



**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ



ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *MYTILUS*
GALLOPROVINCIALIS ΣΤΟ ΘΕΡΜΑΪΚΟ ΚΟΛΠΟ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΕΣ
ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ (NEXT GENERATION SEQUENCING
TECHNOLOGIES)**

Μπόμπου Εμμανουέλα

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ιμσιρίδου Αναστασία

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *MYTILUS*
GALLOPROVINCIALIS ΣΤΟ ΘΕΡΜΑΪΚΟ ΚΟΛΠΟ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΕΣ
ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ (NEXT GENERATION
SEQUENCING TECHNOLOGIES)**

**MICROBIOME ANALYSIS OF SPECIES *MYTILUS*
GALLOPROVINCIALIS FROM THERMAIKOS GULF (GREECE) WITH
NEXT GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGIES (NGS)**

ΜΠΟΜΠΟΥ ΕΜΜΑΝΟΥΕΛΑ

*Αφιερώνεται στους πολύτιμους συνοδοιπόρους της ζωής μου:
στους γονείς μου,
στον σύζυγό μου
και στα πολυαγαπημένα μου παιδιά Αριάδνη και Στέλλα*

Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ταυτοποίηση του μικροβιώματος του καλλιεργούμενου μυδιού *Mytilus galloprovincialis* στον κόλπο του Θερμαϊκού, με τεχνικές Αλληλούχησης Επόμενης Γενιάς (Next Generation Sequencing Technologies - NGS). Το μεσογειακό μύδι ανήκει στην τάξη των Bivalvia και ο διατροφικός του μηχανισμός, μέσω της διήθησης μεγάλου όγκου θαλασσινού νερού, προσδίδει στο μύδι πέρα από μεγάλη θρεπτική αξία, την ιδιότητα του περιβαλλοντικού δείκτη ρύπανσης των υδάτων. Το μικροβίωμα του μυδιού, ανάλογα με την επιβάρυνση του θαλάσσιου οικοσυστήματος, μπορεί να φιλοξενήσει πολυάριθμα βακτήρια, με πολλά από αυτά να είναι δυνητικά παθογόνα για τον άνθρωπο. Ο Θερμαϊκός κόλπος έχει τη μεγαλύτερη παραγωγή καλλιεργούμενων μυδιών σε όλη την Ελλάδα, και πρώτη φορά έγινε καταγραφή του μικροβιώματος του μεσογειακού μυδιού *Mytilus galloprovincialis* της περιοχής, με τεχνικές NGS, στοχεύοντας στο 16S rRNA γονίδιο. Η τεχνική NGS που χρησιμοποιήθηκε, με την τεχνολογία των νανοπόρων της εταιρείας Oxford Nanopore Technologies, προσφέρει τη δυνατότητα ανάγνωσης μεγάλου αριθμού βάσεων, επιφέρει βαθιά ταξινομική διάκριση και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, δεν έχει εφαρμοστεί ξανά για την ταυτοποίηση του μικροβιώματος των δίθυρων μαλακίων παγκοσμίως. Παράλληλα με την τεχνική NGS, τα μύδια εξετάστηκαν με μικροβιολογικές τεχνικές, σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (International Organization for Standardization - ISO) για την ανίχνευση *Salmonella spp.* και τον προσδιορισμό του πλέον πιθανού αριθμού (MPN) για το είδος *E. coli*. Οι περιοχές μυδοκαλλιέργειας όπου συλλέχθηκαν τα μύδια είναι αυτές της Πιερίας (Μακρύγιαλος) και της Θεσσαλονίκης (Χαλάστρα), όπου λήφθηκαν 12 δείγματα (10-12 ενήλικα ζώντα μύδια ανά δείγμα) κατά τους χειμερινούς μήνες (Δεκέμβριο έως Φεβρουάριο). Κατά τη μικροβιολογική εξέταση όλα τα δείγματα βρέθηκαν με χαμηλό MPN για το είδος *E. coli* και δεν ανιχνεύθηκε *Salmonella spp.*. Η ταξινομική διάκριση του μικροβιώματος έγινε για τα επίπεδα φύλου, κλάσης, τάξης, οικογένειας και γένους. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) στην αφθονία των βακτηριακών γενών μεταξύ των δύο περιοχών, καθώς και μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας εντός της κάθε περιοχής, αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο z-score. Τα κυρίαρχα βακτήρια που βρέθηκαν σε επίπεδο κατάταξης γένους, είναι τα εξής: *Mycoplasma*, *Anaplasma*, *Mariniblastus*, και *Pseudomonas*. Η παρούσα εργασία αποκάλυψε μεγάλη ετερογένεια ανάμεσα στις δύο περιοχές δειγματοληψίας, αλλά και μεταξύ των μηνών δειγματοληψίας για τα ίδια σημεία συλλογής, υποδηλώνοντας τη μεγάλη δυναμική των βακτηριακών πληθυσμών.

Abstract

The objective of the study was to identify the bacterial microbiota associated to the farmed oysters *Mytilus galloprovincialis*, in the region of Thermaikos gulf, in Northern Greece. Due to their nutritional mechanisms which involve filtering huge amounts of water, the mussels are affected by seawater pollution and can host microbial diversity of environmental origin as well as pathogenic bacteria, which must be constantly monitored. The Thermaikos gulf provides 90% of the Greek mussel production, which is of great economic importance, despite the presence of numerous human activities, and river estuaries which affect the quality of seawater. During the winter season, mussels were sampled from 2 different marine farms (Chalastra and Makrygialos). After harvesting, the samples were analysed for the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella spp.*, as prescribed by Greek and European Community regulations, and further for metagenomic analysis. In the laboratory, DNA extraction, amplification and sequencing of the 16S rRNA gene were performed to establish the taxonomic units. Compared to other NGS techniques, the nanopore technology developed by Oxford Nanopore Technologies that was used in this study, enables the reading of a long length of bases and thus enhances the taxonomic classification. Notably, this technique has not been previously utilized for identifying the microbiome of bivalve mollusks, as per the existing literature. The microbiological analysis that was conducted for the enumeration of *E. coli* with the Most Probable Number (MPN) method, revealed a low presence of *E. coli* for all the 12 samples. The ISO 6579-1:2017 method confirmed the absence of *Salmonella spp.* using 25g from each analyzed sample. Metabarcoding analysis revealed the mussels' bacterial diversity in the examined areas and the identified taxonomic units were compared in terms of zone, region and month of collection. The relative abundance of the taxonomic units was calculated using only the classified reads and the overall composition of the *M. galloprovincialis* microbiome. Statistically significant differences ($p < 0.05$) in the abundance of the most dominant bacterial genera between regions, as well as zones within each region of sampling, were evaluated with z -score computation. The most prevalent taxa at the genus level were *Mycoplasma*, *Anaplasma*, *Mariniblastus* and *Pseudomonas*. The present research revealed great heterogeneity between the two areas, but also between the sampling months for the same collection areas.

Πίνακας Περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
1.1	Η Φυσιολογία του μυδιού <i>Mytilus galloprovincialis</i>	13
1.1.1	Συστηματική κατάταξη του μυδιού <i>Mytilus galloprovincialis</i>	13
1.1.2	Ανατομία και μορφολογία του μυδιού <i>Mytilus galloprovincialis</i>	13
1.1.3	Η αναπαραγωγή του είδους <i>Mytilus galloprovincialis</i>	15
1.1.4	Φυσιολογία θρέψεως και ανάπτυξης του είδους <i>Mytilus galloprovincialis</i>	16
1.2	Συστήματα εκτροφής μυδιών.....	17
1.2.1	Περιοχές μυδοκαλλιέργειας στην Ελλάδα.....	18
1.3	Θαλάσσιο περιβάλλον Θερμαϊκού κόλπου	19
1.3.1	Γεωμορφολογία του Θερμαϊκού κόλπου.....	19
1.3.2	Κλίμα Θερμαϊκού Κόλπου	20
1.3.3	Φυσικοχημικοί παράμετροι του νερού στον Θερμαϊκό κόλπο	21
1.3.4	Ρύπανση στο Θερμαϊκό κόλπο	21
1.4	Το μικροβίωμα του μυδιού <i>Mytilus galloprovincialis</i> και οι τεχνικές ταυτοποίησης του.....	22
1.4.1	Το μικροβίωμα του μυδιού <i>Mytilus galloprovincialis</i>	22
1.4.2	Δυνητικά παθογόνα είδη για τον άνθρωπο στο μικροβίωμα του είδους <i>Mytilus galloprovincialis</i>	23
1.4.3	Νομοθεσία για την ασφάλεια των δίθυρων μαλακίων στην Ελλάδα	26
1.4.4	Μεθοδολογίες ταυτοποίησης μικροβιώματος.....	27
1.4.5	Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA.....	28
1.4.6	Τεχνικές αλληλούχισης Νέας γενιάς (NGS).....	29
1.4.7	Nanopore DNA sequencing (Oxford Nanopore Technologies)	30
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31

2.1	Περιοχή συλλογής δειγμάτων	31
2.2	Συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων για τη μετέπειτα ανάλυση.....	33
2.3	Ανάλυση των δειγμάτων	36
2.3.1	Τεχνική MPN: Μέθοδος ISO 16649-3:2015	36
2.3.2	Υλικά	36
2.3.3	Διαδικασία	37
2.4	Τεχνική για την ανίχνευση <i>Salmonella spp.</i>	38
2.4.1	Διαδικασία για την ανίχνευση <i>Salmonella spp.</i>	39
2.4.2	Βιοχημικές δοκιμές ταυτοποίησης	40
2.5	Ανάλυση μικροβιώματος με τη χρήση της τεχνολογίας αλληλούχησης Τρίτης Γενιάς MinION (MinION Oxford Nanopore technologies)	41
2.5.1	Εξαγωγή DNA	41
2.5.2	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης των δειγμάτων	43
2.5.3	Αντιδραστήρια και διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αραρόζης.....	43
2.5.4	Παρασκευή πηκτής αραρόζης και διαδικασία ηλεκτροφόρησης	44
2.5.5	Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR).....	45
2.5.6	Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR, σε πηκτή αραρόζης.....	46
2.6	Προετοιμασία για τη δημιουργία Βιβλιοθήκης Αλληλούχησης 16S rRNA.....	47
2.6.1	Αρχική Φασματοφωτομέτρηση.....	47
2.6.2	Συνένωση των δειγμάτων (sample pooling).....	48
2.6.3	Καθαρισμός αρχικού προϊόντος PCR.....	49
2.6.4	Τελική Φασματοφωτομέτρηση.....	49
2.6.5	Προετοιμασία των προϊόντων PCR για την τοποθέτησή τους στην κυψέλη ροής (flow cell)	49
2.6.6	Γονοτύπηση των προϊόντων PCR στην πλατφόρμα αλληλούχησης MinION	50

2.6.7	Βιοπληροφορική ανάλυση μεταγονιδιωματικής.....	53
2.7	Στατιστική επεξεργασία	54
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	55
3.1	Αποτελέσματα του Πλέον Πιθανού αριθμού (MPN-Most Probable Number), του πληθυσμού <i>E. coli</i>	55
3.2	Αποτελέσματα ανίχνευσης του γένους <i>Salmonella spp.</i>	56
3.3	Αποτελέσματα της ανάλυσης μικροβιώματος, με τη χρήση της τεχνολογίας αλληλούχησης Τρίτης Γενιάς MinION (Nanopore Oxford Technologies).....	56
3.3.1	Εξαγωγή του DNA και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης.....	56
3.3.2	Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR.....	56
3.3.3	Αρχική φασματοφωτομέτρηση με τη συσκευή Q3000 και καθαρισμός του προϊόντος της PCR.....	57
3.3.4	Τελική φασματοφωτομέτρηση με τη συσκευή Q3000	57
3.3.5	Αλληλούχηση του pooled δείγματος στη συσκευή MinION	58
3.4	Μεταγονιδιωματική ανάλυση.....	60
3.4.1	Αποτελέσματα μεταγονιδιωματικής ανάλυσης.....	61
4	Συζήτηση	81
5	Συμπεράσματα και Μελλοντική έρευνα.....	90
6	Βιβλιογραφία	92

Παράρτημα εικόνων

Εικόνα 1: Το κέλυφος του είδους <i>Mytilus galloprovincialis</i>	14
Εικόνα 2: Η ανατομία του είδους <i>Mytilus galloprovincialis</i>	15
Εικόνα 3: Τυπική εικόνα μυδοκαλλιέργειας σε σύστημα μακράς γραμμής	18
Εικόνα 4: Χάρτης του Θερμαϊκού κόλπου.....	20
Εικόνα 5: Η συσκευή MinION, η πρώτη εμπορικά διαθέσιμη συσκευή για Nanopore sequencing	31
Εικόνα 6: Ο χάρτης του Θερμαϊκού κόλπου με τα σημεία δειγματοληψίας σε Χαλάστρα και Μακρύγιαλο	32
Εικόνα 7: Τα ενήλικα μύδια πριν τη διάνοιξη.....	34
Εικόνα 8: Η διάνοιξη και η τοποθέτηση σε πλαστικό αποστειρωμένο περιέκτη.....	35
Εικόνα 9: Συλλογή σε ειδική σακούλα stomacher bag με φίλτρο	35
Εικόνα 10: Σωλήνες θετικοί για <i>E. coli</i> (κίτρινο χρώμα) μετά από επώαση 24 ωρών.....	38
Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης όπου φαίνεται το ενισχυμένο προϊόν των 1600 ζευγών βάσεων (γονίδιο 16S rRNA).....	47
Εικόνα 12: Η φασματοφωτομέτρηση σε συσκευή Q3000 (Quawell, Καναδάς)	48
Εικόνα 13: Η συσκευή αλληλούχησης (MinION MK 1B).....	51
Εικόνα 14: Η έγχυση του μείγματος στην ειδική υποδοχή της κυψέλης ροής (flow cell).....	51
Εικόνα 15: Η εμφάνιση ιστογράμματος στην εφαρμογή minKNOW, όπου φαίνεται σε πραγματικό χρόνο το μήκος των ακολουθιών (reads) που έχουν καταγραφεί	52
Εικόνα 16: Η απεικόνιση των ενεργών πόρων, σε πραγματικό χρόνο, κατά τη διάρκεια της αλληλούχησης	53
Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης του ενισχυμένου προϊόντος PCR (1600bp) μαζί με το μάρτυρα	57

Εικόνα 18: Διάγραμμα Quality Score σε συνάρτηση με τον αριθμό των αλληλουχιών (reads), μαζί με το μέσο όρο και την κορυφή του Q-score.....	59
Εικόνα 19: Διάγραμμα μήκους αλληλουχίας σε συνάρτηση με τον αριθμό των ακολουθιών (reads), μαζί με το μέσο όρο και την κορυφή του μήκους αλληλουχίας.....	60
Εικόνα 20: Διάγραμμα βάθους αλληλούχησης (sequencing depth), σε συνάρτηση με τα παρατηρούμενα γένη βακτηρίων (observed features)	61
Εικόνα 21: Η αφθονία των βακτηρίων ταξινομημένα σε επίπεδο φύλου, για το σύνολο του Θερμαϊκού κόλπου και με ποσοστό αφθονίας μεγαλύτερο του 1%.....	63
Εικόνα 22: Η αφθονία των βακτηρίων με ποσοστό μεγαλύτερο του 1%, ταξινομημένα σε επίπεδο κλάσης, για το σύνολο του Θερμαϊκού κόλπου	65
Εικόνα 23: Η αφθονία των βακτηρίων για το σύνολο του Θερμαϊκού κόλπου, ταξινομημένα σε επίπεδο τάξης.....	67
Εικόνα 24: Η αφθονία των βακτηρίων για το σύνολο του Θερμαϊκού κόλπου, ταξινομημένα σε επίπεδο οικογένειας	69
Εικόνα 25: Η αφθονία των βακτηρίων σε επίπεδο ταξινόμησης γένους, στον Θερμαϊκό κόλπο (εξωτερικός κύκλος), στον Μακρύγιαλο (μεσαίος κύκλος) και στη Χαλάστρα (εσωτερικός κύκλος). Αποτυπώνονται τα βακτήρια με ποσοστό αφθονίας πάνω από 1%.....	71
Εικόνα 26: Τα γένη βακτηρίων για τις δύο περιοχές.....	72
Εικόνα 27: Τα κυρίαρχα γένη στον Μακρύγιαλο για τον μήνα Δεκέμβριο.....	74
Εικόνα 28: Τα κυρίαρχα γένη στον Μακρύγιαλο, για τον μήνα Ιανουάριο	76
Εικόνα 29: Τα κυρίαρχα γένη στον Μακρύγιαλο για τον μήνα Φεβρουάριο	77
Εικόνα 30: Τα κυρίαρχα γένη στα 2 σημεία δειγματοληψίας (Σ1Μ, Σ2Μ) συνολικά (Δεκέμβριος-Φεβρουάριος), της περιοχής του Μακρύγιαλου.....	78
Εικόνα 31: Ταξινομικό δέντρο βακτηρίων σε επίπεδο γένους, με minimum abundance cutoff 1%, της περιοχής της Χαλάστρας, για τον μήνα Φεβρουάριο	79
Εικόνα 32: Τα κυρίαρχα γένη στα 3 σημεία δειγματοληψίας της περιοχής της Χαλάστρας, τον μήνα Φεβρουάριο	80

Παράρτημα πινάκων

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του μυδιού <i>Mytilus galloprovincialis</i>	13
Πίνακας 2: Δυναμικότητα των περιοχών μυδοκαλλιέργειας του Θερμαϊκού κόλπου (Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας).....	19
Πίνακας 3: Μέση μηνιαία θερμοκρασία σε βαθμούς Κελσίου.....	21
Πίνακας 4: Μέσος μηνιαίος υετός σε χιλιοστά ύψους βροχής	21
Πίνακας 5: Δυνητικά παθογόνα βακτήρια για τον άνθρωπο που βρίσκονται στα οστρακοειδή.....	25
Πίνακας 6: Κριτήρια για την κατάταξη των περιοχών συγκομιδής των δίθυρων μαλακίων (Διεύθυνση Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας (Κ.Δ.Υ.) της Γενικής Διεύθυνσης Κτηνιατρικής του ΥΠ.Α.Α.Τ)	27
Πίνακας 7: Οι περιοχές δειγματοληψίας και οι φυσικοί παράμετροι του νερού την ημέρα της δειγματοληψίας.....	33
Πίνακας 8: Αξιολόγηση αποτελεσμάτων με βάση το χρώμα και την ύπαρξη αλλοιώσεων στον πυθμένα	40
Πίνακας 9: Αξιολόγηση αποτελεσμάτων με βάση το χρώμα και την ύπαρξη αλλοιώσεων στην κεκλιμένη επιφάνεια	40
Πίνακας 10: Τα κωδικοποιημένα δείγματα με τους ειδικούς σημαντές (barcodes), της εταιρείας Oxford Nanopore	48
Πίνακας 11: Αριθμός MPN (Πλέον Πιθανού Αριθμού) / 100 g δείγματος	55
Πίνακας 12: Παρουσίαση των αλληλουχιών (reads) του κάθε barcode και του συνόλου τους	58
Πίνακας 13: Τα κυρίαρχα βακτήρια σε επίπεδο φύλου (Phylum), με ποσοστό μεγαλύτερο του 1% στο σύνολο του Θερμαϊκού κόλπου. Η παράμετρος N δηλώνει τον αριθμό των reads για κάθε φύλο.....	62
Πίνακας 14: Τα κυρίαρχα βακτήρια σε επίπεδο κλάσης με ποσοστό αφθονίας μεγαλύτερο του 1%, για το σύνολο του Θερμαϊκού κόλπου.	64
Πίνακας 15: Η ταξινόμηση σε επίπεδο τάξης, για τα βακτήρια με ποσοστό αφθονίας μεγαλύτερο του 1%	65
Πίνακας 16: Η ταξινόμηση σε επίπεδο οικογένειας, για τα βακτήρια με ποσοστό αφθονίας μεγαλύτερο του 1%. Η παράμετρος N δηλώνει τον αριθμό των reads για κάθε φύλο.	68

Πίνακας 17: Τα γένη βακτηρίων στον κόλπο του Θερμαϊκού και σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας ξεχωριστά, όπου N ο αριθμός των αλληλουχιών (reads) για κάθε είδος.....	69
Πίνακας 18: Τα κυρίαρχα γένη για τα δύο σημεία δειγματοληψίας στην περιοχή του Μακρύγιαλου, για τον μήνα Δεκέμβριο, όπου N ο αριθμός των αλληλουχιών (reads) για κάθε είδος	73
Πίνακας 19: Τα κυρίαρχα γένη για τα δύο σημεία δειγματοληψίας στην περιοχή του Μακρύγιαλου, για τον μήνα Ιανουάριο	75
Πίνακας 20: Τα κυρίαρχα γένη για τα δύο σημεία δειγματοληψίας (Σ1Μ, Σ2Μ), στην περιοχή του Μακρύγιαλου, για τον μήνα Φεβρουάριο	76
Πίνακας 21: Τα κυρίαρχα γένη για τα δύο σημεία δειγματοληψίας (Σ1Μ, Σ2Μ) συνολικά (Δεκέμβριος-Φεβρουάριος), στην περιοχή του Μακρύγιαλου	77
Πίνακας 22: Τα κυρίαρχα γένη για τα τρία σημεία δειγματοληψίας (Σ1Χ, Σ2Χ, Σ3Χ), στην περιοχή της Χαλάστρας, για τον μήνα Φεβρουάριο	79

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η φυσιολογία του μυδιού *Mytilus galloprovincialis*

1.1.1 Συστηματική κατάταξη του μυδιού *Mytilus galloprovincialis*

Στην Ευρώπη διαβιούν τρία είδη μυδιών του γένους *Mytilus*, τα οποία είναι: το *Mytilus edulis* (μπλε μύδι), το *Mytilus galloprovincialis* (μεσογειακό μύδι) και το *Mytilus trossulus*. Τα δύο πρώτα καλλιεργούνται ευρέως και είναι πολύ σημαντικά για τις μυδοκαλλιέργειες της Μεσογείου αλλά και παγκοσμίως. Στις περιοχές όπου εμφανίζονται ταυτόχρονα και τα δύο αυτά είδη, μπορούν να διασταυρώνονται μεταξύ τους και να δίνουν γόνιμους απογόνους, δυσχεραίνοντας τη συστηματική κατάταξη των υβριδίων τους (Skibinski et al., 1978). Η συστηματική κατάταξη του είδους *Mytilus galloprovincialis* φαίνεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1815)

Συστηματική κατάταξη του μυδιού <i>Mytilus galloprovincialis</i>	
Φύλο (Phylum)	Mollusca (Μαλάκια)
Κλάση (Class)	Bivalvia (Δίθυρα)
Υποκλάση (Subclass)	Pteriomorphia
Τάξη (Order)	Mytiloida
Οικογένεια (Family)	Mytilidae
Γένος (Genus)	<i>Mytilus</i>
Είδος (Species)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>

1.1.2 Ανατομία και μορφολογία του μυδιού *Mytilus galloprovincialis*

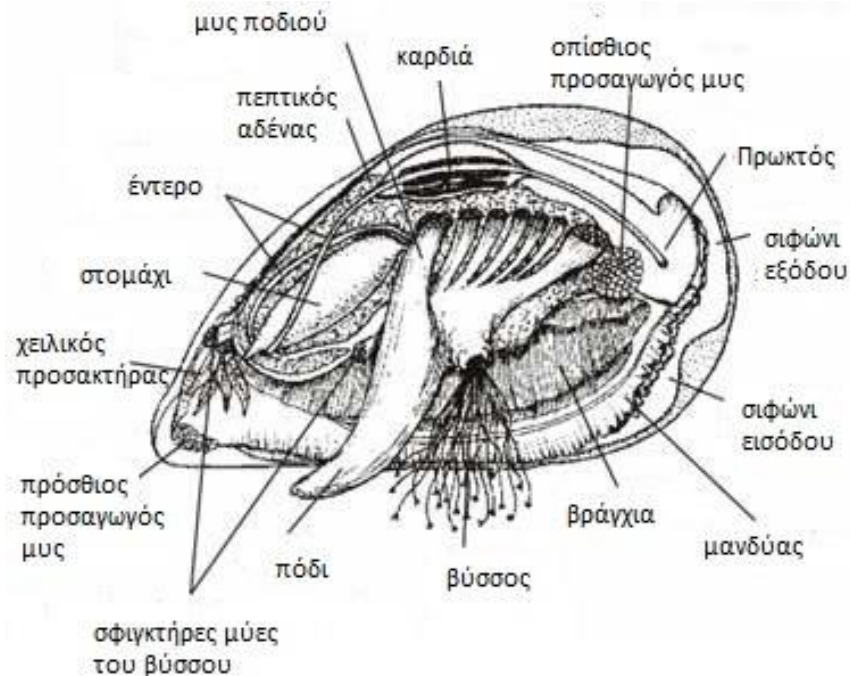
Το είδος *Mytilus galloprovincialis* έχει χρώμα σκούρο μπλε έως σχεδόν μαύρο. Το όστρακο αποτελείται από δύο συμμετρικές θυρίδες, σχήματος υποτριγωνικού, ενωμένες στο πίσω άκρο με έναν ισχυρό ελαστικό σύνδεσμο. Το μέγεθός του στην ενήλικη μορφή μπορεί να φτάσει έως τα 15 cm, ενώ η ηλικία του τα 20 χρόνια. Στο εσωτερικό του

κελύφους βρίσκεται το σώμα στο οποίο ανευρίσκονται: το στόμα με τις χειλικές προσακτρίδες στο οξύ άκρο των θυρών, ο οισοφάγος και το στομάχι το οποίο περιβάλλει ο πεπτικός αδένας (ηπατοπάγκρεας). Μέσα από το στομάχι ξεκινάει ο στίλος, που εκκρίνει ένα κρυσταλλοειδές υγρό σα βλέννη. Ακολουθεί το έντερο, το οποίο μετά από μερικές πτυχές δια μέσου του περικαρδίου, τελειώνει με το απευθυσμένο και τον πρωκτό δίπλα στη σχισμή διαπνοής. Η καρδιά αποτελείται από μία κοιλία και από δύο κόλπους.



Εικόνα 1: Το κέλυφος του είδους *Mytilus galloprovincialis* (Paiva, 2014)

Τα μύδια είναι γονοχωριστικά και τα θηλυκά υπερτερούν των αρσενικών ως προς τον αριθμό. Οι γονάδες οι οποίες αναπτύσσονται μεταξύ του μανδύα και των βραγχίων στην περίοδο της ωριμότητας, καλύπτουν μεγάλο μέρος της σπλαχνικής κοιλότητας (Κυριαζή-Παπαδοπούλου, 2002). Τα μύδια έχουν δύο ζεύγη βραγχίων, τα οποία βρίσκονται μεταξύ του μανδύα και των σπλάγχων, και εκτελούν διπλό ρόλο. Είναι τα αναπνευστικά όργανα, αλλά παράλληλα βοηθούν στη λήψη τροφής μέσω του φιλτραρίσματος του νερού. Ανάμεσα και στο μέσον περίπου της πρόσφυσης των βραγχίων βρίσκεται το πόδι, στη βάση του οποίου βρίσκεται ο αδένας που εκκρίνει τις ουσίες για τον σχηματισμό του βύσσου, με τον οποίο προσδένονται σε διάφορα υποστρώματα (Gosling, 2003; Στάικου, 2015).



Εικόνα 2: Η ανατομία του είδους *Mytilus galloprovincialis* (Μεταφρασμένο στα Ελληνικά, από Saba, 2012)

1.1.3 Η αναπαραγωγή του είδους *Mytilus galloprovincialis*

Η γενετική ωριμότητα αρχίζει μετά τους 5-8 μήνες, όταν έχουν μέγεθος 15-35 mm και αφού γίνει η προσκόλλησή τους σε κάποιο υπόστρωμα. Η γενετική ωριμότητα εμφανίζεται από το τέλος του χειμώνα έως τις αρχές του φθινοπώρου. Η γονιμοποίηση συνήθως πραγματοποιείται εκτός της κοιλότητας του μυδιού, στο υδάτινο περιβάλλον. Το σπέρμα και τα αυγά βγαίνουν από το άνοιγμα της διαπνοής και απλώνονται στο νερό. Η περίοδος εναπόθεσης εξαρτάται από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στις εύκρατες περιοχές, η απελευθέρωση των γαμετών συμβαίνει σε συγκεκριμένη περίοδο του χρόνου, που μπορεί να είναι σύντομη ή παρατεταμένη. Στην ανατολική Μεσόγειο οι περισσότερες εναποθέσεις γίνονται το φθινόπωρο και την άνοιξη. Οι χαμηλές θερμοκρασίες επιβραδύνουν το γενετικό κύκλο των μυδιών.

Τα αυγά είναι σφαιρικά, μεγέθους 70-80μ, σε χρώμα πορτοκαλί, περιτριγυρισμένα από ένα λεπτό στρώμα βλενοπολυσακχαριτών. Το σπέρμα έχει χρώμα υπόλευκο. Μετά τη γονιμοποίηση παρατηρούνται διάφορα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης, μέχρις ότου οι νύμφες μεγέθους 4,80-50μ προσκολληθούν με το βύσσο σε διάφορα στερεά αντικείμενα. Όταν το μέγεθός τους φθάσει τα 1-2 mm, τα νεαρά μύδια αποκολλώνται από τα υποστρώματα και

μπορούν πλέον να μετακινηθούν, μέχρι να βρουν τις κατάλληλες συνθήκες για να προσκολληθούν ξανά, οπότε αποκτούν τη μορφολογία του ενήλικου μυδιού (Κυριαζή-Παπαδοπούλου, 2002).

1.1.4 Φυσιολογία θρέψεως και ανάπτυξης του είδους *Mytilus galloprovincialis*

Τα μύδια τρέφονται με φυτοπλαγκτόν και οργανικό υλικό (Κυριαζή-Παπαδοπούλου, 2002) και η ανάπτυξή τους εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών υλικών στο υδάτινο περιβάλλον. Ως διηθηματοφάγος οργανισμός, διηθεί το θαλασσίνο νερό με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους του και της θερμοκρασίας του νερού, κρατώντας μόνο πολύ μικρά τεμάχια (1-2μ), όπου φέρονται μέσω των βραγχίων και των χειλικών προσακτίδων στο στόμα κι από εκεί στο στομάχι. Τα μεγαλύτερα υλικά, μεγέθους 30-40μ, συγκεντρώνονται στη σωματική κοιλότητα, σχηματίζοντας τα ψευδοκόπρανα τα οποία και αποβάλλουν. Τα μύδια έχουν μεγάλη ικανότητα διήθησης νερού και ενδεικτικά αναφέρεται ότι ένα μύδι 7cm μπορεί να φιλτράρει κατά μέσο όρο έως και 110 λίτρα νερού ανά εικοσιτετράωρο (Petersen et al., 2004; Φασούλας, 2008).

Η ανάπτυξη του μυδιού έχει άμεση σχέση με τη δυνατότητα διήθησης του νερού, έτσι όταν η αλατότητα κατεβαίνει κάτω από 13-14‰ και η θερμοκρασία κάτω των 8°C η ικανότητα διήθησης διακόπτεται. Αντίθετα, η ανάπτυξη επιταχύνεται την άνοιξη και το καλοκαίρι, όπου οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (θερμοκρασία, αλατότητα, ποσότητα θρεπτικών υλικών διαλυμένων στο νερό) είναι ευνοϊκοί. Στα δίθυρα μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση της θνησιμότητας σε όλα τα στάδια του βιολογικού τους κύκλου, εξαιτίας διάφορων περιβαλλοντικών ή βιολογικών παραγόντων. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που αυξάνουν τη θνησιμότητα είναι η υψηλή θερμοκρασία, αλλά και η χαμηλή θερμοκρασία για εκτεταμένα χρονικά διαστήματα, η χαμηλή αλατότητα, καθώς και η υψηλή συγκέντρωση αιωρούμενων σωματιδίων στο νερό. Η κλιματική αλλαγή και ειδικά η αύξηση της θερμοκρασίας στη Μεσόγειο, έχει παρατείνει τα διαστήματα που τα μύδια εκτίθενται σε θερμοκρασίες που ξεπερνούν τους 26°C, όπου εμφανίζονται το θερμικό στρες και οι κυτταρικές δυσλειτουργίες, αυξάνοντας τη θνησιμότητά τους (Ανέστης, 2008). Η βιομηχανική και αστική ρύπανση θεωρείται επίσης αιτία μείωσης του ρυθμού ανάπτυξης αλλά και αύξησης της θνησιμότητας, κυρίως λόγω της αύξησης του οργανικού και βακτηριακού φορτίου του νερού.

