ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Σύσταση, δομή και οικοφυσιολογικός ρόλος μικροοργανισμικών κοινοτήτων στον πεπτικό σωλήνα εκτρεφόμενων ιχθύων»

ΕΛΕΝΗ ΝΙΚΟΥΛΗ

ΒΟΛΟΣ 2019

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Ελένη Νικούλη, 2019, «Σύσταση, δομή και οικοφυσιολογικός ρόλος μικροοργανισμικών κοινοτήτων στον πεπτικό σωλήνα εκτρεφόμενων ιχθύων»

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής υλοποιήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ στην Ολοκληρωμένη Διαχείριση Θαλάσσιων και Εσωτερικών Υδάτων» και συγχρηματοδοτήθηκε κατά 85% από πόρους του ΧΜ ΕΟΧ περιόδου 2009 – 2014 και κατά 15% από το πρόγραμμα Δημοσίων Επενδύσεων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1) Κωνσταντίνος Αρ. **Κορμάς**, Καθηγητής «Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών», Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, επιβλέπων.
2) Ελένη **Μεντέ**, Καθηγήτρια «Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών», Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, μέλος.
3) Ευθυμία **Αντωνοπούλου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια «Φυσιολογία ζωικών οργανισμών με έμφαση στους ιχθείς», Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, μέλος.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή (με αλφαβητική σειρά)

1) Ευθυμία **Αντωνοπούλου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια «Φυσιολογία ζωικών οργανισμών με έμφαση στους ιχθείς», Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής.
2) Ελισάβετ **Βαρδάκα**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια «Βιολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών με έμφαση στα Τοξικά Φωτοσυνθετικά Βακτήρια», Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης. Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής.
3) Ήρα **Καραγιάννη**, Επίκουρη Καθηγήτρια «Υδροβιολογία», Τμήμα Βιοτεχνολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής.
4) Κωνσταντίνος Αρ. **Κορμάς**, Καθηγητής «Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών», Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Επιβλέπων.
5) Ελένη **Μεντέ**, Καθηγήτρια «Φυσιολογία Θρέψης Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών», Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής.
6) Ιωάννης **Νέγκας**, Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών. Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

7) Σταύρος **Χατζηφώτης**, Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών. Μέλος Εξεταστικής Επιτροπής.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της ζωής μου, που μου ανακαλεί μνήμες και με φορτίζει συναισθήματα. Φθάνοντας λοιπόν στο τέλος του κύκλου των προσπαθειών μου, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους συνοδοιπόρους μου σε αυτό το ταξίδι, για όλες τις χαρές, λύπες, αγωνίες αλλά και επιτυχίες που περάσαμε μαζί!

Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω,

Πρώτον από όλους, τον επιβλέποντα της παρούσας διατριβής, Καθηγητή Κ. Αρ. Κορμά, που με εμπιστεύτηκε και με βοήθησε σε όλες τις φάσεις της παρούσας μελέτης, καθώς και για την εμπιστοσύνη και υπομονή του. Εκτιμώ αφάνταστα ότι δίπλα του έμαθα να κολυμπώ σε βαθιά νερά, ενώ την πρόοδος μου την οφείλω σε μεγάλο βαθμό στην αυστηρότητα και καθοδήγηση του.

Επιπλέον, τα δύο μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, την Καθηγήτρια Ε. Μεντέ και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε. Αντωνοπούλο για την πολύτιμη στήριξη και τις ουσιαστικές παρατηρήσεις τους όλα αυτά τα χρόνια. Την Καθηγήτρια Ε. Μεντέ, οφείλω επίσης να την ευχαριστήσω, για την οικονομική στήριξη που μου παρείχε με τη χορήγηση υποτροφίας το διάστημα 15/11/2016 – 31/12/2016, στα πλαίσια του έργου «AirX: Oxygenation by efficient air diffusion system for aquaculture farms (cages and earth ponds) ΕΘΝΙΚΗ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ, με κωδικό 4538.16, που διαχειρίζεται η Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, τους Διευθυντές Ερευνών του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) Ι. Νέγκα και Σ. Χατζηφώτη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Α.Τ.Ε.Ι.Θ. Ε. Βαρδάκα και την Επίκουρη Καθηγήτρια Π.Ι., Η. Καραγιάννη, που δέχτηκαν εγκάρδια να συμμετάσχουν στην επιτροπή ώστε να ολοκληρωθεί η διδακτορική διατριβή.

Τις εταιρίες «Νηρεύς Ιχθυοκαλλιέργειες», «Ιχθυοτροφεία Μαντέ Ι.ΚΕ.» και «Ζέρβας Κυριαζής ΑΕΓΕ», καθώς και τους Νίκο Παπανδρουλάκη και Μιχάλη Ασδέρη από το ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. Κρήτης (Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών), που μας προσέφεραν άτομα ιχθύων για την διεκπεραίωση πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Παράλληλα, το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ), για την υποτροφία που μου παρείχε στα πλαίσια του προγράμματος «Ολοκληρωμένη Διαχείριση Θαλάσσιων και Εσωτερικών Υδάτων» του Χρηματοδοτικού Μηχανισμού Ευρωπαϊκού Οικονομικού Χώρου 2009-2014 (ΧΜ ΕΟΧ 2009-2014), Μικρό Σχέδιο Επιχορήγησης (ΜΣΕ) ΙΙ «Επιχορηγήσεις σε αποφοίτους της τριτοβάθμιας εκπαίδευσης για σπουδές/έρευνα στον τομέα της διαχείρισης των θαλάσσιων και εσωτερικών υδατικών πόρων σε Ιδρύματα στις δότριες χώρες», και μέσω αυτής καλύφθηκε οικονομικά η μετάβαση και διαμονή μου στη Νορβηγία, για τη διεκπεραίωση του πειράματος που αφορά τη νυμφική εκτροφή του είδους *S. salar*.

Τον καθηγητή Olav Vadstein, που με δέχτηκε στην ερευνητική του ομάδα στο “Norwegian University of Science and Technology (NTNU)” (Τρόντχάιμ, Νορβηγία), καθώς και για τις συμβουλές του και συζητήσεις μας, που αποτέλεσαν για μένα πηγή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

έμπνευσής. Επίσης την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του NTNU Ingrid Bakke, που με χαρά μου μετέδωσε τις γνώσεις της και μέρος της δικής της εμπειρίας.

Τους ανθρώπους που συνεργάστηκα όλα αυτά τα χρόνια στα εργαστήρια που έχω βρεθεί, και τις φιλίες που αποκόμισα με εξαίρετους επιστήμονες όπως η Δρ. Αλεξάνδρα Μεζίτη, που με βοήθησε με τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις της! Επίσης, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την Δρ. Torunn Forberg και την Υποψήφια διδάκτωρ Ragnhild I. Vestrum από το NTNU, γιατί η συνεργασία μου μαζί τους αποτέλεσε μία από τις καλύτερες εμπειρίες μου!

Τους γονείς μου Βάγια και Θανάση, για τις θυσίες που έχουν κάνει για μένα! Τα αδέρφια μου Ανδρέα και Μαρία, καθώς και την οικογένεια της (Γιώργο, Μάρθα και Βάγια), αλλά και τους δεύτερους γονείς μου, τα πεθερικά μου Καλλιόπη και Αντώνη, για την αμέριστη συμπαράσταση τους σε πολύ δύσκολες στιγμές.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον σύντροφο μου Κωνσταντίνο Αποστόλου, που είναι πάντα δίπλα μου στις χαρές και στις λύπες, αλλά και για την κατανόηση και ανοχή του απέναντι στις προτεραιότητες που επέβαλε η επίπονη διεκπεραίωση της διδακτορικής μου διατριβής

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα Διδακτορική διατριβή, επικεντρώθηκε στη μελέτη των αυτόχθονων βακτηριακών κοινοτήτων του γαστρεντερικού συστήματος έξι (6) ειδών εκτρεφόμενων ιχθύων (*Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Diplodus puntazzo*, *Pagrus pagrus*, *Argyrosomous regius* και *Salmo salar*). Σκοπός αποτέλεσε η ανίχνευση παραγόντων που συνθέτουν τις γαστρεντερικές βακτηριακές τους κοινότητες (γεωγραφική θέση – απόσταση, συνθήκες εκτροφής κλπ.), την εύρεση κοινών βακτηριακών ειδών σε αλλοπάτριους και συμπάτριους πληθυσμούς ιχθύων και ο προσδιορισμός του λειτουργικού τους ρόλου στο γαστρεντερικό τους σύστημα. Η βακτηριακή ανίχνευση στο DNA των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε με μεθόδους αλληλούχισης νέας γενιάς (Roche 454 FLX titanium και Illumina MiSeq 2x300), στοχεύοντας την περιοχή V3-V4 του γονιδίου 16S rRNA.

Η μελέτη των γαστρεντερικών βακτηριακών κοινοτήτων σε εκτρεφόμενα άτομα (4-6) αλλοπάτριων πληθυσμών ιχθύων (*S. aurata* και *D. labrax*), από πέντε διαφορετικές και απομακρυσμένες μεταξύ τους μονάδες εκτροφής στην Ελλάδα (Ηγουμενίτσα, Αταλάντη, Γιάλτρα, Χίο, Χανιά), έδειξε ότι η γεωγραφική θέση – απόσταση, δεν επηρέασε σημαντικά τη δομή και σύνθεση των γαστρεντερικών βακτηριακών κοινοτήτων σε διαφορετικούς πληθυσμούς του ίδιου είδους, αλλά ούτε μεταξύ των διαφορετικών ειδών ιχθύων. Μάλιστα ανεξαρτήτου γεωγραφικής θέσης οι ιχθυοπληθυσμοί του κάθε είδους παρουσίασαν μια μικρή ομάδα κοινών OTUs (8 OTUs στο *S. aurata* και 10 στο *D. labrax*), ενώ 5 OTUs βρέθηκαν κοινά και στα δύο είδη, υποδεικνύοντας την παρουσία κοινών βακτηριακών εκπροσώπων ακόμα και μεταξύ διαφορετικών ειδών ιχθύων. Ο λόγος του μικρού αριθμού κοινών OTUs πιθανόν να οφείλεται στις ατομικές μεταβολές που παρατηρήθηκαν στις γαστρεντερικές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

βακτηριακές κοινότητες, ακόμα και σε άτομα μεταξύ των ίδιων πληθυσμών και πιθανόν να σχετίζονται με γενετικούς παράγοντες. Τα βακτηριακά είδη στο γαστρεντερικό σύστημα του κάθε είδους ιχθύος φαίνεται να παρουσιάζουν συνεργατικές αλληλεπιδράσεις και διαδραματίζουν διαφορετικούς βιολογικούς ρόλους στο κάθε είδος που μελετήθηκε (*S. aurata* και *D. labrax*).

Για περαιτέρω μελέτη της επίδρασης της γεωγραφικής θέσης στην σύνθεση και δομή των γαστρεντερικών βακτηριακών κοινοτήτων των ιχθύων, μελετήθηκαν δείγματα μεσέντερου από άτομα (3-5) συμπάτριων εκτρεφόμενων πληθυσμών των ειδών ιχθύων *D. puntazzo*, *P. pagrus*, *A. regius*, *S. aurata* και *D. labrax*. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι παρόλο που οι γαστρεντερικές βακτηριακές τους κοινότητες δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, μόνο ένα μικρό ποσοστό των OTUs (3,9%) βρέθηκε να είναι κοινό μεταξύ των προαναφερθέντων ειδών ιχθύων. Τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν επιλεκτικές πιέσεις, ευνοώντας την εποίκιση και ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών στο γαστρεντερικό σύστημα των πέντε ειδών ιχθύων.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της επίδρασης των συνθηκών εκτροφής στην πρώτη αποίκιση και διαδοχή των βακτηριακών κοινοτήτων σε ιχθύδια των ειδών *S. aurata* και *S. salar*, υπέδειξαν ομοιότητες μεταξύ των εκτρεφόμενων ειδών και των βακτηριακών κοινοτήτων του νερού εκτροφής και των παρεχόμενων τροφών. Ωστόσο πλήρη επικάλυψη μεταξύ αυτών δεν παρατηρήθηκε. Και στις δύο περιπτώσεις, σημαντική παρατήρηση αποτέλεσε η ανίχνευση OTUs στα γονιμοποιημένα αυγά των δύο εκτρεφόμενων ειδών, που δεν ανιχνεύθηκαν στο νερό εκτροφής, υποδεικνύοντας την πιθανή προέλευση τους από το μικροβίωμα των γεννητόρων. Γενικά η τροφή δεν επηρέασε σημαντικά την σύνθεση και δομή των βακτηριακών κοινοτήτων κατά τα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν, ούτε στην περίπτωση της υποκατάστασης του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ιχθυελαίου με έλαιο φυτικής προέλευσης, σε διατροφική μεταχείριση του είδους *S. salar*. Αντιθέτως, στο είδος αυτό ο παράγοντας της ηλικίας φάνηκε να επιδρά στη βακτηριακή ποικιλομορφία του γαστρεντερικού του συστήματος.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι μέσα από τη φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στις βακτηριακές κοινότητες όλων των ειδών που μελετήθηκαν, καταγράφηκε επικράτηση των βακτηριακών φύλων Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria και Bacteroidetes. Τα OTUs που ανιχνεύθηκαν σχετίζονται με βακτηριακά είδη που απομονώθηκαν από παρόμοια περιβάλλοντα, ενώ μερικά από αυτά (*Weissela cibaria*, *Pseudomonas veronii*, *Ruegeria mobile* κλπ.), όπως έχει καταγραφεί μέσα από άλλες εργασίες, φαίνεται να παρέχουν προβιοτικές ιδιότητες στα είδη ιχθύων που μελετήθηκαν εδώ.

Συνολικά η παρούσα Διδακτορική διατριβή, συμβάλει στην διεύρυνση των γνώσεων μας για την σύνθεση και δομή των γαστρεντερικών βακτηριακών κοινοτήτων των ιχθύων, στις πιθανές βιολογικές τους σχέσεις και προσδιόρισε τους παράγοντες που τη μεταβάλλουν.

Λέξεις κλειδιά: *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Diplodus puntazzo*, *Pagrus pagrus*, *Argyrosomous regius*, *Salmo salar,* βακτήρια, 16S rRNA, πεπτικός σωλήνας, εκτρεφόμενοι ιχθύες, νυμφική εκτροφή, εντερομικροβίωμα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. **ΕΙΣΑΓΩΓΗ** 1

1.1. Θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα – Κύρια είδη εκτροφής 2

1.2. Συστήματα εκτροφής των ειδών *S. aurata* και *D. labrax* 3

1.3. Εκτροφή του είδους *Salmo salar* 6

1.4. Το πεπτικό σύστημα των ιχθύων – Έμφαση στα είδη *S. aurata*, *D. labrax* και *S. salar* 8

1.4.1. Ο ρόλος της γαστρεντερικής μικροβιακής κοινότητας στους ιχθύες και παράγοντες που τη μεταβάλλουν 10

1.4.2. Εναλλακτικές πρωτεϊνικές πηγές στην παρασκευή ιχθυοτρόφων 16

1.4.3. Υποκατάστατα ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου 17

1.4.4. Άλευρα και έλαια φυτικής προέλευσης 18

1.4.5. Μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες (ΜΖΠ) από μη μηρυκαστικά ζώα 19

1.4.6. Υποκατάσταση ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου στις ιχθυοτροφές και επιπτώσεις στη μικροβιακή γαστρεντερική κοινότητα των ιχθύων 22

1.5. Σκοπός της Διδακτορικής διατριβής 23

2. **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ** 24

2.1. Συνθήκες εκτροφής και συλλογή δειγμάτων 24

2.1.1. Αλλοπάτριοι και συμπάτριοι πληθυσμοί ιχθύων 24

2.1.2. Νυμφική εκτροφή του είδος *S. aurata* 26

2.1.3. Νυμφική εκτροφή του είδους *S. salar* 28

2.2. Απομόνωση DNA 32

2.3. Αλληλούχιση 33

2.4. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης 34

2.5. Αναλύσεις αποτελεσμάτων και γραφικές παραστάσεις 34

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 36

3.1. Μελέτη της επίδρασης της γεωγραφικής θέσης στις αυτόχθονες εντερικές βακτηριακές κοινότητες αλλοπάτριων πληθυσμών των ειδών *S. aurata* και *D. labrax* 36

3.2. Προσδιορισμός των αυτόχθονων εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων σε συμπάτριους πληθυσμούς εκτρεφόμενων ιχθύων 42

3.3. Πρώτη εποίκηση και διαδοχή των βακτηριακών κοινοτήτων σε ιχθυονύμφες του είδους *S. aurata* 47

3.4. Διαδοχή βακτηριακών κοινοτήτων εντέρου στα οντογενετικά στάδια του *Salmo salar* 54

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 63

4.1. Μελέτη της επίδρασης της γεωγραφικής θέσης στις αυτόχθονες εντερικές βακτηριακές κοινότητες αλλοπάτριων πληθυσμών των ειδών *S. aurata* και *D. labrax* 63

4.2. Προσδιορισμός των αυτόχθονων εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων σε συμπάτριους πληθυσμούς εκτρεφόμενων ιχθύων 67

4.3. Πρώτη εποίκιση και διαδοχή των βακτηριακών κοινοτήτων σε ιχθυονύμφες του είδους *S. aurata* 70

4.4. Διαδοχή βακτηριακών κοινοτήτων εντέρου στα οντογενετικά στάδια του *S. salar* 76

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 82

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 84

ABSTRACT 127

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ιχθυηρά αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών, θρεπτικών ουσιών και ενέργειας, και καταναλώνονται σε μεγάλες ποσότητες τόσο στις αναπτυσσόμενες, όσο και στις αναπτυγμένες χώρες. Η υψηλή ζήτηση, σε συνδυασμό με την αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού, οδήγησε στην υπεραλίευση τους, η οποία επέφερε αρνητικές κοινωνικές, οικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Καθώς οι φυσικοί ιχθυοπληθυσμοί αδυνατούσαν να καλύψουν τις απαραίτητες ποσότητες για την κατανάλωση από τον άνθρωπο, ο κλάδος των υδατοκαλλιεργειών οδηγήθηκε σε ανάπτυξη (FAO, 2014).

Υδατοκαλλιέργεια, ονομάζεται η εκτροφή υδρόβιων οργανισμών (όπως είδη ιχθύων, οστρακοειδών, καρκινοειδών αλλά και μικροφυκών και μακροφυκών), με τη βοήθεια ανθρωπογενούς παρέμβασης, με σκοπό την παραγωγή βρώσιμων προϊόντων. Η εκτροφή τους λαμβάνει χώρα σε μισθωμένες χερσαίες και θαλάσσιες εκτάσεις, με τους εκτρεφόμενους οργανισμούς να αποτελούν ιδιοκτησία φυσικού ή νομικού προσώπου (FAO, 1988).

Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα διαθέσιμα στατιστικά στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO), στην Ευρώπη το 2014 καταγράφηκαν 130 εκτρεφόμενα είδη, με κυρίαρχα να αποτελούν τα είδη *Mytilus galloprovincialis* (μεσογειακό μύδι), *Salmo salar* (σολομός του Ατλαντικού) και

Εικόνα 1.1: Είδη υδατοκαλλιέργειας στην Ευρώπη (European Aquaculture Online, http://ec.europa.eu/fisheries/cfp/aquaculture/)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Oncorhynchus mykiss (ιριδίζουσα πέστροφα) (Εικ. 1.1), αντιπροσωπεύοντας το 54% της συνολικής παραγωγής, με το δεύτερο να κατέχει τη μεγαλύτερη εμπορική αξία. Η εκτροφή του είδους *S. salar* πραγματοποιείται κυρίως στην Νορβηγία, καθιστώντας την κυρίαρχη χώρα στην Ευρώπη όσον αφορά την παραγωγή προϊόντων υδατοκαλλιέργειας. Η Ισπανία, το Ηνωμένο Βασίλειο και η Γαλλία παράγουν περίπου το 50% των προϊόντων υδατοεκτροφής στην Ευρωπαϊκή Ένωση, με τις χώρες Ιταλία και Ελλάδα να ακολουθούν (με ποσοστό 12% και 8%, αντίστοιχα).

Παρόλα αυτά, η Ελλάδα αποτελεί τη μεγαλύτερη παραγωγό χώρα στην Ε.Ε. όσον αφορά τα είδη *Sparus aurata* (τσιπούρα) και *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι), τα οποία αποτελούν και τα κυρίαρχα είδη εκτροφής της (FAO, 2017).

1.1. Θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα – Κύρια είδη εκτροφής

Η Ελλάδα τις τελευταίες δεκαετίες κατέχει ηγετική θέση στην Ε.Ε. στον τομέα της υδατοκαλλιέργειας. Η γεωγραφική θέση, οι κλιματικές συνθήκες, το έμπειρο ανθρώπινο δυναμικό και η συνεχής εξέλιξη επιστημονικών και τεχνικών γνώσεων, συνέβαλαν στη βιωσιμότητα του κλάδου. Ανεξάρτητα από τις επιπτώσεις της πρόσφατης οικονομικής κρίσης στη Ελλάδα, η χώρα μας εξακολουθεί να παράγει σταθερά 110.000 τόνους μεταποιημένων και μη ιχθύων ετησίως, με το 78% της παραγωγής να εξάγεται σε 32 χώρες, συμβάλλοντας με ποσοστό 0,32% στο Εθνικό Ακαθάριστο Προϊόν (ΑΕΠ) (EUROSTAT, 2018).

Μονάδες θαλάσσιας εκτροφής, συναντώνται κυρίως στις ακόλουθες περιοχές: Δωδεκάνησα, Εύβοια, Κεφαλονιά, Ιθάκη Θεσπρωτία, Φθιώτιδα και Αιτωλοακαρνανία, συμβάλλοντας στην οικονομική ενίσχυση των περιοχών αυτών, μέσω των παρεχόμενων θέσεων εργασίας. Το 2015 καταγράφηκαν 63 εταιρίες ιχθυοκαλλιέργειας, με 336 μονάδες εκτροφής και 36 ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Εκτός από τα είδη *S. aurata*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

(τσιπούρα) και *D. labrax* (λαβράκι) (Εικ.1.2), σε μικρή κλίμακα (2%) εκτρέφονται επίσης τα είδη *Pagrus pagrus* (φαγκρί), *Argyrosomus regius* (κρανιός), *Diplodus puntazzo* (μυτάκι) και *Mugil cephalus* (κέφαλος), κατακτώντας σταδιακά το ενδιαφέρον των καταναλωτών (ΥΠΑΑΤ & ΣΕΘ, 2016).

Εικόνα 1.2: Ενήλικα άτομα *S. aurata* (αριστερά) και *D. labrax* (δεξιά) (Φωτογραφίες από προσωπικό αρχείο).

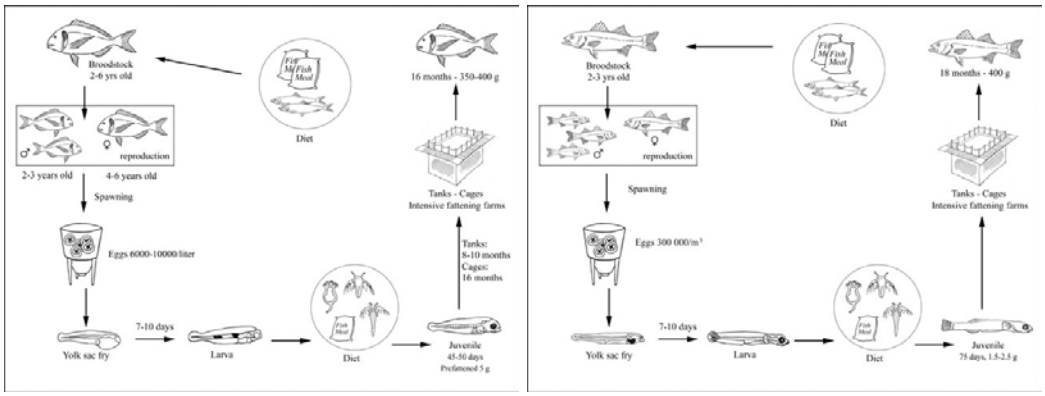
Σε εθνικό επίπεδο, ο τομέας της ιχθυοκαλλιέργειας υπάγεται στο Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (ΥΠΑΑΤ), ενώ σε τοπικό επίπεδο στις Νομαρχιακές Αυτοδιοικήσεις. Το Πλαίσιο Κοινού Χωροταξικού Σχεδιασμού Υδατοκαλλιέργειας (Κοινή Υπουργική Απόφαση αριθ. 31722/2011, ΦΕΚ 2505, επικυρωμένο στις 4 Νοεμβρίου 2011), παρέχει τις απαραίτητες κατευθυντήριες γραμμές για την ανάπτυξη του κλάδου και την αειφορική διαχείριση των χερσαίων και θαλάσσιων εκτάσεων που χρησιμοποιούνται από αυτό.

1.2. Συστήματα εκτροφής των ειδών *S. aurata* και *D. labrax*

Τη δεκαετία του ‘80 εγκαταστάθηκαν στην Ελλάδα τα πρώτα πειραματικά συστήματα εντατικής εκτροφής. Μέχρι τότε, η εκτροφή θαλάσσιων ιχθύων πραγματοποιούνταν παραδοσιακά σε παράκτιες λιμνοθάλασσες και υδατοσυλλογές με θαλασσινό νερό, όπου οι παραδοσιακοί εκτροφείς παγίδευαν τα νεαρά άτομα που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

κατέληγαν εκεί για να τραφούν. Στα πρώτα χρόνια της εντατικής εκτροφής τσιπούρας και λαβρακιού, χρησιμοποιήθηκε γόνος που είχε συλλεχθεί από φυσικούς πληθυσμούς. Σύντομα όμως, κατέστη δυνατή η τεχνητή αναπαραγωγή των ειδών αυτών, σε ελεγχόμενες συνθήκες αιχμαλωσίας, επιτυγχάνοντας με αυτόν τον τρόπο την ανεξαρτητοποίηση της εκτροφής τους από τα φυσικά αποθέματα (FAO, 2005-2019).



Εικόνα 1.3: Κύκλος εντατικής εκτροφής των ειδών *S. aurata* (αριστερά) και *D. labrax* (δεξιά) (FAO, 2005 – 2018*α*&*β*).

Η τσιπούρα και το λαβράκι, παρόλο που δεν ανήκουν στην ίδια οικογένεια (Sparidae και Moronidae αντίστοιχα), παρουσιάζουν ομοιότητες στην βιολογία τους και κατ' επέκταση στη μέθοδο εκτροφής τους (Εικ. 1.3). Πρόκειται για δύο ευρύαλα και ευρύθερμα, υποτροπικά και σαρκοφάγα είδη, με την τσιπούρα να αποτελεί πρώτανδρο ερμαφρόδιτο είδος ενώ το λαβράκι γονοχωριστικό. Τα ενήλικα άτομα των ειδών αυτών έχουν περίπου το ίδιο μήκος (33 – 40cm το *S. aurata* και 23 – 46cm το *D. labrax*) και το εμπορεύσιμο βάρος τους είναι 300 – 400g. Σύμφωνα με τα εγχειρίδια παραγωγής τους (Moretti et al., 1999; Moretti et al., 2005), που περιγράφονται περιληπτικά στην παρούσα υποενότητα, για την εκτροφή τους χρησιμοποιείται η εντατική μέθοδος, με τις μονάδες παραγωγής τους να αποτελούνται: α) από χερσαίες εγκαταστάσεις, που ονομάζονται ιχθυογεννητικοί σταθμοί και περιλαμβάνουν τμήμα εκτροφής γεννητόρων,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

εκκολαπτήριο, προπάχυνση, τμήμα παραγωγής ζωντανής τροφής και φυτοπλαγκτού και β) τις θαλάσσιες εγκαταστάσεις, που απαρτίζονται από τους πλωτούς κλωβούς.

Οι συνθήκες στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς είναι ελεγχόμενες, με το νερό που χρησιμοποιείται να διέρχεται από μηχανικά φίλτρα και στη συνέχεια από λαμπτήρα υπεριώδους ακτινοβολίας. Οι δεξαμενές που χρησιμοποιούνται διαθέτουν στόμιο παροχής και απορροής νερού, φωτισμό και αέρα, ενώ η επιθυμητή θερμοκρασία επιτυγχάνεται με τη χρήση αντιστάσεων. Ο κορεσμός σε οξυγόνο, διατηρείται σε ποσοστό 80 – 100%, ενώ ελέγχονται συχνά οι παράμετροι pH, NO_2^-, NO_3^- και NH_4^+.

Η αναπαραγωγή των ειδών αυτών σε συνθήκες αιχμαλωσίας, επιτυγχάνεται με τη ρύθμιση της θερμοκρασίας και της φωτοπεριόδου, οι οποίες προσαρμόζονται ώστε να μιμούνται αυτές της εποχής ωοτοκίας τους. Τα γονιμοποιημένα αυγά, συλλέγονται από τις δεξαμενές των γεννητόρων με ειδικές απόχες και μεταφέρονται σε νέες δεξαμενές με θαλασσινό νερό και επαρκή αερισμό, ώστε να επιτευχθεί η ομοιόμορφη κατανομή τους στην υδάτινη στήλη. Η θερμοκρασία του νερού είναι ίδια με εκείνη της δεξαμενής αναπαραγωγής (13 – 17°C), με τα αυγά να εκκολάπτονται μέσα σε 75 – 130 ώρες για το λαβράκι και σε 36 – 55 ώρες για την τσιπούρα.

Κατά την επώαση και εκκόλαψη, οι δεξαμενές δεν εκτίθενται σε φυσικό ή τεχνητό φωτισμό. Έπειτα ο αερισμός σταδιακά μειώνεται, ενώ η θερμοκρασία σταδιακά αυξάνεται μέχρι να φτάσει τους 18 – 20°C, όπου και παραμένει σταθερή. Οι προνύμφες που προκύπτουν από την εκκόλαψη, έχουν μήκος 4,9mm για το *D. labrax* και 4,1mm για το *S. aurata*. Για 4 – 6 ημέρες μετά την εκκόλαψη (Η.Μ.Ε.), διατρέφονται αποκλειστικά απορροφώντας θρεπτικά συστατικά από τον λεκιθικό σάκο που διαθέτουν. Έπειτα, χάνουν την τροφική αυτονομία τους και τροφοδοτούνται με ζωντανή τροφή, η οποία στην αρχή αποτελείται από τροχόζωα (*Brachionus plicatilis*), στη συνέχεια με ναύπλιους

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

και μετα-ναύπλιους στελεχών *Artemia* spp., ανάλογα με το μέγεθος του στόματος τους (Εικ. 1.3). Η ζωντανή τροφή, παρέχεται σε μικρές ποσότητες σε τακτά χρονικά διαστήματα. Στο στάδιο αυτό, στις δεξαμενές προστίθενται και μικροφύκη («πράσινα νερά»), με τις ιχθυονύμφες να εκτίθενται για πρώτη φορά σε φως (τεχνητή φωτοπερίοδος 16 ώρες φως, 8 ώρες σκοτάδι).

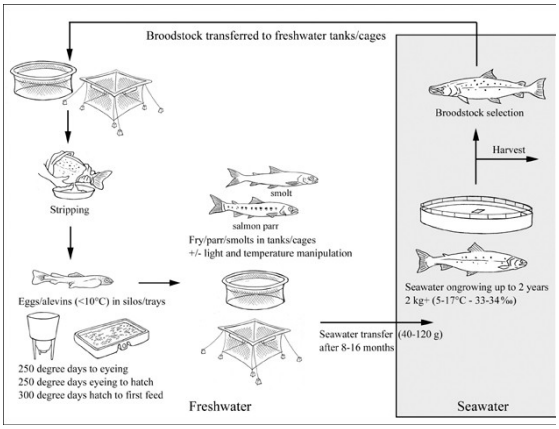
Σαράντα έως πενήντα Η.Μ.Ε., στην διατροφή τους προστίθενται ποσότητες σύμπηκτων συνθετικών τροφών, με τα ποσοστά της ζωντανής τροφής σταδιακά να μειώνονται. Αφού παρατηρηθεί πλήρης προσαρμογή των νυμφών στην συνθετική τροφή, περίπου 70 – 80 Η.Μ.Ε., σταματάει εντελώς η χορήγηση ζωντανής τροφής (απογαλακτισμός). Αφού οι νεαροί ιχθύες εξοικειωθούν στην συνθετική τροφή, μεταφέρονται στο τμήμα της προπάχυνσης, το οποίο αποτελείται συνήθως από χερσαίες εγκαταστάσεις, με ημι-ελεγχόμενες συνθήκες, όπου και παραμένουν μέχρι να εγκλιματιστούν στις εξωτερικές συνθήκες εκτροφής και αποκτήσουν βάρος τουλάχιστον 5g. Έπειτα, μεταφέρονται σε πλωτούς θαλάσσιους ιχθυοκλωβούς, όπου και εκτρέφονται μέχρι να φτάσουν το εμπορεύσιμο μέγεθος (300 – 400g). Στο στάδιο αυτό οι εκτρεφόμενοι ιχθύες, είναι εκτεθειμένοι στις καιρικές συνθήκες, αλλά εξακολουθούν να τρέφονται με συνθετική τροφή.

1.3. Εκτροφή του είδους *Salmo salar*

Ο σολομός του Ατλαντικού (*S. salar*) ενδημεί στις ευρωπαϊκές ακτές του βόρειου Ατλαντικού και στα ποτάμια που εκβάλουν σε αυτόν. Η εκτροφή του άρχισε τον 19ο αιώνα στο Ηνωμένο Βασίλειο, με σκοπό τον εμπλουτισμό των υδάτων με ιχθύδια για την ενίσχυση των αλιευτικών αποθεμάτων. Η εκτροφή για εμπορικούς σκοπούς σε πλωτούς θαλάσσιους κλωβούς, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1960 στη Νορβηγία και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

έκτοτε αποτελεί την κύρια χώρα παραγωγής του (Gjedrem et al., 1991). Αποτελεί ανάδρομο είδος, που σημαίνει ότι αναπαράγεται και εκκολάπτεται στο γλυκό νερό, όπου και διαμένει τα πρώτα στάδια της ζωής του (Kottelat & Freyhof, 2007). Στη συνέχεια, μετά από μία περίοδο προσαρμογής, που ονομάζεται «smoltification» και εξαρτάται από τη φωτοπερίοδο και τη θερμοκρασία (Hoar, 1988; Stefansson et al., 2008; McCormick, 2013), μεταναστεύει στη θάλασσα, όπου και παραμένει μέχρι να φτάσει την αναπαραγωγική περίοδο, όπου επιστρέφει και πάλι στο γλυκό νερό.



Εικόνα 1.4: Κύκλος εντατικής εκτροφής του είδους *S. salar* (FAO, 2008 - 2018).

Για την εκτροφή του (Εικ. 1.4), αρχικά πραγματοποιείται αναπαραγωγή σε αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, με τα γονιμοποιημένα αυγά να τοποθετούνται για εκκόλαψη σε σιλό ή δίσκους όπου και παραμένουν μέχρι την απορρόφηση του λεκιθικού σάκου (alevins). Η εκκόλαψη πραγματοποιείται περίπου σε τρεις μήνες και τα νεοεκκολαφθέντα ιχθύδια (parrs) μεταφέρονται σε δεξαμενές γλυκού νερού, όπου και παραμένουν μέχρι το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τις ανάδρομες μετακινήσεις τους. Οι νεαροί σολομοί (smolts) που έχουν ολοκληρώσει τη διαδικασία προσαρμογής, μεταφέρονται στους θαλάσσιους κλωβούς όπου και παραμένουν μέχρι να αποκτήσουν το εμπορεύσιμο μέγεθος (2 – 5kg) (Jones, 2004).

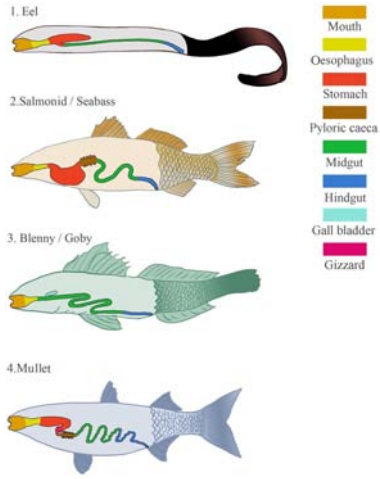
Είναι σαρκοφάγο είδος και μετά την απορρόφηση του λεκιθικού σάκου μπορεί να διατραφεί αμέσως με συνθετική τροφή η οποία είναι πλούσια σε ιχθυάλερο και ιχθυέλαιο. Σε αντίθεση με άλλα είδη (π.χ. τσιπούρα, λαβράκι), οι ιχθυονύμφες (alevins)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

του είδους *S. salar*, μπορούν να διατραφούν από τα θρεπτικά αποθέματα του λεκιθικού τους σάκου για διάστημα περίπου 30 ημέρων, στο οποίο τους δίνεται η δυνατότητα να αναπτύξουν ένα λειτουργικό πεπτικό σύστημα έτοιμο να δεχθεί την πρώτη εξωτερική τροφή, μετά την πλήρη απορρόφηση του (Sahlmann et al., 2015).

1.4. Το πεπτικό σύστημα των ιχθύων – Έμφαση στα είδη *S. aurata*, *D. labrax* και *S. salar*

Η οργάνωση του γαστρεντερικού συστήματος στους ιχθύες, ακολουθεί τα βασικά χαρακτηριστικά των σπονδυλωτών ζώων. Διαφοροποιήσεις ωστόσο παρουσιάζονται μεταξύ διαφορετικών ιχθύων (Suyehiro, 1942), οι οποίες φαίνεται να σχετίζονται με τις διατροφικές τους συνήθειες, εξασφαλίζοντας τη βέλτιστη αξιοποίηση των διαιτητικών θρεπτικών συστατικών που καταναλώνουν (Εικ. 1.5). Μάλιστα παρουσιάζουν τη δυνατότητα να προσαρμόζουν το γαστρεντερικό τους σύστημα σύμφωνα με τις διαφορετικές διατροφικές τους ανάγκες (όπως μετανάστευση, εποχικές μεταβολές στη διατροφή κα.) κατά τη διάρκεια της ζωής τους (Karila et al., 1998).



Εικόνα 1.5: Γραφική απεικόνιση διαφορετικών τύπων γαστρεντερικού συστήματος που απαντώνται σε είδη ιχθύων του θαλασσινού νερού (Egerton et al., 2018).

Γενικά, το πεπτικό σύστημα αποτελείται από τον οισοφάγο, τον στόμαχο, τα πυλωρικά τυφλά, το έντερο και την έδρα. Όσον αφορά τον στόμαχο, σε μερικά είδη ιχθύων απουσιάζει και συνήθως πραγματοποιείται προσωρινή αποθήκευση της τροφής στο εμπρόσθιο τμήμα του εντέρου (Sinha, 1983), ενώ σε πολλά είδη παρατηρείτε η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

παρουσία φαρυγγικών οδόντων που βοηθούν στη διάσπαση της τροφής (Suyehiro, 1942; Fänge & Grove, 1979). Αντίθετα, όταν υπάρχει στομάχι, η διάσπαση των τροφών πραγματοποιείται από το οξύ που εκκρίνει, μαζί συνήθως με κάποια πεπτικά ένζυμα (Olsen & Ringø, 1997).

Το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ξεκινάει από τον πυλωρό και σε αρκετές περιπτώσεις εκτείνεται μέχρι την έδρα. Σε αυτό πραγματοποιείται η τελική φάση της χημικής επεξεργασίας της τροφής και απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών της (Ringø et al., 2003). Το μεσαίο τμήμα (midgut) ξεκινάει αμέσως μετά τα πυλωρικά τυφλά και στη συνέχεια ακολουθεί το τελικό έντερο, το οποίο είναι μια προέκταση του μεσεντέρου και στο οποίο σταδιακά μειώνονται οι απορροφητικές ικανότητες ενώ αυξάνεται η παραγωγή βλέννας. Έχει παρατηρηθεί, ότι στα φυτοφάγα είδη το μήκος του εντέρου είναι μεγαλύτερο από αυτό των σαρκοφάγων, που πιθανόν να οφείλεται στο ότι οι τροφές που καταλαμβάνουν είναι πιο δύσπεπτες (Horn, 2006; Clements & Raubenheimer, 2005). Θα πρέπει να αναφερθεί επίσης, ότι το έντερο εκτός από κύριο όργανο για την πέψη και απορρόφηση, αποτελεί και ζωτικής σημασίας όργανο για την ωσμορύθμιση, τη ρύθμιση των ενδοκρινών αδένων της πέψης, του μεταβολισμού και του ανοσοποιητικού συστήματος (Berg, 1996; Ringø et al., 2003), ενώ προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι η παρουσία των μικροβιακών πληθυσμών σε αυτό, συμβάλλουν σε κάποιες από τις παραπάνω λειτουργίες (Sissons, 1989; Ringø et al., 1995; Nayak, 2010).

Σύμφωνα με τους García Hernández et al. (2001) και Elbal et al. (2004), το πεπτικό σύστημα στα είδη *S. aurata* και *D. labrax* αποτελείται από τον οισοφάγο, το στομάχι, τα πυλωρικά τυφλά και ένα μακρύ έντερο στο οποίο είναι διακριτό το εμπρόσθιο και οπίσθιο μέρος του. Τα οντογενετικά στάδια του πεπτικού συστήματος σε αυτά τα δύο είδη, από ανατομικής και ιστολογικής απόψεως παρουσιάζουν πολλές

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ομοιότητες. Από την εκκόλαψη έως και το άνοιγμα του στόματος (περίπου πέντε μέρες μετά), το έντερο θυμίζει σχηματικά έναν ευθύ σωλήνα, επενδυμένο με επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία αυξάνονται κατά μήκος προς την ουραία περιοχή. Με το άνοιγμα του στόματος και μέχρι την πλήρη απορρόφηση του λεκιθικού σάκου, αρχίζουν να γίνονται εμφανή ο οισοφάγος, μία γαστρική περιοχή, το έντερο και το ορθό. Μετά την απορρόφηση του λεκιθικού σάκου διακρίνονται οι πρώτοι γαστρικοί αδένες και στο έντερο σχηματίζονται βλεννογόνες μεμβράνες, ενώ τα πυλωρικά τυφλά μαζί με τα επιθηλιακά κύτταρα σταδιακά αρχίζουν να θυμίζουν αυτά των ώριμων ατόμων. 55 Η.Μ.Ε. η επιφάνεια του εντέρου αυξάνεται και ο στόμαχος αποκτά την οριστική ανατομική του μορφή.

Όσον αφορά το πεπτικό σύστημα του *S. salar*, αυτό αποτελείται επίσης από τα ίδια τμήματα (οισοφάγο, στομάχι, πυλωρικά τυφλά και έντερο) και είναι δομικά και λειτουργικά έτοιμο πριν ακόμη την πρώτη εξωγενή διατροφή (Suyehiro, 1942). Συγκεκριμένα, σε επτά Η.Μ.Ε. είναι μορφολογικώς διακριτά το στομάχι, το ήπαρ το πάγκρεας και το πρόσθιο και οπίσθιο τμήμα του εντέρου. Η εμφάνιση των γαστρικών αδένων και των πυλωρικών τυφλών πραγματοποιείται πριν την πλήρη απορρόφηση του λεκιθικού σάκου, καθώς επίσης και η γονιδιακή έκφραση των γαστρικών και των παγκρεατικών ενζύμων, προετοιμάζοντας τις νύμφες σολομού (alevins) για την πέψη της εξωτερικής τροφής (Sahlmann et al., 2015).

1.4.1. Ο ρόλος της γαστρεντερικής μικροβιακής κοινότητας στους ιχθύες και παράγοντες που τη μεταβάλλουν

Στις ιχθυοκαλλιέργειες, οι οργανισμοί που εκτρέφονται διαβιούν σε ένα περιβάλλον εκτεθειμένο σε βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς. Ακόμα και στα εκκολαπτήρια όπου οι συνθήκες θεωρούνται πιο ελεγχόμενες, έχει διαπιστωθεί η

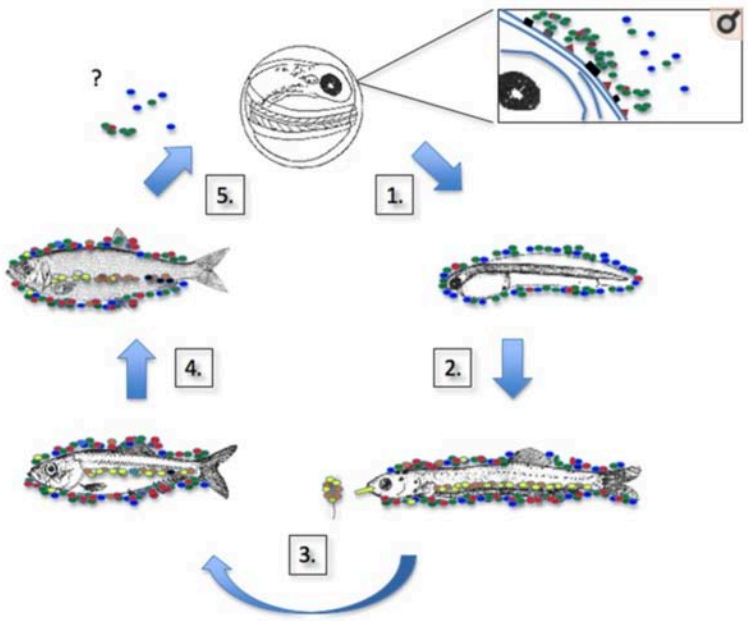
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

παρουσία και αύξηση βακτηριακών πληθυσμών στο νερό, μόλις από το στάδιο του γονιμοποιημένου αυγού (Hansen & Olafsen, 1989). Κατά τη γέννηση, μικροοργανισμοί εποικίζουν τις επιθηλιακές επιφάνειες των ιχθύων, όπως συμβαίνει σε όλα τα σπονδυλωτά, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο συμβιωτική σχέση με τον ξενιστή τους (Spore et al., 2011). Επίσης, για λόγους ωσμορύθμισης, οι λάρβες αρχίζουν την πρόσληψη νερού πριν την πλήρη απορρόφηση του λεκιθικού σάκου, με τα βακτήρια του περιβάλλοντος να εισέρχονται στον οργανισμό πριν αρχίσει η πρώτη διατροφή (Mangor-Jensen & Adoff, 1987; Tytler & Blaxter, 1988; Reitan et al., 1998). Οι μικροοργανισμοί έπειτα, καταλήγουν στον γαστρεντερικό σωλήνα όπου πρέπει να προσαρμοσθούν στο νέο περιβάλλον (pH εντέρου, μικρο-αερόφιλες/αναερόβιες συνθήκες κλπ.), με αυτούς που θα καταφέρνουν να εποικίσουν τον ιστό του εντέρου να αποτελούν τους αυτόχθονους μικροοργανισμούς και αυτούς που απλά τον διαπερνούν και αποβάλλονται με τις απεκκρίσεις, να αποτελούν τους αλλόχθονους (Ringø & Birkbeck, 1999).

Οι εποικισμοί αυτοί (Εικ. 1.6), εξαρτώνται από τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο περιβάλλον του ατόμου, τη φυσιολογία του, αλλά και την απόκρισή του στους αρχικούς μικροβιακούς εποικιστές (Wilkinson, 2002). Έχει αποδειχθεί επίσης, ότι παράγοντες όπως η ηλικία, η διατροφή, περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς και γενετικοί παράγοντες του ξενιστή, επηρεάζουν την μικροβιακή ποικιλότητα στο γαστρεντερικό σύστημα των ιχθύων (Sakata et al., 1980; Bitterlich & Schaber, 1986; MacFarlane et al.,1986; Kim et al., 2007; Navarrete et al., 2009; Ward et al., 2009; Kormas et al., 2014; Mente et al., 2018). Ωστόσο, θεωρείται ότι η πρώτη εποίκιση του εντέρου μπορεί να επηρεάσει την αυτόχθονη ποικιλότητα του και στα επόμενα στάδια ανάπτυξης του ατόμου (Hansen & Olafsen, 1999). Έχει διαπιστωθεί επίσης, ότι τα βακτήρια του εντέρου διαφέρουν μεταξύ ιχθύων γλυκού και θαλασσινού νερού (Nayak, 2010), αλλά ακόμη και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

μεταξύ θαλάσσιων ιχθύων (Givens et al. 2015; Tarnecki et al. 2017). Διαφορετική εντερική μικροβιακή ποικιλότητα φαίνεται να παρουσιάζουν και άτομα του ίδιου γένους, με βακτήρια να προτιμούν συγκεκριμένα είδη (Askarian et al., 2009; Askarian et al., 2011; Gioacchini et al., 2012; Zhou et al, 2012), υποδεικνύοντας ότι το πεπτικό σύστημα παρέχει σε αυτούς ευνοϊκές αλλά και εξειδικευμένες συνθήκες. Ωστόσο οι εργασίες αυτές, παρουσιάζουν σημαντικές μεθοδολογικές διαφοροποιήσεις μεταξύ τους και συχνά αντιφατικά αποτελέσματα.



Εικόνα 1.6: Γραφική απεικόνιση της διαδοχής του μικροβιώματος στους ιχθύες κατά τα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης (Llewellyn, et al., 2014)

Για παράδειγμα, υπάρχει διαφορά στο χειρισμό των δειγμάτων, με έρευνες να χρησιμοποιούν είτε μόνο το εντερικό περιεχόμενο (digesta), είτε μόνο τον εντερικό ιστό ή και συνδυασμό αυτών (Colwell, 1962; Simidu et al., 1969; Newman et al., 1972; Trust, 1975; Gilmour et al., 1976; Sugita et al., 1983). Η πιο σημαντική διαφοροποίηση έγκειται στη μεθοδολογία των αναλύσεων, με τις περισσότερες να πραγματοποιούνται με

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

κλασικές μικροβιολογικές καλλιεργητικές μεθόδους, με χρήση ποικίλων θρεπτικών μέσων. Δύο σημαντικές βιβλιογραφικές αναφορές (Cahill, 1990; Nayak, 2010) παρουσιάζουν συνοπτικά τις κύριες βακτηριακές ομάδες που βρέθηκαν να συνθέτουν τη μικροβιακή γαστρεντερική ποικιλότητα των ιχθύων με τη χρήση αυτών των τεχνικών, τονίζοντας μάλιστα ότι τα δεδομένα αυτά θεωρούνται αμφιλεγόμενα, καθώς δεν εκφράζουν το σύνολο των βακτηριακών κοινοτήτων και την αφθονία τους, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπουν πλήρως την κατανόηση της σύνθεσης και τον ρόλο των μικροοργανισμών αυτών στον ξενιστή τους.

Η έλευση των μοριακών τεχνικών, η δυνατότητα απομόνωσης DNA κατευθείαν από το δείγμα και η χρήση του γονιδίου 16S rRNA σε πρόσφατες εργασίες για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλότητας του εντέρου ιχθύων, απέδειξαν ότι αποτελούν αξιόπιστη μέθοδο ταυτοποίησης και προσδιορισμού της εντερικής μικροβιακής ποικιλότητας (Spanggaard et al., 2000; Romero & Navarrete, 2006; Wu et al., 2010; Lan & Love, 2012; Sorroza et al., 2012; Kormas et al., 2014; Xia et al., 2014).

