

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ**  
**ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**Π.Δ.Ε.**

**«Μικροβιολογικές μεταβολές σε μύδια κατά την διάρκεια της  
εκτροφής και συντήρησης τους με κλασικές και μοριακές τεχνικές»**  
Microbiological changes in farmed mussels during farming and storage using classical  
and molecular approaches

**ΤΣΙΑΡΤΣΑΦΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ**

**ΒΟΛΟΣ, 2020**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

- 1) **Ιωάννης Μποζιάρης (M.Sc., Ph.D.)**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.
  
- 2) **Αθανάσιος Εξαδάκτυλος (Ph.D.)**, Καθηγητής, Γενετική Υδροβίων Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.
  
- 3) **Φωτεινή Παρλαπάνη**, Συμβασιούχος Διδάσκοντας ΠΔ 407/80, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο αποτέλεσμα μιας κοπιαστικής και μακροχρόνιας προσπάθειας με την συγγραφή της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην προσπάθεια αυτή.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Ιωάννη Μποζιάρη, για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους: κ.

Αθανάσιο Εξαδάκτυλο και την κα. Φωτεινή Παρλαπάνη, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους, καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Πιο συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Φωτεινή Φ. Παρλαπάνη, για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού, την αμέριστη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, καθώς επίσης και για τις εξαιρετικά χρήσιμες συμβουλές και την στήριξή της, τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας.

Ακολούθως, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου. Κυρίως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πατέρα μου ο οποίος συνέβαλε και πιο πρακτικά στην διεκπεραίωση της συγκεκριμένης προπτυχιακής εργασίας διότι με την πολύτιμη βοήθεια του πραγματοποιήθηκαν όλες οι απαιτούμενες δειγματοληψίες.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθούν οι μικροβιακές μεταβολές σε μύδια και στο θαλασσινό νερό κατά τη διάρκεια της εκτροφής με κλασσική μικροβιολογική ανάλυση. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση των μεταβολών στις μικροβιακές κοινότητες σε εμπορικού μεγέθους μύδια κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους με μοριακή ανάλυση, συγκεκριμένα με High Resolution Melting (HRM). Μύδια του είδους *Mytilus galloprovincialis* ελήφθησαν από την περιοχή της Χαλάστρας (Ν. Θεσσαλονίκης), από τον μήνα Φεβρουάριο έως τον μήνα Ιούνιο. Δείγματα μυδιών λαμβανόταν μια φορά τον μήνα για μικροβιολογικές αναλύσεις. Κατά την τελευταία δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε, τα μύδια (εμπορικού μεγέθους) τοποθετήθηκαν στους 4°C για την παρακολούθηση των μικροβιακών μεταβολών και τον προσδιορισμό του χρόνου οργανοληπτικής απόρριψης. Μετά το πέρας του πειράματος συντήρησης, βακτήρια τα οποία απομονώθηκαν από τριβλία TSA σε πέντε χρονικά διαστήματα: ημέρα 0, 2, 4, 6 και 8 ομαδοποιήθηκαν με ανάλυση γονιδίου 16S μέσω PCR σε πραγματικό χρόνο σε συνδυασμό με ανάλυση HRM και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχιση.

Τα βακτήρια βρέθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα πληθυσμού στον ιστό μυδιών σε σύγκριση με τα δείγματα θαλασσινού νερού καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, η OMX κυμαινόταν από 1,0 έως 3,8 log cfu / ml και από 3,50 έως 5,20 log cfu / g σε δείγματα νερού και μυδιών. Οι πληθυσμοί του *Pseudomonas* spp., H<sub>2</sub>S και LAB κυμάνθηκαν από 1,0 - 3,9 log cfu / ml, 1,0 - 2,8 και <1 log cfu / ml - 1,5 log cfu / ml, αντίστοιχα, για τα δείγματα του νερού. Το *E. coli* δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα νερού που δοκιμάστηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία σε αντίθεση με τα δείγματα των μυδιών που πιθανόν να

παρατηρήθηκε σε κάποια. Το pH ήταν πολύ υψηλότερο στα δείγματα θαλασσινού νερού από αυτό που παρατηρήθηκε στον ιστό μυδιών.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος συντήρησης η OMX των μυδιών ήταν αρχικά  $4,22 \pm 0,29 \log \text{ cfu} / \text{g}$  και αυξήθηκε κατά την αποθήκευση φτάνοντας τα  $7,63 \pm 0,34 \log \text{ cfu} / \text{g}$  τη στιγμή του ελάχιστου επιπέδου αποδοχής (ημέρα 6) και  $7,95 \pm 0,34 \log \text{ cfu} / \text{g}$  στο χρονικό σημείο απόρριψης (8η ημέρα). Σαράντα δύο (42) προϊόντα απομόνωσης (αποικίες) ταξινομήθηκαν σε επτά διαφορετικές βακτηριακές ομάδες με βάση τις κορυφές θερμοκρασίας τήξης και το σχήμα των ομαλοποιημένων καμπυλών τήξης των αμπλικονίων χρησιμοποιώντας ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο σε συνδυασμό με ανάλυση HRM. Οι επτά καμπύλες HRM βρέθηκαν να αντιπροσωπεύουν επτά βακτηριακά είδη σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA, ιδιαίτερα τέσσερα είδη *Psychrobacter* (*Psychrobacter sp.*, *P. alimentarius*, *P. pulmonis* and *P. celer*), *Klebsiella pneumoniae*, *Oceanimonas smirnovii* και ένα άγνωστο βακτήριο (ονομάστηκε MUSNGR154 φυλότυπος).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, τα μύδια ήταν μικροβιολογικά ασφαλή καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας. Η ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο σε συνδυασμό με την ανάλυση HRM μπορεί να διαφοροποιήσει επιτυχώς ακόμη και στενά συγγενικά βακτηριακά είδη, δηλ. *P. alimentarius*, *P. pulmonis*, *P. celer* και *Psychrobacter sp* με βάση τις καμπύλες τήξης υψηλής ανάλυσης. Η αλληλούχιση επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα καμπυλών τήξης υψηλής ανάλυσης. Ως εκ τούτου, η μεθοδολογία HRM θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως νέο εργαλείο γρήγορης ομαδοποίησης και ως επί το πλείστον οικονομικής ταυτοποίησης άγνωστων καλλιεργούμενων βακτηρίων.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΜΥΔΙΩΝ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Εκτρεφόμενα είδη μυδιών .....	1
1.1.1 Εκτρεφόμενα είδη παγκοσμίως .....	1
1.1.2 Εκτρεφόμενα είδη μυδιών στην Ελλάδα .....	1
1.2 Περίοδος αναπαραγωγής, συλλογής και κατανάλωσης .....	5
1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αφθονία / διασπορά και επιβίωση .....	7
1.4 Μυδοκαλλιέργειες .....	10
1.4.1 Συστήματα εκτροφής μυδιών .....	10
1.4.2 Περιοχές μυδοκαλλιέργειας στον κόσμο .....	18
1.4.3 Περιοχές μυδοκαλλιέργειας στην Ελλάδα .....	18
1.4.4 Παραγωγή μυδιών .....	19
1.4.4.1 Παγκόσμια παραγωγή .....	19
1.4.4.2 Ελληνική παραγωγή .....	19
1.4.5 Στάδια διαδικασίας παραγωγής στην Ελλάδα .....	20
1.5 Θαλάσσιο περιβάλλον κόλπων Θεσσαλονίκης, Θερμαϊκού .....	21
1.5.1 Γεωμορφολογία .....	21
1.5.2 Κλίμα Θεσσαλονίκης .....	22
1.5.3 Φυσικοχημικοί παράμετροι του νερού .....	23
1.5.4 Θεσμικό πλαίσιο. Συνθήκη Ramsar, Natura 2000 .....	25
1.5.5 Ρύπανση .....	27

1.5.6 Προβλήματα που αφορούν την περιοχ μυδοκαλλιέργειας της Χαλάστρας	28
1.6 Ασφάλεια και ποιότητα τροφίμων .....	30
1.6.1 Αρχικό στάδιο μικροοργανισμών αλλοίωσης .....	30
1.7 Μεθοδολογίες ταυτοποίησης μικροοργανισμών.....	31
1.8 Σκοπός της εργασίας .....	34
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>34</b>
2.1 Περιοχή μελέτης.....	34
2.2 Προετοιμασία δείγματος .....	36
2.3 Ανάλυση pH .....	36
2.4 Μικροβιολογική ανάλυση .....	36
2.5 Συντήρηση μυδιών στους 4° C.....	38
2.5.1. Προμήθεια και αποθήκευση μυδιών.....	38
2.5.2 Χρόνος απόρριψης μυδιών .....	38
2.6 Ομαδοποίηση και ταυτοποίηση των βακτηρίων με HRM και αλληλούχιση.....	38
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>41</b>
3.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	41
3.2 Ανάλυση pH .....	43
3.3 Πείραμα συντήρησης .....	44
3.3.1 Μικροβιακοί πληθυσμοί.....	44
3.3.2 Αναλυση HRM .....	45
3.3.3 Βακτηριακές κοινότητες των μυδιών κατά την διάρκεια της αποθήκευση.	49

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>50</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>53</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>55</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>61</b>



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΜΥΔΙΩΝ

### 1.1 Εκτρεφόμενα είδη μυδιών

#### 1.1.1 Εκτρεφόμενα είδη παγκοσμίως

Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή είναι η Κίνα, και κάποιες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης όπως η Ισπανία, η Γαλλία η Ολλανδία και η Ελλάδα. Τα δύο είδη μυδιών που καλλιεργούνται κυρίως είναι το λεγόμενο κοινό ή μπλε μύδι, *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758), και το μεσογειακό μύδι, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck1819), τα οποία έχουν ευρεία κατανομή. Επίσης στα είδη *Mytilus* ανήκουν το είδος *Mytilus chilensis* (Hupé 1854) που καλλιεργείται στην Χιλή, το είδος *M.smaragdinus* (Chemnitz 1785) που καλλιεργείται σε Ταϊλάνδη και Φιλιππίνες, το *M. planulatus* (Lamarck1819) στην Αυστραλία και το *M. coruscus* (Gould 1861) στην Κορέα (FAO, 1999). Εκτός από τα είδη του γένους *Mytilus*, αρκετά είδη του γένους *Perna*, το οποίο έχει τροπική και υποτροπική κατανομή, καλλιεργούνται με επιτυχία σε διάφορες χώρες. Το είδος *P. viridis*(Linnaeus 1758) καλλιεργείται σε χώρες της Άπω ανατολής και στην Ινδία, ενώ το είδος *P. perna* (Linnaeus 1758) στις ακτές του Ατλαντικού στη νότια Αμερική (Βενεζουέλα, Βραζιλία) και στη νότια Αφρική. Το είδος *P. canaliculus* (Gmelin 1791) καλλιεργείται με μεγάλη επιτυχία στη Νέα Ζηλανδία (Βουλτσιάδου et al, 2015).

#### 1.1.2 Εκτρεφόμενα είδη μυδιών στην Ελλάδα

Το αποκλειστικά εκτρεφόμενο είδος μυδιού στην Ελλάδα είναι το *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck1819), γνωστό και ως μεσογειακό μύδι. Η συστηματική κατάταξη του είδους είναι η εξής:

ΦΥΛΟ: Mollusca

ΚΛΑΣΗ: Bivalvia

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: Mytilidae

ΓΕΝΟΣ: *Mytilus*

ΕΙΔΟΣ: *Mytilus galloprovincialis*

Το όστρακο του είναι επίμηκες, γενικά τριγωνικό, υποτριγωνικό και αποστρογγυλεμένο στο πίσω άκρο του (Εικ. 1) Συνήθως το βρίσκουμε σε ρηχά νερά (ως 10 m) στα οποία υπάρχουν οι καταλληλότερες περιβαλλοντικές συνθήκες για τη επιβίωση του (Seed & Suchanek, 1992). Το μέγεθος του φθάνει ή και ξεπερνά τα 15 cm, η ηλικία του ξεπερνά τα 20 χρόνια (ΑΠΘ, 2000), ενώ το κατάλληλο εμπορεύσιμο μέγεθος του είναι μεγαλύτερο των 5 cm. Το σώμα του *Mytilus galloprovincialis* περιβάλλεται από το όστρακο και έχει δίλοβο μανδύα. Ο μανδύας εξωτερικά είναι προσκολλημένος στο εσωτερικό των θυρίδων (Εικ. 2). Στο μανδύα βρίσκονται και οι γονάδες. Αποτελείται από δύο ζεύγη βραγχίων, τα οποία είναι τα αναπνευστικά όργανα των μυδιών και βοηθούν στην λήψη τροφής διότι συμβάλουν στο διαχωρισμό των κατάλληλων μεριδίων τροφής όσον αφορά το μέγεθος τους μεταβιβάζοντας τα στο στόμα. Επίσης υπάρχει το πόδι με το βύσσο. Στην βάση του μανδύα βρίσκεται η σπλαχνική μάζα (Gosling, 2003a).



**Εικόνα 1.** Το όστρακο *Mytilus galloprovincialis* σε εμπορικό μέγεθος.(© ΤΣΙΑΡΤΣΑΦΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ)

Επειδή το μύδι είναι διηθηματοφάγο, διηθεί το θαλασσινό νερό με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους του και της θερμοκρασίας του νερού, κρατώντας έτσι μόνο τα κατάλληλα μερίδια τροφής που οι διαστάσεις τους κυμαίνονται από 1-25 μm, αποβάλλοντας τα υπόλοιπα ως ψευδοκόπρανα (Γαληνού – Μητσούδη, 2003). Τα ψευδοκόπρανα είναι μη αποδεκτή τροφή από άποψη μεγέθους τα οποία, αφού περιβληθούν με βλέννα, αποβάλλονται από το μύδι μέσω των αιωρηματοφάγων και διηθηματοφάγων οργανισμών χωρίς να οδηγηθούν στο πεπτικό σύστημα (<http://www.fishbase.org/Glossary>). Τα μύδια έχουν μεγάλη ικανότητα διήθησης νερού. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ένα μύδι 7 cm μπορεί να φιλτράρει κατά μέσο όρο έως και 110 λίτρα νερού ανά εικοσιτετράωρο (Walne, 1979). Επίσης είναι γονοχωριστικά αλλά τα φύλα γίνονται αντιληπτά από το διαφορετικό χρώμα του μανδύα εφόσον φθάσουν σε γεννητική ωριμότητα. Οι γαμέτες τώρα απελευθερώνονται στο νερό και η γονιμοποίηση πραγματοποιείται εξωτερικά. Οι τροχοφόρες προνύμφες αναπτύσσονται σε διάστημα 1-2 ημερών, ανάλογα με τη θερμοκρασία στην οποία βρίσκεται το νερό. Ο πρωτοτροχός της προνύμφης είναι μία ταινία αποτελούμενη από βλεφαρίδες, τις οποίες χρησιμοποιεί για να επιπλέει, ενώ ταυτόχρονα δημιουργεί ρεύματα νερού τα οποία της επιτρέπουν να τρέφεται με μικροσκοπικά φύκη. Τα ρεύματα παρασύρουν τις προνύμφες σε μεγάλες αποστάσεις. Αυτή η κινητή προνυμφική φάση μπορεί να διαρκέσει από 2-8 εβδομάδες σε σχέση πάντα με το είδος, τη θερμοκρασία αλλά και την αλατότητα του νερού. Κατά την διάρκεια της φάσης αυτής, η προνύμφη αυξάνεται σε μέγεθος και μετατρέπεται σε ιστιοφόρο προνύμφη. Βαθμιαία ο πρωτοτροχός μεταβάλλεται σε ιστίο και εμφανίζεται το όστρακο, το μυώδες πόδι και ένα ζεύγος οφθαλμικών κηλίδων που με την χρήση τους η προνύμφη ανιχνεύει το περιβάλλον. Όταν η προνύμφη βρει το κατάλληλο υπόστρωμα, προσκολλάται σε αυτό εκκρίνοντας νημάτια προσκόλλησης

που προέρχονται από τον αδένα του βύσου, ο οποίος συναντάται στη βάση του ποδιού. Τα νημάτια του βύσου έχουν την δυνατότητα να αποκολλώνται από το υπόστρωμα και να επανακολλώνται σε νέο, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο στα μύδια να αλλάξουν θέση ώστε να μετακινηθούν σε πιο ευνοϊκά για αυτά σημεία για τροφοληψία ή ακόμη και για την αποφυγή ανταγωνισμού με άλλα άτομα (Βουλτσιάδου et al, 2015).

## **1.2 Περίοδος αναπαραγωγής, συλλογής και κατανάλωσης**

Η περίοδος αναπαραγωγής για ένα εμπορικό είδος όπως το μύδι είναι αρκετά ενδιαφέρουσα όχι μόνο για την δυναμική του πληθυσμού αλλά και για την διαχείριση της εκτροφής του (συγκομιδή, τοποθέτηση συλλεκτήρων). Είναι γνωστό ότι στην περίοδο μετά την έκκριση του γεννητικού υλικού η ποιότητα του μυδιού υποβαθμίζεται εμπορικά, με τη μείωση του σωματικού του βάρους. Η ηλικία της πρώτης αναπαραγωγής είναι το πρώτο έτος της ζωής ενός μυδιού που ποικίλει σε μέγεθος ανάλογα με την περιοχή προέλευσης. Το φύλο διακρίνεται στο αρσενικό από τους υπόλευκους γεννητικούς αδένες, ενώ στο θηλυκό από τους αντίστοιχους πορτοκαλόχρωμους (Seed & Suchanek, 1992). Η αναπαραγωγική περίοδος διαφέρει από περιοχή σε περιοχή. Για παράδειγμα, στο είδος *M. galloprovincialis* στις ακτές της Βόρειας Ισπανίας (Ατλαντικός), παρατηρούνται τα μέγιστα της ωοτοκίας του κατά την περίοδο της άνοιξης και της αρχής του καλοκαιριού.





**Εικόνα 2.** Το όστρακο *Mytilus galloprovincialis* εσωτερικά. (© ΤΣΙΑΡΤΣΑΦΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ).

Το πρώτο μέγιστο παρατηρείται ανάμεσα σε Μάρτιο και Απρίλιο ενώ το δεύτερο ανάμεσα σε Μάιο και Ιούνιο (Ferrari et al., 1990; Villalda, 1993). Μετά τον Ιούνιο λιγιστά μύδια παρατηρείται ότι εμφανίζουν μια τρίτη και λιγότερο σημαντική περίοδο ωοτοκίας (Fuentes & Molares, 1993).