1.2 Συστήματα εκτροφής μυδίων

Τα μύδια εκτρέφονται σε περισσότερες από 40 χώρες σε όλο τον κόσμο, και υπάρχουν διάφοροι τρόποι εκτροφής και παραλλαγές τους, ανάλογα με τη γεωμορφολογία της περιοχής. Οι τρόποι εκτροφής διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τις μυδοκαλλιέργειες βυθού και τις μυδοκαλλιέργειες σε στήλη του νερού (Βουλτσιάδου, 2015). Στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην περιοχή μελέτης του Θερμαϊκού κόλπου, συναντάμε μυδοκαλλιέργειες που ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία, όπου τα μύδια είναι προσκολλημένα σε κατάλληλες επιφάνειες και δεν εφάπτονται στο βυθό. Αντίθετα, η καλλιέργεια βυθού είναι πιο διαδεδομένη κυρίως στη Δυτική Ευρώπη και πιο συγκεκριμένα σε Ολλανδία, Γερμανία, Ιρλανδία και Μεγάλη Βρετανία, όπου υπάρχουν εκτεταμένες περιοχές ρηχής θάλασσας, προστατευμένες από παλιρροιακά φαινόμενα, και τα μύδια καλλιεργούνται εφάπτομενα με το βυθό (Smaal, 2002). Αντίθετα, στην καλλιέργεια σε στήλη του νερού, τα μύδια αναπτύσσονται σε υποστρώματα σε μεγάλη απόσταση από το θαλάσσιο βυθό, με πλεονέκτημα τη μείωση των απωλειών από βενθικούς θηρευτές και την εκμετάλλευση των θαλάσσιων ρευμάτων, έτσι ώστε η παροχή τροφής και οξυγόνου στα μύδια να φτάνει στο μέγιστο της. Οι τρεις πιο γνωστοί τρόποι καλλιέργειας παγκοσμίως, αν και με πολλές παραλλαγές, είναι α) η καλλιέργεια σε πασσάλους, β) η καλλιέργεια σε σχεδίες και γ) η καλλιέργεια σε συστήματα μακράς γραμμής, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3: Τυπική εικόνα μυδοκαλλιέργειας σε σύστημα μακράς γραμμής (<https://www.globalseafood.org/wp-content/uploads/2011/01/THEODOROUpic2.jpg>)

Στις δύο τελευταίες μεθόδους (πλωτό σύστημα), τα μύδια προσκολλώνται σε ειδικά σχοινιά, τα οποία αιωρούνται στο νερό, έτσι ώστε οι αρμαθίες να μην ακουμπούν το βυθό. Οι μονάδες καλλιέργειας για το πλωτό σύστημα χρησιμοποιούν είτε σχεδίες, είτε πλαστικά βαρέλια, και είναι τοποθετημένες σε νερά με βάθος που ξεπερνά τα 8 μέτρα. Αντίθετα, σε ρηχές παράκτιες περιοχές που βρίσκονται κυρίως στον κόλπο του Θερμαϊκού, οι αρμαθίες με τα μύδια αιωρούνται από ξύλινους οριζόντιους πασσάλους, που είναι τοποθετημένοι σε σταθερές μεταλλικές εγκαταστάσεις και αποτελούν το λεγόμενο πασσαλωτό σύστημα. Το βάθος του νερού σε μια τέτοια μονάδα είναι συνήθως 2-4 μέτρα, και η αρμαθιά που φέρει τα μύδια πρέπει να έχει μέγεθος τέτοιο ώστε να μπορεί να αιωρείται πάνω από το βυθό για την αποφυγή των βενθικών θηρευτών (Βουλτσιάδου et al., 2015).

1.2.1 Περιοχές μυδοκαλλιέργειας στην Ελλάδα

Οι περισσότερες μονάδες καλλιέργειας μυδιών συναντώνται στην περιφέρεια Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης (Ν. Ροδόπης, Ν. Ξάνθης, Ν. Καβάλας), στην περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας (Ν. Θεσσαλονίκης, Ν. Ημαθίας, Ν. Πιερίας, Ν. Χαλκιδικής, Ν. Σερρών,) στην

περιφέρεια Δυτικής Ελλάδας (Ν. Πρεβέζης και Ν. Θεσπρωτίας), στην Αττική και στο Νομό Φθιώτιδας. Το μεγαλύτερο μερίδιο στην παραγωγή το κατέχει η Κεντρική Μακεδονία. Σύμφωνα με στοιχεία του 2012 (Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας, Επιχειρησιακό Σχέδιο Αγροτικής Ανάπτυξης «Καλάθι Αγροτικών Προϊόντων», Θεσσαλονίκη, Απρίλιος 2012), υπήρχαν συνολικά 549 ενεργές μονάδες καλλιέργειας μυδιών.

Πίνακας 2: Δυναμικότητα των περιοχών μυδοκαλλιέργειας του Θερμαϊκού κόλπου (Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας)

Περιοχή	Αριθμός Μονάδων	Δυναμικότητα (τόνοι/έτος)
Χαλάστρα	23 πλωτές μονάδες	2407
Κύμια	14 πλωτές μονάδες	1.600
Πιερία	57 πλωτές μονάδες	12.000

Οι Νομοί Θεσσαλονίκης, Πιερίας και Ημαθίας κατέχουν σχεδόν το 90% των μονάδων εκτροφής μυδιών που υπάρχουν στον Ελλαδικό χώρο (Κυριαζή-Παπαδοπούλου, 2002; Βουλτσιάδου, 2015). Συγκεκριμένα, η κύρια θαλάσσια δραστηριότητα στη Χαλάστρα είναι η εντατική καλλιέργεια του μεσογειακού μυδιού *Mytilus galloprovincialis*. Το 30% των μυδιών της Ελλάδας εκτρέφονται στη Χαλάστρα, καθιστώντας την τη μεγαλύτερη περιοχή παραγωγής μυδιών της χώρας. Στην περιοχή υπάρχουν περίπου 250 εγγεγραμμένοι μυδοκαλλιεργητές και 14 μεταποιητικές μονάδες. Χρησιμοποιούνται δύο συστήματα καλλιέργειας: α) η καλλιέργεια με συστήματα μακράς γραμμής σε βάθη που κυμαίνονται από 6 έως 22 m, και β) η καλλιέργεια σε πασσάλους σε βάθη από 2 έως 5 m (Konstantinou et al., 2012).

1.3 Θαλάσσιο περιβάλλον Θερμαϊκού κόλπου

1.3.1 Γεωμορφολογία του Θερμαϊκού κόλπου

Ο Θερμαϊκός κόλπος βρίσκεται στο βορειοδυτικό τμήμα του Αιγαίου πελάγους και αποτελεί έναν ημίκλειστο κόλπο, με μέγιστο βάθος τα 100 μέτρα (Karageorgis et al., 2005). Στον κόλπο εκβάλλουν τέσσερεις ποταμοί, ο Γαλλικός, ο Αξιός, ο Λουδίας και ο Αλιάκμονας, και

τα ιζήματα που επικάθονται από τους ποταμούς έχουν ως αποτέλεσμα το ανάγλυφο του πυθμένα να είναι ομαλό (Karageorgis et al., 2005). Επιπλέον, εξαιτίας των διάφορων ανθρωπογενών παρεμβάσεων, όπως είναι η ύπαρξη λιμανιού, η εκβολή των αστικών λυμάτων και των βιομηχανικών αποβλήτων της Θεσσαλονίκης, οι απορροές από τη μονάδα βιολογικού καθαρισμού της πόλης της Θεσσαλονίκης, καθώς και τα απόβλητα γεωργικής προέλευσης, το οικοσύστημα διαταράσσεται και επηρεάζεται εύκολα η σταθερότητά του.



Εικόνα 4: Χάρτης του Θερμαϊκού κόλπου (Kampouris et al., 2019)

1.3.2 Κλίμα Θερμαϊκού Κόλπου

Το κλίμα της περιοχής χαρακτηρίζεται ως μεσογειακό, με θερμά και ξηρά καλοκαίρια, ήπιους χειμώνες και θερμοκρασία να κυμαίνεται από 0°C - 38°C (Πίνακας 3). Το χειμώνα παρατηρούνται κυρίως άνεμοι βόρειοι-βορειοδυτικοί, ενώ το καλοκαίρι επικρατούν οι νότιοι και δυτικοί άνεμοι. Γενικότερα, οι βόρειοι άνεμοι κατέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό εμφάνισης στην περιοχή (40%), σε όλη τη διάρκεια του χρόνου. Όσον αφορά τις βροχοπτώσεις, τείνουν να περιορίζονται τους θερινούς μήνες και να αυξάνονται του φθινοπωρινούς και του χειμερινούς. Η υψηλότερη τιμή βροχόπτωσης σημειώνεται το Νοέμβριο με 61,29 mm βροχής, ενώ η χαμηλότερη τιμή βροχόπτωσης εμφανίζεται το μήνα Αύγουστο με 16,94 mm βροχής (Πίνακας 4) (Πηγή EMY).

Πίνακας 3: Μέση μηνιαία θερμοκρασία σε βαθμούς Κελσίου (Πηγή ΕΜΥ)

ΙΑΝ	ΦΕΒ	ΜΑΡ	ΑΠΡ	ΜΑΙ	ΙΟΥΝ	ΙΟΥΛ	ΑΥΓ	ΣΕΠ	ΟΚΤ	ΝΟΕ	ΔΕΚ
5.4°C	6.8°C	9.8°C	14.3°C	19.9°C	24.7°C	26.9°C	26.4°C	21.9°C	16.5°C	11.3°C	7.0°C

Πίνακας 4: Μέσος μηνιαίος υετός σε χιλιοστά ύψους βροχής (Πηγή ΕΜΥ)

ΙΑΝ	ΦΕΒ	ΜΑΡ	ΑΠΡ	ΜΑΙ	ΙΟΥΝ	ΙΟΥΛ	ΑΥΓ	ΣΕΠ	ΟΚΤ	ΝΟΕ	ΔΕΚ
35.6 mm	42.88 mm	39.54 mm	37.4 mm	35.2 mm	23.7 mm	17.01 mm	16.9 mm	21.7 mm	46.8 mm	61.29 mm	50.3 mm

1.3.3 Φυσικοχημικοί παράμετροι του νερού στον Θερμαϊκό κόλπο

Η **αλατότητα** στο διάστημα Φεβρουάριου - Μαρτίου εμφανίζει τις μικρότερες τιμές στην επιφάνεια, ενώ αντιθέτως στον πυθμένα τις μεγαλύτερες. Στο διάστημα αυτό εμφανίζεται το φυσικό φαινόμενο «αλοκλινές», όπου παρατηρείται απότομη διαβάθμιση της αλατότητας σε σχέση με το βάθος. Το αλοκλινές μειώνεται σταδιακά μέχρι το καλοκαίρι και εμφανίζεται σε συνεχώς μειωμένο βάθος. Το ίδιο ισχύει και με τη **θερμοκρασία**, από το Μάιο γίνεται πιο ομοιογενής και σταθερή, μέχρι να αρχίσουν οι εκροές των ποταμών από το Νοέμβριο και μετά. Το Νοέμβριο παρατηρείται υψηλή αλατότητα στα πιο βαθιά στρώματα της ανατολικής περιοχής, ως αποτέλεσμα της εισροής νερών από το Β. Αιγαίο (ΕΚΘΕ, 2001).

Η μέση συγκέντρωση του **διαλυμένου οξυγόνου** το χειμώνα είναι 7,52 mg/l. Οι χαμηλές τιμές διαλυμένου οξυγόνου δείχνουν αυξημένα επίπεδα οργανικού φορτίου και περιορισμένη κυκλοφορία του νερού. Οι μετρήσεις που έγιναν στην περιοχή της Χαλάστρας τον Οκτώβριο έδειξαν χαμηλές τιμές έως 5 mg/l. Αντίθετα, στην περιοχή του Μακρύγιαλου, όπου έχει μεγαλύτερη κυκλοφορία και διασπορά του οργανικού φορτίου, οι τιμές που καταγράφηκαν δεν είναι χαμηλότερες από 9,6 mg/l. Οι τιμές παρουσιάζονται γενικά αυξημένες τους χειμερινούς μήνες. Σε αυτό συμβάλλει το γεγονός ότι η ικανότητα του νερού να συγκρατεί το διαλυμένο οξυγόνο μειώνεται με την άνοδο της θερμοκρασίας. Η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου επηρεάζει άμεσα την επιβίωση των υδρόβιων οργανισμών (ΕΚΘΕ, 2020).

1.3.4 Ρύπανση στο Θερμαϊκό κόλπο

Εξαιτίας της ύπαρξης μεγάλου ρυπαντικού φορτίου, που καταλήγει στο Θερμαϊκό από ανθρωπογενείς παρεμβάσεις, η θάλασσα τα τελευταία χρόνια έχει μετατραπεί σε εύτροφη. Το φαινόμενο του ευτροφισμού συνεχίζει να αυξάνεται μέχρι και σήμερα, με καταγεγραμμένα

φαινόμενα όπως η συνεχόμενη εμφάνιση «ερυθρών παλιρροιών» και οι μαζικές θνησιμότητες οστρακοειδών και θαλάσσιων οργανισμών, εξαιτίας της απορροής αγροτικών λιπασμάτων και αστικών αποβλήτων που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία πριν καταλήξουν στη θάλασσα (Jusoh et al., 2020). Την περίοδο 2017-2018 καταγράφηκαν τρία γεγονότα ευτροφισμού (Ιούνιος – Ιούλιος 2017, Δεκέμβριος 2017 και Μάιος 2018) και τα οποία οφείλονται, πέρα από τις ανθρωπογενείς παρεμβάσεις, στην επικράτηση νότιων ανέμων στην περιοχή που δεν επιτρέπουν την κυκλική ανανέωση των υδάτων (Androulidakis et al., 2021). Παράλληλα με την εμφάνιση της ερυθράς παλίρροιας, όταν αυτή παραμένει σταθερή για αρκετό διάστημα, παρατηρείται και η άνθιση επιβλαβών τοξικών φυκών και φυτοπλαγκτού του είδους *Dinophysis acuminata* που περιέχει τοξίνη (Fernández et al., 2019), προκαλώντας διαρροϊκό σύνδρομο (Diarrhetic Shellfish Poisoning – DSP). Αυτές οι ανθίσεις μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στην ανθρώπινη υγεία, αλλά και στην οικονομία της παράκτιας περιοχής που ασχολείται με τις υδάτινες καλλιέργειες. Οι οικονομικές απώλειες που οφείλονται στη μόλυνση από το τοξικό φυτοπλαγκτόν εκτιμάται ότι κυμαίνονται περίπου στα 3 εκατομμύρια €/έτος (Karageorgis et al., 2005). Η παρακολούθηση και καταγραφή της εξάπλωσης του φυτοπλαγκτού είναι απαραίτητη, και πλέον γίνεται με σταθμούς μέτρησης, αλλά και με δορυφορική παρακολούθηση. Η εμφάνιση της ερυθράς παλίρροιας και της άλγης είναι τυχαία, και κατά τη διάρκεια της εμφάνισης αυτής απαγορεύεται η συγκομιδή των μυδιών για χρονικές περιόδους που μπορεί να κυμαίνονται από ένα μήνα έως και περισσότερο από έξι μήνες (Karageorgis et al., 2005). Η συντήρηση των μυδιών για τόσο μεγάλο διάστημα αυξάνει το ετήσιο κόστος εργασίας και παράλληλα μειώνει την απόδοση της συνολικής παραγωγής.

1.4 Το μικροβίωμα του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* και οι τεχνικές ταυτοποίησης του

1.4.1 Το μικροβίωμα του μυδιού *Mytilus galloprovincialis*

Το μικροβίωμα στα μύδια διακρίνεται στο ενδημικό (μόνιμο) και στο εισαγόμενο (παροδικό) (Thompson et al., 2005). Το μόνιμο μικροβίωμα επηρεάζεται δυσκολότερα από τις εποχικές διακυμάνσεις, σε αντίθεση με το παροδικό (Pierce & Ward, 2018). Το μικροβίωμα του μυδιού αλλά και κάθε ζωντανού οργανισμού παίζει πολύ σημαντικό ρόλο, τόσο στην υγεία του ίδιου του οργανισμού επηρεάζοντας διαδικασίες όπως η θρέψη και η αναπαραγωγή,

αλλά και μέσω της προστασίας από διάφορες ασθένειες (Sweet and Bulling, 2017). Το μικροβίωμα των δίθυρων έχει ερευνηθεί με τις παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας, ενώ τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί λίγες μελέτες που αναλύουν το μικροβίωμα με μεθόδους Αλληλούχισης Νέας Γενιάς (NGS). Τα αποτελέσματα των ερευνών διαφέρουν ανάλογα με την τοποθεσία της μελέτης αλλά και την εποχή διεξαγωγής των πειραμάτων.

Υπάρχουν καταγραφές με τα κυρίαρχα είδη στο μικροβίωμα του είδους *Mytilus galloprovincialis* στην Μεσόγειο και στον Ατλαντικό, αλλά δεν έχει γίνει μελέτη και καταγραφή στην εγχώρια περιοχή. Έτσι, στις παράκτιες περιοχές της Κωνσταντινούπολης και της Σμύρνης ταυτοποιήθηκαν ως κυρίαρχα φύλα τα εξής: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* και *Actinobacteria* (Bozcal and Dagdeviren, 2020), ενώ σε επίπεδο γένους το κυρίαρχο ήταν το *Arcobacter*. Στην ίδια μελέτη παρουσιάστηκαν και τα εξής παθογόνα στελέχη: *Clostridium*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Morganella*, *Serratia*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Yersinia*, *Mycoplasma*, *Brucellaceae unclassified*, *Pantoea* και *Proteus*. Μία ακόμα καταγραφή του μικροβιώματος που έγινε στην Ιταλία και συγκεκριμένα στην Αδριατική θάλασσα, ανέδειξε ως κυρίαρχα φύλα τα εξής: *Proteobacteria*, *Firmicutes* και *Bacteroidetes* (Musella et al., 2020) και κυρίαρχα γένη ήταν κυρίως βακτήρια της τάξης των *Alteromonadales* και της οικογένειας των *Flavobacteriaceae*. Άλλες δύο καταγραφές έγιναν στον κόλπο Spezia της Ιταλίας, όπου στην αιμολέμφο ατόμων του είδους *Mytilus galloprovincialis* βρέθηκαν τα εξής κυρίαρχα φύλα: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* και *Firmicutes* και κυρίαρχα γένη: *Stenotrophomonas*, *Kistimonas*, *Shewanella*, *Vibrio*, *Mycoplasma*, *Psychrobium*, *Polaribacter*, *Amphritea*, *Tenacibaculum*, *Pseudoalteromonas*, *Arcobacter*, *Aureispira* και *Colwellia* (Auguste et al., 2020; Auguste et al., 2019).

1.4.2 Δυνητικά παθογόνα είδη για τον άνθρωπο στο μικροβίωμα του είδους *Mytilus galloprovincialis*

Ένας μεγάλος αριθμός παθογόνων μικροοργανισμών έχει ταυτοποιηθεί στο θαλάσσιο περιβάλλον και η πιθανότητα μετάδοσής τους στον άνθρωπο, σχετίζεται άμεσα με τους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξή τους. Τόσο τα ενδημικά όσο και τα εισαγόμενα παθογόνα είδη μπορεί να είναι αιτία τροφογενούς λοίμωξης στον άνθρωπο και η εμφάνισή τους εξαρτάται από την οικολογία, το περιβάλλον και την ανάπτυξή τους. Είδη των γενών

Salmonella, *Vibrio* και *Aeromonas* που προκαλούν λοιμώξεις στον άνθρωπο, σχετίζονται συχνά με την κατανάλωση μολυσμένων οστρακοειδών. Το είδος *Salmonella spp.* αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα της τροφογενούς σαλμονέλωσης, που προκαλεί τυφοειδή και παρατυφοειδή πυρετό (Baudart et al. 2000). Αν και τα γένη *Vibrio* και *Aeromonas* είναι ενδημικοί μικροοργανισμοί υδάτινου περιβάλλοντος, ορισμένα είδη αναγνωρίζονται ως παθογόνα για τον άνθρωπο που προκαλούν γαστρεντερίτιδες, πρωτογενή και δευτερογενή σηψαιμία και λοιμώξεις τραυμάτων (Thompson et al. 2004). Τα είδη *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* και *Vibrio vulnificus* έχουν αναγνωριστεί ως αιτιολογικοί παράγοντες τροφολοιμώξεων που συνδέονται με την κατανάλωση ωμών ή ατελώς μαγειρεμένων οστρακοειδών. Τα στελέχη *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* και *Aeromonas veronii* απομονώνονται συχνά από τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των οστρακοειδών, ενώ ορισμένα είδη είναι παθογόνα ή ευκαιριακά παθογόνα σε ζώα και ανθρώπους (Nhung et al., 2007).

Η σημαντικότερη οδός μόλυνσης του ανθρώπου από υδρόβιους παθογόνους μικροοργανισμούς είναι με την κατανάλωση μολυσμένων θαλασσινών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση γαστρεντερίτιδας, που μπορεί να είναι αυτοπεριοριζόμενη ή αντίθετα σοβαρής έντασης και δυνητικά θανατηφόρα. Τα είδη του γένους *Vibrio* αποτελούν το σημαντικότερο κίνδυνο όσον αφορά στην κατανάλωση θαλασσινών, και εκτιμάται ότι συμβαίνουν 80.000 επεισόδια τροφογενών λοιμώξεων κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες (CDC). Ωστόσο, έχουν επίσης ενοχοποιηθεί και άλλα γένη βακτηρίων που απαντώνται φυσιολογικά στα οστρακοειδή, όπως *Aeromonas* και *Clostridium*. Η ρύπανση με κόπρανα από ανθρώπινα λύματα ή ζωικές πηγές αναγνωρίζεται ως μια πρόσθετη σημαντική πηγή μόλυνσης με παθογόνους μικροοργανισμούς, που μεταφέρονται με τα θαλασσινά (π.χ. *Campylobacter*, *Escherichia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella* και *Yersinia*) (Feldhusen, 2000). Ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις δε μπορεί να γίνει σαφής διάκριση, αν ένα παθογόνο είναι κοπρανώδης ρύπος ή ενδημικό είδος της θαλάσσιας κοινότητας. Για παράδειγμα, η *Salmonella*, που γενικά θεωρείται περιστασιακός μολυσματικός παράγοντας, μπορεί να αποτελεί ενδημικό είδος των θαλάσσιων οικοσυστημάτων. Άλλα γένη, όπως το *Campylobacter*, ανιχνεύονται στα κόπρανα θαλάσσιων πτηνών και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως ενδημικοί μολυσματικοί παράγοντες, δεδομένου ότι η παρουσία τους μπορεί να ανιχνευθεί σε περιβάλλοντα που δεν έχουν μολυνθεί από τον άνθρωπο.

Η μόλυνση με κατάποση απαιτεί σχετικά μεγάλες δόσεις παθογόνων (π.χ. 10^5 - 10^{10} κύτταρα για τα περισσότερα παθογόνα γ-πρωτεοβακτήρια), αν και ορισμένα εξαιρετικά παθογόνα όπως η *Shigella* ή η εντεροαιμορραγική *Escherichia coli* μπορούν να δημιουργήσουν λοιμώξεις με δόσεις μικρότερες από 10-100 κύτταρα (Πίνακας 5) (Feldhusen, 2000). Η μη ψύξη των οστρακοειδών μετά τη συγκομιδή μπορεί να ενισχύσει τους ενδημικούς πληθυσμούς του γένους *Vibrio* κατά 10.000 φορές (FDA, 2004), με αποτέλεσμα τα επίπεδα να θεωρούνται μη ασφαλή για την ανθρώπινη κατανάλωση. Τα μαλάκια είναι δυνατό να εξυγιανθούν από τα περισσότερα παθογόνα μέσα σε 72 ώρες, με εξαίρεση τα είδη του γένους *Vibrio*. Τα είδη αυτά παραμένουν στους ιστούς των δίθυρων ακόμη και μετά από παρατεταμένη περίοδο εξυγίανσης (Amin, 2006). Ενώ το μαγείρεμα ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μόλυνσης από θαλασσινά, η δηλητηρίαση θα μπορούσε να προκληθεί από τις βακτηριακές τοξίνες.

Πίνακας 5: Δυνητικά παθογόνα βακτήρια για τον άνθρωπο που βρίσκονται στα οστρακοειδή (Thompson et al., 2005)

Γένος	Είδος	Εκτιμώμενη δόση μόλυνσης	Συμπτώματα τροφολοίμωξης	Ενδημικά ή εισαγόμενα είδη
<i>Aeromonas</i>	<i>A. hydrophila</i> <i>A. caviae</i> <i>A. sobria</i>	10^7 - 10^9 κύτταρα	Γαστρεντερίτιδα, σηψαιμία και μόλυνση τραύματος	Ενδημικά και εισαγόμενα είδη
<i>Campylobacter</i>	<i>C. lari</i> <i>C. jejuni</i>	<500 κύτταρα	Γαστρεντερίτιδα	Εισαγόμενο
<i>Clostridium</i>	<i>C. botulinum</i> (type E) <i>C. perfringens</i>	0.1-1μg τοξίνη / 10^5 κύτταρα 10^6 - 10^8 CFU/g	Αλλαντίαση Γαστρεντερίτιδα Γαστρεντερίτιδα	Ενδημικά και εισαγόμενα είδη
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	10^1 - 10^8 κύτταρα	Γαστρεντερίτιδα	Εισαγόμενο
<i>Leptospira</i>	<i>L. interrogans</i>		Μόλυνση τραύματος	Ενδημικά και εισαγόμενα είδη
<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>		Συμπτώματα που ομοιάζουν με γρίπη έως και θάνατος	Εισαγόμενο
<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>		Παραγωγή ισταμίνης	Ενδημικά και εισαγόμενα είδη
<i>Plesiomonas</i>	<i>P. shigelloides</i>		Γαστρεντερίτιδα	Ενδημικά και εισαγόμενα είδη

<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>		Μόλυνση τραύματος και δέρματος	Ενδημικά και εισαγόμενα είδη
<i>Salmonella</i>	<i>S. enteritidis</i>	10 ² CFU/g	Γαστρεντερίτιδα	Ενδημικά και εισαγόμενα είδη
<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i>	10–200	Γαστρεντερίτιδα	Εισαγόμενο
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	κύτταρα 10 ⁵ –10 ⁶ CFU/g	Γαστρεντερίτιδα	Εισαγόμενο
<i>Vibrio</i>	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. cholerae O1</i> <i>V. cholerae non-O1</i> <i>V. cincinnatiensis</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. furnissii</i> <i>V. hollisae</i> <i>V. metschnikovii</i> <i>V. mimicus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i>	10 ⁶ –10 ¹⁰ κύτταρα	Γαστρεντερίτιδα / σηψαιμία / θάνατος	Ενδημικά είδη
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	10 ⁷ –10 ⁹ CFU/g	Γαστρεντερίτιδα	Εισαγόμενο

1.4.3 Νομοθεσία για την ασφάλεια των δίθυρων μαλακίων στην Ελλάδα

Σύμφωνα με το Π.Δ 786/1978 τα δίθυρα πρέπει να έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Κλειστό κέλυφος και δύσκολα διανοιγόμενο με μαχαίριδιο.
2. Σάρκα που προσφύεται σταθερά στο κέλυφος.
3. Η καρδιά να πάλλεται όταν αφαιρεθεί τμήμα του αντίστοιχου κελύφους.

Η κατανάλωση ωμών ή ελαφρώς μαγειρεμένων δίθυρων μαλακίων που έχουν συλλεχθεί από περιοχές με μολυσμένα νερά, μπορεί να οδηγήσει σε τροφολοίμωξη. Στο παρελθόν, τα δίθυρα μαλάκια είχαν συνδεθεί με τον τυφοειδή και τον παρατυφοειδή πυρετό (οφείλονται στα βακτήρια *Salmonella typhi* και *Salmonella paratyphi*, αντίστοιχα), αλλά η εύρεση των παραπάνω μικροοργανισμών είναι πλέον σπάνια στις ανεπτυγμένες χώρες. Στις μέρες μας οι πιο κοινές λοιμώξεις που σχετίζονται με τα μολυσμένα δίθυρα μαλάκια οφείλονται σε άλλα είδη του γένους *Salmonella* (που προκαλούν γαστρεντερίτιδα), ή σε ιούς, όπως ο ιός Norovirus (που προκαλεί γαστρεντερίτιδα) και ο ιός της ηπατίτιδας Α (που προκαλεί λοιμώδη ηπατίτιδα). Σύμφωνα με την ισχύουσα κοινοτική νομοθεσία (Κανονισμός (ΕΚ) 853/2004,

Κανονισμός (ΕΚ) 854/2004, Κανονισμός (ΕΚ) 2073/2005) ο προσδιορισμός του πληθυσμού του βακτηρίου *E. coli*, ως μικροοργανισμού δείκτη, στα ζώντα δίθυρα μαλάκια χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του κινδύνου της μόλυνσης των δίθυρων μαλακίων με βακτήρια ή/και παθογόνα.

Ο προσδιορισμός του πληθυσμού του βακτηρίου *E. coli* αποτελεί τη βάση των ελέγχων των δίθυρων μαλακίων για την προστασία της δημοσίας υγείας, και πρέπει να πραγματοποιείται υποχρεωτικά τόσο στις περιοχές (ζώνες) συγκομιδής των δίθυρων μαλακίων, όσο και στις μονάδες εξυγίανσης τους (Κέντρα καθαρισμού) (Πίνακας 6). Η συγκεκριμένη εξέταση ορίζεται από την Ευρωπαϊκή νομοθεσία να γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο ISO/TS 16649-3:2005.

Πίνακας 6: Κριτήρια για την κατάταξη των περιοχών συγκομιδής των δίθυρων μαλακίων (Διεύθυνση Κτηνιατρικής Δημόσιας Υγείας (Κ.Δ.Υ.) της Γενικής Διεύθυνσης Κτηνιατρικής του ΥΠ.Α.Α.Τ)

Κατηγορία	Μικροβιολογικά πρότυπα ¹	Απαιτούμενη επεξεργασία μετά την συλλογή
A	Τα Ζ.Δ.Μ. ² από αυτές τις περιοχές δε θα πρέπει να υπερβαίνουν στο 80% των δειγμάτων την τιμή 230MPN <i>E. coli</i> ανά 100g σάρκας και ενδοθυρικού υγρού, κατά τη διάρκεια της υπό εξέτασης περιόδου.	Καμία
B	Τα Ζ.Δ.Μ. από αυτές τις περιοχές δεν πρέπει να υπερβαίνουν, στο 90% των δειγμάτων, την τιμή 4.600MPN <i>E. coli</i> ανά 100g σάρκας και ενδοθυρικού υγρού.	Καθαρισμός, μετεγκατάσταση ή μαγείρεμα με μία εγκεκριμένη μέθοδο
Γ	Τα Ζ.Δ.Μ. από αυτές τις περιοχές δεν πρέπει να υπερβαίνουν την τιμή 46.000MPN <i>E. coli</i> ανά 100g σάρκας και ενδοθυρικού υγρού.	Μετεγκατάσταση ή μαγείρεμα με μία εγκεκριμένη μέθοδο
Απαγορευμένη	>46.000MPN <i>E. coli</i> ανά 100g σάρκας και ενδοθυρικού υγρού.	Μη επιτρεπτή συγκομιδή

Σημειώσεις

¹Με τη μέθοδο αναφοράς ISO 16649-3.

²Ζώντα δίθυρα μαλάκια

1.4.4 Μεθοδολογίες ταυτοποίησης μικροβιώματος

Τα οστρακοειδή ως υδρόβιοι οργανισμοί, που όπως προαναφέρθηκε διηθούν μεγάλες ποσότητες νερού, συγκρατούν μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο υδάτινο περιβάλλον τους, με αποτέλεσμα όταν διαβιούν σε μολυσμένα νερά, να μπορούν να μολυνθούν από παθογόνους για

τον άνθρωπο μικροοργανισμούς. Η παρουσία πολλών παθογόνων για τον άνθρωπο βακτηρίων στο υδάτινο περιβάλλον καθώς και στα θαλασσινά, μπορεί να μη σχετίζεται με τους δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης με *Escherichia coli*, έτσι προτείνεται η ειδική ανίχνευση παθογόνων για την ακριβέστερη εκτίμηση του κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία (Maugeri et al. 2000). Για την παρακολούθηση των εισαγόμενων παθογόνων μικροοργανισμών πρέπει να γίνονται εξετάσεις ρουτίνας στα οστρακοειδή. Η συμβατική μέθοδος ανίχνευσης παθογόνων βακτηρίων βασίζεται κυρίως σε διαδικασίες καλλιέργειας, οι οποίες χρησιμοποιούν εμπλουτισμένους ζωμούς, και ακολουθείται η απομόνωση αποικιών σε εκλεκτικά υποστρώματα, και η βιοχημική ταυτοποίηση. Αυτή η μέθοδος καλλιέργειας είναι επιλεκτική, για την αναζήτηση ενός τύπου παθογόνου κάθε φορά. Ωστόσο, μέθοδοι που στοχεύουν συγκεκριμένα στα παθογόνα, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την προστασία των καταναλωτών (Thompson et al., 2005). Οι μοριακές μέθοδοι επιτρέπουν την ταχεία ανίχνευση παθογόνων, και αυτό είναι ιδιαίτερο πλεονέκτημα όταν απαιτείται η γρήγορη εκτίμηση κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία. Η ταυτοποίηση των μικροβίων με τη χρήση καλλιέργειας, που παραδοσιακά χρησιμοποιείται για ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, είναι χρονοβόρα και χαμηλότερης ευαισθησίας σε σχέση με τις μοριακές τεχνικές (Gugliandolo et al., 2011; Parlapani et al., 2020) που αναλύονται παρακάτω.

1.4.5 Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές, γρήγορες, ακριβείς και αξιόπιστες τεχνικές, όπως η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA (Gugliandolo et al., 2011). Οι μοριακές τεχνικές, που βασίζονται κυρίως στην ενίσχυση του DNA με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction - PCR), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να συμπληρώσουν ή να αντικαταστήσουν τις μεθόδους που βασίζονται στην καλλιέργεια, και να μειώσουν ορισμένους περιορισμούς λόγω της προκατάληψης (bias) που προκύπτει στις μεθόδους καλλιέργειας. Η ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών με τη χρήση PCR θεωρείται ευαίσθητη μέθοδος (Thompson et al. 2005). Οι τεχνικές Multiplex-PCR (m-PCR), οι οποίες επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών στόχων σε μία μόνο δοκιμή, έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία για την ταχεία ανίχνευση διαφόρων παθογόνων βακτηρίων στα οστρακοειδή (Brasher et al., 1998; Kong et al., 2002; Panicker et al., 2004).

