



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

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Μοριακή ποικιλότητα φυλοτύπων *Pseudomonas* spp. από ιχθείς»**

**Τοπάλη Γεωργία**

**ΒΟΛΟΣ 2015**

**«Μοριακή ποικιλότητα φυλοτύπων *Pseudomonas* spp. από ιχθείς»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :**

- 1. Κωνσταντίνος Κορμάς, Καθηγητής,** Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Επιβλέπων.
- 2. Ελένη Μεντέ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια,** Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος.
- 3. Μποζιάρης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής,** Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Μέλος

*Στους γονείς και την αδερφή μου*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή της εργασίας αυτής, τον κύριο Κορμά Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, αποτελούμενη από τους Δρ. Ελένη Μεντέ και Δρ. Ιωάννη Μποζιάρη για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους κατά τη συγγραφή της.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους, τη βοήθειά τους, την κατανόηση και ανοχή τους καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υδατοκαλλιέργειες είναι ένας βιομηχανικός κλάδος με ραγδαία ανάπτυξη, ο οποίος όμως παρουσιάζει οικονομικές απώλειες που οφείλονται στην αλλοίωση του προϊόντος η οποία είναι συνέπεια και της βακτηριακής δραστηριότητας. Οι ψευδομονάδες ανήκουν στα σημαντικά βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση ιχθύων. Υπάρχουν είδη ψευδομονάδων τα οποία είναι ιδιαίτερα επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία. Οι ασθένειες που προκαλούνται από βακτήρια και προσβάλλουν τα ψάρια αποτελούν μία από τις κύριες προκλήσεις που αντιμετωπίζει η ιχθυοκαλλιέργεια. Η αναγνώριση και ταυτοποίηση των βακτηρίων *Pseudomonas* είναι χρονοβόρα και απαιτεί προσοχή, είναι όμως αναγκαία. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να προσδιορίσουμε εάν οι ψευδομονάδες που αλλοιώνουν περισσότερα από ένα είδη ιχθύων είναι φυλογενετικά ίδιες και αν υπάρχουν ψευδομονάδες που να μολύνουν κάθε είδος ιχθύος από περιοχές διαφορετικής προέλευσης. Για την επίτευξη του στόχου αυτού χρησιμοποιήθηκαν δύο κύριες ιστοσελίδες. Η πρώτη ήταν της GenBank ενώ η δεύτερη αντιστοιχούσε στο πρόγραμμα ClustalW2. Επίσης χρησιμοποιήθηκε ο Αλγόριθμος ευθυγράμμισης πολλαπλών ακολουθιών Fasta. Μετά από την επεξεργασία των αρχικών δεδομένων καταλήξαμε στο ότι τα κύρια είδη ψευδομονάδων που βρέθηκαν υπεύθυνα για την επιμόλυνση ιχθύων ήταν τα *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas phychrophila*, ενώ συνολικά ανιχνεύτηκαν 13 είδη ψευδομονάδων. Τελικώς δεν ήταν εφικτό να γίνει σύνδεση συγκεκριμένου είδους ψευδομονάδας το οποίο να είναι υπεύθυνο για την επιμόλυνση ειδών ιχθύων σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές αφού τα αρχικά στοιχεία αποδείχτηκαν ανεπαρκή. Σε

μελλοντικές εργασίες λοιπόν απαιτείται καλύτερος σχεδιασμός και μεγαλύτερος αριθμός δεδομένων.

**Λέξεις κλειδιά:** Pseudomonas sp, GenBank, ClustalW2

## 1. Εισαγωγή

Οι υδατοκαλλιέργειες είναι ένας ανερχόμενος βιομηχανικός τομέας, που απαιτεί συνεχή έρευνα, με επιστημονική και τεχνολογική πρόοδο και ανάπτυξη. Στις θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες τα κυρίαρχα είδη είναι ο σολομός (*Salmo salar*) που παράγεται στη Νορβηγία, Χιλή και Μεγάλη Βρετανία, η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) που παράγεται στην Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία και το καλκάνι (*Paralichthys olivaceus*) που παράγεται στην Ιαπωνία.

Τόσο στα θαλασσινά, όσο και στα γλυκά νερά οι μικροοργανισμοί που προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες στις ιχθυοκαλλιέργειες αποτελούν μόνο ένα μικρό μέρος του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού (Toranzo *et al.*, 2005). Η αλλοίωση που προκαλείται στα ψάρια οφείλεται κυρίως στην αυτόλυση, στη βακτηριακή αύξηση και το μεταβολισμό που οδηγεί στον σχηματισμό ενώσεων που αλλοιώνουν τη γεύση και την οσμή και σε χημικές οξειδώσεις όπως των λιπιδίων (Ashie *et al.*, 1996). Από τις παραπάνω αιτίες η μικροβιακή δραστηριότητα είναι μακράν ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ποιότητα των νωπών ιχθύων (Gram and Dalgaard 2002). Οι μικροοργανισμοί στα θαλασσινά προϊόντα όμως, δεν επηρεάζουν εξίσου την αλλοίωση. Οι τροφικές συνήθειες των ιχθύων, η γεωγραφική περιοχή, η εποχή, η θερμοκρασία, το είδος του ψαριού, ο τόπος παραγωγής του ιχθύος (όταν πρόκειται για καλλιεργούμενο είδος) και οι συνθήκες

αποθήκευσης είναι παράγοντες που θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού, που τελικά θα οδηγήσει στην αλλοίωση του προϊόντος (Lehane and Olley 2000; Gram and Huss 1996). Ιχθύες από την εύκρατη ζώνη περιέχουν κυρίως Gram-αρνητικούς, αυστηρά αερόβιους ή προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς των γενών *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium* ή της οικογένειας *Vibrionaceae* (Boekaert *et al.*, 2011). Σε περιοχές της ευκρατης ζώνης με ψυχρά νερά, οι μικροοργανισμοί που έχουν βρεθεί να προκαλούν αλλοίωση των ιχθύων είναι ψυχρόφιλοι ή ψυχρότροφοι όπως οι *Photobacterium phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* spp. και *Aeromonas* spp. (Dalgaard 2000). Από τους ανωτέρω μικροοργανισμούς, οι *Pseudomonas* spp. και *Shewanella* spp. βρέθηκαν να αποτελούν τον ειδικό αλλοιογόνο μικροοργανισμό σε ψάρια που προήλθαν από την Μεσόγειο θάλασσα και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (Koutsoumanis and Nychas 1999; Parlapani *et al.*, 2014a; Parlapani *et al.*, 2014b).

Σε ζεστά νερά όπως την Αφρική και συγκεκριμένα στην Νιγηρία, σε ιχθύες γλυκών υδάτων, οι μικροοργανισμοί που ανιχνεύτηκαν και βρέθηκαν υπεύθυνοι για την αλλοίωση τους ήταν *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* (Gram and Huss 2001). Η αλλοίωση ιχθύων που προέρχονται από γλυκά νερά συμβαίνει κυρίως λόγω του υψηλού ποσοστού σε μη πρωτεϊνικό άζωτο, όπως είναι τα ελεύθερα αμινοξέα και στις πτητικές αζωτούχες βάσεις όπως η αμμωνία, η κρεατίνη, η ταυρίνη, το ουρικό οξύ και η ισταμίνη, τα οποία ευνοούν την μεταθανάτια βακτηριακή αύξηση. Επίσης το ελαφρώς όξινο pH, η υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία και η ποικιλόθερμη φύση των ιχθύων ευνοούν την αύξηση των μικροοργανισμών (Wogu and Maduakor 2010). Ιχθύες γλυκών υδάτων που αλιεύτηκαν στη Βραζιλία σε μεγάλες λεκάνες όπως αυτή του Αμαζόνιου,



αντιπροσωπεύουν μια ολοένα και αυξανόμενη αγορά. Για την εξαγωγή τους απαραίτητος είναι ο βακτηριακός έλεγχος, ο οποίος είναι ελαστικός σε κάποια βακτήρια αλλά όχι για τις ψευδομονάδες, όπου ο αριθμός τους πρέπει να είναι μηδενικός. Σε έρευνα που έγινε στον ποταμό Tarajos από τους Ardura *et al.*, (2013) τα περισσότερα αλιεύματα ήταν επιμολυσμένα με 5 διαφορετικά είδη ψευδομονάδων, ενώ το ίδιο συνέβει και με τους ιχθύες που αλιεύτηκαν από τον ποταμό Negro, με τη μόνη διαφορά ότι ανιχνεύτηκαν 2 είδη ψευδομονάδων. Παρατηρούμε λοιπόν ότι άτομα ειδών *Pseudomonas spp.* βρίσκονται σε κάθε τύπο υδρόβιου περιβάλλοντος και είναι κυρίαρχης σημασίας. Τα προϊόντα που σχετίζονται με τα ψάρια αποτελούν καλό υπόστρωμα για την αύξηση του γένους *Pseudomonas*, ειδικά κάτω από αερόβιες συνθήκες αποθήκευσης σε πάγο.

Το γένος *Pseudomonas* θεωρείται ότι παράγει το μεγαλύτερο ποσοστό πτητικών ενώσεων που ευθύνεται για την αλλοίωση της γεύσης, ενώ το είδος *Pseudomonas fragi* πιο συγκεκριμένα είναι υπεύθυνο για την παραγωγή δυσάρεστων οσμών. (Franzetti and Scarpellini 2007; Parlapani *et al.*, 2014b). Το γένος *Pseudomonas* είναι η πιο σημαντική οικολογικά ομάδα βακτηρίων και περιλαμβάνει Gram- αρνητικά αερόβια που είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στη φύση και χαρακτηρίζονται από αυξημένη μεταβολική ευελιξία, η οποία σχετίζεται με την παρουσία ενός πολύπλοκου ενζυματικού συστήματος. Κάποια είδη είναι ιδιαίτερα σημαντικά καθώς θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα για τους ανθρώπους αλλά και τα ζώα, ενώ άλλα όπως τα φυτοπαθογόνα είναι σημαντικά για τον αγροτικό τομέα. Τα άτομα του γένους *Pseudomonas spp.*, είναι γενικά μια ομάδα με μεγάλη ετερογένεια και βιοποικιλότητα ανάμεσα στα είδη αλλά και υποείδη (Tryfinopoulou *et al.*, 2002). Μερικά από τα βακτήρια αυτά θεωρούνται και ευκαιριακά παθογόνα και προσβάλλουν τον οργανισμό, όταν αυτός είναι στρεσαρισμένος. Οργανισμοί που ζουν σε υδάτινα συστήματα όπως

τα ψάρια και οι βάτραχοι είναι ευάλωτοι στα βακτήρια αυτά και παρουσιάζουν μέτριο έως αυξημένο αριθμό θνησιμοτήτων. Τα συνήθη υπεύθυνα είδη που ανιχνεύονται είναι τα *P. diminuta*, *P. fluorescens*, *P. putida* και *P. aeruginosa*, με το καθένα να παρουσιάζει διαφορετικό βαθμό επικινδυνότητας. Οι διατροφικές απαιτήσεις του γένους *Pseudomonas* spp. είναι αρκετά απλές και βρίσκεται σε ενδαιτήματα γλυκού και θαλασσινού νερού και στο χώμα, αλλά έχει απομονωθεί και από ασηπτικά διαλύματα, καλλυντικά και ιατρικά προϊόντα. Οι ασθένειες που προκαλούνται από βακτήρια και προσβάλουν τα ψάρια αποτελούν μία από τις κύριες προκλήσεις που αντιμετωπίζει η βιομηχανία.

