

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών εντόμων που διαβιούν
σε αποθηκευμένες πρώτες ύλες ιχθυοτροφών με Maldi-Tof-Ms και
μελέτη της ανθεκτικότητάς τους σε κοινά αντιβιοτικά»

ΚΛΕΙΩ ΧΑΤΖΗΝΙΚΟΛΑΟΥ

ΒΟΛΟΣ 2020

«Ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών εντόμων που διαβιούν σε αποθηκευμένες πρώτες ύλες ιχθυοτροφών με Maldi-Tof-Ms και μελέτη της ανθεκτικότητάς τους σε κοινά αντιβιοτικά»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ιωάννης Σ. Μποζιάρης, Επιβλέπων, Αναπληρωτής Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας
2. Χρήστος Αθανασίου, Μέλος, Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας
3. Φωτεινή Παρλαπάνη, Μέλος, Συμβασιούχος Διδάσκοντας ΠΔ 407/80, Παν/μίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής μελέτης, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον κύριο Ιωάννη Μποζιάρη, τόσο για την ανάθεση της πτυχιακής μελέτης, όσο και για την επίβλεψη και τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά την συγγραφή της, στοιχεία απαραίτητα για την περαίωση της.

Θερμά ευχαριστώ και την κυρία Φωτεινή Παρλαπάνη για την συμβολή της σε όλη της διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και τις εξαιρετικές χρήσιμες συμβουλές κατά τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Σωτήρη Οικονόμου και τον Σπύρο Δώνο για την άψογη συνεργασία μας και την βοήθεια που μου πρόσφεραν.

Τέλος, δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη αλλά και για την κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου μελέτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα έντομα των αποθηκευμένων προϊόντων αποτελούν ένα μεγάλο κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου καθώς συναντώνται στις πρώτες ύλες για την παρασκευή των ιχθυοτροφών. Σκοπός την παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας ήταν η ανίχνευση, αρίθμηση και η απομόνωση των κυριότερων στελεχών τα οποία απαντώνται σε διαφορετικά στελέχη των ειδών *Sitophilus oryzae* και *Sitophilus zeamais* από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

Στα διαφορετικά είδη των στελεχών που μελετήθηκαν, πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, και απομόνωση Εντερόκοκκων και *E. coli*/coliform με σκοπό την περαιτέρω ταυτοποίηση τους με τη χρήση της Maldi-tof MS.

Σύμφωνα με τις μικροβιακές αναλύσεις, η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TSA) για τα είδη *S. oryzae*, *S. zeamais machada* και *S. oryzae* Bel Port Silo έφτασε τους 5,65, 8,39 και 8,03 log cfu/g αντίστοιχα. Στα *S. oryzae* Germany, *S. oryzae* silo MRM, *S. oryzae* silo Beuzelin οι πληθυσμοί έφτασαν τους 7,70, 7,56 και 6,50 log cfu/g αντίστοιχα, ενώ στα *S. oryzae* taub 3 και *S. oryzae* silo sinoryx 1 ήταν 6,16 και 6,92 log cfu/g. Για τις μετρήσεις των Εντερόκοκκων στο *S. oryzae* ο πληθυσμός ήταν 2,71 log cfu/g, στο *S. zeamais machada* και *S. oryzae* Bel Port Silo ήταν 4,44 log cfu/g. Για το *S. oryzae* Germany ο πληθυσμός ήταν 3,85 log cfu/g, για το *S. oryzae* silo MRM ήταν 2,5 log cfu/g και για το *S. oryzae* silo Beuzelin ήταν 3,24 log cfu/g. Για το *S. oryzae* taub 3 και *S. oryzae* silo sinoryx 1 οι τιμές των πληθυσμών ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων. Έπειτα από την ανάλυση με τη Maldi-tof MS, ανιχνεύτηκε ο μικροοργανισμός *Enterococcus faecium* στα *S. oryzae* silo MRM, *S. zeamais machada*, *S. oryzae* Bel Port silo, *S. oryzae* silo Beutzalin, και οι μικροοργανισμοί *Enterococcus*

phoeniculicola και *Enterobacter cloacae* στα *S. oryzae*, *S. oryzae* Germany, *S. oryzae* taub 3, *S. oryzae* silo MRM, *S. oryzae* silo sinoryx 1. Επομένως, η παρουσία των εντόμων αποθηκών στα διάφορα προϊόντα, απαιτεί την προσεκτική επιλογή τους, πριν χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες για την παραγωγή ιχθυοτροφών.

ABSTRACT

Stored-product insects can transfer a wide range of serious pathogens involved in human health. The close contact of these insects with the food production chain makes these species extremely dangerous as carriers of severe infections. In addition, pathogenic bacteria, such as members of Enterococcus, are often resistant to antibiotics commonly used for human therapy. Enterococcus and coliform species isolated from 17 strains of different insect species associated with durable stored products. The antibiotic susceptibility of the isolated strains was also evaluated. MALDI-TOF MS revealed mainly the presence of Enterococcus (*E. faecium*, *E. phoeniculicola* and *E. casseliflavus*) and Enterobacter (*Eb. cloacae* and *Eb. asburiae*). *E. casseliflavus* was resistant to all antibiotics tested, while *E. faecium* and *E. phoeniculicola* were resistant to sulphonamides. Among *E. faecium* isolates, approx. 20% were found to be resistant to tetracycline, while *Eb. cloacae* and *Eb. asburiae* showed resistance to erythromycin. The current series of data clearly indicates that certain bacteria of the genera Enterococcus and Enterobacter are common in stored-product insects, and, under certain circumstances, may seriously endanger public health, through potential introduction of antibiotic resistance.

Key words: stored product insects, Enterococcus, Enterobacter, Maldi-Tof-MS

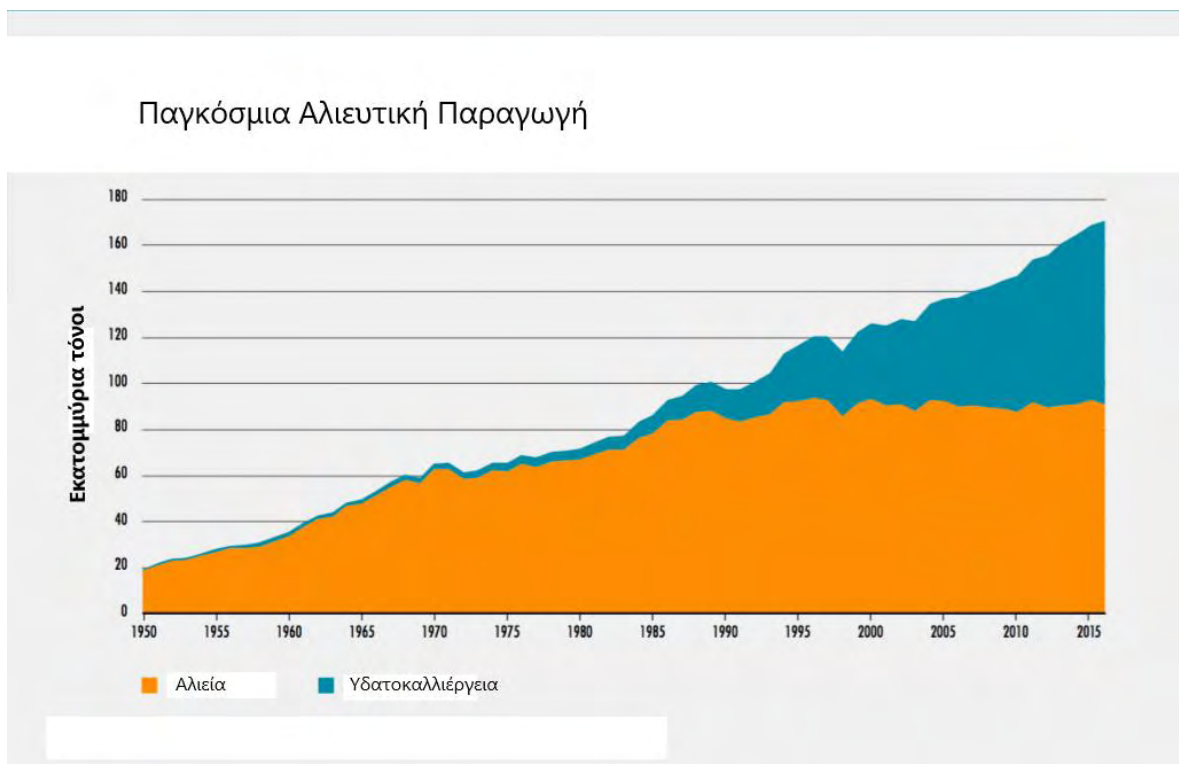
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	1
1.1. Τα έντομα.....	2
1.1.1. <i>Sitophilus granarius</i>	4
1.1.2. <i>Sitophilus oryzae</i>	5
1.1.3. <i>Sitophilus zeamais</i>	6
1.2. Μικροβιακό φορτίο εντόμων αποθηκών.....	7
1.2.1. Εντερόκοκκοι (<i>Enterococcus</i>).....	8
1.2.1.1. Εντερόκοκκοι και τα έντομα των αποθηκών.....	9
1.3. Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.....	10
1.4. Σκοπός παρούσας εργασίας.....	11
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	12
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.....	12
2.2. Μικροβιακές αναλύσεις.....	12
2.2.1. Προετοιμασία θρεπτικών υλικών.....	12
2.2.1.1. Tryptone Soy Agar (TSA).....	12
2.2.1.2. Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar).....	13
2.2.1.3. Harlequin™ E.coli/ Coliform Medium.....	15
2.2.1.4. Slanetz and Bartley Medium (<i>Enterococcus</i> Agar).....	16
2.2.1.5. Kanamycin Aesculin Azide Agar (K.A.A. Agar).....	17
2.2.1.6. Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA Agar).....	18
2.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων.....	19
2.2.3. Τεχνική επίστρωσης τρυβλίων.....	20
2.2.3.1. Τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spreadplate).....	20

2.2.3.2.	Τεχνική ενσωμάτωσης (pour plate technique).....	21
2.2.4.	Επώαση δειγμάτων.....	21
2.3.	Ταυτοποίηση μικροοργανισμών.....	22
2.3.1.	Η μέθοδος MALDI-TOF MS.....	22
2.3.2.	Προετοιμασία δειγμάτων.....	23
2.4.	Ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.....	25
2.4.1.	Προετοιμασία δειγμάτων.....	25
3.	Αποτελέσματα.....	26
3.1.	Μικροβιακοί πληθυσμοί εντόμων.....	26
3.2.	Ταυτοποίηση βακτηρίων.....	30
3.3.	Ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.....	34
4.	Συζήτηση.....	36
5.	Συμπεράσματα.....	39
6.	Βιβλιογραφία.....	40

1. Εισαγωγή.

