



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Παραδοτέο Π3.1** Έκθεση αναφοράς για την επίδραση της ΓΔ στο μικροβιακό φορτίο των  
διαφόρων προϊόντων σε εργαστηριακές συνθήκες και πραγματικές συνθήκες εφαρμογής  
Τύπος: Έκθεση

**Υπο-παραδοτέο Π3.1.3.** «Αξιολόγηση της επίδρασης της γης διατόμων στο μικροβιακό φορτίο  
των διαφόρων προϊόντων»



DiatomiteThem

# DiatomiteThem

Τίτλος Έργου:

**Προστασία των αποθηκευμένων δημητριακών με τη  
χρήση γης διατόμων**

«Το έργο αυτό υλοποιείται στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ και συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου: Τ2ΕΔΚ-03532)»



**ΕΠΑνΕΚ 2014-2020**  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγικά στοιχεία	3
2. Μύκητες	3
3. Ζύμες	9
4. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
5. <i>Escherichia coli</i>	12
6. <i>Bacillus cereus</i>	14
7. Συμπεράσματα	15
8. Βιβλιογραφία	16



## 1. Εισαγωγικά στοιχεία

Σε συνέχεια της Ενότητας Εργασίας 3, σε αυτή τη Δράση, προσδιορίστηκε το μικροβιακό φορτίο προϊόντων στα οποία εφαρμόστηκε η ΓΔ, με έμφαση στα βακτήρια και τους μύκητες που παράγουν αφλατοξίνες, προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση της μεθόδου σε μετασυλλεκτικές προσβολές από παθογόνα. Σε αυτό το πλαίσιο, ποσότητες σιταριού και καλαμποκιού που παραλήφθηκαν από τον συνεταιρισμό, μολύνθηκαν τεχνητά με μύκητες, ζύμες και βακτήρια που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα, προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση της ΓΔ στο μικροβιακό φορτίο των τεχνητά προσβεβλημένων προϊόντων και να συγκριθεί με το αντίστοιχο φορτίο του μάρτυρα (προϊόντα που δεν έχουν μολυνθεί τεχνητά). Τα παθογόνα που χρησιμοποιήθηκαν στις βιοδοκιμές αφορούσαν τα είδη *Aspergillus flavus*, *Penicillium verrucosum*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Bacillus cereus*. Τα αποτελέσματα αυτής της Δράσης αποτέλεσαν την πρώτη αξιολόγηση της εφαρμογής γης διατόμων στο μικροβιακό φορτίο ορισμένων προϊόντων, για τα οποία δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα έως σήμερα.

## 2. Μύκητες

### 2.1. Είδη μυκήτων και καλλιέργεια

Οι μύκητες που αξιολογήθηκαν αφορούσαν τα είδη *Aspergillus flavus* και *Penicillium verrucosum*, παθογόνα που βρέθηκαν στα προϊόντα του συνεταιρισμού, έπειτα από τις επιτόπιες δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν από το Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας (βλέπε Π1.2.1) και τα οποία φυλαγόντουσαν στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα συγκεκριμένα είδη σχετίζονται με την αλλοίωση και την ασφάλεια διαφόρων δημητριακών και μπορούν να παράξουν μυκοτοξίνες, οι οποίες είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες για τη δημόσια υγεία. Κατά την διεκπεραίωση των βιοδοκιμών, συλλέγονταν δεδομένα για να υπολογιστεί η πυκνότητα των μυκήτων στα εξεταζόμενα δημητριακά του συνεταιρισμού. Όπως έχει αναφερθεί και στο Π1.2.1, για την αναγνώριση των συγκεκριμένων ειδών μυκήτων, σπόροι από τα δείγματα καλαμποκιού, σιταριού και κριθαριού που συλλέχθηκαν από τις αποθήκες του συνεταιρισμού, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με υπόστρωμα PDA με σκοπό την επώαση των μυκήτων και την



