

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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*«Απαρίθμηση μικροοργανισμών σε έντομα που απαντώνται
σε πρώτες ύλες ιχθυοτροφών»*

Δώνος Σπυρίδων

Βόλος, 2019

«Απαρίθμηση μικροοργανισμών σε έντομα που απαντώνται σε πρώτες ύλες ιχθυοτροφών»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Ιωάννης Σ. Μποζιάρης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- 2. Χρήστος Αθανασίου**, Καθηγητής Εντομολογίας, Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3. Φωτεινή Παρλαπάνη**, Συμβασιούχος Διδάσκοντας ΠΔ 407/80, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο τέλος της Πτυχιακής μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της Πτυχιακής, Αν. Καθηγητή Ιωάννη Μποζιάρη, τον Καθηγητή Χρήστο Αθανασίου και την Δρ Φωτεινή Παρλαπάνη για την καθοδήγησή τους κατά τη διάρκεια του πειράματος αλλά και της συγγραφής της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Σωτήρη Οικονόμου και την Κλειώ Χατζηνικολάου για την άψογη συνεργασία μας και τη βοήθεια που μου πρόσφεραν στα πλαίσια των πειραμάτων στο εργαστήριο.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στους φίλους μου για τη συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας ήταν η ανίχνευση, απαρίθμηση ή/και απομόνωση των κυριότερων μικροοργανισμών που απαντώνται σε διαφορετικά στελέχη τεσσάρων ειδών εντόμων αποθηκών όπως τα *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* και *Tribolium confusum*. Η εργασία αυτή είχε ως στόχο να δώσει απαντήσεις σχετικά με το ποιοι μικροοργανισμοί μπορεί να βρεθούν σε διάφορα στελέχη των υπό μελέτη εντόμων έτσι ώστε να γνωρίζουμε ποιοι από αυτούς είναι δυνατό να βρεθούν στα συστατικά φυτικής προέλευσης τα οποία είναι αποθηκευμένα στις αποθήκες παραγωγής ιχθυοτροφών.

Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου, δύο παρτίδες από κάθε στέλεχος εντόμων ελήφθησαν από το Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος και μεταφέρθηκαν στο Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος για μικροβιολογική ανάλυση. Στα πλαίσια αυτά, πραγματοποιήθηκε και απομόνωση Εντερόκοκκων και *E. coli*/coliform με σκοπό την περαιτέρω ταυτοποίηση τους με τη χρήση της Maldi-tof MS.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης, βρέθηκε ότι το *Sitophilus oryzae* TS15 είναι φορέας Εντερόκοκκων (3,17 log cfu/g η πρώτη παρτίδα και 2,95 log cfu/g η δεύτερη παρτίδα). Το *Sitophilus oryzae* TS15 είναι επίσης φορέας coliforms (2,19 log cfu/g), χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται *E. coli* και μαζί με το *Sitophilus oryzae* HH2 είναι φορείς ζυμομυκήτων. Το *Oryzaephilus surinamensis* WF2 είναι φορέας Εντερόκοκκων (2,15 log cfu/g). Το *Oryzaephilus surinamensis* WF2 είναι φορέας coliforms (6,80 και 6,74 log cfu/g σε πρώτη και δεύτερη παρτίδα αντίστοιχα), χωρίς να παρατηρούνται *E. coli*. Στο *Oryzaephilus surinamensis* WF2

αναπτύχθηκαν πληθυσμοί ζυμομυκήτων. Η OMX για τα έντομα *Sitophilus oryzae* HH2, L1 και TS15 ήταν 8,53, 7,40 και 7,00 log cfu/g αντίστοιχα για την πρώτη παρτίδα, ενώ για τη δεύτερη ήταν 8,34, 7,65 και 7,08 log cfu/g. Η OMX για τα *Oryzaephilus surinamensis* WF1 και *Oryzaephilus surinamensis* WF2 ήταν 7,26 και 7,39 log cfu/g αντίστοιχα (πρώτη παρτίδα) και 7,00 και 7,53 log cfu/g αντίστοιχα (δεύτερη παρτίδα). Η OMX για τα *Tribolium confusum* BM1 και *Tribolium confusum* KA ήταν 5,48 και 4,23 log cfu/g αντίστοιχα (πρώτη παρτίδα) και 5,00 και 4,39 log cfu/g αντίστοιχα (δεύτερη παρτίδα). Έπειτα από την ανάλυση με τη Maldi-tof MS, ανιχνεύτηκε ο μικροοργανισμός *Enterococcus faecium* στα *S. oryzae* TS15 και *S. oryzae* L1, και οι μικροοργανισμοί *Enterococcus phoeniculicola* και *Enterobacter cloacae* στο *O. surinamensis* WF2.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, η παρουσία των εντόμων αποθηκών στα διάφορα προϊόντα, απαιτεί την προσεκτική επιλογή τους, πριν χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες για την παραγωγή ιχθυοτροφών.

Λέξεις κλειδιά: έντομα αποθηκών, *Enterococcus*, *Enterobacter*, Maldi-Tof-MS

ABSTRACT

The aim of this work was the identification, the enumeration and the isolation of the major microorganisms that are found in different strains from four different insect species, such as *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* και *Tribolium confusum*. 2 batches of each strain from each one of the four different insect species were obtained from the Laboratory of Entomology and Agricultural Zoology, Department of Agriculture, Crop Production and Rural Environment, University of Thessaly. Liquids from the gut of the insects were cultivated in Petri dishes for the studying of their microbiota. Also, the Enterococci and the *E. coli*/coliforms were isolated and identified using Maldi-tof MS.

After the enumeration of the microorganisms, it was found that *Sitophilus oryzae* TS15 was carrier of Enterococci (3,17 log cfu/g in the first batch and 2,95 log cfu/g in the second batch). *Sitophilus oryzae* TS15 is also a carrier of coliforms (2,19 log cfu/g), without the presence of *E. coli*, and among with *Sitophilus oryzae* HH2 are carriers of yeast and mold. *Oryzaephilus surinamensis* WF2 is a carrier of Enterococci (2,15 log cfu/g). It is also a carrier of coliforms (6,80 and 6,74 log cfu/g in the first and second batch respectively), without the presence of *E. coli*. Population of yeasts and mold were grown in *Oryzaephilus surinamensis* WF2, too. The Total Microbial Count for *Sitophilus oryzae* HH2, L1 and TS15 was 8,53, 7,40 and 7,00 log cfu/g respectively for the first batch, whilst for the second it was 8,34, 7,65 and 7,08 log cfu/g, respectively. The Total Microbial Count for *Oryzaephilus surinamensis* WF1 and *Oryzaephilus surinamensis* WF2 was 7,26 and 7,39 log cfu/g respectively (first batch) and 7,00 and 7,53 log cfu/g respectively (second batch). The Total Microbial

Count for *Tribolium confusum* BM1 and *Tribolium confusum* KA was 5,48 and 4,23 log cfu/g respectively (first batch) and 5,00 and 4,39 log cfu/g respectively (second batch).

After the Maldi-tof MS analysis, *Enterococcus faecium* was identified in *S. oryzae* TS15 and *S. oryzae* L1, and *Enterococcus phoeniculicola* and *Enterobacter cloacae* were identified in *Oryzaephilus surinamensis* WF2.

Concluding, the presence of stored-product insects in the different products demand that they will be chosen carefully before they are used for the production of fish-food.

Keywords: stored product insects, *Enterococcus*, *Enterobacter*, Maldi-Tof-MS

Πίνακας περιεχομένων

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1) ΓΕΝΙΚΑ.....	10
1.2) ΕΝΤΟΜΑ ΑΠΟΘΗΚΩΝ.....	11
1.2.1) <i>Sitophilus oryzae</i>	12
1.2.2) <i>Oryzaephilus surinamensis</i>	13
1.2.3) <i>Tribolium confusum</i>	14
1.2.4) <i>Tribolium castaneum</i>	14
1.2.5) <i>Stegobium paniceum</i>	15
1.2.6) <i>Sitophilus granarius</i>	16
1.2.7) <i>Sitophilus zeamais</i>	17
1.3) ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΦΟΡΤΙΟ ΕΝΤΟΜΩΝ ΑΠΟΘΗΚΩΝ	18
1.3.1) ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ	18
1.3.1.1) ΓΕΝΙΚΑ	18
1.3.1.2) ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΑ ΑΠΟΘΗΚΩΝ	19
1.3.1.3) ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ.....	20
1.3.1.4) ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	20
1.4) ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΣΕΑΕ	21
1.5) ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΕΝΤΟΜΩΝ ΑΠΟΘΗΚΩΝ.....	23
1.6) ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	24
2) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1) ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	25
2.2) ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	25
2.2.1) TSA (Tryptone Soy Agar)	26
2.2.2) Kanamycin	26
2.2.3) Harlequin <i>E. coli</i> /coliform medium	27
2.2.4) Slanetz & Bartley Medium	28
2.2.5) R. B. C. (Rose Bengal Chloramphenicol Agar)	28
2.2.6) V. R. B. G. A. (Violet Red Bile Glucose Agar).....	29
2.3) ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ	30
2.4) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ MALDI-TOF MS	31
3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
3.1) ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΤΩΝ ΕΝΤΟΜΩΝ	32
3.2) Ταυτοποίηση βακτηρίων.....	36
4) ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
5) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	41
6) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42
ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	54
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	55

1) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1) ΓΕΝΙΚΑ

Οι απαιτήσεις του ανθρώπινου πληθυσμού για ασφαλή και ποιοτικά προϊόντα έχουν αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς οι καταναλωτές γίνονται ολοένα και πιο συνειδητοποιημένοι για τους πιθανούς κινδύνους που εγκυμονούν τα τρόφιμα. Τα τρόφιμα, εκτός από πηγή ενέργειας για τον άνθρωπο, αποτελούν ιδανικό μέσο για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό μικροοργανισμών. Παράγοντες όπως το pH, η υγρασία, η θερμοκρασία, τα διαθέσιμα θρεπτικά παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να διακριθούν, ανάλογα με τη δράση τους, σε δύο μεγάλες κατηγορίες, στους παθογόνους και στους αλλοιωγόνους. Μεταξύ αυτών, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί ευθύνονται για την εκδήλωση ασθενειών στον άνθρωπο-καταναλωτή, ενώ οι αλλοιωγόνοι για την υποβάθμιση της ποιότητας-φρεσκότητας των τροφίμων. Οι δύο αυτές κατηγορίες μικροοργανισμών βρίσκονται ανάμεσα στους πιο σημαντικούς λόγους για τους οποίους η βιομηχανία τροφίμων χάνει πάνω από το 1/3 των τροφίμων που παράγει (food losses) πράγμα που μεταφράζεται σε τεράστιες ποσότητες χαμένου φαγητού στο περιβάλλον και σε μεγάλες οικονομικές απώλειες τόσο για τη βιομηχανία τροφίμων όσο και για τη γενικότερη οικονομία μιας χώρας.

Τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή ιχθύων υδατοκαλλιέργειας αποτελεί μία από τις σημαντικότερες πηγές παραγωγής τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο. Η Ελλάδα βρίσκεται ανάμεσα στις κυριότερες χώρες της Ε.Ε. σε παραγωγή ιχθύων όπως η τσιπούρα και το λαβράκι υδατοκαλλιέργειας. Η μεγάλη αυτή παραγωγική δραστηριότητα έχει κάνει επιτακτική την ανάγκη του κλάδου να αναζητά τρόπους για

παραγωγή όσο το δυνατό μέγιστης ποιότητας και ασφάλειας προϊόντων. Οι ιχθύες είναι δυνατό να επιμολυνθούν καθ'όλη τη διάρκεια της παραγωγικής αλυσίδας με παθογόνους και αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς από το νερό αλλά και από την τροφή που τους παρέχεται κατά τη διάρκεια της εκτροφής. Οι τροφές των ιχθύων (ιχθυοτροφές) αν και περιέχουν κυρίως ιχθυάλευρα, ωστόσο πολλές φορές περιέχουν και άλλα συστατικά κυρίως φυτικής προέλευσης τα οποία είναι αποθηκευμένα στις αποθήκες παραγωγής ιχθυοτροφών. Τα συστατικά αυτά είναι δυνατό να περιέχουν μικροοργανισμούς οι οποίοι να έχουν επιβιώσει κατά την επεξεργασία της τροφής με αποτέλεσμα να επιμολύνουν το περιβάλλον της υδατοκαλλιέργειας αλλά και το ίδιο το ψάρι. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να προέρχονται από τον αέρα και από άλλες πηγές επιμόλυνσης με σημαντικότερες τα έντομα αποθηκών (stored product insects).

1.2) ENTOMA ΑΠΟΘΗΚΩΝ

"Έντομο αποθηκών" θεωρείται κάθε είδος εντόμου που προσβάλλει και ζημιώνει αμέσως ένα προϊόν και μπορεί να αναπτυχθεί και να αναπαραχθεί σε μια αποθήκη ή χώρο που φιλοξενεί επί αρκετό χρονικό διάστημα γεωργικά προϊόντα ή τρόφιμα. Τα έντομα αποθηκών είναι από αρχαιοτάτων χρόνων μια από τις βασικές ανησυχίες των ανθρώπων που ασχολούνται με την επεξεργασία και αποθήκευση τροφίμων. Έχει καταγραφεί η παρουσία του *Tribolium* sp. σε Αιγυπτιακό τάφο το 2500 π.Χ. και η παρουσία των *Stegobium paniceum*, *Ptinus* sp. και *Lasioderma serricone* στον τάφο του Τουταγχαμών (1930-1380 π.Χ). Σήμερα, σύμφωνα με τον FAO (Food and Agriculture Organization) τα έντομα αποθηκών είναι υπεύθυνα για την απώλεια του 10% των αποθηκευμένων έτοιμων προϊόντων. Επιπλέον, τα έντομα αποθηκών

μπορούν να μεταδώσουν διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι αποτελούν μια σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Η σύνδεση που έχουν τα έντομα αποθηκών με την παραγωγική αλυσίδα καθιστά τα διάφορα είδη πολύ επικίνδυνα, καθώς είναι φορείς μολύνσεων.

Τα κυριότερα έντομα αποθηκών που μπορεί να βρεθούν στις πρώτες ύλες των ιχθυοτροφών παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω:

1.2.1) *Sitophilus oryzae*

Το *S. oryzae* (Εικ. 1) ανήκει στην οικογένεια Curculionidae της τάξης Coleoptera (Πίν. 1) και είναι το είδος με τη μεγαλύτερη οικονομική σημασία, ανάμεσα στα διάφορα είδη εντόμων αποθηκών. Αναφέρεται ως το έντομο που προκαλεί τις περισσότερες καταστροφές σε αποθηκευμένους καρπούς δημητριακών (Champ και Dyte, 1976).



Εικόνα 1. *Sitophilus oryzae* (πηγή:

Πίνακας 1. Ταξινομική κατάταξη του <i>Sitophilus oryzae</i> .	
ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Animalia
ΦΥΛΟ	Arthropoda
ΚΛΑΣΗ	Insecta
ΤΑΞΗ	Coleoptera
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Curculionidae
ΓΕΝΟΣ	<i>Sitophilus</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>Sitophilus oryzae</i>

<http://www.ozanimals.com/Insect/Rice-Weevil/Sitophilus/oryzae.html>)

Προτιμά να προσβάλλει προϊόντα τα οποία είναι αποθηκευμένα σε θερμοκρασία 25-30°C, η οποία είναι και η ιδανική θερμοκρασία για την βέλτιστη ανάπτυξη του. Το είδος αυτό αναπτύσσεται με γρήγορους ρυθμούς και μπορεί να χτίσει γρήγορα μεγάλους πληθυσμούς (Aitken, 1975). Η διάρκεια ζωής του είδους είναι 6-7 μήνες και γεννάει 300-400 αυγά, τα οποία χρειάζονται 25 ημέρες για να εκκολαφθούν (Maliki et al, 2019). Προσβάλλει καρπούς δημητριακών, όπως κριθάρι, σιτάρι και σίκαλη, καθώς επίσης ξηρούς καρπούς και φρούτα.

1.2.2) *Oryzaephilus surinamensis*

Το *O. surinamensis* (Εικ. 2) συναντάται σε σιτηρά, ελαιούχους σπόρους, όσπρια, καφέ, κακάο. Το είδος αυτό εισέρχεται στα τρόφιμα από μικρά ανοίγματα στις συσκευασίες των προϊόντων, όπου ζει και αναπαράγεται.



Εικόνα 2. *Oryzaephilus Surinamensis*

Πίνακας 2. Ταξινόμική κατάταξη του <i>Oryzaephilus surinamensis</i> .	
ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Animalia
ΦΥΛΟ	Arthropoda
ΚΛΑΣΗ	Insecta
ΤΑΞΗ	Coleoptera
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Silvanidae
ΓΕΝΟΣ	<i>Oryzaephilus</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>Oryzaephilus</i>

(πηγή:[https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Oryzaephilus_surinamensis_\(Linnaeus_1758\)_-Sawtoothed_Grain_Beetle.htm](https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Oryzaephilus_surinamensis_(Linnaeus_1758)_-Sawtoothed_Grain_Beetle.htm))

Το είδος αυτό προτιμά να ζει σε τρόφιμα που έχουν ήδη προσβληθεί από άλλα έντομα. Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι το *O. surinamensis* είναι ένα από τα πιο κοινά έντομα της οικογένειας Silvanidae της τάξης Coleoptera (Πίν. 2) που προκαλούν ζημιές στα τρόφιμα. Το μικρό του μέγεθος και η ικανότητα του να κρύβεται εύκολα καθιστούν δύσκολο τον έλεγχό του.

1.2.3) *Tribolium confusum*

Το *Tribolium confusum* (Εικ. 3) είναι ένα από τα πιο γνωστά έντομα αποθηκών. Προσβάλλει ένα ευρύ φάσμα προϊόντων, όπως το αλεύρι σίτου, το αλεύρι σόγιας και το αλεύρι καλαμποκιού, ενώ εντοπίζεται και στη βρώμη, στο κριθάρι, στο ρύζι, στους ξηρούς καρπούς, στα αποξηραμένα φρούτα και σε κάποια όσπρια. Συχνά είναι υπεύθυνο για την μετάδοση Εντερόκοκκων και άλλων ομάδων βακτηρίων. Η ταξινομική κατάταξη του είδους φαίνεται στον πίνακα 3.



Πίνακας 3. Ταξινομική κατάταξη το *Tribolium confusum*

ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Animalia
ΦΥΛΟ	Arthropoda
ΚΛΑΣΗ	Insecta
ΤΑΞΗ	Coleoptera
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Tenebrionidae
ΓΕΝΟΣ	<i>Tribolium</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>Tribolium confusum</i>

Εικόνα 3. *Tribolium confusum*. (πηγή:

https://en.m.wikipedia.org/wiki/Confused_flour_beetle)

1.2.4) *Tribolium castaneum*

Το είδος *Tribolium castaneum* (Εικ. 4) ανήκει στην οικογένεια Tenebrionidae της τάξης των Coleoptera (Πίν. 4) και εντοπίζεται σε καρπούς δημητριακών, πίτουρο, αποξηραμένα φρούτα κλπ, και κάνει κυρίως ζημιές σε προϊόντα που έχουν ήδη αλλοιωθεί από άλλα έντομα.



Εικόνα 4. *Tribolium castaneum*
(πηγή:https://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Tribolium_castaneum_%28Herbst_1797%29_-_Red_Flour_Beetle.htm)

Πίνακας 4. Ταξινόμηση κατάταξη του <i>Tribolium castaneum</i> .	
ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Animalia
ΦΥΛΟ	Arthropoda
ΚΛΑΣΗ	Insecta
ΤΑΞΗ	Coleoptera
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Tenebrionidae
ΓΕΝΟΣ	<i>Tribolium</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>Tribolium castaneum</i>

Σε κάποιες περιπτώσεις, είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση μούχλας και κιτρινωπού χρώματος στα αλεύρα, ενώ τους προσδίδει δυσάρεστη οσμή. Το είδος αυτό είναι συχνά φορέας του μικροοργανισμού *Enterobacter cloacae*, που είναι ένας από τους πιο κοινούς παθογόνους που σχετίζονται με τα τρόφιμα.

1.2.5) *Stegobium paniceum*

Το *Stegobium paniceum* (Εικ. 5) είναι ένα φυτοφάγο είδος της οικογένειας Anobiidae (Πίν. 5) το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο παγκοσμίως. Οι πληθυσμοί του *S. paniceum* επιφέρουν σημαντικές απώλειες στα προϊόντα που προσβάλλουν, καθώς εκτός από το ότι καταναλώνουν μέρος του προϊόντος, προκαλούν αύξηση της

θερμοκρασίας του και αύξηση της υγρασίας. Έτσι, ευνοείται ο σχηματισμός μούχλας (Zhang et al, 2015).



Εικόνα 5. *Stegobium paniceum*

Πίνακας 5. Ταξινόμική κατάταξη του <i>Stegobium paniceum</i>	
ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Animalia
ΦΥΛΟ	Arthropoda
ΚΛΑΣΗ	Insecta
ΤΑΞΗ	Coleoptera
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Anobiidae
ΓΕΝΟΣ	Stegobium
ΕΙΔΟΣ	<i>Stegobium</i>

(Πηγή: <https://radandesintec.com/en/stored-products-pests/stegobium-paniceum/>)

1.2.6) *Sitophilus granarius*

Το είδος *Sitophilus granarius* (Εικ. 6), το οποίο ανήκει στην οικογένεια Dryophthoridae (Πίν. 6), προσβάλλει προϊόντα όπως σιτάρι, βρώμη, κριθάρι, σίκαλη, ρύζι και καλαμπόκι. Τα έντομα εισέρχονται στα προϊόντα μέσα από ανοίγματα στη συσκευασία τους (Mullen & Mowery, 2000). Προκαλεί μεγάλες απώλειες στα τρόφιμα καθώς η ποσότητα της τροφής που καταναλώνει καθημερινά ανέρχεται στο 20% του σωματικού του βάρους (Golebiowska, 1969). Στον ακόλουθο πίνακα (Πίν. 6) δίνεται η συστηματική του κατάταξη:



Πίνακας 6. Ταξινόμική κατάταξη του <i>Sitophilus granarius</i>	
ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Animalia
ΦΥΛΟ	Arthropoda
ΚΛΑΣΗ	Insecta
ΤΑΞΗ	Coleoptera
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Dryophthoridae
ΓΕΝΟΣ	Sitophilus
ΕΙΔΟΣ	<i>Sitophilus granarius</i>

Εικόνα 6. *Sitophilus granarius*

(Πηγή:<https://www.biolib.cz/en/taxonimage/id79809/>)

1.2.7) *Sitophilus zeamais*

Το είδος *Sitophilus zeamais* (**Εικ. 7**) επιτίθεται σε προϊόντα όπως καλαμπόκι, σιτάρι, ρύζι, σόργο, γλυκοπατάτες (Nwana, 1993, Alleoni & Ferreira) σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει απώλειες έως και 30-40% του προϊόντος (CABI, 2005). Το *S. zeamais* έχει αποδειχθεί ότι είναι φορέας Εντερόκοκκων (Larson et al, 2008). Στον πίνακα 7 δίνεται η συστηματική του κατάταξη.