1.4.6 Τεχνικές αλληλούχισης Νέας γενιάς (NGS)

Η κλασσική μέθοδος κατά Sanger επιτρέπει τον προσδιορισμό των επικρατούντων μικροοργανισμών σε κάποιο δείγμα, όπως και να αναγνωρισθούν μικροοργανισμοί που δεν μπορούν να απομονωθούν με καλλιέργεια, αλλά η δυνατότητα ταυτοποίησης μικροβίων που βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις είναι περιορισμένη (Cao et al., 2017). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην καταγράφονται κάποια βακτήρια του μικροβιώματος, με αποτέλεσμα να διακυβεύεται η περιεκτική περιγραφή της μικροβιακής κοινότητας. Η ανάπτυξη των πλατφορμών NGS στην αλληλουχία 16S rRNA βοήθησε στη γρήγορη και πιο ενδεδειγμένη αναγνώριση των βακτηρίων του μικροβιώματος, σε μεγαλύτερο βαθμό και με χαμηλότερο κόστος. Πλέον, υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός νέων τεχνολογιών αλληλούχισης, ο καθένας με τα δικά του ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, και είναι από τις πιο σημαντικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση του μικροβιώματος τα τελευταία χρόνια. Η διάκρισή τους είναι η εξής (Thakur et al., 2018):

1. 454 sequencing ή Pyro sequencing
2. Illumina (Solexa) HiSeq και Mi Seq sequencing
3. SOLID Sequencing
4. Polony sequencing
5. Massively parallel signature sequencing (MPSS)
6. Single molecule real time sequencing (SMRT) Pacific Biosciences
7. Heliscope Sequencing
8. Nanopore DNA sequencing (Oxford Nanopore Technologies)

Η επιλογή της κατάλληλης τεχνολογίας αλληλούχισης πρέπει να γίνεται ανάλογα με το είδος της έρευνας που θα διεξαχθεί (Ercolini, 2013). Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα των NGS τεχνολογιών είναι η ικανότητα να αναλύουν γρήγορα, και με υψηλή ακρίβεια ένα τεράστιο όγκο δεδομένων. Ωστόσο, οι NGS τεχνολογίες παρουσιάζουν και ορισμένα μειονεκτήματα όσον αφορά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους, τα οποία προκύπτουν κυρίως από τον τεράστιο όγκο δεδομένων που παράγουν. Η πιο συχνή δυσκολία που προκύπτει στην ανάλυση δεδομένων είναι πως τα δείγματα που αναλύονται είναι πολύ μεγάλου μεγέθους, έτσι χρειάζονται υποδομές υπολογιστικών πόρων τελευταίας τεχνολογίας και τεράστιοι χώροι αποθήκευσης για τα

δεδομένα και για τα αποτελέσματα. Μία ακόμη δυσκολία είναι οι απαιτούμενες εξειδικευμένες γνώσεις βιοπληροφορικής για την κατάλληλη επεξεργασία, διαχείριση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

1.4.7 Nanopore DNA sequencing (Oxford Nanopore Technologies)

Η αλληλούχιση του DNA με την τεχνολογία Nanopore πραγματοποιείται με τη διαδικασία της μετάβασης του DNA μέσω ενός νανοπόρου, ο οποίος είναι μια μικροσκοπική οπή, με μορφή διαύλου, της τάξης μεγέθους του 1 nm (10^{-9} m). Οι συσκευές της εταιρίας Oxford Nanopore λειτουργούν αφήνοντας να περάσει ιοντικό ρεύμα μέσω των νανοπόρων και έπειτα καταγράφουν τις μεταβολές του, καθώς τα βιολογικά μόρια περνούν δια μέσω αυτών των νανοπόρων. Η μεταβολή του ρεύματος είναι στην ουσία η πληροφορία για την αναγνώριση του κάθε μορίου που διαπερνά το νανοπόρο. Τα υλικά κατασκευής των νανοπόρων είναι είτε από φυσικές πρωτεΐνες (βιολογικοί νανοπόροι), ή από στερεά υλικά (νανοπόροι στερεάς κατάστασης) (Feng et al., 2015). Η διαδικασία της αλληλούχισης γίνεται διαμέσου της κυψελίδας ροής, η οποία περιλαμβάνει εκατοντάδες ανεξάρτητα βοθρία, που το καθένα περιέχει μια συνθετική μεμβράνη που είναι διάτρητη με βιολογικούς νανοπόρους. Όταν οι αζωτούχες βάσεις διαπερνούν το νανοπόρο με τη βοήθεια ενός ενζύμου, προκαλούν χαρακτηριστική μεταβολή της έντασης του ρεύματος που ταυτοποιεί τη βάση. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε είναι το MinION, η οποία κυκλοφόρησε στις αρχές του 2014 από την Oxford Nanopore Technologies και φαίνεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Η συσκευή MinION, η πρώτη εμπορικά διαθέσιμη συσκευή για Nanopore sequencing (<https://store.nanoporetech.com/eu/flow-cells.html>)

Είναι μία φορητή συσκευή αλληλούχισης DNA και RNA και διαθέτει θύρα σύνδεσης USB, τόσο για την τροφοδοσία ενέργειας, όσο και για τη μεταφορά των πληροφοριών απευθείας στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

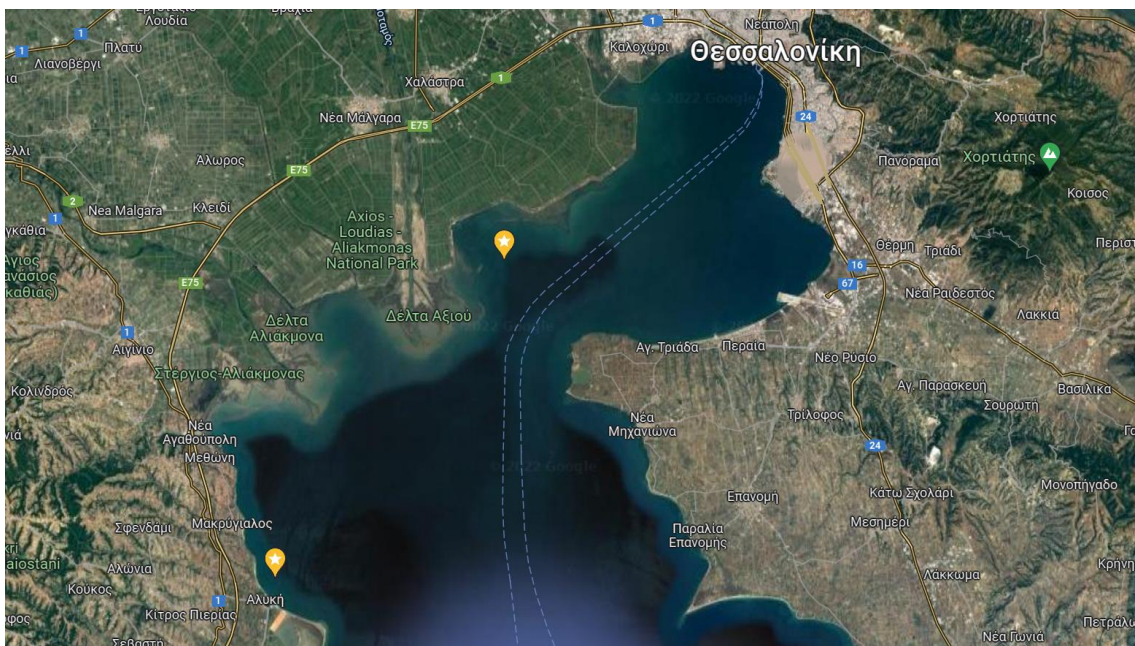
Στην παρούσα εργασία έγινε πρώτα εκτίμηση της κοπρανώδους μόλυνσης, με την τεχνική MPN για το βακτήριο *E. coli* και η αναζήτηση για την ύπαρξη ειδών του γένους *Salmonella sp.* Έπειτα, επιλέχθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης DNeasy Power Food Microbial Kit (QIAGEN), που είναι σχεδιασμένο να απομονώνει υψηλής ποιότητας DNA από τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο δείγμα. Τέλος, επιλέχθηκε η τεχνική αλληλούχισης DNA μέσω νανοπόρων (Nanopore DNA sequencing) της εταιρείας Oxford Nanopore Technologies, με τη χρήση της κυψέλης ροής MinION. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε σε δύο διαφορετικές πλατφόρμες.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Περιοχή συλλογής δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε καθορισμένη χρονική περίοδο, από το Δεκέμβριο του 2021 έως το Φεβρουάριο του 2022, από συγκεκριμένες ζώνες μυδοκαλλιέργειας του Θερμαϊκού κόλπου, της Χαλάστρας (ΠΕ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ) και του Μακρύγιαλου (ΠΕ ΠΙΕΡΙΑΣ), και αποτυπώνονται ως σημεία με αστερίσκο στην Εικόνα 6.

Από την περιοχή της Χαλάστρας πάρθηκαν δείγματα από 3 σημεία, δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, ενώ από τον Μακρύγιαλο πάρθηκαν δείγματα από 2 σημεία, τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές (Πίνακας 7).



Εικόνα 6: Ο χάρτης του Θερμαϊκού κόλπου με τα σημεία δειγματοληψίας σε Χαλάστρα και Μακρύγιαλο (σημεία με αστερίσκο)

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από την Κτηνιατρική Υπηρεσία και με τη μέθοδο που ορίζεται στο πρωτόκολλο συλλογής δειγμάτων για μικροβιολογική εξέταση. Παράλληλα, έγινε η καταγραφή της θερμοκρασίας του νερού στο σημείο δειγματοληψίας. Στη συνέχεια, εντός 4 ωρών από τη δειγματοληψία, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων της Θεσσαλονίκης, μέσα σε ειδικά ισοθερμικά δοχεία με παγοκύστες. Εκεί, με εγκριτική απόφαση του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης, έγινε η παραλαβή των δειγμάτων για την περαιτέρω ανάλυση στο Εργαστήριο Αγροβιοτεχνολογίας και Ελέγχου Αγροτικών Προϊόντων του τμήματος Γεωπονίας, του Διεθνές Πανεπιστημίου Ελλάδας. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο του Πανεπιστημίου την ίδια ημέρα της παραλαβής τους, μέσα σε ειδικό ισοθερμικό δοχείο με παγοκύστες, για τη διατήρηση της θερμοκρασίας έως 4 °C. Συνολικά εξετάστηκαν 12 δείγματα, από δύο περιοχές του Θερμαϊκού Κόλπου (Μακρύγιαλος, Χαλάστρα), μέσα σε διάστημα 3 μηνών. Τα δείγματα M1, M3, M5 πάρθηκαν από το ίδιο σημείο δειγματοληψίας (Σημείο Σ1Μ) αλλά σε διάστημα 3 μηνών, το ίδιο ισχύει και για τα

δείγματα M2, M4, και M6 (Σημείο Σ2Μ). Αντίστοιχα, για τα δείγματα της Χαλάστρας, λήφθηκαν δείγματα από 3 σημεία δειγματοληψίας, αρχές και τέλη Φεβρουαρίου (M7 και M10 από το ίδιο σημείο (Σημείο Σ1Χ), αντίστοιχα M8 και M11 (Σημείο Σ2Χ), M9 και M12 (Σημείο Σ3Χ).

Πίνακας 7: Οι περιοχές δειγματοληψίας και οι φυσικοί παράμετροι του νερού την ημέρα της δειγματοληψίας

Δείγμα	Σημείο Δειγματοληψίας	Περιοχή	Μήνας	Βάθος συλλογής	Θερμοκρασία επιφάνειας νερού
M1	Σ1Μ	Μακρύγιαλος	Δεκέμβριος	3-4 m	10,9 °C
M2	Σ2Μ				
M3	Σ1Μ	Μακρύγιαλος	Ιανουάριος	3-4 m	10,5 °C
M4	Σ2Μ				
M5	Σ1Μ	Μακρύγιαλος	Φεβρουάριος	3-4 m	10,5 °C
M6	Σ2Μ				
M7	Σ1Χ	Χαλάστρα	Φεβρουάριος	4m	10,6 °C
M8	Σ2Χ				
M9	Σ3Χ				
M10	Σ1Χ	Χαλάστρα	Φεβρουάριος	4 m	10,2 °C
M11	Σ2Χ				
M12	Σ3Χ				

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 7, τόσο το βάθος συλλογής όσο και οι θερμοκρασίες που επικρατούσαν τους χειμερινούς μήνες κατά τις ημέρες συλλογής των μυδιών δεν έχουν μεγάλες διακυμάνσεις. Το ίδιο ισχύει και για την αλατότητα, όπου σε όλη την περίοδο δειγματοληψίας παρέμεινε μεταξύ 37 PSU και 37,5 PSU, σύμφωνα με στοιχεία από το σύστημα ΠΟΣΕΙΔΩΝ (<https://poseidon.hcmr.gr/el/ypiresies/prognoseis/proigoymenes-prognoseis>).

2.2 Συλλογή και προετοιμασία των δειγμάτων για τη μετέπειτα ανάλυση

Μετά την παραλαβή των μυδιών, έγινε η επιλογή του δείγματος για το πείραμα. Ως δείγμα ορίζεται το μέρος του μυδιού (σάρκα και ενδοθυρικό υγρό) που επιλέχθηκε για το πείραμα, από μία συγκεκριμένη ζώνη μυδοκαλλιέργειας και μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Επιλέχθηκαν μύδια που είναι ενήλικα, με παρόμοιο μέγεθος και ζωντανά, αφού ελέγχθηκαν τα εξής σημεία (Εικόνα 7):

- ✓ Με χτύπημα στο όστρακο έπρεπε να προκαλείται κίνηση ή κλείσιμο του κελύφους.
- ✓ Να είναι ερμητικά κλειστά τα κελύφη τους.
- ✓ Μετά την αποκάλυψη της σάρκας το μύδι έπρεπε να αντιδρά στο άγγιγμα με κίνηση.



Εικόνα 7: Τα ενήλικα μύδια πριν τη διάνοιξη

Η διάνοιξη του κελύφους έγινε με αποστειρωμένο μαχαιρίδιο και το περιεχόμενο (σάρκα και υγρό) τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο περιέκτη, και μετά σε ζυγό ακριβείας (Εικόνα 8). Η αποστείρωση του μαχαιριδίου έγινε με αιθανόλη, και έπειτα σε φλόγα με ηλεκτρικό σύστημα Bunsen. Το μαχαίρι τοποθετήθηκε ανάμεσα στα δύο κελύφη μέσω του ανοίγματος του βύσσου, και με περιστροφή του μαχαιριού έγινε ο διαχωρισμός του κελύφους. Με ξύσιμο του κάτω κελύφους το περιεχόμενο αδειάζεται σε πλαστικό αποστειρωμένο περιέκτη (τρυβλίο petri).



Εικόνα 8: Η διάνοιξη και η τοποθέτηση σε πλαστικό αποστειρωμένο περιέκτη

Η ζύγιση του κάθε δείγματος έγινε σε ζυγό ακριβείας, έτσι ώστε να έχουμε παρόμοιου βάρους δείγματα. Έπειτα, μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε ειδικές σακούλες stomacher και ομογενοποιήθηκαν για 1 λεπτό, χρησιμοποιώντας τη συσκευή Stomacher (Bag Mixer, Interscience, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο) όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9.



Εικόνα 9: Συλλογή σε ειδική σακούλα stomacher bag με φίλτρο

Το ομογενοποιημένο υγρό συλλέχθηκε με αποστειρωμένη σύριγγα των 10 ml και ύστερα μοιράστηκε σε σωληνάρια των 2 ml για περαιτέρω ανάλυση.

2.3 Ανάλυση των δειγμάτων

Τα δείγματα εξετάστηκαν με τη μέθοδο Most Probable Number (MPN), για την απαρίθμηση του βακτηρίου *Escherichia coli* σύμφωνα με το πρότυπο ISO 16649-3: 2015, και με βάση το σχηματισμό χαρακτηριστικών αποικιών σε εκλεκτικά υποστρώματα για την ανίχνευση *Salmonella spp.* (όπως επιβάλλει ο Ευρωπαϊκός κανονισμός 2073/2005). Παράλληλα, έγινε ο προσδιορισμός του συνολικού μικροβιώματος των δειγμάτων με τη χρήση τεχνολογίας αλληλούχησης Τρίτης Γενιάς MinION (MinION- Oxford Nanopore technologies).

2.3.1 Τεχνική MPN: Μέθοδος ISO 16649-3:2015

Σκοπός της μεθόδου είναι η καταμέτρηση του βακτηρίου *E.coli*, το οποίο αξιολογείται ως δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης της σάρκας των μυδιών. Με βάση τα αποτελέσματα, γίνεται και η κατηγοριοποίηση των ζωνών παραγωγής (Πίνακας 6).

2.3.2 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική, περιλαμβάνουν:

- Αραιωτικό υγρό 0.1% πεπτονόχο νερό (peptone water). Παρασκευάστηκε ως εξής: Απιονισμένο νερό 1 lt και Peptone bacteriological (Oxoid) 1g.
- Υπόστρωμα γλουταμικού διαλύματος (mineral-modified glutamate broth, MMGB) απλής δύναμης σε σωλήνες των 10 ml. Παρασκευάστηκε ως εξής: 2,5 g χλωριούχου αμμωνίου (ammonium chloride) διαλυμένα σε 1 lt αποσταγμένο νερό, προσθήκη 11,4 g βάσης MMGB και 6,4 g γλουταμικού νατρίου (sodium glutamate).
- Υπόστρωμα MMGB διπλής δύναμης. Παρασκευάστηκε ως εξής: 5 g χλωριούχου αμμωνίου σε 1 lt αποσταγμένο νερό, προσθήκη 11,4 g βάσης MMGB και 6,4 g γλουταμικού νατρίου (sodium glutamate).
- Trypton Bile Glucuronide (TBGA). Παρασκευάστηκε ως εξής: 1lt απιονισμένο νερό και TBX chromocult agar 36,5 g.

- Φιάλες αραιώσης με βιδωτό πώμα
- Τριβλία petri

2.3.3 Διαδικασία

Η διαδικασία περιλάμβανε τέσσερα στάδια, την ομογενοποίηση, τον ενοφθαλμισμό, την επώαση και τη σπορά, και περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

- Ζυγίστηκαν 50 g σάρκας μυδιού με ενδοθυρικό υγρό σε στείρο περιέκτη (τριβλίο petri) και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε ειδικές σακούλες stomacher.
- Προστέθηκαν 100 ml πεπτονούχο νερό 0,1% (pH 7,2), έτσι ώστε για κάθε 1 g δείγματος να αντιστοιχούσαν 2 ml αραιωτικού διαλύματος. Στη συνέχεια, ομογενοποιήθηκαν για 2 min, χρησιμοποιώντας τη συσκευή Stomacher (Bag Mixer, Interscience, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο).
- Α' αραιώση: Μεταφέρθηκαν 30 ml από το ομογενοποιημένο δείγμα σε 70 ml αραιωτικού, χρησιμοποιώντας πιπέτα των 10 ml. Έτσι επιτεύχθηκε αραιώση 1:10.
- Β' αραιώση: Μεταφέρθηκε 1ml από το διάλυμα 1:10 σε 9 ml αραιωτικού. Έτσι επιτεύχθηκε αραιώση 1:100.
- Έγινε ενοφθαλμισμός 10 ml από την Α' αραιώση του ομογενοποιημένου δείγματος σε 5 σωλήνες που εμπεριείχαν 10 ml διπλής δύναμης MMGB.
- Έγινε ενοφθαλμισμός 1 ml από την Α' αραιώση του ομογενοποιημένου δείγματος σε 5 σωλήνες που εμπεριείχαν 10 ml απλής δύναμης MMGB.
- Έγινε ενοφθαλμισμός 1 ml από την Β' αραιώση του ομογενοποιημένου δείγματος σε 5 σωλήνες που εμπεριείχαν 10 ml απλής δύναμης MMGB.
- Οι σωλήνες επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες. Ύστερα εξετάστηκαν για την παρουσία οξέος, που υποδηλώνεται από τον κίτρινο χρωματισμό του μέσου, που αρχικά είχε μωβ χρώμα. Οι σωλήνες στους οποίους παρατηρήθηκε αλλαγή χρωματισμού λόγω αλλαγής του pH (από μωβ σε κίτρινο) θεωρήθηκαν ύποπτοι.
- Από όλους τους ύποπτους σωλήνες, έγινε σπορά σε τριβλίο petri με χρωμογόνο υπόστρωμα TBX, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή όχι η παρουσία *E. coli*. Το κάθε τριβλίο petri χωρίστηκε σε 5 τμήματα, όπου σε κάθε τμήμα έγινε η σπορά από ένα σωληνάριο.

- Έπειτα έγινε η επώαση των ενοφθαλισμένων petri, στους 44 °C για 24 ώρες.
- Τα τρυβλία εξετάστηκαν για την παρουσία μπλε-πράσινων αποικιών που υποδήλωναν δραστηριότητα β-γλυκουρινοδάσης, άρα και ύπαρξης *E. coli*.
- Ακολούθησε η καταμέτρηση των επιβεβαιωμένων, ως θετικών σωληνών (Εικόνα 10) (5×1 g, 5×0,1 g, 5×0,01 g) από τον αντίστοιχο πίνακα MPN (Πίνακας Πλέον Πιθανού Αριθμού). Το αποτέλεσμα αναφέρεται σαν αριθμός MPN *E. coli* / 100 g δείγματος.



Εικόνα 10: Σωλήνες θετικοί για *E. coli* (κίτρινο χρώμα) μετά από επώαση 24 ωρών

2.4 Τεχνική για την ανίχνευση *Salmonella spp.*

Με τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε έγινε η ανίχνευση της παρουσίας μικροβίων του γένους *Salmonella* και περιλάμβανε 4 στάδια:

- Προεμπλουτισμός σε μη εκλεκτικό υπόστρωμα (Buffer Peptone Water ή BPW)
- Εμπλουτισμός σε δύο εκλεκτικά υγρά (Rappaport Vasilliadis magnesium chloride/malachite green soya peptone RVS ζωμός / MKTTn Muller Kauffmann Tetrathionate novobiocin broth)
- Σπορά σε τρία στερεά εκλεκτικά υποστρώματα: XLD agar, BGA agar και Rambach agar

- Ταυτοποίηση: οι πιθανές αποικίες του γένους *Salmonella* αναπτύσσονται σε nutrient agar και ακολούθησε βιοχημική και ορολογική δοκιμή.

2.4.1 Διαδικασία για την ανίχνευση *Salmonella spp.*

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε, περιγράφεται παρακάτω:

- Τοποθετήθηκαν 25 g σάρκας μυδιού με ενδοθυρικό υγρό σε σακούλα Stomacher, μαζί με 225 ml προεμπλουτιστικού υποστρώματος Buffer Peptone Water (BPW), το οποίο είχε προηγουμένως θερμανθεί στους 35°C.
- Ομογενοποιήθηκαν σε συσκευή Stomacher για 3 min.
- Έγινε επώαση σε επωαστικό κλίβανο, στους 37 °C για 20 ώρες.
- Μεταφέρθηκε 0,1 ml από τον προεμπλουτισμό, σε σωληνάριο που περιείχε 10 ml RVS broth και 1 ml σε σωληνάριο που περιείχε 10 ml MKTTn broth.
- Το σωληνάριο που περιείχε RVS broth τοποθετήθηκε σε κλίβανο στους 41,5 °C για 24 ώρες, ενώ το σωληνάριο με το MKTTn broth στους 37 °C για 24 ώρες.
- Έγινε σπορά από το RVS broth με κρίκο ενοφθαλμισμού, σε επιφάνεια ενός τριβλίου petri (90 mm) με XLD agar, BGA agar και Rambach agar.
- Έγινε σπορά από το MKTTn broth με κρίκο ενοφθαλμισμού, σε επιφάνεια ενός τριβλίου petri (90 mm) με XLD agar, BGA agar και Rambach agar.
- Τα ενοφθαλμισμένα τριβλία petri επώαστηκαν σε επωαστικό κλίβανο, στους 37 °C για 24 ώρες.
- Εξετάστηκαν για παρουσία τυπικών ή μη τυπικών αποικιών *Salmonella spp.* Οι τυπικές αποικίες στο XLD agar έχουν μαύρο χρώμα στο κέντρο, ελαφρώς διάφανη ζώνη κόκκινου χρώματος και διάμετρο 1-2 mm. Τα στελέχη που είναι H₂S-αρνητικά (π.χ. *S. paratyphi A*) και αναπτύσσονται στο XLD, είναι ροζ, με πιο σκούρο ροζ χρώμα στο κέντρο, ενώ τα στελέχη που είναι λακτόζη-θετικά, όταν αναπτύσσονται στο XLD είναι κίτρινα, με ή χωρίς μαύρο χρώμα. Στο Rambach agar οι αποικίες είναι κόκκινου χρώματος και διαμέτρου 1-2 mm.
- Ακολούθησε η ταυτοποίηση με βιοχημικές και ορολογικές δοκιμές, έπειτα από καθαροποίηση σε Nutrient agar και επώαση στους 37 °C για 24 ώρες.

2.4.2 Βιοχημικές δοκιμές ταυτοποίησης

Οι βιοχημικές δοκιμές ταυτοποίησης που πραγματοποιήθηκαν, είναι οι εξής :

- 1. Ενοφθαλμισμός σε TSI άγαρ:** Με τη βοήθεια ακίδας ενοφθαλμίζεται η ύποπτη ή η τυπική αποικία, σε σωληνάριο με υπόστρωμα TSI agar. Ο ενοφθαλμισμός γίνεται στην κεκλιμένη επιφάνεια και έως τον πυθμένα του σωληναρίου, και επωάζεται σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C για 24 ώρες. Η εξέταση του σωληναρίου γίνεται αμέσως μετά την έξοδό του από τον κλίβανο.

Πίνακας 8: Αξιολόγηση αποτελεσμάτων με βάση την παραγωγή οξέος και αερίου

Χρώμα - Αλλοιώσεις πυθμένα	Αποτέλεσμα
Κίτρινο	Γλυκόζη θετική (έγινε ζύμωση της γλυκόζης)
Κόκκινο ή αμετάβλητο	Γλυκόζη αρνητική (μη ζύμωση της γλυκόζης)
Μαύρο	Σχηματισμός H ₂ S
Φυσαλίδες ή χαραγές	Σχηματισμός αερίου από τη ζύμωση της γλυκόζης

Πίνακας 9: Αξιολόγηση αποτελεσμάτων με βάση την παραγωγή οξέος και αερίου

Χρώμα - Αλλοιώσεις κεκλιμένης επιφάνειας	Αποτέλεσμα
Κίτρινο	Λακτόζη και / ή σουκρόζη θετική (ζύμωση λακτόζης και / ή σουκρόζης)
Κόκκινο ή αμετάβλητο	Λακτόζη και / ή σουκρόζη αρνητική (δεν γίνεται ζύμωση ούτε λακτόζης ούτε σουκρόζης)

Οι τυπικές καλλιέργειες *Salmonella spp.* παρουσιάζουν αλκαλική (κόκκινη) κεκλιμένη επιφάνεια και όξινο (κίτρινο) πυθμένα, με σχηματισμό αερίου (φυσαλίδες), καθώς και πιθανό σχηματισμό υδρόθειου (μαύρος χρωματισμός υποστρώματος) (Πίνακας 8,9).

- 2. Ενοφθαλμισμός σε ουρία άγαρ:** Ενοφθαλμίζεται μόνο η κεκλιμένη επιφάνεια του άγαρ και επωάζεται το ενοφθαλμισμένο υπόστρωμα στους 37 °C για 24 ώρες, όπου εξετάζεται κατά διαστήματα. Εάν η αντίδραση είναι θετική, η διάσπαση της ουρίας απελευθερώνει αμμωνία, η οποία αλλάζει το χρώμα σε ροζ και στη συνέχεια σε σκούρο κόκκινο. Η αντίδραση είναι συνήθως ορατή μετά από 2-4 ώρες επώασης.
- 3. Αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης:** Γίνεται ενοφθαλμισμός κάτω από την επιφάνεια υγρού υποστρώματος και επωάζεται στους 37 °C για 24 ώρες. Η θολερότητα και ο μωβ

χρωματισμός μετά από την επώαση υποδεικνύει θετική αντίδραση, ενώ ο κιτρινο-πράσινος χρωματισμός υποδεικνύει αρνητική αντίδραση.

Όπως φαίνεται από την περιγραφή της τεχνικής, στο εργαστήριο χρειάζονται 4 ημέρες για να γίνει η πρώτη εκτίμηση της ύπαρξης *Salmonella spp.*, με βάση τη δημιουργία των αποικιών στα υποστρώματα (που σε περίπτωση ασθενούς ανάπτυξης τυπικών αποικιών, η επώαση παρατείνεται για ακόμη 48 ώρες), και μία ακόμη ημέρα για την ταυτοποίηση του στελέχους.

2.5 Ανάλυση μικροβιώματος με τη χρήση της τεχνολογίας αλληλούχησης Τρίτης Γενιάς MinION (MinION Oxford Nanopore technologies)

2.5.1 Εξαγωγή DNA

Το πρώτο στάδιο για τη δημιουργία βιβλιοθήκης αλληλούχησης 16S rRNA, είναι η σωστή απομόνωση του βακτηριακού DNA. Η απομόνωση έγινε με μεγάλη προσοχή για να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση των δειγμάτων. Όλα τα εργαλεία και οι επιφάνειες εργασίας καθαρίστηκαν με διάλυμα αιθανόλης 70%. Επιλέχθηκε το κιτ DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen, Χίλντεν, Γερμανία). Για τη λύση των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός χημικής (ρυθμιστικό διαλυμα - lysis buffer) αλλά και μηχανικής λύσης (σφαιρίδια-beads).

Η απομόνωση του DNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen, Χίλντεν, Γερμανία), με ορισμένες τροποποιήσεις και η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω:

- Σε αποστειρωμένο σωληνάριο συλλογής (Collection Tube), προστέθηκε ποσότητα ~1,8 ml ομογενοποιημένου ιστού, και φυγοκεντρήθηκε στις 14.000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για χρονικό διάστημα 3 min.
- Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο διάλυμα, με τη χρήση πιπέτας, χωρίς να διαταραχθεί το ίζημα.
- Προστέθηκε 450 µl MBL Solution σε θερμοκρασία 55 °C. Το μείγμα αναδεύτηκε σε vortex μέχρι να διαλυθεί ικανοποιητικά η πελέτα (pellet).
- Το μείγμα επωάστηκε σε υδατόλουτρο στους 65 °C για 15 min, και έγινε σύντομη ανάδευση σε vortex στα πρώτα 5 min και δεύτερη σύντομη ανάδευση στα 15 min, ώστε να ομογενοποιηθεί πλήρως το μείγμα.

- Μετά το τέλος της επώασης, το μείγμα μεταφέρθηκε με πιπέτα σε σωληνάριο PowerBead Tube (περιέχει σφαιρίδια λύσης), και έγινε ανάδευση σε vortex σε οριζόντια και κάθετη θέση, για χρονικό διάστημα 5 λεπτών ανά κατεύθυνση. Σε αυτό το σημείο επιτεύχθηκε η μηχανική λύση των βακτηρίων.
- Το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000 στροφές (rpm) για 1 min, και το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο Collection Tube των 2 ml.
- Προστέθηκε 100 μl Solution IRS (Inhibitor Removal Technology) και έγινε ανάδευση σε vortex για 1 min.
- Το μείγμα τοποθετήθηκε σε ψυγείο στους 2-8 °C για 5 min.
- Στη συνέχεια, το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14.000 στροφές (rpm) για 1 min, αφαιρέθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο διάλυμα με πιπέτα και τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο σωληνάριο (Collection Tube) των 2 ml.
- Προστέθηκε 900 μl διαλύματος MR σε θερμοκρασία 55 °C και αναδεύτηκε σύντομα στο vortex.
- Μεταφέρθηκε ποσότητα 650 μL με πιπέτα από το Collection Tube των 2 mL σε στήλη περιστροφής (MB Spin Column), και φυγοκεντρήθηκε στις 14.000 στροφές (rpm), για χρονικό διάστημα 1 min. Έγινε απόρριψη του υγρού που διήλθε από τους πόρους (flow-through) και επανάληψη έως ότου τοποθετήθηκε όλη η ποσότητα του υπερκείμενου διαλύματος στο MB Spin Column.

Σημείωση: απαιτήθηκαν δύο τοποθετήσεις για το δείγμα. Το DNA δεσμεύεται στη μεμβράνη του MB Spin Column.

- Τοποθετήθηκε το φίλτρο MB Spin Column σε νέο σωληνάριο συλλογής και προστέθηκε 650μl διαλύματος PW solution. Ακολούθησε καλή ανάδευση σε vortex mixer.
- Αδειάστηκε το περιεχόμενο της στήλης, και προστέθηκε στη στήλη με το φίλτρο, 650 μL διαλύματος αιθανόλης 100% . Έπειτα, η στήλη φυγοκεντρήθηκε στις 14.000 στροφές (rpm) για 1 min.
- Το υπόλειμμα απομακρύνθηκε, και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 14.000 στροφές (rpm) για 2 min.

Σημείωση: η ολική απομάκρυνση της αιθανόλης είναι σημαντική γιατί δρα ανασταλτικά σε επόμενα στάδια.

- Στη συνέχεια, το φίλτρο (MB Spin Column) τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο σωληνάριο Collection Tube, και προστέθηκε 100 µl διαλύματος EB Elution Buffer (διάλυμα έκλουσης) στο κέντρο του φίλτρου. Το σωληνάριο παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
Σημείωση: Καθώς το EB (απαλλαγμένο αλάτων) διέρχεται μέσω της μεμβράνης, το DNA απελευθερώνεται και συγκεντρώνεται στο Collection Tube. Το DNA απελευθερώνεται επειδή μπορεί να δεσμευτεί στο MB Spin Column μόνο παρουσία αλάτων.
- Έγινε φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές (rpm) για 1 min, συλλογή του υγρού με πιπέτα και εκ νέου μεταφορά αυτού επάνω στο φίλτρο.
- Παραμονή για χρονικό διάστημα 3 λεπτών και φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές (rpm), για χρονικό διάστημα 1 min.
- Αφαίρεση και απόρριψη του MB Spin Column.
- Αποθήκευση του φιαλιδίου με το δείγμα σε καταψύκτη (-20 έως -80°C).

2.5.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των δειγμάτων

Η ανίχνευση του βακτηριακού DNA πραγματοποιείται με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης και την παρατήρηση της πηκτής υπό υπεριώδη ακτινοβολία. Η τεχνική ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης επιτρέπει το διαχωρισμό τμημάτων, θραυσμάτων ή μορίων DNA με βάση το μέγεθός τους, τα οποία καθίστανται ορατά μετά από χρώση του DNA με τη μη τοξική χρωστική Midori Green. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της επιτυχούς εξαγωγής του βακτηριακού DNA.

