατηρείται και όταν η θερμοκρασία ξεπεράσει τους 51° C, ενώ άνω των 55° C, ο αριθμός θανάτου των βλαστικών μορφών είναι μεγάλος (Willardsen και συν., 1978).



β) οξύτητα (pH)

Το *C. perfringens* αναπτύσσεται σε τιμές pH από 5,0 μέχρι 3,0 (Smith, 1971), αλλά καλύτερα αναπτύσσεται σε τιμές pH 6,0 μέχρι 7,5 (Duncan, 1975). Ο χρόνος αναδιπλασιασμού σε θερμοκρασία 37° C είναι 100 min σε pH 5,0 21 min σε pH 6,5 και 48 min σε pH 8,0 (Genigeorgis και Riemann, 1979).

Η ανάπτυξή του σε υποστρώματα που περιέχουν ζυμούμενο υδατάνθρακα (π.χ. γλυκόζη) προκαλεί μείωση του pH στο 5,0. Τότε παρατηρείται τάση αυτοανάσχεσης της ανάπτυξης και θάνατος των βλαστικών μορφών, σε χρόνο συχνά 4-5 ημερών, εφόσον τα κύτταρα παραμείνουν σ' αυτό το pH (Duncan, 1976).

Οι τιμές του συντελεστή a_w (ενεργότητας νερού) που μπορεί το *C. perfringens* ν' αναπτυχθεί, κυμαίνονται ανάλογα με το pH, τη θερμοκρασία, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, το στέλεχος, το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος και την ουσία που χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση του a_w (Mead, 1969· Kang και συν., 1969· Strong και συν., 1970).

Η μικρότερη τιμή a_w στην οποία έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη του *C. perfringens* είναι 0,95-0,93 με ρύθμιση του a_w με γλυκερόλη. (Kang και συν., 1969· Strong και συν., 1970). Με ρύθμιση του a_w με γλυκόζη και σε pH 5,5 μέχρι 7,0 το *C. perfringens* αναπτύσσεται σε τιμές a_w 0,95-0,96 και άνω. Όταν χρησιμοποιηθεί NaCl ή KCl για τη ρύθμιση του a_w , η μικρότερη τιμή a_w στην οποία παρατηρείται ανάπτυξη είναι 0,97 (Duncan, 1976).



Αν και η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *C. perfringens* είναι 45° C, όταν ο συντελεστής a_w του υποστρώματος μειώνεται, καλύτερη ανάπτυξη παρατηρείται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Για παράδειγμα, πολλά στελέχη αναπτύσσονται καλύτερα σε θερμοκρασία 37° C σ'όλες τις τιμές a_w που είναι μικρότερες του 0,995 άσχετα με το pH του υποστρώματος. Όταν το a_w βρίσκεται στα χαμηλότερα όρια ανάπτυξεως του *C. perfringens*, το απαιτούμενο Eh μειώνεται (Strong και συν., 1970).

Το *C. perfringens* δεν σπορογονεί εύκολα in vitro όπως ορισμένα άλλα σπορογόνα βακτήρια ή όπως σπορογονεί in vivo στο έντερο του ανθρώπου και των ζώων (Duncan, 1976· Sacks και Thompson, 1978). Για να σπορογονήσει in vitro απαιτεί ιδιαίτερες συνθήκες καλλιέργειας, οι οποίες συνήθως τείνουν προς εξαντλητική στέρηση (Walker, 1976).

Ο σχηματισμός των σπόρων γίνεται συνήθως μετά το τέλος της φάσης λογαριθμικού πολλαπλασιασμού, όταν πλέον έχει υποχωρήσει η έντονη κυτταρική ανάπτυξη και όταν συνήθως δεν υπάρχει υδατάνθρακας ή άλλη πηγή ενέργειας. Επίσης πρέπει να επικρατούν ειδικές συνθήκες pH και δυναμικού οξειδοαναγωγής. Ορισμένοι παράγοντες, όπως διάφορα ιχνοστοιχεία, ευνοούν το σχηματισμό σπόρων (Vinter, 1969).

Εξαιτίας της δύσκολης σπορογονίας του *C. perfringens*, διάφοροι ερευνητές πρότειναν κατά καιρούς ορισμένα υποστρώματα, που κατά τη γνώμη τους ευνοούν το σχηματισμό σπόρων (Ellner, 1956· Angelotti και συν., 1962· Kia και συν., 1967· Duncan και Strong, 1968· Sacks και Thompson, 1977· Sacks και Thompson, 1978· Labbe και Pey, 1979· Craven και Biankenschap, 1982).



Ένα από τα καλύτερα υποστρώματα σπορογονίας θεωρείται το υπόστρωμα Duncan και Strong (ή D.S.), το οποίο περιέχει άμυλο ως πηγή ενέργειας με αποτέλεσμα ο ρυθμός ανάπτυξης να περιορίζεται και να ενεργοποιείται ο μηχανισμός της σπορογονίας (Duncan και Strong, 1968). Η προσθήκη ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα σε αναλογία 1% ή μεθυλοξανθινών (καφεΐνης, θεοφυλλίνης, θεοβρωμίνης) έχει αποδειχτεί ότι αυξάνει την παραγωγή σπόρων από ορισμένα στελέχη (Duncan και Strong, 1968· Sacks και Thompson, 1977).

Οι Labbe και Rey (1979) αναφέρουν ότι αντικατάσταση του αμύλου με ραφινόζη στο υπόστρωμα D.S. αυξάνει το ποσοστό σπορογονίας. Το ποσοστό σπορογονίας στο υπόστρωμα D.S. κυμαίνεται από λιγότερο του 1% μέχρι 90% ανάλογα με το στέλεχος. Ωριμοί θερμοανθεκτικοί σπόροι παράγονται εντός 10 ωρών σε θερμοκρασία 37° C. Συνέχιση της επώασης επί 24 ώρες ή και περισσότερο, δυνατόν να προκαλέσει βλάστηση των σπόρων και ανακύκλωση της καλλιέργειας (Duncan, 1976).

Η θερμική ενεργοποίηση των σπόρων που χρησιμοποιούνται για την έναρξη μιας καλλιέργειας, αυξάνει το ποσοστό σπορογονίας. Η θερμική ενεργοποίηση γίνεται σε θερμοκρασία 75° C επί 15 μέχρι 20 min και το αποτέλεσμα της διατηρείται για αρκετές γενεές βλαστικών κυτάρων (Genigeorgis, 1975).

Το *C. perfringens* δεν σπορογονεί εύκολα στα τρόφιμα. Παρ' όλα αυτά κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να σπορογονήσει και στα τρόφιμα (Genigeorgis, 1975). Σπορογονία μέχρι 50% παρατηρήθηκε σε κρέατα που βρίσκονταν σε επώαση επί 24 ώρες (Mead, 1969).



1.3 Ενεργοποίηση και βλάστηση των σπόρων

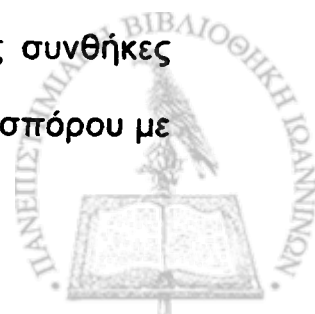
Η ληθαργική φάση ζωής των σπόρων (κρυπτοβίωση) είναι μη ενεργός φάση ζωής, με κύρια χαρακτηριστικά την ελάχιστη μεταβολική δραστηριότητα. Η αλλαγή ή η μετάβαση του σπόρου, που βρίσκεται σε λήθαργο, σε φάση βλαστικής μορφής, απαιτεί την ενεργοποίησή του, στη συνέχεια τη βλάστησή του και τέλος την ανάπτυξή του (Walker, 1976).

Η ενεργοποίηση των σπόρων δεν αποτελεί αρχή για βλάστηση, αλλά μετά από αυτήν οι σπόροι μπορούν να βλαστήσουν γρηγορότερα και σε μεγάλο ποσοστό. Μη ενεργοποιημένοι σπόροι μπορούσαν να βλαστήσουν μόνο κατά 30-50%. Το ποσοστό αυτό στα πλέον θερμοάντοχα στελέχη περιοριζόταν στο 3,6% μέχρι 0,13%. Μετά από θερμική ενεργοποίηση σε θερμοκρασία 75° C για 20 min, οι σπόροι βλάσταιναν σε ποσοστό 99% (Roberts (1968) , Busta και Smith (1972)).

Η ενεργοποίηση μπορεί να επιτευχθεί με θέρμανση, με έκθεση των σπόρων σε χαμηλό pH ή με μίγμα Ca και διπικολινικού οξέος, καθώς και με επίδραση πολικών διαλυτών ή συστατικών που ελαττώνουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Τέλος η γήρανση των σπόρων τους ενεργοποιεί. Η θερμική όμως ενεργοποίηση είναι η πλέον συνηθισμένη (Sussman ,1969 και Walker,1976)

Για τους σπόρους θερμοευαίσθητων στελεχών καλύτερη ενεργοποίηση επιτυγχάνεται με θέρμανση στους 60° C μέχρι 70° C για 20 min. Αντίθετα για θερμοάντοχα στελέχη, θέρμανση στους 80° C για 10 μέχρι 20 min είναι απαραίτητη (Duncan και Strong, 1968).

Μετά την ενεργοποίηση και τη μεταφορά σε ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης, ακολουθεί η βλάστηση και τέλος η ανάπτυξη του σπόρου με



παράλληλη σύνθεση νέων δομικών στοιχείων του κυττάρου, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη της βλαστικής μορφής (Walker, 1976).

Όπως αναφέρουν οι Labbe και Norris (1982), κατάλληλα υποστρώματα για τη βλάστηση και αρίθμηση, θερμικά τραυματισμένων σπόρων του *C. perfringens*, είναι το Tryptone - Sulfite - Neomycin (T.S.N.) agar (Marshall και συν., 1965) και το Sulfite - Polymyxin - Sulfadiazin (S.P.S.) agar Angelotti και συν., 1952). Το βασικό υπόστρωμα S.P.S. (χωρίς την προσθήκη των αντιβιοτικών) δίνει ακόμη καλύτερα αποτελέσματα (Barach και συν., 1974).

Η προσθήκη λυσοζύμης στο υπόστρωμα αυξάνει το ποσοστό βλάστησης των σπόρων (Adams, 1973· Ando και Tsuzuki, 1983). Αν οι σπόροι υποστούν επίδραση αλκαλίων, η προσθήκη λυσοζύμης είναι απαραίτητη (Duncan και συν., 1972a· Labbe και συν., 1978).

Η βλάστηση των σπόρων του *C. perfringens* ευνοείται σε pH 6,0 και σε θερμοκρασίες από 30° C μέχρι και 40° C (Ahmed και Walker, 1971· Ando 1975a· Labbe και Norris, 1982). Η προσθήκη NaCl μέχρι 2% διεγείρει τη βλάστηση (Ando, 1974a· Ando, 1974b). Ο ρυθμός βλάστησης μειώνεται, αν η συγκέντρωση NaCl είναι μεγαλύτερη από 4%. Η βλάστηση εμποδίζεται πλήρως σε συγκέντρωση NaCl 6% όπως και σε συγκέντρωση NaNO₂ 0,06% (Ando, 1975b). Δεν παρατηρείται όμως συνέργεια NaCl και NaNO₂ (Chumney και Adams, 1980).



1.4 ΤΟΞΙΝΕΣ ΚΑΙ ENZYMA

Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί από τις καλλιέργειες του *C. perfringens* 12 τοξικά προϊόντα (τοξίνες ή ένζυμα), τα οποία χαρακτηρίζονται με τα μικρά γράμματα του ελληνικού αλφαβήτου (α, β, γ κ.λ.π.). Τα διάφορα στελέχη παράγουν ορισμένα μόνο από τα προϊόντα αυτά. Η παραγωγή ή όχι μιας ή περισσοτέρων από τις τοξίνες α, β, ε και ι χρησιμοποιείται ως κριτήριο για την ταξινόμηση των διαφόρων στελεχών σε πέντε τύπους : A (τοξίνη α), B (α, β, c), C (α, β). O (α,ε) και E (α, ι). Ο πρώην τύπος F χαρακτηρίζεται πλέον ως ειδικός τύπος C (Smith και Holdeman, 1968· Smith, 1975· Δεληγκάρης 1977·Hobbs, 1979).

Οι τοξίνες και τα ένζυμα αυτά δεν φαίνεται να παίζουν οποιονδήποτε ρόλο στην πρόκληση τροφικής τοξίνωσης. τα συμπτώματα της οποίας οφείλονται στη δράση μιας ειδικής τοξίνης, της εντεροτοξίνης, που παράγεται από ορισμένα μόνο στελέχη των τύπων A και C όταν αυτά σπορογονούν (Duncan, 1976· Banwart, 1979).

Η εντεροτοξίνη του *C. perfringens* είναι πρωτεΐνη μοριακού βάρους 30.000 + 4.000 και με ισοηλεκτρικό σημείο σε pH 4,3 μέγιστη απορρόφηση στο υπεριώδες φως στα 278-280 nm και ελάχιστη στα 250 nm (Hauschild, 1971· Stark και Duncan, 1972· Hobbs, 1979). Αδρανοποιείται από τα ένζυμα προγάση και την πρωτεάση του *Bacillus eubtilis*, αλλά όχι από τη θρυψίνη, τη χυμοθρυψίνη, την παπαΐνη, τη βρωμελίνη και την καρβοξυπεπτιδάση. Είναι θερμοευαίσθητη με τιμή D60x4min (Duncan και Strong, 1969· Hauschild και Hilshelmer, 1971).



Η εντεροτοξίνη του *C. perfringens* τύπου A προκαλεί τη συσσώρευση υγρού σε περιδεμένο έντερο κονίκλου, αμνού και μόσχου. Επίσης προκαλεί διάρροια στα προηγούμενα ζώα και διάρροια και έμετο, όταν χορηγηθεί από το στόμα στον άνθρωπο και στον πίθηκο (Hauschild, 1979).

Η συσσώρευση υγρού στο έντερο λόγω της δράσης της τοξίνης, ελαττώνεται σε τιμή pH μικρότερη από 5,0 ή μεγαλύτερη από 9,0 και παύει όταν η τιμή του pH είναι 1,0 ή 12,0 (Duncan και Strong, 1969). Η τοξικότητα της εντεροτοξίνης αυτής, για τα ποντίκια, ύστερα από ενδοφλέβια χορήγηση, έχει εκτιμηθεί σε 2000 ML D/mgN. Μία MLD προκαλεί το θάνατο στα ποντίκια μέσα σε 20 min (Hauschild και Hillsheimer, 1971).

Η εντεροτοξίνη είναι ουσία αντιγονική και αντίστοιχος αντιορός που προέρχεται από κονίκλους αντιδρά μόνο με την εντεροτοξίνη και όχι με τις άλλες τοξίνες που παράγονται από το *C. perfringens* (Genigeorgis και συν., 1973. Ueguga και συν., 1974).

Η εντεροτοξίνη που παράγεται από καλλιέργεια σε φάση σπορογονίας στελέχους τύπου C, το οποίο απομονώθηκε από περιστατικά νεκρωτικής εντερίτιδας ήταν ορολογικά η ίδια με την εντεροτοξίνη του τύπου A (Hobbs, 1979).

Μεγάλος αριθμός σπόρων στα τρόφιμα θεωρείται ως ένδειξη ύπαρξης και εντεροτοξίνης. Κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν προσχηματισμένη τοξίνη είναι πιθανό να προκαλέσει σύνδρομο τροφικής τοξίνωσης στον άνθρωπο, αφού χορήγηση τοξίνης σε εθελοντές προκάλεσε ανάλογα συμπτώματα (Genigeorgis, 1975. Skjelkvale και



Uemura, 1977· Banwart, 1979). Μεγάλος αριθμός σπόρων στα τρόφιμα θεωρείται ως ένδειξη ύπαρξης και εντεροτοξίνης.

α) Τρόπος δράσης της εντεροτοξίνης

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η εντεροτοξίνη του *C. perfringens* δρα επί του εντέρου με τρόπο παρεμφερή με εκείνο των εντεροτοξινών του *Vibrio cholerae* και της *E. coli* (Mc Donel, 1980).

Όταν η δόση της εντεροτοξίνης είναι ικανή να αντιστρέψει τη ροή των ηλεκτρολυτών, τότε συνήθως προκαλεί και απόπτωση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων από τις κορυφές των λαχνών όχι όμως και από τις πλευρές των λαχνών Α από τις εντερικές κρύπτες. Στα κύτταρα αυτά προκαλείται βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης, προφανώς με τη δράση της εντεροτοξίνης στις εξωτερικές επιφάνειες των κυτταρικών μεμβρανών (McDonel, 1980· McClane και McDonel, 1980). Η δράση της τοξίνης επί του εντέρου δεν επηρεάζεται από τα ειδικά αντισώματα που κυκλοφορούν στο αίμα ούτε από την ειδική IgA του εντέρου, ενώ αδρανοποιείται όταν ευρίσκεται στο αίμα (McDonel, 1974· Genigeorgis, 1975· McDonel, 1980).

1.5 Θερμοαντοχή των σπόρων

Οι σπόροι διαφόρων στελεχών του *C. perfringens* διαφέρουν σημαντικά ως προς τη θερμοαντοχή τους. Ορισμένοι αντέχουν σε θερμοκρασία 100° C επί 5-6 ώρες (θερμοάντοχοι), ενώ άλλοι



(θερμοευαίσθητοι) επιβιώνουν για λίγα μόνο λεπτά της ώρας στη θερμοκρασία αυτή (Barnes και συν., 1963· Duncan 1976· Jay, 1978).

Η θερμοαντοχή των σπόρων μειώνεται με την ακτινοβολήση. Ο βαθμός της απώλειας της θερμοαντοχής εξαρτάται από τη δόση της ακτινοβολίας (Barnhare, 1977· Gombas και Gomez, 1978).

Εξάλλου η D-τιμή, που είναι η δόση ακτινοβολίας σε Kgy που απαιτείται για να μειωθεί ο μικροβιακός πληθυσμός κατά 90%, για το *C.perfringens* είναι 1,2 Kgy, ενώ για περισσότερο ευπαθείς μικροοργανισμούς, όπως η *Listeria monocytogenes* η D-τιμή είναι 0,42 Kgy. Επίσης, το μέσο στο οποίο βρίσκονται οι μικροοργανισμοί κατά την ακτινοβολήση παίζει σπουδαίο ρόλο και μεταβάλλει την τιμή D. Έτσι η τιμή D για την *Listeria monocytogenes* στον ανθότυρο είναι 1,4 Kgy (Tsiotsias et al ,2002).

Η παρουσία μονογλυκεριδίων, στο μέσο θέρμανσης, αν και μειώνει τη θερμοαντοχή των σπόρων του *Bacillus stearochemophilus*. Δεν επηρεάζει τη θερμοαντοχή των σπόρων του *C. perfringens* (Kimsey και συν., 1981).

Ορολογικές μελέτες έδειξαν ότι, όπως η εντεροτοξίνη, έτσι και οι σπόροι έχουν αντιγονικές ιδιότητες. Τα θερμοευαίσθητα στελέχη βρέθηκαν περισσότερο ομοιογενή αντιγονικά απ'ό,τι τα θερμοάντοχα. Ορός έναντι σπόρων θερμοάντοχων στελεχών δεν συγκολλά σπόρους θερμοευαίσθητων στελεχών. Ομοίως σπόροι θερμοάντοχων στελεχών δεν συγκολλούνται με ορό έναντι σπόρων θερμοευαίσθητων στελεχών (Chakrabarty και Marayan, 1979).



2. ΥΠΑΡΞΗ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Το *C. perfringens* είναι σχετικά άφθονο στη φύση όπου απομονώνεται, στο έδαφος : ποσοστό θετικότητας 97%, στη σκόνη 90%, στα τρόφιμα 1,8-82% και στα κόπρανα ανθρώπου και ζώων 80-100%.

Ο άνθρωπος είναι ο κυριότερος φορέας (Bezirtzoglou. E.. Romond. C.,1990 · Bezirtzoglou E., Dimitriou D., Panagiou A., Kagalou I.,1994, Bezirtzoglou, E., Panagiou. A., Savvaidis, I., Theodorou, D., Tsolas, O. and Antoniadis, G.,1995. Bezirtzoglou, E., Panagiou, A., Savvaidis, I. and Maipa, V.,1997)

Οι κύριοι παθογόνοι αναερόβιοι οργανισμοί που απομονώνονται από το υδρόβιο περιβάλλον είναι οι σπόρογόνοι αναερόβιοι οργανισμοί του γένους *clostridium*. Δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ότι ο κύριος βιότοπος των μικροοργανισμών του γένους *clostridium* είναι το χώμα.Μερικοί από τους μικροοργανισμούς αυτούς εμφανίζονται να είναι κοινοί κάτοικοι του εντερικού σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων. Παραδείγματος χάριν το *C.perfringens* είναι ομοιόμορφα παρόν στα περιττώματα. (Bezirtzoglou E., 1994,1995,1997,1999,2001, Papapetropoulou.M,1997)

Έρευνες για την ύπαρξη του *C. perfringens* σε διάφορα τρόφιμα δείχνουν υψηλή θετικότητα για τα διάφορα είδη κρέατος που κυμαίνονται από 37% μέχρι 82% (Duncan, 1976), θερμοανθεκτικοί σπόροι του *C. perfringens* απομονώθηκαν από διάφορα είδη κρεάτων σε ποσοστό 1,5% μέχρι 42,7% (Hobbs, 1979).

Εξάλλου, πολλά άλλα τρόφιμα όπως, ιχθυρά, όσπρια, φρούτα, λαχανικά αλλά και πατατοσαλάτες, μακαρόνια με τυρί, σάλτσες και σούπες, διαπιστώθηκε ότι μπορεί να φέρουν σπόρους του *C. perfringens*



(Nikolaeva 1974· Duncan, 1976· Oka, 1977· Hobbs, 1979· Pasolini και συν., 1981). Στο γάλα και τα προϊόντα του έχει διαπιστωθεί θετικότητα σε ποσοστό 10% μέχρι 80% (Kaqlb, 1972· El-Bassiony, 1980). Η παστερίωση δεν καταστρέφει τους σπόρους του κλωστηριδίου.

Διαπιστώθηκε ποσοστό θετικότητας 20,2% σε συντηρημένα ιχθυηρά Ελληνικής προέλευσης και με πληθυσμούς από 10 μέχρι 20×10^3 σπόρους/g (Amin, 1984).

Συστηματικές μελέτες από Έλληνες ερευνητές δεν φαίνεται να έχουν ολοκληρωθεί, ίσως λόγω της δυσκολίας στην καλλιέργεια του ως αναερόβιο. Το *C. perfringens* είναι ευρέως κατανεμημένο στην φύση και είναι φυσιολογικά παρόν σε μεγάλους αριθμούς στο λάδι, στα ακάθαρτα νερά και στο έντερο των ζώων και του ανθρώπου, όπου ανευρίσκεται τόσο σε βλαστικές όσο και σε σπορογόνες μορφές. (Willis 1969). Για το λόγο αυτό δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι απομονώνεται από διαφορετικά υδάτινα συστήματα.

Το *C. perfringens* και ειδικότερα οι σπόροι του, οι οποίοι είναι περισσότερο ανθεκτικοί σε ποικίλες φυσικοχημικές δράσεις απ' ό,τι άλλοι δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν ιδιαίτερα χρήσιμος δείκτης σε οικοσυστήματα που έχουν υποστεί διαταραχές. Οι αριθμοί του *C. perfringens* αποκαλύπτουν διακυμάνσεις που σχετίζονται με την περιοχή της δειγματοληψίας. Η ύπαρξή του δε είναι περισσότερο συχνή κοντά σε περιοχές όπου υπάρχει βιομηχανική, αλλά και ανθρωπογενής(οικιστική) παρέμβαση. (Bezirtzoglou E., Dimitriou D., Panagiou A., Kagalou, I., 1994, Bezirtzoglou, E., Panagiou, A., Savvaidis, I., Theodorou, D., Tsolas, O. and Antoniadis, G., 1995. Bezirtzoglou, E., Panagiou, A., Savvaidis, I. and Maipa, V., 1997).



Το 1683, ο Antonie van Leeuwenhoek μελέτησε την παρουσία και τις μετακινήσεις των βακτηριδίων στις πτώσεις του ύδατος με το πρωτόγονο μικροσκόπιό του. Μετά από αυτήν την παρατήρηση, αναζητήθηκαν ποικίλα ύδατα για τα βακτηρίδια και τα διαφορετικά είδη μικροοργανισμών. Η βακτηριακή πανίδα ποικίλλει ευρέως στους διαφορετικούς υδρόβιους βιότοπους ανάλογα με το pH του ύδατος, τη θερμοκρασία, την αλατότητα, το οργανικό και ανόργανο υλικό (Parapetrovoulou M, 1997).

Το υδάτινο οικοσύστημα επηρεάζεται άμεσα από τις ανθρώπινες δραστηριότητες. Ένας από τους παράγοντες που το επιβαρύνει είναι η απόρριψη ακατέργαστων λυμάτων ή λυμάτων που έχουν υποστεί μόνο μερικό καθαρισμό. Μία παράμετρος της υποβάθμισης του οικοσυστήματος, είναι η εισαγωγή με τα λύματα μικροοργανισμών χερσαίας προέλευσης, οι οποίοι αλλοιώνουν τους οικολογικούς χαρακτήρες του. Η απόθεση των τελικών προϊόντων της επεξεργασίας λυμάτων ή των ακατέργαστων λυμάτων σε υδάτινες περιοχές (θάλασσα, λίμνες, ποτάμια) έχει άμεση επίδραση στον αποδέκτη για αυτό και η χημική και μικροβιολογική ποιότητα του τελικού προϊόντος πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μην επιφέρει αλλοιώσεις στη χημική και μικροβιακή ισορροπία του υδάτινου αποδέκτη. Το ίδιο ισχύει και για τα απορρίμματα γενικά τα οποία καταλήγουν είτε σε κάποια χωματερή είτε θάβονται στο έδαφος.

Τα εντεροβακτήρια, τα κοπρανώδη εντεροβακτήρια και οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι καθώς και το *C.perfringens* είναι αποδεκτό ότι αποτελούν βακτηριακούς δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης του νερού (ΑΡΗΑ 1985). Αυτά τα βακτήρια σε φυσικά νερά χαρακτηρίζονται από σχετικά μικρή πληθυσμιακή ομοιομορφία, καθώς και μικρό μέσο κυτταρικό μέγεθος (Sorensen et al 1989).



Το υδάτινο μικροβιακό οικοσύστημα είναι ιδιαίτερα ποικιλόμορφο και ετερογενές, συμπεριλαμβανομένων των επιφανειών και των υλικών που έρχονται σε επαφή με το νερό και ευνοούν ή όχι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Το *C.perfringens* , ένα σπορογόνο αναερόβιο βακτήριο αποτελεί άριστο δείκτη σε τέτοιου είδους ετερογενή οικοσυστήματα.

Παρόλη την ενδεχόμενη μετάδοση των ασθενειών μέσω του νερού είναι γενικά αποδεκτό ότι πολλές απ'αυτές τις ασθένειες μεταδίδονται όχι μόνο λόγω της κακής ποιότητας του νερού, αλλά λόγω και πολλών άλλων παραγόντων.(Pinfold 1990).

Η βοήθεια που προκύπτει από την βακτηριολογική-μικροβιολογική εξέταση του νερού έγκειται στην ανίχνευση ανθρώπινης ή ζωικής κοπρανώδους μόλυνσης. Η απομόνωση του *C.perfringens* από το νερό χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλή και ομοιόμορφη-διαρκή αποθεματική αφθονία. Εποχιακές διακυμάνσεις επίσης παρατηρούνται (Hirn 1980).Από παλιά το πιο κοινό και ευρέως διαδεδομένο στέλεχος του *C.perfringens* ανήκει στον τύπο Α. Άλλοι τύποι έχουν περιστασιακά απομονωθεί από λάδι και νερό, όμως η παρουσία τους στην φύση θεωρείται σχετικά περιορισμένη και ίσως και να οφείλεται σε τυχόν επιμολύνσεις εξαιτίας επιμολυσμένων υλικών.

Η παρούσα διατριβή διαπραγματεύεται την ποιοτική και ημι-ποσοτική ανάλυση του *C.perfringens* σε διαφορετικά υδάτινα περιβάλλοντα .

Το μεγάλο μήκος των ποταμών, η μεγάλη ετερογένεια των σταθμών δειγματοληψίας(πηγές, ρέματα, βιοτικοί, αβιοτικοί παράγοντες κτλ) παρέχουν περιβαλλοντικούς παράγοντες με διαφορετική επίδραση(ένταση) στο *C.perfringens*. Γενικά δεν επιτρέπεται εύκολα η επιβίωση των βλαστικών



μορφών του *C.perfringens*. Οι σπορογόνες μορφές είναι περισσότερο συχνές διότι είναι και πιο ανθεκτικές στους «στρεσογόνους» παράγοντες και γενικά ανευρίσκονται συχνά στους ποταμούς(Bezirtzoglou E., Dimitriou D., Panagiou A., Kagalou I.,1994).

Σε αντίθεση με τα οικοσυστήματα των λιμνών που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιογένεια και επηρεάζονται λιγότερο από εξωγενείς παράγοντες, στα ποτάμια, ανευρίσκονται περισσότερες βλαστικές μορφές. (Bezirtzoglou E., Dimitriou D., Panagiou A., Kagalou I.,1994).

Το *C.perfringens* είναι πολύ περισσότερο κοινό σε περιοχές δειγματοληψίας που βρίσκονται κοντά σε βιομηχανικές και οικιστικές δραστηριότητες(Bezirtzoglou E., Dimitriou D., Panagiou A., Kagalou I.,1994).

Το στέλεχος αυτό χρησιμοποιείται σε πολλές χώρες για την ανίχνευση κοπρανώδους μόλυνσης παλαιάς προέλευσης.(Oragui και Mara 1983, Sorensen et al 1989). Όμως επειδή ο μικροοργανισμός αποβάλλεται με τα κόπρανα τόσο ανθρώπων όσο και ζώων, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ειδικός δείκτης που διακρίνει την κοπρανώδη μόλυνση εάν προέρχεται από ζώα ή από άνθρωπο.

Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η ακριβής πηγή της μόλυνσης των νερών(Αντωνιάδης 1982) ο *Rhodococcus coprophilus* χρησιμοποιείται ως ειδικός δείκτης της ζωικής κοπρανώδους μόλυνσης.(Oragui και Mara 1983).

Ένας από τους κύριους λόγους για το γεγονός ότι λίγα είναι γνωστά για την σύσταση των ειδών και την ποικιλότητά τους στα νερά των λιμνών και των ποταμών είναι η δυσκολία ακριβούς και συμβατικής ταυτοποίησης, η οποία απαιτεί καλλιέργεια σε εκλεκτικό θρεπτικό υλικό(Lee και Fuhrman 1999).



Ένας άλλος λόγος είναι ότι τα βακτήρια που βρίσκονται σε υδάτινα οικοσυστήματα είναι γενικά δύσκολα έως και καθόλου ανιχνεύσιμα(CFU<1%) ή βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Είναι κοινά αποδεκτό ότι υπάρχει ανάγκη για γρήγορες και εύκολες τεχνικές, οι οποίες μπορεί να μην ταυτοποιούν επακριβώς συγκεκριμένα είδη μικροοργανισμών όμως διαφοροποιούν συγκεκριμένες βακτηριακές κοινότητες από άλλες. Οι βακτηριακοί πληθυσμοί έχουν βρεθεί γενικά υψηλότεροι το φθινόπωρο και χειμώνα απ'ότι την άνοιξη ή νωρίς το καλοκαίρι.(Gordon 1985)

Τα *C.botulinum* και *Vibrio sp* έχουν απομονωθεί σε διάφορα υδάτινα οικοσυστήματα. Τα ψάρια επιμολύνονται από μικροοργανισμούς κατόπιν μόλυνσης τους από ανθρωπογενείς πηγές ή άλλα θερμόαιμα είδη.(Hackeney και Dicharry 1988).

Το *C.botulinum* είναι παρόν σε όλα τα ιχθυρά και ανευρίσκεται σε ιζήματα. Τύποι E, B, και F βρίσκονται στο έντερο και σπανιότερα στο δέρμα(Huss et al 1974). Τα ιχθυρά ίσως αποβιώνουν λόγω κατανάλωσης άλλων ιχθυρών, που βρίσκονται στην ίδια υδατοσυλλογή, και πάσχουν από βουτυλισμό.(Eklund et al 1982).

Σε είδη ιχθυρών που προέρχονται από υδατοκαλλιέργειες, όπως η πέστροφα, δύναται να επέλθει επιμόλυνση λόγω κακής διαχείρισης. Αυξημένη απόδειξη αποτελεί η πέστροφα που επιμολύνεται από *C.botulinum* (Cann et al 1975) σε υδατοσυλλογές.

Το *C.perfringens* έχει απομονωθεί από ψάρια αλλά προέρχεται κυρίως από κόπρανα ανθρώπων και ζώων.(Matches et al 1974).



2.1 ΥΔΑΤΙΝΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ - ΡΟΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

Οικοσύστημα: Το οικοσύστημα αποτελεί τη θεμελιώδη οικολογική μονάδα. Πρόκειται για οργανωμένη ενότητα έμβιων όντων και αβιοτικών στοιχείων, τα οποία ανταλλάσσουν μεταξύ τους ενέργεια, υλικά και πληροφορία, τροφοδοτούμενα από μια πηγή ενέργειας. Το οικοσύστημα δηλαδή δεν περιλαμβάνει μόνο τους ζωντανούς οργανισμούς και το περιβάλλον τους, αλλά και τις σχέσεις τους. Επομένως το οικοσύστημα είναι ένα σύστημα φυσικοχημικών, βιολογικών και κοινωνικών παραγόντων, που εξασφαλίζει την παρουσία μιας βιοκοινωνίας σε ένα βιότοπο και αποτελείται από δύο ομάδες στοιχείων : α) Βιοτικά στοιχεία (φυτά, ζώα, βακτήρια) και β) Τα αβιοτικά στοιχεία (Νερό, Διοξείδιο του Άνθρακα, ενεργός οξύτητα, άλατα).

Η οριοθέτηση ενός οικοσυστήματος είναι σχεδόν πάντοτε αυθαίρετη, ακόμη και αν υπάρχουν φυσικά όρια. Ένα νησί, για παράδειγμα, μπορεί να θεωρηθεί ένα οριοθετημένο σύστημα γεωγραφικά, αλλά -παράλληλα- δέχεται ενέργεια από τον ήλιο, υλικά μέσω του αέρα και μπορεί να αποτελεί σταθμό μεταναστευτικών πουλιών. Επομένως, είναι ένα σύστημα ανοιχτό. Γενικά, στη φύση κανένα σύστημα δεν είναι κλειστό, καθώς ανταλλάσσει ύλη και ενέργεια με το περιβάλλον του. Κάθε οικοσύστημα συνίσταται από το αβιοτικό (αβιοτική συνιστώσα) και το βιοτικό μέρος (βιοτική συνιστώσα). Στην περίπτωση του οικοσυστήματος της λίμνης των Ιωαννίνων για παράδειγμα εννοούμε με τον όρο "σύστημα" τη λίμνη, το λεκανοπέδιο, το ίζημα και όλους τους βιοτικούς παράγοντες που εμπεριέχονται, καθώς έχουμε μία αλληλοσύνδεση αυτών. Τρεις διακριτές ενότητες απαρτίζουν την



αβιοτική συνιστώσα: η λιθόσφαιρα (ο στερεός φλοιός της Γης), η υγρόσφαιρα (το νερό στην υγρή του φάση) και η ατμόσφαιρα. Η βιοτική συνιστώσα αντιπροσωπεύει το ζωντανό μέρος των οικοσυστημάτων και μπορεί να εντοπίζεται σε τμήματα και των τριών αβιοτικών συνιστωσών. Απαρτίζεται από τρεις διακριτές ενότητες ως προς τη λειτουργία που επιτελούν: τους παραγωγούς, τους καταναλωτές και τους αποικοδομητές. Οι παραγωγοί, που κατά κύριο λόγο είναι τα πράσινα φυτά, είναι οι οργανισμοί που φωτοσυνθέτουν, δηλαδή δεσμεύουν την ηλιακή ενέργεια και τη μετατρέπουν σε χημική υπό τη μορφή οργανικών ενώσεων. Οι καταναλωτές χρησιμοποιούν αυτές τις οργανικές ουσίες και, κυρίως, είναι τα ζώα και ο άνθρωπος. Οι αποικοδομητές είναι μικροοργανισμοί που αποικοδομούν τα οργανικά υλικά των νεκρών ιστών, συντελώντας έτσι στην ανακύκλωση της ύλης. Στα πλαίσια του οικοσυστήματος η βιοτική συνιστώσα αποτελείται από άτομα του ίδιου είδους, τα οποία συγκροτούν/συνθέτουν πληθυσμούς, που με τη σειρά τους συγκροτούν βιοκοινότητες. Ένας πληθυσμός αποτελείται από άτομα του ίδιου είδους (άτομα που αναπαράγονται μεταξύ τους και δίνουν γόνιμους απογόνους), τα οποία ζουν στον ίδιο χώρο και για το ίδιο χρονικό διάστημα. Πληθυσμοί διαφορετικών ειδών που ζουν στον ίδιο χώρο και για το ίδιο χρονικό διάστημα και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους απαρτίζουν τις βιοκοινότητες.

Οι βασικές λειτουργίες που επιτελούνται σε ένα οικοσύστημα είναι

- α) Η προσήλωση της ηλιακής ενέργειας στα χλωροφυλλούχα φυτά (φωτοσύνθεση),
- β) Η ροή της ενέργειας μέσα από τα τροφικά επίπεδα και
- γ) Η ανακύκλωση των χημικών ουσιών (τροφικοί ή βιογεωχημικοί κύκλοι).



Αρχικά, η ενέργεια για όλα τα φυσικά οικοσυστήματα προέρχεται από τον ήλιο. Η ηλιακή ενέργεια (ηλεκτρομαγνητική) δεσμεύεται από τα μεγάλα φύκη, τα υδρόβια και ελώβια φυτά και τους φυτο-πλαγκτονικούς οργανισμούς με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης που την μετασχηματίζουν σε χημική με τη μορφή οργανικών ενώσεων,



Ως γνωστό η ενέργεια μέσα στο οικοσύστημα ρέει μονόδρομα και μεταφέρεται μέσω των τροφικών αλυσίδων από τους παραγωγούς (φυτά, φυτοπλαγκτόν) στους φυτοφάγους οργανισμούς (ζωοπλαγκτόν). Από εκεί στους ανώτερους σαρκοφάγους (πτηνά, άνθρωπος), στους αποικοδομητές (βακτήρια, ζύμες, μύκητες) και τελικά χάνεται, είτε με τη μορφή θερμότητας, είτε με τη μορφή αυξημένης εντροπίας, χωρίς έτσι να επιστρέφει στους παραγωγούς. Αυτό σημαίνει ότι η ενέργεια πρέπει συνεχώς και σταθερά να παρέχεται σε κάθε οικοσύστημα απ' έξω. Κατά κανόνα δε από το ηλιακό φως. Έτσι ισχύει ο γενικός κανόνας ότι μόνο το 1/10 της ενέργειας μετατρέπεται σε βιομάζα από το ένα τροφικό επίπεδο στο επόμενο, ενώ το υπόλοιπο χάνεται σαν ενέργεια μεταβολισμού, συντήρησης κ.λ.π.

Πάντως, παρά το γεγονός ότι ένα οικοσύστημα δεν μπορεί να λειτουργήσει χωρίς την παροχή ενέργειας, αυτή η ενέργεια δεν μπορεί από μόνη της να προκαλέσει την "λειτουργία" του. Πρέπει τουλάχιστον είκοσι διαφορετικά στοιχεία να είναι παρόντα για να συντηρήσουν τη διαδικασία της ζωής στο οικοσύστημα από τα οποία τα κύρια που χρειάζονται είναι ο άνθρακας, το οξυγόνο, το άζωτο, το υδρογόνο, ο φωσφόρος, το θείο. Αντίθετα προς τη ροή της ενέργειας, η οποία είναι



μιας κατεύθυνσης, η ροή των στοιχείων αυτών είναι κυκλική, δηλαδή δεν απαιτείται συνεχής παροχή των στοιχείων στο οικοσύστημά". Οι παραγωγοί μεταφέρουν τα στοιχεία στους καταναλωτές και από εκεί μέσω των αποικοδομητών επιστρέφουν στο περιβάλλον απ' όπου λαμβάνονται και πάλι από τους παραγωγούς.

Στην περίπτωση των λιμνών των Ιωαννίνων και της Καστοριάς τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια υπέρμετρη αύξηση της πρωτογενούς παραγωγής σε σχέση με τους οργανισμούς των άλλων τροφικών επιπέδων. Αυτό φαίνεται μακροσκοπικά από τη μεγάλη έκταση των καλαμώνων σε σχέση με την επιφάνεια της λίμνης, τις πολλές μάζες φυκών και το πράσινο χρώμα του νερού της λίμνης (ύπαρξη μεγάλων ποσοτήτων φυτοπλαγκτού). Πολύ πιθανόν να προέρχεται και από την ύπαρξη μέσα στην υδατοσυλλογή μεγάλων ποσοτήτων θρεπτικών στοιχείων προερχομένων από τα λεκανοπέδια μέσω της έκπλυσης των αγρών, λυμάτων κ.λ.π. Από την άλλη οι καταναλωτές (2^ο τροφικό επίπεδο-ζωοπλαγκτόν) της καθαρής αυτής φυσικής βιομάζας υπάρχουν σε μικρότερα ποσοστά, ενώ τα φυτοφάγα και φυτοπλαγκτονοφάγα ψάρια (2^{ου} τροφικού επιπέδου) σε ελάχιστες ποσότητες για διάφορους λόγους (ανταγωνισμού, μόλυνσης, υπεραλίευσης κ.λ.π.) - σε σχέση πάντα με τα ποσοστά των παραγωγών. Δηλαδή με άλλα λόγια δεν υπάρχει ο τρόπος απαλλαγής των νερών από την υπερβολική και ανεπιθύμητη βλάστηση και φυτοπλαγκτονική μάζα. Έτσι στο νερό των λιμνών περιέχονται μεγάλες ποσότητες οργανικής ύλης, νεκρά φυτά, φυτοπλαγκτόν, καθώς και οργανική ύλη προερχόμενη από τα λεκανοπέδια) προσφέροντας "πλούσιο" υλικό προς αποικοδόμηση στους αποικοδομητές. Λόγω της



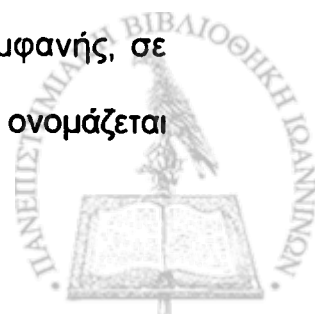
αυξημένης τροφής ο πληθυσμός των αερόβιων αποικοδομητών πολλαπλασιάζεται, μειώνοντας όμως αισθητά το διαλελυμένο οξυγόνο στο νερό, οπότε στη συνέχεια αναλαμβάνουν δράση οι κύριοι αποικοδομητές, οι αναερόβιοι οργανισμοί και έτσι αρχίζει η σήψη. Γι' αυτό το λόγο εισήχθησαν στη λίμνη των Ιωαννίνων από το 1986 και ύστερα φυτοφάγοι και φυτοπλαγκτονοφάγοι κυπρίνοι, ενισχύοντας έτσι το 2^ο τροφικό επίπεδο, παίζοντας έτσι ένα ρόλο ρυθμιστού της πρωτογενούς παραγωγής, απαλλάσσοντας τη λίμνη από τη βλάστηση και το φυτοπλαγκτό και ταυτόχρονα αξιοποιώντας αυτά μετατρέποντας τα σε ζωικές πρωτεΐνες.

2.2.ΡΥΠΑΝΣΗ – ΜΟΛΥΝΣΗ – ΕΥΤΡΟΦΙΣΜΟΣ

2.2.1. ΡΥΠΑΝΣΗ

Με τον όρο ρύπανση του περιβάλλοντος εννοούμε όλες εκείνες τις ανεπιθύμητες μεταβολές των φυσικών, χημικών, βιολογικών χαρακτήρων του αέρα, του εδάφους και των υδάτων. Οι μεταβολές αυτές μπορούν να επιδράσουν ή επιδρούν βλαβερά στην ανθρώπινη ζωή ή στη ζωή των υπολοίπων ζωντανών οργανισμών. Είναι ακόμη οι ανεπιθύμητες μεταβολές που μπορεί να αλλοιώσουν ή αλλοιώνουν τις πηγές παροχής πρώτων υλών. Έτσι η ρύπανση πρέπει να θεωρηθεί ως πρόβλημα καταστροφής της φύσης και των αναπαραγωγικών μηχανισμών.

Ειδικότερα η ρύπανση των νερών, το οποίο καλύπτει το 70% της επιφάνειας της γης, είναι πιο συχνή και γίνεται περισσότερο εμφανής, σε σχέση με τον αέρα και το έδαφος. Ρύπανση υδάτων ονομάζεται



οποιαδήποτε μεταβολή των φυσικών, χημικών και βιολογικών παραμέτρων του νερού (θαλασσών, ποταμών, λιμνών), λόγω της παρουσίας σε αυτό ουσιών σε ποσότητα που υπερβαίνει τα φυσιολογικά όρια. Η μεταβολή αυτή μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στον άνθρωπο, σε άλλους ζωικούς ή φυτικούς οργανισμούς και γενικότερα να διαταράξει την ισορροπία των οικοσυστημάτων σε μικρή ή μεγάλη γεωγραφική κλίμακα. Οι ουσίες αυτές διαλύονται στο νερό, επιπλέουν ή κατακάθονται στον πυθμένα και προέρχονται κυρίως από ανθρωπογενείς δραστηριότητες, όπως το πετρέλαιο και τα λιπάσματα. Επίσης, είναι πιθανή η απελευθέρωση ενέργειας υπό τη μορφή θερμότητας ή ραδιενέργειας, η οποία προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας του νερού, οπότε έχουμε τη «θερμική ρύπανση των υδάτων».

Ως γνωστό η κατανομή του νερού είναι άνιση στο χώρο και ανομοιόμορφη στο χρόνο, έτσι που σε ορισμένες περιοχές της χώρας μας παρατηρείται εξάντληση των οικονομικότερων εκμεταλλεύσιμων φυσικών υδάτινων πόρων, που περιορίζει την ανάπτυξη τους ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, καθώς η επέκταση των αρδεύσεων, η εκβιομηχάνηση, ο τουρισμός, η συνεχιζόμενη αστικοποίηση του πληθυσμού και η άνοδος του βιοτικού επιπέδου, οι απαιτήσεις ανάπαυσης και ψυχαγωγίας δημιουργούν συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες σε νερό.

Αλλά και η χρησιμοποίηση των νερών σε όλες τις δραστηριότητες του ανθρώπου, πέρα από την κατανάλωση συνεπάγεται αλλοίωση και υποβάθμιση των ποιοτικών χαρακτηριστικών, από την προσθήκη κυρίως ρυπογόνων ουσιών, που ως οικιστικά λύματα ή υγρά απόβλητα γεωργικών και εξωγεωργικών δραστηριοτήτων εισέρχονται στο πλησιέστερο υδάτινο αποδέκτη.



Έτσι όλες οι δραστηριότητες του ανθρώπου δημιουργούν ανεπιθύμητες καταστάσεις και επηρεάζουν δυσμενώς τη δομή και λειτουργία του υδάτινου οικοσυστήματος. Ειδικότερα, επιδεινώνονται τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά του υδάτινου αποδέκτη, καταστρέφεται η διαδικασία του φυσικού αυτοκαθαρισμού, διαταράσσεται η βιολογική και οικολογική ισορροπία, δημιουργείται κίνδυνος για τη δημόσια υγεία, σε αρκετές δε περιπτώσεις γίνονται τα νερά ακατάλληλα για τις χρήσεις για τις οποίες προορίζονται.

2.2.2 Περιβάλλον και Ανθρώπινη Υγεία

2.2.2.1.Περιβάλλον

Περιβάλλον είναι όλα τα εξωτερικά ερεθίσματα που προέρχονται από το σύνολο των έμβιων (ζωντανοί οργανισμοί και σχέσεις μεταξύ τους) και των μη έμβιων στοιχείων (ανόργανες, οργανικές ενώσεις, φυσικά φαινόμενα) που επιδρούν σε έναν οργανισμό και καθορίζουν την ανάπτυξή του. Ένας διαχωρισμός που προκύπτει στις οργανωμένες ανθρώπινες κοινωνίες είναι μεταξύ φυσικού και τεχνητού περιβάλλοντος. Φυσικό περιβάλλον μπορεί να θεωρηθούν το σύνολο των οργανισμών του πλανήτη (φυτικοί, ζωικοί, μύκητες, ιοί κ.ά.), τα ανόργανα στοιχεία και ενώσεις, οι οργανικές ενώσεις, οι φυσικοί παράγοντες (ηλιακή ακτινοβολία, άνεμοι κ.λπ.), καθώς και οι σχέσεις και οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ όλων αυτών. Τεχνητό περιβάλλον είναι τα προϊόντα των ανθρώπινων δραστηριοτήτων, τα αποτελέσματα της κοινωνικής οργάνωσης, της τεχνολογίας και όλων των μέσων που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος.



2.2.2.2. Περιβάλλον και Υγεία

Ο άνθρωπος αποτελεί ένα ζωντανό οργανισμό που ζει μέσα στο περιβάλλον, δέχεται ερεθίσματα από αυτό και ανταλλάσσει ύλη και ενέργεια. Ο Ιπποκράτης είπε ότι «το περιβάλλον ρυθμίζει την υγεία του ανθρώπου και διαμορφώνει εκείνα τα στοιχεία που κάνουν έναν άνθρωπο να διαφέρει από τον άλλο και ένα έθνος να διαφέρει από το άλλο». Στη σύγχρονη εποχή ο ρόλος του περιβάλλοντος στη ζωή και την ανάπτυξη των ανθρώπων όχι μόνο δεν απορρίφθηκε, αλλά ενισχύεται από επιστήμες, όπως η βιολογία και η ψυχολογία. Ο άνθρωπος είναι ένας ομοιοστατικός οργανισμός, δηλαδή ένας οργανισμός που εμφανίζει την τάση για σταθερότητα των διαφόρων φυσιολογικών στοιχείων (θερμοκρασία, σύνθεση αίματος) και για αποκατάσταση της σταθερότητας σε περίπτωση μεταβολής της. Έτσι, μπορεί να επιζήσει σε συγκεκριμένες μεταβολές του περιβάλλοντος, μέσα στις οποίες μπορούν να λειτουργούν οι απαραίτητες για τη ζωή φυσικοχημικές διεργασίες, με τρόπο που να μη διαταράσσεται η φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού, δηλαδή η υγεία του. Εάν το περιβάλλον είναι ευνοϊκό, η επίδρασή του στην ανθρώπινη υγεία είναι θετική, ενώ σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες η επίδραση αυτή είναι αρνητική. Η ρύπανση του περιβάλλοντος, δηλαδή η παρουσία ουσιών ή ενέργειας που δεν είναι δυνατόν να αφομοιωθούν ή να εξουδετερωθούν με φυσικούς τρόπους και δημιουργούν αρνητικές επιπτώσεις στους ζωντανούς οργανισμούς, έχει άμεση συνάρτηση με την ανθρώπινη υγεία.



3. ΠΗΓΕΣ ΚΑΙ ΕΙΔΗ ΡΥΠΑΝΣΗΣ

3.1 Πηγές ρύπανσης

Σημειακές πηγές ρύπανσης: έτσι χαρακτηρίζονται όλες οι πηγές που εκβάλλουν ρύπους σε εντοπισμένα σημεία. Αυτά είναι τα άκρα αγωγών, τάφρων ή αποχετευτικών δικτύων που καταλήγουν σε υδάτινους αποδέκτες. Σε αυτή την κατηγορία ταξινομούνται οι βιομηχανικές μονάδες, οι μονάδες επεξεργασίας λυμάτων που απομακρύνουν μέρος των ρύπων, ενεργά η εγκαταλελειμμένα ορυχεία, πετρελαιοπηγές και τάνκερς. Επειδή βρίσκονται σε συγκεκριμένο μέρος, συνήθως σε αστικές περιοχές, είναι σχετικά εύκολος ο εντοπισμός τους και κατά συνέπεια η παρακολούθησή τους.

Μη σημειακές πηγές ρύπανσης: είναι πηγές οι οποίες δεν είναι δυνατόν να εντοπιστούν σε κανένα ειδικό σημείο απορροής. Είναι συνήθως μεγάλες περιοχές που ρυπαίνουν το νερό με επιφανειακή απορροή, υπεδάφια ροή ή απόθεση στην ατμόσφαιρα. Τέτοιες είναι, για παράδειγμα, οι απορροές χημικών στα επιφανειακά νερά και η διαρροή τους στο έδαφος μέσα από χωράφια, υλοτομημένα δάση, ζωοτροφές, δρόμους, αποχετεύσεις κ.ά. Εκτιμάται ότι σε χώρες με αγροτική παραγωγή η γεωργική ρύπανση, υπό τη μορφή στερεών αποθέσεων, ανόργανων λιπασμάτων, κοπριάς, αλάτων διαλυμένων στο νερό άρδευσης και παρασιτοκτόνων, είναι υπεύθυνη για πάνω από το 60% των συνολικών ρύπων που φτάνουν σε ποτάμια και λίμνες. Ο έλεγχος της ρύπανσης αυτού του τύπου είναι πολύ δυσχερής, επειδή είναι δύσκολο να εντοπιστούν οι τόσο διαφορετικές και διεσπαρμένες πηγές ρύπανσης.



3.2 ΦΥΣΗ ΤΩΝ ΡΥΠΩΝ

Οι ρύποι κατά τη φυσική τους κατάσταση διακρίνονται:

(α) Στερεά. Τέτοια είναι τα πάσης φύσης απορρίμματα και τα κατάλοιπα διαφόρων επεξεργασιών. Η ρύπανση αυτού του είδους κρίνεται γενικά ότι δεν είναι ιδιαίτερα σημαντική, (β) Υγρά. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα αστικά λύματα, τα απόβλητα βιομηχανιών, των βιοτεχνιών, και των γεωργοκτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων. Από την εξέταση των ρύπων αυτών συνεπάγεται ότι στο μικρό και ιδιαίτερα ζωτικό χώρο του λεκανοπεδίου υπάρχει πολύ μεγάλος αριθμός δραστηριοτήτων που παράγουν υγρά απόβλητα και οι δραστηριότητες αυτές χαρακτηρίζονται από μία μεγάλη ποικιλία ειδών ρύπων. Ο όγκος των συνολικά παραγόμενων αποβλήτων μπορεί να χαρακτηριστεί αρκετά μεγάλος. Τα ρυπαντικά φορτία καλύπτουν ένα αρκετά ευρύ φάσμα οργανικών και χημικών ρυπαντών. Το δε οργανικό φορτίο είναι ιδιαίτερα ψηλό στα αστικά απόβλητα-λύματα, στα απόβλητα των σφαγείων, των τυροκομείων και των χοιροστασίων. Το χημικό φορτίο που αποτελείται κύρια από τροφικά άλατα, N, P, και K, καθώς και τα βαρέα μέταλλα παρουσιάζεται και αυτό ιδιαίτερα ψηλό στα αστικά απόβλητα-λύματα, στα απόβλητα των σφαγείων, χοιροστασίων και μεταλλοβιομηχανιών. (γ). Αέρια: Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα αέρια που παράγονται κατά τη παραγωγική διαδικασία διαφόρων δραστηριοτήτων και κύρια με τη μορφή αερίων προϊόντων καύσης (π.χ τα καυσαέρια των αυτοκινήτων).



3.3 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΤΩΝ ΡΥΠΩΝ

Η παραγωγή ρύπων και η ρύπανση του περιβάλλοντος είναι συνδεδεμένη αιτιατά με τις ανθρώπινες δραστηριότητες. Κατά κατηγορίες, οι δραστηριότητες που παράγουν ρύπους αφορούν: (α) Εκμετάλλευση φυσικών πόρων. Η ρύπανση που προέρχεται από δραστηριότητες αυτής της κατηγορίας εντοπίζεται κυρίως στην περιοχή των λατομείων. Τα προβλήματα εδώ είναι οπωσδήποτε σοβαρά από την πλευρά της αλλοίωσης του φυσικού περιβάλλοντος, (β) Παραγωγική διαδικασία μεταποίησης. Δραστηριότητες που αφορούν τον μεταποιητικό τομέα και υπάρχουν διάσπαρτες αρκετές με τη μορφή βιοτεχνιών περισσότερο, όπως τα ξυλουργεία, τυροκομεία, μονάδες παραγωγής ζωοτροφών, μονάδες κοπής και κατεργασίας μαρμάρων και λιγότερο με τη μορφή βιομηχανιών, όπως διάφορες μεταλλοβιομηχανίες, εργοστάσια γάλακτος και άλλα. (γ) Διάφορες δραστηριότητες. Μια σειρά από διάφορες δραστηριότητες μεγαλύτερες ή μικρότερες που περισσότερο ή λιγότερο παράγουν ρύπους, είναι υπεύθυνες για ένα σημαντικό μέρος της ρύπανσης στο λεκανοπέδιο. Τέτοιες δραστηριότητες είναι κυρίως η χρήση των λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειες και τα διάφορα συνεργεία και τα πλυντήρια - λιπαντήρια αυτοκινήτων, (δ) Τέλος, η διαβίωση του αστικού πληθυσμού των πόλεων και των γύρω κοινοτήτων με όλες τις συνεπαγόμενες οικιακές και μη ανάγκες που η ικανοποίηση τους δημιουργεί τα αστικά λύματα, τα απορρίμματα και άλλα απόβλητα και κατάλοιπα.

Για τις περιοχές των λεκανοπεδίων είναι γεγονός ότι η ρύπανση δεν προέρχεται από ρύπους που δεν ελέγχονται κατά την παραγωγική



διαδικασία διαφόρων δραστηριοτήτων, αλλά από τη διάθεση στο περιβάλλον των πάσης φύσης λυμάτων, αποβλήτων απορριμμάτων και καταλοίπων.

3.4 Ρύποι, επιπτώσεις

Παθογόνοι μικροοργανισμοί: Έτσι ονομάζονται όσοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να μολύνουν ή να μεταφέρουν ασθένειες. Πολλά είδη παθογόνων οργανισμών είναι ικανά να επιβιώσουν στο νερό και να διατηρήσουν τις μολυσματικές ιδιότητές τους για μεγάλες χρονικές περιόδους. Περιλαμβάνουν είδη όπως τα βακτήρια, τους ιούς, τα πρωτόζωα κ.ά.

Βακτήρια: Μονοκύτταροι οργανισμοί, συνήθως άχρωμοι, με σχήμα ραβδοειδές, σφαιρικό ή ελικοειδές. Πολλές ασθένειες μεταδίδονται μέσω παθογόνων βακτηρίων, όπως, για παράδειγμα, η χολέρα, η οποία δυστυχώς εμφανίζεται ακόμη σε χώρες του τρίτου κόσμου. Άλλες ασθένειες που προκαλούνται από βακτήρια είναι ο τυφοειδής πυρετός και η δυσεντερία.

Ιοί: Οι μικρότερες γνωστές βιολογικές δομές, που δρουν ως παράσιτα, καθώς χρησιμοποιούν άλλον οργανισμό για να ζήσουν και να αναπαραχθούν. Είναι γνωστόν ότι ιός ευθύνεται για τη μετάδοση της λοιμώδους ηπατίτιδας μέσω του νερού.

Πρωτόζωα: Είναι μονοκύτταροι οργανισμοί, πιο σύνθετοι στη δομή από τα βακτήρια, που δρουν παρασιτικά ή μη και μπορεί να είναι παθογόνοι ή όχι. Από παρασιτικά πρωτόζωα μεταδίδεται η αμοιβαδική δυσεντερία.

Ανόργανες και οργανικές διαλυτές στο νερό ουσίες: Περνούν στο νερό είτε από τον αέρα μέσω της βροχής είτε κατά τη διήθησή του μέσα από το



έδαφος είτε (η πιο συνηθισμένη περίπτωση) λόγω της ανάμειξής του με αστικά λύματα ή υγρά απόβλητα. Οι οργανικές ενώσεις, λόγω της αποικοδόμησής τους από τους μη παθογόνους μικροοργανισμούς του νερού, προκαλούν την κατανάλωση του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου. Έτσι όμως οι αερόβιοι οργανισμοί του νερού, όπως τα ψάρια, ασφυκτιούν και πεθαίνουν, ενώ αναπτύσσονται οργανισμοί που δεν χρειάζονται οξυγόνο για να ζήσουν, οι οποίοι παράγουν ανεπιθύμητα προϊόντα, όπως δύσοσμα αέρια (υδρόθειο, μεθάνιο). Από τις ανόργανες ουσίες πρόβλημα δημιουργούν τα θετικά φορτισμένα ιόντα των λεγόμενων βαρέων μετάλλων, όπως ιόντα μολύβδου (Pb^{2+}), υδραργύρου (Hg^+ , Hg^{2+}), χρωμίου (Cr^{3+} , Cr^{6+}) και καδμίου (Cd^{2+}), τα οποία βρίσκονται συνήθως σε βιομηχανικά απόβλητα και είναι τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς.

Αιωρούμενες στο νερό ενώσεις. Είναι συνήθως ανόργανες (σπανιότερα οργανικές) ενώσεις, που στα φυσικά νερά προέρχονται από τη διάβρωση εδαφών, στα αστικά λύματα από αδιάλυτα στερεά που παρασύρονται στους αγωγούς αποχέτευσης και στα υγρά βιομηχανικά απόβλητα από αδιάλυτα στερεά παραπροϊόντα της παραγωγικής διαδικασίας. Συνήθως απορροφούν στην επιφάνειά τους διαλυτές ενώσεις οργανικές ή ανόργανες, πολλές από τις οποίες είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες, όπως τα διάφορα ζιζανιοκτόνα.



3.5 ΕΙΔΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΠΗΓΩΝ ΡΥΠΑΝΣΗΣ

Οι πηγές ρύπανσης των λεκανοπεδίων Ιωαννίνων και Καθτοριάς αλλά και των ποταμών που μελετώνται στην παρούσα διατριβή κατά βασικές κατηγορίες είναι: (α) Γεωργοκτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις. (π.χ χοιροστάσια, πτηνοτροφεία, ιχθυοτροφεία κ.α), (β) Βιομηχανίες-βιοτεχνίες. (π.χ μεταλλοβιομηχανίες, τυροκομεία, λατομεία, βιομηχανίες-βιοτεχνίες παραγωγής ζωοτροφών, πλυντήρια και συνεργεία αυτοκινήτων κ.α) (γ) Πόλη και γύρω οικισμοί. (Λύματα όπως βόθροι, χαβούζες και παράνομες συνδέσεις με το αποχετευτικό δίκτυο, απορρίμματα κάθε φύσης), (δ). Λιπάσματα γεωργικών καλλιεργειών, και (ε) Φυτοφάρμακα γεωργικών εκμεταλλεύσεων.



4. Παράμετροι φυσικοχημικού ελέγχου νερών

4.1. Θερμοκρασία νερών (T)

Ακριβή στοιχεία της θερμοκρασίας είναι απαραίτητα σε μια υδρολογική μελέτη. Η θερμοκρασία παίζει καθοριστικό ρόλο σε όλα τα είδη των χημικών αντιδράσεων αλλά και στα διάφορα φυσικά φαινόμενα.

Στα υδάτινα οικοσυστήματα, η θερμοκρασία του νερού και ιδιαίτερα η μεταβολή της θερμοκρασίας και το βάθος επιδρά στη δημιουργία ρευμάτων, στην οξυγόνωση του νερού, στην παραγωγή πλαγκτόν και γενικά στη διαβίωση των υδρόβιων οργανισμών.

Στα δείγματα που παίρνονται από διάφορα βάθη η θερμοκρασία του νερού μετράται αμέσως, πριν η μάζα του νερού του δείγματος αλλάξει θερμοκρασία.

Η θερμοκρασία, συνήθως μετράται στο πεδίο, χρησιμοποιώντας υδραργυρικά θερμόμετρα ($^{\circ}\text{C}$).

