

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200114



42-2003.....456.....2.9



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: Επίκουρος Καθηγήτρια
Σταματίνα Λεβειδιώτου - Στεφάνου**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΕΥΝΟΟΥΝ ΤΗΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ CLOSTRIDIUM SPP ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗΝ
ΠΗΓΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ**

**Θεοχάρης Ν. Κέγκος
Βιολόγος**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα
N.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού τμήματος)»



ΑΙΤΗΣΗ: 09/02/1998

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 16/06/1998

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

Μπεζιρτζόγλου Ευγενία

Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΜΕΛΗ :

Κοντομηνάς Μιχάλης

Καθηγητής Χημείας Τροφίμων Χημικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μάϊτα Βασιλική

Επίκουρος Καθηγήτρια Υγιεινής Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΘΕΜΑΤΟΣ: 22/06/1998

ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 30/06/2003

ΟΝΟΜΑ ΠΡΟΕΔΡΟΥ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ : Αγνάντη Νίκη

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ευαγγέλου Άγγελος

Καθηγητής Φυσιολογίας Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κοντομηνάς Μιχάλης

Καθηγητής Χημείας Τροφίμων Χημικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σιμόπουλος Κων/νος

Καθηγητής Χειρουργικής Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης

Τσιάνος Επαμεινώντας

Καθηγητής Παθολογίας Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καλφακάκου Βασιλική

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

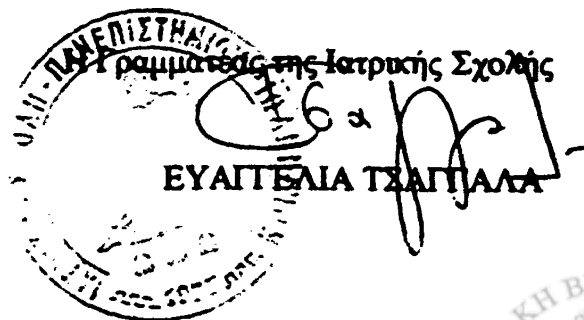
Μάϊτα Βασιλική

Επίκουρος Καθηγήτρια Υγιεινής Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μπεζιρτζόγλου Ευγενία

Επίκουρος Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικού Τμήματος Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: Άριστα



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος της στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, βοήθεια υπήρξε όταν αυτό ήταν αναγκαίο από τα Εργαστήρια Υγιεινής και Φυσιολογίας της Ιατρικής Σχολής καθώς και το Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του Χημικού Τμήματος. Ένα μέρος της επίσης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής και Φυσιολογίας βακτηρίων του Τμήματος Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Austin του Texas.

Αρχικά και ιδιαίτερως θέλω να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια της Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Ευγενία Μπεζιρτζόγλου για την ανάθεση του θέματος της διατριβής, την συνεχή βοήθειά της, την κατανόηση και υπομονή της καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής αυτής. Ακόμη θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την δυνατότητα μετεκπαίδευσης μου στην Αμερική που μου έδωσε, με στόχο την πληρέστερη επιστημονική μου κατάρτιση.

Ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια της Υγιεινής της Ιατρικής Σχολής κ. Βασίλική Μάιττα για τη συνεργασία και τις εύστοχες υποδείξεις της, καθώς και τους συνεργάτες της στο Εργαστήριο Υγιεινής.

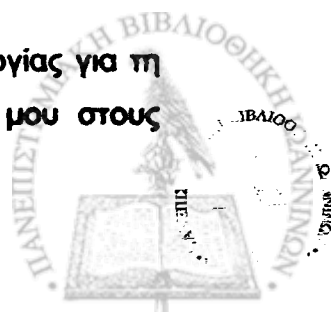
Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Τροφίμων του Χημικού Τμήματος κ. Μιχάλη Κοντομηνά για την συνεργασία και φιλοξενία στο εργαστήριο όταν υπήρξε ανάγκη, καθώς και στους συνεργάτες του στο Εργαστήριο.

Θερμά ευχαριστώ στον Καθηγητή της Παθολογίας κ. Επαμεινώντα Τσιάνο που επέτρεψε τη δυνατότητα συλλογής δειγμάτων βιοψιών από τη Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Ευχαριστώ επίσης θερμά όλο το Ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό της Γαστρεντερολογικής Κλινικής για την βοήθεια, φιλική συμπεριφορά του και ανοχή, καθότι από τις πρωινές μέχρι τις μεσημβρινές ώρες σχεδόν κάθε μέρα για μακρύ χρονικό διάστημα βρισκόμουν στην Κλινική τους περιμένοντας το κατάλληλο δείγμα.

Τις θερμές μου ευχαριστίες εκφράζω στον Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Αγγελο Ευαγγέλου και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας κ. Βασίλική Καλφακάκου για τη συνεργασία, φιλική συμπεριφορά και κατανόηση.

Ευχαριστώ, τον Καθηγητή της Χειρουργικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης κ. Κωνίνο Σιμόπουλο που παρά το βεβαρημένο πρόγραμμα του παρευρέθη στην παρουσίαση της διδακτορικής μου διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας για τη συνεργασία και το φιλικό κλίμα. Ιδιαίτερως εκφράζω τις ευχαριστίες μου στους



άμεσους συνεργάτες μου, κ. Χρύσα Βοϊδάρου (PhD) και τον κ. Αρσένη Τσιότσια (PhD), για την αλληλοβοήθεια και αμοιβαία κατανόηση. Ακόμη τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη του ΕΤΕΠ του εργαστηρίου Μικροβιολογίας κ. Όλγα Σάρρα και κ. Ελευθερία Τσαντά για τη βοήθεια όταν αυτή ήταν απαραίτητη και τα φιλικά αισθήματα.

Θερμά ευχαριστώ στον Καθηγητή του Χημικού Τμήματος κ. Νικόλαο Χατζηλιάδη καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σωτήριο Χατζηκακού με την μεγάλη βοήθεια των οποίων πραγματοποιήθηκε η μετεκπαίδευση μου στο Πανεπιστήμιο του Austin του Texas.

Ευχαριστώ, τον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων κ. Ιωάννη Σαββαΐδη για τις συμβουλές του και την παρέα στην συνοδοιπορία προς τις Δρακόλιμνες.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους Καθηγητές του Πανεπιστημίου του Austin του Texas, κ. George Georgiou, κ. Charles F. Earhart, κ. Ian Molineux για την βοήθεια τους και δυνατότητα βαθιάς κατανόησης της Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής των βακτηριών.



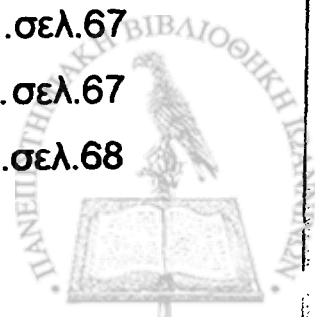
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

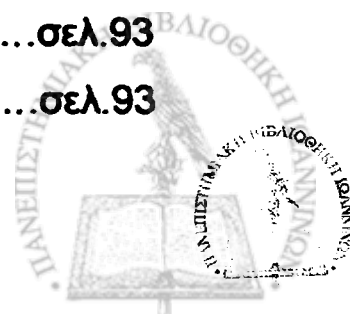
Οικολογία Μικροβίων.....σελ. 1	σελ. 1
Βιογεωχημικοί κύκλοι.....σελ. 8	σελ. 8
Κύκλος άνθρακα.....σελ. 9	σελ. 9
Κύκλος θείου.....σελ. 10	σελ. 10
Κύκλος αζώτου.....σελ. 11	σελ. 11
Κύκλος σιδήρου.....σελ. 12	σελ. 12
Αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμών σε σχέση με το υπόστρωμα.....σελ. 13	σελ. 13
Ρύθμιση έκφρασης της γενετικής πληροφορίας στους προκαρυωτικούς οργανισμούς.....σελ. 17	σελ. 17
Πώς οι προκαρυωτικοί οργανισμοί επικοινωνούν με το περιβάλλον.....σελ. 17	σελ. 17
Γενικό μοντέλο για το σύστημα μεταγωγής ερεθίσματος.....σελ. 19	σελ. 19
Μεταγραφικός έλεγχος έκφρασης γενετικής πληροφορίας.....σελ. 19	σελ. 19
Μοντέλο RNA-πολυμέρασης.....σελ. 20	σελ. 20
Σφαιρική άποψη ελέγχου του δικτύου με ρύθμιση στο επίπεδο ολόκληρου του κυττάρου.....σελ. 21	σελ. 21
Κοπρανώδεις δείκτες.....σελ. 24	σελ. 24
Ολικός αριθμός των κολοβακτηριδίων (Coliforms).....σελ. 29	σελ. 29
Κοπρανώδη κολοβακτηρίδια.....σελ. 30	σελ. 30
Escherichia coli.....σελ. 31	σελ. 31
Clostridium perfringens.....σελ. 31	σελ. 31
Streptococci, Enterococci.....σελ. 32	σελ. 32
Άλλοι κοπρανώδεις δείκτες.....σελ. 33	σελ. 33
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS.....σελ. 34	σελ. 34
Φυλογενετική προέλευση κλωστηριδίων.....σελ. 34	σελ. 34



Μορφολογία και γενικά χαρακτηριστικά του	
<i>Clostridium perfringens</i>σελ.36	σελ.36
Συνθήκες ανάπτυξης και επίδραση θερμοκρασίας και pH....σελ.37	σελ.37
Μεταβολική δραστηριότητα και βιοχημικές ιδιότητες	
του <i>Clostridium perfringens</i>σελ.39	σελ.39
Τύποι <i>Clostridium perfringens</i>σελ.42	σελ.42
Σπορογονία.....σελ.42	σελ.42
Κύριες τοξίνες του <i>Clostridium perfringens</i>σελ.44	σελ.44
α-τοξίνη.....σελ.44	σελ.44
β-τοξίνη.....σελ.45	σελ.45
ε-τοξίνη.....σελ.45	σελ.45
ι-τοξίνη.....σελ.46	σελ.46
Εντεροτοξίνη του <i>Clostridium perfringens</i>σελ.46	σελ.46
Δευτερεύουσες τοξίνες.....σελ.47	σελ.47
Χαρτογράφηση γονιδιώματος <i>Clostridium perfringens</i>σελ.48	σελ.48
Οικολογία του είδους <i>Clostridium perfringens</i>σελ.52	σελ.52
Παθογόνος δράση	
Αεριογόνος γάγγραινα (μυονέκρωση).....σελ.55	σελ.55
Νεκρωτική εντεροκολίτιδα.....σελ.56	σελ.56
Νεκρωτική εντεροκολίτιδα νεογνών.....σελ.57	σελ.57
SIDS (Σύνδρομο αιφνίδιου θανάτου σε παιδιά).....σελ.57	σελ.57
Τροφική δηλητηρίαση από <i>Clostridium perfringens</i>σελ.58	σελ.58
ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ.....σελ.60	σελ.60
Μικροχλωρίδα εντέρου.....σελ.60	σελ.60
Σημασία της φυσιολογικής μικροβιακής	
χλωρίδας και παράγοντες που την επηρεάζουν.....σελ.63	σελ.63
Βασικές λειτουργίες της εντερικής χλωρίδας.....σελ.67	σελ.67
Συμμετοχή στο μεταβολισμό.....σελ.67	σελ.67
Λιπαρά οξέα με κοντή αλυσίδα (SCFAs).....σελ.68	σελ.68



Σύνθεση βιταμινών.....	σελ.69
Συμμετοχή στην άμυνα του οργανισμού.....	σελ.70
Φαινόμενο φραγμού.....	σελ.70
Συμμετοχή στην κυτταρική ανοσία.....	σελ.71
Συμμετοχή στη χημική ανοσία.....	σελ.71
Μικροχλωρίδα παχέος εντέρου.....	σελ.72
Προβιοτικά.....	σελ.76
Εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων.....	σελ.79
Συσχέτιση της χλωρίδας του παχέους εντέρου με την ελκώδη κολίτιδα (UC) και τη νόσο του Crohn (IBD Ασθένειες).....	σελ.81
Συσχέτιση της χλωρίδας του παχέους εντέρου με καρκίνο του παχέους εντέρου.....	σελ.85
Β-γλουκορονιδάση και β-γλυκοσιδάση.....	σελ.86
Νιτρορεδουκτάση και νιτρική ρεδουκτάση.....	σελ.87
Ετεροκυκλικές αμίνες.....	σελ.87
Πιθανά γονοτοξικά ή καρκινογόνα προϊόντα από την αποσύνθεση των πρωτεϊνών στο παχύ έντερο....	σελ.87
Δευτερογενή χολικά οξέα.....	σελ.88
Επίδραση προβιοτικών στην εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου.....	σελ.89
Οικογενής πολυποδίαση παχέος εντέρου.....	σελ.89
Μεταβολή της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας μετά τη χορήγηση αντιβιοτικών.....	σελ.89
Σίδηρος.....	σελ.91
Πρόσληψη σιδήρου.....	σελ.91
Σιδεροφόρα.....	σελ.93
Περιβάλλοντα με μικρή συγκέντρωση σιδήρου.....	σελ.93



B ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	σελ.95
Σκοπός πειραμάτων.....	σελ.95
ΕννΖ και FerB πρωτεΐνες.....	σελ.97
Ακετυλο-φωσφορικό και FerB.....	σελ.98
Ανάλυση εύρεσης σχέσης ΕννΖ και FerB.....	σελ.98
Ανάλυση εύρεσης σχέσης ferB με ακετυλο-φωσφορικό οξύ.....	σελ.99
Δραστηριότητα αλκαλικής φωσφατάσης σε τριβλία.....	σελ.99
Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδιο.....	σελ.101
Υλικά και μέθοδοι.....	σελ.102
Βακτηριακά στελέχη, πλασμίδιο και φάγος.....	σελ.102
Θρεπτικά μέσα, διαλύματα.....	σελ.102
Μετασχηματισμός.....	σελ.102
Δραστηροποίηση αλκαλικής φωσφατάσης.....	σελ.103
Παραλλαγή της δραστικότητας της αλκαλικής φωσφατάσης (τριβλία).....	σελ.103
Ηλεκτροφόρηση DNA.....	σελ.104
Εξαγωγή πλασμιδίου.....	σελ.104
SDS-PAGE Ηλεκτροφόρηση.....	σελ.105
Πρόελευση δειγμάτων.....	σελ.105
ΑΛΠΙΚΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ (Λίμνες Δρακόλιμνες, Τσουμάνη).....	σελ.105
Χειρισμός δειγμάτων και ανάλυση βακτηριακών δεικτών.....	σελ.105
Χειρισμός δειγμάτων και ανάλυση αυτών προς καθορισμό μεταλλικών στοιχείων.....	σελ.106



ΒΙΟΨΙΕΣ ΑΠΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ	
ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	
ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΩΝ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΩΝ.....σελ.107	
Μέθοδοι απομόνωσης.....σελ.108	
Μέθοδος <i>Clostridium perfringens</i>σελ.109	
Μέθοδος απομόνωσης του γένους <i>Staphylococcus</i>σελ.110	
Μέθοδος απομόνωσης Κολοβακτηριοειδών-Εντερικής	
Προέλευσης Κολοβακτηριοειδών- <i>Escherichia</i>σελ.111	
Μέθοδος απομόνωσης εντερικών στρεπτοκόκκων.....σελ.113	
Μέθοδος απομόνωσης σπορογόνων βακτηριών.....σελ.115	
ΝΕΡΟ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΟ ΑΠΟ ΕΙΔΙΚΗ ΔΕΞΑΜΕΝΗ	
ΠΤΗΝΟΣΦΑΓΕΙΟΥ.....σελ.117	
Συλλογή δειγμάτων.....σελ.118	
Μέθοδοι.....σελ.118	
Μέθοδος απομόνωσης του <i>Clostridium perfringens</i>σελ.119	
Μέθοδος απομόνωσης κολοβακτηριοειδών-εντερικής	
προέλευσης κολοβακτηριοειδή – <i>E. coli</i>σελ.120	
Μέθοδος απομόνωσης <i>Enterococci spp</i> και	
<i>Streptococci spp</i>σελ.121	
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ (ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ	
ΔΟΚΙΜΕΣ)	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....σελ.123	
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....σελ.125	
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ.....σελ.130	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....σελ.134	
ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΡΟΣΛΗΨΗΣ ΣΙΔΗΡΟΥ.....σελ.134	
Δραστικότητα Αλκαλικής φωσφατάσης.....σελ.135	
Καμπύλες Ανάπτυξης.....σελ.137	
Ιστογράμματα.....σελ.145	



λ vir.....σελ.150	σελ.150
Arnou Assay.....σελ.151	σελ.151
ΑΛΠΙΚΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ.....σελ.152	σελ.152
Ιστογράμματα.....σελ.154	σελ.154
ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ.....σελ.157	σελ.157
Πίνακες.....σελ.159	σελ.159
Ιστογράμματα.....σελ.177	σελ.177
ΥΔΑΤΙΝΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ ΕΚΠΛΥΣΗΣ	
ΠΤΗΝΟΣΦΑΓΕΙΩΝ.....σελ.181	σελ.181
Πίνακες.....σελ.183	σελ.183
Ιστογράμματα.....σελ.191	σελ.191
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ.194	σελ.194
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....σελ.207	σελ.207
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ.....σελ.209	σελ.209
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ.....σελ.211	σελ.211
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....σελ.213	σελ.213



ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ

Ο όρος «οικολογία» χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Haeckel στα 1869. Σύμφωνα με τον ορισμό του Haeckel (Anderson J.M., 1980), οικολογία είναι η επιστημονική μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των οργανισμών και του περιβάλλοντός τους. Η γενετική, η φυσιολογία, η ηθολογία και η εξέλιξη είναι τα τέσσερα πεδία των βιολογικών επιστημών που συνδέονται με την επιστήμη της Οικολογίας.

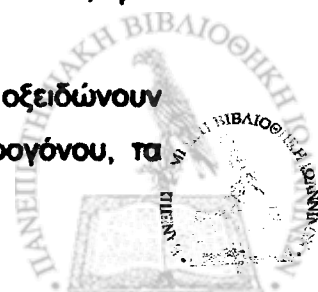
Πολλοί ορισμοί κατά καιρούς δόθηκαν για τον πληρέστερο καθορισμό του όρου «οικολογία». Ανάμεσα σε αυτούς, ένας από τους σημαντικότερους είναι του Krebs, στα 1972 (Krebs C.J., 1972), ο οποίος ορίζει την οικολογία ως την επιστημονική μελέτη των αλληλεπιδράσεων που καθορίζουν την διανομή και αφθονία των οργανισμών. Το κυριότερο πλεονέκτημα του ορισμού αυτού είναι ότι επισημαίνει τον πρωταρχικό στόχο της οικολογικής έρευνας. Όπως καθορίζεται από τη φράση των Begon, Harper και Townsend, στα 1986 (Begon M. et al., 1986), «Σχεδόν τίποτα δεν έχει νόημα στην εξέλιξη παρά μόνο κάτω από το φως της οικολογίας».

Μία από τις βασικότερες έννοιες της οικολογίας είναι το οικοσύστημα, το οποίο είναι μια κοινότητα από οργανισμούς και το φυσικό χημικό τους περιβάλλον. Όλα μαζί λειτουργούν ως μια οικολογική μονάδα. Τα οικοσυστήματα χαρακτηρίζονται από ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Απαρτίζονται από το βιοτικό και το αβιοτικό μέρος καθώς και από τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ αυτών.

Ως αβιοτικό μέρος καθορίζεται η λιθόσφαιρα, η υγρόσφαιρα και η ατμόσφαιρα. Εκάστη από αυτές έχει χαρακτηριστικές ιδιότητες και αλληλεπιδρά με ειδικό τρόπο με τις άλλες καθώς και με τους οργανισμούς. Αβιοτικά στοιχεία που χαρακτηρίζουν ένα συγκεκριμένο αβιοτικό πλαίσιο θεωρούνται το κλίμα, η σύσταση του εδάφους, η ενεργός οξύτητα, η αλατότητα του νερού, η παρουσία ή η απουσία CO₂ κ.α.

Το βιοτικό μέρος του οικοσυστήματος αντιπροσωπεύει το ζωντανό του μέρος και αποτελείται από τους παραγωγούς, τους καταναλωτές και τους αποικοδομητές. Παραγωγοί είναι οι οργανισμοί που φωτοσυνθέτουν (φυτά, φύκη, μπλε - πράσινα βακτήρια, κυανά και πράσινα θειούχα βακτήρια), δηλαδή δεσμεύουν την ηλιακή ενέργεια και τη μετατρέπουν σε χημική υπό μορφή οργανικών ενώσεων. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούν το CO₂ και ως δότη υδρογόνων / ηλεκτρονίων, μία ανόργανη ένωση.

Σήμερα βέβαια γνωρίζουμε ότι υπάρχουν βακτήρια όπως αυτά που οξειδώνουν το θείο, τα νιτροβακτηρίδια, τα βακτήρια σιδήρου και τα βακτήρια υδρογόνου, τα



οποία χρησιμοποιούν μία ανόργανη χημική ένωση ως πηγή ενέργειας, το CO₂ ως πηγή άνθρακα και μία ανόργανη ένωση ως δότη υδρογόνων / ηλεκτρονίων για να παράγουν οργανικές ενώσεις. Η δεύτερη αυτή ομάδα οργανισμών έχει μικρή συνεισφορά οργανικής ύλης στα οικοσυστήματα του πλανήτη γιατί συναντάται μόνο σε πολύ εξειδικευμένα περιβάλλοντα (π.χ. πυθμένας λίμνης Βαϊκάλης, όπου υπάρχουν υδροθερμικά ανοίγματα).

Οι καταναλωτές χρειάζονται έτοιμη οργανική ύλη για να καλύψουν τις ανάγκες τους γιατί δεν μπορούν να συνθέσουν οργανική ύλη χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη τις απλές ανόργανες ενώσεις και ως πηγή ενέργειας τον ήλιο ή τις ανόργανες ενώσεις. Τέτοιοι οργανισμοί είναι τα ζώα και τα πρωτόζωα.

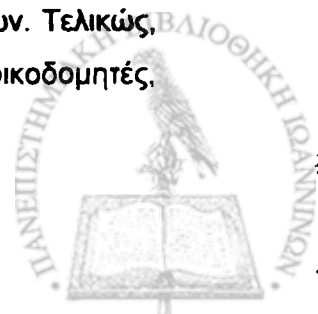
Τέλος, οι αποικοδομητές είναι μικροοργανισμοί (μύκητες, βακτήρια) που αποικοδομούν τις οργανικές ενώσεις σε ανόργανες (διοξείδιο του άνθρακα, νερό, ανόργανα συστατικά). Η διαδικασία της αποικοδόμησης περιλαμβάνει διάφορα στάδια, από την απλούστευση του οργανικού υλικού μέχρι την πλήρη ανοργανοποίησή του.

Η βιοτική συνιστώσα του οικοσυστήματος αποτελείται από πληθυσμούς. Πληθυσμός είναι σύνολο ατόμων που ανήκουν στο ίδιο είδος και συνυπάρχουν στον ίδιο χώρο και χρόνο. Οι διάφοροι πληθυσμοί και οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των οργανισμών που συνθέτουν αυτούς, ορίζονται ως η βιοκοινότητα του οικοσυστήματος.

Η οριοθέτηση των οικοσυστημάτων είναι αυθαίρετη, τα όριά τους καθορίζονται από τον εκάστοτε ερευνητή, π.χ. η λίμνη των Ιωαννίνων, η χαράδρα του Βίκου, μία γλάστρα.

Προϋπόθεση της λειτουργίας ενός οικοσυστήματος είναι : α) η εισροή ενέργειας σε αυτό, β) η ροή της ενέργειας μέσα στο οικοσύστημα και γ) η ανακύκλωση των χημικών θρεπτικών στοιχείων.

Η ύπαρξη των οικοσυστημάτων της γης στηρίζεται κυρίως στην καθήλωση και μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Αυτοί δεσμεύουν την ηλιακή ενέργεια παράγοντας οργανικές ουσίες (υδατάνθρακες), στους δεσμούς των οποίων βρίσκεται εγκλωβισμένη η ηλιακή ενέργεια υπό μορφή χημικών δεσμών. Βέβαια, υπάρχουν οικοσυστήματα όπου η εισαγωγή ενέργειας γίνεται με τη μορφή έτοιμης οργανικής ύλης (π.χ. μία πόλη, η μικροχλωρίδα του εντέρου). Η ενέργεια, ως οργανική ύλη, θα περάσει στις διάφορες τάξεις καταναλωτών μέσω των τροφικών αλυσίδων. Τελικώς, όλη η οργανική ύλη που έχει απομείνει, θα αποικοδομηθεί από τους αποικοδομητές, με τελικό σκοπό την πλήρη ανοργανοποίησή της.

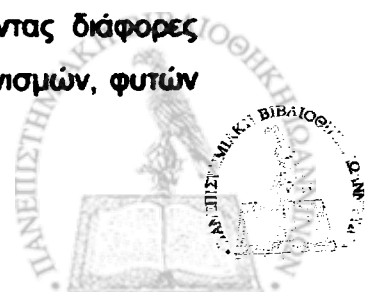


Παρατηρούμε λοιπόν, ότι καθώς ρέει η ενέργεια σε ένα οικοσύστημα, αφήνει αυτό υπό υποβαθμισμένες μορφές ενέργειας (μορφές ενέργειας που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκ νέου, θερμότητα) μέχρις του σημείου να απελευθερωθεί όλη η ενέργεια που υπάρχει στους δεσμούς των οργανικών ενώσεων. Για το λόγο αυτό, τα οικοσυστήματα χρειάζονται πάντα μία πηγή ενέργειας να τα τροφοδοτεί.

Τα υλικά από τα οποία αποτελούνται οι οργανισμοί συνίστανται από χημικά στοιχεία πεπερασμένα στην ποσότητα και αμετάβλητα. Τα κύρια χημικά στοιχεία που συναντώνται στη ζωή είναι ο άνθρακας, το οξυγόνο, το υδρογόνο, το άζωτο, ο φωσφόρος, το θείο, το ασβέστιο, το κάλιο, το νάτριο, το χλώριο, το μαγνήσιο, ο σίδηρος κ.α. Επειδή δεν υπάρχει κάποια πηγή να τροφοδοτεί τη γη με καινούργιες ποσότητες των χημικών αυτών στοιχείων, θα πρέπει αυτά να ανακυκλώνονται, ούτως ώστε να συνεχίσει να υπάρχει η ζωή. Κύριο ρόλο στην ανακύκλωση των χημικών στοιχείων που είναι απαραίτητα για την ύπαρξη της ζωής παίζουν οι αποικοδομητές. Η κυκλοφορία των χημικών στοιχείων δεν γίνεται αποκλειστικά μέσω των τροφικών αλυσίδων, αλλά περιέχει στάδια χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο αβιοτικό περιβάλλον. Για το λόγο αυτό, οι κύκλοι των υλικών ονομάζονται βιογεωχημικοί κύκλοι.

Όπως διαφαίνεται από την ανωτέρω ανάλυση, όλα τα οικοσυστήματα έχουν κοινά χαρακτηριστικά, εκ των οποίων ένα είναι η παρουσία μικροοργανισμών, είτε πρόκειται για λίμνη, ποταμό, ωκεανό, έδαφος, πεπτικό σύστημα ζώων. Η συμμετοχή των μικροοργανισμών στα οικοσυστήματα περιλαμβάνει δύο βασικούς συμπληρωματικούς ρόλους : α) τη σύνθεση οργανικού υλικού, από διοξείδιο του άνθρακα και ανόργανα συστατικά και β) την αποικοδόμηση του συσσωρευμένου οργανικού υλικού.

Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί αναγνωρίζονται ως η κυρίαρχη μορφή ζωής στη γη. Σύμφωνα με τον Carl Woese (University of Illinois at Urbana) (Atlas R.M. & Barthe, 1998), οι μικροοργανισμοί είναι η μεγαλύτερη ζωντανή βιομάζα στον πλανήτη. Αναλυτικότερα, οι μικροοργανισμοί μπορούν να φέρουν σε πέρας σημαντικές λειτουργίες στα διάφορα φυσικά περιβάλλοντα, όπως : 1) αποσύνθεση του οργανικού υλικού, 2) χρησιμοποιούμενοι ως μία πλούσια πηγή τροφής για άλλους χημειοετερότροφους μικροοργανισμούς (ανοργανοποίηση), πρωτόζωα, νηματώδεις, 3) τροποποιώντας διάφορες ουσίες, έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν από άλλους οργανισμούς, 4) αλλάζοντας την ποσότητα διαφόρων ουσιών που βρίσκονται σε διαλυτή ή αέρια μορφή και 5) παράγοντας διάφορες ουσίες, οι οποίες εμποδίζουν ή περιορίζουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών, φυτών και ζώων.



Ο όρος «οικολογία μικροβίων» σήμερα χρησιμοποιείται με ένα γενικό τρόπο, για να περιγράψει την παρουσία και συνεισφορά των μικροβίων διαμέσου των δραστηριοτήτων τους στα διάφορα περιβάλλοντα, όπου αυτοί βρίσκονται. Στο πρόσφατο παρελθόν, ως «οικολογία μικροβίων», σύμφωνα με τον Thomas D. Brock, ο οποίος ανακάλυψε τον προκαρυωτικό οργανισμό *Thermus aquaticus* (Prescott et al., 1999), ο οποίος είναι η πηγή της Taq πολυμεράσης για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, είναι η μελέτη της συμπεριφοράς και των δραστηριοτήτων των μικροβίων στα φυσικά τους περιβάλλοντα. Το σημείο κλειδί σε αυτόν τον ορισμό είναι η έκφραση στα περιβάλλοντά τους. Το περιβάλλον ενός μικροοργανισμού ή όπως λεπτομερέστερα αναφέρεται «μικροπεριβάλλον», είναι αυτό που καθορίζει τα εξειδικευμένα είδη μικροοργανισμών που θα το αποικίσουν με τον μικρότερο ανταγωνισμό προς άλλα είδη που οι λειτουργίες διαφέρουν πολύ λίγο. Το μικροπεριβάλλον ενός μικροοργανισμού είναι πολύ σημαντικό λόγω του μικρού μεγέθους του και της άμεσης επαφής με αυτό. Παράλληλα, με τον όρο «οικολογία μικροβίων» υπήρχε και υπάρχει ο όρος «Περιβαλλοντική Μικροβιολογία», ο οποίος συσχετίζει όλες τις μικροβιακές διαδικασίες που συμβαίνουν στο έδαφος, το νερό, την τροφή, ως παραδείγματα. Δεν ενδιαφέρεται για τα ειδικά μικροπεριβάλλοντα, στα οποία πράγματι λειτουργούν οι μικροοργανισμοί, αλλά με τα πλατύτερης κλίμακας αποτελέσματα της δράσης των μικροοργανισμών. Τώρα και τα δύο πεδία έρευνας περιλαμβάνονται στον όρο «οικολογία μικροβίων».

Κατωτέρω, θα αναφέρουμε ορισμένες έννοιες που έχουν άμεση σχέση με την οικολογία μικροβίων :

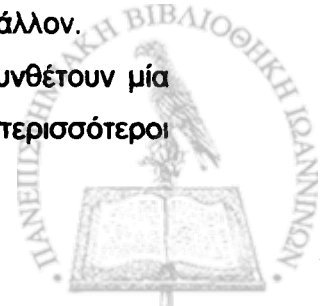
Πληθυσμός : μία άθροιση από οργανισμούς που έχουν κοινά χαρακτηριστικά. Τα κοινά χαρακτηριστικά δείχνουν ίδια ή παρόμοια καταγωγή.

Ενδιαίτημα - κατοικία : μία τοποθεσία με κάποια μοναδικότητα, με οικολογική σημασία. Μερικά είδη είναι περιορισμένα να ζουν σε κάποια μοναδικά περιβάλλοντα, ενώ άλλα μπορούν να ζουν σε μια ποικιλία διαφορετικών κατοικιών (κοσμοπολίτικα είδη).

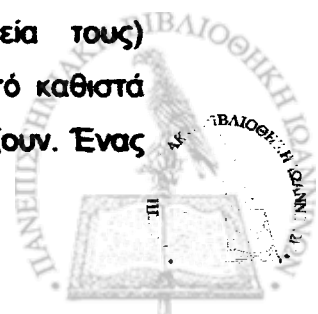
Φωλιά : οι λειτουργίες ή τα χαρακτηριστικά ενός οργανισμού που του επιτρέπουν να επιβιώσει σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον, π.χ. ένας οργανισμός ζει στο νερό, αλλά η λειτουργία του είναι η δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου.

Κοινότητα : μία συσσώρευση από διαφορετικά είδη από μικροοργανισμούς, οι οποίοι συναντώνται και αλληλεπιδρούν μέσα σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον.

Η επίδραση του περιβάλλοντος στην επιλογή των οργανισμών που συνθέτουν μία κοινότητα είναι φανερή από συγκεκριμένα περιβάλλοντα. Οι περισσότεροι



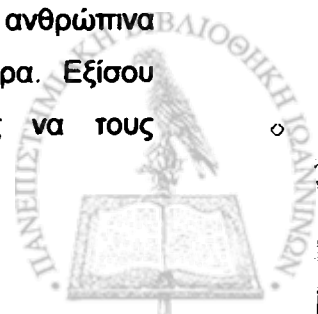
μικροοργανισμοί που είναι παρόντες στις επιφάνειες των νερών δεν είναι χαρακτηριστικοί των εδαφών ή των μικροοργανισμών που βρίσκονται στην επιφάνεια ενός φύλλου. Οι δυνάμεις επιλογής πολλές φορές δεν είναι βιολογικές, μπορεί π.χ. μία περιοχή (μικροπεριβάλλον) να χαρακτηρίζεται από χαμηλό pH, υψηλή ακτινοβολία, όχι διαθέσιμο πολύ οξυγόνο, μικρή ποσότητα ενός θρεπτικού υλικού. Η κοινωνία των μικροοργανισμών που θα εγκατασταθεί στο συγκεκριμένο αυτό περιβάλλον θα πρέπει να είναι ικανή να αντιμετωπίσει αυτούς τους περιορισμούς. Η ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού σε ένα μικροπεριβάλλον εκφράζεται από το νόμο του ελαχίστου του Liebig (Margulis L. & Fester R., 1991) και το νόμο αντοχής του Shelfold (Margulis L. & Fester R., 1991). Βέβαια, μεγαλύτερο ενδιαφέρον επιστημονικά παρουσιάζει η εξέταση κοινωνιών με βιοτικές επιδράσεις που λειτουργούν σε ένα μικροπεριβάλλον, στο οποίο οι αβιοτικές πιέσεις δεν καθορίζουν την σύνθεση της κοινότητας. Οι ιθαγενείς πληθυσμοί που απαρτίζουν μία κοινότητα είναι υπεύθυνοι για τις βιοτικές ισορροπίες που διατηρούνται. Οι οργανισμοί της κοινότητας ρυθμίζουν τον πληθυσμό, την πυκνότητα, την βιομάζα των συγκεκριμένων συστατικών ειδών της κοινότητας και αυτοί λειτουργούν για να εμποδίσουν την καθιέρωση ενός εισβολέα είδους. Αυτές οι ποικίλες αλληλεπιδράσεις καθορίζουν την σταθερότητα μιας μικροβιακής κοινότητας και αντιπροσωπεύουν αυτό που ονομάζουμε «ομοιόσταση». Ομοιόσταση είναι η ικανότητα μιας κοινότητας να διατηρεί τη σταθερότητα και ολότητα της σε ένα περιβάλλον που υφίσταται αβιοτικές και βιολογικές τροποποιήσεις. Οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί λειτουργούν όταν συμβεί μια μεγάλη διαταραχή. Συνήθως οι διαταραχές που αναστατώνουν μια κοινότητα είναι αβιοτικές. Η εισαγωγή μη ιθαγενών μικροοργανισμών σε μία κοινότητα είναι δύσκολο να αλλάξει τη σύνθεση της σημαντικά ή να επιτρέψει την εγκατάσταση ενός εισαγόμενου είδους. Αυτός είναι και ο λόγος που είναι δύσκολο να εισάγουμε σε φυσικά οικοσυστήματα μικροοργανισμούς για «βιοθεραπεία» (Alexander M., 1994) (προστασία περιβάλλοντος από έναν ρυπαντή). Φυσικά, η εισαγωγή ενός μικροοργανισμού σε ένα περιβάλλον μπορεί να πετύχει. Η επιτυχία ή αποτυχία αντικατοπτρίζει την μη ολοκληρωμένη γνώση μας πάνω στους μηχανισμούς της ομοιόστασης. Βέβαια, ένας κυρίαρχος παράγων για την καθιέρωσή του σε ένα περιβάλλον είναι τα μορφολογικά, φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του. Μια άλλη επίσης αξιοσημείωτη παράμετρος είναι το ότι οι περισσότερες πληροφορίες που διαθέτουμε για τους μικροοργανισμούς (πληροφορίες που αφορούν την μορφολογία, φυσιολογία, βιοχημεία τους) προέρχονται από την καλλιέργεια τους στο εργαστήριο. Το γεγονός αυτό καθιστά αυτές κάπως αβέβαιες ως προς το οικολογικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν. Ένας



μικροοργανισμός για να επιβιώσει σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον πρέπει να μπορεί να υπομείνει τις αβιοτικές πιέσεις, όπως pH, αλατότητα, θερμοκρασία, πίεση κ.α. Πολλά είδη είναι ικανά να αντέξουν το συγκεκριμένο αβιοτικό περιβάλλον, δεν μπορούν όμως να εγκαθιδρυθούν σε αυτό. Η αιτία είναι οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί που λειτουργούν στην κοινότητα που φθάνουν τα καινούργια είδη, οι οποίοι μπορούν να απομακρύνουν πολλές καινούργιες αφίξεις. Βέβαια, γενικά μπορούμε να παραδεχθούμε ότι τα μορφολογικά, φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά είναι αυτά που τον καθιερώνουν σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον, αλλά μας λείπει η πληροφορία για να προβλέψουμε την οικολογική επιτυχία ή αποτυχία ενός μικροοργανισμού (Simberloff D. & Alexander M., 1994).

Στις φυσικές κοινότητες, οι περισσότεροι κάτοικοι μεγαλώνουν αργά και όχι όπως όταν εκτίθενται σε ένα εμπλουτισμένο μέσο. Στις κοινότητες μικροοργανισμών που συναντούμε στον φυσικό κόσμο, συνήθως εμφανίζεται το φαινόμενο της οικολογικής διαδοχής. Αρχικά, σε μία κοινότητα είναι κάποια συγκεκριμένα είδη, αλλά συν τω χρόνω υπάρχει η τάση της αύξησης της ποικιλότητας των ειδών. Τα προσαρμοστικά χαρακτηριστικά των ειδών που αποικίζουν το συγκεκριμένο περιβάλλον γίνονται λιγότερο ξεκάθαρα μεταξύ των παραγόντων που καθορίζουν την επιλογή κατά τη διάρκεια της οικολογικής διαδοχής. Οι παράγοντες που καθορίζουν την επιλογή μπορεί να είναι η διαθεσιμότητα των θρεπτικών που συνθέτονται από τα προηγούμενα είδη, η αλλαγή συγκέντρωσης ανόργανων συστατικών, ο σχηματισμός τοξικών προϊόντων. Η διαδοχή των ειδών δημιουργεί τις λεγόμενες «κλιμακωτές κοινότητες» που τείνουν να παραμείνουν οι ίδιες στη διάρκεια του χρόνου. Στην κλιμακωτή κοινότητα είναι δύσκολο να διευκρινιστεί η φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μικροοργανισμών και τα ειδικά προσαρμοστικά χαρακτηριστικά του κάθε οργανισμού, όπως η φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντέρου που τείνει να παραμείνει σταθερή με το χρόνο, παρόλο που εμείς καταπίνουμε μεγάλους αριθμούς μικροβίων. Μολονότι μερικά από αυτά που καταπίνουμε είναι σχεδόν παρόμοια με αυτά που υπάρχουν, τα νέα στελέχη έχουν μεγάλη δυσκολία προσαρμογής.

Ένα κρίσιμο σημείο στην οικολογία μικροβίων είναι η παρατήρηση των μικροοργανισμών στο φυσικό τους περιβάλλον. Το μέγεθος του τοπικού περιβάλλοντος (μικροπεριβάλλον) μαζί με το μέγεθος των μικροοργανισμών δημιουργούν τέτοιες συνθήκες που δεν μπορούμε να παρατηρήσουμε τους μικροοργανισμούς στο φυσικό τους περιβάλλον. Ακόμη, ο αριθμός των μικροοργανισμών σε ένα μικροπεριβάλλον είναι τεράστιος, π.χ. στα ανθρώπινα περιπτώματα σε ένα γραμμάριο υπάρχουν 10 δισεκατομμύρια κύτταρα. Εξίσου δύσκολο είναι να παρατηρήσουμε τους μικροοργανισμούς χωρίς να τους



ενοχλήσουμε. Βέβαια, παρόλες τις δυσκολίες, υπάρχουν τεχνικές που μας επιτρέπουν την *in situ* παρατήρηση. Το μικροσκόπιο Confocal Scanning Laser Microscopy (=CSLM) μπορεί να μας παρέχει είδωλο χωρίς ενόχληση και στερεοποίηση. Επιπλέον, έχουμε την δυνατότητα απομόνωσης κυττάρων από το συγκεκριμένο περιβάλλον. Συγχρόνως έχουν αναπτυχθεί μεθοδολογίες που εισημαίνονται τα μικροπεριβάλλοντα και τα φυσικοχημικά συστατικά αυτών, π.χ. Winogradsky column. Σήμερα βέβαια μπορούμε να αναλύσουμε μια μικροβιακή κοινότητα κάνοντας την ανάλυση του γενετικού υλικού των μικροβίων με μεθόδους ανασυνδυασμένου DNA, υβριδοποίησης ή αυτοραδιογραφίας (autoradiography) χωρίς την καλλιέργεια των δειγμάτων στο εργαστήριο. Εξετάζοντας την αλληλουχία βάσεων ενός μεταβολικού γονιδίου ή του γονιδίου που κωδικοποιεί το 16S rRNA. Η πρόοδος σε τεχνικές να διακρίνουμε και να μετρούμε τους μικροοργανισμούς (οπτικές μέθοδοι, μικροηλεκτρόδια) συνεχίζεται. Εντούτοις θα πρέπει να αναπτυχθούν μέθοδοι που να μας παρέχουν τις αλλαγές που συμβαίνουν σε μια κοινότητα από την επίδραση κάποιου παράγοντα.

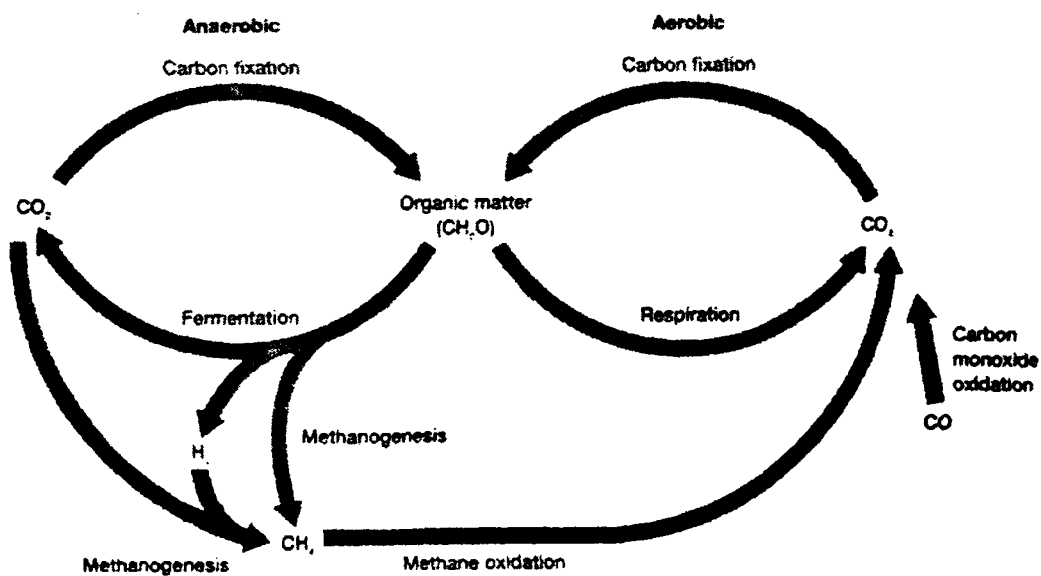
Οι κοινότητες των μικροοργανισμών παίζουν σημαντικό ρόλο στους βιογεωχημικούς (βιολογικές και χημικές διαδικασίες που περιλαμβάνονται στον κύκλο και τη μετατροπή των απαραίτητων θρεπτικών για τους μικροοργανισμούς, τα φυτά και τα ζώα) κύκλους. Στους κύκλους αυτούς συχνά συμβαίνουν αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, οι οποίες αλλάζουν τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά των θρεπτικών. Οι μικροοργανισμοί παίζουν ουσιαστικό ρόλο στον μετασχηματισμό του άνθρακα, του αζώτου, του θείου και του σιδήρου. Θα περιγράψουμε τους κύκλους των στοιχείων αυτών καθέναν ξεχωριστά, αλλά στην πραγματικότητα κανένας δεν λειτουργεί ανεξάρτητα από τον άλλο. Οι κύκλοι αυτοί λειτουργούν σε διαφορετικές χρονικές κλίμακες, τόσο στο επίπεδο του μικροπεριβάλλοντος έως και γενικότερα. Ένας τρόπος προσέγγισης των κοινοτήτων των μικροοργανισμών είναι οι βιογεωχημικοί κύκλοι.



Πίνακας 1 : Οι κυριότερες μορφές των σημαντικότερων χημικών στοιχείων στους βιογεωχημικούς κύκλους (Κύριες μορφές και σθένη)

Κύκλος	Αναγόμενες μορφές	Ενδιάμεσες οξειδωτικές μορφές	Οξειδούμενες μορφές
C	CH ₄ (-4)	CO (+2)	CO ₂ (+4)
N	NH ₄ ⁺ , οργανικά N (-3)	N ₂ N ₂ O NO ₂ ⁻ (0) (+1) (+3)	NO ₃ ⁻ (+5)
S	H ₂ S, SH ομάδες σε οργανικό υλικό (-2)	S ⁰ S ₂ O ₃ ²⁻ SO ₃ ²⁻ (0) (+2) (+4)	SO ₄ ²⁻
Fe	Fe ²⁺ (+2)		Fe ³⁺ (+3)

Σχήμα1:Κύκλος του άνθρακα. Προσαρμογή από «Microbiology» των Prescott ML, Harley P.S. , Klein D. A.



Ο βασικός κύκλος του άνθρακα στο περιβάλλον

Ο άνθρακας είναι παρών σε αναγόμενες μορφές, όπως CH_4 και οργανικό υλικό και σε οξειδούμενες μορφές, όπως CO και CO_2 . Ισχυρά αναγωγικά μέσα (υδρογόνο) και οξειδωτικά (O_2) μπορούν να επηρεάσουν τις βιολογικές και χημικές διαδικασίες που έχουν σχέση με τον κύκλο του άνθρακα. Η καθήλωση του άνθρακα συμβαίνει διαμέσου των ενεργών των φωτοαυτότροφων και χημειοαυτότροφων μικροοργανισμών. Υδρογόνο μπορεί να παραχθεί κατά τη διάρκεια αποσύνθεσης οργανικού υλικού, ειδικά κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Μεθάνιο μπορεί να παραχθεί από ανόργανα υποστρώματα ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$) ή από οργανικό υλικό. Το μονοξείδιο που παράγεται από αυτοκίνητα και βιομηχανίες επιστρέφεται στον κύκλο του άνθρακα από βακτήρια που το οξειδώνουν.

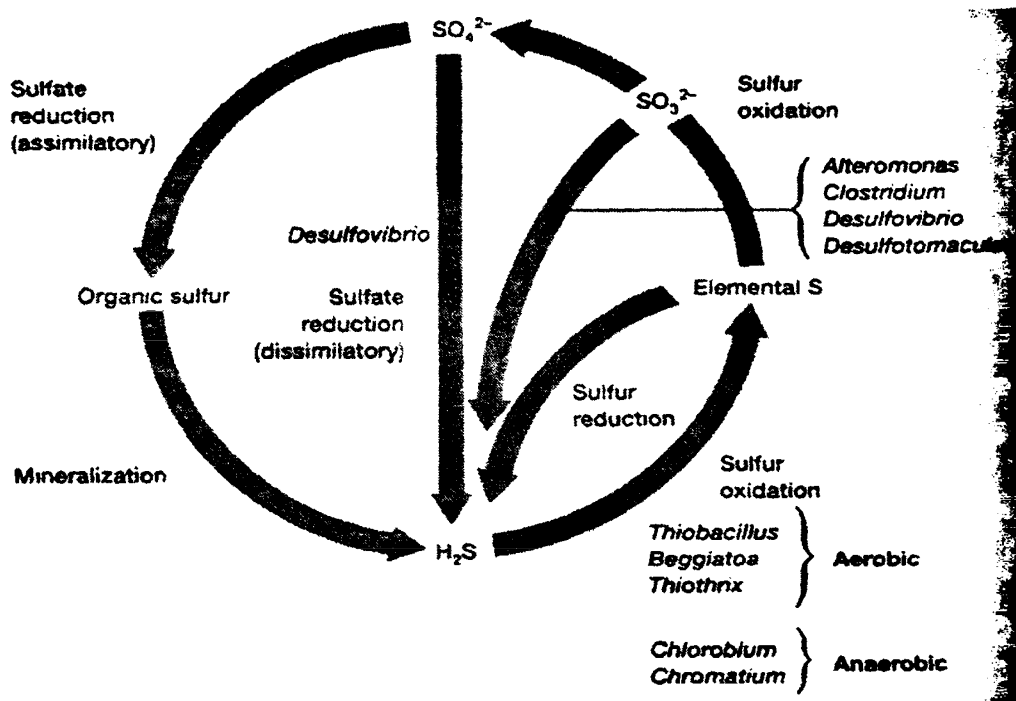
Κατωτέρω παραθέτουμε σε Πίνακα την επεξήγηση όρων που αφορούν τους μικροοργανισμούς, σύμφωνα με την προέλευση των πηγών ενέργειας και των άλλων ουσιών.

Πίνακας 2

	Πηγές ενέργειας, Η/ηλεκτρόνια, άνθρακας	Οργανισμοί
Φωτολιθότροφοι αυτότροφοι	Φωτεινή ακτινοβολία, δότη Η/e ⁻ υπό ανόργανη μορφή, πηγή άνθρακα CO_2	Φύκη, κυανά και πράσινα βακτήρια θείου, κυανά-πράσινα βακτήρια (Cyanobacteria)
Φωτοοργανοτροφικά ετερότροφοι	Φωτεινή ενέργεια, οργανική μορφή Η/e ⁻ δότη, οργανική μορφή ενέργειας (μπορεί και CO_2)	Κυανά όχι θείου βακτήρια Πράσινα όχι θείου βακτήρια
Χημειολιθότροφοι αυτότροφοι	Χημική πηγή ενέργειας (ανόργανη), ανόργανος δότης ηλεκτρονίων, πηγή άνθρακα CO_2	Βακτήρια που οξειδώνουν το θείο, υδρογονούχα βακτήρια, νιτροποιητικά βακτήρια, σιδηρούχα βακτήρια

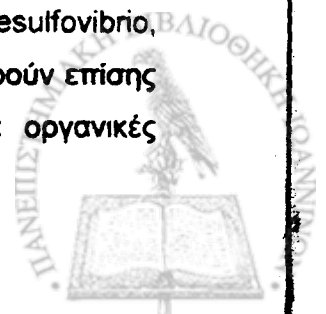
Χημειοοργανότροφοι ετερότροφοι	Χημική πηγή ενέργειας (οργανική), οργανικός δότης ηλεκτρονίων, οργανική πηγή άνθρακα	Πρωτόζωα, μύκητες, τα περισσότερα μη φωτοσυνθετικά βακτήρια (περιλαμβάνουν τους περισσότερους παθογόνους οργανισμούς)
-----------------------------------	---	--

Σχήμα 2: Κύκλος του θείου



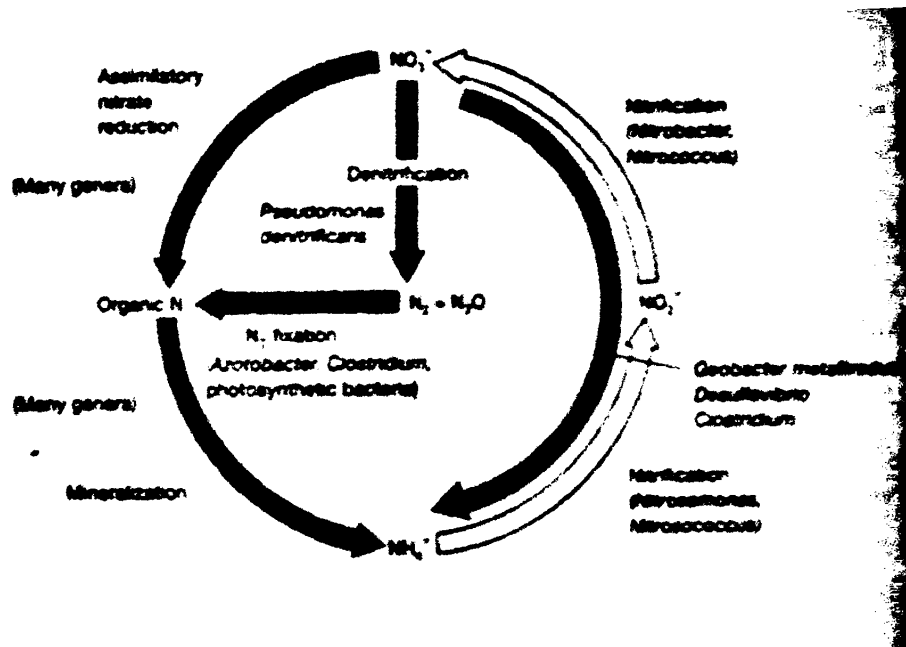
Βασικός κύκλος του θείου (απλοποιημένη επισκόπηση). Προσαρμογή από
«Microbiology» των Prescott ML, Harley P.S., Klein D. A.

Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί σχηματίζουν το θείο (στοιχειακό) χρησιμοποιώντας σουλφατίδιο σαν πηγή ηλεκτρονίων. Απουσία φωτός, τα σουλφατίδια χρησιμοποιούνται από χημειοαυτότροφα γένη (*Thiobacillus*). Αναερόβια αναγωγή των θειικών και θειωδών φέρεται εις πέρας από γένη όπως το *Desulfovibrio*, *Clostridium* και αναφέρονται ως καταβολικές διαδικασίες. Τα θειικά μπορούν επίσης να αναχθούν μέσα από αφομοιωτικές αντιδράσεις καταλήγοντας σε οργανικές μορφές θείου (αμινοξέα, σύνθεση πρωτεϊνών).



Θειικά, θειώδη χρησιμοποιούνται ως εξωτερικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων, όταν παρούσα είναι μία οργανική αναγωγική ουσία προς παραγωγή ενέργειας, σχηματίζοντας σουλφατίδια. Ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να καταβάλουν στοιχειακό θείο (*Desulfuromonas*).

Σχήμα 3: Κύκλος του αζώτου



Βασικός κύκλος του αζώτου. Προσαρμογή από «Microbiology» των Prescott ML, Harley P.S., Klein D. A.

Νιτροποίηση : αερόβια διαδικασία οξειδωσης του αμμωνιακού ιόντος σε νιτρώδη (NO_2^-) και ακολούθως νιτρικά. Η διαδικασία της απονιτροποίησης απαιτεί διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτή η καταβολική αναερόβια αναπνοή, κατά την οποία χρησιμοποιούνται ως οξειδωτικό μέσο τα νιτρικά, περιλαμβάνει ετερότροφους οργανισμούς όπως η *Pseudomonas denitrificans*. Τα προϊόντα της απονιτροποίησης, αέριο N_2 , νιτρώδες οξείδιο (N_2O) και νιτρώδη (NO_2^-). Τα νιτρώδη συνεισφέρουν στο σχηματισμό νιτροζαμινών, οι οποίες είναι καρκινογόνες.

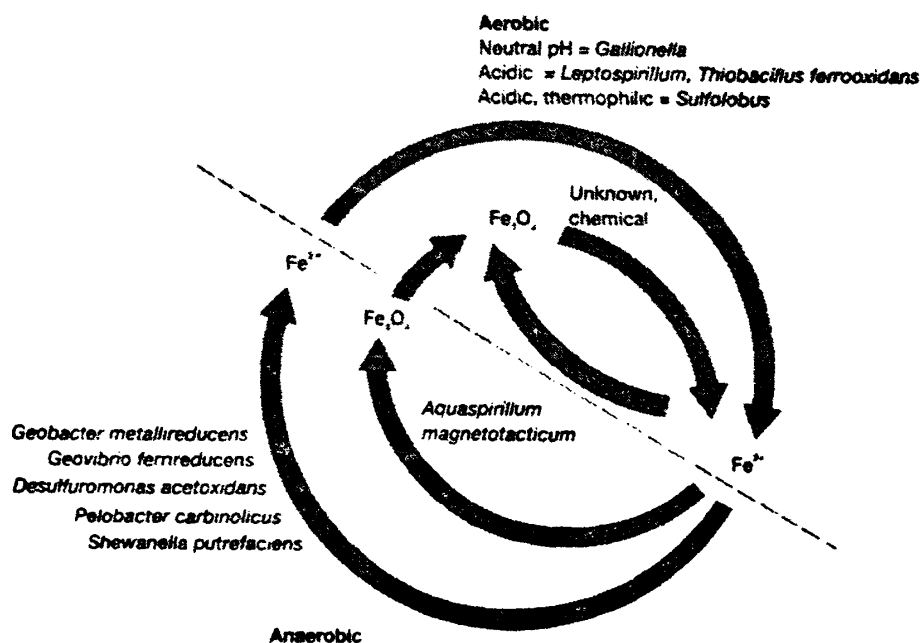
Τα νιτρικά μετασχηματίζονται σε NH_3 μέσα από ένα καταβολικό αναγωγικό μονοπάτι, από μία ποικιλία βακτηρίων όπως *Clostridium*, *Desulfonitro* spp. κ.α. Η αφομοίωση του αζώτου συμβαίνει όταν ανόργανο άζωτο χρησιμοποιείται σαν

θρεπτικό και ενσωματώνεται στην καινούργια μικροβιακή βιομάζα. Αμμωνιακό ιόν μπορεί να ενσωματωθεί αμέσως χωρίς ενεργειακό κόστος, γιατί είναι αναγμένο.

Η αζωτοδέσμευση μπορεί να συμβεί υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, μόνο από προκαρυωτικούς οργανισμούς. Υπό αερόβιες συνθήκες δεσμεύουν ατμοσφαιρικό άζωτο, γένη όπως το *Azotobacter*, *Azospirillum*. Εάν οι συνθήκες είναι αναερόβιες, πολλά μέλη του γένους *Clostridium* δεσμεύουν N_2 . Μοριακό άζωτο μπορούν να καθηλώσουν τα *Cyanobacteria* και τα συμβιωτικά βακτήρια του γένους *Rhizobium* και *Bradyrhizobium*.

Στην ανωτέρω παράσταση του κύκλου του αζώτου, δεν σημειώνονται οι ετερότροφοι οργανισμοί οι οποίοι συνδυάζουν την νιτροποίηση με την αναερόβια απονιτροποίηση, οξειδώνοντας αμμωνιακά ιόντα σε N_2O και N_2 σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου.

Σχήμα 4: Κύκλος του σιδήρου . Προσαρμογή από «Microbiology» των Prescott ML, Harley P.S. , Klein D. A.



Βασικός κύκλος σιδήρου.

Ο κύκλος του σιδήρου περιλαμβάνει πολλά γένη, που φέρουν σε πέρας οξειδώσεις του σιδήρου, μετασχηματίζοντας δισθενή Fe^{2+} σε τρισθενή Fe^{3+} (*Thiobacillus ferrooxidans*, *Gallionella* και άλλα). Τελευταία έχουν βρεθεί βακτήρια



που οξειδώνουν Fe^{2+} χρησιμοποιώντας νιτρικά ως αποδέκτη ηλεκτρονίων. Αυτό συμβαίνει σε υδατικά ιζήματα με χαμηλό επίπεδο οξυγόνου και μπορεί να είναι ένα άλλο μονοπάτι από το οποίο μεγάλες ζώνες από οξειδωμένο σίδηρο έχουν συγκεντρωθεί σε περιβάλλοντα με χαμηλό επίπεδο οξυγόνου. Η αναγωγή του σιδήρου λαμβάνει χώρα κάτω από αναερόβιες συνθήκες καταλήγοντας στη συσσώρευση δισθενούς σιδήρου. Πολλοί μικροοργανισμοί μπορούν να ανάγουν μικρά ποσά σιδήρου κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού τους. Οι περισσότερες αναγωγές του σιδήρου γίνονται από ειδικούς σίδηρο-αναπνευστικούς μικροοργανισμούς (*Geobacter metallireducans*), οι οποίοι αποκτούν ενέργεια αναπτυσσόμενοι σε οργανικό υλικό χρησιμοποιώντας σίδηρο ως οξειδωτικό μέσο. Τα μαγνητοτακτικά βακτήρια (*Aquaspirillum magnetotacticum*) μετασχηματίζουν εξωκυττάριο σίδηρο δημιουργώντας Fe_3O_4 και κατασκευάζουν μαγνητικές πυξίδες. Το Fe_3O_4 έχει βρεθεί σε ιζήματα υπό μορφή κομματιών.

Πρόσληψη σιδήρου

Όλοι σχεδόν οι μικροοργανισμοί χρειάζονται σίδηρο για τα κυττοχρώματα και άλλα ένζυμα. Η πρόσληψη του σιδήρου είναι δύσκολη λόγω του γεγονότος ότι ο τρισθενής σίδηρος και τα παράγωγά του διαλύονται δύσκολα. Πολλά βακτήρια εκκρίνουν χαμηλού μοριακού βάρους ουσίες, οι οποίες δημιουργούν σύμπλοκα με τον τρισθενή σίδηρο. Το σύμπλοκο αυτό μπορεί να προσληφθεί εύκολα από τα βακτηριακά κύτταρα γιατί πάνω στην κυτταρική επιφάνεια υπάρχουν υποδοχείς πρωτεΐνες για τις ουσίες αυτές. Οι ουσίες με το χαμηλό μοριακό βάρος που έχουν συγγένεια με το σίδηρο ονομάζονται «Σιδηροφόρα». Τελικά ο σίδηρος θα βρεθεί στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου υπό την ανηγμένη μορφή του δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}). Ο σίδηρος είναι σημαντικότερο στοιχείο για τους μικροοργανισμούς, για το λόγο αυτό χρησιμοποιούν εναλλακτικές οδούς για να το προμηθευτούν.

Αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμών σε σχέση με το υπόστρωμα

Οι διαδοχικές μικροβιακές κοινότητες μπορούν να υπάρξουν όταν οργανικό υλικό είναι χρησιμοποιούμενο ως πηγή ενέργειας και θρεπτικών ουσιών. Όταν οι συνθήκες είναι αερόβιες, συσσωρεύονται οξειδούμενα προϊόντα, από την αποσύνθεση σύνθετου οργανικού υλικού όπως νιτρικά, θειικά, CO_2 . Σε αντίθεση, υπό αναερόβιες συνθήκες, αναγόμενα τελικά προϊόντα (NH_4^+ , H_2S , CO_2 , H_2 , CH_4) συγκεντρώνονται. Συχνά παρατηρούμε στις μικροβιακές κοινότητες χρησιμοποίηση των τελικών προϊόντων μιας ομάδας μικροοργανισμών από άλλους.



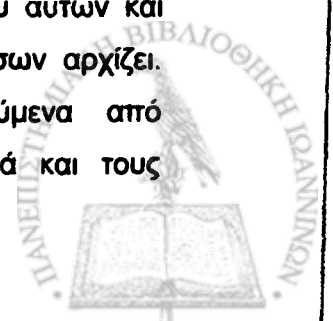
Διαδοχή και αλληλεπιδράσεις στις μικροβιακές κοινότητες συμβαίνουν επίσης όταν συναντώνται μίγματα από αποδέκτες ηλεκτρονίων. Όταν οξυγόνο, νιτρικά, μαγγανικό ιόν, τρισθενής σίδηρος, θειικά και CO₂ υπάρχουν σε κάποιο περιβάλλον, είναι εύκολο να προβλέψουμε την σειρά με την οποία θα οξειδωθεί το υπάρχον υπόστρωμα.

Πίνακας 3 : Σειρά χρησιμοποίησης οξειδωτικών μέσων από μία μικροβιακή κοινότητα κάτω από διαδοχικές αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (pH 7.0)

Οξειδωτικό μέσο	Οξειδοαναγωγικό δυναμικό ζεύγους	Σειρά χρήσης	Παρουσία οξυγόνου
Οξυγόνο	+ 0.814	1	+
Νιτρικά	+ 0.741	2	-
Mn ⁴⁺	+ 0.401	3	-
Fe ³⁺	- 0.185	4	-
SO ₄ ²⁻	- 0.214	5	-
CO ₂	- 0.244	6	-

Από : K.A. Smith and R. M. Arah «Anaerobic Microenvironments in Soil and the Occurrence of Anaerobic Bacteria» in FEMS Symposium 33, p. 258, 1986 Essex:Elsevier

Το οξυγόνο είναι ο πρώτος αποδέκτης ηλεκτρονίων γιατί αναστέλλει τη χρήση των νιτρικών από μικροοργανισμούς που είναι ικανοί να επιτελέσουν την διαδικασία της αναπνοής, είτε με οξυγόνο είτε με νιτρικά. Όταν υπάρχει και οξυγόνο, οι μικροοργανισμοί που ανάγουν τα θειικά και οι μεθανογόνοι δεν μπορούν να επιβιώσουν γιατί είναι υποχρεωτικά αναερόβιοι. Αφού εξαντληθεί το οξυγόνο και τα νιτρικά, τα παραγόμενα προϊόντα ζύμωσης θα συσσωρευθούν μεταξύ αυτών και υδρογόνο και ο ανταγωνισμός για τη χρήση άλλων οξειδωτικών μέσων αρχίζει. Μαγγάνιο και σίδηρος θα χρησιμοποιηθούν πρώτα ακολουθούμενα από ανταγωνισμό ανάμεσα στους μικροοργανισμούς που ανάγουν θειικά και τους



μεθανογόνους. Αυτό επηρεάζεται από την μεγαλύτερη ενέργεια που παράγεται, όταν τα θειικά χρησιμοποιούνται ως αποδέκτες ηλεκτρονίων. Σημαντικό ρόλο στον ανταγωνισμό μεταξύ των δύο τελευταίων ομάδων μικροοργανισμών (αυτούς που ανάγουν θειικά και μεθανογόνους) παίζει η ενζυματική συγγένεια ως προς το υδρογόνο. Τελικά, στο περιβάλλον θα κυριαρχήσουν οι μεθανογόνοι που ανάγουν το CO_2 .

Με βάση τις ανωτέρω αλληλεπιδράσεις, η μικροβιακή χρήση οξειδωτικών μέσων μπορεί να κατανοηθεί, προβλεφθεί και κατευθυνθεί.



Πίνακας 4 : Χαρακτηριστικά σύνθετων οργανικών υποστρωμάτων που επηρεάζουν την αποικοδόμησή τους

Υπόστρωμα	Βασική υπομονάδα	Συνδέσεις (Δεσμοί)	Στοιχεία παρόντα σε μεγάλες ποσότητες	με O ₂	Αποικοδόμηση χωρίς O ₂
Άμυλο	Γλυκόζη	α (1 → 4) α (1 → 6)	CHONP + + + - -	+	+
Κυτταρίνη	Γλυκόζη	β (1 → 4)	+ + + - -	+	+
Ημικυτταρίνη	C ₆ και C ₆ μονοσακχαρίτες	β (1 → 4), β (1 → 3) β (1 → 6)	+ + + - -	+	+
Χιτίνη	N-Ακετυλογλυκοζαμίνη	β (1 → 4)	+ + + + -	+	+
Λιγνίνη	Φαινυλο-προπάνιο	C-C, C-O δεσμοί	+ + + - -	+	-
Πρωτεΐνη	Αμινοξέα	Πεπτιδικό δεσμό	+ + + + -	+	+
Υδρογονάνθρακες	Αλειφατικοί, Κυκλικοί Αρωματικοί		+ + - - -	+	+ -
Λιπίδια	Γλυκερόλη, Λιπαρά οξέα μερικά περιέχουν φωσφόρο και άζωτο	Εστερικές	+ + + + +	+	+
Μικροβιακή Βιομάζα		Σύνθετες	+ + + + +	+	+
Νουκλεϊκά οξέα	Πουρίνες, Πυριμιδίνες Σάκχαρα, Φωσφορικό	Σύνθετες	+ + + + +	+	+

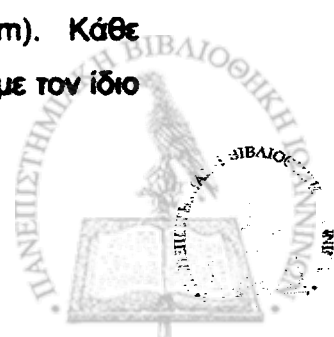
Ρύθμιση έκφρασης της γενετικής πληροφορίας στους προκαρυωτικούς οργανισμούς

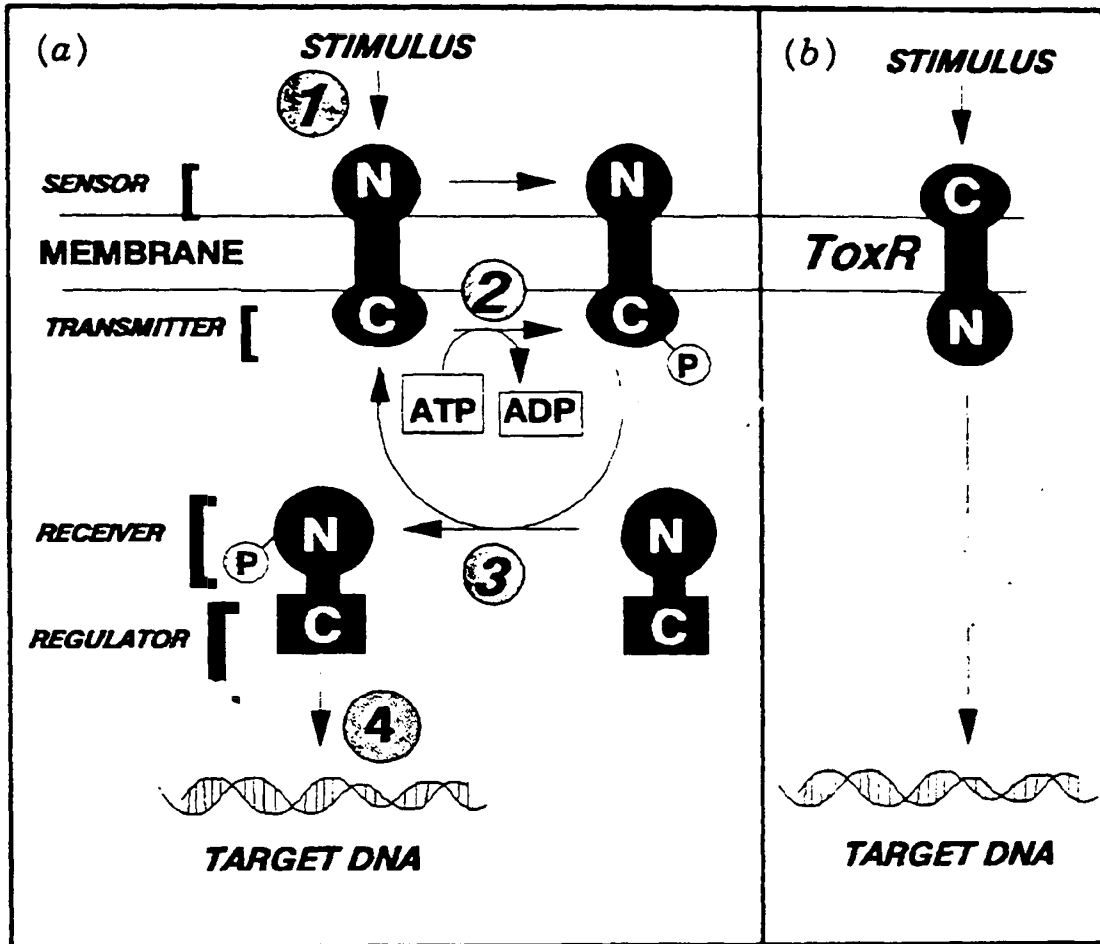
Το εξωτερικό περιβάλλον έχει μια προφανή επίδραση στο εσωτερικό του κυττάρου ενός μικροοργανισμού σε σχέση με την επίδραση στα κύτταρα ενός ανώτερου πολυκύτταρου οργανισμού. Αυτό είναι π.χ. φανερό στην περίπτωση της θερμοκρασίας, όπου οι ανώτεροι πολυκύτταροι οργανισμοί διαθέτουν ειδικά όργανα που ρυθμίζουν την θερμοκρασία τους. Οι αλλαγές που συμβαίνουν σε ένα μικροπεριβάλλον γίνονται άμεσα αντιληπτές από τον μικροοργανισμό. Στις καινούργιες συνθήκες που προκύπτουν γύρω του, ο μικροοργανισμός θα πρέπει να προσαρμοσθεί για να επιβιώσει. Η προσαρμογή οφείλεται στην έκφραση των κατάλληλων γονιδίων που τον βοηθούν να αντιμετωπίσει τις καινούργιες συνθήκες. Η απάντηση του μικροοργανισμού στο ερέθισμα από το περιβάλλον του (βιοτικό, αβιοτικό) θα πρέπει να είναι άμεση γιατί πουθενά στον ζωντανό κόσμο ο ανταγωνισμός δεν είναι τόσο έντονος και άμεσος όσο στις μικροβιακές κοινότητες.

Πως οι προκαρυωτικοί οργανισμοί επικοινωνούν με το περιβάλλον

Έρευνες που έγιναν τα τελευταία λίγα χρόνια έδειξαν ότι βακτήρια όπως του εδάφους, συμβιωτικά, παθογόνα, συχνά χρησιμοποιούν το «μηχανισμό μεταγωγής σημάτων από δύο συστατικά» για να αποκρίθούν σε ερεθισμούς του περιβάλλοντος. Στους ερεθισμούς που αντιλαμβάνονται τα βακτήρια με το σύστημα αυτό περιλαμβάνονται το pH, η οσμωμοριακότητα, η θερμοκρασία, η παρουσία απωθητικών ή προσελκυστικών ουσιών, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών, η διαθεσιμότητα αζώτου και φωσφόρου.

Το σύστημα αίσθησης των βακτηρίων αποτελείται από μια πρωτεΐνη που διασχίζει την κυτταροπλασματική μεμβράνη και αντιλαμβάνεται το ερέθισμα του περιβάλλοντος και μία ρυθμιστική πρωτεΐνη που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, η οποία συχνά, μέσω φωσφορλίωσης και αποφωσφορλίωσης, ρυθμίζει τη γενετική έκφραση. Αυτό είναι το αποτελούμενο εκ δύο συστατικών σύστημα μεταγωγής μηνύματος (two-component signal transduction system). Κάθε σύστημα αποκρίνεται σε διαφορετικό ερέθισμα, όλα όμως λειτουργούν με τον ίδιο τρόπο.





Σχήμα 5: Σύστημα μεταγωγής πληροφορίας (two-component signal transduction system). Προσαρμογή από «Microbial Physiology» των Albert G. Moat, John W. Foster.

Γενικό μοντέλο για το σύστημα μεταγωγής ερεθίσματος

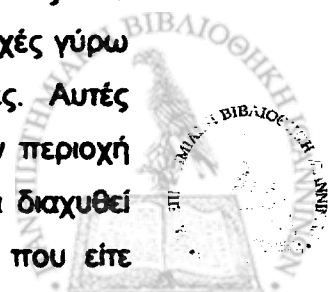
Το γενικό αυτό μοντέλο για το σύστημα μεταγωγής ερεθίσματος συνίσταται στα ακόλουθα :

- A.** 1. Το ερέθισμα αντιδρά με το αμινοτελικό συνήθως άκρο της πρωτεΐνης αισθητήρα.
Αυτό ενεργοποιεί την ιδιότητα αυτοκινάσης που διαθέτει στο καρβοξυτελικό άκρο.
2. Η φωσφορική ομάδα μεταφέρεται στην ρυθμιστική πρωτεΐνη ενεργοποιώντας τη λειτουργία της να προσδεθεί στο DNA (3 και 4).
- B.** Το σύστημα μεταγωγής ερεθίσματος με ένα συστατικό.
Το παράδειγμα είναι από το βακτήριο *Vibrio cholerae*. Η ToxR πρωτεΐνη είναι ενσωματωμένη στη μεμβράνη και μπορεί κατευθείαν να δεθεί στο στόχο DNA όταν ενεργοποιηθεί από κάποιο εξωτερικό ερέθισμα.

Παράδειγμα συστήματος μεταγωγής ερεθίσματος που αποτελείται από δύο συστατικά είναι το EnvZ / OmpR της *E. coli* και *S. typhimurium*, όπου η EnvZ πρωτεΐνη αισθητήρας και η OmpR ρυθμιστική πρωτεΐνη δένεται σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA. Το σύστημα αυτό αφορά αλλαγές στην οσμωμοριακότητα. Επίσης, το σύστημα SroOF σε συνεργασία με το GseE ρυθμίζει τη σπορογένεση.

Μεταγραφικός έλεγχος έκφρασης γενετικής πληροφορίας

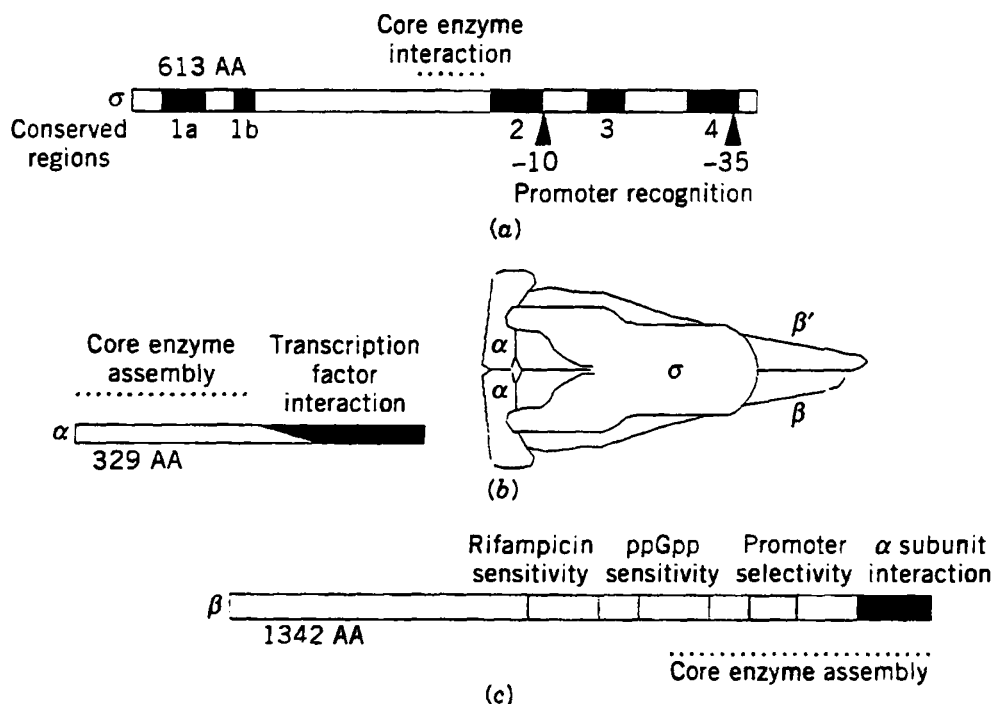
Η έκφραση των γονιδίων των προκαρυωτικών οργανισμών ελέγχεται βασικά σε δύο επίπεδα, στην μεταγραφή του DNA και την μετάφραση του RNA. Επίσης, κάποιο ρόλο παίζει ο χρόνος αποικοδόμησης του mRNA και η τροποποίηση της δραστηριότητας των πρωτεϊνών. Βέβαια, τα περισσότερα προκαρυωτικά γονίδια ελέγχονται στο επίπεδο της μεταγραφής. Η ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδίου λαμβάνει χώρα γύρω από την περιοχή του υποκινητή (προαγωγέα, promoter) του. Ο έλεγχος πραγματοποιείται μέσω της δυνατότητας της RNA-πολυμεράσης να δεθεί στον υποκινητή και εφόσον αυτό γίνει, κατόπιν να μεταγράψει το δομικό μέρος του γονιδίου. Το κύτταρο μπορεί να ελέγξει το ποσό του μηνύματος που θα σχηματισθεί, καθώς και του τελικού προϊόντος (πρωτεΐνη). Οι περιοχές γύρω από το δομικό μέρος του γονιδίου είναι οι ρυθμιστικές περιοχές. Αυτές αποτελούνται από τον υποκινητή, όπου η μεταγραφή ξεκινά, από την περιοχή του χειριστή (operator) στην οποία μία ρυθμιστική πρωτεΐνη ικανή να διαχυθεί μπορεί να προσδεθεί. Και τέλος, υπάρχουν ρυθμιστικές πρωτεΐνες που είτε



εμποδίζουν τη μεταγραφή (αρνητικός έλεγχος) είτε αυξάνουν αυτή (θετικός έλεγχος). Επίσης, μερικές φορές οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες χρειάζονται μόρια επαγωγείς που προσδένονται πάνω τους, όπως σάκχαρα, αμινοξέα.

Το ξεκίνημα της μεταγραφής περιλαμβάνει τρία βήματα : α) το δέσιμο της RNA-πολυμεράσης στο DNA, β) τον ισομερισμό μερικών νουκλεοτιδίων καθώς και γ) την απόδραση της από την περιοχή του υποκινητή, με σκοπό την επιμήκυνση του μηνύματος. Οι πρωτεΐνες που κάνουν αρνητικό έλεγχο συνήθως μπλοκάρουν το δέσιμο της RNA-πολυμεράσης στο DNA, ενώ οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τη μεταγραφή, αντιδρούν με την RNA-πολυμεράση, καθιστώντας ένα από τα ανωτέρω τρία βήματα δυνατό. Οι πρωτεΐνες που παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στο μεταγραφικό επίπεδο είναι αυτές που μπορούν να προσδεθούν στο DNA (DNA-binding proteins) και φέρουν κοινά χαρακτηριστικά κατασκευής. Παράδειγμα, οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συστήματος μεταγωγής ερεθίσματος, που προσδένονται σε συγκεκριμένη περιοχή του DNA, μετά το κατάλληλο ερέθισμα.

Σχήμα 6: RNA – Πολυμεράση. Προσαρμογή από «Microbial Physiology» των Albert G. Moat, John W. Foster.



Μοντέλο RNA-πολυμεράσης

Η RNA-πολυμεράση είναι ένα σύμπλοκο ένζυμο, αποτελείται από τέσσερις (4) τουλάχιστον υπομονάδες. Ο πυρήνας του ενζύμου αποτελείται από δύο



υπομονάδες, την β και β' . Ο πυρήνας μπορεί να προσδεθεί σε τυχαίες τοποθεσίες του DNA και να μεταγράψει τυχαία μήκη RNA. Ο παράγων σ είναι αυτός που αναγνωρίζει συγκεκριμένο υποκινητή (όλοι οι υποκινητές δεν είναι ίδιοι) και μεταγράφει συγκεκριμένο μήκος. Οι παράγοντες σ αλλάζουν κάτω από διαφορετικές συνθήκες και κατ' αυτόν τον τρόπο έχουμε μεταγραφή διαφορετικών γονιδίων.

Πίνακας 5 : Παραδείγματα παραγόντων σ

Παράγων σ	Δομικό γονίδιο	Μοριακό βάρος	Θέση στο γενετικό χάρτη	Λειτουργία
σ^{70}	pro D	83.000	60	Ξεκίνημα μεταγραφής
σ^{32}	pro H	32.000	76	Ξεκίνημα, απάντηση σε θερμικό σοκ
σ^{28} (σ^F)	flaA	28.000	43	Γονίδια μαστίγιων, Χημειόταξη
σ^{24} (σ^E)		24.000		Ακραίο θερμικό σοκ
σ^{38} (σ^S)	proS (Katf)	38.000	59	Στατική φάση ανάπτυξης
σ^{54}	proN	54.000	72	Αζωτο

Σφαιρική άποψη ελέγχου του δικτύου με ρύθμιση στο επίπεδο ολόκληρου του κυττάρου.

Το κλασσικό «πειραματόζωο» στα πειράματα Μικροβιολογίας είναι το βακτήριο *Escherichia coli*, το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί και να επιβιώσει κάτω από την επίδραση πολλών διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως μεταφορές του βακτηρίου από ένα πλούσιο θρεπτικά περιβάλλον σε ένα φτωχό, αλλαγές στην πηγή άνθρακα, μεταφορά από ένα αερόβιο σε ένα αναερόβιο περιβάλλον, περιορισμένη παροχή θρεπτικών συστατικών αζώτου, φωσφόρου, άνθρακα, απότομες αλλαγές θερμοκρασίας. Διαμέσου όλων αυτών των δυσμενών συνθηκών, το κύτταρο κατορθώνει να διατηρήσει την ισορροπία μεταξύ των διαφόρων συστατικών και παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για τον δπλασιασμό του γενετικού υλικού, την αύξηση και τη διαίρεσή του. Η ικανότητα που έχει ένα κύτταρο να μπορεί να συντονίζει τις διάφορες κυτταρικές

φυσιολογικές λειτουργίες σε σχέση με μία περιβαλλοντική επίδραση, αναφέρεται ως σφαιρικός έλεγχος (γονιδιακής ρύθμισης). Η ρύθμιση των δικτύων σφαιρικά περιλαμβάνει ομάδες σπερονίων και ρέγκουλον με φαινομενικά μη σχετιζόμενες λειτουργίες και με γενετικές θέσεις διασκορπισμένες στο χρωμόσωμα του μικροοργανισμού, να ελέγχονται και να συντονίζονται σε μία συγκεκριμένη περιβαλλοντική επίδραση.



Μία σύντομη αναφορά στους όρους αυτούς παρατίθεται κατωτέρω :

Οπερόνιο : μία αλληλουχία βάσεων στο DNA που κωδικοποιεί για ένα ή περισσότερα πολυπεπτίδια, με κοινό έλεγχο έκφρασης.

Ρέγκουλον (regulon) : είναι ένα δίκτυο από οπερόνια, τα οποία ελέγχονται από την ίδια ρυθμιστική πρωτεΐνη.

Μόντουλον (modulon) : αναφέρεται στα οπερόνια και ρεγκουλόνια που βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο μιας κοινής πλειοτροπικής ρυθμιστικής πρωτεΐνης. Ο απλούστερος τρόπος των οπερονίων σε ένα μόντουλον να απαντήσουν σε έναν παράγοντα stress είναι διαμέσου της παραγωγής ενός μορίου μηνύματος, το οποίο συγκεντρώνεται κατά τη διάρκεια του stress. Μόρια που παίζουν το ρόλο του μηνύματος είναι συχνά μικρά νουκλεοτίδια, όπως cAMP ή ppGpp.

Στίμουλον (stimulon) : ο όρος χρησιμοποιείται για όλα τα γονίδια, οπερόνια, ρεγκουλόνια και μοντουλόνια τα οποία απαντούν σε ένα κοινό περιβαλλοντικό ερέθισμα. Είναι δυνατό μερικά οπερόνια τα οποία αποκρίνονται σε συγκεκριμένο περιβαλλοντικό ερέθισμα, να μην μοιράζονται την ίδια ρυθμιστική πρωτεΐνη.



Κοπρανώδεις Δείκτες

Το θαλάσσιο περιβάλλον είναι αχανές, που φαίνεται σχεδόν αδύνατο να επηρεαστεί από μολυσματικούς παράγοντες. Παρόλα αυτά, στις παράκτιες περιοχές, οι δραστηριότητες που ανέπτυξε ο άνθρωπος αλλοιώνουν την κανονική λειτουργία των μικροοργανισμών και την ποιότητα του νερού. Τα γλυκά νερά είναι το μικρότερο μέρος πάνω στη γη, είναι όμως εξαιρετικά σημαντικά γιατί είναι η πηγή του πόσιμου νερού. Η μόλυνση των υδάτων από οικιακά ή βιομηχανικά απόβλητα προκαλεί προβλήματα στο περιβάλλον. Στα θαλάσσια και τα γλυκά νερά δημιουργούνται μοναδικές οικολογικές φωλιές για πολλούς εξειδικευμένους οργανισμούς, οι οποίοι χρειάζονται περιβάλλοντα με μία συνεχή υδάτινη φάση.

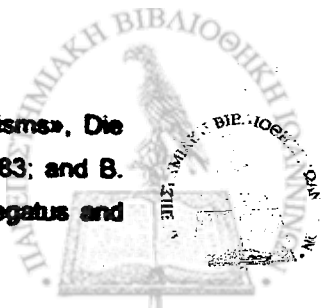
Η μεγαλύτερη διακύμανση στα νερά είναι το επίπεδο των θρεπτικών συστατικών που υπάρχουν στα διάφορα νερά. Καθαρό νερό που μεταφέρεται σε λιμνούλες του βουνού από λιώσιμο του χιονιού περιέχει πολύ λίγα θρεπτικά συστατικά. Τέτοια χαμηλού περιεχομένου θρεπτικών συστατικών οικοσυστήματα χαρακτηρίζονται ως **Ολιγοτροφικά (Oligotrophic)** και μπορούν να στηρίξουν πολύ λίγους μικροοργανισμούς και μερικά είναι αποστειρωμένα. Στο άλλο άκρο, υπάρχουν υδάτινα οικοσυστήματα που το ποσοστό των θρεπτικών συστατικών τους προσεγγίζει αυτά τα υψηλά ποσοστά των καλλιεργειών στο εργαστήριο. Αυτά τα οικοσυστήματα βρίσκονται σε ρυπογόνες περιοχές και περιοχές όπου αποβάλλονται κατεργασμένα φυτικά απόβλητα.



Πίνακας 6: Τα σημαντικότερα γένη προκαρυωτικών οργανισμών που πρωταρχικά βρίσκονται στα θαλάσσια και γλυκά νερά

<u>Ομάδα οργανισμών</u>	<u>Γένος</u>
Φωτοαυτότροφοι	Chlorobium Chloroherpeton Chromatium Pelodictyon Thiodictyon Thiopodia
Φωτοετερότροφοι	Chloroflexus Hellobacterium Heliothrix Rhodocyclus Rhodomicrobium Rhodopseudomonas Rhodospirillum
Χημειοετερότροφοι	Blastobacter Caulobacter Flexibacter Flexithrix Gemmobacter Hyphomicrobium Leucothrix Sphaerotilus
Χημειολιθοαυτότροφοι	Beggiatoa Gallionella Thioplace Thiothrix Thiovulum

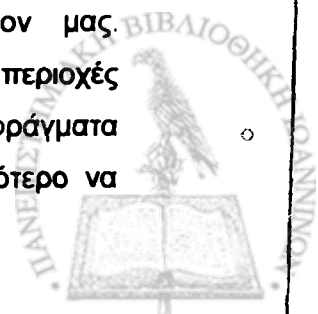
Πηγή δεδομένων : from V.M. Gorlenko, et al. «The Ecology of Aquatic Micro-Organisms», Die Binnengewasser, Vol. XXVIII, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 1983; and B. Rothe, et al., «The Phylogenetic Position of the Budding Bacteria Blastobacter aggregatus and Gemmobacter aquatilis» in Archives of Microbiology, 147 : 92-99, 1987.