Η παγκόσμια παραγωγή αλιευτικών προϊόντων άγγιξε τους 171 εκατομμύρια τόνους το 2016 όταν η παραγωγή αλιευμάτων υδατοκαλλιέργειας έφτασε τα 80,4 εκατομμύρια τόνους (FAO, 2016), καθιστώντας έτσι τον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών τον πιο γρήγορα αναπτυσσόμενο (Εικ. 1). Η συνεχής αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού δημιουργεί μεγαλύτερες απαιτήσεις για παραγωγή τροφής, με αποτέλεσμα να ασκείται ολοένα και μεγαλύτερη πίεση στις υδατοκαλλιέργειες για αύξηση της παραγωγής τους. Κατά συνέπεια, η παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας σιτηρεσιών που θα χρησιμοποιηθούν ως τροφές για τα εκτρεφόμενα είδη κρίνεται απαραίτητη (FAO, 2013).



Εικόνα 1: Παγκόσμια Αλιευτική Παραγωγή (Πηγή: FAO, 2016)

Το ιχθυάλευρο και το ιχθυέλαιο αποτελούν τα σημαντικότερα συστατικά των ιχθυοτροφών παγκοσμίως. Το ιχθυάλευρο περιέχει ιδανική σύνθεση σε αμινοξέα, παρέχοντας αρκετά καλή ποσότητα πρωτεϊνών για τα εκτρεφόμενα είδη, είναι γευστικό και ενισχύει την απορρόφηση, ενώ το ιχθυέλαιο αποτελεί πολύ καλή πηγή λιπαρών οξέων (Jackson, 2006). Η υποβάθμιση του θαλάσσιου οικοσυστήματος αλλά και η μείωση του ιχθυοαποθέματος λόγω αλίευσης έχει ως αποτέλεσμα οδηγήσει στη μείωση της παραγωγής ιχθυαλεύρου παγκοσμίως (Sánchez-Muros *et al.*, 2014). Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου με άλευρα προέλευσης από σιτάρι, καλαμπόκι, κριθάρι κ.α. Η αποθήκευση και η διακίνηση των προϊόντων από τις αποθήκες στα εργοστάσια επιτρέπουν στα έντομα να αναπτύσσονται σε στεγασμένους χώρους και να επιζούν κάτω από συνθήκες και περιβάλλοντα που διαφορετικά δεν θα τα ευνοούσαν.

1.1 Τα έντομα.

Τα έντομα είναι από τους μακροβιότερους οργανισμούς στον κόσμο με την εμφάνισή τους να χρονολογείται πολλά εκατομμύρια χρόνια πριν. Χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλομορφία, με περίπου 1.000.000 είδη εντόμων να έχουν ήδη περιγραφεί. Περίπου το 85% των ειδών ζώων που υπάρχουν στον πλανήτη σήμερα είναι έντομα, ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό έχει ταξινομηθεί. Η συστηματική κατάταξη τους είναι η εξής:

Βασίλειο	Ζώα (Animalia)
Φύλο	Αρθρόποδα (Arthropoda)

Κλάση	Έντομα (Insecta)
-------	------------------

Λιγότερο από το 0,5% των ειδών των εντόμων είναι παράσιτα του ανθρώπου, ενώ πολύ λίγα από αυτά μπορούν να αποτελέσουν σοβαρή απειλή για τον άνθρωπο ή τα τρόφιμα. Από την εποχή που ο άνθρωπος άρχισε να καλλιεργεί τη γη με σκοπό να παράγει προϊόντα για την διατροφή του και να τα αποθηκεύει, τα έντομα υπήρξαν διαρκών παράσιτα των προϊόντων αυτών. Τα έντομα αυτά ονομάζονται έντομα αποθηκών και είναι κάθε είδος εντόμου που προσβάλλει και ζημιώνει άμεσα ένα προϊόν, το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί και να αναπαραχθεί σε μια αποθήκη ή χώρο που φιλοξενεί επί αρκετό χρονικό διάστημα τρόφιμα. (Μπούχελος, 2005). Τα έντομα αυτά μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές απώλειες οι οποίες υπολογίζονται από το 9% έως 20% ή περισσότερο στις αναπτυσσόμενες χώρες (Pimentel D. 1991). Το μικρό τους μέγεθος και το βραχύβιο της ζωής τους, χάρη στα οποία χρειάζονται μικρή ποσότητα τροφής και οξυγόνου, τους προσδίδει την ικανότητα επιβίωσης σε χώρους όπου μεγαλύτερα ζώα δεν θα μπορούσαν να επιβιώσουν. Κοινό χαρακτηριστικό των εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων είναι η ευρεία γεωγραφική τους εξάπλωση, στην οποία συνέβαλε κατά κύριο λόγο ο άνθρωπος. Έτσι, ακόμα και αν κάποια από αυτά έχουν χάσει την ικανότητα πτήσης, μέσω του διεθνούς εμπορίου μπορούν να βρεθούν σε όλα τα μέρη του πλανήτη μεταφερόμενα μαζί με το προϊόν.

Το μέγεθος αλλά και το σχήμα τους είναι οι κύριοι παράγοντες που τα καθιστούν τέλειους εχθρούς. Το μήκος του σώματός τους ποικίλει από περίπου 1 mm μέχρι 12 mm, ενώ η πλειοψηφία τους δεν ξεπερνά τα 5 mm. Έτσι, μια στενή ρωγμή ή σχισμή στην κατασκευή του αποθηκευτικού χώρου γίνεται πολλές φορές καταφύγιο πληθυσμών εντόμων, ικανών να προξενήσουν προβλήματα. Επίσης το μικρό τους

μέγεθος τους παρέχει τη δυνατότητα να αποφεύγουν εύκολα τους φυσικούς τους εχθρούς.

Μερικά γνωστά είδη που προσβάλλουν τα αποθηκευμένα τρόφιμα είναι για παράδειγμα τα *Sitophilus granarius*, *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium confusum*, και *Tribolium castaneum*.

1.1.1. *Sitophilus granarius*



Εικόνα 2: *Sitophilus granarius* (Πηγή Μπουχέλος, 2005)

Το είδος αυτό θεωρείται από τα πιο κοινά και επικίνδυνα που συναντάμε στις αποθήκες σιτηρών. Τα ενήλικα έντομα έχουν μήκος σώματος 3-5 mm και έχει σκούρο καστανό έως και μαύρο χρώμα. Θεωρείται κοσμοπολίτικο είδος και απαντάται τόσο στα εύκρατα όσο και στα ψυχρά γεωγραφικά πλάτη. Τόσο το ενήλικο όσο και η προνύμφη προσβάλλουν σπόρους σιτηρών και συμπαγή αμυλούχα προϊόντα. Προτιμά τους ξηρούς καρπούς. Πυκνοί πληθυσμοί του εντόμου σε σημεία των σωρών των σπόρων όπου η

υγρασία είναι υψηλή σε συνδυασμό με την έντονη μεταβολική δραστηριότητα που παρατηρείται εκεί, προκαλεί «άναμμα» των σπόρων που ευνοεί την ανάπτυξη μυκήτων, δημιουργώντας συμπαγή συσσωματώματα του προϊόντος και ποσοτική και ποιοτική υποβάθμιση (Μπουχέλος, 2005).

1.1.2. *Sitophilus oryzae*



Εικόνα 3: *Sitophilus oryzae* (Πηγή: wikipedia.org)

Το σκαθάρι του ρυζιού (rice weevil) είναι μορφολογικά παρόμοιο με το *S. granarius*. Έχει μικρό μήκος σώματος (2,5-4,5 mm) και έχει χρώμα καστανό. Η χαρακτηριστική του διαφορά είναι ότι στα έλυτρά του φέρει τέσσερις ανοιχτόχρωμες κηλίδες (πορτοκαλί ή κίτρινες), δύο σε κάθε έλυτρο. Έχει επίσης ανεπτυγμένες τις μεμβρανώδεις πτέρυγες και μπορεί να πετά. Το *S. Oryzae* θεωρείται κοσμοπολίτικο είδος καθώς προτιμά υποτροπικές και τροπικές περιοχές όπως Ινδία, Αυστραλία, παράλια της Β. Αφρικής και κάποια μέρη της Κίνας. Είναι ένα είδος όπου ο βιολογικός του κύκλος επηρεάζεται σημαντικά από την θερμοκρασία. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη και ωστοκία κυμαίνεται στους 30°C. Φτάνει στην αποθήκη πετώντας από τον αγρό, όπου το θηλυκό μπορεί να εναποθέσει πάνω από 500 αυγά κατά τη διάρκεια

της ζωής του. Η προνύμφη αναπτύσσεται στον σπόρο, τον οποίο και κατατρώει, ενηλικιώνεται και πετά προσβάλλοντας και το προϊόν στον αγρό. Οι κυριότερες πηγές τροφής του είναι το ρύζι και οι σπόροι δημητριακών αλλά μπορεί να προσβάλει και αλευρώδη προϊόντα (Μπουχέλος, 2005).

1.1.3. *Sitophilus zeamais*



Εικόνα 4: *Sitophilus zeamais* (Πηγή: forestryimages.org)

Το σχήμα και το μέγεθος του σκαθαριού του αραβόσιτου (maize weevil) μοιάζει πολύ με το *S. oryzae*. Ο χρωματισμός του είναι πιο σκούρος ενώ στα έλυτρα, αντί για τέσσερις κηλίδες (από δύο σε κάθε έλυτρο), φέρει ισάριθμες, πιο ευκρινείς, εγκάρσιες, ατρακτοειδείς κηλίδες, πορτοκαλοκίτρινου χρώματος (Μπουχέλος, 2005) Στη χώρα μας, η μελέτη του συγκεκριμένου είδους είναι μικρή, καθώς η ομοιότητά του με το είδος *S. oryzae* καθιστά πιο δύσκολη την αναγνώρισή του (Athanassiou, 1999). Προσβάλλει κυρίως τον αραβόσιτο, το σιτάρι και το κριθάρι. (Μπουχέλος, 2005).