4.2. Αγωγιμότητα (SpC)

Η αγωγιμότητα εκφράζει την ευκολία με την οποία το ηλεκτρικό ρεύμα διέρχεται μέσα από διάφορους αγωγούς

Η μέτρηση της αγωγιμότητας δίνει διάφορες πληροφορίες για τις διαλυμένες ουσίες-άλατα. Στην πράξη χρησιμοποιείται η ειδική αγωγιμότητα, η οποία συμβολίζεται με το SpC και η τιμή της εκφράζεται σε ms/sec. Η ειδική αγωγιμότητα του νερού επηρεάζεται σημαντικά από την θερμοκρασία και αυξάνει μ' αυτήν. Για το λόγο αυτό, κάθε φορά που γίνονται μετρήσεις αγωγιμότητας, καταγράφεται και η θερμοκρασία του νερού.

Η ειδική αγωγιμότητα του νερού παρέχει πληροφορίες για την ποιότητα του νερού αλλά και το βαθμό ρύπανσης. Σε μη ρυπασμένα



νερά η αγωγιμότητα αυξάνει 2-3% ανά βαθμό °C. Για τη μέτρηση της αγωγιμότητας χρησιμοποιούνται ειδικά όργανα, τα αγωγιμόμετρα.

4.3. Αιωρούμενα στερεά (TDS)

Τα φυσικά νερά δέχονται μεγάλες ποσότητες αιωρούμενων σωματιδίων που προέρχονται κυρίως από την φυσική αποσάθρωση των πετρωμάτων και του εδάφους και σε μικρότερο βαθμό από τα βιομηχανικά λύματα και οικιακά απορρίμματα.

Οι παράμετροι που εκφράζουν ποσοτικά τα διάφορα χαρακτηριστικά των αιωρούμενων στερεών στα φυσικά νερά και τα λύματα είναι:

α) Το σύνολο των περιεχόμενων στερεών ουσιών (TDS, total dissolved solids) που προσδιορίζεται με εξάτμιση του νερού σε 105°C και ζύγιση. β) Τα μη διασπώμενα και πτητικά συνολικά στερεά. γ) Τα αιωρούμενα και διαλυμένα στερεά, SS, DS, (Suspended και Dissolved solids

Τα κυριώτερα προβλήματα από την παρουσία των αιωρούμενων στερεών στα φυσικά νερά είναι:

- Μειώνουν την διαπερατότητα του φωτός με αποτέλεσμα την μείωση του ρυθμού της φωτοσύνθεσης.
- Είναι επιβλαβή για τους υδρόβιους οργανισμούς
- Σε αρκετές περιπτώσεις μεταφέρουν σε προσροφημένη κατάσταση διάφορες τοξικές ουσίες.

4.4. οξύτητα (pH)

Η οξύτητα (pH) είναι μια καθοριστική ιδιότητα των υδάτινων διαλυμάτων και κατ'επέκταση μια σημαντική παράμετρος του ελέγχου των νερών. Το pH του αποσταγμένου νερού, λόγω της απορρόφησης CO₂ από την ατμόσφαιρα, έχει pH=5.65. Την ίδια τιμή pH έχει και η καθαρή βροχή.



Το pH των φυσικών νερών κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 4-9, ανάλογα με το γεωλογικό υπόστρωμα της περιοχής.

Το pH είναι σημαντική παράμετρος. Μελετάται όχι μόνο το pH αλλά και οι μεταβολές του αφού επιδρά σε διάφορες βιολογικές διεργασίες.

Θα πρέπει να ελέγχεται πάντα το pH των υγρών αποβλήτων πριν διατεθούν σε κάποια υδάτινη συλλογή. Η νομοθεσία προβλέπει ορισμένη τιμή pH υγρών αποβλήτων πριν αυτά διατεθούν σε κάποια υδάτινη συλλογή, η οποία κυμαίνεται συνήθως από 6.5-8.5.

Το pH μετράται στο πεδίο με ειδικά όργανα τα pHμετρα.

4.5. Διαλυμένο οξυγόνο (DO)

Το διαλυμένο οξυγόνο θεωρείται παράμετρος ελέγχου οργανικής ρύπανσης των νερών.

Η συγκέντρωση του αποτελεί, καθοριστική παράμετρο ελέγχου της ποιότητας και του βαθμού ρύπανσης των νερών. Εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία και την συγκέντρωση των διαλυμένων αλάτων.

Το διαλυμένο οξυγόνο προσδιορίζεται τη στιγμή της δειγματοληψίας. Τα δείγματα είναι δυνατόν να συντηρηθούν για μερικές ώρες (μέχρι 8ώρες) σε φιάλες χωρίς αέρα με προσθήκη, 0.7ml πυκνού H_2SO_4 και 1ml διαλύματος NaN_3 . Τα δύο αυτά αντιδραστήρια διακόπτουν κάθε βιολογική δράση η οποία καταναλώνει οξυγόνο.

Ορισμένες φορές οι τιμές του DO των επιφανειακών νερών εμφανίζονται υψηλότερες από τις τιμές κορεσμού. Αυτό οφείλεται στο φαινόμενο της φωτοσύνθεσης στην διάρκεια της οποίας παράγεται οξυγόνο. Η συγκέντρωση του DO μετρείται σε mg/lit.



4.6.Βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD)

Το βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD) δηλώνει την ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται από τους μικροοργανισμούς για την βιολογική αποικοδόμηση των οργανικών ενώσεων που περιέχονται στα νερά σε διάστημα 5 ημερών και σε θερμοκρασία 20°C.

Το BOD είναι μια συμβατική παράμετρος, η οποία μας δίνει πληροφορίες για την φόρτιση των νερών με οργανικές ενώσεις. Φυσικά σε 5 ημέρες δεν αποικοδομούνται όλες οι οργανικές ενώσεις αλλά το μεγαλύτερο μέρος αυτών.

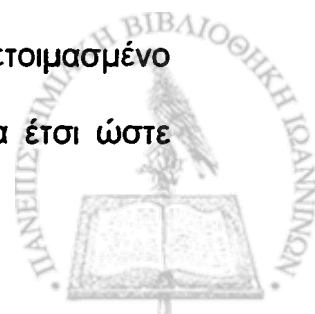
Η μικροβιακή αποικοδόμηση των οργανικών ενώσεων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως:

- Είδος και αριθμός μικροοργανισμών
- Προσφορά θρεπτικών συστατικών
- Προσφορά οξυγόνου.
- Θερμοκρασία και φωτισμός κ.α.

Η παρουσία τοξικών ουσιών παρεμποδίζει τη δράση των μικροοργανισμών, έτσι ώστε οι τιμές του BOD να εμφανίζονται μικρότερες ή ακόμη και μηδενικές. Η μέτρηση του BOD είναι σημαντική για τον καθορισμό της επίδρασης εκροών οικιακών και βιομηχανικών απόβλητων στην βιομηχανική κατεργασία και καθαρισμό υδάτων .

Ο εξοπλισμός μέτρησης αποτελείται από τον BOD –αισθητήρα. Ο αισθητήρας μετρά άμεσα τις τιμές του BOD προσφέροντας πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με την μέθοδο διάλυσης για τον προσδιορισμό του BOD όπως αυτή προσδιορίζεται από προτυποποιημένες διαδικασίες .

Ο αισθητήρας βιδώνεται απλά στο μπουκάλι με το προετοιμασμένο δείγμα .Οι αρχές μέτρησης είναι αξιόπιστες σε κλειστό σύστημα έτσι ώστε



όταν τα βακτηρίδια καταναλώσουν το διαλυμένο οξυγόνο του δείγματος αυτό αντικαθίσταται από το οξυγόνο που βρίσκεται πάνω από το δείγμα. Το διοξείδιο του άνθρακα παραγόμενο από τα βακτηρίδια απομακρύνεται από το σύστημα με την προσθήκη διαλύματος υδροξειδίου του καλίου το οποίο εμπεριέχεται στο καπάκι το οποίο κλίνει ερμητικά. Το αποτέλεσμα είναι η πτώση πίεσης στο μπουκάλι δείγματος η οποία μετράται ως mg/lit BOD.

4.7.ΕΝΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Οι ενώσεις του αζώτου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην αξιολόγηση της ρύπανσης των νερών. Το άζωτο συντελεί στη δημιουργία του ευτροφισμού των νερών, και ιδιαίτερα των θαλασσών, όπου κατά κανόνα η διαθέσιμη ποσότητα του εμφανίζεται ως περιοριστικός παράγοντας. Το άζωτο απαντά με διάφορες βαθμίδες οξείδωσης από +5 μέχρι -3. Οι κυριότερες μορφές του αζώτου που εμφανίζονται στα νερά είναι:

- Νιτρικά ιόντα
- Αμμωνιακά ιόντα
- Νιτρώδη ιόντα
- Οργανικό άζωτο

Όλες αυτές οι ενώσεις, ακόμη και το διαλυμένο αέριο άζωτο, είναι αφομοιώσιμες από τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη διαμόρφωση του κύκλου του αζώτου.

Παρακάτω, θα εξεταστούν χωριστά κάθε μία από τις παραπάνω μορφές του αζώτου και θα περιγραφούν οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό τους στα νερά. Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες που αντιστοιχούν στο άζωτο, π.χ. τα



νιτρικά εκφράζονται ως: $\text{mgNO}_3^-/\text{lt}$, τα νιτρώδη ως: $\text{mgNO}_2^-/\text{lt}$ τα αμμωνιακά ως: $\text{mgNH}_4^+/\text{lt}$.

4.8. Αμμωνία - Αμμωνιακά ιόντα

Η αμμωνία με τη μορφή NH_4^+ ή NH_4^+OH ή NH_3 βρίσκεται σ' όλα τα επιφανειακά νερά και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα αστικά λύματα και βιομηχανικά απόβλητα. Η συγκέντρωση της στα υπόγεια νερά είναι πολύ μικρή ή μηδενική.

Η αμμωνία προέρχεται κυρίως από την υδρόλυση της ουρίας και την αποικοδόμηση οργανικών αζωτούχων ενώσεων. Επειδή είναι και προϊόν μικροβιακών δράσεων, η παρουσία της αμμωνίας αποτελεί ένδειξη ρύπανσης των νερών από οργανικές ενώσεις και παρουσίας μικροοργανισμών. Γι' αυτό, τα πόσιμα νερά που περιέχουν ίχνη αμμωνίας κρίνονται ακατάλληλα.

Η αναλογία ανάμεσα στα κατίοντα και την ελεύθερη αμμωνία, καθορίζεται κατά κύριο λόγο από το pH του νερού. Κατά τη χλωρίωση των επεξεργασμένων λυμάτων παρατηρείται σχηματισμός μονό- και διχλωραμινών.

4.9. Νιτρικά ιόντα

Τα νιτρικά ιόντα αντιστοιχούν στην ανώτατη οξειδωτική κατάσταση του αζώτου. Είναι θερμοδυναμικώς σταθερά, και οι μεταβολές της συγκέντρωσής τους στα νερά, οφείλονται σε διάφορες βιολογικές δράσεις.

Η συγκέντρωση των νιτρικών στα φυσικά νερά είναι πολύ μικρή, ενώ ορισμένα υπόγεια νερά, εμφανίζουν αυξημένες συγκεντρώσεις.

Η ανώτατη επιτρεπτή τιμή των νιτρικών στο πόσιμο νερό είναι 50 ppm δηλαδή 500 φορές μεγαλύτερη των νιτρωδών. Στην πράξη γίνεται



προσπάθεια η συγκέντρωση των νιτρικών να μην υπερβαίνει τα 10ppm. Όταν το πόσιμο νερό υπόκειται σε καθαρισμό με ενεργό άνθρακα (αποχρωματισμό-απόσμηση) τότε είναι δυνατό να παρατηρηθεί αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη, τα οποία είναι ιδιαίτερα επικίνδυνα για την υγεία. Τα νιτρικά είναι ένα ουσιώδες θρεπτικό συστατικό πολλών φωτοσυνθετικών αυτότροφων οργανισμών και σε ορισμένες περιπτώσεις είναι περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης.



5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο πληθυσμός του *C. perfringens* στο νερό χρησιμοποιήθηκε το υγρό θρεπτικό υλικό LS, το οποίο ενδείκνυται για ταυτοποίηση και ποσοτικό προσδιορισμό του εν λόγω βακτηρίου, χωρίς να απαιτούνται συμπληρωματικά επιβεβαιωτικές δοκιμασίες (ISO 7937). Η σύσταση του υγρού θρεπτικού υλικού (Lactose – Sulfito) είναι η ακόλουθη:

Tryptic digest of casein : 5g

Yeast extract (Difco) :2,5g

Sodium chloride : 2,5g

Lactose :10g

L-cysteine hydrochloride : 0,3g

Distilled water :1000ml

Το pH ρυθμίζεται στο 7 και προσόητα 9 ml από το υγρό θρεπτικό υλικό τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Ακολουθεί αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 115°C για 20 λεπτά. Πριν χρησιμοποιηθεί το υγρό αυτό θρεπτικό υλικό φέρεται επί 20 λεπτά σε βράσμο ώστε να απομακρυνθεί το διαλυμένο οξυγόνο που θα θανάτωνε ενδεχομένως τους αναερόβιους μικροοργανισμούς. Επίσης προστίθενται 0,5 ml διαλύματος 1,2% anhydrous sodium metabisulphite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) και 0,5 ml διαλύματος 1% ferric ammonium citrate σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.

Χρησιμοποιείται εξοπλισμός διηθητικής συσκευής για διήθηση του νερού. Όλα τα δείγματα διηθούνται αρχικά με ηθμό πορώδους 20-25 μm για την κατακράτηση του άφθονου φυτοπλαγκτού και ένα άλλο πορώδους 0,45 μm για την κατακράτηση του *C.perfringens*. Εν συνεχεία κάθε ηθμός



τοποθετείται στον πρώτο από σειρά δοκιμαστικών σωλήνων που περιέχουν 10ml θρεπτικού ζωμού LS, και στους οποίους θα πραγματοποιηθούν δεκαδικές αραιώσεις από 10^{-1} έως 10^{-4} . Οι σωλήνες εν συνεχεία επωάζονται στους 46°C σε υδατόλουτρο για 24 ώρες. Ο ζωμός LS επιτρέπει τον ταχύτατο προσδιορισμό πολύ μικρού αριθμού κυττάρων *C.perfringens*.

Αναλυτικότερα πρόκειται για το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Διήθηση 250ml νερού σε όλα τα δείγματα αρχικά με ηθμούς πορώδους 20-25 μm για την κατακράτηση του φυτοπλαγκτού.
- Νέα διήθηση σε ηθμούς πορώδους 0,45 μm για την κατακράτηση του *C. perfringens*.
- Τοποθέτηση των ηθμών σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 ml ζωμού LS
- Πραγματοποίηση δεκαδικών αραιώσεων από 10^{-1} έως 10^{-4} . Επώαση σε υδατόλουτρο στους 46°C για 24 ώρες.
- Για την ανεύρεση σπορογόνων μορφών, οι εμβολιασμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες LS θερμάνθηκαν στους 80°C για 20 λεπτά και κατόπιν τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 46°C για 72 ώρες.
- Θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO_2). Η θερμοκρασία επώασης σε υδατόλουτρο στους 46°C διαχωρίζει εκλεκτικά το *C.perfringens* από άλλους θετικούς στη λακτόζη μικροοργανισμούς που δίνουν θολερότητα μόνον στους 37°C .



5.1. Ο φθορισμός και ο επιτόπου υβριδισμός (FISH) για απ'ευθείας παρατήρηση των μικροοργανισμών

Η τεχνική αυτή επιτρέπει άμεση παρατήρηση, ταυτοποίηση προσδιορισμό, καταμέτρηση και προσδιορισμό της θέσης του καθενός μικροβιακού κυττάρου.

Η τεχνική αυτή είναι χρήσιμη σε πολλές εφαρμογές και σε πολλά και διάφορα πεδία της Μικροβιολογίας.

Ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι επιτρέπει την ανίχνευση όχι μόνο μικροοργανισμών που δύνανται να καλλιεργηθούν αλλά επίσης και αυτών που είναι μη καλλιεργήσιμοι ή που τα επίπεδα τους δεν είναι ανιχνεύσιμα. Γι'αυτό το λόγο αυτή η μέθοδος μπορεί να βοηθήσει ώστε να κατανοήσουμε καλύτερα σύνθετες μικροβιακές κοινότητες.

Η σημαντική προσφορά της διαγνωστικής μικροβιολογίας είναι η γρήγορη και ακριβής ταυτοποίηση των μικροβίων στο δικό τους φυσικό περιβάλλον. Οι μέθοδοι της καλλιέργειας είναι χρονοβόρες και πολλές φορές αρκετά επιλεκτικές γι'αυτό και δεν αντικατοπτρίζουν την ακριβή σύσταση μικροβιακών κοινοτήτων. (Wagner et al 1993, Choi et al 1914).

Τα τελευταία χρόνια μοριακές τεχνικές όπως της PCR, υβριδισμού, εύρεσης ακολουθιών βάσεων έχουν επιφέρει πραγματική επανάσταση σ'όλα τα πεδία της Μικροβιολογίας. Επιπλέον η ανίχνευση με υψηλή ευαισθησία και η επακριβής ταυτοποίηση των βακτηρίων είναι δυνατή. Χρησιμοποιούνται επιπλέον επιτυχώς στην κλινική Μικροβιολογία για την ανίχνευση μικροοργανισμών με μικρό ρυθμό



ανάπτυξης όπως τα Μυκοβακτήρια, ή οργανισμών δύσκολων να καλλιεργηθούν όπως *Tropherym whipplei*.

Εντούτοις, αυτές οι μέθοδοι δεν προσφέρουν πληροφορίες σχετικά με μορφολογία, αριθμό, κατανομή ή για το ενδοκυτταρικό περιβάλλον.

Πάντως, ακόμη και οι παλιές τεχνικές των χρώσεων (π.χ. Gram) εξακολουθούν να είναι χρήσιμες παρόλο που είναι αρκετά παλιές. Είναι φτηνές και γρήγορες συνδυάζοντας απ'ευθείας παρατήρηση και παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την δομή των μικροοργανισμών π.χ. κυτταρικό τοίχωμα.

Επειδή οι απλές μικροσκοπικές μέθοδοι παρατήρησης δεν επιτρέπουν αληθή προσδιορισμό, αρχικά έγιναν προσπάθειες το εμπόδιο αυτό να υπερνικηθεί με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα. Πάντως, αυτή η τεχνική δεν απέδωσε σημαντικά αποτελέσματα δεδομένων των δυσκολιών που ανέκυπταν από τη μη ειδική πρόσδεση αντιγόνου - αντισώματος σε πολλές περιπτώσεις εξαιτίας της φαινοτυπικής ποικιλότητας του αντιγόνου.

Επιπλέον, απαιτείται ο μικροοργανισμός - στόχος να καλλιεργηθεί ούτως ώστε να αναπτύξει στην κυτταρική επιφάνειά του ειδικά αντισώματα. Εξάλλου πολλές φορές περιοριστικός παράγων είναι το μέγεθος των αντισωμάτων (Szweringi et al 1985).

Επιπλέον, έχει δειχτεί ότι υπάρχει σοβαρό πρόβλημα όταν χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα κατά τη μελέτη σύνθετων μικροβιακών κοινοτήτων. Για τον λόγο αυτό δεν μπορεί να ειπωθεί για τη μέθοδο αυτήν ότι είναι εντελώς ανεξάρτητη της καλλιέργειας.



Αντιθέτως, η FISH συνδυάζει την ακρίβεια της μοριακής γενετικής με την οπτική πληροφορία από την μικροσκοπική παρατήρηση, επιτρέποντας τον προσδιορισμό και παρατήρηση μεμονωμένων μικροβιακών κυττάρων δίχως να χρειαστεί να απομακρυνθούν από το φυσικό τους περιβάλλον.

5.1.1. Ιστορική αναδρομή

Ο επί τόπου υβριδισμός αναπτύχθηκε ανεξάρτητα από δύο ερευνητικές ομάδες (Pardue και Gall 1969 ; John et al, 1969).

Ραδιοσημασμένο DNA ή 28S RNA υβριδίστηκε σε κυτταρολογικές μελέτες από ωκύτταρα του *Xenopus* και ανιχνεύτηκε με μικροαυτοραδιογραφία.

Η τεχνική αυτή επέτρεψε την εξέταση αλληλουχιών νουκλεϊνικού οξέος εντός των κυττάρων δίχως να επηρεαστεί στη μορφολογία των κυττάρων ή η ακεραιότητα των διαφόρων ενδοκυτταρικών τμημάτων.

Μέχρι τότε η FISH εχρησιμοποιείτο για μελέτες χρωμοσωμάτων στα πλαίσια της εξέλιξης ή του καρκίνου και στις κυτταρογενετικές μελέτες μιας ευρείας περιοχής των ειδών.

Τελικά, η εισαγωγή αυτής της μεθόδου στην βακτηριολογία έγινε από τον Giannopoli et al (1988) που ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε ραδιενεργά σημασμένο rRNA για την μικροσκοπική ανίχνευση βακτηρίων.

Με την ανάπτυξη και των σημασμένων συστατικών με φθορισμό έγινε σιγά-σιγά αντικατάσταση των ραδιενεργά σημασμένων μορίων με φθορίζοντα σημασμένα συστατικά (Landegent 1984).



Το 1989 ο De Long πρώτος χρησιμοποίησε σημασμένα φθορίζοντα ολιγονουκλεοτίδια για την ανίχνευση μικροοργανισμών. Σε σύγκριση με τα ραδιενεργά σημασμένα μόρια ο φθορισμός φαίνεται να είναι ασφαλέστερος, δεν απαιτεί επιπλέον στάδια ανίχνευσης, ενώ παρέχει καλύτερη δυνατότητα ανάλυσης. Επιπλέον η σήμανση με μόρια που απορροφούν σε διαφορετικά μήκη κύματος προσφέρει τη δυνατότητα να στοχεύσουμε διάφορες ακολουθίες στόχους με ένα και μόνο στάδιο, αυτό του υβριδισμού. Τα τελευταία χρόνια η ευαισθησία και η ταχύτητα που επιδεικνύει η FISH την έκαναν πολύτιμο εργαλείο στην μελέτη φυλογενετικών, οικολογικών, διαγνωστικών και περιβαλλοντικών ερευνών στην μικροβιολογία (Aman et al 1990ab).

5.1.2.ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Με την FISH ανιχνεύουμε αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων διαμέσου σημασμένων ακολουθιών που υβριδίζονται μόνο με το συμπληρωματικό τους τμήμα (εξειδίκευση).

Η επιλογή του υβριδιστή (probe) για την FISH πρέπει να γίνει παίρνοντας υπ'όψη μας την εξειδίκευση, την ευαισθησία και το πόσο εύκολα εισέρχεται (διεισδύει) στο κύτταρο-στόχο. Ένας τυπικός υβριδιστής περιλαμβάνει 15-30 ζεύγη βάσεων (base pair) σε μήκος.

Μικρότερες σε μήκος probes έχουν καλύτερη πρόσβαση στον στόχο, όμως ενδεχομένως φέρουν λιγότερη σήμανση. Η άμεση σήμανση είναι η πιο διαδεδομένη και είναι η πιο γρήγορη, φθηνή και εύκολη διότι δεν απαιτεί άλλα στάδια για παραπέρα παρατήρηση παρά μόνον τον υβριδισμό.



Ένα ή περισσότερα μόρια με σήμα φθορισμού μπορούν να προσδεθούν απ'ευθείας στο ολιγονουκλεοτίδιο, είτε με χημικές διεργασίες κατά τη διάρκεια της σύνθεσης διαμέσου της αμινοομάδας στο 5' άκρο ή ενζυματικά χρησιμοποιώντας τρανσφεράση για την πρόσδεση του φθορίζοντος μορίου στο 3- άκρο του ολιγονουκλεοτιδίου (Moter et al 1998a).

Μπορούν να προσκολληθούν φθορίζοντα μόρια και στα δύο άκρα, προκειμένου να αυξηθεί το μέγεθος του σώματος που θα πάρουμε. Μάλιστα ενδείκνυται η αναλογία 1 μόριο στο 3' - άκρο και 4 μόρια στο 5- άκρο χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα διαστήματα.

Τα φθορίζοντα ολιγονουκλεοτίδια είναι πλέον εμπορικά διαθέσιμα. Μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C στο σκοτάδι για αρκετούς μήνες.

Σε πολλές περιπτώσεις και η έμμεση παρατήρηση είναι πολύ χρήσιμη. Έχει φανεί ότι η ευαισθησία της FISH μπορεί να αυξηθεί με σύνδεση στην probe ενός μορίου αναφοράς όπως η Διγοξυγενίνη (DIG) η οποία προσδένεται σε αντίσωμα όπου φέρει το φθορίζον μόριο (Zarda et al 1991).

Η ευαισθησία της FISH μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω με χρήση ενζυματικής μεθόδου. Αυτή η μέθοδος αναπτύχθηκε (Kagiyama et al (1993)) για κυτογενετικές μελέτες και πολύ αργότερα προσαρμόστηκε για την ανίχνευση βακτηρίων (Yamaguchi et al (1996)).

Το ολιγονουκλεοτίδιο με την DIG συνδέεται με αντίσωμα αντί-DIG που είναι προσδεμένο με αλκαλική φωσφατάση. Το ένζυμο αυτό



καταλύει την αντίδραση HNPP \rightarrow HNP + P που δίνει ανοιχτό - κόκκινο φθορισμό σε συνδυασμό με Fast RED (FR).

Ο φθορισμός στην περίπτωση αυτή είναι 8 φορές πιο ισχυρός από ότι τα άλλα ολιγονουκλεοτίδια. Αυτή η μέθοδος για τον καθαρισμό του σώματος βελτιώθηκε και άλλο και μετονομάστηκε σε TSA σύστημα (Tyramide Signal Amplification System). Εξάλλου, σε ολιγονουκλεοτίδια τοποθετήθηκε HRP ραδιενεργός υπεροξειδάση αλόγου και το TSA σύστημα βελτίωσε το σώμα του κατά 10-20 φορές.

Εντούτοις, το νούμερο των θετικών κυττάρων μειωνόταν σε σχέση με τα απλά σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια. Αυτό θα μπορούσε να συμβαίνει διότι εξαιτίας της δύσκολης διεύθυνσης των υψηλού MB συστατικών εντός του κυττάρου.

Παρόλο που η διαπερατότητα εντός των κυττάρων βελτιώθηκε πολύ με λυσοζύμη και έτσι βελτιώθηκε και το σώμα, εντούτοις αυτή η μέθοδος δεν ήταν ικανοποιητική στην περίπτωση κάποιων GRAM(+) μικροοργανισμών.

Η ευαισθησία της FISH σε πολλά δείγματα που λαμβάνονται από το περιβάλλον βελτιώθηκε παραπέρα με τη χρήση του συστήματος πολυριβονουκλεοτιδικών υβριδιστών σημασμένων με διάφορα μόρια φθορισμού (De Long et al 1999).

Πιθανώς η πιο ευαίσθητη προσέγγιση είναι ο συνδυασμός πολυριβονουκλεοτιδικών υβριδιστών που έχουν εσωτερικά προσδεμένα διγοξυγενίνη και το TSA σύστημα. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς στην ανίχνευση και παρατήρηση ενός λοιμογόνου παράγοντα της *Listeria* (Wagner et al 1998).



5.1.3. Το ριβοσωμικό RNA (rRNA) ως στόχος στην FISH

Στην Μικροβιολογία ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος στόχος είναι το μόριο 16S r-RNA, σ'ό,τι αφορά τη μέθοδο αυτή, λόγω της γενετικής σταθερότητας που επιδεικνύει και της γενικότερης δομής που έχει σταθερές και μεταβλητές περιοχές και λόγω των πολλών αντιτύπων που υπάρχουν, ιδιαίτερα στα μεταβολικά δραστήρια βακτήρια (Wohese, 1987). Έτσι μπορούν να σχεδιαστούν ειδικοί υβριδιστές τόσο ανάλογα με το γένος, όσο και ανάλογα με το είδος λαμβάνοντας υπ'όψη το r RNA στόχο (Göbel, Awanh et al 1995).

Εξάλλου λόγω της εύκολης πλέον ανεύρεσης των ακολουθιών βάσεων και με βάση τις γενετικές τράπεζες που υπάρχουν σήμερα κυκλοφορούν και εμπορικά υβριδιστές. Το γονίδιο για το 16 S rRNA προσφέρεται για τον ευκολότερο και ακριβέστερο προσδιορισμό στους περισσότερους μικροοργανισμούς. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό ειδικά στους μικτούς βακτηριακούς πληθυσμούς.

Ο υψηλός αριθμός αντιγράφων του 16 S rRNA κατά τις διαδικασίες διπλασιασμού και μεταβολισμού των ενεργών κυττάρων συχνά προσφέρει καλούς στόχους για παρατήρηση ακόμα και με απλούς υβριδιστές. Η επιλογή του στόχου και ο σχεδιασμός των υβριδιστών είναι πολύ βασικά στάδια και πρέπει να γίνονται πολύ προσεκτικά.

Υπάρχουν σχετικά Software και διευθύνσεις στο Internet που έχουν τράπεζες δεδομένων για ακολουθίες rRNA και για υβριδιστές. Τέτοιο είναι το πρόγραμμα ARB με διεύθυνση www.mikro.biologic.tu-muenchen.de. Άλλοι στόχοι όπως το 23S rRNA, το 18S rRNA και mRNA πρόσφατη (Wagner, 1988) έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς με FISH.



5.1.4. ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ (FIXATION)

Πριν τον υβριδισμό είναι απαραίτητη η προετοιμασία των κυττάρων ώστε να γίνουν διαπερατά στους υβριδιστές. Επίσης, πρέπει να προστατευθεί το ενδογενές rRNA από τη δράση των ριβονουκλεασών. Έτσι αιθανόλη, μεθανόλη, αλδεϋδες ή και συνδυασμός τους, χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της προετοιμασίας.

Οι συνθήκες της προετοιμασίας εξαρτώνται από το είδος του μικροοργανισμού-στόχου και το ειδικό περιβάλλον που τον περικλείει κάθε φορά. Η καλή προετοιμασία είναι απαραίτητη για την επιτυχία της πρώτης μεθόδου, όμως δυστυχώς είναι εξαιρετικά δύσκολο να εξιδανικεύσουμε τις συνθήκες. Η ιδεατή προετοιμασία θα πρέπει να περιλαμβάνει εύκολη διείσδυση του υβριδιστή, εύκολη σύνδεση υβριδιστή - στόχου, ώστε να καλυφθούν κατά το δυνατό όλοι οι στόχοι και φυσικά καλό θα ήταν να διασφαλίζεται η ακεραιότητα του κάθε κυττάρου.

Γενικά ένα (3-4)% (v/v) διάλυμα μεθανόλης ή φορμαλδεϋδης είναι πολύ καλό για προετοιμασία των περισσότερων GRAM (-) βακτηρίων. Για GRAM (+) οργανισμούς, αιθανόλη (50%) αιθανόλη / φορμαλίνη (9:1 v/v) ή θέρμανση προαπαιτούνται καθώς επίσης και κάποια επιπλέον στάδια που θα διασφαλίσουν την επιτυχή είσοδο του υβριδιστή.

Για την καλύτερη προσκόλληση του δείγματος στο γυαλί της αντικειμενοφόρου πλάκας προτείνεται κατάλληλη προετοιμασία με κάποιον ειδικό παράγοντα κάλυψης του γυαλιού. Τα χημικά τα οποία επιτυχώς προτάθηκαν περιλαμβάνουν την ζελατίνη (Aurman 1990b), την πολύ-L-λυσίνη (Lee et al 1998b).



Ο υβριδισμός θα πρέπει να λαμβάνει χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, τις ιδεατές όσο γίνεται, ούτως ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατό καλύτερη προσκόλληση του υβριδιστή με την ακολουθία - στόχο του r-RNA. Γι' αυτό το κρίσιμο στάδιο στη μέθοδο FISH, κατά την διαδικασία χρησιμοποιούμε προθερμασμένο διάλυμα υβριδισμού το οποίο εμπεριέχει τους υβριδιστές. Το πόσο καλά γίνεται ο υβριδισμός και το συνταίριασμα των συμπληρωματικών κομματιών του RNA εξαρτάται από τον χρόνο του υβριδισμού και από τη συγκέντρωση φορμαμίδης που χρησιμοποιείται. Η φορμαμίδα ελαττώνει το χρόνο υβριδισμού με την ενίσχυση των υδρογονοδεσμών γι' αυτό και όταν χρησιμοποιείται φορμαμίδα μπορεί να χρησιμοποιηθούν χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Ο υβριδισμός συνήθως λαμβάνει χώρα σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασίες μεταξύ 37° C και 50° C. Ο χρόνος που απαιτείται κυμαίνεται μεταξύ 30 min και κάποιων ωρών. Μετά τον υβριδισμό γίνεται πλύσιμο με απιονισμένο νερό για να απομακρυνθούν οι μη προσδεδεμένοι υβριδιστές. Αυτό είναι ένα απαραίτητο στάδιο στην περίπτωση του υβριδισμού.

Για να ελαττωθεί η ποσότητα τοξικών ανεπιθύμητων ουσιών γίνεται ρύθμιση του διαλύματος (για πλύση) με αλάτι (Lathe 1985). Τελικά οι αντικειμενοφόρες πλάκες (slides) μετά την πλύση με το ειδικό διάλυμα υβριδισμού πλένονται πολύ γρήγορα με νερό στεγνώνονται και αφού τοποθετηθεί ειδικό κεδρέλαιο και καλυπτρίδα είναι έτοιμα προς παρατήρηση.



5.1.5.Μη ακριβή αποτελέσματα . Αυτοφθορισμός

Θεωρώντας τα αυτοφθορίζοντα υλικά, η FISH ξεκάθαρα έχει περιορισμούς. Το περισσότερο άμεσο πρόβλημα είναι ο αυτοφθορισμός ορισμένων μικροβίων. Έχει γίνει αναφορά ότι αυτό συμβαίνει σε πολλούς ζυμομύκητες και μύκητες (Margo και Bombartier, 1985) καθώς και σε ορισμένα βακτήρια όπως αυτά του γένους *Pseudomonas* (Brown and Lowbury, 1996), *Legiomella* (Edelstein, 1985, Wilkinson et al 1990) *Rhodospirillum Clutenum* (Albrecht-Buehler, 1996) για τα κυανοβακτήρια (Schonhuber et al., 1999) για αρχαϊκά είδη όπως μεθανογόνα βακτήρια (Sorensen et al, 1997).

Αυτοφθορισμός μπορεί να συμβεί και στην περίπτωση υλικών που περιβάλλουν τα βακτήρια σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως ενεργή λάσπη, φυτά ή ακόμα και πόσιμο νερό και οφείλεται στον φυσικό φθορισμό βιολογικό ή ανόργανο. Παραπλήσια, πολλοί ιστοί που περιέχουν ελασίνη και κολλαγόνο ή κύτταρα του αίματος όπως ερυθροκύτταρα και ηωσινόφιλα κοκκώδη συνήθως δίνουν πολύ έντονο αυτοφθορισμό.

Συνήθως όμως μειώνει το μέγεθος του σήματος λόγω των θορύβων που προέρχονται από φαινόμενα αυτοφθορισμού.

Σε κυτταρογενετικές και ανοσολογικές μελέτες, ο αυτοφθορισμός των ιστών έχει επιτυχώς μειωθεί με ανάλυση ριχελ=ψηφίου - ψηφίου κατά τη διάρκεια της ψηφιακής ανάλυσης εικόνας.

Παρόλο που η ανάλυση του φαινομένου του αυτοφθορισμού δεν έχει πολυμελετηθεί, εν τούτοις τα μέσα εμπλουτισμού, τα μέσα ανάπτυξης, οι μέθοδοι προσήλωσης και τα υλικά όπως ειδικό κεδρέλαιο



φαίνεται να έχουν δραματική επίδραση στην ένταση των σημάτων ((Sorensen et al, 1997, Grafet al., 1999). Πάντως έχουν προταθεί διάφορα συστήματα απομόνωσης καθαρών σωμάτων για να ξεπεραστεί το ανωτέρω πρόβλημα (Sorensen 1997).

Ο αυτοφθορισμός της *Candida albicans* έχειδειχτεί ότι εξαρτάται από την επιλογή του μήκους κύματος που γίνονται οι μετρήσεις. Εξάλλου σ'ό,τι αφορά τους σπόγγους (fungi) η επιλογή του φωτός πάντα πρέπει να γίνεται με προσοχή. Επίσης, η ανίχνευση των ζυμομυκήτων και των μυκήτων σε κυτταρικές καλλιέργειες σε πειραματικώς επιμολυσμένους ιστούς έχει αναφερθεί. Πάντως, όταν πρόκειται να ασχοληθούμε με άγνωστες μικτές μικροβιακές κοινότητες απαιτείται να γίνει έλεγχος για αυτοφθορισμό προτού χρησιμοποιηθεί η FISH μέθοδος.

5.1.6. Η επιλογή της σωστής εξειδίκευσης

Η ακρίβεια και η αξιοπιστία της FISH είναι στενά συνδεδεμένη με την επιλογή του εξειδικευμένου ολιγονουκλεοτιδίου. Προσεκτικός σχεδιασμός και επιλογή με κρίση νέων υβριδιστών είναι απαραίτητα.

Θετικά κοντρόλ (μάρτυρες) δειγμάτων για τις ειδικές αυτές αλληλουχίες με λίγα λάθη θα πρέπει να υπάρχουν. Είναι σημαντικό να σχεδιάζονται ολιγονουκλεοτίδια εξειδικευμένα και ακριβή από την τράπεζα δεδομένων. Επειδή σε πολλές περιπτώσεις τροποποιείται η τράπεζα δεδομένων θα πρέπει σε πολλές περιπτώσεις να γίνεται έλεγχος των ακολουθιών και διόρθωση προς αυτήν την κατεύθυνση των υβριδιστών.



Ο σχεδιασμός των υβριδιστών θα πρέπει να γίνεται από εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας που έχουν αρκετή εμπειρία στο θέμα.

Όταν γίνεται ανάλυση μικτών βακτηριακών κοινοτήτων δεν θα πρέπει να αποκλείεται το γεγονός ότι ο υβριδιστής μπορεί να είναι ειδικός και για βακτήρια που δεν έχουν περιγραφεί μέχρι στιγμής.

Για να είμαστε περισσότερο σίγουροι ότι γίνεται σωστή ανίχνευση των μικροοργανισμών που ψάχνουμε, χρησιμοποιούνται δύο υβριδιστές για διαφορετικές θέσεις στόχους την 16s rRNA περιοχή και στιγματίζονται με διαφορετικές ουσίες που προσδίδουν φθορισμό.

Κύτταρα που ανιχνεύονται εξ αιτίας και των δύο αυτών υβριδιστών θεωρούνται σαν κύτταρα στόχοι (Neef et al 1996). Εντούτοις αυτή η μέθοδος ακριβείας έχει μικρή διαθεσιμότητα σήμερα εξαιτίας της μικρής διαθεσιμότητας στόχων - ακολουθιών rRNA για τον προς ανίχνευση μικροοργανισμό.

5.1.7.Μη ακριβή αρνητικά αποτελέσματα

Όταν υπάρχει μικρή ένταση στο σήμα φθορισμού αυτό ίσως είναι συνέπεια του γεγονότος της μικρής διαπερατότητας των υβριδιστών διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης του κυττάρου-στόχου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος.

Έτσι GRAM (-) βακτήρια συνήθως είναι εύκολοι στόχοι διότι είναι περισσότερο διπερατά στους υβριδιστές, ακόμη και για πολυριβονουκλεοτίδια - υβριδιστές.



Για τα GRAM (+) εξαιτίας της ειδικής σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος με μυκολικό οξύ απαιτείται ειδική προετοιμασία για αύξηση της διαπερατότητας.

Η FISH έχει ήδη εφαρμογές στους GRAM (+) κόκκους (Beimfohr et al, 1993 ,krimmer et al.,1999) *Corynebacteirum* (Roller et al.,1994).

Εντούτοις, οι ιδιότητες του κυτταρικού τοιχώματος μπορούν μερικές φορές να χρησιμοποιηθούν με πλεονέκτημα για μας. Η FISH είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για να δείξει και την κατάσταση του κυτταρικού τοιχώματος (Bidnenko et al, 1998).

Εξαιτίας της στερεοχημικής διαμόρφωσης του μορίου του rRNA, όχι όλες οι ακολουθίες αλλά μόνο μερικές είναι προσιτές από τους υβριδιστές. Βρόχοι και συμπλέγματα καθώς επίσης και οι αλληλεπιδράσεις rRNA και πρωτεϊνών.

Τέλος η τεχνική FISH επιλέγεται προνομιακά σε σύγκριση με τις μεθόδους καλλιέργειας διότι στην καλλιέργεια τα επίπεδα ορισμένων μικροοργανισμών δεν είναι ανιχνεύσιμα ή αναπτύσσονται με ιδιαίτερη δυσκολία.



5.1.8. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Αναλυτικά τα υλικά και μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ακολουθούν τα πρωτόκολλα του FISH manual του Τμήματος Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Groningen της Ολλανδίας. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από 2 σταθμούς στη Λίμνη των Ιωαννίνων.

Συγκεκριμένα ελήφθησαν 5 λίτρα νερού από τον σταθμό 1 και διαχωρίστηκαν σε δύο μέρη και 5 λίτρα νερού από τον σταθμό 2 τα οποία διαχωρίστηκαν επίσης σε δύο μέρη. Έγινε διήθηση των 2500ml νερού σε όλα τα δείγματα αρχικά με ηθμούς πορώδους 20-25 μm για την κατακράτηση του φυτοπλαγκτού. Ακολούθησε νέα διήθηση σε φίλτρα πορώδους 0,45 μm για την κατακράτηση του *C. perfringens*. Έγινε τοποθέτηση των φίλτρων σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 3 ml ζωμού Brain heart.

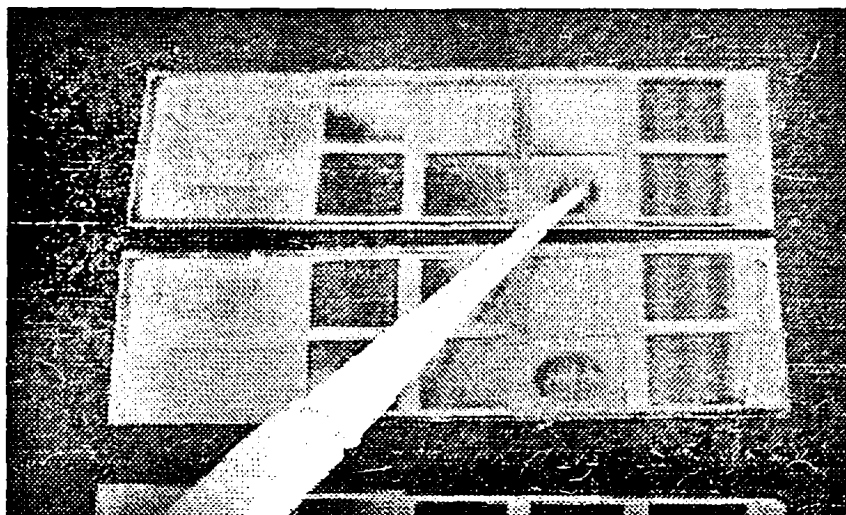
Προέκυψαν έτσι δύο δοκιμαστικοί σωλήνες για το σημείο 1, εκ των οποίων στον έναν τοποθετήθηκε στην επιφάνεια του υγρού θρεπτικού υλικού στερεά παραφίνη (ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑ) ενώ ο άλλος έμεινε ως έχει (ΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑ). Προέκυψαν επίσης δύο δοκιμαστικοί σωλήνες με υγρό θρεπτικό υλικό για το σημείο 2 εκ των οποίων στην επιφάνεια του ενός τοποθετήθηκε πάνω από το θρεπτικό υλικό στερεά παραφίνη (ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑ) ενώ ο άλλος έμεινε ως έχει (ΑΕΡΟΒΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑ).

Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αυτοί μεταφέρθηκαν με πάγο στο εργαστήριο για περαιτέρω επεξεργασία τους όπου και ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:



Φυγοκέντρωση στα 700g(2000rpm) για μετακίνηση τυχόν μεγάλων υπολειμμάτων. Λήψη του υπερκείμενου υγρού. Νέα φυγοκέντρωση στα 5000rpm ούτως ώστε να καταβυθιστούν τα κύτταρα. Απόρριψη του υπερκείμενου και διάλυση με 1 ml PBS. Τοποθέτηση 100μl στις οπές των ειδικών επικαλυμμένων με ζελατίνη ("gelatin-coated") αντικειμενοφόρων πλακών (φωτογραφία 1).

φωτογραφία 1



Έπειτα απλώνεται ομοιόμορφα το δείγμα και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου στον αέρα. Αφού γίνει το στέγνωμα γίνεται η μονιμοποίηση (fixation) των κυττάρων του δείγματος στην ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα με χρήση 96% αιθανόλης για 10 λεπτά.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε ο υβριδιστής Dapi (για το σύνολο των οργανισμών που φέρουν DNA(Ιοί και βακτήρια), 1μl Dapi probe(500μg/ml)προστέθηκαν σε 400μl PBS και από εκεί 110 μl τοποθετήθηκαν πάνω στο δείγμα. Ο υβριδισμός έλαβε χώρα σε 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου αποφεύγοντας το φως. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε για 10 λεπτά σε PBS και ξεπλύθηκε γρήγορα με απιονισμένο



νερό. Η αντικειμενοφόρος πλάκα στέγνωσε και αφού τοποθετήθηκε ειδικό κεδρέλαιο (Vectashield 50μl) τοποθετήθηκε καλυπτρίδα από πάνω και στερεώθηκε με όζα. Έπειτα το δείγμα ήταν έτοιμο για καταμέτρηση.

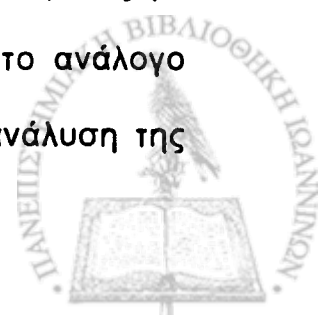
Όταν χρησιμοποιείται ο υβριδιστής EUB με αλληλουχία από το 5' άκρο στο 3' GCTGCCTCCCGTAGGAGT τότε ο στόχος είναι τα βακτήρια όλα (δίχως τους ιούς). Ο υβριδισμός κρατά 16ώρες στους 50°C και επακολουθεί πλύση με κανονικό ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης (normal wash buffer) για 30min στους 50°C (Amann, et al, 1995)

Όταν χρησιμοποιείται ο υβριδιστής EREC τότε ο στόχος είναι όλα τα κλωστηρίδια. Ο υβριδισμός κρατά 16ώρες στους 50°C και επακολουθεί πλύση με κανονικό ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης για 30min στους 50°C. Ενώ όταν χρησιμοποιείται ο υβριδιστής Chis/Clit με αλληλουχία από το 5' άκρο στο 3' (5'-TTATGCGGTATTAATCT(C/T)CCTTT) τότε ο στόχος είναι το *Clostridium perfringens* καθώς επίσης και το *Clostridium histolyticum* και *Clostridium lituseburense*. Ο υβριδισμός κρατά 16ώρες στους 50°C και επακολουθεί πλύση με κανονικό ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης για 30min στους 50°C.

5.1.9. ΤΡΟΠΟΣ ΕΞΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ

Αυτοματοποιημένα

Τα έτοιμα slides τοποθετούνται σε μικροσκόπιο φθορισμού το οποίο έχει δυνατότητα εναλλαγής των μηκών κύματος του φωτός αυτοματοποιημένα. Ο φακός του μικροσκοπίου είναι συνδεδεμένος με κάμερα και αυτή με υπολογιστή που υποστηρίζεται από το ανάλογο software που μπορεί να ψηφιοποιεί τα σήματα μετά την ανάλυση της



εικόνας. Το σύστημα αυτό έχει την δυνατότητα να ρυθμίζεται ακόμα και για τα ψηλά σήματα. Έτσι μπορεί να γίνει αυτοματοποιημένα και η καταμέτρηση των μικροοργανισμών που όμως αναφέρεται σε 25 πεδία και ανάγεται το αποτέλεσμα για όλο το δείγμα.

Εξάλλου είναι δυνατό να καταμετρηθεί η δραστηριότητα (μεταβολισμός) απλών κυττάρων με ποσοτικοποίηση του σώματος που αφορά την ποσότητα του rRNA (Poulsen et al 1993).

Με παρατήρηση

Με την κατάλληλη επιλογή του σωστού μήκους κύματος στο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού OlympusBH20 μετριοούνται τουλάχιστον 50 πεδία ανα οπή και βρίσκεται ο μέσος όρος X_{μ} των βακτηρίων ανά πεδίο

Ισχύει: $\text{Αριθμός βακτηρίων/ml} = X_{\mu} \cdot 2000 \cdot 10$

Αυτό γιατί ο αριθμός των πεδίων ανά οπή είναι 2000 όταν η μεγέθυνση του μικροσκοπίου είναι 10×63 και διότι χρησιμοποιήθηκαν 100μl οπότε και ο συντελεστής διόρθωσης είναι $1000\mu\text{l}/100\mu\text{l} = 10$.

Επειδή τέλος όσοι μικροοργανισμοί προέκυψαν από την διαδικασία αυτή αντιστοιχούν στους μικροοργανισμούς των 2500ml που διηθήθηκαν αρχικά, έπεται ότι και επειδή το 1 ml που περιέχει τους μικροοργανισμούς τοποθετείται σε 10 οπές :

$\text{Αριθμός βακτηρίων}/2500\text{ml δείγματος} = X_{\mu} \cdot 10 \cdot 20000 / 500$



ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ CLOSTRIDIUM

5.2. ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Οι παράμετροι T, SpC, pH, DO, TDS προσδιορίστηκαν από τη φορητή Hydrolab, που διαθέτει τους κατάλληλους αισθητήρες. Το BOD προσδιορίστηκε από αισθητήρες Lonibond με τη χρήση του ανάλογου πρωτοκόλλου. Τα ιόντα NO_3^- , NO_2^- , και NH_4^+ , προσδιορίστηκαν με το φωτόμετρο Hack με τη χρήση του ανάλογου πρωτοκόλλου.



5.3.ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ- ΣΗΜΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

Στην παρούσα διατριβή προσδιορίστηκαν οι πληθυσμοί του *Clostridium perfringens* στα νερά των λιμνών Καστοριάς και Ιωαννίνων, όπως και των ποταμών Αώος, Βοιδομάτης, Καλαμάς, Λούρος, καθώς επίσης και στο Ρέμα Σουλού (Πτολεμαίδα 14^ο χλμ).

Συγκεκριμένα κατά την διάρκεια των 3 τελευταίων ετών (1999-2002) ελήφθησαν 8 φορές δείγματα από 6 διαφορετικά σημεία στην Λίμνη της Καστοριάς (n=48x2), 15 φορές από 6 σημεία στην Λίμνη Ιωαννίνων (n=90x2), 5 φορές από 3 σημεία στον ποταμό Αώο(n=15x2), 5 φορές από 3 σημεία στον Βοιδομάτη (n=15x2), 5 φορές από 6 σημεία και 5 φορές από 2 σημεία στον ποταμό Καλαμά (n=40x2), 15 φορές από 20 σημεία κατά μήκος του ποταμού Λούρου τα οποία ομαδοποιήθηκαν σε 4 μεγάλα σημεία (n=57x2), 12 φορές από 6 σημεία στο ρέμα Σουλού Πτολεμαίδας (n=72x2), και 8 φορές από 6 διαφορετικά σημεία. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων ήταν (n=337x2).

Το σύμβολο x2 σημαίνει ότι λαμβάνονταν δείγμα 250ml εις διπλούν για ανάλυση τόσο των βλαστικών όσο και των σπορογόνων μορφών του *C.perfringens*.



5.3.1. ΠΕΡΙΟΧΗ ΛΙΜΝΗΣ ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ

Η λίμνη της Καστοριάς βρίσκεται στο Νομό Καστοριάς σε υψόμετρο 629,5 μέτρων. Γενικά είναι μια ρηχή καρστική λίμνη με μέση επιφάνεια 27,9 Km², μέσο βάθος 4,4 μέτρα και μέγιστο βάθος 9,10 μέτρα. Έχει ελλειψοειδή μορφή με δυο φυσικές εσοχές και διαιρείται σε δύο τμήματα από τη χερσόνησο της Κοριτσάς όπου είναι χτισμένη και η πόλη της Καστοριάς.

Η λεκάνη απορροής είναι κλειστή με έκταση 263,6 Km² και μέσο υψόμετρο 895 μέτρα και χαρακτηρίζεται από απότομες κλίσεις, μεγάλα υψόμετρα και έντονες κλιματικές συνθήκες με ραγδαίες βροχοπτώσεις και ευπάθεια στα χειμαρρικά φαινόμενα λόγω του ελλειπούς φυτομανδύα της. Το κλίμα της περιοχής χαρακτηρίζεται ως Μεσογειακό-Ηπειρωτικό με ιδιαίτερα ψυχρή χειμερινή περίοδο. Είναι υγρό με μεσοθερμικές συνθήκες. Η περίοδος των βροχών είναι από Σεπτέμβριο ως Μάιο και η ξηρή περίοδος από Ιούνιο ως Αύγουστο. Το υδρολογικό ισοζύγιο για τη λίμνη της Καστοριάς είναι αρνητικό. Αυτό σε συνδυασμό με την έλλειψη διαχείρισης στη διακύμανση της στάθμης επιδεινώνουν την κατάσταση της λίμνης.

Η λίμνη της Καστοριάς είναι ένα οικοσύστημα που συνδυάζει σπουδαίες παραγωγικές (μεγάλη βιομάζα ειδικά στα ψάρια) και περιβαλλοντικές (μεγάλη βιολογική ποικιλότητα που περιλαμβάνει πολλά είδη σπάνιων φυτών και ζώων) αξίες. Η λίμνη έχει προταθεί ως περιοχή κοινοτικού ενδιαφέροντος στο δίκτυο ΦΥΣΗ 2000'. Αποτελεί έναν από τους ελάχιστους ελληνικούς υγροτόπους στους οποίους εξακολουθούν να υπάρχουν παραλίμνια δάση που μαζί με τις ζώνες καλαμώνων αποτελούν καταφύγιο μιας μεγάλης ζωικής ποικιλίας. Έκτος των άλλων αποτελεί ένα σημαντικό σύστημα από άποψη ορνιθοπανίδας. Το χειμώνα η λίμνη χρησιμεύει ως



ενδιαίτημα μεγάλων πληθυσμών ψαροφάγων πουλιών που διαχειμάζουν στη χώρα μας και δείχνουν και το πολύ πλούσιο υπόβαθρο της λίμνης από άποψη ψαριών. Σημαντική είναι και η παρουσία αργυροπελεκάνων και λαγγόνων που προστατεύονται αυστηρά από τη Οδηγία ΕΕ/409/79. Την άνοιξη αλλά και κατά την φθινοπωρινή μετανάστευση παρατηρούνται στα υγρά λιβάδια πολλά παρυδάτια πουλιά. Το καλοκαίρι η λίμνη είναι ένα από τα λίγα μέρη που φωλιάζουν ερωδιόμορφα πουλιά .

Η Καστοριά είναι εύκρατη λίμνη, με θερμική στρωμάτωση το καλοκαίρι (το θερμόκλινο βρίσκεται στα 3-4,5 μέτρα) και παγώνει το χειμώνα λίγες μέρες. Η θερμική στρωμάτωση αρχίζει από τα μέσα Ιουνίου και τελειώνει στις αρχές Αυγούστου. Κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής θερμικής στρωμάτωσης η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου είναι μειωμένη σχεδόν σε όλη τη στήλη του νερού, ενώ το pH σημειώνει μείωση στην κατακόρυφη κατανομή του, γεγονός που δείχνει την αυξημένη φωτοσύνθεση στην επιφάνεια και αποσύνθεση στον πυθμένα. Σήμερα η λίμνη κατατάσσεται στις υπερεύτροφες, και το καλοκαίρι παρατηρούνται στον πυθμένα της λίμνης ανοξικές συνθήκες. Στη φυτοπλαγκτική κοινωνία κυριαρχούν τα κυανοφύκη σε όλη τη διάρκεια του έτους, ενώ η συγκέντρωση της χλωροφύλλης σημειώνει σταθερή αύξηση από τις αρχές καλοκαιριού για να δώσει τη μέγιστη τιμή το Σεπτέμβριο. Η υπερβολική ανάπτυξη του φυτοπλαγκτού που επαυξάνεται από την ελευθέρωση του φωσφόρου επηρεάζει την αισθητική αξία της λίμνης που μαζί με την διάσπαση της οργανικής ύλης στον πυθμένα συντελεί στην δημιουργία ανοξικών συνθηκών.

Τα νερά της λίμνης εμπλουτίζονται με επιφανειακά κατακρημνίσματα, επιφανειακές και υπόγειες απορροές και υπολίμνιες πηγές. Συγκεκριμένα



δέχεται τις απορροές από 9 χείμαρρους, ενώ τα νερά της έχουν φυσική εκροή στη Γκιάλι (ανατολικά του Δισπηλιού) προς τον ποταμό Αλιάκμονα που ελέγχεται τεχνητά. Με τα νερά από τα ρέματα της λεκάνης απορροής στη λίμνη φέρονται σημαντικές ποσότητες φερτών υλικών που είναι ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που αντιμετωπίζει σήμερα η λίμνη.

Ακόμη το γεγονός ότι στη λεκάνη απορροής το 24% καλύπτεται από καλλιέργειες έχει ως αποτέλεσμα να φτάνουν στη λίμνη μεγάλες ποσότητες λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων. Το νερό της λίμνης είναι επιβαρημένο τόσο με βαρέα μέταλλα όσο και με φυτοφάρμακα, ενώ ο βυθός της λίμνης έχει πολλαπλάσιες συγκεντρώσεις μετάλλων. Γενικά πάντως δεν υπάρχει σοβαρό πρόβλημα ρύπανσης από τοξικές ουσίες.

Η κατάσταση της λίμνης επιδεινώθηκε όσον αφορά τον ευτροφισμό τις τελευταίες δεκαετίες, κάτι που οφείλεται κυρίως στα αστικά λύματα που έπεφταν μέχρι το 1990 απευθείας στη λίμνη. Από το 1990 όμως και μετά άρχισε η λειτουργία του βιολογικού καθαρισμού. Παρόλα αυτά το ίζημα της λίμνης είναι πλούσιο σε οργανική ύλη και ενώσεις φωσφόρου που σε συνδυασμό με τις υψηλές θερμοκρασίες το καλοκαίρι και το μικρό βάθος της λίμνης συμβάλλουν στην ελευθέρωση του φωσφόρου και αυξάνεται η συγκέντρωση του στη λίμνη κατά 10 φορές. Η αφομοιωτική ικανότητα της λίμνης (4050 κιλά/χρόνο) υπολείπεται σημαντικά των φορτίων που δέχεται σήμερα και ως εκ τούτου, είτε τα σημερινά φορτία (14400 κιλά/χρόνο) πρέπει μειωθούν κατά 3.5 φορές είτε η υδρολογική κατάσταση να μεταβληθεί έτσι ώστε αυξηθεί η αφομοιωτική ικανότητα. Η αναγέννηση της λίμνης θα απαιτήσει μακρό χρονικό διάστημα και θα χρειαστεί και άλλη επέμβαση σε αυτή επιπλέον του βιολογικού καθαρισμού των δημοτικών αποβλήτων.



Ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα που αντιμετωπίζει η λίμνη της Καστοριάς είναι οι προσχώσεις από τις οποίες μειώνεται με ταχύ ρυθμό η χωρητικότητα της λίμνης και προκαλούνται πλημμύρες αγονοποιήσεις και υγράσεις στις γύρω περιοχές.

ΧΑΡΤΗΣ ΤΗΣ ΛΙΜΝΗΣ ΤΗΣ ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ(Χάρτης1)



ΛΙΜΝΗ ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ (ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ)



5.3.2.ΠΕΡΙΟΧΗ ΛΙΜΝΗΣ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΟΠΟΓΡΑΦΙΑ – ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ - ΒΑΘΟΣ

Η λίμνη Παμβώτιδα βρίσκεται στο βορειοδυτικό τμήμα της Ελλάδας (γεωγραφικό πλάτος $39^{\circ} 39'30''$ βόρειο, γεωγραφικό μήκος $20^{\circ} 51'$ ανατολικά) κατά μήκος της πάλης των Ιωαννίνων. Η γενική μορφή της λίμνης Παμβώτιδας είναι αυτή ενός ισοσκελούς τριγώνου στο οποίο ο μεγαλύτερος άξονας μήκους 8 Km. βρίσκεται προς την διεύθυνση Β.ΒΔ-Ν.ΝΑ ενώ ο μικρός άξονας είναι μήκους περίπου 5Km. Η λίμνη Παμβώτιδα σε αντιστοιχία με τη πάλη των Ιωαννίνων (μώλος) σχηματίζει ένα λαιμό μήκους περίπου ενός χιλιομέτρου στο βόρειο τμήμα του οποίου υπάρχει το νησί.

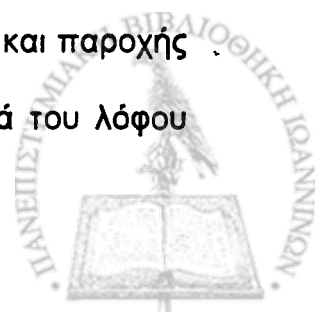
Αυτός ο σχηματισμός χωρίζει την λίμνη σε δύο μέρη ένα πιο μικρό (ονομαζόμενη μικρή λίμνη) με προσανατολισμό προς το βορρά και ένα αξιοσημείωτα πιο μεγάλο (ονομαζόμενη μεγάλη λίμνη) που εκτείνεται προς το νότο.

Η λίμνη παρουσιάζει επιφάνεια συνολικής έκτασης $21,72 \text{ Km}^2$ και με συνολικά μήκος ακτών 22,5 Km και ευρίσκεται στο ύψος των 469,70 μέτρων από την επιφάνεια της θάλασσας. Το μεγαλύτερο βάθος που έχει μετρηθεί πρόσφατα (Μάιος 1989) είναι 11 μέτρα στο στενό μεταξύ νησιού και, απέναντι όχθης της λίμνης στο ύψος της τοποθεσίας των πηγών της Ντραμπάντοβας (Κρουονέρι), ενώ το μέσο βάθος αυτής είναι 4,23 m. και συνολικός της όγκος 90 εκατομμύρια κυβικά μέτρα, συνεπώς πρόκειται για μια λίμνη αβαθή και αρκετά εκτεταμένη. Το ύψος των υδάτων δεν είναι σταθερό κατά την διάρκεια του έτους αλλά κυμαίνεται σε σχέση με



τις βροχοπτώσεις την άρδευση των αγρών μέσω της άντλησης, τις διαφυγές προς τον ποταμό Καλαμά, τις υπόγειες διαφυγές μέσα στο καρστικό του λεκανοπεδίου την εξάτμιση και την διαπνοή.