Ένας σημαντικός παράγων στα υδρόβια περιβάλλοντα είναι η κίνηση των θρεπτικών υλικών, είτε είναι αέρια, στερεά ή σε διαλυμένη μορφή. Αυτές οι αλλαγές στη συγκέντρωση είναι μέρος από τον κόσμο των υδρόβιων μικροοργανισμών, οι οποίοι πρέπει να είναι έτοιμοι να ανταποκριθούν γρήγορα και να επιλέξουν το κατάλληλο γι' αυτούς περιβάλλον (Στήλη Winogradsky). Πολύ σημαντικό για τα μικρόβια και τον αποικισμό τους είναι η προσκόλληση σε διάφορες επιφάνειες με σκοπό την αυξημένη συγκέντρωση θρεπτικών. Σε oligοτροφικά περιβάλλοντα, κάποιος μπορεί να παρατηρήσει την ανάπτυξη λεπτών στρωμάτων μικροοργανισμών (Biofilms) ως παράγοντα μικροβιακής ανάπτυξης. Τα λεπτά αυτά στρώματα μικροοργανισμών με την παρουσία φωτός, θρεπτικών και διαφόρων διαχύσεων μπορεί να γίνουν συνθετότερα. Η παρατήρηση αυτών γίνεται με το Confocal Scanning Laser Microscopy (CSLM). Η συνάντηση σύνθετων στρωμάτων μικροοργανισμών έχει μεγάλη σχέση με τη δημόσια υγεία. Σε αυτά τα σύνθετα στρώματα μικροοργανισμών μπορεί να έχουμε ανάπτυξη της *Legionella* σε θερμά νερά ή σε νερά που μπορούν να γίνουν πόσιμα.

Το νερό πρέπει να είναι καθαρό από παθογόνους μικροοργανισμούς, διαλυμένες τοξίνες, δυσάρεστη θολερότητα, μυρωδιά, χρώμα και γεύση. Όπως γνωρίζουμε, νερό καλής ποιότητας είναι δύσκολο να έρθει εύκολα στα σπίτια μας. Η καλή υγεία εξαρτάται από το καθαρό πόσιμο νερό. Πολλές επιδημίες, π.χ. στη νότια Αμερική από χολέρα, έχουν σκοτώσει χιλιάδες ανθρώπους. Σε ένα μεγάλο κομμάτι του κόσμου η έλλειψη υγιεινής του νερού είναι υπεύθυνη για δισεκατομμύρια διάρροιες και γύρω στα 2 εκατομμύρια παιδιά πεθαίνουν κάθε χρόνο λόγω έλλειψης υγιεινής του νερού.

Διαμέσου του αέρα, του εδάφους, των διαφόρων απορροών, τα επιφανειακά νερά αποκτούν σαπροβιοτικούς οργανισμούς και μπορεί και παθογόνους. Παθογόνα πρωτόζωα όπως *Giardia*, *Cryptosporidium*, βακτήρια όπως *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Mycobacterium* και διάφορους παθογόνους ιούς. Ο έλεγχος πολλών ασθενειών που μεταδίδονται με το πόσιμο νερό, κατά ένα μεγάλο μέρος, επιτυγχάνεται με την χλωρίωσή του ή την οζόνωσή του (Bezirtzoglou et al., 2003). Αλλά, αδυνατούμε να μετακινήσουμε τους ιούς και τα πρωτόζωα, καθώς και η έλλειψη γενικών σταθερών της ποιότητας του νερού για αυτούς τους οργανισμούς επιβάλλει το συνεχές ενδιαφέρον μας. Επιπρόσθετα προβλήματα έχουμε σε υδάτινα μέρη αναψυχής και σε περιοχές όπου μαζεύονται οστρακοειδή. Σε αυτές τις περιοχές δεν υπάρχουν φράγματα επανακαθαρισμού του νερού ενάντια στις μολύνσεις και είναι ευκολότερο να επέλθει λοίμωξη.



Οι μικροοργανισμοί που προκαλούν ασθένειες προέρχονται κυρίως από ανθρώπινα ή ζωικά περιπτώματα ή μπορεί να είναι παρόντες στο έδαφος και το νερό. Τα βακτήρια των αφοδεύσεων, εάν είναι παθογόνα ή απλοί δείκτες μόλυνσης, δεν επιβιώνουν στα καινούργια περιβάλλοντα.

Το φυσικό περιβάλλον για πολλά από αυτά τα μικρόβια είναι το πλούσιο σε θρεπτικά περιβάλλον του εντέρου των θερμόαιμων ζώων και εμφανίζονται να έχουν χάσει τη δυνατότητα να διατηρήσουν τον εαυτό τους στα βλαβερά εξωτερικά περιβάλλοντα. Αυτοί οι αλλόχθονοι ή εισαγόμενοι μικροοργανισμοί είναι σταθερά προστιθέμενοι στα φυσικά περιβάλλοντα ως ένα μέρος των ανθρώπινων, ζωικών περιπτώσεων και λυμάτων. Γενικά, αυτοί οι μικροοργανισμοί επιβιώνουν καλύτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες, σε καταστάσεις ψύξης ο χρόνος παρατείνεται εξαιρετικά (Batic O., 1980), (Bradley D.J., 1977).

Ο βαθμός θανάτου των μικροοργανισμών που προέρχονται από την εντερική χλωρίδα εξαρτάται γενικώς από τη θερμοκρασία, την επίδραση του φωτός, την παρουσία άλλων μικροοργανισμών και τη χημική σύνθεση του νερού. Μια μεγάλη ομάδα από ιούς, πρωτόζωα και βακτήρια που προκαλούν ασθένειες, καταλήγουν να μολύνουν το νερό από ανθρώπινα περιπτώματα, λύματα καθώς επίσης και ζωικά περιπτώματα. Η κυριότερη αιτία του σταδιακού θανάτου των μικροοργανισμών που εισάγονται σε ένα καινούργιο περιβάλλον, μετά από πολλά χρόνια ερευνών, φαίνεται πως είναι η αδυναμία τους να συναγωνισθούν τους ιθαγενείς πληθυσμούς.

Η απομόνωση των παθογόνων βακτηρίων από το νερό είναι δύσκολη, λόγω των μικρών συγκεντρώσεων, των δύσκολων συνθηκών επιβίωσης στο καινούργιο περιβάλλον, που γίνονται δυσκολότερες από τον ανταγωνισμό των υδρόβιων μικροοργανισμών και τις εξειδικευμένες τροφικές απαιτήσεις πολλών παθογόνων. Μέθοδοι εμπλουτισμού συχνά χρησιμοποιούνται για την απομόνωσή τους πριν μεταφερθούν σε εκλεκτικά θρεπτικά υλικά για την ταυτοποίησή τους. Έτσι, ως αποτέλεσμα έχουμε να περιορίζεται η δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των παθογόνων μικροοργανισμών στο δείγμα. Επίσης, πολλοί μικροοργανισμοί είναι δύσκολο να ανιχνευθούν και για πολλούς καινούργιους παράγοντες ασθενειών πρέπει να βρεθούν μέθοδοι ανίχνευσης στα δείγματα. Πολλά εντερικά βακτήρια έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν σε λανθάνουσα κατάσταση στο καινούργιο περιβάλλον, είναι ικανά να επιζήσουν για μεγάλες περιόδους, αλλά μη καλλιεργούμενα σε θρεπτικά, διατηρώντας όμως τη δυνατότητα μόλυνσης. Βακτήρια τα οποία ανακάμπτουν δύσκολα κάτω από δυσμενείς καταστάσεις, οδηγούν σε ψεύτικα συμπεράσματα για την υπολογιζόμενη ποιότητα του νερού (Hazen T.C., 1988), (Walch M. & Colwell R.R., 1994). Βέβαια, τα τελευταία χρόνια έχουν υιοθετηθεί μοριακές μέθοδοι

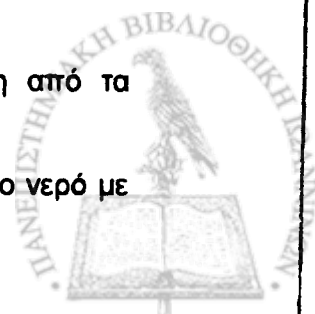
ανίχνευσης της ποικιλομορφίας και διανομής των βακτηρίων στα υδρόβια οικοσυστήματα (Giovannoni et al., 1990, Fuhman et al., 1993). Ανίχνευση συγκεκριμένων ακολουθιών RNA ή γονιδίων που αντικατοπτρίζουν τη φυλογενετική προέλευση των προκαρυωτικών οργανισμών (DeLong et al., 1989, Hiorns et al., 1997, Onreas et al., 1997) λόγω του μεγάλου αριθμού βακτηρίων που δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε θρεπτικά υλικά (Giovannoni et al., 1990, Ward et al., 1990).

Στις Η.Π.Α., από 32 μολυσματικές ασθένειες που μεταδίδονται μέσω του νερού μεταξύ του 1991 και 1992, ο αιτιογόνος παράγων ανιχνεύθηκε στο νερό σε 4 μόνο περιπτώσεις. Στην πρώτη περίπτωση, αιτιογόνος παράγων ήταν η *Shigella*, στη δεύτερη και τρίτη περίπτωση αιτιογόνος παράγων ήταν η *Giardia* και τέλος, στην τέταρτη περίπτωση αιτιογόνος παράγων ήταν το *Cryptosporidium* (Center for Disease Control and Prevention, 1993). Βέβαια, η μη ανίχνευση μπορεί να οφείλεται και στην προσωρινή μόλυνση και απομάκρυνση του αιτιογόνου παράγοντα από το νερό.

Λόγω των ανωτέρω δυσκολιών και μειονεκτημάτων που παρουσιάζει η ανίχνευση και ταυτοποίηση του αιτιογόνου παράγοντα μιας μολυσματικής ασθένειας που μεταδίδεται διαμέσου του νερού, χρησιμοποιούμε ορισμένους μικροοργανισμούς δείκτες για την μόλυνση του από περιπτώματα ανθρώπων ή ζώων (U.S. Environmental Protection Agency, 1994), (W.H.O., 1993). Οι μικροοργανισμοί δείκτες εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες από τα άτομα (άνθρωπος, ζώα). Επίσης, είναι ευκολότερο να εκτελεστούν διάφορες δοκιμασίες για την ανίχνευσή τους και μας παρέχουν ένα μέτρο της επικινδυνότητας από τη λήψη ή την επαφή με το νερό.

Ως δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης χρησιμοποιούνται ο ολικός αριθμός των coliforms, τα κοπρανώδη coliforms, η *Escherichia coli*, το *Clostridium perfringens*, Streptococci, Enterococci (APHA, 1985). Οι διάφοροι ερευνητές ψάχνουν για τον ιδανικό μικροοργανισμό που να μπορούν να χρησιμοποιούν για την καταλληλότητα των νερών. Ανάμεσα στα κριτήρια που πρέπει να διαθέτει είναι τα ακόλουθα :

1. Το βακτήριο δείκτης πρέπει να είναι κατάλληλο για ανάλυση όλων των τύπων νερού.
2. Το βακτήριο δείκτης πρέπει να είναι παρόν οπουδήποτε εντερικοί παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι παρόντες.
3. Το βακτήριο δείκτης πρέπει να παρουσιάζει καλύτερη επιβίωση από τα παθογόνα εντερικά βακτήρια.
4. Το βακτήριο δείκτης δεν θα πρέπει να αναπαράγεται στο μολυσμένο νερό με αποτέλεσμα την υπερτίμησή του.



5. Η διαδικασία ανάλυσης για τον δείκτη πρέπει να έχει μεγάλη εξειδίκευση, με άλλα λόγια, άλλα βακτήρια να μην δίνουν θετικά αποτελέσματα. Επιπρόσθετα, η διαδικασία πρέπει να έχει υψηλή ευαισθησία και να ανιχνεύει χαμηλά επίπεδα του δείκτη.
6. Η μέθοδος ανίχνευσης να μπορεί να εκτελεσθεί εύκολα.
7. Ο μικροοργανισμός δείκτης θα πρέπει να είναι αβλαβής για τους ανθρώπους.
8. Το επίπεδο του βακτηρίου δείκτη στο μολυσμένο νερό θα πρέπει να έχει ευθεία σχέση με το βαθμό της κοπρανώδους μόλυνσης (Prescott et al., 1999).

Ολικός αριθμός των κολοβακτηριδίων (Coliforms)

Ως κολοβακτηρίδια χαρακτηρίζονται τα αερόβια, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, αρνητικά κατά Gram, που δεν σχηματίζουν σπόρους, έχουν σχήμα βακίλου, ζυμώνουν τη λακτόζη παράγοντας αέριο σε 24 έως 48 ώρες στους 35° C.

Τα κριτήρια ταυτοποίησης των κολοβακτηριδίων σήμερα είναι τα ακόλουθα : α) είναι αρνητικά για το ένζυμο κυτοχρωματική οξειδάση και β) θετικά για το ένζυμο γαλακτοσιδάση. Ανήκουν στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae* συνήθως περιλαμβάνουν την *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*. Ένας από τους παραδοσιακούς δείκτες μόλυνσης των νερών από περιτώματα και λύματα, που συνεπάγεται την ύπαρξη παθογενετικών μικροοργανισμών, είναι η μέτρηση του ολικού αριθμού των κολοβακτηριδίων, που μπορεί να γίνει ευκολότερα, από την εκτέλεση ειδικών δοκιμασιών για κάθε συγκεκριμένο παθογενετικό μικροοργανισμό (Payment P.L. et al., 1991). Ο δείκτης αυτός προτείνεται και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και τον Οργανισμό Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA). Οι μικροοργανισμοί αυτοί (κολοβακτηρίδια) εκκρίνονται σε μεγάλες ποσότητες από ανθρώπους και ζώα και μολύνουν τα νερά. Ο χρόνος επιβίωσής τους στο νερό είναι μικρός (Fattal B. Et al., 1983, Panagiotou A., Bezirtzoglou E. Et al., 1995) και η μεγάλη επιδεκτικότητα τους στις διαδικασίες καθαρισμού του νερού δεν μπορούν να τα καταστήσουν κατάλληλους δείκτες όταν ο αιτιολογικός παράγοντας μιας ασθένειας είναι πρωτόζωο ή ιός.

Βέβαια, πολλές φορές τα αποτελέσματα έχουν συμπίεση με τον ολικό αριθμό των κολοβακτηριδίων (Mackenzie W.R. et al., 1994). Ένα άλλο μειονέκτημα που εμφανίζει η μέτρηση του ολικού αριθμού των κολοβακτηριδίων ως δείκτης μόλυνσης είναι το γεγονός ότι τα κολοβακτηρίδια μπορεί να μην προέρχονται από

το έντερο ζώων ή ανθρώπων, αλλά από απόβλητα βιομηχανίας ξύλου (Wun C.K. et al., 1976) ή από λεπτά στρώματα κοινοτήτων μέσα στο νερό (Geldreich E.E. & Kenner B.A., 1969), (Health and weal fare Canada, 1993), (Panagiou A., Savvaidis I., Theodorou D., Bezirtzoglou E., 1995) ή από διάφορα ρυάκια (American Public Health Association, 1992), (Mc Feters G.A., 1974). Ακόμη, για τα τροπικά νερά, ο ολικός αριθμός των κολοβακτηριδίων είναι αυξημένος λόγω άριστης θερμοκρασίας ανάπτυξης

Κοπρανώδη κολοβακτηρίδια

Τα κολοβακτηρίδια περιλαμβάνουν μια πλατιά κλίμακα βακτηρίων των οποίων η πρωταρχική πηγή μπορεί να μην είναι το έντερο. Για να ξεπεράσουμε αυτό το εμπόδιο, έχουν αναπτυχθεί δοκιμασίες που επιτρέπουν να εξετάσουμε την παρουσία κοπρανωδών κολοβακτηριδίων. Αυτά είναι κολοβακτηρίδια που προέρχονται από το έντερο θερμόαιμων ζώων. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι μπορούν να αναπτυχθούν σε περισσότερες ακραίες θερμοκρασίες, όπως των 44.5°C . Μπορούν να ζυμώσουν τη λακτόζη παράγοντας οξύ και αέριο, στους $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$. Αυτά τα κολοβακτηρίδια, ως η *Klebsiella*, έχουν άμεση σχέση με τη μόλυνση του νερού από θερμόαιμα ζώα (Pouchet A.M. et al., 1991).

Στα τροπικά κλίματα, στα θαλάσσια νερά που χρησιμοποιούνται για κολύμπι, ο αριθμός των κοπρανωδών κολοβακτηριδίων είναι πάντα αυξημένος, σε σχέση με τα standards που δίνει ο Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος των Η.Π.Α. και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας. Η συμβουλευτική έκθεση ήταν 200 σποικίες κοπρανωδών κολοβακτηριδίων ανά 100 ml (CFU) per 100mL. Κατά το έτος 1986 τα standards άλλαξαν, αντικατοπτρίζοντας μειωμένη εμπιστοσύνη στον κοπρανώδη δείκτη των κολοβακτηριδίων σε σχέση με τον κίνδυνο μόλυνσης από ασθένειες. Ο αυξημένος αριθμός των κοπρανωδών κολοβακτηριδίων οφείλεται στην ανάπτυξη των βακτηρίων στο έδαφος και τη μεταφορά τους στα θαλάσσια οικοσυστήματα μέσω της επιφανειακής απορροής, λόγω των καλών κλιματολογικών συνθηκών στα τροπικά κλίματα (Fujroka R.S., 2001), (Dr. Gary et al., 2000).

Escherichia coli



Το βακτήριο αυτό πληρεί όλα τα κριτήρια από τον ολικό και κοπρανώδη δείκτη των κολοβακτηριδίων, αλλά διαθέτει και επιπλέον χαρακτηριστικά που το καθιστούν έναν από τους πιο χρήσιμους δείκτες της μόλυνσης του νερού. Η *E. Coli* έχει αποδειχθεί σημαντικότερος δείκτης για τη μόλυνση με κόπρανα από ότι η ίδια η ομάδα των κολοβακτηριδίων (Dufour A.P., 1997). Το βακτήριο αυτό μπορούμε να το ταυτοποιήσουμε εύκολα γιατί χαρακτηρίζεται από την έλλειψη ουρεάσης και την παρουσία β' γλυκορονιδάσης, ένζυμα τα οποία είναι η βάση για τις μεθόδους διαφοροποίησης από άλλα βακτήρια. Η *Escherichia coli* βρίσκεται σε όλα τα κόπρανα των θηλαστικών σε μεγάλες συγκεντρώσεις, αλλά δεν πολλαπλασιάζεται αισθητά στο περιβάλλον. Ο χρόνος επιβίωσης της στο πόσιμο νερό είναι μεταξύ 4 και 12 εβδομάδων, εξαρτώμενος από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, μικροχλωρίδα και άλλα). Παθογόνα βακτήρια και ιοί είναι περίπου το ίδιο ευαίσθητα και τα παράσιτα περισσότερο ευαίσθητα από τις δύο προηγούμενες ομάδες.

Η *E. Coli* έχει πιο παρατεταμένο κύκλο ζωής μέσα στο πόσιμο νερό από τα προηγούμενα και για το λόγο αυτό θεωρείται ως ο καλύτερος δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης για το πόσιμο νερό (Edberg S.C. et al., 2000). Η *E. Coli* θεωρείται ως δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης και για τα νερά αναψυχής από τον Οργανισμό Προστασίας Περιβάλλοντος (EPA) (U.S. Environmental Protection Agency, 1986). Βέβαια, σε νερά αναψυχής με μέτρια θερμοκρασία και προπάντων γλυκά νερά, όπου τα standards είναι 126 CFU *E. Coli*/100mL (Dr Gary et al., 2000). Είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης σε θαλάσσια και γλυκά νερά στα τροπικά κλίματα, όπου έχει βρεθεί σε νερά βροχών (Haren T.C. & Toranzos, 1990), (Fujioka, 2001, Dr Gary et al., 2000).

Clostridium perfringens

Το *Clostridium perfringens* είναι ο κύριος αναερόβιος μικροοργανισμός που είναι αποδεκτός ως δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης του νερού. Είναι σταθερά παρών σε μέτριες συγκεντρώσεις στα περιττώματα ανθρώπων και ζώων και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εξειδικευμένος δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης μεταξύ ανθρώπινης ή ζωικής κοπρανώδους μόλυνσης (Oragui J. Et al., 1983). Η κατανομή του *C. perfringens* σχετίζεται με τα ανθρώπινα και ζωικά περιττώματα, τα λύματα και τα μολυσμένα νερά (Sorensen et al., 1989, Bezirtzoglou et al., 1996, 1997). Έχει προταθεί να χρησιμοποιείται ως δείκτης κοπρανώδους

μόλυνσης των νερών από (ΑΡΗΑ, 1985), (Sorensen et al., 1989). Το *C. perfringens* μπορεί να επιβιώσει περισσότερο στα περιβαλλοντικά νερά από την πλειονότητα των παθογόνων μικροοργανισμών και από τα άλλα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως κοπρανώδεις δείκτες (Oragui J.I. et al., 1983, Bezirtzoglou et al., 1990, Sorensen et al., 1989). Ένα άλλο πλεονέκτημα του βακτηρίου αυτού και κυρίως της σπορογόνου μορφής είναι ότι μπορεί να αντέξει σε δυσμενείς φυσικοχημικές συνθήκες, για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης σε οικοσυστήματα που βρίσκονται υπό την επίδραση δυσμενών συνθηκών (Hirn et al., 1980, Willis A.T., 1969). Το *C. perfringens* χρησιμοποιείται σε πολλές χώρες για την ανίχνευση της περιπρωματικής ρύπανσης παλαιάς προέλευσης (Pinfold, 1990), λόγω της εξαιρετικής σταθερότητας των σπόρων του βακτηρίου στις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτό σημαίνει ότι η εύρεση σπόρων του βακτηρίου σε ένα σημείο ενός υδάτινου αποδέκτη δεν δεικνύει απαραίτητως ότι η περιπρωματική μόλυνση συμβαίνει κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της έρευνας.

Πολλά από τα κλωστηρίδια που ανάγουν τα θειώδη και σχηματίζουν σπόρους είναι ικανά να αναπτύσσονται στα ιζήματα που υπάρχουν στους σωλήνες του πόσιμου νερού. Το *C. perfringens* δεν αναπτύσσεται στα ιζήματα και τα νερά, η εύρεσή του δεικνύει κοπρανώδη μόλυνση (Schets F.M., 1995). Για το λόγο αυτό έχει προταθεί ως δείκτης για το πόσιμο νερό. Επιπλέον, η μέθοδος ανεύρεσης του μπορεί να χρησιμοποιηθεί από πολλά εργαστήρια. Έχει γίνει ένας πετυχημένος δείκτης για την ανίχνευση λυμάτων σε μολυσμένα ποτάμια, λίμνες (Bezirtzoglou et al., 1997) (Easterbrook T.J. & West P.A., 1987), (Fujioka R.S. & Shizumura L.K., 1985), (Sorensen D.L. et al., 1989), ωκεανούς (Fujioka R.C. et al., 1992), εκβολικά οικοσυστήματα (Christobel et al., 1999). Σε έρευνα που διεξήχθη στις θαλάσσιες παραλίες του Hong Kong μεταξύ 25.000 λουομένων, ευρέθη άμεση συσχέτιση μεταξύ των γαστρεντερολογικών συμπτωμάτων των λουομένων με το ποσοστό του *C. perfringens* στα νερά. Δεν ευρέθη άμεση συσχέτιση με τους άλλους κοπρανώδεις δείκτες (Kueh C.S.W. et al., 1995).

Το *C. perfringens* θεωρείται ως ένας συντηρητικός δείκτης της μόλυνσης από περιτώματα. Εάν υπάρξουν αποτελέσματα που δείχνουν καθόλου ή μικρά επίπεδα *C. perfringens*, κάποιος μπορεί να έχει τη βεβαιότητα ότι το νερό αυτό είναι καλής ποιότητας.

Streptococci, Enterococci

Είναι Gram θετικά βακτήρια και είναι χρήσιμοι δείκτες για την ποιότητα του νερού, ως κάτοικοι του εντέρου ανθρώπων και ζώων. Έχουν προταθεί ως δείκτες



κοπρανώδους μόλυνσης από ΑΡΗΑ, WHO, ΕΡΑ. Οι Εντερόκοκκοι είναι μια υποομάδα των Στρεπτόκοκκων. Όπως και με τα κολοβακτηρίδια, μερικά από αυτά υπάρχουν σε περιβάλλοντα με παθογόνους μικροοργανισμούς (Richardson K.J.,).

Ανάλογα με το είδος των Στρεπτοκόκκων διαφαίνεται και η πηγή προέλευσης. Οι *S. faecalis*, *S. Faecium* προέρχονται από τον άνθρωπο, οι *S. Bovis*, *S. equines*, *S. avium* από ζώα και πουλιά (Geldreich E.E., 1967). Αυτοί οι τελευταίοι μικροοργανισμοί δεν επιβιώνουν στο νερό, εντούτοις θεωρούνται δείκτες (Geldreich E.E., 1970), (McFeters G.A., 1974). Οι Εντερόκοκκοι μαζί με την *E. Coli* θεωρούνται δείκτες του πόσιμου νερού (Edberg S.C. et al., 2000), αλλά κυρίως δείκτες των νερών αναψυχής. Ως standards για θαλάσσια νερά αναψυχής δίνονται οι 35 CFU από εντερόκοκκους / 100 ml. Στα τροπικά κλίματα, οι εντερόκοκκοι για τα γλυκά νερά αναψυχής δεν θεωρούνται κατάλληλοι δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης γιατί συναντώνται σε υψηλά ποσοστά (Dr Gary et al., 2000).

Άλλοι κοπρανώδεις δείκτες

Ως κοπρανώδεις δείκτες χρησιμοποιούνται διάφοροι ιοί όπως βακτηριοφάγοι του *Bacteroides fragilis*, F⁺ ιοί, εντεροϊοί (F. Lucene et al., 1999, Campos C. et al., 2002). Ο *Rhodococcus coprophilus* έχει προταθεί ως δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης από ζώα αγροκτημάτων και μάλιστα περιττωματικής ρύπανσης παλαιάς προέλευσης (Oragui J.I., Mara D.D., 1983). Διάφοροι ερευνητές προτείνουν διάφορους χημικούς δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης ανθρώπινης προέλευσης όπως κοπρανώδη λιπίδια, ουροχολίνη, καφεΐνη (Dr Gary et al., 2000), ποσοστό κοπροστανόλης (Leeming R., Nichols P.D., 2000), (Bezirtzoglou, 1997).



CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

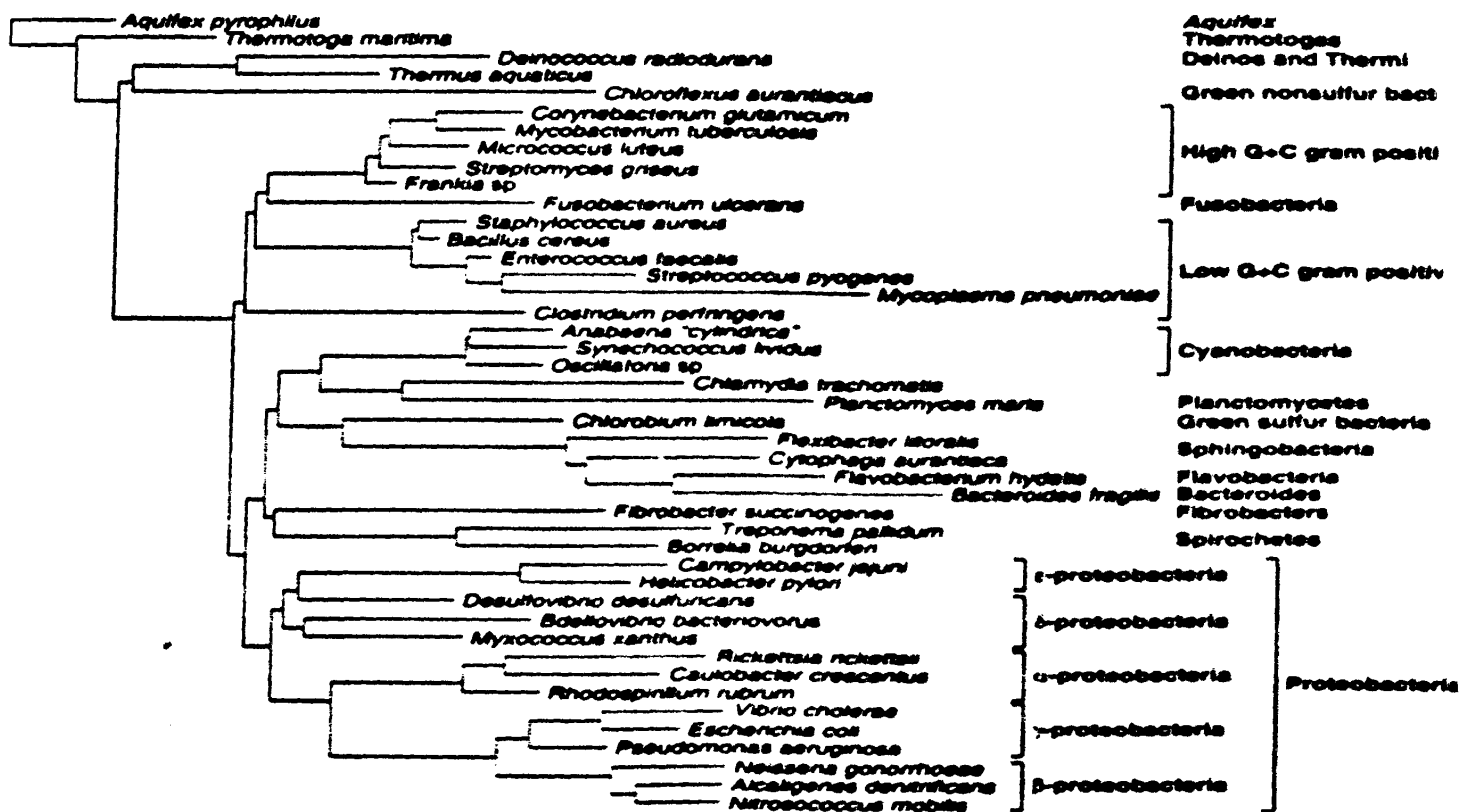
Φυλογενετική προέλευση κλωστηριδίων

Οι σύγχρονες μέθοδοι ταξινόμησης των μικροοργανισμών στηρίζονται κυρίως σε μοριακά δεδομένα, όπως το ποσοστιαίο περιεχόμενο των βάσεων στο γενετικό υλικό ενός μικροοργανισμού ποί % G + C, η σύγκριση των πρωτεϊνών, η εύρεση της αλληλουχίας των νουκλεοπιδίων στα διάφορα νουκλεϊκά οξέα (προπάντων των 5S, 16SrRNAs), σε αντίθεση με τα κλασσικά συστήματα ταξινόμησης, όπου οι διαφορετικές ταξινομικές ομάδες καθορίζονται από φαινοτυπικούς χαρακτήρες. Τέτοιοι χαρακτήρες είναι : το σχήμα και γενικότερα η μορφολογία του μικροβίου, η Gram χρώση, η σχέση με το οξυγόνο, η κινητικότητα, η παρουσία ενδοσπορίων, ο τρόπος παραγωγής ενέργειας και άλλα.

Βάσει των μοριακών δεδομένων έχουν κατασκευασθεί φυλογενετικά δένδρα, τα οποία καταδεικνύουν την φυλογενετική συγγένεια και προέλευση των μικροοργανισμών. Κατωτέρω παρατίθεται το φυλογενετικό δένδρο των Eubacteria.



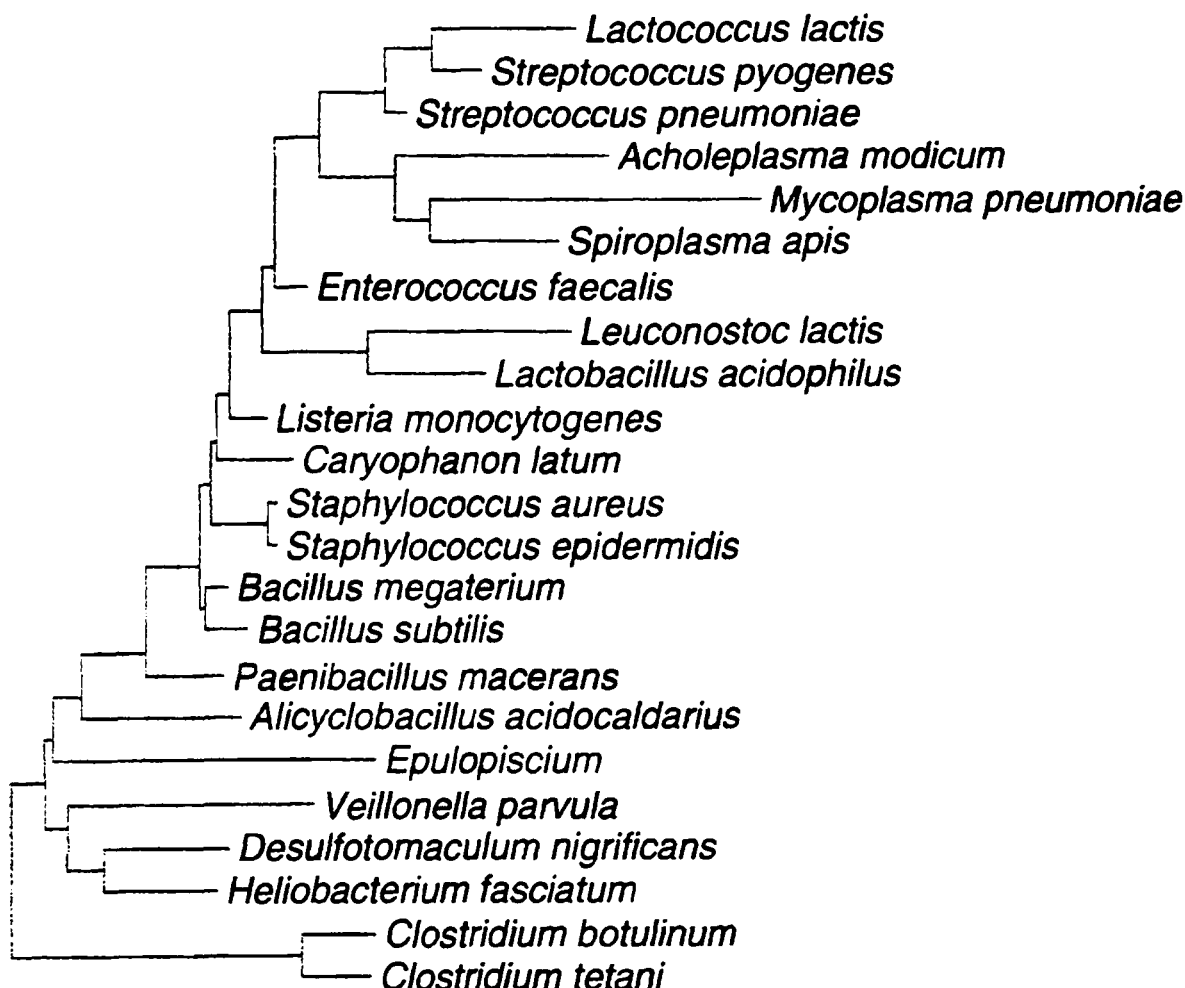
Σχήμα7: φυλογενετικό δένδρο των Eubacteria. Το φυλογενετικό δένδρο στηρίζεται σε συγκρίσεις του 16SrRNA



Στην ομάδα των βακτηρίων με μικρό περιεχόμενο mol % G + C περιλαμβάνεται το γένος των κλωστηριδίων (η διαχωριστική γραμμή μεταξύ μεγάλου και μικρού περιεχομένου G + C mol % είναι το 50%). Η καινούργια έκδοση του «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» είναι βασισμένη σε φυλογενετικά και οικολογικά χαρακτηριστικά. Ο τρίτος τόμος περιέχει τα Gram-θετικά βακτήρια με μικρό περιεχόμενο mol % G + C. Τα βακτήρια αυτά χωρίζονται σε τρεις κλάσεις : α) τα κλωστηρίδια (Clostridia), β) τα Μυκοπλάσματα (Mycoplasma) και γ) τους Βάκιλλους (Bacilli). Το γένος με τα περισσότερα είδη είναι το γένος *Clostridium*. Το γένος των κλωστηριδίων περιλαμβάνει πάνω από 100 είδη βακτηρίων (Allen, Barton, 1991).



Σχήμα 8: φυλογενετικό δένδρο με βάση το 16SrRNA μεταξύ των Gram θετικών βακτηρίων με χαμηλό G+C

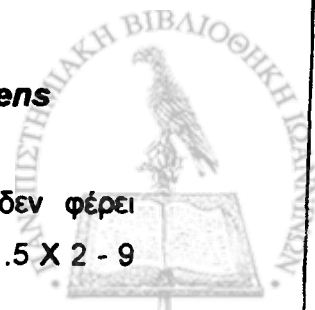


Τα κύρια χαρακτηριστικά του γένους είναι ότι περιέχει βακτήρια τα οποία είναι υποχρεωτικά αναερόβια, Gram-θετικά, σχηματίζουν ενδοσπόρια και δεν ανάγουν τα θειικά. Τα ενδοσπόρια είναι ανθεκτικά στη θέρμανση και εξαιτίας αυτού του λόγου είναι υπεύθυνα για την καταστροφή της τροφής, ακόμη και σε κονσέρβες.

Τα κλωστηρίδια πολύ συχνά ζυμώνουν αμινοξέα και παράγουν ATP, οξειδώνοντας ένα αμινοξύ και χρησιμοποιώντας ένα άλλο ως δέκτη ηλεκτρονίων, σε μία διαδικασία που ονομάζεται «αντίδραση Stickland». Πολλά κλωστηρίδια παράγουν τοξίνες που προκαλούν ασθένειες.

Μορφολογία και γενικά χαρακτηριστικά του *C. perfringens*

Το *C. perfringens* είναι ένα Gram-θετικό, ακίνητο βακτήριο, δεν φέρει βλεφαρίδες όπως τα άλλα παθογόνα κλωστηρίδια, διαστάσεων 0.8 - 1.5 X 2 - 9



μπι, με στρογγυλεμένα άκρα. Οι σπόροι είναι ωοειδείς, συνήθως παραπολλικοί, μη παραμορφωτικοί. Συναντώνται τα κύτταρα του *C. perfringens* ως μεμονωμένα ή σε μακριές αλυσίδες (Bergey's Manual, 1974, Duncan, 1976). Οι διαστάσεις των κυττάρων σχετίζονται με το στέλεχος, τη φύση του θρεπτικού υλικού και την ηλικία της καλλιέργειας. Σε μία ηλικιωμένη καλλιέργεια παρατηρούνται ποικίλες κυτταρικές μορφές.

Στο κυτταρικό τοίχωμα του *C. perfringens* ο τύπος κατασκευής της πεπτιδογλυκάνης είναι παρόμοιος με συγκεκριμένων Gram-θετικών βακτηρίων που έχουν μικρό περιεχόμενο G + C mol %, παρατήρηση που δείχνει την κοινή φυλογενετική προέλευση των Gram-θετικών βακτηρίων με μικρό περιεχόμενο G + C mol %. Η κατασκευή είναι του τύπου A3 γάμμα με L,L διαπτενλικό οξύ στη θέση 3, D Αλανίνη στη θέση 4 και εσωτερική γέφυρα πεπτιδίου γλυκίνης (Pickett MW. et al., 1994). Από τον κάθε τύπο *C. perfringens*, από το κυτταρικό του τοίχωμα απομονώθηκαν ειδικά αντιγόνα. Πρόκειται για πολυσακχαρίτη ή μουκοπεπτιδίο, όπου επιβεβαιώθηκε η παρουσία εξοζαμίνης, υδατάνθρακα, ακετυλ-ομάδας (τείχοϊκά οξέα) και πρωτεΐνης (M πρωτεΐνη) (Johnson et al., 1969).

Το ποσοστιαίο περιεχόμενο των αζωτούχων βάσεων σε G + C mol % στο DNA των στελεχών του *C. perfringens* είναι 25 - 28 mol %.

Σε παρασκευάσματα από ιστούς μπορεί να παρατηρηθεί έλυτρο, αλλά σπάνια σε *in vitro* καλλιέργειες. Η ύπαρξή του διαπιστώνεται με την αρνητική χρώση ινδικής μελάνης (Lee & Cherniak, 1974). Κάποια στελέχη σχηματίζουν βλενώδεις αποικίες σε θρεπτικό άγαρ που περιέχει γλυκόζη, σε ποσοστό 5% και εμφανίζουν έλυτρο (Meisel-Mikolajczyk, 1963).

Το *C. perfringens* είναι αναερόβιο βακτήριο, αλλά μπορεί να αναπτυχθεί σε ατμόσφαιρα με μικρή περιεκτικότητα οξυγόνου (2 - 8%). Από τα σπορογόνα είναι το λιγότερο ευαίσθητο στην παρουσία οξυγόνου (Duncan, 1976).

Συνθήκες ανάπτυξης και επίδραση θερμοκρασίας και pH

Το *C. perfringens* αναπτύσσεται σε αναερόβιες συνθήκες. Βέβαια, δεν ανήκει στην ομάδα των αναερόβιων βακτηρίων που έχουν μεγάλη ευαισθησία στο οξυγόνο. Στην ομάδα αυτή συναντώνται ορισμένα βακτήρια της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του εντέρου, όπως μερικά είδη του *Peptostreptococcus*, το *Eubacterium aerofaciens*, το *Bifidobacterium adolescentis* και άλλα. Τα βακτήρια αυτά δεν επιβιώνουν πάνω από 10 λεπτά, εάν εκτεθούν στον ατμοσφαιρικό αέρα, για το λόγο αυτό είναι δύσκολη η απομόνωσή τους, ενώ το *C. perfringens* μπορεί



να επιβιώσει εκτιθέμενο στον ατμοσφαιρικό αέρα, από 90 λεπτά μέχρι μερικές ημέρες.

Εκτός των αναεροβίων συνθηκών, για την ανάπτυξη του *C. perfringens* σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα, όπως και όλων των αναεροβίων βακτηρίων, θεωρείται απαραίτητη η ύπαρξη ενός ελάχιστου δυναμικού οξειδοαναγωγής (Eh). Το επίπεδο του οξειδοαναγωγικού δυναμικού εξαρτάται από το pH του θρεπτικού υλικού, το στέλεχος του βακτηρίου, την μεταβολική του κατάσταση. Το ανώτερο Eh ανάπτυξης του *C. perfringens* κυμαίνεται από +31 mV μέχρι +230 mV, σε pH από 7.74 έως 6.0, ενώ το άριστο Eh είναι γύρω στα -200 mV (Barnes, 1956, Duncan, 1975, Labbe, 2000). Το *C. perfringens*, όπως και όλα τα βακτήρια, λόγω της άμεσης επαφής με το περιβάλλον τους, είναι ικανό να ελέγχει το Eh του μικροπεριβάλλοντός τους και να αναπτύσσεται σε τρόφιμα με όχι αρνητικό Eh (Genigeorgis & Riemon, 1979). Στους περισσότερους ιστούς του ανθρωπίνου σώματος το Eh είναι μεταξύ +126 mV έως +246 mV. Το πλείστον των αναεροβίων βακτηρίων απαιτεί για την ανάπτυξή τους *in vitro*, Eh να κυμαίνεται από -100 mV έως -250 mV. Οι συνθήκες αυτές σε μία περιοχή του ανθρωπίνου σώματος επιτυγχάνονται όταν δεν γίνεται σωστή αιμάτωση (κακοήθης όγκος, τραυματισμός, αρτηριοσκλήρυνση).

Η ελάχιστη τιμή του συντελεστή ενεργότητας του νερού (a_w) ενός υποστρώματος στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί το *C. perfringens* είναι 0.93 (Strong et al., 1970, Bartsch & Wolker, 1982). Πολλά από τα στελέχη του *C. perfringens* αναπτύσσονται καλύτερα σε τιμές a_w μικρότερες του 0.995, σε θερμοκρασία 37⁰ C, ανεξαρτήτως της τιμής του pH (Strong et al., 1970).

Το *C. perfringens* αναπτύσσεται καλύτερα σε τιμές pH από 6.0 έως 7.5, με άριστο σημείο ανάπτυξης το pH 7.0 (Duncan, 1975). Ανάπτυξη σε pH κάτω από 5.0 και πάνω από 9.0 έχει ανασταλτικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη του *C. perfringens*. Ανάπτυξή του παρατηρείται σε pH μικρότερο του 5.0, μόνον όταν η θερμοκρασία καλλιέργειας είναι κάτω από 45⁰ C (Mc Clane, 1997). Στους 37⁰ C, ο χρόνος διπλασιασμού του σε pH 5.0 είναι 100 λεπτά, σε pH 6.0 22 λεπτά και σε pH 8.0, 48 λεπτά (Smith, 1971).

Οι θερμοκρασίες ανάπτυξης του *C. perfringens* κυμαίνονται από 6.5⁰ C μέχρι 50⁰ C (Hobbs, 1967). Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι μεταξύ 43⁰ C και 47⁰ C, με χρόνο διπλασιασμού 10 λεπτά στους 45⁰ C (Smith, 1971). Σε θερμοκρασία 25⁰ C και pH 7.0, ο χρόνος διπλασιασμού είναι 100 λεπτά, σε θερμοκρασία 35⁰ C και pH 7.0 είναι 34 λεπτά και στους 50⁰ C και pH 7.0, είναι 15 λεπτά (Smith, 1971). Σε θερμοκρασίες πάνω από 55⁰ C, οι βλαστικές μορφές του βακτηρίου θανατώνονται έντονα (Willardsen et al., 1978). Μεταξύ των θερμοκρασιών 5 - 15⁰ C παρατηρούμε στασιμότητα στην ανάπτυξη και θάνατο

μερικών βακτηρίων (Duncan, 1976). Πολύ καλή ανάπτυξη του *C. perfringens* παρατηρούμε σε θερμοκρασία 37° C, προηγηθείσας όμως μιας λανθάνουσας φάσης 2 - 4 ωρών (Duncan, 1976). Ο χρόνος διπλασιασμού του *C. perfringens* είναι ίσως πιθανότατα ο μικρότερος συναντώμενος μεταξύ των μικροοργανισμών.

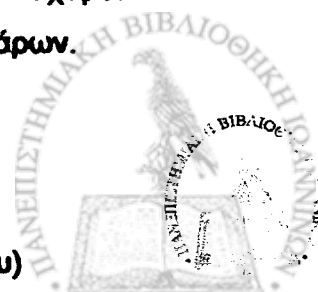
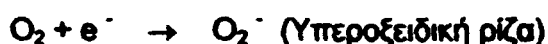
Το *C. perfringens* αναπτύσσεται στα κοινά θρεπτικά υλικά και η ανάπτυξη ευκολύνεται όταν γίνει προσθήκη 1% γλυκόζης. Καλλιεργείται σε αιματούχο άγαρ και σχηματίζει αποικίες που περιβάλλονται από διπλή ζώνη αιμόλυσης, μία εσωτερική πλήρους αιμόλυσης (α-τοξίνη) και μία εξωτερική ατελούς αιμόλυσης (β-τοξίνη).

Η καλλιέργεια του *C. perfringens* επηρεάζεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 3% NaCl (Smith, 1970). Τα στελέχη του *C. perfringens* αναπτύσσονται σε συγκεντρώσεις NaCl μέχρι 8%. Δεν παρατηρείται ανάπτυξη σε συγκεντρώσεις 10% (Gough & Alford, 1965).

Μεταβολική δραστηριότητα και βιοχημικές ιδιότητες του *C. perfringens*

Το *C. perfringens* ανήκει στους αναερόβιους βάκκλους. Για το λόγο αυτό, όπως και όλα τα αναερόβια βακτήρια, στερείται των ενζύμων καταλάσης, υπεροξειδάσης και δισμουτάσης. Μερικά αναερόβια φέρουν αυτά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και κατά συνέπεια δεν μπορούν να αντέξουν στην παρουσία οξυγόνου.

Η διαφορετική σχέση που αναπτύσσουν οι διαφορετικές ομάδες βακτηρίων με το οξυγόνο οφείλεται σε ορισμένους συγκεκριμένους παράγοντες, μεταξύ των οποίων οι κυριότεροι είναι η αδρανοποίηση μερικών πρωτεϊνών και η επίδραση των τοξικών παραγώγων του οξυγόνου. Οι πρωτείνες αδρανοποιούνται όταν έχουν ευαίσθητες ομάδες που οξειδώνονται, όπως είναι τα σουλφιδρίλια. Τέτοιο παράδειγμα αδρανοποίησης ενζύμου από την παρουσία οξυγόνου είναι η νιτρογενάση. Το οξυγόνο μπορεί να δεχθεί εύκολα ηλεκτρόνια και να αναχθεί γιατί τα δύο ηλεκτρόνια του εξωτερικού του τροχιακού είναι αζευγάρωτα. Πολλά ένζυμα και συστατικά των κυττάρων, μεταξύ των οποίων και οι φλαβοπρωτείνες, προκαλούν την αναγωγή του οξυγόνου. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός συνδυασμού τοξικών προϊόντων λόγω της δυνατότητάς τους να είναι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες και να καταστρέφουν πολλά συστατικά των κυττάρων.





Ένας μικροοργανισμός πρέπει να μπορεί να προστατεύει τον εαυτό του απέναντι αυτών των ριζών. Για το λόγο αυτό πρέπει να διαθέτει τα κατάλληλα ένζυμα.

(υπεροξειδάση δισμουτάσης)



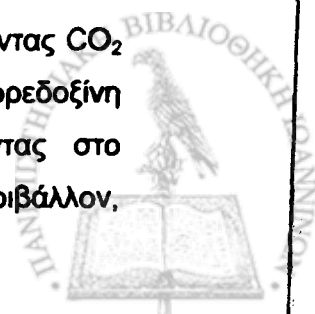
(καταλάση)



Τα ουδετερόφιλα και μακροφάγα χρησιμοποιούν αυτές τις ρίζες για να καταστρέφουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Το *C. perfringens* ως τελικός αποδέκτης e^- / H^+ , κατά την οξειδωση της οργανικής ύλης προς παραγωγή ενέργειας, δεν χρησιμοποιεί το οξυγόνο (αερόβια αναπνοή), αλλά χρησιμοποιεί είτε οργανικές ουσίες (ζύμωση) είτε ανόργανες ρίζες (αναερόβια αναπνοή : τελικός αποδέκτης e^- / H^+ είναι : NO_3^- , SO_4^{2-} , διάφορα μεταλλικά ιόντα). Η αναγωγή των νιτρικών έχει παρατηρηθεί σε ορισμένα στελέχη του *C. perfringens* (Duncan, 1976, Hobbs, 1979). Επίσης, ανάγει τα SO_3^{2-} προς H_2S .

Η μεταβολική οδός διάσπασης των σακχάρων γίνεται μέσω του βιοχημικού μονοπατιού των Embden-Meyerhof (γλυκολυτική οδός). Το κύριο προϊόν της μεταβολικής αυτής οδού είναι το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο ανάγεται περαιτέρω από τις διάφορες ομάδες ή συγκεκριμένα βακτήρια με διαφορετικό τρόπο. Λαμβάνονται δηλαδή διαφορετικά τελικά προϊόντα. Αυτά τα διαφορετικά τελικά προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κριτήριο ταυτοποίησης και ταξινόμησης των βακτηρίων. Τα Κλωστηρίδια όταν ζυμώνουν σάκχαρα παράγουν ως τελικά προϊόντα τα : βουτυρικό, γαλακτικό, οξικό οξύ, αιθανόλη, CO_2 , H_2 (Sneath, P.H.A., Sneath et al., 1986). Στο βιοχημικό μονοπάτι της ζύμωσης, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε ακετυλο-συνένζυμο Α, από το ένζυμο πυροσταφυλική οξειδουρεντουκτάση της φερρεδοξίνης, παράγοντας CO_2 και ανάγοντας την φερρεδοξίνη. Τα ηλεκτρόνια από την αναγόμενη φερρεδοξίνη μεταφέρονται σε πρωτόνια (H^+) με την υδρογένωση, καταλήγοντας στο σχηματισμό H_2 . Τα δύο αέρια CO_2 και H_2 , απελευθερώνονται στο περιβάλλον,



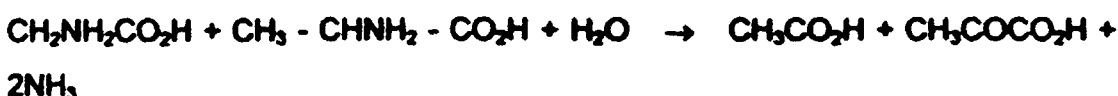
δίνοντας πλεονέκτημα στην ανάπτυξη του *C. perfringens*, όταν αυτή συμβαίνει σε κάποιον ιστό, γιατί δημιουργούν αναερόβιο περιβάλλον.

Το *C. perfringens* μπορεί να ζυμώσει μία μεγάλη ποικιλία σακχάρων, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, γλυκογόνο, ξυλόζη, μαννόζη, μαλτόζη, ραφινόζη, άμυλο, σουκρόζη (Sneath P. et al., 1986). Δεν ζυμώνει την μανιτόλη. Η ζύμωση της γλυκερόλης δεν είναι σταθερή.

Η ανάπτυξη του *C. perfringens* είναι γρήγορη όταν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η γλυκόζη, η μαννόζη ή η ριβόζη (Duncan, 1976). Από την ζύμωση δεν παράγεται ινδόλη.

Το *C. perfringens*, μαζί με άλλα σπηπτικά κλωστηρίδια, είναι υπεύθυνα για την αναερόβια αποσύνθεση πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Από αυτή τη διάσπαση παράγονται NH_3 , CO_2 , H_2O , λιπαρά οξέα και αμίνες. Τα προϊόντα αυτά είναι υπεύθυνα για τις δυσάρεστες μυρωδιές κατά τη διάρκεια της σήψης. Η ζύμωση των αμινοξέων και η παραγωγή ενέργειας γίνεται με τη βοήθεια αντιδράσεων οξειδοαναγωγής, στις οποίες συμμετέχουν αμινοξέα που λειτουργούν ως δότες και δέκτες ηλεκτρονίων. Η ζύμωση αυτή των αμινοξέων ονομάζεται «αντίδραση Stickland». Ο μηχανισμός της δεν είναι πλήρως κατανοητός. Ο ρυθμός της αντίδρασης είναι πολύ γρήγορος και η παραγωγή ενέργειας γίνεται μέσω φωσφορυλίωσης υποστρώματος.

Παράδειγμα αντίδρασης Stickland στην οποία συμμετέχουν τα αμινοξέα γλυκίνη, αλανίνη :



Το *C. perfringens* μπορεί να ζυμώσει τα αμινοξέα χωρίς ο δέκτης των ηλεκτρονίων να είναι υποχρεωτικά αμινοξύ. Τα στελέχη του *C. perfringens* με το ανωτέρω χαρακτηριστικό περιέχουν μεγάλη ποσότητα του ενζύμου αφυδρογονάση του L - γλουταμινικού οξέος. Έχει ακόμη βρεθεί βιοσυνθετικό μονοπάτι μετατροπής της σερίνης και θρεονίνης σε προπιονικό οξύ διαμέσου προπιονυλ-CoA, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενέργειας (Tohghishimizu et al., 2002).

Το *C. perfringens* ρευστοποιεί την ζελατίνη και προκαλεί πήξη του γάλακτος, με σύγχρονη παραγωγή αερίου (Stormy fermentation). Όταν το *C. perfringens* καλλιεργείται σε θρεπτικό υλικό egg-yolk agar, παράγει λεκιθινάση (ποτέ λπάση). Η λεκιθινάση υδρολύει τη λεκιθίνη σε φωσφορολοχολίνη και ένα διγλυκερίδιο, με αποτέλεσμα γύρω από τις αποικίες του βακτηρίου να σχηματίζεται μια ιριδίζουσα ζώνη (θετική αντίδραση Nagler για ανίχνευση

λεκιθινάσης). Από τους Β και Ε τύπους του *C. perfringens* έχει παρατηρηθεί παραγωγή ουρεάσης.

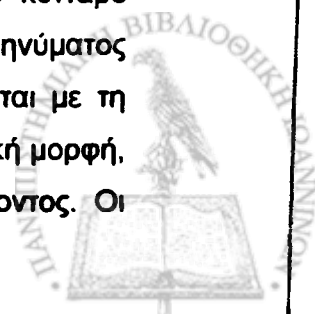
Τύποι *C. perfringens*

Συνήθως, τα διάφορα στελέχη ενός είδους βακτηρίου χωρίζονται σε διάφορους τύπους, βάσει των αντιγόνων τους (ελύτρου, σωματικών, μαστιγίων). Τα στελέχη του *C. perfringens* διαφοροποιούνται σε σχέση με τις τοξίνες που εκκρίνει ο κάθε τύπος. Ο συνολικός αριθμός των τοξινών είναι πάνω από 12 και συμβολίζονται με τα μικρά γράμματα της ελληνικής αλφαβήτου (α, β, γ, δ, ε, η, θ, ι, κ, λ, μ και ν).

Οι τοξίνες είναι πρωτεϊνικής φύσεως, με προσθήκη φορμόλης μετατρέπονται σε ανατοξίνες και χρησιμοποιούνται στα εμβόλια. Με βάση την παραγωγή των τοξινών α, β, ε και ι, διακρίνουμε πέντε (5) τύπους του *C. perfringens* (Sterne & Wagack, 1964). Ο τύπος Α παράγει την τοξίνη α, ο τύπος Β παράγει τις τοξίνες α, β και ε, ο τύπος C παράγει τις τοξίνες α και β, ο τύπος D παράγει τις τοξίνες α και ε και ο τύπος Ε παράγει τις τοξίνες α και ι.

Σπορογονία

Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του *C. perfringens* είναι ο σχηματισμός ενδοσπορίου μέσα στο βλαστικό κύτταρο. Το *C. perfringens* παράγει ενδοσπόρια κεντρικά ή υποτελικά, χωρίς να προκαλούν διόγκωση του βακτηριακού σώματος. Ο σχηματισμός του ενδοσπορίου χωρίζεται σε επτά διαφορετικά στάδια, βάσει της μελέτης του στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και της φυσιολογίας του (Johnstone et al., 1977, Long, 1983). Το έβδομο στάδιο περιγράφει την αυτόλυση του βακτηρίου και την απελευθέρωση του ώριμου σπόρου. Το σπόριο δεν έχει εμφανή μεταβολική δραστηριότητα και μπορεί να παραμείνει αδρανές για δεκαετίες. Η βλάστηση του έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία βλαστικού κυττάρου, το οποίο πολλαπλασιάζεται περαιτέρω με κυτταρική διαίρεση. Η δημιουργία σπόρων είναι αποτέλεσμα έλλειψης κάποιου θρεπτικού στοιχείου, συνήθως άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου. Το κύτταρο αντιλαμβάνεται την έλλειψη των θρεπτικών, με το σύστημα μεταγωγής μηνύματος και ρυθμίζει την έκκριση διαφορετικών σ παραγόντων, που σχετίζονται με τη σπορογονία (σ^E , σ^K , σ^F , σ^G). Ο σπόρος είναι μία τροποποιημένη βλαστική μορφή, έτσι ώστε να είναι ανθεκτικός στις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος. Οι



σπόροι είναι ανθεκτικότεροι έναντι των βλαστικών μορφών, στις εναλλαγές της θερμοκρασίας, ακτινοβολίες και χημικές ουσίες.

Το *C. perfringens* *in vitro* δεν σπορογονεί εύκολα. Η σπορογονία επιτυγχάνεται μετά την εκθετική φάση ανάπτυξης, όταν έχουμε έλλειψη θρεπτικών συστατικών και ιδιαίτερες συνθήκες στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης (Walker, 1976).

Σπόρους παράγει το *C. perfringens* στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων. Η παραγωγή σπόρων ευνοείται από διάφορα ιχνοστοιχεία (Vinter, 1969), αλκαλικό περιβάλλον και δεν παρατηρούμε σπορογονία σε pH μικρότερο από 6,6, όπως όταν το θρεπτικό υλικό περιέχει σάκχαρα που αποσυντίθενται από τον μικροοργανισμό (Granum & Magnusson, 1987).

Λόγω της δυσκολίας της σπορογονίας του *C. perfringens*, αναπτύχθηκαν διάφορα θρεπτικά μέσα, με στόχο το μεγαλύτερο ποσοστό σπορογονίας του. Ανάμεσα σε αυτά, ένα από τα καλύτερα θεωρείται το υπόστρωμα των Duncan και Strong (D.S.), το οποίο περιέχει άμυλο ως πηγή ενέργειας, ούτως ώστε να περιορίζεται ο μηχανισμός ανάπτυξης (Duncan & Strong, 1968). Το ποσοστό σπορογονίας στο D.S. είναι μεταξύ 1% έως 90% και εξαρτάται από το στέλεχος. Οι Labbe και Rufner, το 1999, υποστηρίζουν ότι αντικατάσταση του αμύλου με ραφινόζη αυξάνει το ποσοστό σπορογονίας. Σπόροι παράγονται εντός 10 περίπου ωρών, σε θερμοκρασία 37° C. Περαιτέρω επώαση μπορεί να προκαλέσει βλάστηση αυτών και ανακύκλωση της καλλιέργειας.

Οι σπόροι του *C. perfringens* A αντέχουν σε θερμοκρασία 80° C, αλλά καταστρέφονται αν θερμανθούν από 5 - 60 λεπτά, στους 100° C (θερμοευαίσθητοι) (Τζαννετής, 1987). Σπόροι άλλων στελεχών αντέχουν περισσότερο σε βρασμό, από 1 μέχρι 6 ώρες (θερμο-ανθεκτικοί) (Hauschild A.H.W., 1974). Σπόροι του *C. perfringens* που παράγονται σε υψηλές θερμοκρασίες, έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη θερμο-ανθεκτικότητα από σπόρους που έχουν παραχθεί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Gerhardt & Marquis, 1989).

Η μεταβολική δραστηριότητα των σπόρων είναι ελάχιστη, για να βλαστήσει ο σπόρος και να παράγει την βλαστική μορφή του βακτηρίου, θα πρέπει να ενεργοποιηθεί. Ενεργοποίηση δεν σημαίνει άμεση βλάστηση των σπόρων, αλλά μεγάλη πιθανότητα βλάστησης αυτών, καθώς επίσης και μεγάλου ποσοστού αυτών. Η ενεργοποίηση επιτυγχάνεται με θέρμανση και τοποθέτηση των σπόρων σε χαμηλό pH, επίδραση πολικών διαλυτών, διαφόρων συστατικών που ελαττώνουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, με μίγμα Ca και διπικολνικού οξέος. Ο πλέον συνηθισμένος τρόπος ενεργοποίησης είναι με θέρμανση. Σπόροι οι

οποίοι δεν ενεργοποιήθηκαν, βλαστάνουν σε ποσοστό 30 - 50% σε θερμοευαίσθητα στελέχη και 3.6 - 0.13% σε θερμοάντοχα, ενώ μετά από ενεργοποίηση με θέρμανση στους 75⁰ C για 20 λεπτά, οι σπόροι βλαστάνουν σε ποσοστό 99% (Smith, 1968).

Όταν η θερμική επεξεργασία γίνει σε υψηλές θερμοκρασίες και για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, μπορεί να έχουμε αδρανοποίηση του μηχανισμού βλάστησης, αλλά όχι θανάτωση των σπόρων (Duncan et al., 1972).

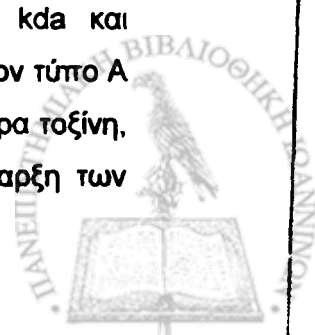
Οι σπόροι, μετά την ενεργοποίησή τους, μεταφέρονται σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό και ευνοϊκές συνθήκες, όπου ακολουθεί η βλάστησή τους και η δημιουργία των βλαστικών μορφών. Σπόροι οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε παρατεταμένη θερμική επεξεργασία ή έχουν υποστεί την επίδραση ισχυρών αλκαλικών ενώσεων, είναι ανίκανοι να βλαστήσουν. Προσθήκη λυσοζύμης ή πρωτεΐνης που έχει παραχθεί από καλλιέργεια βλαστικών μορφών, προκαλεί την ενεργοποίηση και βλάστηση των σπόρων (Duncan et al., 1972). Φαίνεται πως με κάποιο τρόπο, η παρατεταμένη υψηλή θερμοκρασία και η επίδραση του αλκαλικού περιβάλλοντος επηρεάζουν τις ενζυματικές λειτουργίες που είναι υπεύθυνες για το άνοιγμα και την ακεραιότητα του φλοιού (Tang & Labbe, 1987).

Η βλάστηση των σπόρων γίνεται γρηγορότερη σε pH 6.0 και θερμοκρασίες από 30⁰ έως 40⁰ C (Labbe & Norris, 1982). Επίσης, η βλάστηση ευνοείται από την προσθήκη NaCl και ο ρυθμός βλάστησης μειώνεται αν η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη από 4% (Ando, 1974b). Η παραγωγή της εντεροτοξίνης από τα στελέχη του *C. perfringens* έχει σχέση με την σπορογονία. Το 15-30% των πρωτεϊνών που συνθέτονται κατά τη διάρκεια της σπορογονίας είναι εντεροτοξίνη (cpe) (Mc Clane, 1997). Τα βλαστικά κύτταρα του *C. perfringens* συνθέτουν εντεροτοξίνη, ακόμη και αν εκτεθούν σε μεγάλη διάρκεια θερμικής επεξεργασίας (Granum, 1990).

Κύριες τοξίνες του *C. perfringens*

α - τοξίνη

Η α-τοξίνη είναι μία φωσφολιπάση, έχει μοριακό βάρος 43 kda και ισοηλεκτρικό σημείο 1 (Hatheway C.L., 1990). Παράγεται κυρίως από τον τύπο A και σε μικρότερες ποσότητες από τους άλλους τύπους. Είναι θανατηφόρα τοξίνη, θερμοάντοχη σχετικά και ευαίσθητη στη δράση της θρυψίνης. Η ύπαρξη των κατιόντων Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ μεγιστοποιεί τη δράση της (Isolatovkaya, 1972).



Η πρωτεΐνη αποτελείται από δύο δομικές περιοχές, με διαφορετική λειτουργικότητα :

α) την αμινοτελική περιοχή, με 3 ιόντα Zn^{++} στις θέσεις δράσης αυτής, που συνδέονται με μία σειρά από ιστιδίνες και ασπαργίνες. Πιστεύεται ότι η αμινοτελική περιοχή ελέγχει την φωσφολιπαστική δραστηριότητα της α-τοξίνης.
β) την καρβοξυτελική περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την κυτταρολυτική δράση της α-τοξίνης (Isrolatonskaya, 1972). Η α-τοξίνη καταστρέφει τα λευκά, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Καταστρέφει τις μεμβράνες των μυϊκών ινών (Titball, 1997). Η βιολογική δράση της α-τοξίνης οφείλεται στη δράση της εναντίον της λεκθίνης που αποτελεί συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς επίσης και των φωσφολιπιδίων (φωσφατιδυλο-σερίνη, αιθολαμίνη, σφιγγομυελίνη) που και αυτά είναι συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Ακόμη, επηρεάζει ενζυμικά συστήματα, όπως της ΑΤΡάσης της αδενοσίνης, στο σαρκεύλημα της μυϊκής ίνας. Σε πειραματική μόλυνση απεδείχθη ο σημαντικός ρόλος της στην αεριογόνο γάγγραινα (Awad M.M., 1985).

β - τοξίνη

Είναι μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 28 kda, παράγεται από τους τύπους Β και C. Έχει θανατηφόρες και νεκρωτικές ιδιότητες, αλλά όχι αιμολυτικές. Προκαλεί νεκρωτική εντερίτιδα στον άνθρωπο ή νόσο rig-bell, ενδημική ασθένεια της φυλής Parua στη Νέα Γουινέα και είναι ο κύριος λοιμογόνος παράγοντας σε περιπτώσεις εντεροτοξιναιμίας προβάτων. Είναι μία θερμοευαίσθητη τοξίνη, επώαση στους $50^{\circ}C$, για 5 ώρες, μειώνει αισθητά τη δράση της (Sakurai & Duncan, 1978). Είναι ευαίσθητη στη δράση πρωτεολυτικών ενζύμων, σε θερμοκρασία $37^{\circ}C$. Η δράση της αναστέλλεται μετά από 30 λεπτά στην θερμοκρασία αυτή. Η ευαισθησία της στα πρωτεολυτικά ένζυμα (θρυψίνη) εξηγεί γιατί η β-τοξίνη δεν βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου, εκτός περιπτώσεων ανθρώπων με ασυνήθιστες διαιτητικές απαιτήσεις.

Ο ακριβής μηχανισμός δράσης της τοξίνης δεν είναι γνωστός, πειράματα σε κόνικλους έδειξαν ότι επηρεάζεται η κινητικότητα των εντερικών λαχνών (Papas J., 1976). Ακόμη, ενδοφλέβια έγχυση β-τοξίνης προκαλεί συστολή αρτηριών και αύξηση της αρτηριακής πίεσης σε ποντίκια (Sakurai J. et al., 1981).

ε - τοξίνη



Η τοξίνη αυτή παράγεται από τον τύπο D και σε μικρές ποσότητες από τον τύπο B. Είναι μία από τις ισχυρότερες κλωστηριδιακές τοξίνες, έχει νεκρωτικές και θανατηφόρες ιδιότητες, όχι όμως αιμολυτικές (Buxton D., 1978) και προσβάλλει άμεσα το κεντρικό νευρικό σύστημα. Στον οργανισμό παρατηρείται αύξηση στη διαπερατότητα των αγγείων του εγκεφάλου και ακολουθεί νέκρωση (Nayahama M. et al., 1992). Σε λοιμώξεις από τον τύπο D του *C. perfringens* έχει παρατηρηθεί η ικανότητά της να αυξάνει τη διαπερατότητα του βλεννογόνου του εντέρου (Buxton D., 1978).

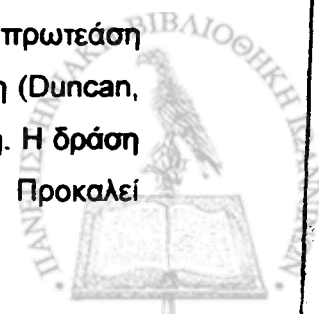
Η ε-τοξίνη είναι μία πρωτεάση, φέρει ιόντα Zn^{++} και παράγεται υπό τη μορφή προ-τοξίνης (ανενεργή μορφή), που αποτελείται από 911 αμινοξέα. Με τη δράση της θρυψίνης και χυμοθρυψίνης, από το αμινοτελικό άκρο της προ-τοξίνης αποσπάται ένα πολυπεπτίδιο 14 αμινοξέων, με αποτέλεσμα την παραγωγή της ενεργής μορφής της τοξίνης (Hathaway C.L., 1990).

Ι - τοξίνη

Η Ι-τοξίνη συνθέτεται από στελέχη του *C. perfringens* που ανήκουν στον τύπο E. Εκκρίνεται με τη μορφή προ-τοξίνης, με τη συνεργεία πρωτεολυτικών ενζύμων (θρυψίνη) λαμβάνει την τοξική της μορφή (Cole S.T. et al., 1997). Έχει νεκρωτικές, θανατηφόρες, αλλά όχι αιμολυτικές ικανότητες (Sakurai J., 1995). Παράγοντες οι οποίοι ενισχύουν την δράση της Ι-τοξίνης, ενεργοποιώντας την προ-τοξίνη, θεωρούνται τα αντιβιοτικά και η γαλουχία.

Εντεροτοξίνη του *Clostridium perfringens*

Η εντεροτοξίνη είναι εκείνη η τοξίνη που παράγεται από το *C. perfringens* και θεωρείται υπεύθυνη για την πρόκληση τροφικών δηλητηριάσεων. Εκκρίνεται κυρίως από στελέχη του τύπου A, αλλά και του C. Η έκκριση της εντεροτοξίνης σχετίζεται άμεσα με τη φάση της σπορογονίας της βλαστικής μορφής του βακτηρίου (Duncan, 1976). Το μοριακό της βάρος είναι 34 kDa και το ισοηλεκτρικό της σημείο σε pH 4.3. Έχει αντιγονικές ιδιότητες και προκαλεί την έκκριση αντισωμάτων από κουνέλια. Ορός από τα αντισώματα αυτά αντιδρά μόνο με την εντεροτοξίνη και όχι με τις άλλες τοξίνες του *C. perfringens* (Genigeorgis et al., 1973). Είναι ευαίσθητη στα ένζυμα προγαστή και πρωτεάση του *Bacillus subtilis*, αλλά όχι στην θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και παπαΐνη (Duncan, 1972), ακόμη χαρακτηριστικό της είναι η ευαισθησία της στη θέρμανση. Η δράση της υποδεκαπλασιάζεται όταν θερμανθεί στους 60° C, για 10 λεπτά. Προκαλεί



διάρροια και έμετο ή χορήγηση εντεροτοξίνης από το στόμα, σε ανθρώπους και πθήκους (Hauschild, 1973).

Χαρακτηριστικό της βιολογικής δράσης της εντεροτοξίνης είναι η συσώρευση υγρού στο έντερο του πειραματόζωου, το οποίο ελαττώνεται σε pH μικρότερο από 5.0 και μεγαλύτερο από 9.0 και παύει όταν η τιμή του pH είναι 1.0 και 12.0 (Duncan & Strong, 1969). Μέσα στο υγρό αυτό που εκκρίνεται από το έντερο του πειραματόζωου, υπάρχει μεγάλη ποσότητα ύδατος, ιόντων νατρίου και χλωρίου, ακόμη παρατηρείται αναστολή της απορρόφησης της γλυκόζης από το έντερο (Mc Donel, 1974).

Η ποσότητα έκκρισης της εντεροτοξίνης αυξάνεται κατά πολύ όταν το βακτήριο σπορογονεί (Labbe, 1989). Επίσης, η κατεργασία τροφίμων πάνω στα οποία βρίσκονται στελέχη του *C. perfringens*, σε θερμοκρασίες από 65° - 100° C και κατόπιν διατήρηση στους 4° - 20° C, ευνοεί την σπορογονία τους και επομένως και τα ποσοστά της εντεροτοξίνης (Venura et al., 1974).

Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της εντεροτοξίνης είναι το *cpe*. Ο γονιδιακός αυτός τύπος, σε ορισμένα στελέχη εντοπίζεται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου, ενώ σε άλλα, σε πλασμίδιο. Τα στελέχη του *C. perfringens* με χρωμοσωμική εντόπιση του γονιδίου *cpe* είναι αυτά που συμμετέχουν στις περισσότερες περιπτώσεις τροφικών δηλητηριάσεων (Sarker, 2000, Miyamoto K. et al., 2002).

Δευτερεύουσες τοξίνες

Η γ-τοξίνη παράγεται από στελέχη τύπου Β και C, είναι θανατηφόρα και νεκρωτική, χωρίς αιμολυτική ικανότητα.

Η δ-τοξίνη είναι αιμολυτική και θανατηφόρα για τα μηρυκαστικά, παράγεται από στελέχη του C τύπου και μερικά του τύπου Β (Yamagishi et al., 1971).

Η θ-τοξίνη παράγεται κυρίως από στελέχη του τύπου C. Είναι μία αιμολυσίνη με νεκρωτικές ιδιότητες, θερμοευαίσθητη και οξυγονοευαίσθητη.

Η κ-τοξίνη παράγεται από τους τύπους Α, C και Ε, είναι μία κολλαγενάση (υδρολύει κολλαγόνο και διευκολύνει την αποίκιση του βακτηρίου στους ιστούς).

Η λ-τοξίνη παράγεται από στελέχη των τύπων Β και Ε, υδρολύει την ζελατίνη, καζεΐνη, αιμοσφαιρίνη.

Η μ-τοξίνη είναι μία υαλουρονιδάση (προκαλεί υδρόλυση υαλουρονικού οξέος που βρίσκεται μεταξύ των κυττάρων και δεν επιτρέπει την προσπέλαση των μικροοργανισμών).



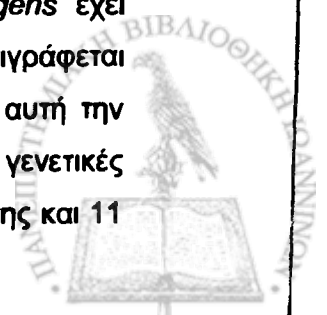
Η ν-τοξίνη παράγεται από όλους τους τύπους και είναι μία δεσοξυριβοζονουκλεάση (προκαλεί ελάττωση του ιξώδους των εκκριμάτων, δίνοντας στο βακτήριο μεγαλύτερη κινητικότητα).

Χαρτογράφηση γονιδιώματος *C. perfringens*

Πολλές προσεγγίσεις έχουν γίνει μέχρι σήμερα για την κατανόηση και διασαφήνιση της δομής του γενετικού υλικού πολλών στελεχών του *C. perfringens*. Έχουν κατασκευασθεί φυσικοί και γενετικοί χάρτες του γονιδιώματος διαφόρων στελεχών (Canard & Cole, 1992, Karayama et al., 1995). Η ανάλυση του γενετικού υλικού που θα παραθέσω κατωτέρω προέρχεται από την εύρεση της αλληλουχίας βάσεων και των χαρακτηριστικών του γονιδιώματος του στελέχους 13 του *C. perfringens*. Ανήκει στον τύπο A και απομονώνεται από το έδαφος. Χρησιμοποιείται σε πολλά πειράματα, γιατί έχει μεγάλη δυνατότητα μετασχηματισμού (πρόσληψη πλασμιδίων) (Mahony D.E. et al., 1989). Ο τύπος A είναι υπεύθυνος για την αεριογόνο γάγγραινα (μυονέκρωση) στους ανθρώπους.

Η πληρέστερη ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους 13 τύπου A, μέχρι τώρα έγινε από τον Tohtu Shimizu et al., 2002. Πολλές από τις πληροφορίες αντλούνται από την ανάλυση του γονιδιώματος του *C. perfringens* που πραγματοποίησε η ερευνητική του ομάδα.

Το κυκλικό χρωμόσωμα του *C. perfringens* περιέχει 3.031.430 ζεύγη βάσεων και το περιεχόμενό του σε G + C είναι 28.6%. Στο χρωμόσωμα υπάρχουν 10 γονίδια που κωδικοποιούν rRNAs και 96 γονίδια που κωδικοποιούν tRNAs. Στο συγκεκριμένο στέλεχος υπάρχει το πλασμίδιο rCP13, το οποίο έχει 54.310 ζεύγη βάσεων και το περιεχόμενο σε G + C είναι 25.5%. Το χρωμόσωμα περιέχει 2.660 προβλεπόμενα πλαίσια ανάγνωσης και το πλασμίδιο 63. Όπως η πλειονότητα των Gram θετικών βακτηρίων, έτσι και το *C. perfringens* έχει τακτοποιημένα τα περισσότερα γονίδια στην αλυσίδα του DNA που αντιγράφεται συνεχώς, όπως επίσης και το μεγαλύτερο ποσοστό G + C πάνω σε αυτή την αλυσίδα. Στο χρωμόσωμα του *C. perfringens* βρέθηκαν κινούμενες γενετικές αλληλουχίες, ένα υπόλειμμα ιού με 27.000 βάσεις, 37 πλαίσια ανάγνωσης και 11 γονίδια που κωδικοποιούν τρανσποζόνια (μεταθετά στοιχεία).



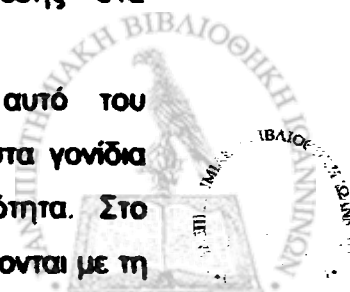
Πάνω στο χρωμόσωμα του *C. perfringens* υπάρχουν όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα της γλυκόλυσης και του μεταβολισμού του γλυκογόνου. Δεν υπάρχουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος (TCA) και της αναπνευστικής αλυσίδας. Επίσης, βρέθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα που δίνουν τη δυνατότητα στο *C. perfringens* να ζυμώσει μία πλειονότητα σακχάρων (α-γαλακτοσιδάση, β-γαλακτοσιδάση, α-γλυκοσιδάση, β-γλυκοσιδάση, β-γλυκοροσιδάση, α-αμυλάση, β-σακχαράση και άλλα).

Εν αντιθέσει με την ευρεθείσα ποικιλία γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα σε σχέση με τη χρησιμοποίηση των σακχάρων, τα περισσότερα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα για την βιοσύνθεση των αμινοξέων, λείπουν. Γύρω στα 45 γονίδια μόνο ταυτοποιήθηκαν σχετιζόμενα με την σύνθεση αμινοξέων. Τα περισσότερα γονίδια που απαιτούνται για τη βιοσύνθεση αμινοξέων όπως η αργινίνη, το γλουταμινικό, η ιστιδίνη, η λυσίνη, η μεθειονίνη, η σερίνη, η θρεονίνη, τα αρωματικά κυκλικά και τα αμινοξέα με διακλαδισμένη αλυσίδα, είναι απόντα. Άρα, το *C. perfringens* δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα περιβάλλον που η προμήθεια αμινοξέων είναι περιορισμένη.

Το *C. perfringens* έχει 211 γονίδια που σχετίζονται με την έκφραση πρωτεϊνών, που η λειτουργία τους είναι να μεταφέρουν μέσα στο κύτταρο αμινοξέα, κατόντα / ανιόντα, υδατάνθρακες, νουκλεοτίδια. Υπάρχουν εξειδικευμένες κλάσεις από πρωτεΐνες που μεταφέρουν σάκχαρα, αμινοξέα, όπως επίσης ομάδες πρωτεϊνών που μπορούν μόνο να εισάγουν ουσίες μέσα στο κύτταρο ή μόνο να εξάγουν.

Ταυτοποιήθηκαν 61 γονίδια που συμμετέχουν στη σπορογένεση και τη βλάστηση των σπόρων. Η πλειονότητα των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες κλειδιά για την σπορογένεση είναι παρόντα στο γονιδίωμα του *C. perfringens*. Γονίδια όπως αυτά που κωδικοποιούν τους σίγμα παράγοντες, τις καθοριστικές πρωτεΐνες για κάθε στάδιο της σπορογένεσης. Ως προς την σπορογένεση, τα γονίδια του *C. perfringens* είναι παρόμοια με αυτά του *C. acetobutylicum* (Nolling J. et al., 2001), αλλά διαφέρουν από αυτά του *Bacillus subtilis*, όπου συναντούμε πάνω από 80 γονίδια να έχουν σχέση με τη σπορογένεση (Kunst et al., 2000). Βέβαια, τα γονίδια κλειδιά για την σπορογένεση είναι παρόντα και στα τρία είδη. Αυτή η διαφορά γονιδίων στον αριθμό, προτείνει πιθανώς έναν διαφορετικό τρόπο σπορογένεσης στα κλωστηρίδια, σε σχέση με τον *Bacillus subtilis*.

Εάν συγκρίνουμε το γονιδίωμα του *C. perfringens* με αυτό του *C. acetobutylicum*, θα παρατηρήσουμε ότι η διαφορά τους έγκειται στα γονίδια που έχουν σχέση με τον παράγοντα που εκφράζεται ως τοξικότητα. Στο γονιδίωμα του *C. acetobutylicum* θα συναντήσουμε γονίδια που σχετίζονται με τη



χημειότητα, τα μαστίγια, με την καθήλωση του ατμοσφαιρικού αζώτου, με την βιοσύνθεση των αμινοξέων, με β-μαννοζάσες (Nolling J. et al., 2001). Στο γονιδίωμα του *C. perfringens* δεν υπάρχουν αυτά τα γονίδια, αντί αυτών υπάρχουν γονίδια που εκφράζουν τοξικούς παράγοντες. Η διαφορά αυτή του γονιδιώματος, εκφράζει και τη χρησιμοποίηση διαφορετικών οικοτόπων από τα δύο είδη.

Πάνω στο χρωμόσωμα του *C. perfringens* βρέθηκαν όλα τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των γνωστών τοξινών του *C. perfringens*. Αλλά επίσης έχουν βρεθεί πολλά άλλα γονίδια που η έκφρασή τους κωδικοποιεί πρωτεΐνες που είναι τοξικές. Αυτό συμπεραίνεται από άλλα είδη μικροοργανισμών, όπου τα γονίδια αυτά είναι παρόντα. Έχουν βρεθεί 5 γονίδια αιμολυσινών, πλην αυτών των α-τοξίνης και θ-τοξίνης. Τέσσερα (4) γονίδια παρόμοια με αυτό της εντεροτοξίνης που βρίσκεται στο είδος *Bacillus cereus*. Πέντε (5) γονίδια υαλουροδυνασών που εκκρίνονται από το κύτταρο. Ακόμη, 2 γονίδια που εκφράζουν πρωτεΐνες που δεσμεύουν την φιμπρονεκτίνη και είναι παρόμοιες με αυτές της *Listeria monocytogenes* (Gilot P. et al., 2000). Αυτό υποδεικνύει την δυνατότητα αποικισμού του *C. perfringens* μέσα στον οργανισμό.

Στο πλασμίδιο υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν την β-τοξίνη (νεκρωτική εντερίτιδα) και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που επιτρέπουν στο βακτήριο να προσκολληθεί στο κολλαγόνο. Τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τις πρωτεΐνες που εκφράζουν τοξικότητα, δεν βρίσκονται πάνω σε κινούμενες περιοχές του DNA (ιούς, τρανσποζόνια). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η ύπαρξή τους στο γονιδίωμα του *C. perfringens* δεν είναι πρόσφατη. Στο γονιδίωμα του *C. perfringens* βρέθηκαν 48 γονίδια που κατατάσσονται στο βακτηριακό, δύο συστατικών σύστημα μεταγωγής της πληροφορίας (Hoch J.A., 2000). Τα 28 εκφράζουν αισθητήρες πρωτεΐνες (κινάσες ιστιδίνης) και τα 20 ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Το γνωστότερο σύστημα μεταγωγής πληροφορίας στο *C. perfringens* είναι το VirR / VirS, που ρυθμίζει την έκφραση των τοξινών (α, κ, θ) και πρωτεϊνών υπεύθυνων για τη μεταγραφή των γονιδίων των τοξινών (Ba-Thein et al., 1996). Η VirR είναι η ρυθμιστική πρωτεΐνη που προσδέεται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA. Πολύ λίγα είναι γνωστά μέχρι τώρα για τη λειτουργία του συστήματος δύο συστατικών μεταγωγής της πληροφορίας στο *C. perfringens*. Η φυσιολογία και η ανάλυση του γονιδιώματος του *C. perfringens* μας υποδεικνύουν ένα λογικό πλάνο για τη δημιουργία μιας πιθανής παθογόνου κατάστασης, όταν ο μικροοργανισμός βρεθεί σε κάποιο ιστό ενός ξενιστή (ανθρώπου). Η μόλυνση ενός ιστού δίνει τη δυνατότητα εγκατάστασης και γρήγορης ανάπτυξης λόγω της δυνατότητας του μικροοργανισμού να χρησιμοποιεί υλικά από τον ξενιστή. Μπορεί να αποσυνθέσει μακρομόρια

σακχάρων και τα μονομερή να τα εισάγει μέσα στο κύτταρο του, όπου τα ζυμώνει παράγοντας ενέργεια και αέρια (CO_2 , H_2), τα οποία βοηθούν το μικροπεριβάλλον γύρω από το βακτήριο να γίνει περισσότερο αναερόβιο. Ακόμη, διαθέτει ένζυμα και τοξίνες, όπως οι υαλουρονιδάσες, οι σπυλιδάσες, οι κολλογενάσες, οι κυτταλυτικές εντεροτοξίνες, η α-τοξίνη, η θ-τοξίνη, που του δίνουν τη δυνατότητα να διεισδύσει μέσα στους ιστούς και να αποσυνθέσει πολλά από τα συστατικά τους. Το βακτήριο με αυτό τον τρόπο μπορεί να προμηθευτεί την πλειονότητα των αμινοξέων, τα οποία δεν μπορεί να βιοσυνθέσει. Την μεγάλη ποσότητα ενζύμων και τοξινών, το *C. perfringens* παράγει κατά το μέσο της εκθετικής φάσης (Petit L. et al., 1999). Η λογική υπόθεση λοιπόν είναι ότι το *C. perfringens* χρειάζεται θρεπτικά υλικά για τη γρήγορη ανάπτυξή του, για το λόγο αυτό συνθέτει ένζυμα και τοξίνες, προς απόκτηση θρεπτικών υλικών από τους ιστούς του ξενιστή. Η δυναμική αυτή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού εκδηλώνεται ως παθογένεση στον ξενιστή.



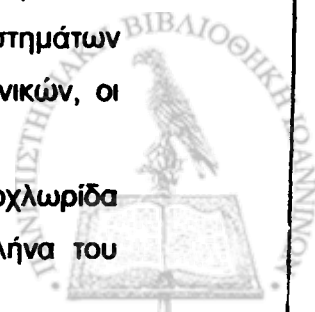
Οικολογία του είδους *C. perfringens*

Το *C. perfringens* συναντάται σε μία μεγάλη ποικιλία διαφορετικών οικοτόπων. Βρίσκεται στο έδαφος, στη σκόνη, στα τρόφιμα, στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων, στα περιπτώματά τους, στο δέρμα τους, στα πτώματα προκαλώντας σήψη αυτών, στα ρούχα των ανθρώπων, στους θαλάμους και τα χειρουργεία των νοσοκομείων και στο νερό. Μία από τις σημαντικότερες αιτίες της μεγάλης του κατανομής είναι η δυνατότητά του να σχηματίζει σπόρους οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος. Θεωρείται ως το περισσότερο διαδεδομένο αναερόβιο βακτήριο (Smith & Williams, 1984).

Έδαφος : Ο κύριος βιότοπος και πηγή του μικροοργανισμού στο περιβάλλον είναι το έδαφος, όπου οι βλαστικές μορφές του βακτηρίου μπορούν και πολλαπλασιάζονται. Το ποσοστό θετικότητας απομόνωσης από διάφορα δείγματα εδαφών φθάνει το 90% (Miwa, 1975). Ο Α τύπος του *C. perfringens* είναι αυτός που το έδαφος είναι η κύρια οικολογική φωλεά του. Οι τύποι Β, C, D και E, οι οποίοι είναι παράσιτα των ζώων και περιστασιακά του ανθρώπου, δεν μπορούν να προσαρμοστούν στις συνθήκες του εδάφους και οι βλαστικές μορφές τους, μετά από λίγο καιρό, πεθαίνουν. Μόνο μερικοί σπόροι από αυτούς τους τύπους του *C. perfringens* παραμένουν στο περιβάλλον (Smith, 1975).

Νερό : Ο τύπος του *C. perfringens* που έχει απομονωθεί από τα υδάτινα οικοσυστήματα είναι ο Α τύπος και περιστασιακά οι άλλοι τύποι. Τα υδάτινα περιβάλλοντα χαρακτηρίζονται, ως επί το πλείστον, ως oligotroφικά (μικρή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά). Σε τέτοιου είδους περιβάλλοντα είναι δύσκολο οι βλαστικές μορφές του *C. perfringens* να πολλαπλασιασθούν. Η ύπαρξη μεγάλου αριθμού βλαστικών μορφών και σπόρων στα υδάτινα οικοσυστήματα θεωρείται ως εισβολή του είδους μέσω περιπτωμάτων ανθρώπων, ζώων, λυμάτων πόλεων και βιομηχανιών. Αυτός είναι και ο λόγος της καθιέρωσής του ως δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης (WHO, APHA). Οι σπόροι του, εξαιτίας της ανθεκτικότητάς τους στις δυσμενείς συνθήκες του περιβάλλοντος, θεωρούνται και ως δείκτες μόλυνσης παλιάς προέλευσης. Ακόμη, οι σπόροι χρησιμοποιούνται ως δείκτες ανεπαρκούς απολύμανσης του πόσιμου νερού μιας πόλης, λόγω της ανθεκτικότητας που εμφανίζουν στα απολυμαντικά και σηπτικά μέσα (Franco et al., 1991). Σε περιοχές υδάτινων οικοσυστημάτων που βρίσκονται κοντά στην απόρριψη λυμάτων οικιστικών ή βιομηχανικών, οι αριθμοί του *C. perfringens* είναι αυξημένοι (Bezirtzoglou et al., 1994).

Ανθρωπος - Ζώα : Το *C. perfringens* ανήκει στη φυσιολογική μικροχλωρίδα του ανθρώπου και των ζώων. Απομονώνεται από τον εντερικό σωλήνα του



ανθρώπου, το δέρμα, τον κόλπο των γυναικών, την ουρήθρα του άνδρα (Ledger & Hachett, 1973). Από το έντερο του ανθρώπου απομονώνεται κυρίως ο τύπος A του βακτηρίου (Yamagishi et al., 1976). Βρίσκεται ομοιόμορφα κατανεμημένο στα περιττώματα ανθρώπου και ζώων (Bezirtzoglou E. 1994, 1995, 1999, 2001). Βέβαια, ο άνθρωπος είναι ο κατεξοχήν φορέας του (Bezirtzoglou E., Romond C., 1990), (Bezirtzoglou et al., 1997). Η συχνότητα με την οποία απομονώνεται από τα κόπρανα του ανθρώπου, ανεξαρτήτως φύλου, ηλικίας, τρόπου διατροφής, επαγγέλματος, είναι μεταξύ 80-100% (Genigeorgis, 1975).