1.2 Μικροβιακό φορτίο εντόμων αποθηκών

Τα έντομα των αποθηκών εκτός από την οικονομική ζημία που μπορούν να προκαλέσουν στους παραγωγούς, μπορούν να μεταδώσουν μικροοργανισμούς που είναι

επικίνδυνοι για την δημόσια υγεία. Αυτό συμβαίνει λόγω της συμβιωτικής σχέσης που δημιουργούν με τους μικροοργανισμούς που μεταφέρουν. Ενδεικτικά, τα βακτήρια που έχουν βρεθεί σε έντομα αποθηκευμένων προϊόντων αντιπροσωπεύει μια μεγάλη ποικιλία ειδών, όπως για παράδειγμα *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Indiana, *Bacillus subtilis*, & *Streptococcus* spp. Τα τελευταία χρόνια η παρουσία των Εντερόκοκκων και των βακτηρίων της οικογένειας των Enterobacteriaceae έχει μελετηθεί περισσότερο.

1.2.1. Εντερόκοκκοι (Enterococcus)

Το γένος *Enterococcus* ανήκει στα οξυγαλακτικά βακτήρια. Είναι Gram (+) και προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Αν και αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας του γαστρεντερικού συστήματος των ανθρώπων και των θηλαστικών, μπορούν να ζήσουν σχεδόν παντού στη φύση λόγω της ικανότητας τους να επιβιώνουν σε αντίξοες συνθήκες (Franz et al.,1999). Τα περισσότερα είδη του γένους αναπτύσσονται σε ένα θερμοκρασιακό εύρος από 10°C έως 45°C, με τη βέλτιστη τιμή της θερμοκρασίας στους 35°C. Τα βακτήρια αυτά δεν θεωρούνται πρωτογενή παθογόνα, αλλά γενικά αναγνωρίζονται ως νοσοκομειακά παθογόνα παγκοσμίως (Linden and Miller, 1999).



Εικόνα 5: Απεικόνιση *Enterococcus faecalis* στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. (Πηγή: 123rf.com)

Μέχρι σήμερα έχουν καταγραφεί περισσότερα από 37 είδη που ανήκουν στο γένος *Enterococcus*. Μερικά από αυτά είναι τα *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*. Τα δύο πιο συνηθισμένα είδη είναι το *E faecium* και το *E faecalis*.

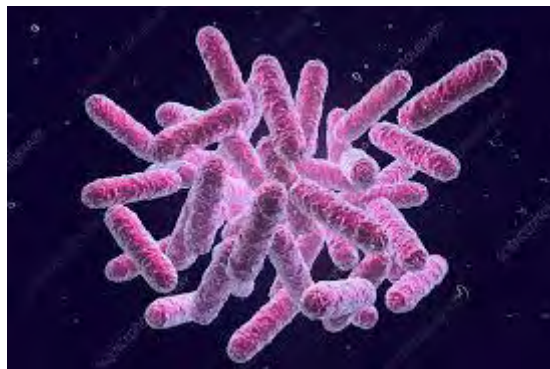
1.2.1.1. Εντερόκοκκοι και τα έντομα των αποθηκών.

Τα τελευταία χρόνια η αναζήτηση στελεχών Εντερόκοκκων στα έντομα των αποθηκών έχει τραβήξει το ενδιαφέρον μεγάλου αριθμού επιστημόνων ανά τον κόσμο. Οι Larson et al. (2008) και οι Parlarani et al. (2019) βρήκαν ότι τα πιο κοινά είδη εντόμων αποθηκών είναι φορείς Εντερόκοκκων, οι οποίοι παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά. Οι Channaiah et al. (2010) κατέγραψαν 154 απομονώσεις Εντερόκοκκων από 95 έντομα αποθηκών, ενώ οι Allotey et al. (2017) απέδειξαν την ικανότητα των πιο γνωστών εντόμων αποθηκών να φέρουν κάποια παθογόνα στελέχη Εντερόκοκκων και 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.

1.2.2. Enterobacteriaceae

Είναι Gram (-) 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 θεرمόφιλα και κάποια μεσόφιλα. Γενικά, μπορούν να αναπτυχθούν στα περισσότερα περιβάλλοντα. Μερικά από τα πιο γνωστά είδη Enterobacteriaceae είναι τα: *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Staphylococcus* spp..



Εικόνα 6: Απεικόνιση του είδους *Enterobacter* στο μικροσκόπιο (Πηγή: sciencephoto.com)

Το βακτήριο *E. cloacae* είναι από τους πιο κοινούς παθογόνους μικροοργανισμούς υπεύθυνο για πολλές μολύνσεις (πχ. βακτηριαμία, μηνιγγίτιδα κ.α.) Έχει αποδειχθεί ότι είναι ανθεκτικό και σε αντιβιοτικά (αμπικιλίνη, αμοξυκιλίνη). Συναντάται σε κάθε είδους περιβάλλον και ζει στο γαστρεντερικό σύστημα των 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* spp. 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.

1.3. Ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

Τα αντιβιοτικά είναι φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και την θεραπεία των βακτηριακών λοιμώξεων. Η αντοχή στα αντιβιοτικά εμφανίζεται όταν μεταβάλλονται τα βακτήρια ως απόκριση στη χρήση αυτών των φαρμάκων. Τα βακτήρια αυτά μπορεί να μολύνουν ανθρώπους και ζώα, και οι μολύνσεις που προκαλούν είναι πιο δύσκολο να θεραπευθούν από εκείνες που προκαλούνται από μη ανθεκτικά βακτήρια (World Health Organization, February 2018). Τα έντομα των αποθηκευμένων προϊόντων είναι αρκετά κοσμοπολίτικα στη διανομή και εμφανίζονται σε εργοστάσια παραγωγής ζωοτροφών σε ολόκληρο τον κόσμο. Οι εντερόκοκκοι δεν είναι παθογόνα βακτήρια που μεταδίδονται μέσω των τροφίμων αλλά η μόλυνση των

τροφίμων προκύπτει καθώς δρουν ως φορείς η δεξαμενές παθογόνων βακτηρίων. Οι Larson et al. (2008) βρήκαν ότι πολλά κύρια είδη εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων ήταν θετικά σε εντερόκοκκους και παρουσίαζαν ανθεκτικότητα σε διαφορετικά αντιβιοτικά όπως η τετρακυκλίνη και η ερυθρομυσίνη.

1.4. Σκοπός παρούσας εργασίας.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση, η απαρίθμηση και η απομόνωση των κυριότερων μικροοργανισμών (συγκεκριμένα Εντερόκοκκων και *E.coli/coliform*) που απαντώνται σε διαφορετικά στελέχη δύο ειδών εντόμων αποθηκών του *Sitophilus oryzae* και του *Sitophilus zeamais*, η ταυτοποίησή τους με MALDI-TOF-MS καθώς και η μελέτη της ανθεκτικότητας αυτών των βακτηρίων σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως για την θεραπεία του ανθρώπου.

2. Υλικά και Μέθοδοι.

2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.

Τα είδη τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι το *Sitophilus oryzae* και το *Sitophilus zeamais*. Τα έντομα προέρχονται διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Βραζιλία, Γερμανία, Γαλλία, Ελλάδα, Σερβία και Ουγγαρία) και προϊόντα (αλεύρι και καλαμπόκι). Τα 7 στελέχη του είδους *Sitophilus oryzae* και το στέλεχος του είδους *Sitophilus zeamais* εκτράφηκαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας, του τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στους 25°C με 65% σχετική υγρασία και σε συνεχές σκοτάδι. Τα στελέχη έπειτα μεταφέρθηκαν στον εργαστηριακό χώρο του εργαστηρίου Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος για τη διεξαγωγή του πειράματος.

2.2. Μικροβιακές αναλύσεις

2.2.1. Προετοιμασία θρεπτικών υλικών.

Τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονται από την LABM (Lancashire, UK), ενώ τα χημικά αντιδραστήρια προέρχονται από την Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

2.2.1.1. Tryptone Soy Agar (TSA)

Το TSA είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την αύξηση σχεδόν όλων των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια τόσο αερόβιων όσο και αναερόβιων βακτηρίων. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας παρέχουν άζωτο (N), βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) χρησιμεύει ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης. Η σύνθεση του θρεπτικού υλικού φαίνεται παρακάτω:

Tryptone	15,0
Soy Tryptone	5,0
Sodium Chloride	5,0
Agar	12,0

Πίνακας 2.1: Συστατικά g/1000 ml

Για την παρασκευή του, σε μία φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 37 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min και στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού υλικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri.

2.2.1.2. Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar)

Το Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar) είναι ένα εκλεκτικό θρεπτικό υλικό το οποίο χρησιμοποιείται για την απομόνωση και την απαρίθμηση των ζυμών και των μυκήτων. Η μυκολογική πεπτόνη ενεργεί ως πηγή άνθρακα, αζώτου, μετάλλων, βιταμινών και άλλων απαραίτητων θρεπτικών συστατικών. Η δεξτρόζη λειτουργεί ως υδατάνθρακας, το φωσφορικό κάλιο ως ο ρυθμιστικός παράγοντας και το θειικό μαγνήσιο είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο. Η χλωραμφενικόλη έχει ανασταλτική δράση στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Η χρωστική ουσία Rose Bengal καταστέλλει την ανάπτυξη βακτηριδίων και περιορίζει το μέγεθος και την εξάπλωση των αποικιών μούχλας, ενώ απορροφάται από την μούχλα και τις αποικίες ζύμες βοηθώντας έτσι την απαρίθμηση των αποικιών. Η σύνθεση του θρεπτικού υλικού φαίνεται παρακάτω:

Mycological peptone	5,0
Dextrose	10,0
Monopotassium phosphate	1,0
Magnesium sulfate	0,5
Rose Bengal	0,05
Chloramphenicol	0,1
Agar	15,5

Πίνακας 2.2: Συστατικάg/1000 ml

Για την παρασκευή του, σε μία φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 32,15g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Η φιάλη έπειτα τοποθετήθηκε σε συσκευή βρασμού και αναδεύτηκε με μαγνητικό αναδευτήρα έτσι ώστε να διαλυθεί εντελώς. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για

15 min και στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού υλικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri.