Η είσοδος των νερών είναι μια παράμετρος πολύ σημαντική γιατί μέσω αυτής εισέρχονται και όλοι οι ρύποι που δημιουργούν τα προβλήματα της υποβάθμισης του λιμναίου οικοσυστήματος. Η είσοδος αυτών είναι συνάρτηση τριών παραγόντων, των βροχοπτώσεων, της επιφανειακής απορροής της λεκάνης και της αποστράγγισης, ενώ η έξοδος αυτών είναι της υπερχειλίσης, της εξάτμισης και της άρδευσης. Η περιοχή των Ιωαννίνων είναι πάρα πολύ βροχερή οπότε η ποσότητα των νερών που διοχετεύονται στον υδροφόρο ορίζοντα είναι μεγάλη. Άλλη είσοδο των νερών αντιπροσωπεύεται από τις επιφανειακές απορροές των οποίων η παροχή σχετίζεται με τις βροχοπτώσεις (αυξάνουν όταν αυξάνουν οι τελευταίες και αντίστροφα) και από τη διάθεση στην επιφάνεια του εδάφους λυμάτων. Προφανώς η οδός αυτή, των επιφανειακών απορροών μεταφέρει και τα αμεταβόλιστα από τα καλλιεργούμενα φυτά, λιπάσματα και αγροτοφάρμακα από τους αγρούς του λεκανοπεδίου. Επί πλέον η συνολική παροχή των επιφανειακών απορροών δεν είναι εύκολο να εκτιμηθεί με ακρίβεια. Ένα τμήμα της διοχετεύεται μέσα στη λίμνη από τρία τεχνικά κανάλια που κατασκευάστηκαν 40 χρόνια πριν, αλλά το σύνολο υπερβαίνει την παροχή των τριών αυτών καναλιών, με αποτέλεσμα να μη μπορούμε να γνωρίζουμε την ποσότητα των ρύπων που εισέρχονται στη λίμνη. Τα τρία αυτά κανάλια (τάφροι) είναι: Του Κουτσελιού μήκους 6.500 m. και παροχής $14 \text{ m}^3 / \text{sec}$, που διοχετεύει τα νερά της περιοχής, ανατολικά του λόφου

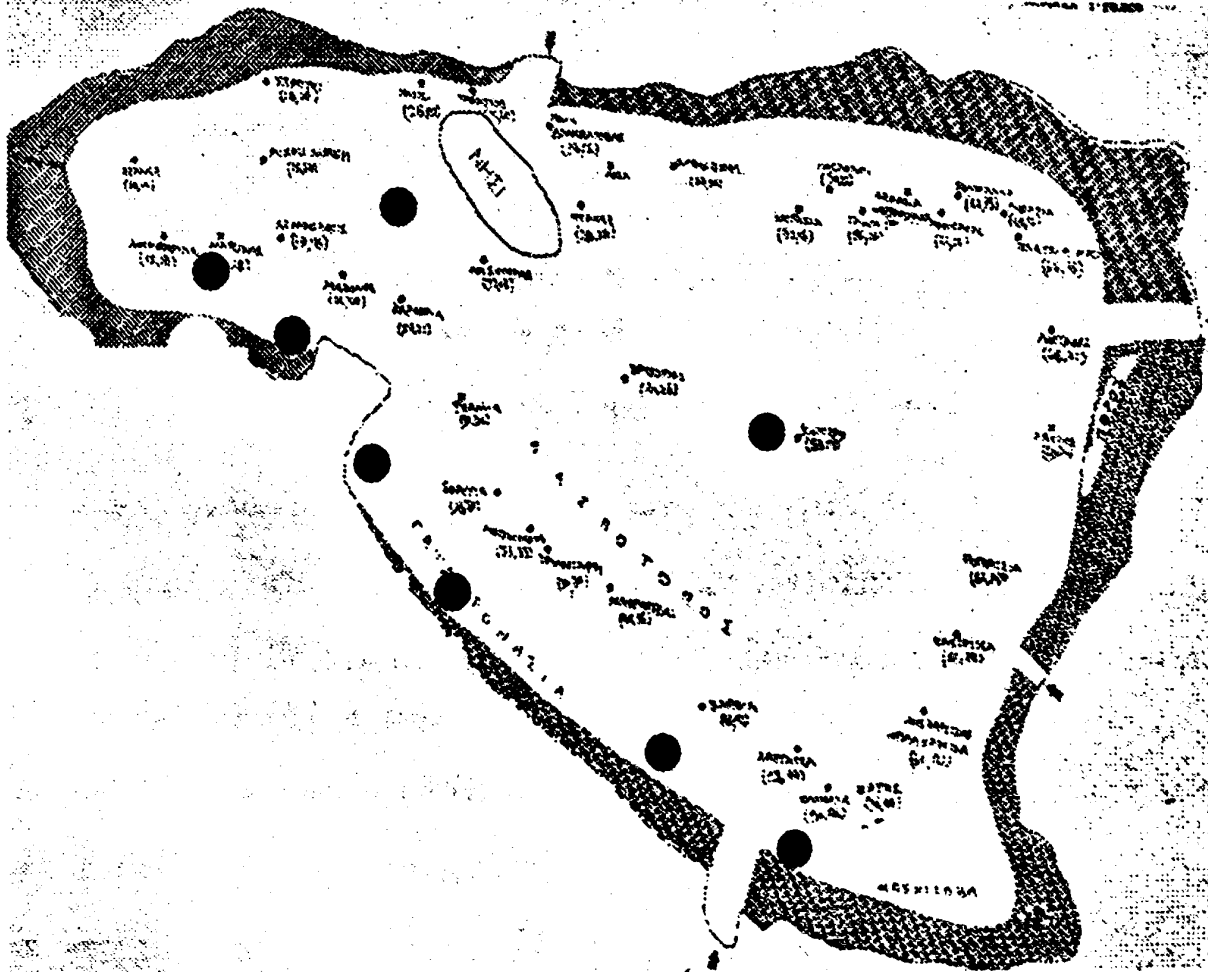


της Καστρίτσας προς τη λίμνη, δηλαδή τα νερά της λεκάνης Κουτσελιού και Πόρου και οι τάφροι Λαγκάτσας και Κοσμηράς με μήκη 6.810 και 2.900 μέτρων που οδηγούν τα νερά των περιοχών Ανατολής, Πεδινής, Μπάφρας και Κατσικάς Ν.Δ. της λίμνης στη σήραγγα Λαγκάτσας, μήκους 1.036 μ. και παροχής $40 \text{ m}^3 / \text{sec}$ η οποία στη συνέχεια τα διοχετεύει στη λίμνη.

ΚΛΙΜΑ

Το κλίμα της περιοχής του λεκανοπεδίου Ιωαννίνων είναι ηπειρωτικό. Αυτό σημαίνει πολλές βροχοπτώσεις και χαμηλές θερμοκρασίες τη χειμερινή περίοδο και υψηλές θερμοκρασίες με αρκετά μεγάλη ηλιοφάνεια την καλοκαιρινή περίοδο





Χάρτης της λίμνης των Ιωαννίνων (Χάρτης 2)



5.3.3.ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΟΤΑΜΟΥ ΑΩΟΥ ΚΑΙ ΒΟΪΔΟΜΑΤΗ

Το σύστημα των ποταμών περιλαμβάνει τον Αώο, τον Βοΐδομάτη και τους παραπόταμους τους. Καλύπτει συνολικά 100 Km με μέσο πλάτος 16 μέτρα και παροχή 3,2 m³/sec.

Ο Αώος ποταμός έχει μήκος 80 Km, μέσο πλάτος 18 μέτρα και βάθος 1-0,60 μέτρα (m) χαρακτηρίζεται από υψηλή χειμαρότητα και συχνές πλημμύρες την χειμερινή περίοδο.

Στο πεδινό τμήμα του διακλαδίζεται ακανόνιστα και η κοίτη διαμορφώνεται από τα έργα αμμοληψίας στην περιοχή.

Στον ποταμό καταλήγουν οι πηγές του χωριού Ελεύθερο που σχηματίζουν παραπόταμο 10 Km, το ρεύμα Διστράτου μήκους 8 Km, πλάτους 4 m. βάθους 0,45 m. και παροχής 1 m³/sec, η πηγή Τοπόλιστας μη συνεχούς ροής, και μικροί καταρράκτες και ορεινά ρεύματα που σχηματίζονται περιστασιακά και εξαρτώνται από την ετήσια βροχόπτωση και τις καιρικές συνθήκες.

Η οδική συγκοινωνία αν και παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα ιδιαίτερα τους χειμερινούς μήνες, προσφέρει την δυνατότητα προσέγγισης των κλάδων του ποταμού μέχρι τα χωριά Δίστρατο και Βωβούσα, όχι όμως και της κύριας κοίτης του.

Ο ποταμός Βοΐδομάτης καλύπτει υδάτινη επιφάνεια μήκους 2025 Km, με μέσο πλάτος 15 m, βάθος 1-15m και παροχή 2,8 m³/sec.

Η χειμαρότητά του είναι χαρακτηριστική τους χειμερινούς μήνες και σε πολλές περιπτώσεις μεταφέρει κορμούς και ογκώδη φερτά υλικά.

Στον ποταμό καταλήγουν τα νερά πολλών κατά μήκος πηγών που καθορίζουν και την καθαρότητά του.

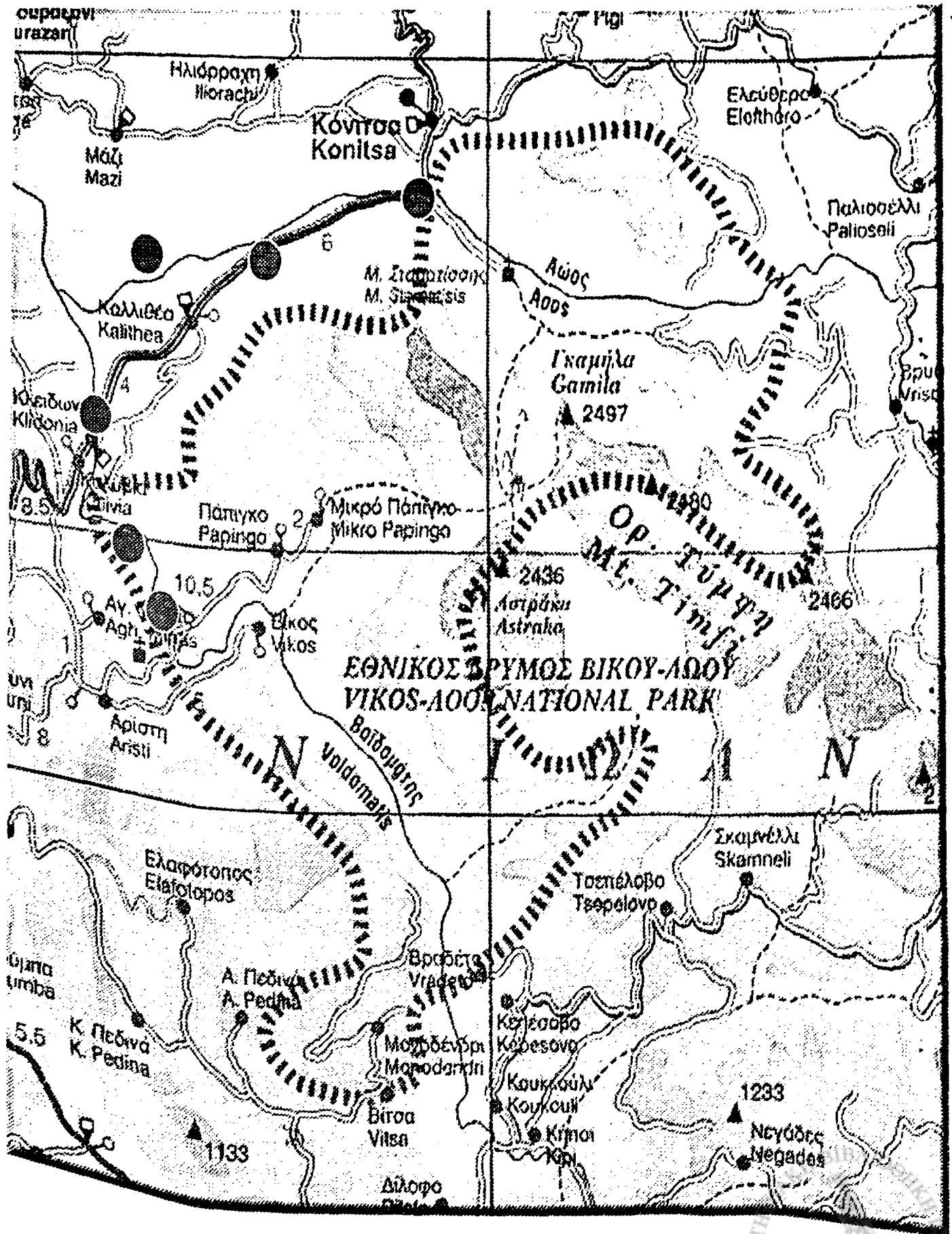


Το οδικό δίκτυο είναι ανεπτυγμένο και υπάρχει δυνατότητα πρόσβασης σε πολλά σημεία μέχρι την χαράδρα του Βίκου.

Στο σύστημα των ποταμών είναι δυνατόν να εντοπίσουμε δύο ζώνες από γεωμορφολογική άποψη, την ορεινή που οριοθετείται από τις πηγές μέχρι τις γέφυρες της εθνικής οδού και την πεδινή ζώνη από τις γέφυρες μέχρι την ένωση των ποταμών με τον Σαραντάπορο.



Χάρτης δειγματοληψιών για τον ποταμό Αώο και Βοιδομάτη (Χάρτης 3)



5.3.4.ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΟΤΑΜΟΥ ΛΟΥΡΟΥ

Ο ποταμός Λούρος είναι ένα από τα χαρακτηριστικότερα ποτάμια της Ηπείρου και αποτελεί πόλο έλξης για την περιοχή. Ίσως είναι το μοναδικό ποτάμι της χώρας που συνδέθηκε τόσο έντονα με την οικονομική δραστηριότητα της περιοχής, δεδομένου ότι τα νερά του χρησιμοποιούνται για την λειτουργία και υποστήριξη 23 μονάδων εκτροφής πέστροφας. Έτσι τα κυριότερα χαρακτηριστικά του ποταμού Λούρου είναι:

Η συνολική λεκάνη του ποταμού έχει επιφάνεια 1150 km². Η παροχή του κυμαίνεται από 2,5 m³/sec (μέση ελάχιστη θερινή) έως 6,7 m³/sec (μέση χειμερινή).

Το νερό του ποταμού χρησιμοποιείται κυρίως για πεστροφοκαλλιέργεια, αλλά και για άρδευση, ύδρευση, βιομηχανική χρήση καθώς και για τη διατήρηση του οικοσυστήματος.

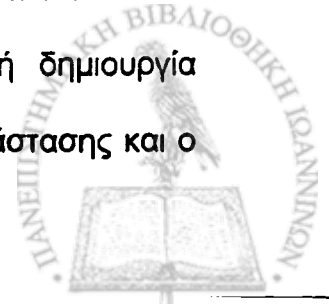
Ελήφθησαν δείγματα από 25 σημεία κατά μήκος του ποταμού συμπεριλαμβανομένων και των περισσότερων μονάδων πεστροφοκαλλιέργειας. Συγκεκριμένα: 7 σημεία βρίσκονταν στην περιοχή Βουλιάστα, 7 στην περιοχή Μουσιωτίτσα, 4 στην περιοχή Πλατανάκια και 7 στην περιοχή Κερασώνας.

Ο Κερασώνας θεωρείται περισσότερο πεδινή περιοχή σε σχέση με τις υπόλοιπες και με περισσότερες ανθρωπογενείς δραστηριότητες (σφαγεία, χοιροστάσια). Η εποχή των δειγματοληψιών αφορά χαρακτηριστική εποχή κατά τα τελευταία 10 χρόνια δεδομένων των λίγων βροχοπτώσεων, της



5.3.5.ΠΕΡΙΟΧΗ ΠΟΤΑΜΟΥ ΚΑΛΑΜΑ

Ο ποταμός Καλαμάς έχει συνολικό μήκος 113 χιλιόμετρα διασχίζοντας τους νομούς Ιωαννίνων και Θεσπρωτίας. Η περιοχή που αφορά τις δειγματοληψίες περιλαμβάνει την έκταση που καλύπτεται από την λεκάνη απορροής του ποταμού Καλαμά και του λεκανοπεδίου Ιωαννίνων. Στην περιοχή αυτή κύριες δραστηριότητες του πρωτογενή τομέα αποτελούν οι γεωργικές καλλιέργειες, η κτηνοτροφία, η ιχθυοκαλλιέργεια και η αλιεία. Κύριες γεωργικές καλλιέργειες αποτελούν οι καλλιέργειες καλαμποκιού, σιτηρών, εσπεριδοειδών, ελιάς, πατάτας, λαχανοκομικών, αμπέλιων αλλά σε μεγαλύτερο ποσοστό γίνεται καλλιέργεια κτηνοτροφικών φυτών που εξυπηρετούν τις ανάγκες της κτηνοτροφίας. Η γεωργία ασκείται κύρια στην πιο γνωστή και διαδεδομένη μορφή της την συμβατική Γεωργία, στην οποία η παραγωγή των γεωργικών προϊόντων βασίζεται στη χρήση εξωτερικών βοηθημάτων παρασκευασμένων τεχνητά από τον άνθρωπο, όπως λιπασμάτων, φυτοφαρμάκων και άλλων βοηθητικών ουσιών βιομηχανικά παρασκευασμένων. Στην περιοχή της λεκάνης του Καλαμά, η κύρια επιβάρυνση προέρχεται από περιοχές όπου συσσωρεύεται μεγάλος πληθυσμός μονάδων εκτροφής και ρυπογόνων καλλιεργειών όπως λαχανοκομικών σε θερμοκήπια, πατάτας και καλαμποκιού. Σε πολλές όμως περιοχές, οι γεωργικές καλλιέργειες όπως η καλλιέργεια του αμπελιού, των σιτηρών, της ελιάς και κυρίως των κτηνοτροφικών φυτών, δεν θεωρούνται επιβλαβής μιας και η χρήση γεωργικών φαρμάκων και λιπασμάτων είναι περιορισμένη. Εντούτοις και σε αυτή την περίπτωση θα πρέπει να δοθεί προσοχή για δυο λόγους. Ο πρώτος αφορά στην πιθανή δημιουργία προβλήματος ρύπανσης με την συνέχιση της υπάρχουσας κατάστασης και ο



δεύτερος αφορά στην δυνατότητα που υπάρχει σήμερα μέσα από νέες τεχνικές καλλιέργειας για τον έλεγχο και περιορισμό των ρύπων από τις εκμεταλλεύσεις.

Η κτηνοτροφία ασκείται κύρια στην εκτατική της μορφή για την αιγοπροβατοτροφία ενώ υπάρχουν πολλές μονάδες εκτροφής χοίρων και πουλερικών. Ελάχιστες είναι οι εκμεταλλεύσεις βοοειδών. Οι κτηνοτροφικές μονάδες που λειτουργούν στην περιοχή μπορούν να θεωρηθούν ζημιογόνες για το περιβάλλον. Τα απόβλητα των μονάδων αυτών όταν διατίθενται ανεπεξέργαστα στο περιβάλλον αποτελούν σημαντική πηγή ρύπανσης. Η μορφή αλλά και η ικανότητα ρύπανσης εξαρτάται από το είδος σταυλισμού, το είδος των εκτρεφόμενων ζώων, τον τρόπο συλλογής και απομάκρυνσης των αποβλήτων από τους χώρους εκτροφής, τον τρόπο αποθήκευσης και επεξεργασίας και την περιεκτικότητα τους σε ολικά στερεά.

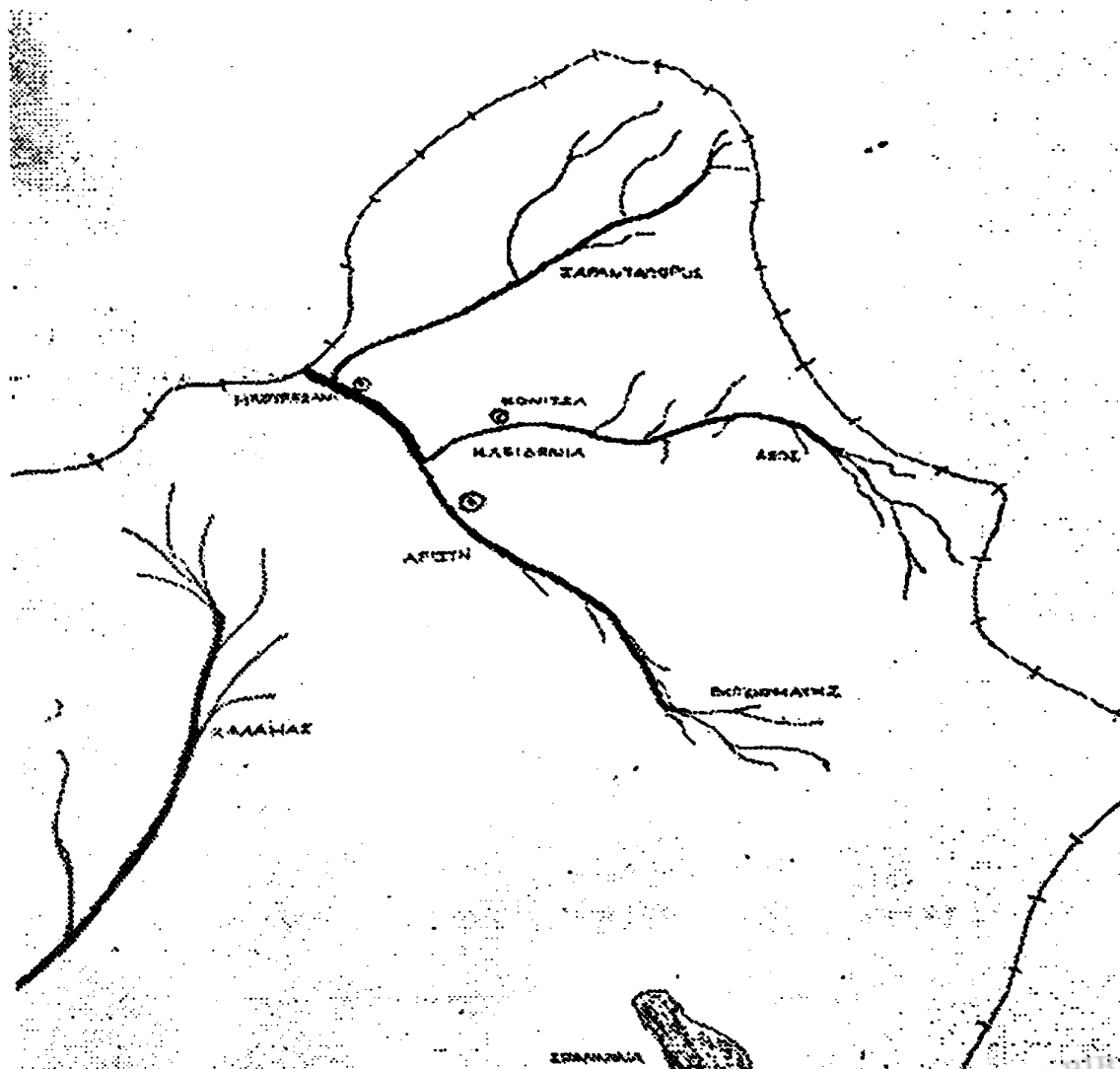
Πιθανές επιδράσεις στο περιβάλλον μπορεί να προέρχονται και από την λειτουργία μονάδων ιχθυοκαλλιεργειών. Η ιχθυοκαλλιέργεια δεν είναι αρκετά ανεπτυγμένη στην περιοχή του Καλαμά όπως συμβαίνει σε άλλα ποτάμια της Ηπείρου. Στην περιοχή του ποταμού Καλαμά λειτουργούν σήμερα 8 μονάδες με μέση παραγωγή 30 τόνους το χρόνο. Το πρόβλημα της ρύπανσης είναι πολύ μικρό και προέρχεται κύρια από τη χρήση ιχθυοτροφών, η περίσσεια των οποίων διαφεύγει από τις μονάδες στο νερό.

Η αλιεία γίνεται κύρια στην λίμνη των Ιωαννίνων και στα παράλια κοντά στις εκβολές του ποταμού. Δεν θεωρείται επιβαρυντική δραστηριότητα από θέματα ρύπανσης. Παρόλα αυτά θα πρέπει να τονιστεί ότι η παράνομη αλιεία που διεξάγεται σε πολλές περιοχές του ποταμού είναι επιβλαβής για το περιβάλλον από την πλευρά της καταστροφής της ποικιλότητας των



ζωντανών οργανισμών που υπάρχουν στα νερά που μπορεί να φτάσει στην εξαφάνιση ειδών ψαριών πολλά από τα οποία βρίσκονται μόνο στην περιοχή μας. Αξίζει να αναφερθεί όμως και η περίπτωση της караβίδας, που ενώ βρίσκεται συνήθως σε μεγάλους πληθυσμούς, τείνει να εξαφανιστεί από ορισμένες περιοχές, λόγω της έντονης και παράνομης αλίευσης της. Η διατήρηση του φυσικού περιβάλλοντος συνεπάγεται πάντα την διατήρηση της ποικιλότητας των ειδών που το αποτελούν.

ΧΑΡΤΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΚΑΛΑΜΑ



Χάρτης του ποταμού Καλαμά Χάρτης 5

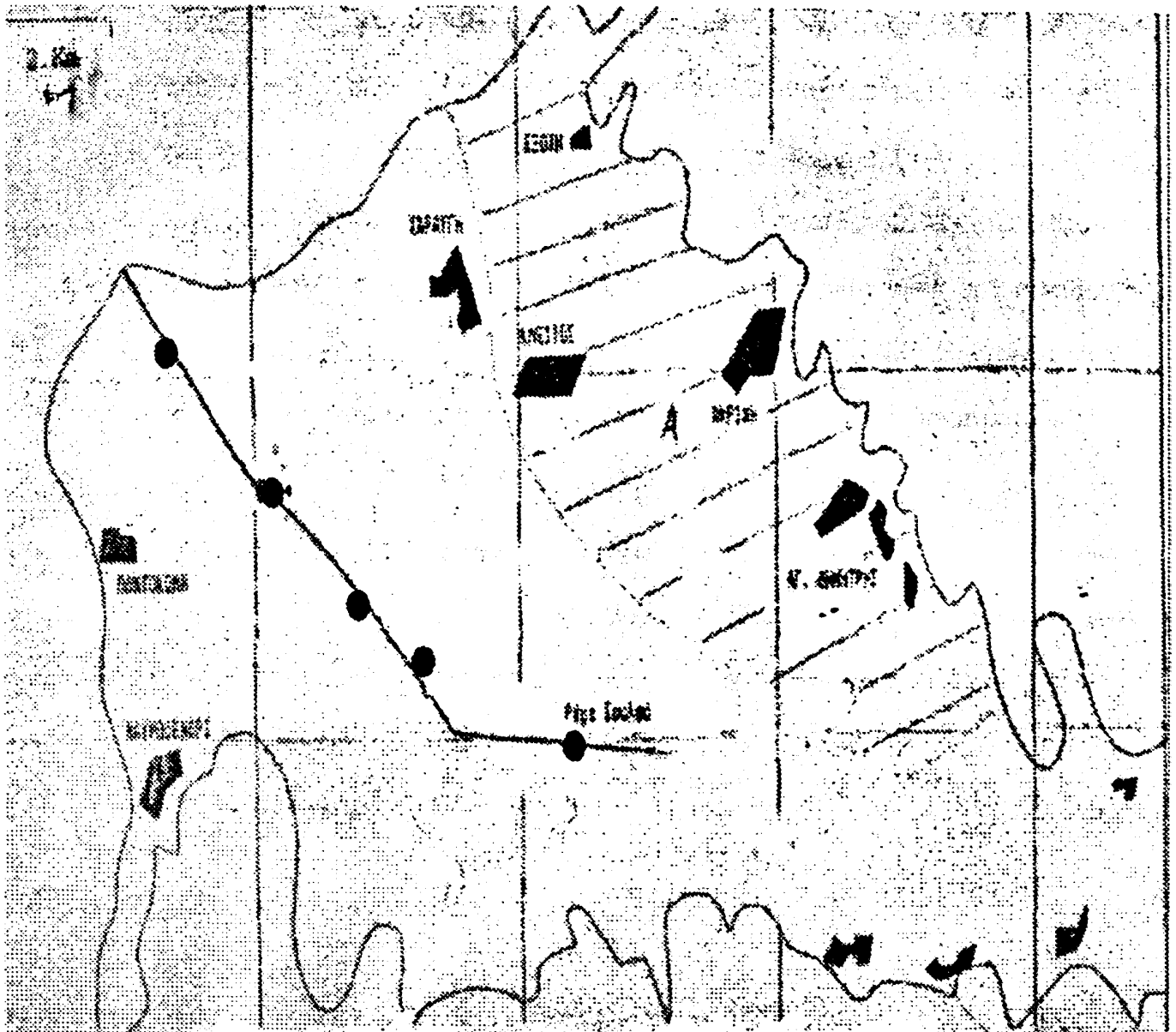


5.3.6.ΠΕΡΙΟΧΗ ΡΕΜΑΤΟΣ ΣΟΥΛΟΥ ΠΤΟΛΕΜΑΪΔΑΣ

Το ρέμα Σουλού βρίσκεται στο 14^ο χιλιόμετρο του δρόμου Πτολεμαΐδας-Κοζάνης. Βρίσκεται σε βιομηχανοποιημένη περιοχή κοντά στα Λιγνιτωρυχεία της Πτολεμαΐδας και δέχεται νερά εκτός από τους υπόγειους υδροφόρους ορίζοντες και των λεκανών Πτολεμαΐδας και Αμυνταίου. Τα υγρά απόβλητα της βιομηχανικής και οικιστικής δραστηριότητας της περιοχής της Πτολεμαΐδας εκβάλλουν ανεπεξέργαστα στο ρέμα Σουλού. Εξάλλου τα νερά του χρησιμοποιούνται και για τις ανάγκες των ατμοηλεκτρικών σταθμών της ΔΕΗ. Τέλος, εκτός από τη μείωση του όγκου του λόγω κατανάλωσης μεγάλων ποσοτήτων νερού από τους ΑΗΣ (ατμοηλεκτρικός σταθμός) και ΥΔΣ (υδροηλεκτρικός σταθμός) πρόβλημα δημιουργείται και από το ποσοστό του νερού που επιστρέφει αφού χρησιμοποιηθεί και υγροποιηθεί, οπότε και μαζεύεται σε υδατοσυλλογές, και προκαλεί θερμική ρύπανση και μείωση του οξυγόνου.



Χάρτης του ρέματος Σουλού στην Πτολεμαίδα(Χάρτης 6)



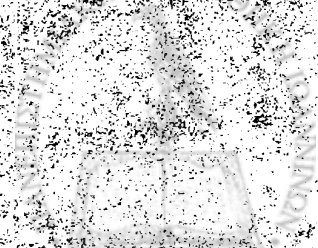
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



6.1.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΛΙΜΝΗΣ ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ

44

ΛΙΜΝΗ ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ



Καστοριά 1^η αραίωση. Βλαστικές μορφές
ΠΙΝΑΚΑΣ 1

<u>Ημερομηνία δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο 1^ο</u>	<u>Σημείο 2^ο</u>	<u>Σημείο 3^ο</u>	<u>Σημείο 4^ο</u>	<u>Σημείο 5^ο</u>	<u>Σημείο 6^ο</u>	<u>Θετικότητα (%ποσοστό θετικότητας)</u>
<u>26-03-2000</u>	+	-	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>17-04-2000</u>	-	+	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>06-05-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>02-06-2000</u>	-	-	+	+	-	-	2/6 (33,33%)
<u>29-06-2000</u>	+	+	+	-	-	-	3/6 (50%)
<u>29-11-2000</u>	+	+	-	+	-	-	3/6 (50%)
<u>30-01-2001</u>	-	-	-	-	+	-	1/6 (16,67%)
<u>15-02-2001</u>	-	-	-	-	-	+	1/6 (16,67%)
<u>Θετικότητα</u>	3/8	3/8	2/8	2/8	1/8	1/8	ΣΥΝΟΛΟ 12/48 (25%)
<u>(%ποσοστό θετικότητας)</u>	(37,5%)	(37,5%)	(25%)	(25%)	(12,5%)	(12,5%)	

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



Καστοριά 2^η αραίωση. Βλαστικές μορφές
ΠΙΝΑΚΑΣ 2

<u>Ημερομηνία δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο 1^ο</u>	<u>Σημείο 2^ο</u>	<u>Σημείο 3^ο</u>	<u>Σημείο 4^ο</u>	<u>Σημείο 5^ο</u>	<u>Σημείο 6^ο</u>	<u>Θετικότητα (%Ποσοστό θετικότητας)</u>
<u>26-03-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>17-04-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>06-05-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>02-06-2000</u>	-	+	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>29-06-2000</u>	+	-	+	-	-	-	2/6
<u>29-11-2000</u>	+	-	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>30-01-2001</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>15-02-2001</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>Θετικότητα</u>	2/8	1/8	1/8	0/8	0/8	0/8	ΣΥΝΟΛΟ 4/48
<u>(%Ποσοστό θετικότητας)</u>	(25%)	(12,5%)	(12,5%)	(0%)	(0%)	(0%)	(8,33%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



Καστοριά 1^η αραίωση. Σπορογόνες μορφές
ΠΙΝΑΚΑΣ 3

<u>Ημερομηνία δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο 1^ο</u>	<u>Σημείο 2^ο</u>	<u>Σημείο 3^ο</u>	<u>Σημείο 4^ο</u>	<u>Σημείο 5^ο</u>	<u>Σημείο 6^ο</u>	<u>Θετικότητα (%ποσοστό θετικότητας)</u>
<u>26-03-2000</u>	+	-	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>17-04-2000</u>	-	+	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>06-05-2000</u>	-	-	-	-	+	-	1/6 (16,67%)
<u>02-06-2000</u>	-	-	-	+	-	-	1/6 (16,67%)
<u>29-06-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>29-11-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>30-01-2001</u>	-	+	-	-	-	+	2/6 (33,33%)
<u>15-02-2001</u>	+	-	+	-	-	-	2/6 (33,33%)
<u>Θετικότητα</u>	2/8	2/8	1/8	1/8	1/8	1/8	ΣΥΝΟΛΟ 8/48
<u>(%ποσοστό θετικότητας)</u>	(25%)	(25%)	(12,5%)	(12,5%)	(12,5%)	(12,5%)	(16,67%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



Με βάση τους αναλυτικούς πίνακες 1,2,3 προκύπτουν οι συνοπτικοί πίνακες 4,5,6 . Στον πίνακα 4 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου ανεξαρτήτως χώρου και χρόνου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4

Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%Ποσοστό θετικότητας)	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%Ποσοστό θετικότητας)	Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%Ποσοστό θετικότητας)
25	8,33	16,67

Στον πίνακα 5 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (χρονική κατανομή).

ΠΙΝΑΚΑΣ 5

Μήνας δειγματοληψίας	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%Ποσοστό θετικότητας)	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%Ποσοστό θετικότητας)	Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%Ποσοστό θετικότητας)
ΙΑΝ	16,67	0	33,33
ΦΕΒ	16,67	0	33,33
ΜΑΡ	16,67	0	16,67
ΑΠΡ	16,67	0	16,67
ΜΑΗΣ	0	0	16,67
ΙΟΥΝ	33,33	16,67	16,67
ΙΟΥΝ	50	33,33	0
ΝΟΕΜ	50	16,67	0



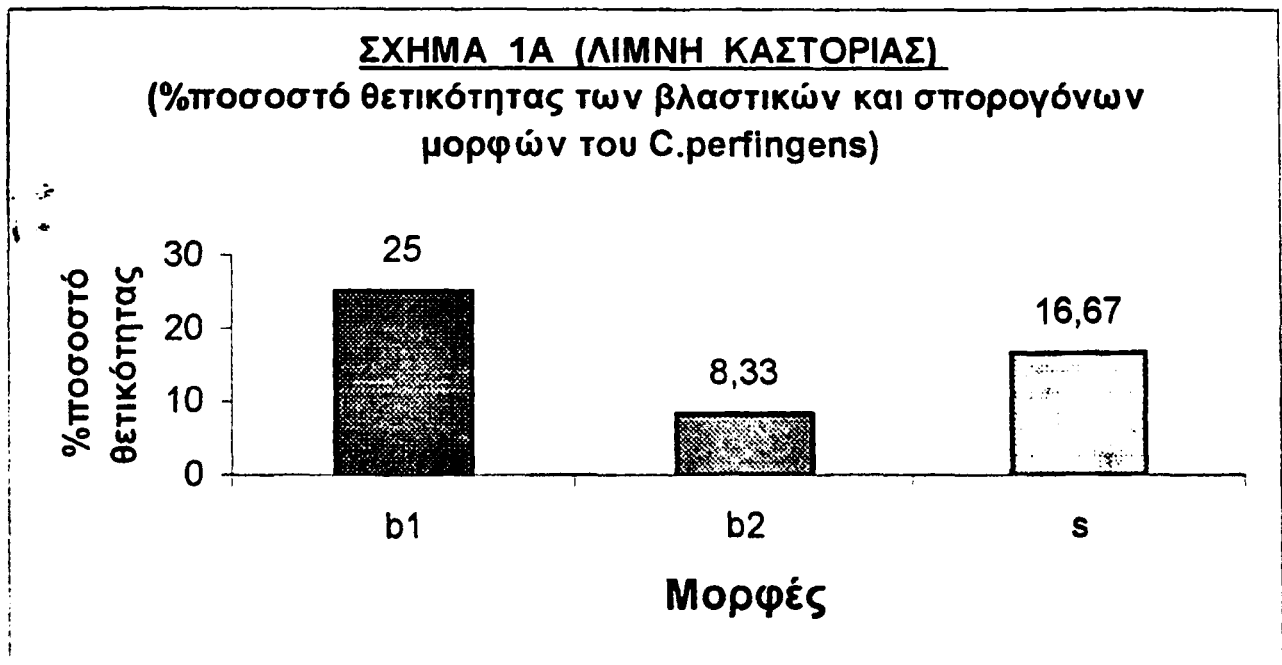
Στον πίνακα 6 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τα σημεία δειγματοληψίας (χωρική κατανομή).

ΠΙΝΑΚΑΣ 6

	<u>Σημείο</u> 1 ^ο	<u>Σημείο</u> 2 ^ο	<u>Σημείο</u> 3 ^ο	<u>Σημείο</u> 4 ^ο	<u>Σημείο</u> 5 ^ο	<u>Σημείο</u> 6 ^ο
Βλαστικές μορφές Αραίωση 10 ⁻¹ (Μορφή b1) (%Ποσοστό θετικότητας)	37,5	37,5	25	25	12,5	12,5
Βλαστικές μορφές Αραίωση 10 ⁻² (Μορφή b2) (%Ποσοστό θετικότητας)	25	12,5	12,5	0	0	0
Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10 ⁻¹ (Μορφή S) (%Ποσοστό θετικότητας)	25	25	12,5	12,5	12,5	12,5

Το σχήμα 1A που προκύπτει ως γραφική παράσταση του πίνακα 4 δείχνει το % ποσοστό θετικότητας των βλαστικών μορφών στην 1^η (b1) και 2^η (b2) αραίωση καθώς και των σπορογόνων μορφών στην 1^η (s) αραίωση του *C.perfringens* στην Λίμνη της Καστοριάς. Από το σχήμα αυτό φαίνεται ότι επικρατούν κυρίως οι βλαστικές μορφές με ποσοστό 25% στην 1^η αραίωση(στήλη b1) και 8,33 στην 2^η αραίωση (στήλη b2) ενώ οι σπορογόνες μορφές εμφανίζουν ποσοστό θετικότητας 16,67% (στήλη s).

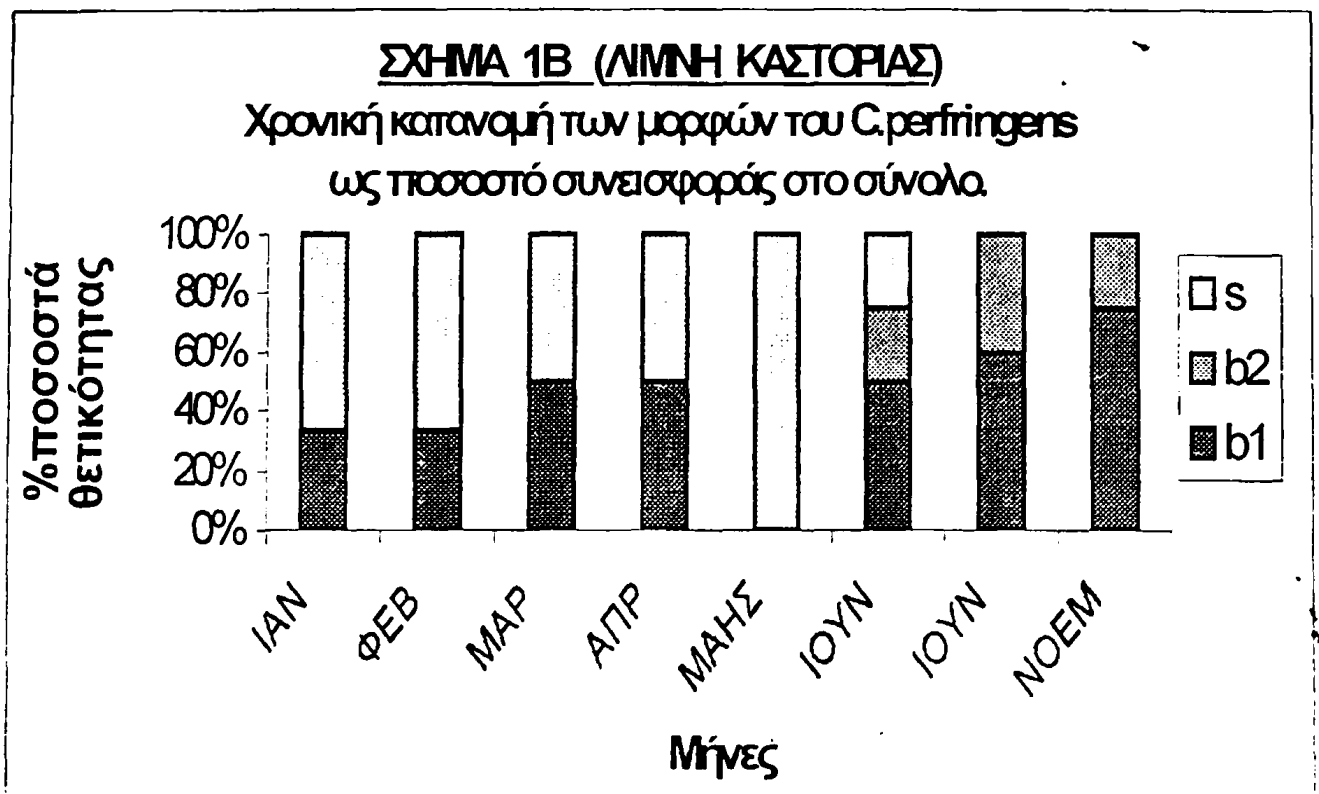




(Μορφή b1) =Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2)=Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S)=Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
--	---	---

Στο σχήμα 1B που προκύπτει με βάση τον πίνακα 5 φαίνεται η χρονική κατανομή των μορφών του *C. perfringens* σαν ποσοστό συνεισφοράς των επιμέρους μορφών (b1)(b2)(s), στην εκάστοτε χρονική στιγμή, στο σύνολο των μορφών εάν αυτό θεωρηθεί το 100%. Από εδώ φαίνεται ότι για την λίμνη της Καστοριάς κατά τους μήνες Ιανουάριο (ΙΑΝ), Φεβρουάριο (ΦΕΒ) και Μάη οι σπορογόνες μορφές έχουν μεγαλύτερο ποσοστό συνεισφοράς σ' ότι αφορά την εμφάνιση του βακτηρίου με την μορφή αυτή. Κατά τους μήνες Μάρτη (ΜΑΡ) και Απρίλη τόσο οι σπορογόνες (s) όσο και οι βλαστικές μορφές (b1) φαίνονται να παρουσιάζουν παραπλήσια ποσοστά συνεισφοράς. Τέλος κατά τους μήνες Ιούνιο, Ιούλιο και Νοέμβρη φαίνεται ότι το ποσοστό συνεισφοράς των βλαστικών μορφών είναι σαφώς μεγαλύτερο.

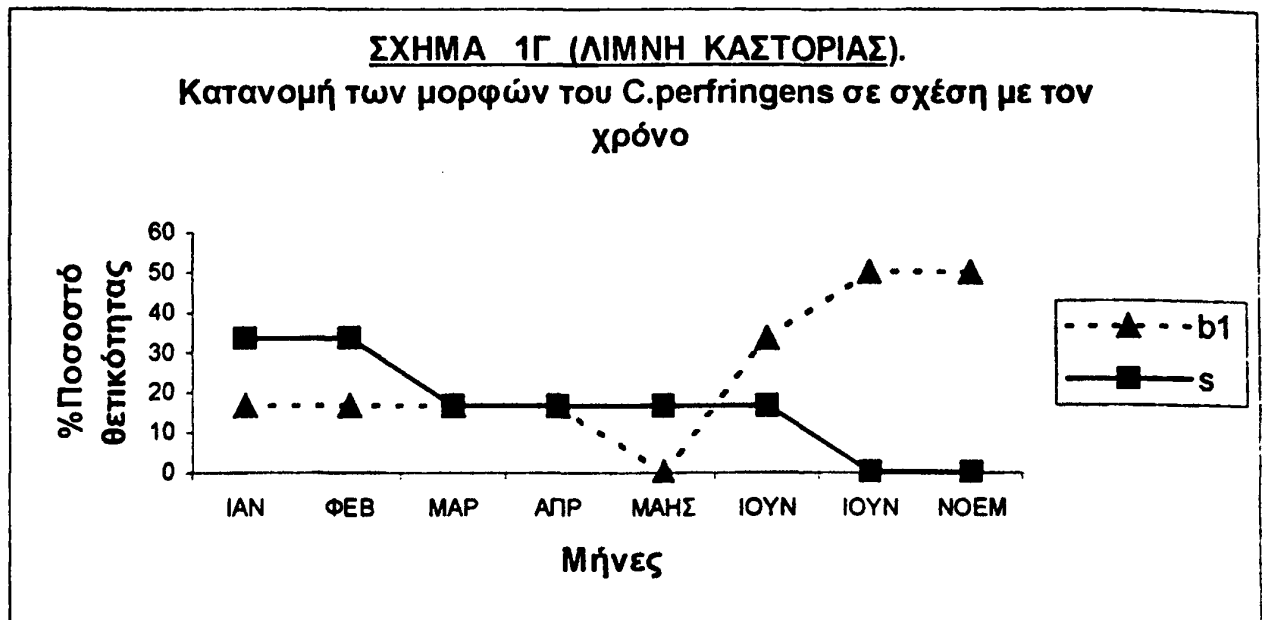




(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
---	---	---

Τα παραπάνω μπορούν να φανούν ακόμα πιο καθαρά εάν παρασταθούν σχηματικά ως η τάση εμφάνισης των μορφών του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (Σχήμα 1Γ) που προκύπτει με βάση τον πίνακα 5. Έτσι μελετώντας την γραμμή για τις σπορογόνες μορφές (s) παρατηρείται ότι υπάρχει η τάση για συχνότερη εμφάνιση κατά τους χειμερινούς και ανοιξιάτικους μήνες ενώ οι βλαστικές μορφές (b1) μορφές φαίνεται να εμφανίζονται συχνότερα κατά τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες.

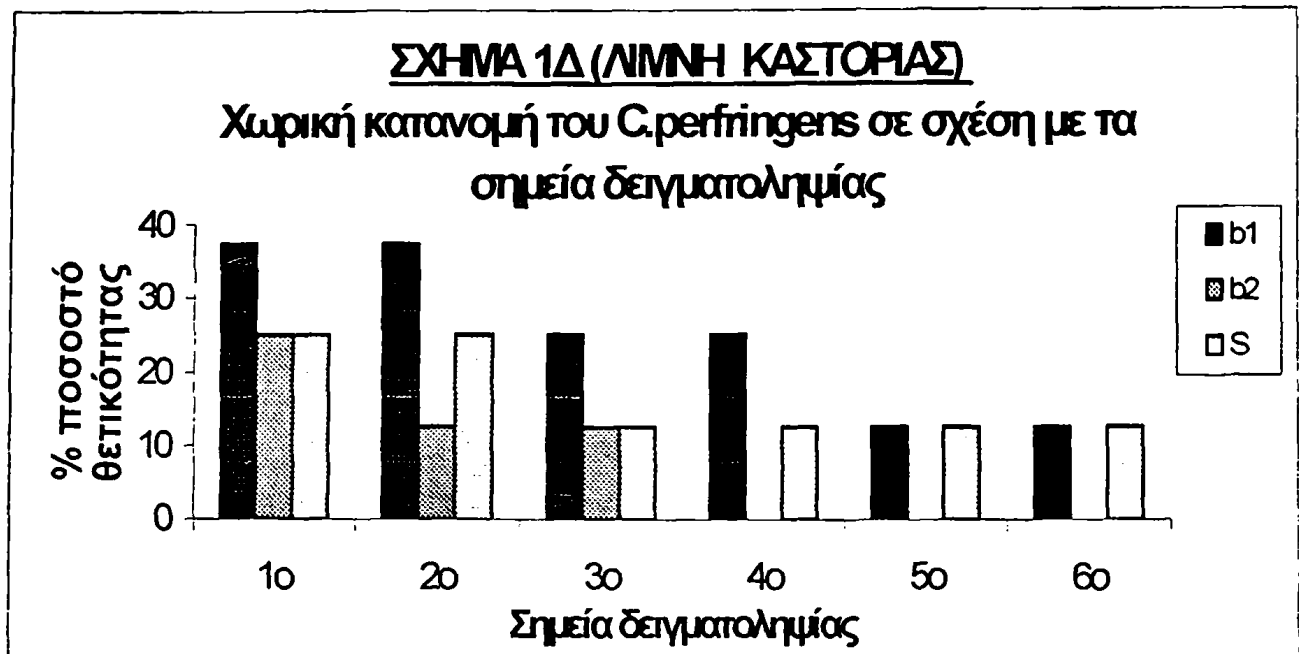




(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}

(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}

Στο σχήμα 1Δ που προκύπτει με βάση τον πίνακα 6 φαίνεται η χωρική κατανομή του εν λόγω βακτηρίου στην λίμνη της Καστοριάς, με τις διάφορες επιμέρους μορφές που μπορεί να έχει το βακτήριο, ανεξάρτητα από την χρονική στιγμή. Το γράφημα αυτό δύναται να περιγράψει ποιο σημείο είναι περισσότερο επιμολυσμένο υποδεικνύοντας ενδεχομένως τυχόν σημειακές πηγές μόλυνσης αν και δευτερευόντως και άλλοι παράγοντες παίζουν ρόλο στην εμφάνιση του βακτηρίου. Τα σημεία 1,2,3,4,5,6 φαίνονται στον χάρτη 1. Παραστήθηκαν δε με τα σύμβολα 1,2,3,4,5,6 μετά την χωρική ανάλυση ξεκινώντας από το περισσότερο επιμολυσμένο σημείο και καταλήγοντας στο λιγότερο επιμολυσμένο σημείο.



(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
---	---	---

Πρέπει να σημειωθεί ότι τα περισσότερο επιμολυσμένα σημεία 1,2,3 αντιστοιχούν σε περισσότερο ευτροφικά-ανοξικά σημεία κατά μήκος του παραλιμνίου, όπου εκβάλλουν αγωγοί ομβρίων υδάτων. Εξάλλου κατά τους θερινούς-φθινοπωρινούς μήνες παρατηρείται βλάστηση των σπορίων του βακτηρίου. Έτσι το θέρος, οι σημειακές πηγές μόλυνσης και τα ανοξικά περιβάλλοντα φαίνεται να υποδηλώνουν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του βακτηρίου.

6.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΛΙΜΝΗΣ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

41

Χημική Ανάλυση



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ
ΙΤΥΤΕ

ΠΡΟΤΥΠΟ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ

ΙΤΥΤΕ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ

ΙΤΥΤΕ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ

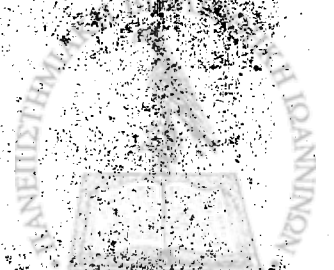
ΙΤΥΤΕ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ

ΙΤΥΤΕ



ΠΙΝΑΚΑΣ 7
Ιωάννινα 1^η αραίωση. Βλαστικές μορφές

<u>Ημερομηνία δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο 1^ο</u>	<u>Σημείο 2^ο</u>	<u>Σημείο 3^ο</u>	<u>Σημείο 4^ο</u>	<u>Σημείο 5^ο</u>	<u>Σημείο 6^ο</u>	<u>Θετικότητα (%ποσοστό θετικότητας)</u>
<u>29-11-1999</u>	+	-	-	-	-	+	2/6 (33,33%)
<u>13-12-1999</u>	-	+	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>17-01-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>20-02-2002</u>	+	-	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>18-03-2002</u>	-	-	+	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>02-04-2000</u>	-	-	-	+	-	-	1/6 (16,67%)
<u>14-05-2000</u>	-	-	-	-	+	-	1/6 (16,67%)
<u>15-06-2002</u>	+	+	-	+	-	-	3/6 (50%)
<u>01-07-2000</u>	+	-	+	-	+	-	3/6 (50%)
<u>20-07-2000</u>	+	+	+	+	-	-	4/6 (66,67%)
<u>20-09-2000</u>	+	+	+	+	-	-	4/6 (66,67%)
<u>10-10-2000</u>	+	+	+	+	-	-	4/6 (66,67%)
<u>15-04-2002</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>20-05-2002</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>22-06-2002</u>	+	+	-	-	-	-	2/6 (33,33%)
<u>Θετικότητα</u>	8/15	6/15	5/15	5/15	2/15	1/15	ΣΥΝΟΛΟ 27/90
<u>(%ποσοστό θετικότητας)</u>	(53,33%)	(40%)	(33,3%)	(33,3%)	(13,3%)	(6,67%)	(30%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



ΠΙΝΑΚΑΣ 8
Ιωάννινα 2^η αραίωση. Βλαστικές μορφές

<u>Ημερομηνία</u> <u>δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο</u> <u>1^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>2^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>3^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>4^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>5^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>6^ο</u>	<u>Θετικότητα</u> (%ποσοστό θετικότητας)
<u>29-11-1999</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>13-12-1999</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>17-01-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>20-02-2002</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>18-03-2002</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>02-04-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>14-05-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>15-06-2002</u>	+	-	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>01-07-2000</u>	-	-	-	-	+	-	1/6 (16,67%)
<u>20-07-2000</u>	-	-	-	+	-	-	1/6 (16,67%)
<u>20-09-2000</u>	+	-	+	-	-	-	2/6 (33,33%)
<u>10-10-2000</u>	-	+	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>15-04-2002</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>20-05-2002</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>22-06-2002</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>Θετικότητα</u>	2/15	1/15	1/15	1/15	1/15	0/15	ΣΥΝΟΛΟ 6/90
<u>(%ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>	(13,33%)	(6,67%)	(6,67%)	(6,67%)	(6,67%)	(0%)	(6,67%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



ΠΙΝΑΚΑΣ 9
Ιωάννινα 1^η αραίωση Σπορογόνες μορφές

<u>Ημερομηνία</u> <u>δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο</u> <u>1^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>2^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>3^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>4^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>5^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>6^ο</u>	<u>Θετικότητα</u> (%ποσοστό θετικότητας)
<u>29-11-1999</u>	+	-	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>13-12-1999</u>	+	-	-	+	-	-	2/6 (33,33%)
<u>17-01-2000</u>	-	+	-	-	+	-	2/6 (33,33%)
<u>20-02-2002</u>	-	+	-	-	-	+	2/6 (33,33%)
<u>18-03-2002</u>	-	-	+	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>02-04-2000</u>	-	+	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>14-05-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>15-06-2002</u>	-	-	+	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>01-07-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>20-07-2000</u>	+	-	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>20-09-2000</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>10-10-2000</u>	+	-	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>15-04-2002</u>	+	-	-	-	-	-	1/6 (16,67%)
<u>20-05-2002</u>	-	-	-	+	-	-	1/6 (16,67%)
<u>22-06-2002</u>	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>Θετικότητα</u>	5/15	3/15	2/15	2/15	1/15	1/15	ΣΥΝΟΛΟ 14/90
<u>(%ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>	(33,33%)	(20%)	(13,3%)	(13,3%)	(6,67%)	(6,67%)	(15,55%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



Με βάση τους αναλυτικούς πίνακες 7,8,9 προκύπτουν οι συνοπτικοί πίνακες 10,11,12. Στον πίνακα 10 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου ανεξαρτήτως χώρου και χρόνου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10

Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)
30	6,67	15,55

Στον πίνακα 11 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τα σημεία δειγματοληψίας (χωρική κατανομή).

ΠΙΝΑΚΑΣ 11

	<u>Σημείο</u> <u>1^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>2^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>3^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>4^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>5^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>6^ο</u>
Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	53,33	40	33,33	33,33	13,33	6,67
Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	13,33	6,67	6,67	6,67	6,67	0
Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)	33,33	20	13,33	13,33	6,67	6,67



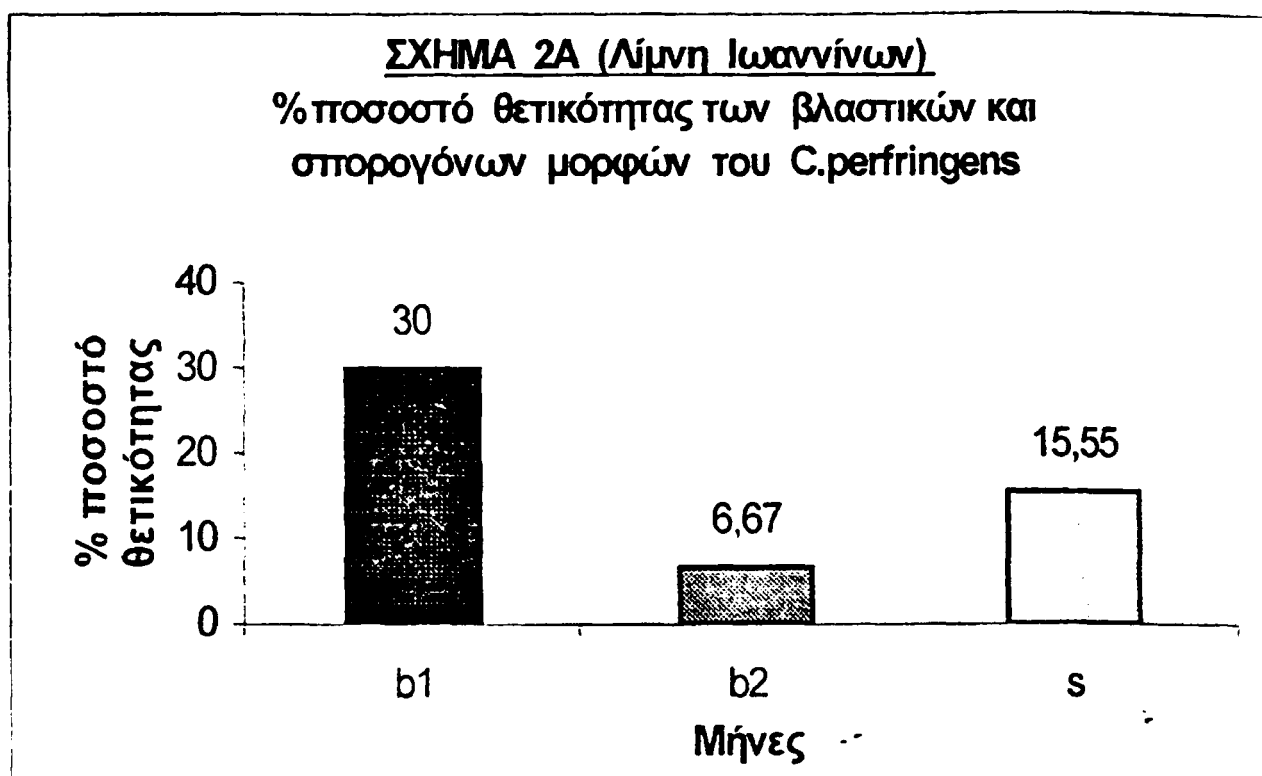
Στον πίνακα 12 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (χρονική κατανομή).

ΠΙΝΑΚΑΣ 12

<u>Μήνας</u> <u>δειγματοληψίας</u>	<u>Βλαστικές</u> <u>μορφές</u> <u>Αραίωση 10⁻¹</u> <u>(Μορφή b1)</u> <u>(%ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>	<u>Βλαστικές</u> <u>μορφές</u> <u>Αραίωση 10⁻²</u> <u>(Μορφή b2)</u> <u>(%ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>	<u>Σπορογόνες</u> <u>μορφές</u> <u>Αραίωση 10⁻¹</u> <u>(Μορφή S)</u> <u>(%ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>
ΙΑΝ	0	0	33,33
ΦΕΒ	16,67	0	33,33
ΜΑΡ	16,67	0	16,67
ΑΠΡ	16,67	0	16,67
ΑΠΡ	0	0	16,67
ΜΑΗΣ	16,67	0	0
ΜΑΗΣ	0	0	16,67
ΙΟΥΝ	50	0	16,67
ΙΟΥΝ	33,33	16,67	0
ΙΟΥΛ	50	16,67	0
ΙΟΥΛ	66,67	16,67	16,67
ΣΕΠ	66,67	33,33	0
ΟΚΤ	66,67	16,67	16,67
ΝΟΕ	33,33	0	16,67
ΔΕΚ	16,67	0	33,33

Το σχήμα 2Α που προκύπτει ως γραφική έκφραση του πίνακα 10 δείχνει το % ποσοστό θετικότητας των βλαστικών μορφών στην 1^η (b1) και 2^η (b2) αραίωση καθώς και των σπορογόνων μορφών στην 1^η (s) αραίωση του *C.perfringens* στην Λίμνη των Ιωαννίνων. Από το σχήμα αυτό φαίνεται ότι επικρατούν κυρίως οι βλαστικές μορφές με ποσοστό 30% στην 1^η αραίωση(στήλη b1) και 6,67% στην 2^η αραίωση (στήλη b2) ενώ οι σπορογόνες μορφές εμφανίζουν ποσοστό θετικότητας 15,55% (στήλη s).



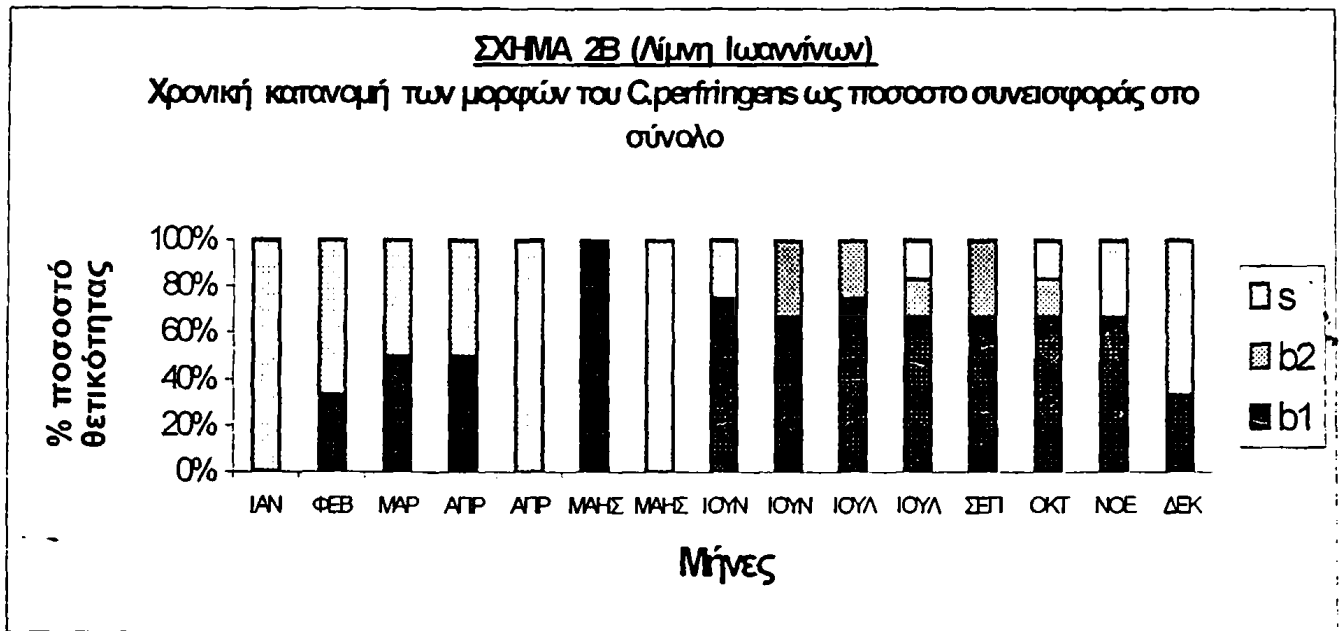


(Μορφή b1) =Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2)=Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S)=Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
--	---	---

Στο σχήμα 2B που προκύπτει με βάση τον πίνακα 12 φαίνεται η χρονική κατανομή των μορφών του *C. perfringens* σαν ποσοστό συνεισφοράς των επιμέρους μορφών (b1)(b2)(s), στην εκάστοτε χρονική στιγμή, στο σύνολο των μορφών εάν αυτό θεωρηθεί το 100%. Από εδώ φαίνεται ότι για την λίμνη των Ιωαννίνων κατά τους μήνες Ιανουάριο (ΙΑΝ), Φεβρουάριο(ΦΕΒ), Μάρτιο (ΜΑΡ), Απρίλη(ΑΠΡ) και Δεκέμβρη οι σπορογόνες μορφές έχουν μεγαλύτερο ποσοστό συνεισφοράς σ' ότι αφορά την εμφάνιση του βακτηρίου με την μορφή αυτή. Κατά τον μήνα Μάη τόσο οι σπορογόνες(s) όσο και οι βλαστικές μορφές (b1) φαίνονται να παρουσιάζουν παραπλήσια



ποσοστά συνεισφοράς. Τέλος κατά τους μήνες Ιούνιο, Ιούλιο Σεπτέμβρη, Οκτώβρη και Νοέμβρη φαίνεται ότι το ποσοστό συνεισφοράς των βλαστικών μορφών είναι σαφώς μεγαλύτερο.



