

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ

ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΥΔΑΤΩΝ

ΚΕΦΑΛΟΝΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

των

ΖΑΦΕΙΡΑΣ ΣΤΑΥΡΟΣ

ΜΠΟΥΧΑΓΙΑΡ ΣΤΥΛΙΑΝΟΣ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Μάιος 2024

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

ΗΡΕΙΩΤΟΥ ΕΥΦΗΜΙΑ

ΛΙΟΣΑΤΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΜΟΥΡΕΛΑΤΟΥ ΑΘΗΝΑΪΔΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με την δραματική αύξηση του τουρισμού τα τελευταία χρόνια, τα παραθαλάσσια ύδατα χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για υπολείμματα. Υδρορροές από ξενοδοχεία και παλιές υποδομές έχουν βρεθεί να ρίχνουν απόβλητα στη θάλασσα, ακόμη και σε σημεία κοντά στις ακτές. Ο μικροβιολογικός έλεγχος των υδάτων αυτών είναι σημαντικός για την ασφάλεια των λουόμενων, την σωστή ενημέρωσή τους και την καταπολέμηση των περιβαλλοντικών προβλημάτων. Η αλιεία στις περιοχές αυτές μπορεί να είναι επικίνδυνη για τους καταναλωτές των προϊόντων αυτών αν τα προς κατανάλωση θαλασσινά είναι μολυσμένα.

Στην παρούσα πτυχιακή, αναλύονται μικροβιολογικά τα θαλάσσια ύδατα της Κεφαλονιάς. Η ανάλυση αυτή έγινε σε μία πληθώρα μικροοργανισμών, κυρίως παθογόνων, οι οποίοι μας δίνουν μία γενική εικόνα για το μικροβιακό φορτίο στις θάλασσες αυτές. Στόχος είναι η ευαισθητοποίηση του κοινού και η ενημέρωση του πληθυσμού για τα τυχόν περιβαλλοντικά αντίκτυπα των δράσεων αυτών.

Λέξεις – Κλειδιά: Μικροβιολογία, Κεφαλονιά, μικροβιακή ανάλυση, ύδατα

ABSTRACT

With the dramatic increase in tourism in recent years, coastal waters are increasingly used for residues. Water spills from hotels and old infrastructure have been found to dump waste into the sea, even in places close to the coast. Microbiological monitoring of these waters is important to ensure the safety of swimmers, to inform them properly and to combat environmental problems. Fishing in these areas can be dangerous for consumers if the seafood to be consumed is contaminated.

In this thesis, the marine waters of Kefalonia are microbiologically analyzed. This analysis was performed on a variety of microorganisms, mainly pathogens, which give us a general picture of the microbial load in these waters. The aim is to raise public awareness and inform the population about the possible environmental impact of these actions.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο

Σελίδα

I ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
II ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	11
2.1 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	11
2.1.1 Escherichia coli.....	11
2.1.2 Salmonella sp.....	12
2.1.3. Shigella spp.....	13
2.1.4 Staphylococcus aureus.....	14
2.1.5 Listeria monocytogenes.....	15
2.1.6 Vibrio sp.....	17
2.1.6.1 Vibrio cholerae.....	17
2.1.6.2 Vibrio parahaemolyticus.....	18
2.1.6.3 Vibrio vulnificus.....	19
2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	20
2.2.1 Tryptic Soy Agar (TSA).....	20
2.2.2 Eosin-Methylene Blue Agar (EMB).....	21
2.2.3 CHROMagar™ Vibrio.....	22
2.2.4 Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS).....	23
2.2.5 MacConkey Agar (MC).....	24
2.2.6 Baird-Parker Agar (B-P).....	25
2.2.7 Mannitol Salt Agar (MSA).....	26
2.2.8 Salmonella-Shigella Agar (S-S).....	27
2.2.9 Listeria-Agar (L-A).....	28
III ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	29
3.1 Προετοιμασία Υλικών (Θρεπτικών Υποστρωμάτων).....	29
3.2 Δειγματοληψία.....	29
3.3.Πειραματική Διαδικασία.....	33
3.3.1 Σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν.....	33
3.3.2 Διαδικασία πειράματος.....	34
IV ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
4.1.1 Σάμη.....	35
4.1.2 Αγία Κυριακή.....	36
4.1.3 Αγία Ευφημία.....	36

4.1.4 Γραδάκια.....	37
4.1.5 Ξι.....	38
4.1.6 Πεσσάδα.....	39
4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
4.2.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	40
4.2.2. Νομοθεσία.....	41
4.2.2.1. Σάμη.....	41
4.2.2.2. Αγία Κυριακή.....	42
4.2.2.3. Αγία Ευθυμία.....	42
4.2.2.4. Γραδάκια.....	42
4.2.2.5. Ξί.....	42
4.2.2.6. Πεσσάδα.....	42
V ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	43
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	46

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα Σελίδ

α

Εικόνα 1: TSA με καλλιεργήσιμα βακτήρια που απομονώθηκαν από έντερο πέστροφας.....	20
Εικόνα 2: E.coli που φαίνεται η πράσινη-μεταλλική χρώση.....	21
Εικόνα 3: CHROMagar™ Vibrio με αποικίες V. vulnificus/cholerae. (μπλε), V. parahaemolyticus (μωβ) και V. alginolyticus (λευκές).....	22
Εικόνα 4: V. cholerae πάνω σε υπόστρωμα TCBS.....	23
Εικόνα 5: Α: Λακτόζη θετικά βακτήρια. Β: Λακτόζη αρνητικά βακτήρια.....	24
Εικόνα 6: Αποικίες Staphylococcus aureus σε BP agar.....	25
Εικόνα 7: Κίτρινες αποικίες του S. aureus σε MSA.....	26
Εικόνα 8: Αποικίες Salmonella spp. και Shigella spp. σε SS Agar.....	27
Εικόνα 9: Αποικίες L. monocytogenes σε LA υπόστρωμα.....	28
Εικόνα 10: Ακριβή σημεία δειγματοληψίας στο Ξι.....	30
Εικόνα 11: Ακριβές σημείο δειγματοληψίας στα Γραδάκια.....	31
Εικόνα 12: Ακριβές σημείο δειγματοληψίας στη Σάμη.....	31
Εικόνα 13: Ακριβές σημείο δειγματοληψίας Αγίας Ευθυμίας.....	32
Εικόνα 14: Ακριβές σημείο δειγματοληψίας στο λιμάνι της Πεσσάδας.....	32

Εικόνα 15: Ακριβές σημείο δειγματοληψίας στην Αγία Κυριακή.....	33
Εικόνα16: Διάταξη οργάνου φιλτραρίσματος.....	34

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα Σελίδ

α

Γράφημα 1: Αποτελέσματα από το λιμάνι της Σάμης.....	35
Γράφημα 2: Αποτελέσματα Αγίας Κυριακής.....	36
Γράφημα 3: Αποτελέσματα στην Αγία Ευφημία.....	36
Γράφημα 4: Αποτελέσματα στα Γραδάκια.....	37
Γράφημα 5: Αποτελέσματα στην παραλία Ξί.....	38
Γράφημα 6: Αποτελέσματα στο λιμάνι της Πεσσάδας.....	39

Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μια παράκτια περιοχή, η οποία από άποψη οικολογίας και ανθρώπινης ανάπτυξης αποτελεί ένα μοναδικό γεωγραφικό περιβάλλον, επηρεάζεται έντονα από ανθρώπινες δραστηριότητες όπως η αστικοποίηση, η βιομηχανική ανάπτυξη, η γεωργία, η αλιεία, η απόρριψη λυμάτων και οι δραστηριότητες αναψυχής.

Η Ελλάδα, ως δημοφιλής ευρωπαϊκός τουριστικός προορισμός, ήταν μία από τις πρώτες μεσογειακές χώρες που άρχισαν να εξετάζουν τη μικροβιολογική ποιότητα των νερών κολύμβησης. Υπό το πρίσμα των τουριστικών ερευνών που δείχνουν ότι η καθαρότητα του θαλασσινού νερού και η ομορφιά της ακτογραμμής αποτελούν το 90% των λόγων προσέλκυσης επισκεπτών σε μια συγκεκριμένη παραλία, ένα αποτελεσματικότερο και ακριβέστερο σύστημα ελέγχου της ποιότητας των νερών κολύμβησης αποτελεί μια από τις προτεραιότητες του ελληνικού τουρισμού.

Η αξιολόγηση του δυνητικού κινδύνου για την υγεία βασίζεται σε δεδομένα της συγκέντρωσης του δείκτη βακτηρίων, ο οποίος υποδεικνύει έμμεσα την πιθανή παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών. Παγκοσμίως, χρησιμοποιούνται διάφοροι δείκτες και κριτήρια για την αξιολόγηση της ποιότητας των παράκτιων υδάτων. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η αναθεωρημένη οδηγία της ΕΕ για τα ύδατα κολύμβησης (Directive, 2006/7/EC) προβλέπει τον προσδιορισμό δύο βακτηρίων-δεικτών κοπράνων *Escherichia coli* (EC) και εντερόκοκκων (ENT).

Η οδηγία της ΕΕ ορίζει ελάχιστα κριτήρια που πρέπει να πληρούν τα κράτη μέλη, αλλά επιτρέπει την εφαρμογή αυστηρότερων κριτηρίων. Αν και η εθνική νομοθεσία της Ελλάδας βασίζεται στη σχετική οδηγία, τα εθνικά μέτρα που ισχύουν

είναι αυστηρότερα, όπως επίσης στη Γαλλία, την Ιταλία και την Ισπανία (MAP, 2010). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, η εθνική καθοδήγηση της EPA των ΗΠΑ έχει προτείνει τη χρήση των εντερόκοκκων ως τον μοναδικό θαλάσσιο βακτηριακό δείκτη. Η συγκέντρωση των εντερόκοκκων δεν πρέπει να υπερβαίνει τη γεωμετρική μέση τιμή ($GM < 35 \text{ CFU}/100 \text{ mL}$) και τη στατιστική οριακή τιμή ($STV < 130 \text{ CFU}/100 \text{ mL}$) ανά μήνα (U.S. EPA, 2012).

Αρκετές μελέτες τονίζουν ότι οι συγκεντρώσεις μικροβίων στα ύδατα αναψυχής παρουσιάζουν μεγάλη χρονική και χωρική διακύμανση (Ekklesia *et al.*, 2015- Enns *et al.*, 2012- Hassou *et al.*, 2014) και υπόκεινται σε πολλούς παράγοντες: ηλιακή ακτινοβολία, ποσότητα βροχόπτωσης, παλιρροιακό στάδιο, διεύθυνση ανέμου και ταχύτητας, ανάμιξη, θολότητα, θήρευση, πυκνότητα λουομένων, ανεπαρκή χωρητικότητα δικτύου αποχέτευσης (Cho *et al.*, 2010- He and He, 2008).

(Darija Vukic Lusic *et al*)

Είναι γνωστό πως η Ελλάδα αποτελεί έναν από τους πιο γνωστούς τουριστικούς προορισμούς παγκοσμίως. Σύμφωνα με τους Zamira E. Soto-Varela *et al* οι διεθνείς αφίξεις τουριστών αυξήθηκαν από 25 εκατομμύρια το 1950 σε 1.5 δισεκατομμύρια το 2019 και εκτιμάται ότι θα φτάσουν τα 1.8 δισεκατομμύρια μέχρι το 2030. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της υδάτινης συγκοινωνίας και επομένως την αυξημένη απόρριψη ελλιπώς επεξεργασμένων (ή και μη επεξεργασμένων) λυμάτων στις θάλασσες.

(Zamira E. Soto-Varela *et al*)

Τα λύματα περιέχουν μεγάλες ποσότητες παθογόνων μικροοργανισμών για τον άνθρωπο, εκ των οποίων αρκετοί είναι και μικροοργανισμοί δείκτες καθαρότητας του νερού. Το *Escherichia coli* είναι μια υποομάδα των κολοβακτηριδίων των κοπράνων. Η παρουσία εντερόκοκκων επίσης, υποδηλώνει πάντα πρόσφατη μόλυνση με κόπρανα από ανθρώπους ή θερμόαιμα ζώα δημιουργώντας μεγαλύτερο κίνδυνο για την παρουσία άλλων παθογόνων.

(Panagiotis Papastergiou *et al*)

Η θαλάσσια πανίδα επιβιώνοντας σε νερά τα οποία δύναται να μολυνθούν με παθογένη, για τον άνθρωπο, μικροοργανισμούς, γίνεται φορέας αυτών. Μέρος της, εμπεριέχεται στην ανθρώπινη διατροφή (π.χ.: ψάρια, όστρακα). Τις περισσότερες φορές πραγματοποιείται κατάλληλη επεξεργασία πριν την κατανάλωση. Ωστόσο υπάρχει περίπτωση να καταναλώνονται με ελάχιστη επεξεργασία, έως και καθόλου. Επομένως, είναι σημαντικό να γνωρίζουμε κατά πόσο είναι ασφαλής η κατανάλωσή τους σε μικροβιακό επίπεδο.

Η ανάλυση των υδάτων θα δώσει πληροφορίες για την καταλληλότητά τους όχι μόνο ως χώρο αναψυχής, αλλά κυρίως για την αλιεία. Μια τέτοια γνώση θα βοηθήσει στην πιθανή ευαισθητοποίηση για καλύτερη επεξεργασία πριν την κατανάλωση θαλασσινών τροφίμων, πιθανώς την αποφυγή αλιείας σε ύδατα τα οποία μολύνονται και άρα την πρόληψη της ανθρώπινης υγείας.

Αναλύσεις στα νερά του Ιονίου έγιναν και το 2019 με τους De Gilgio et. Al που ανέλυσαν δείγματα άμμου και νερού από παραλίες στον κόλπο του Τάραντα. Οι μικροοργανισμοί που ερεύνησαν ήταν οι *E. coli*, *Enterococci* και *P. aeruginosa*. Η *Escherichia* και οι *Enterococci* είναι παθογόνα βακτήρια που βρίσκονται στο έντερο ζωντανών οργανισμών, οπότε η εύρεσή τους σε δείγματα νερού υποδηλώνει πως τα νερά έχουν μολυνθεί από περιττώματα. Και τα τρία βακτήρια βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα με την *E. coli* κυρίως στα δείγματα του νερού. Η συγκέντρωση εντεροβακτηριδίων στο νερό της θάλασσας είναι ένας βασικός δείκτης για την ποιότητα του νερού της περιοχής αυτής.

Στην παρούσα πτυχιακή αναλύθηκαν και άλλοι μικροοργανισμοί, παθογόνοι κυρίως, για να υπάρχει μία μεγαλύτερη εικόνα του φορτίου στις θάλασσες του Ιονίου. Παθογόνοι όπως το γένος *Vibrio* έχουν ως φυσικό περιβάλλον την θάλασσα, όμως βρίσκονται και σε δείγματα άμμου (Indicator microbes correlate with pathogenic bacteria, yeasts and helminthes in sand at a subtropical recreational beach site. Shah et. al, 2011), ενώ οι *L. monocytogenes* και *S. aureus* είναι από μόνα τους στη φύση και καταλήγουν στην θάλασσα. (ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Karl R Matthews et al 4^η Αγγλική Έκδοση/1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΔίΣΙΓΜΑ 2021)

Η ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

2.1 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

2.1.1 *Escherichia coli*

Το *Escherichia coli*, είναι ένα ραβδόμορφο, gram-αρνητικό, γάμμα πρωτεοβακτήριο της οικογένειας Enterobacteriaceae. Είναι ο πιο διαδεδομένος κοινός κάτοικος του γαστρεντερικού σωλήνα των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων, καθώς και ένα από τα πιο σημαντικά παθογόνα που συνδέονται με γαστρεντερικές παθήσεις (Nerino Allocati *et al* 2013).