2.5.3 Αντιδραστήρια και διαλύματα για την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική της ηλεκτροφόρησης είναι τα εξής:

- Ρυθμιστικό διάλυμα 1xTBE: 100 ml διαλύματος 10xTBE (Appllichem Panreac) (τρεις υδροξυ-μεθυλαμινομεθάνιο, βορικό οξύ, EDTA) και 900 ml δις-αποσταγμένο H₂O
- 0,7-1 g Σκόνη αγαρόζης (Appllichem Panreac, Germany)
- 0,8-1 µl Χρωστική Midori Green (Appllichem Panreac, Germany)
- Διάλυμα φόρτωσης: 1% κυανό της βρωμοφαινόλης
- Μάρτυρας FastGene 1 kb DNA Ladder (Nippon Genetics Europe GmbH, Germany)

2.5.4 Παρασκευή πηκτής αγαρόζης και διαδικασία ηλεκτροφόρησης

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- Σε κωνική φιάλη, προστίθενται 100 ml διαλύματος 1xTBE και 1 g αγαρόζης (Appllichem Panreac, Germany) υπό μορφή σκόνης.
- Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται μέχρι το σημείο βρασμού, έτσι ώστε να λιώσει η αγαρόζη και το μείγμα να γίνει διαυγές.
- Ύστερα, το διάλυμα ψύχεται υπό συνεχή ανάδευση κάτω από τρεχούμενο νερό.
- Όταν το διάλυμα αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 0,8-1 μl μη τοξική χρωστική Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Germany), και γίνεται προσεκτική ανάδευση ώστε να μη σχηματιστούν φυσαλίδες. Η χρωστική έχει τη δυνατότητα να δεσμεύεται στο DNA και να το καθιστά ορατό στη UV ακτινοβολία.
- Το διάλυμα της αγαρόζης χύνεται στο ειδικό πλαίσιο (εκμαγείο) και απομακρύνονται οι φυσαλίδες που πιθανόν έχουν δημιουργηθεί.
- Στο ένα άκρο του εκμαγείου που περιέχει τη ρευστή αγαρόζη εισέρχεται μία ειδική «χτένα», η οποία θα δημιουργήσει τα βοθρία (πηγαδάκια) στα οποία θα τοποθετηθεί το προς ηλεκτροφόρηση δείγμα.
- Η αγαρόζη παραμένει για περίπου 30 min σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς φωτισμό (φωτοευαίσθητη χρωστική), όπου ζελατινοποιείται και στερεοποιείται.
- Αφού στερεοποιηθεί η αγαρόζη, η «χτένα» αφαιρείται, και η πηκτή τοποθετείται προσεκτικά στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχουν προστεθεί 700 ml διαλύματος 1xTBE.
- Για την παρατήρηση του απομονωμένου DNA, 0,5 μL διαλύματος φόρτωσης (κυανούν της βρωμοφαινόλης) αναμιγνύεται με 3-4 μL διαλύματος DNA και, στη συνέχεια, πραγματοποιείται ήπια ανάδευση σε συσκευή vortex. Το κυανούν της βρωμοφαινόλης χρησιμοποιήθηκε για την αποφυγή απώλειας των δειγμάτων DNA στα βοθρία (έως την έναρξη της ηλεκτροφόρησης) και για την παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης.
- Τοποθετήθηκε ο μάρτυρας FastGene 1 kb DNA Ladder (NIPPON Genetics Europe, Germany), σε ένα από τα βοθρία της πηκτής, ενώ στα υπόλοιπα τοποθετήθηκαν τα δείγματα απομονωμένου DNA, με λεπτούς χειρισμούς και με τη βοήθεια μικροπιπέτας.

- Αφού ολοκληρώθηκε η τοποθέτηση όλων των δειγμάτων στα βιοθρία της πηκτής, ακολούθησε η προσεκτική αποσυναρμολόγηση του εκμαγείου και η τοποθέτηση της πηκτής στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- Η συσκευή ηλεκτροφόρησης συνδέεται με ένα τροφοδοτικό μηχανήμα και εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο στα άκρα της πηκτής, το οποίο ρυθμίζεται σε τάση 150 Volts και ένταση ρεύματος 90 mA. Εφόσον ο σκελετός σακχάρου - φωσφορικής ομάδας του DNA είναι αρνητικά φορτισμένος, τα μόρια του DNA μετακινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο (άνοδος). Η πρόοδος της ηλεκτροφόρησης παρακολουθείται με τη μετακίνηση του δείκτη του κυανού της βρωμοφαινόλης. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης διαρκεί 30 λεπτά. Σε επιτυχημένη απομόνωση του DNA, το γενετικό υλικό εμφανίζεται σαν μια φωτεινή ζώνη επάνω στην πηκτή αγαρόζης.
- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αγαρόζης απομακρύνεται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται επάνω στην τράπεζα της συσκευής υπεριώδους ακτινοβολίας, όπου το γενετικό υλικό παρατηρείται, συνήθως, ως μία φωτεινή ζώνη.

2.5.5 Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR)

Με τη μέθοδο αυτή ενισχύεται μια συγκεκριμένη περιοχή του DNA, αυτή του γονιδίου 16S rRNA. Το διάλυμα της PCR προετοιμάστηκε στο εργαστήριο σύμφωνα με το πρωτόκολλο 16S Barcoding Kit (SQK-RAB204, Oxford Nanopore Technologies). Το kit περιλαμβάνει 12 διαφορετικούς σημαντές (barcodes) για την τελική ταυτοποίηση των δειγμάτων. Κάθε barcode περιέχει μία μοναδική αλληλουχία βάσεων, επιτρέποντας την ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων στην κυψέλη ροής (Flow cell). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 27F και 1492R, οι οποίοι είναι ειδικοί για τις υπερμεταβλητές περιοχές V1-V9 (~1500 bp) του 16S rRNA γονιδίου.

Ο συνολικός όγκος για κάθε αντίδραση PCR πρέπει να είναι 35 μl και το μείγμα της αντίδρασης περιέχει τα παρακάτω συστατικά:

- 17,5 μl PCR mix LongAmp®Taq2X Master Mix (New England Biolab)
- 6,8 μl υπερκάθαρο νερό (PCR Grade Water)

- 0,7 μl από τους εκκινητές: 27F (Πρόσθιος εκκινητής (forward) 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 1492R (Οπίσθιος εκκινητής (reverse) 5'-TACCTTGTACGACTT) (universal primers 16s barcode oxford nanopore)
- 10 μl απομονωμένου DNA

Μετά την ανάμιξη των συστατικών του μείγματος, έγινε η ανάδευσή τους σε vortex και σύντομη φυγοκέντρηση (spin) για λίγα δευτερόλεπτα.

Στη συνέχεια, κάθε δείγμα με ξεχωριστό barcode, προστέθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή PTC-200 (Biorad). Η συσκευή ρυθμίστηκε στις παρακάτω θερμοκρασίες και χρόνους, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας, και το πρόγραμμα έχει ως εξής:

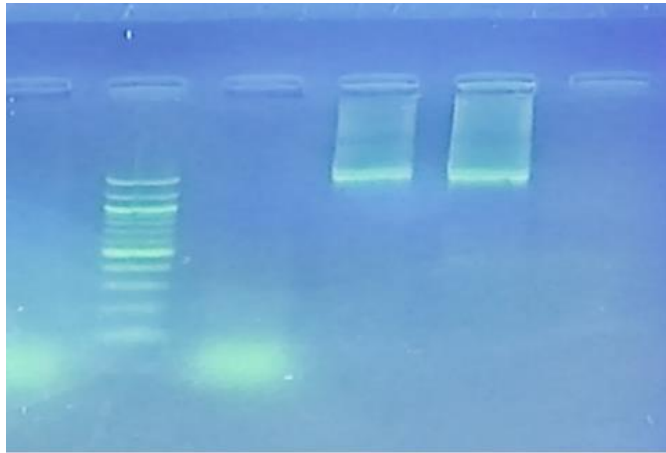
1. 95 °C για 3 min, αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation)
2. 95 °C για 30 s, αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
3. 55 °C για 1min, σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της κάθε μονόκλωνης αλυσίδας DNA (annealing)
4. 65 °C για 2,5 min, δράση της πολυμεράσης και επιμήκυνση των αλυσίδων DNA (extension). Επανάληψη των βημάτων 2-4 (ένας κύκλος PCR) για 40 φορές
5. 65 °C για 10 min, τελική συμπληρωματική επιμήκυνση
6. Διατήρηση στους 4 °C

Η ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA με το παραπάνω θερμοκρασιακό πρόγραμμα διαρκεί περίπου 3 ώρες. Μετά το τέλος της διαδικασίας τα σωληνάρια τοποθετούνται στο ψυγείο, μέχρι να χρησιμοποιηθούν στο επόμενο στάδιο.

2.5.6 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR, σε πηκτή αγαρόζης

Για να διαπιστωθεί η ενίσχυση του γονιδίου, γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, όπως και στον έλεγχο απομόνωσης του DNA. Η παρασκευή της πηκτής γίνεται με παρόμοιο τρόπο, όπως περιγράφηκε στην υποπαράγραφο 2.5.2, με μόνη διαφορά στη συγκέντρωσή της, η οποία είναι 1,5% σε διάλυμα 1xTBE. Για να βρεθούν τα μήκη των τμημάτων του DNA που έχουν ενισχυθεί (αριθμός ζευγών βάσεων), σε ένα βοθρίο της πηκτής φορτώνεται ένας μάρτυρας DNA. Όταν ο μάρτυρας φορτωθεί μαζί με τα ενισχυμένα τμήματα DNA στην πηκτή αγαρόζης, γίνεται σύγκριση των θέσεων τους με τα θραύσματα γνωστού μήκους του μάρτυρα. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο FastGene 100 bp DNA Ladder (NIPPON Genetics

Europe, Germany) και προστέθηκε, όπως και στη πρώτη ηλεκτροφόρηση, για τη σύγκριση και την ποσοτικοποίηση του DNA των δειγμάτων (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης όπου φαίνεται το ενισχυμένο προϊόν των 1600 ζευγών βάσεων (γονίδιο 16S rRNA)

2.6 Προετοιμασία για τη δημιουργία Βιβλιοθήκης Αλληλούχησης 16S rRNA

2.6.1 Αρχική Φασματοφωτομέτρηση

Στο αρχικό στάδιο της φασματοφωτομέτρησης, γίνεται η πρώτη εκτίμηση της ποιότητας και της ποσότητας του προϊόντος της PCR. Είναι βασική προϋπόθεση, τα προϊόντα PCR που θα ενωθούν (pooling) σε επόμενο στάδιο, να έχουν ισόποσες συγκεντρώσεις DNA, για την αποφυγή δημιουργίας άνισης αντιπροσωπευτικότητας (bias). Το τελικό δείγμα (pooled sample), πρέπει να περιέχει προϊόντα PCR σε ισόποσες συγκεντρώσεις DNA (nanogram/μl) από το κάθε δείγμα. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε σε συσκευή Q3000 (Quawell, Καναδάς).



Εικόνα 12: Η φασματοφωτομέτρηση σε συσκευή Q3000 (Quawell, Καναδάς)

2.6.2 Συνένωση των δειγμάτων (sample pooling)

Στο στάδιο αυτό γίνεται η συνένωση των δειγμάτων (sample pooling), δηλαδή η ταυτόχρονη τοποθέτηση του κάθε δείγματος PCR, που έχει ήδη σημειωθεί με διαφορετικό barcode κατά τη διαδικασία της PCR, σε ένα κοινό φιαλίδιο. Έτσι, ορισμένη ποσότητα από το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε ένα κοινό φιαλίδιο (pool), και η χρήση των barcodes επέτρεψε την αναγνώριση και το διαχωρισμό του κάθε δείγματος στη συσκευή αλληλούχησης MinION, κατά τη διαδικασία της αλληλούχησης. Τα δείγματα κωδικοποιήθηκαν με τους ειδικούς σημαντές (barcodes) όπως φαίνονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10: Τα κωδικοποιημένα δείγματα με τους ειδικούς σημαντές (barcodes), της εταιρείας Oxford Nanopore

Αρίθμηση Δείγματος	Barcode	Περιοχή δειγματοληψίας
M1	01	Μακρύγιαλος
M2	02	Μακρύγιαλος
M3	03	Μακρύγιαλος
M4	04	Μακρύγιαλος
M5	07	Μακρύγιαλος
M6	08	Μακρύγιαλος
M7	05	Χαλάστρα
M8	06	Χαλάστρα
M9	09	Χαλάστρα
M10	10	Χαλάστρα

M11	11	Χαλάστρα
M12	12	Χαλάστρα

2.6.3 Καθαρισμός αρχικού προϊόντος PCR

Μετά την ισομοριακή ανάμιξη και συνένωση των δειγμάτων (sample pooling), ακολούθησε ο καθαρισμός του προϊόντος της PCR, όπου χρησιμοποιήθηκε το έτοιμο kit καθαρισμού MicroCLEAN® (microzone, Clent Life Science, UK) και η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

- Προσθήκη ισόποσης ποσότητας (σε µl) καθαριστικού διαλύματος (MicroCLEAN) και τελικού δείγματος (pooled sample). Ακολουθεί η επικάλυψη της πλάκας βοθρίων (96 well plate) με διάφανη μεμβράνη, η έντονη ανάδευση σε vortex (Multivortex V-32) για 30 sec και η σύντομη φυγοκέντρηση (short spin) στις 500 στροφές (rpm).
- Γίνεται η επώαση της πλάκας σε θερμοκρασίου δωματίου, για τουλάχιστον 6 min.
- Έπειτα η πλάκα φυγοκεντρείται στις 3700 στροφές (rpm) για 40 min.
- Ακολουθεί η αφαίρεση της μεμβράνης, η τοποθέτηση της πλάκας ανάστροφα σε απορροφητικό χαρτί και φυγοκέντρηση για 30 sec στις 400 στροφές (rpm).
- Η πλάκα μεταφέρεται σε κλίβανο και παραμένει στους 37 °C για 10 min.
- Προστίθενται 20 µl διαλύματος TE (Tris-EDTA) στο δείγμα, ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση (spin) στις 1500 στροφές (rpm) και διακοπή λειτουργίας μόλις επιτευχθούν οι στροφές. Η πλάκα τοποθετείται στο ψυγείο για τουλάχιστον 15 min.

2.6.4 Τελική Φασματοφωτομέτρηση

Ακολουθεί η τελική μέτρηση με φασματοφωτόμετρο, με τη συσκευή Q3000 (Quawell, Καναδάς), για την αξιολόγηση της συγκέντρωσης του DNA. Στο δείγμα, η αναλογία A260/280 ήταν 1,8 και η συγκέντρωση ήταν 300 nanogram/µl. Η συσκευή αλληλούχησης MinION απαιτεί ~100 ng. Σε περίπτωση υψηλότερης συγκέντρωσης, λαμβάνεται λιγότερη ποσότητα δείγματος ή το δείγμα αραιώνεται με επιπλέον ποσότητα TE.

2.6.5 Προετοιμασία των προϊόντων PCR για την τοποθέτησή τους στην κυψέλη ροής (flow cell)

Η έκδοση της κυψέλης ροής που χρησιμοποιήθηκε ήταν η R9.4.1, η οποία είναι ιδανική για 1D πειράματα. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, πριν την έναρξη του πειράματος αλληλούχησης, συνιστάται ο έλεγχος των διαθέσιμων πόρων της κυψέλης ροής. Αρχικά, η συσκευή συνδέθηκε στον υπολογιστή, και μέσω του MinKNOW λογισμικού επιλέχθηκε η λειτουργία «Flow Cell Check». Ο ελάχιστος αριθμός ενεργών πόρων για το κελί ροής του MinION είναι 800 πόροι.

Η διαδικασία της προετοιμασίας των προϊόντων PCR είναι η ακόλουθη:

- Το παραπάνω προϊόν PCR μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωληνάριο, ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 0,5 μl (150 ng καθαρισμένου προϊόντος).
- Προστίθενται 0,5 μl από τον αντάπτορα αλληλούχησης της εταιρείας Oxford Nanopore Technologies (Rapid sequencing adapter). Ο αντάπτορας αλληλούχησης προσδένεται στους ειδικά διαμορφωμένους υποδοχείς των εκκινητών (5' tags).
- Ακολουθεί συμπλήρωση με υπερκίθαρο νερό, ώστε ο συνολικός όγκος του μείγματος να είναι 11 μl.
- Το μείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min, ώστε να πραγματοποιηθεί η επαρκής σύνδεση (ligation) του αντάπτορα σε όλα τα διαθέσιμα θραύσματα του γονιδίου 16S rRNA.

2.6.6 Γονοτύπηση των προϊόντων PCR στην πλατφόρμα αλληλούχησης MinION

Έπειτα από τον έλεγχο των πόρων και το πέρας της διαδικασίας σύνδεσης του αντάπτορα, ακολούθησε η τοποθέτηση της κυψέλης ροής (flow cell) στην πλατφόρμα αλληλούχησης (MinION MK1B) (Εικόνα 13). Η πλατφόρμα συνδέεται μέσω USB σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η πληροφορία αποκτάται μέσω της μέτρησης του ηλεκτρικού σήματος, κατά τη διέλευση του DNA από τον πόρο ενός κελιού ροής. Η κάθε συσκευή έχει 512 κανάλια, με 4 νανοπόρους σε κάθε κανάλι, και συνολικά 2.048 νανοπόρους. Το κάθε κελί ροής αποτελείται από μία μη αγώγιμη μεμβράνη πολυμερούς, που διαθέτει πόρους διαμέτρου 1-2 nm (nanoporetech.com).



Εικόνα 13: Η συσκευή αλληλούχησης (MinION MK 1B)

Πριν την έγχυση, γίνεται προετοιμασία της κυψέλης ροής για την αλληλούχηση, με εισαγωγή ενός ειδικού μείγματος που ονομάζεται μείγμα εκκίνησης, και αποτελείται από:

- 1 ml διαλύματος flush buffer (FB)
- 30 μl διαλύματος flush tether (FLT)

Το μείγμα ανακινείται με σύντομο vortex σε θερμοκρασία δωματίου.

Έπειτα, έγινε άνοιγμα του καλύπτρου της θύρας εκκίνησης και τοποθέτηση 800 μl διαλύματος priming mix στη θύρα εκκίνησης. Η εισαγωγή του μείγματος έγινε με αργό και σταθερό ρυθμό, για να μην εισχωρήσουν φυσαλίδες και καταστραφούν οι νανοπόροι (Εικόνα 14).



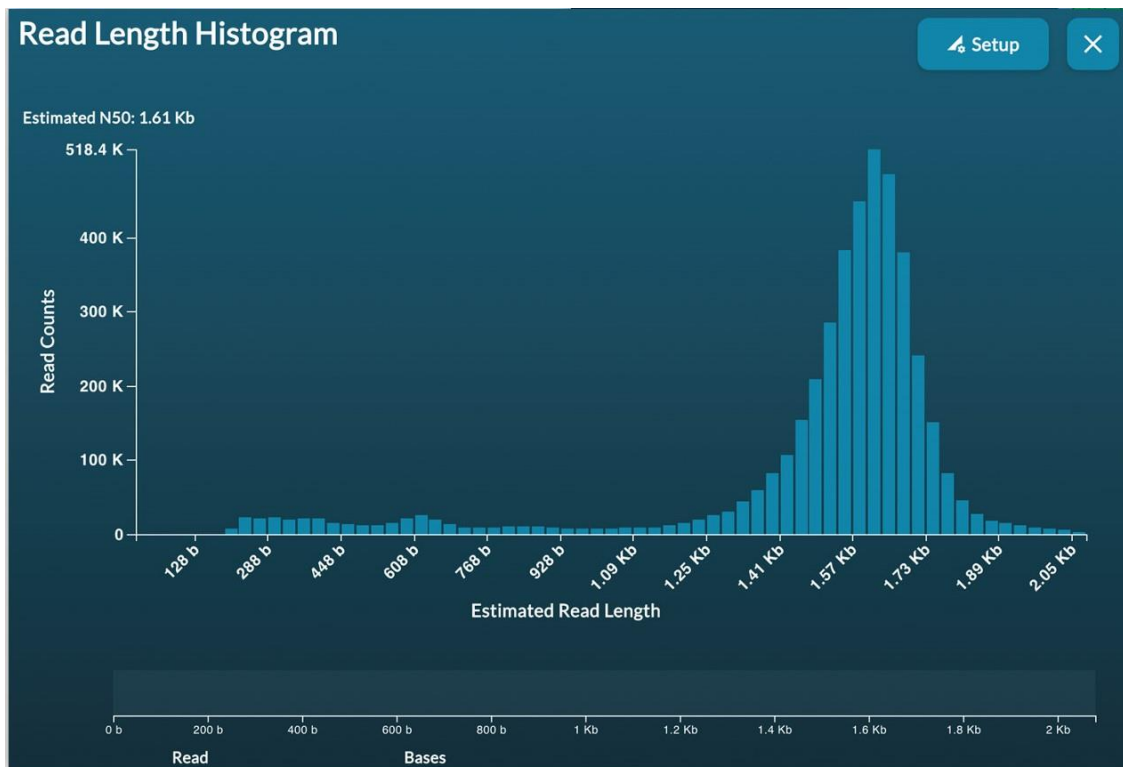
Εικόνα 14: Η έγχυση του μείγματος στην ειδική υποδοχή της κυψέλης ροής (flow cell)

Εν συνεχεία, παρασκευάστηκε το μείγμα με τα προϊόντα PCR ως εξής:

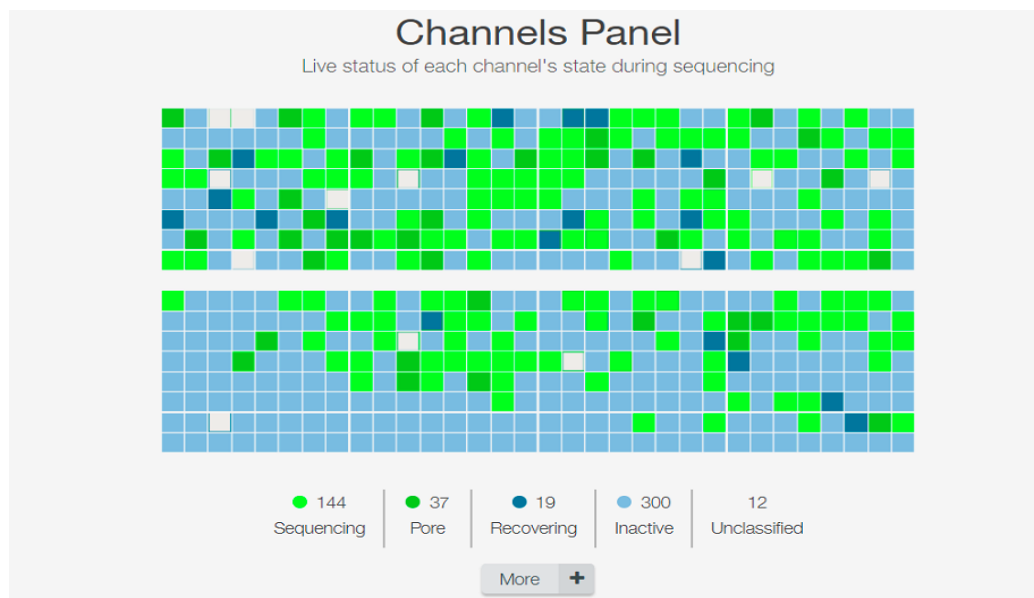
- Ανάμιξη των συστατικών του διαλύματος Loading Beads (LB) με σύντομο vortex
- 11 μl διαλύματος αντάπτορα-PCR προϊόντος
- 34 μl διαλύματος αλληλούχησης (sequencing buffer)
- 25,5 μl διαλύματος που φέρει ειδικά σφαιρίδια (loading beads)
- 4,5 μL υπερκάθαρου νερού (Nuclease-free water)

Ο συνολικός όγκος του μείγματος είναι 75 μl και εγχύεται με πολύ αργό και σταθερό ρυθμό στην ειδική υποδοχή της κυψέλης ροής.

Για να ξεκινήσει η διαδικασία, θέτονται οι παράμετροι της αλληλούχησης στο λογισμικό minKNOW, στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, και γίνεται εκκίνηση της διαδικασίας. Η παρακολούθηση της διαδικασίας γίνεται μέσω της εφαρμογής που είναι εγκατεστημένη στον ηλεκτρονικό υπολογιστή, και έτσι επιτυγχάνεται η παρακολούθηση των αλληλουχιών (reads) σε πραγματικό χρόνο (Εικόνες 15, 16).



Εικόνα 15: Η εμφάνιση ιστογράμματος στην εφαρμογή minKNOW, όπου φαίνεται σε πραγματικό χρόνο το μήκος των ακολουθιών (reads) που έχουν καταγραφεί



Εικόνα 16: Η απεικόνιση των ενεργών πόρων, σε πραγματικό χρόνο, κατά τη διάρκεια της αλληλούχησης

Η διαδικασία διαρκεί περίπου 72 ώρες. Με το πέρας 6, 12 και 24^{ων} ωρών από την έναρξη της διαδικασίας, προστέθηκε εκ νέου ποσότητα διαλύματος priming mix ίση με 250 μ L κάθε φορά.

2.6.7 Βιοπληροφορική ανάλυση μεταγονιδιωματικής

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των νουκλεοτιδίων (nucleotide basecalling) είναι το GUPPY (Oxford Nanopore Technologies), όπου επεξεργάστηκαν τα ακατέργαστα δεδομένα της αλληλούχησης (raw FAST5 αρχεία). Οι αλληλουχίες του γονιδίου 16S rRNA (reads) αποκωδικοποιήθηκαν (demultiplexed) σύμφωνα με τα barcodes που χρησιμοποιήθηκαν. Οι επεξεργασμένες αλληλουχίες (clean reads) προέκυψαν έπειτα από αποκοπή των barcodes, των ακολουθιών του αντάπορα αλληλούχησης και των εκκινήτων. Στη συνέχεια, έγινε η βιοπληροφορική ανάλυση στην πλατφόρμα EPI2ME Fastq 16s (cloud-based analysis) (Oxford Nanopore Technologies), ώστε να γίνει η ταξινομική κατάταξη. Έγινε προσπάθεια ελαχιστοποίησης των σφαλμάτων (bias) λόγω τυχαίας λανθασμένης αλληλούχησης, φιλτράροντας τα μήκη των αλληλουχιών και εξαιρώντας τις αλληλουχίες (reads) με μήκος μικρότερο των 1 kb. Επίσης, ως ελάχιστος βαθμός ακρίβειας αλληλούχησης (quality score) ορίστηκε το Q-score10. Διεξήχθη η alpha diversity ανάλυση, για την εκτίμηση

του βάθους αλληλούχησης (reads) που απαιτείται για την κάλυψη όσο το δυνατόν μεγαλύτερου φάσματος βακτηριακής ποικιλότητας. Για την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MetONTIME.

2.7 Στατιστική επεξεργασία

Για τη διερεύνηση της σχέσης των συνολικών αλληλουχιών (reads) μεταξύ των βακτηρίων, σε κάθε ταξινομικό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε έλεγχος ανεξαρτησίας χ^2 τεστ, για την εύρεση πιθανής στατιστικής ανομοιογένειας μεταξύ των αποτελεσμάτων. Ο δείκτης αυτός εξετάζει αν οι διαφορές στο σύνολο των δειγμάτων ενός πληθυσμού είναι στατιστικά σημαντικές, ώστε αυτός να χαρακτηριστεί ανομοιογενής ή ομοιογενής. Επιλέχθηκε ως επίπεδο σημαντικότητας το 5% ($p \leq 0.05$), που σημαίνει ότι ένας πληθυσμός μπορεί να θεωρηθεί ανομοιογενής όταν το αποτέλεσμα είναι μικρότερο από 0,05 και το αντίθετο.

Σε περίπτωση που στον έλεγχο ανεξαρτησίας χ^2 τεστ το p είναι μικρότερο από 0,05 ακολουθεί, με τη μέθοδο Z-score, η σύγκριση μεταξύ κάθε δύο ανεξάρτητων δειγμάτων, με επίπεδο σημαντικότητας $p \leq 0,05$. Στην εν λόγω εργασία οι συγκρίσεις έγιναν για κάθε ταξινομικό επίπεδο, μεταξύ των δύο περιοχών (Μακρύγιαλος και Χαλάστρα), αλλά και μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας της κάθε περιοχής ξεχωριστά (Σ1Μ και Σ2Μ για τον Μακρύγιαλο, και Σ1Χ, Σ2Χ, Σ3Χ για τη Χαλάστρα). Το αποτέλεσμα του p αναγράφεται σε κάθε πίνακα σύγκρισης στην ενότητα Αποτελέσματα.

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις διεξήχθησαν με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Minitab v21.1.0 software. Τέλος, όλα τα διαγράμματα παρήχθησαν με το εργαλείο Microsoft Excel, Έκδοση 2016.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην ενότητα αυτή θα παρουσιαστούν αρχικά τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης, με τον προσδιορισμό του Πλέον Πιθανού Αριθμού (MPN-Most Probable Number) του πληθυσμού *E. coli* και της ανίχνευσης του γένους *Salmonella spp.* Έπειτα, ακολουθούν τα αποτελέσματα της ανάλυσης του μικροβιώματος, με τη χρήση της τεχνολογίας αλληλούχησης Τρίτης Γενιάς MinION (Nanopore Oxford Technologies).

3.1 Αποτελέσματα του Πλέον Πιθανού αριθμού (MPN-Most Probable Number), του πληθυσμού *E. coli*

Τα δείγματα εξετάστηκαν αυθημερόν, αμέσως μετά την παραλαβή τους, με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην ενότητα υλικά και μέθοδοι (κεφάλαιο 2.3.1). Τα αποτελέσματα όπως φαίνονται στον Πίνακα 11, δείχνουν ότι οι ζώνες όπου έγινε η δειγματοληψία κατατάσσονται στην κατηγορία Α, σύμφωνα με τον Πίνακα 6 (κεφάλαιο 1.4.3).

Πίνακας 11: Αριθμός MPN (Πλέον Πιθανού Αριθμού) / 100 g δείγματος

Αρ. δείγματος	Barcode δείγματος	Αριθμός MPN/ 100 g
M1	Barcode 1	78
M2	Barcode 2	40
M3	Barcode 3	170
M4	Barcode 4	140
M5	Barcode 7	45
M6	Barcode 8	20
M7	Barcode 5	45
M8	Barcode 6	20
M9	Barcode 9	<18
M10	Barcode 10	20
M11	Barcode 11	<18
M12	Barcode 12	<18

Οι πλέον πιθανοί αριθμοί του πληθυσμού *E. coli*, ως μικροοργανισμού δείκτη στα ζώντα δίθυρα μαλάκια, χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του κινδύνου της μόλυνσης των δίθυρων μαλακίων με παθογόνα βακτήρια. Στην παρούσα εξέταση τα δείγματα χαρακτηρίζονται από χαμηλή παρουσία του βακτηρίου *E. coli*, που υποδηλώνει χαμηλή κοπρανώδους ρύπανση της θαλάσσιας περιοχής όπου συλλέχθηκαν τα μύδια.

3.2 Αποτελέσματα ανίχνευσης του γένους *Salmonella spp.*

Τα δείγματα εξετάστηκαν αυθημερόν για την ύπαρξη *Salmonella spp.* με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.4., και το αποτέλεσμα ήταν ότι σε κανένα δείγμα δεν ανιχνεύθηκε *Salmonella spp.*, σε ιστό 25 g. Όπως φαίνεται από την περιγραφή της τεχνικής, στο εργαστήριο χρειάζονται 4 ημέρες για να γίνει η πρώτη εκτίμηση της ανίχνευσης παρουσίας του γένους *Salmonella spp.*, με βάση τη δημιουργία των αποικιών στα υποστρώματα (που σε περίπτωση ασθενούς ανάπτυξης τυπικών αποικιών, η επώαση παρατείνεται για ακόμη 48 ώρες), και μία ακόμη ημέρα για την ταυτοποίηση του στελέχους.

Συνολικά, χρειάζονται 5 με 7 ημέρες για να αξιολογηθεί το δείγμα, καθιστώντας τη μέθοδο χρονοβόρα για ευαλλοίωτα τρόφιμα, αλλά και για καταστάσεις που απαιτούν γρήγορη εργαστηριακή απάντηση, για το αν υπάρχει μόλυνση με συγκεκριμένο είδος *Salmonella spp.* (όπως για παράδειγμα σε μαζικές τροφολοιμώξεις από *Salmonella spp.*).

