



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

## ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

---

«Προοπτικές χρήσης του νέου βιοτεχνολογικού εμβολιασμού  
με μικροφύκη στις ιχθυοκαλλιέργειες»

---

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΟΥΤΟΥ ΚΑΤΕΡΙΝΑ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΑΘΗΝΑ ΦΛΟΚΑ  
00090  
Αθήνα 2021



UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION  
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

**INTERSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES  
IN  
BIOENTREPRENEURSHIP**



**MASTERTHESIS**

---

**“Perspectives of using new biotechnological vaccination with microalgae in fish farms”**

---

**SUPERVISOR: Moutou Katerina**

**ATHINAFLOKA  
00090  
ATHENS, 2021**

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στο

## **ΒΙΟΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ**

που απονέμει το Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, σε συνεργασία με \*χώρος εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας\* (αν υπάρχει).

Εγκρίθηκε την ..... από την τριμελή εξεταστική επιτροπή:

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ**

**ΒΑΘΜΙΔΑ**

**ΥΠΟΓΡΑΦΗ**

(Επιβλέπων/ουσα)

(Μέλος 1)

(Μέλος 2)

## Ευχαριστίες

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την επιβλέπουσα κ. Μούτου Κατερίνα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, όπου παρά τις αντίξοες συνθήκες, παρείχε την βοήθεια και τη στήριξή της για τη συγγραφή και την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης τον κο Γιάννη Τρούλη, Δ/τη της TTMI ConsultingLtd, για τις κατευθύνσεις και τις παρατηρήσεις του οι οποίες συνέβαλαν στην υλοποίηση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ θερμά την συμφοιτήτρια μου Χριστιάνα Στραμάρκο για τη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος. Παράλληλα, ένα ξεχωριστό ευχαριστώ οφείλω στις φίλες μου Ελένη και Αγγελική για τη στήριξή τους στην εκπόνηση της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Κωνσταντίνο για τον καταλυτικό του ρόλο συνολικά.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την αδιάκοπη υποστήριξή τους σε όλους τους τομείς όλα αυτά τα χρόνια.

Η εργασία είναι αφιερωμένη στον εαυτό μου.

## Πίνακας Περιεχομένων

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
1.1	Γενικά στοιχεία υδατοκαλλιεργειών .....	6
1.2	Μεσογειακή και παγκόσμια ιχθυοκαλλιέργεια .....	7
1.3	Στάδια παραγωγής ιχθυοκαλλιεργειών .....	10
1.4	Ασθένειες ιχθύων .....	12
1.5	Μικροφύκη .....	14
2.	ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ .....	15
2.1	Υγεία των ψαριών .....	15
2.1.1	Ρυθμιστικό πλαίσιο για τη χρήση εμβολίων σε Ε.Ε. και Ελλάδα .....	16
2.2	Τρόποι χορήγησης των εμβολίων .....	16
2.3	Τύποι εμβολίων στις ιχθυοκαλλιέργειες .....	18
2.4	Εμπορικά σκευάσματα εμβολίων .....	19
2.5	Τα μικροφύκη ως μέσο παραγωγής εμβολίων .....	21
2.6	Παραδείγματα εμβολίων με μικροφύκη .....	23
2.7	Παραδείγματα εταιρειών .....	27
2.8	Περιορισμοί στη χρήση ανασυνδυασμένων μικροφυκών .....	28
3.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	29
4.	Παράρτημα .....	33
5.	Βιβλιογραφία .....	34

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας έχει μια σημαντική οικονομική άνοδο ως μία ταχέως αναπτυσσόμενη βιομηχανία παραγωγής θαλασσινών προϊόντων με τη μισή κατανάλωση παγκοσμίως να καλύπτεται από την ιχθυοκαλλιέργεια. Οι βασικοί δείκτες απόδοσης στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι ο ρυθμός ανάπτυξης, η θνησιμότητα και η μετατρεψιμότητα τροφής. Στα εντατικά συστήματα εκτροφής, ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής είναι συνήθως πολύ ευνοϊκός. Οι ιχθυοκαλλιέργειες απειλούνται από την πιθανότητα μόλυνσης κυρίως από βακτήρια όπως *Aeromonas*, *Pseudomonas* και *Vibrio*, ιούς όπως ο ιός της νευρικής νάρκωσης (NNV) και παράσιτα τα οποία αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες για τη βελτίωση της εντατικής ιχθυοκαλλιέργειας. Τα μικροφύκη αποτελούν μία κατηγορία οργανισμών για την παραγωγή νέων προϊόντων καθώς προσφέρουν φυσικά οφέλη στη διατροφή των ιχθύων λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς σε πρωτεΐνες, ενώ διαθέτουν φυσικές αντιμικροβιακές ενώσεις που μπορούν να χρησιμεύσουν ως ανοσοδιεγερτικά. Παράλληλα, είναι ένα οικονομικό σύστημα έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, ενώ ταξινομούνται και ως «ασφαλή» (GRAS). Οι κυριότεροι μέθοδοι για τη χορήγηση εμβολίων στα ψάρια είναι η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση, η εμφύσηση, το μπάνιο, ο ψεκασμός ή η χορήγηση διά στόματος. Η χορήγηση εμβολίων δια στόματος με αντιγόνο που ενσωματώνεται στην τροφή, είναι η ιδανική μέθοδος για τον εμβολιασμό των ψαριών, ωστόσο η ποσότητα τροφής που λαμβάνει κάθε ψάρι μέσα σε έναν πληθυσμό δεν είναι εγγυημένη. Η πλέον σύγχρονη εξέλιξη στα εμβόλια είναι η τεχνολογία των εμβολίων DNA με την απελευθέρωση πλασμιδιακού DNA που κωδικοποιεί την περιοχική ανοσοποίησης. Η παραγωγή τους είναι σχετικά οικονομική και εύκολη, όμως η χρήση τους περιορίζεται καθώς ανήκουν σε γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς. Τα μικροφύκη μπορούν να παρέχουν ένα έξυπνο και οικονομικό μέσο για την ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων ιδιαίτερα με τη γενετική τροποποίηση των χλωροπλαστών, καθώς παρέχουν ένα υψηλό και σταθερό επίπεδο έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης, αλλά και ένα επιπλέον στρώμα βιοενθυλάκωσης προστατεύοντας τα από το όξινο περιβάλλον του στομάχου των ψαριών. Τα διαγονιδιακά μικροφύκη που προκύπτουν, μπορούν να επιτύχουν ανοσολογική απόκριση. Επίσης, γίνεται απευθείας χορήγηση καθώς τα φύκη αποτελούν φυσικό συστατικό της διατροφής τους. Παρά το υψηλό κόστος για την καλλιέργεια και τη λυοφιλοποίηση μικρής κλίμακας βιομάζας μικροφυκών, με μαζική αύξηση της βιομάζας, το κόστος μειώνεται ενώ επιτυγχάνεται εύκολη συντήρηση και φύλαξη του τελικού προϊόντος. Συνεπώς, οι υδρόβιοι οργανισμοί μπορούν να αποκτήσουν σημαντική ανοσία με τη χρήση εδώδιμων εμβολίων, αποφεύγοντας τη σωματική βλάβη που προκαλείται με άλλες

μεθόδους. Ωστόσο μειονεκτήματα όπως ελλείψεις στην τυποποίηση της μεθόδου γενετικής τροποποίησης, χαμηλή απόδοση έκφρασης και κακή σταθερότητα, χαμηλή περιεκτικότητα σε ανασυνδυσασμένη πρωτεΐνη, ανώριμη γενετική πλατφόρμα θα πρέπει να επιλυθούν. Όπως και η πρόβλεψη των συνεπειών από τη διαφυγή διαγονιδιακών ψαριών, τη διανομή DNA εμβολίων στο θαλάσσιο περιβάλλον αλλά και των γενετικά τροποποιημένων τροφών.

## **ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:**

Ιχθυοκαλλιέργειες

Παθογόνα

Εμβολιασμός

Μικροφύκη

Αναςυνδυσασμένες πρωτεΐνες

## **ΣΚΟΠΟΣ**

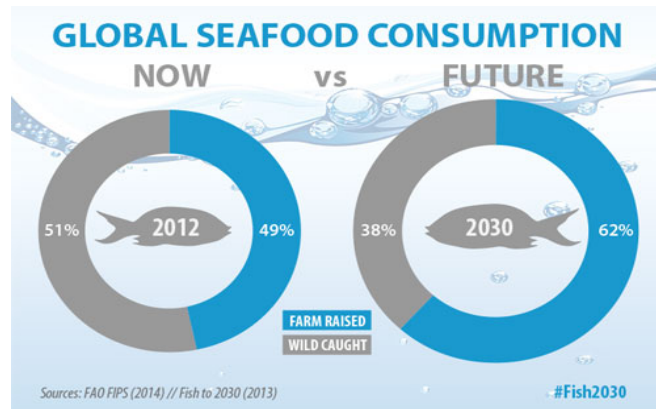
Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παρουσίαση των ιχθυοκαλλιεργειών κυρίως στη Μεσόγειο αλλά και σε παγκόσμιο επίπεδο όπως είναι σήμερα και με την δυνητική αξιοποίηση μια συγκεκριμένης καινοτομίας. Περιγράφονται και αναλύονται οι πρακτικές που χρησιμοποιούνται έως σήμερα σε όλα τα στάδια διεξαγωγής, ενώ παράλληλα παρατίθεται και αξιολογείται ένας νέος τρόπος εμβολιασμού βιοτεχνολογικού σχεδιασμού με τη χρήση μικροφυκών από το θαλάσσιο περιβάλλον.

Τα δεδομένα και τα στοιχεία τα οποία παρουσιάζονται αφορούν τα εντατικά συστήματα παραγωγής ιχθυοκαλλιεργειών, για τα κύρια είδη εκτροφής στις μεσογειακές ιχθυοκαλλιέργειες αλλά και αναφορές παγκοσμίως.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικά στοιχεία υδατοκαλλιέργειών

Ο κλάδος της υδατοκαλλιέργειας τα τελευταία χρόνια έχει μια σημαντική οικονομική άνοδο ως μία ταχέως αναπτυσσόμενη βιομηχανία παραγωγής θαλασσινών προϊόντων ανά τον κόσμο. Σημαντικό ρόλο για την ανάπτυξη του κλάδου έχει τόσο η τεχνολογία όσο και η τεχνογνωσία με σκοπό την αύξηση κάλυψης των διατροφικών αναγκών σε ιχθυηρά και την προσφορά προϊόντων υψηλής διατροφικής αξίας ενώ παράλληλα συμβάλλει στην εξασθένιση της υπεραλίευσης (ΣΕΘ 2021). Ήδη, η μισή κατανάλωση παγκοσμίως καλύπτεται από την ιχθυοκαλλιέργεια, η οποία αναμένεται να καλύψει ακόμα μεγαλύτερο ποσοστό στο άμεσο μέλλον (Εικ. 1).



**Εικόνα 1** Σύγκριση κατανάλωσης εκτρεφόμενων ιχθύων σήμερα και στο μέλλον (Πηγή: FAO FIPS 2014)

Ως υδατοκαλλιέργεια ορίζεται η εκτροφή ή η καλλιέργεια υδρόβιων οργανισμών χρησιμοποιώντας τεχνικές σχεδιασμένες για την αύξηση της παραγωγής των οργανισμών αυτών σε μεγαλύτερες ποσότητες από ότι η φυσική ικανότητα του περιβάλλοντος, όπου οι οργανισμοί παραμένουν στην ιδιοκτησία ενός ή περισσότερων φυσικών ή νομικών προσώπων σε όλα τα στάδια της εκτροφής ή της καλλιέργειας μέχρι και την αλίευση. Ιχθυοκαλλιέργεια συγκεκριμένα ορίζεται η καλλιέργεια ιχθύων, διαχωρίζοντάς την από την καλλιέργεια των υπόλοιπων θαλάσσιων ειδών (FAO). Οι υδατοκαλλιέργειες ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τους εκτρεφόμενους οργανισμούς, το περιβάλλον της καλλιέργειας, την ένταση της παραγωγής και το σύστημα παραγωγής που χρησιμοποιείται.

Ανάλογα με τον τρόπο χρήσης του νερού μέσα στο οποίο πραγματοποιείται η καλλιέργεια, οι κύριες κατηγορίες ιχθυοκαλλιεργειών είναι: τα ανοικτά συστήματα στα οποία η εκτροφή γίνεται μέσα στο νερό της θάλασσας με τη χρήση κυρίως κλωβών που επιπλέουν στην υδάτινη επιφάνεια με τη βοήθεια πλωτήρων που σταθεροποιούνται στον πυθμένα (πλωτές εγκαταστάσεις). Η δεύτερη κατηγορία είναι τα ημίκλειστα συστήματα ή συνεχούς ροής, όπου το νερό διέρχεται από το σύστημα μία μόνο φορά και μετά εκβάλλει στο υδάτινο περιβάλλον περιλαμβάνοντας όλες τις εκτροφές που γίνονται μέσα σε κάθε είδους δεξαμενές (χερσαίες εγκαταστάσεις). Τέλος, στα κλειστά συστήματα ή αλλιώς ανακυκλούμενα συστήματα υδατοκαλλιέργειας (Recirculation Aquaculture Systems / RAS) όπου το νερό επανακυκλοφορεί συνεχώς, χωρίς να ανανεώνεται μέσα στις δεξαμενές εκτροφής και σε φίλτρα (χημικά, βιολογικά, μηχανικά) που παρεμβάλλονται για τον καθαρισμό του, τις συσκευές οξυγόνωσης, θέρμανσης ή ψύξης κλπ (Υδατοκαλλιέργεια και Natura 2000, 2018).

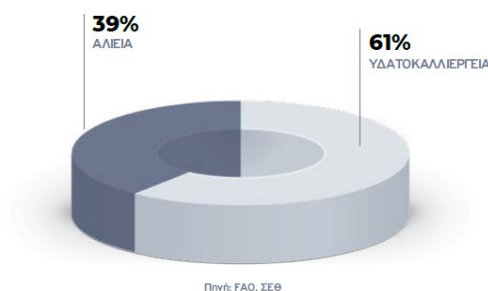
Ανάλογα με τον τρόπο διατροφής και με το περιβάλλον στο οποίο λαμβάνει χώρα η παραγωγή, οι υδατοκαλλιέργειες μπορούν να διακριθούν:

- στις εκτατικές τύπου υδατοκαλλιέργειες όπου οι οργανισμοί καλλιεργούνται σε φυσικά υδάτινα οικοσυστήματα, δεν προσφέρεται τροφή και εξαρτώνται σχεδόν αποκλειστικά από την τροφή που υπάρχει στο φυσικό περιβάλλον με ελάχιστη ή και καμία ανθρώπινη παρέμβαση
- στις ημιεντατικές ή ημιεκτατικές τύπου υδατοκαλλιέργειες όπου γίνεται χρήση της φυσικής παραγωγικότητας του οικοσυστήματος, όμως με ανθρώπινη παρέμβαση με την προσθήκη λιπασμάτων ή οργανικής ύλης για αύξηση της παραγωγικότητας κι ενίσχυση της τροφικής αλυσίδας
- και στις εντατικές τύπου υδατοκαλλιέργειες που παρέχεται το σύνολο της απαιτούμενης τροφής και συνεπώς η εκτροφή είναι απολύτως ελεγχόμενη (Υδατοκαλλιέργεια και Natura 2000, 2018).

