

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος



ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΩΝ

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Vibrio vulnificus*

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΤΙΤΑΚΗ ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑΣ

A.M 18015

Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Σεπτέμβριος 2024

ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΑΡΑΙΤΗΤΩΝ
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *Vibrio vulnificus*

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Επιβλέπων καθηγήτρια :
Ηρειώτου Ευφημία

Μέλος της Επιτροπής :
Μουρελάτου Αθηναΐδα

Μέλος της Επιτροπής ;
Λιοσάτου Γεωργία

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Με την πάροδο των ετών οι μέθοδοι μικροβιολογικών αναλύσεων τροφίμων έχουν προσφέρει την δυνατότητα να εντοπίζονται τα περισσότερα παθογόνα που προκαλούν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα ασθένειες με ανυπολόγιστες συνέπειες. Μεταξύ των παθογόνων αυτών βρίσκεται και ένα πολύ ζημιογόνο είδος του γένους *Vibrio*, το *V. vulnificus*, στο οποίο δίνει έμφασή η εργασία αυτή. Το συγκεκριμένο παθογόνο εντοπίζεται σε παράκτια ύδατα και ωμά θαλασσινά και είναι το πιο επικίνδυνο από τα είδη των *Vibrio* καθώς παρουσιάζει ποσοστά θνησιμότητας που φτάνουν το 60% σε σοβαρά περιστατικά ατόμων με χρόνιες ασθένειες και ευάλωτο ανοσοποιητικό. Μέσω της συγκεκριμένης έρευνας εξετάζεται η καταλληλότητα και η ακρίβεια των δυο θρεπτικών υλικών, CHROMagar*Vibrio* & TCBSagar, με την μέθοδο της διήθησης υπό κενό σε δείγματα νερού από δυο μέρη της Κεφαλλονιάς, για την ανάπτυξη και ανίχνευση του *V.vulnificus*. Ως αποτέλεσμα της ερευνάς εξακριβώνεται πως για την ταυτοποίηση του παθογόνου *V.vulnificus* είναι προτιμότερη η παράλληλη χρήση και των δυο θρεπτικών υποστρωμάτων καθώς αποδεικνύεται αποτελεσματικότερη και εγκυρότερη σε σχέση με την μεμονωμένη χρήση αυτών.

ABSTRACT

Over the years, microbiological methods of food analysis have provided the ability to detect most pathogens that cause in both humans and animals disease with incalculable consequences. Among these pathogens is a very damaging species of the genus *Vibrio*, known as *V. vulnificus*, which is the focus of this work. This pathogen is found in coastal waters and raw seafood and is the most dangerous of the *Vibrio* species as it has a mortality rate of up to 60% in cases of people with chronic diseases and vulnerable immune systems. Through this study, the suitability and accuracy of two selective mediums, CHROMagar*Vibrio* & TCBSagar, is investigated using the vacuum filtration method on water samples from two different locations in Kefalonia, suitable for the growth and detection of *V. vulnificus*. The results of this study show that for the identification of *V. vulnificus* pathogen, it is preferable to use both selective media simultaneously as it proves to be more effective and valid compared to their individual use.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο	Σελίδα
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. <i>Vibrios</i> γενικά	1
1.2. <i>Vibrio Vulnificus</i>	2
1.3 Θειοθειικό-κιτρικό-διπλό άλας-σακχαρόζης άγαρ (TCBS)	3
1.4 CHROMagarVibrio	4
II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	
2.1 <i>Vibrios</i> και τρόφιμα	5
2.2 Ε Χαρακτηριστικά λοίμωξης από <i>Vibrios</i>	6
2.3 Μέθοδοι εξάλειψης <i>Vibrio</i>	7
2.4 Τροφιμογενής λοίμωξη από <i>V. vulnificus</i>	8
2.5 Τροφιμογενής λοίμωξη από <i>V. cholerae</i>	10
2.6 Τροφιμογενής λοίμωξη από <i>V. parahaemolyticus</i>	12
2.7 Τροφιμογενής λοίμωξη από <i>V. alginolyticus</i>	14
2.8 Τα Θρεπτικά Υποστρώματα	15
2.9 CHROMagar™Vibrio	16
2.10 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) agar	17
III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	
3.1 Πειραματικό μέρος	18
3.1.1 Περιοχές μελέτης	18
3.1.2 Νομός Αργοστολίου	18
3.1.3 Νομός Σάμης	18
3.1.4 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων	19
3.1.5 CHROMagar™Vibrio	19
3.1.6 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) agar	20
3.1.7 Διαδικασία δειγματοληψίας	21
3.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός	22
3.2.1 Κλίβανος υγρής αποστείρωσης	22
3.2.2 Συσκευή διήθησης	22
3.2.3 Ηθμοί κυτταρίνης	23
3.2.4 Επωαστικοί κλίβανοι	24
3.2.5 Συσκευή καταμέτρησης αποικιών	24
3.2.6 Λοιπός εξοπλισμός	25
3.3 Διαδικασία πειράματος	26

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
4.1 Πειραματικά αποτελέσματα Περιοχή Κουτάβου	30
4.2 4.2 Πειραματικά αποτελέσματα περιοχή Σάμης.....	36
V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	41
5. Συμπεράσματα.....	41
Κεφάλαιο	Σελίδα
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας	Σελίδα
Κεφάλαιο 3	
Πίνακας 1. Σύνθεση CHROMagar TM Vibrio	19
Πίνακας 2. Σύνθεση TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) agar.....	20
Κεφάλαιο 4	
Πίνακας 1. Τιμές ανάπτυξης Vp Vn, Vc, Va σε CHROMagarVibrio και TCBSagar στη περιοχή του Κουτάβου ανά μήνα και χρόνο επώασης.....	30
Πίνακας 2. Τιμές ανάπτυξης Vp Vn, Vc, Va σε CHROMagarVibrio και TCBSagar στη περιοχή της Σάμης ανά μηνά και χρόνο επώασης.	36

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα	Σελίδα
Γράφημα 1. Ανάπτυξη του <i>V. parahaemolyticus</i> στις 24 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο	31
Γράφημα 2. Ανάπτυξη του <i>V. parahaemolyticus</i> στις 48 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο.	31
Γράφημα 3. Ανάπτυξη <i>V. vulnificus</i> & <i>V. cholerae</i> στις 24 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο	31
Γράφημα 4. Ανάπτυξη <i>V. vulnificus</i> & <i>V. cholerae</i> στις 48 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο.	31
Γράφημα 5. Ανάπτυξη <i>V. alginolyticus</i> στις 24 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο	32
Γράφημα 6. Ανάπτυξη <i>V. alginolyticus</i> στις 24 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο.	32
Γράφημα 7. Ανάπτυξη των <i>Vibrios</i> στις 24 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο.	32
Γράφημα 8. Ανάπτυξη των <i>Vibrios</i> στις 48 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο.	33
Γράφημα 9. Ανάπτυξη <i>V. parahaemolyticus</i> & <i>V. vulnificus</i> στις 24 ώρες στο TCBS agar για τον Κούταβο.....	33
Γράφημα 10. Ανάπτυξη <i>V. parahaemolyticus</i> & <i>V. vulnificus</i> στις 48 ώρες στο TCBS agar για τον Κούταβο.....	33
Γράφημα 11. Ανάπτυξη <i>V. alginolyticus</i> & <i>V. cholerae</i> στις 24 ώρες για το TCBSagar για τον Κούταβο	34
Γράφημα 12. Ανάπτυξη <i>V. alginolyticus</i> & <i>V. cholerae</i> στις 48 ώρες για το TCBSagar για τον Κούταβο.	34
Γράφημα 13. Ανάπτυξη των <i>Vibrios</i> στις 24 ώρες στο TCBSagar για τον Κούταβο.	34
Γράφημα 14. Ανάπτυξη των <i>Vibrios</i> στις 48 ώρες στο TCBSagar για τον Κούταβο.	35
Γράφημα 15. Ανάπτυξη του <i>V. parahaemolyticus</i> στις 24 ώρες στο CHROMagar για την Σάμη.....	37
Γράφημα 16. Ανάπτυξη του <i>V. parahaemolyticus</i> στις 48 ώρες στο CHROMagar. για την Σάμη.....	37
Γράφημα 17. Ανάπτυξη του <i>V. vulnificus</i> & <i>V. cholerae</i> στις 24 ώρες στο CHROMagar για την Σάμη	37
Γράφημα 18. Ανάπτυξη του <i>V. vulnificus</i> & <i>V. cholerae</i> στις 48 ώρες στο CHROMagar. για την Σάμη.	37
Γράφημα 19. Ανάπτυξη του <i>V. alginolyticus</i> στις 24 ώρες στο CHROMagar για την Σάμη.....	37
Γράφημα 20. Ανάπτυξη του <i>V. alginolyticus</i> στις 48 ώρες στο CHROMagar. για την Σάμη.	37
Γράφημα 21. Ανάπτυξη των <i>Vibrios</i> στις 24 ώρες στο CHROMagar για την Σάμη.	38
Γράφημα 22. Ανάπτυξη των <i>Vibrios</i> στις 48 ώρες στο CHROMagar για την Σάμη.	38

Γράφημα 23. Ανάπτυξη <i>V.parahaemolyticus</i> & <i>V. vulnificus</i> στις 24 ώρες στο TCBS agar για την Σάμη	39
Γράφημα 24. Ανάπτυξη <i>V.parahaemolyticus</i> & <i>V. vulnificus</i> στις 48 ώρες στο TCBS agar για την Σάμη.	39
Γράφημα 25. Ανάπτυξη <i>V.alginolyticus</i> & <i>V. cholerae</i> στις 24 ώρες για το TCBSagar για την Σάμη.	39
Γράφημα 26. Ανάπτυξη <i>V.alginolyticus</i> & <i>V. cholerae</i> στις 48 ώρες για το TCBSagar για την Σάμη.	39
Γράφημα 27. Ανάπτυξη των <i>Vibrios</i> στις 24 ώρες στο TCBSagar για την Σάμη.....	40
Γράφημα 28. Ανάπτυξη των <i>Vibrios</i> στις 48 ώρες στο TCBSagar για την Σάμη.....	40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. *Vibrios* γενικά

Η οικογένεια *Vibrionaceae* αποτελείται από επτά γένη, δηλαδή τα *Enterovibrio*, *Salinivibrio*, *Enhydrobacter*, *Listonella*, *Allomonas*, *Photobacterium* και *Vibrio*. Επί του παρόντος, το γένος *Vibrio* έχει 48 είδη που μοιράζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: είναι αρνητικά κατά Gram, καμπύλες ή ευθείες ράβδοι, θετικά στην οξειδάση (εκτός από το *Vibrio metschnikovii*), ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη, είναι ευαίσθητα στη βιμπριοστατική ένωση O129, κινούνται με πολικά μαστίγια και είναι προαιρετικά αναερόβια. Τα *Vibrios* φθάνουν σε μεγάλες ποσότητες στα θαλάσσια ύδατα, ιδίως κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (Palit and Nair, 2014).

Αν και βρίσκονται κυρίως σε θαλάσσια οικοσυστήματα, ορισμένα είδη (*V. cholerae* non-O1 και *Vibrio mimicus*) μπορούν να ζουν σε γλυκό νερό. Τα αλόφιλα *Vibrios* απαιτούν Na^+ για την ανάπτυξή τους. Διάφοροι αβιοτικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα και το pH των υδάτινων σωμάτων θεωρούνται οι παράγοντες που ρυθμίζουν την αφθονία και την ποικιλομορφία τους. Μεταξύ των ειδών *Vibrio* που έχουν περιγραφεί σήμερα, 12 είναι γνωστό ότι σχετίζονται με λοιμώξεις στον άνθρωπο. Το *Vibrio parahaemolyticus* είναι το πιο συχνό *Vibrio* που συνδέεται με λοιμώξεις στον άνθρωπο, ενώ το *Vibrio vulnificus* είναι λιγότερο συχνό αλλά πιο θανατηφόρο. Άλλα είδη *Vibrio* που προκαλούν περιστασιακά ανθρώπινες λοιμώξεις περιλαμβάνουν: *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio alginolyticus* και *Vibrio cincinnatiensis*. (Palit and Nair, 2014)

Είναι γνωστοί διάφοροι τύποι σχέσεων, όπως η αμοιβαία σχέση μεταξύ *Vibrio fischeri* και ψαριών, η συμβιωτική σχέση του *V. fischeri* με καλαμάρια sepiolid,

χιτινώδη οστρακοειδή και οι παρασιτικές σχέσεις ορισμένων vibrios που συνήθως προσβάλλουν ψάρια, βατράχια και χέλια. Στα εύκρατα κλίματα, η αφθονία των *Vibrio* ποικίλλει εποχιακά, καθώς το καλοκαίρι, τα vibrios μπορούν εύκολα να απομονωθούν από το νερό, τα αιωρούμενα σωματίδια, το πλαγκτόν, τα φύκη, το ιζήμα, τα ψάρια, τα οστρακοειδή και το βενθικό θαλάσσιο περιβάλλον, ενώ κατά τους χειμερινούς μήνες, ο αριθμός τους μειώνεται αισθητά και διαχειμάζουν στα ιζήματα.

Πολλά από τα είδη *Vibrio* έχουν την ικανότητα να παράγουν βιοφίλμ, ή κοινότητες που συνδέονται με επιφάνειες (surface-associated communities), οι οποίες βοηθούν στην προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων σε επιφάνειες ξενιστών ή περιβάλλοντος και στην επιβίωση των βακτηρίων. Μέσω του σχηματισμού βιοφίλμ, τα *Vibrio* εισέρχονται σε μια βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση .(Palit and Nair, 2014)

1.2. *Vibrio Vulnificus*

Τα στελέχη του *V. vulnificus* είναι φαινοτυπικά και γενετικά ποικίλα και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 3 βιοτύπους βάσει βιοχημικών χαρακτηριστικών, όπου τα στελέχη του βιοτύπου 1 (BT1) είναι κυρίως υπεύθυνα για την πλειονότητα των ανθρώπινων λοιμώξεων, ενώ τα στελέχη του βιοτύπου 2 (BT2) συνδέονται συχνότερα με τη νόσο στα χέλια. Τα στελέχη του βιοτύπου 3 (BT3) έχουν διακριτά φαινοτυπικά και μοριακά πρότυπα που υποδηλώνουν την εμφάνιση ενός πρόσφατου γεγονότος υβριδισμού του γονιδιώματος μεταξύ των BT1 και BT2 .