Πριν τον τοκετό, το νεογνό είναι στείρο μικροβίων. Μικρόβια αρχίζουν να εμφανίζονται στα περιττώματα του μωρού, μέσα σε λίγες ώρες από τη γέννησή του. Η παρουσία του *C. perfringens* στην εντερική χλωρίδα έχει επιβεβαιωθεί 2 ημέρες μετά τη γέννηση του νεογνού (Bezirtzoglou 1985, 1991). Σε νεογνά που τρέφονται με τεχνητή τροφή, τα ποσοστά του *C. perfringens* είναι υψηλότερα, σε σχέση με τα νεογνά που τρέφονται με μητρικό θηλασμό (Bezirtzoglou, 1991), (Benno et al., 1984), (Kleesen B. et al., 1995). Στα νεογνά με νεκρωτική εντεροκολίτιδα, τα ποσοστά μόλυνσης από *C. perfringens* ήταν 40%, σε σχέση με τα φυσιολογικά νεογνά, όπου το ποσοστό απομόνωσής του ήταν 13%. Τα νεογνά αυτά ήταν ηλικίας μέχρι 14 ημερών (Blakey J.L. et al., 1985). Ακόμη, τα ιστολογικά ευρήματα από ασθενείς με νεκρωτική εντεροκολίτιδα μοιάζουν με αυτά της αεριογόνου γάγγραινας (Peterson P.V. et al., 1988). Οι ανωτέρω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το *C. perfringens* εμπλέκεται στην παθογένεση της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας νεογνών, κυρίως όταν έχουμε πρόωρη αποϊκίση του εντέρου με σπόρους ή βλαστικές μορφές του βακτηρίου, κυρίως σε τεχνητή τροφή του νεογνού. Η εισαγωγή στερεάς τροφής στα γεύματα του νεογνού εγκαθιδρύει την ύπαρξη του *C. perfringens* στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου, λόγω δημιουργίας σηπτικής χλωρίδας. Βέβαια, το *C. perfringens* απομονώνεται σε υψηλότερους αριθμούς από γέροντες παρά από ενήλικες (Bezirtzoglou E., 2000).

Μεγάλο ποσοστό στελεχών *C. perfringens* που βρίσκονται στα κόπρανα του ανθρώπου είναι θερμοανθεκτικά (63%) (Bygh, 1969).

Πειραματόζωα τα οποία εκτέθηκαν σε πιεστικές καταστάσεις (stress), όπως στέρηση τροφής, χαμηλές θερμοκρασίες περιβάλλοντος, ηλεκτρικό shock, οι απομονωθείσες από τα κόπρανά τους βλαστικές μορφές και σπόροι του βακτηρίου βρίσκονταν σε υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με τα επίπεδά τους στα περιττώματα, πριν την εφαρμογή της έντονης πιεστικής κατάστασης (Bezirtzoglou et al., 1999). Παρόμοια μελέτη σε πληθυσμό φοιτητών κατά την περίοδο εξετάσεων, έδειξε αυξημένο αριθμό βλαστικών μορφών και σπόρων του βακτηρίου (Mullie et al., 1999). Ο τρόπος μεταχείρισης των ζώων πριν τη σφαγή,

κατά τη διάρκεια της ασθένειάς τους, οδηγεί στην μετατόπιση βακτηρίων από τον εντερικό αυλό στα μεσεντέρια και άλλους ιστούς. Μεταξύ αυτών των βακτηρίων έχει ανιχνευθεί και το *C. perfringens* (Genigeorgis, 1975).

Σε 5 ασθενείς που πάσχουν από εκκολπωματίτιδα, στα κόπρανά τους παρατηρήθηκαν μειωμένα ποσοστά των γενών *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* και αυξημένα του είδους *Clostridium perfringens* (Ruseler van Embden J.G. et al., 1994).

Τρόφιμα : Το *C. perfringens* είναι ευρύτατα κατανεμημένο στα διάφορα είδη τροφίμων. Για να καταστεί επικίνδυνο για τον καταναλωτή (τροφική λοίμωξη) θα πρέπει οι βλαστικές μορφές του να περιέχονται σε μεγάλο αριθμό στο τρόφιμο (10^6 - 10^8 κύτταρα / gr τροφίμου). Επικίνδυνο όμως είναι ένα είδος τροφίμου που περιέχει μικρό αριθμό σπόρων και ευνοεί την βλάστησή τους και τον πολλαπλασιασμό τους λόγω μη σωστής συντήρησής του. Πολλά παραδείγματα τροφολοιμώξεων αναφέρονται με αίτιο το *C. perfringens*, εξαιτίας της μη σωστής ψύξης των τροφίμων μετά από θερμική επεξεργασία (Hewitt et al., 1986), (Collier et al., 1988).

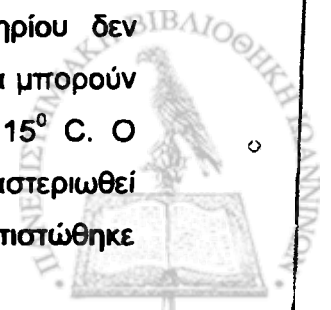
Τα ποσοστά απομόνωσης στελεχών *C. perfringens* από διάφορα είδη κρέατος κυμαίνονται από 37% έως 82% (Duncan, 1976). Σπόροι του βακτηρίου απομονώθηκαν από κρέατα, σε ποσοστό 1.5% έως 42.7% (Hobbs, 1979).

Σε σφαγεία αιγοπροβάτων, αγελάδων, πουλερικών, τα ποσοστά παρουσίας στελεχών *C. perfringens* ευρέθησαν αντίστοιχα 52%, 82%, 58% (Hell, Angelotti, 1965).

Σε σάλτσες, σούπες, πατατοσαλάτες, έχουν βρεθεί σπόροι του. Οι τροφές αυτές αποτελούν ιδανικό αναερόβιο περιβάλλον για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Hobbs, 1979) (Pasolini et al., 1981).

Το κρέας από τα πουλερικά μολύνεται εύκολα γιατί δεν αφαιρείται το δέρμα των πουλερικών κατά τη σφαγή. Κατά την αποπτίλωσή τους, που γίνεται με το βάπτισμα του πτηνού σε δεξαμενή νερού θερμοκρασίας 50-55^o C, μολύνεται το πτηνό με μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο νερό του ζεματίσματος. Τα νερά αποπτίλωσης είναι σημαντική πηγή μόλυνσης του πτηνού με *C. perfringens*, ως διαφαίνεται. Επίσης, από τα σπλάχνα πουλερικών του εμπορίου έχει απομονωθεί *C. perfringens* σε ποσοστό 75% (Turcsan et al., 2001).

Το *C. perfringens* έχει απομονωθεί σε ποσοστό από 10% έως 80% στο γάλα και τα προϊόντα του (El-Bassiony, 1980). Οι σπόροι του βακτηρίου δεν καταστρέφονται με την παστερίωση. Οι βλαστικές μορφές του στο γάλα μπορούν να πολλαπλασιασθούν όταν η θερμοκρασία είναι μεγαλύτερη από 15^o C. Ο πολλαπλασιασμός είναι εντονότερος όταν το γάλα έχει παστεριωθεί προηγουμένως. Σε συντηρημένα ιχθυηρά ελληνικής προέλευσης διαπιστώθηκε



παρουσία σπόρων *C.perfringens* σε ποσοστό 20.2% των δειγμάτων (Amin, 1984).

Παθογόνος δράση

1. Αεριογόνος γάγγραινα (μυονέκρωση)

Η αεριογόνος γάγγραινα είναι μία λοίμωξη που χαρακτηρίζεται από τοξιναιμία, αιμολυτική αναιμία, ίκτερο και μυϊκή νέκρωση. Ακολουθεί μικροβιαμία και θάνατος του ασθενούς. Ο αιτιολογικός παράγων της ασθένειας είναι κυρίως ο τύπος A του *C.perfringens*. Έχει απομονωθεί από το 80% έως 90% των περιπτώσεων (Levison, 1990). Επίσης, προκαλείται και από τα είδη *C. novyi*, *C.septicum*, η συχνότητα απομόνωσης αυτών από τις διάφορες περιπτώσεις είναι αντιστοίχως 40% και 20%.

- Η ανάπτυξη του *C. perfringens* στους ιστούς ευνοείται από τη δημιουργία χαμηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού, το οποίο δημιουργείται σε περιπτώσεις τραυματισμών, απόφραξης αιμοφόρων αγγείων, μεγάλης καταστροφής ιστών.

Το *C. perfringens* είναι ένα βακτήριο το οποίο βρίσκεται σε μία μεγάλη ποικιλία οικοτόπων (έδαφος, σκόνη, άνθρωπος, ζώα) με τη βλαστική μορφή του ή ως σπόριο. Σε περίπτωση τραυματισμού ενός ατόμου είναι εύκολο να υπάρξει μόλυνσή του. Κατόπιν ακολουθεί πολλαπλασιασμός του βακτηρίου. Το *C. perfringens*, σε ένα ανοξικό περιβάλλον με χαμηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό, μπορεί να πολλαπλασιασθεί με ταχείς ρυθμούς, καθότι είναι ένα ζυμωτικό βακτήριο και διαθέτει τοξίνες και ένζυμα που το βοηθούν στην αποικοδόμηση των ιστών. Η α-τοξίνη του τύπου A του *C. perfringens* είναι μία φωσφολιπάση C και σφιγγομυελινάση, δρα επομένως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των μυϊκών κυττάρων, των ερυθρών και λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα την λύση των κυττάρων και των ιστών. Στην αποικοδόμηση των ιστών βοηθούν και τα ένζυμα κολλαγενάσες, δεσοξυριβοζονουκλεάσες, υαλουρονιδάσες, σαλιδάσες, δίνοντας τη δυνατότητα στο βακτήριο, της καταστροφής των ιστών και επέκτασης της βλάβης.

Η επώαση της νόσου διαρκεί από 7 ώρες έως 7 ημέρες μετά τον τραυματισμό. Η κλινική εικόνα του ασθενή είναι : επίμονος πόνος στην περιοχή του τραύματος, οίδημα, ωχρότητα και ευαισθησία. Συγχρόνως έχουμε παραγωγή αερίων στην περιοχή του τραύματος (ζυμώσεις), τα οποία γίνονται αντιληπτά με την ψηλάφηση ή την ακτινογράφιση. Η χροιά του δέρματος γίνεται μπρούτζινη,

με αιμορραγικές φουσαλίδες και παράγεται καστανόχρωμο, ορώδες, δύσοσμο έκκριμα.

Το 50% των περιπτώσεων αεριογόνου γάγγραινας οφείλεται σε ατυχήματα (εργατικά, τροχαία). Το άλλο 50% οφείλεται σε χειρουργικές επεμβάσεις, κυρίως του παχέος εντέρου και της χολής.

Το *C. perfringens* βρίσκεται στον κόλπο και τον τράχηλο των υγιών γυναικών, σε ποσοστό από 1% έως 9% (Chow, 1974). Μετά από έκτρωση ή παρατεταμένο τοκετό, μπορεί να προκληθεί κλωστηριδιακή μυνέκρωση του μυομητρίου, στην οποία ο θάνατος μπορεί να επέλθει σε μερικές ώρες από την έναρξη της σήψης. Η κλινική εικόνα της ασθενούς χαρακτηρίζεται από αναιμία, σηψαιμία, αιμοσφαιρινουρία, υπόταση, πνευμονικό οίδημα, έκκριση δύσοσμου υγρού με αέριο από τον κόλπο.

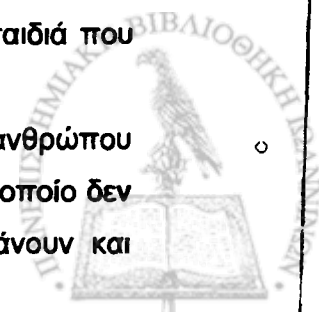
2. Νεκρωτική εντεροκολίτιδα

Η νεκρωτική εντεροκολίτιδα χαρακτηρίζεται από αιμορραγία, φλεγμονή, εντερική ισχαιμία. Η νέκρωση αφορά το λεπτό έντερο, αλλά κυρίως την νήσιδα. Οφείλεται στην β-τοξίνη του *C. perfringens* τύπου C. Συναντάται πιο συχνά στις αναπτυσσόμενες χώρες και σπάνια στις ανεπτυγμένες. Στις ανεπτυγμένες χώρες, τα συμπτώματά της εμφανίζονται σε ενήλικες που υποφέρουν από χρόνιες ασθένειες.

Η πρώτη εμφάνιση της νόσου έγινε στη Βόρεια Γερμανία, μετά τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο, μεταξύ των ετών 1946 - 1948. Τα συμπτώματα εμφανίστηκαν σε ανθρώπους που είχαν καταναλώσει κουνέλια ή κονσέρβες κρέατος. Η ονομασία της ήταν «Darmbrand», είχε προσλάβει τη μορφή επιδημίας, με θνησιμότητα 40% περίπου (Kreft B. et al., 2000).

Η νόσος της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας ενδημεί στη Νέα Γουινέα, συγκεκριμένα στα υψίπεδα της περιοχής Papua της Νέας Γουινέας, όπου είναι γνωστή με το όνομα rigbel. Το 1964, έρευνα στα υψίπεδα της περιοχής Papua έδειξε ότι η συχνότητα θανάτου ήταν 14 περιπτώσεις σε 10.000 πληθυσμό (Bartlett, 1990). Εμβόλιο που παρασκευάστηκε από τα τοξικά προϊόντα του τύπου C του *C. perfringens* και ενέθηκε σε 2.500 παιδιά από την Papua, έδειξε ανοσοποίηση για 24 μήνες, οκταπλάσια σε ποσοστό, σε σχέση με παιδιά που δεν ενέθηκαν με το εμβόλιο (Lawrence G. et al., 1979).

Οι σπόροι του *C. perfringens* τύπου C στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου προέρχονται από κατανάλωση κρέατος μολυσμένου από σπόρους, το οποίο δεν μαγειρεύτηκε σωστά. Όταν οι σπόροι βρεθούν στο έντερο, βλαστάνουν και



πολλαπλασιάζονται, εκκρίνοντας β-τοξίνη, της οποίας η δράση αναστέλλεται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα του εντέρου. Σε περίοδο υποσιτισμού του οργανισμού, που κατόπιν ακολουθείται από μεγάλη κατανάλωση κρέατος χοίρου ή γλυκοπατάτας (αναστολή πρωτεολυτικών ενζύμων), η β-τοξίνη του τύπου C του *C. perfringens* παράγεται σε μεγάλη ποσότητα, με αποτέλεσμα νέκρωση του εντερικού βλεννογόνου, κυρίως της νήσιδας.

Στις ανεπτυγμένες χώρες, προσφάτως έχουν παρατηρηθεί κρούσματα νεκρωτικής εντερίτιδας σε ασθενείς που πάσχουν από χρόνιες παθολογικές καταστάσεις, όπως διαταραχές της γαστρεντερικής κινητικότητας, αύξηση της γαστρικής οξύτητας, καθώς και σε ανθρώπους που διατρέφονται κακώς ή βρίσκονται κάτω από την επίδραση στρεσογόνων καταστάσεων (Severin et al., 1984), (Farrant et al., 1996). Αναφέρθηκε περίπτωση 12χρονου που υπέφερε από διαβήτη και κατανάλωσε έντερα χοίρου και εμφάνισε συμπτώματα νεκρωτικής εντερίτιδας. Η ταυτοποίηση του *C. perfringens* έγινε από τα γονίδια *cpa* και *cpb*, που αντιστοίχως κωδικοποιούν τις τοξίνες α και β, με την τεχνική της PCR (Petrillo T.M. et al., 2000).

Σε πειράματα που διεξήχθησαν σε γνωθοξενικά ορτύκια (εμφύτευση γνωστών στελεχών βακτηρίων στο έντερό τους), εμφύτευσαν στελέχη *C. perfringens*, *C. butyricum*, που απομόνωσαν από ανθρώπινα νεογνά που έπασχαν από νεκρωτική εντεροκολίτιδα. Η διατροφή των ορτυκίων στηρίζονταν σε διαίτα λακτόζης. Παρατήρησαν στα τοιχώματα του τυφλού των πτηνών ανάπτυξη αλλοιώσεων, παρόμοιων με αυτές των ανθρώπινων νεογνών που πάσχουν από νεκρωτική εντεροκολίτιδα. Κατόπιν εισήγαγαν στην εντερική χλωρίδα των ορτυκίων στελέχη του γένους *Bifidobacterium* που είχαν απομονωθεί από υγιή ανθρώπινα νεογνά. Η εγκατάσταση των *Bifidobacterium* είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης του *C. butyricum*, την εξαφάνιση του *C. perfringens* και την θεραπεία των αλλοιώσεων του τυφλού (Butel M.J. et al., 1998).

Νεκρωτική εντεροκολίτιδα νεογνών : Είναι μία γαστρεντερική ασθένεια, που συναντάται σε μωρά που γεννήθηκαν πρόωρα και είναι ελλιποβαρή, κατά την πρώτη εβδομάδα της ζωής τους. Ως αιτία της νόσου αναφέρεται η τεχνητή διατροφή, η εντερική ισχαιμία και τα εντεροδικοισδυτικά, τοξινογόνα μικρόβια, όπως το *C. perfringens*, *C. butyricum* (Kosloske A.M. et al., 1985), (Kosloske A.M., 1979). Η ασθένεια εντοπίζεται στον τελικό ειλεό, το κόλον, αλλά σε μερικές περιπτώσεις περιλαμβάνει ολόκληρο τον γαστρεντερικό σωλήνα. Τα κλινικά συμπτώματα είναι εμετός, μετεωρισμός και αιματηρές διάρροιες.

SIDS (Σύνδρομο αιφνίδιου θανάτου σε παιδιά) : Είναι ο αιφνίδιος θάνατος φαινομενικά υγιών μωρών. Αιτία του θανάτου θεωρούνται δύο

τοξινογόνα βακτήρια, το *C. perfringens* και ο *S. aureus* (Gordon et al., 1999). Τα παιδιά που δεν θηλάζουν από τη μητέρα τους εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο να προσβληθούν από την ασθένεια αυτή. Αυτό ίσως οφείλεται στα υψηλά επίπεδα IgA αντισωμάτων που υπάρχουν στο μητρικό γάλα.

3. Τροφική δηλητηρίαση από το *C. perfringens*

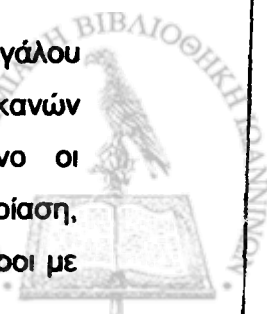
Υπεύθυνος για την τροφική δηλητηρίαση είναι ο τύπος A του *C. perfringens*. Ο τύπος A παράγει την εντεροτοξίνη (εκφράζεται από το γονιδιακό τόπο *cpe*), η οποία είναι υπεύθυνη για τα συμπτώματα της δηλητηρίασης. Από τους τύπους E και D έχει απομονωθεί μία παρόμοια εντεροτοξίνη (Uemura et al., 1976).

Η νόσος εμφανίζεται μέσα σε 6 - 18 ώρες από τη στιγμή κατανάλωσης της μολυσμένης τροφής. Τα κύρια συμπτώματά της είναι διάρροια και κοιλιακοί πόνοι. Ναυτία και εμετός συναντώνται στο 25% και 9% των ασθενών αντιστοίχως (Shandera et al., 1983). Τα κόπρανα των ασθενών είναι υδαρή, αφρώδη, δύσοσμα, αλλά σε αυτά δεν βρίσκεται αίμα. Τα συμπτώματα της νόσου υποχωρούν μέσα σε 24 ώρες, για το λόγο αυτό λίγοι ασθενείς ζητούν ιατρική βοήθεια.

Η διάγνωση της τροφικής δηλητηρίασης στηρίζεται στην απομόνωση του ίδιου οροτύπου *C. perfringens* από τα κόπρανα του ασθενούς και το ύποπτο τρόφιμο, στον παρατηρούμενο χρόνο επώασης, στις κλινικές εκδηλώσεις, στην εύρεση εντεροτοξίνης στα κόπρανα ή στην τροφή και στη διερεύνηση του τρόπου παρασκευής και συντήρησης της τροφής.

Θα πρέπει να γίνει διαφοροποιητική διάγνωση από τις άλλες γαστρεντερίτιδες που το αίτιό τους είναι κάποιο άλλο μικρόβιο. Οι γαστρεντερίτιδες που οφείλονται σε *Staphylococcus aureus* εμφανίζουν μικρότερο χρόνο επώασης, ναυτία, εμετό, σε *Campylobacter* μεγαλύτερο χρόνο επώασης, εμετό, διάρροια, σε *Salmonella* spp., *Shigella* spp. μεγαλύτερο χρόνο επώασης, αίμα στα κόπρανα, συστηματική τοξικότητα.

Για να προκληθεί δηλητηρίαση θεωρείται απαραίτητη η πρόσληψη μεγάλου αριθμού βακτηρίων (10^8 βακτήρια / gr τροφίμου) (Dische & Elok, 1957), ικανών να παράγουν μεγάλη ποσότητα εντεροτοξίνης. Η άποψη ότι μόνο οι θερμοανθεκτικοί σπόροι μπορούν να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση, εξαιτίας του γεγονότος ότι επιζούν της θέρμανσης, δεν είναι ακριβής. Σπόροι με



μικρότερη θερμοανθεκτικότητα μπορούν να επιζήσουν και να προκαλέσουν επιδημίες (Finogold, 1977).

Η εντεροτοξίνη, ο αιτιολογικός παράγων της ασθένειας, είναι μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 3.5 kDa. Αρχικά, εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα του επιθηλιακού κυττάρου, με αποτέλεσμα την αλλαγή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και απώλειας ιόντων και μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους. Ακολουθεί μία δεύτερη φάση, κατά την οποία ενδοκυτταρικά αυξάνεται το ποσοστό των ιόντων ασβεστίου. Αυτή η αύξηση συνοδεύεται από μία μεγαλύτερη αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης και απώλειας ουσών μεγάλου μοριακού βάρους, με κατάληξη τον θάνατο του κυττάρου (Mc Donel, 1979). Η εντεροτοξίνη προκαλεί μεγαλύτερη απώλεια υγρών από τον ειλέο. Η βλαστική μορφή του βακτηρίου και η εντεροτοξίνη εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία στο γαστρικό υγρό, αλλά όταν η ποσότητα της τροφής είναι μεγάλη, η δράση του γαστρικού υγρού κατά ένα μεγάλο μέρος εξουδετερώνεται και εμφανίζονται τα συμπτώματα της τροφικής δηλητηρίασης με εμετό (Georgiades, 1975).

Τα κρέατα και τα διάφορα σκευάσματα κρέατος θεωρούνται ως τα πιο επικίνδυνα τρόφιμα για την πρόκληση τροφικής δηλητηρίασης από *C. perfringens*. Για το λόγο αυτό, συνιστάται το μαγείρεμα σε θερμοκρασίες πάνω από 100° C, αλλά κυρίως η διατήρηση του τροφίμου σε χαμηλές θερμοκρασίες, δηλαδή κάτω από 5° C. Ακόμη, επανασθέρμανση των μαγειρεμένων φαγητών προ της κατανάλωσής τους, σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 75° C.



Οικολογία ανθρώπινου εντέρου

1. Μικροχλωρίδα εντέρου

Το γαστρεντερολογικό μονοπάτι αντιπροσωπεύει ένα οικοσύστημα υψηλότερης πολυπλοκότητας. Παρόλες τις ερευνητικές εργασίες που έγιναν μέχρι σήμερα, η κατανόηση της συνθετότητας και των μικροβιακών αλληλεπιδράσεων είναι περιορισμένη.

Σε αυτό το τόσο πολύπλοκο οικοσύστημα, υπάρχουν τουλάχιστον 17 οικογένειες βακτηρίων και πάνω από 50 γένη που ανήκουν σε αυτές τις οικογένειες. Σε αυτά τα γένη περιλαμβάνονται γύρω στα 400 - 500 είδη βακτηρίων για κάθε άνθρωπο (Moore W.E.C. & Holdeman, 1975). Χρησιμοποιώντας τεχνικές γενετικών αποτυπωμάτων, ο Tannock et al., 1997, έδειξε ότι μία ομάδα στελεχών από *Bifidobacteria* και *Lactobacilli* είναι μοναδικοί για κάθε άνθρωπο.

Ο μέσος αριθμός μικροβίων σε έναν ενήλικο άνθρωπο, στο έντερό του, είναι περίπου 10^{14} μικροβιακά κύτταρα, 10 περίπου φορές περισσότερα από τα κύτταρα όλων των ιστών του ανθρώπινου σώματος (Lucy & Floch, 1972). Η μεγαλύτερη πυκνότητα βακτηρίων συναντάται στο παχύ έντερο (10^{11} κύτταρα ανά γραμμάριο).

Η σύνθεση της χλωρίδας διαφέρει στα διάφορα τμήματα του γαστρεντερολογικού σωλήνα. Γενικά, από το στόμα μέχρι το κόλον υπάρχει μία αυξανόμενη συνθετότητα, ποσοτική και ποιοτική, με μόνη εξαίρεση την στοματική κοιλότητα (Marsh P. 1980). Κατωτέρω αναφέρονται οι κυριότερες οικογένειες, γένη και είδη μικροβίων, στα διάφορα τμήματα του γαστρεντερολογικού σωλήνα.

Φυσιολογική μικροχλωρίδα στομάχου	Φυσιολογική μικροχλωρίδα λεπτού εντέρου
<ol style="list-style-type: none"> 1. Streptococcus 2. Staphylococcus 3. Lactobacillus 4. Peptostreptococcus 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Lactobacillus spp. 2. Bacteroides spp. 3. Clostridium spp. 4. Mycobacterium spp. 5. Enterococci 6. Enterobacteriaceae

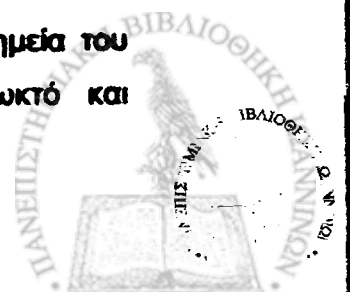


Φυσιολογική μικροχλωρίδα παχέος εντέρου	Φυσιολογική μικροχλωρίδα στόματος - στοματοφάρυγγα
<ol style="list-style-type: none"> 1. Bacteroides spp. 2. Fusobacterium spp. 3. Clostridium spp. 4. Peptostreptococcus spp. 5. Escherichia coli 6. Proteus spp. 7. Lactobacillus spp. 8. Enterococci 9. Streptococci 10. Pseudomonas spp. 11. Acinetobacter spp. 12. Coagulase-negative Staphylococci 13. Staphylococcus aureus 14. Mycobacterium spp. 15. Actinomyces spp. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Viridans Streptococci 2. Coagulase negative Staphylococci 3. Veillonella spp. 4. Fusobacterium spp. 5. Treponema spp. 6. Porphyromonas spp. - Prevotella spp. 7. Neisseria spp. - Branhamella catarrhalis 8. Streptococcus pneumoniae 9. Beta-hemolytic Streptococci (όχι η ομάδα A) 10. Candida spp. 11. Haemophilus spp. 12. Diptheroids 13. Actinomyces 14. Eikenella corrodens 15. Staphylococcus aureus

Οι συγκεντρώσεις των βακτηρίων στα διάφορα τμήματα του πεπτικού μονοπατιού έχουν ως ακολούθως : στο στομάχι η συγκέντρωση είναι περίπου 10^3 κύτταρα / ml περιεχομένου, στο δωδεκαδάκτυλο $10^4 - 10^5$ κύτταρα / gr, στο λεπτό έντερο $10^5 - 10^8$ κύτταρα / gr, στο παχύ έντερο $10^8 - 10^{11}$ κύτταρα / gr και τέλος, έχει υπολογιστεί ότι ένα γραμμάριο κοπράνων περιέχει 10^{12} μικροοργανισμούς.

Στην ποσοτική και ποιοτική εξέταση της συνθετότητας της μικροχλωρίδας υπεισέρχονται ορισμένοι περιορισμοί.

Πρώτος : Δεν μπορούμε να έχουμε εύκολη πρόσβαση σε όλα τα σημεία του γαστρεντερολογικού σωλήνα, εκτός από το στόμα και τον πρωκτό και προπάντων σε υγιείς ανθρώπους.



Δεύτερος : Όταν εξετάζουμε ένα συγκεκριμένο τμήμα του γαστρεντερολογικού σωλήνα πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη μας ότι σε αυτό υπάρχουν διαφορετικές οικολογικές φωλιές, που φιλοξενούν διαφορετικά είδη μικροβίων.

Τρίτος : Στα σημεία του γαστρεντερολογικού σωλήνα που δεν έχουμε πρόσβαση για τη λήψη δειγμάτων, αυτή γίνεται δυνατή κατά τη διάρκεια εγχείρησης ή βιοψίας. Θα πρέπει όμως να λάβουμε υπόψη μας την μόλυνση των εργαλείων, την επίδραση του αναισθητικού στη μικροχλωρίδα, τη λήψη καθαρκτικού και αντιβιοτικών από τον ασθενή.

Τέταρτος : Θα πρέπει να έχουμε φροντίσει το περιβάλλον στο οποίο μεταφέρεται το δείγμα να είναι αναερόβιο, καθώς η πλειονότητα των βακτηρίων που αποικίζουν το έντερο είναι αναερόβιοι.

Πέμπτος : Ο χρόνος από τη στιγμή της συλλογής μέχρι την καλλιέργεια των μικροβίων είναι σημαντικός για την ανάκαμψη των βακτηρίων στο θρεπτικό υλικό, καθώς επίσης και οι συνθήκες αποθήκευσης, αν συμβαίνει κάτι τέτοιο (Crowther J.S., 1971).

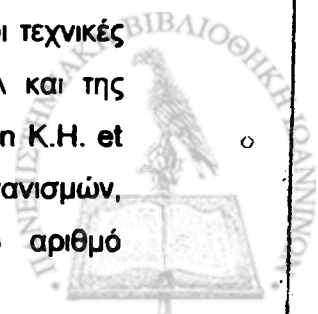
Έκτος : Μία άλλη μεγάλη σημαντική δυσκολία για τον καθορισμό της μικροχλωρίδας είναι η ικανότητα καλλιέργειας των μικροοργανισμών που είναι παρόντες. Τα περισσότερα μέσα καλλιέργειας δεν είναι ικανά να υποστηρίξουν την καλλιέργεια κάποιων βακτηρίων. Ακόμη, μεγάλη σημασία έχει η αποθήκευση του δείγματος, που στερεί τη δυνατότητα σε ορισμένα είδη να ανακάμψουν, ενώ εάν καλλιεργηθούν αμέσως, ανακάμπτουν στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειάς τους.

Έβδομος : Δύσκολα δηλώνεται το όριο εύρεσης ενός πληθυσμού βακτηρίων, το οποίο συνήθως κυμαίνεται από 10^2 / gr έως 10^4 / gr.

Ογδοος : Ο χρόνος ανάπτυξης των διαφόρων ειδών ποικίλλει πολύ, άλλα παρουσιάζουν ταχεία ανάπτυξη και άλλα αργή. Επίσης, η ποσοτική κατανομή στο δείγμα είναι δύσκολο να καθορισθεί.

Ένατος : Οι τεχνικές που χρησιμοποιούμε για την ταυτοποίηση των στελεχών των διαφόρων ειδών και η εμπειρία του ερευνητή.

Το 10 - 20% των βακτηρίων του εντέρου καλλιεργούνται σε θρεπτικά υλικά, το υπόλοιπο 80 - 90% ορίζονται ως μη καλλιεργήσιμα. Εάν αυτό συγκριθεί με το γεγονός ότι μόνο το 1% των μικροοργανισμών στη φύση μπορούν να καλλιεργηθούν, δεν μπορεί να θεωρηθεί μικρό ποσοστό. Βέβαια, σήμερα ένας από τους τρόπους να υπερκεράσουμε τα προβλήματα της καλλιέργειας και ταυτοποίησης των μικροοργανισμών με τις κλασσικές μεθόδους είναι οι τεχνικές της PCR, της εύρεσης της αλληλουχίας των βάσεων του 16SrRNA και της αλληλουχίας των βάσεων ορισμένων χαρακτηριστικών γονιδίων (Wilson K.H. et al., 1996). Με τις τεχνικές αυτές, χωρίς την καλλιέργεια των μικροοργανισμών, μπορούμε να ανιχνεύσουμε και να ταυτοποιήσουμε μεγαλύτερο αριθμό



μικροβίων. Αλλά πάντα πρέπει να έχουμε υπόψη μας ότι σε ένα όργανο πρέπει να εξετάζουμε πολλές διαφορετικές οικολογικές φωλιές, γιατί εμφανίζονται πολλά διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα, άρα σε αυτά έχουν τη δυνατότητα να επιβιώσουν διαφορετικά είδη βακτηρίων.

2. Σημασία της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας και παράγοντες που την επηρεάζουν

Η εντερική χλωρίδα φθάνει το 30% περίπου του υγρού βάρους των κοπράνων και μπορούμε να τη θεωρήσουμε σαν ένα «όργανο» του σώματος. Αν ο ορισμός αυτός είναι αποδεκτός, τότε η χλωρίδα του εντέρου είναι μεταβολικά το πιο δραστήριο όργανο. Για την κατανόηση και διευκρίνιση του ρόλου της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του εντέρου έγιναν πολλές μελέτες, πολλές από τις οποίες βασίζονται στην παρατήρηση ότι πριν τον τοκετό, το νεογνό είναι στείρο μικροβίων (Bezirtzoglou et al., 1987, 1989, 1990). Στον φυσιολογικό τοκετό, το νεογνό έρχεται σε επαφή με μικρόβια των φυσιολογικών μητρικών χλωρίδων, δέρματος, κόλπου, σπυτευμένου (Bezirtzoglou et al., 1990). Σε αντίθεση, το νεογνό που έρχεται στον κόσμο με καισαρική τομή είναι στείρο μικροβίων τη στιγμή της πρώτης έκθεσής του στον εξωτερικό κόσμο. Για το λόγο αυτό, τα νεογνά που γεννήθηκαν με φυσιολογικό τοκετό αποικίζονται ήδη από τα μικρόβια των μητρικών χλωρίδων, που τα προφυλάσσουν τις πρώτες ώρες της ζωής τους, σε μια περίοδο που υπόκεινται σε εξωτερικές μολυσματικές επιθέσεις και που το ανοσοποιητικό τους σύστημα δεν έχει ακόμα αναπτυχθεί. Έχοντας προέλευση άλλη από τη μητρική, παρόλο που δεν αποκλείεται τελείως (π.χ. πρόωρη ρήξη του αμνιακού υμένα ή μεταφορά μητρικών μικροβίων από το νοσοκομειακό προσωπικό), τα μικρόβια που αποικίζουν το νεογνό με καισαρική τομή προέρχονται κυρίως από το περιβάλλον. Το νοσοκομειακό περιβάλλον και το νοσηλευτικό προσωπικό αποτελούν τη νοσοκομειακή χλωρίδα, που είναι διαφορετική από το ένα μαιευτήριο στο άλλο και εξαρτάται από τις τεχνικές απολύμανσης των χώρων, του νοσοκομειακού υλικού, τα συνήθη χορηγούμενα σχήματα αντιβιοτικών από το νοσοκομειακό προσωπικό, καθώς επίσης και από την πυκνότητα των γεννήσεων (Bezirtzoglou E. et al., 1992).

Ανεξάρτητα από τον τρόπο απόκτησής της, η φυσιολογική χλωρίδα φαίνεται να αποικίζει σταθερά το έντερο του νεογνού, για να σταθεροποιηθεί μετά τη δωδέκατη μέρα της ζωής του. Η σταθεροποίηση της χλωρίδας υπόκειται στην επίδραση πολλών παραγόντων (Neut G. et al., 1987), (Rottimi V.O., 1981), (Bezirtzoglou E. et al., 1989). Ο σημαντικότερος ίσως παράγοντας είναι ο τύπος



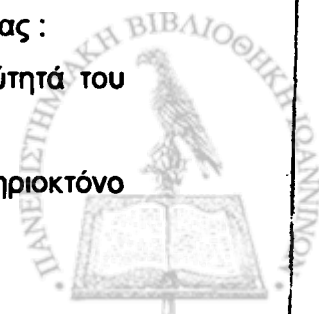
της διατροφής. Η χορήγηση μητρικού γάλακτος ευνοεί την εγκατάσταση των *Bifidobacterium*, σε αντίθεση με τα νεογνά που λαμβάνουν τεχνητή τροφή και στα οποία παρατηρείται να ευνοείται η εγκατάσταση του *Clostridium perfringens* (Bezirtzoglou E. et al., 1990, 1991), (Borriello S.P., 1984) και των *Enterobacteriaceae*. Τα νεογνά που λαμβάνουν τεχνητή τροφή είναι πιο επιρρεπή σε εντερίτιδες από *Escherichia coli* σε σύγκριση με τα νεογνά που θηλάζουν, όπου η παρουσία του *Bifidobacterium* προκαλεί τη μείωση της *E.coli* (Bezirtzoglou E. et al., 1991). Η εισαγωγή στερεάς τροφής στα γεύματα του νεογνού προκαλεί τροποποίηση της χλωρίδας, με τη μαζική εγκατάσταση σπητικών βακτηρίων (*Clostridium*, *Bacteroides*) (Bezirtzoglou E. et al., 1990).

Η οικολογική διαδοχή στην κοινότητα των μικροβίων δείχνει ότι πρώτα αποικίζουν το έντερο τα προαιρετικά αναερόβια δημιουργώντας τις κατάλληλες συνθήκες και οξειδοαναγωγικό δυναμικό για την ανάπτυξη των αναερόβιων. Μεταξύ των πρώτων αναερόβιων που αποικίζουν το ανθρώπινο έντερο είναι τα κλωστηρίδια (*C.perfringens*, *C. tertium*) και τα *Bifidobacteria*. Η κλιμακωτή αυτή κοινότητα σιγά-σιγά γίνεται σταθερή, αποκτά ομοιότητα και δύσκολα επιτρέπει την εγκατάσταση κάποιου άλλου βακτηρίου (Borriello S.P. & Barcles, 1986). Διατροφή του ενήλικα πλούσια σε λαχανικά ή αντιθέτως σε κρέας, τροποποιεί την εντερική χλωρίδα. Η φυσιολογική χλωρίδα φαίνεται επίσης να τροποποιείται με την ηλικία. Τα *Bacteroides*, τα *Eubacterium* και οι αναερόβιοι κόκκοι γενικά εμφανίζονται κατά τη διάρκεια του απογαλακτισμού και τα επίπεδά τους παραμένουν υψηλά μέχρι τις μεγάλες ηλικίες (Mitsuoka T., 1996). Τα *Enterobacteriaceae* ελαττώνονται από το παιδί στον ενήλικο, για να αυξηθούν αργότερα. Στα άτομα προχωρημένης ηλικίας, τα *Bifidobacteria* μειώνονται ή εξαφανίζονται, ενώ οι *Lactobacilli*, που είναι σπάνιοι στην αρχή της ζωής, είναι άφθονοι στον ενήλικα και το γέροντα. Οι *Staphylococci* απομονώνονται συχνότερα στα παιδιά. Οι *Enterococci*, τα *Enterobacteria* και τα *Clostridia* αυξάνονται στους γέροντες σε σχέση με τους ενήλικες (Mitsuoka T. et al., 1974), (Romond M.B. et al., 1998), (Kleesen B. et al., 1997). Όπως δε αναφέρει ο Mitsuoka, «Κάθε ηλικία έχει τη χλωρίδα της στο έντερο».

Διαφορές στον τρόπο διαβίωσης και υγιεινής, παραδοσιακές συνήθειες διατροφής, εισαγωγής αντιβιοτικών στο νερό και στα τρόφιμα, μπορούν να επηρεάσουν τη χλωρίδα.

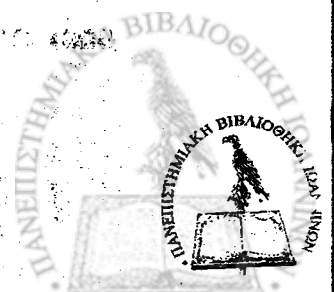
Φυσιολογικοί επίσης παράγοντες ελέγχουν την εγκατάσταση της χλωρίδας :

1. Το στόμα, που αποτελεί πύλη εισόδου των βακτηρίων με την οξύτητά του (που οφείλεται στην παρουσία *Lactobacillus*), ελέγχει την είσοδο.
2. Το στομάχι, με την παραγωγή γαστρικού υγρού, που είναι βακτηριοκτόνο λόγω της οξύτητάς του.



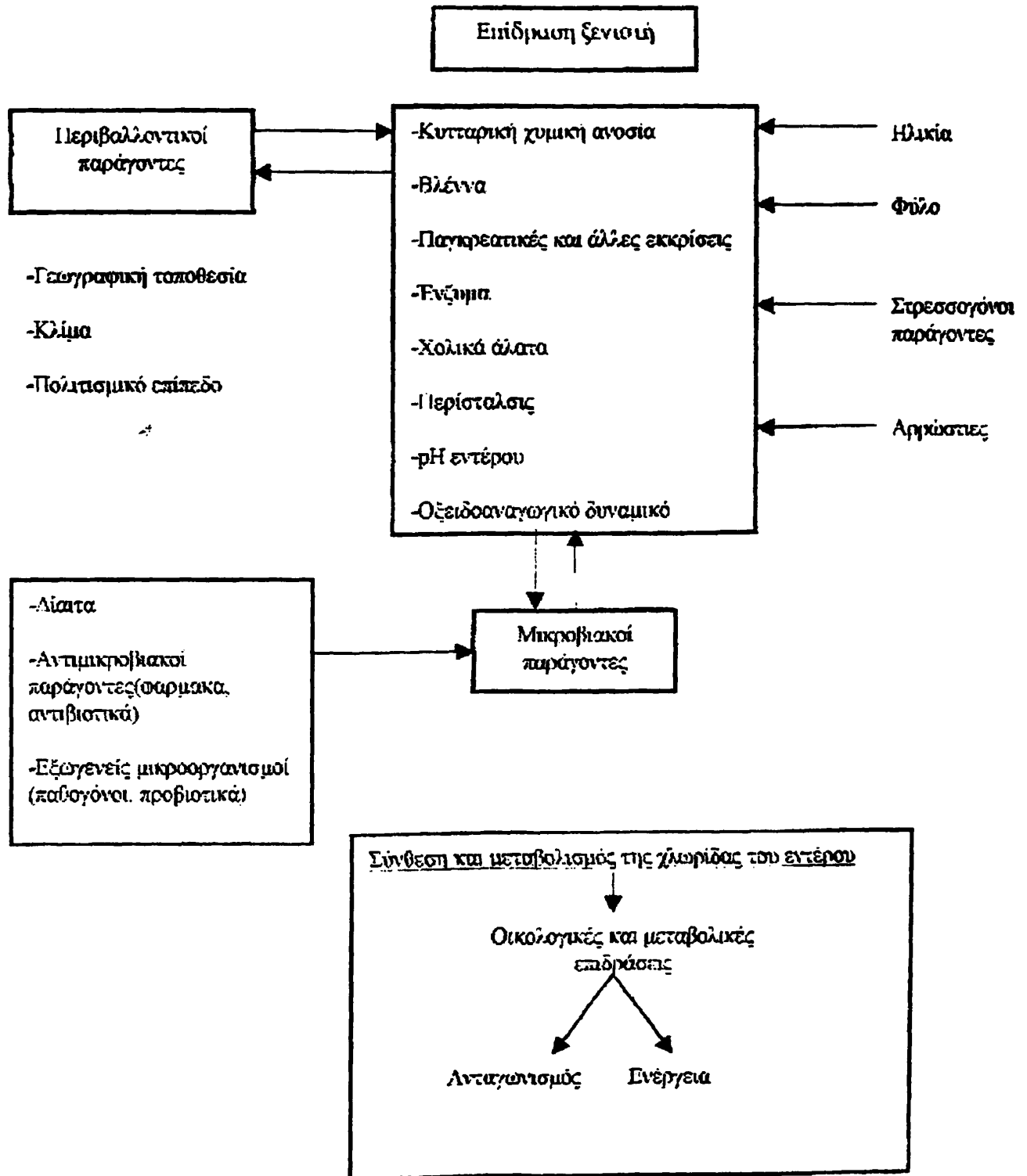
3. Η παραγωγή της χολής, που ευνοεί την ανάπτυξη ορισμένων στελεχών, ενώ αναστέλλει άλλα.
4. Η περισταλτικότητα του εντέρου. Ελάττωση της κινητικότητας του εντέρου, στένωση ή στάση, αλλοκύνουν γρήγορα τη σύνθεση δημιουργώντας μια χλωρίδα που προσβάλλει τους βλεννογόνους και μπορεί να προκαλέσει εντερικές αλλοιώσεις.
5. Αντιβακτηριακές ουσίες εκκρίνονται σε όλη τη διαδρομή του εντερικού αυλού.
6. Ανοσολογικοί παράγοντες φαίνεται να υπεισέρχονται στη σταθεροποίηση της εντερικής χλωρίδας. Απουσία ανοσοσφαιρινών και κυρίως IgA οδηγούν σε χρόνιες διάρροιες.
7. Παράγοντες περιβάλλοντος, κυρίως εποχιακοί, ευνοούν την εγκατάσταση ορισμένων βακτηρίων. Τέλος, ο ανταγωνισμός των βακτηρίων του εντερικού αυλού υπεισέρχεται στην τροποποίηση της φυσιολογικής χλωρίδας.

Στον πίνακα 7 απεικονίζονται όλοι οι παράγοντες που επηρεάζουν τη χλωρίδα του ανθρώπου.



Πίνακας 7 : Παράγοντες που επηρεάζουν την ανθρώπινη μικροβιακή χλωρίδα

Πίνακας: Παράγοντες που επηρεάζουν την ανθρώπινη μικροβιακή χλωρίδα



Βασικές λειτουργίες της εντερικής χλωρίδας

1. Συμμετοχή στο μεταβολισμό

Τα κύρια συστατικά της χολής είναι τα χολικά άλατα και η χοληστερίνη. Τα συνεζευγμένα χολικά άλατα είναι απαραίτητα για την γαλακτωματοποίηση των λιπών και σε αυτό συμμετέχει η εντερική χλωρίδα (Campbell R., 1983), (Ducruzeau R. & Raibaud P, 1979). Στο ήπαρ, από τη χοληστερίνη παράγονται δύο χολικά οξέα (χολικό οξύ και γενοδεοξυχολικό οξύ). Η αποσύζευξη των χολικών οξέων γίνεται με την υδρολότητα, που παράγουν στελέχη *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Veillonella*, *St. faecalis* (Λεγάκης Ν., Παπαβασιλείου Ι., 1981). Επίσης, παραγωγή κοπροστερόλης από την χοληστερίνη επιτυγχάνεται με την παρουσία στελεχών *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, στο παχύ έντερο.

Τα βακτήρια του εντέρου *S. aureus*, *Klebsiella*, *B. fragilis*, *C. perfringens*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* και οι αναερόβιοι *Lactobacillus*, παράγουν ουρεάση, με την οποία διασπάται η ουρία σε NH_3 και CO_2 . Η ουρία αποτελεί την κύρια πηγή NH_3 στο έντερο. Έχει υπολογιστεί ότι το 40% περίπου της συντιθέμενης από το ήπαρ ουρίας υδρολύεται σε NH_3 και CO_2 από τα βακτήρια του εντέρου. Στην ουραιμία, η ουρία του αίματος αυξάνεται. Το ποσοστό που υδρολύεται στο έντερο παραμένει σταθερό λόγω της αύξησης των βακτηριακών στελεχών που την υδρολύουν. Η αυξημένη παραγωγή αμμωνίας στην ουραιμία, έχει σαν αποτέλεσμα τη χρησιμοποίηση μέρους της αμμωνίας της ουρίας για βιοσυνθετικές επεξεργασίες. Η διαδικασία αυτή καταλήγει στη βελτίωση της νόσου, χωρίς να διαταράσσεται το ισοζύγιο του N_2 .

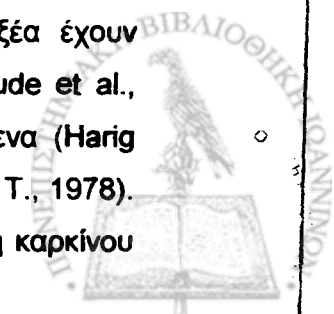
Στο παχύ έντερο, τα μικρόβια συντελούν στη συμπληρωματική πέψη ουσιών που διέφυγαν την πέψη και απορρόφηση στο λεπτό έντερο. Σε αυτές τις ουσίες ανήκουν ανθεκτικές μορφές αμύλου, πολυσακχαρίτες κυτταρικών τοιχωμάτων φυτών (κυτταρίνη), ολιγοσακχαρίτες, πεπτιδία, πρωτεΐνες και άλλες ουσίες μικρού μοριακού βάρους (Cummings J.H. & Mac Farlane G.T., 1991). Αυτές οι ουσίες, μαζί με πρωτεΐνες και άλλα σύνθετα πολυμερή που σχηματίζονται από τον ξενιστή, όπως εκκρίσεις του παγκρέατος, μουκοπολυσακχαρίτες, αποσυντίθενται από υδρολυτικά ένζυμα των βακτηρίων στα συστατικά σάκχαρα και αμινοξέα, τα οποία ακολούθως ζυμώνονται από τα βακτήρια.



Λιπαρά οξέα με κοντή αλυσίδα (SCFAs)

Ανάμεσα στα παρα-προϊόντα των ζυμώσεων υπάρχει μία ομάδα ενώσεων που αναφέρονται με το όνομα Λιπαρά οξέα με κοντή αλυσίδα (SCFAs). Στα θηλαστικά, τα λιπαρά αυτά οξέα είναι : το οξικό οξύ c2, προπιονικό οξύ c3, βουτυρικό οξύ c4, όλα με ευθύ σκελετό. Επίσης, στο κόλον συναντούμαι σε μικρότερα ποσοστά (5 - 10% της ολικής ποσότητας των SCFAs) τα : βαλερικό οξύ c5, εξανικό οξύ c6, ισοβουτυρικό οξύ c4 και ισοβαλερικό οξύ c5. Τα διακλαδισμένα οξέα προκύπτουν από την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Ο ρόλος των λιπαρών αυτών οξέων ήταν γνωστός εδώ και πολλά χρόνια για τα μηρυκαστικά, όπου πάνω από το 70% της ενέργειας στο ζώο προσφέρεται από αυτές τις ουσίες, ενώ στον άνθρωπο υπολογίζεται γύρω στο 20 - 25%. Τα λιπαρά οξέα με κοντή αλυσίδα είναι πηγή ενέργειας για τα κύτταρα του βλεννογόνου του παχέος εντέρου (Wisker E. et al., 1954), (Roediger W.E., 1980). Ανάμεσά τους, το βουτυρικό είναι το πλέον σημαντικό για τον μεταβολισμό των κυττάρων του βλεννογόνου του παχέος εντέρου. Το 70-90% του ποσοστού αυτού του λιπαρού οξέος μεταβολίζεται από αυτά τα κύτταρα (Cook S.I. & Sellin J.H., 1998). Η παρουσία του βουτυρικού οξέος είναι επίσης καθοριστική για την απορρόφηση του νατρίου από το ανθρώπινο έντερο. Η απουσία του δεικνύει ελαττωμένη πρόσληψη νατρίου (Roediger W.E. & Moore A., 1981), (Roediger W.E. & Roe D.A., 1982), (Sellin J.H. & De Soignie R., 1990). Τα λιπαρά αυτά οξέα διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της βασικής στιβάδας των κρύπτων (Mortensen F.V. et al., 1990), επηρεάζουν την κινητικότητα του γαστρεντερολογικού σωλήνα με διαφορετικούς τρόπους, δρώντας είτε τοπικά είτε σε απόσταση, μέσω του νευρικού ή ορμονικού συστήματος (Cherbut et al., 1997). Έχει παρατηρηθεί από μελέτες σε ανθρώπους ότι το προπιονικό οξύ είναι γλυκονεογενετικό και αναστέλλει τη σύνθεση χοληστερόλης από το ήπαρ (Wolover T.M.S. et al., 1991) (Royall D., Wolner T.M.J. et al., 1990). Μέσω αυτής της οδού δεικνύεται η μειωμένη επίδραση της χοληστερόλης που παράγεται από ίνες, οφειλόμενη στην παραγωγή προπιονικού από τα βακτήρια του παχέος εντέρου (Jenkins D.J., 1989).

Σε ασθενείς με φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου, όπως ελκώδης κολίτιδα, εκκολπωματίτιδα, τα ποσοστά των λιπαρών οξέων με κοντή αλυσίδα έχουν βρεθεί χαμηλά (Clausen et al., 1991). Τα λιπαρά αυτά οξέα έχουν προταθεί ως θεραπευτικοί παράγοντες ασθενειών του εντέρου (Korude et al., 1988). Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή αυτή είναι αντικρουόμενα (Harig J.M. et al., 1989), (Clausen M.R. et al., 1991), (Galf P., 1985), (Sakata T., 1978). Δίαιτα με υψηλό ποσοστό ινών πιστεύεται ότι ελαττώνει την ανάπτυξη καρκίνου



στο παχύ έντερο. Βέβαια, προσφάτως υπάρχουν δεδομένα που δεν στηρίζουν την άποψη αυτή (O' Keefe S.J. et al., 1999), (Reddy B.S., 1999). Ωστόσο, υπάρχουν αρκετά δεδομένα που δεικνύουν τα ευεργετικά αποτελέσματα των ινών και των παραγώγων αυτών λιπαρών οξέων με κοινή αλυσίδα. Ο Mc Intyre και οι συνεργάτες του, το 1993, ανέλυσαν την επίδραση των διαλυτών και αδιάλυτων ινών ως προς την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου σε αρουραίους. Παρατήρησαν ότι η παραγωγή βουτυρικού οξέος από τις αδιάλυτες ίνες προσφέρει μεγαλύτερη προστασία στον ξενιστή ως προς την εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου.

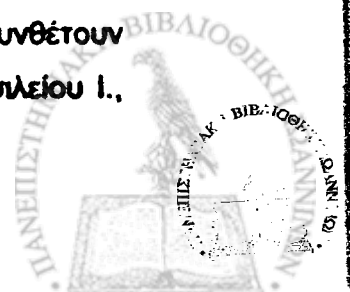
Σε ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από πολύποδα, καρκίνο, φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, που έγινε μέτρηση της αναλογίας των λιπαρών οξέων με κοινή αλυσίδα, σε δείγματα από υποκλισμό πριν τη σιγμοειδοσκόπηση, παρατήρησαν υψηλότερο ποσοστό οξικού οξέος και χαμηλότερο βουτυρικού σε σύγκριση με υγιείς ανθρώπους (Weaver G.A. et al., 1993).

Πολλές επιστημονικές μελέτες αναφέρουν την επίδραση των λιπαρών οξέων με κοινή αλυσίδα πάνω σε κλώνους επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου, που βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης καρκινώματος. Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι προκαλείται απόπτωση των αδενωματικών ή καρκινικών κυττάρων και ενδείκνυται η ιδιαίτερη δράση του βουτυρικού στην διαδικασία αυτή (Hague A. et al., 1999), (Κλυ J., 1999), (Taneke Y. et al., 1990), (Hague A. et al., 1997).

Στην παραγωγή προϊόντων από τα δυνητικά αναερόβια και τα αναερόβια, όπως πτηνικά λιπαρά οξέα, αλκοόλες, γαλακτικό, ηλεκτρικό οξύ, στηρίζεται η ταχεία διάγνωση των αναερόβιων λοιμώξεων με αέριο χρωματογραφία (Bezirtzoglou E., 1999).

Σύνθεση βιταμινών

Τα βακτήρια *E. coli* και *Bacteroides fragilis* συνθέτουν βιταμίνη Κ, η οποία είναι απαραίτητη για την πήκτικότητα του αίματος, κυρίως σε περιόδους όπου η διαίτα είναι φτωχή σε βιταμίνες (Conly J.M. & Stein R.T., 1992). Άλλα βακτήρια του εντέρου βιοσυνθέτουν φυλλικό οξύ (αντικαρκινική δράση). Βακτήρια του λεπτού εντέρου, καθώς επίσης και της στοματικής κοιλότητας, συνθέτουν νικοτινικό οξύ, βιοτίνη, βιταμίνες Β (Β₁, Β₆, Β₁₂) (Λεγάκης Ν., Παπαβασιλείου Ι., 1981).



2. Συμμετοχή στην άμυνα του οργανισμού

Η εντερική χλωρίδα εμποδίζει την εγκατάσταση παθογόνων μικροοργανισμών με διάφορους μηχανισμούς.

Φαινόμενο φραγμού (Barrier effect)

Ένας σημαντικός ρόλος της φυσιολογικής χλωρίδας είναι η ικανότητά της να αναγνωρίζει τους εξωγενείς παθογόνους μικροοργανισμούς, προκαλώντας την αποβολή τους και προφυλάσσοντας με αυτό τον τρόπο τον ξενιστή. Στο υγιές άτομο υπάρχει ισορροπία μεταξύ εντερικής χλωρίδας και ξενιστή, που καθορίζεται από το φαινόμενο φραγμού (Barrier effect) (Μπεζιρτζόγλου Ε., 1994).

Υπάρχουν δύο τύποι φραγμού :

- α) *Δραστικός φραγμός*, που συντελεί στην γρήγορη αποβολή του εξωγενούς μικροοργανισμού και
- β) *Ατελής φραγμός*, που επιτρέπει την παραμονή του μικροοργανισμού σε χαμηλά επίπεδα, χωρίς να καθίσταται παθογόνος.

Ο ακριβής μηχανισμός που εμποδίζεται η εγκατάσταση εξωγενών βακτηρίων δεν έχει διευκρινισθεί. Πολλές θεωρίες έχουν προταθεί :

1. Η παραγωγή κατώτερων λιπαρών οξέων από τα αναερόβια φαίνεται να παίζει ρόλο.
2. Η θεωρία του «spatial arrangement», το γεγονός δηλαδή ότι η εντερική χλωρίδα καταλαμβάνει την επιφάνεια του εντερικού βλεννογόνου και δεν υπάρχει ελεύθερος χώρος για την εγκατάσταση παθογόνων εξωγενών μικροοργανισμών.
3. Συναγωνισμός των βακτηρίων για μία ουσία που βρίσκεται σε περιορισμένη ποσότητα και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του αποβληθέντος.
4. Τροποποιήσεις του δυναμικού οξειδοαναγωγής και του pH.
5. Παραγωγή από βακτηριακά στελέχη ανασταλτικών ουσιών (οργανικά οξέα και αντιβιοτικά).
6. Η πέψη ουσιών από ορισμένα βακτήρια αποτελεί πηγή ενέργειας για άλλα, π.χ. η *Veillonella* χρησιμοποιεί το γαλακτικό οξύ των *Streptococcus* και *Bifidobacterium*.



3. Συμμετοχή στην κυτταρική ανοσία

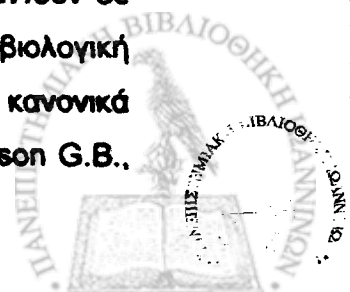
Η προσαρμογή του ανοσοβιολογικού συστήματος του βλεννογόνου και γενικότερα του εντέρου είναι απαραίτητη έναντι των μικροοργανισμών της φυσιολογικής μικροχλωρίδας, για τον περαιτέρω περιορισμό της έκθεσης των ιστών του σώματος. Είναι ξεκαθαρισμένο ότι το έντερο υφίσταται ουσιαστικές αλλαγές προσαρμοζόμενο στους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς της χλωρίδας του.

Τα περισσότερα πειράματα που αποδεικνύουν την ορθότητα της προηγούμενης πρότασης διεξήχθησαν μεταξύ αξενικών (ζώα χωρίς μικρόβια, «germ free») πειραματόζων και ολοξενικών (ζώα με κανονική φυσιολογική χλωρίδα). Η σύγκριση του εντερικού σωλήνα των δύο αυτών ομάδων πειραματόζων δείχνει εντυπωσιακά αποτελέσματα.

Ο λεμφοποιητικός ιστός είναι πολύ περισσότερος στα φυσιολογικά παρά στα αποκαλούμενα «germ free» πειραματόζωα (Duclozeau R. & Raibaud P., 1979), (Guy Grand et al., 1978). Στα «germ free» πειραματόζωα το εντερικό τοίχωμα είναι λεπτό και εύθραυστο, ενώ παρατηρείται παραγωγή αυξημένης ποσότητας εντερικής βλέννης (Duclozeau R., 1979). Ακόμη επηρεάζεται η μορφολογία του εντερικού αυλού (Alam M. et al., 1994) και η κινητικότητά του (Husebye E. et al., 1994). Τα αξενικά πειραματόζωα είναι πτωχά σε κύτταρα που παράγουν ανοσοσφαιρίνες. Οι πλάκες του Peyer βρίσκονται σε ατροφία (Duclozeau R., 1979).

4. Συμμετοχή στη χυμική ανοσία

Αντισώματα έναντι συστατικών της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας ανευρίσκονται σε μεγάλη αναλογία στον φυσιολογικό πληθυσμό. Τα αντισώματα αυτά σχηματίζονται κατόπιν αντιγονικού ερεθισμού και απορροφούνται από το έντερο (Duclozeau R., 1979), (Μπεζιρτζόγλου Ε., 1994). Στα «germ free» πειραματόζωα έχουμε χαμηλό επίπεδο ανοσοσφαιρινών λόγω μη ύπαρξης αντιγονικού ερεθισμού. Αν και τα στείρα μικροβίων πειραματόζωα απαντούν σε αντιγονικούς ερεθισμούς, ο τρόπος με τον οποίο εκδηλώνεται η ανοσοβιολογική απάντηση διαφέρει σε σύγκριση με αυτό που παρατηρείται στα κανονικά πειραματόζωα. Το ύψος της πρωταρχικής αντίδρασης ελαττώνεται (Olson G.B., Wostmen B.S., 1966).



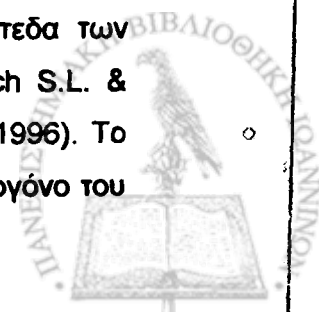
Σε έναν φυσιολογικό άνθρωπο, το ανοσοβιολογικό σύστημα παράγει 5 γραμμάρια IgA κάθε ημέρα και πολλά T κύτταρα στην πεταλοειδή ουσία και το επιθήλιο (Ailse L. Hart et al., 2002). Άνθρωποι οι οποίοι δεν έχουν IgA στον εντερικό αυλό τους, δεν εμφανίζουν συστηματικές μολύνσεις αλλά έλλειψη σε ουδετερόφιλα και μακροφάγα έχει ως συνέπεια να υποφέρουν από ασθένειες του εντέρου, έστω κι αν έχουν T και B κύτταρα στο βλεννογόνο τους (Shiloh M.V. et al., 1999), (Johnston R.B., 2001). Μολονότι ο βλεννογόνος παράγει T και B λεμφοκύτταρα σε μεγάλη ποσότητα, δεν είναι μεγάλης λειτουργικής σημασίας γιατί τα βακτήρια της φυσιολογικής μικροχλωρίδας δεν διεισδύουν στους ιστούς, αλλά η παραγωγή τους είναι το τίμημα για μια πιθανή παθογόνο κατάσταση.

Μακροφάγα που λαμβάνονται από στείρα μικροβίων πειραματόζωα πέπτουν τα ξένα αντιγόνα πιο αργά από αυτά φυσιολογικών ζώων (Bauer H. et al., 1964). Η ιδιότητα αυτή θεωρείται πολύ σημαντική για τη μεταβίβαση των αντιγονικών πληροφοριών. Το ποσό του συμπληρώματος φαίνεται επίσης να είναι χαμηλότερο στα στείρα μικροβίων πειραματόζωα.

Μικροχλωρίδα παχέος εντέρου

Το περισσότερο αποικισμένο με μικροοργανισμούς κομμάτι του γαστρεντερολογικού σωλήνα είναι το παχύ έντερο. Η πλειονότητα των ερευνητικών εργασιών αφορά την ανάλυση της μικροχλωρίδας των περιττωμάτων και είναι γεγονός ότι περιορισμένες πληροφορίες υπάρχουν για άλλα τμήματα του εντέρου, όπως π.χ. την απόφυση ή την μικροχλωρίδα του βλεννογόνου. Υποστηρίζεται από πολλούς ερευνητές ότι η μικροχλωρίδα των περιττωμάτων είναι η ίδια με του βλεννογόνου, αλλά σε πολλά ζώα, στα οποία έγινε ανάλυση της μικροχλωρίδας του βλεννογόνου και αυλού, παρατηρήθηκαν διαφορές (Hawksworth G.M., 1971).

Στα κόπρανα ανθρώπων, η αναλογία αναερόβιων προς αερόβια είναι της τάξης 100 έως 1.000 φορές περισσότεροι αναερόβιοι μικροοργανισμοί έναντι των αερόβιων (Finegold S.M. et al, 1983). Η αντίστοιχη αναλογία στον βλεννογόνο είναι 1/10 αερόβιων μικροοργανισμών έναντι των αναερόβιων. Επίσης, ο ολικός αριθμός βακτηρίων ανά γραμμάριο ιστού είναι 10^6 cfu έναντι $10^{10} - 10^{12}$ βακτηρίων ανά γραμμάριο κοπράνων. Σε μερικές εργασίες, τα επίπεδα των μικροοργανισμών ανέρχονται σε 10^9 cfu ανά γραμμάριο ιστού (Peach S.L. & Tabaqchali S., 1982), (Poxton I.R. et al., 1997), (Hartley M.G. et al., 1996). Το *Bacteroides* spp. έχει απομονωθεί σε υψηλούς αριθμούς από το βλεννογόνο του



εντέρου και τα συχνότερα απομονωθέντα είδη είναι τα *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. fragilis* (Namavar F., 1989).

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που παίζουν ρόλο στη σύνθεση της φυσιολογικής μας μικροχλωρίδας είναι η διαίτα. Επιπλέον, είναι ένας παράγοντας που μπορούμε να τον χειρισθούμε. Γενικά, άνθρωποι των οποίων η διαίτα στηριζόταν κυρίως σε υδατάνθρακες, στα κόπρανά τους παρουσίασαν αυξημένο αριθμό από *Bifidobacterium*.

Διαίτα βασισμένη σε λίπη δίνει αυξημένο ποσοστό των *Bacteroides* και μία στοιχειακή διαίτα φέρει ελαττωμένους αριθμούς από *Streptococcus* και *Lactobacillus* στα κόπρανα. Μεγάλες αλλαγές παρατηρούνται με την επίδραση της διατροφής στη μεταβολική ικανότητα της χλωρίδας. Μία στοιχειακή διαίτα στους ανθρώπους οδηγεί στη μείωση του μεταβολισμού της χοληστερόλης και των χολικών αλάτων και την παραγωγή φαινολών (Aitoe L. Hart et al., 2002).

Ας παρατηρήσουμε μέσα από διαφορετικές μελέτες στα περιπτώματα ανθρώπων με διαφορετική εθνικότητα, τρόπο ζωής, διατροφής, το ποσοστό και επίπεδο απομόνωσης ορισμένων κοινών βακτηρίων. Τα *Clostridium* βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα ανθρώπινων περιπτώσεων με ένα μέσο όρο \log_{10} 9.8 ανά γραμμάριο. Το *C. perfringens* είναι το κυρίαρχο είδος, αλλά η κυριαρχία του ποικίλλει ανάλογα με τον τρόπο διατροφής και την εθνικότητα. Το βακτήριο αυτό ήταν παρόν στο 73% των δειγμάτων από Γαλλομένους, με μέσο \log_{10} 7.6, αλλά απουσίαζε παντελώς στους αυστηρά χορτοφάγους (Kleesen B., Bezirtzoglou E. et al., 2000). Όσον αφορά τις άλλες ομάδες ανθρώπινου πληθυσμού, ο μικροοργανισμός ήταν παρών (Draser B.J. et al., 1976). Οι *Streptococcus* ή *Enterococcus* βρέθηκαν σε όλες τις ομάδες ανθρώπων με μέσο όρο \log_{10} 8.9 ανά γραμμάριο και ο *Enterococcus faecalis* ήταν το συχνότερο απομονωθέν είδος. Ακόμη βρέθηκαν τα είδη *E. faecium*, *S. bovis*, *S. lactis*, *S. mitis*, *S. sanguis*. Από όλες τις ομάδες, σε ποσοστό 93% απομονώθηκε η *Escherichia coli*, με μέσο όρο \log_{10} 8.6 ανά γραμμάριο. Τα είδη του *Citrobacter* απομονώθηκαν συχνά, αλλά σε μικρούς αριθμούς. Το γένος *Bacillus* απομονώθηκε από το 82% των δειγμάτων, με μέσο όρο \log_{10} 5.2 ανά γραμμάριο. Ο *S. aureus* ήταν παρών στο 11% των δειγμάτων, με μέσο όρο \log_{10} 5.4 ανά γραμμάριο (Kleesen B., Bezirtzoglou E. et al., 2000). Επίσης, φαίνεται ότι οι διάφοροι ορότυποι του *C. perfringens* και οι αριθμοί του ποικίλλουν από εβδομάδα σε εβδομάδα, στα κόπρανα των νεογνών (Bortello, 1981), (Bezirtzoglou E., 1991).

Η παρακολούθηση της μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου κυρίως επιτυγχάνεται με την ανάλυση των περιπτώσεων. Ευκόλως η μικροχλωρίδα θεωρείται ως μία ομοιογενής ολότητα, στην πραγματικότητα όμως είναι κάπως δύσκολο να ισχύει αυτό, γιατί υπάρχουν πολλά διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα

και μεταβολικές φωλιές, όπως ο βλεννογόνος, η βλέννα, ο αυλός με διάφορα σωματίδια μέσα σε αυτόν. Όπου υπάρχουν κατάλληλες επιφάνειες, τα βακτήρια και άλλοι μικροοργανισμοί φαίνεται πως έχουν την έμφυτη τάση να σχηματίζουν λεπτά στρώματα με αποικίες (Biofilms). Τα λεπτά αυτά στρώματα συνήθως αποτελούνται από πολλά είδη μικροβίων, που βρίσκονται σε μία συντονισμένη σχέση μεταξύ τους και με το μικροπεριβάλλον τους (Bradshaw D.J. et al., 1997).

Τα βακτήρια που μεγαλώνουν σε «biofilms» συχνά συμπεριφέρονται διαφορετικά από αυτά που δεν είναι αγκυροβολημένα σε μία επιφάνεια, ακόμα και αν ανήκουν στο ίδιο μικροβιακό είδος. Ο μεταβολισμός τους αλλάζει και εμφανίζουν μεγάλη αντίσταση στα αντιβιοτικά (Anwar H. et al., 1990), (Mozes N. et al., 1992), (Van Loosdrecht M.C.M., 1990). Τα βακτήρια των «biofilms» στο παχύ έντερο είναι πιθανότερο να έχουν άμεση σχέση με την αποσύνθεση των σύνθετων αδιάλυτων πολυμερών της βλέννας ως προς τα βακτήρια του αυλού (MacFarlane G.T. et al., 1997).

Ένα παράδειγμα που αποκαλύπτει τις σχέσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των μικροοργανισμών των «biofilms» είναι οι υποχρεωτικά χρησιμοποιούντες το H_2 μικροοργανισμοί (Μεθανογόνα αρχαιοβακτήρια, όπως το *Methanobrevibacter smithii* που αναπτύσσεται πάνω στη βλέννα) και οι παράγοντες H_2 . Οι υποχρεωτικά χρησιμοποιούντες H_2 δεν μπορούν να πέσουν τις γλυκοπρωτεΐνες της βλέννας και στηρίζονται τροφικά στα βακτήρια που ζυμώνουν σάκχαρα και πρωτεΐνες παράγοντας H_2 και CO_2 (Conrad R. et al., 1995).

Οι πληθυσμοί βακτηρίων πάνω στο βλεννογόνο είναι δύσκολο να μελετηθούν σε υγιείς ανθρώπους. Λίγες εργασίες που υπάρχουν από βιοψίες προτείνουν ότι πάνω στο βλεννογόνο συνήθως συναντούμε τα γένη *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium* και Gram θετικούς κόκκους (Croucher S.G., 1983), (Edmiston C.E. et al., 1982).

Ο βλεννογόμος του εντέρου αποτελείται από ένα στρώμα επιθηλιακών κυττάρων, κάτω από το οποίο είναι συγκεντρωμένο ένα μεγάλο μέρος των ανοσοβιολογικών και βιοχημικών πηγών του σώματός μας.

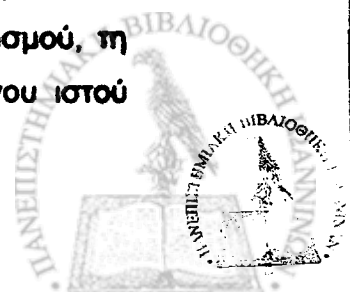
Τα κύτταρα του επιθηλίου αυτού φέρουν τον γλυκοκάλυκα που αποτελείται κυρίως από γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια. Πάνω στον γλυκοκάλυκα είναι η βλέννα, ένα στρώμα που κυμαίνεται μεταξύ 100 - 200 μm (Pullen R.D. et al., 1994). Η βλέννα αποτελείται από ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και βλεννίνες, που εκκρίνονται από τα καλυκοειδή κύτταρα και σχηματίζουν αυτό το ιξώδες - ελαστικό στρώμα. Πλην της βλέννας, υπάρχει ο αυλός του εντέρου. Πάνω στο υδατανθρακικό μέρος των γλυκοπρωτεϊνών και γλυκολιπιδίων προσδένονται μόρια, όπως οι λεκτίνες, προσκολλητίνες (adhesins), βακτηριακές τοξίνες, ορμόνες, αντιβιοτικά. Κατά αυτό τον τρόπο, δηλαδή μέσω των

προσκολλητινών τους, τα βακτήρια αγκυροβολούν πάνω στον βλεννογόνο και σχηματίζουν μια μικροβιακή κοινότητα που βρίσκεται σε ισορροπία με το επιθήλιο του ξενιστή. Η κοινότητα αυτή των μικροβίων κατορθώνει να διεγείρει το ανοσοβιολογικό σύστημα του ξενιστή (Schiffin E.J. et al., 1997), ούτως ώστε να καταστεί ετοιμοπόλεμο, για να μην επιτρέψει το αγκυροβόλημα παθογόνων μικροοργανισμών στον βλεννογόνο και επιπλέον να προστατεύει το επιθήλιο από τη δράση τοξινών, μεταβολιτών και ενζύμων (Allen A., 1981). Στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου παρατηρούνται μειωμένα ποσά από σialo-θειο-βλεννίνες στον βλεννογόνο του εντέρου καθώς επίσης και γλυκοπρωτεΐνες που απομονώθηκαν από τον βλεννογόνο ασθενών με καρκίνο εμφάνιζαν αυξημένα ποσοστά αρνητικά φορτισμένων γλυκοπρωτεϊνών.

Η επιδεκτικότητα των ιστών σε ασθένειες σχετίζεται με την παρουσία ή απουσία της κατάλληλης γλυκοσυλίωσης, που έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή της ομοιόστασης επιθηλίου μικροοργανισμών (Μουρίσου Μ., 1997). Υπάρχουν πολλές αλλαγές στους ολιγοσακχαρίτες της επιφάνειας των κυττάρων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Οι αλλαγές αυτές συνδέονται με την μη φυσιολογική δράση των γλυκοτρανσφερασών στα κύτταρα του επιθηλίου. Ο καρκίνος στο παχύ έντερο έχει συσχετισθεί με τη μειωμένη δραστηριότητα πολλών γλυκοτρανσφερασών, π.χ. α3-sialoτρανσφεράση, β4-γαλακτοσολτρανσφεράση (Brockhausen I., 1999).

Η ομοιόσταση της μικροχλωρίδας αναπτύσσεται μεταξύ του επιθηλίου, του αυλού και του ανοσοβιολογικού συστήματος του ξενιστή (Zinkemagel et al., 1996), (Wren B.W. et al., 2000). Το ανοσοβιολογικό σύστημα έχει εξαιρετική ικανότητα να αναγνωρίζει τα αντιγόνα και διαθέτει ακόμη ενισχυτικούς μηχανισμούς εναντίον αυτών (Hoffman T.A.F., 1999). Οι φλεγμονώδεις ασθένειες του εντέρου ως χαρακτηριστικό τους έχουν την χρόνια καταστροφή αυτής της σχέσης της ομοιόστασης μεταξύ αυτών των παραγόντων.

Τελευταία, υπάρχει μία προσπάθεια κατανόησης αυτής της διαταραχής της ομοιόστασης μέσω της ενεργοποίησης του ανοσοβιολογικού συστήματος και της καταστροφής των ιστών (Martin H.M. & Rhodes, 2000). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι το βακτήριο *Helicobacter pylori* που συμμετέχει στο πεπτικό έλκος. Από αυτή τη σχέση έχουμε μάθει ότι η εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων είναι αλληλεπίδραση των συμβιωτικών βακτηρίων και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του ξενιστή. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν το επίπεδο αποικισμού, τη φύση, τη δύναμη της φλεγμονής και την καταστροφή του υποκείμενου ιστού (Covecci et al., 1999), (Blanchard T.G. et al., 1999).



Προβιοτικά

Ο όρος «προβιοτικά» αναφέρεται σε «ζωντανά μικρόβια» με ωφέλιμες ιδιότητες για τον ξενιστή, που δρουν προωθούντα ή υποστηρίζοντα μια ωφέλιμη, δυναμική ισορροπία μεταξύ των αυτόχθονων μικροβιακών πληθυσμών (Holzapfel et al., 2001), (Bezirtzoglou E., 2000).

Τα στελέχη LAB (Lactic Acid Bacteria) είναι οι κυριότεροι αντιπρόσωποι των προβιοτικών. Η προμήθειά τους γίνεται είτε μέσω της τροφής είτε μέσω διαφόρων φαρμακευτικών προϊόντων. Τα LAB στελέχη αποικίζουν πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα πλούσια σε θρεπτικά, όπως τροφές, φυτικά υπολείμματα, τα οποία είναι δυνατόν να ζυμωθούν και αποσυντεθούν. Στον άνθρωπο, τα στελέχη αυτά (LAB) βρίσκονται στη στοματική κοιλότητα, στο έντερο και στον κόλπο της γυναίκας. Τα στελέχη LAB που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά προέρχονται κυρίως από το έντερο του ανθρώπου. Πριν τη χρήση τους θα πρέπει να έχουν υποβληθεί σε εμπειριστατωμένο έλεγχο για την ασφάλειά τους. Τα προβιοτικά διατίθενται στο εμπόριο σε λυόφιλο μορφή ή κάψουλες ή ως συμπληρώματα διατροφής ή φαρμακευτικά σκευάσματα, αλλά κυρίως συναντώνται ως τρόφιμα με ιδιαίτερη έμφαση στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Οι κυριότερες ιδιότητες που θα πρέπει να διαθέτει ένας προβιοτικός μικροοργανισμός είναι οι ακόλουθες : 1) να ασκεί ωφέλιμη δράση στον ξενιστή, 2) να είναι μη παθογόνος και τοξικός, 3) να μπορεί να επιβιώνει σε υψηλά επίπεδα στα τρόφιμα και άλλα σκευάσματα, 4) να έχει τη δυνατότητα αποίκησης στο έντερο και να συμμετέχει στις διαδικασίες μεταβολισμού (Bezirtzoglou, 2000). Ορισμένα είδη βακτηρίων που ανήκουν στα προβιοτικά και έχουν αποδεδειγμένα ωφέλιμη επίδραση στον ξενιστή είναι τα ακόλουθα : *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. johnsoii*, *L. crispatus*, *Bifidobacterium bifidum* (Salminen et al., 1998), (Schular-Malyoth et al., 1968).

Στις ωφέλιμες λειτουργίες των προβιοτικών σε σχέση με τον ξενιστή αναφέρονται: 1) θρεπτικά οφέλη, 2) παραγωγή βιταμινών, διαθεσιμότητα χημικών στοιχείων και ιχνοστοιχείων, 3) παραγωγή απαραίτητων πεπτικών ενζύμων, π.χ. β-γαλακτοσιδάση, 4) διατήρηση του εντερικού φραγμού (barrier effect), 5) θεραπεία μολυσματικής διάρροιας (κατά τη διάρκεια ταξιδιού, ιική διάρροια παιδιών, 6) θεραπεία διάρροιας που οφείλεται σε αντιβιοτικά ή ακτινοβολίες, 7) μείωση δράσης χοληστερόλης, 8) διέγερση του ανοσοβιολογικού συστήματος, 9) ενίσχυση της κινητικότητας του εντέρου, 10) ανακούφιση από δυσκοιλιότητα, 11) προσκολλητικότητα στον εντερικό βλεννογόνο και αποτροπή

προσκόλλησης των εντεροπαθογόνων, 12) τροποποίηση της διαπερατότητας του εντερικού βλεννογόνου και διατήρηση της ακεραιότητάς του, 13) ωφέλιμη τροποποίηση της εντερικής χλωρίδας, 14) τροποποίηση της ενζυμικής βακτηριακής ικανότητας στο έντερο και ιδιαίτερα αυτής που σχετίζεται με καρκινογόνο επαγωγή (Holzerfel et al., 1998), (Βεζιρτζογίου, 2000).

Ορισμένες από τις λειτουργίες αυτές δεν είναι πλήρως επαληθευμένες από κλινικά πειράματα. Η υπόθεση για τα λιπίδια υποστηρίζει ότι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα οδηγούν σε αύξηση της χοληστερόλης στο αίμα. Υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν το ρόλο των LAB βακτηρίων με τη μείωση των λιπιδίων στο αίμα (Gilliland S.E., Nelson C.R. et al., 1985). Βέβαια, αυτό δεν είναι πλήρως αποδεδειγμένο. Η επίδραση των προβιοτικών βακτηρίων στη διέγερση του ανοσοβιολογικού συστήματος έχει αποδειχθεί πλήρως. Στη διέγερση της μη ειδικής άμυνας του οργανισμού έχει παρατηρηθεί ότι μεσολαβούν και οι πλάκες του Peyer, οι οποίες βρίσκονται σε αφθονία στο λεπτό έντερο (Brussart D. & Schiffnin E.J., 1997). Επίσης, διέγερση της μη ειδικής άμυνας παρατηρήθηκε σε υγιή και υπερευαίσθητα άτομα, από το στέλεχος *Lactobacillus GG* (Pelto et al., 1999). Φαίνεται ότι τα προβιοτικά στελέχη αποκίζουν παροδικά τον βλεννογόνο χωρίς να εισβάλουν σε αυτόν, προκαλώντας την αύξηση των IgA ανοσοσφαιρινών (Schiffnin et al., 1999) και των προ-φλεγμονικών και αντι-φλεγμονικών κυτοκινών, με αποτέλεσμα να ανακουφίζουν και ρυθμίζουν την υπερευαίσθησία (Isolaui et al., 2001). Πολλά από τα προβιοτικά βακτήρια εκκρίνουν πολυσακχαρίτες, οι οποίοι βοηθούν στην προσκολλητικότητα των βακτηρίων στο επιθήλιο του εντέρου (Holzarfel W.H. et al., 1998), (Tuomola E.M. et al., 1998).

Η βελτίωση που παρατηρείται σε περπτώσεις διάρροιας και γαστρεντερίτιδας κατόπιν χορήγησης LAB στελεχών *Lactobacillus GG*, *L. casei*, *B. bifidum*, λοίμωξης από *S. typhimurium* κατόπιν χορήγησης ζωντανών γιαουρτικών με LAB, θεραπεία της ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας από *C. difficile* με χορήγηση *Lactobacillus GG* θεωρείται ότι οφείλεται στην δυνατότητα αυτών των στελεχών να προσκολλούνται στο επιθήλιο και να διεγείρουν το ανοσοβιολογικό σύστημα (Salminen & Tuomola, 1998).

Υψίστης σημασίας είναι επίσης η παρατήρηση ότι ορισμένα στελέχη LAB παρουσιάζουν αντικαρκινογόνο δράση. Αυτό οφείλεται στην ικανότητα των στελεχών αυτών να προλαμβάνουν ή να μειώνουν την καταστροφή του DNA στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης. Αντικαρκινικά χαρακτηριστικά εκδηλώνουν τα είδη *B. infantis*, *B. bifidum*, *L. paracasei* και *L. acidophilus* έναντι της MCF7 σειράς καρκινικών κυττάρων του στήθους (Biffi et al., 1997). Σε αρουραίους, τα είδη *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. gasseri*, *B. longum* και *B. breve* αποδείχθηκε ότι

αναστέλλουν την καταστροφή του DNA, η οποία επάγεται στα κύτταρα του παχέος εντέρου από την καρκινογόνο ουσία 1,2 διμεθυλουδροζαμίνη (Isolaui et al., 1999).

Ανθρωποι, οι οποίοι καταναλώνουν τηγανισμένα κρέατα, είναι γνωστό ότι αυξάνουν την μεταλλακτική δραστηριότητα των ούρων και περιπτώματων εξαιτίας της παρουσίας καρκινογόνων ουσιών στο μαγειρεμένο κρέας. Επιπροσθέτως, όταν εθελοντές κατανάλωσαν *Lactobacillus*, οι εκκρίσεις των μεταλλαξιόγόνων ελαττώθηκαν (Lidbeck, 199..).

Η ασφάλεια και η μη παθογενετικότητα, από ένα καινούργιο στέλεχος που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικό, είναι μεγάλης σημασίας. Τα LAB βακτήρια χρησιμοποιούνται επί σειρά ετών ως ασφαλή (GRAS), ενώ για κάποια στελέχη των *Streptococcus* και *Enterococcus* αμφισβητείται η ασφάλειά τους, εφόσον έχουν αναφερθεί σε βακτηριαιμίες, ενδοκαρδίτιδες και διάρροιες.

Για την καθιέρωση ενός στελέχους ως προβιοτικού προτείνεται η ισχύς ορισμένων κριτηρίων :

1. Μελέτη των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του στελέχους (βιοχημικοί χαρακτήρες, προσκολλητικότητα, διεισδυτικότητα, τοξικότητα).
2. Φαρμακοκινητική του στελέχους (χρόνος επιβίωσης, δραστηριοποίηση στο έντερο, συσχετισμός δόσης ανταπόκρισης, αποβολή στα κόπρανα).
3. Αλληλεπίδραση στελέχους ξενιστή, ανταγωνιστικότητα με άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς.
4. Ενδείξεις μη παρενεργειών στον γενικό πληθυσμό από την κατανάλωση του προβιοτικού (Salminen et al., 2000), (Bezirtzoglou E., 2000).

Μερικοί υδατάνθρακες που δεν πέπτονται αλλά ζυμώνονται, μπορούν επιλεκτικά να διεγείρουν στο παχύ έντερο την ανάπτυξη βακτηρίων, όπως τα *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* και *Eubacterium*. Οι ολιγοσακχαρίτες αυτοί θεωρούνται ωφέλιμοι για τον ξενιστή και καλούνται «prebiotics» (Cumpling et al., 2001). Η ινουλίνη και οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες είναι τα περισσότερο γνωστά «prebiotics». Πολλά σκευάσματα περιέχουν συγχρόνως τα προβιοτικά στελέχη και αυτούς τους ολιγοσακχαρίτες και ονομάζονται με μία λέξη «συμβιωτικά» (synbiotic). Υπάρχουν μελέτες που δείχνουν τα θετικά αποτελέσματα της εφαρμογής των «prebiotics» στη δίαιτα των ανθρώπων. Στο λεπτό έντερο αναφέρεται η θετική επιρροή των «prebiotics» στην πέψη της ζάχαρης και απορρόφησής της, στον μεταβολισμό των λιπιδίων και της γλυκόζης καθώς και στην προστασία των καρδιαγγειακών νοσημάτων από αναγνωρισμένους επικίνδυνους παράγοντες (Schepach et al., 2001). Στο παχύ έντερο, η ζυμωπική παραγωγή των λιπαρών οξέων με κοντή αλυσίδα, θεωρείται ότι έχει θετική

επίδραση στην πρόληψη ανάπτυξης καρκίνου (Scherrach et al., 2001). Σε υγιείς ανθρώπους, χορήγηση 40 γραμμαρίων πουλίνης καθημερινά, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των *Bifidobacterium* (Kleesen et al., 1997).

Βεβαιωμένα χαρακτηριστικά και αποτελέσματα των prebiotics είναι τα εξής :

1. Είναι μη πεπτώμενοι ολιγοσακχαρίτες, με μικρό ενεργειακό περιεχόμενο (<9 KJ/γραμ.)
2. Αυξάνουν τον όγκο των περιττωμάτων.
3. Τροποποιούν την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου α) διεγείροντας την ανάπτυξη ωφέλιμων βακτηρίων (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* και *Eubacterium* spp.), β) αναστέλλουν την ανάπτυξη μη επιθυμητών βακτηρίων (*Clostridium*, *Bacteroides*).

Χαρακτηριστικά των prebiotics που δεν έχουν επιβεβαιωθεί και απαιτούνται με την εύρεση κατάλληλων ουσιών είναι : 1) η προστασία από εντερικές μολύνσεις, 2) ο χειρισμός ανοσοβιολογικής απάντησης, 3) η προστασία από τον καρκίνο του παχέος εντέρου και τέλος 4) η μείωση του ποσού της χοληστερόλης στον ορό του αίματος (Scherrach et al., 2001).

Στο έντερο μας εμφανίζεται μια ισορροπημένη κοινότητα, που φαίνεται να αποτελείται από τους «καλούς» μικροοργανισμούς, όπως *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bifidus* και άλλους, ενώ από την άλλη πλευρά είναι οι «κακοί» μικροοργανισμοί, όπως *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι σε αντιπαλότητα (Bezirtzoglou E., 1990). Όταν υπερισχύουν οι «κακοί» μικροοργανισμοί, έχουμε ασθένεια. Η αύξηση του αριθμού των «καλών» μικροοργανισμών με ταυτόχρονα χαμηλά επίπεδα των «κακών» μικροοργανισμών, έχουν ως αποτέλεσμα τη διαφύλαξη της υγείας του ξενιστή.

Εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων

Οι φυσιολογικοί άνθρωποι δεν εμφανίζουν κανένα πρόβλημα με τη φυσιολογική τους μικροχλωρίδα, η οποία έχει συνεξελιχθεί μαζί με τον άνθρωπο. Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη μιας δυναμικής ισορροπίας (ομοιόστασης) ανάμεσα στον άνθρωπο και τα μικρόβια, σε διατάραξη της οποίας παρουσιάζονται παθολογικές καταστάσεις (Ducluzeau R. et al., 1979), (Λεγάκης Ν., Παπαβασιλείου Ι., 1981), (Μπεζιρτζόγλου Ε., 1994), (Ailsa L. Hart et al., 2002). Βέβαια, δεν αποκλείεται η δυναμική ισορροπία που αναπτύσσεται ανάμεσα στον

ξενιστή άνθρωπο και τα μικρόβια του εντέρου του, με την αλλαγή του τρόπου ζωής (π.χ. διατροφή) του ξενιστή, να μπορεί να οδηγηθεί σε μία άλλη δυναμική ισορροπία, ανώτερη προσαρμοστικά, εμφανιζόμενη στον ξενιστή ως μακροβιότητα (Metchnikoff, 1908). Τα τελευταία χρόνια, έχει αναζωπυρωθεί η έρευνα στον τομέα αυτόν, διαμέσου της εφαρμογής των προβιοτικών στη διαίτα του ανθρώπου.