Πίνακας 7. Ταξινόμική κατάταξη του <i>Sitophilus zeamais</i>	
ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Animalia
ΦΥΛΟ	Arthropoda
ΚΛΑΣΗ	Insecta
ΤΑΞΗ	Coleoptera

Εικόνα 7. *Sitophilus zeamais*

(Πηγή:https://en.m.wikipedia.org/wiki/Maize_weevil)

1.3) ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΦΟΡΤΙΟ ΕΝΤΟΜΩΝ ΑΠΟΘΗΚΩΝ

Τα παραπάνω έντομα έχουν συνδεθεί με τη μεταφορά μικροοργανισμών στα τρόφιμα αποθηκών. Κάποιες από κυριότερες ομάδες μικροοργανισμών που μεταδίδουν τα προαναφερθέντα έντομα είναι οι Εντερόκοκκοι και τα βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae.

1.3.1) ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ

1.3.1.1) ΓΕΝΙΚΑ

Το γένος *Enterococcus* ανήκει σε μια κατηγορία μικροοργανισμών γνωστή ως οξυγαλακτικά βακτήρια. Είναι Gram-θετικά, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Αν και αποτελούν κυρίως μέρος της μικροχλωρίδας του γαστρεντερικού συστήματος των ζώων, μπορούν να ζήσουν σχεδόν παντού στη φύση, λόγω της ικανότητας τους να επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες. Τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται σε ένα

θερμοκρασιακό εύρος από 10 έως 45°C, με ιδανική τιμή θερμοκρασίας τους 35°C. Κάποια είδη μπορούν να επιβιώσουν στους 60°C για μισή ώρα και μπορούν να αναπτυχθούν σε περιβάλλον με 6,5% NaCl, και σε pH 9,6. Επίσης, ζουν στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου αλλά και άλλων θηλαστικών, και εντοπίζονται επίσης σε πουλιά, έντομα, χώμα, νερό, φυτά. Η ταξινόμική τους κατάταξη παραμένει ασαφής, καθώς δεν διαθέτουν συγκεκριμένα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.

Μέχρι σήμερα, έχουν καταγραφεί 37 είδη που ανήκουν στο γένος *Enterococcus* τα οποία είναι: *E. avium*, *E. devriesei*, *E. gilvus*, *E. malodoratus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. cecorum*, *E. columba*, *E. dispar*, *E. asini*, *E. canintestini*, *E. hermannienseis*, *E. pallens*, *E. faecalis*, *E. caccae*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. silesiacus*, *E. termitis*, *E. ureasiticus*, *E. quebecensis*, *E. faecium*, *E. canis*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. phoeniculicola*, *E. ratti*, *E. villorum*, *E. thailandicus*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. saccharolyticus*, *E. aquimarinus*, *E. camellia*, *E. italicus*, *E. sulfurous* (Franz et al. 2006, Franz and Holzappel, 2006). Τα δύο πιο συνηθισμένα είδη είναι το *E. faecium* και το *E. faecalis* (Chenoweth and Schaberg, 1990).

1.3.1.2) ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΑ ΑΠΟΘΗΚΩΝ

Τελευταία, η παρουσία Εντερόκοκκων στα έντομα αποθηκών έχει τραβήξει την προσοχή πολλών επιστημόνων (Parlapani et al. 2019). Οι Εντερόκοκκοι δεν είναι τροφιμογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί, και η επιμόλυνση των τροφίμων γίνεται εξαιτίας των εντόμων που δρουν ως φορείς. Οι Channaiah et al. (2010) κατέγραψαν 154 απομονώσεις Εντερόκοκκων από 95 έντομα αποθηκών. Οι Larson et al. (2008) και οι Parlapani et al. (2019) βρήκαν ότι τα πιο κοινά είδη εντόμων αποθηκών είναι

φορείς Εντερόκοκκων, οι οποίοι παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά. Οι Guzman, Prieto et al. (2016) υποστηρίζουν ότι οι συμβιωτικοί κλώνοι Εντερόκοκκων που προέρχονται από τις διάφορες περιβαλλοντικές πηγές, συμπεριλαμβανομένων και των εντόμων, μπορούν να εξελιχθούν σε νοσοκομιακούς κλώνους, προκαλώντας ασθένειες και ταυτόχρονα να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

1.3.1.3) ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

Οι Εντεροκοκκοί, και πιο συγκεκριμένα κάποια στελέχη των ειδών *E. faecium* και το *E. faecalis* χρησιμοποιούνται συχνά στη βιομηχανία τροφίμων ως προβιοτικά (ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες παρέχουν όφελος στην υγεία του ξενιστή). Οι λόγοι που προστίθενται στις τροφές είναι η αντιμετώπιση της διάρροιας, το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, η μείωση της χοληστερόλης κλπ. (Franz et al. 2011).

1.3.1.4) ΕΝΤΕΡΟΚΟΚΚΟΙ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Παρά το γεγονός ότι κάποια είδη θεωρείται ότι έχουν θετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, έχει αποδειχθεί ότι οι Εντερόκοκκοι είναι υπεύθυνοι για την πρόκληση ασθενειών. Σύμφωνα με έρευνες, οι Εντερόκοκκοι προκαλούν συχνά πολλά σοβαρά νοσήματα στον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα, το *E. faecium* (συχνότητα περίπου 10% των μολύνσεων) μαζί με τον *E. faecalis* (περίπου 80-90% των μολύνσεων) θεωρούνται από τους πιο κοινούς νοσοκομιακούς παθογόνους καθώς συνδέονται με διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο πχ. βακτηραιμία, ενδοκαρδίτιδα, ουρολοίμωξη κλπ. (Top et al. 2008). Σύμφωνα με μια έρευνα (Giraffa, 2002), από τα

είδη των Εντερόκοκκων που προκαλούν ασθένειες, το *E. faecalis* είναι το πιο κοινό, ενώ το *E. faecium* φαίνεται να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Η ανθεκτικότητα των Εντερόκοκκων στα αντιβιοτικά προβληματίζει σε μεγάλο βαθμό το χώρο της επιστημονικής κοινότητας καθώς ολοένα και αυξάνεται τα τελευταία χρόνια.

1.4) ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ENTEROBACTERIACEAE

Μια άλλη κατηγορία μικροοργανισμών, γνωστή για ασθένειες που προκαλούνται στον άνθρωπο (καθώς και σε άλλα ζώα και φυτά) αλλά και άρρηκτα συνδεδεμένη με τα τρόφιμα, αποτελούν κάποια είδη/στελέχη της οικογένειας Enterobacteriaceae. Τα Enterobacteriaceae είναι Gram-αρνητικά βακτήρια τα οποία δεν σχηματίζουν σπόρια. Δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο θερμοκρασιακό εύρος το οποίο να ευνοεί την ανάπτυξη τους και να ισχύει για όλα τα είδη, καθώς κάποια είναι ψυχρόφιλα, κάποια θερμόφιλα και κάποια μεσόφιλα. Γενικά, μπορούν να αναπτυχθούν σε περιβάλλοντα με pH από 3,8 έως 9,0. Ορισμένα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες υγιεινής καθώς και ως δείκτες μόλυνσης των επεξεργασμένων τροφίμων κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας τους. Τα είδη *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp* και *Salmonella spp.* είναι αυτά που εντοπίζονται συχνά στα κρέατα (Al-Mutairi, 2011).

Κάποια από τα πιο γνωστά είδη Έντεροβακτηρίων που συναντώνται συχνά στα τρόφιμα αναφέρονται ονομαστικά παρακάτω:

- *Citrobacter* sp.
- *Enterobacter* sp.
- *Klebsiella* sp.

- *Salmonella* sp.
- *Shigella* sp.
- *Yersinia* sp.
- *Escherichia* sp.
- *Proteus* sp.
- *Staphylococcus* sp.

Έχει αναφερθεί ότι τα *S. oryzae*, *T. castaneum* και *O. surinamensis* μπορεί να είναι φορείς του μικροοργανισμού *Salmonella montevideo* (Crumrine et al., 1971). Το βακτήριο *Enterobacter cloacae* είναι από τους πιο κοινούς παθογόνους μικροοργανισμούς, υπεύθυνους για πολλές μολύνσεις. Συγκεκριμένα, προκαλεί βακτηριαμία, μνηγγίτιδα, μόλυνση στο αίμα, λοιμώξεις στο ουροποιητικό, μόλυνση σε πληγές, στο δέρμα, στο κεντρικό νευρικό σύστημα και στο γαστρεντερικό σύστημα (Lambert-Zechovsky et Al., 1992; Sanders and Sanders, 1997; Dijk et Al., 2002; Kaminska et al., 2002; Liu et al., 2003; Liu et al., 2004; Haryani et al, 2008), ενώ έχει αποδειχθεί ότι είναι ανθεκτικό στα αντιβιοτικά (πχ. αμπικιλίνη, αμοξικιλίνη). Συναντάται σε κάθε είδους περιβάλλον (χώμα, νερό, φυτά, τρόφιμα) και ζει στο γαστρεντερικό σύστημα ζώων και εντόμων. Παρόμοια δράση έχει ο μικροοργανισμός *Enterobacter aerogenes*, ο οποίος επίσης ζει στο έντερο του ανθρώπου και άλλων ζώων, προκαλεί διαταραχές στην υγεία και παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (πχ. χλωραμφενικόλη, τετρακυκλίνη). Σύμφωνα με έρευνα (Abubakar et al, 2018) το είδος *S. oryzae* είναι σε πολλές περιπτώσεις υπεύθυνο για την διάδοση των *Enterobacter* sp. στα προϊόντα που προσβάλλει. Το είδος *Staphylococcus aureus* εντοπίζεται σε τρόφιμα τόσο ζωικής (κρέατα,

γαλακτοκομικά) όσο και φυτικής προέλευσης (σαλάτες) και με τις τοξίνες που παράγει προκαλεί τροφικές δηλητηριάσεις, χωρίς όμως ο κίνδυνος για την ανθρώπινη υγεία να είναι μεγάλος. Το βακτήριο *Escherichia coli* αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της υγιούς λειτουργίας του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπινου οργανισμού. Ωστόσο, κάποια στελέχη του *E. coli* έχουν παθογόνο δράση και μπορούν να γίνουν η αιτία για την πρόκληση διάρροιας, ουρωλοίμωξης, νεφρικής ανεπάρκειας κλπ. Το πεπτικό σύστημα των εντόμων αποτελεί ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη όλων των προαναφερθέντων βακτηρίων (Dillon and Dillon, 2004).

