



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας – Τμήμα Ιατρικής
ΠΜΣ «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική
Υγιεινή

**“Εξέλιξη της σύνθεσης του μικροβιώματος σε
εκτρεφόμενα ψάρια μετά την εξαλίευση. Επίδραση
του τρόπου εξαλίευσης”**

Παπαδοπούλου Αικατερίνη

Υπεύθυνος καθηγητής: Αικατερίνη Μούτου

ΛΑΡΙΣΑ 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ :

ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ): Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ: Καθηγητής Γενετικής Ζωικών πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας,

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αλιεύματα θεωρούνται από τα πιο ευπαθή προϊόντα. Είναι λοιπόν ιδιαίτερος σημαντικό να διασφαλιστεί η συντήρησή τους σε καλή ποιότητα για όσες περισσότερες μέρες είναι δυνατόν. Αυτό είναι κάτι που επιτυγχάνεται με τον σωστό χειρισμό μετά την αλίευση και την αποθήκευσή τους.

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν οι διαφορές του μικροβιώματος της επιφάνειάς του δέρματος του λαβρακιού, από την ημέρα εξαλίευσης μέχρι την ημέρα 4 της αποθήκευσης στους 4°C με διαφορετικές μεθόδους εξαλίευσης και συντήρησης. Οι τρόποι εξαλίευσης που εξετάστηκαν είναι η κλαστική μέθοδος αλίευσης με παγόνερο (C0), εξαλίευση με μίγμα slurry ice (S0). Επιπλέον εξετάστηκαν οι διαφορετικοί μέθοδοι αποθήκευσης σε πάγο (C4), slurry ice (S4), μίγμα πάγου και slurry ice σε ίσες ποσότητες (1:1) (50SC4) και τέλος θανάτωση σε slurry ice και αποθήκευση σε πάγο (CS4).

Για την ανίχνευση του μικροβιώματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αλληλούχισης επομένης γεννιάς (NGS) στην 16S περιοχή του γονιδιώματος.

Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 38 γένη βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων και ειδών που είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση και υποβάθμιση των τροφίμων και ιδιαίτερα των ιχθύων. Σε επίπεδο είδους ταυτοποιήθηκε πολύ μικρός αριθμός βακτηρίων. Στη μέθοδο εξαλίευσης με slurry ice εντοπίστηκε ο μεγαλύτερος αριθμός OTUs. Ο αριθμός των OTUs μειώθηκε σημαντικά κατά την τέταρτη μέρα της αποθήκευσης των ιχθύων σε όλες τις μεταχειρίσεις. Ο αριθμός των αλλοιογόνων βακτηρίων ήταν μικρότερος κατά τη συντήρηση σε slurry ice και σε πάγο όπου τα ποσοστά των *Shewanella* και *Pseudomonas* ήταν πολύ μικρότερα σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους.

Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται πάνω στην εξέλιξη του μικροβιώματος μετά την εξαλίευση των ιχθύων για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

ABSTRACT

Fish is considered one of the most perishable products in the food-market. To maximize quality it is therefore important to ensure fish are maintained at optimal conditions the maximum period of time. This can be achieved through appropriate handling and the right storage conditions after the fish slaughter.

The current thesis examined changes within the sea bass skin microbiome from the day of slaughter until day of storage (at 4°C).

The methods of slaughter examined are the classic method of slaughter using ice water (C0), slaughter with a mixture of slurry ice (S0). Additionally, the influence of different methods of long-term storage in ice (C4), in slurry ice (S4) and mixture of ice and slurry ice in 1:1 ratio (50SC4) and slaughter with slurry ice and storage in ice (CS4) were also examined.

The next generation sequencing (NGS) method in the 16S region of the genome was used to detect the microbiome.

A total of 38 genera of bacteria were identified, including species responsible for the deterioration and degradation of food, especially in fish. At species level, a very small number of bacteria were identified. The slurry ice extraction method revealed the largest number of OTUs. The number of OTUs decreased significantly during the fourth day of storage in all treatments. The number of spoilage bacteria was lower during the storage on slurry ice and ice where the ratio of *Shewanella* and *Pseudomonas* were much lower compared to the other methods.

Further studies are needed to facilitate in the building of a more accurate picture and draw safer conclusions on the post-slaughter evolution of the fish microbiome.

Περιεχόμενα

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά λαβρακιού	5
1.1.1Γεωγραφική εξάπλωση	5
1.1.2Εκτροφή λαβρακιού	6
1.2 Τρόποι εξαλίευσης	7
1.1.2 Θανάτωση σε παγόνερο	8
1.2.2 Θανάτωση με slurry ice.....	9
1.3 Αλλοίωση ιχθύων.....	9
1.3.1 Μικροβιακή αλλοίωση.....	9
1.3.2 Μικροβίωμα αλιευμάτων	10
1.4 Αποθήκευση αλιευμάτων σε πάγο	11
1.5Αποθήκευση σε slurry ice	11
1.6 Μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών	12
1.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR.....	14
1.6.2 16S του ριβοσωμικού RNA	14
1.6.3 Αλληλούχιση νέας γενιάς.....	15
2. ΣΚΟΠΟΣ	16
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	17
3.1 Συλλογή δειγμάτων	17
3.2 Απομόνωση DNA	17
3.3 Προσδιορισμός ποσότητας DNA ανά δείγμα	18
3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR.....	18
3.5 Ηλεκτροφόρηση.....	19
3.6 Αλληλούχιση νέας γενιάς και βιοπληροφορική ανάλυση.....	20
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	21
4.1 OTUs.....	21
4.2 Σύγκριση OTUs ανά μεταχείριση	23
4.3 Ταξινόμηση βακτηρίων σύμφωνα με το φύλο	27
4.4 Ταξινόμηση βακτηρίων σύμφωνα με το Γένος.....	28
4.6 Ταξινόμηση βακτηρίων σύμφωνα με το είδος.....	29
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	30
6.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	34
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	35

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά λαβρακιού

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) είναι παράκτιο θαλάσσιο ψάρι που ζει σε ρηχά νερά μέχρι 100 μέτρα. Είναι ένα ευρύθερμο και ευρύαλο είδος που επιβιώνει σε θερμοκρασίες 5 έως 28 °C και σε αλατότητες 0,5 ως 70‰. Επιπλέον είναι σαρκοφάγο αρπακτικό και τρέφεται με μικρού μεγέθους ψάρια, καβούρια γαρίδες και σουπιές. Συναντάται κυρίως σε εκβολές και λιμνοθάλασσες από τον Δεκέμβριο μέχρι και τον Μάρτιο καθώς την συγκεκριμένη περίοδο αναπαράγεται. Συνήθως κατά τη διάρκεια του χειμώνα μεταναστεύουν από την ακτή σε βαθύτερα νερά, όπου η θερμοκρασία είναι πιο σταθερή. Το λαβράκι χαρακτηρίζεται από επίμηκες σώμα καλυμμένο με λέπια μικρά και λεπτά και δυο ραχιαία πτερύγια (Εικόνα1). Το χρώμα του είναι ασημένιο προς γκρίζο. Στα νεαρά εντοπίζονται μαύρες κηλίδες στο πάνω μέρος του σώματος, σε αντίθεση με τα ενήλικα στα οποία οι κηλίδες αυτές δεν συναντώνται (FAO, 2020).

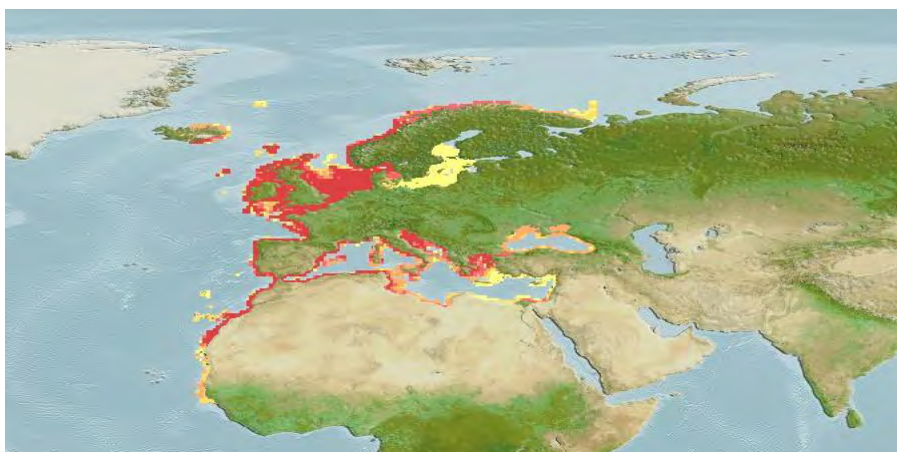


Εικόνα 1: Λαβράκι *Dicentrarchus labrax*

(<https://www.fishbase.se/photos/PicturesSummary.php?StartRow=8&ID=63&what=species&TotRec=15>)

1.1.1 Γεωγραφική εξάπλωση

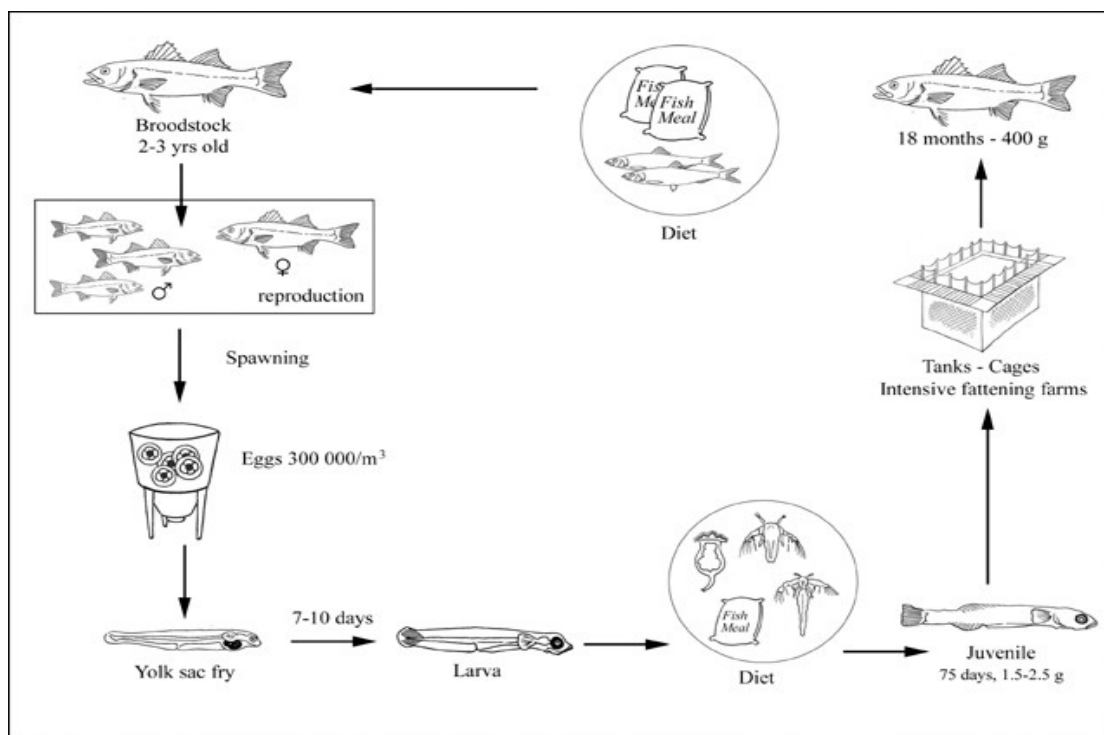
Στο φυσικό του περιβάλλον συναντάται στην Μεσόγειο και στην Μαύρη θάλασσα ενώ βρίσκεται και κατά μήκος των ανατολικών ακτών του Ατλαντικού, από την μεγάλη Βρετανία ως την Σενεγάλη (Εικόνα 2) (Fishbase, 2020).



Εικόνα 2: Γεωγραφική εξάπλωση Λαβρακιού (www.aquamaps.org)

1.1.2 Εκτροφή λαβρακιού

Το λαβράκι είναι από τα κύρια είδη εκτροφής της Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας. Η εξημέρωση του λαβρακιού είναι πολύ πρόσφατη και είναι το πρώτο μη σολωμοειδές θαλάσσιο είδος που καλλιεργήθηκε στην Ευρώπη (Bagni, 2005). Σήμερα είναι το σημαντικότερο εμπορικό ψάρι που καλλιεργείται ευρέως στις Μεσογειακές περιοχές. Η Ελλάδα, η Τουρκία, η Ιταλία, η Ισπανία, η Κροατία και η Αίγυπτος είναι οι μεγαλύτεροι παραγωγοί (FAO, 2020). Το λαβράκι έχει λευκή σάρκα, σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και υψηλή διατροφική αξία. Συμβάλει σημαντικά στην οικονομία καθώς μόνο το 2016 παρήχθησαν 87.189 τόνοι. Το 94% της συνολικής παραγωγής του προήλθε από την ιχθυοκαλλιέργεια. Συγκεκριμένα 81.852 τόνοι παρήχθησαν από την ιχθυοκαλλιέργεια έναντι 5.337 τόνων που προήλθαν από την αλιεία (EUMOFA, 2019). Η εκτροφή του λαβρακιού μπορεί να είναι εκτατική, ημι-εντατική και εντατική. Η εντατική εκτροφή περιλαμβάνει το στάδιο της γονιμοποίησης και εκκόλαψης αυγών ως την δημιουργία ιχθυδίων μεγέθους 1,5 έως 2 γραμμάρια. Η διαδικασία διαρκεί έως τρεις μήνες. Στη συνέχεια τα ιχθύδια μεταφέρονται σε δεξαμενές ή πλωτούς ιχθυοκλωβούς μέχρι να φτάσουν το εμπορεύσιμο μέγεθος περίπου 400-450 γραμμάρια όπου αυτό γίνεται σε 18 έως 24 μήνες (Εικόνα 3) (FAO, 2020).