Απαιτεί μόνο απλές πηγές άνθρακα και αζώτου, συν φώσφορο, θείο και άλλα ιχνοστοιχεία για να αναπτυχθεί. Για να εξασφαλίσει την απαιτούμενη ενέργεια μπορεί και αποικοδομεί διάφορους τύπους αρωματικών ενώσεων (όπως το φαινυλοξικό οξύ και το βενζοϊκό οξύ). Επιπλέον, μπορεί να αναπτυχθεί τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες, τις οποίες μπορεί να αντιμετωπίσει σε ανάλογα περιβάλλοντα. Ακόμα, μπορεί να επιβιώσει σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (7.5–49°C), με βέλτιστη ανάπτυξη 37°C.

(SATOSHI ISHII¹, και MICHAEL J. SADOWSKY *et al* 1991)

Το *E. coli* βρέθηκε (μαζί με τους εντερόκοκκους) να έχουν την υψηλότερη συσχέτιση της συχνότητας εμφάνισης γαστρεντερικών νόσων, σε θαλάσσια και γλυκά ύδατα. Επομένως, η απαρίθμηση του *E. coli* συστήθηκε ως μέσο για την εκτίμηση του φορτίου των κοπράνων.

(Nerino Allocati *et al* 2013)

Αν και τα περισσότερα *E. coli* είναι κοινά, μη παθογόνα, βακτήρια, υπάρχουν στελέχη τα οποία προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την Εντεροαιμοραγική *E. coli* (EHEC) η οποία προκαλεί μη αιματώδη διάρροια (αιμορραγική κολλίτιδα), νεφροπάθεια (αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο-HUS) και θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα (TTP).

Η προσλαμβανόμενη δόση η οποία μπορεί να προκαλέσει ασθένεια από την εντεροαιμορραγική *E. coli* στον άνθρωπο πιστεύεται πως είναι εξαιρετικά χαμηλή (<100 κύτταρα). Η ικανότητα να μεταφέρεται η μόλυνση της EHEC από άνθρωπο σε άνθρωπο και δια μέσω του νερού, είναι μια ακόμα απόδειξη της χαμηλής μολυσματικής δόσης. Ωστόσο, εάν ένα άτομο θα ασθενήσει ή όχι, παίζουν ρόλο και παράγοντες όπως, η ηλικία, η ανοσολογική κατάσταση και η τυχόν εξασθένηση του οργανισμού ο οποίος έχει προσβληθεί.

(ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Karl R Matthews *et al* 4^η Αγγλική Έκδοση/1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΔίΣΙΓΜΑ 2021)

2.1.2 *Salmonella* sp

Τα *Shalmonella* sp είναι μία από τις κύριες αιτίες εντερικών παθήσεων σε όλο τον κόσμο, καθώς και ο αιτιολογικός παράγοντας πιο σοβαρών συστηματικών παθήσεων όπως ο τυφοειδής και παρατυφοειδής πυρετός. Όπως και άλλα εντερικά βακτήρια, εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της γαστρεντερικής οδού. Μπορεί να εισέλθει άμεσα στο υδάτινο περιβάλλον μέσω περιττωμάτων μολυσμένων ανθρώπων ή ζώων, είτε έμμεσα μέσω απόρριψης περιττωμάτων ή απορροή γεωργικής γης.

Συνήθως υπάρχουν σε μεγάλους αριθμούς στα ακατέργαστα λύματα (10^3 – 10^4 CFU/L) και μπορεί να εξακολουθούν να υπάρχουν στα λύματα μετά από προηγμένη δευτεροβάθμια επεξεργασία, συμπεριλαμβανομένης της πήξης, της διήθησης και της απολύμανσης

Τα συναντάμε συχνά σε περιβαλλοντικά δείγματα. Συγκεκριμένα, στο υδάτινο περιβάλλον αυτό το παθογόνο, έχει επανειλημμένα ανιχνευθεί, σε διάφορους τύπους φυσικών νερών όπως ποτάμια, λίμνες, παράκτια ύδατα, εκβολές ποταμών καθώς και μολυσμένα υπόγεια ύδατα.

(Caterina Levantesi *et al* 2012)

Τα *Salmonella* sp κατατάσσονται στα ανθεκτικά βακτήρια, καθώς μπορούν να προσαρμόζονται εύκολα σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ορισμένα στελέχη έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν σε υψηλές θερμοκρασίες ($T=54^{\circ}\text{C}$) και άλλα σε χαμηλές ($T=2-3^{\circ}\text{C}$). Επομένως, μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας αλλά και σε συνθήκες κατάψυξης.

Οι συνθήκες pH των συγκεκριμένων βακτηρίων κυμαίνεται από $\text{pH}=4.5-9.5$ με βέλτιστη τιμή $\text{pH}=6.5-7.5$. Επιπρόσθετα, ενώ η δράση των *Salmonella* sp

μειώνεται σε περιβάλλον με 3-4% NaCl, η ανθεκτικότητά του, στο NaCl, αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας μεταξύ T=10-30°C.

Φυσικές πηγές των *Salmonella sp* είναι τα πουλερικά και τα προϊόντα τους, τα ψάρια και τα οστρακοειδή, με κύριες να αποτελούν οι πρώτες (πουλερικά και προϊόντα π.χ.: αυγά). Επομένως συναντιούνται τόσο σε χερσαίους όσο και σε υδάτινους οργανισμούς.

Η μόλυνση από *Salmonella sp* μπορεί να προκαλέσει εντερικό (τυφοειδή) πυρετό, απλή εντεροκολίτιδα και συστηματικές μολύνσεις από μη τυφοειδείς μικροοργανισμούς. Ακόμα τα *Salmonella sp* μπορούν να προκαλέσουν χρόνιες καταστάσεις όπως είναι η ασηπτική αρθρίτιδα, το σύνδρομο Reiter και η αγκυλωτική σπονδυλίτιδα.

Η αποτελεσματικότητα της μόλυνσης εξαρτάται από την ηλικία του οργανισμού αλλά και από το ανοσοποιητικό του σύστημα. Το μη ανεπτυγμένο σύστημα των παιδιών, οι ηλικιωμένοι και η χαμηλή παραγωγή γαστρικού οξέος, διευκολύνει την ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών στο έντερο και κατά επέκταση την εξάπλωσή τους. Ωστόσο, εκτός των χαρακτηριστικών του οργανισμού, η παθογένεια εξαρτάται και από τον αριθμό των κυττάρων *Salmonella sp*, τα οποία πρέπει να έχει προσλάβει ο οργανισμός, ο οποίος θεωρείται πολύ μικρός.

(ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Karl R Matthews *et al* 4^η Αγγλική Έκδοση/1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΔίΣΙΓΜΑ 2021)

2.1.3. *Shigella spp.*

Τα *Shigella spp.* δεν έχουν κάποια απαραίτητη συσχέτιση με συγκεκριμένα τρόφιμα όμως, είναι τα υπεύθυνα βακτήρια για την βακτηριακή δυσεντερία ή σιγγέλωση. Η νόσος προκαλεί συμπτώματα σε εύρος μίας ήπιας διάρροιας έως και σοβαρής δυσεντερίας. Η δυσεντερία συνοδεύεται με άλλα συμπτώματα όπως έντονοι κοιλιακοί πόνοι, ορθικός τεινισμός, σπασμοί, πυρετός και αιματώδη βλεννώδη κόπρανα. Στους υγιείς ενήλικες η σιγγέλωση είναι αυτοπεριοριζόμενη, εντός δυο εβδομάδων, ακόμη και χωρίς την χρήση αντιβιοτικών.

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος μόλυνσης είναι μέσω επαφής του τροφίμου με κάποιο άτομο προσωπικού. Η μετάδοση γίνεται μέσω νερού ή με τα "Five F's": τρόφιμα (food), δάκτυλα (fingers), περιτώματα (feces), μύγες (flies) και μικροβιοφόρες εστίες (fomites). Η μόλυνση γίνεται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού και η δόση που

χρειάζεται είναι πολύ μικρή, τα 100 κύτταρα είναι αρκετά (ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Karl R Matthews *et al* 4^η Αγγλική Έκδοση/1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΔίΣΙΓΜΑ 2021), γεγονός που κάνει την *Shigella* ένα ισχυρό ανθρώπινο παθογόνο. Η εξάπλωση της ασθένειας μπορεί να γίνει μέσα σε ιδρύματα και εγκαταστάσεις με μεγάλο συνωστισμό που οι υγιεινές συνθήκες είναι ανεπαρκείς. Ακόμη, οι φυσικές καταστροφές που προκαλούν βλάβες σε εγκαταστάσεις νερού και υγειονομικές υποδομές συσχετίζονται με την σιγγέλωση λόγω της κακής διαχείρισης αποβλήτων. (A Brief History of Shigella, Lampel *et.al.*, 2018)

Η ανάπτυξη των *Shigella spp.* παρεμποδίζεται σε εύρος pH 4.8 έως 5.0, παρουσία NaCl 3.8 έως 5.2%, 300 έως 700mg/L νερού NaNO₂ και 0.5 έως 1.5mg NaClO/L νερού στους 4°C. Έχει παρατηρηθεί η ανάπτυξη σε τιμές pH 2 έως 3 ανάλογα με τις συνθήκες για κάποιες ώρες. Γενικά όμως τα *Shigella spp.* δεν μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε τρόφιμα με χαμηλό pH. Οι θερμοκρασίες επιβίωσής του κυμαίνονται από T= -20°C έως και θερμοκρασία δωματίου, όμως η επιβίωσή τους διαρκεί περισσότερο σε τρόφιμα κατάψυξης ή ψύξης.

(ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Karl R Matthews *et al* 4^η Αγγλική Έκδοση/1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΔίΣΙΓΜΑ 2021)

2.1.4 *Staphylococcus aureus*

Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο Gram θετικό βακτήριο (κόκκος). Είναι ικανός να αναπτυχθεί σε ένα υψηλό θερμοκρασιακό εύρος T=7°C-48.5°C με βέλτιστη θερμοκρασία T=30°C-37°C. Οι τιμές του pH που μπορεί να επιβιώσει κυμαίνονται μεταξύ pH=4.2-9.3 με βέλτιστες pH=7-7.5. Ακόμα μπορεί να αναπτυχθεί και να επιβιώσει σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση NaCl (συγκέντρωση έως και 15%).

(Yves Le Loir, *et al* 31 May 2020)

Αποτελεί ένα από τα πιο συχνά τροφο-παθογενή βακτήρια και αυτό, διότι κύρια πηγή του είναι ο ίδιος ο άνθρωπος. Το βακτήριο αυτό μεταφέρεται από, και προς τον άνθρωπο είτε μέσω της άμεσης επαφής, βήχα ή φτερνίσματος, είτε έμμεσα όπως η παρασκευή τροφίμων. Κυριότερη περιοχή αποίκησής του στον άνθρωπο, είναι η ρινική κοιλότητα αλλά και το δέρμα.

Ο *S.aureus* εκκρίνει ποικίλες ενώσεις πολλές από τις οποίες αποτελούν σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες. Οι τοξίνες αυτές είναι παράγοντες μολυσματικότητας και προκαλούν τουλάχιστον δύο ανθρώπινες ασθένειες, το σύνδρομο τοξικού σοκ και την σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση η οποία και προκαλεί γαστρεντερίτιδα.

Σε αντίθεση με άλλα βακτήρια, ο *S.aureus* δεν προκαλεί δηλητηρίαση με την κατανάλωση ζωντανών κυττάρων, αλλά με τη πρόσληψη της παραγόμενης τοξίνης. Η τροφική δηλητηρίαση που οφείλεται στην κατανάλωση μολυσματικής τοξίνης και όχι ζωντανών κυττάρων (τροφολοίμωξη) ονομάζεται τροφοτοξίνωση. Το χαρακτηριστικό της σταφυλοκοκκικής τοξίνης είναι πως δεν καταστρέφεται με θέρμανση, και κατά επέκταση ούτε με κονσερβοποίηση. Επομένως, ακόμα και αν καταστραφεί ο σταφυλόκοκκος με θέρμανση, εάν έχει παραχθεί η τοξίνη, το τρόφιμο θεωρείται μολυσμένο (λόγω της ανθεκτικότητάς της).

(ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Karl R Matthews *et al* 4^η Αγγλική Έκδοση/1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΔίΣΙΓΜΑ 2021)

Οι λουόμενοι (ενήλικες και παιδιά) μεταφέρουν υψηλά επίπεδα *S. aureus*, στα ύδατα, περίπου 10^5 – 10^6 CFU/άτομο κατά τη διάρκεια 15 λεπτών. Το παραπάνω σε συνδυασμό με τις παθήσεις που προκαλεί ο σταφυλόκοκκος, οδηγεί στο να προτείνεται, ο *S. aureus*, ως πιθανή πρόσθετη παράμετρος για την παρακολούθηση της ποιότητας των παράκτιων υδάτων κολύμβησης. Η παραπάνω πρόταση υποστηρίζεται λόγω της ικανότητας του σταφυλόκοκκου να επιβιώνει σε υψηλές αλατότητες.

(Nancy Topić *et al* 2021)

2.1.5 *Listeria monocytogenes*

Η *L. monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά gram, ραμβόμορφο βακτήριο. Είναι το μόνο είδος από το γένος της *Listeria* που είναι παθογόνο στον άνθρωπο. Βρίσκεται φυσιολογικά στο περιβάλλον, σε γλυκό αλλά και αλμυρό νερό, απόβλητα ζώων και σε ωμά τρόφιμα που μπορεί να προέρχονται από τα προαναφερόμενα περιβάλλοντα. Γενικά, η *L. monocytogenes* έχει παρατηρηθεί σε τεράστια ποικιλία τροφίμων, με την μεγαλύτερη απειλή να είναι τα προϊόντα με μεγάλη διάρκεια ζωής, τρόφιμα ψυγείου και τρόφιμα που δεν χρειάζονται κάποια θερμική προετοιμασία πριν

την κατανάλωση. (*Listeria monocytogenes* in Aquatic Food Products—A Review, Jami et. Al., 2014)

Η ανάπτυξή της είναι δυνατή σε θερμοκρασίες από 0 έως 45°C, όμως θανατώνεται σε θερμοκρασίες άνω των 50°C. Αναπτύσσεται σε τιμές pH έως και 4.4. Κάτω από 4.3 η *L. monocytogenes* επιβιώνει αλλά δεν αναπτύσσεται. Πρόσθετα οργανικά οξέα συγκέντρωσης έως και 0.1% μπορούν να εμποδίσουν την ανάπτυξή της. Έχει καλύτερη ανάπτυξη σε υψηλές τιμές ενεργότητας νερού ($a_w \geq 0.97$). Η ελάχιστη τιμή ανάπτυξης είναι 0.93 αλλά έχει τη δυνατότητα να επιβιώνει σε τιμές μέχρι και 0.83 για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Έχει αντοχή σε υψηλά ποσοστά NaCl έως και 10 με 12% και μπορεί να επιβιώσει σε ποσοστά 28% για μικρά χρονικά διαστήματα (*Listeria monocytogenes* in Aquatic Food Products - A Review, Mansoori et.al. 2014). Σε περιβάλλον με υψηλές συγκεντρώσεις NaCl η μείωση της θερμοκρασίας ευνοεί την ανάπτυξη και την επιβίωση της *L. monocytogenes*.

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της *L. monocytogenes* είναι η δύσκολη εξαφάνισή της από τα εργοστάσια τροφίμων. Λόγω του ότι ο μικροοργανισμός αυτός βρίσκεται σε αφθονία στο περιβάλλον, έχει την δυνατότητα να εισαχθεί μέσα σε εργοστάσια μέσω των παπουτσιών και των ρούχων του προσωπικού. Η θερμική επεξεργασία δεν έχει μεγάλο αποτέλεσμα στην εξαφάνισή της καθώς η μόλυνση είναι συνεχής. Θρεπτικές ουσίες ή απορρίμματα που υπάρχουν στο εργοστάσιο σε συνδυασμό με την υψηλή υγρασία στο περιβάλλον, δημιουργούν ιδανικές συνθήκες για την επώαση και επιβίωση της *L. monocytogenes*. Ακόμη κατά την προσκόλλησή της στις επιφάνειες του εργοστασίου, πολλές φορές σε σημεία με δύσκολη πρόσβαση, έχει την δυνατότητα να δημιουργήσει βιοϋμένια που την κάνουν ανθεκτική σε απολυμαντικά.

