



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
« ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ »

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Διερεύνηση τροφιμογενών παθογόνων σε οστρακοειδή υδατοκαλλιέργειας»

Καραμάνη Ευαγγελία

ΒΟΛΟΣ, 2022

«Διερεύνηση τροφιμογενών παθογόνων σε οστρακοειδή υδατοκαλλιέργειας»

«Investigation of foodborne pathogens in aquaculture shellfish»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) **Ιωάννης Σ. Μποζιάρης**, Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*.
- 2) **Φωτεινή Παρλαπάνη, Επίκουρος Καθηγήτρια**, Μοριακή Μικροβιολογία και Ποιότητα Αλιευτικών Προϊόντων – Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.
- 3) **Έλενα Γκολομάζου, Επίκουρος Καθηγήτρια**, Προστασία-Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της συγγραφής της παρούσας μεταπτυχιακής 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, τόσο για την ανάθεση της μεταπτυχιακής μελέτης όσο και για την πολύτιμη βοήθεια του και τη διαρκή υποστήριξή του.

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

Ευχαριστώ επίσης και τους υποψήφιους διδάκτορες Φαίδρα Συροπούλου και Στέφανο Κακάση, για την υπομονή και την καθοδήγησή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα είναι συχνά αποδέκτες διαφόρων βιολογικών επιμολυντών, όπως είναι τα παθογόνα βακτήρια, που εισέρχονται από το χερσαίο περιβάλλον κυρίως από ανθρωπογενείς παρεμβάσεις διαφορετικής προέλευσης και συνδράμουν στην υποβάθμιση της ποιότητας τόσο των υδάτων όσο και των αλιευτικών προϊόντων. Την τελευταία δεκαετία, έχει παρατηρηθεί ότι τέτοια οικοσυστήματα είναι πιθανό να αποτελέσουν δεξαμενές ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων αυξάνοντας έτσι την ανησυχία της επιστημονικής κοινότητας για εκτεταμένη έρευνα. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η διερεύνηση των παθογόνων μικροοργανισμών του γένους *Enterococcus*, συμπεριλαμβάνοντας τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, σε μύδια (σάρκα) και στο νερό εκτροφής τους (μυδοκαλλιέργειες) καθώς και την ανίχνευση των πηγών από τις οποίες οι μικροοργανισμοί αυτοί εισβάλλουν στο υδάτινο οικοσύστημα όπου βρίσκονται οι μυδοκαλλιέργειες. Τα δείγματα μυδιών συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές μονάδες καλλιέργειας (μυδοκαλλιέργειες), καθώς από τα ίδια σημεία συλλέχθηκαν και δείγματα νερού, αλλά από την περιοχή της Χαλάστρας, Νομού Θεσσαλονίκης. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με απώτερο στόχο να αναπτυχθούν μελλοντικά στρατηγικές πρόληψης ή/και αντιμετώπισης τέτοιων βιολογικών κινδύνων στον Θερμαϊκό Κόλπο προς την κατεύθυνση της προστασίας του υδάτινου περιβάλλοντος, την προστασία του καταναλωτή και της δημόσιας υγείας γενικότερα. Για την επίτευξη του παραπάνω σκοπού, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση των πιθανών παθογόνων μικροοργανισμών με τη χρήση κλασικών μικροβιολογικών τεχνικών, απομόνωση και ταυτοποίηση ειδών Εντερόκοκκων με πρωτεομική ανάλυση Maldi-TOF-MS, καθώς και τη χρήση δίσκων αντιβιοτικών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα για τη μελέτη της ανθεκτικότητας των βακτηρίων σε 20 αντιβιοτικά. Τα είδη των Εντερόκοκκων που απομονώθηκαν από τα

δείγματα μυδιών (σάρκα) και του νερού ήταν τα: *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* και *E. gallinarum*. Στην παρούσα έρευνα όλα τα βακτήρια ήταν ανθεκτικά στις κεφαλοσπορίνες και στη σουλφοναμίδη. Τα βακτήρια παρουσίασαν ευαισθησία στην ερυθρομυκίνη, σουλφαμεθοξαζόλη, αμοξυκιλλίνη, πενικιλίνη, βανκομυκίνη, οξυτετρακυκλίνη και αμπικιλίνη, ενώ μερική ανθεκτικότητα παρουσίασαν στη κλινδαμικίνη, καναμυκίνη, γενταμικίνη, σιπροφλατοξίνη, τετρακυκλίνη, ναλιδιξικό οξύ, στρεπτομυκίνη και αζυθρομυκίνη.

Λέξεις-Κλειδιά: οστρακοειδή, μύδια, *Mytilus galloprovincialis*, παθογόνα βακτήρια, *Enterococcus*, ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, Maldi-TOF-M

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ασφάλεια Τροφίμων – αλιευτικών προϊόντων	1
1.1.1 Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	1
1.1.2 Παθογόνα βακτήρια στα αλιευτικά προϊόντα – οστρακοειδή.....	2
1.2 Οστρακοειδή – μύδια στην Ελλάδα.....	7
1.2.1 Εκτρεφόμενα είδη παγκοσμίως.....	7
1.2.2 Εκτρεφόμενα είδη στην Ελλάδα.....	8
1.2.3 Παγκόσμια παραγωγή.....	11
1.2.4 Ελληνική παραγωγή.....	12
1.2.5 Θαλάσσιο περιβάλλον κόλπων Θεσσαλονίκης, Θερμαϊκού	12
1.2.5.1 Γεωμορφολογία.....	12
1.2.5.2 Κλίμα Θεσσαλονίκης.....	14
1.2.5.3 Φυσικοχημικό παράμετροι του νερού.....	15
1.2.5.4 Θεσμικό πλαίσιο. Συνθήκη Ramsar, Natura 2000.....	17
1.2.5.5 Ρύπανση- μόλυνση	20

1.2.5.6 Θαλάσσια κυκλοφορία	21
1.3 Μοντέρνες μέθοδοι ανίχνευσης – ταυτοποίησης παθογόνων μικροοργανισμών.....	22
1.4 Σκοπός της μελέτης.....	23
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</u>	
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1 Περιοχή της μελέτης.....	24
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός.....	25
2.3 Μικροβιολογική ανάλυση.....	25
2.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	26
2.3.2 Απομόνωση μικροοργανισμών.....	28
2.4 Ταυτοποίηση μικροοργανισμών με MALDI-TOF-ms.....	28
2.4.1 MALDI-TOF MS.....	28
2.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε υπόστρωμα με άγαρ.....	30
2.5.1 Προετοιμασία δειγμάτων	30
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</u>	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	32
3.1 Βακτήρια στο νερό.....	32

3.2 Ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά.....	36
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</u>	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5</u>	
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6</u>	
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7</u>	
<u>ABSTRACT</u>	75

1.Εισαγωγή

1.1. Ασφάλεια Τροφίμων – αλιευτικών προϊόντων

Στα παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα διαταράσσεται το φυσικό οικοσύστημά τους και υπόκεινται όλο και περισσότερο σε υποβάθμιση της ποιότητας των νερών κυρίως από ανθρωπογενείς παρεμβάσεις διαφορετικής προέλευσης. Η ρύπανση των υδάτων οφείλεται σε εναποθέσεις ρύπων που καταλήγουν σε ποτάμια και υδάτινα παράκτια οικοσυστήματα μέσω της επιφανειακής και υπόγειας απορροής του νερού (κατακριμνήσεις, εκπλύσεις εδαφών και εκβολές υποθαλάσσιων αγωγών). Στην υποβάθμιση των υδάτων συνδράμουν τα αστικά (οικιακά απόβλητα κτλ), βιομηχανικά, γεωργικής και κτηνοτροφικής προέλευσης απόβλητα (βοσκοτόπια, φάρμες ζώων κτλ). Πληθώρα παθογόνων μικροοργανισμών μπορούν να εμφανιστούν στα υδάτινα περιβάλλοντα και κατά συνέπεια στα αλιευτικά προϊόντα. Τέτοιοι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι υπαίτιοι για χιλιάδες περιπτώσεις τροφικών δηλητηριάσεων και θανάτων λόγω της κατανάλωσης ζωντανών ή μη επαρκώς μαγειρεμένων αλιευμάτων με αποτέλεσμα να κατατάσσονται τα αλιευτικά προϊόντα στα κορυφαία προϊόντα που συνδέονται με τροφιμογενείς επιδημίες παγκοσμίως (Littman, 2020).

1.1.1 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Τα τρόφιμα και κατ' επέκταση και τα αλιευτικά προϊόντα δύναται να επιμολυνθούν με παθογόνους μικροοργανισμούς σε διάφορα στάδια της παραγωγικής αλυσίδας τους με αποτέλεσμα να προκαλούν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Η παρουσία ικανού αριθμού παθογόνων μικροοργανισμών (κυρίως βακτηρίων) στο καταναλωθέν τρόφιμο ή η ύπαρξη τοξινών που παράγουν κατά την ανάπτυξή τους μέσα στο τρόφιμο, οι οποίες παράχθηκαν σε κάποιο στάδιο

επεξεργασίας τους οδηγούν σε τροφικές δηλητηριάσεις και διαχωρίζονται σε τροφολοιμώξεις και τροφοτοξινώσεις. Τέτοιοι μικροοργανισμοί προκαλούν προβλήματα τα οποία είναι ποικίλης σοβαρότητας και κυρίως πεπτικά: στομαχόπονος, ναυτία, εμετός, διάρροια πιθανώς συνοδευόμενη από πονοκέφαλο και πυρετό. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προσβληθούν το νευρικό, το κυκλοφοριακό ή το σκελετικό σύστημα.

Παθογόνα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για τροφικές δηλητηριάσεις και απαντώνται στο υδάτινο περιβάλλον και μπορεί να αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας στα αλιευτικά προϊόντα είναι τα *Clostridium botulinum* type E, και τα παθογόνα στελέχη του *Vibrio* και *Aeromonas*. Τα παθογόνα βακτήρια *C. botulinum* type A και B, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* και στελέχη του *Bacillus* απαντώνται γενικότερα στο περιβάλλον και η παρουσία τους είναι αποτέλεσμα αναπόφευκτης μόλυνσης. Ορισμένα άλλα βακτήρια όπως τα *Enterococcus*, *Salmonella* και διάφορα άλλα εντερικά παθογόνα όπως τα *Shigella*, παθογόνα στελέχη του *Escherichia coli* και το *Campylobacter jejuni* απαντώνται στον γαστρεντερικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων και ανθρώπων και μπορούν να βρεθούν στα υδάτινα οικοσυστήματα από τα κόπρανα ανθρώπων και ζώων (Huss et al., 2000).

1.1.2 Παθογόνα βακτήρια στα αλιευτικά προϊόντα – οστρακοειδή

Τα οστρακοειδή προσλαμβάνουν την τροφή τους μέσω διήθησης, έτσι μέσα από τη διατροφή τους δύναται να συσσωρεύουν ουσίες από το θαλάσσιο περιβάλλον στο οποίο διαβιούν. Η ανάπτυξή τους σε καθαρά ύδατα τα καθιστά ασφαλές τρόφιμο για τον άνθρωπο. Όμως, στο περιβάλλον, το νερό στο οποίο ζουν μπορεί να περιέχει βακτήρια ή και ιούς (Gosling, 2003) με αποτέλεσμα να συγκεντρώνουν στο εσωτερικό τους (κυρίως στο γαστρικό σωλήνα), τέτοιους παθογόνους

μικροοργανισμούς που μπορούν να παραμείνουν εκεί ζωντανοί για μεγάλο χρονικό διάστημα (Desenclos et al., 1991). Οι τροφογενείς παθογόνοι μικροοργανισμοί δεν βλάπτουν τους ίδιους τους οργανισμούς όπως είναι τα οστρακοειδή, αλλά μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες σε ανθρώπους κυρίως όταν τα οστρακοειδή καταναλώνονται ωμά ή ανεπαρκώς μαγειρεμένα γι' αυτό κρίνεται απαραίτητη η καλλιέργεια τους σε πολύ καθαρά νερά, υψηλότερης καθαριότητας.

Η συσσώρευση παθογόνων μικροοργανισμών σε οστρακοειδή έχει μελετηθεί από τα τέλη του 19ου αιώνα και είναι γνωστή η μετάδοση εντεροπαθογόνων ασθενειών από την κατανάλωση τους (Desenclos et al., 1991; Halliday et al., 1991). Ενδεικτικά, ασθένειες όπως ο τυφοειδής πυρετός, η χολέρα, η λοιμώδης ηπατίτιδα και πολλές άλλες γαστρικές λοιμώξεις (Scott, 1994) έχουν παρουσιαστεί κατά την κατανάλωση τους. Παθογόνοι μικροοργανισμοί που έχουν ανιχνευθεί σε οστρακοειδή είναι οι *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium* και *Vibrio* (Mustafa et al., 2011). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στα στελέχη του *Enterococcus* λόγω της ανθεκτικότητας που εμφανίζουν σε διάφορα αντιβιοτικά καθώς οι λοιμώξεις που προκαλούν στον άνθρωπο λόγω κατανάλωσης ή επαφής με τα τρόφιμα είναι πλέον δύσκολο να αντιμετωπιστούν. Τέτοιοι μικροοργανισμοί παρουσιάζονται πολύ συχνά σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως είναι και το θαλάσσιο περιβάλλον, όπου είναι δυνατό να επιμολύνουν τα αλιευτικά προϊόντα.

Enterococcus

Τα τελευταία χρόνια, εκτός των βακτηρίων που προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις, ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί σε βακτήρια τα οποία μπορεί να μεταφερθούν με τα τρόφιμα και να προκαλέσουν λοιμώξεις στον άνθρωπο, είτε λόγω της επαφής του με τα τρόφιμα (πχ. παρασκευαστές/επεξεργαστές τροφίμων, διανομείς, κ.α.), ή ως καταναλωτές τροφίμων. Τέτοιοι

μικροοργανισμοί είναι τα *Enterococcus*, με σημαντικότερα τα είδη *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium*. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί αυτοί, ανήκουν σε αυτούς για τους οποίους έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται ευρέως για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων.

Η ονομασία Εντερόκοκκους (*Enterococcus*) δόθηκε για πρώτη φορά το 1899 από τον Thiercelin στην Γαλλία, για να υποδείξει την εντερική προέλευση ενός νέου για την εποχή θετικού κατά Gram (Gram +) κόκκου (Thiercelin, 1899; Murray, 1990; Murray, 2000). Οι Εντερόκοκκοι είναι μη σπορογόνα βακτήρια τα οποία απαρτίζουν σημαντικό μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του γαστρεντερικού σωλήνα και ευκαιριακά του κόλπου, του στοματοφάρυγγα αλλά και του δέρματος, των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων. Ο γαστρεντερικός σωλήνας αποτελεί την κύρια περιοχή στην οποία οι Εντερόκοκκοι συμβιώνουν μαζί με άλλους μικροοργανισμούς χωρίς να προκαλούν λοιμώξεις. Οι Εντερόκοκκοι καθώς αποτελούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου εντοπίζονται στα κόπρανα τόσο των ανθρώπων αλλά και των θερμόαιμων ζώων, συνήθως σε πληθυσμούς 10^6 cfu/g των κοπράνων.

Επιπλέον, θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα τα οποία προκαλούν λοιμώξεις. Οι Εντερόκοκκοι είναι υπεύθυνοι για σοβαρές νοσοκομειακές λοιμώξεις και γι' αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται και ως σημαντικοί δια – νοσοκομειακοί λοιμογόνοι παράγοντες. Συγκεκριμένα, αποτελούν το δεύτερο κατά σειρά συχνότητας αίτιο λοίμωξης των χειρουργικών τραυμάτων και των νοσοκομειακών ουρολοιμώξεων, καθώς και το τρίτο αίτιο νοσοκομειακών βακτηριαμιών στις Η.Π.Α. (Low et al., 2001) και συχνά σχετίζονται με το 5-15% των περιπτώσεων μικροβιακής ενδοκαρδίτιδας (Donlan et al., 2002). Προσβάλλουν κυρίως το ουροποιητικό σύστημα, το ενδοκάρδιο, το αίμα, την κοιλιακή χώρα, τα χοληφόρα, ενώ συχνά προκαλούν λοιμώξεις μετά από εγκαύματα και καθετηριασμούς (Eliopoulos, 1992). Το γένος των *Enterococcus* αποτελείται από

δώδεκα είδη εκ' των οποίων τα *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* και *Enterococcus avium* εντοπίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα.

Η διασπορά των εντεροκόκκων στο περιβάλλον γίνεται με τα κόπρανα των ανθρώπων, των θερμόαιμων ζώων και τα οικιακά απόβλητα. Από τις αρχές του αιώνα ήταν γνωστή η αναγνώριση τόσο των Εντεροκόκκων όσο και των Κολοβακτηριοειδών (coliforms) ως δείκτες μόλυνσης των νερών και των τροφίμων. Οι Εντεροκόκκοι δεν χρησιμοποιήθηκαν από την αρχή ως δείκτες μόλυνσης του νερού (Buttiaux, 1961). Επιλέχθηκαν ως δείκτες αφού τα κόπρανα των ανθρώπων και των χοίρων περιέχουν πάντα Εντεροκόκκους, ενώ το 80-90% των δειγμάτων περιέχει κολοβακτηριοειδή. Από την στοματική κοιλότητα του ανθρώπου εισέρχονται 10^3 βακτήρια ανά gr τροφής, όσο βρίσκονται στον εντερικό βιότοπο πολλαπλασιάζονται και μετά αποβάλλονται με τα κόπρανα σε ποσότητες $10^5 - 10^8$ cfu/g (Duncan et al, 1995). Οι Εντεροκόκκοι αν και είναι καλοί δείκτες κοπρανόδους μόλυνσης για επιφανειακά νερά δεν έχουν μελετηθεί σε τέτοια έκταση που έχει γίνει για το *Escherichia coli*. Το *E. faecalis* έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να επιβιώσει σε υδάτινα περιβάλλοντα για περισσότερο χρόνο, συγκριτικά με άλλους Εντεροκόκκους, γι' αυτό και καθίσταται ο πιο κατάλληλος σαν δείκτης.

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που διαθέτουν οι Εντεροκόκκοι ως δείκτες μόλυνσης του νερού από κόπρανα, βάση του Ostrolenk (1947) και του Burton (1949) είναι ότι:

1. Δεν δύναται να πολλαπλασιάζονται στο νερό σε αντίθεση με τα κολοβακτηριοειδή
2. Η συγκέντρωσή τους στα κόπρανα είναι μικρότερη απ' ό,τι τα κολοβακτηριοειδή (ελάχιστη σχέση 1:4) αυτή η σχέση αντανακλά τη μόλυνση από ανθρώπινα κόπρανα.
3. Διαβιούν στο υδάτινο περιβάλλον για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα απ' ό,τι τα κολοβακτηριοειδή, δηλώνουν έτσι μια παλιά μόλυνση.