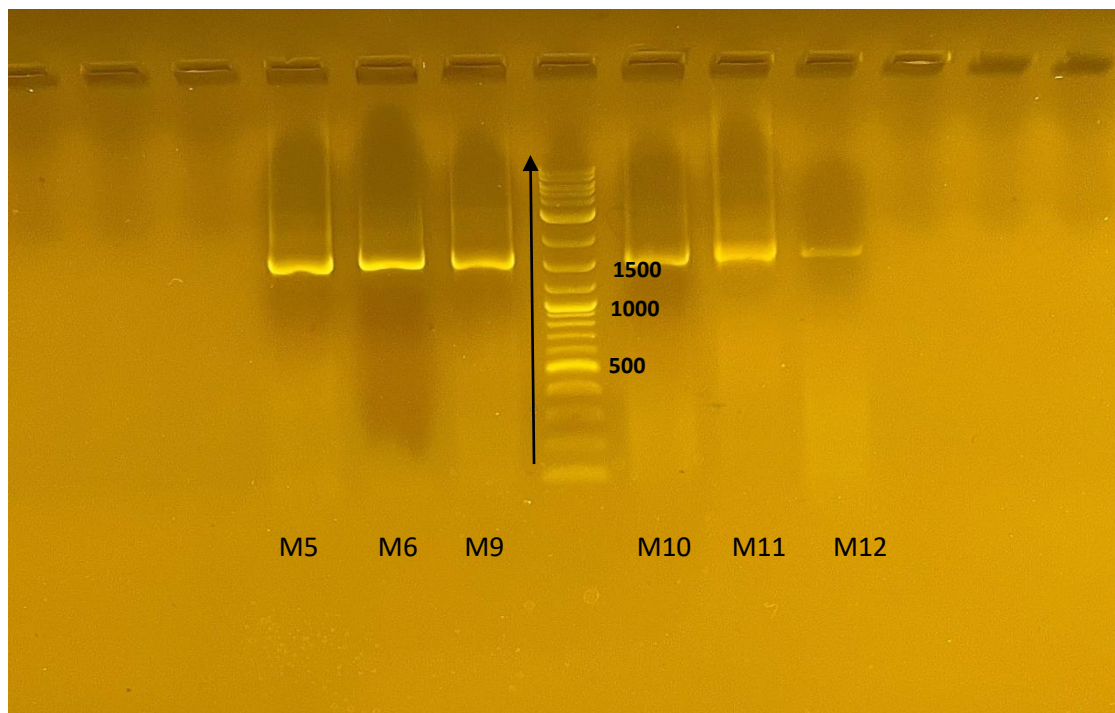
3.3 Αποτελέσματα της ανάλυσης μικροβιώματος, με τη χρήση της τεχνολογίας αλληλούχησης Τρίτης Γενιάς MinION (Nanopore Oxford Technologies)

3.3.1 Εξαγωγή του DNA και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης

Έπειτα από τη διαδικασία εξαγωγής του DNA, ακολούθησε η πρώτη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Κατά την ηλεκτροφόρηση αξιολογήθηκαν τα δείγματα και συγκρίθηκαν με το μάρτυρα. Η σύγκριση ήταν επιτυχής για όλα τα δείγματα.

3.3.2 Ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR

Μετά την αντίδραση PCR, έγινε ο έλεγχος του ενισχυμένου προϊόντος με τη δεύτερη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Τα αποτελέσματα για τα δείγματα M5, M6, M9-M12 παρουσιάζονται στην Εικόνα 17, όπου φαίνονται τα δείγματα και ο μάρτυρας μοριακών βαρών στο κέντρο. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε, δημιουργεί διαδοχικές φωτεινές ζώνες με διαφορά 100 bp ανά ζώνη.



Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του ενισχυμένου προϊόντος PCR (1600bp) μαζί με το μάρτυρα

3.3.3 Αρχική φασματοφωτομέτρηση με τη συσκευή Q3000 και καθαρισμός του προϊόντος της PCR

Ακολούθησε ο προσδιορισμός του λόγου απορρόφησης (260nm/280nm) και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA με τη συσκευή Q3000. Σε αυτό το στάδιο, τα δείγματα μετρήθηκαν ξεχωριστά και ο λόγος απορρόφησης βρέθηκε εντός των αποδεκτών ορίων, δηλαδή 1,8-2,0. Παράλληλα, η συγκέντρωση του DNA του κάθε δείγματος κυμάνθηκε στα 700 ng/μl, εκτός του δείγματος M12 που ήταν στα 350 ng/μl. Επειδή στη διαδικασία καθαρισμού του προϊόντος PCR υπάρχει υψηλό ποσοστό απώλειας, απαιτείται υψηλή συγκέντρωση DNA. Επομένως, από το κάθε δείγμα λήφθηκε ποσότητα 10 μL, προκειμένου η ποσότητα του DNA στο τελικό δείγμα (pooled sample) να είναι ~7000 ng/ δείγμα. Ωστόσο, από το δείγμα M12 λήφθηκε ποσότητα 20 μL, καθώς όπως φαίνεται και στην Εικόνα 17, το δείγμα αυτό είναι πιο αχνό και με βάση τη μέτρηση είχε χαμηλότερη συγκέντρωση. Έγινε η συνένωση των 12 προϊόντων της PCR και ακολούθησε ο καθαρισμός του δείγματος (pooled sample), με βάση το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην ενότητα 2.6.3.

3.3.4 Τελική φασματοφωτομέτρηση με τη συσκευή Q3000

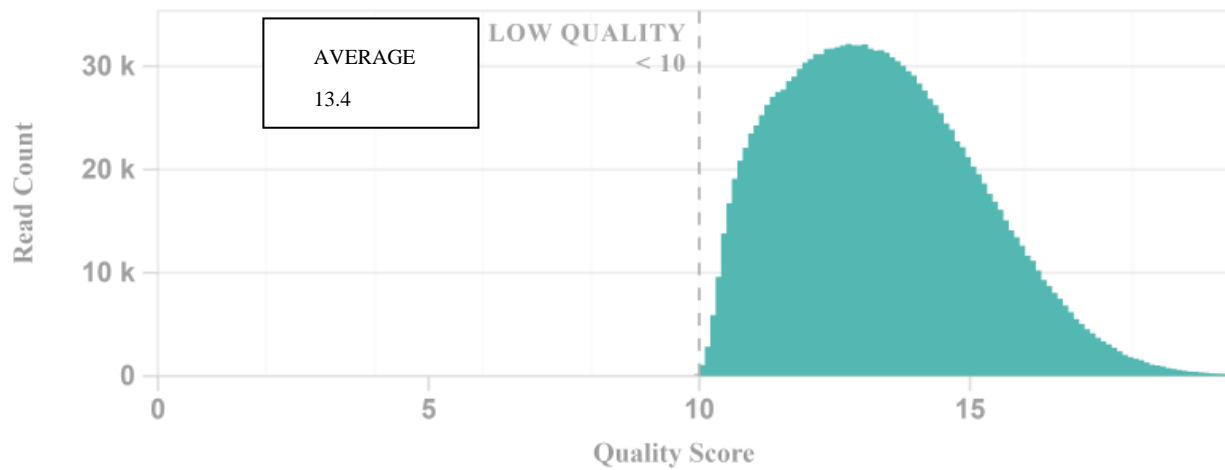
Στην συνέχεια έγινε εκ νέου προσδιορισμός του λόγου απορρόφησης του προϊόντος PCR (pooled sample), και της συγκέντρωσης του DNA με τη συσκευή Q3000. Ο λόγος απορρόφησης του DNA στο τελικό δείγμα βρέθηκε ίσος με 1,84, ο οποίος βρίσκεται στα επιθυμητά όρια και υποδηλώνει υψηλή καθαρότητα του τελικού δείγματος. Η συγκέντρωση του PCR προϊόντος βρέθηκε να είναι 200 ng/μl και επειδή η επιδιωκόμενη συγκέντρωση, για την τοποθέτησή του στη συσκευή αλληλούχησης MinION, είναι ~100 ng, λήφθηκε 0,5 μl δείγματος.

3.3.5 Αλληλούχηση του pooled δείγματος στη συσκευή MinION

Στο παρόν στάδιο πραγματοποιήθηκε η επιτυχής αλληλούχηση των 12 δειγμάτων στη συσκευή MinION, η μετέπειτα ανάγνωσή τους, η επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων (Fast5 αρχείων) και η μετατροπή τους σε FastQ αρχεία, στο λογισμικό GUPPY. Τα επεξεργασμένα reads φιλτραρίστηκαν και τελικά διατηρήθηκαν οι αλληλουχίες (reads) με μήκος μεταξύ 1-2 kb, ενώ παράλληλα απορρίφθηκαν αυτές που είχαν ακρίβεια ανάγνωσης βάσεων μικρότερη του 10% (<Q-score10). Τα συνολικά reads που αναλύθηκαν ήταν 1.581.663, εκ των οποίων απορρίφθηκαν 374.594 λόγω μήκους βάσεων, και επιπλέον 315, λόγω του φίλτρου Q-score10. Τελικά, από την εφαρμογή των φίλτρων, οι συνολικές αλληλουχίες (reads) που παρέμειναν προς ταξινόμηση ήταν 1.206.754, και φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12: Παρουσίαση των αλληλουχιών (reads) του κάθε barcode και του συνόλου τους

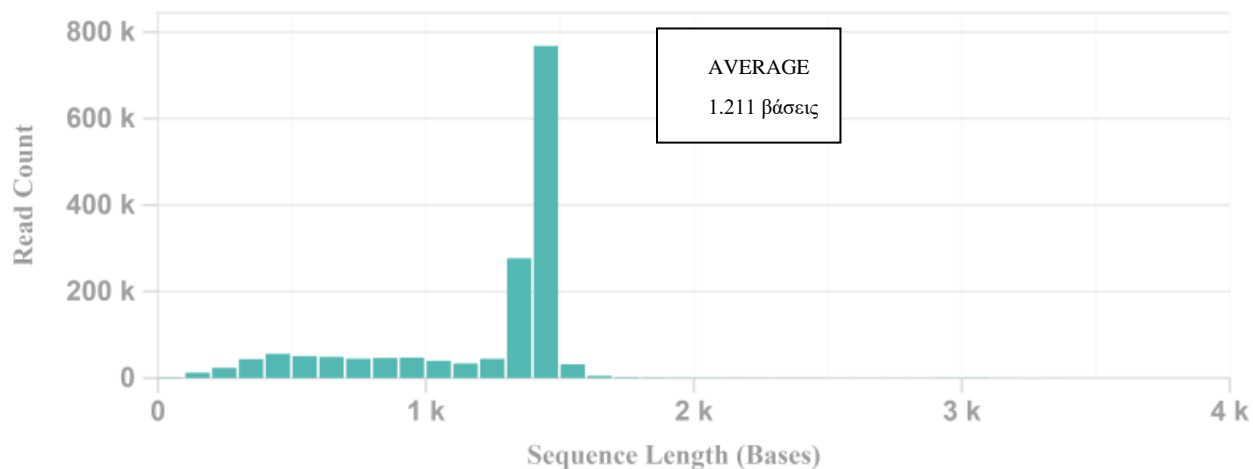
Barcode	Αλληλουχίες (Reads)
Barcode 01	58.371
Barcode 02	78.823
Barcode 03	76.266
Barcode 04	67.431
Barcode 05	85.572
Barcode 06	118.402
Barcode 07	170.679
Barcode 08	152.459
Barcode 09	109.953
Barcode 10	96.880
Barcode 11	118.963
Barcode 12	72.955
Σύνολο	1.206.754



Εικόνα 18: Διάγραμμα Quality Score σε συνάρτηση με τον αριθμό των αλληλουχιών (reads), μαζί με το μέσο όρο και την κορυφή του Q-score (Πηγή: EPI2ME)

Τα 1.206.754 reads κατέληξαν σε 370.528 ταξινομημένα (classified) και σε 836.226 μη ταξινομημένα (unclassified) reads. Το δείγμα M7 είχε τα περισσότερα classified reads (44.324), ενώ το δείγμα M3 είχε τα λιγότερα (12.646). Τα classified reads παρουσίασαν μέσο Q-score (Average Q-score) ίσο με 13,4 (Εικόνα 18), ενώ η μέση ακρίβεια (average raw read accuracy) προσδιορίστηκε ίση με 97,5%.

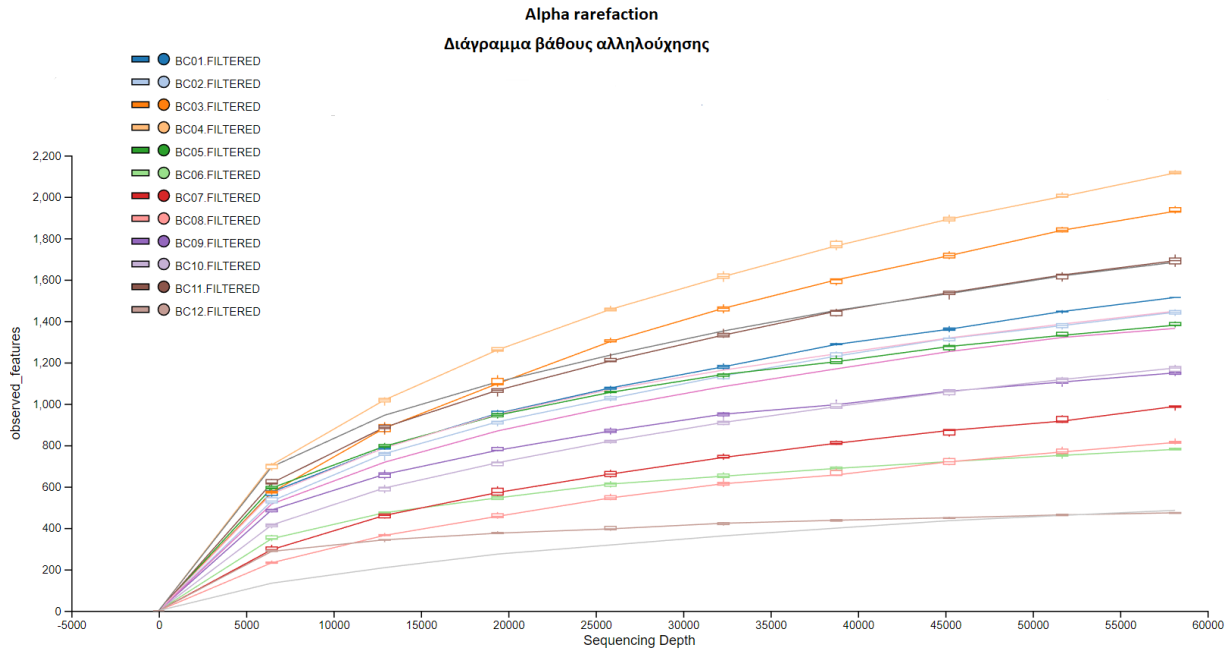
Ακόμη, στην Εικόνα 19 αναπαρίσταται το μέσο μήκος αλληλουχίας (Average Sequence Length) των ακολουθιών (reads), το οποίο υπολογίστηκε ίσο με 1.211 βάσεις.



Εικόνα 19: Διάγραμμα μήκους αλληλουχίας σε συνάρτηση με τον αριθμό των ακολουθιών (reads), μαζί με το μέσο όρο και την κορυφή του μήκους αλληλουχίας (Πηγή: EPI2ME)

3.4 Μεταγονιδιωματική ανάλυση

Αρχικά, για την εκτίμηση του ποσοστού κάλυψης του φάσματος της βακτηριακής ποικιλότητας των δειγμάτων, σε σχέση με τον αριθμό των αλληλουχιών (reads) του κάθε δείγματος, υπολογίστηκαν οι καμπύλες alpha-rarefaction, οι οποίες λήφθηκαν μέσω του προγράμματος MetONTIME, και το βάθος αλληλούχησης συναρτήσεαι του δείκτη Shannon. Τα δεδομένα αποτυπώνονται στην Εικόνα 20.



Εικόνα 20: Διάγραμμα βάθους αλληλούχησης (sequencing depth), σε συνάρτηση με τα παρατηρούμενα γένη βακτηρίων (observed features)

Η μεταγονιδιωματική ανάλυση αποκάλυψε τη βακτηριακή ποικιλότητα των μυδιών των εξεταζόμενων περιοχών. Οι ταξινομικές ομάδες που ταυτοποιήθηκαν, συγκρίθηκαν ως προς την ετερογένεια των δειγμάτων μεταξύ των δύο περιοχών, αλλά και ως προς την ομοιογένεια των δειγμάτων εντός της ίδιας περιοχής.

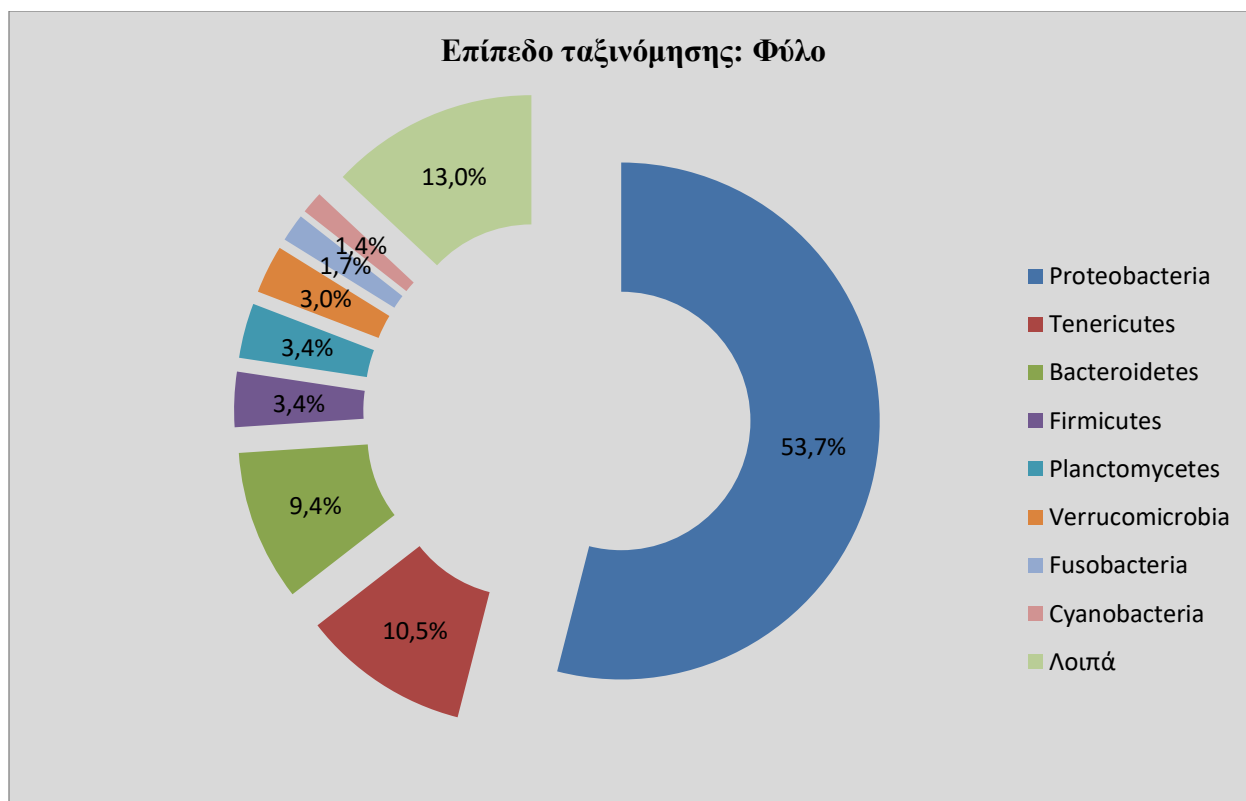
3.4.1 Αποτελέσματα μεταγονιδιωματικής ανάλυσης

Στην παρούσα ενότητα θα καταγραφούν τα αποτελέσματα ταξινομημένα ανά ταξινομικό επίπεδο, ξεκινώντας από το επίπεδο του φύλου μέχρι και το επίπεδο του γένους. Η στατιστική διερεύνηση έγινε αρχικά με τον έλεγχο ανεξαρτησίας χ^2 τεστ, σε όλες τις παρακάτω συγκρίσεις. Το αποτέλεσμα έδειξε $p \leq 0.05$ για κάθε σύγκριση που έγινε, που δηλώνει τη στατιστική ανομοιογένεια μεταξύ των αποτελεσμάτων. Επομένως, ακολούθησε η σύγκριση των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο Z-score, όπου το αποτέλεσμα του p αναγράφεται σε κάθε πίνακα σύγκρισης (σημειώνεται με κόκκινο όταν $p > 0.05$).

Σε επίπεδο **φύλου** (Phylum) οι κυρίαρχες βακτηριακές ομάδες όπως φαίνονται από τον Πίνακα 13 και απεικονίζονται στην Εικόνα 21, είναι οι εξής: Proteobacteria 53,7% (M: 62,3%, X: 48,0%), Tenericutes 10,5% (M: 8,3%, X: 11,8%), Bacteroidetes 9,4% (M: 10,3%, X: 8,8%), Firmicutes (M: 3,4%, X: 3,40%), Planctomycetes 3,4%(M: 1,9%, X: 4,4%), Verrucomicrobia 3,0% (M: 2,8%, X: 3,1%), όπου M αναφέρεται στην περιοχή του Μακρύγιαλου και X της Χαλάστρας.

Πίνακας 13: Τα κυρίαρχα βακτήρια σε επίπεδο φύλου (Phylum), με ποσοστό μεγαλύτερο του 1% στο σύνολο του Θερμαϊκού κόλπου. Η παράμετρος N δηλώνει τον αριθμό των reads για κάθε φύλο.

Επίπεδο φύλου	Θερμαϊκός (Μακρύγιαλος και Χαλάστρα)		Μακρύγιαλος		Χαλάστρα		P-value
	N	%	N	%	N	%	
Proteobacteria	198931	53,7%	91580	62,3%	107351	48%	< 0.00001
Tenericutes	38736	10,5%	15062	8,3%	26498	11,8%	< 0.00001
Bacteroidetes	34807	9,4%	12238	10,3%	19745	8,8%	< 0.00001
Firmicutes	12694	3,4%	5012	3,4%	7682	3,4%	0.3907
Planctomycetes	12662	3,4%	2815	1,9%	9847	4,4%	< 0.00001
Verrucomicrobia	11114	3,0%	4161	2,8%	6953	3,1%	< 0.00001
Fusobacteria	6423	1,7%	358	0,2%	6366	2,8%	< 0.00001
Cyanobacteria	5119	1,4%	711	0,5%	4408	2%	< 0.00001
Λοιπά <1%	50042	13,5%	14977	10,2%	34764	15,5%	< 0.00001
Σύνολο	370528	100%	146914	100%	223614	100%	



Εικόνα 21: Η αφθονία των βακτηρίων ταξινομημένα σε επίπεδο φύλου, για το σύνολο του Θερμαϊκού κόλπου και με ποσοστό αφθονίας μεγαλύτερο του 1%

Για τη διερεύνηση της σχέσης των συνολικών αλληλουχιών (reads) για κάθε βακτηριακό πληθυσμό σε επίπεδο φύλου, μεταξύ των δύο περιοχών (Μακρύγιαλος και Χαλάστρα), εφαρμόστηκε ο έλεγχος ανεξαρτησίας χ^2 τεστ και η μέθοδος Z-score, για τον υπολογισμό της στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των δύο περιοχών, με επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$.

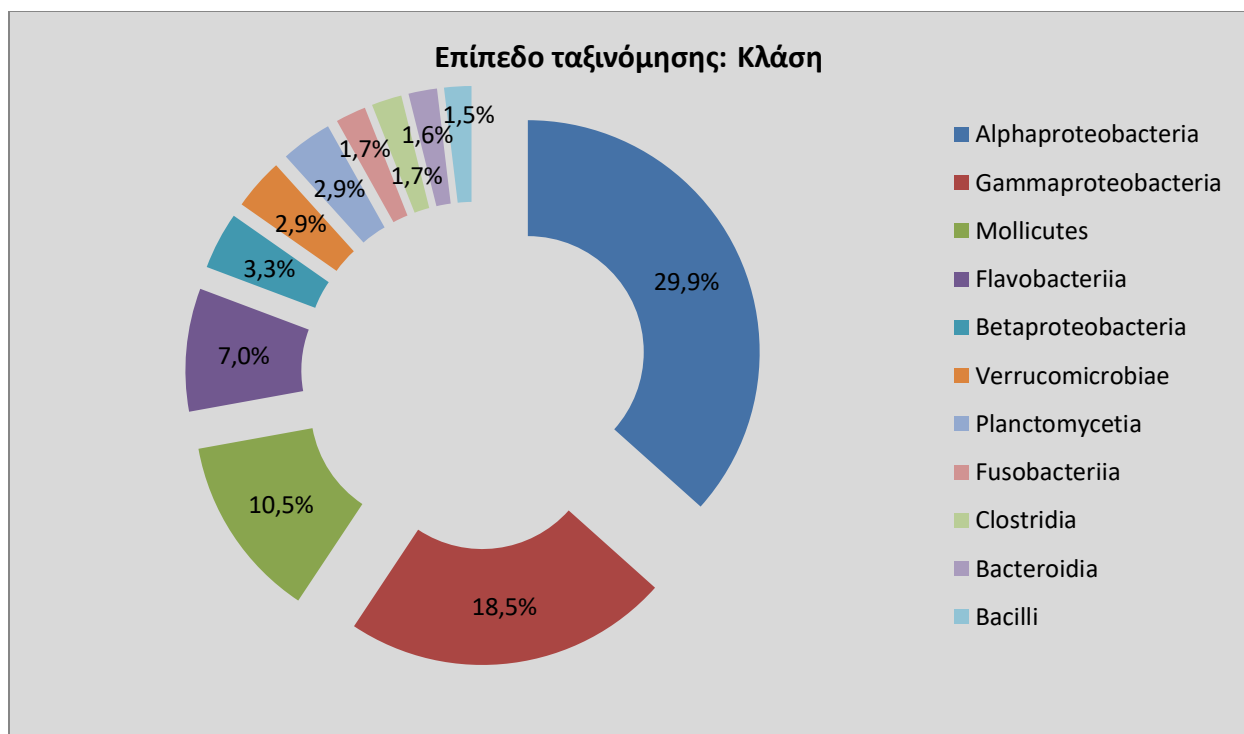
Από τον Πίνακα 13, βλέπουμε ότι οι διαφορές σε επίπεδο φύλου μεταξύ των περιοχών είναι στατιστικά σημαντικές, εκτός από το φύλο Firmicutes, όπου οι συνολικές αλληλουχίες (reads) δεν φαίνεται να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ της Χαλάστρας και του Μακρύγιαλου.

Σε επίπεδο κλάσης τα Alphaproteobacteria κυριαρχούν με ποσοστό 29,9%, ακολουθούν τα Gammaproteobacteria με 18,5%, Mollicutes με 10,5%, Flavobacteriia με 7,0%, Betaproteobacteria με 3,3%, και Verrucomicrobiae με 2,9%.

Πίνακας 14: Τα κυρίαρχα βακτήρια σε επίπεδο κλάσης με ποσοστό αφθονίας μεγαλύτερο του 1%, για το σύνολο του Θερμαϊκού κόλπου.

Επίπεδο κλάσης	Θερμαϊκός (Μακρύγιαλος και Χαλάστρα)		Μακρύγιαλος		Χαλάστρα		P-value
	N	%	N	%	N	%	
Alphaproteobacteria	110684	29,9%	70022	47,7%	40662	18,2%	< 0.00001
Gammaproteobacteria	68671	18,5%	17579	12,0%	51092	22,8%	< 0.00001
Mollicutes	38734	10,5%	12238	8,3%	26496	11,8%	< 0.00001
Flavobacteriia	25933	7,0%	12944	8,8%	12989	5,8%	< 0.00001
Betaproteobacteria	12058	3,3%	2300	1,6%	9758	4,4%	< 0.00001
Verrucomicrobiae	10862	2,9%	4058	2,8%	6804	3,0%	< 0.00001
Planctomycetia	10801	2,9%	2751	1,9%	8050	3,6%	< 0.00001
Fusobacteriia	6423	1,7%	57	0,04%	6366	2,8%	< 0.00001
Clostridia	6369	1,7%	3591	2,4%	2778	1,2%	< 0.00001
Bacteroidia	6013	1,6%	1531	1,0%	4482	2,0%	< 0.00001
Bacilli	5729	1,5%	1252	0,9%	4477	2,0%	< 0.00001
Epsilonproteobacteria	4508	1,2%	675	0,5%	3833	1,7%	< 0.00001
Λοιπά <1%	63743	17,2%	17916	12,2%	45827	20,5%	
Σύνολο	370528	100%	146914	100%	223614	100%	

* Όπου N είναι ο αριθμός των αλληλουχιών (reads)



Εικόνα 22: Η αφθονία των βακτηρίων με ποσοστό μεγαλύτερο του 1%, ταξινομημένα σε επίπεδο κλάσης, για το σύνολο του Θερμαϊκού κόλπου

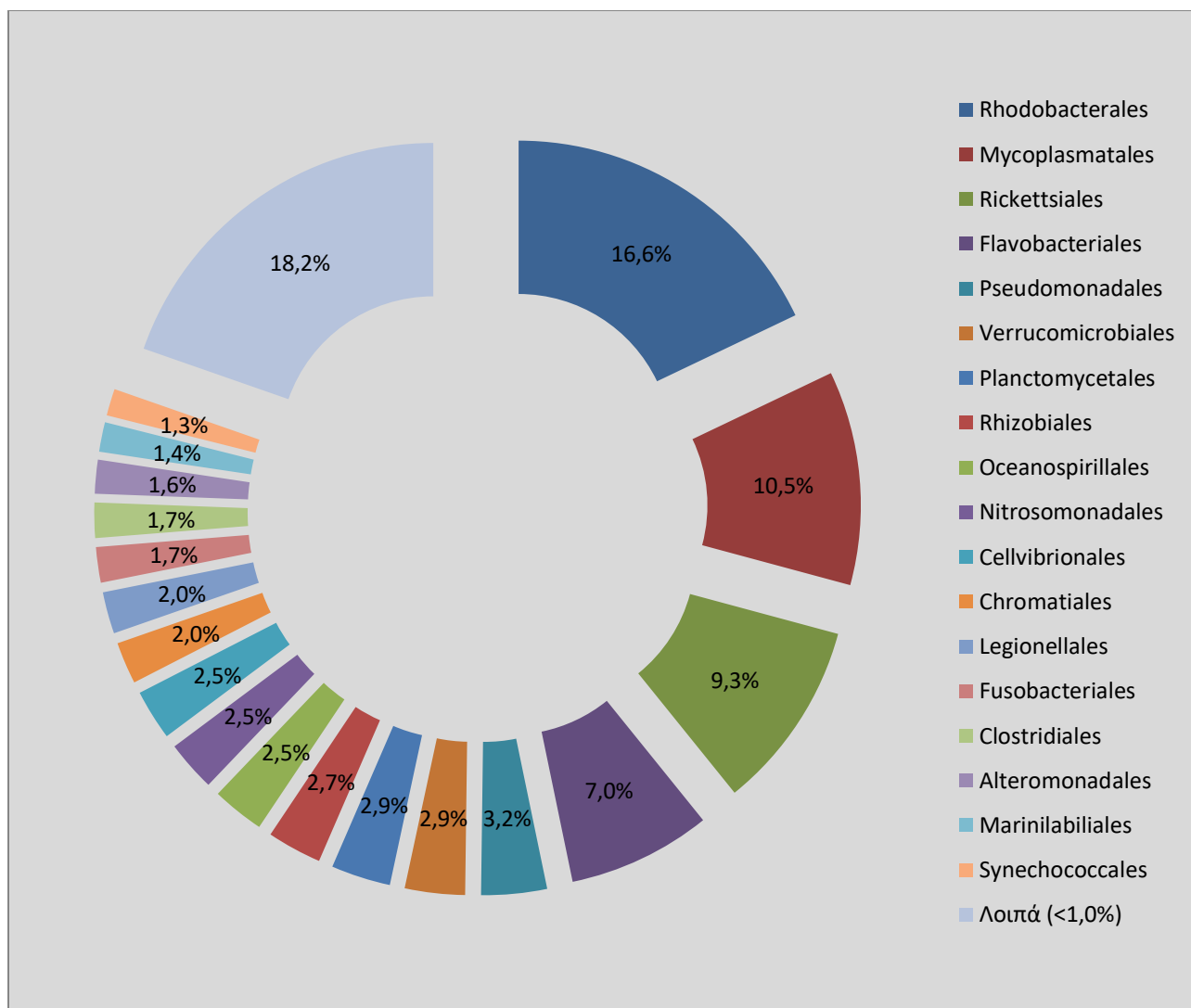
Σε επίπεδο **τάξης**, η σχετική αφθονία των συνολικών αλληλουχιών (classified reads) των βακτηρίων για τον Θερμαϊκό περιγράφεται στην Εικόνα 23 και στον Πίνακα 15. Τα κυρίαρχα είδη ανήκουν στις παρακάτω τάξεις: Rhodobacterales 16,59% (M: 20,5%, X: 14,0%), Mycoplasmatales 10,45% (M: 8,3%, X: 11,8%), Rickettsiales 9,26% (M: 21,4%, X: 1,3%), Flavobacteriales 7,00% (M: 8,8%, X: 5,8%), Pseudomonadales 3,20% (M: 0,8%, X: 4,8%), Verrucomicrobiales 2,93% (M: 2,8%, X: 3%), όπου M αναφέρεται στην περιοχή του Μακρύγιαλου και X της Χαλάστρας.

Πίνακας 15: Η ταξινόμηση σε επίπεδο τάξης, για τα βακτήρια με ποσοστό αφθονίας μεγαλύτερο του 1%

Επίπεδο Τάξης	Θερμαϊκός (Μακρύγιαλος και Χαλάστρα)		Μακρύγιαλος		Χαλάστρα		P-value
	N	%	N	%	N	%	
Rhodobacterales	61486	16,59%	30184	20,5%	31302	14%	< 0.00001
Mycoplasmatales	38732	10,45%	12238	8,3%	26494	11,8%	< 0.00001
Rickettsiales	34323	9,26%	31418	21,4%	2905	1,3%	< 0.00001

Flavobacteriales	25933	7,00%	12944	8,8%	12989	5,8%	< 0.00001
Pseudomonadales	11869	3,20%	1142	0,8%	10727	4,8%	< 0.00001
Verrucomicrobiales	10862	2,93%	4058	2,8%	6804	3%	< 0.00001
Planctomycetales	10767	2,91%	2737	1,9%	8030	3,6%	< 0.00001
Rhizobiales	9870	2,66%	5922	4%	3948	1,8%	< 0.00001
Oceanospirillales	9447	2,55%	5108	3,5%	4339	1,9%	< 0.00001
Nitrosomonadales	9138	2,47%	555	0,4%	8583	3,8%	< 0.00001
Cellvibrionales	9119	2,46%	1769	1,2%	7350	3,3%	< 0.00001
Chromatiales	7591	2,05%	1660	1,1%	5926	2,7%	< 0.00001
Legionellales	7554	2,04%	873	0,6%	6681	3%	< 0.00001
Fusobacteriales	6423	1,73%	57	<0.5%	6366	2,8%	< 0.00001
Clostridiales	6368	1,72%	3590	2,4%	2778	1,2%	< 0.00001
Alteromonadales	6108	1,65%	2182	1,5%	3926	1,8%	< 0.00001
Marinilabiliales	5343	1,44%	1478	1%	3865	1,7%	< 0.00001
Synechococcales	4865	1,31%	648	0,45%	4217	1,9%	< 0.00001
Λοιπά <1%	67475	18,21%	28351	19,3%	66384	29,7%	
Σύνολο	370528	100%	146914	100%	223614	100%	

Από τον Πίνακα 15 βλέπουμε ότι οι διαφορές μεταξύ των περιοχών είναι στατιστικά σημαντικές. Οι τάξεις που κυριαρχούν και στις δύο περιοχές του Θερμαϊκού είναι οι Rhodobacterales και Mycoplasmatales, ενώ για την τάξη Rickettsiales παρατηρείται μεγάλη διαφορά μεταξύ των δύο περιοχών. Αναλυτικά, στον Μακρύγιαλο έχει ποσοστό αφθονίας 21,4%, αρκετά μεγαλύτερο από το ποσοστό αφθονίας της Χαλάστρας (1,3%).



