

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**“Επιβιωσιμότητα ενός στελέχους *Salmonella* σε νερό
της λίμνης Κάρλα”**

Τσότσκου Αναστασία

ΒΟΛΟΣ 2016

“Επιβιωσιμότητα ενός στελέχους *Salmonella* σε νερό
της λίμνης Κάρλα”

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1) Κωνσταντίνος Κορμάς, Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.

2) Ιωάννης Μποζιάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

3) Χρήστος Χατζηχριστοδούλου, Καθηγητής, Υγιεινή και Επιδημιολογία, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Κορμά Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μποζιάρη Ιωάννη για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά του, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού και για την υποστήριξή του κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επιβιωσιμότητας του ορότυπου *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium σε νερό της λίμνης Κάρλα για θερινή και χειμερινή περίοδο καθώς και η εξακρίβωση της χρονικής διάρκειας αυτής της πιθανής επιβιωσιμότητας. Συνολικά πραγματοποιήθηκε μία δειγματοληψία νερού από την λίμνη Κάρλα για την κάθε εποχή.

Το στέλεχος εμφάνισε αποικίες ακόμα και 14 ημέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό κατά το πείραμα της θερινής περιόδου. Το δείγμα του νερού που συλλέχθηκε αποστειρώθηκε, διηθήθηκε και διαχωρίστηκε σε έξι διαφορετικές γυάλινες φιάλες των 400ml, στις τρεις από τις οποίες τοποθετήθηκε εμβόλιο με το στέλεχος *Salmonella* σε τελική συγκέντρωση 10^3 cfu/ml και οι υπόλοιπες τρεις φιάλες αποτέλεσαν τον μάρτυρα του πειράματος. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε επωαστή σε θερμοκρασία 20°C ενώ η επώαση των τρυβλίων Petri έγινε στους 37°C . Κατά την πορεία του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές αραιώσεις για την επίστρωση των τρυβλίων Petri ενώ οι μετρήσεις αποικιών στα τρυβλία πραγματοποιούνταν 24 ώρες μετά την επίστρωση. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το XLD agar.

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αύξησης για την κάθε αραιώση του πειράματος ενώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι μέχρι και την πέμπτη ημέρα του πειράματος παρατηρούνταν τραυματισμένα κύτταρα.

Επιστρώσεις τρυβλίων με την αραιώση 1/10 έλαβαν χώρα από την τρίτη ως και την ενδέκατη ημέρα η παρατήρηση των οποίων έδωσε πολύ υψηλό αριθμό αποικιών, η καταμέτρηση των οποίων ήταν αδύνατη.

Επιστρώσεις τρυβλίων με την αραιώση 1/100 πραγματοποιήθηκαν από την

πέμπτη ημέρα μέχρι και το τέλος του πειράματος και η καταμέτρηση των αποικιών *Salmonella* εμφάνισε δύο μέγιστες και δύο ελάχιστες τιμές.

Οι επιστροφές τρυβλίων με την αραιώση 1/1000 πραγματοποιήθηκαν από την έβδομη ημέρα και μετά. Η παρατηρούμενη αύξηση αποικιών εμφάνισε επίσης δύο μέγιστες και δύο ελάχιστες τιμές παρουσιάζοντας όμως την ακριβώς αντίθετη τάση της καμπύλης αύξησης της προηγούμενης αραιώσης. Το γεγονός αυτό ίσως υποδηλώνει την ύπαρξη και ενός δεύτερου στελέχους στο εμβόλιο *Salmonella* που χρησιμοποιήθηκε ή οφείλεται στην έλλειψη διαθέσιμου χώρου στην επιφάνεια του τρυβλίου λόγω πληθώρας ζώντων κυττάρων του δείγματος.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που συλλέχθηκαν έδειξε πως υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και των μετρήσεων που αφορούν τις αραιώσεις 1/100 και 1/1000.

Στην επανάληψη του πειράματος κατά την χειμερινή περίοδο παρατηρήθηκε μηδενική επιβιωσιμότητα.

Λέξεις κλειδιά: *Salmonella*, επιβιωσιμότητα, λίμνη Κάρλα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Το γένος <i>Salmonella</i>	8
1.2. Η λίμνη Κάρλα.....	11
1.3 Σκοπός της προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.....	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
2.1 Πειραματική διαδικασία.....	17
2.2 Το θρεπτικό υλικό XLD.....	19
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ–ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	21
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	29
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	30
6. ABSTRACT.....	35

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το γένος *Salmonella*

Το γένος *Salmonella* διαιρείται σε δύο είδη: Το είδος *S. enterica* το οποίο υποδιαιρείται σε πάνω από 2.000 στελέχη και το είδος *S. bongori*. Κάποια στελέχη του είδους *S. bongori*, όπως το υποείδος *S. typhi*, προκαλούν συστηματικές μολύνσεις και τυφοειδή πυρετό, ενώ στελέχη του *S. enterica*, όπως το υποείδος *S. typhimurium*, προκαλούν γαστρεντερίτιδα. Ορισμένα στελέχη π.χ. του *S. typhi*, είναι ειδικευμένοι ξενιστές οι οποίοι προσβάλουν μόνο ανθρώπους, ενώ στελέχη του *S. typhimurium* θεωρούνται γενικευμένοι ξενιστές που απαντώνται και στον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και σε άλλα είδη θηλαστικών. Τα οικόσιτα ζώα δρουν ως αποταμιευτήρας για την τροφογενή εξάπλωση στελεχών που χαρακτηρίζονται γενικευμένοι ξενιστές, κάτι το οποίο ευθύνεται για την υψηλή συχνότητα εμφάνισης μυ-τυφοειδών μολύνσεων από *Salmonella* παγκοσμίως. Εκτιμάται ότι το κόστος τροφογενών ασθενειών στις ΗΠΑ (με την σαλμονέλωση να αποτελεί κύρια συνιστώσα) κυμαίνεται από 4.8 έως 23 εκατομμύρια δολάρια (Todd 1990).

Το στέλεχος *Salmonella typhimurium* LT2, το πρωταρχικό στέλεχος για την κυτταρική και μοριακή βιολογία στο *Salmonella*, απομονώθηκε την δεκαετία του 1940 και χρησιμοποιήθηκε στις πρώτες μελέτες μεταγωγών φάγων (Neidhardt 1996). Οι σιωπηλές μεταλλάξεις του *S. enterica* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ζωντανά από του στόματος εμβόλια ενάντια στη μόλυνση από *Salmonella*, για την έκφραση αντιγόνων από άλλα παθογόνα καθώς και για την παράδοση πρωτεϊνών σε όγκους (Bermudes *et al.* 2000). Τα γενικά χαρακτηριστικά του γονιδιώματος του στελέχους *S. typhimurium* LT2 παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά του γονιδιώματος *Salmonella typhimurium* LT2 (McClelland *et al.* 2001).

Παράμετρος	Χρωμόσωμα	Πλασμίδιο pSLT
Μέγεθος (bp)	4,857,432	93,94
Περιεχόμενο G+C	53,00%	53,00%
Συμπλέγματα rRNA	7	0
tRNAs	85	0
Ψευδογονίδια tRNA	1	0
Δομικά RNAs	11	1
CDS	4,49	108
CDS ψευδογονιδίων	39	6

Τα στελέχη *Salmonella* αποτελούν κάποιους από τους πιο κοινούς παράγοντες τροφογενών ασθενειών στο κόσμο. Μέλη αυτού του γένους έχουν την δυνατότητα αποίκισης και πρόκλησης ασθένειας σε ζώα (π.χ. πουλερικά, βοοειδή, χοίροι, τρωκτικά) καθώς και σε ανθρώπους. Κάποια στελέχη, όπως το *S. typhimurium* (το οποίο θεωρείται και το καλύτερα μελετημένο είδος *Salmonella*) και το *S. enteritidis* μολύνουν ένα ευρύ φάσμα ζωικών και ανθρώπινων ξενιστών, ενώ κάποια άλλα, όπως το *S. typhi*, περιορίζονται σε συγκεκριμένους ξενιστές (Stevens *et al.* 2009). Σαν σύνολο, το *Salmonella* έχει την ικανότητα προσαρμογής, ανάπτυξης και/ή επιβίωσης σε ένα ευρύ φάσμα στρεσογόνων συνθηκών περιβάλλοντος οι οποίες περιλαμβάνουν: εξωκυττάρια τιμές pH από 3.99 έως 9.5, συγκέντρωση αλατότητας έως 4% w/v NaCl και θερμοκρασίες από 2 έως 54 °C (D' Aoust *et al.* 2001). Επομένως, αυτοί οι στρεσογόνοι παράγοντες έχουν σημαντική επίδραση στην επιβιωσιμότητα του *Salmonella* κατά τη διάρκεια της τροφικής επεξεργασίας, προετοιμασίας και αποθήκευσης καθώς και στην μετάδοση του μέσω του οργανισμού-ξενιστή (Spector & Kenyon 2012).