1.5) ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΕΝΤΟΜΩΝ ΑΠΟΘΗΚΩΝ

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση των εντόμων αποθηκών, και την εξασφάλιση της καλύτερης δυνατής ποιότητας των τροφίμων που προορίζονται προς κατανάλωση από τον άνθρωπο. Για την αντιμετώπιση του *S. oryzae* για παράδειγμα, και σύμφωνα με τους Maliki et al (2019), χρησιμοποιούνται παρασιτοκτόνα. Τα προϊόντα δηλαδή ψεκάζονται με παρασιτοκτόνα κατά την αποθήκευσή τους, μια μέθοδος που είναι επικίνδυνη για την υγεία του ανθρώπου αλλά και για το περιβάλλον. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν την χρήση ζωντανών οργανισμών, τα οποία είναι φυσικοί εχθροί του *Sitophilus oryzae*, για τη μείωση του πληθυσμού τους στα αποθηκευμένα τρόφιμα. Μια πιο ασφαλής και αποτελεσματική μέθοδος για την αντιμετώπιση του *Sitophilus oryzae* είναι η θέρμανση του προϊόντος με ραδιοκύματα. Σε εργασία των Vearasilp et al (2015) αναφέρεται ότι η χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου αποφέρει 100% θνησιμότητα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του είδους στο ρύζι, χωρίς να επηρεάζει το χρώμα και την ποιότητα του προϊόντος. Σύμφωνα με τους Gharsan et al (2018), η χρήση των

αιθερίων ελαίων από τα φυτά *Lavandula angustifolia* Mill., *Allium cepa* L., *Carum carvi* [Lindl] H. Wolff είναι αποτελεσματική μέθοδος για την εξολόθρευση των *O. surinamensis* και *T. castaneum*, καθώς επιφέρουν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας, και είναι περισσότερο ασφαλή από ότι τα παρασιτοκτόνα. Για την αντιμετώπιση του *T. confusum*, οι Thompson και Reddy (2018) προτείνουν την χρήση του βακτηρίου *Saccharopolyspora spinosa* και του μύκητα *Beauveria bassiana*, σε συνδυασμό με την έκθεση του είδους σε χαμηλή θερμοκρασία (8°C), καθώς σε πείραμα που πραγματοποίησαν η θνησιμότητα των εντόμων έφτασε το 80% και για τους δύο εξεταζόμενους μικροοργανισμούς.

1.6) ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση, απαρίθμηση ή/και απομόνωση των κυριότερων μικροοργανισμών που απαντώνται σε διαφορετικά στελέχη τεσσάρων ειδών εντόμων αποθηκών όπως τα *Sitophilus oryzae*, *Orizaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* και *Tribolium confusum*. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε για τους Εντερόκοκκους και τα *E. coli/coliform* με σκοπό την περαιτέρω ταυτοποίηση τους.

2) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1) ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Δύο παρτίδες (περίπου από εκατό άτομα η καθεμία) των ειδών *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *T. confusum* και *T. castaneum* μεταφέρθηκαν από το Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας

Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, εντός πλαστικών φιαλιδίων, σε θερμοκρασία 25°C και σχετική υγρασία 65%, χωρίς να εκτεθούν στο φως. Κατά την παραμονή τους στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, τα *S. oryzae* τρέφονταν με σπόρους σίτου, τα *T. confusum* και *T. castaneum* με αλεύρι σίτου και τα *O. surinamensis* με νιφάδες βρώμης.

2.2) ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Όλα τα μικροβιολογικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς του πειράματος προέρχονταν από τη LAB M (Lancashire, UK). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- TSA (Tryptone Soy Agar)
- Kanamycin aesculin azide agar
- Harlequin *E. coli*/coliform Medium
- Slanetz and Bartley Medium
- R. B. C. (Rose Bengal Chloramphenicol Agar)
- V. R. B. G. A. (Violet Red Bile Glucose Agar)

2.2.1) TSA (Tryptone Soy Agar)

Το TSA είναι ένα μη επιλεκτικό υλικό το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη όλων σχεδόν των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν στα εργαστηριακά υλικά. Το συγκεκριμένο υλικό χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (O.M.X). Για να παρασκευαστούν 1000ml TSA χρειάζονται:

Tryptone	15,0 g
----------	--------

Soy Peptone	5,0 g
Sodium Chloride	5,0 g
Agar	12,0 g

Διαδικασία παρασκευής: 37g του θρεπτικού υλικού ζυγίζονται και προστίθενται σε φιάλη χωρητικότητας 1000ml. Στη συνέχεια προστίθενται 1000ml απιονισμένο νερό. Έπειτα, η φιάλη τοποθετείται στο αυτόκαυστο για αποστείρωση, όπου παραμένει για 15 λεπτά στους 121°C. Μόλις τελειώσει η αποστείρωση, το υλικό μοιράζεται στα τριβλία Πετρί.

2.2.2) Kanamycin

Το Kanamycin είναι ένα επιλεκτικό υλικό, ιδανικό για την ανάπτυξη των Εντερόκοκκων. Για την Παρασκευή 1000ml Kanamycin, χρειάζονται:

Tryptone	20,0g
Yeast Extract	5,0g
Sodium Chloride	5,0g
Sodium Citrate	1,0g
Aesculin	1,0g
Ferric ammonium citrate	0,5g
Sodium Azide	0,15g
Agar	10,0g

Διαδικασία παρασκευής: 42,6g από το υλικό ζυγίζονται και στη συνέχεια διαλύονται σε 1000ml απιονισμένο νερό. Έπειτα το υλικό τοποθετείται σε συσκευή

θέρμανσης, και αφήνεται μέχρι να φτάσει σε σημείο βρασμού. Ακολουθεί η αποστείρωσή του, η οποία γίνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, το υλικό διανέμεται ισόποσα στα τριβλία Πετρί.

2.2.3) Harlequin *E. coli*/coliform medium

Το Harlequin χρησιμοποιείται για την ταυτόχρονη απαρίθμηση των αποικιών του *E. coli* και των υπόλοιπων κολοβακτηριδίων. Οι διάφοροι τύποι αποικιών διαχωρίζονται εύκολα με το μάτι, με τις αποικίες του *E. coli* να παίρνουν μια γαλαζοπράσινη απόχρωση, ενώ αυτές των υπολοίπων κολοβακτηριδίων παίρνουν ένα ροζ χρώμα.

Προκειμένου να παρασκευαστούν 1000ml Harlequin, απαιτούνται:

Tryptone	20,0g
Bile salts No.3	1,5g
X-glucuronide	0.075g
Magenta-β-galactoside	0.1g
Agar	15.0g

Διαδικασία παρασκευής: Ζυγίζονται 36,6g από το υλικό και τοποθετούνται σε φιάλη, στην οποία προστίθενται 1000ml απιονισμένο νερό. Έπειτα το μίγμα αφήνεται να μουλιάσει για περίπου 10 λεπτά. Στη συνέχεια ανακατεύεται έως ότου να διαλυθεί. Ακολουθεί η αποστείρωση, η οποία γίνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά την αποστείρωση, μεταφέρεται στο υδατόλουτρο, όπου και αφήνεται μέχρι η θερμοκρασία του να πέσει στους 47°C. Τέλος, το υλικό μοιράζεται στα τριβλία.

2.2.4) Slanetz & Bartley Medium

Πρόκειται για επιλεκτικό υλικό το οποίο χρησιμοποιείται στο εργαστήριο για την ανάπτυξη αποικιών Εντερόκοκκων. Για να παρασκευαστούν 1000ml από το υλικό, χρειάζονται:

Tryptose	20.0g
Yeast Extract	5.0g
Dextrose (Glucose)	2.0g
Disodium Hydrogen Phosphate	4.0g
Sodium Azide	0.4g
2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride	0.1g
Agar	15.0g

Διαδικασία παρασκευής: Σε μια φιάλη των 1000ml προστίθενται 46.5g από το υλικό (αφού πρώτα ζυγιστούν) και 1000ml απιονισμένο νερό. Μετά, το υλικό τοποθετείται σε συσκευή θέρμανσης και αφήνεται μέχρι να βράσει και να ομογενοποιηθεί. Το Slanetz δεν μπαίνει στην αποστείρωση. Μεταφέρεται κατευθείαν στο υδατόλουτρο, όπου και αφήνεται μέχρι η θερμοκρασία του να φτάσει τους 45-50°C. Μόλις γίνει αυτό, με προσεκτικές κινήσεις μοιράζεται ισόποσα στα τριβλία.

2.2.5) R. B. C. (Rose Bengal Chloramphenicol Agar)

Το R.B.C. είναι ένα επιλεκτικό υλικό, και αποτελεί ιδανικό θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων. Το R.B.C., σε 1000ml περιέχει:

Dextrose	10.0g
Soy Peptone	5.0g
Monopotassium Phosphate	1.0g
Magnesium Sulfate	0.5g
Chloramphenicol	0.1g
Rose Bengal	0.05g
Agar	15.0g

Διαδικασία παρασκευής: 31.65g από το υλικό ζυγίζονται και προστίθενται σε φιάλη των 1000ml, μαζί με 1000ml απιονισμένο νερό. Έπειτα το υλικό τοποθετείται σε συσκευή θέρμανσης, όπου αφήνεται μέχρι να βράσει και να διαλυθεί τελείως. Στη συνέχεια, η φιάλη που περιέχει το υλικό μπαίνει στην αποστείρωση για 15 λεπτά στους 121°C. Ακολουθεί η μεταφορά του υλικού στο υδατολουτρο. Εκεί παραμένει μέχρι να πέσει στους 40-45°C, ενώ τελευταίο βήμα είναι το μοίρασμα στα τριβλία.

2.2.6) V. R. B. G. A. (Violet Red Bile Glucose Agar)

Το V.R.B.G.A. είναι επιλεκτικό υλικό και ευνοεί την ανάπτυξη βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae. Σε 1000ml, περιέχονται:

Yeast Extract	3.0g
Balanced Peptone	7.0g
Sodium Chloride	5.0g
Bile Salts	1.5g
Glucose	10.0g
Neutral red	0.03g
Crystal violet	0.002g
Agar	12.0g

Διαδικασία παρασκευής: Τα παραπάνω υλικά ζυγίζονται και τοποθετούνται σε φιάλη των 1000ml, η οποία συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό. Μετά, το υλικό μεταφέρεται σε συσκευή βρασμού, όπου και αφήνεται μέχρι να ομογενοποιηθεί και τέλος, μοιράζεται στα τριβλία.