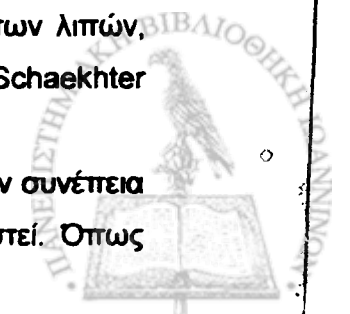
Η φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα, εκτός από τη φυσιολογική σημασία της για τον άνθρωπο και τον πρωταρχικό ρόλο της στην εμφάνιση ενδογενών λοιμώξεων, είναι δυνατόν σε ορισμένες περιπτώσεις να συμβάλλει στη δημιουργία ή διαμόρφωση παθολογικών καταστάσεων. Η τελευταία αυτή επίδραση της φυσιολογικής μικροχλωρίδας οφείλεται στην ειδική βακτηριακή μεταβολική δραστηριότητα, που εκδηλώνεται όταν αυξηθεί ο αριθμός των βακτηρίων της χλωρίδας ή όταν η διαίτα του ξενιστή είναι πλούσια σε λίπη και πρωτεΐνες (Μπεζιρτζόγλου Ε., 2000).

Ακολούθως επιχειρείται συνοπτικά περιγραφή διαφόρων παθολογικών καταστάσεων που συνδέονται με τη φυσιολογική βακτηριακή χλωρίδα. Η αύξηση του αριθμού των βακτηρίων στο λεπτό έντερο προκαλεί ανωμαλίες στη λειτουργικότητά του, οι δε λόγοι εξαιτίας των οποίων μπορεί να αυξηθεί ο αριθμός των βακτηρίων στο τμήμα αυτό του εντέρου είναι :

1. να υπάρξει αχλωρυδρία του στομάχου,
2. σε καταστάσεις που ευνοείται η στάση του περιεχομένου του εντέρου, όπως συγγενής στένωση ή κατόπιν φλεγμονής ή αναστολής της κινητικότητας του εντέρου και μερική απόφραξη των χοληφόρων οδών ή χολοαγγειίτιδα και τέλος,
3. όταν υπάρχει ελεύθερη επικοινωνία μεταξύ του λεπτού και του παχέος εντέρου ή εντομή της ειλεοτυφλικής βαλβίδας.

Η στεατόρροια οφείλεται στην κακή απορρόφηση του διαιτητικού λίπους. Θεωρείται πιθανό ότι η στεατόρροια οφείλεται σε διαταραχή του μεταβολισμού των χολικών αλάτων. Αυτά είναι απαραίτητα για την γαλακτωματοποίηση και απορρόφηση των λιποειδών. Μέρος των συνεζευγμένων χολικών αλάτων παράγονται από βακτήρια. Στην περίπτωση αυξημένου βακτηριακού αποικισμού του λεπτού εντέρου, το ποσό των συζευγμένων χολικών ελατώνεται πολύ. Η κατάσταση αυτή καταλήγει στην ελαττωματική γαλακτωματοποίηση των λιπών, τη συσσώρευσή τους στο έντερο και πρόκληση στεατόρροιας (Schaeckhter Moselion Ph.D. et al., 1993).

Ο αυξημένος βακτηριακός αποικισμός του λεπτού εντέρου έχει σαν συνέπεια την εμφάνιση διάρροιας. Ο μηχανισμός δεν έχει απόλυτα διευκρινιστεί. Όπως



αναφέρθηκε προηγούμενα, ο μεγάλος βακτηριακός πληθυσμός έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλου ποσού ελεύθερων χολικών αλάτων και οξέων. Κατά μία άποψη, τα οξέα αυτά προκαλούν μεγάλο βαθμού εντερική έκκριση νερού και ηλεκτρολυτών. Ορισμένα επίσης βακτήρια της εντερικής χλωρίδας, όπως τα *Clostridium*, τα *Bifidobacterium* και ο *St. faecalis* έχουν την ικανότητα να προκαλούν υδροξυλίωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων. Τυπικό παράδειγμα είναι ο σχηματισμός υδροξυστεατικού οξέος από ελαϊκό οξύ. Το υδροξυστεατικό οξύ είναι παρόμοιο προς το ρικενελαϊκό οξύ, που αποτελεί βασικό συστατικό του ρικενελαίου (ρετσινόλαδο), που ως γνωστό χρησιμοποιείται σαν ισχυρό καθαρτικό. Επίσης, ο έντονος βακτηριακός αποικισμός του εντέρου προκαλεί ελαττωμένη απορρόφηση υδατανθράκων και διαταραχή του μεταβολισμού των πρωτεϊνών (Μπεζιρτζόγλου Ε., 2000).

Συσχέτιση της χλωρίδας του παχέος εντέρου με την ελκώδη Κολίτιδα (UC) και τη νόσο του Crohn (IBD Ασθένειες).

Η ελκώδης κολίτιδα και η νόσος του Crohn αναφέρονται με την κοινή ονομασία «φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου» (IBD=Inflammatory Bowel Disease). Οι ασθένειες αυτές χαρακτηρίζονται ως χρόνιες άγνωστης αιτιολογίας. Η συχνότητα εμφάνισής τους είναι περίπου η ίδια. Παρατηρούνται συχνότερα στη λευκή φυλή, σε ίδιο ποσοστό στους άνδρες και τις γυναίκες. Το ποσοστό εμφάνισης των ασθενειών είναι μεγαλύτερο στους Σημίτες, σε σχέση με τη λευκή φυλή.

Ως αιτίες των ασθενειών αυτών έχουν προταθεί διάφοροι παράγοντες, με σημαντικότερους τους γενετικούς παράγοντες και τη δυσλειτουργία του ανοσολογικού συστήματος. Ανοσολογική δυσλειτουργία έχει βρεθεί στο 20% των οικογενειών με ελκώδη κολίτιδα και στο 40% των οικογενειών με νόσο του Crohn. Οι διάφοροι παράγοντες που πιθανώς έχουν κάποια σχέση με την εκδήλωση των ασθενειών αυτών είναι οι ακόλουθοι :

1. Οι μικροοργανισμοί του εντέρου. Βέβαια, δεν έχει βρεθεί κάποιος συγκεκριμένος μικροοργανισμός να απομονώνεται σταθερά από τις φλεγμονώδεις περιοχές του εντέρου.
2. Ανοσολογικά αίτια. Η καταφανής διήθηση του βλεννογόνου με λεμφοκύτταρα, η παρουσία αντισωμάτων προς τα επιθηλιακά κύτταρα των T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, καθώς επίσης και οι εξω-εντερικές εκδηλώσεις της πάθησης είναι ενδείξεις ανοσολογικής αιτιολογίας της εντερικής βλάβης.



3. Ψυχολογικοί παράγοντες. Δεν διαφαίνεται σχέση μεταξύ ψυχολογικών παραγόντων και εμφάνιση των ασθενειών αυτών, πιθανώς όμως να συντελούν στην έξαρση των συμπτωμάτων.
4. Περιβαλλοντικοί παράγοντες. Από μερικές ερευνητικές εργασίες, δεικνύονται παράγοντες του περιβάλλοντος που διεγείρουν μια σειρά αντιδράσεων που οδηγούν στην ανάπτυξη των φλεγμονωδών νόσων.

Ελκώδης κολίτιδα : Χαρακτηρίζεται από μία διάχυτη φλεγμονή, βλεννογόνια και υποβλεννογόνια, η οποία σχεδόν πάντα εντοπίζεται στο ορθό, αλλά μπορεί να επεκτείνεται σε ολόκληρο το παχύ έντερο. Το επιθήλιο είναι διηθημένο από πολυμορφοπύρηνα, παρουσιάζει διάχυτη φλεγμονή και είναι εύθρυπτο, λόγω των διάχυτων ελκών. Αν δεν αναπτυχθεί καρκίνωμα στο υπόστρωμά της, δεν προκαλεί αποφρακτικές αλλοιώσεις ή σχηματισμό συριγγίων.

Νόσος του Crohn : Η φλεγμονή καταλαμβάνει όλους τους χιτώνες και την επιφάνεια του ορογόνου, είναι ασυνεχής και προσβάλλει το ορθό, σε λιγότερες από το 50% των περιπτώσεων. Η νόσος του Crohn δεν είναι πάθηση μόνο του παχέος εντέρου. Το 1/3 των περιπτώσεων εντοπίζεται στο κόλον, το άλλο 1/3 στον ειλέο και το υπόλοιπο 1/3 στην ειλεοκολική περιοχή. Ο βλεννογόνος μπορεί να φαίνεται φυσιολογικός ή να παρουσιάζει όψη πλακόστρωτου, τα βαθιά γραμμοειδή έλκη είναι παράλληλα προς τον επιμήκη άξονα του εντέρου. Στα παχιά και άκαμπτα τοιχώματα συναντούμε ουδετερόφιλα λεμφοκύτταρα, μακροφάγα με σχηματισμό κοκκιωμάτων στο 50% των περιπτώσεων. Ο σχηματισμός συριγγίων είναι συχνό φαινόμενο αλλά δεν παρατηρείται δυσπλασία των επιθηλιακών κυττάρων.

Η παθογένεια της ασθένειας του Crohn και της ελκώδους κολίτιδας είναι σύνθετη και περιλαμβάνει τρεις διαφορετικούς παράγοντες να αλληλεπιδρούν : την γενετική επιδεκτικότητα του ατόμου, την δημιουργία πληγής από το ανοσοποιητικό σύστημα και την παρουσία των βακτηρίων της μικροχλωρίδας (Sartor R.B., 1997), (Shanahan F., 2001), (Elson C.O., 2000).

Η εμφάνιση των φλεγμονωδών ασθενειών φαίνεται να εμφανίζεται από μία ανώμαλη αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος προς τα συστατικά της εντερικής χλωρίδας, σε άτομα γενετικά επιδεκτικά. Δεν φαίνεται ως μία απλή μάχη μεταξύ του ανθρώπου και των μικροβίων, αλλά ως μία παρέμβαση στην σωστή ανάπτυξη της ανοσίας του βλεννογόνου και του προγράμματος της έκκρισης των κυτοκινών.



Παρόλο που η ασθένεια του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα εμφανίζουν ετερογένεια συμπτωμάτων, εντούτοις υπάρχουν πολλοί κοινοί παράγοντες, είτε γενετικοί, είτε περιβαλλοντικοί, που δεικνύουν μία περίεργη σχέση των ασθενειών αυτών (Taylor K.D. et al., 2001) : α) σε μονοζυγωτικούς διδύμους, η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας του Crohn είναι πάνω από 50%, ενώ της ελκώδους κολίτιδας πάνω από 10%, β) διαφορετικά ποσοστά εμφάνισης των ασθενειών σε εθνικές ομάδες που ζουν σε διαφορετικά γεωγραφικά πλάτη, γ) αποδεδειγμένη επίδραση από συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το κάπνισμα, που επηρεάζουν την αυστηρότητα εκδήλωσης της ασθένειας και τον τύπο της (Ailse L. Hart et al., 2002), δ) επιδημιολογικές μελέτες σε διαφορετικές χώρες δείχνουν ότι η εμφάνιση και επικράτηση των ασθενειών αυτών συμβαδίζει με τη βιομηχανοποίηση των χωρών αυτών (Lofthus E.V. et al., 1993), (Bernstein C.N. et al., 1999), ε) ακόμη η αύξηση των ασθενειών αυτών βρίσκεται σε παραλληλότητα με την επικράτηση αλλεργικών, άσθματος, διαβήτη, σκληρίτιδας. Όλες αυτές χαρακτηρίζονται ως ασθένειες που έχουν σχέση με το ανοσοβιολογικό σύστημα (Herz U. Et al., 2000), (Rook G.A., 1998). Τα T-λεμφοκύτταρα είναι αυτά που ελέγχουν και ρυθμίζουν την ανοσο-απόκριση προς τα βακτήρια του εντέρου, με αποτέλεσμα την «φυσιολογική φλεγμονή» πάνω στον βλεννογόνο. Αποτυχία της ρύθμισης αυτής έχει ως αποτέλεσμα την «παθολογική φλεγμονή». Η ανοσοκαταστολή από τα T-λεμφοκύτταρα σε τοπικό επίπεδο γίνεται μέσω της παραγωγής των IL-10 και TGF-β (Read S. et al., 2000). Σε προ-φλεγμονώδη επίπεδα, η επίδραση διαφόρων συστατικών της μικροχλωρίδας στην έκκριση χυμοκινών και κυτοκινών, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της άμυνας του οργανισμού (Kagnoff et al., 1997), (Lugter A.D., 2001). Αποτυχία ρύθμισης των δύο ανωτέρω φαινομένων, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αλλοιώσεων στον βλεννογόνο.

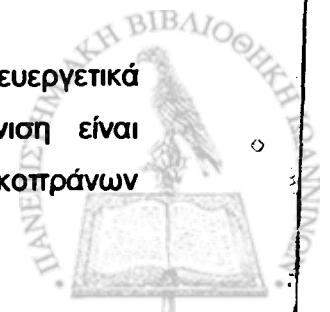
Έναν σημαντικό ρόλο, αν όχι στην απαρχή της γένεσης των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, αλλά στη διακίνηση των αλλοιώσεών του, φαίνεται ότι παίζουν οι μικροοργανισμοί της μικροχλωρίδας (Sartor R.B., 1997). Διαταραχή της μικροχλωρίδας του εντέρου μπορεί κατά ένα μέρος να είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία αυτών των αλλοιώσεων. Τα δεδομένα από τη μικροχλωρίδα των κοπράνων και τη μικροχλωρίδα του βλεννογόνου στη φλεγμονή είναι αλληλοσυγκρουόμενα (Keighley M.R.B. et al., 1978), (Ruseker van Embden J.G.H. et al., 1983), (Hofing E. et al., 1991). Υπάρχει βέβαια μία γενική συμφωνία ότι η διάρροια οδηγεί σε αυξημένους αριθμούς αεροβίων και coliforms. Τα αναερόβια *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Coprococcus* και *Bacteroides*, μπορεί αν εμπλέκονται στην εκδήλωση των φλεγμονωδών νοσημάτων, αλλά σαφείς ενδείξεις υπάρχουν μόνον για τα βακτήρια που ανάγουν τα θειικά. Σε

ασθενείς που πάσχουν από ελκώδη κολίτιδα έχει παρατηρηθεί αυξημένη παραγωγή H_2S στην περιοχή της αλλοίωσης και επιπλέον οι ασθενείς, σε σχέση με υγιείς ανθρώπους, πάνω στον βλεννογόνο τους έχουν αγκυροβολημένο μεγαλύτερο αριθμό θεϊκά αναγόντων βακτηρίων (Chedwick V.S., Chen W., 1999), (Pitcher M., Cumming J.H., 1996). Αυξημένα ποσοστά ηλεκτρικού και N-βουτυρικού οξέος έχουν βρεθεί σε κόπρανα ασθενών, σε σχέση με υγιείς ανθρώπους (Onderdonk A.B. et al., 1979), (Roediger W.E.R. et al., 1982). Τι ακριβώς αντανακλά αυτή η διαφορά, δεν είναι ξεκαθαρισμένο. Ξεκαθαρισμένο είναι το γεγονός ότι ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα εμφανίζουν αδυναμία να οξειδώσουν το βουτυρικό οξύ (Roediger W.E.W., 1993), (Chapman M. et al., 1993), καθώς επίσης πειραματόζωα τρεφόμενα με θειικούς πολυσακχαρίτες είναι πολύ καλά μοντέλα για τη μελέτη της ελκώδους κολίτιδας (Pitcher M., Cummings J.H., 1996). Σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του Crohn, η βλέννα του εντέρου τους συνεχώς αποθειώνεται και αποσιλιώνεται εξαιτίας ενζύμων των οποίων η προέλευση είναι κυρίως βακτηριακή και ανιχνεύονται στα κόπρανα. Η επιδεκτικότητα της βλέννας σε αποσύνθεση μπορεί να είναι η αρχή γένεσης της αρρώστιας (Phodes J.M. et al., 1985). Τα μικρόβια τα οποία μπορούν να αναστέλλουν τη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών, που προκαλούν την αποθείωση και αποσιλίωση, δεν συναντώνται στα κόπρανα των ασθενών με νόσο του Crohn (Bergstrand L.O. et al., 1981).

Από άλλη μελέτη, που έγινε από τους Duffy M. et al., 2002, διαπιστώθηκε ότι στα εκκολπώματα της ελκώδους κολίτιδας, σε ποσοστό 80% υπήρχαν θειικά ανάγοντα βακτήρια, όχι όμως και στις εγκολπώσεις της οικογενούς πολυποδίασης. Σε ασθενείς με ειλεοστομική διαρροή αποβλήτων θειικά ανάγοντα βακτήρια, δεν είναι παρόντα. Ο αριθμός των *C. perfringens*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* είναι παρόμοιος στην ελκώδη κολίτιδα και την πολυποδίαση. Σε ασθενείς με εκκολπωματίτιδα, σε εξέταση των περιπτώματων τους παρατηρήθηκε μειωμένο ποσοστό αναεροβίων σε σχέση με τα αερόβια, καθώς ακόμη λιγότερα *Bifidobacteria*, *Lactobacilli* και μεγαλύτερο ποσοστό *Clostridium perfringens*.

Άλλες ενδείξεις που ενισχύουν τη συμμετοχή της φυσιολογικής χλωρίδας στην εκδήλωση των φλεγμονωδών ασθενειών του εντέρου, χωρίς να αποκλείεται η άμεση εμπλοκή κάποιου παθογόνου μικροοργανισμού, είναι οι ακόλουθες :

1. Οι αλλοιώσεις υπάρχουν σε περιοχές με το μεγαλύτερο αριθμό βακτηρίων (Ailse L. Hart et al., 2002).
2. Η εκτροπή των κοπράνων στην ασθένεια του Crohn έχει ευεργετικά αποτελέσματα στα απομακρυσμένα σημεία και η επανεμφάνιση είναι προβλεπόμενη μετά την αποκατάσταση του μονοπατιού των κοπράνων (Jenowitz H.D. et al., 1998), (Rutgeerts P. et al., 1991).



3. Η άμεση σχέση της επανεμφάνισης της ασθένειας, όταν ξαναυπάρξει επαφή του περιεχομένου του αυλού με τον βλεννογόνο, έχει αποδειχθεί σαφώς (Harper P.H. et al., 1985), (D' Haesus C.R. et al., 1998).
4. Η εμφάνιση εκκολπωματίτιδας σε ασθενείς που έπασχαν από ελκώδη κολίτιδα, αλλά όχι σε εκείνους με οικογενή πολυποδίαση. Η ανταπόκριση στα αντιβιοτικά δείχνει συμμετοχή της χλωρίδας του ανθρώπου, σε σχέση πάντα με τη γενετική επιδεκτικότητα του ασθενούς (Aitse L. Hart et al., 2002).
5. Αποίκιση από τη μικροβιακή χλωρίδα είναι απαραίτητη για την εμφάνιση των συμπτωμάτων των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, ανεξάρτητα από το γενετικό υπόβαθρο των πειραματόζωνων (Eison C.O., Sartor R.B. et al., 1999), (Fuss I.J. et al., 1998), (Blumberg R.J. et al., 1999).
6. Σε πειραματόζωα, οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου έχουν μεταφερθεί με ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα που αντιδρούν με εντερικά βακτήρια (Cong Y. et al., 1998).
7. Μελέτες για την ικανότητα απόκρισης των T-λεμφοκυττάρων σε αυτόχθονα ή ετερόχθονα βακτήρια της εντερικής χλωρίδας έχουν δείξει μία αδυναμία ανοσολογικής αντοχής προς την εντερική χλωρίδα, σε ασθενείς με φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου (Duchmann R. et al., 1995), (Duchmann R. et al., 1999).

Μέχρι πρόσφατα δεν είχε δοθεί μεγάλη σημασία στο μικρο-περιβάλλον ως μία δυνατότητα θεραπευτικής ευκαιρίας. Μία πιθανή θεραπευτική στρατηγική για τη θεραπεία των φλεγμονωδών νόσων μπορεί να περικλείει το χειρισμό του μικρο-περιβάλλοντος, με σκοπό την επαναφορά της μικροβιακής ισορροπίας (Camprien M., Gionchetti P., 1999). Σε αυτό τον τρόπο χειρισμού των ασθενών πιθανώς σημαντικό ρόλο μπορούν να παίξουν τα προβιοτικά, καθότι σε βιοψίες από ανθρώπους που έπασχαν από ελκώδη κολίτιδα παρατηρήθηκαν μειωμένα ποσοστά Lactobacilli (Fabie R. et al., 1993) και σε ασθενείς με Crohn μειωμένα ποσοστά από Bifidobacteria και Lactobacilli (Favier C. et al., 1997).

Οι εφαρμογές σε ζώα έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Fabie R. et al., 1993). Ετοιμάζονται επίσης προβιοτικά στελέχη γενετικά τροποποιημένα, τα οποία, εκτός από την προβιοτική τους δράση, να έχουν τη δυνατότητα παραγωγής αντι-φλεγμονωδών ουσιών, όπως κυτοκινών (Steidberh et al., 2000).

Συσχέτιση της χλωρίδας του παχέος εντέρου με καρκίνο του παχέος εντέρου

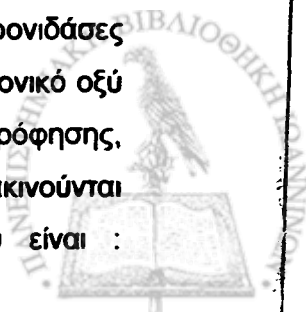


Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι ο τρίτος κατά σειρά συχνότητας καρκίνος και ο ορθοκολικός το τρίτο αίτιο θανάτου από καρκίνο. Επιδημιολογικές μελέτες αποδεικνύουν ότι η δίαιτα είναι άμεσα εμπλεκόμενη με το 80% των ορθοκολικών περιπτώσεων καρκίνου (Willett W.C., 1995).

Η φυσιολογική μας μικροχλωρίδα αποκτά ενέργεια ζυμώνοντας την μη πεπτώμενη τροφή και την βλέννα του εντέρου. Η φύση και η σημασία του μεταβολισμού αυτού εξαρτάται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της μικροχλωρίδας, τον χρόνο παραμονής της τροφής στο έντερο και την διαθεσιμότητα της τροφής σε θρεπτικά συστατικά, κυρίως υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Τα προϊόντα από τη ζύμωση των υδατανθράκων θεωρούνται ωφέλιμα για τον ξενιστή σε αντίθεση με ορισμένα τοξικά προϊόντα που προέρχονται από τη ζύμωση των πρωτεϊνών. Οι μεταβολικές επίσης δραστηριότητες της μικροχλωρίδας του εντέρου σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου του εντέρου, μέσω της δραστηριότητας των ενζύμων της βακτηριακής χλωρίδας, που έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό τοξικών προϊόντων (Roisin Hughes & Ian R. Rowland, 2000), (Μπεζιρτζόγλου Ε., 2000). Δίαιτα αυξημένη σε ποσοστό λιπών θεωρείται επίσης υπεύθυνη για την πιθανή εμφάνιση καρκίνου (Μπεζιρτζόγλου Ε., 2000). Η ολική μεταβολική δραστηριότητα της βακτηριακής μας χλωρίδας έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ουσιών που δρουν ως καρκινογόνες. Η δράση τους μπορεί να λαμβάνει χώρα στο προ-καρκινωματικό επίπεδο ή κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του όγκου (Ducluzeau R., Raibaud P., 1979).

Η ενζυματική δραστηριότητα της μικροχλωρίδας σε προσλαμβανόμενα συστατικά, όπως νιτρο-αρωματικές ενώσεις, οξοενώσεις και νιτρικά, μπορεί να οδηγήσει στη γένεση καρκινογόνων και γονοτοξικών ουσιών. Βακτηριακά ένζυμα που ενέχονται στη δραστηριότητα αυτή είναι τα ακόλουθα : β-γλουκορονιδάση, β-γλυκοσιδάση, αζορεδουκτάση, νιτρορεδουκτάση, νιτρική ρεδουκτάση (Roisin Hughes & Ian R. Rowland, 2000).

Β-γλουκορονιδάση και β-γλυκοσιδάση : Πολλά τοξικά και καρκινογόνα προϊόντα οξειδώνονται στο ήπαρ από τα ένζυμα που εξαρτώνται από το κυτόχρωμα P₄₅₀ και κατόπιν με τα «ένζυμα της 2^{ης} φάσης» συζεύγνυνται με το γλυκουρονικό οξύ. Το σύμπλοκο αυτό, κατά ένα μεγάλο μέρος, εκκρίνεται μέσω της χολής στο λεπτό έντερο. Στο κόλον, οι βακτηριακές β-γλουκορονιδάσες υδρολύουν το συνεζευγμένο σύμπλοκο απελευθερώνοντας το γλυκουρονικό οξύ ή τον ηπατικό μεταβολίτη. Το γλυκουρονικό, μέσω της εντερικής απορρόφησης, εισέρχεται πάλι στην ηπατική κυκλοφορία. Ξενοφοβικές ουσίες που μετακινούνται μέσω της χολής ως συνεζευγμένες ενώσεις του γλυκουρονικού είναι :

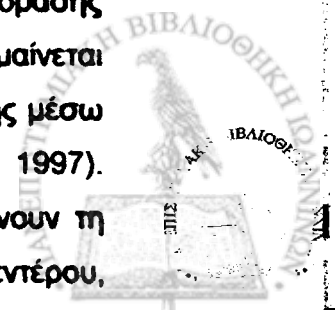


βενζοπυρένιο του γλυκουρονικού, μεθυλοαζοξυμεθανόλη του γλυκουρονικού, N-γλουκοζίνες και ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες. Οι προσθετικές αυτές ομάδες θεωρούνται καρκινογόνες (Turesky R.J. et al., 1991). Για τους γλουκοζίνες των οποίων η προέλευση είναι φυτική υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα. Οι αγλυκόνες, προϊόν υδρόλυσης του φυτικού γλουκοζίνης από τη β-γλυκοσιδάση, θεωρούνται από ορισμένους ερευνητές ως μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες, ενώ οι φλαβονοειδείς αγλυκόνες θεωρούνται αντικαρκινογόνες (Rowland I.R. et al., 1985), (Goldin B.R., 1986).

Νιτρορεδουκτάση και νιτρική ρεδουκτάση : Τα νιτρικά, εισερχόμενα στον άνθρωπο μέσω της δίαιτας ή του πόσιμου νερού, φθάνουν στο κόλον του ανθρώπου όπου μετατρέπονται, με τη δραστηριότητα της νιτρικής ρεδουκτάσης, σε νιτρώδη. Η αναερόβια αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη είναι ένα από τα κυριότερα καταβολικά μονοπάτια της ανθρώπινης μικροχλωρίδας (Allison C., MacFarlane G.T., 1998). Αυτή η αντίδραση έχει σημαντικές συνέπειες για τον ξηριστή καθώς αζωτούχα οξείδια του αζώτου που παράγονται από τα νιτρώδη μπορούν να αντιδράσουν με αζωτούχες ενώσεις, όπως αμίνες και αμιόνια και να παράγουν N-νιτροζοπαράγωγα, πολλά εκ των οποίων είναι καρκινογόνα.

Ετεροκυκλικές αμίνες : Σχηματίζονται από αμινοξέα, όταν η τροφή είναι μαγειρεμένη σε υψηλές θερμοκρασίες (Gross G.A. et al., 1993). Μερικές από αυτές τις ενώσεις είναι καρκινογόνες. Ενισχύουν την εμφάνιση καρκίνου του κόλον σε ζώα που τρέφονται με κρέας μαγειρεμένο σε υψηλές θερμοκρασίες (Layton D.W. et al., 1995), (Pence B.C. et al., 1998). Μικρές ποσότητες από τις ουσίες αυτές σχηματίζονται όταν τηγανίζουμε ή τοπποθετούμε στο grill κρέας ή ψάρια.

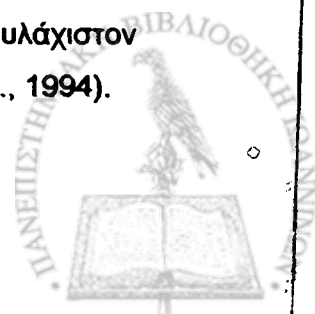
Πιθανά γονοτοξικά ή καρκινογόνα προϊόντα από την αποσύνθεση των πρωτεϊνών στο παχύ έντερο : Τα προϊόντα που προκύπτουν από τη ζύμωση των πρωτεϊνών είναι λπαρά οξέα με κοινή αλυσίδα, υδρογόνο, CO₂ και διακλαδισμένα λπαρά οξέα, όπως ισοβουτυρικό, ισοβαλερικό μαζί με άλλα οργανικά οξέα. Αμμωνία, αμίνες, φαινόλες, ινδόλη, σχηματίζονται κατά τη διάρκεια απαμίνωσης, αποκαρβοξυλίωσης, ζύμωσης και α ή β αντίδρασης αφαίρεσης. Η συγκέντρωση της αμμωνίας στα ανθρώπινα κόπρανα κυμαίνεται από 12 έως 30 mM και είναι θετικά επηρεαζόμενη από την πρόσληψή της μέσω της διατροφής (Cumming J.M. et al., 1979), (Geypens B. et al., 1997). Συγκεντρώσεις αμμωνίας μεταξύ 5 έως 10 mM έχει δείξει ότι αλλοκώνουν τη μορφολογία και τον ενδιάμεσο μεταβολισμό των κυττάρων του εντέρου,



επηρεάζοντας την σύνθεση του DNA και ελαττώνοντας τη διάρκεια ζωής των κυττάρων (Visek W.K., 1978). Τέτοια επίδραση προτείνει λογικά την προώθηση ογκογένεσης μέσα από την γρήγορη ανακύκλωση και πολλαπλασιασμό των κατεστραμμένων κυττάρων. Οι φαινόλες και ινδόλες παράγονται από την αποσύνθεση αρωματικών αμινοξέων. Βακτήρια της μικροχλωρίδας του εντέρου που ενέχονται στη διαδικασία αυτή είναι τα ακόλουθα : Clostridia (Elsden S.R. et al., 1976), Bacteroides (Chung K.T. et al., 1979), Enterobacteria (Bostford J.D., Pesmos R.D., 1972), Bifidobacteria (Aragozzini et al., 1979), Lactobacilli (Yokoyama M.T. et al., 1981). Η σχέση των ουσιών αυτών ως προς την πιθανότητα δημιουργίας καρκίνου ορθοκολικού, δεν είναι ξεκαθαρισμένη. Από εργασίες *in vitro* έχειδειχθεί ότι μπορεί να έχουμε το σχηματισμό N-νιτροζοπαραγώγων (καρκινογόνα, μεταλλαξιγόνα) από την αντίδραση μεταξύ φαινολών και νιτροδών παραγώγων, όπως διαζο-κινόνη (Kikugawe K., Kato T. et al., 1986). Τα N-νιτροζοπαραγώγα είναι καρκινογόνες και μεταλλαξιγόνες ουσίες γιατί μπορούν να προωθήσουν το σχηματισμό ισχυρών αλκυλιλυτικών παραγόντων του DNA, κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού (Rosin Hughes & Ian R. Rowland).

Δευτερογενή χολικά οξέα : Η πρόσληψη λιπαρής διατροφής οδηγεί σε αύξηση της χολής που εκκρίνεται στο έντερο. Η αποικοδόμηση των στερινοειδών της χολής από την εντερική φυσιολογική χλωρίδα έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ποικίλων παραγώγων. Μερικά από αυτά τα παραγώγα είναι καρκινογόνα, όπως το δεσοξυχολικό οξύ, το δισυορ-5-χολενικό οξύ και το χολινικό οξύ (Duculzeau R., Raibaud P., 1979). Σε πειραματόζωα έχειδειχθεί ότι διασπούν την ακεραιότητα του βλεννογόνου του κόλον, οδηγώντας σε ένα αντισταθμιστικό, αυξανόμενο πολλαπλασιασμό τους (Nagengest F.M. et al., 1999).

Πειραματικές μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι τα Κλωστηρίδια προκαλούν, με μία σειρά αντιδράσεων, το σχηματισμό της 17-μεθυλο-οιστραδιόλης. Το οιστρογόνο αυτό μετατρέπεται στο ήπαρ σε οιστραδιόλη. Η παραγωγή της οιστραδιόλης στον άνθρωπο, σε φυσιολογικές συνθήκες, είναι 0.5 mg/24 h. Έχει βρεθεί επίσης ότι τα κλωστηρίδια μετατρέπουν το 1/10 περίπου της ποσότητας των χολικών οξέων σε οιστρογόνα. Αν λοιπόν γίνεται εντερική σύνθεση οιστραδιόλης, αυξάνεται το ποσό των οιστρογόνων που κυκλοφορούν στον οργανισμό, δεδομένου ότι είναι αναμφισβήτητο το γεγονός ότι τα οιστρογόνα αν δεν προκαλούν, τουλάχιστον διεγείρουν τον ήδη εκδηλωθέντα καρκίνο του μαστού (Μπεζιρτζόγλου Ε., 1994).



Επίδραση προβιοτικών στην εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου

Είδη όπως *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* έχουν μικρή δραστηριότητα των ενζύμων που περικλείονται σε αυτά που συμμετέχουν στη δημιουργία καρκινογένεσης, σε αντίθεση με άλλα αναερόβια, όπως τα *Clostridia*, *Bacteroides* και *Eubacteria*, όπου η δραστηριότητα των ενζύμων αυτών είναι μεγάλη (Saijo Y. et al., 1992). Έτσι επομένως, αυξημένο ποσοστό από βακτήρια του γαλακτικού οξέος μπορεί να έχει ωφέλιμα αποτελέσματα για το έντερο. Οι Bisco et al., 1991, αναφέρουν ότι αυξημένος πολλαπλασιασμός των κυττάρων του βλεννογόνου του κόλον μειώθηκε όταν οι ασθενείς άρχισαν να καταναλώνουν προβιοτικά. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι η κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση εμφάνισης καρκίνου του κόλον και του στήθους στον άνθρωπο.

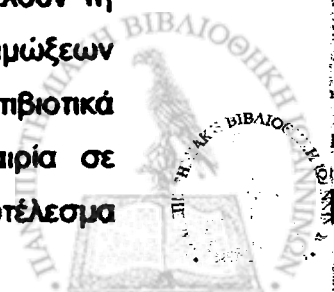
Οικογενής πολυποδίαση παχέος εντέρου

Είναι μία σπάνια γενετική διαταραχή (1 : 8.000 γεννήσεις), κληρονομείται με επικρατή χαρακτήρα. Κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας αναπτύσσονται βαθμιαία πολλοί πολύποδες που καλύπτουν όλη την επιφάνεια του παχέος εντέρου. Τα κύρια συμπτώματα είναι διάρροια και αιμορραγία. Με την πάροδο 10 - 15 χρόνων από την έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου, σε όλες τις περιπτώσεις γίνεται εξαλλαγή σε καρκίνωμα.

Μεταβολή της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας μετά τη χορήγηση αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά είναι δυνατόν να επηρεάσουν τη λειτουργία του πεπτικού συστήματος, είτε με απευθείας τοξική επίδραση είτε με μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας (Mackwiek P.A., 1982), (Waaij van der D., 1982).

Η χορήγηση αντιβιοτικών για την καταπολέμηση μιας λοίμωξης καταλήγει συχνά στη διατάραξη της αναλογίας των μικροοργανισμών, που αποτελούν τη φυσιολογική χλωρίδα, με αποτέλεσμα την εμφάνιση δευτεροπαθών λοιμώξεων από μικροοργανισμούς, ανθεκτικούς στα χορηγούμενα αντιβιοτικά. Τα αντιβιοτικά δηλαδή καταστρέφουν τη φυσιολογική χλωρίδα και δίνεται η ευκαιρία σε ανθεκτικά παθογόνα μικρόβια ή μύκητες να πολλαπλασιαστούν, με αποτέλεσμα την εμφάνιση επιλοιμώξεων (Freter R., 1974).



Η επιλοίμωξη είναι ένα δυσάρεστο φαινόμενο που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της θεραπείας μιας πρωτοπαθούς λοίμωξης με αντιβιοτικά. Σε έναν άρρωστο που βρίσκεται ήδη κάτω από αντιβίωση, είναι δυνατό να παρουσιαστεί μία νέα λοίμωξη από διαφορετικό παθογόνο μικροοργανισμό ή μύκητα (Brooks et al., 1991).

Η μονιλίαση είναι συχνός τύπος επιλοίμωξης. Το αίτιο είναι ο μύκητας μονίλια (*Candida albicans*) που προσβάλλει κυρίως το στόμα και τις περιοχές του ορθού και του κόλπου. Πράγματι, μονιλίαση παρατηρείται πολύ συχνά όταν γίνεται μακροχρόνια χρήση αντιβιοτικών ευρέος φάσματος (Μπεζιρτζόγλου Ε., 1994).

Ωστόσο όμως, η μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας επιδιώκεται όταν πρόκειται να γίνει κάποια χειρουργική επέμβαση στο έντερο. Στις περιπτώσεις αυτές χορηγείται νεομυκίνη, καναμυκίνη ή ορισμένες δυσσαπορρόφητες σουλφοναμίδες. Η μέθοδος αυτή αποστειρώσεως του εντέρου έχει αρκετούς υποστηρικτές. Πολλοί όμως πιστεύουν ότι εξίσου αποτελεσματικός είναι ο προεγχειρητικός αποκλεισμός με απλό υποκλυσμό (Waaïj vand der D., 1982).

Όσον αφορά την τοξική επίδραση αντιβιοτικών σε άτομα που είναι «υγιείς φορείς μικροβίων», άτομα δηλαδή που επιτρέπουν την παραμονή του εξωγενούς μικροοργανισμού σε χαμηλά επίπεδα μέσα στον οργανισμό, χωρίς να είναι παθογόνος - αν χορηγηθεί αντιβιοθεραπεία άκαιρη, θα μπορούσε να προκαλέσει την εξάλειψη βακτηρίων που παίζουν ρόλο φραγμού και τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό του εξωγενούς μικροοργανισμού σε υψηλά επίπεδα, που θα επέτρεπαν την παραγωγή τοξίνης επιβλαβούς για τον ξενιστή (Savage D.C., 1972). Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1977 στην Αγγλία, σε ορισμένους ασθενείς στους οποίους είχε χορηγηθεί κλινδαμυκίνη. Οι ασθενείς αυτοί ήταν υγιείς φορείς του τοξινογόνου *Clostridium difficile*, που είναι ανθεκτικό στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Η αποδιοργάνωση της φυσιολογικής χλωρίδας με τη χορήγηση αντιβιοθεραπείας, οδήγησε στην υπέρμετρη ανάπτυξη του τοξινογόνου στελέχους, με αποτέλεσμα την ψευδομεμβρανική κολίτιδα (σχηματισμός ψεύτικων μεμβρανών), που συνοδεύεται από οξεία διάρροια (Bartlett J.C., 1992), (Lyerly D.M. et al., 1999). Συμπερασματικά, η καλή γνώση της εντερικής χλωρίδας θα μας επιτρέψει την καλύτερη θεραπεία των εντερικών λοιμώξεων και την εξάλειψη του κινδύνου ενδεχομένων παθήσεων που οφείλονται σε αντιβιοτικά.



Ο Σίδηρος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και επιβίωση όλων σχεδόν των μικροβίων πάνω στη γη. Διαδικασίες του κυττάρου στις οποίες είναι ουσιαστική η συμμετοχή του χημικού αυτού στοιχείου είναι : το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων, η καθήλωση του αζώτου, η μετακίνηση τοξικών μορφών οξυγόνου, η σύνθεση πρόδρομων ουσιών του DNA, η τροποποίηση των tRNA μορίων, η σύνθεση συγκεκριμένων αμινοξέων και η σύνθεση ενδιάμεσων προϊόντων του TCA κύκλου. Επίσης, ορισμένα βακτήρια οξειδώνουν το σίδηρο για να αποκτήσουν ενέργεια. Τα μόνα μικρόβια που μπορούν να φέρουν σε πέρας τις λειτουργίες τους χωρίς το σίδηρο είναι συγκεκριμένα είδη των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (Earhart C.F., 1998).

Ένα σημαντικό πρόβλημα με το μεταβολισμό του σιδήρου είναι το γεγονός ότι παρόλο που στην επιφάνεια της γης βρίσκεται σε μεγάλο ποσοστό, εντούτοις είναι μη διαθέσιμος προς τους μικροοργανισμούς. Σε ένα ουδέτερο περιβάλλον ως προς το pH και οξειδωτικό, ο σίδηρος υπάρχει υπό τη μορφή την τρισθενή, η οποία είναι εξαιρετικά αδιάλυτη. Για τα μικρόβια που ζουν σε ζώα ξενιστές, η διαθεσιμότητα του σιδήρου είναι περιορισμένη, από την παρουσία αποθηκευτικών πρωτεϊνών και μεταφορικών πρωτεϊνών (φερριτίνη, λακτοφερρίνη, τρανσφερρίνη).

Σημείωση :

Φερριτίνη : Μία μεγάλη πρωτεΐνη που βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου, προκαρυωτικού και ευκαρυωτικού.

Λακτοφερρίνη : Γλυκοπρωτεΐνη παρούσα στις βλεννώδεις εκκρίσεις και τα φαγολυτικά κύτταρα των σπονδυλωτών, δεσμεύει το σίδηρο και τον μεταφέρει μέσα στο κύτταρο.

Τρανσφερρίνη : Πρωτεΐνη που δεσμεύει σίδηρο και τον μεταφέρει στο εσωτερικό του κυττάρου. Βρίσκεται στον ορό και τη λέμφο των σπονδυλωτών (Leong S.A. & Winkelmann G., 1998).

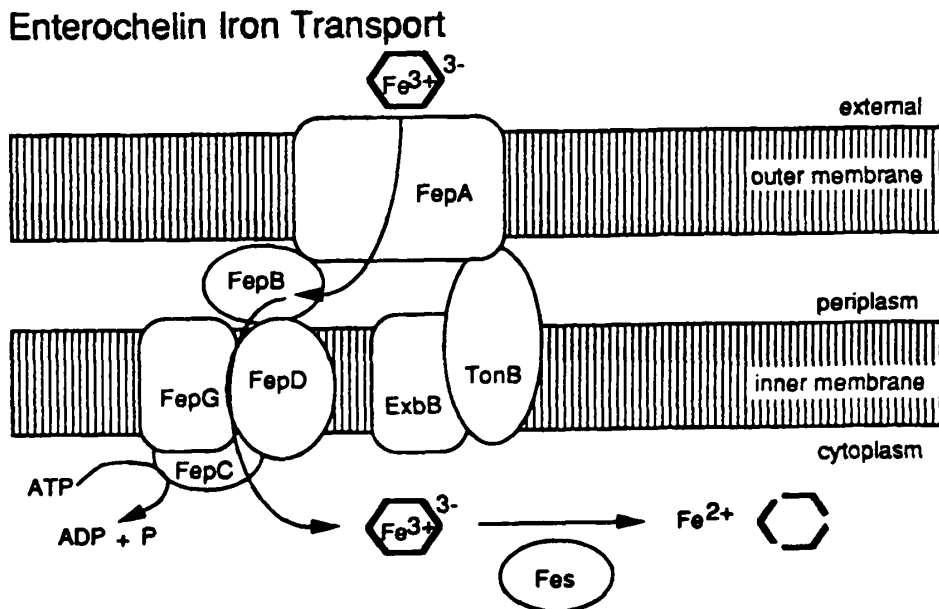
Πρόσληψη σιδήρου

Τα βακτήρια προσλαμβάνουν σίδηρο από μία μεγάλη ποικιλία πηγών. Ανεξαρτήτως από την προέλευση του σιδήρου, αυτός πρέπει να μεταφερθεί διαμέσου των στρωμάτων της επιφάνειας του κυττάρου στο κυτταρόπλασμα. Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, αυτά τα στρώματα είναι η εξωτερική μεμβράνη, ο

περιπλασματικός χώρος όπου βρίσκεται ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης και η κυτταροπλασματική μεμβράνη του βακτηρίου.

Περίληπτικά, η είσοδος του σιδήρου στο κυτταρόπλασμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων απαιτεί μία πρωτεΐνη στην εξωτερική μεμβράνη, με το ρόλο του υποδοχέα, ένα TonB σύστημα (σύστημα παροχής ενέργειας) και ένα ABC σύστημα μεταφορικών πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη. Το πέρασμα του σιδήρου από την εξωτερική και την κυτταροπλασματική μεμβράνη εξαρτάται από την παροχή ενέργειας που γίνεται από το σύστημα πρωτονιοκινητικής δύναμης και ATP αντιστοίχως (Albert G. Moat, 1995). Το σύστημα μεταφοράς σιδήρου μέσα στο κύτταρο και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτό δίδονται στο σχήμα 9

Σχήμα 9: Σύστημα μεταφοράς σιδήρου μέσα στο κύτταρο και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτό.



Σιδεροφόρα

Ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς με τους οποίους τα βακτήρια κατορθώνουν την απόκτηση σιδήρου είναι η παραγωγή και έκκριση μικρών χηλικών μορίων (600 - 1.000 Da), που ονομάζονται σιδεροφόρα. Πολλά είδη διαφορετικών σιδεροφόρων έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί.

Τα σιδεροφόρα συνθέτονται από το μικροβιακό κύτταρο όταν το περιβάλλον το οποίο κατοικεί το μικρόβιο παρουσιάζει έλλειψη σιδήρου. Αυτά απελευθερώνονται από τα κύτταρα, δεσμεύουν τον σίδηρο και κατόπιν το σύμπλοκο σιδεροφόρου - σιδήρου δεσμεύεται από την υποδοχέα πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης (FερΑ) και ακολούθως εισάγεται μέσα στο κύτταρο. Τα σιδεροφόρα κτίζονται γενικώς από αμινοξέα και υδροξυ-οξέα, αν και περιέχουν αμιδικούς δεσμούς, η δε σύνθεση αυτών δεν γίνεται στα ριβοσώματα.

Η δέσμευση του σιδήρου του περιβάλλοντος από τα σιδεροφόρα γίνεται όταν αυτός βρίσκεται στην τρισθενή μορφή του Fe^{3+} και ακολουθεί η απελευθέρωση του σιδήρου στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου υπό τη δισθενή μορφή του.

Μικρόβια τα οποία αποικίζουν περιβάλλοντα όπου η παρουσία του οξυγόνου είναι περιορισμένη (έντερο, βάλτοι), θα πρέπει να έχουν τη δυνατότητα πρόσληψης του σιδήρου υπό την ανηγμένη μορφή του (Fe^{2+}). Στην *E. coli* έχει βρεθεί το δισθενούς σιδήρου μεταφοράς σύστημα. Αποτελείται από δύο πρωτεΐνες, την *fεοΑ* και την *fεοΒ*. Η *fεοΒ* είναι μία μεγάλη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, με μία περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίων, δεικνύοντας ότι η υδρόλυση του ATP είναι η πηγή ενέργειας για τη μεταφορά. Η λειτουργία της *fεοΑ* είναι άγνωστη. Σε Gram-θετικά βακτήρια έχει βρεθεί στην εξωτερική επιφάνειά τους μία ρεδουκτάση, η οποία μετατρέπει τον τρισθενή σε δισθενή σίδηρο. Ακολούθως, ο δισθενής σίδηρος εισάγεται στο κύτταρο με το σύστημα μεταφοράς δισθενούς σιδήρου (Guerinot M.L., 1994).

Περιβάλλοντα με μικρή συγκέντρωση σιδήρου

Ένας από τους παράγοντες που ελέγχει την ανάπτυξη και πληθυσμιακή έκρηξη ενός βακτηριακού είδους είναι η παροχή σιδήρου. Περιβάλλοντα όπως το καθαρό νερό, το εσωτερικό ενός ξενιστή, είναι περιβάλλοντα που χαρακτηρίζονται ως ανεπαρκή ως προς την ποσότητα του σιδήρου, ούτως ώστε να υπάρξει πληθυσμιακή έκρηξη ενός βακτηριακού είδους. Με σκοπό την υπερπήδηση αυτού του βακτηριοστατικού παράγοντα, τα βακτήρια συνθέτουν κατάλληλα μόρια που να έχουν μεγάλη συγγένεια με τον σίδηρο, για να μπορούν

να τον προσλαμβάνουν όταν η διαθεσιμότητά του είναι μικρή. Παθογόνα βακτήρια τα οποία πολλαπλασιάζονται έξω από τα κύτταρα του ξενιστή, όπως στο αίμα ή στους βλεννογόνους και δεν προκαλούν λύση των κυττάρων του ξενιστή, πρέπει να αποκτήσουν το σίδηρο συναγωνιζόμενα την λακτοφερρίνη και την τρανσφερρίνη των κυττάρων του ξενιστή. Ο σκοπός αυτός μπορεί να εκπληρωθεί είτε εκκρίνοντας σιδεροφόρα είτε έχοντας τα βακτήρια πάνω στην επιφάνειά τους κατάλληλους υποδοχείς για τις πρωτεΐνες λακτοφερρίνη και τρανσφερρίνη. Τα σηψαιμικά βακτήρια, τα οποία δεν έχουν ολοκληρωμένα συστήματα μεταφοράς σιδεροφόρων, είναι λιγότερο τοξικά. Από την άλλη πλευρά, παθογόνα βακτήρια που αναπτύσσονται στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή, προσλαμβάνουν το σίδηρο από την αίμη, χωρίς την έκκριση σιδεροφόρων. Αυτό διαπιστώθηκε από παθογόνα βακτήρια μεταλλαγμένα ως προς τα γονίδια τα υπεύθυνα για την έκκριση των σιδεροφόρων, τα οποία παρέμειναν τοξικά για τον ξενιστή.

Πολλοί παθογόνοι χρησιμοποιούν την μικρή συγκέντρωση σιδήρου στον ξενιστή ως μήνυμα για την σύνθεση και έκκριση τοξικών παραγόντων (Otto B.R. et al., 1992).



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το παρόν βιβλίο αποτελεί μια συλλογή κειμένων που έχουν συγγραφεί με σκοπό να βοηθήσουν τον αναγνώστη να κατανοήσει καλύτερα τον κόσμο γύρω μας. Τα κείμενα αυτά είναι γραμμένα με απλό και κατανοητό ύφος, ώστε να είναι διαθέσιμα σε όλους.

Ο σκοπός αυτού του βιβλίου είναι να προσφέρει πληροφορίες και γνώσεις που είναι απαραίτητες για την καθημερινή ζωή. Τα κείμενα έχουν επιλεγεί με βάση την αξία και την χρησιμότητά τους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το ειδικό μέρος του βιβλίου περιλαμβάνει κείμενα που αφορούν σε συγκεκριμένα θέματα, τα οποία είναι ιδιαίτερα σημαντικά για τον αναγνώστη.

Τα κείμενα αυτά είναι γραμμένα με ιδιαίτερη προσοχή και έχουν επιλεγεί με βάση την αξία και την χρησιμότητά τους. Ο σκοπός αυτού του βιβλίου είναι να προσφέρει πληροφορίες και γνώσεις που είναι απαραίτητες για την καθημερινή ζωή. Τα κείμενα έχουν επιλεγεί με βάση την αξία και την χρησιμότητά τους.



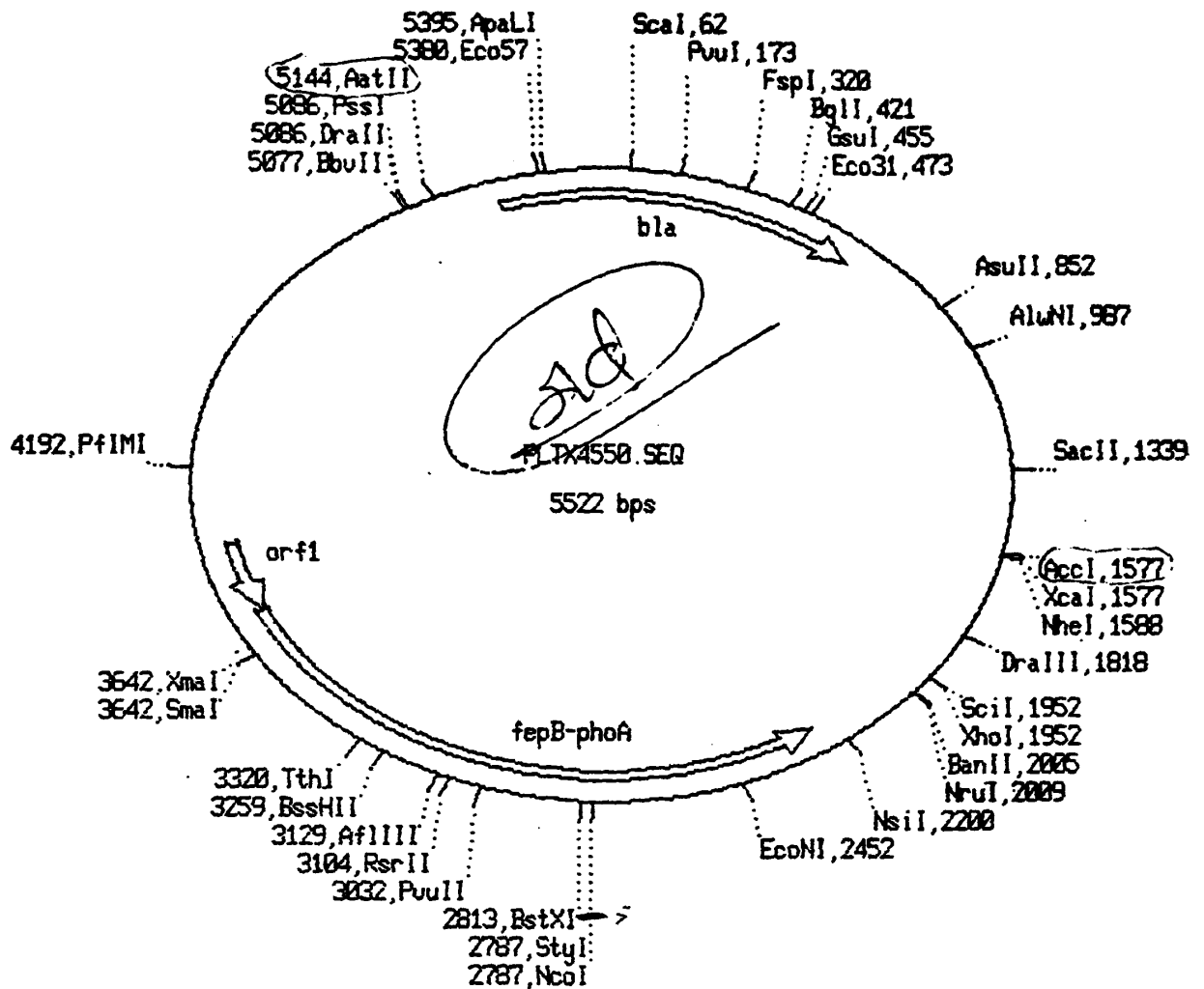
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός πειραμάτων

Με στόχο τη μελέτη της συμπεριφοράς των βακτηριακών κυττάρων σε περιβάλλοντα με μικρή συγκέντρωση σιδήρου, εξετάσαμε : α) την επίδραση του *EpnZ/OmpR* συστήματος μεταγωγής πληροφορίας, σε σχέση με την έκφραση των πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη του σιδήρου (*FerB*) και β) την επίδραση του ακετυλο-φωσφορικού στην έκφραση των πρωτεϊνών του σιδήρου (*FerB*).

Ένα βακτήριο, για να εκκρίνει τα σιδεροφόρα και τις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά αυτών μέσα στο κύτταρο, θα πρέπει πρωτίστως να αντιληφθεί ότι το περιβάλλον στο οποίο ζει έχει χαμηλή συγκέντρωση σιδήρου. Υπάρχουν υπόνοιες ότι ένα από τα συστήματα μεταγωγής πληροφορίας που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή είναι το *EpnZ/OmpR* (υπεύθυνο για οσμωμοριακότητα). Ερευνήσαμε εάν πράγματι ισχύει αυτό, έχοντας ως «πειραματόζωα» διάφορα στελέχη της *E. coli*. Στα στελέχη αυτά περιλαμβάνονται τα «wild strains» και τα μεταλλαγμένα για την πρωτεΐνη *EpnZ* (αισθητήριο πρωτεΐνη).

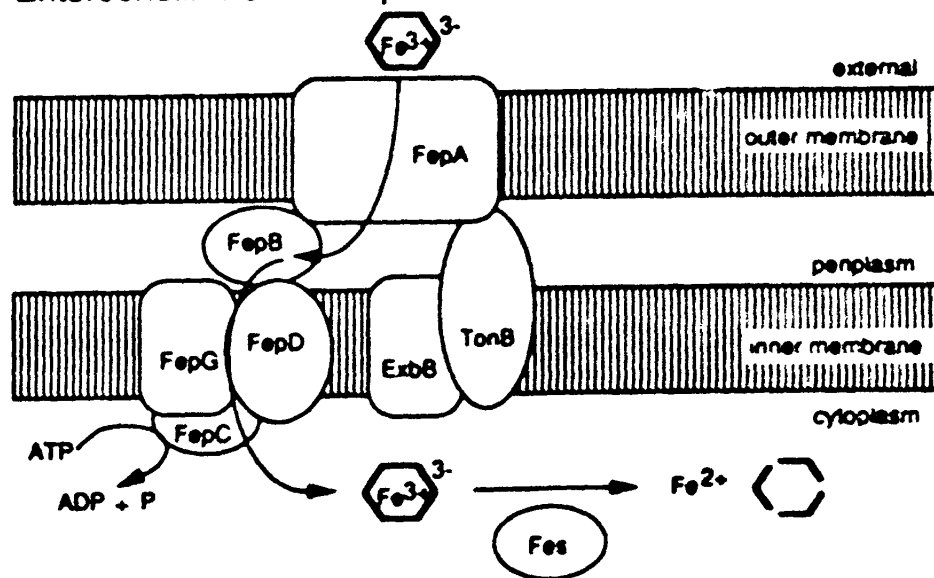
Η *EpnZ* είναι μία αυτοκινάση, άρα θα πρέπει να υπάρχει μία πηγή φωσφορικών για την φωσφορυλίωσή της. Μία από τις πιθανές πηγές φωσφορικών μέσα στο κύτταρο είναι ο σχηματισμός του ακετυλο-φωσφορικού οξέος. Αυτός είναι ο λόγος ελέγχου της συσχέτισης της έκφρασης των πρωτεϊνών του σιδήρου ως προς τη δημιουργία του ακετυλο-φωσφορικού από το βακτηριακό κύτταρο. Προς διερεύνηση της πιθανής αυτής σχέσης, χρησιμοποιήθηκαν το «wild strain» *E. coli* για τα γονίδια δημιουργίας του ακετυλο-φωσφορικού οξέος καθώς και μεταλλαγμένα στελέχη της *E. coli* για το σχηματισμό του ακετυλο-φωσφορικού οξέος. Τα πειράματα αυτά εκτελέστηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Γενετικής Βακτηρίων του Μικροβιολογικού Τμήματος του Πανεπιστημίου του Austin, στο Texas των Η.Π.Α. Χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pLTX4550, που κατασκευάστηκε στο Texas και περιέχει γονίδιο συγχωνευμένο της *ferB* και της *rhoA* και γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Το αμινοτελικό τμήμα της συγχωνευμένης πρωτεΐνης *ferB* - *rhoA* φέρει τα αμινοξέα της *ferB* και το καρβοξυτελικό άκρο της *rhoA*. Η πρωτεΐνη αυτή, επειδή διαθέτει τα αμινοξέα της *ferB* στο αμινοτελικό άκρο, φθάνει στον περιπλασμικό χώρο του βακτηρίου και ακόμη διατηρεί την ενζυματική δύναμη της *rhoA* (αλκαλική φωσφατάση) (Stathopoulos C. et al., 1995).



Σχήμα 10: Πλασμιδίο pLXT4550

Η *ferB* είναι μία πρωτεΐνη που βρίσκεται στον περιπλασματικό χώρο και είναι υπεύθυνη για την μεταφορά του σιδηροφόρου από την εξωτερική μεμβράνη στην κυτταροπλασματική (Σχήμα 9).

Enterochelin Iron Transport



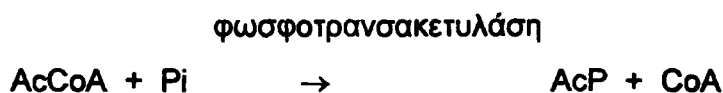
Σχήμα 9: Σύστημα μεταφοράς σιδήρου μέσα στο κύτταρο και οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτό. Προσαρμογή από « Microbial Physiology» των Albert G. Most και John W. Foster.

EnvZ και FerB πρωτεΐνες

Στο πρώτο μέρος των πειραμάτων, εξετάσθηκε η επίδραση των μεταλλάξεων της *EnvZ* στην έκφραση της *ferB*. Το πλασμιδίο pLTX4550 χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό των στελεχών της *E. coli*, έκαστο των οποίων φέρει διαφορετικό τύπο μετάλλαξης της *EnvZ*. Η πρωτεΐνη *EnvZ* είναι μέρος του συστήματος μεταγωγής πληροφορίας για τη ρύθμιση της οσμωμοριακότητας. Η *EnvZ* είναι ενσωματωμένη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Είναι η πρωτεΐνη αισθητήρας και η *OmpR* η ρυθμιστική πρωτεΐνη του συστήματος μεταγωγής πληροφορίας. Το σύστημα *EnvZ/OmpR* είναι υπεύθυνο για την έκφραση των *OmpF*, *OmpC* πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οσμωρύθμιση (πορίνες) και βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηριακού τοιχώματος (Gross R. et al., 1989), (Parkinson J.S. & Kofoid E.C., 1992), (Tokishita S. et al., 1991). Η *EnvZ* έχει τρία χαρακτηριστικά : είναι αυτοκινάση, κινάση και φωσφατάση. Η *EnvZ* φωσφορυλιώνει και αποφωσφορυλιώνει την *OmpR* πρωτεΐνη, η οποία έχει το χαρακτηριστικό να προσδέεται στο DNA (Forst S.A. & Roberts, 1994). Υπάρχουν ενδείξεις ότι το *EnvZ / OmpR* σύστημα επηρεάζει επίσης και την έκφραση των γονιδίων του σιδήρου. Για το λόγο αυτό, εξετάσαμε τη σχέση μεταξύ της *EnvZ* και της *ferB*.

Ακετυλο-φωσφορικό και FerB

Υπάρχουν πρόσφατες παρατηρήσεις που προτείνουν την εμπλοκή του ακετυλο-φωσφορικού στη ρύθμιση του συστήματος μεταγωγής πληροφορίας με δύο συστατικά στα βακτήρια *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* και *Pseudomonas aeruginosa* (Wanner, 1992), (McCleary et al., 1993). Όταν το βακτηριακό κύτταρο βρίσκεται σε αερόβιες συνθήκες, το ακετυλο-φωσφορικό οξύ παράγεται σε περίσσεια, από τη γλυκόζη ή άλλους ενδιάμεσους μεταβολικούς γλυκολίτες. Τα κύτταρα παράγουν οξικό και ATP όταν προσαρμόζονται σε περίσσεια ροής ατόμων άνθρακα, μετατρέποντας το AcCoA διαμέσου του Pta/Ack μονοπατιού.



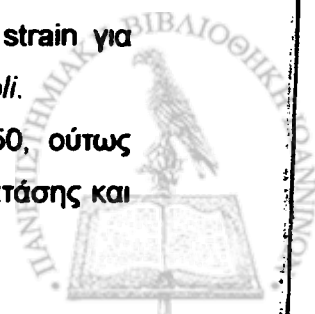
(Albert G. Moat et al., 1995)

Το ακετυλο-φωσφορικό είναι μία πιθανή πηγή φωσφορικών για την φωσφορυλίωση του συστήματος μεταγωγής της πληροφορίας (π.χ. EnvZ / OmpR).

Ανάλυση εύρεσης σχέσης EnvZ και ferB

Τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε για την ανάλυση αυτή είναι τα ακόλουθα : MC4100 (wild strain για EnvZ), SG477 (EnvZ22Am), MH1471 (EnvZ473), JMS58 (new) (EnvZam22), MH513 (wild strain για EnvZ), BW490.12 (wild strain για EnvZ), BW490.9 (EnvZperA8). Όλα τα στελέχη ανήκουν στο είδος *E. coli*.

Τα στελέχη αυτά μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pLTX4550, ούτως ώστε να μπορούμε να μετρούμε την ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης και



συγχρόνως την έκφραση της *ferB*. Η έκφραση της *ferB* πιστοποιείται ακόμη με την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών των μεμβρανών των βακτηριακών στελεχών.

Η παρατήρηση της χαρακτηριστικής ζώνης της *ferB* πιστοποιεί την ύπαρξή της. Άλλος τρόπος παρατήρησης της έκφρασης των πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη του σιδήρου είναι η μόλυνση των αποικιών με τον *ιο λνig*, καθότι οι πρωτεΐνες αυτές λειτουργούν ως υποδοχείς για την εισαγωγή του *ιού* στο κύτταρο.

Το εάν τα κύτταρά μας εκκρίνουν σιδεροφόρα, το είδαμε με την ανάλυση του Απσω, σε περιβάλλον με μικρή συγκέντρωση σιδήρου που δημιουργούμε χρησιμοποιώντας διπυριδύλιο, κατόπιν κατασκευάζουμε τις καμπύλες ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών για να παρατηρήσουμε την επίδραση της χαμηλής συγκέντρωσης σιδήρου στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηριακού στελέχους.

Ανάλυση εύρεσης σχέσης *ferB* με ακετυλο-φωσφορικό οξύ

Τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε στη μελέτη αυτή είναι τα ακόλουθα : RH257 (*wild strain* για ακετυλο-φωσφορικό οξύ), RH258 (*ack :: Tnp_{hoA'} -θ*), RH259 (*pta :: Tnp_{hoA'} -3*), RH260 (έλλειψη *ack, pta*).

Όλα τα στελέχη μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο pLTX4550 για μέτρηση της ενεργότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, συνεπώς της έκφρασης της *ferB*. Η έκφραση της *ferB* ελέγχθηκε ακόμη με την απομόνωση των μεμβρανών, ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών και πιστοποίηση ύπαρξης των χαρακτηριστικών ζωνώσεων των πρωτεϊνών του σιδήρου.

Οι καλλιέργειες χωρίς διπυριδύλιο και στα δύο σκέλη των πειραμάτων ήταν ο μάρτυρας.

Οι συγκεντρώσεις εργασίας των αντιβιοτικών ήταν οι ακόλουθες :

Αμπικιλίνη : 20 $\mu\text{g/ml}$

Καναμικίνη : 10 $\mu\text{g/ml}$

Τετρακυκλίνη : 20 $\mu\text{g/ml}$

Δραστηριότητα αλκαλικής φωσφατάσης σε τριβλία

Αναπτύξαμε μία καινούργια παραλλαγή εξέτασης της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, η οποία μας έδωσε τη δυνατότητα παρακολούθησης της ενεργότητας του ενζύμου ευκρινέστερα.



Πλεονεκτήματα της μεθόδου

1. Εκτέλεση πολλών πειραμάτων αλκαλικής φωσφατάσης σε μία ημέρα.
2. Μπορούμε να έχουμε δείγματα με διπυριδίλιο και χωρίς διπυριδίλιο, την ίδια χρονική στιγμή.
3. Πτυχαίνουμε καλύτερο διαχωρισμό της δραστικότητας του ενζύμου σε σχέση με την κλασσική μέθοδο.

Μειονεκτήματα της μεθόδου

1. Είναι δύσκολο να προσαρμόσουμε την OD λόγω του υπάρχοντος άχρηστου υλικού.
2. Δεν μπορούμε να κατασκευάσουμε την καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους, έτσι ώστε να παρακολουθήσουμε τον χρόνο διπλασιασμού του.



Bacterial strains and plasmid used in this study

Strain	Genotype	Reference
RH257(CP750)	thi-1 thr(Am)-1 leuB6 hisF(Am)159 rps136 lacY	Molecular Microbiology(1994) 12(6), 973-984
RH258(CP758)	RH257 ack::TnphoA'-9 (Kanamycin resistant)	Molecular Microbiology(1994) 12(6), 973-984
RH259(CP760)	RH257 pta::TnphoA'-3 (Kanamycin resistant)	Molecular Microbiology(1994) 12(6), 973-984
RH260(CP764)	RH257 Deletion (ackA pta hisP hisJ dhua) Zej-223::Tn10 (Tetracycline resistant).	Molecular Microbiology(1994) 12(6), 973-984
MC4100	F araD139 Deletion (argF-lac)U169 rpsL150 relA1 ftsB-5310 ptsF25 deoC1 thiA1 rbsR opp	Lysa Shi / Silhavy Lab Department of Molecular Biology, Princeton, New Jersey, March 20, 2000
SG477	MC4100 envZ22(Am)	Lysa Shi / Silhavy Lab Department of Molecular Biology, Princeton, New Jersey, March 20, 2000
MH1471	MC4100 envZ473	Lysa Shi / Silhavy Lab Department of Molecular Biology, Princeton, New Jersey, March 20, 2000
JMS58(New)	MC4100 Fusion (ompC'- lacZ')10-25 envZam22 malPQ::Tn10	Lysa Shi / Silhavy Lab Department of Molecular Biology, Princeton, New Jersey, March 20, 2000
MH513	MC4100 araD Fusion (ompF-lacZ')16-23	Journal of Bacteriology 179, 3729
WH20	MC4100 ara' Deletion (envZ-malP)900 malP::neo Phi(ompF-lacZ')16-23	e-mail from Silhavy, Thomas April 14, 2000
WH57	MC4100 envZ::Kan Fusion (ompF-lacZ')16-23	Journal of Bacteriology 179, 3729
WH66	WH57 Deletion (pta ackA hisQ hisP) zej-223::Tn10	Journal of Bacteriology 179, 3729
BW490.12	robA1 creC510 rpsL267 crp-72 rpos(att) thi	Feras Hantash Dissertation
BW490.9	BW490.12 envZ(perA8)	Feras Hantash Dissertation
Plasmid (pLTX4550)	Fusion fepB-phoA+ Amp+	Feras Hantash Dissertation



Υλικά και μέθοδοι

Βακτηριακά στελέχη, πλασμίδιο και φάγος

Τα στελέχη της *E. coli* και το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή περιγράφονται στον ανωτέρω πίνακα. Ο φάγος λνir χρησιμοποιήθηκε για την μόλυνση των στελεχών. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή ήταν από την τράπεζα του Εργαστηρίου και από τον Dr. Thomas J. Silhavy (Πανεπιστήμιο του Princeton). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν στους 37° C με κίνηση, στα κατάλληλα θρεπτικά μέσα (LB). Επίσης, τα τριβλία επωάστηκαν στους 37° C.

Θρεπτικά μέσα, διαλύματα

LB ζυμός (ανά λίτρο) : 10 gr tryptone, 5 gr yeast extract, 10 gr NaCl, pH 7.

LB τριβλία : 10 gr tryptone, 5 gr yeast extract, 10 gr NaCl + 15 gr agar.

Για τα υγρά θρεπτικά υλικά, οι κατάλληλες ποσότητες αντιβιοτικών και διπυριδιλίου προστέθηκαν κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος. Για τα τριβλία προστέθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες αντιβιοτικών και διπυριδιλίου, μετά από την αποστείρωση. Ετοιμάσαμε τριβλία με 100 μM, 200 μM και 300 μM διπυριδιλίου.

Tris-Cl και p-νιτροφαινύλιο της φωσφατάσης (p-nitrophenyl phosphatase) αγοράστηκαν από τη Sigma. Τα ένζυμα περιορισμού Acc1 και Sma11 αγοράστηκαν από τα England BioLabs.

Μετασχηματισμός

Μετασχηματίσαμε τα στελέχη RH257, RH258, RH259, RH260, MH513, WH57, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του κρύου CaCl₂.

1. Ολονύκτια καλλιέργεια του στελέχους στο επιθυμητό μέσο, στους 37° C.
2. Αραίωση της ολονύκτιας καλλιέργειας 1 : 100, σε 10 ml θρεπτικού υλικού.
3. Επώαση στους 37° C μέχρι OD να φθάσει 0.6 στα 600 nm.
4. Μάζεμα κυττάρων στις 2.000 rpm, στους 4° C, για 15 λεπτά.
5. Χύνουμε το υπερκείμενο και ανακατεύουμε με κρύο 100 mM MgCl₂. 6H₂O
6. Φυγοκεντρούμε στις 6.000 rpm, στους 4° C, για 5 λεπτά.
7. Χύνουμε το υπερκείμενο και ανακατεύουμε τα κύτταρα σε 2 ml κρύο 100 mM CaCl₂.



8. Κρατούμε τα κύτταρα μέσα στον πάγο για 30 λεπτά.
9. Φυγοκεντρούμε στις 6.000 rpm, στους 4° C, για 5 λεπτά.
10. Σε κρύους σωλήνες προσθέτουμε 100 μl 10 mM Tris-Cl pH 7.8, 1 μl DNA (πλασμίδιο) και 100 μl κυττάρων ικανών να προσλάβουν το πλασμίδιο.
11. Αναμειγνύουμε και κρατούμε στον πάγο για 30 λεπτά ή περισσότερο.
12. Επωάζουμε για 5 λεπτά, στους 37° C σε υδατόλουτρο.
13. Προσθέτουμε 800 μl θρεπτικού υλικού.
14. Επωάζουμε το μετασχηματισμένο μίγμα για 1 - 2 ώρες.
15. Στρώνουμε το μίγμα επάνω σε θρεπτικό υλικό με τα κατάλληλα αντιβιοτικά.
16. Επωάζουμε στους 37° C όλη τη νύχτα.

Μετασχηματίσαμε τα στελέχη WH20, WH66, MC4100, SG477, MH1471 και JMS58 με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης (περιγράφεται στο βιβλίο «Short protocols in Molecular Biology»).

Δραστηριοποίηση αλκαλικής φωσφατάσης

Μετρήσαμε τη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο του Menoil (Menoil C. 1991, Methods Cell Biology). Ολονύκτιες καλλιέργειες αραιώνονται 1 : 100 και αναπτύσσονται μέχρι τη μέση της εκθετικής φάσης (OD = 0.5). Τα κύτταρα γίνονται διαπερατά με 0.1% SDS και χλωροφόρμιο. Η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης μετρήθηκε προσθέτοντας p-νιτροφαινόλιο της φωσφατάσης στα κύτταρα. Κατόπιν, τα κύτταρα επώαστηκαν στους 37° C μέχρι της εμφάνισης ελαφριού κίτρινου χρώματος.

$$[\text{OD } 420 - (1.75 \times \text{OD } 550)] \cdot 1.000$$

$$\text{Μονάδες Δραστικότητας} = \frac{\quad}{\quad}$$

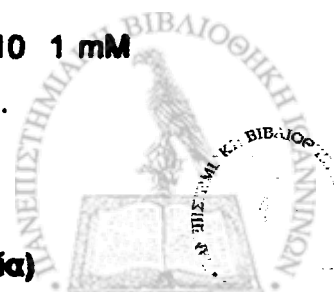
—

Χρόνος σε λεπτά X OD 600 X όγκος κυττάρων σε

ml

Διαλύματα : 1M Tris-HCl, pH 8, 10mM MgSO₄, 1M Tris-HCl pH 8 + 0.10 1 mM ZnCl₂, 0.5M EDTA pH 8 1M KH₂PO₄ για τον τερματισμό της αντίδρασης.

Παραλλαγή της δραστικότητας της αλκαλικής φωσφατάσης (τριβλία)



Αναπτύξαμε μία καινούργια διαδικασία, η οποία διαφέρει από την κλασική. Ετοιμάσαμε τριβλία με θρεπτικό υλικό και δισπυριδίο και στρώσαμε τις ολονύκτιες καλλιέργειες πάνω στα τριβλία. Αφού είχαμε κατάλληλη ανάπτυξη, κατόπιν σκουπίζαμε τα κύτταρα από την επιφάνεια του τριβλίου.

1. Προσθέτουμε 1M Tris-Cl pH 8, μέχρι η επιφάνεια του τριβλίου να είναι πλήρως καλυπτόμενη.
2. Χρησιμοποιούμε σπάτουλα για σκούπισμα των κυττάρων.
3. Μεταφορά των κυττάρων σε δοκιμαστικό σωλήνα, χρησιμοποιώντας μία πιπέττα Pasteur.
4. Προσαρμογή OD των κυττάρων 0.5 έως 0.8. Η OD 0.5 είναι συχνά όχι κατάλληλη, λόγω του άχρηστου υλικού. Η εμπειρία μας θεωρεί ότι 0.7 είναι η καλύτερη OD (ανατάραξη των κυττάρων πριν μετρήσουμε την OD).

Κατόπιν ακολουθούμε τα βήματα της κλασικής μεθόδου.

Ηλεκτροφόρηση DNA (Gel αγαρόζης)

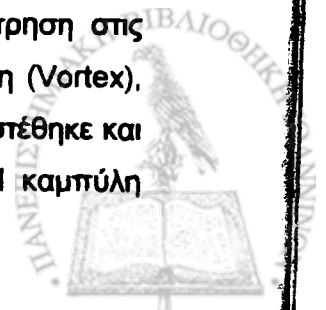
Η αγαρόζη λειώθηκε μέσα σε 1 ΧΤΑΕ. Το ποσοστό της αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1%. Τα δείγματα του DNA φορτώθηκαν με 1/5 DNA χρωστική. Η ηλεκτροφόρηση εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας 1 ΧΤΑΕ διάλυμα σε δυναμικό από 80 έως 100 V. Το DNA χρωματίστηκε σε αιθυλικό βρώμιο (0.5 mg/ml).

Εξαγωγή πλασμιδίου

Χρησιμοποιήσαμε το Q 1Aprep Spin Kit (αναφέρεται στη σελίδα 18 Q1Aprep εγχειρίδιο).

Agnow ανάλυση

Αποσύρουμε 2 ml από το υπερκείμενο της καλλιέργειας (φυγοκέντρηση στις 4.000rpm για 20 λεπτά). 0.5 ml από 1 M HCl προστέθηκε, ανατάραξη (Vortex), κατόπιν 1 ml από 10% νιτρικού νατρίου + 10% μολυβδικό νάτριο προστέθηκε και αναμίχθηκε. Το μίγμα ουδετεροποιήθηκε με 1 M από 2N KOH. Η καμπύλη μάρτυρας κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας DHBA.



SDS - PAGE Ηλεκτροφόρηση

Οι ηλεκτροφορήσεις διεξήχθησαν με σκοπό την κατανομή των πρωτεϊνών των μεμβρανών (εξωτερικής - εσωτερικής μεμβράνης). Η απομόνωση και η ηλεκτροφόρηση διεξήχθησαν ακολουθώντας τα standards πρωτόκολλα.

Προέλευση δειγμάτων

Συνολικά εξετάσθηκαν δείγματα προερχόμενα από τρία διαφορετικά οικοσυστήματα:

- I. Συλλογή ύδατος από αλιτικό περιβάλλον (Δρακόλιμνη)
- II. Βιοψίες από φυσιολογικές και παθολογικές περιοχές στόμων με συμπτώματα γαστρεντερικών δυσλειτουργιών.
- III. Συλλογή ύδατος προερχόμενου από ειδική δεξαμενή πτηνοσφαγείου.

Αλιτικό οικοσύστημα (Λίμνες Δρακόλιμνη, Τσουμάνη)

Χειρισμός δειγμάτων και ανάλυση βακτηριακών δεικτών

Τα δείγματα νερού συλλέχθηκαν από τις αλιτικές λίμνες Δρακόλιμνη και Τσουμάνη, που βρίσκονται σε υψόμετρο 2.100 περίπου μέτρων, στο όρος Τύμφη, στην οροσειρά της Πίνδου.

Η συλλογή των δειγμάτων από τις λίμνες έγινε κατά τη διάρκεια της καλοκαιρινής περιόδου (τέλος Μαΐου έως τέλος Σεπτεμβρίου). Για κάθε δειγματοληπτική περιοχή συλλέχθηκαν διπλά δείγματα, 10 έως 15 cm κάτω από την επιφάνεια του νερού, χρησιμοποιώντας δειγματοληπτική στήλη. Τα δείγματα νερού τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένες φιάλες των 250 ml και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε πάγο, μέσα σε 4 ώρες από τη χρονική στιγμή της συλλογής. Τα δείγματα αποχλωριώθηκαν προσθέτοντας 1 ml από αποστειρωμένο θειοθειικό νάτριο, δίνοντας τελική συγκέντρωση περίπου 100 mg/L (APHA, 1985).

Στο εργαστήριο τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 5° C μέχρι να ολοκληρωθεί η ανάλυση. Όλες οι αναλύσεις εκτελέσθηκαν μέσα σε 24 ώρες από τη συλλογή.

Η μέθοδος των μεμβρανών με φιλτράρισμα χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και ταυτοποίηση του *C. perfringens*. Όλα τα δείγματα πέρασαν διαμέσου δύο φίλτρων, ένα (20 - 25 μm μέγεθος πόρων) χρησιμοποιήθηκε για τη

συγκράτηση του φυτοπλαγκτόν και το άλλο (μέγεθος πόρων 0.45 μm) για το *C. perfringens*. Η τελευταία μεμβράνη φίλτρου, η οποία συγκρατεί το *C. perfringens*, τοποθετήθηκε σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα 9 ml θρεπτικού υλικού L.S.

Η αποστείρωση του θρεπτικού υλικού έγινε στους 115^o C, για 20 λεπτά. Χρησιμοποιήθηκε αποστείρωση μέσω φιλτραρίσματος, για την προετοιμασία του άνυδρου μεταδιθειώδους νατρίου και του τρισθενούς σιδηρο-αμμωνιακού κιτρικού διαλύματος. Πριν τη χρήση, οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το θρεπτικό υλικό βράζονται για 20 λεπτά, με σκοπό τη μείωση του οξυγόνου. Ακολούθως, προστίθενται 0.5 ml μεταδιθειώδους νατρίου από 1.25% διαλύματος και 0.5 ml από 1% τρισθενούς σιδηρο-αμμωνιακού κιτρικού διαλύματος.

Τα δείγματα επωάζονται αεροβίως σε υδατόλουτρο 46^o C για 24 ώρες για τις βλαστικές μορφές. Η ανίχνευση των σπόρων πραγματοποιήθηκε με την ενεργοποίησή τους μέσω θέρμανσης για 20 λεπτά στους 75^o C. Η θετικότητα του δείγματος αναγιγνώσκεται με την εμφάνιση μαύρου ιζήματος (FeS), θολερότητας (ζύμωση λακτόζης), αερίου (CO₂) στους σωλήνες Durham.

Μετρήθηκαν η θερμοκρασία των νερών των λιμνών και το pH αυτών, χρησιμοποιώντας ένα φορητό θερμόμετρο και χάρτινες λωρίδες δείκτες για τη μέτρηση του pH στη θέση δειγματοληψίας.

Η διαδικασία απομόνωσης των ολικών κολοβακτηριδίων, των κοπρανωδών κολοβακτηριδίων, στρεπτοκόκκων και εντεροκόκκων, διεξήχθη εφαρμόζοντας standard μικροβιολογικές μεθόδους, τεχνικές καλλιέργειας και ταυτοποίησης (ARHA, 1985, Μέθοδος φιλτραρίσματος μεμβρανών, η διαδικασία περιγράφεται κατωτέρω).

Χειρισμός δειγμάτων και ανάλυση αυτών προς καθορισμό μεταλλικών στοιχείων

Τα δείγματα (250 ml) συλλέχθηκαν σε Nalgene φιάλες και 1 ml από συμπυκνωμένο HNO₃ (65% υπερ-καθαρό) προστέθηκε και το pH των διαλυμάτων προσαρμόσθηκε σε pH \cong 2. Τα δείγματα, πριν την ανάλυση, πέρασαν από φιλτράρισμα υπό πίεση από αποστειρωμένα φίλτρα κυτταρίνης (0.45 μm , 6N-6 Metrical) και Nalgene φίλτρα συγκρατητές (No 300). Μετά το φιλτράρισμα, τα δείγματα πλύθηκαν με 50 ml διπλά απεσταγμένο νερό σε προπλυμένα τρυβλία και μετά αποξηράνθηκαν για 18 ώρες σε 50^o C σε φούρνο. Τα φίλτρα μεταφέρθηκαν σε μία Teflon βόμβα, 3 ml από συμπυκνωμένο HNO₃ προστέθηκαν και οι βόμβες τοποθετήθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων για 5

λεπτά σε 500 W, με σκοπό την πέψη των μετάλλων των δειγμάτων. Αφού ψυχρανθεί το περιεχόμενο των βομβών, μεταφέρονται σε μία 20 ml μέτρησης όγκου φιάλη. Ξέπλυμα με διπλά απεσταγμένο νερό και καθορισμό του όγκου με επίσης διπλά απεσταγμένο νερό για τον καθορισμό των μετάλλων. Τα φίλτρα και το φιλτραρισμένο νερό αναλύονται κατόπιν χρησιμοποιώντας ένα ατομικής απορρόφησης φασματοφωτόμετρο (Perkin Elmer Model 560). Τα μέταλλα Mn, Fe, Cu και Zn καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας φλόγας ατομική απορρόφηση (FAAS), ενώ τα Ni, Pb και Cd χρησιμοποιώντας κλίβανο γραφίτη (GFAAS).

Βιοψίες από φυσιολογικές και παθολογικές περιοχές στρώτων με συμπτώματα γαστρεντερικών δυσλειτουργιών.

Τα δείγματα βιοψιών από φυσιολογικές και παθολογικές περιοχές προέρχονται από ασθενείς των οποίων οι τελικές διαγνώσεις μετά από ιστοπαθολογική εξέταση είναι οι εξής :

Καρκίνος παχέος εντέρου (αριθμός βιοψιών 5)

Πολύποδας παχέος εντέρου (αριθμός βιοψιών 8)

Ελκώδης κολίτιδα (αριθμός βιοψιών 5)

Νόσος του Crohn (αριθμός βιοψιών 1)

Προφυκτά στάδια
προκαρκινωματώδους εντέρου (αριθμός βιοψιών 1)

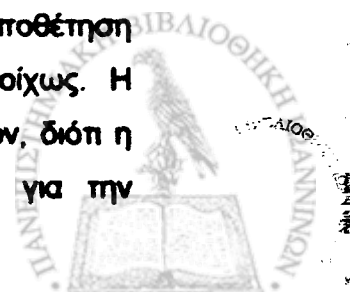
Λαχνωτό αδένωμα (αριθμός βιοψιών 1)

Οικογενής πολυποδίαση (αριθμός βιοψιών 1)

Αδένωμα (αρχή σχηματισμού μικρού πολύποδα), (αριθμός βιοψιών 1)

Συλλογή δειγμάτων

Οι βιοψίες λήφθηκαν από την γαστρεντελογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Κατά τη διάρκεια κολονοσκόπησης, μεταφερόταν άσηπτα μικρό τμήμα φυσιολογικής και παθολογικής περιοχής του εντερικού τοιχώματος σε γυάλινους σωλήνες αεροστεγώς κλεισμένους με τοποθέτηση στοιβάδας paraffine oil που περιείχαν ζωμό Brain Heart, αντιστοίχως. Η μεταφορά των δειγμάτων γινόταν στο εργαστήριο, το ταχύτερο δυνατόν, διότι η καταλληλότητα του δείγματος είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για την



επιτυχία των εργαστηριακών εξετάσεων , καθώς το δείγμα πρέπει να φθάσει στο εργαστήριο με την ίδια σύνθεση σε βακτήρια που είχε τη στιγμή της λήψης.

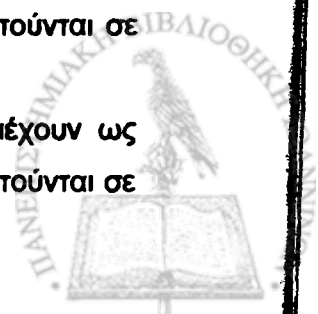
ΜΕΘΟΔΟΙ

Απαιτούμενα υλικά

1. Σιφώνια, γυάλινα ή πλαστικά μιας χρήσης βαθμολογημένα και χωρητικότητας από 0,1ml έως 11ml.
2. Γυάλινοι σωλήνες χωρητικότητας 10 ml.
3. Πώματα από υδρόφοβο βαμβάκι για γυάλινους σωλήνες.
4. Γυάλινα σωληνάκια Dur
5. Αποστειρωμένες μεταλλικές λαβίδες.
6. Μεταλλικά στατό για γυάλινους σωλήνες.
7. Αναδευτήρας τύπου Vortex (GENIE-2).
8. Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (varipette 10-100μl και 100-1000μl)
9. Πλαστικά ρύγχη μιας χρήσης αποστειρωμένα, κίτρινα 10-100μl και μπλε 100-1000μl για τις παραπάνω πιπέτες.
10. Επωαστικός θάλαμος (IPS DIAGNOSTICS Pasteur)
11. Φυγόκεντρος
12. Υδατόλουτρο.
13. API E
14. API STREP
15. Gas Pak

Με σκοπό να προσδιορισθεί η ταυτότητα των βακτηριακών ειδών που κυριαρχούν στο εντερικό μικρο-οικοσύστημα ατόμων με γαστρεντερικές δυσλειτουργίες, ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα :

1. Ήπια ανάδευση των δύο γυάλινων σωληνών, με ζυμό Brain Heart, που περιέχουν τις βιοψίες φυσιολογικής και παθολογικής περιοχής του εντερικού τοιχώματος αντίστοιχα.
2. Από τους προαναφερόμενους σωλήνες τοποθετούνται :
 - α. 0.2 ml σε τρυβλία (ένα για κάθε γυάλινο σωλήνα) που περιέχουν ως θρεπτικό υπόστρωμα το Mc Conkey agar. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο, στους 37^o C για 48 ώρες.
 - β. 0.2 ml σε τρυβλία (ένα για κάθε γυάλινο σωλήνα) που περιέχουν ως θρεπτικό υπόστρωμα το Mannitol Salt agar. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο, στους 37^o C για 48 ώρες.



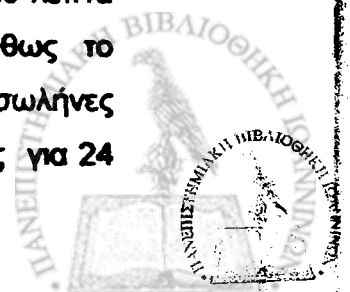
- γ. 0.2 ml σε τρυβλία (ένα για κάθε γυάλινο σωλήνα) που περιέχουν ως θρεπτικό υπόστρωμα το Egg York agar. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε φακέλους Gas Pak και ακολούθως σε επωαστικό κλίβανο, στους 37° C για 5 ημέρες.
- δ. Από τους δύο γυάλινους σωλήνες τοποθετούνται 1 ml αντίστοιχα σε δύο κενούς αποστειρωμένους γυάλινους σωλήνες, οι οποίοι τοποθετούνται σε υδατόλουτρο, στους 75° C για 10 min. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με σκοπό την ενεργοποίηση σπιρογογόνων μορφών που τυχόν υπάρχουν στα συλλεγμένα δείγματα βιοψιών. Στη συνέχεια, 0.2 ml από τους τελευταίους γυάλινους σωλήνες τοποθετούνται σε τρυβλία (ένα για κάθε γυάλινο σωλήνα) που περιέχουν ως θρεπτικό υπόστρωμα το Columbia agar τροποποιημένο. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε Gas Pak και στη συνέχεια σε επωαστικό κλίβανο, στους 37° C για 5 ημέρες.
- ε. 1 ml, με τη βοήθεια σιφωνίου μιας χρήσης, το μεταφέρουμε σε γυάλινους σωλήνες που περιέχουν 9 ml L.S. ζυμού αντίστοιχα. Η υπόλοιπη διαδικασία αναπτύσσεται στη μέθοδο απομόνωσης του *C. perfringens*.
3. Η όλη μεθοδολογία που αναπτύσσεται στο βήμα 2 επαναλαμβάνεται την δεύτερη ημέρα, αφού έχει προηγηθεί επώαση των αρχικών γυάλινων σωλήνων που περιέχουν τα δείγματα βιοψιών, υγιούς και παθολογικής περιοχής εντερικού τοιχώματος, στους 37° C για 24 ώρες.

Μέθοδος απομόνωσης του *C. perfringens*

Στην έρευνά μας για την απομόνωση του *C. perfringens* χρησιμοποιήθηκε Lactose - Sulfite (L.S.) ζυμός (Υ,1).

Από κάθε δείγμα βιοψίας που βρίσκεται εντός γυάλινου σωλήνα με ζυμό Brain Heart παίρνουμε 1 ml υγρού, με σιφώνι μιας χρήσης, και το μεταφέρουμε σε γυάλινο σωλήνα που περιέχει 9 ml L.S. ζυμού. Πραγματοποιείται τοιουτοτρόπως η 10^{-1} αραιώση. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται δεκαδικές αραιώσεις, σε γυάλινους σωλήνες που περιέχουν 9 ml L.S. ζυμού, μέχρι την 10^{-3} αραιώση.