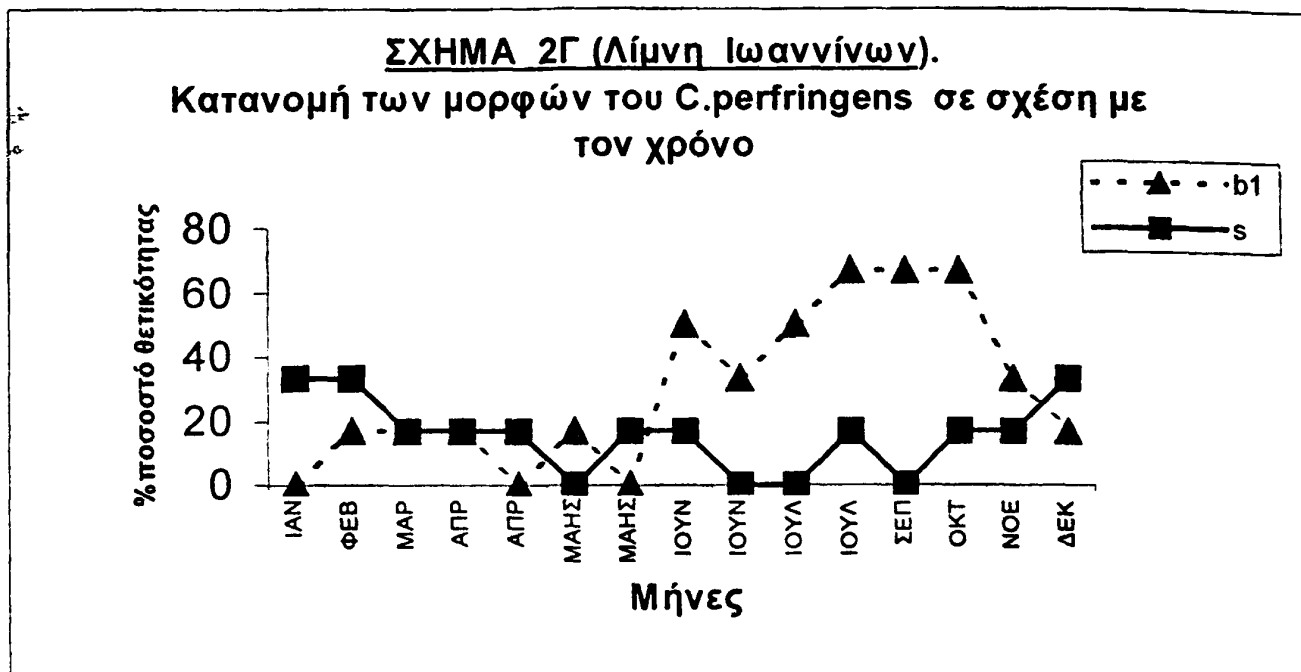
(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραιώση 10^{-1}

(Μορφή b2) = Βλαστικές μορφές Αραιώση 10^{-2}

(Μορφή s) = Σπορογόνες μορφές Αραιώση 10^{-1}

Τα παραπάνω μπορούν να φανούν ακόμα πιο καθαρά εάν παρασταθούν σχηματικά ως η τάση εμφάνισης των μορφών του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (Σχήμα 2Γ). Έτσι μελετώντας την γραμμή για τις σπορογόνες μορφές (s) παρατηρείται ότι υπάρχει η τάση για συχνότερη εμφάνιση κατά τους χειμερινούς και ανοιξιάτικους μήνες ενώ οι βλαστικές μορφές (b1) μορφές φαίνεται να εμφανίζονται συχνότερα κατά τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες. Αυτό φαίνεται να συμφωνεί αρκετά με την περίπτωση της Λίμνης της Καστοριάς.





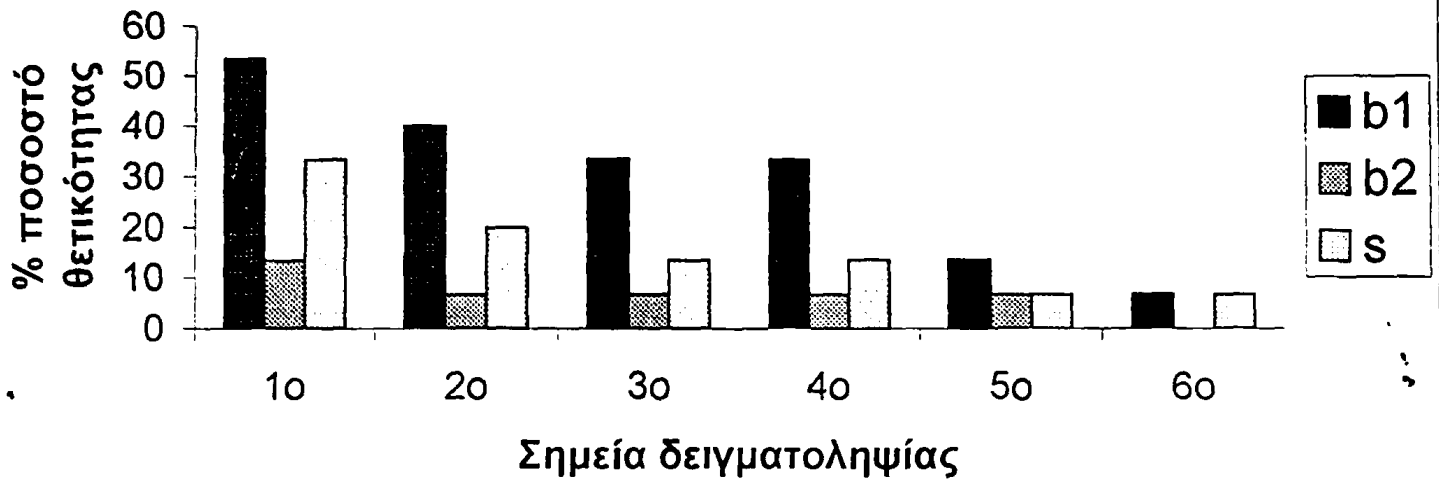
(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}

(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}

Στο σχήμα 2Δ που προκύπτει με βάση τον πίνακα 12 φαίνεται η χωρική κατανομή του εν λόγω βακτηρίου στην λίμνη των Ιωαννίνων, με τις διάφορες επιμέρους μορφές που μπορεί να έχει το βακτήριο, ανεξάρτητα από την χρονική στιγμή. Το γράφημα αυτό δύναται να περιγράψει ποιο σημείο είναι περισσότερο επιμολυσμένο υποδεικνύοντας ενδεχομένως τυχόν σημειακές πηγές μόλυνσης αν και δευτερευόντως και άλλοι παράγοντες παίζουν ρόλο στην εμφάνιση του βακτηρίου. Τα σημεία 1,2,3,4,5,6 φαίνονται στον χάρτη 2. Παραστήθηκαν δε με τα σύμβολα 1,2,3,4,5,6 μετά την χωρική ανάλυση ξεκινώντας από το περισσότερο επιμολυσμένο σημείο και καταλήγοντας στο λιγότερο επιμολυσμένο σημείο.

Σχήμα 2Δ (Λίμνη Ιωαννίνων).

Χωρική κατανομή του *C.perfringens* σε σχέση με το σημείο δειγματοληψίας



(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}

(Μορφή b2) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}

(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}

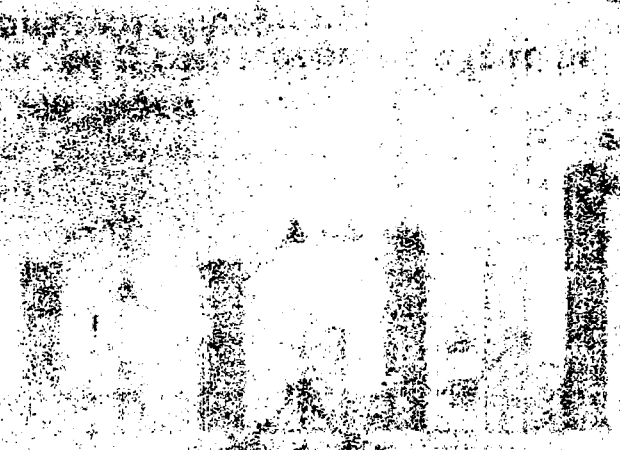
Τα σημεία 1,2,3,4 αντιστοιχούν σε σημεία όπου εκβάλλουν αγωγοί όμβριων υδάτων και αποτελούν σημειακές πηγές κοπρανώδους μόλυνσης. Αντιστοιχούν δε σε σημεία κατά μήκος του παραλιμνίου ξεκινώντας από τις πιο επιβαρυνμένες περιοχές Μαβίλη(σημείο1), Λιμνοπούλα (σημείο2), σφαγεία(σημείο3) και καταλήγωντας στην λιγότερο επιβαρυνμένη περιοχή Κλίματα(σημείο6). Εξάλλου κατά τους θερινούς-φθινοπωρινούς μήνες παρατηρείται βλάστηση των σπορίων του βακτηρίου. Έτσι το θέρος, οι σημειακές πηγές μόλυνσης και τα ανοξικά περιβάλλοντα φαίνεται να υποδηλώνουν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του βακτηρίου.

6.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΤΑΜΟΥ ΑΩΟΥ

4

0.5

0.5
0.4
0.3
0.2
0.1



The remainder of the page is heavily obscured by noise and grain, making the text illegible. Faint horizontal lines suggest a table or list structure.

Αώς 1^η αραίωση. Βλαστικές μορφές

ΠΙΝΑΚΑΣ 13

<u>Ημερομηνία δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο 1^ο</u>	<u>Σημείο 2^ο</u>	<u>Σημείο 3^ο</u>	<u>Θετικότητα (%ποσοστό θετικότητας)</u>
25-02-2002	-	-	-	0/3 (0%)
26-03-2002	-	+	-	1/3 (33,33%)
15-04-2002	-	+	-	1/3 (33,33%)
20-05-2002	-	-	-	0/3 (0%)
22-06-2002	-	+	-	1/3 (33,33%)
<u>Θετικότητα</u>	0/5	3/5	0/5	ΣΥΝΟΛΟ 3/15
<u>(%ποσοστό θετικότητας)</u>	(0%)	(60%)	(0%)	(20%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



Αώς 2^η αραίωση. Βλαστικές μορφές

ΠΙΝΑΚΑΣ 14

<u>Ημερομηνία δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο 1^ο</u>	<u>Σημείο 2^ο</u>	<u>Σημείο 3^ο</u>	<u>Θετικότητα</u> <u>(%Ποσοστό θετικότητας)</u>
25-02-2002	-	-	-	0/3 (0%)
26-03-2002	-	-	-	0/3 (0%)
15-04-2002	-	-	-	0/3 (0%)
20-05-2002	-	-	-	0/3 (0%)
22-06-2002	-	-	-	0/3 (0%)
<u>Θετικότητα</u>	0/5	0/5	0/5	ΣΥΝΟΛΟ 0/15
<u>(%Ποσοστό θετικότητας)</u>	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



Αώος 1^η αραιώση σπορογόνες μορφές

ΠΙΝΑΚΑΣ 15

Ημερομηνία δειγματοληψίας	Σημείο 1 ^ο	Σημείο 2 ^ο	Σημείο 3 ^ο	Θετικότητα (%ποσοστό θετικότητας)
25-02-2002	+	+	-	2/3 (66,67%)
26-03-2002	-	+	-	1/3 (33,33%)
15-04-2002	-	-	-	0/3 (0%)
20-05-2002	-	+	-	2/3 (66,67%)
22-06-2002	-	+	-	0/3 (0%)
<u>Θετικότητα</u>	1/5	4/5	0/5	ΣΥΝΟΛΟ 5/15
<u>(%ποσοστό θετικότητας)</u>	(20%)	(80%)	(0%)	(33,33%)

Με βάση τους αναλυτικούς πίνακες 13,14,15 προκύπτουν οι συνοπτικοί πίνακες 16,17,18. Στον πίνακα 16 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου ανεξαρτήτως χώρου και χρόνου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 16

Βλαστικές μορφές Αραιώση 10 ⁻¹ (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	Βλαστικές μορφές Αραιώση 10 ⁻² (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	Σπορογόνες μορφές Αραιώση 10 ⁻¹ (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)
20	0	33,33

Στον πίνακα 17 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (χρονική κατανομή).



ΠΙΝΑΚΑΣ 17

Μήνας δειγματοληψίας	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)
ΦΕΒ	0	0	66,67
ΜΑΡ	33,3	0	33,3
ΑΠΡ	33,3	0	0
ΜΑΗ	0	0	66,67
ΙΟΥΝ	33,3	0	0

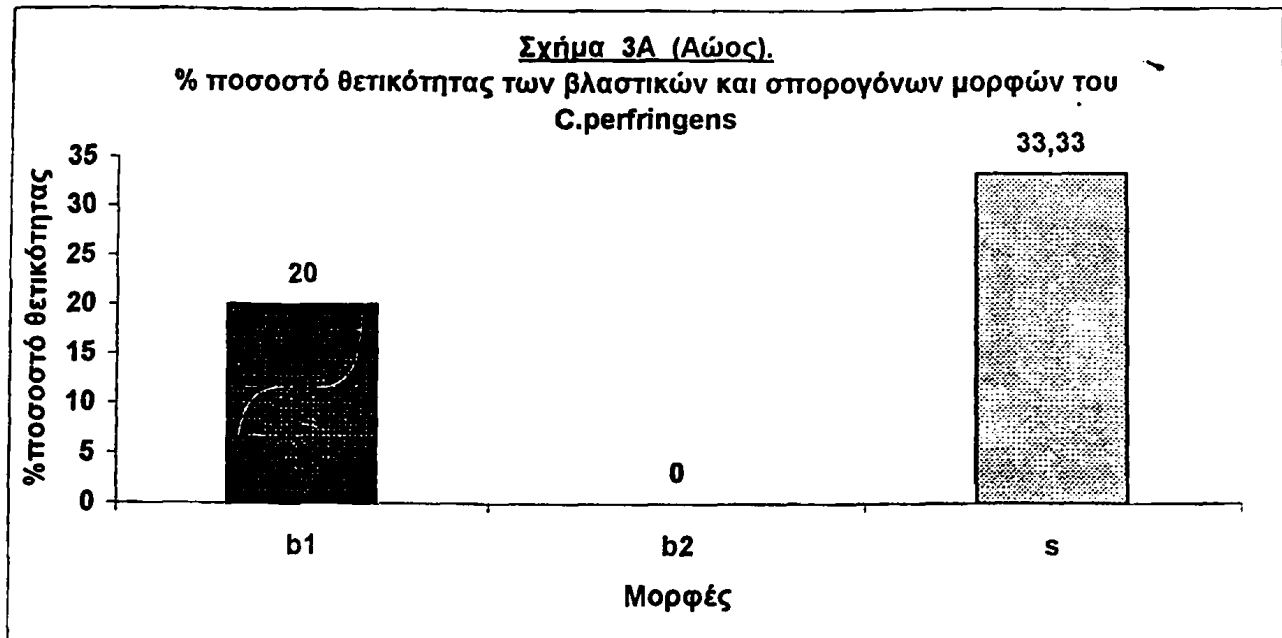
Στον πίνακα 18 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τα σημεία δειγματοληψίας (χωρική κατανομή).

ΠΙΝΑΚΑΣ 18

	Σημείο 1^ο	Σημείο 2^ο	Σημείο 3^ο
Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	0	60	0
Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	0	0	0
Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)	20	80	0

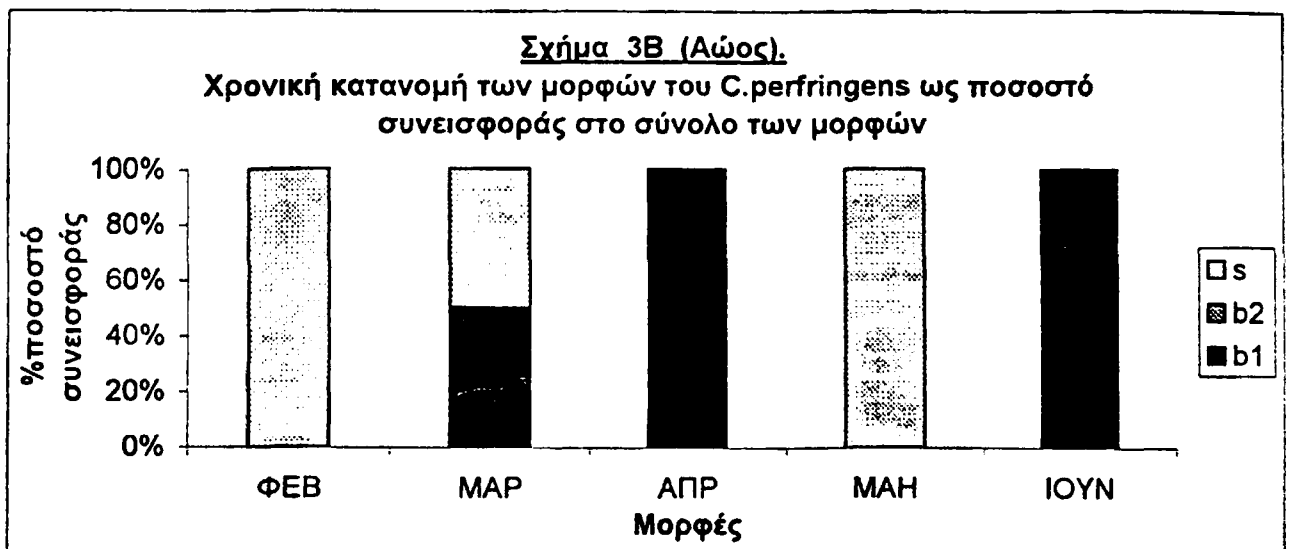
Το σχήμα 3Α δείχνει το % ποσοστό θετικότητας των βλαστικών μορφών στην 1^η (b1) και 2^η (b2) αραίωση καθώς και των σπορογόνων μορφών στην 1^η (s) αραίωση του *C.perfringens* στον ποταμό του Αώου. Από το σχήμα αυτό φαίνεται ότι επικρατούν κυρίως οι σπορογόνες μορφές (στήλη s) με ποσοστό 33,33% ενώ οι βλαστικές μορφές στην 1^η αραίωση(στήλη b1) εμφανίζουν ποσοστό θετικότητας 20% και 0% στην 2^η αραίωση (στήλη b2).





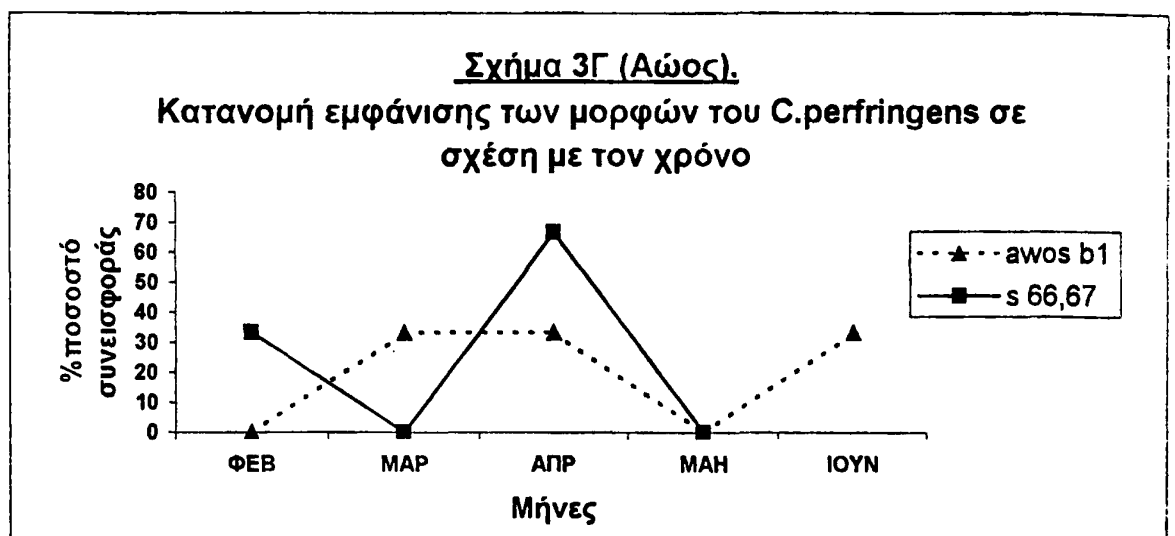
(Μορφή b1) =Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2)=Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S)=Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
--	---	---

Στο σχήμα 3B φαίνεται η χρονική κατανομή των μορφών του *C. perfringens* σαν ποσοστό συνεισφοράς των επιμέρους μορφών (b1)(b2)(s), στην εκάστοτε χρονική στιγμή, στο σύνολο των μορφών εάν αυτό θεωρηθεί το 100%. Από εδώ φαίνεται ότι για τον ποταμό του Αώου.

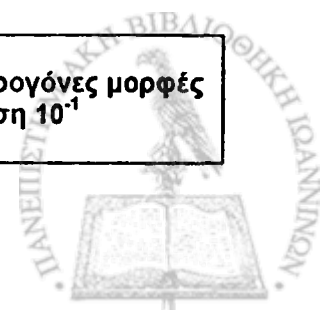


(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
---	---	---

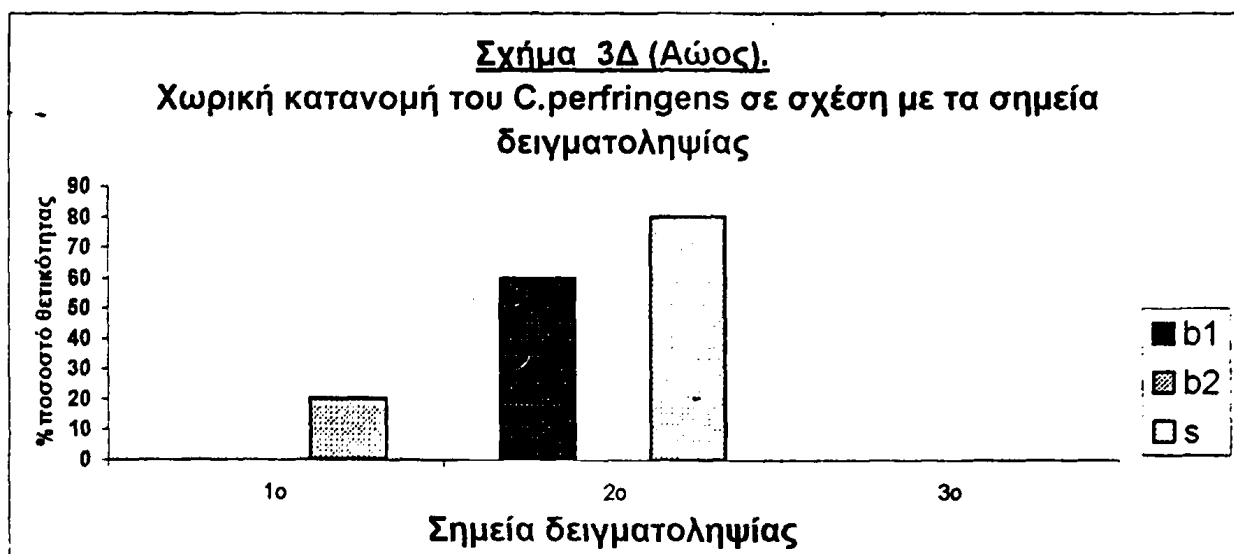
Τα παραπάνω μπορούν να φανούν ακόμα πιο καθαρά εάν παρασταθούν σχηματικά ως η τάση εμφάνισης των μορφών του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (Σχήμα 3Γ).



(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
---	---



Στο σχήμα 3Δ φαίνεται η χωρική κατανομή του εν λόγω βακτηρίου στον ποταμό του Αώου, με τις διάφορες επιμέρους μορφές που μπορεί να έχει το βακτήριο, ανεξάρτητα από την χρονική στιγμή. Το γράφημα αυτό δύναται να περιγράψει ποιο σημείο είναι περισσότερο επιμολυσμένο υποδεικνύοντας ενδεχομένως τυχόν σημειακές πηγές μόλυνσης αν και δευτερευόντως και άλλοι παράγοντες παίζουν ρόλο στην εμφάνιση του βακτηρίου. Τα σημεία 1,2,3 φαίνονται στον χάρτη 3.



(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}

(Μορφή b2) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}

(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}

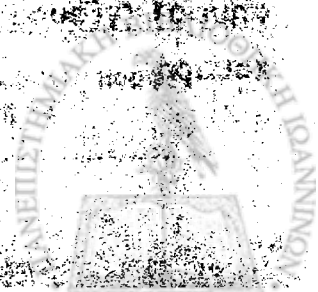
Ο ποταμός Αώος εμφανίζεται ιδιαίτερα καθαρός σ'ότι αφορά την κοπρανώδη μόλυνση, αφού δεν εμφανίζεται καθόλου η στήλη b2 που υποδηλώνει υψηλό μικροβιακό φορτίο. Το σημείο 2 που αντιστοιχεί στην γέφυρα Κόνιτσας φαίνεται να είναι περισσότερο επιβαρυνόμενο, ενώ τα σημεία 1 (γέφυρα Αγίας Παρασκευής) και 3 (μπουραζάνι) είναι ιδιαίτερα καθαρά.



6.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΤΑΜΟΥ ΒΟΙΔΟΜΑΤΗ

4

[The main body of the page contains extremely faint and illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the document. The text is mostly illegible due to low contrast and noise.]



Βοϊδομάτης 1^η αραίωση. Βλαστικές μορφές

ΠΙΝΑΚΑΣ 19

<u>Ημερομηνία δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο 1^ο</u>	<u>Σημείο 2^ο</u>	<u>Σημείο 3^ο</u>	<u>Θετικότητα (%ποσοστό θετικότητας)</u>
25-02-2002	-	-	-	0/3 (0%)
26-03-2002	-	-	-	0/3 (0%)
15-04-2002	-	-	-	0/3 (0%)
20-05-2002	-	-	-	0/3 (0%)
22-06-2002	-	-	-	0/3 (0%)
<u>Θετικότητα</u>	0/5	0/5	0/5	ΣΥΝΟΛΟ 0/15
<u>(%ποσοστό θετικότητας)</u>	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



Βοιδομάτης 2^η αραίωση. Βλαστικές μορφές

ΠΙΝΑΚΑΣ 20

<u>Ημερομηνία δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο 1^ο</u>	<u>Σημείο 2^ο</u>	<u>Σημείο 3^ο</u>	<u>Θετικότητα (%ποσοστό θετικότητας)</u>
25-02-2002	-	-	-	0/3 (0%)
26-03-2002	-	-	-	0/3 (0%)
15-04-2002	-	-	-	0/3 (0%)
20-05-2002	-	-	-	0/3 (0%)
22-06-2002	-	-	-	0/3 (0%)
<u>Θετικότητα</u>	0/5	0/5	0/5	ΣΥΝΟΛΟ 0/15
<u>(%ποσοστό θετικότητας)</u>	(0%)	(0%)	(0%)	(0%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



Βοιδομάτης 1^η αραιώση σπορογόνες μορφές
ΠΙΝΑΚΑΣ 21

<u>Ημερομηνία δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο 1^ο</u>	<u>Σημείο 2^ο</u>	<u>Σημείο 3^ο</u>	<u>Θετικότητα</u> <u>(%ποσοστό θετικότητας)</u>
25-02-2002	-	+	-	1/3 (33,33%)
26-03-2002	-	-	-	0/3 (0%)
15-04-2002	-	-	-	0/3 (0%)
20-05-2002	-	-	-	0/3 (0%)
22-06-2002	-	-	-	0/3 (0%)
<u>Θετικότητα</u>	0/5	1/5	0/5	ΣΥΝΟΛΟ 1/15
<u>(%ποσοστό θετικότητας)</u>	(0%)	(20%)	(0%)	(6,67%)

Με βάση τους αναλυτικούς πίνακες 19,20,21 προκύπτουν οι συνοπτικοί πίνακες 22,23,24. Στον πίνακα 22 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου ανεξαρτήτως χώρου και χρόνου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 22

Βλαστικές μορφές Αραιώση 10⁻¹ (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	Βλαστικές μορφές Αραιώση 10⁻² (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	Σπορογόνες μορφές Αραιώση 10⁻¹ (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)
0	0	6,67

Στον πίνακα 23 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (χρονική κατανομή).



ΠΙΝΑΚΑΣ 23

Μήνας δειγματοληψίας	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)
ΦΕΒ	0	0	33,3
ΜΑΡ	0	0	0
ΑΠΡ	0	0	0
ΜΑΗ	0	0	0
ΙΟΥΝ	0	0	0

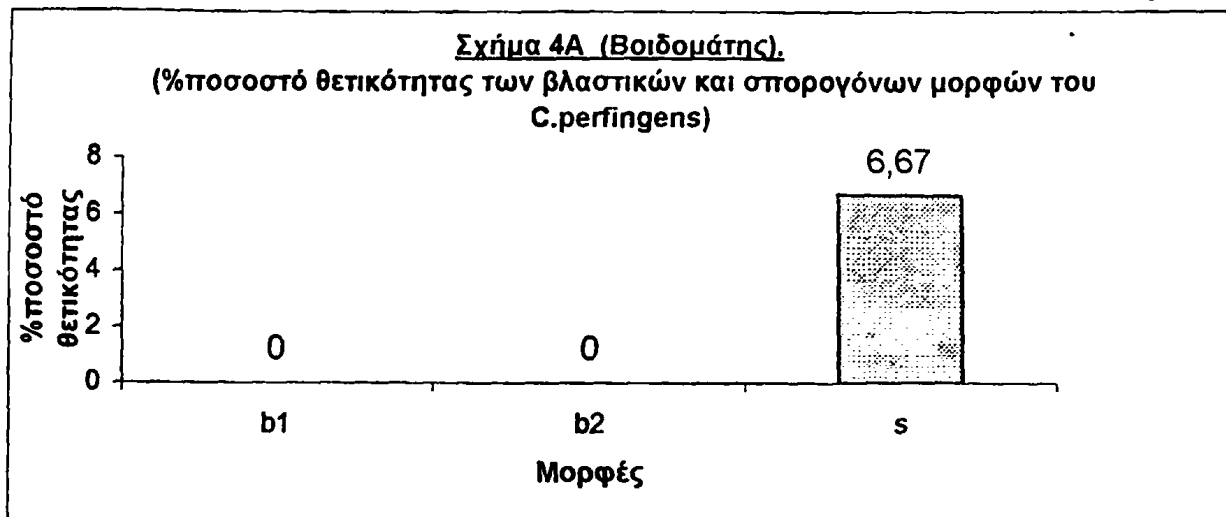
Στον πίνακα 24 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τα σημεία δειγματοληψίας (χωρική κατανομή).

ΠΙΝΑΚΑΣ 24

	Σημείο 1^ο	Σημείο 2^ο	Σημείο 3^ο
Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	0	0	0
Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	0	0	0
Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)	0	33,33	0

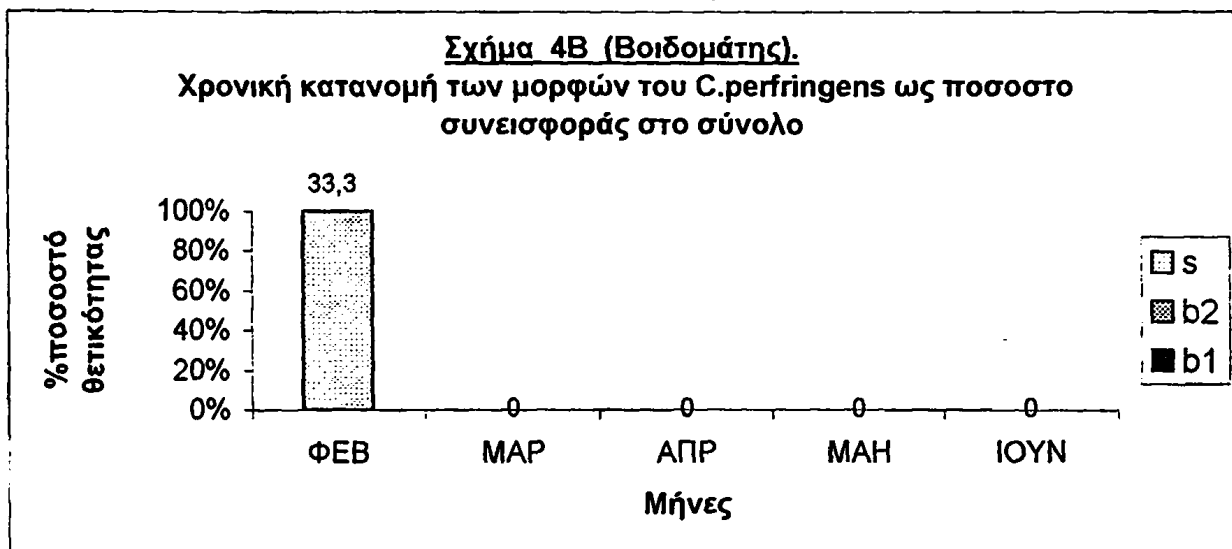
Το σχήμα 4A δείχνει το % ποσοστό θετικότητας των βλαστικών μορφών στην 1^η (b1) και 2^η (b2) αραίωση καθώς και των σπορογόνων μορφών στην 1^η (s) αραίωση του *C.perfringens* στον ποταμό του Βοϊδομάτη. Από το σχήμα αυτό φαίνεται ότι επικρατούν οι σπορογόνες μορφές (στήλη s) με ποσοστό 6,67% ενώ οι βλαστικές μορφές στην 1^η αραίωση(στήλη b1) εμφανίζουν ποσοστό θετικότητας 0% και 0% στην 2^η αραίωση (στήλη b2), δηλαδή δεν εμφανίζεται ούτε ένα θετικό δείγμα.





(Μορφή b1) =Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2)=Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S)=Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
--	---	---

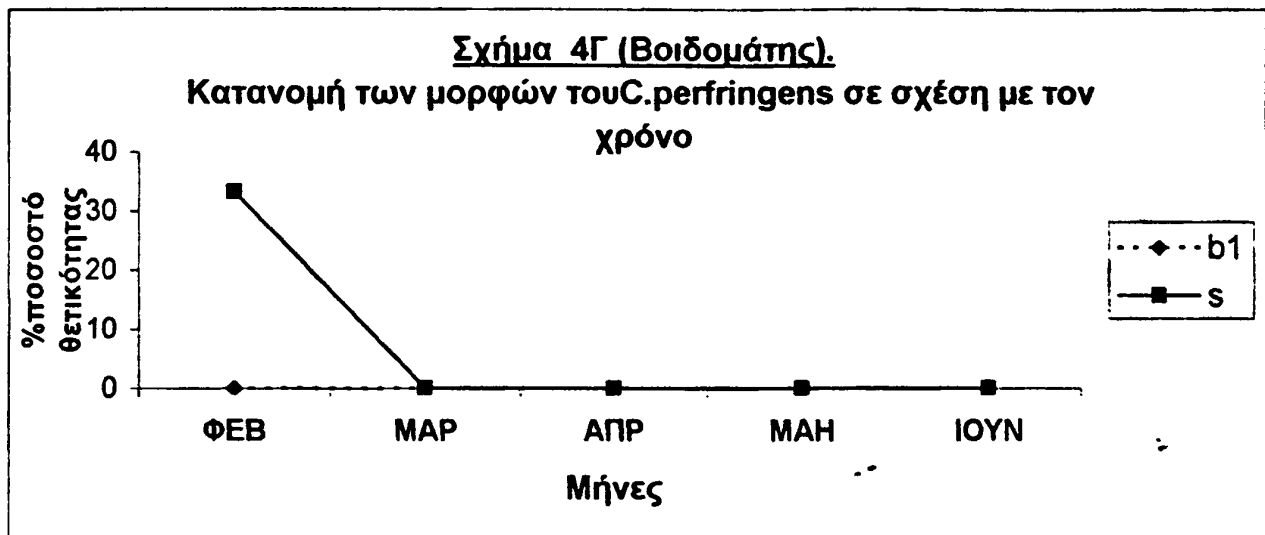
Στο σχήμα 4B φαίνεται η χρονική κατανομή των μορφών του *C. perfringens* σαν ποσοστό συνεισφοράς των επιμέρους μορφών (b1)(b2)(s), στην εκάστοτε χρονική στιγμή, στο σύνολο των μορφών εάν αυτό θεωρηθεί το 100%.



(Μορφή b1) =Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2)=Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S)=Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
--	---	---



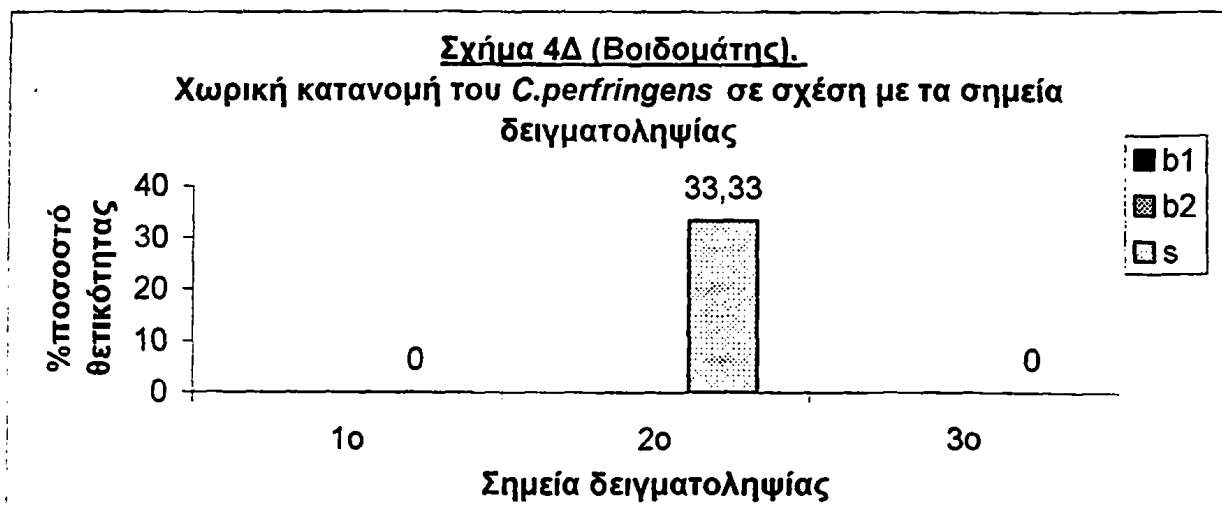
Τα παραπάνω μπορούν να φανούν ακόμα πιο καθαρά εάν παρασταθούν σχηματικά ως η τάση εμφάνισης των μορφών του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (Σχήμα 4Γ).



(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
---	---	---

Στο σχήμα 3Δ φαίνεται η χωρική κατανομή του εν λόγω βακτηρίου στον ποταμό του Βοϊδομάτη, με τις διάφορες επιμέρους μορφές που μπορεί να έχει το βακτήριο, ανεξάρτητα από την χρονική στιγμή. Το γράφημα αυτό δύναται να περιγράψει ποιο σημείο είναι περισσότερο επιμολυσμένο υποδεικνύοντας ενδεχομένως τυχόν σημειακές πηγές μόλυνσης αν και δευτερευόντως και άλλοι παράγοντες παίζουν ρόλο στην εμφάνιση του βακτηρίου. Τα σημεία 1,2,3 φαίνονται στον χάρτη 3.





(Μορφή b1) =Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2)=Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S)=Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
--	---	---

Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι ο ποταμός Βοϊδομάτης είναι ο πιο καθαρός σ'ότι αφορά την κοπρανώδη μόλυνση από τα συστήματα που εξετάστηκαν.Εξάλλου η θερμοκρασιακή ομοιομορφία του ποταμού δεν υποδεικνύει κάποια εποχή που ευνοεί την βλάστηση των σπορίων.Οι σπορογόνες μορφές που εμφανίστηκαν στο σημείο 2(μετά από ένα ιχθυοτροφείο) πιθανότατα να υποδηλώνουν περιστασιακή κοπρανώδη μόλυνση.Ενώ στα σημεία 1,3 (γέφυρα Κλειδωνιάς) απουσιάζει παντελώς το *C.perfringens*.



Καλαμάς 1^η αραίωση. Βλαστικές μορφές
ΠΙΝΑΚΑΣ 25

Ημερομηνία συμμετοληψίας	Σημείο 1 ^ο	Σημείο 2 ^ο	Σημείο 3 ^ο	Σημείο 4 ^ο	Σημείο 5 ^ο	Σημείο 6 ^ο	Σημείο 7 ^ο	Σημείο 8 ^ο	Θετικότητα (%ποσοστό θετικότητας)
9-01-2000	-	+	-	+	+	-			3/6 (50%)
1-03-2000	-	+	-	-	+	-			2/6 (33,33%)
0-05-2000	-	+	-	+	+	-			3/6 (50%)
0-06-2000	-	+	-	+	+	+			4/6 (66,67%)
0-07-2000	-	+	-	+	+	+			4/6 (66,67%)
6-02-2002							-	+	1/2 (50%)
6-03-2002							-	+	1/2 (50%)
6-04-2002							-	+	1/2 (50%)
0-05-2002							-	-	0/2 (0%)
2-06-2002							-	-	0/2 (0%)
Θετικότητα	0/5	5/5	0/5	4/5	5/5	2/5	0/5	3/5	ΣΥΝΟΛΟ 19/40
%ποσοστό θετικότητας)	(0%)	(100%)	(0%)	(80%)	(100%)	(40%)	(0%)	(60%)	(47,5%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



Καλαμάς 2^η αραίωση. Βλαστικές μορφές

ΠΙΝΑΚΑΣ 26

Ημερομηνία ειγματοληψίας	Σημείο 1 ^ο	Σημείο 2 ^ο	Σημείο 3 ^ο	Σημείο 4 ^ο	Σημείο 5 ^ο	Σημείο 6 ^ο	Σημείο 7 ^ο	Σημείο 8 ^ο	Θετικότητα (%ποσοστό θετικότητας)
29-01-2000	-	-	-	-	+	-			1/6 (16,67%)
01-03-2000	-	+	-	-	-	-			1/6 (16,67%)
00-05-2000	-	+	-	-	+	-			2/6 (33,33%)
00-06-2000	-	+	-	-	+	-			2/6 (33,33%)
00-07-2000	-	-	-	-	+	-			1/6 (16,67%)
25-02-2002							-	-	0/2 (0%)
26-03-2002							-	+	1/2 (50%)
15-04-2002							-	-	0/2 (0%)
20-05-2002							-	-	0/2 (0%)
22-06-2002							-	-	0/2 (0%)
Θετικότητα	0/5	3/5	0/5	0/5	4/5	0/5	0/5	1/5	ΣΥΝΟΛΟ 7/40
(%ποσοστό θετικότητας)	(0%)	(60%)	(0%)	(0%)	(80%)	(0%)	(0%)	(20%)	(17,5%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



Καλαμάς 1^η αραιώση σπορογόνες μορφές

ΠΙΝΑΚΑΣ 27

μερομηνία ματοληψίας	Σημείο 1 ^ο	Σημείο 2 ^ο	Σημείο 3 ^ο	Σημείο 4 ^ο	Σημείο 5 ^ο	Σημείο 6 ^ο	Σημείο 7 ^ο	Σημείο 8 ^ο	Θετικότητα (%ποσοστό θετικότητας)
9-01-2000	-	-	+	-	+	-			2/6 (33,33%)
11-03-2000	-	-	-	-	-	+			1/6 (16,67%)
10-05-2000	-	-	+	-	+	+			3/6 (50%)
10-06-2000	-	-	-	-	+	-			1/6 (16,67%)
10-07-2000	-	-	-	-	+	-			1/6 (16,67%)
15-02-2002							-	+	1/2 (50%)
16-03-2002							-	+	1/2 (50%)
16-04-2002							-	+	1/2 (50%)
10-05-2002							-	+	1/2 (50%)
12-06-2002							-	+	1/2 (50%)
Θετικότητα	0/5	0/5	2/5	0/5	4/5	2/5	0/5	5/5	ΣΥΝΟΛΟ 13/40
%ποσοστό θετικότητας	(0%)	(0%)	(40%)	(0%)	(80%)	(40%)	(0%)	(100%)	(32,5%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (F₂S) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



Με βάση τους αναλυτικούς πίνακες 25,26,27 προκύπτουν οι συνοπτικοί πίνακες 28,29,30. Στον πίνακα 28 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου ανεξαρτήτως χώρου και χρόνου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 28

Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)
47,5	17,5	32,5

Στον πίνακα 29 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (χρονική κατανομή).

ΠΙΝΑΚΑΣ 29

<u>Μήνας</u> <u>δειγματοληψίας</u>	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)
ΓΕΝ	50	16,67	33,3
ΦΕΒ	50	0	50
ΜΑΡ	50	50	50
ΜΑΡ	33,3	16,67	16,67
ΑΠΡ	50	0	50
ΜΑΗ	0	0	16,67
ΜΑΗ	50	33,3	50
ΙΟΥΝ	0	0	50
ΙΟΥΝ	66,67	33,33	16,67
ΙΟΥΛ	66,67	16,67	16,67

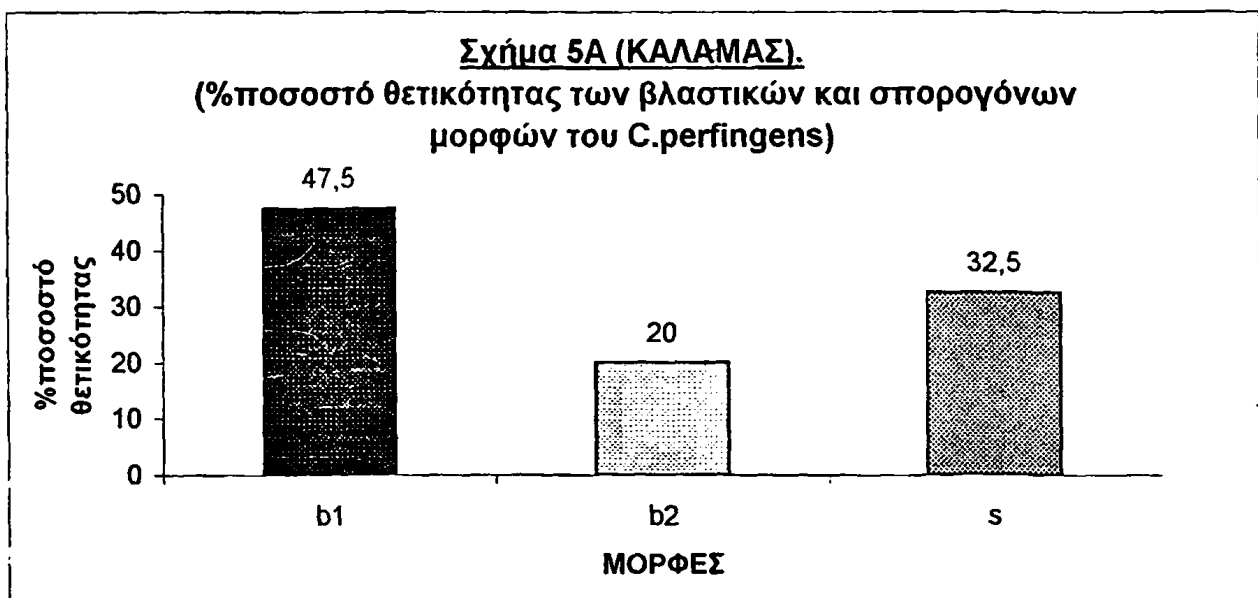
Στον πίνακα 24 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τα σημεία δειγματοληψίας (χωρική κατανομή).



ΠΙΝΑΚΑΣ 30

	<u>Σημείο</u> <u>1°</u>	<u>Σημείο</u> <u>2°</u>	<u>Σημείο</u> <u>3°</u>	<u>Σημείο</u> <u>4°</u>	<u>Σημείο</u> <u>5°</u>	<u>Σημείο</u> <u>6°</u>	<u>Σημείο</u> <u>7°</u>	<u>Σημείο</u> <u>8°</u>
Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	0	100	0	80	100	40	0	60
Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	0	60	0	0	80	0	0	20
Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)	0	0	40	0	80	40	0	100

Το σχήμα 5A δείχνει το % ποσοστό θετικότητας των βλαστικών μορφών στην 1^η (b1) και 2^η (b2) αραιώση καθώς και των σπορογόνων μορφών στην 1^η (s) αραιώση του *C.perfringens* στον ποταμό του Καλαμά.



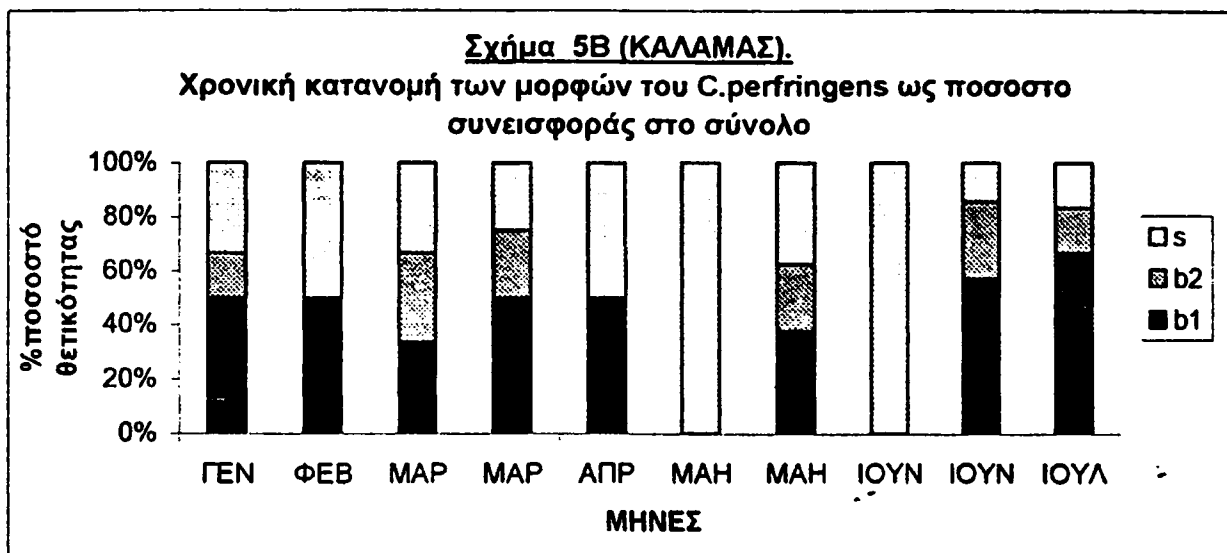
(Μορφή b1) =Βλαστικές
μορφές Αραίωση 10^{-1}

(Μορφή b2)=Βλαστικές μορφές
Αραίωση 10^{-2}

(Μορφή S)=Σπορογόνες
μορφές Αραίωση 10^{-1}



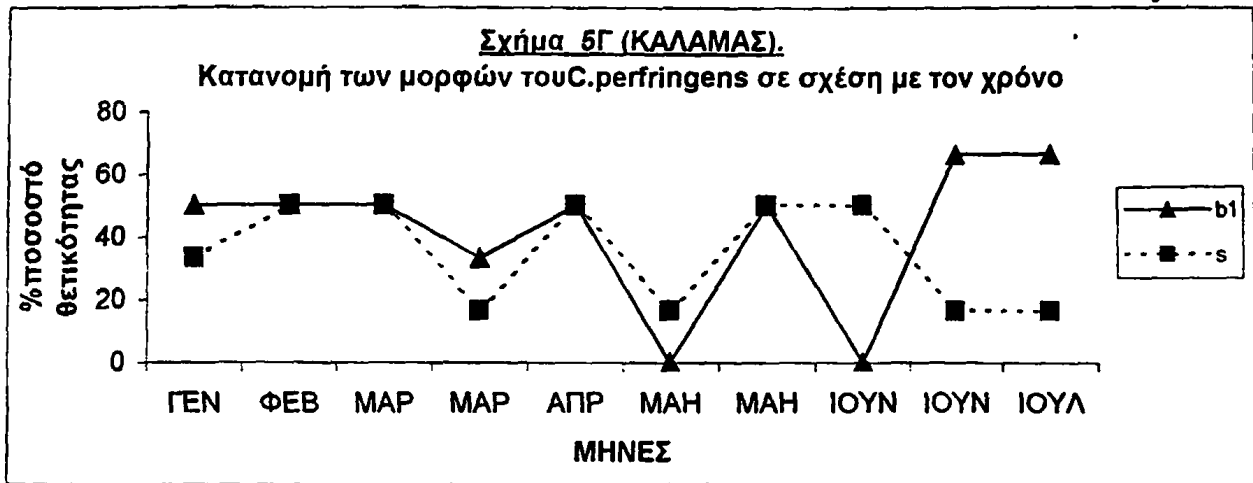
Στο σχήμα 5B φαίνεται η χρονική κατανομή των μορφών του *Clostridium perfringens* σαν ποσοστό συνεισφοράς των επιμέρους μορφών (b1)(b2)(s), στην εκάστοτε χρονική στιγμή, στο σύνολο των μορφών εάν αυτό θεωρηθεί το 100%.



(Μορφή b1) =Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2)=Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S)=Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
--	---	---

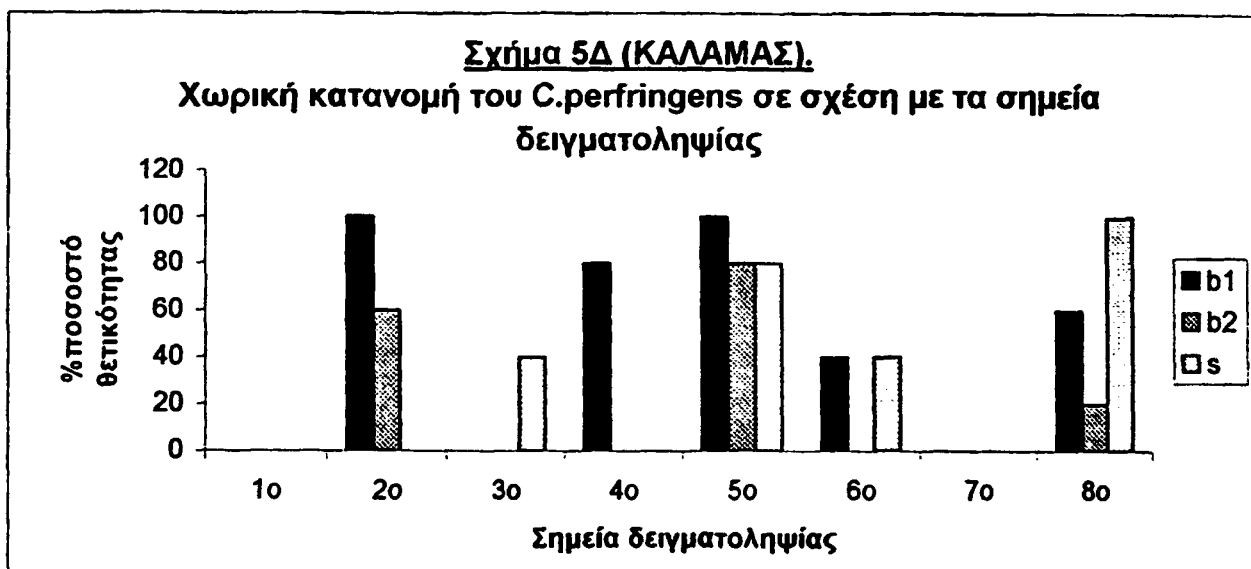
Τα παραπάνω μπορούν να φανούν ακόμα πιο καθαρά εάν παρασταθούν σχηματικά ως η τάση εμφάνισης των μορφών του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (Σχήμα 5Γ).





(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	((Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
---	--

Στο σχήμα 5Δ φαίνεται η χωρική κατανομή του εν λόγω βακτηρίου στον ποταμό του Καλαμά, με τις διάφορες επιμέρους μορφές που μπορεί να έχει το βακτήριο, ανεξάρτητα από την χρονική στιγμή. Το γράφημα αυτό δύναται να περιγράψει ποιο σημείο είναι περισσότερο επιμολυσμένο υποδεικνύοντας ενδεχομένως τυχόν σημειακές πηγές μόλυνσης αν και δευτερευόντως και άλλοι παράγοντες παίζουν ρόλο στην εμφάνιση του βακτηρίου. Τα σημεία 1,2,3,4,5,6 φαίνονται στον χάρτη 5.



(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραιώση 10^{-1}	(Μορφή b2) = Βλαστικές μορφές Αραιώση 10^{-2}	(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραιώση 10^{-1}
---	---	---

Ο ποταμός Καλαμάς φαίνεται να είναι ο περισσότερο επιβαρυσμένος σ'ότι αφορά την κοπρανώδη μόλυνση από τα υπόλοιπα ποτάμια συστήματα, πιθανότατα επειδή αποχύνονται τα λύματα του βιολογικού καθαρισμού της πόλης των Ιωαννίνων. Τα σημεία 2,5,8 είναι ιδιαίτερα ευτροφικά-ανοξικά γιαυτό και ευνοείται η ανάπτυξη του *C.perfringens*. Εξάλλου η θερμοκρασιακή ομοιομορφία του ποταμού δεν υποδεικνύει κάποια εποχή που ευνοεί την βλάστηση των σπορίων.

6.6.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΤΑΜΟΥ ΛΟΥΡΟΥ

[The main body of the page contains extremely faint and illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the paper. The text is scattered and does not form any recognizable paragraphs or tables.]



ΠΙΝΑΚΑΣ 31**Λούρος 1^η αραίωση. Βλαστικές μορφές**

Ημερομηνία δειγματοληψίας	Σημείο 1 ^ο Βουλιάστα	Σημείο 2 ^ο Μουσκιτίτσα	Σημείο 3 ^ο Πλατάνια	Σημείο 4 ^ο Κερασσίνας	Θετικότητα (%Ποσοστό θετικότητας)
10-2002	-	-	-	-	0/4 (0%)
11-2002	-	-	-	+	1/4 (25%)
12-2002	-	-	-	-	0/4 (0%)
01-2002	-	+	-	+	2/4 (50%)
02-2002	0/7	2/7	1/4	4/7	7/25 (28%)
03-2002	-	+	-	+	2/4 (50%)
04-2002	-	-	-	-	0/4 (0%)
05-2002	-	-	-	+	1/4 (25%)
06-2002	-	-	+	-	1/4 (25%)
Θετικότητα	0/15	4/15	2/12	8/15	ΣΥΝΟΛΟ 14/57
(%Ποσοστό θετικότητας)	(0%)	(26,67%)	(16,67%)	(53,33%)	(24,56%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



ΠΙΝΑΚΑΣ 32
Λούρος 2^η αραιώση. Βλαστικές μορφές

Ημερομηνία δειγματοληψίας	Σημείο 1 ^ο Βουλιάστα	Σημείο 2 ^ο Μουσκιτίσα	Σημείο 3 ^ο Πλατάνα	Σημείο 4 ^ο Κερασσώνας	<u>Θετικότητα</u> (%Ποσοστό Θετικότητας)
10-2002	-	-	-	-	0/4 (0%)
11-2002	-	-	-	-	0/4 (0%)
12-2002	-	-	-	+	1/4 (25%)
01-2002	-	-	-	-	0/4 (0%)
02-2002	0/7	0/7	0/4	2/7	2/25 (8%)
03-2002	-	-	-	+	1/4 (25%)
04-2002	-	-	-	-	0/4 (0%)
05-2002	-	-	-	-	0/4 (0%)
06-2002	-	-	-	-	0/4 (0%)
<u>Θετικότητα</u>	0/15	0/15	0/12	4/15	ΣΥΝΟΛΟ 4/57
<u>(%Ποσοστό Θετικότητας)</u>	(0%)	(0%)	(0%)	(26,67%)	(7,01%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



ΠΙΝΑΚΑΣ 33
Λούρος 1^η αραίωση Σπορογόνες μορφές

Ημερομηνία δειγματοληψίας	Σημείο 1 ^ο Βουλιόστα	Σημείο 2 ^ο Μουσκιτίτσα	Σημείο 3 ^ο Πλατάνια	Σημείο 4 ^ο Κερασσύνας	<u>Θετικότητα</u> <u>(%Ποσοστό θετικότητας)</u>
10-2002	-	-	-	+	1/4 (25%)
11-2002	-	-	+	+	2/4 (50%)
12-2002	+	+	-	+	3/4 (75%)
01-2002	+	+	-	-	2/4 (50%)
02-2002	1/7	3/7	1/4	5/7	10/25 (40%)
03-2002	-	+	-	+	2/4 (50%)
04-2002	-	-	-	-	0/4 (0%)
05-2002	-	-	-	+	1/4 (25%)
06-2002	-	-	-	-	0/4 (0%)
<u>Θετικότητα</u>	3/15	6/15	2/12	10/15	ΣΥΝΟΛΟ 21/57
<u>(%Ποσοστό θετικότητας)</u>	(20%)	(40%)	(16,67%)	(66,67%)	(36,84%)

Με βάση τους αναλυτικούς πίνακες 31,32,33 προκύπτουν οι συνοπτικοί πίνακες 34,35,36. Στον πίνακα 34 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου ανεξαρτήτως χώρου και χρόνου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 34

Βλαστικές μορφές Αραίωση 10⁻¹ (Μορφή b1) <u>(%Ποσοστό θετικότητας)</u>	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10⁻² (Μορφή b2) <u>(%Ποσοστό θετικότητας)</u>	Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10⁻¹ (Μορφή S) <u>(%Ποσοστό θετικότητας)</u>
24,56	7,01	36,84

Στον πίνακα 35 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (χρονική κατανομή).



ΠΙΝΑΚΑΣ 35

<u>Μήνας</u> <u>Δειγματοληψίας</u>	<u>Βλαστικές</u> <u>μορφές</u> <u>Αραίωση 10⁻¹</u> <u>(Μορφή b1)</u> <u>(%Ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>	<u>Βλαστικές</u> <u>μορφές</u> <u>Αραίωση 10⁻²</u> <u>(Μορφή b2)</u> <u>(%Ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>	<u>Σπορογόνες</u> <u>μορφές</u> <u>Αραίωση 10⁻¹</u> <u>(Μορφή S)</u> <u>(%Ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>
ΓΕΝ	50	0	50
ΦΕΒ	28	8	40
ΜΑΡ	50	25	50
ΑΠΡ	0	0	0
ΜΑΗ	25	0	25
ΙΟΥΝ	25	0	0
ΟΚΤ	0	0	25
ΝΟΕΜ	25	0	25
ΔΕΚ	0	25	75

Στον πίνακα 36 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τα σημεία δειγματοληψίας (χωρική κατανομή).

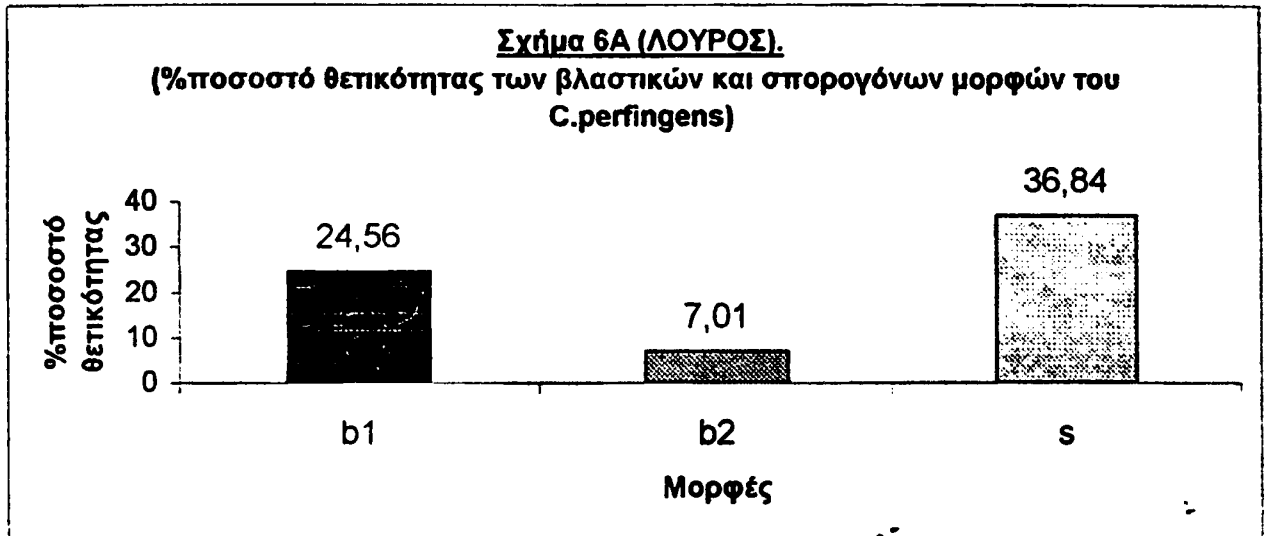
ΠΙΝΑΚΑΣ 36

	Σημείο 1 ^ο Βουλιάστα	Σημείο 2 ^ο Μουσιωτίτσα	Σημείο 3 ^ο Πλατάνια	Σημείο 4 ^ο Κερασσώνας
<u>Βλαστικές</u> <u>μορφές</u> <u>Αραίωση 10⁻¹</u> <u>(Μορφή b1)</u> <u>(%Ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>	0	26,67	16,67	53,33
<u>Βλαστικές</u> <u>μορφές</u> <u>Αραίωση 10⁻²</u> <u>(Μορφή b2)</u> <u>(%Ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>	0	0	0	26,67
<u>Σπορογόνες</u> <u>μορφές</u> <u>Αραίωση 10⁻¹</u> <u>(Μορφή S)</u> <u>(%Ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>	13,33	40	25	66,67

Το σχήμα 6Α δείχνει το % ποσοστό θετικότητας των βλαστικών μορφών στην 1^η (b1) και 2^η (b2) αραίωση καθώς και των σπορογόνων μορφών στην 1^η (s) αραίωση του *C.perfringens* στον ποταμό του Λούρου.

