



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ-ΥΔΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ:

**“Μικροβιακοί δείκτες υγιεινής και παρουσία *Salmonella* spp. σε
νωπά σαλιγκάρια”.**

ΘΕΟΧΑΡΗ ΜΑΡΙΑ

ΒΟΛΟΣ 2010

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- **Ιωάννης Μποζιάρης**, Επίκουρος Καθηγητής Υγιεινής και Συντήρησης Ιχθυερών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- **Χρήστος Νεοφύτου**, Καθηγητής Ιχθυολογίας - Υδροβιολογίας, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- **Μαριάνθη Χατζιωάννου**, Διδάκτορας, Π.Δ 407/80, Εκτροφή Γαστεροπόδων Αμφιβίων και Ερπετών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης απαιτούσε τη βοήθεια και τη συμβολή ορισμένων ανθρώπων τους οποίους εκτιμώ ιδιαίτερα και θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινές μου ευχαριστίες στα πρόσωπά τους.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής Επίκουρο Καθηγητή κ. Ι. Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του, τις συμβουλές του και την καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Ειδικές ευχαριστίες επιθυμώ να απευθύνω στην κα Μαριάνθη Χατζηιωάννου, μέλος της εξεταστικής επιτροπής, διδάσκουσα με το Π.Δ 407/80, για την άριστη συνεργασία της μαζί μου, την προθυμία της και τις τόσο σημαντικές της υποδείξεις.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Χρήστο Νεοφύτου για τις συμβουλές του και τις παρεμβάσεις του κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ τη Φωτεινή Παρλαπάνη και Δέσποινα Κοκιούμη για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της εργασίας μου.

Τέλος, τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου επιθυμώ να εκφράσω στους δύο ανθρώπους που με τόση αγάπη ανέχονται όλα αυτά τα χρόνια την κάθε απροσδόκητη σκέψη και πράξη μου, τους γονείς μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού, των μικροοργανισμών δεικτών υγιεινής καθώς και η επισήμανση της παρουσίας της *Salmonella spp* στα σπλάχνα και τη σώμα (πόδι) νωπών σαλιγκαριών των ειδών *Helix aspersa* και *Helix lucorum* που προορίζονται για εμπορία.

Τα νωπά σαλιγκάρια μελετήθηκαν ως προς την ποιότητα και ασφάλεια με χρήση των μικροοργανισμών δεικτών όπως είναι η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) το *Escherichia coli*, τα coliforms και οι Εντερόκοκκοι.

Η περιεκτικότητα των σπλάχνων σε μικροοργανισμούς ήταν υψηλότερη από αυτή των σωμάτων για όλους τους πληθυσμούς σαλιγκαριών που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα οι πληθυσμοί της OMX σε σώμα και σπλάχνα βρέθηκαν στα επίπεδα των 6,16 και 7,06 log cfu/g, αντίστοιχα, για τα άγρια ζώα του είδους *Helix aspersa*, 6,59 και 7,36 log cfu/g, αντίστοιχα, για τα άγρια ζώα του είδους *Helix lucorum* και 5,38 και 5,62 log cfu/g, αντίστοιχα, για τα ζώα του είδους *Helix aspersa* εκτροφής.

Οι συγκεντρώσεις των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae αποτελούσαν μεγάλο ποσοστό της OMX. Οι μέσοι όροι των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae που ανιχνεύθηκε στα δείγματα των άγριων ζώων του είδους *Helix aspersa* υπολογίσθηκαν σε 5,71 log cfu/g για το σώμα και 7,30 log cfu/g για τα σπλάχνα, για το είδος *Helix lucorum* 6,17 και 6,46 log cfu/g και για τα σαλιγκάρια από την εκτροφή 6,64 και 7,28 log cfu/g, αντίστοιχα.

Ο πληθυσμός *E.coli* ανιχνεύθηκε στα δείγματα των άγριων ζώων του είδους *Helix aspersa* υπολογίσθηκε σε 4,42 log cfu/g για το σώμα και 5,97 log cfu/g για τα σπλάχνα, για το είδος *Helix lucorum* 2,85 και 4,07 log cfu/g και για τα σαλιγκάρια από την εκτροφή 4,83 και 5,18 log cfu/g, αντίστοιχα, ενώ οι μέσοι όροι των

βακτηρίων της ομάδας coliform που ανιχνεύθηκε στα δείγματα των άγριων ζώων του είδους *Helix aspersa* υπολογίσθηκαν σε 5,54 log cfu/g για το σώμα και 6,7 log cfu/g για τα σπλάχνα, για το είδος *Helix lucorum* 5,04 και 5,66 log cfu/g και για τα σαλιγκάρια από την εκτροφή 6,65 και 6,44 log cfu/g, αντίστοιχα. Όσον αφορά τα βακτήρια του γένους *Enterococcus* υπολογίσθηκαν σε 4,71 log cfu/g για το σώμα και 5,22 log cfu/g για τα σπλάχνα, για το είδος *Helix lucorum* 0 και 5,93 log cfu/g και για τα σαλιγκάρια από την εκτροφή 4,74 και 4,92 log cfu/g, αντίστοιχα.

Ο αριθμός και το είδος των μικροοργανισμών που ανευρίσκονται στα ζωντανά σαλιγκάρια εξαρτάται από το είδος και τον πληθυσμό της μικροβιακής χλωρίδας του περιβάλλοντος στο οποίο ζουν, από τη φάση του βιολογικού τους κύκλου και από τις συνθήκες υγιεινής που επικρατούν κατά τη συλλογή, τη μεταφορά και την εμπορία τους.

Τέλος παρουσία *Salmonella spp.* παρατηρήθηκε μόνο στα δείγματα των άγριων πληθυσμών, τόσο στο είδος *Helix aspersa* όσο και στο είδος *Helix lucorum* και όχι στα σαλιγκάρια *Helix aspersa* εκτροφής.

Γενικότερα τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχε διαφορά μεταξύ των δύο άγριων σαλιγκαριών *Helix aspersa* και *Helix lucorum*, καθώς και μεταξύ των άγριων και εκτροφής ζώων του είδους *Helix aspersa* ως προς τη συγκέντρωσή τους σε όλες τις κατηγορίες μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν σε σπλάχνα και σώμα.

Λέξεις Κλειδιά : *Helix aspersa*, *Helix lucorum*, μικροβιακοί δείκτες, ποιότητα τροφίμων – σαλιγκαριών, υγιεινή και ασφάλεια τροφίμων – σαλιγκαριών.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1. Το εδώδιμο σαλιγκάρι.....	8
1.2. Περιγραφή των ειδών.....	8
1.2.1. Εξωτερική μορφολογία.....	8
1.2.2. Εσωτερική μορφολογία.....	10
1.3. Στοιχεία μικροβιολογίας.....	10
1.3.1. Μικροοργανισμοί και τρόφιμα.....	10
1.3.2. Μικροβιολογικοί Δείκτες Υγιεινής και Ασφάλειας.....	11
1.3.2.1. Οικογένεια Enterobacteriaceae.....	12
1.3.2.2. Κολοβακτηριοειδή (Coliforms).....	13
1.3.2.3. <i>Enterococcus</i>	13
1.3.2.4. <i>Salmonella spp</i>	14
1.4. Στοιχεία μικροβιολογίας σαλιγκαριών.....	14
1.5. Σαλιγκάρια και προβλεπόμενη νομοθεσία.....	15
1.6 Αντικείμενο και στόχοι της παρούσας πτυχιακής διατριβής.....	16
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
2.1. Προέλευση σαλιγκαριών.....	18
2.2. Προετοιμασία δειγμάτων.....	18
2.3. Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	19
2.4. Πρωτόκολλο ανίχνευσης <i>Salmonella spp</i>	22
2.4.1. Βιοχημικές δοκιμές με χρήση API 20E.....	24
2.4.2. Ορολογικές δοκιμές με χρήση <i>Salmonella</i> Rapid Latex test.....	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
3.1. Μικροβιολογικός πληθυσμός σαλιγκαριών.....	27

3.2. Ανίχνευση <i>Salmonella spp.</i>	35
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44
5.1. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44
5.2. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	52
5.3. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	55
6. ABSTRACT.....	56

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το εδώδιμο σαλιγκάρι.

Στις μέρες μας τα σαλιγκάρια αποτελούν ένα υψηλής διατροφικής αξίας προϊόν, με συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση και καταναλώνονται από εκατομμύρια ανθρώπους, ενώ ήδη από την αρχαιότητα έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή φαρμακευτικών προϊόντων και καλλυντικών (Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, 2009).

Η μεγαλύτερη ποσότητα των σαλιγκαριών που διακινούνται στην παγκόσμια αγορά προέρχονται από άγριους-φυσικούς πληθυσμούς (Μάνδαλος, 2008).

Τα είδη των εδώδιμων σαλιγκαριών που ζουν ελεύθερα στην Ευρώπη είναι περίπου δώδεκα και μόνο τέσσερα έως πέντε είναι εμπορεύσιμα (Overview of the European Community, 1993). Στην Ελλάδα τα σημαντικότερα και πιο εμπορεύσιμα είδη εδώδιμων σαλιγκαριών είναι τα: *Helix aspersa*, *Helix pomatia*, *Helix lucorum*, *Eobania vermiculata* και *Helix melanostoma*, από τα οποία εξάγονται κυρίως τα *Helix aspersa* και *lucorum* (Γκόγκας κ.α., 2005, Μάνδαλος, 2008).

Παρ' όλα αυτά οι φυσικοί πληθυσμοί των σαλιγκαριών στην Ευρωπαϊκή Ένωση δεν επαρκούν, και έχει ήδη συμβεί εξαφάνιση των περισσότερων ειδών εδώδιμων σαλιγκαριών λόγω υπερσυλλογής (Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, 2009).

1.2. Περιγραφή των ειδών.

1.2.1. Εξωτερική μορφολογία.

Helix aspersa

Το είδος *Helix Aspersa* (Εικόνα 1.1), έχει κέλυφος διαμέτρου 20-40 χιλ., ύψους 25-40 χιλ., στερεό, κωνικό, πολύ κυρτό στην κορυφή και πεπλατυσμένο στη

βάση, με 4-5 σπείρες που εξέχουν χωρίς ομφαλό. Το χρώμα του κελύφους συνήθως είναι κιτρινοκαστανό που παραλλάσσει μέχρι το γκρι, με κυματοειδείς γραμμές ανοιχτότερου χρώματος (Μαρκάκης, 1990).

Κοινά ονόματα του είδους είναι Escargot petit gris στα γαλλικά, Brown garden snail στα αγγλικά και στην Ελλάδα Κρητικός κοχλιός (Χατζηιωάννου, 2007).



Εικόνα 1.1. Σαλιγκάρια του είδους *Helix aspersa* (<http://commons.wikimedia.org>).

Το *Helix aspersa* αποτελεί είδος της Μεσογείου. Στην Ελλάδα συναντάται στην Κρήτη και την Πελοπόννησο καθώς και στην στερεά Ελλάδα και την Θεσσαλία (Μαρκάκης, 1990). Προτιμά υγρές περιοχές με ήπιο κλίμα, ελαφρύ έδαφος και χαμηλό υψόμετρο (INPN, 2007). Γενικά απαντά σε ένα ευρύ φάσμα βιοτόπων (Χατζηιωάννου, 2009).

Helix lucorum

Το είδος ***Helix lucorum***, γνωστό και ως ‘μαυροσαλίγκαρο’ ή ‘σαλιγκάρι των δασών’ ή ‘Τούρκικο’(Εικόνα 1.2), χαρακτηρίζεται από σφαιρικό σχεδόν κωνικό κέλυφος συνήθως με ζωνώσεις που έχουν πολύ σκούρο καφέ χρώμα (Χατζηιωάννου,2007).Η διάμετρος του κελύφους των ώριμων ατόμων κυμαίνεται μεταξύ 35 και 50 mm (Staikou et al.,1988).



Εικόνα 1.2. Σαλιγκάρια του είδους *Helix lucorum* (<http://elrincon-continentales3.iespana.>).

1.2.2. Εσωτερική μορφολογία.

Το σώμα των σαλιγκαριών διακρίνεται σε τέσσερα τμήματα:

- Στην κεφαλή, που είναι καλά αναπτυγμένη και φέρει στόμα και δύο ζεύγη κεραιών από τα οποία στο άκρο του πρώτου βρίσκονται τα μάτια.
- Στο σώμα, το οποίο αποτελεί σαρκώδη μάζα και καθορίζει την κίνηση του ζώου.
- Στο μανδύα, που αποτελεί μια πτύχωση του δέρματος η οποία περιβάλλει την σπλαχνική μάζα και εκκρίνει το κέλυφος.
- Στη σπλαχνική μάζα, η οποία περιλαμβάνει το πεπτικό, κυκλοφοριακό, γεννητικό, αναπνευστικό και απεκκριτικό σύστημα και βρίσκεται τοποθετημένη μέσα στο κέλυφος.

1.3. Στοιχεία μικροβιολογίας.

1.3.1. Μικροοργανισμοί και τρόφιμα.

Οι μικροοργανισμοί είναι διαδεδομένοι παντού. Τα τρόφιμα φέρουν μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο από ότι οι άλλες μορφές οργανικής ύλης. Η αρχική μικροβιακή χλωρίδα και η χλωρίδα επιμόλυνσης των τροφίμων εξαρτάται από το είδος της πρώτης ύλης και τις συνθήκες που επικρατούν κατά την επεξεργασία της αντίστοιχα (Μποζιάρης, 2008, Αρβανιτογιάννης κ.α., 2008).