Οι ψευδομονάδες είναι πολύ σημαντικά όμως και ως ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί και όχι τόσο ως παθογόνα ιχθύων.

Η αναγνώριση και ταυτοποίηση των βακτηρίων *Pseudomonas* είναι χρονοβόρα και απαιτεί προσοχή καθώς ο φαινοτυπός τους ανάμεσα στα είδη είναι αρκετά ομοιόμορφος. Παρόλα αυτά η ταυτοποίηση είναι σημαντική και μπορεί να οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση της βιολογίας και οικολογίας του γένους. (Jaturapahu *et al.*, 2005). Η διάγνωση γίνεται με απομόνωση του οργανισμού και καθαρή καλλιέργεια του από τους μολυσμένους ιστούς, ταυτοποιώντας τον βακτηριακό παράγοντα. Το πρωτεϊνικό προφίλ παρέχει τα εργαλεία για την κατηγοριοποίηση αρκετών βακτηρίων σε υπο-ομάδες και έχει αποδειχτεί χρήσιμο για τον χαρακτηρισμό των στελεχών από μία και μόνο πηγή. Ο όρος κλώνος χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει φαινομενικά όμοια στελέχη που έχουν κοινή προέλευση, ενώ το προφίλ έχει αποδειχτεί να είναι από τα πιο αποτελεσματικά για αναγνώριση βακτηρίων που προέρχονται από τον ίδιο κλώνο. (El-Hady and Samy 2011). Ιστορικά η αναγνώριση των ειδών του συγκεκριμένου γένους έγινε για πρώτη φορά από τον Migula το 1894. Το 1984 οι Pelleroni *et al.*, ξεκίνησε έρευνα σχετικά με το γένος και

αναγνώρισε 5 rRNA ομάδες με ομοιότητες. Πλέον μόνο η πρώτη ομάδα ομοιότητας rRNA θεωρείται ως η ομάδα με την πραγματική *Pseudomonas*.

Τα περισσότερα μέλη της πρώτης ομάδας είναι ψυχρότροπα και μπορεί να είναι φθορίζοντα ή μη φθορίζοντα, ενώ είναι γνωστό ότι είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση τροφίμων υπό ψύξη. Τα κύρια είδη που ανιχνεύονται είναι τα *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas fragi*.

Συνεπώς, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να προσδιορίσουμε εάν οι ψευδομονάδες που αλλοιώνουν περισσότερα από ένα είδη ιχθύων είναι φυλογενετικά ίδιες και αν υπάρχουν ψευδομονάδες που να μολύνουν κάθε είδος ιχθύος από περιοχές διαφορετικής προέλευσης.

## **2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **2.1 Πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης**

Για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο ιστοσελίδες, αυτή της GenBank (<http1>) καθώς και της ClustalW2 (<http2>). Η Genbank είναι μέρος του International Nucleotide Sequence Database Collaboration, που περιλαμβάνει την βάση δεδομένων DNA της Ιαπωνίας (DNA DataBank of Japan), το Ευρωπαϊκό Μοριακό και Βιολογικό Εργαστήριο (European Molecular Biology Laboratory) και το Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογίας, Η.Π.Α. (National Center for Biotechnology Information) οι οποίοι είναι οργανισμοί που καθημερινά ανταλλάσσουν δεδομένα. Η Genbank είναι ένας οργανισμός, ο οποίος συγκεντρώνει και παρέχει πληροφορίες σχετικά με όλες τις δημοσιευμένες γενετικές αλληλουχίες που είναι γνωστές και οι οποίες ανανεώνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα καθιστώντας τη την πιο ενημερωμένη πηγή γενετικών πληροφοριών. Το ClustalW2 είναι ένα παγκόσμιο πρόγραμμα πολλαπλής κατανομής της αλληλουχίας του DNA ή των πρωτεϊνών.

Οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης ClustalW2 και χρησιμοποιώντας το κριτήριο ομοιότητας (>98%) (Stackebrandt & Goebel 1994). Με τη βοήθεια του προγράμματος FASTA κάθε αλληλουχία συγκρίθηκε με διαθέσιμες αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων του NCBI και βρέθηκαν οι συγγενικά κοντινότεροι φυλότυποι της κάθε αλληλουχίας. Το πρόγραμμα ClustalW2 παράγει βιολογικής σημασίας, πολλαπλές ευθυγραμμίσεις αλληλουχιών από αποκλίνουσες σειρές. Υπολογίζει την καλύτερη αντιστοιχία για τις επιλεγμένες σειρές και τις ταξινομεί έτσι ώστε οι ταυτότητες, οι ομοιότητες και οι διαφορές των αλληλουχιών να γίνονται εύκολα αντιληπτές. Οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ συγκεκριμένων αλληλουχιών πρωτεϊνών εμφανίζονται σαν κλαδιογράμματα ή

φυλογραφήματα. Η ευθυγράμμιση μας παρέχει λειτουργικές, δομικές και εξελικτικές πληροφορίες. Μπορούμε να ευθυγραμμίσουμε δύο ακολουθίες και αν είναι αρκετά όμοιες πιθανόν να έχουν τον ίδιο πρόγονο, όπως και να έχουν την ίδια δομή και λειτουργία οι οργανισμοί. Αν για μία από τις ακολουθίες γνωρίζουμε δομή και λειτουργία και την έχουμε ευθυγραμμίσει με μια άγνωστη ακολουθία μπορούμε να εξάγουμε παρόμοια συμπεράσματα και για την άγνωστη (Patel *et al.*, 2012).

Οι βασικές πληροφορίες που παρέχουν είναι η αναγνώριση από συγκεκριμένες περιοχές της αλληλουχίας. Αυτό είναι πολύ χρήσιμο στο σχεδιασμό πειραμάτων για τη δοκιμή και τροποποίηση της λειτουργίας των συγκεκριμένων πρωτεϊνών, στην πρόβλεψη της λειτουργίας και της δομής των πρωτεϊνών, και για τον εντοπισμό νέων μελών των οικογενειών των πρωτεϊνών. Οι αλληλουχίες μπορούν να ευθυγραμμιστούν σε όλο το μήκος τους (ολική ευθυγράμμιση) ή σε ορισμένες μόνο περιοχές (τοπική ευθυγράμμιση). Αυτό είναι αλήθεια για την κατά ζεύγη αλληλουχία και τις πολλαπλές στοιχίσεις αλληλουχίας. Στο πρόγραμμα οι ολικές ευθυγραμμίσεις πρέπει να χρησιμοποιούν κενά (που αντιπροσωπεύουν εισαγωγές / διαγραφές) ενώ οι τοπικές ευθυγραμμίσεις των αλληλουχιών μπορούν να αποφύγουν, ευθυγραμμίζοντας περιοχές μεταξύ των κενών. Περιοχές με υψηλή τοπική ομοιότητα αγνοούνται για να επιτευχθεί μεγαλύτερη ολική βαθμολογία. Στην τοπική ευθυγράμμιση αναζητούμε περιοχές τοπικής ομοιότητας. Η ευθυγράμμιση αυτή σταματά στις περιοχές που είναι ταυτόσημες ή που έχουν μεγάλη ομοιότητα και δίδεται μεγαλύτερη προτεραιότητα στην εύρεση τέτοιων περιοχών (προτύπων) χαρακτήρων παρά για την εύρεση ατομικών ταυτίσεων χαρακτήρων (Διαμαντοπούλου 2014). Επίσης στο πρόγραμμα ClustalW2 η ευθυγράμμιση είναι προοδευτική και εξετάζει την αναντιστοιχία από την ακολουθία Τα δέντρα μπορούν επίσης να υπολογίζονται από τις πολλαπλές ευθυγραμμίσεις. Οι δύο αυτές

ιστοσελίδες χρησιμοποιήθηκαν με στόχο την δημιουργία ομάδων ιχθύων, μολυνσμένων με είδη ψευδομονάδων που η αλληλουχία του DNA τους θα παρουσίαζε ομοιότητα μέχρι και 100% (Patel *et al.*, 2012).

## 2.2 Αλγόριθμοι ευθυγράμμισης πολλαπλών ακολουθιών

Για την περαίωση της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι αλγόριθμοι FASTA και CLUSTAL, που είναι οι χαρακτηριστικότεροι αλγόριθμοι ευθυγράμμισης πολλαπλών ακολουθιών. Χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση και αναπαράσταση πρωτεϊνικών οικογενειών και υπεροικογενειών, στην αναπαράσταση των χαρακτηριστικών που μεταφέρονται στις ακολουθίες DNA ή στις πρωτεϊνικές ακολουθίες και τέλος στην αναπαράσταση την εξελικτικής ιστορίας (φυλογενετικά δέντρα) από ακολουθίες DNA ή πρωτεϊνών (Διαμαντοπούλου 2014).

Για τη δημιουργία των ομάδων αυτών χρησιμοποιήθηκε αρχικά το πρόγραμμα της Genbank και έγινε αναζήτηση για *Pseudomonas* sp. σε ιχθύες. Από κάθε αποτέλεσμα που παρουσιάστηκε, κρατήθηκε ο κωδικός του συγκεκριμένου δείγματος "Locus", η ονομασία του οργανισμού "Organism" και η πηγή "Source" και τοποθετήθηκαν σε φύλλο Microsoft Office Excel. Οι κωδικοί που βρέθηκαν τοποθετήθηκαν ξανά στη μηχανή αναζήτησης της GenBank με σκοπό να βρεθεί η αλληλουχία κάθε κωδικού. Οι παραπάνω κωδικοί τοποθετήθηκαν σε φύλλο Microsoft Office Word και μετατράπηκαν σε μορφή FASTA, φροντίζοντας να υπάρχει ένα κενό μεταξύ των αλληλουχιών ώστε να χρησιμοποιηθεί από τη συγκεκριμένη μηχανή αναζήτησης αλληλουχιών.