Τα τελευταία χρόνια, η δημοσίευση εργασιών με την χρήση αυτών των μεθόδων διεύρυνε τις γνώσεις στον τομέα της μικροβιακής γαστρεντερικής ποικιλότητας των ιχθύων, με δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η ποικιλότητα του εντέρου είναι πιο σύνθετη σε σχέση με τις αρχικές υποθέσεις (Li et al., 2015). Σε αυτό συνέβαλε και η πληθώρα των εργασιών που προέκυψε από το παγκόσμιο εγχείρημα για τη μελέτη του ανθρώπινου μικροβιώματος (Human Microbiome Project – HMP), κάνοντας πλέον κοινά αποδεκτό ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί συμβάλουν σημαντικά, πέρα από την πέψη, στη συνολική υγεία του ξενιστή (Umesaki et al., 1995; Xu & Gordon, 2003; Bäckhed, 2005; Mazmanian et al., 2005; Wu & Wu 2012; Yoon et al., 2014; Jandhyala et al., 2015).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Όσον αφορά τους ιχθύες, το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει κυρίως επικεντρωθεί στη μελέτη της γαστρεντερικής ποικιλότητας ειδών της οικογένειας Salmonidae, λόγω της μεγάλης εμπορικής αξίας τους (Austin & A1-Zahrani, 1988; Ringø, 1993; Skrodenyte-Arbaciauskiene et al., 2008). Ωστόσο, για το σολομό του Ατλαντικού (*S. salar*) οι γνώσεις μας περιορίζονται σε ευρήματα κυρίως καλλιεργητικών μεθόδων (Jöborn et al.,1999; Ringø et al., 2000; Ringø et al., 2006; Bakke-McKellep et al., 2007; Askarian et al., 2012). Κάποιες πρόσφατες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί με χρήση μοριακών τεχνικών, αφορούν ενήλικα άτομα που διαβιούν στο θαλάσσιο περιβάλλον (Holben et al., 2002; Hovda et al., 2007; Abid et al., 2013; Green et al., 2013; Hatje et al., 2014; Godoy et al., 2015). Δεδομένου όμως του ανάδρομου βιολογικού κύκλου ζωής του είδους και τις βαθμιαίες αλλαγές που πραγματοποιούνται στο γαστρεντερικό του σύστημα κατά τη μετάβαση από το γλυκό στο θαλασσινό νερό (Yoshimizu & Kimura,1976; Yoshimizu et al., 1976; both in Ringø et al., 1995), τα αποτελέσματα της βακτηριακής ποικιλότητας και της αφθονίας τους δεν μπορούν να θεωρηθούν δεδομένα και για τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται και μέσα από την ασυμφωνία των ευρημάτων των παραπάνω εργασιών. Επιπλέον, έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε νεαρά άτομα σολομού, πάλι με μοριακές τεχνικές, αφορούν άτομα μεγαλύτερα του 1g (Liu et al., 2008; Skrodenyte-Arbaciauskiene et al., 2008; Navarrete et al., 2009; Cantas et al.,2011; Reveco et al., 2014), με αποτέλεσμα οι γνώσεις για τη βακτηριακή εποίκηση του γαστρεντερικού σωλήνα κατά τα στάδια της εκκόλαψης, της απορρόφησης του λεκιθικού σάκου, μέχρι την ανάπτυξη του σε ώριμο άτομο, να βασίζονται σε αντικρουόμενα αποτελέσματα (Cahill, 1990; Nayak, 2010) εντείνοντας την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη στα στάδια αυτά με τη χρήση των διαθεσίμων νέων μεθόδων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Όσον αφορά τα κύρια εκτρεφόμενα είδη της χώρας μας, όπως και στην περίπτωση του είδους *S. salar*, οι εργασίες επικεντρώνονται σε ενήλικα άτομα, ή νεαρά ιχθύδια, καθιστώντας αναγκαία τη διερεύνηση της πρώτης μικροβιακής εποίκισης του γαστρεντερικού τους σωλήνα και την επίδραση των συνθηκών εκτροφής (ζωντανή τροφή, «πράσινα νερά», συνθετικό σιτηρέσιο, νερό εκτροφής κ.α.) στη διαμόρφωση τους.

Πληθώρα εργασιών αφορά διατροφικά πειράματα που σχετίζονται με τη διερεύνηση της επίδρασης της υποκατάστασης του ιχθυάλευρου και ιχθυελαίου στη διατροφή τους (Estruch et al., 2015; Parma et al., 2016), στην ανεύρεση προβιοτικών (Carnevali et al., 2004; Tapia-Paniagua et al., 2011; Bourouni et al., 2015), καθώς και στην αναγνώριση παθογόνων μικροοργανισμών (Pujalte et al., 2003; Zorrilla et al. 2003). Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν έχει προηγηθεί στοχευμένη και ολοκληρωμένη μελέτη σχετικά με την αυτόχθονη μικροβιακή ποικιλότητα του γαστρεντερικού τους συστήματος, με τη χρήση νέων μοριακών τεχνικών. Μόνη εξαίρεση αποτελεί η εργασία των Kormas et al. (2014) για το είδος *S. aurata*, στην οποία παρατηρήθηκε η παρουσία κοινών βακτηριακών ειδών μεταξύ ατόμων από φυσικούς πληθυσμούς και ατόμων από συμβατικούς και βιολογικά εκτρεφόμενους συμπάτριους πληθυσμούς, εγείροντας το ερώτημα αν και κατά πόσο η σύνθεση και δομή των γαστρεντερικών κοινοτήτων διαφέρει σε αλλοπάτριους πληθυσμούς ιχθύων.

Παράλληλα, η ανίχνευση κοινών αλλά και ειδικών ανά είδος ιχθύος βακτηριακών εκπροσώπων, φαίνεται να αποτελεί καθοριστικός παράγοντας για την οικολογική κατανόηση του ενδιαιτήματος του εντέρου και της λειτουργίας των μικροβίων σε αυτό (Shade & Handelsman, 2012), που μπορούν να οδηγήσουν στη βελτιστοποίηση της εκτροφής των υπό μελέτη ειδών ιχθύων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

1.4.2. Εναλλακτικές πρωτεϊνικές πηγές στην παρασκευή ιχθυοτρόφων

Η ραγδαία αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού μέσα στις επόμενες δεκαετίες, θα οδηγήσει σε αυξημένη ζήτηση τροφίμων (FAO, 2006; Lutz & Samir, 2010), με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής του πρωτογενή τομέα. Σε αυτόν ανήκει και ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας, ο οποίος αποτελεί τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο κλάδο της γεωργίας και της βιομηχανίας παρασκευής ζωοτροφών (Akiyama & Hunter, 2000; Tacon & Forster, 2000). Ωστόσο, για να είναι εφικτή η περαιτέρω βιώσιμη ανάπτυξη του κλάδου, θα πρέπει αρχικά να αντιμετωπιστούν κάποιες προκλήσεις που σχετίζονται κυρίως με τη παραγωγή ιχθυοτροφών.

Οι πρώτες ιχθυοτροφές παρασκευάστηκαν στις αρχές του 1900, με πρώτες ύλες να αποτελούν κυρίως αιματάλευρα και κρεατάλευρα από χοίρους, βοοειδή και κατά καιρούς ιχθυάλευρα (Embody, 1918). Ωστόσο, λόγω των κρουσμάτων εγκεφαλοπάθειας των βοοειδών, το 2001 η Ε.Ε. προέβη στην απαγόρευση της χρήσης κρεατάλευρων και οστεάλευρων από χερσαία θηλαστικά στις ζωοτροφές όλων των εκτρεφόμενων ζώων (ΕΕ/999/2001). Έκτοτε, τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ιχθυοτροφών, αλλά και των υπόλοιπων ζωοτροφών, είναι κυρίως προϊόντα και υποπροϊόντα αλιείας και γεωργίας, όπως ιχθυάλευρο, ιχθυέλαιο, φυτικής προέλευσης άλευρο και έλαιο, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά κλπ.

Το ιχθυάλευρο χρησιμοποιείται γενικά στις ζωοτροφές, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης πρωτεϊνών που διαθέτει, ενώ ταυτοχρόνως αποτελεί πηγή ασβεστίου φωσφόρου και άλλων μεταλλικών στοιχείων (Cho & Kim, 2011). Επιπλέον, διαθέτει ένα εξαιρετικά ισορροπημένο προφίλ αμινοξέων για τους εκτρεφόμενους υδρόβιους οργανισμούς. Το ιχθυέλαιο, αποτελεί επίσης σημαντική πρώτη ύλη στις ιχθυοτροφές, παρέχοντας στα εκτρεφόμενα είδη ενέργεια και τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (Tacon &

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Metian, 2008). Πιο συγκεκριμένα, για τις ανάγκες διατροφής των ιχθύων στις υδατοκαλλιέργειες, το 68 και 88% της παγκόσμιας παραγωγής ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων αντιστοίχως χρησιμοποιείται για την παραγωγή ιχθυοτροφών, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό του παραγόμενου ιχθυελαίου (13%) προορίζεται απευθείας για κατανάλωση από τον άνθρωπο ως συμπλήρωμα διατροφής (Naylor et al., 2009; Tacon et al., 2011; IFFO, 2016).

Το ιχθυάλευρο και ιχθυέλαιο, προέρχονται από μικρά κυρίως ψάρια (όπως σαρδέλα και ρέγγα), τα οποία αρχικά κονιορτοποιούνται και στη συνέχεια ακολουθεί διαχωρισμός των υγρών (λάδι και νερό) και στερεών. Το λάδι που προκύπτει αποτελεί το «ιχθυέλαιο». Όσον αφορά τα στερεά μέρη, επεξεργάζονται περαιτέρω με χρήση θερμότητας και το τελικό προϊόν (ιχθυάλευρο), έχει τη μορφή πούδρας (Olsen et al., 2011). Η παραγόμενη ποσότητα ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου ποικίλει ανάλογα με τα είδη που χρησιμοποιούνται (Shepherd et al., 2005).

Πλέον έχει αποδειχθεί, ότι αυτοί οι πόροι δεν είναι βιώσιμοι και παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις όσον αφορά τη διαθεσιμότητα τους (Tacon & Metian, 2008; Hardy, 2010), η οποία προβλέπεται να αποτελέσει σημαντικό εμπόδιο στην ανάπτυξη του κλάδου της υδατοκαλλιέργειας. Για τους παραπάνω λόγους, τα τελευταία χρόνια, γίνεται μεγάλη προσπάθεια για μείωση του ποσοστού του ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου στις ιχθυοτροφές και εύρεση υποκατάστατων των προαναφερόμενων δύο συστατικών, όπως φυτικά άλευρα και έλαια, υποπροϊόντα από τις μονάδες επεξεργασίας ζώων αλλά και αλιευμάτων.

1.4.3. Υποκατάστατα ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου

Όπως προαναφέρθηκε, τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται μία σημαντική ερευνητική προσπάθεια για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου στις

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ιχθυοτροφές με πιο οικονομικές και περιβαλλοντικά βιώσιμες πρώτες ύλες. Οι πρωτεϊνικές πηγές φυτικής προέλευσης (κυρίως από σόγια), αποτελούν τις πιο διαδεδομένες αλλά και πολλά υποσχόμενες (Higgs et al., 1995; Storebakken et al., 2000; Gatlin et al., 2007; Tacon et al., 2011). Ως υποκατάστατα, έχουν προταθεί και δοκιμαστεί επίσης φυτικά άλευρα θαλάσσιας προέλευσης (Rico et al., 2016; Udayasoundari et al., 2016), μονοκυτταρικές πρωτεΐνες (Bob-Manuel and Alfred-Ockiya, 2011; Zhang et al., 2013; Bob-Manuel, 2014), υποπροϊόντα ασπόνδυλων ζώων (Hertrampf & Piedad-Pascual, 2000), αλλά και μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες από μη μηρυκαστικά ζώα (Kumar et a1., 2017), που πρόσφατα επανεντάχθηκαν ως πρώτες ύλες στην παραγωγή ζωοτροφών, ύστερα από άρση της απαγόρευσης χρήσης τους από την Ευρωπαική Ένωση (ΕΕ 56/2013).

1.4.4. Άλευρα και έλαια φυτικής προέλευσης

Τα φυτικής προέλευσης άλευρα, έχουν αποδειχθεί ικανά υποκατάστατα. Ωστόσο παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα. Σε αρκετές περιπτώσεις, έχει παρατηρηθεί αδυναμία πεπτικότητας, παρουσία τοξικών παραγόντων (Francis et al., 2001; Hendricks, 2002; Krogdahl et al., 2003; Gatlin et al., 2007), αλλά και μη ισορροπημένο προφίλ σε απαραίτητα αμινοξέα, που μπορούν να επηρεάσουν μεταξύ άλλων την πέψη και την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών (Francis et al., 2001). Επίσης, έχει διαπιστωθεί αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, προσδίδοντας σε κάποιες περιπτώσεις ανεπιθύμητο χρώμα στη σάρκα των ιχθύων (Gaylord et al., 2010). Ανησυχίες υπάρχουν όσον αφορά και το ποσοστό των χερσαίων εκτάσεων που πλέον θα χρησιμοποιούνται για την διατροφή των ιχθύων, ανταγωνίζοντας στην ουσία τους διαθέσιμους πόρους για παραγωγή προϊόντων για την διατροφή του ανθρώπου (Kumar et al., 2008).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Εν αντιθέσει με τα χερσαία φυτά, τα μικροφύκη θα μπορούσαν επίσης να αντικαταστήσουν τις συμβατικές πρώτες ύλες των ιχθυοτροφών, παράγοντας μεγάλη βιομάζα χωρίς την απαίτηση μεγάλων χερσαίων εγκαταστάσεων. Έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να παρέχουν πρωτεΐνες, λιπίδια, βιταμίνες, καροτενοϊδή, και ενέργεια (Brown et al., 1997; Becker, 2004) ενώ με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής, μπορούν να βελτιωθούν τα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά (Li & Tsai, 2009; Hemaiswarya et al., 2011; Khatoon & Pal, 2015). Ωστόσο, η παραγωγή τους παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες και μεγάλο κόστος (Becker, 2007; Sarker et al., 2016) ενώ η κυτταρική μεμβράνη μερικών ειδών που έχουν προταθεί, είναι δύσπεπτη (Skrede et al., 2011).

Έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί και σε είδη μακροφυκών (Mustafa et al., 1995; Dy Peñaflorida & Golez, 1996; Wassef, 2005; Ergün et al., 2009), καθώς αποτελούν πηγή βιταμινών, πρωτεϊνών, υδατανθράκων, ιχνοστοιχείων και άλλων βιοδραστικών ενώσεων (Kumar et al., 2008). Δεν απαιτούν χερσαίες εγκαταστάσεις καλλιέργειας και αποδίδουν μεγαλύτερη παραγωγή (σε ξηρό βάρος) σε σχέση με τη σόγια και την κράμβη (Neori et al., 2004). Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών είναι ενθαρρυντικά, ωστόσο χρειάζεται περισσότερη έρευνα ώστε να βρεθεί το βέλτιστο ποσοστό αντικατάστασης για κάθε εκτρεφόμενο είδος ιχθύος και να αξιολογηθεί αν τα ποσοστά αυτά αποδίδουν οικονομικά σε εμπορική κλίμακα (Younis et al., 2018).

1.4.5. Μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες (ΜΖΠ) από μη μηρυκαστικά ζώα

Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες φυτικής προέλευση, οι ζωϊκές πρωτεΐνες είναι πλούσιες σε απαραίτητα αμινοξέα και περιέχουν σημαντικές ποσότητες υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών, οι οποίες, πέραν του ότι είναι ιδιαίτερα εύπεπτες, βελτιώνουν επίσης την γευστικότητα των ζωοτροφών (Davies et al., 2009; Burr et al., 2012; Badillo et al., 2014; Dong et al., 2016). Για λόγους πρόληψης, καταπολέμησης και εξάλειψης ορισμένων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

μεταδοτικών νοσημάτων που σχετίζονταν με τη σπογγώδη εγκεφαλοπάθεια σε βοοειδή και αιγοπρόβατα, το ευρωπαϊκό κοινοβούλιο θέσπισε το 2001 ειδικό κανονισμό (ΕΚ/999/2001) για μείωση του δυνητικού κινδύνου με σκοπό την προστασία της υγείας του ανθρώπου αλλά και των ζώων. Σύμφωνα με τον κανονισμό αυτό απαγορεύτηκε η σίτιση εκτρεφόμενων ζώων με πρωτεΐνη προερχόμενη από συγκεκριμένα χερσαία ζώα.

Ωστόσο, το 2013 ύστερα από τροποποίηση του παραπάνω κανονισμού, αναθεωρήθηκαν κάποιοι περιορισμοί που αφορούσαν τις ζωοτροφές. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 56/2013, όσον αφορά τα ζώα υδατοκαλλιέργειας, από 1η Ιουνίου του 2013, επιτρέπεται η χορήγηση μεταποιημένων ζωικών πρωτεϊνών, που προέρχονται από μη μηρυκαστικά καθώς και σύνθετες ζωοτροφές οι οποίες περιέχουν αυτές τις μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες που παράγονται, διατίθενται στην αγορά και χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τους γενικούς όρους που καθορίζονται στο συγκεκριμένο κανονισμό. Επιπροσθέτως, ο πρόσφατος κανονισμός 2017/893 τροποποιεί περαιτέρω τους Κανονισμούς (ΕΚ) αριθ.999/2001 και (ΕΕ) αριθ. 142/2011, επιτρέποντας τη χρήση και παραγωγή μεταποιημένης ζωικής πρωτεΐνης από εκτρεφόμενα έντομα. Μάλιστα η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA), όσον αφορά τους κινδύνους που συνδέονται με την παρουσία μολυσματικών πρωτεϊνών, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα μη μεταποιημένα έντομα παρουσιάζουν χαμηλότερη επικινδυνότητα σε σχέση με των επί του παρόντος εγκεκριμένων πηγών πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης (EFSA, 2015).

Το ενδιαφέρον για ένταξη των εντόμων ως πρωτεϊνική πηγή στις ζωοτροφές υπάρχει εδώ και χρόνια (FAO, 2013), καθώς πολλά είδη εντόμων παρουσιάζουν υψηλής ποιότητας και ποσότητας πρωτεΐνη (Sánchez-Muros et al., 2014). Μέσα από μια πληθώρα εργασιών, έχουν προταθεί ως μία ενδιαφέρουσα πρόταση για την

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου και του σογιάλευρου (Van Huis, 2013), με τους εκτροφείς αλλά και τους καταναλωτές να έχουν θετική στάση απέναντι στη χρήση τους ως συστατικό των ζωοτροφών (Verbeke et al., 2015; Mancuso et al., 2016).

Είδη εντόμων χρησιμοποιούνται χρόνια στην εμπορική παραγωγή και έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να εκτραφούν σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις (Oonincx & de Boer, 2012). Παρουσιάζουν ταχεία ανάπτυξη, μετατρέποντας αποδοτικά χαμηλής ποιότητας οργανικά υλικά σε πρωτεΐνες και λιπαρές ουσίες υψηλής αξίας, ενώ αναπαράγονται εύκολα, δεν απαιτούν καλλιεργήσιμη γη (Barroso et al., 2014; Sánchez-Muros et al., 2014; Henry et al., 2015) και αποτελούν μέρος της φυσικής διατροφής πολλών ειδών ιχθύων (Van Huis, 2013; Tran et al., 2015).

Μερικά από τα είδη εντόμων που έχουν δοκιμαστεί με επιτυχία στις ιχθυοτροφές είναι: η μαύρη μύγα, (*Hermetia illucens*), ο μεταξοσκώληκας (*Bombyx mori*), ο σκώληκας αλεύρου (*Tenebrio molitor*), και η οικιακή μύγα (*Musca domestica*) (Awoniyi et al., 2004; Pimentel et al., 2004; Newton et al., 2005; St-Hilaire et al., 2007; Anand et al., 2008; Ijaiya & Eko, 2009; Kroeckel et al., 2012; Veldkamp et al., 2012; Tran et al., 2015; Lock et al., 2016), με το ποσοστό υποκατάστασης ωστόσο να ποικίλει μεταξύ των εκτρεφόμενων ειδών ιχθύων (Henry et al., 2015; Roncarati et al., 2015).

Τα θρεπτικά στοιχεία επίσης φαίνεται να διαφέρουν από είδος σε είδος αλλά και μεταξύ των σταδίων ανάπτυξης τους (Alegbeleye et al., 2012; Van Huis, 2013; Barroso et al., 2014; Makkar et al., 2014; Sánchez-Muros et al., 2014;Henry et al., 2015; Tran et al., 2015;). Σε αυτό το σημείο ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα μόνα είδη εντόμων που επιτρέπει ο συγκεκριμένος ευρωπαϊκός κανονισμός να χρησιμοποιούνται για παραγωγή μεταποιημένης ζωικής πρωτεΐνης για χρήση στις ζωοτροφές είναι:

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

- η μαύρη μύγα των απορριμμάτων *Hermetia illucens* και η κοινή οικιακή μύγα *Musca domestica*

- το μεγάλο σκαθάρι των αλεύρων *Tenebrio molitor* και μικρό σκαθάρι των αλεύρων *Alphitobius diaperinus*

- ο οικοδίαιτος γρύλλος *Acheta domesticus*, ο στικτός μαύρος γρύλλος *Gryllodes sigillatus* και ο αγροδίαιτος γρύλλος *Gryllus assimilis*

1.4.6. Υποκατάσταση ιχθυαλεύρου και ιχθυελαίου στις ιχθυοτροφές και επιπτώσεις στη μικροβιακή γαστρεντερική κοινότητα των ιχθύων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το γαστρεντερικό μικροβίωμα των ιχθύων φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από παράγοντες όπως η ηλικία, το περιβάλλον και η διατροφή (Sakata et al., 1980; Bitterlich & Schaber, 1986; MacFarlane et al., 1986; Kim et al., 2007; Navarrete et al., 2009; Ward et al., 2009). Δεδομένου ότι η αντικατάσταση των συμβατικών συστατικών των ιχθυοτροφών φαίνεται δυνατή, η μεταβολή των μικροβιακών κοινοτήτων του γαστρεντερικού συστήματος των ιχθύων σε διατροφικά πειράματα με τα νέα πειραματικά σιτηρέσια προκαλεί ανησυχία. Αιτία αποτελεί η συσχέτιση των μεταβολών αυτών με ιστολογικές αλλοιώσεις που έχουν καταγραφεί στον γαστρεντερικό σωλήνα των εκτρεφόμενων πληθυσμών (Sitjà-Bobadilla et al., 2005; Merrifield et al., 2009; Cerezuela et al., 2013; Silva et al., 2011; Estruch et al., 2015; Silva et al., 2015; Baeza-Ariño et al., 2016), οι οποίες μπορεί να σχετίζονται με λειτουργικές διαταραχές όπως η εντερίτιδα και η αυξημένη παρουσία φλεγμονωδών κυττάρων (Krogdahl et al., 2003; Bakke-Mckellep et al., 2007).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

1.5. Σκοπός της Διδακτορικής διατριβής

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αποτέλεσε:

- Η μελέτη της επίδρασης της γεωγραφικής θέσης στην αυτόχθονη εντερική βακτηριακή κοινότητα εκτρεφόμενων πληθυσμών των ειδών *S. aurata* και *D. labrax*, από πέντε διαφορετικές και απομακρυσμένες μεταξύ τους περιοχές
- Η διερεύνηση ομοιοτήτων μεταξύ της αυτόχθονης εντερικής βακτηριακής κοινότητας συμπάτριων πληθυσμών εκτρεφόμενων ιχθύων (*D. puntazzo*, *P. pagrus*, *A. regius*, *S. aurata* και *D. labrax*)
- Η μελέτη της πρώτης εποίκησης και διαδοχής των βακτηριακών κοινοτήτων κατά τη νυμφική εκτροφή των ειδών *S. aurata* και *S. salar*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συνθήκες εκτροφής και συλλογή δειγμάτων

2.1.1. Αλλοπάτριοι και συμπάτριοι πληθυσμοί ιχθύων

Για την μελέτη της επίδρασης της γεωγραφικής θέσης στις εντερικές βακτηριακές κοινότητες αλλοπάτριων πληθυσμών ιχθύων, συλλέχθηκαν άτομα (4-6) των ειδών *S. aurata* και *D. labrax* από πέντε διαφορετικές μονάδες εκτροφής, που βρίσκονταν σε 5 διαφορετικές και απομακρυσμένες μεταξύ τους περιοχές της Ελλάδας (Εικ. 2.1). Οι ιχθύες εκτρέφονταν σε πλωτούς ιχθυοκλωβούς, σε παρόμοιες συνθήκες εκτροφής (θερμοκρασία, pH, αλατότητα, τροφή - συχνότητα ταΐσματος, βλέπε Πίν. Π1) και κατά τη δειγματοληψία βρίσκονταν στο εμπορεύσιμο μέγεθος (451±86,4g και 481,3±165,5g νωπό βάρος για το *S. aurata* και *D. labrax* αντίστοιχα, βλέπε Πιν. Π2).

Όσον αφορά τα δείγματα των συμπάτριων εκτρεφόμενων πληθυσμών ιχθύων, από την ίδια μονάδα εκτροφής στην περιοχή της Αταλάντης (Α), εκτός από τα δείγματα *S. aurata* και *D. labrax*, συλλέχθηκαν επίσης άτομα (n=3-5) των ειδών *Diplodus puntazzo*, *Pagrus pagrus* και *Argyrosomus regius* (Πίν. Π3). Τα δείγματα και στις δύο περιπτώσεις (αλλοπάτριοι και συμπάτριοι πληθυσμοί) λήφθηκαν τον ίδιο μήνα και έτος (Σεπτέμβριο 2014), με σκοπό την αποφυγή τυχόν εποχικών μεταβολών στην εντερική βακτηριακή ποικιλότητα τους. Οι ιχθύες αφέθηκαν άσιτοι για 24 ώρες πριν την δειγματοληψία, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα τροφής από το γαστρεντερικό τους σύστημα. Αμέσως μετά την αλίευση, ακολούθησε θανάτωση τους σε παγόνερο, τοποθέτηση σε κιβώτια από διογκωμένη πολυστερίνη (φελιζόλ) με πάγο (0°C) και μεταφορά τους στο εργαστήριο μέσα σε 6-14 ώρες.

Εκεί, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του νωπού βάρους για κάθε άτομο ιχθύος ξεχωριστά (Πίν. Π2 και Πίν. Π3). Έπειτα, με τη βοήθεια αποστειρωμένων χειρουργικών

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

εργαλείων, πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του εντερικού σωλήνα από τα δείγματα, απομάκρυνση του εντερικού περιεχομένου (κόπρανα) και ξέπλυμα του εντερικού ιστού με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό απαλλαγμένο από στερεά, διηθημένο σε ηθμό με μέγεθος πόρου 0,2μm, για την απομάκρυνση μικροβιακών οργανισμών που δεν ανήκαν στις ενδο- και επιβιωτικές μικροβιακές κοινότητες του εντερικού σωλήνα. Ακολούθησε, αποκοπή του μεσέντερου (midgut) και αποθήκευση του, για κάθε άτομο ξεχωριστά, σε κωνικό σωληνάριο 1.5 ml τύπου Eppendorf με πώμα. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την περαιτέρω ανάλυση τους.

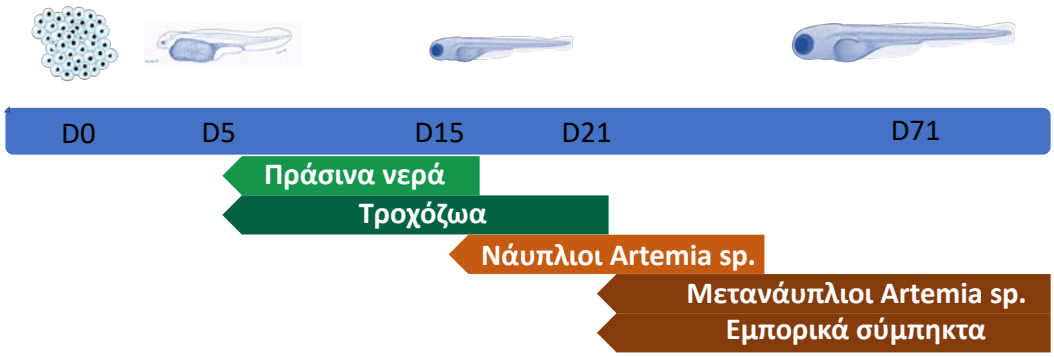
Εικόνα 2.1: Χάρτης με τις περιοχές των μονάδων εκτροφής από τις οποίες λήφθηκαν τα άτομα *S. aurata* και *D. labrax* (Nikouli et al. 2018): I: Igoumenitsa (Ηγουμενίτσα), Y: Yaltra, (Γιαλτρα), A: Atalanti (Αταλάντη), Ch: Chios (Χίος), C: Chania (Χανιά).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

2.1.2. Νυμφική εκτροφή του είδος *S. aurata*

Το πείραμα διεξήχθη σε ιχθυογεννητικό σταθμό (σε συνθήκες εμπορικής εκτροφής) και είχε διάρκεια τριών μηνών (Νοέμβριος 2015 – Ιανουάριος 2016). Τα γονιμοποιημένα αυγά προήλθαν από την ίδια ωοτοκία μίας ομάδας γεννητόρων. Η εκκόλαψη των αυγών και μετέπειτα η εκτροφή των λαρβών πραγματοποιήθηκαν σε κυλινδρικές δεξαμενές με σύστημα συνεχούς ροής φυσικού θαλασσινού νερού (επεξεργασμένο με μηχανικά φίλτρα και αποστειρωμένο με υπεριώδη ακτινοβολία) σύμφωνα με τα εγχειρίδια παραγωγής των Moretti et al. (1999; 2005).

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθημερινά πραγματοποιούνταν έλεγχος των φυσικοχημικών παραμέτρων (διαλυμένο οξυγόνο, θερμοκρασία, αλατότητα, pH, αμμωνία, νιτρικά), ώστε να διατηρούνται στα επιθυμητά επίπεδα. Τα στάδια της εκκόλαψης και του λεκιθικού σάκου πραγματοποιήθηκαν σε στάσιμο νερό, ενώ στα επόμενα στάδια υπήρχε συνεχής παροχή νερού (flow-through).



Εικόνα 2.2: Χρονικά σημεία (D0 - D71) δειγματοληψιών κατά τη διάρκεια της νυμφικής εκτροφής του είδους *S. aurata*.

Κατά τη διάρκεια της εκτροφής πραγματοποιήθηκαν 5 δειγματοληψίες (Εικ. 2.2), που αντιστοιχούν σε 5 διαφορετικά αναπτυξιακά/διατροφικά στάδια. Συγκεκριμένα, στην αρχή του πειράματος συλλέχθηκαν γονιμοποιημένα αυγά (D0) και λεκιθοφόρες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ιχθυονύμφες (D5). Μετά την έναρξη παροχής εξωτερικής τροφής, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες κάθε φορά πριν την αλλαγή της εκάστοτε δίαιτας (D15 = 10 μέρες διατροφής μόνο με τροχόζωα, D21 = 6 μέρες διατροφής με τροχόζωα και ναύπλιους *Artemia* sp., D71 = 50 μέρες διατροφής με μεταναύπλιους *Artemia* sp. και σταδιακή ένταξη εμπορικών σύμπηκτων), ώστε να μπορεί να αξιολογηθεί η επίδραση της κάθε τροφής ξεχωριστά, στη διαμόρφωση της βακτηριακής κοινότητας στις λάρβες *S. aurata*. Για την ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας του νερού εκτροφής, σε κάθε χρονικό σημείο λήφθηκαν 2L νερού από τη δεξαμενή εκτροφής με τη βοήθεια αποστειρωμένων γυάλινων φιαλών. Μετά το πέρας κάθε δειγματοληψίας, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε διάστημα ~2 ωρών, σε συσκευασία από διογκωμένη πολυστερίνη (φελιζόλ) με πάγο (0°C).

Σε κάθε χρονικό σημείο λήφθηκαν 3 ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις (biological replicates) για κάθε τύπο δείγματος (αυγά - λάρβες, τροχόζωα, ναύπλιοι *Artemia* sp., μεταναύπλιοι *Artemia* sp., νερό εκτροφής, εμπορικά σύμπηκτα τροφών) υγρού βάρους ~0,25g η κάθε μία. Τα δείγματα αυτά (με εξαίρεση τα εμπορικά σύμπηκτα) ξεπλύθηκαν καλά με αποστειρωμένο και απαλλαγμένο από στερεά φυσικό θαλασσινό νερό (βλέπε § 2.1.1) για την απομάκρυνση μικροβιακών πληθυσμών από την εξωτερική τους επιφάνεια. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στα δείγματα *S. aurata* που λήφθηκαν σε όλα τα χρονικά σημεία του συγκεκριμένου πειράματος, δεν πραγματοποιήθηκε αφαίρεση του γαστρεντερικού σωλήνα λόγω του μικρού μεγέθους των λαρβών.

Όσον αφορά τα δείγματα νερού, μετά από προ-διήθηση των δειγμάτων σε ηθμό με μέγεθος πόρου 180μm, ακολούθησε διήθηση με χρήση διηθητικού ηθμού 47mm τύπου GTTP ίσου πόρου με διάμετρο 0,2μm (GTTP, Millipore, USA) με τη βοήθεια πίεσης από ελεγχόμενη αντλία κενού (< 150 mm HG). Μετά το τέλος της διήθησης, οι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ηθμομεμβράνες τοποθετήθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας σε σωληνάριο τύπου cryovial 5 ml. Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80°C μαζί με τα υπόλοιπα δείγματα μέχρι την απομόνωση του DNA.

2.1.3. Νυμφική εκτροφή του είδους *S. salar*

Η νυμφική εκτροφή του είδους *S. salar* πραγματοποιήθηκε σε ιχθυογενετικό σταθμό του Norwegian University of Science and Technology, στον όρμο Ervika του δήμου Frøya (Trøndelag, Norway) (Εικ. 2.3). Τον Ιανουάριο του 2016, αυγά 3 θηλυκών ατόμων, γονιμοποιήθηκαν από το σπέρμα ενός αρσενικού ατόμου και τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα γλυκού νερού σε σκοτάδι στους 7ºC. Οι γεννήτορες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από εκτρεφόμενους πληθυσμούς.

Η εκκόλαψη των αυγών πραγματοποιήθηκε μέσα σε 36 ημέρες περίπου (6/1 - 10/2/2016), ενώ η πλήρης απορρόφηση του λεκιθικού σάκου παρατηρήθηκε σε 49 ημέρες μετά την εκκόλαψη (29/03/2016). Σε αυτό το σημείο, τα νεαρά άτομα σολομού μοιράστηκαν σε δεξαμενές εκτροφής (4 δεξαμενές, 200 άτομα/δεξαμενή) και τους χορηγήθηκε για πρώτη φορά εξωτερική τροφή (D0). Η αρχική θερμοκρασία του νερού στις δεξαμενές εκτροφής ήταν 8,5 ºC, και σταδιακά αυξήθηκε στους 12ºC όπου και διατηρήθηκε μέχρι το τέλος του πειράματος.

Από την έναρξη του πειράματος (D0) έως και την ολοκλήρωση (D93) του, η παροχή της τροφής γινόταν συνεχόμενα με αυτόματες ταΐστρες. Στη νυμφική εκτροφή του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δυο πειραματικά σύμπηκτα τροφών (Πιν. 2.1). Οι ιχθυοπληθυσμοί των δυο δεξαμενών διατράφηκαν αποκλειστικά με σιτηρέσιο που περιείχε ως πηγή λιπιδίων αποκλειστικά ιχθυέλαιο (FD), ενώ οι ιχθυοπληθυσμοί στις υπόλοιπες 2 δεξαμενές με σιτηρέσιο που βασίζονταν αποκλειστικά σε έλαια φυτικής προέλευσης (VD).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Εικόνα 2.3: Φωτογραφίες από τη νυμφική εκτροφή της παρούσας διδακτορικής διατριβής για το είδος *S. salar* (από προσωπικό αρχείο).

Κατά τη διάρκεια της εκτροφής πραγματοποιήθηκαν 6 δειγματοληψίες (Πίν. 2.2) που αντιστοιχούσαν σε 6 διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια (EG, YS, D0, D35, D65, D93). Σε κάθε στάδιο λήφθηκαν 10 δείγματα από κάθε δεξαμενή εκτροφής και

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ξεπλύθηκαν αμέσως 3-4 φορές με υπερκάθαρο νερό για την απομάκρυνση τυχόν μικροβιακών πληθυσμών που δεν σχετίζονταν με το μικροβίωμα του ξενιστή. Λόγω του μικρού μεγέθους των λαρβών στα χρονικά σημεία D0 (ολικό μήκος 29,9±1,6mm) και D35 (ολικό μήκος 38,9±5,4mm και 38,2±4,9mm, για τη διατροφή FD και VD αντίστοιχα), ο διαχωρισμός του εντέρου από τα υπόλοιπα εσωτερικά όργανα, αλλά και η τομή του, έγιναν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου στις εγκαταστάσεις του κέντρου «Αλιείας και Υδατοκαλλιέργειας» του NTNU (NTNU Center of Fisheries and Aquaculture - SeaLab) στην πόλη Τροντχάιμ (Trondheim, Norway). Για την μεταφορά των ατόμων ιχθύων εκεί, πραγματοποιήθηκε σε κάθε άτομο ξεχωριστά ξέπλυμα της εξωτερικής τους επιφάνειας με υπερκάθαρο νερό, τομή στην κοιλιακή χώρα και τοποθέτηση του σε φιαλίδιο με διάλυμα σταθεροποίησης (RNAlater®, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA). Στα υπόλοιπα χρονικά σημεία (D65 – D93) το μέγεθος αλλά και η πλήρη διαμόρφωση των εσωτερικών οργάνων επέτρεψαν την επιτόπου λήψη δειγμάτων εντερικού ιστού.

Παράλληλα, για την ανάλυση της βακτηριακής ποικιλότητας του νερού, σε κάθε χρονικό σημείο λήφθηκαν δείγματα νερού (0,1L) από κάθε δεξαμενή εκτροφής με τη βοήθεια αποστειρωμένων γυάλινων φιαλών και διατηρήθηκαν στους 4ºC μέχρι την άφιξη τους στο εργαστήριο. Εκεί, μετά από προ-διήθηση σε ηθμό με μέγεθος πόρου 180μm, ακολουθούσε διήθηση σε δύο διηθητικούς ηθμούς (50ml στον καθένα) με χρήση διηθητικού ηθμού 47mm τύπου GTTP ίσου πόρου με διάμετρο 0,2μm (GTTP, Millipore, USA) με τη βοήθεια πίεσης από ελεγχόμενη αντλία κενού (< 150 mm HG). Μετά το τέλος της διήθησης, οι ηθμομεμβράνες τοποθετήθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας σε σωληνάριο τύπου cryovial των 5 ml και αποθηκεύτηκαν στους -20°C μαζί

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

με τα υπόλοιπα δείγματα μέχρι την απομόνωση του DNA. Επίσης λήφθηκαν και τρεις επαναλήψεις των 0,25g από την κάθε τροφή (FD, VD).

Πίνακας 2.1: Συστατικά των πειραματικών τροφών FD και VD που χορηγήθηκαν στα ιχθύδια *S. salar*. Τα διαφορετικά συστατικά αναφέρονται με πράσινο χρώμα.

Συστατικά	**FD** %	**VD** %
Ιχθυάλευρο	10,000	10,000
CPSP 90	15,000	15,000
Άλευρο από καλαμάρι	25,000	25,000
Υδρολυμένη πρωτεΐνη γαρίδας	5,000	5,000
Ζελατίνη ψαριών	2,000	2,000
Πρωτεΐνη μπιζελιού	7,500	7,500
Γλουτένη σίτου	12,500	12,500
Ζελατοποιημένο άμυλο πατάτας	2,500	2,500
Ιχθυέλαιο	**7,200**	**0,000**
Έλαιο τόνου	**2,300**	**0,000**
Κραμβέλαιο	**0,000**	**2,900**
Λινέλαιο	**0,000**	**2,400**
Φοινικέλαιο	**0,000**	**4,200**
Μείγμα βιταμινών και μετάλλων	1,500	1,500
Lutavit C35	0,030	0,030
Lutavit E50	0,120	0,120
Μαγιά μπύρας	5,000	5,000
Βεταϊνη HCL	1,000	1,000
φωσφορικό μονοαμμώνιο	3,000	3,000
Ταυρίνη	0,350	0,350
Σύνολο	100	100

Πίνακας 2.2: Χρονικά σημεία δειγματοληψιών κατά τη νυμφική εκτροφή του είδους *S. salar*.

	Χρονικά σημεία					
	Γονιμοποιημένα αυγά (EG)	**Λεκιθοφόρα προνύμφη (YS)**	**D0**	**D35**	**D65**	**D93**
Μέσο βάρος (g)			0,23	0,58	2,23	4,56
Εγκαταστάσεις	Επωαστήρας		Δεξαμενές εκτροφής			
Θερμοκρασία νερού εκτροφής (°C)	8,1	8,1	8,1	9	10	11
Αριθμός δεξαμενών	1	1	1	4	4	4
Αριθμός δειγμάτων/δεξαμενή	10	10	10	10	10	10

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

2.2. Απομόνωση DNA

Για τον προσδιορισμό των βακτηριακών κοινοτήτων στα δείγματα που λήφθηκαν από τους συμπάτριους και αλλοπάτριους πληθυσμούς ιχθύων, χρησιμοποιήθηκαν 3 – 6 δείγματα μεσεντέρου, ανά είδος ιχθύος από κάθε περιοχή. Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό κιτ απομόνωσης PowerSoil DNA Isolation kit (MoBio, USA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του DNA μετρήθηκαν για κάθε δείγμα σε φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου (NanoDrop, ThermoScientific, USA).

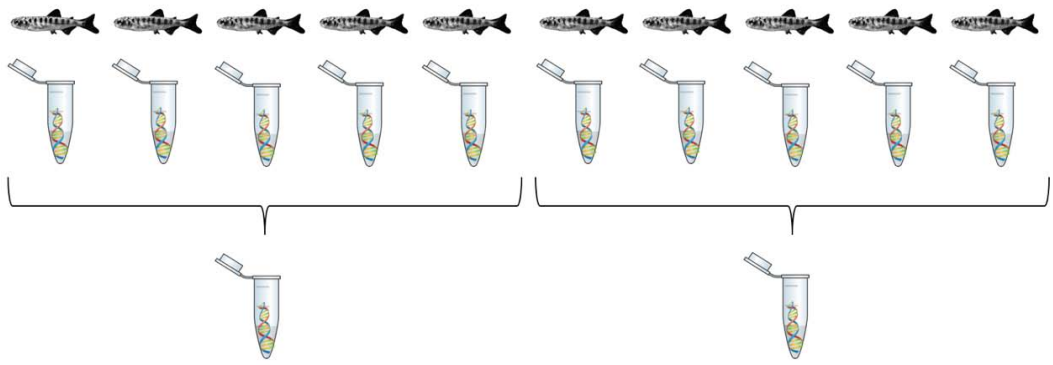
Όσον αφορά τη νυμφική διατροφή του είδους *S. aurata*, για την ανίχνευση των βακτηριακών κοινοτήτων χρησιμοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις για κάθε τύπο δείγματος από κάθε χρονικό σημείο. Το κάθε φίλτρο νερού πριν την απομόνωση χωρίστηκε σε τρία ίσα μέρη και το κάθε κομμάτι χρησιμοποιήθηκε ως ανεξάρτητη επανάληψη. Η απομόνωση του DNA όλων των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό σετ απομόνωση QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή για απομόνωση από ιστούς.

Το ίδιο εμπορικό κιτ απομόνωσης χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό των βακτηριακών κοινοτήτων στα δείγματα που λήφθηκαν κατά την νυμφική εκτροφή του είδους *S. salar* (Εικ. 2.4). Η απομόνωση του DNA έγινε ξεχωριστά για κάθε άτομο σολομού που λήφθηκε από κάθε δεξαμενή σε κάθε χρονικό σημείο (σύνολο 150 δείγματα) και στη συνέχεια μέρος τους ομαδοποιήθηκε ανά χρονικό σημείο και δεξαμενή.

Εικόνα 2.4: Απομόνωση DNA από τα δείγματα *S. salar* με χρήση του εμπορικού κιτ QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). (Φωτογραφία από προσωπικό αρχείο).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Συνολικά από κάθε χρονικό σημείο προέκυψαν 2 ομαδοποιημένα δείγματα τα οποία περιλάμβαναν 4μL DNA από το κάθε ατομικό δείγμα (Εικ. 2.5). Ομοίως, μετά την απομόνωση του DNA από δείγματα νερού έγινε ομαδοποίηση μέρους τους με βάση την πειραματική δίαιτα (FW και VW), ενώ ξεχωριστά στάλθηκε για ανάλυση το δείγμα νερού από τη δεξαμενή που πραγματοποιήθηκε η εκκόλαψη και απορρόφηση του λεκιθικού σάκου (WST). Η ίδια μέθοδος ακολουθήθηκε και στα δείγματα της χορηγούμενης τροφής (FD, VD).



Εικόνα 2.5: Γραφική απεικόνιση της ομαδοποίησης του DNA των ατόμων *S. salar* από κάθε δεξαμενή εκτροφής, πριν την αλληλούχιση.

2.3. Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση του DNA των δειγμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου MrDNA Ltd. (Shallowater, TX), με το ζεύγος εκκινητών S-D-Bact-0341-b-S-17 and S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth et al., 2012), στοχεύοντας την περιοχή V3-V4 του γονιδίου 16S rRNA. Για τα δείγματα των συμπάτριων και αλλοπάτριων πληθυσμών ιχθύων, καθώς και της νυμφικής εκτροφής του είδους *S. aurata*, η αλληλούχιση έγινε σε μηχάνημα Roche 454

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

FLX titanium, ενώ για τα δείγματα από τη νυμφική εκτροφή του *S. salar* σε πλατφόρμα Illumina MiSeq 2x300, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

2.4. Ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την αλληλούχιση, επεξεργάστηκαν με το λογισμικό MOTHUR (Schloss et al., 2009) σύμφωνα με τα πρωτόκολλο των Kozich et al. (2013) και Schloss et al. (2011) ενώ η ταξινομική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στην διαδικτυακή βάση δεδομένων SINA (Pruesse et al., 2012), με ελάχιστο ποσοστό ομοιότητας 80%. Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα που προέκυψαν από την αλληλούχιση έχουν υποβληθεί στη βάση δεδομένων Sequence Read Archive (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/) του Εθνικού Κέντρου Βιοτεχνολογικών Πληροφοριών των Η.Π.Α, με αριθμούς καταχώρισης SRR5161931, SRR5803847, SRR7946780.

2.5. Αναλύσεις αποτελεσμάτων και γραφικές παραστάσεις

Η στατιστική ανάλυση και οι γραφικές παραστάσεις, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση των λογισμικών PAST (Hammer et al., 2001) και R studio (RStudio Team, 2015) με εργαλεία της βιβλιοθήκης enveomics.R (Rodriguez-R & Konstantinidis, 2016). Η ανίχνευση των κοινών και ειδικών OTUs, μεταξύ των βακτηριακών κοινοτήτων των διαφορετικών δειγμάτων, έγινε με τη βοήθεια του διαδραστικού εργαλείου Venny 2.1. (Oliveros, 2007 – 2015). Στις εντερικές βακτηριακές κοινότητες των συμπάτριων πληθυσμών ιχθύων, πραγματοποιήθηκε επίσης ανάλυση δικτύων (network analysis) για τη διερεύνηση ομοιών ή μη βιολογικών σχέσεων των OTUs. Τα δίκτυα βασίστηκαν στις συσχετίσεις όλων των OTUs με βάση τον συντελεστή Spearman που προέκυψαν από τη χρήση του λογισμικού PAST (Hammer et al., 2001). Τα δίκτυα οπτικοποιήθηκαν με το

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

λογισμικό CYTOSCAPE 2.8.3 (Shannon et al., 2003) λαμβάνοντας υπόψη μόνο τις στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις ($p < 0.05$) με $R > 0.6$ ή $R < -0,6$.

Όσον αφορά τους αλλοπάτριους πληθυσμούς, οι χωρικές κατανομές των γαστρεντερικών βακτηριακών κοινοτήτων υπολογίστηκαν σύμφωνα με τα μακρο-οικολογικά πρότυπα των Lennon & Locey (2017). Για τον προσδιορισμό ειδικής, ανά είδος ιχθύος, δυναμικής των βακτηριακών κοινοτήτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος "DOC" των Bashan et al. (2016), υπολογίζοντας τη συσχέτιση μεταξύ των όμοιων και μη OTUs για κάθε πιθανό συνδυασμό ζευγών σε κάθε είδος ξενιστή για κάθε περιοχή. Επιπλέον, για την εξεύρεση πιθανών σχέσεων – αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βακτηρίων του γαστρεντερικού συστήματος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση δικτύου σύμφωνα με τους Morueta-Holme et al. (2016) βασισμένη στο λόγο των θετικών συσχετίσεων προς το σύνολο των συσχετίσεων των πιο άφθονων OTUs που ανιχνεύθηκαν στο εντερικό σύστημα στα άτομα των υπό μελέτη ιχθύων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μελέτη της επίδρασης της γεωγραφικής θέσης στις αυτόχθονες εντερικές βακτηριακές κοινότητες αλλοπάτριων πληθυσμών των ειδών *S. aurata* και *D. labrax*

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δεδομένων της πυροαλληλούχισης για τα δείγματα μεσεντέρου που λήφθηκαν από τους αλλοπάτριους πληθυσμούς *S. aurata* και *D. labrax*. Παρά το μικρό αριθμό αλληλουχιών σε μερικές περιπτώσεις, η κάλυψη των βακτηριακών OTUs στην παρούσα εργασία, με βάση τις καμπύλες αραιοσύστασης ήταν επαρκής (Εικ. Π1). Οι βακτηριακές κοινότητες του γαστρεντερικού συστήματος δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών περιοχών εκτροφής ($p>0,05$), στα δύο είδη ιχθύων που μελετήθηκαν, ενώ σε κάθε περίπτωση μόλις 10-21 OTUs κατείχαν ≥ 80% της συνολικής σχετικής αφθονίας (Πιν. 3.1).