Μέχρι σήμερα, οι τεκμηριωμένες απομονώσεις αυτού του βιοτύπου έχουν περιοριστεί γεωγραφικά σε εγκαταστάσεις υδατοκαλλιέργειας στο Ισραήλ. Προηγούμενες

γενετικές αναλύσεις στελεχών BT1 έχουν αποκαλύψει την παρουσία γενετικών πολυμορφισμών που συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με την πηγή απομόνωσης. (Tiffany et.al, 2013)

1.3 Θειοθειικό-κιτρικό-διπλό άλας-σακχαρόζης άγαρ (TCBS)

Για την απομόνωση ειδών *Vibrio* από περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιούνται διάφορα επιλεκτικά ή/και διαφορικά μέσα . Τα μέσα αυτά είναι συνήθως χρήσιμα για να επιτρέπουν την ανάπτυξη επιλεγμένων ειδών *Vibrio*, ενώ αποκλείουν την ανάπτυξη άλλων *Vibrio* και στενά συγγενών γενών. Ωστόσο, λόγω της φαινοτυπικής παραλλακτικότητας των ειδών *Vibrio*, όλα αυτά τα μέσα απαιτούν ένα πρόσθετο μοριακό βήμα, όπως η PCR, για την επιβεβαίωση της ταυτοποίησης του οργανισμού ενδιαφέροντος .

Το θειοθειικό-κιτρικό-διπλό άλας-σακχαρόζης άγαρ (TCBS) ήταν ένα από τα πρώτα εκλεκτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και τον καθορισμό των *Vibrios*. Σε αυτό το μέσο, τα στελέχη που μπορούν να ζυμώσουν τη σακχαρόζη σχηματίζουν κίτρινες αποικίες, ενώ τα στελέχη που δεν ζυμώνονται με σακχαρόζη, όπως το *V. vulnificus*, εμφανίζονται πράσινα. Το μέσο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την απομόνωση των *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis* και *V. vulnificus* από κλινικά δείγματα, καθώς και από το υδάτινο περιβάλλον, ωστόσο μελέτες έχουν καταδείξει διακυμάνσεις του μέσου αυτού από παρτίδα σε παρτίδα και από μάρκα σε μάρκα, με το επίπεδο ανάκτησης των *vibrios* να ποικίλλει σημαντικά (Tiffany et.al, 2013).

1.4 CHROMagarVibrio

Το CHROMagar Vibrio (CHROMagar, Παρίσι, Γαλλία), είναι ένα ιδιόκτητο μέσο που χρησιμοποιεί χρωμογόνο τεχνολογία για την απομόνωση και την ανίχνευση των *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* και *V. alginolyticus* με βάση την ανάπτυξη του χρώματος των αποικιών. Σε αυτό το μέσο οι αποικίες του *V. Vulnificus* εμφανίζονται τυρκουάζ, πιθανώς λόγω της δραστηριότητας της β-γαλακτοσιδάσης.

Η δυνατότητα απομόνωσης και ταυτοποίησης τεσσάρων παθογόνων vibrios με ένα μέσο είναι εξαιρετικά πλεονεκτική και ένα τέτοιο μέσο παρέχει σημαντικό αριθμό πληροφοριών σχετικά με τη δομή του πληθυσμού ενός εξεταζόμενου περιβάλλοντος (Tiffany et.al, 2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

2.1 *Vibrios* και τρόφιμα

Μέχρι σήμερα ο αριθμός των ειδών του γένους *Vibrio* όπου έχουν περιγραφεί γενικά ξεπερνάει τα 80. Από αυτά τουλάχιστον 12 είναι εκείνα τα οποία έχουν την δυνατότητα να προκαλούν λοιμώξεις στους ανθρώπους. Εκ των οποίων τα 8 αποτελούν παθογόνα που σχετίζονται άμεσα με τα τρόφιμα. Κάποια από αυτά είναι το *V.vulnificus*, το *V.cholerae*, το *V.parahaemolyticus* και το *V.alginolyticus*, Τα οποία μελετούνται σε αυτήν την εργασία. (Matthews et.al, 2021).

Είναι γνωστό ότι τα *Vibrios* συνδέονται με μεγάλη ποικιλία θαλασσινών καθώς αποτελούν το κυρίαρχο γένος βακτηρίων των παρόχθιων υδάτων. Ως αποτέλεσμα αυτού, το πιο κοινό χαρακτηριστικό των λοιμώξεων από *Vibrio* έχει παρατηρηθεί ότι είναι η κατανάλωση θαλασσινών ή οστρακοειδών προηγουμένως. Η πιθανότητα είδη του γένους *Vibrio* να βρεθούν σε οστρακοειδή ή και ψαριά με πτερύγιά τα οποία πωλούνται σε σούπερ μάρκετ ανέρχεται στο 40% έως και 60%, με συχνότερα απομονωμένα συνήθως το *V. parahaemolyticus* και το *V. alginolyticus*. Η απομόνωση των *Vibrios* γίνεται συχνότερα σε οστρακόδερμα μαλάκια κατά τους θερινούς μήνες, με το *V. vulnificus* και το *V. parahaemolyticus* να επηρεάζονται περισσότερο από την αύξηση της θερμοκρασίας. (Matthews et.al, 2021).

Έτσι η ενημέρωση των καταναλωτών για των κίνδυνο που διατρέχουν από λοιμώξεις *Vibrio* όταν καταναλώνουν ωμά θαλασσινά είναι απαραίτητη. (Matthews et.al, 2021).

2.2 Χαρακτηριστικά λοίμωξης από *Vibrios*

Η επικινδυνότητα των ασθενειών που σχετίζονται με τα *Vibrios* παρουσιάζει σημαντική διακύμανση. Το επίπεδο υγείας του κάθε ατόμου παίζει καθοριστικό ρόλο στις συνέπειες της λοίμωξης καθώς ένας υγιής οργανισμός δεν είναι όσο ευάλωτος είναι ένας μη υγιής οργανισμός με κάποια χρόνια πάθηση . Εξαιρείται το *V. cholerae* καθώς ακόμα και άτομα χωρίς εξασθενημένο ανοσοποιητικό ασθενούν με την ίδια ευκολία. (Matthews et.al, 2021).

Η πλειονότητα των περιστατικών συνδέεται με κατανάλωση θαλασσινών. Η διατήρηση των ωμών θαλασσινών σε κρύες θερμοκρασίες είναι υψίστης σημασίας ώστε να επιτυγχάνεται η πρόληψη της ανάπτυξης βακτηρίων σε υψηλά επίπεδα, και εξίσου σημαντική είναι η σωστή θερμική επεξεργασία των θαλασσινών αυτών. Διότι ο έλεγχος των μολύνσεων από *Vibrio* δεν μπορεί να πραγματοποιείται μέσω των προγραμμάτων υγιεινής για τα οστρακοειδή, καθώς τα *Vibrios* ανήκουν στην φυσιολογική μικροχλωρίδα παράκτιων υδάτων προερχόμενα από κοπρανώδη μόλυνση. (Matthews et.al, 2021).

Τα χαρακτηριστικά της ασθένειας διαφέρουν για το κάθε είδος , ακόμη και αναμεσά στα δυο πιο κοινά είδη του γένους . Δηλαδή μεταξύ των συμπτωμάτων για την λοίμωξη από *V.vulnificus* είναι ο πυρετός, το ρίγος και η ναυτία ενώ δεν παρατηρείται καθόλου διάρροια, και υπάρχει μεγάλη θνησιμότητα για μη υγιείς οργανισμούς σε ποσοστά 40-60%. Ενώ αντίθετα για την λοίμωξη από *V. parahaemolyticus* τα ποσοστά θνησιμότητας είναι πολύ χαμηλά, ενώ μέρος των συμπτωμάτων αποτελεί η διάρροια, οι κοιλιακοί πόνοι, η ναυτία και ο εμετός. (Matthews et.al, 2021).

2.3 Μέθοδοι εξάλειψης *Vibrio*

Γενικός τα *Vibrio* παρουσιάζουν ευαισθησία στις κρύες θερμοκρασίες εάν δεν βρίσκονται σε προστατευτικό περιβάλλον. Τα *Vibrio* έχουν επιβιώσει μέσα σε αποθηκευμένα προϊόντα σε θερμοκρασίες ψύξης και κατάψυξης και αυτό διότι τα θαλασσινά αποτελούν περιβάλλον προστασίας σε αυτές της συνθήκες. (Matthews et.al, 2021).

Συνεπώς η θερμική επεξεργασία αποτελεί το πλέον καταλληλότερο μέσο για την μείωση των πληθυσμών *Vibrio* στα τρόφιμα. Από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (FDA) συνίσταται το μαγείρεμα των οστρακοειδών με κέλυφος στον ατμό για 4 με 9 λεπτά, το τηγάνισμα των οστρακοειδών χωρίς κέλυφος για 10 λεπτά στους 190,6°C , ή να ψήνονται τα στρείδια για 10 λεπτά στους 232,2°C. Γενικά τα *Vibrio* θανατώνονται όταν τα οστρακοειδή αποκτούν εσωτερική θερμοκρασία 60°C και άνω για μερικά λεπτά . (Matthews et.al, 2021).

Επίσης οι πληθυσμοί τους μειώνονται και μέσω χρήσης ακτινοβολίας αλλά και με την υδροστατική πίεση. Μείωση των παθογόνων επιτυγχάνεται και με την χρήση ορισμένων ξηρών μπαχαρικών, ελαίων από βότανα, ή και σάλτσα τομάτας και διάφορων οργανικών οξέων λόγω της βακτηριοκτόνου δράσης τους. (Matthews et.al, 2021).

2.4 Τροφιογενής λοίμωξη από *V. vulnificus*

Πρόκειται για το σοβαρότερο παθογόνο μεταξύ των *Vibrio* καθώς σε αυτό οφείλονται τα μεγαλύτερα ποσοστά θανάτων που έχουν συσχετισθεί με τροφική ασθένεια. Ενώ καταλήγει να χρειάζεται νοσηλεία το 86% των ασθενών που έχουν προσβληθεί από το *V.vulnificus*, και βιώνουν την τροφική λοίμωξη από το βακτήριο. Τα περιστατικά στα οποία αναπτύχθηκε πρωτογενής σηψαιμία εξαιτίας της κατανάλωσης ωμών στρειδιών, από τους πληθυσμούς που διατρέχουν κίνδυνο, εμφανίζουν συνήθως 60% ποσοστό θνησιμότητας. (Matthews et.al, 2021).

Για τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ) αυτό είναι το μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητάς που σχετίζεται με τροφογενείς μολύνσεις. Σύμφωνα με τα κέντρα ελέγχου και πρόληψης ασθενειών (CDC) των ΗΠΑ τα περιστατικά από τροφογενή λοίμωξη εξαιτίας του *V. vulnificus* ετησίως υπολογίζονται περίπου στα 90 και τα περισσότερα αναφέρονται στον κόλπο του Μεξικού. (Matthews et.al, 2021).

Η λοίμωξη από το παθογόνο δεν περιορίζεται μόνο στην πρόκληση γαστρεντερίτιδας και τη πρωτογενή σηψαιμία καθώς έχει την ιδιότητα να μολύνει και τις υπάρχουσες πληγές. Σε ορισμένες περιπτώσεις κρίνεται απαραίτητος ακόμη και ο ακρωτηριασμός ενώ συνήθως πραγματοποιείται χειρουργική επέμβαση ώστε να καθαριστούν τα σημεία που έχουν μολυνθεί. Γενικά οι λοιμώξεις των πληγών παρουσιάζουν ποσοστό θνησιμότητας περίπου 20% με 25% και σχετίζονται με θαλασσινό νερό και οστρακοειδή. (Matthews et.al, 2021).

Σε γενικά πλαίσια τα συμπτώματα της ασθένειας ποικίλουν μεταξύ των περιστατικών όπως και οι χρόνοι έναρξης εκδήλωσης τους. Με μέσο ορό τις 26 ώρες, οι χρόνοι εκδήλωσης μπορούν να κυμαίνονται από 7 ώρες έως και μερικές ημέρες. Τα κύρια συμπτώματα που παρουσιάζονται κατά την λοίμωξη είναι ο πυρετός, το ρίγος, η ναυτία και η υπόταση. Σπανιότερη θεωρείται η εμφάνιση του εμετού, της διάρροιας και του κοιλιακού πόνου. Η μολυσματική δόση του *V.vulnificus* δεν είναι γνωστή ενώ από την ταχεία χορήγηση του αντιβιοτικού εξαρτάται η επιβίωση σε πολλές περιπτώσεις. Το *V. vulnificus* παρουσιάζει ευαισθησία στα περισσότερα αντιβιοτικά. (Matthews et.al, 2021).

Η εξάλειψή του παθογόνου από τα οστρακοειδή επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους καθώς το ίδιο είναι αρκετά ευαίσθητο στις θερμοκρασίες κατάψυξης, στην παστερίωση χαμηλής θερμοκρασίας, στην υψηλή υδροστατική πίεσή και στην ιοντίζουσα ακτινοβολία. Η θανάτωση του ακόμη μπορεί να προέλθει και με την χρήση σάλτσας από ραπανάκι. (Matthews et.al, 2021).