Έτσι προκύπτει πως η πιο σημαντική απαίτηση για τα τρόφιμα είναι η ασφάλεια. Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius, η ασφάλεια στα τρόφιμα σημαίνει εξασφάλιση ότι το τρόφιμο δε θα προκαλέσει βλάβη στον καταναλωτή όταν ετοιμαστεί ή και καταναλωθεί, σύμφωνα με την προοριζόμενη χρήση του. Υπάρχουν

τρεις τύποι κινδύνων που είναι οι βιολογικοί, οι χημικοί και οι φυσικοί (Χατζηγιάννου, 2007 και Αρβανιτογιάννης και Μπονσέα, 2001).

Οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι αποτελούν την μεγαλύτερη απειλή για την υγεία των καταναλωτών. Γενικότερα αποτελούν και τον κυριότερο παράγοντα αλλοίωσης τροφίμων. Αλλοιωγόνα βακτήρια κυρίως, είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση των νωπών τροφίμων ζωικής προέλευσης, ενώ οι ζύμες και οι μύκητες κυρίως κυριαρχούν στην αλλοίωση των τροφίμων φυτικής προέλευσης (Καραγκούνη-Κύρτσου, 1999).

Τέλος, τα τρόφιμα θεωρούνται γενικά ως φθαρτά προϊόντα τα οποία κατά τη διατήρησή τους κάτω από ορισμένες συνθήκες υφίστανται ποιοτική υποβάθμιση και αλλοίωση. Στο ποιοτικά υποβαθμισμένο τρόφιμο επέρχονται μεταβολές στα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά που μειώνουν την αποδοχή του από τον καταναλωτή και συνεπώς την εμπορική του αξία, χωρίς ωστόσο το τρόφιμο να θεωρείται ακατάλληλο για κατανάλωση. Όμως, μια αρχικά μικρή ποιοτική υποβάθμιση ενός τροφίμου είναι δυνατόν να αποτελέσει την απαρχή παραπέρα αλλοίωσης (Μπλούκας, 2004). Τα αίτια που προκαλούν ποιοτική υποβάθμιση και αλλοιώσεις στα τρόφιμα είναι τα μηχανικά αίτια, όπως χτύπημα, εφελκυσμός, οι μικροοργανισμοί ,βακτήρια, μύκητες και ζύμες, τα ενδογενή ένζυμα, οι φυσικοί παράγοντες, όπως η υγρασία, το οξυγόνο, το φως, η θερμοκρασία κ.α. (Αρβανιτογιάννης και Μπονσέα, 2001).

1.3.2. Μικροβιολογικοί Δείκτες Υγιεινής και Ασφάλειας.

Μικροβιολογικοί δείκτες είναι ομάδες ή είδη μικροοργανισμών των οποίων η παρουσία όταν ξεπερνά ορισμένα προκαθορισμένα όρια για κάθε είδος τροφίμου, θεωρείται ένδειξη ελλιπούς ασφάλειας. Η παρουσία των μικροοργανισμών δεικτών στα τρόφιμα σε πληθυσμό που ξεπερνά ένα προκαθορισμένο όριο σε cfu/g τροφίμου

δε συνεπάγεται την ύπαρξη παθογόνων αλλά καθιστά πιθανή την παρουσία τους (Παρλαπάνη, 2009). Οι πιο κοινοί δείκτες σήμερα είναι τα κολοβακτηριοειδή (Total coliforms), το *Enterococcus spp.* και τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (Faecal coliforms) με πιο αξιόπιστο δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης το είδος *E. coli*.

Οι μικροοργανισμοί δείκτες της υγιεινής και ασφάλειας των τροφίμων πρέπει να πληρούν τα παρακάτω κριτήρια (Jay, 2005):

- Να υπάρχουν στο τρόφιμο όταν υπάρχει ο παθογόνος μικροοργανισμός για την παρουσία του οποίου αποτελούν ένδειξη.
- Να απουσιάζουν από τα τρόφιμα όταν αυτά δε φέρουν παθογόνους μικροοργανισμούς ή να υπάρχουν σε πολύ μικρό αριθμό.
- Ο πληθυσμός τους στο τρόφιμο να βρίσκεται σε συσχέτιση με τον πληθυσμό του παθογόνου μικροοργανισμού.
- Να έχουν απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά και ρυθμό ανάπτυξης παρόμοια με τον παθογόνο.
- Ο ρυθμός καταστροφής τους να είναι τουλάχιστον όμοιος με του παθογόνου και σε ιδανικές περιπτώσεις να είναι ελαφρά ανθεκτικότεροι από τον παθογόνο.

1.3.2.1. Οικογένεια Enterobacteriaceae.

Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει βακίλους με περίτριχα μαστίγια. Είναι δυνητικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, με απλές θρεπτικές απαιτήσεις. Ανήκουν στη φυσική χλωρίδα του εντέρου και αποικοδομούν σάκχαρα μέσω της Embder-Meyerhof μεταβολικής οδού, διασπούν δε το πυροσταφιλικό οξύ σε μυρμηκικό. Στη συνέχεια, ζυμώνουν το μυρμηκικό σε υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Η Οικογένεια Enterobacteriaceae χρησιμοποιείται ως δείκτης υγιεινής και ασφάλειας

για διάφορα τρόφιμα, τους χώρους και τον εξοπλισμό των βιομηχανιών τροφίμων (Μποζιάρης, 2008).

1.3.2.2. Κολοβακτηριοειδή (Coliforms).

Τα κολοβακτηριοειδή αποτελούν ετερογενή ομάδα της οικογένειας Enterobacteriaceae και είναι αυτά τα οποία έχουν την δυνατότητα να ζυμώνουν και την λακτόζη στους 37°C. Σε αυτά ανήκει και το *Escherichia coli* (Μποζιάρης, 2008). Τα βακτήρια αυτά συναντώνται στον εντερικό σωλήνα και στα κόπρανα ανθρώπων και ζώων, έτσι χρησιμοποιούνται ως μικροοργανισμοί δείκτες για την ανίχνευση κοπρανώδους μόλυνσης και για την πιθανή παρουσία παθογόνων μικροβίων στο πόσιμο νερό και στα τρόφιμα.

Escherichia coli.

Το *E.coli* είναι προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός ο οποίος βρίσκεται στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων και αποτελεί εξειδικευμένο δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης των τροφίμων και του πόσιμου νερού. Χρησιμοποιείται μαζί με τα ολικά κολοβακτηριοειδή και την ολική μεσόφιλη χλωρίδα ως δείκτης ποιότητας και ασφάλειας στις βιομηχανίες τροφίμων (Odumeru and Belvedere, 2002).

1.3.2.3. *Enterococcus*

Αποτελείται από είδη των πρώην Στρεπτόκοκκων (*Streptococcus*) της ορολογικής σειράς D. Απαντούν στον εντερικό σωλήνα και τα κόπρανα των ζώων και του ανθρώπου. Είναι μικροαερόφιλα και αρνητικά στην καταλάση. Αναπτύσσονται σε χαμηλό pH και είναι ανθεκτικά σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων σε χαμηλή ενεργότητα νερού και είναι πιο ανθεκτικά στην κατάψυξη σε σχέση με τα

Enterobacteriaceae. Τα σημαντικότερα είδη είναι τα *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium*. Χρησιμοποιούνται ως δείκτες υγιεινής και ασφάλειας για το πόσιμο νερό και διάφορα τρόφιμα.

1.3.2.4. *Salmonella* spp.

Η σαλμονέλα είναι το όνομα ενός γένους ραβδόμορφων κινητών βακτηρίων (τα μη κινητά στελέχη είναι οι εξαιρέσεις *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum*), μη σπορογόνων και Gram-αρνητικών. Απαντάται ιδιαίτερα συχνά στα ζώα, ειδικά στα πουλερικά και τους χοίρους. Διάφορα είδη σαλμονέλας έχουν απομονωθεί εδώ και πολύ καιρό και έξω από το κέλυφος αυγών. Οι περιβαλλοντικές πηγές του μικροοργανισμού περιλαμβάνουν το νερό, το χώμα, τα έντομα, τις επιφάνειες εργοστασίων, τις επιφάνειες κουζινών, τα ζωικά περιττώματα, τα ακατέργαστα κρέατα. Τέλος, Η σαλμονέλα είναι ευαίσθητη στη θέρμανση και εξουδετερώνεται με τη θέρμανση (πάνω από 70 °C). Το κατάλληλο μαγείρεμα και ο υγιεινός χειρισμός τροφίμων μπορούν να προλάβουν τις μολύνσεις από σαλμονέλα σε μεγάλο βαθμό (<http://www.food-info.net/gr/bact/salm.htm>).

1.4. Στοιχεία μικροβιολογίας σαλιγκαριών.

Ο ποιοτικός έλεγχος των σαλιγκαριών περιλαμβάνει το μακροσκοπικό και εργαστηριακό έλεγχο. Ο μακροσκοπικός είναι ο έλεγχος που πραγματοποιείται στα ζωντανά σαλιγκάρια με σκοπό τη διαπίστωση του είδους και της κατάστασης στην οποία βρίσκονται π.χ. ζωντανά ή νεκρά, άρρωστα, ετοιμοθάνατα ή σε κατάσταση σήψης. Ο εργαστηριακός έλεγχος περιλαμβάνει το μικροβιολογικό έλεγχο και πραγματοποιείται αμέσως μετά τη θανάτωση των ζωντανών σαλιγκαριών αλλά και κατά τη μεταποίηση τους (Παρλαπάνη, 2009).

Ο αριθμός και το είδος των μικροοργανισμών που ανευρίσκονται στα ζωντανά σαλιγκάρια, εξαρτάται από το είδος και τον πληθυσμό της μικροβιακής χλωρίδας του περιβάλλοντος στο οποίο ζουν, από τη φάση του βιολογικού τους κύκλου και από τις συνθήκες υγιεινής που επικρατούν κατά τη συλλογή, τη μεταφορά και την εμπορία τους (Χατζηιωάννου, 2007).

Συγκεκριμένα, οι μικροοργανισμοί που έχουν ανιχνευθεί τις τελευταίες δεκαετίες σε διάφορα είδη σαλιγκαριών είναι οι εξής: OMX (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα) (Pinasu and Leoni, 1980), Enterobacteriaceae (Kiebre-Toe et al., 2003), *E.coli*/coliforms (Parisi-Bianco, 1978), *Salmonella* (Andrews et al., 1975), *Listeria spp* (Temelli et al., 2006), *Staphylococcus* (Temelli et al., 2006), *Streptococcus spp.* (Pinasu and Leoni, 1980), Θειοαναγωγικά Κλωστρίδια (Pinasu and Leoni, 1980), Aeromonadacea (Kiebre-Toe et al., 2003), Pseudomonadaceae (Kiebre-Toe et al., 2003), ζύμες και μύκητες (Παρλαπάνη, 2009).

1.5. Σαλιγκάρια και προβλεπόμενη νομοθεσία.

Η ανάγκη για την προστασία της δημόσιας υγείας οδήγησε στον προσδιορισμό ειδικών όρων έτσι ώστε να αποφεύγεται το ενδεχόμενο κινδύνου για την κατανάλωση των συγκεκριμένων προϊόντων από τον άνθρωπο.

Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την απόφαση 96/340/EK στις 10 Μαΐου του 1996 της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων τα κράτη μέλη πρέπει να φροντίζουν ώστε τα αποκελυφωμένα, μαγειρευμένα ή διατηρημένα σαλιγκάρια να αποτελούν αντικείμενο εμπορίου, με σκοπό την κατανάλωση από τον άνθρωπο, μόνο εφόσον πληρούν τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

- Πρέπει να προέρχονται από μονάδα (εγκατάσταση) που πληρεί τις προβλεπόμενες προϋποθέσεις στο άρθρο 4 παράγραφος 2 της παρούσας απόφασης και που προβαίνει σε αυτοέλεγχο σύμφωνα με τις διατάξεις.
- Πρέπει να υποβληθούν σε οργανοληπτικό έλεγχο που πραγματοποιείται με δειγματοληψία. Εάν προκύψει από την οργανοληπτική εκτίμηση ότι τα σαλιγκάρια είναι ακατάλληλα για την ανθρώπινη κατανάλωση, πρέπει να ληφθούν μέτρα απόσυρσής τους από την αγορά και μεταποίησής τους κατά τρόπον ώστε να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανθρώπινη κατανάλωση.

Επίσης επειδή οι φυσικοί πληθυσμοί των σαλιγκαριών στην Ευρωπαϊκή Ένωση δεν επαρκούν, και σε ορισμένες περιοχές έχει ήδη συμβεί εξαφάνιση των περισσότερων ειδών εδώδιμων σαλιγκαριών λόγω υπερσυλλογής (Daguzan, 1989), επίκειται η ολική απαγόρευση της ελεύθερης συλλογής σαλιγκαριών, με οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, οδηγία που θα δώσει ιδιαίτερη ώθηση στην ανάπτυξη των μονάδων εκτροφής και πάχυνσης σαλιγκαριών.

1.6. Αντικείμενο και στόχοι της παρούσας πτυχιακής διατριβής.

Αντικείμενο της συγκεκριμένης έρευνας ήταν ο προσδιορισμός του αρχικού μικροβιολογικού πληθυσμού καθώς και των μικροοργανισμών που αποτελούν δείκτες υγιεινής στα νωπά σαλιγκάρια -είτε άγρια είτε εκτροφής- των ειδών *Helix aspersa* καθώς και *Helix lucorum* που προορίζονταν για εμπορία και επιπλέον η διερεύνηση της παρουσίας ή απουσίας *Salmonella spp.* στο σώμα των σαλιγκαριών αυτών.

Οι λόγοι για τους οποίους έπρεπε να πραγματοποιηθεί η παρούσα μελέτη ήταν:

- Η απουσία επαρκών ερευνητικών δεδομένων.