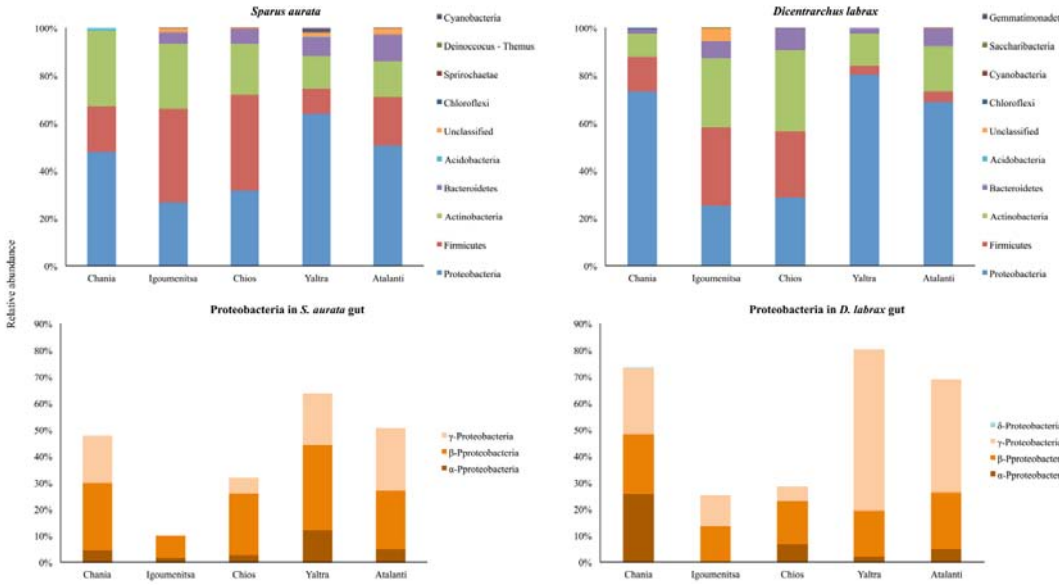
Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα της πυροαλληλούχισης για τις βακτηριακές κοινότητες των δειγμάτων εντέρου των ατόμων *S. aurata* (SA) και *D. labrax* (DL). C: Χίος, I: Ηγουμενίτσα, Ch: Χανιά, Y: Γιάλτρα, A: Αταλάντη.

	Αλληλουχίες		OTUs		Αριθμός πιο άφθονων OTUs (αθροιστική αφθονία ≥ 80%)		Κυρίαρχο OTU, σχετική αφθονία και κοντινότερος συγγενής	
Περιοχή	SA	DL	SA	DL	SA	DL	SA	DL
C	827 ± 512,4 N=4	2395 ± 725,4 N=5	11 ± 2,2	16 ± 8,7	10 (80,0)	17 (79,9)	OTU0011 (22,7) *Micrococcaceae* sp.	OTU0014 (17,2) *Paracoccus* sp.
I	2360 ± 1972,7 N=5	1809 ± 571,3 N=4	25 ± 28,3	27 ± 20,3	13 (81,0)	14 (80,0)	OTU0004 (27,8) *Bacillus* sp.	OTU0001(19,9) *Corynebacterium* sp.
Ch	2407 ± 1771,0 N=6	2148 ± 1785,2 N=6	18 ± 11,4	17 ± 9,8	13 (79,5)	13 (80,9)	OTU0004 (22,0) *Bacillus* sp.	OTU0001(24,7) *Corynebacterium* sp.
Y	2656 ± 1529,0 N=6	697 ± 367,3 N=6	19 ± 12,2	11 ± 2,4	21 (80,0)	10 (79,9)	OTU0002 (16,9) *Delftia* sp.	OTU0025 (21,9) *Acinetobacter* sp.
A	2533 ± 1052,7 N=5	1574 ± 1005,9 N=4	14 ± 8,1	13 ± 6,1	11 (80,0)	12 (80,1)	OTU0002 (17,7) *Delftia* sp.	OTU0005 (14,7) *Pseudomonas* sp.

Τα OTUs που ανιχνεύθηκαν στο εντερικό σύστημα των ατόμων *S. aurata* και *D. labrax*, που λήφθηκαν από τις 5 διαφορετικές και απομακρυσμένες μεταξύ τους μονάδες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

εκτροφής, ανήκαν σε 11 βακτηριακά φύλα (Εικ. 3.1). Τα φύλα Proteobacteria, Firmicutes και Actinobacteria αποτέλεσαν τα πιο άφθονα (≥ 78%) σε όλα τα δείγματα. Εκπρόσωποι των Bacteroidetes, βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα και στα δύο είδη, αλλά σε χαμηλότερη σχετική αφθονία. Τα υπόλοιπα φύλα (Chloroflexi, Spirochaetae, Deinoccocus – Thermus, Cyanobacteria, Saccharibacteria, Gemmatimonadetes, Acidobacteria) ανιχνεύθηκαν μόνο σε μερικές περιπτώσεις και μάλιστα σε χαμηλή σχετική αφθονία (≤ 1,5%).



Εικόνα 3.1: Συστηματική ταξινόμηση των βακτηριακών εκπροσώπων του γαστρεντερικού συστήματος των ιχθύων *S. aurata* και *D. labrax* (Nikouli et al. 2018).

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά το φύλο Proteobacteria στα δείγματα του είδους *S. aurata*, στις τέσσερις περιοχές (Γιάλτρα, Χανιά, Χίο, Ηγουμενίτσα), κυριάρχησε το υπόφυλο των *β*-Proteobacteria, ενώ στην πέμπτη περιοχή (Αταλάντη), τα *β*- και *γ*-Proteobacteria συγκυριαρχούσαν με 22,1% και 23,7%, σχετική αφθονία αντίστοιχα (Εικ. 3.1). Γενικά τα *γ*-Proteobacteria στην παρούσα εργασία, αποτέλεσαν το δεύτερο πιο άφθονο υπόφυλο των Proteobacteria, ενώ τα *α*-Proteobacteria βρίσκονταν πάντα σε

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

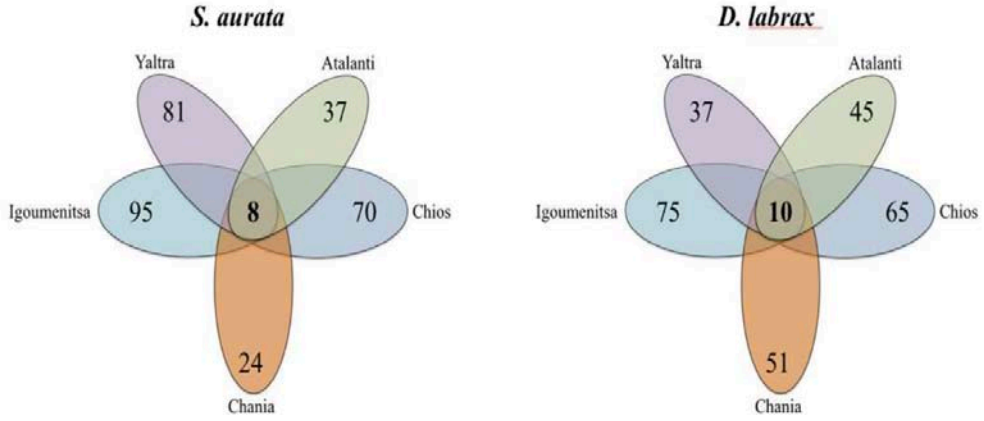
χαμηλή αφθονία. Αντίθετα, στο είδος *D. labrax*, στις τρεις από τις πέντε περιοχές (Χανιά, Γιάλτρα, Αταλάντη) το υπόφυλο *γ*-Proteobacteria ήταν το κυρίαρχο, ακολουθούμενο από τα *β*- και *α*-Proteobacteria. Στις υπόλοιπες περιοχές (Ηγουμενίτσα και Χίος), τα *β*-Proteobacteria κυριάρχησαν και πάλι. Στο *D. labrax* καταγράφηκαν μεγαλύτερες σχετικές αφθονίες των *α*-Proteobacteria σε σχέση με το *S. aurata* (Εικ. 3.1). Οι κυρίαρχες τάξεις και στις πέντε περιοχές εκτροφής που μελετήθηκαν και για τα δύο είδη ήταν οι ακόλουθες: Micrococcales, Corynebacteriales, Propionibacteriales, Bifidobacteriales, Flavobacteriales, Bacteroidales, Bacillales, Lactobacillales, Burkholderiales και Pseudomonadales.

Μετά από σύγκριση των εντερικών βακτηριακών ειδών (OTUs) των δύο ειδών ιχθύων, μεταξύ των πέντε διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών, παρατηρήθηκε η παρουσία κοινών OTUs (8 στο είδος *S. aurata* και 10 στο *D. labrax*, βλέπε Εικ. 3.2) σε όλα τα άτομα ανεξαρτήτου περιοχής. Πέντε (5) από αυτά τα OTUs, ήταν επίσης κοινά μεταξύ των δύο διαφορετικών ειδών ιχθύων (Εικ. 3.3), και ταξινομήθηκαν ως κοντινοί συγγενείς των ειδών *Delftia acidovorans* (Burkholderiales), *Pseudomonas panacis* (Pseudomonadales), *Pelomonas puraquae* (Burkholderiales), *Propionibacterium acnes* (Propionibacteriales) και *Atopostipes suicloacalis* (Lactobacillales). Με βάση τη σχέση μεταξύ του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου 16S rDNA και του τάχους αύξησης των βακτηρίων (Roller et al., 2016), ο χρόνος διπλασιασμού αυτών των μικροοργανισμών κυμαίνεται μεταξύ 0,8 - 2,0 h^{-1} (Nikouli et al. 2018).

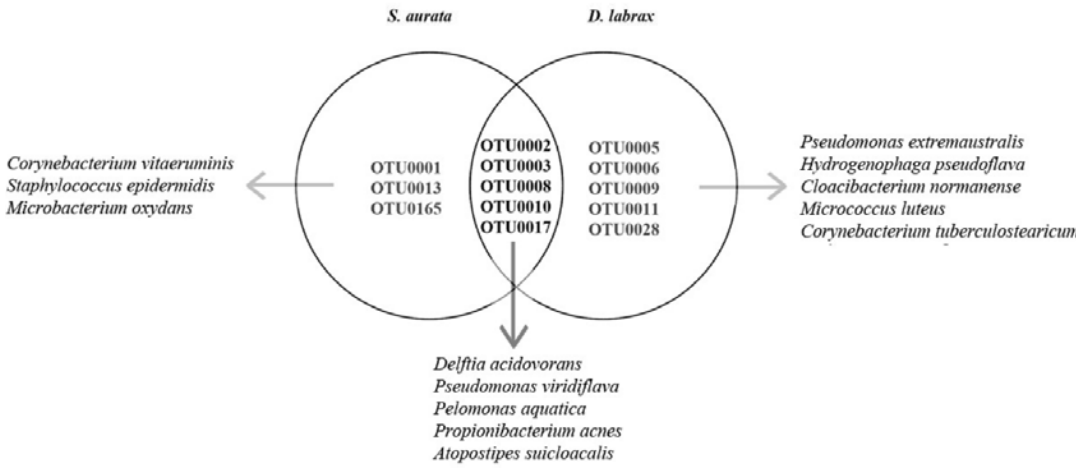
Η γεωγραφική θέση (απόσταση) των μονάδων εκτροφής δεν παρουσίασε συσχέτιση με την αφθονία των OTUs ή τον αριθμό των κοινών OTUs στις γαστρεντερικής βακτηριακές κοινότητες των δύο ειδών ιχθύων (Εικ. 3.4). Παράλληλα, συγκρίνοντας τις γαστρεντερικές βακτηριακές κοινότητες τους, με τη χρήση του δείκτη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ομοιότητας Bray-Curtis, (NMDS, Εικ. 3.5), τα αποτελέσματα δεν επέδειξαν σαφή διαχωρισμό μεταξύ των δύο υπό μελέτη ειδών (ANOSIM χρησιμοποιώντας την Ευκλείδεια απόσταση p = 0,391, R=9,3-05). Ομοίως, ούτε η ανάλυση διασποράς με έναν παράγοντα (one-way ANOVA) υπέδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των βακτηριακών κοινοτήτων των δύο ειδών ιχθύων (p>0.05).

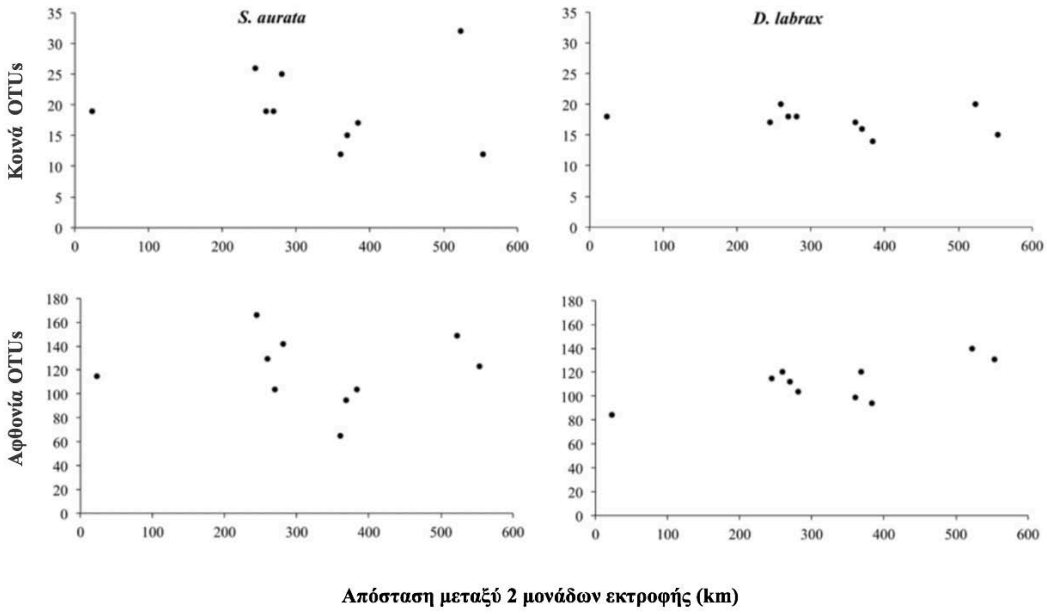


Εικόνα 3.2: Κοινά OTUs στις εντερικές βακτηριακές κοινότητες μεταξύ των ατόμων των διαφορετικών πληθυσμών στα είδη *S. aurata* και *D. labrax*.

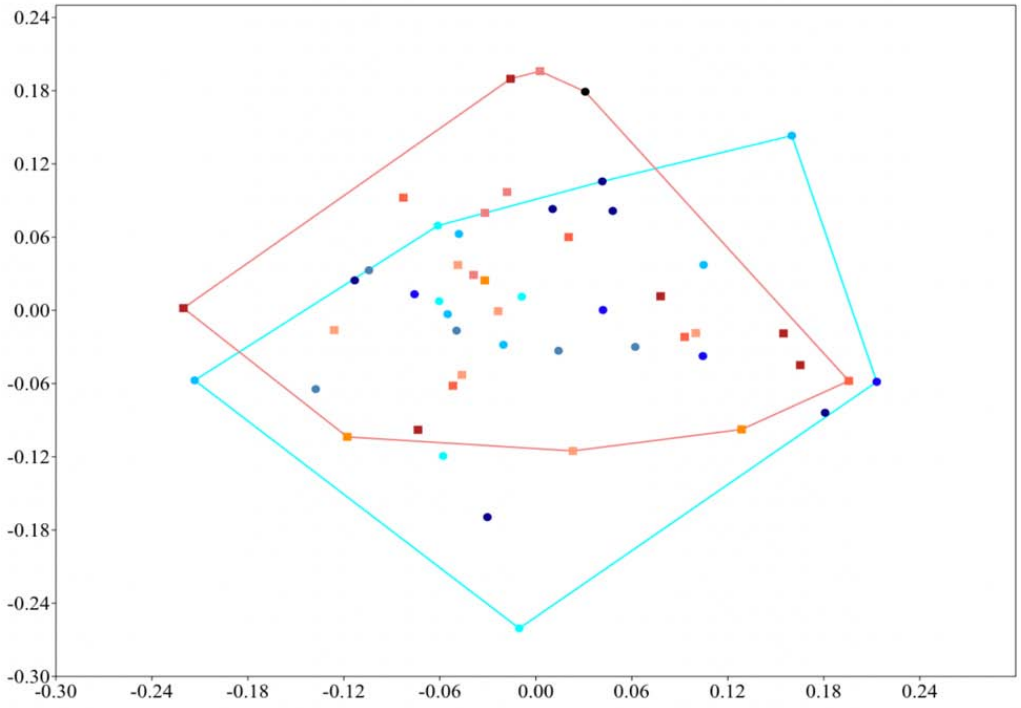


Εικόνα 3.3: Κοινά OTUs στις εντερικές βακτηριακές κοινότητες των δύο ειδών ιχθύων (*S. aurata* και *D. labrax*)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49



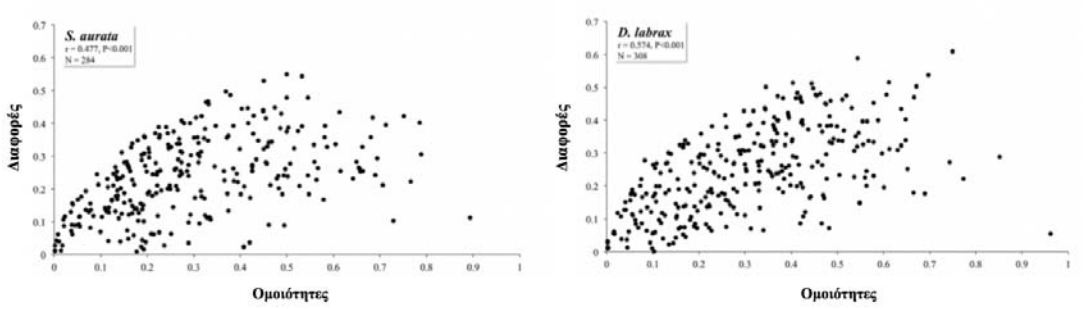
Εικόνα 3.4: Γραφική παράσταση της σχέσης των κοινών OTUs και της συνολικής αφθονίας των OTUs με την απόσταση μεταξύ των διαφορετικών μονάδων εκτροφής των ιχθύων *S. aurata* και *D. labrax*.



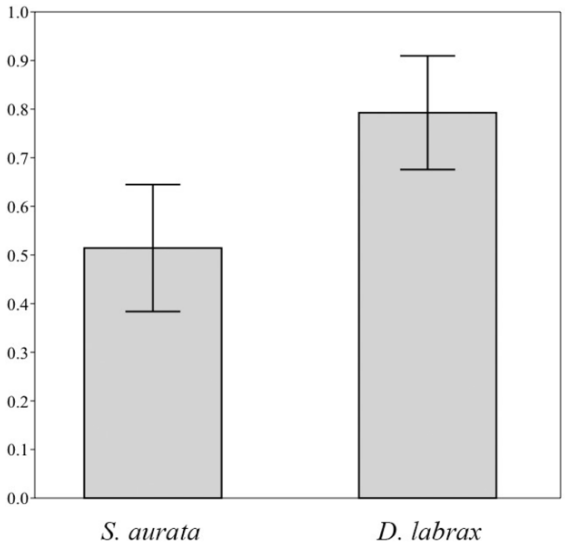
Εικόνα 3.5: NMDS απεικόνιση (Μήτρα αποστάσεων κατά Bray-Curtis) των βακτηριακών κοινοτήτων των δειγμάτων *S. aurata* (κόκκινη γραμμή) και *D. labrax* (μπλε γραμμή).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Επιπλέον, με τη χρήση της μεθόδου “DOC” (όπως αυτή περιγράφεται στην § 2.5.), οι συσχετίσεις μεταξύ των ομοιοτήτων και των διαφορών στη δομή των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων, βρέθηκαν θετικές και για τα δύο είδη (r= 0,477 και 0,574, p<0,002 στα είδη *S. aurata* και *D. labrax*, αντίστοιχα), υποδεικνύοντας υψηλές ατομικές διαφορές, όσον αφορά τις αφθονίες των OTUs, ακόμα και μεταξύ των ατόμων του ίδιου πληθυσμού (Εικ. 3.6). Τέλος, η ανάλυση δικτύου (Εικ. 3.7), με βάση τον λόγο των θετικών προς των ολικών συσχετίσεων των πιο άφθονων OTUs (που υπολογίστηκαν για κάθε είδος ξεχωριστά) διέφεραν σημαντικά (p<0,05).



Εικόνα 3.6: Γραφική απεικόνιση των συσχετίσεων μεταξύ των όμοιων και διαφορετικών OTUs για κάθε πιθανό συνδυασμό ζευγών σε κάθε είδος ξενιστή (*S. aurata* και *D. labrax*) για κάθε περιοχή (Igoumenitsa, Yaltra, Atalanti, Chios, Chania).

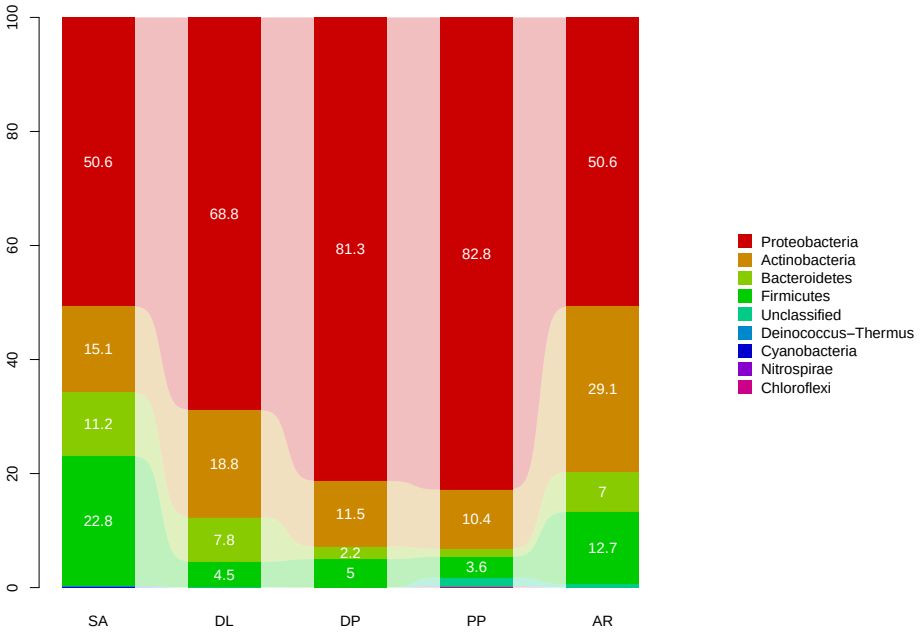


Εικόνα 3.7: Γραφική απεικόνιση του λόγου των θετικών συσχετίσεων προς το σύνολο των συσχετίσεων (Pearson, −0,7 > R > 0,7, p < 0,05) των πιο άφθονων OTUs που ανιχνεύθηκαν στο εντερικό σύστημα των εκτρεφόμενων ατόμων *S. aurata* και *D. labrax*. Οι κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν το τυπικό σφάλμα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

3.2. Προσδιορισμός των αυτόχθονων εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων σε συμπάτριους πληθυσμούς εκτρεφόμενων ιχθύων

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της πυροαλληλούχισης για τα δείγματα μεσεντέρου των ιχθύων *D. puntazzo* (DP), *P. pagrus* (PP), *A. regius* (AR), *S. aurata* (SA) και *D. labrax* (DL), προέκυψαν συνολικά 181 διαφορετικά OTUs. Σύμφωνα με την ανάλυση αραιοσύστασης η κάλυψη των βακτηριακών OTUs ήταν επαρκής (Εικ. Π3). Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι η πλειοψηφία αυτών ταξινομήθηκε στο βακτηριακό φύλο Proteobacteria (με σχετική αφθονία 66,8%). Το φύλο αυτό, παρουσίασε τη μεγαλύτερη σχετική αφθονία στις εντερικές βακτηριακές κοινότητες και στα 5 είδη εκτρεφόμενων ιχθύων, ενώ σε αυτό επίσης ανήκε και το κυρίαρχο OTU του κάθε ξενιστή. Συνολικά, ανιχνευθήκαν 8 βακτηριακά φύλα (Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Chloroflexi, Nitrospirae, Cyanobacteria και Deinococcus-Thermus).



Εικόνα 3.8: Σχετική αφθονία των βακτηριακών φύλων που ανιχνεύθηκαν στον εντερικό σωλήνα των συμπάτριων εκτρεφόμενων ιχθύων *S. aurata* (SA), *D. labrax* (DL), *D. puntazzo* (DP), *P. pagrus* (PP) και *A. regius* (AR).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

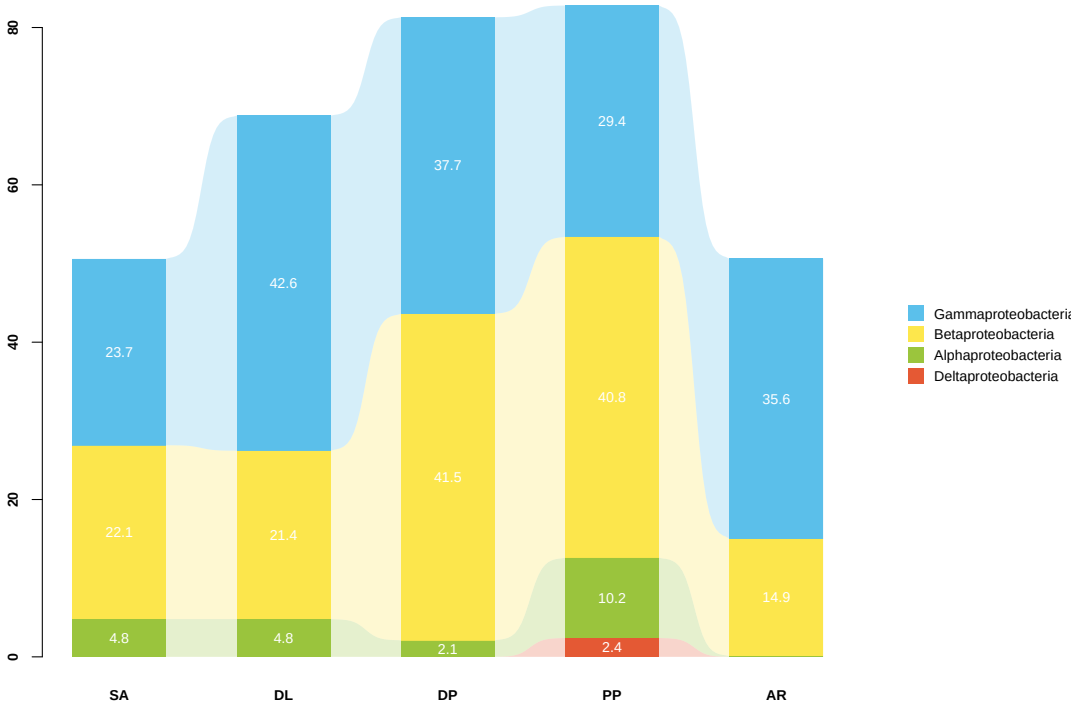
Τα φύλα Actinobacteria, Firmicutes και Bacteroidetes (με σχετική αφθονία 17,0%, 9,7% και 5,9% αντίστοιχα) αποτέλεσαν τα αμέσως πιο άφθονα από τα Proteobacteria (Εικ. 3.8), ενώ τα φύλα Chloroflexi, Nitrospirae, Cyanobacteria και Deinococcus-Thermus ανιχνεύθηκαν σε σχετική αφθονία ≤0,2%. Παράλληλα, 19 OTUs (με συνολική σχετική αφθονία 0,6%) δεν ταξινομήθηκαν σε κανένα γνωστό βακτηριακό φύλο και χαρακτηρίστηκαν ως «μη ταξινομημένα» (unclassified).

Τα Proteobacteria εκπροσωπήθηκαν κυρίως από είδη των *β*- και *γ*- Proteobacteria (Εικ. 3.9), ενώ η σχετική αφθονία του υπόφυλου *α*-Proteobacteria και στα πέντε είδη ιχθύος παρέμεινε σε χαμηλά ποσοστά (≤10,2%). Το κυρίαρχο OTU κάθε ξενιστή, κατέγραψε σχετική αφθονία ≥14,67% και διέφερε ανά είδος ιχθύος. Μόνη εξαίρεση αποτέλεσε το OTU002, το οποία ήταν το κυρίαρχο στα είδη ιχθύων SA και DP και ταξινομήθηκε ως *Delftia acidovorans*. Οι κοντινότεροι συγγενείς των υπόλοιπων κυρίαρχων OTUs ήταν οι *Pseudomonas veronii*, *Hydrogenophilus thermoluteolus* και *Enterobacter cloacae* (Πιν. 3.2). Επίσης, σε κάθε είδος ξενιστή παρατηρήθηκε ότι ένα σύνολο αποτελούμενο από μόλις 6 – 12 OTUs κατείχε σχετική αθροιστική αφθονία ≥ 80% (Πιν. 3.2) με την κατανομή της αφθονίας τους ωστόσο να διαφέρει από ξενιστή σε ξενιστή (Εικ. Π4).

Περαιτέρω σύγκριση των βακτηριακών εκπροσώπων μεταξύ των πέντε διαφορετικών ξενιστών, έδειξε την παρουσία 7 κοινών OTUs (Εικ. 3.10), υποδεικνύοντας ότι μόλις το 3,9% των συνολικών ανιχνευμένων OTUs ήταν κοινό μεταξύ αυτών. Παρά τις διαφορές που καταγράφηκαν, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ($p>0,05$), όσον αφορά την παρουσία των OTUs μεταξύ των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων των πέντε συμπάτριων εκτρεφόμενων ιχθύων (SA, DL, DP, PP, AR), ενώ ούτε η παρατηρηθείσα αφθονία διέφερε σημαντικά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

(Εικ. 3.11). Η γραφική απεικόνιση στο χώρο με NMDS (non-metric multidimensional scaling) (Εικ. 3.12), βασισμένη στον δείκτη ομοιότητας Bray-Curtis μεταξύ των βακτηριακών κοινοτήτων όλων των δειγμάτων για κάθε είδος ιχθύος (SA, DL, DP, PP, AR), δεν έδειξε ομαδοποίηση των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων ανά ξενιστή. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι διαφορές μεταξύ των πέντε διαφορετικών ιχθύων έδειξε η ανάλυση δικτύων (Εικ. 3.13), σύμφωνα με την οποία το είδος *A. regius* είχε με διαφορά τις περισσότερες συνδέσεις με OTUs (2013) ενώ το DP τις λιγότερες (42, βλέπε Πιν. Π4). Ο αριθμός συνδέσεων στα είδη SA, DL και PP ήταν 310, 223 και 118 αντίστοιχα (Πιν. Π4).

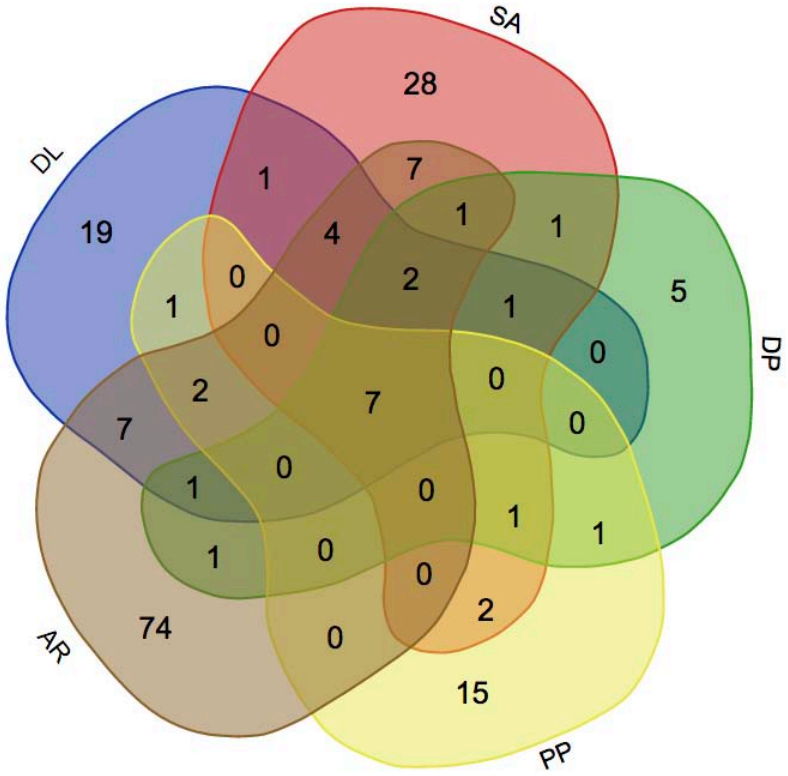


Εικόνα 3.9: Σχετική αφθονία των ανιχνευμένων υπόφυλων του βακτηριακού φύλου Proteobacteria στο εντερικό σύστημα των συμπάτριων εκτρεφόμενων ιχθύων *S. aurata* (SA), *D. labrax* (DL), *D. puntazzo* (DP), *P. pagrus* (PP) και *A. regius* (AR).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

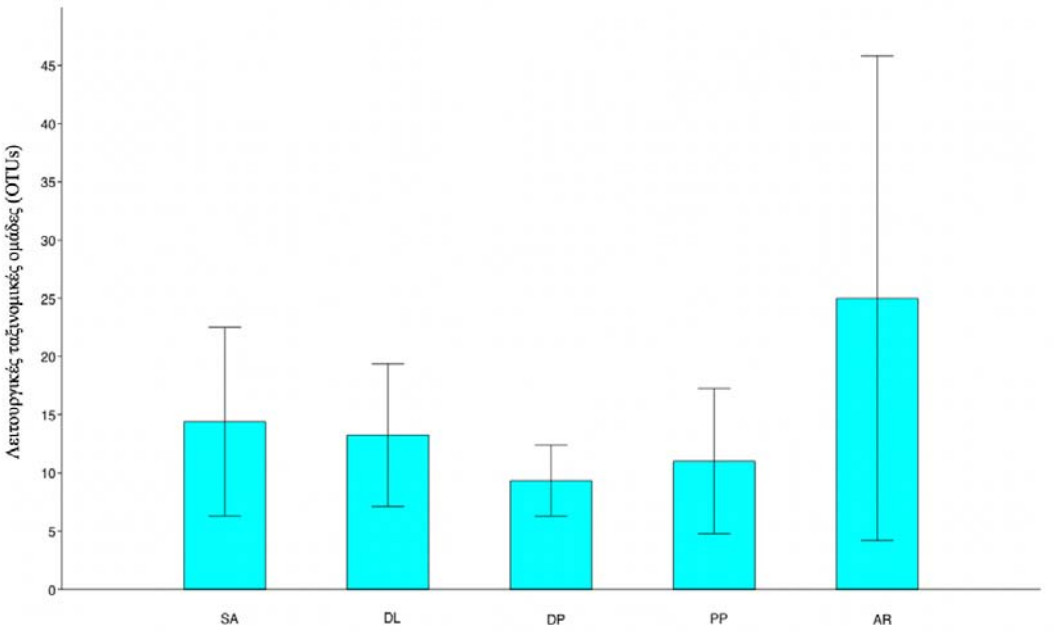
Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα της πυροαλληλούχισης για τις βακτηριακές κοινότητες στο εντερικό σύστημα των συμπάτριων εκτρεφόμενων ιχθύων *S. aurata* (SA), *D. labrax* (DL), *D. puntazzo* (DP), *P. pagrus* (PP) και *A. regius* (AR) και οι κοντινότεροι συγγενείς τους.

Ξενιστής	Reads	OTUs	Αριθμός πιο άφθονων OTUs (αθροιστική αφθονία ≥ 80%)	Κυρίαρχο OTU, σχετική αφθονία και κοντινότερος συγγενής
SA	1574 ± 1005,9 N=4	13 ± 6,1	11 (80)	OTU002 (17,72%) *Delftia acidovorans*
DL	2533 ± 1052,7 N=5	14 ± 8,1	12 (80,1)	Otu0005 (14,67%) *Pseudomonas veronii*
DP	2454 ± 1140,5 N=3	9 ± 3,1	6 (81,2)	Otu0002 (29,67%) *Delftia acidovorans*
PP	3027 ± 1957,3 N=3	11 ± 6,2	8 (81,1)	Otu0018 (22,11%) *Hydrogenophilus thermoluteolus*
AR	3519 ± 2283,4 N=5	25 ± 20,8	11 (81,5)	Otu0007 (25,04) *Enterobacter cloacae*

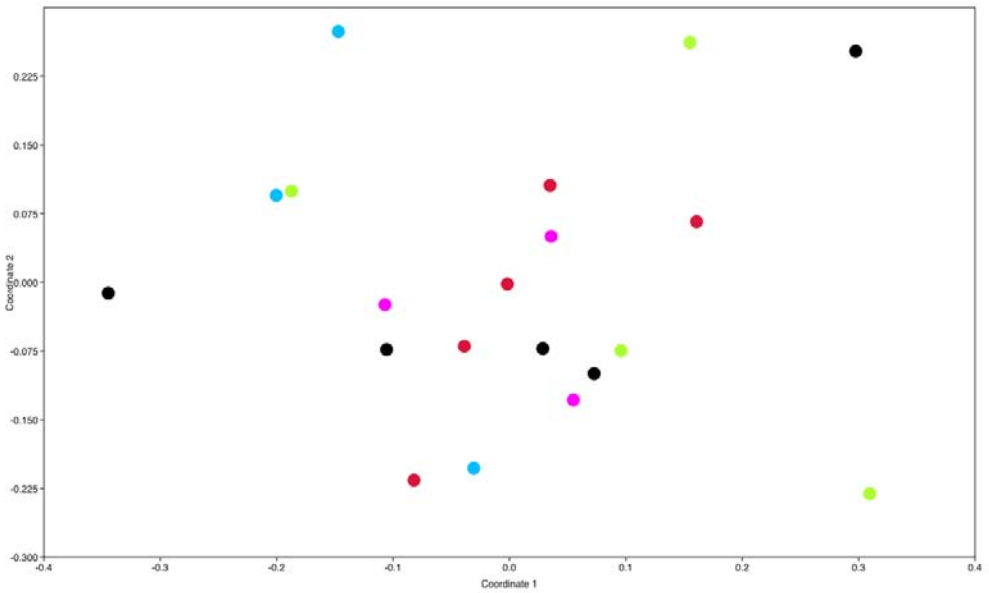


Εικόνα 3.10: Κοινά OTUs στο εντερικό σύστημα των συμπάτριων εκτρεφόμενων ιχθύων *S. aurata* (SA), *D. labrax* (DL), *D. puntazzo* (DP), *P. pagrus* (PP) και *A. regius* (AR).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

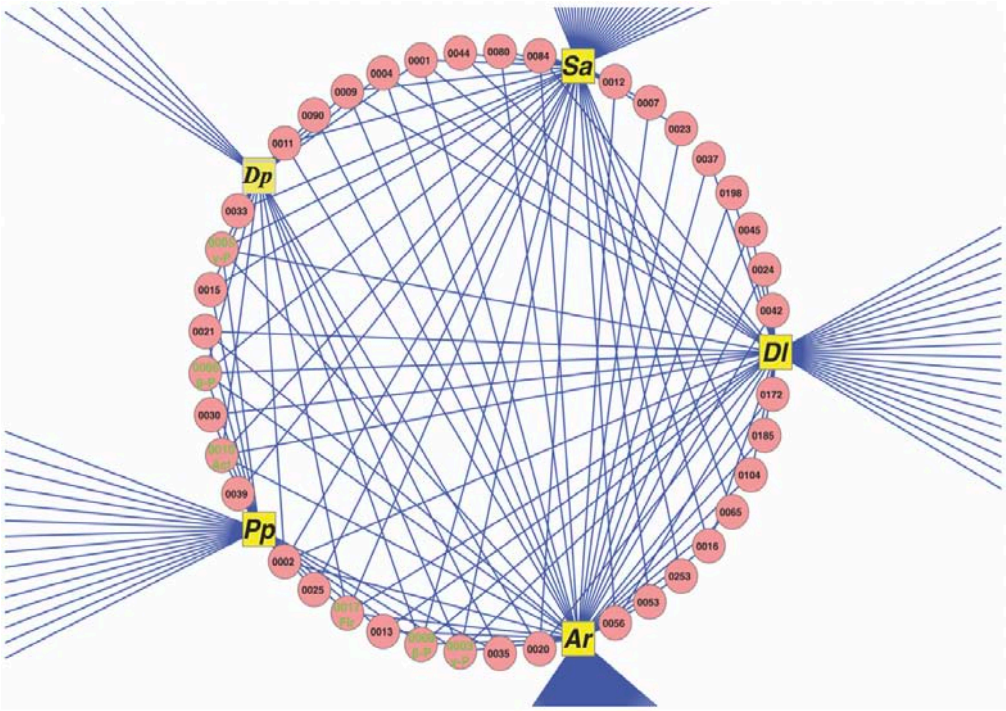


Εικόνα 3.11: Αφθονία βακτηριακών ειδών (OTUs) στο εντερικό σύστημα των συμπάτριων εκτρεφόμενων ιχθύων *S. aurata* (SA), *D. labrax* (DL), *D. puntazzo* (DP), *P. pagrus* (PP) και *A. regius* (AR). Οι κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 3.12: NMDS απεικόνιση (μήτρα αποστάσεων κατά Bray-Curtis) των βακτηριακών κοινοτήτων στον εντερικό σωλήνα των συμπάτριων εκτρεφόμενων ιχθύων *S. aurata* (κόκκινο), *D. labrax* (πράσινο), *D. puntazzo* (ροζ), *P. pagrus* (μπλε) και *A. regius* (μαύρο).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49



Εικόνα 3.13: Δομή δικτύων των σχέσεων μεταξύ των OTUs που ανιχνεύθηκαν στον εντερικό σωλήνα των συμπάτριων εκτρεφόμενων ιχθύων *S. aurata* (SA), *D. labrax* (DL), *D. puntazzo* (DP), *P. pagrus* (PP) και *A. regius* (AR). Οι τετράγωνοι κίτρινοι κόμβοι αντιπροσωπεύουν τα πέντε είδη ιχθύων ενώ οι στρογγυλοί τα OTUs που παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές συσχετίσεις ($p < 0,05$, $R > 0,6$) με βάση τον συντελεστή Spearman.

3.3. Πρώτη εποίκηση και διαδοχή των βακτηριακών κοινοτήτων σε ιχθυονύμφες του είδους *S. aurata*

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των περιβαλλοντικών δειγμάτων (νερό εκτροφής, παρεχόμενη ζωντανή τροφή και σιτηρέσια) και των δειγμάτων *S. aurata*, από το πείραμα της νυμφικής εκτροφής του. Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της πυροαλληλούχισης και αφού προηγήθηκε ποιοτικός έλεγχος και αφαίρεση των αλληλουχιών που εμφανίστηκαν μόνο μία φορά στο σύνολο των δεδομένων (singletons), προέκυψαν 1917 λειτουργικές ταξινομικές ομάδες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

(OTUs, Operational Taxonomic Units). Με βάση τις καμπύλες αραιοσύστασης (Εικ. Π5) και τον δείκτη Chao1 (Πιν. Π5), το βάθος της αλληλούχισης ήταν ικανοποιητικό για την πλειοψηφία των δειγμάτων.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.3, ο μέσος όρος των OTUs στα δείγματα κυμάνθηκε από 93 ± 2,1 (D5) έως 366 ± 49,2 (WD0_5). Η παρατηρηθείσα (observed) αφθονία ειδών (OTUs) στα δείγματα *S. aurata* (SA) ήταν χαμηλότερη στο χρονικό σημείο D5 (93 ± 2,1), ενώ στο D0 καταγράφηκε η μεγαλύτερη τυπική απόκλιση (217 ± 87,5). Ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες μεταβολές στην αφθονία των OTUs μετά το άνοιγμα του στόματος (D15, D21, D71, βλέπε Εικ. Π6). Όσον αφορά τους υπόλοιπους τύπους δειγμάτων (νερό εκτροφής και παρεχόμενες τροφές), η παρατηρηθείσα αφθονία τους (Πιν. 3.3) σε κάθε χρονικό σημείο ήταν πάντα μεγαλύτερη από αυτή των δειγμάτων *S. aurata* (με εξαίρεση το δείγμα AN). Σύμφωνα με τους δείκτες ποικιλότητας Shannon H

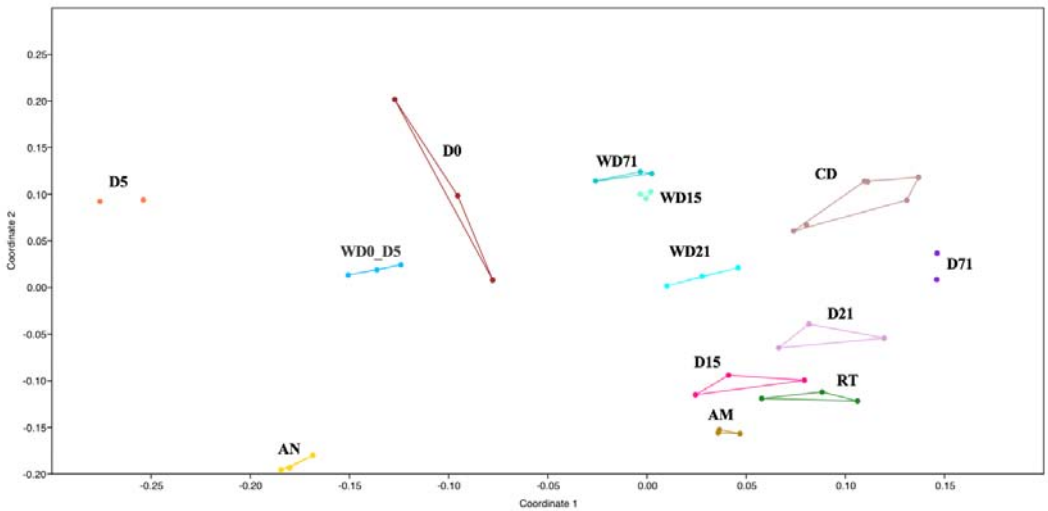
Πίνακας 3.3: Αποτελέσματα της πυροαλληλούχισης για τις βακτηριακές κοινότητες των περιβαλλοντικών δειγμάτων (νερό εκτροφής, παρεχόμενη ζωντανή τροφή και σιτηρέσια) και των δειγμάτων *S. aurata* για κάθε χρονικό σημείο (D0 – D71).

Τύπος δείγματος	Κωδικός Δείγματος	Reads	OTUs
S. aurata	D0	4525,3 ± 1930,9 N=3	217,3 ± 87,5
	D5	6872,5 ± 1065,6 N=2	92,5 ± 2,1
	D15	2831,0 ± 1521,6 N=3	160,7 ± 30,1
	D21	1063,7 ± 447,7 N=3	141,0 ± 29,5
	D71	1346,5 ± 494,3 N=2	140,5 ± 4,9
Νερό εκτροφής	WD0_5	11331,3 ± 4103,6 N=3	366,3 ± 49,2
	WD15	10260,7 ± 1145,7 N=3	327,7 ± 8,0
	WD21	4634,3 ± 2064,9 N=3	335,3 ± 33,5
	WD71	5373,0 ± 2577,2 N=3	288,0 ± 49,7
Τροχόζωα	RT	4244,7 ± 1281,1 N=3	288,0 ± 42,0
A. salina (ναύπλιοι)	AN	14363,0 ± 2992,5 N=3	137,0 ± 6,6
A. salina (μεταναύπλιοι)	AM	9002,0 ± 12516 N=3	223,7 ± 14,0
Εμπορικά Σύμπηκτα	CD	2266,3 ± 1007,7 N=6	257,2 ± 36,0

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

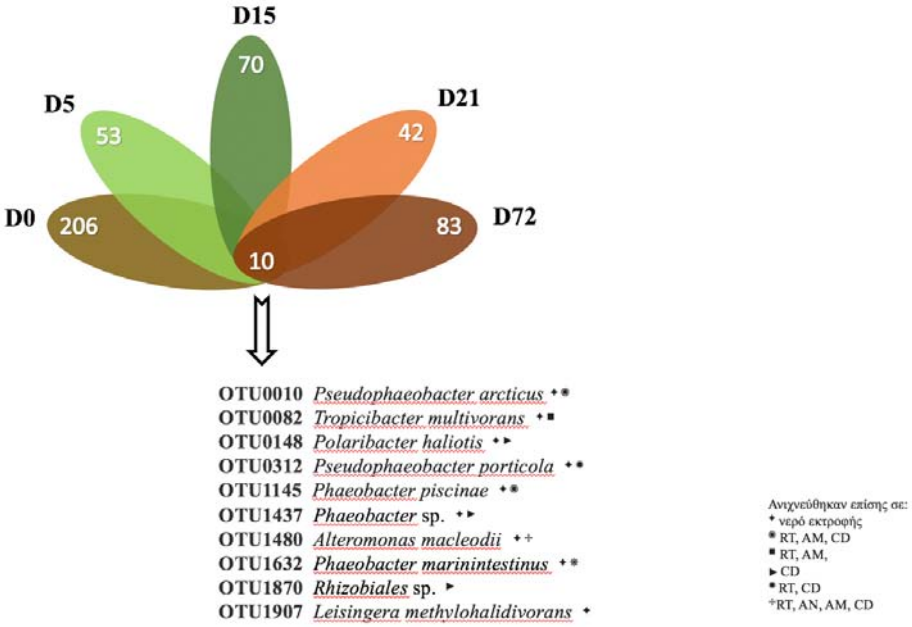
και Simpson 1-D (Πιν. Π5), παρατηρήθηκε μεγάλη ποικιλότητα σε όλα τα δείγματα, με την κυριαρχία να ανήκει μόνο σε μερικά είδη.

Η γραφική απεικόνιση στο χώρο με NMDS (Εικ. 3.15), βασισμένη στην μήτρα ομοιότητας μεταξύ των βακτηριακών κοινοτήτων όλων των δειγμάτων υπολογισμένη με το δείκτη Bray–Curtis, έδειξε μη επικάλυψη και σαφή διαχωρισμό μεταξύ των διαφορετικών τύπων δειγμάτων. Συγκρίνοντας τις βακτηριακές κοινότητες των δειγμάτων SA, παρατηρήθηκε η παρουσία 10 κοινών OTUs και στα πέντε χρονικά σημεία που μελετήθηκαν (Εικ. 3.16 και Εικ. Π7), τα οποία ανιχνεύθηκαν επίσης σε δείγματα του περιβάλλοντος εκτροφής (νερό εκτροφής και τροφές). Οι ταξινομικά κοντινοί χαρακτηρισμένοι συγγενείς τους είναι οι *Pseudophaeobacter arcticus*, *Tropicibacter multivorans*, *Polaribacter haliotis*, *Pseudophaeobacter porticola*, *Phaeobacter piscinae*, *Phaeobacter* sp., *Alteromonas macleodii*, *Phaeobacter marinintestinus*, *Rhizobiales* sp. and *Leisingera methylohalidivorans* (Εικ. 3.16). Θα πρέπει να αναφερθεί επίσης, ότι σε όλα τα χρονικά σημεία, ένα ποσοστό OTUs (19,2%



Εικόνα 3.15: NMDS απεικόνιση (Μήτρα αποστάσεων κατά Bray-Curtis) των βακτηριακών κοινοτήτων των δειγμάτων *S. aurata* (D0, D5, D15, D21, D71), νερού (WD0_5, WD15, WD21, WD71) και τροφών (RT, AN, AM, CD).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49



Εικόνα 3.16: Κοινά OTUs μεταξύ των δειγμάτων *S. aurata* και στα 5 διαφορετικά χρονικά σημεία που μελετήθηκαν (D0, D5, D15, D21, D71) και οι κοντινοί χαρακτηρισμένοι συγγενείς τους.