Εικόνα 3: Εντατική εκτροφή λαβρακιού. Πηγή: FAO

1.2 Τρόποι εξαλίευσης

Τα τελευταία χρόνια ένας προβληματισμός των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας είναι να διατηρούν υψηλά επίπεδα ευζωίας. Διασφαλίζοντας την ευζωία στα καλλιεργούμενα ζώα αυξάνεται η παραγωγή, λόγω της μείωσης των ασθενειών και των θανάτων, καθώς επίσης και η ποιότητά του τελικού προϊόντος είναι πολύ καλύτερη (Turnbull & Huntingford, 2012).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός για την Υγεία των Ζώων (OIE) ορίζει ως ευζωία την καλή διαβίωση των ζώων όχι μόνο από άποψη σωματικής κατάστασης αλλά και της ψυχολογικής (Terrestrial Animal Health Code, 2018). Ένα ζώο με καλή διαβίωση είναι υγιές, ασφαλές, δεν υποφέρει από δυσάρεστες καταστάσεις όπως πόνο, φόβο, αγωνία και πείνα. Σημαντικό ρόλο πέρα από τις συνθήκες που ζει παίζουν και οι συνθήκες που θανατώνεται (Nunny, 2019).

Η διαδικασία θανάτωσης των ψαριών μπορεί να δημιουργήσει στρες στο ψάρι με αντίκτυπο και στην ποιότητα του φιλέτου. Για την αποφυγή αυτού θα πρέπει ο τρόπος που επιλέγεται να είναι γρήγορος και να αναισθητοποιεί το ψάρι. επίσης, απαιτείται και σωστά εκπαιδευμένο προσωπικό που να μπορεί να αντιλαμβάνεται την αναισθητοποίηση του ιχθύ (FAO, 2019). Οι τρόποι θανάτωσης είναι ποικίλοι

και διαφέρουν ως προς την ταχύτητα θανάτωσης. Οι καθιερωμένοι τρόποι θανάτωσης είναι:

1. Θανάτωση με ασφυξία
2. Θανάτωση με παγόνερο
3. Θανάτωση με παροχή CO₂ στο νερό
4. Θανάτωση με ηλεκτρισμό
5. Θανάτωση με χρήση αναισθητικών ουσιών
6. Θανάτωση σε υγρό πάγο (slurry ice)

Η θανάτωση με ηλεκτρισμό θεωρείται ένας μη επίπονος τρόπος με την προϋπόθεση όμως να αναισθητοποιείται σωστά το ψάρι αλλιώς μπορεί να γίνει πολύ επώδυνος (EFSA, 2002). Η παροχή CO₂ στο νερό αποτελεί μια μη αποδεκτή μέθοδο για το λόγο ότι αυξάνει τα επίπεδα του στρες (Grans et al., 2016). Επίσης η χρήση αναισθητικών έχει χρησιμοποιηθεί μόνο πειραματικά, παρόλο που έχει θετικά αποτελέσματα στην μείωση του στρες κατά την θανάτωση, απαγορεύεται ωστόσο από την νομοθεσία καθώς υπάρχουν κίνδυνοι που σχετίζονται με τη χρήση χημικών (EFSA 2009).

Η θανάτωση με παγόνερο προκαλεί υποθερμία και ανοξία στο ψάρι (Ashley, 2007). Η ασφυξία προκαλεί έντονο στρες και επηρεάζει την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Οι συνέπειες αυτές καθιστούν και τις δυο μεθόδους επίπονες (EFSA, 2002).

1.1.2 Θανάτωση σε παγόνερο

Η θανάτωση σε παγόνερο αποτελεί τον πιο διαδεδομένο τρόπο θανάτωσης στην εκτροφή λαβρακιού. Τα ψάρια κατά την εξαλίευσή τους τοποθετούνται σε ένα μείγμα νερού πάγου σε αναλογία ένα προς ένα. Η ψύξη των ψαριών καθώς και η απότομη αλλαγή της θερμοκρασίας προκαλεί παράλυση των μυών χωρίς όμως απαλλαγή από τον πόνο, ενώ σε διάφορα είδη ψαριών παρατηρήθηκε και αυξημένη ταχυκαρδία που υποδηλώνει έντονο στρες (Lambooij et. al, 2015).

1.2.2 Θανάτωση με slurry ice

Το slurry ice είναι ένα εναιώρημα θρυμματισμένου πάγου σε θαλασσινό νερό. Ο θρυμματισμένος πάγος έχει διάμετρο 250–500 μm. Το διάλυμα αυτό έχει την μορφή «τζελ» επιτρέποντας έτσι την καλύτερη επαφή με το ψάρι και την ομοιόμορφη μεταφορά θερμοκρασίας σε αυτό (Keys et.al., 2017).

Τα περισσότερα εκτρεφόμενα ψάρια, θανατώνονται χωρίς προηγούμενη αναισθητοποίηση με ασφυξία ή με υποθερμία σε slurry ice ή σε παγόνερο (Lines & Spence, 2014). Η έκθεση στον αέρα για 3 λεπτά έχει σαν αποτέλεσμα σημαντική αύξηση των επιπέδων κορτιζόλης τόσο στο ευρωπαϊκό λαβράκι όσο και στην τσιπούρα. Ωστόσο, η ασφυξία σε slurry ice προκαλεί λιγότερο στρες από την ασφυξία στον αέρα (Bagni et.al, 2006).

1.3 Αλλοίωση ιχθύων

Με τον όρο αλλοίωση ενός τρόφιμου αναφερόμαστε στην μείωση της ποιότητας των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του, που έχει ως αποτέλεσμα να καθιστούν το τρόφιμο ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση (Rawat, 2015). Τα αλιεύματα είναι από τα πιο ευαλλοιώτα τρόφιμα και ένας από τους λόγους είναι ότι το δέρμα τους παραμένει σε επαφή με τη σάρκα τους και έτσι παραμένουν όλα τα βακτήρια που υπάρχουν στην επιφάνεια της (Gram & Huss, 1996).

Το πόσο θα αλλοιωθεί εξαρτάται από το είδος του αλιεύματος, τις συνθήκες αποθήκευσης και επεξεργασίας (Sivertsvik et al., 2002). Κύριες αιτίες της αλλοίωσης είναι η μικροβιακή δράση, οι χημικές δράσεις, η δράση ενδογενών ενζύμων και η προσβολή από έντομα και τρωκτικά (Huis in't Veld, 1996).

Για τα νωπά αλιεύματα η μικροβιακή δράση είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες υποβάθμισης και μειώνει και την διάρκεια ζωής τους (Gram & Dalgaard, 2002).

1.3.1 Μικροβιακή αλλοίωση

Με τον όρο μικροβιακή αλλοίωση εννοούμε την δραστηριότητα του μικροβιακού πληθυσμού που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ανεπιθύμητων οσμών, αλλαγές

στο χρώμα και την γεύση. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στην παραγωγή ουσιών που είναι αποτέλεσμα της μεταβολικής δράσης των βακτηρίων. Τα βακτήρια αυτά είναι μέρος του μικροβιώματος των ιχθύων και ονομάζονται ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (Gram & Dalgard, 2002). Στην αρχή, αμέσως μετά την αλίευση βρίσκονται σε μικρό αριθμό, στην συνέχεια όμως κατά την διάρκεια της συντήρησης αναπτύσσονται με μεγαλύτερο ρυθμό. Η κυριαρχία συγκεκριμένων μικροοργανισμών εξαρτάται από το είδος του ψαριού, την γεωγραφική προέλευση του, την σύνθεση του αρχικού μικροβιώματος, μικροβιακές αλληλεπιδράσεις, την επιμόλυνση κατά την αλιεία, αποθήκευση, διανομή και αποθήκευση (Parlapani et al., 2018).

1.3.2 Μικροβίωμα αλιευμάτων

Οι μικροοργανισμοί στο φρέσκο ψάρι συναντώνται κυρίως στο δέρμα, στα βράγχια και στο πεπτικό σύστημα. Οι εσωτερικοί ιστοί είναι μικροβιολογικά στείροι. Το επιφανειακό μικροβίωμα τους εξαρτάται από το φυσικό περιβάλλον του ψαριού και σε μερικές περιπτώσεις από την κάθετη μετάδοση, δηλαδή από τον γεννήτορα στο ιχθύδιο (Beemelmans et al. 2019). Επιπρόσθετα, το πόσο καθαρά είναι τα ύδατα καθώς και η θερμοκρασία τους επηρεάζει το μικροβιακό φορτίο των ψαριών. Στα κρύα ύδατα ο αριθμός των βακτηρίων είναι μικρότερος από ότι στα θερμά (Larsen et.al., 2013).

Μετά την εξαλίευση, η απενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος επιτρέπει στα βακτήρια να πολλαπλασιαστούν ελεύθερα. Κατά την αποθήκευση όταν το δέρμα δεν αφαιρείται τα βακτήρια προσβάλλουν την σάρκα. Δεδομένου ότι μόνο ένας μικρός αριθμός οργανισμών εισβάλλει στη σάρκα των ψαριών και η μικροβιακή αύξηση πραγματοποιείται κυρίως στην επιφάνεια τους, η αλλοίωση είναι πιθανώς σε μεγάλο βαθμό συνέπεια των βακτηριακών ενζύμων που διαχέονται στη σάρκα τους. Οι ουσίες που υπάρχουν στο δέρμα (πολυσακχαρίτες, ελεύθερα αμινοξέα, οξείδια της τριμεθυλαμίνης κτλ) βοηθάνε την ανάπτυξη αλλοιογόνων βακτηρίων (Jay, 2005).

Το μικροβίωμα των ιχθύων στα εύκρατα κλίματα αποτελείται κυρίως από Gram αρνητικά βακτήρια. Τα πιο συνηθισμένα είναι *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Sewanella*, *Moraxella*, *Vibrio* και *Aeromonas* (Gram & Dalgaard, 2002) καθώς και

Gram θετικών οργανισμούς όπως *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Coryneforms* και *Clostridium*. Σε αντίθεση, στην βόρεια Ευρώπη συναντώνται ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί όπως *Photobacterium* και *Shewanella* (Ross et al., 2019).

1.4 Αποθήκευση αλιευμάτων σε πάγο

Η αποθήκευση των νωπών ιχθύων σε πάγο αμέσως μετά την αλίευση είναι ο πιο διαδεδομένος τρόπος αποθήκευσης. Η αποθήκευση σε πάγο δεν αναστέλλει αλλά επιβραδύνει την μικροβιακή ανάπτυξη και την ενζυμική δραστηριότητα (Kaale et.al., 2011).

Η αποθήκευση σε θερμοκρασίες από -5°C έως 5°C ευνοούν κυρίως την ανάπτυξη ψυχρόφιλων και ψυχρότροφων βακτηρίων λόγω της αντοχής τους στις χαμηλές θερμοκρασίας. Η διάρκεια εμπορικού χρόνου ζωής είναι 14 ημέρες για τα αλιεύματα (Mendes, 2017), ενώ λόγω της επικράτησης ψυχρόφιλων βακτηρίων στο τέλος συναντώνται βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* και το είδος *Shewanella* κυρίως στα μεσογειακά ψάρια (Tryfinopoulou, 2007).

1.5 Αποθήκευση σε slurry ice

Η τεχνολογία του slurry ice έχει δείξει πολλά πλεονεκτήματα έναντι του συμβατικού πάγου για την αποθήκευση αλιευμάτων. Σε πολλές μελέτες έχει αναφερθεί ότι έχει σημαντικές ανασταλτικές ιδιότητες στους μικροβιολογικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αλλοίωση των ιχθύων. Με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά η διάρκεια ζωής των αλιευμάτων (Lozada et. al, 2015). Τα κυριότερα πλεονεκτήματα του που πρέπει να επισημανθούν είναι ότι το ψάρι ψύχεται πιο γρήγορα λόγω της πιο γρήγορης ανταλλαγής θερμότητας. Επιπλέον, μειώνεται η σωματική βλάβη που προκαλείται στην σάρκα των ψαριών από τον κοινό πάγο καθώς αποτελείται από μικροσκοπικά σφαιρικά σωματίδια. Τέλος, η πλήρης κάλυψη της επιφάνειας του ιχθύος το προστατεύει από την δράση του οξυγόνου με αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση της οξειδωσης και αφυδάτωσης. Το μίγμα πάγου επιτρέπει ένα πιο υγιεινό χειρισμό ψαριών και μια αυτοματοποιημένη διαδικασία. Ένα άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα του πάγου

είναι ότι μπορεί να συνδυαστεί με άλλα πρόσθετα για διαφορετικούς σκοπούς όπως για παράδειγμα το όζον με σκοπό να επιτευχθεί καλύτερος μικροβιακός έλεγχος (Huidobro et. al, 2002).