Από το αρχικό δείγμα βιοψίας, παίρνουμε ξανά, 1ml υγρού και το μεταφέρουμε σε γυάλινο σωλήνα ο οποίος μετέπειτα θερμαίνεται για 20 λεπτά στους 80°C, για τον προσδιορισμό σπόρων στο δείγμα. Ακολούθως το θερμαινόμενο δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα με 9 ml L.S. ζυμό Όλοι οι σωλήνες τοποθετούνται σε μεταλλικά στατό και επωάζονται στους 46°C αεροβίως για 24 ώρες.



Ανάγνωση του αποτελέσματος

Για την εξαγωγή του αποτελέσματος εκτιμάται για κάθε αραιώση δείγματος σε υλικό L.S. ζυμό η θόλωση από ζύμωση λακτόζης, η παραγωγή ιζήματος (FeS) και ο σχηματισμός αερίου (CO₂).

Θόλωση : Αναγνωρίζεται από την απώλεια της διαύγειας του θρεπτικού υλικού , λόγω ζύμωσης της λακτόζης.

Παραγωγή : Αναγνωρίζεται με την ύπαρξη μαύρου χρώματος στον πυθμένα του γυάλινου σωλήνα ή σε όλη τη μάζα του υγρού λόγω παραγωγής FeS .

Σχηματισμός αερίου (CO₂) : Αναγνωρίζεται με την ύπαρξη φυσαλίδων στο εσωτερικό του σωληναρίου Durham και απώθηση αυτού προς την επιφάνεια του υγρού κατά την διάρκεια της ζύμωσης της λακτόζης .

Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία 46^o C για τον διαχωρισμό από άλλα βακτήρια που δίνουν επίσης την αντίδραση της ζύμωσης της λακτόζης θετική.

- Η κάθε αραιώση του εξεταζόμενου δείγματος σε υλικό L.S. κρίνεται θετική ως προς την ύπαρξη στελεχών του είδους *C. perfringens* αν συνυπάρχει θολερότητα, παραγωγή ιζήματος και σχηματισμός αερίου. Το ίδιο ισχύει και για την ανάδειξη θετικού ή όχι αποτελέσματος για την ύπαρξη σπόρων στο εξεταζόμενο δείγμα.

Μέθοδος απομόνωσης του γένους *Staphylococcus*

Στην έρευνά μας για την απομόνωση του γένους *Staphylococcus* από δείγματα βιοψιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης σε Mannitol Salt Agar (Chapman 1945, APHA 1966).

Το γένος *Staphylococcus* ανήκει στην οικογένεια *Micrococcaceae*.

Το γένος *Staphylococcus* περιλαμβάνει τρία είδη: α) *S. aureus*, β) *S. epidermidis*, γ) *S. saprophyticus* (Bergey' s Manual, 1974). Τα είδη αυτά διαφοροποιούνται με βάση τα χαρακτηριστικά του πίνακα 1 .

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά διαφοροποίησης των ειδών του γένους *Staphylococcus*



Ιδιότητα	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Παραγωγή πηκτάσης	+	-	-
Ζύμωση μαννιτόλης (αεροβίως)	+	d	d
Ζύμωση μαννιτόλης (αναεροβίως)	+	-	-
Παραγωγή α-τοξίνης	+	-	-
Θερμανθεκτική Dnase	+	-	-

d: διάφορη αντίδραση (Bergey's Manual, 1974)

Από τους αρχικούς γυάλινους σωλήνες που περιέχουν τα δείγματα βιομικών φυσιολογικής και παθολογικής περιοχής του εντερικού τοιχώματος γίνεται απευθείας επιφανειακή σπορά, με τη βοήθεια κεκαμένης γυάλινης ράβδου 0,2ππ σε τρυβλία που περιέχουν ως υπόστρωμα Mannitol Salt agar (Υ,2).

Γίνεται επώαση στους 37°C για 24-48 ώρες. Μετά την επώαση όλες οι χαρακτηριστικές αποικίες (εφόσον είναι λιγότερες από 10) ή αριθμός ίσος με την τετραγωνική ρίζα του συνόλου τους (εφόσον είναι περισσότερες από 10) εξετάζονται μικροσκοπικώς με την παρασκευή χρώσης Gram.

Στα παρασκευάσματα Gram χρώσης ευρίσκεται τυπικός σωρός κόκκων Gram + σε σχηματισμούς μικρού βοτρουσταφυλιού. Ζεύγη κόκκων ως και μεμονωμένοι κόκκοι είναι επίσης παρόντες. Κατόπιν οι χαρακτηριστικές αποικίες υποβάλλονται στη δοκιμή της καταλάσης (B,1) και στη δοκιμή της πηκτάσης (B,2) με τη μέθοδο επί αντικειμενοφόρου πλάκας και επί αρνητικού αποτελέσματος με τη μέθοδο των σωληνών (B,2).

Ανάγνωση αποτελέσματος: Θετικό αναγνωρίζεται το υπό εξέταση δείγμα όταν οι χαρακτηριστικές αποικίες της προκαταρκτικής δοκιμής που θεωρήθηκαν ως σταφυλλόκοκοι δώσουν θετική τη δοκιμή της καταλάσης. Ακολούθως όλες οι αποικίες που έχουν χαρακτηριστεί ως σταφυλλόκοκοι υποβάλλονται στη δοκιμή της πηκτάσης (κουαγκουλάσης). Επί θετικού αποτελέσματος της δοκιμής της πηκτάσης αναγνωρίζονται ως *Staphylococcus aureus*.

Οι χαρακτηριστικές αποικίες του γένους *Staphylococcus* που αναπτύχθηκαν από κάθε δείγμα βιοψίας διατηρούνται σε ζυμό Brain heart infusion (Υ,7) στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C.

Μέθοδος απομόνωσης Κολοβακτηριοειδών - Εντερικής προέλευσης
Κολοβακτηριοειδών - *Escherichia coli*



Στην έρευνά μας για την απομόνωση κολοβακτηριοειδών εντερικής προέλευσης με κύριο αντιπρόσωπο την *E. coli* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης σε McConkey Agar (Υ,3) και σε Endo Agar (Υ,4).

Τα κολοβακτηριοειδή συνιστούν μια ομάδα της οικογένειας των εντεροβακτηριοειδών. Είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να ζυμώνουν τη λακτόζη με παραγωγή οξέος και αερίου.

Οι αντιπρόσωποι των κολοβακτηριοειδών ανήκουν στα γένη *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* και *Klebsiella*.

Πίνακας 9 : Ταξινόμηση κολοβακτηριοειδών με βάση τις δοκιμές IMVIC

Είδος - τύπος	Παραγωγή αερίου στους 44 - 44,5 °C	Ινδόλη (I)	Methyl-red (ερυθρό του μεθυλίου) (M)	Voges Proskauer (V)	Κιτρικά (C)
<i>Escherichia coli</i> Τύπος I (τυπικά)	+	+	+	-	-
Τύπος II	-	-	+	-	-
Ενδιάμεσοι					
Τύπος I	-	-	+	-	+
Τύπος II	-	+	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>					
Τύπος I	-	-	-	+	+
Τύπος II	-	+	-	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	+
<i>Klebsiella spp.</i>	-	-	-	+	+
<i>Citrobacter spp.</i>	-	-	+	-	+

Από τους αρχικούς γυάλινους σωλήνες που περιέχουν τα δείγματα βιοψιών φυσιολογικής και παθολογικής περιοχής του εντερικού τοιχώματος γίνεται

απειθείας επιφανειακή σπορά, με τη βοήθεια κεκαμένης γυάλινης ράβδου 0,2ml σε τρυβλία που περιέχουν ως υπόστρωμα McConkey agar. Τα τρυβλία επωάζονται στους 35°C -37°C για 24-48 ώρες. Μετά την επώαση αριθμούνται οι κόκκινες αποικίες, χαρακτηριστικές, που ζυμώνουν τη λακτόζη. Από τις χαρακτηριστικές αποικίες κάθε τρυβλίου γίνονται παρασκευάσματα Gram χρώσης. Οι αποικίες που παρουσιάζουν κατά τη μικροσκόπηση Gram αρνητικά βακτηρίδια μέσου μήκους και διαμέτρου μεμονωμένα ενοφθαλμίζονται επιφανειακά με κρίκο σε τρυβλία που περιέχουν ως υπόστρωμα Endo Agar και επωάζονται στους 35-37°C για 24-48 ώρες. Οι χαρακτηριστικές αποικίες της *E. coli* που αναπτύχθηκαν στο υπό εξέταση δείγματα, διατηρούνται σε ζυμό Brain heart infusion (Υ,7) στην κατάψυξη σε θερμοκρασία -20°C. Ο σχηματισμός μαύρων με μεταλλική απόχρωση αποικιών υποδηλώνει θετικότητα για κολοβακτηριοειδή και κυρίως *E. coli* στο εξεταζόμενο δείγμα.

Από κάθε χαρακτηριστική αποικία που αναπτύχθηκε στο McConkey agar και μετέπειτα στο Endo agar πραγματοποιούνται οι δοκιμές IMVIC :

Παραγωγή αερίου στους 44 - 44,5 °C

Δοκιμή Ινδόλης (Υ,3)

Δοκιμή ερυθρού του μεθυλίου (Υ,4)

Δοκιμή Voges - Proskauer (Υ,5)

Δοκιμή χρησιμοποίησης των κιτρικών αλάτων (Υ,6)

Ανάγνωση αποτελέσματος: Η θετικότητα για εντερικής προέλευσης κολοβακτηριοειδών - *Escherichia coli* του υπό εξέταση δείγματος βιοψίας αναγνωρίζεται από τα αποτελέσματα των δοκιμών IMVIC, των οποίων οι τεχνικές και η αναγνώριση του θετικού αποτελέσματος δίνονται στο ειδικό παράρτημα ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ.

Συμπληρωματικά για την ταυτοποίηση των στελεχών της *E. coli* έγινε η χρήση συστημάτων API E .

Μέθοδος απομόνωσης εντερικών στρεπτοκόκκων



Οι στρεπτόκοκκοι που ανήκουν στην ορολογική ομάδα D της Lancefield κατατάσσονται σε τρεις υποομάδες, με βάση τα φυσικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τα οποία περιγράφονται στον πίνακα 10. Οι υποομάδες αυτές είναι :

1. *Streptococcus faecalis* και τα υποείδη του : *S. faecalis* var. *liquefasciens*,
S. faecalis var. *symogenes*.
2. *Streptococcus faecium* και *Streptococcus faecium* var. *durans*.
3. *Streptococcus bovis* και *Streptococcus equinus*.

Πίνακας 10 : Φυσικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της ομάδας D των στρεπτοκόκκων

Φυσικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά	<i>S.</i> <i>faecalis</i>	<i>S.</i> <i>faecium</i>	<i>S.</i> <i>durans</i>	<i>S.</i> <i>bovis</i>	<i>S.</i> <i>equinus</i>
Ανάπτυξη σε θερμοκρασία 45 ^o C	+	+	+	+	+
Ανάπτυξη σε συγκέντρωση 40% χολής	+	+	+	+	+
Παραγωγή καταλάσης	-	-	-	-	-
Ανάπτυξη σε pH 9.6	+	+	+	-	-
Ανάπτυξη σε συγκέντρωση NaCl 6.5%	+	+	+	-	-
Επιβίωση σε θερμοκρασία 60 ^o C για 30 min	+	+	+	-	-
Ανάπτυξη σε συγκέντρωση 0.05% τελλουρικού καλίου	+	-	-	-	-
Ζύμωση της σορβιτόλης με παραγωγή αερίου	+	±	-	-	-
Ανάπτυξη σε TTC Agar	+	-	±	±	-

(Thatcher και Clark,

1968)

Δεδομένου ότι όλοι οι στρεπτόκοκκοι της ομάδας D ανήκουν στη φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντέρου του ανθρώπου και των ζώων και έχουν την ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασία 45^o C και συγκέντρωση βοείου χολής 40%, ο όρος «εντερόκοκκοι» ταυτίζεται σήμερα με την ομάδα D των στρεπτοκόκκων (Shattock, 1962).

Στην έρευνά μας, για την απομόνωση στρεπτοκόκκων της ομάδας D, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης σε Egg Yolk agar (Υ,5).

Από τους αρχικούς γυάλινους σωλήνες που περιέχουν τα δείγματα βιοψικών φυσιολογικής και παθολογικής περιοχής εντερικού τοιχώματος, μεταφέρονται 0.2 ml υγρού στην επιφάνεια τρυβλίου που έχει ως θρεπτικό υπόστρωμα Egg Yolk agar. Στη συνέχεια, γίνεται απευθείας σπορά, με τη βοήθεια κεκαμμένης γυάλινης ράβδου. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε ειδικά δοχεία αναερόβιωσης GASPAC και ακολουθώς σε επωαστικό κλίβανο, στους 37° για 5 ημέρες.

Μετά την επώαση, όλες οι αποικίες εξετάζονται μικροσκοπικά με την παρασκευή χρώσης Gram, δοκιμή καταλάσης, δοκιμή κοαγκουλάσης και έλεγχος του αναπνευστικού τύπου.

Ανάγνωση αποτελέσματος : Στα παρασκευάσματα Gram χρώσης ευρίσκονται είτε τυπικές αλυσίδες Gram (+) κόκκων, είτε ζεύγη κόκκων Gram (+) ανά δύο ή ανά τέσσερεις. Κατόπιν, οι χαρακτηριστικές αποικίες υποβάλλονται στη δοκιμή της καταλάσης και της κοαγκουλάσης, οι οποίες χαρακτηρίζονται αρνητικές. Τέλος, η δοκιμή του ελέγχου του αναπνευστικού τύπου δείχνει ότι οι ανωτέρω αποικίες στρεπτόκοκκου αναπτύσσονται σε αναερόβιο - αερόβιο περιβάλλον. Συμπληρωματικά, για την ταυτοποίηση των απομονωθέντων στρεπτοκόκκων έγινε χρήση συστημάτων API STREP.

5. Μέθοδος απομόνωσης σπορογόνων βακτηρίων

Στην έρευνά μας, για την απομόνωση των κύριων σπορογόνων βακτηρίων (*Bacillus* spp. και *Clostridium* spp.), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης σε Columbia agar τροποποιημένο (Υ,6) και σε Egg Yolk agar (Υ,5).

Το γένος *Bacillus* περιλαμβάνει αερόβιους ή προαιρετικά αναερόβιους βακίλλους, θετικούς κατά Gram, με τάση ανάπτυξης σε σχηματισμούς με μορφή αλυσίδας, σχηματίζει δε σπόρους. Σε σχέση δε με τα άλλα γένη βακίλλων, θετικά κατά Gram *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothix*, *Lactobacillus*, είναι το μόνο γένος που σχηματίζει σπόρους και δίνει θετική την αντίδραση της οξειδάσης.

Το γένος *Clostridium* περιλαμβάνει βακτηρίδια θετικά κατά Gram, τα οποία είναι συνήθως υποχρεωτικά αναερόβια, όλα δε τα στελέχη που ανήκουν στο γένος *Clostridium* είναι σπορογόνα. Μερικά είδη του γένους *Clostridium* έχουν την ικανότητα να παράγουν λεκιθινάση. Η παραγωγή λεκιθινάσης διαπιστώνεται με την καλλιέργεια των εξεταζόμενων κλωστηριδίων σε θρεπτικό

υλικό που περιέχει αυγό (Egg Yolk agar). Σχηματισμός θολερότητας περί των αποικιών δηλώνει θετικότητα στην παραγωγή λεκιθινάσης. Στη συνέχεια, τα κλωστηρίδια που παράγουν λεκιθινάση διαχωρίζονται σε δύο υποομάδες. Στην πρώτη υποομάδα, η παραγωγή λεκιθινάσης αναστέλλεται παρουσία αντιορού α-τοξίνης του *C. perfringens* (στην υποομάδα ανήκουν τα *C. perfringens*, *C. C. barati*, *C. bifementans*, *C. sordellii*). Στη δεύτερη υποομάδα, η παραγωγή λεκιθινάσης δεν αναστέλλεται (στην υποομάδα αυτή ανήκουν τα *C. botulinum* (A-F), *C. sporogenes* και *C. oedematiens*). Η αναστολή της παραγωγής λεκιθινάσης διαπιστώνεται με την αντίδραση Nagler. Στον πίνακα 11 αναφέρεται ο διαχωρισμός των κλωστηριδίων που δίνουν θετική την αντίδραση Nagler, με βάση συγκεκριμένες βιοχημικές αντιδράσεις. Λόγω του γεγονότος ότι το *C. barati* απομονώνεται σπάνια σε εξεταζόμενα δείγματα, όταν το κλωστηρίδιο χαρακτηριστεί ως ακίνητο και με θετική τη ζύμωση της λακτόζης, ταυτοποιείται ως *C. perfringens*.

Πίνακας 11

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ	ΕΙΔΗ ΚΛΩΣΤΗΡΙΔΙΩΝ			
	<i>C.perfringens</i>	<i>C.barati</i>	<i>C.bifermentans</i>	<i>C.sordellii</i>
Κινητικότητα	-	-	+	+
Ζύμωση λακτόζης	+	+	-	-
Ρευστοποίηση ζελατίνης	+	-	+	+
Παραγωγή συρεάσης	±	-	-	+

+ Θετική αντίδραση

- Αρνητική αντίδραση

± Τα περισσότερα στελέχη δίνουν αρνητική αντίδραση



Ανάγνωση αποτελέσματος : Μετά το πέρας της επωαστικής περιόδου, όλες οι διαφορετικές αποικίες εξετάζονται μικροσκοπικά με την παρασκευή χρώσης Gram, δοκιμή καταλάσης, δοκιμή οξειδάσης, έλεγχο αναπνευστικού τύπου και ειδικά για τα στελέχη του γένους *Clostridium* πραγματοποιείται και η αντίδραση Nagler. Το εξεταζόμενο δείγμα βιοψίας θεωρείται θετικό για την ύπαρξη στελεχών του γένους *Bacillus*, όταν στα παρασκευάσματα χρώσης Gram βρίσκονται μεγάλοι ακίνητοι βάκιλλοι Gram (+) με κεντρικούς σπόρους, οι οποίοι δεν προκαλούν παραμόρφωση του μικροβιακού σώματος. Οι δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης βρίσκονται θετικές. Επίσης, στον έλεγχο του αναπνευστικού τύπου χαρακτηρίζονται αερόβιοι, προαιρετικά αναερόβιοι. Το εξεταζόμενο δείγμα βιοψίας θεωρείται θετικό για την ύπαρξη στελεχών του γένους *Clostridium* όταν κατά τη μικροσκόπηση των χαρακτηριστικών αποικιών ανευρίσκονται βάκιλλοι μικροί, ορθογώνιοι, με κοφτά άκρα Gram (+), με συνήθως παραπολικούς σπόρους, οι οποίοι προκαλούν διόγκωση του μικροβιακού σώματος. Οι δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης συνήθως βρίσκονται αρνητικές. Στον έλεγχο του αναπνευστικού τύπου διαπιστώνεται ο αυστηρά αναερόβιος χαρακτήρας ανάπτυξης των στελεχών του γένους *Clostridium*. Επίσης, κοντά στα τρυβλία τα οποία έχουν ως θρεπτικό υπόστρωμα το Egg Yolk agar αναζητούνται οι αποικίες με ζώνη θολερότητας, ώστε να διαπιστωθεί η παραγωγή λεκιθινάσης από τα απομονωθέντα στελέχη. Με αυτό τον τρόπο, γίνεται ο διαχωρισμός των κλωστηριδίων που παράγουν λεκιθινάση από τα υπόλοιπα είδη, τα οποία δεν έχουν την παρούσα ικανότητα. Τέλος, πραγματοποιείται η αντίδραση Nagler, για όσα απομονωθέντα στελέχη παράγουν λεκιθινάση, ώστε να διαπιστωθεί αν η παραγωγή λεκιθινάσης αναστέλλεται ή όχι από την παρουσία α-τοξίνης του *C.perfringens*.

Νερό προερχόμενο από ειδική δεξαμενή πτηνοσφαγείου

Τα δείγματα νερού προέρχονται από ειδική λεκάνη (δεξαμενή CHILLER), στην οποία γίνεται εμβάπτιση των σφαγμένων και αποπτιλωμένων πουλερικών για ορισμένο χρονικό διάστημα (περίπου 30 λεπτά). Αυτή η λεκάνη περιέχει νερό και πάγο σε θερμοκρασία περί τους 4^o C και έχει ροή αντίθετη με την κίνηση των σφαγίων. Το πλύσιμο των σφαγίων έχει ως σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμμάτων του εκσπλαχνισμού από τα σφαγεία και η πρόψυξη τη μείωση του μικροβιολογικού φορτίου. Τέλος, τα σφάγια μετά την έξοδο από τη λεκάνη



πρόψυξης τοποθετούνται σε εναέριο μεταφορέα για να στραγγίσουν και οδηγούνται στη διαδικασία συσκευασίας.

Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα νερού συλλέγονται σε αποστειρωμένα γυάλινα δοχεία χωρητικότητας ενός λίτρου (1L). Τοποθετούνται σε φορητά ψυγεία και μεταφέρονται το ταχύτερο δυνατό στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα δείγματα νερού συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικά σημεία :

- Τοποθεσία Α : βρίσκεται στο μέσο της διαδρομής της ειδικής λεκάνης (CHILLER) πρόψυξης
- Τοποθεσία Β : βρίσκεται στο τέλος της διαδρομής της ειδικής λεκάνης (CHILLER) πρόψυξης

ΜΕΘΟΔΟΙ

Απαιτούμενα υλικά

1. Σιφώνια, γυάλινα ή πλαστικά μιας χρήσης βαθμολογημένα και χωρητικότητας από 0,1ml έως 11ml.
2. Γυάλινοι σωλήνες χωρητικότητας 10 ml.
3. Πώματα από υδρόφοβο βαμβάκι για γυάλινους σωλήνες.
4. Γυάλινα σωληνάκια Dur
5. Αποστειρωμένες μεταλλικές λαβίδες.
6. Μεταλλικά στατό για γυάλινους σωλήνες.
7. Αναδευτήρας τύπου Vortex (GENIE-2).
8. Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (varipette 10-100μl και 100-1000μl)
9. Πλαστικά ρύγχη μιας χρήσης αποστειρωμένα, κίτρινα 10-100μl και μπλε 100-1000μl για τις παραπάνω πιπέτες.
10. Επωαστικός θάλαμος (IPS DIAGNOSTICS Pasteur)
11. Υδατόλουτρο
12. API E
13. Μεταλλικές λαβίδες (αποστειρωμένες)
14. Συσκευή διήθησης κατάλληλη για μικροβιοκρατείς μεμβράνες, διαμέτρου 47mm



15. Μικροβιοκρατείς μεμβράνες διαμέτρου 47 mm και μέγεθος πόρων 0.45 μm

16. Φίλτρα διήθησης με οπές, διαμέτρου 20 - 25 μm

Μέθοδος απομόνωσης του *C. perfringens*

Στην έρευνά μας, για την απομόνωση του *C. perfringens* χρησιμοποιήθηκε Lactose-Sulfite (L.S.) ζυμός.

Δείγματα νερού : αρχικά, 500 ml δείγματος νερού διηθούνται σε αυτόματη συσκευή διήθησης ύδατος. Χρησιμοποιούνται φίλτρα δύο μεγεθών : α) η πρώτη διήθηση γίνεται με φίλτρα διαμέτρου πόρων 20 - 25 μm, για να απομακρυνθούν τα στερεά συστατικά του δείγματος. Το διηθούμενο υγρό συλλέγεται σε αποστειρωμένες ευρύστομες φιάλες, β) η δεύτερη διήθηση του υγρού που προήλθε από την πρώτη διήθηση, γίνεται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45μm, που συγκρατεί το *C.perfringens*. Το υγρό που διηθείται με φίλτρο διήθησης 0.45 μm μοιράζεται κατά το ήμισυ, ώστε να προκύψουν δύο φίλτρα 0.45μm που έχουν κατακρατήσει το *C.perfringens*. Τα δύο αυτά φίλτρα τοποθετούνται σε δύο γυάλινους σωλήνες. Ο καθένας περιέχει από 9 ml L.S. ζυμού (10⁻¹ αραιώση).

Ο ένας από αυτούς τους σωλήνες ανακινείται ελαφρά και στη συνέχεια πραγματοποιούνται δεκαδικές αραιώσεις σε σωλήνες που περιέχουν ο καθένας 9ml L.S. ζυμού.

Ο σωλήνας που περιέχει το δεύτερο φίλτρο 0.45μm από τη διήθηση του δείγματος θερμαίνεται για 20 λεπτά στους 80° C και αμέσως ψύχεται σε παγόλουτρο, κάτω από 5° C. Με αυτό τον τρόπο, αφενός μεν καταστρέφονται οι βλαστικές μορφές, αφετέρου δε ενεργοποιούνται οι σπόροι.

Στη συνέχεια, όλοι οι σωλήνες τοποθετούνται σε ματαλλικά στατό και η επώαση γίνεται αεροβίως σε υδατόλουτρο, στους 46° C για 24 ώρες.

Ανάγνωση αποτελέσματος :

Για την εξαγωγή του αποτελέσματος εκτιμάται για κάθε αραιώση δείγματος σε υλικό L.S. ζυμό η θόλωση από ζύμωση λακτόζης, η παραγωγή κζήματος (FeS) και ο σχηματισμός αερίου (CO₂).

Θόλωση : Αναγνωρίζεται από την απώλεια της διαύγειας του θρεπτικού υλικού, λόγω ζύμωσης της λακτόζης.

Παραγωγή : Αναγνωρίζεται με την ύπαρξη μαύρου χρώματος στον πυθμένα του γυάλινου σωλήνα ή σε όλη τη μάζα του υγρού λόγω παραγωγής FeS .



Σχηματισμός αερίου (CO₂) : Αναγνωρίζεται με την ύπαρξη φυσαλίδων στο εσωτερικό του σωληναρίου Durham και απώθηση αυτού προς την επιφάνεια του υγρού κατά την διάρκεια της ζύμωσης της λακτόζης .

Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία 46° C για τον διαχωρισμό από άλλα βακτήρια που δίνουν επίσης την αντίδραση της ζύμωσης της λακτόζης θετική.

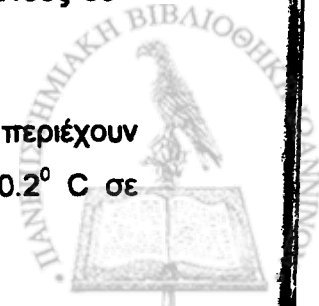
- Η κάθε αραίωση του εξεταζόμενου δείγματος σε υλικό L.S. κρίνεται θετική ως προς την ύπαρξη στελεχών του είδους *C. perfringens* αν συνυπάρχει θολερότητα, παραγωγή ιζήματος και σχηματισμός αερίου. Το ίδιο ισχύει και για την ανάδειξη θετικού ή όχι αποτελέσματος για την ύπαρξη σπόρων στο εξεταζόμενο δείγμα.

Μέθοδος απομόνωσης κολοβακτηριοειδών - εντερικής προέλευσης κολοβακτηριοειδή - *E. coli*

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των μικροβιοκρατών μεμβρανών (MEMBRANE FILTRATION METHOD). Αρχικά, πραγματοποιείται αραίωση 1 : 100 με αραιωτικό υγρό φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (A,1).

Τεχνική :

1. Παρασκευάζονται στο εργαστήριο τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υπόστρωμα M-FC-Agar (Y,8) και M-Endo Agar MF (Y,9), τα οποία αφήνονται στους 37° C για 30 min να ξεραθούν επιφανειακά.
2. Ετοιμάζεται το αυτόματο σύστημα διήθησης και ακολούθως τοποθετούνται με αποστειρωμένες μεταλλικές λαβίδες οι μεμβράνες διαμέτρου 47 mm.
3. Διηθούνται εις διπλούν 10 ml από την αραίωση 1 : 100.
4. Η μια σειρά φίλτρων τοποθετείται με προσοχή στην επιφάνεια τρυβλίων, τα οποία περιέχουν M-FC-Agar ή M-Endo Agar MF και επωάζονται στους 35 - 37° C για 24 ± 2 ώρες.
5. Η δεύτερη σειρά φίλτρων τοποθετείται σε τρυβλία, τα οποία περιέχουν θρεπτικό υπόστρωμα M-FC-Agar και επωάζονται στους 44.5 ± 0.2° C σε επωαστικό κλίβανο για 24 ± 2 ώρες.



Ανάγνωση αποτελέσματος : Από την πρώτη σειρά τρυβλίων που επωάσθηκαν στους 37° C, αριθμούνται οι κόκκινες αποικίες στο M-Endo Agar και οι κυανές στο M-FC-Agar. Το αποτέλεσμα εκφράζει τον αριθμό κολοβακτηριοειδών με βάση τη σχέση:

$$\text{Κολοβακτηριοειδή / 100 ml} = \frac{\text{Αριθμός αποικιών}}{\text{ml δείγματος}} \times 100$$

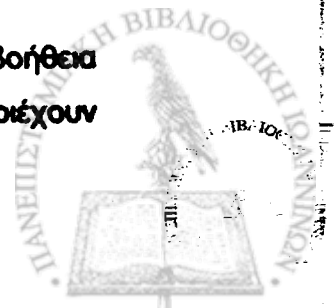
Από τη δεύτερη σειρά τρυβλίων που επωάσθηκαν στους 44.5 ± 0.2° C αριθμούνται οι κυανές αποικίες και το αποτέλεσμα εκφράζει τον πληθυσμό *E. coli* στην αντίστοιχη ποσότητα του δείγματος που διηθήθηκε.

3. Μέθοδος απομόνωσης *Enterococci spp.* και *Streptococci spp.*

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μικροβιοκρατών μεμβρανών (MEMBRANE FILTRATION METHOD). Αρχικά, πραγματοποιείται αραιώση 1 : 100, με αρακτικό υγρό φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (A,1)

Τεχνική :

1. Χρησιμοποιώντας ειδική αυτόματη συσκευή διήθησης, πραγματοποιείται διήθηση μέσω μικροβιοκρατών μεμβρανών οξικής κυτταρίνης, με διάμετρο πόρων 0.45 μm, κατάλληλου όγκου (π.χ. 100 ml, 10 ml) από την αραιώση 1/100 του εξεταζόμενου δείγματος που αρχικώς πραγματοποιήθηκε, ώστε το αποτέλεσμα να είναι η ανάπτυξη 20 - 100 ευδιάκριτων αποικιών σε κάθε μεμβράνη.
2. Η σειρά φίλτρων που προκύπτει από τη διήθηση τοποθετείται με τη βοήθεια αποστειρωμένης μεταλλικής λαβίδας στην επιφάνεια τρυβλίων που περιέχουν το υπόστρωμα M-Enterococcus Agar (Υ,10).



3. Ακολουθεί τοποθέτηση των τρυβλίων σε επωαστικό κλίβανο, στους 44^o C για 48 ώρες.

Ανάγνωση του αποτελέσματος : Αναγνωρίζονται και αριθμούνται οι αποικίες που έχουν χρώμα κόκκινο ανοικτό έως βαθύ, ως *Enterococci*. Η ταυτοποίηση των εντεροκόκκων, ιδιαίτερα των στελεχών του γένους *Streptococci spp.*, γίνεται με τα ακόλουθα βήματα :

1. Με τη χρήση αποστειρωμένου μεταλλικού κρίκου μεταφέρονται οι χαρακτηριστικές αποικίες σε γυάλινους σωλήνες που περιέχουν ως υπόστρωμα Brain Heart Infusion Broth. Πραγματοποιείται επώαση των σωλήνων στους 35 ± 0.5^oC για 24 ώρες.
2. Μετά την επώαση, μεταφέρονται 0.2 ml υγρού από τους γυάλινους σωλήνες στην επιφάνεια τρυβλίου που περιέχει υπόστρωμα Bile Esculin Agar (Υ,11) και ακολούθως πραγματοποιείται δεύτερη επώαση στους 35 ± 0.5^o C για 48 ώρες.
3. Μετά το πέρας των 48 ωρών, το δείγμα θεωρείται θετικό για την ύπαρξη στελεχών group D *Streptococcus*, όταν διαπιστωθεί μαύρισμα της επιφάνειας του τρυβλίου κατά μήκος της γραμμής σποράς των εξεταζόμενων αποικιών. Η ταυτοποίηση των *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas spp*, *Proteus vulgaris* *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii* πραγματοποιήθηκε με API.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ****A. Αντιδραστήρια****1. PBS διάλυμα**

NaCl	8,2 gr
Na H ₂ PO ₄ H ₂ O	1,4 gr
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	1,8 gr
DW g.s	1000,0 ml
Ph:7,5	

Παρασκευή: Διαλύονται τα συστατικά με ανάδευση για μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να γίνει πλήρης διάλυση των συστατικών, ρυθμίζεται το pH, κατανέμεται σε φιάλες και αποστειρώνεται στους 121°C / 15 λεπτά.



2. Πεπτονόχο νερό (peptone dilution water)

Peptone 1,0 gr
D.W. 1000,0 ml
Ph= 7-+0,1

Παρασκευή: Διαλύεται η πεπτόνη με ήπια θέρμανση, ρυθμίζεται το pH με 1 N διάλυμα NaOH, κατανέμεται σε φιάλες και αποστειρώνεται στους 121°C / 15 λεπτά.

3. Ringer solution

Υπάρχουν ειδικά δισκία στο εμπόριο τα οποία διαλύονται σύμφωνα με τις οδηγίες του παρασκευαστή οίκου.

Κατανέμεται σε γυάλινους σωλήνες κατά 9ml σε κάθε σωλήνα και αποστειρώνεται στους 121°C / 10 λεπτά.

4. Αντιδραστήριο α- naphthol

α) α-Naphthol (m.p. 92.5) 5.0 g

Ethyl Alcohol (absolute) έως 100.0 ml

Το χρώμα του διαλύματος δεν πρέπει να είναι πιο σκούρο από το αχυρόχρουν.

β) KOH 40.0 g

D.W. q.s. 100.0 ml

Χρήση : Αντιδραστήριο για την ανίχνευση της Acetylmethylcarbinol (VP test).



Υ. Υποστρώματα**1. Medium Lactose - Sulfito: L.S.**

Tryptic digest of casein	5 gr
Yeast extract (Difco)	2,5 gr
Sodium chloride	2,5 gr
Lactose	10 gr
L-cysteine hydrochloride	0,3 gr
D.W.	1000,0 ml
pH: 7,1±0,1	

Παρασκευή: Τα υλικά του υποστρώματος L.S. διαλύονται με βρασμό, ρυθμίζεται το pH, κατανέμεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες ανά 9 ml.

Τοποθετείται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα ανεστραμμένο σωληνάριο Durham. Αποστειρώνεται στους 115°C / 20 λεπτά.

Πριν τη χρήση του υποστρώματος L.S., πραγματοποιείται βρασμός στους 100°C για 20 λεπτά για να μειωθεί το διαλυτό O₂ που περιέχεται στο υπόστρωμα κάθε δοκιμαστικού σωλήνα. Ακολουθεί ψύξη των σωληνίων με κρύο νερό. Λίγο πριν την τοποθέτηση των υπό εξέταση δειγμάτων στους σωλήνες τοποθετείται σ' αυτούς 0,5 ml από διάλυμα 1,2% anhydrous sodium metabisulphite (Na₂S₂O₂) και 0,5ml από διάλυμα 1% ferric ammonium citrate.

Τα δυο παραπάνω διαλύματα έχουν προετοιμασθεί, φιλτραρισθεί (με φίλτρο διάμετρο πόρων 0,45μm) και αποστειρωθεί λίγο πριν την τοποθέτησή τους στους δοκιμαστικούς σωλήνες.

2. Mannitol salt agar (Chapman)

pH: 7,4

Χρησιμοποιείται έτοιμο του εμπορίου και ακολουθούνται οι οδηγίες του παρασκευαστή οίκου.

Γίνεται αποστείρωση στους 115°C / 20 λεπτά. Μετά την αποστείρωση το υπόστρωμα κατανέμεται σε τρυβλία petri ανά 15-20ml τα οποία μετά τη στερεοποίησή τους τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37°C για δοκιμαστική επώαση.

3. MacConkey Agar

pH: 7,0+/-0,1

Χρησιμοποιείται έτοιμο του εμπορίου και ακολουθούνται οι οδηγίες του παρασκευαστή οίκου.

Γίνεται αποστείρωση στους 115°C / 20 λεπτά. Μετά την αποστείρωση το υπόστρωμα κατανέμεται σε τρυβλία petri ανά 15-20ml τα οποία μετά τη στερεοποίησή τους τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37°C για δοκιμαστική επώαση.

4. Endo Agar

pH:7,5

Χρησιμοποιείται έτοιμο του εμπορίου και ακολουθούνται οι οδηγίες του παρασκευαστή οίκου.

Γίνεται αποστείρωση στους 115°C / 20 λεπτά. Μετά την αποστείρωση το υπόστρωμα κατανέμεται σε τρυβλία petri ανά 15-20ml τα οποία μετά τη στερεοποίησή τους τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37°C για δοκιμαστική επώαση.

5. Egg York Agar

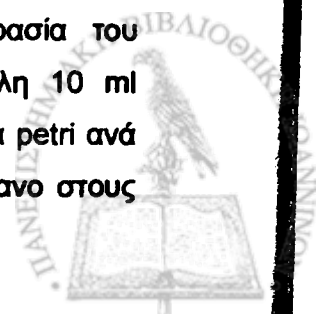
Υπόστρωμα A

Columbia base agar	42 gr
Biotryocase	17 gr
Glucose	5 gr
L-cysteine hydrochloride	0,5 gr
D.W.	1000,0 ml

pH: 6.8+/-0,1

Υπόστρωμα B : Γαλάκτωμα λεκίθου αυγού

Παρασκευή: Τα συστατικά του υποστρώματος A διαλύονται με βρασμό , ρυθμίζεται το pH, κατανέμεται σε γυάλινα ανά 90 ml και αποστειρώνεται στους 115°C / 20 λεπτά . Μετά την αποστείρωση ,όταν η θερμοκρασία του υποστρώματος είναι 45° C , προσθέτονται άσηπτα σε κάθε φιάλη 10 ml γαλακτώματος B. Ακολούθως το υπόστρωμα κατανέμεται σε τρυβλία petri ανά 15-20ml τα οποία μετά τη στερεοποίησή τους τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37°C για δοκιμαστική επώαση



6. Columbia Agar (τροποποιημένο)

Columbia base agar	42 gr
Glucose	5 gr
L-cysteine hydrochloride	0,5 gr
D.W.	1000,0 ml
pH: 6.8±0,1	

Χρησιμοποιείται έτοιμο του εμπορίου και ακολουθούνται οι οδηγίες του παρασκευαστή οίκου.

Γίνεται αποστείρωση στους 115°C / 20 λεπτά. Μετά την αποστείρωση το υπόστρωμα κατανέμεται σε τρυβλία ρετί ανά 15-20ml τα οποία μετά τη στερεοποίησή τους τοποθετούνται σε κλίβανο στους 37°C για δοκιμαστική επώαση.

7. Buffered Glucose Broth

Proteose Peptone	5.0 g
Glucose	5.0 g
Potassium Monohydrogen Phosphate (K ₂ HPO ₄)	5.0 g
D.W. q.s.	1000.0 ml
pH : δεν ρυθμίζεται	

Παρασκευή : Τα συστατικά του υποστρώματος διαλύονται με θέρμανση, κατανέμεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες ανά 6 ml και αποστειρώνεται στους 121°C / 15 min.

Χρήση : Για τη δοκιμή MR - VP.

8. Koser's Citrate Medium , τροποποιημένο

Sodium Chloride	5.0 g
Magnesium Sulfate (MgSO ₄)	0.2 g
Ammonium Dihydrogen Phosphate (NH ₄ H ₂ PO ₄)	1.0 g
Potassium Dihydrogen Phosphate (KH ₂ PO ₄)	1.0 g



Sodium Citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	5.0 g
D.W. q.s.	1000.0 ml
pH : πρέπει να είναι 6.8	

Παρασκευή : Τα συστατικά του υποστρώματος διαλύονται με θέρμανση, ελέγχεται το pH, κατανέμεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστειρώνεται στους $121^\circ\text{C} / 15\text{min}$

Χρήση : Για τη δοκιμή της ικανότητας χρησιμοποίησης των κιτρικών αλάτων.

9. Brain heart infusion Broth (BHI Broth)

pH: 7,4

Χρησιμοποιείται έτοιμο του εμπορίου και ακολουθούνται οι οδηγίες του παρασκευαστή οίκου.

Ρυθμίζεται το pH, κατανέμεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστειρώνεται στους $121^\circ\text{C} / 15$ λεπτά.

10. M – FC – Agar

Έχει την ίδια σύνθεση με το ζωμό M-FC (B-57) με επιπλέον προσθήκη Agar σε αναλογία 1.5%.

Χρήση : Για την αρίθμηση κολοβακτηριοειδών και *E. coli* στο νερό με την τεχνική των μεμβρανών.

11. M Endo Agar - MF

Polypeptone	10.0 g
Thiopeptone	5.0 g
Casitone	5.0 g
Yeast Extract	1.5 g
Lactose	12.5 g
Sodium Chloride	5.0 g
Potassium Dihydrogen Phosphate (KH_2PO_4)	1.375 g
Dipotassium Phosphate (K_2HPO_4)	4.375 g
Sodium Lauryl Sulfate	0.05 g



Sodium Desoxycholate	0.1 g
Sodium Sulfite	2.1 g
Basic Fuchsin	1.05 g
Agar	15.0 g
D.W. q.s.	1000.0 ml

pH : Δεν ρυθμίζεται αλλά πρέπει να είναι 7.2

Παρασκευή : Τα συστατικά του υποστρώματος διαλύονται με βρασμό, ψύχεται στους 50 - 60° C και κατανέμεται ανά 15 ml σε τρυβλία. ΔΕΝ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΝΕΤΑΙ. Μπορεί να διατηρηθεί έως 4 ημέρες στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4° C.

Χρήση : Για την αρίθμηση των κολοβακτηριοειδών με τη μέθοδο των μικροβιοκρατών μεμβρανών.

12. M Enterococcus Agar

Yeast Extract	5.0 g
Tryptone ή Trypticase Peptone	15.0 g
Dextrose (Glucose)	2.0 g
Phytone Peptone	5.0 g
Dipotassium Phosphate (K ₂ HPO ₄)	4.0 g
Sodium Azide	0.4 g
Tetrazolium Chloride	0.1 g
Agar	10.0 g
D.W. q.s.	1000.0 ml

p.H. (τελικό) : 7.1

Παρασκευή : Διαλύονται τα συστατικά του υποστρώματος χωρίς να υπερθερμανθεί. ΔΕΝ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΝΕΤΑΙ. Σε ορισμένες περιπτώσεις στο υπόστρωμα μπορεί να προστεθεί σε θερμοκρασία 50° C, 0.5 ml Tween 80 (Polysorbate 80) και 2 ml ανθρακικού νατρίου 2% πρόσφατης παρασκευής.

Χρήση : Για την αρίθμηση εντερόκοκκων.

13. Bile Esculin Agar



Bacto Beef Extract	3.0 gr
Bacto Peptone	5.0 gr
Bacto Oxgall	40 gr
Bacto Esculin	1.0 gr
Ferric Citrate	0,5 gr
Bacto Agar	15.0 gr
D.W	1000.0 ml

pH: 6.6

Χρησιμοποιείται έτοιμο του εμπορίου και ακολουθούνται οι οδηγίες του παρασκευαστή οίκου.

Ρυθμίζεται το pH, κατανέμεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστειρώνεται στους 121°C / 15 λεπτά.

Βιοχημικές δοκιμασίες

1. Δοκιμή της καταλάσης

2. Δοκιμασία της πηκτάσης (κοαγκουλάσης)

α. Δοκιμασία κοαγκουλάσης επί αντικειμενοφόρου πλάκας.

Αποικίες *Staphylococcus* μεταφέρονται με μεταλλικό κρίκο σε αντικειμενοφόρο πλάκα, που περιέχει μικρή ποσότητα νερού. Σχηματίζεται πυκνό και ομοιογενές αιώρημα. Προστίθεται με τη βοήθεια μεταλλικού κρίκου ίση ποσότητα μη αραιωμένου ανθρώπινου πλάσματος. Γίνεται προσεκτικά ανάμιξη. Αν μέσα σε πέντε δευτερόλεπτα παρατηρηθεί σχηματισμός μεγάλων κροκίδων (πρόκειται για συσσωρευμένα μικροβιακά κύτταρα που έλκονται από την υαλίνη του πλάσματος), θεωρείται θετική η δοκιμασία της πηκτάσης.

β. Δοκιμασία κοαγκουλάσης με τη μέθοδο των σωλήνων.

Σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 0,5 ml αραιωμένου ανθρώπινου πλάσματος γίνεται ενοφθαλμισμός αποικίας *Staphylococcus*. Το μίγμα επωάζεται για μια ώρα. Η ύπαρξη πήγματος (θρόμβου) προσκολλημένο στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα δίνει θετική την δοκιμασία της πηκτάσης.

3. Δοκιμασία ινδόλης



Ενοφθαλμίζονται σωλήνες με Pertone water (Υ,5) με τις υπό εξέταση αποικίες και επωάζονται στους 37°C για 48 ώρες, μπορεί να γίνει επιμήκυνση του χρόνου επώασης για άλλες 48 ώρες για να υπάρξει η απαιτούμενη συγκέντρωση ινδόλης στο υπόστρωμα.

Προστίθενται 0,2ml αντιδραστηρίου Kovacs σε 5ml καλλιέργειας και το περιεχόμενο του σωλήνα αναδεύεται ελαφρά. Θετική θεωρείται η δοκιμασία όταν η στοιβάδα της αμυλικής αλκοόλης πάρει κόκκινο χρώμα.

4. Δοκιμή ερυθρού του μεθυλίου

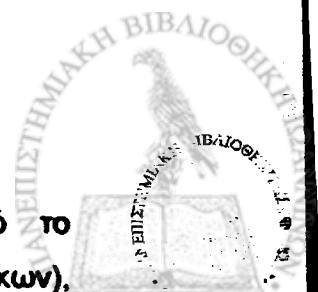
Το ερυθρό του μεθυλίου στη δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται απλώς σαν δείκτης pH. Ορισμένα βακτήρια, όπως η *Escherichia coli*, παράγουν αρκετή ποσότητα οξέος από τη διάσπαση της γλυκόζης που περιέχεται στο υπόστρωμα, στο οποίο εκτελείται η δοκιμή, ώστε να προκαλείται αυτοσάνοσχεση. Άλλα βακτήρια, όπως τα γένη *Klebsiella* και *Aerobacter*, δεν παράγουν αρκετό οξύ για να αναστείλει την ανάπτυξή τους, οπότε εξακολουθούν να αναπτύσσονται και αποδομούν τις πεπτόνες, οι οποίες περιέχονται στο υπόστρωμα. Συνέπεια του γεγονότος αυτού είναι η μεταβολή του pH του υποστρώματος προς το αλκαλικότερο. Με την προσθήκη σταγόνων ερυθρού του μεθυλίου διαπιστώνεται το pH της καλλιέργειας. Το ερυθρό του μεθυλίου είναι δείκτης που σε pH 4.2 παίρνει κόκκινο και σε pH 6.3 κίτρινο χρώμα.

Τεχνική : Ενοφθαλμίζονται σωλήνες, οι οποίοι περιέχουν Buffered Glucose Broth (B-7) και επωάζονται στους 37° C για 2 ημέρες ή στους 30° C για 5 ημέρες. Προσθέτονται 5 σταγόνες αντιδραστηρίου MR ανά 5 ml καλλιέργειας, αναδεύεται το περιεχόμενο των σωλήνων και γίνεται αμέσως η ανάγνωση. Κόκκινο χρώμα σε όλη την έκταση του υποστρώματος σημαίνει θετική δοκιμή, πορτοκαλί αμφίβολη και κίτρινο αρνητική.

Στην ίδια καλλιέργεια είναι δυνατόν να γίνει στη συνέχεια η δοκιμή VP. Συνήθως όμως, επειδή οι δοκιμές MR και VP γίνονται σε συνδυασμό, το στέλεχος που εξετάζεται αναπτύσσεται σε 6 ml υποστρώματος, οπότε 1 ml από την καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα διαστάσεων 13 X 100 mm, όπου εκτελείται η δοκιμή VP και στην υπόλοιπη καλλιέργεια γίνεται η δοκιμή MR.

5. Δοκιμή Voges – Proskauer

Πολλά βακτήρια σχηματίζουν από τη γλυκόζη (ή ορθότερα από το πυροσταφυλικό οξύ, στο οποίο καταλήγει η ζύμωση των υδατανθράκων),



ακετυλομεθυλοκαρβινόλη (ακετοΐνη). Η ακετοΐνη ή το παράγωγό της 2,3-βουτυλενογλυκόλη, κατά τη στιγμή της αντίδρασης, παρουσία αλκάλειας, οξειδώνεται προς διακετύλιο, το οποίο σε αλκαλικές συνθήκες αντιδρά με αργινίνη ή κρεατίνη και δίνει έγχρωμη ένωση (Cruickshank et al., 1975). Η δοκιμή γίνεται σε συνδυασμό με τη δοκιμή MR.

Τεχνική

Μέθοδος Barritt (1936) : Από τις καλλιέργειες της δοκιμής ερυθρού του μεθυλίου μεταφέρεται 1 ml καλλιέργειας σε καθαρό σωλήνα 13 X 100 mm. Προσθέτονται 0.2ml 40% διαλύματος KOH, γίνεται ανάμιξη και προσθέτονται 0.6 ml αντιδραστήριου α-naphthol. Γίνεται ανάμιξη και ο σωλήνας τοποθετείται σε κεκλιμένη θέση ώστε να ευνοηθεί η οξείδωση. Παρατηρείται κάθε 15 min επί 1 ώρα. Θετική είναι η δοκιμή όταν το υγρό του σωλήνα πάρει έντονο κόκκινο (ρουμπινί) χρώμα. Χρώμα χαλκόχρουν ή καφέ ερμηνεύεται σαν αρνητική δοκιμή.

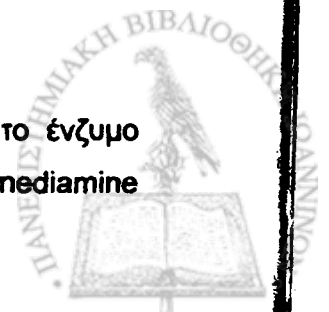
6. Δοκιμή χρησιμοποίησης των κιτρικών αλάτων

Με τη δοκιμή αυτή διερευνάται η ικανότητα των βακτηρίων να αξιοποιούν τα κιτρικά άλατα σαν μόνη πηγή άνθρακα και τα άλατα του αμμωνίου σαν μόνη πηγή αζώτου. Η δοκιμή είναι δυνατόν να γίνει με δύο μεθόδους.

Μέθοδος 1^η : Ενοφθαλμίζονται σωλήνες με Koser's Citrate Medium με εναιώρημα του βακτηρίου που εξετάζεται, σε φυσιολογικό ορό και επωάζονται στους 30^o C για 7 ημέρες, όταν πρόκειται για εντεροβακτηριοειδή ή στην άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης για τα υπόλοιπα βακτήρια και επί 4 ημέρες. Θετική θεωρείται η δοκιμή όταν μετά την επώαση παρατηρείται θολερότητα (ανάπτυξη) στο υπόστρωμα. Αρνητική, όταν δεν παρατηρείται θολερότητα. Από τους θετικούς σωλήνες γίνεται ενοφθαλμισμός είτε σε σωλήνες οι οποίοι περιέχουν το ίδιο υπόστρωμα, είτε σε σωλήνες με Simmon's Citrate Medium (B-93). Η δεύτερη μέθοδος εξασφαλίζει από λάθος θετικές αντιδράσεις, οι οποίες είναι δυνατόν να οφείλονται στο μέγεθος του ενοφθαλμισμού.

7. Δοκιμή οξειδάσης

Ορισμένα βακτήρια (π.χ. ψευδομονάδες, δονάκια κλπ.) παράγουν το ένζυμο οξειδάση, το οποίο ανάγει το αντιδραστήριο Tetramethyl-p-phenylenediamine



dihydrochloride (A-14) σε ένωση με χρώμα πορφυρό. Η δοκιμή είναι δυνατόν να γίνει με περισσότερες από μία μεθόδους.

Μέθοδος 1^η (Κοναcs, 1956) : Διηθητικό χαρτί διαμέτρου 7 cm τοποθετείται σε τρυβλίο petri και πάνω σ' αυτό τοποθετούνται 2-3 σταγόνες αντιδραστήριου οξειδάσης. Προτού στεγνώσει το αντιδραστήριο, μεταφέρεται με κρικό πλατίνας, καλλιέργεια του στελέχους που αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα, το οποίο δεν περιέχει γλυκόζη και νιτρικά και απλώνεται στο σημείο που είναι το αντιδραστήριο. Η ανάπτυξη σκοτενού πορφυρού χρώματος μέσα σε 10 sec υποδηλώνει θετική αντίδραση.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

I. Μελέτη πρωτεϊνών πρόσληψης σιδήρου



Το MC4100 pLTX4550 στέλεχος είναι το πατρικό στέλεχος όλων των άλλων στελεχών, εκτός των BW490.9 pLTX4550 και BW490.12 pLTX4550. Τα MC4100 pLTX4550 και MH513 pLTX4550 είναι wild strain (ως προς την *envZ*). Η δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης για τα στελέχη αυτά σε υγρή καλλιέργεια είναι μεταξύ των 4 και 5 μονάδων, με προσθήκη 200 μM διπυριδιλίου. Επίσης, η εξέταση του MC4100 pLTX4550 με τη νέα μέθοδο μέτρησης της δραστικότητας της αλκαλικής φωσφατάσης έδειξε 15.47 μονάδες. Το MC4100 pLTX4550 καλλιιεργήθηκε σε τριβλία 300 μM διπυριδιλίου (ολονύκτια υγρή καλλιέργεια σε 200 μM διπυριδιλίου). Το MC4100 pLTX4550 αναπτύχθηκε σε 300 μM διπυριδιλίου υγρής καλλιέργειας, αφού προηγουμένως είχε καλλιιεργηθεί σε ολονύκτια 200 μM διπυριδιλίου. Όταν τοποθετήσουμε το στέλεχος κατευθείαν στα 300 μM διπυριδιλίου, δεν μπορεί να αναπτυχθεί.

Το στέλεχος WH20 pLTX4550 έχει έλλειψη της *envZ*, *ompR* και του *feo* συστήματος πρόσληψης σιδήρου. Το WH20 pLTX4550 έδειξε δραστικότητα αλκαλικής φωσφατάσης γύρω στις 7 μονάδες, σε 150 μM διπυριδιλίου. Επίσης, δεν μπορεί να επιβιώσει σε 200 μM διπυριδιλίου και η καμπύλη ανάπτυξης του έφθασε μέχρι $\text{OD}_{600} = 0.08$.

Το WH57 pLTX4550 είναι *envZ* :: *Kan* (μέσα στο γονίδιο της *envZ* έχει τοποθετηθεί το γονίδιο της καναμικίνης. Το βακτήριο παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό). Η δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε 200 μM διπυριδιλίου ήταν γύρω στις 8 μονάδες. Στο ίδιο στέλεχος, η μέτρηση της αλκαλικής φωσφατάσης με τη νέα μέθοδο σε 100 μM διπυριδιλίου, έδειξε δραστικότητα 23 μονάδων (ολονύκτια καλλιέργεια σε 200 μM διπυριδιλίου). Το στέλεχος αυτό μπορεί και αναπτύσσεται γρήγορα και καλά.

Το WH66 pLTX4550 στέλεχος έχει ως πατρικό το WH57 pLTX4550. Το WH66 pLTX4550 είναι *pta/ack* μεταλλαγμένο (γονίδια υπεύθυνα για δημιουργία ακετυλο-φωσφορικού) και φέρει την μετάλλαξη *envZ* :: *Kan*, όπως το πατρικό του. Η δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης του WH66 pLTX4550 σε 200 μM διπυριδιλίου, όλη τη νύχτα και κατόπιν υποκαλλιέργεια σε 100 μM διπυριδιλίου, έδειξε 8 μονάδες δραστικότητας αλκαλικής φωσφατάσης. Το WH66 pLTX4550 έχει περιορισμένη ανάπτυξη σε 200 μM διπυριδιλίου ($\text{OD}_{600} = 0.08$).

Το JMS58 pLTX4550 φέρει τη μετάλλαξη *envZ* *am* 22 (δημιουργία κωδικωνίου λήξης μέσα στο πλαίσιο ανάγνωσης). Το στέλεχος εξετάστηκε σε 200 μM και 300 μM , δεν βρέθηκε δραστηριότητα αλκαλικής φωσφατάσης. Βρέθηκε η χαρακτηριστική ζώνη της *ferB* στην ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών της μεμβράνης του στελέχους αυτού. Σε 300 μM διπυριδιλίου, το στέλεχος εμφάνισε μία στατική φάση ανάπτυξης σε $\text{OD}_{600} = 0.4$.



Το SG477 pLTX4550 είναι εννZ 22 Am. Η δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε 200 μM διπυριδιλίου (ολονύκτια 200 μM διπυριδιλίου) ήταν 1 μονάδα. Ένα αξιοσημείωτο γεγονός με το στέλεχος αυτό ήταν ότι μετά την στατική φάση $OD_{600} = 0.08$, η οποία διήρκησε 90 λεπτά, το στέλεχος άρχισε πάλι να αναπτύσσεται ταχύτατα.

Το στέλεχος MH1471 pLTX4550 φέρει τη μετάλλαξη εννZ473 (πλειοτροπικός φαινότυπος), η δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης σε 200 μM και 300 μM διπυριδιλίου ήταν αρνητική. Όταν μία αποικία του στελέχους MH1471 pLTX4550 εμβολιάζεται σε υγρό θρεπτικό υλικό με 200 μM διπυριδιλίου, η φάση προσαρμογής διαρκούσε 14 έως 16 ώρες. Μετά τη φάση αυτή προσαρμογής, είχαμε ανάπτυξη (σε τόσο μακριά φάση προσαρμογής μπορεί να έχουμε έντονη μεταλλακτικότητα όμως).

Το στέλεχος BW490.12 pLTX4550 που είναι το wild strain για την εννZ, έδειξε εντονότερη δραστικότητα αλκαλικής φωσφατάσης συγκρινόμενο με το BW490.9 pLTX4550, το οποίο είναι εννZ (per A8). Το BW490.9 pLTX4550 έχει ως πατρικό το BW490.12 pLTX4550.

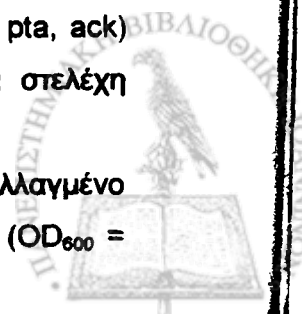
Από τις Απωv αναλύσεις παρατηρούμε ότι όλα τα στελέχη, σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου, εκκρίνουν σιδεροφόρα στο περιβάλλον τους. Εκ των αποτελεσμάτων αυτών αποδεικνύεται ότι πράγματι το σύστημα μεταγωγής πληροφορίας εννZ/ompR συμμετέχει στην έκφραση των πρωτεϊνών που έχουν σχέση με την πρόσληψη του σιδήρου (ferB), αλλά δεν διασαφηνίζεται ο ακριβής τρόπος εμπλοκής του.

Αποτελέσματα σχέσης έκφρασης της ferB με το ακετυλο-φωσφορικό

Όπως παρατηρούμε από τα αποτελέσματα και τα τέσσερα στελέχη εμφανίζουν δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης, δηλαδή το wild strain RH257 pLTX4550 και τα τρία μεταλλαγμένα στελέχη, RH258n pLTX4550 μεταλλαγμένος για ack, RH259 pLTX4550 μεταλλαγμένος για pta και ο RH260 pLTX4550 δπλά μεταλλαγμένος για ack, pta.

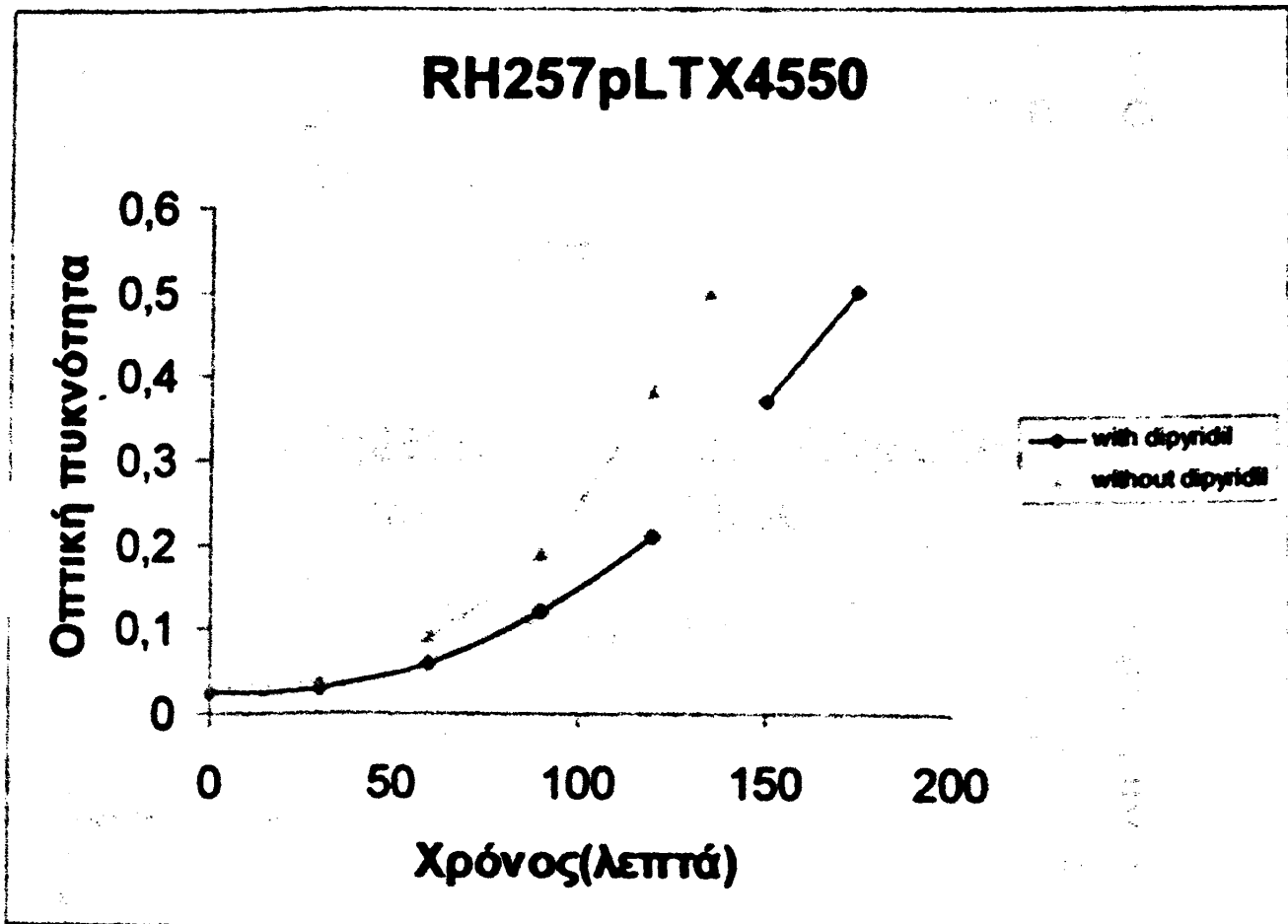
Από το γεγονός αυτό, συμπεραίνουμε ότι η έκφραση της ferB δεν έχει άμεση σχέση με την παραγωγή του ακετυλο-φωσφορικού οξέος. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από τα στελέχη WH57 pLTX4550 (wild strain για pta, ack) και WH66 pLTX4550 (μεταλλαγμένα για pta / ack). Τα δύο αυτά στελέχη εμφανίζουν επίσης δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης.

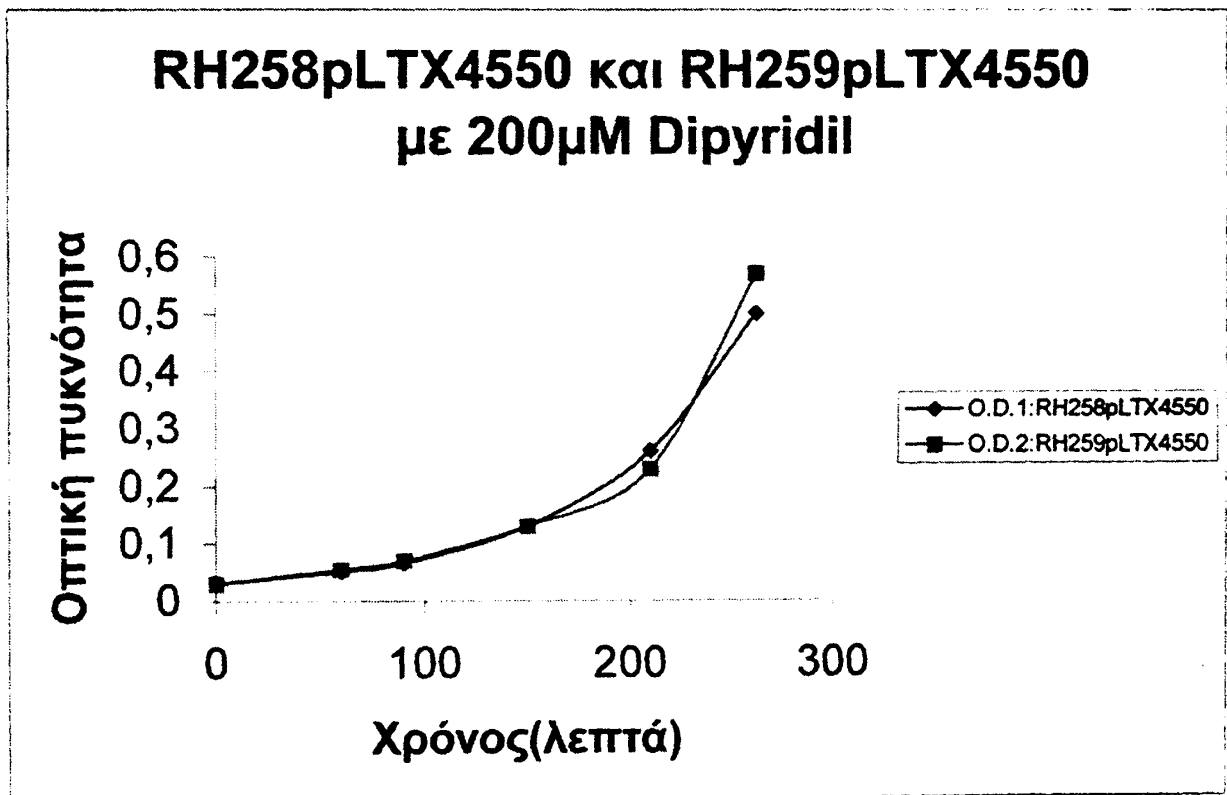
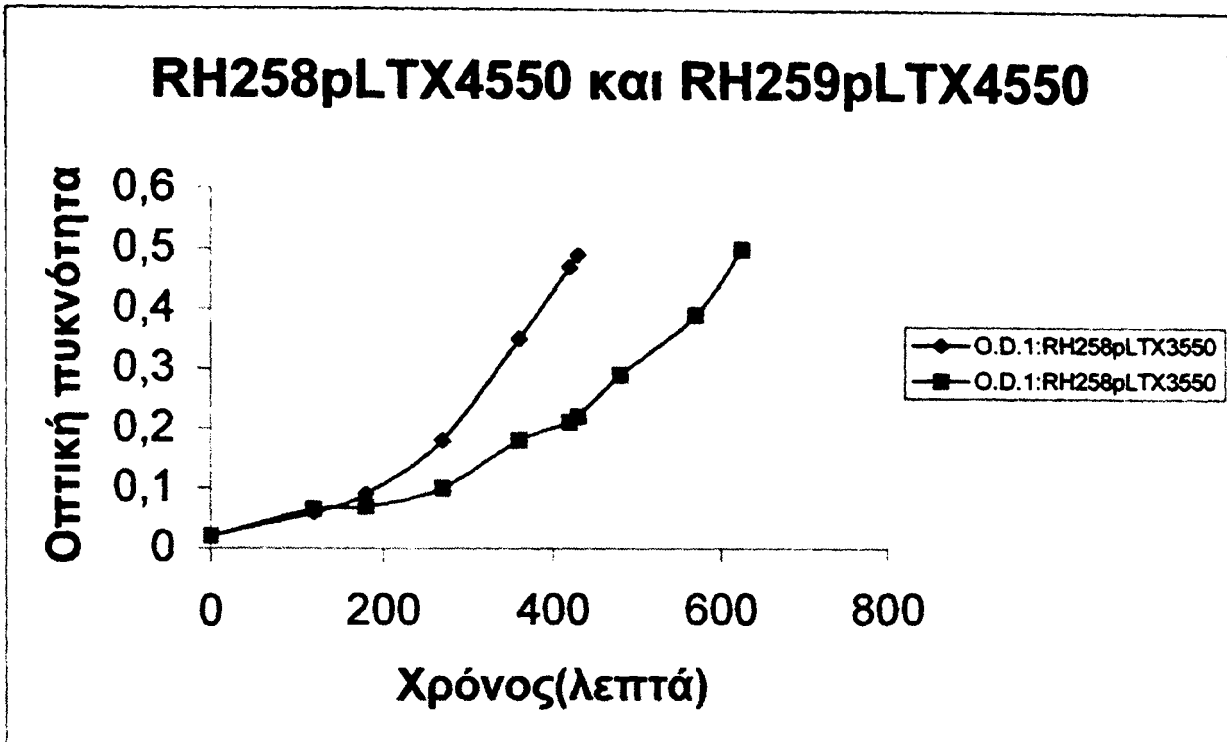
Τα δύο μεταλλαγμένα στελέχη, δηλαδή το WH66 pLTX4550 (μεταλλαγμένο για pta, ack) δεν μπορεί να αναπτυχθεί καλά σε 200 μM διπυριδιλίου ($OD_{600} =$



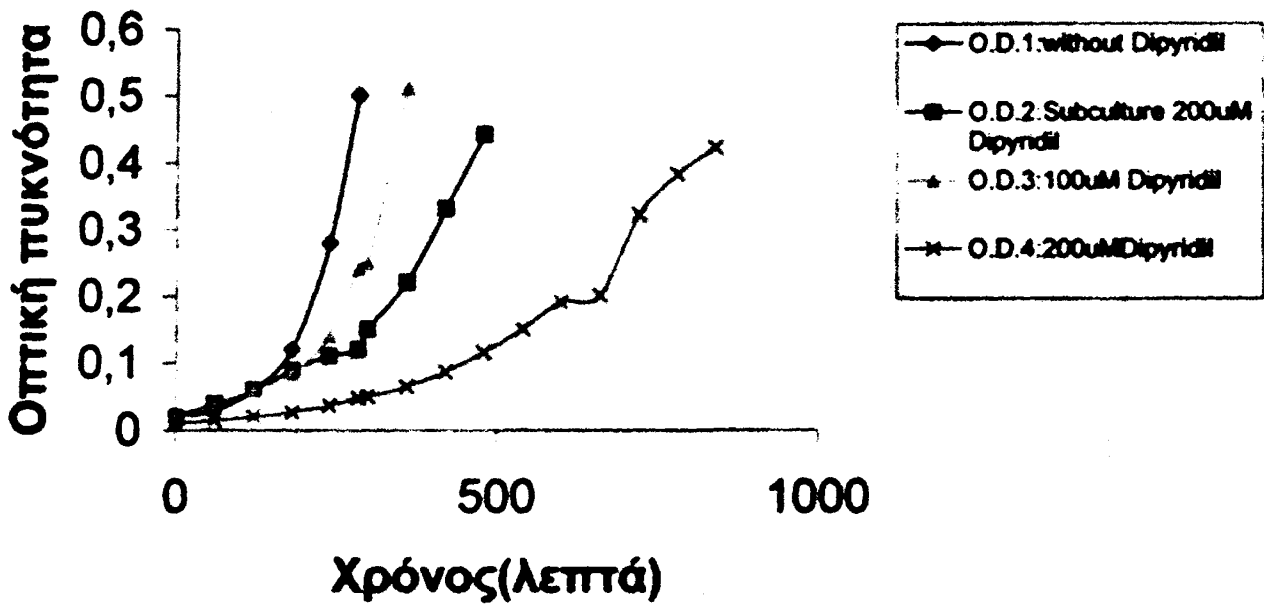
0.08) και το RH260 pLTX4550 (μεταλλαγμένο για pta, ack) δεν μπορεί επίσης να αναπτυχθεί καλά σε 200 μ M διπυριδίου και αρχίζει να καμπυλώνεται η γραμμή ανάπτυξής του σε $OD_{600} = 0.45$.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

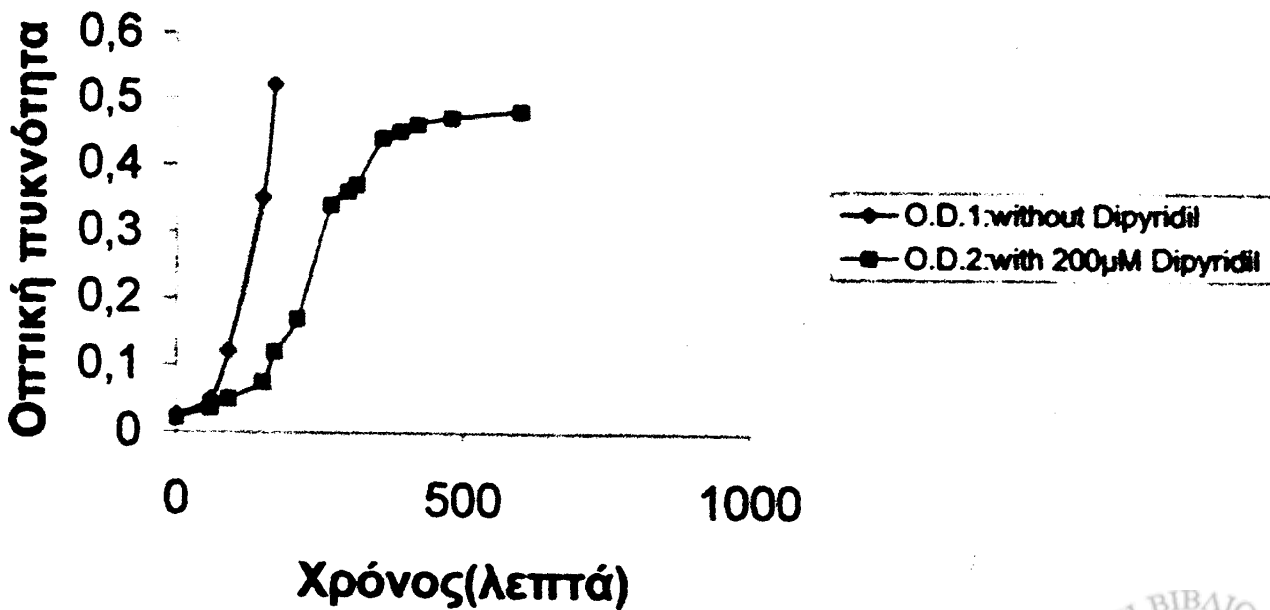


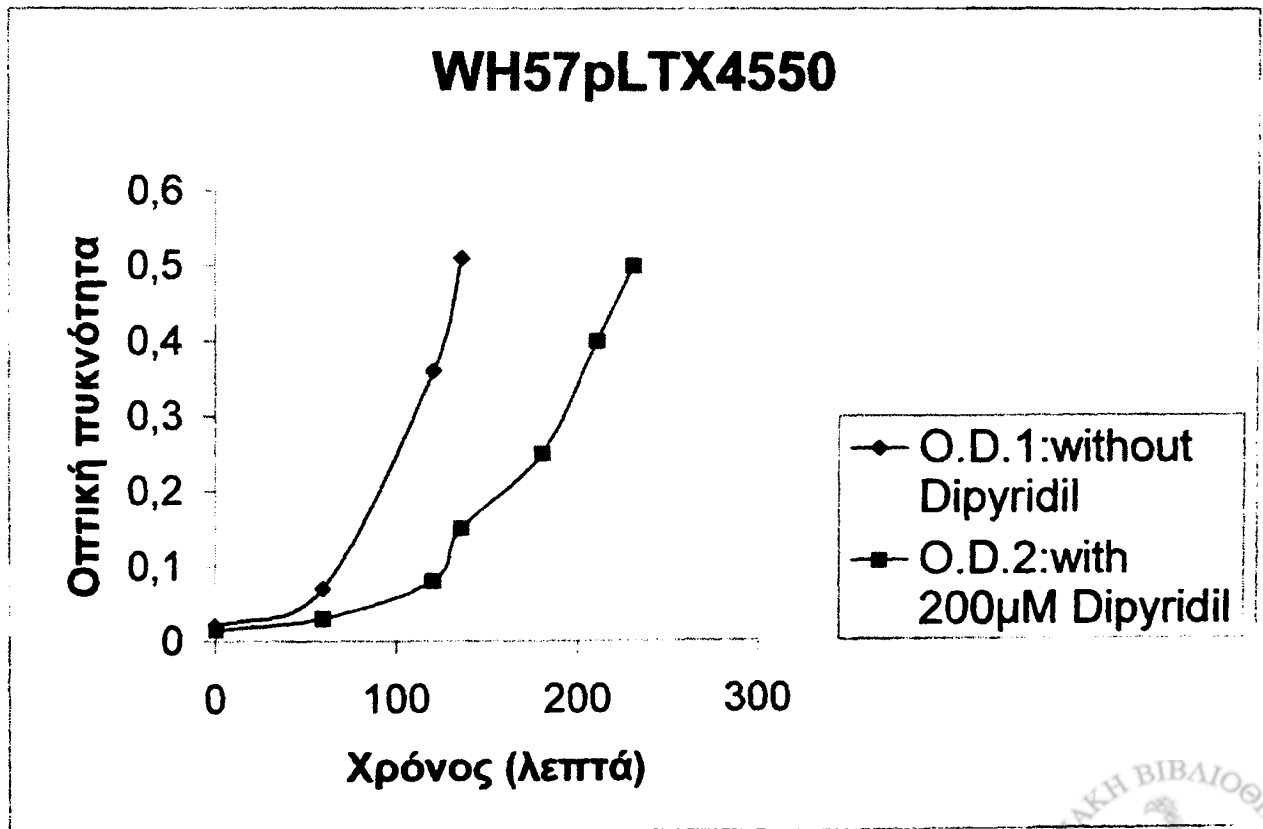
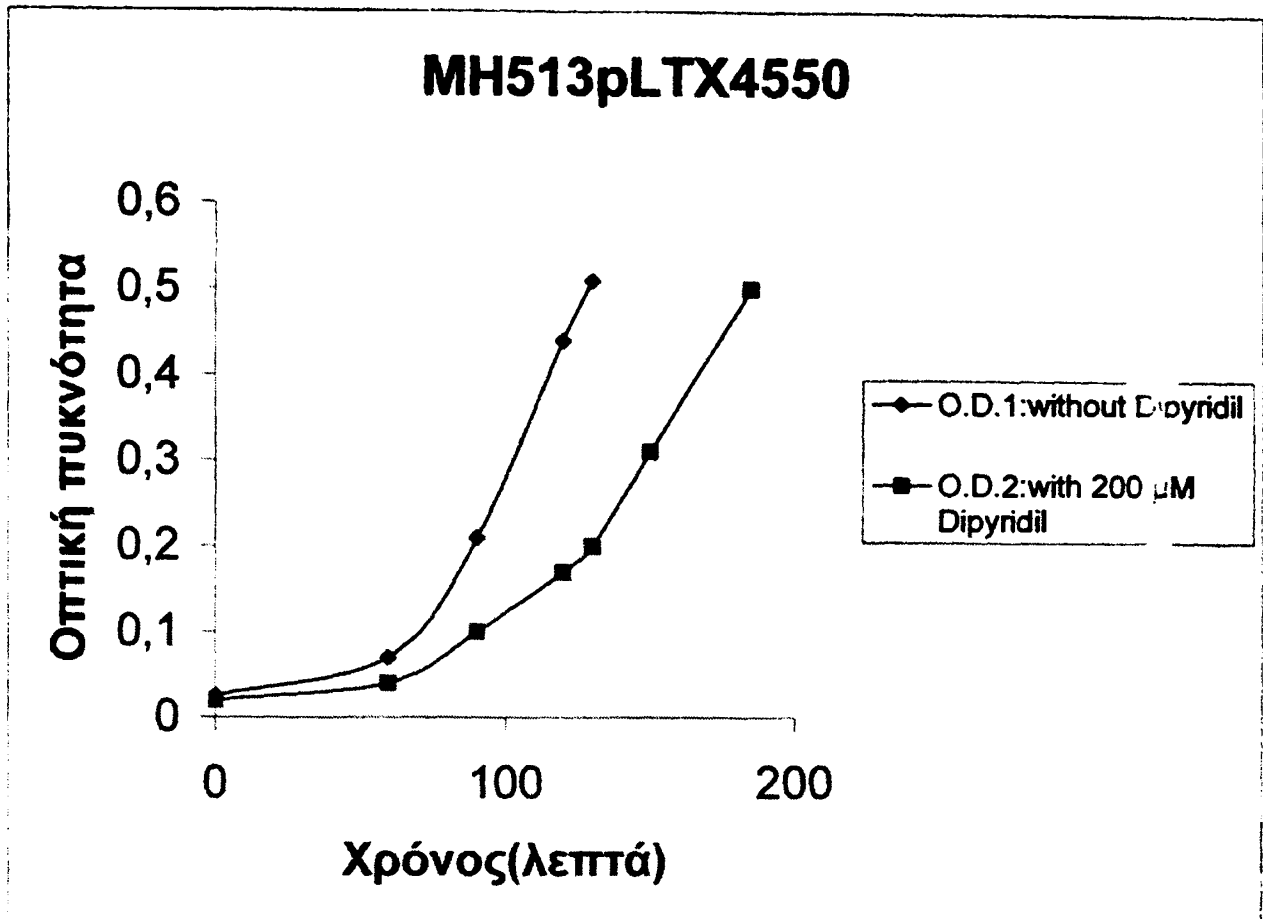


RH260pLTX4550

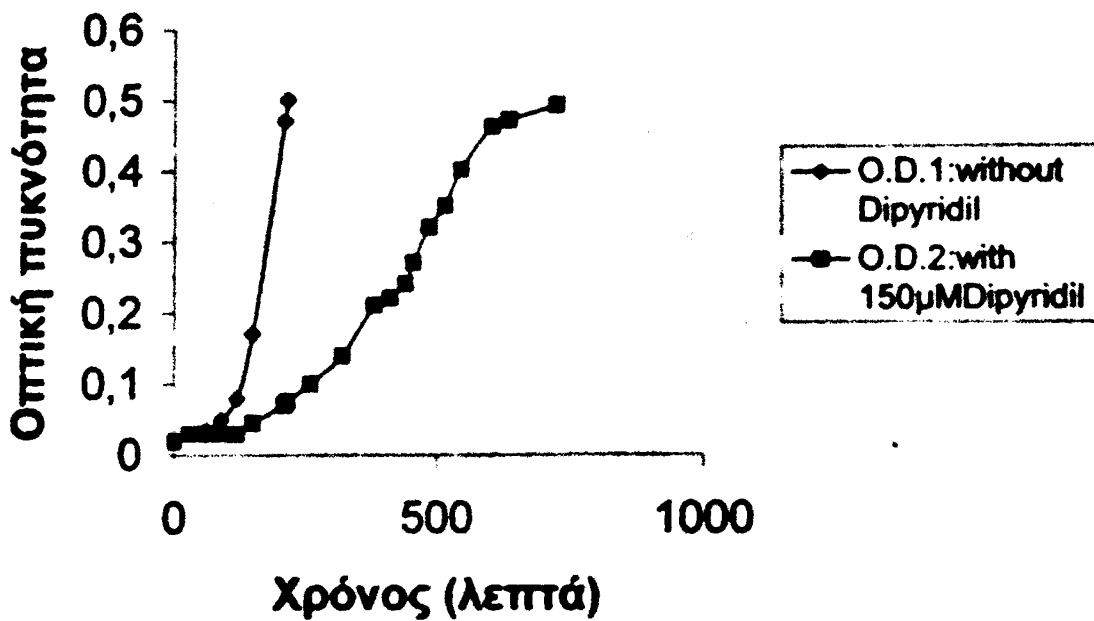


JMS58pLTX4550

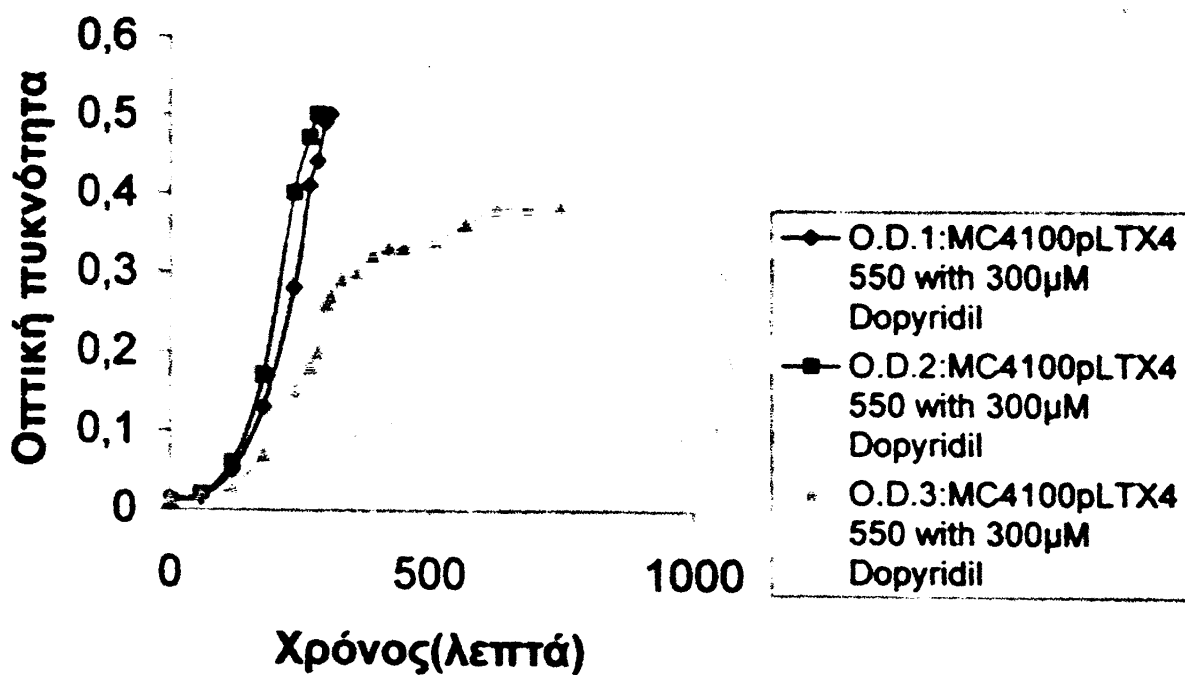


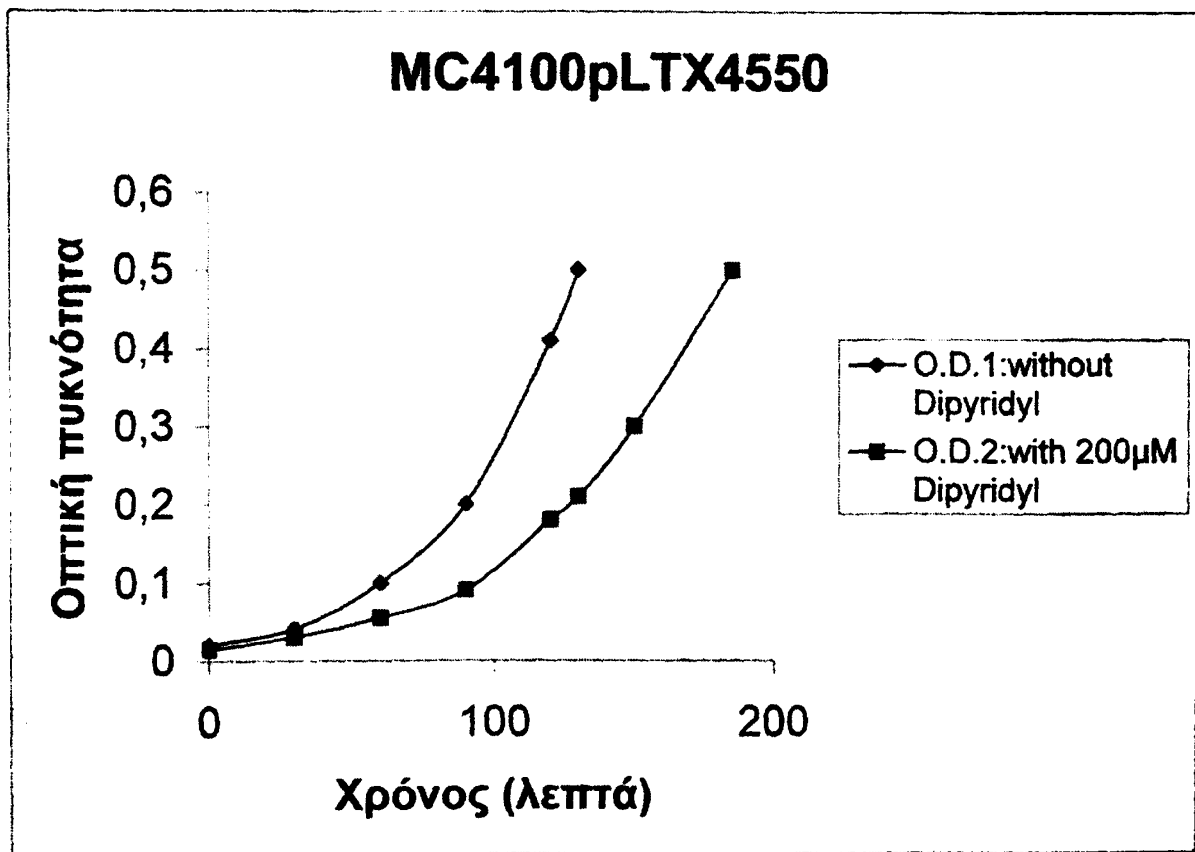
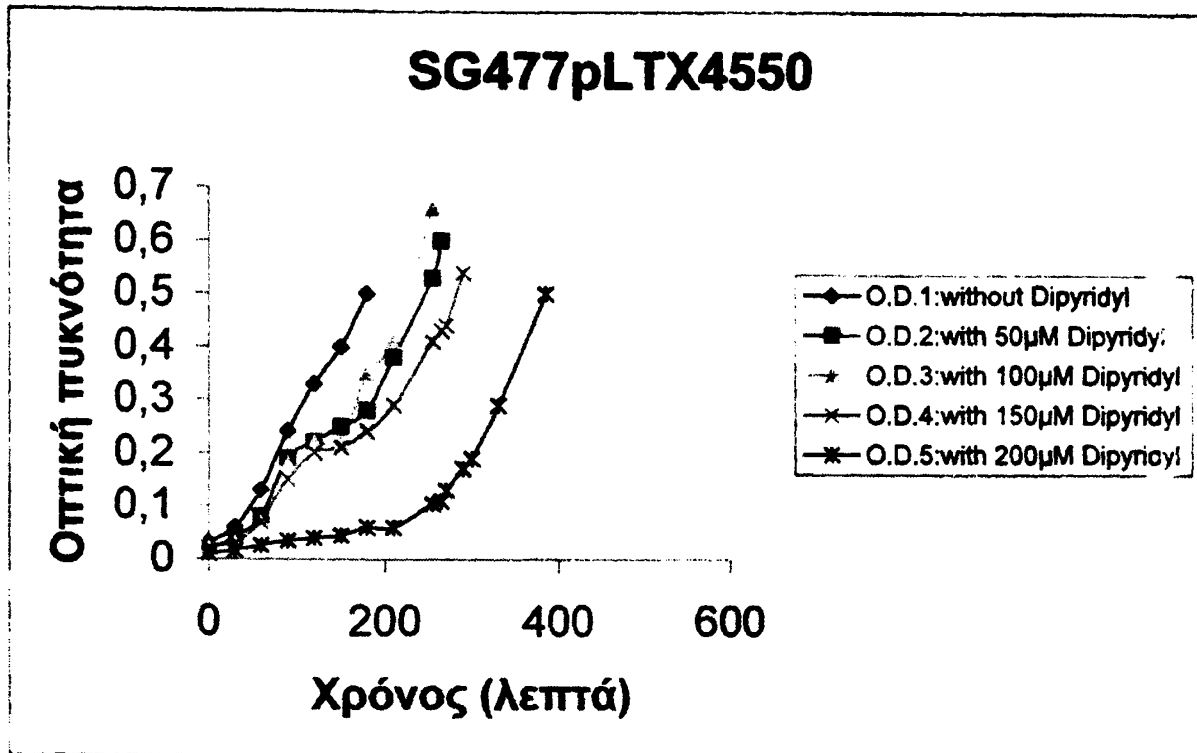