2.2.1.3. Harlequin™ E.coli/ Coliform Medium

Αυτό το διπλό χρωμογόνο θρεπτικό μέσο έχει αναπτυχθεί για την ταυτόχρονη ανίχνευση και απαρίθμηση της *Escherichia coli* και των κολοβακτηριδίων (coliforms) στα στελέχη που μελετάμε. Το διαφορετικό χρώμα που παίρνουν οι αποικίες, μας δίνει τη δυνατότητα να διακρίνουμε, να διαχωρίσουμε και να υπολογίσουμε με ακρίβεια τον αριθμό των αποικιών της *E. coli* και των κολοβακτηριδίων από ένα δείγμα. Βασισμένο στη φόρμουλα του TBA (LAB072), το θρεπτικό μέσο έχει τροποποιηθεί με την προσθήκη δύο χρωμογόνων υποστρωμάτων του X-glucuronide και magenda-β-galactoside. Με την διάσπαση του χρωμογόνου X-glucuronide ανιχνεύουμε την παραγωγή του ενζύμου β-glucuronidase ενώ με την διάσπαση του χρωμογόνου magenda-β-galactoside ανιχνεύουμε την παραγωγή του ενζύμου β-γαλακτοξιδάση. Η *E. Coli* παράγει και τα δύο ένζυμα και οι αποικίες της παίρνουν πάντα γαλαζοπράσινο χρώμα. Τα υπόλοιπα κολοβακτηρίδια, κατά τον πολλαπλασιασμό τους παράγουν μόνο β-γαλακτοξιδάση ένζυμα και οι αποικίες τους παίρνουν ροζ χρώμα από τη διάσπαση του χρωμογόνου magenda-β-galactoside. Η σύνθεση του θρεπτικού υλικού φαίνεται παρακάτω:

Tryptone	20,0
Bile salts No.3	1,5
X-glucuronide	0,075

Magenda-β-galactoside	0,1
Agar	15,0

Πίνακας 2.3: Συστατικά g/1000 ml

Για την παρασκευή του, σε μία φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 36,6 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min και στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού υλικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri.

2.2.1.4. Slanetz and Bartley Medium (Membrane Enterococcus Agar)

Το θρεπτικό αυτό μέσο αρχικά περιγράφηκε από τους Slanetz & Bartley για την απαρίθμηση των εντερόκοκκων από δείγματα νερού χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της διηθητικής μεμβράνης, όμως μπορεί να χρησιμοποιηθεί και με τη μέθοδο της επίστρωσης για την εξέταση άλλων ειδών δειγμάτων. Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της επίστρωσης. Οι εντερόκοκκοι μειώνουν το χλωριούχο τετραζόλιο στην αδιάλυτη κόκκινη χρωστική φορμαζάνη, παράγοντας έτσι αποικίες που είναι σκούρες κόκκινες ή καστανές στην επιφάνεια του άγαρ. Η αντίδραση αυτή όμως δεν είναι αποκλειστική για τους εντερόκοκκους με αποτέλεσμα να μην έχουμε σίγουρα αποτελέσματα. Οι αποικίες μπορούν να επιβεβαιωθούν ως εντερόκοκκοι υποδεικνύοντας την υδρόλυση της ασεκουλίνης χρησιμοποιώντας το Kanamycin Aesculin Azide Agar (LAB106). Η σύνθεση του θρεπτικού υλικού φαίνεται παρακάτω:

Tryptose	20,0
Yeast extract	5,0
Glucose	2,0
Dipotassium hydrogen phosphate	4,0
Sodium azide	0,4
2,3,5 Tetrazolium chloride	0,1
Agar	12,0

Πίνακας 2.4: Συστατικά g/1000 ml

Για την παρασκευή του, σε μία φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 43,5 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό υλικό θερμάνθηκε μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα (δεν χρειάζεται περαιτέρω αποστείρωση). Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 47°C στη συνέχεια μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri.

2.2.1.5. Kanamysin Aesculin Azide Agar (K.A.A. Agar)

Είναι ένα επιλεκτικό θρεπτικό υλικό για την απαρίθμηση των εντερόκοκκων. Το αζίδιο του νατρίου (Na) και η καναμυκίνη είναι υπεύθυνα για την επιλεκτική αναστολή που απαιτείται, ενώ η ασεκουλίνη και τα άλατα σιδήρου (Fe) σχηματίζουν ένα σύστημα δείκτη για την τεκμηριωμένη ταυτοποίηση των εντερόκοκκων. Η σύνθεση του θρεπτικού υλικού φαίνεται παρακάτω:

Tryptone	20,0
Yeast extract	5,0
Sodium chloride	5,0
Sodium citrate	1,0
Aesculin	1,0
Ferric ammonium citrate	0,5
Sodium azide	0,15
Kanamysin sulphate	0,02
Agar No.1	10,0

Πίνακας 2.5: Συστατικά g/1000 ml

Για την παρασκευή του, σε μία φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 43 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min και στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού υλικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri.

2.2.1.6 Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA Agar)

Το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση εντεροβακτηριδίων στα δείγματα. Είναι εκλεκτικό υλικό χάρη στη δράση των χολικών (biles) αλάτων και του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet), όπου εκεί αναπτύσσονται μόνο τα βακτηρίδια της οικογένειας Enterobacteriaceae. Η ζελατίνη παρέχει άζωτο (N), αμινοξέα και άνθρακα (C). Το εκχύλισμα ζύμης προσφέρει τις απαραίτητες βιταμίνες

για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η δεξτρόζη παρέχει υδατάνθρακες. Η αντίδραση των βακτηρίων με τη δεξτρόζη χρωματίζει τις αποικίες κόκκινες με ένα κόκκινο-μωβ φωτοστέφανο παρουσία του δείκτη pH (Neutral Red).

Yeast extract	3,0
Peptone	7,0
Sodium Chloride	5,0
Bile Salts	1,5
Glucose	10,0
Neutral Red	0,03
Crystal Violet	0,002
Agar	12,0

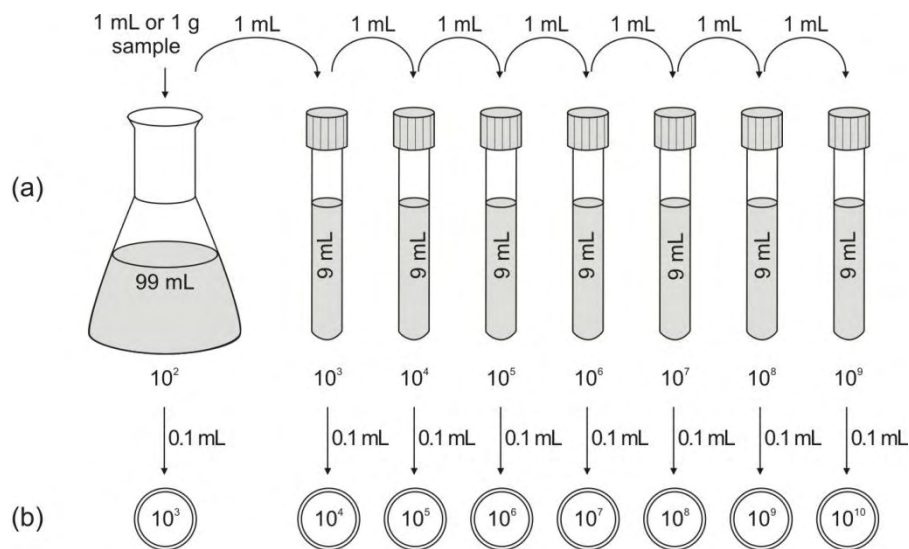
Πίνακας 2.6 : Συστατικά g/1000 ml

Για την παρασκευή του, σε μία φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 38,5 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό υλικό θερμάνθηκε μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα (δεν χρειάζεται περαιτέρω αποστείρωση). Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 47°C στη συνέχεια μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri.

2.2.2 Προετοιμασία δειγμάτων.

Σε κάθε δειγματοληψία, λαμβάνονταν ασηπτικά 1 g εντόμων του ίδιου στελέχους (περίπου 100 άτομα) και μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες

Stomacher. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη 9ml αραιωτικού διαλύματος MRD (Maximum Recovery Diluent, 0,85% w/v NaCl, 0,1% w/v peptone) και η σακούλα οδηγούνταν σε συσκευή ομογενοποίησης (BagMixer 400 VW, Interscience, London, UK) όπου τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν για 3 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων με μεταφορά 1ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου (Εικ. 2).



Εικόνα 2: Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας των βακτηρίων, με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος

2.2.3. Τεχνική επίστρωσης τρυβλίων

2.2.3.1. Τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spreadplate)

Η τεχνική αυτή αφορά την εξάπλωση γνωστού όγκου (0,1ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υλικό με τη βοήθεια ειδικού διανομέα. Εφαρμόζεται γενικά, στους αερόβιους μικροοργανισμούς, και στα θρεπτικά υλικά TSA, RBC, Harlequin™ E.coli/ Coliform, Slanetz & Bartley, Kanamysin Aesculin Azide Agar.

2.2.3.2. Τεχνική ενσωμάτωσης (pour plate technique)

Αρχικά γίνεται ενοφθαλμισμός γνωστού όγκου (1ml) από το βακτηριακό εναιώρημα του δείγματος σε αποστειρωμένα άδεια τρυβλία Petri και στη συνέχεια γίνεται μετάγγιση τηγμένου θρεπτικού υλικού, θερμοκρασίας 45°C περίπου. Στη συνέχεια, και αφού το θρεπτικό υλικό έχει στερεοποιηθεί, μεταγγίζεται επιπλέον ποσότητα θρεπτικού υλικού (overlay). Εφαρμόζεται γενικά στους μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς και στο θρεπτικό υλικό VRBGA.

2.2.4. Επώαση δειγμάτων

Ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα τα τρυβλία με τις καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε ανάλογες συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη του επιθυμητού μικροοργανισμού σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίν. 2.7)

Θρεπτικό υλικό	Μικροοργανισμός στόχος	Επώαση
Tryptone Soy Agar	Ολική Μικροβιακή χλωρίδα	25 °C για 48-72h

Rose Bengal Chloramphenicol Agar	Μούγλα & Ζύμες	25 °C για 24-48h
Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	<i>Escherichia coli</i> , Coliforms	37 °C για 18-24h
Slanetz & Bartley Medium	<i>Enterobacteriaceae</i>	37 °C για 24h
Kanamycin Aesculin Azide Agar	<i>Enterobacteriaceae</i>	37 °C για 18-24h
Violet Red Bile Glucose Agar	<i>Enterobacteriaceae</i>	37 °C για 24h

Πίνακας 2.7: Χρόνοι επώασης δειγμάτων

2.3. Ταυτοποίηση μικροοργανισμών.

2.3.1 Η μέθοδος MALDI-TOF MS.