1.6 Μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών

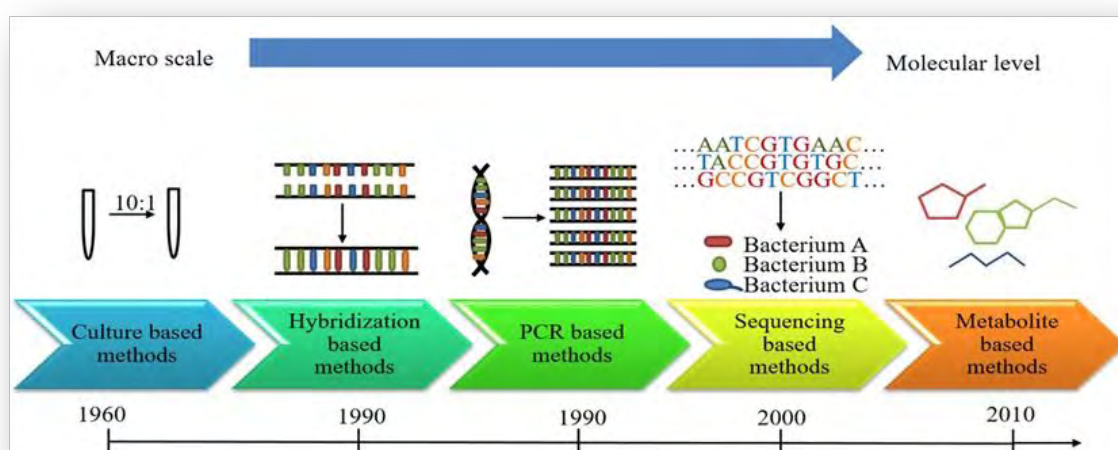
Τα τελευταία χρόνια για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών χρησιμοποιούνται μη καλλιεργητικές και μοριακές μέθοδοι σε αντίθεση με τα προηγούμενα χρόνια που ο κυρίως τρόπος ανίχνευσης μικροοργανισμών επικεντρωνόταν στις καλλιεργητικές μεθόδους.

Οι καλλιεργητικές μέθοδοι υπήρξαν ευρέως διαδεδομένες για αρκετά χρονιά ως ένα φθινό εργαλείο ανίχνευσης της μικροβιακής κοινότητας. Η αναπαραγωγικότητα των αποτελεσμάτων, ο έλεγχος εξωτερικών μεταβλητών, ο απλός σχεδιασμός τους και το χαμηλό κόστος τους αποτελούν τα πλεονεκτήματα αυτών των μεθόδων. Παρόλα αυτά υπάρχουν αρκετοί περιορισμοί που συνδέονται με τη χρήση των μεθόδων αυτών με τον σημαντικότερο να είναι η μη δυνατότητα ανίχνευσης όλων των μικροοργανισμών (Law et al. 2014). Έχει αναφερθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία ότι η χαμηλή ειδικότητα και ευαισθησία της μεθόδου μπορεί να οδηγήσει σε ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές και σε ψευδή αποτελέσματα (Lee et al. 2014; Coşkuner 2002 et al. 2002). Επίσης, υπάρχουν μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται δύσκολα ή καθόλου ή έναντι κάποιων άλλων στα καλλιεργητικά μέσα (Gartza & Dutih, 2015). Οι παραδοσιακές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια βακτηρίων εστιάζονται στη χρήση πλούσιων σε θρεπτικά συστατικά μέσα και στη δημιουργία ενός περιβάλλοντος που ωφελεί τα είδη ταχείας ανάπτυξης (Stewart & Growing, 2012). Ωστόσο, τα υποστρώματα μπορεί να είναι τοξικά σε μερικά βακτήρια καθώς και το άγαρ που χρησιμοποιείται ως συστατικό στερεοποίησης, μπορεί να αναστείλει την αναπαραγωγή μικροοργανισμών (Gans, 2005).

Εν αντιθέτως οι μη καλλιεργητικές μέθοδοι είναι πιο ακριβείς, επιτρέπουν το χειρισμό μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων, είναι πιο γρήγορες και χρησιμοποιούνται για καλλιεργήσιμα και μη καλλιεργήσιμα βακτήρια. Ωστόσο,

αρκετές παγίδες, όπως ψευδώς θετικά δείγματα, έχουν παρατηρηθεί, δημιουργώντας την ανάγκη να ερμηνευθούν τα αποτελέσματα με προσοχή (Fenolar, 2008).

Στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 4) φαίνεται η εξέλιξη στη χρήση διαφόρων τεχνικών για τη διερεύνηση μικροοργανισμών: Μέθοδοι με βάση την καλλιέργεια, μέθοδοι που βασίζονται σε υβριδισμό, μέθοδοι που βασίζονται σε PCR, μέθοδοι αλληλούχισης και μέθοδοι που βασίζονται στην ανίχνευση μεταβολιτών (Kotu et.al, 2019).



Εικόνα 4: Ιστορική αναδρομή μεθόδων ανίχνευσης μικροοργανισμών Πηγή: (Kotu et.al, 2019).

Οι μέθοδοι καλλιέργειας έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τον εντοπισμό μικροοργανισμών. Ωστόσο, με την εξέλιξη της μοριακής βιολογίας οι μοριακές τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, ο υβριδισμός και η αλληλούχιση χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με μικροβιακές κοινότητες καθώς είναι και πιο γρήγορες. Ωστόσο αν και είναι ωφέλιμες, αυτές οι μέθοδοι απαιτούν κατάλληλα και περίπλοκα πρωτόκολλα και έχουν υψηλότερο κόστος. Τέλος οι μέθοδοι που βασίζονται στους μεταβολίτες είναι σχετικά καινούργιες. Σε αυτές τις μεθόδους ανήκουν η φασματοσκοπία μάζας και η χρωματογραφία. Η φασματοσκοπία μάζας είναι μια τεχνολογία που επιτρέπει των

διαχωρισμών ουσιών ενός δείγματος. Αυτό επιτυγχάνεται με τον ιονισμό του δείγματος ώστε τα ιόντα να διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο και να ανιχνεύονται σύμφωνα με το ιοντικό ρεύμα. Ενώ η χρωματογραφική μέθοδος για τον διαχωρισμό των ουσιών βασίζεται στις διαφορετικές βιοφυσικές ιδιότητες τους (π.χ. υδροφοβικότητα). Οι μεταβολικές μέθοδοι χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία και το κόστος τους είναι χαμηλό (Kotu et.al, 2019).

1.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR

Η PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) χρησιμοποιείται για να συνθέσει και να ενισχύσει ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA του μικροοργανισμού (Oliveira et al., 2011, Satoh et al., 2009) σε γονίδια όπως το 16S ριβοσωμικό rRNA που υπάρχει σε πολλούς οργανισμούς και διαφοροποιείται ανάλογα το είδος (Ludwig & Klenk, 2005). Μετά την PCR, οι ενισχυμένες περιοχές αλληλουχούνται και τα δεδομένα χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση των οργανισμών που υπάρχουν στο δείγμα (Teng et al., 2008).

1.6.2 16S του ριβοσωμικού RNA

Συνήθως, η διερεύνηση του μικροβιακού πληθυσμού σε προϊόντα διατροφής γίνεται με μεθόδους αλληλούχισης νέας γενιάς (new generation sequencing, NGS). Για την ταξινομική περιγραφή της μικροβιακής κοινότητας χρησιμοποιούνται τα δεδομένα από την αλληλούχιση της 16S rRNA περιοχή τους. Η ταξινομική ανάλυση απαιτεί μια βάση δεδομένων αναφοράς στην οποία αντιστοιχίζονται οι αλληλουχίες με βάση την ομοιότητα τους (Alessandria et al., 2016). Το 16S rRNA είναι ριβονουκλεϊκό οξύ, τμήμα της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας 30S του προκαρυωτικού ριβοσώματος (Caporaso et al. 2011) Αποτελείται από 1542 βάσεις και συναντάται σε όλα τα βακτήρια. Χάριν του μικρού μεγέθους μπορεί να αντιγραφεί και να αλληλουχηθεί σε μικρό χρόνο και με χαμηλό κόστος. Η 16S περιοχή αποτελείται από τις συντηρημένες περιοχές και από 9 περιοχές (V1-V9) οι οποίες είναι μεταβλητές και διαφέρουν μεταξύ των βακτηριών. Οι μεταβλητές αυτές περιοχές χρησιμοποιούνται στην αναγνώριση και στην διάκριση των

βακτηρίων (Chakravorty, 2007). Οι συντηρημένες περιοχές στοχεύονται για την δημιουργία εκκινητών καθολικής χρήσης (Clarridge, 2004). Τα πλεονεκτήματα της 16S rRNA είναι ότι υπάρχει σχεδόν σε όλα τα βακτήρια. Η λειτουργία της με την πάροδο του χρόνου δεν έχει αλλάξει και το μέγεθος του γονιδίου επαρκεί για σκοπούς βιοπληροφορικής ανάλυσης. Το 16S rRNA γονίδιο είναι ένα καλά μελετημένο γονίδιο στο βακτηριακό γονιδίωμα και χρησιμοποιείται σε πολλές μελέτες (Janda & Abbott, 2007).

Η διαδικασία για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών μετά την αλληλούχιση της 16S RNA περιοχής περιλαμβάνει την ομαδοποίηση των αλληλουχιών και την σύγκριση με μια βάση δεδομένων. Για την ομαδοποίηση των αλληλουχιών χρησιμοποιούνται δυο μέθοδοι. Η μέθοδος που βασίζεται στην ομαδοποίηση σε λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) και η φαινοτυπική κατηγοριοποίηση όπου ομαδοποιούνται σύμφωνα με τον φαινότυπο. Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι και οι δυο μέθοδοι παρουσιάζουν μειονεκτήματα. Αρχικά στην φαινοτυπική μέθοδο υπάρχει ο κίνδυνος της λάθος εκτίμησης καθώς υπάρχουν οργανισμοί με τον ίδιο φαινότυπο που ανήκουν σε διαφορετικές ταξινομικές ομάδες και οργανισμοί που έχουν διαφορετικούς φαινότυπους και ανήκουν στο ίδιο είδος (Schloss & Westcott, 2010). Αντίθετα η ομαδοποίηση χαμηλής ποιότητας αλληλουχιών μπορεί να παράγει ψευδή OTUs οδηγώντας σε υπερεκτίμηση των μικροοργανισμών που υπάρχει στο δείγμα (Albanese et al., 2015).

1.6.3 Αλληλούχιση νέας γενιάς

Το 1977 ο Sanger ανέπτυξε την μέθοδο αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος με την τεχνική τερματισμού της αλυσίδας (chain termination). Λόγω της υψηλής απόδοσης της μεθόδου και της χαμηλής ραδιενέργειας που απαιτούνταν έγινε η πιο δημοφιλής μέθοδος. Η μέθοδος του Sanger ονομάζεται αλληλούχιση πρώτης γενιάς. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για 30 χρόνια και συνέβαλε στην αλληλούχιση ολόκληρου του ανθρώπινου γονιδιώματος το 2004. Στην συνέχεια όμως το 2005 άρχισαν να αναπτύσσονται καινούριες μέθοδοι αλληλούχισης γνωστές και ως αλληλούχιση νέας γενιάς (Liu et. Al., 2012). Τα πλεονέκτημά που είχαν αυτές σε σχέση με την μέθοδο του Sanger είναι ότι δεν χρειάζεται η δημιουργία κλώνων τμημάτων DNA με βακτηριακά πλασμίδια. Οι

αλληλουχίσεις γίνονται παράλληλα και το αποτέλεσμα της αλληλούχισης δεν χρειάζεται ηλεκτροφόριση (Heather & Chain., 2016).

Η πρώτη NGS τεχνολογία που δημιουργήθηκε το 2005 ήταν η μέθοδος της πυροαλληλούχισης (pyrosequencing) από την εταιρία 454 Life Science. Η κύρια διαφορά από την κλασική αλληλούχιση Sanger είναι ότι η πυροαλληλούχιση βασίζεται στην ανίχνευση της έκλυσης πυροφωσφορικού κατά την ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων αντί για την ανίχνευση του τερματισμού της αλυσίδας μέσω της χρήσης ραδιο- ή φθορίζοντος-σημαντων dNTPs ή ολιγονουκλεοτιδίων (Oulas et al., 2015).

Μια σειρά από παράλληλες τεχνικές προσδιορισμού αλληλουχίας αναδύθηκαν μετά την επιτυχία του 454. Η πιο σημαντική μεταξύ αυτών είναι αναμφισβήτητα η μέθοδος αλληλοίχισης Solexa, η οποία αργότερα αποκτήθηκε από την Illumina. Η Illumina θεωρείται ιδανική για την αλληλούχιση μικρότερων σε μέγεθος τμημάτων DNA όπως αυτών που παράγονται από την χρήση του μοριακού δείκτη 16S rRNA. Η μέθοδος αυτή θεωρείται ιδανική καθώς έχει χαμηλό κόστος και περιορίζει τα συστηματικά λάθη (Heather & Chain., 2016).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής είναι να διερευνηθούν οι διαφορές του μικροβιώματος της επιφάνειάς του δέρματος του λαβρακιού, από την ημέρα εξαλίευσης μέχρι την ημέρα 4 της αποθήκευσης στους 4°C με διαφορετικές μεθόδους εξαλίευσης και συντήρησης. Οι τρόποι εξαλίευσης που εξετάζονται είναι η κλασική μέθοδος αλίευσης με παγόνη, εξαλίευση με μίγμα slurry ice, και μίξη πάγου και slurry ice σε ίσες ποσότητες (1:1). Οι μέθοδοι εξαλίευσης συνδυάζονται με διαφορετικές μεθόδους αποθήκευσης σε πάγο, slurry ice ή μίγμα πάγου και slurry ice.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα ελήφθησαν από την εταιρία Philosofish στις 17/10/2019 (θερμοκρασία νερού 22.3°C). Τα ψάρια αλιεύθηκαν με τρεις τρόπους παγόνερο, slurry ice, μίξη πάγου με slurry ice (1:1) και έγιναν δειγματοληψίες για τον προσδιορισμό του μικροβιώματος την ημέρα της εξαλίευσης (ημέρα 0) και τέσσερις μέρες μετά την εξαλίευση (ημέρα 4). Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία είναι 69.