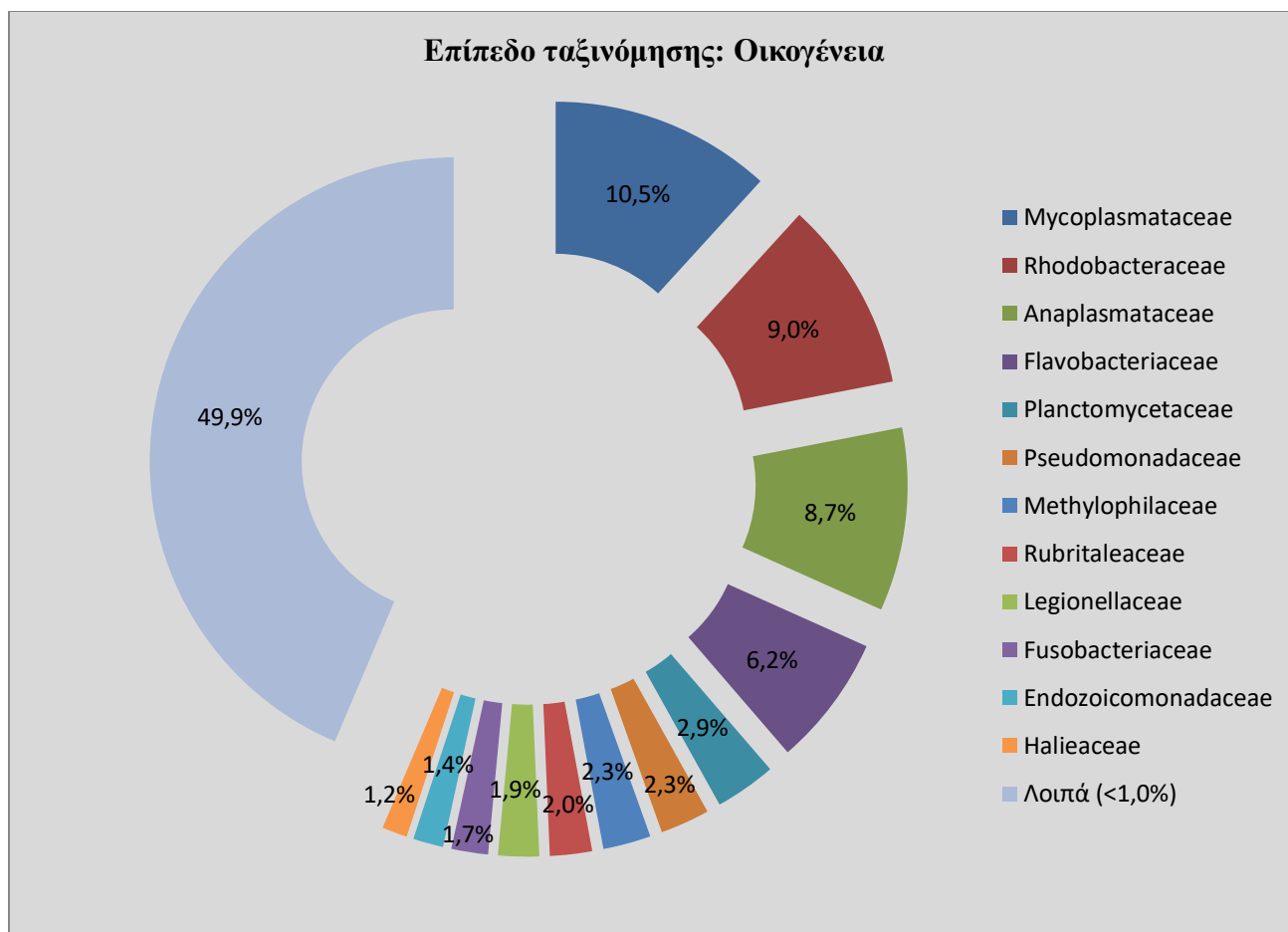
Εικόνα 23: Η αφθονία των βακτηρίων για το σύνολο του Θερμαϊκού κόλπου, ταξινομημένα σε επίπεδο τάξης

Στη συνέχεια, ακολουθούν τα αποτελέσματα από τα κυρίαρχα βακτήρια σε επίπεδο **οικογένειας** (family), για όλο τον Θερμαϊκό κόλπο και ανά περιοχή δειγματοληψίας (Πίνακας 16, Εικόνα 24). Οι οικογένειες που κυριαρχούν στον Θερμαϊκό είναι: Mycoplasmataceae 10,5% (M: 8,3%, X: 11,8%), Rhodobacteraceae 9,0% (M: 11,5%, X: 7,4%), Anaplasmataceae 8,7% (M: 21,2%, X: 0,1%), όπου M αναφέρεται στην περιοχή του Μακρύγιαλου και X της Χαλάστρας.

Πίνακας 16: Η ταξινόμηση σε επίπεδο οικογένειας, για τα βακτήρια με ποσοστό αφθονίας μεγαλύτερο του 1%. Η παράμετρος N δηλώνει τον αριθμό των reads για κάθε φύλο.

Επίπεδο Οικογένειας	Θερμαϊκός (Μακρύγιαλος και Χαλάστρα)		Μακρύγιαλος		Χαλάστρα		P-value
	N	%	N	%	N	%	
Mycoplasmataceae	38732	10,5%	12238	8,3%	26494	11,8%	< 0.00001
Rhodobacteraceae	33477	9,0%	16922	11,5%	16555	7,4%	< 0.00001
Anaplasmataceae	32084	8,7%	31148	21,2%	936	0,4%	< 0.00001
Flavobacteriaceae	22956	6,2%	12183	8,3%	10773	4,8%	< 0.00001
Planctomycetaceae	10659	2,9%	2646	1,8%	8013	3,6%	< 0.00001
Pseudomonadaceae	8630	2,3%	209	0,1%	8421	3,8%	< 0.00001
Methylophilaceae	8361	2,3%	388	0,3%	7973	3,6%	< 0.00001
Rubritaleaceae	7369	2,0%	2480	1,7%	4889	2,2%	< 0.00001
Legionellaceae	7154	1,9%	697	0,5%	6457	2,9%	< 0.00001
Fusobacteriaceae	6420	1,7%	55	<0,1%	6365	2,8%	< 0.00001
Endozoicomonadaceae	5292	1,4%	2468	1,7%	2824	1,3%	< 0.00001
Haliaceae	4426	1,2%	1234	0,8%	3192	1,4%	< 0.00001
Λοιπά <1%	184968	49,9%	59356	40,4%	120722	54%	
Σύνολο	370528	100%	146914	100%	223614	100%	

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 16, οι οικογένειες Mycoplasmataceae και Rhodobacteraceae κυριαρχούν και στις δύο περιοχές του Θερμαϊκού, αλλά η οικογένεια Anaplasmataceae υπερτερεί με μεγάλη διαφορά στο ποσοστό αφθονίας (21,2%) στον Μακρύγιαλο, σε σχέση με τη Χαλάστρα (0,4%).



Εικόνα 24: Η αφθονία των βακτηρίων για το σύνολο του Θερμαϊκού κόλπου, ταξινομημένα σε επίπεδο οικογένειας. Ακολουθεί η ανάλυση των βακτηριακών ομάδων σε επίπεδο γένους τόσο για τον κόλπο του Θερμαϊκού όσο και για κάθε περιοχή δειγματοληψίας ξεχωριστά και αποτυπώνονται στον Πίνακα 17 και στην Εικόνα 25. Τα κυρίαρχα βακτήρια σε επίπεδο γένους είναι: *Mycoplasma* 9,4% (M: 7,6%, X: 10,6%), *Anaplasma* 8,5% (M: 20,9%, X: 0,4%), *Mariniblastus* 2,7% (M: 1,6%, X: 3,4%), *Pseudomonas* 2,3% (M: 0,1%, X: 3,7%), όπου το M αναφέρεται στην περιοχή του Μακρύγιαλου και το X στην περιοχή της Χαλάστρας.

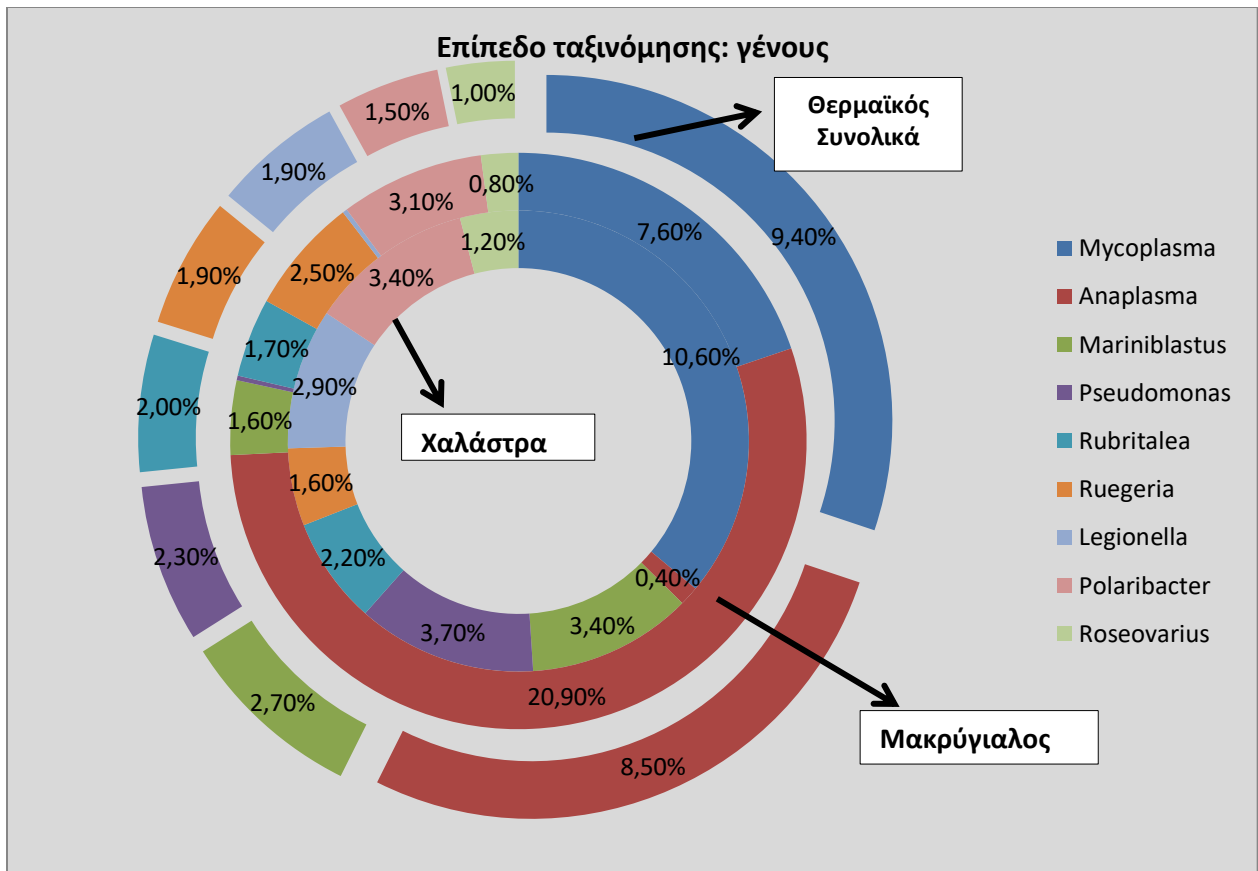
Πίνακας 17: Τα γένη βακτηρίων στον κόλπο του Θερμαϊκού και σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας ξεχωριστά, όπου N ο αριθμός των αλληλουχιών (reads) για κάθε είδος

Επίπεδο γένους	Θερμαϊκός (Μακρύγιαλος και Χαλάστρα)		Μακρύγιαλος		Χαλάστρα		P-value
	N	%	N	%	N	%	
Anaplasma	31622	8,5%	30707	20,90%	915	0,41%	< 0.00001
Mycoplasma	34756	9,4%	11149	7,59%	23607	10,56%	< 0.00001

Polaribacter	5554	1,5%	4519	3,08%	1035	0,46%	< 0.00001
Ruegeria	7224	1,9%	3628	2,47%	3596	1,61%	< 0.00001
Rubritalea	7369	2,0%	2480	1,69%	4889	2,19%	< 0.00001
Mariniblastus	9941	2,7%	2341	1,59%	7600	3,40%	< 0.00001
Tenacibaculum	3109	0,8%	2214	1,51%	895	0,40%	< 0.00001
Sulfurovum	2612	0,7%	338	0,23%	2274	1,02%	< 0.00001
Rickettsia	2170	0,6%	215	0,15%	1955	0,87%	< 0.00001
Sulfitobacter	3174	0,9%	2036	1,39%	1138	0,51%	< 0.00001
Pseudomonas	8528	2,3%	196	0,13%	8332	3,73%	< 0.00001
Aliiroseovarius	2579	0,7%	2036	1,39%	549	0,25%	< 0.00001
Clostridium	2208	0,6%	1676	1,14%	532	0,24%	< 0.00001
Kistimonas	2777	0,7%	1536	1,05%	1241	0,55%	< 0.00001
Roseovarius	3834	1,0%	1195	0,81%	2639	1,18%	< 0.00001
Vibrio	2779	0,8%	274	0,19%	2505	1,12%	< 0.00001
Amylibacter	1765	0,5%	740	0,50%	1025	0,46%	0.05
Legionella	7124	1,9%	684	0,47%	6440	2,88%	< 0.00001
Shewanella	1221	0,3%	42	0,03%	1179	0,53%	< 0.00001
Staphylococcus	1178	0,3%	26	0,02%	1152	0,52%	< 0.00001
Yersinia	1091	0,3%	53	0,04%	1038	0,46%	< 0.00001
Streptococcus	1653	0,4%	94	0,06%	1559	0,70%	< 0.00001
Psychrobacter	2521	0,7%	636	0,43%	1885	0,84%	< 0.00001
Endozoicomonas	1582	0,4%	630	0,43%	952	0,43%	< 0.00001
Winogradskyella	1893	0,5%	626	0,43%	1267	0,57%	< 0.00001
Λοιπά <1%	220264	59,4%	76100	51,80%	143526	64,18%	
Σύνολο	370528	100%	146914	100%	223614	100%	

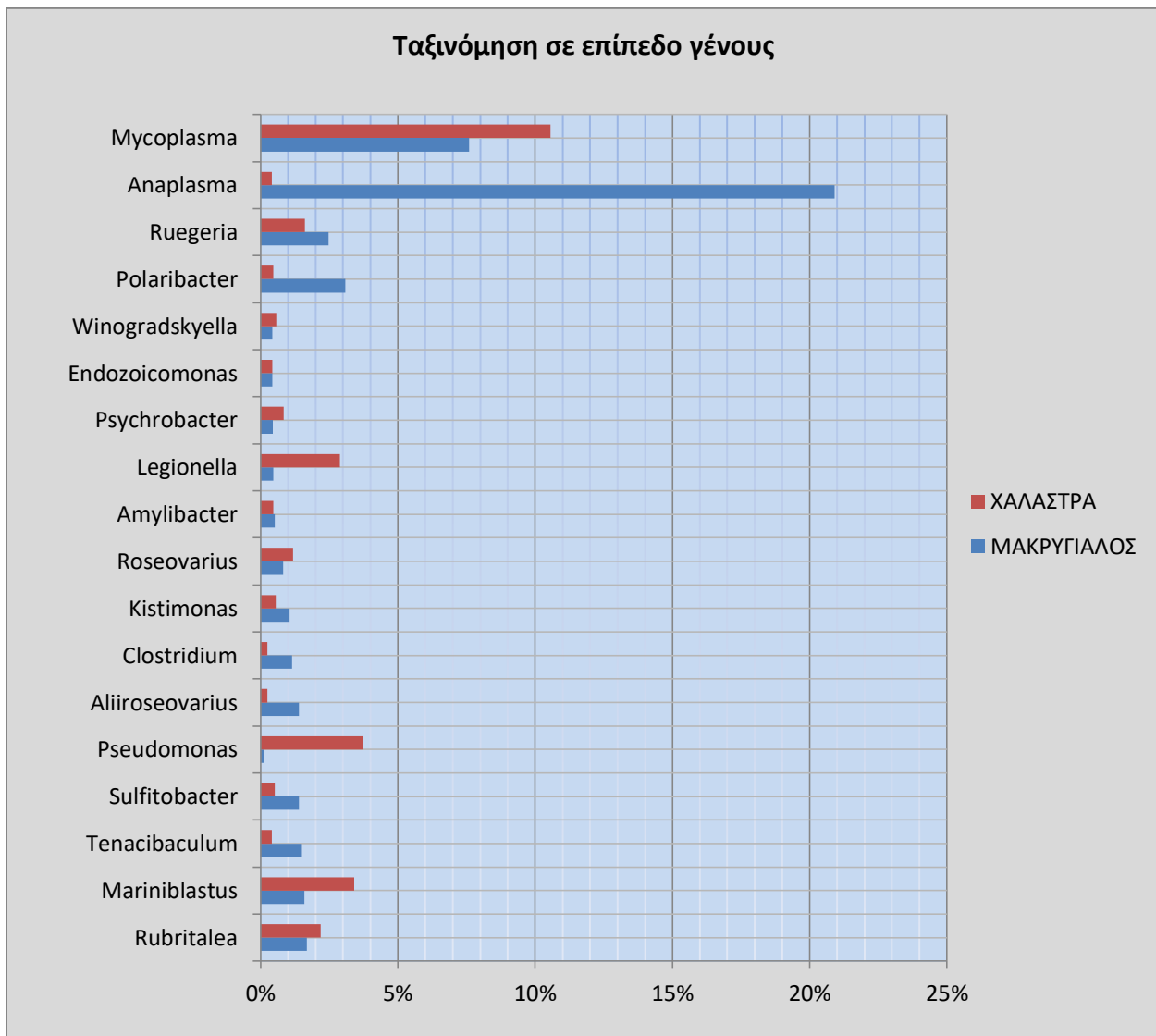
Από τον Πίνακα 17, βλέπουμε ότι οι διαφορές στα ποσοστά αφθονίας για τα γένη βακτηρίων μεταξύ των δύο περιοχών είναι στατιστικά σημαντικές, εκτός του γένους *Amylibacter* όπου το ποσοστό αφθονίας δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ του Μακρύγιαλου και της Χαλάστρας.

Όπως αποτυπώνεται και στην Εικόνα 25, το γένος *Mycoplasma* κυριαρχεί και στις δύο περιοχές του Θερμαϊκού, ενώ το γένος *Anaplasma* (20,9%) μόνο στην περιοχή του Μακρύγιαλου (μεσαίος κύκλος).



Εικόνα 255: Η αφθονία των βακτηρίων σε επίπεδο ταξινόμησης γένους, στον Θερμαϊκό κόλπο (εξωτερικός κύκλος), στον Μακρύγιαλο (μεσαίος κύκλος) και στη Χαλάστρα (εσωτερικός κύκλος). Αποτυπώνονται τα βακτήρια με ποσοστό αφθονίας πάνω από 1%.

Αντίστοιχα, στη Χαλάστρα σε επίπεδο γένους κυριαρχεί το *Mycoplasma* με ποσοστό 10,6% και ακολουθούν τα γένη *Mariniblastus* (3,4%) και *Pseudomonas* (3,7%).



Εικόνα 26: Τα γένη βακτηρίων για τις δύο περιοχές

Στο παραπάνω ραβδόγραμμα (Εικόνα 26), παρατηρείται η μεγάλη διαφορά στο ποσοστό αφθονίας για το γένος *Anaplasma* στον Μακρύγιαλο σε σχέση με τη Χαλάστρα, αλλά και η ύπαρξη μεγαλύτερου ποσοστού αφθονίας για τα γένη *Legionella* και *Pseudomonas* στη Χαλάστρα, έναντι του Μακρύγιαλου.

Για το μήνα **Δεκέμβριο**, κατά τον οποίο ελήφθησαν δείγματα από δύο διαφορετικά σημεία (Σ1Μ, Σ2Μ) της περιοχής του Μακρύγιαλου, παρατηρήθηκαν τα εξής κυρίαρχα γένη (Πίνακας 18, Εικόνα 27):

Πίνακας 18: Τα κυρίαρχα γένη για τα δύο σημεία δειγματοληψίας στην περιοχή του Μακρύγιαλου, για τον μήνα Δεκέμβριο, όπου N ο αριθμός των αλληλουχιών (reads) για κάθε είδος

Επίπεδο γένους	M1 (Σ1Μ)		M2 (Σ2Μ)		P-value
	N	%	N	%	
Polaribacter	1801	8,3%	2508	9%	0.00694
Rubritalea	1180	5,4%	759	2,7%	<0.00001
Aliiroseovarius	772	3,6%	1041	3,7%	0.30772
Ruegeria	730	3,4%	799	2,9%	0.00138
Clostridium	459	2,1%	360	1,3%	0.00001
Sulfitobacter	414	1,9%	635	2,3%	0.00466
Mycoplasma	382	1,8%	583	2,1%	0.00854
Tenacibaculum	248	1,1%	218	0,8%	<0.00001
Romboutsia	238	1,1%	80	0,1%	<0.00001
Psychrobacter	100	0,2%	371	1,3%	<0.00001
Λοιπά <1%	15404	71,1%	20202	73,8%	
ΣΥΝΟΛΟ	21702	100%	27905	100%	



Εικόνα 27: Τα κυρίαρχα γένη στον Μακρύγιαλο για τον μήνα Δεκέμβριο

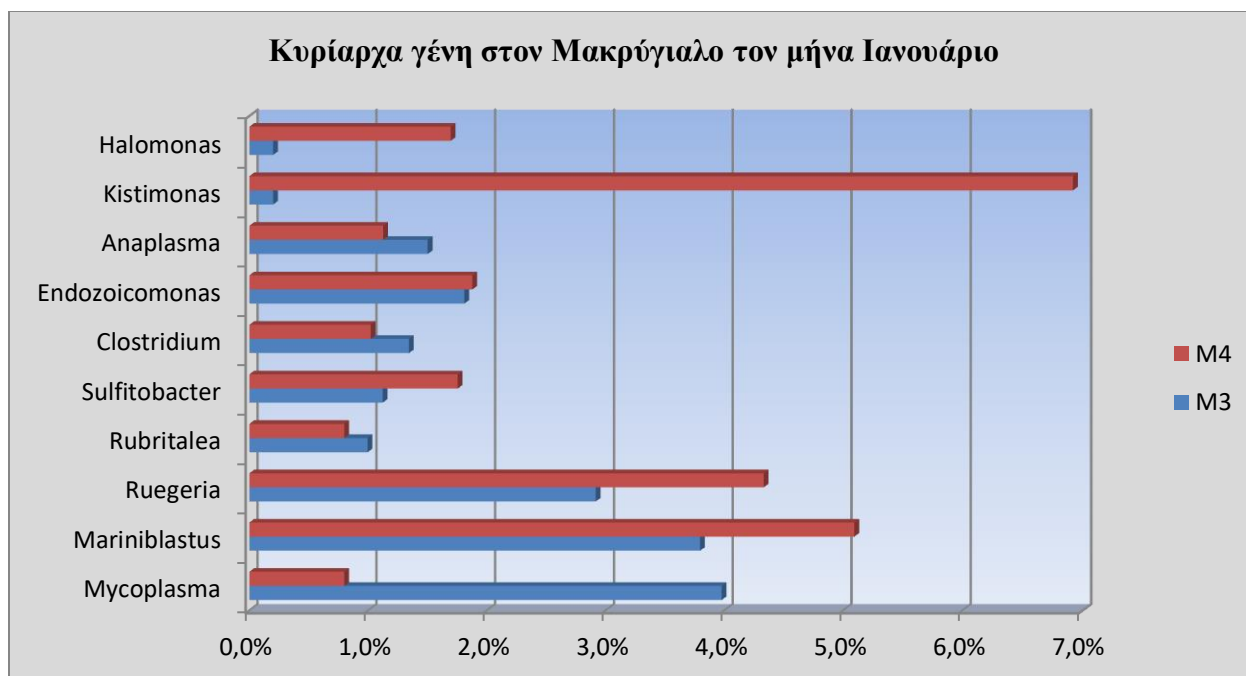
Από τον Πίνακα 18, βλέπουμε ότι οι διαφορές μεταξύ των δύο σημείων είναι στατιστικά σημαντικές για όλα τα βακτήρια εκτός του γένους *Aliiroseovarius*, όπου το ποσοστό αφθονίας δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά για τα δύο σημεία (Σ1Μ και Σ2Μ). Ωστόσο και στα δύο σημεία δειγματοληψίας κυριαρχούν τα ίδια γένη βακτηρίων, με κυρίαρχα τα γένη *Ruegeria*, *Rubritalea*, *Aliiroseovarius* και *Polaribacter*.

Για τον μήνα Ιανουάριο, ελήφθησαν δείγματα από δύο διαφορετικά σημεία (Σ1Μ, Σ2Μ) της περιοχής του Μακρύγιαλου, και παρατηρήθηκαν τα εξής κυρίαρχα γένη (Πίνακας 19, Εικόνα 28):

Πίνακας 19: Τα κυρίαρχα γένη για τα δύο σημεία δειγματοληψίας στην περιοχή του Μακρύγιαλου, για τον μήνα Ιανουάριο

Επίπεδο γένους	M3 (Σ1M)		M4 (Σ2M)		P-value
	N	%	N	%	
<i>Mycoplasma</i>	503	4,0%	140	6,9%	<0.00001
<i>Mariniblastus</i>	480	3,8%	868	5,1%	<0.00001
<i>Ruegeria</i>	369	2,9%	738	4,3%	<0.00001
<i>Rubritalea</i>	126	1,0%	20	0,8%	<0.00001
<i>Sulfitobacter</i>	142	1,1%	299	1,8%	<0.00001
<i>Clostridium</i>	170	1,3%	174	1,0%	<0.00001
<i>Endozoicomonas</i>	229	1,8%	320	1,9%	0,667
<i>Anaplasma</i>	190	1,5%	192	1,1%	0,004
<i>Kistimonas</i>	21	0,2%	1179	6,9%	<0.00001
<i>Halomonas</i>	101	0,8%	289	1,7%	<0.00001
Λοιπά <1%	10349	81,8%	12456	73,1%	
ΣΥΝΟΛΟ	12646	100%	17038		

Στον Πίνακα 19, παρατηρούμε ότι οι διαφορές μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών, μεταξύ των δύο σημείων είναι στατιστικά σημαντικές για όλα τα βακτήρια εκτός του γένους *Endozoicomonas*, για το οποίο το ποσοστό αφθονίας δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά για τα δύο σημεία (Σ1M και Σ2M). Στην Εικόνα 28 εμφανίζονται ταξινομημένα σε επίπεδο γένους, με βάση το ποσοστό αφθονίας των βακτηριακών πληθυσμών. Όπως φαίνεται και από το ραβδόγραμμα της Εικόνας 28, στο σημείο Σ1M (δείγμα M3) υπερτερεί το γένος *Mycoplasma*, ενώ στο σημείο Σ2M (δείγμα M4) υπερτερεί το γένος *Kistimonas*.



Εικόνα 28: Τα κυρίαρχα γένη στον Μακρύγιαλο, για τον μήνα Ιανουάριο

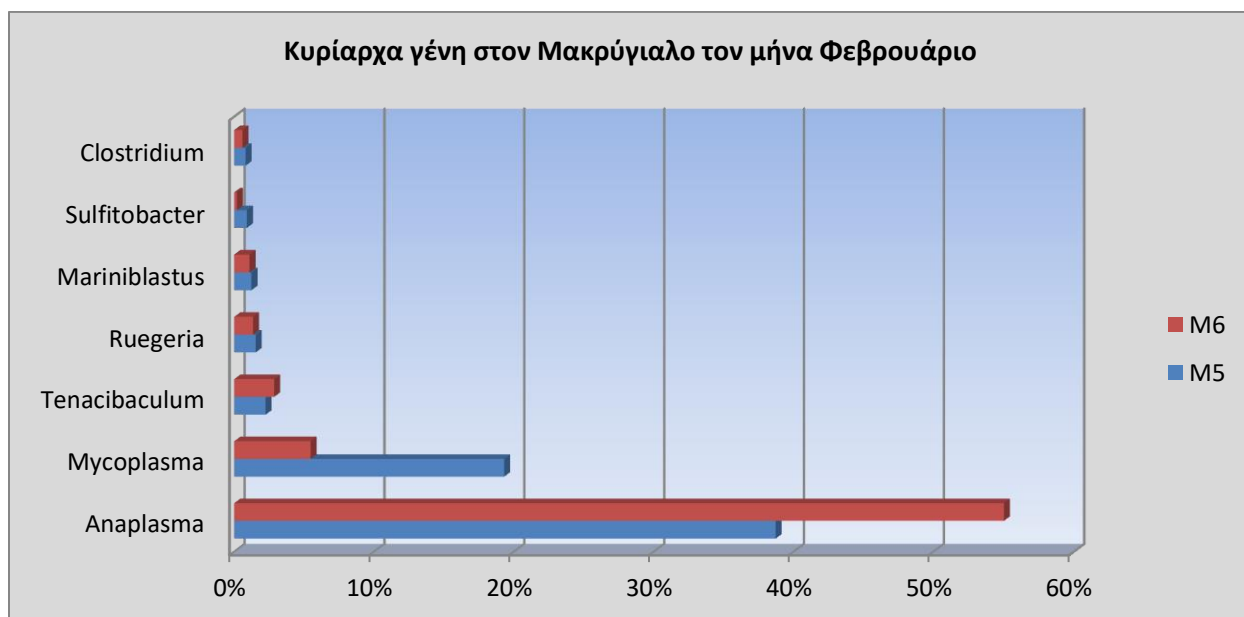
Για τον μήνα **Φεβρουάριο**, ελήφθησαν δείγματα από δύο διαφορετικά σημεία (Σ1Μ, Σ2Μ) της περιοχής του Μακρύγιαλου, και παρατηρήθηκαν τα εξής κυρίαρχα γένη (Πίνακας 20):

Πίνακας 20: Τα κυρίαρχα γένη για τα δύο σημεία δειγματοληψίας (Σ1Μ, Σ2Μ), στην περιοχή του Μακρύγιαλου, για τον μήνα Φεβρουάριο

Επίπεδο γένους	M5 (Σ1Μ)		M6 (Σ2Μ)		P-value
	N	%	N	%	
Anaplasma	16351	38,7%	13974	55%	<0.00001
Mycoplasma	8153	19,3%	1388	5,5%	<0.00001
Tenacibaculum	948	2,2%	725	2,9%	<0.00001
Ruegeria	649	1,5%	343	1,4%	<0.00001
Mariniblastus	523	1,2%	280	1,1%	<0.00001
Sulfitobacter	385	0,9%	161	0,6%	<0.00001
Clostridium	348	0,8%	165	0,6%	<0.00001
Λοιπά <1%	14869	35,4%	8361	32,9%	
ΣΥΝΟΛΟ	42226	100%	25397	100%	

Από τον Πίνακα 20, βλέπουμε ότι οι διαφορές μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών μεταξύ των δύο σημείων, είναι στατιστικά σημαντικές για όλα τα βακτήρια. Στην Εικόνα 29, εμφανίζονται

ταξινομημένα σε επίπεδο γένους, με βάση το ποσοστό αφθονίας των βακτηριακών πληθυσμών, όπου παρατηρείται μεγάλο ποσοστό του γένους *Anaplasma* και για τα δύο σημεία, και ακολουθεί το γένος *Mycoplasma*.