Τα στελέχη *Salmonella*, κατά την έξοδο τους από τον οργανισμό-ξενιστή, γενικά, εισέρχονται σε κάποιο υδάτινο περιβάλλον (π.χ. δημοτικά συστήματα ύδρευσης και

αποχέτευσης ή επιφανειακής απορροής) το οποίο αρχικά μπορεί να είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά αλλά μπορεί ραγδαία να μετατραπεί σε θρεπτικά φτωχό μέσο σαν αποτέλεσμα της αραίωσης. Αυτή η αιφνίδια έξοδος από πιο βέλτιστες συνθήκες είναι πιθανό να οδηγήσει στο να αντιμετωπίσουν τα βακτήρια μείωση θερμοκρασίας, μείωση ωσμωτικών συνθηκών και παραλλακτικότητα στο pH. Με την πάροδο του χρόνου, τα βακτήρια μπορούν να εισέλθουν σε αδράνεια ή στάδιο VBNC (viable but not culturable, βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα βακτήρια), στο οποίο μπορούν να παραμείνουν για μεγάλες χρονικές περιόδους (Foster & Spector 1995). Επιπροσθέτως, τα βακτήρια υφίστανται θήρευση από συγκεκριμένα πρωτόζωα/αμοιβάδες στα οποία μπορεί να παραμείνουν επί μακρόν (Barker & Brown 1994). Ζώα και άνθρωποι τυπικά μολύνονται από *Salmonella* μετά από κατάποση μολυσμένης τροφής ή νερού. Για τον ανθρώπινο οργανισμό, σημαντικές πηγές στελεχών *Salmonella* περιλαμβάνουν: μολυσμένο βοδινό, χοιρινό, αυγά, πουλερικά, φρούτα, λαχανικά ή παράγωγα και παραπροϊόντα όλων αυτών (π.χ. φυστικοβούτυρο) (Spector & Kenyon 2012).

Τα στελέχη του είδους *S. enterica* αντιμετωπίζουν πληθώρα στρεσογόνων παραγόντων κατά την διέλευση τους από μια μεγάλη ποικιλία φυσικών και εμπορικών περιβαλλοντικών συνθηκών και συνθηκών σε περιβάλλοντα ξενιστών. Τα βακτήρια αυτά είναι εξαιρετικά προσαρμοσμένα και ευέλικτα όσον αφορά τις στρατηγικές που διαθέτουν έτσι ώστε να επιβιώσουν σε αυτά τα συχνά επιβλαβή περιβάλλοντα. Το γένος *Salmonella*, όπως και άλλα βακτήρια, έχει αναπτύξει εξειδικευμένους μηχανισμούς αντίστασης ενάντια σε στρεσογόνους παράγοντες που παράγονται ως αντίδραση σε ημιθανή επίπεδα στρες, και οι οποίοι αυξάνουν την επιβιωσιμότητα όταν το βακτήριο εκτεθεί σε υψηλότερα πιθανώς θανατηφόρα επίπεδα του στρες (προσαρμογές). Ίσως τα βακτήρια αυτά να έχουν αναπτύξει μηχανισμούς εξαιτίας ενός μόνο στρεσογόνου παράγοντα, οι οποίοι όμως τα βοηθούν να αντισταθούν σε κινδύνους πολλών διαφορετικών, φαινομενικά ασύνδετων, στρεσογόνων παραγόντων. Αυτές οι γενικές

ανταποκρίσεις στο στρες ίσως καθιστούν ικανό το βακτήριο προβλέψει και να προετοιμαστεί για μη επιθυμητά περιβάλλοντα που πιθανώς θα αντιμετωπίσει αργότερα, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα επιβίωσης. Έτσι, το *Salmonella* έχει εξελίξει πολλαπλά, πολύπλοκα και συχνά διασυνδεδεμένα συστήματα διαχείρισης του στρες, ως μέρος των στρατηγικών επιβίωσης του. Ο έλεγχος αυτών των επικαλυπτόμενων δικτύων αντιμετώπισης του στρες επιτυγχάνεται από μια ποικιλία ρυθμιστικών πρωτεϊνών/μοριακών συστημάτων. Η ενσωμάτωση αυτών των αντιδράσεων στο στρες σε μια πολυ-αμυντική στρατηγική επιτρέπει στον οργανισμό να επιβιώσει και να παραμείνει στα διάφορα περιβάλλοντα ξενιστών και μη-ξενιστών που αντιμετωπίζει (Spector & Kenyon 2012).

1. 2 Η λίμνη Κάρλα

Η Λίμνη Κάρλα συμπεριλαμβανόταν στη λίστα με τις ρηχές λίμνες της Ελλάδας έως το 1962 όταν έλαβε χώρα η αποξήρανση της με σκοπό τη δημιουργία καλλιεργήσιμων εκτάσεων γης. Πριν την δεκαετία του 1960, η λίμνη Κάρλα θεωρούνταν ως ένα από τα πιο σημαντικά οικοσυστήματα της περιοχής, λειτουργώντας ως ένας φυσικός υδρο-ταμιευτήρας τροφοδοτώντας τα υπόγεια ύδατα. Επομένως, η σημαντικότητα της ανασύστασης αυτού του υδάτινου συστήματος και η αναστροφή των περιβαλλοντικών συνθηκών που προέκυψαν από τις ανθρώπινες δραστηριότητες, θεωρήθηκε ως ένα περιβαλλοντικό πρόγραμμα υψηλής σημασίας από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Papadimitriou *et al.* 2013). Η δομή και η λειτουργία του νέου ταμιευτήρα της Κάρλας συνδέεται με τον Πηνειό ποταμό, τροφοδοτώντας τον απευθείας, ενώ επίσης ο ταμιευτήρας δέχεται απορρέοντα ύδατα από την λεκάνη απορροής του Πηνειού ποταμού μαζί με λύματα από την σημαντικότερη γεωργική περιοχή της Ελλάδας (Sidiropoulos *et al.* 2012). Μετά από δύο χρόνια επαναπλήρωσης, εμφανίστηκαν συνθήκες δραστικού ευτροφισμού στην λίμνη Κάρλα με μακράς διάρκειας επικράτηση κυανοβακτηρίων και

σχετικών τοξινών (Oikonomou *et al.* 2012, Papadimitriou *et al.* 2013). Η εμφάνιση κυανοβακτηρίων και κυανοτοξινών είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς ο ταμειευτήρας πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για άρδευση, αλιεία και αναψυχή. Κατά την διάρκεια του πρώτου χρόνου πλήρωσης, τα κυρίαρχα είδη κυανοβακτηρίων *Anabaenopsis elenkinii*, *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* και *Planktothrix agardhii* βρέθηκε ότι συνδέονταν με την παραγωγή κυανοτοξινών στο νερό αλλά και σε ιστούς ψαριών, αποτελώντας χαμηλό κίνδυνο για την δημόσια υγεία όσον αφορά τις δραστηριότητες αναψυχής και υψηλό κίνδυνο όσον αφορά την κατανάλωση ψαριών (Papadimitriou *et al.* 2013, Mitsoura *et al.* 2013). Είναι επομένως εμφανές ότι καθώς δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή η λειτουργία του νέου ταμειευτήρα της λίμνης Κάρλας, είναι σημαντικό μέσω της έρευνας να προσδιοριστούν τα νέα υδρο-οικολογικά χαρακτηριστικά του.

Η λίμνη Κάρλα καταλαμβάνει το χαμηλότερο τμήμα του Θεσσαλικού κάμπου και θεωρούνταν ένας από τους σημαντικότερους υδροβιότοπους της Ελλάδας έως το 1962. Η επιφανειακή απορροή και τα πλημμυρικά ύδατα του Πηνειού ποταμού τροφοδοτούσαν την λίμνη με μεγάλους όγκους γλυκού νερού. Η ανασυσταμένη λίμνη Κάρλα βρίσκεται στο κατώτατο τμήμα του θεσσαλικού κάμπου στην περιοχή της Κεντρικής Ελλάδας. Βρίσκεται σε γεωγραφικό πλάτος μεταξύ $39^{\circ}26'49''$ και $39^{\circ}32'03''$ N και σε γεωγραφικό μήκος μεταξύ $22^{\circ}46'47''$ και $23^{\circ}51'50''$ E, καλύπτοντας μία έκταση 38km^2 με περίμετρο 30.55km . Η υδρολογική λεκάνη της λίμνης Κάρλας αποτελείται από $1,171\text{km}^2$ από τα οποία πάνω από 600km^2 περιλαμβάνουν μία νότια επίπεδη κοιλάδα ενώ το ανατολικό τμήμα περιβάλλεται από βουνά και λόφους. Η λίμνη Κάρλα χαρακτηρίζεται από μικρό βάθος (μέσο βάθος 2m) ενώ το μέγιστο βάθος της φτάνει τα 4.5m. Επί του παρόντος, η κύρια πηγή νερού για την λίμνη αποτελεί ο Πηνειός ποταμός. Επίσης, δέχεται επιφανειακή απορροή από την περιβάλλουσα, κυρίως αγροτική, περιοχή και εισροές από ρέματα της γύρω ορεινής περιοχής. Η λίμνη Κάρλα δεν διαθέτει φυσική εκροή

(Chamoglou *et al.* 2014). Επηρεάζεται αρνητικά και από παρακείμενες αγροτικές και βιομηχανικές δραστηριότητες λειτουργώντας σαν αποδέκτης λιπασμάτων και αγροτικών λυμάτων. Στις μέρες μας, η λίμνη Κάρλα συμπεριλαμβάνεται στη λίστα των προστατευόμενων περιοχών της Ελλάδας καθώς θεωρείται ένα ζωτικής σημασίας υδάτινο οικοσύστημα, από την άποψη της βιοποικιλότητας που αυτή διαθέτει αλλά και ως μια νεο-συσταθείσα πηγή νερού (Sidiropoulos *et al.* 2012).