3.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε από δείγματα που λήφθηκαν με νυστέρι από την επιφάνεια του δέρματος του λαβρακιού. Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκε 200μl NaCl 5M με σκοπό την λύση των κυτταρικών μεμβρανών για να ελευθερωθεί το DNA στο διάλυμα. Προστέθηκαν 40μl διαλύματος λυσοζύμης καθώς αυτό το ένζυμο δρα στα Gram+ βακτήρια και λύει τις δομές τους και το δείγμα παρέμεινε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της μισής ώρας προστέθηκαν 50 μl πρωτεΐνάσης K (200 mg/ μl) και 350μl lysis buffer από το PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Cat No K182002) για τον διαχωρισμό του DNA από πρωτεΐνες και άλλα κυτταρικά υπολείμματα. Τα δείγματα επώαστηκαν για μια ώρα σε θερμοκρασία 55⁰C στην οποία δρα βέλτιστα η πρωτεΐνάση K. Έπειτα ομογενοποιήθηκαν με glass beads για 3 λεπτά σε ταχύτητα 8000rpm και στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 10000 στροφές. Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το PureLink DNA Purification Kit της εταιρίας ThermoFisher Scientific σύμφωνα με τις οδηγίες. Ο τελικός όγκος έκλουσης ήταν τα 30μl TE

ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ TE BUFFER

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (ΓΙΑ 100 mL)	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
EDTA (0.5 M, Ph 8.0)	0.2 mL	1 mM
Tris-Cl (1M , Ph 8.0)	1 mL	10 mM
H ₂ O	Μέχρι 100 mL	

3.3 Προσδιορισμός ποσότητας DNA ανά δείγμα

Για να προσδιοριστεί η ποσότητα του DNA που απομονώθηκε κάθε δείγμα φωτομετρήθηκε. Για την φωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο της εταιρίας Biorad. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 260 nm στο οποίο τα νουκλειικά οξέα έχουν την μέγιστη απορρόφηση. Το δείγμα για την φωτομέτρηση αραιώθηκε 50 φορές. Με την μέθοδο της φωτομέτρησης προσδιορίστηκε και η καθαρότητα του DNA από τις πρωτεΐνες. Για την εκτίμηση της καθαρότητας μετρήθηκε η απορρόφηση στα 260 nm και στα 280 nm με αποδεκτές τιμές λόγου 260/280 ~ 1.8.

3.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – PCR

Μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό του απομονωμένου DNA ακολούθησε η ενίσχυση της 16s περιοχής του βακτηριακού DNA με κατάλληλους εκκινητές με στόχο τον έλεγχο της επιτυχίας της απομόνωσης. Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Forward: 341F CCTACGGGNGGCWGCAG

Reverse: 805R GACTACHVGGGTATCTAATCC

Με τους συγκεκριμένους εκκινητές ενισχύεται μια περιοχή με μήκος 450bp (ζεύγη βάσεων) μεταξύ των V3-V4 υπερμεταβλητών περιοχών του γονιδίου που κωδικοποιεί την 16S ριβοσωμική υπομονάδα των βακτηρίων.

Η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 50μl. Το δείγμα DNA που χρησιμοποιήθηκε στην PCR ήταν αραιωμένο 1:100 (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Αναλυτικές συγκεντρώσεις του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε στην PCR

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ
DNA	2μl
Primers 100 pmol/μl	1 μl forward + 1 μl reverse

Buffer 10x + 1.5 mM MgCl ₂	5 μl
dNTPs 10mM	5 μl
MgCl ₂ 25mM	5 μl
Taq πολυμεράση 5 units	0.2 μl
ddH ₂ O	30.8 μl

Η διαδικασία ενίσχυσης περιλαμβάνει:

1. Στάδιο αποδιάταξης: Σε αυτό το στάδιο σπάνε οι δεσμοί των δυο αλυσίδων του DNA και προκύπτουν δυο μονόκλωνες αλυσίδες. Η διαδικασία αυτή γίνεται σε θερμοκρασία 95°C.
2. Στάδιο σύνδεσης εκκινητών: Σε αυτό το στάδιο προσδένονται οι εκκινητές στο 3' και στο 5' άκρο αντίστοιχα. Η διαδικασία αυτή γίνεται σε θερμοκρασία 53°C.
3. Στάδιο επιμήκυνσης: Σε αυτό το στάδιο η θερμοκρασία φτάνει στους 72°C και η πολυμεράση ξεκινάει την διαδικασία αντιγραφής.

Στην συνέχεια προσδιορίζονται ποιοτικά τα προϊόντα της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v για να βεβαιωθεί ότι πραγματοποιήθηκε η αντίδραση και δεν υπήρξε επιμόλυνση.

3.5 Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια διαδομένη τεχνική για τον διαχωρισμό και την ανάλυση νουκλεϊκών οξέων. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων κατά μήκος πηκτής αγαρόζης στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Ο διαχωρισμός των μορίων γίνεται κατά κύριο λόγο ανάλογα με το μέγεθός τους.

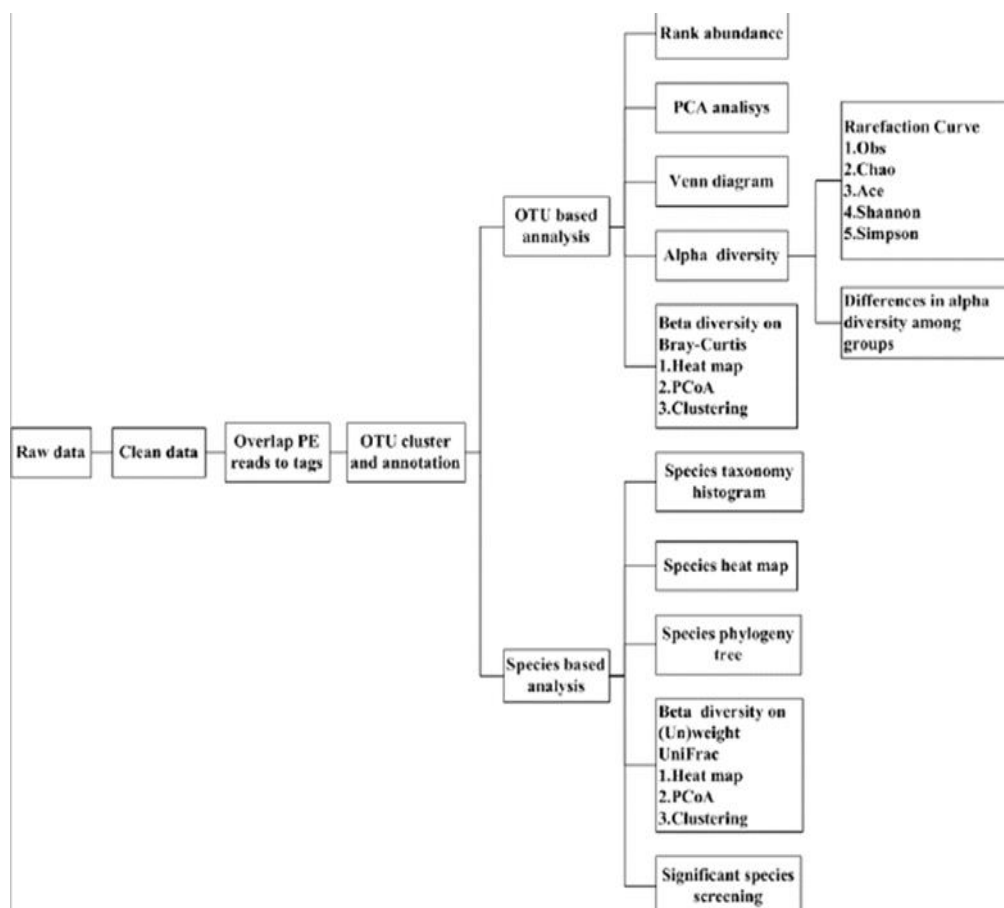
Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης χωρίζεται σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο γίνεται η παρασκευή της πηκτής αγαρόζης. Στο δεύτερο τοποθετούνται τα δείγματα στις θέσεις υποδοχής πάνω στην πηκτική και εφαρμόζεται η κατάλληλη ηλεκτρική τάση και η βέλτιστη χρονική περίοδο για τον διαχωρισμό των μορίων DNA. Και στο τρίτο στάδιο παρατηρούνται τα αποτελέσματα σε πλάκα UV.

Για την δημιουργία του gel αγαρόζης 2% w/v διαλύονται 1.0 g αγαρόζης σε 50 ml TAE. Στην συνέχεια προστίθενται 4 μl χρωστική Expert green και τοποθετείται σε ειδικά καλούπια ηλεκτροφόρησης μέχρι να στερεοποιηθεί.

Αφού στερεοποιηθεί μεταφέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρισης και εκεί κάθε πηγάδι της πηκτής φορτώνεται με 8μl δείγμα 5μl χρωστική. Τέλος, η ηλεκτροφόρηση εκτελείται σε 150V περίπου για 15 λεπτά. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρατηρούνται σε πλάκα UV.

3.6 Αλληλούχιση νέας γενιάς και βιοπληροφορική ανάλυση

Τα δείγματα που απομονώθηκαν, ομαδοποιήθηκαν ανά μέθοδο, ανά ημέρα και στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρία BGI. Τα ομαδοποιημένα δείγματα που στάλθηκαν ήταν 7. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε σε HiSeq2500, PE300 και χρησιμοποιήθηκαν 100000 tag sequences. Η αλληλούχιση στόχευε στις ευμετάβλητες περιοχές του 16s rDNA V3~V4. Η Βιοπληροφορική ανάλυση που ακολουθήθηκε φαίνεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5. Pipeline Βιοπληροφορικής ανάλυσης που ακολουθήθηκε

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

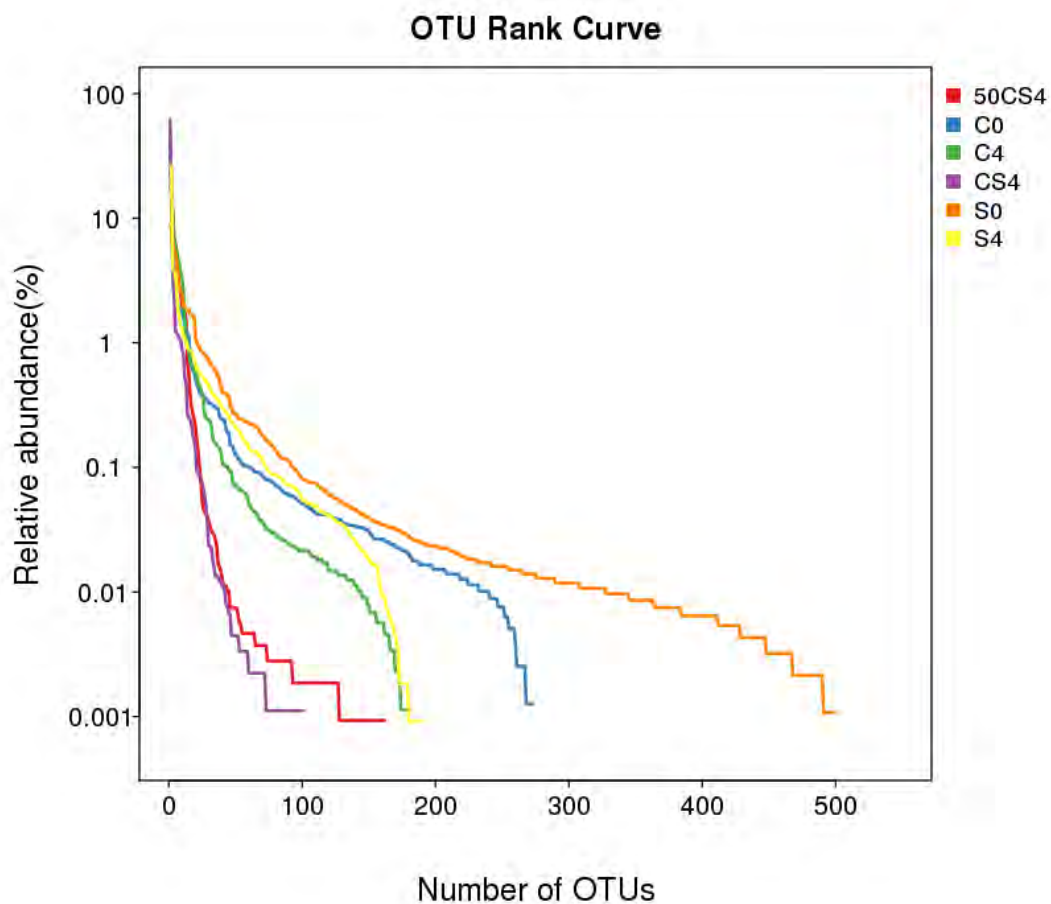
4.1 OTUs

Η αλληλούχιση των έξι δειγμάτων είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση 1408 OTUs συνολικά. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) απεικονίζεται ο αριθμός των αλληλουχιών και των OTUs για κάθε δείγμα.

Πίνακας 2. Αριθμός αλληλουχιών και OTUs ανά δείγμα

Κωδικός Δείγματος	Θανάτωση	Συντήρηση	Ημέρες μετά την εξαλίευση	Αριθμός αλληλουχιών	Αριθμός OTUs
C0	Πάγος	-	0	78960	273
S0	Slurry ice	-	0	93260	500
C4	Πάγος	Πάγος	4	88192	181
S4	Slurry ice	Slurry ice	4	109258	191
CS4	Slurry ice	Πάγος	4	89785	101
50CS4	1:1 Slurry ice / πάγος	Πάγος	4	107423	162

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι τα περισσότερα OTUs κατά την εξαλίευση παρατηρούνται στην θανάτωση με slurry ice (S0) (500), ενώ στην θανάτωση με πάγο (C0) τα OTUs είναι σχεδόν τα μισά (273). Τα OTUs μειώθηκαν κατά την τέταρτη ημέρα αποθήκευσης σε όλες τις μεταχειρίσεις. Μικρότερος ήταν ο αριθμός στην θανάτωση σε slurry ice και αποθήκευση σε πάγο την ημέρα 4 (CS4) (101). Αναλυτικά απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 6).