Επιπροσθέτως οι ιδιότητες που τους καθιστά ανθεκτικά παθογόνα βακτήρια είναι η ανάπτυξη τους σε ένα μεγάλο φάσμα θερμοκρασιών, η ανθεκτικότητα τους στο αλάτι, κ.α. Οι Εντερόκοκκοι εκτός των φυσικών τους αντοχών έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τις αντιστάσεις τους όταν έρχονται αντιμέτωποι με συνθήκες πίεσης (stress). Οι προαναφερθείσες αντιστάσεις μπορούν να χαρακτηριστούν ως φαινοτυπική προσαρμογή στις αλλαγές του περιβάλλοντος, η οποία είναι γρήγορη και παροδική.

Τα είδη *E. faecalis* και *E. faecium* είναι αυτά που απομονώνονται πιο συχνά από τον άνθρωπο. Τα φυτά και το έδαφος αποτελούν υπόστρωμα για τον *Enterococcus casseliflavus*, τον *Enterococcus mundii* αλλά και για τα είδη *E. faecalis* και *E. faecium* (Mundt, 1982). Η μόλυνση των υδάτινων οικοσυστημάτων με αστικά λύματα, με λύματα από κτηνοτροφικές διεργασίες σε παράκτιες περιοχές κ.α, συμβάλλουν στην υποβάθμιση της ποιότητας των υδάτων και στην άμεση υποβάθμιση των αλιευτικών προϊόντων. Τις τελευταίες δεκαετίες γίνεται όλο και πιο έντονο το φαινόμενο διασποράς των Εντερόκοκκων στο υδάτινο οικοσύστημα με αποτέλεσμα να το καθιστά απειλητικό βακτήριο για τον άνθρωπο και να καταλαμβάνει στις μέρες μας πρωταρχική θέση στον τομέα της Μικροβιολογίας και της Επιδημιολογίας.

Ένας σημαντικός λόγος για την ανάδειξη των Εντερόκοκκων ως σημαντικά νοσοκομειακά παθογόνα είναι η αυξανόμενη αντοχή τους σε ένα μεγάλο εύρος αντιβιοτικών (Low et al., 2001) αλλά και η πολυ-ανθεκτικότητα που εμφανίζουν. Το είδος *E. faecalis* προκαλεί πληθώρα εντεροκοκκικών λοιμώξεων στον άνθρωπο και η πολυ-ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά είναι κοινό χαρακτηριστικό μαζί με το είδος *E. faecium* (Huysck et al., 1997). Οι περισσότεροι εντερόκοκκοι είναι ενδογενώς ανθεκτικοί στις κεφαλοσπορίνες, στις αντι-σταφυλοκοκκικές πενικιλίνες, στις αμινογλυκοσίδες και στην κλινταμυκίνη (Gray and Pedler, 1992; Murray, 1998). Η επίκτητη αντοχή των εντεροκόκκων περιλαμβάνει αντοχή σε: υψηλές συγκεντρώσεις των β-λακταμών,

υψηλές συγκεντρώσεις των αμινογλυκοσιδών, γλυκοπεπτίδια (βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη), τετρακυκλίνη, ερυθρομυκίνη, φλουοροκινολίνες, ριφαμπικίνη, αμινοπενικιλίνες, μακρολίδες, χλωραμφαινικόλη και νιτροφουραντοϊνη (Cetinkaya et al., 2000; Kayser, 2003; Pai and Kim, 1999). Με αποτέλεσμα όλα αυτά τα χαρακτηριστικά να καθιστούν τους εντεροκόκκους το πιο δύσκολο νοσοκομειακό παθογόνο όσον αφορά τον τρόπο θεραπείας τους (Pai and Kim, 1999).

1.2 Οστρακοειδή - μύδια

1.2.1 Εκτρεφόμενα είδη παγκοσμίως

Οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή μυδιών παγκοσμίως είναι η Κίνα και ορισμένες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης όπως είναι η Ισπανία, η Γαλλία, η Ολλανδία και η Ελλάδα. Τα δύο κυριότερα είδη μυδιών που καλλιεργούνται είναι το αναφερόμενο ως κοινό ή μπλε μύδι, *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758) και το λεγόμενο μεσογειακό μύδι, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819), τα οποία έχουν ευρεία κατανομή. Τα είδη του γένους *Mytilus* απαρτίζουν τα πιο κοινά θαλάσσια δίθυρα μαλάκια και συνεισφέρουν στη λειτουργία των παράκτιων οικοσυστημάτων. Ο γρήγορος ρυθμός αύξησης τους και η μεγάλη θρεπτική τους αξία τα καθιστούν ιδανικούς οργανισμούς για καλλιέργεια (Gosling, 1992). Από τα είδη *Mytilus*, καλλιεργείται το είδος *Mytilus smaragdinus* (Chemnitz 1785) στην Ταϊλάνδη και στις Φιλιππίνες, το είδος *Mytilus chilensis* (Hupe 1854) στην Χιλή, το είδος *Mytilus planulatus* (Lamarck 1819) στην Αυστραλία και το είδος *Mytilus coruscus* (Gould 1861) στην Κορέα (FAO, 1999). Επίσης, εκτός από τα είδη του *Mytilus*, καλλιεργούνται με μεγάλη επιτυχία σε πολλές χώρες και αρκετά είδη του γένους *Perna*, το οποίο έχει τροπική καθώς και υποτροπική κατανομή. Συγκεκριμένα το είδος *Perna viridis* (Linnaeus 1758) καλλιεργείται στην Ινδία και σε χώρες της Άπω Ανατολής, το είδος *Perna perna* (Linnaeus 1758) στις ακτές του Ατλαντικού στην νότια Αμερική (Βενεζουέλα και Βραζιλία) και στην Νότια

Αφρική. Στη Νέα Ζηλανδία καλλιεργείται με μεγάλη επιτυχία το είδος *Perna canaliculus* (Gmelin 1791; Βουλτσιάδου και συν., 2015).

1.2.2 Εκτρεφόμενα είδη στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα εκτρέφεται αποκλειστικά το είδος μυδιού *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819), γνωστό και με την ονομασία μεσογειακό μύδι. Η συστηματική κατάταξη του είδους είναι η εξής:

Φύλο: Mollusca

Κλάση: Bivalvia

Οικογένεια: Mytilidae

Γένος: *Mytilus*

Είδος: *Mytilus galloprovincialis*

Το όστρακό του είναι επίμηκες, γενικά τριγωνικό, υποτριγωνικό και αποστρογγυλεμένο στο πίσω άκρο του.



Εικόνα 1 : Το Μεσογειακό μύδι *Mytilus galloprovincialis* (πηγή: Θ. Φασούλας)

Συνήθως συναντάται σε ρηχά νερά (έως 10 m) όπου υπάρχουν οι καταλληλότερες περιβαλλοντικές συνθήκες διαβίωσής του (Seed and Suchanek, 1992). Το μέγεθος του μυδιού μπορεί να φτάσει ή και να ξεπεράσει τα 15 cm σε ιδανικές συνθήκες, η ηλικία ξεπερνά τα 20 έτη, ενώ το κατάλληλο εμπορεύσιμο μέγεθός του είναι μεγαλύτερο από 5 cm (ΠΔ. 86/1998 όπως τροποποιήθηκε από το ΠΔ. 227/2003). Το όστρακο περικλείει το σώμα του *M. galloprovincialis* και αποτελείται από συμμετρικές θυρίδες, που ενώνονται στο πίσω μέρος από ένα ισχυρό ελαστικό σύνδεσμο. Το άνοιγμα των δύο θυρίδων ελέγχεται από τον ελαστικό ισχυρό σύνδεσμο, ενώ το κλείσιμο τους ελέγχεται από δύο μύες που ονομάζονται προσαγωγοί μύες. Λόγω των θυρίδων του οστράκου προστατεύονται τα μαλακά μέρη του ζώου και σε κάποια περίπτωση κινδύνου με τη βοήθεια των προσαγωγών μυών κλείνουν ερμητικά και διαφυλάσσετε το σώμα του ζώου από πιθανούς εχθρούς. Εσωτερικά του οστράκου υπάρχει ένας δίλοβος μανδύας που είναι προσκολλημένος στο εσωτερικό των θυρίδων του οστράκου.



Εικόνα 2 : Το Μεσογειακό μύδι *Mytilus galloprovincialis* (πηγή: Θ. Φασούλας)

Τα κύτταρα της επιφάνειας του μανδύα σχηματίζουν χιτινώδη επιδερμίδα που μετασχηματίζεται σε όστρακο. Το όστρακο αποτελείται από δύο στρώματα: το εξωτερικό στρώμα, που είναι κατασκευασμένο από ανθρακικό ασβέστιο, σκεπάζεται γύρω-γύρω από το περίοστρακο, μια κερατοειδή ουσία, που εκκρίνεται από τα χείλη του μανδύα και το εσωτερικό στρώμα, που αποτελείται από την κογχυλίνη. Στο μανδύα βρίσκονται και οι γονάδες, που φέρουν το γεννητικό υλικό. Το στόμα τους δεν έχει όργανα μάσησης γι' αυτό περιβάλλεται από 4 φυλλοειδείς κεραίες, οι οποίες πάλλονται και διευκολύνουν έτσι την είσοδο του θαλασσινού νερού που περιέχει τις τροφές του. Με ένα μικρό άνοιγμα των θυρίδων, το νερό περνά από τα δύο ζεύγη βραγχίων μέσα από τις σχισμές του μανδύα ή από τον σίφωνα, πραγματοποιώντας τη διατροφή και την αναπνοή του ζώου. Επίσης υπάρχει το πόδι με το βύσσο που βρίσκονται στην κοιλιακή περιοχή (Gosling, 2003). Στην βάση του μανδύα περιέχεται η σπλαχνική μάζα (Gosling, 2003a).

Επειδή το μύδι είναι διηθηματοφάγος οργανισμός, τρέφεται διηθώντας το θαλασσινό νερό με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους του και της θερμοκρασίας του νερού, κρατώντας έτσι την

κατάλληλη ποσότητα τροφής που οι διαστάσεις της κυμαίνεται από 1-25 μm, αποβάλλοντας τα υπόλοιπα ως ψευδοκόπρανα (Μητσούδη, 2003). Ως ψευδοκόπρανα χαρακτηρίζεται η μη αποδεκτή τροφή από απόψεως μεγέθους, τα οποία απομακρύνονται από το μύδι μέσω των αιωρηματοφάγων και διηθηματοφάγων οργανισμών χωρίς να οδηγηθούν στο πεπτικό σύστημα (<http://www.fishbase.org/Glossary>).

Επιπλέον, τα μύδια έχουν μεγάλη ικανότητα διήθησης νερού, χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ένα μύδι *M. edulis* 7 cm φιλτράρει κατά μέσο όρο περίπου 110 l νερού το εικοσιτετράωρο (Walne, 1979).

1.2.3 Παγκόσμια παραγωγή

Στην παγκόσμια κατάταξη παραγωγής μυδιών, πρωτεύοντα ρόλο έχουν η Κίνα και η Ευρωπαϊκή Ένωση με την μεγαλύτερη παραγωγή, ενώ στην συνέχεια ακολουθεί η Χιλή και η Νέα Ζηλανδία. Σύμφωνα με τα στοιχεία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το μεγαλύτερο μέρος της προσφοράς μυδιών στην Ε.Ε. παράγεται τοπικά. Η Ισπανία είναι η μεγαλύτερη παραγωγός χώρα μυδιών στην Ευρώπη με περισσότερους από 150 χιλιάδες τόνους μυδιών ετησίως. Ακολουθεί μετά η Γαλλία με παραγωγή που κυμαίνεται από 20 έως 50 χιλιάδες τόνους και στη συνέχεια η Μ. Βρετανία, η Ελλάδα και η Ολλανδία με παραγωγές που κυμαίνονται μεταξύ 20 και 50 χιλιάδων τόνων. Μικρότερες ποσότητες παράγονται από τη Γερμανία, τη Σουηδία, την Πορτογαλία και τη Βουλγαρία (Βουλτσιάδου και συν, 2015).

1.2.4 Ελληνική παραγωγή

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση από τους 95.000 τόνους ετήσιας παραγωγής του μεσογειακού μυδιού (*Mytilus galloprovincialis*), οι 30.000 τόνοι μυδιών αποτελούν την Ελληνική παραγωγή (FAO 2002) εκ' των οποίων το 80-90% της παραγωγής αυτής εξάγεται, κυρίως, στην Ιταλία. Η Ελληνική παραγωγή μυδιών ξεκίνησε να αυξάνει από τις αρχές κυρίως της δεκαετίας του 1990, δηλαδή είκοσι αργότερα από ότι στην Ευρώπη (Α.Τ.Ε.Ι.Θ., 2007). Η παραγόμενη αξία στην περιοχή μελέτης είναι 10 εκατομμύρια € ετησίως (Zanou and Anagnostou, 2001) και απασχολούνται περίπου 1000 άτομα στις μονάδες (Α.Τ.Ε.Ι.Θ., 2007). Σχετικά με το εμπόριο ετήσια δυναμικότητα παραγωγής της περιοχής, ανέρχεται σε 17.000-20.000 t με κύρια χώρα προορισμού να είναι η Ιταλία (ΕΚΘΕ, 2001).

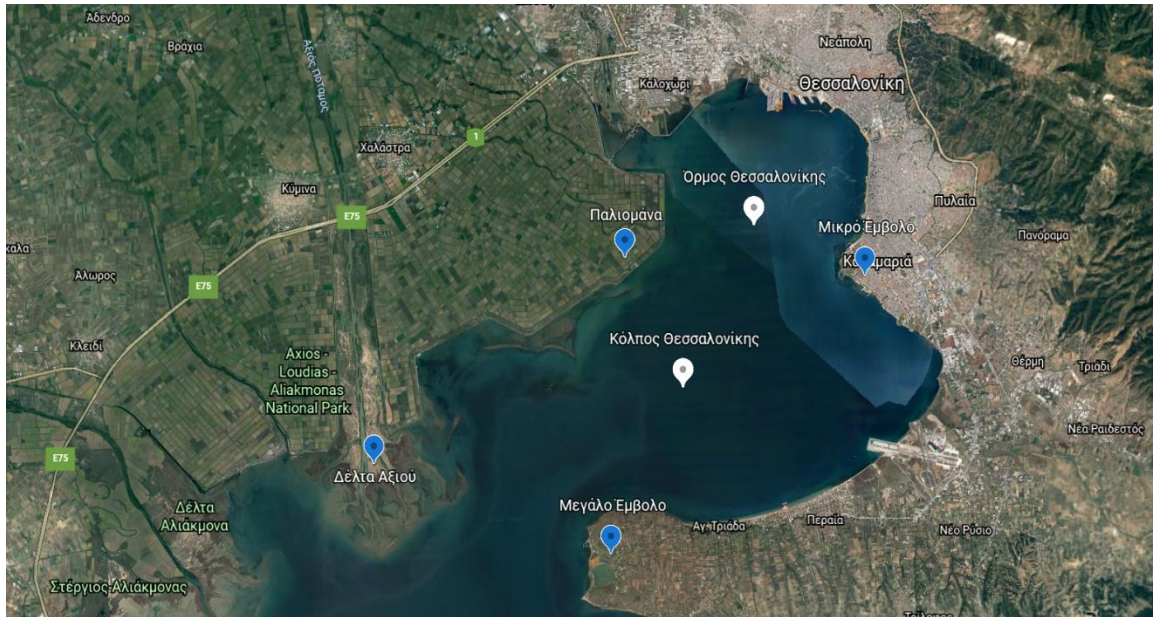
1.2.5 Θαλάσσιο περιβάλλον κόλπων Θεσσαλονίκης, Θερμαϊκού

1.2.5.1 Γεωμορφολογία

Ο Θερμαϊκός κόλπος έχει συνολική επιφάνεια 5100 km², εντάσσεται στο βορειοδυτικό τμήμα του Αιγαίου πελάγους και αποτελεί χαρακτηριστική περίπτωση ημίκλειστης λεκάνης. Η ευρύτερη περιοχή της μελέτης εντάσσεται σε μια πολύπλοκη θαλάσσια λεκάνη και από γεωμορφολογική άποψη, διακρίνεται σε τρία επιμέρους τμήματα (Ε.Κ.Θ.Ε, 1994):

- 1) Όρμος Θεσσαλονίκης – βόρειο τμήμα: γύρω από τον οποίο βρίσκεται η πόλη της Θεσσαλονίκης και εκτείνεται μέχρι την νοητή γραμμή μεταξύ Παλιομάνας και Μικρού έμβολου (μέγιστο βάθος 25m).
- 2) Κόλπος Θεσσαλονίκης- νότιο τμήμα: συνορεύει με τον όρμο και εκτείνεται μέχρι τα ακρωτήρια Μεγάλο Έμβολο και Βαρδάρη (μέγιστο βάθος 28m) έως τις εκβολές Αξιού (στην ΒΔ περιοχή βρίσκεται Χαλάστρα)

- 3) Θερμαϊκό κόλπο- νότιο ή εξωτερικό: έχει χαρακτηριστικά ανοιχτής θάλασσας και εκτείνεται έως την ευθεία των ακρωτηρίων Ποσειδί (Κασσάνδρα) και Δερματάς (Όσσα) (μέγιστο βάθος μεγαλύτερο των 110m) (Φάμελλος και συν, 2008).



Εικόνα 3: Χάρτης της ευρύτερης περιοχής μελέτης όπου φαίνεται Όρμος Θεσσαλονίκης Κόλπος Θεσσαλονίκης και τμήμα του Θερμαϊκού κόλπου. Επεξεργασμένη εικόνα (Google Earth).

Το ανάγλυφο του πυθμένα είναι ομαλό, λόγω των συνεχών αποθέσεων υλικών από τους ποταμούς, (Karageorgis et al., 2004). Ο κόλπος της Θεσσαλονίκης βάση της μορφολογίας του αποτελεί τμήμα που αντιστοιχεί στην εσωτερική ηπειρωτική κατωφέρεια του ευρύτερου Θερμαϊκού. Εντός του κόλπου εκβάλλουν τέσσερις ποταμοί, ο Γαλλικός, ο Αξίος, ο Λουδίας και ο Αλιάκμονας. Επίσης, εδρεύουν τρία αντλιοστάσια του αρδευτικού δικτύου της πεδιάδας της Θεσσαλονίκης αλλά και η έξοδος των βιολογικών καθαρισμών της Θεσσαλονίκης.

Η παράκτια ζώνη όπου ασκείται η δραστηριότητα της μυδοκαλλιέργειας αποτελείται από τρία είδη περιοχών :

- 1) Υγροτοπικές: χαρακτηρίζονται οι περιοχές που εντάσσονται σε όλο το εκβολικό σύστημα συμπεριλαμβανομένων και των δέλτα των ποταμών Αξιού, Λουδία, Αλιάκμονα, Γαλλικού και σε βάθος θάλασσας μικρότερο των 6 μέτρων των αλυκών του Κίτρου, Αγγελοχωρίου και της Επανάμης.
- 2) Θαλάσσιες: εκεί έχουν εγκατασταθεί οι μονάδες καλλιέργειας
- 3) Χερσαίες: εκεί έχουν εγκατασταθεί τα αλιευτικά καταφύγια καθώς και η υποδομή στήριξης των μυδοκαλλιεργειών (Φασούλας, 2008).