Το υψόμετρο της περιοχής κυμαίνεται από 50m έως και πάνω από 2000m ενώ το μέσο υψόμετρο φτάνει τα 230m. Το κλίμα της περιοχής θεωρείται ηπειρωτικό με κρύους και υγρούς χειμώνες και θερμά και ξηρά καλοκαίρια. Οι μέσες ετήσιες κατακρημνίσεις στην λεκάνη απορροής της λίμνης είναι περίπου 560mm και παρουσιάζουν ανομοιομορφη κατανομή στο χώρο αλλά και στον χρόνο. Η μέση ετήσια δυνητική εξατμισοδιαπνοή είναι περίπου 775mm και η μέση ετήσια θερμοκρασία φτάνει τους 14.3^ο C (Vasilides *et al.* 2009).

Η γεωλογική δομή αποτελείται κυρίως από κόκκους διαφόρων μεγεθών που προέρχονται από τις πρόσφατες εναποθέσεις της λίμνης. Αδιαπέραστες γεωλογικές δομές καλύπτουν το 30.6% της συνολικής περιοχής και βρίσκονται σε τμήματα των παρακείμενων ορεινών όγκων, καρστικές δομές καλύπτουν το 14.5% της περιοχής και βρίσκονται στο όρος Μαυροβούνι στο βορειο-ανατολικό τμήμα της λεκάνης απορροής της λίμνης Κάρλα και τέλος, διαπερατές δομές που εμφανίζονται κυρίως στην πεδιάδα της περιοχής και καλύπτουν το 54.9%. Ο ιζηματογενής υδροφορέας της λίμνης καταλαμβάνει το μεγαλύτερο τμήμα της πεδιάδας της με έκταση 500km² και υπόκειται υπερ-εκμετάλλευση καλύπτοντας και τις απαιτήσεις για άρδευση των καλλιεργούμενων εκτάσεων αλλά και τις ανάγκες ύδρευσης των παρακείμενων οικισμών (Sidiropoulos *et al.* 2011).

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία όσον αφορά το οικοσύστημα της λίμνης Κάρλα καθώς

επίσης και το σύνολο της λεκάνης απορροής της, θεωρείται εξαιρετικά περιορισμένη. Ο Ananiadis (1956) μελέτησε τα λιμνολογικά χαρακτηριστικά της λίμνης πριν από την αποξήρανση της. Κλιματολογικά και υδρολογικά δεδομένα για την περίοδο εκείνη δεν είναι διαθέσιμα καθώς δεν υπήρχαν υδρο-μετεωρολογικοί σταθμοί στην περιοχή την εποχή εκείνη. Τα υδρολογικά δεδομένα για την "νέα" λίμνη Κάρλα (μετά την αποξήρανση και ανασύσταση) έχουν συλλεχθεί και παρουσιαστεί από τους Gerakis 1992), Loukas *et al.* (2007) και Myloropoulos & Sidiropoulos (2009). Πενήντα χρόνια μετά την δημοσίευση των λιμνολογικών χαρακτηριστικών από τον Ananiadi (1956), οι Papadimitriou *et al.* (2011) διεξήγαγαν την πρώτη μελέτη της ποιότητας του νερού της λίμνης ενώ οι Oikonomou *et al.* (2012) και Nikouli *et al.* (2013) κατέγραψαν την μικροβιακή ποικιλότητα της λίμνης. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, η λίμνη παρουσίαζε μεγάλη ποικιλία μικροβιακών κοινοτήτων υποδεικνύοντας τον υπερτροφικό της χαρακτήρα. Τα ευρύματα φυλότυπων και μορφότυπων ήταν υδρόβιας αλλά και χερσαίας προέλευσης συμπεριλαμβανομένων και γνωστών παραγωγών τοξινών σε υψηλές συγκεντρώσεις (είδη όπως *Anabaenopsis*, *Planktothrix*, *Prymnesium*, *Pfiesteria*). Τα πλημμυρικά φαινόμενα που έλαβαν χώρα στην περιοχή εκείνη την χρονική περίοδο θα μπορούσαν να αποτελέσουν κίνδυνο για τις παράκτιες περιοχές του Παγασητικού κόλπου, ο οποίος μαζί με τις απορροές της λίμνης Κάρλα δέχεται και οργανισμούς όπως *Pfiesteria*. Η Jouni (2011) μελέτησε την σύσταση των ιζημάτων της νεο-συσταθείσας λίμνης. Σε μελέτη που διεξήχθη το 2011, βρέθηκε ότι οι σημαντικότερες ομάδες μικροοργανισμών που παρατηρήθηκαν στη λίμνη Κάρλα ήταν τα κυανοβακτήρια, τα φύκη και τα πρωτόζωα με τα κυανοβακτήρια να εμφανίζουν μεγαλύτερη αφθονία κατά το μήνα Ιανουάριο. Ορισμένοι από τους οργανισμούς αυτούς θεωρήθηκαν παρασιτικοί ή δυνητικώς τοξικοί (Trikolas *et al.* 2011).

Η μειωμένη διαφάνεια του νερού εξαιτίας του οργανικού υλικού και του πλαγκτόν

σε συνδυασμό με τις συχνές εξάρσεις φυτοπλαγκτόν (όπως π.χ. *Anabaena* sp., *Aphanizomenon* sp.) που περιεγράφηκαν από τον Ananiadis (1956), υποδηλώνουν ότι η λίμνη εμφάνιζε ευτροφικά χαρακτηριστικά τουλάχιστον από την δεκαετία του 1950. Η ανάλυση νερού της υδάτινης στήλης, που έλαβε χώρα το 1955, έδειξε πως η Κάρλα ήταν σχετικά πλούσια σε διαλυμένα θρεπτικά συστατικά και παρουσίαζε χαμηλές τιμές διαλυμένου οξυγόνου κοντά στον βυθό, κάτι που την κατέστησε ως μια ευτροφική λίμνη (Ananiadis 1956). Όσον αφορά την υδάτινη βλάστηση, η λίμνη Κάρλα υποστήριζε την ανάπτυξη μερικών επιπλεόντων φυτών και ευρεία ανάπτυξη των ειδών *Potamogeton natans*, *Typha* και *Phragmites*.

Σε μελέτη του 2012, παρατηρήθηκε ότι η θερμοκρασία του νερού κυμάνθηκε μεταξύ των 7°C το μήνα Φεβρουάριο και 32.5°C το μήνα Αύγουστο. Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου εμφάνισε τιμές από 2.24mg/L τον Οκτώβριο έως 18.0mg/L τον Ιανουάριο κάτι που συνδέθηκε άμεσα με το βάθος Secchi ($r=0.851$; $p<0.01$) οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η διαύγεια του νερού συμπίπτει με υψηλές τιμές διαλυμένου οξυγόνου. Οι τιμές του pH κυμάνθηκαν μεταξύ 7.43 και 9.12 χωρίς όμως να παρουσιάζουν κάποια συγκεκριμένη εποχική διακύμανση. Η αγωγιμότητα του νερού παρατηρήθηκε ότι ήταν σχετικά υψηλή, εμφανίζοντας τιμές μεταξύ 2.11 mS/cm το μήνα Μάρτιο και 3.68 mS/cm το Σεπτέμβριο κάτι που ίσως θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεωλογικό προφίλ της λεκάνης απορροής αλλά και στην απορροή της περιβάλλουσας αγροτικής περιοχής (Chamoglou 2014).

1.3 Σκοπός της προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Υπάρχει η γενική πεποίθηση ότι τα εντεροβακτήρια θα έπρεπε να παρουσιάζουν χαμηλό ποσοστό επιβίωσης στο νερό, καθώς χαρακτηρίζονται ως αλλόχθονα ως προς τα διάφορα υδάτινα περιβάλλοντα. Η υπόθεση αυτή έχει προκύψει κυρίως από μελέτες που χρησιμοποιούν την μέθοδο της καλλιέργειας όπως αυτή των Monfort & Baleux (1994) ή των Morinigo *et al* (1990). Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματα αυτών καθώς και παρόμοιων μελετών αμφισβητούνται από έρευνες που δείχνουν επιβιωσιμότητα μεγαλύτερη από την προβλεπόμενη όσον αφορά βακτήρια που φυσιολογικά εντοπίζονται στον γαστρεντερικό σωλήνα (Smith *et al.* 1994). Επομένως, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της επιβιωσιμότητας του είδους *Salmonella enterica enterica typhimurium* σε νερό της λίμνης Κάρλα για θερινή και χειμερινή περίοδο καθώς και η εξακρίβωση της χρονικής διάρκειας αυτής της πιθανής επιβιωσιμότητας.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματική διαδικασία

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έλαβαν χώρα δύο δειγματοληψίες. Η πρώτη περιλάμβανε την συλλογή νερού από την λίμνη Κάρλα στις 13/06/2012 το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την πρώτη φάση του πειράματος (θερινή περίοδος), ενώ η δεύτερη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στις 02/02/13 και αντίστοιχα ακολούθησε η δεύτερη φάση του πειράματος (χειμερινή περίοδος). Τα δύο αυτά δείγματα νερού προέρχονταν από ένα σταθερό σημείο της λίμνης (μετρητής στάθμης της λίμνης) (Εικόνα 1.).



Εικόνα 1. Άποψη του σημείου συλλογής του δείγματος νερού.

Στη συνέχεια, τα δείγματα νερού μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και διατηρήθηκαν στους 4°C σε σκουρόχρωμες πλαστικές φιάλες έτσι ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη φυτοπλαγκτικών οργανισμών λόγω φωτοσύνθεσης. Τα δείγματα νερού, αφού διηθήθηκαν με φίλτρο πόρου

0,2μm τοθετήθηκαν σε έξι γυάλινες φιάλες οι οποίες στην συνέχεια αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά. Οι έξι αυτές φιάλες διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες των τριών φιαλών η καθεμία. Η μία ομάδα θα αποτελούσε τον μάρτυρα του πειράματος (BLANK) και η άλλη ομάδα αποτελούνταν από τις φιάλες που θα δέχονταν το εμβόλιο του στελέχους *Salmonella* (SAL).