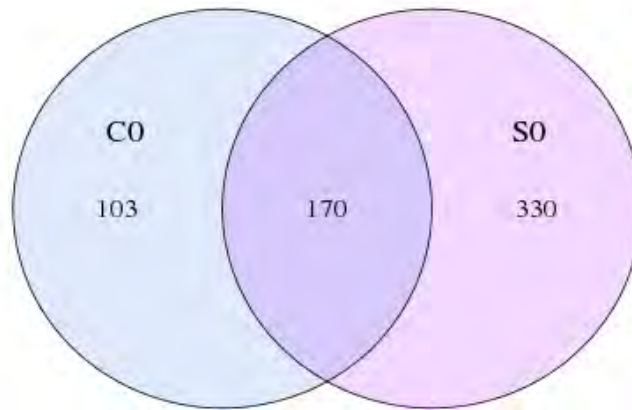


Εικόνα 6. Αριθμός OTUs και σχετική αφθονία. 50CS4: Μέρα 4 σε 1:1 slurry- πάγο, C0: Θανάτωση σε πάγο μέρα μηδέν, C4: Μέρα τέσσερα σε πάγο, CS4: Θανάτωση σε slurry ice και αποθήκευση σε πάγο μέρα 4, S0: Θανάτωση σε slurry ice μέρα μηδέν, S4: Μέρα 4 σε slurry ice.

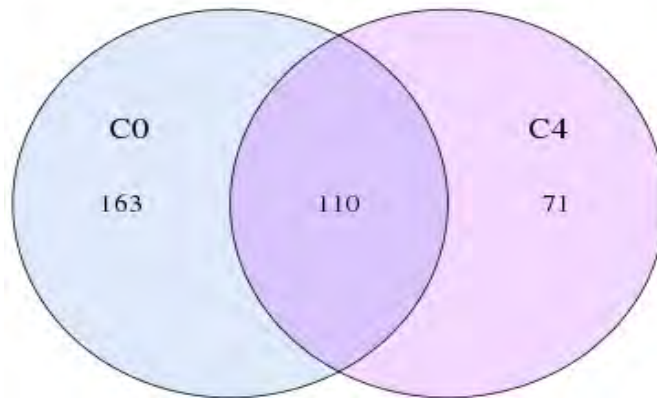
4.2 Σύγκριση OTUs ανά μεταχείριση

Τα κοινά OTUs ανά μεταχείριση φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα Venn (Εικόνες 7-9). 170 κοινά OTUs ανιχνεύτηκαν στο δέρμα των ιχθύων που θανατώθηκαν με πάγο και με slurry ice (Εικόνα 7). Δηλαδή το 37% των συνολικών OTUs των ιχθύων που θανατώθηκαν με slurry ice ήταν κοινά με τα OTUs της μεταχείρισης CO. Ενώ το 62% των συνολικών OTUs της μεταχείρισης CO ήταν κοινά με την μεταχείριση S0.

Μείωση των OTUs παρατηρήθηκε μεταξύ της ημέρας μηδέν και της ημέρας τέσσερα σε εξάλειψη και αποθήκευση σε πάγο (Εικόνα 8). Τα κοινά OTUs είναι 110 ενώ το ποσοστό των κοινών OTUs ανά των συνολικών για την μέρα μηδέν και την μέρα 4 είναι 63% και 60%.



Εικόνα 7. Κοινά OTUs μεταξύ της θανάτωσης με πάγο (C0) και της θανάτωσης με slurry ice (S0) την ημέρα της εξαλίευσης.



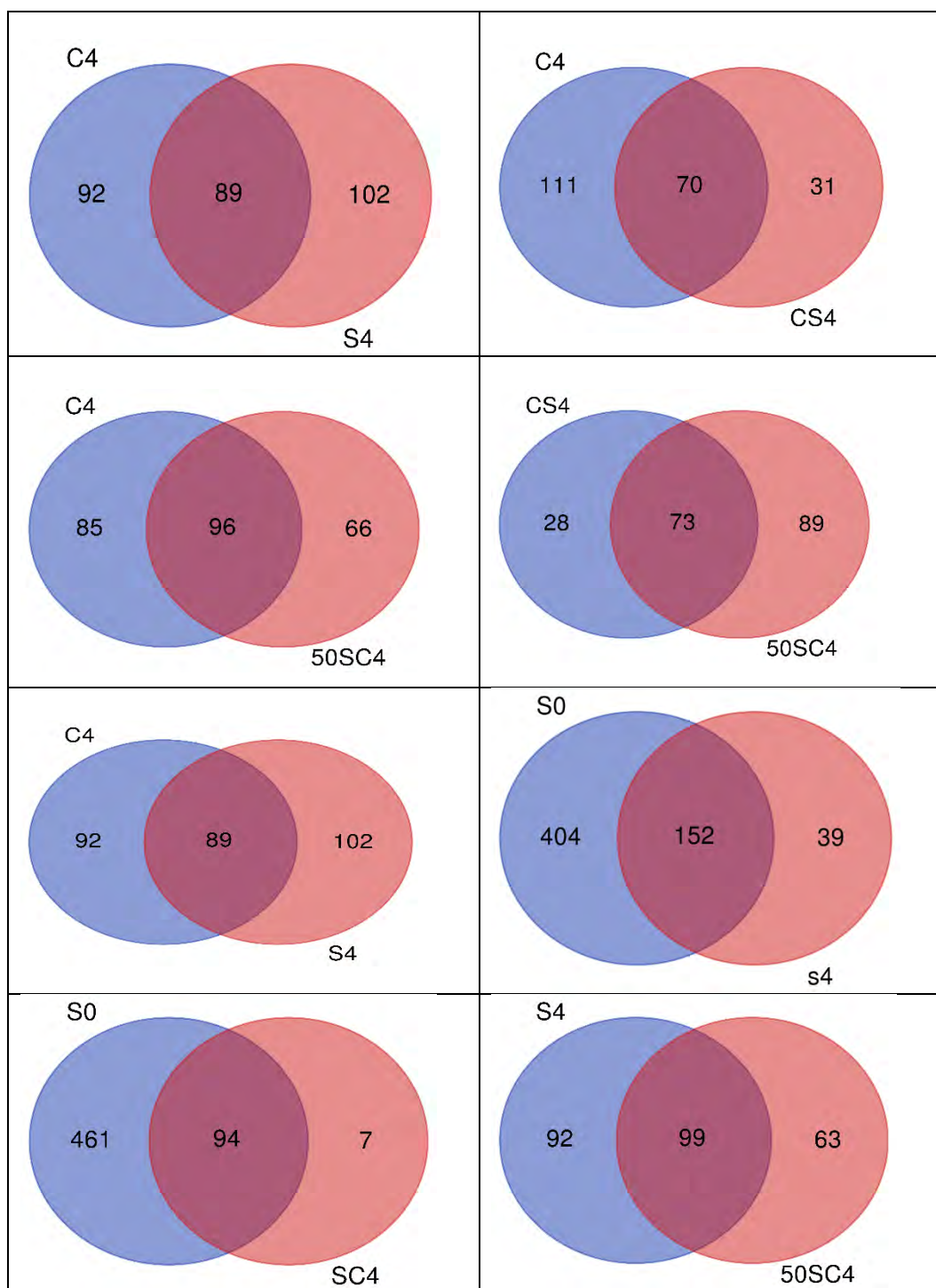
Εικόνα 8. Κοινά OTUs μετά από τέσσερις μέρες εξαλίευσης και αποθήκευσης σε πάγο (C4), και εξαλίευσης και αποθήκευσης σε slurry ice (S4).

Τέσσερις ημέρες μετά την εξαλίευση, ο αριθμός των OTUs ήταν συγκρίσιμος μεταξύ όλων των μεταχειρίσεων. Η σύγκριση των μεταχειρίσεων ανά δύο (Εικόνα 9) ανέδειξε ότι τα ψάρια που θανατώθηκαν σε slurry ice και συντηρήθηκαν σε πάγο (CS4) μοιραζόταν κοινά OTUs κατά **69%** με ψάρια που θανατώθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (C4), **70%** με ψάρια που θανατώθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε slurry ice (S4), και **72%** με ψάρια που θανατώθηκαν σε 1:1 slurry ice- πάγο και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (50CS4) και 93% με ψάρια που θανατώθηκαν σε slurry ice (S0)

Αντίστοιχα, τα ψάρια που θανατώθηκαν και συντηρήθηκαν σε πάγο (C4) μοιραζόταν κοινά OTUs κατά **46%** με ψάρια που θανατώθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε slurry ice (S4), **39%** με ψάρια που θανατώθηκαν σε slurry ice και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (CS4), και **53%** με ψάρια που θανατώθηκαν σε 1:1 slurry ice- πάγο και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (50CS4).

Τα ψάρια που θανατώθηκαν και συντηρήθηκαν σε slurry ice (S4) μοιραζόταν κοινά OTUs κατά **37%** με ψάρια που θανατώθηκαν σε slurry ice και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (CS4), **47%** με ψάρια που θανατώθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (C4), **52%** με ψάρια που θανατώθηκαν σε 1:1 slurry ice- πάγο και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (50 CS4) και **80%** με ψάρια που θανατώθηκαν σε slurry ice (S0).

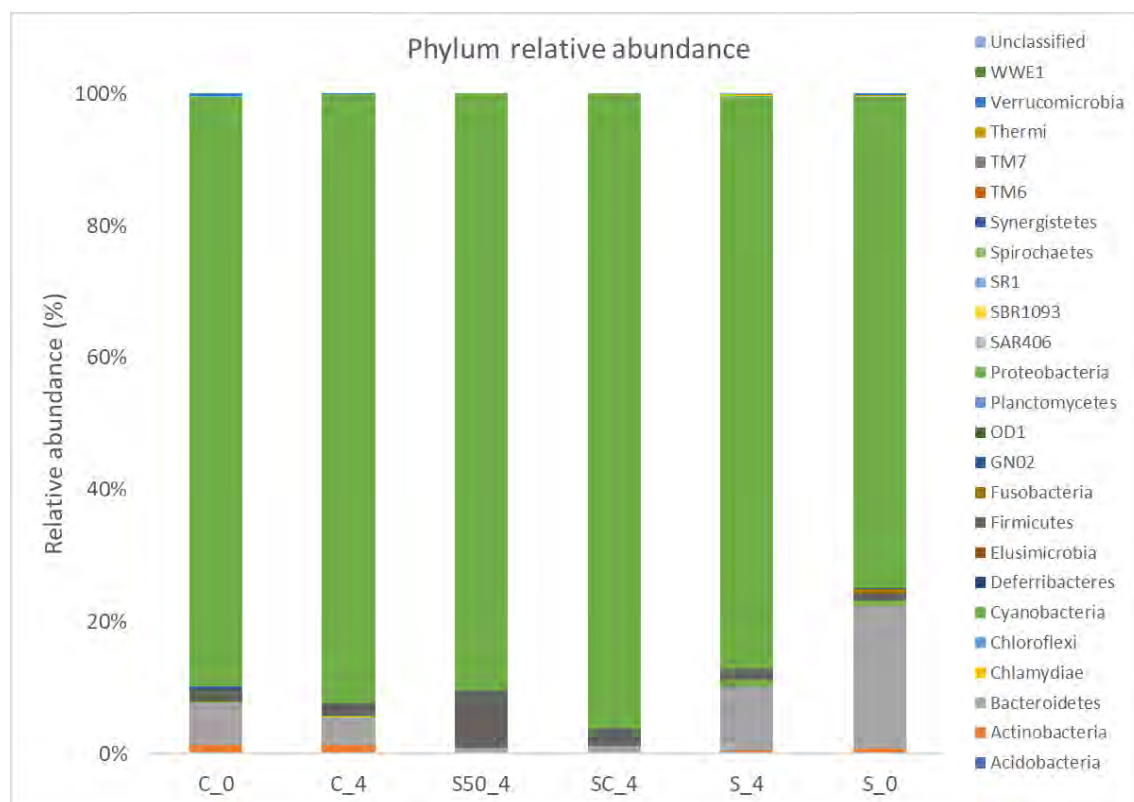
Τα ψάρια που θανατώθηκαν σε 1:1 slurry ice- πάγο και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (**50CS4**) μοιραζόταν κοινά OTUs κατά **59%** με ψάρια που θανατώθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (C4), **45%** με ψάρια που θανατώθηκαν σε slurry ice και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (CS4) και **61,1%** με ψάρια που θανατώθηκαν και συντηρήθηκαν σε slurry ice (S4)



Εικόνα 9. Αριθμός κοινών OTUs κατά την ημέρα 4 μετά την εξαλίευση σε 1:1 slurry- πάγο (50CS4) και αποθήκευση σε πάγο, την εξαλίευση και αποθήκευση σε πάγο (C4), την εξαλίευση σε slurry ice και αποθήκευση σε πάγο (CS4), την εξαλίευση και αποθήκευση σε slurry ice (S4).