- Η προστασία της δημόσιας υγείας, διότι όπως έχει ειπωθεί και πριν, οι μικροβιολογικοί κίνδυνοι αποτελούν το μεγαλύτερο κίνδυνο και απειλή για την υγεία των καταναλωτών, είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενοι και άμεσοι για την υγεία του καταναλωτή.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.

2.1. Προέλευση σαλιγκαριών.

Οι φυσικοί πληθυσμοί σαλιγκαριών οι οποίοι μελετήθηκαν άνηκαν στα είδη *Helix aspersa* και *Helix lucorum*. Τα άτομα των πληθυσμών αυτών προέρχονταν από την Κρήτη και τη Βόρεια Ελλάδα. Ειδικότερα, τα δείγματα των δύο αυτών ειδών πάρθηκαν από αγορές της Θεσσαλονίκης και της Κρήτης, αντίστοιχα, στις αρχές Μαΐου του 2009.

Τα εκτρεφόμενα σαλιγκάρια του είδους *Helix aspersa* προήλθαν από την πειραματική εκτροφή του Εργαστηρίου Εκτροφής Γαστεροπόδων του Τμήματος κατά τη διάρκεια του Σεπτεμβρίου του 2009. Ακολούθησε η μεθοδολογία της μεικτής εκτροφής σύμφωνα με την οποία τα σαλιγκάρια μπορεί να γεννηθούν και να εκκολαφθούν μέσα σε ελεγχόμενο περιβάλλον και έπειτα να μεταφερθούν σε διχτυοκήπια για την πάχυνση (Δεσποτοπούλου 2008; Νεοφύτου και Χατζηιωάννου 2008).

Ειδικότερα όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο μέσα σε διχτυωτούς σάκους και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για λίγες ώρες, μέχρι να διεξαχθούν όλες οι αναλύσεις. Ακολούθησε μακροσκοπικός έλεγχος. Δηλαδή έλεγχος με σκοπό τη διαπίστωση του είδους και της κατάστασης στην οποία βρίσκονται π.χ. ζωντανά ή νεκρά, άρρωστα, ετοιμοθάνατα ή σε κατάσταση σήψης.

2.2. Προετοιμασία δειγμάτων.

Αρχικά επιλέχθηκαν τα φυσιολογικά άτομα και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα δοχεία ανά είδος. Ακολούθησε προσεχτικός καθαρισμός-απολύμανση των κελυφών με οινόπνευμα 70%. Κατόπιν, υπό ασηπτικές συνθήκες, για την αποφυγή επιμόλυνσης, απομακρύνθηκαν προσεχτικά τα κελύφη και με ιδιαίτερη

προσοχή χωρίστηκε το κάθε ζώο σε σώμα και σπλάχνα και αφού τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια, συλλέχθηκαν σε διαφορετικούς αποστειρωμένους περιέκτες και ακολούθησαν άμεσα οι μικροβιολογικές αναλύσεις.

Η διαδικασία αυτή ακολούθηθηκε για όλα τα δείγματα που αναφέρθηκαν και παραπάνω.

Συγκεκριμένα οι ποσότητες που πάρθηκαν από τους άγριους-φυσικούς πληθυσμούς των ειδών *Helix aspersa* και *Helix lucorum* ήταν 25g σώματος και 25g σπλάχνων τα οποία προέρχονται από 25 με 30 άτομα ανάλογα με το είδος. Για όλες τις αναλύσεις τα δείγματα των 25g πάρθηκαν εις τριπλούν (n=3).

2.3. Μικροβιολογικές αναλύσεις.

Σε κάθε δειγματοληψία λαμβάνονταν δείγμα 25g σώματος ή σάρκας, μεταφέρονταν σε ασηπτικά αποστειρωμένες σακούλες, προσθέτονταν 225ml Maximum Recovery Diluent (MRD- αλάτι 0.85%, πεπτόνη 0.1%) και ακολουθούσε ομογενοποίηση για 2-3 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher. Ακολουθούσαν διαδοχικές αραιώσεις σε MRD.

Οι μικροοργανισμοί που καταμετρήθηκαν ήταν οι εξής:

- Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX).

Ο προσδιορισμός της OMX γινόταν με τη μέθοδο της επίστρωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA).

Το TSA περιέχει σε 1000 ml :

Tryptone	15.0 g
Soy peptone	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Agar	12.0 g

Το TSA είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει να αύξηση σχεδόν όλων των μικροοργανισμών που είναι ικανοί να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Ακολουθούσε καταμέτρηση μετά από επώαση των τρυβλίων στους 25° C για 48 ώρες.

- Οικογένεια Enterobacteriaceae.

Ο προσδιορισμός των Enterobacteriaceae πραγματοποιούνταν με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar). Η επώαση των τρυβλίων γινόταν στους 37° C για 24 ώρες και ακολουθούσε καταμέτρηση των αποικιών χρώματος μωβ με δακτύλιο.

Το VRBGA περιέχει σε 1000 ml :

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

Το VRBGA είναι εκλεκτικό που επιτρέπει την ανάπτυξη μόνο των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae λόγω της ιδιότητάς τους να ανθίσταται στην δράση των χολικών (biles) αλάτων και του κρυσταλλικού ιώδες (crystal violet).

- Εντερόκοκκοι

Ο προσδιορισμός των *Enterococcus* γινόταν με τη μέθοδο της επίστρωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα Kanamycin Aesculin Azide Agar. Ακολουθούσε καταμέτρηση μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37° C για 24 ώρες, των αποικιών που ήταν λευκές-γκρι.

Το Kanamycin Aesculin Azide Agar περιέχει σε 1000 ml :

Tryptone	20.0 g
Yeast extract	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Sodium citrate	1.0 g
Aesculin	1.0 g
Ferric ammonium citrate	0.5 g
Sodium azide	0.15 g
Kanamycin sulphate	0.02 g
Agar	10.0 g

Το αντιβιοτικό kanamycin και το sodium azide αποτελούν τους εκλεκτικούς παράγοντες για την ανάπτυξη των εντεροκόκκων.

- *Escherichia coli*/coliform

Η καταμέτρηση των αποικιών του είδους *E.coli* γινόταν με τη μέθοδο της επίστρωσης σε ειδικό χρωμογόνο θρεπτικό υπόστρωμα για ταυτόχρονη καταμέτρηση *E.coli*/coliform. Ακολουθούσε καταμέτρηση μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37° C για 24 ώρες. Το *E.coli* σχημάτιζε σκούρες μπλε αποικίες, ενώ τα coliform ροζοκόκκινες (Εικόνα 2.1)



Εικόνα 2.1. Αποικίες *E.coli* (σκούρες μπλε) και coliform (ροζοκόκκινες) στο ειδικό χρωμογόνο εκλεκτικό υλικό.

Το ειδικό χρωμογόνο θρεπτικό υλικό περιέχει σε 1000 ml:

Peptone	8.0
Di-sodium hydrogen phosphate	2.2
Sodium chloride	5.0
Potassium di-hydrogen phosphate	1.8
Sodium lauryl sulphate	0.1
Chromogenic mix (Rose-Gal, X-Glu)	0.35
Agar	10.6

2.4. Πρωτόκολλο ανίχνευσης *Salmonella spp.*

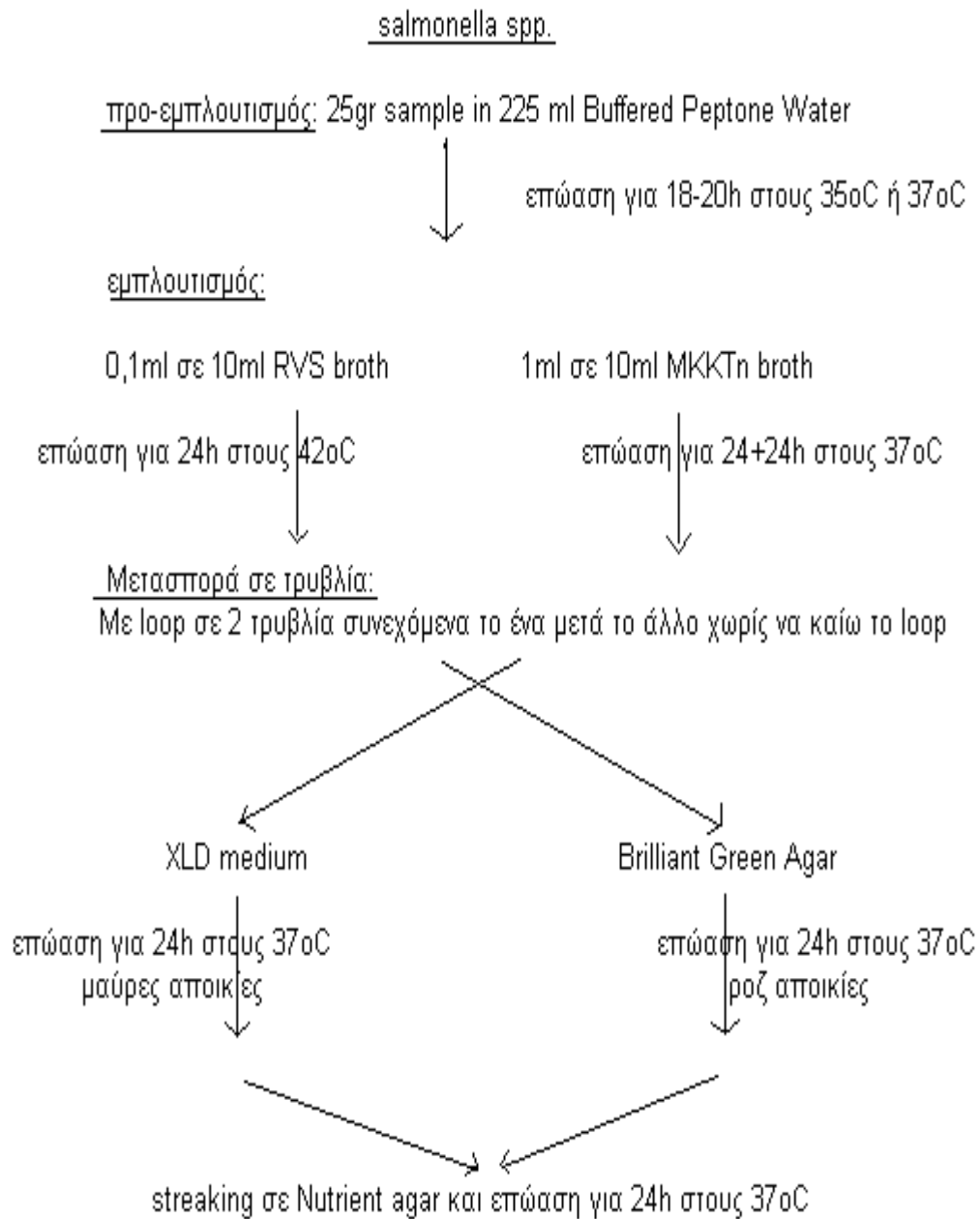
Για την ανίχνευση *Salmonella spp.* λαμβάνονταν δείγμα 25gr , μεταφέρονταν σε ασηπτικά αποστειρωμένες σακούλες, προσθέτονταν 225ml Buffered Peptone Water (BPW) και ακολουθούσε ομογενοποίηση για 2-3 λεπτά σε συσκευή τύπου Stomacher. Στη συνέχεια ακολουθούσε επώαση στους 37° C για 18-20 ώρες.

Το BPW περιέχει σε 1000ml:

Peptone	13.5 g
Potassium dihydrogen phosphate	2.025 g
Sodium chloride	6.75 g
Sodium hydrogen phosphate dihydrate	5.93 g

Κατόπιν, πραγματοποιούνταν εμπλουτισμός σε (Rappaport-Vasiliadis RVS broth (επώαση για 24 ώρες στους 42° C) και (Mueller-Kaufmann Tetrathionate) MKTTn broth (επώαση για 24 ώρες στους 37° C). Ακολουθούσε μετασπορά (τύπου streaking) σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα (Xylose, Lysine Deoxycholate) XLD agar (σχηματισμός μαύρων αποικιών ύστερα από 24 ώρες στους 37° C) και Brilliant Green Agar (σχηματισμός ροζ αποικιών ύστερα από 24 ώρες στους 37° C). Για τις ύποπτες αποικίες ακολουθούσε μετασπορά (τύπου streaking) σε θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar. Οι τελικές αποικίες σχηματίζονταν ύστερα από επώαση για 24 ώρες

στους 37° C. Ακολουθούν τα τεστ επιβεβαίωσης API 20E και *Salmonella* Rapid Latex test.



Σχήμα 1. Πρωτόκολλο ανίχνευσης *Salmonella spp.*

Οι καθαρές αποικίες από το Nutrient Agar χρησιμοποιούνται περαιτέρω για Βιοχημικές και ορολογικές δοκιμές επιβεβαίωσης .

2.4.1. Βιοχημικές Δοκιμές με χρήση API 20E.

Το API 20E αποτελεί ένα τυποποιημένο σύστημα ταυτοποίησης για Enterobacteriaceae και άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια, που χρησιμοποιεί 21 βιοχημικές εξετάσεις σε μικρογραφία και μια βάση δεδομένων.

Η ταινία του API 20E αποτελείται από 20 μικροσωλήνες που περιέχουν αφυδατωμένα υποστρώματα (Εικόνα 2.2). Αυτές οι εξετάσεις ενοφθαλμίζονται με βακτηριακό εναιώρημα που προκαλεί ανασύσταση των υλικών. Κατά τη διάρκεια της επώασης, ο μεταβολισμός προκαλεί χρωματικές μεταβολές που είτε είναι αυτόματες ή αποκαλύπτονται με την προσθήκη αντιδραστηρίων.