Επειδή η *L. monocytogenes* είναι τόσο διαδεδομένη στο περιβάλλον είναι σχεδόν αδύνατο να μην υπάρχει μέσα στα τρόφιμα. Για τον λόγο αυτό τα τρόφιμα που προηγουμένως έχουν προκαλέσει λιστερίωση, εισάγονται σε μία άλλη κατηγορία τροφίμων που απαιτεί περισσότερους και πιο αυστηρούς ελέγχους. Ανά έθνος υπάρχουν συγκεκριμένες ποσότητες που επιτρέπουν την ύπαρξη της *L. monocytogenes*. Το μεγαλύτερο ποσοστό των Ευρωπαϊκών χωρών υποστηρίζει πως τα τρόφιμα πρέπει να έχουν όσο λιγότερη ποσότητα *L. monocytogenes* γίνεται. Τρόφιμα που προορίζονται για ευπαθείς ομάδες δεν έχουν καμία ανοχή, ενώ στα υπόλοιπα επιτρέπονται ποσότητες μικρότερες των 100 CFU/g. Οι Ηνωμένες Πολιτείες και το Ηνωμένο Βασίλειο δεν επιτρέπουν να υπάρχει ο μικροοργανισμός

σε δείγματα των 25g. Όμως, η μηδενική ανοχή των χωρών αυτών δεν προσφέρει κάποιο όφελος στην υγεία, καθώς τα περιστατικά της ασθένειας είναι περίπου τα ίδια και σε περιοχές με ανοχή και χωρίς.

(ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Karl R Matthews *et al* 4^η Αγγλική Έκδοση/1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΔίΣΙΓΜΑ 2021)

Η ασθένεια είναι πιο επικίνδυνη κυρίως σε ευπαθείς ομάδες όπως έγκυες και τα νεογέννητά τους, ενήλικες άνω των 65 ετών και άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα συμπτώματα ποικίλλουν ανάλογα με το άτομο. Στις ευπαθείς ομάδες, εκτός των εγκύων, μπορεί να προκαλέσει πυρετό, μυϊκούς πόνους, πονοκέφαλο, δύσκαμπτο αυχένα, σύγχυση, απώλεια ισορροπίας και σπασμούς. Οι έγκυες γυναίκες εμφανίζουν συνήθως μόνο πυρετό και άλλα γενικά συμπτώματα όπως ρίγη και πονοκέφαλο. Ωστόσο, η λοίμωξη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή, θνησιγένεια, πρόωρο τοκετό ή απειλητική για τη ζωή του νεογέννητου λοίμωξη. Οι υγιείς άνθρωποι σπάνια αναπτύσσουν λιστερίωση, αν όμως μολυνθούν τα συμπτώματα είναι ήπια με διάρροια και πυρετό. (CDC, *Listeria*)

2.1.6 *Vibrio* sp

2.1.6.1 *Vibrio cholerae*

Το 1854 είναι μια πολύ σημαντική ημερομηνία όσο αναφορά τις τροφικές δηλητηριάσεις από το νερό και από κατανάλωση μικροοργανισμών που ζουν στα ύδατα. Ο ιατρός και επιδημιολόγος John Snow ταυτοποίησε την ασθένεια της χολέρας με το βακτήριο που την προκαλεί, το *Vibrio cholerae* και τη συσχέτισή του με τα τρόφιμα. Το συγκεκριμένο βακτήριο συχνά βρίσκεται σε τρόφιμα όπως το ωμό ψάρι, τα οστρακοειδή, το ρύζι, το ωμό χοιρινό, τα ωμά λαχανικά και φρούτα. Χαρακτηριστικό των τροφίμων αυτό είναι το ουδέτερο pH τους. Έτσι τα τρόφιμα προστατεύουν το βακτήριο από το pH του γαστρικού οξέος, λειτουργώντας ως ρυθμιστές οξύτητας.

Από τη στιγμή που θα ληφθεί το *V.cholerae*, ανάλογα με την ποσότητα που έχει προσληφθεί, τα συμπτώματα εμφανίζονται μεταξύ μερικών ωρών έως και 5 ημερών. Αυτά είναι εκρηκτική διάρροια σε συνδυασμό με αφυδάτωση. Ωστόσο αυτό

συμβαίνει στη μειοψηφία των ατόμων που έχουν μολυνθεί, η πλειοψηφία των μολυσμένων ατόμων έχουν ελαφριά συμπτώματα ή είναι ακόμα και ασυμπτωματικά.

Με βάση στοιχεία υγείων εθελοντών, το *V.cholerae* για να προκαλέσει συμπτώματα, χρειάστηκε να υπάρχει στο εμβόλιο σε 10^{11} CFU σε αλατούχο διάλυμα με PH=7.2. Ωστόσο, όταν στους εθελοντές χορηγήθηκε *V.cholerae* μέσω τροφίμου, ο αριθμός των βακτηρίων που προκάλεσαν μόλυνση ήταν μικρότερος (10^6 CFU). (ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Karl R Matthews *et al* 4^η Αγγλική Έκδοση/1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΔίΣΙΓΜΑ 2021)

2.1.6.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Ένα ακόμα παθογόνο που βρίσκεται στις ακτές και σχετίζεται με τροφικές δηλητηριάσεις είναι το *V. Parahaemolyticus*. Τρόφιμα που ενοχοποιούνται είναι τα θαλασσινά, όπως τα ψάρια και τα οστρακοειδή. Ωστόσο ο αριθμός των βακτηρίων αυτών κυμαίνεται ανάλογα με την εποχή.

Η μόλυνση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την επεξεργασία του τροφίμου πριν από την κατανάλωσή του, όπως και στα υπόλοιπα βακτήρια που προαναφέρθηκαν (εκτός του σταφυλόκοκκου, όπου η δηλητηρίαση εξαρτάται από την παραγωγή της τοξίνης του πριν από θερμική επεξεργασία). Τα κρούσματα επομένως εμφανίζονται μετά από κατανάλωση ωμών ή μη επαρκώς μαγειρεμένων θαλασσινών τροφίμων ή επιμολυσμένων μετά την επεξεργασία τους. (ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Karl R Matthews *et al* 4^η Αγγλική Έκδοση/1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΔίΣΙΓΜΑ 2021). Δε μεταφέρεται από άνθρωπο σε άνθρωπο και ούτε μέσω της κόπρανο-στοματικής οδού.

(*Vibrio* spp. Infections Craig Baker-Austin *et al* 2018)

Ο ρυθμός ανάπτυξης του είναι 8 με 9 λεπτά με βέλτιστη θερμοκρασία $T=37^{\circ}\text{C}$. Στα θαλασσινά τρόφιμα σε ίδια θερμοκρασία αναπτύσσεται κάθε 12 με 18 λεπτά. Για να προκληθεί μόλυνση, σύμφωνα με επιδημιολογικές πληροφορίες και πληροφορίες από εθελοντές, χρειάζονται 10^5 - 10^7 CFU του βακτηρίου. Από τη στιγμή που ένα άτομο μολυνθεί, θα εμφανίσει συμπτώματα μεταξύ 3 έως και 30 ωρών με μέσο όρο τις 23-24 ώρες. Τα συμπτώματα αποτελούν η διάρροια, οι κοιλιακοί σπασμοί, ο εμετός, η ναυτία και ο πυρετός.

2.1.6.3 *Vibrio vulnificus*

Ένα από τα επικίνδυνα είδη του γένους *Vibrio*, είναι το *Vibrio vulnificus*. Εντοπίζεται σε ακτές όλου του κόσμου κυρίως τους θερμούς μήνες, καθώς σε κρύα ύδατα πιθανότατα δεν επιβιώνει ή βρίσκεται σε κατάσταση VBNC (Viable but nonculturable), μια κατάσταση κατά την οποία τα βακτήρια παραμένουν ζωντανά, αλλά δεν είναι ικανά να αναπτυχθούν.

Τρόφιμα που ενοχοποιούνται είναι τα θαλασσινά, κυρίως όμως τα ωμά στρείδια. Ωστόσο το αν τα στρείδια είναι φορείς, σε μεγάλο ποσοστό του *V. vulnificus*, είναι τυχαίο, καθώς έχει βρεθεί πώς ακόμα και σε ίδια μέρα σερβιρίσματος ή παρτίδας η ποσότητα του παθογόνου που φέραν τα στρείδια διέφερε αρκετά.

Το βακτήριο αυτό είναι ευαίσθητο στην κατάψυξη και την παστερίωση υπό χαμηλών θερμοκρασιών, σε υψηλή υδροστατική πίεση αλλά και σε ιονίζουσα ακτινοβολία (UV). (ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Karl R Matthews *et al* 4^η Αγγλική Έκδοση/1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΔίΣΙΓΜΑ 2021). Εντοπίζεται στα υφάλμυρα ύδατα, με περιεκτικότητα σε αλάτι 2–25 μέρη ανά χιλιάδες NaCl, και σε θερμοκρασίες μεταξύ T=13–30 °C. (*Vibrio* spp. Infections Craig Baker-Austin *et al* 2018)

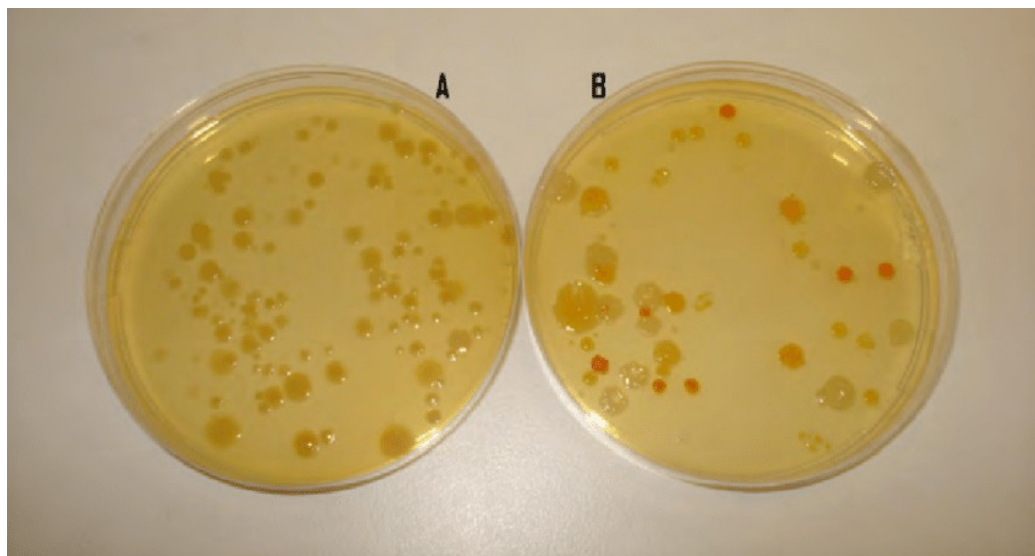
Από τη στιγμή όπου ένα άτομο θα μολυνθεί, θα εκδηλώσει ασθένεια μεταξύ 7 ωρών, ή ακόμα και αρκετές ημέρες, με μέσο όρο τις 26 ώρες. Συμπτώματα που θα εμφανιστούν θα είναι πυρετός, ρίγος, ναυτία και υπόταση. Από τα άτομα που δηλητηριάζονται, το 86% νοσηλεύονται. Αυτά τα οποία πάσχουν από πρωτογενή σηψαιμία λόγω μόλυνσης από κατανάλωση ωμών στρειδιών έχουν ποσοστό θνησιμότητας 60%. Επιπρόσθετα, ορισμένες λοιμώξεις από *V. vulnificus* οδηγούν σε νεκρωτική απονευρωσίτιδα (necrotizing fasciitis), μια σοβαρή λοίμωξη κατά την οποία η σάρκα γύρω από μια ανοιχτή πληγή “πεθαίνει”. (CDC- *Vibrio vulnificus* & Wounds-2019) Ενώ οι πληροφορίες για τις ασθένειες που προκαλούνται είναι πολλές,

εντούτοις, δεν είναι γνωστή ακόμα η ποσότητα του βακτηρίου που θα πρέπει να προσληφθεί ώστε να νοσήσει ένα άτομο.

(ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ Karl R Matthews *et al* 4^η Αγγλική Έκδοση/1^η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΔίΣΙΓΜΑ 2021)

2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

2.2.1 Tryptic Soy Agar (TSA)



Εικόνα 1: TSA με καλλιέργησιμα βακτήρια που απομονώθηκαν από έντερο πέστροφας.

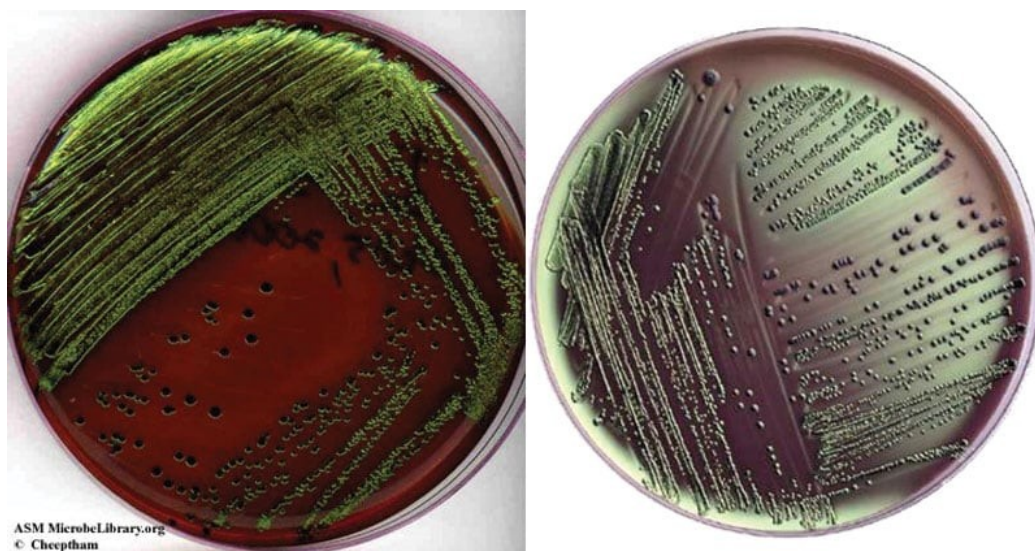
Το Tryptic Soy Agar (TSA) είναι ένα μη εκλεκτικό μέσο ανάπτυξης γενικής χρήσης που υποστηρίζει την ανάπτυξη των περισσότερων Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων, καθώς και πολλές ζύμες και μούχλες.

Σύσταση:

- Ενζυματική Πέψη Καζεΐνης...15.0g
- Ενζυματική Πέψη Σόγιας.....5.0g
- Χλωριούχο Νάτριο.....5.0g
- Άγαρ.....15.0g

(Tryptic Soy Agar (TSA) Principle, Preparation, Interpretation, MICROBIOLOGIE CLINIQUE)

2.2.2 Eosin-Methylene Blue Agar (EMB)



Εικόνα 2: *E.coli* που φαίνεται η πράσινη-μεταλλική χρώση.

Το Eosin-Methylene Blue Agar (EMB) είναι επιλεκτικό για αρνητικά κατά Gram αρνητικά. Επιπλέον, είναι χρήσιμο για την απομόνωση και τη διαφοροποίηση των διαφόρων αρνητικών κατά Gram βακίλλων και των εντερικών βακίλλων, γενικά γνωστά ως κολοβακτηριοειδή και κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή αντίστοιχα.

Σύσταση:

- Bacto Peptone.....10.0g
- Bacto Λακτόζης.....5.0g
- Bacto Σακχαρόζης.....5.0g
- Φωσφορικού Δικαλίου.....2.0g
- Άγαρ.....13.5g
- Bacto Eosin Y.....0.4g
- Bacto Μπλε του Μεθυλενίου.....0.065g

(American Society for Microbiology, Eosin-Methylene Blue Agar Plates Protocol, 2016)

2.2.3 CHROMagar™ Vibrio



Εικόνα 3: CHROMagar™ Vibrio με αποικίες *V. vulnificus/cholerae*. (μπλε), *V. parahaemolyticus* (μωβ) και *V. alginolyticus* (λευκές).