4.3 Ταξινόμηση βακτηρίων σύμφωνα με το φύλο

Τα *Proteobacteria* ήταν το επικρατέστερο φύλο στο μικροβίωμα όλων των μεταχειρίσεων που εξετάστηκαν (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Ταξινομική κατανομή σε επίπεδο φύλου

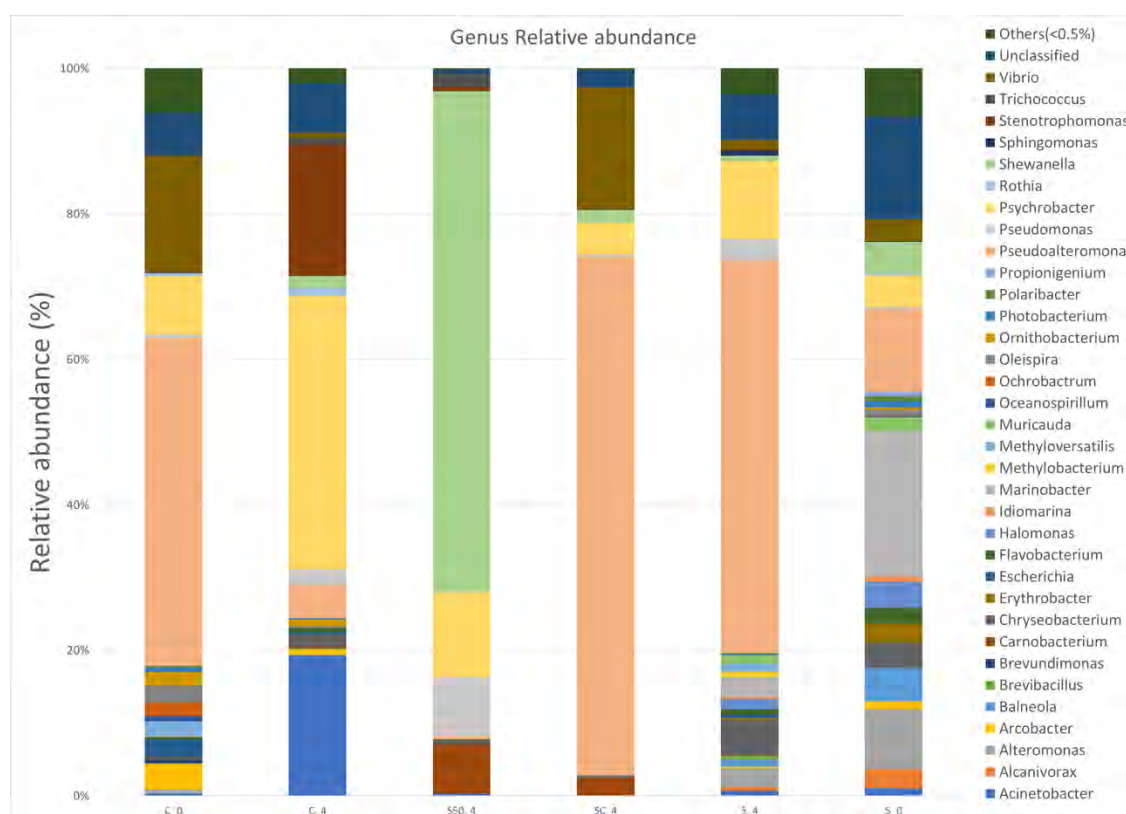
Κατά την αλίευση, το μικροβίωμα των ψαριών σε slury ice (S0) χαρακτηρίστηκε από σημαντικά υψηλότερη παρουσία *Bacteroidetes* (22,18 %) σε σχέση με αυτά σε παγόνερο (C0, 6,63%). Αντιστρόφως, στα C0 ψάρια ήταν υψηλότερη η παρουσία *Proteobacteria* (90,21%) και ήταν δυνατή και η ανίχνευση *Actinobacteria* (1,30%).

Τα *Actinobacteria* ήταν παρόντα στα ψάρια που αλιεύτηκαν σε παγόνερο και την ημέρα 4 μετά την αλίευση (C4, 1,30%), στα οποία συνεχίζουν να κυριαρχούν τα *Proteobacteria* (92,47%), με αυξημένη παρουσία συγκριτικά με την ημέρα της αλίευσης (C0). Αντίστοιχη αύξηση στα *Proteobacteria* 4 ημέρες μετά την αλίευση παρατηρήθηκε και στα ψάρια που αλιεύτηκαν σε slurry ice (S4). Η κυριαρχία των *Proteobacteria* ήταν ακόμη πιο έντονη στα ψάρια που αλιεύτηκαν σε slurry ice και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (SC4). Στα ψάρια που αλιεύτηκαν σε 1:1 slurry ice- πάγο

(50CS4), 4 ημέρες μετά την αλίευση ανιχνεύτηκε η ισχυρότερη παρουσία *Firmicutes* (8,66%).

4.4 Ταξινόμηση βακτηρίων σύμφωνα με το Γένος

Σημαντική διαφοροποίηση στα 34 κυρίαρχα γένη βακτηρίων παρατηρήθηκε μεταξύ του μικροβιώματος των διαφορετικών μεταχειρίσεων (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Ταξινομική κατανομή σε επίπεδο γένους

Το χαρακτηριστικό της αλίευσης σε παγόγερο (C0) ήταν η ισχυρή παρουσία στο μικροβίωμα των γενών *Pseudoalteromonas* (47,5%), *Vibrio* (16,85%) και *Escherichia* (2,48%), σε αντίθεση με τη αλίευση σε slurry ice (S0), στο οποίο το *Pseudoalteromonas* είχε τέσσερις φορές μικρότερη παρουσία (12,02%) και κυριαρχούσε το *Marinobacter* (20,94%). Τα γένη *Alteromonas* (8,67%), *Balneola* (4,80%), *Shewanella* (4,69%), *Psychrobacter* (4,54%), *Halomonas* (3,76%) *Chryseobacterium* (3,58%), *Vibrio* (3,17%), *Erythrobacter* (2,73%), *Alcanivorax*

(2,75%), *Flavobacterium* (2,31%) συμπλήρωναν την πλουσιότητα των γενών παρόντα στο μικροβίωμα S0.

Τέσσερις ημέρες μετά την αλίευση σε slurry ice (S4) τα *Pseudoalteromonas* (58,39%) και *Psychrobacter* (11,65%) είχαν κυριαρχήσει έναντι των άλλων γενών: *Chryseobacterium* (5,22 %), *Pseudomonas* (3,13%), *Marinobacter* (2,93%), *Alteromonas* (2,72%), *Halomonas* (1,55%), *Vibrio* (1,39%), *Muricauda* (1,23%), *Methyloversatilis* (1,15%).

Αντίστοιχα μεγάλες αλλαγές παρουσίασαν τα μικροβιώματα και των υπόλοιπων μεταχειρίσεων 4 ημέρες μετά την αλίευση. Το *Pseudoalteromonas* κυριαρχούσε και στα ψάρια που αλιεύτηκαν σε slurry ice και αποθηκεύτηκαν (CS4, 72,12%), στα οποία ήταν επίσης έντονη η παρουσία *Vibrio* (16,80%), ενώ ανιχνεύτηκαν και *Psychrobacter* (4,42%), *Carnobacterium* (2,46%) και *Shewanella* (1,78%). Αυτά τα τρία γένη (*Shewanella* 70,82%, *Psychrobacter* 11,99%, *Carnobacterium* 6,92%) και το *Pseudomonas* (8,43%) συνιστούσαν το βασικό κορμό του μικροβιώματος των ψαριών που αλιεύτηκαν σε 1:1 slurry- πάγο (50CS4). Το *Psychrobacter* είχε την ισχυρότερη παρουσία στο μικροβίωμα των ψαριών που αλιεύτηκαν σε πάγο (C4: 39,64%), στο οποίο ανιχνεύτηκαν επίσης σε μεγάλα ποσοστά τα γένη *Acinetobacter* (20,34%), και *Stenotrophomonas* (18,99%).

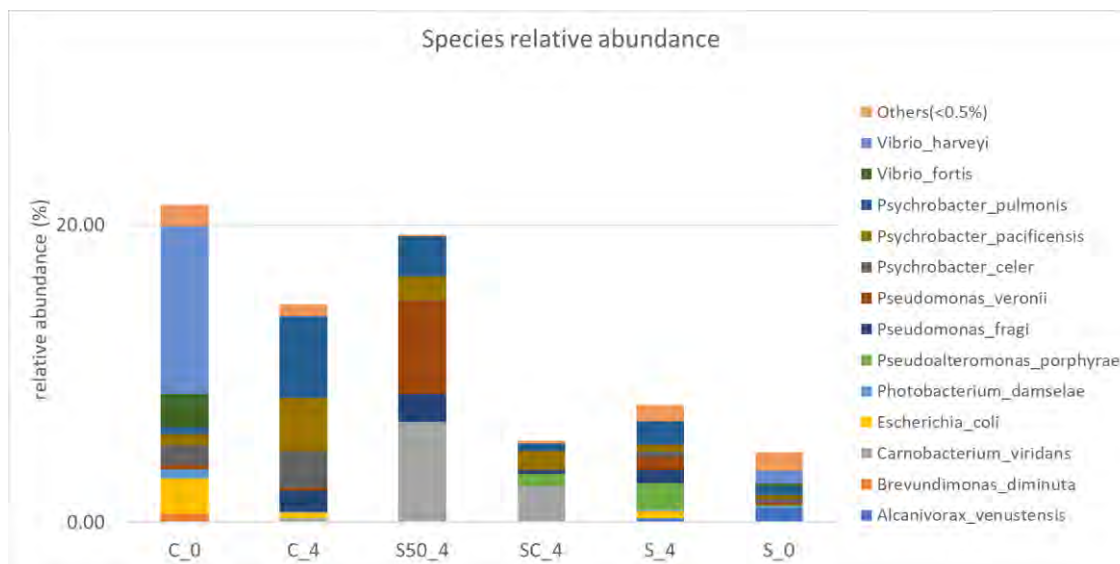
Τέλος, τα γένη *Alcanivorax*, *Balneola*, *Chryseobacterium* και *Idiomarina* παρατηρήθηκαν αποκλειστικά σε ψάρια που αλιεύτηκαν και αποθηκεύτηκαν σε slury ice (S0, S4)

4.6 Ταξινόμηση βακτηρίων σύμφωνα με το είδος

Τα μικροβιώματα που εξετάστηκαν περιείχαν ένα μεγάλο αριθμό ειδών (78,65 - 95,33%) που δεν ταυτοποιήθηκε με τις βάσεις αναφοράς. Στην Εικόνα 12 απεικονίζεται η κατανομή των ταυτοποιημένων βακτηριακών ειδών σε κάθε μεταχείριση.

Τα είδη *Vibrio harveyi* (11,60%) και *Vibrio fortis* (2,30%) παρατηρήθηκαν αποκλειστικά την ημέρα της αλίευσης τόσο σε ψάρια που αλιεύτηκαν σε πάγο (C0) όσο και σε slury ice (S0). Αντιθέτως, το είδος *Alcanivorax venustensis* παρατηρήθηκε αποκλειστικά σε ψάρια που αλιεύτηκαν και αποθηκεύτηκαν σε (S0, S4). Το είδος *Escherichia coli* παρατηρήθηκε σε ψάρια που αλιεύτηκαν σε πάγο

(C0: 2,42%) για να εμφανιστεί σημαντικά μειωμένο τέσσερις μέρες μετά την αλίευση και μόνο σε ψάρια που αλιεύτηκαν και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (C4) και σε slurry ice (S4).



Εικόνα 12. Ταξινομική κατανομή σε επίπεδο είδος

Τρία είδη *Psychrobacter* ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα μικροβιώματα, με ισχυρότερη παρουσία σε ψάρια που αλιεύτηκαν και αποθηκεύτηκαν σε πάγο (C4). Το είδος *Carnobacterium viridans* ανιχνεύτηκε μόνο τέσσερις μέρες μετά την αλίευση και είχε την εντονότερη παρουσία (6,72%) στα ψάρια που αλιεύτηκαν σε 1:1 slurry ice-πάγο (50CS4). Σε αυτά τα ψάρια ταυτοποιήθηκαν και δύο είδη *Pseudomonas* (*Pseudomonas veronii* 6,25%, *Pseudomonas fragi* 1,92%).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε το βακτηριακό μικροβίωμα στην επιφάνεια του δέρματος του λαβρακιού με αλληλούχηση νέας γενιάς. Σκοπός ήταν να παρατηρηθεί η εξέλιξη της σύνθεσης του μικροβιώματος με τρεις τρόπους εξαλίευσης και αποθήκευσης. Συγκεκριμένα οι τρόποι εξαλίευσης ήταν σε πάγο, σε slurry ice και 1:1 πάγο/slurry ice.