Πιο συγκεκριμένα, αρχικά προετοιμάζουμε ένα κυτίο επώασης όπου διανέμονται περίπου 5ml απιονισμένου νερού στις κυψέλες του δίσκου για να δημιουργηθεί μια υγρή ατμόσφαιρα. Στην συνέχεια για την δημιουργία του εναιωρήματος αναμειγνύουμε 5ml API NaCl 0.85% Medium με μία αποικία από ένα τρυβλίο απομόνωσης και ομογενοποιούμε. Χρησιμοποιώντας την ίδια πιπέτα, διανείμουμε το βακτηριακό εναιώρημα στα σωληνάκια της ταινίας, κλείνουμε το κυτίο επώασης και επωάζουμε στους 37⁰ C για 24 ώρες.

Η ταυτοποίηση προκύπτει με ένα αριθμητικό προφίλ 7 ψηφίων.

Οι αντιδράσεις διαβάζονται σύμφωνα με τον Πίνακα Ανάγνωσης και η ταυτοποίηση γίνεται με αναφορά στον Αναλυτικό Κατάλογο Προφίλ ή χρησιμοποιώντας το λογισμικό ταυτοποίησης (bioMerieux SA).

Σε κάποιες περιπτώσεις, το 7ψήφιο αριθμητικό προφίλ δεν είναι αρκετά διευκρινιστικό και χρειάζεται να διεξαχθούν και συμπληρωματικές εξετάσεις.

Αν ταυτοποιηθεί *Salmonella*, πρέπει να διεξαχθεί ορολογική ταυτοποίηση για να επιβεβαιωθεί η βακτηριακή ταυτοποίηση.

Τέλος το σύστημα API 20 E προορίζεται μόνο για την ταυτοποίηση των Enterobacteriaceae και των μη απαιτητικών Gram-αρνητικών βακτηριδίων που περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων, ενώ μόνο καθαρές καλλιέργειες αποκλειστικά ενός οργανισμού πρέπει να χρησιμοποιηθούν.



Εικόνα 2.2. Απεικόνιση του TEST API 20E.

2.4.2. Ορολογικές δοκιμές με χρήση *Salmonella* Rapid Latex test.

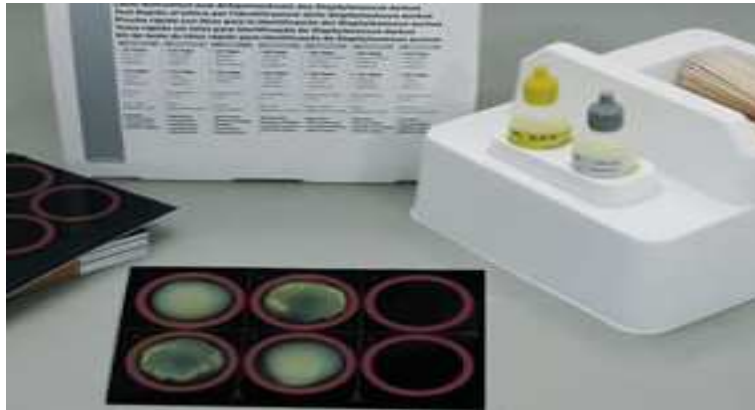
Το *Salmonella* Rapid Latex test (Εικόνα 2.3) είναι μια εξέταση συγκόλλησης για την ταυτοποίηση της *Salmonella spp.* Διάφορες έρευνες έχουν δείξει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση *Salmonella spp.* τόσο από τα τρόφιμα όσο και από κλινικά δείγματα. Η δοκιμή επιτρέπει στο χρήστη να εντοπίσει και να επιβεβαιώσει την παρουσία *Salmonella spp.* (www.oxid.com).

Το *Salmonella* Rapid Latex test περιέχει:

- Test Latex (FT0204),
- Control Latex (FT0205),
- Positive Control Suspension (FT0206),
- Test Cards (DR500G).

Πιο συγκεκριμένα, μεταφέρουμε μία σταγόνα Test Latex (FT0204) σε έναν από τους κύκλους που φέρουν οι κάρτες-αντικειμενοφόροι που περιέχει το τεστ και

αναμειγνύομαι με μία ύποπτη αποικία που απομονώσαμε. Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία και με το Control Latex (FT0205) ως μάρτυρα αυτοσυγκόλλησης. Στη συνέχεια τα εναιωρήματα αναμειγνύονται με κυκλική κίνηση για 2 λεπτά. Σε περίπτωση που παρατηρηθεί συγκόλληση, τότε το δείγμα είναι θετικό στην παρουσία *Salmonella spp.*



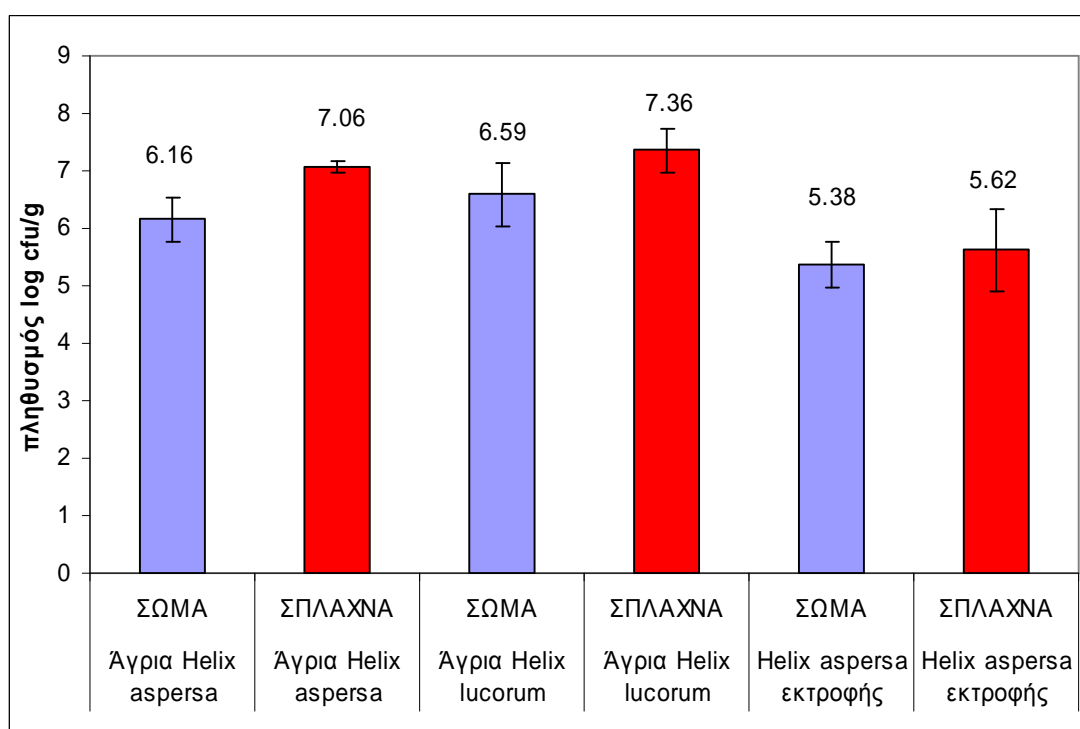
Εικόνα 2.3. Salmonella Rapid Latex test.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

3.1. Μικροβιολογικός πληθυσμός σαλιγκαριών.

Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα.

Οι μέσοι όροι για n=3 επαναλήψεις του μικροβιακού φορτίου της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας των άγριων ατόμων των ειδών *Helix aspersa* και *Helix lucorum* καθώς και των σαλιγκαριών *Helix aspersa* από εκτροφή παρουσιάζονται στο Σχήμα 2. Τα αποτελέσματα μαζί με την τυπική απόκλιση παρουσιάζονται και στον Πίνακα 1.



Σχήμα 2. Πληθυσμοί OMX των δύο ειδών σαλιγκαριών, άγριων και εκτροφής, σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA. Τα άγκιστρα στις μπάρες υποδεικνύουν την \pm τυπική απόκλιση

Πίνακας 1. Πληθυσμοί OMX (log cfu/g) σε σπλάχνα και σώμα άγριων (*Helix aspersa* και *Helix lucorum*) και εκτροφής σαλιγκαριών *Helix aspersa*.

		1η	2η	3η	Μ.Ο.	ΤΥΠ.ΑΠΟΚ.
ΑΓΡΙΑ <i>HELIX ASPERSA</i>	ΣΩΜΑ	6,54	6,32	5,64	6,16	0,38
	ΣΠΛΑΧΝΑ	7,15	7,10	6,93	7,06	0,09
ΑΓΡΙΑ <i>HELIX LUCORUM</i>	ΣΩΜΑ	7,33	6,45	6,00	6,59	0,55
	ΣΠΛΑΧΝΑ	7,89	7,22	6,99	7,36	0,38
<i>HELIX ASPERSA</i>						
ΕΚΤΡΟΦΗΣ	ΣΩΜΑ	5,24	5,93	4,99	5,38	0,39
	ΣΠΛΑΧΝΑ	6,08	6,18	4,61	5,62	0,72

Οι πληθυσμοί της OMX σε σώμα και σπλάχνα βρέθηκαν στα επίπεδα των 6,16 και 7,06 log cfu/g, αντίστοιχα, για τα άγρια ζώα του είδους *Helix aspersa*, 6,59 και 7,36 log cfu/g, αντίστοιχα, για τα άγρια ζώα του είδους *Helix lucorum* και 5,38 και 5,62 log cfu/g, αντίστοιχα, για τα ζώα του είδους *Helix aspersa* εκτροφής.

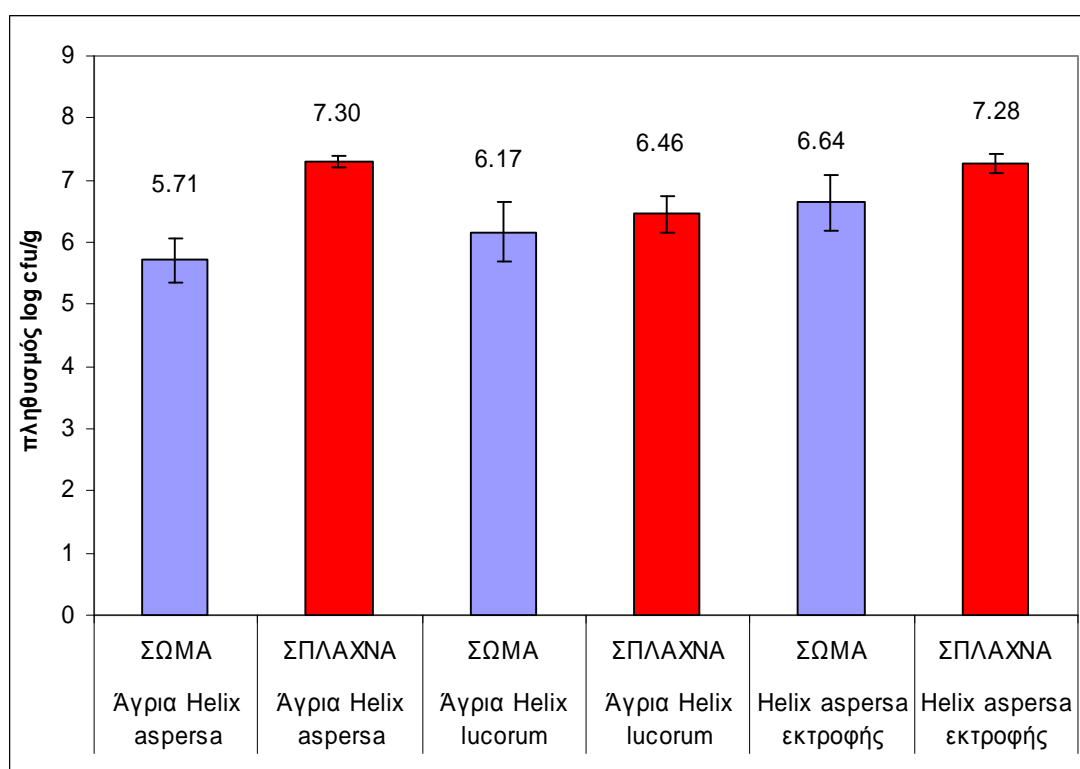
Στατιστικές δοκιμές με χρήση t-test δεν πραγματοποιήθηκαν λόγω του γεγονότος ότι οι τρεις επαναλήψεις δεν είναι επαρκείς για αξιόπιστες συγκρίσεις. Παρόλα αυτά αξιόπιστα συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν στις περιπτώσεις όπου οι μέσοι όροι απέχουν σημαντικά λαμβάνοντας υπόψη βέβαια και τις τυπικές αποκλίσεις

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι γενικά υπάρχει διαφορά μεταξύ της OMX μεταξύ των σπλάχνων και του σώματος. Η διαφορά αυτή είναι λίγο μικρότερη από ένα λογάριθμο και απαιτούνται περισσότερα δείγματα και στατιστική δοκιμή για να εξαχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα.

Η OMX στα ζώα εκτροφής όμως είναι σημαντικά μικρότερη κατά ένα ή δύο λογάριθμους σε σχέση με τα άγρια και για το σώμα και τα σπλάχνα αντίστοιχα (Σχήμα 2).

Οικογένεια Enterobacteriaceae

Οι μέσοι όροι για n=3 επαναλήψεις των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae που ανιχνεύθηκε στα δείγματα των άγριων ζώων του είδους *Helix aspersa* υπολογίσθηκαν σε 5,71 log cfu/g για το σώμα και 7,30 log cfu/g για τα σπλάχνα, για το είδος *Helix lucorum* 6,17 και 6,46 log cfu/g και για τα σαλιγκάρια από την εκτροφή 6,64 και 7,28 log cfu/g, αντίστοιχα (Σχήμα 3, Πίνακας 2).