Οι εξάρσεις του *V. vulnificus* έχουν καταγραφεί σε πολλές περιπτώσεις και είναι γνωστό ότι η βέλτιστη ανάπτυξη του απαιτεί συνθήκες που περιλαμβάνουν θερμοκρασίες νερού οι οποίες υπερβαίνουν τους 18 °C και επίπεδα αλατότητας που κυμαίνονται από 5 έως 25 μονάδες πρακτικής αλατότητας (PSU) (Glackin et.al, 2024.) (Matthews et.al, 2021).

Συχνότερη εμφάνιση του μικροοργανισμού παρατηρείται στα παράκτια ύδατα σε ολόκληρο τον κόσμο, και επηρεάζεται από την θερμοκρασία του νερού. Η

απομόνωσή του παθογόνου από το νερό και από τα στρείδια είναι σπάνια όταν οι θερμοκρασίες είναι χαμηλές πιθανώς λόγω της θανάτωσης του εξαιτίας των κρύου.

Τα περισσότερα περιστατικά που οφείλονται στο *V. vulnificus* καταγράφονται μεταξύ Απριλίου και Οκτωβρίου, αφού η θερμοκρασία του νερού τότε είναι υψηλότερη. Αντίστοιχα για το Νότιο Ημισφαίριο όπου η θερμοκρασία ανεβαίνει τους μήνες Οκτώβρη με Μάρτιο οι περισσότερες περιπτώσεις σημειώνονται τότε. (Matthews et.al, 2021).

2.5 Τροφιμογενής λοίμωξη από *V. cholerae*

Το *V. cholerae* O1 είναι υπεύθυνο για την δημιουργία μιας από της λίγες τροφιμογενείς ασθένειες που μπορούν να οδηγήσουν σε επιδημία ή και σε πανδημία, την χολέρα. Εδώ και πάνω από έναν αιώνα έχει αναγνωριστεί η κρισιμότητα που έχει το νερό για την μετάδοση της χολέρας. Ο Λονδρέζος γιατρός και επιδημιολόγος John Snow, ήταν εκείνος που ανακάλυψε το 1854 ότι η ασθένεια σχετίζεται με το νερό αφού αυτό πήγαζε από τον ποταμό Τάμεση σε ένα σημείο με εισροές αποβλήτων. (Matthews et.al, 2021).

Ανάμεσα στα τρόφιμα τα οποία έχουν ενοχοποιηθεί ανά τους καιρούς για την μετάδοση την χολέρας βρίσκονται τα εξής : καβούρια, γαρίδες, ωμό ψάρι, μύδια, κυδώνια, καλαμάρια, στρείδια, χτένια, ρύζι, ωμό χοιρινό, χυλός σιτηρών, μαγειρεμένο ρύζι, φαγητά αγορασμένα από πλανώδιους πωλητές, κατεψυγμένο γάλα καρδιάς, ωμά λαχανικά, και φρούτα. Όλα αυτά τα τρόφιμα έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό τους το ουδέτερο pH, με αποτέλεσμα όταν συμβαίνει κάποιο

τροφογενές περιστατικό τα τρόφιμα με όξινο pH να μην λαμβάνονται υπόψιν. (Matthews et.al, 2021).

Χαρακτηριστικό της ασθένειας σε αυτήν την λοίμωξη είναι συνήθως η απότομη διάρροια με έντονη αφυδάτωση όμως ένα πολύ μικρό ποσοστό ασθενών έχουν αυτό το σύμπτωμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις η λοίμωξη παρουσιάζει ελαφριά συμπτώματα ενώ κάποιες μπορεί να είναι και ασυμπτωματικές. Η επωαστική περίοδος της χολέρας εξαρτάται από την συγκέντρωση του παθογόνου στον οργανισμό και η εμφάνιση των συμπτωμάτων κυμαίνεται από μερικές ώρες έως και 5 ημέρες. Τα συμπτώματα μπορεί να εκδηλωθούν ξαφνικά και να συμπεριλαμβάνουν υδατώδη διάρροια, απώλεια όρεξης, κοιλιακό πόνο ή απλή διάρροια. (Matthews et.al, 2021).

Η απότομη και σοβαρή διάρροια και η έντονη αφυδάτωση της χολέρας προκαλείται από την εντεροτοξίνη που παράγει ο μικροοργανισμός, διότι διακόπτει την μεταφορά των ιόντων από τα επιθηλιακά κύτταρα. Η εντεροτοξίνη (CT) αυτή έχει την ικανότητα να διέρχεται από το όξινο περιβάλλον του στομάχου ανεπηρέαστη, αφού έχει προηγηθεί η κατανάλωση μολυσμένου νερού ή τροφίμου με *V. cholerae*. Η χορήγηση αντιβιοτικών αποτελεί την αποτελεσματικότερη μέθοδο καταπολέμησης της ασθένειας (Matthews et.al, 2021).

2.6 Τροφιμογενής λοίμωξη από *V. parahaemolyticus*

Το *V. parahaemolyticus* ανήκει μαζί με το *V. cholerae* στα παθογόνα του *Vibrio* όπου έχουν περιγραφεί καλύτερα και μελετηθεί περισσότερο από τα υπόλοιπα. Από τον CDC το 2011 υπολογίστηκαν περίπου 8 χιλιάδες περιστατικά λοιμώξεων από *Vibrio* εκ των οποίων οι 4,5 χιλιάδες συσχετίστηκαν με το *V. parahaemolyticus*. (Matthews et.al, 2021).

Σε παράκτια ύδατα συναντάται φυσιολογικά και το παθογόνο αυτό, και η απομόνωση του μπορεί να γίνει με ευκολία από τα νερά των ακτών, αλλά και από φερτά υλικά, αιωρούμενα σωματίδια, πλαγκτόν, και από μια ποικιλία ψαριών και οστρακοειδών. Τα είδη που ανήκουν στην τελευταία πηγή ανέρχονται στα 30 διαφορετικά μεταξύ των οποίων βρίσκονται τα μύδια, τα στρείδια, οι αστακοί, τα χτένια, οι γαρίδες και τα καβούρια. Τα επίπεδα του *V. parahaemolyticus* εξαρτώνται επίσης από την θερμοκρασία, και για αυτό τους ψυχρούς μήνες είναι πολύ χαμηλά και τον Ιανουάριο και Φεβρουάριο τα δείγματα που αναλύονται συχνά δίνουν αρνητικό αποτέλεσμα. (Matthews et.al, 2021).

Η λοίμωξη από το *V. parahaemolyticus* προκαλεί γαστρεντερίτιδα και οφείλεται σχεδόν αποκλείστηκε από κατανάλωσή ωμών θαλασσινών ή όχι καλά μαγειρεμένων ή ακόμα και μολυσμένων μετά το μαγείρεμα. Το συγκεκριμένο παθογόνο αποτελεί μια σημαντική αιτία τροφιμογενών λοιμώξεων για την Ιαπωνία. Το 1960 μάλιστα οι τροφιμόγενεις λοιμώξεις σε ποσοστό 70% είχαν συσχετιστεί με αυτό. Η περίπτωση 320 ατόμων που ασθένησαν μετά από την κατανάλωση καβουριών που δεν είχαν μαγειρευτεί σωστά στον ατμό αποτέλεσε το πρώτο μεγάλο ξέσπασμα πολλαπλών

κρουσμάτων. Όμως το μεγαλύτερο ξέσπασμα για τις ΗΠΑ συνέβη λίγο αργότερα όταν 1133 άτομα ασθένησαν μαζικά σε ένα δείπνο στο Πορτλάντ το καλοκαίρι του 1978. (Matthews et.al, 2021)

Ο πολλαπλασιασμός του *V. parahaemolyticus* γίνεται ανά 8 με 9 λεπτά σε θερμοκρασία 37°C ενώ στα θαλασσινά χρειάζεται 12 με 18 λεπτά. Επομένως πρόκειται για ένα μικροοργανισμό ο οποίος αναπτύσσεται ταχύτατα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* φτάνοντάς έτσι πολύ γρήγορα την τιμή της μολυσματικής δόσης που απαιτείται ώστε να εμφανιστεί η ασθένεια, περίπου 10^5 έως 10^7 CFU/L. Η εμφάνιση των συμπτωμάτων γίνεται σε 3 ώρες έως και 30 ώρες μετά την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου, κατά μέσο όρο 23,6 ώρες στα περισσότερα άτομα. Μεταξύ των συμπτωμάτων βρίσκονται η διάρροια, οι κοιλιακοί σπασμοί, η ναυτία, ο εμετός και ο πυρετός, που υποχωρούν έπειτα από περίπου 3 με 5 μέρες. (Matthews et.al, 2021).

Έχει παρατηρηθεί ότι οι αριθμοί των οργανισμών του *V. parahaemolyticus* δεν ξεπερνούν τα 10^4 κύτταρα σε ψάρια και σε οστρακοειδή. Κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι η μετέπειτα αύξησή των τιμών του οφείλεται στην κακή θερμική μεταχείριση των τροφίμων αυτών πριν την κατανάλωσή τους. (Matthews et.al, 2021)

2.7 Τροφιμογενής λοίμωξη από *V. alginolyticus*

Ο εντοπισμός μεγάλων πληθυσμών του *V. alginolyticus* προκύπτει συνήθως είτε από θαλασσινά νερά είτε από θαλασσινά τρόφιμα, ανά τον κόσμο. Τα θαλασσινά από τα οποία απομονώνεται εύκολα είναι τα ψάρια, τα χτένια, τα καβούρια, τα στρείδια, τα μύδια και οι γαρίδες. Η τροφογενής λοίμωξη από το *V. alginolyticus* είναι πιο σπάνια και λιγότερο επιβλαβής σε σύγκρισή με εκείνες που προκαλούνται από τα παθογόνα όπου αναφερθήκαν παραπάνω. Κοινό χαρακτηριστικό παρόλα αυτά παραμένει και σε αυτήν την περίπτωση η κατανάλωση μολυσμένων θαλασσινών ως πηγή μόλυνσης. (Matthews et.al, 2021)

2.8 Τα Θρεπτικά Υποστρώματα

Για τον εντοπισμό και την απομόνωση του *V.vulnificus* από δείγματα νερού είναι απαραίτητη η χρήση Συνθετικών Διαγνωστικών θρεπτικών υποστρωμάτων. Υποστρωμάτων δηλαδή των οποίων είναι γνωστή τόσο ποιοτική όσο και η ποσοτική τους σύσταση από την μια και έχουν παράλληλα την δυνατότητα να αυξάνουν συγκεκριμένα είδη μικροοργανισμών, που παράγουν χαρακτηριστικές αποικίες επιτρέποντάς έτσι την εύκολη αναγνώριση τους.

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την ακριβή ταυτοποίηση του *V. vulnificus* με τη χρήση μιας προσέγγισης που βασίζεται σε καλλιέργειες, οι οποίες διαφέρουν σημαντικά ως προς το ποσοστό επιτυχίας τους. Το TCBS άγαρ από μόνο του έχει αποδειχθεί ότι δεν είναι αρκετά επιλεκτικό για δείγματα *Vibrio* από το περιβάλλον. Έτσι, η συντριπτική πλειονότητα των πιο πρόσφατων ερευνών περιλαμβάνει τη χρήση άγαρ TCBS, CHROMagar™ *Vibrio* ή άγαρ κολλιστίνης Cellobiose polymyxin B (CPC) με ποικίλα αποτελέσματα σε περιβαλλοντικά δείγματα. Η ακριβέστερη καταμέτρηση του *V. vulnificus* μέχρι στιγμής ήταν μια μέθοδος τριπλής επιμετάλλωσης, η οποία παρήγαγε ακρίβεια 92,8% σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού και στρεπιδιών. (Glackin et.al, 2024.)

Για τον καθορισμό του καταλληλότερου θρεπτικού υποστρώματος για το *V. vulnificus* σε αυτήν την εργασία επιλεχθήκαν να μελετηθούν τα εξής δυο θρεπτικά υποστρώματα : Α) CHROMagar™*Vibrio* και Β) TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) agar.

2.9 CHROMagar™Vibrio

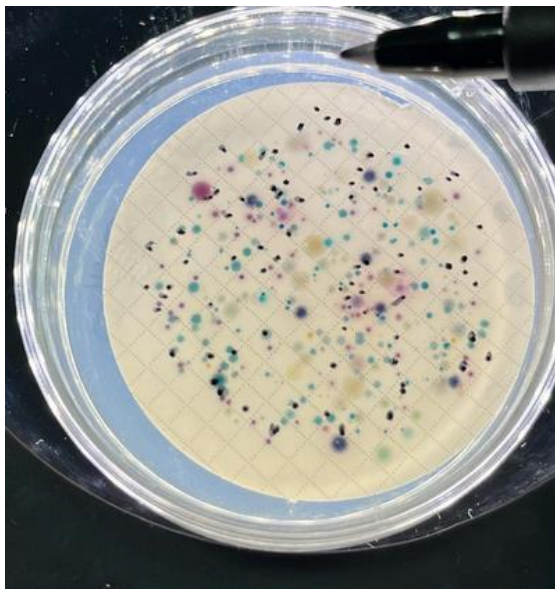
Πρόκειται για ένα ισχυρό μέσο στον τομέα των χρωμογενετικών μέσων.

Σε αυτό παρουσιάζονται διαφορετικά καθαρά και έντονα χρώματα χάρη στην ισχυρή χρωμογόνο τεχνολογία του. Η ανάγνωση του γίνεται πολύ εύκολα.

Το *V. alginolyticus* παραμένει άχρωμο στο CHROMagar™Vibrio, αποφεύγοντας έτσι οποιαδήποτε παρεμβολή με την ανίχνευση άλλων ειδών.

Η διάκριση μεταξύ *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus*. είναι πολύ σαφής.