Όσον αφορά τώρα τις περιόδους συλλογής του γόνου είναι απαραίτητη η γνώση των χρονικών περιόδων της αναπαραγωγής των φυσικών πληθυσμών, έτσι ώστε να τοποθετηθούν οι γονοσυλλέκτες σε κατάλληλη χρονική περίοδο. Στην εύκρατη ζώνη, οι περίοδοι αναπαραγωγής είναι σχετικά διακριτές και ο γόνος συνηθίζεται να συλλέγεται κατά την περίοδο ανάμεσα σε Φεβρουάριο και Μάρτιο. Στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές, οι περίοδοι αναπαραγωγής μπορεί να πραγματοποιούνται με πολύ μεγάλη συχνότητα και για αυτό τον λόγο δεν υπάρχουν διακριτά μέγιστα της αναπαραγωγικής τους δραστηριότητας. Σε αυτές τις περιοχές, η τοποθέτηση δοκιμαστικών γονοσυλλεκτών είναι μια συνήθης πρακτική που ακολουθείται προκειμένου να βρεθούν οι κατάλληλες περιόδους για τη συλλογή του γόνου (Βουλτσιάδου et al, 2015).

Τα μύδια έχουν το κατάλληλο μέγεθος και σάρκα, τους μήνες όπως λένε και οι Γάλλοι που δεν έχουν «P» δηλαδή Μάιο, Ιούνιο, Ιούλιο και Αύγουστο, τότε το μέγεθος τους φτάνει τα 4-5cm μήκος και έχουν συμπαγή σάρκα και καθαρό χρώμα ([ostria-mussels.eu](http://ostria-mussels.eu),2014).

### **1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αφθονία / διασπορά και επιβίωση**

Η αναπαραγωγική στρατηγική (Lutz & Kennish, 1992) του γένους *Mytilus* (μεγάλη γονιμότητα) και η οντογενετική φάση του που εμπεριέχει πλαγκτικές μορφές που έχουν την ικανότητα μεγάλης εξάπλωσης, συντελούν στην ευρεία γεωγραφική κατανομή του γένους.

Σε αρκετές περιοχές οι προνύμφες του γένους *Mytilus* συναντώνται σε μεγάλους αριθμούς την άνοιξη και το καλοκαίρι ενώ κατά την διάρκεια του κάθε προνυμφικού / νυμφικού σταδίου σημαντικό ρόλο παίζουν διάφοροι παράγοντες

όπως η διαθεσιμότητα της τροφής, η θερμοκρασία, η αλατότητα αλλά και η ύπαρξη του κατάλληλου υποστρώματος (Lutz & Kennish, 1992).

Οι κατάλληλες συνθήκες της θερμοκρασίας και της αλατότητας κατευθείαν μετά τη γονιμοποίηση (εμβρυϊκή ανάπτυξη) του είδους *Mytilus galloprovincialis* κυμαίνονται μεταξύ 15 - 20 °C και 27 - 40 ‰ (Hrs- Brenko, 1974). Οι ανωμαλίες κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη πληθαίνουν όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος διαφέρουν αρκετά από το συγκεκριμένο εύρος τιμών.

Η καταλληλότητα της τροφής εξαρτάται από δύο παράγοντες την ποιότητα και το μέγεθος της. Οι νύμφες μπορούν να αξιοποιήσουν την τροφή της οποίας το μέγεθος βρίσκεται μεταξύ 1-9 μm (Riisgard et al. 1980). Το ποσοστό του φυτοπλαγκτού στην τροφή αν και παίζει σημαντικό ρόλο, τα μύδια έχουν την ικανότητα να αξιοποιούν τρίμματα, βακτήρια, μέχρι και διαλυμένες οργανικές ουσίες.

Έρευνες έχουν δείξει ότι η ανατάραξη του νερού μπορεί να αυξήσει 2-8 φορές την προσκόλληση των προνυμφών σε φυλλοειδείς επιφάνειες (Eyster & Pechenik, 1987; Wildish & Kristmanson, 1993). Επιπλέον η διασπορά του γόνου ορίζεται από το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι την εγκατάσταση - μεταμόρφωση σε συνδυασμό με τις κινήσεις των νερών (Day & McEdward, 1984). Όταν δεν επικρατούν οι κατάλληλες συνθήκες η διάρκεια της πλαγκτονικής ζωής επιμηκύνεται από 2 (Bayne, 1965, 1976b) ως και περισσότερο από 6 μήνες (Lane et al., 1985). Η καθυστερημένη μεταμόρφωση δεν μπορεί να διαρκέσει παραπάνω και οι νύμφες συνήθως πεθαίνουν. Η θνησιμότητα κατά την πλαγκτονική φάση είναι αρκετά μεγάλη και η ολοκλήρωση με επιτυχία αυτής της περιόδου εξαρτάται από τους εξής παράγοντες: 1) την ύπαρξη κατάλληλων περιβαλλοντικών συνθηκών κυρίως της θερμοκρασίας, 2) την διαθεσιμότητα της τροφής, 3) την θήρευση, 4) τον βαθμό



ενεργητικής ή παθητικής (διηθηματοφάγοι) πρόσληψης τροφής, 5) την δυνατότητα ανίχνευσης κατάλληλου υποστρώματος (Hancock, 1973; Bayne, 1976b).

Οι νύμφες του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* μεταμορφώνονται στα 250-257  $\mu\text{m}$  (Hrs - Brenko, 1973). Η ένταση της εγκατάστασης δεν κυμαίνεται στις ίδιες τιμές ετησίως αλλά εξαρτάται από την θερμοκρασία. Έτσι μια πρόωρη μείωση της θερμοκρασίας του νερού μπορεί να προκαλέσει πρόωρη γαμετογένεση, ωρίμανση των κυττάρων και γέννηση μεγάλου αριθμού μυδιών με αποτέλεσμα το φθινόπωρο την ύπαρξη μεγάλου αριθμού γόνου.

Η μείωση του διαλυμένου οξυγόνου που πρέπει να υπάρχει στο νερό, οδηγεί στην θνησιμότητα των προνυμφών και του γόνου των μυδιών, όπως συμβαίνει και σε πολλά άλλα είδη υδρόβιων οργανισμών (Alfaro, 2006).

Μια σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την ομαλή διαβίωση του γόνου είναι η θολερότητα του νερού που συνδυαστικά με την άνοδο της θερμοκρασίας μπορεί να προκαλέσει φαινόμενα υποξίας ή και ανοξίας. Όπως είναι γνωστό μεγάλες συγκεντρώσεις οργανικής ύλης επηρεάζουν την κατανομή του διαλυμένου οξυγόνου, αφού εξαιτίας οξειδωτικών αντιδράσεων μειώνεται σημαντικά το ποσοστό του στο νερό (ΕΚΘΕ., 2001). Αυτή η παράμετρος έχει αρνητικό αντίκτυπο στα νεαρά άτομα του γόνου και στην εγκατάστασή τους, με αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή μυδιών γενικότερα. Οι λόγοι κατά τους οποίους προκαλείται το συγκεκριμένο αποτέλεσμα, είναι η συσσώρευση οργανικού υλικού στη στήλη του νερού από τους παραγωγούς ή και από την υψηλή ρύπανση που επικρατεί στην περιοχή. Σε συγκεντρώσεις αιωρούμενων στερεών υψηλότερες από 200  $\mu\text{l}^{-1}$  ο ρυθμός πρόσληψης τροφής στις νύμφες μειώνεται (Bayne, 1976a).

Η αλατότητα είναι μία παράμετρος που παίζει καθοριστικό ρόλο στο γόνου και θα πρέπει να βρίσκεται σε επίπεδο υφάλμυρων νερών περίπου στο 29-37% και με την

εισαγωγή γλυκού νερού όπως συμβαίνει στον κόλπο του Θερμαϊκού (Γαληνού-Μητσούδη, 2003).

Τέλος σημαντικό ρόλο για την ομαλή διαβίωση του γόνου παίζει ο υδροδυναμισμός (ρεύματα), έτσι ώστε να πραγματοποιείται ανανέωση μαζών νερού και μείωση φαινομένων θερμικής στρωμάτωσης στο νερό, αλλά και αυξημένη παροχή τροφής (φυτοπλαγκτόν) στα άτομα γόνου. Παρά την σημαντικότητα τους τα ρεύματα έχουν τύχει ελάχιστης σημασίας. Οι ταχύτητες των ρευμάτων που έχουν καταγραφεί σε περιοχές εκτροφής κυμαίνονται από 0,02-0,10 m sec<sup>-1</sup> (Hickman, 1992).

## **1.4 Μυδοκαλλιέργειες**

### **1.4.1 Συστήματα εκτροφής μυδιών**

Είδη μυδιών καλλιεργούνται σε περισσότερες από 40 χώρες ανά την υφήλιο. Η συλλογή του γόνου πραγματοποιείται από φυσικούς πληθυσμούς και οι καλλιεργήσιμοι τρόποι διακρίνονται με βάση τον χώρο εγκατάστασης των μυδιών σε δύο κύριες κατηγορίες: τις καλλιέργειες βυθού και στις καλλιέργειες σε στήλη του νερού προσκολλημένα σε κατάλληλες επιφάνειες και δεν εφάπτονται στο βυθό. Η επιλογή του χώρου εγκατάστασης μιας μονάδας καλλιέργειας μυδιών καθορίζεται κυρίως από τα χαρακτηριστικά του παλιρροιακού κύκλου στην περιοχή εγκατάστασης, τις κατά τόπους παραδοσιακές τεχνικές αλλά και από την καταλληλότητα και διαθεσιμότητα του γόνου (Βουλτσιάδου et al, 2015).

### **Καλλιέργεια στο βυθό**

Η καλλιέργεια αυτού του τύπου συναντάται κυρίως στην Ευρώπη και πιο συγκεκριμένα σε Ολλανδία, Γερμανία, Ιρλανδία και Μεγάλη Βρετανία (Spencer,

2002). Για να επιτευχθεί ο συγκεκριμένος τύπος καλλιέργειας είναι απαραίτητη η ύπαρξη προστατευμένων θαλάσσιων εκτάσεων στη διαπαλιρροιακή ή και την υποπαλιρροιακή ζώνη. Ο συγκεκριμένος τύπος καλλιέργειας περιέχει τη μετακίνηση γόνου από περιοχές όπου συναντάμε μεγάλες πυκνότητες αλλά παρατηρείται έντονος κυματισμός, σε περιοχές, προστατευμένες, στις οποίες τα μύδια τοποθετούνται σε χαμηλή πυκνότητα ώστε να πραγματοποιηθεί γρηγορότερα η αύξηση και πάχυνσή τους. Τα μικρά σε ηλικία μύδια συλλέγονται με δράγες από τα φυσικά τους υποστρώματα και μετακινούνται σε προστατευμένες περιοχές εκτροφής κοντά στις ακτές. Τα μύδια που μεταφέρονται με τον συγκεκριμένο τρόπο έχουν συνήθως μέγεθος που κυμαίνεται από 10-30 mm και ηλικία ενός περίπου έτους, ενώ η μεταφορά τους γίνεται την περίοδο της άνοιξης ή στις αρχές του καλοκαιριού. Ανάλογα με την περιοχή όπου βρίσκεται η μονάδα αλλά και το εμπορεύσιμο μέγεθος που ζητεί η τοπική αγορά, ο κύκλος καλλιέργειας μπορεί να έχει διάρκεια από 1 έως 2,5 χρόνια. Η πυκνότητα φόρτισης των πεδίων καλλιέργειας έχει καθοριστικό ρόλο στον ρυθμό αύξησης των μυδιών που θα καλλιεργηθούν. Συνεχόμενες δοκιμές έχουν δείξει ότι μια πυκνότητα 2,5-3 τόνων ανά στρέμμα προσφέρει αποδεκτά αποτελέσματα. Επιπλέον, αραιώσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα της αρχικής πυκνότητας και προστατευτική περίφραξη των πεδίων για την αποφυγή θηρευτών, όπως για παράδειγμα τα καβούρια, μπορεί να βελτιώσουν ακόμη περισσότερο την απόδοση της καλλιέργειας. Η συλλογή των μυδιών από τις συγκεκριμένες μονάδες πραγματοποιείται είτε με τα χέρια και απλά εργαλεία, είτε με ειδικές δράγες που μπορούν να συλλέγουν υψηλές ποσότητες σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, μειώνοντας έτσι το εργατικό κόστος της μονάδας καλλιέργειας (Βουλτσιάδου et al, 2015).

### **Καλλιέργεια στη στήλη του νερού**

Οι μεγαλύτερες ποσότητες μυδίων σε παγκόσμιο επίπεδο προέρχονται από μονάδες καλλιέργειας στις οποίες τα μύδια αναπτύσσονται σε υποστρώματα που έχουν μεγάλη απόσταση από τον θαλάσσιο βυθό. Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η αποφυγή των βενθικών θηρευτών και η 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 (Spencer, 2002). Στις δύο τελευταίες μεθόδους τα μύδια προσκολλώνται σε συγκεκριμένα σχοινιά τα οποία αιωρούνται στο νερό και οι μονάδες καλλιέργειας είναι πλωτές και τοποθετημένες σε νερά με βάθος που ξεπερνά τα 8 μέτρα. Σε ρηχές παράκτιες περιοχές, όπως σε αρκετές περιοχές της Ελλάδας, τα κρυστάλλια με τα μύδια (αρμαθιές) μπορεί να αιωρούνται από ξύλινους οριζόντιους πασσάλους που είναι τοποθετημένοι σε σταθερές μεταλλικές εγκαταστάσεις (πασσαλωτό σύστημα). Το πασσαλωτό σύστημα διαφέρει από την καλλιέργεια σε πασσάλους που αναφέρεται παραπάνω επειδή σε αυτό τα μύδια είναι προσκολλημένα σε αιωρούμενο υπόστρωμα (κρυστάλλι-αρμαθιά) και όχι απευθείας πάνω στους πασσάλους (Εικόνα 3). Το βάθος του νερού, στο οποίο θα τοποθετηθεί μια τέτοια μονάδα είναι συνήθως 2-4 μέτρα και το κρυστάλλι που φέρει τα μύδια (αρμαθιά) πρέπει να έχει μέγεθος τόσο όσο να του επιτρέπει να αιωρείται πάνω από το βυθό για την αποφυγή των θηρευτών (Βουλτσιάδου et al, 2015).



**Εικονα 3.** Πασσαλοτή μονάδα καλλιέργειας μυδιών του είδους *Mytilus galloprovincialis* στην περιοχή της Χαλάστρας (©ΤΣΙΑΡΤΣΑΦΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ)

### **Καλλιέργεια σε πασσάλους**

Αυτός ο τύπος καλλιέργειας εμφανίστηκε για πρώτη φορά στη Γαλλία τον 13ο αιώνα και είναι ίσως η αρχαιότερη μέθοδος στην Ευρώπη. Προϋποθέτει την ύπαρξη ρηχών νερών στη διαπαλιρροιακή ζώνη, έτσι ώστε η εγκατάσταση να είναι προσβάσιμη κυρίως ή και μόνο κατά την άμπωτη. Σειρές από ξύλινους πασσάλους (bouchots) ή από αλουμίνιο, τοποθετούνται στον θαλάσσιο βυθό. Οι πάσσαλοι έχουν τις περισσότερες φορές μήκος 4-7 μέτρα και διάμετρο 25-30 cm και προεξέχουν από τον βυθό κατά 2-3 μέτρα. Χρησιμεύουν τόσο για τη συλλογή γόνου όσο και για την ανάπτυξη των μυδιών μέχρι αυτά να φτάσουν στο εμπορεύσιμο μέγεθος. Τρία έως πέντε μέτρα σχοινού συλλογής γόνου ή σωλήνων από δίχτυ γεμάτα με μικρά σε ηλικία μύδια τυλίγονται περιμετρικά από τους πασσάλους και προσαρτώνται σε αυτούς. Στη συνέχεια, πάνω από ολόκληρη τη δομή τοποθετείται ένα δίχτυ που δεν επιτρέπει στα μύδια να πέσουν. Τα νεαρά μύδια, σε μικρό χρονικό διάστημα, εξέρχονται από τους σωλήνες μέσα από τα ανοίγματα και με τη βοήθεια των νηματίων του βύσου προσκολλώνται σε όλη την επιφάνεια του πασσάλου. Μερικές φορές, χρειάζονται αραίωση επειδή η πυκνότητά τους είναι πολύ μεγάλη. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με αφαίρεση μιας ποσότητας μυδιών από τους υπερφορτωμένους πασσάλους και με την τοποθέτηση τους σε καινούργιους σωλήνες και πασσάλους. Στο τελευταίο στάδιο του κύκλου εκτροφής, που μπορεί να έχει διάρκεια μέχρι και δύο χρόνια, από τον κάθε πάσσαλο ξεχωριστά μπορούν να συλλεχτούν μέχρι και 25-60 kg μυδιών με μέγεθος 40-50 mm (Βουλτσιάδου et al,2015)



**Εικόνα 4.** Μονάδα καλλιέργειας μυδιών σε πασσάλους  
(©europa.eufisheriessitesfisheriesfilesdocsbodymussels\_el)

### **Καλλιέργεια σε σχεδίες**

Σε αυτή τη μέθοδο καλλιέργειας, τα μύδια προσκολλώνται σε σχοινιά που αιωρούνται κάθετα στο νερό κρεμασμένα από μια πλωτή κατασκευή. Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει την καλλιέργεια μεγάλων ποσοτήτων μυδιών σε περιορισμένο χώρο και για αυτό το λόγο εγκυμονεί κινδύνους εάν χρησιμοποιηθεί εντατικά, επειδή μπορεί να προκαλέσει περιβαλλοντικά προβλήματα εξαιτίας της συσσώρευσης των απεκκριμάτων των μυδιών στον πυθμένα του βυθού. Είναι λοιπόν πολύ σημαντικό ζήτημα σε αυτόν τον τύπο καλλιέργειας η επιλογή της κατάλληλης τοποθεσίας για την εγκατάσταση της μονάδας. Το βάθος του νερού πρέπει να είναι σχετικά μεγάλο ώστε τα σχοινιά να μην εφάπτονται στον βυθό για την αποφυγή των βενθικών θηρευτών, αλλά και να υπάρχουν ρεύματα με σχετικά μεγάλη δύναμη, τόσο για την προμήθεια τροφής στα μύδια όσο και για την απομάκρυνση των απεκκριμάτων τους. Η καλλιέργεια των μυδιών σε σχεδίες είναι αρκετά διαδεδομένη στην Ισπανία, που είναι και η μεγαλύτερη χώρα σε παραγωγή μυδιών στην Ευρωπαϊκή Ένωση, όπου λειτουργεί μεγάλος αριθμός μονάδων τοποθετημένες σε περιοχές κοντά στις εκβολές ποταμών. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση αυτής της δραστηριότητας βρίσκεται στις

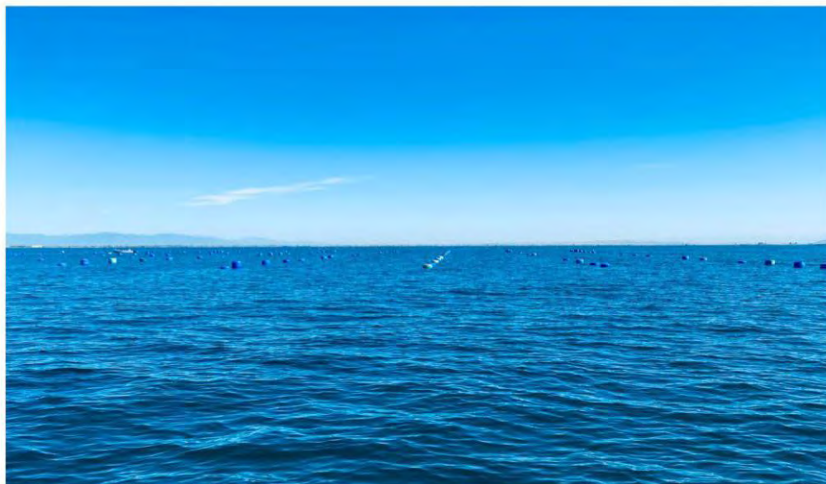
ακτές της Γαλικίας, στο βορειοδυτικό τμήμα της χώρας. Οι σχεδίες απαρτίζονται από πλαστικούς ή ξύλινους πλωτήρες, οι οποίοι υποστηρίζουν ένα ξύλινο συνήθως πλαίσιο από παράλληλα τοποθετημένες σειρές ξύλων, από τις οποίες κρεμιούνται τα σχοινιά με τα μύδια. Έχει υπολογιστεί ότι μια τυπική τετράγωνη σχεδία με πλευρά μήκους 20 μέτρων, από την οποία αιωρούνται 500 σχοινιά με απόσταση 50 cm μεταξύ τους, μπορεί να παράγει μέχρι και 60 τόνους μυδιών ετησίως. Η καλλιέργεια σε σχεδίες είναι δημοφιλής και σε άλλες χώρες παγκοσμίως όπως η Αυστραλία, η Κίνα, η Χιλή, ο Καναδάς, οι ΗΠΑ, η Ινδία κ.ά. Στην Ευρώπη καλλιέργεια μυδιών σε σχεδίες γίνεται επίσης στην Ιρλανδία και Σκοτία (Βουλτσιάδου et al, 2015).