Σχήμα 3. Πληθυσμοί Enterobacteriaceae των δύο ειδών σαλιγκαριών, άγριων και εκτροφής, σε θρεπτικό υπόστρωμα VRBGA. Τα άγκιστρα στις μπάρες υποδεικνύουν την \pm τυπική απόκλιση

Όπως φαίνεται, μόνο στα άγρια ζώα του είδους *Helix aspersa* παρατηρείται μεγάλη διαφορά στις συγκεντρώσεις των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae που προέρχονται από το σώμα και τα σπλάχνα και συγκεκριμένα

λίγο μεγαλύτερη από ένα λογάριθμο, που σημαίνει ότι τα σπλάχνα περιέχουν τουλάχιστον 10 φορές περισσότερους μικροοργανισμούς από το σώμα (Σχήμα 3).

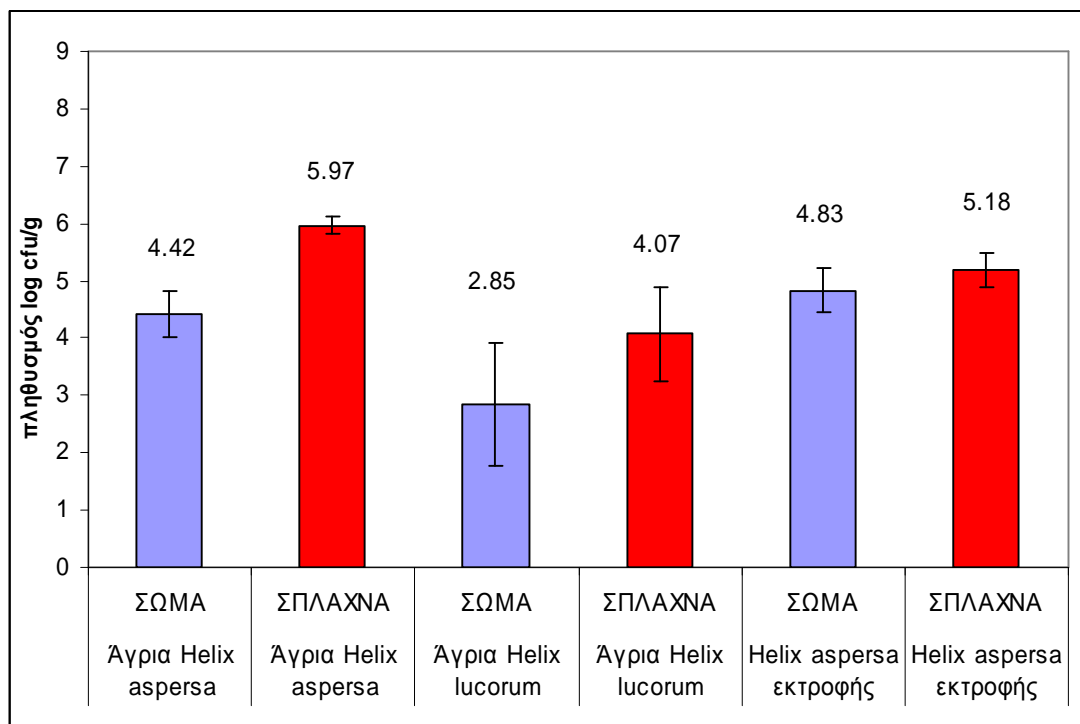
Πίνακας 2. Πληθυσμοί Enterobacteriaceae (log cfu/g) σε σπλάχνα και σώμα άγριων (*Helix aspersa* και *Helix lucorum*) και εκτροφής σαλιγκαριών *Helix aspersa*.

		1η	2η	3η	Μ.Ο.	ΤΥΠ.ΑΠΟΚ.
ΑΓΡΙΑ <i>HELIX ASPERSA</i>	ΣΩΜΑ	5,86	6,04	5,23	5,71	0,35
	ΣΠΛΑΧΝΑ	7,35	7,39	7,17	7,30	0,09
ΑΓΡΙΑ <i>HELIX LUCORUM</i>	ΣΩΜΑ	6,83	5,84	5,84	6,17	0,47
	ΣΠΛΑΧΝΑ	6,07	6,77	6,56	6,47	0,29
<i>HELIX ASPERSA</i> ΕΚΤΡΟΦ	ΣΩΜΑ	6,20	6,48	7,26	6,65	0,45
	ΣΠΛΑΧΝΑ	7,15	7,50	7,20	7,28	0,15

Escherichia coli.

Ο πληθυσμός *E.coli* για n=3 επαναλήψεις που ανιχνεύθηκε στα δείγματα των άγριων ζώων του είδους *Helix aspersa* υπολογίσθηκε σε 4,42 log cfu/g για το σώμα και 5,97 log cfu/g για τα σπλάχνα, για το είδος *Helix lucorum* 2,85 και 4,07 log cfu/g και για τα σαλιγκάρια από την εκτροφή 4,83 και 5,18 log cfu/g, αντίστοιχα (Σχήμα 4, Πίνακας 3).

Το είδος *Helix aspersa* (άγριο ή εκτροφής) έχει σημαντικά υψηλότερο αριθμό βακτηρίων *E.coli* από το *Helix lucorum* σε σπλάχνα και σώμα όσον αφορά τα άγρια σαλιγκάρια. Επίσης η συγκέντρωση των μικροοργανισμών αυτών είναι χαμηλότερη στο σώμα σε σχέση με τα σπλάχνα και στα δύο είδη κατά ένα λογάριθμο τουλάχιστον (Σχήμα 4, Πίνακας 3).



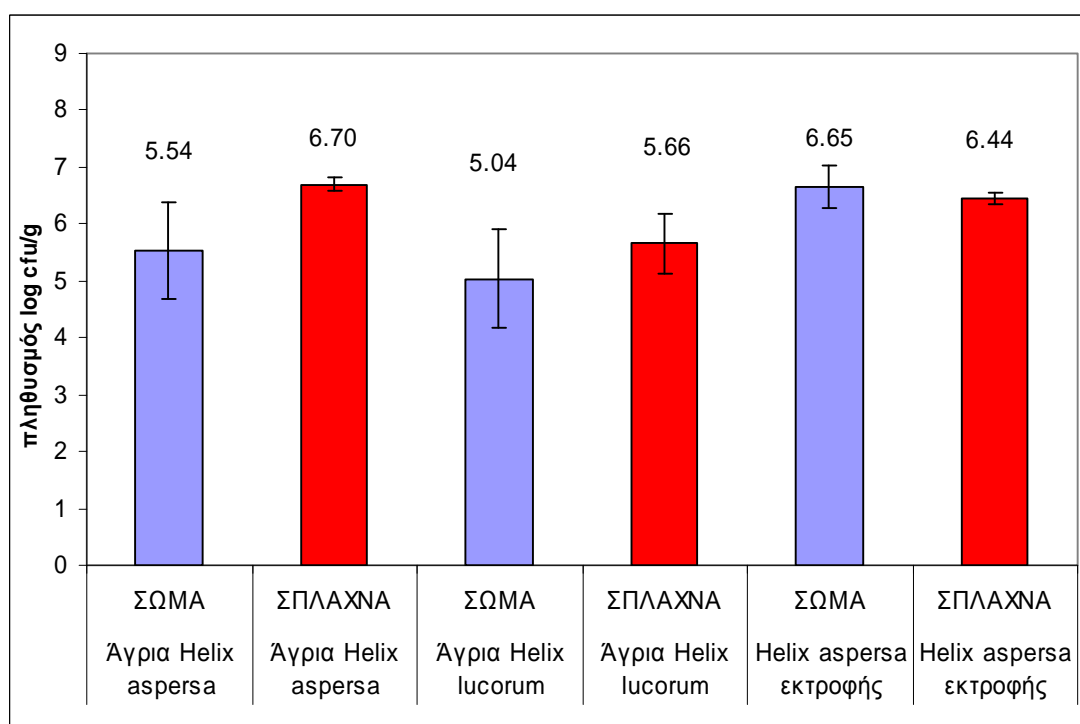
Σχήμα 4. Πληθυσμοί *E.coli* των δύο ειδών σαλιγκαριών, άγριων και εκτροφής, σε θρεπτικό υπόστρωμα *E.coli*/Coliform. Τα άγκιστρα στις μπάρες υποδεικνύουν την \pm τυπική απόκλιση

Πίνακας 3. Πληθυσμοί *E.coli* (log cfu/g) σε σπλάχνα και σώμα άγριων (*Helix aspersa* και *Helix lucorum*) και εκτροφής σαλιγκαριών *Helix aspersa*.

		1η	2η	3η	Μ.Ο.	ΤΥΠ.ΑΠΟΚ.
ΑΓΡΙΑ HELIX ASPERSA	ΣΩΜΑ	4,78	4,61	3,88	4,42	0,39
	ΣΠΛΑΧΝΑ	5,90	6,17	5,85	5,97	0,14
ΑΓΡΙΑ HELIX LUCORUM	ΣΩΜΑ	4,30	4,26	<2	2,85	2,02
	ΣΠΛΑΧΝΑ	5,00	3,00	4,23	4,07	0,82
HELIX ASPERSA ΕΚΤΡΟΦΗΣ	ΣΩΜΑ	4,34	5,30	4,86	4,83	0,39
	ΣΠΛΑΧΝΑ	5,54	5,18	4,82	5,18	0,29

Coliforms

Οι μέσοι όροι για $n=3$ επαναλήψεις των βακτηρίων της ομάδας coliform που ανιχνεύθηκε στα δείγματα των άγριων ζώων του είδους *Helix aspersa* υπολογίσθηκαν σε 5,54 log cfu/g για το σώμα και 6,7 log cfu/g για τα σπλάχνα, για το είδος *Helix lucorum* 5,04 και 5,66 log cfu/g και για τα σαλιγκάρια από την εκτροφή 6,65 και 6,44 log cfu/g, αντίστοιχα (Σχήμα 5, Πίνακας 4).



Σχήμα 5. Πληθυσμοί coliforms των δύο ειδών σαλιγκαριών, άγριων και εκτροφής, σε θρεπτικό υπόστρωμα *E.coli*/Coliform. Τα άγκιστρα στις μπάρες υποδεικνύουν την \pm τυπική απόκλιση.

Παρατηρείται πως δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων coliform σε σώμα και σπλάχνα για κάθε πληθυσμό. Ωστόσο μεταξύ των πληθυσμών παρατηρείται ότι στα *H. lucorum* ο πληθυσμοί coliform στα σπλάχνα και στο σώμα είναι σημαντικά μικρότεροι (πάνω από ένα λογάριθμο) σε σύγκριση με τους άλλους

δύο πληθυσμούς. Συγκρίνοντας τα **Σχήματα 4 και 5** διακρίνουμε ότι το *E. coli* αποτελεί μεγάλο ποσοστό των coliform.

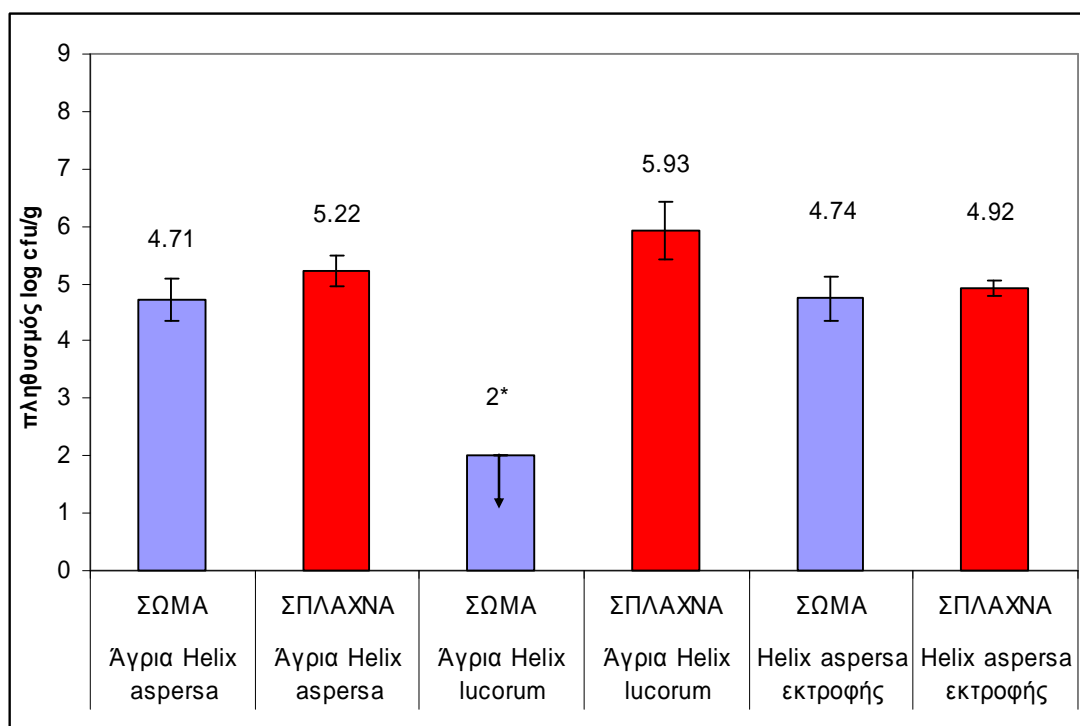
Πίνακας 4. Πληθυσμοί coliforms (log cfu/g) σε σπλάχνα και σώμα άγριων (*Helix aspersa* και *Helix lucorum*) και εκτροφής σαλιγκαριών *Helix aspersa*.