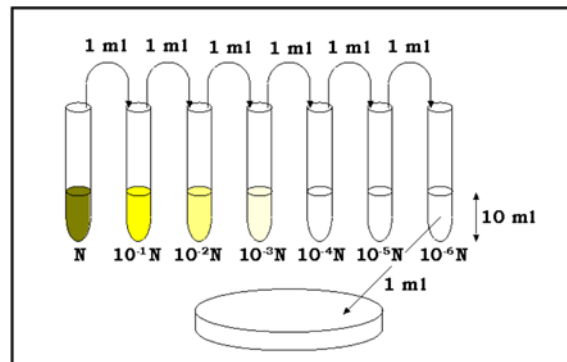
ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών τους. Οι μύκητες ταξινομήθηκαν με την χρήση μικροσκοπίου και διαφόρων οδηγών αναγνώρισης. Από αυτές τις καλλιέργειες, πάρθηκαν και μυκηλιακές υφές (από διχοτόμηση των μυκηλιακών υφών με χρήση μικροσκοπίου με μεγέθυνση από 200-400) που αντιστοιχούσαν σε συγκεκριμένο είδος μύκητα και επώαστηκαν για την χρήση των παθογόνων σε αυτή την δράση. Για την αξιολόγηση της πληθυσμιακής ανάπτυξης των ειδών στους σπόρους καθ' όλη την διάρκεια της αποθήκευσης, ακολουθήθηκε διαφορετικό πρωτόκολλο, όπως αναφέρεται με λεπτομέρειες στο Π1.2.1. Τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων εκφράζονται ως ο αριθμός (μέσος όρος) των αποικιών των μυκήτων ανά γραμμάριο σπόρου (cfu/g).

## 2.2. Μέθοδος εμβολιασμού και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Τα δύο είδη μυκήτων ανανεώθηκαν και ελέγχθηκαν για την ύπαρξη τυχόν άλλων μικροοργανισμών στις καλλιέργειες πριν την χρήση τους στα πειράματα. Έπειτα και τον έλεγχο της καθαρότητας των καλλιεργειών, οι μύκητες (20 μl σπόρια/ml) εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Malt Extract Agar (MEA) (Pitt και Hocking, 2009) για το *A. flavus* και σε μίγμα γλυκερίνης-σακχαρόζης-ζύμης-διχορανίου-χλωροτετρακλίνης (Burlakoti et al., 2012) για το *P. verrucosum* σε τριβλία, και επώαστηκαν για μια εβδομάδα με σκοπό την βλάστησή τους στους  $24 \pm 0.5$  °C. Έπειτα, τα σπόρια συλλέχθηκαν σε υδατικό διάλυμα (0,2 ml v/v Tween80 και 0,9 w/v NaCl) για την απόξεσή τους σε θάλαμο νηματικής ροής (κάτω από ασηπτικές συνθήκες). Από το πυκνό διάλυμα πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις (Εικόνα 1) με λήψη δειγμάτων για την μέτρηση των σποριών που περιέχονταν στο διάλυμα με σκοπό την δημιουργία συγκεκριμένης συγκέντρωσης των  $10^7$  cfu/ml (Εικόνα 2). Έπειτα, το ψεκάστικό διάλυμα του 1 ml (με συγκέντρωση σποριών  $10^7$  cfu), ψεκάστηκε σε ομάδες των 15 γρ σπόρων σιταριού και καλαμποκιού και τα δημητριακά τοποθετήθηκαν σε πλαστικά φιαλίδια και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης στους  $24 \pm 0.5$  °C για 3 ημέρες με σκοπό την ανάπτυξη των μυκήτων στους σπόρους. Έπειτα, ακολούθησε δειγματοληψία από τις ποσότητες σπόρου με σκοπό την μέτρηση των σποριών που μπόρεσαν να αναπτυχθούν σε αυτά με την ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω και η υπόλοιπη ποσότητα των δημητριακών επιπάστηκε με 0 (μάρτυρας) και 1000 ppm γης διατόμων και επέστρεψε στον θάλαμο επώασης στις ίδιες συνθήκες για άλλες 25 ημέρες. Μετά το πέρας



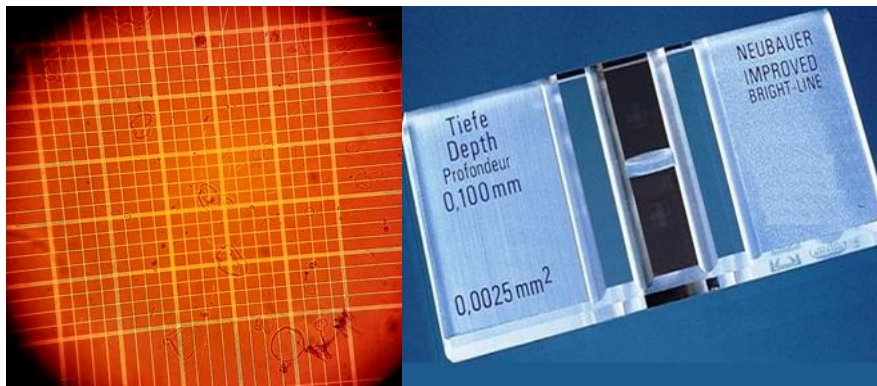
της περιόδου, οι σπόροι των δημητριακών βγήκαν από τα φιαλίδια, βυθίστηκαν σε 10 ml υδατικού διαλύματος (0,2 ml v/v Tween80 και 0,9 w/v NaCl) και ανακινήθηκαν με αναδευτήρα vortex για 2 λεπτά για την απόξεσή των σποριών. Στο υδατικό διάλυμα, μετά την εξαγωγή των δημητριακών, πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες δεκαδικές αραιώσεις και μετρήθηκαν τα σπόρια του μύκητα (σπόρια/ml) με χρήση αιμοκυτταρόμετρου (πλάκα Neubauer)(Εικόνα 3). Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε 6 φορές για κάθε δημητριακό x είδος μύκητα x δόση γης διατόμων (συνολικά 48 φιαλίδια) (Εικόνα 4).