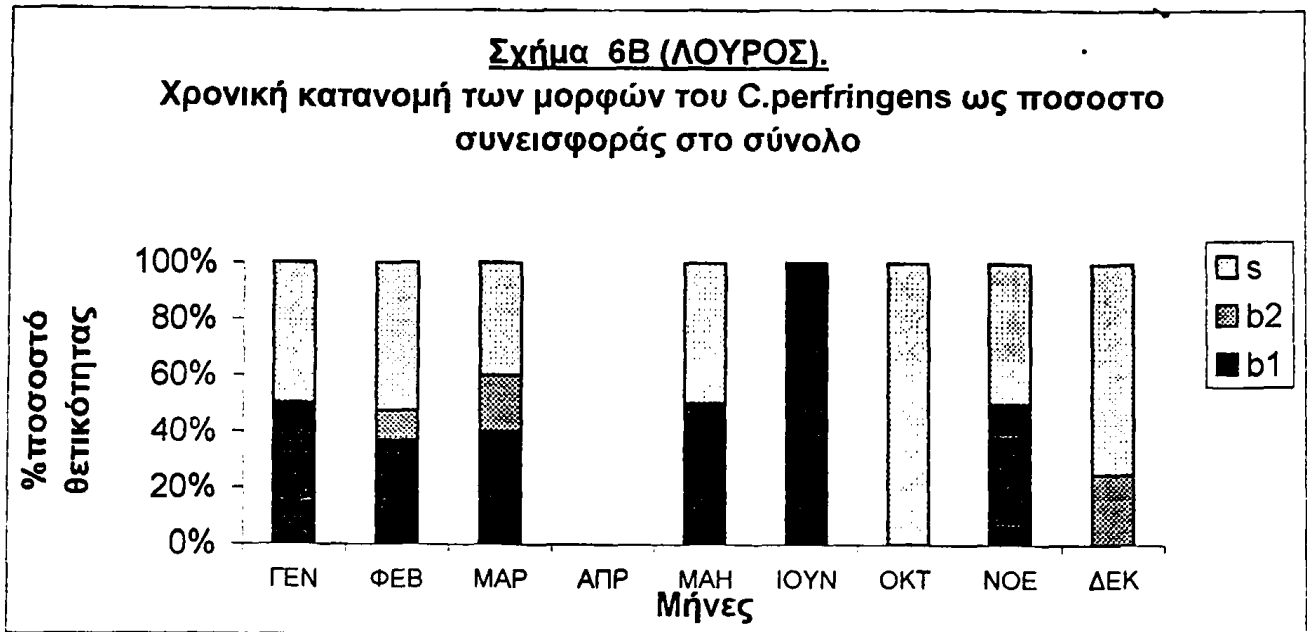


Από το σχήμα αυτό φαίνεται ότι επικρατούν οι σπορογόνες μορφές (στήλη s) με ποσοστό 36,84% ενώ οι βλαστικές μορφές στην 1^η αραιώση(στήλη b1) εμφανίζουν ποσοστό θετικότητας 24,56% και 7,01% στην 2^η αραιώση (στήλη b2),



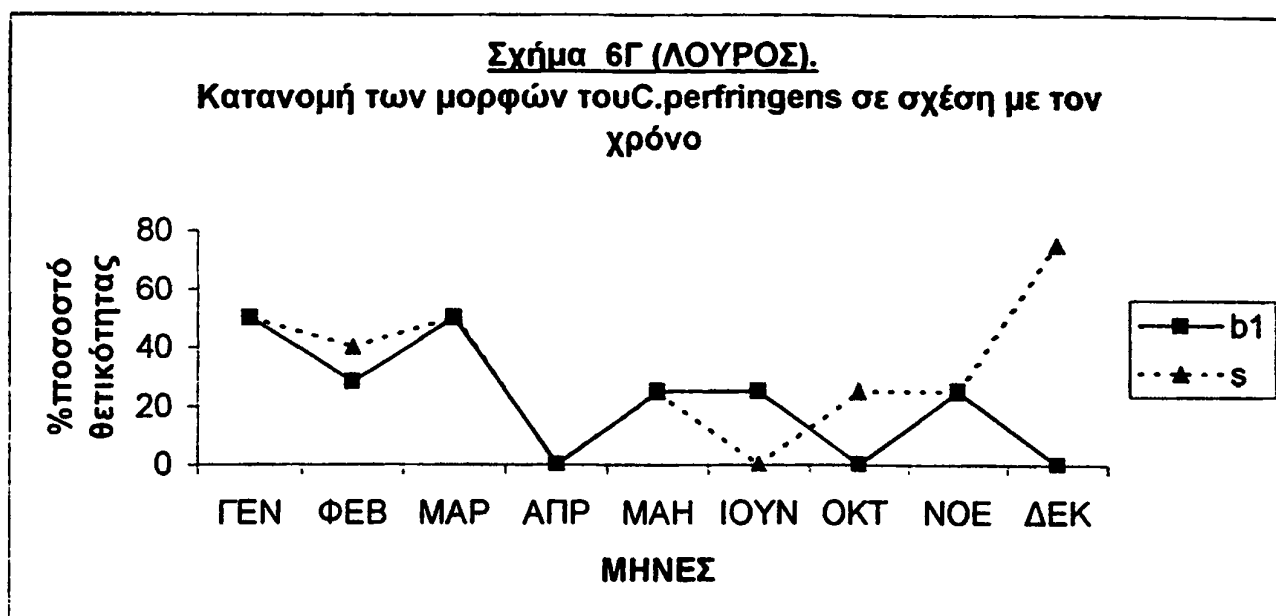
(Μορφή b1) =Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2)=Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S)=Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
--	---	---

Στο σχήμα 6B φαίνεται η χρονική κατανομή των μορφών του *C. perfringens* σαν ποσοστό συνεισφοράς των επιμέρους μορφών (b1)(b2)(s), στην εκάστοτε χρονική στιγμή, στο σύνολο των μορφών εάν αυτό θεωρηθεί το 100%.Από εδώ φαίνεται ότι για τον ποταμό του Λούρου.



(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
---	---	---

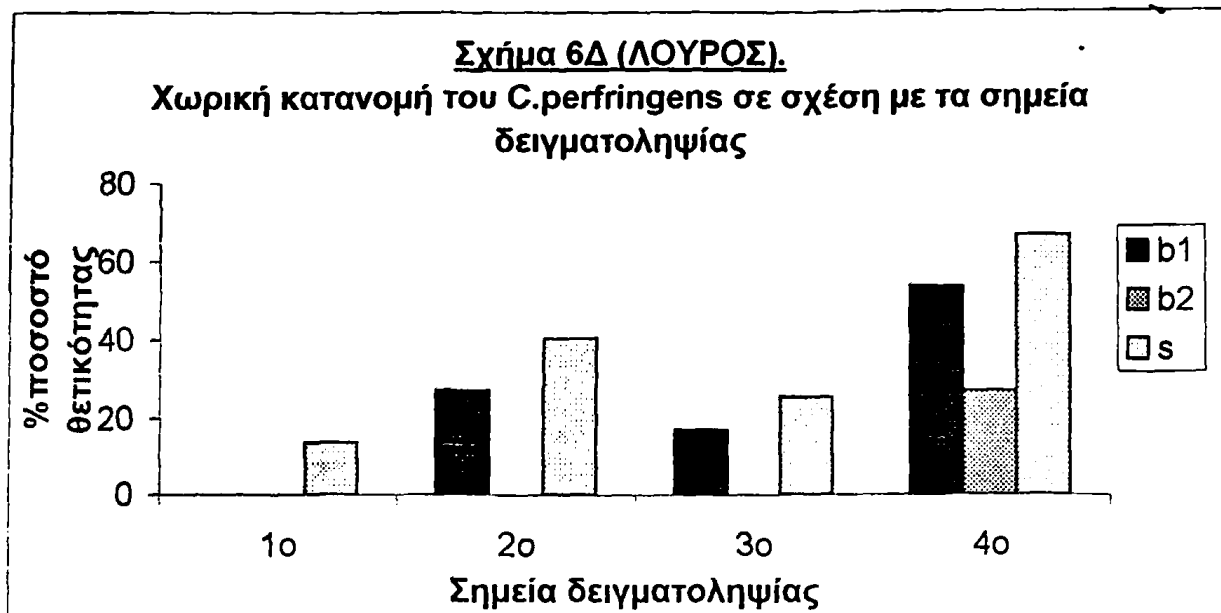
Τα παραπάνω μπορούν να φανούν ακόμα πιο καθαρά εάν παρασταθούν σχηματικά ως η τάση εμφάνισης των μορφών του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (Σχήμα 6Γ).



(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραιώση 10^{-1}

(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραιώση 10^{-1}

Στο σχήμα 6Δ φαίνεται η χωρική κατανομή του εν λόγω βακτηρίου στον ποταμό του Λούρου, με τις διάφορες επιμέρους μορφές που μπορεί να έχει το βακτήριο, ανεξάρτητα από την χρονική στιγμή. Το γράφημα αυτό δύναται να περιγράψει ποιο σημείο είναι περισσότερο επιμολυσμένο υποδεικνύοντας ενδεχομένως τυχόν σημειακές πηγές μόλυνσης αν και δευτερευόντως και άλλοι παράγοντες παίζουν ρόλο στην εμφάνιση του βακτηρίου. Τα σημεία 1,2,3,4 φαίνονται στον χάρτη 6. Παραστήθηκαν δε με τα σύμβολα 1,2,3,4 μετά την χωρική ανάλυση ξεκινώντας από το λιγότερο επιμολυσμένο σημείο και καταλήγοντας στο περισσότερο επιμολυσμένο σημείο.



(Μορφή b1) =Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2)=Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S)=Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
--	---	---

Τα αποτελέσματα από τον ποταμό Λούρο αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα που συνηγορεί ότι το *C.perfringens* μπορεί να αποτελέσει αξιόλογο δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης. Αυτό γιατί στην περισσότερο πεδινή περιοχή του Κερασώνα (σημείο 4), όπου λαμβάνουν χώρα περισσότερες ανθρωπογενείς παρεμβάσεις (χοιροστάσιο-σφαγεία) υπάρχουν υψηλότερα ποσοστά θετικότητας του *C.perfringens*. Αντίθετα στις ορεινές περιοχές Βουλιάστα, Μουσιωτίτσα, Πλατανάκια (σημεία 1,2,3) όπου η μοναδική ανθρώπινη παρέμβαση έγκειται στην πεστροφοκαλλιέργεια τα ποσοστά θετικότητας του *C.perfringens* είναι ιδιαίτερα χαμηλά.

6.7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΡΕΜΑΤΟΣ ΣΟΥΛΟΥ (ΠΤΟΛΕΜΑΙΔΑ)

[The body of the page contains extremely faint and illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the document. The text is mostly illegible due to the quality of the scan and the density of the noise.]

ΠΙΝΑΚΑΣ 37
Πτολεμαίδα: Αραίωση πρώτη. Βλαστικές μορφές

<u>Ημερομηνία</u> <u>δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο</u> <u>1°</u>	<u>Σημείο</u> <u>2°</u>	<u>Σημείο</u> <u>3°</u>	<u>Σημείο</u> <u>4°</u>	<u>Σημείο</u> <u>5°</u>	<u>Σημείο</u> <u>6°</u>	<u>Θετικότητα</u> (%ποσοστό θετικότητας)
26-03-2000	-	+	-	+	-	-	2/6 (33,33%)
17-04-2000	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
06-05-2000	+	+	+	-	-	-	3/6 (50%)
21-05-2000	-	+	-	+	-	-	2/6 (33,33%)
02-06-2000	-	+	+	-	+	-	3/6 (50%)
29-06-2000	-	+	+	-	+	-	3/6 (50%)
07-07-2000	-	+	+	+	-	-	3/6 (50%)
23-09-2000	-	-	+	-	+	-	3/6 (50%)
11-10-2000	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
29-11-2000	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
30-01-2001	-	-	-	+	-	-	1/6 (16,67)%
15-02-2001	-	-	-	+	-	-	1/6 (16,67)%
<u>Θετικότητα</u>	1/12	7/12	5/12	5/12	3/12	0/12	<u>ΣΥΝΟΛΟ</u> 21/72
<u>(%ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>	(8,33%)	(58,33)	(41,67%)	(41,67%)	(25%)	(0%)	(29,16%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



ΠΙΝΑΚΑΣ 38
Πτολεμαίδα: Αραίωση δεύτερη (2^η) . Βλαστικές μορφές

<u>Ημερομηνία</u> <u>δειγματοληψίας</u>	<u>Σημείο</u> <u>1^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>2^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>3^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>4^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>5^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>6^ο</u>	<u>Θετικότητα</u> <u>(%ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>
26-03-2000	-	-	-	+	-	-	1/6 (16,67)%
17-04-2000	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
06-05-2000	-	+	-	-	-	-	1/6 (16,67)%
21-05-2000	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
02-06-2000	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
29-06-2000	-	+	-	-	+	-	2/6 (33,33%)
07-07-2000	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
23-09-2000	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
11-10-2000	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
29-11-2000	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
30-01-2001	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
15-02-2001	-	-	-	-	-	-	0/6 (0%)
<u>Θετικότητα</u>	0/12	2/12	0/12	0/12	1/12	0/12	ΣΥΝΟΛΟ 3/72
<u>(%ποσοστό</u> <u>θετικότητας)</u>	(0%)	(16,67%)	(0%)	(0%)	(8,33%)	(0%)	(4,16%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



ΠΙΝΑΚΑΣ 39
Πτολεμαίδα: Αραίωση πρώτη Σπορογόνες μορφές

Ημερομηνία δειγματοληψίας	Σημείο 1°	Σημείο 2°	Σημείο 3°	Σημείο 4°	Σημείο 5°	Σημείο 6°	Θετικότητα (%ποσοστό θετικότητας)
26-03-2000	-	+	-	-	+	-	2/6 (33,33%)
17-04-2000	+	+	-	-	-	-	2/6 (33,33%)
06-05-2000	-	-	-	-	+	-	1/6 (16,67)%
21-05-2000	-	-	-	+	-	-	1/6 (16,67)%
02-06-2000	-	-	-	-	+	-	1/6 (16,67)%
29-06-2000	-	-	-	-	-	-	0/6 (0)%
07-07-2000	+	-	-	-	-	-	1/6 (16,67)%
23-09-2000	-	+	-	-	+	-	2/6 (33,33%)
11-10-2000	+	-	+	-	-	-	2/6 (33,33%)
29-11-2000	-	+	-	+	+	-	3/6 (50)%
30-01-2001	-	+	-	+	+	-	3/6 (50)%
15-02-2001	-	+	-	+	+	-	3/6 (50)%
Θετικότητα	3/12	6/12	1/12	4/12	7/12	0/12	ΣΥΝΟΛΟ 21/72
(%ποσοστό θετικότητας)	(25%)	(50%)	(8,33%)	(33,33%)	(58,33%)	(0%)	(29,16%)

*Στον πίνακα το (+) συμβολίζει δείγμα θετικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή θετικό είναι το δείγμα που παρουσιάζει θολερότητα (ζύμωση της λακτόζης), μαύρο ίζημα (FeS) και αέριο στους ανεστραμμένους σωλήνες Durham (CO₂). Με (-) συμβολίζεται το δείγμα που είναι αρνητικό στην ύπαρξη του *C.perfringens*, δηλαδή αρνητικό ως προς τουλάχιστον ένα εκ των παραπάνω χαρακτηριστικών.



Με βάση τους αναλυτικούς πίνακες 37,38,39 προκύπτουν οι συνοπτικοί πίνακες 40,41,42. Στον πίνακα 40 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου ανεξαρτήτως χώρου και χρόνου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 40

Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)
29,16	4,16	29,16

Στον πίνακα 11 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τα σημεία δειγματοληψίας (χωρική κατανομή).

ΠΙΝΑΚΑΣ 41

	<u>Σημείο</u> <u>1^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>2^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>3^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>4^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>5^ο</u>	<u>Σημείο</u> <u>6^ο</u>
Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	8,33	58,33	41,67	41,67	25	0
Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2} (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	0	16,67	0	0	8,33	0
Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1} (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)	25	50	8,33	33,33	58,33	0

Στον πίνακα 42 περιγράφεται το ποσοστό θετικότητας για τις διάφορες μορφές του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (χρονική κατανομή).

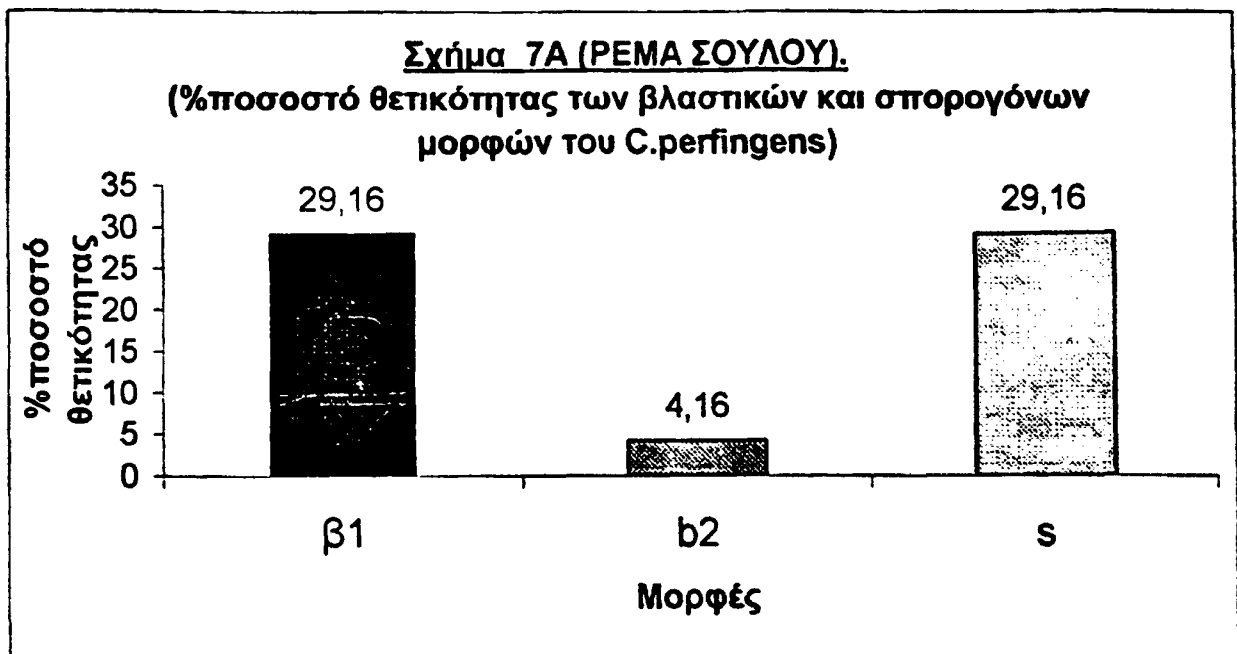


ΠΙΝΑΚΑΣ 42

Μήνας δειγματοληψίας	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10⁻¹ (Μορφή b1) (%ποσοστό θετικότητας)	Βλαστικές μορφές Αραίωση 10⁻² (Μορφή b2) (%ποσοστό θετικότητας)	Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10⁻¹ (Μορφή S) (%ποσοστό θετικότητας)
ΙΑΝ	16,67	16,67	33,33
ΦΕΒ	16,67	0	33,33
ΜΑΡ	33,33	16,67	16,67
ΑΠΡ	0	0	16,67
ΜΑΗΣ	50	0	16,67
ΜΑΗΣ	33,33	33,33	0
ΙΟΥΝ	50	0	16,67
ΙΟΥΝ	50	0	33,33
ΙΟΥΛ	50	0	33,33
ΣΕΠΤ	50	0	50
ΟΚΤ	0	0	50
ΝΟΕΜ	0	0	50

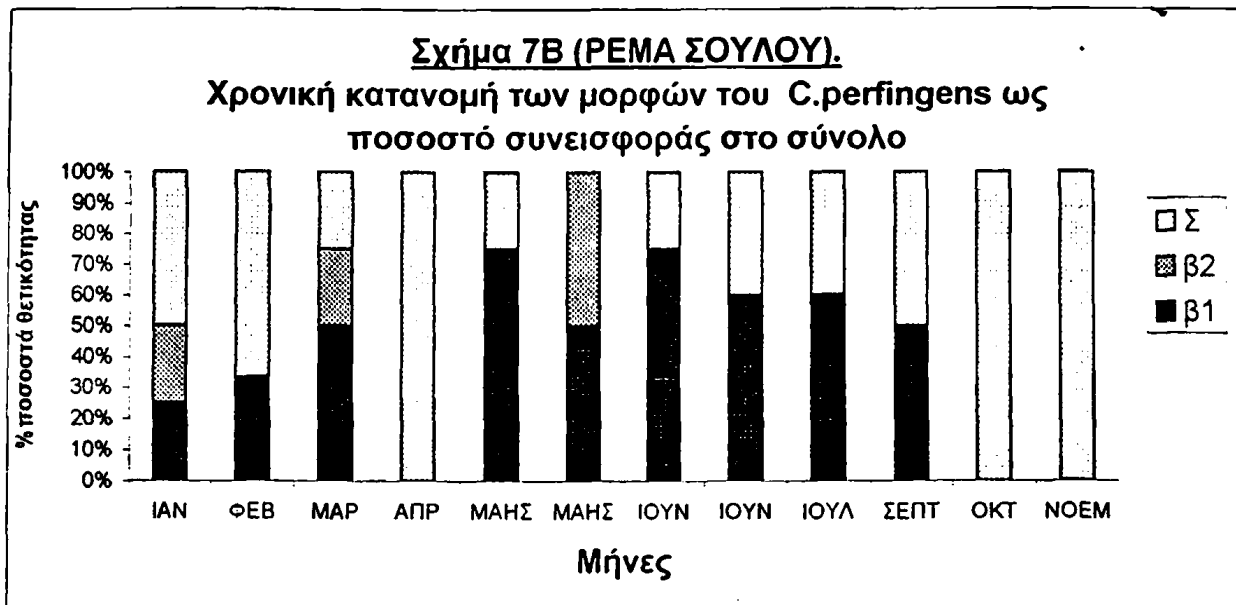
Το σχήμα 7Α δείχνει το % ποσοστό θετικότητας των βλαστικών μορφών στην 1^η (b1) και 2^η (b2) αραίωση καθώς και των σπορογόνων μορφών στην 1^η (s) αραίωση του *C.perfringens* στο ρέμα Σουλού Πτολεμαΐδας.





(Μορφή b1) =Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2)=Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S)=Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
--	---	---

Στο σχήμα 7B φαίνεται η χρονική κατανομή των μορφών του *C. perfringens* σαν ποσοστό συνεισφοράς των επιμέρους μορφών (b1)(b2)(s), στην εκάστοτε χρονική στιγμή, στο σύνολο των μορφών εάν αυτό θεωρηθεί το 100%. Από εδώ φαίνεται ότι για το ρεμα Σουλού Πτολεμαίδας.

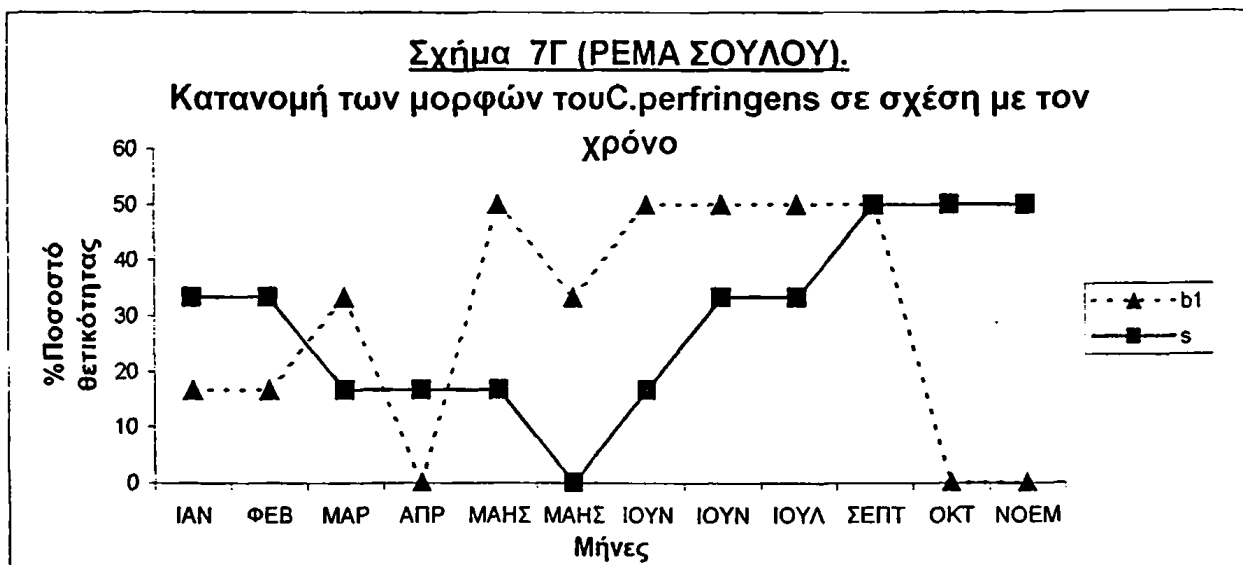


(Μορφή β1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}

(Μορφή β2) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}

(Μορφή Σ) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}

Τα παραπάνω μπορούν να φανούν ακόμα πιο καθαρά εάν παρασταθούν σχηματικά ως η τάση εμφάνισης των μορφών του βακτηρίου σε σχέση με τον χρόνο (Σχήμα 7Γ).

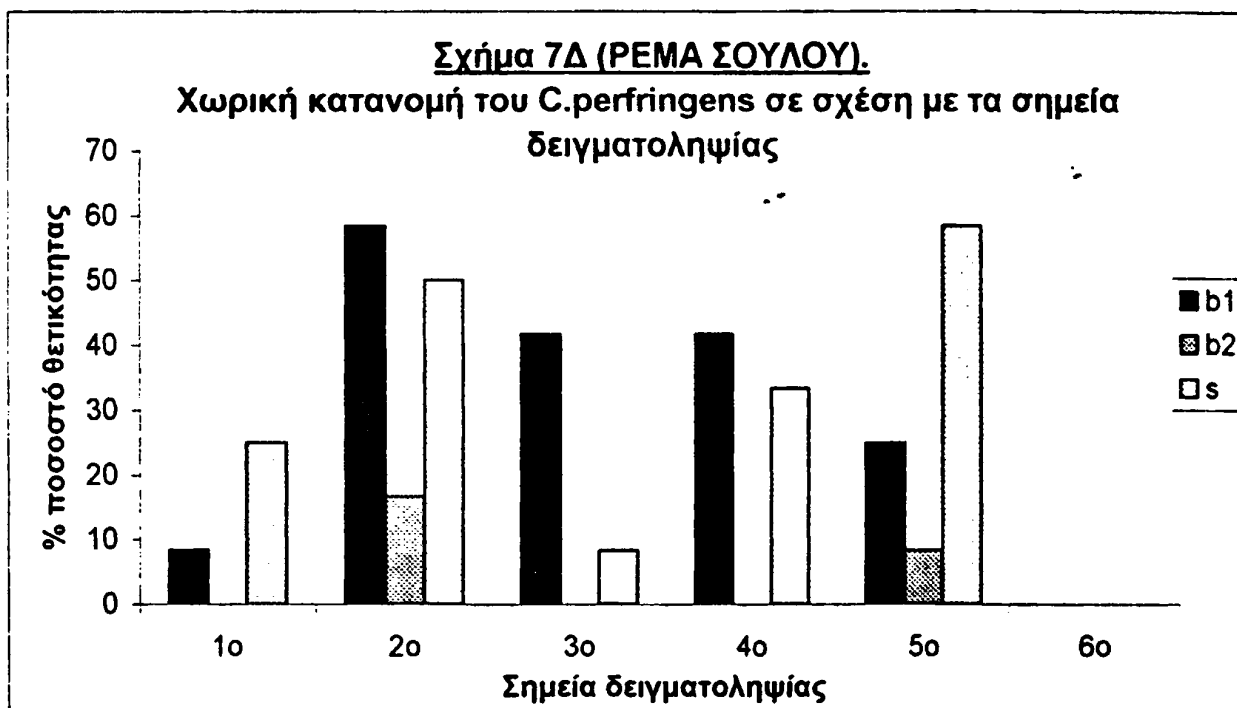


(Μορφή b1) = Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}

(Μορφή S) = Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}



Στο σχήμα 7Δ φαίνεται η χωρική κατανομή του εν λόγω βακτηρίου στο ρεμα Σουλού Πτολεμαίδας, με τις διάφορες επιμέρους μορφές που μπορεί να έχει το βακτήριο, ανεξάρτητα από την χρονική στιγμή. Το γράφημα αυτό δύναται να περιγράψει ποιο σημείο είναι περισσότερο επιμολυσμένο υποδεικνύοντας ενδεχομένως τυχόν σημειακές πηγές μόλυνσης αν και δευτερευόντως και άλλοι παράγοντες παίζουν ρόλο στην εμφάνιση του βακτηρίου. Τα σημεία 1,2,3,4,5,6 φαίνονται στον χάρτη 7.



(Μορφή b1) =Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-1}	(Μορφή b2)=Βλαστικές μορφές Αραίωση 10^{-2}	(Μορφή S)=Σπορογόνες μορφές Αραίωση 10^{-1}
--	---	---

Το ρεμα Σουλού φαίνεται επιμολυσμένο πιθανότατα γιατί αποχύνονται λύματα του βιολογικού καθαρισμού από την πόλη της Πτολεμαίδας.

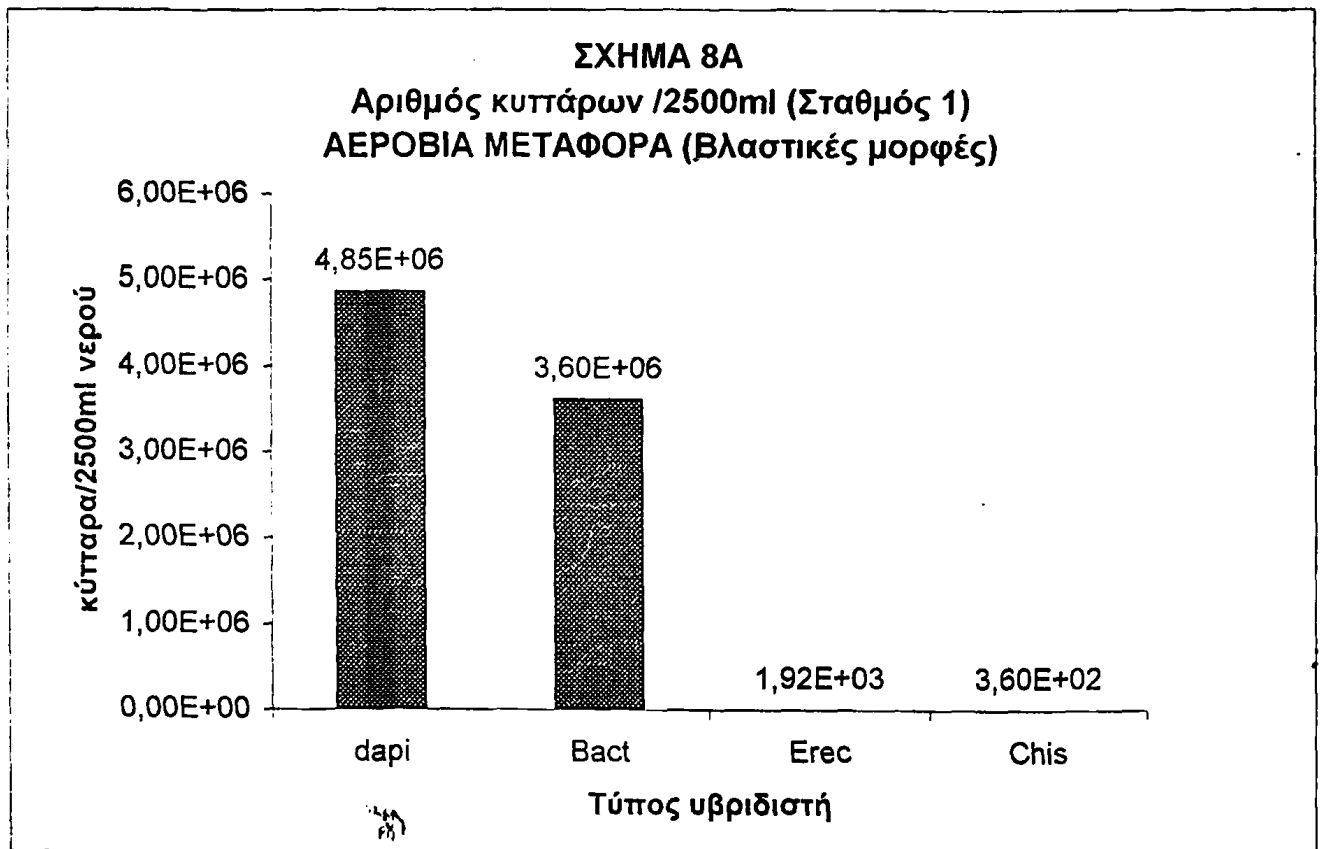


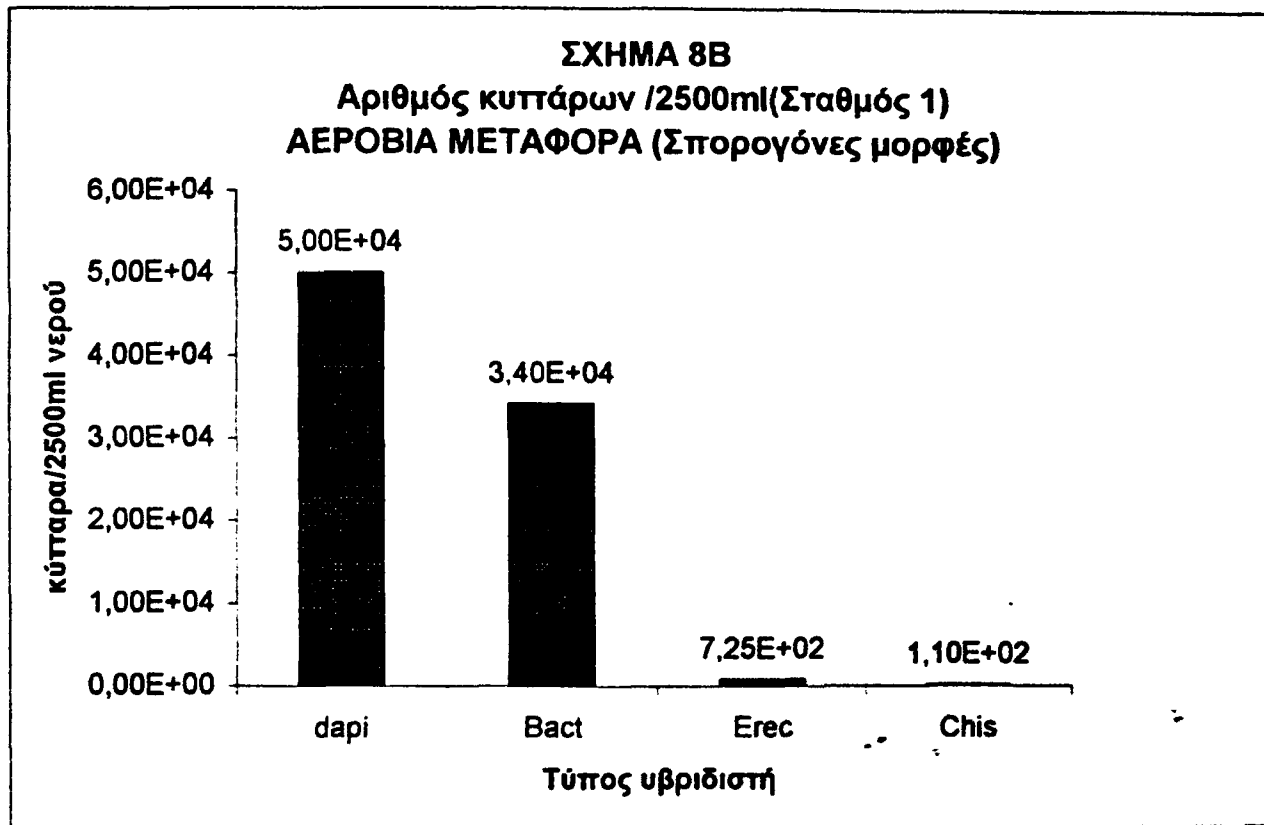
6.8.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΡΟΕΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ

FISH

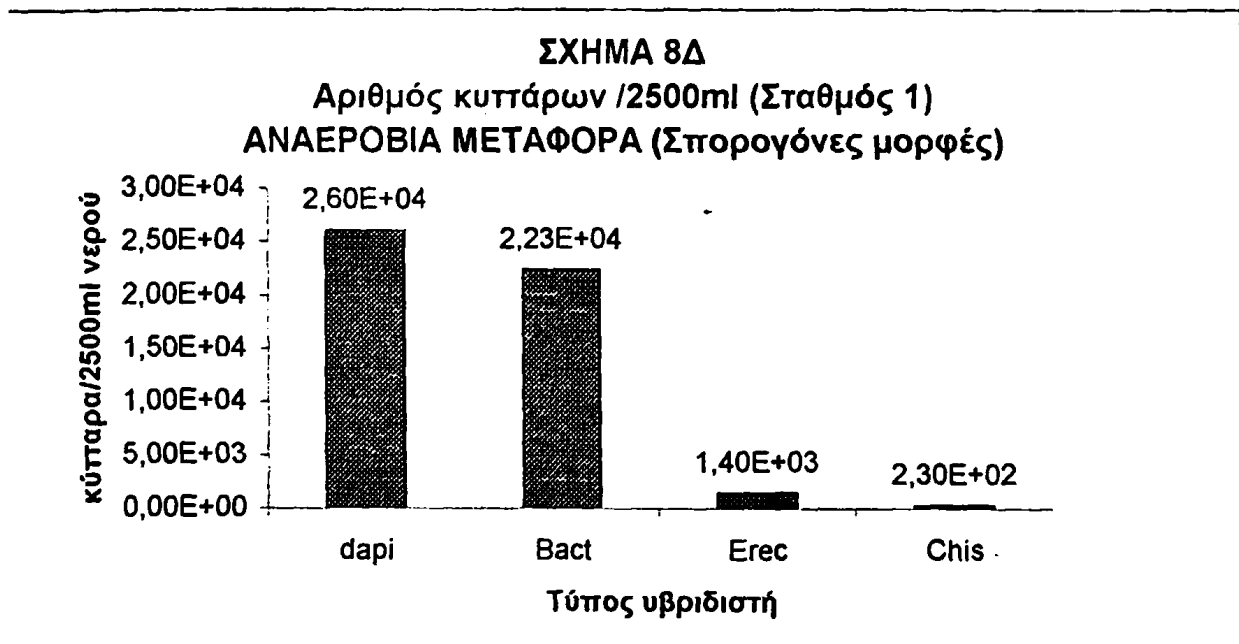
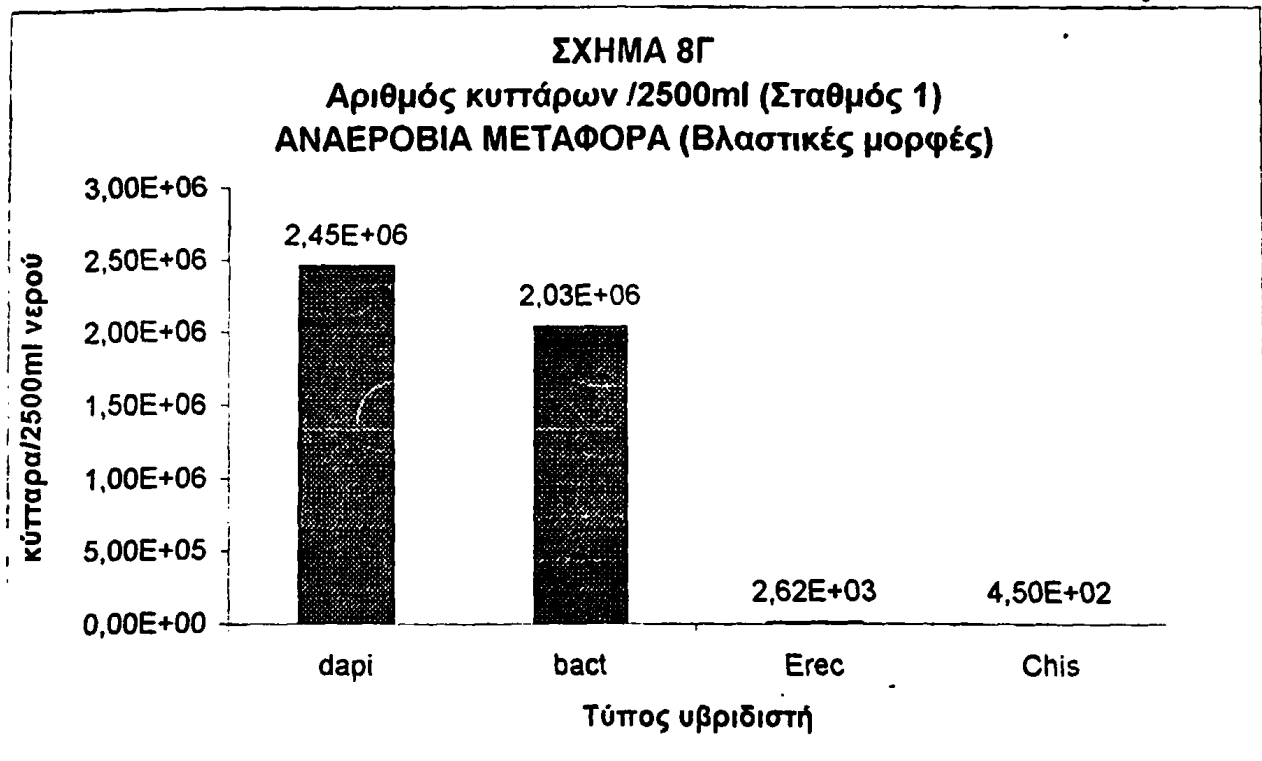
Χρησιμοποιώντας τους υβριδιστές Dapi και Bact η καταμέτρηση έγινε αυτοματοποιημένα αξιοποιώντας το λογισμικό του υπολογιστή Quanti-met(Leica) του τομέα Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου του Groningen Αντίθετα για τους υβριδιστές Eub και Chis/Clit η καταμέτρηση έγινε με οπτική παρατήρηση εφόσον το λογισμικό δεν κάλυπτε μικρότερα όρια. Η διαδικασία περιγράφηκε αναλυτικά στα υλικά και μεθόδους της διαδικασίας FISH.

Έτσι από την καταμέτρηση αυτή προέκυψαν για τον σταθμό 1 και την αερόβια μεταφορά τα σχήματα 8A και 8B.



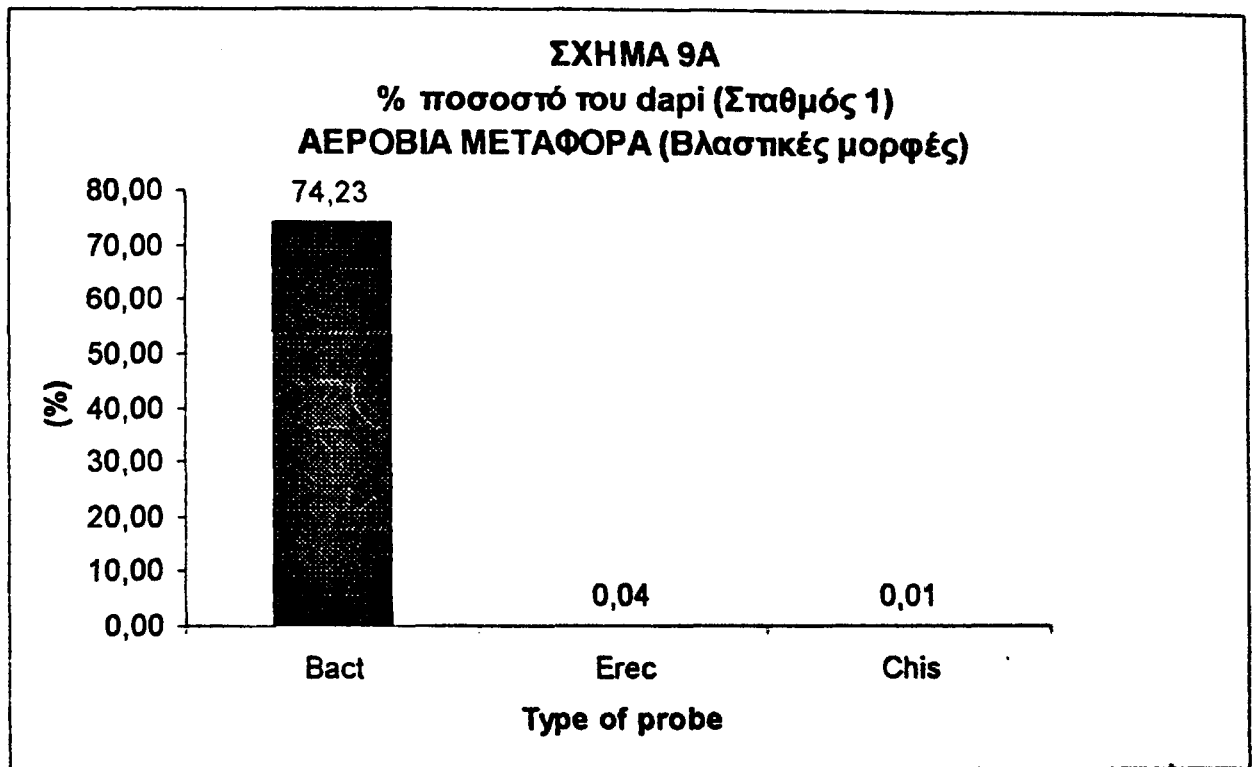


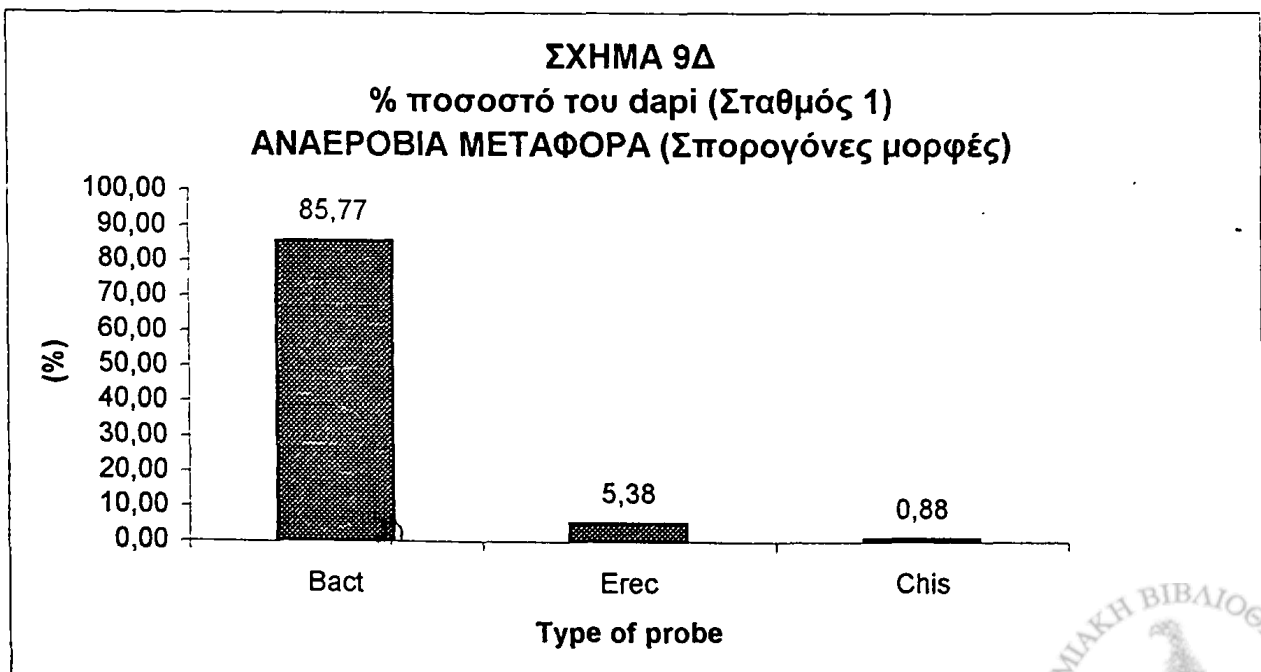
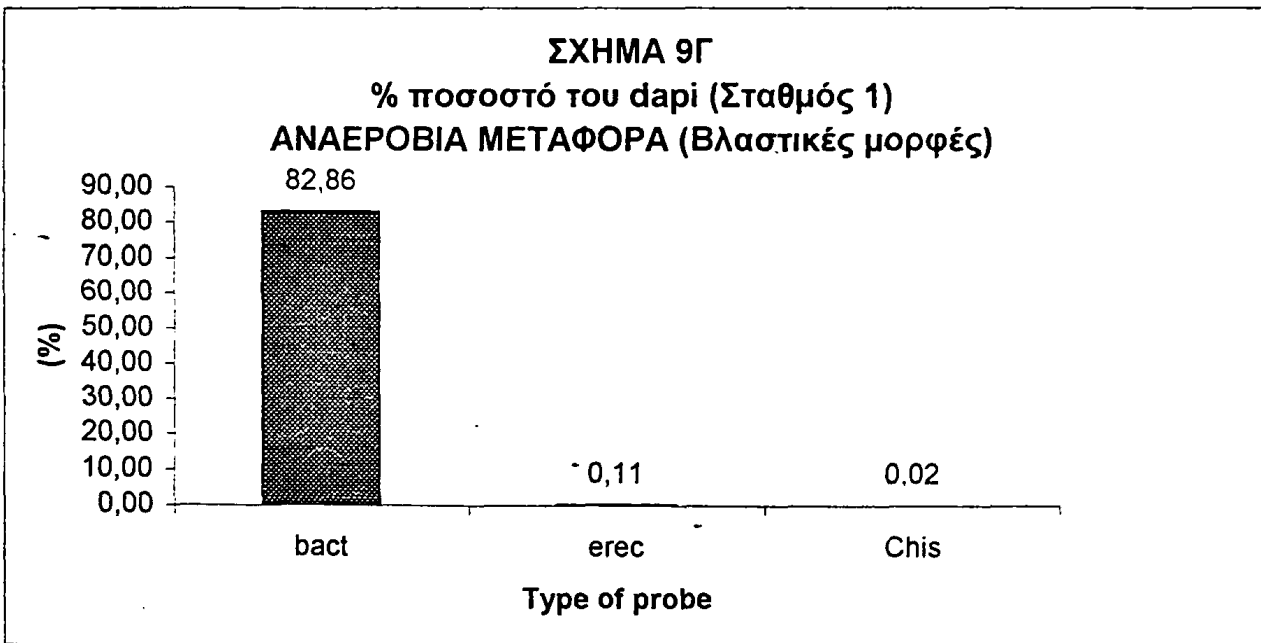
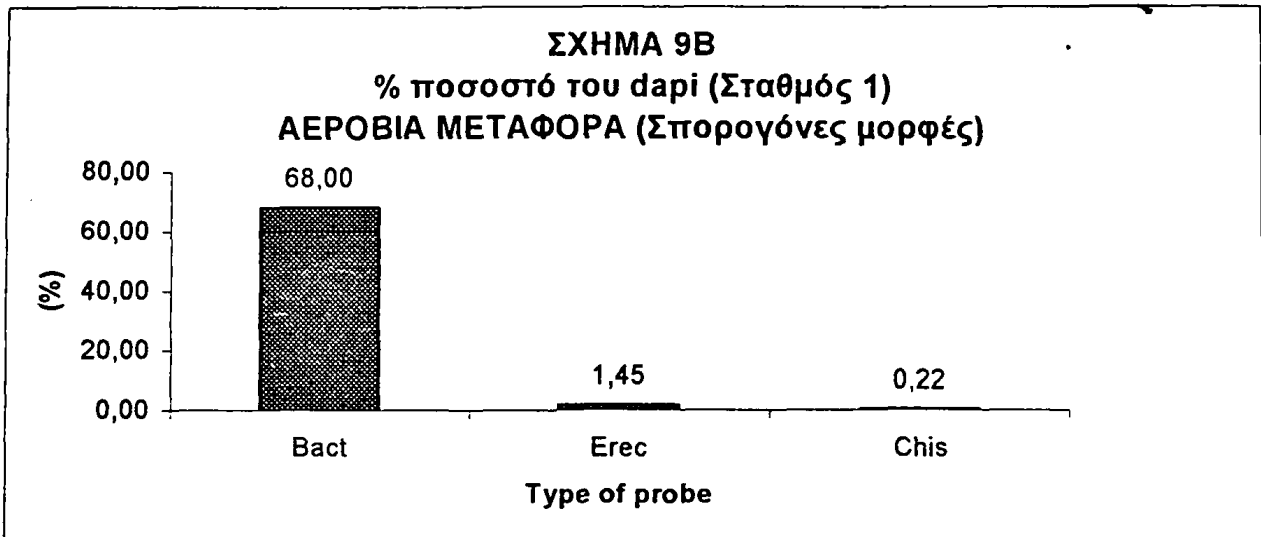
Από την καταμέτρηση για τον σταθμό 1 και την αναερόβια μεταφορά προκύπτουν τα σχήματα 8Γ και 8Δ.



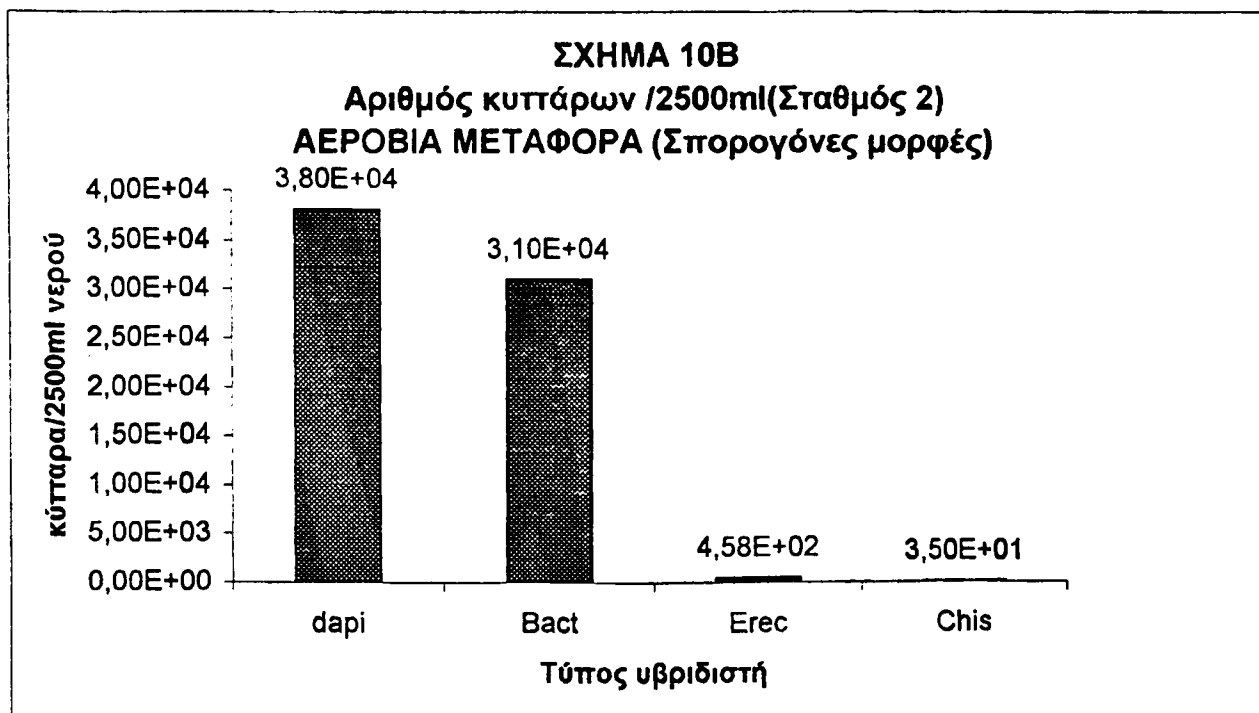
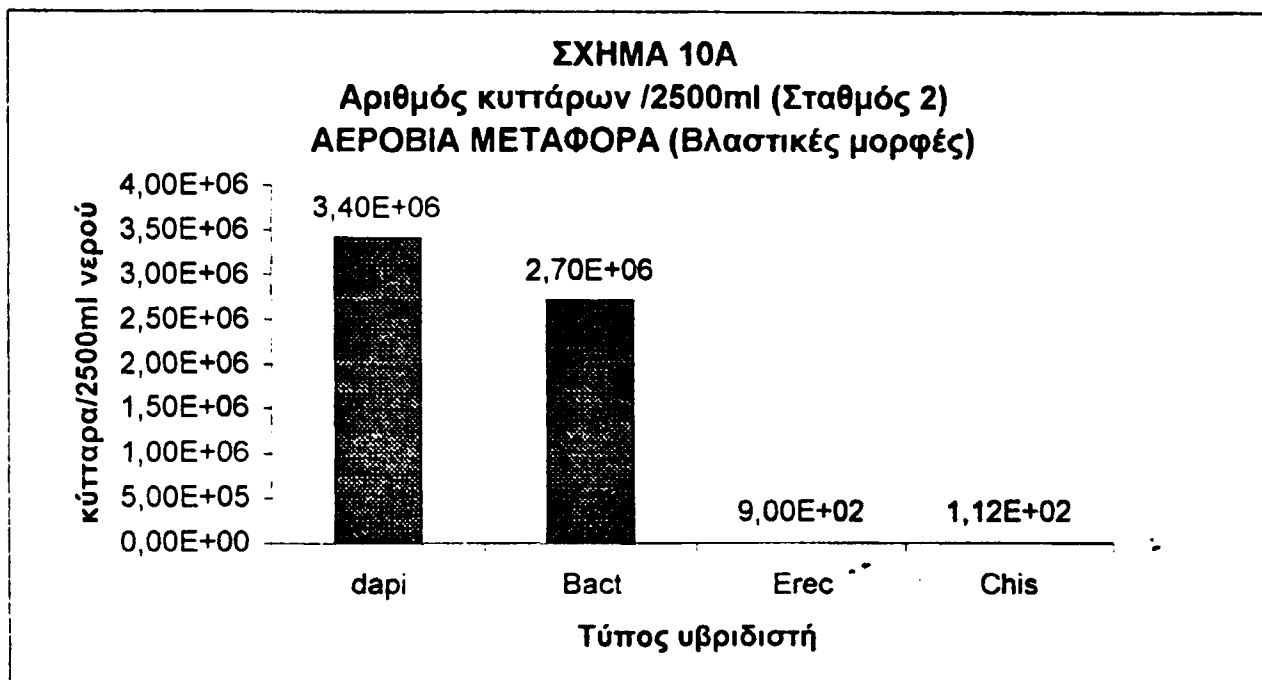
Εάν τα αποτελέσματα αυτά εκφραστούν σαν ποσοστό του Dapi δηλαδή σαν ποσοστό του συνολικού DNA, που εκφράζει το Dapi προκύπτουν τα σχήματα 9Α,9Β,9Γ και 9Δ αντίστοιχα. Ο υβριδιστής Bact υπενθυμίζεται ότι μαρκάρει όλα τα βακτήρια, ο Erec τα κλωστηρίδια γενικά και ο Chis/Clit το *C.perfringens*.