Μετά την επώαση, οι αποικίες από κάθε θρεπτικό υπόστρωμα μεταφέρονταν μία-μία σε θρεπτικό υπόστρωμα γενικής χρήσης για έλεγχο της καθαρότητάς τους (καθαρές καλλιέργειες) και στη συνέχεια η ταυτοποίησή τους πραγματοποιούνταν με MALDI-TOF MS.

Η Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI_TOF MS) είναι μία ανάλυση του πρωτεόματος, δηλαδή του συνόλου των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων τα οποία κωδικοποιούνται και παράγονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού. Στόχοι της είναι α) ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση, ο χαρακτηρισμός και η αλληλούχιση πρωτεϊνών, β) η μελέτη αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών

με σύμπλοκα και γ) η ποσοτικοποίησή τους και η συσχέτιση με την κυτταρική λειτουργία. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την βακτηριακή ταυτοποίηση με βάση τη σύγκριση μεταξύ του πρωτεομικού προφίλ των άγνωστων μικροοργανισμών με των στελεχών αναφοράς που υπάρχουν στη βιβλιοθήκη. Σε αντίθεση με άλλες μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για το ίδιο πεδίο, π.χ. βιολογικής αναγνώρισης ή αναγνώρισης με βάση την PCR, η MALDI-TOF MS είναι μια σύγχρονη, οικονομικά αποδοτική μεθοδολογία όσον αφορά το κόστος λειτουργίας και τις δαπάνες χρόνου στο εργαστήριο (Hart et al. 2015; Lasch et al. 2016; Fernández-Álvarez et al. 2018).

2.3.2. Προετοιμασία δειγμάτων.

Για τη διεξαγωγή της ανάλυσης συλλέχθηκε περισσότερο από το 50% των αποικιών που είχαν αναπτυχθεί στο Kanamycin Aesculin Azide Agar (K.A.A. Agar) και στο Harlequin™ E.coli/ Coliform Medium. Πριν την ταυτοποίηση οι αποικίες αυτές μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με TSA θρεπτικό υλικό και επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των δειγμάτων για την MALDI-TOF MS ανάλυση ήταν τα εξής:

- α) 70% (v/v) Formic acid
- β) 100% Ακετυλονιτρίλιο
- γ) HPLC-grade water (καθαρό νερό)
- δ) Καθαρή αιθανόλη.

Αρχικά 300 μL καθαρού νερού HPLC τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάκια τύπου Eppendorf. Έπειτα 5-10 mg από την κάθε αποικία μεταφέρθηκαν με τη χρήση

αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου από τα τρυβλία στα σωληνάκια τύπου Eppendorf. Ακολούθησε η ομογενοποίηση του περιεχομένου για 1 λεπτό σε συσκευή Vortex. Στη συνέχεια 900 μL καθαρής αιθανόλης προστέθηκαν και ακολούθησε εκ νέου ομογενοποίηση για 1 λεπτό στη συσκευή Vortex. Ακολούθησε η φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13.000 στροφές το λεπτό, για 2 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης και με τη χρήση πιπέτας απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό, με όσο το δυνατόν πιο προσεκτικές κινήσεις ώστε να μην προκληθεί ζημιά στην πελλέτα στο κάτω μέρος του σωλήνα. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν ξανά για 2 λεπτά στις 13.000 στροφές το λεπτό και αφαιρέθηκε με την πιπέτα το υπερκείμενο υγρό. Τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν ανοιχτά επάνω στον εργαστηριακό πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου για να εξατμιστούν τα υπολείμματα αλκοόλης. Επόμενο βήμα ήταν η προσθήκη 180 μL H_2O και 820 μL 85% Formic Acid σε καθαρό σωλήνα Eppendorf και η ομογενοποίηση με συσκευή Vortex, για 1 λεπτό περίπου, έτσι ώστε να δημιουργηθεί υδατικό διάλυμα 70% Formic acid. Μετά περίπου 30 μL από το καθαρό διάλυμα 70% Formic acid προστέθηκε στην πελλέτα, το οποίο ανακατεύτηκε αρχικά με τη χρήση της πιπέτας και μετά για 1 λεπτό στη συσκευή Vortex. Η ίδια ποσότητα διαλύματος 100% ακετυλονιτριλίου προστέθηκε στα σωληνάκια και ακολούθησε ανάδευση. Τα σωληνάκια μεταφέρθηκαν 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 χρήση της MALDI-TOF MS πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που βρίσκεται στη Λάρισα στην οδό Παπακυριαζή 22.

2.4. Ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά

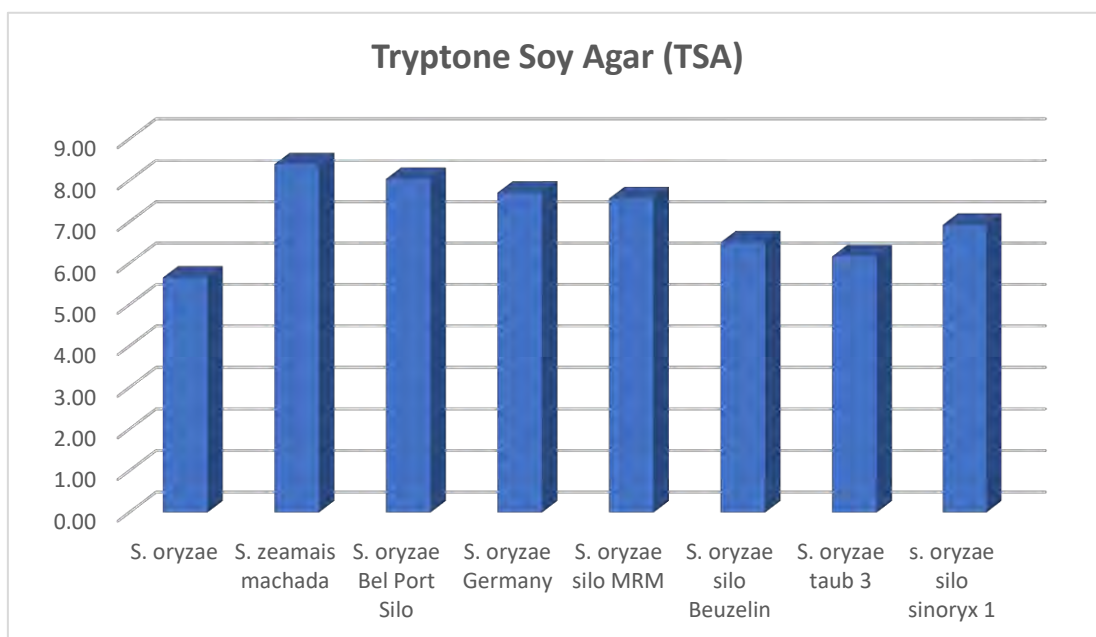
2.4.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Αρχικά 1 ml βακτηριακού εναιωρήματος μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες που περιείχαν 9 ml υγρού θρεπτικού υλικού Tryptone Soy Broth (LAB004, Lab M). Ακολούθησε η επώαση των δειγμάτων για 24 ώρες στους 37°C. Έπειτα έγινε δεκαδική αραίωση του δείγματος μεταφέροντας 1 ml δείγματος σε σωλήνα που περιείχε 9 ml θρεπτικού υλικού. Μετά από ομογενοποίηση, λήφθηκε από το τελικό διάλυμα ποσότητα 0,1 ml, το οποίο προστέθηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό Mueller-Hilton Agar με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης έτσι ώστε ο πληθυσμός ενοφθαλμισμού να είναι 10^7 cfu/g. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν οι δίσκοι που περιείχαν γνωστή ποσότητα αντιβιοτικού. Τα τρία αντιβιοτικά και οι συγκεντρώσεις του ήταν η τετρακυκλίνη (30 μgr), η ερυθρομυκίνη (15 μgr) και η σουλφοναμίδη (300 μgr) (Thermo Scientific™ Oxoid™ Antimicrobial Susceptibility Disk)

3. Αποτελέσματα.

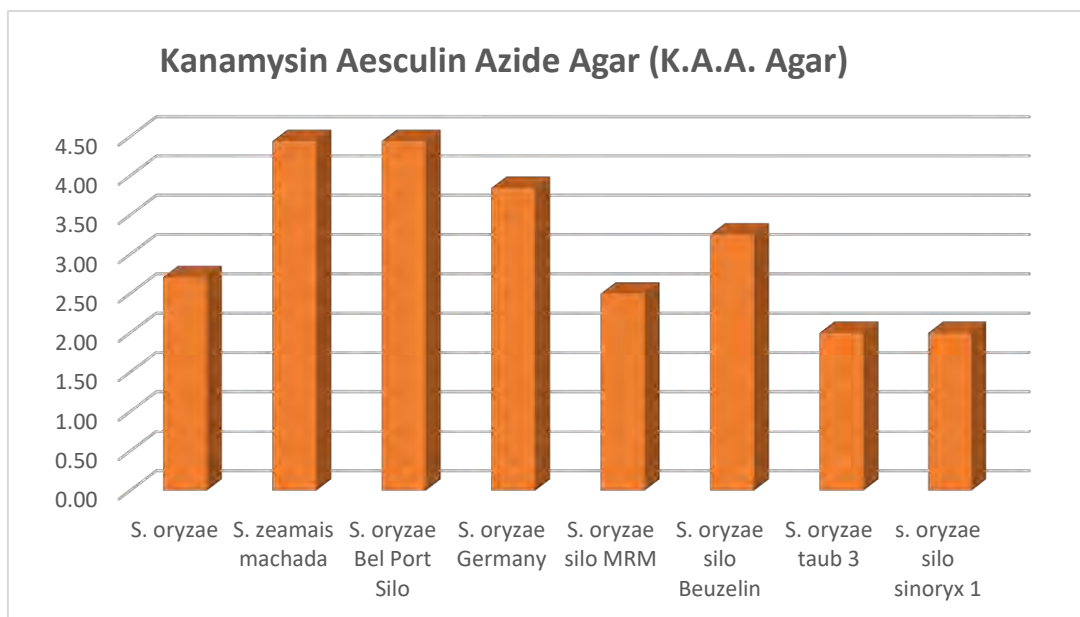
3.1. Μικροβιακοί Πληθυσμοί Εντόμων.