2.3) ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

Τα έντομα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο μέσα σε πλαστικά φιαλίδια. Για να μην υπάρχουν απώλειες κατά την εξαγωγή τους από τα φιαλίδια κατά τη διάρκεια της κάθε δειγματοληψίας, τα φιαλίδια αρχικά τοποθετούνταν στο ψυγείο για 20-30 λεπτά. Έπειτα, η κάθε παρτίδα (περίπου 100 άτομα, συνολικού βάρους 1g) μεταφερόταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε σακούλες Stomacher, όπου προστίθονταν 9ml M.R.D. (Maximum Recovery Diluent - NaCl 0,85% και 0,1% Peptone). Ακολουθούσε η ομογενοποίηση για 2-3 λεπτά με τη χρήση συσκευής τύπου Stomacher (Bug Mixer, Interscience, London, UK). Ακολούθησε η μέθοδος των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων των δειγμάτων, με τη μεταφορά 0.1ml από κάθε αραιώση στον επόμενο

δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννιαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου. Έπειτα, ακολούθησε ο εμβολιασμός του εναιωρήματος στα θρεπτικά υλικά. Για τα υλικά TSA, Kanamycin, Harlequin, Slanetz & Bartley και RBC χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης, όπου λαμβάνονταν 0,1 ml από το εναιώρημα. Για το υλικό V.R.B.G.A. χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ενσωμάτωσης, όπου λαμβάνονταν 1 ml από το εναιώρημα που περιείχε ο κάθε δοκιμαστικός σωλήνας. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί που απαριθμήθηκαν ήταν:

- Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X) σε TSA, μετά από επώαση για 48-72 ώρες στους 25°C.
 - Εντερόκοκκοι σε Kanamycin, μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες.
 - *E.coli*/coliforms σε Harlequin, μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες.
 - Εντερόκοκκοι σε Slanetz & Bartley medium, μετά από επώαση στους 25°C για 24-48 ώρες.
 - Ζύμες και μύκητες σε R.B.C., μετά από επώαση στους 25°C για 24-48 ώρες.
- Βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae σε V.R.B.G.A., μετά από επώαση στους 25°C για 24-48 ώρες

Για κάθε μία παρτίδα εντόμων οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως mean log cfu/g.

2.4) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ MALDI-TOF MS

Για να γίνει η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών, συλλέχθηκε περίπου το 50% των αποικιών που είχαν αναπτυχθεί στα υλικά Kanamycin και Harlequin και είχαν

επωαστεί στους 37°C για 24 ώρες. Πριν την ταυτοποίηση, οι αποικίες αυτές επανακαλλιεργήθηκαν σε TSA στους 37°C για 24 ώρες.

Αρχικά, 300μl Hplc-grade water διανεμήθηκαν σε σωλήνες erpendorf. Στη συνέχεια, 5-10mg από την κάθε αποικία μεταφέρονταν από τα τριβλία στους σωλήνες erpendorf με τη χρήση μεταλλικού κρίκου και ακολουθούσε ομογενοποίηση του περιεχομένου των σωληνών erpendorf με τη χρήση του Vortex, για περίπου 1 λεπτό. Έπειτα, στον κάθε σωλήνα προστίθονταν 900μl καθαρής αιθανόλης και ακολουθούσε εκ νέου ομογενοποίηση του περιεχομένου των σωληνών με Vortex, για περίπου 1 λεπτό. Στη συνέχεια, γινόταν φυγοκέντρηση των σωληνών στις 13.000 rpm (επαναλήψεις το λεπτό) για 2 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης και με τη χρήση πιπέτας, το υπερκείμενο υγρό απομακρύνονταν από τους σωλήνες, με όσο το δυνατόν πιο προσεκτικές κινήσεις για να μην προκληθεί ζημιά στα pellets στο κάτω μέρος του σωλήνα. Στη συνέχεια οι σωλήνες έμπαιναν ξανά στη φυγόκεντρο, για 2 λεπτά στις 13.000 rpm, και επαναλαμβανόταν η διαδικασία της αφαίρεσης του υπερκείμενου υγρού με την πιπέτα. Έστερα, οι σωλήνες αφήνονταν ανοιχτοί πάνω στον εργαστηριακό πάγκο, σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να αποξηρανθούν και να απομακρυνθεί η υπολειπόμενη αιθανόλη. Επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη 180μl H₂O και 820μl 85% Formic Acid σε καθαρό σωλήνα erpendorf και η ομογενοποίηση με Vortex, για 1 λεπτό περίπου, έτσι ώστε να δημιουργηθεί υδατικό διάλυμα 70% Formic acid. Μετά, 1-80μl από το διάλυμα 70% Formic acid, προστίθονταν στα pellets, τα οποία ανακατεύονταν αρχικά με τη χρήση πιπέτας και μετά με τη χρήση Vortex για 1 λεπτό. Ανάλογη ποσότητα 100% ακετονυτριλίου προστίθονταν στους σωλήνες και ακολουθούσε ανάδευση. Οι σωλήνες μεταφέρονταν ξανά για φυγοκέντρηση, για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές.

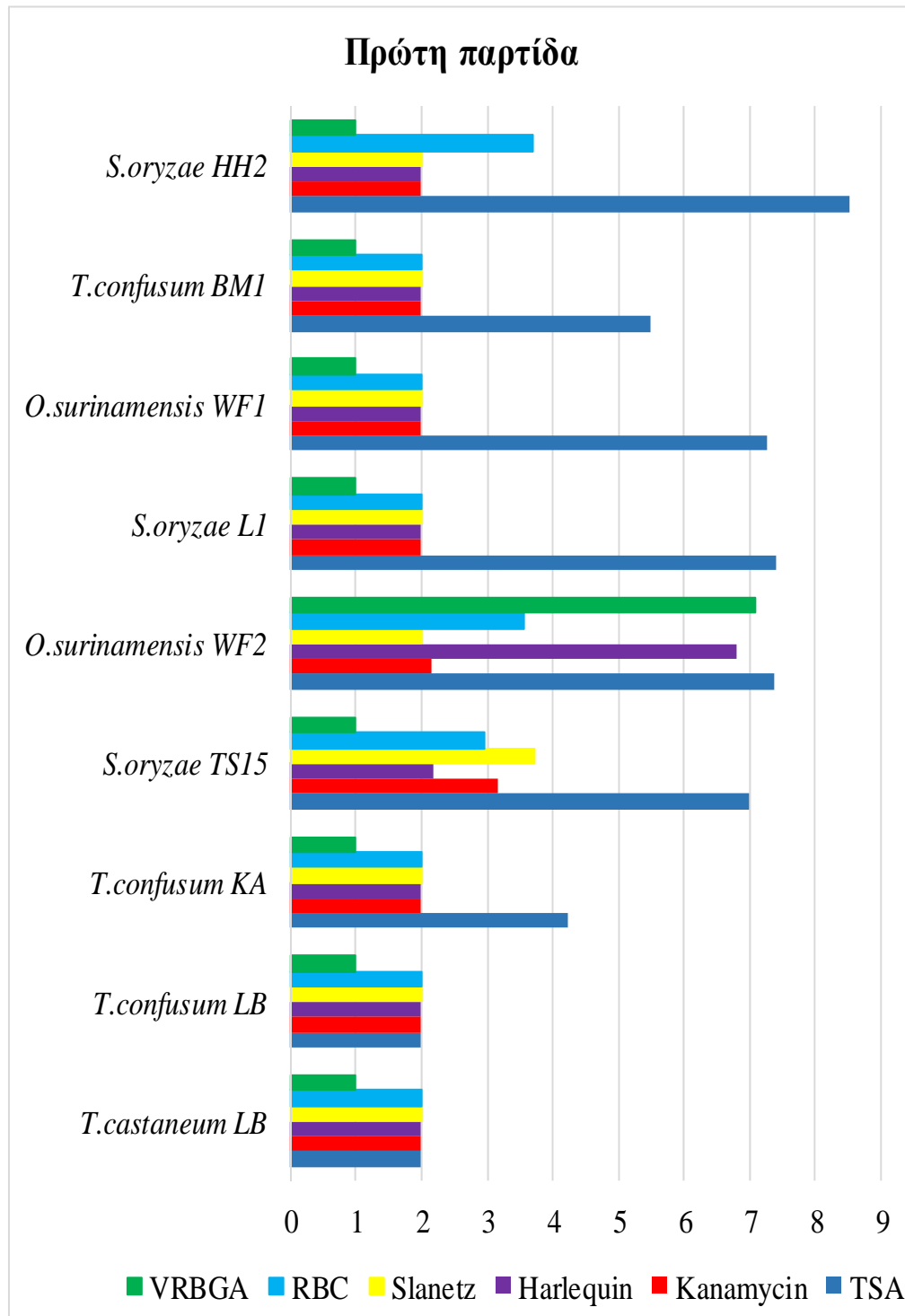
Τα τελικά βήματα της προετοιμασίας των δειγμάτων, καθώς και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με τη MALDI-TOF MS, πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, από εξειδικευμένους επιστήμονες.

3) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1) ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ ΤΩΝ ENTOMΩΝ

Στα σχήματα 3.1 και 3.2 δίνονται οι τιμές των πληθυσμών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TSA), των Εντερόκοκκων στα υλικά Kanamycin και Slanetz & Bartley, των *E.coli* και των κολοβακτηριδίων που αναπτύχθηκαν στο Harlequin, των Enterobacteriaceae στο V.R.B.G.A., και των ζυμών και μυκήτων (RBC) για τα διαφορετικά είδη εντόμων της πρώτης (Σχ 3.1) και της δεύτερης (Σχ 3.2) παρτίδας, αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.1, η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα για τα είδη *S. oryzae* HH2, *S. oryzae* L1 και *S. oryzae* TS15 έφτασε τους 8,53, 7,40 και 7,00 log cfu/g αντίστοιχα. Στα *O. surinamensis* WF1 και *O. surinamensis* WF2 οι πληθυσμοί έφτασαν τους 7,26 και 7,39 log cfu/g. Τα *T. confusum* BM1 και *T. confusum* KA είχαν τιμές 5,48 και 4,23 αντίστοιχα, ενώ οι τιμές των πληθυσμών για το *T. confusum* LB και *T. castaneum* LB ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων.