### **Καλλιέργεια σε σύστημα μακράς γραμμής**

Αυτός ο τύπος καλλιέργειας έχει πολλά κοινά στοιχεία με την καλλιέργεια σε σχεδίες όσον αφορά στην αιώρηση των σχοινιών με τα μύδια στον νερό. Τα συστήματα αυτά, όμως σε σχέση με τις σχεδίες μπορούν να εγκατασταθούν σε περιοχές με πιο έντονο κυματισμό και ρεύματα. Τα μοντέρνα συστήματα μακράς γραμμής δημιουργήθηκαν από την τροποποίηση της μεθοδολογίας που είχε αναπτυχθεί στην Ιαπωνία για την καλλιέργεια στρειδιών και χτενιών. Οι μονάδες καλλιέργειας απαρτίζονται από σειρές οριζόντιων σχοινιών από πολυπροπυλένιο που συγκρατούνται με πλωτήρες στην επιφάνεια ή, σε κάποιες ειδικές περιπτώσεις, 1,5 έως 3 μέτρα κάτω από την επιφάνεια του νερού (Εικόνα 5). Τα σχοινιά με τα μύδια (αρμαθίες) κρέμονται από τα οριζόντια σχοινιά σε απόσταση περίπου 50 cm μεταξύ τους. Για την κατασκευή μιας γραμμής αρμαθιών 200 μέτρων, χρησιμοποιείται σχοινί με διάμετρο 18-30 mm, το οποίο υποστηρίζεται από πλαστικά βαρέλια χωρητικότητας 25-30 λίτρων που τοποθετούνται σε απόσταση 10 έως 12 μέτρων μεταξύ τους και τα κάθετα σχοινιά με τα μύδια έχουν συνήθως μήκος 4-6 μέτρων. Οι δύο ακραίοι πλωτήρες κάθε σειράς



αρμαθιών στερεώνονται στον βυθό με χοντρό σχοινί το οποίο είναι δεμένο σε τσιμεντένιο αγκυροβόλιο που βρίσκεται τοποθετημένο στον πυθμένα. Σε ορισμένες περιοχές με ισχυρά θαλάσσια ρεύματα και έντονο κυματισμό, τα οριζόντια σχοινιά κάθε σειράς αρμαθιών βυθίζονται σε βάθος από 1,5 έως 3 μέτρα κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας για την αποφυγή ζημιών στην παραγωγή αλλά και για την καλύτερη αύξηση των μυδιών, τα οποία με τον τρόπο αυτό βρίσκονται σε πιο ήρεμα νερά, κάτι το οποίο επιτρέπει το άνοιγμα των θυρίδων για τροφοληψία (Βουλτσιάδου et al,2015).



**Εικόνα 5.** Μονάδα καλλιέργειας μυδιών τύπου μακράς γραμμής (long line) στην περιοχή της Χαλάστρας (©ΤΣΙΑΡΤΣΑΦΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ)

#### **1.4.2 Περιοχές μυδοκαλλιέργειας στον κόσμο**

Τα μύδια εκτρέφονται σε αρκετές περιοχές ανά τον κόσμο με κυριότερα τα είδη *Mytilus edulis* και *Mytilus galloprovincialis*. Πιο συγκεκριμένα σε περιοχές όπως η Κίνα η Ισπανία, η Γαλλία, η Ολλανδία, η Χιλή, η Ταϊλάνδη και οι Φιλιππίνες. Επίσης μονάδες εκτροφής υπάρχουν στην Αυστραλία, στην Κορέα (FAO, 1999), σε χώρες της Άπω ανατολής, στην Ινδία, στις ακτές του Ατλαντικού στη νότια Αμερική (Βενεζουέλα, Βραζιλία), στη νότια Αφρική και στη Νέα Ζηλανδία (Βουλτσιάδου et al, 2015).

#### **1.4.3 Περιοχές μυδοκαλλιέργειας στην Ελλάδα**

Σήμερα, μονάδες καλλιέργειας μυδιών συναντώνται στην περιφέρεια Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης (Ν. Ροδόπης, Ξάνθης, Καβάλας), στην περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας (Ν. Θεσσαλονίκης, Ημαθίας, Πιερίας, Χαλκιδικής και Σερρών,) στην περιφέρεια Δυτικής Ελλάδας (Ν. Πρεβέζης και Θεσπρωτίας), στην Αττική και στον Νομό Φθιώτιδας. Το μεγαλύτερο τμήμα αυτής της δραστηριότητας λαμβάνει χώρα στην Κεντρική Μακεδονία. Σύμφωνα με στοιχεία του 2012 (Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας, Επιχειρησιακό Σχέδιο Αγροτικής Ανάπτυξης «Καλάθι Αγροτικών Προϊόντων», Θεσσαλονίκη, Απρίλιος 2012), το 2007 υπήρχαν συνολικά 549 ενεργές μονάδες καλλιέργειας μυδιών. Οι Ν. Θεσσαλονίκης, Πιερίας και Ημαθίας κατέχουν σχεδόν το 90% των μονάδων εκτροφής μυδιών που υπάρχουν στον Ελλαδικό χώρο. Περισσότερες από τις μισές μονάδες της Ελλάδας βρίσκονται στο Ν. Θεσσαλονίκης με δεύτερη την Ημαθία με ποσοστό 21% και τρίτη την Πιερία με ποσοστό 13%. Το ίδιο ισχύει και για την παραγωγή μυδιών από καλλιέργεια αλλά

όχι και για τη θαλάσσια έκταση που σκεπάζεται από καλλιέργειες, στην οποία υπερισχύει η Πιερία έναντι των υπολοίπων. Οι υπόλοιπες περιοχές έχουν μικρό αριθμό μονάδων και μικρή παραγωγή (Βουλτσιάδου et al,2015)..

#### **1.4.4 Παραγωγή μυδιών**

##### **1.4.4.1 Παγκόσμια παραγωγή**

Όσον αφορά τα μύδια, η Κίνα και η Ευρωπαϊκή Ένωση έχουν τη μεγαλύτερη παραγωγή και ακολουθούν η Χιλή και η Νέα Ζηλανδία. Σύμφωνα με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το μεγαλύτερο μέρος της προσφοράς μυδιών στην ΕΕ. παράγεται τοπικά. Η Ισπανία είναι η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα μυδιών στην Ευρώπη με παραγωγή που ξεπερνά τους 150 χιλιάδες τόνους μυδιών ετησίως. Ακολουθεί δεύτερη η Γαλλία με παραγωγή που υπολογίζεται από 20 έως 50 χιλιάδες τόνους ετησίως και τέλος η Μ. Βρετανία, η Ελλάδα και η Ολλανδία με παραγωγές που κυμαίνονται μεταξύ 20 και 50 χιλιάδων τόνων ετησίως. Μικρότερες ποσότητες παράγονται από τη Γερμανία, τη Σουηδία, την Πορτογαλία και τη Βουλγαρία (Βουλτσιάδου et al,2015)..

##### **1.4.4.2 Ελληνική παραγωγή**

Από τους 95.000 τόνους της Ευρωπαϊκής Ένωσης μεσογειακού μυδιού (*Mytilus galloprovincialis*), οι 30.000 τόνοι μυδιών αποτελούν την Ελληνική παραγωγή (FAO,2002). Η Ελληνική παραγωγή μυδιών άρχισε να ανθίζει από τις αρχές της δεκαετίας του 1990, μια εικοσαετία αργότερα από ότι στην Ευρώπη (Α.Τ.Ε.Ι.Θ.,2007). Η παραγόμενη αξία στην περιοχή μελέτης είναι € 10 εκατομμύρια ετησίως (Zanou & Anagnostou, 2001) και σχεδόν 1000 άτομα απασχολούνται στις μονάδες (Α.Τ.Ε.Ι.Θ., 2007). Σχετικά με το εμπόριο η ετήσια δυναμική παραγωγής της

περιοχής, ανέρχεται σε 17.000-20.000 τόνους και σχεδόν αποκλειστική χώρα προορισμού της παραγωγής είναι η Ιταλία (ΕΚΘΕ, 2001).

#### **1.4.5 Στάδια διαδικασίας παραγωγής στην Ελλάδα**

Πρώτο και κυριότερο στάδιο στην παραγωγική διαδικασία είναι η συλλογή του γόνου. Προϋπόθεση για τη συλλογή του γόνου είναι η γνώση των χρονικών περιόδων αναπαραγωγής των φυσικών πληθυσμών, έτσι ώστε να τοποθετηθούν οι γονοσυλλέκτες σε κατάλληλη χρονική περίοδο. Στην εύκρατη ζώνη, οι περίοδοι αναπαραγωγής είναι σχετικά εμφανείς και τις περισσότερες φορές ο γόνος συλλέγεται κατά την περίοδο ανάμεσα σε Φεβρουάριο και Μάρτιο (Βουλτσιάδου et al, 2015)..Οι μυδοκαλλιεργητές αφαιρούν το γόνο από τα σχοινιά και τον τοποθετούν σε πλαστικά κυλινδρικά δίχτυα(κρυστάλλια) με την βοήθεια πλαστικών σωλήνων με διάμετρο ανάλογη με το μέγεθος του γόνου, τις λεγόμενες αρμαθιές, που κρέμονται δεμένα με την βοήθεια σχοινού ανάλογα με μάκρος αντίστοιχο της κάθε μονάδας καλλιέργειας εντός του νερού. Η εκτροφή πραγματοποιείται είτε πάνω σε πασσάλους (πασσαλωτά μυδοτροφεία), είτε πάνω σε σχοινιά που κρέμονται από πλωτήρες (πλωτά ή long-line μυδοτροφεία). Από τον Μάιο έως και τον Ιούλιο αλλά και τους χειμερινούς μήνες, οι μυδοκαλλιεργητές φροντίζουν να ανοίγουν κατά καιρούς τις αρμαθιές, να αραιώνουν τα μύδια που στο μεταξύ έχουν μεγαλώσει και να τα επανατοποθετούν ξανά πίσω στην μονάδα, ώσπου να φτάσουν στο εμπορεύσιμο μέγεθος και να είναι έτοιμα για συγκομιδή(axiosdelta.gr, Φορέας Διαχείρισης)

## 1.5 Θαλάσσιο περιβάλλον κόλπων Θεσσαλονίκης, Θερμαϊκού

### 1.5.1 Γεωμορφολογία

Ο Θερμαϊκός κόλπος βρίσκεται στο βορειοδυτικά του Αιγαίου πελάγους. Οι συνεχείς αποθέσεις υλικών από τους ποταμούς έχουν ως αποτέλεσμα το ανάγλυφο του πυθμένα να είναι ομαλό (Karageorgiset al., 2004). Η μορφολογία του κόλπου της Θεσσαλονίκης είναι τμήμα που αντιστοιχεί στην εσωτερική ηπειρωτική κατωφέρεια του ευρύτερου Θερμαϊκού. Στον κόλπο εκβάλλουν τέσσερις ποταμοί, ο Γαλλικός, ο Αξιός, ο Λουδίας και ο Αλιάκμονας. Εδρεύουν τρία αντλιοστάσια του αρδευτικού δικτύου της πεδιάδας της Θεσσαλονίκης αλλά και η έξοδος των βιολογικών καθαρισμών της Θεσσαλονίκης. Η παράκτια ζώνη όπου πραγματοποιείται η παραγωγή της οστρακοειδών περιλαμβάνει τρία είδη περιοχών:

- α) Υνροτοπικές: χαρακτηρίζονται οι περιοχές που βρίσκονται σε όλο το εκβολικό σύστημα συμπεριλαμβανομένων και των δέλτα των ποταμών Αξιού, Λουδία, Αλιάκμονα, Γαλλικού και σε θαλάσσιο βάθος μικρότερο των 6 m των αλυκών του Κίτρου, Αγγελοχωρίου και της Επανομής.
- β) Θαλάσσιες: Εκεί είναι τοποθετημένες οι μονάδες καλλιέργειας.
- γ) Χερσαίες: στις οποίες υπάρχουν τα αλιευτικά καταφύγια (καλύβες) και η υποδομή στήριξης των μυδοκαλλιεργητών ( Φασούλας, 2008)(Εικ. 6).



**Εικόνα 6.** Καλύβες μυδοκαλιεργητών στην περιοχή της Χαλάστρας (©ΤΣΙΑΡΤΣΑΦΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ)

### 1.5.2 Κλίμα Θεσσαλονίκης

Το κλίμα χαρακτηρίζεται ηπειρωτικό και αλλάζει σε μεσογειακό στις παράκτιες περιοχές. Η θερμοκρασία παίρνει τιμές από 0 °C-38 °C (Poulos et al., 2000). Η μέση ετήσια θερμοκρασία του αέρα κυμαίνεται από 9 °C-17,5 °C, ενώ η ετήσια βροχόπτωση από 400-1300 mm (Poulos et al., 2000). Το χειμώνα, παρατηρούνται άνεμοι βόρειοι-βορειοδυτικοί (επικρατούντες άνεμοι στη διάρκεια του έτους), ενώ το καλοκαίρι η μεταβλητότητα αυξάνετε με επικρατέστερα είδη ανεμών τους νότιους και δυτικούς (Hyder et al., 2002; ΥΠΓΕ, 2003). Οι άνεμοι βορείων κατευθύνσεων φυσούν ανά διαστήματα κυρίως το χειμώνα και διαρκούν από 4-6 ημέρες και με ταχύτητα που μπορεί να φτάνει ακόμη και τα 20 m sec<sup>-1</sup>. Το μελέμι είναι ενεργό από Μάιο μέχρι και Σεπτέμβριο στο νότια του κόλπου. Φυσάει κατά διαστήματα στις

αρχές και σταθεροποιείται περίπου στα μέσα του Ιουλίου με Σεπτέμβριο, αυξάνοντας ταυτόχρονα και την ένταση του (φυσάει από βόρεια και βορειοανατολικά). Επίσης το καλοκαίρι εμφανίζεται ημερήσια θαλάσσια αύρα (5-10 m sec<sup>-1</sup>), που προέρχεται από τα νότια και τα νοτιοανατολικά (Hyder et al., 2002). Η επίδρασή της είναι αρκετά σημαντική, όταν δε φυσούν τα μελέμια (Poulos et al., 2000). Γενικότερα η βόρεια συνιστώσα του ανέμου κατέχει τη μεγαλύτερη συχνότητα (40 %), (Karageorgis & Anagnostou, 2001) σε όλη τη διάρκεια του χρόνου.

### **1.5.3 Φυσικοχημικοί παράμετροι του νερού**

Στους φυσικοχημικούς παραμέτρους του νερού ανήκουν η θερμοκρασία, η αλατότητα, τα ρεύματα, το διαλυμένο οξυγόνο και τα θρεπτικά άλατα.

α) Πιο συγκεκριμένα στην περιοχή μελέτης, η θερμοκρασία παίρνει τις μικρότερες τιμές της μεταξύ του Φεβρουάριου και του Μαρτίου. Αργότερα αρχίζει μια συνεχής αύξησή της που φτάνει ακόμη και στα πιο βαθιά θαλάσσια στρώματα στα τέλη Μαΐου και συνεχίζει να αυξάνεται μέχρι και τα τέλη του Αυγούστου. Οπότε αρχίζει μια σταδιακή μείωση προς τις αρχές του χειμώνα, χωρίς όμως να εμφανίζονται έντονες μεταβολές στις βαθμίδες θερμοκρασίας του βάθους, όπως παρατηρείται κατά την περίοδο της ανόδου (ΕΚΘΕ, 2001)

β) Η αλατότητα στο διάστημα Φεβρουάριου - Μαρτίου εμφανίζει τις μικρότερες τιμές στην επιφάνεια ενώ αντιθέτως στον πυθμένα τις μεγαλύτερες. Στο διάστημα αυτό εμφανίζεται το έντονο φαινόμενο που ονομάζεται αλοκλινές. Το αλοκλινές μειώνεται κατά το πέρασμα στους θερινούς μήνες και εμφανίζεται σε συνεχώς μειωμένο βάθος. Το ίδιο ισχύει και με την θερμοκρασία, από τον Μάιο η θαλάσσια στήλη γίνεται πιο ομοιογενής και μένει σταθερή μέχρι να αρχίσουν οι εκροές των ποταμών από τον Νοέμβριο και μετά. Τον Νοέμβριο παρατηρείται υψηλή αλατότητα στα πιο βαθιά

στρώματα της ανατολικής περιοχής ως αποτέλεσμα της εισροής νερών από το Β. Αιγαίο (ΕΚΘΕ,2001).

γ) Το διαλυμένο οξυγόνο (D02) είναι βασικός παράγοντας για τη ζωή των θαλάσσιων οργανισμών. Οι αυξομειώσεις στις συγκεντρώσεις του έχουν άμεση σχέση τόσο με βιολογικές διεργασίες όπως η φωτοσύνθεση, αλλά και παραμέτρους όπως η θερμοκρασία και το βάθος. Στην συγκεκριμένη περιοχή η μέση συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου τον χειμώνα είναι 7,52 mg Γ1 ενώ το καλοκαίρι 7,0 mg Γ1 (στοιχεία της περιόδου 1992-2002 HCMR, 2003). Από έρευνες του ΕΚΘΕ (2001) οι τιμές δεν προσέγγισαν τα όρια του φαινομένου της ανοξίας ούτε κατά την διάρκεια της θερινής περιόδου κοντά στον πυθμένα, παρά το γεγονός ότι η θερμοκρασία και η στρωματώση αυξήθηκαν κατά το έτος του 2000.