**Εικόνα 1:** Σχηματική παράσταση της μεθόδου των διαδοχικών αραιώσεων (όπου N η πυκνότητα του πληθυσμού του παθογόνου, κύτταρα ml<sup>-1</sup>)



**Εικόνα 2:** Πυκνό διάλυμα (κωνική φιάλη) από όπου πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις με λήψη δειγμάτων για την μέτρηση των σποριών που περιέχονταν στο διάλυμα με σκοπό την δημιουργία συγκεκριμένης συγκέντρωσης των 10<sup>7</sup> cfu/ml.



**Εικόνα 3:** Χρήση αιμοκυταρόμετρου στο οπτικό μικροσκόπιο, σε μεγέθυνση x400 (1 σπόριο= 10.000 σπόρια/ml)



**Εικόνα 4:** Πλαστικά φιαλίδια με σιτάρι με *Penicillium verrucosum* (μάρτυρας)



**Εικόνα 5:** Σπόροι καλαμποκιού με *Aspergillus flavus*

### **2.3.Αποτελέσματα**

Τα ποσοστά των μυκήτων που μετρήθηκαν στην αρχή του πειράματος και πριν την επίταση των σπόρων με γη διατόμων είναι παρόμοια με αυτά που αξιολογήθηκαν από άλλους ερευνητές, έπειτα από δειγματοληψίες σε αποθηκευμένα δημητριακά (Berghofer et al., 2003; Weidenborner et al., 2000). Συνεπώς, ακόμα και αν η επιμόλυνση του σιταριού και καλαμποκιού έγινε τεχνητά στο παρόν πείραμα, η αρχική πυκνότητα των μυκήτων που μετρήθηκε προσομοιάζει την πραγματική που μπορεί κάποιος να βρει σε αποθηκευμένα δημητριακά. Οι μετρήσεις που πάρθηκαν για τον υπολογισμό της τελικής πυκνότητας των σπορίων των μυκήτων μετά την επίταση με γη διατόμων και την επώαση για 25 ημέρες φανερώνουν ότι η γη διατόμων επηρεάζει-παρεμποδίζει την ανάπτυξη των μυκήτων, συγκρίνοντας τα δείγματα που επιτάστηκαν με 1000 ppm σε σχέση με αυτά του μάρτυρα (0 ppm). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η παρουσία των συγκεκριμένων μυκήτων θεωρείται ως ένδειξη της παρουσίας μυκοτοξινών στο τρόφιμο. Σύμφωνα με έρευνα των





Lund και Frisvad (2003), περισσότερο του 7% των προσβολών από *P. verrucosum* ανέδειξε την παρουσία της ωχρατοξίνης Α (μυκοτοξίνη που παράγεται από το συγκεκριμένο είδος μύκητα).

**Πίνακας 1:** Παρουσία των *A. flavus* και *P. verrucosum* εκφραζόμενη ως ο αριθμός (μέσος όρος) των αποικιών των μυκήτων ανά γραμμάριο σπόρου (cfu/g).

Είδος	Δείγμα	Δόση γης διατόμων	Αρχική πυκνότητα σποριών (cfu/g)	Τελική πυκνότητα σποριών (cfu/g)
<i>Aspergillus flavus</i>	Σιτάρι	0	1.009,7 ± 9,4	3.652,7 ± 96,7
		1000	1129,0 ± 28,8	911,0 ± 45,8
	Καλαμπόκι	0	1370,3 ± 7,5	5510,5 ± 94,3
		1000	1231,8 ± 77,1	1403,8 ± 82,0
<i>Penicillium verrucosum</i>	Σιτάρι	0	1619,8 ± 55,1	6379,2 ± 69,2
		1000	1555,8 ± 11,5	1639,0 ± 72,6
	Καλαμπόκι	0	1572,8 ± 121,7	1171,0 ± 78,0
		1000	1451,0 ± 132,4	1553,0 ± 119,5