– 69,9%) ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στον ξενιστή (SA), με τα γονιμοποιημένα αυγά να καταγράφουν το μεγαλύτερο ποσοστό (D0). Μετά το άνοιγμα του στόματος (D15) παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού των ειδικών προς τον ξενιστή OTUs, με τις βακτηριακες κοινότητες του ξενιστή να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με τις τροφές παρά με το νερό εκτροφής (Εικ. Π8).

Η φυλογενετική ανάλυση κατέδειξε την παρουσία 19 βακτηριακών φύλων (Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Cyanobacteria, Planctomycetes, Fusobacteria, Gracilibacteria, Deinococcus-Thermus, Chloroflexi, Omnitrophica, Chlorobi, Saccharibacteria, Thermotogae, Spirochaetae, Acidobacteria, Gemmatimonadetes and SBR1093, βλέπε Εικ. 3.17) με επικράτηση των Proteobacteria και Bacteroidetes (65,0% και 22,0% σχετική αφθονία αντίστοιχα). Τα υπόλοιπα φύλα βρέθηκαν σε σχετική αφθονία ≤1,0%, με εξαίρεση το φύλο Actinobacteria (1,6% σχετική αφθονία). Παράλληλα, ένα 4,1% δεν ταξινομήθηκε σε

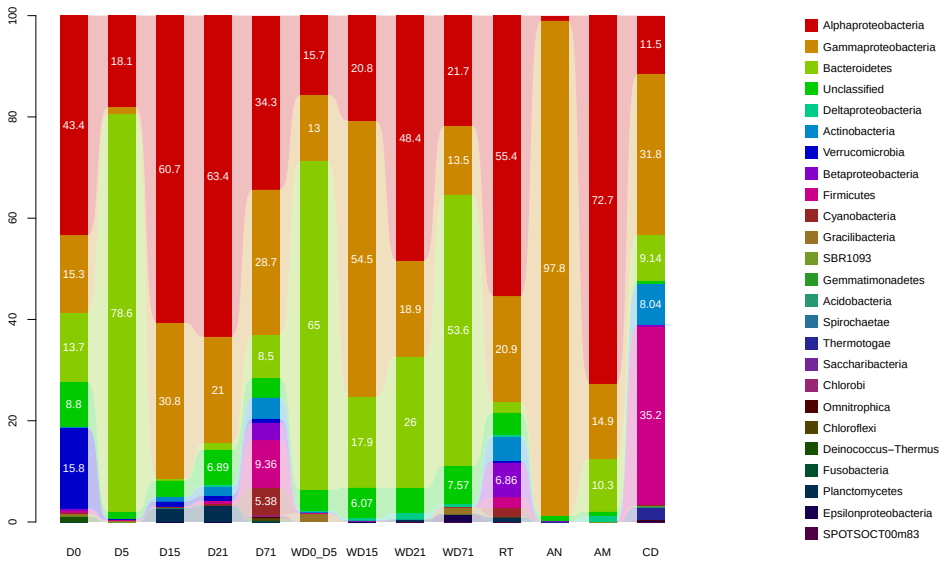
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

κανένα από τα γνωστά βακτηριακά φύλα για αυτό και χαρακτηρίστηκαν ως «μη ταξινομημένα» (unclassified).

Οι βακτηριακές κοινότητες στα δείγματα SA, παρουσίασαν μεταβολή στη δομή και σύνθεση τους κατά τα πέντε χρονικά σημεία που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία (D0, D5, D15, D21, D71). Πιο συγκεκριμένα, το φύλο Proteobacteria κυριάρχησε κατά το χρονικό σημείο D0 (με σχετική αφθονία 59,2%), ενώ το Bacteroidetes βρίσκονταν σε χαμηλή αφθονία (13,7%). Στη συνέχεια, στο χρονικό σημείο D5 επικράτησε το Bacteroidetes (με σχετική αφθονία 78,6%). Από το χρονικό σημείο D15 και μέχρι το τέλος του πειράματος (D17) η σχετική αφθονία του φύλου Bacteroidetes κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα ενώ το Proteobacteria αποτέλεσε και πάλι το κυρίαρχο φύλο (με σχετική αφθονία 66,5% – 91,6%).

Η κυριαρχία του φύλου Bacteroidetes κατά το χρονικό σημείο D5 οφειλόταν κυρίως στην παρουσία εκπροσώπων του γένους *Tenacibaculum* (με σχετική αφθονία 77,0%). Όσον αφορά το Proteobacteria (Εικ. Π9), το υπόφυλου *α*-Proteobacteria (με σχετική αφθονία 18,1% – 63,4%) αποτελούσε το κυρίαρχο, ακολουθούμενο από το υπόφυλο *γ*-Proteobacteria. Η οικογένεια Rhodobacteraceae ήταν η πιο άφθονη σε όλα τα χρονικά σημεία (με σχετική αφθονία 25,2% – 60,3%), εκτός από το χρονικό σημείο D5, όπου τα Proteobacteria βρίσκονταν σε χαμηλότερη σχετική αφθονία και αποτελούνταν κυρίως από είδη που σχετίζονταν με την κλάση OCS116 (με σχετική αφθονία 16,7%). Είδη της ίδιας κλάσης συνείσφεραν και στο χρονικό σημείο D0, με σχετική αφθονία 10,1%. Στα υπόλοιπα χρονικά σημεία, οι δεύτερες σε σειρά πιο άφθονες οικογένειες των Proteobacteria ήταν οι: Pseudoalteromonadaceae (D15 με σχετική αφθονία 19,9%), Vibrionaceae (D21 με σχετική αφθονία13,5%) και Moraxellaceae (D71 με σχετική αφθονία 9,6%).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49



Εικόνα 3.17: Σχετική αφθονία των ανιχνευμένων βακτηριακών φύλων στα δείγματα *S. aurata* (D0, D5, D15, D21, D71), νερού (WD0_5, WD15, WD21, WD71) και τροφών (RT, AN, AM, CD)

Μεταβολές στη σύνθεση των βακτηριακών κοινοτήτων καταγράφηκαν επίσης και στα δείγματα του νερού εκτροφής μεταξύ των δειγματοληψιών (Εικ. 3.17). Αρχικά, στα χρονικά σημεία που το νερό της δεξαμενής ήταν στάσιμο (WD0_5) κυριαρχούσε το φύλο Bacteroidetes (με σχετική αφθονία 65%). Στα χρονικά σημεία D15 και D21 κυριαρχούσε το φύλο Proteobacteria (με σχετική αφθονία 75,7% και 68,6 % αντίστοιχα), ενώ στην τελευταία δειγματοληψία (D71) το φύλο Bacteroidetes ήταν και πάλι το πιο άφθονο (με σχετική αφθονία 53,6%).

Η αφθονία του φύλου Proteobacteria στα δείγματα WD0_5, WD21 και WD71 οφειλόταν στην οικογένεια Rhodobacteraceae (με 14,4%, 45,8% και 21,4% σχετική αφθονία αντίστοιχα), ενώ στο χρονικό σημείο WD15 η οικογένεια Oceanospirillaceae κατείχε το 51,1% της συνολικής σχετικής αφθονίας. Το φύλο Bacteroidetes εκπροσωπήθηκε κυρίως από την οικογένεια Flavobacteriacea, η οποία κατέγραψε αύξηση στη σχετική αφθονία κατά τη διάρκεια του πειράματος (από 12,6% σχετική

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

αφθονία στο χρονικό σημείο WD0_5 σε 37,9% σχετική αφθονία στο WD71). Ωστόσο η κυρίαρχη οικογένεια στο νερό εκτροφής στο χρονικό σημείο WD0_5 ήταν η Cryomorphaceae με σχετική αφθονία 51,9%.

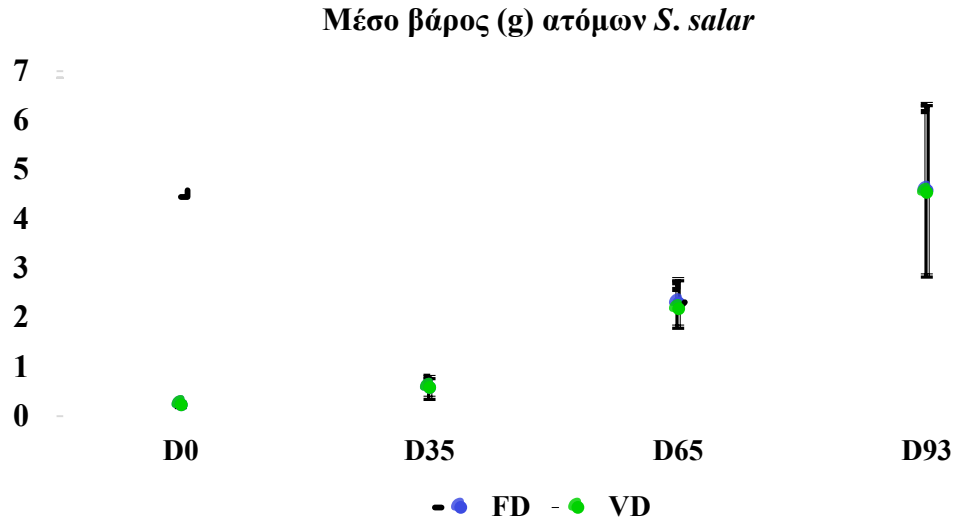
Οι διαφορετικές παρεχόμενες τροφές παρουσίασαν επίσης διαφορές στις βακτηριακές κοινότητες τους (Εικ. 3.17). Τα δείγματα ζωντανής τροφής (RT, AN, AM) αποτελούνταν σχεδόν εξολοκλήρου από Proteobacteria (83,7%, 98,8% και 88,8% αντίστοιχα). Πιο συγκεκριμένα, στα RT ανιχνεύθηκαν σε μεγάλη αφθονία (55,4%) *α*-Proteobacteria, με είδη κυρίως των οικογενειών Rhodobacteraceae (31,7%) και Phyllobacteriaceae (20,2%). Τα *γ*-Proteobacteria (με σχετική αφθονία 20,9%) εκπροσωπήθηκαν κυρίως από τις οικογένειες Vibrionaceae, Enterobacteriaceae και Oceanospirillaceae (με σχετική αφθονία 6,7%, 3,7% και 2,9% αντίστοιχα). Όσον αφορά τους ναύπλιους *Artemia* sp. (AN), αποτελούνταν σχεδόν αποκλειστικά από *γ*-Proteobacteria και συγκεκριμένα από είδη της οικογένειας Alteromonadaceae (με σχετική αφθονία 85,9%), ενώ οι μεταναύπλιοι *Artemia* sp. (AM) από *α*-Proteobacteria της οικογένειας Rhodobacteraceae (με σχετική αφθονία 70,1%).

Όσον αφορά τα εμπορικά σύμπηκτα, εκεί ανιχνεύθηκαν σε μεγάλη αφθονία τα βακτηριακά φύλα Proteobacteria, Firmicutes και Bacteroidetes με σχετική αφθονία 44,0%, 35,2% και 9,1% αντίστοιχα. Τα Firmicutes εκπροσωπήθηκαν κυρίως από είδη των οικογενειών Streptococcaceae (8,9%), Staphylococcaceae (6,7%), Lactobacillaceae (6,7%), Bacillaceae (1,8%) και Clostridiaceae (7,3%) των υπόφυλων Bacilli (25,3%) και Clostridia (9,8%). Όσον αφορά το φύλο Proteobacteria αποτελούνταν κυρίως από *γ*-(31,8%) και *α*-proteoabcteria (11,5%) με εκπροσώπους κυρίως των οικογενειών Vibrionaceae (17,5%), Rhodobacteraceae (10,5%) και Oceanospirillaceae (9,0%).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

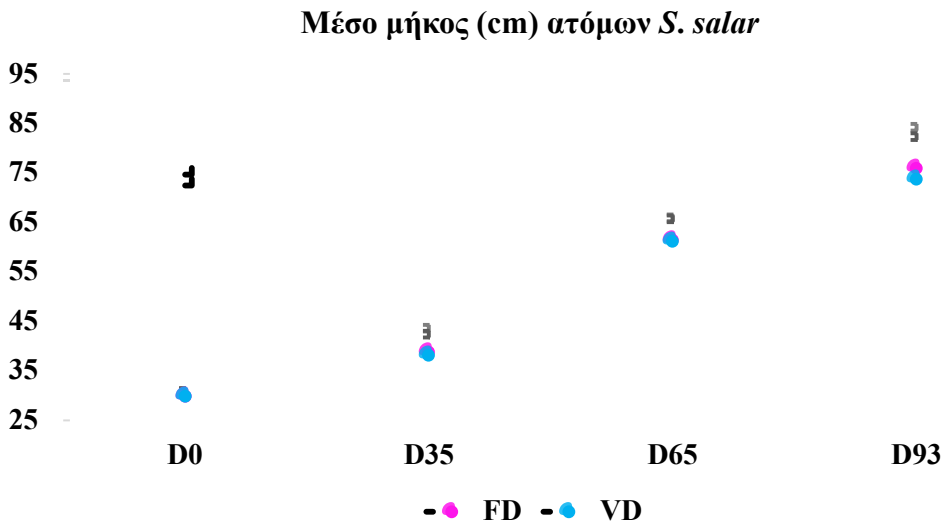
3.4. Διαδοχή βακτηριακών κοινοτήτων εντέρου στα οντογενετικά στάδια του *Salmo salar*

Τα άτομα των ιχθυοπληθυσμών, που διατράφηκαν με τις δύο διαφορετικές, ως προς την πηγή λιπιδίων τροφές (FD, VD), δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p>0,05$) ως προς το ποσοστό θνησιμότητας, το μέσο νωπό βάρος τους αλλά και το μέσο ολικό μήκος τους. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια του διατροφικού πειράματος (D0 – D93), το ποσοστό επιβίωσης των ιχθυοπλυθησμών ήταν >80%. Τα ιχθύδια κατά το στάδιο D0 είχαν μέσο νωπό βάρος 0,23±0,03g, ενώ κατά τη λήξη του πειράματος το μέσο νωπό βάρος τους έφτασε τα 4,5±2 g και στις δυο μεταχειρίσεις (Εικ. 3.18). Όσον αφορά το μέσο μήκος των ιχθυδίων (Εικ. 3.19), κατά το D0 ήταν 29,9±1,6cm, ενώ στο χρονικό σημείο D93 ήταν 76,0±8,9cm και 73,8±9,2 cm για τα ιχθύδια *S. salar* που διατράφηκαν με FD και VD αντίστοιχα.



Εικόνα 3.18: Μέσος όρος του βάρους ατόμων *S. salar* (≥10) κατά τα χρονικά σημεία D0, D35, D65 και D93. Οι κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49



Εικόνα 3.19: Μέσος όρους του ολικού μήκους ατόμων *S. salar* (≥10) κατά τα χρονικά σημεία D0, D35, D65 και D93. Οι κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση.

Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης, και αφού προηγήθηκε ποιοτικός έλεγχος και αφαίρεση των αλληλουχιών που εμφανίστηκαν μόνο μία φορά στο σύνολο των δεδομένων (singletons), προέκυψαν 4548 OTUs. Με βάση τις καμπύλες αραιοσύστασης (Εικ. Π10) και τον δείκτη Chao1 (Πίν. Π6), το βάθος της αλληλούχισης ήταν ικανοποιητικό για την πλειοψηφία των δειγμάτων.

Ο μέσος όρος των OTUs στα δείγματα που μελετήθηκαν, κυμάνθηκε από 79±25,3 (D93V) έως 1683±183,8 (FW) (Πιν. 3.4). Η παρατηρηθείσα αλλά και εκτιμώμενη αφθονία ήταν πάντα υψηλότερη στα δείγματα του νερού εκτροφής (STW, FW, VW, βλέπε Εικ.3.20, Πιν 3.4 και Πιν. Π5). Με βάση τους δείκτες Shannon H και Simpson 1-D (Πιν. Π5), καταγράφηκε μεγάλη ποικιλότητα σε όλα τα δείγματα, με τα είδη που απαρτίζουν τις βακτηριακές κοινότητες στα δείγματα του νερού εκτροφής να παρουσιάζουν ισομερή κατανομή.

Στα δείγματα *S. salar* (EG, YS, D0, D35F, D65F, D93F, D35V, D65V, D93V) αλλά και των τροφών (FD, VD), οι τιμές του δείκτη Shannon H κυμάνθηκαν από

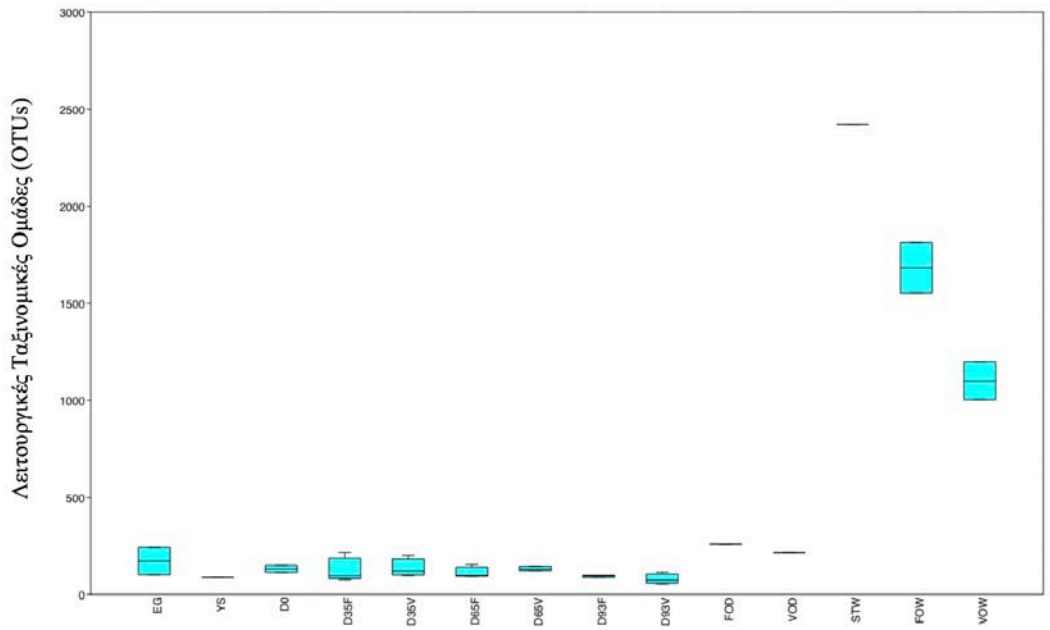
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

2,29±0,457 (EG) έως 3,75±0,173 (D65F) υποδεικνύοντας ανισομερείς βακτηριακές κοινότητες. Όσον αφορά την αφθονία ειδών που παρατηρήθηκε στα δείγματα *S. salar*, τα γονιμοποιημένα αυγά (EG) κατέγραψαν την υψηλότερη τιμή αλλά και τυπική απόκλιση (172±99,7). Στη συνέχεια, ο αριθμός των βακτηριακών ειδών μειώθηκε σε 87±0,7 (YS) και αυξήθηκε και πάλι στο D0. Μεγάλη μείωση στον αριθμό των ειδών καταγράφηκε στη συνέχεια μόνο στο χρονικό σημείο D93 για τη διατροφή VD (Εικ. 3.20).

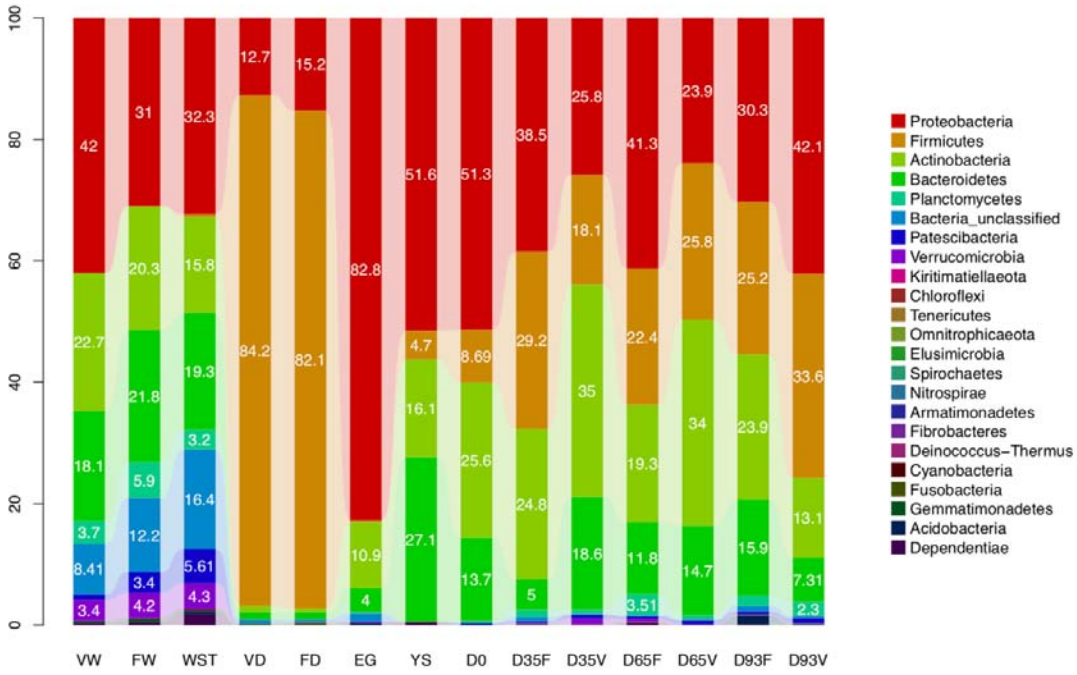
Πίνακας 3.4: Αποτελέσματα της αλληλούχισης για τα δείγματα που λήφθηκαν κατά τη νυμφική εκτροφή του είδους *S. salar*

	READS	OTUs	Αριθμός πιο άφθονων OTUs (αθροιστική αφθονία ≥ 80%)	Κυρίαρχο OTU, σχετική αφθονία και κοντινότερος συγγενής
EG	22151 ± 7168,6 N=2	172 ± 99,7	16	SOTU0011 (23,9%) *Methylotenera versatilis*
YS	14382 ± 3186,2 N=2	87 ± 0,7	10	SOTU0013 (19,4%) *Delftia acidovorans*
D0	21081 ± 1712,6 N=2	132 ± 26,2	14	SOUT0009 (32,3%) *Iodobacter fluviatilis*
D35F	7658 ± 5011,0 N=4	121 ± 64,8	46	SOTU0017 (9,3%) *Pseudomonas viridiflava*
D35V	25175 ± 27875,9 N=4	135 ± 46,2	33	SOTU0005 (10,4%) *Cloacibacterium normanense*
D65F	2735 ± 1660,5 N=4	110 ± 29,9	56	SOTU0070 (7,9%) *Janthinobacterium agaricidamnosum*
D65V	4812 ± 1975,0 N=3	132 ± 11,7	37	SOTU0005 (11,1%) *Cloacibacterium normanense*
D93F	2003 ± 637,1 N=4	93 ± 6,4	51	SOTU0005 (11,5%) *Cloacibacterium normanense*
D93V	1170 ± 608,3 N=4	79 ± 25,3	46	SOTU0004 (7,0%) *Weissella cibaria*
FD	21022 N=1	259	7	SOTU0004 (38,6%) *Weissella cibaria*
VD	20699 N=1	216	8	SOTU0004 (37,8%) *Weissella cibaria*
STW	53280 N=1	2422	259	SOTU0001 (9,4%) *Polynucleobacter necessarius*
FW	76806 ± 11852,5 N=2	1683 ± 183,8	52	SOTU0001 (14,5%) *Polynucleobacter necessarius*
VW	53618 ± 8553,9 N=2	1100 ± 137,2	35	SOTU0001 (20,8%) *Polynucleobacter necessarius*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49



Εικόνα 3.20: Θηκόγραμμα (BoxPlot) της παρατηρηθείσας αφθονίας ειδών (OTUs, Operational Taxonomic Units) στα δείγματα *S. salar* (EG, YS, D0, D35F, D35V, D65F, D65V, D93F, D93V), νερού (STW, FW, VW) και τροφών (FD, VD).



Εικόνα 3.21: Σχετική αφθονία των ανιχνευμένων βακτηριακών φύλων στα δείγματα *S. salar* (EG, YS, D0, D35F, D35V, D65F, D65V, D93F, D93V), νερού (STW, FW, VW) και τροφών (FD, VD).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

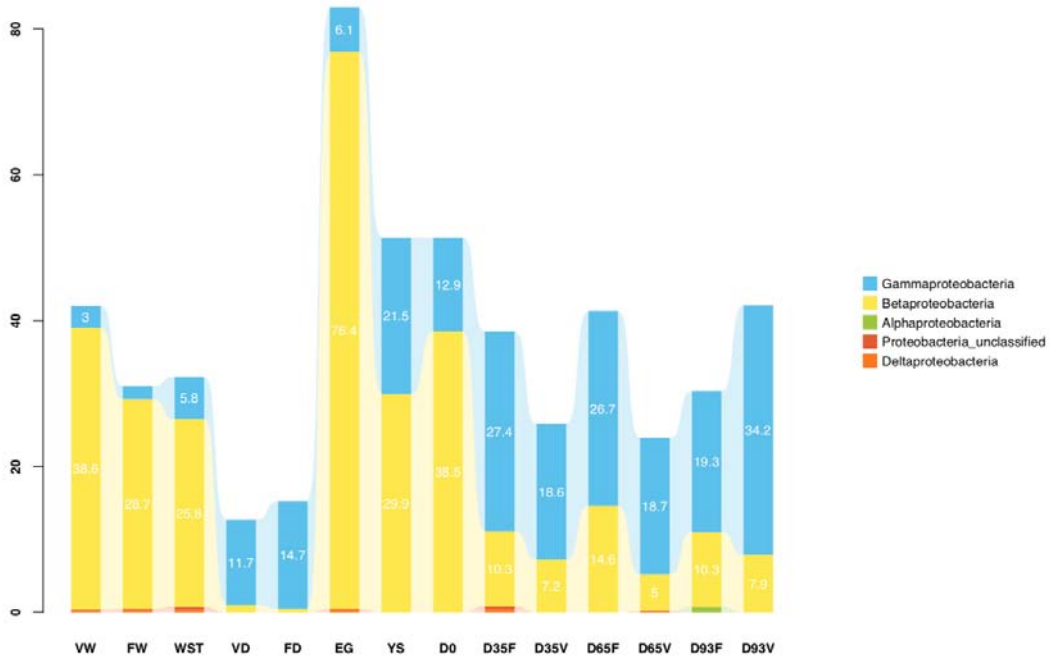
Η συστηματική ταξινόμηση των OTUs έδειξε την παρουσία 22 βακτηριακών φύλων (Εικ. 3.21). Τα OTUs που δεν ταξινομήθηκαν σε κανένα από τα γνωστά βακτηριακά φύλα χαρακτηρίστηκαν ως «μη ταξινομημένα» (unclassified). Τα φύλα Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria και Bacteroidetes αποτέλεσαν τα κυρίαρχα στο σύνολο των δεδομένων. Τα υπόλοιπα 19 βακτηριακά φύλα (Planctomycetes, Verrucomicrobia, Patescibacteria, Dependentiae, Acidobacteria, Gemmatimonadetes, Fusobacteria, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Fibrobacteres, Armatimonadetes, Nitrospirae, Spirochaetes, Elusimicrobia, Omnitrophicaeota, Tenericutes, Chloroflexi και Kiritimatiellaeota) ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό ≤2%.

Όσον αφορά τα δείγματα *S. salar*, τα Proteobacteria κυριάρχησαν στα τρία πρώτα οντογενετικά στάδια. Μετά την έναρξη της εξωτερικής τροφής και μέχρι το τέλος του πειράματος, οι εντερικοί βακτηριακοί πληθυσμοί των ατόμων που διατράφηκαν με τη δίαιτα FD εξακολούθησαν να αποτελούνται κυρίως από εκπροσώπους του φύλου Proteobacteria (38,5% – 82,9% της συνολικής σχετικής αφθονίας). Όσον αφορά την μεταχείριση με την διατροφή VD, οι εντερικές βακτηριακές κοινότητες στα δύο από τα τρία χρονικά σημεία που μελετήθηκαν (D35V και D65V), εκπροσωπήθηκαν κυρίως από είδη του φύλου Actinobacteria (35,0% και 34,0% της συνολικής σχετικής αφθονίας αντίστοιχα), αλλά στο τέλος του πειράματος (D93V) κυριάρχησε και πάλι το φύλο Proteobacteria.

Η κυριαρχία του φύλου Proteobacteria οφειλόταν κυρίως σε εκπροσώπους των *γ*- και *β*-Proteobacteria (Εικ. 3.22). Πιο συγκεκριμένα, τα *β*-Proteobacteria κυριάρχησαν στα τρία πρώτα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν (EG, YS, D0), με την αφθονία τους να οφείλεται κυρίως στις οικογένειες Burkholderiaceae και Chromobacteriaceae (Εικ. Π11), ενώ ένα μεγάλο ποσοστό στο χρονικό σημείο EG (με σχετική αφθονία 44,1%)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ταξινομήθηκε μόνο μέχρι το επίπεδο κλάσης. Τα γ-Proteobacteria κυριάρχησαν στα επόμενα τρία χρονικά σημεία και στις δύο διατροφικές συνθήκες (D35F, D65F, D93F, D35V, D65V και D93V). Οι οικογένειες Pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae, Vibrionaceae, Enterobacteriaceae, Moraxellaceae και Aeromonadaceae, αποτέλεσαν τις πιο άφθονες, με τις αφθονίες τους να παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις τόσο μεταξύ των διαφορετικών χρονικών σημείων, όσο και μεταξύ των δύο διαφορετικών διατροφών (Εικ. Π12). Το Actinobacteria, το κυρίαρχο φύλο στα δείγματα D35V και D65V, οφείλει κυρίως την αφθονία του στις οικογένειες Microbacteriaceae, Propionibacteriales, και σε εκπροσώπους των τάξεων Corynebacteriales και Micrococcales. Το Firmicutes στην τάξη Bacilli και το Bacteroidetes στα Bacteroidia.



Εικόνα 3.22: Σχετική αφθονία των ανιχνευμένων υπόφυλων του βακτηριακού φύλου Proteobacteria στα δείγματα *S. salar* (EG, YS, D35F, D35V, D65F, D65V, D93F, D93V), νερού (VW, FW, WST) και τροφών (FD, VD).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Όσον αφορά τα δείγματα των τροφών (FD, VD), αποτελούνταν σχεδόν αποκλειστικά από είδη που ταξινομήθηκαν στο φύλο Firmicutes (με σχετική αφθονία 84,2% και 82,1% στην FD και VD αντίστοιχα) και στις οικογένειες Lactobacillaceae (με σχετική αφθονία 38,5% και 36,6% στην FD και VD αντίστοιχα) και Leuconostocaceae (με σχετική αφθονία 37,9% και 38,8% στην FD και VD αντίστοιχα). Τα δείγματα νερού, παρουσίασαν επίσης μικρές μεταβολές μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών και αποτελούνταν κυρίως από τα φύλα Proteobacteria, Actinobacteria και Bacteroidetes. Σε αντίθεση με τις πειραματικές τροφές, το φύλο Firmicutes στα δείγματα νερού ανιχνεύθηκε σε σχετική αφθονία <1%. Οι οικογένειες Burkholderiaceae (*β*-Proteobacteria), Sporichthyaceae (Actinobacteria) και Chitinophagaceae (Bacteroidetes), αποτέλεσαν τις πιο άφθονες.

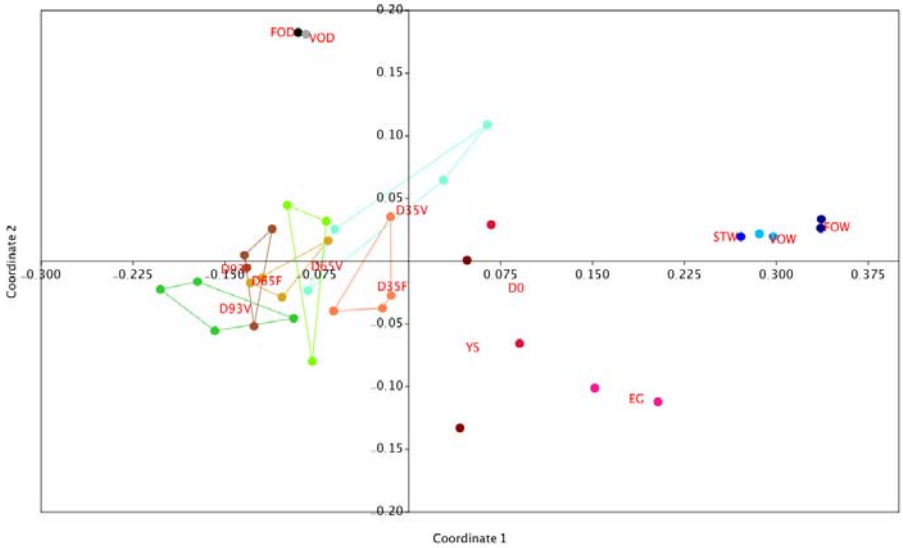
Από τη στατιστική ανάλυση, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ($p>0,05$) μεταξύ των βακτηριακών κοινοτήτων των δειγμάτων *S. salar* κατά τα πρώτα οντογενετικά στάδια (EG, YS, D0). Ωστόσο, τα δείγματα EG και D0, διέφεραν σημαντικά από εκείνα που λήφθηκαν μετά την έναρξη της εξωτερικής διατροφής (D35 – D93) και στις δυο διατροφικές μεταχειρίσεις. Μόνη εξαίρεση αποτέλεσε δείγμα D35V (Εικ. Π13). Όσον αφορά τις βακτηριακές κοινότητες του χρονικού σημείου YS, διέφεραν σημαντικά ($p<0,05$) μόνο με τις βακτηριακές κοινότητες του χρονικού σημείου D93 και στις δύο διατροφικές μεταχειρίσεις. Οι εντερικές κοινότητες των ιχθυδίων *S. salar*, δεν κατέγραψαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο διαφορετικών διατροφικών μεταχειρίσεων ($p>0.05$). Μόνη εξαίρεση αποτέλεσε η γαστρεντερική μικροβιακή κοινότητα D35V (Εικ. Π13).

Περαιτέρω σύγκριση βασισμένη στην μήτρα ομοιότητας μεταξύ των βακτηριακών κοινοτήτων όλων των δειγμάτων, υπολογισμένη με το δείκτη Bray–Curtis

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

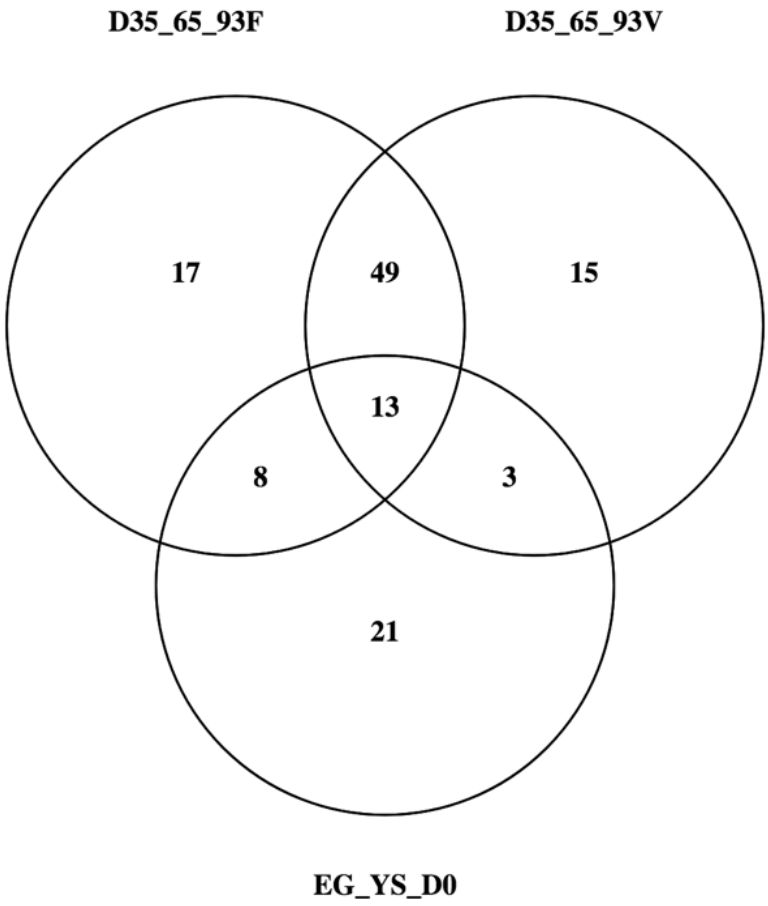
(Εικ. 3.23), έδειξε σαφή διαχωρισμό των βακτηριακών κοινοτήτων του ξενιστή από τις βακτηριακές κοινότητες των περιβαλλοντικών δειγμάτων (STW, VW, FW, FD, VD). Επιπλέον, οι βακτηριακές κοινότητες των δειγμάτων *S. salar*, παρουσίασαν σχέση – ομοιότητα με βάση τα χρονικά σημεία των δειγματοληψιών και όχι με βάση την χορηγούμενη τροφή.

Ωστόσο, παρά τις διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν μεταξύ των δειγμάτων *S. salar*, 13 OTUs βρέθηκαν να είναι κοινά μεταξύ όλων των σταδίων (EG, YS, D0, D35, D65, D93) και στις δύο διατροφικές μεταχειρίσεις (Εικ. 3.24, Εικ. Π14)). Κοντινότεροι χαρακτηρισμένοι συγγενείς αυτών των OTUs βρέθηκαν τα είδη *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Pseudomonas migulae*, *Cutibacterium acnes*, *Flavobacterium succinicans*, Candidatus *Planktophila vernalis*, *Delftia acidovorans*, *Leifsonia shinshuensis*, *Corynebacterium vitaeruminis*, *Weissella cibaria*, *Aeromonas veronii* και *Acidovorax ebreu*.



Εικόνα 3.23*:* NMDS απεικόνιση (Μήτρα αποστάσεων κατά Bray-Curtis) των βακτηριακών κοινοτήτων των δειγμάτων *S. salar* (EG, YS, D0, D35, D65, D93) που συλλέχθηκαν από τις διατροφικές μεταχειρίσεις FD και VD, καθώς επίσης δείγματα νερού (VW, FW) και τροφών (FD, VD).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49



Εικόνα 3.24: Διάγραμμα Venn στο οποίο παρουσιάζεται ο αριθμός των κοινών λειτουργικών ταξινομικών ομάδων (OTUs) μεταξύ των όμοιων OTUs που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα *S. salar* στη διατροφική μεταχείριση FD (D35_65_93F), στη διατροφική μεταχείριση VD (D35_65_93V) και στα στάδια πριν την χορήγηση εξωτερικής τροφής (EG_YS_D0).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Μελέτη της επίδρασης της γεωγραφικής θέσης στις αυτόχθονες εντερικές βακτηριακές κοινότητες αλλοπάτριων πληθυσμών των ειδών *S. aurata* και *D. labrax*

Στο μέρος αυτό, μελετήθηκε η επίδραση της γεωγραφικής θέσης στη σύνθεση και δομή των αυτοχθόνων εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων, σε αλλοπάτριους πληθυσμούς δυο ειδών ιχθύων με μεγάλη εμπορική αξία για την Ελλάδα και για άλλες χώρες της Μεσογείου (βλέπε § 1.1.). Θα πρέπει να αναφερθεί, ότι η επίδραση της βακτηριακής κοινότητας του νερού εκτροφής δεν λήφθηκε υπόψη στην παρούσα εργασία, καθώς σύμφωνα με αποτελέσματα προηγούμενων εργασιών, η συμβολή της στη σύνθεση των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων των ιχθύων, φαίνεται να είναι στατιστικώς μη σημαντική (Meziti et al., 2012; Estruch et al., 2015; Schmidt et al., 2015; Borsodi et al., 2017). Πιθανός παράγοντας μπορεί να θεωρηθεί, η συχνή μεταβολή του θαλάσσιου βακτηριοπλαγκτού (Ottesen et al., 2014; Aylward et al., 2015).

Τα άτομα *S. aurata* και *D. labrax*, που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία: α) προέρχονταν από διαφορετικές και απομακρυσμένες μεταξύ τους μονάδες εκτροφής (23 – 554 km απόσταση μεταξύ τους), β) είχαν κοινή γενετική προέλευση, γ) παρόμοια ηλικία δ) παρόμοια παρεχόμενη τροφή, και ε) οι δειγματοληψίες σε όλες τις μονάδες εκτροφής πραγματοποιήθηκαν το ίδιο χρονικό διάστημα. Οι παραπάνω παράγοντες, είναι καθοριστικοί για την διερεύνηση της παρουσίας μιας κοινής εντερικής βακτηριακής κοινότητας μεταξύ διαφορετικών ατόμων, αποτρέποντας την επιρροή των δεδομένων από παράγοντες όπως η εποχικότητα ή η διαφορετική σύνθεση τροφής.

Η παρούσα εργασία, είναι η πρώτη που συνδυάζει όλα τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά για τη μελέτη των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων σε άτομα των

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ειδών *S. aurata* και *D. labrax* και μάλιστα σε τόση μεγάλη κλίμακα. Προηγουμένως, οι Floris et al. (2013), είχαν διερευνήσει την επίδραση της γεωγραφικής θέσης στην εντερική βακτηριακή κοινότητα ατόμων του είδους *S. aurata* που διαβιούσαν σε δύο παράκτιες λιμνοθάλασσες στην Σαρδηνία, Ιταλία. Ωστόσο, η ανάλυση των δειγμάτων τους, περιορίστηκε μόνο σε δύο γειτονικές γεωγραφικά θέσεις και βασίστηκε σε παλαιότερες τεχνικές, οι οποίες αδυνατούν να προσδιορίσουν με μεγάλη ακρίβεια την βιοποικιλότητα των οικοσυστημάτων. Όσον αφορά το είδος *D. labrax*, υπάρχουν ορισμένες μόνο σχετικές εργασίες, οι οποίες έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην αξιολόγηση υποψήφιων μικροοργανισμών για προβιοτική χρήση (Silvi et al., 2008; Bourouni et al., 2012; Lamari et al., 2016; Mladineo et al., 2016), αλλά και στην επίδραση των εναλλακτικών συστατικών των ιχθυοτροφών στην γαστρεντερική βακτηριακή τους ποικιλότητα (Torrecillas et al., 2017).

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, η γεωγραφική θέση των μονάδων εκτροφής δεν επηρέασε σημαντικά τη δομή και τη σύνθεση των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων, τόσο μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών του ίδιου είδους, όσο και μεταξύ των πληθυσμών των δύο διαφορετικών ειδών ιχθύων. Παράλληλα, μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών των ειδών ιχθύων που μελετήθηκαν, ανιχνεύθηκαν κοινοί εντερικοί βακτηριακοί εκπρόσωποι ανεξαρτήτως γεωγραφικής θέσης (8 OTUs στο είδος *S. aurata* και 10 OTUs στο *D. labrax*). Μάλιστα, ένα μέρος αυτών (5 OTUs) βρέθηκε να είναι κοινό και στα δυο εκτρεφόμενα είδη, υποδεικνύοντας την παρουσία των ίδιων εντερικών βακτηριακών εκπροσώπων ακόμα και μεταξύ διαφορετικών ειδών ιχθύων.

Τα κοινά OTUs μεταξύ των ατόμων *S. aurata* βρέθηκαν να ανήκουν σε τάξεις (Burkholderiales, Pseudomonadales, Flavobacteriales, Actinobacteria) που η παρουσία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

τους έχει αναφερθεί προηγουμένως σε φυσικούς, βιολογικά και συμβατικά εκτρεφόμενα πληθυσμούς του ίδιου είδους (Kormas et al., 2014), ενώ οι πλησιέστεροι κοντινοί συγγενείς τους έχουν επίσης βρεθεί σε παρόμοια περιβάλλοντα (Nikouli et al., 2018). Τα στοιχεία αυτά στηρίζουν περαιτέρω την άποψη ότι τα συγκεκριμένα βακτήρια αποτελούν μέλη της αυτόχθονης εντερικής βακτηριακής κοινότητας του είδους *S. aurata*. Με βάση τους κοντινούς συγγενείς των 5 κοινών εκπροσώπων (*Delftia acidovorans*, *Pseudomonas panacis*, *Pelomonas puraquae*, *Propionibacterium acnes* και *Atopostipes suicloacalis*), ο εκτιμώμενος χρόνος διπλασιασμού τους (0,8 - 2,0 h^{-1}, Nikouli et al., 2018) υποδηλώνει ότι τα συγκεκριμένα είδη βακτηρίων μπορούν να αναπτυχθούν γρήγορα στο εντερικό σύστημα των ιχθύων, ξεπερνώντας σε αφθονία τα υπόλοιπα είδη.

Γενικά, η κοινή εντερική βακτηριακή κοινότητα των δύο ξενιστών, φαίνεται να αποτελείται από αερόβια και αναερόβια μεσόφιλα βακτήρια που δεν δημιουργούν σπόρια, με μερικά μάλιστα από αυτά να παρουσιάζουν σημαντικά χαρακτηριστικά σε άλλα ζώα. Για παράδειγμα, το είδος *Micrococcus luteus*, φαίνεται να επηρεάζει τη δραστηριότητα στελεχών *Vibrio* sp. σε άτομα ιχθύων γλυκού νερού (*Oreochromis niloticus*). Τα είδη του γένους *Pseudomonas* έχουν απομονωθεί από πολλά είδη ιχθύων και μάλιστα έχουν προταθεί ως πιθανοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας (Abd El-Rhman et al., 2009; Korkea-aho et al., 2011). Το *P. panacis*, αποικοδομεί την κυτταρίνη στο έντερο του σκαθαριού *Dendroctonus armandi*, ενώ έχει αναφερθεί ότι το *P. veronii*, παρουσιάζει μεταβολικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη μεταβολή των υδατανθράκων, την πρόσληψη θρεπτικών ουσιών και την παραγωγή αυξητικών ορμονών στις ρίζες του αμπελιού *Vitis vinifera* (Montes et al., 2016). Το γένος *Delftia,* αποτελείται αποκλειστικά από αερόβιους, οργανότροφους οργανισμούς, που δεν πραγματοποιούν ζύμωση (Wen et al., 1999) και έχουν ανιχνευθεί προηγουμένως στο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

έντερο υγιών ατόμων ροφού (Sun et al., 2009), ιριδίζουσας πέστροφας (Navarrete et al., 2012) και σολομού του Ατλαντικού (Gajardo, et al., 2016). Τα είδη του γένους *Atopostipes*, πραγματοποιούν ζυμώσεις και έχουν βρεθεί τόσο στο δέρμα όσο και στο εντερικό σύστημα ιχθύων (Jang et al., 2017). Όσον αφορά το *P. acnes*, είναι ένα ακόμα είδος που απαντάται σε δείγματα ιχθύων (Carda-Diéguez et al., 2014; Kormas et al., 2014; Estruch et al., 2015; Godoy et al., 2015; Rurangwa et al., 2015), αλλά αποτελεί και σημαντικό μέρος του μικροβιώματος της ανθρώπινης επιδερμίδας (Krutmann et al., 2009), καθιστώντας αβέβαιη την παρουσία του στην αυτόχθονη εντερική βακτηριακή ποικιλότητα των ειδών *S. aurata* και *D. labrax*.

Οι υψηλές ατομικές μεταβολές που καταγράφηκαν στις αφθονίες των OTUs και στους δύο ξενιστές, έχουν παρατηρηθεί επίσης και σε αποτελέσματα άλλων εργασιών, για τα ίδια είδη ιχθύων, αλλά σε δείγματα κοπράνων (De Schryver et al., 2011; Silva et al., 2011). Οι κύριοι παράγοντες που φαίνεται να προάγουν τις ατομικές διάφορες στις εντερικές μικροβιακές κοινότητες είναι ο γονότυπος του ξενιστή, η αρχική μικροβιακή εποίκιση του εντέρου, περιβαλλοντικοί παράγοντες, η διατροφή, ασθένειες και η αντίστοιχη φαρμακευτική αγωγή (Flint et al., 2017). Η παρούσα εργασία κατέληξε στο συμπέρασμα, ότι οι ατομικές μεταβολές που καταγράφηκαν στο εντερικό σύστημα των δύο ξενιστών (*S. aurata* και *D. labrax*) πιθανότατα να σχετίζονται με γενετικούς παράγοντες και να αποτελούν το λόγο για τον μικρό αριθμό των κοινών OTUs μεταξύ των ιχθυοπληθυσμών. Επίσης, υποδεικνύουν ότι το μικροπεριβάλλον του εντέρου των δύο ειδών προωθεί επιλεκτική πίεση στις βακτηριακές κοινότητες. Ωστόσο, όσο οι ομοιότητες μεταξύ των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων αυξάνονται, το ίδιο συμβαίνει και με τις διαφορές τους, υποδεικνύοντας επίσης παραμέτρους, ανεξάρτητες από τον ξενιστή που συμβάλουν στη διαμόρφωση της εντερικής βακτηριακής

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

κοινότητας, τόσο στον άνθρωπο (Bashan et al., 2016; Faust et al., 2016) αλλά και στους ιχθύες (Hovda et al., 2007; Zarkasi et al., 2017).

Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης δικτύου, οι βιολογικές σχέσεις των κυρίαρχων OTUs διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δύο ειδών ιχθύων ($p<0,05$), υποδεικνύοντας επίσης διαφορετικούς βιολογικούς ρόλους στο εντερικό τους σύστημα. Ωστόσο, η υψηλή αναλογία των θετικών προς το σύνολο των συσχετίσεων και στις δύο περιπτώσεις, υποδεικνύουν ότι η πλειοψηφία των κυρίαρχων βακτηριακών ειδών, έχουν είτε συνεργατικές αλληλεπιδράσεις, ή τουλάχιστον δεν παρουσιάζουν ανταγωνισμό ως προς τις θρεπτικές τους απαιτήσεις. Αυτές οι σχέσεις στους μικροβιακούς πληθυσμούς, θεωρούνται ωφέλιμες προς τον ξενιστή, παρουσιάζοντας υψηλή ικανότητα χρήσης των πολύπλοκων διαθέσιμων υποστρωμάτων που βρίσκονται στο περιβάλλον του εντέρου (Coyte et al., 2015; Widder et al., 2016; Torrecillas et al., 2017).