Το CHROMagar™ Vibrio είναι εκλεκτικό υπόστρωμα για τα βακτήρια του είδους *Vibrio*. Τα *V. vulnificus* και *V. cholerae* εμφανίζονται με χρώμα μπλε, το

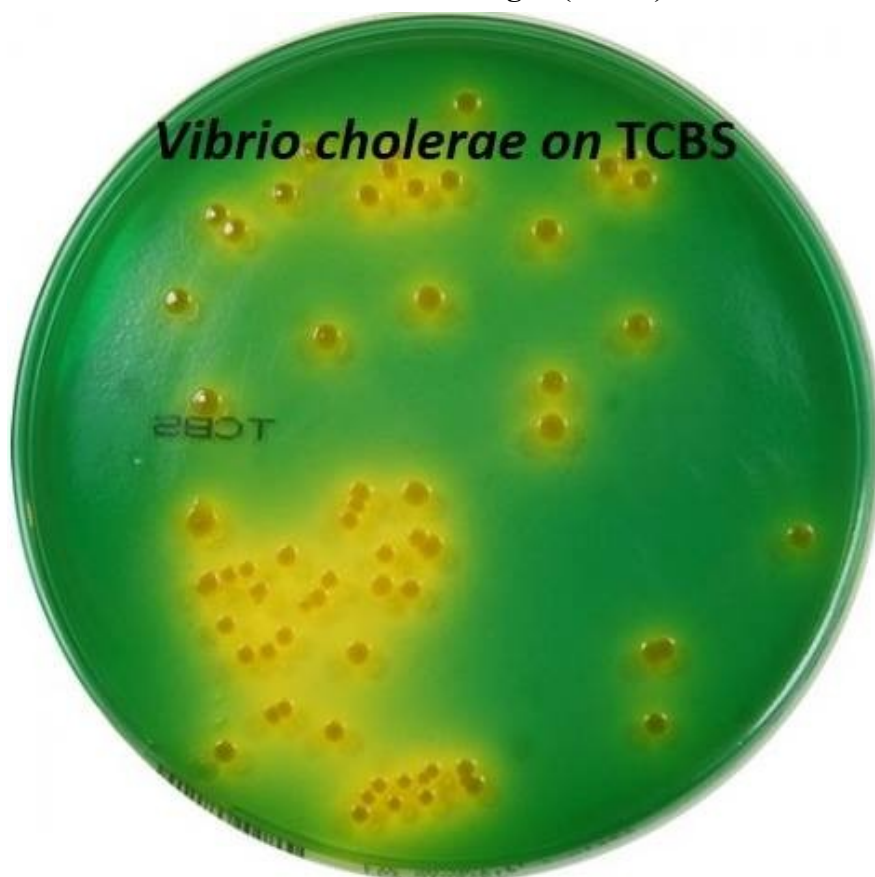
V.parahaemolyticus με χρώμα μωβ και οι αποικίες του *V.alginolyticus* παρουσιάζονται λευκές.

Σύσταση:

- Άγαρ.....15.0g
- Πεπτόνη & εκχύλισμα μαγιάς....8.0g
- Άλατα.....51.4g
- Μείγμα χρωμογόνου.....0.3g

(CHROMagar™ Vibrio, The Chromogenic Media Pioneer)

2.2.4 Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS)



Εικόνα 4: *V. cholerae* πάνω σε υπόστρωμα TCBS.

Το Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS) χρησιμοποιείται για την απομόνωση των *V. cholerae* και *V. parahaemolyticus*. Η αναστολή των θετικών κατά Gram βακτηρίων επιτυγχάνεται με την ενσωμάτωση oxgall, μια φυσική ουσία που περιέχει μείγμα χολικών αλάτων και χολικού νατρίου, ένα χολικό άλας. Το θειοθειικό νάτριο χρησιμεύει ως πηγή θείου που σε συνδυασμό με τον κιτρικό σίδηρο, ανιχνεύει την παραγωγή υδρόθειου. Η σακχαρόζη (σακχαρόζη) περιλαμβάνεται ως ζυμώσιμος υδατάνθρακας για τον μεταβολισμό των *Vibrio*.

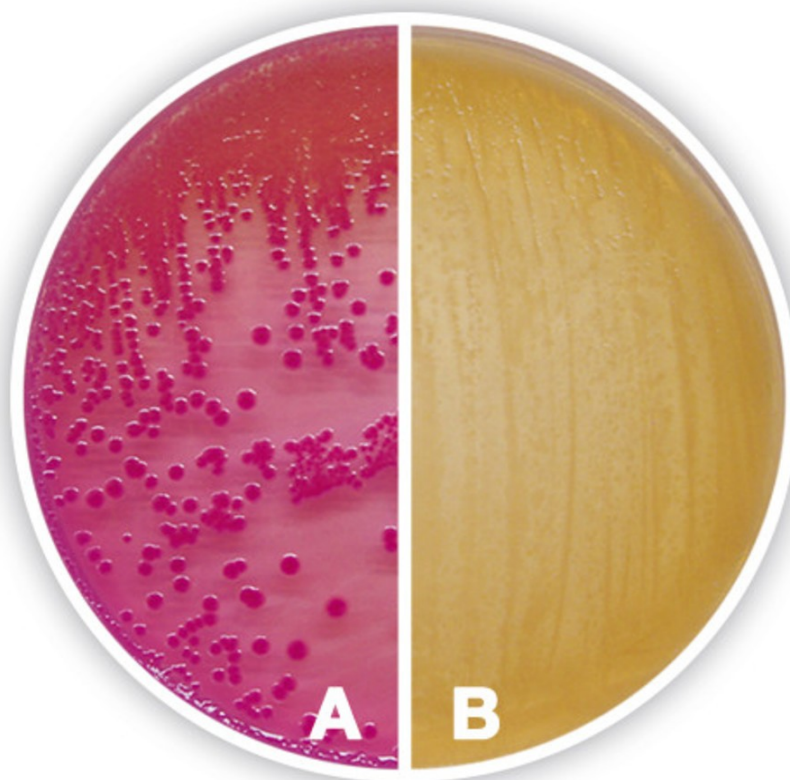
Το αλκαλικό pH του μέσου ενισχύει την ανάκτηση του *V. cholerae*. Το μπλε της θυμόλης και το μπλε της βρωμοθυμόλης περιλαμβάνονται ως δείκτες των μεταβολών του pH.

Σύσταση:

- Εκχύλισμα Μαγιάς..... 5.0 g
- Πεπτόνη Πρωτεόζης No.3..... 10.0 g
- Κιτρικό Νάτριο..... 10.0 g
- Θειοθειικό Νάτριο..... 10.0 g
- Oxgall..... 8.0 g
- Σακχαρόζη..... 20.0 g
- Χλωριούχο Νάτριο..... 10.0 g
- Εναμμώνιος Κιτρικός Σίδηρος..... 1.0 g
- Μπλε της Βρωμοθυμόλης..... 0.04 g
- Μπλε της Θυμόλης.....0.04 g
- Άγαρ.....15.0 g

(Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition)

2.2.5 MacConkey Agar (MC)



Εικόνα 5: A: Λακτόζη θετικά βακτήρια. B: Λακτόζη αρνητικά βακτήρια.

Το MacConkey Agar (MC) χρησιμοποιείται για την απομόνωση αρνητικών κατά Gram εντερικών βακτηρίων. Διαφοροποιεί μεταξύ των βακτηρίων που ζυμώνουν τη λακτόζη και αυτών που δεν έχουν την ικανότητα να την ζυμώσουν.

Χρησιμοποιείται για την απομόνωση κολοβακτηριδίων και εντερικών παθογόνων μικροοργανισμών σε ένα μεγάλο εύρος δειγμάτων.

Η μονοϋδρική λακτόζη είναι η ζυμώσιμη πηγή υδατανθράκων. Η εκλεκτική δράση αυτού του μέσου αποδίδεται στο κρυσταλλικό ιώδες και στα χολικά άλατα, τα οποία είναι ανασταλτικά για τα περισσότερα είδη θετικών κατά Gram βακτηρίων.

Τα στελέχη που ζυμώνουν την λακτόζη αναπτύσσονται σε κόκκινο ή ροζ χρώμα και τα στελέχη που δεν ζυμώνουν την λακτόζη έχουν άχρωμα διαφανές.

Σύσταση:

- Πεπτόνη.....17.0 g
- Πεπτόνη Πρωτεόζης.....3.0g
- Μονοϋδρική Λακτόζη.....10.0g
- Χολικά Άλατα.....1.5g
- Χλωριούχο Νάτριο.....5.0g
- Neutral Red.....0.03g
- Crystal Violet.....0.001 g
- Άγαρ.....13.5g

(MacConkey Agar- Composition, Principle, Uses, Preparation and Colony Morphology, Sagar Aryal, MicrobiologyInfo, 2022)

2.2.6 Baird-Parker Agar (B-P)



Εικόνα 6: Αποικίες *Staphylococcus aureus* σε BP agar.

Το Baird-Parker Agar (BP) χρησιμοποιείται ως μέσο για την καταμέτρηση του *Staphylococcus aureus*. Το εκλεκτικό μέσο χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του παθογόνου από τρόφιμα, περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα. Οι αποικίες του *S. aureus* είναι μαύρες με λεπτό λευκό περίγραμμα, που περιβάλλεται από μια γκρίζα περιοχή.

Σύσταση:

- Παγκρεατική Πέψη Καζεΐνης.....10.0g

- Εκχύλισμα Κρέατος.....5.0g
- Εκχύλισμα Μαγιάς.....1.0g
- Πυρροβικό Μάτριο.....10.0g
- L-γλυκίνη.....12.0g
- Χλωριούχο Λίθιο.....5.0g
- Άγαρ.....20.0g

(Baird-Parker Agar : Principle, Composition, Uses and Interpretation, MICROBIOLOGIE CLINIQUE)

2.2.7 Mannitol Salt Agar (MSA)



Εικόνα 7. Κίτρινες αποικίες του *S. aureus* σε MSA.

Το Mannitol Salt Agar (MSA) χρησιμοποιείται για την επιλεκτική απομόνωση και διαφοροποίηση του *Staphylococcus aureus*, για την απαρίθμηση των σταφυλόκοκκων σε τρόφιμα και γαλακτοκομικά προϊόντα και επιπλέον στη βακτηριολογική εξέταση νερού πισίνας, ιαματικών λουτρών και πόσιμου νερού με διήθηση με μεμβράνες.

Η μαννιτόλη είναι ο ζυμώσιμος υδατάνθρακας, η ζύμωση του οποίου οδηγεί σε παραγωγή οξέος, που ανιχνεύεται με τον δείκτη ερυθρό της φαινόλης, βοηθά στη διαφοροποίηση των σταφυλοκοκκικών ειδών. Οι θετικοί στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκοι (π.χ. *Staphylococcus aureus*) παράγουν κίτρινες αποικίες και περιβάλλοντες κίτρινες περιοχές, ενώ οι αρνητικοί στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκοι παράγουν κόκκινες αποικίες χωρίς κάποια αλλαγή χρώματος.

Σύσταση:

- Παγκρεατική Πέψη Καζεΐνης.....5.0g
- Πεπτική Πέψη Ζωικού Ιστού.....5.0g
- Εκχύλισμα Βοδινού Κρέατος.....1.0g
- Χλωριούχο Νάτριο.....75.0g
- D-Μαννιτόλη.....10.0g

- Ερυθρό της Φαινόλης.....0.025g
- Άγαρ.....15.0g

(Mannitol Salt Agar for the isolation of *Staphylococcus aureus*, Sagar Aryal, MicrobiologyInfo, 2022)

2.2.8 Salmonella-Shigella Agar (S-S)



Εικόνα 8: Αποικίες *Salmonella spp.* και *Shigella spp.* σε SS Agar.

Το Salmonella-Shigella Agar (SS) είναι εκλεκτικό υπόστρωμα για την απομόνωση των *Salmonella spp.* και *Shigella spp.* από διάφορους τύπους δειγμάτων όπως τα κόπρανα ή και τα τρόφιμα.

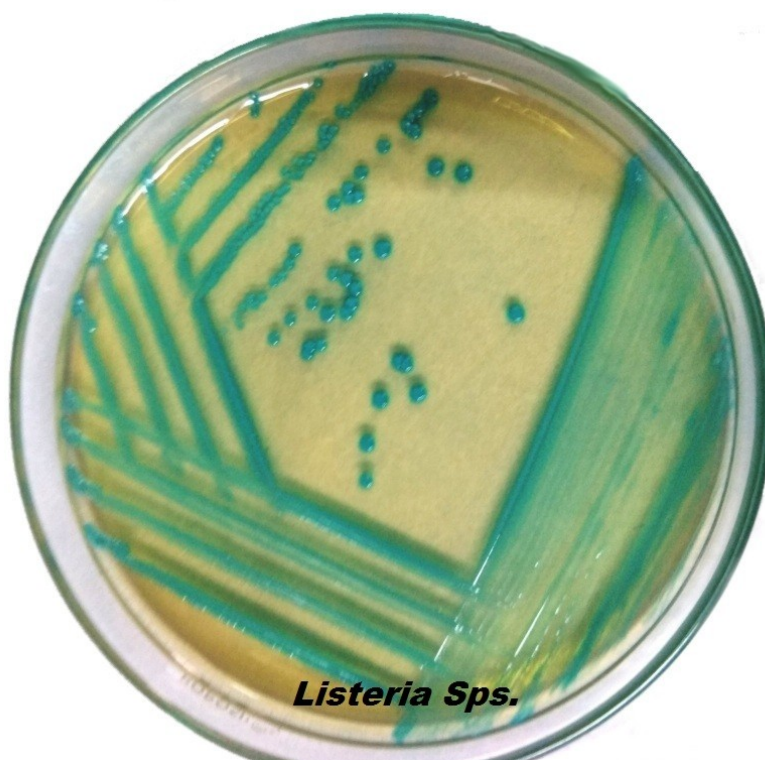
Οι αποικίες των παθογόνων αυτών εμφανίζονται ως κυκλικές μαύρες τελείες στο υπόστρωμα που είναι ερυθρό.

Σύσταση:

- Brilliant Green.....0.0003g
- Κιτρικό Σίδηρο.....1.0g
- Λακτόζη.....10.0g
- Εκχύλισμα Κρέατος.....5.0g
- Neutral Red.....0.025g
- Χολή Βοδιού, Αφυδατωμένη.....8.5g
- Πεπτόνη.....5.0g
- Κιτρικό Νάτριο.....10.0g
- Θειοθειικό Νάτριο.....8.5g
- Άγαρ.....15.0g

(Salmonella Shigella (SS) Agar- Composition, Principle, Uses, Preparation and Result Interpretation, Sagar Aryal, MicrobiologyInfo, 2022)

2.2.9 Listeria-Agar (L-A)



Εικόνα 9: Αποικίες *L. monocytogenes* σε LA υπόστρωμα.

Το Listeria-Agar (LA) είναι εκλεκτικό υπόστρωμα για το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes*. Χρησιμοποιείται για την απομόνωση και διαφοροποίηση της *L. monocytogenes* από άλλα είδη του γένους.

Το Listeria περιέχει τη χρωμογόνο ένωση 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γλυκοπυρανοσίδη, η οποία αποτελεί υπόστρωμα για την ανίχνευση της β γλυκοσιδάσης. Αυτό το ένζυμο είναι κοινό σε όλες τις *Listeria* που εμφανίζονται ως αποικίες με μπλε-πράσινο χρώμα στο μέσο. Η διαφοροποίηση της *L. monocytogenes* από τη μη παθογόνο *Listeria spp.* επιτυγχάνεται μέσω της παραγωγής μιας ειδικής για τη φωσφατιδυλνισιτόλη, φωσφολιπάση C (PI-PLC). Η *Listeria monocytogenes* υδρολύει το ειδικό καθαρισμένο υπόστρωμα που προστίθεται στο μέσο, παράγοντας ένα αδιαφανές φωτοστέφανο γύρω από τις αποικίες.