Μικροοργανισμός	Τυπική εμφάνιση αποικίας
<i>V. parahaemolyticus</i>	→ μωβ
<i>V. vulnificus</i> / <i>V. cholerae</i>	→ πράσινο μπλε έως τυρκουάζ μπλε
<i>V. alginolyticus</i>	→ κρεμ



Εικόνα 1. Τρυβλίο petri με αποικίες Vibrios

2.10 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) agar

Το θειοθειικό κιτρικό άλας χολικών αλάτων σακχαρόζης (TCBS) είναι ένα εκλεκτικό και διαγνωστικό άγαρ για την απομόνωση και την καλλιέργεια του *Vibrio cholerae* και άλλων ειδών *Vibrio*. Αναπτύχθηκε μετά από τροποποίηση του εκλεκτικού μέσου του Nakanishi. Ο συνδυασμός αλκαλικού νερού πεπτόνης και TCBS Agar χρησιμοποιείται σε πολλές διαδικασίες για την απομόνωση του *V. cholerae* και άλλων ειδών *Vibrios* από κόπρανα. (Difco™ & BBL™.)

Μικροοργανισμός	Τυπική εμφάνιση αποικίας
<i>V. alginolyticus</i> , <i>Vibrio cholerae</i>	→ Μεγάλες κίτρινες αποικίες
<i>V. fluvialis</i> , <i>V. vulnificus</i>	→ Πράσινες ή ημιδιαφανείς αποικίες
<i>V. parahaemolyticus</i>	→ Άχρωμες αποικίες με πράσινο κέντρο
<i>Pseudomonas</i>	Μπλε αποικίες



Εικόνα 2. *Vibrio parahaemolyticus* (αριστερά), *Vibrio cholerae* (κέντρο), και *Vibrio vulnificus* (δεξιά) σε TCBS agar (Fedio et al)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

3.1 Πειραματικό μέρος

3.1.1 Περιοχές μελέτης

Οι περιοχές που μελετάει η ερευνά βρίσκονται στο Ιόνιο πέλαγος, στο νησί της Κεφαλονιάς.

Η Κεφαλονιά είναι το μεγαλύτερο νησί των Επτανήσων, συνολικής επιφάνειας 773 τ.χλμ και με πληθυσμό περίπου 36 χιλιάδες άτομα.

3.1.2 Νομός Αργοστολίου

Η πρώτη περιοχή μελέτης βρίσκεται στην πρωτεύουσα του νησιού και είναι η λιμνοθάλασσα του Αργοστολίου, γνωστή και ως ‘Κούταβος’ που στα αρχαία σημαίνει λεκάνη. Αποτελεί καταφύγιο για πολλά είδη ιχθυρών και πτηνών καθώς πρόκειται για υδροβιότοπο.



Εικόνα 1. Κούταβος

3.1.3 Νομός Σάμης

Η δεύτερη περιοχή μελέτης βρίσκεται στην ανατολική πλευρά του νησιού και πρόκειται για την παραλία του χωρίου Καραβόμυλος της Σάμης. Ο Καραβόμυλος είναι μέρος των γεωλογικών περιέργων φαινομένων που παρατηρούνται στην Κεφαλονιά: εκεί καταλήγουν τα νερά από τις Καταβόθρες του Αργοστολίου, στην δυτική πλευρά του νησιού, αφού διασχίσουν υπογείως την Κεφαλονιά και αναμειχθούν με τα γλυκά νερά του υπεδάφους.



Εικόνα 2. Καραβόμυλος, Σάμη

3.1.4 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων.

3.1.5 CHROMagar™Vibrio

Πίνακας 1. Σύνθεση CHROMagar™Vibrio

Προϊόν	Συσκευασία
Σύνολο g/L	74.7 g/L
Σύνθεση g/L	Agar 15.0 Peptone and yeast extract 8.0 Salts 51.4 Chromogenic mix 0.3
Όψη	Μορφή σκόνης
Αποθήκευση	15/30°C
Τελικό pH υλικού	9.0 +/- 0.2

Εκτέλεση

Διαλύουμε αργά 74,7 g υλικού σε 1L απιονισμένου νερού

Ανακατεύουμε μέχρι να πήξει το agar

Θερμαίνουμε μέχρι να βράσει κι φροντίζουμε η θερμοκρασία να μην ξεπεράσει τους 100°C

Μεταφέρουμε το έτοιμο υλικό σε φιάλες Duran και αφήνουμε το υλικό να έρθει σε θερμοκρασία 45-50°C

Ρίχνουμε το υλικό σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri υπό ασηπτικές συνθήκες

Αφήνουμε τα τρυβλία έως ότου το υλικό κρυώσει και πήξει

Μόλις είναι έτοιμα τα αποθηκεύουμε στη συντήρηση



Εικόνα 3 CHROMagar™Vibrio

3.1.6 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) agar

Πίνακας 2. Σύνθεση TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) agar

Προϊόν	Συσκευασία
Σύνολο g/L	88.08g/L
Σύνθεση g/L	Agar, 14 g/L Bromothymol blue, 0.04 g/L Ferric citrate, 1 g/L Mixed peptone, 10 g/L Ox-bile, 5 g/L Sodium chloride, 10 g/L Sodium cholate, 3 g/L Sodium citrate, 10 g/L Sodium thiosulfate, 10 g/L Sucrose, 20 g/L Thymol blue, 0.04 g/L Yeast extract, 5 g/L
Όψη	Μορφή σκόνης
Αποθήκευση	25°C
Τελικό pH υλικού	8.6 +/- 0.2

Εκτέλεση

Διαλύουμε 88 g υλικού σε 1L απιονισμένου νερού

Θερμαίνουμε μέχρι να βράσει

Μεταφέρουμε σε φιάλες Duran και αφήνουμε να έρθει σε θερμοκρασία 45-50°C

Ρίχνουμε το υλικό σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri υπό ασηπτικές συνθήκες

Αφήνουμε τα τρυβλία έως ότου το υλικό κρυνώσει και πήξει

Μόλις είναι έτοιμα τα αποθηκεύουμε στη συντήρηση



Εικόνα 4 TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose) agar

3.1.7 Διαδικασία δειγματοληψίας

Η διαδικασία της δειγματοληψίας ήταν επαναλαμβανόμενη και πραγματοποιήθηκε για έξι διαδοχικούς μήνες, από τον Δεκέμβριο του 2022 έως τον Μάιο του 2023 .

Από τις περιοχές μελέτης λήφθηκε δέγμα μια φορά τον κάθε μήνα τις ίδιες ημερομηνίες (με μικρή απόκλιση).

Την διαδικασία της δειγματοληψίας προηγούνταν η προετοιμασία των εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων CHROMagarVibro και TCBS την προηγούμενη ημέρα , και η προετοιμασία του απαραίτητου εξοπλισμού για την δειγματοληψία, όπως αποστείρωση τριών φιαλών Duran 1000ml.

Για την λήψη της κατάλληλης ποσότητας νερού από τις περιοχές μελέτης, με την χρήση αποστειρωμένων γαντιών μιας χρήσεως γινόταν βύθιση της κάθε φιάλης στο νερό, σε συγκεκριμένο σημείο έως ότου να επιτευχθεί η πλήρωση της.

Έπειτα οι φιάλες τοποθετούνταν σε καθαρές αχρησιμοποίητες πλαστικές σακούλες μιας χρήσεως για την ασφαλή μεταφορά τους στο εργαστήριο.

3.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός και υλικά

3.2.1 Κλίβανος υγρής αποστείρωσης

Ο κλίβανος υγρής αποστείρωσης εξασφαλίζει ομοιόμορφη θερμοκρασία στο εσωτερικό του (θερμοκρασία αποστείρωσης 121°C). Σε αυτό γίνεται η αποστείρωση όλων των σκευών που χρησιμοποιούνται για τον μικροβιολογικό έλεγχο.



Εικόνα 5. Κλίβανος υγρής αποστείρωσης

3.2.2 Συσκευή διήθησης

Το σύστημα διήθησης αποτελείται από έξι υποδοχές διήθησης νερού, επιπλέον διαθέτει κωνική φιάλη διήθησης και συνδέεται με αντλία κενού. Οι έξι υποδοχές διήθησης συνδέονται με γυάλινα χωνιά επάνω στα οποία τοποθετούνται ειδικά δοχεία με ανοίγματα και στις δυο τους πλευρές. Η μικρότερης διαμέτρου πλευρά εφάπτεται ακριβώς πάνω στο κάθε χωνί και ασφαλίζει με ειδική λαβίδα. Ενώ η μεγαλύτερης επιφάνειας πλευρά βρίσκεται προς τα πάνω.



Εικόνα 6-7 Συσκευή διήθησης

3.2.3 Ηθμοί Κυτταρίνης

Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένοι ηθμοί κυτταρίνης με διάμετρο 0,45μm 47mm λευκού πλέγματος, που έχουν βελτιστοποιηθεί για μικροβιολογική ανάλυση νερού.

Κάθε ηθμός είναι ατομικά σφραγισμένος, με μπλε διαχωριστικό χαρτί, αποστειρωμένο.



Εικόνα 8. Ηθμός κυτταρίνης

3.2.4 Επωαστικοί κλίβανοι

Βασικότερο χαρακτηριστικό των επωαστικών κλιβάνων είναι η διατήρηση της επιθυμητής ομοιόμορφης και σταθερής θερμοκρασίας, καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας και σε όλα τα σημεία του θαλάμου επώασης.



Εικόνα 9. Κλίβανος επώασης με τρυβλία

3.2.5 Συσκευή καταμέτρησης αποικιών

Η χειροκίνητη συσκευή καταμέτρησης αποικιών εξασφαλίζει στην ακριβή καταμέτρηση των αποικιών του κάθε τρυβλίου. Διαθέτει ειδικό σύστημα αισθητήρων και ήχου για κάθε εφαρμογή πίεσης πάνω στο τρυβλίο και αυτόματο αυξανόμενο αριθμητικό μετρητή για να είναι εμφανής ο τελικός αριθμός που έχει καταμετρηθεί.



Εικόνα 10 Συσκευή καταμέτρησης αποικιών

3.2.6 Λοιπός εξοπλισμός

- Τρυβλία Petri,
- Λαβίδες,
- Φιάλες Duran,
- Λύχνος Bunsen
- Ποτήρια ζέσεως 1000ml
- Ζυγός και αναλυτικός ζυγός
- Μαγνητικός αναδευτήρας- θερμαντήρας



Εικόνα 11.
Φιάλη Duran, Τρυβλία Petri.
Λύχνος Bunsen



Εικόνα 12.
Θρεπτικό υπόστρωμα σε ποτήρι ζέσεως
πάνω σε θερμαντήρα – αναδευτήρα

3.3 Διαδικασία πειράματος

Γυρνώντας στο εργαστήριο μετά τη δειγματοληψία, βγάζουμε από το ψυγείο τα τρυβλία για να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν τα χρησιμοποιήσουμε για την μικροβιολογική εξέταση.

Τρία τρυβλία για κάθε θρεπτικό υπόστρωμα, το κάθε τρυβλίο ανήκει σε μια φιάλη δείγματος αντίστοιχα

Στην κάτω πλευρά του κάθε τρυβλίου πρέπει να αναγράφεται το θρεπτικό υπόστρωμα που υπάρχει μέσα, καθώς και η τοποθεσία δειγματοληψίας και η ημερομηνία αυτής.

Στήνουμε την συσκευή διήθησής για να ξεκινήσει το μικροβιολογικός έλεγχος.

Το πείραμα πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες με χρήση λυχνιών Bunsen .

Τρία από τα ειδικά χωνιά διήθησής οπού έχουν προηγουμένως αποστειρωθεί τοποθετούνται στις τρεις πρώτες θέσεις του συστήματος διήθησης.

Οι ηθμοί κυτταρίνης αφαιρούνται προσεκτικά από τις ατομικές συσκευασίες τους και τοποθετούνται με την χρήση λαβίδων, των οποίων τα άκρα έχουν κάθε φορά εμβαπτιστεί σε αιθυλική αλκοόλη 95° και έχουν περαστεί από φλόγα, επάνω στο κάθε χωνί. (Εικόνες 13-14)

Έπειτα τοποθετείται επάνω στην βάση κάθε ενός από τα χωνιά το αντίστοιχο δοχείο το οποίο έχει αποστειρωθεί. (Εικόνα 15)

Το δοχείο παραμένει σταθερό στην θέση του με την χρήση ειδικής μεταλλικής

λαβίδας η οποία συγκρατεί τα δυο τμήματα ενωμένα και εφαρμόζεται στο σημείο που εφάπτονται τα δυο τμήματα.(Εικόνα 15)

Σε τρεις ογκομετρικούς κυλίνδρους μεταφέρεται από την κάθε μια φιάλη Duran η απαραίτητη ποσότητα δείγματος αντίστοιχα υπό ασηπτικές συνθήκες. Η ποσότητα δείγματος για την κάθε μια από της δυο περιοχές μελέτης διαφέρει. Για να βρεθεί η ιδανική ποσότητα στην κάθε περίπτωση χρειάστηκε να πραγματοποιηθούν μετρήσεις ενδεικτικών όγκων δείγματος. Το τελικό πείραμα δεν επηρεάζεται από τους διαφορετικούς όγκους καθώς όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται σε cfu/L.

Κάθε ογκομετρούμενο δείγμα έπειτα αδειάζεται στο δοχείο διήθησής το οποίο σκεπάζεται αμέσως με προστατευτικό αλουμινόχαρτο και θέτεται σε λειτουργία η αντλία κενού . (Εικόνα 16)

Όταν διηθηθεί όλο το δείγμα από κάθε δοχείο θέτουμε την αντλία σε παύση, βγάζουμε την ειδική λαβίδα η οποία συγκρατεί τα δυο τμήματα ενωμένα και αφαιρούμε το επάνω δοχείο ώστε να μπορέσουμε να συλλέξουμε τον ηθμό κυτταρίνης με την χρήση λαβίδων που έχουν εμποτιστεί στην αλκοόλη και περάσει από την φλόγα ξανά. (Εικόνα 17)

Ο κάθε ηθμός τοποθετείται σε εάν τρυβλίο Petri με το επιθυμητό εκλεκτικό υπόστρωμα υπό ασηπτικές συνθήκες. (Εικόνες 18 έως 21)

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται με αποστειρωμένα χωνιά και δοχεία διήθησής και για το επόμενο εκλεκτικό υπόστρωμα .