Μορφή FASTA είναι η τυπική μορφή κάθε αλληλουχίας. Όλες οι σειρές FASTA ξεκινούν με μια γραμμή που προσδιορίζει την αλληλουχία και αποτελείται από: έναν μοναδικό αναγνωριστικό αριθμό (ο αριθμός ένταξης), τον αριθμό έκδοσης της ακολουθίας, το μήκος της αλληλουχίας; τον τύπο του μορίου (DNA ή mRNA),

την ταξινομική διαίρεση, την τελευταία ημερομηνία κυκλοφορίας, και τον οργανισμό προέλευσης. Το ClustalW2 θα προσπαθήσει να ευθυγραμμιστούν οι αλληλουχίες αμινοξέων με βάση τις ομοιότητες τους ([http24](http://24)). Μόλις ολοκληρώθηκε το βήμα αυτό χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ClustalW2, όπου οι μορφοποιημένες αλληλουχίες τοποθετήθηκαν στην αναζήτηση FASTA. Το ClustalW2 βρίσκει τις καλύτερες ευθυγραμμίσεις στο πλήρες μήκος της κάθε αλληλουχίας που τοποθετήθηκε και τα αποτελέσματα του ClustalW2 δείχνουν τον βαθμό ομοιότητας μεταξύ όλων των αλληλουχιών. Μία βαθμολογία κατά ζεύγη υπολογίζεται για κάθε ζεύγος αλληλουχιών που πρόκειται να ευθυγραμμιστούν. Τα κατά ζεύγη σκορ υπολογίζονται ως ο αριθμός των ταυτοτήτων με την καλύτερη ευθυγράμμιση η οποία διαιρείται με τον αριθμό των υπολειμμάτων για σύγκριση. Τελικά αυτές οι βαθμολογίες παρουσιάζονται σε πίνακα αποτελεσμάτων, ο οποίος παρουσιάζει τον αριθμό των αλληλουχιών που τοποθετήθηκαν στο πρόγραμμα και η ευθυγράμμιση έχει σκοράρει ενώ επιπλέον παρουσιάζονται και άλλες πληροφορίες. Οι τρεις πρώτες σειρές είναι οι ευθυγραμμισμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων. Στην συνέχεια, τα αποτελέσματα αυτά αντιγράφηκαν ξανά σε φύλλο εργασίας του Microsoft Office Word και βρέθηκαν οι αλληλουχίες, που έχουν τον επιθυμητό για την ερευνά μας βαθμό ομοιότητας. Όπως αναφέρθηκε κάθε αλληλουχία DNA από κάθε οργανισμό τοποθετήθηκαν μαζί και στο τέλος της διαδικασίας εμφανίστηκαν τα ποσοστά ομοιότητας κάθε αλληλουχίας. Τα ποσοστά που βρέθηκαν να παρουσιάζουν ομοιότητα κάτω από 99% απορρίφθηκαν άμεσα. Τα δείγματα ιχθύων που βρέθηκαν επιμολυσμένα με *pseudomonas sp.* και παρουσίαζαν ομοιότητα από 99-100% ανέρχονταν σε 145. Αυτό πραγματοποιήθηκε τρέχοντας ξανά το ClustalW2 και τοποθετώντας τα νέα δεδομένα στη μηχανή αναζήτησης του FASTA διαλέγοντας όμως τη φορά αυτή την επιλογή “άλλοι μέθοδοι αναζήτησης”. Συνολικά

δημιουργήθηκαν έξι ομάδες, αποτελούμενες από διαφορετικά είδη ιχθύων που ήταν επιμολυσμένα με ίδια ή διαφορετικά είδη ψευδομονάδων, που ο αριθμός των ατόμων που περιείχαν διέφερε στατιστικώς σημαντικά (Πιν. 1). Μόλις η διαδικασία της δημιουργίας των ομάδων ολοκληρώθηκε, το επόμενο στάδιο ήταν η ταξινόμηση των δεδομένων που αντιστοιχούσαν σε κάθε κωδικό "Locus". Τα δεδομένα που κρατήθηκαν έδιναν πληροφορίες σχετικά με το είδος του ψαριού, την περιοχή προελεύσεώς του, τον ιστό από τον οποίο προήλθε το δείγμα (Πιν. 2), τον μικροοργανισμό με τον οποίο ήταν μολυνσμένος, πληροφορίες που αφορούσαν τον τρόπο μόλυνσης του ιχθύος καθώς και το επιστημονικό περιοδικό στο οποίο δημοσιεύτηκε η κάθε έρευνα. Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν σε έναν αριθμό ιχθύων που βρέθηκαν να είναι επιμολυσμένοι με ψευδομονάδες.

### **2.3 Βιολογία ειδών ιχθύων**

Η περιγραφή των συγκεκριμένων ιχθύων είναι αναγκαία, ώστε να κατανοήσουμε την διαφορετικότητα των ενδιαιτημάτων που ζουν οι ιχθύες που αναφέρονται στην παρούσα εργασία και την διαφορετικότητα των ειδών ψευδομονάδων.

#### ***Clupea harengus* (Linnaeus, 1758)**

Η ρέγγα είναι ένα θαλάσσιο, βενθοπελαγικό είδος που ανήκει στην οικογένεια Clupeidae. Ζει σε υφάλμυρα νερά βάθους μέχρι 360 μέτρα, ενώ συνήθως βρίσκεται μέχρι τα 200 μέτρα και η θερμοκρασία των νερών διαβίωσής του κυμαίνεται από 1 μέχρι 18 °C. Συναντάται στα ρηγά και ζεστά νερά του βόρειου Ειρηνικού και του βόρειου Ατλαντικού ωκεανού και της Βαλτικής θάλασσας. Τα ενήλικα άτομα περνούν τη μέρα σε βαθύτερα νερά και ανεβαίνουν στην επιφάνεια κατά τη διάρκεια



της νύχτας. Γενικά το φως είναι ένας ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας ο οποίος ελέγχει την κατακόρυφη κατανομή του ([http3](#)).

***Abramis brama* (Linnaeus, 1758)**

Το χάνι είναι ένα Ευρωπαϊκό, βενθοπελαγικό είδος ψαριού της οικογένειας Cypriniformes. Διαβιεί σε γλυκά και υφάλμυρα νερά θερμοκρασίας μεταξύ 10 και 24 °C. Συναντάται σε ένα εύρος ενδιαιτημάτων στην Ευρώπη και την Ασία. Τα ενήλικα άτομα ζουν σε λίμνες και ποτάμια μεσαίου και μεγάλου μεγέθους, συνήθως σε περιοχές που βρίσκονται χαμηλότερα και με αργή ροή νερών, ενώ σχηματίζουν μεγάλα κοπάδια. Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους τέλος είναι ότι μπορούν να ζήσουν έξω από το νερό για παρατεταμένο διάστημα ([http4](#)).

***Salmo salar* (Linnaeus, 1758)**

Ο σολομός ανήκει στην οικογένεια των Salmonidae και απαντάται σε κρύα νερά στο βόρειο Ατλαντικό και σε ποταμούς που εκβάλλουν σε αυτό, ενώ έχει εισαχθεί και στο βόρειο Ειρηνικό. Οι σολομοί ζουν σε κρύα νερά, με θερμοκρασία από 2 μέχρι 9 °C. Τα ψάρια γεννιούνται σε γλυκά νερά και παραμένουν σε αυτά για 2 με 5 χρόνια, και στη συνέχεια μετακινούνται στον ωκεανό, όπου ζουν για άλλα πέντε χρόνια. Μετά, όταν ενηλικιωθούν σταματούν να τρώνε και επιστρέφουν πίσω στα ρυάκια και λίμνες όπου γεννήθηκαν για να αναπαραχθούν. Τα περισσότερα ψάρια πεθαίνουν μετά την αναπαραγωγή, ενώ λίγα επιστρέφουν στον ωκεανό ([http5](#)), ([http6](#)).

***Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)**

Είναι ένα βενθοπελαγικό είδος, το οποίο βρίσκεται σε θαλάσσια, υφάλμυρα και γλυκά νερά και ανήκει στην οικογένεια Salmonidae. Είναι ένα υποτροπικό είδος και η

θερμοκρασία διαβίωσης του κυμαίνεται από 10 μέχρι 24 °C. Ο χρωματισμός του ποικίλλει και εξαρτάται από το ενδιαίτημα του, το μέγεθος και την σεξουαλική του κατάσταση. Συνήθως τα άτομα που βρίσκονται σε ρυάκια έχουν πιο έντονα σκοτεινά χρώματα, σε αντίθεση με τα άτομα που βρίσκονται σε λίμνες και το χρώμα τους πλησιάζει το ασημένιο. Μπορεί να ζήσει σε ρυάκια, μικρά και μεγάλα ποτάμια και λίμνες όπου η θερμοκρασία δεν ξεπερνά τους 25 °C και σε περιοχές με χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου ([http7](#)).

### ***Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**

Η τιλάπια είναι ένα βενθοπελαγικό είδος που ανήκει στην οικογένεια Cichlidae και μπορεί να βρεθεί και να ζήσει σε ένα πολύ μεγάλο εύρος ενδιαιτημάτων. Βρίσκεται σε γλυκά και υφάλμυρα νερά και η ιδανική θερμοκρασία διαβίωσής του κυμαίνεται από 14 μέχρι 33 °C. Οι περιοχές φυσικής του εξάπλωσης είναι στην Ασία και την Αφρική , ενώ έχει εισαχθεί σχεδόν σε κάθε σημείο του πλανήτη. Τρέφεται κυρίως με φυτοπλαγκτόν και με βενθικούς οργανισμούς ([http8](#)).

### ***Thymallus baicalensis* (Dybowski, 1874)**

Είναι ένα βενθοπελαγικό είδος των γλυκών νερών και ανήκει στην οικογένεια Salmonidae. Συναντάται στην Ευρώπη και την Ασία, στον ποταμό Ανγκάρα και σε ολόκληρη τη λίμνη Βαϊκάλη, στην Σελένγκα καθώς και σε παραπόταμους της λίμνης Βαϊκάλης. Ζει κυρίως σε ρηγά νερά με βραχώδες υπόστρωμα και τρέφεται με προνύμφες μυγών, διάφορα αμφίποδα και αυγά διαφόρων ειδών ([http9](#)).

***Coregonus migratorius* (Georgi, 1775)**

Βενθοπελαγικό είδος που ζει σε γλυκά, υφάλμυρα και αλμυρά νερά και ανήκει στην οικογένεια Salmonidae και πιο συγκεκριμένα στο γένος Coregoninae. Απαντάται στην λίμνη Βαϊκάλη στην Βόρεια Σιβηρία και εισέρχεται στους παραποτάμους Κιχέρα, Ανάγκαρα, Μπαργκουζιν και Σελένγκα. Λίγα είναι γνωστά για την βιολογία του και τους τρόπους αναπαραγωγής του καθώς δεν υπάρχουν στοιχεία για το είδος στη διεθνή βιβλιογραφία. Το μόνο που γνωρίζουμε είναι ότι αποτελεί ένα σημαντικό είδος τροφής των κατοίκων της λίμνης Βαϊκάλης ([http10](#)).