Η *Listeria ivanovii* επίσης παράγει ένα αδιαφανές φωτοστέφανο γύρω από τις αποικίες μετά από επώαση 48 ωρών. Οι αναστολές στο μέσο μειώνουν την ανάπτυξη της άλλων θετικών ή αρνητικών κατά Gram παθογόνων, καθώς και των ζυμομυκήτων και των μυκήτων. Το άγαρ είναι ο στερεοποιητικός παράγοντας, ενώ το χλωριούχο λίθιο, το ναλιδιζικό οξύ και η κυκλοεξιμίδη παρέχουν εκλεκτικότητα.

Σύσταση:

- Ενζυματική Πέψη Ζωικών Ιστών.....18.0g
- Ενζυματική Πέψη Καζεΐνης.....6.0g
- Εκχύλισμα Ζύμης.....10.0g
- Πυρροβικό Νάτριο.....2.0g
- Γλυκόζη.....2.0g
- Γλυκεροφωσφορικό Μαγνήσιο.....1.0g
- MgSO₄, άνυδρο.....0.5g
- NaCl.....5.0g

- LiCl.....10.0g
- Na₂HPO₄, άνυδρο.....2.5g
- 5-Βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β-D-γλυκοκυρανοσίδη.....0.05g
- Άγαρ.....13.0g

Συμπληρώματα που προστίθενται μετά τη θέρμανση:

- Ναλιδιξικό Οξύ Άλας Νατρίου.....0.02g
- Κεφταζιδίμη.....0.02g
- Θεϊκή Πολυμυξίνη Β.....76700 IU
- Αμφοτερικίνη Β.....0.01g
- L-α-φωσφατιδυλινοσιτόλη.....2.0g

(Chromocult® Listeria Agar (Base) acc. OTTAVIANI and AGOSTI acc. ISO 11290, Millipore)

III ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Προετοιμασία Υλικών (Θρεπτικών Υποστρωμάτων)

Για την παρασκευή των υλικών χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό και όλα τα σκεύη ήταν αποστειρωμένα. Η παρασκευή του κάθε υλικού έγινε με βάση τις προδιαγραφές του κατασκευαστή του. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία, τα υλικά τοποθετούνται σε φιάλες Duran. Στη συνέχεια, οι φιάλες Duran, που περιέχουν τα θρεπτικά υποστρώματα σε υγρή μορφή, τοποθετούνται στον κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά το πέρας της αποστείρωσης οι φιάλες μπαίνουν σε κλίβανο ξηρής θερμότητας, έτσι ώστε να πέσει η θερμοκρασία ομαλά στους 50-60°C (η θερμοκρασία δε θα πρέπει να είναι κάτω από τα παραπάνω όρια, καθώς στερεοποιείται το άγαρ στις φιάλες). Όταν η θερμοκρασία των υλικών είναι εντός ορίων, τα υλικά, τοποθετούνται σε τρυβλία διαμέτρου 55mm. Τέλος αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος να στερεοποιηθεί το υγρό υλικό και έπειτα, τοποθετούνται σε ψυγείο στους 4°C.

3.2 Δειγματοληψία

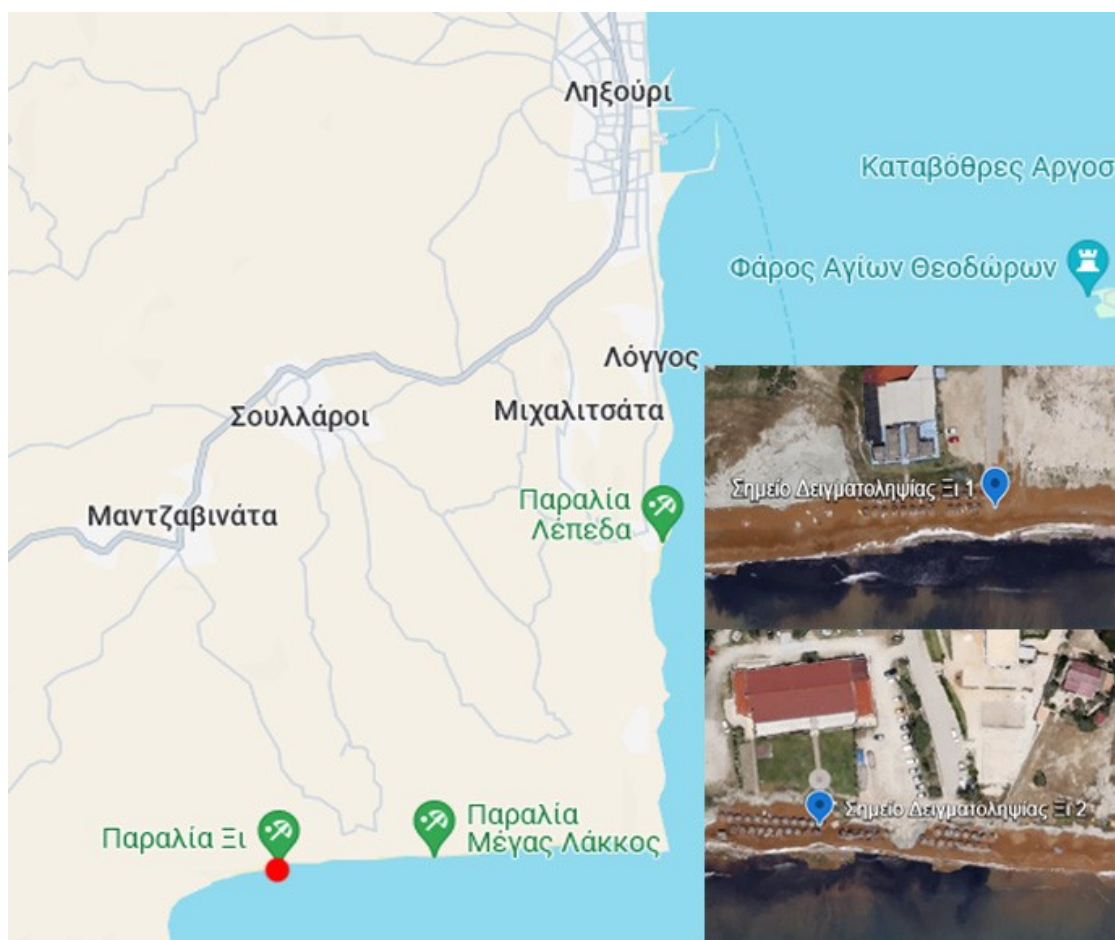
Η δειγματοληψία από τα σημεία αυτά πραγματοποιήθηκε παίρνοντας δείγμα νερού από την επιφάνεια του νερού, μέχρι τα 10cm. Το νερό τοποθετήθηκε σε φιάλες Duran όγκου 1 λίτρου οι οποίες ήταν αποστειρωμένες προ δειγματοληψίας. Η αποστείρωση των φιαλών έγινε σε κλίβανο αποστείρωσης στους 121°C για 15 λεπτά.

Συνολικά έγιναν δύο δειγματοληψίες ανά περιοχή με διαφορά, περίπου, ενός μήνα μεταξύ τους. Στης 29 Οκτωβρίου έγιναν οι πρώτες δειγματοληψίες στην Πεσσάδα και τα Γραδάκια. Ακολούθησαν η Σάμη και η Αγία Ευφημία που έγιναν 2 Νοεμβρίου και τέλος η Αγία Κυριακή και το Ξί που πραγματοποιήθηκαν 5 Νοεμβρίου. Οι επόμενες δειγματοληψίες έγιναν σχεδόν ένα μήνα μετά, με την Αγία Κυριακή, Αγία Ευφημία και το Ξί στις 30 Νοεμβρίου και τα Γραδάκια, την Σάμη και την Πεσσάδα στις 9 Δεκεμβρίου.

Οι τοποθεσίες που επιλέχτηκαν για την δειγματοληψία είναι σημεία τα οποία περιτριγυρίζουν την Κεφαλονιά. Με τον τρόπο αυτό, τα δείγματα έχουν διαφορές μεταξύ τους καθώς στην Σάμη, για παράδειγμα, υπάρχουν απέναντι ελληνικές ακτές, ενώ παραλίες σαν το Ξί βαπτίζονται μόνο με το Ιόνιο Πέλαγος.

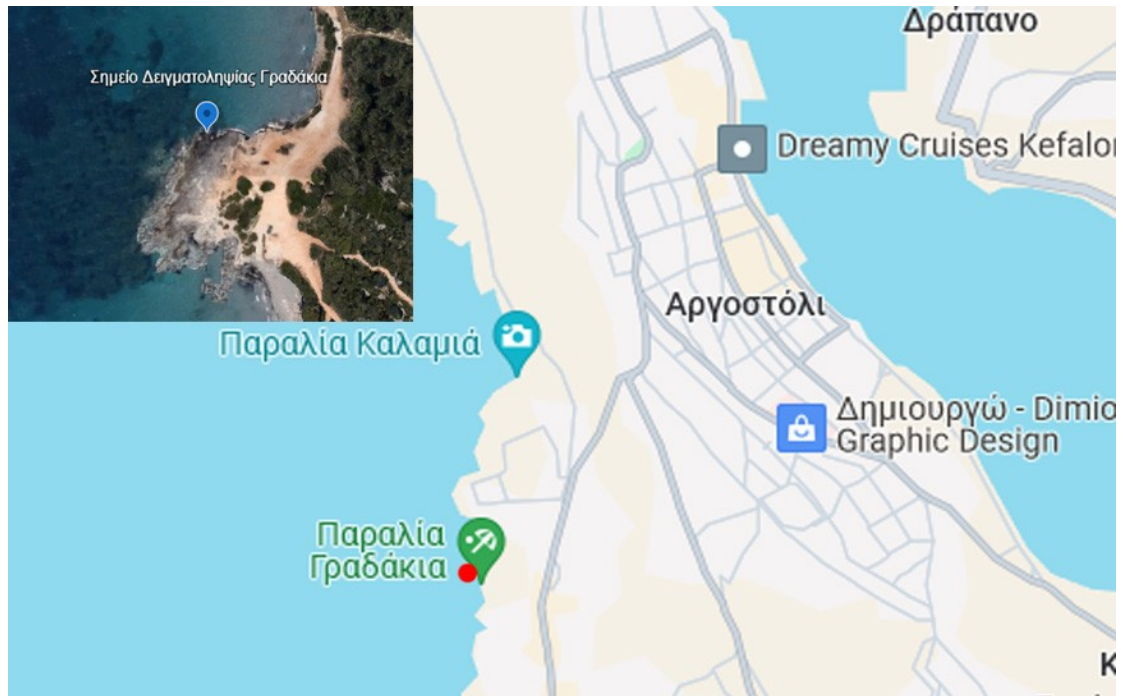
Οι παραλίες που επιλέχτηκαν για δειγματοληψία είναι:

- Το Ξί, παραλία δυτικής Κεφαλονιάς, νότια από το Ληξούρι.



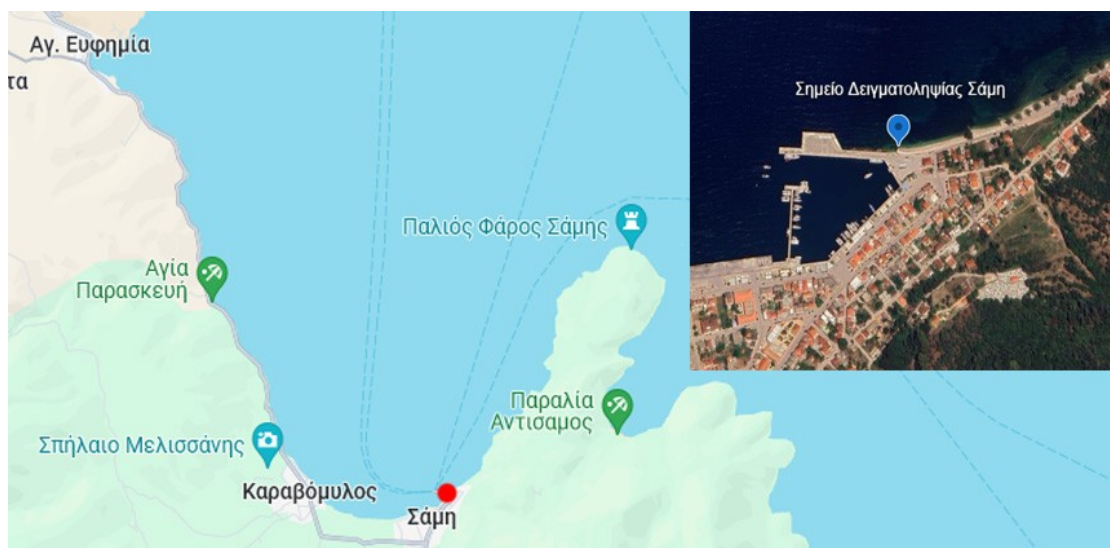
Εικόνα 10: Ακριβή σημεία δειγματοληψίας στο Ξί.

- Τα Γραδάκια, παραλία δυτικά του Αργοστολίου. Η παραλία αυτή είναι πιο κοντά στο Αργοστόλι από όλα τα υπόλοιπα σημεία δειγματοληψίας.



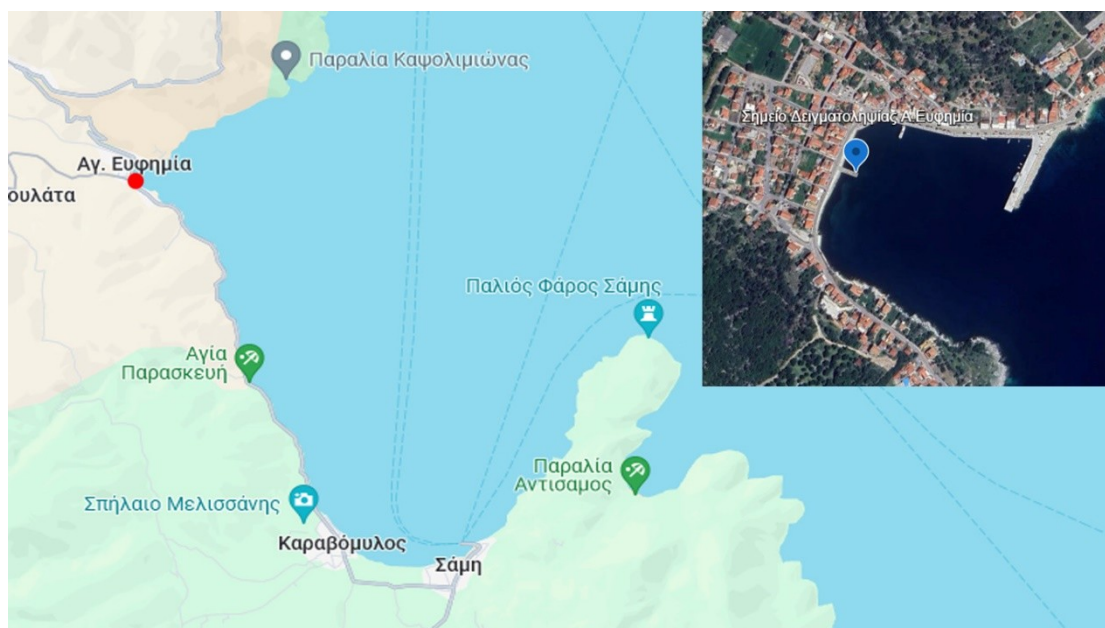
Εικόνα 11: Ακριβές σημείο δειγματοληψίας στα Γραδάκια.

- Η Σάμη, το κεντρικό λιμάνι της Κεφαλονιάς, ανατολικά βρίσκονται ελληνικές ακτές.