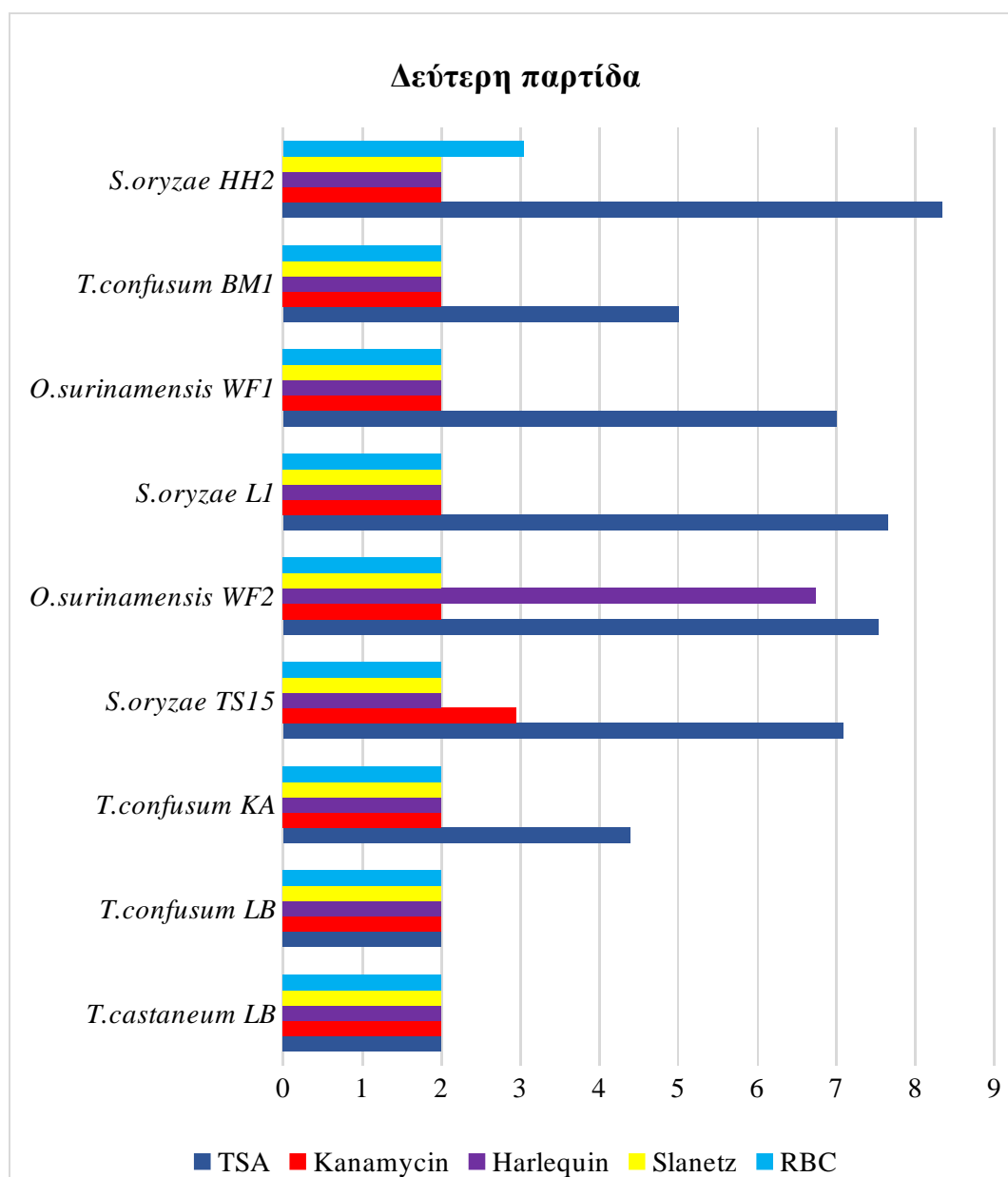


Σχήμα 3.1 Μικροβιακοί πληθυσμοί σε log cfu/g που μετρήθηκαν στα υλικά TSA, Kanamycin, Harlequin, Slanetz RBC και V.R.B.G.A. για τα έντομα της πρώτης παρτίδας.

Στις μετρήσεις για Εντερόκοκκους στο Kanamycin, στο *S. oryzae* TS15 αναπτύχθηκε πληθυσμός 3,17 λογαρίθμων ενώ στο *O. surinamensis* WF2 2,15 λογαρίθμων. Οι πληθυσμοί των υπολοίπων μικροοργανισμών στο συγκεκριμένο υλικό ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων. Το *S. oryzae* TS15 ήταν το μόνο έντομο το οποίο έδωσε αποτελέσματα στο Slanetz & Bartley, με την τιμή του πληθυσμού των Εντερόκοκκων να φτάνει τους 3,73 log cfu/g. Όσον αφορά τους πληθυσμούς coliforms, το *O. surinamensis* WF2 είχε το μεγαλύτερο πληθυσμό (6,80 log cfu/g), ενώ το *S. oryzae* TS15 είχε πληθυσμό 2,19 λογαριθμούς. Σε κανένα από τα είδη δεν εντοπίστηκαν *E. coli* Τα υπόλοιπα έντομα είχαν πληθυσμούς μικρότερους του ορίου ανίχνευσης.

Για τα έντομα της δεύτερης παρτίδας (Σχ. 3.2), η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα για τα είδη *S. oryzae* HH2, *S. oryzae* L1 και *S. oryzae* TS15 έφτασε τους 8,53, 7,40 και 7,00 log cfu/g αντίστοιχα. Στα *O. surinamensis* WF1 και *O. surinamensis* WF2 οι πληθυσμοί έφτασαν τους 7,26 και 7,39 log cfu/g. Τα *T. confusum* BM1 και *T. confusum* KA είχαν τιμές 5,48 και 4,23 αντίστοιχα, ενώ οι τιμές των πληθυσμών για το *T. confusum* LB και *T. castaneum* LB ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων.

Στις μετρήσεις για Εντερόκοκκους στο Kanamycin, στο *S. oryzae* TS15 αναπτύχθηκε πληθυσμός 2,95 λογαρίθμων. Οι πληθυσμοί των υπολοίπων μικροοργανισμών στο συγκεκριμένο υλικό ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Όσον αφορά τους πληθυσμούς coliforms, το *O. surinamensis* WF2 είχε το μεγαλύτερο πληθυσμό (6,74 log cfu/g). Ωστόσο, δεν εντοπίστηκαν *E. coli*.



Σχήμα 3.2 Μικροβιακοί πληθυσμοί σε log cfu/g που μετρήθηκαν στα υλικά TSA, Kanamycin, Harlequin, Slanetz RBC και V.R.B.G.A. για τα εντομα της δεύτερης παρτίδας.

Τα υπόλοιπα εντομα είχαν πληθυσμούς μικρότερους του ορίου ανίχνευσης. Τέλος, τα είδη *S. oryzae* HH2 εμφάνισε πληθυσμό ζυμών και μυκήτων με τιμή στο RBC να είναι 3,08 log cfu/g.

3.2) Ταυτοποίηση βακτηρίων

Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζονται οι μικροοργανισμοί που ταυτοποιήθηκαν μετά την ανάλυση με MALDI-TOF MS, οι οποίοι απομονώθηκαν από τα διαφορετικά είδη, και ο αριθμός των αποικιών που απομονώθηκαν από τα επιλεκτικά υλικά Kanamycin και Harlequin.

Πίνακας 3.1 Ταυτότητα των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα διαφορετικά είδη, και ο αριθμός των αποικιών που απομονώθηκαν από τα υλικά.

Όνομα μικροοργανισμού	Είδος εντόμου	Μικροβιολογικό υλικό	Αριθμός αποικιών που απομονώθηκαν
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>S. Oryzae</i> TS15	Kanamycin	2
	<i>S. Oryzae</i> L1	Kanamycin	3
<i>Enterococcus phoeniculicola</i>	<i>O. surinamensis</i>	Kanamycin	2
	WF2		
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>O. Surinamensis</i>	Harlequin	9
	WF2		

Σύμφωνα με τον πίνακα 3.1, απομονώθηκαν 2 αποικίες από το Kanamycin για το έντομο *S. oryzae* TS15. Οι αποικίες αυτές πριν την ανάλυση με MALDI-TOF, όπως προαναφέρθηκε, επανακαλλιεργήθηκαν σε TSA. Η ανάλυση έδειξε την παρουσία του μικροοργανισμού *Enterococcus faecium*. Ο ίδιος μικροοργανισμός ταυτοποιήθηκε μετά το τέλος της ανάλυσης και για το είδος *S. oryzae* L1, για το οποίο απομονώθηκαν 3 αποικίες από το Kanamycin. Για το είδος *O. surinamensis* WF2,

απομονώθηκαν 2 αποικίες από το Kanamycin, και η MALDI-TOF ανίχνευσε το μικροοργανισμό *Enterococcus phoeniculicola*. Τέλος, για το *O. surinamensis* WF2, μετά από την απομόνωση 9 αποικιών από το Harlequin και την ανάλυση με MALDI-TOF, ανιχνεύτηκε ο μικροοργανισμός *Enterobacter cloacae*.

4) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα έντομα αποθηκών (stored product insects) είναι μια ευρεία ομάδα εντόμων τα οποία εισέρχονται σε αποθηκευμένα προϊόντα και είναι υπεύθυνα για την μετάδοση παθογόνων μικροοργανισμών στα προϊόντα αυτά. Τα έντομα συναντώνται σε σπίτια, αποθήκες, εστιατόρια, φούρνους, εργοστάσια, φάρμες, σιλό. Η επαφή των προσβεβλημένων τροφίμων με τον άνθρωπο μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στην υγεία του. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση, απαρίθμηση ή/και απομόνωση των κυριότερων μικροοργανισμών που απαντώνται σε διαφορετικά στελέχη τεσσάρων ειδών εντόμων αποθηκών όπως τα *Sitophilus oryzae*, *Orizaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* και *Tribolium confusum*. Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε για τους Εντερόκοκκους και τα *E. coli*/coliform με σκοπό την περαιτέρω ταυτοποίηση τους με MALDI-TOF MS.

Ο πληθυσμός των Εντερόκοκκων συνήθως κυμαίνεται από 2.0 έως 4.0 log cfu/g στα έντομα αποθηκών (Larson et al. 2008). Πράγματι στην παρούσα πτυχιακή εργασία βρέθηκε ότι οι πληθυσμοί των Εντερόκοκκων όντως κυμαίνονται σε αυτό το εύρος. Οι διαφορές στο μικροβιακό προφίλ που παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφορετικών εντόμων πιθανόν συνδέονται με την διαφορετικού τύπου τροφή που καταναλώνει το κάθε είδος. Σε εργασία τους οι Channaiah et al. (2010) βρήκαν ότι στα είδη *T. castaneum* και *T. confusum* αναπτύχθηκαν Εντερόκοκκοι έπειτα από επώαση στους

37°C για 48 ώρες. Οι Larson et al (2008) σε εργασία τους βρήκαν ότι το είδος *T. castaneum* είχε φορτίο Εντερόκοκκων της τάξης των 1.9×10^4 cfu/άτομο, ενώ το *T. confusum* είχε φορτίο $1,2 \times 10^1$ cfu/άτομο. Οι Beckel et al (2006) εντόπισαν το μικροοργανισμό *E. faecalis* στο *O. surinamensis*.