4.2. Προσδιορισμός των αυτόχθονων εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων σε συμπάτριους πληθυσμούς εκτρεφόμενων ιχθύων

Σε αυτό το μέρος, έγινε ανίχνευση των αυτόχθονων εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων σε πέντε είδη ιχθύων (*D. puntazzo*, *P. pagrus*, *A. regius*, *S. aurata* και *D. labrax*) που εκτρέφονταν στην ίδια γεωγραφική θέση, με σκοπό να διερευνηθεί αν συμπάτρια είδη παρουσιάζουν όμοιες βακτηριακές εντερικές κοινότητες. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι οι εντερικές βακτηριακές κοινότητες των πέντε ειδών ιχθύων που μελετήθηκαν, αποτελούνται κυρίως από είδη του βακτηριακού φύλου Proteobacteria (με σχετική αφθονία 50,6% – 82,9%). Το φύλο αυτό, έχει ανιχνευθεί σε μεγάλες αφθονίες σε είδη ιχθύων τόσο του γλυκού όσο και του θαλασσινού νερού (Bates et al., 2006; Rombout et al., 2011; Ghanbari et al., 2015).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Στην συγκεκριμένη μελέτη, η επικράτηση του φύλου Proteobacteria οφείλεται κυρίως σε είδη που ταξινομήθηκαν στα *β*- και *γ*-Proteobacteria, με τα επικρατέστερα OTUs να παρουσιάζουν ομοιότητες με τα είδη *Delftia acidovorans, Pseudomonas veronii*, *Hydrogenophilus thermoluteolus* και *Enterobacter cloacae*. Όσον αφορά τα είδη του γένους *Delftia* και *Pseudomonas*, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως αναλυτικά (βλέπε § 4.1), έχουν ανιχνευθεί στο εντερικό σύστημα πολλών ειδών ιχθύων. Λαμβάνοντας υπόψη και τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, γίνεται κατανοητό ότι τα είδη του γένους *Delftia*, αν και αποκλειστικώς αερόβια, φαίνεται να έχουν προσαρμοστεί πλήρως στις μικροαερόφιλες συνθήκες του εντερικού σωλήνα των ιχθύων. Η επικράτηση τους ωστόσο, φαίνεται να οφείλεται επίσης στην ικανότητα τους να αναπτύσσονται γρήγορα (§ 3.1).

Το *Enterobacter cloacae*, αποτελεί μέλος της οικογένειας Enterobacteriaceae, και είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση (νερό, ίζημα, φυτά), ενώ έχει ανιχνευθεί σε δείγματα κοπράνων ανθρώπων και ζώων (Davidson et al., 2000; Neto et al., 2003). Μάλιστα έχει χαρακτηριστεί ως ευκαιριακά παθογόνο στο γαστρεντερικό σύστημα των ανθρώπων (Mezzatesta et al., 2012; Pestourie et al. 2014). Ωστόσο πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι σε αντίθεση με άλλα είδη αυτού του γένους, δεν κατέχει λοιμογόνα γονίδια (Azevedo et al., 2018), ενώ όσον αφορά τους ιχθύες, η παθογένεια του δεν είναι ξεκάθαρη (Thillai Sekar et al., 2008). Στην προκειμένη περίπτωση, τα άτομα του είδους *A. regius*, στο εντερικό σύστημα των οποίων το *Enterobacter cloacae* ανιχνεύθηκε σε μεγάλη αφθονία (25,04%), ήταν υγιή.

Η παρουσία ειδών του γένους *Hydrogenophilus* στο εντερικό σύστημα ατόμων ιχθύων, έχει αναφέρει έως τώρα μόνο από τους Godoy et al. (2015) οι οποίοι το ανίχνευσαν σε χαμηλή αφθονία στο είδος *S. salar*. Ωστόσο η παρουσία τους είναι επίσης

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

γνωστή σε δείγματα ανθρώπινων κοπράνων (Mueller et al., 2016), καθώς και στο εντερικό σύστημα εντόμων και ποντικιών (Gumiel et al., 2015; Gray et al., 2017; Zhou et al., 2018).

Στην παρούσα εργασία, το OTU που σχετίζεται με το είδος *Hydrogenophilus thermoluteolus* (OTU0018), ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στο εντερικό σύστημα του είδους *P. pagrus*. Μάλιστα παρόλο που τα είδη *P. pagrus*, *S. aurata* και *D. puntazo* ανήκουν στην ίδια οικογένεια ιχθύων, οι εντερικές βακτηριακές τους κοινότητες δεν έδειξαν κάποια ομαδοποίηση (Εικ. 3.12). Παράλληλα, η κατανομή αφθονίας των πιο άφθονων OTUs τους (αθροιστική αφθονία ≥ 80%) παρουσίασε διαφοροποιήσεις (Εικ. Π4). Λαμβάνοντας υπόψη επίσης το γεγονός ότι αυτά τα είδη ιχθύων διατράφηκαν με παρόμοια σύμπηκτα τροφών (Πιν. Π1), στον ίδιο βιότοπο, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρουσιάζουν μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς η υπάρχουσα βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι η διατροφή και οι συνθήκες εκτροφής, θεωρούνται από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη εντερική μικροβιακή ποικιλότητα στους ιχθύες (Clements et al., 2007; Sullam et al., 2012; Cordero et al., 2015).

Επίσης, όσον αφορά και τα πέντε είδη ιχθύων που μελετήθηκαν εδώ, μόνο το 3,9% των εντερικών βακτηριακών OTUs που ανιχνεύθηκαν ήταν κοινό μεταξύ τους (Εικ. 3.10). Παράλληλα, ο αριθμός των συνδέσεων που προέκυψε από την ανάλυση δικτύου διέφερε ανά ξενιστή (Εικ. 3.14, Πιν. Π4). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν επιλεκτικές πιέσεις, ευνοώντας την εποίκιση και ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών στο εντερικό σύστημα των υπό μελέτη ιχθύων. Αντίστοιχα συμπεράσματα, έχουν προκύψει και μέσα από άλλες μελέτες σε υδρόβια και χερσαία ζώα, που υποστηρίζουν ότι παράγοντες που σχετίζονται με τον ξενιστή έχουν μεγαλύτερη επίδραση στη σύνθεση της εντερικής βακτηριακής κοινότητας (Wong & Rawls, 2012; Smith et al., 2015;

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Martinson et al., 2017; Perofsky et al., 2019). Μάλιστα, οι Moeller et al. (2013), μετά από μελέτη κοπράνων δύο συμπάτριων ειδών θηλαστικών, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η γεωγραφική απομόνωση δύο ξενιστών, προωθεί την εξελικτική διαφοροποίηση των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων τους.

4.3. Πρώτη εποίκιση και διαδοχή των βακτηριακών κοινοτήτων σε ιχθυονύμφες του είδους *S. aurata*

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του περιβάλλοντος εκτροφής και της παρεχόμενης τροφής στην εποίκιση και διαδοχή των βακτηριακών κοινοτήτων του είδους *S. aurata* από το στάδιο του γονιμοποιημένου αυγού έως 71 ημέρες μετά την εκκόλαψη. Η εντερική μικροβιακή κοινότητα σε ιχθυονύμφες του είδους *S. aurata* και η επίδραση των συνθηκών εκτροφής στη δομή και σύνθεση της, έχουν μελετηθεί στο παρελθόν και από άλλες ερευνητικές ομάδες (Grisez et al., 1997; Savas et al., 2005; Califano et al., 2017).

Οι Califano et al. (2017) ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν μεθόδους αλληλούχισης νέας γενιάς για να προσδιορίσουν με μεγαλύτερη ακρίβεια τις βακτηριακές κοινότητες που σχετίζονται με την εκτροφή ιχθυονυμφών του είδους *S. aurata*. Παρόλο που οι δύο εργασίες παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες όσον αφορά τον τρόπο λήψης και επεξεργασίας των δειγμάτων, οι Califano et al. (2017) μελέτησαν μόνο την αρχική μικροβιακή ποικιλότητα (σε δείγματα δύο ημερών μετά την εκκόλαψη) και πώς αυτή διαμορφώθηκε 32 μέρες μετά. Παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν επίσης το νερό εκτροφής και η παρεχόμενη ζωντανή τροφή, χωρίς ωστόσο να ερευνήσουν πιθανές μεταβολές στις μικροβιακές κοινότητες των ιχθυονυμφών *S. aurata* από την παροχή εμπορικών σύμπηκτων στα επόμενα στάδια ή πιθανή συνεισφορά του μικροβιώματος των γονιμοποιημένων αυγών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Ωστόσο η σημαντικότερη διαφορά της παρούσας εργασίας με αυτή των Califano et al. (2017) έγκειται στο γεγονός ότι για πρώτη φορά μελετήθηκε η επίδραση της κάθε τροφής ξεχωριστά, πραγματοποιώντας ενδιάμεσες δειγματοληψίες κατά το διάστημα εκτροφής, κάθε φορά που άλλαζε η τροφή. Πλεονέκτημα του συγκεκριμένου πειραματικού σχεδιασμού αποτελεί η δυνατότητα της μελέτης του κάθε διατροφικού σταδίου ξεχωριστά και η παρατήρηση διακυμάνσεων στις μικροβιακές κοινότητες στους υπό μελέτη τύπους δειγμάτων.

Παράλληλα για πρώτη φορά καταγράφηκε η βακτηριακή κοινότητα σε υγιή αυγά του είδους *S. aurata*. Μάλιστα, οι βακτηριακές κοινότητες που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα των αυγών, ύστερα από σύγκριση με αυτές του νερού εκτροφής κατά τη D0, απέδειξαν ότι το 60,9% των βακτηριακών κοινοτήτων των αυγών απαντάται μόνο σε αυτά. Πιθανόν αυτά τα βακτήρια να προέρχονται από το νερό εκτροφής των γεννητόρων. Ωστόσο ευρήματα των Hansen & Olafsen (1989), οι οποίοι κατέγραψαν την παρουσία μικροβιακών πληθυσμών σε αυγά μέσα σε ωοθήκες υγειών ατόμων μπακαλιάρου (*Gadus rnorhua*), τα οποία είχαν αφαιρεθεί υπό ασηπτικές συνθήκες, μπορούν να υποστηρίξουν την άποψη ότι το ποσοστό αυτό της βακτηριακής κοινότητας που ανιχνεύθηκε αποκλειστικά στα αυγά της παρούσας έρευνας να αποτελεί μέρος του φυσιολογικού μικροβιώματός τους.

Έρευνες έχουν δείξει επίσης, ότι οι νεοεκκολαφθείσες θαλάσσιες λάρβες για λόγους ωσμορύθμισης αρχίζουν την πρόσληψη νερού πριν την έναρξη της πρώτης διατροφής, λαμβάνοντας με αυτόν τον τρόπο και τα βακτήρια που υπάρχουν σε αυτό (Tytler & Blatxer, 1988; Hansen & Olafsen, 1989). Παρόλο που στην παρούσα εργασία δεν διερευνήθηκε η πρόσληψη νερού από τις λάρβες πριν την πρώτη διατροφή, οι βακτηριακές κοινότητες που ανιχνεύθηκαν στο στάδιο του λεκιθικού σάκου (D5)

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα (94,6%) με τα βακτηριακά είδη που απαντώνται είτε στο νερό είτε στα αυγά. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στο στάδιο αυτό καταγράφηκε σημαντικά χαμηλότερη αφθονία ειδών σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στάδια που μελετήθηκαν, κάτι που φαίνεται να χαρακτηρίζει το πρώτο στάδιο μετά την εκκόλαψη (Muroga et al., 1987; Skjermo & Vadstein, 1993; Ringo et al., 1996; Ringo & Vadstein, 1998).

Στο χρονικό σημείο (D15), όπου οι λάρβες έχουν ανοίξει το στόμα τους και διατρέφονταν με την παρεχόμενη ζωντανή τροφή, η αφθονία ειδών αυξήθηκε 1,73 φορές σε σχέση με το προηγούμενο στάδιο. Η αύξηση στην αφθονία των βακτηριακών ειδών μετά την πρώτη διατροφή έχει παρατηρηθεί και σε άλλα εκτρεφόμενα είδη ιχθύων (Muroga et al., 1987; Tanasomwang & Muroga, 1989; Ingerslev et al., 2014), ενώ οι Savas et al. (2005) είχαν ήδη καταγράψει αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού σε νεαρά άτομα *S. aurata*, που είχαν διατραφεί με ζωντανή τροφή, αλλά είχαν μελετήσει μόνο τους αερόβιους πληθυσμούς.

Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι από το χρονικό σημείο D15, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση των κοινών ειδών μεταξύ νερού εκτροφής – λαρβών, με παράλληλη αύξηση της επίδρασης του μικροβιώματος της παρεχόμενης τροφής. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τους Bakke et al. (2013), οι οποίοι είχαν παρατηρήσει μεγαλύτερη επίδραση του νερού εκτροφής στις βακτηριακές κοινότητες λαρβών του είδους *Gadus morhua*, που είχαν διατραφεί προηγουμένως με ζωντανή τροφή. Παράλληλα, 14 OTUs βρέθηκαν να είναι κοινά μεταξύ των σταδίων D0 και D15, που δεν είχαν ανιχνευθεί στις λεκιθοφόρες προνύμφες (D5), υποστηρίζοντας όντως ότι οι λάρβες ιχθύων κατά την πρώτη διατροφή καταναλώνουν θραύσματα αυγών και κατ' επέκταση μέρος του μικροβιώματος τους (Olafsen, 1984; Olafsen & Hansen, 1992;

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Beveridge et al., 1991). Σύμφωνα άλλωστε με τους Bates et al. (2006), οι βακτηριακές κοινότητες των αυγών, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση και λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος των ιχθύων.

Οι παρεχόμενες τροφές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή χαρακτηρίστηκαν από υψηλή αφθονία βακτηριακών ειδών. Όσον αφορά τα τροχόζωα, δεδομένα άλλων ερευνητικών εργασιών, συμφωνούν ότι μεταφέρουν μεγάλο αριθμό βακτηρίων ανά άτομο (Muroga & Yasunobu,1987; Munro et al., 1993; Skjermo & Vadstein 1993; Ishino et al., 2012) που μπορεί να προέρχεται από το γαστρεντερικό τους μικροβίωμα, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι προσλαμβάνουν βακτήρια από το περιβάλλον εκτροφής τους (ZoBell & Feltham, 1938; McHenery & Birkbeck, 1985).

Η χαμηλή σχετικά αφθονία που παρατηρήθηκε στα δείγματα ναύπλιων *Artemia* sp. (AN) οφείλεται πιθανόν στο γεγονός ότι οι εμπορικές κύστες αποστειρώνονται με εμβάπτιση σε χλωριούχα διαλύματα πριν την αποκελύφωση τους. Μετά την εκκόλαψη τους, διανέμονται κατευθείαν στις δεξαμενές εκτροφής των ιχθύων με το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί να μην επαρκεί πιθανόν για να διαμορφώσουν μία πιο σύνθετη βακτηριακή κοινότητα. Για την παραγωγή μεταναύπλιων (AM), ναύπλιοι εκτρέφονται για περίπου 12 ώρες με παροχή εμπορικών θρεπτικών εμπλουτιστικών. Ίσως σε αυτό το χρονικό περιθώριο να οφείλεται η σημαντική διαφορά που παρατηρείται στην αφθονία ειδών μεταξύ των ναύπλιων και μεταναύπλιων *Artemia* sp. στην παρούσα εργασία. Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης, ότι τα δείγματα του νερού εκτροφής σημείωσαν τη μεγαλύτερη αφθονία ειδών σε σύγκριση με τους άλλους τύπους δειγμάτων, κάτι που παρατηρήθηκε και από άλλους ερευνητές σε παρόμοια πειράματα (Stephens et al., 2016; Califano et al., 2017).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Παρά το γεγονός ότι σε κάθε χρονικό σημείο μέρος της βακτηριακής κοινότητας των δειγμάτων *S. aurata* φαίνεται να παρουσιάζει ομοιότητες με τις βακτηριακές κοινότητες του νερού εκτροφής και των παρεχόμενων τροφών, δεν υπάρχει πλήρη επικάλυψη μεταξύ τους. Η σύνθεση των βακτηριακών κοινοτήτων στα δείγματα *S. aurata* αποτελείται σε μεγάλο βαθμό από Proteobacteria και Bacteroidetes, κάτι που χαρακτηρίζει άλλωστε την εντερική βακτηριακή ποικιλότητα πολλών θαλάσσιων ειδών ιχθύων (Rombout et al., 2011; Kormas et al., 2014; Ghanbari et al., 2015; Tarnecki et al., 2017; Nikouli et al., 2018). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι τα νεαρά άτομα *S. aurata*, ειδικά στα πρώτα στάδια (D0, D5, D15, D21) αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από *α*-Proteobacteria, ενώ το συγκεκριμένο υπόφυλο συναντάται πάντα σε χαμηλή αφθονία στα ενήλικα άτομα (Nikouli et al., 2018).

Επίσης, παρόλο που σε ενήλικα άτομα *S. aurata* έχει παρατηρηθεί μεγάλη αφθονία από Firmicutes (Nikouli et al., 2018), η αφθονία τους στην παρούσα εργασία παραμένει σε χαμηλά ποσοστά σε όλα τα στάδια που μελετήθηκαν. Ωστόσο στο χρονικό σημείο D71 παρατηρήθηκε μεταβολή των μικροβιακών κοινοτήτων που οφειλόταν στην αύξηση της αφθονίας των *γ*-Proteobacteria και των Firmicutes. Αυτή η αλλαγή μπορεί να σχετίζεται με την προσθήκη εμπορικών σύμπηκτων στην δίαιτα τους και μπορεί να θεωρηθεί ως πρώτη ένδειξη της ωρίμανσης της βακτηριακής κοινότητας στα νεαρά άτομα *S. aurata*.

Το Bacteroidetes, το κυρίαρχο φύλο στο χρονικό σημείο D5, εκπροσωπείται κυρίως από είδη του γένους *Tenacibaculum*. Το γένος αυτό αποτελείται από είδη θαλάσσιας προέλευσης αλλά και από παθογόνα ιχθύων (Parte, 2018), όπως για παράδειγμα το *Tenacibaculum ovolyticum* το οποίο μπορεί να λύσει το χωρίο σε αυγά του είδους *Hippoglossus hippoglossus*, να καταστρέψει τη zona radiata με αποτέλεσμα

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

τον θάνατο των προνυμφών (Hansen et al., 1992). Ο κοντινότερος χαρακτηρισμένος συγγενής του κυρίαρχου OTU κατά χρονικό σημείο D5, βρέθηκε να είναι το *Tenacibaculum dicentrarchi*, το οποίο έχει βρεθεί προηγουμένως σε νοσούντα άτομα των ειδών *Dicentrarchus labrax* (Piñeiro-Vidal et al., 2012) και *Salmo salar* (Avendaño-Herrera et al., 2016; Olsen et al. 2017). Παρ' όλα αυτά τα προηγούμενα ευρήματα, στην παρούσα εργασία δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις παθογένειας στα αυγά αλλά ούτε και στις λάρβες *S. aurata*.

Στα υπόλοιπα χρονικά σημεία (D0, D15, D21, D71) τα κυρίαρχα OTUs φαίνεται να σχετίζονται με βακτηριακά είδη που έχουν απομονωθεί προηγουμένως από κόπρανα/έντερα ιχθύων και άλλων υδρόβιων ζώων (Yoon et al., 2010; Dishaw et al., 2014; Mandakovic et al., 2016). Στα χρονικά σημεία D15 και D21, όπου οι λάρβες τρέφονται μόνο με ζωντανή τροφή, το κυρίαρχο OTU (OTU0006) φαίνεται να σχετίζεται με το είδος *Ruegeria mobile,* το οποίο παρουσιάζει πλαγκτικό τρόπο ζωής αλλά κατέχει και τη δυνατότητα σχηματισμού βιοϋμενίων, βέλτιστη αύξηση σε pH 7, σε χαμηλή συγκέντρωση NaCl (Muramatsu et al., 2007), ενώ διαθέτει γονίδια για την παραγωγή του αντιβιοτικού tropodithietic acid (D'Alvise et al., 2014). Η συγκεκριμένη αντιβιοτική ουσία, σε άλλα βακτηριακά είδη φαίνεται να έχει τη δυνατότητα να περιορίζει την παρουσία του είδους *Vibrio anguillarum* στην εκτροφή νεαρών ατόμων *Gadus morhua* (D'Alvise et al., 2012). Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά, συνθέτουν ένα προβιοτικό προφίλ για το OTU0006 το οποίο έχει ανιχνευθεί επίσης σε χαμηλή αφθονία στο χρονικό σημείο D0 (0,29% της σχετικής αφθονίας) δημιουργώντας υποθέσεις για πιθανή κάθετη μετάδοση.

Τέλος, το κυρίαρχο OTU στο χρονικό σημείο D71 (OTU0025) σχετίζεται με το βακτηριακό είδος *Photobacterium phosphoreum,* το οποίο σχετίζεται με αλλοιώσεις

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

αλιευτικών προϊόντων ενώ έχει βρεθεί επίσης και στη φυσιολογική βακτηριακή κοινότητα ειδών ιχθύος (Rudy & Morin, 1979; Hovda et al., 2007), χωρίς ωστόσο να είναι γνωστός ο ρόλος του στο γαστρεντερικό οικοσύστημα.

Παρόλο που σε ενήλικα άτομα *S. aurata* έχει παρατηρηθεί μεγάλη σχετική αφθονία από Firmicutes (Nikouli et al., 2018), η σχετική αφθονία τους στην παρούσα εργασία παραμένει σε χαμηλά ποσοστά σε όλα τα στάδια που μελετήθηκαν. Συγκριτικά με την προαναφερθείσα εργασία, ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι τα νεαρά άτομα, ειδικά στα πρώτα στάδια (D0, D5, D15, D21) αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από *α*-Proteobacteria, ενώ το συγκεκριμένο υπόφυλο συναντάται πάντα σε χαμηλή σχετική αφθονία στα ενήλικα άτομα. Ωστόσο, η μεγαλύτερη σχετική αφθονία αυτού του υπόφυλου στο χρονικό σημείο D71, πιθανόν να οφείλεται στην υψηλή αφθονία που αυτό παρουσιάζει στα εμπορικά σύμπηκτα (CD) με τα οποία διατράφηκαν οι λάρβες μέχρι το D71.

4.4. Διαδοχή βακτηριακών κοινοτήτων εντέρου στα οντογενετικά στάδια του *S. salar*

Στην παρούσα μελέτη, έγινε χρήση μεθόδων αλληλούχισης νέας γενιάς, παρέχοντας πληροφορίες για τις επι- και ενδοβιοτικές βακτηριακές κοινότητες πληθυσμών του είδους *S. salar* που διατράφηκαν με δύο διαφορετικές ως προς την πηγή λιπιδίων τροφές (VD και FD). Παράλληλα, αναλύθηκαν δείγματα που σχετίζονταν με τη νυμφική εκτροφή του είδους αυτού (νερό εκτροφής και σύμπηκτα τροφών), με σκοπό τον προσδιορισμό του βακτηριακού τους προφίλ και τη συμβολή τους στην πρώτη εποίκηση και διαδοχή των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων τους. Θα πρέπει να αναφερθεί, ότι ο αριθμός των ανιχνευμένων OTUs (4548) στην παρούσα εργασία, είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό που έχει αναφερθεί έως τώρα στις περισσότερες εργασίες

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

άλλων ερευνητών (≤3000 OTUs) στο εντερικό σύστημα του ίδιου ξενιστή (Gajardo et al., 2016; Llewellyn et al., 2016; Dehler et al., 2017; Zarkasi et al., 2017; Lokesh et al., 2018). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές μεθόδους αλληλούχισης καθώς και στους διαφορετικούς τύπους δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Ευρήματα προηγούμενων εργασιών, υποστηρίζουν ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες εκτροφής των ιχθύων (όπως η διαθέσιμη τροφή και το νερό εκτροφής), καθορίζουν τις μικροβιακές κοινότητες του εντερικού συστήματος τους (Hansen & Olafsen, 1999; Nayak, 2010; McDonald et al., 2012; Scott et al., 2013; Bolnick et al., 2014; Eichmiller et al., 2016; Kashinskaya et al., 2018). Για παράδειγμα, οι Schmidt et al. (2016), σε διατροφικό πείραμα σε άτομα του είδους *S. salar*, διαπίστωσαν σαφή επίδραση στην εντερική μικροβιακή σύνθεση του ξενιστή, ύστερα από υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου στις παρεχόμενες τροφές με άλευρα φυτικής προέλευσης. Ωστόσο, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ, υποδεικνύουν ότι η υποκατάσταση του ιχθυελαίου με έλαια φυτικής προέλευσης, δεν εμπλέκεται σημαντικά στη βακτηριακή σύνθεση των εντερικών μικροβιακών κοινοτήτων σε άτομα αυτού του είδους.

Επίσης οι μικροβιακές κοινότητες που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα του νερού εκτροφής δεν παρουσίασαν σχέση με τα δείγματα του ξενιστή (Εικ. 3.23). Αντιθέτως, ο παράγοντας της ηλικίας είναι αυτός που φαίνεται να επιδρά στη βακτηριακή ποικιλομορφία του εντερικού τους συστήματος. Η άποψη αυτή, έρχεται σε συμφωνία επίσης με τα ευρήματα των Llewellyn et al. (2016), οι οποίοι μελέτησαν 96 άτομα *S. salar*, με διαφορετική ηλικία και προέλευση (γλυκό και θαλασσινό νερό) και παρατήρησαν ομαδοποίηση των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων τους με βάση το στάδιο του κύκλου ζωής. Επίσης οι Lokesh et al. (2018), σε δείγματα του εντερικού βλεννογόνου από νεαρά άτομα του ίδιου είδους, κατέγραψαν επιλεκτικό μικροβιακό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

εμπλουτισμό στα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν (από το στάδιο του γονιμοποιημένου αυγού, έως 80 εβδομάδες μετά την εκκόλαψη).

Από τη φυλογενετική ανάλυση προέκυψε ότι τα πιο άφθονα βακτηριακά φύλα στα δείγματα *S. salar* και στις δύο μεταχειρίσεις ήταν τα Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria και Bacteroidetes, τα οποία φαίνεται να σχετίζονται με το εντερικό σύστημα ατόμων αυτού του είδους, στα στάδια του κύκλου ζωής τους που διαβιούν στο γλυκό νερό (Llewellyn et al., 2016). Πρόκειται για φύλα που γενικά απαντώνται στο εντερικό σύστημα των ιχθύων (Rombout et al., 2011; Kormas et al., 2014; Ghanbari et al., 2015; Tarnecki et al., 2017; Nikouli et al., 2018) και δεν διαφέρουν από αυτά που ήδη ανιχνεύθηκαν στο εντερικό σύστημα ειδών ιχθύων θαλασσινού νερού στις προηγούμενες ενότητες. Θα πρέπει να αναφερθεί επίσης, ότι όπως και την ενότητα 3.3., έτσι και εδώ ένα ποσοστό (26,4%) των ανιχνευμένων OTUs στα γονιμοποιημένα αυγά (EG), δεν ανιχνεύθηκε στο νερό εκτροφής (WST), υποστηρίζοντας περαιτέρω την άποψη ότι τα βακτηριακά αυτά είδη πιθανόν να προέρχονται από το μικροβίωμα των γεννητόρων (Hansen & Olafsen,1989) ή του περιβάλλοντος εκτροφής αυτών (βλέπε § 3.3).

Αν και οι τροφές αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από Firmicutes, η αύξηση της αφθονίας αυτού του φύλου στις γαστρεντερικές κοινότητες μετά από τη χορήγηση των τροφών, δεν οφείλεται αποκλειστικά σε OTUs που ανιχνεύθηκαν στις τροφές, αλλά ούτε και στο νερό εκτροφής. Επίσης η κυρίαρχη βακτηριακή οικογένεια κατά το D0 (Chromobacteriaceae) δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα τροφών, ενώ η παρουσία της στα υπόλοιπα δείγματα ήταν πάντα χαμηλή (σχετική αφθονία <0,6%). Γενικά η μικροβιακή κοινότητα του νερού εκτροφής κατά τη διάρκεια του πειράματος δεν παρουσίασε μεγάλες μεταβολές, ενώ ως κυρίαρχο OTU στο νερό εκτροφής όλων των δεξαμενών βρέθηκε το SOTU0001, με κοντινότερο συγγενή το είδος *Polynucleobacter necessarius*.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Το είδος αυτό απαντάται συχνά σε δείγματα γλυκού νερού, ενώ με την παρουσία του εδώ πιθανόν να συμβάλει στον καταβολισμό της ουρίας και των νιτρικών (Boscaro et al., 2013). Επίσης θα πρέπει να αναφερθεί ότι η αφθονία ειδών στα δείγματα νερού εκτροφής ήταν πάντα μεγαλύτερη σε σχέση με τα δείγματα *S. salar*, όπως έχει επίσης διαπιστωθεί μέσα από αποτελέσματα άλλων ερευνών για το ίδιο είδος (Schmidt et al., 2016; Lokesh et al., 2018).

Όσον αφορά τους κυρίαρχους βακτηριακούς εκπροσώπους που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα *S. salar*, φαίνεται να σχετίζονται με είδη που παρέχουν διαφορετικές λειτουργίες και έχουν απομονωθεί από ποικίλα περιβάλλοντα. Συγκεκριμένα το κυρίαρχο SOTU0011 στα γονιμοποιημένα αυγά (EG), ταξινομήθηκε στο γένος *Methylotenera* (β-Proteobacteria), το οποίο έχει ανιχνευθεί προηγουμένως ξανά σε γονιμοποιημένα αυγά σολομού από τους ερευνητές Lokesh et al. (2018). Το γένος αυτό, αποτελείται από μεθυλότροφα είδη που χρησιμοποιούν τη μεθυλαμίνη ως μοναδική πηγή άνθρακα, ενέργειας και αζώτου (Kalyuzhnaya et al., 2006). Το κυρίαρχο OTU στο στάδιο YS (SOTU0013), φαίνεται να σχετίζεται με το είδος *Delftia acidovorans* (*β*-Proteobacteria), το οποίο περιλαμβάνει αποκλειστικά αερόβιους, οργανοτροφικούς οργανισμούς, που δεν πραγματοποιούν ζυμώσεις (Wen et al., 1999) και έχουν ανιχνευθεί προηγουμένως στο έντερο υγιών ατόμων ροφού (Sun et al., 2009), ιριδίζουσας πέστροφας (Navarrete et al., 2012) αλλά και σολομού του Ατλαντικού (Gajardo et al., 2016).

Στο χρονικό σημείο D0, το κυρίαρχο OTU (SOTU0009) παρουσίασε ομοιότητες με το είδος *Iodobacter fluviatilis* της οικογένειας Chromobacteriaceae (*β*-Proteobacteria). Η οικογένεια αυτή στα επόμενα χρονικά σημεία αλλά και στα δείγματα νερού ήταν πάντα σε χαμηλή σχετική αφθονία ($\leq 0,3\%$), ενώ δεν ανιχνεύθηκε στα δείγματα τροφών (FD,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

VD). Είδη του γένους αυτού έχουν καταγραφεί κυρίως σε ιζήματα και δείγματα νερού (Ryall & Moss, 1975; Wynn-Williams, 1983; Logan, 1989). Η παρουσία τους στο δέρμα ιχθύων (*Oncorhynchus mykiss* και *Salmo trutta*) έχει συνδεθεί με δερματικές παθήσεις (Carbajal-González et al., 2011), αλλά στο εντερικό σύστημα του ιχθύος *Coreius guichenoti* έχουν ανιχνευθεί σε μεγάλη αφθονία μόνο σε υγιή άτομα (Li et al, 2016). Στο εντερικό σύστημα του είδους *S. salar*, καταγράφεται για πρώτη φορά μέσα από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Μετά το D0, άρχισε η παροχή εξωτερικής τροφής στους πληθυσμούς *S. salar* και οι δύο διατροφικές μεταχειρίσεις παρουσίασαν διαφοροποιήσεις όσον αφορά τα κυρίαρχα OTUs τους. Στις περιπτώσεις των D35F και D65F, τα κυρίαρχα OTUs (SOTU0017 και SOTU0070 αντίστοιχα), σχετίστηκαν με βακτηριακά είδη που φαίνεται να αποτελούν παθογόνα φυτών (Alivizatos et al., 1986; Alimi et al., 2011; Taylor, 2011; Sarris et al., 2012) και μυκήτων (Lincoln et al., 1999, Graupner et al., 2015). Σύμφωνα με πρόσφατα ευρήματα, τουλάχιστον για το είδος *Janthinobacterium lividum* (*β*-Proteobacteria), η παρουσία του στο γαστρεντερικό σύστημα των ατόμων *S. salar*, μπορεί να παρέχει προβιοτικές ιδιότητες, καθώς το είδος αυτό παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε πολυανθεκτικά βακτήρια κλινικής και περιβαλλοντικής προέλευσης, όπως σε στελέχη των *Enterococci,* και *Enterobacteriaceae* (Baricz et al., 2018).

Το κυρίαρχο OTU στα αντίστοιχα χρονικά σημεία που ανιχνεύθηκαν στη διατροφική μεταχείριση VD (D35V και D65V) ήταν το SOTU0005, με κοντινότερο χαρακτηρισμένο συγγενή το *Cloacibacterium normanense* (Bacteroidetes). Η υπάρχουσα βιβλιογραφία, αναφέρει τη συχνή παρουσία του είδους αυτού σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Benedict & Carlson, 1971; Güde, 1980), συμβάλλοντας στη

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

διάσπαση σύνθετων οργανικών ενώσεων (Bernardet et al., 2002) και στην απομάκρυνση του φωσφόρου (Van Ommen Kloeke & Geesey, 1999). Τα παραπάνω, υποδεικνύουν παρόμοιες διεργασίες στο εντερικό σύστημα των ατόμων *S. salar* που διατράφηκαν με την πειραματική τροφή που περιείχε φυτικά έλαια (VD). Την ίδια ανάγκη φαίνεται να καλύπτει το ίδιο OTU στο χρονικό σημείο D93, αλλά αυτή τη φορά στη διατροφική μεταχείριση FD. Αντιθέτως στο δείγμα D93V, κυρίαρχο OTU αποτελεί το SOTU0004, το οποίο παρουσίασε επίσης τη μεγαλύτερη αφθονία και στα δείγματα των τροφών. Το *Weissella cibaria* (Firmicutes), με το οποίο παρουσιάζει ομοιότητες, ανήκει στα οξυγαλακτικά βακτήρια, και φαίνεται να παρέχει αντιμικροβιακή δράση στο εντερικό σύστημα των ιχθύων (Mourino et al., 2016). Σημαντικό γεγονός επίσης αποτελεί, ότι το συγκεκριμένο OTU (SOTU0004), καθώς και τα SOUT0013 και SOTU0017, που επίσης φαίνεται να σχετίζονται με προβιοτικά βακτηριακά είδη, ανιχνεύθηκαν σε όλα τα χρονικά σημεία που μελετήθηκαν εδώ (EG – D93), ανεξαρτήτου διατροφικής μεταχείρισης (FD & VD). Η παρατήρηση αυτή, υποδεικνύει δυνητικά συν-εξελικτική σχέση των βακτηρίων αυτών με τον υπό μελέτη ξενιστή και πιθανή εξειδίκευση στις λειτουργίες του εντερικού του συστήματος.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τους στόχους που τέθηκαν στην αρχή της παρούσας διδακτορικής διατριβής (§1.5), η μελέτη των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων (που προέκυψαν από την επεξεργασία των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν εδώ) και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξαν:

- την κυριαρχία συγκεκριμένων βακτηριακών φύλων στο εντερικό σύστημα των ιχθύων (Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes)
- την ύπαρξη κοινών βακτηριακών εκπροσώπων στο εντερικό σύστημα ιχθυοπληθυσμών του ίδιου είδους, ανεξαρτήτως γεωγραφικής θέσης - απόστασης
- την ύπαρξη κοινών βακτηριακών εκπροσώπων στις αυτόχθονες βακτηριακές εντερικές κοινότητες αλλοπάτριων και συμπάτριων ιχθυοπληθυσμών διαφορετικών ειδών ιχθύων
- ενδείξεις για διαφορετικούς βιολογικούς ρόλους των εντερικών βακτηριακών κοινοτήτων μεταξύ διαφορετικών ειδών ιχθύων
- ενδείξεις συνεργατικής σχέσης μεταξύ των βακτηριακών ειδών της ίδιας εντερικής κοινότητας
- την επίδραση της ηλικίας και όχι των εκτρεφόμενων συνθηκών (παρεχόμενη τροφή και νερό εκτροφής) στην διαδοχή των βακτηριακών κοινοτήτων των ιχθύων κατά τη νυμφική εκτροφή
- την παρουσία μοναδικών OTUs στα γονιμοποιημένα αυγά που πιθανόν να προέρχονται από το μικροβίωμα των γεννητόρων

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

- την παρουσία OTUs που σχετίζονται με βακτηριακά είδη, που φαίνεται να κατέχουν προβιοτικές ιδιότητες

Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν επιλεκτικές πιέσεις του εντερικού περιβάλλοντος του ξενιστή – είδος ιχθύος, που ευνοούν την εποίκιση και ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών σε αυτό. Τα αποτελέσματα αυτά συνεισφέρουν σημαντικά στις γνώσεις μας για τις εντερικές βακτηριακές κοινότητες των ιχθύων, παρέχοντας πληροφορίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής των συγκεκριμένων ειδών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ΒιΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΥΠΑΑΤ, ΣΕΘ https://www.fgm.com.gr/uploads/file/FGM_2016.pdf

Abid, A.; Davies, S. J.; Waines, P.; Emery, M.; Castex, M.; Gioacchini, G.; Carnevali, O.; Bickerdike, R.; Romero, J. and Merrifield, D.L. (2013) Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. Fish & Shellfish Immunology, 35, 1948-1956.

Abd El-Rhman, A.M.; Khattab, Y.A.E. & Shalaby, A.M.E. (2009) Micrococcus luteus and Pseudomonas species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology, 27:175–180.

Akiyama D. & Hunter B. (2000) A review of the Asian aquafeed industry. International Aquafeed Directory & Buyers Guide 2001, Turret RAI plc, Uxbridge, UK, pp.36-38.

Alegbeleye, W.O.; Obasa, S.O.; Olude, O.O.; Otubu, K. & Jimoh, W. (2012) Preliminary evaluation of the nutritive value of the variegated grasshopper (*Zonocerus variegatus* L.) for African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell. 1822) fingerlings. Aquaculture Research, 43(3): 412-420.

Alimi, M.; Rahimian, H.; Hassanzadeh, N.; Darzi, M.T.; Ahmadikhah, A.; Heydari, A. & Balestra G.M. (2011) First detection of *Pseudomonas viridiflava*, the causal agent of blossom blight in apple by using specific designed primers. African Journal of Microbiology Research, 5(26):4708-4713. DOI: 10.5897/AJMR11.840

Alivizatos, AS. (1986) Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas viridiflava*. Ann Inst Phytopathol Benaki, 15:41–47.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Anand, H.; Ganguly, A. & Haldar P. (2008) Potential value of acridids as high protein supplement for poultry feed. International Journal of Poultry Science, 7(7): 722–725.

Askarian, F.; Kousha, A. and Ringø, E. (2009) Isolation of lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract of beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Journal of Applied Ichthyology, 25:91–94.

Askarian, F.; Kousha, A.; Salma, W. & Ringø, E. (2011) The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. Aquaculture Nutrition, 17:488–497.

Askarian, F.; Zhou, Z.; Olsen, R.E.; Sperstad, S. & Ringø, E. (2012) Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin: characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of fish pathogens. Aquaculture, 326–329:1–8.

Austin, B. & A1-Zahrani, A.M.J. (1988) The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Journal of Fish Biology, 33:1-14.

Avendaño-Herrera, R.; Irgang, R.; Sandoval, C.; Moreno-Lira, P.; Houel, A.; Duchaud, E.; Poblete-Morales, M.; Nicolas P. & Ilardi P. (2016) Isolation, Characterization and Virulence Potential of *Tenacibaculum dicentrarchi* in Salmonid Cultures in Chile. Transboundary and Emerging Diseases, 63(2):121-6. DOI: 10.1111/tbed.12464.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Awoniyi, T.A.M.; Adetuyi, F.C. & Akinyosoye, F.A. (2004) Microbiological investigation of maggot meal, stored for use as livestock feed component. Journal of Food Agriculture and Environment, 2(3-4): 104–106.

Aylward, F.O.; Eppley, J.M.; Smith, J.M.; Chavez, F.P.; Scholin, C.A. & DeLong, E.F. (2015) Microbial community transcriptional networks are conserved in three domains at ocean basin scales. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112:5443–5448.

Azevedo, P.A.A.; Furlan, J.P.R.; Oliveira-Silva, M.; Nakamura-Silva, R.; Gomes, C.N.; Costa, K.R.C.; Stehling, E.G. & Pitondo-Silva, A. (2018) Detection of virulence and β-lactamase encoding genes in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 49 Supplement 1:224-228. Doi: 10.1016/j.bjm.2018.04.009.

Bäckhed, F.; Ley, R.E.; Sonnenburg, J.L.; Peterson, D.A. & Gordon J.I. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science, 307:1915–20.

Badillo, D., Herzka, S.Z. & Viana, M.T. (2014). Protein retention assessment of four levels of poultry by-product substitution of fishmeal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets using stable isotopes of nitrogen (δ15N) as natural tracers. PLoS ONE, 9(9):e107523. pmid:25226392

Baeza-Ariño, R.; Martínez-Llorens, S.; Nogales-Mérida, S.; Jover-Cerda, M. & Tomás-Vidal, A. (2016) Study of liver and gut alterations in sea bream, *Sparus aurata* L. fed a mixture of vegetable protein concentrates. Aquaculture research, 47:460–471.

Bakke-McKellep, A.M.; Penn, M.H.; Mora Salas, P.; Refstie, S.; Sperstad, S.; Landsverk, T.; Ringø, E. & Krogdahl, E. (2007) Effects of dietary soybean meal, inulin and

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). British Journal of Nutrition, 97:699–713.

Bakke, I.; Skjermo, J.; Vo, T.A. & Vadstein, O. (2013) Live feed is not a major determinant of the microbiota associated with cod larvae (*Gadus morhua*). Environmental Microbiology Reports, 5(4):537-548.

Baricz, A.; Coman, C.; Szekeres, E.; Farkas, A.; Nica, M.; Dascălu, A.; Lavin, P.; Teban, A.; Chiriac, C.M. & Oprișan, C. (2018) Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a One Health approach. Scientific Reports, 8:15272.

Barroso, F.G.; de Haro, C.; Sanchez-Muros, M.J.; Venegas, E.; Martinez-Sanchez, A. & Perez-Banon C. (2014) The potential of various insect species for use as food for fish. Aquaculture, 422-42:193–201

Bashan, A.; Gibson, T.E.; Friedman, J.; Carey, V.J.; Weiss, S.T.; Hohmann, E.L. & Liu Y-Y. (2016) Universality of human microbial dynamics. Nature, 534: 259-262.

Bates, J.M; Mittge, E.; Kuhlman, J.; Baden, K.N; Cheesman, S.E. & Guillemin K. (2006) Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. Developmental Biology, 297(2):374-386.

Becker, E. (2007) Micro-algae as a source of protein. Biotechnology Advances, 25:207–210

Becker W. (2004) Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A (ed) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd, Cambridge, pp 312–351.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Benedict, R.G. & Carlson, D.A. (1971) Aerobic heterotrophic bacteria in activated sludge. Water Research, 5:1023–1030.

Berg, R.D. (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. Trends in Microbiology, 4:430–435.

Bernardet, J.-F., Nakagawa, Y. & Holmes, B. (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family Flavobacteriaceae and emended description of the family. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52:1049–1070.

Beveridge, M.C.M., Sikdar, P.K., Frerichs, G.N. & Millar, S., (1991) The ingestion of bacteria in suspension by the common carp *Cyprinus carpio* L. Journal of Fish Biology, 39:825–831.

Bitterlich, G. & Schaber, E. (1986) Bacteria-food or food competitors of silver carp, *Hypophthalmichthy smolitrix* Val.? Journal of Fish Biology, 29:605–612.

Bob-Manuel, F.G. (2014) A comparative study of the effect of yeast single cell protein on growth, feed utilization and condition factor of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell) and tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) fingerlings. African Journal of Agricultural Research, 9(26):2005-2011.

Bob-Manuel, F.G. & Alfred – Ockiya, J.F. (2011) Evaluation of yeast single cell protein (SCP) diets on growth performance, feed conversion and carcass composition of Triapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings. African Journal of Biotechnology, 10(46):9473 – 9478.

Bolnick, D.I.; Snowberg, L.K.; Hirsch, P.E.; Lauber, C.L.; Knight, R.; Caporaso, J.G. & Svanback, R. (2014) Individuals' diet diversity influences gut microbial diversity

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

in two freshwater fish (threespine stickleback and Eurasian perch). Ecology Letters, 17:979–987. https://doi.org/10.1111/ele.12301

Borsodi, A.K.; Szabó, A.; Krett, G.; Felföldi, T.; Specziár, A. & Boros, G. (2017) Gut content microbiota of introduced bigheaded carps (*Hypophthalmichthys* spp.) inhabiting the largest shallow lake in central Europe. Microbiological Research, 195:40–50.

Boscaro, V.; Felletti, M.; Vannini, C.; Ackerman, M.S.; Chain, P.S.; Malfatti, S.; Vergez, L.M.; Shin, M.; Doak, T.G.; Lynch, M. & Petroni, G. (2013) *Polynucleobacter necessarius*, a model for genome reduction in both free-living and symbiotic bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(46):18590-5.

Bourouni, O.C.; Barros-Velàzquez, J.; Calo-Mata, P. & El Bour, M. (2015) Lactic acid bacteria associated with the digestive tract and skin of Sea bream (*Sparus aurata*) cultured in Tunisia. African Journal of Microbiology Research, 9(31):1853-1865. DOI: 10.5897/AJMR2014.6685

Bourouni, O.C.; El Bour, M.; Calo-Mata, P.; Mraouna, R.; Abedellatif, B. & Barros-Velàzquez, J. (2012) Phylogenetic analysis of antimicrobial lactic acid bacteria from farmed seabass *Dicentrarchus labrax*. Canadian Journal of Microbiology, 58:463–474.

Brown, M.; Jeffrey, S.; Volkman, J. & Dunstan, G. (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture ,151:315–331.

Burr, G.S.; Wolters, W.R.; Barrows, F.T. & Hardy, R.W. (2012) Replacing fishmeal with blends of alternative proteins on growth performance of rainbow trout

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

(*Oncorhynchus mykiss*), and early or late stage juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 334:110–116.

Cahill, M.M. (1990) Bacterial flora of fishes: a review. Microbial Ecology, 19:21-41.

Califano, G., Castanho, S., Soares, F., Ribeiro, L., Cox, C.J., Mata, L. & Costa, R., (2017) Molecular taxonomic profiling of bacterial communities in a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) hatchery. Frontiers in Microbiology, 8:204.

Cantas, L.; Fraser, T.W.K.; Fjelldal, P.G.; Mayer, I.; & Sørum, H. (2011) The culturable intestinal microbiota of triploid and diploid juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) - a comparison of composition and drug resistance. BMC Veterinary Research, 7:71. DOI: 10.1186/1746-6148-7-71.

Carda-Diéguez, M.; Mira, A. & Fouz, B. (2014) Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. FEMS Microbiology Ecology, 87:451–459.

Carbajal-González, M.T.; Fregeneda-Grandes, J.M.; Suárez-Ramos, S.; Rodríguez Cadenas, F. & Aller-Gancedo, J.M. (2011) Bacterial skin flora variation and in vitro inhibitory activity against *Saprolegnia parasitica* in brown and rainbow trout. Diseases of aquatic organisms, 96(2):125-35. DOI:10.3354/dao02391.

Carnevali, O.; Zamponi, M.C.; Sulpizio, R.; Rollo, A.; Nardi, M.; Orpianesi, C.; Silvi, S.; Caggiano, M.; Polzonetti, A.M. & Cresci, A. (2004) Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. Aquaculture International, 12(4-5): 377-386. http://dx.doi.org/10.1023/b:aqui.0000042141.85977.bb.

Cerezuela, R.; Fumanal, M.; Tapia-Paniagua, S.T.; Meseguer, J.; Moriñigo, M.Á. & Esteban, M.Á. (2013) Changes in intestinal morphology and microbiota caused

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

by dietary administration of inulin and Bacillus subtilis in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. Fish and Shellfish Immunology, 34(5):1063-70. DOI:10.1016/j.fsi.2013.01.015

Cho J. & Kim I. (2011) Fish meal−nutritive value. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 95:685–692.

Clements, K.D. & Raubenheimer, D. (2005) Feeding and nutrition. In: The Physiology of Fishes (eds D.H. Evans and J.B. Claiborne), CRC Press, Boca Raton, pp. 47–82.

Clements, K.D.; Pasch, I.B.; Moran, D. & Turner, S.J. (2007). Clostridia dominate 16S rRNA gene libraries prepared from the hindgut of temperate marine herbivorous fishes. Marine Biology, 150:1431–1440. DOI:10.1007/s00227-006-0443-9

Colwell, R.R. (1962) The bacterial flora of Puget Sound fish. Journal of Applied Bacteriology 25:147-158.

Cordero, H.; Guardiola, F.A.; Tapia-Paniagua, S.T.; Cuesta, A.; Meseguer, J.; Balebona, M. C.; Moriñgo, M.A. & Esteban, M.A. (2015) Modulation of immunity and gut microbiota after dietary administration of alginate encapsulated *Shewanella putrefaciens* Pdp11 to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology, 45:608–618. DOI:10.1016/j.fsi.2015.05.010.

Coyte, K.Z.; Schluter, J.; Foster, K.R. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. Science 2015, 350, 663–666.

D'Alvise, P.W.; Lillebø, S.; Prol-Garcia, M.J.; Wergeland, H.I.; Nielsen, K.F.; Bergh, Ø. &Gram, L. (2012) *Phaeobacter gallaeciensis* reduces *Vibrio anguillarum* in cultures of microalgae and Rotifers, and prevents vibriosis in cod larvae. PLoS ONE, 7(8):e43996. DOI:10.1371/journal.pone.0043996.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

D'Alvise P.W.; Magdenoska, O.; Melchiorsen, J.; Nielsen, K.F. & Gram, L. (2014) Biofilm formation and antibiotic production in *Ruegeria mobilis* are influenced by intracellular concentrationsof cyclic dimeric guanosinmonophosphate. Environmental Microbiology, 16(5):1252-66. DOI:10.1111/1462-2920.12265.

Davidson, E.W.; Rosell, R.C. & Hendrix, D.L. (2000) Culturable bacteria associated with the whitefly, *Bemisia argentifolii* (Homoptera: aleyrodidae). Florida Entomologist, 83:159–171.

Davies, S.J.; Gouveia, A.; Laporte, J.; Woodgate, S.L. & Nates, S. (2009) Nutrient digestibility profile of premium (category III grade) animal protein by-products for temperate marine fish species (European sea bass, gilthead sea bream and turbot). Aquaculture Research, 40:1759–1769

Dehler, E.; Secombers, C.J. & Martin, S.A.M. (2017) Environmental and physiological factors shape the gut microbiota of Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 467: 149–157. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.07.017.

De Schryver, P.; Dierckens, K.; Bahn Thi, Q.Q.; Amalia, R.; Marzorati, M.; Bossier, P.; Boon, N. & Verstraete, W. (2011) Convergent dynamics of the juvenile European sea bass gut microbiota induced by poly-β-hydroxybutyrate. Environmental Microbiology, 13: 1042–1051.