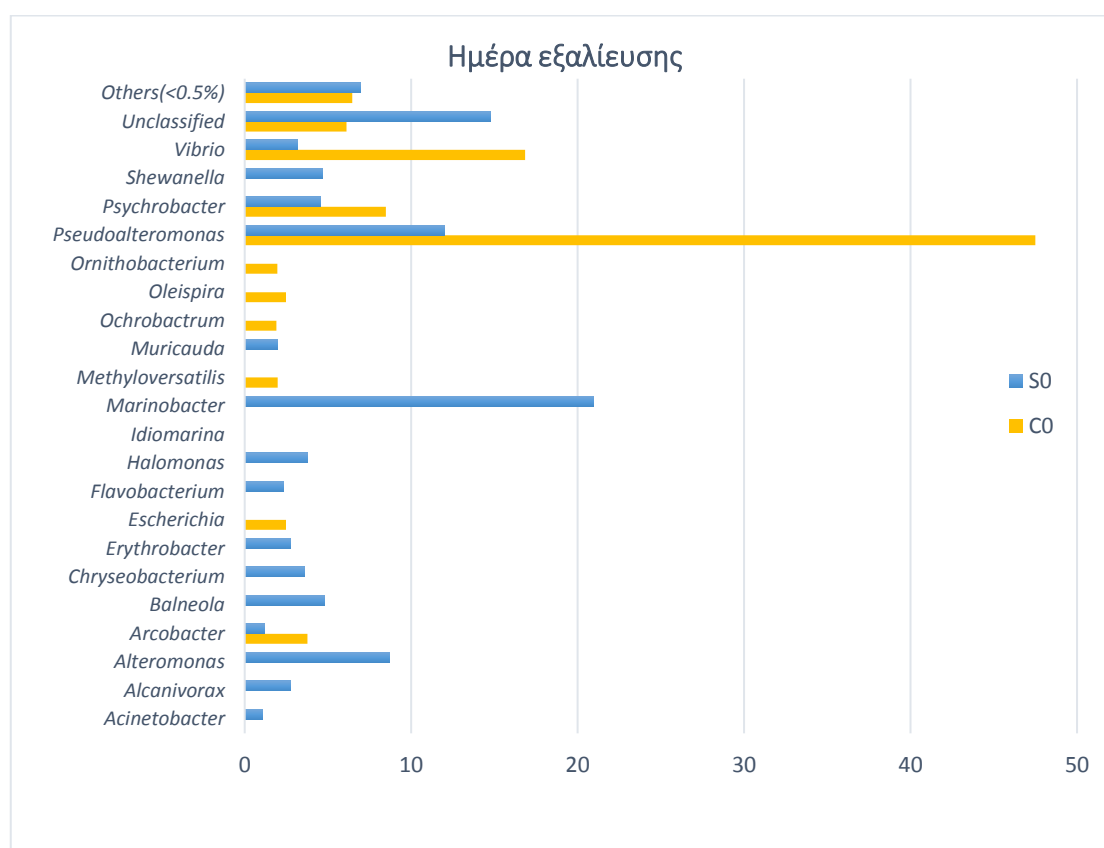
Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 38 γένη βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων και ειδών που είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση και υποβάθμιση των τροφίμων και ιδιαίτερα των ιχθύων. Σε επίπεδο είδους ταυτοποιήθηκε πολύ μικρός αριθμός βακτηρίων. Για να προσδιοριστούν τα στελέχη των βακτηρίων σε επίπεδο είδους πρέπει οι αλληλουχίες τους να παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ομοιότητα συγκεκριμένα μεγαλύτερη ή ίση με 99% κάτι που δεν συμβαίνει στην συγκεκριμένη περίπτωση.

Πιο αναλυτικά τα κύρια φύλα βακτηρίων που ανιχνευτήκαν ήταν: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*. Και στις έξι μεταχειρίσεις το μεγαλύτερο ποσοστό κατείχαν τα *Proteobacteria* (96-76%). Τα *Proteobacteria* είναι το πιο συνηθισμένο φύλο που αναφέρεται στο μικροβίωμα του δέρματος και των βραγχίων του λαβρακιού και της τσιπούρας (Chiarello et al., 2015; Pimentel et al., 2017; Tapia-Paniagua et al., 2018). Στη συνέχεια μετά τα *Proteobacteria* επικρατούν σε μικρότερα ποσοστά τα *Bacteroidetes*, ενώ μετά από τέσσερις μέρες συντήρησης τα *Bacteroidetes* μειώνονται και αυξάνονται τα *Firmicutes*. Τα *Bacteroidetes* έχουν επίσης ανιχνευτεί στο μικροβίωμα του λαβρακιού (Chiarello et al., 2015; Tapia-Paniagua et al., 2018). Η μείωση τους μετά από τέσσερις μέρες φαίνεται να οφείλεται στις θερμοκρασίες αποθήκευσης (Zheng et al., 2020).

Σε επίπεδο γένους στην συγκεκριμένη εργασία βρέθηκε μεγάλη ποικιλία σε κάθε μεταχείριση. Τα κυρίαρχα γένη που εντοπίστηκαν στην θανάτωση με πάγο είναι τα *Pseudoalteromonas* (47,5%), *Vibrio* (16,85%) και *Psychobacter* (8,48%) ενώ παρατηρήθηκε και ένα ποσοστό *Escherichia* (2,48%). Η ύπαρξη του γένους *Pseudoalteromonas* είναι ευνοϊκή καθώς τα βακτήρια αυτού του γένους ασκούν ανταγωνιστικές δράσεις σε βακτήρια που είναι επιβλαβή για τα ψάρια (Aranda et al., 2012). Μερικά είδη των *Pseudoalteromonas* έχουν αντιβακτηρική, αντική και αντιμυκητιακή δράση (Holmström et al., 2002), ενώ έχει αποδεχτεί η μεγάλη τους αποτελεσματικότητα έναντι τους γένους *Vibrio* και πιο συγκεκριμένα του *Vibrio anguillarum* και του *Vibrio parahaemolyticus* (Aranda et al., 2012; Wesseling et al., 2016). Σε μεγάλο ποσοστό εμφανίζεται και το γένος *Vibrio* που αποτελείται από δυνητικά παθογόνα βακτήρια. Η ύπαρξη του όμως είναι λογική καθώς είναι βακτηριακό γένος που έχει ανιχνευτεί στο μικροβίωμα του λαβρακιού και σε προηγούμενη μέλετη (Rosardo et al., 2019). Το γένος *Echerichia* που παρατηρείται είναι ασυνήθιστο για την επιφάνεια του δέρματος καθώς συναντάται συνήθως στην

εντερική χλωρίδα. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε μολυσμένα ύδατα ή ιζήματα (Argal , 2020).

Επιπλέον κατά την αλίευση με slurry ice τα κυρίαρχα γένη που εντοπίστηκαν είναι τα *Marinobacter* (20,94%), *Pseudoalteromonas* (12,02%), *Alteromonas* (8,67%), *Balneola* (4,80%), *Shewanella* (4,69%), *Psychrobacter* (4,54%), *Halomonas* (3,76%), *Chryseobacterium* (3,58%) και *Vibrio* (3,17%). Σε αντίθεση με την εξαλίευση σε πάγο, παρατηρούνται μικρότερα ποσοστά σε *Vibrio*. Στο παρακάτω γράφημα (Εικόνα 13) φαίνεται πως διαφοροποιούνται τα βακτηριακά γένη την ημέρα της εξαλίευσης σε κάθε μεταχείριση.



Εικόνα 13: Σύγκριση των βακτηριακών γενών την μέρα μηδέν μεταξύ της εξαλίευσης σε slurry ice (S0) και σε πάγο (C0).

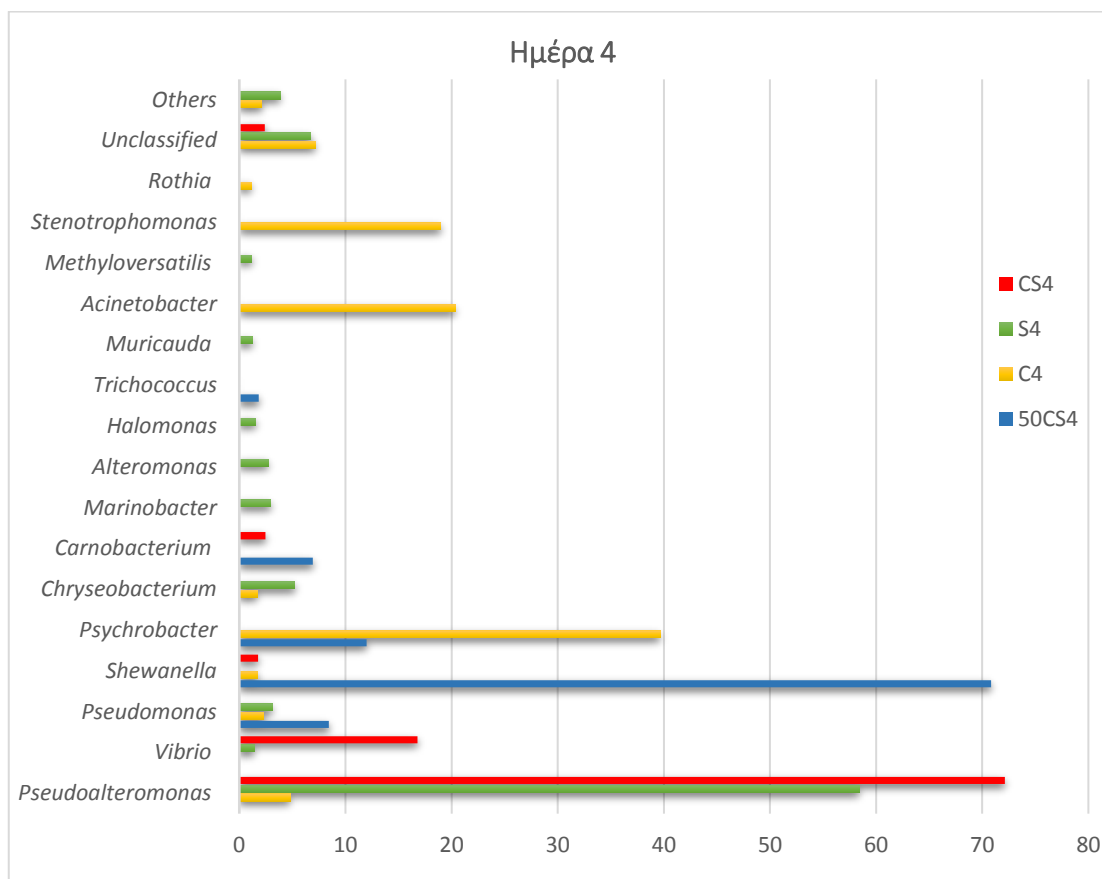
Μετά από τέσσερις μέρες αποθήκευσης σε πάγο τα κύρια γένη που παρατηρούνται είναι *Psychrobacter* (39,64%), *Acinetobacter* (20,34%), *Stenotrophomonas* (18,99%), *Pseudoalteromonas* (4,80%), *Pseudomonas* (2,32%), *Shewanella* (1,75%). Δεν παρατηρείται το γένος *Echerichia* που σημαίνει ότι επικράτησε κάποιο ανταγωνιστικό είδος. Μεγάλη αύξηση παρατηρείται στα *Psychrobacter* σε

σχέση με την μέρα μηδέν. Αυτό συμβαίνει επειδή τα γένη *Psychobacter* και *Pseudomonas* αντέχουν σε χαμηλές θερμοκρασίες και επικράτησαν έναντι άλλων (Zhang et al., 2019). Επίσης, και τα βακτηριακά είδη του γένους *Shewanella* αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Σύμφωνα με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές, τα βακτηριακά γένη *Shewanella* και *Pseudomonas* θεωρούνται υπεύθυνα για την αλλοίωση πολλών τροφίμων συμπεριλαμβανομένου και του λαβρακιού (Wang et al., 2017).

Μετά την τέταρτη μέρα αποθήκευσης σε slurry ice τα κύρια γένη που παρατηρούνται είναι τα *Pseudoalteromonas* (58,39%), *Psychobacter* (11,65%), *Chryseobacterium* (5,22 %), *Pseudomonas* (3,13%), *Marinobacter* (2,93%), *Alteromonas* (2,72%), *Halomonas* (1,55%), *Vibrio* (1,39%). Σε αυτή την μεταχείριση δεν βρέθηκε καθόλου *Shewanella* όπως την μέρα μηδέν και την μέρα τέσσερα αποθήκευση σε πάγο, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη στην οποία τα ψυχρότροφα βακτήρια στο δέρμα των ιχθύων και στην συγκεκριμένη μελέτη στο δέρμα της σαρδέλας μειώνονται σε συντήρηση σε slurry ice σε σχέση με την συντήρηση σε πάγο (Cambos C., et.al., 2005). Ενώ το γένος *Pseudomonas* δεν έχει μεγάλες διαφορές με την μέρα τέσσερα αποθήκευσης σε πάγο. Σε αποθήκευση σε slurry ice έχει αποδειχτεί ότι τα *Pseudomonas* αναπτύσσονται πιο αργά σε σχέση με την αποθήκευση σε πάγο (Annamalai J., et.al., 2018).

Τα γένη που βρέθηκαν στα λαβράκια που αποθηκευτήκαν σε 1:1 πάγο – slurry ice μετά από τέσσερις μέρες δεν ήταν πολλά. Συγκεκριμένα βρέθηκαν τα *Shewanella* (70,82%), *Psychobacter* (11,99%), *Pseudomonas* (8,43%), *Carnobacterium* (6,92%) και *Trichococcus* (1,84 %). Μεγαλύτερα ήταν τα ποσοστά της *Shewanella* και *Pseudomonas* σε σχέση με κάθε άλλη μεταχείριση.

Στην μεταχείριση αλίευσης σε slurry ice και αποθήκευση σε πάγο μετά από τέσσερις μέρες παρατηρούνται τα γένη *Pseudoalteromonas* (72,12%), *Vibrio* (16,80 %), *Psychobacter* (4,42 %), *Carnobacterium* (2,46%) *Shewanella* (1,78%). Το γένος *Shewanella* βρίσκεται σχεδόν στα ίδια ποσοστά με την μέρα τέσσερα σε πάγο. Δεν παρατηρείται καθόλου το γένος *Pseudomonas*. Στο παρακάτω γράφημα (Εικόνα 14) φαίνεται πως διαφοροποιούνται τα βακτηριακά γένη την ημέρα 4 σε κάθε μεταχείριση.



Εικόνα 14: Σύγκριση των βακτηριακών γενεών την μέρα τέσσερα μεταξύ των μεταχειρίσεων 1:1 slurry- πάγο (50CS4), αποθήκευση σε slurry ice (S4), αποθήκευση σε πάγο (C4) και θανάτωση σε slurry ice και αποθήκευση σε πάγο (CS4).