WH20pLTX4550

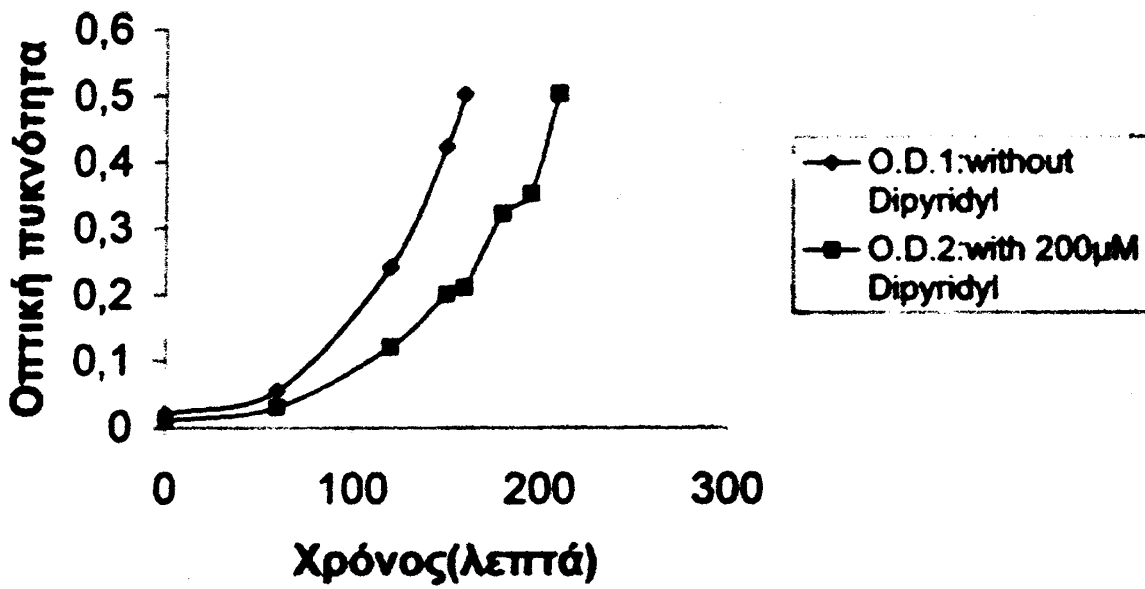


MC4100, MH1471, JMS58 ,pLTX4550

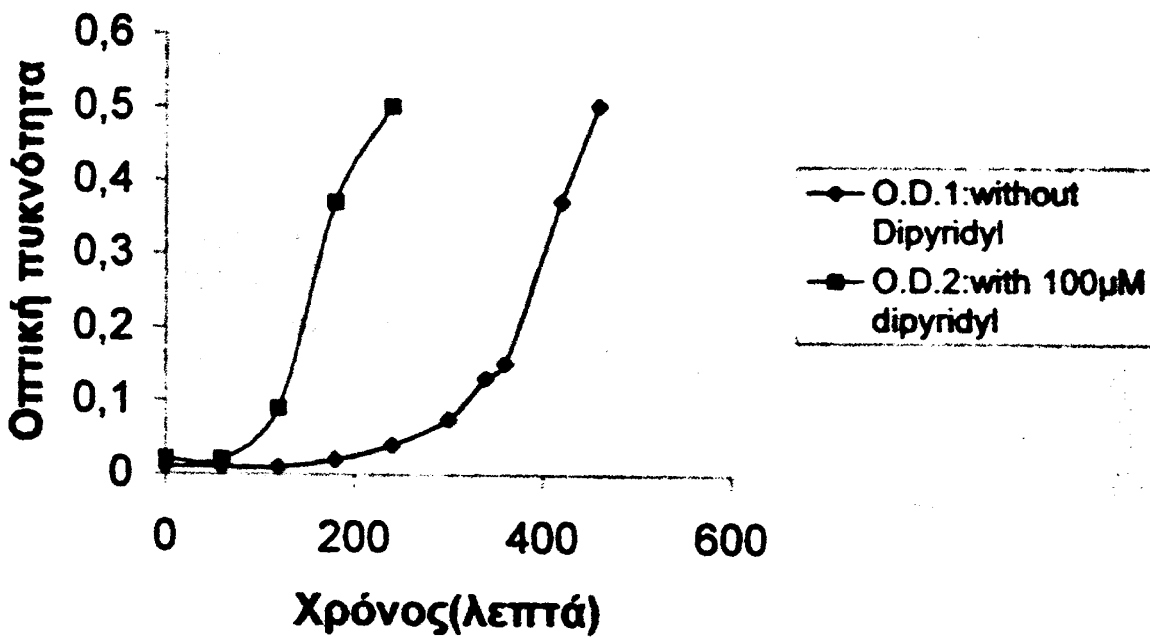


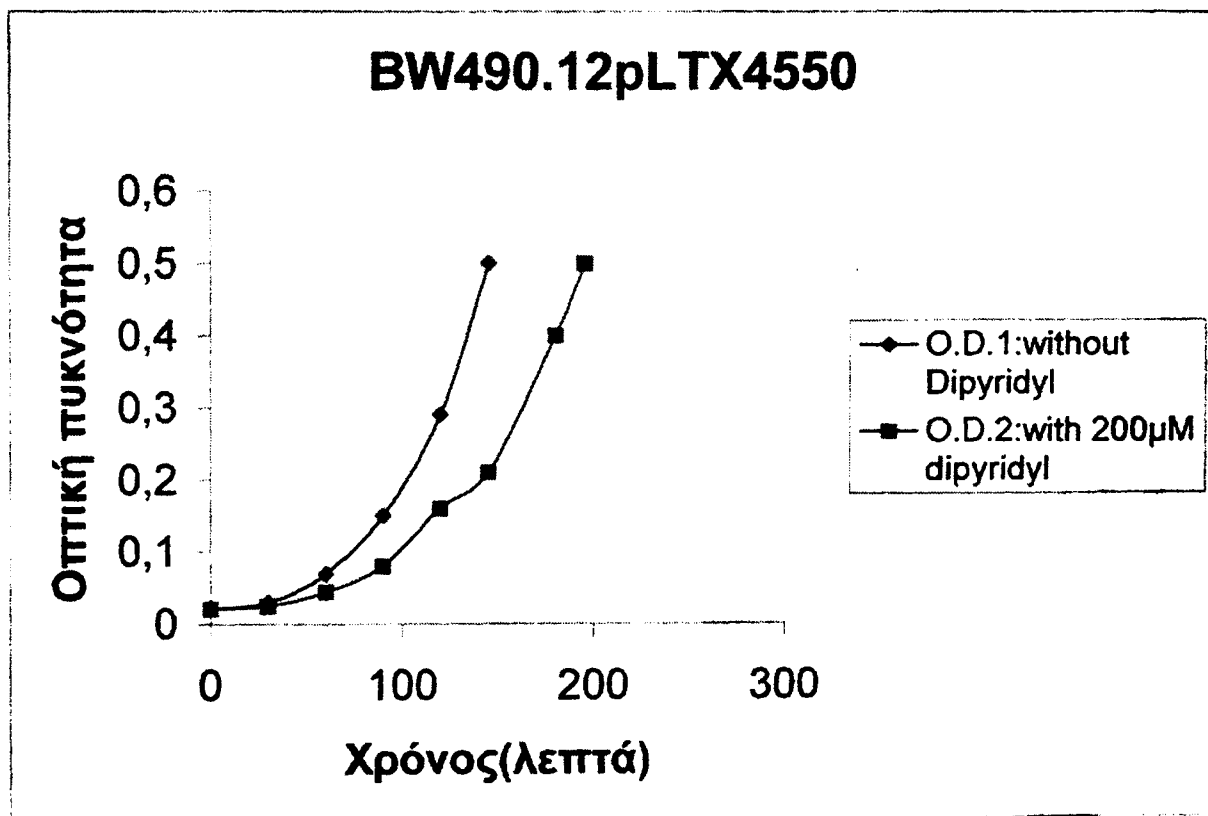
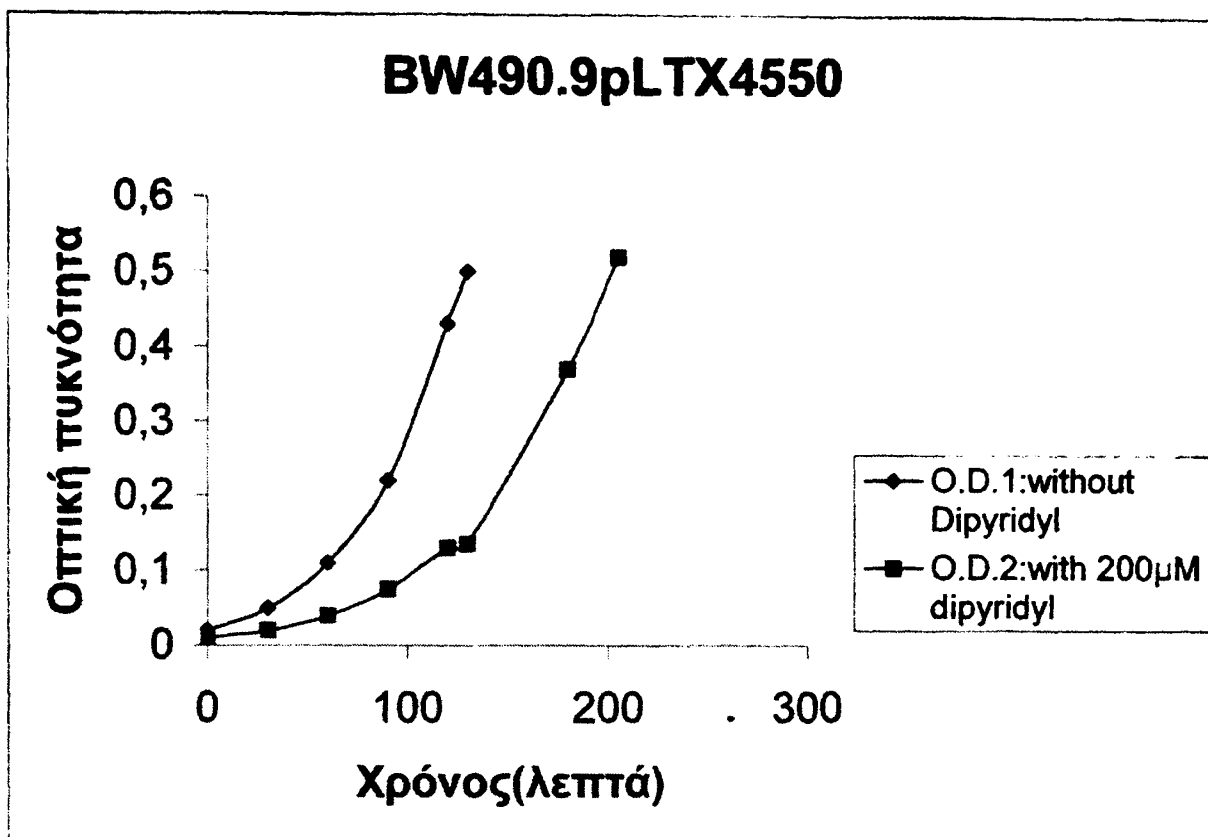


MH1471pLTX4550

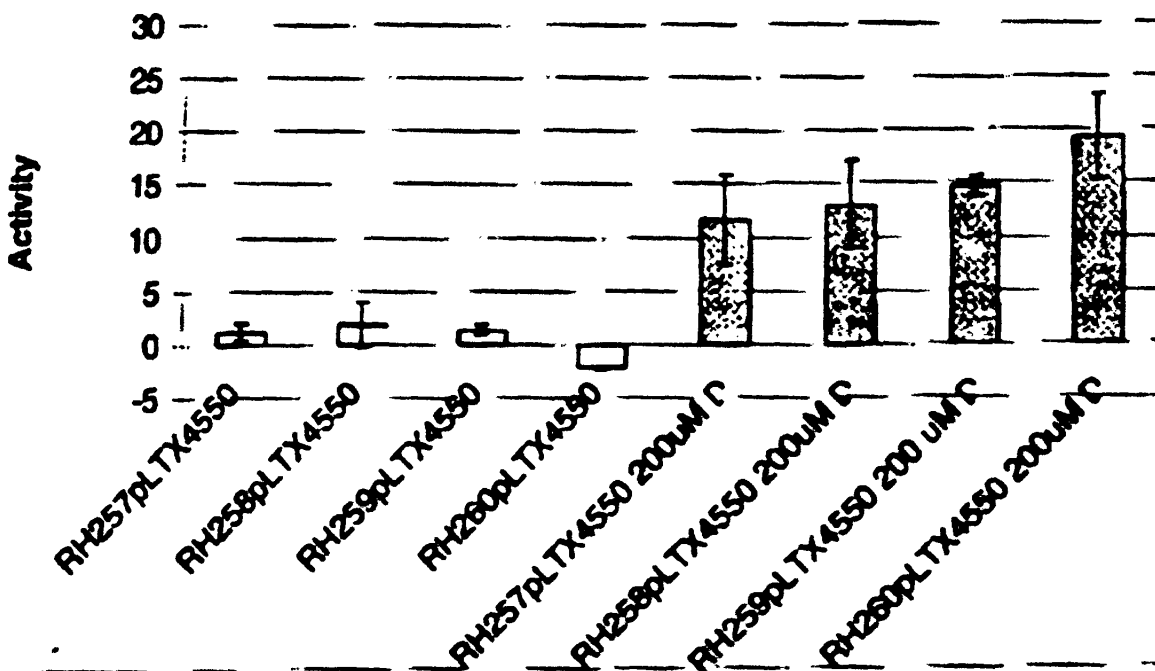


WH66pLTX4550

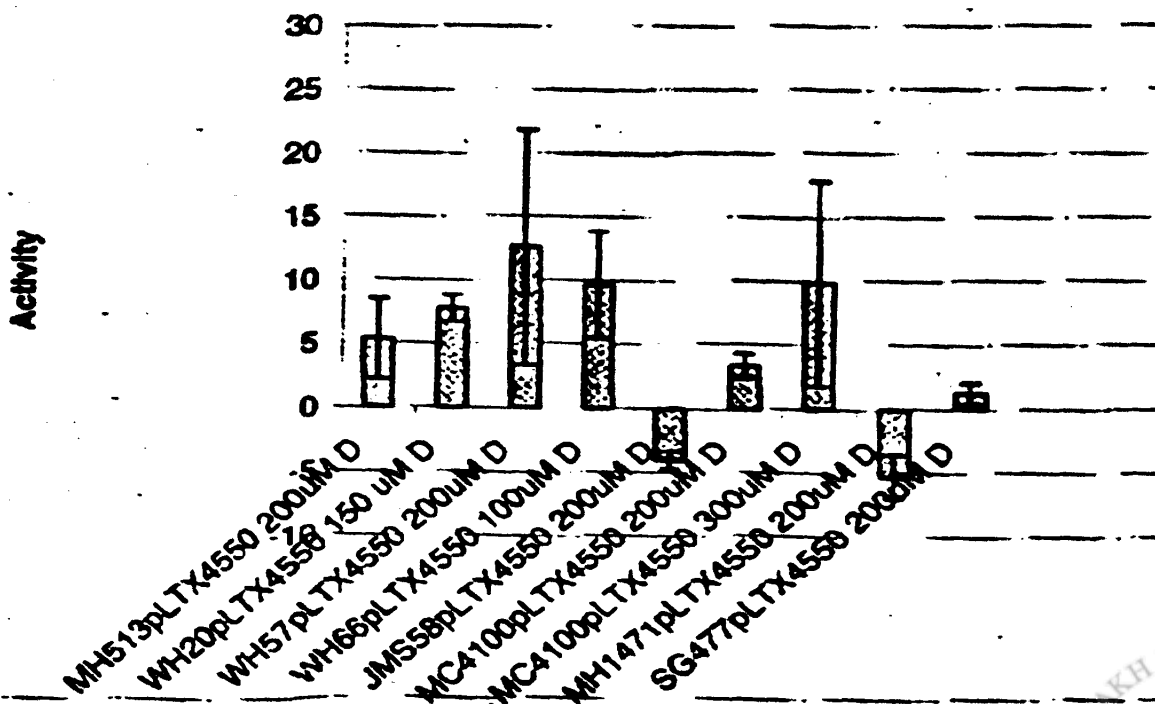




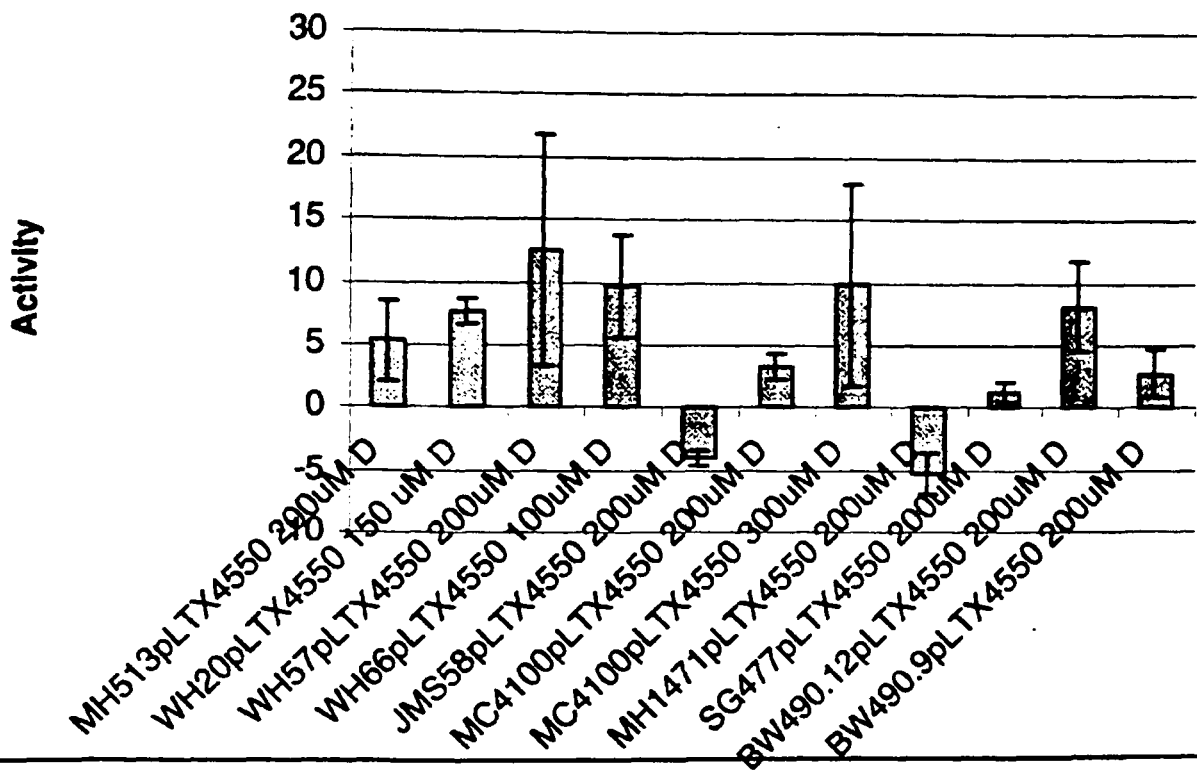
Relationship between Acetyl Phosphate and FepB Expression



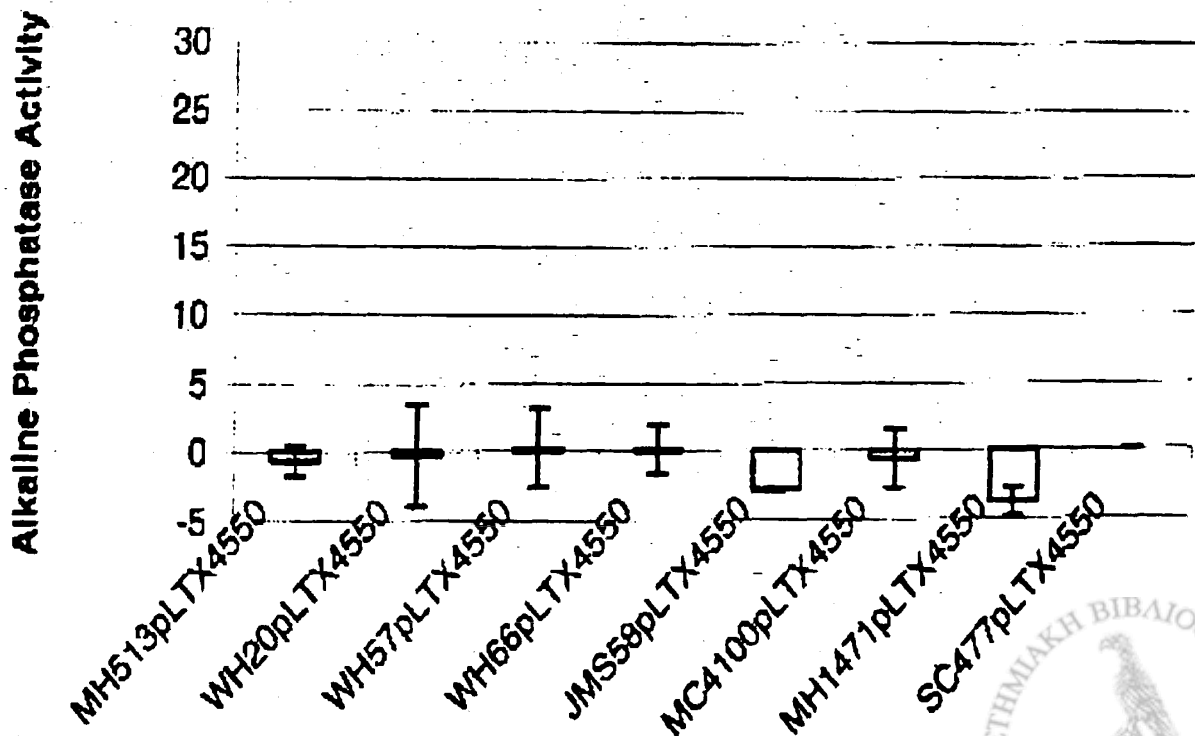
Wild Types and evnZ Mutations with Dipyrldyl



Wild Types and *envZ* Mutations with Dipyridyl

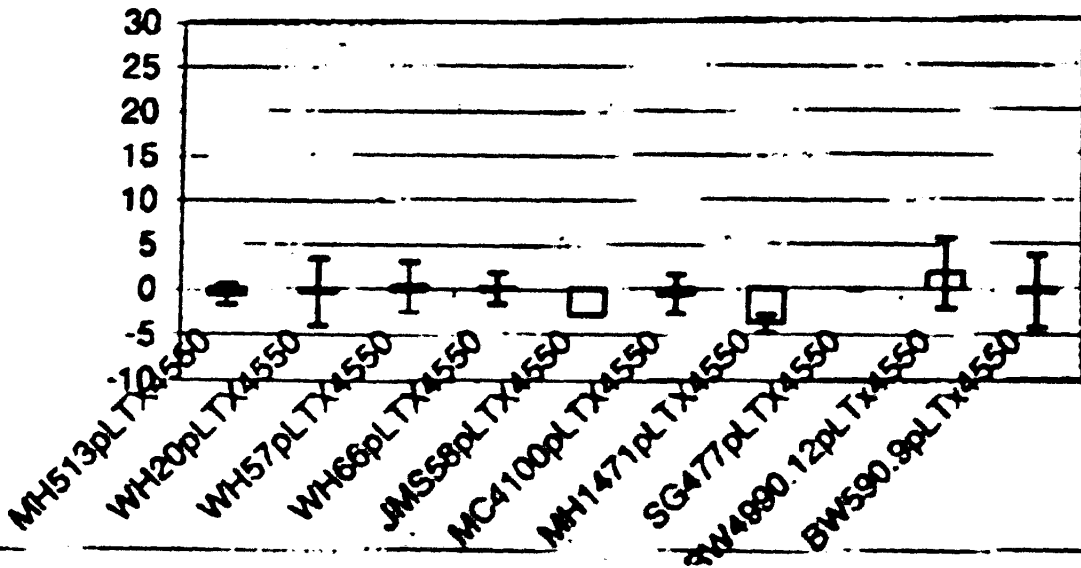


envZ Mutations without Dipyridyl



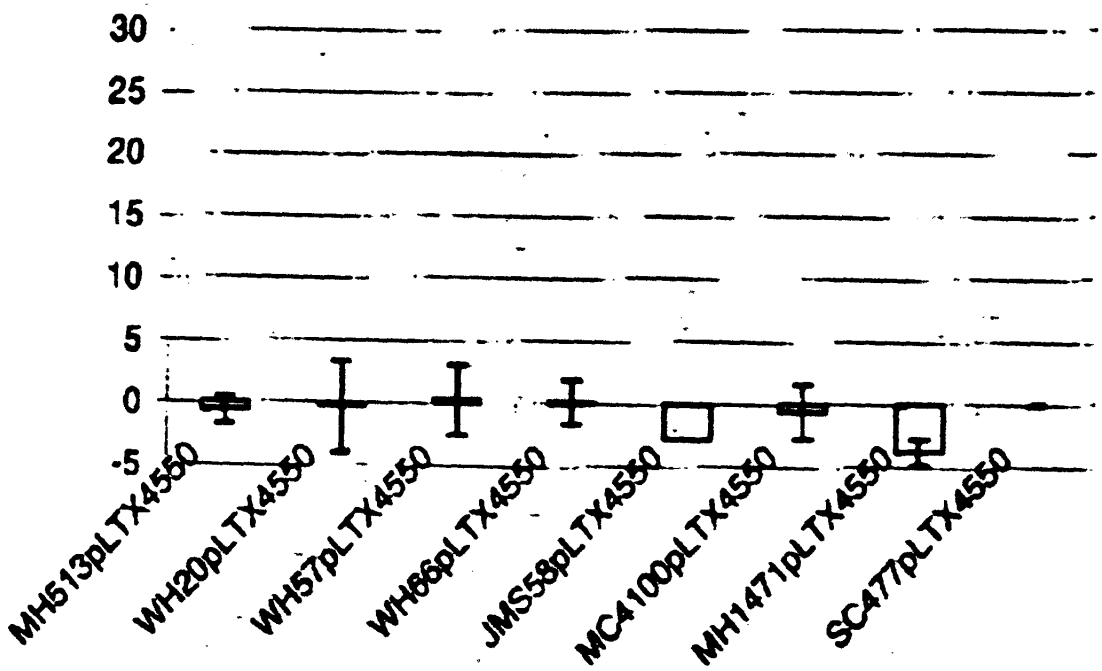
Wild Types and envZ Mutations without Dipyridyl

Alkaline Phosphatase Activity

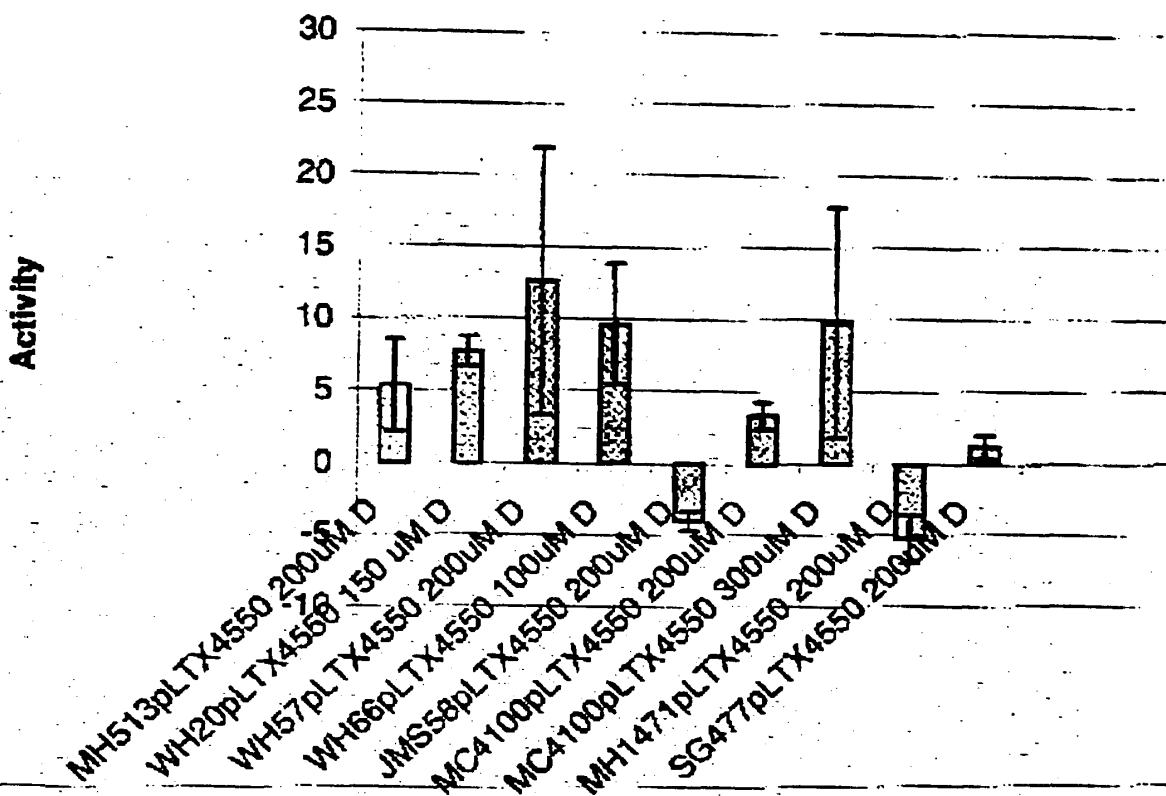


envZ Mutations without Dipyridyl

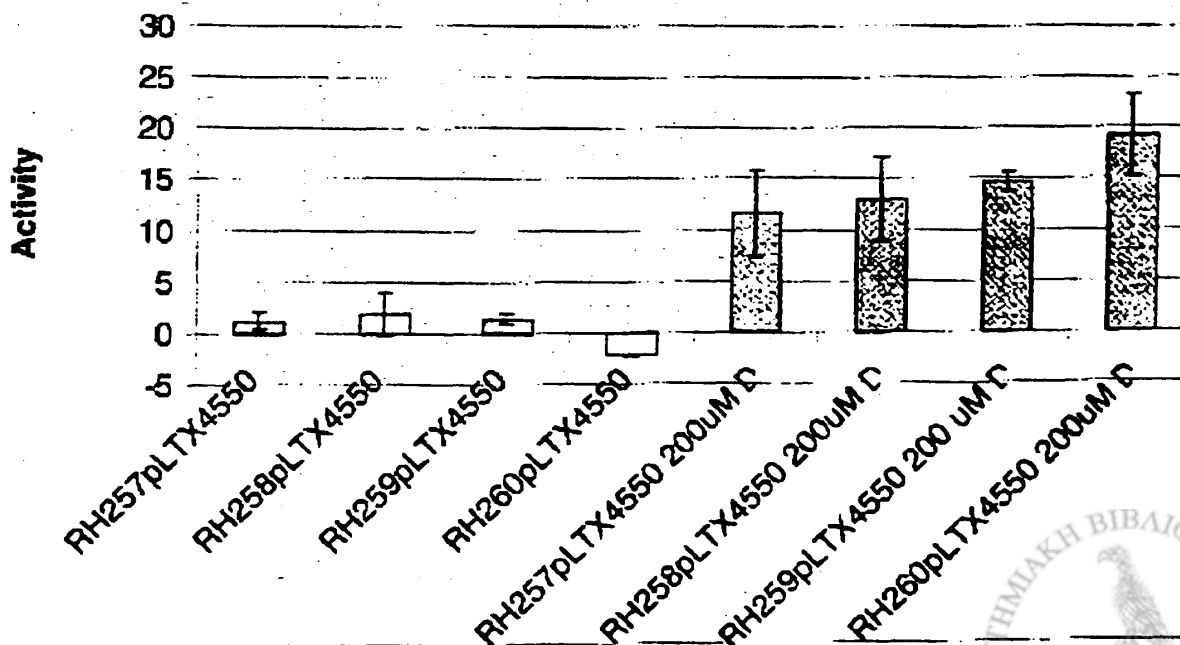
Alkaline Phosphatase Activity



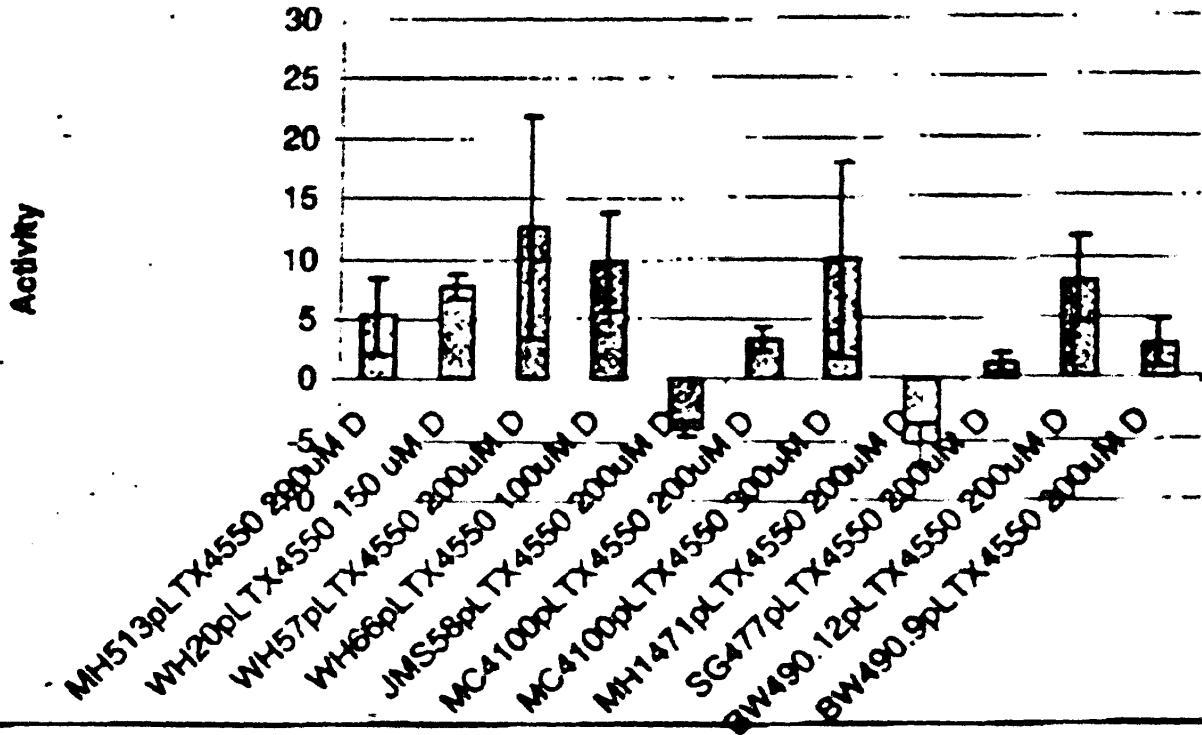
Wild Types and evnZ Mutations with Dipyrldyl



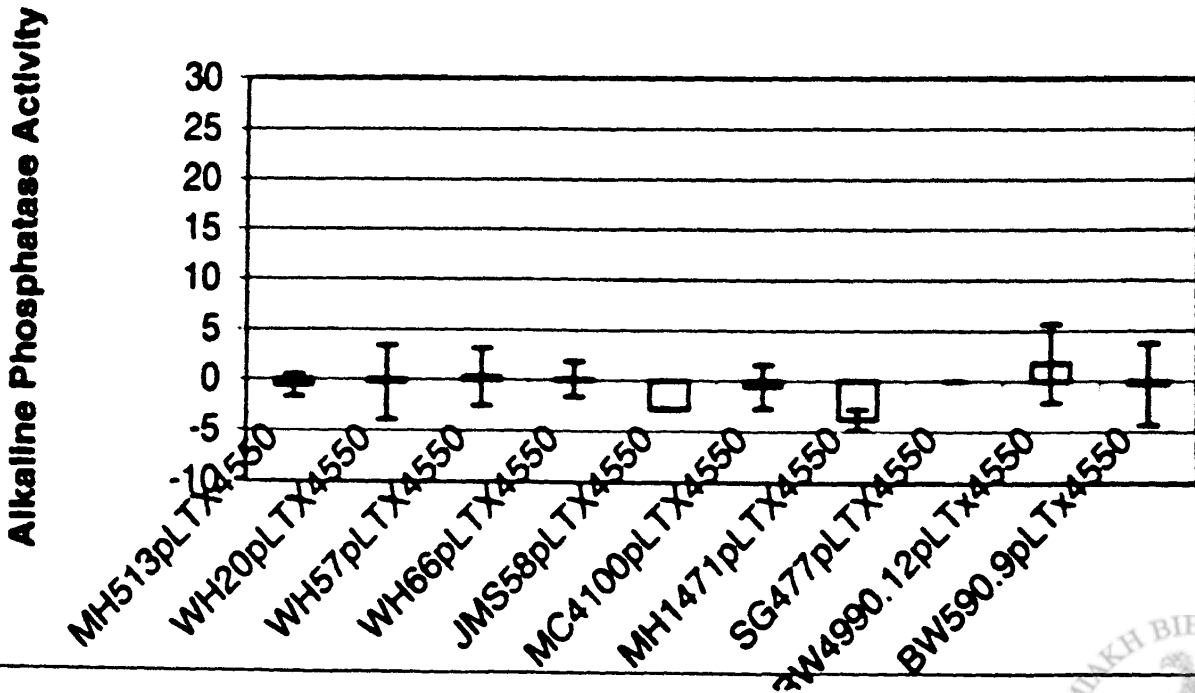
Relationship between Acetyl Phosphate and FepB Expression



Wild Types and envZ Mutations with Dipyriddy



Wild Types and envZ Mutations without Dipyriddy



λ vir. Infections results

BW490.12 + λ vir : clear plaques

BW490.9 + λ vir: turbid

WH20pITX4550 + λ vir: clear plaques

WH66pITX4550 + λ vir: clear plaques

WH57pITX4550 + λ vir: clear plaques

JMS58pITX4550 +: λ vir: clear plaques

BW490.12pITX4550+ λ vir: clear plaques

BW490.9pITX4550 + λ vir: turbid

SG477 + λ vir: clear plaques

MH1471 +Xvir: turbid

MC4100 + λ vir: clear plaques

SG477pITX + λ vir: clear plaques

MH1471 pITX + λ vir: turbid

MC4100pITX + λ vir: clear plaques

JMS58 + λ vir: clear plaques



Strain	OD ₅₁₀ 10min	Siderophore
WH20 pLTX 100uM dip	0.06	3.5ug/2ml
WH20 pLTX 150uM dip	0.07	4ug/2ml
MH513 pLTX200uM dip	0.08	4ug/2ml
WH57 pLTX 200uM dip	0.08	4ug/2ml
WH66 pLTX 150uM dip	0.1	4.5ug/2ml
MC4100 pLTX 200uM dip	0.13	5.5ug/2ml
SG477 pLTX 200uM dip	0.12	5.0ug/2ml
SG477 pLTX 200uM dip	0.13	5.5ug/ml
JMS58 200uM dip	0.1	4.5ug/2ml

Arnow Assay



Το αλπικό οικοσύστημα είναι ένα από τα πιο ευαίσθητα οικοσυστήματα της γης. Η αλπική περιοχή χαρακτηρίζεται από χαμηλές θερμοκρασίες, μεγάλες κλίμακες κλιματικών μεταβολών και υψηλή ηλιακή ακτινοβολία. Η αλπική περιοχή είναι η περιοχή που βρίσκεται στα βουνά, όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλή και η υγρασία είναι υψηλή.

Η αλπική περιοχή είναι η περιοχή που βρίσκεται στα βουνά, όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλή και η υγρασία είναι υψηλή. Η αλπική περιοχή είναι η περιοχή που βρίσκεται στα βουνά, όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλή και η υγρασία είναι υψηλή. Η αλπική περιοχή είναι η περιοχή που βρίσκεται στα βουνά, όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλή και η υγρασία είναι υψηλή.

Η αλπική περιοχή είναι η περιοχή που βρίσκεται στα βουνά, όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλή και η υγρασία είναι υψηλή. Η αλπική περιοχή είναι η περιοχή που βρίσκεται στα βουνά, όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλή και η υγρασία είναι υψηλή. Η αλπική περιοχή είναι η περιοχή που βρίσκεται στα βουνά, όπου η θερμοκρασία είναι χαμηλή και η υγρασία είναι υψηλή.

II. Αλπικό υδάτινο οικοσύστημα



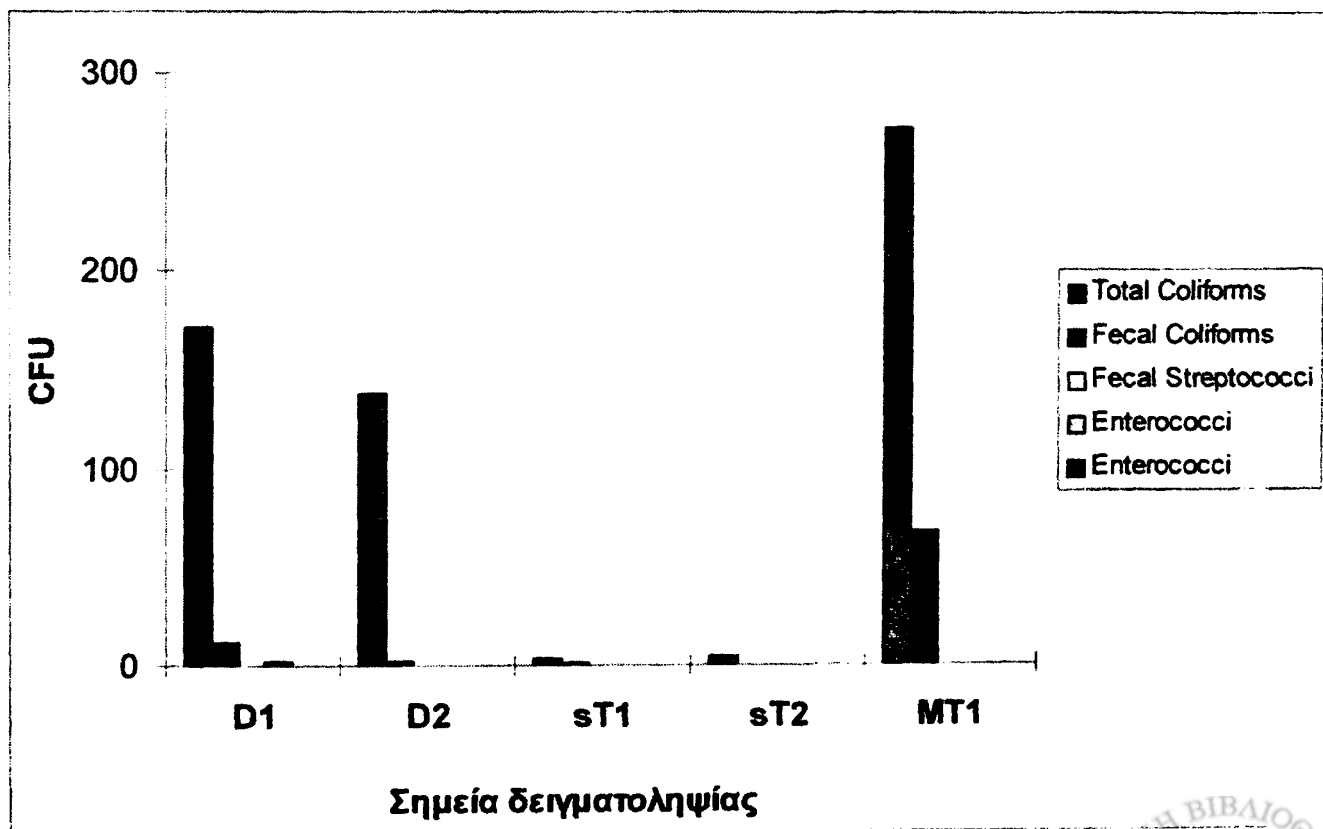
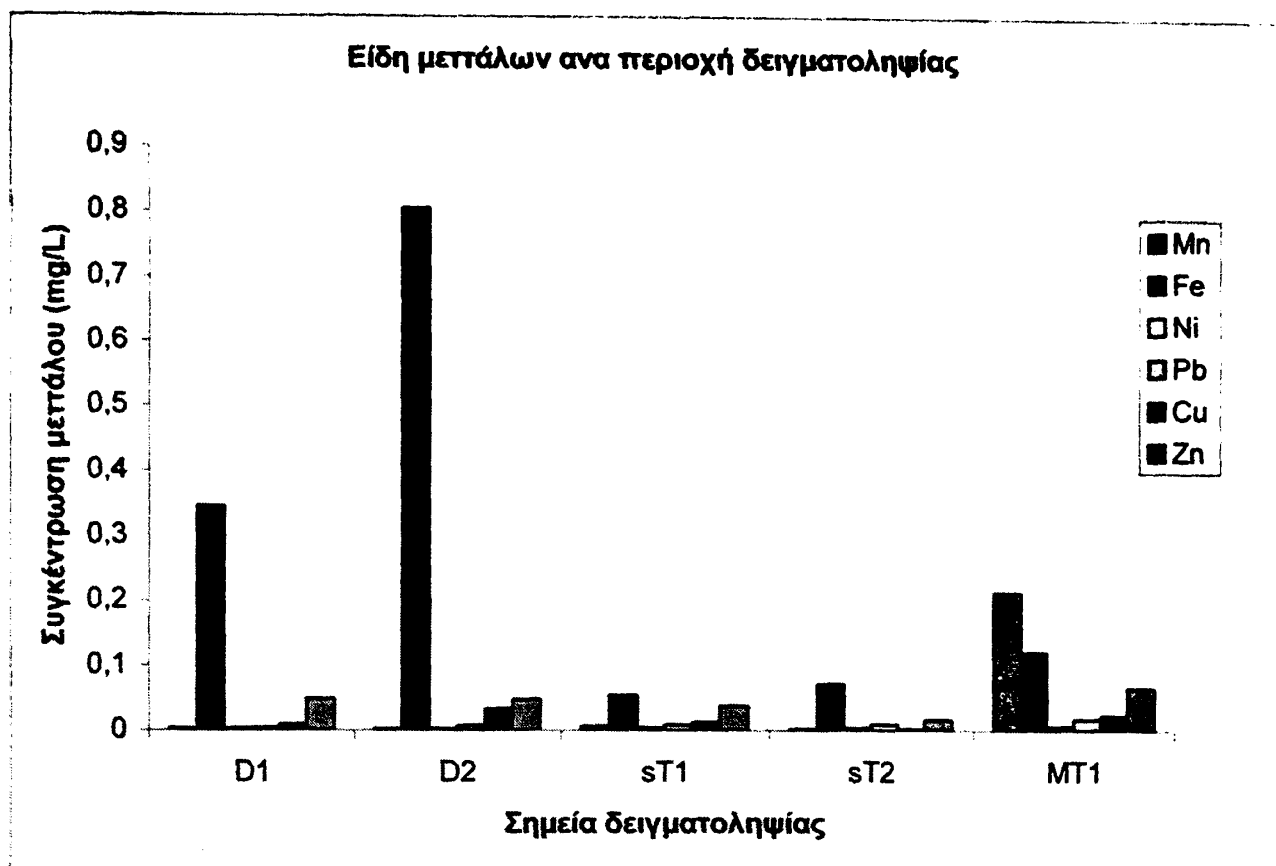
Τα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν χαμηλούς αριθμούς των ολικών κολοβακτηριδίων, των κοπρανωδών κολοβακτηριδίων καθώς και των στρεπτοκόκκων.

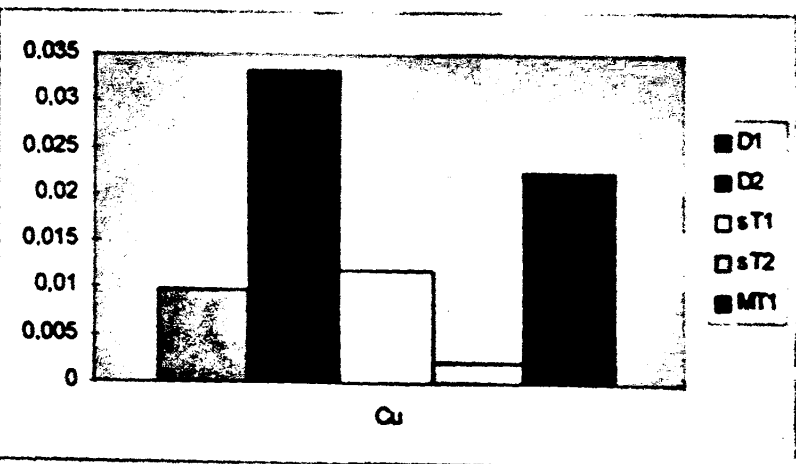
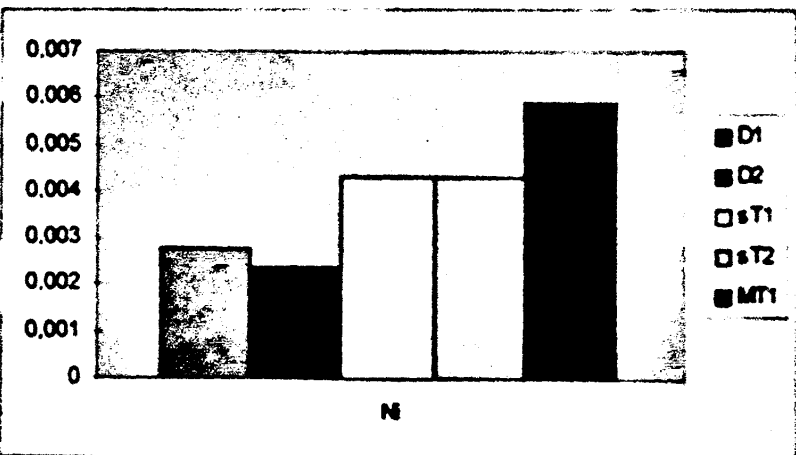
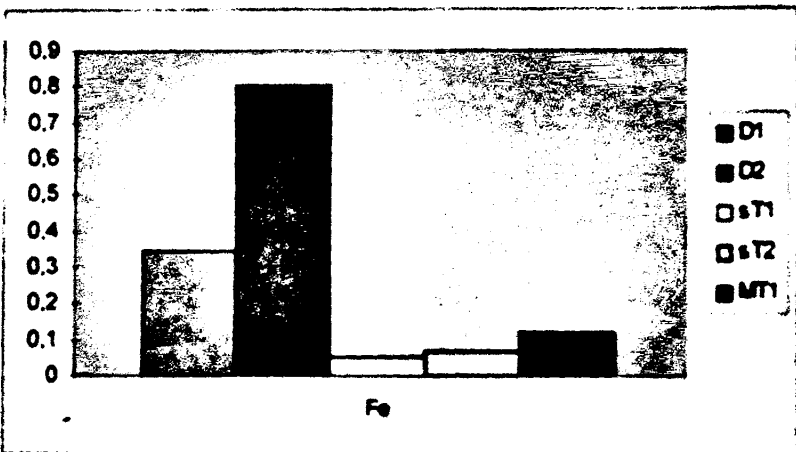
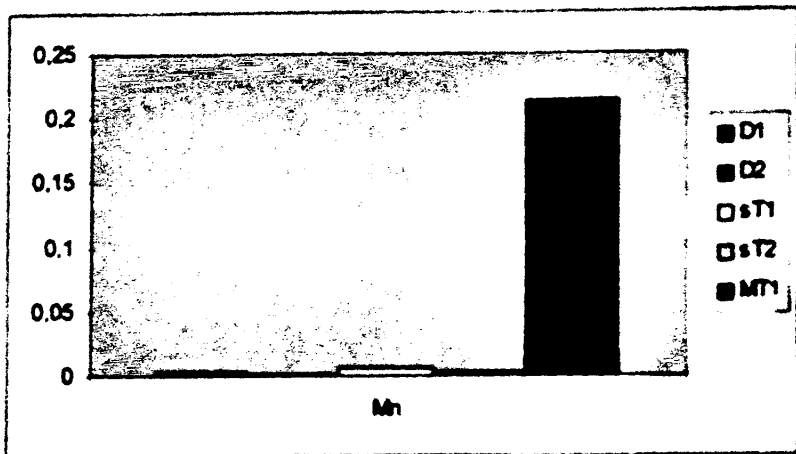
Στην μεγάλη λίμνη Τσουμάνη παρατηρούμε μεγαλύτερους αριθμούς ολικού αριθμού κολοβακτηριδίων και κοπρανωδών κολοβακτηριδίων. Το *C. perfringens* ανιχνεύεται σε σχετικά χαμηλούς αριθμούς, μόνο με τη σπορογόνο μορφή του. Η βλαστική μορφή του *C. perfringens* είναι δύσκολο να αναπτυχθεί και πολλαπλασιασθεί σε υδάτινο περιβάλλον, όπως αυτά της Δρακόλιμνης και των λιμνών Τσουμάνη.

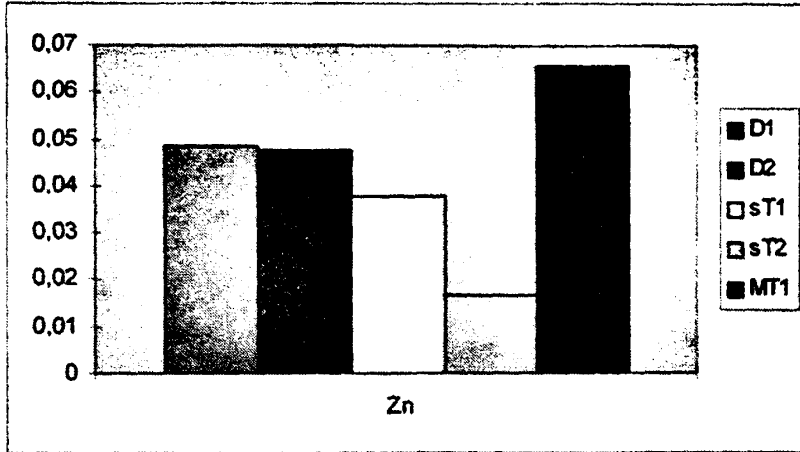
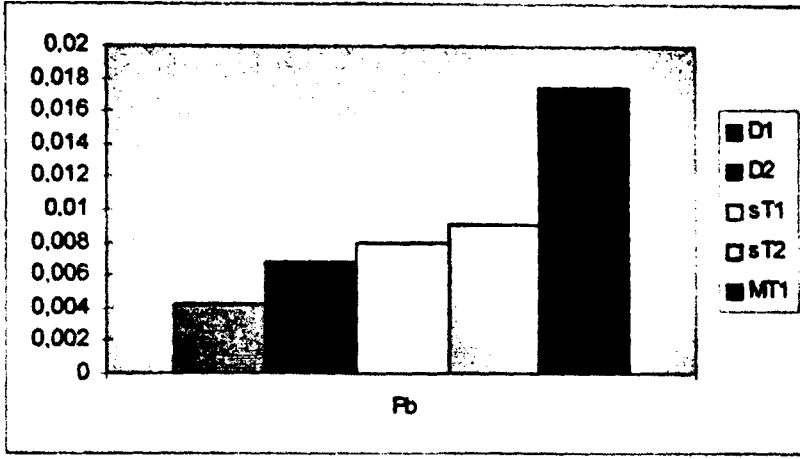
Στη μελέτη του αλιπικού αυτού περιβάλλοντος μετρήθηκαν επίσης τα επίπεδα παρουσίας βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον των υδάτων των λιμνών αυτών. Πολύ μικρά επίπεδα για όλα τα μέταλλα βρέθηκαν σε όλες τις τοποθεσίες δειγματοληψίας, εκτός μιας δειγματοληπτικής περιοχής, όπου ο σίδηρος βρέθηκε σε ελαφρά υψηλότερο επίπεδο. Η θερμοκρασία των νερών των λιμνών, κατά τις μεσημβρινές ώρες ηλιόλουστης ημέρας, μετρήθηκε στους 8° C, με θερμοκρασία του περιβάλλοντος αέρα 15° C. Το pH των λιμνών κυμανόταν από 6.0 έως 6.5.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα παρακάτω διαγράμματα.









Η επιβίωση της οικογένειας του είναι εξαρτημένη από το C που παράγει και η υγεία του εξαρτάται από την ποσότητα της ενέργειας που παράγει. Η ενέργεια που παράγει είναι ανάλογη της ποσότητας του C που παράγει. Η ενέργεια που παράγει είναι ανάλογη της ποσότητας του C που παράγει.

Η ενέργεια που παράγει είναι ανάλογη της ποσότητας του C που παράγει. Η ενέργεια που παράγει είναι ανάλογη της ποσότητας του C που παράγει.

Η ενέργεια που παράγει είναι ανάλογη της ποσότητας του C που παράγει. Η ενέργεια που παράγει είναι ανάλογη της ποσότητας του C που παράγει.

Η ενέργεια που παράγει είναι ανάλογη της ποσότητας του C που παράγει. Η ενέργεια που παράγει είναι ανάλογη της ποσότητας του C που παράγει.

Η ενέργεια που παράγει είναι ανάλογη της ποσότητας του C που παράγει. Η ενέργεια που παράγει είναι ανάλογη της ποσότητας του C που παράγει.

III. Εντερικό οικοσύστημα

Η ενέργεια που παράγει είναι ανάλογη της ποσότητας του C που παράγει. Η ενέργεια που παράγει είναι ανάλογη της ποσότητας του C που παράγει.



Στις παθολογικές περιοχές του υλικού βιοψίας, το *C. perfringens* ανιχνεύθηκε σε υψηλότερα ποσοστά (95.65%) σε σχέση με τις φυσιολογικές (78.26%). Τα υπόλοιπα είδη *Clostridium*, πλην του *C. perfringens*, ανιχνεύθηκαν τόσο στις παθολογικές περιοχές (47.82%) όσον και στις φυσιολογικές περιοχές (43.47%), σε παρόμοια επίπεδα.

Οι *Bacillus* παρουσιάζουν επίσης παρόμοια επίπεδα στις παθολογικές (47.82%) σε σχέση με τις φυσιολογικές (52.17%) περιοχές.

Επίσης, τα επίπεδα των *E. coli* υπερτερούν στις παθολογικές περιοχές (60.86%) σε σχέση με τις φυσιολογικές (43.47%).

Το *Enterobacter aerogenes* εμφανίζει το ίδιο ποσοστό σε παθολογικές και φυσιολογικές περιοχές (8.69%) καθώς επίσης και οι ενδιάμεσοι τύποι *E. coli*, που εμφανίζονται σε επίπεδα 13.04%, τόσο στις παθολογικές όσο και στις φυσιολογικές περιοχές.

Οι *Streptococcus* σαφώς υπερτερούν στα παθολογικά δείγματα (91.30%) και ιδιαίτερα σε αυτά του καρκίνου παχέος εντέρου (100%) και των φλεγμονωδών νόσων του παχέος εντέρου (100%) σε σχέση με τα φυσιολογικά (47.82%).

Ο κυρίως παθογόνος *S. aureus* εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα στις παθολογικές περιοχές (30.43%) σε σύγκριση με τις φυσιολογικές (17.39%).

Σε αντίθεση, οι μη παθογόνοι *Staphylococcus* spp. κοαγκουλάση (-) παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα στις παθολογικές περιοχές (8.69%).

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες και διαγράμματα.

Π Ι Ν Α Κ Α Σ 12

Αποτελέσματα απομόνωσης μικροβίων από βιοψίες φυσιολογικής και παθολογικής περιοχής των ασθενών,

Ασθενής	Φυσιολογική περιοχή				Παθολογική περιοχή				
	Εντεροβακτηριοειδή Gram -	Σπορογόνα βακτήρια	Βακτήρια υπό τη μορφή κόκκων Gram +	Εντεροβακτηριοειδή Gram -	Σπορογόνα βακτήρια	Βακτήρια υπό τη μορφή κόκκων Gram +	Εντεροβακτηριοειδή Gram -	Σπορογόνα βακτήρια	Βακτήρια υπό τη μορφή κόκκων Gram +
N ₀ 1 Διάγνωση Καρκίνος παχέος εντέρου	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus spp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus spp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus spp.</i>
N ₀ 2 Διάγνωση Καρκίνος παχέος εντέρου	<i>E.coli</i>	<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus spp.</i>	<i>E.coli</i>	<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus spp.</i>	<i>E.coli</i>	<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus spp.</i>
N ₀ 3 Διάγνωση Νόσος του Crohn	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus spp.</i> <i>coagulase (-)</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus spp.</i> <i>coagulase (-)</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

<p>№ 4 Διάγνωση Πολύποδας παχός εντέρου</p>	-	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>	-	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lsc(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>
<p>№ 5 Διάγνωση Καρκίνος παχός εντέρου</p>	<p><i>E. coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lsc(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus spp.</i></p>	<p><i>E. coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lsc(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>
<p>№ 6 Διάγνωση Προφυτική εστία προκαρκινωματώδης αλλοίωσης</p>	-	-	<p><i>Staphylococcus spp.</i> <i>coagulans (-)</i></p>	-	<p><i>Clostridium</i> <i>parfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>

<p>N₀7 Διάγνωση Πολύποδας παχέος εντέρου</p>	-	<p><i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	-	-	<p><i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>
<p>N₀8 Διάγνωση Πολύποδας παχέος εντέρου</p>	<p>Ενδιάμεσοι τύποι <i>E. coli</i></p>	<p><i>Clostridium spp. lec(-)</i></p>	-	<p>Ενδιάμεσοι τύποι <i>E. coli</i></p>	<p><i>Clostridium spp. lec(-)</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>
<p>N₀9 Διάγνωση Πολύποδας παχέος εντέρου</p>	<p><i>E. coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>	<p><i>E. coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>
<p>N₀10 Διάγνωση Λαχνωτό αδένωμα</p>	-	-	<p><i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i> <i>Coagulase (-)</i></p>	-	<p><i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>

N^o 11 Διάγνωση Πολύποδας παχέος εντέρου	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	-	E.coli	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i> Coagulase (-)
N^o 12 Διάγνωση Πολύποδας παχέος εντέρου	Ενδιάμεσοι τύποι E.coli	<i>Bacillus spp.</i>	-	E.coli	<i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i>	-
N^o 13 Διάγνωση Ελακώδης κολίτιδα	E.coli	<i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	E.coli	<i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus spp.</i>

<p>N₀ 14 Διάγνωση Πολύποδας παχέος εντέρου</p>	<p>Ενδίδμεσοι τύποι <i>E.coli</i></p>	<p><i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p>-</p>	<p>Ενδίδμεσοι τύποι <i>E.coli</i></p>	<p><i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>
<p>N₀ 15 Διάγνωση Καρκίνος παχέος εντέρου</p>	<p><i>E.coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>	<p><i>E.coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>
<p>N₀ 16 Διάγνωση Πολύποδας παχέος εντέρου</p>	<p><i>Enterobacteriaceae</i></p>	<p><i>Clostridium spp. lec(-)</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>	<p><i>E.coli</i></p>	<p><i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus spp.</i></p>

<p>№ 17 Διάγνωση Ελκώδης κολίτιδα</p>	<p>Ενδύμσοι τύποι <i>E.coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p>• -</p>	<p>Ενδύμσοι τύποι <i>E.coli</i></p>	<p><i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>
<p>№ 18 Διάγνωση Καρκίνος παχέος εντέρου</p>	<p><i>E.coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p>•</p>	<p><i>E.coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>
<p>№ 19 Διάγνωση Αδένωμα (αρχή σχηματισμού μικρούς πολύποδα)</p>	<p><i>Enterobacter aerogenes</i> Τύπος I</p>	<p><i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>	<p><i>Enterobacter aerogenes</i> Τύπος I</p>	<p><i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>



<p>N₀ 20 Διάγνωση Οικογενής πολυποδίαση</p>	<p><i>Enterobacter cloacae</i> <i>Lactobacillus spp.</i></p>	-	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>	<p><i>E. coli</i></p>	-	<p><i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i> <i>Coagulase (-)</i></p>
<p>N₀ 21 Διάγνωση Ελκώδης κολίτιδα</p>	<p><i>E. coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	-	<p><i>E. coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i></p>
<p>N₀ 22 Διάγνωση Ελκώδης κολίτιδα σε στάδιο ύφεσης</p>	<p><i>E. coli</i></p>	<p><i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>	<p><i>E. coli</i></p>	<p><i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>

<p>№ 23 Διάγνωση Ελκώδης κολίτιδα σε στάδιο έξαρσης</p>	<p><i>E.coli</i></p>	<p><i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i></p>	<p><i>E.coli</i></p>	<p><i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i></p>
<p>№ 24 Διάγνωση Ελκώδης κολίτιδα</p>	<p><i>E.coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>E. coli</i></p>	<p><i>E.coli</i></p>	<p><i>Bacillus spp.</i> <i>Clostridium spp. lec(-)</i> <i>Clostridium perfringens</i></p>	<p><i>Streptococcus spp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i></p>



ΠΙΝΑΚΑΣ 13

Αποτελέσματα απομόνωσης *C. perfringens*
από βιοψίες φυσιολογικής και παθολογικής περιοχής ασθενών με διαταραχές του πεπτικού
συστήματος

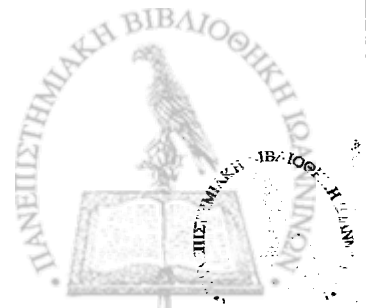
Α/Α	Ασθενείς (διάγνωση)	L . S ζωμός Φυσιολογική περιοχή			
		Βλαστικές μορφές			Σπόροι
		αραίωση -1	αραίωση -2	αραίωση -3	
1	Καρκίνος παχέος εντέρου	+	-	-	+
2	Καρκίνος παχέος εντέρου	+	+	-	+
3	Νόσος του Crohn	+	+	-	+
4	Πολύποδας παχέος εντέρου	-	-	-	+
5	Καρκίνος παχέος εντέρου	+	-	-	+
6	Προφυτικά στάδια προκαρκινωματ ώδης αλλοιώσεις	-	-	-	-
7	Πολύποδας του παχέος εντέρου	-	-	-	+
8	Πολύποδας του παχέος εντέρου	-	-	-	-
9	Πολύποδας παχέος εντέρου	+	-	-	-
10	Λαχνωτό αδένωμα	-	-	-	-
11	Πολύποδας παχέος εντέρου	+	-	-	+
12	Πολύποδας του παχέος εντέρου	-	-	-	-



ΠΙΝΑΚΑΣ 14

Αποτελέσματα απομόνωσης *C. perfringens*
από βιοψίες φυσιολογικής και παθολογικής περιοχής ασθενών με διαταραχές του πεπτικού
συστήματος

Α/Α	Ασθενής (διάγνωση)	L. S ζωός Παθολογική περιοχή			
		Βλαστικές μορφές			Σπόροι
		αραίωση -1	αραίωση -2	αραίωση -3	
1	Καρκίνος παχέος εντέρου	+	+	-	+
2	Καρκίνος παχέος εντέρου	+	+	+	+
3	Νόσος του Crohn	+	+	-	+
4	Πολύποδας παχέος εντέρου	+	-	-	-
5	Καρκίνος παχέος εντέρου	+	+	-	+
6	Προφυτικά στάδια προκαρκινωματώδης αλλοιώσεις	+	-	-	-
7	Πολύποδας του παχέος εντέρου	+	-	-	+
8	Πολύποδας του παχέος εντέρου	-	-	-	-
9	Πολύποδας παχέος εντέρου	-	-	-	+
10	Λαχνωτό αδένωμα	+	+	-	-
11	Πολύποδας παχέος εντέρου	+	-	-	-
12	Πολύποδας του παχέος εντέρου	+	-	-	-



ΠΙΝΑΚΑΣ 15

Αποτελέσματα απομόνωσης *C. perfringens*
από βιοψίες φυσιολογικής και παθολογικής περιοχής ασθενών με διαταραχές του πεπτικού
συστήματος

Α/Α	Ασθενείς (διάγνωση)	L . S ζωμός Φυσιολογική περιοχή			
		Βλαστικές μορφές			Σπόροι
		αραίωση -1	αραίωση -2	αραίωση -3	
13	Ελκώδης κολίτιδα	+	-	-	+
14	Πολύποδας παχέος εντέρου	-	-	-	+
15	Καρκίνος παχέος εντέρου	+	+	-	+
16	Πολύποδας παχέος εντέρου	-	-	-	-
17	Ελκώδης κολίτιδα	+	-	-	+
18	Καρκίνος παχέος εντέρου	+	-	-	-
19	Αδένωμα (αρχή σχηματισμού μικρού πολύποδα)	-	-	-	+
20	Οικογενής πολυποδίαση	-	-	-	-
21	Ελκώδης κολίτιδα	-	-	-	+
22	Ελκώδης κολίτιδα σε στάδιο ύφεσης	-	-	-	+
23	Ελκώδης κολίτιδα σε στάδιο έξαρσης	+	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 16

Αποτελέσματα αιτομόνωσης *C. parvityphi*
από βιοψίες φυσιολογικής και παθολογικής περιοχής ασθενών με διαταραχές του πεπτικού
συστήματος

Α/Α	Ασθενείς (διάγνωση)	L . S ζυμός Παθολογική περιοχή			
		Ελαστικές μορφές			Σπόροι
		αραίωση -1	αραίωση -2	αραίωση -3	
13	Ελκώδης κολίτιδα	+	+	-	+
14	Πολύποδας καχτός εντέρου	-	-	-	+
15	Καρκίνος καχτός εντέρου	+	+	-	+
16	Πολύποδας καχτός εντέρου	+	-	-	+
17	Ελκώδης κολίτιδα	+	-	-	+
18	Καρκίνος καχτός εντέρου	+	+	-	+
19	Αδένωμα (αρχή σχηματισμού μικρού κολόποδα)	-	-	-	+
20	Οικογενής κολοκοδίαση	-	-	-	+
21	Ελκώδης κολίτιδα	+	-	-	+
22	Ελκώδης κολίτιδα σε στάδιο ύφεσης	-	-	-	+
23	Ελκώδης κολίτιδα σε στάδιο έξαρσης	+	-	-	+



ΠΙΝΑΚΑΣ 17

Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων απομόνωσης βλαστικών μορφών και σπόρων *C. perfringens* από δείγματα βιοψιών φυσιολογικής περιοχής ασθενών με διαταραχές του πεπτικού συστήματος

Ασθενής (διάγνωση)	Αριθμός δειγμάτων (βιοψιών)	<i>C. perfringens</i>			
		Θετικά		Σπόροι	
		Βλαστικές μορφές			
		n	%	n	%
Καρκίνος παχέος εντέρου	5	5	100	4	80
Πολύποδας παχέος εντέρου	8	1	12.5	4	50
Νόσος του Crohn	1	1	100	1	100
Προφυτικά στάδια προκαρκινωμάτωσης αλλοιώσεις εντέρου	1	-	-	1	100
Ελκώδης κολίτιδα	5	3	60	4	80
Λαχνωτό αδένωμα	1	-	-	-	-
Οικογενής πολυποδίαση	1	-	-	-	-
Αδένωμα (αρχή σχηματισμού μικρού πολύποδα)	1	-	-	-	-
Σύνολο	23	10	43,47	12	52,17



ΠΙΝΑΚΑΣ 18

Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων απομόνωσης βλαστικών μορφών και σπόρων *C. parvulus* από δείγματα βιοψικών παθολογικής περιοχής ασθενών με διαταραχές του πεπτικού συστήματος

Ασθενής (διάγνωση)	Αριθμός δειγμάτων (βιοψιών)	<i>C. parvulus</i>			
		Θετικά			
		Ελαστικές μορφές		Σπόροι	
		#	%	#	%
Καρκίνος παχέος εντέρου	5	5	100	5	100
Πολύποδος παχέος εντέρου	8	5	62.5	4	50
Νόσος του Crohn	1	1	100	1	100
Προφυτικά στάδια προκαρκινωματώδης αλλοιώσεις εντέρου	1	1	100	-	-
Ελκώδης κολίτιδα	5	4	80	5	100
Λαχνωτό αδένωμα	1	1	100	-	-
Οικογενής πολυποδίαση	1	-	-	1	100
Αδένωμα (αρχή σχηματισμού μικρού πολύποδα)	1	-	-	1	100
Σύνολο	23	17	73,91	17	73,91



ΠΙΝΑΚΑΣ 19

Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων απομόνωσης βλαστικών μορφών του *C. perfringens* από δείγματα βιοψιών φυσιολογικής περιοχής ασθενών με διαταραχές του πεπτικού συστήματος

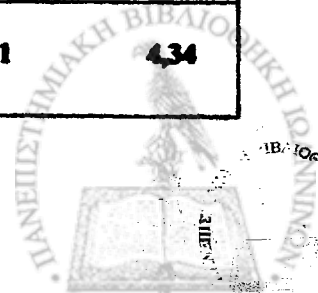
Ασθενής (διάγνωση)	Αριθμός δειγμάτων (βιοψιών)	αραίωση -1		αραίωση -2		αραίωση -3	
		θετικά n	%	θετικά n	%	θετικά n	%
Καρκίνος παχέος εντέρου	5	5	100	2	40	-	-
Πολύποδας παχέος εντέρου	8	2	25	-	-	-	-
Νόσος του Crohn	1	1	100	1	100	-	-
Προφυτικά στάδια προκαρκινωματώδης αλλοιώσεις εντέρου	1	-	-	-	-	-	-
Ελκώδης κολίτιδα	5	2	40	-	-	-	-
Λαχνωτό αδένωμα	1	-	-	-	-	-	-
Οικογενής πολυποδίαση	1	-	-	-	-	-	-
Αδένωμα (αρχή σχηματισμού	1	-	-	-	-	-	-
Σύνολο	23	10	43.47	3	13.04	-	-



ΠΙΝΑΚΑΣ 20

Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων απομόνωσης βλαστικών μορφών του *C. perfringens* από δείγματα βιοψιών παθολογικής περιοχής ασθενών με διαταραχές του πεπτικού συστήματος

Ασθενής (διάγνωση)	Αριθμός δειγμάτων (βιοψιών)	αραίωση -1		αραίωση -2		αραίωση -3	
		■	θετικά %	■	θετικά %	■	θετικά %
Καρκίνος παχέος εντέρου	5	5	100	5	100	1	20
Πολύποδας παχέος εντέρου	8	5	62,5	-	-	-	-
Νόσος του Crohn	1	1	100	1	100	-	-
Προφυτικά στάδια προκαρκινωματώδης αλλοιώσεις εντέρου	1	1	100	-	-	-	-
Ελκώδης κολίτιδα	5	4	80	1	20	-	-
Λαχνωτό αδένωμα	1	1	100	1	100	-	-
Οικογενής πολυποδίαση	1	-	-	-	-	-	-
Αδένωμα (αρχή σχηματισμού)	1	-	-	-	-	-	-
Σύνολο	23	17	73,91	8	34,78	1	4,34

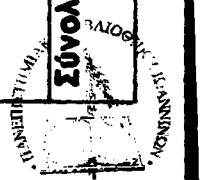


Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων απομόνωσης του *C. perfringens* σε σύγκριση με άλλα απομονωθέντα από βιοψίες φυσιολογικής περιοχής ασθενών με διαταραχές του πεπτικού συστήματος

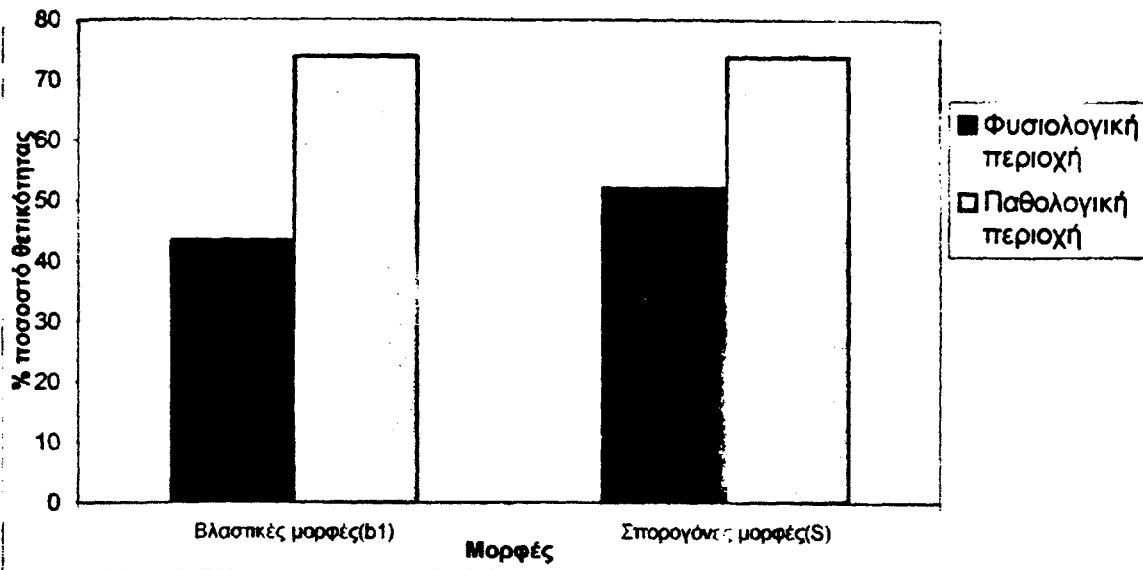
Ασθενής (διάρρωση)	Αριθμός δειγμάτων (βιοψιών)	C. perfringens		Clostridium spp. lec(-)		Bacillus spp		E. coli		Enterobacter aerogenes		Ενδύμεσοι τύποι E. coli		Sireptococcus spp.		Staphylococcus aureus		Staphylococcus spp. coagulase (-)		
		π	%	π	%	π	%	π	%	π	%	π	%	π	%	π	%	π	%	
Καρκίνος παχέος εντέρου	5	5	100	3	60	5	100	5	100	-	-	-	-	4	80	3	60	1	12,5	
Πολύποδας παχέος εντέρου	8	6	75	4	50	4	50	1	12,5	-	-	2	25	3	37,5	-	-	-	-	
Νόσος του Crohn	1	1	100	1	100	1	100	-	-	1	100	-	-	-	-	-	-	1	100	
Προφυπτικά στάδια προκαρκινωματώδης αλλοιώσεως εντέρου	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100
Ελακώδης κολίτιδα	5	5	100	2	40	2	40	4	80	-	-	1	20	2	40	1	20	-	-	
Οικογενής πολυποδίαση	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Λαγκωτό αδένωμα	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100	-	-	-	-	
Αδένωμα (αρχή σχηματισμού)	1	1	100	-	-	-	-	-	-	1	100	-	-	1	100	-	-	-	-	
Σύνολο	23	18	78,26	10	43,47	12	52,17	10	43,47	2	8,69	3	13,04	11	47,82	4	17,39	3	13,04	

Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων απομόνωσης του *C. perfringens* σε σύγκριση με άλλα απομονωθέντα από βιοβίες παθολογικής περιοχής ασθενών με διαταραχές του πεπτικού συστήματος

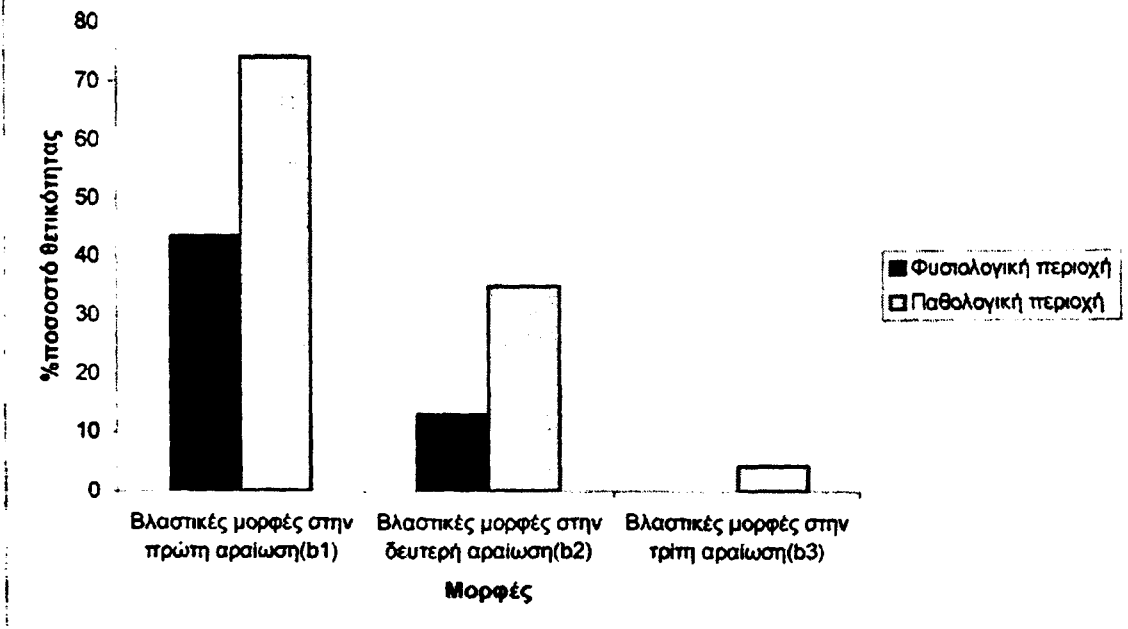
Ασθενής (διάρροια)	Αριθμός δειγμάτων (βιοβίων)	<i>C. perfringens</i>		<i>Clostridium</i> app. loc(-)		<i>Bacillus</i> spp		<i>E. coli</i>		<i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i>		Ενδείκται τύπου <i>E. coli</i>		<i>Streptococcus</i> app.		<i>Streptococcus</i> <i>aureus</i>		<i>Streptococcus</i> app. <i>saegulae</i> (-)	
		π	%	π	%	π	%	π	%	π	%	π	%	π	%	π	%	π	%
Καρπίνος παχός εντέρου	5	5	100	2	40	5	100	5	100	5	100	2	40	.	.
Πολύσπας παχός εντέρου	8	7	87,5	6	75	4	50	4	50	.	.	2	25	7	87,5	1	12,5	1	12,5
Νόσος του Crohn	1	1	100	.	.	1	100	.	.	1	100	1	100	.	.
Προφυλακτικό στάδιο προκαρκινωματώδους αλλοίωσης εντέρου	1	1	100	1	100
Ελαστική κολίτιδα	5	5	100	3	60	1	20	4	80	.	.	1	20	5	100	3	60	.	.
Οικογενής πολυποδίαση	1	1	100	1	100	1	100	.	.	1	100
Λαρυγγικό αδένωμα	1	1	100	1	100
Αδένωμα (αρχή σχηματισμού)	1	1	100	1	100	.	.	1	100
Σύνολο	23	22	95,65	11	47,82	11	47,82	14	60,86	2	8,69	3	13,04	21	91,30	7	30,43	2	8,69
Σύνολο	23	22	95,65	11	47,82	11	47,82	14	60,86	2	8,69	3	13,04	21	91,30	7	30,43	2	8,69



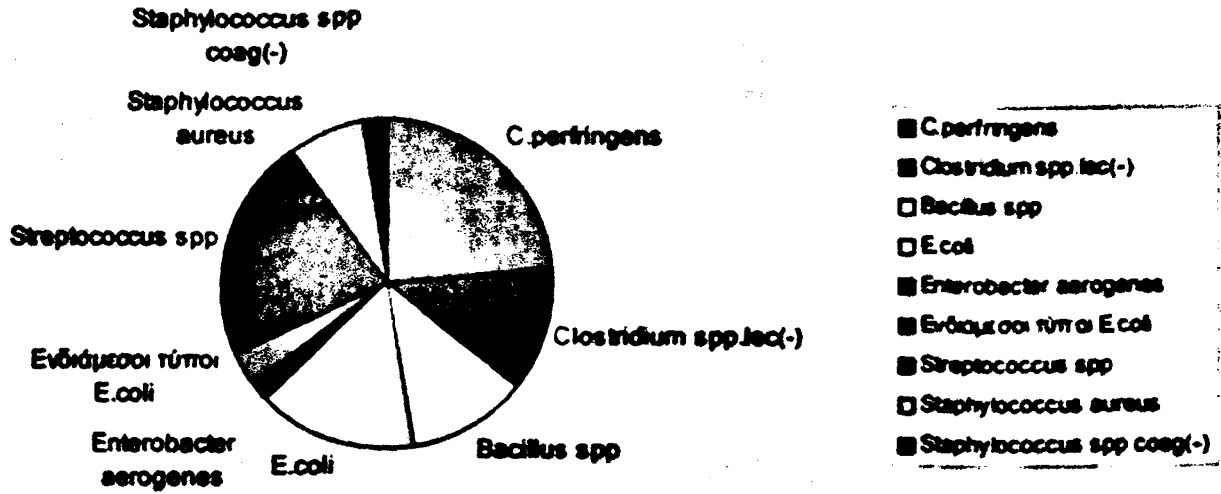
Ποσοστό θετικότητας του βακτηρίου Clostridium perfringens (βλαστικές και σπορογόνες μορφές) σε ασθενείς με διαταραχές του πεπτικού συστήματος



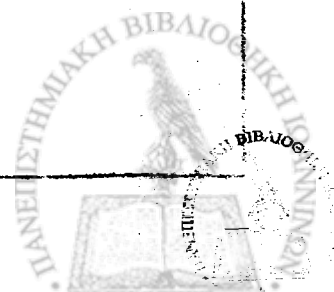
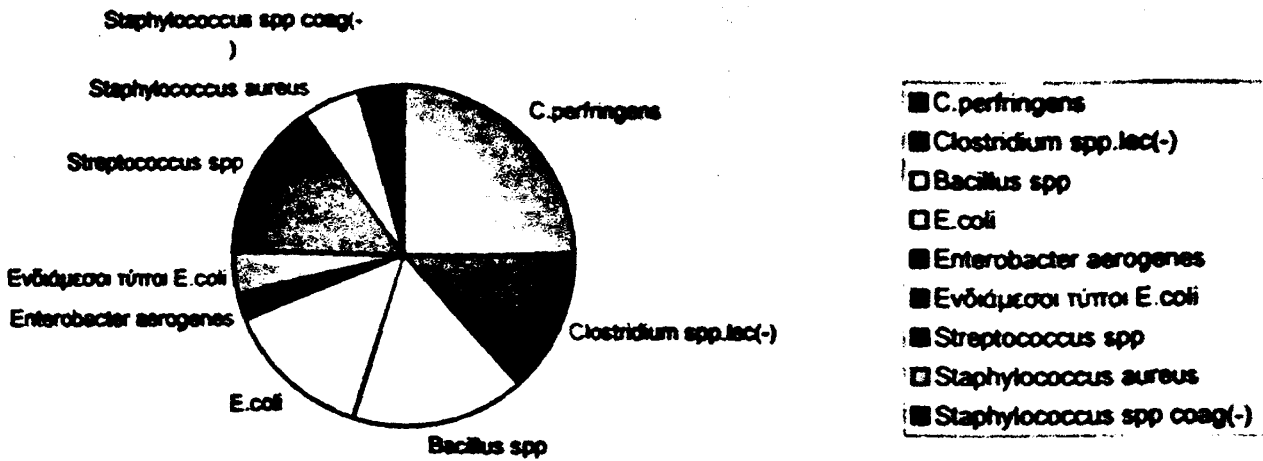
Ποσοστό θετικότητας των βλαστικών μορφών του Clostridium perfringens στις 3 πρώτες αραιώσεις

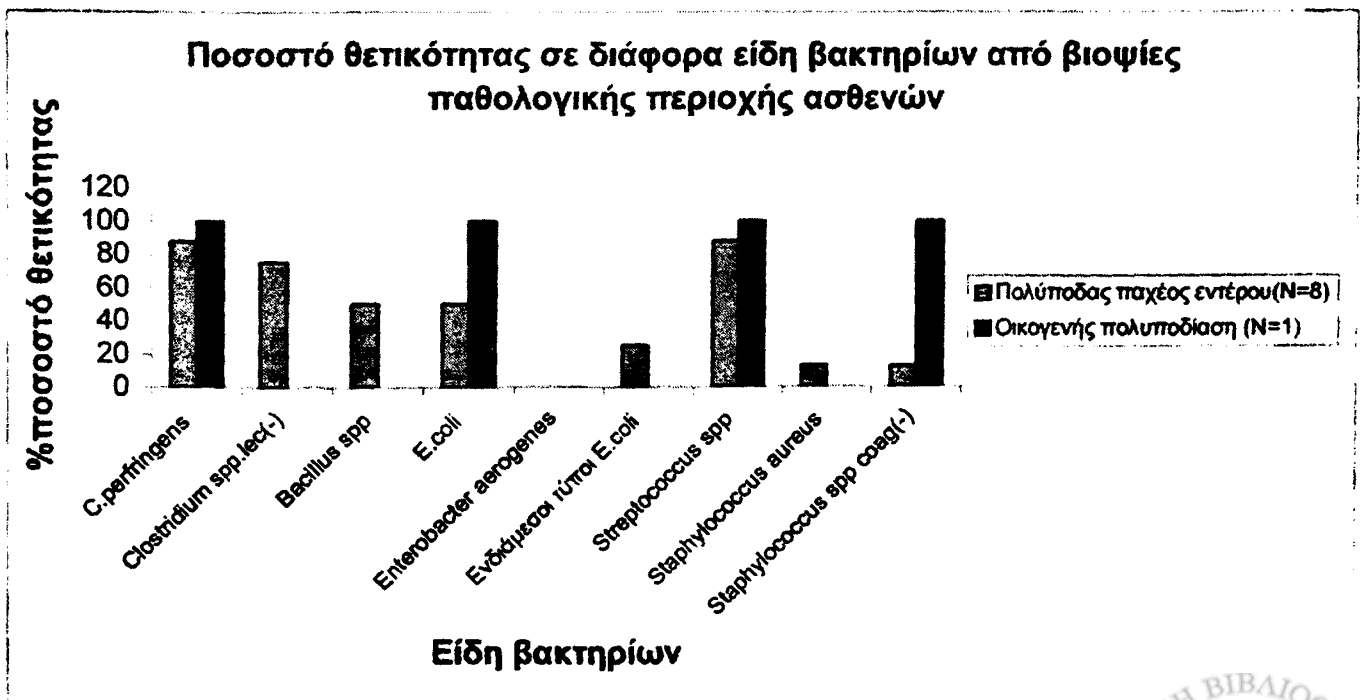
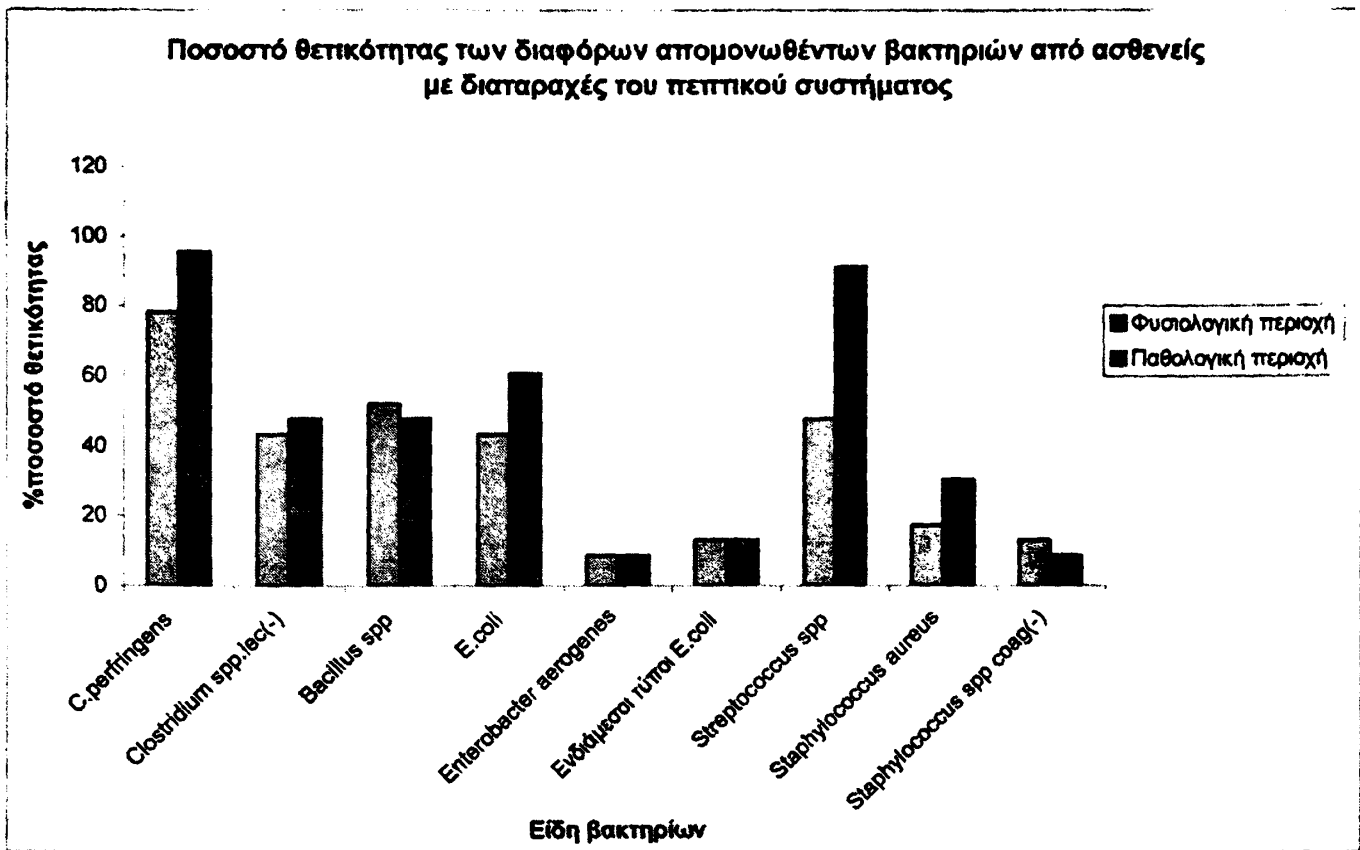


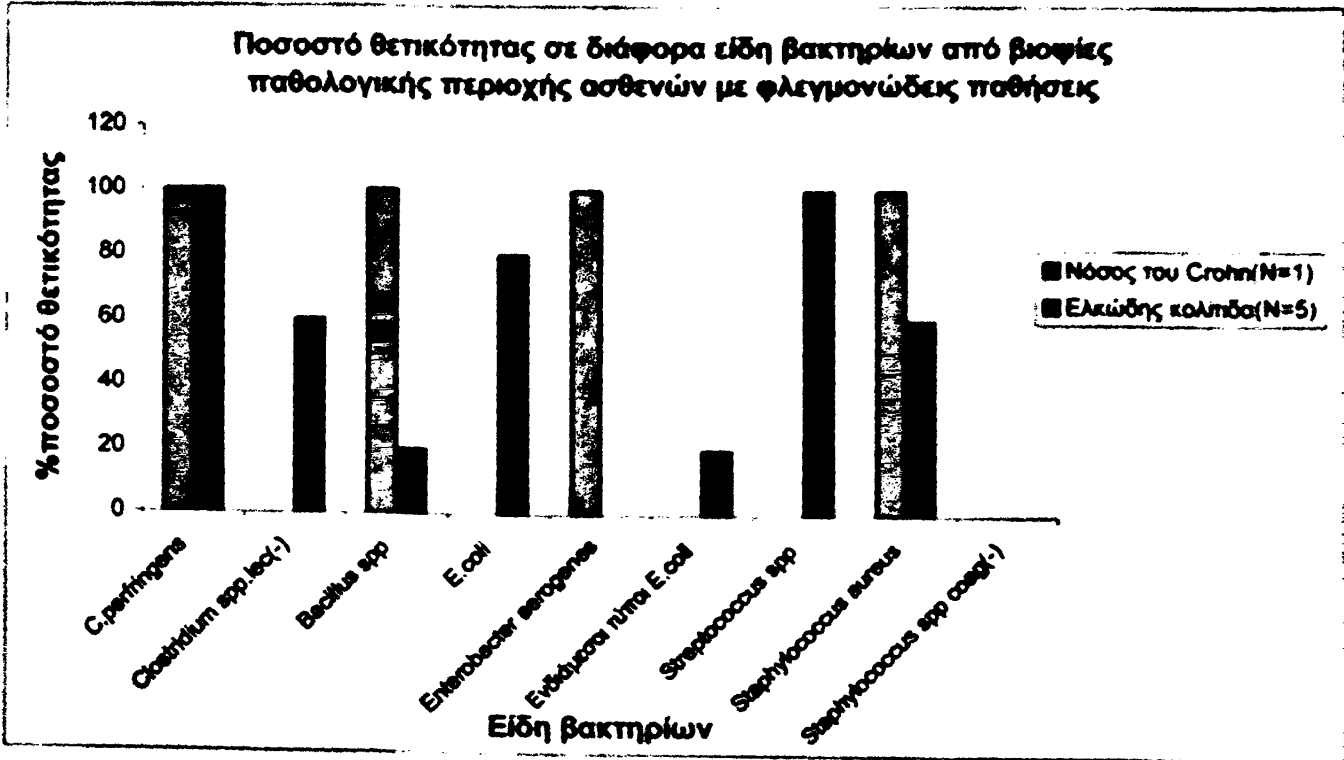
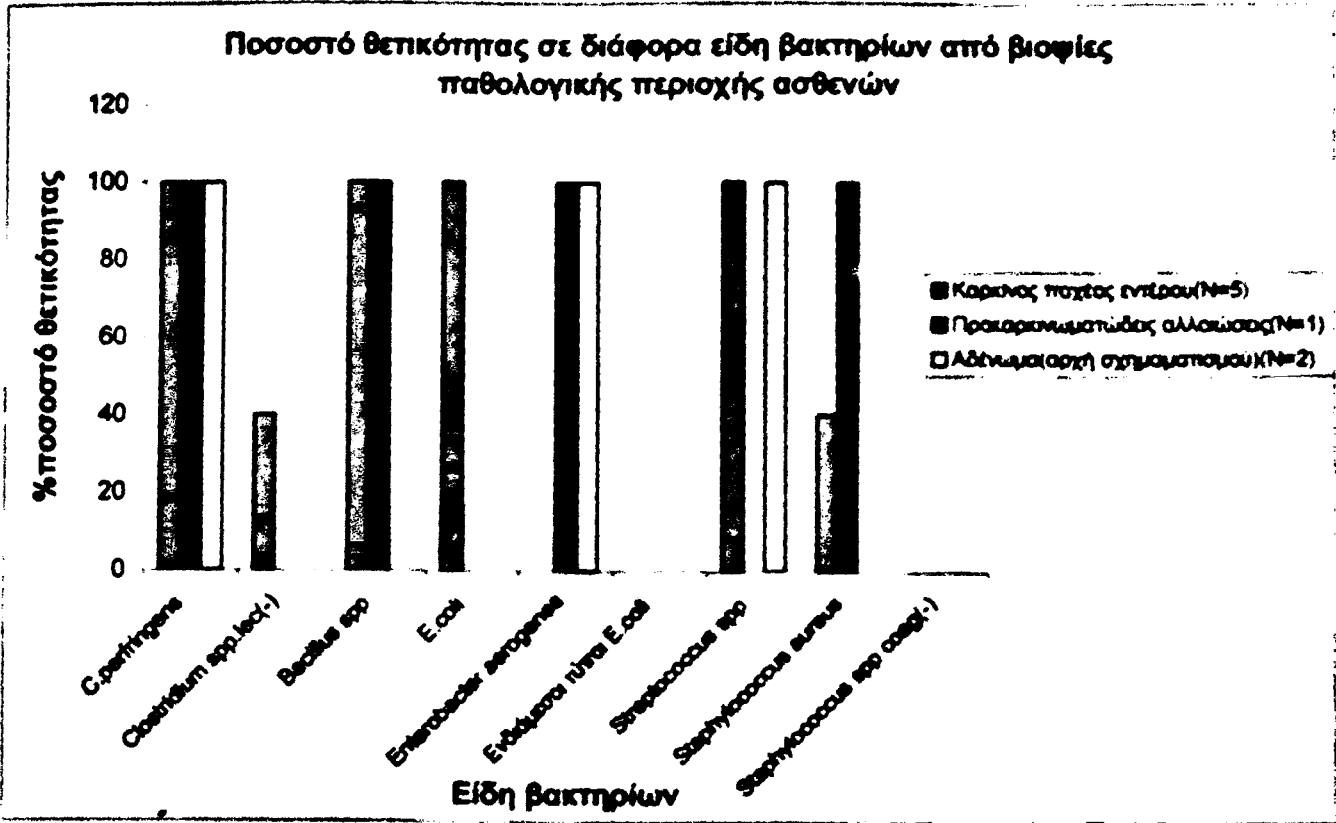
Παθολογική περιοχή



Φυσιολογική περιοχή







IV. Υδάτινο οικοσύστημα έκπλυσης πηνοσφαγείων



Στην τοποθεσία Α, απομονώθηκαν οι μικροοργανισμοί : *C. perfringens* (100%), κοπρανώδους προέλευσης κολοβακτηριοειδή (100%), *Enterococcus* sp. (100%), *Streptococcus* sp. (100%), *E. coli* (40%), *Proteus mirabilis* (25%), *Salmonella* sp. (10%), *Proteus vulgaris* (5%), *Morganella morganii* (5%) και τέλος, ανευρέθη σε μία περίπτωση το *Citrobacter freundii*.