		1η	2η	3η	Μ.Ο.	ΤΥΠ.ΑΠΟΚ.
ΑΓΡΙΑ <i>HELIX ASPERSA</i>	ΣΩΜΑ	6,23	6,04	4,36	5,54	0,84
	ΣΠΛΑΧΝΑ	6,71	6,85	6,54	6,70	0,12
ΑΓΡΙΑ <i>HELIX LUCORUM</i>	ΣΩΜΑ	6,20	4,78	4,14	5,04	0,86
	ΣΠΛΑΧΝΑ	6,38	5,50	5,11	5,66	0,53
<i>HELIX ASPERSA</i> ΕΚΤΡΟΦ	ΣΩΜΑ	6,27	7,17	6,51	6,65	0,38
	ΣΠΛΑΧΝΑ	6,53	6,49	6,3	6,44	0,10

Enterococcus sp.

Οι μέσοι όροι για n=3 επαναλήψεις των βακτηρίων της οικογένειας *Enterococcus sp* που ανιχνεύθηκε στα δείγματα των άγριων ζώων του είδους *Helix aspersa* υπολογίσθηκαν σε 4,71 log cfu/g για το σώμα και 5,22 log cfu/g για τα σπλάχνα, για το είδος *Helix lucorum* <2, και 5,93 log cfu/g και για τα σαλιγκάρια από την εκτροφή 4,74 και 4,92 log cfu/g, αντίστοιχα (**Σχήμα 6, Πίνακας 5**).

Δεν φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών εντεροκόκκων (enterococci) μεταξύ σπλάχνων και σώματος, εκτός στην περίπτωση του *Helix lucorum* όπου στο σώμα ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης των 100 cfu/g.



Σχήμα 6. Πληθυσμοί των enterococci των δύο ειδών σαλιγκαριών, άγριων και εκτροφής, σε θρεπτικό υπόστρωμα Kanamycin Aesculin Azide Agar. Τα άγκιστρα στις μπάρες υποδεικνύουν την \pm τυπική απόκλιση.

*Οι εντερόκοκκοι στο σώμα των άγριων *Helix lucorum* είναι λιγότερο από 100 cfu/g (2 log), δηλαδή κάτω από το όριο ανίχνευσης, όπως υποδεικνύεται και από το βέλος (\downarrow).

Πίνακας 5. Πληθυσμοί των enterococci (log cfu/g) σε σπλάχνα και σώμα άγριων (*Helix aspersa* και *Helix lucorum*) και εκτροφής σαλιγκαριών *Helix aspersa*.

		1η	2η	3η	Μ.Ο.	ΤΥΠ.ΑΠΟΚ.
ΑΓΡΙΑ HELIX ASPERSA	ΣΩΜΑ	4,91	5,04	4,2	4,72	0,37
	ΣΠΛΑΧΝΑ	5,27	5,53	4,86	5,22	0,27
ΑΓΡΙΑ HELIX LUCORUM	ΣΩΜΑ	<2	<2	<2	<2	---
	ΣΠΛΑΧΝΑ	6,54	5,95	5,32	5,94	0,50
HELIX ASPERSA ΕΚΤΡΟΦΗΣ	ΣΩΜΑ	4,30	4,69	5,25	4,75	0,39
	ΣΠΛΑΧΝΑ	5,11	4,82	4,85	4,93	0,13

3.2. Ανίχνευση *Salmonella spp.*

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο για την ανίχνευση της *Salmonella spp.* και έπειτα από τα τεστ επιβεβαίωσης API 20E και *Salmonella* Rapid Latex test, προέκυψαν τα εξής:

- Ανίχνευση κυττάρων *Salmonella spp.* στα δείγματα που προέρχονταν από τα άγρια ζώα του είδους *Helix aspersa*.
- Ανίχνευση κυττάρων *Salmonella spp.* στα δείγματα που προέρχονταν από τα άγρια ζώα του είδους *Helix lucorum*.
- Απουσία κυττάρων *Salmonella spp.* στα δείγματα που προέρχονταν από τα εκτρεφόμενα ζώα του είδους *Helix aspersa*.

Αναλυτικότερα, τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον **Πίνακα 6**.

Πίνακας 6. Περιπτώσεις ανίχνευσης *Salmonella spp.* και για τις τρεις επαναλήψεις σε όλα τα είδη σαλιγκαριών, άγρια και εκτροφής.

	<i>HELIX ASPERSA</i> ΑΓΡΙΑ			<i>HELIX LUCORUM</i> ΑΓΡΙΑ			<i>HELIX ASPERSA</i> ΕΚΤΡΟΦΗΣ		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ΣΩΜΑ	+	+	-	-	+	+	-	-	-
ΣΠΛΑΧΝΑ	+	+	+	-	-	+	-	-	-
ΣΥΝΟΛΙΚΑ	+	+	+	-	+	+	-	-	-

Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 6**, *Salmonella* έχει ανιχνευθεί μόνο στα άγρια σαλιγκάρια και όχι στα εκτροφής. Πιο συγκεκριμένα στα *Helix aspersa* και τα 3 δείγματα έδωσαν αποτέλεσμα θετικό στην παρουσία σαλμονέλας ενώ *Helix lucorum*

έδωσαν τα 2 στα 3. Σε μία περίπτωση στα *Helix aspersa* και σε μία στα *Helix lucorum* ανιχνεύθηκε σαλμονέλα στα σπλάχνα και στο σώμα μόνο.

Τα δείγματα που βρέθηκαν θετικά σε *Salmonella spp.* ήταν κυρίως αυτά που προήλθαν ύστερα από εμπλουτισμό σε MKKTn broth και μετασπορά σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα XLD τόσο στα άγρια σαλιγκάρια *Helix aspersa* και *H. lucorum* όσο και στα σαλιγκάρια *Helix aspersa* εκτροφής. Αναλυτικά παρουσιάζονται στους Πίνακες 7 και 8.

Πίνακας 7. Στον πίνακα αυτό παρουσιάζονται οι περιπτώσεις εμφάνισης ύποπτων αποικιών *Salmonella spp* (από πιο εμπλουτιστικό και από πιο θρεπτικό υλικό μετασποράς) και κατόπιν σε ποιες περιπτώσεις η επιβεβαίωση με API και Latex test έδωσε θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα στα άγρια σαλιγκάρια *Helix aspersa* και *Helix lucorum* μετά τα τεστ επιβεβαίωσης.

ΕΙΔΟΣ ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΟΥ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ	ΜΕΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ	ΜΕΤΑΣΠΟΡΑ	API TEST	LATEX TEST
<i>Helix aspersa</i> άγρια	1 ^H	σώμα	MKTTn	XLD	+	+
		σπλάχνα	MKTTn	XLD	+	+
	2 ^H	σώμα	MKTTn	XLD	+	+
		σπλάχνα	MKTTn	BG	+	+
	3 ^H	σώμα	MKTTn	XLD	-	-
		σπλάχνα	MKTTn	XLD	+	+
<i>Helix lucorum</i> άγρια	1 ^H	σώμα	RVS	XLD	-	-
		σπλάχνα	MKTTn	XLD	-	-
	2 ^H	σώμα	MKTTn	XLD	+	+
			MKTTn	BG	-	-
		σπλάχνα	RVS	XLD	+	+
			RVS	BG	-	-
	3 ^H	σώμα	RVS	XLD	+	+
			RVS	BG	-	-
		σπλάχνα	MKTTn	XLD	+	+

+: Θετικό αποτέλεσμα παρουσίας *Salmonella spp.*

-: Αρνητικό αποτέλεσμα παρουσίας *Salmonella spp.*

Πίνακας 8. Στον πίνακα αυτό παρουσιάζονται οι περιπτώσεις εμφάνισης ύποπτων αποικιών *Salmonella spp* (από πιο εμπλουτιστικό και από πιο θρεπτικό υλικό μετασποράς) και κατόπιν σε ποιες περιπτώσεις η επιβεβαίωση με API και Latex test έδωσε θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα στα σαλιγκάρια *Helix aspersa* εκτροφής.

ΕΙΔΟΣ ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΟΥ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ	ΜΕΡΟΣ ΣΩΜΑΤΟΣ	ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ	ΜΕΤΑΣΠΟΡΑ	API TEST	LATEX TEST
<i>Helix aspersa</i> εκτροφής	1 ^Η	σώμα	RVS	BG	-	-
			MKTTn	BG	-	-
		σπλάχνα	RVS	BG	-	-
			RVS	XLD	-	-
			MKTTn	BG	-	-
	2 ^Η	σώμα	MKTTn	BG	-	-
			MKTTn	XLD	-	-
		σπλάχνα	MKTTn	XLD	-	-
			MKTTn	BG	-	-
			RVS	BG	-	-
	3 ^Η	σώμα	MKTTn	XLD	-	-
			RVS	BG	-	-
		σπλάχνα	MKTTn	XLD	-	-
			MKTTn	BG	-	-
			RVS	BG	-	-

+: Θετικό αποτέλεσμα παρουσίας *Salmonella spp*.

-: Αρνητικό αποτέλεσμα παρουσίας *Salmonella spp*.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γενικότερα έχουν αναφερθεί μελέτες, στην παγκόσμια βιβλιογραφία, σχετικές με την μικροβιολογία των εδώδιμων σαλιγκαριών αλλά δεν υπάρχει καμία παρόμοια με την παρούσα για να γίνει απόλυτη σύγκριση. Στον **Πίνακα 9** αναγράφονται οι μικροοργανισμοί που έχουν ανιχνευθεί όλα αυτά τα χρόνια.

Πίνακας 9. Μικροοργανισμοί που έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα είδη σαλιγκαριών.

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	ΕΙΔΟΣ ΣΑΛΙΓΚΑΡΙΟΥ	ΠΗΓΗ
ΟΜΧ (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα)	<i>Helix pomatia</i>	Parisi-Bianco (1978)
	<i>Helix aspersa</i> , <i>H. vermiculata</i> , <i>H. aperta</i>	Pinasu and Leoni (1980)
	<i>Eobonia vermiculata</i>	Gallo and Caracappa (1980)
Enterobacteriaceae	<i>Helix pomatia</i>	Cantoni et al. (1976)
	<i>Helix aspersa</i> , <i>H. vermiculata</i> , <i>H. aperta</i>	Pinasu and Leoni (1980)
	<i>Helix aspersa</i> (εκτροφής)	Kiebre-Toe et al. (2003)
	<i>Eobonia vermiculata</i>	Gallo and Caracappa (1980)
	<i>Helix pomatia</i> (εκτροφής)	Parisi-Bianco (1978)
coliforms	<i>Helix pomatia</i>	Temelli et al. (2006)
<i>E. coli</i>	<i>Helix pomatia</i>	Cantoni et al. (1976)
	<i>Helix pomatia</i> (εκτροφής)	Parisi-Bianco (1978)
	<i>Eobonia vermiculata</i>	Gallo and Caracappa

		(1980)
<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Helix pomatia</i>	Cantoni et al. (1976)
	<i>Helix aspersa, H. vermiculata, H. aperta</i>	Pinasu and Leoni (1980)
	<i>Eobonia vermiculata</i>	Gallo and Caracappa (1980)
	<i>Helix pomatia</i> (εκτροφής)	Parisi-Bianco (1978)
<i>Salmonella</i>	<i>Helix aspersa</i>	Andrews et al. (1975)
<i>Listeria spp.</i>	<i>Helix pomatia</i>	Temelli et al. (2006)
<i>Staphylococcus</i>	<i>Helix pomatia</i>	Temelli et al. (2006)
	<i>Helix pomatia</i> (εκτροφής)	Temelli et al. (2006)
	<i>Eobonia vermiculata</i>	Gallo and Caracappa (1980)
Θειοαναγωγικά Κλωστρίδια	<i>Helix pomatia</i>	Cantoni et al. (1980)
	<i>Helix aspersa, H. vermiculata, H. aperta</i>	Pinasu and Leoni (1980)
	<i>Eobonia vermiculata</i>	Gallo and Caracappa (1980)
Ζύμες και Μύκητες	<i>Helix pomatia</i>	Temelli et al. (2006)
	<i>Helix και Achatina fulica</i>	Παρλαπάνη (2009)
Aeromonadaceae	<i>Helix aspersa</i> (εκτροφής)	Kiebre-Toe et al. (2003)
Pseudomonadaceae	<i>Helix aspersa</i> (εκτροφής)	Kiebre-Toe et al. (2003)

Κατά καιρούς πολλοί ερευνητές εξέτασαν το μικροβιακό φορτίο σε ολόκληρο το σώμα των ζωντανών σαλιγκαριών ενώ ορισμένοι π.χ. Parisi – Bianco (1978), Παρλαπάνη (2009) μελέτησαν χωριστά κάποια τμήματα του ζώου.

Σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας ήταν δυνατό να γίνει με τα αποτελέσματα της Parisi – Bianco (1978) η οποία βρήκε ότι ο πληθυσμός της OMX στο σώμα κυμαίνονταν από 1 έως 10^7 cfu/g αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό των δειγμάτων περιείχε 10^5 έως 10^6 cfu/g κι έτσι φαίνεται ότι τα σαλιγκάρια του παρόντος πειράματος περιείχαν κατά μέσο όρο υψηλότερες τιμές OMX.

Επίσης, η Παρλαπάνη (2009) που μελέτησε χωριστά το σώμα και τα σπλάχνα στα είδη *Helix aspersa* και *Helix lucorum* βρήκε πως οι μέσοι όροι της OMX σε σπλάχνα και σώμα ήταν 7,59 και 6,13 log cfu/g, αντίστοιχα, για τους άγριους πληθυσμούς *Helix aspersa*, 8,36 και 7,04 log cfu/g για τους άγριους πληθυσμούς *Helix lucorum* καθώς και 8,69 και 7,10 log cfu/g για τα ζώα εκτροφής *Helix aspersa*.