1.2.5.2 Κλίμα Θεσσαλονίκης

Το κλίμα στην περιοχή της Θεσσαλονίκης χαρακτηρίζεται ως ηπειρωτικό και μεταβάλλεται σε μεσογειακό στις παράκτιες περιοχές. Η θερμοκρασία γενικά κυμαίνεται στο εύρος των τιμών από 0 °C έως 38 °C (Poulos et al., 2000). Η μέση ετήσια θερμοκρασία του αέρα κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 9 °C -17,5 °C, ενώ η ετήσια βροχόπτωση 400 - 1300 mm (Poulos et al., 2000). Το χειμώνα παρατηρούνται βόρειοι-βορειοδυτικοί άνεμοι (επικρατούντες άνεμοι καθ' όλη τη διάρκεια του έτους), ενώ το καλοκαίρι αυξάνεται η μεταβλητότητα με επικρατέστερους τους νότιους και δυτικούς ανέμους (Hyder et al. 2002, ΥΠΓΕ, 2003). Οι άνεμοι βόρειων διευθύνσεων φυσούν ανά διαστήματα κυρίως το χειμώνα με διάρκεια 4-6 ημέρες και με ταχύτητα που μπορεί να φτάνει τα 20 m/sec. Το μετέμι είναι ενεργό από Μάιο έως Σεπτέμβριο στο νότιο τμήμα του κόλπου. Στις αρχές φυσάει κατά διαστήματα, ενώ σταθεροποιείται κατά τα μέσα 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),

προερχόμενη από τα νότια και τα νοτιοανατολικά (Hyder et al., 2002). Η επίδρασή της οποίας είναι ιδιαίτερα σημαντική, όταν δε φυσούν τα μελέμια (Poulos et al., 2000). Σε γενικότερο πλαίσιο η βόρεια συνιστώσα του ανέμου έχει τη μεγαλύτερη συχνότητα (40 %), (Karageorgis and Anagnostou, 2001) σε όλη τη διάρκεια του χρόνου.

1.2.5.3 Φυσικοχημικοί παράμετροι του νερού

Οι βιοτικοί και αβιοτικοί παράμετροι του νερού είναι σημαντικοί για την διαβίωση καθώς και για την ανάπτυξη των μυδιών, σε αυτούς ανήκουν η θερμοκρασία, η αλατότητα, το διαλυμένο οξυγόνο, τα θρεπτικά άλατα και τα ρεύματα. Στην περιοχή όπου βρίσκονται οι μυδοκαλλιέργειες στον Θερμαϊκό Κόλπο (Χαλάστρα), η θερμοκρασία εμφανίζει τις μικρότερες τιμές της μεταξύ των μηνών Φεβρουαρίου και Μαρτίου. Μετέπειτα αρχίζει μια συνεχής αύξησή της που φτάνει έως και τα βαθύτερα θαλάσσια στρώματα στα τέλη Μαΐου και συνεχίζει η αύξησή της έως και τα τέλη του Αυγούστου. Εμφανίζεται μια σταδιακή μείωσή της από τις αρχές του χειμώνα, χωρίς όμως να παρατηρούνται έντονες μεταβολές στις βαθμίδες θερμοκρασίας με το βάθος, όπως είναι εμφανές κατά την περίοδο της ανόδου (ΕΚΘΕ, 2001). Στο διάστημα Φεβρουαρίου – Μαρτίου η αλατότητα εμφανίζει τις μικρότερες τιμές στην επιφάνεια και τις μεγαλύτερες στον πυθμένα. Το διάστημα αυτό είναι έντονο το φαινόμενο αλοκλινές, το οποίο μειώνεται κατά την μετάβαση προς τους θερινούς μήνες και παρατηρείται σε συνεχώς μειωμένο βάθος. Το ίδιο παρατηρείται και με την θερμοκρασία, από τον Μάιο η θαλάσσια στήλη γίνεται πιο ομοιογενής και παραμένει σταθερή μέχρι τον Νοέμβριο που ξεκινούν οι εκροές των ποταμών. Τον Νοέμβριο στα βαθύτερα στρώματα της ανατολικής περιοχής παρατηρείται υψηλή αλατότητα που σχετίζεται με την εισροή νερών από το Βόρειο Αιγαίο (ΕΚΘΕ 2001).

Βασικός παράγοντας για την επιβίωση των θαλάσσιων οργανισμών είναι το διαλυμένο οξυγόνο (DO_2). Οι διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις του διαλυμένου οξυγόνου συνδέονται άμεσα τόσο με τις βιολογικές διεργασίες όπως είναι η φωτοσύνθεση, αλλά και με παραμέτρους όπως είναι η θερμοκρασία και το βάθος. Στην συγκεκριμένη περιοχή (Χαλάστρα), η μέση τιμή συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου είναι 7,52 mg/l για τον χειμώνα και 7,0 mg/l για το καλοκαίρι (στοιχεία της περιόδου 1992-2002 HCMR, 2003). Από μελέτες του ΕΚΘΕ 2001 οι τιμές της συγκέντρωσης δεν προσέγγισαν τα όρια της ανοξίας ούτε κατά την θερινή περίοδο κοντά στον πυθμένα, παρόλο που κατά το έτος 2000 είχε παρατηρηθεί αύξηση της θερμοκρασίας και της στρωμάτωσης.

Στην περιοχή του Θερμαϊκού κόλπου τα θρεπτικά άλατα παρουσιάζουν υψηλές συγκεντρώσεις κατά ένα βαθμό που προκύπτει από τη δράση των ποταμών. Επιπροσθέτως παρουσιάζουν μεγάλες χρονικές διακυμάνσεις λόγω του ότι οι κυριότερες πηγές των νιτρικών και των φωσφορικών είναι η γεωργία, ως αποτέλεσμα έχουμε την αύξηση των τιμών συγκέντρωσης κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες λόγω αρδεύσεων και την χρονική περίοδο από το Νοέμβριο μέχρι και το Δεκέμβριο λόγω βροχοπτώσεων (ΕΚΘΕ, 2001). Η αύξηση των θρεπτικών αλάτων προκαλεί και την αύξηση του φυτοπλαγκτού. Όμως τα μύδια των μυδοκαλλιεργειών χρησιμοποιούν το φυτοπλαγκτόν ως τροφή με αποτέλεσμα να αυξάνουν την διαφάνεια. Η αναπλήρωση των ποσοτήτων του φυτοπλαγκτού επιτυγχάνεται με την βοήθεια της παλίρροιας, επαναιώρησης κ.λ.π. (Γκανούλης, 1993). Οι αρκετά υψηλές τιμές των θρεπτικών όπως στην περιοχή της Χαλάστρας είναι χαρακτηριστικές των παράκτιων περιοχών ως αποτέλεσμα των ανθρωπογενών δράσεων και των εισροών των ποταμών. Σε σύγκριση με μετρήσεις της περιόδου 1995-1996 (Κράββα, 2000), το 2000 οι τιμές κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα των νιτρικών και των νιτροδών. Πιο συγκεκριμένα τα νιτρικά κυμάνθηκαν από 0,5-4,8 μM επιφανειακά και 0,5-2,5 μM

σε βάθος 5m και τα νιτρώδη από 0,05-0,2 μM με ιδιαίτερα υψηλές τιμές τον Οκτώβριο 0,4-0,5 μM ενώ οι μέγιστες τιμές των φωσφορικών αυξήθηκαν κατά 100 pg/l δηλαδή κυμάνθηκαν από 0,2-0,8 μM στα επιφανειακά και 0,15-0,7 μM σε βάθος 5m και των αμμωνιακών οι τιμές μειώθηκαν κατά 15 pg/l δηλαδή κυμάνθηκαν από 0,1-1,5 μM με αύξηση από τον Σεπτέμβριο που προσέγγισαν τα 4,5 μM (ΕΚΘΕ, 2001). Παρόλη την ύπαρξη των μυδοκαλλιεργειών δεν φαίνεται να αυξάνονται οι τιμές των θρεπτικών. Στα νιτρικά άλατα παρατηρείται αύξηση τιμών τον Σεπτέμβριο, τον Οκτώβριο και τον Νοέμβριο, που εμπίπτει με την «άνθηση» του φυτοπλαγκτού, ενώ μειώνονται σταδιακά από το Μάρτιο προς το Μάιο και διατηρούν ιδιαίτερα χαμηλές τιμές το καλοκαίρι. Αντιθέτως τα νιτρώδη παραμένουν σταθερά, ενώ έχουν καταγραφεί υψηλές τιμές τον Οκτώβριο. Σταδιακή αύξηση παρουσιάζουν τα αμμωνιακά και πυριτικά τον μήνα Σεπτέμβριο. Τα φωσφορικά είναι γενικώς αυξημένα με τις υψηλότερες τιμές να εμφανίζονται τον Ιούνιο και το φθινόπωρο.

1.2.5.4 Θεσμικό πλαίσιο. Συνθήκη Ramsar, Natura 2000.

Στην Βόρεια Ελλάδα βρίσκεται ένας μεγάλος αριθμός υγροτόπων που είναι είτε διεθνούς αξίας και προστατεύονται από τη συνθήκη Ramsar, είτε αποτελούν εθνικής αξίας και προστατεύονται από την εθνική νομοθεσία ή από το δίκτυο Natura 2000. Το Δέλτα του Αξιού καθώς και μέρος του ποταμού έως 7 km πάνω από τις εκβολές (67 km^2) είναι υπό το καθεστώς της συνθήκης Ramsar, που υπογράφηκε στην Ελλάδα στις 19/11/1974. Επιπροσθέτως η Ευρωπαϊκή Ένωση με το πρόγραμμα Natura 2000, για τον χαρακτηρισμό και την προστασία των οικοσυστημάτων που είναι σημαντικά για το περιβάλλον και έχουν μεγάλη βιοποικιλότητα, περιέλαβε τις ακόλουθες περιοχές: GR1220002 Δέλτα Αξιού-Λουδία-Αλιάκμονα (112 km^2), GR1220007 Αξιού ποταμού (77 km^2), GR1250010 Δέλτα Αξιού-Λουδία-Αλιάκμονα-Αλυκή Κίτρους (138 km^2) (Πίνακας 1).

Το Δίκτυο Natura 2000, είναι ένα Ευρωπαϊκό Οικολογικό Δίκτυο περιοχών που αφορούν φυσικούς τύπους οικοτόπων και οικοτόπους ειδών που είναι σημαντικοί σε Ευρωπαϊκό επίπεδο.

Πλαισιώνεται από δύο κατηγορίες περιοχών:

- 1) Τις «Ζώνες Ειδικής Προστασίας (ΖΕΠ)» (Special Protection Areas - SPA) για την Ορνιθοπανίδα, όπως ορίζονται στην Οδηγία 79/409/ΕΚ και τους
- 2) «Τόπους Κοινοτικής Σημασίας (ΤΚΣ)» (Sites of Community Importance - SCI) όπως ορίζονται στην Οδηγία 92/43/ΕΟΚ (<http://www.minenv.gr>).

Μια μυδοκαλλιέργεια με πλωτό σύστημα εγκαθίσταται σε βάθη μεγαλύτερα των 6 m, το οποίο αποτελεί όριο των προστατευμένων υγροτοπικών περιοχών σύμφωνα με τη Συνθήκη Ramsar, και διενεργείται στο ΒΔ κόλπο Θεσσαλονίκης (περιοχή Χαλάστρα). Η περιοχή μελέτης που συμπεριλαμβάνεται στον ΒΔ κόλπο Θεσσαλονίκης, χαρακτηρίζεται και ως ιδιαίτερος 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 Κίτρους, είναι οικολογικά σημαντικές και προστατεύονται (Karageorgis et al., 2004).

Πίνακας 1. Περιοχές Natura 2000 στην Θεσσαλονίκη (<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	ΛΙΝΟΘΑΛΛΑΣΣΑ 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

1.2.5.5 Ρύπανση - μόλυνση

Ο ΒΔ κόλπος της Θεσσαλονίκης αποτελεί αποδέκτη ενός τεράστιου ρυπαντικού φορτίου, με φυσικό οικοσύστημα του κόλπου να διαταράσσεται από διαφορετικής προέλευσης ανθρωπογενείς παρεμβάσεις. Η ρύπανση αυτή πιο συγκεκριμένα οφείλεται σε κατακριμνήσεις, εκπλύσεις εδαφών, από πλοία, σκάφη των μυδοκαλλιεργειών, εναποθέσεις ρύπων στη ξηρά και εκβολές υποθαλάσσιων αγωγών.

Τα απόβλητα της γεωργικής προέλευσης που καταλήγουν στον κόλπο προέρχονται από την ροή των τριών ποταμών που είναι στην δυτική πλευρά του κόλπου. Συγκεκριμένα ο Αξιός με το 83% της λεκάνης απορροής του να είναι στην Βόρεια Μακεδονία στην πρώην περιοχή Σκοπίων έχει καταγραφεί ως ο δεύτερος ποταμός που δημιουργεί την μεγαλύτερη ρύπανση στην Ελλάδα σε σχέση με τα θρεπτικά, το οργανικό φορτίο, τα βαρέα μέταλλα, και την συγκέντρωση του οξυγόνου (Karageorgis et al., 2004).

Ο Θερμαϊκός κόλπος είναι και αποδέκτης αστικών λυμάτων και βιομηχανικών αποβλήτων της Θεσσαλονίκης καθώς και της ευρύτερης περιοχής της. Τα αστικά λύματα υπολογίζεται ότι είναι περίπου 3.300.000 κατοίκων που κατοικούν στην υδρολογική λεκάνη του (Karageorgis et al., 2004). Στον ήδη μέχρι στιγμής επιβαρυνμένο αποδέκτη εναποθέτονται και τα προϊόντα του μεταβολισμού των μυδιών (κόπρανα και ψευδοκόπρανα) στο βυθό κάτω από τις μονάδες εκτροφής αλλά και τα παραπροϊόντα της διαχείρισης των μυδοκαλλιεργειών (πχ. αραιώσεις). Επίσης, η ποσότητα των προϊόντων μεταβολισμού είναι ιλύδους μορφής και εξαρτώνται αποκλειστικά από τη μεταβολική δραστηριότητα των μυδιών. Από την διαχείριση μιας μυδοκαλλιέργειας παράγεται ακόμη ένας μεγάλος όγκος ρύπων όπως προκύπτει από τα χρησιμοποιημένα δίχτυα αρμαθιών, τα κελύφη νεκρών μυδιών, τις μάζες φυκών, τους επιβιότες και άλλα οργανικά υπολείμματα (ΕΚΘΕ, 2001).

1.2.5.6 Θαλάσσια κυκλοφορία

Η ποιότητα του νερού στις παράκτιες περιοχές του Θερμαϊκού κόλπου έχει άμεση σχέση με την ανάμιξη των παράκτιων νερών που έχουν υψηλό ποσοστό ρυπαντικού φορτίου με τα βαθύτερα νερά της ανοιχτής θάλασσας. Σε περιοχές που η παλίρροια είναι σχεδόν ανύπαρκτη, ο άνεμος έχει ιδιαίτερη σημασία όσον αφορά την ανάμιξη και την κυκλοφορία του νερού (Barber & Volakos, 1997).

Ο Θερμαϊκός κόλπος είναι μια ημίκλειστη ρηχή λεκάνη με βάθος 10 έως και 75 m, περικλείεται από ξηρά από τις τρεις πλευρές και έχει ένα μοναδικό άνοιγμα από το νότιο τμήμα, με εύρος παλίρροιας να είναι 0,25 m (Barber and Volakos, 1997). Στην ευρύτερη περιοχή έχουμε βόρειους, βορειο-δυτικούς ανέμους και το κοινό μελέμι (βορειο-ανατολικό) και δημιουργούν μια σειρά από κυκλωνικές και αντικυκλωνικές δίνες. Μέσω προσομοίωσης έγινε γνωστό ότι η ανταλλαγή του νερού διαμέσου της στενής εισόδου του όρμου Θεσσαλονίκης είναι ελάχιστη για τους ανέμους που πνέουν στην ευρύτερη περιοχή, ως αποτέλεσμα να έχει άμεση επίδραση στην διάλυση αλλά και στην διασπορά των ρύπων στο βόρειο τμήμα του κόλπου (Barber and Volakos, 1997). Στον Θερμαϊκό κόλπο η κυκλοφορία είναι κυρίως κυκλωνική (Barber & Volakos, 1997; Hyder et al., 2002). Τα νερά του Αιγαίου διεισδύουν στον κόλπο από τα βαθύτερα στρώματα κατά μήκος του ανατολικού τμήματος της ακτής και με αντίθετη φορά από αυτήν των δεικτών του ωρολογίου εισβάλλουν στον κόλπο της Θεσσαλονίκης. Επίσης, το νερό των ποταμών κινείται κατά μήκος του δυτικού τμήματος της ακτής νότια αν και έχουν ανιχνευτεί γλυκά νερά στον κόλπο της Θεσσαλονίκης κάτω από την επίδραση δυτικών ανέμων (Kontoyiannis et al., 2003). Το νερό ανανεώνεται περισσότερο κατά την περίοδο της μεγαλύτερης απορροής των ποταμών. Ειδικότερα στην περιοχή της Χαλάστρας όταν φυσά βόρειος και βορειοδυτικός άνεμος (επικρατέστερος στην

περιοχή) δημιουργούνται ανατολικά και βορειοανατολικά ρεύματα στη βόρεια καθώς και ανατολική πλευρά της λεκάνης, νότια και νοτιοανατολικά ρεύματα στην δυτική και νότια πλευρά, και στο κέντρο δημιουργούνται νοτιοανατολικά ρεύματα (Savvidis et al., 2007). Σύμφωνα με τα λεγόμενα των ίδιων συγγραφέων όσον αφορά στην ταχύτητα των ρευμάτων στη στήλη του νερού, υπάρχει μείωση στα βαθύτερα στρώματα σε σχέση με τα επιφανειακά στρώματα, επαληθεύοντας την ανεμογενή δράση των ρευμάτων. Επιπροσθέτως, στο μέσο μιας καλλιέργειας μυδιών οι τιμές που παρατηρούνται στα 2-3 m από την επιφάνεια, μειώνονται απότομα στο 50 % στα 5 m από την επιφάνεια.