Τα τρυβλία τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο για 24 ώρες στους 37 °C .

(Εικόνα 22)

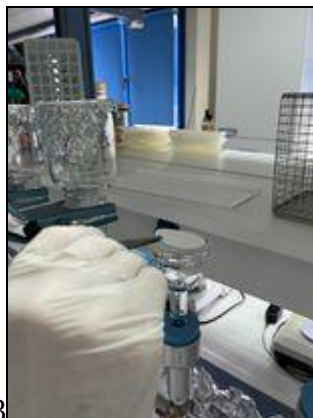
Μόλις παρέλθει το εικοσιτετράωρο τα τρυβλία αφαιρούνται από το επωαστικό κλίβανο και με την χρήση της συσκευής καταμέτρησης γίνεται η καταγραφή των αποικιών που έχουν αναπτυχθεί. (Εικόνα 23-24)

Κατά την διάρκεια της καταμέτρησης τα τρυβλία πρέπει να παραμένουν ερμητικά κλειστά ώστε να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις από το περιβάλλον.

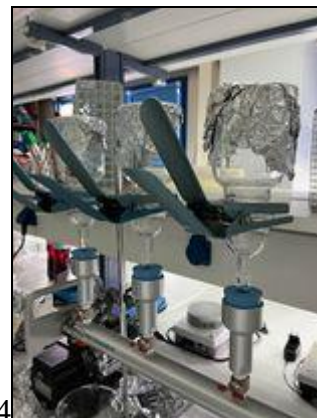
Στην συνέχεια τα τρυβλία επανατοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο στους 37 °C για να ξανά μετρηθούν με τον ίδιο τρόπο όταν παρέλθουν 48 ώρες.



13



14



15

Εικόνες 13-14-15



16



17



18

Εικόνες 16-17-18



19



20

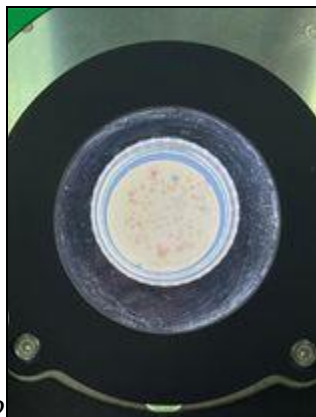


21

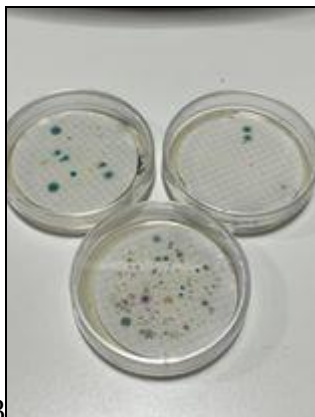
Εικόνες 19-20-21



22



23



24

Εικόνες 22-23-24

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

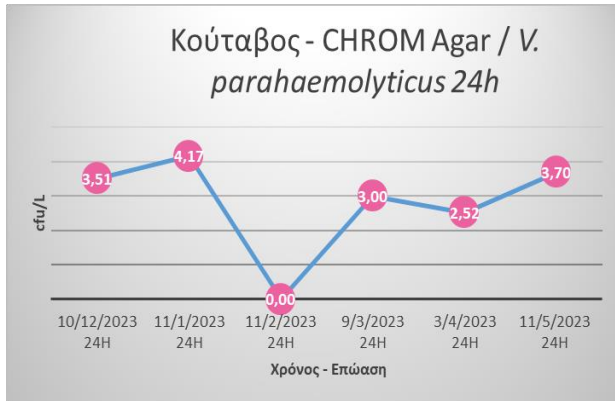
4.1 Πειραματικά αποτελέσματα Περιοχή Κουτάβου

Πίνακας 1. Τιμές ανάπτυξης Vp Vn, Vc, Va σε CHROMagarVibrio και TCBSagar στη περιοχή του Κουτάβου ανά μήνα και χρόνο επώασης.

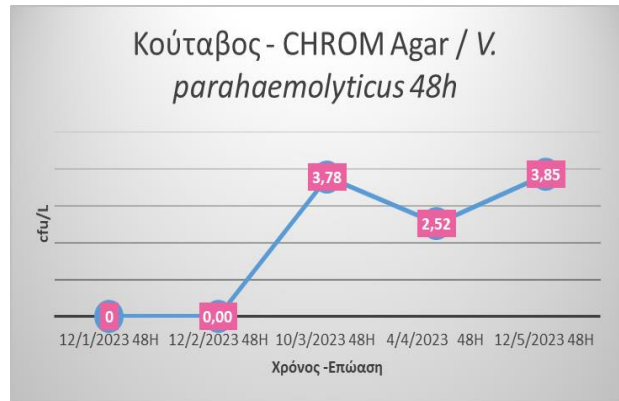
	ΚΟΥΤΑΒΟΣ				
	CHROM TM agar			TCBS	
Μικροοργανισμοί / Ημερομηνία	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus/ cholerae</i>	<i>V. alginoliticus</i>	<i>V. alginoliticus/ cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus/ vulnificus</i>
	cfu/L				
10/12/2023 24h	3,51	3,81	3,01	-	-
11/12/2023 48h	-	-	-	-	-
11/1/2023 24h	4,17	2,82	4,11	-	-
12/1/2023 48h	-	-	-	-	-
11/2/2023 24h	0,00	2,52	0,00	-	-
12/2/2023 48h	0,00	2,82	0,00	-	-
9/3/2023 24h	3,00	2,82	3,43	2,52	0,00
10/3/2023 48h	3,78	3,52	3,00	2,82	3,48
3/4/2023 24h	2,52	3,00	2,52	2,82	0,00
4/4/2023 48h	2,52	3,30	3,52	3,00	2,82
11/5/2023 24h	3,70	4,10	4,11	4,03	3,85
12/5/2023 48h	3,85	3,85	4,40	4,01	3,92

Για τους δυο πρώτους μήνες διεξαγωγής του πειράματος η καταμέριση των αποικιών στις 48 ώρες επώασης ήταν αδύνατη στο CHROMagar καθώς στα δείγματα του Κουτάβου υπήρχε υπερανάπτυξη των καλλιεργειών των μικροοργανισμών στα τρυβλία καθιστώντας έτσι δυσδιάκριτες τις αποικίες.

Επιπλέον, για το TCBSagar δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για τους μήνες Δεκέμβριο, Ιανουάριο και Φεβρουάριο καθώς η χρήση του έγινε εφικτή τον μηνά Μάρτιο και έπειτα τα δυο υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα για την πειραματική διαδικασία.

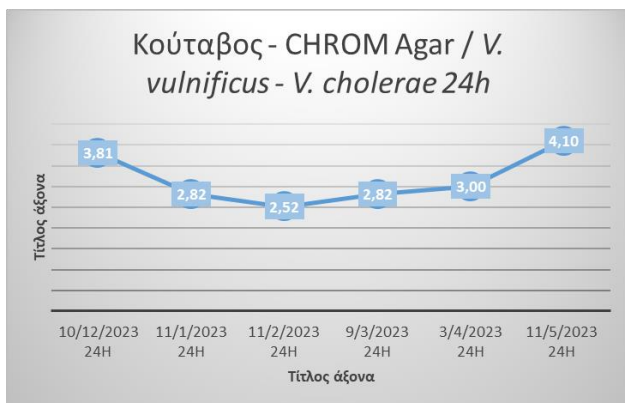


1

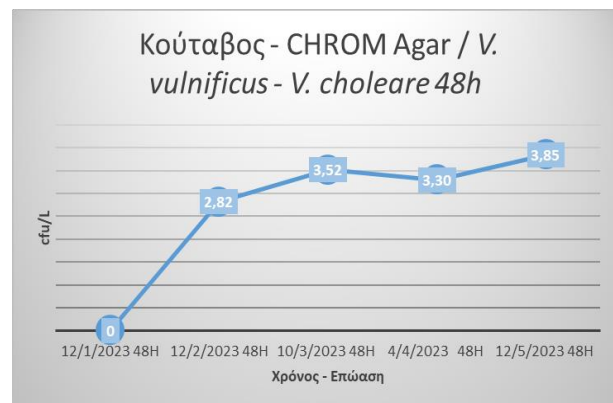


2

Σχήματα 1-2. Ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* στις 24 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο / Ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* στις 48 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο. Οι τιμές είναι σταθερά αυξάνουσες για όλους τους μήνες με εξαίρεση την Φεβρουάριο όπου δεν ανιχνεύτηκε καθόλου το παθογόνο.

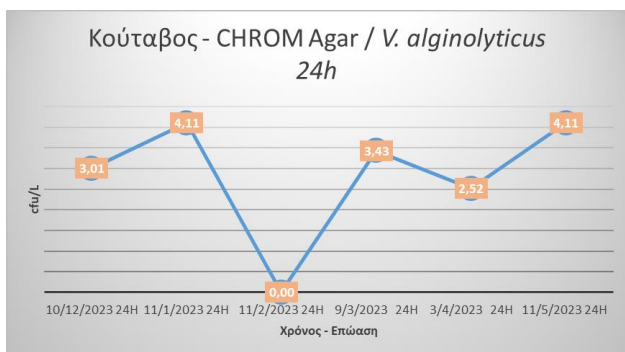


3

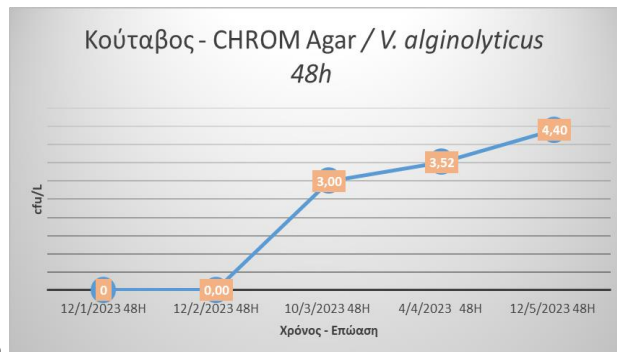


4

Σχήματα 3-4. Ανάπτυξη *V. vulnificus* & *V. cholerae* στις 24 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο/ Ανάπτυξη *V. vulnificus* & *V. cholerae* στις 48 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο. Παρατηρούνται χαμηλότερες τιμές για τους πιο κρύους μήνες, ενώ σημαντική είναι η αύξηση τον μήνα Μάιο καθώς είναι θερμότερος μήνας.



5

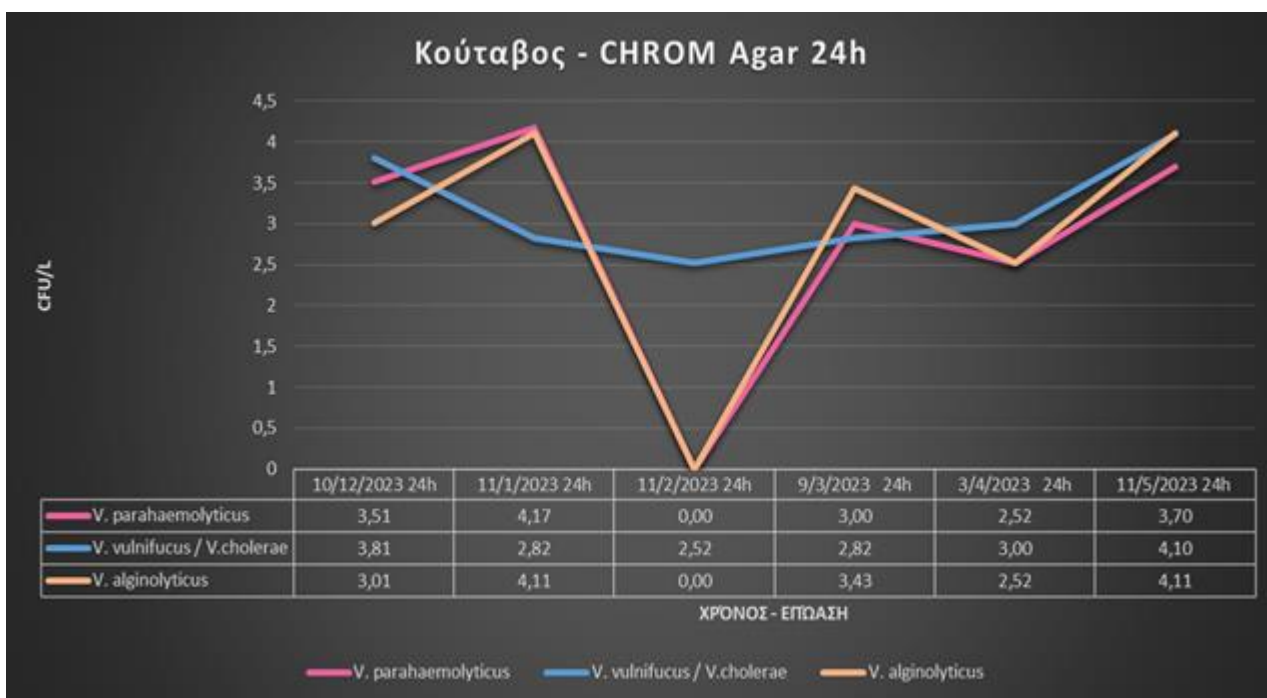


6

Σχήματα 5-6. Ανάπτυξη *V. alginolyticus* στις 24 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο/