6.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα μας δείχνουν διαφορές στην κατανομή βακτηρίων μεταξύ των μεθόδων. Την μέρα της εξαλίευσης τα OTUs που ανιχνεύτηκαν με την μέθοδο του slurry ice ήταν περισσότερα από αυτά από την εξαλίευση με πάγο. Κατά την αποθήκευση σε slurry ice και πάγο το ποσοστό των αλλοιογόνων βακτηρίων ήταν χαμηλό σε αντίθεση με την εξαλίευση σε 1:1 πάγο-slurry ice και αποθήκευση σε πάγο όπου τα ποσοστά της *Shewanella* και *Pseudomonas* ήταν πολύ μεγαλύτερα. Στην αποθήκευση με πάγο μετά από θανάτωση σε slurry ice η παρουσία των *Vibrio* ήταν επίσης υψηλή.

Η χρήση της αλληλούχησης νέας γενιάς σε τέτοιου είδους μελέτες παράγει σημαντικό αριθμό πληροφοριών ως προς το πλήθος των γενών που αποκαλύπτονται σε αντίθεση με την καλλιέργεια βακτηρίων όπου υπάρχουν

μικροοργανισμοί που δεν αναπτύσσονται λόγω ανταγωνισμού Στην βιβλιογραφία μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες για την αλληλούχηση του μικροβιώματος μετά την εξαλίευση των ιχθύων. Θα πρέπει να γίνουν περαιτέρω μελέτες με την μέθοδο NGS για την διερεύνηση του μικροβιώματος των ιχθύων μετά την εξαλίευση τους και μετά την αποθήκευση τους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albanese, Davide, Paolo Fontana, Carlotta De Filippo, Duccio Cavalieri, and Claudio Donati.** 2015. "MICCA: A Complete and Accurate Software for Taxonomic Profiling of Metagenomic Data." *Scientific Reports* 5
- Annamalai J.,Lakshmi N.M., Sivam V., Chandragiri R., Rao N.**(2018). A Comparative Study on the Quality Changes of Croaker (*Johnius dussumieri*) Fish Stored in Slurry Ice and Flake Ice. *Journal of Aquatic Food Product Technology*.27.4
- Aranda C.P , Valenzuela C., Barrientos J.** (2012) "Bacteriostatic anti-Vibrio parahaemolyticus activity of Pseudoalteromonas sp. strains DIT09, DIT44 and DIT46 isolated from Southern Chilean intertidal *Perumytilus purpuratus*," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, no. 6, pp. 2365–2374
- Aryal S.** (2020). Habitat of *E. coli*. *Bacteriology*
- Ashley A. Ross, Aline Rodrigues Hoffmann & Josh D. Neufeld** (2019). The skin microbiome of vertebrates. *Microbiome*. 79
- Ashley P.J.** (2007) Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* 104, 199–235.
- Bagni M.** (2005) Cultured Aquatic Species Information Programme. *Dicentrarchus labrax*. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome.
- Bagni M., Civitareale C., Priori A., Ballerini A., Finoia M., Brambilla G., Marino G.,**Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*).*Aquaculture* , 263: 52-60
- Beemelmans A, Poirier M, Bayer T, Kuenzel S, Roth O** (2019) Microbial embryonal colonization during pipefish male pregnancy. *Scientific Reports* 9: 14.
- Campos C., Rodríguez O.,Losada V.,Aubourgc S. Velázquez J.** (2005). Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (*Sardina pilchardus*). *International Journal of Food Microbiology*. 103:121-130.
- Caporaso, J Gregory, Christian L Lauber, William A Walters, Donna Berg-Lyons, Catherine A Lozupone, Peter J Turnbaugh, Noah Fierer, Rob Knight.** 2011. "Global Patterns of 16S rRNA Diversity at a depth of Millions of Sequences per Sample." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl (Supplement_1): 4516-22.

- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. & Alland.** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* 69, 330–339 (2007).
- Chiarello M, Villéger S.,Bouvier C., Bettarel Y., Bouvier T.** (2015)High diversity of skin-associated bacterial communities of marine fishes is promoted by their high variability among body parts, individuals and species. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 91 (7)
- EFSA** (2009) Food safety considerations concerning the species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed fish. *The EFSA Journal* 1190, 1–16.
- EFSA** (2009) Food safety considerations concerning the species-specific welfare aspects of the main systems of stunning and killing of farmed fish. *The EFSA Journal* 1190, 1–16.
- F.F. Parlapani, S. Michailidou, K. Pasentsis, A. Argiriou, G. Krey, I.S. Boziaris** (2018).A meta-barcoding approach to assess and compare the storage temperature dependent bacterial diversity of gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) originating from fish farms from two geographically distinct areas of Greece
- FAO** 2018 EUROPEAN INLAND FISHERIES AND AQUACULTURE ADVISORY COMMISSION (EIFAAC)
- Fenollar F., Raoult D.**(2008). Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *Jurnal of pathology, microbiology and immulogy.* 112: 785-807
- Gans, J., Wolinsky, M. & Dunbar, J.**(2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387–1390
- Gartza D., Dutih B.** (2015). From cultured to uncultured genome sequences: metagenomics and modeling microbial ecosystems. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 72: 4287–4308
- Gram L., Dalgaard P.** (2002), Fish spoilage bacteria – problems and solutions, 1 *Current Opinion in Biotechnology* , 13: 262-266
- Gram L., Huss. H.** (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology.* 33, 121-137
- Gräns A., Niklasson L.,Sandblom E.,Sundel K., Algiers B., Berg C.,Lundh T., Axelsson M., Sundh H., Kiessling A.**(2016). Stunning fish with CO₂ or electricity: contradictory result on behavioural and physiological stress responses. *Animal.* 10:2, pp 294–301
- Gregory N.G. Grandin T.** (1998) Fish. In: *Animal Welfare and Meat Science.*CABI Publishing, New York, USA. pp 195–212.
- Heather JM, Chain B.**(2016). The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. *Genomics.*107:1–8.
- Heather JM, Chain B.**(2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 107(1): 1–8.
- Holmström C, Egan S, Franks A, McCloy S, Hjelleberg** 2002. Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41:47–58
- Huidobro M., Caballero L.,Mendes R.**(2002) Onboard processing of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) with liquid ice: effect on quality.*Eur. Food Res. Technol.*, 214: 469-475

- Huis in't Veld, J.H.J** (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods : an overview. *International Journal of Food Microbiology* 33: 1-18
- Illumina.** (2015). *An introduction to Next-Generation Sequencing Technology*
- Jay, J.M.** (2005). "Modern Food Microbiology", 7th ed. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Kaale D.,Eikevik T.M.,Rustad T., Kolsaker K.**(2011). Superchilling of food: A review. *Journal of Food Engineering.*107.2
- Keys D., Lowder A., DeWitt C.**(2017). Conditions for the effective chilling of fish using a nano-sized ice slurry. *Food processing and preservation.*42.3
- Kotu S., Mannana S., Jayaramanac A.** (2019). Emerging molecular techniques for studying microbial community composition and function in microbiologically influenced corrosion.
- Laetitia Nunny**(2020). Animal Welfare in Predator Control: Lessons from Land and Sea. How the Management of Terrestrial and Marine Mammals Impacts Wild Animal Welfare in Human–Wildlife Conflict Scenarios in Europe. *Animals.* 10(2), 218
- Lambooij E., Van Der Vis J.W., Kloosterboer R.J. & Pieterse C.** (2002) Evaluation of head-only and head-to-tail electrical stunning of farmed eels (*Anguilla anguilla*,L.) for the development of a humane slaughter method. *Aquaculture Research* 33, 323–331
- Lambooij, Bert.**(2015).Electrophysiological and Behavioural Responses of Turbot (*Scophthalmus Maximus*) Cooled in Ice Water.*Physiology & Behavior.* 129: 23-28
- Larsen A., Tao Z., Bullard S., Arias C.** (2013). Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. *FEMS Microbiology Ecology.* 85: 483–494.
- Lines, J. A., & Spence, J.** (2014). Humane harvesting and slaughter of farmed fish. *OIE Revue Scientifique Et Technique,* 33(1), 255–264.
- Li, Q. et al.,** 2014. Dysbiosis of gut fungal microbiota is associated with mucosal inflammation in Crohn's disease. *Journal of clinical gastroenterology,* 48(6), pp.513–23.
- Liu L, Li, Y. Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M.**(2012)Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. Hindawi Publishing Corporation *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* p.p 11
- Lozada V., Velázquez J. Aubourga S.** (2006). Rancidity development in frozen pelagic fish: Influence of slurry ice as preliminary chilling treatment. *LWT - Food Science and Technology.*40.990-999
- M. Sivertsvik, W.K. Jeksrud, J.T. Rosnes** (2002).A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products significance of microbial growth, activities and safety*Int. J. Food Sci. Technol.,* 37 (2) pp. 107-127
- Mendes R.** (2018).Technological processing of fresh gilthead seabream (*Sparus aurata*): A review of quality changes. *Food Reviews International.* 20-53
- Morzel M., Sohier D., H. Van de Vis.** (2002). Evaluation of slaughtering methods for turbot with respect to animal welfare and flesh quality. *Science of food agriculture.* 83: 19-28
- Oulas, Anastasis, Christina Pavloui, Paraskevi Polymenakou, Georgios A. Pavlopoulos, Nikolas Papanikolaou, Georgios Kotoulas, Christos Arvanitidis, and Ioannis Iliopoulos** (2015) *Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing next-*

Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies. *Bioinformatics and Biology Insights* 9:75-88.

- P. Tryfinopoulou, E. Tsakalidou, M. Vancanneyt, B. Hoste, J. Swings, G.-J.E. Nychas** (2007), Diversity of *Shewanella* population in fish *Sparus aurata* harvested in the Aegean Sea *Journal of Applied Microbiology*, 103 pp. 711-721
- Pimentel T., Marcelino J., Ricardo F., Soares A.M., Calado R.**(2017).Bacterial communities 16S rDNA fingerprinting as a potential tracing tool for cultured seabass *Dicentrarchus labrax*. *Sci. Rep.*, 7 (1).
- Rawat S.** (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science & Research*.
- Rosardo D., Losadaab M.,Severinoc R.,Cabled J.,Xavier R.** (2019). Characterization of the skin and gill microbiomes of the farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*) and seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 500: 57-64.
- Schloss P., Westcott S.** (2010). Assessing and Improving Methods Used in Operational Taxonomic Unit-Based Approaches for 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Stewart, E. J. Growing** (2012) unculturable bacteria. *J. Bacteriol.* 16: 4151–4160
- Tapia-Paniagua S.T.,Ceballos-Francisco D., Balebona M.C., Esteban M.A, Moriñigo M.A.**(2018). Mucus glycosylation, immunity and bacterial microbiota associated to the skin of experimentally ulcerated gilthead seabream (*Sparus aurata*).*Fish Shellfish Immunol.*, 75.
- Turnbull F. et.al.**(2012).Welfare and aquaculture: where benefish fits in, *Aquaculture Economics & Management*, 16:433–440
- V. Alessandria, I. Ferrocino, F. De Filippis, M. Fontana, K. Rantsiou, D. Ercolini, L. Cocolin.**(2016).Microbiota of an Italian Grana-like cheese during manufacture and ripening, unraveled by 16S rRNA-based approaches *Appl. Environ. Microbiol.*, 82 pp. 3988-3995
- Van de Vis. H., Kestin S., Robb D., Oehlenschlager J., Lambooij B., Munkner W., Kuhlmann H.,Tejada M., Huidobro A., Ottera H.,Roth B., Sorensen NK., Akse L., Byrne H., Nesvadba H.**(2003). Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquaculture Res.* 34:211-220
- Wang F, Fu L, Bao X, et al.** (2017). The spoilage microorganisms in seafood with the existed quorum sensing phenomenon. *J Food Microbiol.*1(1):14-19.
- Wesseling W.,Lohmeyer M.,Wittka S.,Bartels J.,Kroll S., Soltmann C.,Kegler P., Kunzmann A.,Neumann S., Ramsch B.,Sellner B., Meinhardt F.** (2016). Adverse Effects of Immobilised *Pseudoalteromonas* on the Fish Pathogenic *Vibrio anguillarum*: An In Vitro Study. *Journal of Marine Science.*27:4.
- Zampacavallo G., Scappini F., Mecatti M., Iurzan F., Mosconi G. ,Poli B.M.** (2003) Study on methods to decrease the stress at slaughter in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Italian Journal of Animal Science.*616–618.
- Zhang Y. Et.al.**(2019). Diversity and characterization of spoilage-associated psychrotrophs in food in cold chain. *International Journal of Food Microbiology.*Vol 290 Pg: 86-95.
- Zheng R., Xu X., Xing J., Cheng H., Zhang S., Shen J., Li H.** (2020). Article Quality Evaluation and Characterization of Specific Spoilage Organisms of Spanish Mackerel by High-Throughput Sequencing during 0 °C Cold Chain Logistics.MDPI.

Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

- http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en
- https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/593479/Advice_about_sustainable_agriculture_and_farm_animal_welfare_-_final_2016.pdf
- https://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular
- <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/45>
- <https://www.fishbase.se/photos/PicturesSummary.php?StartRow=8&ID=63&what=species&TotRec=15>
- https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/593479/Advice_about_sustainable_agriculture_and_farm_animal_welfare_-_final_2016.pdf
- https://www.aquamaps.org/receive.php?type_of_map=regular
- <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/45>
- <https://www.fishbase.se/photos/PicturesSummary.php?StartRow=8&ID=63&what=species&TotRec=15>
- http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en