Dishaw, L.J.; Flores-Torres, J.; Lax, S.; Gemayel, K.; Leigh, B.; Melillo, D.; Mueller, M.G.; Natale, L.; Zucchetti, I., Santis, R.D., Pinto, M.R., Litman G.W. & Gilbert J.A. (2014) The gut of geographically disparate *Ciona intestinalis* harbors a core microbiota. PLoS ONE, 9(4) e93386. DOI:10.1371/journal.pone.0093386.

Dong, C.; He, G.; Mai, K.; Zhou, H. & Xu, W. (2016) Palatability of water-soluble extracts of protein sources and *replacement of fishmeal by a selected mixture of*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

protein sources for juvenile turbot (Scophthalmus maximus). Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research), 15(3):561–567.

Dy Peñaflorida, V. & Golez, N.V. (1996) Use of seaweed meals from *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria heteroclada* as binders in diets for juvenile shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture, 143:393–401.

EFSA (2015) Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed EFSA Journal, 13(10):4257. DOI:10.2903/j.efsa.2015.4257.

Egerton, S.; Culloty, S.; Whooley, J.; Stanton, C. & Ross, R.P. (2018) The Gut Microbiota of Marine Fish. Frontiers in Microbiology, 9:873. DOI:10.3389/fmicb.2018.00873.

Elbal, M.T.; García Hernández, M.P.; Lozano, M.T. & Agulleiro, B. (2004) Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. Aquaculture, 234(1–4):215-238. DOI:10.1016/j.aquaculture.2003.11.028.

Embody, G.C. (1918) Results of some trout feeding experiments carried on in the experimental hatching station of Cornell University. Transactions of the American Fisheries Society, 48, 26e33.

Ergün, S., Soyutürk, M., Güroy, B., Güroy, D. & Merrifield, D. (2009) Influence of Ulva meal on growth, feed utilization, and body composition of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at two levels of dietary lipid. Aquaculture International, 17(4):355–361.

Estruch, G.; Collado, M.C; Peñaranda, D.C.; Tomás Vidal, A.; Jover Cerdá, M.; Pérez Martínez, G. & Martinez-Llorens, S. (2015) Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on the gastrointestinal microbiota

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

determined by pyrosequencing the 16S rRNA Gene. PLoS ONE 10(8):e0136389. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136389.

Eichmiller, J.J.; Hamilton, M.J.; Staley, C.; Sadowsky, M.J. & Sorensen, P.W. (2016) Environment shapes the fecal microbiome of invasive carp species. Microbiome, 4(1):44.

EUROSTAT Statistics Explained (http://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/) - 03/04/2018

Fänge, R. & Grove, D. (1979) Digestion. In: Fish Physiology, vol. VIII (eds W.S. Hoar, D.J. Randall and J.R. Brett), Academic Press, New York, pp. 161–260.

FAO (1988) Definition of aquaculture, Seventh Session of the IPFC Working Party of Expects on Aquaculture, IPFC/WPA/WPZ, p.1-3, RAPA/FAO, Bangkok.

FAO (2005-2018*α*) Cultured Aquatic Species Information Programme. *Sparus aurata*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Colloca, F.; Cerasi, S. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 8 February 2005. [Cited 17 September 2018].

FAO (2005-2018*β*) Cultured Aquatic Species Information Programme. *Dicentrarchus labrax*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Bagni, M. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 18 February 2005. [Cited 17 September 2018].

FAO (2006) Food and Agricultural Organization of the United Nations. World agriculture: Towards 2030/2050.http://www.fao.org/docrep/016/ap106e/ap106e.pdf

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

FAO (2008 - 2018) Fisheries and Aquaculture topics. FAO Fisheries and Aquaculture e-Bulletin. Topics Fact Sheets. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated. [Cited 17 September 2018].

FAO (2013) The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, Italy, http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf

FAO (2014) FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy

FAO (2017) FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics, ISBN: 978-92-5-009987-3.

Faust, K. & Raes, J. (2016) Host-microbe interaction: Rules of the game for microbiota. Nature, 534:182–183.

Flint, H.J.; Duncan, S.H. & Louis, P. (2017) The impact of nutrition on intestinal bacterial communities. Current Opinion in Microbiology, 38:59–65.

Floris, R.; Manca, S. & Fois, N. (2013) Microbial ecology of intestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) from two coastal lagoons of Sardinia (Italy). Transitional Waters Bulletin, 7:4–12.

Francis, G.M.; Makkar, H.P.S. & Becker, K. (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. Aquaculture 199(197-297)

Gajardo, K.; Rodiles, A.; Kortner, T.M.; Krogdahl, Å.; Bakke, A.M.; Merrifield, D.L. & Sørum, H. (2016) A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research. Scientific Reports, 6: 30893.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

García Hernández, M.; Lozano, M.; Elbal, M. & Agulleiro, B. (2001) Development of the digestive tract of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). Light and electron microscopic studies. Anatomy and Embryology, 204:39-57. DOI:10.1007/s004290100173.

Gatlin III, D.M.; Barrows, F.T.; Brown, P.; Dabrowski, K.; Gaylord, T.G.; Hardy, R.W.; Herman, E.; Hu, A.; Kroghal, Å.; Nelson, R.; Overturf, K.; Rust, R.; Sealey, W.; Skonberg, D.; Souza, E.J.; Stone, D.; Wilson, R. & Wurtele, E. (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. Aquaculture Research, 38:551-579

Gaylord, G.T.; Barrows, F.T.; Overturf, K.E.; Liu, K. & Hu, G. (2010) An overview of progress toward developing an all plant-based diet for rainbow trout. Bulletin of Japan Fisheries Research and Education Agency, 31:9-14.

Ghanbari M.; Kneifel W. & Domig K.J. (2015) A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing. Aquaculture, 448:464–475. 10.1016/j.aquaculture.2015.06.033

Gioacchini, G.; Giorgini, E.; Merrifield, D.L.; Hardiman, G.; Borini, A.; Vaccari, L. & Carnevali, O. (2012) Probiotics can induce follicle maturational competence: the *Danio rerio* case. Biology of Reproduction, 86(3):65. DOI:10.1095/biolreprod.111.094243.

Gilmour, A.; McCallum, M.F. & Allan, M.C. (1976) A study of the bacterial types occurring on the skin and in the intestines of farmed plaice, *Pleuronectes platessa*. Aquaculture, 7:161-172.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Givens, C.; Ransom, B.; Bano, N. &Hollibaugh, J. (2015) Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. Marine Ecology Progress Series. 518:209–223.

Gjedrem, T.; Gjøen, H.M. & Gjerde, B. (1991) Genetic-origin of Norwegian farmed Atlantic salmon. Aquaculture, 98:41–50.

Godoy, F.A.; Miranda, C.D.; Wittwer, G.D.; Aranda, C.P. & Calderón, R. (2015) High variability of levels of *Aliivibrio* and lactic acid bacteria in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* L. Annals of Microbiology, 65(4):2343-2353. DOI: 10.1007/s13213- 015-1076-3

Gray, J.; Oehrle, K.; Worthen, G.; Alenghat, T.; Whitsett, J. & Deshmukh, H. (2017) Intestinal commensal bacteria mediate lung mucosal immunity and promote resistance of newborn mice to infection. Science Translational Medicine, 9(376). pii: eaaf9412. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf9412.

Graupner, K.; Lackner, G. & Hertweck, C. (2015) Genome Sequence of Mushroom Soft-Rot Pathogen *Janthinobacterium agaricidamnosum*. Microbiology resource announcements, e00277-15.

Green, T.J.; Smullen, R. & Barnes, A.C. (2013) Dietary soybean protein concentrate-induced intestinal disorder in marine farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* is associated with alterations in gut microbiota. Veterinary Microbiology ,166:286-292.

Grisez, L.; Reyniers, J.; Verdonck, L.; Swings, J. & Ollevier, F. (1997) Dominant intestinal microflora of sea bream and sea bass larvae, from two hatcheries, during larval development. Aquaculture, 155, 387-399.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Güde, H. (1980) Occurrence of cytophagas in sewage plants. Applied and Environmental Microbiology, 39:756–763.

Gumiel, M.; da Mota, F.F.; Rizzo Vde, S.; Sarquis, O.; de Castro, D.P.; Lima, M.M.; Garcia, E.dS.; Carels, N. & Azambuja, P. (2015). Characterization of the microbiota in the guts of Triatoma brasiliensis and Triatoma pseudomaculata infected by Trypanosoma cruzi in natural conditions using culture independent methods. Parasites & Vectors, 8:245. DOI:10.1186/s13071-015-0836-z

Hammer, Ø.; Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica, 4(1):9pp.

Hansen, G.H.; Bergh, O.; Michaelsen, J., & Knappskog, D. (1992) *Flexibacter ovolyticus* sp. nov., a pathogen of eggs and larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 42:451-458.

Hansen, G.H. & Olafsen, J.A. (1989) Bacterial colonization of cod (*Gadus rnorhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. Applied and Environmental Microbiology, 53:1435-1446.

Hansen, G.H. & Olafsen J.A. (1999) Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. Microbial Ecology, 38:1–26. DOI:10.1007/s002489900158.

Hatje, E.; Neuman, C.; Stevenson, H.; Bowman, J.P & Katouli, M. (2014) Population dynamics of vibrio and pseudomonas species isolated from farmed Tasmanian Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a seasonal study. Microbiology of Aquatic Systems, 68:697- 687.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Hardy, R.W. (2010) Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. Aquaculture Research, 41(5):770–776

Hemaiswarya, S.; Raja, R.; Kumar, R.R.; Ganesan, V. & Anbazhagan, C. (2011) Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27:1737–1746.

Hendricks, J.D. (2002) Adventitious toxins. In: Halver, J.E. & Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition, third ed. Elsevier, pp. 601-649

Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G. & Fountoulaki, E. (2015) Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. Animal Feed Science and Technology, 203:1-22.

Hertrampf, J.W. & Piedad-Pascual. F. (2000) Squid Meal. In: Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds. Springer, Dordrecht, pp. 403 – 420

Higgs D.A., Dosanjh B.S., Pendergast A.F., Beames R.M., Hardy R.W., Riley W. & Deacon G. (1995) Use of rapeseed/canola protein products in finfish diets. In: Lim, C.E., Sessa, D.J. (Eds.), Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture. AOAC Press, Champaign, pp. 130-156

Hoar, W. S. (1988). The physiology of smolting salmonides. In Fish Physiology, Vol. XIB (Hoar, W. S. & Randall, D. J., eds), pp. 275–343. New York, NY: Academic Press.

Holben, W.E.; Williams, P.; Saarinen, M.; Sarkilahti, L.K., & Apajalahti, J.H.A. (2002) Phylogenetic analysis of intestinal microflora indicates a novel mycoplasma phylotype in farmed and wild salmon. Microbial Ecology 44, 175–185.

Horn, M.H.; Gawlicka, A.K.; German, D.P.; Logothetis, E.A.; Cavanagh, J.W. & Boyle, K.S. (2006) Structure and function of the stomachless digestive system in three

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

related species of New World silverside fishes (Atherinopsidae) representing herbivory, omnivory and carnivory. Marine Biology, 149:1237–1245.

Hovda, M.B.; Lunestad, B.T.; Fontanillas, R. & Rosnes, J.T. (2007) Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 272:581–588.

IFFO (2016) Fishmeal and fish oil statistical yearbook http://www.seafish. org/media/publications/SeafishFishmealandFishOilFactsandFigures_ 201612.pdf

Ijaiya A.T. & Eko E.O. (2009) Effect of replacing dietary fish meal with silkworm (*Anaphe infracta*) caterpillar meal on performance, carcass characteristics and haematological parameters of finishing broiler chicken. Pakistan Journal of Nutrition, 8(6): 850–855.

Ingerslev, H. C.; von Gersdorff Jørgensen, L.; Lenz Strube, M.; Larsen, N.; Dalsgaard, I.; Boye, M. & Madsen L. (2014) The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. Aquaculture, 424:24–34. DOI: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.032

Ishino, R.; Iehata, S.; Nakano, M.; Tanaka, R.; Yoshimatsu, T. & Maeda, H. (2012) Bacterial diversity associated with the rotifer *Brachionus plicatilis* sp. complex determined by culture-dependent and -independent methods. Biocontrol Science, 17:51-56.

Jandhyala, S. M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M. & Reddy, D.N. (2015) Role of the normal gut microbiota. World Journal of Gastroenterology, 21(29):8787–8803, http://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Jang, G.I.; Kim, G.; Hwang, C.Y. & Cho, B.C. (2017) Prokaryotic community composition in alkaline-fermented skate (*Raja pulchra*). Food Microbiology, 61:72–82.

Jöborn, A.; Dorsch, M.; Olsson, J.C.; Westerdahl, A. & Kjelleberg, S. (1999) *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). International Journal of Systematic Bacteriology, 49:1891–1898.

Jones, M. (2004) Cultured aquatic species information programme. *Salmo salar*. Cultured Aquatic Species Information Programme. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. [Cited 16 May 2018].

Kalyuzhnaya, M.G.; Bowerman, S.; Lara, J.C.; Lidstrom, M.E. & Chistoserdova, L. (2006) *Methylotenera mobilis* gen. nov., sp. nov., an obligately methylamine-utilizing bacterium within the family Methylophilaceae. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56(Pt 12):2819-23.

Kashinskaya, E.N.; Simonov, E.P.; Kabilov, M.R.; Izvekova, G.I.; Andree, K.B. & Solovyev, M.M. (2018) Diet and other environmental factors shape the bacterial communities of fish gut in an eutrophic lake. Journal of Applied Microbiology, doi: 10.1111/jam.14064

Karila, P.; Shahbazi, F.; Jensen, J. & Holmgren, S. (1998) Projections and actions of tachykininergic, cholinergic, and serotonergic neurons in the intestine of the Atlantic cod. Cell and Tissue Research, 291:403 – 413.

Khatoon, N. & Pal, R. (2015) Microalgae in biotechnological application: a commercial approach. In: Bahadur, B., Rajam, M.V., Sahijram, L., Krishanamurthy, M.V. (eds) Plant biology and biotechnology. Springer, New Delhi, pp. 27–47

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Kim, D.; Brunt, J. & Austin, B. (2007) Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Microbiology, 102:1654– 1664.

Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M. & Glöckner, F. O. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Research, 41(1):e1. http://doi.org/10.1093/nar/gks808

Korkea-aho, T.L.; Heikkinen, J.; Thompson, K.D.; von Wright, A. & Austin, B. (2011) *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Journal of Applied Microbiology, 111:266–277.

Kormas, K. A.; Meziti, A.; Mente, E. & Frentzos, A. (2014) Dietary differences are reflected on the gut prokaryotic community structure of wild and commercial reared sea bream (*Sparus aurata*). MicrobiologyOpen, 3:718-728.

Kottelat, M. & Freyhof, J. (2007) Handbook of European Freshwater Fishes. Publications Kottelat, Cornol, Switzerland.

Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K. & Schloss P.D. (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. Applied and Environmental Microbiology, 79(17):5112-20.

Kroeckel, S.; Harjes, A.G.E.; Roth, I.; Katz, H.; Wuertz, S.; Susenbeth, A. & Schulz, C. (2012) When a turbot catches a fly: evaluation of a pre-pupae meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute - growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). Aquaculture, 364/365: 345-352.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Krogdahl, Å.; Bakke-McKellep, A.M. & Baeverfjord, G. (2003) Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture Nutrition, 9:361–371.

Krutmann, J. (2009) Pre- and probiotics for human skin. Journal of Dermatological Science, 54:1–5.

Kumar, C.S.; Ganesan, P.; Suresh, P.V. & Bhaskar, N. (2008) Seaweed as a source of nutritionally beneficial compounds - A review. Journal of Food Science and Technology, 45:1-13

Kumar, S.; Sándor Zs, J.; Nagy, Z.; Fazekas, G.; Havasi, M.; Sinha, A.K.; De Boeck, G. & Gál. D. (2017) Potential of processed animal protein versus soybean meal to replace fish meal in practical diets for European catfish (*Silurus glanis*): growth response and liver gene expression. Aquaculture nutrition, 23(5):1179-1189

Lamari, F.; Mahdhi, A.; Chakroun, I.; Esteban, M.A.; Mazurais, D.; Amina, B. & Gatesoupe, F.J. (2016) Interactions between candidate probiotics and the immune and antioxidative responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Journal of Fish Diseases, 39:1421–1432.

Lan, C.C. & Love, D.R. (2012) Molecular characterisation of bacterial community structure along the intestinal tract of zebrafish (*Danio rerio*): A Pilot Study. ISRN Microbiology, 590385. DOI:10.5402/2012/590385

Lennon, J.T.; Locey, K.J. (2017) Macroecology for microbiology. Environmental Microbiology Reports, 9:38–40.

Li, T.; Long, M.; Ji, C.; Shen, Z., Gatesoupe, F.J; Zhang, X.; Zhang, Q.; Zhang, L.; Zhao, Y.; Liu, X. & Li., A. (2016) Alterations of the gut microbiome of largemouth

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) suffering from furunculosis. Scientific Reports, 6: 30606.

Li, T.; Long, M.; Gatesoupe, F.J.; Zhang, Q.; Li, A. & Gong, X. (2015) Comparative analysis of the intestinal bacterial communities in different species of carp by pyrosequencing. Microbiology of Aquatic Systems, 69:25-36.

Li, S.S. & Tsai, H.J. (2009) Transgenic microalgae as a non-antibiotic bactericide producer to defend against bacterial pathogen infection in the fish digestive tract. Fish and Shellfish Immunology, 26:316–325

Liu, Y.; Zhou, Z.; Yao, B.; Shi, P.; He, S.; Holvold, L.B. & Ringø, E. (2008) Effect of intraperitoneal injection of immunostimulatory substances on allochthonous gut microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) determined using denaturing gradient gel electrophoresis. Aquaculture Research, 39:635-646.

Llewellyn, M.S.; McGinnity, P.; Dionne, M.; Letourneau, J.; Thonier, F.; Carvalho, G.R.; Creer, S. & Derome, N. (2016) The biogeography of the atlantic salmon (*Salmo salar*) gut microbiome. The ISME Journal, 10:1280–1284.

Lock, E.; Arsiwalla, T. & Waagbø, R. (2016) Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolt. Aquaculture nutrition, 22(6):1202-1213.

Logan, N.A. (1989) Numerical taxonomy of violet-pigmented, gram-negative bacteria and description of *Iodobacter fluviatile* gen. nov., comb. nov.. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 39:450–456.

Lokesh, J.; Kiron, V.; Sipkema, D.; Fernandes, J.M.O. & Moum, T. (2018) Succession of embryonic and the intestinal bacterial communities of Atlantic salmon (*Salmo*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

salar) reveals stage-specific microbial signatures. MicrobiologyOpen. 2018;e672. DOI: 10.1002/mbo3.672

Lutz W. & Samir K.C. (2010) Dimensions of global population projections: what do we know about future population trends and structures? Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 365(1554): 2779–2791

MacFarlane, R.D.; McLaughlin, J.J. & Bullock, G.L. (1986) Quantitative and qualitative studies of gut flora in striped bass from estuarine and coastal environments. Journal of wildlife diseases, 22:344–348.

Makkar, H.P.S.; Tran, G.; Heuzé, V. & Ankers, P. (2014) State-of-the-art on use of insects as animal feed. Animal Feed Science and Technology, 197:1-33.

Mangor-Jensen, A. & Adoff, G.R. (1987) Drinking activity of the newly hatched larvae of cod *Gadus morhua* L. Fish Physiology and Biochemistry, 3:99–103.

Mancuso, T.; Baldi, L. & Gasco, L. (2016) An empirical study on consumer acceptance of farmed fish fed on insect meals: the Italian case. Aquaculture International, 24(5):1489-1507.

Mandakovic, D.; Glasner, B.; Maldonado, J.; Aravena, P.; Gonzalez, M.; Cambiazo, V. and Pulgar, R. (2016) Genomic-Based Restriction Enzyme Selection for Specific Detection of Piscirickettsia salmonis by 16S rDNA PCR-RFLP. Frontiers in Microbiology, 7:643.

Martinson, V.G.; Carpinteyro-Ponce, J.; Moran, N.A. & Markow T.A. (2017) A Distinctive and host-restricted gut microbiota in populations of a cactophilic *Drosophila* species. Applied and Environmental Microbiology, 83(21): e01551-17.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Mazmanian, S.K.; Liu, C.H.; Tzianabos, A.O. & Kasper, D.L. (2005) An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. Cell, 122(1):107-18.

Mente, E.; Nikouli, E.; Antonopoulou, E.; Martin, S.A.M. & Kormas, K.A. (2018) Core versus diet-associated and postprandial bacterial communities of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) midgut and faeces. Biology Open, 7:bio034397. DOI:10.1242/bio.034397

Merrifield, D.L.; Dimitroglou, A.; Bradley, G.; Baker, R.T.M. & Davies, S.J. (2009) Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 32:755–766

Mezzatesta, M.L.; Gona, F. & Stefani, S. (2012) *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future Microbiology, 7:887–902. DOI:10.2217/fmb.12.61

McCormick, S.D. (2013) Smolt physiology and endocrinology. In: McCormick, S.D.; Farrell, A.P.; Brauner, C.J. (Eds.), Euryhaline Fishes. Academic Press, Amsterdam, pp. 199–251.

McDonald, R.; Schreier, H.J. & Watts JE. (2012) Phylogenetic analysis of microbial communities in different regions of the gastrointestinal tract in *Panaque nigrolineatus*, a wood-eating fish. Plos One, 7:e48018. DOI: 10.1371/journal.pone.0048018

McHenery, J.G. & Birkbeck, T.H. (1985) Uptake and processing of cultured microorganisms by bivalves. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 90:145-163.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Meziti, A.; Mente, E. & Kormas, K.A. (2012) Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*. Systematic and Applied Microbiology, 35:473–482.

Mladineo, I.; Bušelic, I.; Hrabar, J.; Radonic, I.; Vrbatovic, A.; Jozic, S. & Trumbic, Ž. (2016) Autochthonous bacterial isolates successfully stimulate in vitro peripheral blood leukocytes of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Frontiers in Microbiology, 7:1244. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01244.

Moeller, A.H.; Peeters, M.; Ndjango, J.B.; Li, Y.; Hahn, B.H. & Ochman, H. (2013) Sympatric chimpanzees and gorillas harbor convergent gut microbial communities. Genome Research, 23(10):1715-20. DOI: 10.1101/gr.154773.113.

Montes, C.; Altimira, F.; Canchignia, H.; Castro, Á.; Sánchez, E.; Miccono, M.; Tapia, E.; Sequeida, Á.; Valdés, J.; Tapia, P.; González, C. & Humberto, P. (2016) A draft genome sequence of *Pseudomonas veronii* R4: A grapevine (*Vitis vinifera* L.) root-associated strain with high biocontrol potential. Standards in Genomic Sciences, 11: 76.

Moretti, A.; Pedini Fernandez-Criado, M.; Cittolin, G. & Guidastri, R. (1999) Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream. Volume 1. Rome, FAO.

Moretti, A.; Pedini Fernandez-Criado, M. & Vetillart, R. (2005) Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream. Volume 2. Rome, FAO. 152 p.

Mouriño, J.L.P.; Pereira, G.D.V.; Vieira, F.D.N.; Jatobá, A.B.; Ushizima, T.T.; Silva, B.C.D.; Seiffert, W.Q.; Jesus, G.F.A. & Martins, M.L. (2016). Isolation of probiotic bacteria from the hybrid South American catfish *Pseudoplatystoma reticulatum Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae): A

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

haematological approach. Aquaculture Reports, 3:166-171. DOI:10.1016/j.aqrep.2016.03.001.

Mueller, N.T.; Shin, H.; Pizoni, A.; Werlang, I.C.; Matte, U., Goldani, M.Z., Goldani, H.A. & Dominguez-Bello M.G. (2016) Birth mode-dependent association between pre-pregnancy maternal weight status and the neonatal intestinal microbiome. Scientific Reports, 6:23133. DOI:10.1038/srep23133.

Muramatsu, Y., Uchino, Y., Kasai, H., Suzuki, K. & Nakagawa, Y. (2007) *Ruegeria mobilis* sp. nov., a member of the Alphaproteobacteria isolated in Japan and Palau. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57:1304–1309.

Mustafa, M.G.; Wakamatsu, S.; Takeda, T.; Umino, T. & Nakagawa, H. (1995) Effects of algae meal as feed additive on growth, feed efficiency and body composition in red sea bream. Fisheries Science, 61: 25–28.

Morueta-Holme, N.; Blonder, B.; Sandel, B.; McGill, B.J.; Peet, R.K.; Ott, J.E.; Violle, C.; Enquist, B.J.; Jørgensen, P.M. & Svenning, J-C (2016) A network approach for inferring species associations 354 from co-occurrence data. Ecography, 39:1139-1150.

Munro, P.D.; Birkbeck, T.H. & Barbour, A. (1993) Influence of rate of bacterial colonization of the gut of turbot larvae on larval survival. In Fish Farming Technology ed. Reinertsen, H., Dahle L. A., Jorgensen, L. and Tvinnereim, K. pp. 85–92. Rotterdam: A. A. Balkema

Muroga, K.; Higashi, M. & Keitoku H. (1987) The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. Aquaculture, 65:79—88.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Muroga, K. & Yasunobu, H. (1987) Uptake of bacteria by rotifer. Nippon Suisan Gakkaishi 53, 2091.

Navarrete, P.; Espejo, R.T. & Romero, J. (2009) Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Microbial Ecology, 57: 550- 561. Doi:10.1007/s00248-008-9448-x.

Navarrete, P.; Magne, F.; Araneda, C.; Fuentes, P.; Barros, L.; Opazo, R.; Espejo, R. & Romero, J. (2012) PCR-TTGE analysis of 16s rRNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. PLoS ONE, 7:e31335.

Nayak, S.K. (2010) Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquaculture Research, 41:1553-1573.

Naylor, R.L.; Hardy, R.W.; Bureau, D.P.; Chiu, A.; Elliott, M.; Farrell, A.P.; Forster, I.; Gatlin, D.M.; Goldburg, R.J.; Hua, K. & Nichols P.D., (2009) Feeding aquaculture in an era of finite resources. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 106:15103-15110

Neori, A.; Chopin, T.; Troell, M.; Buschmann, A.H.; Kraemer, G.P.; Halling, C.; Shpigel, M. & Yarish, C. (2004) Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art, emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. Aquaculture, 231:361–391.

Neto, R.J.; Yano, T.; Beriam, L.O.S.; Destefano, S.A.L.; Oliveira, V.M. & Rosato, Y.B. (2003) Comparative RFLP- ITS Analysis between Enterobacter cloacae strains isolated from plants and clinical origin. Arquivos do Instituto Biológico, 70367–372.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Newman, J.T.; Jr Cosenza, B.J. & Buck, J.D. (1972) Aerobic microflora of the bluefish (*Pomatomus saltatrix*) intestine. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 29:333-336.

Newton, L.; Sheppard, C.; Watson, D.W. & Burtle, G. (2005) Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure. North Carolina, North Carolina State University. Available at: www.cals.ncsu.edu/ waste_mgt/smithfield_projects/phase2report05/cd,web%20files/A2.pdf

Nikouli, E. Meziti, A.; Antonopoulou, E.; Mente, E. & Kormas, K.A. (2018) Gut Bacterial Communities in Geographically Distant Populations of Farmed Sea Bream (*Sparus aurata*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). Microorganisms, 6(3):92. DOI:10.3390/microorganisms6030092.

Olafsen JA (1984) Ingestion of bacteria by cod (*Gadus morhua* L.) larvae. In: DahI E, Danielssen DS, Moksness E, Solemdal P(eds)The Propagation of Cod *Gadus Morhua* L., pp. 627–643.Institute of Marine Research, Flødevigen Biological Station, O. Rasmussen AS, Skien.

Olafsen, J.A. & Hansen, G.H. (1992) Intact antigen uptake by intestinal epithelial cells of marine fish larvae. Journal of Fish Biology, 40:141–156.

Olafsen, J.A. (2001) Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. Aquaculture, 200:223-247.

Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html

Olsen, R.E. & Ringø, E. (1997) Lipid digestibility in fish: a review. Recent Research Developments in Lipid Research, 1:199–264.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Olsen, A.B.; Gulla, S.; Steinum, T.; Colquhoun, D.J.; Nilsen, H.K.; Duchaud, E. (2017) Multilocus sequence analysis reveals extensive genetic variety within *Tenacibaculum* spp. associated with ulcers in sea-farmed fish in Norway. Veterinary Microbiology, 205:39–45.

Olsen, R.E.; Waagbø, R.; Melle, W.; Ringø, E. & Lall S.P. (2011) Alternative marine resources. In: Turchini, G.M., Ng, W.K., Tocher, D.R. (Eds.), Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds. CRC Press, Baton Rouge, pp. 237-324.

Oonincx, D.G.A.B. & De Boer, I.J.M. (2012) Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans—a life cycle assessment. PLoS One 7(12):e51145. DOI:10.1371/journal.pone.0051145

Ottesen, E.A.; Young, C.R.; Gifford, S.M.; Eppley, J.M.; Marin, R.; Schuster, S.C.; Scholin, C.A. & DeLong, E.F. (2014) Multispecies diel transcriptional oscillations in open ocean heterotrophic bacterial assemblages. Science, 345:207–212.

Parma, L.; Candela, M.; Soverini, M.; Turroni, S.; Consolandi, C.; Brigidi, P.; Mandrioli, L.; Sirri, R.; Fontanillas, R.; Gatta, P.P. & Bonaldo, A. (2016) Next-generation sequencing characterization of the gut bacterial community of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed low fishmealbased diets with increasing soybean meal levels. Animal Feed Science and Technology, 222:204-216. DOI:10.1016/j.anifeedsci.2016.10.022.

Parte, A.C. (2018) LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 68:1825-1829. DOI:10.1099/ijsem.0.002786,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

http://www.bacterio.net/tenacibaculum.html

Perofsky, A.C.; Lewis, R.J. & Meyers, L.A. (2019) Terrestriality and bacterial transfer: a comparative study of gut microbiomes in sympatric Malagasy mammals. The ISME Journal, 13:50-63.

Pestourie, N.; Garnier, F.; Barraud, O.; Bedu, A.; Ploy, M.C.; & Mounier, M. (2014). Outbreak of AmpC β-lactamase-hyper-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit in a French teaching hospital. American Journal of Infection Control, 42:456–458. DOI:10.1016/j.ajic.2013.11.005

Pimentel, D.; Berger, B.; Filiberto, D.; Newton, M.; Wolfe, B.; Karabinakis, E.; Clark, S.; Poon, E.; Abbett, E. & Nandagopal, S. (2004) Water resources: agricultural and environmental issues. BioScience, 54: 909–918

Piñeiro-Vidal, M.; Gijón, D.; Zarza, C. & Santos Y. (2012) *Tenacibaculum dicentrarchi* sp. nov., a marine bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from European sea bass. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62(Pt 2):425-9. doi: 10.1099/ijs.0.025122-0.

Pruesse, E.; Peplies, J. & Glöckner F.O. (2012) SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. Bioinformatics, 28(14):1823-9. doi:10.1093/bioinformatics/bts252.

Pujalte, M.J.; Sitjà-Bobadilla, A.; Álvarez-Pellitero, P. & Garay, E. (2003) Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms. Diseases of aquatic organisms, 54:119-126

Reitan, K.I.; Natvik, C.M. and Vadstein, O. (1998) Drinking rate, uptake of bacteria and microalgae in turbot larvae. Journal of Fish Biology 53, 1145–1154.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Reveco, F.E; Øverland, M.; Romarheim, O.H. & Mydland, L.T. (2014) Intestinal bacterial community structure differs between healthy and inflamed intestines in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 420–421:262–269.

Rico, R.M.; Tejedor-Junco, M.T.; Tapia-Paniagua, S.T.; Alarcón, F.J.; Mancera, J.M.; López-Figueroa, F.; Balebona, M.C.; Abdala-Díaz, R.T. & Moriñigo, M.A. (2016) Influence of the dietary inclusion of *Gracilaria cornea* and *Ulva rigida* on the biodiversity of the intestinal microbiota of *Sparus aurata* juveniles. Aquaculture International, 24(4):965–984

Ringø, E. (1993) The effect of chromic oxide (Cr2O3) on aerobic bacterial populations associated with the intestinal epithelial mucosa of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). Canadian Journal of Microbiology, 39:1169-1173 .

Ringø, E.; Birkbeck, T.H.; Munro, P.D.; Vadstein, O. & Hjelmeland, K. (1996) The effect of early exposure to Vibrio pelagius on the aerobic flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Journal of Applied Bacteriology, 81:207-211.

Ringø, E.; Bendiksen, H.R.; Wesmajervi, M.S.; Olsen, R.E.; Jansen, P.A. & Mikkelsen, H. (2000) Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Journal of Applied Microbiology, 89:317–322.

Ringø, E. & Birkbeck, T.H. (1999) Intestinal microflora of fish larvae and fry. Aquaculture Research, 30:73–93.

Ringø, E.; Olsen, R.E.; Mayhew, T.M. & Myklebust, R. (2003) Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. Aquaculture, 227:395–415.

Ringø, E.; Sperstad, S.; Myklebust, R.; Mayhew, T.M.; Mjelde, A.; Melle, W. & Olsen, R.E. (2006) The effect of dietary krill supplementation on epithelium-associated

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

bacteria in the hindgut of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a microbial and electron microscopical study. Aquaculture Research, 37:1644–1653.

Ringø, E.; Sperstad, S.; Myklebust, R.; Refstie S. & Krogdahl, Å. (2006) Characterization of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. Aquaculture, 261:829–841.

Ringø, E.; Strøm, E. & Tabachek, J.A. (1995) Intestinal Microflora of Salmonids: A Review. Aquaculture Research, 26:773-89.

Ringø, E. & Vadstein, O. (1998) Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. Journal of Applied Microbiology, 84:227-233.

Rodriguez-R, L.M. & Konstantinidis, K.T. (2016) A collection of functions for microbial ecology and other applications of genomics and metagenomics. Companion package for the Enveomics Collection. doi:10.7287/peerj.preprints.1900v1

Roller, B.R.K.; Stoddard, S.F. & Schmidt, T.M. (2016) Exploiting rRNA operon copy number to investigate bacterial reproductive strategies. Nature Microbiology, 1:16160.

Rombout, J.H.; Abelli, L.; Picchietti, S.; Scapigliati, G. & Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. Fish and Shellfish Immunology, 31:616–626. DOI:10.1016/j.fsi.2010.09.001

Romero, J. & Navarrete, P. (2006) 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Microbial Ecology, 51:422–430.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Roncarati, A.; Gasco, L.; Parisi, G. & Terova. G. (2015) Growth performance of common catfish (*Ameiurus melas* Raf.) fingerlings fed insect meal diets. Journal of Insects as Food and Feed, 1:233-240

Ruby, E.G. & Morin, J.G. (1979) Luminous enteric bacteria of marine fishes: a study of their distribution, densities, and dispersion. Applied and Environmental Microbiology, 38:406-411.

RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL http://www.rstudio.com

Rurangwa, E.; Sipkema, D.; Kals, J.; ter Veld, M.; Forlenza, M.; Bacanu, G.M.; Smidt, H. & Palstra, A.P. (2015) Impact of a novel protein meal on the gastrointestinal microbiota and the host transcriptome of larval zebrafish *Danio rerio*. Frontiers in Physiology, 6:133.

Ryall, C. & Moss, M.O. (1975) Selective media for the enumeration of *Chromobacterium* spp. in soil and water. Journal of Applied Bacteriology, 38:53–59.

Sahlmann, C.; Gu, J.; Kortner, T.M.; Lein, I.; Krogdahl, Å. & Bakke, A.M. (2015) Ontogeny of the digestive system of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and effects of soybean meal from Start-Feeding. PLoS ONE, 10(4):e0124179, DOI: 10.1371/journal.pone.0124179

Sakata, T.; Okabayashi, J. & Kakimoto, D. (1980) Variations in the intestinal microflora of Tilapia reared in fresh and sea water. Bulletin of the Japanese society of scientific fisheries, 46:313–317.

Sánchez-Muros, M.J.; Barroso, F.G. & Manzano-Agugliaro, F. (2014) Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. Journal of Cleaner Production, 65:16–27.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Sarker, P.; Gamble, M.; Kelson, S. & Kapuscinski, A. (2016) Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater Spirulina sp. feed ingredients. Aquaculture Nutrition, 22:109–119

Sarris, P.F.; Trantas, E.A.; Mpalantinaki, E.; Ververidis, F. & Goumas, D.E. (2012) *Pseudomonas viridiflava*, a multi host plant pathogen with significant genetic variation at the molecular level. PLoS ONE 7(4): e36090. DOI:10.1371/journal.pone.0036090

Savas, S; Kubilay A. & Basmaz, N. (2005) Effect of bacterial load in feeds on intestinal seabream (*Sparus aurata*) larvae and juveniles. The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh, 57(1):3-9.

Schloss, P.D.; Gevers, D. & Westcott, S.L. (2011) Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. PloS ONE, 6:e27310.

Schloss, P., Westcott, S., Ryabin, T., Hall, J., Hartmann, M., Hollister, E., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H, Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., and Weber, C.F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 75: 7537–7541.

Schmidt, V.; Amaral-Zettler, L.; Davidson J.; Summerfelt S. & Good C. (2016) Influence of fishmeal-free diets on microbial communities in Atlantic salmon (*Salmo salar*) recirculation aquaculture systems. Applied and Environmental Microbiology, 82(15):4470-4481. DOI:10.1128/AEM.00902-16.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Schmidt, V.T.; Smith, K.F.; Melvin, D.W. & Amaral-Zettler, L.A. (2015) Community assembly of a euryhaline fish microbiome during salinity acclimation. Molecular Ecology, 24:2537–2550.

Shade, A. &Handelsman, J. (2012) Beyond the venn diagram: The hunt for a core microbiome. Environmental Microbiology, 14:4–12.

Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B & Ideker, T. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Research, 13(11):2498-504.

Shepherd, C.J., Pike, I.H. & Barlow, S.M. (2005) Sustainable feed resources of marine origin. European Aquaculture Society, 35:59-66.

Scott, K.P.; Gratz, S.W.; Sheridan, P.O.; Flint, H.J. & Duncan, S.H. (2013) The influence of diet on the gut microbiota. Pharmacological Research, 69:52–60, DOI:10.1016/j.phrs.2012.10.020.

Silva, F.C.D.P.; Nicoli, J.R.; Zambonino-Infante, J.L.; Kaushik, S. & Gatesoupe, F.-J. (2011) Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). FEMS Microbiology Ecology, 78:285–296.

Silva, D.M.; Valente, L.M.P.; Sousa-Pinto, I.; Pereira, R.; Pires, R.M.; Seixas, F. & Rema, P. (2015) Evaluation of IMTA-produced seaweeds (*Gracilaria, Porphyra*, and *Ulva*) as dietary ingredients in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., juveniles. Effects on growth performance and gut histology. Journal of Applied Phycology, 27(4):1671–1680

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Silvi, S.; Nardi, M.; Sulpizio, R.; Orpianesi, C.; Caggiano, M.; Carnevali, O. & Cresci, A. (2008) Effect of the addition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* on the gut microbiota composition and contribution to the well-being of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Microbial Ecology in Health and Disease, 20:53–59.

Simidu, U.; Kaneko, E. & Also, K. (1969) Microflora of fresh and stored flatfish, Kareius bicoloratus. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish, 35:77-82.

Sinha, G.M. (1983) Scanning electron microscopic study of the intestinal mucosa of an Indian freshwater adult major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung, 97:979–992.

Sissons, J.W. (1989) Potential of probiotic organisms to prevent diarrhea and promote digestion in farm-animals - a review. Journal of the Science of Food and Agriculture, 49:1-13.

Sitjà-Bobadilla, A.; Peña-Llopis, S.; Gómez-Requeni, P.; Médale, F.; Kaushik, S. & Pérez-Sáncheza, J. (2005) Effect of fish meal replacement by plant protein sources on non-specific defence mechanisms and oxidative stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 249:387–400.

Skjermo, J. & Vadstein, O. (1993) Characterization of the bacterial flora of mass cultivated *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia, 255/256:185–191.

Skrodenyte-Arbaciauskiene, V.; Sruoga, A.; Butkauskas, D. & Skrupskelis, K. (2008) Phylogenetic analysis of intestinal bacteria of freshwater salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta trutta* and diet. Fisheries Science 74, 1307-1314.

Sorroza, L.; Padilla, D.; Acosta, F.; Romœn, L.; Grasso, V.; Vega, J. & Real, F. (2012) Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. Veterinary Microbiology, 155:369–373.

Smith, C.C.; Snowberg L.K., Gregory Caporaso, J.; Knight, R. & Bolnick, D.I. (2015) Dietary input of microbes and host genetic variation shape among-population differences in stickleback gut microbiota. The ISME Journal, 9:2515–2526.

Spanggaard, B.; Huber, I.; Nielsen, J.; Nielsen, T.; Appel, K.F. & Gram, L. (2000) The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. Aquaculture, 182:1-15.

Spore, A.; Koren, O. & Ley, R. (2011) Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. Nature Reviews Microbiology, 9:279-290. DOI:10.1038/nrmicro2540.

Stefansson, S.O.; Bjørnsson, B.Th.; Ebbesson, L.O.E. & McCormick, S.D. (2008) Smoltification. In Fish Larval Physiology (Finn, R.N. & Kapoor, B.G., eds), pp. 639–681. Enfield, NH: Science Publishers Inc..

Stephens, W.Z.; Burns, A.R.; Stagaman, K.; Wong S.; Rawls, J.F.; Guillemin, K. & Bohannan B.J.M (2016) The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. The ISME Journal, 10: 644–654.

St-Hilaire, S.; Cranfill, K.; Mcguire, M.A.; Mosley, E.E.; Tomberlin, J.K.; Newton, L.; Sealey, W.; Sheppard, C. & Irving, S. (2007) Fish offal recycling by the Black Soldier Fly produces a foodstuff high in omega-3 fatty acids. Journal of the World Aquaculture Society, 38(2):309–313.

Storebakken, T.; Refstie, R. & Ruyter, B. (2000) Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. In: Drackley, J.K. (Eds.), Soy in Animal Nutrition. Federation Animal Science Societies, Savoy, pp. 127-170

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Sugita, H.; Oshima, K.; Tamura, M. & Deguchi, Y. (1983) Bacterial flora in the gastrointestine of freshwater fishes in the river. Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish, 49:1387-1395.

Sullam, K.E.; Essinger, S.D.; Lozupone, C.A.; O'Connor, M.P.; Rosen, G.L.; Knight, R.; Kilham, S.S. & Russell, J.A. (2012) Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. Molecular ecology, 21:3363-3378.

Sun, Y.; Yang, H.; Ling, Z.; Chang, J. & Ye, J.D. (2009) Gut microbiota of fast and slow growing grouper *Epinephelus coioides*. African Journal of Microbiology Research, 3:713–720.

Suyehiro, Y. (1942) A study on the digestive system and feeding habits of fish. Japanese Journal of Zoology, 10:1–303.

Tacon, A.G.J. & Forster, I.N. (2000) Global trends and challenges to aquaculture and aquafeed development in the new millennium. International Aquafeed Directory & Buyers Guide 2001, Turret RAI plc, Uxbridge, Middlesex, UK, pp.4-25

Tacon, A.G.J.; Hasan, M.R. & Metian M. (2011) Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans. Trends and prospects. In: FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 564, pp. 87

Tacon, A.G.J. & Metian, M. (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. Aquaculture, 285(1–4):146–158

Tanasomwang, V. & Muroga, K. (1988) Intestinal micro-flora of larval and juvenile stages in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish Pathology, 23:77—83.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Tapia-Paniagua, S.T.; Reyes-Becerril, M.; Ascencio-Valle, F.; Esteban, M.Á.; Clavijo, E., Baledona, M.C. & Moriñigo, M.A. (2011) Modulation of the intestinal microbiota and immune system of farmed *Sparus aurata* by the administration of the yeast *Debaryomyces hansenii* L2 in Conjunction with Inulin. Journal of Aquaculture Research and Development, S1:012. DOI:10.4172/2155-9546.S1-012.

Tarnecki, A.M.; Burgos, F.A.; Ray, C.L. & Arias, C.R. (2017) Fish intestinal microbiome: Diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. Journal of Applied Microbiology, 123:2–17.

Thillai Sekar, V.; Santiago, T.C.; Vijayan, K.K.; Alavandi, S.V.; Stalin Raj, V.; Rajan, J.J.S.; Sanjuktha, M. & Kalaimani, N. (2008) Involvement of *Enterobacter cloacae* in the mortality of the fish, *Mugil cephalus*. Letters in Applied Microbiology, DOI:10.1111/j.1472-765X.2008.02365.x.

Torrecillas, S.; Mompel, D.; Caballero, M.J.; Montero, D.; Merrifield, D.; Rodiles, A.; Robaina, L.; Zamorano, M.J.; Karalazos, V.; Kaushik, S. & Izquierdo (2017) Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 2017, 468:386–398.

Tran, G., Heuzé, V. & Makkar, H.P.S. (2015) Insects in fish diets. Animal Frontiers, 5(2):37-44

Trust, T.J. (1975) Bacteria associated with the gills of salmonid fishes in freshwater. Journal of Applied Bacteriology, 38:225-233.

Tytler, P. & Blaxter, J.H.S. (1988) Drinking in yolk-sac stage larvae of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). Journal of Fish Biology, 32:493- 494.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Udayasoundari, D.; Jeyanthi, S.; Santhanam, P.; Devi, A.S.; Shyamala, V. & Thangaraju, N. (2016) Effects of Partial Replacement of Fishmeal with Seaweed (*Lobophora variegata*) meal on the growth and biochemical composition of commercial important fish Asian Seabass *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) fingerlings. International Journal of Marine Science, 6(25):1-8

Umesaki, Y.; Okada, Y.; Matsumoto, S.; Imaoka, A. & Setoyama, H. (1995) Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. Microbiology and Immunology, 39(8):555-62.

Van Huis, A. (2013) Potential of insects as food and feed in assuring food security. Annual Review of Entomology, 58:563–583

Van Ommen Kloeke, F. & Geesey, G.G. (1999) Localization and identification of populations of phosphatase-active bacterial cells associated with activated sludge. Microbial Ecology, 38:201–214.

Veldkamp, T.; van Duinkerken, G.; van Huis, A.; Lakemond, C.M.M.; Ottevanger, E.; Bosch, G. & van Boekel, M.A.J.S. (2012) Insects as a sustainable feed ingredient in pig and poultry diets - a feasibility study. Repport 638 – 48, Wageningen Livestock Research.

Verbeke, W.; Spranghers, T.; DeClercq, P.; DeSmet, S.; Sas, B. & Eeckhout, M. (2015) Insects in animal feed: acceptance and its determinants among farmers, agriculture sector stakeholders and citizens. Animal Feed Science and Technology, 204:72-87.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Ward, N.; Steven, B.; Penn, K. Methé, B. & Detrich, W. (2009) Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species. Extremophiles, 13: 679– 685.

Wassef, E.A. (2005) Alternative protein sources for fish feeds in Egypt. In: Montero D, Basurco B, Nengas I, Alexis M, Izquierdo M (eds) Mediterranean Fish Nutrition. CIHEAM, Cahiers Options Méditerranéennes; n. 63, Zaragoza. pp. 127–141.

Wen, A.; Fegan, M.; Hayward, C.; Chakraborty, S. & Sly, L.I. (1999) Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (Den Dooren De Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 49:567–576.

Widder, S.; Allen, R.J.; Pfeiffer, T.; Curtis, T.P.; Wiuf, C.; Sloan, W.T.; Cordero, O.X.; Brown, S.P.; Momeni, B.; Shou, W.; Kettle, H.; Flint, H.J.; Haas, A.F.; Laroche, B; Kreft, J.U.; Rainey, P.B.; Freilich, S.; Schuster, S.; Milferstedt, K.; van der Meer, J.R.; Groβkopf, T.; Huisman, J.; Free, A.; Picioreanu, C.; Quince, C.; Klapper, I.; Labarthe, S.; Smets B.F.; Wang, H.; Isaac Newton Institute Fellows & Soyer, O.S. (2016) Challenges in microbial ecology: Building predictive understanding of community function and dynamics. ISME Journal, 10:2557–2568.

Wilkinson, M.H.F. (2002) Model intestinal microflora in computer simulation: A simulation and modeling package for host-microflora interactions. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 49:1077-1085.

Wong S. & Rawls J.F. (2012) Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment. Molecular Ecology, 21(13):3100-2.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Wu, S.; Gao, T.; Zheng, Y.; Wang, W.; Cheng, Y. & Wang, G. (2010) Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Aquaculture, 303:1–7.

Wu, H.J. & Wu, E. (2012) The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. Gut Microbes, 3(1):4–14. DOI:10.4161/gmic.19320.

Xia, J.H.; Lin, G.; Fu, G.H.; Wan, Z.Y.; Lee, M.; Wang, L.; Liu, X.J. & Yue, G.H. (2014) The intestinal microbiome of fish under starvation. BMC Genomics, 15:266. DOI:10.1186/1471-2164-15-266.

Xu, J. & Gordon, J.I. (2003) Honor thy symbionts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(18):10452-9.

Wynn-Williams, D.D. **(**1983**)** Distribution and characteristics of *Chromobacterium* in the maritime and sub-Antarctic. Polar Biology, 2(2):101–108.

Yoon, J.; Kasai, H. & Yokota, A. (2010) Phylogenetic interrelationships of the genus *Rubritalea* inferred from 16S rRNA and gyrB gene sequences. Microbiology and Culture Collections, 26(2):89-95.

Yoon, M.Y.; Lee, K. & Yoon, S.S. (2014) Protective role of gut commensal microbes against intestinal infections. Journal of Microbiology, 52:983. DOI:10.1007/s12275-014-4655-2

Yoshimizu, M. & Kimura, T. (1976) Study on the intestinal microflora of salmonids. Fish Pathology, 10:243-259.

Yoshimizu, M.; Kimura, T. & Sakai, M. (1976) Studies on the intestinal microflora of salmonids. 1: The intestinal microflora of fish reared in fresh water and sea water. Fisheries Science, 42:91–99.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Younis, E-S.M.; Al-Quffail, A-S.; Al-Asgah, N-A.; Abdel-Warith, A-W.A. & Al-Hafedh, Y.S. (2018) Effect of dietary fish meal replacement by red algae, *Gracilaria arcuata*, on growth performance and body composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Saudi Journal of Biological Sciences, 25(2):198-203.

Zarkasi, K.Z.; Taylor, R.S.; Glencross, B.D.; Abell, G.C.J.; Tamplin, M.L. & Bowman, J.P. (2017) In vitro characteristics of an Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hind gut microbial community in relation to different dietary treatments. Research in Microbiology, 168:751–759.

Zhang, H.Y.; Piao, X.S.; Li, P.; Yi, J.Q.; Zhang, Q.; Li, Q.Y.; Liu, J.D. & Wang, G.Q. (2013) Effects of Single Cell Protein Replacing Fish Meal in Diet on Growth Performance, Nutrient Digestibility and Intestinal Morphology in Weaned Pigs. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 26(9):1320-1328.

Zhou, N.; Sun, Y.T.; Chen, D.W.; Du, W.; Yang, H. & Liu, S.J. (2018) Harnessing microfluidic streak plate technique to investigate the gut microbiome of *Reticulitermes chinensis*. Microbiologyopen, 13:e00654. DOI: 10.1002/mbo3.654.