## 1.2 Μεσογειακή και παγκόσμια ιχθυοκαλλιέργεια

Η υδατοκαλλιέργεια και κυρίως η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί στην Ελλάδα έναν από τους πιο σημαντικούς κλάδους του πρωτογενούς τομέα ζωικής παραγωγής λόγω της συμβολής της στην οικονομική ανάπτυξη και την κοινωνική συνοχή της χώρας. Στην Ελλάδα, η παραγωγή της ιχθυοκαλλιέργειας υπερτερεί της αλιείας (Εικ. 2). Τα μεσογειακά είδη τα οποία εκτρέφονται στις ελληνικές ιχθυοκαλλιέργειες είναι κυρίως η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και σε ένα μικρότερο ποσοστό νέα είδη όπως μυτάκι, κρυνός, συναγρίδα κ.α. (Εικ. 3).

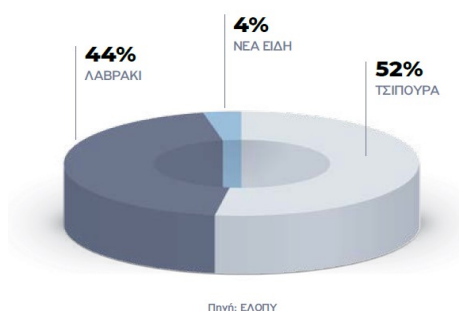
### Παραγωγή αλιευτικών προϊόντων



**Εικόνα 2** Κατανομή παραγωγής αλιευτικών προϊόντων στην Ελλάδα (Πηγή FAO, ΣΕΘ 2021)

Με βάση τα τελευταία διαθέσιμα στοιχεία του ΥΠΑΑΤ για το 2021, υπάρχουν 280 μονάδες θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας στις οποίες εκτρέφονται κυρίως τσιπούρα και λαβράκι. Σύμφωνα με την ετήσια έκθεση του Συνδέσμου Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών (ΣΕΘ), το 2020 η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού ανήλθε σε 117.000 τόνους (65.000 τόνοι τσιπούρας και 52.000 τόνοι λαβρακιού) συνολικής αξίας 546,26 εκ. ευρώ. Σε σχέση με το 2019 παρατηρείται πτώση σχεδόν 3% ως προς τον όγκο παραγωγής και οριακή αύξηση 0,1% ως προς την αξία πωλήσεων. Η μείωση του όγκου παραγωγής οφείλεται σε μειωμένη τοποθέτηση γόνου το προηγούμενο έτος. Τα αποτελέσματα και οι διαφορές μεταξύ των τελευταίων ετών, έχουν επηρεαστεί από την υγειονομική κρίση που έχει προκύψει από την πανδημία Covid-19.

### Βασικά είδη εκτροφής



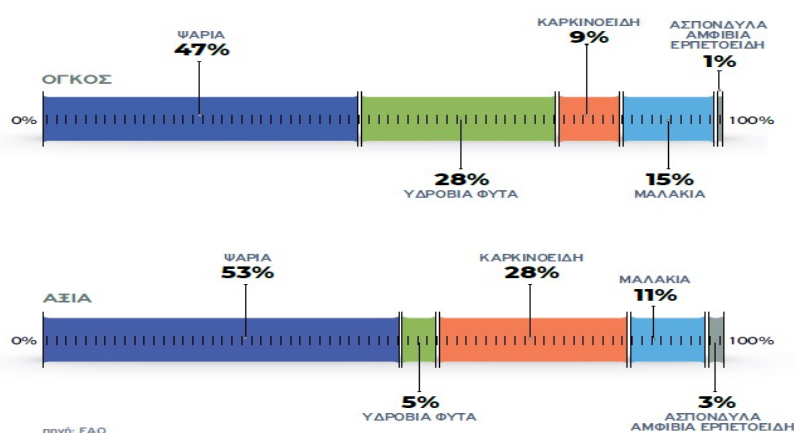
**Εικόνα 3** Βασικά είδη εκτροφής (Πηγή ΕΛΟΠΥ 2021)

Η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια το 2020 αντιπροσώπευσε το 83% του όγκου και το 98% της αξίας της συνολικής παραγωγής υδατοκαλλιέργειας της χώρας. Ως κύρια παραγόμενα προϊόντα εξαγωγών της θαλάσσιας υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα αναδείχθηκαν η τσιπούρα και το λαβράκι, τα οποία σε ένα ποσοστό περίπου 80% εξάγονται σε χώρες της

Ε.Ε. με κυριότερη την Ιταλία (σχεδόν το 40% των συγκεκριμένων ειδών), και λοιπές χώρες. Η τσιπούρα αντιστοιχεί στο 56% του όγκου παραγωγής και το λαβράκι στο 44%. Τα προϊόντα ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας για το έτος 2020 διατέθηκαν σε 40 χώρες παγκοσμίως (ΣΕΘ 2021).

Η προσφορά προϊόντων αλιείας και υδατοκαλλιέργειας παγκοσμίως για το 2019 εκτιμάται σε 213,69 εκατ. τόνους παρουσιάζοντας οριακή αύξηση 0,2% σε σχέση με το προηγούμενο έτος (213,36 εκατ. τόνοι). Το 56% προήλθε από την υδατοκαλλιέργεια και το υπόλοιπο 44% από την αλιεία. Σχετικά με τον όγκο παραγωγής, ανήλθε συνολικά σε 120,1 εκατ. τόνους προϊόντων παρουσιάζοντας αύξηση 3,7% σε σχέση με το προηγούμενο έτος. Ο μεγαλύτερος όγκος αλιευμάτων καλλιεργήθηκε σε θαλάσσιες εκτάσεις καθώς εκεί παράχθηκε το 48% της παγκόσμιας παραγωγής (57,06 εκατ. τόνοι) και ακολουθούν αυτά που καλλιεργήθηκαν σε εσωτερικά (γλυκά) ύδατα (44%, 52,29 εκατ. τόνοι) και τα προϊόντα που καλλιεργήθηκαν σε υφάλμυρα ύδατα (8%, 9,94 εκατ. τόνοι), (ΣΕΘ 2021).

Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα διαθέσιμα στοιχεία και την κατηγοριοποίηση του FAO ως προς τον όγκο και την αξία παραγωγής για την παγκόσμια ιχθυοκαλλιέργεια το 2019, αναλύεται ως εξής (Εικ.4, Εικ.5): Τα ψάρια αποτέλεσαν σχεδόν το ήμισυ της παγκόσμιας παραγωγής. Ο όγκος παραγωγής τους ξεπέρασε το 47% του συνόλου των προϊόντων υδατοκαλλιέργειας που παρήχθησαν (56,33 εκατ. τόνοι) και η αξία τους σε πρώτη πώληση ανήλθε στο 53%. Στη δεύτερη κατηγορία κατατάσσονται τα υδρόβια φυτά για στη συνέχεια ακολουθούν τα μαλάκια, τα καρκινοειδή, και τέλος τα αμφίβια και τα ασπόνδυλα (ΣΕΘ 2021).



**Εικόνα 4** Διάρθρωση παραγωγής υδατοκαλλιέργειας παγκοσμίως (Πηγή FAO, ΣΕΘ 2021)

Το 2019 η παραγωγή σε όλες της ηπείρους παρουσίασε αύξηση από 1,2% (Ωκεανία) μέχρι 9,6% (Αμερική). Ωστόσο, η κατανομή της δραστηριότητας παραμένει άνιση αφού στις χώρες της Ασίας εκτρέφονται τα 2/3 της παγκόσμιας παραγωγής καθώς ο μεγαλύτερος παραγωγός και εξαγωγέας ψαριών και αλιευτικών προϊόντων είναι με διαφορά η Κίνα (17,28 δισ. ευρώ). Σημειώνεται ωστόσο πως η Κίνα από το 2011 είναι και από τους μεγαλύτερους εισαγωγείς αλιευμάτων, όχι μόνο λόγω της αύξησης της εγχώριας κατανάλωσης αλλά κυρίως λόγω των εισαγωγών πρώτων υλών για μεταποίηση (ΣΕΘ 2021).

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ		ΑΣΙΑ ΧΙΛΙΑΔΕΣ (€)	ΕΤΗΣΙΑ ΜΕΤΑΒΟΛΗ %
<b>ΕΙΔΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ 2019 (ΑΣΙΑ)</b>			
Γαρίδα Κεντρικής Αμερικής	<i>Penaeus vannamei</i>	<b>225.753</b>	<b>5,60</b>
Αμερικάνικη Καραβίδα	<i>Procambarus clarkii</i>	<b>14.698</b>	<b>27,10</b>
Σολομός Ατλαντικού	<i>Salmo salar</i>	<b>13.653</b>	<b>-0,10</b>
Κινέζικος Κυπρίνος	<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	<b>10.497</b>	<b>0,50</b>
Κυπρίνος	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	<b>8.293</b>	<b>0,00</b>
Κινέζικος Κάβουρας	<i>Eriocheir sinensis</i>	<b>7.917</b>	<b>2,90</b>
Τιλάπια Νείλου	<i>Oreochromis niloticus</i>	<b>7.344</b>	<b>6,10</b>
Κοινός Κυπρίνος	<i>Cyprinus carpio</i>	<b>7.237</b>	<b>2,90</b>
Ιριδιζουσα πέστροφα	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	<b>5.863</b>	<b>0,20</b>
Στρείδια	<i>Crassostrea spp</i>	<b>5.569</b>	<b>1,10</b>
<b>ΣΥΝΟΛΟ 10 ΠΡΩΤΩΝ ΕΙΔΩΝ</b>		<b>106.823</b>	<b>5,40</b>
<b>ΣΥΝΟΛΟ ΥΠΟΛΟΙΠΩΝ ΕΙΔΩΝ</b>		<b>112.861</b>	<b>4,00</b>
<b>ΣΥΝΟΛΟ ΠΑΓΚ. ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ</b>		<b>219.684</b>	<b>4,70</b>

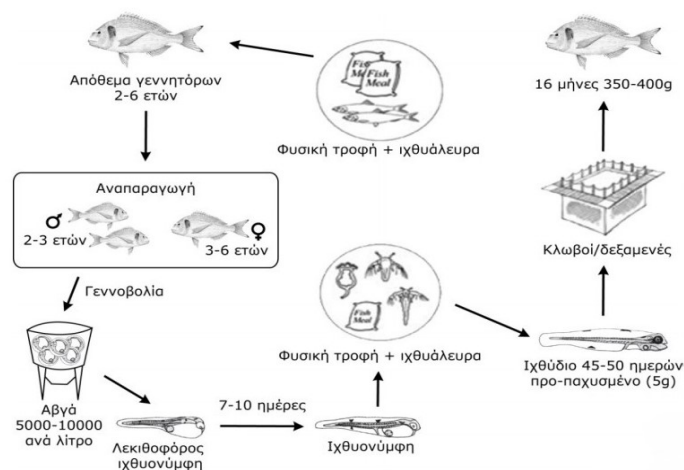
Εικόνα 5 Είδη με την μεγαλύτερη παραγωγή 2019 (FAO , ΣΕΘ 2021)

### 1.3 Στάδια παραγωγής ιχθυοκαλλιέργειών

Τα στάδια που ακολουθούνται στα συστήματα παραγωγής αποτελούνται από την τεχνητή αναπαραγωγή, την εκτροφή των ιχθυοσυμφών δηλαδή την εκκόλαψη και την ανάπτυξή τους, την αποκοπή (το πέρασμα από τη ζωντανή τροφή στη συνθετική) και τέλος την προπάχυνση (Εικ. 6), (Βουλτσιάδου Ε., 2015). Πιο αναλυτικά, η παραγωγική διαδικασία ξεκινάει στον ιχθυογεννητικό σταθμό (χερσαία εγκατάσταση). Εκεί οι γεννήτορες (ενήλικα ψάρια) με ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας παράγουν αυγά τα οποία γονιμοποιούνται με φυσικό τρόπο, και στην συνέχεια συλλέγονται και εκκολάπτονται καθώς γίνονται λάρβες (νύμφες). Το στάδιο αυτό διαρκεί περίπου 40 μέρες και οι λάρβες τρέφονται με ζωντανή τροφή (πλαγκτόν και ζωοπλαγκτόν πχ Artemia) η οποία παρασκευάζεται στον ιχθυογεννητικό σταθμό. Όταν οι λάρβες μεταμορφωθούν σε ιχθύδια αρχίζει διαδοχικά η αποκοπή τους και η παροχή ξηράς τροφής σε μορφή μικρών κόκκων και τότε μεταφέρονται σε μεγαλύτερες δεξαμενές όπου παραμένουν μέχρι να αποκτήσουν μέγεθος ικανό για την

μεταφορά τους στους θαλάσσιους ιχθυοκλωβούς. Το στάδιο αυτό διαρκεί περίπου 120 μέρες. Γενικότερα τα πρώτα στάδια ζωής των ιχθυδίων χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής λόγω της αυξημένης ευαισθησίας τους. Στο τελευταίο στάδιο, τα ιχθύδια (γόνοι) μεταφέρονται σε ιχθυοκλωβούς στη θάλασσα και εκτρέφονται εκεί μέχρι την αλίευσή τους. Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιούνται ιχθυοτροφές αυστηρών προδιαγραφών ώστε να παρέχονται στα ψάρια όλα τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται για να έχουν μια υγιή ανάπτυξη (ΣΕΘ 2021).