Η πρώτη φάση του πειράματος ξεκίνησε στις 08/10/12. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε ο ορότυπος *Salmonella enterica enterica* Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) που βρίσκονταν στους -80°C και με κατάλληλες αραιώσεις κατασκευάστηκε εμβόλιο συγκέντρωσης 10^5 cfu/ml. Στη συνέχεια, το εμβόλιο τοποθετήθηκε στις τρεις γυάλινες φιάλες (SAL1, SAL2, SAL3). Η τελική συγκέντρωση του στελέχους σε κάθε φιάλη ήταν της τάξης του 10^3 cfu/ml ενώ ο όγκος του νερού της κάθε φιάλης ήταν 400ml. Οι δύο ομάδες φιαλών τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 20°C . Η θερμοκρασία αυτή ήταν η ίδια με την θερμοκρασία της λίμνης την περίοδο της διεξαγωγής του πειράματος.

Ακολούθησαν επτά (7) διατάξεις εμβολιασμών και επιστρώσεις τρυβλίων που περιείχε θρεπτικό υλικό XLD, εκλεκτικό για αύξηση κυττάρων *Salmonella*, με 100μl δείγματος νερού ενώ πραγματοποιήθηκαν και διαδοχικές αραιώσεις όποτε αυτό κρίνονταν απαραίτητο έτσι ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία μέτρησης των αποικιών. Αναλυτικότερα, οι αραιώσεις που έλαβαν χώρα στην πορεία του πειράματος φαίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στην πορεία της παρούσας μελέτης.

	Αναραίωτο	1 προς 10	1 προς 100	1 προς 1000
1η Ημέρα (T0)	X			
3η Ημέρα (T1)	X	X		
5η Ημέρα (T2)	X	X	X	
7η Ημέρα (T3)	X	X	X	X
9η Ημέρα (T4)	X	X	X	X
11η Ημέρα (T5)	X	X	X	X
13η Ημέρα (T6)			X	X

Κάθε εμβολιασμός περιελάμβανε και τα τρυβλία – μάρτυρες (BLANK). Η επώαση των τρυβλίων Petri έγινε στους 37°C. Η μέτρηση των αποικιών που αναπτύσσονταν σε κάθε τρυβλίο Petri πραγματοποιούνταν περίπου 24 ώρες μετά την επίστρωση τους.

Η δεύτερη φάση του πειράματος ξεκίνησε στις 02/02/13. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την πρώτη φάση με την μόνη διαφορά την θερμοκρασία του επωαστή στον οποίο τοποθετήθηκαν οι δύο ομάδες φιαλών (11°C). Συνολικά πραγματοποιήθηκαν μόνο δύο διατάξεις εμβολιασμών καθώς η δεύτερη μέτρηση αποικιών που είχαν αναπτυχθεί στα τρυβλία Petri έδωσε μηδενικά αποτελέσματα (<10 cfu/ml).

2.2 Το θρεπτικό υλικό XLD

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν, όπως προαναφέρθηκε, το XLD agar (xylose lysine deoxycholate) το οποίο έχει δημιουργηθεί για την απομόνωση των ειδών *Salmonella* και *Shigella*. Η λειτουργία του βασίζεται στην χρήση του εκλεκτικού ανασταλτικού παράγοντα του δεοξυχολικού νατρίου και σε ένα σύστημα τριών δεικτών (ξυλόζη, λακτόζη και σακχαρόζη) σε συνδυασμό με φαινολικό κόκκινο, υδροχλωρική λυσίνη και φαινολικό κόκκινο, θειοθειικό νάτριο και σίδηρο. Έτσι περιορίζεται η ανάπτυξη πολλών ανεπιθύμητων οργανισμών ενώ τα επιθυμητά προς μελέτη βακτήρια εμφανίζουν αποικίες μαύρου χρώματος εξαιτίας της αποκαρβοξυλίωσης της λυσίνης, τον σχηματισμό υδρόθειου από θειοθειικό και λόγω της ανομοίωσης των υδατανθράκων.

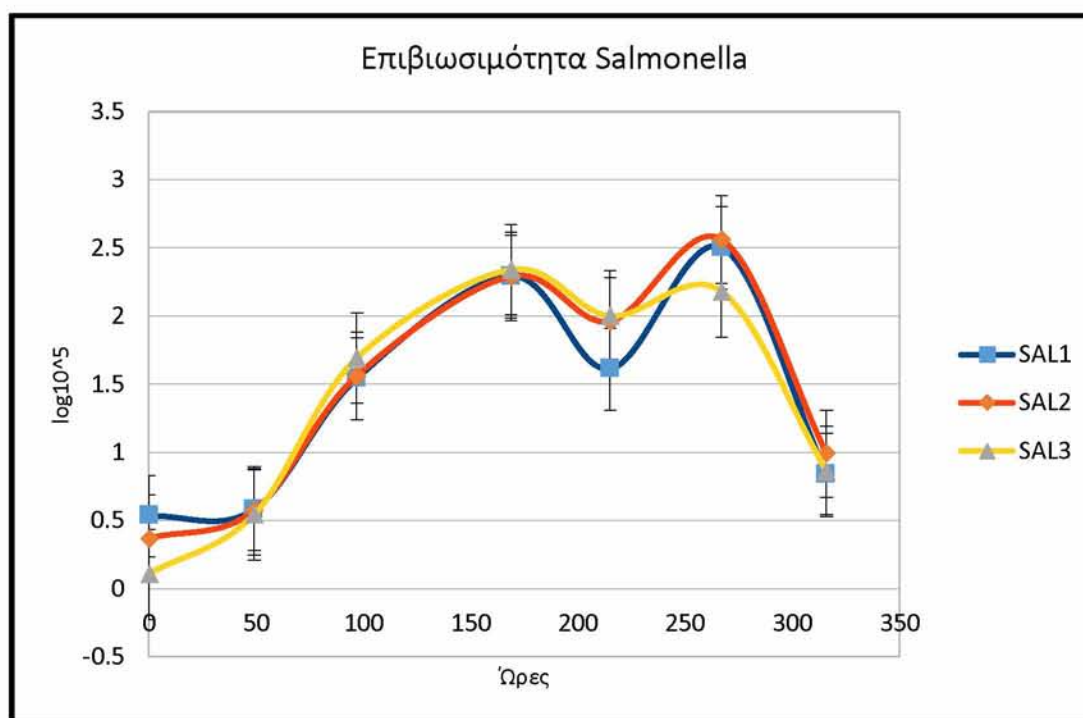
Το XLD agar αποτελείται από εκχύλισμα ζύμης, χλωριούχο νάτριο, ξυλόζη,

λακτόζη, σακχαρόζη, L-λυσίνη υδροχλωρίδιο, θειοθειικό νάτριο, σίδηρο, κιτρικό αμμώνιο, ερυθρό φαινόλης, δεοξυχολικό νάτριο, άγαρ και απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό.

Η παρασκευή του περιλαμβάνει την θέρμανση του με συνεχή ανάδευση μέχρις ότου το μέσο να φτάσει σε σημείο βρασμού. Στη συνέχεια, το θρεπτικό υλικό μεταφέρεται σε υδατόλουτρο 50°C έτσι ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία του. Έπειτα, διαμοιράζεται σε τρυβλία Petri και αφήνεται να σταθεροποιηθεί (Atlas 2004).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όσον αφορά την επιβιωσιμότητα, το στέλεχος εμφάνισε αποικίες ακόμα και 14 ημέρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό, για την θερινή περίοδο. Αντίθετα, η επανάληψη του πειράματος για την χειμερινή περίοδο έδειξε μηδενική επιβιωσιμότητα, καθώς δεν βρέθηκαν αποικίες στο δείγμα του νερού 24 ώρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό. Επομένως, όλα τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας που θα ακολουθήσουν, αφορούν την πρώτη φάση του πειράματος, δηλαδή την θερινή περίοδο. Στο διάγραμμα του Σχήματος 1 παρουσιάζεται η επιβιωσιμότητα του *Salmonella* Typhimurium για την θερινή περίοδο σε νερό της λίμνης Κάρλα.