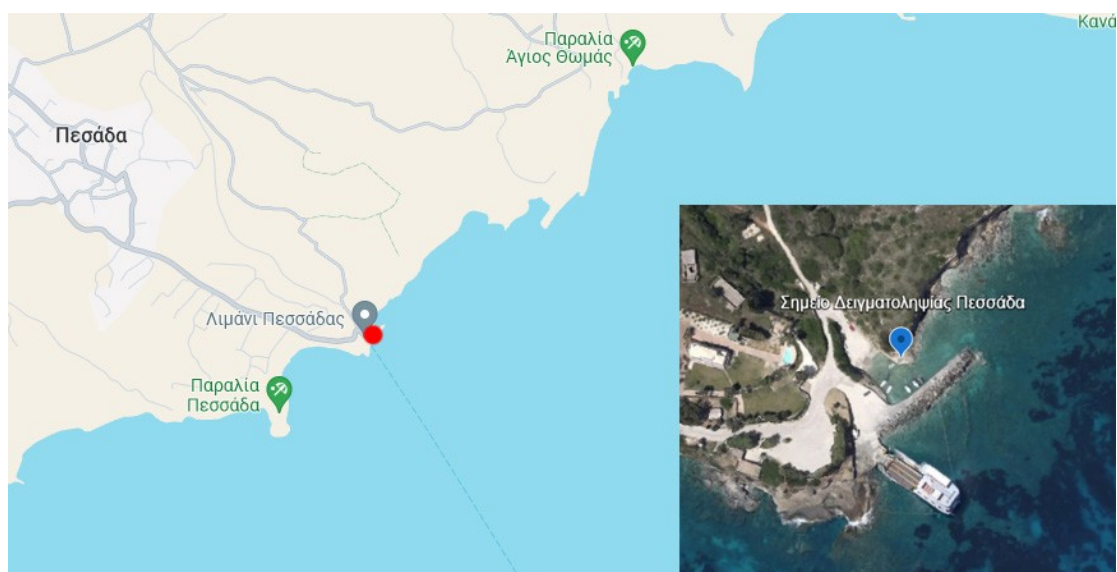
Εικόνα 12: Ακριβές σημείο δειγματοληψίας στη Σάμη.

- Η Αγία Ευφημία, παραλία ανατολικής Κεφαλονιάς, βόρεια από το λιμάνι της Σάμης.



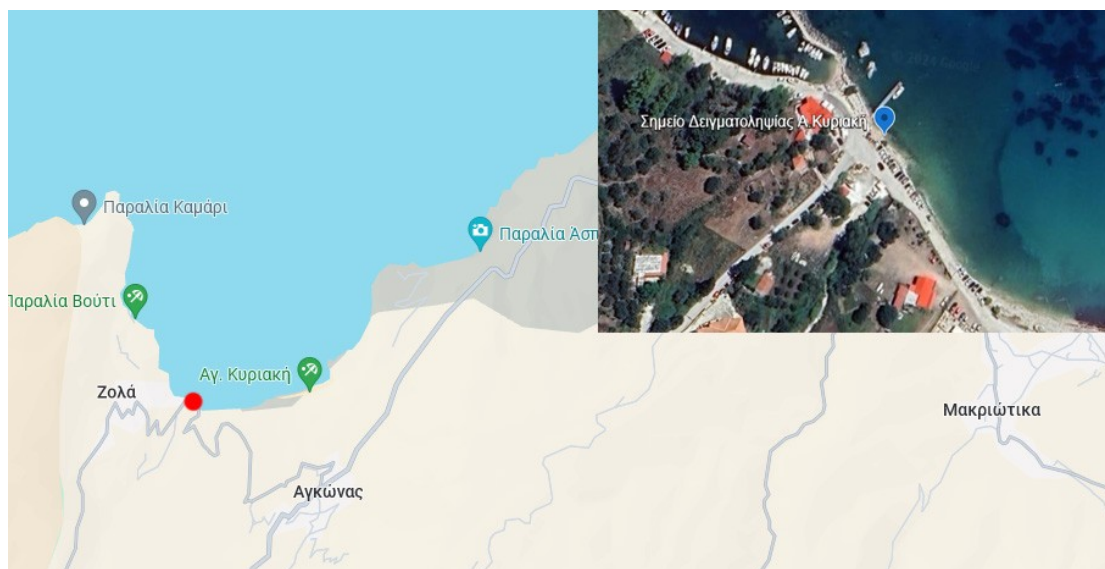
Εικόνα 13: Ακριβές σημείο δειγματοληψίας Αγίας Ευφημίας.

- Το λιμάνι της Πεσσάδας, νοτιοανατολικά του Αργοστολίου, απέναντι βρίσκονται οι ακτές της Ζακύνθου.



Εικόνα 14: Ακριβές σημείο δειγματοληψίας στο λιμάνι της Πεσσάδας.

- Η Αγία Κυριακή, παραλία βόρειας Κεφαλονιάς.



Εικόνα 15: Ακριβές σημείο δειγματοληψίας στην Αγία Κυριακή.

3.3. Πειραματική Διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία ακολούθησε το πρωτόκολλο του American society of Microbiology, Bacteriological Examination of Waters: Membrane Filtration Protocol, Foster and Pinedo, 23 Ιουλίου 2015.

3.3.1 Σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν

Κάθε μέρα όπου γινόταν η κάθε δειγματοληψία, πραγματοποιούνταν και η διαδικασία της ανάλυσης. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν:

1. Ειδική στήλη φιλτραρίσματος
2. Αντλία κενού
3. Ειδικά γυάλινα σκεύη φιλτραρίσματος (ένα “χωνί” και ένα φίλτρο)
4. Λαβίδες
5. Αποστειρωμένα φίλτρα, από την εταιρία *Millipore*, διαμέτρου 47 mm και διατομή πόρων 0.45 mm με τετραγωνικό πλέγμα.
6. Μικροπιπέτες των 1000μL
7. Ογκομετρικοί κύλινδροι των 100ml
8. Δοκιμαστικοί σωλήνες με 9ml πεπτόνη για περίπτωση αραίωσης κατά 10 φορές (αραίωση 1/10: 1ml νερού και 9ml πεπτόνης)

Όλα τα σκεύη ήταν αποστειρωμένα και όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες.

3.3.2 Διαδικασία πειράματος

- Κατά την έναρξη της διαδικασίας μεταφέρθηκαν 100ml νερού-δείγματος από τις φιάλες Duran σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100ml.
- Από τα γυάλινα σκεύη φιλτραρίσματος αφαιρέθηκαν τα “χωνιά” και τοποθετήθηκαν με χρήση λαβίδας τα φίλτρα, με το πλέγμα προς τα πάνω, για την κατακράτηση των βακτηρίων πάνω σε αυτό.
- Επανατοποθετήθηκαν τα “χωνιά” πάνω στα γυάλινα φίλτρα και έπειτα προστέθηκαν τα 100ml νερού-δείγματος για ανάλυση.
- Αφού περάσει το δείγμα από τα φίλτρα, αφαιρούνται τα “χωνιά”, και μετά τα φίλτρα, με χρήση αποστειρωμένων λαβίδων, και τοποθετούνται σε τρυβλία.

Παρατηρήθηκε πως ορισμένοι μικροοργανισμοί βρίσκονταν σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις. Για αυτόν το λόγο πραγματοποιήθηκε αραίωση 1/10 με 1ml νερού δείγματος με 9ml πεπτόνης για τα συγκεκριμένα θρεπτικά υποστρώματα.

Η διαδικασία επαναλήφθηκε με τις κατάλληλες αραιώσεις για όλα τα υποστρώματα (για όλους τους μήνες όπου πραγματοποιήθηκε η ανάλυση, τέλη Οκτώβρη-αρχές Νοέμβρη και τέλη Νοέμβρη-αρχές Δεκέμβρη).



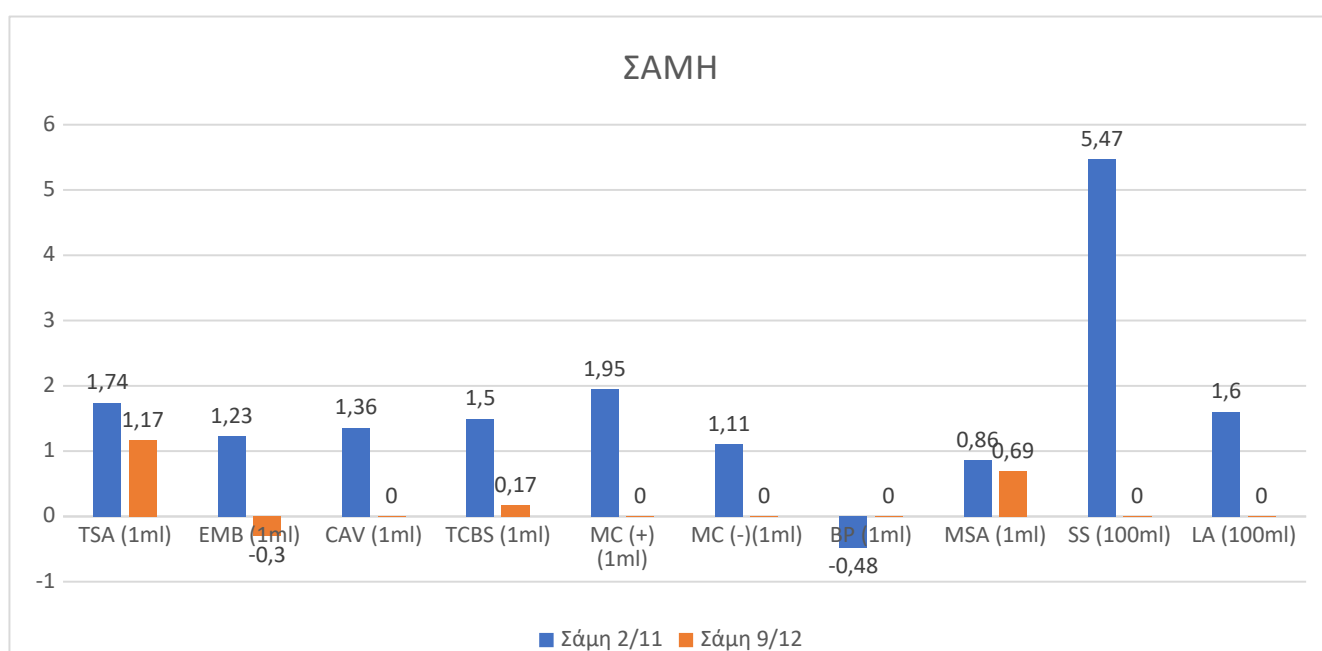
Εικόνα16: Διάταξη οργάνου φιλτραρίσματος.

IV ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μετά την ανάλυση και την επώαση των μικροοργανισμών, τα τρυβλία μετρήθηκαν. Οι μονάδες όπου χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρησή τους είναι CFU/1ml, Colony Forming Units ανά 1ml, δηλαδή το ποσό των κυττάρων που μπορούν να δημιουργήσουν αποικίες στο 1ml. Τα τρυβλία SS (Salmonella – Shigella) και τα LA (Listeria Agar) έχουν φιλτραριστεί από όγκο των 100ml.

4.1.1 Σάμη



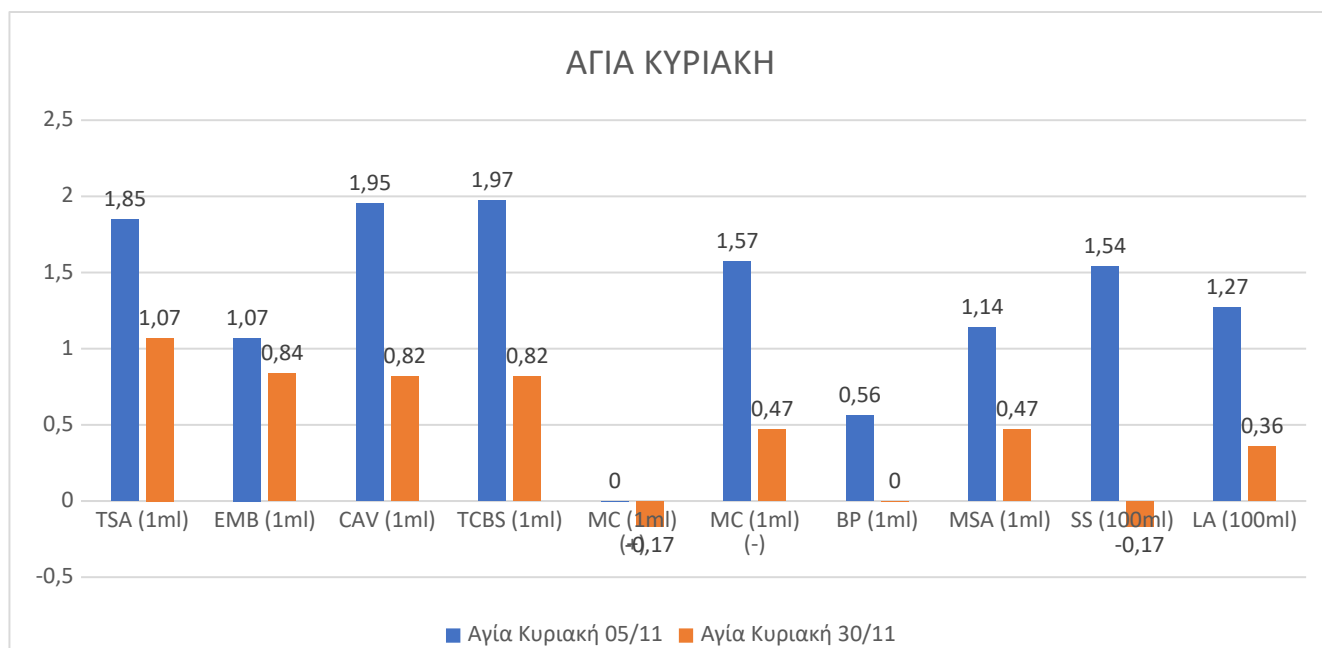
Γράφημα 1: Αποτελέσματα από το λιμάνι της Σάμης.

Οι τιμές των τρυβλίων της Σάμης που λήφθηκαν αρχές Νοέμβρη κυμαίνονται στα 1.0-2.0 CFU/1ml. Τα τρυβλία SS και LA έχουν φιλτραριστεί από 100ml οπότε δείχνουν και μεγαλύτερη ένδειξη. Αντιθέτως οι τιμές του Δεκέμβρη είναι τελείως αντίστροφα καθώς πολλά από τα δείγματα δεν είχαν εμφανίσει καθόλου αποικίες.

4.1.2 Αγία Κυριακή

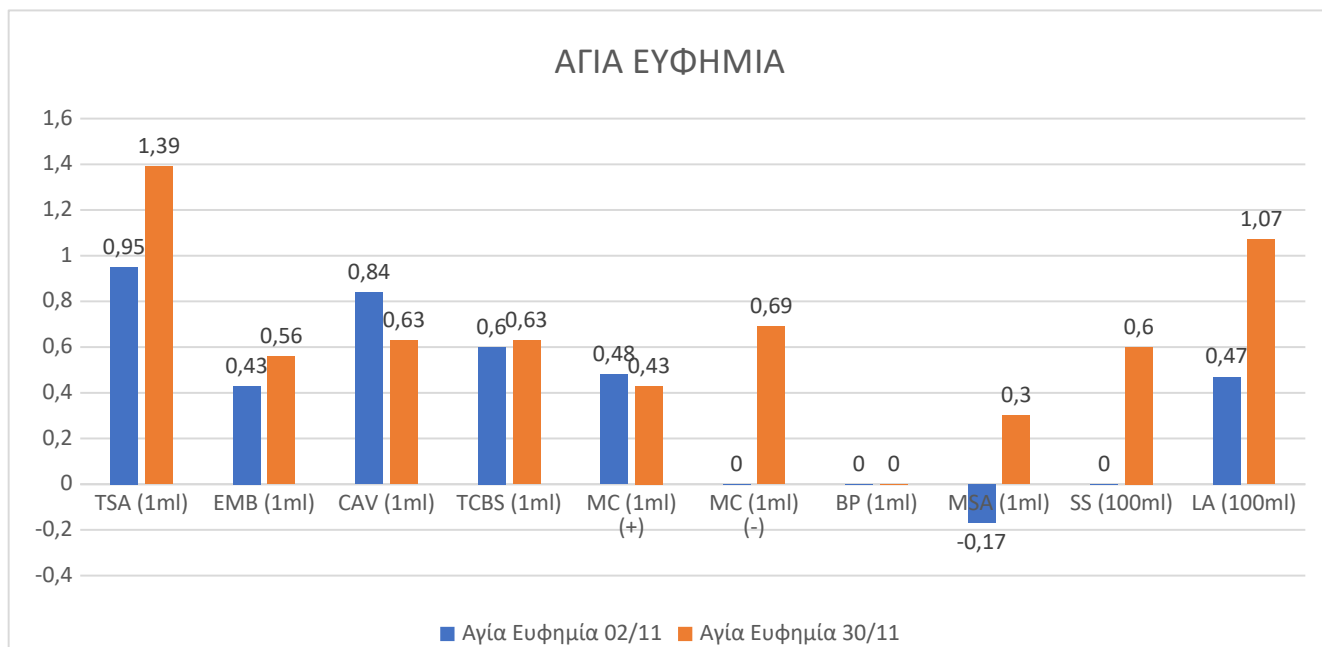
Γράφημα 2: Αποτελέσματα Αγίας Κυριακής.