δ) Τα θρεπτικά άλατα στην περιοχή του Θερμαϊκού κόλπου δείχνουν υψηλές συγκεντρώσεις κατά ένα βαθμό που είναι αποτέλεσμα της δράσης των ποταμών. Επιπλέον εμφανίζουν μεγάλες χρονικές διακυμάνσεις επειδή η γεωργία είναι η πιο σημαντική πηγή των νιτρικών και φωσφορικών, με αποτέλεσμα το ανέβασμα των τιμών συγκέντρωσης τους καλοκαιρινούς μήνες λόγω αρδεύσεων και τον Νοέμβριο - Δεκέμβριο λόγω βροχοπτώσεων (ΕΚΘΕ, 2001). Η αύξηση των θρεπτικών αλάτων οδηγεί στην αύξηση του φυτοπλαγκτού. Τα μύδια των μυδοκαλλιεργειών όμως, χρησιμοποιούν ως τροφή το φυτοπλαγκτόν, μεγαλώνοντας έτσι την διαφάνεια. Η αναπλήρωση των ποσοτήτων του φυτοπλαγκτού πετυχαίνεται μη τη βοήθεια της επαναιώρησης, παλίρροιας κτλ. (Γκανούλης, 1993). Οι τιμές των θρεπτικών (αρκετά υψηλές) στην περιοχή της Χαλάστρας είναι χαρακτηριστικές των παράκτιων περιοχών που έρχονται σε επαφή με την ανθρωπογενή δράση και τις εισροές των ποταμών. Σε σχέση με μετρήσεις που έχουν γίνει κατά την περίοδο 1995-1996 (Κράββα, 2000), το 2000 οι τιμές στις οποίες κυμάνθηκαν τα νιτρικά και τα νιτρώδη



παρέμειναν στα ίδια επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα τα νιτρικά πήραν τιμές από 0,5-4,8  $\mu\text{M}$  επιφανειακά και 0,5-2,5  $\mu\text{M}$  στα 5m βάθος και τα νιτρώδη από 0,05-0,2  $\mu\text{M}$  με εξαιρετικά αυξημένες τιμές τον Οκτώβριο 0,4-0,5  $\mu\text{M}$  ενώ οι υψηλότερες τιμές φωσφορικών αυξήθηκαν κατά 100  $\text{pg/l}$  και συγκεκριμένα κυμάνθηκαν από 0,2-0,8  $\mu\text{M}$  επιφανειακά και 0,15-0,7  $\mu\text{M}$  στα 5m βάθος και των αμμωνιακών βρέθηκαν μειωμένα κατά 15  $\text{pg}$  Γ1 δηλαδή ήταν ανάμεσα από 0,1-1,5 $\mu\text{M}$  με αύξηση από τον Σεπτέμβριο που έφτασε μέχρι και τα 4,5  $\mu\text{M}$  (ΕΚΘΕ, 2001). Οι τιμές των θρεπτικών δεν φαίνεται να έχουν αυξητική τάση λόγω της ύπαρξης των μυδοκαλλιεργειών. Τα νιτρικά άλατα αυξάνονται τους μήνες του φθινοπώρου (Σεπτέμβριο, Οκτώβριο, Νοέμβριο), που συμπίπτουν με την «άνθηση» του φυτοπλαγκτού. Μειώνονται σταδιακά από τον Μάρτιο προς τον Μάιο και έχουν σταθερά χαμηλές τιμές το καλοκαίρι. Τα νιτρώδη παραμένουν σταθερά και έχουν καταγραφεί υψηλές τιμές τον μήνα Οκτώβριο. Τα αμμωνιακά και τα πυριτικά έχουν σταδιακή αύξηση τον Σεπτέμβριο. Τα φωσφορικά είναι γενικώς αυξημένα αλλά κορυφώνονται τον Ιούνιο και το φθινόπωρο ( Φασούλας,2008).

#### **1.5.4 Θεσμικό πλαίσιο. Συνθήκη Ramsar, Natura 2000.**

Στη Βόρεια Ελλάδα βρίσκεται αρκετά μεγάλος αριθμός υγροτόπων που είναι είτε διεθνούς αξίας και προστατεύονται από τη συνθήκη Ramsar, είτε εθνικής αξίας που προστατεύονται από εθνική νομοθεσία ή από το δίκτυο Natura 2000. Το Δέλτα του Αξιού και μέρος του ποταμού έως 7 km πάνω από τις εκβολές (67  $\text{km}^2$ ), βρίσκεται υπό το καθεστώς της συνθήκης Ramsar, που υπογράφηκε από την Ελλάδα στις 19/11/1974. Επιπλέον η Ευρωπαϊκή Ένωση με το πρόγραμμα Natura 2000, για τον χαρακτηρισμό και την προστασία των οικοσυστημάτων με μεγάλα ποσοστά βιοποικιλότητας και σημαντικών για το περιβάλλον, περιέλαβε τις παρακάτω περιοχές: GR1220002 Δέλτα Αξιού-Λουδία-Αλιάκμονα (112  $\text{km}^2$ ), GR1220007

Αξιού ποταμού (77 km<sup>2</sup>), GR1250010 Δέλτα Αξιού-Λουδία-Αλιάκμονα-Αλυκή Κίτρος (138 km<sup>2</sup>) (Πιν. 1). Το Δίκτυο Natura 2000 είναι ένα Ευρωπαϊκό Οικολογικό Δίκτυο με περιοχές οι οποίες φιλοξενούν φυσικούς τύπους οικοτόπων και οικοτόπους ειδών που είναι σημαντικοί σε Ευρωπαϊκό επίπεδο. Απαρτίζεται από δύο κατηγορίες περιοχών: Τις «Ζώνες Ειδικής Προστασίας (ΖΕΠ)» (Special Protection Areas - SPA) για την Ορνιθοπανίδα, όπως ονομάζονται στην Οδηγία 79/409/ΕΚ, και τους «Τόπους Κοινοτικής Σημασίας (ΤΚΣ)» (Sites of Community Importance - SCI) όπως ονομάζονται στην Οδηγία 92/43/ΕΟΚ (<http://www.minenv.gr>) Η μυδοκαλλιέργεια με το πλωτό σύστημα εγκαθίσταται σε βάθη μεγαλύτερα των 6 m, που αποτελεί το όριο των προστατευόμενων υγροτοπικών περιοχών σύμφωνα με την Συνθήκη Ramsar, και διενεργείται στο ΒΔ κόλπο Θεσσαλονίκης (Χαλάστρα). Η περιοχή μελέτης που υπάγεται στον ΒΔ κόλπο Θεσσαλονίκης, χαρακτηρίζεται επιπλέον ως ιδιαιτέρως προστατευόμενη περιοχή (Special Protected Areas - SPA). Με Κοινή Υπουργική Απόφαση (αρ.14874/3291/6/7/1998) οι εκβολές του Γαλλικού, η Λιμνοθάλασσα του Καλοχωρίου και η Αλυκή Κίτρος, χαρακτηρίζονται ως σημαντικές οικολογικά και προστατεύονται (Karageorgis et al., 2004).

**Πίνακας 1.** Οι περιοχές Natura 2000 στην περιοχή της Θεσσαλονίκης (<http://www.minenv.gr>) • Όπου SCI = Τόποι Κοινοτικής Σημασίας, SPA = Ζώνες Ειδικής Προστασίας.

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΤΟΠΟΥ	ΕΚΤΑΡΙΑ (ha)
GR1220001	SCI	ΛΙΜΝΕΣ ΒΟΛΒΗ & ΛΑΓΚΑΔΑ-ΕΥΡΥΤΕΡΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	26947.81

GR1220002	SCI	ΔΕΛΤΑ ΑΞΙΟΥ-ΛΟΥΔΙΑ- ΑΛΙΑΚΜΟΝΑ-ΕΥΡΥΤΕΡΗ ΠΕΡΙΟΧΗ-ΑΧΙΟΥΠΟΛΗ	33676.35
GR1220003	SCI	ΣΤΕΝΑ ΡΕΝΤΙΝΑΣ - ΕΥΡΥΤΕΡΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	2905.16
GR1220005	SCI/SPA	ΛΙΜΝΟΘΑΛΑΣΣΑ ΑΓΓΕΛΟΧΩΡ ΙΟΥ	377.20
GR1220009	SPA	ΛΙΜΝΕΣ ΒΟΛΒΗ ΚΑΙ ΛΑΓΚΑΔΑ ΚΑΙ ΣΤΕΝΑ ΡΕΝΤΙΝΑΣ	15671.00
GR1220010	SPA	ΔΕΛΤΑ ΑΞΙΟΥ-ΛΟΥΔΙΑ- ΑΛΙΑΚΜΟΝΑ-ΑΛΥΚΗ ΚΙΤΡΟΥΣ	29551.00
GR1220011	SPA	ΛΙΜΝΟΘΑΛΑΣΣΑ ΕΠΑΝΟΜΗΣ	690.00
GR1220012	SCI	ΛΙΜΝΟΘΑΛΑΣΣΑ ΕΠΑΝΩΜΗΣ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΑ ΠΑΡΑΚΤΙΑ ΖΩΝΗ	830.38

### 1.5.5 Ρύπανση

Ο ΒΔ κόλπος της Θεσσαλονίκης είναι αποδέκτης τεράστιου ρυπαντικού φορτίου από ανθρωπογενείς παρεμβάσεις που πραγματοποιούνται εντός αυτού ή καταλήγουν σε αυτόν. Πιο συγκεκριμένα ρύπανση αυτή συμβαίνει χάρη στις κατακρημνίσεις, εκπλύσεις εδαφών, από πλοία και σκάφη μυδοκαλλιέργειας, εναποθέσεις ρύπων στην ξηρά, και εκβολές υποθαλάσσιων αγωγών. Η συνεχόμενη επιβάρυνση της θάλασσας με ρύπους έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή της σε εύτροφη. Το φαινόμενο του ευτροφισμού αυξήθηκε αρκετά μετά το 1992 με τη συνεχόμενη εμφάνιση «ερυθρών παλιρροιών» και μαζικές θνησιμότητες οργανισμών (Pagou et al., 2003, SoHelME, 2005).

Ο Αξιός με το 83% της λεκάνης απορροής του να βρίσκεται στην πρώην περιοχή των Σκοπίων, έχει καταγραφεί ως ο δεύτερος ποταμός που προκαλεί την μεγαλύτερη ρύπανση στην Ελλάδα όσον αφορά τα θρεπτικά, το οργανικό φορτίο, τα βαρέα μέταλλα, και την συγκέντρωση του οξυγόνου (Karageorgis et al., 2004). Σύμφωνα με την ίδια έρευνα, ο Θερμαϊκός είναι η κατάληξη αστικών λυμάτων περίπου 3.300.000 κατοίκων που υπολογίζεται ότι κατοικούν στην υδρολογική λεκάνη του, καθώς και βιομηχανικών αποβλήτων.

Στον είδη επιβαρυνόμενο αποδέκτη έρχεται να προστεθεί η εναπόθεση των προϊόντων του μεταβολισμού των μυδιών (κόπρανα και ψευδοκόπρανα) στο βυθό κάτω από τις μονάδες καθώς και τα παραπροϊόντα της διαχείρισης των μυδοκαλλιέργειών (πχ. αραιώσεις). Η ποσότητα των προϊόντων μεταβολισμού έχει ιλύωδη μορφή και εξαρτώνται από τη μεταβολική τους δραστηριότητα. Η διαχείριση της μυδοκαλλιέργειας παράγει μεγάλο όγκο ρύπων όπως για παράδειγμα χρησιμοποιημένα δίχτυα αρμαθιών, κελύφη νεκρών μυδιών, μάζες φυκών, επιβιώτες και άλλα οργανικά υπολείμματα (ΕΚΘΕ, 2001).

#### **1.5.6 Προβλήματα που αφορούν την περιοχή μυδοκαλλιέργειας της Χαλάστρας**

- Εμφάνιση τοξικού φυτοπλαγκτού

Στον Θερμαϊκό η ανταπόκριση του φυτοπλαγκτού στον ευτροφισμό από το 1980 έως το 1995 ήταν η εμφάνιση ανθήσεων και διστόμων κατά την διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών (Moncheva et al., 2001). Η επικράτηση των διστόμων αποδόθηκε στην δυνατότητα τους να εκμεταλλεύονται τα υψηλά επίπεδα θρεπτικών ιδιαίτερα του πυριτίου (Si). Αργότερα μετά το 1995 με βάση τους Karageorgis et al. (2004), ακολουθούν οι ανθήσεις του είδους *Dinophysis acuminata* (Claparede et Lachmann, 1859) που περιέχει τοξίνη (Gosling, 2003c) προκαλώντας διαρροϊκό σύνδρομο (Diarrhetic Shellfish Poisoning - DSP). Η αρχική αναφορά έγινε τον

Ιανουάριο μέχρι τον Μάιο του 2000 με συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την συγκέντρωση των 1000 κυττάρων Γ1 που θεωρητικά εμφανίζει προβλήματα τοξικότητας. Στην συνέχεια εμφανίστηκε την άνοιξη του 2001 με συγκεντρώσεις αρκετά μικρότερες 100-500 κυττάρων Γ1. Το 2002 εμφανίστηκε το διάστημα Φεβρουάριου - Μαΐου. Τα μύδια στις περιόδους αυτές παραμένουν στις μονάδες για μεγάλα διαστήματα, μέχρι να κριθούν κατάλληλα για κατανάλωση από την αρμόδια για την δημόσια υγεία Δ/ση Κτηνιατρικής της Ν.Α.Θ. Στο διάστημα αυτό μπορεί εγκυμονεί μεγάλος κίνδυνος να χαθεί η παραγωγή λόγω της αύξησης του βάρους της αρμαθιάς, αν δεν γίνουν οι απαραίτητες αραιώσεις. Οι οικονομικές απώλειες που οφείλονται στην μόλυνση από το τοξικό φυτοπλαγκτό εκτιμάται ότι κυμαίνονται περίπου στα € 3 εκατομμύρια/έτος (Karageorgis et al., 2004).

- Μείωση σωματικού βάρους

Ο ρυθμός ανάπτυξης των μυδιών σε μήκος και βάρος ήταν εμφανώς μεγαλύτερος το 1996 σε σχέση με το 2000 (Κράββα, 2000; ΕΚΘΕ, 2001). Έτσι παρατηρήθηκε α) μείωση της παραγωγής ανά στρέμμα παρά την αύξηση της συνολικής παραγωγής που προερχόταν από την αύξηση της στρεμματικής κάλυψης, β) αλλοίωση της ποιότητας του προϊόντος (μικρότερο μήκος και βάρος) γ) αύξηση του χρόνου διαμονής τους από τους 9 μήνες σε 12 μήνες όταν υπήρχαν επιβλαβείς «ανθήσεις».

- Υποβάθμιση ποιότητας νερού

Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του αιωρούμενου υλικού και ο υδροδυναμισμός είναι μειωμένος, τόσο περισσότερο αυξάνεται η εναπόθεση των ψευδοκοπράνων στον πυθμένα, υπονομεύοντας έτσι την ποιότητα της παραγωγής μυδιών και του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Σε κάποιες περιπτώσεις όπου παρατηρείται μεγάλη συγκέντρωση αιωρούμενων μυδιών στο νερό παρατηρείται η απόρριψη αυτών σαν να ήταν ψευδοκόπρανα (Spenser, 2002). Έχει αναφερθεί εναπόθεση/συσσώρευση

ψευδοκοπράνων ύψους ενός μέτρου μέσα σε χρονική περίοδο ενός έτους. Στους κόλπους Θεσσαλονίκης και Θερμαϊκού και στην περιοχή των μυδοκαλλιέργειών, οι ταχύτητες ρευμάτων που βρέθηκαν ήταν αρκετά χαμηλές (<2 cm sec<sup>-1</sup>). Για να αποφευχθεί η συσσώρευση οργανικού ρυπαντικού φορτίου (κόπρανα, ψευδοκόπρανα, υπολείμματα των διαχειριστικών ενεργειών της εκτροφής) κάτω από τις μυδοκαλλιέργειες στον πυθμένα του κόλπου, είναι απαραίτητες ταχύτητες ρευμάτων 5 - 20 cm sec<sup>-1</sup>.

- Επίδραση στο περιβάλλον

Ωστόσο εντατικές εκτροφές με μεγάλες πυκνότητες μυδιών μπορούν να οδηγήσουν στην εξάντληση του αποθέματος τροφής ή στην μεταβολή της σύνθεσης των πλαγκτονικών πληθυσμών σε διαφορετικούς πληθυσμούς με χαμηλότερη θρεπτική αξία και έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των μυδιών (Hickman, 1992).

## 1.6 Ασφάλεια και ποιότητα τροφίμων

### 1.6.1 Αρχικό στάδιο μικροοργανισμών αλλοίωσης

(SSO). Η διαδοχή των μικροβίων αλλοίωσης επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία και την ατμόσφαιρα της συσκευασίας. Κυρίως το *Pseudomonas spp.* και δευτερευόντως, το *Shewanella putrefaciens* έχει βρεθεί ότι είναι οι κύριοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης ψαριών από την περιοχή της Μεσογείου (FAO 37) που αποθηκεύονται αερόβια σε χαμηλές θερμοκρασίες (αναφορές). Ο προσδιορισμός των ειδών και / ή των στελεχών που εμπλέκονται στην αλλοίωση των ψαριών ή θαλασσινών είναι το αρχικό στάδιο πριν από τον προσδιορισμό του δυναμικού της αλλοίωσης και της δραστηριότητας (π.χ. πτητικοί μεταβολίτες, παραγωγή εκτός οσμής κ.λπ.) των απομονωμένων προϊόντων.

Η ταυτοποίηση των μικροβίων των προϊόντων της θάλασσας πραγματοποιείται κυρίως με φαινοτυπικές δοκιμές (μορφολογικές, βιοχημικές) μετά την απομόνωση μικροοργανισμών χρησιμοποιώντας διάφορα μη επιλεκτικά και / ή επιλεκτικά μέσα ανάπτυξης. Στο παρελθόν, αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει μικροοργανισμούς θαλασσινών προϊόντων είτε σε επιλεκτικά είτε σε γενικά μέσα ανάπτυξης βασισμένοι στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά κάθε απομονωμένης αποικίας. Ωστόσο, οι φαινοτυπικές δοκιμές υστερούν σε ισχύ σε σχέση με τις μοριακές τεχνικές. Η εφαρμογή μοριακών τεχνικών στα τρόφιμα έχει αλλάξει τον τρόπο με τον οποίο διερευνούνται πλέον οι μικροβιακές κοινότητες. Η ανάλυση αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA είναι στις μέρες μας η πιο κοινή προσέγγιση για τη μελέτη μικροβίων των θαλασσινών που καλλιεργούνται σε τρυβλία. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται με την χρήση εργαστηριακών μέσων απομονώνονται εύκολα και αναγνωρίζονται χρησιμοποιώντας μόνο ελάχιστη ποσότητα DNA. Η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA δίνει πολύ πιο ακριβείς φυλογενετικές πληροφορίες από άλλες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την διαφοροποίηση των καλλιεργούμενων μικροοργανισμών στα θαλασσινά.