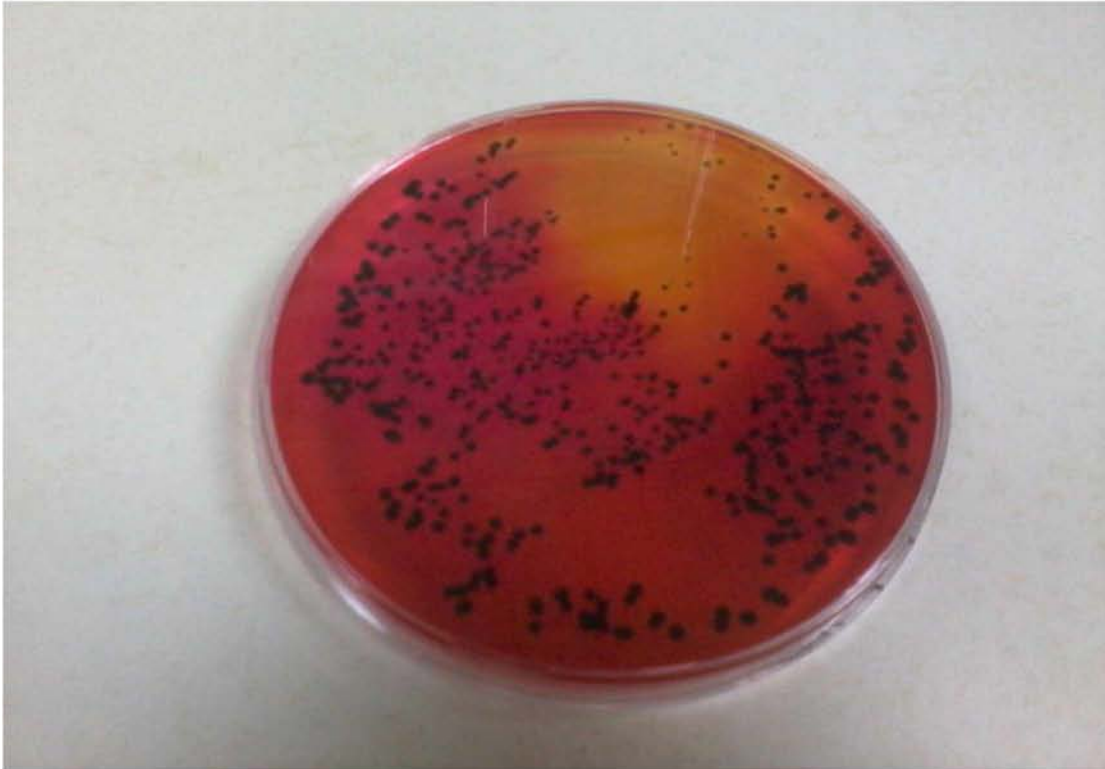
Σχήμα 1. Επιβιωσιμότητα *Salmonella* για την θερινή περίοδο.

Την πρώτη ημέρα του πειράματος (T0) επιστρώθηκαν τρυβλία μόνο με αναραιωτο δείγμα. Μετά από περίπου 24 ώρες επώασης, αποικίες μαύρου χρώματος εμφανίστηκαν σε όλα τα τρυβλία. Οι αποικίες αυτές, αν και μετρήσιμες, ήταν μικρές σε μέγεθος και υποδείκνυαν την ύπαρξη τραυματισμένων κυττάρων (Εικόνα 2). Σε όλες τις επόμενες

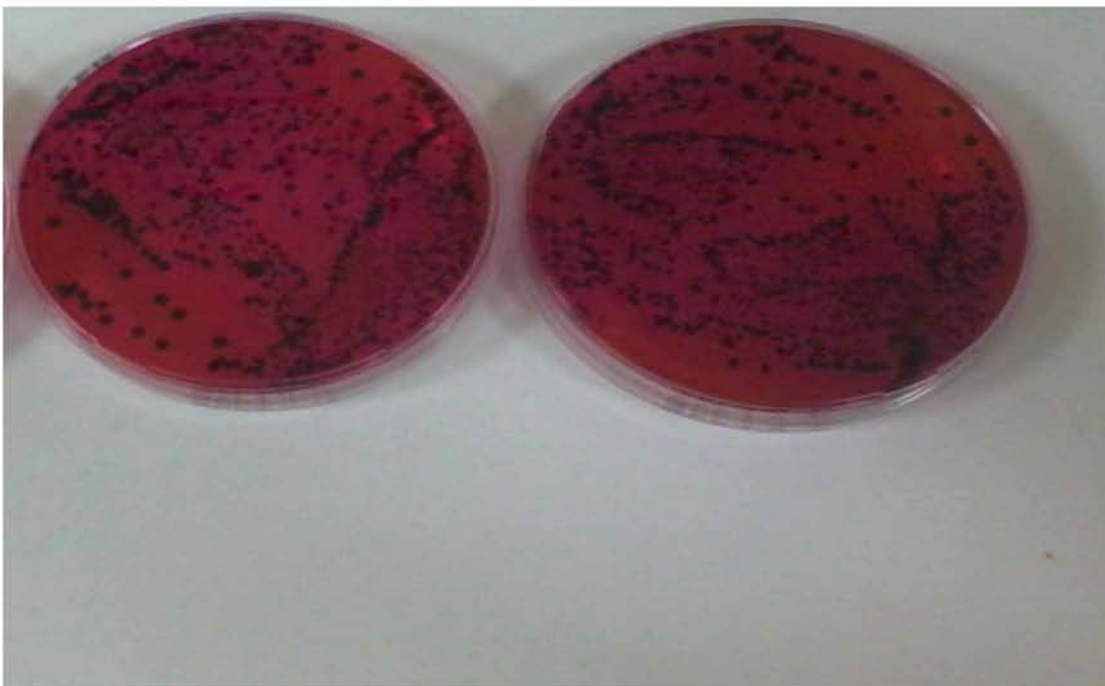
επιστρώσεις τρυβλίων με αναραϊώτο δείγμα εμφανίστηκαν αμέτρητες μαύρες αποικίες σε όλα τα τρυβλία ενώ οι επιστρώσεις της τρίτης (Εικόνα 3) (T1) και της πέμπτης (T2) ημέρας χαρακτηρίζονταν επίσης από την ύπαρξη τραυματισμένων κυττάρων. Σε σύγκριση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, σε μελέτη του 2000 (Santo Domingo *et al.* 2000) η οποία αναφέρεται σε αποστειρωμένο νερό ποταμού, παρατηρήθηκε επιβίωση *Salmonella* για τουλάχιστον 45 ημέρες στους 23⁰ C. Σε σύγκριση με μη επεξεργασμένο νερό, στη μελέτη αυτή, η επιβιωσιμότητα είχε μεγαλύτερη διάρκεια σε αποστειρωμένο νερό. Σύμφωνα με μελέτες, έχει αναφερθεί η επιβίωση του *Salmonella* σε δείγματα γλυκού νερού και σε ιζήματά του για 54 και 119 ημέρες, αντίστοιχα (Moore *et al.* 2003). Επίσης, έχει ήδη αναφερθεί ότι πολλά είδη βακτηρίων και ειδικά το *Salmonella* (Passerat *et al.* 2009), εισέρχονται σε καθεστώς VBNC όταν αντιμετωπίσουν μεγάλες αλλαγές στις συνθήκες του περιβάλλοντός τους που μπορεί να αφορούν χαμηλές θερμοκρασίες, ολιγοτροφικές συνθήκες, διηθητική πίεση, και βιοκτόνα όπως είναι τα βαρέα μέταλλα και η υπεριώδης ακτινοβολία (Oliver 1995, Lindbäck *et al.* 2010). Τα βακτήρια αυτά, κατά την καλλιέργεια τους εμφανίζουν διαφορές στην κυτταρική φυσιολογία και μορφολογία τους (Xu *et al.* 1982).

Μελέτες που έχουν διεξαχθεί με σκοπό την διαπίστωση της επιβιωσιμότητας των εντερικών παθογόνων μικροοργανισμών σε υδρόβια περιβάλλοντα έχουν δείξει ότι το *Salmonella* μπορεί να εισέλθει σε κατάσταση VBNC. Η συντριπτική πλειοψηφία των τεχνικών ανίχνευσης και απαρίθμησης απαιτούν την καλλιέργεια *Salmonella* με την χρήση ενός εκλεκτικού θρεπτικού υλικού. Σαν αποτέλεσμα, αν μια μελέτη βασιστεί μόνο στις τεχνικές καλλιέργειας για την ανίχνευση ζωντανών μικροοργανισμών, είναι δυνατό να υποτιμηθεί σημαντικά το πραγματικό εύρος της βιωσιμότητας του *Salmonella* στο φυσικό περιβάλλον. Στελέχη *Salmonella* απομονώνονται συχνά σε μολυσμένα ύδατα και μπορούν να επιμείνουν σε ύδατα με υψηλή συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών. Τα

αναφερόμενα επίπεδα *Salmonella* σε μη χλωριωμένο νερό έως σε εκροές υγρών αποβλήτων κυμαίνονται μεταξύ 1 και 1 100/100 κύτταρα/ml (Percival *et al.* 2013).

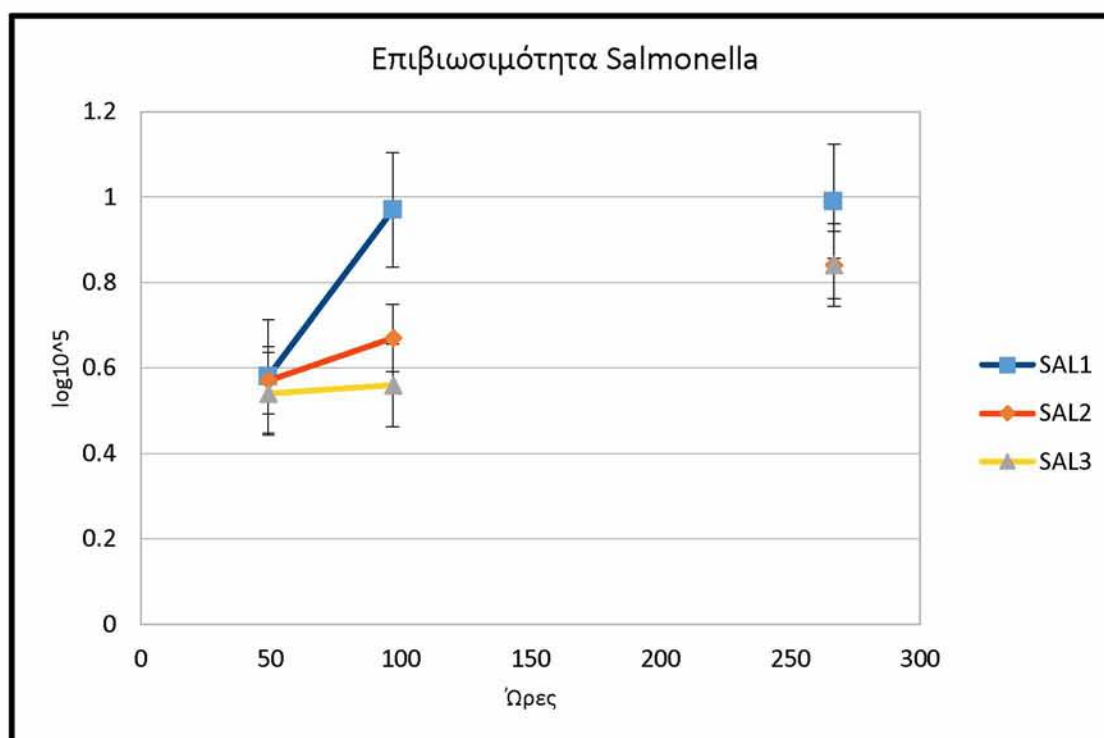


Εικόνα 2. Αποικίες *Salmonella* από την πρώτη ημέρα (T0) του πειράματος.