***Neogobius fluviatilis* (Pallas, 1814)**

Είναι βενθοπελαγικό είδος που ζει σε γλυκά και υφάλμυρα νερά, σε θερμοκρασία μεταξύ 4 και 20 °C. Προτιμά παράκτια ενδιαιτήματα, εκβολές ποταμών και λίμνες και μεγάλου μεγέθους ποτάμια με λασπώδες υπόστρωμα. Αναπαράγεται από τον Απρίλιο μέχρι τον Ιούλιο και τοπικά μέχρι τον Σεπτέμβριο, όταν η θερμοκρασία είναι πάνω από τους 13 °C. Τα ενήλικα άτομα τρέφονται με ποικιλία ασπόνδυλων, ειδικά με μαλάκια ([http11](#)).

***Etroplus maculatus* (Bloch, 1795)**

Βενθοπελαγικό είδος, που ζει σε γλυκά και υφάλμυρα νερά, σε θερμοκρασία 20 με 25 °C. Ανήκει στην οικογένεια Cichlidae και στο γένος Etroplinae και συναντάται στη Ινδία και την Σρι Λάνκα. Βρίσκεται σε λιμνοθάλασσες και μικρά ρέματα, ενώ εισέρχεται σε εκβολές ποταμών. Μπορεί να βρεθεί ανάμεσα σε ρίζες και χόρτα. Τρέφεται με προνύμφες ψαριών, ζωοπλαγκτόν και άλγη ([http12](#)).

***Eetroplus suratensis* (Bloch, 1790)**

Τροπικό, βενθοπελαγικό ψάρι, που ζει σε υφάλμυρα νερά σε θερμοκρασία μεταξύ 23 και 26 °C. Ανήκει στην οικογένεια Cichlidae και στο γένος Eetroplinae και συναντάται στον Δυτικό Ινδικό ωκεανό, την Ινδία και την Σρι Λάνκα. Μπορεί να βρίσκεται συνήθως σε υφάλμυρα νερά, αλλά μπορεί να ανεχθεί γλυκό ή θαλασσινό νερό για σύντομο χρονικό διάστημα. Βρίσκεται σε λιμνοθάλασσες και μεγάλα ποτάμια και σε εκβολές ποταμών. Τρέφεται με άλγη, έντομα και μέρη φυτών ([http13](#)).

***Spoeroides annulatus* (Jenyns, 1842)**

Είναι ένα είδος ιχθύος που ανήκει στην οικογένεια Tetraodontidae και ζει σε θαλάσσια και υφάλμυρα ύδατα, σε περιοχές κοντά σε κοραλλιογενείς υφάλους. Απαντάται στον κόλπο της Καλιφόρνιας και κατά μήκος του Ανατολικού Ειρηνικού ωκεανού, από το Σαν Ντιέγκο στο Περού και τα νησιά Γκαλαπάγκος ([http14](#)). Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς είναι υποψήφιο είδος για καλλιέργεια στον ανατολικό Ειρηνικό ωκεανό και έχει οικονομικό ενδιαφέρον για το Μεξικό όπου μπορεί να πωληθεί μέχρι US \$ 5 ανα κιλό (Garcia-Ortega et al. 2002).

***Callichthys callichthys* (Linnaeus, 1758)**

Είναι ένα βενθοπελαγικό είδος των γλυκών νερών και ζει σε υποτροπικές περιοχές σε θερμοκρασία 18 με 28 °C. Ανήκει στην οικογένεια Callichthyidae και συναντάται στην Βόρειο Αμερική, σε ποτάμια των Άνδεων και στην Αργεντινή. Βρίσκεται και μπορεί να ζήσει σε ακραία περιβάλλοντα με ανοξικές συνθήκες, με τυρβώδη με συνεχή ροή νερά σε ρέματα. Όταν οι περιοχές διαβίωσής του ξεραίνονται μπορεί να μετακινηθεί έξω από το νερό προς αναζήτηση άλλου βιότοπου ([http15](#)).

***Tor putitora* (Hamilton, 1822)**

Είναι ένα βενθοπελαγικό είδος των γλυκών νερών, που ζει σε υποτροπικές περιοχές σε θερμοκρασία που κυμαίνεται μεταξύ 13 και 30 °C. Συναντάται στην Ασία, το Αφγανιστάν, το Πακιστάν, το Νεπάλ, την Ινδία, το Μπαγκλαντές και τη Μιανμάρ. Βρίσκεται σε ρυάκια, παραποτάμιους λάκους και λίμνες, ενώ προτιμά τα ρέματα με βραχώδες υπόστρωμα. Είναι παμφάγο ψάρι και τρέφεται με άλλα ψάρια, ζωοπλαγκτόν, προνύμφες διπτέρων και μέρη φυτών ([http16](#)).

***Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758)**

Ανήκει στην οικογένεια Percidae (Perches) και είναι είδος που ζει σε γλυκά και υφάλμυρα νερά σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 10 μέχρι 22 °C. Απαντάται στην Σκανδιναβία, την κεντρική Ιταλία και την λεκάνη της Ανδριατικής. Επίσης βρίσκεται στο Αιγαίο πέλαγος και τις εκβολές του Αλιάκμονα. Πλέον έχει εισαχθεί σε πάρα πολλές περιοχές και σε αρκετές από αυτές έχει προκαλέσει σημαντικά προβλήματα κατά την επαφή του με τους ντόπιους πληθυσμούς ([http17](#)). Ξεχωρίζει από τα άλλα είδη πέρκας στην Ευρώπη γιατί έχει κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά ([http18](#)).

***Dicologlossa cuneata* (Moreau, 1881)**

Είναι ένα υποτροπικό είδος, που ζει σε υφάλμυρο και θαλασσινό νερό και ανήκει στην οικογένεια Soleidae. Συναντάται στον ανατολικό Ατλαντικό ωκεανό, στον κόλπο Μπισκαη, και από τη Μεσόγειο θάλασσα μέχρι το Ακρωτήριο της καλής Ελπίδας στην Νότιο Αφρική. Το χρώμα του είναι ανοικτό καφέ, με μικρές σκουρόχρωμες κηλίδες. Βρίσκεται κυρίως σε αμμώδη ή λασπώδη υποστρώματα και τρέφεται με ποικιλία μικρών οργανισμών που ζουν στο βυθό, κυρίως καρκινοειδή, πολύχαιτους και μαλάκια ([http19](#)).

***Pelteobargus fulvidraco* (Richardson, 1846)**

Είναι ένα μη μεταναστευτικό είδος των γλυκών υδάτων και ανήκει στην οικογένεια Bagridae. Προτιμά θερμοκρασία μεταξύ 16 και 25 °C, και συναντάται στο Λάος, το Βιετναμ και τη νοτιοανατολική Σιβηρία. Τα ενήλικα άτομα του είδους βρίσκονται κυρίως σε κανάλια ποταμών και λίμνες. Τρέφονται από τον βυθό, με έντομα, μαλάκια και περιστασιακά ψάρια. Τη περίοδο πριν την εκκόλαψη, τα αυγά φυλάσσονται από τα αρσενικά ([http20](#)).

***Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758)**

Ο τόνος είναι ένα ωκεανο-πελαγικό ψάρι, που ζει σε θαλασσινά και υφάλμυρα ύδατα των υποτροπικών περιοχών, σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 3 μέχρι 30 °C. Ανήκει στην οικογένεια Scombridae και συναντάται στον Δυτικό και Ανατολικό Ατλαντικό, την Μεσόγειο θάλασσα και το βόρειο τμήμα της Μαύρης θάλασσας ([http21](#)).

***Xiphias gladius* (Linnaeus, 1758)**

Ο ξιφίας, είναι ωκεανοπελαγικό ψάρι που ζει σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 5 μέχρι 27. Βρίσκεται στον Ατλαντικό, Ινδικό και Ειρηνικό ωκεανό, σε τροπικά και ζεστά νερά, αλλά μερικές φορές σε πιο κρύα, συμπεριλαμβανομένων της Μεσόγειου θάλασσας, τη θάλασσα του Μαρμαρά και τη Μαύρη θάλασσα. Είναι το μοναδικό μέλος της οικογένειας Xiphiidae ([http22](#)). Ο ξιφίας είναι ο μεγαλύτερος εχθρός των τόνων. Μοναδικός πραγματικός εχθρός του ξιφία είναι μικρά θαλάσσια παράσιτα που γαντζώνονται πάνω του και τον βασανίζουν. Στις περιπτώσεις αυτές πλησιάζει τις ακτές και τρίβεται με μανία στα βράχια οπότε και καθίσταται πολύ επικίνδυνος ([http23](#)).

### 3. Αποτελέσματα

Στην 1<sup>η</sup> ομάδα βρέθηκαν 14 περιπτώσεις επιμόλυνσης από ψευδομονάδες (Πιν. 3). Από αυτές οι 2 ανιχνεύτηκαν στην τιλάπια και η επιμόλυνση οφειλόταν στο είδος *Pseudomonas aeruginosa*. Η περιοχή προέλευσης των δειγμάτων αυτών ήταν η Ινδία και η Μαλαισία. Δύο περιστατικά ακόμα ήταν επιμολυσμένα με το είδος *Pseudomonas aeruginosa*. Οι ιχθείς που βρέθηκαν επιμολυσμένοι άνηκαν στο είδος *Neogobius fluviatilis* και η περιοχή προελεύσεώς τους ήταν η Ινδία. Δύο περιπτώσεις επιμόλυνσης ανιχνεύτηκαν για το γένος *Etroplus* και πιο συγκεκριμένα για τα είδη *Etroplus maculatus* και *Etroplus suratensis*. Ο υπεύθυνος οργανισμός για την επιμόλυνση ήταν και σε αυτές τις περιπτώσεις το *Pseudomonas aeruginosa*. Για το πρώτο η περιοχή προέλευσης ήταν άγνωστη ενώ το δεύτερο βρέθηκε στην Ινδία. Το είδος *Cottocomephorus growingki* βρέθηκε στην Ρωσία και πιο συγκεκριμένα στη λίμνη Βαϊκάλη και ήταν επιμολυσμένο με ψευδομονάδες του στελέχους Zh1N-8. Το είδος με τη γενική ονομασία Blue Gurami βρέθηκε επιμολυσμένο με το στέλεχος RCPVK-NCCS-PS1 σε περιοχή της Ινδίας. Δύο ακόμα δείγματα του γλυκού νερού αλλά αγνώστου είδους βρέθηκαν επιμολυσμένα από ψευδομονάδες. Το ένα από αυτά προερχόταν από την Κίνα και ο υπεύθυνος οργανισμός για την επιμόλυνση ήταν ο *Pseudomonas fragi*. Το δεύτερο δείγμα προερχόταν από τη Βραζιλία και ειδικότερα από τον ποταμό Ταπάχος και στο οποίο η μόλυνση οφειλόταν στο στέλεχος FY6. Τα επόμενα 4 δείγματα προέρχονταν από άγνωστα είδη. Οι ψευδομονάδες που βρέθηκαν άνηκαν στο είδος *pseudomonas aeruginosa* σε 3 περιπτώσεις και η περιοχή προέλευσης των ιχθύων ήταν ο παταμός Ταπάχος της Βραζιλίας σε μία περίπτωση και η Ινδία στις επόμενες δύο περιπτώσεις. Το τέταρτο δείγμα βρέθηκε επιμολυσμένο με το είδος *Pseudomonas putida* ενώ η περιοχή προέλευσης του ήταν άγνωστη. Συνοψίζοντας στην 1<sup>η</sup> ομάδα ως κύριος οργανισμός επιμόλυνσης βρέθηκε το είδος

*Pseudomonas aeruginosa* που ανιχνεύτηκε σε 8 από τις 14 συνολικά περιπτώσεις. Η Ινδία ήταν η περιοχή από την οποία προήλθαν τα περισσότερα από τα δείγματα. Τα δείγματα που ήταν επιμολυσμένα με το είδος *Pseudomonas aeruginosa* προερχόντουσαν όλα από την Ινδία. Τέλος στοιχεία για τον ιστό από τον οποίο πάρθηκε το δείγμα σε 12 από τις 14 περιπτώσεις δεν ήταν διαθέσιμα.