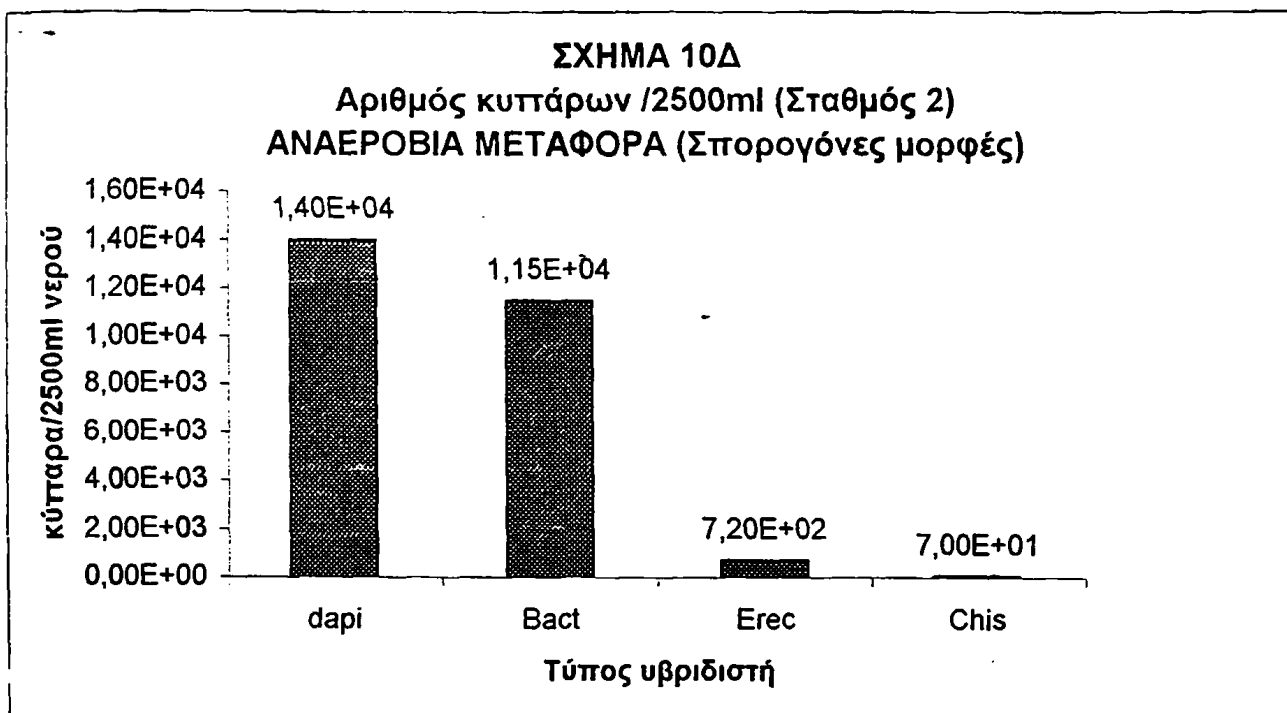
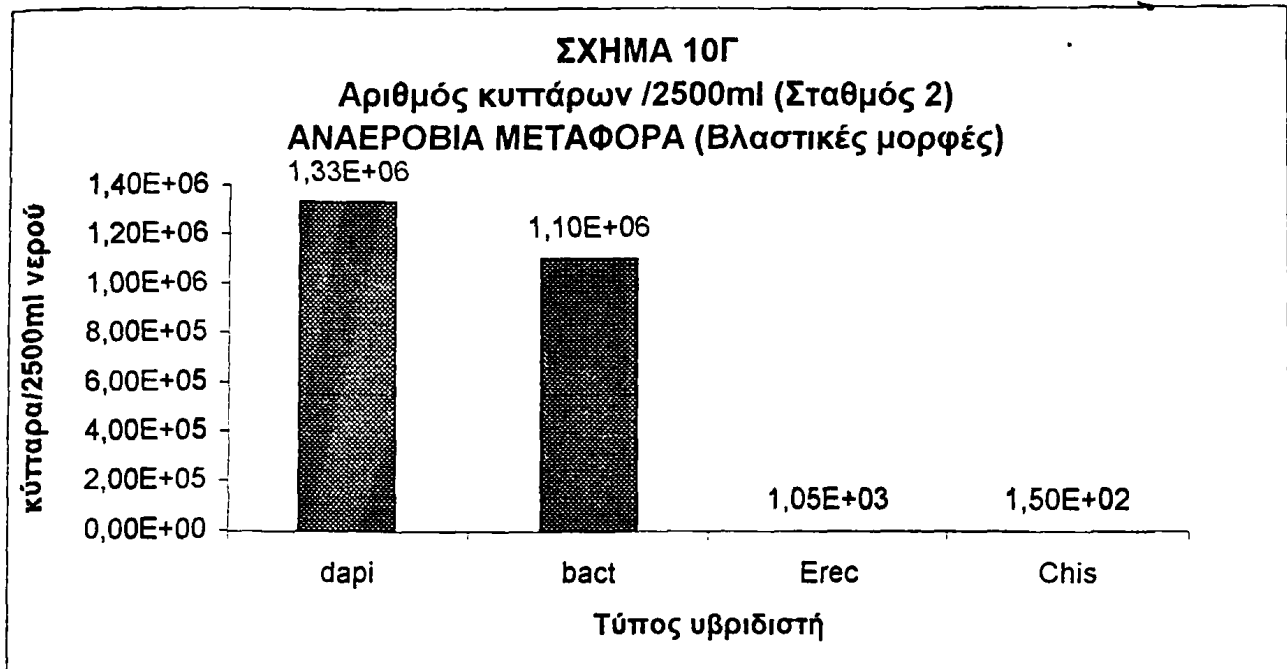






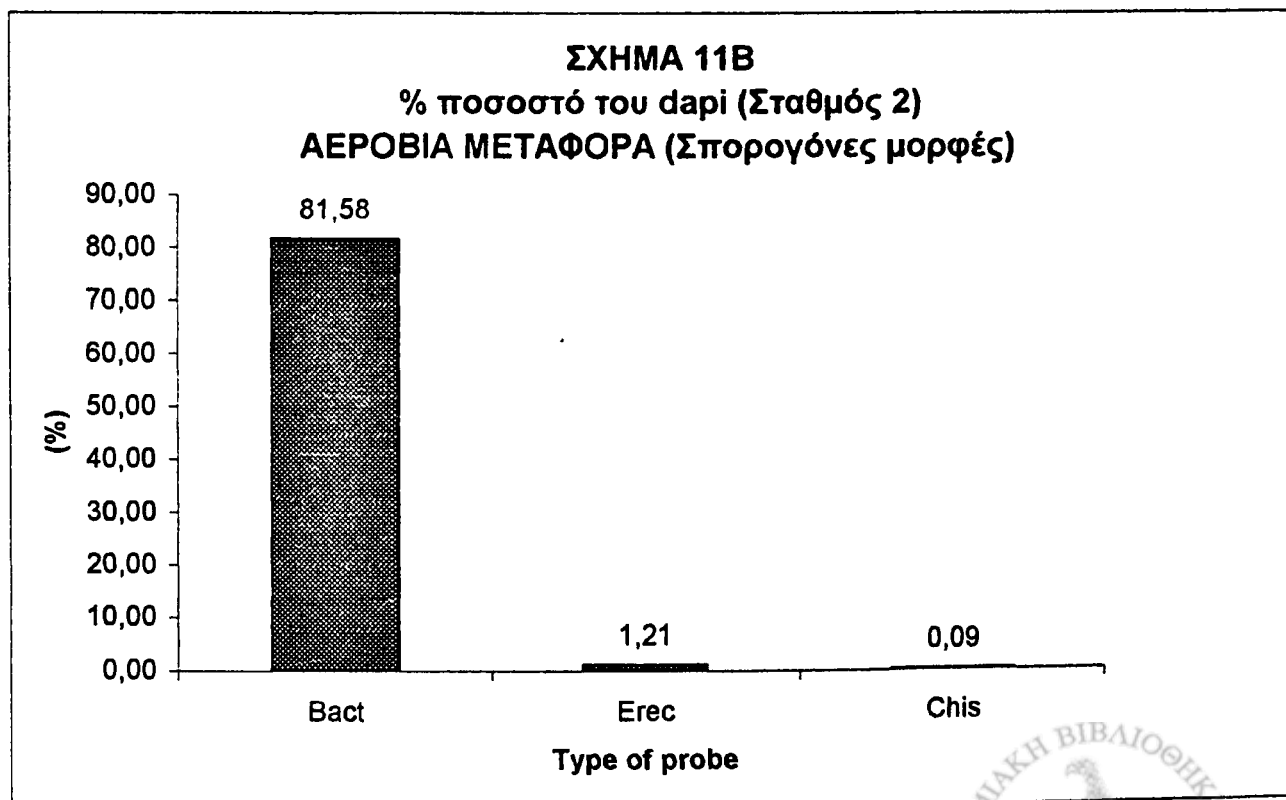
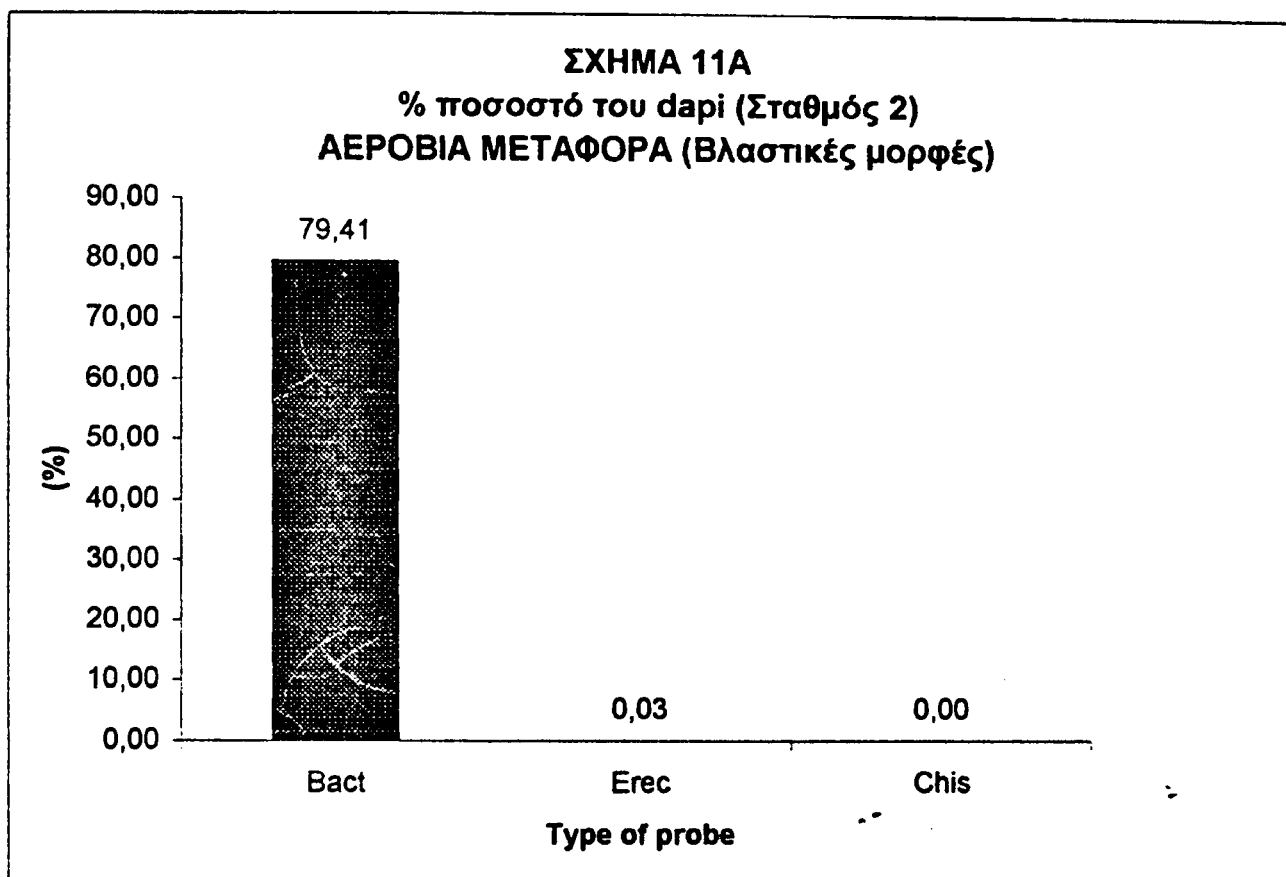
Κάνοντας την ίδια εργασία για τον σταθμό 2 της Λίμνης των Ιωαννίνων για την αερόβια μεταφορά προκύπτουν τα σχήματα 10Α και 10Β ενώ για την αναερόβια μεταφορά τα σχήματα 10Γ και 10Δ.

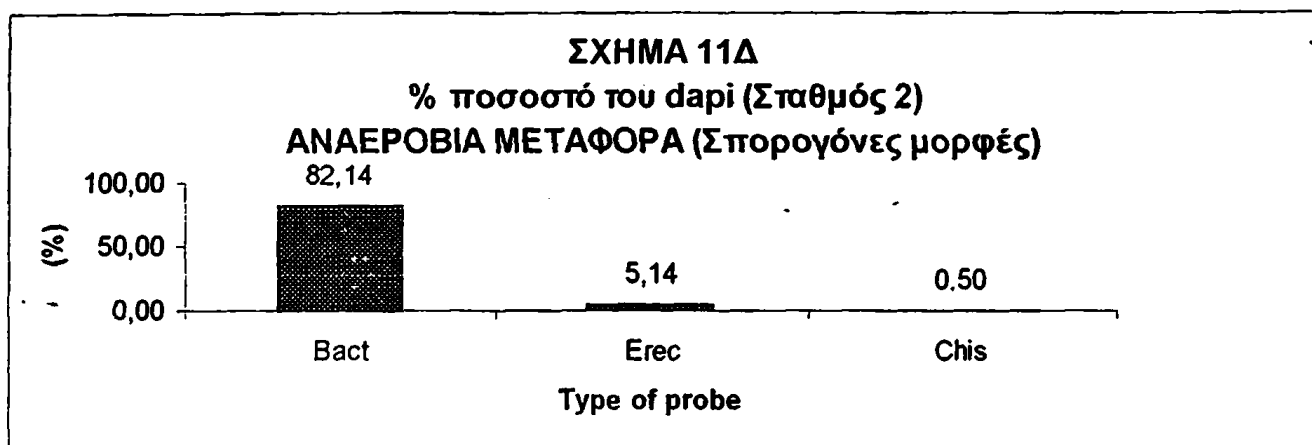
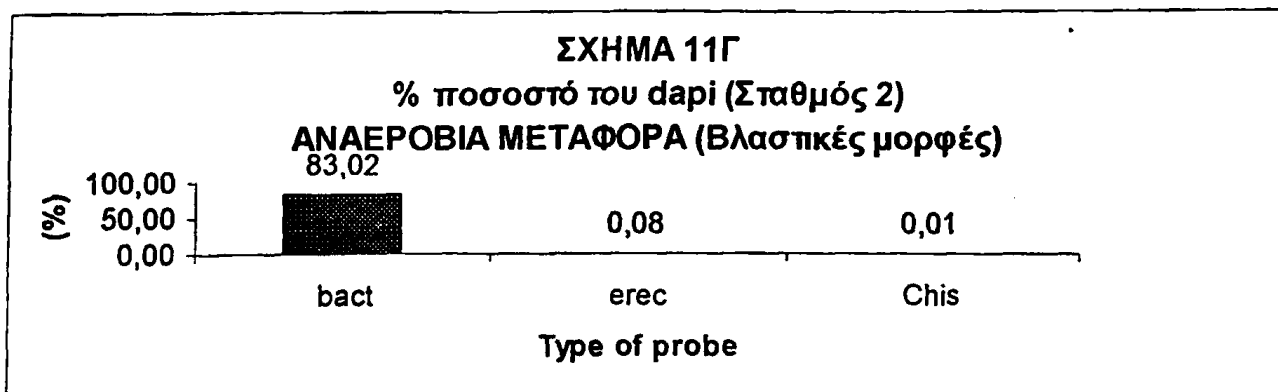




Εάν τα αποτελέσματα αυτά εκφραστούν σαν ποσοστό του Dapi δηλαδή σαν ποσοστό του συνολικού DNA, που εκφράζει το Dapi προκύπτουν τα σχήματα 11Α,11Β,11Γ και 11Δ αντίστοιχα. Ο υβριδιστής Bact υπενθυμίζεται ότι μαρκάρει όλα τα βακτήρια, ο Erec τα κλωστηρίδια γενικά, και ο Chis/Clit το *C.perfringens*.







Από τα αποτελέσματα με την μέθοδο FISH φαίνεται αφενός ότι οι πληθυσμοί του *C.perfringens* αποτελούν μικρό ποσοστό της συνολικής βακτηριακής κοινότητας στα δείγματα των νερών, αφετέρου φαίνεται ότι ο σταθμός 1(μώλος-περιοχή Μαβίλη) είναι περισσότερο επιμολυσμένος από τον σταθμό 2 (περιοχή σφαγεία).

6.9.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ

ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Οι παράμετροι T, SpC, pH, DO, TDS προσδιορίστηκαν από τη φορητή Hydrolab, που διαθέτει τους κατάλληλους αισθητήρες. Το BOD προσδιορίστηκε από αισθητήρες Lonibond με τη χρήση του ανάλογου πρωτοκόλλου. Τα ιόντα NO_3^- , NO_2^- , και NH_4^+ , προσδιορίστηκαν με το φωτόμετρο Hack με τη χρήση του ανάλογου πρωτοκόλλου.

Οι οργανισμοί επηρεάζονται από τη φυσικοχημική σύσταση του νερού και οποιαδήποτε αλλαγή της καταγράφεται ως μεταβολή των γνωρισμάτων των βιοκοινωνιών τους ή και των ίδιων των ατόμων. Κατά αυτόν τον τρόπο, δίνουν πληροφορίες για τις συνθήκες που επικρατούν πριν και κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, ενώ οι φυσικοχημικές μετρήσεις παρέχουν πληροφορίες μόνο για τη στιγμή της δειγματοληψίας, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητα πολλά δείγματα για την ολοκληρωμένη εικόνα της κατάστασης των υδάτων.

Ωστόσο καταγράφηκαν οι παράμετροι αυτοί προκειμένου να δοθεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τα υδάτινα οικοσυστήματα που εξετάζονται, αλλά και για το πόσο περίπλοκα διαπλέκονται οι βιοτικοί με τους αβιοτικούς παράγοντες στα πλαίσια ενός οικοσυστήματος.

Παρακάτω παρατίθενται πίνακες με τις φυσικοχημικές παραμέτρους που βοηθούν ώστε να εξαχθούν πιο ολοκληρωμένα συμπεράσματα για τα διάφορα οικοσυστήματα.



ΔΙΜΝΗ ΚΑΣΤΟΡΙΑΣ

ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ	Γ	Φ	Μ	Α	Μ	Ι	Ι	Ν
T(°C)	5,2	6,3	11,2	12,1	21	27,9	29,09	10,1
SpC(μs/cm)	393,6	398,7	400,3	399,5	412,9	427,8	408,2	401
TDS(g/l)	0,2519	0,2551	0,2563	0,2556	0,2642	0,2738	0,2645	0,2566
DO(mg/l)	7,23	8,7	7,89	7,76	6,39	6,91	5,58	7,2
PH	7,74	7,83	7,61	7,81	7,96	7,99	7,91	8,1
BOD ₅	4	4	6	7	7	9	12	7
NO ₃ ⁻	0,3	-	0,4	-	0,5	-	0,8	-
NO ₂ ⁻	0,006	-	0,004	-	0,009	-	0,012	-
NH ₄ ⁺	0,13	-	0,24	-	0,28	-	0,25	-

Γ:ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ, Φ:ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ, Μ:ΜΑΡΤΙΟΣ, Α:ΑΠΡΙΛΙΟΣ, Μ:ΜΑΙΟΣ, Ι:ΙΟΥΝΙΟΣ, Ι:ΙΟΥΛΙΟΣ, Ν:ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ.

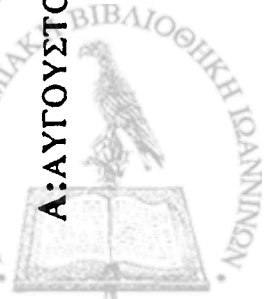


ΔΙΜΝΗ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ	Γ	Φ	M	A	M	I	I	A	Σ	O	N	Δ
T(°C)	7,4	7,7	13,5	13,9	21,3	24	26	25,4	20,8	14	11,6	8,7
SpC(μs/cm)	324	335	315	329	343	337	281,6	293	289,6	330	401	356
TDS(g/l)	0,2071	0,2140	0,2014	0,2106	0,2195	0,2157	0,1799	0,1875	0,1850	0,2112	0,2567	0,2278
DO(mg/l)	7,8	10,7	9,8	10,7	9,3	8,91	10,71	9,6	10,1	9	9,2	8,6
PH	8,5	8,6	7,71	7,78	8,76	9,09	7,74	7,92	8,08	8,2	8,1	7,7
BOD ₅	5	6	8	4	7	11	14	16	14	9	10	8
NO ₃ ⁻	0,2	-	0,3	-	0,8	0,7	0,6	0,9	0,8	-	0,7	-
NO ₂ ⁻	0,002	-	0,006	-	0,007	0,008	0,008	0,009	0,011	-	0,006	-
NH ₄ ⁺	0,18	-	0,18	-	0,17	0,25	0,31	0,33	0,31	-	0,21	-

Γ:ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ, Φ:ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ, Μ:ΜΑΡΤΙΟΣ, Α:ΑΠΡΙΛΙΟΣ, Μ:ΜΑΙΟΣ, Ι:ΙΟΥΝΙΟΣ, Ι:ΙΟΥΛΙΟΣ,

Α:ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ, Σ:ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ, Ο:ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, Ν:ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ, Δ:ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ



ΠΟΤΑΜΟΣ ΑΩΟΣ

ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ	Γ	Φ	Μ	Α	Μ	Ι	Ι	Ν
T(°C)	8,9	9,2	9,7	13,08	14,8	18	19,43	10,3
SpC(μs/cm)	274,1	271,2	279,3	287,8	278,4	309	299,3	280
TDS(g/l)	0,1756	0,1737	0,1789	0,1844	0,1784	0,1980	0,1916	0,1794
DO(mg/l)	8,63	8,32	9,01	8,67	8,4	6,7	8,07	7,4
PH	7,67	7,38	7,56	7,45	7,41,	7,8	7,7	7,91
BOD ₅	2	2	1	1	1	3	3	1
NO ₃ ⁻	0,1	-	0,5	-	0,3	-	0,0	-
NO ₂ ⁻	0,005	-	0,009	-	0,003	-	0,007	-
NH ₄ ⁺	0,05	-	0,0	-	0,04	-	0,02	-

Γ:ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ, Φ:ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ, Μ:ΜΑΡΤΙΟΣ, Α:ΑΠΡΙΛΙΟΣ, Μ:ΜΑΙΟΣ, Ι:ΙΟΥΝΙΟΣ, Ν:ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ.



ΠΟΤΑΜΟΣ ΚΑΛΑΜΑΣ

ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ	Γ	Φ	M	A	M	I	I	N
T(°C)	11,8	12,3	12,2	12,3	12,5	12,8	13,2	11,9
SpC(μs/cm)	1811	1877	1826	1872	1877	1889	1892	1907
TDS(g/l)	1,160	1,117	1,169	1,199	1,117	1,209	1,211	1,221
DO(mg/l)	4,3	4,1	4,5	3,9	4,7	3	2,9	3,3
PH	6,6	6,43	6,34	6,31	6,49	6,53	6,62	6,3
BOD ₅	0	1	0	1	2	4	3	1
NO ₃ ⁻	0,3	-	0,4	-	0,2	-	0,4	-
NO ₂ ⁻	0,005	-	0,009	-	0,008	-	0,017	-
NH ₄ ⁺	2,37	-	0,44	-	0,69	-	0,71	-

Γ:ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ, Φ:ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ, Μ:ΜΑΡΤΙΟΣ, Α:ΑΠΡΙΛΙΟΣ, Μ:ΜΑΙΟΣ, Ι:ΙΟΥΝΙΟΣ, Ι:ΙΟΥΛΙΟΣ, Ν:ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ.



ΠΟΤΑΜΟΣ ΒΟΙΔΟΜΑΤΗΣ

ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ	Γ	Φ	Μ	Α	Μ	Ι	Ι	Ν
T(°C)	8,1	8,5	9	9,3	10,25	11,22	11,1	10
SpC(μs/cm)	268,8	277,8	281,2	278,5	277	278,2	279,3	280
TDS(g/l)	0,1721	0,1779	0,1800	0,1783	0,1774	0,1781	0,1788	0,1794
DO(mg/l)	9,63	9,32	9,17	8,92	9,01	8,95	8,7	8,4
PH	7,29	7,18	7,11	7,22	7,18	7,21	7,32	7,41
BOD ₅	0	0	0	0	0	1	1	0
NO ₃ ⁻	0,2	-	0,1	-	0,3	-	0,1	-
NO ₂ ⁻	0,004	-	0,009	-	0,004	-	0,006	-
NH ₄ ⁺	0,03	-	0,04	-	0,0	-	0,0	-

Γ:ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ, Φ:ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ, Μ:ΜΑΡΤΙΟΣ, Α:ΑΠΡΙΛΙΟΣ, Μ:ΜΑΙΟΣ, Ι:ΙΟΥΝΙΟΣ, Ν:ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ.



ΠΟΤΑΜΟΣ ΛΟΥΡΟΣ

ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ	Γ	Φ	M	A	M	I	I	A	Σ	O	N	Δ
T(°C)	11,91	12,41	13,03	13,11	13,17	13,66	13,78	13,93	12,98	12,31	12,21	11,73
SpC(μs/cm)	345,4	347,2	345,1	354,8	346,1	354,2	345,4	347,2	344,3	349,9	345,8	356,2
TDS(g/l)	0,2209	0,2207	0,2209	0,2269	0,2201	0,2265	0,2209	0,2207	0,2204	0,2239	0,2212	0,2278
DO(mg/l)	9,23	9,35	9,74	9,1	8,14	8,21	8,18	7,83	8,3	8,8	9,01	9,23
PH	7,43	7,38	7,27	7,31	7,11	7,16	7,27	7,25	7,32	7,39	7,41	7,31
BOD ₅	1	0	1	0	0	1	2	2	2	1	0	0
NO ₃ ⁻	0,6	0,7	0,7	0,5	0,6	0,6	0,7	0,6	0,5	0,5	0,3/	0,4
NO ₂ ⁻	0,008	0,008	0,003	0,004	0,009	0,012	0,007	0,009	0,007	0,003	0,004	0,002
NH ₄ ⁺	0,09	0,02	0,05	0,19	0,13	0,11	0,17	0,38	0,12	0,15	0,12	0,03

Γ:ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ, Φ:ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ, Μ:ΜΑΡΤΙΟΣ, Α:ΑΠΡΙΛΙΟΣ, Μ:ΜΑΙΟΣ, Ι:ΙΟΥΝΙΟΣ, Ι:ΙΟΥΛΙΟΣ, Α:ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ,
Σ:ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ, Ο:ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, Ν:ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ, Δ:ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ



ΡΕΜΑ ΣΟΥΛΟΥ (ΠΙΤΟΛΕΜΑΙΔΑ)

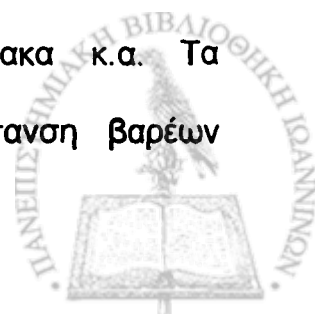
ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ	Γ	Φ	M	A	M	I	I	Σ	O	N	Δ
T(°C)	13,2	13,45	13,4	13,9	13,7	17,9	19,9	18,1	15,2	14,78	14
SpC(μs/cm)	1012	1028	1075	1056	1009	1028	1037	1060	1037	1098	1029
TDS(g/l)	0,6531	0,6575	0,6873	0,6755	0,6517	0,6573	0,6631	0,6771	0,6606	0,702	0,6587
DO(mg/l)	6,12	5,11	5,67	5,78	5,09	5,88	5,23	5,01	5,98	5,87	5,57
PH	7,58	7,65	7,47	7,39	7,41	7,35	7,44	7,22	7,44	7,51	7,41
BOD ₅	1	2	1	1	2	2	3	3	4	4	2
NO ₃ ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO ₂ ⁻	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NH ₄ ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Γ:ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ, Φ:ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ, Μ:ΜΑΡΤΙΟΣ, Α:ΑΠΡΙΛΙΟΣ, Μ:ΜΑΙΟΣ, Ι:ΙΟΥΝΙΟΣ, Ι:ΙΟΥΛΙΟΣ, Σ:ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ,
Ο:ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, Ν:ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ, Δ:ΔΕΚΕΜΒΡΙΟ**

7.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μικροοργανισμοί έχουν την τάση να προσκολλώνται στα αιωρούμενα σωματίδια και να σχηματίζουν συσσωματώματα. Σειρά βιολογικών διεργασιών εξουδετερώνουν τη χερσαία μικροβιακή ρύπανση. Στο νερό και ειδικά στην θάλασσα οι μικροοργανισμοί των λυμάτων βρίσκονται σε άξενο περιβάλλον και αυτό οδηγεί, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, στην αδρανοποίηση τους. Εν τούτοις, όταν οι ποσότητες των αποβλήτων που εισέρχονται στο υδάτινο σύστημα είναι μεγάλες, η ικανότητα του οικοσυστήματος να εξουδετερώνει τις ξένες ουσίες - και τους μικροοργανισμούς - δεν επαρκεί και η μικροβιακή μόλυνση είναι ικανή να επηρεάσει την υγεία των ανθρώπων.

Η μόλυνση του νερού μπορεί να έχει διάφορες πηγές, οι κυριότερες από τις οποίες είναι: Αστικά λύματα, Βιομηχανικά απόβλητα, οικιακά απορριμμάτα. Η μόλυνση άρχισε από τότε που δημιουργήθηκαν οικισμοί και συστήματα αποχέτευσης. Στο νερό τα υγρά απορρίμματα προξενούν ρύπανση φυσικής, χημικής ή βιολογικής προέλευσης. Η ρύπανση ως προς τις φυσικές παραμέτρους του νερού συνίσταται σε αλλαγή της θερμοκρασίας του. Ως προς τη χημική τους υφή τα λύματα περιέχουν πολυάριθμες και συμπλοκές ενώσεις του αζώτου από τα απορρίμματα του ανθρώπου, απορρυπαντικά, τα χημικά που συνήθως βρίσκονται στα δίκτυα ύδρευσης. Τα βιομηχανικά απόβλητα που φθάνουν στο νερό επιβαρύνουν με υδρογονάνθρακες, ανόργανα ιόντα, οξέα, αλκάλια, ακόμα και δηλητηριώδεις, τοξικές ή ραδιενεργές ουσίες, εντομοκτόνα, φυτοφάρμακα κ.α. Τα οικοσυστήματα λιμνών είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στη ρύπανση βαρέων



μετάλλων, και η βιοσυσσώρευσή τους καθώς επίσης και η βιοενίσχυση είναι πάντα μια απειλή (Kalfakakou, 1983). Στα Ιωάννινα υπάρχει ένα σύστημα 14 αγωγών που εκβάλλουν στη λίμνη. Μεταφέρει ρύπους όπως ο Pb, ο Hg, ο Zn σε υψηλές συγκεντρώσεις και άλλα τοξικά μέταλλα που προέρχονται από τα καύσιμα, τον άνθρακα, τα παλιά χρώματα σπιτιών και τις στέγες. Οι διαβρωτικές όξινες βροχές μπορούν να διαλύσουν τα βαρέα μέταλλα μέσω της επαφής με τις μεταλλικές επιφάνειες. Αυτές οι τοξικές προσμίξεις καταλήγουν στη λίμνη συμβάλλοντας έτσι στη ρύπανσή της. Η βιοενίσχυση βαρέων μετάλλων πραγματοποιείται μέσω της τροφικής αλυσίδας (Kalfakakou, 1983). Τα βιολογικά λύματα περιέχουν μεγάλους αριθμούς μικροοργανισμών σε περιοχές τροπικές και υποτροπικές που υποφέρουν από παρασιτώσεις, αυγά παρασίτων. Ο συνολικός αριθμός βακτηριδίων στα λύματα έχει υπολογιστεί ότι είναι της τάξης των 10^6 έως $10^7 / \text{cm}^3$. από τα οποία περίπου $10^5 / \text{cm}^3$ ή κατ' άλλους 10^6 έως $10^{11} / 100 \text{ cm}^3$ είναι *E.coli* (Bellair et al, 1977).

Κάθε χερσαίος οργανισμός είτε προέρχεται από έκπλυση του εδάφους, είτε από φυτά, ζώα ή τον άνθρωπο, φτάνει στο νερό με τη μορφή ρύπανσης. Η παρουσία μικροοργανισμών στο νερό είχε παρατηρηθεί και μελετηθεί ήδη από τον προηγούμενο αιώνα.

Με την είσοδο τους στο νερό, οι χερσαίες προέλευσης μικροοργανισμοί βρίσκονται σε άξενο περιβάλλον, όχι ευνοϊκό για τη διατήρηση της ζωτικότητάς τους. Η ελάττωση των εντερικών μικροοργανισμών που βρίσκουν τον δρόμο προς το νερό επιτυγχάνεται με συνδυασμό των εξής τριών παραγόντων: αρχική μεγάλη αραιώση στο νερό, επακολουθούσα αραιώση, θάνατος ή τραυματισμός των μικροοργανισμών (Paparetropoulou M, 1997).



Ο βαθμός και η έκταση της μικροβιολογικής μόλυνσης του νερού στις ακτές εξαρτάται από παράγοντες όπως: οι τοπογραφικές ιδιομορφίες της περιοχής που εκβάλλουν λύματα, κλιματικοί παράγοντες (άνεμοι που επικρατούν στην περιοχή και οι οποίοι με τον κυματισμό και τα επιφανειακά ρεύματα που δημιουργούν συμβάλλουν στη διασπορά των λυμάτων), βροχόπτωση (συντελεί αφενός στην αραίωση τους και αφετέρου στην έκπλυση από τη στεριά και την επιβάρυνση του νερού με ακαθαρσίες), ηλιοφάνεια (υπεριώδης ακτινοβολία), θερμοκρασία, οσμωτική πίεση κ.ά. Τα παθογόνα έρχονται στο υδάτινο περιβάλλον είτε από σημειακές πηγές (point sources όπως αγωγοί λυμάτων, ποταμοί, βιομηχανίες (Godfree, 1997), είτε από μη σημειακές πηγές (non point sources) όπως έκπλυση εδαφών από βροχή, κόπρανα κ.τ.λ (Jones & Obiri-Danso, 1999).

Σε γενικές γραμμές οι περισσότερες από τις κοινωνικοοικονομικές συνέπειες της μόλυνσης του νερού μπορούν να εκφραστούν με όρους άμεσων ή μακροπρόθεσμων επιπτώσεων στην υγεία του ανθρώπου. Με αυτή την έννοια οι τύποι ανθρώπινης έκθεσης στους μολυσματικούς παράγοντες του νερού είναι κυρίως: η κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων και η απευθείας επαφή με το μολυσμένο νερό. Σε μερικές περιπτώσεις όπου το νερό, μετά από επεξεργασία, χρησιμοποιείται σαν πόσιμο, η μόλυνση του επίσης συνιστά κίνδυνο για την υγεία.

Αν και η ύπαρξη των αναερόβιων βακτηριδίων ήταν γνωστή από τον τελευταίο αιώνα, έχει υπάρξει μια αυξανόμενη συνειδητοποίηση της σημασίας τους κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 ετών. Στις μέρες μας αναγνωρίζεται ότι οι αναερόβιοι οργανισμοί αποτελούν ένα σημαντικό συστατικό της κανονικής χλωρίδας στο άτομο και άλλα ζώα, ότι περιλαμβάνουν πολλά



σημαντικά παθογόνα, και ότι τα αναερόβια βακτηρίδια είναι παρόντα σε πολλά διαφορετικά φυσικά περιβάλλοντα όπου εκθέτουν τις σημαντικές μεταβολικές δραστηριότητες. (Parapetrovou, 1997).

Η συντριπτική πλειοψηφία των υδρόβιων μικροοργανισμών είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για το θαλάσσιο περιβάλλον. Εκτός από τη σημασία τους στην περιβαλλοντική ρύπανση και ως αιτιολογικούς παράγοντες σε ορισμένους τύπους διαβρώσεων, τα αναερόβια βακτηρίδια διαδραματίζουν έναν ζωτικής σημασίας ρόλο σε διαδικασίες όπως η πέψη των αποβλήτων και η παραγωγή του μεθανίου. Τα αναερόβια μικρόβια είναι αρμόδια για την ανάπτυξη των ανοξικών όρων στα υδρόβια περιβάλλοντα. Μπορούν επιπλέον να αναπτυχθούν περαιτέρω στο περιβάλλον και να επιτρέψουν έτσι μια ευρύτερη ποικιλία των αναερόβιων βακτηριδίων. (Parapetrovou, 1997).

Τα εντεροβακτήρια, τα κοπρανώδη εντεροβακτήρια και οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι καθώς και το *C. perfringens* είναι αποδεκτό ότι αποτελούν βακτηριακούς δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης του νερού (ΑΡΗΑ 1985).

Το *C. perfringens* έχει συνδεθεί με τα ανθρώπινα και ζωικά απόβλητα και διανέμεται ευρέως στα περιττώματα, τα λύματα και το μολυσμένο ύδωρ (Sorensen et al, 1989). Το *C. perfringens* χρησιμοποιείται σε πολλές χώρες για να ανιχνεύσει την περιττωματική ρύπανση παλαιάς προέλευσης (Pinfold 1990) αλλά δεδομένου ότι ο οργανισμός εκκρίνεται και από τους ανθρώπους και από τα ζώα, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συγκεκριμένος οργανισμός δεικτών για να διακρίνει την ανθρώπινη και ζωική περιττωματική μόλυνση (Oragui και Mara 1983).



Η γνώση της μικροβιακής ποικιλομορφίας και των χημικών παραμέτρων των υδρόβιων συστημάτων είναι σημαντική στην κατανόηση των πιθανών ρόλων που οι μικροοργανισμοί διαδραματίζουν στη βιόσφαιρα. Επιπλέον, είναι σημαντικό να ελεγχθεί η ανθρώπινη ή ζωική κοπρανώδης μόλυνση του περιβάλλοντος στα υδρόβια συστήματα και ορισμένοι μικροβιακοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα στην εξέταση του ύδατος (stuart et al. 1976 Oragui et mara 1983 , Sorensen et al. 1989 Bezirtzoglou et al 1997).

Τα τελευταία χρόνια, οι ερευνητές έχουν υιοθετήσει μεθόδους βασισμένες στη μοριακή φυλογένεση ως μέσα αξιολόγησης της ποικιλομορφίας και της διανομής βακτηρίων στα υδρόβια οικοσυστήματα (Giovannoni et al,1990,Fuhrman et al, 1993). Αυτές οι μέθοδοι στηρίζονται κυρίως επάνω στις πληροφορίες ακολουθίας των γονιδίων που συντηρούνται παγκοσμίως. Οι ακολουθίες νουκλεοτιδίων του rRNA έχουν χρησιμοποιηθεί για να αναπτύξουν τους συγκεκριμένους ελέγχους βακτηρίων (DeLong et al ,1989, Hiorns et al,1997, Ovreas et al,1997). Μέχρι τώρα οι περισσότερες προσεγγίσεις που εξετάζουν την απομόνωση και την ταξινόμηση των βακτηριδίων οφείλονται στους υψηλούς αριθμούς βακτηριδίων που είναι μη καλλιεργήσιμοι (Giovannoni et al,1990, Ward et al 1990). Εντούτοις, υπάρχει ανάγκη για μια γρήγορη και απλή τεχνική που δεν προσδιορίζει απαραίτητως τα μεμονωμένα είδη αλλά διαφοροποιεί τις βακτηριακές κοινότητες που ενδιαφέρουν την δημόσια υγεία.

Για την απομόνωση και απαρίθμηση των υδρόβιων αερόβιων μικροβίων ή τους αναερόβιων μικροοργανισμών πρέπει να αντιμετωπίσουν διάφορες δυσκολίες, όπως ο μικρός αριθμός μικροοργανισμών λόγω της



διάλυσης και των μορφολογικών ενζυματικών και δομικών αλλαγών τους που αντανακλούν τις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες και που οδηγούν, στις περισσότερες περιπτώσεις, σε τραυματισμένες-μη καλλιεργήσιμες μορφές. (Nicolopoulou A., Zoumbou K., Papageorgakopoulou N. and Papapetropoulou M., 1994)

Το *C.perfringens* επιζεί επί μακρόν σε μολυσμένα νερά και για το λόγο αυτό θεωρείται εξαιρετος δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης παλαιάς προέλευσης.

Παρά τους υψηλούς αριθμούς βακτηρίων στις λίμνες και τα χαμηλά επίπεδα στους πληθυσμούς του *C.perfringens* τα αποτελέσματα που παίρνονται με χρήση του θρεπτικού υλικού LS το καταδεικνύουν ως υψηλά εκλεκτικό μέσον. (Beerens et al 1978, Romond et al 1981)

Το *C.perfringens* και ειδικότερα οι σπόροι του, που είναι περισσότερο ανθεκτικοί σε μεγαλύτερο εύρος φυσικοχημικών επιδράσεων μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης οικοσυστημάτων που έχουν υποστεί διαταραχές με την επίδραση κοπρανώδους μόλυνσης. (Hirn et al 1980).

Δεδομένου ότι τα περισσότερα βακτηρίδια στο ύδωρ είναι μη ανιχνεύσιμα (CFU < 1%) ή υπάρχουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα, υπάρχει ανάγκη για γρήγορες και απλές τεχνικές που δεν προσδιορίζουν απαραίτητως τα μεμονωμένα είδη αλλά μπορούν να διαφοροποιήσουν τις βακτηριακές κοινότητες από την άποψη των συστατικών τους.

Το υγρό θρεπτικό υλικό LS, (Bezirtzoglou και Romond 1990, Bezirtzoglou et al, 1995, 1996, 1997) παρέχει την δυνατότητα ανίχνευσης πολύ μικρών αριθμών του *C.perfringens* σε δείγματα νερών ποταμών και λιμνών, τα οποία συνήθως περιέχουν μεγάλο αριθμό βακτηρίων.



Επίσης τα διαχωρίζει εκλεκτικά από άλλα είδη κλωστηριδίων. Επιτρέπει τον εξειδικευμένο προσδιορισμό του βακτηρίου *C.perfringens* σε 24 ώρες ή στην περίπτωση των σπορογόνων μορφών σε 3 ημέρες.(Romond et al 1981, Bezirtzoglou E.,1994,1995,1997,1999. Bezirtzoglou και Romond 1990). Επιπλέον, περαιτέρω ταυτοποίηση του μικροοργανισμού δεν απαιτείται και η ευαισθησία και εκλεκτικότητα του θρεπτικού υλικού αποτελούν σημαντικά πλεονεκτήματα της διαδικασίας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έρχονται σε συμφωνία και με εργασίες παραπλήσιες για ακραία οικοσυστήματα (Δρακόλιμνη-Savnaidis et al 2001)-.(Ανταρκτική- Edwards et al1998). Στις εργασίες αυτές αναφέρεται έρευνα για τη μικροβιακή χλωρίδα της αλπικής λίμνης Δρακόλιμνη της οροσειράς της Πίνδου και του σταθμού McMurdo στην Ανταρκτική. Για την μεν Δρακόλιμνη αναφέρεται μια ποιοτική και ποσοτική μελέτη των επιπέδων μιας σειράς ιόντων μετάλλων και του *C.perfringens* των ακραίων υδρόβιων περιβαλλόντων λιμνών βουνών(Δρακόλιμνη).Θα ήταν δε ιδιαίτερα απίθανο να αναμένονται υψηλοί αριθμοί παθογόνων μικροοργανισμών γενικά στα ακραία περιβάλλοντα (6.000 ft). Αυτό οφείλεται και στις περιορισμένες ανθρώπινες δραστηριότητες και επίσης στις αυστηρές κλιματολογικές συνθήκες, ειδικά κατά τη διάρκεια του χειμώνα με τις χαμηλές θερμοκρασίες ύδατος και αέρα, καθιστώντας το κατά συνέπεια μάλλον αδύνατο για τους περισσότερους κοινούς μικροοργανισμούς να επιζήσουν ή ακόμα και να είναι παρόντες σε υψηλούς αριθμούς. Τα αποτελέσματα από αυτήν εργασία αποκάλυψαν χαμηλούς αριθμούς για τα συνολικά κολοβακτηρίδια, κοπρανώδη κολοβακτηρίδια, κοπρανώδεις στρεπτόκοκκους στα υδάτινα δείγματα της αλπικής λίμνης Δρακόλιμνη. Οι ανθρώπινες δραστηριότητες είναι



περιορισμένες στους εποχιακούς γεωργικούς στόχους, πρώτιστα να βοηθήσουν τα ζώα από τα τέλη της άνοιξης μέχρι την πρόωρη περίοδο του φθινοπώρου (Savvaidis et al 2001). Είναι επίσης πιθανό ότι οι αριθμοί μικροοργανισμών δεικτών στις λίμνες και τα ποτάμια μπορούν ελαφρώς να αυξηθούν, ως αποτέλεσμα των ανθρώπινων επισκεπτών και των σχετικών ψυχαγωγικών δραστηριοτήτων όπως η πεζοπορία ή/και η οδοιπορία σε αυτές τις περιοχές.

Το θαλάσσιο περιβάλλον που περιβάλλει το σταθμό McMurdo είναι μοναδικό και παλιό. Ο σταθμός McMurdo στην Ανταρκτική αποτελεί τη μεγαλύτερη κοινότητα στην ήπειρο, έχει απελευθερώσει δε μη επεξεργασμένα απόβλητα στο υδάτινο περιβάλλον για πολλές δεκαετίες. Αυτή η πρακτική έχει τη δυνατότητα να υποβαθμίσει το περιβάλλον (Grimes, et al 1984, Hill, et al, 1996, Lenihan, et al 1990, Het et al 1995.), να μολύνει τα γηγενή είδη (Matches, et al 1974.), και να μολύνει το νερό που προορίζεται για το πόσιμο σύστημα του σταθμού (McFeters, et al 1993., Howington, et al 1992. Venkatesan, and Mirsadeghi. 1992.). Αυτές οι παρατηρήσεις που απορρέουν από αυτήν την εργασία προτείνουν ότι η διάθεση των λυμάτων και τα σχετικά προβλήματα αξίζουν περισσότερη προσοχή σε αυτό το ακραίο και εύθραυστο θαλάσσιο περιβάλλον. Τα αποτελέσματα της συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής σε ότι αφορά την χωρική κατανομή του *C.perfringens*.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, με βάση τη μέθοδο φιλτραρίσματος σε μεμβράνη και καλλιέργεια στο υγρό θρεπτικό υλικό LS, το *C. perfringens* εμφανίζεται στις λίμνες περισσότερο με τη βλαστική του μορφή και λιγότερο με την σπορογόνο μορφή. Έτσι το ποσοστό θετικότητας του



C. perfringens είναι για την λίμνη της Καστοριάς 25% για τις βλαστικές μορφές και 16,67% για τις σπορογόνες. Ομοίως για την λίμνη των Ιωαννίνων οι βλαστικές μορφές εμφανίζονται συχνότερα με ποσοστό θετικότητας 30% έναντι του ποσοστού θετικότητας για τις σπορογόνες μορφές που είναι μόνο 15,55%.

Τα επίπεδα του *C.perfringens* σε δείγματα που θερμαίνονται μετά τον εμβολιασμό τους στους 80°C για 20 λεπτά, με σκοπό την ανίχνευση σπορογόνων μορφών, παρουσιάζονται συχνότατα θετικά περί την 4^η ημέρα επώασης τους, πιθανόν λόγω της μετατροπής των σπορογόνων μορφών σε βλαστικές, αλλά και λόγω του γεγονότος ότι κάποιες βλαστικές μορφές είχαν υποστεί σπορογονία κατά την θέρμανση και κατά την επώαση μετέπεσαν και πάλι σε βλαστικές μορφές (Bezirtzoglou E.,1994,1995,1997,1999.). Οι βλαστικές μορφές ανιχνεύονται διότι αυτές είναι μεταβολικά ενεργές.

Αντιθέτως στα ποτάμια οικοσυστήματα εμφανίζονται περισσότερο οι σπορογόνες μορφές του βακτηρίου έναντι των βλαστικών μορφών.

Έτσι στον Αώο οι σπορογόνες μορφές του βακτηρίου εμφανίζονται συχνότερα με ποσοστό θετικότητας 33% έναντι των βλαστικών μορφών που έχουν ποσοστό θετικότητας 20%.

Στον Βοϊδομάτη εξάλλου, που όπως φαίνεται αποτελεί το λιγότερο επιμολυσμένο οικοσύστημα απ' αυτά που εξετάζονται στην διατριβή αυτή εμφανίζεται το βακτήριο μόνο σε σπορογόνο μορφή με πολύ μικρό ποσοστό θετικότητας, μόλις 6,6%.

Στον ποταμό Λούρο εξάλλου οι σπορογόνες μορφές βρίσκονται συχνότερα με ποσοστό θετικότητας 36,8% έναντι των βλαστικών μορφών (24,56%).



Εξαίρεση αποτελεί ο ποταμός Καλαμάς στον οποίο ανευρίσκεται πιο συχνά το *C. perfringens* με την βλαστική του μορφή (47,5%) έναντι της σπορογόνου μορφής (32,5%). Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι ο ποταμός αυτός έρχεται σε επαφή με τη Λίμνη των Ιωαννίνων, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την εξαίρεση αυτή.

Στο ρέμα Σουλού στην περιοχή της Πτολεμαΐδας εμφανίζονται το ίδιο συχνά τόσο οι βλαστικές όσο και οι σπορογόνες μορφές του βακτηρίου με ποσοστά θετικότητας (29,16%).

Έτσι ως προς την κατανομή του *C. perfringens* ανεξαρτήτως χώρου και χρόνου, όπως φαίνεται (Πίνακες, 4, 10, 16, 22, 28, 34, 40), (Διαγράμματα 1Α, 2Α, 3Α, 4Α, 5Α, 6Α και 7Α) που αντιστοιχούν στην Καστοριά, Ιωάννινα, Αώος, Βοϊδομάτης, Καλαμάς, Λούρος και ρέμα Σούλου (Πτολεμαΐδα), διαφαίνεται ότι στις μεν Λίμνες Ιωαννίνων και Καστοριάς επικρατούν οι βλαστικές μορφές στα δε ποτάμια οι σπορογόνες.

Εάν συνδυαστεί το παραπάνω συμπέρασμα με τις μετρήσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων απ' όπου φαίνεται ότι παρέχονται ευνοϊκότερες συνθήκες για την ανάπτυξη μικροοργανισμών στα λιμνιαία οικοσυστήματα παρέχεται ικανοποιητική εξήγηση για την συχνότερη εμφάνιση βλαστικών μορφών στις λίμνες.

Έτσι με προσεκτική μελέτη του Πίνακα 43 που αποδίδει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ενός λιμνιαίου οικοσυστήματος (λίμνη Ιωαννίνων) φαίνεται ότι οι υψηλές τιμές BOD που υποδηλώνουν ότι υπάρχει αρκετή ποσότητα οργανικής ύλης, οι ευνοϊκές υψηλές θερμοκρασίες ιδιαίτερα κατά τους θερινούς μήνες, η μικρή ποσότητα του διαλυτού O₂ ιδιαίτερα το καλοκαίρι, αποτελούν παραμέτρους που καθιστούν την βλάστηση των τυχόν



σπορογόνων μορφών ευκολότερη. Προφανώς έτσι δίνεται μια ικανοποιητική εξήγηση για το υψηλότερο ποσοστό θετικότητας των βλαστικών μορφών έναντι των σπορογόνων στις λίμνες.

Αντίθετα εξετάζοντας τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ποτάμιων οικοσυστημάτων διαπιστώνεται ότι το θερμοκρασιακό εύρος είναι μικρότερο, το διαλυτό οξυγόνο παραμένει σχεδόν σταθερά σε υψηλά επίπεδα, το BOD είναι σχετικά χαμηλό και έτσι οι σπορογόνες μορφές δεν βλασταίνουν τόσο εύκολα, αφού οι «στρεσογόνοι» παράγοντες ανευρίσκονται σταθερά στα ποτάμια οικοσυστήματα. (Bezirtzoglou E., 1994, 1995, 1997, 1999.).

Σ' ότι αφορά την χρονική κατανομή των μορφών του *C. perfringens* που φαίνεται στα (σχήματα 1B, 2B, 3B, 4Γ, 5Γ, 6Γ, 7Γ) υπάρχει ένα σαφές πρότυπο βλάστησης των σπορογόνων μορφών στις λίμνες.

Παρατηρώντας τις καμπύλες στα σχήματα 1Γ και 2Γ που αφορούν τις λίμνες Καστοριάς και Ιωαννίνων είναι χαρακτηριστική η αύξηση της κλίσης της καμπύλης για τις βλαστικές μορφές κατά τους καλοκαιρινούς και φθινοπωρινούς μήνες. Έτσι διαφαίνεται ένας κύκλος ζωής του βακτηρίου στα λιμναία οικοσυστήματα.

Ο κύκλος ζωής συνίσταται στη συχνότερη εμφάνιση των σπορογόνων μορφών κατά τους χειμερινούς και ανοιξιάτικους μήνες και συχνότερη εμφάνιση των βλαστικών μορφών κατά τους θερινούς και φθινοπωρινούς μήνες.

Αντίθετα στα ποτάμια οικοσυστήματα δεν φαίνεται εύκολα αυτός ο εποχιακός κύκλος ζωής.

Εξετάζοντας χωρικά την κατανομή του *C. perfringens* σε σχέση με τα σημεία δειγματοληψίας είναι ολοφάνερο ότι κάποια σημεία είναι περισσότερο



επιμολυσμένα από άλλα υποδεικνύοντας σημειακές και μη πηγές κοπρανώδους μόλυνσης.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι υπάρχει έντονα χωρική και χρονική εξάρτηση των μορφών του βακτηρίου στις λίμνες. Στα δε ποτάμι η εξάρτηση αυτή φαίνεται να είναι περισσότερο χωρική.

Το ποσοστό θετικότητας του βακτηρίου στην 2^η αραίωση υποδεικνύει υψηλούς αριθμούς του βακτηρίου και άρα εντονότερη μόλυνση, όπου ανεβρέθηκε.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την παρούσα διατριβή μπορούν να συνδυαστούν και με την γενικότερη μακροσκοπική εικόνα των οικοσυστημάτων που εξετάστηκαν. Έτσι τα νερά των λιμνών στα περισσότερα σημεία που είναι παρόχθια είναι υποπράσινα-υποκίτρινα. Σε όλα τα σημεία η ένταση ποικίλει αναλόγως της εποχής και της ύπαρξης ή μη φυτοπλαγκτού. Πάντως εξαιτίας των βροχοπτώσεων που συμβαίνουν η χροιά αυτή εξασθενίζει ενώ το καλοκαίρι με την συνήθη ανομβρία η χροιά γίνεται εντονότερη.

Η ένταση της χροιάς εξαρτάται και από την ποσότητα του φυτοπλαγκτού. Συνήθως γίνεται πιο έντονη από τον Ιούνιο μέχρι το Νοέμβρη. Πάντως το υποκίτρινο-υποπράσινο χρώμα είναι πιο έντονο στα σημεία όπου υπάρχουν καλάμια. Αυτό γιατί υπάρχει περισσότερο φυτοπλαγκτόν. Άλλωστε οι καλάμινες είναι δείγμα ευτροφισμού όπου λόγω υπερβολικής ποσότητας, P, N υπεραυξάνονται τα υδρόβια φυτά κάνοντας περισσότερο ανοξικό το υδρόβιο περιβάλλον και θέτουν πιο ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του *C. perfringens*.



Στα βαθιά σημεία και ειδικά τις εποχές που η λίμνη είχε ικανοποιητική ποσότητα νερού το χρώμα είναι κυανό. Γενικά πάντως στις λίμνες η χροιά βελτιώνεται μετά από βροχοπτώσεις και αφού εκλείψει η θολερότητα, τους χειμερινούς μήνες, μετά από θελλώδεις ανέμους και αφού εκλείψει ο κυματισμός.

Στα ποτάμια οικοσυστήματα όπου δε λαμβάνουν χώρα τόσο έντονα φαινόμενα ευτροφισμού η χροιά είναι περισσότερο κυανή.

Εξάλλου ενώ στις λίμνες η χροιά ποικίλλει κατά περιοχή και ανάλογα με την εποχή του έτους, αλλά και τις κλιματολογικές συνθήκες, στα ποτάμια το νερό είναι σχεδόν πάντα διαυγές.

Ειδικά στους καλαμώνες η διαύγεια εξαφανίζεται παντελώς ενώ από τα μέσα Μάη έως και το Νοέμβρη η διαύγεια του νερού των λιμνών είναι μειωμένη, πιθανώς επειδή πλεονάζει η αιωρούμενη οργανική ύλη, αυτό φαίνεται και από τις τιμές του BOD.

Αντίθετα στα ποτάμια όπου οι τιμές του BOD είναι σαφώς μικρότερες η διαύγεια είναι μεγαλύτερη.

Εξάλλου τα νερά των λιμνών αναδίδουν ελαφρώς οσμή ευρώτος από την σήψη της οργανικής ύλης. Η οσμή της αποσυντιθέμενης οργανικής ύλης γίνεται εντονότερη το καλοκαίρι, καθώς και ανάμεσα από τους καλαμώνες.

Μια θεμελιώδης κατανόηση των υδρόβιων οικοσυστημάτων απαιτεί τη γνώση της ποικιλομορφίας, της διανομής και της λειτουργίας των βακτηριδίων λόγω της σημασίας τους στην αποσύνθεση, στις τροφικές αλυσίδες και στους βιογεωχημικούς κύκλους, όμως οι έρευνες για τα του γλυκού νερού συστήματα λιμνών και ποταμών είναι σημαντικά λιγότερες από εκείνες των



θαλασσίων περιβαλλόντων και ισοδύναμα συμπεράσματα δεν έχουν εξαχθεί (Hiorns et al, 1997, Friedrich et al, 1999).

Η μελέτη της βακτηριακής ποικιλομορφίας έχει στηριχθεί μέχρι τώρα στις συμβατικές μεθόδους και τεχνικές για την καλλιέργεια και τον προσδιορισμό των μικροοργανισμών, και επίσης στις μοριακές και γενετικές τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί κατά τη διάρκεια της προηγούμενης δεκαετίας (Pace et al, 1986, Muyzer et Ramsing, 1995). Εντούτοις, γενικά, λίγα είναι γνωστά για τη σύνθεση ειδών και την παραλλαγή τους, και αυτό οφείλεται κυρίως στην έμφυτη δυσκολία των μικροοργανισμών για καθαρές καλλιέργειες έξω από τα περιβάλλοντά τους (Giovannoni et al, 1990, Ward et al, 1990).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που προέρχονται από την μέθοδο FISH με τα αποτελέσματα από την χρήση του υγρού μέσου LS βγαίνουν τα εξής συμπεράσματα:

Στο σημείο 1 που αντιστοιχεί στον Μώλο της λίμνης των Ιωαννίνων με την δε μέθοδο LS εμφανίζονται τα ποσοστά θετικότητας για το *C. perfringens* ως 53,33% στην 1^η αραίωση, 13,33% στην 2^η αραίωση και 33,33% στην 1^η αραίωση στις σπορογόνες μορφές.

Η FISH μέθοδος για τον ίδιο σταθμό και για τον μήνα Ιούνιο έδωσε συγκρίσιμα αποτελέσματα με τη μέθοδο LS για τον μήνα Ιούνιο όπου: τα ποσοστά θετικότητας είναι ως εξής: b₁: 41,6%, b₂: 8,33% και S: 8,33%.

Έτσι για τον σταθμό 1 με την αερόβια μεταφορά του δείγματος ενώ οι βλαστικές μορφές του *C. perfringens* είναι 36 κύτταρα/250 ml δείγματος, οι σπορογόνες είναι 11 κύτταρα /250ml δείγματος, για την αερόβια μεταφορά οι βλαστικές μορφές είναι 45 κύτταρα /250ml.



Δηλαδή από την μεν μέθοδο LS φαίνεται ότι το βακτήριο εμφανίζεται και στην 2^η αραίωση για τις βλαστικές μορφές, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη πυκνότητα βλαστικών μορφών, ενώ στις σπορογόνες μορφές. εμφανίζεται μόνο στην 1^η αραίωση.

Η δε μέθοδος FISH επαληθεύει επακριβώς αυτά τα αποτελέσματα και επιπλέον ποσοτικοποιεί αυτά τα αποτελέσματα.

Ενώ δηλαδή η μέθοδος LS είναι περισσότερο ποιοτική και ημιποσοτική η μέθοδος FISH είναι καθαρά ποσοτική.

Στον δε σταθμό 2 που από την μέθοδο LS φαίνεται λιγότερο επιμολυσμένος από τον σταθμό 1 τα αποτελέσματα επαληθεύονται από την μέθοδο FISH όπου για την μεν αερόβια μεταφορά φαίνεται ότι οι βλαστικές μορφές που βακτηρίου είναι 11 κύτταρα /250ml και οι σπορογόνες 3 κύτταρα /250ml, ενώ για την αναερόβια μεταφορά 15 κύτταρα /250ml και 7 κύτταρα /250ml αντίστοιχα.

Έτσι συνοψίζοντας για την σύγκριση των δύο μεθόδων μπορεί να παρατεθεί ο πίνακας που φαίνεται παρακάτω.

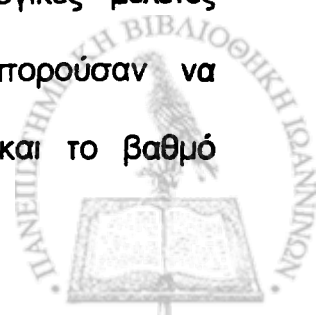


Η μικροβιακή χλωρίδα των επιφανειακών υδάτων είναι εξαιρετικά πλούσια σε αριθμό και ποικίλλει σε είδη μικροοργανισμών. Περιλαμβάνει μικρόβια τα οποία διαβιώνουν φυσικά στο νερό, όπως θειοβακτηρίδια, σιδηροβακτηρίδια, φθορίζοντα βακτήρια, σαπροφυτικά μικρόβια του εδάφους τα οποία εισρέουν στο νερό από βροχή κ.ά. Στα σαπροφυτικά μικρόβια υπάγονται σπορογόνοι μύκητες, βλαστομύκητες, αερόβιοι σπορογόνοι βάκιλλοι, νιτροβακτηρίδια, σπόροι αναερόβιων μικροοργανισμών και κλωστηριδίων. Οι περισσότεροι από τους μικροοργανισμούς αυτούς διαβιώνουν σαπροφυτικά στο νερό και παίρνουν μέρος στην αποσύνθεση των οργανικών ουσιών στο έδαφος και το νερό.

Πολλές από τις οδηγίες που αφορούν την πρόληψη της ρύπανσης αφορούν επίσης έναν πιθανό κίνδυνο υγείας που συνδέεται με τα θαλάσσια παράκτια ύδατα δεδομένου ότι αυτά τα ύδατα κληρονομούν τελικά ένα μεγάλο μέρος της ρύπανσης που εισάγεται στο γλυκό νερό.

Επομένως, είναι απαραίτητο να υπολογιστεί η ποιότητα του ύδατος που θα μπορούσε να παρέχει κίνδυνο για την υγεία των ανθρώπων με τη χρησιμοποίηση των παραλίων που έχουν μολυσμένα νερά κολύμβησης.

Αν και δεν υπάρχει ικανοποιητικό επιδημιολογικό στοιχείο για να υποστηρίξει μια ακριβή σχέση μεταξύ των ασθενειών των κολυμβητών και του επιπέδου βακτηριολογικών δεικτών της ρύπανσης των υδάτων, γίνεται αποδεκτό ότι υπάρχει κάποιος βαθμός κινδύνου υγείας που συνδέεται με ένα ορισμένο επίπεδο μόλυνσης. Οι διαφορετικές επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι ορισμένες επιπτώσεις στην υγεία θα μπορούσαν να συσχετιστούν με την κολύμβηση στα μολυσμένα ύδατα και το βαθμό



μικροβιολογικής ρύπανσης (Seyfried PI et al, 1985, Corbett SJ et al. 1993, Kay D et al, 1994).

Τα άλγη βρέθηκαν σε όλες τις μελετημένες θέσεις. Τα άλγη είναι φωτόαυτότροφοι οργανισμοί των οποίων η αύξηση εξαρτάται άμεσα από το φως μπορούν επίσης να είναι χημειοαυτότροφοι υπό ορισμένους όρους. Τα περιττωματικά βακτηρίδια δεικτών αναφέρονται ως χημειοαυτότροφα βακτηρίδια και απαιτούν την αποσύνθεση των οργανικών ενώσεων για τη διατροφή τους. Αυτές οι οργανικές ενώσεις μπορούν να παρασχεθούν από τα φωτόαυτότροφα άλγη (Panagίου A, Savvaidis I, Theodorou D, Bezirtzoglou E. 1995). Κατά συνέπεια, η περιττωματική βακτηριακή αύξηση δεικτών μπορεί να συσχετιστεί με την ανάπτυξη της υδρόβιας βιολογικής αλυσίδας.

Σαν ποιοτικά κριτήρια θαλάσσιου νερού που προτείνονται από το WHO και άλλα διεθνή πρότυπα τίθενται συνήθως οι μικροβιολογικοί δείκτες ρύπανσης, συνολικά κολοβακτηρίδια, κοπρανώδη κολοβακτηρίδια, εντερόκοκκοι και κοπρανώδη στρεπτόκοκκοι (WHO, Regional Office for Europe. Guidelines for health-related monitoring of coastal recreational and shellfish areas, Part II. Copenhagen, 1994, Council of European Communities. Directive concerning the quality of bathing water (76/160/EEC) . Official Journal L31/1.5 February 1976, Pike EB. 1993).

Μια πρόσφατη τυχαία δοκιμαστική μελέτη προτείνει ότι οι περιττωματικοί στρεπτόκοκκοι φαίνονται να είναι ο καλύτερος δείκτης της ποιότητας νερού, όπως σχετικά με τον κίνδυνο γαστρεντερίτιδας (Kay D. et al 1994).

Ο συνδυασμός διάφορων δεικτών είναι πιθανό να προσφέρει μια σφαιρική εικόνα της ποιότητας νερού (Seyfried PL, et al 1985)



Βασικής σημασίας για την υγιεινή του νερού είναι η παρουσία στο νερό μικροοργανισμών, οι οποίοι διαβιώνουν φυσικά στο έντερο των ανθρώπων και των ζώων (Bezirtzoglou E., 1994, 1995, 1997, 1999.). Ένας τέτοιος μικροοργανισμός είναι και το *C. perfringens*. Η ανεύρεση τους στο νερό είναι αδιάφευκτη μαρτυρία μόλυνσης του με κοπρανώδεις ακαθαρσίες.

Πάντως από τα αποτελέσματα με την FISH μέθοδο και από τα σχήματα που δείχνουν τα κλωστηρίδια και το *C. perfringens* ως ποσοστό του συνολικού DNA που φέρουν οι διάφοροι μικροοργανισμοί συμπεριλαμβανομένου και των ιών (dapi) φαίνεται ότι αυτά αποτελούν ένα μικρό μόνο ποσοστό σε σχέση με το σύνολο των μικροοργανισμών.

Η αυξανόμενη μικροβιολογική ρύπανση κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών, κυρίως για τους μήνες Ιούλιο και Αύγουστο παρατηρείται στην περίπτωση των λιμνιαίων οικοσυστημάτων.

Πρέπει να επισημανθεί ότι άλλες μελέτες που πραγματοποιούνται στα μεσογειακά παράκτια ύδατα προτείνουν μια χαμηλότερη μικροβιολογική ρύπανση κατά τη διάρκεια των θερινών μηνών. Το αυξανόμενο φως της ημέρας καλοκαιριού και η ηλιακή ακτινοβολία θα μπορούσαν να έχουν επιπτώσεις στο θάνατο των μικροοργανισμών σε αυτές τις περιπτώσεις (Fattal B, et al 1983. Panagiou et al 1995).