Στην τοποθεσία Β, απομονώθηκαν οι ίδιοι μικροοργανισμοί, αλλά επί το πλείστον σε χαμηλότερα επίπεδα : *C. perfringens* (100%), κοπρανώδους προέλευσης κολοβακτηριοειδή (100%), *Enterococcus* sp. (100%), *Streptococcus* sp. (100%), *E. coli* (25%), *Proteus mirabilis* (25%), *Salmonella* sp. (5%), *Proteus vulgaris* (5%), *Hafnia alvei* (5%). Στην τοποθεσία αυτή απομονώθηκαν οι *Pseudomonas* (5%). Η *Hafnia alvei* ουδέποτε ανευρέθη και ανευρέθη το *Citrobacter freundii* σε μία περίπτωση. Όσον αφορά τον σπορογόνο μικροοργανισμό *C. perfringens*, απομονώθηκε τόσο στη σπορογόνο του μορφή, όσο και στις βλαστικές μορφές του.

Στην τοποθεσία Α, εμφανίζονται λιγότερες βλαστικές μορφές (70%) σε σύγκριση με την Β (75%). Οι σπορογόνες μορφές εμφανίζονται στα ίδια επίπεδα και στις δύο τοποθεσίες (95%). Ο μικροοργανισμός παραμένει σε υψηλότερα επίπεδα στην πρώτη αραιώση ($\cong 10^8$) και είναι εμφανής έως την τρίτη αραιώση ($\cong 10^3$).

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στους παρακάτω πίνακες και διαγράμματα.



ΠΙΝΑΚΑΣ 23

Αποτελέσματα απομόνωσης μικροβίων
από δείγματα νερού δεξαμενής πτηνοσφαγείου

A/A	Δείγματα (πρόλευση)	<i>C. perfringens</i>	Κοκτρινοειδής Προέλευσης Κολοβακτηριοειδή	<i>Enterococci</i> spp.	<i>Streptococci</i> spp.	<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> <i>mirabilis</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Proteus</i> <i>vulgaris</i>	<i>Morganella</i> <i>morganii</i>	<i>Morhelia</i> <i>alvei</i>	<i>Citrobacter</i> <i>Freund II</i>
1	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
2	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
4	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
6	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
7	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
8	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 24

Αποτελέσματα απομόνωσης μικροβίων
από δείγματα νερού δεξαμενής κτηνοοφαγείου

A/A	Δείγματα (πρόβλεψη)	<i>C. perfringens</i>	Κορεσμένος Πρόβλεσης Κολοβακτηριοειδή	<i>Enterococci</i> spp.	<i>Streptococci</i> spp.	<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> <i>mallei</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Proteus</i> <i>vulgaris</i>	<i>Morganella</i> <i>morganii</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Chromococcus</i> <i>Proved II</i>
11	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
13	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
14	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
15	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
16	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
17	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
20	Τοποθεσία Α	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 25

Αποτελέσματα απομόνωσης μικροβίων
από δείγματα νερού δεξαμενής πτηνοσφαγείου

A/A	Δείγματα (πρόελευση)	<i>C.perfringens</i>	Κοπρανώδους Πρόελευσης Κολοβακτηριοειδή	<i>Enterococci</i> <i>spp.</i>	<i>Streptococci</i> <i>spp.</i>	<i>E.coli</i>	<i>Proteus</i> <i>militaris</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Proteus</i> <i>vulgaris</i>	<i>Morganella</i> <i>morganii</i>	<i>Magnia</i> <i>abtei</i>	<i>Citrobacter</i> <i>Freund II</i>
1	Τοποθεσία Β	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Τοποθεσία Β	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3	Τοποθεσία Β	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
4	Τοποθεσία Β	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
5	Τοποθεσία Β	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Τοποθεσία Β	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Τοποθεσία Β	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Τοποθεσία Β	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
9	Τοποθεσία Β	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
10	Τοποθεσία Β	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 26

Αποτελέσματα απομόνωσης μικροβίων
από δείγματα νερού δεξαμενής κτηνοοφαγείου

A/A	Δείγματα (πρόβλεψη)	<i>C. perfringens</i>	Κορρανόβος Πρόβλεπτης Κολοβακτηριασίδα	<i>Enterococci</i> app.	<i>Streptococci</i> I app.	<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> <i>malleus</i>	<i>Salmoneella</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Proteus</i> <i>vulgaris</i>	<i>Morganella</i> <i>morganii</i>	<i>M. lysis</i> abv.	<i>Citrobacter</i> <i> freundii</i>
11	Τοκοθεσία Β	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	Τοκοθεσία Β	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
13	Τοκοθεσία Β	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
14	Τοκοθεσία Β	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
15	Τοκοθεσία Β	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
16	Τοκοθεσία Β	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
17	Τοκοθεσία Β	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Τοκοθεσία Β	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Τοκοθεσία Β	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Τοκοθεσία Β	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

ΠΙΝΑΚΑΣ 27

Αποτελέσματα απομόνωσης *C. perfringens*
από δείγματα νερού δεξαμενής πτηνοσφαγείου

Α/Α	Δείγμα	L . S ζωμός			
		Βλαστικές μορφές			Σπόροι
		αραίωση -1	αραίωση -2	αραίωση -3	
1	Τοποθεσία Α	+	-	-	+
2	Τοποθεσία Α	+	-	-	+
3	Τοποθεσία Α	+	-	-	+
4	Τοποθεσία Α	+	-	-	+
5	Τοποθεσία Α	+	-	-	+
6	Τοποθεσία Α	-	-	-	+
7	Τοποθεσία Α	+	-	-	+
8	Τοποθεσία Α	+	+	-	+
9	Τοποθεσία Α	-	-	-	+
10	Τοποθεσία Α	+	-	-	-
11	Τοποθεσία Α	-	-	-	+
12	Τοποθεσία Α	+	+	+	+
13	Τοποθεσία Α	+	+	+	+
14	Τοποθεσία Α	-	-	-	+
15	Τοποθεσία Α	-	-	-	+
16	Τοποθεσία Α	+	+	-	+
17	Τοποθεσία Α	+	-	-	+
18	Τοποθεσία Α	-	-	-	+
19	Τοποθεσία Α	+	+	-	+
20	Τοποθεσία Α	+	+	-	+



ΠΙΝΑΚΑΣ 28

Αποτελέσματα απομόνωσης *C. parfringens*
από δείγματα νερού δεξαμενής κτηνοοφαγείου

Α/Α	Δείγμα	L. S ζυμός			
		Βλαστικές μορφές			Σπόροι
		αραίωση -1	αραίωση -2	αραίωση -3	
1	Τοποθεσία Β	+	-	-	+
2	Τοποθεσία Β		-	-	+
3	Τοποθεσία Β	+	-	-	+
4	Τοποθεσία Β	+	-	-	+
5	Τοποθεσία Β	+	-	-	+
6	Τοποθεσία Β	-	-	-	+
7	Τοποθεσία Β	+	-	-	+
8	Τοποθεσία Β	+	+	+	+
9	Τοποθεσία Β	-	-	-	+
10	Τοποθεσία Β	+	+	-	-
11	Τοποθεσία Β	+	-	-	+
12	Τοποθεσία Β	+	+	+	+
13	Τοποθεσία Β	+	+	+	+
14	Τοποθεσία Β	-	-	-	+
15	Τοποθεσία Β	-	-	-	+
16	Τοποθεσία Β	+	-	-	+
17	Τοποθεσία Β	+	+	-	+
18	Τοποθεσία Β	+	+	-	+
19	Τοποθεσία Β	+	+	-	+
20	Τοποθεσία Β	+	+	-	+



ΠΙΝΑΚΑΣ 29

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα απομόνωσης μικροβίων από δείγματα νερού δεξαμενής πτηνοσφαγείου

Δείγματα (προέλευση)	Αριθμός δειγμάτων	<i>C. perfringens</i>	Κοπρανώδους Προέλευσης Κολλοβακτηριοειδή	<i>Enterococci</i> spp.	<i>Streptococci</i> spp.	<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> <i>mirabilis</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Proteus</i> <i>vulgaris</i>	<i>Morganella</i> <i>morganii</i>	<i>Magnia</i> <i>aivel</i>	<i>Citrobacter</i> <i>Frend II</i>
		θετικά	θετικά	θετικά	θετικά	θετικά	θετικά	θετικά	θετικά	θετικά	θετικά	θετικά	θετικά
		n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Τοποθεσία Α	20	20	20	20	20	8	5	2	-	1	1	-	1
		100	100	100	100	40	25	10	-	5	5	-	5
Τοποθεσία Β	20	20	20	20	20	5	5	1	1	1	-	1	1
		100	100	100	100	25	25	5	5	5	-	5	5
Σύνολο	40	20	20	20	20	13	10	3	1	2	1	1	2
		100	100	100	100	32.5	25	7.5	2.5	5	2.5	2.5	5

ΠΙΝΑΚΑΣ 30

Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων απομόνωσης βλαστικών μορφών και σπόρων
C. perfingens από δείγματα νερού πτηνοσφαγείου

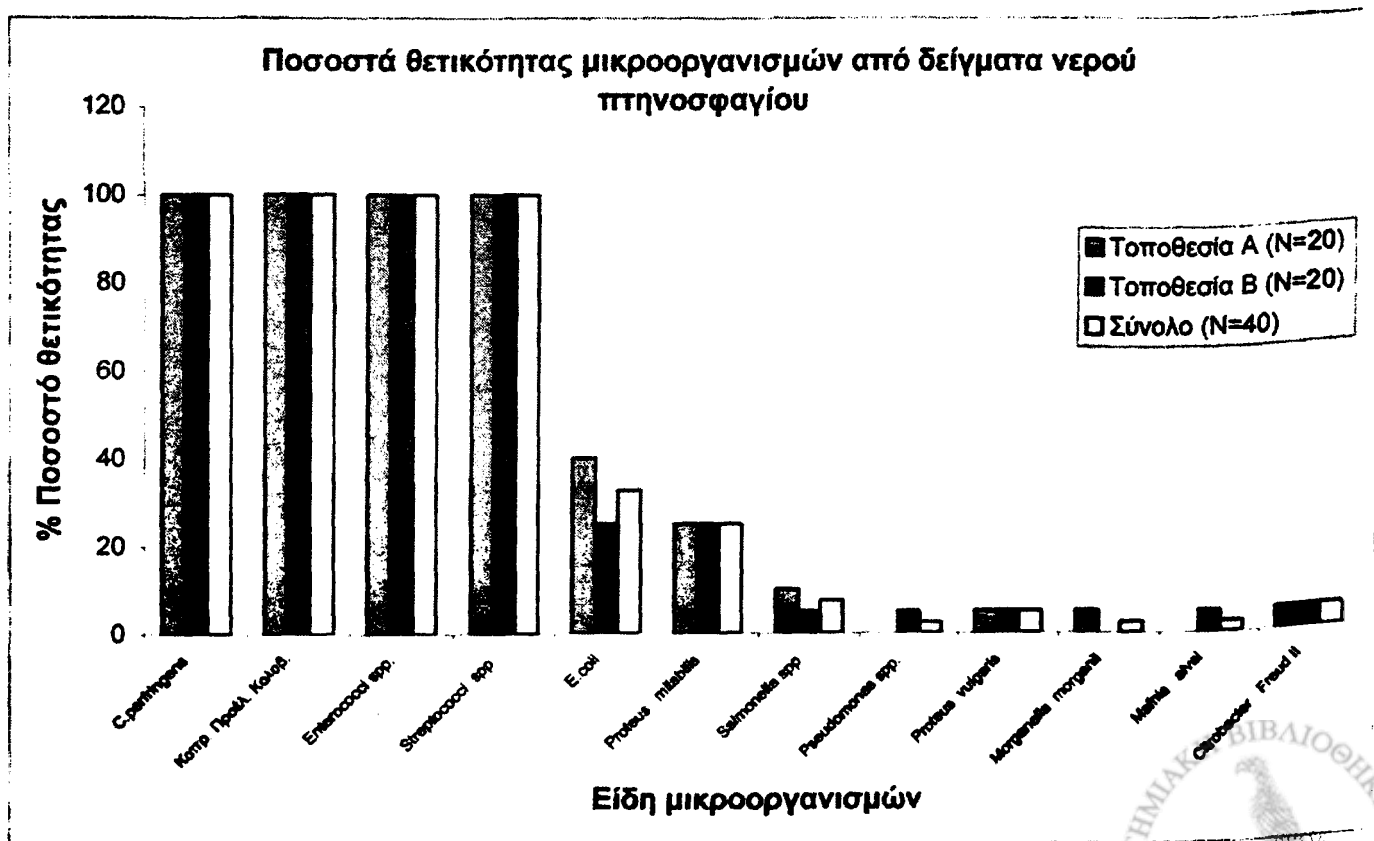
Είδος δειγμάτων (τοποθεσία)	Αριθμός δειγμάτων	<i>C. perfingens</i>			
		Θετικά		Σπόροι	
		■	%	■	%
Τοποθεσία Α	20	14	70	19	95
Τοποθεσία Β	20	15	75	19	95
Σύνολο	40	29	72,5	38	95



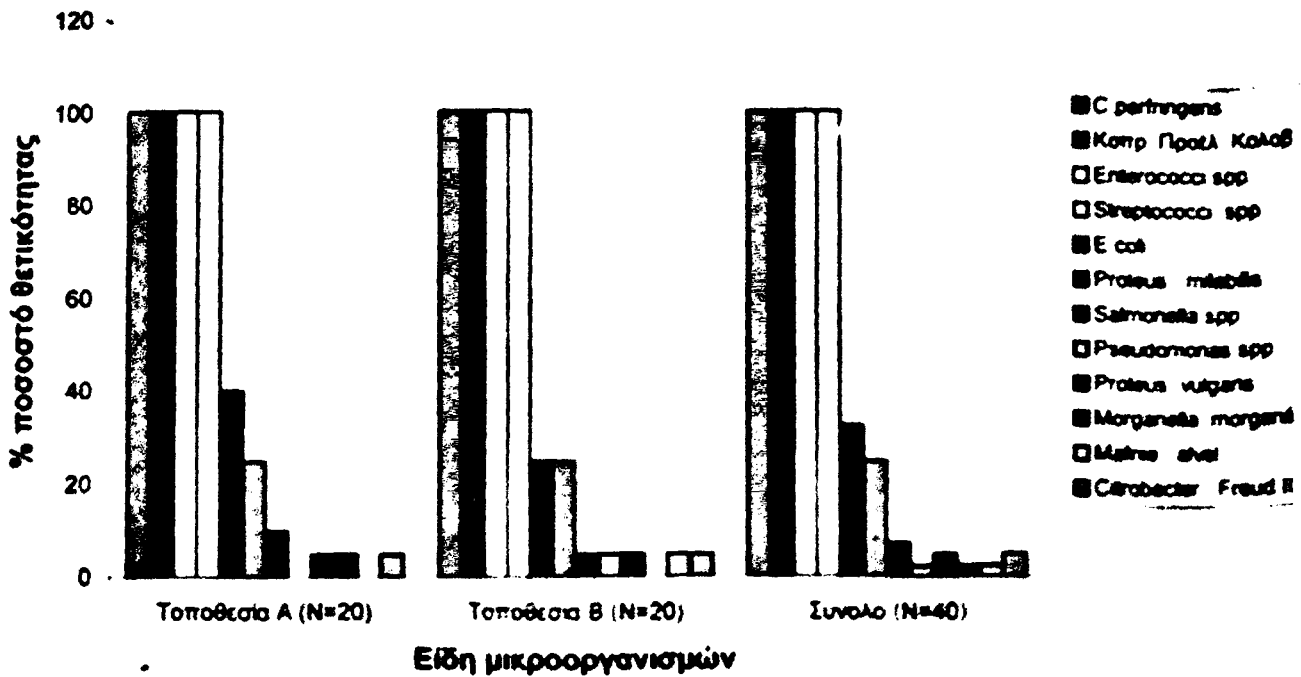
ΠΙΝΑΚΑΣ 31

Αναλυτικός πίνακας αποτελεσμάτων απομόνωσης βλαστικών μορφών του *C. perfringens* από δείγματα νερού πτηνοσφαγείου

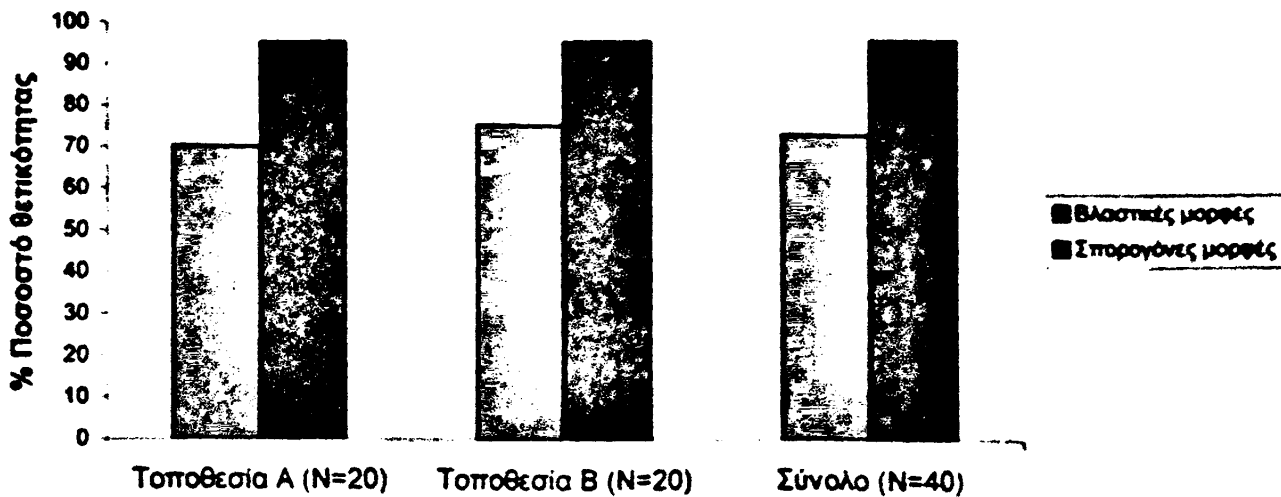
Είδος δειγμάτων (τοποθεσία)	Αριθμός δειγμάτων	αραίωση -1		αραίωση -2		αραίωση -3	
		θετικά n	%	θετικά n	%	θετικά n	%
Τοποθεσία Α	20	14	70	6	30	2	10
Τοποθεσία Β	20	15	75	8	40	3	15
Σύνολο	40	29	72,5	14	35	5	12,5

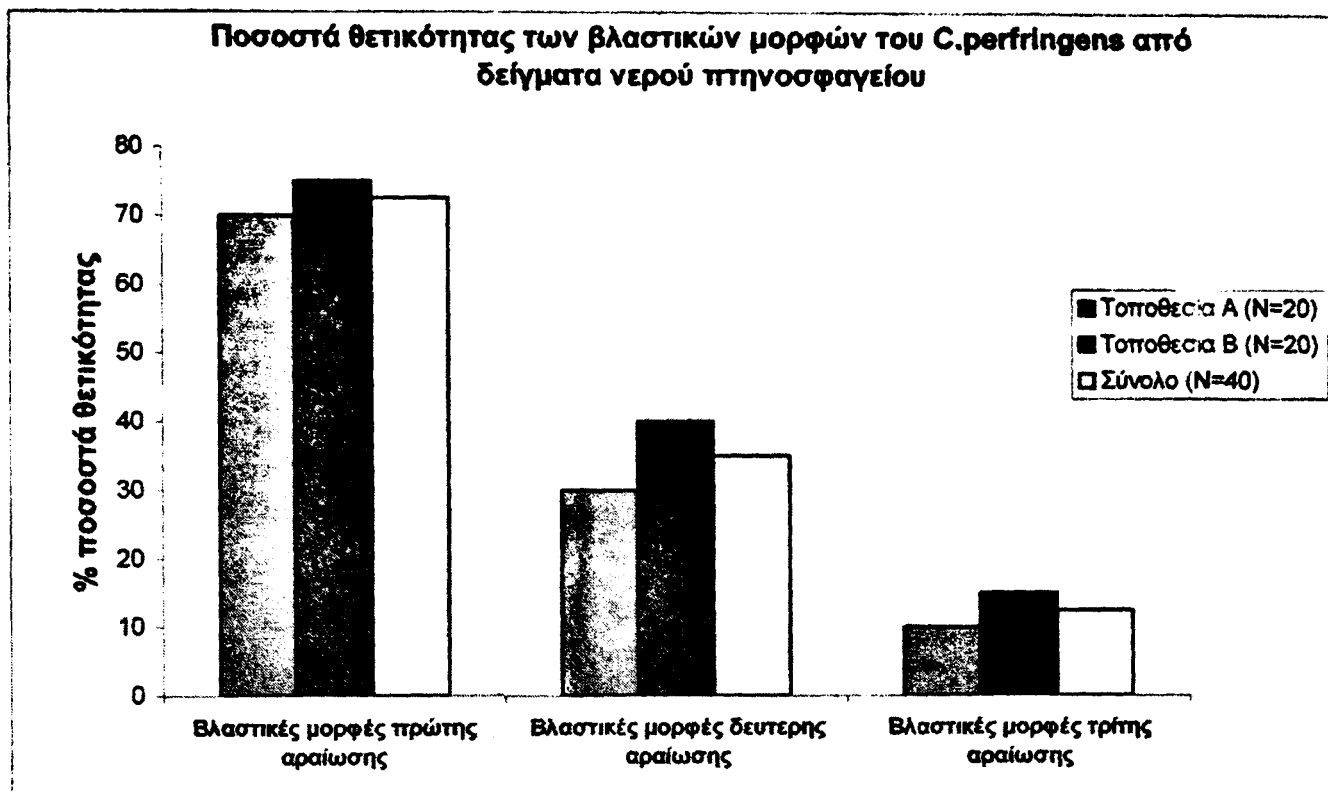


Ποσοστά θετικότητας μικροοργανισμών από δείγματα νερού πτηνοσφαγείου



Ποσοστά θετικότητας βλαστικών και σπορογόνων μορφών του C. perfringens από δείγματα νερού πτηνοσφαγείου



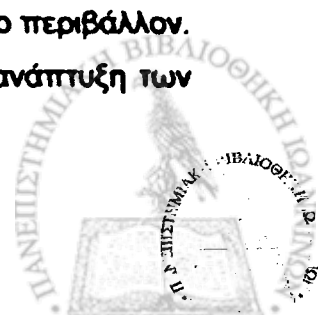


ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η *enpZ* είναι μία πρωτεΐνη που βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη της *E. coli*. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν γύρω στα 10 αντίγραφα της πρωτεΐνης πάνω στη μεμβράνη και περίπου γύρω στα 1.000 αντίγραφα της *ompR* στο κυτταρόπλασμα (S Lauch J.M. et al., 1987).

Όπως προαναφέραμε και στα αποτελέσματα, τα διάφορα αλληλόμορφα της *enpZ* επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο την έκφραση των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των πρωτεϊνών, που είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη του σιδήρου. Αυτό δεικνύεται από την διαφορετική δραστικότητα της αλκαλικής φωσφατάσης και την επίδραση των αλληλόμορφων της *enpZ* στην ανάπτυξη των στελεχών, παρουσία περιβάλλοντος με μικρή συγκέντρωση σιδήρου (διπυριδύλιο). Άρα λοιπόν, το σύστημα *enpZ* / *ompR* που είναι υπεύθυνο για την έκφραση των πουρινών *ompF*, *ompC* (οσομμοριακότητα) (Weihong Hsing & Silhavy T.J., 1997) εμπλέκεται και στην έκφραση των πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη του σιδήρου. Πράγματι, τα αποτελέσματα δεικνύουν αυτό, αλλά υπάρχει μία ασυμφωνία που εμφανίζει το SG477 *pLTX4550*. Το στέλεχος αυτό φέρει την μετάλλαξη *am22*, δηλαδή μετά το 22^ο κωδικόνιο υπάρχει κωδικόνιο λήξης. Άρα δημιουργείται μία *enpZ* πρωτεΐνη 22 αμινοξέων. Η ιδιότητα της *enpZ* να φωσφοριλκύνεται και να αποσφωριλκύνεται, βρίσκεται στο 243 αμινοξύ, που είναι ιστιδίνη (Weihong Hsing & Thomas J. Silhavy, 1997). Τι συμβαίνει λοιπόν ; Γιατί το στέλεχος αυτό δεν εμφανίζει δραστηριοποίηση αλκαλικής φωσφατάσης, αλλά αναπτύσσεται σε περιβάλλον με μικρή συγκέντρωση σιδήρου ;

Πραγματοποιώντας ηλεκτροφόρηση, υπάρχει η ζώνωση των πρωτεϊνών του σιδήρου. Η εξήγηση που διαφαίνεται είναι ότι με κάποιο τρόπο το μικρό αυτό πεπτιδίο των 22 αμινοξέων επεμβαίνει είτε στο μπλοκάρισμα της μεταγραφής - μετάφρασης της πρωτεΐνης *ferB* - *rhoA* από το πλασμίδιο, είτε στη γρήγορη διάσπαση της πρωτεΐνης, πριν φθάσει στον περιπλασματικό χώρο ή μέσα σε αυτόν. Όπως προαναφέραμε, άμεση σχέση μεταξύ έκφρασης της *ferB* και του ακετυλο-φωσφορικού δεν συμπεραίνεται, γιατί όλα τα στελέχη εμφανίζουν δραστικότητα αλκαλικής φωσφατάσης, τόσο τα *wild strain* όσο και τα μεταλλαγμένα στελέχη. Στις καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών υπάρχει η εξής σημαντική παρατήρηση : Ο χρόνος διπλασιασμού των μεταλλαγμένων είναι πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με το *wild strain*. Ακόμη, το διπλά μεταλλαγμένο στέλεχος RH260 *pLTX4550* (*ack*, *pta*) έχει τον μεγαλύτερο χρόνο διπλασιασμού και σε $OD_{600} = 0.45$ η καμπύλη ανάπτυξής του αρχίζει να καμπυλώνεται. Όλα αυτά συμβαίνουν σε συνθήκες μικρής συγκέντρωσης Fe στο περιβάλλον. Όταν δεν υπάρχει έλλειψη σιδήρου, δεν εμφανίζεται κανένα πρόβλημα στην ανάπτυξη των στελεχών.



Εν ολίγοις, τα μεταλλαγμένα στελέχη εμφανίζουν πρόβλημα σε συνθήκες έλλειψης σιδήρου και εκφράζουν τις πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για την πρόσληψή του, όπως φαίνεται από τη δραστηριοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης.

Τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύσσονται σε συνθήκες αερισμού με κίνηση στους 37° C, επομένως τα μεταλλαγμένα κύτταρα δεν μπορούν να τη διοχετεύσουν την περίσσεια των ατόμων άνθρακα από το *pta/ack* μονοπάτι.

Τα επίπεδα του ακετυλο-φωσφορικού οξέος, καθώς προχωρεί η ανάπτυξη, συνέχεια ελαττώνονται, δηλαδή έχουμε μείωση μιας πηγής φωσφορικών. Το σύστημα μεταγωγής πληροφορίας *envZ/ompR*, για να λειτουργήσει σωστά, χρειάζεται φωσφορικά. Μέσω αυτού του μονοπατιού, θα πρέπει να εμπλέκεται το ακετυλο-φωσφορικό οξύ, με την έκφραση των πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη σιδήρου. Άλλοι ερευνητές είχαν επίσης παρόμοια αποτελέσματα με τα ανωτέρω, αλλά στο σύστημα έκφρασης των πρωτεϊνών των μαστιγίων (Pruil B.M., 1994) (Wolfe A.J., 1994), χρησιμοποιώντας τα ίδια στελέχη.

Το συμπέρασμα και των δύο μελετών, είναι ότι το ακετυλο-φωσφορικό οξύ λειτουργεί ως συνδετήριος κρίκος μεταξύ των αισθητηρίων συστημάτων του βακτηρίου και του κεντρικού μεταβολισμού και είναι μία από τις πηγές που δανείζουν φωσφορικά στο αισθητήριο σύστημα (σύστημα μεταγωγής πληροφορίας) σε πτωχό περιβάλλον.

Ως ήδη προαναφέραμε, τα σιδηροφόρα παράγονται σε περιβάλλον ολιγοτροφικό και για τούτο, θελήσαμε να μελετήσουμε την συμπεριφορά των βακτηρίων και ειδικότερα του *C. perfringens* σε διαφορετικής ποιότητας οικοτόπους και διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα.

Το *C. perfringens* είναι ένας αναερόβιος μικροοργανισμός με ευρύτατη κατανομή στο φυσικό περιβάλλον, θεωρείται ως το περισσότερο διαδεδομένο αναερόβιο βακτήριο στη φύση (Smith, 1984). Ανιχνεύεται στο έδαφος, στις λίμνες, στις θάλασσες, στα τρόφιμα, στη σκόνη, στον εντερικό σωλήνα ανθρώπου και ζώων, στο δέρμα τους, στους υπονόμους και στα ρούχα των ανθρώπων. Ο σημαντικότερος λόγος της μεγάλης διασποράς του σε πολλούς διαφορετικούς οικοτόπους οφείλεται, κατά μεγάλο μερίδιο, στη δυνατότητα δημιουργίας ανθεκτικών σπορογόνων μορφών (Λεγάκης Ν. συν., 1981), (Akama & Otani, 1970), (Smith & Hoideman, 1968).

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια απομόνωσης και ταυτοποίησης του *C. perfringens* από τρία συγκεκριμένα οικοσυστήματα :

1. Από ύδατα αλτικής προέλευσης (λίμνες Δρακόλιμνη, Τσουμάνη).
2. Από βιοψίες του πεπτικού σωλήνα ανθρώπων που υποφέρουν από γαστρεντερολογικές παθήσεις (καρκίνος παχέος εντέρου, πολύποδες, ελκώδη κολίτιδα, ασθένεια Crohn, οικογενή πολυποδίαση)
3. Από ύδατα πτηνοσφαγείου, μετά την εμβάπτιση και αποπτίλωση του πτηνού,



σε σχέση πάντα με την απομόνωση και ταυτοποίηση και άλλων μικροοργανισμών (ειδών, γενών) που απαρτίζουν την μικροβιακή κοινότητα του καθενός οικοσυστήματος από τα ανωτέρω.

Στη δυνατότητα απομόνωσης και ταυτοποίησης των μικροοργανισμών ελήφθησαν υπόψη και τα ιδιαίτερα αβιοτικά χαρακτηριστικά του κάθε οικοσυστήματος.

Η ανίχνευση και ταυτοποίηση του *C. perfringens* από τα διαφορετικά περιβάλλοντα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον εκλεκτικό θρεπτικό ζωμό L.S. (Lactose-Sulfite). Ο θρεπτικός ζωμός L.S. μας παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης πολύ μικρών αριθμών κυττάρων του *C. perfringens* στο δείγμα μας, όπως αυτό αποδεικνύεται από ερευνητικές εργασίες (Bezirtzoglou και Romond, 1990), (Bezirtzoglou E. et al., 1995, 1996, 1997), (Τσιότσιας Α., 2002), (Βοϊδάρου Χ., 2002).

Στα πλεονεκτήματα του L.S. συγκαταλέγονται επίσης : α) η επιλεκτική ανάπτυξη του *C. perfringens* σε σχέση με άλλα είδη του γένους *Clostridium* ή άλλων βακτηριακών ειδών, β) η γρήγορη ταυτοποίηση των βλαστικών μορφών, μέσα σε 24 ώρες και γ) η ταυτοποίηση των σπορογόνων μορφών σε 3 ημέρες, αφού βέβαια προηγηθεί ενεργοποίηση αυτών με θέρμανση (Romond et al., 1981), (Bezirtzoglou E., 1994, 1995, 1996, 1997), (Τσιότσιας Α., 2002), (Βοϊδάρου Χ., 2002). Περαιτέρω διαδικασία ταυτοποίησης του μικροοργανισμού δεν απαιτείται.

Η σημαντικότητα της ανίχνευσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου *C. perfringens* από τα υδάτινα οικοσυστήματα εστιάσθηκε κυρίως στον χαρακτηρισμό του ως δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης (ΑΡΗΑ, 1985, Sorensen et al., 1989). Τα διάφορα υδάτινα οικοσυστήματα μολύνονται από διάφορες πηγές, κυριότερες των οποίων είναι τα αστικά λύματα, τα βιομηχανικά απόβλητα, η απόρριψη απορριμάτων και τα ζωικά περιττώματα. Η ανθρώπινη υγεία είναι άμεσα εξαρτώμενη από την καθαρότητα των πόσιμων υδάτων αλλά και των υδάτων αναψυχής. Για το λόγο αυτό, ανά πάσα στιγμή θα πρέπει να έχουμε γνώση του μικροβιακού φορτίου ενός υδάτινου οικοσυστήματος.

Η μελέτη της βακτηριακής κατανομής βασίζεται κυρίως στις συμβατικές μεθόδους και τεχνικές, των οποίων προϋπόθεση για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών είναι η δυνατότητα απομόνωσής τους από την περιοχή δειγματοληψίας και η επιδεκτικότητα αυτών να καλλιεργηθούν σε θρεπτικά υλικά. Βεβαίως ακολούθως, για πολλούς μικροοργανισμούς χρειάζονται εξειδικευμένες τεχνικές ταυτοποίησης και μεγάλη εμπειρία από τον ερευνητή. Η πλειονότης των μικροοργανισμών εμφανίζουν μία έμφυτη αδυναμία να καλλιεργηθούν έξω από τον φυσικό τους χώρο (Giovannoni et al., 1990), (Ward et al., 1990). Πολλά βακτήρια στα υδάτινα οικοσυστήματα δεν μπορούν να ανιχνευθούν λόγω των χαμηλών επιπέδων συγκέντρωσης των κυττάρων αυτών (CFU < 1%). Η απομόνωση και ταυτοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών από τα υδάτινα οικοσυστήματα είναι δύσκολη γιατί χαρακτηρίζονται από τα ανωτέρω περιγραφέντα μειονεκτήματα. Η πιθανή μόλυνση ενός

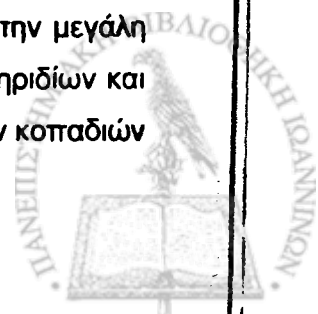
υδάτινου οικοσυστήματος δεικνύεται από μικροοργανισμούς δείκτες, η ύπαρξη των οποίων πάνω από ένα επίπεδο δεικνύει το επίπεδο μόλυνσης του συγκεκριμένου οικοσυστήματος και την πιθανή ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί δείκτες χαρακτηρίζονται από τη δυνατότητα καλλιέργειας τους σε θρεπτικά υλικά και την γρήγορη ταυτοποίηση αυτών με απλές και φθηνές τεχνικές. Οι παραδοσιακά αποδεκτοί μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται ως δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης είναι ο ολικός αριθμός των κολοβακτηριδίων, τα κοπρανώδη κολοβακτηρίδια, οι κοπρανώδεις *Streptococci* και το *C.perfringens* (ΑΡΗΑ, 1985).

Οι διάφορες ερευνητικές ομάδες προτείνουν για κάθε συγκεκριμένο περιβάλλον έναν ή περισσότερους από τους ανωτέρω ως τον καταλληλότερο ή καταλληλότερους δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης. Μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί ο ιδανικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης για όλα τα περιβάλλοντα (Prescott et al., 1999). Ο Edberg S.C. και οι συνεργάτες του (2000) προτείνουν ως καλύτερο δείκτη για την εύρεση κοπρανώδους μόλυνσης στο πόσιμο νερό την *E. coli*.

Το *C. perfringens* θεωρείται πετυχημένος δείκτης για την ανίχνευση λυμάτων σε ποτάμια, λίμνες ή εν γένει οικοσυστημάτων ευρισκομένων υπό την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων (Bezirtzoglou E. et al., 1997), (Hirn et al., 1980).

Ο συνδυασμός διαφόρων δεικτών πιθανά να προσφέρει μία πληρέστερη εικόνα για την ποιότητα του νερού (Seyfried P.L. et al., 1985) ή ανάλογα με τις ιδιαιτερότητες που εμφανίζονται σε κάθε περιβάλλον, να υπάρχει ο καταλληλότερος δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήσαμε τα υδάτινα οικοσυστήματα των λιμνών Δρακόλιμνη και Τσουμάνη, που βρίσκονται σε υψόμετρο 2.100 περίπου μέτρων, στο όρος Τύμφη, στην οροσειρά της Πίνδου. Οι κλιματικές συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον αυτό είναι ακραίες. Η πρόσβαση από ανθρώπους και παραγωγικά ζώα είναι δυνατή μετά το μέσον του μηνός Μαΐου και μόνον μέχρι τις αρχές του Οκτωβρίου. Είναι λοιπόν αναμενόμενη η μη εύρεση υψηλών ποσοστών παθογόνων μικροοργανισμών στο περιβάλλον αυτό, διότι με δυσκολία επιβιώνουν στις ακραίες συνθήκες αυτού του οικοσυστήματος. Τα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν χαμηλούς αριθμούς των ολικών κολοβακτηριδίων, των κοπρανωδών κολοβακτηριδίων καθώς και των στρεπτοκόκκων. Τα βακτήρια δείκτες της κοπρανώδους μόλυνσης φθάνουν στο νερό των λιμνών κυρίως από τα περιττώματα των παραγωγικών ζώων (βοοειδή, πρόβατα, αίγες) καθώς η περιβάλλουσα περιοχή, κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, χρησιμοποιείται ως βοσκότοπος. Μία άλλη πηγή κοπρανωδών βακτηρίων είναι οι επισκέψεις των ανθρώπων, κυρίως την περίοδο μεταξύ Μαΐου και Οκτωβρίου. Στην μεγάλη λίμνη Τσουμάνη παρατηρούμε μεγαλύτερους αριθμούς ολικού αριθμού κολοβακτηριδίων και κοπρανωδών κολοβακτηριδίων και αυτό οφείλεται στην ευκολότερη πρόσβαση των κοπαδιών ζώων στη λίμνη αυτή.



Το *C. perfringens* ανιχνεύεται σε σχετικά χαμηλούς αριθμούς, μόνο με τη σπορογόνο μορφή του. Η ύπαρξη της σπορογόνου μορφής του σχετίζεται με την αποβολή κοπράνων από τον άνθρωπο και τα ζώα και όχι με άλλες μη σημειακές πηγές μόλυνσης, όπως απορροή μολυσμένου ύδατος, βιομηχανικών αποβλήτων. Τέτοιου είδους δραστηριότητες δεν συναντώνται σε τόσο μεγάλο υψόμετρο. Οι σπόροι του *C. perfringens* έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτης σημειακής πηγής μόλυνσης σε μικρά ποτάμια των οπίων η βακτηριολογική ποιότητα του νερού επηρεαζόταν από περισσότερες σημειακές πηγές (Sorensen et al., 1989).

Η βλαστική μορφή του *C. perfringens* είναι δύσκολο να αναπτυχθεί και πολλαπλασιασθεί σε υδάτινο περιβάλλον, όπως αυτά της Δρακόλιμνης και των λιμνών Τσουμάνη, για τους εξής λόγους :

1. Το υδάτινο περιβάλλον των λιμνών αυτών χαρακτηρίζεται ως ολιγοτροφικό (μικρή παροχή θρεπτικών συστατικών). Το *C. perfringens* χρειάζεται να προσλάβει 13 αμινοξέα από το περιβάλλον του για να ολοκληρώσει την ανάπτυξή του (Novak J.S. & Juneja V.K., 2002), (Tohushimizu et al., 2002).
2. Παροχή μεταλλικών στοιχείων, κυρίως σιδήρου, που είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και πληθυσμιακή έκρηξη των μικροοργανισμών. Σε μικρές συγκεντρώσεις σιδήρου στο περιβάλλον, τα βακτήρια εκκρίνουν σιδεροφόρα (Pague, 1993). Στη μελέτη του αλτικού αυτού περιβάλλοντος μετρήθηκαν επίσης τα επίπεδα παρουσίας βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον των υδάτων των λιμνών αυτών. Πολύ μικρά επίπεδα για όλα τα μέταλλα βρέθηκαν σε όλες τις τοποθεσίες δειγματοληψίας, εκτός μιας δειγματοληπτικής περιοχής, όπου ο σίδηρος βρέθηκε σε ελαφρά υψηλότερο επίπεδο. Τα ευρεθέντα ποσοστά των μετάλλων δεν αποτελούν απειλή για το περιβάλλον.
3. Η θερμοκρασία των νερών των λιμνών, κατά τις μεσημβρινές ώρες ηλιόλουστης ημέρας, μετρήθηκε στους 8° C, με θερμοκρασία του περιβάλλοντος αέρα 15° C. Γνωρίζουμε ότι το *C. perfringens* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 6.5° - 50° C (Hobbs, 1969), (McClane, 1997), με άριστη τους 45° C (Smith, 1971).
4. Το pH των λιμνών κυμαινόταν από 6.0 έως 6.5. Το *C. perfringens* αναπτύσσεται σε pH από 5.0 έως 9.0, με άριστο το 7.0 (Genigeorgis, 1975).

Τέλος, οι σπόροι τους οποίους ανιχνεύουμε στις λίμνες δεν είναι ιθαγενείς, αλλά προέρχονται από τα ζώα και τους ανθρώπους που βρίσκονται στον περιβάλλοντα χώρο των λιμνών.

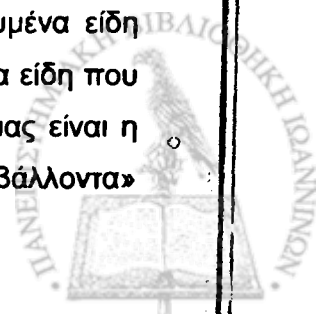
Συμπερασματικά, οι σπόροι του *C. perfringens* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κατάλληλοι δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης ενός αλτικού περιβάλλοντος, όπως χρησιμοποιούνται μέχρι τώρα ως δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης οικοσυστημάτων βρισκομένων υπό την επίδραση στρεσογόνων καταστάσεων (Him et al., 1980), (Bezirtzoglou E., 1999).

Το δεύτερο οικοσύστημα στο οποίο πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και ταυτοποίηση του *C. perfringens*, μαζί με άλλα είδη που απαρτίζουν την μικροβιακή κοινότητα του οικοσυστήματος αυτού, είναι ο γαστρεντερικός αυλός ανθρώπων που πάσχουν από γαστρεντερολογικές διαταραχές και συγκεκριμένα από καρκίνο, πολύποδες, ελκώδη κολίτιδα, νόσο του Crohn, οικογενή πολυποδίαση. Οι ανωτέρω νόσοι χαρακτηρίζονται από την αδυναμία μας να τις θεραπεύσουμε ολοκληρωτικά. Για τις περισσότερες, ο παράγων ή οι παράγοντες που τις προκαλούν δεν έχουν διασαφηνιστεί πλήρως. Ένας από τους παράγοντες που πιθανά μπορεί να εμπλέκεται στη γένεση ή την πιθανότητα εκδήλωσης των συμπτωμάτων των ασθενειών αυτών, είναι τα μικρόβια της φυσιολογικής μας μικροχλωρίδας ή πιθανώς κάποιος παθογόνος μικροοργανισμός. Μεταξύ της φυσιολογικής μας μικροχλωρίδας των κυττάρων του επιθηλίου και του ανοσοβιολογικού μας συστήματος αναπτύσσεται μία δυναμική ισορροπία (Kernagel L. et al., 1996), (Wren B.W. et al., 2000). Η διαταραχή της ισορροπίας αυτής εκδηλώνεται ως νόσος του γαστρεντερικού συστήματος.

Η πλειονότητα των ερευνητικών εργασιών που αφορά τη σύνθεση, την μεταβολική δραστηριότητα, την ενζυματική δραστηριότητα της μικροχλωρίδας του εντέρου ή την επίδραση διαφόρων παραγόντων, όπως η διατροφή, οι ασθένειες, η ηλικία, η εθνικότητα κ.α., στηρίζονται κυρίως στη δειγματοληψία και ανάλυση της μικροχλωρίδας των κοπράνων.

Λίγες ερευνητικές εργασίες εστιάζονται στην εξέταση της μικροχλωρίδας εκάστου τμήματος του εντέρου, κυρίως των απομακρυσμένων (Moore W.E.C., 1975), (Gorbech S.L. et al., 1967), (Bentley B.W. et al., 1972). Ελάχιστοι ερευνητές διερεύνησαν την μικροχλωρίδα του βλεννογόνου (MacFarlane S. et al., 2000), (Ahme et al., 1998) που απαρτίζεται από μικρόβια που προσκολλώνται πάνω σε αυτόν και σχηματίζουν λεπτά στρώματα μικροβιακών κοινοτήτων (biofilms). Αυτό είναι λογικό, γιατί δείγματα από τις περιοχές αυτές του εντέρου μπορούμε να συλλέξουμε σε περίπτωση εγχείρησης ή βιοψίας. Προφανώς, το δυσκολότερο όλων είναι η συλλογή τέτοιων δειγμάτων από φυσιολογικούς ενήλικες.

Τα δείγματα της έρευνάς μας προέρχονται από βιοψίες κατά τη διάρκεια κολονοσκόπησης σε ασθενείς. Οι κολονοσκοπήσεις έγιναν στην Γαστρεντερολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Θεωρώ ότι το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ερευνητικής μας εργασίας έγκειται στο γεγονός ότι διαθέταμε ιστό από την παθολογική περιοχή καθώς και ιστό από την προσκείμενη σε αυτή φυσιολογική περιοχή. Αυτό το γεγονός μας έδωσε τη δυνατότητα να συγκρίνουμε τις δύο γειτονικές κοινότητες μικροβίων. Προσπαθήσαμε να εκμεταλλευτούμε την έννοια του μικροπεριβάλλοντος. Το «μικροπεριβάλλον» ενός μικροοργανισμού είναι αυτό που καθορίζει τα εξειδικευμένα είδη μικροοργανισμών που θα το αποικίσουν με τον μικρότερο ανταγωνισμό προς άλλα είδη που οι λειτουργίες διαφέρουν πολύ λίγο. Τα «μικροπεριβάλλοντα» στην περίπτωση μας είναι η παθολογική περιοχή και η προσκείμενη σε αυτή φυσιολογική. Στα «μικροπεριβάλλοντα»



αυτά, οι αλληλεπιδράσεις είναι αμφίδρομες και οι μικροβιακές κοινότητες επηρεάζονται από την επαφή τους με τους ιστούς (παθολογικό, φυσιολογικό). Καθώς επίσης, η ακεραιότητα ή η δυνατότητα αντίδρασης του ιστού επηρεάζεται από τη μικροβιακή κοινότητα.

Η σύγκριση των δύο αυτών οικοτόπων, δηλαδή παθολογική και φυσιολογική περιοχή, για κάθε ασθένεια χωριστά, παρατίθεται περαιτέρω.

Στις παθολογικές περιοχές του υλικού βιοψίας, το *C. perfringens* ανιχνεύθηκε σε υψηλότερα ποσοστά (95.65%) σε σχέση με τις φυσιολογικές (78.26%). Τα υπόλοιπα είδη *Clostridium*, πλην του *C. perfringens*, ανιχνεύθηκαν τόσο στις παθολογικές περιοχές (47.82%) όσον και στις φυσιολογικές περιοχές (43.47%), σε παρόμοια επίπεδα.

Οι *Bacillus* παρουσιάζουν επίσης παρόμοια επίπεδα στις παθολογικές (47.82%) σε σχέση με τις φυσιολογικές (52.17%) περιοχές.

Επίσης, τα επίπεδα των *E. coli* υπερτερούν στις παθολογικές περιοχές (60.86%) σε σχέση με τις φυσιολογικές (43.47%).

Το *Enterobacter aerogenes* εμφανίζει το ίδιο ποσοστό σε παθολογικές και φυσιολογικές περιοχές (8.69%) καθώς επίσης και οι ενδιάμεσοι τύποι *E. coli*, που εμφανίζονται σε επίπεδα 13.04%, τόσο στις παθολογικές όσο και στις φυσιολογικές περιοχές.

Οι *Streptococci* σαφώς υπερτερούν στα παθολογικά δείγματα (91.30%) και ιδιαίτερα σε αυτά του καρκίνου παχέος εντέρου (100%) και των φλεγμονωδών νόσων του παχέος εντέρου (100%) σε σχέση με τα φυσιολογικά (47.82%).

Ο κυρίως παθογόνος *S. aureus* εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα στις παθολογικές περιοχές (30.43%) σε σύγκριση με τις φυσιολογικές (17.39%).

Σε αντίθεση, οι μη παθογόνοι *Staphylococcus spp.* κοαγκουλάση (-) παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα στις παθολογικές περιοχές (8.69%).

Συμπερασματικά, τα *C. perfringens*, *E. coli*, *S. aureus* και *Streptococcus* είναι οι συχνότερα απομονωθέντες μικροοργανισμοί στις παθογόνες περιοχές. Κατά γενικό κανόνα, υπερισχύουν οι σηπτικοί μικροοργανισμοί και οι κυρίως παθογόνοι στις παθογόνες αυτές περιοχές.

Η ενζυματική δραστηριότητα της μικροχλωρίδας σε προσλαμβανόμενα συστατικά, όπως νιτρο-αρωματικές ενώσεις, οξοενώσεις και νιτρικά, μπορεί να οδηγήσει στη γένεση καρκινογόνων και γονοτοξικών ουσιών. Βακτηριακά ένζυμα που ενέχονται στη δραστηριότητα αυτή είναι τα ακόλουθα : β-γλουκορονιδάση, β-γλυκοσιδάση, αζορεδουκτάση, νιτρορεδουκτάση, νιτρική ρεδουκτάση (Roisin Hughes & Ian R. Rowland, 2000).

Οι φαινόλες και ινδόλες παράγονται από την αποσύνθεση αρωματικών αμινοξέων. Βακτήρια της μικροχλωρίδας του εντέρου που ενέχονται στη διαδικασία αυτή είναι τα ακόλουθα : *Clostridium* (Elsden S.R. et al., 1976), *Bacteroides* (Chung K.T. et al., 1979), *Enterobacteria* (Bostford J.D., Pesmos R.D., 1972), *Bifidobacterium* (Aragozzini et al., 1979), *Lactobacillus* (Yokoyama M.T. et al., 1981).

Σύμφωνα με τη μελέτη μας, οι *Streptococci* και το *C. perfringens* εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα στις περιπτώσεις του καρκίνου παχέος εντέρου. Άλλοι ερευνητές επίσης, φαίνεται να συσχετίζουν την παρουσία *Streptococcus* με τον καρκίνο παχέος εντέρου (Hetal K.N., 2002). Ειδικότερα, η παρουσία του *S. bovis* φαίνεται να συσχετίζεται με τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Waisberg J. et al., 2002), (Ellmerich S. et al., 2000), (Arzanauskiene R. et al., 2003), (Baptista S.B. et al., 1998), (Bezirtzoglou E. et al., 1998). Επίσης, βακτηριαιμία από *S. sanguis* φαίνεται να έχει συσχέτιση με τον καρκίνο του παχέος εντέρου (Macaluso et al., 1998), (Siegert C.E. & Overbosch D., 1998). Εκ των αποτελεσμάτων μας, ο *S. aureus* φαίνεται να ανευρίσκεται σε υψηλότερα ποσοστά (60 - 100%) στις φλεγμονώδεις παθήσεις του παχέος εντέρου (IBD).

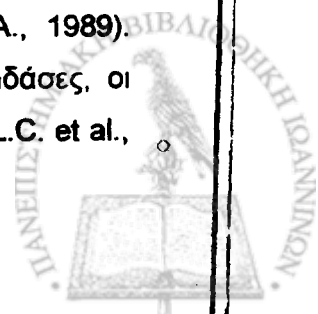
Λοιμώξεις από *S. aureus* σε ασθενείς με IBD έχουν αναφερθεί στην διεθνή βιβλιογραφία (Chiba N. et al., 2001), (Reichardt P. et al., 2002), (Tropko L.V. et al., 2002), (Dickinson R.J. et al., 1980).

Μέχρι πρόσφατα δεν είχε δοθεί μεγάλη σημασία στο μικρο-περιβάλλον ως μία δυνατότητα θεραπευτικής ευκαιρίας. Μία πιθανή θεραπευτική στρατηγική για τη θεραπεία των φλεγμονωδών νόσων μπορεί να περικλείει το χειρισμό του μικρο-περιβάλλοντος, με σκοπό την επαναφορά της μικροβιακής ισορροπίας (Camprien M., Gionchetti P., 1999). Σε αυτό τον τρόπο χειρισμού των ασθενών πιθανώς σημαντικό ρόλο μπορούν να παίξουν τα προβιοτικά, καθότι σε βιοψίες από ανθρώπους που έπασχαν από ελκώδη κολίτιδα παρατηρήθηκαν μειωμένα ποσοστά *Lactobacillus* (Fabie R. et al., 1993) και σε ασθενείς με Crohn μειωμένα ποσοστά από *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* (Favier C. et al., 1997).

Οι εφαρμογές σε ζώα έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Fabie R. et al., 1993). Ετοιμάζονται επίσης προβιοτικά στελέχη γενετικά τροποποιημένα, τα οποία, εκτός από την προβιοτική τους δράση, έχουν τη δυνατότητα παραγωγής αντι-φλεγμονωδών ουσιών, όπως κυτοκινών (Steidberh et al., 2000).

Ως προαναφέραμε, στις παθολογικές περιοχές είναι σαφής η υπεροχή των σηπτικών μικροοργανισμών και των κατ' εξοχήν παθογόνων.

Η βλέννα του εντέρου αποτελείται από γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες φέρουν τον πεπτιδικό σκελετό πάνω στον οποίο είναι προσκολλημένοι οι ολιγοσακχαρίτες με Ο-γλυκοσιδικό δεσμό. Η βλέννα δρα ως λιπαντής του εντερικού σωλήνα, ως τοίχος προστασίας, σταθεροποιητής του μικροκλίματος του εντέρου και αποτελεί μία από τις κυριότερες πηγές ενέργειας των μικροβίων. Η πλήρης αποσύνθεση της βλέννας απαιτεί μία ποικιλία ενζύμων από γλυκοσιδάσες και πρωτεάσες και πιθανά χρειάζεται η συνεργασία πολλών βακτηριακών στελεχών για την αποσύνθεσή της (Hoskins L.C. et al., 1985), (Karlsson K.A., 1989). Ανάμεσα στα ένζυμα που χρειάζονται ανήκουν οι α-γλυκοσιδάσες, οι β-γλυκοσιδάσες, οι νευραμινιδάσες, οι σιαλιδάσες, οι γαλακτοσιδάσες, οι φουκοσιδάσες κ.α. (Hoskins L.C. et al., 1985).



Τα βακτήρια που διαθέτουν προσκολλητίνες αγκυροβολούν πάνω στη βλέννα ή στον γλυκοκάλυκα των γλυκοπρωτεϊνών των επιθηλιακών κυττάρων. Ο αυλός του εντέρου είναι ένα φτωχό σε θρεπτικά υλικά υπόστρωμα για τα βακτήρια (Guiot H.F.L., 1982), (Wadobkowski E.A. et al., 1988). Σε αντίθεση, η βλέννα είναι ένα πλούσιο θρεπτικό περιβάλλον για τα βακτήρια. Παρατηρήσεις έχουν δείξει ότι στελέχη *E. coli* που είναι προσκολλημένα έχουν χρόνο διπλασιασμού 40 έως 80 λεπτά, ενώ τα αντίστοιχα στελέχη του αυλού είναι στατικά (Roulsen L.K. et al., 1995). Όταν το επιθήλιο είναι απείραχτο και ακέραιο, μόνο η ψυκτροειδής μεμβράνη είναι διαθέσιμη για την προσκόλληση των βακτηρίων. Καταστροφή της βλέννας επιτρέπει να αποκαλυφθούν υποεπιθηλιακές δομές και τα βακτήρια μπορούν να προσκολληθούν σε πρωτεΐνες, όπως το κολλαγόνο, η ελαστίνη, η φιμπρονεκτίνη, με περαιτέρω αποικισμό και καταστροφή των ιστών (Westerland & Korhonen T.K., 1993). Γνωρίζουμε επίσης, ότι σε ασθενείς που πάσχουν από τη νόσο του Crohn, η βλέννα του εντέρου τους συνεχώς αποθεκώνεται και αποσιλώνεται εξαιτίας ενζύμων που η προέλευσή τους κυρίως είναι βακτηριακή και ανιχνεύονται στα κόπρανά τους (Phodes J.M. et al., 1985).

Η επιδεκτικότητα της βλέννας σε αποσύνθεση μπορεί να είναι η αρχή γένεσης της αρρώστιας (Phodes J.M. et al., 1985). Τα μικρόβια τα οποία μπορούν να αναστέλλουν τη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών, που προκαλούν την αποθείωση και αποσιλωση, δεν συναντώνται στα κόπρανα των ασθενών με νόσο του Crohn (Bergstrand L.O. et al., 1981).

Η βακτηριακή αλλόθεση (translocation) είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται σε ανθρώπους με ανοσοκαταστολή ή τραυματισμό. Τα βακτήρια του εντέρου διασχίζουν το εντερικό τοίχωμα και φθάνουν σε εξω-εντερικούς χώρους. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να λάβει χώρα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (Webbs C. et al., 1988), (Bezirtzoglou E., 2001). Η πιθανότητα βακτηριακής αλλόθεσης αυξάνεται όταν αυξηθεί η συγκέντρωση ενός βακτηριακού είδους ή το στρώμα της βλέννας ελαττωθεί σημαντικά (Webbs C. et al., 1988).

Έχει αναφερθεί ότι ασθενής με γεροντική άνοια εκδήλωσε βακτηραιμία από *C.perfringens* που η προέλευσή του αποδείχθηκε ότι οφειλόταν σε αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου (Sungkenparph S. et al., 2002).

Άλλο παράδειγμα βακτηριακής αλλόθεσης είναι αυτό, ασθενούς που εμφάνισε μυνέκρωση από *C. perfringens*, που εισήλθε στην κυκλοφορία από καρκίνο του εντέρου (Kaiser C.W., 1986).

Έναν σημαντικό ρόλο, αν όχι στην απαρχή της γένεσης των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, αλλά στη διαιώνιση των αλλοιώσεών του, φαίνεται ότι παίζουν οι μικροοργανισμοί της μικροχλωρίδας (Sartor R.B., 1997). Διαταραχή της μικροχλωρίδας του εντέρου μπορεί κατά ένα μέρος να είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία αυτών των αλλοιώσεων. Τα δεδομένα από τη μικροχλωρίδα των κοπράνων και τη μικροχλωρίδα του βλεννογόνου στη φλεγμονή



είναι αλληλοσυγκρουόμενα (Keighley M.R.B. et al., 1978), (Ruseler van Embden J.G.H. et al., 1983), (Horing E. et al., 1991).

Σε ασθενείς που πάσχουν από φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου (IBD), αν και δεν εμφανίζουν καθαρά ελκώδεις καταστάσεις, έχει παρατηρηθεί αυξημένη βακτηριακή αλλόθεση (Ohkuse et al., 1993). Πολλά στελέχη από *Bifidobacterium* ανθρώπινης προέλευσης και προβιοτικοί *Lactobacillus* έχουν παρατηρηθεί να αποικίζουν την επιφάνεια του εντέρου και να εκτοπίζουν μικροοργανισμούς, όπως η *E. coli*, η *Salmonella typhimurium*, τα *Clostridium*, τα *Enterobacteriaceae* (Bemet M.F. et al., 1993), (Johansson M.L. et al., 1993), (Bezirtzoglou E., 1985).

Αξιοσημείωτο γεγονός είναι τα κοινά ένζυμα που παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί :

- Υαλουρονιδάση : *Streptococcus A, B,C, Staphylococcus, Clostridium*
- Δεοξυριβοζονουκλεάση : *Clostridium perfringens, Streptococcus, Staphylococcus*
- Αιμολυσίνες : *Staphylococcus, Streptococcus, Escherichia coli, Clostridium perfringens* (Prescott, 1999)

Ειδικότερα και αναλυτικότερα για το *C. perfringens* λάβαμε τα εξής αποτελέσματα :

- Για την φυσιολογική περιοχή, για τις βλαστικές μορφές 43.07% στην πρώτη αραιώση (-1) και 13.04% στην δεύτερη αραιώση (-2)
- Για την παθολογική περιοχή 73.91% στην πρώτη αραιώση (-1), 34.78% στην δεύτερη αραιώση (-2) και 4.34% στην τρίτη αραιώση (-3).
- Στην παθολογική περιοχή, η απομόνωση σπόρων έφθασε το 73.91%, ενώ στην φυσιολογική το 52.17%.

Το *C. perfringens* παράγει ένζυμα που αποικοδομούν την βλέννα και του δίνουν τη δυνατότητα προσκόλλησης και εισβολής (Hoskins L.C. et al., 1985), δηλαδή διαθέτει υαλουρονιδάσες, σιαλιδάσες, κολλαγενάσες, γλυκοσιδάσες, κυτταρολυτικές εντεροτοξίνες, α-τοξίνη, θ-τοξίνη κ.α.

Για κάποιο λόγο, η ισορροπία που υπάρχει ανάμεσα στα κύτταρα του βλεννογόνου, του ανοσοβιολογικού συστήματος και των μικροβίων της φυσιολογικής μας μικροχλωρίδας διαταράσσεται, δίνοντας την ευκαιρία σε σηπτικούς μικροοργανισμούς, όπως το *C. perfringens*, να αποκτήσουν σε πρώτη φάση μεγάλο βαθμό προσκολλητικότητας στα κύτταρα του βλεννογόνου. Ακολούθως, μπορούν να εισβάλλουν στον ιστό χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα ένζυμα για αποικοδόμηση των μεγαλομορίων. Η αποικοδόμηση αυτή δημιουργεί ένα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά υπόστρωμα και δίνει τη δυνατότητα τοπικής πληθυσμιακής έκρηξης. Από *in vitro* πειράματα γνωρίζουμε ότι την μεγάλη ποσότητα ενζύμων και τοξινών το *C.perfringens* αρχίζει να την παράγει στο μέσον της εκθετικής του φάσης (Petit L. et al., 1999). Είναι λογικό να υποθέσουμε ότι χρειάζεται περισσότερα θρεπτικά υλικά για να ολοκληρώσει την ανάπτυξή του. Φθάνοντας στην στατική φάση, αρχίζει την σπορογονία, λόγω έλλειψης θρεπτικών υλικών και παραγωγής τοξικών μεταβολιτών αλλά

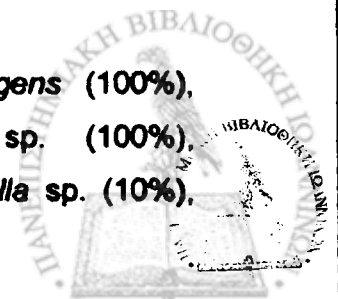
και πιέσεων που δέχεται είτε από το περιβάλλον, είτε από τους μικροοργανισμούς της φυσιολογικής μικροχλωρίδας είτε από τον ξενιστή. Αυτό είναι μία πιθανή λογική υπόθεση για την εξήγηση των αυξημένων ποσοστών βλαστικών και σπορογόνων μορφών του *C. perfringens* στην παθολογική περιοχή, σε σχέση με την φυσιολογική. Βέβαια, στις περιπτώσεις του καρκίνου, η πληθυσμιακή έκρηξη είναι μεγαλύτερη, γιατί το *C. perfringens* εμφανίζεται πάντα στη δεύτερη αραιώση και συχνά στην τρίτη αραιώση. Στους πολύποδες, ο μικροοργανισμός ανιχνεύεται στην πρώτη αραιώση. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι στην ελκώδη κολίτιδα που βρίσκεται στο στάδιο της ύφεσης, ανιχνεύεται μόνο με τη σπορογόνο μορφή του.

Το τρίτο οικοσύστημα αντιπροσωπεύεται από τη λεκάνη πρόψυξης ενός συγκεκριμένου πτηνοσφαγείου. Στο οικοσύστημα αυτό ελέγξαμε την παρουσία του *C. perfringens* σε σχέση πρώτον με την παρουσία άλλων βακτηρίων που χαρακτηρίζονται ως δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης και δεύτερον ως προς την παρουσία βακτηρίων χαρακτηριζόμενων ως παθογόνων.

Τα σφάγια, αφού θανατωθούν, εμβαπτίζονται σε νερό θερμοκρασίας 51° έως 53°C, ούτως ώστε να είναι δυνατή η αποπύλωση. Ακολουθεί η αφαίρεση της κεφαλής, η κοπή των άκρων, ο εκοππλαχνισμός, η απεντέρωση, η διαλογή των εδωδιμων σπλάχνων, ο εσωτερικός καθαρισμός του σφάγιου (καθαρισμός υπολειμμάτων σπλάχνων με ειδικό μηχανισμό και συγχρόνως ψεκασμός με νερό υπό πίεση), η πρόψυξη, που περιλαμβάνει δύο στάδια, η στράγγιση των σφαγίων στον αέρα, η διαλογή και τέλος η ζύγιση αυτών. Στο σημείο αυτό, τα σφάγια είναι έτοιμα να ελεγχθούν από ειδικούς επιθεωρητές για την καταλληλότητα διάθεσής τους στην αγορά. Μία συνιστώσα του ελέγχου θα πρέπει να εστιάζεται στο μικροβιολογικό φορτίο των σφαγίων, με στόχο την αποφυγή μετάδοσης παθογόνων μικροοργανισμών στους καταναλωτές.

Η πρόψυξη, όπως προαναφέραμε, έχει δύο στάδια. Το πρώτο αφορά το πλύσιμο των σφαγίων ενώ βρίσκονται κρεμασμένα σε ένα εναέριο μεταφορέα, με στόχο την απομάκρυνση των υπολειμμάτων εκοππλαχνισμού από τα σφάγια και το δεύτερο, τη μείωση του μικροβιολογικού φορτίου από τα σφάγια, εμβαπτίζοντάς τα σε μία ειδική λεκάνη, για περίπου 30 λεπτά. Η λεκάνη αυτή περιέχει νερό μαζί με πάγο, ο οποίος εκχύνεται συνεχώς στη λεκάνη. Η θερμοκρασία του νερού της λεκάνης είναι περίπου 4° C και η κίνηση του νερού έχει αντίθετη ροή από αυτή των σφαγίων. Η δειγματοληπτική περιοχή Α βρίσκεται στο κέντρο της λεκάνης, όπου συνεχώς εκχύνεται πάγος και η δειγματοληπτική περιοχή Β στο άκρο της λεκάνης, από όπου τα σφάγια επανέρχονται στον αέρα.

Στην τοποθεσία Α, απομονώθηκαν οι μικροοργανισμοί : *C. perfringens* (100%), κοπρανώδους προέλευσης κολοβακτηριοειδή (100%), *Enterococcus* sp. (100%), *Streptococcus* sp. (100%), *E. coli* (40%), *Proteus mirabilis* (25%), *Salmonella* sp. (10%),



Proteus vulgaris (5%), *Morganella morganii* (5%) και τέλος, ανευρέθη σε μία περίπτωση το *Citrobacter freundii*.

Στην τοποθεσία Β, απομονώθηκαν οι ίδιοι μικροοργανισμοί, αλλά επί το πλείστον σε χαμηλότερα επίπεδα : *C. perfringens* (100%), κοπρανώδους προέλευσης κολοβακτηριοειδή (100%), *Enterococcus* sp. (100%), *Streptococcus* sp. (100%), *E. coli* (25%), *Proteus mirabilis* (25%), *Salmonella* sp. (5%), *Proteus vulgaris* (5%), *Hafnia alvei* (5%). Στην τοποθεσία αυτή απομονώθηκαν οι *Pseudomonas* (5%). Η *Hafnia alvei* ουδέποτε ανευρέθη στην Α τοποθεσία και ανευρέθη το *Citrobacter freundii* σε μία περίπτωση. Όσον αφορά τον σπορογόνο μικροοργανισμό *C. perfringens*, απομονώθηκε τόσο στη σπορογόνο του μορφή, όσο και στις βλαστικές μορφές του.

Στην τοποθεσία Α, εμφανίζονται λιγότερες βλαστικές μορφές (70%) σε σύγκριση με την Β (75%). Οι σπορογόνες μορφές εμφανίζονται στα ίδια επίπεδα και στις δύο τοποθεσίες (95%). Ο μικροοργανισμός παραμένει σε υψηλότερα επίπεδα στην πρώτη αραιώση ($\cong 10^8$) και είναι εμφανής έως την τρίτη αραιώση ($\cong 10^2$).

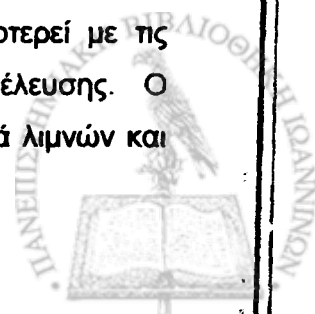
Ως προαναφέρθη, στην περιοχή Α, όπου τα πτηνοσφαγεία εκπλένονται συστηματικά με θρυμματισμένο πάγο και επομένως η θερμοκρασία διατηρείται χαμηλή ($\cong 4^\circ \text{C}$), με σκοπό την παρεμπόδιση ανάπτυξης των μικροοργανισμών, βλέπουμε να μην υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, τόσο στους μικροοργανισμούς δείκτες όσο και στους κυρίως παθογόνους που ανευρίσκονται. Το μικροβιακό φορτίο των πτηνοσφαγείων αντανakλάται στα νερά έκπλυσής τους στη λεκάνη. Παρότι η ροή του ύδατος στην λεκάνη αυτή είναι συνεχής και αντιθέτου ροής και ο πάγος εμποδίζει την υπερανάπτυξη των μικροοργανισμών, οι διάφορες περιοχές του ύδατος της λεκάνης είναι σαφώς σε άμεση επικοινωνία λόγω του περιορισμένου όγκου του υδάτινου συστήματος έκπλυσης. Επομένως, τα ανωτέρω αποτελέσματα είναι αναμενόμενα.

Είναι όμως αξιοσημείωτο, ότι το *C. perfringens* υπερτερεί σε όλες τις περιπτώσεις, στις σπορογόνες του μορφές. Οι υπόλοιποι κοπρανώδεις δείκτες (κοπρανώδους προέλευσης κολοβακτηριοειδή, *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp. και βλαστικές μορφές *C. perfringens*) παρουσιάζονται σε υψηλότερα επίπεδα (100%).

Η *E. coli* δεν φαίνεται να αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη για τα νερά των πτηνοσφαγείων (40%), παρατήρηση που έγινε επίσης και από άλλους ερευνητές (De Zutter L. et al., 1980).

Άλλες μέθοδοι έκπλυσης των πτηνοσφαγείων, όπως αυτή της έκπλυσης με ψεκασμό (spray washing) δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά το μικροβιακό φορτίο (Mulder R.W. et al., 1981), (Fries R. et al., 1999), (Rho M.J. et al., 2001).

Το *C. perfringens* φαίνεται λοιπόν και σε αυτή την περίπτωση να υπερτερεί με τις ανθεκτικότερες σπορογόνες του μορφές ως δείκτης κοπρανώδους προέλευσης. Ο μικροοργανισμός έχει προταθεί σταθερά και για άλλα οικοσυστήματα, π.χ. νερά λιμνών και



ποταμών (Bezirtzoglou E., 1999), (Τσιότσας Α., 2002) και τρόφιμα (Βόιδαρου Χ., 2002), (Novak J.S. et al., 2002).

Η απομάκρυνση των κοπρανωδών μικροοργανισμών από τις λεκάνες των πτηνοσφαγείων είναι ουσκώδους σημασίας, για να φέρει το σφάγιο όσο γίνεται μικρότερο μικροβιακό φορτίο. Δια τούτο, έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι χημικής επεξεργασίας των υδάτων αυτών (De Zutter L. et al., 1981), (Salvat G. et al., 1997).



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

I. ΕΚΦΡΑΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΙΔΗΡΟΥ ΣΕ ΠΤΩΧΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΣΕ ΣΙΔΗΡΟ

Η αισθητήριος ενζ πρωτεΐνη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που ανήκει στο σύστημα μεταγωγής πληροφορίας ενΖ/ompR, υπεύθυνο για την έκφραση των πρωτεϊνών οσμομοριακότητας ompF, ompC, εμπλέκεται και στην έκφραση των πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη του σιδήρου (σιδεροφόρα), όταν το βακτήριο αναπτύσσεται σε περιβάλλον πτωχό σε σίδηρο.

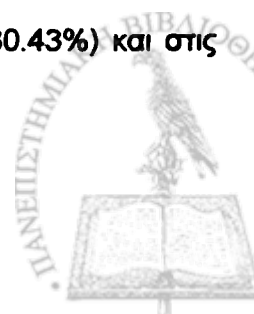
Το ακετυλο-φωσφορικό οξύ δεν σχετίζεται άμεσα με την έκφραση των πρωτεϊνών του σιδήρου σε συνθήκες έλλειψης αυτού, αλλά λειτουργεί ως πηγή φωσφορικών ομάδων για το σύστημα μεταγωγής πληροφορίας ενΖ/ompR. Αποτελεί έναν συνδετικό κρίκο μεταξύ του κεντρικού μεταβολισμού του βακτηρίου και των «αισθητηρίων συστημάτων» του.

II. ΥΔΑΤΙΝΟ ΑΛΠΙΚΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ

- Μη ανεύρεση παθογόνων μικροοργανισμών λόγω των κλιματολογικών συνθηκών στο ακραίο αυτό περιβάλλον.
- Το *C. perfringens* απαντάται μόνον στην σπορογόνο του μορφή σε στρεσογόνα οικοσυστήματα.
- Η βλαστική μορφή του *C. perfringens* δεν αναπτύχθηκε στο ακραίο αυτό υδάτινο περιβάλλον.

III. ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ

- Το *C. perfringens* ανιχνεύεται σε υψηλά ποσοστά (95.65%) στο παθολογικό υλικό βιοψίας και ιδιαίτερα στον καρκίνο παχέος εντέρου.
- Η *E. coli* υπερτερεί στις παθολογικές περιοχές υλικού βιοψίας (60.86%).
- Οι *Streptococcus* υπερτερούν στα παθολογικά δείγματα (91.30%) και ιδιαίτερα σε αυτά του καρκίνου παχέος εντέρου (100%) και των φλεγμονωδών νόσων του παχέος εντέρου (100%).
- Ο *S. aureus* εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα στις παθολογικές περιοχές (30.43%) και στις φλεγμονώδεις παθήσεις του παχέος εντέρου (60 - 100%).



IV. ΥΔΩΡ ΠΤΗΝΟΣΦΑΓΕΙΩΝ

- Το *C. parvum* απαντάται σε υψηλότερα επίπεδα (85%) στη σπορογόνο του μορφή σε όλες τις περιπτώσεις και προτείνεται ως χαρακτηριστικός δείκτης για τα νερά των πτηνοσφαγείων.
- Όλοι οι κοπρανώδεις δείκτες, πλην της *E. coli* (40%), απαντώνται επίσης σε υψηλά επίπεδα. Η *E. coli* δεν αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη για τα νερά πτηνοσφαγείων.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

I. Η έκφραση των πρωτεϊνών του Σιδήρου σε περιβάλλοντα πτωχά σε σίδηρο.

Διερευνήσαμε την έκφραση των πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη του σιδήρου στα βακτήρια κυρίως σε περιβάλλοντα πτωχά σε σίδηρο. Διαπιστώσαμε ότι: Η αισθητήριος *envZ* πρωτεΐνη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που ανήκει στο σύστημα μεταγωγής πληροφορίας *envZ/ompR*, υπεύθυνο για την έκφραση των πρωτεϊνών οσμωμοριακότητας *ompF*, *ompC*, εμπλέκεται και στην έκφραση των πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη του σιδήρου (σιδεροφόρα), όταν το βακτήριο αναπτύσσεται σε περιβάλλον πτωχό σε σίδηρο.

Το ακετυλο-φωσφορικό οξύ δεν σχετίζεται άμεσα με την έκφραση των πρωτεϊνών του σιδήρου σε συνθήκες έλλειψης αυτού, αλλά λειτουργεί ως πηγή φωσφορικών ομάδων για το σύστημα μεταγωγής πληροφορίας *envZ/ompR*. Αποτελεί έναν συνδετικό κρίκο μεταξύ του κεντρικού μεταβολισμού του βακτηρίου και των «αισθητήριων συστημάτων» του.

II. Βακτηριακοί δείκτες σε αλπικό περιβάλλον.

Βακτηριακοί δείκτες όπως *total coliforms*, *fecal coliforms*, *total Streptococci*, *Enterococci* και *Clostridium perfringens*, υπολογίστηκαν σε αλπικά νερά λιμνών (Δρακόλιμνη, λίμνες Τσουμάνη) που βρίσκονται σε μεγάλο υψόμετρο στα βουνά της Πίνδου.

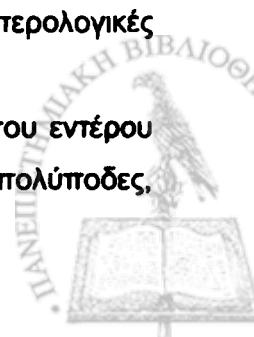
Δεν βρέθηκαν παθογόνοι μικροοργανισμοί εξαπτίας των ακραίων κλιματολογικών συνθηκών.

Βλαστικές μορφές του *C. perfringens* δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα από τα δείγματα, σε αντίθεση με τις σπορογόνες που ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα.

III. Οικοσύστημα εντέρου

Η παρούσα μελέτη ταυτοποίησε και καταμέτρησε τα είδη που κυρίως αποτελούν την χλωρίδα του εντέρου από ασθενείς με γαστρεντερολογικές διαταραχές από δείγματα βιοψιών.

Οι βιοψίες συλλέχθηκαν από την υγιή και παθολογική περιοχή του εντέρου από ασθενείς με τις ακόλουθες γαστρεντερολογικές διαταραχές, πολύποδες,



οικογενής πολυποδίαση, κολίπδες, ελκώδης κολίπδα, ασθενείς του Crohn και καρκίνος παχέος εντέρου.

Το *C. perfringens* ταυτοποιήθηκε σε υψηλά ποσοστά (95.65%) σε όλους τους παθολογικούς ιστούς και ειδικότερα στις περριπτώσεις του καρκίνου.

Η *E. coli* ήταν παρών σε υψηλά ποσοστά (60.86%) στην παθολογική περιοχή. *Streptococci* ήταν πάντα παρόντες στις περριπτώσεις καρκίνου (100%) και στις φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου, ασθένεια Crohn και ελκώδη κολίπδα.

Ο *S. aureus* έδειξε υψηλότερα ποσοστά στις παθολογικές περιοχές (30.43%) και η παρουσία του σε περριπτώσεις φλεγμονωδών νόσων κυμαινόταν από 60 έως 100%.

IV. Νερό πτηνοσφαγείων

Οι ποικίλες διαδικασίες από τις οποίες παίρνουν τα σφάγια των πτηνών μέχρι της διαθεσής τους στο εμπόριο έχουν σημαντικό αποτέλεσμα στο μικροβιολογικό τους φορτίο, διότι τα πτηνά έχουν πάνω τους μεγάλους αριθμούς από μικροοργανισμούς του εντέρου τους, των φτερών και των ποδιών τους. Τα πτηνά κατ' αρχήν, ζαλίζονται με ηλεκτρικά μέσα, αποκεφαλίζονται, αποπτελώνονται στους 55° C με μηχανικά μέσα και κατόπιν ακολουθεί ο εκσπλαχνισμός τους.

Τα σφάγια κρυώνονται σε πάγο με τη ροή ρεύματος νερού στο τελευταίο στάδιο της διαδικασίας, με σκοπό την απομάκρυνση του βακτηριακού φορτίου από τα σφάγια.

Οι σπόροι του *C. perfringens* βρέθηκαν σε υψηλά ποσοστά (95%) και για το λόγο αυτό προτείνονται ως βακτηριακοί δείκτες για νερά προερχόμενα από πτηνοσφαγεία.

Η *E. coli* δεν βρέθηκε σε υψηλά ποσοστά (40%) και για το λόγο αυτό θα πρέπει να αποκλεισθεί ως κατάλληλος δείκτης για τέτοιου είδους νερά.

Όλοι οι άλλοι βακτηριακοί δείκτες βρέθηκαν σε υψηλά ποσοστά.

The title

Investigation on the factors, which favour the development of *Clostridium* spp according to the place of origin of them.

Kegkos Theocharis



SUMMARY

I. The expression of iron proteins in iron deficient environments

The sensor envZ protein of cytoplasmic membrane which belongs to the two component signal transduction system envZ / ompR, responsible on the expression of osmolarity-proteins ompF, ompC, is also involved in the expression of proteins, which are responsible for iron uptake (siderophore), when the bacterium is developing in an iron-deficient environment. The acetyl-phosphate is not involved directly on the expression of iron-proteins in an iron-deficient environment, but acetyl-phosphate is used by the bacterium as a pool of phosphate groups to the two component signal transduction system envZ / ompR. The acetyl-phosphate is a connecting ring between the central metabolism of bacterium and the «sensor systems» of it.

II. Bacterial indicators in extreme environment

Bacterial indicators, including total coliforms, fecal coliforms, total *Streptococci*, *Enterococci* and *Clostridium perfringens*, were evaluated in alpine lake water environments at elevated altitudes in the Pindons mountain region.

No pathogenic bacteria were found due to the extreme climatologic conditions. Vegetative forms of *C. perfringens* were not recovered in any of the lake samples, on the contrary spore forms were detected in all samples.

III. Intestinal ecosystem

The present study evaluate the major intestinal flora species from patients with gastrointestinal disorders in biopsy specimens.

Biopsies were collected from healthy and diseased areas of the intestine from patients with the following disease states; polype, familial polyposis, colitis, ulcerative colitis, Crohn' s disease and intestinal cancer.

C. perfringens was recovered in high levels (95.65%) in all pathologic tissues and especially in the case of intestinal cancer.

E. coli was present in higher levels (60.86%) in the diseased areas.



Streptococcus were always present in cancer (100%) and in the inflammatory diseases including Crohn's disease and ulcerative colitis.

S. aureus showed higher levels in pathologic regions (30.43%) and its presence in the case of the inflammatory diseases varied from 60 to 100%.

IV. Poultry slaughtery waters

The various stages in the processing of birds have a significant effect on the microbiological microflora, because the birds are harboring large numbers of microorganisms on their intestine, but also on their feathers and feet. The birds are electrically stunned, followed by scalding, at 55° C, mechanical defeathering and evisceration. Chilling of carcasses on ice together with a current flow of water is the final stage of the whole procedure. The water carried to bacterial load of the carcasses.