Zhou, Z.; Wang, W.; Liu, W.; Gatlin, D.M. III; Zhang, Y.; Yao, B. & Ringø, E. (2012) Identification of highly-adhesive gut Lactobacillus strains in zebra fish (*Danio rerio*) by partial rpoB gene sequence analysis. Aquaculture, 370–371:150–157.

ZoBell, C.E. & Feltham, C.B. (1938) Bacteria as food for certain marine invertebrates. Journal of Marine Research, 1:312-327.

Zorrilla, I.; Chabrillon, M.; Arijo, S.; Dıaz-Rosales, P.; Martınez-Manzanares, E.; Balebona, M.C. & Morinigo, M.A. (2003) Bacteria recovered from diseased

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. Aquaculture, 218: 11-20.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ABSTRACT

Studies have shown that host, diet and habitat can affect fish gut bacterial diversity, but even under the same environmental conditions, significant differences may occur. Up-to-date studies on fish bacterial symbionts are related to the effect of diet on the structure of these bacterial communities. This thesis studied for the first time the autochthonous gut bacterial diversity of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals originating from five distantly located aquaculture installations in Greece, in order to determine the impact of geographic location and to reveal their core gut microbiota.

Moreover, we assessed whether five fish (*Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Diplodus puntazzo*, *Pagrus pagrus*, *Argyrosomous regius*) species cultured on the same site and fed with isoenergetic and isoproteic diets differ in their gut bacterial communities. Finally, we also investigated the host-associated bacterial succession during the early embryonic stages and first feeding in farmed *Sparus aurata* and *Salmo salar* populations.

We analyzed the 16S rRNA gene diversity of Bacteria, targeting the V3-V4 region by using next generation sequencing techniques (454 pyrosequencing, illumina). Data analyses resulted in no significant geographic impact in the gut bacterial communities within the two allopatric host species (*S. aurata*, *D. labrax*), while strong similarities between them were also present. Our survey revealed the existence of a core gut microbiota within and between them independent of diet and geographic location consisting of the *Delftia*, *Pseudomonas*, *Pelomonas*, *Propionibacterium*, and *Atopostipes* genera.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Results also revealed that the OTUs richness between the five sympatric host species (*S. aurata*, *D. labrax*, *D. puntazzo*, *P. pagrus*, *A. regius*) did not vary significant, but only 4% of the found OTUs belong to the core gut microbiota, indicating selective pressure within the gut, favoring the establishment and development of specific bacterial species in the gastrointestinal system in each of the five fish species. Results regarding the host associated bacterial succession in *S. aurata* and *S. salar* larviculture showed significantly higher species richness in rearing water samples. OTUs were shared between larvae and environmental samples (rearing water and diet), no overlap was detected between their bacterial communities.

Overall this thesis contributes to broadening our knowledge on the composition and structure of the gut bacterial communities in fish species, their possible biological roles and also in understanding the factors that influence interactions between hosts and gut microbiota.

Keywords: *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Diplodus puntazzo*, *Pagrus pagrus*, *Argyrosomous regius*, *Salmo salar,* bacteria, 16S rRNA, gut, larviculture, gut bacteria

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Πίνακας Π1: Σύσταση των παρεχόμενων τροφών στους συμπάτριους και αλλοπάτριους πληθυσμούς

Ingredient	***Sparus aurata*** **(6 mm; 350-450 g)****	***Dicentrarchus labrax*** **(6 mm; 450-800 g)****	***Diplodus puntazzo*** **(6.5 mm; 400-500 g)****	***Pagrus pagrus*** **(6 mm; 450-575 g)****	***Argyrosomus regius*** **(6 mm; 350-450 g)****
Crude proteins (%)	42 – 44	37 – 39	44	44	45
Crude lipids (%)	19 – 21	20 – 22	12	13	16
Nitrogen free extract (NFE) (%)	20 – 26	19 – 25	NA	NA	19.9
Crude cellulose (%)	1 – 3	2 – 4	NA	NA	3.0
Crude fibers (%)	NA	NA	≤3.2	≤2	NA
Ash (%)	5.8 – 7.8	6.2 – 8.2	≤9	≤13.0	8.4
Total P (%)	0.7 – 0.9	0.8 – 1.0	0.9	2.0	1.2
Gross energy (MJ/Kg)	21.5 – 23.5	20.6 – 22.6	19.7	19.0	20.9
Classical digestible energy* (MJ/Kg)	19.5	18.9	16.4	16.5	18.2
Added vitamin D3 (mg/Kg)	500	500	3,000	4,200	500
Added vitamin E (mg/Kg)	180	100	250	350	150
Added vitamin C (mg/Kg)	250	100	250	1000	200
Feeding rate (%)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.77

***** : Classical digestible energy calculated on proteins, lipids and NFE.

****** : Mean size of feed pellet; fish weight.

******* : Kg of fish feed/100 Kg of fish biomass per day

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Πίνακας Π2: Νωπό βάρος των ατόμων *S. aurata* και *D. labrax* που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της

		Chania		**Chios**		**Igoumenitsa**		**Yaltra**		**Atalanti**	
Δείγμα	**Νωπό βάρος (gr)**	SA	DL	SA	DL	SA	DL	SA	DL	SA	DL
1		359	378	558	420	433	448	481	346	260	785
2		355	294	579	442	493	556	516	397	240	340
3		376	275	468	554	450	464	540	415	440	500
4		492	395	530	460	440	483	492	493	365	860
5		420	362	483	479	542		492	406		995
6				521	505			506	461		
	Μέσος όρος	380,40	340,80	523,17	476,67	471,60	487,75	504,50	419,67	326,25	696,00
	Τυπικό	11,89	23,76	17,36	19,56	20,46	23,68	8,68	21,00	46,79	120,29

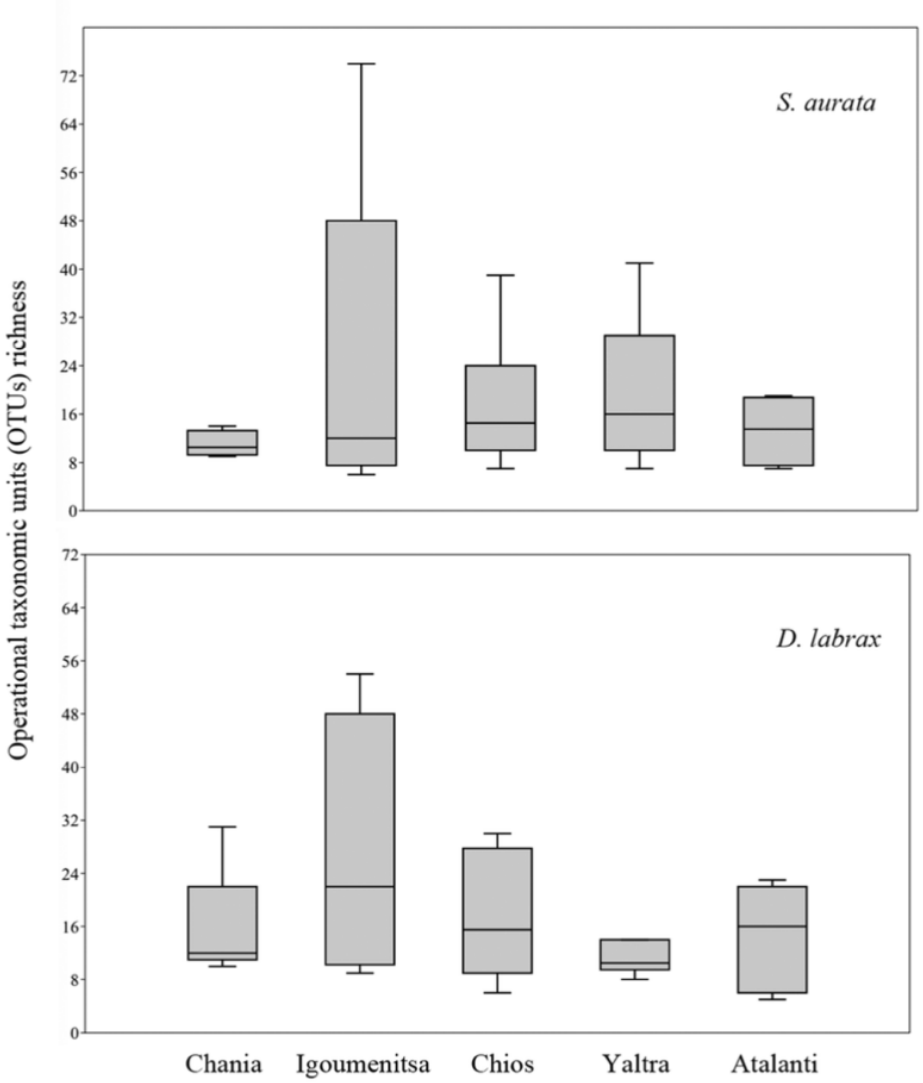
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Πίνακας Π3: Νωπό βάρος των ατόμων *D. puntazzo* (DP), *P. pagrus* (PP), *A. regius* (AR), *S. aurata* (SA) και *D. labrax* (DL) που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της γαστρεντερικής βακτηριακής κοινότητας σε συμπάτριους

Δείγμα	**Νωπό βάρος (gr)**	SA	DL	AR	DP	PP
1		260	785	870	200	640
2		240	340	860	220	558
3		440	500	630	220	415
4		365	860	1060		
5			995	810		
	Μέσος όρος	326,25	696,00	846,00	213,33	540,00
	Τυπικό σφάλμα	46,79	120,29	68,75	6,67	63,31

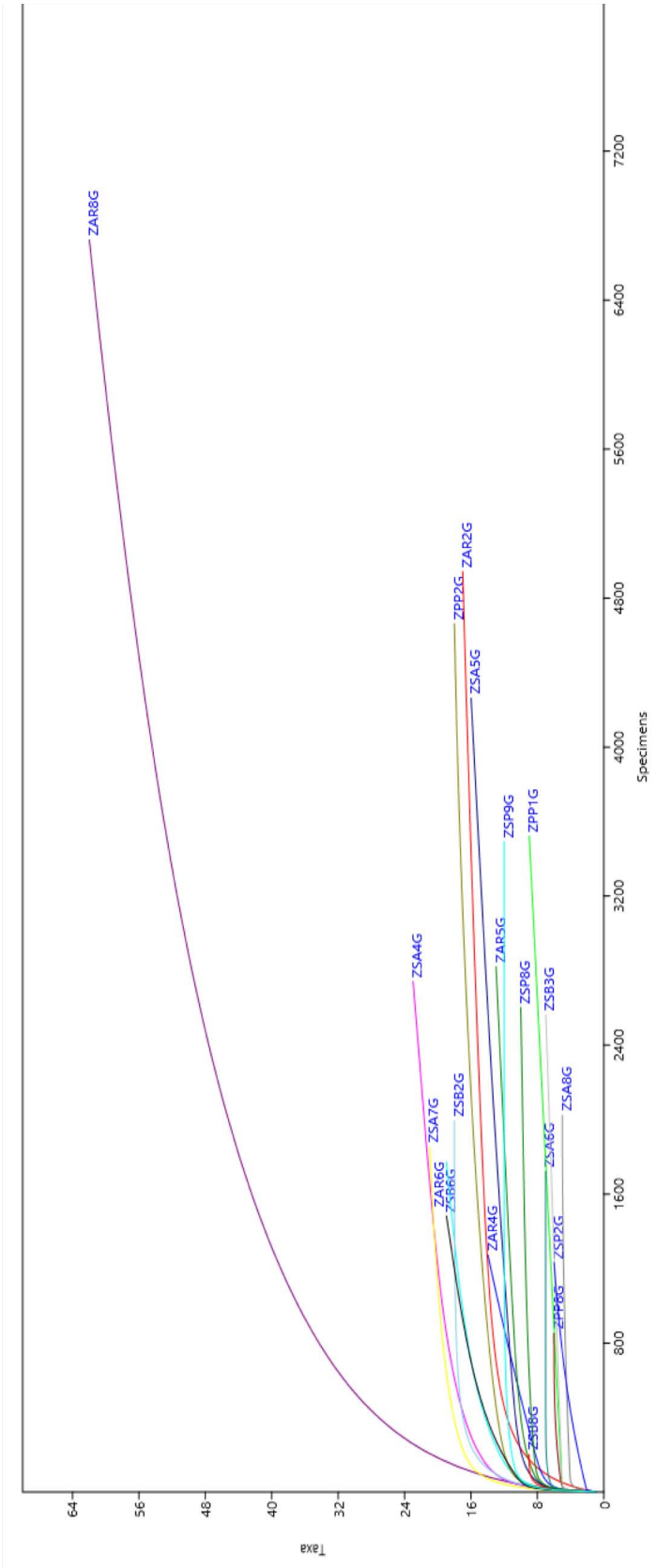
δειγμάτων εντέρου των ατόμων *S. aurata* και *D. labrax*.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

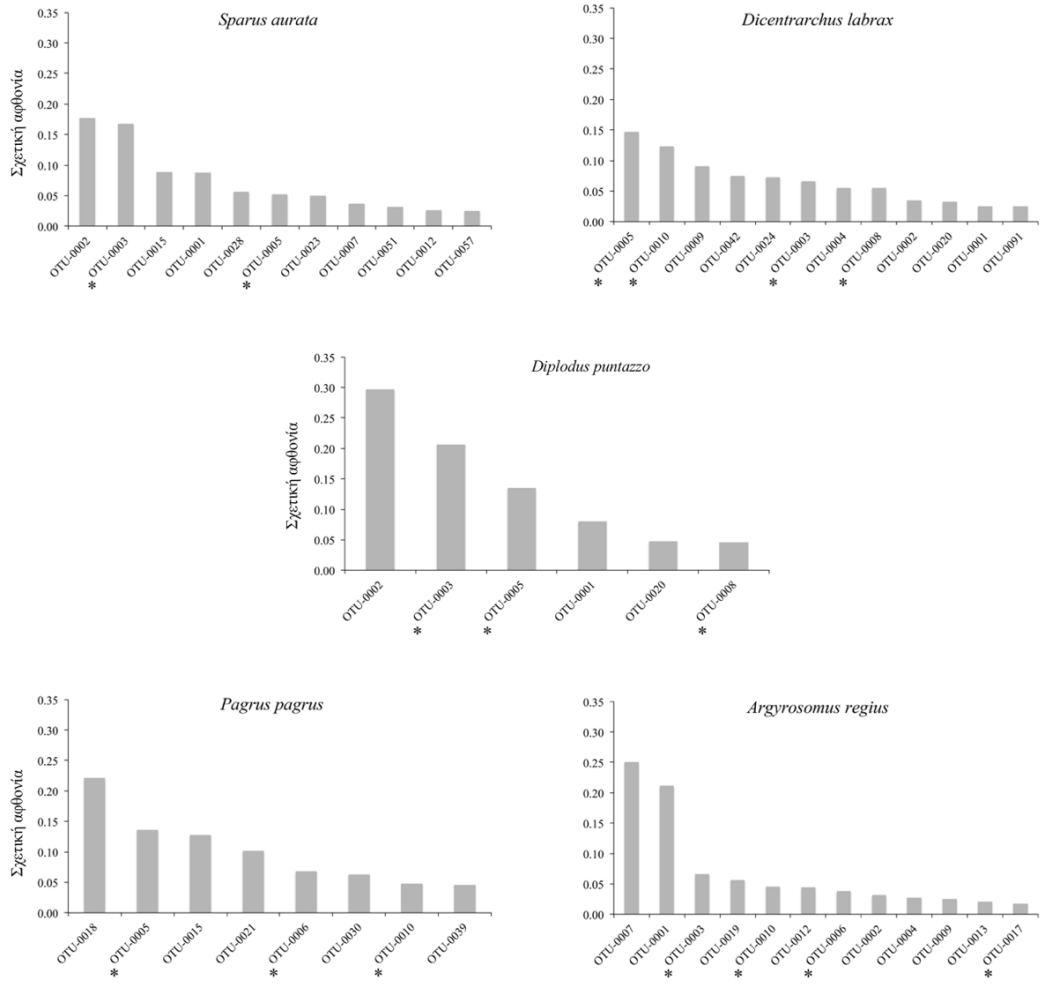


Εικόνα Π2: Παρατηρηθείσα αφθονία βακτηριακών ειδών (OTUs) στο γαστρεντερικό σύστημα σε συμπάτριους πληθυσμούς ιχθύων *S. aurata* και *D. labrax*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49



Εικόνα Π4: Κατανομή αφθονίας των πιο άφθονων OTUs (αθροιστική αφθονία ≥ 80%) στο γαστρεντερικό σύστημα των ατόμων *S. aurata*, *D. labrax*, *D. puntazzo, P. Pagrus* και *A. Regius*. *: Κοινά OTUs μεταξύ των ειδών ιχθύων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Πίνακας Π4: Αποτελέσματα ανάλυσης δικτύων των OTUs στο γαστρεντερικό σύστημα των ατόμων *S.*

	D. labrax	*S. aurata*	*S. pizzuto*	*P. pagrus*	*A. regius*
Συνολικές ακμές (δεσμοί)	223	310	42	118	2013
Κόμβοι (OTUs)	45	55	21	29	106
Θετικές συσχετίσεις %	100.0	99.0	92.3	100.0	99.8
Μη συνδεδεμένα OTUs %	6.7%	3.6%	19.0%	13.8%	1.9%
Συντελεστής συσσώρευσης	0.93	0.92	1.00	1.00	0.97
Συνδεδεμένες ομάδες	4	5	3	3	3
Διάμετρος δικτύου	4	4	1	1	3
Δικτυακή κεντρικότητα	0.11	0.31	0.07	0.16	0.22
Ελάχιστη διαδρομή	512 (29%)	1186 (43%)	84 (30%)	236 (39%)	5634 (52%)
Μέση τιμή της απόστασης	1.14	1.66	1.00	1.00	1.53
Μέσος όρος σύνδεσης κόμβου στο δίκτυο	10.6	11.7	4.9	9.4	38.7
Πυκνότητα δικτύων	0.26	0.22	0.31	0.39	0.38
Ετερογένεια δικτύων	0.45	0.50	0.23	0.44	0.66

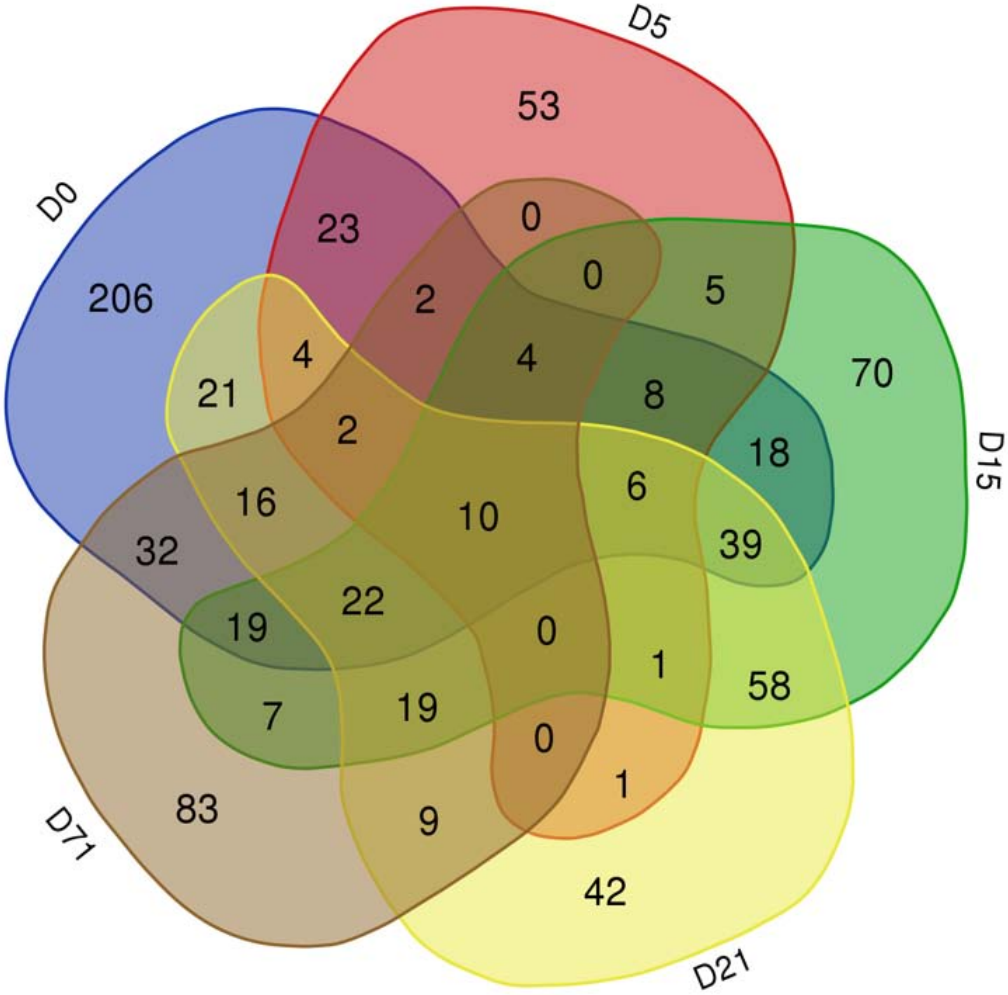
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Πίνακας Π5: Δείκτες αφθονίας και ποικιλότητας (Chao1, Simpson1-D, Shannon H) για τα δείγμα *S. aurata* (D0, D5, D15, D21, D71), νερού (WD0_5, WD15, WD21, WD71) και τροφών (RT, AN, AM, CD).

Δείγμα	Chao1	Simpson 1-D	Shannon H
D0	260 ± 104.4	0.89 ± 0.082	3.46 ± 0.714
D5	125 ± 23.7	0.82 ± 0.031	2.40 ± 0.049
D15	229 ± 12.6	0.89 ± 0.041	3.34 ± 0.340
D21	218 ± 16.1	0.93 ± 0.031	3.68 ± 0.376
D71	197 ± 14.4	0.97 ± 0.001	4.19 ± 0.035
WD0_5	436 ± 51.5	0.91 ± 0.006	3.73 ± 0.075
WD15	411 ± 19.8	0.85 ± 0.014	3.34 ± 0.085
WD21	440 ± 46.5	0.94 ± 0.008	4.02 ± 0.052
WD71	351 ± 43.5	0.94 ± 0.026	3.95 ± 0.252
RT	392 ± 80.4	0.93 ± 0.010	3.86 ± 0.150
AN	154 ± 8.9	0.89 ± 0.004	2.98 ± 0.039
AM	263 ± 18.5	0.87 ± 0.010	3.22 ± 0.089
CD	349 ± 55.1	0.94 ± 0.031	4.11 ± 0.349

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

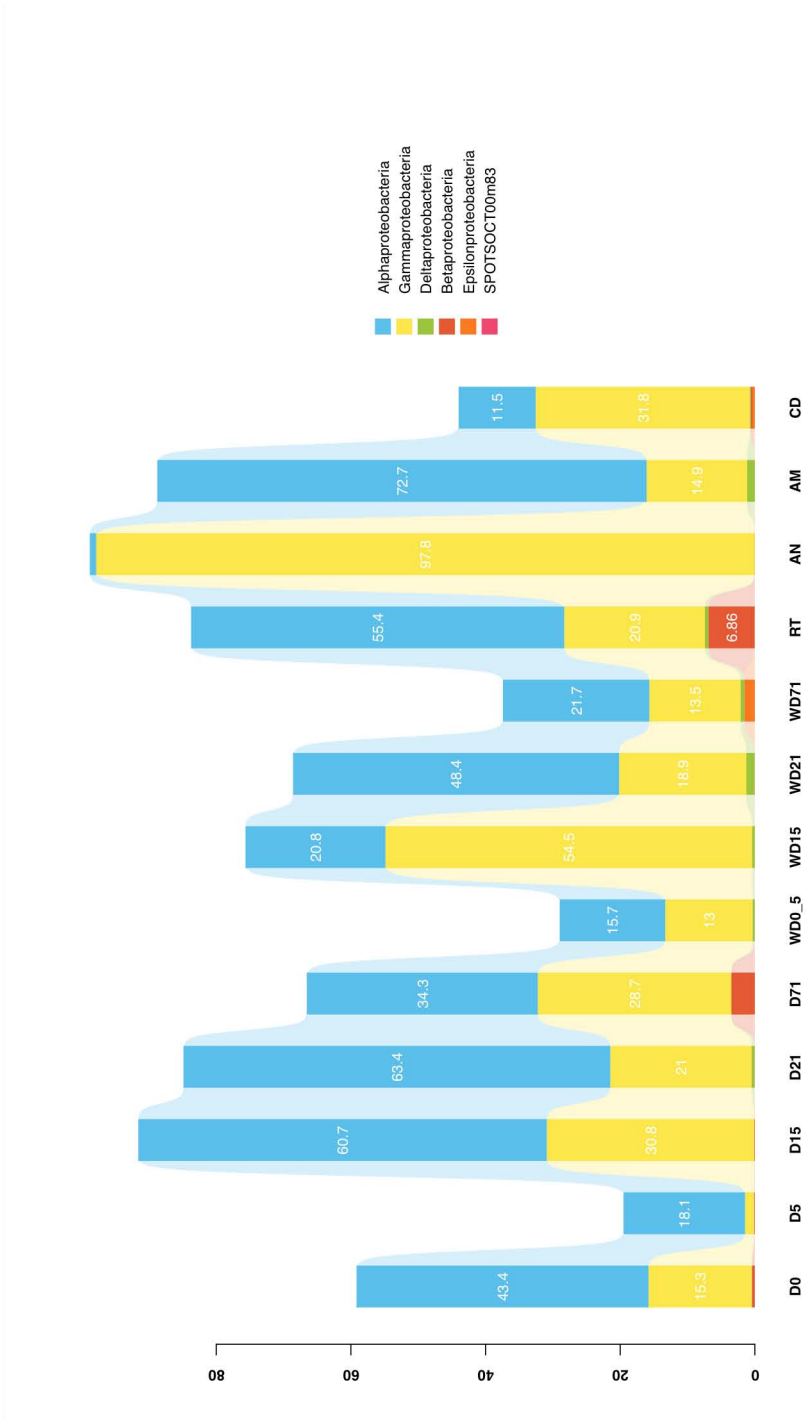
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49



Εικόνα Π.7: Κοινά OTUs των δειγμάτων *S. aurata* μεταξύ των 5 διαφορετικών χρονικών σημείων που μελετήθηκαν (D0, D5, D15, D21, D71).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

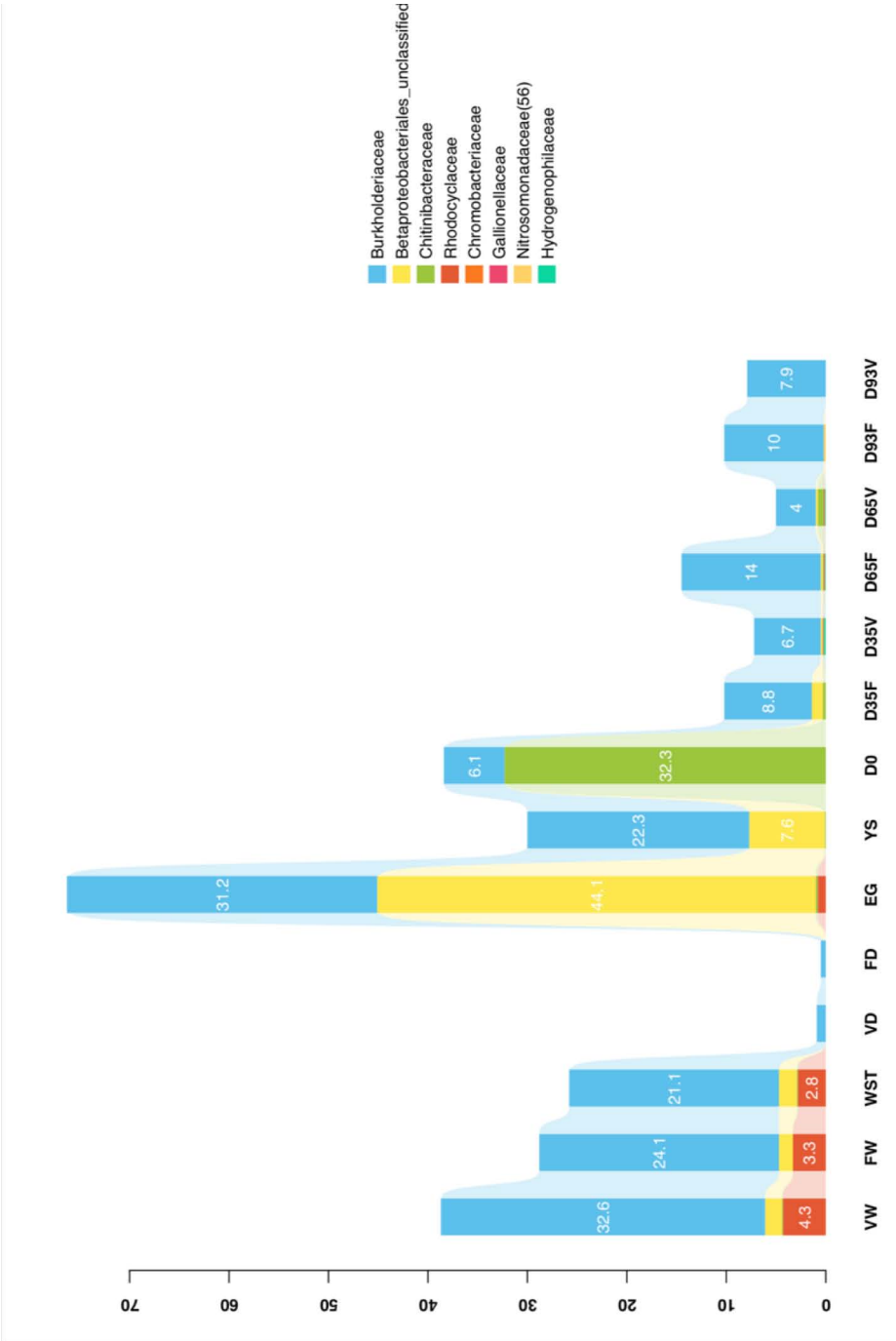
τροφών (VD, FD).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Πίνακας Π6: Δείκτες αφθονίας και ποικιλότητας (Chao1, Simpson1-D, Shannon H) για τα δείγμα *S. salar* (EG, YS, D0, D35, D65, D93), νερού (STW, FW, VW) και τροφών (VD, FD).

	Chao1	Simpson1-D	Shannon H
EG	222 ± 113,9	0,89 ± 0,010	2,92 ± 0,457
YS	127 ± 28,9	0,84 ± 0,088	2,29 ± 0,498
D0	167 ± 33,6	0,72 ± 0,277	2,29 ± 1,037
D35F	143 ± 67,5	0,95 ± 0,021	3,52 ± 0,360
D35V	151 ± 46,4	0,96 ± 0,010	3,57 ± 0,214
D65F	135 ± 30,9	0,96 ± 0,011	3,75 ± 0,173
D65V	144 ± 10,2	0,93 ± 0,048	3,50 ± 0,302
D93F	109 ± 10,7	0,96 ± 0,021	3,64 ± 0,254
D93V	85 ± 30,6	0,95 ± 0,014	3,49 ± 0,262
FD	306	0,81	2,56
VD	249	0,82	2,59
STW	2466	0,98	5,41
FW	1769 ± 179,6	0,95 ± 0,008	4,31 ± 0,140
VW	1213 ± 156,3	0,93 ± 0,012	3,90 ± 0,148

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49



Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Εικόνα Π12: Σχετική αφθονία των ανιχνευμένων οικογενειών του υπόφυλου *γ*-Proteobacteria στα δείγματα *S. salar* (EG, YS, D0, D35F, D65F, D93F, D35V, D65V, D93V), νερού (VW, FW, STW) και τροφών (FD, VD).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

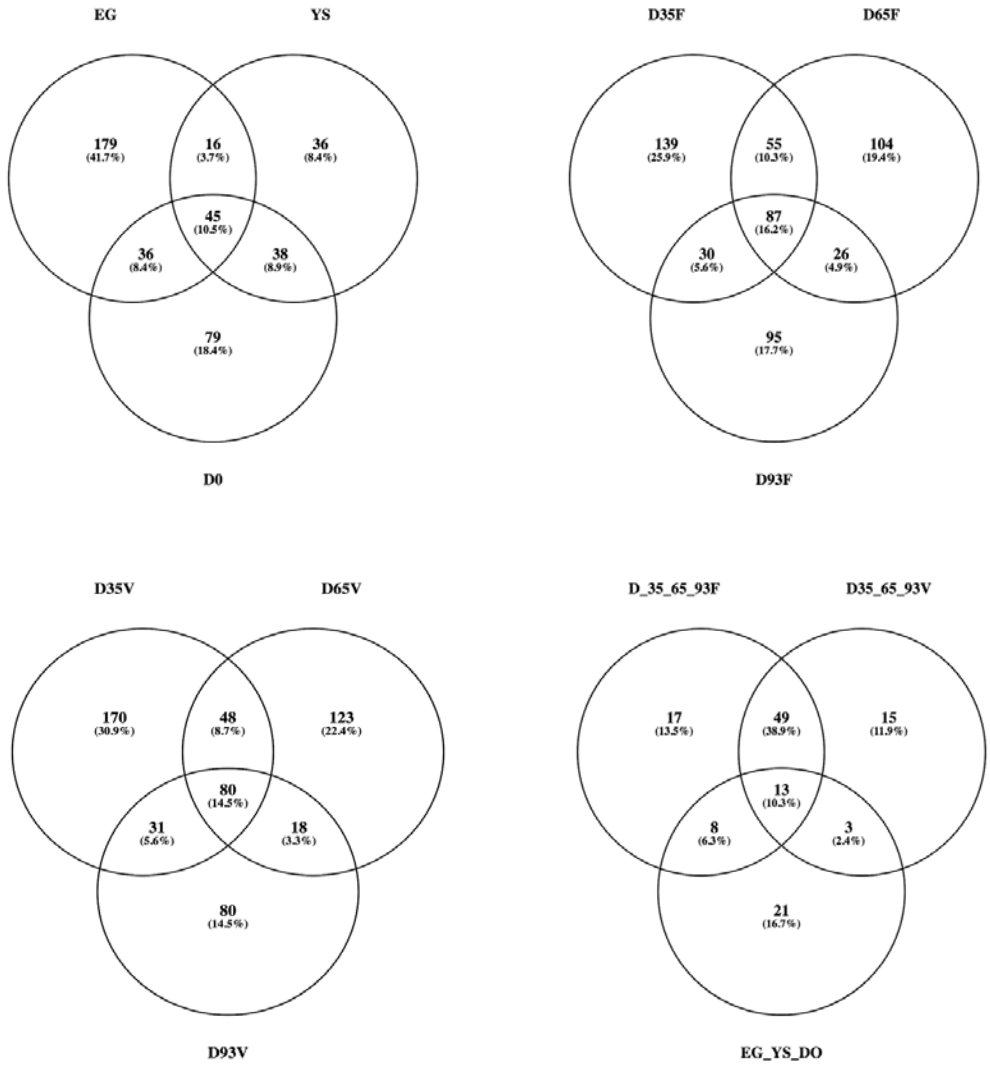
Εικόνα Π13: Αποτελέσματα ανάλυσης T-test μεταξύ των δειγμάτων *S. salar* (EG, YS, D0, D35F, D65F, D93F, D35V, D65V, D93V)

One-way ANOVA | Residuals | **Tukey's pairwise** | Kruskal-Wallis | Mann-Whitney pairwise | Dunn's post hoc

Tukey's Q below the diagonal, p(same) above the diagonal. Significant comparisons are pink.

Copenhaver-Holland 1988

	EGA1P	YSA1P	D0AG1P	D35.AFOAG1P	D65.AFOAG1P	D93.AFOAG1P	D35.AVOAG1P	D65.AVOAG2P	D93.AVOAG1P
EGA1P		0,6192	1	0,005695	0,0006646	0,000655	0,9972	0,001456	0,0006512
YSA1P	2,677		0,7875	0,7146	0,06172	0,03505	0,1127	0,3235	0,01754
D0AG1P	0,3686	2,308		0,01462	0,0007115	0,0006733	0,9789	0,003052	0,0006572
D35.AFOAG1P	5,338	2,477	4,944		0,904	0,8104	0,0006789	0,9982	0,6658
D65.AFOAG1P	7,151	4,29	6,757	1,958		1	0,0006495	0,9998	1
D93.AFOAG1P	7,421	4,559	7,027	2,25	0,2912		0,0006495	0,9984	1
D35.AVOAG1P	1,114	3,975	1,508	6,969	8,927	9,218		0,0006536	0,0006495
D65.AVOAG2P	5,973	3,297	5,605	1,048	0,7652	1,035	7,5		0,9901
D93.AVOAG1P	7,727	4,866	7,333	2,581	0,6225	0,3313	9,549	1,341	



Εικόνα Π14: Διάγραμμα Venn στο οποίο παρουσιάζεται ο αριθμός των κοινών λειτουργικών ταξινομικών ομάδων (OTUs) στα δείγματα *S. salar* μεταξύ των διαφορετικών χρονικών σημείων και διατροφικών μεταχειρίσεων.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Πίνακας Π14: Βακτηριακά OTUs (με σχετική αφθονία ≥1% στο σύνολο των δεδομένων) που ανιχνεύθηκαν στο μεσέντερο των συμπάτριων (*S. aurata, D. labrax, D. puntazzo*, *P. pagrus* και *A. regius*) και αλλοπάτριων (*S. aurata, D. labrax*) ειδών ιχθύων που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

OTU	Phylum	Class	Order	Family	Genus
OTU0001	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	*Corynebacterium*
OTU0002	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Delftia*
OTU0003	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*
OTU0004	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	*Bacillus*
OTU0005	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*
OTU0006	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	-
OTU0007	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	*Enterobacter*
OTU0008	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	-
OTU0009	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Cloacibacterium*
OTU0010	Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	*Propionibacterium*
OTU0011	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	-
OTU0012	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Porphyromonadaceae	*Proteiniphilum*
OTU0013	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	*Staphylococcus*
OTU0014	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Paracocccus*
OTU015	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Stenotrophomonas*
OTU0016	Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	*Bifidobacterium*
OTU0017	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	*Atopostipes*
OTU0018	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	*Hydrogenophilus*
OTU0019	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Methylophilales	Methylophilaceae	*Methylophilus*
OTU0020	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	*Ralstonia*
OTU0021	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	*Bradyrhizobium*
OTU0022	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	*Paenibacillus*
OTU0023	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Xanthomonas*
OTU0024	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Sphaerotilus*
OTU0025	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	*Acinetobacter*
OTU0026	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	*Tepidiphilus*
OTU0027	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*
OTU0028	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	*Corynebacterium*
OTU0030	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	*Comamonas*
OTU0031	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	*Bacillus*
OTU0032	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	*Salinicoccus*
OTU0037	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	*Bacillus*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Πίνακας Π15: Βακτηριακά OTUs (με σχετική αφθονία ≥1% στο σύνολο των δεδομένων) που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα *S. aurata* (D0, D5, D15, D21, D71), νερού (WD0_5, WD15, WD21, WD71) και τροφών (RT, AN, AM, CD).

OTU	Phylum	Class	Order	Family	Genus
OTU0001	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	*Marinobacterium*
OTU0004	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	*Alteromonas*
OTU0002	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	uncultured
OTU0005	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Nautella*
OTU0006	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Ruegeria*
OTU00129	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	*Alteromonas*
OTU0281	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	*Alteromonas*
OTU0008	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Dokdonia*
OTU0007	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Tenacibaculum*
OTU0009	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	uncultured
OTU0012	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Tenacibaculum*
OTU0011	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	OCS116 clade	
OTU0038	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	uncultured
OTU0010	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	
OTU0013	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	NS3a marine group
OTU1738	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	*Alteromonas*
OTU0022	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	*Pseudoalteromonas*
OTU0025	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	*Photobacterium*
OTU0015	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*
OTU0016	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phyllobacteriaceae	*Cohaesibacter*
OTU0122	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	
OTU0051	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	*Bowmanella*
OTU0026	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Rubritaleaceae	*Rubritalea*
OTU0017	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	*Pseudohongiella*
OTU0144	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	uncultured
OTU0019	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	
OTU0018	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	
OTU0039	Proteobacteria	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	*Arcobacter*
OTU0031	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Colwelliaceae	*Colwellia*
OTU0020	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	
OTU0023	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Tenacibaculum*
OTU0021	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Nereida*
OTU0029	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	*Winogradskyella*
OTU0089	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Ruegeria*
OTU1485	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	*Alteromonas*
OTU0064	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*
OTU0024	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	*Sulfitobacter*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Πίνακας Π16: Βακτηριακά OTUs (με σχετική αφθονία ≥1% στο σύνολο των δεδομένων) που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα από τη νυμφική εκτροφή του *S. salar* (EG, YS, D0, D35F, D65F, D93F, D35V, D65V, D93V, VW, FW, STW, FD, VD).

OTU	Phylum	Class	Order	Family	Genus
SOTU0001	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	
SOTU0002	Bacteroidetes	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	*Sediminibacterium*
SOTU0003	Actinobacteria	Actinobacteria	Frankiales	Sporichthyaceae	*hgcI_clade*
SOTU0004	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	*Weissella*
SOTU0005	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	
SOTU0006	Actinobacteria	Actinobacteria	Frankiales	Sporichthyaceae	*hgcI_clade*
SOTU0007	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales		
SOTU0008	Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified		
SOTU0009	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Chitinibacteraceae	*Iodobacter*
SOTU0010	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	*Stenotrophomonas*
SOTU0011	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales		
SOTU0012	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Rhodocyclaceae	
SOTU0013	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	
SOTU0014	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	
SOTU0015	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	*Limnohabitans*
SOTU0016	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales		
SOTU0017	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*
SOTU0018	Planctomycetes	Planctomycetacia	Gemmatales	Gemmataceae	uncultured
SOTU0019	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	
SOTU0020	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Microbacteriaceae	
SOTU0021	Bacteria_unclassified				
SOTU0022	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas*
SOTU0023	Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	
SOTU0024	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales		
SOTU0025	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	*Lactobacillus*
SOTU0026	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales		
SOTU0027	Bacteroidetes	Bacteroidia	Cytophagales	Spirosomaceae	*Pseudarcicella*
SOTU0028	Actinobacteria	Actinobacteria	Frankiales	Sporichthyaceae	hgcI_clade
SOTU0029	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Vibrionales	Vibrionaceae	*Photobacterium*
SOTU0030	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Dysgonomonadaceae	*Proteiniphilum*
SOTU0031	Bacteroidetes	Bacteroidia	Chitinophagales	Chitinophagaceae	*Sediminibacterium*
SOTU0032	Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	*Scardovia*
SOTU0033	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	*Enterococcus*
SOTU0034	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	*Tolumonas*
SOTU0035	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Betaproteobacteriales	Burkholderiaceae	
SOTU0036	Actinobacteria	Actinobacteria	Frankiales	Sporichthyaceae	hgcI_clade
SOTU0037	Bacteroidetes	Bacteroidia	Flavobacteriales	Weeksellaceae	*Chryseobacterium*
SOTU0038	Actinobacteria	Actinobacteria	Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	
SOTU0039	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	
SOTU0040	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	*Lactobacillus*
SOTU0041	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	*Lactobacillus*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά:

Nikouli E., Meziti A., Antonopoulou E., Mente E. & Kormas K.A. (2018) Gut Bacterial Communities in Geographically Distant Populations of Farmed Sea Bream (*Sparus aurata*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). Microorganisms, 6(3):92.

Nikouli E., Meziti A., Antonopoulou E., Mente E. & Kormas K.A. (2019) Host-associated bacterial succession during the early embryonic stages and first feeding in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In preparation.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

microorganisms

MDPI

Article

Gut Bacterial Communities in Geographically Distant Populations of Farmed Sea Bream (*Sparus aurata*) and Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*)

Eleni Nikouli [1], Alexandra Meziti [1], Efthimia Antonopoulou [2], Eleni Mente [1] and Konstantinos A. Kormas [1,*]

[1] Department of Ichthyology and Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, Volos 384 46, Greece; nikouli.eleni@gmail.com (E.N.); ameziti@gmail.com (A.M.); emente@uth.gr (E.M.)

[2] Laboratory of Animal Physiology, Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki 541 24, Greece; eantono@bio.auth.gr

* Correspondence: kkormas@uth.gr; Tel.: +30-242-109-3082

Received: 18 July 2018; Accepted: 31 August 2018; Published: 1 September 2018

Abstract: This study investigated the profile of the autochthonous gut bacterial communities in adult individuals of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* reared in sea cages in five distantly located aquaculture farms in Greece and determine the impact of geographic location on them in order to detect the core gut microbiota of these commercially important fish species. Data analyses resulted in no significant geographic impact in the gut microbial communities within the two host species, while strong similarities between them were also present. Our survey revealed the existence of a core gut microbiota within and between the two host species independent of diet and geographic location consisting of the *Delftia*, *Pseudomonas*, *Pelomonas*, *Propionibacterium*, and *Atopostipes* genera.

Keywords: teleosts; intestine; bacteria; microbiota; aquaculture

1. Introduction

Studies on fish gastrointestinal tract microbiota (GITM) are mostly focused on the isolation, identification and evaluation of microorganisms in farmed species. The main target of such studies is the possible use of these microorganisms as potential probiotics in order to promote fish growth and health [1]. With the advent of next generation sequencing technologies, results have demonstrated that fish GITM diversity shows higher complexity than originally considered [2]. Knowing the core microbiota (sensu [3]) is pivotal in predicting and further investigating the provided microbial services to the host [4], since these communities are important for the ecological understanding of the gut habitat and the functions of its microbes [5]. The investigation of co-occurrence patterns, including core and less frequent occurring microbes, has been shown to be extremely useful for depicting fundamental and keystone microbial species across same types of habitats-host in spatial and temporal scales [6]. Such approaches have shown that correlations between microbes and latitude can exist even for the human gut [7].

While dietary studies profiling the human gut microbiota pose certain limitations [8], sea cage farmed fish species can be a good model system to investigate fish core GITM since these populations are genetically homogeneous and consume a well-balanced diet that meets their nutritional requirements throughout their life cycle, while populations of the same species are reared in similar environmental conditions. For fish GITM, it has been suggested that these communities are not mere reflections of their host's habitat but are rather shaped by host-specific selective forces [9]. In this study, we compared the GITM of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals originating from five

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

distantly located aquaculture installations in Greece in order to reveal their core GITM, i.e., bacteria that occur across all samples regardless of location and supplied diet.

2. Materials and Methods

Adult individuals of *S. aurata* and *D. labrax*, weighing on average 451 ± 86.4 and 481.3 ± 165.5 (Table S1), respectively, were collected from five commercial aquaculture farms distantly located from each other in different areas in Greece (Figure S1). Fish were grown in sea cages and fed commercial diets (Table S2), and raised under similar husbandry conditions (temperature, pH, salinity, feeding frequency) throughout the rearing cycle. All samples were collected in September 2014 in order to limit possible seasonal variations. Fish were sacrificed by emersion on ice water, packaged in insulated boxes with melted ice (0 °C), and transferred to the laboratory within 6–24 h. Wet weight was measured and gut tissues were obtained by aseptic dissection and the intestinal content was squeezed out. The midgut from 4–6 individuals from each species (n = 2) originating from the same cage in every location (n = 5) was excised with sterile scissors and rinsed with sterile particle free seawater, as we targeted the resident gut microorganisms, i.e., epi and endobionts of the gut tissue cells, and not the ones associated with the ingested food. Gut samples were kept at −80 °C until further analysis. DNA was extracted directly from ca. 0.25 g gut tissue using the PowerMax Soil DNA Isolation kit (MoBio, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's protocol. The concentrations of extracted DNA (absorbance at 260nm) and purity (absorbance ratio 260/280) were measured using NanoDrop (ThermoScientific, Waltham, MA, USA). We analyzed the 16S rDNA gene diversity of gut bacteria from each individual sample, targeting the V3¬V4 region by using 454 pyrosequencing with the primer pair S¬D-Bact¬0341¬b¬S¬17 and S¬D¬Bact¬0785¬a¬A¬21 [10]. Samples were sequenced utilizing Roche 454 FLX titanium instruments and reagents after following manufacturer's guidelines at the MRDNA Ltd. (Shallowater, TX, USA) sequencing facilities. Pyrosequencing reads were processed by the MOTHUR platform (Pat Schloss, University of Michigan, MI, USA; version 1.38) [11,12]. Only sequences with ≥250 bp and no ambiguous or no homopolymers ≥8 bp were considered for further analysis. All remaining sequences were binned in operational taxonomic units (OTUs) and were clustered using a 97% sequence similarity threshold. OTUs taxonomic classification was determined by the SILVA Incremental Aligner (SINA) online alignment service for small (16S) subunit ribosomal RNA [13], by setting minimum identity with query sequence 0.95 and by rejecting sequences below identity 80%. The sequences that could not be classified into any known phylum were assigned as "unclassified" from the SILVA database, release 130 [14].

Statistical analysis and graphical illustrations were performed using the PAlaeontological STudies (PAST) software [15] and the R Studio platform [16]. Macroecological patterns were calculated based on species area relationship (SAR) according to [17]. To evaluate host-specific dynamics, we applied the "DOC method" [18] by calculating the correlation between the overlap and dissimilarity of all OTUs for all the possible individual pairs from the five locations for each host species. To reveal microbial associations within the gut environment the network approach of [19] was used based on the ratio of positive to total correlations of the most dominant OTUs in individuals of *S. aurata* and *D. labrax*. Raw sequence data from this study have been submitted to the Sequence Read Archive (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/) with accession numbers SRR5161931 and SRR5803847, for *S. aurata* and *D. labrax*, respectively.

3. Results and Discussion

In this study, we analyzed the midgut bacterial diversity of farmed *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals in order to determine members of the adult core microbiota of these commercially important fish species. Taking into account that microbiota are important in health and disease, revealing the core microbiota of a species would be important in order to explore how to achieve a beneficial collaboration between host and microbiota (for a review see [5]). The analyzed fish individuals had the following features: (a) common genetic origin, (b) very similar supplied commercial

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

feed (Table S2), (c) origin from distant aquaculture farms (23–554 km between them), (d) similar age, and (e) were sampled within days. These criteria allowed us to assess the core microbiota of these animals by minimizing the effects of host genetics, nutritional state and environmental stressors (e.g., salinity, temperature) variability. In this study, core OTUs refer to the ones found in each individual midgut sample. The effect of the surrounding water was not studied since it is expected to be insignificant for the GITM diversity as shown previously [20–23]. A single water sampling on the same day of the midgut sampling of the investigated fish individuals, would not be so informative due to the following two factors: 1) marine bacterioplankton is characterized by strong variation in short (e.g., [24,25]) and longer [26–29] time scales, and 2) the life cycle of farmed *S. aurata* and *D. labrax* spans over several months. To the best of our knowledge, this is the first study combining all the above features for the gut bacterial communities of *S. aurata* and *D. labrax*. Floris et al. [30] investigated the gut microbiota of *S. aurata* at two coastal lagoons in Sardinia, Italy, but their study was based on older techniques with limited power to uncover the full extent of biodiversity. For *D. labrax*, there are a few relevant studies but were mainly focused on candidate probiotic's evaluation [31–34] and the effect of alternative feed ingredients in gut microbiome [35].