Όμως η επιβίωση των περισσότερων βακτηριδίων στο νερό της θάλασσας εξαρτάται επίσης από την αλατότητα, τη θερμοκρασία, το pH, την ηλιακή ακτινοβολία και άλλους παράγοντες, οι οποίοι πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά το ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Τα περιττωματικά κολοβακτηρίδια επι παραδείγματι θεωρούνται ότι παρουσιάζουν έναν ισχυρό συσχετισμό με την περιττωματική μόλυνση από τα



θερμόαιμα ζώα. Η παρουσία τους στο θαλάσσιο νερό δείχνει την πρόσφατη μόλυνση από το περιττωματικό υλικό επειδή τα περιττωματικά κολοβακτηρίδια πεθαίνουν εντός ωρών όταν εκτίθενται στο φως του ήλιου στο θαλάσσιο νερό στις θερμοκρασίες επάνω από + 40°C (WHO, Regional Office for Europe. Guidelines for health-related monitoring of coastal recreational and shellfish areas, Part II. Copenhagen, 1994).

Είναι σαφές ότι το γλυκό νερό που εξετάζεται στην παρούσα διατριβή αποτελεί διαφορετικό-πιο φιλόξενο περιβάλλον απ' ότι το θαλασσινό νερό.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Γενικεύοντας, από αυτήν την διατριβή προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

-Το πρότυπο κατανομής του *C.perfringens* περιγράφει το είδος των εξεταζομένων συστημάτων.

Ανοικτά συστήματα(ποτάμια)-Κλειστά συστήματα (λίμνες)

-Προσφέρεται ένα εργαλείο άμεσης σύγκρισης του βαθμού μόλυνσης κοπρανώδους προέλευσης των όμοιων οικοσυστημάτων.

-Το *C.perfringens* και ιδιαίτερα οι ανθεκτικές-σπορογόνες μορφές του, που παραμένουν στα οικοσυστήματα για μεγάλα χρονικά διαστήματα θα μπορούσαν να αποτελέσουν τον ιδανικότερο κοπρανώδη δείκτη

-Το *C. perfringens* φαίνεται να παρουσιάζει χωρική κατανομή σε ποτάμια συστήματα και χωροχρονική κατανομή σε λιμναία συστήματα.

-Οι λίμνες αποτελούν κλειστά οικοσυστήματα που κατά τους θερινούς μήνες του χρόνου παρουσιάζεται αύξηση των βλαστικών μορφών του



C.perfringens. Η αύξηση αυτή συμβαδίζει με αύξηση των επιπέδων του B.O.D.

- Τα ποτάμια οικοσυστήματα είναι ανοικτά συστήματα που υποβάλλονται συνεχώς σε διαρκές περιβαλλοντικό stress. Για το λόγο αυτό οι ανθεκτικές-σπορογόνες μορφές παραμένουν σε υψηλά επίπεδα.

-Καταδεικνύονται σημειακές πηγές κοπρανώδους μόλυνσης. Το *C. perfringens* φαίνεται να ανευρίσκεται με υψηλότερα ποσοστά θετικότητας και άρα συχνότερα σε περιοχές με περισσότερο εμφανή την ανθρωπογενή παρέμβαση.

-Το *C. perfringens* φαίνεται να παρουσιάζει περισσότερο χωρική κατανομή σε ποτάμια συστήματα και χωροχρονική κατανομή σε λιμναία συστήματα. Αυτό σημαίνει ότι στα μεν ποτάμια η κατανομή του φαίνεται να επηρεάζεται σε υψηλότερο ποσοστό από τις σημειακές πηγές μόλυνσης και λιγότερο από τις εποχές του χρόνου. Άλλωστε ανευρίσκεται συχνότερα με σπορογόνα μορφή στα ποτάμια συστήματα, ενώ στα λιμναία συστήματα οι βλαστικές μορφές εμφανίζονται συχνότερα.

-Στα λιμναία συστήματα ο αποικισμός από το *C. perfringens* φαίνεται να ακολουθεί πιο ξεκάθαρο πρότυπο κατανομής των μορφών του βακτηρίου(βλαστικές-σπορογόνες) που ακολουθεί σε μεγάλο βαθμό τις μεταβολές των αβιοτικών παραμέτρων. Στα δε ποτάμια συστήματα δεν φαίνεται να υπάρχει ξεκάθαρα μια τέτοια συσχέτιση.

-Στα λιμναία συστήματα το *C. perfringens* φαίνεται να εμφανίζει έναν περισσότερο σταθερό κύκλο ζωής με εναλλαγές μορφών (βλαστική σε σπορογόνα και το αντίστροφο) που εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις αβιοτικές παραμέτρους.



-Η μέθοδος FISH που είναι ποσοτική αποδίδει συγκρίσιμα αποτελέσματα με την μέθοδο του υγρού μέσου LS, που είναι ημιποσοτική-ποιοτική.

-Από την μελέτη του D.O στα λιμναία συστήματα προκύπτει ότι το θέρος η πυκνότητα του αερίου γίνεται ελάχιστη και κατέρχεται σε επικίνδυνα επίπεδα για τους ζώντες οργανισμούς, αντιθέτως οι συνθήκες γίνονται ευνοϊκές για την ανάπτυξη του *C.perfringens*. Η πτώση ερμηνεύεται ως έναν βαθμό από την αύξηση της θερμοκρασίας, οφείλεται όμως και στην πλεονάζουσα μόλυνση και ρύπανση κατά το καλοκαίρι, όπως φαίνεται από τις υψηλές τιμές του B.O.D. Στις χαμηλές τιμές του διαλυτού οξυγόνου φαίνεται να συμβάλλουν και η ηρεμία και ακινησία των νερών των λιμνών.

-Στα ποτάμια συστήματα φαίνεται να υπάρχει σχετικά περισσότερη σταθερότητα στην επάρκεια του διαλυμένου οξυγόνου. Επίσης το BOD είναι σε χαμηλότερα επίπεδα υποδεικνύοντας μικρή ποσότητα οργανικής ύλης και άρα μικρότερους ρυθμούς αποικοδόμησης.

-Στα λιμναία οικοσυστήματα παρατηρείται ότι κατά τους καλοκαιρινούς μήνες το BOD παρουσιάζει την υψηλότερη τιμή του ενώ το DO την μικρότερη και η θερμοκρασία παραμένει σε υψηλά επίπεδα. Αυτό εξηγεί την επικράτηση των μεταβολικά ενεργών βλαστικών μορφών του *Clostridium perfringens*. Άλλωστε ένας από τους λόγους ελαττώσεως του DO είναι και η μεγάλη κατανάλωση οξυγόνου από τους ετερότροφους μικροοργανισμούς για την αποικοδόμηση της περίσσειας οργανικής ύλης.

-Παρατηρείται επίσης ότι αμέσως μετά από βροχοπτώσεις ο αριθμός των βακτηρίων είναι υψηλότερος πιθανότατα λόγω της παράσυρσης



επιφανειακών ρύπων. Μετά από την καθίζηση και ηρεμία των φερτών υλών ο αριθμός των βακτηρίων φαίνεται να μειώνεται.

-Όταν οι δειγματοληψίες έγιναν κοντά σε οχετούς το μικροβιακό φορτίο ήταν αυξημένο. Πάντως είναι φανερό ότι οι τιμές αυτές έχουν έντονα τοπικό χαρακτήρα και δεν αντανακλούν σε ολόκληρα τα συστήματα. Ο αριθμός των μικροβίων μειώνεται με την απομάκρυνση από το σημείο εκβολής της σημειακής πηγής ρύπανσης.

-Τέλος πρέπει να σημειωθεί ότι όλες οι δειγματοληψίες ήταν παρόχθιες. Η μόλυνση όμως είναι εντονότερη εκεί. Άρα εάν ληφθεί υπόψη ο συνολικός όγκος των συστημάτων που εξετάζονται η μόλυνση είναι σαφώς μικρότερη.

Επομένως τα πρότυπα κατανομής (γενικής, χρονικής, χωρικής) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλα πρόβλεψης αφενός για το είδος των εξεταζομένων συστημάτων (ανοικτά-κλειστά) και αφετέρου για το βαθμό κοπρανώδους μόλυνσης.



8.ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της κατανομής του *C.perfringens* σε υδάτινα οικοσυστήματα, όπως των λιμνών Καστοριάς και Ιωαννίνων, των ποταμών Βοϊδομάτη, Αώου, Λούρου, Καλαμά καθώς και του ρέματος Σουλού Πτολεμαΐδας.

Συγκεκριμένα εξετάστηκε η κατανομή του βακτηρίου αυτού σε τρία επίπεδα. Σε επίπεδο χώρου(χωρική κατανομή) με απώτερο σκοπό να καταδειχθούν σημειακές και μη σημειακές πηγές κοπρανώδους μόλυνσης, δεδομένου ότι το βακτήριο αυτό αποτελεί δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης. Σε επίπεδο χρόνου (χρονική κατανομή) με απώτερο σκοπό να εξαχθούν πληροφορίες για τον κύκλο ζωής του βακτηρίου, καθώς και για τον τύπο των οικοσυστημάτων (ανοιχτά-κλειστά συστήματα). Σε επίπεδο συσχετίσεων με βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της διατριβής αυτής είναι η μέθοδος του υγρού θρεπτικού μέσου LS, η μέθοδος FISH και μετρήσεις φυσικοχημικών παραμέτρων στα σημεία δειγματοληψίας.

Τα αποτελέσματα από την παρούσα διατριβή καταδεικνύουν το *C.perfringens* ως αξιόλογο δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης. Επίσης τα πρότυπα κατανομής (γενικής, χρονικής, χωρικής)που απορρέουν από τη διατριβή αυτή μπορούν να χρησιμεύσουν ως εργαλεία πρόβλεψης αφ'ενός για τον τύπο των οικοσυστημάτων (ανοιχτά-κλειστά συστήματα) και αφ'ετέρου για τον βαθμό κοπρανώδους μόλυνσης τους.



Title: The distribution of *Clostridium perfringens* in aquatic environments and interaction with other factors or microorganisms

Arsenis I. Tsiotsias

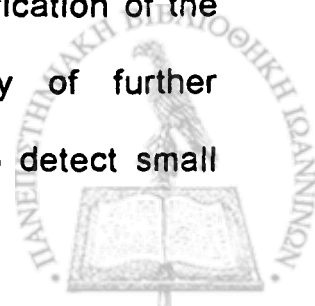
SUMMARY IN ENGLISH

C. perfringens has been associated with human and animal wastes and is widely distributed in feces, sewage and polluted waters. *C. perfringens* is used in many countries to detect fecal pollution of remote origin

The aim of the present thesis is the investigation of the distribution of *C. perfringens* in aquatic ecosystems. Namely the lakes Kastoria and Ioannina, the rivers Voidomatis, Aaos, Louros, Kalamas as well as the stream Soulou of Ptolemaida city.

Specifically the distribution of this bacterium was examined at three levels. At the level of space (spatial distribution) with the final aim to show the existence of specific and non specific sources of fecal pollution, since this bacterium constitutes an indicator of fecal pollution. At the level of time (seasonal distribution) with the final aim to provide information on the life cycle of the involved bacterium, as well as on the type of ecosystems (open-closed systems). Finally at the level of cross-correlations with biotic and abiotic factors.

The methods used for the realization of this thesis were: The method of a selective nutrient medium supplemented with lactose-sulphite (LS) proposed for rapid enumeration and identification of the microorganism *C. perfringens* without the necessity of further confirmatory tests. Using this medium, we were able to detect small



numbers of *C. perfringens* in samples of water that also contained a large number of other bacteria, including other clostridia species.

The method of fluorescence *in situ* hybridisation (FISH). With this technique, total community RNA or DNA can be analyzed and single cells can be specifically stained *in situ* with rRNA based fluorescent probes.

Other physicochemical parameters such as pH, temperature (T), Biological Demanded Oxygen (B.O.D), Specific conductivity (SpC) and Total Dissolved Solids (TDS) were also determined at the points of sampling.

The results show that *C. perfringens* may serve as a useful fecal indicator in ecosystems with mixed populations of heterogeneous bacteria and therefore is suggested as an appreciable indicator of fecal pollution. This microorganism due to its spores is more tolerant to various environmental conditions than other indicator bacteria. Also the patterns of distribution (general, seasonal, spatial) could be useful as tools of forecast not only for the type of ecosystem (open-closed system) but also for the degree of their fecal pollution. The numbers of *C. perfringens* revealed fluctuations depending on the sampling site. The findings also revealed that the concentration of *C. perfringens* decreased with distance from the outfall. It was significantly more common in the vicinity of industrial or domestic activities.

Finally the extended length of rivers (open systems), the heterogeneity of sampling locations (source, downstream), the influence of stress and environmental factors do not easily permit the survival of vegetative forms. Spore forms being more tolerant to these effects are found generally in rivers. On the contrary, the lake ecosystem (close system) is more homogenous and



is usually less influenced by environmental effects than rivers. Therefore, more vegetative forms were found in lakes.

42



9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Albrecht-Buehler, G., 1996. *Autofluorescence of live purple bacteria in the near infrared. Exp. Cell Res, 236, 43—50.*

Amann, R., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., 1990a. *Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1919-1925.*

Amann, R., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990b. *Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylo-genetic, and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172, 762-770.*

Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1995. *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59, 143-169.*

Amin, A. 1984. Έρευνα για την υγιεινολογική κατάσταση των συντηρημένων ιχθύων στην Ελλάδα. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Τμήμα Κτηνιατρικής.

Angelloti, R., H.E. Hall, M.L. Foter, and K.H. Lewis. 1962. *Quantitation of Clostridium perfringens in foods. Appl. Microbiol. 10:193-199.*

Antoniadis, G., Seidel, K., Bartocha, W., Lopez, J. M. (1982): *Virus removal from municipal wastewater in activated sludge sewage treatment plants. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 76. 537-545.*

APHA (1985): *Standard Methods for the examination of water and waste water. 16th edition.* American Public Health Association. Washington. D.C.



Beimfohr, C.A., Krause, A., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1993. *In situ identification of lactococci, enterococci and streptococci.* Syst. Appl. Microbiol. 16, 450-456.

Beerens, H., Romond. C., Lepaae. C. Criquelion. J. (1978): A liquid medium for the enumeration of *C. perfringens* in food and faeces. In: *Isolation and identification methods of food poisoning organisms* (Eds: Corry, J. E. L., Roberts, D., Skinner. F. A.). Academic Press. London. 132-149.

Bezirtzoglou. E., Romond. C. (1990): Rapid identification and enumeration of *C. perfringens* in the human faecal flora. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 3. 159-163.

Bezirtzoglou, E., Panagiou, A., Savvaidis, I., Theodorou, D., Tsolas, O. and Antoniadis, G. (1995). A new and rapid method for identification of *C. perfringens* in cave waters. *Microecology and Therapy* 23, 188-194.

Bezirtzoglou, E., Dimitriou, D. and Panagiou, A. (1996). Anaerobe. Occurrence of *Clostridium perfringens* in river water by using a new procedure. *Anaerobe* 2, 169-173.

Bezirtzoglou, E., Panagiou, A., Savvaidis, I. and Maipa, V. (1997). Distribution of *Clostridium perfringens* in polluted lake environments. *Anaerobe* 3, 169-172.

Bezirtzoglou E., Dimitriou D., Panagiou A., Kagalou I. (1994): Distribution of *C.perfringens* in different aquatic environments in Greece. *Microbiological Research*, 1994, 149, 129-134.

Bhatia, U., Robison, K., Gilbert, w., 1997. Dealing with database explosion: a cautionary note. *Science* 276, 1724-1725.



Bidnenko, E., Mercier, C., Tremblay, J., Tailliez, P., Kulakauskas, S., 1998. Estimation of the state of the bacterial cell wall by fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3059-3062.

Brown-Howland, E.B., Danielsen, S.A., Nierzwicki-Bauer, S.A., 1992. Development of a rapid method for detecting bacterial cells in situ using 16S rRNA-targeted probes. *BioTechniques* 13, 928-933.

Banwart, J.G. 1979. Basic food microbiology, pp. 271-284. AVI publishing company, INC. Westport, Connecticut.

Barnes, E.M., and M. Ingram. 1956. The effect of redox potential on the growth of *Clostridium welchii* strains Isolated from horse muscle. *J. Appl. Bacteriol.* 19:117-128.

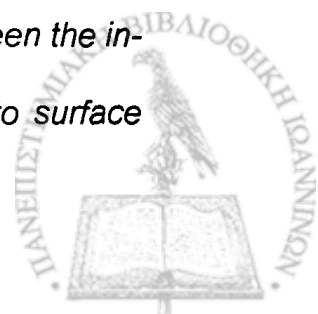
Bellair, J.T., Parr-Smith, G.A. & Wallis, I.G. (1977) Significance of diurnal variations in Faecal coliform die-off rates in the design of ocean outfalls. *Journal of the water Pollution Control Federation* 49, 2022-2030.

Bergeys'w Manuall Of Determinative Bacteriology. 1974. R.E.Puchanan and N.E. Gibbons ed. (8th ed.) pp 556, 558, 559, 562-563.

Busta, F.F., and L.B. Smith. 1972. Influence of food proteins on germination of *Clostridium perfringens* spores. *Abstracts of the American Society for Microbiology.* 72:5 .

Chakrabarty, A.K., and K.G. Narayan. 1979. A proposed sero -grouping scheme for epidemiological investigation of food poisoning due to *Clostridium perfringens* type A. *Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene.* 245:114-122.

Chumney. R.K., and D.M. Adams. 1980. Relationship between the increased sensitivity of heat injured *Clostridium perfringens* spores to surface



active antibiotics and to sodium chloride and sodium nitrite. *J. Appl. Bacteriol.* **49:55-63.**

Council of European Communities. Directive concerning the quality of bathing water (76/160/EEC) . *Official Journal L31/1.5 February 1976,*

Corbett SJ, Rubin GL, Curry GK, Kleinbaum DG. 1993 The health effects of swimming at Sydney beaches. *Am J Public Health*; **83 : 1701-1706.**

Collee, J., J. Knowlden and B. Hobbs. 1961. Studies on the growth, sporulation and carriage of *dostridium welchii* with special reference to food poisoning strains. *J. App1. Bacteriol.* **24:326-339.**

Craven, S., and L.C. Blankenship. 1982. Effect of purine derivatives, papaverine hydrochloride, and imidazole on enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* type A. *Canad.J. of Microbiol.* **28:851-859.**

DeLong, E.F., Wickham, G.S., Pace, N.R., 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science* **243, 1360-1363.**

DeLong, E.F., Franks, D.G. and Allredge, A.L. (1993). Phylogenetic diversity of aggregate-attached vs. Free-living marine bacterial assemblages. *Limnology and Oceanography* **38, 924-934.**

DeLong, E.F., Taylor, L.T., Marsh,- T.L., Preston, CM, 1999. Visualization and enumeration of marine planctonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65, 5554-5563.**

Δεληγκάρης, N. 1977. Συμβολή στη μελέτη της εντεροτοξιναιμίας των αιγοπροβάτων. Τοξινικοί τύποι του *Clostridium perfringens* υπεύθυνοι για τη



νόσο στην Ελλάδα. Διατριβή επί Διδακτορία. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Dimitriou D., Kagalou I., Stavropoulos A., Bezirtzoglou E.:
(1992) *Clostridium perfringens* as an Indicator of Fecal Contamination of Lake Water. *Medical and Environmental Aspects of Anaerobes*. Ed. B.I. Duerden, J.S. Brarier, S.V. Seddon, W.G. Wade. 37/1992 Wrightson Biomedical Publishing Ltd.

Duncan, C.L. 1976. *Clostridium perfringens*. pp 170-197. (In M. Deftigueiredo and D. Splittstoesser (ed) "Food Microbiology. Public Health and Spoilage Aspects" Avi Publishing Co. Westport, Connecticut).

Duncan, C.L., and D.H. Strong. 1968. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* **16:82-89.**

Duncan, C.L.. and D.H. Strong. 1969. ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell-free product of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **100:86-94.**

Edwards D. Diane, McFeters A. Gordon, and Venkatesan M. Indira. 1998. Distribution of *Clostridium perfringens* and Fecal Sterols in a Benthic Coastal Marine Environment Influenced by the Sewage Outfall from McMurdo Station, Antarctica *Appl. Environ. Microbiol.* **64:2596-2600**

Edelstein, PH., 1985. Legionella. In: Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J., Shadowy, H.J. (Eds.), Manual of Clinical Microbiology, 4th Edition. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 373-381.

Ei-Bassiony, T.A., 1980. Occurrence of *Clostridium perfringens* in milk and dairy products. *J. Food Prot.* **43:536-542 .**



Ellner, P.D. 1956. *A medium promoting rapid quantitative sporulation in Clostridium perfringens.* *J. Bacteriol.* **71:495-496.**

Fattal B, Vasi RJ, Katzenelson E, Shuval HI. 1983 *Survival of bacterial indicator organisms and enteric viruses in the mediterranean coastal waters of Tel-Aviv.* *Water Res;* **17(4) : 397-402**

Friedrich, U., Schallenberg, M. and Hollinger, C. (1999). *Pelagic bacteria-particle interactions and community-specific growth rates in four lakes along a trophic gradient.* *Microbial Ecology* **37, 49-61.**

Fuhrman, J.A., McCallum, K. and Davis, A. (1993). *Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from Atlantic and Pacific oceans.* *Applied and Environmental Microbiology* **59, 1294-1302.**

Frischer, M.E., Floriani, P.J., Nierawicki-Bauer, S.A., 1996. *Differential sensitivity of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes used for fluorescence in situ hybridization is a result of higher order structure.* *Can. J. Microbiol.* **42, 1061-1071**

Genigeorgis., C. 1975. *Public health importance of Clostridium perfringens.* *J.A.V.M.A.* **167:821-827.**

Genigeorgis. C., and H. Riehnann. 1979. *Food processing and Hygiene pp.(613-701).*(In H. Riemann and F.L. Bryan (ed)."Food-borne Infection and Intoxication"(2nd ed) Academic Press. New York and London).

Genigeorgis. C., G. Sakaguchi and H. Riehnann. 1973. *Assay methods for Clostridium perfringens type A enterotoxin.* *App. Microbiol.* **26:111-115**



Giovannoni, S.J., DeLong, E.F., Olsen, G.J., Pace, N.R., 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170, 720-726.

Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L. and Field, K.G. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345, 60-62.

Gobel, U.B., 1991. Targeting ribosomal RNA sequences: a universal approach to the detection and identification of microorganisms. In: Vaheri, A., Tillon, R.C., Balows, A. (Eds.), *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology*. Springer, Heidelberg; pp. 27-36

GodFree, A. (1997) Point source discharges to bathing waters. In *Technical feasibility of an apriori measurement approach for managing bathing water quality. Report of a Workshop held in Sitges (Spain) 26-29 April 1997, European Commission Measurement and Testing Programme, EUR. 17801EN.*

Gordon. R. C. (1985): Winter survival of bacteria in a subarctic alaskan river. U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis. Ore. EPA-R2-72-013.

Graf, B., Gobel, U.B., Adam, T., 1998. Qualitative and quantitative analysis of autofluorescence in fungi. *Mycoses* 41, 39-46

Grimes, D. J., F. L. Singleton, J. Stemmler, L. Palmer, P. Brayton, and R. R. Colwell. 1984. Microbiological effects of wastewater effluent discharged into coastal waters of Puerto Rico. *Water Res.* 18:613-619.

John. H., Birnstiel, M., Jones, K., 1969. RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. *Nature* 223, 582-587.



Junshuk, R.J., Blick, M., Bresser, J., Fox, G.E., Jurtshuk, P., 1992.

Rapid in situ hybridization technique using 16S rRNA segments for detecting and differentiating the closely related gram-positive organisms Bacillus polymyxa and Bacillus macerans. Appl. Environ. Microbiol. 58. 2571-2578.

Hauschild, A.H.W. 1970. Erythematous activity of the cellular enteropathogenic factor of *Clostridium perfringens* type A. *Can J. Microbiol. 16:651-654.*

Hauschild, A.H.W. and R. Hilshemer. 1971. Purification and characteristics of enterotoxin of *Clostridium perfringens* type A. *Can. J. Microbiol. 17:1425-1433.*

Hill, R. T., W. L. Straube, A. C. Palmisano, S L. Gibson, and R. R. Colwell. 1996. Distribution of sewage indicated by *Clostridium perfringens* at a deep-water disposal site after cessation of sewage disposal. *Appl. Environ. Microbiol. 62:1741-1746*

Hobbs, B.C. 1974. *Food Poisoning and Food Hygiene* (3rd ed). Edward Arnold (ed). London.

Hobbs, B.C. 1979. *Clostridium perfringens* gastroenteritis, pp. 131-171. (In H. Riemann and F.L. Bryan (ed) "Food-borne Infection and Intoxication" (2nd ed)-Academic Press. New York and London).

Howington, J. P., G. A. McFeters, J. P. Barry, and J. J. Smith. 1992. Distribution of the McMurdo Station sewage plume. *Mar. Pollut. Bull. 25:324-327.*

Hiorns, W.D., Methe, B.A., Nierzwicki-Bauer, S.A. and Zehr, J. P. (1997). Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S



rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2957-2960.

Hirn. J., Viljamaa. H., Raevuori. M. (1980): The effect of physicochemical phytoplankton and seasonal factors on faecal indicator bacteria in northern brackish water. *Water Research.*, 14, 279-285.

Jones, K. & Obiri_Danso, K. (1999) Non-compliance of beaches with the EU Directives of bathing water quality. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 85, 101S-107S

Kagiyama, N., Yoshida, K., Hamabata. T., Juni, N., Awasaki, T., Fujita, S., Momijama, M., Yoshida, M.C., Horí, S.H.. 1993. A novel fluorescent method for in situ hybridization. *Acta Histochem. Cytochem.* 26, 441-445.

Kalmbach, S., Manz, W., Wecke, J., Szewzyk, U., 1999. *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium cit-ratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 769-777.

Kay D, Fleisher JM, Salmon RL, Wyer MD, Godfree AF, Zelenauch-Jacquotte Z, Shore R. 1994 Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomised exposure. *Lancet*; 344 : 905-909.

Krimmer, V, Merkert, H., von Eiff, C., Frosch, M., Eulert, J., Lohr, J.F., Hacker, J., Ziehbür, W., 1999. Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2667-2673.



Kalfakakou V. *Transfer factors of heavy metals in aquatic organisms of different trophic levels.*

<http://business.hol.gr/~bio/HTML/PUBS/VOL1/kalfak.htm>

Kang. K. C., H. Hoodburn, A. Pagenkorf and R. Cheney. 1969.

Growth sporulation, and germination of Clostridium perfringens In media of controlled water activity. Appl. Microbiol. 18:798-805.

Labbe, R.G. and K.E. Norris. 1982. *Evaluation of plating media for recovery of heated Clostridium perfringens spores. J. Food Prot. 45:686-688.*

Landegent, J.E., Jansen in de Wal, N., Baan, R.A., Hoeijmakers, J.H.J., van der Ploeg, M., 1984. *2-Acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences. Exp. Cell. Res. 153, 61-72.*

Lathe, R., 1985. *Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. J. Mol. Biol. 183, 11-12.*

Lee, N., Nielsen, P.H., Andreasen, K.H., Juretschko, S., Nielsen, J.L., Schleifer, K.-H., Wagner, M., 1999. *Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1289-1297.*

Lee. S., Fuhrman, J. A. (1990): *DNA hybridisation to compare species compositions of natural bacterioplankton assemblages. Appl. Environ. Microbiol.. 56, 739-746.*

Lenihan, H. S., J. S. Oliver, M. D. Oakden, and M. D. Stephenson. 1990. *Intense and localized pollution around McMurdo Station, Antarctica. Mar. Pollut. Bull. 21:422-430.*



Lischewski, A., Amann, R., Harmsen, D., Merkert, H., Hacker, J., Morschhauser, J.. 1996. Specific detection of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* by fluorescent *in situ* hybridization with an 18S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Microbiology* 142, 2731-2740.

Lischewski, A., Kretschmar, M., Hot, H., Amann, R., Hacker, J., Morschhauser, J., 1997. Detection and identification of *Candida* species in experimentally infected tissue and human blood by rRNA-specific fluorescent *in situ* hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2943-2948.

Matches, J. R., J. Liston, and D. Curran. 1974. *Clostridium perfringens* in the environment. *Appl. Microbiol.* 28:655-660

McClane, B.A., and J.L. McDonel. 1980. Characterization of membrane permeability alterations induced in vero cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Biochim. Biophys. Acta.* 600:974-985.

McFeters, G. A., J. P. Barry, and J. P. Howington. 1993. Distribution of enteric bacteria in antarctic seawater surrounding a sewage outfall. *Water Res.* 27:645-650

McDonell, J.L. 1974. *In vivo* effects of *Clostridium perfringens* enteropathogenic factors on the rat ileum. *Infect-Immunity.* 10; H56-H62.

McDonel, J.L. 1980. Mechanism of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Food Technol.* 43:91-94.

Mead, G.C. 1969. Combined effect of salt concentration and redox potential of the medium on the initiation of vegetative growth by *Clostridium welchii*. *J. appl. Bacteriol.* 32:468-475.



Muyzer, G. and Ramsing, N.B. (1995). *Molecular methods to study the organization of microbial communities. Water Science and Technology* **32**, 1-9.

Moter, A., Hoenig, C., Choi, B.-K., Riep, B., Gobel, U.B., 1998a. *Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. J. Clin. Microbiol.* **36**, 1399-1403.

Neef, A., Zaglauer, A., Meier, H., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K.-H., 1996. *Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of Paracoccus spp. in methanol-fed biofilms. Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4329-4339.

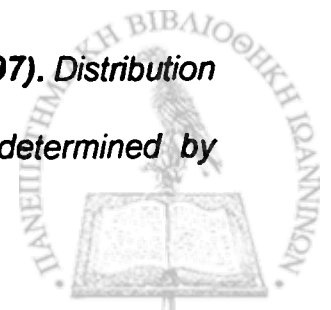
Nikolaeva, S.A. 1974. *The heat resistance of Clostridium perfringens spores under various sterilization conditions. Trudy, Vsesoyuznyi Nauchno-issledovatel'skii Institut Konservnoi i Ovoshchesushil'noi promyshlennosti.* **21:44-49.**

Nicolopoulou A., Zoumbou K., Papageorgakopoulou N. and Papapetropoulou M. (1994) *Metabolic and structural changes of E. coli cells starved in seawater. Microbiol Res* **149**: 343-350

Oragui, J.I. and Mara, D.D. (1983). *Investigation of the survival characteristics of Rhodococcus coprophilus and certain fecal indicator bacteria. Applied and Environmental Microbiology* **46**, 356-360.

Oka, S. 1977. *Heat resistance of Clostridium perfringens isolated from natural sources and processed sea-foods. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. (Nippon Suisan Gakkai - shi).* **43:701-708.**

Ovreas, L., Forney, L., Daae, F.L. and Torsvik, V. (1997). *Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saalenvennet, as determined by*



denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3367-3373.

Pace, N., Stahl, D.J., Lane, D.J. and Olsen, G.J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology* **9**, 1-55.

Πανέτσος, Α. 1978. Υγιεινή Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως. Τόμος Α Τετάρτη έκδοσις. σελ. 752-757. Θεσσαλονίκη.

Panagiou A, Savvaidis I, Theodorou D, Bezirtzoglou E. 1995 Influence of light on the presence of *C. perfringens* in caves. *Clinical Infectious Diseases*; **20 (2) : 380-381.**

Papapetropoulou M. 1997. Anaerobes in waters. *Anaerobe* **3:111-115**

Pardue. M.L., Gall, J.G., 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **64**, 600-604.

Pasolinil, B., M. Aloi and M. Ceralli. 1981. Various types of fresh pasta. Preliminary studies on the microflora, with special consideration of pathogens (*Salmone11ae*, *Staphylococci*, *Clostridium perfringens*). *Rivista della societa Italians di Sci-enza dell Alimentazione.* **10:165-174.**

Paul, J. H., J. B. Rose, S. Jaing, C. Kellogg, and E. A. Shinn. 1995. Occurrence of fecal indicator bacteria in surface waters and the subsurface aquifer in Key Largo, Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* **61:2235-2241**

Pinfold, J.V. (1990). Faecal contamination of water and fingertip-rinses as a method for evaluating the effect of low-cost water supply and sanitation activities on faeco-oral disease transmission. *Journal of Epidemiology and Infection* **105**, 363-375.



Pike EB. 1993 Recreational use of coastal waters : development of health related standarts. *J IWEM*; 7 : 162-167

Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1994. In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 140. 2849-2858.

Roberts, T.A. 1968. Heat and radiation resistance and activation of spores of *Clostridium welchii*. *J. Appl. Bact.* 31:133-144

Romond. C., Beerens. H., Criquelion. J., Lepage. C. (1981): Enumeration of *C. perfringens* in foods. *Ann. Fals. Exp. Chim.* 74. 181-184.

Sacks. L.E., and P.A. Thompson. 1977. Increased spore yields of *Clostridium perfringens* in the presence of methylxanthines. *App. and Env. Microbiol.* 34:189-193.

Sacks. L.E., and P.A. Thompson. 1978. Clear, defined medium for the sporulation of *Clostridium perfringens*. *App. and Env. Microbiol.* 35:405-410.

Seyfried PL, Tobin RS, Brown NE, Ness PF. 1985 A prospective study of swimming-related illness. I. Swimming-associated health risk. *Am J Public Health*; 75: 1068-1070.

Seyfried PL, Tobin RS, Brown NE, Ness PF. 1985 A prospective study of swimming-related illness. II. Morbidity and the microbiological quality of water. *Am J Public Health*; 75 : 1071-1074.

Schonhuber, W., Zarda, B., Eix, S., Rippka, R., Herdmann, M., Ludwig, W., Amann, R., 1999. In situ identification of Cyano-bacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1259-1267.



Savvaidis I., Kegos Th., Papagiannis C., Voidarou C., Tsiotsias A., Maipa V., Kalfakakou V., Evangellou A. and Bezirtzoglou E.(2001). *Bacterial Indicators and Metal Ions in High Mountain Lake Waters. Microbial Ecology in Health and Disease, 13:147-152*

Sorensen, A.H., Torsvic, V.L., Torsvic, T., Poulsen, L.K., Ahring, B.K.. 1997. Whole-cell hybridization of *Melhanosarcina* cells with two new oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3043-3050.

Sorensen, D.L., Eberl, S.G. and Dicksa, R.A. (1989). *Clostridium perfringens* as a point source indicator in non-point polluted streams. *Water Research* 23, 191-197.

Szollosi. J., Locket. S.J., Balazs, M., Waldman, P.M., 1995. Aytofluorescent correction for fluorescence in situ hybridization. *Cytomeiry* 20, 356-361.

Szwerinski, H., Gaiser, S., Bardtke, D., 1985. Immunofluorescence for the quantitative determination of nitrifying bacteria: interference of the test in biofilm reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21. 125-128.

Skjelkvale, R. and T. Uemura. 1977. Experimental diarrhoea In human volunteers following oral administration of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J. Appl. Bact.* 43:281-286.

Smith, L. DS. 1971. Factors affecting the growth of *Clostridium perfringens*. In *SOS/70 Proc. 3rd Intern. Cong. Food Sc. Technol., Inst. Food Technol., Chicago.*

Smith, L. DS. and L.V. Holdeman. 1968. The pathogenic anaerobic bacteria, pp 201-255. Charles. C. Thomas. Springfield, Illinois, U.S.A.



Stark, R.L. and C.L. Duncan. 1972. Transient increase in capillary permeability induced by *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.* 5:147-150.

Strong, D.H., E.F. Poster and C.L. Duncan. 1970. Influence of water activity on the growth of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* 19:980-987.

Stuart, S.A., McFeters, G.A., Schillinger, J. E. and Stuart, D.G. (1976). Aquatic bacteria in the high alpine zone. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 163-167.

Sussman, A.S. 1969. The prevalence and role of dormancy, pp.1 -38. (In G.W. Could and A. Hurst (ed) "The bacterial Spore; Academic Press. London and New York).

Tabatabai, L.B. and H.H. Walker. 1970. Oxidation reduction potential and growth of *Clostridium perfringens* and *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Microbiol.* 20:441-446.

Tsiotsias A., Savvaidis I., Vassila A., Kontominas M. and Kotzekidou P. April 2002: Control of *Listeria monocytogenes* by low-dose irradiation in combination with refrigeration in the soft whey cheese 'Anthotyros'. *Food Microbiology*, Volume 19, Issues 2-3, Pages 117-126

Uemura, T., C. Genigeorgis. P.H. Riemann and C.E. Franti. 1974. Antibody against *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in human sera. *Infect. Immun.* 9:470-471.

Van de Lest, C.H.A., Versteeg, E.M.M., Veerkamp. J.H., van Kuppevelt, T.H., 1995. Elimination of autofluorescence in



immunofluorescence microscopy with digital image processing. J. Histochem. Cytochem. 43, 727-730.

Venkatesan, M. I., and F. H. Mirsadeghi. 1992. Coprostanol as sewage tracer in McMurdo Sound, Antarctica. *Mar. Pollut. Bull.* 25:9-12

Vesey, G., Deere, D., Gauci, M.R., Griffiths, K.R., Williams, K.L., Veal, D.A., 1997. Evaluation of fluorochromes and excitation sources for immunofluorescence in water samples. *Cytometry* 29, 147-154.

Vaqueiro-Garibay, C. 1980. Germination of spores of *Clostridium perfringens* FDI. *Dissertation Abstracts International, B.* 40: 4188.

Вивтер, В. 1969. Physiology and biochemistry of spore, pp.73 - 123. (In G.W. Could and A. Hurst (ed) "The Bacterial Spore." Academic Press, London and New York).

Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K.H., 1993. Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1520-1525.

Wagner, M., Schmid, M., Juretschko, S., Trebesius, K.-H., Bubert, A., Goebel, W., Schleifer, K.-H., 1998. In situ detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 159-168.

Walker, H.U. 1976. Aerobic and anaerobic spore-forming bacteria and food spoilage, pp 356-386. (In M. Defiqueiredo and D.S. Split-tstoesser (ed) "Food Microbiology. Public Health a'nd Spoilage Aspects" Avi Publishing Co. Mestport, Connecticut).



Wilkinson, I.J., Sangster, N., Ratcliff, P.M., Mugg, P.A., Davos, D.E., Lanser, J.A., 1990. Problems associated with identification of *Legionella* species from the environment and isolation of six possible new species. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 796-802.

Willis, A. T. (1969): *Clostridia of Wound Infection*. Ed. Butterworths) London. 43—52.

Ward, D.M., Weller, R. and Bateson, M.M. (1990). 16rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345, 63-65.

WHO, 1994, Regional Office for Europe. Guidelines for health-related monitoring of coastal recreational and shellfish areas, Part-II. Copenhagen,

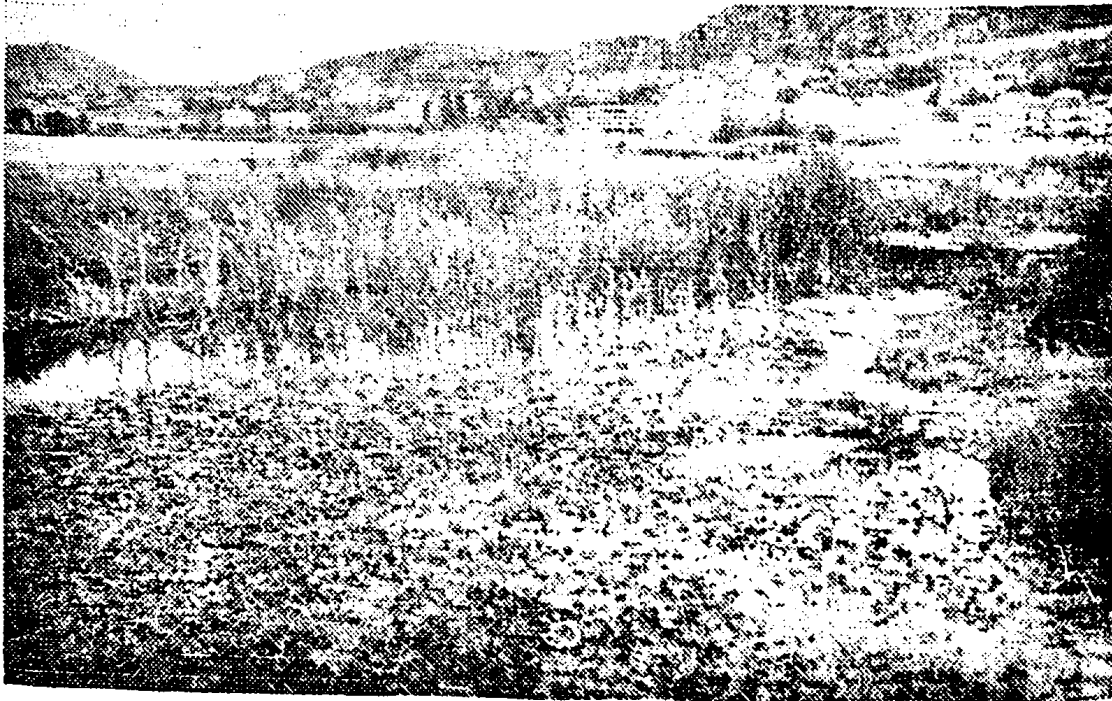
Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51. 221-271.

Willadersen, R.R., F.F. Busta, C.E. Allen and L.B. Smith. 1978. Growth and survival of *Clostridium perfringens* during constantly rising temperature. *J. Food Sci.* 43:470-475.

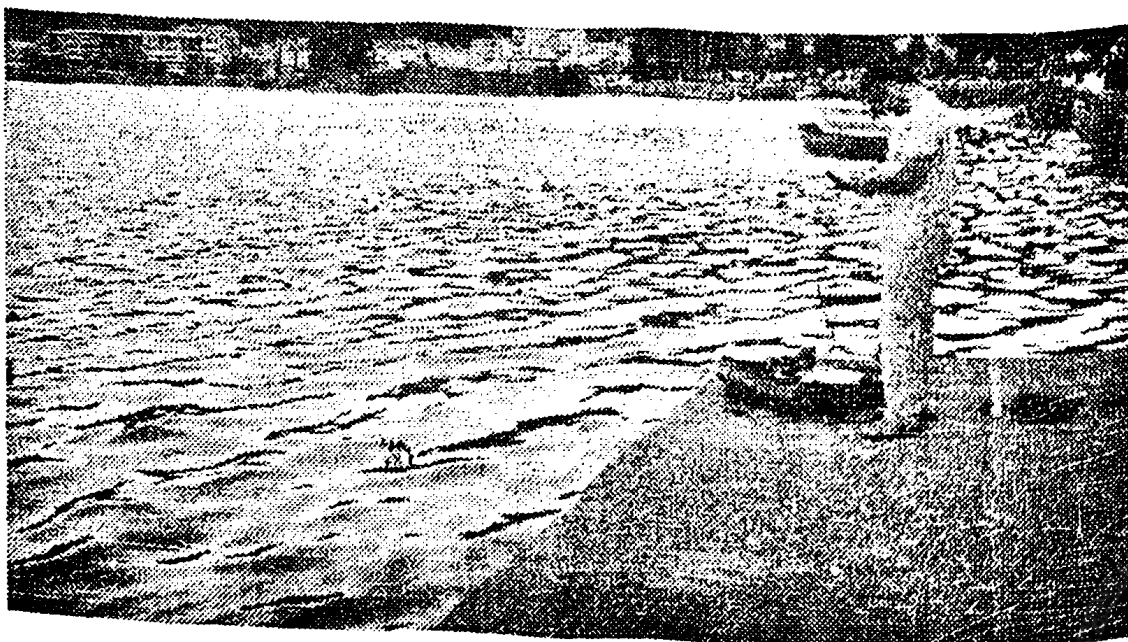


10.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ ΑΠΟ ΤΙΣ ΠΕΡΙΟΧΕΣ
ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

Λίμνη της Καστοριάς



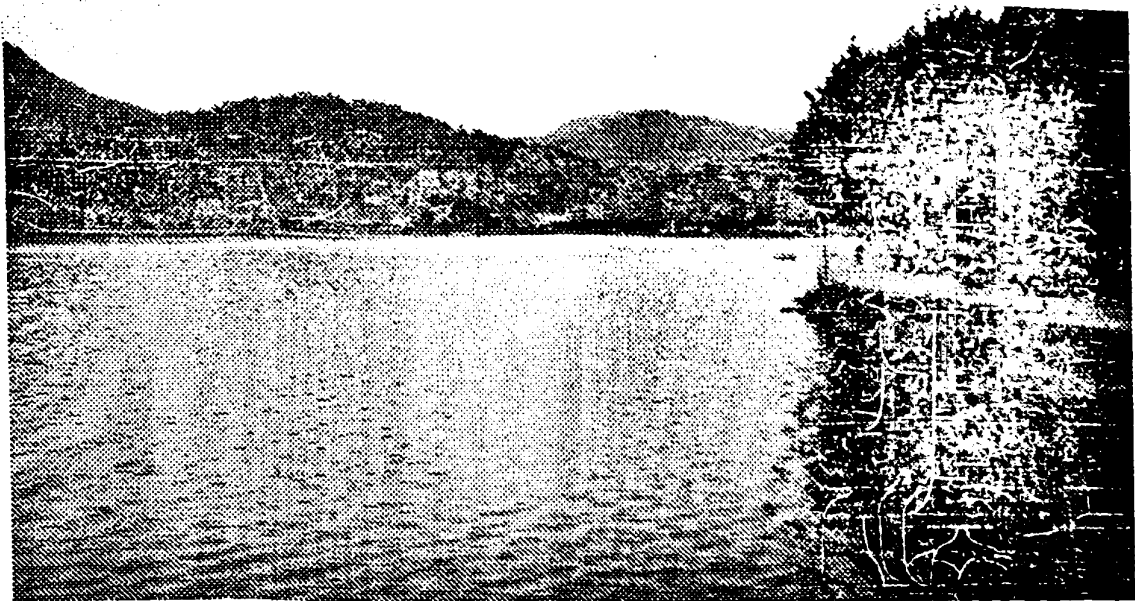
Λίμνη της Καστοριάς(Είσοδος στην πόλη)



Λίμνη της Καστοριάς(Ναυτικός Όμιλος)

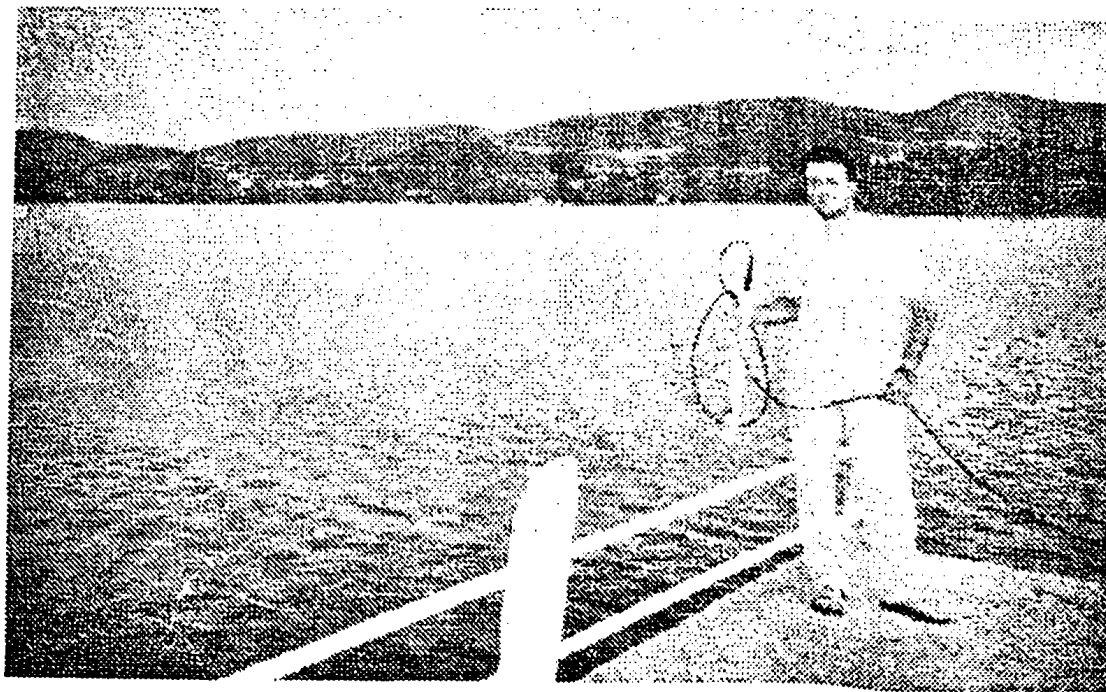


Λίμνη της Καστοριάς(Κόζια)

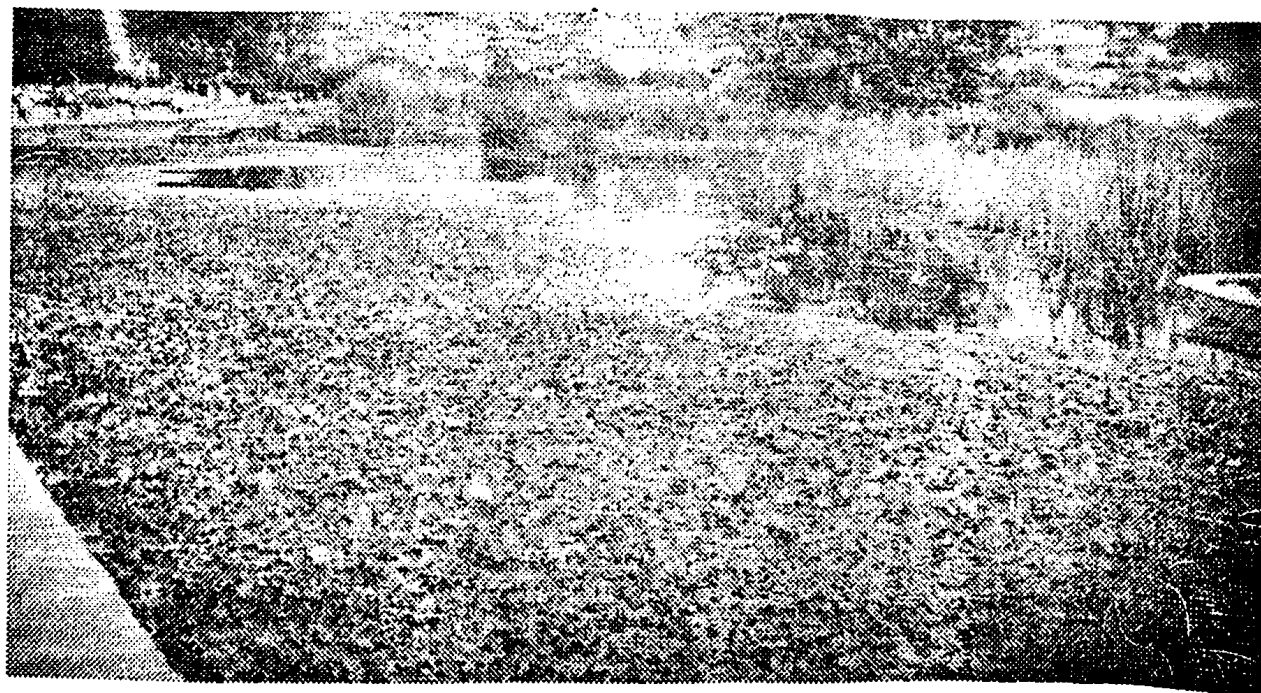


Λίμνη της Καστοριάς(Πριν την γέφυρα)



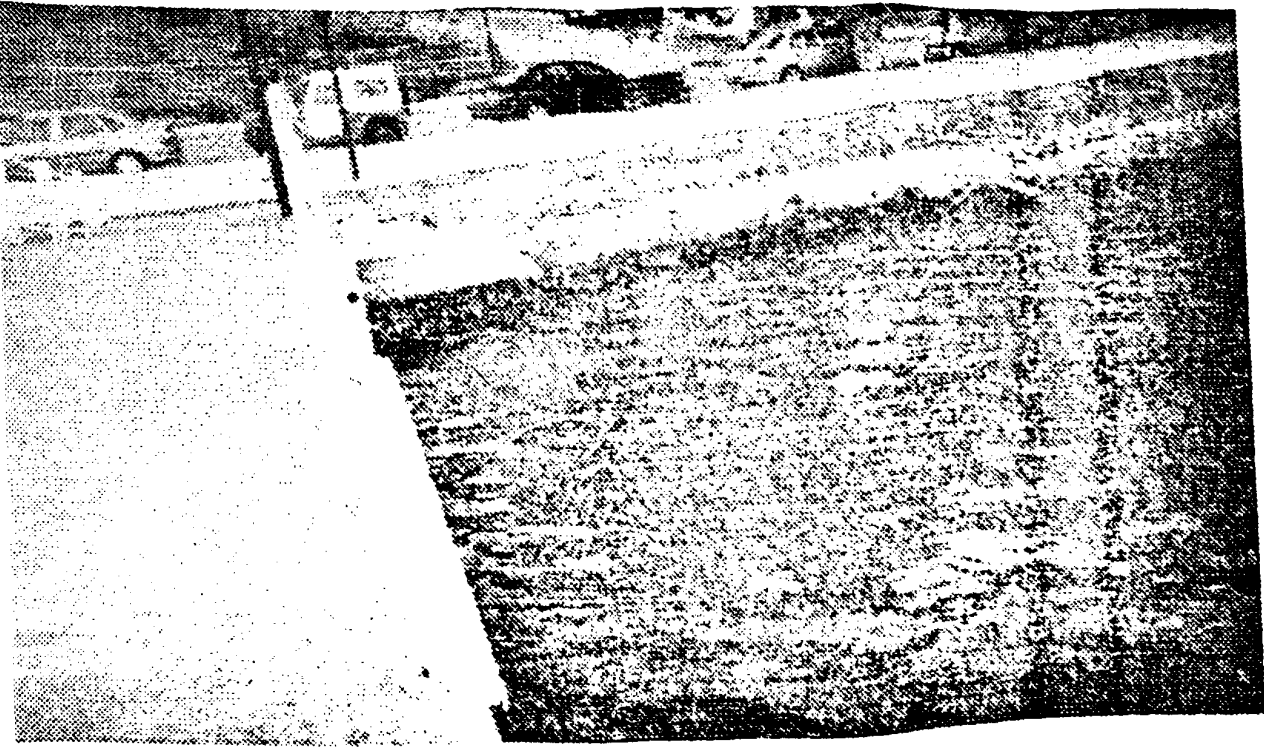


Λίμνη της Καστοριάς(Γέφυρα)

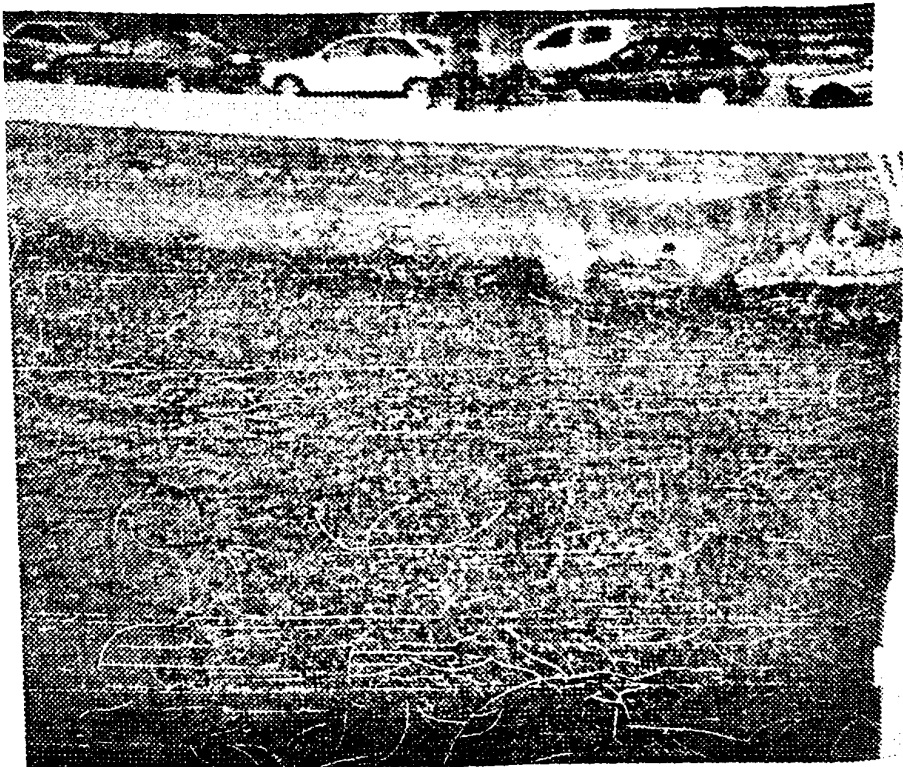


Λίμνη της Καστοριάς(Είσοδος στην πόλη)

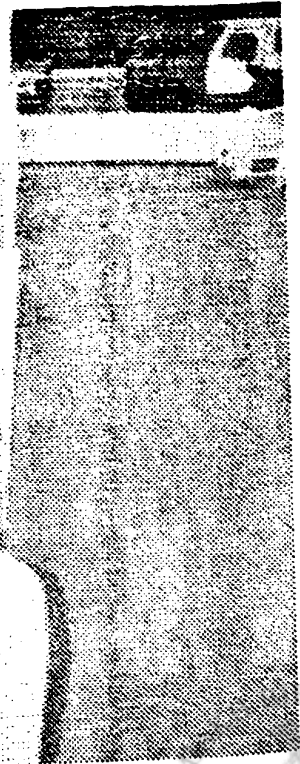




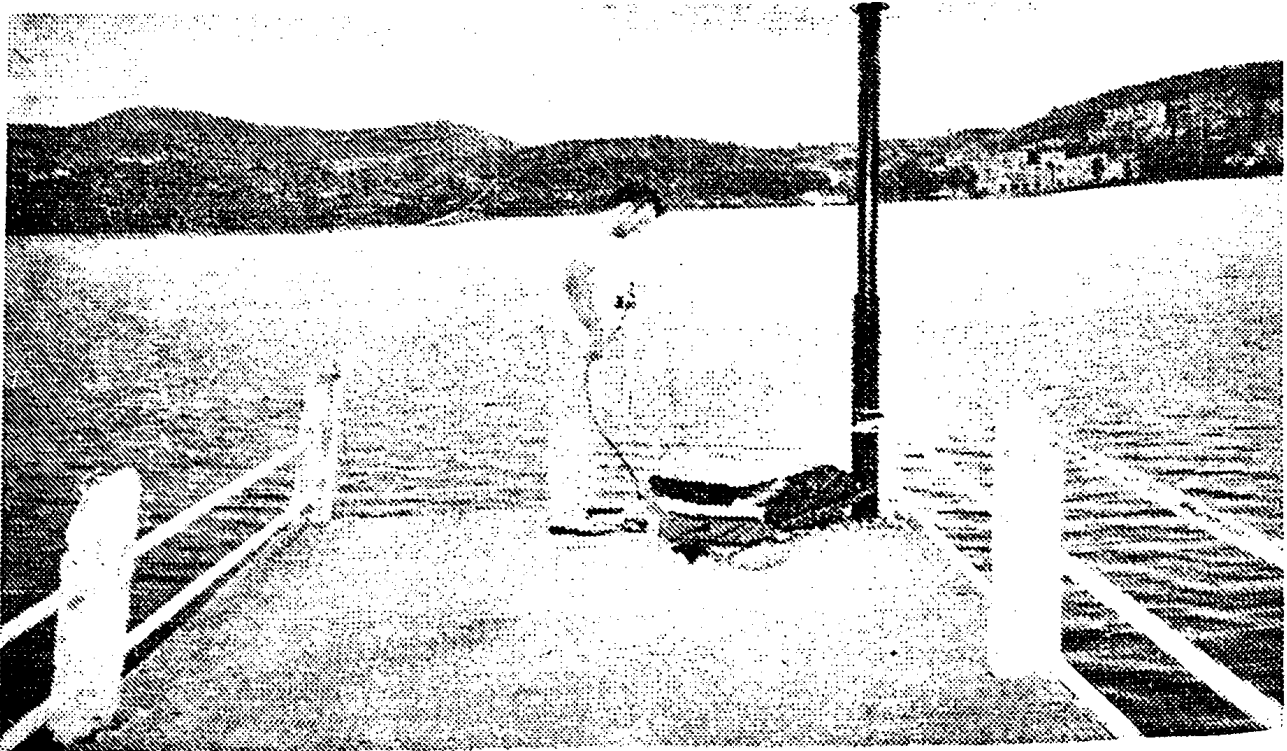
Λίμνη της Καστοριάς(Γέφυρα)



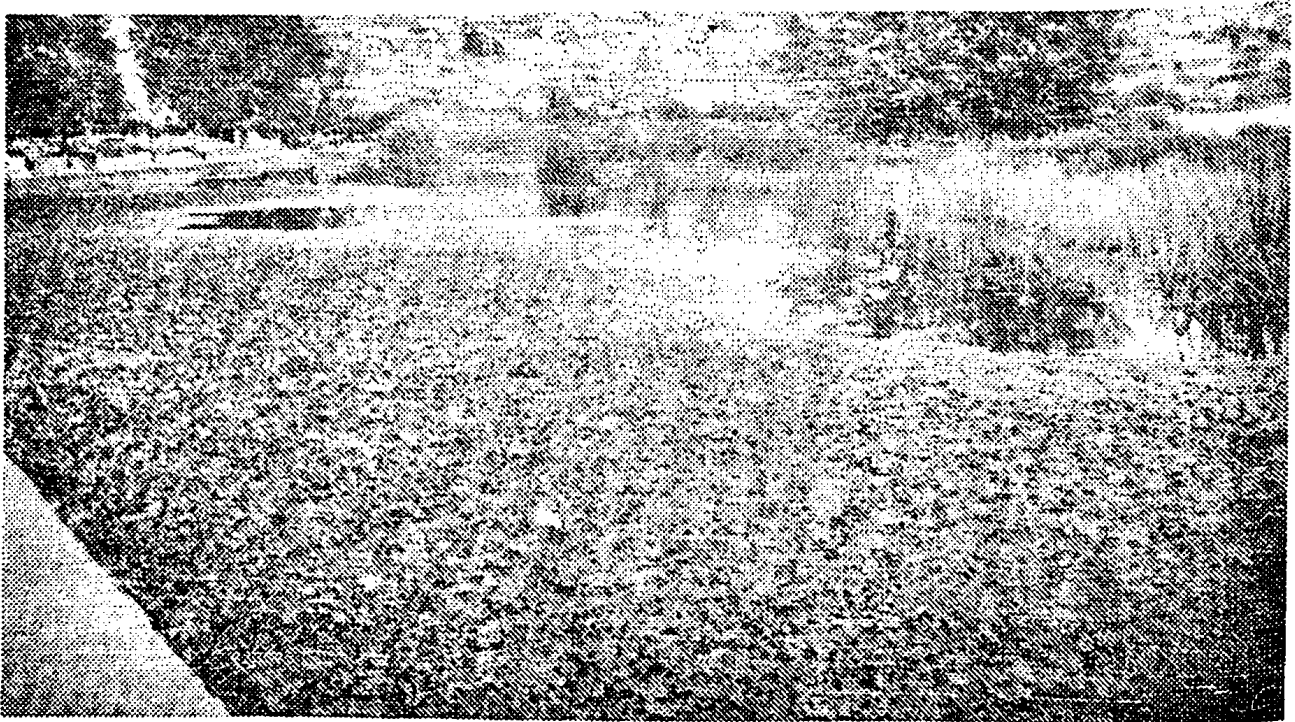
Λίμνη της Καστοριάς(Γέφυρα)