Εικόνα 29: Τα κυρίαρχα γένη στον Μακρύγιαλο για τον μήνα Φεβρουάριο

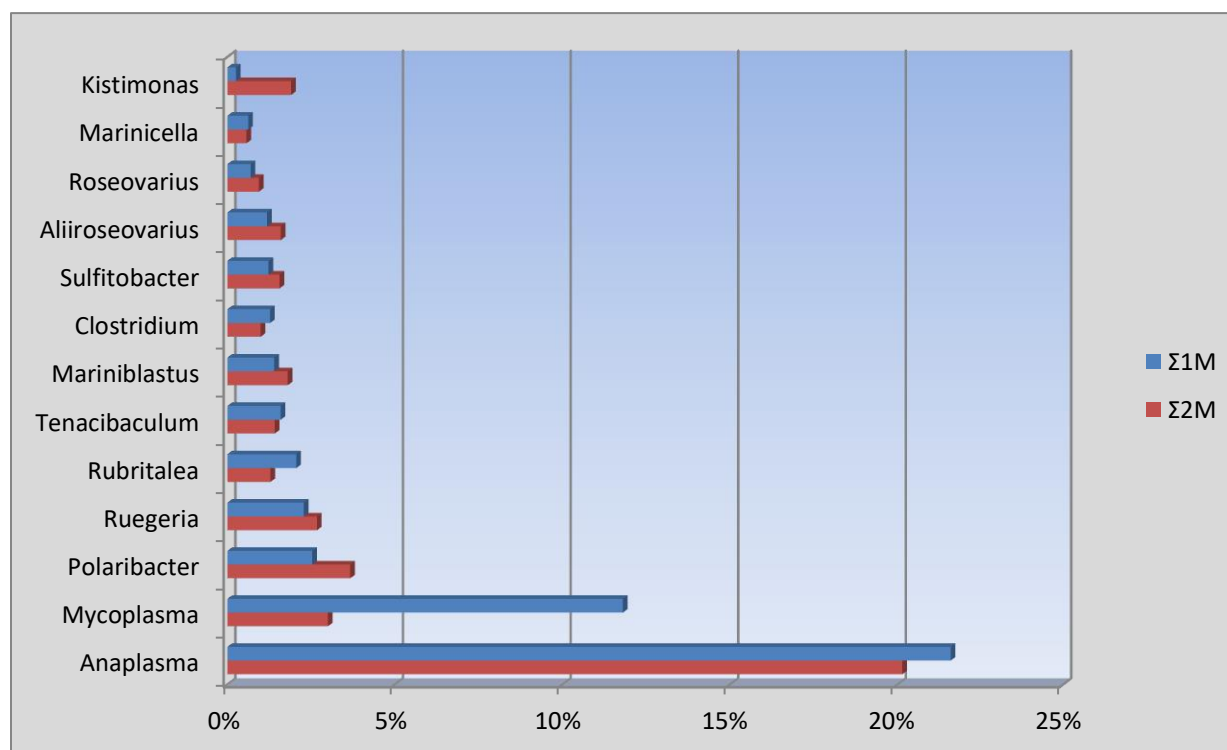
Συνολικά, στην περιοχή του Μακρύγιαλου, ελήφθησαν 6 δείγματα, τρία από το σημείο Σ1Μ και τρία από το σημείο Σ2Μ, σε διάστημα τριών μηνών. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 21, τα κυρίαρχα γένη βακτηρίων που αναλύθηκαν, εντοπίστηκαν εξίσου και στα δύο σημεία δειγματοληψίας, αλλά διαφέρουν ως προς το ποσοστό αφθονίας.

Πίνακας 21: Τα κυρίαρχα γένη για τα δύο σημεία δειγματοληψίας (Σ1Μ, Σ2Μ) συνολικά (Δεκέμβριος-Φεβρουάριος), στην περιοχή του Μακρύγιαλου

Επίπεδο γένους	Σ1Μ		Σ2Μ		P-value
	N	%	N	%	
Anaplasma	16541	21,6%	14166	20,1%	<0.00001
Mycoplasma	9038	11,8%	2111	3,0%	<0.00001
Polaribacter	1940	2,5%	2579	3,7%	<0.00001
Ruegeria	1748	2,3%	1880	2,7%	<0.00001
Rubritalea	1575	2,1%	905	1,3%	<0.00001
Tenacibaculum	1219	1,6%	995	1,4%	<0.00001
Mariniblastus	1072	1,4%	1269	1,8%	<0.00001

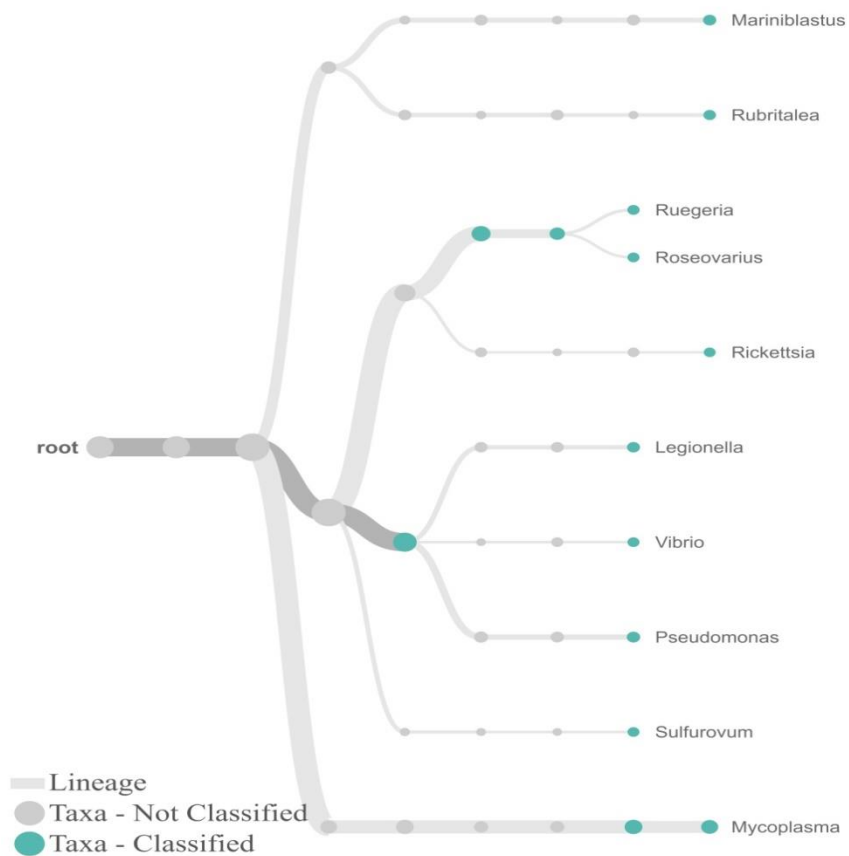
Clostridium	977	1,3%	699	1,0%	<0.00001
Sulfitobacter	941	1,2%	1095	1,6%	<0.00001
Aliiroseovarius	908	1,2%	1122	1,6%	<0.00001
Roseovarius	533	0,7%	662	0,9%	<0.00001
Marinicella	478	0,6%	400	0,6%	<0.00001
Kistimonas	197	0,3%	1339	1,9%	<0.00001
Λοιπά <0,5%	39407	51,5%	41118	58,5%	
ΣΥΝΟΛΟ	76574	100%	70340	100%	

Η στατιστική επεξεργασία έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα ποσοστά αφθονίας των κυρίαρχων γενών βακτηρίων, αλλά όπως διαπιστώθηκε υπάρχει ομοιογένεια ως προς το γένος των βακτηρίων με ποσοστό αφθονίας μεγαλύτερο του 1%. Όπως αποτυπώνεται και στην Εικόνα 30, το *Anaplasma* κυριαρχεί και στα δύο σημεία δειγματοληψίας, και ακολουθούν το *Mycoplasma* για το σημείο Σ1Μ και το *Polaribacter* για το σημείο Σ2Μ.



Εικόνα 30: Τα κυρίαρχα γένη στα 2 σημεία δειγματοληψίας (Σ1Μ, Σ2Μ) συνολικά (Δεκέμβριος-Φεβρουάριος), της περιοχής του Μακρύγαλου

Στην περιοχή της Χαλάστρας, τον μήνα Φεβρουάριο, ελήφθησαν δείγματα από τρία διαφορετικά σημεία (Σ1Χ, Σ2Χ, Σ3Χ), και παρατηρήθηκαν τα εξής κυρίαρχα γένη (Εικόνα 31, Πίνακας 22):



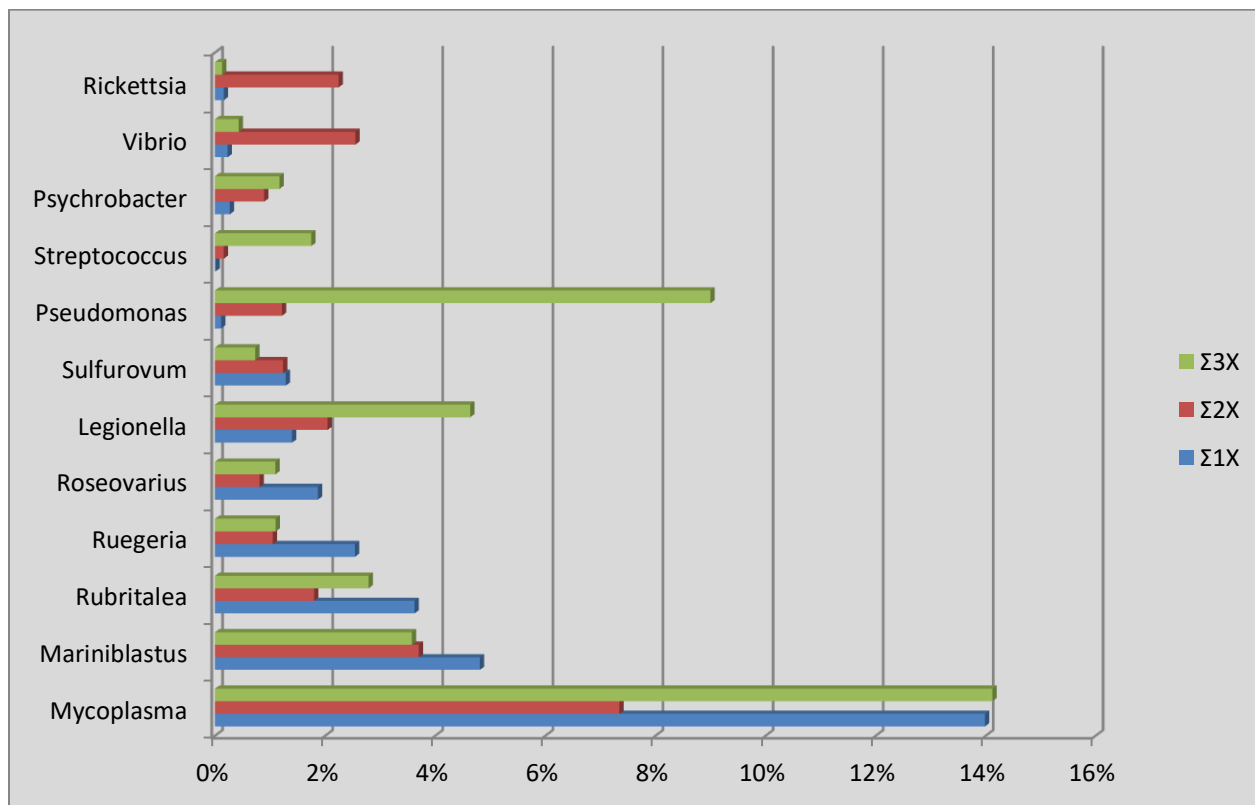
Εικόνα 31: Ταξινομικό δέντρο βακτηρίων σε επίπεδο γένους, με minimum abundance cutoff 1%, της περιοχής της Χαλάστρας, για τον μήνα Φεβρουάριο (πηγή EPI2ME)

Πίνακας 22: Τα κυρίαρχα γένη για τα τρία σημεία δειγματοληψίας (Σ1Χ, Σ2Χ, Σ3Χ), στην περιοχή της Χαλάστρας, για τον μήνα Φεβρουάριο

Επίπεδο γένους	Σ1Χ		Σ2Χ		Σ3Χ		P-value		
	N	%	N	%	N	%	Σ1Χ-Σ2Χ	Σ1Χ-Σ3Χ	Σ2Χ-Σ3Χ
Mycoplasma	12904	13,99%	5581	7,35%	11520	14,12%	<0.0001	0.42372	<0.0001
Mariniblastus	4439	4,81%	2814	3,70%	2918	3,58%	<0.0001	<0.0001	0.18024
Rubritalea	3342	3,62%	1366	1,80%	2276	2,79%	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Ruegeria	2345	2,54%	798	1,05%	894	1,10%	<0.0001	<0.0001	0.37886
Roseovarius	1723	1,87%	612	0,81%	894	1,10%	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Legionella	1292	1,40%	1553	2,04%	3781	4,64%	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Sulfurovum	1186	1,29%	941	1,24%	596	0,73%	0.38978	<0.0001	<0.0001
Pseudomonas	97	0,11%	923	1,21%	7312	8,96%	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Streptococcus	13	0,01%	119	0,16%	1427	1,75%	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Psychrobacter	249	0,27%	679	0,89%	957	1,17%	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Vibrio	216	0,23%	1938	2,55%	351	0,43%	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Rickettsia	146	0,16%	1704	2,24%	105	0,13%	<0.0001	0.10524	<0.0001
Λοιπά <1%	62317	69,7%	56942	75%	48543	59,5%			
ΣΥΝΟΛΟ	92246	100%	75970	100%	81574	100%			

Τα κυρίαρχα γένη για τα σημεία Σ1Χ, Σ2Χ και Σ3Χ είναι το *Mycoplasma*, ακολουθεί το *Mariniblastus* για τα σημεία Σ1Χ, Σ2Χ, ενώ αντίστοιχα στο σημείο Σ3Χ ακολουθούν τα γένη *Pseudomonas* και *Legionella*, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της Εικόνας 32. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο σημείο δειγματοληψίας Σ2Χ, καταγράφηκε το μεγαλύτερο ποσοστό του γένους *Vibrio*. Φαίνεται, από τα στατιστικά αποτελέσματα, ότι τα γένη *Mycoplasma* και *Rickettsia* κατέχουν τα ίδια ποσοστά αφθονίας στα σημεία Σ1Χ και Σ3Χ, όπως αντίστοιχα τα γένη *Mariniblastus* και *Ruegeria* στα σημεία Σ2Χ και Σ3Χ ($p>0.05$). Μη στατιστικά σημαντική είναι και η διαφορά στα ποσοστά αφθονίας για το γένος *Sulfurovum* ($p=0.38978$) στα σημεία Σ1Χ και Σ2Χ της Χαλάστρας.



Εικόνα 32: Τα κυρίαρχα γένη στα 3 σημεία δειγματοληψίας της περιοχής της Χαλάστρας, τον μήνα Φεβρουάριο

4 Συζήτηση

Κατά μήκος της παράκτιας ζώνης του Θερμαϊκού κόλπου, παράγεται το μεγαλύτερο μέρος των ελληνικών μυδιών (περίπου 20.000 τόνοι ετησίως) και οι περιοχές της Χαλάστρας και του Μακρύγιαλου αποτελούν τις κύριες ζώνες παραγωγής της Βόρειας Ελλάδας. Η μυδοκαλλιέργεια είναι μια σημαντική δραστηριότητα για την τοπική, αλλά και για την εθνική οικονομία, καθώς μεγάλο ποσοστό των μυδιών που παράγεται, εξάγεται σε πολλές χώρες. Τα εκτρεφόμενα μύδια του Θερμαϊκού αναπτύσσονται γρήγορα και φτάνουν στο επιθυμητό μέγεθος για κατανάλωση σε λιγότερο από εννέα μήνες, λόγω της παρουσίας πολλών θρεπτικών συστατικών, από τα ποτάμια που εισρέουν στον Θερμαϊκό κόλπο. Ωστόσο, παρά το μεγάλο οικονομικό όφελος για την εθνική οικονομία, δεν έχουν διεξαχθεί μελέτες για την ταυτοποίηση του μικροβιώματος του είδους *Mytilus galloprovincialis* στην περιοχή του Θερμαϊκού, με τεχνικές Αλληλούχησης Επόμενης Γενιάς (NGS). Στην παρούσα εργασία, η ανάλυση του μικροβιώματος έγινε με τις σύγχρονες μεθόδους αλληλούχησης Τρίτης Γενιάς (Oxford Nanopore Technologies), όπου διαπιστώθηκε η μεγάλη έκταση της δυναμικής που δύναται να φέρουν οι μικροβιακές κοινότητες. Παρακάτω, θα συζητηθούν τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, σε σχέση και με παρόμοιες αναλύσεις που έχουν διεξαχθεί από άλλους ερευνητές.

Η τεχνική για τον προσδιορισμό του Πλέον Πιθανού Αριθμού (MPN) έδειξε την άριστη υγειονομική κατάσταση των μυδιών, και την πολύ χαμηλή έκθεσή τους σε κοπρανώδη ρύπανση (Πίνακας 11), παρά το γεγονός ότι ο Θερμαϊκός κόλπος αποτελεί επιβαρυσμένη θαλάσσια περιοχή. Σύμφωνα με το Φυτιανό (2009) εντοπίζονται πέντε εστίες ρύπανσης των νερών του Θερμαϊκού κόλπου. Οι τρεις εστίες βρίσκονται στις δυτικές ακτές του κόλπου και εντοπίζονται στα σημεία εκβολών των ποταμών και των καναλιών που εκβάλουν στον κόλπο. Οι άλλες δύο αφορούν την περιοχή δυτικά των λιμενικών εγκαταστάσεων της Θεσσαλονίκης (Καλοχώρι, παλιά βυρσοδεψεία, Βιολογικός κλπ), και την περιοχή πριν τον αερολιμένα. Η καλή ρευματική κυκλοφορία του κόλπου συντελεί στην αραιώση και διάχυση των μολυσματικών ουσιών στο ευρύτερο θαλάσσιο περιβάλλον του κόλπου. Αυτό διαπιστώνεται στην παρούσα εργασία, τόσο με το αποτέλεσμα του δείκτη μόλυνσης με *E. coli* με την τεχνική του Πλέον Πιθανού Αριθμού (MPN), αλλά και με την τεχνική Αλληλούχησης Νέας Γενιάς (NGS), όπου οι αλληλουχίες που ταυτοποιούν την οικογένεια Enterobacteriaceae και το είδος *E. coli* είναι λιγότερες από 0,01%, στο σύνολο των ταξινομημένων αλληλουχιών.

Παράλληλα, τα μύδια ελέγχθηκαν για την παρουσία του γένους *Salmonella spp.*, με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο κεφ. 2.4., όπου δεν ανιχνεύτηκε το παραπάνω γένος σε κανένα δείγμα που εξετάστηκε. Την υγειονομική ασφάλεια για την κατανάλωση των μυδιών, επιβεβαιώνει και το αποτέλεσμα από την παρούσα ανάλυση του μικροβιώματος με NGS, όπου δεν καταγράφηκαν αλληλουχίες που αντιστοιχούν στο γένος *Salmonella spp.*.

Όπως φαίνεται και από την περιγραφή της τεχνικής ανίχνευσης της παρουσίας *Salmonella spp.* στο κεφάλαιο 2.4, ο συνολικός χρόνος που απαιτείται μέχρι την ταυτοποίηση του στελέχους είναι 5 ημέρες. Συγκεκριμένα, απαιτούνται 4 ημέρες έως την πρώτη εκτίμηση ύπαρξης *Salmonella spp.*, με βάση τη δημιουργία των αποικιών στα υποστρώματα (που σε περίπτωση ασθενούς ανάπτυξης τυπικών αποικιών η επώαση παρατείνεται για ακόμη 48 ώρες), και μία ακόμη ημέρα για την ταυτοποίηση του στελέχους. Η ταχεία μέθοδος εξέτασης που επιφέρει η τεχνική NGS, σε σχέση με την συμβατική καλλιέργεια για την ανίχνευση *Salmonella spp.*, είναι καθοριστικής σημασίας για τρόφιμα ευαλλοίωτα που πρέπει να ελεγχθούν άμεσα από τις αρχές ή από τα εργοστάσια πριν διατεθούν στην κατανάλωση, όπως υποστηρίζει και εργασία των Tatsika et al. (2019). Το γρήγορο αποτέλεσμα που παρέχουν οι τεχνολογίες NGS μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην επιδημιολογική έρευνα για την αναγνώριση της πηγής τροφολοιμώσεων, με τη γρήγορη εξακρίβωση όμοιων στελεχών μεταξύ των ασθενών και των ύποπτων τροφίμων, όπως ήδη έχει περιγραφεί και από δημοσιευμένες εργασίες (Forbes et al., 2017; Li et al., 2019; Yu et al., 2020).

Τα τελευταία χρόνια, έχει παρατηρηθεί ταχεία εξέλιξη στις μεθόδους ταυτοποίησης του μικροβιώματος, με τεχνικές αλληλούχησης επόμενης γενιάς, οι οποίες έχουν το πλεονέκτημα να ανιχνεύουν ένα ευρύ φάσμα του μικροβιώματος και όχι μόνο εκείνους τους μικροοργανισμούς που εντοπίζονται μέσω της καλλιέργειας, και παράλληλα να δίνουν αποτελέσματα υψηλής ακρίβειας. Διάφορες έρευνες έχουν εφαρμόσει τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS) για την μελέτη του μικροβιώματος των μυδιών, ανά τον κόσμο. Η έρευνα των Bozcal & Dagdeviren (2020) για την ταυτοποίηση του μικροβιώματος του είδους *Mytilus galloprovincialis*, πραγματοποιήθηκε με την χρήση της τεχνολογίας αλληλούχησης Δεύτερης Γενιάς (Illumina 16S αλληλούχηση), στοχεύοντας στις υπερμεταβλητές περιοχές V3-V4 του βακτηριακού γονιδίου 16S rRNA. Αντίστοιχη μελέτη διεξήγαγαν και οι Musella et al. (2020), οι οποίοι ανέλυσαν με την ίδια τεχνολογία τις ίδιες περιοχές του 16S rRNA γονιδίου, όπως επίσης και οι Wathsala et al. (2021) οι οποίοι, ωστόσο, επικεντρώθηκαν μόνο στο μικροβίωμα του πεπτικού αδένου του

μυδιού. Οι Auguste et al. (2019; 2020) και Balbi et al. (2020) μελέτησαν το μικροβίωμα του μυδιού, μέσω της υπερμεταβλητής περιοχής V4 (αλληλούχηση στην πλατφόρμα Ion Torrent). Μια άλλη τεχνική που εφαρμόστηκε σε προηγούμενη έρευνα, είναι με τη χρήση της πλατφόρμας Roche 454's pyrosequencing, την οποία εφάρμοσαν οι Vezzuli et al. (2017) στην υπερμεταβλητή περιοχή V6, για την ανάλυση του μικροβιώματος της αιμολέμφου και του πεπτικού αδένου του μυδιού.

Στις προηγούμενες έρευνες που αναφέρθηκαν (Balbi et al., 2020; Bozcal & Dagdeviren, 2020; Musella et al., 2020; Auguste et al., 2019; 2020; Vezzuli et al., 2017), οι υπερμεταβλητές περιοχές αντιπροσωπεύουν ένα μικρό τμήμα του 16S rRNA γονιδίου, το οποίο αντιστοιχεί σε έως 460 bp. Στην τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα (long-read αλληλούχηση της εταιρείας Oxford Nanopore Technologies) αλληλουχείται ολόκληρο το γονίδιο, μήκους ~1600 bp που περιλαμβάνει τις υπερμεταβλητές περιοχές V1-V9. Η διαφορά έγκειται στο ότι η ανάγνωση μεγαλύτερου αριθμού βάσεων επιφέρει και βαθύτερη ταξινομική διάκριση (μέχρι και σε επίπεδο είδους), με μοναδικό μειονέκτημα την ελαχίστως μικρότερη ακρίβεια ανάγνωσης των αλληλουχιών (97,5%-98%).

Η αναλογία ταξινομημένων και μη ταξινομημένων αλληλουχιών στην παρούσα έρευνα έδειξε ότι η πλειοψηφία των αλληλουχιών ανήκει στα μη ταξινομημένα, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στην αδυναμία του χρησιμοποιούμενου kit να απομονώσει μόνο το βακτηριακό DNA και παράλληλα στην αδυναμία απομάκρυνσης του γενετικού υλικού του μυδιού (DNA ξενιστή). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι χρησιμοποιηθέντες εκκινητές να ενισχύουν και το γονίδιο 16S rRNA του μιτοχονδριακού DNA του μυδιού. Το ίδιο ζήτημα παρατηρήθηκε και στις μελέτες των Bozcal & Dagdeviren (2020) και Vezzuli et al. (2017), παρά τη χρήση διαφορετικών kit εξαγωγής βακτηριακού DNA. Η αδυναμία ολικής απομόνωσης του βακτηριακού DNA ενδεχομένως να οφείλεται σε απουσία εξειδικευμένων kit, ή και μεθοδολογιών/πρωτοκόλλων απομόνωσης βακτηριακού DNA από δίθυρα μαλάκια. Ένας άλλος παράγοντας που πιθανόν να ευθύνεται για το μεγάλο ποσοστό μη ταξινομημένων αλληλουχιών είναι η πληθώρα μικροβιακών κοινοτήτων, ιδίως από το θαλάσσιο οικοσύστημα, που δεν έχουν καταγραφεί και καταχωρηθεί στις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων, και έτσι δεν μπόρεσαν να ταυτοποιηθούν κατά την βιοπληροφορική ανάλυση.

Παρ' όλα αυτά, η επιτυχημένη έκβαση της ανάλυσης στη βάση των ταξινομημένων αλληλουχιών φαίνεται ξεκάθαρα στην καμπύλη alpha-rarefaction, η οποία παρουσιάζεται στην

Εικόνα 20. Η καμπύλη φαίνεται να αναπτύσσεται ταχεία με εκθετικό τρόπο, καθώς ταυτοποιούνται τα πιο κοινά είδη με μικρό αριθμό αλληλουχιών (5.000-10.000). Έπειτα, παρατηρείται σταδιακή σταθεροποίηση της καμπύλης, καθώς εντοπίζονται τα λιγότερο συχνά είδη (μικρό ποσοστό στον βακτηριακό πληθυσμό). Οι καμπύλες alpha-rarefaction καταλήγουν να φτάνουν σε κορεσμό, υποδηλώνοντας ικανοποιητικό βάθος αλληλούχησης (sequencing depth) των δειγμάτων, το οποίο επιτρέπει τη μεταξύ τους σύγκριση, παρά τον άνισο αριθμό των ταυτοποιημένων αλληλουχιών (reads) του κάθε δείγματος. Ακόμα και αν διαφέρουν σε συνολικό αριθμό ταξινομημένων αλληλουχιών (classified reads) η σύγκρισή τους είναι εφικτή, καθώς τα διαγράμματα επιβεβαιώνουν την ικανότητα της ανάλυσης να καλύψει σχεδόν ολόκληρο το φάσμα της βακτηριακής ποικιλότητας.

Η τεχνική αλληλούχησης τρίτης γενιάς εφαρμόστηκε για να αναλύσει το μικροβίωμα του είδους *Mytilus galloprovincialis* στις μυδοκαλλιέργειες της Χαλάστρας και του Μακρύγιαλου, κατά τους χειμερινούς μήνες. Τα αποτελέσματα μετά τη βιοπληροφορική ανάλυση εμφανίζονται ταξινομημένα σε 7 ταξινομικά επίπεδα: Υπερβασιλείο (Superkingdom), Φύλο (Phylum), Κλάση (Class), Τάξη (Order), Οικογένεια (Family), Γένος (Genus), Είδος (Species).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα σε επίπεδο φύλου, η κυρίαρχη ομάδα βακτηρίων στο σύνολο των δειγμάτων ήταν τα Proteobacteria με ποσοστό 53,7%, ακολουθούμενα από τα Tenericutes (10,4%), Bacteroidetes (9,4%), Firmicutes (3,4%), Planctomycetes (3,4%), Verrucomicrobia (3%), Fusobacteria (1,7%) και Cyanobacteria (1,4%). Σε σχέση με έρευνες που έχουν γίνει στο παρελθόν με τεχνικές NGS, τα αποτελέσματα ως προς την ταξινομική κατάταξη του φύλου δεν εμφανίζουν μεγάλες διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, η έρευνα των Bozcal & Dagdeviren (2020), όπου η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε την καλοκαιρινή περίοδο, έδειξε σαν κυρίαρχα φύλα βακτηρίων τα Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes και Actinobacteria. Αντίστοιχα, και τα αποτελέσματα των Musella et al. (2020), έδειξαν ως κυρίαρχα τα: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Spirochaetes, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Tenericutes, Planctomycetes, Cyanobacteria, Fusobacteria, παρόλο που η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε την άνοιξη. Τα ίδια κυρίαρχα είδη, Proteobacteria (52,7%) και Bacteroidetes (17,2%), κατέγραψαν και οι Balbi et al. (2020) στην ανάλυσή τους για το μικροβίωμα του μυδιού στα πρώιμα στάδια ανάπτυξής του.

Οι μοριακές αναλύσεις των θαλάσσιων μικροβιακών κοινοτήτων έχουν αποκαλύψει πολλές μη αναγνωρισμένες ομάδες σε επίπεδο φύλου. Είναι σαφές ότι πολλά βακτηριακά φύλα πέρα από

τα πρωτεοβακτήρια (Proteobacteria) και τα κυανοβακτήρια (Cyanobacteria) ενδημούν στα θαλάσσια οικοσυστήματα, σε μεγάλη αφθονία, αλλά δεν έχουν μελετηθεί ακόμη σε βάθος (Giovannoni et al., 2005). Η παρούσα έρευνα κατέγραψε σε επίπεδο φύλου και με μεγαλύτερο ποσοστό αφθονίας το φύλο Proteobacteria και ακολουθούν τα φύλα Tenericutes, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia και Cyanobacteria. Τα τελευταία συμμετέχουν σε σημαντικούς βιοχημικούς κύκλους, όπως η αποδόμηση πολλών πολυμερών και η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας (NH₃), που επηρεάζει τον κύκλο του αζώτου. Αντίστοιχα, το φύλο Verrucomicrobia είχε χαρακτηριστεί σαν φύλο που κυριαρχεί στο έδαφος. Όπως απέδειξε η έρευνα της Freitas (2012), και επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, το φύλο Verrucomicrobia κυριαρχεί στα θαλάσσια οικοσυστήματα και κυρίως κοντά στις ακτές.

Τα αποτελέσματα της παρούσας ανάλυσης σε επίπεδο κλάσης έδειξαν ως κυρίαρχες ομάδες τις εξής: Alphaproteobacteria (30%), Gammaproteobacteria (18,5%), Mollicutes (10,5%), Flavobacteriia (7%), Betaproteobacteria (3,3%), Verrucomicrobiae και Planctomycetia (3%). Παρόμοια αποτελέσματα σε επίπεδο κλάσης έδειξε και η έρευνα των Balbi et al. (2020), όπου ανέδειξε ως κυρίαρχες ομάδες τα Gammaproteobacteria, τα Alphaproteobacteria και τα Bacteroidia.

Για το ταξινομικό επίπεδο της τάξης στην παρούσα εργασία, φαίνεται πως κυριαρχούν οι τάξεις Rhodobacterales (16,6%), Mycoplasmatales (10,4%), Rickettsiales (9,2%), Flavobacteriales (7%), Pseudomonadales (3,2%), Verrucomicrobiales (2,9%), Planctomycetales (2,9%), Rhizobiales (2,6%), Oceanospirillales (2,5%). Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκεται και η έρευνα των Bozcal & Dagdeviren (2020), όπου έδειξε πρώτη σε σειρά αφθονίας την τάξη Rhodobacterales (15,32%) και ακολουθείται από την τάξη Clostridiales.

Όσον αφορά σε επίπεδο οικογένειας η έρευνα των Musella et al. (2020) ανέδειξε ως κυρίαρχες τις Alteromonadaceae (10,7 ± 21,6%) και Flavobacteriaceae (8,8% ± 9,6%), ενώ σε χαμηλότερα ποσοστά (3% έως 5%) αναγνωρίστηκαν οι οικογένειες βακτηρίων: Spirochaetaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Bacillaceae, Vibrionaceae, Verrucomicrobiaceae, Hahellaceae και Rhodobacteraceae. Η παραπάνω έρευνα έδειξε ομοιότητα με την παρούσα έρευνα ως προς την αφθονία της οικογένειας Flavobacteriaceae, η οποία κατέλαβε ποσοστό ίσο με 6,2% (4η θέση στη σειρά αφθονίας) και της οικογένειας Rhodobacteraceae, η οποία κατέλαβε ποσοστό ίσο με 9% (2η θέση στη σειρά αφθονίας). Αντίστοιχα, η οικογένεια Vibrionaceae εμφανίζει μικρότερο ποσοστό (0,8%) και βρίσκεται στην 14^η θέση στην σειρά αφθονίας.

Όσον αφορά την κατάταξη σε επίπεδο γένους, οι διαθέσιμες μεταγονιδιωματικές έρευνες ταυτοποιούν κάποιες ομάδες γενών ως μη ταξινομημένα γένη κλάσης, τάξης ή οικογένειας. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αδυναμία ταυτοποίησης των τεχνολογιών Αλληλούχησης Δεύτερης Γενιάς σε επίπεδο γένους, λόγω του γεγονότος ότι αναλύονται μόνο 1-2 από τις 9 υπερμεταβλητές περιοχές (V1-V9) του 16S rRNA γονιδίου. Έτσι, οι Bozcal & Dagdeviren (2020) ανέφεραν ως κυρίαρχα γένη βακτηρίων τα Rhodobacteraceae _ unclassified, Alphaproteobacteria _ unclassified, Lachnospiraceae _ unclassified, Gammaproteobacteria _ unclassified, Vibrionaceae _ unclassified, Bacteroidetes _ unclassified και Enterobacteriaceae _ unclassified. Στην ίδια έρευνα ταυτοποιήθηκαν τα *Arcobacter*, *Psychrilyobacter*, *Dokdonella*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Escherichia_Shigella*, *Klebsiella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Pseudomonas*, *Morganella*, *Serratia*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Yersinia*, *Mycoplasma*, *Brucellaceae*, *Pantoea* and *Proteus*. Αντίστοιχα, η έρευνα των Musella et al. (2020) ανέφερε ως κυρίαρχα γένη: μη ταξινομημένα γένη της τάξης των Alteromonadales (10,6% ± 21,4%), των Flavobacteriaceae (5,4% ± 6,3%), σε μικρότερο ποσοστό τα γένη *Spirochaeta*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Endozoicomonas*, και επίσης τα μη ταξινομημένα γένη της οικογένειας Verrucomicrobiaceae και το γένος *Mycoplasma*. Στην παρούσα έρευνα υπήρξε επιτυχής ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους, με κυρίαρχα γένη τα *Mycoplasma* (9,4%) *Anaplasma* (8,5%), *Mariniblastus* (2,7%), *Pseudomonas* (2,3%), *Rubritalea* (2%), *Legionella* (1,9%), *Ruegeria* (1,9%) και *Polaribacter* (1,5%).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ταξινόμησης σε επίπεδο γένους στην περιοχή της Χαλάστρας κυριαρχεί το *Mycoplasma* (10,6%), ενώ στον Μακρύγιαλο το *Anaplasma* (20,9%). Το *Mycoplasma* βρέθηκε και στην περιοχή του Μακρύγιαλου (7,6%), με στατιστικά σημαντική διαφορά από το αντίστοιχο ποσοστό στην περιοχή της Χαλάστρας. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε και η πρόσφατη ανάλυση του μικροβιώματος του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* από 16 δείγματα στις ίδιες περιοχές του Θερμαϊκού, αλλά σε δύο διαφορετικές περιόδους (χειμώνας – καλοκαίρι). Σύμφωνα με την εργασία των Schoinas et al. (2023) κυριαρχούν τα γένη *Mycoplasma* (12.2%), *Anaplasma* (5.8%), *Ruegeria* (5.2%) and *Mariniblastus* (2.1%). Το *Mycoplasma* έχει καταγραφεί και σε άλλα δίθυρα (στρείδια), όπου σύμφωνα με την εργασία των King et al. (2012) είναι παθογόνο για τα ίδια τα δίθυρα αλλά και δυνητικά παθογόνο για τον άνθρωπο. Τα γένη *Mycoplasma* και *Anaplasma* έχουν ανευρεθεί σε μεγάλο ποσοστό και στην έρευνα του Cano et al. (2020), οι οποίοι απέδωσαν την ευρεία διασπορά των συγκεκριμένων

γενών στα θαλάσσια μαλάκια και δίθυρα τόσο στη μετάδοσή τους μέσω των φυσικών δεξαμενών (μολυσμένα κύτταρα από ζώα και ανθρώπους), όσο και στη φυσική κατανομή, προσαρμογή και εξέλιξη αυτών των βακτηριακών ομάδων στα θαλάσσια οικοσυστήματα.