Στο σχήμα 3.1 δίνονται οι τιμές των πληθυσμών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TSA) και των Εντερόκοκκων στα υλικά Kanamycin και Slanetz & Bartley για τα διαφορετικά στελέχη των εντόμων *Sitophilus oryzae* και *Sitophilus zeamais*. Όπως φαίνεται στο σχήμα 3.1 η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TSA) για τα είδη *S. oryzae*, *S. zeamais machada* και *S. oryzae* Bel Port Silo έφτασε τους 5,65, 8.39 και 8,03 log cfu/g αντίστοιχα. Στα *S. oryzae* Germany, *S. oryzae* silo MRM, *S. oryzae* silo Beuzelin οι πληθυσμοί έφτασαν τους 7,70, 7,56 και 6,50 log cfu/g αντίστοιχα, ενώ στα *S. oryzae* taub 3 και *S. oryzae* silo sinoryx 1 ήταν 6,16 και 6,92 log cfu/g.



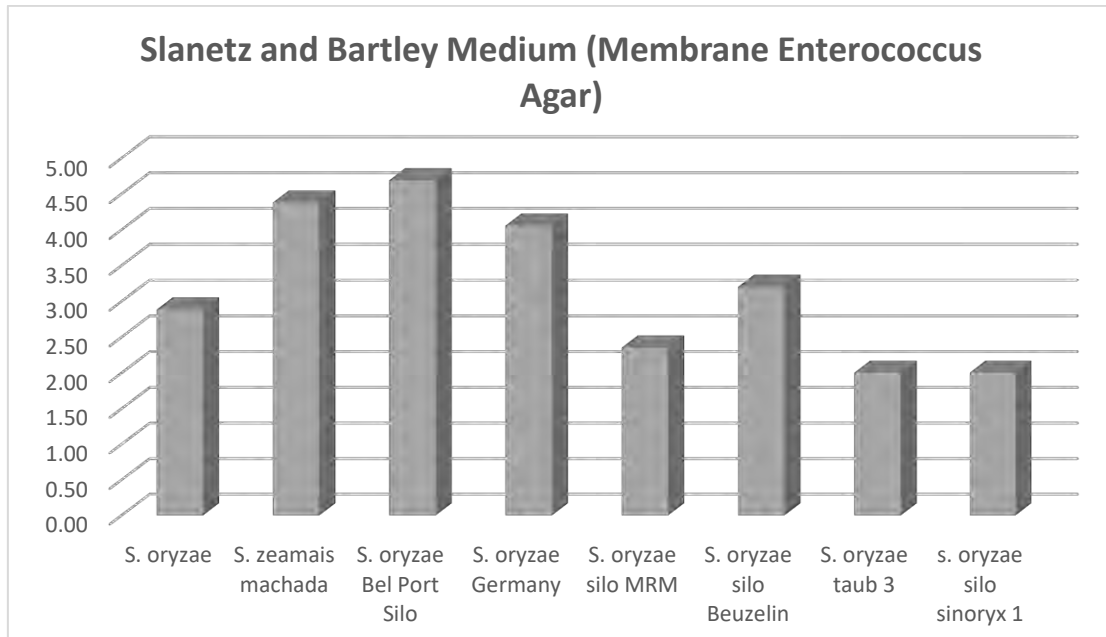
Σχήμα 3.1 Μικροβιακοί πληθυσμοί εντόμων σε log cfu/g που μετρήθηκαν στο υλικό TSA.

Για τις μετρήσεις των Εντερόκοκκων στο Kanamycin όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα 3.2, στο *S. oryzae* ο πληθυσμός ήταν 2,71 log cfu/g, στο *S. zeamais machada* και *S. oryzae* Bel Port Silo ήταν 4,44 log cfu/g. Για το *S. oryzae* Germany ο πληθυσμός ήταν 3,85 log cfu/g, για το *S. oryzae* silo MRM ήταν 2,5 log cfu/g και για το *S. oryzae* silo Beuzelin ήταν 3,24 log cfu/g. Για το *S. oryzae* taub 3 και *S. oryzae* silo sinoryx 1 οι τιμές των πληθυσμών ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων.

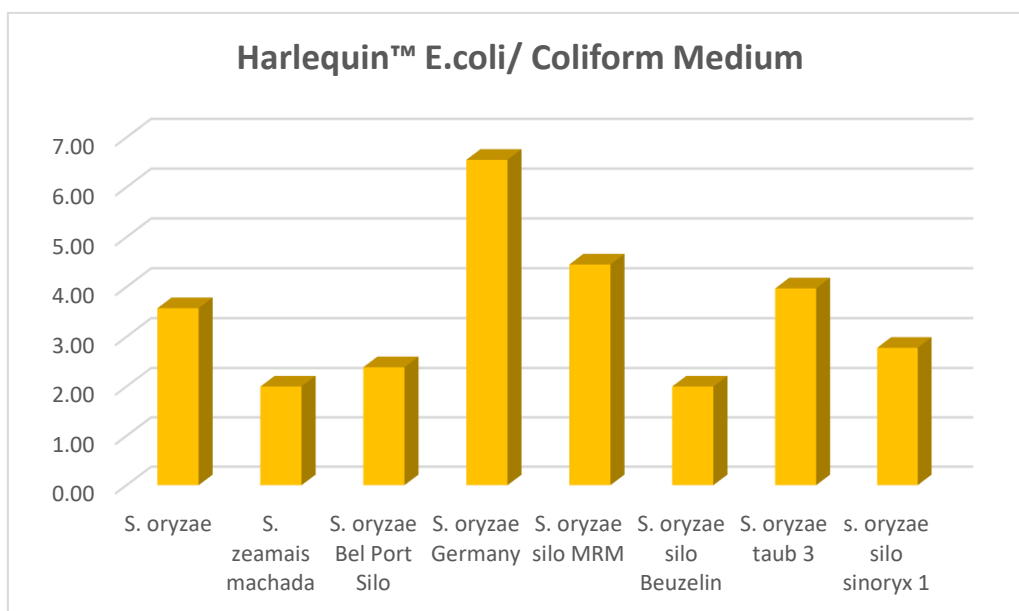


Σχήμα 3.2 Μικροβιακοί πληθυσμοί εντόμων σε log cfu/g που μετρήθηκαν στο υλικό Kanamycin.

Για τα αποτελέσματα των πληθυσμών των Εντερόκοκκων στο Slanetz & Bartley όπως φαίνεται στο σχήμα 3.3, στο *S. oryzae* ο πληθυσμός ήταν 2,88 log cfu/g, στο *S. zeamais machada* και *S. oryzae* Bel Port Silo ήταν 4,50 log cfu/g. Για το *S. oryzae* Germany ο πληθυσμός ήταν 4,05 log cfu/g, για το *S. oryzae* silo MRM ήταν 2,35 log cfu/g και για το *S. oryzae* silo Beuzelin ήταν 3,20 log cfu/g. Για το *S. oryzae* taub 3 και *S. oryzae* silo sinoryx 1 οι τιμές των πληθυσμών ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων.

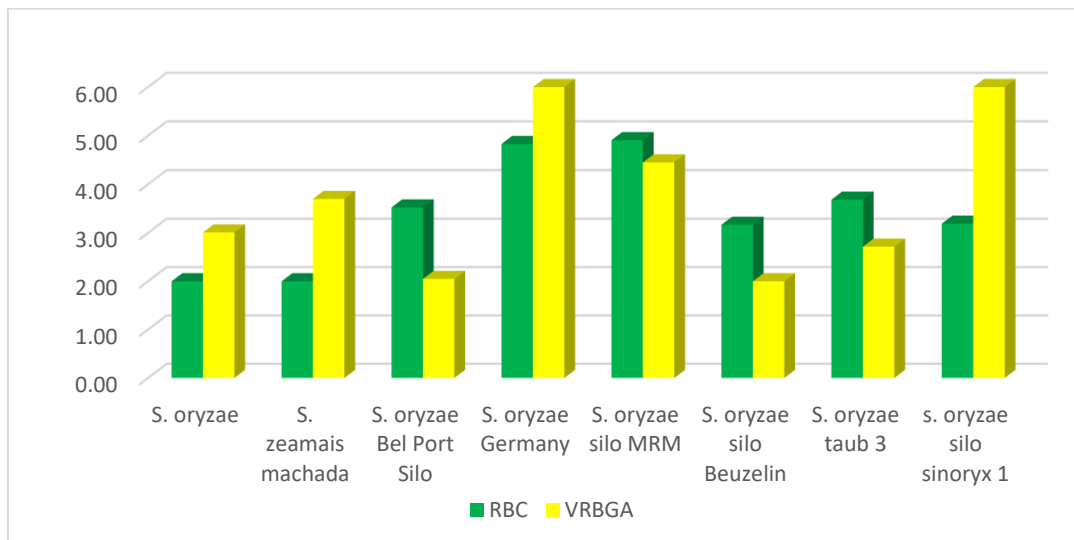


Σχήμα 3.2 Μικροβιακοί πληθυσμοί εντόμων σε log cfu/g που μετρήθηκαν στο υλικό Slanetz & Bartley.



Σχήμα 3.3 Μικροβιακοί πληθυσμοί εντόμων σε log cfu/g που μετρήθηκαν στο υλικό Harlequin™ E.coli/ Coliform Medium.

Για τους πληθυσμούς *E. coli*/coliform όπως φαίνεται στο σχήμα 3.3 στο *S. oryzae* ο πληθυσμός ήταν 3,57 log cfu/g, στο *S. zeamais machada* ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων και στο *S. oryzae* Bel Port Silo ήταν 2,39 log cfu/g. Για το *S. oryzae* Germany ο πληθυσμός ήταν 6,55 log cfu/g, για το *S. oryzae* silo MRM ήταν 4,45 log cfu/g και για το *S. oryzae* silo Beuzelin ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων. Για το *S. oryzae* taub 3 και *S. oryzae* silo sinoryx 1 οι τιμές των πληθυσμών ήταν 3,97 και 2,78 log cfu/g αντίστοιχα.



Σχήμα 3.4 Μικροβιακοί πληθυσμοί εντόμων σε log cfu/g που μετρήθηκαν στα υλικά Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC Agar) και Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA Agar).

Για τους πληθυσμούς των βακτηρίων της οικογένειας των Enterobacteriaceae, όπως φαίνεται και στο παραπάνω σχήμα (Σχ. 3.4), στο *S. oryzae* ο πληθυσμός ήταν 3,01 log cfu/g, στο *S. zeamais machada* ο πληθυσμός ήταν 3,70 log cfu/g και στο *S. oryzae* Bel Port Silo ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων. Για το *S.*

oryzae Germany ο πληθυσμός ήταν 6,00 log cfu/g, για το *S. oryzae* silo MRM ήταν 4,45 log cfu/g. Για το *S. oryzae* silo Beuzelin και το *S. oryzae* taub 3 ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων. Στο *S. oryzae* silo sinoryx 1 ο πληθυσμός ήταν 6,00 log cfu/g.