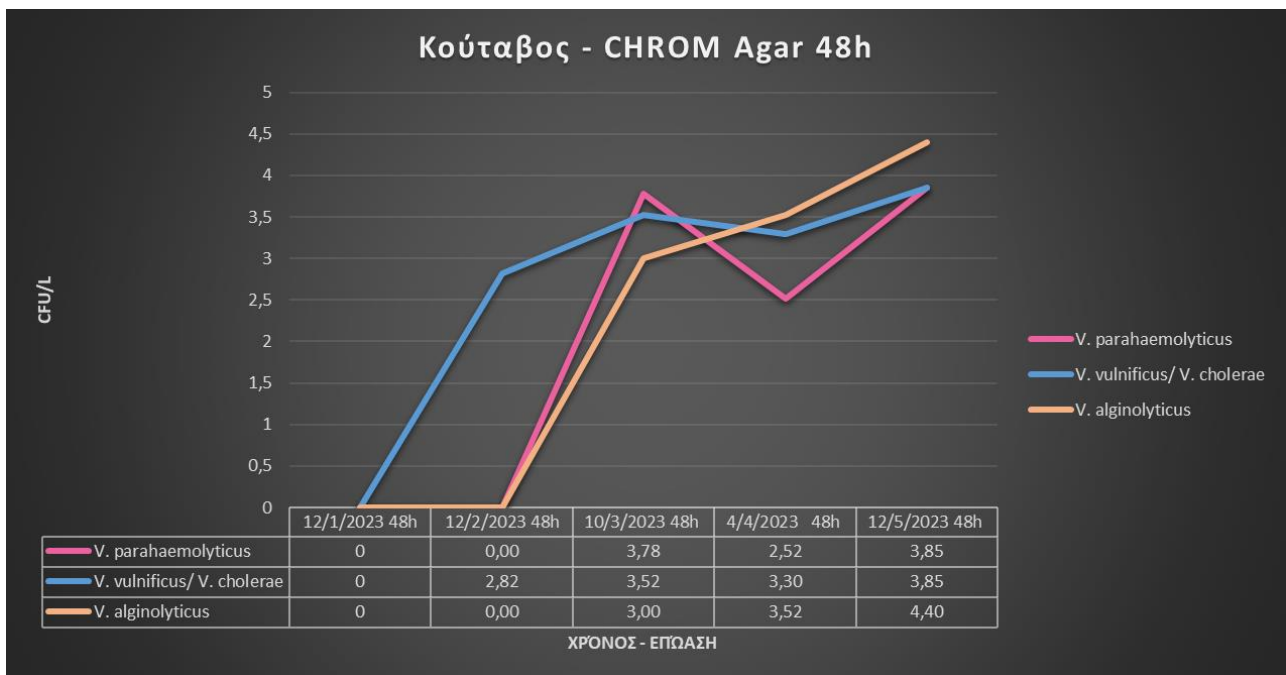
Ανάπτυξη *V. alginolyticus* στις 24 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο.

Οι τιμές των πρώτων 24ωρων ποικίλουν ανά μήνα, ενώ οι τιμές στις 48 ώρες παρουσιάζουν εκθετική αύξηση. Τον μηνά Φεβρουάριο το παθογόνο δεν ανιχνεύθηκε καθόλου.



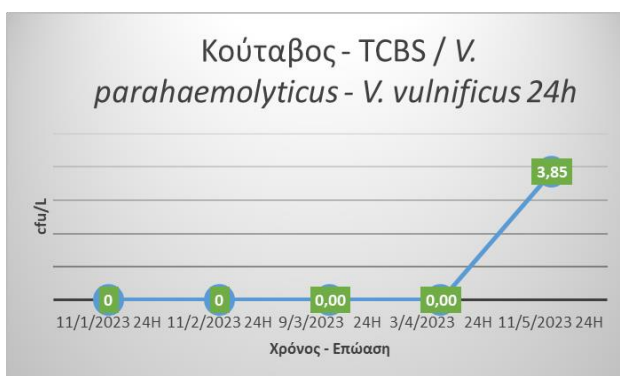
Σχήμα 7. Ανάπτυξη των *Vibrios* στις 24 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο.

Το *V. parahaemolyticus* & *V. alginolyticus* παρουσιάζουν έντονες διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις τους για τους ίδιους μήνες, ενώ το *V. vulnificus* & *V. cholerae* έχουν διαφορετική καμπύλη ανάπτυξης χωρίς έντονες διακυμάνσεις και διακοπές.

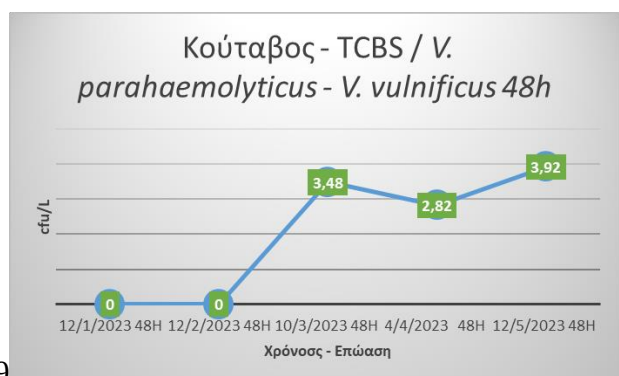


Σχήμα 8. Ανάπτυξη των *Vibrios* στις 48 ώρες στο CHROMagar για τον Κούταβο.

Η καμπύλη ανάπτυξης του *V. parahaemolyticus* παρουσιάζει μείωση την Απρίλιο σε αντίθεση με τα υπόλοιπα vibrio όπου αναπτύσσονται εκθετικά.



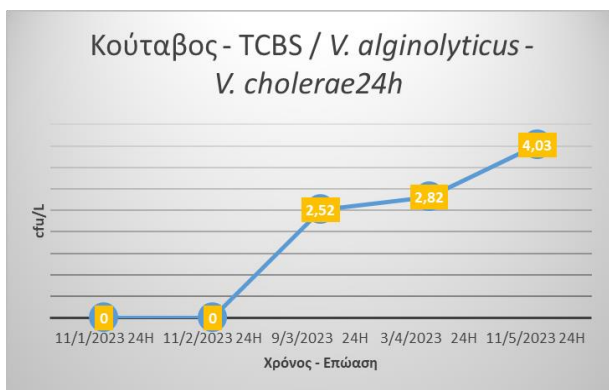
9



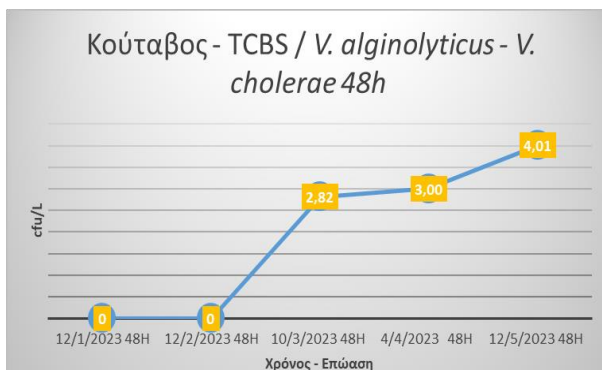
10

Σχήματα 9-10. Ανάπτυξη *V. parahaemolyticus* & *V. vulnificus* στις 24 ώρες στο TCBS agar για τον Κούταβο/ Ανάπτυξη *V. parahaemolyticus* & *V. vulnificus* στις 48 ώρες στο TCBS agar για τον Κούταβο.

Το πρώτο 24ωρο οι μικροοργανισμοί δεν παρουσίασαν ανάπτυξη για τους μήνες Φεβρουάριο και Μάρτιο ενώ στις 48 ώρες ήταν εμφανείς η απότομη αύξηση τους.



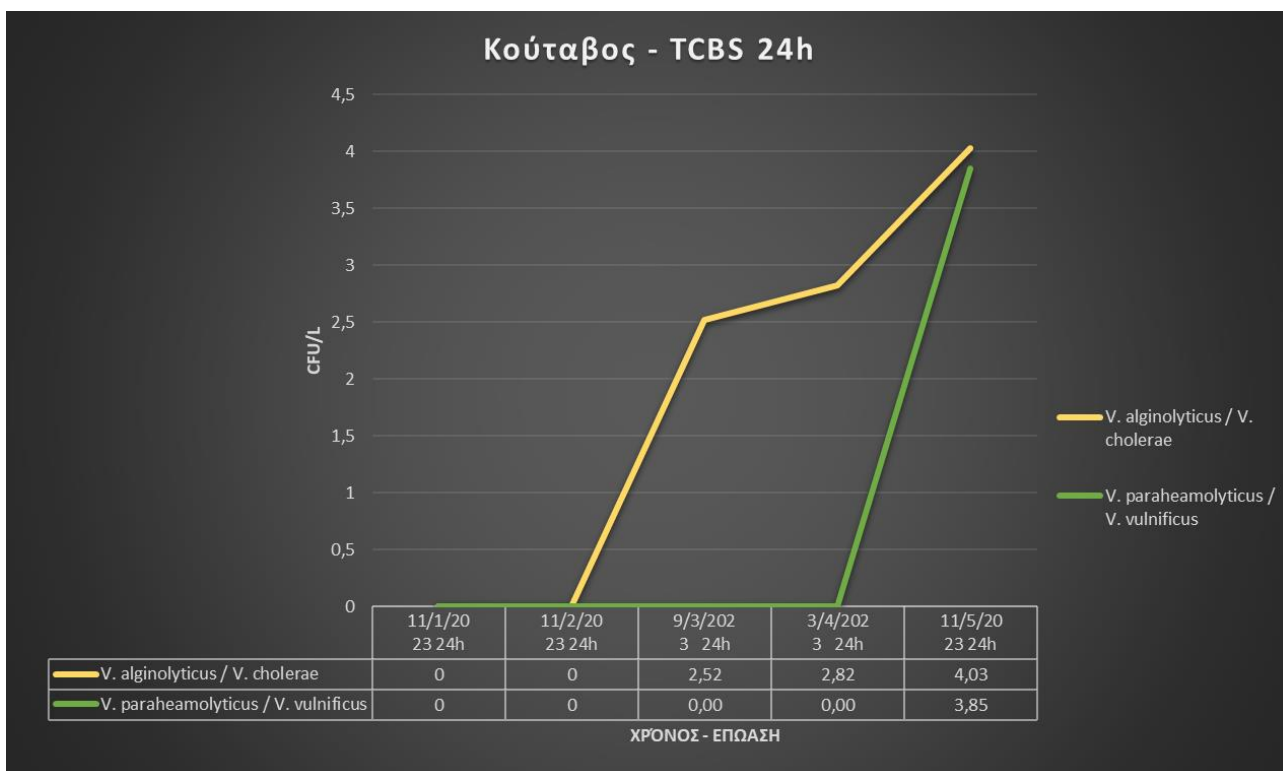
11



12

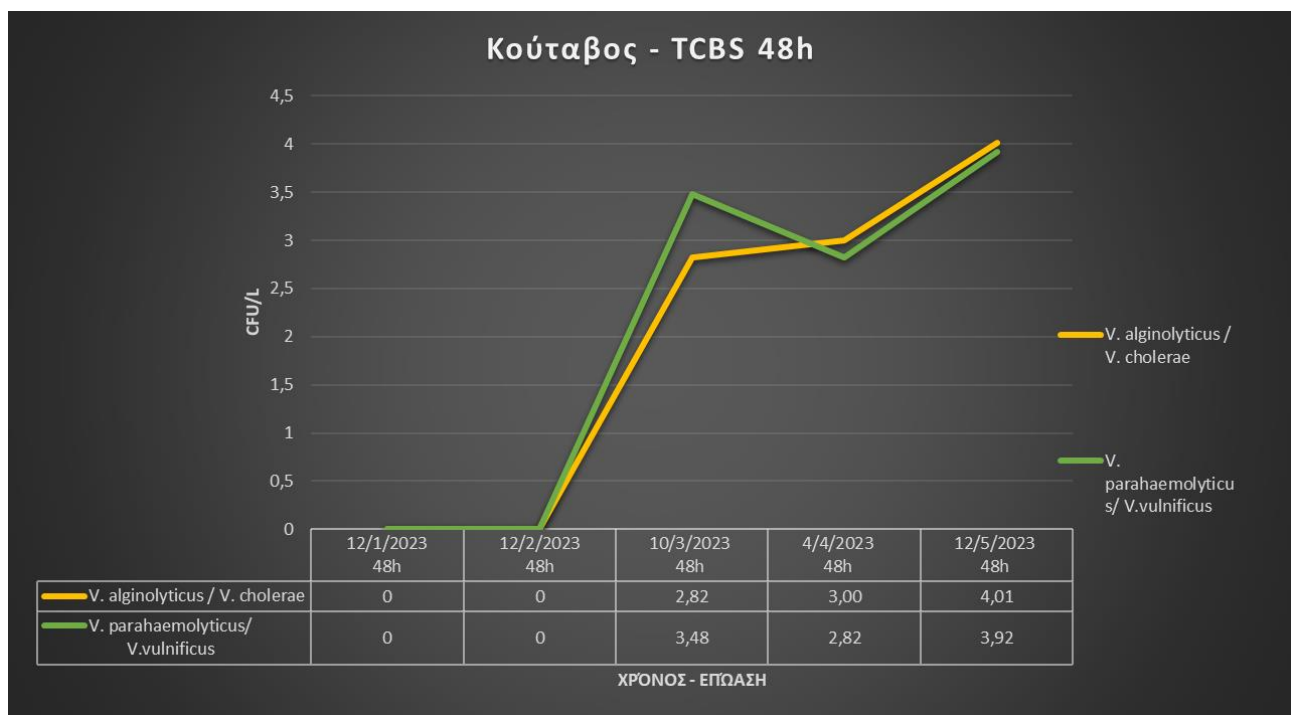
Σχήματα 11-12. Ανάπτυξη *V. alginolyticus* & *V. cholerae* στις 24 ώρες για το TCBSagar για τον Κούταβο./ Ανάπτυξη *V. alginolyticus* & *V. cholerae* στις 48 ώρες για το TCBSagar για τον Κούταβο.

Οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν εκθετική αύξηση ανά τους μήνες στο πρώτο 24ωρο και οι τιμές αυτών αυξάνονται ελαφρώς κατά τις 48 ώρες.



Σχήμα 13. Ανάπτυξη των *Vibriosis* στις 24 ώρες στο TCBSagar για τον Κούταβο.

Παρατηρείται ότι στις 24 ώρες τα *V. alginolyticus* & *V. cholerae* αναπτύσσονται και τους κρύους μήνες Μάρτιο και Απρίλιο σε αντίθεση με τα *V. parahaemolyticus* & *V. vulnificus* όπου ανιχνεύονται τον μηνά Μάιο μόνο.



Σχήμα 14. Ανάπτυξη των *Vibrios* στις 48 ώρες στο TCBSagar για τον Κούταβο.

Η ανάπτυξη των *Vibrios* στις 48 ώρες ακολουθεί παρόμοια πορεία και για τα 4 στελέχη, με μια ελάχιστη μείωση για τα *V. parahaemolyticus* & *V. vulnificus* τον μήνα Απρίλιο.

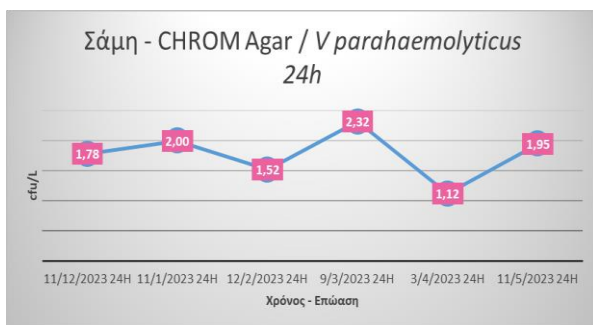
4.2 Πειραματικά αποτελέσματα περιοχή Σάμης

Πίνακας 2. Τιμές ανάπτυξης Vp Vn, Vc, Va σε CHROMagarVibrio και TCBSagar στη περιοχή της Σάμης ανά μηνά και χρόνο επώασης.

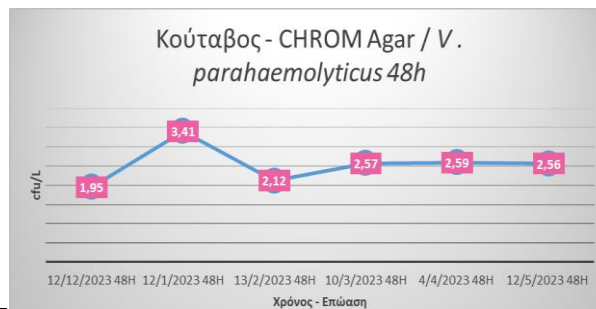
	ΣΑΜΗ				
	CHROMagar			TCBS	
Μικροοργανισμοί / Ημερομηνία	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus/ cholerae</i>	<i>V. alginoliticus</i>	<i>V. alginoliticus/ cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus /vulnificus</i>
	cfu/L				
11/12/2023 24h	1,78	2,62	3,22	-	-
12/12/2023 48h	1,95	2,65	3,42	-	-
11/1/2023 24h	2,00	3,85	4,00	-	-
12/1/2023 48h	3,41	3,79	3,48	-	-
12/2/2023 24h	1,52	2,82	3,16	-	-
13/2/2023 48h	2,12	2,00	2,51	-	-
9/3/2023 24h	2,32	2,14	2,68	2,78	2,57
10/3/2023 48h	2,57	2,36	2,56	2,99	0,52
3/4/2023 24h	1,12	2,31	2,87	2,61	2,79
4/4/2023 48h	2,59	2,29	2,55	2,97	1,48
11/5/2023 24h	1,95	2,37	2,20	3,05	0,32
12/5/2023 48h	2,56	2,37	2,70	3,11	0,00

Στην περίπτωση των δειγμάτων της Σάμης για το CHROMagar όπως μπορούμε να δούμε και από τις τιμές, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών ήταν αρκετά χαμηλότερή σε σύγκριση με τις τιμές του πίνακα 1.1. Συνεπώς η καταμέτρηση και η συλλογή δεδομένων ήταν εφικτή στις 48 ώρες όλους τους μήνες.

Όμοιος με τον πίνακα 1.1 για το TCBSagar δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για τους μήνες Δεκέμβριο, Ιανουάριο και Φεβρουάριο καθώς η χρήση του έγινε εφικτή τον μήνα Μάρτιο και έπειτα, οπότε τα δυο υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα για την πειραματική διαδικασία.



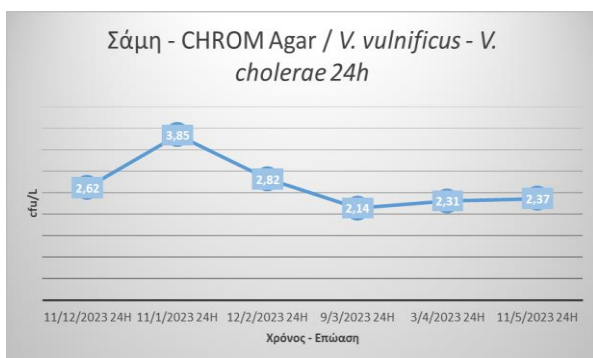
15



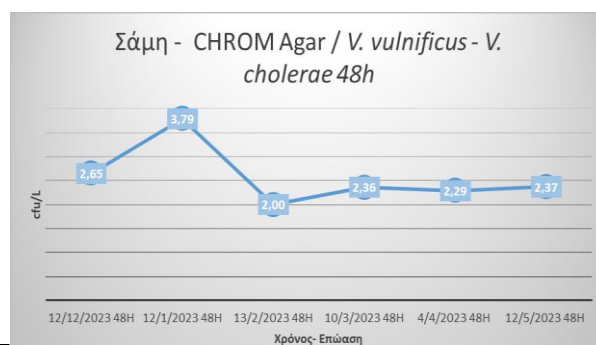
16

Σχήματα 15-16. Ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* στις 24 ώρες στο CHROMagar για την Σάμη / Ανάπτυξη του *V. parahaemolyticus* στις 48 ώρες στο CHROMagar. για την Σάμη.

Παραιτείται αύξηση του μικροοργανισμού κατά τις 48 ώρες, και μια πιο σταθερή καμπύλη σε σχέση με τις τιμές του πρώτου 24ώρου.



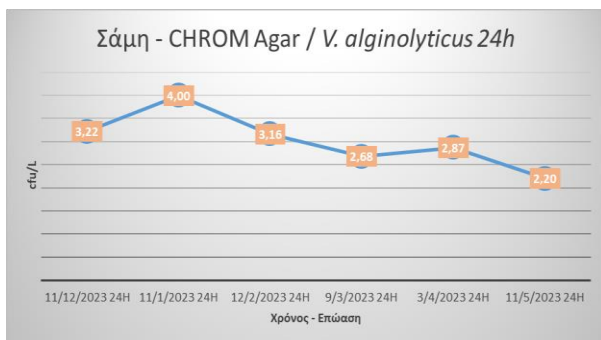
17



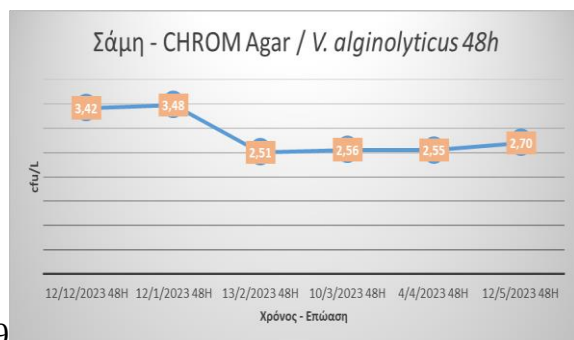
18

Σχήματα 17-18. Ανάπτυξη του *V. vulnificus* & *V. cholerae* στις 24 ώρες στο CHROMagar για την Σάμη / Ανάπτυξη του *V. vulnificus* & *V. cholerae* στις 48 ώρες στο CHROMagar. για την Σάμη.

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών διατηρείται σε σχετικά σταθερές τιμές και τα δυο 24ωρα ανά τους μήνες, με εξαίρεση τον Φεβρουάριο όπου υπάρχει έντονη αύξηση.



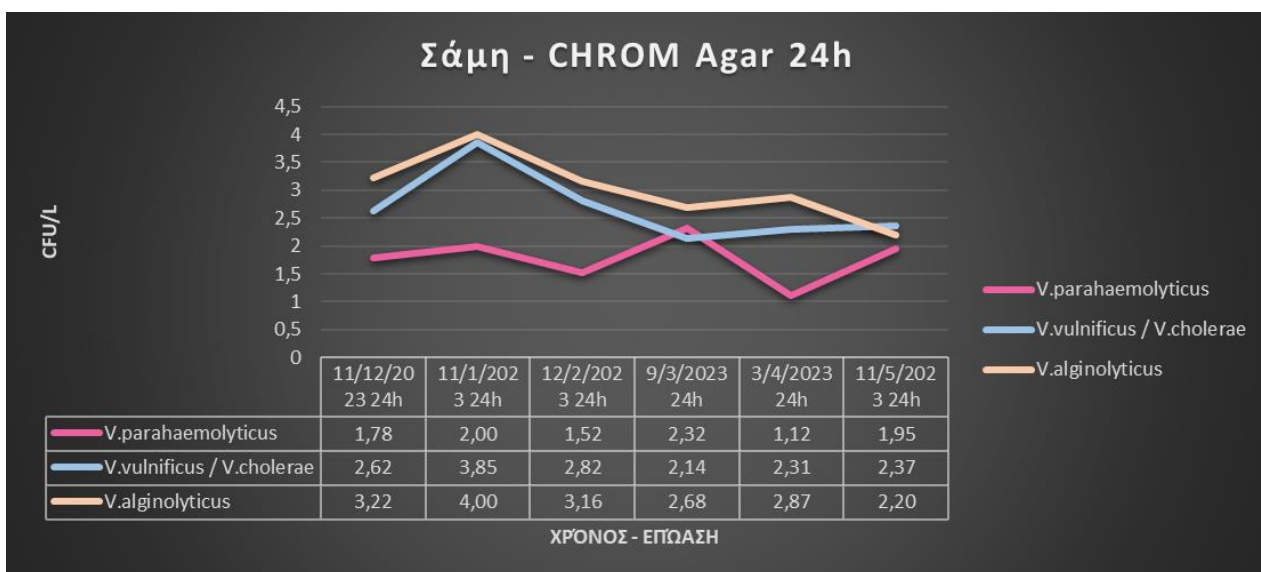
19



20

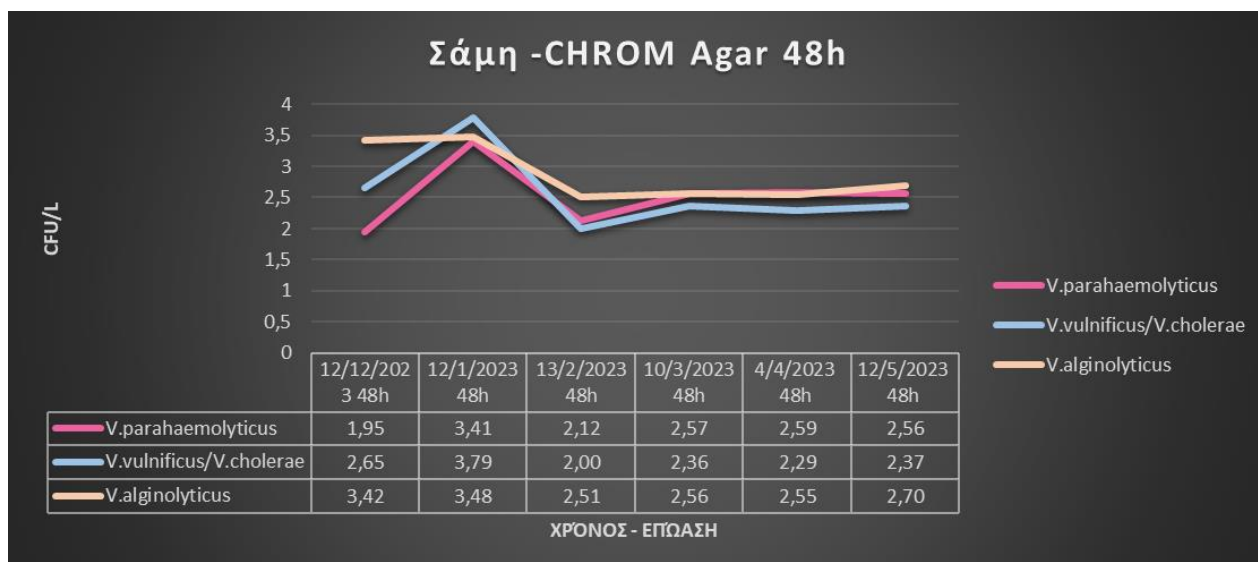
Σχήματα 19-20. Ανάπτυξη του *V.alginolyticus* στις 24 ώρες στο CHROMagar για την Σάμη / Ανάπτυξη του *V.alginolyticus* στις 48 ώρες στο CHROMagar. για την Σάμη.

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρουσιάζει καθοδική πορεία όσο περνάνε οι μήνες για τις 24 ώρες επώασης ενώ στις 48 ώρες οι τιμές αυτού δεν φαίνεται να αυξάνονται πέρα από τον τελευταίο μήνα.



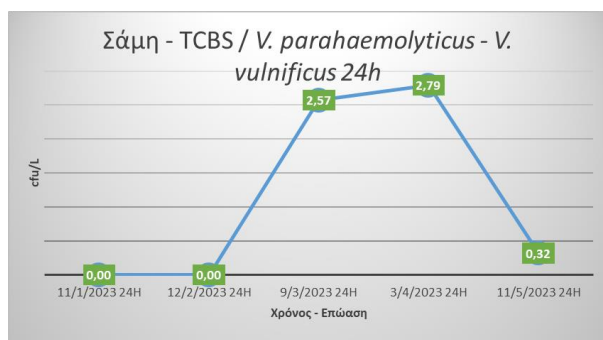
Σχήμα 21. Ανάπτυξη των *Vibrios* στις 24 ώρες στο CHROMagar για την Σάμη.