1.3 Μοντέρνες μέθοδοι ανίχνευσης – ταυτοποίησης παθογόνων μικροοργανισμών

Οι συμβατικές τεχνικές μικροβιολογίας που βασίζονται στην ανάλυση αλληλουχίας 16S rDNA, χρησιμοποιούνται ευρέως για την ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών. Ωστόσο, αυτές οι τεχνικές είναι χρονοβόρες και οικονομικά ασύμφωρες. Σε αντίθεση με άλλες μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για το ίδιο πεδίο, π.χ. βιολογικής αναγνώρισης ή αναγνώρισης με βάση την PCR, η MALDI-TOF MS είναι μια σύγχρονη, οικονομικά αποδοτική μεθοδολογία όσον αφορά το κόστος λειτουργίας και τις δαπάνες χρόνου στο εργαστήριο (Hart et al., 2015; Lasch et al., 2016; Fernández-Álvarez et al., 2018). Η Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) είναι μία μέθοδος για την ανάλυση του πρωτεόματος, δηλαδή του συνόλου των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων τα οποία κωδικοποιούνται και παράγονται από το γονιδίωμα ενός οργανισμού. Το MALDI-TOF MS ανιχνεύει σήματα μάζας από βακτηριακές πρωτεΐνες ή πεπτίδια και προσδιορίζει τα μοναδικά τους φάσματα μάζας ή δακτυλικά αποτυπώματα μάζας πεπτιδίων. Στη συνέχεια, τα ληφθέντα PMF συγκρίνονται με βακτηριακά στελέχη αναφοράς στις δημόσιες βάσεις δεδομένων πρωτεομικής /γονιδιωματικής ή σε μια ειδική

βιβλιοθήκη φασμάτων μάζας (Piamsomboon et al., 2020). Στόχοι της είναι α) ο διαχωρισμός, η ταυτοποίηση, ο χαρακτηρισμός και η αλληλούχιση πρωτεϊνών, β) η μελέτη αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με σύμπλοκα και γ) η ποσοτικοποίησή τους και η συσχέτιση με την κυτταρική λειτουργία. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την βακτηριακή ταυτοποίηση με βάση τη σύγκριση μεταξύ του πρωτεομικού προφίλ των άγνωστων μικροοργανισμών με των στελεχών αναφοράς που υπάρχουν στη βιβλιοθήκη. Η MALDI-TOF MS έχει εφαρμοστεί στην ιατρική και κτηνιατρική ως εναλλακτικό διαγνωστικό εργαλείο με αυξανόμενη δημοτικότητα λόγω της ταχύτητάς του, απλότητας, σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας και ισχυρή διακριτική ισχύ. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί για την ταυτοποίηση μικροοργανισμών όπως είναι τα *Enterococcus* και τα *Enterobacter* που απομονώθηκαν από έντομα αποθηκών τα οποία απαντώνται συνήθως σε πρώτες ύλες ιχθυοτροφών (Parlapani et al., 2019).

1.4 Σκοπός της Διατριβής

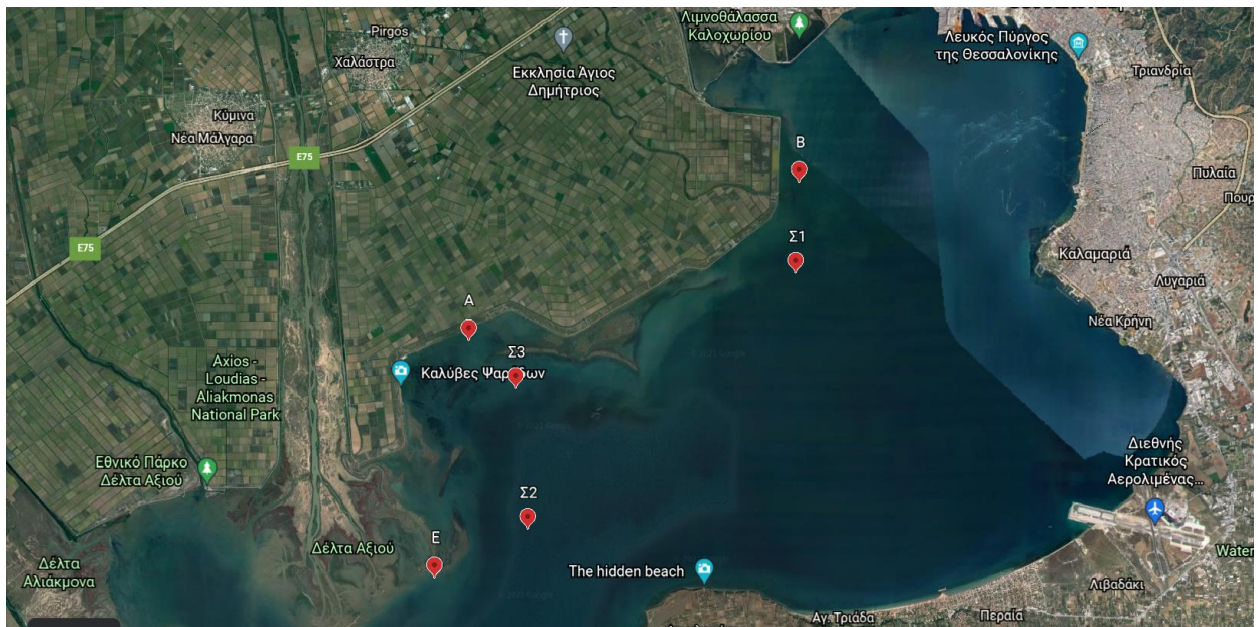
Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η διερεύνηση παθογόνων μικροοργανισμών του γένους *Enterococcus*, συμπεριλαμβάνοντας και τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, σε μύδια και στο νερό εκτροφής τους (μυδοκαλλιέργειες) καθώς και η ανίχνευση των πηγών από τις οποίες οι μικροοργανισμοί εισβάλλουν στο υδάτινο οικοσύστημα όπου βρίσκονται οι μυδοκαλλιέργειες.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Περιοχή της μελέτης

Η περιοχή μελέτης βρίσκεται στο ΒΔ κόλπο της Θεσσαλονίκης, στην περιοχή Χαλάστρα, όπου διενεργείται μυδοκαλλιεργητική δραστηριότητα σε πασσαλωτές και πλωτές μονάδες. Τα σημεία δειγματοληψίας ήταν τα εξής (Εικόνα 4):

- 1) Σημείο Β: περιοχή του βιολογικού
- 2) Σημείο Ε: περιοχή των εκβολών
- 3) Σημείο Α: περιοχή των αντλιοστασίων
- 4) Σημείο Σ1: μυδοκαλλιέργεια κοντά στην περιοχή του βιολογικού
- 5) Σημείο Σ2: μυδοκαλλιέργεια ανοιχτή θάλασσα
- 6) Σημείο Σ3: μυδοκαλλιέργεια κοντά στην περιοχή των αντλιοστασίων



Εικόνα 4: Χάρτης της περιοχής μελέτης όπου φαίνονται τα σημεία δειγματοληψίας.

Επεξεργασμένη εικόνα (Google Earth).

2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Τα δείγματα (θαλασσινό νερό και μύδια) ελήφθησαν από ελληνικές μονάδες καλλιέργειας μυδιών στην περιοχή της Χαλάστρας (ΒΔ κόλπο Θεσσαλονίκης). Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν τον Σεπτέμβριο του 2020 έως και τον Ιανουάριο του 2021. Όπως αναφερθήκαμε και στην παράγραφο 2.1 τα δείγματα μυδιών συλλέχθηκαν από τρεις μονάδες καλλιέργειας, καθώς από τα ίδια σημεία συλλέχθηκαν και δείγματα νερού αλλά σε βάθος περίπου 5-6m. Επιπλέον, συλλέχθηκαν δείγματα νερού από σημεία κοντά στο αντλιοστάσιο, τις εκβολές και τον βιολογικό καθαρισμό. Τα μύδια και τα δείγματα νερού τοποθετήθηκαν σε φορητό ψυγείο με πάγο και οδηγήθηκαν 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 δύο ωρών από τη δειγματοληψία τους. Στα δείγματα (μύδια και νερό) πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις την ίδια μέρα της παραλαβής τους. Η διεξαγωγή των μικροβιολογικών αναλύσεων είχαν ως στόχο την ανίχνευση και την απομόνωση των πιθανών παθογόνων βακτηρίων του γένους *Enterococcus*. Μετά την ανίχνευση ακολούθησε ταυτοποίηση των αποικιών των βακτηρίων με MALDI-TOF MS και μελέτη ανθεκτικότητας των αποικιών αυτών σε 20 διαφορετικά αντιβιοτικά που έχουν ευρεία χρήση στη θεραπεία του ανθρώπου ή/και των ζώων.

2.3 Μικροβιολογική ανάλυση

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα

Tryptone Soy Agar (TSA,) για την εκτίμηση της γενικότερης ποιότητας των δειγμάτων (νερού και μύδια), το οποίο είναι ένα γενικής χρήσης θρεπτικό υλικό που θεωρείται το

καταλληλότερο ποιοτικά και ποσοτικά για την απαρίθμηση μικροοργανισμών στα ιχθυηρά (Kakasis et al., 2011). Στο υλικό αυτό, οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας παρέχουν άζωτο (N), βιταμίνες και μέταλλα, καθιστώντας το θρεπτικό μέσο για μια ποικιλία μικροοργανισμών. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη του εκάστοτε μικροοργανισμού. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) λειτουργεί ως ρυθμιστής της οσμωτικής πίεσης.

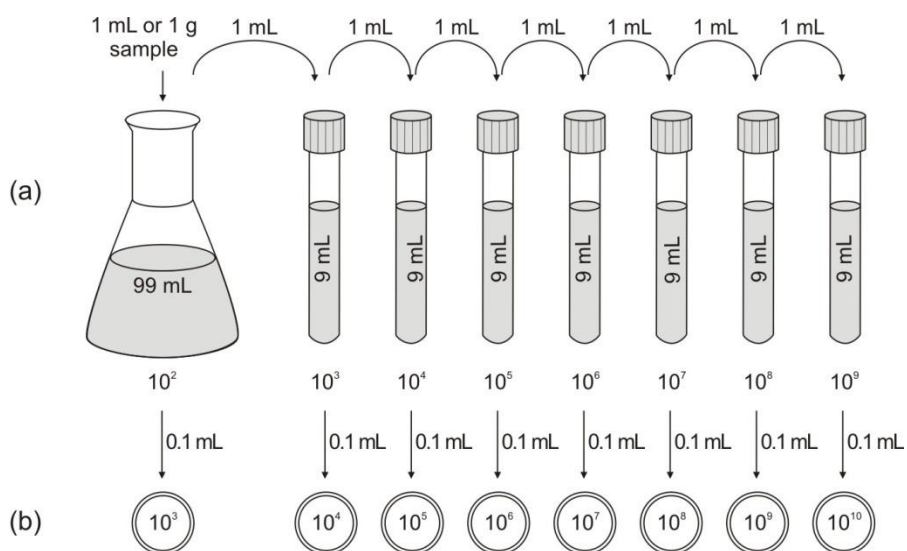
Kanamycin Aesculin Azide Agar (K.A.A. Agar,) για την απομόνωση των εντερόκοκκων, το οποίο είναι ένα επιλεκτικό θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των εντερόκοκκων. Σε αυτό το θρεπτικό υπόστρωμα, το αζίδιο του νατρίου (Na) και η καναμυκίνη είναι υπεύθυνα για την επιλεκτική αναστολή που απαιτείται, ενώ η ασεκουλίνη και τα άλατα σιδήρου (Fe) σχηματίζουν ένα σύστημα δείκτη για την τεκμηριωμένη ταυτοποίηση των εντερόκοκκων.

Τα μικροβιολογικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την LAB M (Lancashire, UK).

2.3.1 Προετοιμασία δειγμάτων.

Δείγματα μυδιών

Σε κάθε δειγματοληψία, λαμβάνονταν ασηπτικά 25 g σε ειδικές αποστειρωμένες σακούλες stomacher μαζί με 225 ml MRD (Maximum Recovery Diluent, 0,85% w/v NaCl, 0,1% w/v peptone) και η σακούλα οδηγούνταν σε συσκευή ομογενοποίησης (Bug Mixer 400 VW, Interscience, London, UK) όπου τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν για 3 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων με μεταφορά 1ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 ml ποσότητα αραιωτικού μέσου (Εικόνα 5).



Εικόνα 5 . Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις.

Δείγματα νερού

Για την μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων του θαλασσινού νερού χρησιμοποιήθηκαν 100ml από το νερό τα οποία διηθούνταν από φίλτρα νερού με τη βοήθεια αντλίας κενού. Μετέπειτα, τα φίλτρα τοποθετούνταν σε τρυβλία Petri που περιείχαν το επιλεκτικό θρεπτικό υλικό K.A.A. Agar (Kanamycin Aesculin Azide Agar).

Τεχνική επίστρωσης τρυβλίων

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν της επιφανειακής επίστρωσης (spreadplate). Η μέθοδος της επίστρωσης (0,1 ml από σειριακές δεκαδικές αραιώσεις σε MRD) χρησιμοποιήθηκε για την απαρίθμηση των ακόλουθων μικροοργανισμών α) ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX) σε TSA, το οποίο επωάστηκε για 48-72 ώρες στους 25°C και β) για τους εντερόκοκκους σε K.A.A. Agar το οποίο επωάστηκε για 24-48 ώρες στους 37°C.

2.3.2 Απομόνωση μικροοργανισμών

Μετά την επώαση των μικροοργανισμών σε K.A.A. Agar (, το οποίο επώαστηκε για 24-48 ώρες στους 37°C, συλλέχθηκε περισσότερο από το 50% των αποικιών. Στην συνέχεια έγινε μεταφορά των αποικιών με τη χρήση αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου από τα τρυβλία σε σωληνάκια που περιείχαν TSB (Trypticase Soy Broth) θρεπτικό υλικό, και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C. Ακολούθησε μεταφορά των μικροοργανισμών με τη βοήθεια του αποστειρωμένου μικροβιολογικού κρίκου από τα σωληνάκια TSB σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα γενικής χρήσης TSA μέσω γραμμικής μετασποράς (streaking) για τον έλεγχο της καθαρότητας τους (καθαρές καλλιέργειες) και στη συνέχεια η ταυτοποίησή τους πραγματοποιούνταν με MALDI-TOF MS. Οι καθαρές καλλιέργειες αποθηκεύτηκαν σε σωληνάκια με γλυκερόλη στους -20°C μέχρι την ολοκλήρωση των αναλύσεων με MALDI-TOF MS έτσι ώστε να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.

2.4 Ταυτοποίηση μικροοργανισμών με MALDI-TOF-ms

2.4.1 MALDI-TOF MS.

Οι απομονωμένες αποικίες ταυτοποιήθηκαν με Ιοντισμό με Εκρόφηση από Μήτρα μέσω Λείζερ – MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) με φασματομετρία μάζας – Mass Spectrometry (MS). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Συγκεκριμένα, λαμβάνονταν μια μικρή ποσότητα από καθαρή αποικία και εναποτίθονταν ομοιόμορφα με εξάπλωση σε μία μεταλλική (ατσάλινη) επιφάνεια 96 θέσεων, που καλείται πλακίδιο ανάλυσης MALDI. Αφού καλύπτονταν όλες οι θέσεις του πλακιδίου, λαμβάνονταν 1 μL διαλύματος μυρμηκικού οξέος 70 % (v/v; Formic Acid 85% AG, Penta, Praha), τοποθετούνταν προσεκτικά πάνω από κάθε θέση του πλακιδίου και αφήνονταν να ξηραθεί σε θερμοκρασία

δωματίου για περίπου 10 λεπτά. Κατόπιν με τον ίδιο τρόπο τοποθετούνταν πάνω στο δείγμα το χημικό υπόστρωμα της μήτρας και αφήνονταν για άλλα 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου να κρυσταλλωθεί κατά την ξήρανση του. Το χημικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ως μητρική ουσία ήταν το α -CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic; Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Το μίγμα αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν εισήχθη στον φασματογράφο μάζας για την πραγματοποίηση των αναλύσεων. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν η MALDI Microflex LT mass spectrometer (Bruker Daltonic GmbH, Bremen, Germany).

Για τη λήψη των φασμάτων ο φασματογράφος μάζας ρυθμίστηκε σε θετική γραμμική ανάλυση ιόντων και σε συχνότητα λέιζερ στα 60 Hz. Η λήψη φάσματος γίνονταν αυτόματα με το λογισμικό (Flex control 3.4; Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Το εύρος μαζών εντός του οποίου καταγράφηκαν και αξιολογήθηκαν οι πρωτεϊνικές κορυφές ήταν από m/z 2000 έως 20.000. Οι υπόλοιπες ρυθμίσεις Microflex LT με τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις ήταν: πηγή ιόντων 1: 20kV, πηγή ιόντων 2: 18,5kV, φακοί: 6kV, παλμική εξαγωγή ιόντων: 100 ns. Η ταυτοποίηση των απομονωμένων αποικιών έγινε μέσω του λογισμικού MALDI Biotyper Software (version 4.0) και η σύγκριση των φασμάτων μάζας που λαμβάνονταν συγκρίνονταν στη βιβλιοθήκη φασμάτων μάζας (6.093 MSPs). Για την εξωτερική βαθμονόμηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το Bruker Bacterial Test Standard (BTS), που είναι ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα στελέχους αναφοράς, συγκεκριμένα, ένα τεχνητό πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους *E. coli* (*E. coli* DH5- α 1ha, Brucker Company). Η βαθμολογία που δίνονταν από τον MALDI Biotyper RTC, πρόβαλλε την πιθανότητα για έναν άγνωστο μικροοργανισμό να βρίσκεται ως είδος στην βάση δεδομένων του MALDI Biotyper.

2.5 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων αντιβιοτικών σε υπόστρωμα με άγαρ

2.5.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Μετά την ταυτοποίηση των αποικιών με MALDI-TOF-ms, ελήφθησαν τυχαία από κάθε στέλεχος αντιπρόσωποι (που αποτελούσαν το 50-100% των αποικιών του στελέχους) για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Αρχικά από τις καθαρές καλλιέργειες που αποθηκεύτηκαν στους -20°C έγινε μεταφορά με τον αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο σε σωληνάκια με TSB (Trypticase Soy Broth) θρεπτικό υλικό και επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C . Μετέπειτα μεταφέρθηκε 1 ml βακτηριακού εναιωρήματος σε αποστειρωμένους σωλήνες που περιείχαν 9 ml υγρού θρεπτικού υλικού Tryptone Soy Broth (LAB004, Lab M). Στη συνέχεια έγινε η επώαση των δειγμάτων για 24 ώρες στους 37°C . Έπειτα έγινε δεκαδική αραίωση του δείγματος μεταφέροντας 1 ml δείγματος σε σωλήνα που περιείχε 9 ml αλατούχου διαλύματος, η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Μετά από ομογενοποίηση, λήφθηκε από το τελικό διάλυμα ποσότητα 150 μl, το οποίο προστέθηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υλικό Tryptone Soy Agar (TSA) με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης έτσι ώστε ο πληθυσμός ενοφθαλμισμού να είναι 10^7 cfu/ml Έπειτα σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν τρεις δίσκοι (εις διπλούν) που περιείχαν τη γνωστή συγκέντρωση αντιβιοτικού και στην συνέχεια επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C . Τα 20 αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν και οι συγκεντρώσεις του αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Είκοσι (20) αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της ανθεκτικότητας των απομονωμένων βακτηρίων από δείγματα νερού και από τη σάρκα μυδιών μυδοκαλλιέργειας από την περιοχή της Χαλάστρας.