Τέλος τα περισσότερα στελέχη εντόμων εμφάνισαν πληθυσμούς ζυμών και μυκήτων, με εξαίρεση τα στελέχη *S. oryzae* και *S. zeamais* machada όπου ο πληθυσμός τους ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων. Για *S. oryzae* Bel Port Silo ο πληθυσμός ήταν 3,52 log cfu/g, για το *S. oryzae* Germany ο πληθυσμός ήταν 4,83 log cfu/g, για το *S. oryzae* silo MRM ήταν 4,91 log cfu/g. Τέλος για τα στελέχη *S. oryzae* silo Beuzelin, *S. oryzae* taub 3 και *S. oryzae* silo sinoryx 1 ο πληθυσμός ήταν 3,17, 3,69 και 3,19 log cfu/g αντίστοιχα.

3.2. Ταυτοποίηση βακτηρίων.

Συνολικά απομονώθηκαν 130 μικροοργανισμοί από τα δύο θρεπτικά υποστρώματα, συγκεκριμένα 97 από το Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium και 33 από το Kanamycin Aesculin Azide Agar (Πίν. 3.1).

Πίνακας 3.1. Ταυτότητα των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από τα

διαφορετικά είδη, και ο αριθμός των αποικιών που απομονώθηκαν από τα υλικά.

Όνομα μικροοργανισμού	Στέλεχος εντόμου	Μικροβιολογικό υλικό	Αριθμός αποικιών που
--------------------------	------------------	----------------------	-------------------------

			απομονώθηκαν
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>S. oryzae</i>	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	15
	<i>S. oryzae</i>	Kanamycin Aesculin Azide Agar (K.A.A. Agar)	10
	<i>S. oryzae</i> Germany	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	5
	<i>S. oryzae</i> taub 3	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	21
	<i>S. oryzae</i> silo MRM	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	6
	<i>S. oryzae</i> silo sinoryx 1	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	5
<i>Enterobacter asburiae</i>	<i>S. oryzae</i> taub 3	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	1
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>S. oryzae</i> silo sinoryx 1	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	2
<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>S. oryzae</i> Bel Port silo	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	3
	<i>S. oryzae</i> silo MRM	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	1
	<i>S. oryzae</i> silo sinoryx	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	13

	1	Coliform Medium	
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	<i>S. oryzae</i> silo MRM	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>S. oryzae</i> silo MRM	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	1
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>S. oryzae</i> silo MRM	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	5
	<i>S. zeamais</i> machada	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	10
		Kanamycin Aesculin Azide Agar (K.A.A. Agar)	15
	<i>S. oryzae</i> Bel Port silo	Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium	8
	<i>S. oryzae</i> silo Beutzalin	Kanamycin Aesculin Azide Agar (K.A.A. Agar)	6
<i>Enterococcus phoeniculicola</i>	<i>S. oryzae</i> Germany	Kanamycin Aesculin Azide Agar (K.A.A. Agar)	1
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>S. oryzae</i> Germany	Kanamycin Aesculin Azide Agar (K.A.A. Agar)	1

Σύμφωνα με τον πίνακα 3.1 απομονώθηκαν 15 αποικίες από το υλικό Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium και 10 αποικίες από το υλικό Kanamycin Aesculin Azide Agar (K.A.A. Agar) για το στέλεχος *S. oryzae*. Οι αποικίες πριν την ανάλυση με MALDI-TOF MS, όπως προαναφέρθηκε επανακαλλιεργήθηκαν σε Tryptone Soy Agar (TSA). Η ανάλυση έδειξε την παρουσία του μικροοργανισμού *Enterobacter cloacae*. Για το στέλεχος *S. oryzae* Germany απομονώθηκαν 5 αποικίες από το υλικό Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium, και η MALDI-TOF MS ανίχνευσε τον μικροοργανισμό *Enterobacter cloacae*. Επίσης από τα στελέχη *S. oryzae* taub 3, *S. oryzae* silo MRM και *S. oryzae* silo sinoryx 1 απομονώθηκαν από το υλικό Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium 21, 6 και 5 αποικίες αντίστοιχα, όπου η ανάλυση έδειξε επίσης τον μικροοργανισμό *Enterobacter cloacae*. Επίσης απομονώθηκε 1 αποκία από το υλικό Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium για το στέλεχος *S. oryzae* taub 3 όπου η ανάλυση έδειξε την παρουσία του μικροοργανισμού *Enterobacter asburiae*. Η ύπαρξη του μικροοργανισμού *Pantoea agglomerans* ανιχνεύτηκε μετά την απομόνωση 1 αποικίας από το υλικό Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium για το στέλεχος *S. oryzae* silo sinoryx 1. Η MALDI-TOF MS έδειξε την παρουσία του μικροοργανισμού *Staphylococcus xylosus* στα στελέχη *S. oryzae* Bel Port silo, *S. oryzae* silo MRM και *S. oryzae* silo sinoryx 1 μετά την απομόνωση 3, 1 και 13 αποικιών αντίστοιχα από το υλικό Harlequin™ E. coli/ Coliform Medium. Για το στέλεχος *S. oryzae* silo MRM η απομόνωση 1 αποικίας από το ίδιο υλικό έδειξε τη παρουσία των μικροοργανισμών *Leclercia adecarboxylata* και *Klebsiella oxytoca*. Για την ανίχνευση του μικροοργανισμού *Enterococcus faecium* απομονώθηκαν 5 αποικίες για το στέλεχος *S. oryzae* silo MRM, 10 αποικίες για το στέλεχος *S. zeamais* machada, 8 αποικίες για το στέλεχος *S. oryzae* Bel Port silo από το υλικό υλικό Harlequin™ E. coli/ Coliform

Medium και 15 αποικίες για το στέλεχος *S. zeamais machada* και 6 αποικίες για το στέλεχος *S. oryzae silo* Beutzalin από το υλικό Kanamycin Aesculin Azide Agar (K.A.A. Agar). Τέλος μετά την απομόνωση 1 αποικίας από το υλικό Kanamycin Aesculin Azide Agar (K.A.A. Agar) για το στέλεχος *S. oryzae* Germany, η ανάλυση έδειξε την παρουσία των *Enterococcus phoeniculicola* και *Enterococcus casseliflavus*.

3.3 Ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.

Σύμφωνα με τον πίνακα 3.2. τα στελέχη του είδους *Enterobacter* (*E. cloacae*, *E. asburiae*) και τα δύο στελέχη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, *K. oxytoca* και *P. agglomerans* βρέθηκαν ευπαθή σε τετρακυκλίνη (30 μg) και σουλφοναμίδη (300 μg), αλλά παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην ερυθρομυσίνη (15 μg). Επιπλέον, τα *E. faecium* και *E. phoeniculola* εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην σουλφοναμίδη (300 μg), ενώ αυτά τα στελέχη βρέθηκαν ευπαθή στη τετρακυκλίνη (30 μg) και στην ερυθρομυσίνη (15 μg). Ωστόσο, το 20% των αποικιών του *E. faecium* βρέθηκαν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη (30 μg).

	Σουλφοναμίδη	Τετρακυκλίνη	Ερυθρομυσίνη
<i>Enterobacter cloacae</i>	19.6±1.19	25.2±2.92	NI
<i>Enterobacter asburiae</i>	21.1±0.38	23.1±0.30	NI
<i>Klebsiella oxytoca</i>	21.0±1.00	24.0±1.00	NI
<i>Pantoea agglomerans</i>	21.9±0.54	22.8±0.25	NI

<i>Enterococcus faecium</i>	NI	30.9±1.44 (20 %)	19.8±0.79
<i>Enterococcus phoeniculola</i>	NI	30.7±2.08	21.2±0.39
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	NI	NI	NI
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	20.7±1.15	34.7±0.58	27.3±4.04
<i>Staphylococcus xylosus</i>	20.3±0.71	32.4±0.83 (25 %)	16.9±0.26 (25 %)

Πίνακας 3.2 Ζώνες αναστολής (διάμετρος σε mm) των αντιβιοτικών Σουλφοναμίδη (S3 300 µg), Τετρακυκλίνη (TE 30 µg) και Ερυθρομυσίνη (E 15 µg) που δοκιμάστηκαν στους οργανισμούς που απομονώθηκαν από τα δείγματα εντόμων. Οι τιμές υποδεικνύουν τη μέση ± τυπική απόκλιση των τριών διαφορετικών διαμέτρων ανά είδος. Τα ποσοστά σε παρένθεση αντιστοιχούν στα ανθεκτικά στελέχη. NI: μη αναστολή.

Το *E. casseliflavus* επίσης παρουσίασε ανθεκτικότητα σε όλα τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν. Το *L. adecarboxylate* (100% των στελεχών σε όλα τα αντιβιοτικά) και το *S. xylosus* (100, 75 και 75% των στελεχών στη σουλφοναμίδη (300 µg), τετρακυκλίνη (30 µg) και ερυθρομυσίνη (15 µg)) βρεθηκαν ευπαθή στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν. Τέλος, στην περίπτωση του *S. xylosus*, το 25% ήταν ανθεκτικά στην τετρακυκλίνη (30 µg) και στην ερυθρομυκίνη (15 µg).

4. Συζήτηση.