### 3. Ζύμες

#### 3.1.Είδη ζυμών και καλλιέργεια

Παρόλο που διάφορα γένη ζυμών υπάρχουν σε πολλά οικοσυστήματα χωρίς να αναφέρονται ως παθογόνοι μικροοργανισμοί, κάποια γένη όπως το γένος *Candida*, είναι σημαντικά παθογόνα (Hurley et al., 1987). Τα τελευταία 20 χρόνια, έχει παρατηρηθεί μια σημαντική αύξηση των λοιμώξεων που προκαλούνται από διάφορα είδη *Candida* σε παγκόσμιο επίπεδο (Perloth et al., 2007). Το *Candida albicans* είναι η κύρια αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων σε ευπαθείς ομάδες ασθενών (Ozhak-Baysan et al., 2012). Αυξητική τάση παρουσιάζουν και οι λοιμώξεις από άλλα είδη *Candida*, όπως τα *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* κ.α. (Daniel et al., 2014, Storti et al., 2012). Η παρουσία του *C. albicans*, έχει αναφερθεί στο χόμα, στο γλυκό νερό, σε διάφορα λαχανικά αλλά και σε αποθηκευμένα δημητριακά (Cook and Schlitzer, 1981, Mok et al., 1984, Druvefors et al., 2002, Stone et al., 2012).



Συνεπώς, για το παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε η ζύμη *Candida albicans* (Robin) Berkhout. Η καλλιέργεια της ζύμης πάρθηκε από το Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας και ελέγχθηκε για την ύπαρξη τυχόν άλλων μικροοργανισμών πριν την χρήση της στα πειράματα.

### 3.2. Μέθοδος εμβολιασμού και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Ο εμβολιασμός της ζύμης στα δείγματα αποστειρωμένου με UV ακτίνες σιταριού και καλαμποκιού, έγινε με εμβάπτιση των σπόρων για 45 λεπτά σε διάλυμα ζύμης συγκέντρωσης  $10^6$  cfu/ml. Μετά το πέρας της εμβάπτισης, οι σπόροι των δημητριακών σουρώθηκαν από το διάλυμα και τοποθετήθηκαν ανά ομάδες των 15 γρ. σε πλαστικά φιαλίδια όπου και παρέμειναν για τρεις ημέρες μέχρι την επίπασή τους με 0 (μάρτυρας) και 1000 ppm γης διατόμων. Η πρώτη μέτρηση πάρθηκε μετά την 3<sup>η</sup> ημέρα επώασης της ζύμης και πριν την επίπαση των σπόρων με την γη διατόμων. Αφού καταμετρήθηκαν οι αρχικές αποικίες της ζύμης σε δείγματα των 5 γρ. των επιμολυσμένων σπόρων, ακολούθησε η επίπαση των υπόλοιπων (10 γρ σπόρων) με 0 και 1000 ppm γης διατόμων, τα δημητριακά επέστρεψαν στα πλαστικά φιαλίδια και τοποθετήθηκαν στους 28°C για άλλες 28 ημέρες επώασης. Μετά και το πέρας των 28 ημερών, καταμετρήθηκαν οι αποικίες και το αποτέλεσμα εκφράστηκε ως cfu ζύμης / g σπόρου δημητριακού και μετασχηματίσθηκαν σε λογαριθμική κλίμακα ως  $\log_{10}$ cfu/g σπόρου. Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε 6 φορές για κάθε δημητριακό x δόση γης διατόμων (συνολικά 24 φιαλίδια).

### 3.3. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα της παρούσας βιοδοκιμής (Πίνακας 2) δείχνουν ότι η γη διατόμων είναι ικανή να μειώσει το μικροβιακό φορτίο όσον αφορά τις ζύμες σε σπόρους σιταριού και καλαμποκιού.

**Πίνακας 2:** Παρουσία του *Candida albicans* εκφραζόμενη ως ο λογάριθμος του αριθμού των αποικιών των ζυμών ανά γραμμάριο σπόρου ( $\log_{10}$ cfu/g).