### **1.7 Μεθοδολογίες ταυτοποίησης μικροοργανισμών**

Η καλλιέργεια που εξαρτάται από τον προσδιορισμό των μικροβίων που συναντάμε στα θαλασσινά προϊόντα έχει παραδοσιακά μελετηθεί από φαινοτυπικά και βιοχημικά τεστ, ωστόσο αυτά είναι επίπονα και συνήθως στερούνται ισχύς και εγκυρότητας, δίνοντας αποτυχημένα αποτελέσματα (Nisiotou et al., 2014). Για τους παραπάνω λόγους, έχουν αναπτυχθεί νέες, εναλλακτικές, γρήγορες, ακριβείς και αξιόπιστες μεθοδολογίες. Η ανάλυση της αλληλουχίας γονιδίου 16S rRNA έχει διεξαχθεί αναλύοντας (ενίσχυση και προσδιορισμός αλληλουχίας) πολυάριθμες απομονώσεις

π.χ. 50% ή περισσότερες από τις συνολικές αποικίες που αναπτύχθηκαν σε τριβλία (Parlapani and Boziaris, 2016, Parlapani et al., 2015a, 2015b). Εντούτοις, η ανάλυση αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου είναι μια αρκετά ακριβή μέθοδος όταν μεγάλος αριθμός απομονωμένων προϊόντων πρέπει να προσδιοριστεί. Μια πληθώρα μελετών χρησιμοποιεί μοριακές fingerprinting μεθοδολογίες, π.χ. T-RFLP (Rudi et al., 2004), DGGE (Broekaert et al., 2013; Hovda et al., 2007a, 2007b; Svanevik and Lunestad, 2011), TTGE (Jaffrès et al., 2009; Macé et al., 2012), ακολουθούμενες από προσδιορισμό αλληλουχίας των 16S rRNA γονιδίων, για τη διαφοροποίηση και την ταυτοποίηση απομονωμένων θαλασσινών προϊόντων. Σε αυτές τις προσεγγίσεις ηλεκτροφόρησης, το T-RFLP διαχωρίζει τα προϊόντα κατά μέγεθος, ενώ τα DGGE και TGGE διαχωρίζουν τα προϊόντα ανά σύνθεση αλληλουχίας (περιεχόμενο GC).

#### **High-Resolution Melting (HRM) analysis**

Η ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθόδου έδωσε την δυνατότητα στους επιστήμονες να εντοπίζουν και να ταξινομούν γρήγορα γενετικές μεταλλαγές καθώς και πολυμορφισμούς μεμονωμένων νουκλεοτιδίων (Single nucleotide polymorphism SNPs). Η μέθοδος υψηλής ανάλυσης τήξης (High Resolution Melting analysis, HRM) αποτελεί μια νέα μετα-PCR ανάλυση την οποία την χαρακτηρίζει η ακρίβεια και η ταχύτητα της. Συγχρόνως έχει την δυνατότητα να ανιχνεύει μεταλλαγές χωρίς την αλληλούχιση του DNA. Το πρώτο βήμα του πρωτοκόλλου της μεθόδου υψηλής ανάλυσης τήξης (HRM) είναι η διεξαγωγή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με σκοπό την ενίσχυση της προς μελέτης περιοχής με την βοήθεια ενός ειδικού, για διπλή έλικα DNA, προσδέτη-ιχνηθέτη. Το χαρακτηριστικό αυτού του προσδέτη είναι να φωσφορίζει έντονα όταν είναι προσδεμένος στην διπλή έλικα και ελάχιστα όταν δεν είναι προσδεμένος τον καθιστά ιδανική επιλογή για αυτή την μέθοδο. Ταυτόχρονα λόγω του συγκεκριμένου χαρακτηριστικού είναι δυνατή η



παρακολούθηση των σταδίων της real-time PCR. Στο δεύτερο βήμα του πρωτοκόλλου, αφού ολοκληρωθεί η PCR, πραγματοποιείται σταδιακή αποδιάταξη του προϊόντος. Η αύξηση της θερμοκρασίας γίνεται σε πολύ μικρή κλίμακα της τάξης των 0,008-0,2<sup>0</sup> C έτσι ώστε να προκύψει ένα χαρακτηριστικό προφίλ καμπύλης τήξης. Ως αποτέλεσμα της αποδιάταξης του προϊόντος της PCR έχουμε την απελευθέρωση των μορίων του ειδικού προσδέτη που συνεπάγεται την μείωση του φορτισμού της αντίδρασης. Το συγκεκριμένο στάδιο ονομάζεται ανάλυση τήξης (melting analysis). Η ακρίβεια της συγκεκριμένης μεθόδου είναι τεράστια με αποτέλεσμα να μπορεί να διαφοροποιήσει αλληλουχίες ακόμα και με διαφορά ενός μόνο νουκλεοτιδίου. Οι προσδέτες έχουν ιδιαίτερη σημασία καθώς είναι το βασικό στοιχείο της μεθόδου αυτής. Ένας ιδανικός προσδέτης δεν πρέπει να είναι ανασταλτικός παράγοντας για τον πολλαπλασιασμό του και τέλος πρέπει να προσδένεται με την ίδια ευκολία και στις πουρίνες και στις πυριμιδίνες, δεν θα πρέπει να αλλάζει το σημείο τήξης (Temperature melting T<sub>m</sub>) του τμήματος DNA που βρίσκεται προς ανάλυση. Με την συνεχόμενη ανάπτυξη της τεχνολογίας και την ανακάλυψη νέων παρεμβαλλόμενων προσθετών πρόέκυψε ως αποτέλεσμα η ραγδαία αύξηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας της μεθόδου. Οι προσδέτες που χρησιμοποιούνται για την HRM ανάλυση είναι διαφορετικοί σε σχέση με αυτούς μίας απλής ποσοτικής PCR (Quantitative PCR, qPCR). Οι παράγοντες οι οποίοι είναι κρίσιμοι σε μια qPCR, όπως η αναλογία του σήματος προς το θόρυβο του υποβάθρου και η απόδοση του πολλαπλασιασμού (efficiency), δεν χρήζουν ιδιαίτερης σημασίας στην HRM ανάλυση. Όμως ο προσδέτης επιβάλλεται να δίνει ακριβή στοιχεία για την διαμόρφωση του προφίλ τήξης του ενισχυμένου προϊόντος. Επίσης η σταδιακή άνοδος της θερμοκρασίας με αρκετά χαμηλό ρυθμό, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μας δίνει την δυνατότητα για ακόμα πιο λεπτομερή ανάλυση του

σημείου τήξης του τμήματος DNA που θέλουμε να μελετήσουμε (Οικονομόπουλος, 2017).

### **1.8 Σκοπός της εργασίας**

Σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθούν οι μικροβιακές μεταβολές σε μύδια και στο θαλασσινό νερό κατά τη διάρκεια της εκτροφής με κλασσική μικροβιολογική ανάλυση. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση των μεταβολών στις μικροβιακές κοινότητες σε εμπορικού μεγέθους μύδια κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους με μοριακή ανάλυση (High Resolution Melting).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Περιοχή μελέτης**

Η περιοχή μελέτης βρίσκεται στο ΒΔ κόλπο Θεσσαλονίκης όπου υπάρχει μυδοκαλλιεργητική δραστηριότητα σε πασσαλωτές και πλωτές μονάδες. Οι δειγματοληψίες διενεργήθηκαν από το σκάφος «ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ» (ΝΘ 1689).



**ΕΙΚΟΝΑ 7.** Ένα πρότυπο μοντέλο μυδοκαλιεργητικού σκάφους. Πιο συγκεκριμένα το σκάφος με το οποίο πραγματοποιήθηκαν όλες οι δειγματοληψίες. (©ΤΣΙΑΡΤΣΑΦΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ)

## 2.2 Προετοιμασία δείγματος

Τα δείγματα (θαλασσινό νερό και μύδια) ελήφθησαν ανά μήνα από ελληνική μονάδα καλλιέργειας μυδιών στην περιοχή της Χαλάστρας (Δ. Θεσσαλονίκη, Β. Ελλάδα) από το Φεβρουάριο έως τον Ιούνιο του 2017. Τα δείγματα μυδιών συλλέχθηκαν από τρία διαφορετικά σημεία της ίδιας μονάδας καλλιέργειας (1 δείγμα από την πάνω πλευρά 1 δείγμα από την πλευρά και 1 δείγμα από την μέση). Συλλέχθηκε επίσης νερό από τα ίδια σημεία αλλά σε βάθος περίπου 5-6 m. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φορητό ψυγείο με πάγο και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Μάρκετινγκ και Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας εντός 2 ωρών από τη δειγματοληψία.

## 2.3 Ανάλυση pH

Το pH του ιστού των μυδιών αξιολογήθηκε εισάγοντας ένα ηλεκτρόδιο pH (Inolab WTW pH meter, Weilheim, Germany) σε ένα ομογενοποιημένο 1 / 10 ιστού 1MRD στους 20 ° C. Τα δείγματα θαλασσινού νερού χρησιμοποιήθηκαν απευθείας για ανάλυση.

## 2.4 Μικροβιολογική ανάλυση

Όλα τα μικροβιολογικά μέσα ελήφθησαν από την εταιρία LAB M (Lancashire, UK).

Το Iron Agar (IA) παρασκευάστηκε σύμφωνα με τους Gram et al. (1987).

Είκοσι πέντε (25) g μυδιών μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε ειδικές σακούλες stomacher μαζί με 225 ml MRD (Maximum Recovery Diluent, 0.1% w/v peptone, 0.85% w/v NaCl) και ομογενοποιήθηκαν για 2 λεπτά χρησιμοποιώντας την συσκευή Stomacher (Bug Mixer, Interscience, Λονδίνο, Ηνωμένο Βασίλειο). Τα δείγματα θαλασσινού

νερού χρησιμοποιήθηκαν απευθείας για ανάλυση. Η μέθοδος της επίστρωσης (0,1 ml σειριακών αραιώσεων σε MRD) χρησιμοποιήθηκε για την απαρίθμηση των ακόλουθων μικροοργανισμών α) ολική μεσόφιλη χλωρίδα (APC) σε TSA (Tryptone Soy Agar), το οποίο επώαστηκε για 48-72 ώρες στους 25 °C και (b) *Pseudomonas* spp., Σε ceftrimide-fucidin-cephaloridine agar (CFC), το οποίο επώαστηκε για 48 ώρες στους 25 ° C. Χρησιμοποιήθηκε μέθοδος ενσωμάτωσης (1 ml σειριακών αραιώσεων σε MRD) για την απαρίθμηση (α) βακτηρίων που παράγουν H<sub>2</sub>S σε IA μετρώντας μόνο τις μαύρες αποικίες, μετά από επώαση στους 25°C για 72 ώρες, (β) Βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) σε De Man, Rogosa, Sharpe agar (MRS) μετά από επώαση στους 25°C για 72 ώρες και (c) Enterobacteriaceae σε Violet Red Bile Glucose agar (VRBGA), που επώαστηκε στους 37°C για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέση τιμή log cfu g<sup>-1</sup> ± τυπική απόκλιση 3 επαναλήψεων ανά σημείο της περιοχής καλλιέργειας.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Most Probable Number (MPN) για την απαρίθμηση του *Escherichia coli* σύμφωνα με το ISO 16649-3: 2005.

Οι κινητικές παράμετροι των μικροοργανισμών υπολογίσθηκαν χρησιμοποιώντας την εξίσωση Baranyi (Baranyi και Roberts, 1994),  $y(t) = y_{\max} - \ln[1 + (e^{-y_{\max} - y_0} - 1)e^{\mu_m A_n(t)}]$  όπου:  $y(t)$  είναι ο λογάριθμος του πληθυσμού τη στιγμή  $t$ ,  $y_{\max}$  είναι ο λογάριθμος του μέγιστου πληθυσμού,  $y_0$  είναι ο λογάριθμος του αρχικού πληθυσμού,  $\mu_m$  είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και  $A_n(t)$  είναι μια συνάρτηση που σχετίζεται με τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων, με χρήση του λογισμικού DMFIT (Institute of Food Research, Reading, UK).

## **2.5 Συντήρηση μυδιών στους 4° C**

### **2.5.1. Προμήθεια και αποθήκευση μυδιών**

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φορητό ψυγείο και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Εμπορίας & Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του οικείου Τμήματος στο Βόλο εντός 2 ωρών από τη δειγματοληψία. Τα νεκρά μύδια στη συνέχεια απορρίφθηκαν. Το κρέας από τα υπόλοιπα μύδια αφαιρέθηκε από το κέλυφος με ένα αποστειρωμένο μαχαίρι. Στη συνέχεια, 200 γραμμάρια σάρκας από περίπου 10 άτομα συσκευάστηκαν σε πλαστικά σακουλάκια και σφραγίστηκαν. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε επωαστικό θάλαμο στους 4 ° C μέχρι το τέλος του πειράματος.

### **2.5.2 Χρόνος απόρριψης μυδιών**

Το χρονικό σημείο απόρριψης ορίστηκε όταν τουλάχιστον ένας από τους πέντε εκπαιδευμένους δοκιμαστές (panelists), κατέγραψε δυσάρεστες οσμές, π.χ. αμμωνιακό, ξινό, αλλοιωμένο ή φτωχό σύμφωνα με το FAO (1999). Η οργανοληπτική αξιολόγηση δεν πραγματοποιήθηκε για να περιγράψει τις αλλαγές των χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, αλλά μόνο για να προσδιορίσει το χρονικό σημείο απόρριψης για την ανάλυση των μικροβίων δειγμάτων μέχρι το τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος.

## **2.6 Ομαδοποίηση και ταυτοποίηση των βακτηρίων με HRM και αλληλούχιση**

### **Απομόνωση αποικιών και εκχύλιση DNA**

Οι αποικίες (50% από τρυβλία με 30-300 αποικίες) που απομονώθηκαν από το TSA κατά την αποθήκευση μυδιών στους 4°C ελήφθησαν για ταυτοποίηση.

Στη συνέχεια, ακολούθησε καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani για κάθε απομόνωση. Χρησιμοποιήθηκε ένα χιλιοστόλιτρο εναιωρήματος κυττάρων για εκχύλιση DNA τροποποιώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Cocolin et al. (2002). Μετά από μια πρώτη φυγοκέντρηση στα 14.000 g στους 4 ° C για 10 λεπτά, προστέθηκαν 500 µl ρυθμιστικού διαλύματος λυσοζύμης (25% [wt / vol] σακχαρόζη, 5 mg λυσοζύμης / ml) και ακολούθησε μια δεύτερη φυγοκέντρηση στα 14.000 g στους 4 ° C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το σφαιρίδιο επανααιωρήθηκε σε 50 µl λυσοζύμης (5 mg / ml) και ακολούθησε επώαση στους 37 ° C για 30 λεπτά. Τα κύτταρα αναμίχθηκαν με 300 µl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (2% Triton X-100, 1% sodium dodecyl sulfate, 100 mM NaCl, 10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8), 300 µl φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (25:25) και 0,3g γυάλινων σφαιριδίων. Ακολούθησαν τρεις αναδεύσεις 30 δευτερολέπτων, με διάλειμμα 15 δευτερολέπτων μεταξύ τους, στη μέγιστη ταχύτητα στο Mini-Bead Beater (Retsch MM300, Haan Germany). Επιπλέον, προστέθηκαν 300 µl 10 mM Tris – 5 mM EDTA (pH 8) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 12.000 g στους 4°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, η άνω φάση μεταφέρθηκε σε διαυγές σωλήνα όπου προστέθηκε 1 ml αιθανόλης και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 14.000 g για 10 λεπτά. Μετά από αυτό, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το DNA ξηράνθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Τέλος, προστέθηκαν 100 µl διαλύματος Tris-EDTA (TE) 1X και 2 µl RNase (10 mg / ml) και οι σωλήνες επώαστηκαν στους 37 ° C για 1 ώρα.

Τα δείγματα στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -20 ° C για την ανάλυση γονιδίου 16S rRNA με ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο σε συνδυασμό με ανάλυση τήξης υψηλής ανάλυσης (HRM).

## **Ανάλυση HRM**

Η ανάλυση καμπύλης τήξης των αμπλικονών διαχωρίζει τις αποικίες σε διαφορετικά είδη ομάδων δημιουργώντας ξεχωριστά προφίλ καμπύλης HRM (Sakaridis et al., 2014). Με βάση αυτό το αποδεδειγμένο σενάριο, η ανάλυση HRM χρησιμοποιήθηκε για την ταξινόμηση των αποικιών που απομονώθηκαν από τριβλία TSA. Στην PCR, η V3-V4 περιοχή του 16S rRNA γονιδίου ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας τον βακτηριακό εκκινητή S-DBact-0341-bS-17 (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') και Reverse (R) primer SD-Bact -0785-aA-21 (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Klindworth et al., 2013). Η ενίσχυση του γονιδίου στόχου πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 20  $\mu$ L σε Rotor-Gene 6500 σε πραγματικό χρόνο 5P HRM PCR Thermocycler (Corbett Research, Sydney, Australia). Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε 1 X ρυθμιστικό διάλυμα PCR B (Kapa), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,2  $\mu$ M F και R εκκινητές, 1,2  $\mu$ M Syto 9 πράσινου φθορίζοντος νουκλεϊκού οξέος χρώση, 1U / ml KAPA Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen, UK) και 20 ng γονιδιωματικού DNA. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα αποτελούνταν από ένα αρχικό στάδιο PCR στους 95 ° C για 5 λεπτά, μετουσίωση στους 95 ° C για 30 s, υβριδισμό στους 53 ° C για 30 s και επιμήκυνση στους 72 ° C για 20 s. Η PCR ρυθμίστηκε σε 40 κύκλους. Η ανάλυση HRM πραγματοποιήθηκε με ένα στάδιο προ-τήγματος στους 70 ° C για 30 δευτερόλεπτα από 75-92 ° C με κατάλληλο εύρος θερμοκρασίας στους 0,1 ° C με προσαυξήσεις κάθε 2 δευτερόλεπτα. Το μέγεθος των προϊόντων PCR αναλύθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τρεις τεχνικές επαναλήψεις.



## Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση έγινε σε ABI Prism 3730 XL Capillary Sequencer (VBC-BIOTECH Vienna, Αυστρία). Για την ανίχνευση των πλησιέστερων συγγενών, όλες οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν μέσω BLAST (Zhang et al. 2000), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Οι φυλότυποι ορίστηκαν ως αλληλουχίες που δείχνουν  $\geq 98\%$  ομολογία μεταξύ τους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

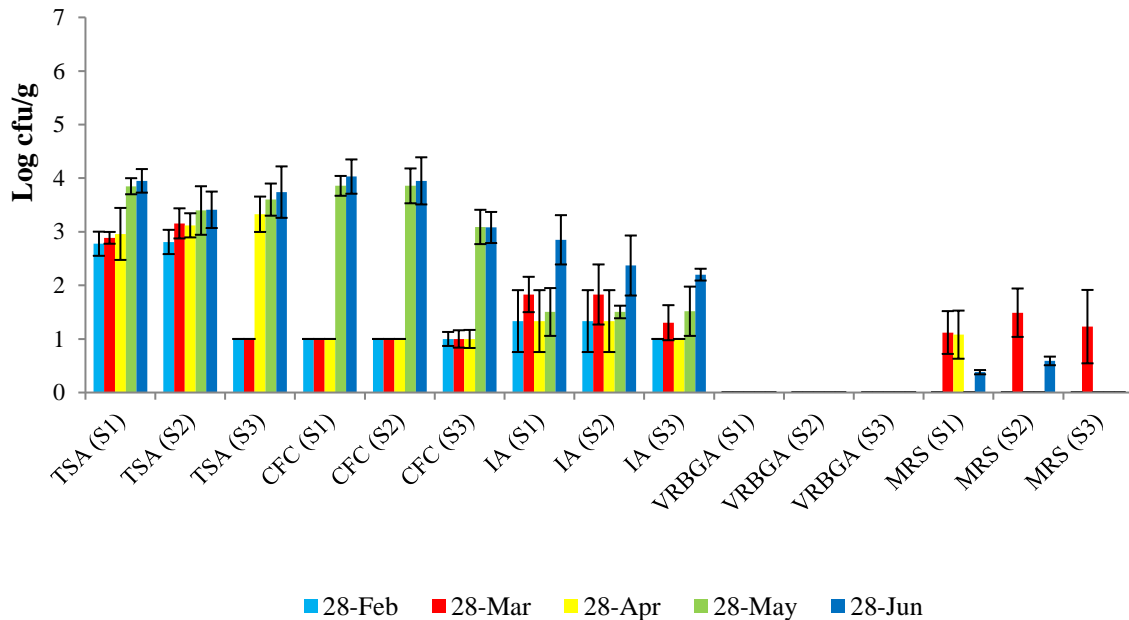
### 3.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Τα βακτήρια βρέθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα πληθυσμού στον ιστό μυδιών σε σύγκριση με τα δείγματα θαλασσινού νερού καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, η OMX κυμαινόταν από 1,0 έως 3,8 log cfu / ml και από 3,50 έως 5,20 log cfu / g σε δείγματα νερού και μυδιών (σχήμα 1). Οι πληθυσμοί του *Pseudomonas* spp., H<sub>2</sub>S και LAB κυμάνθηκαν από 1,0 - 3,9 log cfu / ml, 1,0 - 2,8 και <1 log cfu / ml - 1,5 log cfu / ml, αντίστοιχα, για τα δείγματα του νερού (Εικ. 1α). Όσον αφορά τον ιστό μυδιών, οι πληθυσμοί αυτοί βρέθηκαν να είναι <2-4,8, 2,3-4,7 και 2,6-4,1 log cfu / g, αντίστοιχα (σχήμα 1β). Ο πληθυσμός του εντεροβακτηριδίου ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης 1 cfu / ml ή g για νερό ή μύδια ιστού αντίστοιχα.

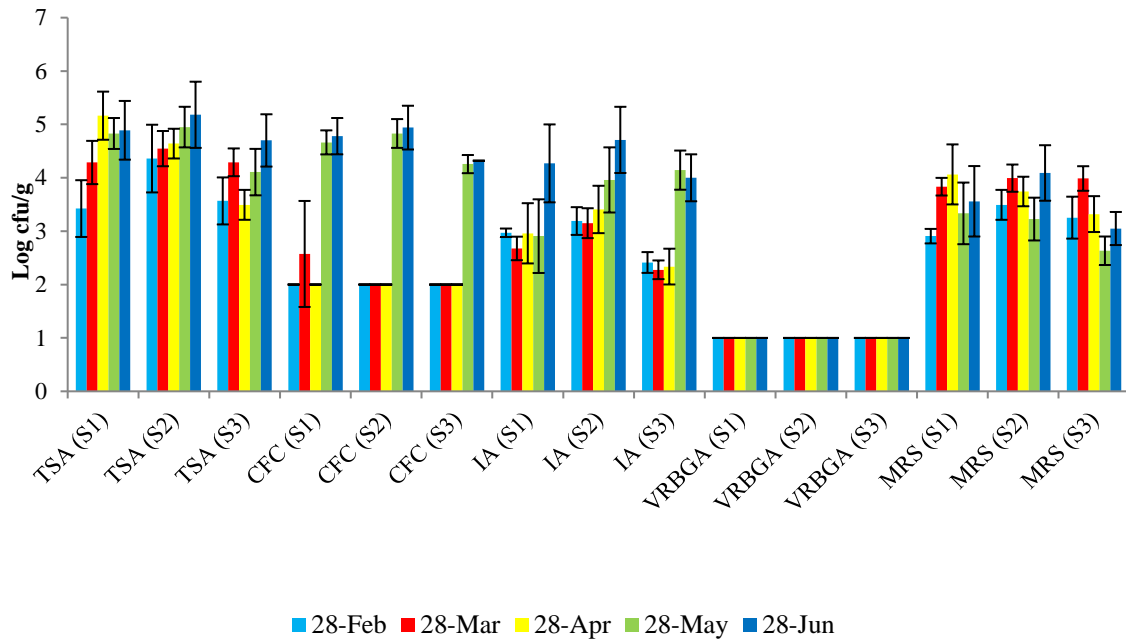
Όσον αφορά τα βακτηριακά επίπεδα πληθυσμού ανά μήνα (από Φεβρουάριο έως Ιούνιο 2017), τα *Pseudomonas* spp. και οι πληθυσμοί βακτηρίων που παράγουν H<sub>2</sub>S αυξήθηκαν σημαντικά τόσο στο θαλασσινό νερό όσο και στα δείγματα μυδιών στα τέλη Μαΐου και Ιουνίου (σχήμα 1). Σε αυτά τα χρονικά σημεία, η OMX, τα *Pseudomonas* spp. και τα βακτήρια που παράγουν H<sub>2</sub>S έφτασαν στα επίπεδα των 4,0-5,0 log cfu / g στον ιστό μυδιών (σχήμα 1β). Λαμβάνοντας υπόψη τα διαφορετικά σημεία της περιοχής καλλιέργειας, δείγματα νερού και μυδιών που συλλέχθηκαν από

την περιοχή S3 παρουσίασαν τα χαμηλότερα επίπεδα πληθυσμού βακτηρίων για όλους τους μικροοργανισμούς που ελέγχθηκαν (σχήμα 1).

Το *E. coli* δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα νερού που δοκιμάστηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία (<2 MPN / 100 ml). Στα μύδια, πιθανών *E. coli* παρατηρήθηκε σε δείγματα της περιοχής S1 που συλλέχτηκαν στις 28 Φεβρουαρίου (8-23 MPN / g), στις περιοχές S1 και S2 στα δείγματα που συλλέχτηκαν στις 28 Μαρτίου και Απριλίου (8-23 MPN / g), αλλά και σε δείγματα της περιοχής S2 που συλλέχτηκαν τον Μάιο και τον Ιούνιο (8 MPN / g). Δεν βρέθηκε *E. coli* σε δείγματα μυδιών της περιοχής S3.



(α)

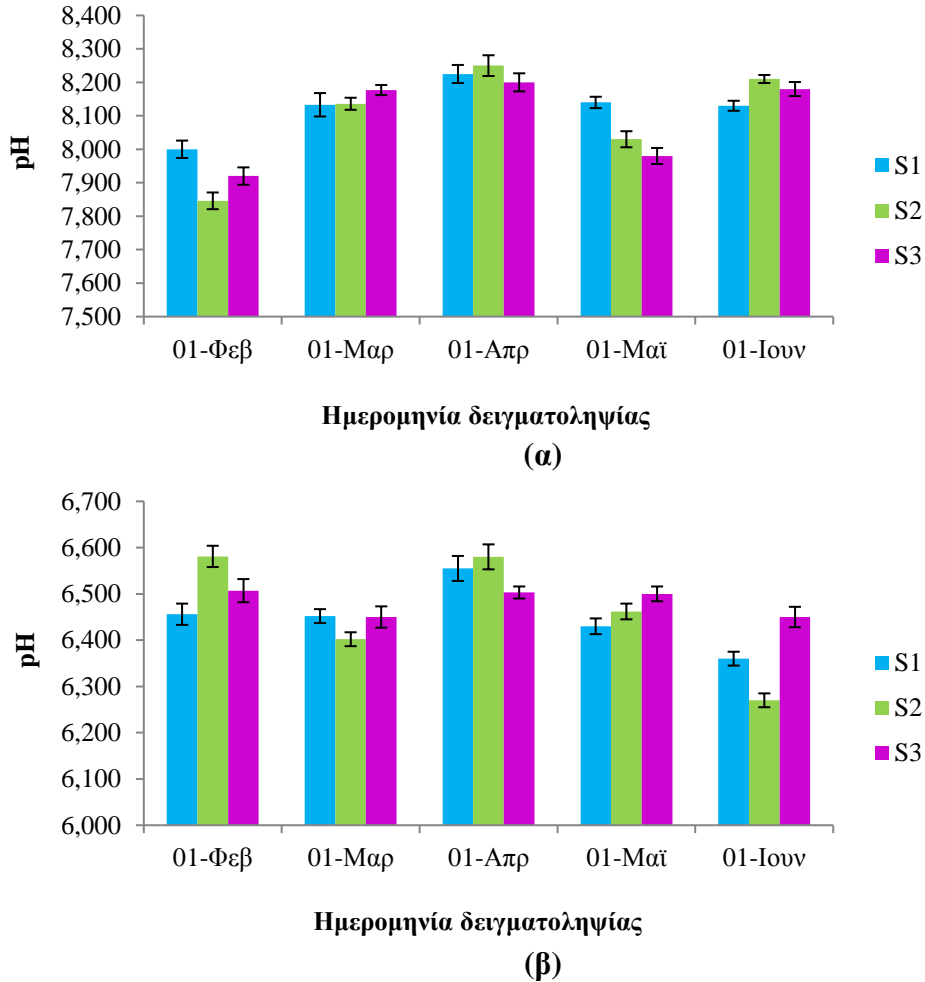


(β)

**Σχήμα 1.** Μικροβιολογικές αλλαγές (α) θαλασσινού νερού και (β) ιστού μυδιών, από τον Φεβρουάριο έως τον Ιούνιο του 2017. Οι πληθυσμοί υπολογίζονται σε καλλιέργειες TSA, CFC, IA, VRBGA και MRS. Κάθε σημείο δεδομένων και οι γραμμές σφάλματος δείχνουν τον μέσο όρο  $\pm$  st. dev από 3 επαναλήψεις.

### 3.2 Ανάλυση pH

Οι μεταβολές του pH κατά την περίοδο καλλιέργειας μυδιών στην περιοχή της Χαλάστρας φαίνονται στο σχήμα 2. Το pH ήταν πολύ υψηλότερο στα δείγματα θαλασσινού νερού από αυτό που παρατηρήθηκε στον ιστό μυδιών. Στο θαλασσινό νερό η τιμή του pH κυμαινόταν από 7,85 (S2, Φεβ) έως 8,25 (S2, Απρ), ενώ στον ιστό μυδιών ήταν 6,27 (S2, Ιουν.) έως 6,58 (S2, Φεβ) (σχήμα.2α). Επιπλέον, το pH του ιστού μυδιών τον Ιούνιο (τη χρονική στιγμή κατά την οποία τα μύδια έφτασαν στο εμπορικό μέγεθος και συλλέχθηκαν) ήταν 6,36, 6,270 και 6,45 για τις περιοχές καλλιέργειας S1, S2 και S3, αντίστοιχα (σχήμα. 2β).



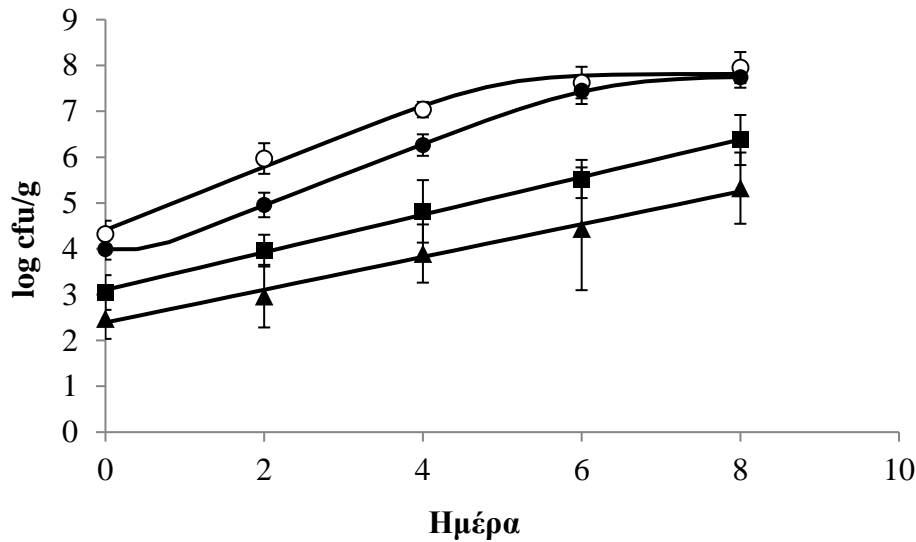
**Σχήμα 2.** Μεταβολές του pH (α) θαλασσινού νερού και (β) ιστών μυδιών κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας μυδιών από το Φεβρουάριο έως τον Ιούνιο του 2017 σε κάθε σημείο δειγματοληψίας (S1, S2 και S3). Κάθε σημείο δεδομένων και οι γραμμές σφάλματος δείχνουν τον μέσο όρο  $\pm$  st. dev από 3 επαναλήψεις.

### 3.3 Πείραμα συντήρησης

#### 3.3.1 Μικροβιακοί πληθυσμοί

Η OMX των μυδιών ήταν αρχικά  $4,22 \pm 0,29$  log cfu / g και αυξήθηκε κατά την αποθήκευση φτάνοντας τα  $7,63 \pm 0,34$  log cfu / g τη στιγμή του ελάχιστου επιπέδου αποδοχής (ημέρα 6) και  $7,95 \pm 0,34$  log cfu / g στο χρονικό σημείο απόρριψης ( 8η ημέρα). Οι μετρήσεις σε CFC, IA και MRS ήταν  $3,99 \pm 0,23$ ,  $3,03 \pm 0,35$  και  $2,48 \pm 0,45$  log cfu / g αντίστοιχα, την ημέρα 0, ενώ οι μετρήσεις VRBGA ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης 1 log καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι μετρήσεις στο CFC ήταν επίσης υψηλότερες από τις μετρήσεις σε IA και MRS καθ' όλη τη διάρκεια της

αποθήκευσης φτάνοντας στο επίπεδο των  $7,45 \pm 0,29$  και  $7,74 \pm 0,23$  log cfu / g την ημέρα 6 και 8, αντίστοιχα. Ο πληθυσμός σε IA ήταν  $5,52 \pm 0,42$  και  $6,37 \pm 0,55$  log cfu / g, ενώ οι μετρήσεις στο MRS ήταν  $4,44 \pm 1,34$  και  $5,32 \pm 0,78$  log cfu / g την ημέρα 6 και 8, αντίστοιχα (σχήμα, 3).



**Σχήμα 3** Μικροβιολογικές αλλαγές κατά την αποθήκευση των μυδιών στους 40C. APC (○), CFC (●), IA (■) και MRS (▲). Κάθε σημείο δεδομένων και οι γραμμές σφάλματος δείχνουν το μέσο και  $\pm$  st. dev από 3 επαναλήψεις. Οι καμπύλες αντιπροσωπεύουν την εφαρμογή δεδομένων χρησιμοποιώντας την εξίσωση Baranyi (Baranyi και Roberts, 1994). Οι κάθετες διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν το χρονικό σημείο της απόρριψης οργανοληπτικών.

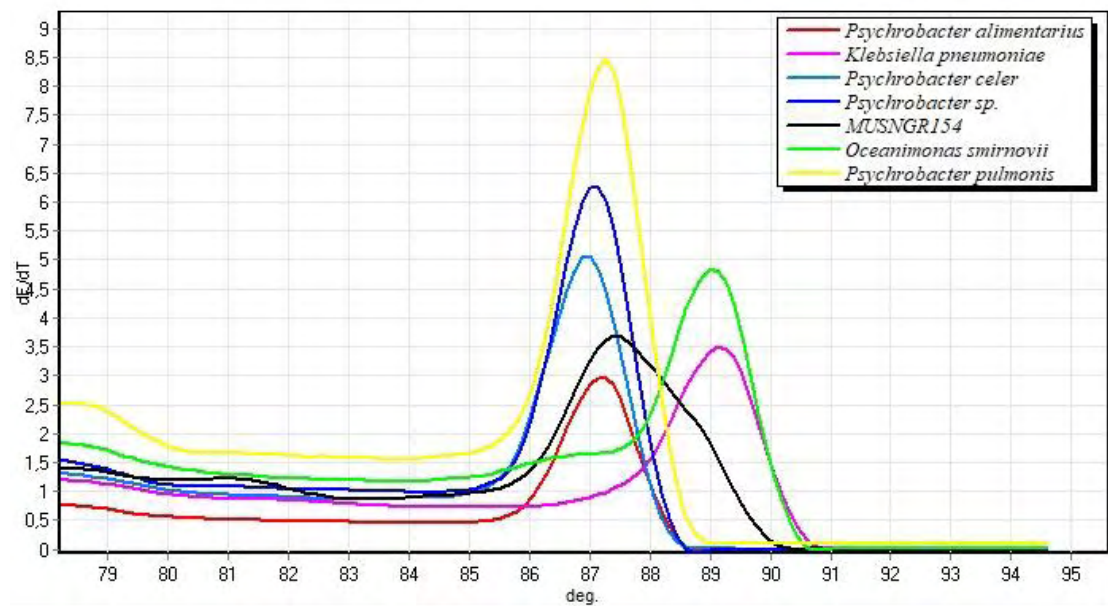
### 3.3.2 Ανάλυση HRM

Σαράντα δύο (42) προϊόντα απομόνωσης ταξινομήθηκαν σε επτά διαφορετικές βακτηριακές ομάδες με βάση τις κορυφές θερμοκρασίας τήξης και το σχήμα των ομαλοποιημένων καμπυλών τήξης των αμπλικονίων χρησιμοποιώντας ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο σε συνδυασμό με ανάλυση HRM. Από αυτά τα προϊόντα απομόνωσης, 7, 2, 24, 6, 1, 1 και 1 προϊόντα απομόνωσης έδειξαν κορυφές στους 87,00 °C (ομάδα 1), 87,08 °C (ομάδα 2), 87,20 °C (ομάδα 3), 87,28 °C (ομάδα 4), 87,40 °C (ομάδα 5), 89,00 °C (ομάδα 6) και 89,20 °C (ομάδα 7), αντίστοιχα (Πίνακας 2). Οι ομαλές καμπύλες της HRM έδειξαν ότι τα προϊόντα απομόνωσης μπορούν να