Οι μέσοι όροι των πληθυσμών της οικογένειας Enterobacteriaceae που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία συμφωνούσαν αρκετά τόσο με τα αποτελέσματα της Παρλαπάνη (2009) όσο και με της Parisi – Bianco (1978). Συγκεκριμένα η Parisi – Bianco (1978) βρήκε ότι ο πληθυσμός των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae στο σώμα κυμαίνονταν μεταξύ 1 cfu/g έως 10^7 cfu/g με το μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ 10^5 και 10^6 cfu/g. Η Παρλαπάνη (2009) βρήκε 7,40 και 5,25 log cfu/g για τα σπλάχνα και το σώμα των άγριων πληθυσμών *Helix aspersa*, 7,90 και 5,23 log cfu/g αντίστοιχα, για τους άγριους πληθυσμούς του είδους *Helix lucorum* καθώς 7,11 και 5,60 log cfu/g για τα ζώα εκτροφής *Helix aspersa*.

Όσον αφορά τους πληθυσμούς του βακτηρίου *E.coli*, η Parisi – Bianco (1978) βρήκε ότι ο μέσος όρος των βακτηρίων *E.coli* που καταμετρήθηκαν στο σώμα των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών *Helix pomatia* ήταν 0 έως 10^3 log cfu/g. Αντίθετα, η

Παρλαπάνη (2009) καταμέτρησε 5,00 και 3,80 log cfu/g για τα σπλάχνα και το σώμα των άγριων πληθυσμών *Helix aspersa*, 3,92 και 2,87 log cfu/g αντίστοιχα, για τους άγριους πληθυσμούς του είδους *Helix lucorum* ενώ για τα ζώα εκτροφής *Helix aspersa* ήταν κάτω από 2 log cfu/g. Το είδος *Helix aspersa* έχει υψηλότερο αριθμό βακτηρίων *E. coli* από το *Helix lucorum* σε σπλάχνα και σώμα όσον αφορά τα άγρια σαλιγκάρια. Η συγκέντρωση των μικροοργανισμών αυτών είναι χαμηλότερη στο σώμα σε σχέση με τα σπλάχνα και στα δύο είδη τουλάχιστον κατά ένα λογάριθμο.

Οι διαφορές που προέκυψαν στα αποτελέσματα, τόσο ανάμεσα στα είδη των σαλιγκαριών, *Helix aspersa* και *Helix lucorum*, άγρια και εκτροφής, όσο και στα αποτελέσματα σε σχέση με άλλων ερευνητών μπορούν να οφείλονται :

- στις διαφορετικές κλιματολογικές συνθήκες κάθε περιοχής,
- στη χρήση διαφορετικής τροφής,
- στο περιβάλλον διαβίωσης,
- στο στάδιο ανάπτυξης που βρίσκονται τα ζώα,
- στην επεξεργασία που δέχονται πριν την κατανάλωση τους
- στην παρουσία ή απουσία επιφράγματος
- στην εκκένωση του πεπτικού κ.α..

Η επιμόλυνση των σαλιγκαριών από το περιβάλλον και την τροφή τους είναι αρκετά πιθανή εφόσον είναι είδος φυτοφάγο το οποίο τρέφεται κυρίως με οργανική ύλη που υπάρχει στο έδαφος, με τους φλοιούς των δέντρων και με λαχανικά και ταυτόχρονα αποτελεί παράσιτο αρκετών ειδών λαχανικών, δέντρων, σιτηρών, θάμνων και λουλουδιών (Dekle and Fasulo, 2002). Ειδικότερα, οι Caracappa et al. (1980) απέδειξαν ότι τα σαλιγκάρια μολύνονται με σαλμονέλες από την τροφή τους.

Ακόμη, διαπιστώνουμε πως τα άγρια σαλιγκάρια έχουν υψηλότερους πληθυσμούς OMX, Enterobacteriaceae και *E.coli*/Coliforms από αυτά που προέρχονταν από μονάδες εκτροφής, αφού η τήρηση των κανόνων της Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής είναι δυνατόν προλαμβάνει επιμολύνσεις από διάφορες πηγές που προαναφέρθηκαν. Επίσης η σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις των Enterobacteriaceae στο σώμα των ζώων σε σχέση με τα σπλάχνα τους, οφείλεται στο γεγονός ότι η φυσική χλωρίδα του εντέρου είναι πλούσια σε είδη των Enterobacteriaceae.

Από όλα τα παραπάνω φαίνεται ότι ο αριθμός και το είδος των μικροοργανισμών που ανευρίσκονται στα ζωντανά σαλιγκάρια εξαρτάται από:

- Το είδος και τον πληθυσμό της μικροβιακής χλωρίδας του περιβάλλοντος στο οποίο ζουν.
- Τη φάση του βιολογικού τους κύκλου.
- Τις συνθήκες υγιεινής που επικρατούν κατά τη συλλογή, τη μεταφορά και την εμπορία τους.

Ακόμα έχει παρατηρηθεί ότι:

- Τα σαλιγκάρια που βρίσκονται σε νάρκη, εμφανίζουν μικρότερο φορτίο μικροβιακής χλωρίδας.
- Όταν τα σαλιγκάρια δεν τρέφονται, τότε το μικροβιακό φορτίο ελαττώνεται.
- Όταν το περιβάλλον είναι μολυσμένο, τότε τα κελύφη μολύνονται περισσότερο από τα σώματα.
- Το πεπτικό και γεννητικό σύστημα των σαλιγκαριών, έχουν μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο από τα άλλα συστήματα (Χατζιωάννου, 2009).

Το σημαντικότερο εύρημα αφορά την παρουσία *Salmonella spp.* στους άγριους πληθυσμούς σαλιγκαριών και όχι στα εκτροφής, τουλάχιστον για το παρόν πείραμα και στα σαλιγκάρια της συγκεκριμένης μονάδας.

Στα σαλιγκάρια εκτροφής η παρουσία *Salmonella spp.* έχει αποφευχθεί πιθανώς λόγω:

- της εφαρμογής κατάλληλων διαδικασιών καθαρισμού και απολύμανσης στις εγκαταστάσεις (θάλαμος αναπαραγωγής, εκκολαπτήριο, θάλαμοι διάπαυσης και αποθήκευσης των γεννητόρων και του προϊόντος), τα διχτυοκήπια πάχυνσης, τον εξοπλισμό τους κλωβούς μεταφοράς, τα οχήματα κλπ.,
- της λήψης προληπτικών μέτρων κατά την εισαγωγή νέων ζώων στη μονάδα εκτροφής (γεννητόρων και γόνου σαλιγκαριών),
- της ορθής χρήσης κτηνιατρικών φαρμακευτικών προϊόντων και προσθέτων
- τη χορήγηση ελεγχμένων ζωοτροφών,
- της απομόνωσης των ασθενών ζώων και την ενδεδειγμένη διάθεση νεκρών ζώων και των αποβλήτων,
- της καθαριότητας των ζώων προς συγκομιδή,
- της εφαρμογής αποτελεσματικών προγραμμάτων καταπολέμησης των επιβλαβών οργανισμών,
- προστατευτικών μέτρων για την πρόληψη της εισαγωγής λοιμωδών ασθενειών ή ασθενειών που μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο,
- πιθανών κινδύνων που συνδέονται με τις ζωοτροφές,
- της περιγραφής των προβλημάτων που μπορούν να επηρεάσουν την ανθρώπινη υγεία και πρέπει να αναφέρονται στην αρμόδια αρχή

(Χατζηγιάννου, 2009).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

- **Adak G.K., Meakins S.M., Yip H., Lopman B.A. and O'Brien S.J. (2005).** Disease risks from foods, England and Wales, 1996–2000. *Emerging Infectious Diseases*, 11: 365–372.
- **Adams M.R. and Moss M.O. (1995).** *Food Microbiology*. The Royal Society of Chemistry.
- **Anaya I., Aguirrezabal A., Ventura M., Comellas L. and Agut M. (2008).** Survivability of *Salmonella* cells in popcorn after microwave oven and conventional cooking. *Microbiological Research*, 163: 73—79.
- **Andrews W.H., Wilson C.R., Romero A. and Poelma P.L. (1975).** The Moroccan Food Snail, *Helix aspersa*, as a Source of *Salmonella*. *Applied Microbiology*, 3: 328-330.
- **Arthur L., Jones S., Fabri M. and Odumeru J. (2007).** Microbial survey of selected Ontario-grown fresh fruits and vegetables. *International Association for Food Protection*, Vol. 70, 12: 2864-2867.
- **Biannic M. and Dacuzan J. (1993).** Cold-hardiness and freezing in the land snail *Helix aspersa Muller* (Gastropoda, Pulmonata). *Physiology*, 3: 503-506.
- **Bredie W. L. P. and Boer E. (1992).** Evaluation of the MPN, Anderson-Baird-Parker, Petrifilm *E. coli* and Fluorocult ECD method for enumeration of *Escherichia coli* in foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier Science Publishers , 16: 197- 208.
- **Buckalew D. W., Hartman L. J., Grimsley G. A., Martin A. E. and Register K. M. (2006).** A long-term study comparing membrane filtration

with Colilertw defined substrates in detecting fecal coliforms and *Escherichia coli* in natural waters. Journal of Environmental Management, 80: 191–197.

- **Cakir I., Douan H. B., Bappinar E., Keven F. and Halkman A. K. (2002).** The Need for Confirmation in Coliform and *E. coli* Enumeration in Foods. Turkish Veterinary Animal Science, 26: 1049-1053.
- **Chevalier, H. (1977).** La variabilite de l'escargot Petit- Gris *Helix aspersa* Müller. Bull. Mus. natn. Hist. nat., Paris, Zoologie, 311: 425-442.
- **Cudjoe K.S., Hagtvedt T. and Dainty R. (1995).** Immunomagnetic Separation of *Salmonella* from foods and their detection. International Journal Food Microbiology, 23:159-65.
- **Dubal Z.B. , Paturkar A.M. , Waskar V.S. , Zende R.J. , Latha C., Rawool D.B. and Kadam M. M. (2004).** Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. Meat Science, 66: 817–821.
- **Fantasia L.D., Sperber W.H. and Deibel R.H. (1969).** Comparison of Two Procedures for Detection of *Salmonella* in Food, Feed, and Pharmaceutical Products. American Society for Microbiology, 540-541.
- **Finneya M., Smullena J., Foster H.A., Brokxb S. and Storey D.M. (2003).** Evaluation of Chromocult coliform agar for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae from faecal samples from healthy subjects. Journal of Microbiological Methods, 54: 353– 358.
- **Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization (FAO/ WHO) (2009).** *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat. Microbiological Risk Assessment Series.

- **Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization (FAO/ WHO) (2001).** Codex Alimentarius Commission. Food Hygiene - Basic Texts - Second Edition Joint Food Standards Programme, Rome.
- **Frahm E. and Obst U. (2003).** Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 123-131.
- **Geissler K., Manafi M., Amoro I. and Alonso J.L. (2000).** Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 280–285.
- **Gomot, A. (1998).** Biochemical composition of *Helix* snails: Influence of genetic and physiological factors. *Journal of Molluscs Studies*, 64: 173-181.
- **Gould, G.W. (1989).** Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures. Elsevier Science Publishers, Essex, UK.
- **Gounadaki A.S., Skandamisa, P.N., Drosinos E.H. and Nychas G-J.E. (2008).** Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages. *Food Microbiology*, 25: 313–323.
- **Gram L. and Huss H.H (1996).** Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 121-137.
- **Grandi A. and Panella F. (1978).** Composizione chimica e qualita proteica delle carni di *Helix aspersa* Mull e di *Helix lucorum* Mull. *Quaderno del 1° Centro di Elicicoltura Borgo*, 7: 113 - 122.

- **Huss H.H., Reilly A. and Karim Ben Embarek P. (2000).** Prevention and control of hazard in seafood. *Food control*, 11: 149-156.
- **Huss, H.H. (1993).** Assurance of seafood quality. Food Agriculture Organisation (FAO). Fisheries Technical Paper 334. FAO, Rome, Italy.
- **Huss, H.H. (1995).** Quality and quality changes in fresh fish. Food Agriculture Organisation (FAO). Fisheries Technical Paper 348. FAO, Rome, Italy.
- **Huss, H.H. (1997).** Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. *Food Control*, 8: 91-98.
- **Huss, H.H. (2004).** Assessment and management of seafood safety and quality. Food Agriculture Organisation (FAO). FAO, Rome, Italy.
- **International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1986a).** Microorganisms in Foods: 1. Their Significance and Methods of Enumeration, 2nd edition. University of Toronto Press, Toronto, Ontario.
- **International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (1986b).** Microorganisms in Foods: 2. Sampling for Microbiological Analysis Principles and Specific Applications. 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, Ontario.
- **Jay, J.M. (2005).** 'Modern Food Microbiology', 7rd edition, Van Nostrand Reinhold, New York, USA: 471-491.
- **Jenikova G., Pazlarova J. and Demnerova K. (2000).** Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *International Microbiology*, 3:225-229.