Ο δείκτης μετατρεψιμότητας FCR (feed conversion ratio) εκφράζει την ποσότητα της καταναλωθείσας τροφής σε kg (επί ξηρού βάρους) η οποία απαιτείται για την παραγωγή 1 kg ψαριού (νωπό βάρος). Εξαρτάται από τους εξής παράγοντες: το μέγεθος του ψαριού, τη θερμοκρασία του νερού η οποία καθορίζει τη μεταβολική δραστηριότητα του οργανισμού και την ποιότητα της τροφής και τον τρόπο χορήγησης της. Στα εντατικά συστήματα εκτροφής, ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (food conversion ratio, FCR) είναι συνήθως πολύ ευνοϊκός (περίπου 1,3:1). Η εκτροφή σε θαλάσσιους κλωβούς είναι πιο απλή και οικονομική διαδικασία και αποτελεί το πλέον διαδεδομένο σύστημα πάχυνσης στη λεκάνη της Μεσογείου. Αν και οι πυκνότητες (10-15 kg/m<sup>3</sup>) είναι μικρότερες από ότι στις δεξαμενές, υπάρχουν μεγάλα πλεονεκτήματα που καθιστούν τους κλωβούς εκτροφής πιο κερδοφόρους. Για παράδειγμα, δεν υπάρχει ενεργειακό κόστος για την άντληση, τον εξαερισμό, ή την επεξεργασία του νερού. Ωστόσο, στους κλωβούς εκτροφής δεν είναι δυνατόν να ελεγχθεί η θερμοκρασία, με αποτέλεσμα η διάρκεια της πάχυνσης έως το αγοραστικό μέγεθος να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τις δεξαμενές και να δημιουργείται η ανάγκη χρησιμοποίησης ιχθυδίων μεγαλύτερου μεγέθους, τα οποία θα έχουν και μεγαλύτερο κόστος (Βουλτσιάδου Ε., 2015). Συνεπώς οι κύριοι παράγοντες που συμβάλουν στις επιδόσεις της εντατικής ιχθυοκαλλιέργειας ως βασικούς δείκτες απόδοσης (KPIs) είναι ο ρυθμός ανάπτυξης, η θνησιμότητα και η μετατρεψιμότητα τροφής (<http://performfish.eu/>).



**Εικόνα 6** Κύκλος παραγωγής πχ τσιπούρας εντατικής καλλιέργειας (Πηγή Βουλτσιάδου Ε., 2015)

## 1.4 Ασθένειες ιχθύων

Οι ιχθυοκαλλιέργειες ωστόσο απειλούνται από την πιθανότητα μόλυνσης των ιχθύων από βακτήρια, ιούς και παράσιτα τα οποία αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες για τη βελτίωση της εντατικής ιχθυοκαλλιέργειας (Dadar et al., 2016). Μία από τις κυριότερες απειλές στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι η θνησιμότητα η οποία οφείλεται σε μολυσματικές ασθένειες. Με βάση τη βιβλιογραφία το 54,9% οφείλεται σε βακτηριακά παθογόνα, το 22,6% σε ιικά, το 3,1% σε μυκητιακά και το 19,4% σε παρασιτικά τα οποία είναι υπεύθυνα για τις ασθένειες στις καλλιέργειες ιχθύων (Dharet al., 2014). Έως σήμερα παρατηρούνται ορισμένες διακυμάνσεις σε αυτά τα ποσοστά, ωστόσο εξακολουθεί να είναι μεγαλύτερο εκείνο των βακτηριακών παθογόνων, με κυριότερα είδη που ανήκουν στα γένη *Aeromonas*, *Pseudomonas* και *Vibrio*.

Τα πιο συχνά επιβλαβή και πιο σημαντικά είναι τα βακτήρια από το γένος *Vibrio* και συγκεκριμένα το *Vibrio anguillarum* και το *Photobacterium damsela*. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει μια αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης ασθενειών που προκαλείται από το βακτήριο *Vibrio harveyi*, παλαιότερα γνωστό ως παθογόνο καρκινοειδών, μαλακίων και ψαριών σε υποτροπικές περιοχές (Mancuso, 2014). Επίσης η φωτοβακτηριδίαση ή παστερέλλωση (Pasteurellosis) που προέρχεται από το είδος *Photobacterium damsela* και η δονακίωση (Vibriosis) από το είδος *Vibrio alginolyticus*. Οι τσιπούρες ειδικότερα προσβάλλονται από διάφορους ιούς (Aquareovirus), ενδοπαράσιτα και τέλος από το βακτήριο *Pseudomonas anguilliseptica* το οποίο προκαλεί το «σύνδρομο του χειμώνα» (winter disease syndrome).

Πιο πρόσφατα, μια σειρά από ιογενείς ομάδες έχουν επίσης αναφερθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες ασθένειας σε ψάρια, συμπεριλαμβανομένου του ιού Betanodavirus όπως ο ιός της νευρικής νέκρωσης (NNV), ο Megalocyticvirus ιός που προκαλεί μόλυνση στη σπλήνα και στο νεφρό (ISKNV), και ο ιός της κόκκινης τσιπούρας (RSIV) (Charoonnart et al., 2018). Η πιο σημαντική από άποψη βαρύτητας, οικονομικής επίπτωσης και εξάπλωσης, είναι η ιογενής νευρική νέκρωση (nervous necrosis virus - NNV) συνώνυμη με την ιογενή εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια (Viral Encephalopathy and Retinopathy -VER). Συγκεκριμένα για το λαβράκι είναι η πιο συχνή περίπτωση ασθένειας και οφείλεται στον Nodaiό (Nodavirus) που έχει θεωρηθεί ως η πιο σοβαρή ιογενής απειλή στην εκτροφή ειδών θαλασσινού νερού στην περιοχή της Μεσογείου (Zrnčić S., 2020). Μια άλλη σχετική ασθένεια, που προσβάλλει κυρίως τη τσιπούρα (*Sparus aurata*), είναι η νόσος της λεμφοκύστης (LCD) που προκαλείται από ένα μέλος της οικογένειας Iridoviridae.

Όσον αφορά τις κύριες ασθένειες που προκαλούν υψηλές απώλειες στα αποθέματα γαρίδας, αυτές προέρχονται από ιικά παθογόνα (για παράδειγμα η νόσος του συνδρόμου της λευκής κηλίδας (WSSD), τη νόσο του κίτρινου κεφαλιού (YHD) και από βακτηριακά παθογόνα όπως το σύνδρομο EMS (Early Mortality Syndrome), (Charoonart et al., 2018).

Γενικότερα για την πρόληψη των ασθενειών είναι απαραίτητο τα ψάρια να διατηρούνται σε ένα περιβάλλον υγιεινό και με βάση την εμπειρία του προσωπικού, να γίνεται πρόβλεψη για το είδος και χρόνο εμφάνισης της ασθένειας που μπορεί να αναμένεται κάτω από τις επικρατούσες συνθήκες. Εάν οι συνθήκες υποδηλώνουν την πιθανότητα μιας επιζωοτίας, τότε πρέπει να μειώνεται η πυκνότητα εκτροφής και να περιορίζεται η σίτιση. Η απομάκρυνση των νεκρών ψαριών είναι το πρώτο βήμα για την πρόληψη της περαιτέρω εξάπλωσης της ασθένειας. Είναι απαραίτητο, τόσο τα άρρωστα όσο και τα νεκρά ψάρια να απομακρύνονται όσο το δυνατόν συντομότερα από τις πληγείσες δεξαμενές/κλωβούς. Οι καλλιέργειες γίνονται πιο ευάλωτες σε ξεσπάσματα ασθενειών όταν η θερμοκρασία του νερού αυξάνεται πάνω από τους 28 °C (Βουλτσιάδου Ε., 2015).

Οι επιπτώσεις των μολυσματικών αυτών παθογόνων απαιτούσαν την ανάπτυξη διαφόρων στρατηγικών για τον σχεδιασμό εμβολίων με στόχο την προστασία της υγείας των ιχθύων, όσο και την ανάγκη επέκτασης της χρήσης αντιβιοτικών για την απόκτηση υψηλότερης παραγωγής στις υδατοκαλλιέργειες. Εντούτοις, η εκτεταμένη χρήση αντιβιοτικών στις ιχθυοκαλλιέργειες έχει υψηλό κόστος και μικρή απόδοση, μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων, κινδύνους στην ασφάλεια των προϊόντων αλλά και περιβαλλοντικά ζητήματα λόγω της απελευθέρωσης αντιβιοτικών στο θαλάσσιο περιβάλλον κατά τη διάρκεια της χορήγησής τους. Συνεπώς, για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας των παθογόνων υιοθετήθηκαν οι απαραίτητες στρατηγικές ανοσοπροφύλαξης ή εμβολιασμού για την προστασία της υγείας των ψαριών (Dadar et al., 2016). Μολονότι τα ψάρια είναι ποικιλόθερμα ζώα, χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή στον τρόπο εμβολιασμού αλλά και στον τύπο εμβολίων, σε συνδυασμό με το είδος των ψαριών, καθώς το πρωτόκολλο χορήγησης / διάθεσης θα πρέπει να ακολουθεί συγκεκριμένες οδούς όπως εμβάπτιση, δια στόματος, είτε με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση για την βέλτιστη ανοσοαπόκριση μετά τον εμβολιασμό (Muktar et al., 2016, Ortiz et al., 2016).

## 1.5 Μικροφύκη

Τα μικροφύκη αποτελούν μία κατηγορία οργανισμών στην οποία στρέφεται το ενδιαφέρον της βιομηχανίας διεθνώς τα τελευταία χρόνια για παραγωγή νέων προϊόντων. Η βιομάζα των μικροφυκών χρησιμοποιείται εδώ και μερικές δεκαετίες στις υδατοκαλλιέργειες ως ζωντανή τροφή αλλά και στην παραγωγή προϊόντων διατροφής, είτε αυτούσια είτε μετά από επεξεργασία. Η καλλιέργεια ποικίλει ανάλογα με το τελικό προϊόν και γενικά δεν θεωρείται απλή. Απαιτείται συνδυασμός της τεχνολογίας φυτικής παραγωγής με αυτήν της μικροβιακής τεχνολογίας δεδομένης της φύσης των οργανισμών οι οποίοι είναι μικροσκοπικοί (κατά κανόνα μονοκύτταροι) υδρόβιοι, και φωτοσυνθετικοί. Παρά τα μεγάλα προβλήματα που υφίστανται στην παραγωγή και την προ-επεξεργασία (συγκομιδή, ξήρανση, κτλ) οι προοπτικές είναι ενθαρρυντικές (Μάρκου, 2013).

Τα φύκη είναι μια μεγάλη πολυφυλετική κατηγορία μονοκύτταρων ή πολυκύττατων οργανισμών με σχήματα και μεγέθη που ποικίλουν σημαντικά. Ο όρος φύκη περιλαμβάνει δύο κύριες μορφολογικές κατηγορίες: τα μακροφύκη και τα μικροφύκη. Το κριτήριο της διάκρισης μεταξύ των δύο αυτών κατηγοριών είναι μόνο το μέγεθος. Τα μικροφύκη που έχουν μελετηθεί και ερευνηθεί περισσότερο στον τομέα της γενετικής μηχανικής έως σήμερα ανήκουν στα γένη *Dunaliella* και *Chlamydomonas*. Μεταξύ των δύο ειδών υπάρχουν αρκετές ομοιότητες καθώς έχουν την ίδια συστηματική ταξινόμηση έως το επίπεδο Οικογένειας. Επίσης έχει μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί και το είδος *Nannochloropsis oculata* (Charoonnart et al., 2018).

Αρχικά, τα μικροφύκη προσφέρουν φυσικά οφέλη παρέχοντας θρεπτικά συστατικά στη διατροφή των ιχθύων λόγω της γρήγορης πέψης και της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες, λιπίδια και απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Επιπλέον, ορισμένα είδη μικροφυκών διαθέτουν φυσικές αντιμικροβιακές ενώσεις ή περιέχουν βιομόρια που μπορούν να χρησιμεύσουν ως ανοσοδιεγερτικά (Charoonnart et al., 2018). Τα πράσινα μικροφύκη, ως ισχυροί φωτοβιοαντιδραστήρες, μπορούν να θεωρηθούν ως ένα οικονομικό σύστημα έκφρασης για την παραγωγή ανασυνδυασμένων θεραπευτικών πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα λόγω του χαμηλού κόστους παραγωγής σε συνδυασμό με το γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης και συγχρόνως ευκολία στον χειρισμό τους. Διαθέτουν όλα τα ευεργετικά χαρακτηριστικά των ευκαρυωτικών συστημάτων συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που απαιτείται για τη σωστή αναδίπλωση και σταθερότητα των ενεργών πρωτεϊνών (Akbari et al., 2014).

Για παράδειγμα το *Dunaliella*, είναι ένα από τα καλύτερα μελετημένα μονοκύτταρα πράσινα φύκη στον τομέα της φυσιολογίας, της βιοχημείας και της γενετικής (Oren 2005). Κατά την παραγωγή πρωτεϊνών, τα μονοκύτταρα πράσινα φύκη ταξινομούνται ως «ασφαλή» (Generally Regarded As Safe , GRAS) και χρησιμοποιούνται συχνά λόγω της εύκολης επεξεργασίας κατά την έκφραση των πρωτεϊνών. Απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη μικροφυκών εκτός από την ανάγκη χλωριούχου νατρίου, είναι το διοξείδιο του άνθρακα και το φως τα οποία είναι εξαιρετικά χαμηλού κόστους ( Akbari et al., 2014).

## 2. ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Υγεία των ψαριών

Πρωταρχικός στόχος στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι η παραγωγή θρεπτικών προϊόντων στην υψηλότερη δυνατή ποιότητα. Μια σειρά από μέτρα στοχεύουν στην εξασφάλιση της υγείας των εκτρεφόμενων ψαριών. Αποφυγή περιττού στρες στα ψάρια, το οποίο επιτυγχάνεται με τη λήψη όλων των απαραίτητων μέτρων στα μέσα και τις συνθήκες διαβίωσης του ιχθυοπληθυσμού. Τακτικές επιθεωρήσεις ώστε να εξασφαλιστεί ότι οποιοσδήποτε σημαντικές αλλαγές στη συμπεριφορά και τη σωματική διάπλαση θα ανακαλυφθούν άμεσα με τις κατάλληλες ενέργειες. Αποφυγή μετάδοσης ασθενειών η οποία επιτυγχάνεται όταν τα ψάρια τοποθετούνται σε ένα σύστημα ιχθυοκαλλιεργειών με σκοπό να έχουν καλή υγεία και πιστοποιημένη προέλευση. Παράλληλα, θα πρέπει να ληφθούν επαρκή προληπτικά μέτρα προκειμένου να αποφευχθεί η μετάδοση της ασθένειας μέσα στην μονάδα(μέσω της άμεσης σωματικής επαφής). Σε περίπτωση υποψίας παρουσίας ασθένειας, θα πρέπει να γίνει η εξεύρεση της κατάλληλης διάγνωσης. Η χρήση και η εφαρμογή θεραπευτικών μέσων πρέπει να συμμορφώνεται με την ενδεδειγμένη δοσολογία και όπου απαιτείται με τους χρόνους απόσυρσης, προκειμένου να αποφευχθεί η συσσώρευση καταλοίπων στα ψάρια. Εφόσον απαιτείται, πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο εγκεκριμένα και επιτρεπόμενα θεραπευτικά μέσα. Αναφορικά με την αποφυγή εξάπλωσης των ασθενειών, Οι ιχθυοκαλλιεργητές φέρουν την ευθύνη να ελαχιστοποιήσουν τον κίνδυνο εξάπλωσης πέραν των μονάδων τους και μέσα στο οικοσύστημα, όπου μπορούν να επηρεαστούν ελεύθερα ψάρια ή άλλες ιχθυοκαλλιέργειες. Ανεξάρτητα από τα αίτια των θανάτων, απαιτείται να απομακρύνονται τυχόν νεκρά ή ετοιμοθάνατα ψάρια από την περιοχή εκτροφής, με τρόπο που δεν επηρεάζει την ποιότητα ζωής των υπόλοιπων ψαριών. Και τέλος, η αποκομιδή των νεκρών ψαριών πρέπει να γίνεται προσεκτικά και αποτελεσματικά, με τρόπο που δεν επηρεάζει αρνητικά το περιβάλλον (ΣΕΘ 2021).