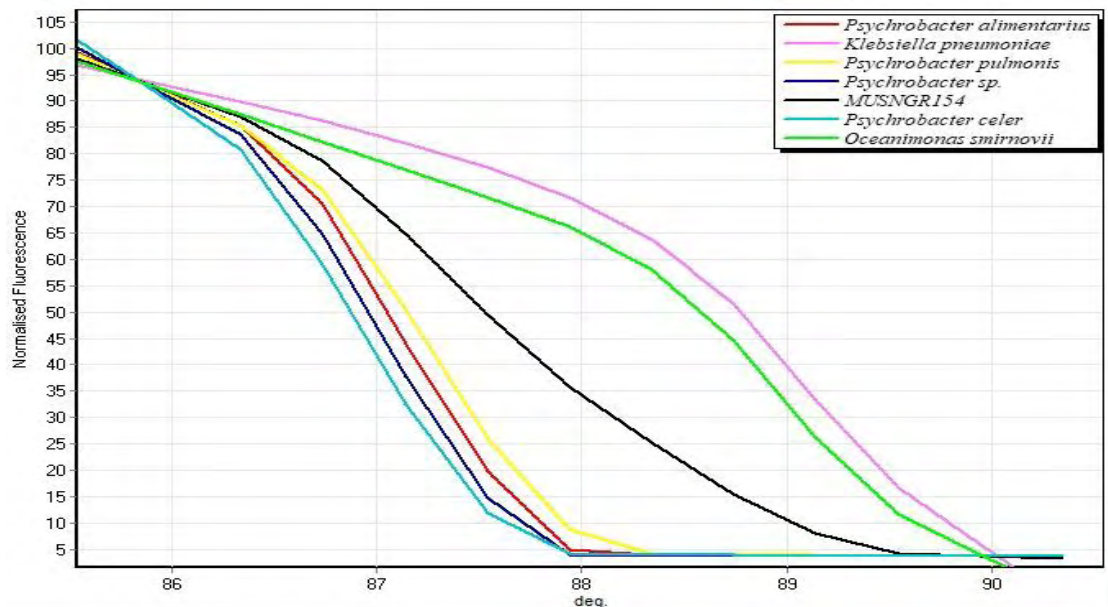
διακριθούν και να διαφοροποιηθούν ευκολότερα με βάση το σχήμα των καμπυλών τους σε σύγκριση με το συμβατικό προφίλ των καμπυλών τήξης (σχήμα. 4). Η ταυτοποίησή τους χρησιμοποιώντας αλληλούχιση γονιδίου 16S rRNA αποκάλυψε ότι τα αμπλικόνια με τις ίδιες κορυφές θερμοκρασίας τήξεως και το ίδιο σχήμα καμπυλών τήξεως όντως ομαδοποιήθηκαν στο ίδιο βακτηριακό είδος (Πίνακας 2, Σχήμα. 4). Οι επτά καμπύλες HRM βρέθηκαν να αντιπροσωπεύουν επτά βακτηριακά είδη με βάση την αλληλουχία γονιδίων 16S rRNA, ιδιαίτερα τέσσερα είδη *Psychrobacter* (*Psychrobacter* sp., *P. alimentarius*, *P. pulmonis* and *P. celer*), *Klebsiella pneumoniae*, *Oceanimonas smirnovii* και ένα άγνωστο βακτήριο (ονομάστηκε MUSNGR154 φυλότυπος από την ομάδα μας). Είκοσι εκπρόσωποι π.χ., *P. alimentarius* 1, *P. alimentarius* 2, *P. alimentarius* 3 κ.λπ. από τα επτά βακτηριακά είδη π.χ. Το *P. alimentarius* παρουσιάζονται στο Σχήμα 5. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν δύο ακόμη φορές (τρεις τεχνικές επαναλήψεις συνολικά).

Επιπλέον, 59 ακόμη προϊόντα απομόνωσης που ελήφθησαν από τριβλία TSA ταξινομήθηκαν επίσης στα επτά βακτηριακά είδη, χρησιμοποιώντας αναγνωρισμένους αντιπροσώπους από τον Πίνακα 2.

Τα αποτελέσματα, που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας την ανάλυση HRM, επαληθεύτηκαν περαιτέρω μέσω της αλληλούχισης των αμπλικονίων. Τα δεδομένα αλληλουχίας DNA αντιστοιχούσαν στα είδη που αποδόθηκαν από το προφίλ καμπύλης HRM ακόμη και σε περιπτώσεις όπου το δείγμα ήταν άγνωστο διασφαλίζοντας έτσι ότι η διάκριση των διαφορετικών ειδών από το HRM ήταν πράγματι πραγματική.

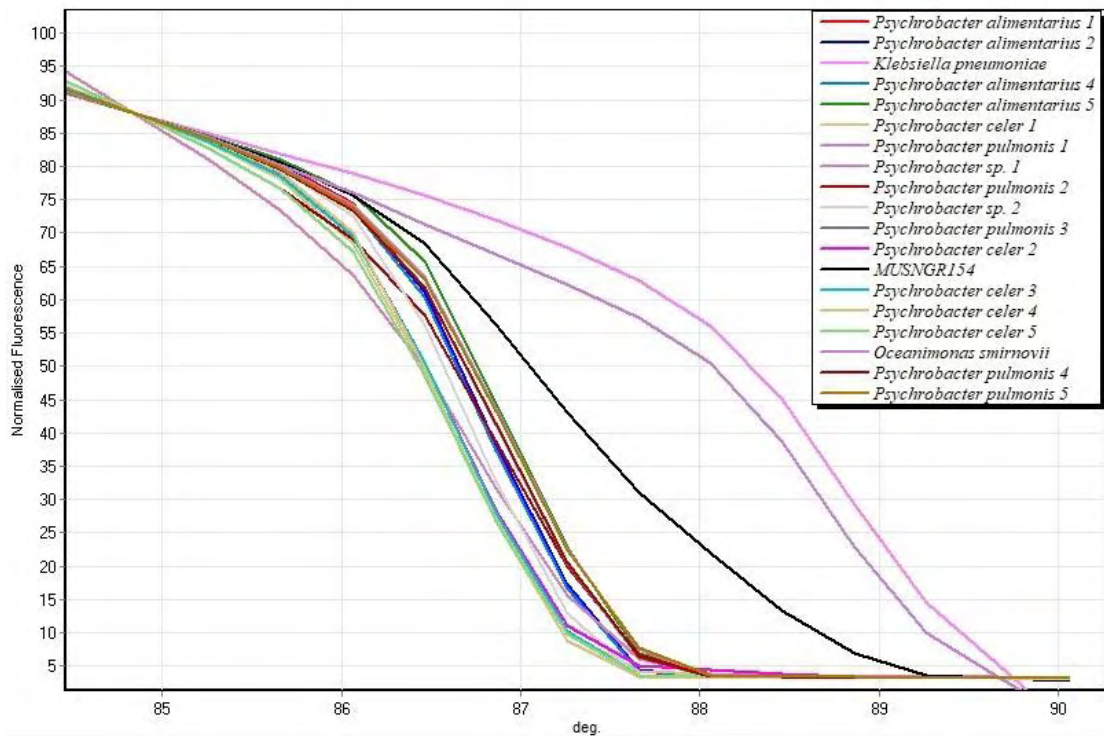


(α)



(β)

**Σχήμα 4** Συμβατικές (α) και ομαλοποιημένες (β) καμπύλες τήξης των επτά ειδών βακτηριακής ομάδας.



**Σχήμα 5.** Ομαλοποιημένες καμπύλες HRM 20 εκπροσώπων των επτά ειδών βακτηριακών ομάδων.

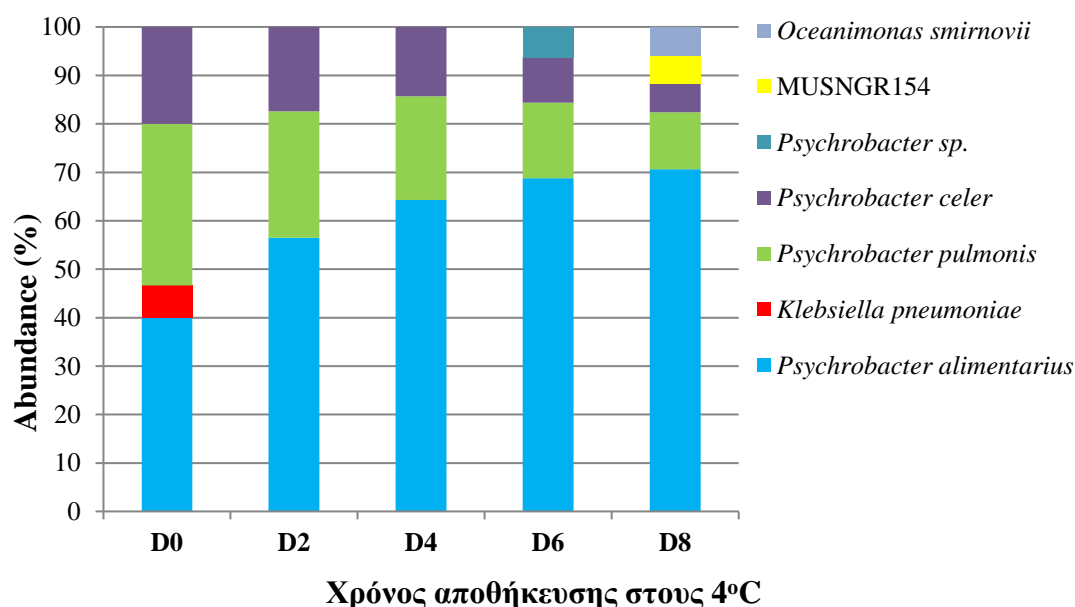
**Πίνακας 2.** Οι κορυφές θερμοκρασίας τήξης και οι πλησιέστεροι συγγενείς ( $\geq 98\%$  ομοιότητα) των αναλυμένων απομονωμένων προϊόντων.

Groups	Isolates	Peaks °C	Phylotypes	Closest relative	Similarity %
1	7	87.00	MUSNGR105	<i>Psychrobacter celer</i> strain G13	100
2	2	87.08	MUSNGR112	<i>Psychrobacter</i> sp. BA17	99
3	24	87.20	MUSNGR114	<i>Psychrobacter alimentarius</i> strain F430	100
4	6	87.28	MUSNGR116	<i>Psychrobacter pulmonis</i> strain YT49	100
5	1	87.40	MUSNGR154	Non-described in GENBANK database	-
6	1	89.00	MUSNGR171	<i>Oceanimonas smirnovii</i> strain AL2C-4W	98
7	1	89.20	MUSNGR095	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain LB-AMP3KSU	100



### 3.3.3 Βακτηριακές κοινότητες των μυδιών κατά την διάρκεια της αποθήκευσης

Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων των μυδιών χρησιμοποιήθηκε ένα άθροισμα 101 απομονώσεων, από πέντε χρονικά διαστήματα: ημέρα 0, 2, 4, 6 και 8 από τριβλία TSA. Το *P. alimentarius* βρέθηκε αρχικά σε υψηλότερες αφθονίες (40% των μικροβίων που αναπτύχθηκαν σε TSA) από άλλα βακτήρια όπως *P. pulmonis* (33,3%), *P. celer* (20,0%) και *K. pneumoniae* (6,67%) (Σχήμα 6). Η αφθονία του *P. alimentarius* αυξήθηκε κατά την αποθήκευση στα 56,5, 64,3, 68,8 και 70,6% για την ημέρα 2, 4, 6 και 8, αντίστοιχα. Τη στιγμή της ελάχιστης αποδοχής (ημέρα 6), ο *P. alimentarius* ακολούθησε ο *P. pulmonis* (15,6%), ο *P. celer* (9,37%) και ο *Psychrobacter sp.* (6,25%) (Σχήμα 6). Τη στιγμή της απόρριψης (ημέρα 8), ο *P. alimentarius* έφτασε σε αφθονία 70,6%, ενώ ο *P. pulmonis* και ο *P. celer* μειώθηκαν στα 11,8 και 5,88%, αντίστοιχα. Ο φυλότυπος MUSNGR154 βρέθηκε σε αφθονίες 5,88%. Παρουσιάστηκε επίσης το *Oceanimonas smirnovii* (Σχημα 6).



**Σχήμα 6.** Οι αλλαγές των μικροβίων των μυδιών που βρισκόντουσαν αποθηκευμένα σε αερόβιες συνθήκες στους 4 °C που αναπτύχθηκαν σε τριβλία TSA και προσδιορίστηκαν με ανάλυση HRM.

#### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο αρχικός πληθυσμός ΟΜΧ των εκτρεφόμενων μυδιών *Mytilus galloprovincialis* κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 4 και 5 log cfu / g (Goulas et al. 2005; Parlapani et al. 2017). Τα *Pseudomonas* spp και το H<sub>2</sub>S έχουν βρεθεί σε επίπεδα 3,5-4,5 και 2,5-4,0 log cfu / g σε μύδια στην αρχή της διάρκειας ζωής τους (Goulas et al. 2005; Parlapani et al. 2017). Πράγματι, αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα ευρήματά μας (για μύδια που συλλέχθηκαν τον Ιούνιο και είχαν το εμπορικό μέγεθος). Τα υψηλά επίπεδα πληθυσμού (4-5 log) αυτών των μικροοργανισμών (με υψηλό δυναμικό αλλοίωσης) είναι υπεύθυνα για τη σύντομη διάρκεια ζωής των μυδιών που έχουν αποθηκευτεί σε ψύξη (Goulas et al. 2005; Parlapani et al. 2017). Η παρούσα μελέτη αποκάλυψε ότι ο πληθυσμός βακτηρίων *Pseudomonas* spp και H<sub>2</sub>S αυξάνεται σημαντικά στα τέλη Μαΐου και Ιουνίου κατά τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας. Έτσι ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός αποτελείται από τους παραπάνω αλλοιογόνους μικροοργανισμούς.

Για να μελετηθεί η μικροβιακή ποικιλομορφία των θαλασσινών, εφαρμόστηκε μια ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο σε συνδυασμό με ανάλυση HRM για τη διάκριση του βακτηριακού φορτίου σε επίπεδο είδους. Τα αμπλικόνια που παρουσίασαν τις ίδιες καμπύλες τήξης (κορυφές) και καμπύλες τήξης υψηλής ανάλυσης (σχήμα) αλληλουχήθηκαν. Η ανάλυση αλληλουχίας επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της ανάλυσης HRM (αποτελέσματα καμπυλών τήξης υψηλής ανάλυσης) που μας επιτρέπουν να προτείνουμε αυτήν τη μεθοδολογία ως ένα νέο εργαλείο για τη λήψη αποτυπωμάτων και τον εντοπισμό άγνωστων καλλιεργούμενων βακτηρίων. Βασίζεται πραγματικά στην αλληλουχία ενός μόνο αντιπροσώπου κάθε ομάδας με το ίδιο προφίλ καμπύλης τήξης, μειώνοντας έτσι το κόστος της αλληλουχίας.

Η διαφοροποίηση σε επίπεδο ειδών των μικροβίων των θαλασσινών είναι σημαντική για την παρακολούθηση των βακτηρίων που δεν διαφοροποιούνται ούτε απαριθμούνται σε επίπεδο ειδών σε γενικά ή επιλεκτικά μέσα καλλιέργειας. Η αναγνώριση των βακτηρίων που αναπτύσσονται σε ένα πιάτο μπορεί να μας δώσει μια εικόνα του πλούτου των βακτηριακών κοινοτήτων στα θαλασσινά (Alfaro and Hernandez, 2013; Bozianis and Parlapani, 2016; Hovda et al., 2007a, 2007b; Macé et al., 2012, Olofsson et al., 2007). Στα ψάρια και τα θαλασσινά, η αρχική μικροβιακή ποικιλομορφία αποτελείται συνήθως από διάφορα βακτηριακά γένη, ενώ μόνο λίγα κυριαρχούν στο τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος (Dalgaard, 2003; Gram and Huss, 1996). Η μεθοδολογία της HRM που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία διαφοροποίησε τα βακτήρια των μικροβίων των μυδιών σχεδόν κοντά σε επίπεδο ειδών, επισημαίνοντας τον *P. alimentarius* ως τον κυρίαρχο μικροοργανισμό έναντι άλλων του γένους *Psychrobacter* (*P. pulmonis*, *P. celer* και *Psychrobacter sp.*). Η διαφοροποίηση και ταυτοποίηση άλλων γενών ή / και ειδών, π.χ., των βακτηρίων γαλακτικού οξέος, έχει ήδη ελεγχθεί από άλλους ερευνητές (Iacumin et al., 2015; Lin and Gänzle, 2014; Sakaridis et al., 2014). Στις μελέτες τους, τα προφίλ καμπύλης HRM χρησιμοποιήθηκαν για να ταξινομήσουν πολλά άγνωστα προϊόντα απομόνωσης σε δέκα ομάδες στελεχών αναφοράς βακτηρίων γαλακτικού οξέος (Sakaridis et al., 2014) ή προηγουμένως ταχτοποιήθηκαν, με άλλες προσεγγίσεις, απομονωμένες σε ένα ή περισσότερα είδη *Lactobacillus* (Iacumin et al. 2015; Lin και Gänzle, 2014). Τα ευρήματά τους έδειξαν ότι ακόμη και τα είδη που σχετίζονται πολύ στενά μπορούν να διακριθούν με ανάλυση HRM. Πράγματι, στη μελέτη μας, οι τέσσερις στενοί σχετικοί φυλότυποι *P. alimentarius*, *P. pulmonis*, *P. celer* και *Psychrobacter sp.* παρουσίασαν διαφορετικές καμπύλες τήξης υψηλής ανάλυσης, επομένως διακρίθηκαν εύκολα με ανάλυση HRM.

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, η εισαγωγή πληθώρας μοριακών μεθοδολογιών στον τομέα της Μικροβιολογίας Τροφίμων έχει βελτιώσει σημαντικά τις γνώσεις μας για τα βακτήρια που σχετίζονται με την αλλοίωση. Όχι μόνο οι *Pseudomonas* και H<sub>2</sub>S βακτήρια, όπως το *Shewanella*, μπορούν να εντοπιστούν ως κυρίαρχοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης θαλασσινών, αλλά και άλλα βακτήρια όπως το *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas* και / ή *Carnobacterium* (Broekaert et al., 2013; Parlapani et al., 2018a) , 2018β). Οι μοριακοί δείκτες αποκάλυψαν επίσης ότι τα ψάρια που προέρχονται από μονάδες υδατοκαλλιέργειας από δύο γεωγραφικές περιοχές της Μεσογείου παρουσιάζουν διαφορετικά μικροβιώματα αλλοίωσης, ειδικότερα το *Pseudomonas* κυριαρχεί σε ψάρια από το Ιόνιο και το *Psychrobacter* σε ψάρια στο Αιγαίο Πέλαγος (Parlapani et al., 2018b). Επιπλέον, όσον αφορά τη συσκευασία, διάφορα είδη βακτηρίων γαλακτικού οξέος, *Photobacterium* ή *Brochothrix* κυριαρχούν στα θαλασσινά. Η ανάλυση HRM θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια γρήγορη μέθοδος διαλογής SSOs μεταξύ ειδών θαλασσινών ή θαλασσινών διαφορετικής προέλευσης, αποθήκευσης (θερμοκρασία, ατμόσφαιρα) ή συνθήκες επεξεργασίας.