- **Jordan E., Egan J., Dullea C., Ward J., McGillicuddy K., Murray G., Murphy A., Bradshaw B., Leonard N., Rafter P. and McDowell S. (2006).** *Salmonella* surveillance in raw and cooked meat and meat products in the Republic of Ireland from 2002 to 2004. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 66–70.
- **Kaper J. B., Nataro J. P. and Mobley H.L.T. (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. *National Microbiology*, 2: 123 – 140.
- **Kiebre-Toe M.B., Borges E., Maurin F., Richard Y. and Kodjo A. (2003).** Etude de la flore bactérienne aérobie à Gram négatif de l’escargot d’élevage (*Helix aspersa*). 154, 10: 605-610.
- **Lazaridou-Dimitriadou M. and Kattoulas M. E. (1985).** Edible and Commercialized Snails of Greece- Heliciculture. *Haliotis*, 11: 129–137.
- **Lazaridou-Dimitriadou M., Kattoulas M. and Staikou A. (1983).** Searching for the Factors that Provoke Differences in Size and Weight of Snails (*Helix aspersa* Müller) from two Different Populations, One from the Island of Crete and the Other from Peloponnesos (Greece). *J. Mollus Studies*, 49: 89-93.
- **Luiz A.deF., Moreira F.C., Correa E.deF. and Falcao D.P. (2004).** Monitoring of the Dissemination of *Salmonella* in the Chichen Frankfurt-sausage Production Line of a Sausage Factory in the State of Sao Paulo, Brazil. *Institute of Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol 99(5):477-480.
- **Milinska M.C, Padrea R.G., Hayashib C., Oliveiraa C.C., Visentainera J.V., Evela’ zio de Souzaa N. and Matsushita M. (2006).** Effects of feed protein and lipid contents on fatty acid profile of snail (*Helix aspersa maxima*) meat. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 212–216.

- **Noble R.T., Moore D.F., Leecaster M.K., McGee C.D. and Weisberg S.B. (2003).** Comparison of total coliform, faecal coliform, and enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. *Water Research*, 37: 1637-1643.
- **Ozogul Y., Ozogul F. and Ilkan Olgunoglu A. (2005).** Fatty acid profile and mineral content of the wild snail (*Helix pomatia*) from the region of the south of the Turkey. *European Food Technology*, 221:547–549.
- **Parisi – Bianco E. (1978).** Isolamento di germi dai diversi apparati di *Helix pomatia* L. *Quaderno del 1° Centro di Elicicoltura Borgo S.D.*, 7: 143 - 147.
- **Pisanu S. and Leoni A. (1980).** Indagine batteriologica e aspetti idienico – sanitary delle lumache. *Quaderno del 1° Centro di Elicicoltura Borgo S.D.* 9: 77 - 78.
- **Rembacken B.J., Snelling A.M., Hawkey P.M., Chalmers D.M. and Axon A.T. (1999).** Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet*, 354: 635–639.
- **Reuter, G. (1992).** Culture media for *enterococci* and group *D-streptococci*. *International Journal of Food Microbiology*, 17: 101- 111.
- **Rompré A., Servais P., Baudart J., De-Roubin R.M. and Patrick L. (2002).** Detection and Enumeration of coliforms in drinking water :current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 49: 31-54.
- **Rooney R. and Wall P.G. (2003).** *Food Safety*. Elsevier Science. UK : 2682-2688.
- **Ruby J.R., Zhu J. and Ingham S.C. (2007).** Using indicator bacteria and *Salmonella* test results from three large-scale beef abattoirs over an 18-month

period to evaluate intervention system efficacy and plan carcass testing for *Salmonella*. International Association for Food Protection. Vol. 70, 12: 2732-2740.

- **Samakupa A.P., Einarsson H. and Eypórsdóttir A. (2003).** Hygiene indicators in an fish progressing establishment- A case study in a white fish processing establishment. United Nations University-Fisheries Training Programme, United Nations University : 1 - 29.
- **Selma M.V., Ibanez A.M., Cantwell M. and Suslow T. (2008).** Reduction by gaseous ozone of *Salmonella* and microbial flora associated with fresh-cut cantaloupe. Food Microbiology, 25: 558– 565.
- **Serrano S., Medina L.M., Jurado M. and Jodral M. (2004).** Microbiological Quality of Terrestrial Gastropods Prepared for Human Consumption. Journal of Food Protection, Vol. 67, 8: 1779–1781.
- **Solem, A. (1978).** Classification of Land *Mollusca* in *Pulmonates*. Systematic, Evolution and Ecology. Academic Press, New York, Vol. 2A pp 49-97
- **Staikou A., Lazaridou-Dimitriadou, M. and Farmakis N. (1988).** Aspects of the life cycle, population dynamics, growth and secondary production of the edible snail *Helix lucorum* Linnaeus, 1758 (Gastropoda, Pulmonata) in Greece. J. Mollus Studies, 54: 139 – 155.
- **Stanier R.Y., Ingraham J.L., Wheelis M.L. and Painter P.R. (1986).** The Microbial World, 5th edition Prentice Hall. New Jersey, USA: 266-439.
- **Temelli S., Dokuzlu C. and Kurtulus Cem Sen M. (2006).** Determination of microbiological contamination sources during frozen snail meat processing stages. Food Control, 17: 22–29.

- **Tsola E. , E.H. Drosinos E.H. and Zoiopoulos P. (2008).** Impact of poultry slaughter house modernisation and updating of food safety management systems on the microbiological quality and safety of products. *Food Control*, 19: 423–431.
- **Van Kessel J.S., Pachepsky Y.A., Shelton D.R. and Karns J.S. (2007).** Survival of *Escherichia coli* in cowpats in pasture and in laboratory conditions. *Journal of Applied Microbiology Environmental Microbial Safety Laboratory*, Beltsville, USA Original article.
- **Weissman M.A. and Carpenter J.A. (1969).** Incidence of *Salmonella* in Meat and Meat Products. *American Society for Microbiology*, p. 899-902.
- **Yildirim M.Z. Kebapci U. and Gumus B.A. (2004).** Edible Snails (Terrestrial) of Turkey. *Turk J. Zool.*, 28: 329-335.

5.2. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

- **Αρβανιτογιάννης Ι. και Κούρτης Λ. (2002).** ISO 9000:2000. Παρουσίαση του νέου προτύπου-σύγκριση με το ISO 9000:1994, εφαρμογές του ISO 9000 σε παραγωγή προϊόντων και παροχή υπηρεσιών, διαχείριση ολικής ποιότητας, έρευνα αγοράς, ικανοποίηση καταναλωτή. Εκδόσεις ΣΤΑΜΟΥΛ., Αθήνα.
- **Αρβανιτογιάννης Ι. και Μπονσέα Λ. (2001).** Στοιχεία Τεχνολογίας, Μεταποίησης & Συσκευασίας Τροφίμων. University Studio Press. Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών. Θεσσαλονίκη.
- **Αρβανιτογιάννης Ι. και Τζούρος Ν. (2006).** Το νέο Πρότυπο για Ποιότητα & Ασφάλεια Τροφίμων ISO 22000: Παρουσίαση & Ερμηνεία. Με στοιχεία ιχθυλασιμότητας-ανάλυσης αστοχίας & παρουσίαση της Ευρωπαϊκής νομοθεσίας για τα τρόφιμα. Εκδόσεις ΣΤΑΜΟΥΛΗ. Αθήνα.
- **Αρβανιτογιάννης Ι., Βαρζάκας Θ.Χ. και Τζίφα Κ. (2008).** Έλεγχος Ποιότητας Τροφίμων. Εργαστηριακός Οδηγός. Εκδόσεις ΣΤΑΜΟΥΛΗ. Αθήνα.
- **Γκόγκας Α., Χατζηιωάννου Μ., Εξαδάκτυλος Α., Λαζαρίδου Μ. και Νεοφύτου Χρ. (2005).** Μεταποίηση και εμπορία των εδάδιμων σαλιγκαριών στην Ελλάδα. 2ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υδροβιολογίας και Αλιείας, Βόλος.
- **Δεσποτοπούλου, Α. (2008).** «Καταγραφή του σταδίου του γεννητικού συστήματος του εδάδιμου σαλιγκαριού *Helix aspersa* που προερχόταν από μονάδα εκτροφής». Μεταπτυχιακή διατριβή. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- **Καραγκούνη-Κύρτσου Α. (1999).** Μικροβιολογία. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.

- **Κορμάς Κ.Α. (2007).** Μικροβιακή Οικολογία Υδάτινων Συστημάτων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- **Λαζαρίδου – Δημητριάδου Μ. και Κάτουλας Μ. (1985).** Τα εδώδιμα και εμπορεύσιμα σαλιγκάρια της Ελλάδας – Σαλιγκαροτροφία. Θεσσαλονίκη : 22-35.
- **Μάνδαλος, Α.Η (2008).** Η Δυναμική της Προσφοράς των Ελληνικών Σαλιγκαριών στην Αγορά της Ε.Ε.. Πτυχιακή Διατριβή, Π.Θ., Βόλος: 41- 43.
- **Μαρκάκης, Σ. (1990).** Το σαλιγκάρι και η εκτροφή του. 2η έκδοση. Χρονοπρές Α.Ε., Αθήνα.
- **Μπλούκας Ι.Γ. (2004).** Επεξεργασία & Συντήρηση Τροφίμων. Εκδόσεις Σταμούλη. Αθήνα.
- **Μπλούκας, Ι.Σ (2004).** Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων. Εκδόσεις Σταμούλη. Αθήνα: 25-31.
- **Μποζιάρης Ι. (2008).** Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- **Νεοφύτου Χρ. και Χατζηϊωάννου Μ. (2008).** Καθορισμός των ποιοτικών προδιαγραφών των εκτρεφόμενων σαλιγκαριών *Helix aspersa*. Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Πυθαγόρας ΙΙ. (Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ. ΙΙ).
- **Παπαετροπούλου Μ. και Μαυρίδου Α. (1995).** Μικροβιολογία του υδάτινου περιβάλλοντος - Βασικές Αρχές. Εκδόσεις Τραυλος-Κωσταράκη, Αθήνα.

- **Παρλαπάνη Φ. (2009).** «Χαρακτηρισμός της μικροβιακής χλωρίδας και επίδρασης της στην ασφάλεια και στο χρόνο ζωής των μεταποιημένων καλλιεργούμενων σαλιγκαριών.» Μεταπτυχιακή διατριβή. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.
- **Χατζηγιάννου, Μ. (2007).** Πανεπιστημιακές παραδόσεις του μαθήματος Εκτροφή Γαστεροπόδων Αμφιβίων και Ερπετών. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Βόλος.

5.3. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

- **Απόφαση 96/340/EK (1996).**
[http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996D0340:
EL:HTML](http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996D0340:EL:HTML)
- **CLECOM (2001).** Check List of European Continental Mollusca.
<http://www.jaxshells.org/cornu.htm>
- **WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) (2005b).** Drug-resistant *Salmonella*. Fact Sheet. No 139.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/print.html>
- **Overview of The European Community (1993).** Market Brief on Snails. ITC. Market Development. International trade centre unctad /WTO: 1-13.
http://www.helixdelsur.com.ar/web/mercado_europeo.pdf
- **Regulation(EC)No852/2004**
[http://www.lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:277:0007
:0007:EL:PDF](http://www.lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:277:0007:0007:EL:PDF)
- **Regulation(EC)No853/2004**
<http://www.eureuropa.eu/LexUriServ./LexUriServ.do?>
- **Regulation(EC)No2073/2005**
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/el/consleg/2005/R/02>
- <http://commons.wikimedia.org>
- <http://elrincon-continentales3.iespana>
- <http://www.food-info.net/gr/bact/salm.htm>

- Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή

Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. (2009)

<http://www.apae.uth.gr/pdf/Arxiki/Saligaria/saligkaria.pdf>

6. ABSTRACT

The aim of the present work was to determine the levels of total microbial population, Enterobacteriaceae, *E. coli*, coliforms and enterococci as well as the pointing out of presence of *Salmonella spp* in the intestines and the body of fresh snails of species *Helix aspersa* and *Helix lucorum* that is intended for human consumption.

The microbial population in intestines was higher than the one in bodies. TVC level of 7,36 log cfu/g was contained in the intestines of wild snails, *Helix lucorum*, 7.06 log cfu/g in wild snails *Helix aspersa* and 5.62 log cfu/g in breeding snails *Helix aspersa*. Their bodies contained 6.59 log cfu/g, 6.16 και 5.38 log cfu/g respectively.

Enterobacteriaceae population constituted a great percentage of TVC. Enterobacteriaceae level of 6.46 log cfu/g was contained in the intestines of wild snails, *Helix lucorum*, 7.30 log cfu/g in wild snails *Helix aspersa* and 7.28 log cfu/g in breeding snails *Helix aspersa*. Their bodies contained 6.17 log cfu/g, 5.71 και 6.64 log cfu/g respectively.

E.coli level of 4.07 log cfu/g was contained in the intestines of wild snails, *Helix lucorum*, 5.97 log cfu/g in wild snails *Helix aspersa* and 5.18 log cfu/g in breeding snails *Helix aspersa*. Their bodies contained 2.85 log cfu/g, 4.42 και 4.83 log cfu/g respectively. Coliforms level of 5.66 log cfu/g was contained in the intestines of wild snails, *Helix lucorum*, 6.7 log cfu/g in wild snails *Helix aspersa* and 6.64 log cfu/g in breeding snails *Helix aspersa*. Their bodies contained 5.04 log cfu/g, 5.54 και 6.65 log cfu/g respectively. *Enterococcus* level of 5.93 log cfu/g was

contained in the intestines of wild snails, *Helix lucorum*, 5.22 log cfu/g in wild snails *Helix aspersa* and 4.92 log cfu/g in breeding snails *Helix aspersa*. Their bodies contained 0 log cfu/g, 4.71 και 4.74 log cfu/g respectively.

The number and the species of micro-organisms that is detected in the live snails depend from the species and the population of microbial flora of environment in which they live, from the phase of their biological circle and from the conditions of hygiene that prevail at the collection, the transport and their marketing.

The presence of *Salmonella spp.* was observed only in the samples of wild populations, in type *Helix aspersa* and *Helix lucorum* and no in breeding snails of *Helix aspersa*.

Generally the results showed that existed difference between two wild snails *Helix aspersa* and *Helix lucorum*, as well as between wild and breeding animals of species *Helix aspersa*, as for their concentration in all the categories of micro-organisms that were counted in intestines and body.

Key Words: *Helix aspersa*, *Helix lucorum*, microbial indicators, food-snail quality, food-snail hygiene and safety.