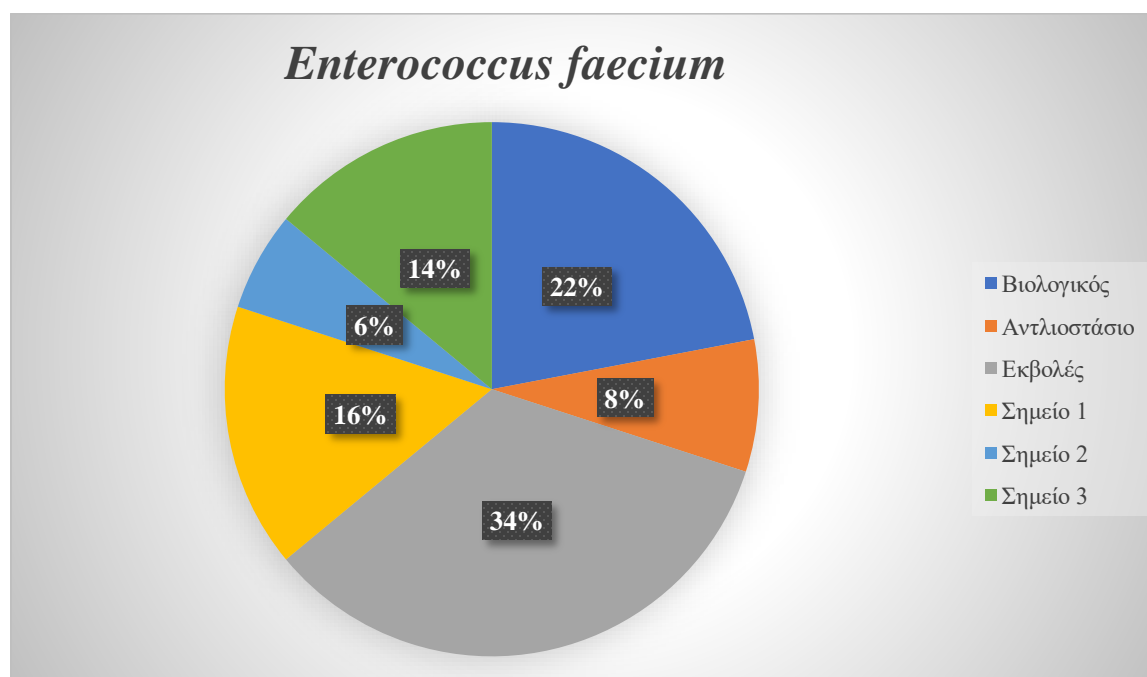
Ampicilin	AMP10	Αμπικιλίνη
Ceftazidime	CAZ30	Κεφταζιδίμη
Oxytetracycline	OT30	Οξυτετρακυκλίνη
Cephazolin	KZ30	Κεφαζολίνη
Clindamycin	DA ₂	Κλινδαμυκίνη
Gentamicin	CN10	Γενταμικίνη
Streptomycin	S10	Στρεπτομυκίνη
Kanamycin	K30	Καναμυκίνη
Ciprofloxacin	CIP5	Σιπροφλατοξίνη
Penicillin G	P10	Πενικιλίνη
Erythromycin	E15	Ερυθρομυκίνη
Amoxicilin	AML25	Αμοξυκιλλίνη
Azithromycin	AZM15	Αζιθρομυκίνη
Sulphamethoxazole	SXT25	Σουλφαμεθοξαζόλη
Tetracycline	TE30	Τετρακυκλίνη
Vancomycin	VA30	Βανκομυκίνη
Cephalothin	KF30	Κεφαλοθίνη
Cefoxitin	FOX30	Κεφοτοξίνη
Nalidixic acid	NA30	Ναλιδιξικό οξύ
Sulphonamides	S ₃₀₀	Σουλφοναμίδη

3. Αποτελέσματα

3.1 *Enterococcus* στο νερό

Βακτήρια του είδους *Enterococcus faecium* απομονώθηκαν από τα σημεία δειγματοληψίας Βιολογικός, Αντλιοστάσιο, Εκβολές, Σημείο Σ1 – μυδοκαλλιέργεια κοντά στην περιοχή του βιολογικού, Σημείο Σ2 - μυδοκαλλιέργεια ανοιχτή θάλασσα και Σημείο Σ3 - μυδοκαλλιέργεια κοντά στην περιοχή των αντλιοστασίων σε ποσοστά 22%, 8%, 34%, 16%, 6% και 14% αντίστοιχα (Σχήμα 1).

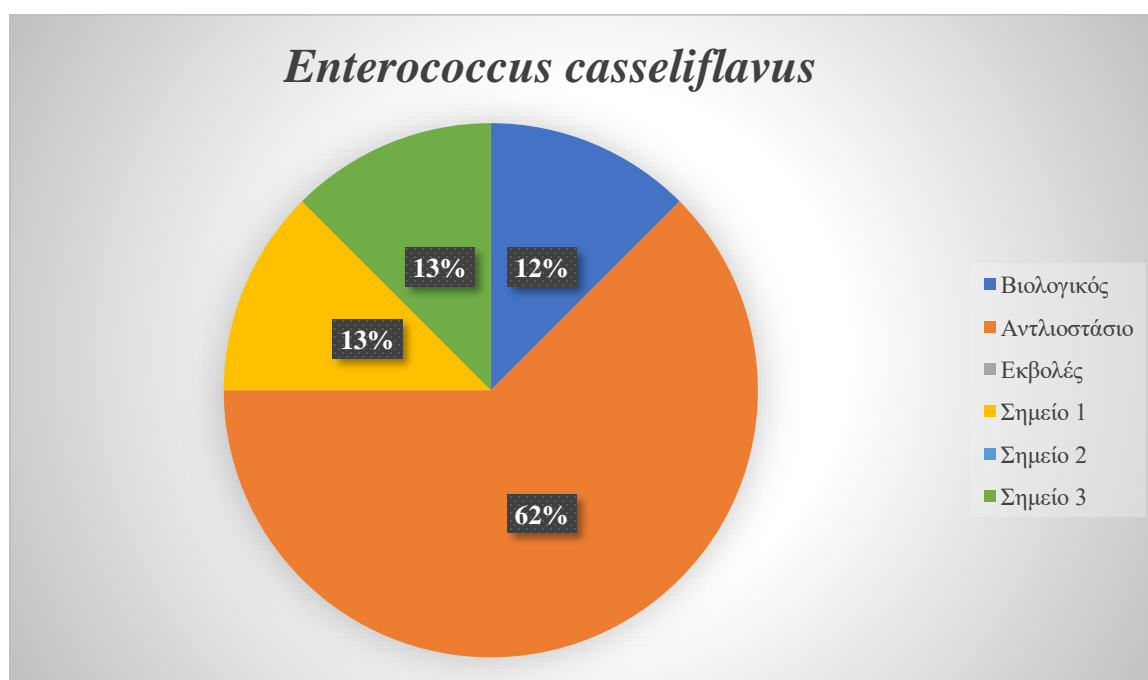
Enterococcus faecium



Σχήμα 1. Αφθονία (%) του στελέχους *Enterococcus faecium* που απομονώθηκε από τα δείγματα νερού στα σημεία δειγματοληψίας Βιολογικός, Αντλιοστάσιο και Εκβολές, καθώς και από τα δείγματα νερού στο Σημείο 1, Σημείο 2 και Σημείο 3 στην περιοχή της Χαλάστρας και ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο MALDI-TOF MS.

Enterococcus casseliflavus

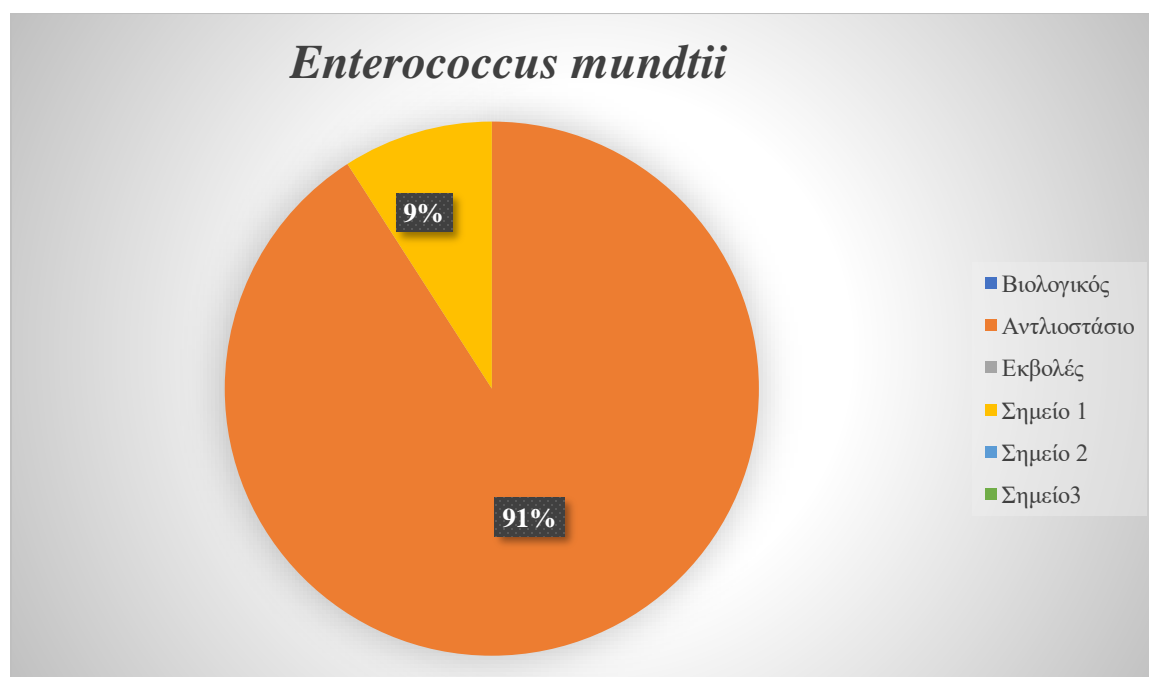
Βακτήρια του είδους *Enterococcus casseliflavus* απομονώθηκαν από τα σημεία δειγματοληψίας Βιολογικός, Αντλιοστάσιο, Σημείο Σ1 - μυδοκαλλιέργεια κοντά στην περιοχή του βιολογικού και Σημείο Σ3 - μυδοκαλλιέργεια κοντά στην περιοχή των αντλιοστασίων σε ποσοστά 12%, 62%, 13%, 13% αντίστοιχα (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Αφθονία (%) του στελέχους *Enterococcus casseliflavus* που απομονώθηκε από δείγματα νερού στα σημεία δειγματοληψίας Βιολογικός, Αντλιοστάσιο, και από δείγματα νερού στο Σημείο 1 και Σημείο 3 στην περιοχή της Χαλάστρας, και ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο MALDI-TOF MS.

Enterococcus mundtii

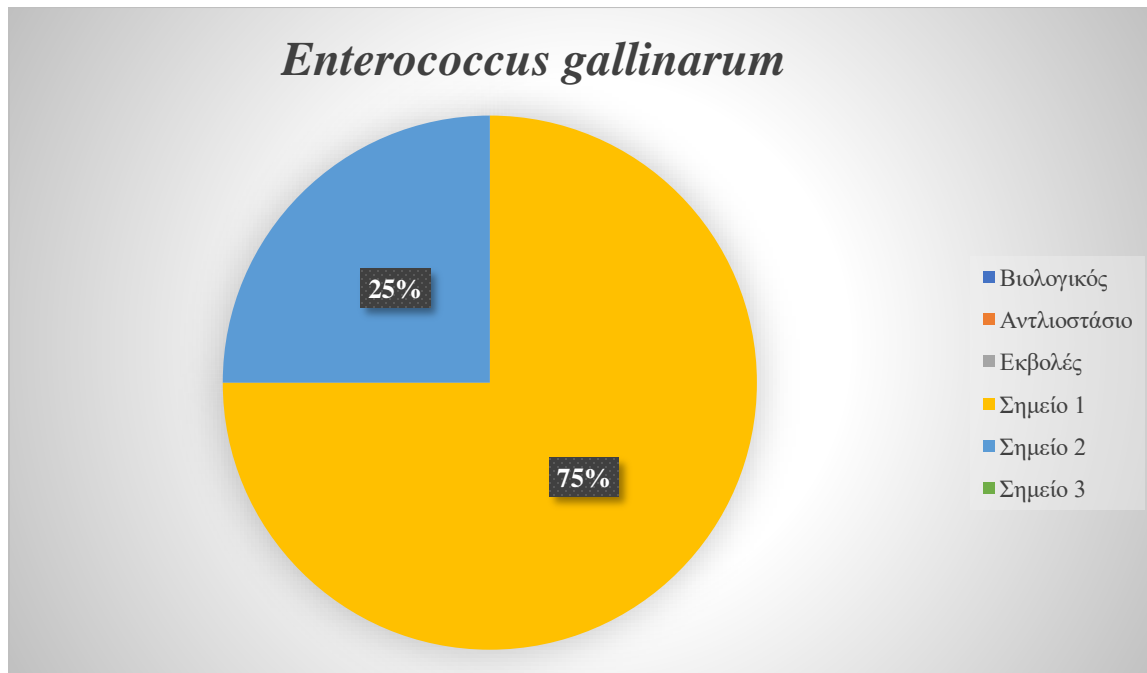
Βακτήρια του είδους *Enterococcus mundtii* απομονώθηκαν από τα σημεία δειγματοληψίας Αντλιοστάσιο και Σημείο Σ1 - μυδοκαλλιέργεια κοντά στην περιοχή του βιολογικού σε ποσοστά 91% και 9% αντίστοιχα (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Αφθονία (%) του στελέχους *Enterococcus mundtii* που απομονώθηκε από τα δείγματα νερού στα σημεία δειγματοληψίας Αντλιοστάσιο και από δείγματα νερού στο Σημείο 1 στην περιοχή της Χαλάστρας, και ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο MALDI-TOF MS.

Enterococcus gallinarum

Βακτήρια του είδους *Enterococcus gallinarum* απομονώθηκαν από τα σημεία δειγματοληψίας Βιολογικός, Σημείο Σ1 - μυδοκαλλιέργεια κοντά στην περιοχή του βιολογικού σε ποσοστά 25% και 75% αντίστοιχα (Σχήμα 4).

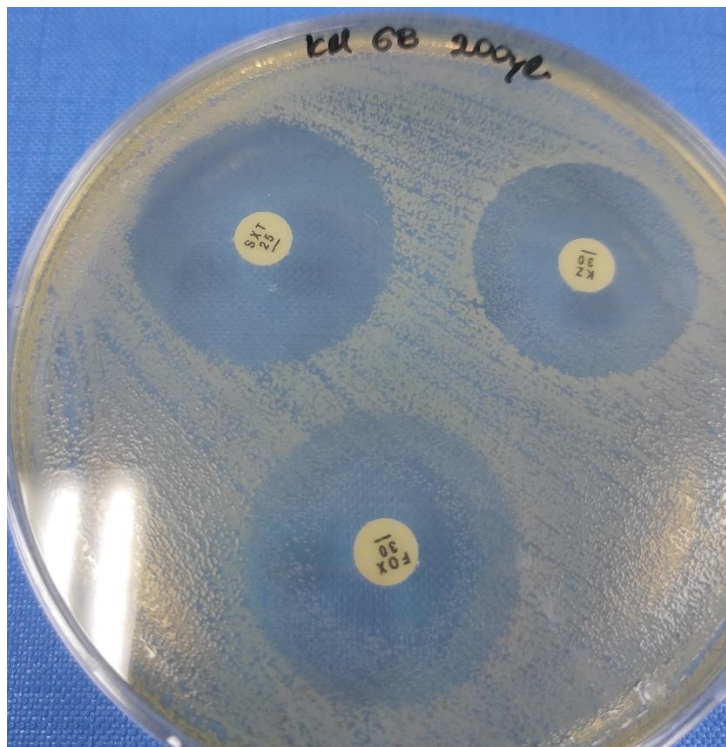


Σχήμα 4. Αφθονία (%) του στελέχους *Enterococcus gallinarum* που απομονώθηκε από τα δείγματα νερού στα σημεία δειγματοληψίας Βιολογικός και από δείγματα νερού στο Σημείο 1 στην περιοχή της Χαλάστρας, και ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο MALDI-TOF MS.

3.2 Ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε αντιβιοτικά

Τα αποτελέσματα σχετικά με την ανθεκτικότητα των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν παραπάνω με MALDI-TOF MS παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

Όπως θα παρατηρήσουμε και παρακάτω στους πίνακες που παρατίθενται διαπιστώθηκε ότι εκτός από την ανθεκτικότητα που είχαν τα βακτήρια του γένους *Enterococcus* σε ορισμένα αντιβιοτικά έδειξαν μερική ανθεκτικότητα – περιοριστική δράση, καθώς μέσα στην ευδιάκριτη ζώνη ανάσχεσης υπήρχαν ακόμη αποικίες του βακτηρίου διάσπαρτες. Επίσης, παρατηρήθηκε και η δημιουργία δύο ζωνών ανάσχεσης, εκ των οποίων στην πρώτη το αντιβιοτικό ήταν δραστικό (βακτηριοκτόνο δράση) και στην δεύτερη είχαμε την μερική ανθεκτικότητα του αντιβιοτικού (περιοριστική δράση) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Σχηματισμός διπλής ζώνης ανάσχεσης περιφερειακά από το δισκίο του αντιβιοτικού.

Σημείο Δειγματοληψίας Β (Βιολογικός)

Όσον αφορά την ανθεκτικότητα των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερού που ελήφθησαν από το σημείο Β, τα βακτήρια του είδους *E. faecium* (Πίνακας 5) παρουσίασαν ανθεκτικότητα 100% στο ναλιδιζικό οξύ (30mg) και τη σουλφοναμίδη (S3300), 75% στη κεφταζιδίμη (30mg), 50% ανθεκτικότητα των βακτηρίων στην κεφαζολίνη (30mg) και την στρεπτομυκίνη (10mg), ενώ ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 25% των βακτηρίων στην πενικιλίνη (10mg), οξυτετρακυκλίνη (30mg), κλινδαμυκίνη, τετρακυκλίνη (30mg), κεφοτοξίνη (30mg) και κεφαλοθίνη (30mg). Επίσης, απομονώθηκε ένα στέλεχος του είδους *E. casseliflavus* εμφάνισε ανθεκτικότητα στα εξής αντιβιοτικά: κεφταζιδίμη (30mg), οξυτετρακυκλίνη (30mg), κεφαζολίνη (30mg), κλινδαμυκίνη, ερυθρομυκίνη (15mg), αμπικιλίνη (10mg), πενικιλίνη (10mg), αζιθρομυκίνη (15mg), τετρακυκλίνη (30mg), βανκομυκίνη (30mg), ναλιδιζικό οξύ (30mg) και σουλφοναμίδη (Πίνακας 6).