Δείγμα	Δόση γης διατόμων	Αρχική πυκνότητα σποριών ( $\log_{10}$ cfu/g)	Τελική πυκνότητα σποριών ( $\log_{10}$ cfu/g)
Σιτάρι	0	$3,5 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,1$
	1000	$4,1 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$



Καλαμπόκι	0	6,6 ± 0,2	8,5 ± 0,6
	1000	5,8 ± 0,5	4,4 ± 0,7

#### 4. *Staphylococcus aureus*

##### 4.1. Καλλιέργεια

Το βακτήριο *Staphylococcus aureus* είναι ένα παθογόνο που σχετίζεται με σοβαρές περιπτώσεις τροφικών δηλητηριάσεων (Scallan et al., 2011, Kadariya et al., 2014, Wu et al., 2018). Συγκαταλέγεται ανάμεσα από τα πιο κοινά παθογόνα που προκαλούν διάφορες λοιμώξεις και παθήσεις προερχόμενες από το φαγητό παγκοσμίως (Jamali et al., 2015). Το βακτήριο καλλιεργήθηκε στους 35 °C σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα BHIA (Brain Heart Infusion Agar) και εξετάσθηκε για την καθαρότητα της καλλιέργειας πριν την χρήση τους στις βιοδοκιμές.

##### 4.2. Μέθοδος εμβολιασμού και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Για την δημιουργία των εμβολίων, μεταφερόταν μικρή ποσότητα του θρεπτικού υποστρώματος της εργαστηριακής καλλιέργειας που έφερε αποικία του βακτηρίου σε φιαλίδιο με 9 ml BHIB (Brain Heart Infusion Broth) και αφήνονταν να επωαστεί στους 35 °C για 20 έως 24 ώρες. Έπειτα, το βακτηριακό διάλυμα ψεκαζόταν σε ομάδες σπόρων σιταριού και καλαμποκιού των 15 γρ., τα δημητριακά τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια στους 21°C, την 3<sup>η</sup> ημέρα επώασης πάρθηκαν δείγματα για την αρχική μέτρηση των αποικιών στους σπόρους, έπειτα τα δημητριακά επιπάστηκαν με δυο δόσεις γης διατόμων (0 και 1000 ppm) και τοποθετήθηκαν πάλι στους θαλάμους επώασης για άλλες 24 ημέρες. Για την καταμέτρηση των αποικιών στα δημητριακά, κάθε δείγμα σπόρου τοποθετούνταν σε ειδική σακούλα Whirl-Pak, με 99 ml BPD (Butterfield's Phosphate diluent) και αφέθηκαν για 2 λεπτά. Έπειτα ακολουθήθηκαν οι απαραίτητες δεκαδικές αραιώσεις, το διάλυμα ψεκάστηκε σε πλάκα με θρεπτικό υπόστρωμα 3M Petrifilm Staph Express και αφέθηκε να επωαστεί για 24 ώρες ώστε να εξεταστούν οι αποικίες του βακτηρίου.



### 4.3.Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 3, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών, όπου φαίνεται ότι η γη διατόμων σαφώς επηρεάζει την ανάπτυξη και αυτού του βακτηρίου.

<b>Πίνακας 3:</b> Παρουσία του <i>Staphylococcus aureus</i> εκφραζόμενη ως ο λογάριθμος του αριθμού των αποικιών των ζυμών ανά γραμμάριο σπόρου ( $\log_{10}\text{cfu/g}$ ).			
<b>Δείγμα</b>	<b>Δόση γης διατόμων</b>	<b>Αρχική πυκνότητα σποριών (<math>\log_{10}\text{cfu/g}</math>)</b>	<b>Τελική πυκνότητα σποριών (<math>\log_{10}\text{cfu/g}</math>)</b>
Σιτάρι	0	$6,3 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,1$
	1000	$6,3 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$
Καλαμπόκι	0	$7,3 \pm 0,1$	$10,2 \pm 0,2$
	1000	$6,8 \pm 0,3$	$4,7 \pm 0,7$

## 5. *Escherichia coli*

### 5.1.Καλλιέργεια

Πρόκειται για το πιο γνωστό από τα είδη κολοβακτηρίδιων. Τα κολοβακτηρίδια ορίζονται ως προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά κατά Gram, ραβδόμορφοι οργανισμοί που μετουσιώνουν έντονα τη λακτόζη στους  $35 \pm 2$  °C εντός 24 ή 48 ωρών. Το *E. coli* είναι από τα πιο συχνά βακτήρια της ομάδας των κολοβακτηρίων και θεωρείται ως μικροοργανισμός-δείκτης επειδή η παρουσία του στα τρόφιμα υποδηλώνει ότι οι συνθήκες είναι κατάλληλες για την παρουσία εντερικών παθογόνων και μπορεί να υποδηλώνει ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής καθ' όλη την διάρκεια της επεξεργασίας των διαφόρων τύπων τροφίμων (Batt and Tortorello, 2014).