Σε προηγούμενες έρευνες τα βακτηριακά γένη *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Psychrobacter sp.*, *Proteus sp.*, *Photobacterium sp.*, *Vibrio sp.*, *Shewanella sp.*, *Oceanisphaerae sp.*, *Pseudoalteromonas sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Mycoplasma sp.* και *Clostridium sp.*, έχει αποδειχτεί ότι ανήκουν στα ενδημικά είδη και ανευρίσκονται στο μικροβίωμα των θαλάσσιων ειδών (Gram and Huss, 1996; Svanevik and Lunestad, 2011; Mussella et al., 2020). Πιο συγκεκριμένα, ο Cavallo (2009) με τη μέθοδο της καλλιέργειας ταυτοποίησε συγκεκριμένα βακτήρια, όπως το γένος *Pseudomonas sp.* (12%). Στην παρούσα έρευνα ταυτοποιήθηκε επίσης το γένος *Pseudomonas sp.*, με συνολικό ποσοστό 2,3% και υψηλότερη αφθονία στο δείγμα M12 (Χαλάστρα).

Επιπρόσθετα, το γένος *Legionella* κατείχε συνολικό ποσοστό 1,9% και ανιχνεύθηκε μόνο στα δείγματα της περιοχής της Χαλάστρας. Αν και η μετάδοση στον άνθρωπο γίνεται μόνο από μικρά σταγονίδια μέσω της αναπνευστικής οδού, η ύπαρξή του στα μύδια συνιστά δεξαμενή του βακτηρίου για δυνητικά παθογόνο δράση (Goni et al., 2020). Επίσης, στην ίδια περιοχή εντοπίστηκαν και τα γένη *Sulfurovum* και *Sulfitobacter*, που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχουν τη δυνατότητα οξειδωσης του θείου. Συγκεκριμένα, το γένος *Sulfitobacter* απομονώθηκε από δείγματα θαλασσινού νερού, σε πρόσφατη μελέτη της Kalaitzidou (2022) στον κόλπο του Θερμαϊκού, και ίσως αποτελεί δείκτη κάποιας μορφής ρύπανσης του κόλπου, ο οποίος είναι ιδιαίτερα επιβαρυνμένος. Το γένος *Sulfurovum* βρίσκεται κυρίως σε μεγάλα θαλάσσια βάθη αλλά και σε ηφαιστειογενή μέρη. Παρ' όλα αυτά, η έρευνα των Marziah et al. (2016) έδειξε την εμφάνισή του σε μολυσμένα από υδρογονάνθρακες θαλάσσια ύδατα. Η πιθανότητα επιβάρυνσης της περιοχής της Χαλάστρας με υδρογονάνθρακες είναι πιθανή, λόγω του λιμανιού και της συνεχούς διέλευσης πλοίων και τάνκερ που μεταφέρουν καύσιμα.

Επίσης, η παρούσα μελέτη ταυτοποίησε το γένος *Clostridium* και στις δύο περιοχές της δειγματοληψίας (αν και σε σημαντικά μικρότερο ποσοστό στην περιοχή της Χαλάστρας). Παρά το χαμηλό ποσοστό ύπαρξής του στην περιοχή του Θερμαϊκού συνολικά (0,8%), σύμφωνα με την έρευνα των Madden et al. (1986), η παρουσία του μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σαν δείκτης καθαρότητας των μυδιών. Το γένος *Clostridium* επιζεί πιο πολύ από το είδος *E. coli* στο

θαλασσινό νερό και μπορεί να αποκαλύψει επιμολύνσεις που έγιναν σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, συγκριτικά με το είδος *E. coli*.

Τόσο στην περιοχή του Μακρύγιαλου όσο και στη Χαλάστρα βρέθηκε σε πολύ μικρό ποσοστό (0,03%) το γένος *Aeromonas*, το οποίο θεωρείται δυνητικά παθογόνο για τα δίθυρα αλλά και για τον άνθρωπο. Σύμφωνα με την εργασία του Aberoum (2010) υπάρχουν ψυχρότροφα στελέχη που μπορούν να αναπτύσσονται ακόμα και σε θερμοκρασίες έως 5°C, όπως κατά την συντήρηση των δίθυρων στα ψυγεία. Η παθογόνος δράση του γένος *Aeromonas* μπορεί να εμφανιστεί, εάν ο πληθυσμός τους πολλαπλασιαστεί αρκετά κατά τη διατήρηση ή την επεξεργασία των δίθυρων από τα εργοστάσια αποκελύφωσης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι και στις δυο περιοχές δειγματοληψίας ταυτοποιήθηκε το γένος *Vibrio* (1,12% στη Χαλάστρα και 0,19% στον Μακρύγιαλο). Μερικά είδη που ανήκουν στο παραπάνω γένος (όπως *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus*) έχουν αναγνωριστεί ως αιτιολογικοί παράγοντες τροφολοιμώξεων, που συνδέονται με την κατανάλωση ωμών ή ατελώς μαγειρεμένων οστρακοειδών (Thompson et al., 2004). Καθώς τα δείγματα μυδιού συλλέχθηκαν κατά τη χειμερινή περίοδο, συνεπάγεται ότι το εν λόγω γένος ενδημεί στα μύδια της περιοχής όλο το έτος, διότι θεωρητικά αναπτύσσεται κατά τους θερινούς μήνες που η θερμοκρασία της θάλασσας είναι αυξημένη. Ο κίνδυνος τροφολοιμώξης μετά την κατανάλωση μυδιών επιβαρυνμένων με το γένος *Vibrio* είναι πιθανός, καθώς τα είδη του εν λόγω γένους παραμένουν στους ιστούς των δίθυρων, ακόμη και μετά από παρατεταμένη περίοδο εξυγίανσης (Crocì et al., 2002).

Παρά το γεγονός ότι η βακτηριακή ποικιλότητα που ταυτοποιήθηκε είναι παρόμοια φαινομενικά για όλα τα σημεία δειγματοληψίας, η στατιστική ανάλυση έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη σειρά κατάταξης για τα κυρίαρχα γένη βακτηρίων, τόσο μεταξύ των δύο περιοχών όσο και μεταξύ των σημείων δειγματοληψίας εντός της ίδιας περιοχής μυδοκαλλιέργειας. Μικρές διαφορές στη σειρά κατάταξης των βακτηριακών πληθυσμών αποκάλυψε η μελέτη των Bozcal & Dagdeviren (2020), στην οποία διερευνήθηκαν και σταθμοί δειγματοληψίας που βρίσκονταν σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους. Αυτές οι διαφορές στην αφθονία της βακτηριακής ποικιλότητας μπορεί να προκύπτουν ως αποτέλεσμα διακυμάνσεων περιβαλλοντικών παραμέτρων, όπως η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών. Η θερμοκρασία παίζει βασικό ρόλο στη μικροβιακή κοινότητα του εντέρου του είδους *M. galloprovincialis*, όπως απέδειξε η μελέτη των Li et al. (2019).

Πιο συγκεκριμένα, για το μήνα Δεκέμβριο στην περιοχή του Μακρύγιαλου κυριαρχούν τα γένη *Polaribacter* και *Rubritalea*, ενώ στην ίδια περιοχή τον μήνα Ιανουάριο κυριαρχεί το γένος *Kistimonas*. Το συγκεκριμένο γένος περιλαμβάνει βακτήρια μη σπορογόνα, που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 15 και 30°C, σε pH 6–10, και με παρουσία 1–4% NaCl (για μερικά είδη έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη και σε 9% NaCl). Σύμφωνα και με τους Glaeser and Kämpfer (2020), το γένος αυτό ενδημεί σε θαλάσσιους μικροοργανισμούς. Τα είδη του γένους *Polaribacter* (Flavobacteriaceae) είναι gram - αρνητικά, αερόβια βακτήρια που μπορεί να είναι ετερότροφα, ψυχρόφιλα ή μεσόφιλα. Τα περισσότερα είδη έχουν προσαρμοστεί κυρίως σε θαλάσσια οικοσυστήματα και το βέλτιστο εύρος ανάπτυξής τους είναι σε θερμοκρασία 10-32°C και σε pH 7-8. Σύμφωνα με έρευνα των Xing et al. (2015), η ύπαρξη του γένους αυτού μπορεί να επηρεάσει θετικά το θαλάσσιο περιβάλλον. Εξαιτίας της κλιματικής αλλαγής και της αύξησης της θερμοκρασίας των θαλασσών, η εκτεταμένη άνθηση της άλγης και τα προβλήματα που δημιουργεί γίνονται ολοένα και πιο συχνά. Τα μέλη του γένους *Polaribacter* αποσυνθέτουν κύτταρα άλγης και έτσι είναι σημαντικά, καθώς επηρεάζουν την ποιότητα του θαλασσινού νερού αλλά και τη σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων.

Για τον ίδιο μήνα αξίζει να σημειωθεί η έντονη παρουσία των γενών *Mariniblastus*, *Ruegeria* και *Mycoplasma*. Το γένος *Ruegeria* αποτελεί μέρος μιας μεγάλης ομάδας της οικογένειας Rhodobacteraceae, περιέχει 14 είδη που έχουν απομονωθεί κυρίως από θαλάσσια οικοσυστήματα και ασπόνδυλους οργανισμούς και είναι χημειοτροφικά αερόβια, ελαφρώς αλόφιλα (1.5–6 % NaCl) και μεσόφιλα (15°C - 26°C). Έχει παρατηρηθεί σε κάποια είδη η ικανότητα να συνθέτουν κυανοφυκίνη, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως απόθεμα αζώτου από τα κυανοβακτήρια (Arahal, 2018).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα και με την έρευνα του Cavallo (2009), πολλά βακτήρια δεν κατάφεραν να ανευρεθούν με τις συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους στα δείγματα νερού αλλά μόνο στα μύδια, όπως το γένος *Vibrio* που ταυτοποιήθηκε μόνο στα δείγματα μυδιού, καθιστώντας το μύδι τον καταλληλότερο βιοδείκτη για το μικροβιολογικό προφίλ των θαλάσσιων υδάτων. Ο Θερμαϊκός κόλπος, λόγω της γεωμορφολογίας του όπως περιγράφηκε στην εισαγωγή, είναι σημαντικό να παρακολουθείται με εποχικές ή τακτικές μικροβιολογικές αναλύσεις και κυρίως μέσω τεχνικών ανεξάρτητων της καλλιέργειας, για τον εντοπισμό παθογόνων αλλά και για την επιτήρηση των υδάτων μέσω των δίθυρων μαλακίων.

5 Συμπεράσματα και Μελλοντική έρευνα

Στη συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε, με τη χρήση τεχνικών NGS, ο προσδιορισμός του μικροβιώματος του μυδιού *Mytillus galloprovincialis*, από δύο κύριες περιοχές μυδοκαλλιέργειας του Θερμαϊκού κόλπου. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει αντίστοιχη έρευνα για την ταυτοποίηση του μικροβιώματος του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* με τεχνικές αλληλούχησης Τρίτης Γενιάς και γι' αυτό το λόγο η παρούσα ανάλυση είναι πρωτοποριακή για την Ελλάδα. Η δειγματοληψία έγινε από 5 διαφορετικά σημεία και τα αποτελέσματα αποκάλυψαν τη μεγάλη ποικιλομορφία των μικροβιακών κοινοτήτων. Το μικροβίωμα των μυδιών, για την περίοδο που εξετάστηκαν, έδειξε ότι τα μύδια της περιοχής του Θερμαϊκού φιλοξενούν δυνητικά παθογόνα για τον άνθρωπο, παρόλο που η υγειονομική τους κατάσταση ήταν στην κατηγορία Α.

Τα μύδια είναι ευαλλοιώτα και πολλές φορές καταναλώνονται ωμά ή ατελώς μαγειρεμένα, γι' αυτό θα πρέπει να ελέγχονται ανά τακτά διαστήματα με γρήγορο και αξιόπιστο τρόπο, για το αν φιλοξενούν δυνητικά για τον άνθρωπο παθογόνα. Μέχρι στιγμής, η ελληνική νομοθεσία επιβάλλει τον μικροβιολογικό έλεγχο στα δίθυρα μόνο για τα *E. coli* και *Salmonella spp.*, αλλά όπως φαίνεται και από την παρούσα έρευνα, το γένος *Vibrio* (παρόλο που τα δείγματα συλλέχθηκαν χειμερινή περίοδο) ήταν σε σχετικά υψηλή θέση στη σειρά κατάταξης. Η σημασία να ελέγχονται τα δίθυρα για βακτήρια του γένους *Vibrio*, έγκειται στο ότι ο πληθυσμός τους δε μειώνεται μέσω της εξυγίανσης των δίθυρων και παράλληλα ευθύνονται για πολλά και σοβαρά περιστατικά τροφικών δηλητηριάσεων.

Η σημασία της ταυτοποίησης του μικροβιώματος με τεχνικές αλληλούχησης Νέας Γενιάς είναι πολύ μεγάλη, γιατί η μέθοδος δεν αποκλείει μικροοργανισμούς που δεν αναπτύσσονται με συμβατικούς τρόπους καλλιέργειας, και αποτελεί μια αρκετά ταχεία μέθοδο. Σε προηγούμενες εργασίες για τον προσδιορισμό του μικροβιώματος των δίθυρων οργανισμών, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές που μελετούν τις υπερμεταβλητές περιοχές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν ένα μικρό τμήμα του 16S rRNA γονιδίου, το οποίο αντιστοιχεί σε έως 460 bp. Αντίθετα, η τεχνολογία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα, της εταιρείας Oxford Nanopore Technologies, χρησιμοποιεί ολόκληρο το γονίδιο και έτσι επιτρέπει την ανάγνωση μεγαλύτερου αριθμού βάσεων και τη βαθύτερη ταξινομική διάκριση των βακτηρίων.

Το μικροβίωμα του μυδιού στις περιοχές της Χαλάστρας και του Μακρύγιαλου δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν και ως εκ τούτου, αποτελείται και από μη ταυτοποιημένα βακτηριακά στελέχη, για τα οποία δε βρέθηκε αντιστοίχιση σε υπάρχουσες ενημερωμένες βάσεις δεδομένων. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αποκάλυψαν ότι οι διαφορές στη βακτηριακή ποικιλότητα είναι πιο εμφανείς στα χαμηλότερα ταξινομικά επίπεδα (επίπεδο γένους). Αυτές οι διαφορές προκύπτουν λόγω της δυναμικής των βακτηρίων, και οφείλονται κυρίως σε διακυμάνσεις περιβαλλοντικών παραμέτρων (π.χ. pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση O₂, αλατότητα) και σε ανθρωπογενείς παράγοντες (π.χ. γεωργικά και βιομηχανικά λύματα). Ωστόσο, δεν έχει διερευνηθεί πλήρως πώς ανταποκρίνεται το μικροβίωμα του μυδιού σε αυτές τις αλλαγές. Έτσι, αυτή η πρωτοποριακή μελέτη θέτει μια βάση για μελλοντικές αναλύσεις του μικροβιώματος του μυδιού στις περιοχές του Θερμαϊκού.

Η παρακολούθηση της μικροβιακής ποικιλότητας στον Θερμαϊκό κόλπο απαιτεί πολλαπλά σημεία δειγματοληψίας, λόγω της μεγάλης δυναμικής των μικροβιακών κοινοτήτων που εισέρχονται στο θαλάσσιο οικοσύστημα με ποικίλους τρόπους. Τόσο η εισροή ποταμών όσο και οι ανθρώπινες δραστηριότητες, είναι μερικοί από τους παράγοντες που επηρεάζουν το μικροβιακό προφίλ των μυδιών και είναι συνεχώς μεταβαλλόμενοι. Γι' αυτό το λόγο είναι σημαντικό να διεξαχθούν παρόμοιες μελέτες, ιδίως κατά τους θερινούς μήνες, που αυξάνεται η θερμοκρασία της θάλασσας και επηρεάζεται η μικροβιακή κοινότητα των δίθυρων. Επίσης, θα ήταν χρήσιμο να γίνουν συγκριτικές μελέτες μεταξύ των υπόλοιπων περιοχών μυδοκαλλιέργειας της Ελλάδας, όπως επίσης και η ταυτοποίηση του μικροβιώματος με NGS, για τα υπόλοιπα δίθυρα που καλλιεργούνται στην Ελλάδα (στρείδια, κυδώνια, γυαλιστερές κτλ.).

6 Βιβλιογραφία

Ξένη Βιβλιογραφία

Aberoum A., Jooyandeh H. (2010). A review on occurrence and characterization of the Aeromonas species from marine fishes. World Journal of Fish and Marine Sciences 2: 519-523. <https://www.researchgate.net/publication/312898449>

Androulidakis Y., Kolovoyiannis V., Makris C., Krestenitis Y., Baltikas V., Stefanidou N., Chatziantoniou A., Topouzelis K., Moustaka-Gouni M. (2021). Effects of ocean circulation on the eutrophication of a Mediterranean gulf with river inlets: The Northern Thermaikos Gulf. Continental Shelf Research 221: 104416. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2021.104416>

Arahal D.R., Lucena T., Rodrigo-Torres L., Pujalte M.J. (2018). Ruegeria denitrificans sp. nov., a marine bacterium in the family Rhodobacteraceae with the potential ability for cyanophycin synthesis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 68: 2515-2522. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002867>

Auguste M., Lasa A., Pallavicini A., Gualdi S., Vezzulli L., Canesi L. (2019). Exposure to TiO₂ nanoparticles induces shifts in the microbiota composition of *Mytilus galloprovincialis* hemolymph. Science of the Total Environment 670: 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.133>

Auguste M., Lasa A., Balbi T., Pallavicini A., Vezzulli L., Canesi L. (2020). Impact of nanoplastics on hemolymph immune parameters and microbiota composition in *Mytilus galloprovincialis*. Marine Environmental Research 159: 105017. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105017>

Balbi T., Vezzulli L., Lasa A., Pallavicini A., Canesi L. (2020). Insight into the microbial communities associated with first larval stages of *Mytilus galloprovincialis*: Possible interference by estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 237: 108833. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108833>

Baudart J., Lemarchand K., Brisabois A., Lebaron P. (2000). Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1544-1552. <https://doi.org/10.1128/aem.66.4.1544-1552.2000>

Bozcal E., Dagdeviren M. (2020). Bacterial metagenome analysis of *Mytilus galloprovincialis* collected from Istanbul and Izmir coastal stations of Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment* 192: 186. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-8129-1>

Brasher C.W., DePaola A., Jones D.D., Bej A.K. (1998). Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR. *Current Microbiology* 37: 101-107. <https://doi.org/10.1007/s002849900346>

Cano I., Ryder D., Webb S.C., Jones B.J., Brosnahan C.L., Carrasco N., Bodinier B., Furones D., Pretto T., Carella F., Chollet B., Arzul I., Cheslett D., Collins E., Lohrmann K.B., Valdivia A.L., Ward G., Carballal M.J., Villalba A., Marigómez I., Mortensen S., Christison K., Kevin W.C., Bustos E., Christie L., Green M., Feist S.W. (2020). Cosmopolitan distribution of Endozoicomonas-like organisms and other intracellular microcolonies of bacteria causing infection in marine mollusks. *Frontiers in Microbiology* 11: 577481. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.577481>

Cao Y., Fanning S., Proos S., Jordan K., Srikumar S. (2017). A review on the applications of Next Generation Sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Frontiers in Microbiology* 8: 21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017>

Cavallo R.A., Acquaviva M.I., Stabili L. (2009). Culturable heterotrophic bacteria in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea – Italy). *Environmental Monitoring and Assessment* 149: 465-475. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0223-8>

Croci L., Suffredini E., Cozzi L., Toti L. (2002). Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology* 92: 460-465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01548.x>

Ercolini D. (2013). High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and environmental microbiology* 79: 3148-3155. <https://doi.org/10.1128/AEM.00256-13>

Feldhusen F. (2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and infection* 2: 1651-1660. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)01321-6](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)01321-6)

Feng Y., Zhang Y., Ying C., Wang D., Du C. (2015). Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. *Genomics, proteomics & bioinformatics* 13: 4-16. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.01.009>

Fernández R., Mamán L., Jaén D., Fernández F.L., Ocaña M.A., Gordillo M.M. (2019). Dinophysis species and diarrhetic shellfish toxins: 20 years of monitoring program in Andalusia, south of Spain. *Toxins* 11: 189. <https://doi.org/10.3390/toxins11040189>

Forbes J.D., Knox N.C., Ronholm J., Pagotto F., Reimer A. (2017). Metagenomics: the next culture-independent game changer. *Frontiers in microbiology* 8: 1069. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01069>

Freitas S., Hatosy S., Fuhrman J.A., Huse S.M., Welch M.D.B., Sogin M.L., Martiny A.C. (2012). Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia. *The ISME Journal* 6:1499-1505. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.3>

Giovannoni S.J., Stingl U. (2005). Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437: 343-348. <https://doi.org/10.1038/nature04158>

Glaeser S.P., Kämpfer P. (2015). Kistimonas. *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*. 1: 7. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01541>

Gosling E. (2003). *Bivalve molluscs biology, ecology and culture*, pp. 443, Blackwell Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470995532>

Gram L., Huss H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33: 121-137. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01134-8](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(96)01134-8)

Gugliandolo C., Lentini V., Spanò A., Maugeri T.L. (2011). Conventional and molecular methods to detect bacterial pathogens in mussels. *Letters in applied microbiology* 52: 15-21. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02959.x>

Kalaitzidou M.P., Alvanou M.V., Papageorgiou K.V., Lattos A., Sofia M., Kritas S.K., Petridou E., Giantsis I.A. (2022). Pollution indicators and HAB-Associated halophilic bacteria alongside harmful cyanobacteria in the largest mussel cultivation area in Greece. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(9): 5285. <https://doi.org/10.3390/ijerph19095285>

Karageorgis A.P., Skourtos M.S., Kapsimalis V., Kontogianni A.D., Skoulikidis N.T., Pagou K., Nikolaidis N.P., Drakopoulou P., Zanou B., Karamanos H., Levkov Z., Anagnostou C. (2004). An integrated approach to watershed management within the DPSIR framework: Axios River catchment and Thermaikos Gulf. *Regional Environmental Change* 5(2-3): 138-160. <https://doi.org/10.1007/s10113-004-0078-7>

Kong R.Y., Lee S.K., Law T.W., Law S.H., Wu R.S. (2002). Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water Research* 36: 2802-2812. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00503-6](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00503-6)

Konstantinou Z.I., Krestenitis Y.N., Latinopoulos D., Pagou K., Galinou-Mitsoudi S., Savvidis Y. (2012). Aspects of mussel-farming activity in Chalastra, Thermaikos Gulf, Greece: An effort to untie a management gordian knot. *Ecology and Society* 17: 1. <http://www.jstor.org/stable/26268989>

Li Y.F., Xu J.K., Chen Y.W., Ding W.Y., Shao A.Q., Liang X., Zhu Y.T., Yang J.L. (2019). Characterization of gut microbiome in the mussel *Mytilus galloprovincialis* in response to thermal stress. *Frontiers in Physiology* 10: 1086. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01086>

Madden R.H., Buller H., McDowell D.W. (1986). *Clostridium perfringens* as an indicator of hygienic quality of depurated shellfish. *Journal of Food Protection* 49: 33-36. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-49.1.33>

Marziah Z., Mahdzir A., Musa M.N., Jaafar A.B., Azhim A., Hara H. (2016). Abundance of sulfur-degrading bacteria in a benthic bacterial community of shallow sea sediment in the off-Terengganu coast of the South China Sea. *Microbiology Open* 5: 967-978. <https://doi.org/10.1002/mbo3.380>

Maugeri T., Caccamo D., Gugliandolo C. (2000). Potentially pathogenic *Vibrios* in brackish waters and mussels. *Journal of applied microbiology* 89: 261. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01096.x>

Musella M., Wathsala R., Tavella T., Rampelli S., Barone M., Palladino G., Biagi E., Brigidi P., Turrone S., Franzellitti S., Candela M. (2020). Tissue-scale microbiota of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and its relationship with the environment. *Science of The Total Environment* 717: 137209. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137209>

Nhung P.H., Hata H., Ohkusu K., Noda M., Shah M.M., Goto K., Ezaki T. (2007). Use of the novel phylogenetic marker *dnaJ* and DNA–DNA hybridization to clarify interrelationships

within the genus *Aeromonas*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 1232-1237. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64957-0>

Panicker G., Call D.R., Krug M.J., Bej A.K. (2004). Detection of pathogenic *Vibrio spp.* in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. Applied and Environmental Microbiology 70: 7436-7444. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7436-7444.2004>

Parlapani F.F., Syropoulou F., Tsiartsafis A., Ekonomou S., Madesis P., Exadactylos A., Boziaris I.S. (2020). HRM analysis as a tool to facilitate identification of bacteria from mussels during storage at 4 °C. Food Microbiology 85: 103304. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103304>

Petersen J., Bougrier S., Smaal A.C., Garen P., Stephane R., Larsen J.E.N., Brummelhuis E.B.M. (2004). Intercalibration of mussel *Mytilus edulis* clearance rate measurements. Marine Ecology Progress 267: 187-194. <https://doi.org/10.3354/meps267187>

Pierce M.L., Ward J.E. (2018). Microbial ecology of the Bivalvia, with an emphasis on the family Ostreidae. Journal of Shellfish Research 37: 793-806. <https://doi.org/10.2983/035.037.0410>

Schoinas K., Konstantou V., Bompou E., Floros G., Chatziplis D., Imsiridou A., Loukovitis D. (2023). Microbiome profile of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from northern Aegean Sea (Greece) culture areas, based on a 16S rRNA Next Generation Sequencing approach. Diversity 15(3): 463. <https://doi.org/10.3390/d15030463>

Skibinski D.O.F., Ahmad M., Beardmore J.A. (1978). Genetic evidence for naturally occurring hybrids between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. Evolution 32: 354-364. <https://doi.org/10.2307/2407603>

Smaal A.C. (2002). European mussel cultivation along the Atlantic coast: production status, problems and perspectives. In: Sustainable increase of marine harvesting: fundamental

mechanisms and new concepts. (Eds Vadstein O., Olsen Y.), pp. 89-98, Springer Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-3190-4_8

Svanevik C.S., Lunestad B.T. (2011). Characterisation of the microbiota of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). International Journal of Food Microbiology 151: 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.016>

Sweet M.J., Bulling M.T. (2017). On the importance of the microbiome and pathobiome in coral health and disease. Frontiers in Marine Science 4: 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00009>

Tatsika S., Karamanoli K., Karayanni H., Genitsaris S. (2019). Metagenomic characterization of bacterial communities on ready-to-eat vegetables and effects of household washing on their diversity and composition. Pathogens 8: 37. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010037>

Thakur N., Shirkot P., Pradesh H., Pandey I., Rachappanavar K., Pandey H., Thakur K., Kumar V. (2018). Next generation sequencing-Techniques and its applications. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 7: 1316-1320.

Thompson J.R., Marcelino L.A., Polz M.F. (2005). Diversity, sources, and detection of human bacterial pathogens in the marine environment. In: Oceans and health: Pathogens in the marine environment. (Eds Shimshon B., Rita R.C.), pp. 29-68, Springer New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-23709-7_2

Thompson F.L., Iida T., Swings J. (2004). Biodiversity of vibrios. Microbiology and molecular biology reviews 68: 403-431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>

Vezzulli L., Stagnaro L., Grande C., Tassistro G., Canesi L., Pruzzo C. (2017). Comparative 16SrDNA gene-based microbiota profiles of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a shellfish farm (Ligurian Sea, Italy). Microbial Ecology 75: 495-504. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1051-6>

Wathsala R., Musella M., Valbonesi P., Candela M., Franzellitti S. (2021). Variability of metabolic, protective, antioxidant, and lysosomal gene transcriptional profiles and microbiota composition of *Mytilus galloprovincialis* farmed in the North Adriatic Sea (Italy). *Marine Pollution Bulletin* 172: 112847. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112847>

Xing P., Hahnke R.L., Unfried F., Markert S., Huang S., Barbeyron T., Harder J., Becher D., Schweder T., Glöckner F.O., Amann R.I., Teeling H. (2015). Niches of two polysaccharide-degrading *Polaribacter* isolates from the North Sea during a spring diatom bloom. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 9: 1410-1422. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.225>

Yu H., Elbediwi M., Zhou X., Shuai H., Lou X., Wang H., Li Y., Yue M. (2020). Epidemiological and genomic characterization of *Campylobacter jejuni* isolates from a foodborne outbreak at Hangzhou, China. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 3001. <https://doi.org/10.3390/ijms21083001>

Zohdi E., Abbaspour M. (2019). Harmful algal blooms (red tide): a review of causes, impacts and approaches to monitoring and prediction. *International Journal of Environmental Science and Technology* 16: 1789-1806. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2108-x>

Ελληνική Βιβλιογραφία

Αμίν Α. (2006). Διδακτικές σημειώσεις. Υγιεινή των αλιευμάτων, σσ. 93, Τμήμα Εκδόσεων 2005-2006, Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Ανέστης Α. (2008). Βιοχημικές και μεταβολικές προσαρμογές των δίθυρων στην αύξηση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. <http://hdl.handle.net/10442/hedi/18881>

Βουλτσιάδου Ε., Αμπατζόπουλος Θ., Αντωνοπούλου Ε., Γκάνιας Κ., Γκέλης Σ., Στάικου Α., Τριανταφυλλίδης Α. (2015). Καλλιέργεια δίθυρων μαλακίων. Υδατοκαλλιέργειες - οργανισμοί,

συστήματα παραγωγής, προοπτικές, σσ. 209-239, Κάλλιπος, Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα, Θεσσαλονίκη. <http://hdl.handle.net/11419/5083>

ΕΚΘΕ. (2001). Διαχειριστική μελέτη των ζωνών παραγωγής μυδιών των κόλπων Θεσσαλονίκης και Θερμαϊκού, σσ.149, Τελική τεχνική έκθεση.

Κυριαζή-Παπαδοπούλου Α. (2002). Ποιοτική αξιολόγηση και μεταποίηση της σάρκας του μεσογειακού μυδιού (*Mytilus galloprovincialis*). Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. <http://hdl.handle.net/10442/hedi/15106>

Φασούλας Θ. (2008). Δυναμική του γόνου του εκτρεφόμενου μυδιού *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819 στον ΒΔ κόλπο Θεσσαλονίκης. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. <https://ir.lib.uth.gr/xmlui/bitstream/handle>

Ιστοσελίδες

Φυτιανός Κ. (2009). Εκτίμηση της ποιότητας του Θερμαϊκού κόλπου-προϋποθέσεις για το μέλλον. Ημερίδα, 20 Μαρτίου 2008, Διεύθυνση Προστασίας και Ανάπτυξης Θερμαϊκού Κόλπου, ΕΥΑΘ, ΑΠΘ, ΤΕΕ/ΤΚΜ (Μ.Ε. Περιβάλλοντος) (http://portal.tee.gr/portal/page/portal/teetkm/DRASTHRIOTHTES/EKDHLVSEIS/EKDHLWEIS_2007_2009/THERMAIKOS_H_THALASSA_DIPLA/Tab2/thermaikos_fytianos.pdf) (Πρόσβαση στις 25 Ιουνίου 2022)

Vibrio Species Causing Vibriosis, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases. <https://www.cdc.gov/vibrio/faq.html> (Πρόσβαση στις 22 Ιουνίου 2022)

DNeasy PowerFood Microbial Kit, 2022. www.qiagen.com (Πρόσβαση στις 20 Ιουνίου 2022)

FastGene 100 bp DNA Marker. NIPPON Genetics Europe, 2022. www.nippongenetics.eu
(Πρόσβαση στις 29 Ιουνίου 2022)

Food and Drug Administration - FDA (2001). Public health impact of *Vibrio parahaemolyticus* in raw molluscan shellfish. <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/vprisk.html> (Πρόσβαση στις 15 Ιουνίου 2022)

Oxford Nanopore Technologies, 2022. nanoporetech.com (Πρόσβαση στις 12 Ιουνίου 2022)

Q3000. Quawell, 2021. www.quawell.com (Πρόσβαση στις 20 Ιουνίου 2022)

Illumina. Sequencing and array-based solutions for genetic research, 2022. illumina.com
(Πρόσβαση στις 17 Αυγούστου 2022)

MicroClean. Clent Life Science. www.clentlifescience.co.uk (Πρόσβαση στις 23 Ιουνίου 2022)

Μυδοκαλλιέργεια. Εθνικό Πάρκο Δέλτα Αξιού, 2022. axiosdelta.gr (Πρόσβαση στις 20 Ιουνίου 2022)

Σύστημα Ποσειδών <https://poseidon.hcmr.gr/el/ypiresies/prognoseis/proigoymenes-prognoseis>
(Πρόσβαση στις 24 Ιουνίου 2022)