### 2.1.1 Ρυθμιστικό πλαίσιο για τη χρήση εμβολίων σε Ε.Ε. και Ελλάδα

Τα προϊόντα τα οποία προσφέρουν ανοσία όπως δηλαδή τα εμβόλια, εμπίπτουν στην νομοθεσία περί Κτηνιατρικής Ιατρικής της Ευρωπαϊκής Ένωσης ( Αρχική Οδηγία 81/851 και 81/852, τροποποιημένες από την Οδηγία 90/667/ΕΚ, συμπεριλαμβανομένων των ανοσολογικών προϊόντων). Επομένως, όλα τα εμβόλια για τα ψάρια απαιτούν κτηνιατρική έγκριση στις μεσογειακές χώρες της ΕΕ. Σε μεσογειακές χώρες εκτός ΕΕ, η χρήση του εμβολίου πρέπει να συμμορφώνεται με την εθνική νομοθεσία, η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις απαιτεί άδεια εισαγωγής και χρήσης ( LeBreton, 2009).

Σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία, επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται μόνο εμβόλια εγκεκριμένα σύμφωνα με την υπ' αριθμ. 282371/2006 (B T731) απόφαση Υπουργών Οικονομίας και Οικονομικών και Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων «Εναρμόνιση της Ελληνικής νομοθεσίας προς την αντίστοιχη κοινοτική στον τομέα της παραγωγής και της κυκλοφορίας των κτηνιατρικών φαρμάκων, σε συμμόρφωση προς τις οδηγίες 2001/82/ΕΚ και 2004/28/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου περί κοινοτικού κώδικα για τα κτηνιατρικά φάρμακα» και τον κανονισμό (ΕΚ) υπ' αριθμ. 726/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 31ης Μαρτίου 2004 (ΕΕ υπ' αριθμ. L 136 της 30.4.2004 σελ. 1), για τη θέσπιση κοινοτικών διαδικασιών χορήγησης άδειας και εποπτείας όσον αφορά τα φάρμακα που προορίζονται για ανθρώπινη και για κτηνιατρική χρήση και για τη σύσταση Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων».

### 2.2 Τρόποι χορήγησης των εμβολίων

Η εξασφάλιση της ποιότητας του τελικού προϊόντος από τις ιχθυοκαλλιέργειες, επιτυγχάνεται εκτός της χρήσης ανοσοενισχυτικών και αντιβιοτικών, και με τη χορήγηση εμβολίων. Για να γίνει πιο αποτελεσματικός ο τρόπος εμβολιασμού στο σύνολό του εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Αρχικά από ποιο παθογόνο και με ποιον τρόπο θα μολυνθούν τα ψάρια, τις τεχνικές παραγωγής του εμβολίου, το επίπεδο ανοσίας του ψαριού, το στάδιο ζωής στο οποίο βρίσκεται, τη θερμοκρασία του νερού κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ανοσοποίησης, την κατανόηση των αρχών εμβολιασμού από τους εργαζόμενους αλλά και το κόστος εργασίας (Yanong & Erlacher-Reid, 2012). Για την επίτευξη επαρκούς και μακροχρόνιας προστασίας, μπορεί να χρειαστεί να ακολουθηθεί συγκεκριμένη διαδρομή χορήγησης, ακόμη και πολλαπλές εφαρμογές χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους (Dadar et al., 2016).

Η χορήγηση των εμβολίων στα ψάρια στις ιχθυοκαλλιέργειες, μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους από τις οποίες οι κυριότερες είναι μέσω ενδοπεριτοναϊκής έγχυσης, με εμβάπτιση, με μπάνιο και ψεκάσμο ή με χορήγηση διά στόματος. Οι μέθοδοι αυτές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την καταπόνηση και τους χειρισμούς που υφίστανται τα ψάρια κατά την εφαρμογή των εμβολιασμών, αλλά και ως προς τον χρόνο και την εργασία που απαιτείται για την εφαρμογή τους (Μπακόπουλος, 2015).

Η χορήγηση εμβολίων δια στόματος με αντιγόνο που ενσωματώνεται στην τροφή είναι ενδεχομένως η ιδανική μέθοδος για τον εμβολιασμό των ψαριών. Αφορά μεγάλο αριθμό ατόμων χωρίς να προκαλεί στρες, δεν διακόπτει τον κύκλο εργασιών της παραγωγής και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα μεγέθη ψαριών. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μέθοδος έχει ορισμένα μειονεκτήματα. Αρχικά, δεν είναι εγγυημένη η ίση ποσότητα τροφής που λαμβάνει κάθε ψάρι μέσα σε έναν πληθυσμό. Παράλληλα, ο βαθμός προστασίας που επιτυγχάνεται είναι μικρός και δεν πραγματοποιείται πολύ καλή πρωτογενής ανοσολογική ανταπόκριση ενώ και η ενσωμάτωση του εμβολίου στην τροφή είναι μία ακριβή διαδικασία.

Η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση (ένεση) είναι η πιο αποδοτική μέθοδος σε ότι αφορά την ανάπτυξη αντισωμάτων συστηματικά και επιπλέον επιτρέπει τη χρήση ανοσοενισχυτικών για τη βελτίωση της προστασίας. Όμως, απαιτεί υψηλά εργατικά έξοδα και χρόνο, ενώ παράλληλα προκαλεί στρες και δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε μικρού μεγέθους ψάρια. Επιπλέον, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν προκαλεί έκκριση αντισωμάτων στα επιθήλια με συνέπεια ο ξενιστής να μην προστατεύεται κατά τη μόλυνση μέσω του νερού.

Η απευθείας εμβάπτιση αφορά στην έκθεση των ψαριών στο εμβολιακό μείγμα (αραίωση 1: 10 για 20-30 δευτερόλεπτα). Η συγκεκριμένη μέθοδος επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα και είναι αρκετή για την πρόσληψη των αντιγόνων από τα ψάρια. Όμως, παρά το γεγονός πως προκαλεί λιγότερο στρες, η μέθοδος περιορίζεται από τον αριθμό των ψαριών που μπορούν να εμβολιαστούν ανά μονάδα όγκου του εμβολίου και είναι αρκετά ακριβή όταν πρέπει να εμβολιαστούν σχετικά μεγάλα ψάρια. Σε αυτή τη μέθοδο δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική παραγωγή αντισωμάτων συστηματικά, επομένως τα ψάρια ενώ προστατεύονται καλύτερα από τις μολύνσεις μέσω του νερού, σε περίπτωση που ο παθογόνος εισέλθει στο εσωτερικό του σώματος, τα ψάρια παραμένουν απροστάτευτα.

Τέλος, οι μέθοδοι μπάνιου και ψεκάσμου είναι παραλλαγές της απευθείας εμβάπτισης. Τα ψάρια εκτίθενται σε αραιωμένα διαλύματα αντιγόνου για μακρές περιόδους (30-60 λεπτά) στις οποίες αυξάνεται η πρόσληψη αντιγόνου και μπορούν να αντισταθμίσουν την υψηλή αρραίωση του εμβολίου ή απλά ψεκάζονται με το εμβόλιο. Ωστόσο, μερικά μειονεκτήματα της

εμβάπτισης και του μπάνιου είναι πως δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική παραγωγή αντισωμάτων συστηματικά παρά μόνο η ανάπτυξη τους σε τοπικό επίπεδο στα επιθήλια. Έτσι σε περίπτωση που ο μικροοργανισμός εισέλθει στο εσωτερικό του σώματος, τα ψάρια μένουν απροστάτευτα. (Μπακόπουλος 2015).

### 2.2.1 Αποτελεσματικότητα εμβολίων

Η αποτελεσματικότητα των εμβολίων αναγνωρίζεται με την ποσοστιαία επιβίωση (relativepercentsurvival= rps) ή εναλλακτικά με τον υπολογισμό του «σχετικού ποσοστού επιβίωσης». Το σχετικό ποσοστό επιβίωσης υπολογίζεται από τον εξής τύπο (Amend, 1981) :

$$Rps= 1- \frac{\% \text{ επιβίωση εμβολιασμένων ψαριών}}{\% \text{ επιβίωση μη εμβολιασμένων ψαριών}} * 100\%$$

Η συγκεκριμένη σχέση εκφράζει το ποσοστό των ψαριών τα οποία δεν πέθαναν από την ασθένεια επειδή προστατεύθηκαν από τα εμβόλια. Ο εμβολιασμός θεωρείται επιτυχημένος όταν το αποτέλεσμα είναι τουλάχιστον μεγαλύτερο του 70%.

### 2.3 Τύποι εμβολίων στις ιχθυοκαλλιέργειες

Τα πρώτα εμβόλια που εφαρμόστηκαν στις ιχθυοκαλλιέργειες περιείχαν ολόκληρο το παθογόνο απενεργοποιημένο και παρότι επαρκή έναντι πολλών βακτηρίων, ήταν αναποτελεσματικά απέναντι στους ιούς. Ένας άλλος τύπος εμβολίου που έχει χρησιμοποιηθεί είναι αυτός στον οποίο το παθογόνο δεν είναι απενεργοποιημένο, αλλά εξασθενημένο (Bedekar et al, 2019). Εξαιτίας όμως μειονεκτημάτων που εμφανίζουν, ήταν ζωτικής σημασίας η ένταξη νέων τεχνολογιών στην ανάπτυξη αποτελεσματικότερων εμβολίων, όπως αυτή των ανασυνδυασμένων εμβολίων. Για την δημιουργία ενός ανασυνδυασμένου εμβολίου, οι περιοχές του παθογόνου που προκαλούν ανοσολογική απόκριση εκφράζονται και πολλαπλασιάζονται σε έναν ετερόλογο ξενιστή μέσω ζύμωσης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν βακτηριακά ή ευκαρυωτικά συστήματα έκφρασης όπως λόγω χάρη σε μικροφύκη σε αυστηρά ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες. Είναι απαραίτητη προϋπόθεση η γνώση της αλληλουχίας του γονιδίου επιλογής από το αντιγόνο, ώστε να σχεδιαστεί η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη. Με χρήση ανοσοπρωτεωμικής είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός των πρωτεϊνών των βακτηριακών παθογόνων με ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2DSDS- PAGE).Επιπλέον, με τη χρήση Westernblot εντοπίζονται οι πιο εύκολα αναγνωρίσιμοι στόχοι του ανοσοποιητικού, οπότε μπορούν να δημιουργηθούν πιο στοχευμένα ανασυνδυασμένα εμβόλια τα οποία είναι εύκολο να παραχθούν σε μεγάλη

κλίμακα με μικρό κόστος (Bedekar et al, 2019). Τα εμβόλια ιικού φορέα έχουν παρόμοια τεχνολογία με τα ανασυνδυασμένα εμβόλια, όμως χρησιμοποιούνται ιικοί ξενιστές παραγωγής του εμβολιακού αντιγόνου. Είναι αυτοσυναρμολογούμενα, αφού είναι εγγενής ιδιότητα των ιών.

Η πρόοδος της γενετικής μηχανικής βοήθησε στην παραγωγή ζωντανών εξασθενημένων εμβολίων(ή γενετικά εξασθενημένο παθογόνο) που συνήθως γίνονται με έλλειψη, διάσπαση ή εισαγωγή γονιδίου ενός μεταβολικού μονοπατιού ή του γονιδίου που προκαλεί εξασθένηση στο παθογόνο. Τα μεταλλαγμένα παθογόνα που προκύπτουν, στη συνέχεια λειτουργούν ως παθογόνα χωρίς λοιμογόνο δράση προκαλώντας προστατευτική ανοσοαπόκριση σε έναν ξενιστή. Αν και αυτή η προσέγγιση μπορεί να είναι αποτελεσματική, οι σχετικές ανησυχίες για την ασφάλεια για τα εμβολιασμένα ζώα καθώς και για το περιβάλλον ήταν ο νομικός λόγος για την απαγόρευση αυτών των εμβολίων στην υδατοκαλλιέργεια (Bedekar et al, 2019)

Η πλέον σύγχρονη εξέλιξη στα εμβόλια είναι η τεχνολογία των εμβολίων DNA. Γίνεται με απελευθέρωση πλασμιδιακού DNA που κωδικοποιεί την περιοχή ανοσοποίησης. Η έκφραση αυτής εξαρτάται από ευκαρυωτικό υποκινητή. Η παραγωγή τους είναι σχετικά οικονομική και εύκολη. Επίσης, η χορήγηση γίνεται δια στόματος. Παρόλο που το εμβόλιο με βάση το DNA έχει αποδειχθεί ότι είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική εμβολιασμού για την παροχή προστασίας έναντι διαφόρων παθογόνων, η χρήση του σε ψάρια περιορίζεται νομικά στις περισσότερες χώρες καθώς εμπíπτον σε γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, ένα εμβόλιο DNA κατά του ιού της λοιμώδους νέκρωσης των αιμοποιητικών οργάνων (IHNV) έχει νομική έγκριση για χρήση στον Καναδά. Τέλος, ο ανάστροφος εμβολιασμός, η τελευταία εξέλιξη στην τεχνολογία των εμβολίων, γίνεται με χρήση βιοπληροφορικής για την πρόβλεψη των περιοχών που μπορούν να προκαλέσουν ανοσολογική απόκριση (Dadar et al, 2016 , Bedekar et al, 2019).