Η ανάπτυξη των *V. vulnificus* & *V.cholerae* & *V.alginolyticus* ενώ έχει υψηλή συγκέντρωση τον μηνά Ιανουάριο, τους επομένους μήνες ακολουθεί καθοδική πορεία. Το *V. parahaemolyticus* ανιχνεύεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε μήνα με αρκετά έντονες διακυμάνσεις.

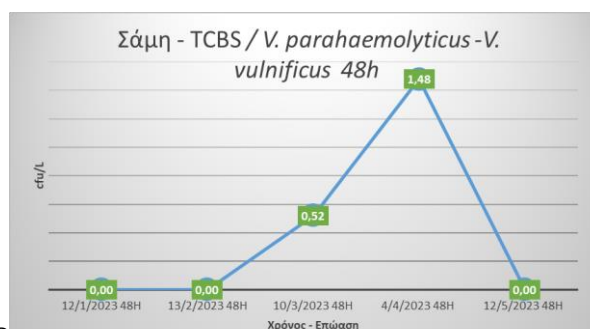


Σχήμα 22. Ανάπτυξη των *Vibrios* στις 48 ώρες στο CHROMagar για την Σάμη.

Τα *Vibrios* φθάνεται να παρουσιάζουν όμοιες διακυμάνσεις στις 48 ώρες καθ'όλους τους μήνες. Αρχικά ανιχνεύονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οι οποίες έπειτα αυξάνουν απότομα και τελικά καταλήγουν να μειώνονται στο ίδιο επίπεδο.

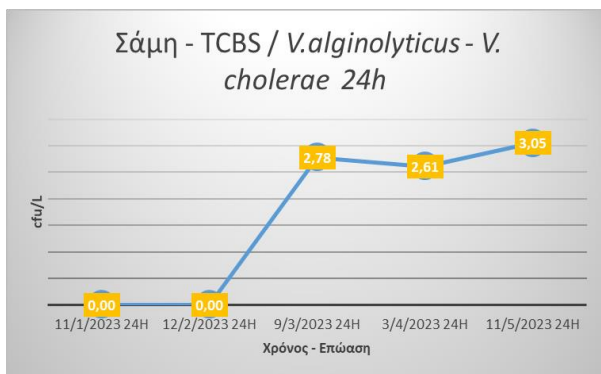


23

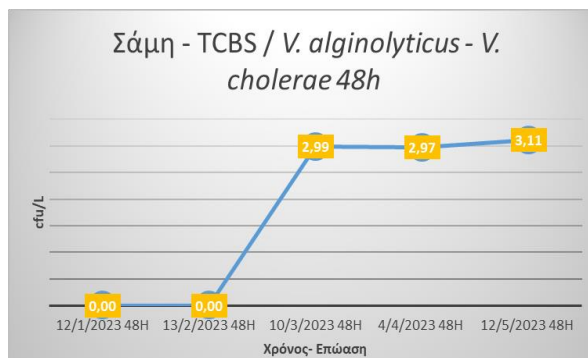


24

Σχήματα 23-24. Ανάπτυξη *V. parahaemolyticus* & *V. vulnificus* στις 24 ώρες στο TCBS agar για την Σάμη/ Ανάπτυξη *V. parahaemolyticus* & *V. vulnificus* στις 48 ώρες στο TCBS agar για την Σάμη. Η ανάπτυξη των παθογόνων για τους πρώτους μήνες αυξάνεται εκθετικά και στα δυο 24ωρα, όμως τον τελευταίο μήνα ανιχνεύεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση.

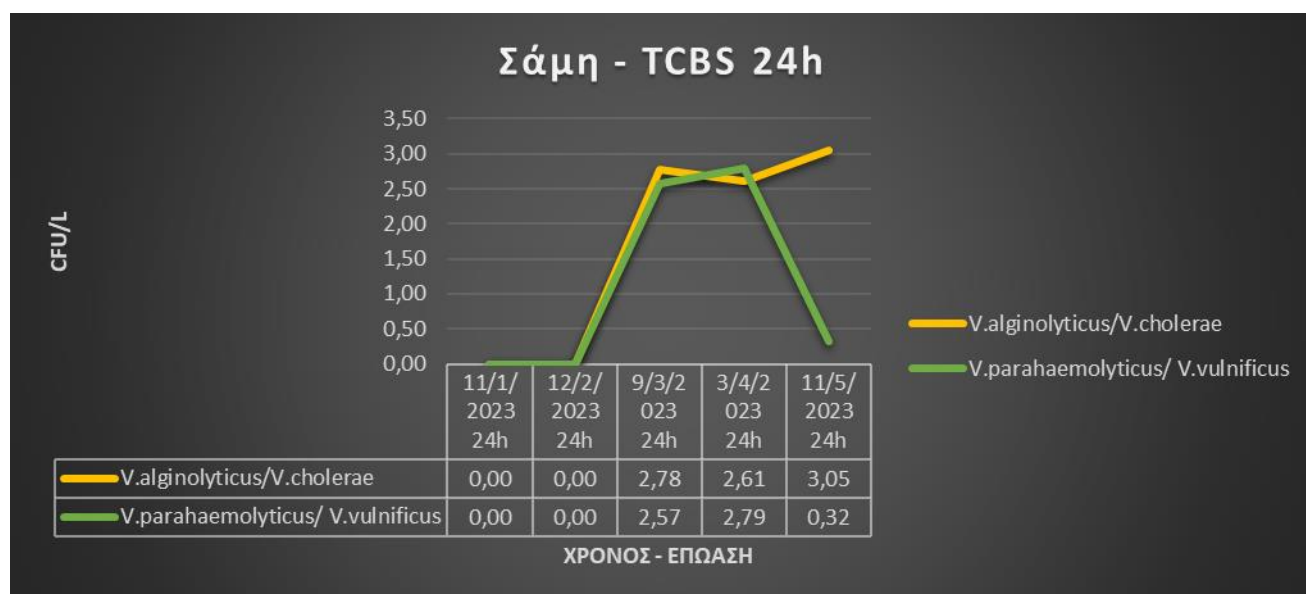


25



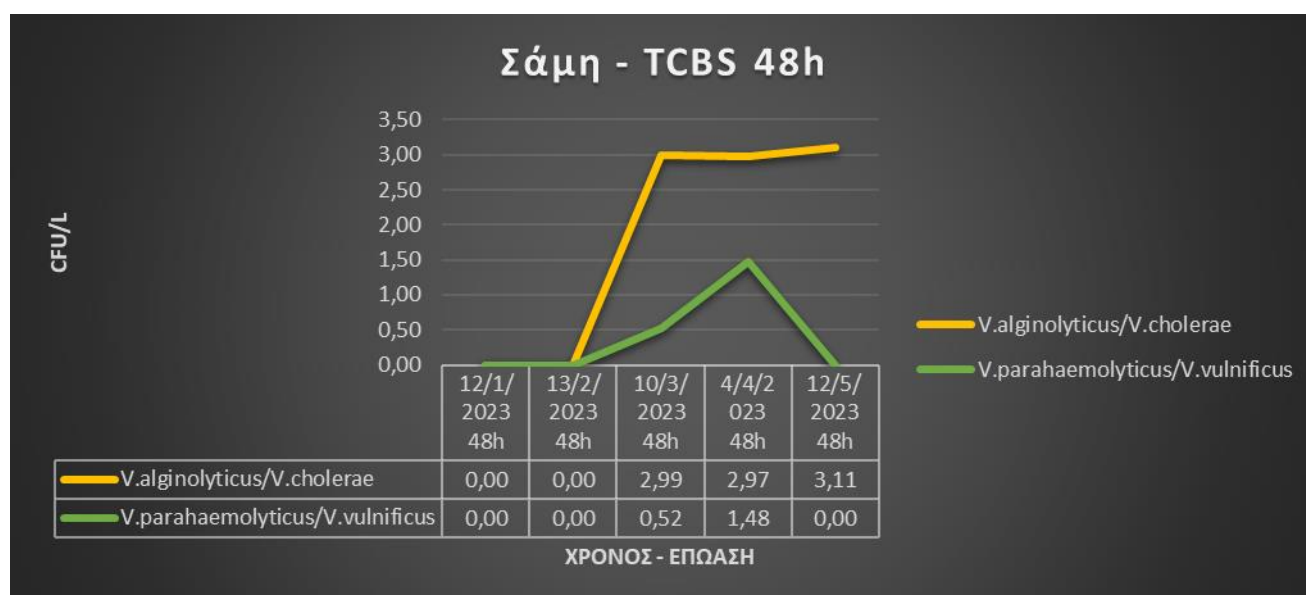
26

Σχήματα 25-26. Ανάπτυξη *V.alginolyticus* & *V. cholerae* στις 24 ώρες για το TCBSagar για την Σάμη. / Ανάπτυξη *V.alginolyticus* & *V. cholerae* στις 48 ώρες για το TCBSagar για την Σάμη. Το πλήθος των παθογόνων παρουσιάζει μια σχετικά σταθερή ανάπτυξη με μικρές διακυμάνσεις όλους τους μήνες για τις 24 ώρες και οι συγκεντρώσεις αυτών αυξάνονται κατά τις 48 ώρες



Σχήμα 27. Ανάπτυξη των *Vibrios* στις 24 ώρες στο TCBSagar για την Σάμη.

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών φαίνεται να ξεκινάει με παρόμοιες τιμές συγκεντρώσεων όμως στην πορεία των μηνών οι δυο καμπύλες παρουσιάζουν αντίθετα αποτελέσματα καθώς τα *V.alginolyticus* & *V. cholerae* αυξάνονται , τα *V. parahaemolyticus* & *V. vulnificus* μειώνονται απότομα.



Σχήμα 28 Ανάπτυξη των *Vibrios* στις 48 ώρες στο TCBSagar για την Σάμη.

Τα *V.alginolyticus* & *V. cholerae* παρουσιάζουν αύξηση της συγκέντρωσης τους στις 48 ώρες, ενώ τα *V. parahaemolyticus* & *V. vulnificus* αντίθετα μειώνονται δραματικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.Συμπεράσματα.

Έχοντας μελετήσει και εκτιμήσει τις τιμές των αποτελεσμάτων που δόθηκαν από τα πειραματικά δεδομένα, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι και τα δυο θρεπτικά υποστρώματα που επιλεχθήκανε να εξεταστούν για τον προσδιορισμό του *V.vulnificus* μπορούν να θεωρηθούν καταλληλά για την ανίχνευση του μικροοργανισμού.

Η παράλληλη χρήση τους μάλιστα μπορεί να αποτελέσει ιδανικότερη μέθοδο για την επίτευξη αποφυγής ψευδών αποτελεσμάτων, καθώς τα δυο αυτά θρεπτικά υποστρώματα , CHROMagarVibrio & TCBSagar, δρουν βοηθητικά. Επιπροσθέτως, με την επιπλέον χρήση ορισμένων μοριακών αναλύσεων που έχουν πραγματοποιηθεί σε αντίστοιχες έρευνες έχει αποδειχθεί η εγκυρότητα των ταυτοτήτων των μικροοργανισμών που ανιχνεύονται σε αυτά τα δυο θρεπτικά υλικά.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα που καταμετρήθηκαν για την ανάπτυξη του *V.vulnificus* στο CHROMagarVibrio μπορούν να θεωρηθούν πιο αξιόπιστα, καθώς καθίσταται αρκετά ευκολότερη και ξεκάθαρη η ταυτοποίηση του παθογόνου σε σύγκριση με το TCBSagar.

Παρόλα αυτά το TCBSagar προσέφερε την επιβεβαίωση της ύπαρξης του *V.vulnificus* και για τις δυο περιοχές μελέτης. Αυτό επαληθεύτηκε και με περαιτέρω απομόνωση των πράσινων αποικιών του, σε θρεπτικό υλικό CHROMagar. Οι αποικίες που αναπτυχθήκαν μετά την απομόνωση αυτή ήταν γαλάζιου χρώματος, άρα κατά συνέπεια εξακριβώθηκε πως ανήκαν στο είδος *V.vulnificus*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφική

Matthews, K., Kniel, K., Montville, T., 2021. *Μικροβιολογία Τροφίμων – Μία Εισαγωγή*, Εκδόσεις Δισίγμα (1η Ελληνική έκδοση) Σελ 345-358.

Ηλεκτρονική

Difco™ & BBL™ Manual, 2nd Edition. Online διαθέσιμο στη: https://www.humebau.com/media/blfa_files/265020.pdf

Fedio, W.M., Jones, J.L., Zapata, R., Browning, P., Pamboukian, R., DePaola, A., *Single Laboratory Validation of the BAX qPCR Vibrio Assay for Identification of Vibrio Isolates*, New Mexico State University, FDA

Glackin, C.C., Dupke, S., Chandra, T.S., Riedinger, D., Labrenz, M., 2024. *Combined TCBS and CHROMagar Analyses Allow for Basic Identification of Vibrio vulnificus within a 48 h Incubation Period in the Coastal Baltic Sea*, Microorganisms, 12, σελ. 614. Online διαθέσιμο στη: <https://www.mdpi.com/2076-2607/12/3/614>

Palit, A., Nair, G.B. 2014. *Encyclopedia of Food Safety*, σελ. 570-573. Online διαθέσιμο στη: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123786128001207>

Tiffany C. Williams, Brett Froelich¹, James D. Oliver.2013, *A new culture-based method for the improved identification of Vibrio vulnificus from environmental samples, reducing the need for molecular confirmation*. Journal of Microbiological Methods, σελ. 277-283, Online διαθέσιμο στη: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701213001>