Εικόνα 3. Αποικίες *Salmonella* από την τρίτη (T1) ημέρα του πειράματος.

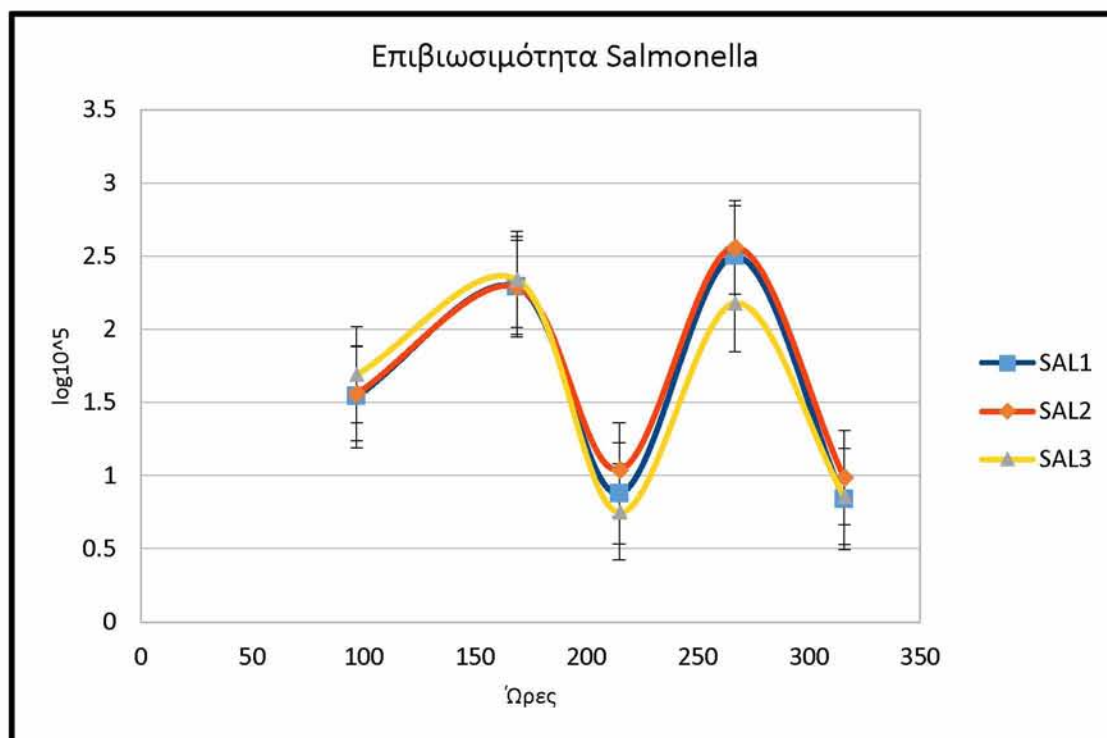
Αραιώσεις της τάξης του 1/10 πραγματοποιήθηκαν για τις επιστροφές τρυβλίων από την T1 έως και την T5, δηλαδή από την τρίτη έως και την ενδέκατη ημέρα του πειράματος. Μετά την επώαση των τρυβλίων που επιστρώθηκαν κατά την T1 και την T2 παρατηρήθηκε η ανάπτυξη ευδιάκριτων και μετρήσιμων αποικιών μαύρου χρώματος, ενώ η ύπαρξη τραυματισμένων κυττάρων σημειώθηκε μόνο κατά την επίστρωση T1. Στη συνέχεια, κατά τις επιστροφές των T3 και T4, παρατηρήθηκε πολύ υψηλός αριθμός αποικιών στα τρυβλία και των τριών φιαλών του πειράματος, γεγονός που δεν επέτρεψε την καταμέτρηση τους. Το πλήθος των παρατηρούμενων αποικιών άρχισε να μειώνεται κατά την επίστρωση της T5, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα του Σχήματος 2.



Σχήμα 2. Επιβιωσιμότητα *Salmonella* για την αραιώση 1/10. Το κενό μεταξύ του δεύτερου και του τελευταίου σημείου κάθε καμπύλης αύξησης δηλώνει το αμέτρητο πλήθος των αποικιών που εμφανίστηκαν σε τρυβλία Petri μετά την επώασή τους.

Αραιώσεις της τάξης του 1/100 πραγματοποιήθηκαν από την πέμπτη ημέρα του πειράματος μέχρι και το τέλος αυτού. Η ανάπτυξη αποικιών *Salmonella* εμφάνισε την

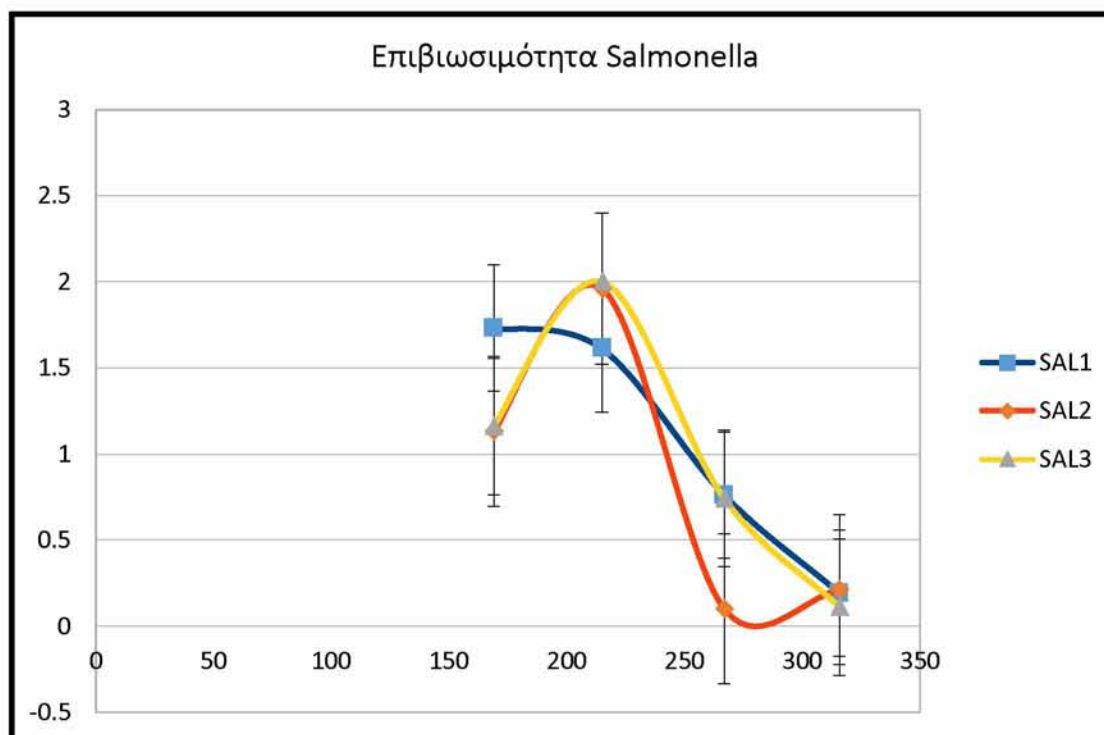
ίδια τάση και για τις τρεις φιάλες (SAL1, SAL2, SAL3) παρουσιάζοντας δύο μέγιστες τιμές, κατά τις επιστροφές T3 και T5, και δύο ελάχιστες τιμές, κατά τις επιστροφές T4 και T6. Οι καμπύλες αύξησης για την κάθε φιάλη φαίνονται στο διάγραμμα του Σχήματος 3.



Σχήμα 3. Επιβιωσιμότητα *Salmonella* στην αραιώση 1/100.