Despite the low reads numbers in some samples (Table 1) rarefaction curves have reached a plateau (Figure S2), indicating satisfactory coverage of the existing bacterial OTUs. The effect of different aquaculture location on bacterial species richness was not important since OTUs richness between locations did not vary significantly (Figure S3). Each species had a rather defined bacterial community, with 10–21 OTUs accounting for $\geq$80% of the relative abundance per sample (Table 1).

All detected OTUs belonged to 11 different phyla (Figure S4), commonly occurring in fish gut [36,37] with *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* dominating (>78%) across all samples. *Bacteroidetes*-related OTUs also occurred in all locations for both species but with lower contributions (Figure S4). The rest of the phyla (*Chloroflexi*, *Spirochaetae*, *Deinoccocus-Thermus*, *Cyanobacteria*, *Saccharibacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Actinobacteria*) occurred sporadically in low abundances ($\leq$1.5%).

Within *Proteobacteria* in *S. aurata*, *Betaproteobacteria* was the dominant class in four locations (Yaltra, Chania, Chios, Igoumenitsa; Greece), while in Atalanti, *Betaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria* co-dominated, with 22.1% and 23.7%, respectively (Figure S4). Other than this, *Gammaproteobacteria* was the second most abundant class of *Proteobacteria*, with *Alphaproteobacteria* always in low abundances (Figure S4). On the contrary, in *D. labrax*, *Gammaproteobacteria* dominated in three locations (Chania, Yaltra, Atalanti; Greece) followed by *Betaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria*. In the rest of the locations (Igoumenitsa and Chios; Greece), *Betaproteobacteria* was the dominant taxon. In general, *Alphaproteobacteria* abundances in *D. labrax* were higher than in *S. aurata* (Figure S4). The most abundant orders in all locations for both host species were the *Micrococcales*, *Corynebacteriales*, *Propionibacteriales*, *Bifidobacteriales*, *Flavobacteriales*, *Bacteroidales*, *Bacillales*, *Lactobacillales*, *Burkholderiales* and *Pseudomonadales*.

A small set of OTUs was found to occur in all individuals from all five locations (8 in *S. aurata* and 10 in *D. labrax*), i.e., representing the core mid gut microbiota (sensu [3]) for each species (Figure 1). Moreover, five of these OTUs (Figure 1) were shared between the two species. The closest phylogenetic relatives for these OTUs were *Delftia acidovorans* (*Burkholderiales*), *Pseudomonas panacis* (*Pseudomonadales*), *Pelomonas puraquae* (*Burkholderiales*), *Propionibacterium acnes* (*Propionibacteriales*) and *Atopostipes suicloacalis* (*Lactobacillales*). (Table S3). The estimation of the shared OTUs doubling time (based on the 16S rDNA gene copy number [38] ranged between 0.8 and 2.0 h^{-1} (Table S3), implying that they represent bacteria which can grow fast in the fish GIT and thus, they are more likely to outcompete other bacterial taxa.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Table 1. Pyrosequencing results of the bacterial 16S rDNA gene diversity in the midgut of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals (N) from different aquaculture sites in Greece. OTUs: operational taxonomic units; N: number of individual midgut samples analyzed.

Site	Reads		OTUs		No. of the Most Dominant OTUs (Cumulative Relative Dominance ≥ 80%)		Most Abundant OTU, Dominance (%) and Closest Relative (≥97%)	
	S. aurata	*D. labrax*	*S. aurata*	*D. labrax*	*S. aurata*	*D. labrax*	*S. aurata*	*D. labrax*
Chania	827 ± 512.4 *N* = 4	2395 ± 725.4 *N* = 5	11 ± 2.2	16 ± 8.7	10 (80.0)	17 (79.9)	OTU0011 (22.7) *Micrococcus luteus*	OTU0014 (17.2) *Paracocccus denitrificans*
Igoumenitsa	2360 ± 1972.7 *N* = 5	1809 ± 571.3 *N* = 4	25 ± 28.3	27 ± 20.3	13 (81.0)	14 (80.0)	*OTU0004* (27.8) *Bacillus hisashii*	OTU0001 (19.9) *Corynebacterium vitaeruminis*
Chios	2407 ± 1771.0 *N* = 6	2148 ± 1785.2 *N* = 6	18 ± 11.4	17 ± 9.8	13 (79.5)	13 (80.9)	OTU0004 (22.0) *Bacillus hisashii*	OTU0001 (24.7) *Corynebacterium vitaeruminis*
Yaltra	2656 ± 1529.0 *N* = 6	697 ± 367.3 *N* = 6	19 ± 12.2	11 ± 2.4	21 (80.0)	10 (79.9)	OTU0002 (16.9) *Delftia acidovorans*	OTU0025 (21.9) *Acinetobacter lwoffii*
Atalanti	1574 ± 1005.9 *N* = 4	2533 ± 1052.7 *N* = 5	13 ± 6.1	14 ± 8.1	12 (80.1)	11 (80.0)	OTU0005 (14.7) *Pseudomonas extremaustralis*	OTU0002 (17.7) *Delftia acidovorans*

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

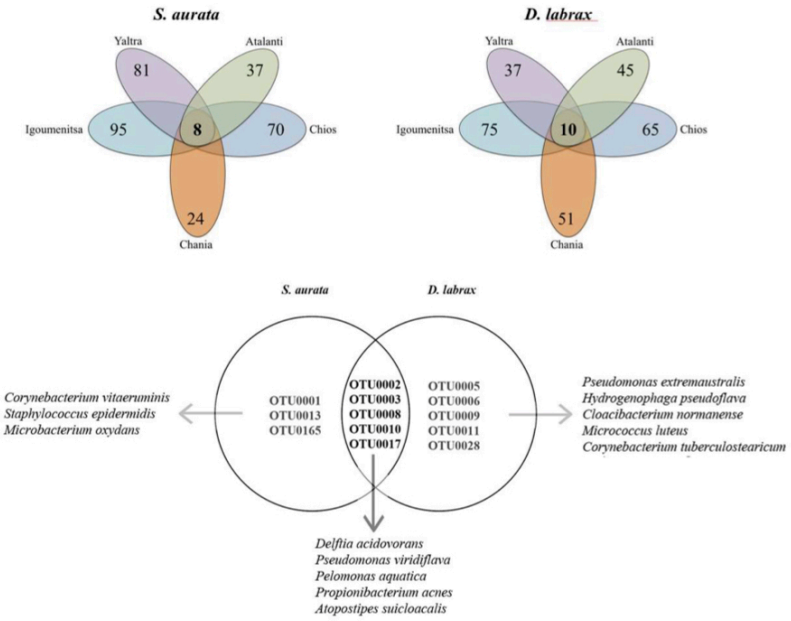


Figure 1. Flower diagram of the shared operational taxonomic units (OTU) between *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals from different aquaculture sites in Greece.

Delftia spp. have been previously retrieved from fish gut of healthy grouper [39], rainbow trout [40], 2012), and Atlantic salmon [41] individuals. The members of this genus are strictly aerobic and chemo-organotrophic but not fermentative [42]. *Pseudomonas* spp. have been isolated from several fish species and have been evaluated as potential probiotics in aquaculture industry [43–45]. *Pelomonas* sp. could be a resident GITM as it has been found in the gut of farmed fish [46]. *Propionibacterium acnes* is commonly found in fish [21,47–50] and snails [51] but its major importance for the human skin microbiome [52] renders it as an uncertain autochthonous gut symbiont for *S. aurata* and *D. labrax*. *Atopostipes* is a fermentative genus and to date it has been associated with fermented flesh of skate (*Raja pulchra*) [53] but also with the Atlantic salmon (*Salmo salar*) gut [49]. Thus, it is likely a bacterium with potential fermentative role in farmed *S. aurata* and *D. labrax*.

S. aurata shared OTUs belonged to taxa (*Burkholderiales*, *Pseudomonadales*, *Flavobacteriales*, *Actinobacteria*) reported in wild, organic and conventionally reared *S. aurata* individuals [48] while the identified closest relatives of these OTUs have been previously retrieved from similar environments (Table S3). This further suggests that these bacteria could be members of *S. aurata* core bacterial community.

The observed core bacterial community for both species consisted mostly from nonsporulating, mesophilic bacteria, with diverse types of respiration with some of them presenting important features in other animals. For example, *Micrococcus luteus* possesses anti-*Vibrio* activity in the freshwater fish *Oreochromis niloticus*; *Pseudomonas panacis* degrades cellulose in the gut of the bark beetles *Dendroctonus armandi*, while *P. veronii* has been reported to have metabolic pathways related to central carbohydrate metabolism, nutrients uptake and plant hormone auxin production in the grapevine, *Vitis vinifera*, root [54]. Most of the rest core gut bacterial OTUs, in *S. aurata* and *D. labrax* were assigned to similar orders such as *Corynebacteriales*, *Pseudomonadales* and *Micrococcales*, though in different species

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

(Table S2). Most of them have been retrieved from similar isolation sources (e.g., stool, intestine, manure) (Table S3). The number of OTUs occurring only in one location varied between 11–61 and 22–55 for *S. aurata* and *D. labrax*, respectively (Figure S4).

Geographic distance between the aquaculture farms did not show any correlation with the gut bacterial community structure for both species (Figure S5) and nonmetric multidimensional scaling (NMDS, Figure S6) based on the Bray–Curtis distance of presence/absence OTUs, showed no clear geographic separation (ANOSIM using Euclidean distances $p = 0.391$, $R = 9.3^{-5}$) of the gut bacterial communities for both species as well. This implies, that the observed GITM structure for each of the two fish species investigated in this study are not related to the vicinity of the aquaculture farms.

In the current study, the correlations between the overlap and dissimilarity of GITM communities structure were positive for both fish species considered ($r = 0.477$ and 0.574 for $p < 0.002$ in *S. aurata* and *D. labrax,* respectively) (Figure 2), suggesting high inter-individual variability in terms of OTUs abundances even in the same location. Similar results have also been observed in fecal microbiota for both *S. aurata* and *D. labrax* [55,56]. While in human gut microbiome, the inter-individual variability is more easily understood due to parameters such as dietary patterns and personal interests [57,58], here we concluded that inter-individual variability in the autochthonous gut bacteria of *D. labrax* and *S. aurata*, is more likely related with individual genetic factors. The observed inter-individual variability means that the gut microenvironment of these two host fish species promotes selective pressure in the bacterial communities. However, while the overlap of these bacterial communities increases, the same happens with dissimilarity, indicating host-independent parameters also shaping gut bacterial community in human [18,59] and fish GITM [60,61].

The most prominent factors promoting the inter-individual microbiota variation have only recently been taken into account and these are host genotype, gut colonization during the early developmental stages, environmental effects on GITM acquisition, diet, diseases and respective medication [8]. One reason for the GITM inter-individual variability is that caged fish are fed mechanically, a way that does not secure equal food consumption for each fish due to individual differences in their activity. The extent of GITM individual variability is important to know for the following reasons: (a) it dictates the number of replicate samples per species that need to be analyzed [58], (b) it helps distinguishing between autochthonous (resident) bacteria which colonize the gut mucosa and the allochthonous (transient) bacteria occurring mostly in the digesta [9,62]. The demonstrated individual host variability could be the reason for the low number of shared OTUs in both allopatric populations studied here, but larger datasets are required in order to fully unravel this issue.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

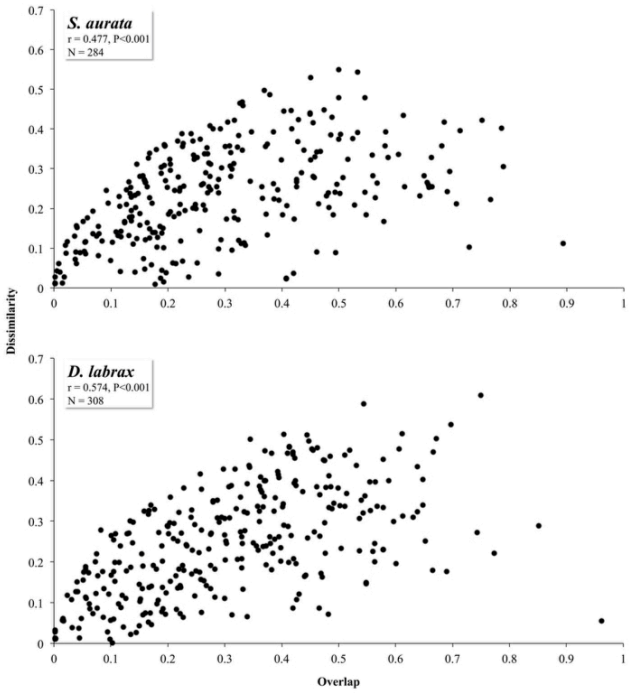


Figure 2. Dissimilarity vs. overlap correlation of all the possible sample pairs of the gut bacterial operational taxonomic units between different *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* aquaculture sites in Greece.

Although one-way analysis of variance (ANOVA) revealed no statistically significant differences between gut bacterial communities for both species ($p > 0.05$), (Figure S3), the biological relations of the bacterial communities were different. The ratio of positive to total (PT) correlations of the most dominant OTUs of *S. aurata* and *D. labrax* individuals was significantly different ($p < 0.05$), suggesting different biological relationships in the guts of the two species (Figure 3). The high ratio of the positive to total (PT) correlations of the most dominant operational taxonomic units demonstrates that the majority of the dominant bacteria have either cooperative interactions or, at least, they do not participate in competitive nutrition. Such relationships in microbial populations are believed to be beneficial to the host as they ensure high capacity of utilizing the complex array of available substrates found in the gut [35,63,64].

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

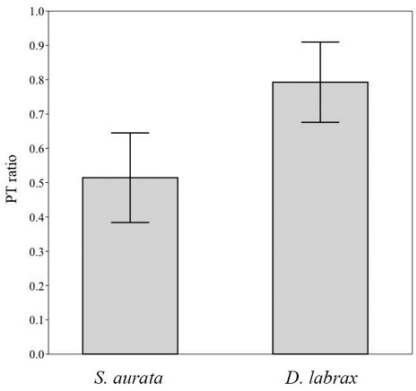


Figure 3. Ratio of positive to total (PT) correlations (Pearson, $-0.7 > R > 0.7$, $p < 0.05$) of the most dominant operational taxonomic units (OTUs) in *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals from aquaculture sites in Greece. Vertical lines indicate standard error.

4. Conclusions

It is still unknown whether and how the gut microbial communities of fish can contribute nutrients and energy to the host and maintain a balance with the fish's metabolism and immune system. This study presents evidence for core gut bacterial communities within the two examined host species (*S. aurata* and *D. labrax*), and also a small set of OTUs that have been found in common between them, indicating that some autochthonous gut bacterial representatives of the *Delftia*, *Pseudomonas*, *Pelomonas*, *Propionibacterium* and *Atopostipes* genera can colonize different host species. Despite the inter-individual variability and the distance of each farm location, there is no significant difference between the gut bacterial communities in the two host species. The results also revealed these gut bacterial communities form different biological relations between their members as revealed by their populations association networks.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2076-2607/6/3/92/s1, Table S1. Body weight of the *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals used in this study; Table S2. Ingredients of the diets used at the time of sampling; Table S3. Bacterial 16S rDNA operational taxonomic units (OTU) found in the midgut of commercially reared *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals from different aquaculture sites in Greece; Figure S1. Aquaculture sampling sites. I: Igoumenitsa, Y, Yaltra, A: Atalanti, Ch: Chios, C: Chania; Figure S2. Rarefaction curves bacterial operational taxonomic units generated by16S rDNA tag pyrosequencing from the midgut of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals originating from different aquaculture farms in Greece; Figure S3. Box-plot of the bacterial operational taxonomic units found in the midgut of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals originating from different aquaculture farms in Greece; Figure S4. Taxonomy (phyla: top row; *Proteobacteria* sub-phyla: bottom row) of the found bacterial operational taxonomic units found in the midgut of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals originating from different aquaculture farms in Greece; Figure S5. Relationship of the shared operational taxonomic units (OTUs) and the total number of OTUs with the distance between different *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* aquaculture sites in Greece; Figure S6. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) based on the gut bacterial operational taxonomic units between *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals from different aquaculture sites in Greece. Red and blue lines include all *S. aurata* and *D. labrax* samples, respectively.

Author Contributions: E.N.: performed field and laboratory analyses, analyzed the data, and contributed to paper writing; A.M.: analyzed the data and contributed to paper writing; E.A.: conceived the study and contributed to paper writing; E.M.: conceived the study and contributed to paper writing; K.A.K: conceived the study, analyzed the data, and wrote the first draft of the paper.

Acknowledgments: We thank the Nireus and Zervas-Kyriazis aquaculture companies in Greece for providing the fish samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

References

1. Hai, N.V. The use of probiotics in aquaculture. *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *119*, 917–935. [CrossRef] [PubMed]
2. Sullam, K.E.; Essinger, S.D.; Lozupone, C.A.; O'Connor, M.P.; Rosen, G.L.; Knight, R.O.B.; Kilham, S.S.; Russell, J.A. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: A meta-analysis. *Mol. Ecol.* **2012**, *21*, 3363–3378. [CrossRef] [PubMed]
3. Hamady, M.; Knight, R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res.* **2009**, *19*, 1141–1152. [CrossRef] [PubMed]
4. Llewellyn, M.S.; Boutin, S.; Hoseinifar, S.H.; Derome, N. Teleost microbiomes: The state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 1–17. [CrossRef] [PubMed]
5. Shade, A.; Handelsman, J. Beyond the venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environ. Microbiol.* **2012**, *14*, 4–12. [CrossRef] [PubMed]
6. Zelezniak, A.; Andrejev, S.; Ponomarova, O.; Mende, D.R.; Bork, P.; Patil, K.R. Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 6449–6454. [CrossRef] [PubMed]
7. Suzuki, T.A.; Worobey, M. Geographical variation of human gut microbial composition. *Biol. Lett.* **2014**, *10*, 20131037. [CrossRef] [PubMed]
8. Flint, H.J.; Duncan, S.H.; Louis, P. The impact of nutrition on intestinal bacterial communities. *Curr. Opin. Microbiol.* **2017**, *38*, 59–65. [CrossRef] [PubMed]
9. Wong, S.; Rawls, J.F. Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment. *Mol. Ecol.* **2012**, *21*, 3100–3102. [CrossRef] [PubMed]
10. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.R.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F.O. Evaluation of general 16s ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *41*, e1. [CrossRef] [PubMed]
11. Schloss, P.D.; Gevers, D.; Westcott, S.L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16s rRNA-based studies. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27310. [CrossRef] [PubMed]
12. Schloss, P.D.; Westcott, S.L.; Ryabin, T.; Hall, J.R.; Hartmann, M.; Hollister, E.B.; Lesniewski, R.A.; Oakley, B.B.; Parks, D.H.; Robinson, C.J.; et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7537–7541. [CrossRef] [PubMed]
13. Pruesse, E.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. Sina: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1823–1829. [CrossRef] [PubMed]
14. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D596. [CrossRef] [PubMed]
15. Hammer, Ø.; Harper, D.; Ryan, P. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electr.* **2001**, *4*, 1–9.
16. Team, R. Rstudio. Integrated development for R. Rstudio, Inc., Boston, MA. Available online: http://www.rstudio.com/ (accessed on 2 July 2018).
17. Lennon, J.T.; Locey, K.J. Macroecology for microbiology. *Environ. Microbiol. Rep.* **2017**, *9*, 38–40. [CrossRef] [PubMed]
18. Bashan, A.; Gibson, T.E.; Friedman, J.; Carey, V.J.; Weiss, S.T.; Hohmann, E.L.; Liu, Y.-Y. Universality of human microbial dynamics. *Nature* **2016**, *534*, 259–262. [CrossRef] [PubMed]
19. Morueta-Holme, N.; Blonder, B.; Sandel, B.; McGill, B.J.; Peet, R.K.; Ott, J.E.; Violle, C.; Enquist, B.J.; Jørgensen, P.M.; Svenning, J.-C. A network approach for inferring species associations from co-occurrence data. *Ecography* **2016**, *39*, 1139–1150. [CrossRef]
20. Meziti, A.; Mente, E.; Kormas, K.A. Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **2012**, *35*, 473–482. [CrossRef] [PubMed]
21. Estruch, G.; Collado, M.C.; Peñaranda, D.S.; Tomás Vidal, A.; Jover Cerdá, M.; Pérez Martínez, G.; Martinez-Llorens, S. Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead sea bream *Sparus aurata* on the gastrointestinal microbiota determined by pyrosequencing the 16s rRNA gene. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136389. [CrossRef] [PubMed]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

22. Schmidt, V.T.; Smith, K.F.; Melvin, D.W.; Amaral-Zettler, L.A. Community assembly of a euryhaline fish microbiome during salinity acclimation. *Mol. Ecol.* **2015**, *24*, 2537–2550. [CrossRef] [PubMed]
23. Borsodi, A.K.; Szabó, A.; Krett, G.; Felföldi, T.; Specziár, A.; Boros, G. Gut content microbiota of introduced bigheaded carps (*Hypophthalmichthys* spp.) inhabiting the largest shallow lake in central Europe. *Microbiol. Res.* **2017**, *195*, 40–50. [CrossRef] [PubMed]
24. Ottesen, E.A.; Young, C.R.; Gifford, S.M.; Eppley, J.M.; Marin, R.; Schuster, S.C.; Scholin, C.A.; DeLong, E.F. Multispecies diel transcriptional oscillations in open ocean heterotrophic bacterial assemblages. *Science* **2014**, *345*, 207–212. [CrossRef] [PubMed]
25. Aylward, F.O.; Eppley, J.M.; Smith, J.M.; Chavez, F.P.; Scholin, C.A.; DeLong, E.F. Microbial community transcriptional networks are conserved in three domains at ocean basin scales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 5443–5448. [CrossRef] [PubMed]
26. Fuhrman, J.; Steele, J.A. Community structure of marine bacterioplankton: Patterns, networks, and relationships to function. *Aquat. Microb. Ecol.* **2008**, *53*, 69–81. [CrossRef]
27. Meziti, A.; Kormas, K.A.; Moustaka-Gouni, M.; Karayanni, H. Spatially uniform but temporally variable bacterioplankton in a semi-enclosed coastal area. *Syst. Appl. Microbiol.* **2015**, *38*, 358–367. [CrossRef] [PubMed]
28. Bunse, C.; Pinhassi, J. Marine bacterioplankton seasonal succession dynamics. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 494–505. [CrossRef] [PubMed]
29. Troussellier, M.; Escalas, A.; Bouvier, T.; Mouillot, D. Sustaining rare marine microorganisms: Macroorganisms as repositories and dispersal agents of microbial diversity. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 947. [CrossRef] [PubMed]
30. Floris, R.; Manca, S.; Fois, N. Microbial ecology of intestinal tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) from two coastal lagoons of Sardinia (Italy). *Transit. Waters Bull.* **2013**, *7*, 4–12. [CrossRef]
31. Silvi, S.; Nardi, M.; Sulpizio, R.; Orpianesi, C.; Caggiano, M.; Carnevali, O.; Cresci, A. Effect of the addition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* on the gut microbiota composition and contribution to the well-being of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Microbial Ecology in Health and Disease* **2008**, *20*, 53–59. [CrossRef]
32. Bourouni, O.C.; El Bour, M.; Calo-Mata, P.; Mraouna, R.; Abedellatif, B.; Barros-Velàzquez, J. Phylogenetic analysis of antimicrobial lactic acid bacteria from farmed seabass *Dicentrarchus labrax*. *Can. J. Microbiol.* **2012**, *58*, 463–474. [CrossRef] [PubMed]
33. Lamari, F.; Mahdhi, A.; Chakroun, I.; Esteban, M.A.; Mazurais, D.; Amina, B.; Gatesoupe, F.J. Interactions between candidate probiotics and the immune and antioxidative responses of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *J. Fish Dis.* **2016**, *39*, 1421–1432. [CrossRef] [PubMed]
34. Mladineo, I.; Bušelić, I.; Hrabar, J.; Radonić, I.; Vrbatović, A.; Jozić, S.; Trumbić, Ž. Autochthonous bacterial isolates successfully stimulate in vitro peripheral blood leukocytes of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. [CrossRef] [PubMed]
35. Torrecillas, S.; Mompel, D.; Caballero, M.J.; Montero, D.; Merrifield, D.; Rodiles, A.; Robaina, L.; Zamorano, M.J.; Karalazos, V.; Kaushik, S.; et al. Effect of fishmeal and fish oil replacement by vegetable meals and oils on gut health of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* **2017**, *468*, 386–398. [CrossRef]
36. Givens, C.; Ransom, B.; Bano, N.; Hollibaugh, J. Comparison of the gut microbiomes of 12 bony fish and 3 shark species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2015**, *518*, 209–223. [CrossRef]
37. Tarnecki, A.M.; Burgos, F.A.; Ray, C.L.; Arias, C.R. Fish intestinal microbiome: Diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. *J. Appl. Microbiol.* **2017**, *123*, 2–17. [CrossRef] [PubMed]
38. Roller, B.R.K.; Stoddard, S.F.; Schmidt, T.M. Exploiting rRNA operon copy number to investigate bacterial reproductive strategies. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16160. [CrossRef] [PubMed]
39. Sun, Y.; Yang, H.; Ling, Z.; Chang, J.; Ye, J.D. Gut microbiota of fast and slow growing grouper *Epinephelus coioides*. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2009**, *3*, 713–720. [CrossRef]
40. Navarrete, P.; Magne, F.; Araneda, C.; Fuentes, P.; Barros, L.; Opazo, R.; Espejo, R.; Romero, J. PCR-TTGE analysis of 16s rRNA from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gut microbiota reveals host-specific communities of active bacteria. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e31335. [CrossRef] [PubMed]
41. Gajardo, K.; Rodiles, A.; Kortner, T.M.; Krogdahl, Å.; Bakke, A.M.; Merrifield, D.L.; Sørum, H. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30893. [CrossRef] [PubMed]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

42. Wen, A.; Fegan, M.; Hayward, C.; Chakraborty, S.; Sly, L.I. Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (Den Dooren De Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1999**, *49*, 567–576. [CrossRef] [PubMed]
43. Abd El-Rhman, A.M.; Khattab, Y.A.E.; Shalaby, A.M.E. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* **2009**, *27*, 175–180. [CrossRef] [PubMed]
44. Korkea-aho, T.L.; Heikkinen, J.; Thompson, K.D.; von Wright, A.; Austin, B. *Pseudomonas* sp. M174 inhibits the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *111*, 266–277. [CrossRef] [PubMed]
45. Lazado, C.C.; Caipang, C.M.A.; Kiron, V. Enzymes from the gut bacteria of Atlantic cod, *Gadus morhua* and their influence on intestinal enzyme activity. *Aquacult. Nutr.* **2012**, *18*, 423–431. [CrossRef]
46. Rasheeda, M.K.; Rangamaran, V.R.; Srinivasan, S.; Ramaiah, S.K.; Gunasekaran, R.; Jaypal, S.; Gopal, D.; Ramalingam, K. Comparative profiling of microbial community of three economically important fishes reared in sea cages under tropical offshore environment. *Mar. Genomics* **2017**, *34*, 57–65. [CrossRef] [PubMed]
47. Carda-Diéguez, M.; Mira, A.; Fouz, B. Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, *87*, 451–459. [CrossRef] [PubMed]
48. Kormas, K.A.; Meziti, A.; Mente, E.; Frentzos, A. Dietary differences are reflected on the gut prokaryotic community structure of wild and commercially reared sea bream (*Sparus aurata*). *MicrobiologyOpen* **2014**, *3*, 718–728. [CrossRef] [PubMed]
49. Godoy, F.A.; Miranda, C.D.; Wittwer, G.D.; Aranda, C.P.; Calderón, R. High variability of levels of *Aliivibrio* and lactic acid bacteria in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Ann. Microbiol.* **2015**, *65*, 2343–2353. [CrossRef]
50. Rurangwa, E.; Sipkema, D.; Kals, J.; ter Veld, M.; Forlenza, M.; Bacanu, G.M.; Smidt, H.; Palstra, A.P. Impact of a novel protein meal on the gastrointestinal microbiota and the host transcriptome of larval zebrafish *Danio rerio*. *Front. Physiol.* **2015**, *6*. [CrossRef] [PubMed]
51. Koleva, Z.; Dedov, I.; Kizheva, J.; Lipovanska, R.; Moncheva, P.; Hristova, P. Lactic acid microflora of the gut of snail *Cornu aspersum*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2014**, *28*, 627–634. [CrossRef] [PubMed]
52. Krutmann, J. Pre- and probiotics for human skin. *J Dermatol. Sci.* **2009**, *54*, 1–5. [CrossRef] [PubMed]
53. Jang, G.I.; Kim, G.; Hwang, C.Y.; Cho, B.C. Prokaryotic community composition in alkaline-fermented skate (*Raja pulchra*). *Food Microbiol.* **2017**, *61*, 72–82. [CrossRef] [PubMed]
54. Montes, C.; Altimira, F.; Canchignia, H.; Castro, Á.; Sánchez, E.; Miccono, M.; Tapia, E.; Sequeida, Á.; Valdés, J.; Tapia, P.; et al. A draft genome sequence of *Pseudomonas veronii* R4: A grapevine (*Vitis vinifera* L.) root-associated strain with high biocontrol potential. *Stand. Genomic Sci.* **2016**, *11*, 76. [CrossRef] [PubMed]
55. De Schryver, P.; Dierckens, K.; Bahn Thi, Q.Q.; Amalia, R.; Marzorati, M.; Bossier, P.; Boon, N.; Verstraete, W. Convergent dynamics of the juvenile European sea bass gut microbiota induced by poly-β-hydroxybutyrate. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13*, 1042–1051. [CrossRef] [PubMed]
56. Silva, F.C.D.P.; Nicoli, J.R.; Zambonino-Infante, J.L.; Kaushik, S.; Gatesoupe, F.-J. Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, *78*, 285–296. [CrossRef] [PubMed]
57. Costello, E.K.; Lauber, C.L.; Hamady, M.; Fierer, N.; Gordon, J.I.; Knight, R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* **2009**, *326*. [CrossRef] [PubMed]
58. Gatesoupe, F.-J.; Huelvan, C.; Le Bayon, N.; Le Delliou, H.; Madec, L.; Mouchel, O.; Quazuguel, P.; Mazurais, D.; Zambonino-Infante, J.-L. The highly variable microbiota associated to intestinal mucosa correlates with growth and hypoxia resistance of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, submitted to different nutritional histories. *BMC Microbiol.* **2016**, *16*, 266. [CrossRef] [PubMed]
59. Faust, K.; Raes, J. Host-microbe interaction: Rules of the game for microbiota. *Nature* **2016**, *534*, 182–183. [CrossRef] [PubMed]
60. Hovda, M.B.; Lunestad, B.T.; Fontanillas, R.; Rosnes, J.T. Molecular characterisation of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **2007**, *272*, 581–588. [CrossRef]
61. Zarkasi, K.Z.; Taylor, R.S.; Glencross, B.D.; Abell, G.C.J.; Tamplin, M.L.; Bowman, J.P. In vitro characteristics of an Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) hind gut microbial community in relation to different dietary treatments. *Res. Microbiol.* **2017**, *168*, 751–759. [CrossRef] [PubMed]

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

62. Sánchez, B.; Delgado, S.; Blanco-Míguez, A.; Lourenço, A.; Gueimonde, M.; Margolles, A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, 1600240. [CrossRef] [PubMed]
63. Coyte, K.Z.; Schluter, J.; Foster, K.R. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *Science* **2015**, *350*, 663–666. [CrossRef] [PubMed]
64. Widder, S.; Allen, R.J.; Pfeiffer, T.; Curtis, T.P.; Wiuf, C.; Sloan, W.T.; Cordero, O.X.; Brown, S.P.; Momeni, B.; Shou, W.; et al. Challenges in microbial ecology: Building predictive understanding of community function and dynamics. *ISME J.* **2016**, *10*, 2557–2568. [CrossRef] [PubMed]

© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Gut bacterial communities in geographically distant populations of farmed sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*)

Eleni Nikouli[1], Alexandra Meziti[1], Efthimia Antonopoulou[2], Eleni Mente[1], Konstantinos Ar. Kormas[1*]

[1] Department of Ichthyology and Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, 384 46 Volos, Greece

[2] Laboratory of Animal Physiology, Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of Thessaloniki, 541 24 Thessaloniki, Greece

* Corresponding author; Tel.: +30-242-109-3082, Fax: +30-242109-3157, E-mail: kkormas@uth.gr, kkormas@gmail.com

Supplementary material

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Table S1. Body weight of the *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals used in this study.

		Chania		**Chios**		**Igoumenitsa**		**Yaltra**		**Atalanti**	
Sample	**Body weight (g)**	*S. aurata*	*D. labrax*	*S. aurata*	*D. labrax*	*S. aurata*	*D. labrax*	*S. aurata*	*D. labrax*	*S. aurata*	*D. labrax*
1		359	378	558	420	433	448	481	346	260	785
2		355	294	579	442	493	556	516	397	240	340
3		376	275	468	554	450	464	540	415	440	500
4		392	395	530	460	440	483	492	493	365	860
5		420	362	483	479	542		492	406		995
6				521	505			506	461		
	Mean	380.40	340.80	523.17	476.67	471.60	487.75	504.50	419.67	326.25	696.00
	SEs	11.89	23.76	17.36	19.56	20.46	23.85	8.68	21.00	46.79	120.29

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Table S2. Ingredients of the diets used at the time of sampling.

Ingredient	***Sparus aurata*** **(6 mm; 350-450 g)****	***Dicentrarchus labrax*** **(6 mm; 450-800 g)****
Crude proteins (%)	42 – 44	37 – 39
Crude lipids (%)	19 – 21	20 – 22
Nitrogen free extract (NFE) (%)	20 – 26	19 – 25
Crude cellulose (%)	1 – 3	2 – 4
Ash (%)	5.8 – 7.8	6.2 – 8.2
Total P (%)	0.7 – 0.9	0.8 – 1.0
Gross energy (MJ/Kg)	21.5 – 23.5	20.6 – 22.6
Classical digestible energy* (MJ/Kg)	19.5	18.9
Added vitamin D3 (I.U./Kg)	500	500
Added vitamin E (I.U./Kg)	180	100
Added vitamin C (I.U./Kg)	250	100
Feeding rate (%), i.e. Kg of fish feed/100 Kg of fish biomass per day	0.7	0.7

* Classical digestible energy calculated on proteins, lipids and NFE.
** Mean size of feed pellet; fish weight.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Figure S1. Aquaculture sampling sites. I: Igoumenista, Y, Yaltra, A: Atalanti, Ch: Chios, C: Chania.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

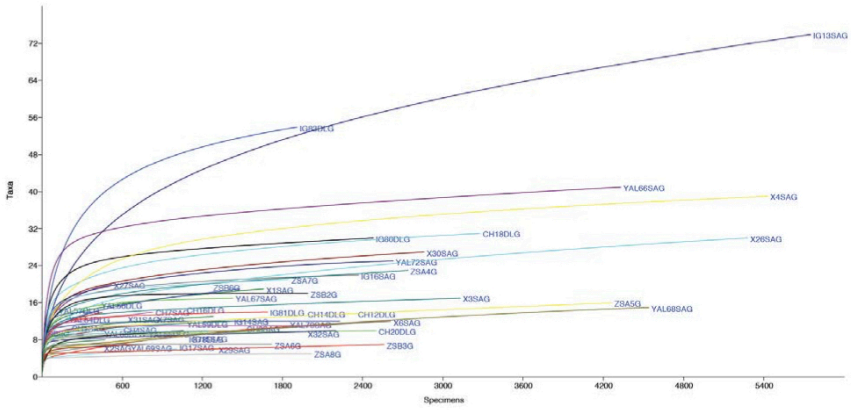


Figure S2. Rarefaction curves bacterial operational taxonomic units generated by16S rDNA tag pyrosequencing from the midgut of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals originating from different aquaculture farms in Greece.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

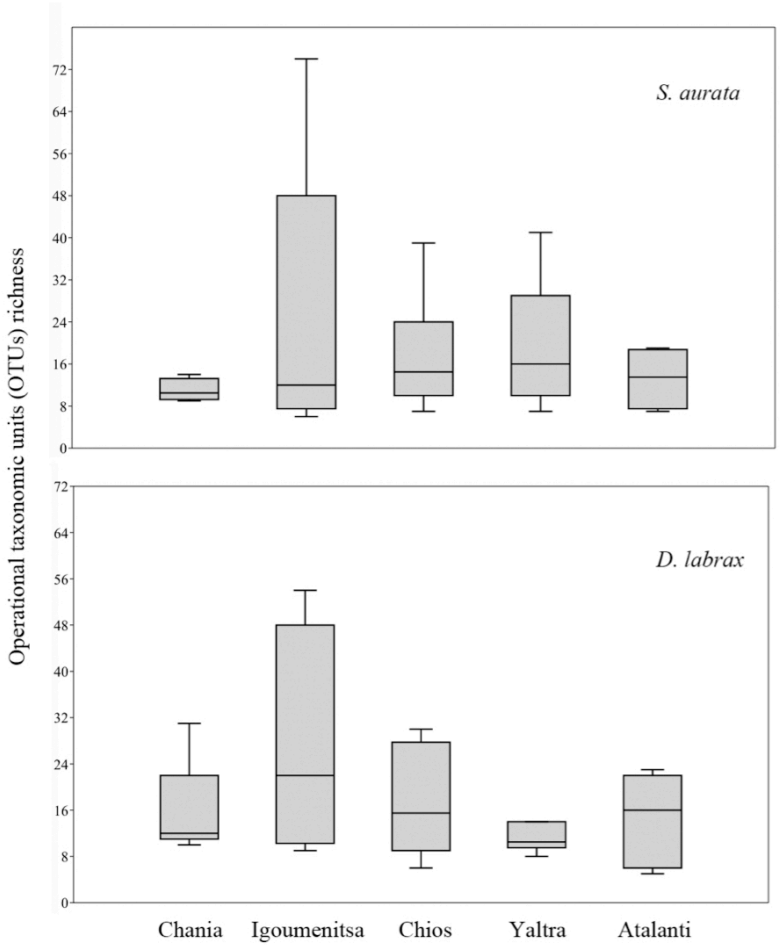


Figure S3. Box-plot of the bacterial operational taxonomic units found in the midgut of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals originating from different aquaculture farms in Greece.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

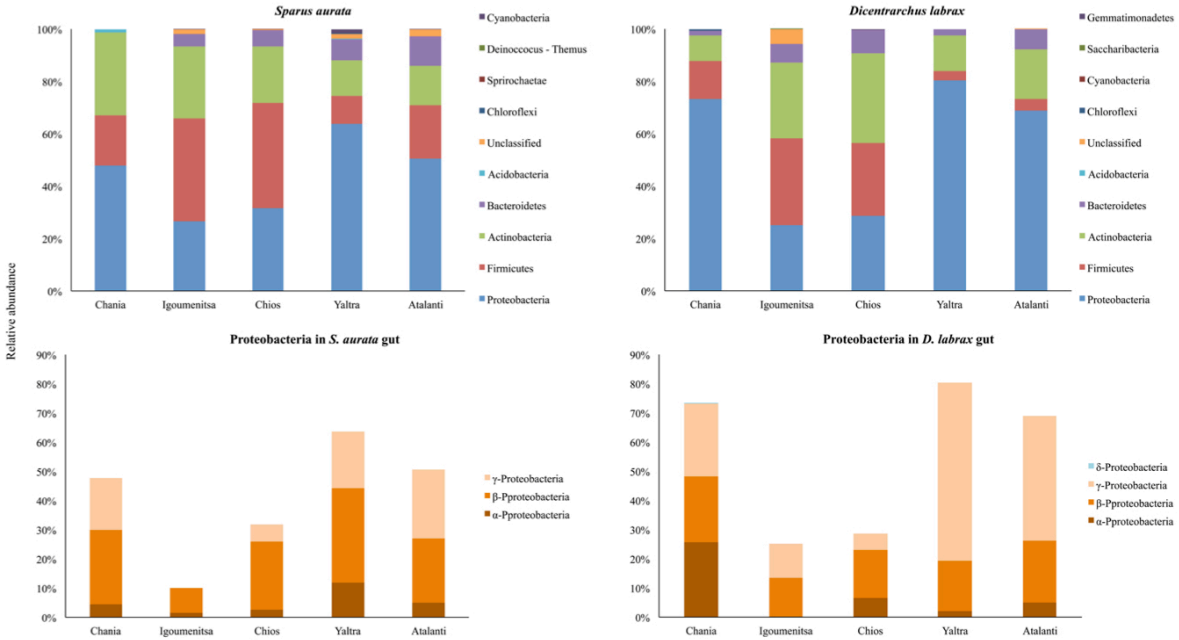


Figure S4. Taxonomy (phyla: top row; Proteobateria sub-phyla: bottom row) of the found bacterial operational taxonomic units found in the midgut of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals originating from different aquaculture farms in Greece.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

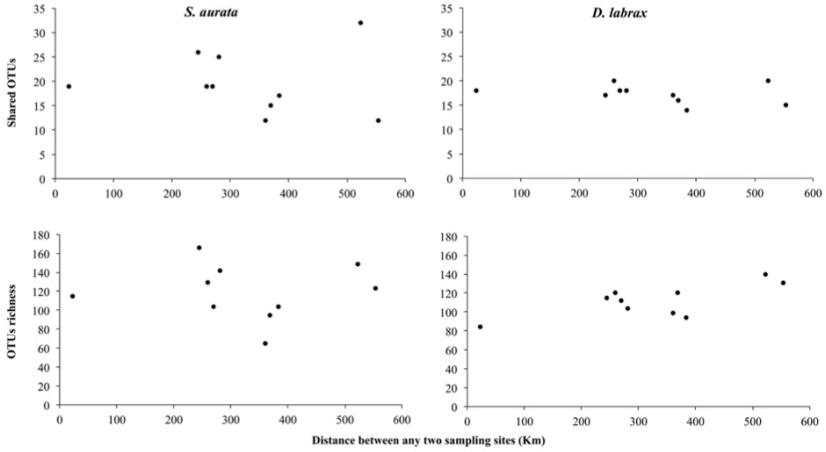


Figure S5. Relationship of the shared operational taxonomic units (OTUs) and the total number of OTUs with the distance between different *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* aquaculture sites in Greece.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

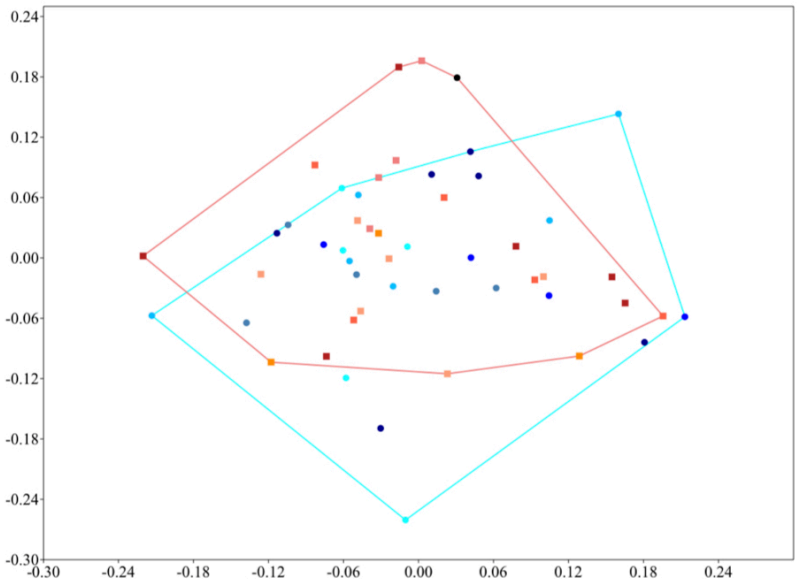


Figure S6. Non-metric multidimensiosal scaling (NMDS) based on the gut bacterial operational taxonomic units between *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax* individuals from different aquaculture sites in Greece. Red and blue lines include all S. aurata and D. labrax samples, respectively.

References

65. Madhaiyan, M.; Alex, T.H.; Ngoh, S.T.; Prithiviraj, B.; Ji, L. Leaf-residing methylobacterium species fix nitrogen and promote biomass and seed production in *Jatropha curcas*. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8*, 222. doi: 10.1186/s13068-015-0404-y.
66. Cotta, M.A.; Whitehead, T.R.; Collins, M.D.; Lawson, P.A. *Atopostipes suicloacale* gen. nov., sp. nov., isolated from an underground swine manure storage pit. *Anaerobe* **2004**, *10*, 191–195. doi: 10.1016/j.anaerobe.2004.04.001.
67. Goyache, J.; Vela, A.I.; Collins, M.D.; Ballesteros, C.; Briones, V.; Moreno, J.; Yorio, P.; Domínguez, L.; Hutson, R.; Fernández-Garayzábal, J.F. *Corynebacterium spheniscorum* sp. nov., isolated from the cloacae of wild penguins. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53*, 43–46. doi: 10.1099/ijs.0.02343-0.
68. Allen, T.D.; Lawson, P.A.; Collins, M.D.; Falsen, E.; Tanner, R.S. *Cloacibacterium normanense* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family *Flavobacteriaceae* isolated from municipal wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2006**, *56*, 1311–1316. doi: 10.1099/ijs.0.64218-0.
69. Abd Al-Abbas, M.J.; Jasim, N.A. Isolation and identification of bacteria from urine of patient with kidney stone. *American Sci. Res. J. for Eng. Technol. Sci.* **2016**, *26*: 230-249.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

70. Lagkouvardos, I.; Pukall, R.; Abt, B.; Foesel, B.U.; Meier-Kolthoff, J.P.; Kumar, N.; Bresciani, A.; Martinez, I.; Just, S.; Ziegler, C., et al. The mouse intestinal bacterial collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16131. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.131.
71. Krakat, N.; Schmidt, S.; Scherer, P. Potential impact of process parameters upon the bacterial diversity in the mesophilic anaerobic digestion of beet silage. *Bioresour. Technol*. **2011**, *102*, 5692–5701. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.108.
72. Futamata, H.; Nagano, Y.; Watanabe, K.; Hiraishi, A. Unique kinetic properties of phenol-degrading *Variovorax* strains responsible for efficient trichloroethylene degradation in a chemostat enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 904–911. doi: 10.1128/aem.71.2.904-911.2005.
73. Bunešová, V.; Vlková, E.; Rada, V.; Ročková, Š.; Svobodová, I.; Jebavý, L.; Kmeť, V. *Bifidobacterium* animalis subsp. lactis strains isolated from dog faeces. *Vet. Microbiol*. **2012**, *160*, 501–505. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.06.005.
74. Yousuf, B.; Keshri, J.; Mishra, A.; Jha, B. Application of targeted metagenomics to explore abundance and diversity of CO_2-fixing bacterial community using *cbbL* gene from the rhizosphere of Arachis hypogaea. Gene **2012**, *506*, 18–24. doi: 10.1016/j.gene.2012.06.083.
75. Oh, J.; Freeman, A.F.; Park, M.; Sokolic, R.; Candotti, F.; Holland, S.M.; Segre, J.A.; Kong, H.H. The altered landscape of the human skin microbiome in patients with primary immunodeficiencies. *Genome Res*. **2013**, *23*, 2103–2114. doi: 10.1101/gr.159467.113.
76. Muñoz, C.; Hidalgo, C.; Zapata, M.; Jeison, D.; Riquelme, C.; Rivas, M. Use of cellulolytic marine bacteria for enzymatic pretreatment in microalgal biogas production. *Appl. Environ. Microbiol*. **2014**, *80*, 4199–4206. doi: 10.1128/aem.00827-14.
77. Moeseneder, M.M.; Winter, C.; Herndl, G.J. Horizontal and vertical complexity of attached and free-living bacteria of the Eastern Mediterranean Sea, determined by 16S rDNA and 16S rRNA fingerprints. *Limnol. Oceanogr.* **2001**, *46*, 95–107. doi: 10.4319/lo.2001.46.1.0095.
78. Son, H.-M.; Kook, M.; Tran, H.T.H.; Kim, K.-Y.; Park, S.-Y.; Kim, J.-H.; Yi, T.-H. *Sphingomonas kyeonggiense* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *Antonie van Leeuwenhoek* **2014**, *105*, 791–797. doi: 10.1007/s10482-014-0122-7.
79. Hoyles, L., Honda, H., Logan N.A., Halket, G., La Ragione R.M., McCartney A.L. Recognition of greater diversity of *Bacillus* species and related bacteria in human faeces. *Res. Microbiol*. **2012**, *163*, 3–13. doi: 10.1016/j.resmic.2011.10.004.
80. Ghosh, S.; Osman, S.; Vaishampayan, P.; Venkateswaran, K. Recurrent isolation of extremotolerant bacteria from the clean room where phoenix spacecraft components were assembled. *Astrobiology* **2010**, *10*, 325–335. doi:10.1089/ast.2009.0396.
81. Yoon, J.H.; Kang, S.J.; Park, S.; Oh, T.K. *Daeguia caeni* gen. nov., sp. nov., isolated from sludge of a textile dye works. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **2008**, *58*, 168–172. doi: 10.1099/ijs.0.65483-0.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49

Host-associated bacterial succession during the early embryonic stages and first feeding in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*).

Eleni Nikouli[1], Alexandra Meziti[1], Efthimia Antonopoulou[2], Eleni Mente[1] and Konstantinos Ar. Kormas[1]*

[1] Department of Ichthyology and Aquatic Environment, School of Agricultural Sciences, University of 8 Thessaly, Volos 384 46, Greece; EN: elnikoul@uth.gr; AM: ameziti@gmail.com; EM: emente@uth.gr

[2] Laboratory of Animal Physiology, Department of Zoology, School of Biology, Aristotle University of 10 Thessaloniki, 541 24, Greece; eantono@bio.auth.gr

* Correspondence: kkormas@uth.gr, kkormas@gmail.com; Tel.: +30-242-109-3082 12

Abstract: We investigated the *Sparus aurata* microbiota from fertilized eggs to 71 days post hatch (dph) larvae and assessed the contribution of the rearing water and the provided feed (rotifers, *Artemi*a sp. and commercial diet) to the host's microbiota. On average, between 93±2.1 and 366±49.2 bacterial operational taxonomic units (OTUs) per sample were found, with most of them belonging to Proteobacteria and Bacteroidetes. OTUs richness in rearing water was significantly higher in all time points compared to *S. aurata*, except fertilized eggs and the diet. *S. aurata* at yolk sac stage (5 dph) showed significantly lower species richness, while the majority of the OTUs were shared with the rearing water. However, after the mouth opening (15 dph) OTUs richness increased. Ten OTUs were shared between all *S. aurata* stages and were also detected in the rearing water or diet. The formulated diet showed higher contribution to the *S. aurata* microbiota than the rearing water. Despite the similarities between the host and the surrounding environment microbiota, no overlap was detected. Between 19 and 66.9% of the OTUs occurred across all *S. aurata* stages. Finally, after introduction of the formulated diet, the observed microbiota showed similarities with that of adult *S. aurata*.

Keywords: sea bream; development; larvae; symbionts; bacteria

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
03/06/2024 22:05:31 EEST - 3.137.212.49