Για τις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκε η καλλιέργεια του *E. coli* που υπάρχει στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας. Οι καλλιέργειες για την διεξαγωγή του πειράματος αναπτύσσονται σε θρεπτικό υπόστρωμα TBX στους 44 °C, μέχρι να σχηματιστούν οι γαλαζοπράσινες αποικίες του παθογόνου από όπου και λαμβάνονται δείγματα για την διεκπεραίωση των σχετικών πειραμάτων.



## 5.2. Μέθοδος εμβολιασμού και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Για τον εμβολιασμό των σπόρων του σιταριού και του καλαμποκιού, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σπόρων περί τα 25 γρ. Τα δείγματα σπόρων ψήθηκαν για 20 λεπτά στους 121 °C για την αποστείρωσή τους και έπειτα αφέθηκαν για 12 ώρες ώστε να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου, κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια Erlenmeyer των 500 ml όπου υπήρχε μεμονωμένη αποικία του παθογόνου σε 50 mL ζωμού Trypticase. Οι ποσότητες των δημητριακών σουρώθηκαν και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά αποστειρωμένα φιαλίδια, μετρήθηκε η πυκνότητα των παθογόνων, επιπάστηκαν με δυο δόσεις γης διατόμων (0 και 1000 ppm) και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 35 °C για 15 ημέρες επώασης. Ο αρχικός (πριν την επίπαση των σπόρων με γη διατόμων) και ο τελικός αριθμός των παθογόνων στους σπόρους μετά την επίπαση με γη διατόμων και την επώαση του *E. coli* για 15 ημέρες προσδιορίστηκε κάνοντας δεκαπλάσιες σειριακές αραιώσεις δειγμάτων σπόρων σε 0,85% NaCl, και έπειτα το βακτηριακό εναιώρημα απλώθηκε σε πλάκες Petrifilm με σκοπό να απαριθμηθούν τα *E. coli*. Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε 6 φορές, για κάθε συνδυασμό σπόρου δημητριακού και δόσης γης διατόμων (συνολικά 24 φιαλίδια).

## 5.3. Αποτελέσματα

Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρούμε ότι η γη διατόμων είχε θετική επίδραση στην μείωση της ανάπτυξης του *E. coli* στους σπόρους των δημητριακών που εξετάστηκαν εδώ, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους μάρτυρες χωρίς καμία μεταχείριση.

**Πίνακας 4:** Παρουσία του *Escherichia coli* εκφραζόμενη ως ο αριθμός των αποικιών ανά γραμμάριο σπόρου (cfu/g).

Δείγμα	Δόση γης διατόμων	Αρχική πυκνότητα (cfu/g)	Τελική πυκνότητα (cfu/g)
Σιτάρι	0	1,4 ± 0,4	8,3 ± 0,4
	1000	2,3 ± 0,5	1,6 ± 0,4
Καλαμπόκι	0	3,2 ± 0,8	7,4 ± 0,6
	1000	3,3 ± 0,5	2,5 ± 0,3



## 6. *Bacillus cereus*

### 6.1. Καλλιέργεια

Το *Bacillus cereus* είναι ένα πολύ διαδεδομένο βακτήριο στην φύση. Βρίσκεται κυρίως στο έδαφος από όπου σπορογονεί και προσβάλλει τους σπόρους του σιταριού και άλλων δημητριακών. Η ικανότητά των σπορίων του να επιβιώνουν στην θερμότητα, στην αποξήρανση, στα απολυμαντικά και στην ακτινοβολία είναι ένας βασικός παράγοντας που συμβάλλει στην μετακίνηση, την επιμονή και την επιβίωσή του σε πληθώρα τροφών, από ακατέργαστα γεωργικά προϊόντα έως και επεξεργασμένα τρόφιμα. Συνήθως, η κατανάλωση μικρών ποσοτήτων του παθογόνου από τον άνθρωπο δεν προκαλεί σοβαρά προβλήματα υγείας, κάτι τέτοιο όμως δεν ισχύει όταν καταποθεί σε μεγάλες ποσότητες ή από ευαίσθητες ομάδες ανθρώπων. Συνεπώς, η ύπαρξή του στα τρόφιμα δεν είναι επιθυμητή και γι' αυτό το λόγο η επισήμανσή του πρέπει να ελέγχεται στα πλαίσια της ασφάλειας των τροφίμων (Ceuppens et al., 2013, Ehling et al., 2015, Ruan et al., 2015). Για τις βιοδοκιμές χρησιμοποιήθηκε η καλλιέργεια του *B. cereus* που υπάρχει στο Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας.