Σε αυτήν τη μελέτη, οι καμπύλες τήξης υψηλής ανάλυσης διαφοροποίησαν τα βακτήρια σε επίπεδο ειδών, επιτρέποντάς μας να παρακολουθούμε ποια βακτήρια κυριάρχησαν στα μύδια κατά την αποθήκευση. Η κυριαρχία του *P. alimentarius* έναντι άλλων ειδών *Psychrobacter* όπως *P. pulmonis*, *P. celer* και *Psychrobacter sp.* καθώς και η *K. pneumonia*, η *O. smirnovii* και ο φυλότυπος MUSNGR154 ήταν εμφανείς. Το *Psychrobacter* και άλλα διάφορα άλλα γένη π.χ. Οι *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* και *Bacillus* ανήκουν στα ιθαγενή μικροβιώματα των ψαριών και θαλασσινών (Gram and Huss, 1996; Parlapani et al., 2015b; Svanevik and Lunestad, 2011), ενώ το *K. pneumoniae* μπορεί αρχικά να

βρεθεί ως μικροβιοτική μόλυνση από π.χ. γήινο περιβάλλον, επιφάνειες επαφής με τρόφιμα, εργαζόμενους κ.λπ. Όσον αφορά τον φυλότυπο MUSNGR154, αυτή είναι η πρώτη φορά που περιγράφεται στη βάση δεδομένων GENBANK ( $\leq 92\%$  ομολογίες με καταχωρήσεις GenBank / αρχεία βάσης δεδομένων), επομένως δεν υπάρχουν προηγούμενες πληροφορίες. Βακτήρια όπως *Pseudomonas*, *H<sub>2</sub>S* (συμπεριλαμβανομένων των *Shewanella putrefaciens*) και βακτήρια γαλακτικού οξέος είχαν προηγουμένως εμπλακεί σε αλλοίωση μυδιών (*Mytilus galloprovincialis*) αποθηκευμένα στους 4 ° C με βάση την κλασική (απαρίθμηση) μικροβιολογική προσέγγιση (Goulas et al., 2005). Από την άλλη πλευρά, όταν χρησιμοποιήθηκαν μοριακές προσεγγίσεις σε διατηρημένα σε ψύξη προϊόντα βρέθηκε να κυριαρχεί το *Psychrobacter spp.* στους αστακούς της Νορβηγίας (Bekaert et al., 2015), καφέ γαρίδες (Broekaert et al., 2013), τσιπούρα (Parlapani et al., 2018b) και σουπιές (Parlapani et al., 2018β). Η κυριαρχία ενός ή περισσότερων μικροοργανισμών έναντι άλλων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες π.χ. θερμοκρασία, διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, αρχική αφθονία, μικροβιακή αλληλεπίδραση και άλλοι έμμεσοι παράγοντες, π.χ. pH, aw, Eh (Boziaris and Parlapani, 2016). Στο παρόν, η ανάλυση HRM ανέδειξε τον *P. alimentarius* ως τον κυρίαρχο μικροοργανισμό μυδιών που αποθηκεύτηκε στους 4 ° C υπό αερόβιες συνθήκες.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Ο πληθυσμός των εντεροβακτηριδίων ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης 1 cfu / ml για δείγματα νερού και 1 log cfu / g για ιστό μυδιών, ενώ το *E. coli* ήταν κάτω από 2 MPN / 100ml και 8 MPN / g υποδεικνύοντας μια πολύ καλή κατάσταση υγιεινής του θαλασσινού νερού και τα μύδια μας σε μέγεθος εμπορικού μεγέθους. Η παρουσία αυτών των βακτηρίων κάτω από το όριο ανίχνευσης στο θαλασσινό νερό και στα

μύδια δείχνει ότι δεν υπάρχει ή υπάρχει πολύ χαμηλή περιβαλλοντική μόλυνση. Τα μύδια ήταν μικροβιολογικά ασφαλή καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου καλλιέργειας. Η ανάλυση PCR σε πραγματικό χρόνο σε συνδυασμό με την ανάλυση HRM μπορεί να διαφοροποιήσει επιτυχώς ακόμη και στενά συγγενικά βακτηριακά είδη, δηλ. *P. alimentarius*, *P. pulmonis*, *P. celer* και *Psychrobacter* sp με βάση τις καμπύλες τήξης υψηλής ανάλυσης. Η ανάλυση αλληλουχίας επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα καμπυλών τήξης υψηλής ανάλυσης. Ως εκ τούτου, η μεθοδολογία HRM θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως νέο εργαλείο συν ταχείας αποτύπωσης και ως επί το πλείστον οικονομικής ταυτοποίησης άγνωστων καλλιεργούμενων βακτηρίων. Βασίζεται στην αλληλουχία μόνο ενός εκπροσώπου κάθε ομάδας με το ίδιο προφίλ καμπύλης τήξης υψηλής ανάλυσης, μειώνοντας έτσι το κόστος της αλληλουχίας.

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ****Ξένη Βιβλιογραφία**

**Alfaro, A. (2006)** Byssal attachment of juvenile mussels, *Perna canaliculus*, affected by water motion and air bubbles. *Aquaculture*, 255,1-4, 357-361.

**Bayne, B. L. (1965)** Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia*, 2, 1-47.

**Bayne, B. L. (1976a)** Aspects of reproduction in bivalve molluscs. In: F. J. Verneberg (ed), *Estuarine Processes*. Vol. 1. Uses, stresses and adaptation to the estuary. Academic press, New York, pp. 432-448.

**Bayne, B. L. (1976b)** The biology of mussel Larvae. In: *Marine Mussels: their ecology and physiology*. B. L. Bayne (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 81-120.

**Brenko, M. (1973)** The study of mussel larve and their settlement in Vela Draga Bay (Pula , the northen Adriatic Sea). *Aquaculture*, 2, 173-182.

**Day, R. & McEdward, L. (1984)** Aspects of the physiology and ecology of pelagic larve of marine benthic invertebrates. In: *Marine plankton life cycle strategies*. K.A., Steidinger and L.M., Walker, (Eds). CRC, Boca Raton, Florida, pp. 93- 120.

**Eyster, L.S. & Pechenik, J.A. (1987)** Attachment of the *Mytilus edulis* L. larve on algal and byssal filaments is enhanced by water agitation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 114, 99-110.

**FAO (1999)** Yearbook of Fishery Statistics for 1997. Vol. 84. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, Italy.

**FAO (2002)** Food and agriculture organization of the United Nations, FAOSTAT database, <http://apps.fao.org/page/collections>.

**Ferran, E., Trevino, M., Mancebo, M. J., Crespo, C., Espinosa, J. (1990)** Estudio del ciclo gonadal anual en *Mytilus galloprovincialis*: cinetica de poblaciones celulares en el manto y reservas bioenergeticas. In: *Adas, III Congreso National de Acuicultura*, pp. 467-472.

**Fuentes, J., Molares, J. (1993)** Settlement of the mussel *Mytilus galloprovincialis* on collectors suspended from rafts in the Ria de Arousa (NW of Spain): annual pattern and spatial variability. *Aquaculture*, 122, 55-62.

**Gosling E. (2003a)** An introduction to Bivalves. In: *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. Blackwell, Oxford, 1, 1-6.

**Gosling E. (2003c)** Bivalve Growth. In: *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. Blackwell, Oxford, 6, 169-200.

**Hancock, D. A. (1973)** The relationship between stock and recruitment in exploited invertebrates. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 164, 113-131.

**Hickman, R.W. (1992)** Mussel cultivation. In: *The mussel, Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture*. E. M. Gosling (ed), Elsevier, Amsterdam, 10, pp 465-504.

**Hrs- Brenko, M. (1974)** Temperature and salinity requirements for embryonic development of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Thalassia Jugosl.*, 10, 131-138.

Riisgard, H.U., Randlev, A., and Kristensen, P.S., 1980. Rates of water processing oxygen consumption and efficiency of particle retention in veligers and young post metamorphic *Mytilus edulis*. *Ophelia*, 19, 37-47.



- Hyder, P., J., Simpson, H., Christopoulos, S. & Krestenitis, Y. (2002).** The seasonal cycles of stratification in the Thermaikos Gulf Region of Freshwater Influence (ROFI), North-west Aegean. *Continental Shelf Research*, 22, 2573- 2597.
- Karageorgis, A. & Anagnostou C. (2001).** Particulate matter spatial-temporal distribution and associated surface sediment properties: Thermaikos Gulf and Sporades Basin, NW Aegean Sea. *Continental Shelf Research*, 21, 2141- 2153.
- Karageorgis, A. P., Skourtos, M. S., Kapsimalis V., Kontogianni, A. D., Skoulikidis, N.Th., Pagou, K., Nikolaidis, N.P., Drakopoulou, P., Zanou, B., Karamanos, H., Levkov, Z., Anagnostou, Ch. (2004).** An integrated approach to watershed management within the DPSIR framework: Axios River catchment and Thermaikos Gulf. *Regional Enviromental Change*, Spinger-Verlag, 2004.
- Lutz, R. A. & Kennish, M.J. (1992)** Ecology and morphology of larval and early postlarval mussels. In: *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture*. E. M. Gosling, (ed), *Elsevier*, Amsterdam, pp. 53-80.
- Moncheva S, Gotsis-Skretas O, Pagou K, Krastev A (2001)** Phytoplankton blooms in Black Sea and Mediterranean ecosystems subjected to anthropogenic eutrophication: Similarities and differences. *Est Coast Shelf Sci* 53:281-295.
- Pagou, K., Siokou-Fragou, I., Catsiki, A.V., Pavlidou, A., Assimakopouloum G. & Papathanasiou, E. (2003).** “Assessment of the trophic conditions in the Inner Thermaikos Gulf”. In: *7th Hell. Symp. Oceanogr. Fish.*, 6-9 May 2003m Hersonissos, Crete, 43 p.
- Poulos, S. E., Chronis, G. Th., Collins, M.B. & Lycousis V. (2000)** *Thermaikos Gulf Coastal System, NW Aegean Sea : an Overview of Water/Sediment Fluxes in*

*Relation to Air-Land-Ocean Interactions and Human Activities*. Journal of Marine Systems, 25, 47-76.

**Seed R. & Suchanek, T. H. (1992)**. Population and community ecology of *Mytilus edulis*. In: *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture*. E. M. Gosling, (ed), Elsevier, Amsterdam, pp. 87-169.

**SoHelME. (2005)**. State of the Hellenic Marine Environment. E. Papathanasiou & A. Zenetos (eds), HCMR Publ., 360 pp.

**Spencer, B.E. (2002)** Mussel cultivation. In: *Molluscan Shellfish Farming*, pp.147-165. Blackwell, Oxford.

**Villalda, A. (1993)** Estrategias reproductoras del mejillon, *Mytilus galloprovincialis*, cultivado en las Rias de Vigo, Arosa, Muros y Ares-Betanzos (Galicia, NO. De Espana). In : A. Cervino, A. Landin, A. de Coa, A. Guerra and M. Torre (ed.), *Adas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*, 21-24 September, Illa de Arousa, Galicia, Spain, pp. 329-334.

**Walne, P.R. (1979)** Culture of bivalve mollusks, 50 years of experience at Conway. Fishing News Books Ltd, Farnham.

**Wildish D & Kristmanson D (1993)** Hydrodynamic control of bivalve filter feeders: a conceptual view. In: *Bivalve Filter Feeders in Estuarine and Coastal Ecosystem Processes*, (ed. Richard F. Dame) Conway, pp299-325.

**Zanou B, Anagnostou Ch (2001)** Integrated management in the drainage basin of the Thermaikos Gulf (NW-Aegean Sea) methodological steps and proposed measures, according to the win-win policy. *Europ Water Manage*, 4(6): 33-42.

## Ελληνική Βιβλιογραφία

**Α. Τ. Ε. Ι. Θ. (2007)** Κυκλοφορία του νερού σε Περιοχές Οργανωμένης Ανάπτυξης Υδατοκαλλιεργειών/μυδοκαλλιεργειών (ΠΟΑΥ) και Διαχειριστικές Παρεμβάσεις Χωροταξικής και Περιβαλλοντικής Βελτίωσης. Επιστ. Υπεύθ. Δρ. Α. Μωρίκη, Θεσ/νικη, Ενδιάμεση Έκθεση, σελ.164.

**ΑΠΘ. (2000)** Χαρτογράφηση και γεννητική ταυτοποίηση των φυσικών πληθυσμών μυδιών του είδους *Mytilus galloprovincialis* στους κόλπους της Θεσσαλονίκης και Θερμαϊκού. Α' ενδιάμεση τεχνική έκθεση για την ΝΑΘ, Δ/ση Αλιείας.

Επιστημονικός υπεύθυνος Δρ. Σκούρας Ζ. και Δρ. Χιντήρογλου Χ., σελ. 45.

Γαληνού-Μητσούδη Σοφία. (2003). Σημειώσεις Εκτροφής οστράκων, σελ.109

**Βουλτσιάδου, Ε., Αμπατζόπουλος, Θ., Αντωνοπούλου, Ε., Γκάνιας, Κ., Γκέλης, Σ., Στάικου, Α., Τριανταφυλλίδης, Α., 2015.** *Υδατοκαλλιέργειες*. [ηλεκτρ. βιβλ.] Κεφάλαιο 8 Καλλιέργεια δίθυρων μαλακίων. Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5083>

**Γαληνού-Μητσούδη Σ. (1999)** Οι μυδοκαλλιέργειες του νομού Θεσσαλονίκης. Πρακτικά ημερίδας, Χαλάστρα 19 Ιουνίου 1999. Κέντρο Πληροφόρισης Δέλτα Αξιού-Λουδία-Αλιάκμονα-Γαλλικού & Αλυκής Κίτρους, σελ.18-31.

**Γκανούλης, Ι. (1993)** Περιβαλλοντική Κατάσταση και Προστασία του Κόλπου της Θεσσαλονίκης. *Τεχνικά Χρονικά: Επιστημονική Έκδοση ΤΕΕ, Επιστημονική περιοχή Α 13*: 8-25.

**Ε.Κ.Θ.Ε. (2001)** Διαχειριστική Μελέτη των Ζωνών Παραγωγής Μυδιών των Κόλπων Θεσσαλονίκης και Θερμαϊκού. Τελική Τεχνική Έκθεση για ΝΑΘ, Δ/ση αλιείας. Επιστημονικός υπεύθυνος Δρ. Παπαθανασίου Ε., σελ. 147.

**Κράββα, Ν. (2000)** Γενετική σύσταση και αύξηση σε πληθυσμούς του μυδιού *Mytilus galloprovincialis* στο Θερμαϊκό κόλπο. Διατριβή, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη 2000, σελ. 158.

**Οικονομόπουλος Λάμπρος, 2017**, Διπλωματική εργασία «Ανάπτυξη μη επεμβατικών μεθόδων για τον έλεγχο των θαλασσαιμιών με έμφαση στην ανίχνευση της πατρικής μεταλλαγής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Τμήμα Βιολογίας.

**ΥΠΓΕ, (2003)** Υπηρεσία διαχείρισης Επιχειρησιακού Προγράμματος Αλιείας. Καθορισμός περιοχών οργανωμένης ανάπτυξης θαλασσίων υδατοκαλλιεργειών Π.Ο.Α.Υ. στον Θερμαϊκό κόλπο. Ανάδοχος : Eco Consultants S.A. Βαβυζος - Ζαννάκη, Μελέτες Α.Ε. Υπουργείο Γεωργίας. Αθήνα.

**Φασούλας Θεόδωρος 2008** Δυναμική του γόνου του εκτρεφόμενου μυδιού *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819 στον ΒΔ κόλπο Θεσσαλονίκης. Μεταπτυχιακή Εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

### **Ηλεκτρονική βιβλιογραφία**

<https://axiosdelta.gr/> (Φορέας Διαχείρισης)

<http://www.fishbase.org/Glossary>

<http://www.minenv.gr>

[https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/mussels\\_el.pdf](https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/mussels_el.pdf)

**ABSTRACT**

The aim of the study was to investigate the microbial changes in mussels and in seawater during breeding with classical microbiological analysis. Subsequently, changes in microbial communities of commercial mussels, were monitored during their maintenance with molecular analysis, specifically with High Resolution Melting (HRM). Mussels of the species *Mytilus galloprovincialis* were taken from the area of Chalastra (Prefecture of Thessaloniki), from February to June. Samples of mussels were taken once a month for microbiological analysis. During the last sampling, the mussels (commercial size) were placed at 4 ° C to monitor microbial changes and determine the time of organoleptic rejection. At the end of the maintenance experiment, the bacteria which isolated from contact plates TSA at five intervals: day 0, 2, 4, 6, and 8 were grouped by 16S gene with real-time PCR analysis in combination with HRM analysis and then identified by sequence.

The bacteria were found in higher levels of population in mussel tissue compared with seawater samples throughout the growing season. Specifically, the APC ranges from 1.0 to 3.8 log cfu / ml and from 3.50 to 5.20 log cfu / g in water and mussel samples. The populations of *Pseudomonas spp.*, H<sub>2</sub>S and LAB ranged from 1.0 - 3.9 log cfu / ml, 1.0 - 2.8 and <1 log cfu / ml - 1.5 log cfu / ml, correspondingly, for water samples. *E. coli* was not detected in any water sample tested in this study, in contrast to the samples of mussels that may have been observed. The pH was much higher in seawater samples than in mussel tissue.

During the maintenance experiment, the APC of the mussels was initially  $4.22 \pm 0.29$  log cfu / g and increased during storage reaching  $7.63 \pm 0.34$  log cfu / g at the time of the minimum acceptance level (6<sup>th</sup> day) and  $7.95 \pm 0.34$  log cfu / g, at the time of

rejection (8<sup>th</sup> day). Forty-two (42) isolation products (colonies) were classified into seven different bacterial groups based on melting temperature peaks and the shape of the normalized melt melting curves using real-time PCR analysis combined with HRM analysis. The seven HRM curves were found to represent seven bacterial species according to the results of the 16S rRNA gene sequencing, especially four species *Psychrobacter* (*Psychrobacter sp.*, *P. alimentarius*, *P. pulmonis* and *P. celer*), *Klebsiella pneumoniae*, *Oceanimias smnovi*, and one unknown bacterium (named MUSNGR154 genotype).

According to the results of this study, mussels were microbiologically safe throughout the growing season. Real-time PCR analysis combined with HRM analysis can successfully differentiate even closely related bacterial species, i.e. *P. alimentarius*, *P. pulmonis*, *P. celer*, and *Psychrobacter sp* based on high-resolution melting curves. The sequence confirmed the results of high-resolution melting curves. Therefore, the HRM methodology could be used as a new tool for rapid grouping and mostly economic identification of unknown cultivated bacteria.