Τα αποτελέσματα στην Αγία Κυριακή αρχές Νοεμβρίου κυμαίνονται σε τιμές 1.0-2.0 CFU/ml. Την μεγαλύτερη τιμή έδειξε το TCBS, θρεπτικό υπόστρωμα για τους



V. cholerae και *V. parahaemolyticus*, που έφτασε σε 1.97 CFU/ml και την μικρότερη τα λακτόζη-θετικά, που δεν υπήρχε κανένα. Οι τιμές στα τέλη Νοεμβρίου έχουν μειωθεί σχεδόν κατά το ήμισυ.

4.1.3 Αγία Ευφημία

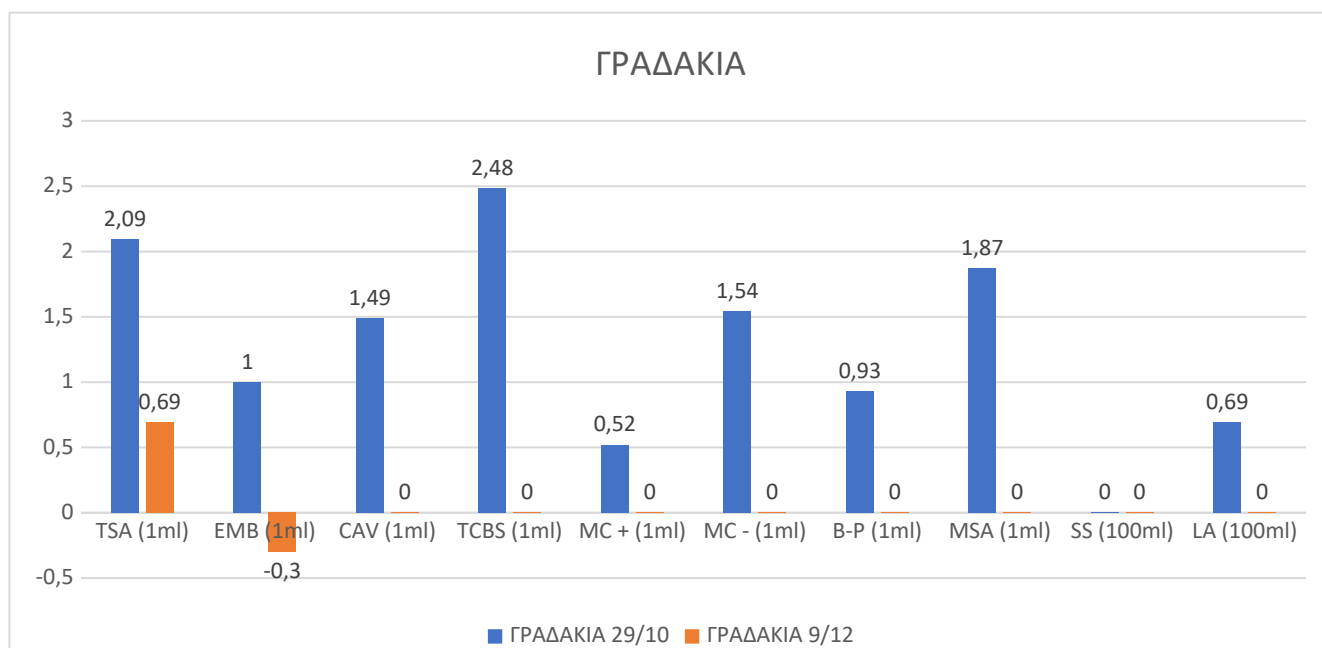


Γράφημα 3: Αποτελέσματα στην Αγία Ευφημία.

Η μέση κύμανση τιμών και στις δύο δειγματοληψίες στην Αγία Ευφημία είναι από 0.4-1.0 CFU/ml. Υπήρξαν αρκετές διαφορές ανάμεσα στους δύο μήνες με την

αύξηση των αποικιών στο TSA και SS, αύξηση στα λακτόζη-αρνητικά βακτήρια του MC Agar και διπλασιασμός των αποικιών στα τρυβλία LA.

4.1.4 Γραδάκια



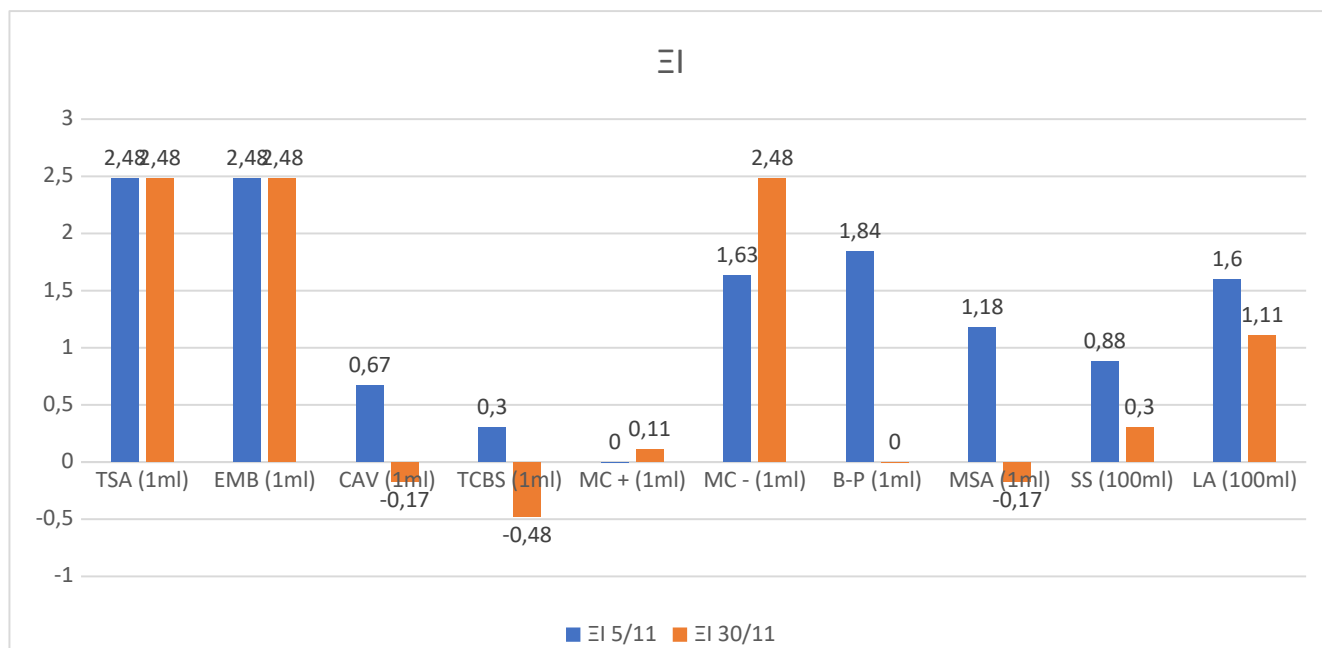
Γράφημα 4: Αποτελέσματα στα Γραδάκια..

Το μικροβιακό φορτίο τέλη Οκτωβρίου έχει μεγάλη διακύμανση με την μικρότερη τιμή στα 0.52 CFU/ml στα λακτόζη-θετικά βακτήρια του MC Agar και την μεγαλύτερη στα 2.48 CFU/ml στο υπόστρωμα TCBS, θρεπτικό υπόστρωμα για τους *V. cholerae* και *V. parahaemolyticus*. Η μόνη υπάρχουσα τιμή στην δεύτερη δειγματοληψία είναι στο TSA με τιμή 0.69 CFU/ml.

4.1.5 Ξι

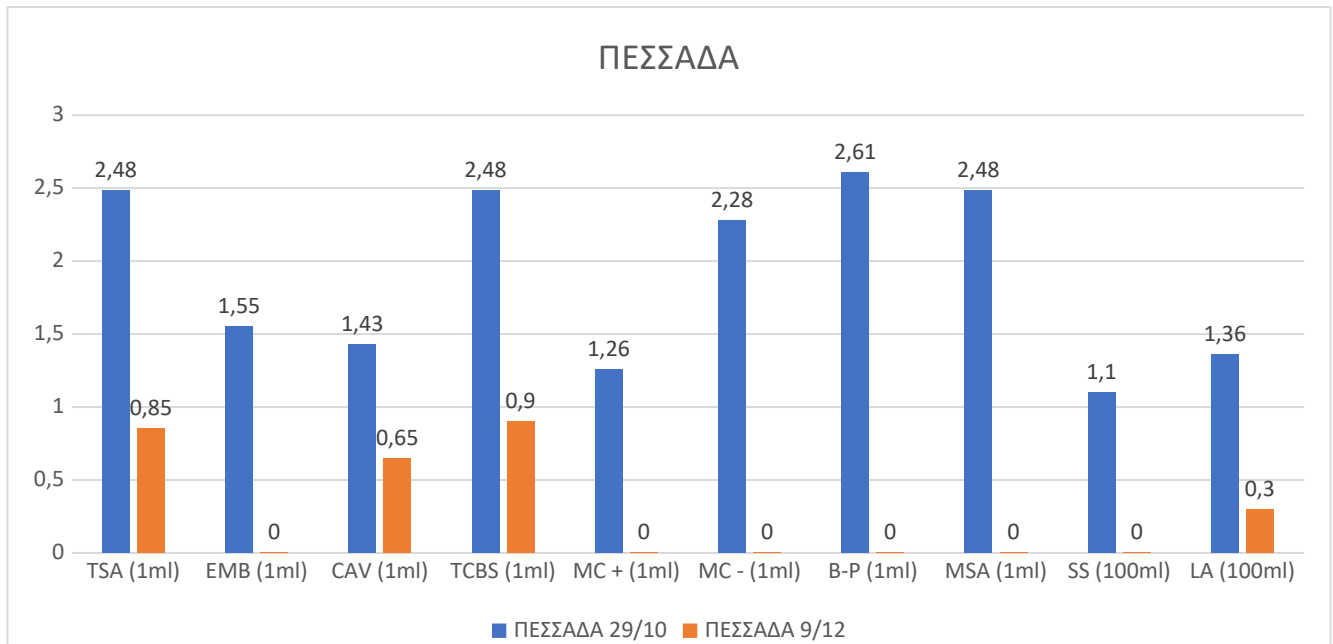
Γράφημα 5: Αποτελέσματα στην παραλία Ξί.

Οι τιμές στην παραλία του Ξί αρχές Νοέμβρη είχαν μέγιστο 2.48 CFU/ml και ελάχιστο τα λακτόζη-θετικά βακτήρια του MC Agar που δεν είχαν κάποια ένδειξη.



Στο Ξί παρατηρήθηκε πως οι τιμές και στις δύο δειγματοληψίες για το γενικό υπόστρωμα και το EMB, που ανιχνεύει *E. coli*, είχαν τις ίδιες τιμές. Ακόμη, τον Δεκέμβρη υπήρχε αύξηση στα λακτόζη-αρνητικά, όμως δεν υπήρχε καθόλου ένδειξη σταφυλόκοκκων.

4.1.6 Πεσσάδα



Γράφημα 6: Αποτελέσματα στο λιμάνι της Πεσσάδας.

Τα αποτελέσματα της Πεσσάδας τέλη Οκτώβρη ξεκινούσαν με τιμή 1.1 CFU/ml, να είναι η μικρότερη, και με μεγαλύτερη 2.61 CFU/ml. Αρχές Δεκέμβρη όμως υπήρχε τεράστια διαφορά στα τρυβλία, καθώς σα περισσότερα δεν είχαν καθόλου ένδειξη.

4.2 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.2.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα έχουν χωριστεί σε δύο ομάδες, καθώς σε κάποιες από τις περιοχές δεν υπήρχαν μεγάλες αλλαγές και το μικροβιακό φορτίο έμεινε σχεδόν ίδιο, ενώ σε άλλες περιοχές, ίσως με περισσότερο τουρισμό, υπήρξε τεράστια διαφορά μέσα σε δύο μήνες. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει πως τουριστικές παραλίες, δεν είχαν την ίδια κίνηση με τον προηγούμενο μήνα.

Ένα ακόμη φαινόμενο που επηρεάζει το μικροβιακό φορτίο των θαλασσών, είναι η μετατροπή παλαιών πηγαδιών σε βόθρους. Τα πηγάδια αυτά είναι συνδεδεμένα υπόγεια με τον υδροφόρο ορίζοντα, ο οποίος με τη σειρά του συνδέεται με τα θαλάσσια ύδατα.

Η Σάμη είναι μία από τις περιοχές που παρουσίασε μεγάλες διαφορές ανάμεσα στις δειγματοληψίες. Οι αλλαγές αυτές πιθανό να έχουν προκληθεί από την μείωση των δρομολογίων που πραγματοποιούνταν στο λιμάνι, αλλά και τον ίδιο τον αριθμό των πλοίων που στάθμευαν στο λιμάνι ή κοντά σε αυτό.

Η Αγία Κυριακή πιθανό να έχει αυξημένο μικροβιακό πληθυσμό και τον χειμώνα, διότι περιτριγυρίζεται από βουνά, όπου κατά τη διάρκεια έντονων βροχοπτώσεων παρασύρεται το μικροβιακό τους φορτίο στη θάλασσα. Ακόμη, κοντά στο σημείο της δειγματοληψίας υπήρχε ένας σωλήνας ο οποίος συνδεόταν άμεσα με την θάλασσα. Τα περιεχόμενα της υδρορροής αυτής μπορεί να είναι απλά νερό της βροχής ή και να συνδέεται με κάποιο βόθρο, όπως προαναφέρθηκε παραπάνω. Πάντως η ύπαρξη του σωλήνα αυτού επηρέασε το μικροβιακό φορτίο της παραλίας.

Η Αγία Ευφημία είναι ένα λιμάνι, το οποίο χρησιμοποιείται χρονιάια. Η λειτουργία αυτή του λιμανιού σαν σταθμός για καράβια αλιείας, σε συνδυασμό με τις βροχοπτώσεις, εξηγούν την ύπαρξη του αυξημένου φορτίου, είτε εντός μηνών με έντονο τουρισμό, είτε εκτός.

Τα Γραδάκια παρουσιάζουν διαφορές παρόμοιες με την Σάμη. Τέλη Οκτώβρη, που ο τουρισμός σταματάει, υπάρχει μεγάλη αύξηση μικροβιακού φορτίου. Ωστόσο, το Δεκέμβρη αποτέλεσμα έδωσε μόνο το TSA.

Η ιδιαιτερότητα της παραλίας του Ξί είναι το αργιλώδες περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Η άργιλος είναι ένα περιβάλλον όπου ορισμένα βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν επιτρέποντάς τους να παράγουν βιοϋμένια, ενώ ταυτόχρονα προστατεύονται από άλλους παράγοντες που μπορούν να τα καταπολεμήσουν. Κατά

την διάρκεια βροχοπτώσεων η άργιλος παρασύρεται από το έδαφος και εισέρχεται στη θάλασσα, αλλάζοντας το χρώμα αυτής σε ένα πυκνό γκρι ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται το μικροβιακό φορτίο. Μάλιστα τα βακτήρια, που από την άργιλο καταλήγουν στο νερό, είναι πιο ανθεκτικά λόγω των βιοϋμενίων που έχουν παράχθει. (Clay minerals interaction with microorganisms: a review, Cuadros et. Al., 2017).