Τα είδη *E. faecium* και *E. faecalis* καθώς και τα *Enterobacter* spp., είναι από τους πιο κύριους παθογόνους στις Ηνωμένες Πολιτείες (Rice, 2008). Ο *E. faecium* έχει εντοπιστεί σε έντομα αποθηκών (Channaiah et al. 2010; Larson et al. 2008). Έπειτα από την ανάλυση με Maldi-tof MS, διαπιστώθηκε η παρουσία των μικροοργανισμών *E. faecium* στο *S. oryzae* και *E. phoeniculicola* και *E. cloacae* στο *O. surinamensis*. Η προσβολή του ανθρώπου από τον *E. faecium* είναι πιθανό να έχει δυσάρεστες επιπτώσεις στην υγεία του. Ο *E. faecium* είναι ικανός να προκαλέσει βακτηραιμία, η οποία σε κάποιες περιπτώσεις οδηγεί σε θάνατο (Noskin et al. 1995). Αν και ο *E. faecalis* είναι ο πιο κοινός μικροοργανισμός-αιτία πρόκλησης εντεροκοκκικής ενδοκαρδίτιδας, η παρουσία του *E. faecium* είναι πιθανή αιτία πρόκλησης της συγκεκριμένης ασθένειας. Η πάθηση αυτή εμφανίζεται κυρίως σε γηραιότερα άτομα (Anderson et al. 2004; McDonald et al. 2005; Wilson et al. 1984). Οι Hidron et al. (2008) επισημαίνουν ότι τις τελευταίες 2 δεκαετίες ο *E. faecium* αποτελεί κύρια αιτία εντεροκοκκικών παθήσεων με ανθεκτικότητα σε ένα ευρύ φάσμα αντιβιοτικών. Ο *E. phoeniculicola*, ο οποίος ανιχνεύτηκε στο *S. oryzae*, έχει εντοπιστεί στο είδος *Phoeniculus purpureus* (Law-Brown & Meyers, 2003). Ωστόσο, το συγκεκριμένο ζώο είναι πτηνό. Δεν βρέθηκε στη βιβλιογραφία συσχέτιση του *E. phoeniculicola* με τα έντομα αποθηκών. Σύμφωνα μάλιστα με τους Byarpanahalli et al. (2012) ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός δεν έχει παθογόνο δράση στον άνθρωπο. Ο τρίτος μικροοργανισμός που ταυτοποιήθηκε έπειτα από την ανάλυση με τη Maldi-tof MS, ο

E. cloacae, είναι ικανός να βλάψει την υγεία του ανθρώπου. Οι John et al. (1982) υποστηρίζουν ότι ο *E. cloacae* ήταν υπεύθυνος για την πρόκληση του 4,5% των περιπτώσεων βακτηριαμίας σε ένα νοσοκομείο στις Η.Π.Α., το 1978. Ο *E. cloacae* προσβάλλει και προκαλεί λοιμώξεις σε ασθενείς με καψίματα στο δέρμα, σε καρκινοπαθείς και σε άτομα με κατεσταλμένο ανοσοποιητικό. Συχνά εξαιτίας του συγκεκριμένου μικροοργανισμού προκαλούνται λοιμώξεις στον πνεύμονα και ουρολοιμώξεις (Musil et al. 2010). Ο *E. cloacae* μάλιστα είναι ανθεκτικός στη δράση πολλών αντιβιοτικών (Davín-Regli & Pages, 2015).

Όπως αναφέρουν σε πολύ πρόσφατη εργασία τους οι Abubakar et al (2018), είναι δύσκολη η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός των βακτηρίων που φέρουν τα έντομα αποθηκών, καθώς είναι δύσκολη η καλλιέργειά τους σε εργαστηριακές συνθήκες. Οι Colman et al (2012) υποστηρίζουν ότι λιγότερο από το 1% του μικροβιακού πληθυσμού των εντόμων αποθηκών απομονώνεται και ταυτοποιείται με την μέθοδο της καλλιέργειας. Γι αυτό και είναι περιορισμένες οι εργασίες στη βιβλιογραφία που να αναφέρονται στο μικροβιακό φορτίο των εντόμων αποθηκών. Στην ίδια εργασία, οι Abubakar et al. (2018) αναγνώρισαν βακτήρια του γένους *Enterobacter* sp. Για το είδος *S. oryzae*, χωρίς ωστόσο να υπολογίζουν την ένταση του μικροβιακού φορτίου. Δεν βρέθηκε κάποια εργασία που να συμφωνεί με την παρούσα εργασία όσον αφορά την ανάπτυξη Εντερόκοκκων στα έντομα *Sitophilus oryzae*. Οι Yoon et al (2009) υποστηρίζουν ότι η παρουσία του *S. oryzae* σε αποθηκευμένο ρύζι παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη μούχλας, και ειδικότερα των ειδών *Aspergillus candidus* και *Aspergillus niger*. Οι Kumari et al (2011) εντόπισαν ότι στο είδος *T. castaneum* έπειτα από 48 ώρες αναπτύχθηκαν πληθυσμοί μυκήτων αλλά και των βακτηρίων *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*,

Enterobacter spp. (Βακτήρια δηλαδή τα οποία ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae) χωρίς ωστόσο να προσδιορίζουν την ένταση του μικροβιακού φορτίου του είδους. Στην παρούσα εργασία, έπειτα από 48 ώρες δεν αναπτύχθηκαν ούτε πληθυσμοί μυκήτων ούτε βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae για το συγκεκριμένο έντομο. Η εργασία των Zuberi et al (1972) έδειξε ότι το είδος *T. confusum* αποτελεί φορέα Enterobacteriaceae, καθώς ανιχνεύτηκαν τα είδη *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*. Στην παρούσα εργασία δεν ανιχνεύτηκαν Enterobacteriaceae στο συγκεκριμένο έντομο.

Σύμφωνα με τα παραπάνω φαίνεται ότι υπάρχει η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα της μικροβιακής ποικιλότητας των εντόμων αποθηκών. Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς γνωστή ως Next Generation Sequencing (NGS) πιθανόν να δώσει την πλήρη εικόνα για το ποιοι πραγματικά είναι οι μικροοργανισμοί που απαντώνται στα έντομα αποθηκών λαμβάνοντας το προκαρυωτικό DNA απευθείας από το ίδιο το έντομο, αποφεύγοντας την καλλιέργεια σε τρυβλία.

5) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα έντομα αποθηκών αποτελούν έναν μόνιμο κίνδυνο για την βιομηχανία παραγωγής τροφίμων και ζωοτροφών. Για το λόγο αυτό, είναι αναγκαία η μελέτη του μικροβιακού τους φορτίου. Μετά από τις μικροβιακές απαριθμήσεις, διαπιστώθηκε ότι τα έντομα *Sitophilus oryzae* TS15, *Sitophilus oryzae* L1 και *Oryzaephilus surinamensis* WF2 αποτελούν φορείς Εντερόκοκκων. Το γεγονός ότι δεν υπάρχουν εργασίες που να επιβεβαιώνουν τη σύνδεση των συγκεκριμένων εντόμων με τους Εντερόκοκκους καθιστά αναγκαία την περαιτέρω διερεύνηση του μικροβιακού τους φορτίου. Τα *Sitophilus oryzae* TS15 και *Oryzaephilus surinamensis* WF2 αποτελούν

φορείς coliforms. Τα *Sitophilus oryzae* TS15, *Sitophilus oryzae* HH2 και *Oryzaephilus surinamensis* WF2 είναι φορείς ζυμομυκήτων. Όσον αφορά τα έντομα στα οποία δεν αναπτύχθηκαν μικροβιακοί πληθυσμοί, το γεγονός ότι οι μετρήσεις ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων δε σημαίνει ότι η παρουσία τους στα αποθηκευμένα τρόφιμα είναι ακίνδυνη. Για την αποφυγή απωλειών και τη διασφάλιση της ποιότητας των προϊόντων, είναι απαραίτητο να διαδοθούν στη βιομηχανία τροφίμων μέθοδοι για την εξολόθρευση των εντόμων-φορέων. Τέλος, εξαιτίας του μικροβιακού φορτίου που περιέχουν τα έντομα αποθηκών, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερα προσοχή στην ποιότητα των αποθηκευμένων προϊόντων που προορίζονται ως πρώτες ύλες για ιχθυοτροφές.

6) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abubakar A., Abdullah Y., Memi G. G., Mohammed S. (2018) Characterization of *Enterobacter* Spp. Isolated from the gut of Rice Weevil. *Bima Journal of Science and Technology*, 2:222-237

Agudele Higueta N.I., Huycke M.M. (2014) Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, 10:385-386

Aitken A.D. (1975). Insect travelers I-Coleoptera. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. *Technological Bulletin*, 31.

Al-Mutairi M. F. (2011) The Incidence of Enterobacteriaceae Causing Food Poisoning In Some Meat Products, *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3:116-121

Alleoni B., Ferreira W. Control of *Sitophilus zeamais* Mots., 1958 and *Sitophilus oryzae* (L., 1763) weevils (Coleoptera, Curculionidae) in stored rice grain (*Oryza Sativa* L.) with insecticide pirimiphos methyl (Actellic 500 CE). *General Session on Stored Grain Protection*, 1234-1241

Allotey J., Loeto D., Moseki P., Wale K. R., Randome I., Kgositlou M. J., Morobe I. C. (2017) Occurrence of antibiotic-resistant *Enterococci* in some insects from stored food products in Botswana. *Journal of Applied Zoological Researches*, 28:138-146

Anderson D. J., Murdoch D. R., Sexton D. J., Reller L. B., (2004) Risk factors for infective endocarditis in patients with enterococcal bacteraemia: a case-control study. *Infection*, 32:72-77

Batta Y. A. (2004) Control of rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) (Coleoptera: Curculionidae) with various formulations of *Metarhizium anisopliae*, *Crop Protection*, 23: 103-108

Baylis C., Uyttendaele M., Joosten H., Davies A. (2011) The Enterobacteriaceae and their significance to food industry. *International Life Sciences Institute*. 31-32

Beckel H., Langaro N. C., Lorini I., Lazzari S. M. N. (2006) RNA investigation of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) resistant and susceptible strains to fenitrothion insecticide. 9th International Working Conference on Stored Product Protection. 352-358

Byappanahalli M. N., Nevers M. B., Jorajkic A., Staley Z. R., Harwood V. J. (2012) *Enterococci* in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76:685–706

Champ B. R., Dyte C. E. (1976) Global Survey of pesticide susceptibility of Stored grain pests. FAO Plant Protection Science, No. 5, FAO, Rome

Channaiah L. H., Subramanyam B. McKinney L. J., Zurek L. (2010) Stored-product insects carry antibiotic-resistant and potentially virulent *enterococci*. FEMS Microbiology Ecology, 74:464-471

Chaves-López C., De Angelis M., Martuscelli M., Serio A., Paparella A., Suzzi G. (2006) Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an Artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). Journal of Applied Microbiology, 101

Chenoweth C., Schaberg D. (1990) The epidemiology of *Enterococci*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 9:80-89

Colman, D. R., Toolson, E. C. And Takacs Vesbach, C. (2012). Do diet and Taxonomy influence insect gut Bacterial communities? Molecular Ecology. 21: 5124-5137.

Crumrine M. H., Foltz V. D., Harris J. O. (1971) Transmission of *Salmonella montevideo* in Wheat by Stored-Product Insects. Applied Microbiology, 22:578-580

Dos Santos Beckel H., Lorini I., Lazzari S. M. N. (2007) Rearing method of *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) On various wheat grain granulometry. *Revista Brasileira de Entomologia*, 51:501-505

Davin-Regli A., Pagès J. M. (2015) *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; Versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, 6:392

De Graef E. M., Devriese L. A., Vancanneyt M., Baele M., Collins M. D., Lefebvre K., Swings J., Haesebrouck F. (2003) Description of *Enterococcus canis* sp. Nov. From Dogs and reclassification of *Enterococcus Porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym Of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53:1069-1074

Dijk, Y.V., Bik, E.M., Hochstenbach-Vernooji, S., Vlist, G.J.V.D., Savelkoul, P.H.M., Kaan, J.A., Diepersloot, R.J.A. (2002). Management of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal Unit using simple preventive measures. *Journal Of Hospital Infection*, 51:21-26.