Στην 2<sup>η</sup> ομάδα τοποθετήθηκαν συνολικά 29 δείγματα (Πιν.4). Τα δείγματα αυτά αποτελούντο από 9 διαφορετικά είδη ιχθύων, ενώ ένα δείγμα δεν ήταν αναγνωρισμένο. Πιο συγκεκριμένα το είδος *Thymallus baicalensis* βρέθηκε 12 φορές στην Ρωσία και ειδικότερα στην περιοχή Ιρκουτσκ, στην λίμνη Βαϊκάλη. Σε κάθε μια από τις παραπάνω περιπτώσεις οι ιχθύες ήταν επιμολυσμένοι με *pseudonades sp.* οι οποίες ανιχνεύτηκαν στο έντερο του ψαριού και συγκεκριμένα στη μικροχλωρίδα. Οκτώ άτομα του είδους *Coregonous migratorius* βρέθηκαν επιμολυσμένα με ψευδομονάδες άγνωστου είδους στην περιοχή Ιρκουτσκ, στην λίμνη Βαϊκάλη. Η επιμόλυνση ανιχνεύτηκε στη μικροχλωρίδα του εντέρου του ιχθύος όπως και στην παραπάνω περίπτωση. Σε 2 περιπτώσεις από τα δείγματα που άνηκαν στη 2<sup>η</sup> ομάδα το είδος που βρέθηκε επιμολυσμένο με ψευδομονάδες ήταν το *Pseudosciaena crocea*. Ο οργανισμός που βρέθηκε υπεύθυνος για την επιμόλυνση ήταν σε μία περίπτωση ο *Pseudomonas putida* και στην άλλη ο *Pseudomonas plecoglossicida*. Η περιοχή προέλευσης των δειγμάτων αυτών ήταν στην πρώτη περίπτωση η Κίνα και συγκεκριμένα ο κόλπος Xiangshan ενώ για την δεύτερη περίπτωση η περιοχή ήταν άγνωστη. Τα είδη *Cottocomephorus grewinki*, *Sphoeroides annulatus*, *Callichthys callichthys*, red rock fish και *Tor putitora* βρέθηκαν επιμολυσμένα από μια φορά. Ειδικότερα το είδος *Cottocomephorus grewinki* βρέθηκε επιμολυσμένο με ψευδομονάδες του στελέχους Zh2-6. Το δείγμα αυτό προήλθε από την περιοχή Ιρκουτσκ της Ρωσίας και η μόλυνση ανιχνεύτηκε στο δέρμα του ιχθύος. Το είδος



*Sphoeroides annulatus* προήλθε από το Μεξικό και ήταν επιμολυσμένο με *Pseudomonas taiwanensis*. Το είδος *Callichthys callichthys* που προήλθε από την Κίνα ήταν επιμολυσμένο με το στέλεχος V7. Το ψάρι με την γενική ονομασία Red rock βρέθηκε επιμολυσμένο με το στέλεχος FI1029 και η περιοχή προέλευσης του ήταν άγνωστη. Τέλος το είδος *Tor putitora* βρέθηκε επιμολυσμένο με το είδος *Pseudomonas koreensis*. Η περιοχή προέλευσης ήταν άγνωστη.

Στην 3<sup>η</sup> ομάδα ανήκαν μόνο 3 δείγματα. Τα δείγματα αυτά ήταν επιμολυσμένα με ψευδομονάδες του είδους *Pseudomonas chlororaphis* και η περιοχή προέλευσης ήταν η Ελβετία (Πιν. 6). Το είδος του ιχθύος που είχε προσβληθεί ήταν η πέρκα και η πέστροφα, ενώ στην Τρίτη περίπτωση το είδος ήταν άγνωστο.

Η 4<sup>η</sup> ομάδα είναι αυτή με το μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων (82) και περιλαμβάνει 18 διαφορετικά είδη ιχθύων (Πιν. 5). Το είδος *Oncorhynchus mykiss* ανιχνεύτηκε 11 φορές στην περιοχή της Φιλανδίας. Τα δείγματα συλλέχτηκαν από το δέρμα του ιχθύος και μικροοργανισμός που βρέθηκε ήταν ψευδομονάδες μη ταυτοποιημένες (*Pseudomonas sp.*). Ο σολομός (*Salmo salar*) βρέθηκε σε 7 περιπτώσεις, από άγνωστη περιοχή προέλευσης. Τα δείγματα συλλέχτηκαν από το πεπτικό σύστημα του ιχθύος και οι ψευδομονάδες που αναγνωρίστηκαν ως υπεύθυνες για την επιμόλυνση ήταν οι *Pseudomonas sp.* με στελέχη S227, S236, S224, S226, S230, S231 και S237. Το είδος *Thymallus baicalensis* βρέθηκε και αυτό σε 7 περιπτώσεις. Τα δείγματα αυτά προήλθαν από τη Ρωσία, τη περιοχή του Ιρκουτσκ και ειδικότερα τη λίμνη Βαϊκάλη. Τα δείγματα συλλέχτηκαν από το έντερο του ξενιστή και το είδος ψευδομονάδας που ανιχνεύτηκε ήταν μη ταυτοποιημένο (*Pseudomonas sp.*). Το είδος *Cottocomephorus grewingki* βρέθηκε 6 φορές, στην περιοχή Ιρκουτσκ, στη λίμνη Βαϊκάλη. Σε 5 περιπτώσεις το δείγμα συλλέχτηκε από το δέρμα του ιχθύος και σε μία από τη βλέννα του δέρματος. Οι μικροοργανισμοί που ανιχνεύτηκαν ήταν

τα στελέχη Zh1-1, Zh1-2, Zh1-3, Zh1-4, Zh2-4, Zh1N-3 μη ταυτοποιήσιμων ψευδομονάδων. Το είδος *Abramis brama* προήλθε και αυτό από τη περιοχή του Ιρκουτσκ και ειδικότερα από τη λίμνη Βαϊκάλη. Τα δείγματα σε όλες τις περιπτώσεις συλλέχτηκαν από τη βλέννα του δέρματος και οι ψευδομονάδες που ανιχνεύτηκαν ήταν *Pseudomonas sp.* με τα στελέχη L1N-1, L1N-10, L1N-12, L1N-15, L1-8. Από την λίμνη Βαϊκάλη προήλθαν και τα επόμενα 4 είδη. Το *Coregonus migratorius* βρέθηκε σε 3 περιπτώσεις, και τα είδη *Lymnaea jacutica*, *Nucleocyclus radiat* και *Coregonus lavaretus pidschian* από μία. Οι ψευδομονάδες που ανιχνεύτηκαν ήταν *Pseudomonas sp* σε κάθε περίπτωση. Τα δείγματα που συλλέχτηκαν ήταν στην πρώτη περίπτωση από το έντερο του ιχθύος και στις επόμενες από τον πεπτικό του σωλήνα. Το είδος *Dicologlossa cuneata* βρέθηκε σε 4 περιπτώσεις και το είδος *Pelteobargus fulvidraco* σε δύο. Η περιοχή προέλευσης και ο ιστός από τον οποίο προήλθαν τα δείγματα είναι άγνωστος. Οι υπεύθυνες ψευδομονάδες για την επιμόλυνση βρέθηκαν να είναι στην πρώτη περίπτωση το είδος *Pseudomonas baetica* και στη δεύτερη το *Pseudomonas sp.* Τα είδη ιχθύων *Callichthys callichthys* και *Tor putitora* βρέθηκαν σε δύο και μία περιπτώσεις αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση η περιοχή προέλευσης είναι άγνωστη, ενώ στη δεύτερη είναι η Ινδία. Ο ιστός από τον οποίο συλλέχτηκαν τα δείγματα ήταν το Fish ball και το μάτι, ενώ οι ψευδομονάδες που βρέθηκαν να προκαλούν την μόλυνση ήταν οι *Pseudomonas sp.* V6, *Pseudomonas sp.* V8 για το είδος *Callichthys callichthys* και το *Pseudomonas lurida* για το *Tor putitora*. Είδος τόνου και ξιφία βρέθηκαν από μία και δύο φορές. Ο μικροοργανισμός που βρέθηκε υπεύθυνος ήταν σε 2 δείγματα το είδος *Pseudomonas fragi* και σε μία το είδος *Pseudomonas fluorescens*. Άλλα στοιχεία δεν για τις περιπτώσεις αυτές δεν είναι διαθέσιμα. Σε 3 περιπτώσεις το είδος του ιχθύος είναι άγνωστο. Στην πρώτη από αυτές το δείγμα προήλθε από την Ιαπωνία και συλλέχτηκε

από το περιεχόμενο του εντέρου, ενώ ο μικροοργανισμός που βρέθηκε ήταν το *Pseudomonas sp.*. Το επόμενο δείγμα προήλθε από τον κόλπο του Κουβέιτ και συλλέχθηκε από την μεμβράνη του ιχθύ και το είδος ψευδομονάδων ήταν το ξανά το *Pseudomonas sp.*. Για την τελευταία περίπτωση το είδος ψευδομονάδων που ανιχνεύτηκε ήταν το *Pseudomonas mendocina*. Περαιτέρω στοιχεία δεν ήταν διαθέσιμα στην βάση δεδομένων. Σε 24 περιπτώσεις τα δείγματα προήλθαν από τη Βραζιλία και ειδικότερα από έναν παραπόταμο του Αμαζονίου, τον ποταμό Ταπάχο. Για το είδος των ιχθύων γνωρίζουμε μόνο ότι πρόκειται για εμπορικά είδη του Αμαζονίου. Στοιχεία για τον ιστό που συλλέχθηκαν τα δείγματα δεν υπάρχουν. Τα είδη των ψευδομονάδων που βρέθηκαν ποικίλουν. Το είδος *Pseudomonas putida* ανιχνεύτηκε σε 12 περιπτώσεις, το είδος *Pseudomonas phychrophila* σε 6 περιπτώσεις και τα είδη *Pseudomonas fluorescens* και *Pseudomonas syringae* σε τρεις.