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

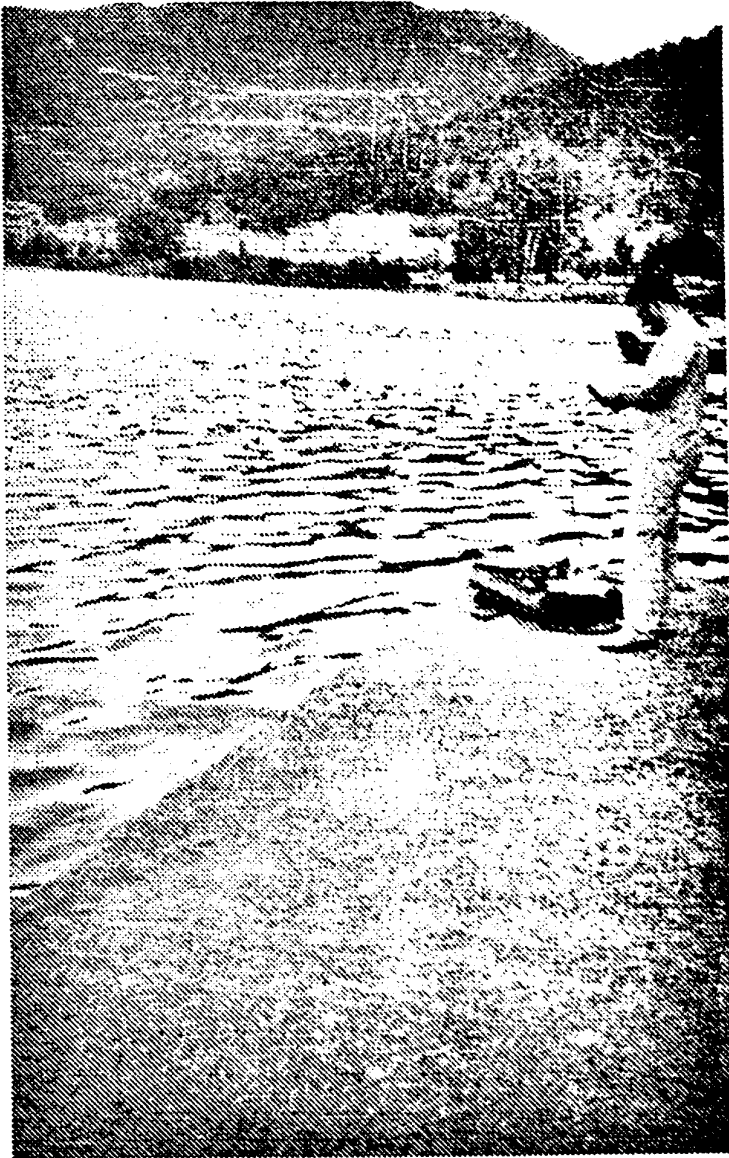


Λίμνη της Καστοριάς(Γέφυρα)



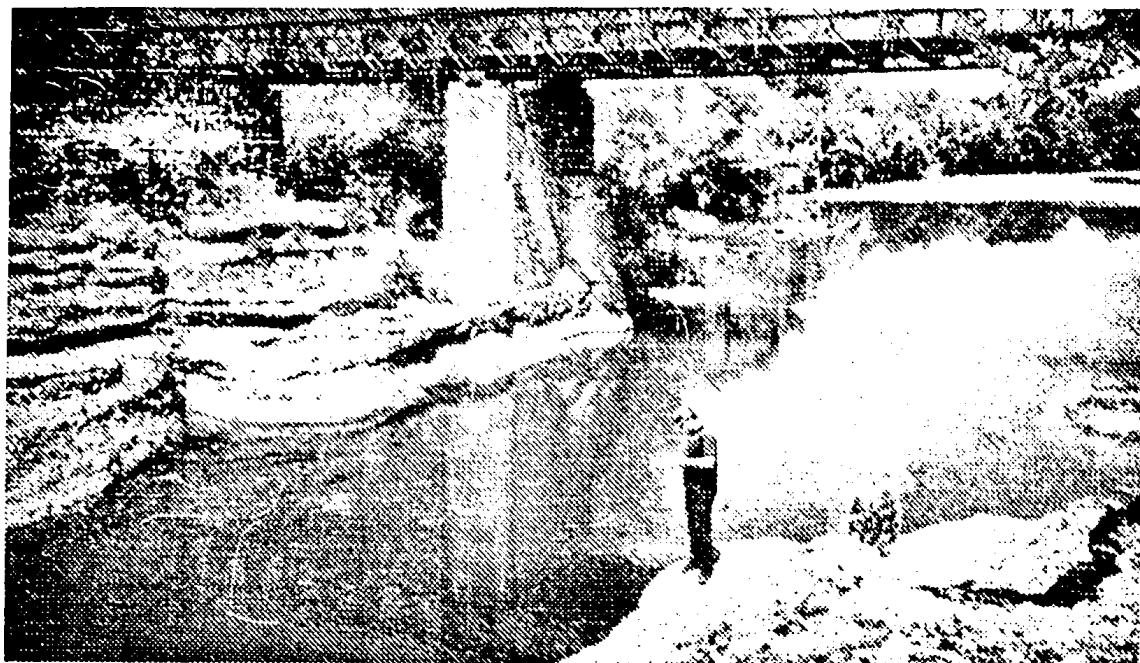
Λίμνη της Καστοριάς(Είσοδος στην πόλη)



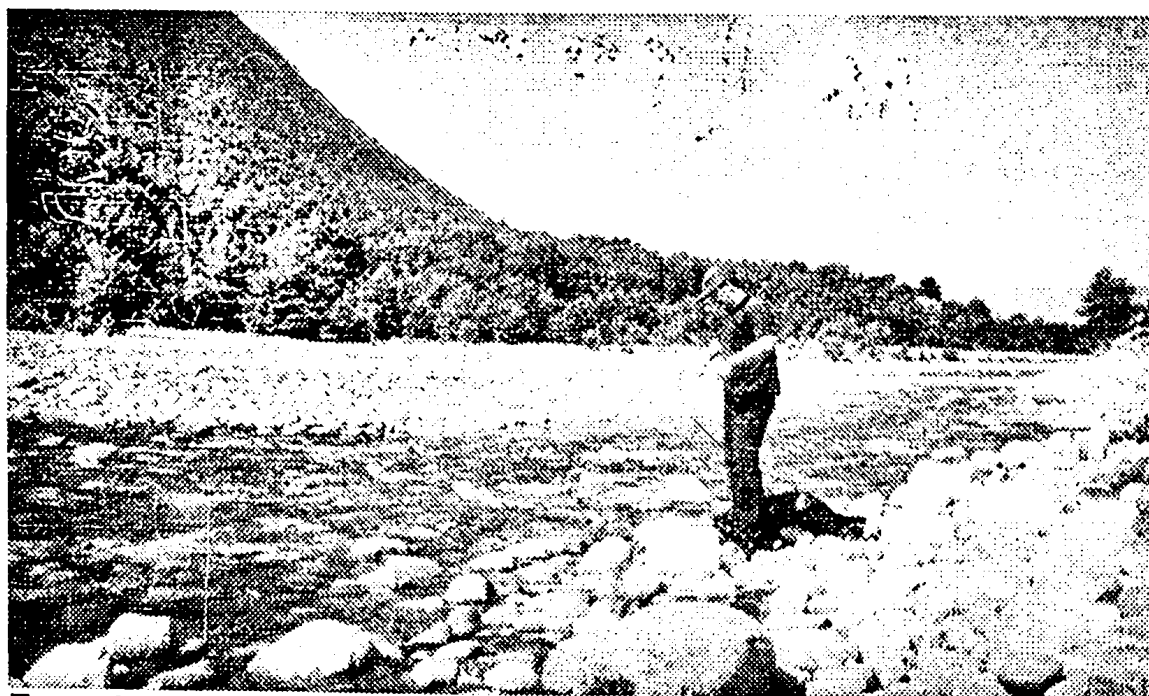


Λίμνη της Καστοριάς(Είσοδος στην πόλη)

Ποταμός Αώος



Ποταμός Αώος(Μπουραζάνι)



Ποταμός Αώος(Γέφυρα Κόνιτσας)



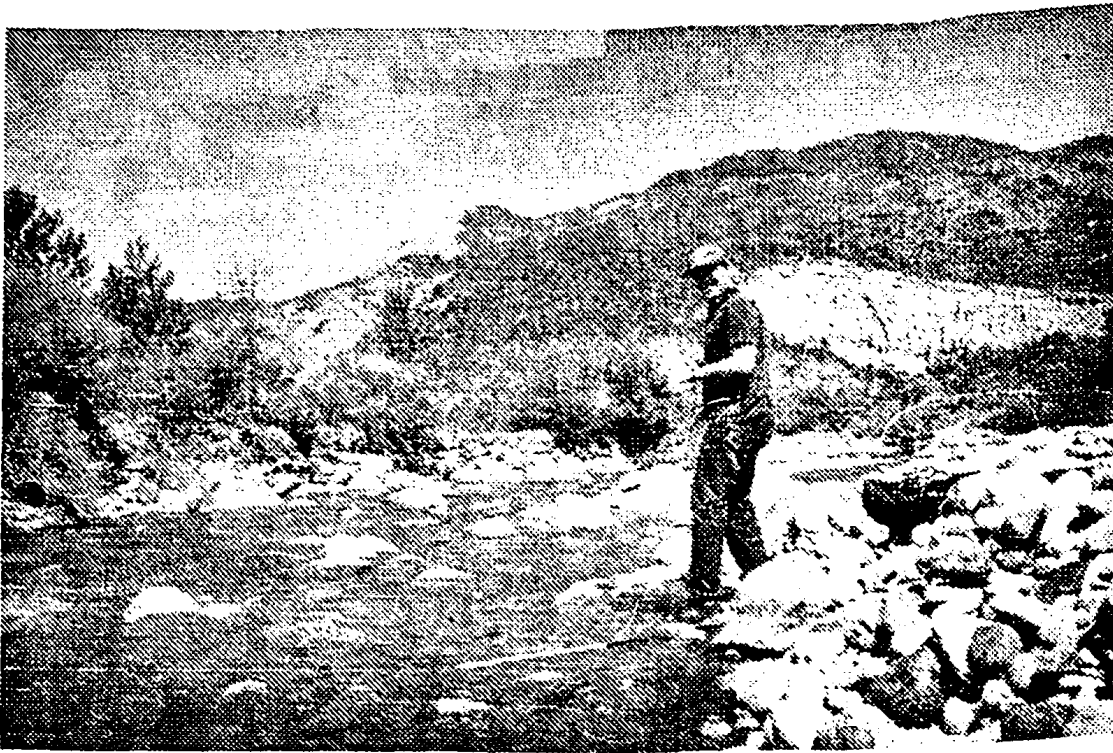


Ποταμός Αώος(Γέφυρα Αγίας Παρασκευής)

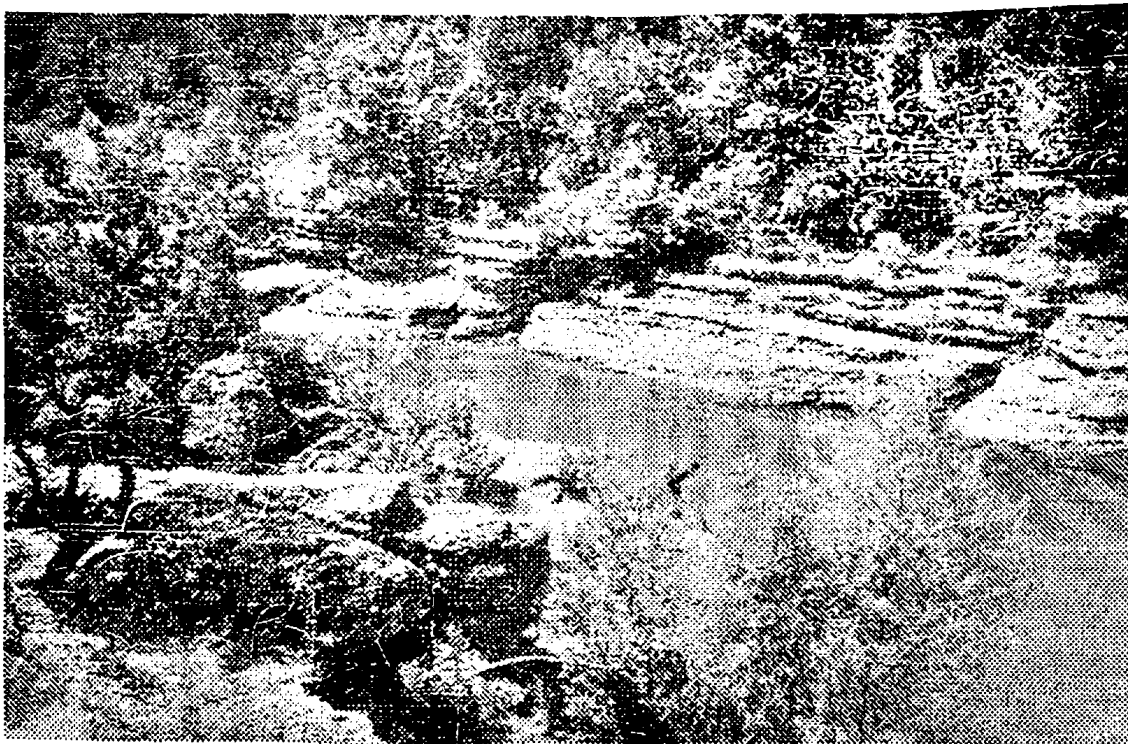


Ποταμός Αώος(Γέφυρα Κόνιτσας)





Ποταμός Αώος(Γέφυρα Αγίας Παρασκευής)



Ποταμός Αώος(Μπουραζάνι)

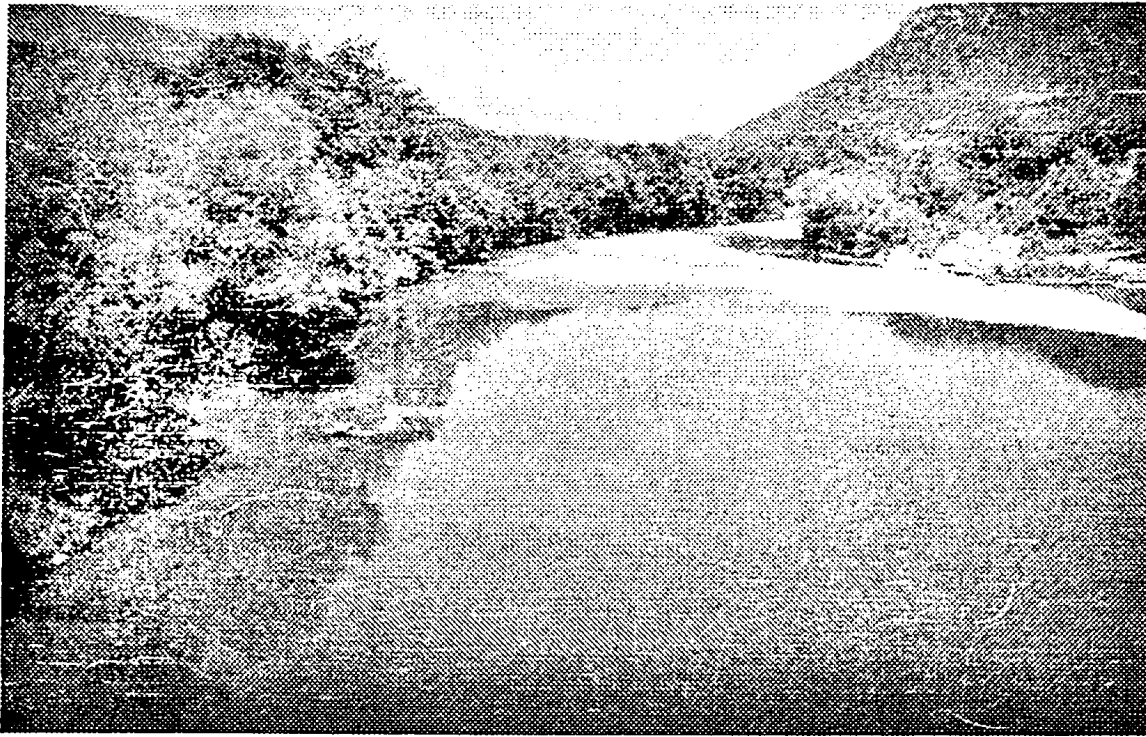


Ποταμός Αώος(Μπουραζάνι)

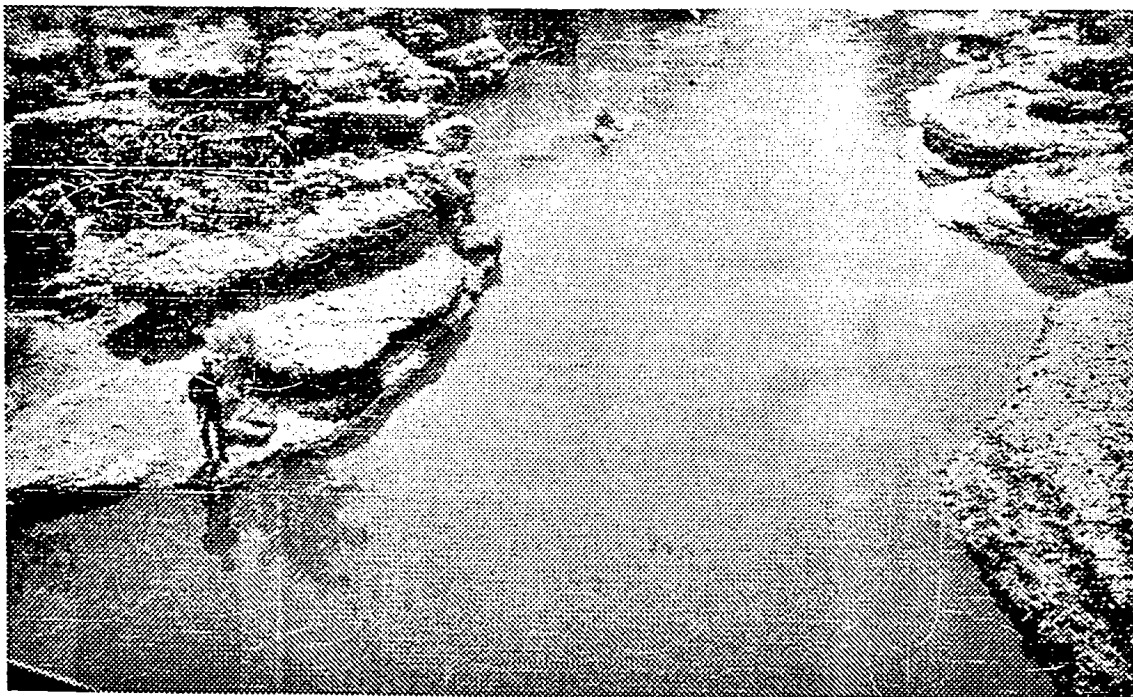


Ποταμός Αώος(Μπουραζάνι)

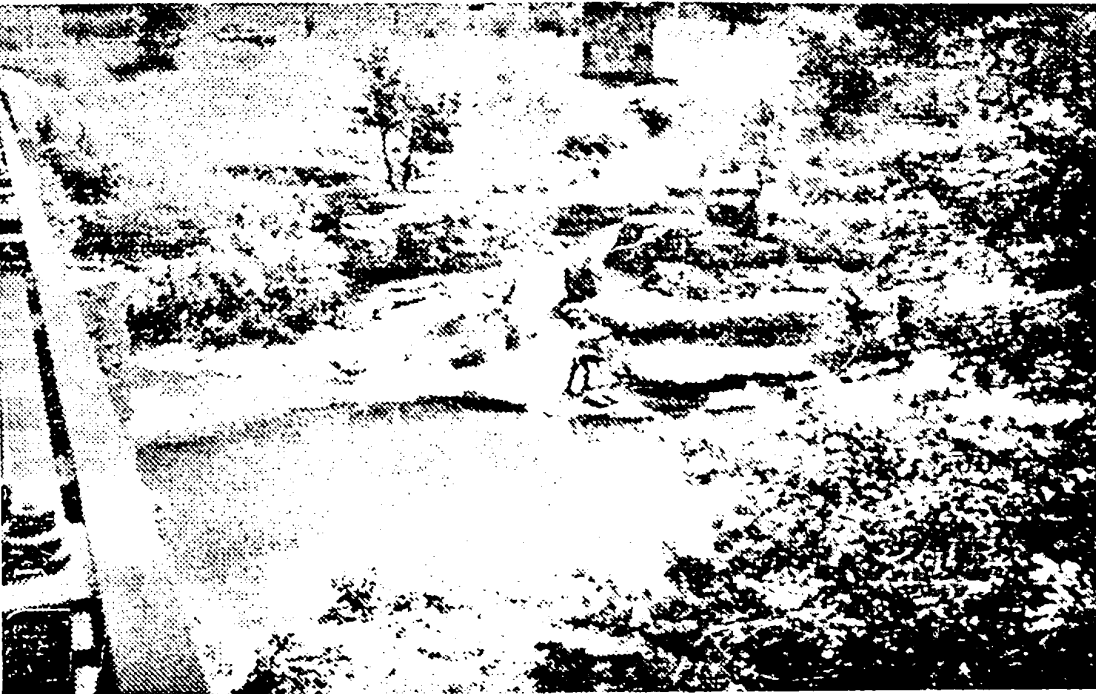




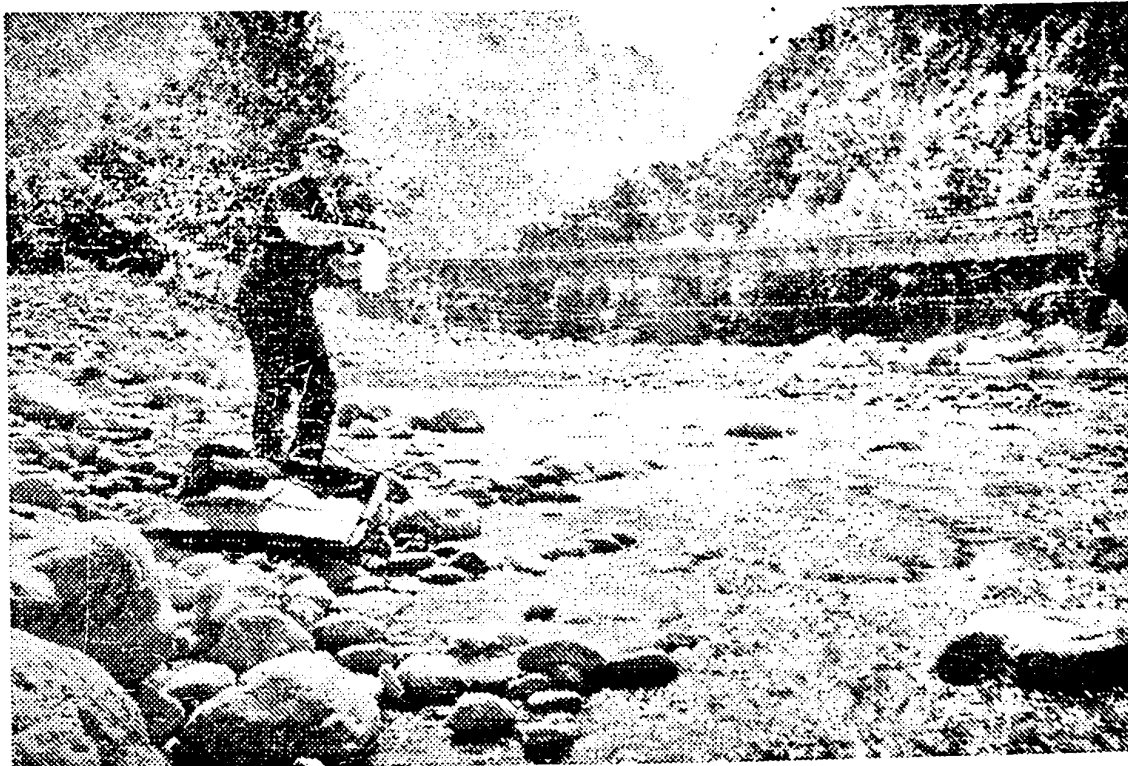
Ποταμός Αώος(Μπουραζάνι)



Ποταμός Αώος(Μπουραζάνι)

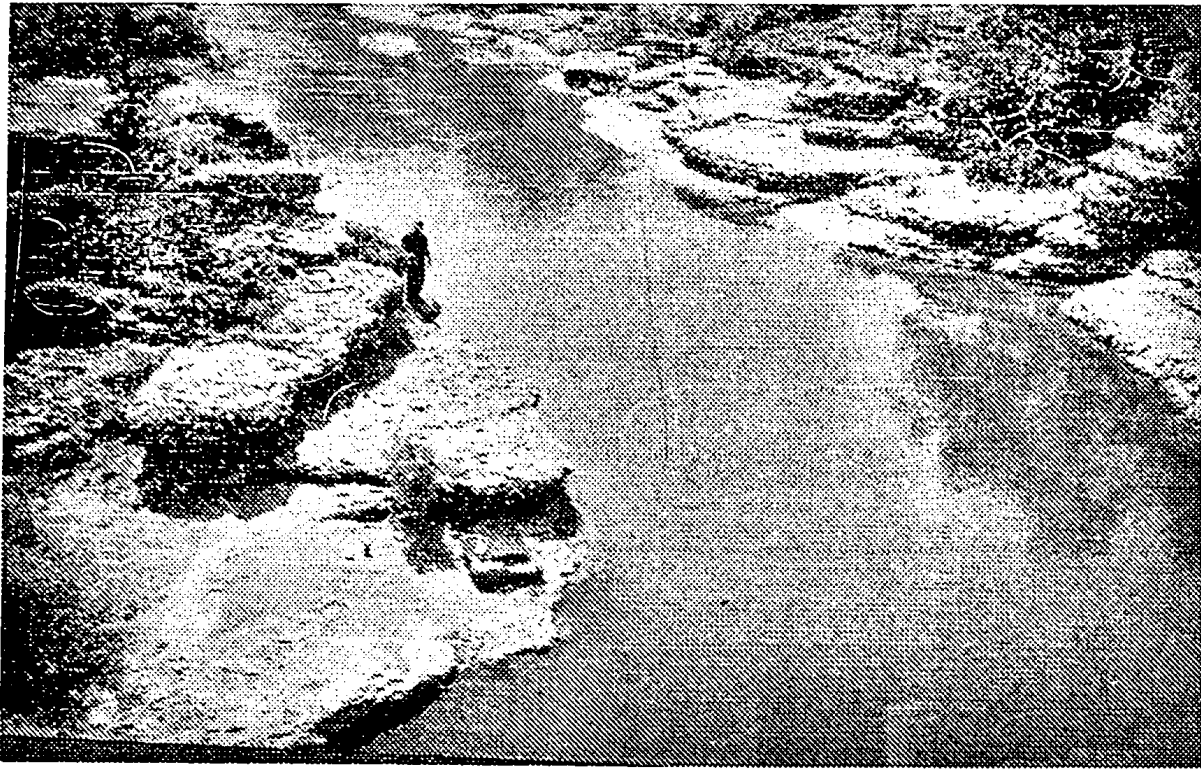


Ποταμός Αώος(Μπουραζάνι)



Ποταμός Αώος(Γέφυρα Κόνιτσας)





Ποταμός Αίως(Μπουραζάνι)



Βοϊδομάτης

Βοϊδομάτης(Παλαιά γέφυρα-Κλειδωνιά)

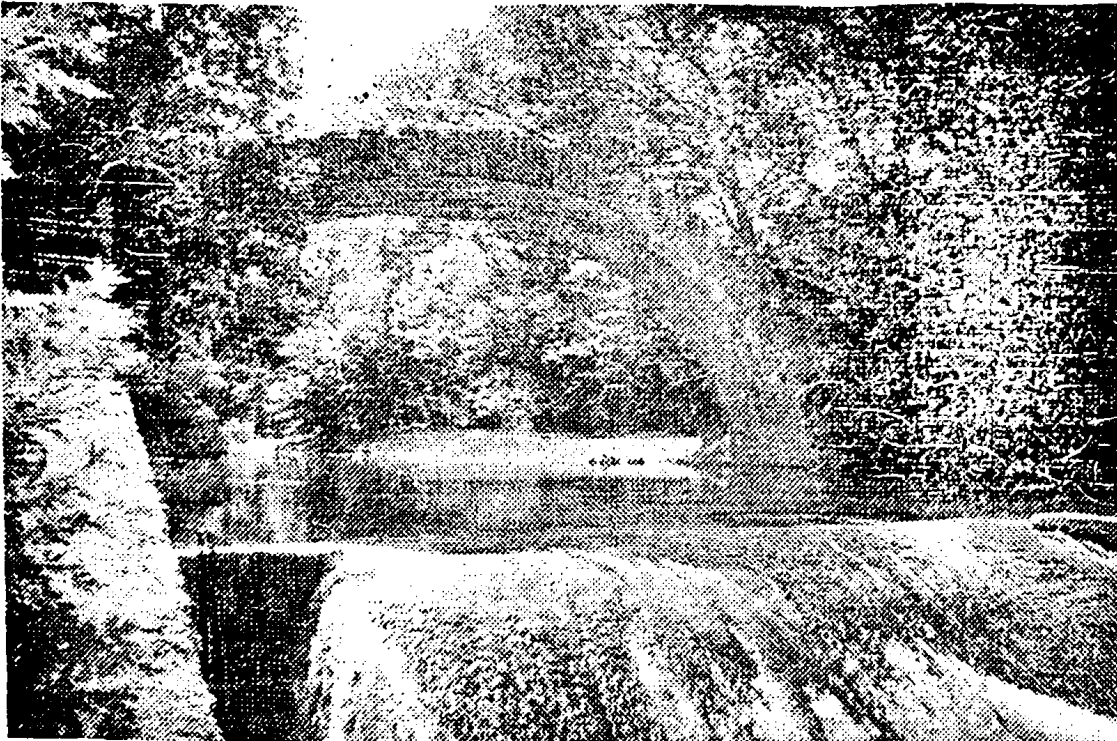


Βοϊδομάτης(Παλαιά γέφυρα-Κλειδωνιά)





Βοΐδομάτης(Παλαιά γέφυρα-Κλειδωνιά)



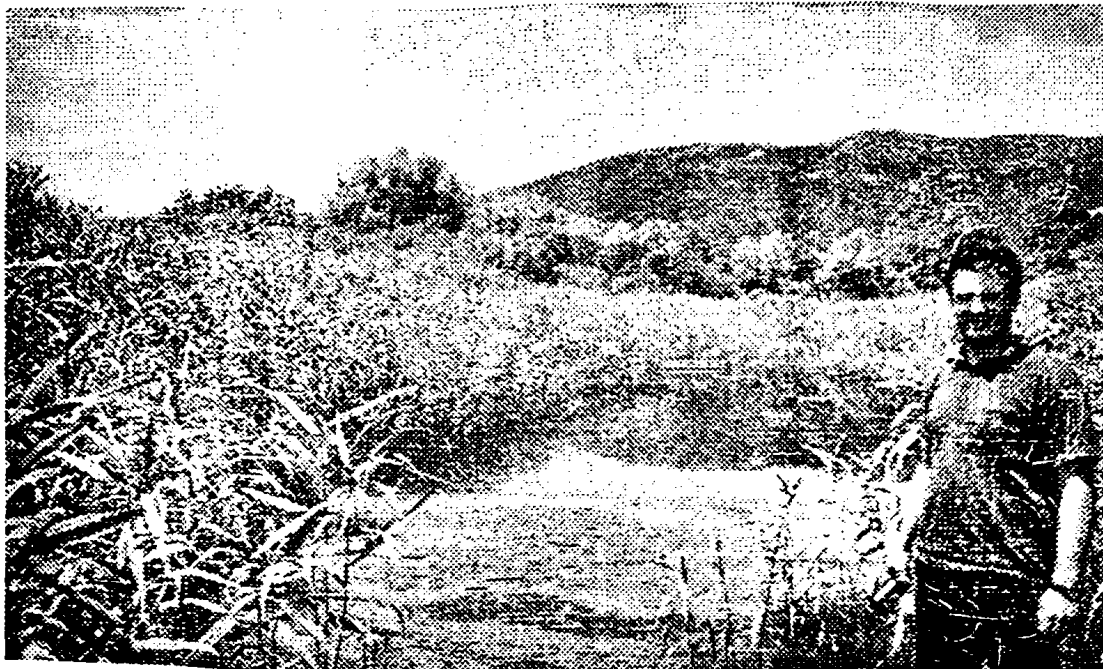
Βοΐδομάτης(Παλαιά γέφυρα-Κλειδωνιά)





Βοϊδομάτης (Μετά το Ιχθυοτροφείο Γιαννέτα)

Ποταμός Καλαμάς

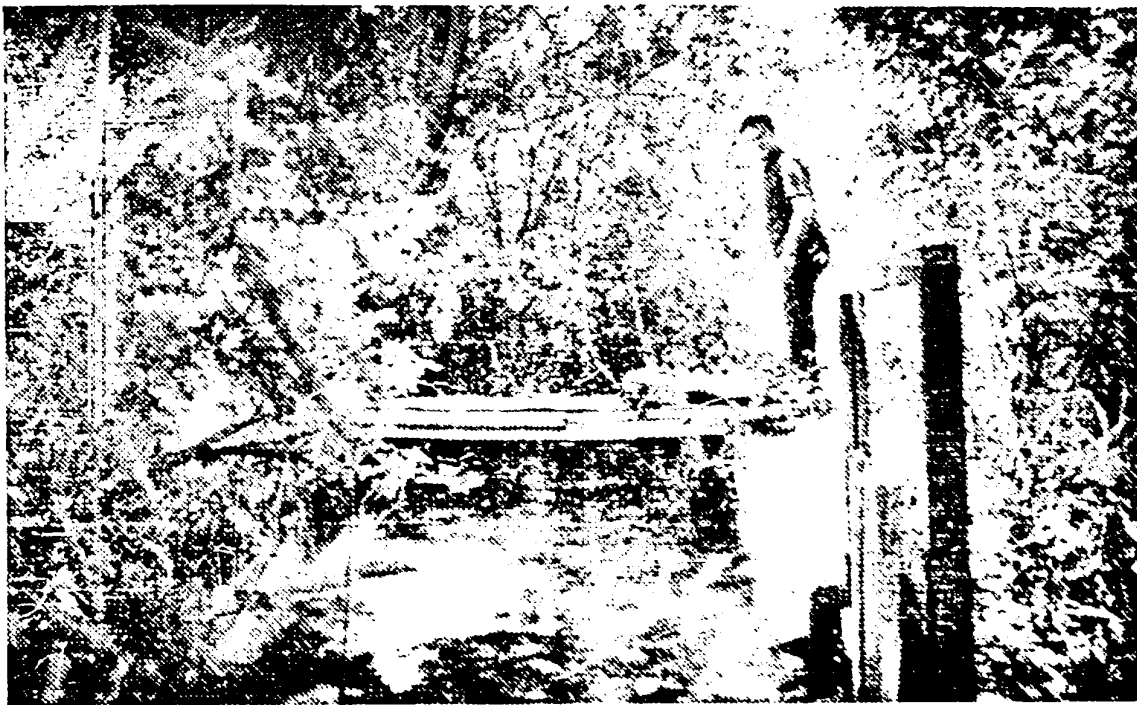


Ποταμός Καλαμάς(Πηγές)



Ποταμός Καλαμάς(ΑΣΜΕΚ)





Ποταμός Καλαμάς(Πηγές)

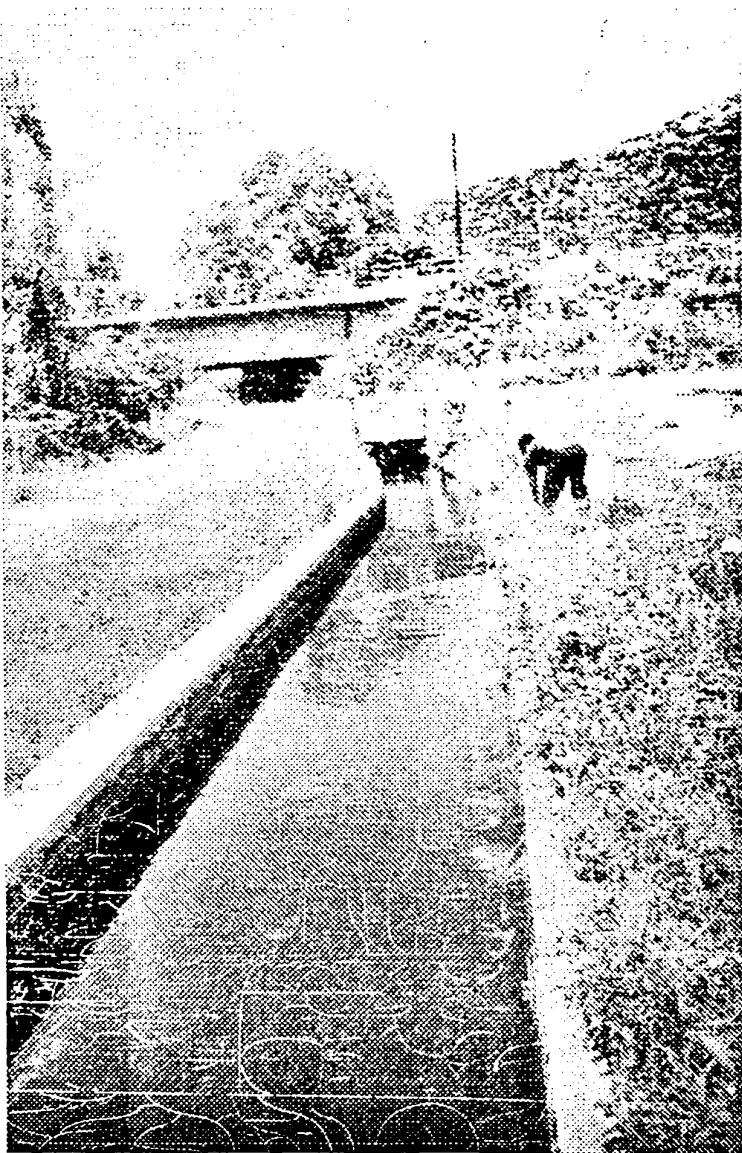


Ποταμός Καλαμάς(Κοντά στον Γορμό)



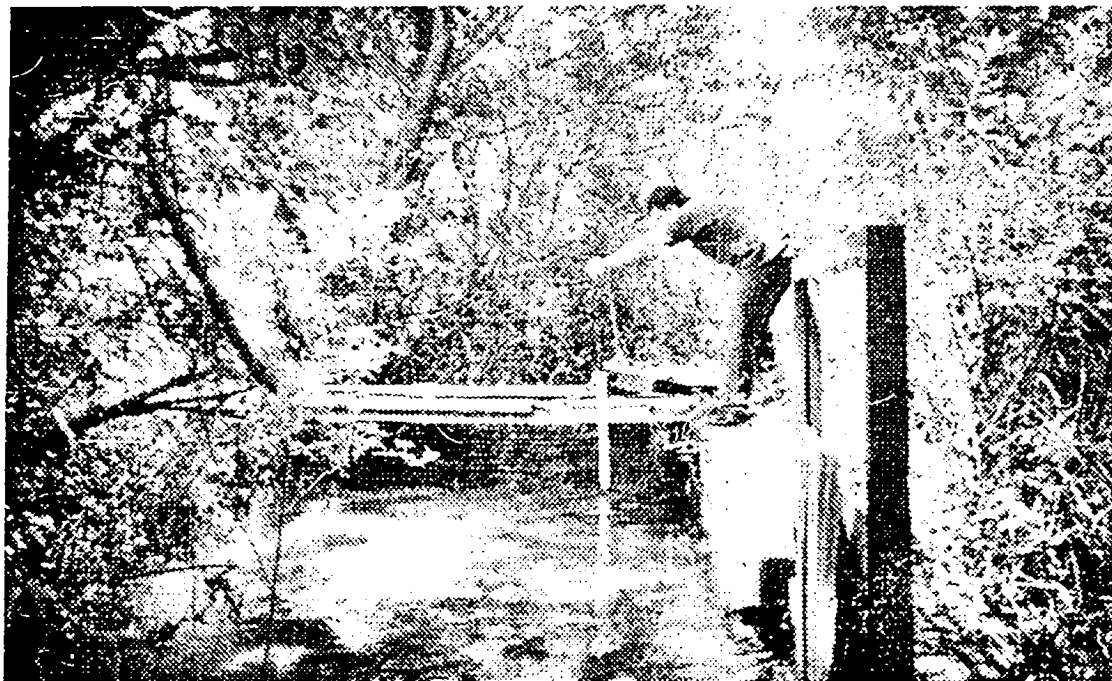


Ποταμός Καλαμάς(Πηγές)

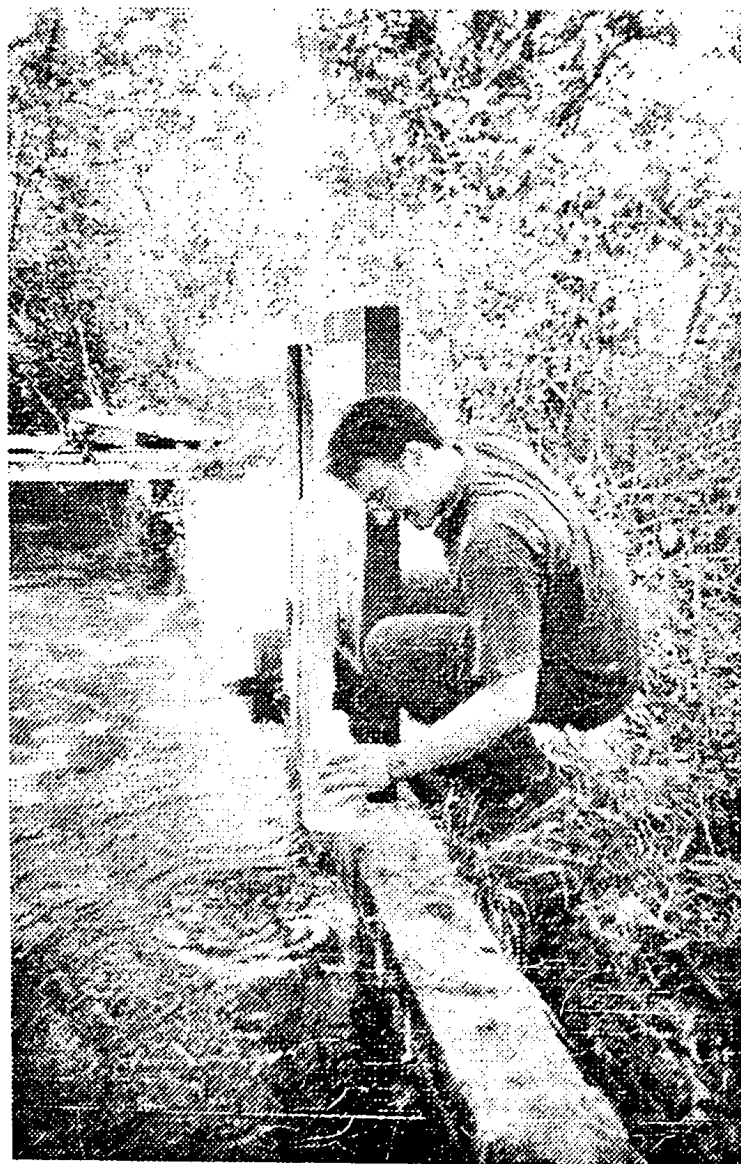


Ποταμός Καλαμάς(ΑΣΜΕΚ)





Ποταμός Καλαμάς(Πηγές)



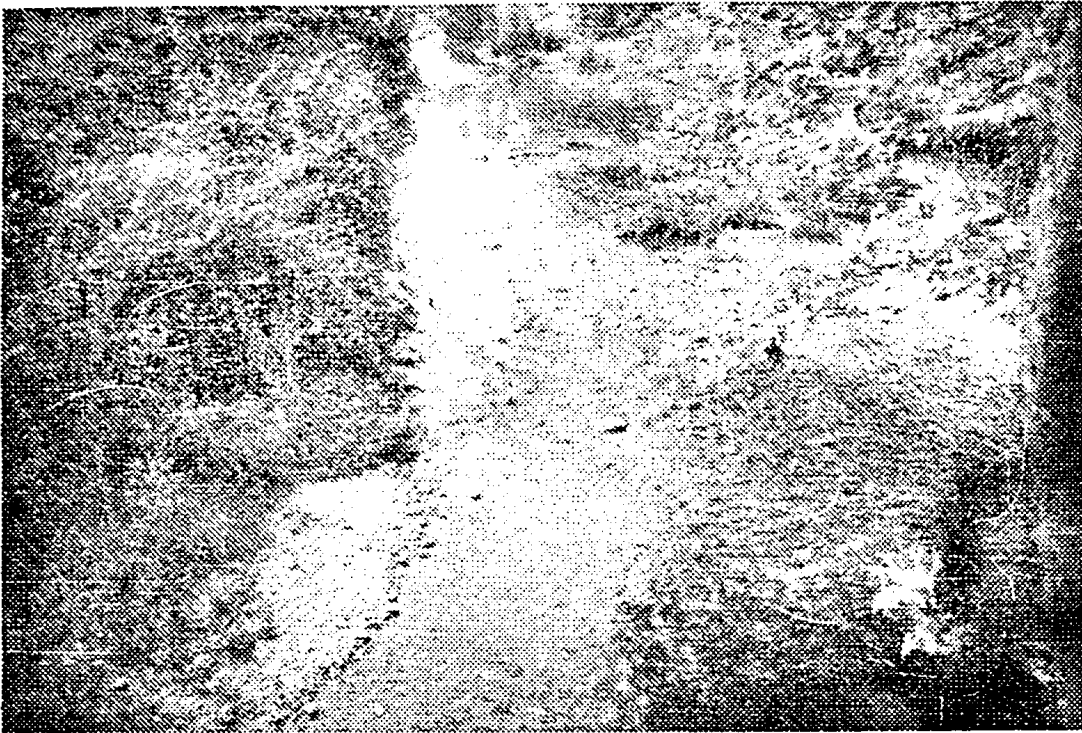
Ποταμός Καλαμάς(Πηγές)



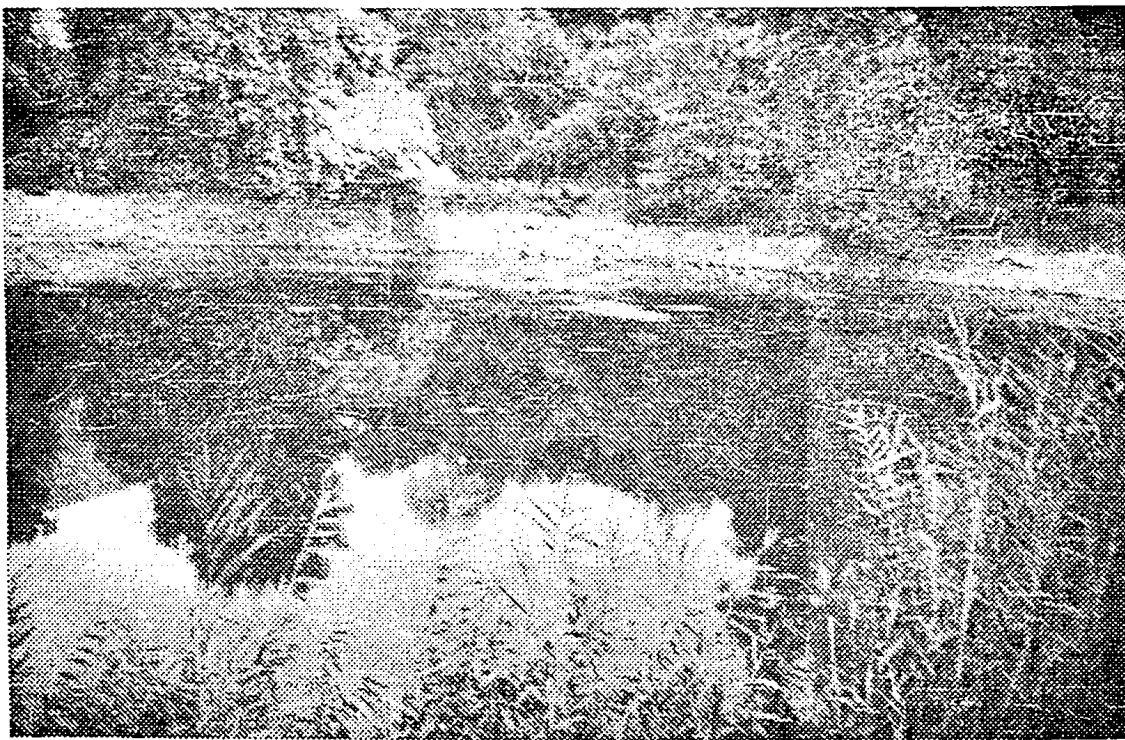
Πτολεμαίδα(Ρέμα Σουλού)



Ποταμός Λούρος



Ποταμός Λούρος(Βουλιάστα)



Ποταμός Λούρος(Βυρού)



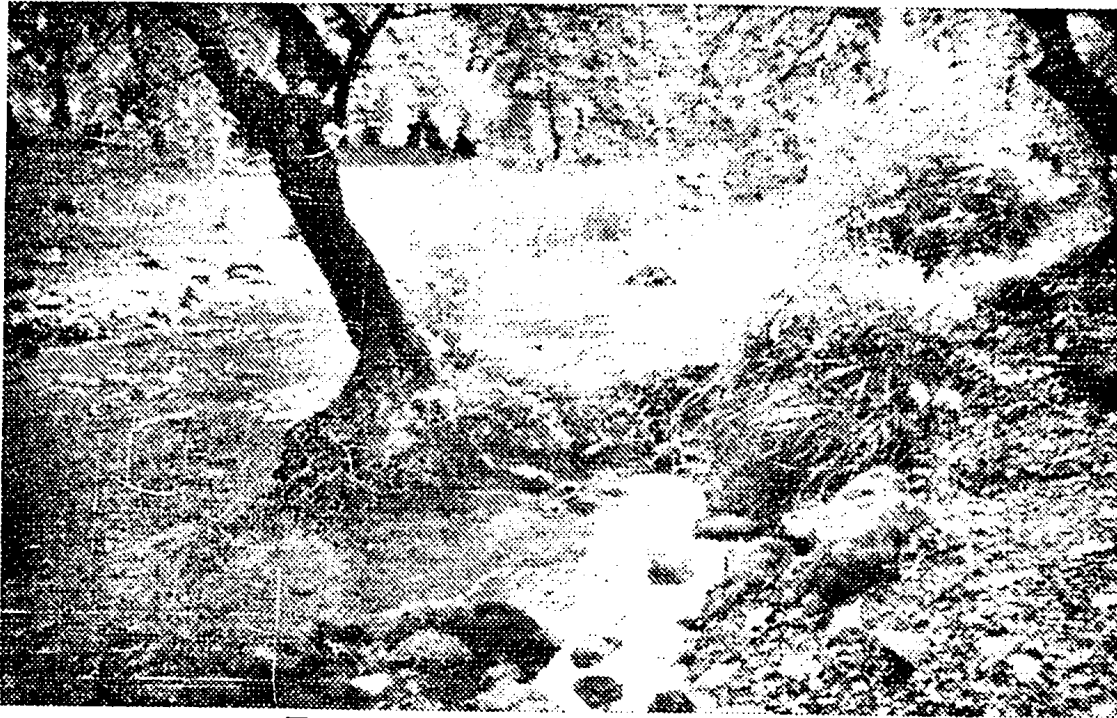


Ποταμός Λούρος(Μουσιωτίτσα)

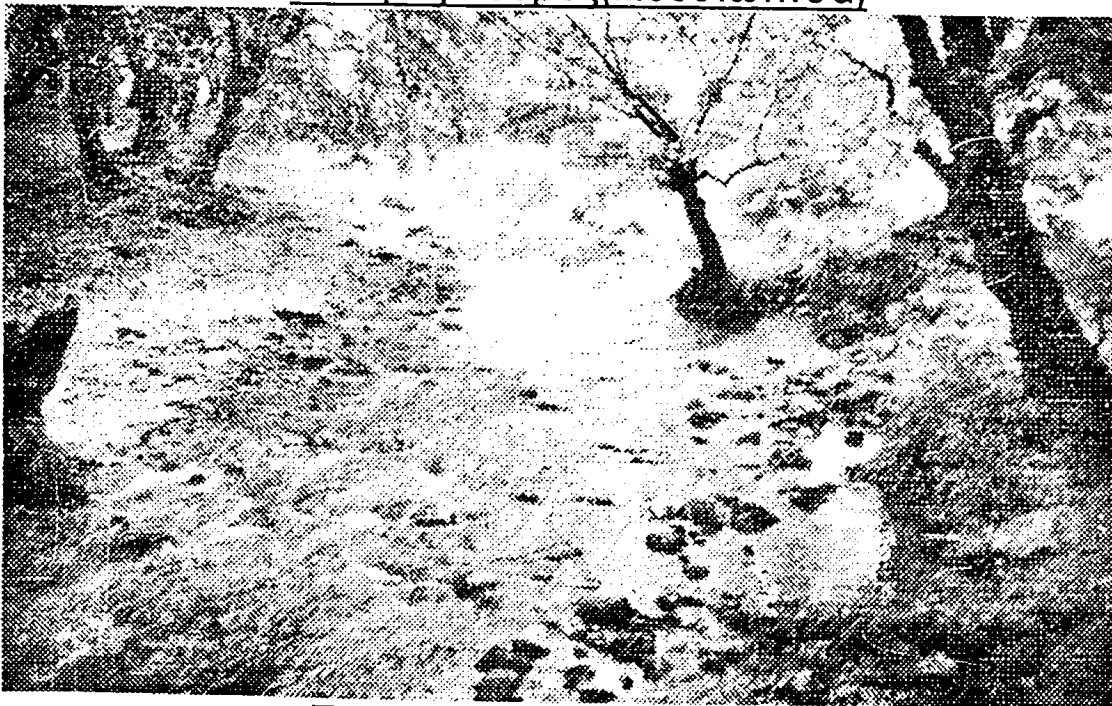


Ποταμός Λούρος(Πλατανάκια)





Ποταμός Λούρος(Μουσιωτίτσα)

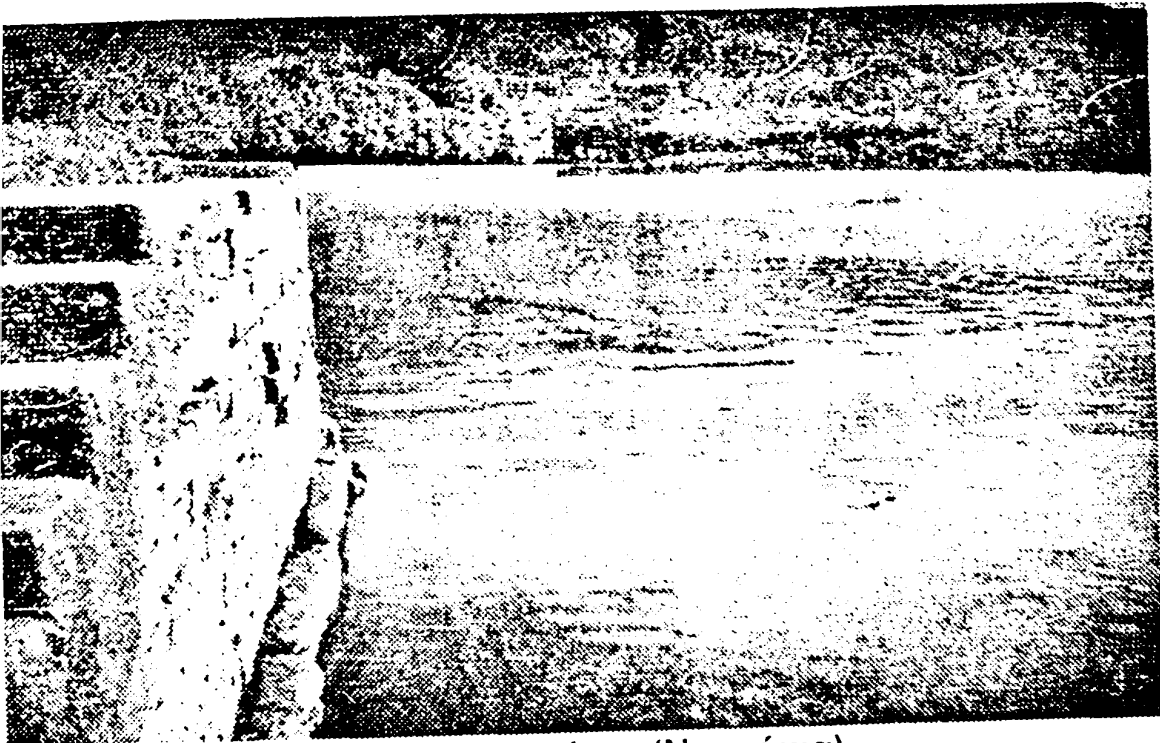


Ποταμός Λούρος(Βουλιάστα)

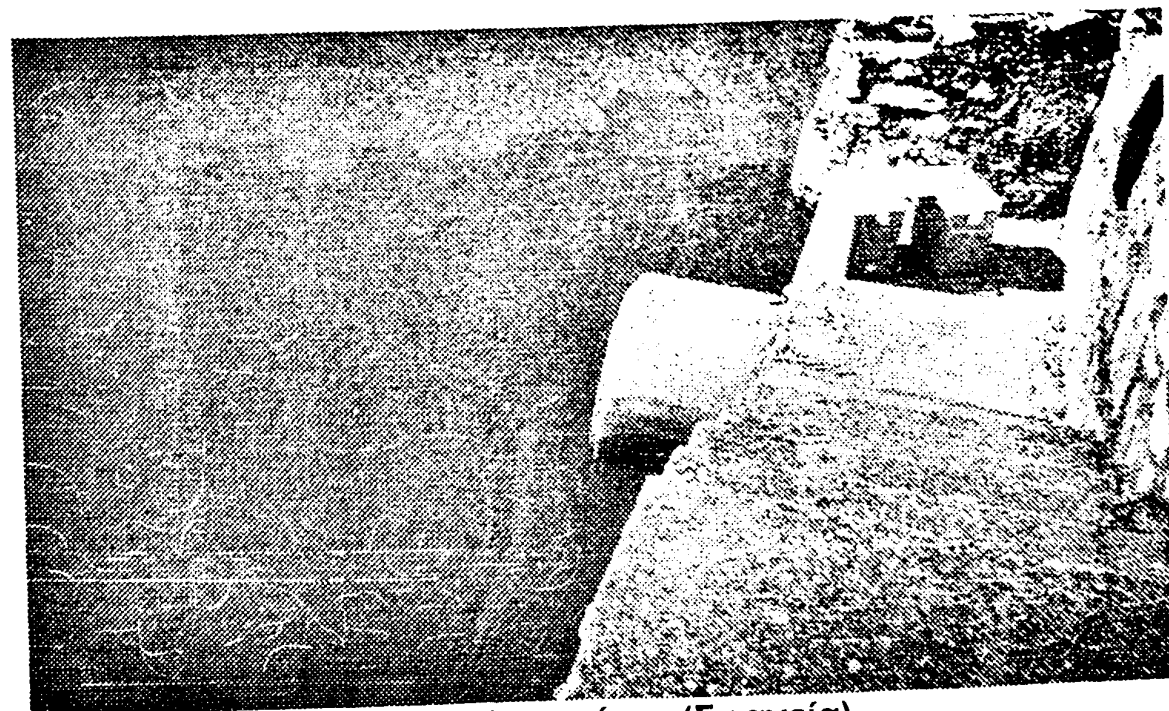
23



Λίμνη Ιωαννίνων

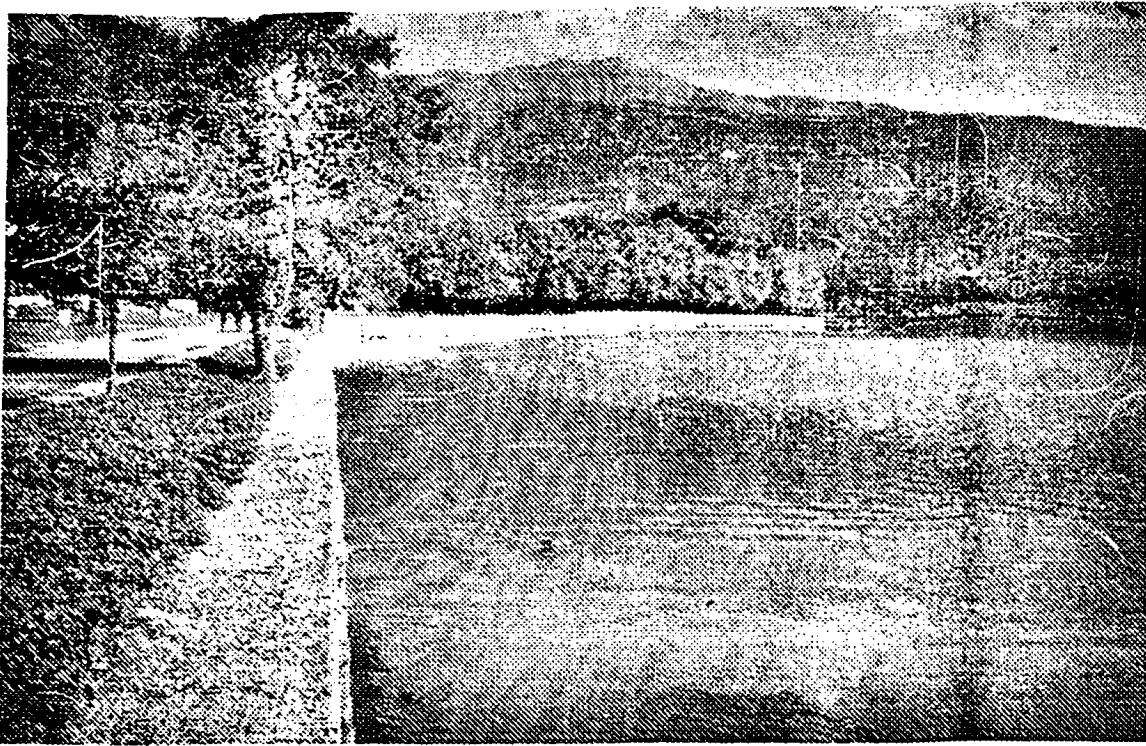


Λίμνη Ιωαννίνων(Ναυτάκια)

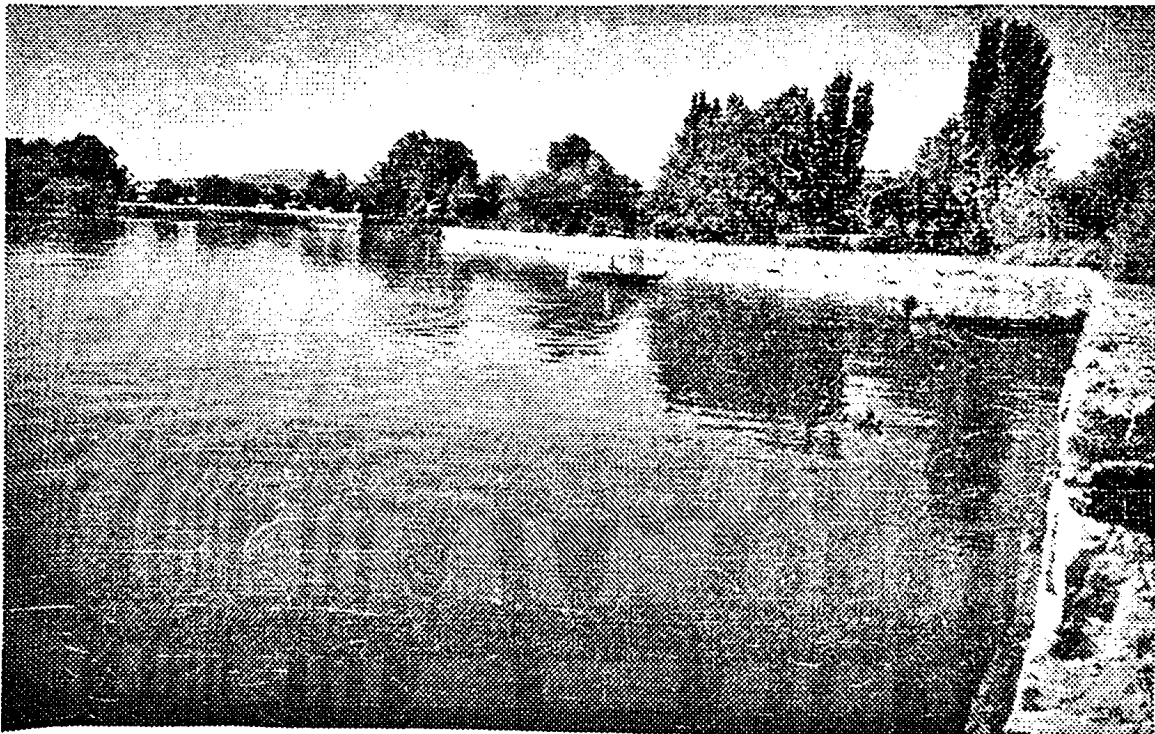


Λίμνη Ιωαννίνων(Σφαγεία)





Λίμνη Ιωαννίνων(Du Lac)



Λίμνη Ιωαννίνων(Κοντά στα Ναυτάκια)