Dillon R. J., Dillon V. M., (2004). The gut bacteria of insects: nonpathogenic Interactions. *Annual Review of Entomology*, 49:71-92

Erfan A. M., Marouf S. H., Rezk A. (2015) The role of lesser grain borer in transmission of pathogenic bacteria to poultry and animal feed. *Merit Research Journals*, 3:306-314

FAO/WHO (2001) Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Fisher K., Phillips C. (2009) The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococci*. *Microbiology*, 155:1749-1757

Foulquié Moreno M. R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. (2006) The role and application of *enterococci* in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106:1-24

Franz C.M.A.P., Holzapfel W. H., Stiles M. E. (1999) *Enterococci* at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47:1-24

Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., (2006) The enterococci. Motarjemi, Y., Adams, M. (Eds.), *Emerging Foodborne Pathogens*. Woodhead Publishing, pp. 557–613.

Franz C.M.A.P., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., Gálvez A. (2011) *Enterococci* as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151:125-140.

Gharsan F., Jubara N., Alghamdi L., Almakady Z., Bansdwh E. (2018) Toxicity of Five Plant Oils to Adult *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). Florida Entomologist, 101:592-596

Giraffa G. (2002) *Enterococci* from Foods. FEMS Microbiology Reviews, 26:163-171

Giraffa G., Carminati D., Neviani E. (1997) *Enterococci* Isolated 'from Dairy Products: A Review of Risks and Potential Technological Use. Journal of Food Protection, 60:732-738

Gołębiowska Z. (1969) The Feeding and Fecundity of *Sitophilus Granarius* (L.), *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.) in Wheat Grain. Journal of Stored Product Research, 5:143-155

Guzman Prieto A. M., van Schalk W., Rogers M. R., Coque T. M., Baquero F., Corander J., Willem R. J. (2016) Global Emergence and Dissemination of *Enterococci* as Nosocomial Pathogens: Attack of the clones? Frontiers in Microbiology, 26:788

Hanchi H., Mottawea W., Sebei K., Hammami R. (2018) The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns-An Update. Frontiers in Microbiology, 9:1791

Haryani Y., Tunung R., Chai L. C., Lee H. Y., Tang S. Y., Son R. (2008) Characterization of *Enterobacter cloacae* isolated from street food. ASEAN Food Journal, 15:57-64

Hennekinne J. A., De Buyser M. L., Dragacci S. (2012) *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiology Reviews, 36:815-836

Hidron A. I., Edwards J. R. Patel J., Horan T. C., Sievert D. M., Pollock D. A., et al (2008) NHSN annual update: antimicrobial resistant Pathogens associated with Healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. Infection Control and Hospital Epidemiology. 29:996-1011

John J. D., Sharbaugh R. J., Bannister E. R. (1982) *Enterobacter cloacae*: Bacteraemia, Epidemiology, and Antibiotic Resistance. Reviews of Infectious Diseases, 4:13-28

Kadhim A. D., Salim H. A., Abed M. S. (2015) Efficacy of Harmal *Pegnum harmala* on Rice weevil *Sitophilus oryzae* L. in the stored Rice grains. European Academic Research., 3:7506-7514

Kaminska, W., Patzer, J. And Dzierzanowska, D. (2002). Urinary tract infections caused by Endemic multi-resistant *Enterobacter cloacae* in A dialysis and transplantation unit. *Journal of Hospital Infection*, 51: 215-220

Kilbas I., Ciftci I. H. (2018) Antimicrobial resistance of *Enterococcus* isolates in Turkey: A meta-analysis of current studies. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 12: 26-30

Koluman A., Akan L. S., Çakiroğlu F. P. (2008) Occurrence and antimicrobial resistance of *enterococci* in retail foods. *Food Control*, 20:281–283

Kumari P., C., Sivadasan R., Jose A. (2011) Microflora associated with the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Agricultural Technology* 7:1625-1631.

Lambert-Zechovsky, N., Bingen, E., Denamur, E., Brahimi, N. Brun, P., Mathieu, H. And Elion, J. (1992). Molecular analysis provides evidence For the endogenous origin of bacteremia and Meningitis due to *Enterobacter cloacae* in an Infant. *Clinical and Infectious Diseases*, 15:30-32.

Law-Brown J., Meyers P. R. (2003) *Enterococcus phoeniculicola* sp. Nov. A novel member of the *enterococci* isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:683-685

Liu, C., Song, Y., McTeague, M., Vu, A.W., Wexler, H. and Finegold, S.M. (2003). Rapid Identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using Group- and species-specific primers. FEMS Microbiology Letters, 222: 9-16.

Liu, C.P., Wang, N.Y., Lee, C.M., Weng, L.C., Tseng, H.K., Liu, C.W., Chiang, C.S. and Huang, F.Y. (2004). Nosocomial and community-acquired *Enterobacter cloacae* bloodstream infection: risk factors for and prevalence of SHV-12 in Multiresistant isolates in a medical centre. Journal of Hospital Infection, 58: 63-77.

Maliki I., Rosemizi A. R., Juanita M. N., Siti Zulaika A. N. Muhammad T. A. (2019) Thermal distribution analysis of rice weevil disinfestation using Microwave heating treatment. Indonesian Journal of Electrical Engineering and Computer Science, 13:759~765

McDonald J. R., Olaison L., Anderson D. J., Hoen B., Miro J. M., Eykyn S., et al. (2005) Enterococcal endocarditis: 107 cases from the international collaboration on endocarditis merged database. The American Journal of Medicine, 118:759-766

Mowery S. V., Campbell J. F., Mullen M. A., Broce A. B. (2004) Response of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) to Food Odor Emanating Through Consumer Packaging Films. Environmental Entomology, 33:75-80

Mowery S. V., Mullen M. A., Campbell J. F., Broce A. B. (2002) Mechanisms Underlying Sawtoothed Grain Beetle (*Oryzaephilus surinamensis* [L.]) (Coleoptera: Silvanidae) Infestation of Consumer Food Packaging Materials. *Journal of Economic Entomology*, 95:1333-1336

Mullen M. A., Mowery S. V. (2000) Insect-resistant packaging. *International Food Hygiene*, 11:13-14

Musil I., Jensen V., Schilling J., Ashdown B., Kent T. (2010) *Enterobacter cloacae* infection of an expanded polytetrafluoroethylene femoral-popliteal bypass graft: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, 4:131

Noskin G. A., Peterson L. A., Warren J. A. (1995) *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* bacteraemia: acquisition and outcome. *Clinical Infectious Disease*, 20:296-301

Nwana I.E. (1993) A survey of storage coleopteran which attack dried cocoyam chips in Nigeria. *Journal of Stored Product Research*, 29:95–98

Parlapani F.F., Kyritsi M., Sakka M., Chatzinikolaou K., Donos S., Boziaris I.S., Chadjichristodoulou C., Athanassiou C.G. (2019) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry reveals *Enterococcus* and *Enterobacter* spp. In major insect species in food security with resistance in common antibiotics. *Journal of Pest Science*, pp. 1-12

Poh C.H., Oh H.M.L., Tan A.L. (2006) Epidemiology and clinical outcome of enterococcal Bacteraemia in an acute care hospital. *Journal of Infection*, 52: 383–386

Quintela-Baluja M., Böhme K., Fernandez-No I.C., Alnaki M.E., Caamaño S., Barros-Velázquez J., Calo-Mata P. (2014) MALDI-TOF Mass Spectrometry, a Rapid and Reliable Method for the Identification of Bacterial Species in Food-Microbiology Laboratories. *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques*, Boziaris I., pp. 353-358

Rice L. B. (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial Pathogens. *Journal of Infectious Diseases*, 197:1079-1081

Sanders, W.E. and Sanders, C.C. (1997). *Enterobacter* Spp.: Pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 220-241.

Shen Z., Pappan K., Mutti N. S., He Q., Denton M., Zhang Y., Kanost M. R., Reese J. Reeck G. R. (2005) Pectinmethylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae*: cDNA isolation and sequencing, genetic origin, and expression of the recombinant enzyme. *Journal of Insect Science*, 5:21

Teuber M., Meile L., Schwarz F. (1999) Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 115-137

Top J., Willems R., Bonten M. (2008). Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52:297-308

Trivedi M. K., Branton A., Trivedi Dahryn, Shettigar H., Nayak G., Gangwar M., Jana S. (2015) Assessment of Antibiogram of Multidrug-Resistant Isolates of *Enterobacter aerogenes* after Biofield Energy Treatment. *Pharmaceutical Care & Health Systems*, 2:5

Vearasilp S., Thanapornpoonpong S., Krittigamas N., Suriyong S., Akaranuchat P., von Hörsten D. (2015) Vertical operating prototype development supported radio frequency heating system in controlling rice weevil in milled rice. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 5:184-192

Wen-Juan Zhang, Chun-Xue You, Kai Yang, Yang Su, Zhu-Feng Geng, Shu-Shan Du, Cheng-Fang Wang, Zhi-Wei Deng, Yong-Yan Wang (2015) Bioactivity and Chemical Constituents of the Essential Oil from *Dendranthema indicum* (L.) Des Moul. Against Two Stored Insects. *Journal of Oleo Science*, 5:553-560

Wilson W. R., Wikowske C. J., Wright A. J., Sande M. A., Geraci J. E. (1984) Treatment of streptomycin-susceptible and streptomycin-resistant enterococcal endocarditis. *Annals of Internal Medicine*, 100:816-823

Yoon E.Y., Nam Y., Ryoo M.I. (2009) Effects of biological control of rice weevil by *Anisopteromalus calandrae* with a population of two *Aspergillus* spp. *Environmental Entomology*, 38(1):121-8

Zuberi R.I., Effendi Q.H., Ashrafi, S.H. (1972) A study of aerobic bacteria and fungi associated with *Blatella germanica* (Linnaeus), *Tribolium confusum* (Jacquelin du Val), and *Poekilocerus pictus* (Fabricus). *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* 15, 64-66.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αθανασιάδης Χ. (2007) Έντομα αποθηκών και μέθοδοι αντιμετώπισης τους. Πτυχιακή εργασία. Α. Τ. Ε. Ι. Κρήτης, σελ. 10-12

Θεοφίλου Σ. (2006) Μελέτη της αντιμικροβιακής δραστηριότητας μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών Ag/γ-Al₂O₃ με στόχο τη μικροβιολογική επεξεργασία του νερού έρματος των πλοίων. Πτυχιακή Εργασία. Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, σελ. 34

Λαδογιάννης Γ. (2009) Τροφικές προτιμήσεις του *Tribolium confusum* και ανάπτυξή του σε συστατικά ιχθυοτροφών. Πτυχιακή εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, σελ. 13-18

Μπούχελος Κ. Θ. (2005) Έντομα αποθηκευμένων προϊόντων και τροφίμων.

Πανεπιστημιακές παραδόσεις, σελ. 9-11

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

https://animaldiversity.org/accounts/Stegobium_paniceum/classification/

https://en.m.wikipedia.org/wiki/Wheat_weevil

<https://www.antimicrobialcopper.org/us/enterobacter-aerogenes>

<https://www.cabi.org/isc/datasheet/10850>

<https://www.cabi.org/isc/datasheet/54667>

<https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/infectious-diseases/enterobacteriaceae/article/609758/>

<https://www.jcehrlich.com/pests-in-food/>

<https://www.merriam-webster.com/medical/Enterobacteriaceae>