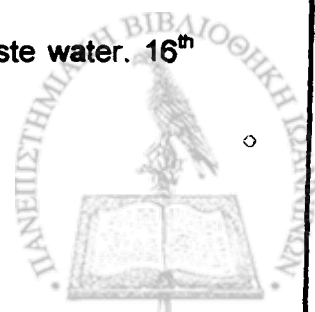
C. perfringens spores were found in very high levels (95%) and then it is proposed as a bacterial indicator in such waters. *E. coli* is not found in very high levels (40%), and so it must be excluded to be a bacterial indicator.

All the other bacterial indicator are found in high levels.

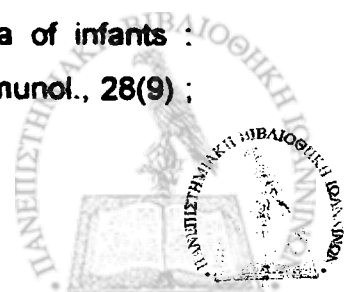


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

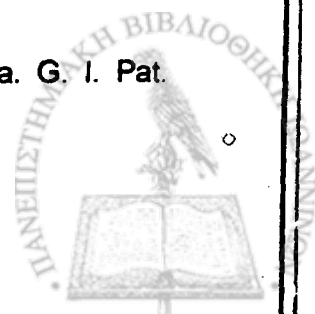
1. **Adlerberth I., Cerquetti M., Poilane I., Wold A., Collignon A. (2000).** Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2 : 223-239.
2. **Ahrne S., Nobaek S., Jeppsson B., Adlerberth I., Wold A.E., Molin G. (1998).** The normal *Lactobacillus* flora of healthy human oral and rectal mucosa. *J. Appl. Microbiol.*, 85 : 88-94.
3. **Ailse L.H., Stagg J.A., Graffner L., Glise H., Facik P., Kamm A.M. (2002).** Gut Ecology, published in the United Kingdom 2002 by Martin Dunitz Ltd. Pp5, 9,17, 43-45, 53, 61, 83, 136-139.
4. **Alam M., Midtvedt T., Uribe A. (1994).** Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, 29 : 445-451.
5. **Alexander M. (1994).** Biodegradation and Bioremediation. Academic Press Inc., San Diego, California pp57.
6. **Allen A. (1981).** Structure and function of gastrointestinal mucus. In: Johnson L.R. (ed) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, pp. 617-639.
7. **Allen D., Baron E. (1991).** *Clostridium*. In: Balows A., Hausler W.J. Jr., Hermann K.L., Isenberg D., Shadony H.J. (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 50-505.
8. **Allison C., MacFarlane G.T. (1988).** Effect of nitrate on methane production and fermentation by slurries of human faecal bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 134 : 1397-1405.
9. **American Public Health Association (1992).** *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed. American Public Health Association, Washington.
10. **Amin A. (1984).** Έρευνα για την υγιεινολογική κατάσταση των συντηρημένων ιχθύων στην Ελλάδα. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Κτηνιατρικής.
11. **Anderson J.M (1980)** *Ecology for Environmental Sciences* pp23.
12. **Angelloti R., Hall H.E., Foter M.L., Lewis K.H. (1962).** Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. *Appi. Microbiol.* 10 : 193-199.
13. **Anwar H., Dasgupta M.K., Costerton J.W. (1990).** Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, 34: 2043-2046.
14. **APHA (1985).** *Standard methods for the examination of water and waste water*. 16th edition. American Public Health Association. Washington, D.C.



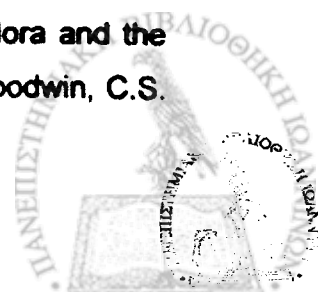
15. Aragozzini F., Ferrari A., Pacini N., Saulandris R. (1979). Indole-3-lactic acid as a tryptophan metabolite produced by *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38: 544-546.
16. Arseculeratne S.N., Panabokke R.G., Navaratnam C. (1980). Pathogenesis of necrotising enteritis with special reference to intestinal hypersensitivity reactions. *Gut*, 21 (4) : 265-278.
17. Arzanauskienė R., Zabiela P., Sakalnikiene M. (2003). *Streptococcus bovis* endocarditis - predictor of colonic carcinoma. *Medicina (Kaunas)*, 39 (2) : 174-178.
18. Atlas R.M., Bartha R. *Microbial Ecology - fundamentals and applications*, 4th ed., Redwood City, California, Benjamin / Cumming pp 203-206
19. Awad M., Bryant A., Stevens D., Rood J. (1995). Virulence studies on chromosomal α -toxin and θ -toxin mutants constructed by allelic exchange provides genetic evidence for the essential role of α -toxin in *C. perfringens* - mediated gas gangrene. *Mol. Microbiol.*, 15 : 191-202.
20. Baptista S.B., Duarte F.P., Galrinho A., Dutachmann L. (1998). *Streptococcus bovis* endocarditis and colonic involvement. *Rev. Port. Cardiol.*, 17 (12) : 1025-1030.
21. Barnes E.M., Ingram M. (1956). The effect of redox potential on the growth of *Clostridium welchii* strains isolated from horse muscle. *J. Appl. Bacteriol.* 19 : 117-128.
22. Bartlett J.C. (1990). Gas gangrene (other *Clostridium*-associated diseases). Churchill, Livingstone pp 31-32
23. Bartlett J.C. (1994). *Clostridium difficile* : history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clin. Infect. Dis.*, 18 (suppl.4) : S265-272.
24. Batik O.G., Craun F., Tuthill R.W., Kraemer D.F. (1980). An epidemiologic study of the relationship between hepatitis A and water supply characteristics and treatment. *Am. J. Public Health*, 70 : 167-168.
25. Bauer H., Horowitz R.E., Watkins K.C., Popper H. (1964). Immunologic competence and phagocytosis in germfree animals with and without stress. *J.A.M.A.*, 187 : 713.
26. 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.
27. Bennett J.M.B., Brachman P.M.D. (1986). *Hospital infection*, 2nd edition pp 232-235.
28. Benno Y., Sawada K., Mitsuoka T. (1984). The intestinal microflora of infants : composition of fecal flora breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol. Immunol.*, 28(9) : 975-986.



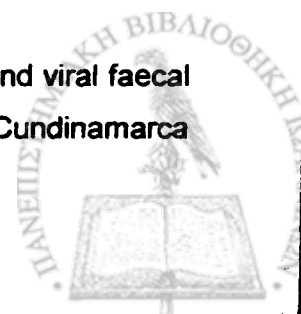
29. Bentley D.W., Nichols R.L., Condon R.E., Gorbach S.L. (1972). The microflora of the human ileum and intraabdominal colon : results of direct needle aspiration at surgery and evaluation of the technique. J. Lab. Clin. Med., 79 : 421-429.
30. Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology (1974). R.E. Puchanan and N.E. Gibbons ed. (8th ed.) pp. 556, 558, 559, 562-563.
31. Bergstrand L.O., Gustafsson B.E., Holmstrom B., Norin K.E. (1981). The physiological activity of human ileal flora in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis evaluated by determination of germfree animal characteristics. Acta Chirurgica Scand., 147 : 707-709.
32. Bernet M.F., Brassart D., Neeser J-R., Servin A.L. (1993). Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. Appl. Environ. Microbiol., 59 : 4121-4128.
33. Bernstein C.N., Blanchard J.F., Rawsthorne P., Wajda A. (1999). Epidemiology of Crohn' s disease and ulcerative colitis in a central Canadian province : a population-based study. Am. J. Epidemiol., 149 : 916-924.
34. Bezirtzoglou E., Romond M.B., Romond C., Beerens H. (1987). Factors modulating the intestinal colonization of infant born by cesarian section. Microecology and Therapy, 17.
35. Bezirtzoglou E., Romond C. (1989). Bacterial flora of the nasal mucosa in newborns delivered by cesarian section. Microecology and Therapy, 19 : 93.
36. Bezirtzoglou E., Chavatte P., Romond C. (1989). A quantitative study of fecal and other bacteria floras of newborns delivered by cesarian section. G. I. Pat. Clin., VI (2).
37. Bezirtzoglou E., Romond M.B., Romond C. (1989). Modulation of *C. perfringens* intestinal colonization in infants delivered by cesarean section. Infection, 17 : 232-236.
38. Bezirtzoglou E., Romond C. (1989). Origin of bacteria colonizing the intestine of the newborn delivered by cesarian section. Hellenic Journal of Gastroenterology, 2(4) : 290.
39. Bezirtzoglou E., Romond C. (1990). Apparition of *Clostridium* sp. and *Bacteroides* in the intestine of the newborn delivered by cesarean section. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 13 (4) : 217-221.
40. Bezirtzoglou E., Romond C. (1990). Nosocomial infections of ocular conjunctiva in newborns delivered by cesarian section. Ophthalmic Res., 104.
41. 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.
42. Bezirtzoglou E. (1991). Establishment of the gastrointestinal microflora. G. I. Pat. Clin., VI (4).



43. **Bezirtzoglou E., Romond C. (1991).** Gram (+) anaerobic intestinal cocci in healthy adults and neonates. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology*, XVIII (4).
44. **Bezirtzoglou E., Romond M.B., Romond C. (1992).** Regulation of the bacterial intestinal implantation in infant born by cesarian section. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.*, 15 (1).
45. **Bezirtzoglou E., Dimitriou D., Panagiou A., Kagalou I. (1994).** Distribution of *Clostridium perfringens* in different aquatic environments in Greece. *Microbiological Research*, 149 : 129-134.
46. **Bezirtzoglou E., Panagiou A., Savvaidis I., Theodorou D., Tsolas O., Antoniadis G. (1995).** A new and rapid method for identification of *C. perfringens* in cave waters. *Microecology and Therapy*, 23 : 188-194.
47. **Bezirtzoglou E., Dimitriou D., Panagiou A. (1996).** Occurrence of *Clostridium perfringens* in river water by using a new procedure. *Anaerobe*, 2 : 169-173.
48. **Bezirtzoglou E. (1997).** The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe*, 3 : 173-177.
49. **Bezirtzoglou E., Panagiou A., Savvaidis I., Maipa V. (1997).** Distribution of *Clostridium perfringens* in polluted lake environments. *Anaerobe*, 3 : 169-172.
50. **Bezirtzoglou E., Konstandi M., Voidarou C., Kostakis D., Marselos M. (1999).** Influence of psychological stress on the faecal carriage of indicator bacteria. *Microecology and Therapy*, 49-53.
51. **Biasco G., Paganelli G.M., Brandi G. (1991).** Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on rectal cell kinetics and fecal pH. *Ital. J. Gastroenterol.*, 23 : 142.
52. **Biffi A., Coradini D., Larsen R., Riva L., Di Fronzo G. (1997).** Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutr. Cancer*, 28 : 93-99.
53. **Blakey J.L., Lubitz L., Campbell N.T., Gillam G.L., Bishop R.F., Barnes (1985).** *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 4 (4) : 591-595.
54. **Blanchard T.G., Czinn S.J., Nedrud J.G. (1999).** Host response and vaccine development to *Helicobacter pylori* infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 241 : 181-213.
55. **Borriello S.P. (1984).** Bacteria and gastrointestinal secretion and motility. *Scan. J. Gastroenterol.*, 19 (93) : 115-121.
56. **Borriello S.P., Stephens S. (1984).** The development of the infant gut flora and the medical microbiology of infant botulism and necrotizing enterocolitis. In: Goodwin, C.S. ed. *Microbes and Infections of the Gut*. London : Blackwell Scientific, 1-26.



57. **Borriello S.P. (1986).** Microbial flora of the gastrointestinal tract. In: Hill M.J., ed. *Microbial Metabolisms in the Digestive Tract*. Florida : CRC Press Inc., 1-19.
58. **Borriello S.P., Barclay F.E. (1986).** An *in vitro* model of colonisation resistance to *Clostridium difficile* infection. *J. Med. Microbiol.*, 21 : 299-309.
59. **Bothner M.H., Gill P.W., Boothman W.S., Taylor B.B., Karl H.A. (1998).** Chemical gradients in sediment cores from an EPA reference site off the Farallon Islands - Assessing chemical indicators of dredged material disposal in the Deep Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 36 (6) : 443-457.
60. **Botsford J.L., Desmoss R.D. (1972).** *Escherichia coli* tryptophanase in the enteric environment. *J. Bacteriol.*, 109 : 74-80.
61. **Bradley D.J. (1977).** Health aspects of water supplies in tropical countries, p. 3-17. In: R.G. Feachem, M.G. McGarry and D.D. Mara (eds). *Water, Wastes and Health in Hot Climates*. John Wiles and Sons, London.
62. **Bradshaw D.J., Marsh P.D., Watson K., Allison C. (1997).** Inter-species interactions in microbial communities. In: Wimpenny J., Handley P., Gilbert P., Lappin-Scott H., Jones M. (ed) *Biofilms. Community Interactions and Controls*. Bioline, Cardiff, pp. 63-71.
63. **Brassart D., Schiffrin E.J. (1997).** The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends Food Sci. Technol.*, 8 : 321-326.
64. **Brockhausen I. (1999).** Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1473 : 67-95.
65. **Brooks F.G., Butt S.J., Ornston L.N. (1991).** *Medical Microbiology*, 18th Edition Appleton & Lange, 289-293.
66. **Bry L., Falk P., Huttner K., Ouellette A., Midtvedt T., Gordon J. I. (1994).** Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91 : 10335-10339.
67. **Butel M.J., Roland N., Hibert A., Popot F., Favre A., Tessedre A.C., Benn M., Rimbault A., Szylit O. (1998).** Clostridial pathogenicity in experimental necrotising enterocolitis gnotobiotic quails and protective role of bifidobacteria. *J. Med. Microbiol.*, 47 (5) : 391-399.
68. **Buxton D. (1978).** Further studies on the mode of action of *C. welchii* type D epsilon toxin. *J. Med. Microbiol.*, 11 : 293.
69. **Campbell R. (1983).** *Microbial Ecology*, Blackwell Scientific Publications, Second Edition pp 232-234.
70. **Campos C., Guerrero A., Cardenas M. (2002).** Removal of bacterial and viral faecal indicator organisms in waste stabilization pond system in Choconta, Cundinamarca (Colombia). *Water Sci. Technol.*, 45 (1) : 61-66.



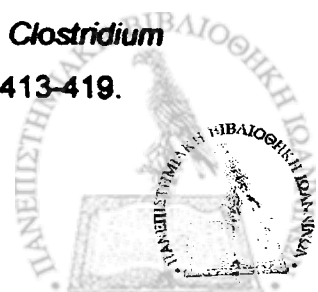
71. Canard B., Saint-Joannis B., Cole S.T. (1992). Genomic diversity and organization of virulence genes in the pathogenic anaerobe *C. perfringens*. *Mol. Microbiol.*, 6 : 1421-1429.
72. Centers for Disease Control and Prevention (1993). Surveillance for water borne disease outbreaks, United States, 1991-1992 *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 42 : 1-22.
73. Chadwick V.S., Chen W. (1999). The intestinal microflora and inflammatory bowel disease. In: *Medical Importance of the Normal Microflora* (Tannock G.W. ed), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 177-221.
74. Chapman M., Grahn M., Boyle M. et al. (1993). Butyrate oxidation is impaired in the colonic mucosa of sufferers of quiescent ulcerative colitis. *Gut*, 35 : 73-77.
75. Cherbut C., Aube A.C., Blottiere H.M., Galmiche J.P. (1997). Effects of short-chain fatty acids on gastrointestinal motility. *Scand. J. Gastroenterol.*, 222 : 58-61.
76. Chiba M., Hoshina S., Kono M., Tobita M., Fukushima T., Iizuka M., Watanabe S. (2001). *Staphylococcus aureus* in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.*, 36 (6) : 615-620.
77. Chon A.W., Guze B. (1974). *Bacteroidaceae bacteremia* : Clinical experience with 111 patients. *Medicine (Baltimore)*, 53 : 93.
78. Chung K.T., Anderson G.M., Fulk G.E. (1975). Formation of indole acetic acid by intestinal anaerobes. *J. Bacteriol.*, 124 : 573-575.
79. Clausen M.R., Bannen H., Tuede M., Mortensen P.B. (1991). Colonic fermentation to short chain fatty acid is decreased in antibiotic-associated diarrhea. *Gastroenterology*, 101 : 1497-1504.
80. Cole S.T., Canard B. (1997). Structure, organization and evolution of the genome of *C. perfringens*. In: Rood J., McClane B., Songer J., Titball R. (eds). *The Clostridia* : London, pp. 49-61.
81. Collier P., Sharp J., Macheod A., Forbes G., Mackay F. (1988). Food poisoning in hospital in Scotland 1971-87. *Epidemiol. Infect.*, 101 (3) : 661-667.
82. Cong Y., Brandwein S.L., McCabe R.P. et al. (1998). CD4 + T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice : increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J. Exp. Med.*, 187 : 855-864.
83. Conrad R., Phelps T.J., Zeikus J.G. (1985). Gas metabolism evidence in support of the juxtaposition of hydrogen-producing and methanogenic bacteria in sewage sludge and lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50 : 595-601.
84. Cook S.I., Sellin J.H. (1998). Short chain fatty acids in health and disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 12 : 499-507.
85. Covacci A.J., Telford L., Del Giudice G. et al. (1999). *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, 284 : 1328-1333.



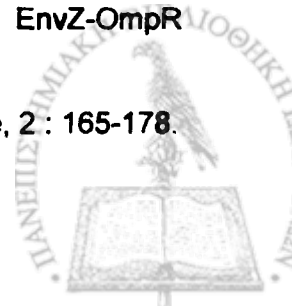
86. Cross R., Arico B., Rappuoli R. (1989). Families of bacteria signal transducing proteins. *Mol. Microbiol.*, 3 : 1661-1667.
87. Croucher S.C., Houston A.P., Bayliss C.E., Turner R.J. (1983). Bacterial populations associated with different regions of the human colon wall. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 : 1025-1033.
88. Crowther J.S. (1971). Transport and storage of faeces for bacteriological examination. *J. App. Bacteriol.*, 34 : 477-483.
89. Cummings J.H., Hill M.J., Bone E.S., Branch W.J., Jenkins D.J.A. (1979). The effect of meat protein and dietary fibre on colonic function and metabolism. II. Bacterial metabolites in faeces and urine. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32 : 2094-2101.
90. Cummings J.H., Macfarlane G.T. (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *J. Parenter. Enteral. Nutr.*, 21 (6) : 357-365.
91. Cummings J.H., Macfarlane G.T., Englyst H.N. (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 : 415-420.
92. DeLong E.F., Wickham G.S., Pace N.R. (1989). Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science*, 243 : 1360-1363.
93. Denton G.R.W., Wood H.R., Suleman N.K., Guerrero A.E.D.L. (2000). The evaluation of several chemical indicators of fecal pollution in relationship to standard microbiological indicators. *Water Resources Research Grant Proposal*.
94. DeZutter L., van Hoof J. (1980). Bacteriological contamination in wastewaters from slaughterhouses. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (B)*, 171 (2-3) : 269-279.
95. DeZutter L., van Hoof J. (1981). Removal of indicator organisms by chemical treatment of wastewater. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (B)*, 173 (3-4) : 266-272.
96. D' Haens G.R., Geboes K., Peeters M., Baert F., Penninckx F., Rutgeerts P. (1998). Early lesions of recurrent Crohn' s disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology*, 114 : 262-267.
97. Dickinson R.J., Dixon M.F., Axon A.T. (1980). Staphylococcal enterocolitis and inflammatory bowel disease. *J. Clin. Pathol.*, 33 (6) : 604-605.
98. Dische F.E., Elok S.D. (1957). Experimental food poisoning caused by *C. welchii*. *Lancet II*, 71.
99. Draser B.S., Goddard P., Heaton S., Peach S., West B. (1976). Clostridia isolated from faeces. *J. Med. Microbiol.*, 9 : 63-71.
100. Duchmann R., Kaiser I., Hermann E., Mayet W., Ewe K., Meyer zum Buschenfelde K-H. (1995). Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.*, 102 : 448-455.



101. Duchmann R., May E., Heike M., Knolle P., Neurath M., Meyer zum Buschenfelde K-H. (1999). T cell specificity and cross reactivity toward enterobacteria, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, and antigens from resident intestinal flora in humans. *Gut*, 44 : 812-818.
102. Ducluzeau R., Raibaud P. (1979). *Ecologie microbienne du tube digestif*. Masson, Paris pp 62-64.
103. Duffy M., O' Mahony L., Coffey J.C., Collins J.K., Shanahan F., Redmond H.P., Kirwan W.O. (2002). Sulfate-reducing bacteria colonize pouches formed for ulcerative colitis but not for familial adenomatous polyposis. *Dis. Colon. Rectum.*, 45(3) : 384-388.
104. Dufour A.P. (1997). *Escherichia coli*, the fecal coliform. In: A.W. Hoadley and B.J. Dutka (eds), *Bacterial Indicators / Health Hazards Associated with Water*. ASTM STP 635, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa, p.48-58.
105. Dugas B., Mercenier A., Lenoir-Wijnkoop I., Arnaud C., Dugas N., Postaire E. (1999). Immunity and probiotics. *Immunol. Today*, 20 : 387-390.
106. Duncan C.L., Strong D.H. (1968). Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 16 : 82-89.
107. Duncan C.L., Strong D.H. (1969). Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell-free product of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.*, 100 : 86-94.
108. Duncan C.L., Labbe R.C., Reich R.R. (1972). Germination of heat and alkali selttered spores of *C. perfringens* type A by lysozyme and an initiation protein. *J. Bacteriol.*, 109 : 505-559.
109. Duncan C.L. (1975). Time of enterotoxin formation and release during sporulation of *C. perfringens* type A. *J. Bacteriol.*, 113 : 932-936.
110. Duncan C.L. (1976). *Clostridium perfringens* pp. 170-197. (In: M. Defiqueiredo and D. Splittstoesser (ed) «Food Microbiology. Public Health and Spoilage Aspects» Avi Publishing Co. Westport, Connecticut).
111. Earhart C.F. (1996). Uptake and metabolism of iron and molybdenum In: *Escherichia coli* and *Samonella* : cellular and molecular biology, 2nd ed., Vol. 1 (F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magnasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger, eds.), ASM Press, Washington, D.C., pp. 1075-1090.
112. Easterbrook T.J., West P.A. (1987). Comparison of most probable number and pour plate procedures for isolation and enumeration of sulphite-reducing *Clostridium* spores and group D fecal *Streptococci* from oysters. *J. Appl. Bacteriol.*, 62 : 413-419.



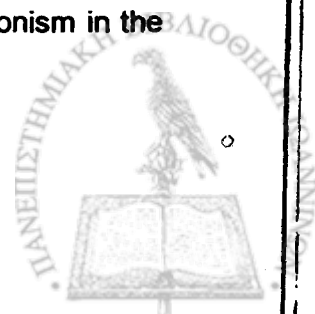
113. Edberg S.C., LeClerc H., Robertson J. (1997). Natural protection of spring and well drinking water against surface microbial contamination. II. Indicators and monitor parameters for parasites. *Crit. Rev. Microbiol.*, 23 (2) : 179-206.
114. Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J., Allen M.J. (2000). *Escherichia coli* : the best biological drinking water indicator public health protection. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*, 29 : 106S-116S.
115. Edmiston C.E. Jr., Anant G.R., Wilson F.A. (1982). Anaerobic bacterial populations on normal and diseased human biopsy tissue obtained at colonoscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43 : 1173-1181.
116. Ellmerich S., Scholler M., Durantou B., Gosse F., Galluser M., Klein J.F. (2000). Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis*, 21(4) : 753-756.
117. Elsdon S.R., Hilton M.G., Walker J.M. (1976). The end products of the metabolism of aromatic amino acids by clostridia. *Arch. Microbiol.*, 107 : 283-288.
118. Elson C.O., Sartor R.B., Tennyson G.S., Riddell R.H. (1995). Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 109 : 1344-1367.
119. Elson C.O. (2000). Commensal bacteria as targets in Crohn' s disease. *Gastroenterology*, 119 : 254-257.
120. Famularo G., De Simone C., Gionchetti P., Campieri M. (2000). The role of digestive microflora and probiotics in inflammatory bowel disease. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2 : 138-145.
121. Fattal B., Vasi R.J., Katzenelson E., Shuval H.I. (1983). Survival of bacterial indicator organisms and enteric viruses in the mediterranean coastal waters of Tel-Aviv. *Water Res.*, 17 (4) : 397-402.
122. Ferguson C.H., Coote B., Ashbolt N.J., Stevenson I.M. (1996). Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water Research*, 30 (9) : 2045-2054.
123. Finegold S.M. (1977). Anaerobic bacteria in human diseases pp 177-185.
124. Finegold S.M., Sutter V.L. (1978). Fecal flora in different populations, with special reference to diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 31 : S116-122.
125. Finegold S.M., Sutter V.L., Mathisen G.E. (1983). Normal indigenous intestinal flora. In: *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. Hentges D.J., ed. Academic Press, London, 3-31.
126. Forst S.A., Roberts D.L. (1994). Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotranfer system in bacteria. *Res. Microbiol.*, 145 : 363-373.
127. Freitas M., Cayuela C. (2000). *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2 : 165-178.



128. Freter R. (1974). Interactions between mechanisms controlling the intestinal microflora. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 2 : 1409-1416.
129. Fries R., Graw C. (1999). Water and air in two poultry processing plants' chilling facie bacteriological survey. *Br. Poult. Sci.*, 40 (1) : 52-58.
130. Fuchs C.S., Giovannucci E.L., Colditz G.A., Hunter D.J., Stampfer M.J., Rosner B., Speizer F.E., Willet W.C. (1999). Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N. Engl. J. Med.*, 340 : 169-176.
131. Fuhrman J.A., McCallum K., Davis A. (1993). Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from Atlantic and Pacific oceans. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 : 1294-1302.
132. Fujioka R.S., Shizumura L.K. (1985). *Clostridium perfringens*, a reliable indicator of streamwater quality. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 57 : 986-992.
133. Fujioka R.S., Shizumura L.K. (1985). *Clostridium perfringens* as a point source indicator in non point polluted streams. *Water Res.*, 23 (2) : 191-197.
134. Fujioka R.S., Oshiro R. (1992). Application of *Clostridium perfringens* to assess the quality of environmental and recreational waters. WRRRC Project Completion Report to Department of Public Works, City and County of Honolulu.
135. Fujioka R.S. (2001). Monitoring coastal marine waters for spore-forming bacterial faecal and soil origin to determine point from non-point pollution. *Water Sci. Technol.*, 44 (7) : 181-188.
136. Fuss I.J., Strober W. (1998). Animal models of inflammatory bowel disease : insights into the immunopathogenesis of Crohn' s disease and ulcerative colitis. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 14 : 476-482.
137. Galfi P., Neogrady S., Veresegyhazi T., Kutas F. (1985). Demonstration of keratinizing effect of n-butyrate on day-old chicken crop epithelium. *Zentralbl. Veterinarmed. A*, 32 : 146-150.
138. Geldreich E.E. (1967). Fecal coliform concepts in stream pollution. *Water Sewage Works*, 114 : 98-110.
139. Geldreich E.E., Kenner B.A. (1969). Concepts of fecal *Streptococci* in stream pollution. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 41 : R335-R352.
140. Geldreich E.E. (1970). Applying bacteriological parameters to recreational water quality. *J. Am. Water Works Assoc.*, 62 : 113-120.
141. Genogeorgis C., Sakaguchi G., Riemann H. (1973). Assay methods for *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Appl. Microbiol.*, 26 : 111-115.
142. Genigeorgis C. (1975). Public health importance of *Clostridium perfringens*. *J.A.V.M.A.*, 167 : 821-827.



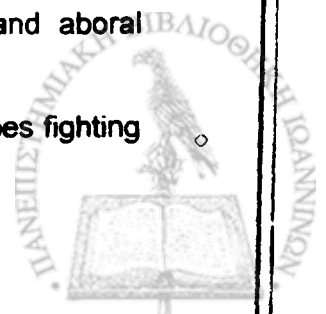
143. Genigeorgis C., Riemann H. (1979). Food processing and hygiene. pp. 613-701. (In: H. Riemann and F.L. Bryan (ed). «Food-borne Infection and Intoxication» (2nd ed), Academic Press, New York and London).
144. Gerhardt P., Marquis R.E. (1989). Spore thermoresistance mechanisms. Washington D.C., American Society for Microbiology, p. 43-63.
145. Geypens B., Claus D., Evenepoel P. et al. (1997). Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. Gut, 41 : 70-76.
146. Gibson G.R., Roberfroid M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. J. Nutr., 125 : 1401-1412.
147. Gibson G.R., Roberfroid M.B., eds. (1999). Colonic Microbiota, Nutrition and Health, Dodrecht : Kluwer Academic.
148. Gilliland S.E., Nelson C.R., Maxwell C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 49 : 377-381.
149. Giovannoni S.J., Britschgi T.B., Moyer C.L., Field K.G. (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. Nature, 345 : 60-62.
150. Goldin B.R. (1986). The metabolism of the intestinal microflora and its relationship to dietary fat, colon and breast cancer. Prog. Clin. Biol. Res., 222 : 655-685.
151. Gorbach S.L., Nahas L., Lerner P.I., Weinstein L. (1967). Studies of intestinal microflora. Gastroenterology, 53 : 845-855.
152. Gordon A.E., Saadi A.T., MacKenzie D.A., Molony N., James V.S., Weir Bisuttill A., Blackwell C.C. (1999). The protective effect of breast feeding in relation to sudden in death syndrome (SIDS) : III. Detection of IgA antibodies in milk that bind to bacterial toxins implicated in SIDS. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 25 (1-2) : 175-182.
153. Gough B., Alford J. (1965). Effect of curing agents on the growth and survival of food-poisoning strains of *C. perfringens*. J. Food Sci., 30 : 1025-1028.
154. Granum P.E., Magnusses J. (1987). The effect of pH on hypochlorite as disinfectant lit. J. Food Microbiol., 4 : 183-186.
155. Granum P.E. (1990). *C. perfringens* toxins involved in food poisoning. Int. J. of Food Microbiol., 10 : 101-112.
156. Gross G.A., Turesky R.J., Fay L.B., Stillwell W.G., Skipper P.L., Tannenbaum S.R. (1993). Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and in grill scrapings. Carcinogenesis, 14 : 2313-2318.
157. Guerinot M.L. (1994). Microbial iron transport. Annu. Rev. Microbiol., 48 : 743-772.
158. Guiot H.F.L. (1982). Role of competition for substrate in bacterial antagonism in the gut. Infect. Immun., 38 : 887-892.



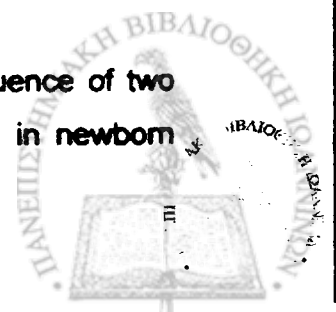
159. Guy-Grand D., Griscelli C., Vassalli P. (1978). The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. Nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *J. Exp. Med.*, 148 : 1661-1677.
160. Hague A., Elder D.J., Hicks D.J., Paraskeva C. (1995). Apoptosis in colorectal tumor cells : induction by the short fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int. J. Cancer*, 60 : 400-406.
161. Hague A., Diaz G.D., Hicks D.J., Krajewski S., Reed J.C., Paraskeva C. (1997). Bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells; however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis. *Int. J. Cancer*, 72 : 898-905.
162. Harig J.M., Soergel K.H., Komorowski R.A., Wood C.M. (1989). Treatment of diversion colitis with short-chain fatty acid irrigation. *N. Eng. J. Med.*, 320 : 23-28.
163. Harper P.H., Lee E.C.G., Kettlewell M.G.W., Bennett M.K., Jewell D.P. (1985). Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis. *Gut*, 26 : 279-284.
164. Hartley M.G., Hudson M.J., Swarbrick E.T., Grace R.H., Gent A.E., Hellier M.D. (1996). Sulphasalazine treatment and the colorectal mucosa-associated flora in ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 10 : 157-163.
165. Hatheway C.L. (1990). Toxigenic Clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.*
166. Hauschild A.H.W., Lecroisey A., Arous J.E. (1973). Purification of *C.perfringens* type C theta toxin. *Can. J. Microbiol.*, 19 : 881-885.
167. Hauschild A.H.W., Hilsheimer R., Griffith D.W. (1974). Enumeration of fecal *C.perfringens* spores in egg yolk free tryptose sulfite cycloserine agar. *Appl. Microbiol.*
168. Hawksworth G.M., Drasar B.S., Hill M.J. (1971). Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds. *J. Med. Microbiol.*, 4 : 451-459.
169. Hazen T.C., Toranzos G.A. (1990). Tropical source water. In: G.A. McFeters (ed), *Drinking Water Microbiology*, Springer-Verlag, New York, pp.32-54.
170. Hazen T.C. (1998). Fecal coliforms as indicators in tropical waters : a review. *Toxic. Assess.*, 3 : 461-477.
171. Health and Welfare Canada (1993). *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality*. Canadian Government Publishing Centre, Ottawa, Canada.
172. Hewitt J., Begg N., Rawat S., Stringer M., Theodore-Ciandi B. (1986). Large outbreaks of *C. perfringens* food poisoning associated with the consumption of boiled salmon. *J. Hyg. Lond.*, 97 (1) : 71-80.
173. Hiorns W.D., Methe B.A., Nierzwicki-Bauer S.A., Zehr J.P. (1997). Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 : 2957-2960.



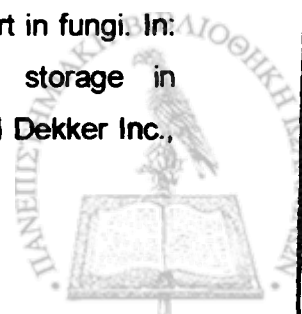
- 174. Hirn J., Viljamaa H., Raevuori M. (1980).** The effect of physicochemical phytoplankton and seasonal factors on faecal indicator bacteria in northern brackish water. *Water Research*, 14 : 279-285.
- 175. Hobbs B.C., Smith M.E., Oakley C.L., Warrack G.H., Cruickshank J.K. (1953).** *Clostridium welchii* food poisoning. *J. Hyg. London* pp 73-75.
- 176. 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).
- 177. Hoffmann J.A.F., Kafatos C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A.B. (1999).** Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284 : 1313-1318.
- 178. Holzapel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J.H.J. (1998).** Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 41 : 85-101.
- 179. Holzapel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U. (2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 : 365-373.
- 180. Holzapel W.H., Schillinger U. (2002).** Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35 (2-3) : 109-116.
- 181. Horing E., Gopfert D., Schroter G., Gaisberg U. (1991).** Frequency and spectrum of microorganisms isolated from biopsy specimens in chronic colitis. *Endoscopy*, 26 : 325-327.
- 182. Hoskins L.C., Agustines M., McKee W.B., Boulding E.T., Kriaris M., Niedermeyer G. (1985).** Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J. Clin. Invest.*, 75 : 944-953.
- 183. Hsing W., Silhavy T.J. (1997).** Function of conserved histidine-243 in phosphatase activity of EnvZ, the sensor for porin osmoregulation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179 (11) : 3729-3735.
- 184. Hughes R., Rowland I.R. (2000).** Metabolic activities of the gut microflora in relation to cancer. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2 : 179-185.
- 185. Hurst C.J., Knudsen C.R., McInerney M.J., Stetzenbach L.D., Walter M.V. (1997).** *Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 1325 Massachusetts Ave., N.W. Washington, D.C. 20005.
- 186. Husebye E., Hellstrom P.M., Midtvedt T. (1994).** Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex. *Dig. Dis. Sci.*, 39 : 946-956.
- 187. Isolauri E., Arvola T., Sutas Y., Salminen S. (1999).** Probiotics : microbes fighting allergic disease. In press.



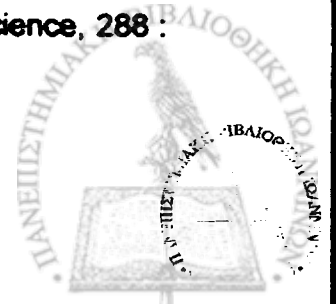
188. Isolauri E., Sutas Y., Kankaanpaa P., Arvillomi H., Salminen S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73 : 444S-450S.
189. Ispolatovskaya M.V. (1972). Ype A *C. perfringens* toxin. In: Kadis S., Montie T.C., and Ajk S.J. (eds). *Microbial Toxins*, pp. 109-158, London.
190. Jackson S.G., Yip-Chuck D.A., Brodsky M.H. (1986). Evaluation of the diagnostic application of an enzyme immunoassay for *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Appl. Env. Microbiol.*
191. Janowitz H.D., Croen E.C., Sacher D.B. (1998). The role of the fecal stream in Crohn's disease : an historical and analytical review. *Inflamm. Bowel Dis.*, 4 : 29-39.
192. Jenkins D.J. (1989). Editorial. *Am. J. Gastroenterol.*, 84 : 1362-1364.
193. Johansson M-L., Molin G., Jeppsson B., Nobaek S., Ahme S., Bengmark S. (1993). Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: *in vivo* colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 : 15-20.
194. Johnstone K., Holland K.T. Ultra structural changes during sporulation of *C. bifementans*. *J. Gen. Microbiol.*, 100 : 217-220.
195. Johnston R.B. (2001). Clinical aspects of chronic granulomatous disease. *Curr. Opin. Hematol.*, 8 : 17-22.
196. Kaiser C.W., Milgrom M.L., Lynch J.A. (1986). Distant nontraumatic clostridial myonecrosis and malignancy. *Cancer*, 57 (4) : 885-889.
197. Karlsson K-A. (1989). Animal glucosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Annu. Rev. Biochem.*, 58 : 309-350.
198. Katayama S., Dupuy B., Garnier T., Cole S.T. (1995). Rapid expansion of the physical and genetic map of the chromosome of *C. perfringens* CPN50. *J. Bacteriol.*, 177 : 5580-5585.
199. Keighley M.R.B., Arabi Y., Dimock F., Burdon D.W., Allan R.N., Alexander-Williams J. (1978). Influence of inflammatory bowel disease on intestinal microflora. *Gut*, 19 : 1099-1104.
200. Kikugawa K., Kato T. (1986). Formation of a mutagenic diazoquinone by interaction of phenol with nitrite. *Fd. Chem. Toxicol.*, 26 : 209-214.
201. Kim N.H., Park J.P., Jeon S.H., Lee Y.J., Choi H.J., Jeong K.M., Lee J.G., Lim J.H., Kim Y.H., Kim Y.S., Kim Y.M., Hwang M.H., Cho J.W., Moon S.K., Jeong J.W. (2002). Purulent pericarditis caused by group C streptococcus as an presentation of colon cancer. *J. Korean Med. Sci.*, 17 (4) : 571-573.
202. Kleesen B., Bunke H., Tovar K., Noack J., Sawatzki G. (1995). Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants. *Acta Paediatr.*, 84 (12) : 1347-1356.



203. Kleesen B., Sykura B., Zunft H-J, Blaut M. (1997). Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity and bowel habit in elderly constipated persons. *Am. J. Clin. Nutr.*, 65 : 1397-1402.
204. Kleesen B., Bezirtzoglou E., Matto J. (2000). Culture-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microflora. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2 : 53-63.
205. Kosloske A.M. (1979). Necrotizing enterocolitis in the neonate. *Surg. Gynecol.*
206. Kosloske A.M., Ball W.S. Jr., Umland E., Skipper B. (1985). Clostridial necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.*, 20 (2) : 155-159.
207. Krebs C. J (1972). *Ecology. The experimental analysis of distribution and abundance.* Harper and Row, New York.
208. Kreft B., Dalhoff K., Sack K. (2000). Necrotizing enterocolitis : a historical and current review. *Med. Klin.*, 95 (8) : 435-441.
209. Kru J. (1982). Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol. Cell Biochem.*, 42 : 65-82.
210. Kueh C.S.W., Tam T-Y., Lee T., Wong S.L., Lloyd O.L., Yu I.T.S., Wong T.W., Tam J.S., Bassett D.C.J. (1995). Epidemiological study of swimming-associated illness relating to bathing-beach water quality. *Water Science and Technology*, 31 (5-6) : 1-4.
211. Labbe R.G., Norris K.E. (1982). Evaluation of plating media for recovery of heated *Clostridium perfringens* spores. *J. Food Prot.*, 45 : 686-688.
212. Labbe R.G. (1989). *Clostridium perfringens* in Doyle M. (ed). *Food borne bacterial pathogens*, New York, pp. 191-234.
213. Labbe R.G. (2000). *The microbiological safety and quality of food U.S.A.*, pp. 1110-1135.
214. Layton D.W., Bogen K.T., Knize M.G. et al. (1995). Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods : an analysis and implications for research. *Carcinogenesis*, 16 : 39-52.
215. Lawrence G., Shann F., Freestone D.S., Walker P.D. (1979). Prevention of necrotising enteritis in Papua New Guinea by immunisation. *Lancet*, 1 (8110) : 227-230.
216. Ledger W., Hackett K. (1973). Significance of Clostridia in the female reproductive tract. *Obstet. Gynecol.*, 41 : 525.
217. Leeming R., Nichols P.D. (1996). Concentrations of coprostanol that correspond to existing bacterial indicator guideline limits. *Water Research*, 30(12): 2997-3006.
218. Leong S.A., Winkelmann G. (1998). Molecular biology of iron transport in fungi. In: *Metal ions in biological systems*, Vol. 135, Iron transport and storage in microorganisms, plants, and animals (A. Sigel and H. Sigel, eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 147-186.



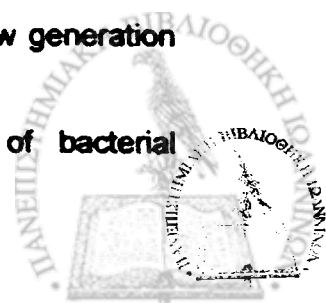
219. Lester W.E., Evans C.R., Lester T.M. (1995). *Microbiology a Human perspective*. Win-C. Brown Publishers.
220. Levison M.E., Bush L.M. (1990). Peritonitis and other intra-abdominal infections. In: Mandell G.L., Douglas R.G. Jr., Bennett J.E. (eds). *Principles and practice of infection disease*, 3rd ed. Churchill Livingstone, 60 : 636.
221. Lidbeck A., Overvick E., Rafter J., Nord C.E., Gustafsson J.A. (1992). Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on mutagen excretion in faeces and urine in humans. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 5 : 59-67.
222. Loftus E.V. Jr., Silverstein M.D., Sandborn W.J., Tremaine W.J., Harmsen W.S., Zinsmeister A.R. (1998). Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993 : incidence, prevalence, and survival *Gastroenterology*, 114 : 1161-1168
223. Long S., Jones D.T., Woods D.R. (1983). Sporulation of *C. acetobutylicum* P262 in a defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 : 1389-1393.
224. Lucena F., Araujo R., Jofre J. (1996). Usefulness of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* as index microorganisms of remote faecal pollution. *Water Research*, 30 (11) : 2812-2816.
225. Lyerly D.M., Wilkins T.D. (1995). *Clostridium difficile*. In: Blaser M J., Smith P.D., Ravdin J.I., Greenberg H.B., Guerrant E.L., eds. *Infections of the gastrointestinal tract*. New York : Raven Press, 867-891.
226. Macaluso A., Simmang C., Anthony T. (1998). *Streptococcus sanguis* bacteremia and colorectal cancer. *South Med. J.*, 91 (2) : 206-207.
227. Macfarlane G.T., Macfarlane S. (1997). Human colonic microbiota : ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, 222 : 3-9.
228. Macfarlane S., Hopkins M.J., Macfarlane G.T. (2000). Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2 : 64-72.
229. MacKenzie W.R., Hoxie N.J., Proctor M.E., Gradus M.S., Blair K.A., Peterson D.E., Kazmierczak J.J., Addiss D.G., Fox K.R., Rose J.B., Davis J.P. (1994). A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.*, 331 : 161-167.
230. Mackowiak P.A. (1982). The normal microbial flora. *New Engl. J. Med.*, 307 : 83-93.
231. Macpherson A.J., Gatto D., Sainsbury E. (2000). A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*, 288 : 2222-2226.



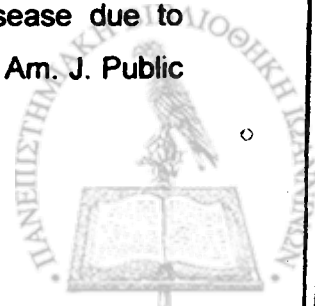
232. Madsen K.L., Doyle J.S., Jewell L.D., Tavernini M.M., Fedorak R.N. (1999). *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology*, 116 : 1107-1114.
233. Mahony D., Gilliatt E., Dawson S., Stockdale E., Lee S. (1989). Vero cell assay rapid detection of *C. perfringens* enterotoxin. *Appl. Env. Microbiol.*
234. Margulis L., Fester R. (1991). Symbiosis as a source of evolutionary innovation : speciation and morphogenesis, Cambridge Mass : MIT Press.
235. Marsh P. (1980). The normal oral flora. In: March P., Oral Microbiology. Aspects of Microbiology Series, Surrey : Nelson, 11-24.
236. Martin H.M., Rhodes J.M. (2000). Bacteria and inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 13 : 503-509.
237. McClane B.A. (1997). *Clostridium perfringens*. *Food Microbiology* pp 289-291.
238. McClane B.A. (1997). *Clostridium perfringens*. In: Doyle M.P., Beuchat L. and Montville T.T. (eds). *Food Microbiology : fundamentals and frontiers*, pp. 305-326.
239. McCleary W.R., Stock J.B., Ninfe A.J. (1993). Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *Bacteriol.*, 175 : 2793-2798.
240. McDonnell J.L. (1974). *In vivo* effects of *Clostridium perfringens* enteropathogenic factors on the rat ileum. *Infect-Immunity*, 10 : H56-H62.
241. McDonnell J.L. (1979). *Clostridium perfringens* toxin (type A, B, C, D, E). *Pharmacol. Ther.*, 10 : 617-635.
242. McFeters G.A., Bissonnette G.K., Jezeski J.J., Thomson C.A., Stewart D.G. (1974). Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Appl. Microbiol.*, 27 : 823-829.
243. McIntyre A., Gibson P.R., Young G.P. (1993). Butyrate production from dietary fiber and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut*, 34 : 386-391.
244. Metchnikoff E. (1908). Prolongation of life. Putnam, New York.
245. Mitsuoka T. et al. (1982). Recent trends in research of intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora*, 1 (1) : 3-24.
246. Mitsuoka T. (1996). Intestinal flora and human health. *Acta Pacific J. Clin. Nutr.*, 5 : 2-9.
247. Miwa T. (1975). Clostridia in soil of the Atlantica. *J. Med. Sci. Biology* pp 177.
248. Moat G., A., Foster W.J. (1995). *Microbial Physiology*, John Wiley and sons, Inc. Publication pp 48, 177-185, 341-342.
249. Mogensen G., Rowland I., Midtvedt T., Fonden R. (2000). Functional aspects of pro- and prebiotics. A literature review on immune modulation and influence on cancer. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2 : 40-44.



250. Moore W.E.C., Cato E.P., Holdeman L.V. (1969). Anaerobic bacteria of the gastrointestinal flora and their occurrence in clinical infections. *J. Infect. Dis.*, 119: 641-649.
251. Moore W.E.C., Holdeman L.V. (1974). Human fecal flora : the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.*, 27 : 961-979.
252. Moore W.E.C., Holdeman L.V. (1975). Discussion of current bacteriological investigations of the relationships between intestinal flora, diet and colon cancer. *Cancer Res.*, 35 : 3418-3420.
253. Mouricout M. (1997). Interactions between the enteric pathogen and the host. An assortment of bacterial lectins and a set of glycoconjugate receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 412 : 109-123.
254. Mozes N., Rouxhet P.G. (1992). Influence of surfaces on microbial activity. In: Melo L.F., Bott T.R., Capdeville B. (ed) *Biofilms-Science and Technology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 125-136.
255. Mulder R.W., Bolder N.M. (1981). The effect of different bird washers on the microbiological broiler carcasses. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 106 (14) : 124-130.
256. Mullie C., Romond M.B., Yazourh A., Behra-Miellet J., Libersa C., Bezirtzoglou E., Romond C. (1999). Influence of neuroemotional stress on fecal carriage of *C.perfringens*. MEHD.
257. Mullie C., Romond M.B., Yazourh A., Behra-Miellet J., Bezirtzoglou E., Romond C. (2001). Modulation of bacterial translocation in mice mediated through viable *Bifidobacterium breve* or cell-free whey intake. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13 : 160-165.
258. Nagengest F.M., Grubben M.J.A.L., Van Munster I.P. (1995). Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur. J. Cancer*, 31A : 1067-1070.
259. Namavar F., Theunissen E.B.M., Verweij-Van Vught A.M., Peerbooms P.G., Bal M., Hotsma H.F., MacLaren D.M. (1989). Epidemiology of the *Bacteroides fragilis* group in the colonic flora in 10 patients with colon cancer. *J. Med. Microbiol.*, 29 : 171-176.
260. Nayahama M., Sakurai J. (1992). *J. Infect. Immunol.*, 60 : 1237-1240.
261. Neut G., Bezirtzoglou E., Romond C., Beerens H., Delcroix M., Noel A.M. (1987). Bacterial colonization of the large intestine in newborns delivered by cesarean section. *Zbl. Bakt. Hyg. A*, 266 : 330-357.
262. Novak J., Juneja V.K. (2002). *Clostridium perfringens* : hazards in new generation foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3 (2) : 127-132.
263. O' Boyle C.J., MacFie J., Mitchell C.J. (1998). Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut*, 42 : 29-35.



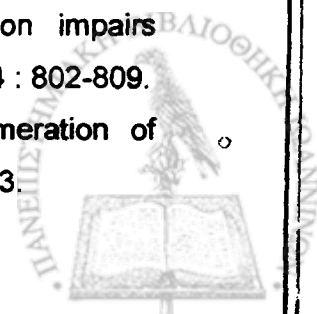
264. Ohkusa T., Okayasu I., Tokoi S. et al. (1993). Bacterial invasion into the colonic mucosa in ulcerative colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 8 : 116-118.
265. O' Keefe S.J., Kidd M., Espitalier Noel G., Owira P. (1999). Rarity of colon cancer in Africans is associated with low animal product consumption, not fiber. *Am. J. Gastroenterology*, 94 : 1373-1380.
266. Olson G.B., Wostman B.S. (1966). Lymphocytopoiesis, phasmacytopoiesis and cellular proliferation in non-antigenically stimulate germfree mice. *J. Immunol.*, 97 : 267.
267. Onderdonk A.B., Bartlett J.G. (1979). Bacteriological studies of experimental ulcerative colitis. *Am. J. Nutr.*, 32 : 258-263.
268. Oragui J.I., Mara D.D. (1983). Investigation of the survival characteristics of *Rhodococcus coprophilus* and certain fecal indicator bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 46 : 356-360.
269. Otto B.R., Verweij-van Voght A.M.J.J., MacLaren D.M. (1992). Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Revs. Microbiol.*, 18 : 217-233.
270. Ovreas L., Forney L., Daae F.L., Torsvik V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannent, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-apmlified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 : 3367-3373.
271. 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.
272. Parkinson J.S., Kofoid E.C. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 26 : 71-112.
273. Parmas J. The effects of *C. perfringens* beta-toxin (type C) on the mobility of intestinal segments *in vitro*. *Abstr. Zentralblat. Bakteriolog.*, 234 : 243-246.
274. Pasolini B., Alois M., Ceralli M. (1981). Various types of fresh pasta. Preliminary studies on the microflora, with special consideration of pathogens (*Salmonellae*, *Staphylococci*, *Clostridium perfringens*). *Rivista della societa Italians di Scienza dell Alimentazione*, 10 : 165-174.
275. Payne S.M. (1993). Iron acquisition in microbial pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 1 : 66-152.
276. Payment P.L., Richardson L., Siemiatycki J., Dewar R., Edwards M., Franco E. (1991). A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumption of drinking water meeting current microbiological standards. *Am. J. Public Health*, 81 : 703-708.



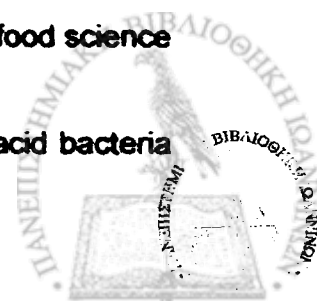
277. Peach S., Lock M.R., Katz D., Todd I.P., Tabaqchali S. (1978). Mucosal-associated bacterial flora of the intestine in patients with Crohn's disease and in a control group. *Gut*, 19 : 1034-1042.
278. Peach S.L., Tabaqchali S. (1982). Mucosa-associated flora of the human gastrointestinal tract in health and disease. *Eur. J. Chemother. Antibiot.*, 2 : 41-50.
279. Pelto L., Isolauri E., Lillus E., Nuutila J., Salminen S. (1999). Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immune stimulatory effect in healthy subjects. *Clin. Exp. Allergy*, 28 : 1474-1479.
280. Pence B.C., Landers M., Dunn D.M., Shen C.L., Miller M.F. (1998). Feeding of a well cooked beef diet containing a high heterocyclic amine content enhances colon and stomach carcinogenesis in 1, 2-dimethylhydrazine treated rats. *Nutr. Cancer*, 30: 220-226.
281. Peterson L., Mshar R., Cooper G., Bruce A., Hadler J. (1988). A large *C.perfringens* food-borne outbreak with an unusual attack rate pattern. *Am. J. Epidemiol.*, 127 (3) : 605-611.
282. Petrillo T.M., Beck-Sague C.M., Songer J.G., Abramowsky C., Fortenbor J.D., Meacham L., Dean A.G., Lee H., Bueschel D.M., Nesheim S.R. (2000). *N. Engl. J. Med.*, 342 (17) : 1250-1253.
283. Petrillo T.M., Beck-Sague M., Songer C.J. et al. (2000). Enteritis necroticans (Pigbel) in a diabetic child. *The New Engl. Journal of Medicine*.
284. Pickett M.W., Weiss N., Kelly D.J. (1994). Gram-positive cell wall structure of the A3 gamma type in heliobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 122 (1-2) : 7-12.
285. 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.
286. Pitcher M., Cummings J.H. (1996). Hydrogen sulphide : a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut*, 39 : 1-4.
287. Poulsen L.K., Licht T.R., Rang C., Krogfeldt K.A., Molin S. (1995). Physiological state of *Escherichia coli* BJ4 growing in the large intestines of streptomycin-treated mice. *J. Bacteriol.*, 177 : 5840-5845.
288. Pourcher A.M., Derriese L.A., Hernandez J.F., Delattre J.M. (1991). Enumeration by a miniaturized method of *E. coli*, *S. bovis* and *Enterococci* as indicators of the origin of faecal pollution of waters. *J. Appl. Bacteriol.*, 70 : 525-530.
289. Poxton I.R., Brown R., Sawyerr A., Ferguson A. (1997). Mucosa-associated bacterial flora of the human colon. *J. Med. Microbiol.*, 46 : 85-91.



290. Prescott M.L., Harley P.J., Klein D.A. (1999). Microbiology, 4th edition by WCB/McCraw-Hill pp 586, 833-845, 853-863, 876-879.
291. Prub B.M., Wolfe A.J. (1994). Regulation of acetyl phosphate synthesis and degradation, and the control of flagellar expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 12 (6) : 973-984.
292. Pruzzo C., Capretti R., Mastrantonio P. (2000). Short chain fatty acids, menaquinones and ubiquinones and their effects on the host. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2 : 209-215.
293. Pullen R.D., Thomas G.A.O., Rhodes M., Newcombe R.G., Williams G.T., Allen A., Rhodes J. (1994). Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut*, 35 : 353-359.
294. Reddy B.S. (1998). Prevention of colon cancer by pre and probiotics : evidence from laboratory studies. *Br. J. Nutr.*, 80 : S219-S223.
295. Reddy B.S. (1999). Role of dietary fiber in colon cancer : an overview. *Am. J. Med.*, 106 : 16S-9S.
296. Reichardt P., Dahnert I., Tiller G., Hausler H.J. (2002). Possible activation of an intramyocardial inflammatory production *Staphylococcus aureus* after treatment with infliximab in a patient with Crohn disease. *Eur. J. Pediatr.*, 161 (5) : 281-283.
297. Rho M.J., Chung M.S., Lee J.H., Park J. (2001). Monitoring of microbial hazards at farms, slaughterhouses, processing lines of swine in Korea. *J. Food Prot.*, 64 (9) : 1388-1391.
298. Rhodes J.M., Black R.R., Gallimore R., Savage A. (1985). Histochemical demonstration of desialation and desulphation of normal and inflammatory bowel disease rectal mucus by faecal extracts. *Gut*, 26 (12) : 1312-1318.
299. Richardson K.J., Stewart M.H., Wolfe R.L. (1991). Application of gene probe technology to the water industry. *J. Am. Water Works Assoc.*, 83 : 71-81.
300. Roediger W.E.W. (1980). Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*, 21 : 793-798.
301. Roediger W.E. (1982). Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology*, 83 : 424-429.
302. Roediger W.E.R., Heyworht M., Willoughby P., et al. (1982). Luminal ions and short chain fatty acids as markers of functional activity of the mucosa in ulcerative colitis. *J. Clin. Pathol.*, 35 : 323-326.
303. Roediger W.E.W. (1993). Reducing sulfur compounds of the colon impairs colonocyte nutrition : implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 104 : 802-809.
304. Romond C., Beerens H., Criquelion J., Lepage C. (1981). Enumeration of *C.perfringens* in river water by using a new procedure. *Anaerobe*, 2 : 169-173.



305. Romond C., Beerens H., Criquelion J., Lepage C. (1981). Enumeration of *C.perfringens* in foods. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 74 : 181-184.
306. Rottimi V.O., Duerden B. (1981). The development of the bacterial flora in normal neonates. *J. Med. Microbiol.*, 15 : 51-62.
307. Royall D., Wolever T.M.S., Jeejeebhoy K.N. (1990). Clinical significance of colonic fermentation. *Am. J. Gastroenterol.*, 83 : 424-429.
308. Rowland I.R., Mallett A.K., Wise A. (1985). The effect of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 16 : 31-103.
309. Ruseler-van Embden J.G.H., Both-Patoir H.C. (1983). Anaerobic gram-negative faecal flora in patients with Crohn's disease and healthy subjects. *Antonie of Leuwenhoeck*, 49 : 125-132.
310. Ruseler-van Embden J.G., Schouten W.R., van Lieshout L.M. (1994). Pouchitis : result of microbial imbalance? *Gut*, 35 (5) : 658-664.
311. Rutgeerts P., Geboes K., Vantrappen G., Beyls J., Kerremans R. , Hiele M. (1990). Predictability of the postoperative course of Crohn' s disease. *Gastroenterology*, 99 : 956-963.
312. Rutgeerts P., Geboes K., Peeters M. et al. (1991). Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn' s disease in the neoterminal ileum. *Lancet*, 338: 771-774.
313. Saito Y., Takano T., Rowland I.R. (1992). Effects of soybean oligosacchandes on the human gut microflora in *in vitro* culture. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 5 : 105-110.
314. Sakata T., Tamate H. (1978). Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. *J. Dairy Sci.*, 61 : 1109-1113.
315. Sakrer M.R., Shivers R., Sparks S., Juneja V.K., McClane B.A. (2001). Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *C. perfringens* isolates carrying plasmid verduis chromosomal enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 : 3234-3240.
316. Sakurai J., Duncan C.L. (1978). Some properties of beta-toxin produced by *C.perfringens* type C. *Infect. Immun.*, 21 : 678-680.
317. Sakurai J., Fujii Y., Matsuura M., Endo K. (1981). Pharmacological effect of beta-toxin of *C. perfringens* type C on rats. *Microbiol. Immun.*, 25 : 423-432.
318. Sakurai J., Kobayashi A. (1995). Lethal and dermonecrotic activities of *C.perfringens* iota toxin : biological activities induced by cooperation of two nonlinked components. *Microbiol. Immunol.*, 39 : 249-253.
319. Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M.C. et al. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.*, 80 : S147-S171.
320. Salminen S., Deighton M.A., Benno Y., Gorbach S.L. (1998). Lactic acid bacteria in health and disease, pp. 211-253.

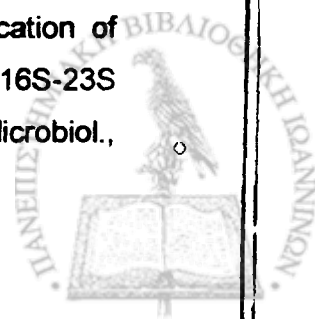


- 321. Salminen S., Tuomola E.M. (1998).** Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 41 : 45-51.
- 322. Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A.C., Holzapfel W.H. (2000).** Safety assessment of starters and probiotics. In: M. Adams and R. Nout (eds). *Fermentation and food safety*, Aspen Publishers, Gathersburg, MD, pp. 239-251.
- 323. Salmond G.P., Bycroft B.W., Stewart G.S., Williams P. (1995).** The bacterial «enigma» : cracking the code of cell-cell communication. *Mol. Microbiol.*, 16 : 615-624.
- 324. Salvat G., Coppin P., Allo J.C., Fenner S., Laisney M.J., Toquin M.T., Colin P. (1997).** Effects of AvGard treatment on the microbiological flora of carcasses. *Br. Poult. Sci.*, 38 (5) : 489-498.
- 325. Sartor R.B. (1997).** Enteric microflora in IBD : pathogens or commensals? *Inflamm. Bowel Dis.*, 3 : 230-235.
- 326. Sartor R.B. (1997).** The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Res. Immunol.*, 148 : 567-576.
- 327. Sartor R.B. (1998).** Postoperative recurrence of Crohn' s disease : the enemy is within the fecal stream. *Gastroenterology*, 114 : 398-407.
- 328. Sartor R.B. (2000).** Colitis in HLA-B27/beta 2 microglobulin transgenic rats. *Int. Rev. Immunol.*, 19 : 39-50.
- 329. Schaekhter Moselion Ph.D., Medoff Gerald M.D., Eisenstein M.D. (1993).** *Mechanisms of Microbial Disease*. 2nd Edition Williams and Wilkins, p. 23.
- 330. Scheppach W., Bartran H.P., Richter F. (1995).** Role of short chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur. J. Cancer*, 31A : 1077-1080.
- 331. Scheppach W., Luehrs H., Menzel T. (2001).** Beneficial health effects of low-digestible carbohydrate consumption. *British Journal of Nutrition*, 85 (1) : 823-930.
- 332. Schets F.M., Medema G.J. (1995).** Evaluation of the membrane filtration method on mCP-agar for determination of *Clostridium perfringens* spores in water. RIVM, Rapport 289202007.
- 333. Schiffrin E.J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschlimann J.M., Donnet-Hughes A. (1995).** Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 78 : 491-497.
- 334. Schiffrin E.J., Brassart D., Servin A.L., Rochat F., Donnet-Hughes A. (1997).** Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66 : 15S-20S.
- 335. Schuler-Malyoth R., Ruppert A., Muller F. (1968).** Die Mikroorganismen der Bifidusgruppe (syn. *Lactobacillus bifidus*). 2. Mitteilung : Die Technologie der Bifiduskultur im milchverarbeitenden Betrieb. *Milchwissenschaft*, 23 : 554-558.

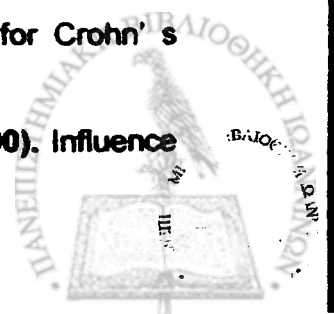


336. Seeliger H., Werner H. (1963). Recherches qualitatives et quantitatives sur la flore intestinale de l' homme. Ann. Inst. Pasteur, 105 : 911-936.
337. Severin W.P., De la Fuente A.A., Stringer M.F. (1984). *Clostridium perfringens* type C causing necrotising enteritis. J. Clin. Pathol., 37 (8) : 942-944.
338. Seyfried P.L., Tobin R.S., Brown N.E., Ness P.F. (1985). A prospective study of swimming-related illness. II. Morbidity and the microbiological quality of water. Am. J. Public Health, 75 : 1071-1074.
339. Shanahan F. (2001). Inflammatory bowel disease : immunodiagnostics, immunotherapeutics and ecotherapeutics. Gastroenterology, 120 : 622-635.
340. Shandera W.X., Tacket C.O., Blake P.A. (1983). Food poisoning due to *C.perfringens* in the United States. J. Infect. Dis.
341. Shiloh M.U., MacMicking J.D., Nicholson S. et al. (1999). Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. Immunity, 10 : 29-38.
342. Shimizu T., Ohtani K., Hirakawa H., Ohshima K., Yamashita A., Shiba T., Ogasawara N., Hattori M., Kuhara S., Hayashi H. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99 (2) : 996-1001.
343. Siegert C.E., Overbosch D. (1995). Carcinoma of the colon presenting as *Streptococcus sanguis* bacteremia. Am. J. Gastroenterol., 90 (9) : 1528-1529.
344. Silvester K.R., Bingham S.A., Pollock J.R.A., Cummings J.H., O' Neil I.K. (1997). Effect of meat and resistant starch on faecal excretion of apparent total N-nitroso compounds and ammonia from the human large bowel. Nutr. Cancer, 29 : 13-23.
345. Simberloff D., Alexander M. (1994). Biological stressors, p. 6-1-6-10. In: Ecological Risk Assessment Issue Papers. EPA/630/R-94/009 U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
346. Simon G.L., Gorboach S.L. (1984). Intestinal flora in health and disease. Gastroenterology, 86 : 174-193.
347. Simpson J.M., Santo Domingo J.W., Reasoner D.J. (2002). Microbial source tracking : state of the science. Environ. Sci. Technol., 36 (24) : 5279-5288.
348. Slauch J.M., Garrett S., Jackson D.E., Silhavy T.J. (1988). EnvZ functions through OmpR to control porin gene expression in *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology, 170 (1) : 439-441.
349. Smith H.W., Crabb W.E. (1961). The fecal bacterial flora of animals and man. Its development in the young. J. Pathol. Bacteriol., 82 : 53-66.
350. Smith L. D.S., Holdeman L.V. (1968). The pathogenic anaerobic bacteria, pp. 201-255. Charles C. Thomas. Springfield, Illinois, U.S.A.

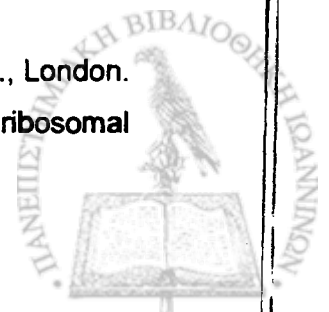
351. **Smith L. DS. (1971).** Factors affecting the growth of *Clostridium perfringens*. In: SOS/70 Proc. 3rd Intern. Cong. Food Sc. Technol., Inst. Food Technol., Chicago.
352. **Smith H.W., Linggood M.A. (1971).** Observations on the pathogenic properties of the K88, HLY and ENT plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhoea. *J. Med. Microbiol.*, 4 : 467-485.
353. **Smith H.W., Williams B. (1984).** Clostridia in the pathogenic anaerobic bacteria. Charles C. Thomas, Springfield, 11 : 101-136.
354. **Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (1986).** In: *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology* (Williams & Wilkins, Baltimore).
355. **Sobsey M.D., Handzel T., Venczel L. (2003).** Chlorination and safe storage of household drinking water in developing countries to reduce waterborne disease. *Water Sci. Technol.*, 47 (3) : 221-228.
356. **Sorensen D.L., Eberl S.G., Dicksa R.A. (1989).** *Clostridium perfringens* as a point source indicator in non-polluted streams. *Water Research*, 23 : 191-197.
357. **Stark P.L., Lee A. (1982).** The microbial ecology of the large bowel of breastfed and formulated infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol.*, 15 : 189-203.
358. **Stathopoulos C., Georgiou G., Earhart C.F. (1996).** Characterization of *Escherichia coli* expressing an Lpp OmpA (46-159)-PhoA fusion protein localized in the outer membrane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45 : 112-119.
359. **Steidler L., Hans W., Schotte L. (2000).** Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, 289 : 1352-1355.
360. **Sterne M., Warrack G.H. (1964).** The types of *C. perfringens*. *J. Pathol. Bacteriol.*, 88 : 279-283.
361. **Strong D.H., Poster E.F., Duncan C.L. (1970).** Influence of water activity on the growth of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 19 : 980-987.
362. **Sungkanuparph S., Chansirikarnjana S., Vorachit M. (2002).** *Scand. J. Infect. Dis.*, 34 (12) : 941-943.
363. **Tanaka Y., Bush K., Eguchi T., Ikekawa N., Takaguchi T., Kobayashi Y., Higgins P.J. (1990).** Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and its analogs on butyrate-induced differentiation of Ht-29 human colonic carcinoma cells and on reversal of the differentiated phenotype. *Arch. Biochem. Biophys.*, 276 : 415-423.
364. **Tang S.S., Labbe R.G.** Mode of action of *Clostridium perfringens* initiation protein (sporolytic enzyme). *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 138 (6) : 597-608.
365. **Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S. et al. (1997).** Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 : 4264-4267.



366. Taylor K.D., Rotter J.I., Yang H. (2001). Genetics of inflammatory bowel disease. In: Targan S.R., Shanahan F., Karp L.C., eds. *Inflammatory Bowel Disease : From Bench to Bedside* 2nd edn. Dordrecht : Kluwer Academic.
367. Titball R.W. (1997). Bacterial phospholipase. *Trends Microbiol.*, 7 : 265.
368. Tokishita S-I., Kojima A., Alba H., Mizuno T. (1991). Transmembrane signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli* Functional importance of the periplasmic domain of the membrane-located protein kinase, EnvZ. *J. Biol. Chem.*, 266 : 6780-6785.
369. Tropko L.V. (2000). Comparative evaluation of effectiveness of the effect of antibody and bacterial substances on clinical strains of *Staphylococcus* isolated from patients with nonspecific ulcerative colitis *Mikrobiol Z.*, 62 (4) : 38-42.
370. Tuomola E.M., Salminen S. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cultures. *Int J. Food Microbiol.*, 41 : 45-51.
371. Turesky R.J., Markovic J., Bracco-Hammer I., Fay L.B. (1991). The effect of dose on cytochrome P450 induction on the metabolism and disposition of the food borne carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in the rat. *Carcinogenesis*, 12 : 1847-1855.
372. Turscan J., Varga I., Turscan Z., Szigeti J., Farkas L. (2001). Occurrence of anaerobic bacterial, clostridial, and *C. perfringens* spores in raw goose livers from a poultry processing plant in Hungary. *J. Food Prot.*, 81 : 1252-1254.
373. Tytgat G.N.J., Mulder C.J.J., Brummelkamp W.H. (1988). Endoscopic lesions in Crohn's disease early after ileocecal resection. *Endoscopy*, 20 : 260-262.
374. Uemura T., Genigeorgis C., Riemann P.H., Franti C.E. (1974). Antibody against *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in human sera. *Infect. Immun.*, 9 : 470-471.
375. Uemura T., Skjelkvale R. (1976). An enterotoxin produced by *C. perfringens* type D. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*
376. U.S. Environmental Protection Agency (1986). *Ambients Water Quality Criteria for Bacteria*. EPA 44015-84-002. Office of Regulations and Standards, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
377. U.S. Environmental Protection Agency (1994). *National Primary Drinking Water Standards*. EPA 810-F-94-001A. Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
378. Van de Merwe J.P., Stegeman J.H., Hazenberg M.P. (1983). The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Antonie van Leeuwenhoek*, 49 : 119-124.
379. Van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W., Zehnder A.J.B. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol. Rev.*, 54 : 75-87.

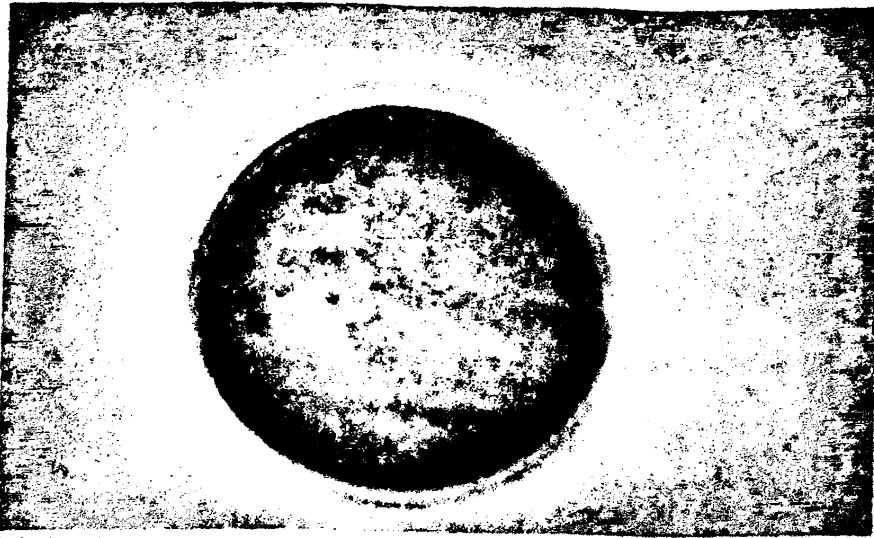


380. Vernia P., Merchelegiano R., Caprilli R., Frieri G., Corrado G., Valpiani D. (1995). Short chain fatty acid topical treatment in distal ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 9 : 309-313.
381. Visek W.K. (1978). Diet and cell growth modulation by ammonia. *Am. J. Clin. Nutr.*, 31 : S216-220.
382. Wadolowski E.A., Laux D.C., Cohen P.S. (1988). Colonization of the streptomycin-treated mouse large intestine by a human faecal *Escherichia coli* strain: role of growth in mucus. *Infect. Immun.*, 56 : 1030-1035.
383. Waisberg J., Matheus Cde O., Pimenta J. (2002). Infectious endocarditis from *Streptococcus bovis* associated colonic carcinoma : case report and literature review. *Arq. Gastroenterol.*, 39 (3) : 177-180.
384. Walch M., Colwell R.R. (1994). Detection of nonculturable indicators and pathogens, p. 258-273. In: C.R. Hackney and M.D. Pierson (eds), *Environmental Indicators and Shellfish Safety*. Chapman and Hall, New York.
385. Walker H.U. (1976). Aerobic and anaerobic spore-forming bacteria and food spoilage, pp. 356-386 (In: M. Defiqueiredo and D.S. Splittstoesser (ed) «Food Microbiology. Public Health and Spoilage Aspects» Avi Publishing Co. Mestport, Connecticut).
386. Wanner B.L. (1992). Is cross regulation by phosphorylation of two-component response regulator proteins important in bacteria? *Bacteriol.*, 174 : 2053-2058.
387. Ward D.M., Weller R., Bateson M.M. (1990). 16rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345 : 63-65.
388. Weaver G.A., Krause J.A., Miller T.L., Wolin M.J. (1988). Short chain fatty acid distribution of enema samples from a sigmoidoscopy population : an association of high acetate and low butyrate ratios with adenomatous polyps and colon cancer. *Gut*, 29 : 1539-1543.
389. Wells C., Maddaus M.A., Simmons R.L. (1988). Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev. Infect. Dis.*, 10 : 958-964.
390. WHO (1994). Regional Office for Europe. Guidelines for health-related monitoring of coastal recreational and shellfish areas, Part II. Copenhagen.
391. Willadersen R.R., Busta F.F., Allen C.E., Smith L.B. (1978). Growth and survival of *Clostridium perfringens* during constantly rising temperature. *J. Food Sci.*, 43 : 470-475.
392. Willett W.C. (1995). Diet, nutrition and avoidable cancer. *Environ. Health Perspectives*, 103 : 165-170.
393. Willis A.T. (1969). *Clostridia* of wound infection, pp. 43-52, Butterworths Ed., London.
394. Wilson K.H., Blitchington R.B. (1996). Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62 : 2273-2278.



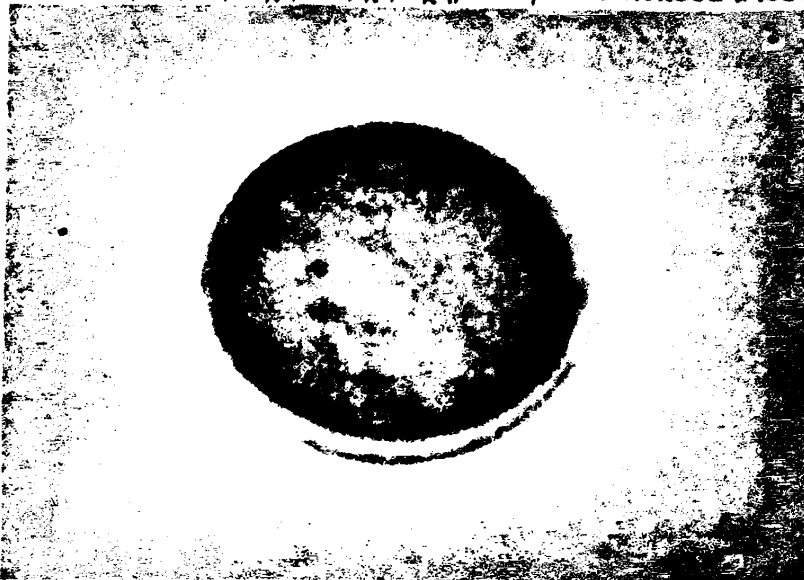
395. Wisker E., Feldheim W. (1994). Energy value of fermentation. In: Binder H., Cummings J., Soergel K.H., eds. Short chain fatty acids. London : Kluwer Academic Publishers, 20 -28.
396. Wolover T.M.S., Spadafora P., Eshuis H. (1991). Interaction between colonic acetate and propionate in humans. Am. J. Clin. Nutr., 53 : 681-687.
397. World Health Organization (1993). Guidelines for drinking water quality, 2nd ed., Vol. 1, Recommendations.
398. Wren B.W. (2000). Microbial genome analysis : insights into virulence, host adaptation, and evolution. Nature Genet., 1 : 30-39.
399. Wright R.C. (1986). The seasonality of bacterial quality of water in a tropical developing country (Sierra Leone) J. Hyg (Lond), 96 (1) : 75-82
400. Wun C.K., Walker R.W., Litsky W. (1976). The use of XAD-2 resin for the analysis of coprostanol in water.
401. Yamagishi T., Serikawa T., Morita R., Nakamura S., Nishida S. (1976). Persistent high numbers of *C. perfringens* in the intestines of Japanese aged adults. Jap. J. Microbiol., 20 : 397.
402. Yokoyama M.T., Carlson J.R. (1981). Dissimilation of tryptophan and related indolic compounds by ruminal microorganism *in vitro*. Appl. Microbiol., 27 : 540-548.
403. Zinkernagel R.M., Bachmann M.F., Kundig T.M. et al. (1996). On immunological memory. Annu. Rev. Immunol., 14 : 333-367.
404. Zoetendal E.G., Akkermans A.D., De Vos W.M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 64 : 3854-3859.
405. Βοϊδάρου Χ. (2002). Προσδιορισμός Κλωστηριδίων από διάφορους οικοτόπους σε περιπτώσεις εντερολοιμώξεων και άλλων διαταραχών της εντερικής χλωρίδας. Διατριβή επί διδακτορία, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
406. Λεγάκης Ν., Παπαβασιλείου Ι. (1981). Παθογόνα Αναερόβια Βακτήρια. Εκδόσεις «Χελιδόνι», Αθήνα.
407. Μπεζιρτζόγλου Ε. (1994). Φυσιολογική Μικροβιακή Χλωρίδα του Ανθρώπου. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
408. Παπαβασιλείου Ι., Δημητρακόπουλος Γ., Τζαννετής Σ., Λεγάκης Ν. (1981). Στοιχεία Ανοσολογίας και Γενικής Βακτηριολογίας. Εκδόσεις Παρισάνος, Αθήνα.
409. Τζαννετής Σ.Ε. Αι δηλητηριάσεις δια τυριών Ελληνικής προελεύσεως. Acta Microbiol. Helen., 11 : 171-183.
410. Τσιότσιας Α. (2002). Κατανομή του *Clostridium perfringens* (Κλωστηρίδιο το διαθλαστικό) στο υδάτινο περιβάλλον και αλληλοσυσχέτιση του με άλλους παράγοντες και μικροοργανισμούς. Διατριβή επί διδακτορία, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.





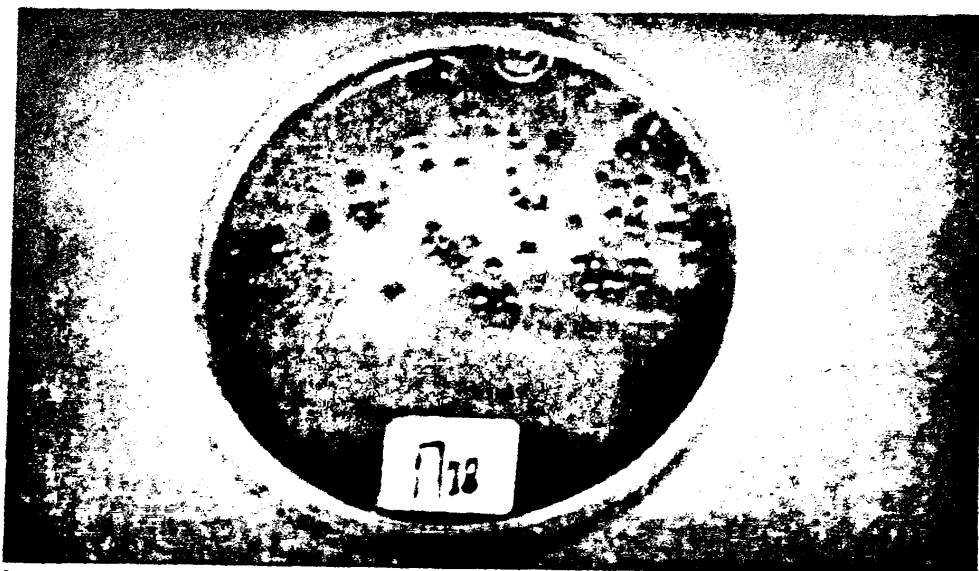
McConkey agar

Φυσιολογική περιοχή . Αρχή σχηματισμού πολύποδα . Αδένωμα

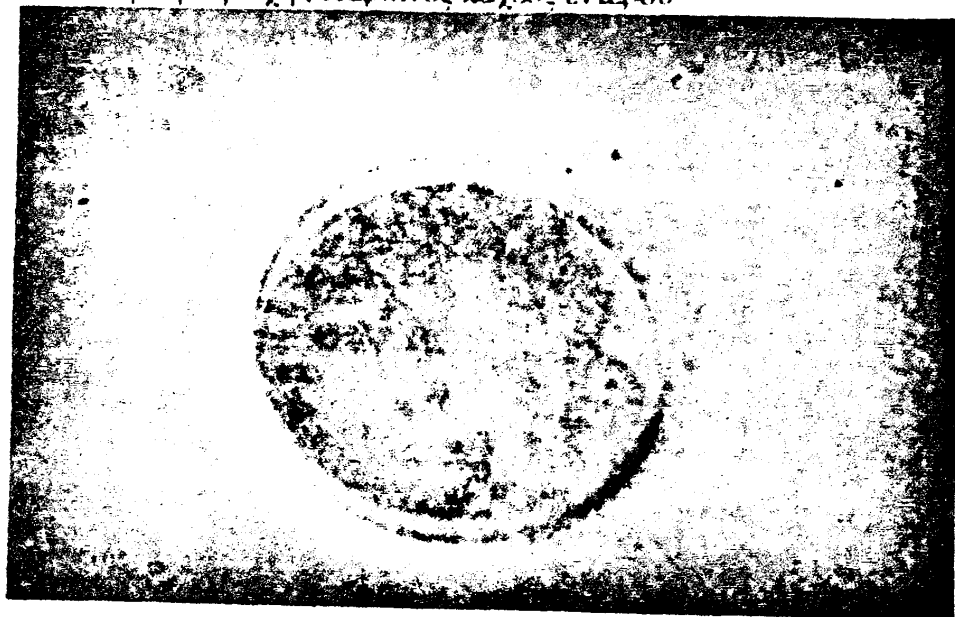


McConkey agar

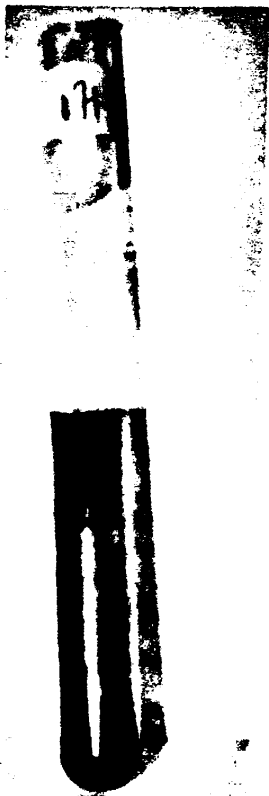
Παθολογική περιοχή. Αρχή σχηματισμού πολύποδα . Αδένωμα



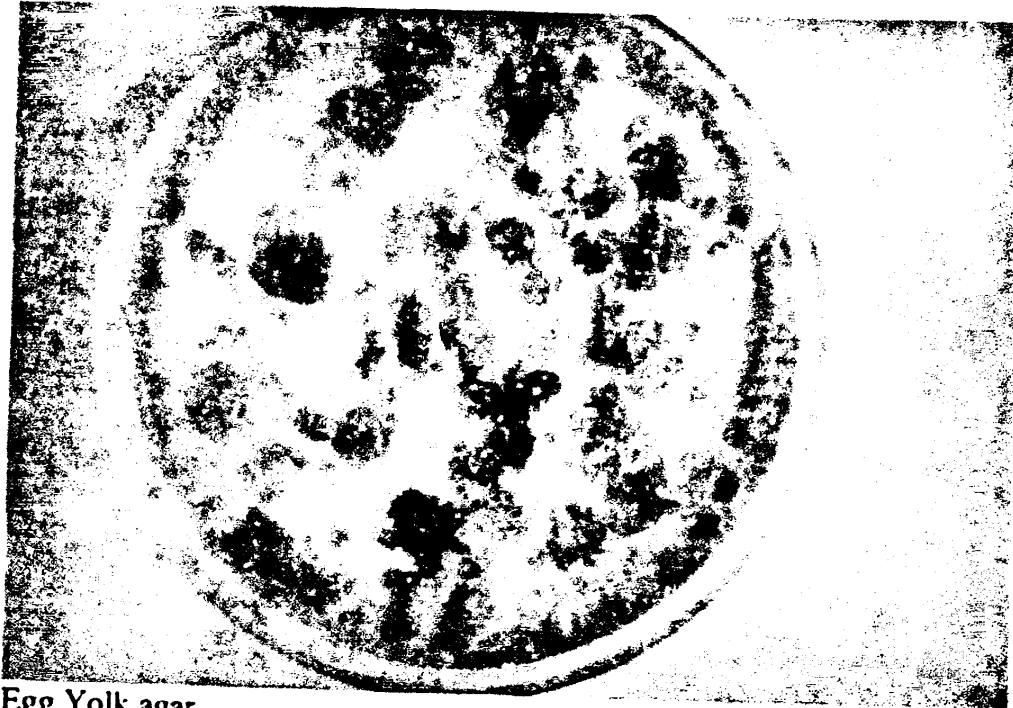
McConkey agar
Παθολογική περιοχή . Καρκίνος παχύς εντέρου



Egg Yolk agar
Παθολογική περιοχή. Αρχή σχηματισμού πολύποδα . Αδένωμα



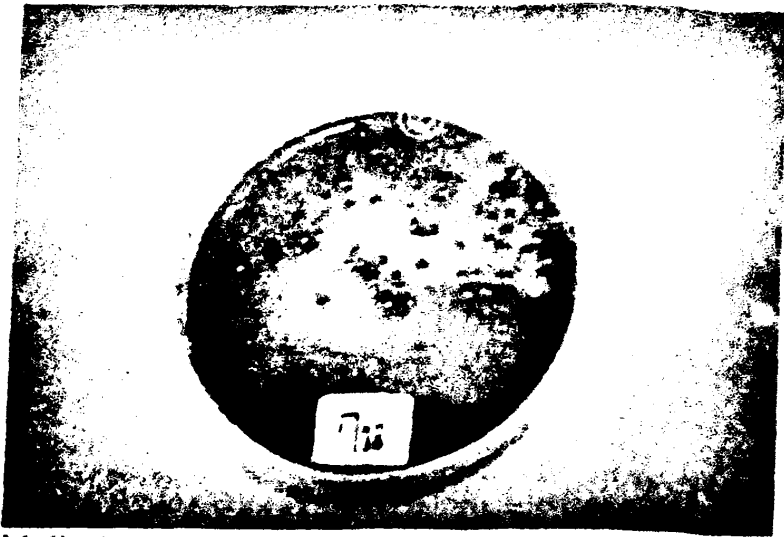
LS θετικό



Egg Yolk agar

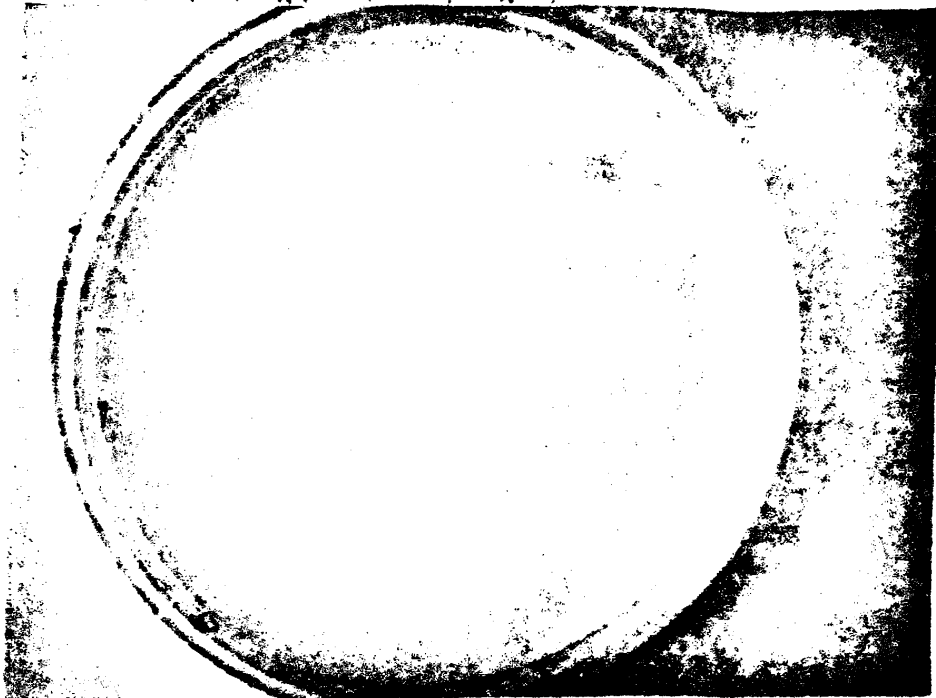
Φυσιολογική περιοχή. Καρκίνος παχέος εντέρου





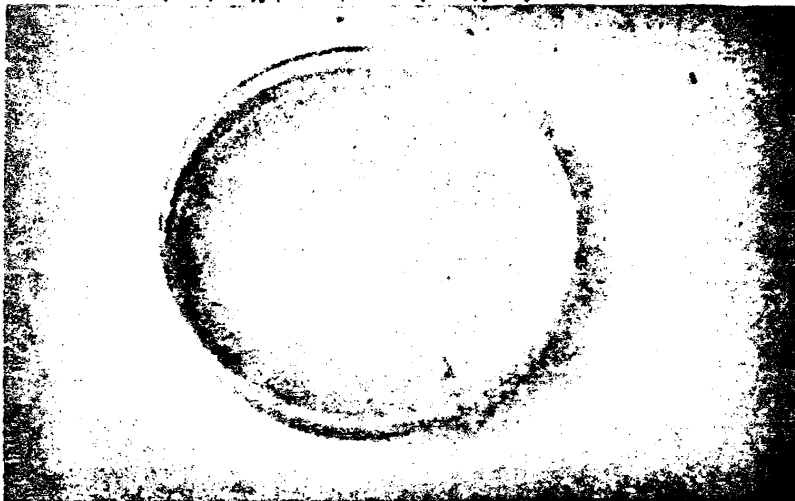
McConkey agar

Φυσιολογική περιοχή. Καρκίνος παχίος εντέρου



Columbia cysteine agar

Παθολογική περιοχή. Καρκίνος παχίος εντέρου



Columbia cysteine agar

Φυσιολογική-Παθολογική περιοχή. Αρχή σχηματισμού πολύποδα ,Αδένωμα



Egg Yolk agar
Φυσιολογική περιοχή . Αδενώματος



Egg Yolk agar
Παθολογική περιοχή . Καρκίνος παχέος εντέρου