## 2.4 Εμπορικά σκευάσματα εμβολίων

Μέχρι σήμερα έχουν εγκριθεί και αδειοδοτηθεί για εμπορική χρήση πάνω από 26 εμβόλια παγκοσμίως και είναι διαθέσιμα για πολλά από τα είδη στις ιχθυοκαλλιέργειες. Τα περισσότερα από αυτά τα εμβόλια έχουν πάρει έγκριση από τον USDA (United States Department of Agriculture) χρησιμοποιώντας συμβατικές μεθόδους παραγωγής ενάντια σε διάφορες σοβαρές ασθένειες και παθογόνα. Σχετικά με την παραγωγή αυτών των εμβολίων απαιτείται η κατανόηση της μικροβιολογίας και της ανοσολογίας τόσο των καλλιεργήσιμων

θαλάσσιων οργανισμών όσο και των παθογόνων από τα οποία προσβάλλονται. Στον Πίνακα1 παραθέτονται τα αδειοδοτημένα εμβόλια τα οποία χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες παγκοσμίως. Με βάση τον πίνακα, τα περισσότερα από αυτά αφορούν σε βακτηριακά παθογόνα με αδρανοποιημένο παθογόνο σαν τύπο εμβολίου (inactivated vaccine type) και ο τρόπος χορήγησης είναι κυρίως μέσω ενδοπεριτοναϊκής ένεσης (IP) (Ma J. et al., 2019). Στο Παράρτημα 1 γίνεται αναφορά για τα εμπορικά σκευάσματα που έχουν αδειοδοτηθεί και εγκριθεί στην Ελλάδα.

**Πίνακας 1** Αδειοδοτημένα εμβόλια τα οποία χρησιμοποιούνται παγκοσμίως στις ιχθυοκαλλιέργειες (Ma J. et al., 2019)

Disease	Pathogen	Major Fish Host	Vaccine Type	Antigens/Targets	Delivery Methods	Country/Region *
<b>Viral Diseases</b>						
Infectious hematopoietic necrosis	IHNV <i>Rhabdovirus</i>	Salmonids	DNA	G Glycoprotein	IM	Canada
Infectious pancreatic necrosis	IPNV <i>Birnavirus</i>	Salmonids, sea bass, sea bream, turbot, Pacific cod	Inactivated	Inactivated IPNV	IP	Norway, Chile, UK
			Subunit	VP2 and VP3 Capsid Proteins	Oral	Canada, USA
			Subunit	VP2 Proteins	IP	Canada, Chile, Norway
Infectious salmon anemia	ISAV <i>Orthomyxovirus</i>	Atlantic salmon	Inactivated	Inactivated ISAV	IP	Norway, Chile, Ireland, Finland, Canada
Pancreatic disease virus	SAV <i>alphaviruses</i>	Salmonids	Inactivated	Inactivated SAV	IP	Norway, Chile, UK
Spring viremia of carp virus	SVCV <i>Rhabdovirus</i>	Carp	Subunit	G Glycoprotein	IP	Belgium
			Inactivated	Inactivated SVCV	IP	Czech Republic
Koi herpesvirus disease	KHV <i>Herpesvirus</i>	Carp	Attenuated	Attenuated KHV	IMM or IP	Israel
Infectious spleen and	ISKNV	Asian seabass, grouper,	Inactivated	Inactivated ISKNV	IP	Singapore
<b>Disease</b>	<b>Pathogen</b>	<b>Major Fish Host</b>	<b>Vaccine Type</b>	<b>Antigens/Targets</b>	<b>Delivery Methods</b>	<b>Country/Region *</b>
Columnaris disease	<i>Flavobacterium columnaris</i>	All freshwater finfish species, bream, bass, turbot, salmon	Attenuated	Attenuated <i>F. columnare</i>	IMM	USA
Pasteurellosis	<i>Pasteurela piscicida</i>	Sea bass, sea bream, sole	Inactivated	Inactivated <i>P. piscicida</i>	IMM	USA, Europe, Taiwan, Japan
Lactococcosis	<i>Lactococcus garviae</i>	Rainbow trout, amberjack, yellowtail	Inactivated	Inactivated <i>L. garviae</i>	IP	Spain
Streptococcus infections	<i>Streptococcus</i> spp.	Tilapia, yellow tail, rainbow trout, ayu, sea bass, sea bream	Inactivated	Inactivated <i>S. agalactiae</i> (biotype 1)	IP	Taiwan Province of China, Japan, Brazil, Indonesia
				Inactivated <i>S. agalactiae</i> (biotype 2)	IP	
				Inactivated <i>S. iniae</i>	IP or IMM	
Salmonid rickettsial septicemia	<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Salmonids	Inactivated	Inactivated <i>P. salmonis</i>	IP	Chile
Motile <i>Aeromonas</i> septicemia (MAS)	<i>Aeromonas</i> spp.	Striped catfish	Inactivated	<i>A. hydrophila</i> (serotype A and B)	IP	Vietnam
Wound Disease	<i>Moritella viscosa</i>	Salmonids	Inactivated	Inactivated <i>M. viscosa</i>	IP	Norway, UK, Ireland, Iceland
Tenacibaculosis	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Turbot	Inactivated	Inactivated <i>T. maritimum</i>	IP	Spain

## 2.5 Τα μικροφύκη ως μέσο παραγωγής εμβολίων

Οι εξελίξεις της επιστήμης έχουν ανοίξει νέες οδούς σε ερευνητικούς τομείς για την ανάπτυξη και το σχεδιασμό νέων και αποτελεσματικών εμβολίων, καθώς και τη βελτίωση των ήδη υπαρχόντων. Οι νέες μέθοδοι στον εμβολιασμό προσφέρουν πολύτιμες ευκαιρίες για να ανακαλυφθούν νέα εμβόλια που θα συμβάλλουν στην καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών (Dadar et al., 2016). Η παραγωγή γενετικώς τροποποιημένων φυτών για εμβολιασμό δια μέσου της στοματικής οδού, διαγονιδιακά ψάρια, γενετικά τροποποιημένη τροφή (με βάση μικροοργανισμούς ή φυτά), καθώς και εμβόλια DNA είναι ορισμένες από τις νέες στρατηγικές που έχουν προταθεί για τον έλεγχο μολυσματικών ασθενειών των ψαριών στις ιχθυοκαλλιέργειες (Dunham 2011, FAO and FOODS 2004, Llewellyn et al., 2014).

Είναι σημαντικό πως καλλιεργούνται μικροφύκη με εμπορικό ενδιαφέρον τόσο ως συστατικά τροφίμων αλλά και ως μία εναλλακτική υγιεινή πηγή τροφίμων (π.χ. είδη *Chlorella*, *Dunaliella* και *Haematococcus*), ενώ έχουν ήδη αναγνωρισθεί ως ασφαλή (GRAS). Η ασφάλεια αυτή προσφέρει την δυνατότητα ανάπτυξης ενός βιοφαρμακευτικού προϊόντος όπως μια αντιμικροβιακή πρωτεΐνη (π.χ. διαμορφωμένη σε κρέμα ή σπρέι) και συνεπώς την αποφυγή δαπανηρών επενδύσεων που απαιτείται σε όποια άλλη περίπτωση (Taunt et al., 2017). Τα εδώδιμα εμβόλια με μικροφύκη έχουν σχεδιαστεί και αναπτυχθεί για συγκεκριμένα παθογόνα στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών έως σήμερα, και η ανοσοπροστασία τους έχει διερευνηθεί αρκετά (Ma K., et al., 2020).

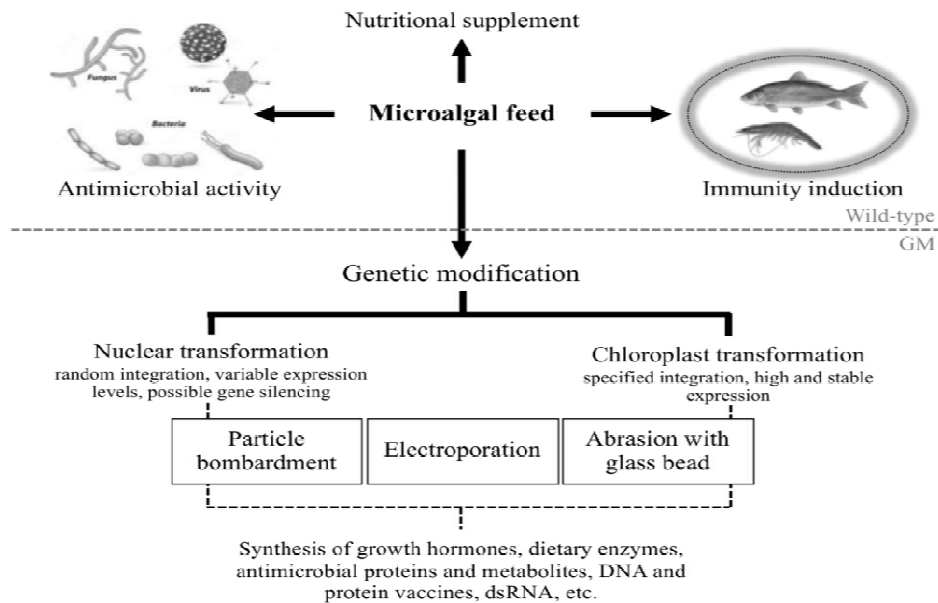
Προκειμένου να ξεπεραστούν οι περιορισμοί και τα προβλήματα που επιφέρουν τα συμβατικά εμβόλια, τα φυτά μπορούν να παρέχουν ένα έξυπνο και οικονομικό μέσο για την ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων με την πρόοδο της βιοτεχνολογίας και της γενετικής μηχανικής (Dhama et al., 2013). Εκτός από τα εγγενή θρεπτικά οφέλη, έχει αναφερθεί ότι περιέχουν διάφορες ενώσεις που λειτουργούν ως μη ειδικά ανοσοδιεγερτικά, βελτιώνοντας τους έμφυτους αμυντικούς μηχανισμούς στο ζώο, παρέχοντας έτσι αυξημένη αντοχή στα παθογόνα (Falaise et al., 2016). Πολλά είδη μικροφυκών έχουν αναφερθεί πως παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις οι οποίες μπορούν να δράσουν αποτελεσματικά κατά βακτηρίων, ιών και πρωτίστων (Qin et al., 2016). Η ανάπτυξη τεχνολογιών γενετικής μηχανικής για πολλά είδη μικροφυκών προσφέρει τη δυνατότητα «ενεργοποίησης» των φυκών για την παραγωγή ενός νέου βιοδραστικού μορίου, όπως λόγω χάρη το εμβόλιο, αυξητική ορμόνη ή αντιμικροβιακό μέσο. Το ανασυνδυασμένο κύτταρο στη συνέχεια χρησιμεύει ως ένας φυσικός τρόπος βιοενθυλάκωσης για στοματική χορήγηση του βιοδραστικού στον ιστό στόχο (Εικ. 7).

Ιδιαίτερα υποσχόμενη είναι η γενετική τροποποίηση των χλωροπλαστών, που προσφέρει υψηλό και σταθερό επίπεδο έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης, αλλά και ένα επιπλέον στρώμα βιοενθυλάκωσης που παρέχεται από τη διπλή μεμβράνη του χλωροπλάστη (Charoonnart et al, 2018). Το γονιδίωμα του χλωροπλάστη των μικροφυκών είναι ένα κυκλικό μόριο, που περιέχει 100-200 γονίδια, τα περισσότερα εκ των οποίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην φωτοσύνθεση ή τον μηχανισμό μετάφρασης του οργανιδίου. Είναι συχνά οργανωμένο σε οπερόνια λόγω της βακτηριακής του προέλευσης (Taunta et al, 2018). Για ορισμένα είδη και συγκεκριμένα στο *Chlamydomonas reinhardtii*, αναπτύσσονται προηγμένες μέθοδοι συνθετικής βιολογίας για τη μηχανική τόσο του πυρήνα όσο και των γονιδιωμάτων του χλωροπλάστη (Dyo et al, 2018).

Η επιτυχής εισαγωγή του λειτουργικού διαγονιδίου σε ένα κύτταρο μικροφύκους γίνεται με τρεις προϋποθέσεις: την ενσωμάτωση του ξένου γονιδίου στον πυρήνα ή τον χλωροπλάστη, την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων και την έκφραση του διαγονιδίου από το μικροφύκος. Το μικρό μέγεθος και το παχύ τοίχωμα των κυττάρων καθιστούν δύσκολο τον μετασχηματισμό. Ωστόσο, τεχνικές όπως βομβαρδισμός μικροσωματιδίων, ηλεκτροπόρωση ή μεταφορά DNA με χρήση του *Agrobacterium*, έχουν αξιοποιηθεί για τη διευκόλυνση της διαδικασίας. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται σειρές με μεταλλαγμένα κυτταρικά τοιχώματα ή μικροάλγη σε συγκεκριμένο στάδιο του κύκλου ζωής τους (Rathod et al, 2017). Η επιτυχής έκφραση του διαγονιδίου στο μικροφύκος γίνεται με προσαρμογή στο γενετικό κώδικα ανάλογα με το εάν θα εισαχθεί στο πυρηνικό ή το χλωροπλαστικό γονιδίωμα, καθώς και σύντηξη της αλληλουχίας με κατάλληλο υποκινητή στις αμετάφραστες περιοχές. Αυτά τα ρυθμιστικά στοιχεία προέρχονται από ενδογενή γονίδια όπως αυτά που συμμετέχουν στην φωτοσυνθετική μεταβολική οδό επειδή έχουν μεγάλη έκφραση στα φύκη. Ωστόσο χρησιμοποιούνται και υποκινητές φυτικής προέλευσης, αλλά και συνθετικά ρυθμιστικά στοιχεία(Charoonnart et al, 2018).

Ο μετασχηματισμός του χλωροπλάστη έναντι του πυρήνα, ενδείκνυται και χρησιμοποιείται περισσότερο για μία σειρά πλεονεκτημάτων. Η ενσωμάτωση του DNA στο γονιδίωμα του χλωροπλάστη είναι ακριβής καθώς μπορεί να κατευθυνθεί σε έναν συγκεκριμένο μέρος μέσω μιας διαδικασίας ομόλογου ανασυνδυασμού, το οποίο καθιστά την έκφραση του προβλέψιμη. Επιπλέον, δεν υπάρχουν μηχανισμοί αποσιώπησης στο μεταφραστικό σύστημα του χλωροπλάστη ενώ παράλληλα υπάρχει αυξημένη έκφραση λόγω των πολλαπλών χλωροπλαστών ανά κύτταρο, αλλά και λόγω των ρυθμιστικών περιοχών που υπερεκφράζονται στα χλωροπλαστικά γονίδια. Ωστόσο, η συνεχιζόμενη ανάπτυξη τεχνολογιών στόχευσης γονιδιώματος για μικροφύκη με βάση το CRISPR-Cas, θα επιτρέψει την ακριβή και προγνωστική εισαγωγή διαγονιδίων σε επιλεγμένους τόπους και στον

πυρήνα, καθιστώντας ευκολότερη και τη χρήση του πυρηνικού γονιδιώματος για εισαγωγή διαγονιδίων (Jeon et al, 2017).