Πίνακας 5: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για τα *Enterococcus faecium* που απομονώθηκαν από το νερό για το σημείο δειγματοληψίας Β στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά. Με αστερίσκο * φαίνεται η περιοριστική δράση του αντιβιοτικού (μερική ανθεκτικότητα). Οι αριθμοί 1-4 εντός των παρενθέσεων συμβολίζουν τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus faecium</i> (1)	<i>Enterococcus faecium</i> (2)	<i>Enterococcus faecium</i> (3)	<i>Enterococcus faecium</i> (4)
CAZ30	0	0	22,6±1,37	0
DA2	0	14,5±0,95	20,8±0,68*	14±0,81
K30	12,3±0,74	12±0,81	11,8±0,89	11,5±0,5
E15	21,5±1,25	24,5±2,6	22	32,1±0,37
SXT25	26,1±1,06	22,1±1,34	27,1±0,89	28,3±0,47
VA30	21±1	19,6±1,1	25,5±0,5	25
FOX30	0	12,5±0,95	26,5±0,5	19,8±0,89
OT30	0	30±0,57	17,6±0,74	32,8±0,68*
CN10	18,1±0,68	18,3±0,94	17±1	16
CIP15	17,8±1,46	18,8±0,68	29,8±0,37	19
AML25	29,8±0,68	31,6±0,94	42,6±1,24	38,6±0,74
TE30	0	30,1±1,06	15,6±1,49	32,6±0,47*
KF30	0	12,1±2,26	33,3±0,47	25±1
KZ30	0	0	3,55±0,5	20,1±2,19
NA30	0	0	0	0
S10	0	0	11,5±0,5	9,6±0,47
P10	0	22,1±1,57	39,8±1,34	32
AZM15	18±1,29	20,1±1,34	18,1±0,68	27,1±0,37
AMP10	20±2,76	24,6±1,24	39,6±0,94	33,6±1,1
S3₃₀₀	0	0	0	0

Πίνακας 6: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για το *Enterococcus casseliflavus* που απομονώθηκε από δείγμα νερού για το σημείο δειγματοληψίας Β στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά. Ο αριθμός 1 εντός της παρένθεσης συμβολίζει τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (1)
CAZ30	0
DA2	0
K30	11,5±0,5
E15	0
SXT25	26,3±0,47
VA30	0
FOX30	10,1±0,37
OT30	0
CN10	16±0,76
CIP15	23,3±0,47
AML25	0
TE30	0
KF30	14,6±0,89
KZ30	0
NA30	0
S10	12,3±2,05
P10	0
AZM15	22,3±4,92
AMP10	0
S3₃₀₀	0

Σημείο Δειγματοληψίας Α (Αντλιοστάσιο)

Όσον αφορά την ανθεκτικότητα των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερού που ελήφθησαν από το σημείο Α, τα βακτήρια του είδους *E. faecium* (Πίνακας 7) παρουσίασαν ανθεκτικότητα 100% στην κεφταζιδίμη (30mg), κεφαζολίνη (30mg), ναλιδιξικό οξύ (30mg) και σουλφοναμίδη. Το 50% των βακτηρίων εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην στρεπτομυκίνη (10mg) και 25% των βακτηρίων στην καναμυκίνη (30mg) και την κεφαλοθίνη (30mg).

Στην περιοχή Α απομονώθηκαν και βακτήρια του είδους *E. mundtii* (Πίνακας 8) με ανθεκτικότητα 100% στην κεφταζιδίμη (30mg), ναλιδιξικό οξύ (30mg) και τη σουλφοναμίδη. Το 75% των βακτηρίων παρουσίασαν ανθεκτικότητα στην κεφαζολίνη (30mg), ενώ 50% των βακτηρίων εμφάνισαν στην στρεπτομυκίνη (10mg).

Επίσης, ταυτοποιήθηκαν βακτήρια του είδους *E. casseliflavus* (Πίνακας 9) με ανθεκτικότητα του 75% των βακτηρίων στα αντιβιοτικά κεφταζιδίμη (30mg), ναλιδιξικό οξύ (30mg) και τη σουλφοναμίδη. Το 50% των βακτηρίων εμφάνισαν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη (10mg). Ενώ το 25% των βακτηρίων εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην κλινδαμυκίνη, βανκομυκίνη (30mg), οξυτετρακυκλίνη (30mg), αμοξυκιλλίνη (15mg), τετρακυκλίνη (30mg), κεφαζολίνη (30mg), πενικιλίνη (10mg) και την αμικιλίνη (10mg).

Πίνακας 7: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για τα *Enterococcus faecium* που απομονώθηκαν από το δείγμα νερού για το σημείο δειγματοληψίας Α στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά.

Οι αριθμοί 5-8 εντός των παρενθέσεων συμβολίζουν τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus faecium</i> (5)	<i>Enterococcus faecium</i> (6)	<i>Enterococcus faecium</i> (7)	<i>Enterococcus faecium</i> (8)
CAZ30	0	0	0	0
DA2	11±1,15	31,3±0,94	13,5±0,5	11,3±0,74
K30	12±0,81	0	14,5±0,5	14
E15	30,1±1,57	23,3±0,94	21,1±0,37	24,1±0,68
SXT25	29,1±0,68	21,8±0,68	27,8±0,68	32,8±2,11
VA30	24,5±0,95	23,1±0,68	21,5±0,5	22,6±0,47
FOX30	12,5±0,95	12,5±0,5	11,3±0,47	12,5±0,5
OT30	16,8±1,06	31,3±0,74	30,1±0,37	32,3±0,94
CN10	19±2	15,1±0,68	18,6±0,74	15,6±0,47
CIP15	26,3±1,88	17,5±0,5	23,1±0,37	25,1±0,68
AML25	33,8±1,34	33,8±1,06	35,8±0,68	36,3±0,74
TE30	14,6±2,35	30,3±0,94	30,6±0,47	30,6±0,47
KF30	11±0,81	0	12,5±0,5	18,6±1,37
KZ30	0	0	0	0
NA30	0	0	0	0
S10	13±0,81	0	13±0,57	0
P10	22,8±0,68	20±0,57	27,6±0,74	24,1±1,21
AZM15	22,5±4,19	17,8±1,34	15,1±0,68	15,3±1,1
AMP10	26,3±0,74	24,5±0,95	30,1±0,37	31,8±0,37
S3₃₀₀	0	0	0	0

Πίνακας 8: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για τα *Enterococcus mundtii* που απομονώθηκαν από το δείγμα νερού για το σημείο δειγματοληψίας Α στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά. Με * φαίνεται η περιοριστική δράση του αντιβιοτικού (μερική ανθεκτικότητα). Οι αριθμοί 1-4 εντός των παρενθέσεων συμβολίζουν τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus mundtii</i> (1)	<i>Enterococcus mundtii</i> (2)	<i>Enterococcus mundtii</i> (3)	<i>Enterococcus mundtii</i> (4)
CAZ30	0	0	0	0
DA2	12,6±0,74	11,1±0,37*	11,4±0,1	12,4±0,56
K30	13,1±0,37	12	12,8±1,8	13,3±0,74
E15	28±0,57	30	28,1±0,9	29
SXT25	30±0,57	30±0,57	30	30,1±0,37
VA30	23,6±0,47	23	23,8±0,88	23,9±0,11
FOX30	12±0,81	12,1±1,21	12	13
OT30	30,1±0,37	30,5±0,5	30,2±0,2	30
CN10	13,5±0,47	16,6±0,74	15,5±0,5	16,8±0,37
CIP15	25,8±0,37	24,5±0,5	24,7±0,82	26,8±0,37
AML25	35,1±0,37	32,8±0,37	33,3±0,74	34
TE30	31,1±0,68	30,6±1,24	30,8±0,37	30,9±0,21
KF30	14±0,57	11*	13,1±0,68	11,1±0,11
KZ30	12,1±0,37	0	0	0
NA30	0	0	0	0
S10	0	12,5±0,95	11,1±0,37	0
P10	25,8±0,37	21,1±0,68	24	24,3±0,74
AZM15	24,5±0,5	25,6±0,47*	23,6±0,47	24,6±0,74
AMP10	26,8±0,37	24,1±1,21	25,7±0,13	25,1±0,68
S3₃₀₀	0	0	0	0

Πίνακας 9: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για τα *Enterococcus casseliflavus* που απομονώθηκαν από το δείγμα νερού για το σημείο δειγματοληψίας Α στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά για το βακτήριο. Με * φαίνεται η περιοριστική δράση του αντιβιοτικού (μερική ανθεκτικότητα). Οι αριθμοί 2-5 εντός των παρενθέσεων συμβολίζουν τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους. Με ** φαίνεται η βακτηριοκτόνος δράση του αντιβιοτικού όταν έχουμε εμφάνιση και της περιοριστικής δράσης (εμφάνιση δύο ζωνών ανάσχεσης)

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (2)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (3)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (4)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (5)
CAZ30	0	0	33±1*	0
DA2	14,8±0,37*	11,6±0,47	0	13±1
K30	13,6±1,1	14	22,8±1,57* 12,3±1,37**	12±1
E15	22,1±0,37	26,3±0,74	9,3±0,47	26,1±0,68
SXT25	27,8±1,86*	33,1±0,89*	29,8±0,89*	30,5±0,5
VA30	23,6±0,74	20,3±0,47	0	22,5±0,76
FOX30	12,6±0,47	21,1±1,86	29±1,41* 18,3±4,38**	15
OT30	30,6±1,59* 13,5±1,89**	29,6±0,74	0	15,5±0,5
CN10	16,1±0,37	14,1±0,37	11,1±0,47	16,3±0,47
CIP15	19,3±0,47	24,1±1,06	14,8±0,37	22,5±0,76
AML25	31,6±0,47	35,5±0,5	0	38,8±0,37
TE30	29,5±0,95* 12,3±0,74**	30,6±0,47	0	12,2±1,73
KF30	10,8±0,89	21,3±1,1	20,3±0,47	15,6±0,74
KZ30	0	19±1	26,5±0,95* 17,1±1,57**	10,3±0,74
NA30	0	0	24,1±0,89	0
S10	9,5±0,5	0	16,8±0,37*	0
P10	21,6±0,47	27,5±1,5	0	26±1

Συνέχεια του Πίνακα 9				
Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (2)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (3)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (4)	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (5)
AZM15	16,3±0,47	20	17,8±0,37	20±1
AMP10	24,1±0,89	30,8±0,37	0	33,5±1,5
S3₃₀₀	0	0	14,2±0,47*	0

Σημείο Δειγματοληψίας E (Εκβολές)

Όσον αφορά την ανθεκτικότητα των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερού που ελήφθησαν από το σημείο E, τα βακτήρια του είδους *E. faecium* (Πίνακας 10) παρουσίασαν ανθεκτικότητα 100% τη σουλφοναμίδη. Το 75% των βακτηρίων παρουσίασαν ανθεκτικότητα στη κεφταζιδίμη (30mg), κεφαζολίνη (30mg) και το ναλιδιξικό οξύ.

Πίνακας 10: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για τα *Enterococcus faecium* που απομονώθηκαν από το δείγμα νερού για το σημείο δειγματοληψίας E στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά. Με * φαίνεται η περιοριστική δράση του αντιβιοτικού (μερική ανθεκτικότητα). Με ** φαίνεται η βακτηριοκτόνος δράση του αντιβιοτικού όταν έχουμε εμφάνιση και της περιοριστικής δράσης (εμφάνιση δύο ζωνών ανάσχεσης) Οι αριθμοί 9-12 εντός των παρενθέσεων συμβολίζουν τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus faecium (9)</i>	<i>Enterococcus faecium (10)</i>	<i>Enterococcus Faecium (11)</i>	<i>Enterococcus faecium (12)</i>
CAZ30	0	24,1±1,57*	0	0
DA2	13,8±*2,67	31±0,81* 12,3±0,94**	12,8±0,89	11±1
K30	13,8±0,68	25,8±0,68* 12,3±0,74**	14	12,5±0,5
E15	27,6±0,94	22,6±1,1	22,5±0,5	29,8±0,37
SXT25	24,5±1,38	31,8±0,68	29,1±0,89	29,8±0,68
VA30	23±0,81	20,6±0,74	22,3±0,47	24,5±0,5
FOX30	18,8±0,68	28,6±1,79* 11,3±0,74**	15±1	12,3±0,47
OT30	12,8±0,68*	33±1	29,8±0,68	30,3±0,47
CN10	19,8±1,06	25,6±1,1* 17,3±1,1**	18,8±0,37	17,1±0,68
CIP15	19,8±1,34	32,8±0,68* 19,8±0,68**	23,5±0,5	26±1
AML25	37,8±1,34	32,5±1,25	34,6±0,47	31,5±1,25
TE30	17,5±7,54*	33,3±0,94*	31,1±0,37	31±1
KF30	21,6±0,94*	45,3±2,35* 11±0,81**	12,5±0,5	11±1
KZ30	18,3±1,1*	0	0	0

Συνέχεια του Πίνακα 10				
Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus faecium (9)</i>	<i>Enterococcus faecium (10)</i>	<i>Enterococcus Faecium (11)</i>	<i>Enterococcus faecium (12)</i>
NA30	0	21,3±0,47*	0	0
S10	12,1±1,77	20,1±1,46*	14	12,6±0,74
P10	30,6±0,94	24,3±0,47	26±1	23,5±0,5
AZM15	22,8±2,85	29,1±1,21* 17,5±0,95**	16,5±0,5	26±1
AMP10	32,6±0,74	26,6±0,74	29,8±0,37	29±1
S3₃₀₀	0	28±1,73*	0	0

Σημείο Δειγματοληψίας Σ1 (κοντά στο Βιολογικό)

Όσον αφορά την ανθεκτικότητα των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερού και της σάρκας μυδιών που ελήφθησαν από το σημείο Σ1, τα βακτήρια του είδους *E. faecium* (Πίνακας 11) παρουσίασαν ανθεκτικότητα 100% στη κεφταζιδίμη (30mg), ναλιδιζικό οξύ (30mg) και τη σουλφοναμίδη. Το 75% των βακτηρίων εμφάνισαν ανθεκτικότητα στη κεφαζολίνη (30mg). Το 50% των βακτηρίων παρουσίασαν ανθεκτικότητα στη κεφαλοθίνη (30mg), ενώ το 25% των βακτηρίων στη κλινδαμυκίνη, καναμυκίνη (30mg), κεφοτοξίνη (30mg) και τη στρεπτομυκίνη (10mg).

Στο σημείο Σ1 απομονώθηκαν και βακτήρια του είδους *Enterococcus gallinarum* (Πίνακας 12) και εμφάνισαν ανθεκτικότητα 100% στη κεφταζιδίμη (30mg), ναλιδιζικό οξύ (30mg) και τη σουλφοναμίδη. Το 50% των βακτηρίων εμφάνισαν ανθεκτικότητα στη κεφοτοξίνη (30 mg).

Επίσης στο σημείο Σ1 απομονώθηκαν και βακτήρια του είδους *Enterococcus mundtii* (Πίνακας 13) και εμφάνισαν ανθεκτικότητα 100% στη κεφταζιδίμη (30mg), ναλιδιζικό οξύ και τη σουλφοναμίδη. Το 50% των βακτηρίων εμφάνισαν ανθεκτικότητα στη κεφαζολίνη (30mg).

Στο σημείο Σ1 βρέθηκε ένα βακτήριο του είδους *Enterococcus casseliflavus* (Πίνακας 14) και εμφάνισε ανθεκτικότητα στη κεφταζιδίμη (30mg), ναλιδιζικό οξύ, στρεπτομυκίνη (10mg) και τη σουλφοναμίδη.

Πίνακας 11: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για τα *Enterococcus faecium* που απομονώθηκαν από το δείγμα νερού και της σάρκας μυδιών για το σημείο δειγματοληψίας Σ1 στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά για το βακτήριο. Με * φαίνεται η περιοριστική δράση του αντιβιοτικού (μερική ανθεκτικότητα). Οι αριθμοί 13-16 εντός των παρενθέσεων συμβολίζουν τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus faecium</i> (13)	<i>Enterococcus faecium</i> (14)	<i>Enterococcus faecium</i> (15)	<i>Enterococcus faecium</i> (16)
CAZ30	0	0	0	0
DA2	10,6±0,94	0	17,6±0,74	33,5±3,14
K30	11,8±0,68	14±1,15	11,5±0,5	0
E15	24,5±0,5	31,5±1,25	32,5±0,5	31,1±0,68
SXT25	29,1±1,57*	31±2,08*	29,3±0,74	27,5±0,76
VA30	24,1±1,06	25±2,16	25	26,5±0,5
FOX30	10,5±0,95	16,8±0,89	20	0
OT30	12,5±1,7	12,8±0,68	31,5±0,95*	15,6±1,59
CN10	19,1±0,68	20,8±0,68	17,3±0,47	17,6±1,1
CIP15	15,5±0,95*	25,3±0,94	25	27±1
AML25	35±1	43±3,82	37,3±0,74	37,1±2,79
TE30	11,5±0,5	12,5±0,76	31,6±0,74*	15,1±3,97
KF30	0	15,6±2,86	20,1±0,68	0
KZ30	0	10,8±1,34*	14,8±0,89	0
NA30	0	0	0	0
S10	10,5±0,5	14±1,63	11,1±0,37	0
P10	21,5±1,25	30,5±1,25	29±1	17,3±2,21
AZM15	18,1±1,95	26,5±0,95	29,5±0,95	25,6±0,74
AMP10	26,5±1,5	33±1,63	33,5±1,11	26,5±1,5
S3₃₀₀	0	0	0	0

Πίνακας 12: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για τα *Enterococcus gallinarum* που απομονώθηκαν από το δείγμα νερού και της σάρκας μυδιών για το σημείο δειγματοληψίας Σ1 στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά. Με * φαίνεται η περιοριστική δράση του αντιβιοτικού (μερική ανθεκτικότητα). Οι αριθμοί 1-2 εντός των παρενθέσεων συμβολίζουν τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus gallinarum</i> (1)	<i>Enterococcus gallinarum</i> (2)
CAZ30	0	0
DA2	11,8±0,68	10,1±0,68*
K30	16,5±0,95*	14,6±0,74
E15	31,3±2,13	30,5±0,5
SXT25	37±1	33,5±1,6
VA30	20,3±0,47	19,5±0,5
FOX30	14,8±0,68	0
OT30	34±1	34,3±0,47
CN10	18	16,3±0,47
CIP15	24,5±0,95	25,1±0,68
AML25	32±1	36,6±0,47
TE30	34,8±1,06	34,5±0,5
KF30	21,1±1,95	22,5±2,21
KZ30	19,6±1,1*	20,3±1,1
NA30	0	0
S10	13±1	12,8±1,21
P10	24,6±1,1	26,6±0,74
AZM15	13±1	26
AMP10	23,5±0,5	25±1
S3₃₀₀	0	0