Ομοίως με την 3<sup>η</sup> ομάδα, έτσι και η 5<sup>η</sup> ομάδα περιελάμβανε μικρό αριθμό δειγμάτων. Η περιοχή προέλευσης των δειγμάτων αυτών ήταν σε κάθε από τις 4 περιπτώσεις η Φιλανδία και το είδος του ιχθύος που είχε προσβληθεί ήταν ο *Oncorhynchus mykiss* (Πιν. 6). Τα δείγματα που συλλέχθηκαν προερχόντουσαν από το δέρμα του ιχθύος. Τέλος ο υπεύθυνος οργανισμός επιμόλυνσης βρέθηκε να είναι ο *Rhodococcus sp.*

Η 6<sup>η</sup> ομάδα ήταν και αυτή με μικρό αριθμό δειγμάτων και περιελάμβανε συνολικά μόλις 9 δείγματα (Πιν. 6). Το κύριο είδος ψευδομονάδων που ανιχνεύτηκε ήταν το *Pseudomonas anguilliseptica* και κάθε δείγμα που βρέθηκε επιμολυσμένο με το συγκεκριμένο μικροοργανισμό προήλθε από τη λίμνη Μόγκαν, που βρίσκεται στην Τουρκία. Το δείγμα συλλέχθηκε από την επιφάνεια του δέρματος του ιχθύος σε κάθε περίπτωση ενώ το είδος των ιχθύων που ήταν 5 είναι άγνωστο. Σε 3 ακόμα

περιπτώσεις το είδους του ιχθύος και η περιοχή προέλευσης ήταν άγνωστη. Τα δείγματα αυτά όμως συλλέχτηκαν από την επιφάνεια του δέρματος του ιχθύος και οι υπεύθυνοι για την επιμόλυνση μικροοργανισμοί βρέθηκαν να είναι ψευδομονάδες μη ταυτοποιημένου είδους του στελέχους F315, F316 και F320. Τέλος το στέλεχος J465 ήταν υπεύθυνο για την επιμόλυνση ενός δείγματος του είδους *Clupea harengus* που προήλθε από τη βόρεια θάλασσα των ακτών του Ηνωμένου Βασιλείου. Το δείγμα τέλος είχε συλλεχτεί από το έντερο του ιχθύος.

#### 4. Συζήτηση

Τα κύρια είδη ψευδομονάδων που ανιχνεύτηκαν και θεωρήθηκαν υπεύθυνα για τη επιμόλυνση των ιχθύων στο σύνολο των ομάδων αποτελούνταν από 13 αναγνωρισμένα είδη και τα μη ταυτοποιημένα είδη ψευδομονάδων (Πιν. 7). Αναλυτικότερα τα είδη αυτά ήταν τα εξής: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas taiwanensis*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas baetica*, *Pseudomonas phychrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas anguilliseptica* και *Pseudomonas lurida*. Επιπλέον όμως ανιχνεύτηκε μεγάλος αριθμός δειγμάτων με μη ταυτοποιημένα είδη ψευδομονάδων (*Pseudomonas sp.*). Από τα είδη που βρέθηκαν να επιμολύνουν τους ιχθείς της συγκεκριμένης εργασίας, αυτοί που ανιχνεύτηκαν περισσότερο ήταν τα είδη *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas phychrophila*.

Συνοψίζοντας στην 1<sup>η</sup> ομάδα ως κύριος οργανισμός επιμόλυνσης βρέθηκε το είδος *Pseudomonas aeruginosa* που ανιχνεύτηκε σε 8 από τις 14 συνολικά περιπτώσεις. Η Ινδία ήταν η περιοχή από την οποία προήλθαν τα περισσότερα από τα δείγματα και ειδικότερα τα δείγματα που ήταν επιμολυσμένα με το είδος *Pseudomonas aeruginosa* προερχόντουσαν όλα από την Ινδία. Το είδος *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο και ο τρίτος συνηθέστερα απομονωμένος οργανισμός. Το συγκεκριμένο είδος μολύνει ένα ευρύ φάσμα ειδών, ενώ επιδεικνύει υψηλό βαθμό αντοχής στα αντιβιοτικά (Phennicie *et al.*, 2010).

Στοιχεία για τον ιστό από τον οποίο πάρθηκε το δείγμα σε 12 από τις 14 περιπτώσεις δεν ήταν διαθέσιμα.

Ένα μεγάλο εύρος μικροβιακής χλωρίδας είναι σε επάρκεια σε υδρόβια συστήματα και σχετίζεται με τους ιχθύες που ζουν στον πυθμένα των ποταμών ή

λιμνών (Hossain *et al.*, 2006). Παρατηρήθηκε, ότι τα είδη που βρέθηκαν επιμολυσμένα με *Pseudomonas aeruginosa* ήταν είδη που διαβιούν σε γλυκά ή υφάλμυρα, συνήθως όμως σε ποτάμια με λασπώδη υποστρώματα (*Oreochromis niloticus*, *Neogobius fluviatilis*, *Etiropus maculatus*, *Etiropus suratensis*). Είδη όπως η τιλάρια είναι σύνηθες να καλλιεργούνται σε χωμάτινες δεξαμενές στην Ινδία και εάν οι συνθήκες υγιεινής δεν είναι οι κατάλληλες οι ιχθύες στρεσάρονται και γίνονται πιο ευπαθείς στις ασθένειες.

Η 2<sup>η</sup> ομάδα περιελάμβανε 29 συνολικά δείγματα ιχθύων. Απο αυτά τα 23 δείγματα προέρχονταν από τη λίμνη της Ρωσίας, Βαϊκάλη και δύο ήταν τα είδη με το μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων (20) στην ομάδα (*Thymallus baicalensis*, *Coregonus migratorius*). Τα είδη ψευδομονάδων όμως ήταν άγνωστα (*Pseudomonas sp.*) σε κάθε από τις παραπάνω περιπτώσεις. Τα είδη ψευδομονάδων αυτά δεν μπορούσαν να αναγνωστούν είτε γιατί δεν υπήρχε αντιστοιχία 100% με κάθε άλλο είδος ψευδομονάδων που υπήρχε διαθέσιμο στη βάση δεδομένων της Genbank, είτε γιατί τα συγκεκριμένα δείγματα ιχθύων ήταν επιμολυσμένα με πάνω από ένα είδη ψευδομονάδων και έτσι η αναγνώριση του επικρατούντος και υπευθύνου βακτηρίου για την μόλυνση δεν ήταν δυνατή. Ενώ δεν είναι γνωστό το είδος των ψευδομονάδων, παρατηρείται ότι τα δείγματα αυτά προήλθαν από το έντερο του ιχθύος.

Στην 3<sup>η</sup> ομάδα το είδος ψευδομονάδων που επιμόλυσε είδος πέρκα βρέθηκε το *P.chlororaphis*. Στις ιχθυοκαλλιέργειες, η χρήση ειδών βακτηρίων όπως το *P.chlororaphis* γίνεται για την καταπόλεμιση άλλων βακτηριακών ασθενειών με ενθαρυντικά αποτελέσματα για τη βιομηχανία (Nour and El-Ghiet 2009). Έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Gobeli *et al.*, 2009 έδειξε ότι στέλεχος του συγκεκριμένου βακτηρίου βοήθησε στη μείωση των θνησιμοτήτων που προκαλούνταν από το *Aeromonas sobria* σε νεαρά άτομα του είδους *Perca fluviatilis*.

Η 4<sup>η</sup> ομάδα περιελάμβανε είδη που στην πλειοψηφία τους ζουν σε γλυκά ή υφάλμυρα νερά σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Τα είδη που ξεχώρισαν σε αριθμό ήταν τα *Oncorhynchus mykiss*, *Thymallus baicalensis*, *Cottocomephorus grewinkii* και οι περιοχή προελεύσεώς τους η Φιλανδία και η Ρωσία αντίστοιχα. Για τις 3 αυτές περιπτώσεις το είδος των ψευδομονάδων ήταν άγνωστο (*Pseudomonas sp.*) ενώ το δείγμα συλλέχτηκε ομοίως από το δέρμα, και το έντερο. Λόγω των περιορισμένων στοιχείων που είναι διαθέσιμα δεν είναι δυνατό να καταλήξουμε σε κάποιο συμπέρασμα. Στο περιβάλλον των περιοχών όπου συλλέχτηκαν τα δείγματα κυριαρχεί το *Pseudomonas psychrophila* που αναπτύσσεται σε ψυχρά περιβάλλοντα (Yumoto *et al.*, 2001).

Στην ομάδα αυτή όμως άνηκαν και 24 δείγματα ιχθύων που ζουν σε γλυκά νερά και που προέρχονταν από την Βραζιλία και τον ποταμό Tapajos. Ο Ardura *et al.*, 2013 πραγματοποίησε έρευνα που σχετιζόταν με την ανίχνευση διαφόρων ειδών ψευδομονάδων σε είδη ιχθύων που ήταν προς πώληση στην αγορά της περιοχής Manaus της Βραζιλίας και προήλθαν από τον ποταμό Tapajos και τον ποταμό Negro (παραπόταμοι του Αμαζονίου). Η έρευνα αυτή έδειξε ότι οι ιχθύες που προήλθαν από τον ποταμό Tapajos ήταν επιμολυσμένοι με 5 διαφορετικά είδη ψευδομονάδων. Τα είδη αυτά ήταν ίδια με τα είδη που καταγράφηκαν στην παρούσα έρευνα και ήταν τα *Pseudomonas putida*, *P. psychrophila*, *P. fluorescens*, *P. fragi* και *P. syringae*. Η ταυτοποίηση των συγκεκριμένων ειδών ψευδομονάδων έγινε μέσω της σύγκρισης του 16S rDNA και της τράπεζας αναφοράς αλληλουχιών της GenBank και τα αποτελέσματα παρουσίασαν ομοιότητα 100%. Ένα από τα συμπεράσματα που κατέληξε η συγκεκριμένη έρευνα ήταν ότι τα είδη των ψευδομονάδων που βρέθηκαν υπεύθυνα για την επιμόλυνση είναι ενδημικά παρόντα στην περιοχή.