Τα έντομα αποθηκών (stored product insects) είναι μια ομάδα εντόμων τα οποία εισέρχονται σε αποθηκευμένα προϊόντα και είναι υπεύθυνα για την μετάδοση παθογόνων μικροοργανισμών στα προϊόντα αυτά. Η επαφή των προσβεβλημένων τροφίμων με τον άνθρωπο μπορεί να προκαλέσει διαταραχές στην υγεία του. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση, απαρίθμηση και η απομόνωση των κυριότερων μικροοργανισμών (συγκεκριμένα Εντερόκοκκων και *E.coli/coliform*) που απαντώνται σε διαφορετικά στελέχη δύο ειδών εντόμων αποθηκών όπως το *Sitophilus oryzae* και το *Sitophilus zeamais*, η ταυτοποίησή τους με MALDI-TOF MS καθώς και η μελέτη της ανθεκτικότητας αυτών των βακτηρίων σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως για την θεραπεία του ανθρώπου. Επιπλέον τα παραπάνω στελέχη δοκιμάστηκαν έναντι διάφορων αντιβιοτικών προκειμένου να αξιολογηθεί η ευαισθησία ή η ανθεκτικότητά τους στα αντιβιοτικά. Ορισμένες μελέτες έχουν αποδείξει ότι ανθεκτικά στελέχη του είδους *Enterobacter spp.* έχουν την ικανότητα εξάπλωσης, τόσο των ανθρώπων όσο και άλλων θηλαστικών και συμβάλλουν επίσης στην αύξηση της ανθεκτικότητας, με την διασπορά των ανθεκτικών στελεχών, επιδεινώνοντας έτσι το ήδη σοβαρό πρόβλημα της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά. (Ahmad et al. 2011; Guzman Prieto et al. 2016). Η πυκνότητα του πληθυσμού των Εντερόκοκκων συνήθως κυμαίνεται από 2,0 έως 4,0 λογαρίθμους (log cfu/g) σε θετικό δείγμα (Larson et al. 2008). Στην παρούσα μελέτη, οι προαναφερθείσες τιμές, συμπεριλαμβανομένων των κολοβακτηριδίων ανιχνεύτηκαν περίπου στο 50% του αριθμού των στελεχών των εντόμων. Η ύπαρξη διαφορετικών τιμών πληθυσμών

πιθανόν να οφείλεται τόσο στις τροφικές προτιμήσεις τους αλλά και στο βιοτικό και αβιοτικό τους περιβάλλον.

Τα είδη του γένους *Sitophilus oryzae* και *Sitophilus zeamais* αποικίζουν και εντοπίζονται στους πυρήνες του σιταριού, του ρυζιού και του αραβόσιτου (Athanasίου et al 2001). Ωστόσο παραμένει αβέβαιο εάν τα βακτήρια που περιέχονται στους ακατέργαστους κόκκους των σιτηρών μπορούν να διατηρηθούν ζωντανοί μετά την μεταποίηση των προϊόντων αυτών. Παρόλα αυτά, η παρουσία ειδών εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων είναι ιδιαίτερα συχνή σε πρώτες ύλες και μεταποιημένα προϊόντα που είναι σημαντικά για την ανθρώπινη διατροφή, όπως τα αμυλούχα προϊόντα (Larson et al. 2008, Hubert et al 2008). Σε εργασία τους οι Channaiah et al (2010) βρήκαν από το σύνολο των στελεχών που είχαν απομονωθεί, ότι τα *E. faecium* και *E. faecalis* προέρχονταν από έντομα αποθηκευμένων προϊόντων που προέρχονταν από μύλους ζωοτροφών. Το *E. faecium* μαζί με το *E. faecalis* έχουν αποδειχτεί από τους πιο κύριους παθογόνους μικροοργανισμούς στον κόσμο (Top et al, 2008). Το *E. faecium* έχει εντοπιστεί ξανά σε έντομα αποθηκών (Channaiah et al, 2010). Τα είδη *E. casseliflavus* και *E. phoeniculicola* βρέθηκαν σε μικρότερες συγκεντρώσεις από το *E. faecium*. Το πιο στενό συγγενικά με το *E. faecium* έχει αποδειχτεί το *E. phoeniculicola* ενώ το *E. casseliflavus* έχει συνδεθεί με ασθένειες σε άτομα με χαμηλό ανοσοποιητικό σύστημα (Reid et al, 2001). Δεν βρέθηκε στη βιβλιογραφία συσχέτιση του *E. phoeniculicola* με τα έντομα αποθηκών. Σύμφωνα μάλιστα με τους Byappanahalli et al. (2012) ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός δεν έχει παθογόνο δράση στον άνθρωπο. Σε παρόμοιες μελέτες οι Larson et al. και Channaiah et al. εντόπισαν στελέχη του *E. faecium* και *E. cloacae*, τα οποία απομονώθηκαν από έντομα αποθηκών που προέρχονταν από αλεύρι. Τα υπόλοιπα βακτήρια που εντοπίστηκαν στην παρούσα

εργασία όπως τα *Eb. asburiae*, *P. agglomerans*, *K. oxytoca*, *L. adecarboxylata* και *S. xylosus*, συμμετέχουν σε διάφορες λοιμώξεις ως παθογόνα βακτήρια με εξαίρεση το *K. oxytoca* το οποίο προσβάλλει ασθενείς με ανοσοκαταστολή (Dortet-Frisoni et al. 2007). Επίσης το *S. xylosus* είναι ένα κοινό βακτήριο το οποίο συναντάται στο δέρμα ανθρώπων, θηλαστικών και πουλιών και είναι πιθανό να βρεθεί στα τρόφιμα (Dortet-Frisoni et al. 2007).

Όλα τα στελέχη των εντερόκοκκων που εντοπίστηκαν στην παρούσα εργασία (68, 6 και 3 στελέχη από *E. faecium*, *E. casseliflavus* και *E. phoeniculicola*) εμφάνισαν ανθεκτικότητα στη σουλφοναμίδη. Γενικά, οι εντερόκοκκοι είναι *in vivo* ανθεκτικοί στη σουλφοναμίδη (Morrison et al. 1997). Τα *E. faecium* και *E. casseliflavus* βρέθηκε να παρουσιάζουν αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά όπως η τετρακυκλίνη, η στρεπτομυκίνη, η ερυθρομυκίνη, η καναμυκίνη, η σιπροφλοξασίνη, η αμικικιλίνη και η χλωραμφενικόλη (Channaiah et al. 2010). Οι Larson et al (2008) ανέφεραν ότι το *E. faecium* που είχε απομονωθεί από διαφορετικά έντομα αποθηκευμένων προϊόντων παρουσίαζε ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη και την ερυθρομυκίνη. Στην συγκεκριμένη εργασία, κανένα από τα στελέχη του *E. faecium* παρουσίασε ανθεκτικότητα στην ερυθρομυκίνη, σε αντίθεση με το *E. casseliflavus*.

Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω υπάρχει η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα της μικροβιακής ποικιλότητας των εντόμων αποθηκευμένων προϊόντων. 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. Συμπεράσματα

Τα έντομα των αποθηκευμένων προϊόντων αποτελούν ένα μόνο κίνδυνο για τη υγεία του ανθρώπου και για τον λόγο αυτό είναι αναγκαία η περαιτέρω μελέτη και παρατήρηση του μικροβιακού τους φορτίου. Μετά τις μικροβιακές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν και τα δεδομένα που συλλέχθηκαν διαπιστώθηκε η παρουσία Εντερόκοκκων σε όλα τα είδη *Sitophilus oryzae* και *Sitophilus zeamais* πάνω από το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων (1of cfu/g), αλλά και η παρουσία *E. coli/ coliform* πάνω από το όριο ανίχνευσης στα είδη *S. oryzae*, *S. oryzae* Gernamy, *S. oryzae* silo MRM, *S. oryzae* taub 3 και *S. oryzae* silo sinoryx 1. Επιπλέον διαπιστώθηκε η ανθεκτικότητα βακτηρίων του γένους *Enterobacter* σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως για την θεραπεία λοιμώξεων του ανθρώπου. Συμπερασματικά, εξαιτίας της ανθεκτικότητας και του μικροβιακού φορτίου που περιέχουν τα έντομα αποθηκών, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερα προσοχή στην ποιότητα των αποθηκευμένων προϊόντων που προορίζονται ως πρώτες ύλες για την παραγωγή ιχθυοτροφών.

6. Βιβλιογραφία.

Ξένη Βιβλιογραφία

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

Ahmad A., Ghosh A., Schal C., Zurek L. (2011) Insects in confined swine operations carry a large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community. *BMC Microbiology*, 11:1-23.

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

Athanassiou C. & Buchelos C., (2001), The presence of *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1855 (Coleoptera: Curculionidae) in Greece: Distribution and food preferences.

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.

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

Dordet-Frisoni E., Dorchies G., De Araujo C., Talon R, Leroy S. (2007) Genomic diversity in *Staphylococcus xylosum*. *J Appl Environ Microbiol* 73(22):7199–7209.

FAO (2013): Edible insects: Future prospects for food and feed security, FAO forestry paper 171.

FAO (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2016.

Fernández-Álvarez C., Torres-Corral Y., Santos Y. (2018) Use of ribosomal proteins as biomarkers for identification of *Flavobacterium psychrophilum* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Proteomics* 170:59–69.

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.

Guzman Prieto AM., van Schaik W., Rogers M.R. et al (2016) Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Front Microbiol* 7:788.

Hart P.J., Wey E., McHugh T.D., Balakrishnan I., Belgacem O. (2015) A method for the detection of antibiotic resistance markers in clinical strains of *Escherichia coli* using MALDI mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 111:1–8.

Hubert J., Stejskal V., Athanassiou C.G., Throne J.E. (2018) Health hazards associated with arthropod infestation of stored products. *Annu Rev Entomol* 63:553–573.

Jackson A., (2006). The importance of fishmeal and fish oil in aquaculture diets. *International Aquafeed*, Nov-Dec 2006:16-19.

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.

Larson Z., Subramanyam B., Zurek L., Herrman T. (2008) Diversity and antibiotic resistance of enterococci associated with stored product insects collected from feed mills. *J Stored Prod Res* 44:198–203.

Lasch P., Jacob D., Grunow R., Schwecke T., Doellinger J. (2016) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) for the identification of highly pathogenic bacteria *Trends. Anal Chem* 85:103–111.

Levinson H. Z., Levinson A. R. 1985. Storage and insect species of stored grain and tombs in ancient Egypt. *Zeits. für Angew. Entomol.* 100:321–39.

Linden K. Peter, Miller B. Carole, (1999), Vancomycin-resistant Enterococci: the clinical effect of a common nosocomial pathogen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 33:113-120.

Morrison D., Woodford N., Cookson B. (1997) Enterococci as emerging pathogens of humans. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 83:89S–99S.

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

Pimentel D. (1991), World resources and food losses to pests. See Ref. 37, pp. 5–11.

Reid K.C., Cockerill F.R. III, Patel R. (2001) Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. *Clin Infect Dis* 32:1540–1546.

Sánchez-Muros M.J., Barroso F.G., Manzano-Agugliaro F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *Journal of Cleaner Production* 65: 16-27.

Top J., Willems R., Bonten M. (2008) Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52:297–308.

Ελληνική Βιβλιογραφία.

Κ.Θ. Μπουχέλος (2005), Έντομα αποθηκευμένων γεωργικών προϊόντων και τροφίμων, Αθήνα 2005.

Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία.

www.fao.com

www.wikipedia.org

www.forestryimages.org

www.123rf.com

www.sciencephoto.com