Εικόνα 7 Παρουσίαση της χρήσης μικροφυκών στις ιχθυοκαλλιέργειες (Charoonnart et al., 2018).

## 2.6 Παραδείγματα εμβολίων με μικροφύκη

Οι εξελίξεις της γενετικής μηχανικής οδήγησαν στην δημιουργία ειδικών αντιπικτών και αντιβακτηριακών βιομορίων για χορήγηση δια στόματος στα ψάρια στις ιχθυοκαλλιέργειες. Η πρόοδος στην ανάπτυξη διαγονιδιακών μικροφυκών ως μέσο παροχής βιομορίων στην υδατοκαλλιέργεια είναι περιορισμένη και παράλληλα ενθαρρυντική. Στην Εικόνα 7, αναφέρεται η παραγωγή ιογενών αντιγόνων, αντιμικροβιακών πεπτιδίων και δίκλωνου RNA μετά από τροποποίηση στον πυρήνα και στους χλωροπλάστες κατά την χορήγηση των μικροφυκών (Charoonnart et al., 2018).

Διάφορα βιολογικά και συνθετικά υλικά που λειτουργούν ως αντιγόνα είναι πλέον διαθέσιμα για χορήγηση σε ψάρια με στόχο την επίτευξη της ανοσίας. Για παράδειγμα, το *Chlamydomonas reinhardtii* είναι ένα μικροφύκος που μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί για τον μετασχηματισμό με ξένα γονίδια, για αυτό και έχει χορηγηθεί ως αντιγόνο σε ψάρια (Siripornadulsil et al., 2007). Η πρωτεΐνη p57 του μύκητα *Renibacterium salmoninarum* (προκαλεί νεφρική ανεπάρκεια) εκφραζόμενη σε *C.reinhardtii* είτε ως μεμονωμένο τμήμα αντιγόνου ή ως ολόκληρη πρωτεΐνη, προκάλεσε ανοσία κατά τη χορήγηση μέσω ταΐσματος ή

εμβάπτισης. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως μέσω εμβάπτισης, προκλήθηκε απόκριση αντισωμάτων κυρίως στο βλεννογόνο του δέρματος, ενώ η χορήγηση από το στόμα είχε ως αποτέλεσμα συστηματική ανοσία (Siripornadulsil et al., 2007). Πέστροφες που κατανάλωσαν τροφή που περιείχε τα αποξηραμένα φύκη μέσω εμβάπτισης ή δια στόματος, αποδείχθηκε πως παρήγαγαν αντισώματα έναντι του αντιγόνου p57. Αυτό υποδεικνύει ότι τα μικροφύκη που χρησιμοποιούνται ως φορείς αντιγόνου αντιστέκονται στο pH του εντέρου, επομένως είναι κατάλληλα ως εμβόλια στις υδατοκαλλιέργειες. Σημειώνεται επίσης πως είναι απαραίτητη η πρόληψη του αντιγόνου από το όξινο περιβάλλον του εντέρου για την αποτελεσματική αύξηση της ανοσοαπόκρισης (Dadar et al., 2016).

Σε μελέτη των Li et al., 2009, κατά τη σίτιση του ψαριού medaka με *Nannochloropsis oculata* με έκφραση της βοδινής λακτοφερίνης (ένα αντιμικροβιακό πεπτιδίο ευρέος φάσματος που μπορεί να απενεργοποιήσει τη δράση πολλών παθογόνων), έξι ώρες πριν από τη δράση του *V. parahaemolyticus*, το ποσοστό επιβίωσης ανήλθε στο 70-85% σε σύγκριση με το 5% όσων τράφηκαν με ελεύθερα τύπου φύκη (Li et al., 2009). Επίσης σε άλλη μελέτη, η ανασυνδυασμένη VP28 (viral envelopeprotein 28, White Spot Syndrome Virus) που παρήχθη με μετασχηματισμό χλωροπλάστων του *C.reinhardtii* χορηγήθηκε σε γαρίδες (*L. vannamei*) όπου στη συνέχεια μολύνθηκαν με WSSV. Παρατηρήθηκε σημαντικός αριθμός επιβίωσης (87%) σε όσες γαρίδες είχαν καταναλώσει το διαγονιδιακό *C.reinhardtii*, ενώ καμία γαρίδα δεν επέζησε από όσες κατανάλωναν ελεύθερου τύπου μικροφύκη (Unajak et al., 2016).

Επιπλέον, επιβεβαιώνεται πως τα συγκεκριμένα διαγονιδιακά μικροφύκη θα μπορούσαν να επάγουν πλήρως την παραγωγή αντισωμάτων στο αίμα, το δέρμα, τον επιθήλιο ιστό και τη βλεννογόνο. Οι Michelet et al. (2011) εξέφρασαν επιτυχώς με γενετική τροποποίηση του χλωροπλάστη του *C. Reinhardtii* τις πρωτεΐνες AcrV και VapA του *Aeromonas salmonicida* με διαφορετικούς υποκινητές και διαφορετικούς τρόπους έκφρασης.

Ομοίως, οι Charoonnart et al. (2018) τροποποίησαν το γονιδίωμα του χλωροπλάστη του *C.reinhardtii* για την έκφραση δίκλωνου RNA (dsRNA) σχεδιασμένο να στοχεύει συγκεκριμένα ιικά γονίδια. Στη συνέχεια χορηγήθηκαν στις γαρίδες τα μικροφύκη με dsRNA πριν τη μόλυνση από YHV (yellow head virus), όπου διαπιστώθηκε πως 8 ημέρες μετά τη μόλυνση είχαν 50% επιβίωση, ενώ μόνο το 15,9% επιβίωσε από τις ομάδες ελέγχου-αναφοράς. Τα αποτελέσματα έπειτα από ανάλυση με RT-PCR, αποκάλυψαν χαμηλότερο ποσοστό μόλυνσης στις γαρίδες που χορηγήθηκαν τα ανασυνδυασμένα μικροφύκη σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα υδρόβια ζώα προστατεύονταν από τη διατροφή με γενετικά τροποποιημένων μικροφυκών (Ma K. et al., 2020).

Σύμφωνα με τον Πίνακα 2, αποδεικνύεται πως η θεωρητική έρευνα για τα εμβόλια με μικροφύκη επεκτείνεται και σε πρακτικές εμπορικές εφαρμογές κατοχυρώνοντας διπλώματα ευρεσιτεχνίας. Ο Betanodavirus που προκαλεί σοβαρές ασθένειες (VNN και VER) είναι αρκετά επιβλαβής για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των θαλάσσιων ψαριών και ιδιαίτερα στο στάδιο των προνυμφών. Σε ένα δίπλωμα ευρεσιτεχνίας που κατατέθηκε από την TransAlgaeInc. στο Ισραήλ (Chen, 2016), οι ερευνητές επέλεξαν θραύσμα ή καψίδιο του ιούNNV ως αντιγόνο ώστε να εκφραστεί σε μικροφύκος. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη απελευθερώθηκε σε βλεννογόνους ιστούς σε προνύμφες λευκής σφυρίδας (*Epinephelus aeneus*) και λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εξωγενή αντιγόνα μπορούσαν να παρουσιαστούν με επιτυχία και διεγείρουν τη συγκεκριμένη ανοσολογική απόκριση στο σώμα του ψαριού, έτσι ώστε τα διαγονιδιακά μικροφύκη να μπορούν να βελτιώσουν το ποσοστό επιβίωσης των προνυμφών (Ma K. et al., 2020).

**Πίνακας 2** Διπλώματα ευρεσιτεχνίας για εμβόλια με ανασυνδυασμένα μικροφύκη (Ma K. et al., 2020)

Number	Patent Number	Pathogen	Antibacterial peptides (AP) Antigen (Ag)	Expression host	Vector	Promoter	Position	Effect
1	US2016346373-A1	Beta-nodavirus	Nervous Necrosis Virus (NNV) Capsid protein or fragment thereof	<i>P. tricornutum</i>	pPhaT1	fcpA, fcp B	Vacuole	Improving the effectiveness of oral vaccines
2	WO2008027235-A1	WSSV	/	<i>D. salina</i>	pRMDWK	Constitutive Inducible	Cytoplasm	Improving survival after virus attack
3	US2011014708-A1	/	LFB VP28	<i>N. oculata</i>	pCB740 pGEM-T	RBCS2, HSP70A	Nucleus Cytoplasm	Improving antibacterial and antiviral activity
4	US2017202940-A1	<i>R. salmoninarum</i>	P57 protein	<i>C. reinhardtii</i>	pUC18 pSSRC7	psbA β2-tubulin	Nucleus Chloroplast	Detecting antibodies in vivo
5	US2014170181-A1	WSSV	VP28	<i>Chlorella</i> sp.	pGA4	/	Cytoplasm	100% protection rate

Διάφοροι μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, μύκητες, ιοί ακόμη και παράσιτα μολύνουν τον ίδιο βιολογικό ξενιστή με διαφορετικούς συνδυασμούς. Αυτή η διαδικασία που προκαλεί οξείες ή χρόνιες ασθένειες ονομάζεται πολυμικροβιακή λοίμωξη (Brogden et al., 2005). Στις ιχθυοκαλλιέργειες η πολυμικροβιακή λοίμωξη είναι ένα σύνηθες φαινόμενο. Έως σήμερα, η ανάπτυξη εδωδιμων διαγονιδιακών μικροφυκών κατά της μόλυνσης βασίζεται σε ετερόλογα

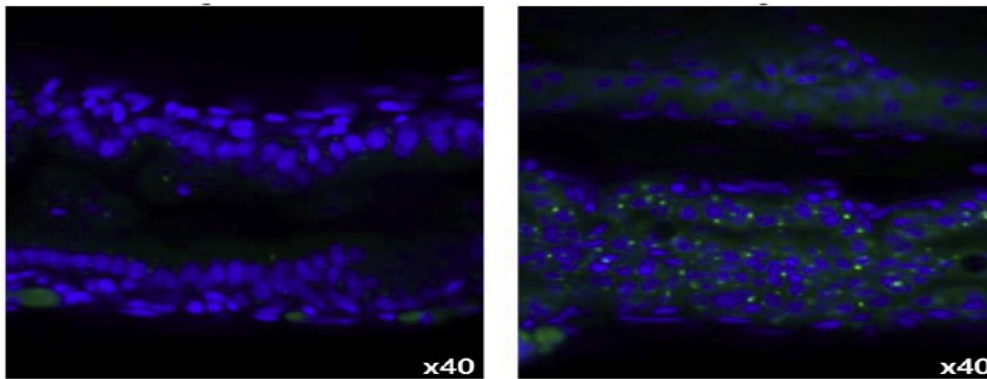
πεπτιδία. Η λακτοφερίνη για παράδειγμα είναι ένα αντιμικροβιακό πεπτιδίο το οποίο μπορεί να σκοτώσει ή να αδρανοποιήσει πολλά παθογόνα (Tsai and Li, 2011). Οι Li και Tsai (2009) χρησιμοποίησαν το μικροφύκος *Nannochloropsis oculata* εκφράζοντας το αντιβακτηριδιακό πεπτιδίο βόειας λακτοφερίνης (LFB) το οποίο ενδείκνυται για την αντιβακτηριακή του ικανότητα *in vitro* και *in vivo*. Το πειραματικό αποτέλεσμα έδειξε πως όταν χορηγήθηκαν διαγονιδιακά μικροφύκη που περιείχαν LFB στο ψάρι medaka, ενεργοποιήθηκε η βακτηριοκτόνος άμυνα τους έναντι στο *Vibrio parahaemolyticus* στο πεπτικό σωλήνα. Μετά τη μόλυνση από *V.parahaemolyticus*, το ποσοστό επιβίωσης της ομάδας ελέγχου στην οποία χορηγήθηκαν τα διαγονιδιακά φύκη αυξήθηκε στο 85%. Ωστόσο, δεν υπάρχει ακόμη αποτελεσματική στρατηγική στόχευση πολυμικροβιακών λοιμώξεων και λίγα εμπορικά εμβόλια είναι διαθέσιμα (Ma et al., 2020).

Προκειμένου να αποδειχθεί η σκοπιμότητα των μικροφυκών και πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς, οι Kwon et al. (2019) χορήγησαν σε ψάρια ζέβρα (*Danio rerio*) πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) εκφρασμένη στο μικροφύκος *C. reinhardtii*. Ανιχνεύτηκαν καθαρά φθορίζοντα σήματα στον εντερικό σωλήνα μέσω φθορισμού (CLSM) και ανοσοχρώσης, γεγονός που αποδεικνύει ότι οι πρωτεΐνες που χορηγήθηκαν δια στόματος προστατεύτηκαν μέχρι να απελευθερωθούν στο έντερο (Εικ. 8). Επιπλέον, το ισχυρό σήμα GFP ανιχνεύθηκε και στο αίμα των ενήλικων ψαριών στα οποία είχε επίσης χορηγηθεί η GFP εκφρασμένη με *C. reinhardtii*, που σημαίνει πως τα GFP που απελευθερώθηκαν, απορροφήθηκαν από τα κύτταρα του εντέρου και έφτασαν στη συστηματική κυκλοφορία.

Πιο αναλυτικά, το επίπεδο έκφρασης της GFP στα λυοφιλοποιημένα μικροφύκη υπολογίστηκε σε 0,47 µg/mg ξηρού βάρους. Στη συνέχεια χορηγήθηκαν στα ψάρια και έπειτα από ανοσοχρώση παρατηρήθηκαν στους ιστούς του εντέρου με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού. Επιπλέον, τα προσλαμβανόμενα GFP στο έντερο ανιχνεύθηκαν και στο αίμα σε επίπεδο 5,4 ng GFP/ml ορού με τη χρήση ELISA. Συνεπώς, προκύπτει πως οι GFP, ανεξάρτητα από το αν είναι βιοενθυλακωμένες ή όχι, μπορούν να φτάσουν στα ανοσοποιητικά κύτταρα. Επίσης, οι GFP βιοενθυλακωμένες στο *Chlamydomonas reinhardtii* παρέμειναν ανεπηρέαστες δίχως αποικοδόμηση για αρκετούς μήνες κατά τη φύλαξή τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Kwon et al., 2019).