Οι αραιώσεις της τάξης του 1/1000 έλαβαν χώρα κατά τις τέσσερις τελευταίες επιστροφές τρυβλίων του πειράματος, δηλαδή από την έβδομη έως και την δέκατη τέταρτη ημέρα. Η αύξηση των αποικιών που παρατηρήθηκε εμφανίζεται με τις ίδιες τάσεις και για τις τρεις φιάλες του πειράματος, διαφέρει όμως σημαντικά σε σύγκριση με την αύξηση των αποικιών που παρατηρήθηκαν για τις ίδιες χρονικές στιγμές στα τρυβλία των αραιώσεων 1/100. Πιο συγκεκριμένα, στα σημεία που παρατηρούνται οι μέγιστες τιμές (T3 και T5) κατά την αραιώση 1/100, για την αραιώση 1/1000 παρατηρούνται οι ελάχιστες τιμές. Αντιθέτως, η μέγιστη τιμή της αραιώσης 1/1000 παρατηρήθηκε στην επίστρωση που πραγματοποιήθηκε στην T4, την χρονική, δηλαδή, στιγμή που

σημειώθηκε η ελάχιστη τιμή για την επίστρωση με αραιώση 1/100. Αυτή η διαφορετική τάση ως προς την αύξηση των αποικιών θα μπορούσε να οφείλεται είτε στην ύπαρξη ενός δεύτερου ή και παραπάνω στελέχους στο εμβόλιο που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση του πειράματος είτε στην έλλειψη διαθέσιμου χώρου στην επιφάνεια του τρυβλίου λόγω πληθώρας ζώντων κυττάρων του δείγματος. Επομένως, λόγω των σχέσεων ανταγωνισμού μεταξύ των δύο διαφορετικών στελεχών παρατηρείται η επικράτηση του ενός έναντι του άλλου στις δύο αυτές αραιώσεις ή, στη δεύτερη περίπτωση δεν είναι δυνατό να γίνει καταμέτρηση του πραγματικού πληθυσμού στο δείγμα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με μελέτη του 2009, η πιθανότητα εντοπισμού ενός συγκεκριμένου στελέχους *Salmonella* σε ένα δείγμα δεν συνδέεται άμεσα με την συγκέντρωση του μέσα στο δείγμα αυτό, αλλά με την ικανότητα του να ανταγωνιστεί στο θρεπτικό μέσο με το συγκεκριμένο μείγμα στελεχών που βρίσκονται παρόντα στο δείγμα (Singer *et al.* 2009). Οι καμπύλες αύξησης του στελέχους για την αραιώση 1/1000 φαίνεται στο διάγραμμα του Σχήματος 4.



Σχήμα 4. Επιβιωσιμότητα *Salmonella* στην αραιώση 1/1000.

Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων με το στατιστικό πακέτο S.P.S.S με την μέθοδο της ανάλυσης διασποράς (Analysis of Variance – ANOVA). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των τιμών των παρατηρούμενων πληθυσμών στα τρυβλία που είχαν επιστρωθεί με δείγμα που περιείχε το εμβόλιο του *Salmonella* Typhimurium και του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης, έδειξαν πως αυτές οι ομάδες παρατηρούμενων τιμών από τα τρυβλία που επιστρώθηκαν με δείγμα νερού διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους ($p < 0.001$).

Υπάρχουν μελέτες οι οποίες υποστηρίζουν πως οι επιδράσεις της θερμοκρασία, του pH και της ενεργότητας νερού (a_w) στο ρυθμό της μικροβιακής αύξησης είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους (McMeekin *et al.* 2000, Presser *et al.* 1998). Αντιθέτως όμως, όσον αφορά το *Salmonella*, μια μελέτη του 2004 έδειξε μια συνεργιστική επίδραση των τριών αυτών παραγόντων στα όρια αύξησης του *Salmonella typhimurium* (Koutsoumanis *et al.* 2004). Πιο συγκεκριμένα, για θερμοκρασίες κάτω των 25°C , οι ελάχιστες τιμές pH και a_w που θα επέτρεπαν να υπάρξει μικροβιακή αύξηση, αυξάνονται όσο μειώνεται η τιμή της θερμοκρασίας. Η διαδραστική αυτή επίδραση των παραπάνω περιβαλλοντικών παραγόντων στο σημείο όπου η μικροβιακή αύξηση παύει έχει επίσης περιγραφεί και για τον μικροοργανισμό *Escherichia coli* (Presser 1998). Επιπροσθέτως, η βακτηριακή αύξηση στο υδάτινο οικοσύστημα επηρεάζεται και από παράγοντες όπως η ύπαρξη πρωτόζωων, το ποσοστό της οργανικής ύλης, η ύπαρξη τοξινών, τα διαλυμένα θρεπτικά, η υπερϊώδης ακτινοβολία καθώς και τα βαρέα μέταλλα (Percival *et al.* 2013).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να πούμε πως η επιβιωσιμότητα του *Salmonella* κατά την επανάληψη του πειράματος για την χειμερινή

περίοδο ίσως να μην οφείλεται μόνο στη χαμηλή θερμοκρασία, αλλά να αποτελεί αποτέλεσμα της επίδρασης περισσότερων περιβαλλοντικών παραγόντων. Λόγου χάρη, όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή της παρούσας μελέτης, ο παράγοντας pH στη λίμνη Κάρλα δεν χαρακτηρίζεται από κάποια συγκεκριμένη εποχική διακύμανση, παρά μόνο έχει παρατηρηθεί ότι βρίσκεται μεταξύ των τιμών 7.43 και 9.12 (Chamoglou 2014). Είναι επομένως πιθανό, η επιβιωσιμότητα του *Salmonella* να επιτευχθεί στο νερό της λίμνης όταν ο συνδυασμός των περιβαλλοντικών παραγόντων το επιτρέψει, ανεξάρτητα από την εποχή.

Τα περισσότερα στελέχη *Salmonella* έχουν την δυνατότητα παρατεταμένης επιβίωσης στο νερό και ίσως διαθέτουν την ικανότητα αύξησης σε ευρέως ρυπασμένα νερά ιδιαίτερα κατά τους θερινούς μήνες. Σε μελέτη του 2012 ανιχνεύθηκε ένα ευρύ φάσμα στελεχών *Salmonella* σε αστικά και αγροτικά ρέματα και διαπιστώθηκε ότι το υδάτινο περιβάλλον ήταν η πηγή των βακτηρίων αυτών (Thomas *et al.* 2012). Επιπλέον, θεωρήθηκε ότι το νερό θα μπορούσε να συμμετέχει στη μεταφορά και διάδοση αυτών των παθογόνων. Έρευνα του 2011 επίσης έδειξε πως το *Salmonella* ήταν το δεύτερο πιο συχνά ανιχνεύσιμο βακτήριο σε δείγματα επιφανειακού νερού, με το *Salmonella rubislaw* να αποτελεί το πιο κοινό στέλεχος (Jokinen *et al.* 2011). Ακόμα, σημαντικός αριθμός μελετών, υποδεικνύει υψηλότερα επίπεδα του *Salmonella* σε νερό ποταμών παρά σε θαλασσινό νερό (Percival *et al.* 2013).

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας που παρουσιάστηκαν παραπάνω, μπορούμε να πούμε με βεβαιότητα πως η επιβιωσιμότητα του στελέχους *Salmonella enterica enterica typhimurium*, όσον αφορά την θερινή περίοδο στην λίμνη Κάρλα, μπορεί να διαρκέσει τουλάχιστον για 14 ημέρες. Αντιθέτως, κατά την χειμερινή περίοδο δεν παρατηρείται καμία αύξηση του στελέχους. Το γεγονός αυτό δεν θα πρέπει να δηλώνει απαραίτητα τη λειτουργία της χαμηλής θερμοκρασίας ως περιοριστικό παράγοντα στην επιβιωσιμότητα του *Salmonella* καθώς είναι πιθανό αυτή να εξαρτάται από έναν συνδυασμό περιβαλλοντικών παραγόντων (pH, ύπαρξη τοξινών, θερμοκρασία κ.α.) οι οποίοι δεν ήταν οι κατάλληλοι την χρονική στιγμή της συλλογής του δείγματος νερού που χρησιμοποιήθηκε. Επίσης, λόγω της ύπαρξης τραυματισμένων κυττάρων και της ικανότητας του *Salmonella* να επέλθει σε καθεστώς VBNC, οι καταγεγραμμένες τιμές του πειράματος θα μπορούσαν να αποκλίνουν από αυτές του φυσικού περιβάλλοντος.

Για τους λόγους αυτούς θεωρείται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της επιβιωσιμότητας του *Salmonella* και των μηχανισμών με τους οποίους αυτή επιτυγχάνεται στο υδάτινο οικοσύστημα της λίμνης Κάρλα λαμβάνοντας υπόψη μια πληθώρα περιβαλλοντικών παραγόντων όπως, λόγου χάρη, το pH, η ύπαρξη τοξινών, η υπεριώδης ακτινοβολία και η a_w .

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

- Ananiadis, C.I. (1956) Limnological study of Lake Karla. Bulletin Del' Institut. Oceanographique 1083, 1-19.
- Atlas R.M., (2004) Handbook of Microbiological Media, CRC Press, Third Edition
- Barker J., Brown M.R.W., (1994) Trojan horses of the microbial world: Protozoa and survival of bacterial pathogens in the environment, Microbiology, 140, pp. 1253–1259
- Bermudes D., Low B., Pawelek J. (2000) Tumor-targeted *Salmonella*. Highly selective delivery vectors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 465, 57–63
- Chamoglou M., Papadimitriou T., Kagalogou I. (2014) Key-Descriptors for the Functioning of a Mediterranean Reservoir: The Case of the New Lake Karla-Greece. *Environ. Process.* 1:127-135
- D' Aoust J.-Y. (2001) *Salmonella* species, M.P. Doyle, L.R. Beuchat, T.J. Montville (Eds.), Food microbiology: Fundamentals and frontiers (2 edn), ASM Press, Washington, D.C., pp. 141–178
- Foster J.W., Spector M.P., (1995) How *Salmonella* survive against the odds, Annual Review of Microbiology, 49, pp. 145–174
- Gerakis P.A. (1992) Former Lake Karla rehabilitation case study, Conservation and Management of Greek Wetlands. IUCN, Gland, Switzerland 429-489.
- Jokinen C., Edge T.A., Ho S., Koning W., Laing C., Mauro W., Medeiros D., Miller J., Robertson W., Taboada E., Thomas J.E., Topp E., Ziebell K., Gannon V.P.J., (2011) Molecular subtypes of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157:H7 isolated from faecal and surface water samples in the Oldman River watershed, Alberta, Canada, *Water Research* 45 (2011) 1247 e1257
- Jouni S. (2011) Current trophic status of Lake Karla, Greece, and proposal for

remadiations. A dissertation presented for the degree of Master of Science University of Edinburgh, Edinburgh.