Το λιμάνι της Πεσσάδας φαίνεται οπτικά να είναι ένα ήσυχο σημείο και όχι ιδιαίτερα βρώμικο. Με μικροβιακό φορτίο σε τόσο υψηλές τιμές μπορεί να υποθεί πως πλοία, ιδιωτικά και μη, αδειάζουν τα λύματά τους μέσα στη θάλασσα. Ακόμη, όπως προαναφέρθηκε, τα παλαιά πηγάδια της περιοχής, που τώρα χρησιμοποιούνται ως βόθροι, καταλήγουν στα νερά της Πεσσάδας. Τέλος τα ξενοδοχεία της περιοχής μπορούν να συμβάλλουν στη μόλυνση των τριγύρω υδάτων έχοντας υδρορροές που καταλήγουν σε αυτήν. (Νέγκας, 2019).

4.2.2. Νομοθεσία

Με βάση το Παράρτημα I της Οδηγίας 2006/7/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 15^{ης} Φεβρουαρίου 2006 σχετικά με τη διαχείριση των υδάτων κολύμβησης, ορίζονται κριτήρια αξιολόγησης για τα παράκτια ύδατα. Περαιτέρω, ορίζει πως για τους Εντερόκοκκους μέσα στα ύδατα η εξαιρετική ποιότητα είναι μέχρι συγκέντρωση 100 cfu/100ml, η καλή ποιότητα 200 cfu/100ml και επαρκής ποιότητα 185 cfu/100ml. Για τα Κολοβακτηρίδια η εξαιρετική ποιότητα είναι μέχρι τα 250cfu/100ml και η καλή και επαρκής ποιότητα μέχρι 500 cfu/100ml. Στην παρούσα πτυχιακή, η ανάλυση των υδάτων συμπεριλάμβανε μόνο κολοβακτηρίδια, *Escherichia coli*, στα θρεπτικά υποστρώματα Eosin-Methylene Blue Agar (EMB).

4.2.2.1. Σάμη

Οι τιμές του EMB της 02/11 ήταν 1.23 cfu/1ml, άρα 123 cfu/100ml που την βάζει στην κατηγορία της εξαιρετικής ποιότητας. Στης 09/12 βγαίνουν αρνητικές, το οποίο σημαίνει πως στα 3 τρυβλία που καταμετρήθηκαν ο μέσος όρος ήταν λιγότερο του 1, οπότε ο λογάριθμος είναι αρνητικός. Η αρνητική τιμή του EMB βάζει την Σάμη στις 09/12 στην κατηγορία της εξαιρετικής ποιότητας.

4.2.2.2. Αγία Κυριακή

Οι τιμές και στις δύο αναλύσεις βάζουν την Αγία Κυριακή στην κατηγορία της εξαιρετικής ποιότητας με 107 cfu/100ml της 5/11 και 84 cfu/100ml της 30/11.

4.2.2.3. Αγία Ευθυμία

Η Αγία Ευθυμία και στις αναλύσεις των δύο αυτών μηνών είχε τιμές 43 cfu/100ml της 02/11 και 56 cfu/100ml της 30/11, γεγονός που την βάζει στην κατηγορία της εξαιρετικής ποιότητας.

4.2.2.4. Γραδάκια

Το EMB στα Γραδάκια είχε τιμή 100 cfu/100ml της 29/10 και βγήκε αρνητική στην ανάλυση που πραγματοποιήθηκε 09/12. Οι αρνητικές τιμές, όπως προαναφέρθηκε, βγήκαν λόγω του μέσου όρου στην καταμέτρηση. Τα Γραδάκια, όπως και οι υπόλοιπες παραλίες, βρίσκεται στην κατηγορία της εξαιρετικής ποιότητας υδάτων.

4.2.2.5. Ξί

Η παραλία του Ξί στους πίνακες έχει τιμή 2.48 cfu/1ml. Στην πραγματικότητα οι τιμές στο EMB βγήκαν πολύ παραπάνω καθώς τα τρυβλία ήταν TNTC, too many to count, οπότε εκεί χρησιμοποιείται το όριο της καταμέτρησης των 300 αποικιών. Το Ξί και στους δύο μήνες είναι πιθανό να έχει περάσει το όριο των 500 cfu/100ml και να είναι λιγότερο από επαρκής ποιότητα. Στην περίπτωση του Ξί το μικροβιακό φορτίο ίσως επηρεάζεται και από την άμμο της παραλίας ή και την άργιλο από την οποία περιτριγυρίζεται.

4.2.2.6. Πεσσάδα

Η Πεσσάδα και στις δύο αναλύσεις βρίσκεται εντός ορίων της εξαιρετικής ποιότητας με 155cfu/100ml στις 29/10 και καμία ένδειξη στην ανάλυση που έγινε της 09/12.

Υ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πέραν των δράσεων αναψυχής όπου προσφέρουν οι θάλασσες, πολλά από τα τρόφιμα τα οποία καταναλώνουμε, καθώς εμπεριέχονται στη διατροφή του ανθρώπου (όπως ψάρια, οστρακοειδή κλπ), προέρχονται από αυτές. Το γεγονός αυτό από μόνο του μας οδηγεί στη μελέτη των υδάτων για την δημόσια ασφάλεια και υγιεινή.

Κάθε είδος τρόφιμου εξαρτάται από την προέλευσή του. Το περιβάλλον, η διατροφή του οργανισμού προς κατανάλωση, οδηγούν και κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητά του.

Επικίνδυνοι μικροοργανισμοί μπορούν να βρεθούν στα θαλάσσια ύδατα εφόσον αποτελούν φυσική χλωρίδα των υδάτων. Δεν επιτρέπεται ωστόσο να βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες, όπως δεν είναι επιτρεπτό να βρίσκονται “ξένοι” μικροοργανισμοί, ειδικότερα όταν αυτοί συναντώνται σε μεγάλες ποσότητες και προέρχονται από ανθρώπινους και γενικότερους μολυσματικούς παράγοντες.

Καθαρά ύδατα συμβάλλουν στην καλή ποιότητα των τροφίμων, καθώς η τροφή αυτών και το περιβάλλον στο οποίο ζούνε οι οργανισμοί αυτοί, τους επηρεάζουν θετικά. Εφόσον τα νερά των θαλασσών όμως, από όπου προέρχονται, είναι μολυσμένα, η μόλυνση αυτή περνάει μέσα στους οργανισμούς, με αποτέλεσμα η ποιότητά τους ως τρόφιμα, να είναι κατώτερη έως επικίνδυνη ή ακόμα και να καθίστανται ακατάλληλα για βρώση.

Είναι σημαντική λοιπόν η γνώση ασφαλών υδάτων για αλιεία, διότι με αυτόν τον τρόπο, μειώνεται η πιθανότητα να υπάρξει αυξημένο επίπεδο του επικίνδυνου μικροβιακού φορτίου. Σε περίπτωση επομένως ελλιπούς επεξεργασίας του τροφίμου πριν τη βρώση, μειώνεται η πιθανότητα δηλητηρίασης.

Ωστόσο, η απάντηση στο παραπάνω πρόβλημα δεν είναι απλώς η γνώση των ασφαλών υδάτων, αλλά κυρίως δημιουργείται και το ερώτημα για το ποιες δράσεις και αποφάσεις θα πρέπει να ληφθούν από την κοινωνία για την αποφυγή του προβλήματος.

Γνωρίζοντας πως στις τουριστικές περιόδους υπάρχει επιδείνωση του προβλήματος θα μπορούσε να γίνει κατάλληλη διαχείριση των λημμάτων από τα πλοία, έτσι ώστε να μην υπάρχει επιμόλυνση. Ακόμα και να αποφεύγεται από τους ίδιους τους λουόμενους ο συνωστισμός στις θάλασσες, ώστε να μην επιβαρύνεται το μικροβιακό φορτίο και από τους ίδιους.

Ταυτόχρονα, θα πρέπει να υπάρξει σχετική ενημέρωση και ευαισθητοποίηση για την αποφυγή τυχόν ανθρώπινων παρεμβάσεων στον υδροφόρο ορίζοντα, είτε από

εργασίες που πραγματοποιούνται κοντά στις θάλασσες είτε, από παράνομες δράσεις οι οποίες μολύνουν μικροβιολογικά τα ύδατα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- American Society for Microbiology, *Eosin-Methylene Blue Agar Plates Protocol*, 2016 <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Eosin-Methylene-Blue-Agar-Plates-Protocol.pdf?ext=.pdf>.
- Brian Forster, Catalina Arango Pinedo. *Bacteriological Examination of Waters: Membrane Filtration Protocol*. 2015.
- Caterina Levantesi, Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco, Elisabeth Grohmann, Simon Toze and Valter Tandoi. *Salmonella in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission*. 2011.
- CDC. *Listeria*. <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>.
- CDC-National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (U.S.). Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases. *Vibrio vulnificus & Wounds*. 2019.
- CHROMagar™ *Vibrio*, *The Chromogenic Media Pioneer*. <https://www.chromagar.com/en/product/chromagar-vibrio/>.
- Chromocult® *Listeria Agar (Base) acc. OTTAVIANI and AGOSTI acc. ISO 11290, Millipore*. file:///C:/Users/User/Downloads/100427-1906-mk-4.pdf.
- Craig Baker-Austin, James D. Oliver, Munirul Alam, Afsar Ali, Matthew K. Waldor, Firdausi Qadri and Jaime Martinez-Urtaza. *Vibrio spp. infections*. 2018.
- CUADROS, JAVIER. *Clay minerals interaction with microorganisms: a review*. 2017.
- Difco™ & BBL™ *Manual*, 2nd Edition. https://www.humebau.com/media/blfa_files/265020.pdf.
- E. Ekklesia, P. Shanahan, L.H.C. Chua, H.S. Eikaas. *Temporal variation of faecal indicator bacteria in tropical urban storm drains*. 2015.
- Karl R Matthews Kalmia E. Kniel, Thomas Montville. *ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ*. 4η Αγγλική Έκδοση/1η Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις ΔΙΣΙΓΜΑ, 2021.
- KEITH A. LAMPEL, SAMUEL B. FORMAL AND ANTHONY T. MAURELLI. *A Brief History of Shigella*. 2018.
- Kyung Hwa Cho, Sung Min Cha, Joo-Hyon Kang, Seung Won Lee, Yongeun Park, Jung-Woo Kim, Joon Ha Kim. *Meteorological effects on the levels of fecal indicator bacteria in an urban stream: A modeling approach*. 2010.
- Li-Ming (Lee) He, Zhen-Li He. *Water quality prediction of marine recreational beaches receiving watershed baseflow and stormwater runoff in southern California, USA*. 2008.
- MICROBIOLOGIE., CLINIQUE. *Baird-Parker Agar : Principle, Composition, Uses and Interpretation*. <https://microbiologie-clinique.com/Baird-Parker-agar-Principle-interpretation.html>.
- MICROBIOLOGIE., CLINIQUE. *Tryptic Soy Agar (TSA) Principle, Preparation, Interpretation*. <https://microbiologie-clinique.com/trypticase-soy-agar-principle-interpretation.html>.
- Microbiology. *MacConkey Agar- Composition, Principle, Uses, Preparation and Colony Morphology*, Sagar Aryal. 2022

- <https://microbiologyinfo.com/macconkey-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/>.
- MicrobiologyInfo. *Mannitol Salt Agar for the isolation of Staphylococcus aureus*, Sagar Aryal,. 2022 <https://microbiologyinfo.com/mannitol-salt-agar-for-the-isolation-of-staphylococcus-aureus/>.
- MicrobiologyInfo. *Salmonella Shigella (SS) Agar- Composition, Principle, Uses, Preparation and Result Interpretation*, Sagar Aryal. 2022 <https://microbiologyinfo.com/salmonella-shigella-ss-agar-composition-principle-uses-preparation-and-result-interpretation/>.
- N.Hassou, M.Maanan, M.Hennani, B.Zourarah, and O.Assobhei. *Spatial and temporal variation of faecal pollution indicators (Escherichia coli and faecal streptococci) and physico-chemical parameters at the Oualidia lagoon and its watershed (Morocco)*. 2014.
- Nancy Topić, Arijana Cenov, Slaven Jozić, Marin Glad, Diana Mance, Dražen Lušić, Damir Kapetanović, Davor Mance and Darija Vukić Lušić. *Staphylococcus aureus - An Additional Parameter of Bathing Water Quality for Crowded Urban Beaches*. 2021.
- Nerino Allocati, Michele Masulli Mikhail F. Alexeyev and Carmine Di Ilio. *Escherichia coli in Europe: An Overview*. 2013.
- Osvalda De Giglio, Marcella Narracci, Francesca Apollonio, Francesco Triggiano, Maria Immacolata Acquaviva, Carmela Caroppo, Giusy Diella, Antonella Di Leo, Fabrizio Fasano, Santina Giandomenico, Lucia Spada, Rosa Anna Cavallo, Maria Teresa Montagna. *Microbiological and chemical characteristics of beaches along the Taranto Gulf (Ionian Sea, Southern Italy)*. 2022.
- Panagiotis Papastergiou, Varvara Mouchtouri, Maria Karanika, Elina Kostara, Foteini Kolokythopoulou, Nikos Mpitsolas, Angelos Papaioannou and Christos Hadjichristodoulou. *Analysis of seawater microbiological quality data in Greece from 1997 to 2006: association of risk factors with bacterial indicators*. 2009.
- Review, *Listeria monocytogenes in Aquatic Food Products*—A. Mansoor Jami, Mahdi Ghanbari, Marija Zunabovic, Konrad J. Domig, and Wolfgang Kneifel. 2014.
- SADOWSKY, SATOSHI ISHII and MICHAEL J. *Escherichia coli in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health*. 2008.
- Spatial and temporal variation in indicator microbe sampling is influential in beach management decisions*. Amber A. Enns, Laura J. Vogel, Amir M. Abdelzaher, Helena M. Solo-Gabriele, Lisa R.W. Plano, Maribeth L. Gidley, Matthew C. Phillips, James S. Klaus, Alan M. Piggot, Zhixuan Feng, Ad J.H.M. Reniers, Brian K. Haus, Samir M. Elmira, Yifan Zhang, Nasly H. Jimenez, Noha Abdel-Mottaleb, Michael E. Schor, Alexis Brown, Sumbul Q. Khan, Adrienne S. Dameron...Lora E. Fleming, 2012.
- Yves Le Loir, Florence Baron, Michel Gautier. *Staphylococcus aureus and food poisoning*. 2003.
- Zamira E. Soto-Varela, David Rosado-Porto, Hernando José Bolívar-Anillo, Camila Pichón González, Bertha Granados Pantoja, Dalidier Estrada Alvarado and Giorgio Anfuso. *Preliminary Microbiological Coastal Water Quality Determination along the Department of Atlántico (Colombia): Relationships with Beach Characteristics*. 2021.

Νέγκας, Ζάκυνθος: Ξενοδοχείο έριχνε απόβλητα στη θάλασσα. 2019
<https://www.ertnews.gr/perifereiakoi-stathmoi/zakinthos/zakynthos-xenodocheio-erichne-apovlita-sti-thalassa-2-syllipseis/>.
ΟΔΗΓΙΑ 2006/7/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 15ης Φεβρουαρίου 2006 σχετικά με τη διαχείριση της
ποιότητας των υδάτων κολύμβησης και την κατάργηση της οδηγίας
76/160/ΕΟΚ, [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/? χ.χ.](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?χ.χ.)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

https://www.researchgate.net/figure/Tryptic-soya-agar-TSA-plates-showing-culturable-allochthonous-bacteria-isolated-from_fig2_221916482
<https://microbenotes.com/eosin-methylene-blue-emb-agar/>
<https://biotrading.com/product/vibrio-chromagartm-chr-vb912/>
<http://www.medical-labs.net/thiosulphate-citrate-bile-salts-sucrose-agar-tcbs-agar-2422/>
<https://www.carlroth.com/fr/en/media-for-salmonella-shigella/macconkey-agar/p/x922.1>
<https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/search/msa-agar?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=msa%20agar&type=product>
<https://www.eolabs.com/product/pp1420-baird-parker-agar/>
<https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/sial/85640>
<https://www.srlchem.com/public/index.php/product/details/3648/45615/chromed-listeria-agar-i>