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα μικροφύκη ως πλατφόρμα χορήγησης για ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας ψάρια χωρίς στομάχι. Ωστόσο, για την καθολική εφαρμογή αυτής της τεχνικής απαιτούνται περαιτέρω μελέτες τόσο για φυτοφάγα όσο και για σαρκοφάγα ψάρια με ή χωρίς στομάχι (Kwon et al., 2019). Συνολικά, η έρευνα

έδειξε την ικανότητα του *C. reinhardtii* ως πλατφόρμα χορήγησης ανασυνδυασμένων βιοδραστικών πρωτεϊνών (Kwon et al., 2019).



**Εικόνα8** Εγκάρσια διατομή εντερικών ιστών ψαριών *Danio rerio* που χορηγήθηκε μη μετασχηματισμένο *C. reinhardtii* (αριστερά) και *C. reinhardtii* που εκφράζει τη GFP (δεξιά) σε μεγέθυνση 40x. (K.-C. Kwon et al., 2019)

## 2.7 Παραδείγματα εταιρειών

Τα μικροφύκη όπως ήδη αναφέρθηκε αποτελούν μία κατηγορία οργανισμών στην οποία στρέφεται το ενδιαφέρον της βιομηχανίας διεθνώς τα τελευταία χρόνια για παραγωγή νέων προϊόντων. Η βιομάζα των μικροφυκών χρησιμοποιείται εδώ και μερικές δεκαετίες στις υδατοκαλλιέργειες ως ζωντανή τροφή αλλά και στην παραγωγή προϊόντων διατροφής, είτε αυτούσια είτε μετά από επεξεργασία. Η καλλιέργεια ποικίλει ανάλογα με το επιθυμητό τελικό προϊόν (Μάρκου, 2013).

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον από τον επιχειρηματικό κόσμο για την εκμετάλλευση των μικροφυκών για πολλαπλές εμπορικές και φαρμακευτικές χρήσεις με μια από αυτές να αποτελεί ο εμβολιασμός στις ιχθυοκαλλιέργειών. Έως σήμερα έχουν ιδρυθεί αρκετές εταιρείες που παράγουν μικροφύκη και εμπορεύονται βρώσιμα εμβόλια. Αυτές οι εταιρείες είναι οι εξής: η Microsymbiotix με έδρα την Ιρλανδία, η Transalgae στο Ισραήλ, η Solarvest BioEnergy στον Καναδά, και πρόσφατα στο κομμάτι παραγωγής εμβολίων προστέθηκε και η LeadingTec στην Κίνα.

Η *Microsynbiotix* είναι μια startup επιχείρηση που εξειδικεύεται στην παραγωγή βρώσιμων εμβολίων για ιχθυοκαλλιέργειες, η οποία πρόσφατα μέσω γενετικής τροποποίησης κατάφερε να εκφράσει σε στέλεχος μικροφύκους ινσουλίνη. Έως σήμερα έχει συγκεντρώσει χρηματοδοτήσεις ύψους \$2.2 εκατομμυρίων. (<https://www.microsynbiotix.com/>). Η *Transalgae* έχει μέχρι σήμερα επενδύσει πάνω από 25 εκατομμύρια στην ανάπτυξη των τεχνολογιών της. Τα προϊόντα της εστιάζουν στην χρήση των μικροφυκών ως μέσα χορήγησης υψηλής αξίας προϊόντων τόσο σε ιχθυοκαλλιέργειες, όσο και σε φυτικές καλλιέργειες, αλλά και στον άνθρωπο. Τα προϊόντα τους δεν σημαίνονται ως γενετικά τροποποιημένα, καθώς πωλούνται αποξηραμένα και κατά συνέπεια τα κύτταρα νεκρώνονται. (<https://pharmafactory.org/Transalgae-Ltd>)

## 2.8 Περιορισμοί στη χρήση ανασυνδυασμένων μικροφυκών

Στην εγκαθίδρυση της χρήσης των μικροφυκών για βρώσιμα εμβόλια ιχθυοκαλλιεργειών υπάρχουν ωστόσο κάποιοι περιορισμοί. Συγκεκριμένα υπάρχουν ακόμα επιστημονικές ελλείψεις που αφορούν στην τυποποίηση της μεθόδου γενετικής τροποποίησης και την ανάγκη πιο αναπτυγμένων αλγορίθμων για την βελτιστοποίηση των κωδικονίων των συνθετικών δι-αγονιδίων σε κάθε είδος μικροφύκους με σκοπό τη μέγιστη μεταφραστική απόδοση. Θα ήταν ωφέλιμη η ανάπτυξη και χρήση υποκινητών που επάγονται εύκολα σε βιομηχανική κλίμακα. Ένας επιπλέον περιορισμός είναι πως πρέπει να ελέγχεται η δραστικότητα των συνθετικών πρωτεϊνών στη μορφή εμπορευματοποίησης τους. Περιορισμοί υπάρχουν και στην προέλευση των ειδών που καλλιεργούνται με βάση τη νομοθεσία κάθε κράτους. Συνεπώς πρέπει να δίνεται απαραίτητη προσοχή στην καθαρότητα των διαγονιδίων και την αποφυγή οριζόντιας μετάδοσης, για να εξασφαλίζεται η ασφάλεια τους (Charoonnart et al, 2018).

Τα μικροφύκη όπως αναφέρθηκε καλύπτουν τις ανάγκες της βιώσιμης ανάπτυξης πολλαπλών βιομηχανιών λόγω των μοναδικών πλεονεκτημάτων τους. Ωστόσο, εξακολουθούν να υπάρχουν κάποια προβλήματα με το σύστημα έκφρασης, όπως χαμηλή απόδοση έκφρασης και κακή σταθερότητα, χαμηλή περιεκτικότητα σε ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, ανώριμη γενετική πλατφόρμα, κλπ. Επιπλέον, η κατάσταση της πολυμικροβιακής λοίμωξης στις υδατοκαλλιέργειες γίνεται ολοένα και πιο σοβαρή, ενώ μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αποτελεσματικά μέτρα πρόληψης και θεραπείας για πολλαπλά παθογόνα, καθώς και οι έρευνες βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο. Μελλοντικά, με την ανάπτυξη των εδωδιμων εμβολίων χρησιμοποιώντας ως φορείς μικροφύκη με αντιβακτηριακή δραστηριότητα, τα ανασυνδυασμένα εμβόλια μικροφυκών αναμένεται να αποκτήσουν μεγάλη ζήτηση (Ma K et al., 2020).

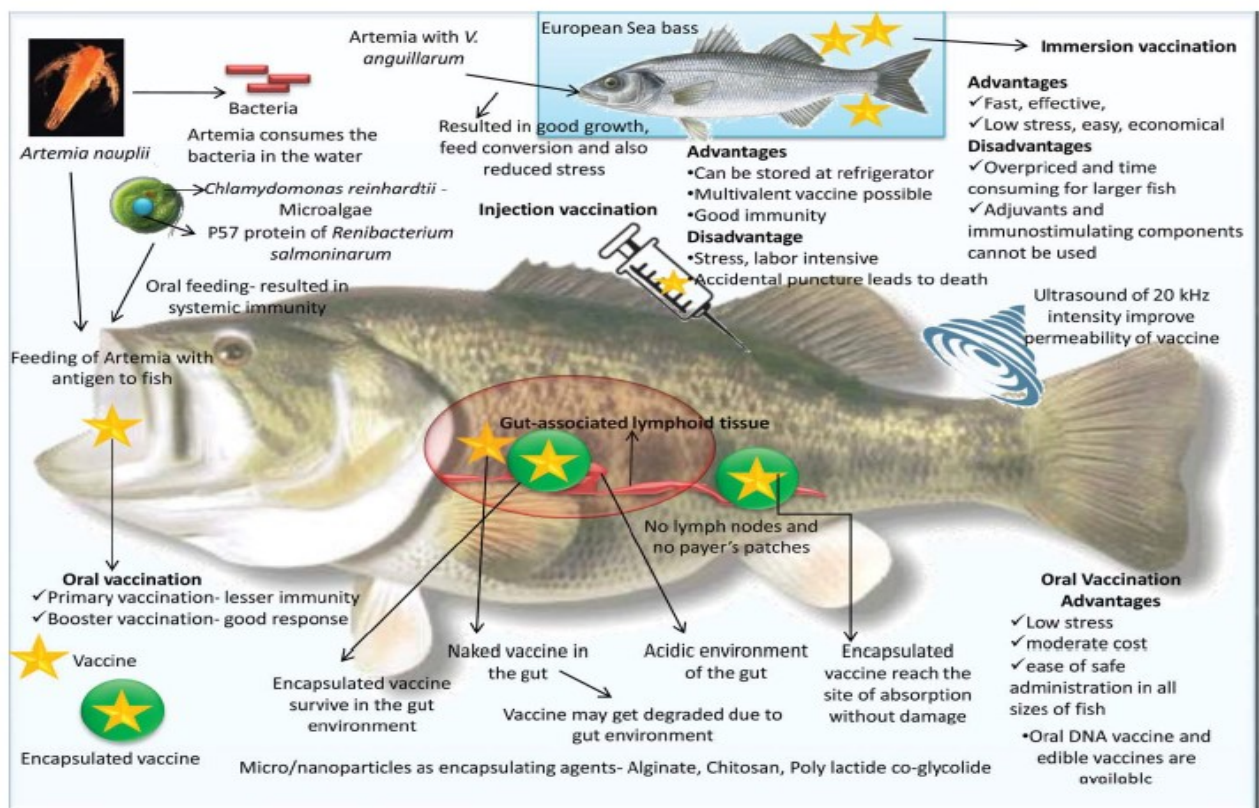
Η πρόβλεψη των πιθανών συνεπειών από τη διαφυγή διαγονιδιακών ψαριών και τη διανομή DNA εμβολίων και γενετικά τροποποιημένων τροφών είναι περιορισμένη. Για παράδειγμα, τα διαγονιδιακά ψάρια μπορούν να αναπαραχθούν με άγρια ψάρια, καθώς και η γενετικά τροποποιημένη τροφή θα μπορούσε να εξαπλωθεί στο υδάτινο περιβάλλον και να χρησιμοποιηθεί από άλλους θαλάσσιους οργανισμούς και κατ' επέκταση από τον άνθρωπο. Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί από διαγονιδιακό DNA σε εμβόλια ή τροφή στο γονιδίωμα αποδέκτη μικροοργανισμών, ή εμβόλια DNA μπορεί να απελευθερωθούν από τα κόπρανα στο περιβάλλον (Myhr&Dalmo 2005, Dadar et al., 2016).

Τέλος ένας καθοριστικός περιοριστικός παράγοντας είναι η τρέχουσα κοινή γνώμη ως προς τους γενετικά τροποποιημένους οργανισμούς, και οι συνέπειες της χρήσης τους ως τροφή του βρώσιμου προϊόντος. Η ισορροπία μεταξύ της αποδοτικότητας της χρήσης τους για προστασία της ιχθυοκαλλιέργειας καθώς και της αποδοχής του καταναλωτή είναι οπωσδήποτε λεπτή και θα πρέπει αυτό να λαμβάνεται υπόψιν στις επιχειρήσεις που ανθίζουν στον κλάδο (Charoonnart et al, 2018).

### **3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Σήμερα, αρκετά από τα μικροφύκη αναγνωρίζονται ως βρώσιμα και χρησιμοποιούνται ως συστατικά τροφίμων ή ζωοτροφών, τα οποία χρησιμεύουν τόσο στη σύνθεση πολύτιμων προϊόντων όσο και ως εδώδιμα εμβόλια (Rosales-Mendoza et al., 2016). Επίσης είναι αναγνωρισμένα ως ασφαλή και από τον αμερικάνικο οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (FDA) (Kwon et al., 2019). Τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετο στην τροφή με τη μορφή ζωντανών κυττάρων ή σκόνης, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση της ανάπτυξης-εξέλιξης των ψαριών, την ενίσχυση της αντίστασης σε παθογόνους μικροοργανισμούς, τη βελτίωση της επιβίωσης των προνυμφών και τέλος συμβάλλουν στην ενίσχυση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Ταυτόχρονα, τα υδρόβια ζώα μπορούν να αποκτήσουν σημαντική ανοσία με τη χρήση εδωδιμων εμβολίων, αποφεύγοντας έτσι τη σωματική βλάβη που προκαλείται μέσω της ένεσης ή της εμβάπτισης, μειώνοντας την επιβάρυνση στα ίδια τα ζώα αλλά και στο λειτουργικό κόστος (Ma et al., 2020) (Εικ. 9). Επομένως, εάν το αντιγόνο εκφράζεται σε υψηλό βαθμό στα κύτταρα των μικροφυκών και συνεπώς παράγονται διαγονιδιακά μικροφύκη μπορεί να καταναλωθεί ως εδώδιμο εμβόλιο, αναμένεται να παίξει ένα σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και τον έλεγχο των ασθενειών (Mutoloki et al., 2015). Παράλληλα τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την μεταφορά ετερόλογων αντιγόνων (Ma K., et al., 2020).

Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες που παράγονται από βιολογικά συστήματα όπως βακτήρια, ζυμομύκητες, κύτταρα θηλασικών και καλλιέργειες εντόμων χρησιμοποιούνται ευρέως για κλινικούς ή βιομηχανικούς σκοπούς. Τα περισσότερα πρωτεϊνικά φάρμακα απαιτούν δύσκολες διαδικασίες φύλαξης- συντήρησης, γεγονός που τα καθιστά απαγορευτικά λόγω υψηλού κόστους με αποτέλεσμα να εμποδίζουν την ευρεία χρήση τους. Αντιθέτως, τα ανασυνδυασμένα μικροφύκη λυοφιλοποιημένα μπορούν να παραμείνουν σε μακροχρόνια αποθήκευση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος διευκολύνοντας τον χειρισμό τους (Kwon et al., 2019).