### 6.2. Μέθοδος εμβολιασμού και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Για τον εμβολιασμό των σπόρων με το βακτήριο, παρασκευάστηκε βακτηριακό διάλυμα με συγκέντρωση τα  $10^7$  cfu/g, στο οποίο εμβυπτίστηκαν ομάδες των 15 γρ σπόρων σιταριού και καλαμποκιού για 10 λεπτά. Έπειτα τα δημητριακά σουρώθηκαν και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά φιαλίδια, σε θάλαμο επώασης για 3 ημέρες. Δείγματα σπόρων των 5 γρ συλλέχθηκαν για την αρχική καταμέτρηση των σπορίων του βακτηρίου, τα δημητριακά επιπάστηκαν με δυο δόσεις γης διατόμων (0 και 1000 ppm) και επέστρεψαν στον θάλαμο επώασης για άλλες 25 ημέρες. Μετά το πέρας της περιόδου, πάρθηκε η τελική μέτρηση των αποικιών του βακτηρίου. Για την καταμέτρηση του *B. cereus*, οι ομάδες των σπόρων αναμείχθηκαν με 90 ml διαλύματος αποστειρωμένης πεπτόνης 0.1% και αφέθηκαν για ένα λεπτό. Έπειτα ακολούθησαν οι απαραίτητες δεκαδικές αραιώσεις και το βακτηριακό εναιώρημα απλώθηκε σε ειδικό θρεπτικό υπόστρωμα όπου και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο AS1766.2.6, με βαθμό ευαισθησίας τα  $2.0 \log$  cfu/g, για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης του *B. cereus*. Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε 6 φορές για κάθε δημητριακό x δόση γης διατόμων (συνολικά 24 φιαλίδια).



### 6.3. Αποτελέσματα

Στην αρχική μέτρηση των δημητριακών δεν βρέθηκαν αποικίες (Πίνακας 5), μάλλον λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης σπορίων του βακτηρίου στο προϊόν, η οποία δεν υπέρβαινε τον βαθμό ευαισθησίας του πρωτοκόλλου καταμέτρησης. Ωστόσο, αυτό δεν ίσχυε στο τέλος της περιόδου επώασης όπου στο καλαμπόκι-μάρτυρα (0 ppm) βρέθηκαν περίπου 2.1 log<sub>10</sub>cfu/g. Από την άλλη πλευρά, σε καμία από τις δύο περιόδους επώασης δεν βρέθηκε συγκέντρωση *B. cereus* στα δημητριακά όπου είχαν επιαστεί με γη διατόμων. Δεδομένου ότι έρευνες έχουν αναφέρει την ύπαρξη του παθογόνου σε μεγάλο ποσοστό δειγμάτων σιταριού που συλλέχθηκαν από αποθήκες, η ανάδειξη μεθόδων για την μείωση της ανάπτυξής του είναι ιδιαίτερα σημαντική (Camage et al., 2021).

**Πίνακας 5:** Παρουσία του *Bacillus cereus* εκφραζόμενη ως ο λογάριθμος του αριθμού των αποικιών ανά γραμμάριο σπόρου (cfu/g).

Είδος	Δείγμα	Δόση γης διατόμων	Αρχική πυκνότητα (log <sub>10</sub> cfu/g)	Τελική πυκνότητα (log <sub>10</sub> cfu/g)
<i>Bacillus cereus</i>	Σιτάρι	0	<2,0	<2,0
		1000	<2,0	<2,0
	Καλαμπόκι	0	<2,0	2,18
		1000	<2,0	<2,0

### 7. Συμπεράσματα

Είναι σαφές από τα αποτελέσματα, ότι η γη διατόμων επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη των παθογόνων *Aspergillus flavus*, *Penicilium verrucosum*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Bacillus cereus*. Σε όλες τις περιπτώσεις των δημητριακών που μολύνθηκαν τεχνητά με τα παραπάνω παθογόνα και επιπάστηκαν με γη διατόμων σε δεδομένες δόσεις που προάγουν την εντομοκτόνο δράση του σκευάσματος, παρατηρήθηκε σαφής μείωση του μικροβιακού φορτίου των δημητριακών σε σχέση με την πληθυσμιακή ανάπτυξη των ίδιων παθογόνων στα αντίστοιχα δημητριακά χωρίς καμία μεταχείριση. Αυτή η ικανότητα της γης διατόμων είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς, μεταξύ άλλων, συμβάλλει



και στην ανάπτυξη ορθών πρακτικών διαχείρισης τέτοιων παθογόνων με σκοπό την διάθεση στην αγορά ασφαλών τροφίμων και ζωοτροφών.