Το *Pseudomonas fluorescens* θεωρείται ως ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο και το γεγονός ότι στον ποταμό Tarajos έχουν αναφερθεί αυξημένα επίπεδα stress στους ιχθύες λόγω εργασιών μεταλλείων (Uryu *et al.*, 2001), ίσως εξηγεί την παρουσία του συγκεκριμένου είδους ψευδομονάδας. Επίσης αποτελεί ένα κυρίαρχο συστατικό των οικοσυστημάτων του γλυκού νερού και έχει συσχετιστεί με σηψαιμία και έλκος σε ένα ευρύ φάσμα ιχθύων. (Toranzo *et al.*, 2005). Είναι λοιπόν ένα παθογόνο που απασχολεί και τις ιχθυοκαλλιέργειες και προσβάλλει πολλά είδη ιχθύων συμπεριλαμβανομένου του Ινδικού και του κοινού κυπρίνου (Khalil *et al.*, 2010) (Mastan 2013). Το είδος *Pseudomonas putida* έχει αναφερθεί ότι προκαλεί λοιμώξεις στους ιχθύες όπως η πέστροφα και σχετίζεται με το stress (Altinok *et al.*, 2006). Το είδος *Pseudomonas fragi* έχει σχετιστεί με την αλλοίωση των θαλασσινών και έτσι είναι δυνατό η επιμόλυνση να είναι αποτέλεσμα επεξεργασίας του ιχθύος πολύ πριν την αποθήκευσή του. Μπορεί όμως να είναι και αποτέλεσμα ευκαιριακής αύξησης των βακτηρίων από ψάρια εκτεθειμένα χωρίς προστασία στο περιβάλλον. Το *Pseudomonas psychrophila* είναι αφύσικο να βρέθηκε στα συγκεκριμένα δείγματα αφού συνήθως αυξάνεται κάτω από ψυχρές συνθήκες. (Yumoto *et al.*, 2001). Είναι δυνατό να είναι ευκαιριακοί αποικιστές κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του δείγματος σε δωμάτια με χαμηλή θερμοκρασία πριν την πωλησή τους. Το είδος *Pseudomonas syringae* αναπτύσσεται ταχύτερα κάτω από συνθήκες που επικρατούν σε τροπικά περιβάλλοντα (Hirano and Upper 1990).

Η 6<sup>η</sup> ομάδα περιελάμβανε 9 δείγματα, με προέλευση από την Τουρκία, λιμνη Morgan και το κύριο βακτήριο που ήταν υπεύθυνο για την επιμόλυνση ήταν το *Pseudomonas anguilliseptica*. Το είδος αυτό θεωρείται ως το πιο σημαντικό παθογόνο βακτήριο για τα καλλιεργούμενα είδη (Wakabayashi and Egusa 1972).



Στην παρούσα έρευνα, έγινε προσπάθεια να προσδιοριστεί εάν οι ψευδομονάδες που αλλοιώνουν περισσότερα από ένα είδη ιχθύων είναι φυλογενετικά ίδιες και αν υπάρχουν είδη ψευδομονάδων που να μολύνουν είδη ιχθύων από περιοχές διαφορετικής προέλευσης. Ο στόχος αυτός δεν πραγματοποιήθηκε. Σε αυτό συνέβαλε ότι η ονομασία του είδους του ιχθύος και των ψευδομονάδων δεν ήταν διαθέσιμες σε αρκετές περιπτώσεις. Επίσης συχνά απουσίαζαν πληροφορίες σχετικές με την περιοχή προέλευσης του δείγματος. Ανύπαρκτα ήταν και πιο λεπτομερεί στοιχεία σχετικά με την προέλευση των δειγμάτων (Θάλασσα-υδατοκαλλιέργειες). Επιπλέον ο αριθμός δειγμάτων που κατανεμήθηκε σε κάποιες ομάδες ήταν αρκετά μικρός και περιελάμβανε μόνο ένα είδος ιχθύος και αντίστοιχα ψευδομονάδων οπότε δεν ήταν δυνατή η συσχετισή του με ιχθείς που άνηκαν σε διαφορετικές ομάδες. Με βάση λοιπόν την ομαδοποίηση των δειγμάτων που έγινε στα πρώτα στάδια της εργασίας και την ακαταλληλότητα των στοιχείων δεν ήταν δυνατό να οδηγηθούμε σε ασφαλή συμπεράσματα. Απαιτείται λοιπόν καλύτερος σχεδιασμός σε μελλοντικές έρευνες με παρόμοια χαρακτηριστικά και πιο συγκεκριμένα σε παρόμοια εργασία θα πρέπει τα δείγματα να είναι καλύτερα κατανεμημένα και ομαδοποιημένα και τα επιμέρους στοιχεία των δειγμάτων στα οποία θα βασιστεί η έρευνα πιο λεπτομερεί.

## 5. Βιβλιογραφία

- Altinok I., Kayisa S., Capkin E., 2006. *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture*. 261:850–855
- Ardura A., Linde R.A., Garcia-Vasquez E., 2013. Genetic detection of *Pseudomonas* spp. in commercial Amazonian fish. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 10:3954-3966
- Ashie I.N.A., Smith J.P., Simpson B.K., 1996. Spoilage and shelf life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 36: 87-121
- Broekaert K., Heyndrickx M., Herman L., Devlieghere F., Vlaemynck G., 2011. Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. *Food Microbiology*. 28:1162-1169
- Dalgaard P., 2000. Fresh and lightly preserved seafood. In *Shell-Life Evaluation of Foods*, edn 2. Edited by Man CMD, Jones AA. London: Aspen Publishers, Inc:2000:110-139
- El-Hady M., Samy A.A., 2011. Molecular typing of *Pseudomonas* species isolated from some cultured fishes in Egypt. *Global Veterinaria*. 7(6):576-580
- Franzetti L., Scarpellini M., 2007. Characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*. 57(1):39-47
- García-Ortega, A., Hernández, C., Abdo-delaParra, I., González-Rodríguez, B., 2002. Advances in the nutrition and feeding of the bullseye puffer *Sphoeroides annulatu*. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-

- Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.
- Gobeli S., Goldschmidt-Clermont E., Frey J., Burr S.E., 2009. *Pseudomonas chlororaphis* strain JF3835 reduces mortality of juvenile perch, *Perca fluviatilis* L., caused by *Aeromonas sobria*. *Journal of Fish Diseases*. 32(7): 597-602
- Gram L., Huss H.H. (2001). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33:121-137.
- Gramm L., Dalgaard P., 2002. Fish spoilage bacteria problems and solutions. *Curr Opin Biotechnol*. 13:262-266
- Hirano S.S., Upper C.D., 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annu. Rev. Phytopathol*. 28: 155–177.
- Hossain I., Neela F., Hussain A.M., Rahman H.M., Suzuki S., 2006. Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in swamps and its infection to *Oreochromis niloticus*. *Journal of Bio-sci*. 14:77-81
- Jaturapahu T., Puttinaowarat S., Somsiri T., 2005. Detection and identification of *Pseudomonas* spp. by polymerase chain reaction reverse cross blot hybridization(PCR-RCBH) with 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer probes. In P. Walker, R. Lester and M.G. Bondad-Reantaso (eds). Diseases in Asian Aquaculture V, pp. 447-456. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Khalil S.A., Khalil R.H., Saad T. T., Safaa M. M., 2010. Studies on *Pseudomonas* septicemia among cultured *Oreochromis niloticus*, *Journal of Aquaculture Association of Saudi Arabia*. 5(1):55-60

- Koutsoumanis K., Nychas G.J.E., 1999. Chemical and sensory changes associated with microbiological flora of Mediterranean boque (*Boops boops*) stored aerobically at 0, 3, 7 and 10 °C. *Appl Environ Microbiol* 65:698-706
- Lehane L., Olley J., 2000. Histamine fish poisoning revisited. *Int. Journal of Food Microbiology*. 30:1-37
- Mastan S.A., 2013. Pseudomonas septicemia in *labeo rohita* (ham.) and *cyprinus carpio* (linn.) in andhra pradesh–natural occurrence and artificial challenge. *International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 5(2): 564-568
- Nour E., El-Ghiet E.N.A., 2011. Efficacy of Pseudomonas fluorescens as Biological Control Agent against Aeromonas hydrophila Infection in Oreochromis niloticus. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 3 (6): 564-569
- Parlapani F.F., Mallouchos A., Haroutounian S.A., Boziaris I.S., 2014b. Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology* 189:153–163
- Parlapani F.F., Meziti A., Kormas K.Ar., Boziaris I.S., 2014a. Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S Rrna gene analysis. *Food Microbiology* 33:85-89
- Patel S., Panchal H., Anjaria K., 2012. Phylogenetic analysis of some Leguminous trees using ClustalW2 bioinformatics tools. International Conference on Bioinformatics and Biomedicine Workshop.
- Phennicie R.T., Sullivan M.J., Singer T.J., Yoder A.J., Kim C., 2010. Specific Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Zebrafish Is Mediated by

- the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Infected Immunology*. 78(11): 4542–4550
- Stackebrandt E., Goebel B.M., 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 846-849
- Toranzo A.E., Magarinos B., Romalde L.J., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*. 246:37-61.
- Toranzo A.E., Magarinos B.A., Jesus L., Romalde R., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture Systems. *Aquaculture* 246: 37-46
- Tryfinopoulou P., Tsakalidou E., Nychas E.G.J., 2002. Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage Gilt-head Sea Bream stored under various conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 65-72
- Uryu Y., Malm O., Thornton I., Payne I., Cleary D. , 2001. Mercury contamination of fish and its implications for other wildlife of the Tapajós Basin, Brazilian Amazon. *Conserv. Biology*. 15: 438–446.
- Wakabayashi H., Egusa S., 1972. Characterization of *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond cultured eel (*Anguilla japonica*). *Bull. Japan Soc. fish* 38:577-587
- Wogu M.D., Maduakor C.C., 2010. Evaluation of microbiological spoilage of some aquacultured fresh fish in Benin City Nigeria. *Ethiopian Journal of Environmental Studies and Management*. 13(3):18-22
- Yumoto I., Kusano T., Shingyo T., Nodasaka Y., Matsuyama H., Okuyama H., 2001. Assignment of *Pseudomonas* sp. strain E-3 to *Pseudomonas psychrophila*

spp. nov., a new facultatively psychrophilic bacterium. *Extremophiles* 25: 343–349

Διαμαντοπούλου Χ., 2014. Εργαλεία βιοπληροφορικής για την ανάλυση των φαρμακογενωμικών δεδομένων. Διπλωματική εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Ηλεκτρολογών Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών, Τομέας Συστημάτων Μεταδοσης Πληροφορίας και Τεχνολογίας Υλικών, Αθήνα, Σεπτέμβριος 2014