Πίνακας 13: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για τα *Enterococcus mundtii* που απομονώθηκαν από το δείγμα νερού και της σάρκας μυδιών για το σημείο δειγματοληψίας Σ1 στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά. Με * φαίνεται η περιοριστική δράση του αντιβιοτικού (μερική ανθεκτικότητα). Οι αριθμοί 5-6 εντός των παρενθέσεων συμβολίζουν τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus mundtii</i> (5)	<i>Enterococcus mundtii</i> (6)
CAZ30	0	0
DA2	11,5±0,5	12,6±0,47
K30	11,1±0,37	14,3±0,74
E15	20	23,5±0,76
SXT25	26±1	32,3±0,47
VA30	20	22,6±0,47
FOX30	10	11,6±0,47
OT30	29,3±0,47	33,1±0,37
CN10	15	18,3±1,69
CIP15	24,5±0,5	25,3±0,74
AML25	34,6±0,47	35,8±0,89
TE30	31±1	30,8±0,89
KF30	9,6±0,47	14,5±0,5
KZ30	0	12,3±2,05
NA30	0	0
S10	9	28,1±0,47
P10	22,3±1,1	25,8±0,68
AZM15	14	15,6±0,47
AMP10	25±1	30,8±0,37

Συνέχεια του Πίνακα 13		
Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus mundtii</i> (5)	<i>Enterococcus mundtii</i> (6)
S3₃₀₀	0	0

Πίνακας 14: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για το *Enterococcus casseliflavus* (μια αποικία) που απομονώθηκε από το δείγμα νερού και της σάρκας μυδιών για το σημείο δειγματοληψίας Σ1 στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά για το βακτήριο. Με * φαίνεται η περιοριστική δράση του αντιβιοτικού (μερική ανθεκτικότητα). Με ** φαίνεται η βακτηριοκτόνος δράση του αντιβιοτικού όταν έχουμε εμφάνιση και της περιοριστικής δράσης (εμφάνιση δύο ζωνών ανάσχεσης) Ο αριθμός 6 εντός της παρένθεσης συμβολίζει τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (6)
CAZ30	0
DA2	11,8±0,37
K30	12,6±0,74
E15	31±1* 24±1**
SXT25	25,5±0,95
VA30	21,3±0,94
FOX30	14,5±0,47
OT30	16,3±0,47
CN10	18±0,57
CIP15	20
AML25	36,6±0,94
TE30	15,6±1,1
KF30	26±0,76* 12,6±1,24**

Συνέχεια του Πίνακα 14	
Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (6)
KZ30	21,1±1,46
NA30	0
S10	0
P10	31,8±0,68
AZM15	29,6±0,47* 17,3±1,37**
AMP10	30,1±0,89
S3₃₀₀	0

Σημείο Δειγματοληψίας Σ2 (ανοιχτή θάλασσα)

Όσον αφορά την ανθεκτικότητα των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερού και της σάρκας των μυδιών που ελήφθησαν από το σημείο Σ2, τα βακτήρια του είδους *E. faecium* (Πίνακας 15) παρουσίασαν ανθεκτικότητα 100% στο ναλιδιξικό οξύ και τη σουλφοναμίδη. Ενώ τα δύο από τα τρία βακτήρια εμφάνισαν ανθεκτικότητα στη κεφταζιδίμη (30mg) και στη κεφαζολίνη (30mg). Επίσης, απομονώθηκε και ένα βακτήριο του είδους *E. gallinarum* (Πίνακας 16) και παρουσίασε ανθεκτικότητα στη κεφταζιδίμη (30mg), ναλιδιξικό οξύ και σουλφοναμίδη.

Πίνακας 15: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για τα *Enterococcus faecium* που απομονώθηκαν από το δείγμα νερού και της σάρκας μυδιών για το σημείο δειγματοληψίας Σ2 στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά. Με * φαίνεται η περιοριστική δράση του αντιβιοτικού (μερική ανθεκτικότητα). Οι αριθμοί 17-19 εντός των παρενθέσεων συμβολίζουν τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus faecium (17)</i>	<i>Enterococcus faecium (18)</i>	<i>Enterococcus faecium (19)</i>
CAZ30	0	15,8±0,68	0
DA2	12,6±1,69*	32,5±2,92	12,6±0,94
K30	14,6±1,69	12,6±0,74	14,8±0,37
E15	22,3±0,94	27,6±0,74	20,6±0,47
SXT25	30±1	28,5±0,76	29,6±0,94
VA30	23,1±1,06	25,8±0,47	22,3±0,74
FOX30	10,3±1,1	20,6±0,74	11,5±0,5
OT30	34,8±1,06	15,3±0,74	32,3±0,47
CN10	20±0,81	18±0,57	19
CIP15	26,5±1,11	20,8±0,37	23,3±0,47
AML25	36,6±1,37	39,6±0,47	34,5±1,11
TE30	33,8±2,19	16,1±0,37	30*
KF30	9,5±0,95	26,3±1,1	9±1
KZ30	0	27,5±1,11	0
NA30	0	0	0
S10	17,5±0,95	10,5±0,5	13,1±0,37
P10	24±1,52	35,3±0,47	24,3±0,47
AZM15	17,1±1,67	25,1±1,21	14,8±0,68
AMP10	28,1±0,89	36,3±1,1	29,6±0,94
S3₃₀₀	0	0	0

Πίνακας 16: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για το *Enterococcus gallinarum* που απομονώθηκε από το δείγμα νερού και της σάρκας μυδιών για το σημείο δειγματοληψίας Σ2 στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά. Ο αριθμός 3 εντός της παρενθέσης συμβολίζει τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus gallinarum</i> (3)
CAZ30	0
DA2	11,1±0,37
K30	16,3±0,47
E15	31,1±0,68
SXT25	35,6±0,74
VA30	20,3±0,47
FOX30	10,5±0,5
OT30	35,3±0,74
CN10	17,3±0,74
CIP15	25,5±0,5
AML25	33±0,57
TE30	36,3±0,94
KF30	21,8±0,68
KZ30	20,5±0,5
NA30	0
S10	12,3±0,47
P10	26±1
AZM15	27

Συνέχεια του Πίνακα 16	
Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus gallinarum</i> (3)
AMP10	26,3±0,47
S3₃₀₀	0

Σημείο Δειγματοληψίας Σ3 (κοντά στο αντλιοστάσιο)

Όσον αφορά την ανθεκτικότητα των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα δείγματα νερού και της σάρκας των μυδιών που ελήφθησαν από το σημείο Σ3, τα βακτήρια του είδους *E. faecium* (Πίνακας 17) παρουσίασαν ανθεκτικότητα 100% στη κεφταζιδίμη (30mg), ναλιδιξικό οξύ και σουλφοναμίδη. Το 25% των βακτηρίων εμφάνισαν ανθεκτικότητα στη κεφαζολίνη (30mg) και τη στρεπτομυκίνη (10mg). Επίσης, απομονώθηκε και ένα βακτήριο του είδους *E. casseliflavus* (Πίνακας 18) και εμφάνισε ανθεκτικότητα στη κεφταζιδίμη (30mg), ναλιδιξικό οξύ και τη σουλφοναμίδη.

Πίνακας 17: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για τα *Enterococcus faecium* που απομονώθηκαν από το δείγμα νερού και της σάρκας μυδιών για το σημείο δειγματοληψίας Σ3 στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά για το βακτήριο. Με * φαίνεται η περιοριστική δράση του αντιβιοτικού (μερική ανθεκτικότητα). Οι αριθμοί 20-23 εντός των παρενθέσεων συμβολίζουν τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus faecium (20)</i>	<i>Enterococcus faecium (21)</i>	<i>Enterococcus faecium (22)</i>	<i>Enterococcus faecium (23)</i>
CAZ30	0	0	0	0
DA2	11,1±1,06	11,6±0,74	12,1±0,37	11,8±0,37
K30	13,6±0,47	13,3±0,74	11,8±0,37	10±0,47
E15	16,8±1,57	21,8±1,21	21,1±1,21	20
SXT25	31±1	30±1	28,8±1,21	24,1±0,89
VA30	25,8±1,34	21,5±0,76	21,8±0,89	21±1
FOX30	16,6±2,05	11,1±1,67	13±1	18,5±0,5
OT30	32±1	13,8±0,68	31±1	29,3±0,47
CN10	17,5±0,5	18,3±0,47	18,6±0,47	14
CIP15	32,6±0,94	22,6±0,94	23,6±0,47	23,3±0,74
AML25	34±1	35,8±0,37	31,8±0,37	34,3±0,74
TE30	33,5±0,5	12,3±1,37	31,1±0,89	30,1±0,68
KF30	12,6±0,47	10,6±1,1*	17,5±1,25	16±2
KZ30	8,8±0,37	0	9,8±0,37	16±2
NA30	0	0	0	0
S10	13,5±0,76	11,8±1,21	13,5±0,5	0
P10	24,6±0,47	25±1	24±1,41	24,3±0,74
AZM15	18,6±5,7	14,6±1,24	15,6±1,1	13±1
AMP10	23,5±0,5	23,1±0,68	27,8±0,68	29±1
S3₃₀₀	0	0	0	0

Πίνακας 18: Ζώνες ανάσχεσης (mm) για το *Enterococcus casseliflavus* που απομονώθηκε από το δείγμα νερού και της σάρκας μυδιών για το σημείο δειγματοληψίας Σ3 στην περιοχή της Χαλάστρας, σε 20 αντιβιοτικά για το βακτήριο. Με * φαίνεται η περιοριστική δράση του αντιβιοτικού (μερική ανθεκτικότητα). Με ** φαίνεται η βακτηριοκτόνος δράση του αντιβιοτικού όταν έχουμε εμφάνιση και της περιοριστικής δράσης (εμφάνιση δύο ζωνών ανάσχεσης) Ο αριθμός 7 εντός της παρένθεσης συμβολίζει τις διαφορετικές αποικίες του στελέχους.

Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (7)
CAZ30	0
DA2	11,1±0,37
K30	13,3±0,47
E15	23,8±0,89
SXT25	23,3±2,21
VA30	21±1
FOX30	13,8±1,57
OT30	29±1* 16,1±0,68**
CN10	16,3±0,74
CIP15	20,1±0,68
AML25	31,8±0,89
TE30	14,8±0,89
KF30	13,5±0,5
KZ30	10,1±1,21

Συνέχεια του Πίνακα 18	
Αντιβιοτικά	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (7)
NA30	0
S10	10,3±1,37
P10	20,8±0,37
AZM15	16,5±0,5
AMP10	25,5±0,5
S3₃₀₀	0

4. Συζήτηση

Τα παράκτια θαλάσσια περιβάλλοντα είναι συχνά αποδέκτες διαφόρων βιολογικών επιμολυντών, όπως είναι τα παθογόνα βακτήρια, που εισέρχονται από το χερσαίο περιβάλλον κυρίως από ανθρωπογενείς παρεμβάσεις διαφορετικής προέλευσης και συνδράμουν στην υποβάθμιση της ποιότητας τόσο των υδάτων όσο και των αλιευτικών προϊόντων. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε διερεύνηση πιθανών παθογόνων μικροοργανισμών του γένους *Enterococcus*, συμπεριλαμβάνοντας και τα ανθεκτικά στα αντιβιοτικά βακτήρια, σε μύδια (σάρκα) και στο νερό εκτροφής τους (μυδοκαλλιέργειες) καθώς και η ανίχνευση των πηγών από τις οποίες οι μικροοργανισμοί εισβάλλουν στο υδάτινο οικοσύστημα όπου βρίσκονται οι μυδοκαλλιέργειες (βιολογικός καθαρισμός, αντλιοστάσιο, εκβολές ποταμού). Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με απώτερο στόχο να συμβάλλει στην ανάπτυξη στρατηγικών πρόληψης ή/και αντιμετώπισης τέτοιων μικροβιακών κινδύνων στον Θερμαϊκό Κόλπο προς την κατεύθυνση της προστασίας του υδάτινου περιβάλλοντος, την προστασία του καταναλωτή και της δημόσιας υγείας γενικότερα.

Η μόλυνση των υδάτων με παθογόνους μικροοργανισμούς και οι ασθένειες/λοιμώξεις που προκαλούν, αποτελούν μείζονα ανησυχία για την ποιότητα των υδάτων παγκοσμίως (Pandey et al., 2014), την ασφάλεια των αλιευτικών προϊόντων και τη δημόσια υγεία γενικότερα. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει αυξηθεί η ανησυχία στον τομέα της Μικροβιολογίας και της Επιδημιολογίας για τη μελέτη των Εντερόκοκκων λόγω της αυξημένης αντοχής τους σε μεγάλο εύρος αντιβιοτικών (Low et al., 2001), με έμφαση στην πολυ-ανθεκτικότητα που εμφανίζουν καθώς είναι πιο έντονο το φαινόμενο διασποράς τους στο υδάτινο οικοσύστημα. Οι Εντερόκοκκοι αποτελούν το δεύτερο κατά σειρά συχνότητας αίτιο λοίμωξης των χειρουργικών τραυμάτων και των νοσοκομειακών ουρολοιμώξεων, καθώς και το τρίτο αίτιο νοσοκομειακών βακτηριακών

στις Η.Π.Α. (Low et al., 2001), συχνά σχετίζονται με το 5-15% των περιπτώσεων μικροβιακής ενδοκαρδίτιδας (Devriese et al., 2006 ; Raveh et al., 2006 ; Suppli et al., 2011), νεογνικής σήψης (Fisher & Phillips, 2009) και σε συνδυασμό με την επίκτητη ανοχή τους αναδεικνύονται ως σημαντικά νοσοκομειακό παθογόνο και καθίσταται απειλητικό βακτήριο για τον άνθρωπο.

Η διασπορά των Εντεροκόκκων στο περιβάλλον προέρχεται κυρίως από μη επεξεργασμένα οικιακά απόβλητα, νοσοκομειακά απόβλητα και απορρίματα, γεωργικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούν κοπριά ζώων, φάρμες ζώων, βιομηχανίες επεξεργασίας προϊόντων ζωικής προέλευσης, βοσκοτόπια, κτλ. Τα παθογόνα βακτήρια που προέρχονται από οικιακά λύματα πολλές φορές διαφεύγουν της επεξεργασίας που γίνεται στους βιολογικούς καθαρισμούς, ιδιαίτερα στην περίπτωση των μεγάλων αστικών κέντρων, κι έτσι μπορεί να βρεθούν στο υδάτινο περιβάλλον και πιθανόν στους οργανισμούς που διαβιούν σε αυτό, όπως στα αλιευτικά προϊόντα και ιδιαίτερα στα οστρακοειδή (διηθηματοφάγα). Παρομοίως, τα νοσοκομειακά παθογόνα είναι δυνατό να βρεθούν στο περιβάλλον και κατ' επέκταση στα αλιευτικά προϊόντα δεδομένου ότι πολλές φορές ανεπεξεργαστα απόβλητα που φέρουν τέτοια βακτήρια διαφεύγουν, λόγω του μεγάλου τους όγκου, της επεξεργασίας που πραγματοποιείται σε ειδικές μονάδες επεξεργασίας νοσοκομειακών λυμάτων (hospital waste processing plants) (Blanch et al., 2003). Παθογόνοι μικροοργανισμοί που απαντώνται σε γεωργικές καλλιέργειες που χρησιμοποιούν κοπριά ζώων, φάρμες ζώων, βιομηχανίες επεξεργασίας προϊόντων ζωικής προέλευσης, βοσκοτόπια, κτλ. είναι δυνατό να παρασυρθούν από τα νερά της βροχής και μέσω της επιφανειακής ή και υπόγειας αποροής ή μέσω της ροής των ποταμών να καταλήξουν στα υδάτινα περιβάλλοντα. Η περιοχή της Χαλάστρας όπου έγινε η παρούσα μελέτη είναι μια περιοχή όπου η μόλυνση των υδάτων και κατ' επέκταση των αλιευτικών προϊόντων είναι δυνατό να συμβεί λόγω όλων των προαναφερθέντων περιπτώσεων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας

μελέτης, το *E. faecium* βρέθηκε στα δείγματα που ελήφθησαν από το σημείο όπου απορρέει ο βιολογικός καθαρισμός, το αντλιοστάσιο, καθώς και τις εκβολές του ποταμού Αξιού. Αυτοί οι μικροοργανισμοί απομονώθηκαν επιπλέον κι από το νερό όπου βρίσκονταν οι τρεις μυδοκαλλιέργειες που μελετήθηκαν (Σημείο Σ1 – μυδοκαλλιέργεια κοντά στην περιοχή του βιολογικού, Σημείο Σ2 - μυδοκαλλιέργεια ανοιχτή θάλασσα και Σημείο Σ3 - μυδοκαλλιέργεια κοντά στην περιοχή των αντλιοστασίων σε ποσοστά 22%, 8%, 34%, 16%, 6% και 14%, αντίστοιχα), πράγμα το οποίο σημαίνει ότι η επιμόλυνση των υδάτων με το *E. faecium* προήλθε πιθανόν από τον ποταμό Αξιό, τον βιολογικό καθαρισμό και από το αντλιοστάσιο. Οι μικροοργανισμοί αυτοί παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε διάφορα αντιβιοτικά για όλα τα σημεία δειγματοληψίας. Ωστόσο, τέτοιοι μικροοργανισμοί δεν απομονώθηκαν από τα μύδια της περιοχής. Τα *E. faecium*, μαζί με τα *E. faecalis*, αποτελούν τα σημαντικότερα και με μεγαλύτερη συχνότητα είδη Εντερόκοκκων που απαντώνται σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα καθώς ευθύνονται για το 5–15% και το 80–90% των ανθρώπινων λοιμώξεων, αντίστοιχα (Bourdon, 2011; Gousia et al., 2015).

Άλλα είδη του γένους *Enterococcus* που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν τα *E. casseliflavus*, *E. mundtii* και το *E. gallinarum*. Από αυτά, το *E. casseliflavus* απομονώθηκε στο νερό στο σημείο όπου απορέει ο βιολογικός καθαρισμός και στο νερό στο αντλιοστάσιο. Επιπλέον, βρέθηκε στο νερό της μυδοκαλλιέργειας που βρίσκεται κοντά στην περιοχή του βιολογικού (Σημείο Σ1) και στο νερό της μυδοκαλλιέργειας που βρίσκεται κοντά στην περιοχή των αντλιοστασίων (Σημείο Σ3), πράγμα το οποίο σημαίνει ότι πιθανότατα η επιμόλυνση των υδάτων εκτροφής των μυδιών προήρθε από αυτές τις δύο πηγές (βιολογικός και αντλιοστάσιο). Το *E. mundtii* απομονώθηκε από το νερό στο αντλιοστάσιο και στο νερό της μυδοκαλλιέργειας που βρίσκεται κοντά στην περιοχή του βιολογικού (Σημείο Σ1), ενώ το *E. gallinarum*

απομονώθηκε από το νερό στο σημείο που απορρέει ο βιολογικός καθώς και από το νερό της μυδοκαλλιέργειας που βρίσκεται κοντά στην περιοχή του βιολογικού (Σημείο Σ1). Από αυτούς τους μικροοργανισμούς, το *E. casseliflavus*, και το *E. gallinarum* τα οποία βρέθηκαν να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ερυθρομυκίνη, τετρακυκλίνη, κλινδαμυκίνη, πενικιλίνη, βανκομυκίνη και στην σουλφαμίδη και ναλιδιξικό οξύ αντίστοιχα στην παρούσα μελέτη, έχουν αναφερθεί ότι σχετίζονται με παθογένεση (πχ. ενδοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα, κ.α.) στον ανθρώπινο οργανισμό (Reid K.C. 2001; Toscano 2005; Lebreton et al. 2014). Ωστόσο, τα φυτά και το έδαφος αποτελούν επίσης υπόστρωμα για τον *E. casseliflavus* και τον *E. mundii* αλλά και για τα είδη *E. faecalis* και *E. faecium* (Mundt, 1982). Το *E. gallinarum* έχει απομονωθεί κι από πουλερικά χωρίς όμως να ανήκει στη φυσιολογική εντερική χλωρίδα των πουλερικών (Lebreton et al. 2014). Επίσης, τα *E. casseliflavus* και *E. mundtii* έχουν απομονωθεί από νερό, ιζήματα και βυθισμένη υδρόβια βλάστηση (Badgley et al., 2010).