- Koutsoumanis K.P., Kendall P.A., Sofos J.N. (2004) Modeling the Boundaries of Growth of *Salmonella* Typhimurium in Broth as a Function of Temperature, Water Activity, and pH, *Journal of Food Protection*, Vol. 67, No. 1, 2004, Pages 53–59
International Association for Food Protection
- Lindbäck T., Rottenberg M.E., Roche S.M., Rørvik L.M., (2010) “The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment,” *Veterinary Research*, vol. 41, no. 1
- Loukas A., Mylopoulos N., Vasiliades L. (2007) A Modeling System for the Evaluation of Water Resources Management Strategies in Thessaly, Greece. *Water Resource and Management* 21, 1673–1702
- McClelland M., Sanderson K.E., Spieth J., Clifton S.W., Latreille P., Courtney L., Porwollik S., Ali J., Dante M., Du F., Hou S., Layman D., Leonard S., Nguyen C., Scott K., Holmes A., Grewal N., Mulvaney E., Ryan E., Sun H., Florea L., Miller W., Stoneking T., Nhan M., Waterston R., Wilson R.K., (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2, *Nature* 413, 852-856 (25 October 2001) doi:10.1038/35101614
- McMeekin T. A., Presser K., Ratkowsky D. A., Ross T., Salter M., Tienungoon S. (2000) Quantifying the hurdle concept by modelling the bacterial growth/no growth interface. *Int. J. Food Microbiol.* 55:93–98.
- Mitsoura A., Papaioannou N., Berillis P., Mente E., Kagalou I., Papadimitriou T. (2013) The presence of microcystins in fish *Cyprinus carpio* tissues: an histopathological study. *Int Aquat Res* 5:8. doi:10.1186/ 2008-6970-5-8

- Monfort P., Baleux B. (1994) Effects of environmental factors present in the St. Lawrence Estuary (Quebec, Canada) on experimental survival of *Salmonella salamae* as determined by flow cytometry. *Can J Microbiol* 40:712–719
- Moore B.C., Martinez E., Gay J.M., Rice D.H. (2003) Survival of *Salmonella enterica* in freshwater and sediments and transmission by the aquatic midge *Chironomus tentans* (Chironomidae: Diptera). *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4556–4560.
- Morinigo M.A, Cornax R., Castro D., Martinez-Manzanares E., Borrego J.J. (1990) Viability of *Salmonella* spp. and indicator microorganisms in seawater using membrane diffusion chambers. *Antonie Van Leeuwenhoek* 57:109–118
- Mylopoulos N. & Sidiropoulos P. (2009) Groundwater management under hydrogeologic uncertainty in an overexploited aquifer. *Global Ground water Resources and Management: Selected Papers from International Geological Congress Oslo (Norway)*.
- Neidhardt F.C. (1996) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (ASM, Washington DC, 1996).
- Oikonomou A., Katsiapi M., Berillis P., Moustaka-Gouni M., Kormas K. (2010) Microbial gangs are taking over the water column of a reconstructed lake, 14th International Conference on Harmful Algae, Crete, Greece.
- Oikonomou A, Katsiapi M, Karayanni H, Moustaka-Gouni M, Kormas K (2012) Plankton microorganisms coinciding with two consecutive mass fish kills in a newly reconstructed lake. *SciWorldJ* 504135, 14 pages, doi:10.1100/2012/504135
- Oliver J.D., (1995) “The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*,” *FEMS Microbiology Letters*, vol. 133, no. 3, pp. 203–208
- Papadimitriou T., Stampouli Z., Kagalou I. (2011) Preliminary results on the cyanotoxicity in the "new" Lake Karla (Thessaly-Greece). 12th International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, pp. 1416-1423.

- Papadimitriou T., Katsiapi M., Kormas K., Moustaka-Gouni M., Kagalou I. (2013) Artificially-born “killer” lake: phytoplankton based water quality and microcystin affected fish in a reconstructed lake. *Sci Total Environ* 452–453:116–124
- Passerat J., Got P., Dukan S., Monfort P., (2009) “Respective roles of culturable and viable-but-nonculturable cells in the heterogeneity of *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasiveness,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 16, pp. 5179–5185
- Percival S.L., Yates M. V., Williams D.W., Chalmers R.M., Gray N.F. (2013) *Microbiology of waterborne diseases: microbiological aspects and risks*. London: Elsevier.
- Presser K. A., Ross T., Ratkowsky D.A. (1998) Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1773–1779.
- Santo Domingo J.W., Harmon S., Bennett J., (2000) Survival of *Salmonella* Species in River Water, *Current Microbiology* Vol. 40, pp. 409–417 DOI: 10.1007/s002840010079
- Sidiropoulos P., Loukas A., Mylopoulos N. (2011) Optimal Groundwater Resources Management of an overexploited aquifer under global change», VI EWRA International Symposium - Water Engineering and Management in a Changing Environment, Catania, Italy.
- Sidiropoulos P., Papadimitriou T., Stabouli Z., Loukas A., Mylopoulos N., Kagalou I. (2012) Past, present and future concepts for conservation of the re-constructed Lake Karla (Thessaly-Greece). *Fresenius' Environ Bull* 21(10a):3027–3034
- Singer R.S., Mayer A.E., Hanson T.E., Isaacson R.E., (2009) Do Microbial Interactions and Cultivation Media Decrease the Accuracy of *Salmonella* Surveillance Systems and Outbreak Investigations?, *Journal of Food Protection*, Vol. 72, No. 4, Pages 707–713
- Smith J.J., Howington J.P., McFeters G.A. (1994) Survival, physiological response, and

recovery of enteric bacteria exposed to a polar marine environment. *Appl Environ Microbiol* 60:2977–2984

- Spector M.P, Kenyon W.J (2012) Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Res Intl* 45: 455–481.
- Stevens M.P, Humphrey T.J., Maskell D.J., (2009) Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364 , pp. 2709–2723
- Thomas J.L., Slawson R.M., Taylor W.D., (2012) *Salmonella* serotype diversity and seasonality in urban and rural streams, *Appl. Microbiol.* 2012 Nov 21.
- Todd, E. (1990) Epidemiology of foodborne illness: North America. *Lancet* 336, 788–790
- Vasiliades L., Loukas A., Patsonas G. (2009) Evaluation of a statistical downscaling procedure for the estimation of climate change impacts on droughts. *Natural Hazards and Earth System Sciences* 9, 879–894.
- Xu H.S., Roberts N., Singleton F. L., Attwell R., Grimes D., Colwell R., (1982) “Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment,” *Microbial Ecology*, vol. 8, no. 4, pp. 313–323

Ελληνική βιβλιογραφία

- Τρίκολας Ν., Κορμάς Κ., Κάγκαλου Ι., Βερίλλης Π., (2011) Συμβολή στην οργανισμική σύνθεση των μικροσκοπικών ευκαρυωτών της λίμνης Κάρλα, 4ο Διεθνές Συνέδριο “Υδροβιολογίας – Αλιείας”, Βόλος 9-11 Ιούνιος 2011

6. ABSTRACT

Title: Survivability of a *Salmonella* strain in water from Lake Karla.

The aim of this research was to study the survivability of the *Salmonella enterica enterica* serovar *typhimurium* in summer and winter water samples from Lake Karla and the identification of this potential survivability's duration. Overall, one sampling from Lake Karla took place for each season.

The strain formed colonies even 14 days after the initial vaccination of the experiment considering the summer period. After collection, the water samples were sterilized, filtered and divided into six different glass bottles of 400ml, three of which were vaccinated with the *Salmonella* serovar to a final concentration of 10^3 cfu/ml. The three remaining bottles were used as a control.

The bottles were placed in an incubator at a temperature of 20° C and the incubation of the Petri dishes took place at 37° C. During the experiment, four different dilutions were used while the colonies counts in the Petri dishes were carried out 24 hours after plating. The growth medium used was the XLD agar.

Subsequently, the growth curves for each dilution of the experiment were constructed. It should be noted that injured cells were observed until the fifth day of the experiment.

Plating with the dilution of 1/10 took place from the third to the eleventh day. The observation of the colonies in the Petri dishes showed very high numbers, the count of which was impossible.

Plating with the dilution of 1/100 were carried out from the fifth day until the end of the experiment and the observation of colonies counts showed two maximum and two minimum values.

Plating Petri dishes with the dilution of 1/1000 took place from the seventh day

onwards. The observed growth of the colonies also showed two maximum and two minimum values, but forming the exact opposite trend compared to the growth curve of the previous dilution. This may indicate the existence of a second strain in the *Salmonella* vaccine used or might have happened due to the lack of space in the plate surface as a result of the plurality of living cells of the sample.

Statistical analysis of the data collected showed that there is statistically significant difference between control and counts regarding the dilutions 1/100 and 1/1000.

The repetition of the experiment during wintertime showed zero survivability.

Key words: *Salmonella*, survivability, Lake Karla