### **Διαδίκτυο**

http1: [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)

http2: [www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)

http3: [www.fishbase.sinica.edu.tw/Summary/SpeciesSummary.php?id=24](http://www.fishbase.sinica.edu.tw/Summary/SpeciesSummary.php?id=24) (<http://www.fao.org/fishery/species/2886/en>)

http4: [www.fishbase.org/summary/268](http://www.fishbase.org/summary/268)

http5: [www.fishbase.org/summary/236](http://www.fishbase.org/summary/236)

http6: [www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo\\_salar/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/en)

http7: [www.fishbase.org/summary/239](http://www.fishbase.org/summary/239)

http8: [www.fishbase.sinica.edu.tw/Summary/SpeciesSummary.php?id=2](http://www.fishbase.sinica.edu.tw/Summary/SpeciesSummary.php?id=2)

http9: [www.fishbase.org/summary/8586](http://www.fishbase.org/summary/8586)

http10: [www.fishbase.org/summary/4788](http://www.fishbase.org/summary/4788)

http11: [www.fishbase.org/summary/4720](http://www.fishbase.org/summary/4720)

http12: [www.fishbase.org/summary/8703](http://www.fishbase.org/summary/8703)

http13: [www.fishbase.org/summary/Etroplus-suratensis.html](http://www.fishbase.org/summary/Etroplus-suratensis.html)

http14: [fishbase.org/summary/4293](http://fishbase.org/summary/4293)

http15: [www.fishbase.org/summary/10922](http://www.fishbase.org/summary/10922)

http16: [www.fishbase.org/summary/9194](http://www.fishbase.org/summary/9194)

http17: [www.fao.org/fishery/species/2298/en](http://www.fao.org/fishery/species/2298/en)

http18: [www.fishbase.org/summary/Perca-fluviatilis.html](http://www.fishbase.org/summary/Perca-fluviatilis.html)

http19: [www.fishbase.org/summary/526](http://www.fishbase.org/summary/526)

http20: [www.fishbase.org/summary/Pelteobagrus-fulvidraco.html](http://www.fishbase.org/summary/Pelteobagrus-fulvidraco.html)

http21: [www.fishbase.org/summary/147](http://www.fishbase.org/summary/147)

http22: [www.fishbase.org/summary/226](http://www.fishbase.org/summary/226)

http23: [www.flmnh.ufl.edu/fish/Gallery/Descript/Swordfish/Swordfish.html](http://www.flmnh.ufl.edu/fish/Gallery/Descript/Swordfish/Swordfish.html)

http24: [www.ebi.ac.uk/Tools/msa/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/)

## Πίνακες

**Πίνακας 1:** Παρουσία ειδών ιχθύων ανά ομάδα, χρησιμοποιώντας το κριτήριο ομοιότητας (>98%).

Είδος	I	II	III	IV	V	VI
<i>Cottocomephorus grewingki</i>	■	■		■		
<i>Etroplus maculatus</i>	■					
<i>Gobi fish</i>	■					
<i>Blue Gourami</i>	■					
<i>Oreochromis niloticus</i>	■					
<i>Etroplus suratensis</i>	■					
<i>Thymallus baicalensis</i>		■		■		
<i>Coregonus migratorius</i>		■		■		
<i>Coregonus lavaretus pidschian</i>		■		■		
<i>Sphoeroides annulatus</i>		■		■		
<i>Callichthys callichthys</i>		■		■		
<i>Pseudosciaena crocea</i>		■		■		
<i>Red rock</i>		■		■		
<i>Tor putitora</i>		■		■		
<i>European perch</i>			■			
<i>Trout</i>			■			
<i>Oncorhynchus mykiss</i>				■	■	
<i>Salmo salar</i>				■	■	
<i>Dicologlossa cuneata</i>				■	■	
<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>				■	■	
<i>Lymnaea jacutica</i>				■	■	
<i>Nucleocyclus radiat</i>				■	■	
<i>Abramis brama</i>				■	■	
<i>Thynnus Thynnus</i>				■	■	
<i>Xiphias gladius</i>				■	■	
<i>Clupea harengus</i>						■



**Πίνακας 2:** Παρουσιάζεται ο ιστός στον οποίο ανιχνεύτηκε η αλλοίωση στους ιχθύες κάθε ομάδας από την επιμόλυνση με ψευδομονάδες.

Ιστός	Ομάδες					
	I	II	III	IV	V	VI
Skin blenna	■			■		
Skin ulcer		■		■		
Skin					■	
Gut	■	■		■		
lower Gut						■
Stomach				■		
Content				■		
Intenstinal				■		
Intenstinal Tract				■		
Liver		■				
Spleen		■				
Eye		■		■		
Ball				■		
Surface Mucus						■
Biofilm				■		

**Πίνακας 3:** Συγκεντρωτικός πίνακας της 1<sup>ης</sup> ομάδας. Παρουσιάζονται ο αριθμός δειγμάτων κάθε είδους, το είδος ψευδομονάδων που ανιχνεύτηκαν και η περιοχή προέλευσης του δείγματος.

<b>Ομάδα I</b>			
<b>Αριθμός</b>	<b>Είδος Ιχθύος</b>	<b>Είδος ψευδομονάδων</b>	<b>Περιοχή προέλευσης</b>
2	<i>O. niloticus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Ινδία
2	<i>N. luviatilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Ινδία
1	<i>E.suratensis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Ινδία
1	<i>E.maculatus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Άγνωστο
2	Άγνωστο	<i>P. aeruginosa</i>	Ινδία
1	Άγνωστο	<i>P. aeruginosa</i>	Βραζιλία
1	Άγνωστο	<i>P.fragi</i>	Κίνα
1	Άγνωστο	<i>P.putida</i>	Άγνωστο
1	<i>C.grewingki</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Ρωσία
1	<i>Blue.Gourami</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Ινδία
1	Άγνωστο	<i>Pseudomonas sp.</i>	Βραζιλία

**Πίνακας 4:** Συγκεντρωτικός πίνακας της 2<sup>ης</sup> ομάδας. Παρουσιάζονται ο αριθμός δειγμάτων κάθε είδους, το είδος ψευδομονάδων που ανιχνεύτηκαν και η περιοχή προέλευσης του δείγματος.

<b>Ομάδα II</b>			
<b>Αριθμός</b>	<b>Είδος Ιχθύος</b>	<b>Είδος ψευδομονάδων</b>	<b>Περιοχή προέλευσης</b>
12	<i>T.baicalensis</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Ρωσία
8	<i>C.migratorius</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Ρωσία
1	<i>C. grewingki</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Ρωσία
1	<i>C.callichthys</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Κίνα
1	<i>Red rock</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Άγνωστη
1	<i>P.crocea</i>	<i>P. putida</i>	Κίνα
1	<i>P.crocea</i>	<i>P.plecoglossicida</i>	Άγνωστη
1	<i>S.annulatus</i>	<i>P.taiwanensis</i>	Μεξικό
1	<i>T.putitora</i>	<i>P.koreensis</i>	Άγνωστη

**Πίνακας 5:** Συγκεντρωτικός πίνακας της 4<sup>ης</sup> ομάδας. Παρουσιάζονται ο αριθμός δειγμάτων κάθε είδους, το είδος ψευδομονάδων που ανιχνεύτηκαν και η περιοχή προέλευσης του δείγματος.

<b>Ομάδα IV</b>			
<b>Αριθμός</b>	<b>Είδος Ιχθύος</b>	<b>Είδος ψευδομονάδων</b>	<b>Περιοχή προέλευσης</b>
5	<i>D.cuneata</i>	P.baetica	Άγνωστο
1	<i>T.putitora</i>	P.lurida	Ινδία
2	<i>T.thynnus</i>	P.fragi	Άγνωστο
1	<i>X.gladius</i>	P.fluorescens	Άγνωστο
12	C.Amazonian fish	P.putida	Βραζιλία
6	C.Amazonian fish	P.phychrophila	Βραζιλία
3	C.Amazonian fish	P. fluorescens	Βραζιλία
3	C.Amazonian fish	P.syringae	Βραζιλία
11	<i>O. mykiss</i>	Pseudomonas sp.	Φιλανδία
7	<i>S.salar</i>	Pseudomonas sp.	Άγνωστο
7	<i>T.baicalensis</i>	Pseudomonas sp.	Ρωσία
6	<i>C. grewinki</i>	Pseudomonas sp.	Ρωσία
5	<i>A. brama</i>	Pseudomonas sp.	Ρωσία
1	<i>L.jacutica</i>	Pseudomonas sp.	Ρωσία
1	<i>N.radiat</i>	Pseudomonas sp.	Ρωσία
3	<i>C.migratorius</i>	Pseudomonas sp.	Ρωσία
1	<i>C. lavaretus pidschian</i>	Pseudomonas sp.	Ρωσία
2	<i>P.fulvidraco</i>	Pseudomonas sp.	Άγνωστο
2	<i>C.callichthys</i>	Pseudomonas sp.	Άγνωστο

**Πίνακας 6:** Συγκεντρωτικός πίνακας της 3<sup>ης</sup>, 5<sup>ης</sup> και 6<sup>ης</sup> ομάδας. Παρουσιάζονται ο αριθμός δειγμάτων κάθε είδους, το είδος ψευδομονάδων που ανιχνεύτηκαν και η περιοχή προέλευσης του δείγματος.

<b>Ομάδα III</b>			
Αριθμός	Είδος Ιχθύος	Είδος ψευδομονάδων	Περιοχή προέλευσης
3	<i>E. perch</i>	P.chlororaphis	Ελβετία

  

<b>Ομάδα V</b>			
Αριθμός	Είδος Ιχθύος	Είδος ψευδομονάδων	Περιοχή προέλευσης
4	<i>O. mykiss</i>	Rhodococcus sp.	Φιλανδία

  

<b>Ομάδα VI</b>			
Αριθμός	Είδος Ιχθύος	Είδος ψευδομονάδων	Περιοχή προέλευσης
5	Άγνωστο	P.anguilliseptica	Τουρκία
3	Άγνωστο	Pseudomonas sp.	Άγνωστο

**Πίνακας 7:** Παρουσιάζονται τα είδη ψευδομονάδων (ταυτοποιημένων και μη) που ανιχνεύτηκαν στο σύνολο των ομάδων.

Αριθμός	Είδη ψευδομονάδων
14	<i>Pseudomonas putida</i>
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6	<i>Pseudomonas phychrophila</i>
5	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>
5	<i>Pseudomonas baetica</i>
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
3	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>
3	<i>Pseudomonas syringae</i>
3	<i>Pseudomonas fragi</i>
1	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>
1	<i>Pseudomonas koreensis</i>
1	<i>Pseudomonas lurida</i>
1	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>
80	<i>Pseudomonas sp.</i>