Όσον αφορά τα αλιευτικά προϊόντα, σε έρευνα που έγινε στην Τουρκία προσδιορίστηκε ότι στα 117 στελέχη που απομονώθηκαν από ωμά αλιευτικά προϊόντα ανήκαν στα είδη *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecium* και *E. faecalis* και παρατηρήθηκε αντοχή στην ερυθρομυκίνη, τετρακυκλίνη, στρεπτομυκίνη και γενταμυκίνη (Çardak, Özmen Toğay 2021), πράγμα το οποίο παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη και συγκεκριμένα, το *E. gallinarum* και *E. faecium* έδειξαν αντοχή στην τετρακυκλίνη και στην στρεπτομυκίνη, ενώ το *E. casseliflavus* στην ερυθρομυκίνη, στρεπτομυκίνη και τετρακυκλίνη. Γενικότερα, οι εντερόκοκκοι έχουν απομονωθεί από αλιευτικά προϊόντα όπως τα οστρακοειδή, το έντερο των ψαριών, επεξεργασμένα προϊόντα αλιευμάτων, γαρίδες, σολομός, καρκάνι, κλπ. Τα *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. malladoratus*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. phoeniculicola*, *E. saccharolyticus* και *E. gilvus* έχουν απομονωθεί επιπλέον από υδάτινα οικοσυστήματα και

παραδοσιακά ή βιομηχανικά επεξεργασμένα αλιευτικά προϊόντα (Hammad et al., 2014 ; Klibi et al., 2013; Psoni et al., 2006 ; Pinto et al., 2009; Valenzuela et al., 2010). Σε σύγκριση με άλλες πηγές τροφίμων, ελάχιστες πληροφορίες έχουν αναφερθεί σχετικά με τη μικροβιακή αντοχή και τους λοιμογόνους παράγοντες των εντερόκοκκων που απομονώνονται από θαλάσσια προϊόντα. Εντερόκοκκοι έχουν απομονωθεί από οστρακοειδή (Wilson and McAfee 2002) όπως διαπιστώθηκε και στην παρούσα έρευνα. Οι Wilson and McAfee (2002) κατάφεραν να απομονώσουν τους *E. faecalis*, *E. faecium* και *E. casseliflavus* από μύδια, εκ' των οποίων μόνο το *E. faecium* έδειξε αντοχή στην βανκομυκίνη. Στην παρούσα έρευνα το *E. casseliflavus* ήταν ο μοναδικός από τους Εντερόκοκκους που απομονώθηκαν στον οποίο παρατηρήθηκε αντοχή στη βανκομυκίνη. Οι λοιμώξεις που προέρχονται από *E. gallinarum* και *E. casseliflavus* λαμβάνονται υπόψη λόγω της εγγενούς αντίστασής τους στη βανκομυκίνη που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία εντεροκοκκικών λοιμώξεων ανθεκτικών στις αμινογλυκοσίδες που έθεσαν σε κίνδυνο την υγεία των ανθρώπων (Lebreton et al. 2014) και την επίκτητη αντίσταση σε αρκετά άλλα αντιβιοτικά. Οι περισσότεροι εντερόκοκκοι είναι ενδογενώς ανθεκτικοί στις κεφαλοσπορίνες, στις αντι-σταφυλοκοκκικές πενικιλίνες, στις αμινογλυκοσίδες και στην κλινταμυκίνη (Gray and Pedler, 1992; Murray, 1998). Επίσης η επίκτητη αντοχή των εντεροκόκκων περιλαμβάνει αντοχή σε: υψηλές συγκεντρώσεις των β-λακταμών, υψηλές συγκεντρώσεις των αμινογλυκοσιδών, γλυκοπεπτίδια (βανκομυκίνη και τεϊκοπλανίνη), τετρακυκλίνη, ερυθρομυκίνη, φλουοροκινολίνες, ριφαμικίνη, αμινοπενικιλίνες, μακρολίδες, χλωραμφαινικόλη και νιτροφουραντοΐνη (Cetinkaya et al., 2000; Kayser, 2003; Pai and Kim, 1998). Όλα τα στελέχη των εντερόκοκκων που εντοπίστηκαν στην παρούσα εργασία (*E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. mundtii* και *E. casseliflavus*) πράγματι εμφάνισαν ανθεκτικότητα 100% στις κεφαλοσπορίνες. Το *E. faecium* εμφάνισε αντοχή 100% στη σουλφοναμίδη και στο ναλιδιξικό οξύ

ενώ υψηλά ποσοστά ανθεκτικότητας παρατηρήθηκαν στην στρεπτομυκίνη και τετρακυκλίνη. Στο *E. gallinarum* παρατηρήθηκε 100% ανθεκτικότητα στην σουλφαμίδα και το ναλιδιξικό οξύ, το *E. mundtii* εμφάνισε αντοχή 50% στην σουλφανιμίδη και το ναλιδιξικό οξύ και 50% στην στρεπτομυκίνη, ενώ το *E. casseliflavus* έδειξε μικρό ποσοστό ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη, αμπικιλλίνη, τετρακυκλίνη, κλινδαμυκίνη, πενικιλλίνη και στην βανκομυκίνη.

Τα *Enterococcus* των οποίων η εμφάνιση στο υδάτινο οικοσύστημα και στα αλιευτικά προϊόντα είναι πιο έντονη τα τελευταία χρόνια, σε συνδυασμό με την αυξανόμενη αντοχή τους σε πληθώρα αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται ευρέως και για την αντιμετώπιση λοιμώξεων αλλά και η πολύ-ανθεκτικότητα που εμφανίζουν, καθίστανται όλο και πιο απειλητικά βακτήρια για τον άνθρωπο. Στις μυδοκαλλιέργειες του Θερμαϊκού Κόλπου, η εξάπλωση τους φαίνεται να προέρχεται από διάφορες πηγές επιμόλυνσης όπως ο βιολογικός καθαρισμός, το αντλιοστάσιο και το νερό των ποταμών. Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι υπάρχει ανάγκη για ανάπτυξη στρατηγικών βελτίωσης της ποιότητας των υδάτων του Θερμαϊκού κόλπου έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα εμφάνισης τέτοιων μικροοργανισμών στα αλιευτικά προϊόντα - οστρακοειδή πράγμα το οποίο θα συμβάλλει στην προστασία του υδάτινου περιβάλλοντος, στην προστασία του καταναλωτή και της δημόσιας υγείας γενικότερα.

Τέλος υπάρχει η ανάγκη για ανάπτυξη στρατηγιών πρόληψης ή/και αντιμετώπισης τέτοιων μικροοργανισμών για την βελτίωση της ποιότητας των υδάτων και των αλιευτικών προϊόντων-οστρακοειδών του Θερμαϊκού κόλπου με κατεύθυνση για την προστασία του υδάτινου περιβάλλοντος, την προστασία του καταναλωτή και της δημόσιας υγείας γενικότερα.

5. Συμπεράσματα

- Όλα τα βακτήρια του γένους *Enterococcus* απομονώθηκαν από τα δείγματα νερού, ενώ δεν απομονώθηκαν από τα μύδια (σάρκα).
- Όλα τα βακτήρια του γένους *Enterococcus* που απομονώθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν ανθεκτικά στις κεφαλοσπορίνες και στη σουλφοναμίδη.
- Όλα τα βακτήρια του γένους *Enterococcus* ήταν ευαίσθητα στην ερυθρομυκίνη, σουλφαμεθοξαζόλη, αμοξικιλίνη, πενικιλίνη, βανκομυκίνη, οξυτετρακυκλίνη και αμικιλίνη.
- Ορισμένα βακτήρια του γένους *Enterococcus* παρουσίασαν μερική ανθεκτικότητα στη κλινδαμικίνη, καναμυκίνη, γενταμικίνη, σιπροφλατοξίνη, τετρακυκλίνη, ναλιδιξικό οξύ, στρεπτομυκίνη και αζιθρομυκίνη.

6. Βιβλιογραφία

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Blanch A.R., Caplin J.L, Iversen A., Kuhn I., Manero A., Taylor H.D., Vilanova X (2003).

Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions. *Journal of Applied Microbiology*, 94 (6): 994-1002

Bourdon N. (2011) Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci in France. *Journal des Anti-infectieux*, 13(1).

Brian D., Badgley Bina S.NayakValerie J.Harwood (2010). The importance of sediment and submerged aquatic vegetation as potential habitats for persistent strains of enterococci in a subtropical watershed. *Water Research*, 44 (20): 5857-5866

Burton M.C. (1949). Comparison of coliforms and enterococcus organisms and indices of pollution in frozen foods. *Journal of Food Science*, 14 (5): 434-438

Buttiaux, R., & D. A. A. Mossel (1961) “The significance of various organisms of faecal origin in foods and drinking water.” *Journal of Applied Bacteriology*,. 24 (3) :353- 364.

Çardak M., Özmen Toğay S. (2021) Antibiotic resistance and virulence genes in *Enterococcus* species isolated from raw and processed seafood. *Journal of Food Science and Technology*

Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G., (2000) Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology. Reviews*,. 13 (4): 686-707.

Desenclos J.-C., Klontz K, Wolfe L., Hoecherl S., (1991). The Risk of *Vibrio* Illness in the Florida Raw Oyster Eating Population, 1981–1988. *American Journal of Epidemiology*, Volume 134 (3): 290-297.

Donlan R.M., Costerton J.W. (2002) Biofilms – Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical. Microbiology. Reviews*, 15 (2): 167-193. (2002)

Duncan H.E. & et Edberg S.C. (1995). Host- Microbe interaction in the gastrointestinal tract. *Critical. Reviews in Microbiology*,. 21 (2): 85-100.

Eliopoulos G.M. (1992). Enterococcal endocarditis In D. Kayl (ed). *Infective endocarditis*. Raven Press, New York p. 209-223.

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. Διαθέσιμο στο: <http://apps.fao.org/page/collections>.

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

Fisher, K., Phillips, C. (2009) The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, , Vol 155 (6):1749 - 1757

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

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

Gray JW, Stewart D, Pedler SJ. (1992). Faecal carriage of antibiotic-resistant enterococci in hospitalized and non-hospitalized individuals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 30, pp:110-112.

Halliday M.L, Lai-Yi Kang, Ting-Kui Zhou, Meng-Dong Hu, Qi-Chao Pan, Ting-Yuan Fu, Yu-Sheng Huang, Shan-Lian Hu (1991). An Epidemic of Hepatitis A Attributable to the Ingestion of Raw Clams in Shanghai, China. *The Journal of Infectious Diseases*, 164 (5).

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

Huss H.H., Reilly A., Embarek P.K.B., (2000). Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*, 11 (2): 149-156

Huycke M., and Gilmore M. (1997) In vivo survival of *Enterococcus faecalis* is enhanced by extracellular superoxide production. *Adv. Exp. Med. Biol.* 418:781-784.

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.

Iaria C., Stassi G., Costa G.B., Leo R.D., Toscano A. & Cascio A. (2005) Enterococcal meningitis caused by *Enterococcus casseliflavus*. First case report. *BMC Infectious Diseases*, 5 (3): 3.

Kayser, F. H. (2003) “Safety aspects of enterococci from the medical point of view.” *International Journal of Food Microbiology*,. 88 (2-3):255-262.

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

Lebreton F., Willems R., et al (2014) Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization

Littman R.A., Fiorenza E.A., Wenger A.S., Berry K.L.E., Douglas D.M.P., Rader C.N, DrewHarvell., Lamb J.B (2020). Coastal urbanization influences human pathogens and microdebris contamination in seafood. *Science of the Total Environment*, Vol 736.

Low D.E., Keller N., Barth A., and Jones R. (2001). “Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999.” *Clinical Infectious Diseases*. (2001), 32 (Supp. 2): S133-S145.

Mundt J.O. (1982). The ecology of the streptococci. *Microbial Ecology*, 8(4) :355-369.

Murray B.E.(1998). Diversity among multidrug-resistant Enterococci. *Emerging Infectious Diseases* . 1998, 4(1): 37-47.

Murray BE.(1990). “The life and times of the Enterococcus.” *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1): 46-65.

Murray BE.(2000). “Vancomycin-resistant enterococcal infections.” *The New England Journal of Medicine*, 342(10): 710-721

Ostrolenk M., Kramer N., et Cleverdon R.C. (1947). Comparative studies of enterococci and *Escherichia coli* as indices of pollution. *Journal of Bacteriology*, 53:197- 203.

Pai CH, and Kim MN. (1999) “Antimicrobial Resistance in Enterococci.” Yonesi Medical Journal, 39: 554-561.

Patharapol Piamsomboon P., Janthima Jaresitthikunchai J., Quang H.T., Roytrakul S., Wongtavatchai J.(2020). Identification of bacterial pathogens in cultured fish with a custom peptide database constructed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). BMC Veterinary Research, Article number: 52.

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.

Raveh D., Rosenzweig I., Rudensky B., Wiener-Well Y., Yinnon A.M. (2006) Risk factors for bacteriuria due to *Pseudomonas aeruginosa* or *Enterococcus* spp in patients hospitalized via the emergency department. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 25 (5): 331-334.

Reid K.C, Cockerill F.R, Patel R. (2001). Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Society of America, 32(11): 1540-1546.

Savvidis, Y.G., Antoniou, A., Dimitriadis, X., Moriki, A., Galinou-Mitsoudi, S.,Alvanou , L. , Petridis, D., Koutitas, C. (2007) Hydrodynamics in a Mussel Culture Area in Thermaikos Gulf. In: Proceedings of the Eighth International Conference on the Mediterranean Coastal Environment, MEDCOAST 07, E. Ozhan (Ed), IO7 November 2007, Alexandria, Egypt

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

Suppli M., Aabenhus R., Harboe Z.B., Andersen L.P., Tvede M., Jensen J-U S. (2011) Mortality in enterococcal bloodstream infections increases with inappropriate antimicrobial therapy. Original Article Infectious Diseases, 17 (7): 1078-1083.

Thiercelin M.E. (1899) “Sur un diplocoque saprophyte de l’intestin susceptible de devenir pathogène.” C.R. Soc. Bid. 1899. 5(5) :269-271.

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

Wilson I., McAfee G. (2002) Vancomycin-resistant enterococci in shellfish, unchlorinated waters, and chicken. International Journal of food Microbiology, 79(3):.143-151

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A. T. E. I. 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 Κίτρου, σελ.18-31.

Γαληνού-Μητσούδη Σ., (2003). Σημειώσεις Εκτροφής οστράκων, Α.Τ.Ε.Ι.Θ., Νέα Μουδανία, σελ.109

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.

Πήττας Θεωδωρής (2018). Παρουσία και τύχη βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Μεταπτυχιακή εργασία, Χανιά 2018

ΥΠΓΕ, (2003) Υπηρεσία διαχείρισης Επιχειρησιακού Προγράμματος Αλιείας. Καθορισμός περιοχών οργανωμένης ανάπτυξης θαλασσιών 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.

Ε.Κ.Θ.Ε. (1994). Ωκεανογραφική Μελέτη Θερμαϊκού Κόλπου, Τελική Τεχνική Έκθεση. Αθήνα. σελ.191.

Φάμελλος Σ., Κρεστενίτης Ι., Γεωργιάδης Γ. (2008). Θερμαϊκός κόλπος πολυπαραμετρικότητα, αξίες και απόθεμα Υπουργείο Μακεδονίας - Θράκης - Ημερίδα "Θερμαϊκός θάλασσα δίπλα μας", σελ. 9.

Parlapani F.F., Kyritsi M., Sakka M., Chatzinikolaou K., Donos S., Boziaris I.S., Chadjichristodoulou C., Athanassiou C.G. (2019). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry reveals Enterococcus and Enterobacter spp. In major insect species in food security with resistance in common antibiotics. Journal of Pest Science, pp. 1-12

Κακάσης Σ. (2011). Αξιολόγηση θρεπτικών υλικών για την καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών σε νωπούς ιχθύες. Πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

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(8): 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*, Springer-Verlag, 2004.

Kontoyiannis, H., Kourafalou, V., & Papadopoulos, V. (2003). The seasonal characteristics of the hydrology and circulation of the nothwest Aegean sea (Eastern Mediterranean): Observations and Modelling. *Journal of Geophysical Research*, 108(9): 3302.

Gousia P., Economou V., Bozidis P., Papadopoulou C., (2015) Vancomycin-resistance phenotypes, vancomycin-resistance genes, and resistance to antibiotics of enterococci isolated from food of animal origin. *Foodborne Pathogens and Disease*,12(3): 214-220.

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

<http://www.minenv.gr>

7. ABSTRACT

Coastal marine environments are often susceptible to various biological contaminants, such as pathogenic bacteria, that enter from the terrestrial environment mainly from anthropogenic interventions of different origins and contribute to the degradation the quality of both water and fishery products. In the last decade, it has been observed that such ecosystems are likely to be reservoirs of antibiotic-resistant bacteria, thus raising the scientific community's concern about extensive research. The aim of this postgraduate dissertation was to investigate the pathogenic microorganisms of the genus *Enterococcus*, including antibiotic-resistant bacteria from mussels (flesh) and seawater (mussel farming) as well as the tracking of sources from which microorganisms enter to aquatic ecosystem where mussel farms are located. The mussel samples were collected from three different cultivation units (mussel farms), as well as water samples from the same points in the area of Chalastra, Thessaloniki. This study was carried out with the ultimate aim to develop future strategies for the prevention and/or response to such biological hazards in the Thermaic Gulf in the direction of the protection of the aquatic environment, the consumer and public health in general. To achieve the above objectives, detection of possible pathogenic microorganisms was performed using standard microbiological techniques, isolation and identification of *Enterococcus* by proteomic analysis by Maldi-TOF-MS and the study of their resistance to 20 antibiotics. According to the results, the species of *Enterococcus* isolated from the mussel (flesh) and water samples were: *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* and *E. gallinarum*. In the present study all bacteria were resistant to Cephalosporins and Sulphonamides while they were resistant to Erythromycin, Sulphamethoxazole, Amoxycilin, Tetracycline, Penicillin, Vancomycin, Ampicillin and Oxytetracycline. Also showed partial resilience to Clindamycin,

Kanamycin, Gentamicin, Ciprofloxacin, Tetracycline, Nalidixic acid, Streptomycin and Azithromycin.

Keywords: shellfish, mussels, *Mytilus galloprovincialis*, foodborne pathogens, *Enterococcus* antibiotic resistance, Maldi-TOF-MS.