## 8. Βιβλιογραφία

Batt C.A., Tortorello M.L. (2014). Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd Edition. Elsevier Ltd. ISBN: 978-0-12-384733-1

Berghofer L.K., Hocking A.D., Miskelly D., Jansson E. (2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia. International Journal of Food Microbiology, 85: 137–149.

Cook W.L., Schlitzer R.L. (1981). Isolation of *Candida albicans* from freshwater and sewage. Applied and Environmental Microbiology, 41: 840–842.  
<https://doi.org/10.1128/aem.41.3.840-842.1981>

Daniel H.M., Lachance M.A., Kurtzman C.P. (2014). On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. Antonie Van Leeuwenhoek, 106: 67–84.  
<https://doi.org/10.1007/s10482-014-0170-z>

Druvefors U., Jonsson N., Boysen M.E., Schnürer J. (2002). Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens. FEMS Yeast Research, 2: 389–394.

Pitt J.I., Hocking A.D. (2009) Fungi and food spoilage (Vol. 519). Springer, New York.

Burlakoti P., Limay-Rios V., Schaafsma A.W. (2012). Dilution Plating: A Key Factor For Survey of *Penicillium verrucosum* In Winter Wheat. MYCORED meeting North America. Carleton University, Ottawa, Canada.

Gamage N.W., Bamforth J., Ashfaq T., Bernard K., Grafenhan T., Walkowiak S. (2021) Profiling of *Bacillus cereus* on Canadian grain. PLoS ONE 16: e0259209.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259209>

Hurley R., de Louvois J., Mulhall A. (1987). Yeasts as human and animal pathogens. In D. H. A. Rose, J. S. Harrison (Eds.), The yeasts (vol. 1, 2nd ed., pp. 207–281). Academic Press.





Jamali H., Paydar M., Radmehr B., Ismail, S. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. Food Control, 54: 383–388. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.02.013

Perloth J., Choi B., Spellberg B. (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis and treatment. Medical Mycology, 45: 321–346. <https://doi.org/10.1080/13693780701218689>

Ceuppens S., Boon N., Uyttendaele M. (2013). Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. FEMS Microbiology Ecology, 84: 433–50. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12110>

Ehling-Schulz M., Frenzel E., Gohar M. (2015). Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. Front Microbiology, 6: 704. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00704>

Ruan L., Crickmore N., Peng D., Sun M. (2015) Are nematodes a missing link in the confounded ecology of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*? Trends in Microbiology, 23: 341–6. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.011>

Ozhak-Baysan B., Ogunc D., Colak D., Ongut G., Donmez L., Vural T., Gunseren F. (2012). Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing nosocomial candiduria. Medical Mycology, 50: 529–532. <https://doi.org/10.3109/13693786.2011.61899>

Kadariya J., Smith T.C., Thapaliya D. (2014). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. BioMed Research International 2014: 9. doi: 10.1155/2014/827965

Lund F., Frisvad J.C. (2003). *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. Journal of Applied Microbiology, 95: 1117–1123.

Mok W.Y., Luizão R.C., do Socorro Barreto da Silva M., Teixeira M.F., Muniz E.G. (1984). Ecology of pathogenic yeasts in Amazonian soil. Applied and Environmental Microbiology, 47: 390–394. <https://doi.org/10.1128/aem.47.2.390-394.1984>



Missiakas D.M., Schneewind O. (2013). Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. Current Protocols Microbiology, Chapter 9. doi: 10.1002/9780471729259.mc09c01s28. PMID: 23408134

Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Robert V.T., Marc-Alain W., Sharon L.R. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. Emerging Infectious Diseases, 17: 7–15. doi: 10.3201/eid1701.P11101

Standards Australia (1991). AS1766.2.6., Food microbiology. Examination for specific organisms: *Bacillus cereus*. Standards Australia, Sydney, New South Wales.

Stone W., Jones B.L., Wilsenach J., Botha A. (2012). External ecological niche for *Candida albicans* within reducing, oxygen-limited zones of wetlands. Applied and Environmental Microbiology, 78: 2443–2445. <https://doi.org/10.1128/AEM.06343-11>

Storti L.R., Pasquale G., Scomparim R., Galastri A.L., Alterthum F., Gambale W., Paula C.R. (2012). *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the Pediatric Unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical College, State of São Paulo, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 45: 225–231. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000200017>

Weidenborner M., Wieczorek C., Appel S., Kunz B., (2000). Whole wheat and white wheat flour—the mycobiota and potential mycotoxins. Food Microbiology, 17: 103–107

Wu S., Huang J., Wu Q., Zhang F., Zhang J., Lei T. (2018). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from retail vegetables in China. Frontiers in Microbiology, 9: 1263. doi: 10.3389/fmicb.2018. 01263