**Εικόνα 7** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των τρόπων εμβολιασμού στις ιχθυοκαλλιέργειες (Dadar et al., 2016)

Το κύριο εμπόδιο στην χορήγηση πρωτεϊνικών φαρμάκων δια στόματος, είναι η αποικοδόμησή τους από οξέα και πρωτεάσες στα περιβάλλοντα του στομάχου και του εντέρου, αντίστοιχα. Ωστόσο, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες βιοενθυλακωμένες από το

κυτταρικό τοίχωμα των μικροφυκών μπορούν να προστατευτούν από το όξινο περιβάλλον του στομάχου και στη συνέχεια να απελευθερωθούν μέσω της αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος από τα κυτταρολυτικά βακτήρια στο έντερο (Kwon et al., 2019)

Αυτές οι ανασυνδυσασμένες πρωτεΐνες προστατεύονται από το περιβάλλον του στομάχου και απελευθερώνονται στο έντερο με τη βοήθεια βακτηρίων. Επιπλέον, τα λυοφιλοποιημένα μικροφύκη μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου για αρκετά χρόνια το οποίο μειώνει περαιτέρω την τιμή του προϊόντος μέσω της κατάργησης της ψυκτικής αποθήκευσης και μεταφοράς. Επιπλέον, η λυοφιλοποίηση μπορεί επίσης να αυξήσει την ισχύ με τη συμπύκνωση των ανασυνδυσασμένων θεραπευτικών πρωτεϊνών μέσω της απομάκρυνσης του νερού, επιτρέποντας πιο ευέλικτα σχήματα εμβολιασμού. Τα φύκη μπορούν να χορηγηθούν ως εδώδιμα εμβόλια και σε ψάρια του εμπορίου όπως το λαβράκι ή ο σολομός, που έχουν όξινο στομάχι. Συνεπώς, εάν χρησιμοποιηθούν τα μικροφύκη ως φορείς μπορούν να παρέχουν πιο φθηνά προϊόντα στη βιομηχανία της ιχθυοκαλλιέργειας καθώς δεν υπάρχει ανάγκη για τον εξαγνισμό των ανασυνδυσασμένων πρωτεϊνών επειδή τα φύκη αποτελούν φυσικό συστατικό της διατροφής των ψαριών, άρα μπορούν να χορηγηθούν απευθείας (Kwon et al., 2019).

Στα συστήματα φυτικής παραγωγής, οι ανασυνδυσασμένες πρωτεΐνες μπορεί να παραχθούν με λιγότερη εισροή κεφαλαίου και χωρίς κίνδυνο μόλυνσης με ζωικούς παθογόνους παράγοντες (Specht et al., 2014). Ωστόσο, το κόστος για την καλλιέργεια και τη λυοφιλοποίηση μικρής κλίμακας βιομάζας μικροφυκών είναι αρκετά ακριβό. Για παράδειγμα, μια παραγωγή 300 λίτρων για 300 γλυοφιλοποιημένων υλικών φυκών κοστίζει αρκετές χιλιάδες ευρώ. Εάν όμως πραγματοποιηθεί μαζική αύξηση της βιομάζας, το κόστος μπορεί να μειωθεί δραματικά (Kwon et al., 2019). Για την παραγωγή αποξηραμένων μικροφυκών, το κόστος παραγωγής 36 τόνων ανά εκτάριο (10.000 m<sup>2</sup>) ετησίως είναι 12,4 €/κιλό (Tredici et al., 2016). Υποθέτοντας ότι ένα γραμμάριο αποξηραμένων μικροφυκών μπορεί να εμβολιάσει μια προνύμφη λαβράκιου 10 g, σύμφωνα με εκτιμήσεις το κόστος για τον εμβολιασμό ενός λαβράκι είναι περίπου 0,0124€. Συνεπώς είναι αρκετά ανταγωνιστικό και μπορεί να προσφέρει οικονομικά οφέλη στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας (Kwon et al., 2019).

Συμπερασματικά, τα μικροφύκη αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη πηγή τόσο επιστημονικού όσο και εμπορικού ενδιαφέροντος. Ήδη έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί αρκετές από τις πολλαπλές χρήσεις τους, όπως ανασυνδυσασμένων και μη στελεχών, με κυριότερη αυτή ως βρώσιμο εμβόλιο για παθογόνα ιχθυοκαλλιεργειών. Ακόμη και εάν δεν εφαρμόζονται ως μέθοδος εμβολιασμού στην Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια μέχρι σήμερα, στο μέλλον

θα μπορούσε να αποτελέσει μια αρκετά συμφέρουσα λύση ενισχύοντας την παραγωγή και συμβάλλοντας στην αύξηση της οικονομίας. Θα πρέπει συνεπώς να εντατικοποιηθεί η έρευνα, ώστε να επιταχυνθεί η ανάπτυξη τέτοιων καινοτόμων μεθόδων και στη συνέχεια προϊόντων, ξεπερνώντας τους υπάρχοντες περιορισμούς.

#### 4. Παράρτημα

Τα εμβόλια τα οποία έχουν αδειοδοτηθεί και εγκριθεί για τη χρήση τους στην Ελλάδα είναι τα ακόλουθα:

ΕΙΔΟΣ	ΕΜΒΟΛΙΟ	ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΜΕΝΟ	ΤΡΟΠΟΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ	ΕΤΑΙΡΕΙΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΓΚΡΙΣΗΣ (ΕΟΦ)
Λαβράκι & Τσιπούρα	ALPHA DIP 2000	<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Photobacterium damsela</i>	ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ	AQUAVET	0115501
Λαβράκι	ALPHA DIP VIBRIO	<i>Vibrio anguillarum</i>	ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ	AQUAVET	0188601
Λαβράκι	ALPHA JECT 2000	<i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Photobacterium damsela</i>	ΕΝΕΣΙΜΟ	AQUAVET	0115601
Λαβράκι & Τσιπούρα	AQUAVAC PHOTOBAC BOOST	<i>Photobacterium damsela</i>	ΔΙΑ ΣΤΟΜΑΤΟΣ	INTERVET	0148401
Λαβράκι & Τσιπούρα	AQUAVAC TM PHOTOBAC PRIME	<i>Photobacterium damsela</i>	ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ	INTERVET	0148501
Λαβράκι & Τσιπούρα	AQUAVAC VIBRIO PASTEURILLA	<i>Photobacterium damsela</i>	ΕΝΕΣΙΜΟ	INTERVET	0158901
Τσιπούρα	ICHTIOVAC PD	<i>Photobacterium damsela</i>	ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ	HIPRA	021501
Λαβράκι	ICHTIOVAC VR/PD	<i>Vibrio anguillarum</i>	ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ	HIPRA	0223001
Λαβράκι & Τσιπούρα	VIBRIO FISHVAX	<i>Vibrio anguillarum</i>	ΕΜΒΑΠΤΙΣΗ, ΕΝΕΣΙΜΟ	AVICO	0076601

Το AquaVacPhotobacBoost και το AquaVacPhotobacPrime χρησιμοποιούνται σαν βοηθήματα για την πρόληψη της παστερέλλωσης, ενώ τα εμβόλια AlphaDip 2000, AquaVacVibrioPasteurella και το AlphaJect 2000 χρησιμοποιούνται για τη διέγερση της ενεργητικής ανοσίας ενάντια στο *Vibrio anguillarum* και στο *Photobacterium damsela* sub sp. *piscicida*.

## 5. Βιβλιογραφία

- Akbari F, Eskandani M, Khosroushahi A Y, (2014) World J Microbiol Biotechnol The potential of transgenic green microalgae; a robust photobioreactor to produce recombinant therapeutic proteins. *World J Microbiol Biotechnol*
- Amend DF (1981) Potency testing of fish vaccines. *Dev Biol Stand* 49:447–454
- Bedekar M, Kole S, Tripathi G, (2019) Biotechnological approaches to fish vaccine, Genomics and biotechnological advances in veterinary, poultry and fisheries
- Brogden, K. A., Guthmiller, J. M., and Taylor, C. E. (2005). Human polymicrobial infections. *Lancet* 365, 253–255.
- Charoonnart P, Purton S, Saksmerprome V, (2018) Applications of Microalgal Biotechnology for Disease Control in Aquaculture. *Biology* , 7, 24
- Dadar M, Dhama K, Vakharia V. N., Hoseinifar S H, Karthik K, Tiwari R, Khandia R, Munjal A,Salgado-M C,and. Joshi K S, (2016) Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. *REVIEWS IN FISHERIES SCIENCE & AQUACULTURE*
- Dhama, K., Wani, M. Y., Deb, R., Karthik, K., Tiwari, R., Barathidasan, R., Kumar, A., Mahima, , Verma, A. K., and Singh, S. D. ,(2013) Plant based oralvaccines for human and animal pathogens—a new era of prophylaxis: Current and future perspectives. *J. Exp. Biol. Agri. Sci.*, 1(1): 1–12
- Dhar, A. K., Manna, S. K., and Allnutt. F. C. T., (2014) Viral vaccines for farmed fish. *Virus Dis.*, 25(1): 1–17
- Dunham, R. A., (2011) *Aquaculture and Fisheries Biotechnology: Genetic Approaches*, Cabi, 52–94
- Dyo Y.M, Purton S, (2018) The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins, *Microbiology*
- Falaise, C.; François, C.; Travers, M.-A.; Morga, B.; Haure, J.; Tremblay, R.; Turcotte, F.; Pasetto, P.; Gastineau, R.; Hardivillier, Y., et al . (2016) Antimicrobial compounds from Eukaryotic Microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Mar. Drugs*, 14, 159.
- Jeon S, Lim J, Lee H, Shin S, Kang, N,Park Y.I, Oh H.M., Jeong W.J, Jeong B, Chang Y.K., (2017) Current status and perspectives of genome editing technology for microalgae. *Biotechnol. Biofuels*
- Kwon, K., Lamb, A., Fox, D., & Porphy Jegathese, S. J. (2019). An evaluation of microalgae as a recombinant protein oral delivery platform for fish using green fluorescent protein (GFP). *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 414-420.
- Le Breton AD (2009) Vaccines in Mediterranean aquaculture: practice and needs. In: Rogers C, Basurco B (eds) *The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture*, pp.

- 147–154. Options M\_editerran\_eennes: S\_erie A. S\_eminaires M\_editerran\_eens n. 86. CIHEAM, Zaragoza.
- 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 Shellfish Immunol.*, 26, 316–325.
- Llewellyn, M. S., Boutin, S., Hoseinifar, S. H., and Derome, N. (2014) Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and Fisheries. *Front. Microbiol.*, 5: 123–131
- Ma J, Bruce TJ, Jones EM, Cain KD. (2019) A Review of Fish Vaccine Development Strategies: Conventional Methods and Modern Biotechnological Approaches. *Microorganisms.*; 7(11):569.
- Ma K, Bao Q, Wu Y, Chen S, Zhao S, Wu H and Fan J (2020) Evaluation of Microalgae as Immunostimulants and Recombinant Vaccines for Diseases Prevention and Control in Aquaculture. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:590431.
- Mancuso M., (2014). Emerging Bacterial Pathologies in Mediterranean Mariculture. *Journal of Aquaculture and Research*, 1, 1-2.
- Michelet, L., Lefebvre-Legendre, L., Burr, S. E., Rochaix, J. D., and Goldschmidt- Clermont, M. (2011). Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of *Chlamydomonas*. *Plant Biotechnol. J.* 9, 565–574.
- Muktar, Y., Tesfaye, S., and Tesfaye, B., (2016) Present status and future prospects of fish vaccination: A review. *J. Veterinar. Sci. Technol.*, 7: 2
- Mutoloki, S., Munang'andu, H. M., and Evensen, O. (2015). Oral vaccination of fish - antigen preparations, uptake, and immune induction. *Front. Immuno* 6:519.
- Myhr, A. I., and Dalmo, R. A. (2005) .Introduction of genetic engineering in aquaculture: ecological and ethical implications for science and governance. *Aquaculture*, 250: 542–554
- Ortiz N., N., Pascoli, F., Picchiatti, S., Buonocore, F., Bernini, C., Toson, M., Scapigliati, G., and Toffan, A., (2016) A formalin-inactivated immunogen against viral encephalopathy and retinopathy (VER) disease in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): immunological and protection effects. *Vet. Res.*, 47(1): 89
- Oren A (2005) A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Syst* 1:2
- Qin, S.; Lin, H.; Jiang, P. (2012) Advances in genetic engineering of marine algae. *Biotechnol. Adv.*, 30, 1602–1613.
- Rathod, J.P.; Gade, R.M.; Rathod, D.R.; Dudhare, M. (2017) A review on molecular tools of microalgal genetic transformation and their application for overexpression of different genes. *Int. J.Curr. Microbiol. App. Sci.*

- Rosales-Mendoza .S, C. Angulo, B. Meza, (2016) Food-grade organisms as vaccine biofactories and oral delivery vehicles, *Trends Biotechnol.* 34 124–136.
- Siripornadulsil S, Dabrowski K, Sayre R (2007) Microalgal vaccines. *Adv Exp Med Biol* 616:122–128
- Specht, E. A., and Mayfield, S. P. (2014). Algae-based oral recombinant vaccines. *Front. Microbiol.* 5:60. doi: 10.3389/fmicb.2014.00060
- Taunta H , Stoffelsb L, Purtonb S, (2018) Green biologics: The algal chloroplast as a platform for making biopharmaceuticals. *Bioengineered*, 2018
- Taunt Henry N., Stoffels Laura & Purton Saul (2017): Green biologics: The algal chloroplast as a platform for making biopharmaceuticals, *Bioengineered*,
- Tredici M.R., L. Rodolfi, N. Biondi, N. Bassi, G. Sampietro, Techno-economic analysis of microalgal biomass production in a 1-ha Green Wall Panel (GWP®) plant, *Algal Research* 19 (2016) 253–263.
- Tsai, H. J., and Li, S. S. (2011). *Nucleic Acid for use in Algae and use Thereof*. United States: US 2011/0014708 A1. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office
- Unajak, S.; Kiataramgul, A.; Wannathong, T.W.; Mavichak, R.; Yokthongwattana, C.; Areechon, N. , (2016) Development of *Chlamydomonas reinhardtii* for control white spot syndrome virus in shrimp (*Penaeus vannamei*). In *Proceedings of the Asian-Pacific Aquaculture Conference*, Surabaya, Indonesia, 26–29 April 2016; p. 610.
- Yanong, R. P., and Erlacher-Reid, C. (2012). *Biosecurity in Aquaculture, Part 1: An Overview*. USDA Southern Regional Aquaculture Center, 25–59
- Zrncic S (2020) *Diagnostic Manual for the main pathogens in European seabass and Gilthead seabream aquaculture..* (ed). Zaragoza: CIHEAM, 174 p. (Options Méditerranéennes, Series B: Studies and Research, No. 75)

### Ελληνική βιβλιογραφία

Βουλτσιάδου Ε., Αμπατζόπουλος Θ.Ι., Αντωνοπούλου Ε., Γκάνιας Κ., Γκέλης Σ., Στάικου Α., Τριανταφυλλίδης Α., (2015) ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Μάρκου Γ., Τζοβένης Ι., Νερατζής Η., (2013) ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ: ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ *e-Journal of Science & Technology (e-JST)*

Μπακόπουλος Γ., (2015) Σημειώσεις Ιχθυολογίας ΤΩΘΒΕ

ΕΛΟΠΥ 2021 Ελληνική Υδατοκαλλιέργεια (ΣΕΘ 2021)

Οδηγός για Υδατοκαλλιέργεια και Natura 2000, 2018

### Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

<https://www.fgm.com.gr/>

<http://performfish.eu/>