



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

## **Μεταβολές του επιφανειακού μικροβιώματος λαβρακιού κατά τη συντήρηση του σε συνθήκες φρεσκότητας**



**Γκουτζαμάνης Αντίγονος**

**Λάρισα, 2022**

<<Μεταβολές του επιφανειακού μικροβιώματος λαβρακιού κατά τη συντήρηση του σε συνθήκες φρεσκότητας>>

<<Changes in the skin microbiome of European sea bass during storage under fresh conditions>>

### **Τριμελής επιτροπή**

**Μούτου Αικατερίνη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια , Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)

**Βασιλειάδης Σωτήρης**, Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Μέλος)

**Γιαννούλη Περσεφόνη**, Επίκουρος Καθηγήτρια , Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Μέλος)

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ευρωπαϊκό λαβράκι είναι ένα είδος μεγάλης οικονομικής και πολιτισμικής σημασίας στην Ευρώπη και αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά είδη για την Μεσογειακή θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια. Τα αλιεύματα ωστόσο αποτελούν πολύ ευπαθή προϊόντα. Η ποιότητα τους μετά την εξαλίευση υποβαθμίζεται πολύ γρήγορα εξαιτίας τριών μηχανισμών: της μικροβιακής δραστηριότητας, των χημικών οξειδώσεων και των ενζυμικών αντιδράσεων. Η αλλοίωση εξαιτίας της μικροβιακής δραστηριότητας συμβάλει σημαντικά στην ποιοτική υποβάθμιση των φρέσκων μη επεξεργασμένων αλιευμάτων. Η σύνθεση του συμβιωτικού μικροβιώματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το υδρόβιο περιβάλλον που ζούνε τα ψάρια καθώς και από το μικροβίωμα που μπορεί να επιμολύνει τα ψάρια, το οποίο προκύπτει από τις συνθήκες χειρισμού και αποθήκευσης κατά την μεταχείριση των ιχθύων. Στην συγκεκριμένη εργασία διερευνήθηκαν οι αλλαγές του μικροβιώματος της επιφάνειας του δέρματος του λαβρακιού σε δείγματα που προήλθαν από διαφορετικές μεθόδους θανάτωσης, διαφορετικές μέρες αποθήκευσης στους 4°C, διαφορετικό περιβάλλον προέλευσης και διαφορετικές θερμοκρασιακές περιόδους. Οι μέθοδοι εξαλίευσης που εξετάστηκαν είναι: η θανάτωση σε παγόνερο, η θανάτωση με χρήση υγρού πάγου, η θανάτωση σε μείγμα 1:1 υγρού πάγου και παγόνερου και η αναισθητοποίηση με χρήση ρεύματος διαφορετικής τάσης και θανάτωση σε παγόνερο. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA και αλληλούχηση των δειγμάτων. Παρατηρήθηκαν διαφορές στην σύνθεση του μικροβιώματος των δειγμάτων λαβρακιού στις συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν με εμφανή την επίδραση του περιβάλλοντος και των μεθόδων εξαλίευσης στην εξέλιξη του μικροβιώματος κατά την αποθήκευση στους 4°C.

## ABSTRACT

European sea bass is a species of great economic and cultural importance in Europe and is one of the most important species for the Mediterranean marine fish farming sector. Fish and shellfish, however, are very perishable products. Their quality degrades rapidly as a result of three mechanisms: microbial activity, chemical oxidation, and enzymatic degradation. Microbial spoilage is the mechanism that contributes markedly to the quality deterioration of fresh and non-processed fish. The composition of initial microbiota is strongly dependent on the aquatic environment in which fish live as well as on the contaminating microbiota that results from handling and storage conditions during processing. In this study, the differences in the European seabass skin microbiome from samples obtained by different harvest methods, at different days of storage at 4°C, different environments of origin, and different temperature periods were studied. The examined harvesting methods were; slaughter in ice slurry, slaughter using slurry ice; slaughter using a mixture of slurry ice and ice flakes (1:1); and slaughter using electrostunning of different voltage conditions. The samples were sequenced using an Illumina platform after DNA extraction. In the comparisons, differences in the microbiome composition of European seabass samples were detected, with an evident influence of the environment and harvesting procedures on the alterations of the microbiome after storage at 4°C.

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	6
1.1 Βιολογία Λαβρακιού.....	6
1.2 Γεωγραφική εξάπλωση .....	7
1.3 Οικονομική σημασία .....	8
1.4 Αλίευση του είδους .....	9
1.5 Σημασία της ιχθυοκαλλιέργειας, ιστορική αναδρομή και προκλήσεις που αντιμετωπίζει .....	10
1.6 Τρόποι εξαλίευσης .....	11
1.7 Συνθήκες αποθήκευσης .....	14
1.8 Σύνθεση μικροβιώματος στο λαβράκι και σημασία .....	15
1.9 Μικροβίωμα και αλλοίωση αλιευμάτων .....	16
1.10 Μέθοδοι προσδιορισμού του μικροβιώματος .....	18
1.11 16s RNA .....	19
1.12 Αλληλούχηση νέας γενιάς .....	20
2. ΣΚΟΠΟΣ .....	22
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
3.1 Επιλογή δειγμάτων.....	23
3.2 Απομόνωση DNA.....	23
3.3 Έλεγχος απομόνωσης DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης .....	24
3.4 Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων .....	26
3.5 16S rDNA V3-V4 sequencing.....	26
3.6 Στατιστική ανάλυση.....	27
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	28
4.1 Βελτιστοποίηση αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης.....	28
4.2 Διαφορές μικροβιώματος θερμής και ψυχρής περιόδου.....	28
4.3 Διαφορές μικροβιώματος δειγμάτων λαβρακιού προερχόμενα από μονάδα της Philosofish (Αιγαίο) και από μονάδα της Angramar (Ιόνιο).....	32
4.4 Εξέλιξη της σύνθεσης του μικροβιώματος κατά την αποθήκευση στους 4°C.....	34
4.5 Μεταβολές επιφανειακού μικροβιώματος ανά μέθοδο θανάτωσης.....	38
4.6 Μεταβολές επιφανειακού μικροβιώματος ανά μέθοδο θανάτωσης – OTUs.....	43
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	52

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Βιολογία Λαβρακιού

Το ευρωπαϊκό λαβράκι *Dicentrarchus labrax* είναι ένας γονοχωριστικός τελεόστεος ιχθύς (Εικόνα 1) που ανήκει στην οικογένεια των Μορονίδων (1 από τα 6 είδη) (*Moronidae*) (Εικόνα 2). Το είδος αυτό πήρε την ιχθυωνυμία του λάβραξ από τον Αριστοτέλη (Ganias et al., 2017), η ετυμολογία του οποίου πιθανώς προέρχεται από το επίθετο λάβρος (Hoffman & Jordan, 1892). Το λαβράκι εμφανίζει φαινοτυπική πλαστικότητα και αποτελεί ευρύθερμο και ευρύαλο είδος το οποίο ζει σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 5 έως 28 °C και σε αλατότητες 0,5 έως 70 ‰ (FAO: European Seabass Home, 2021). Οι προσαρμοστικές του αυτές ικανότητες του επιτρέπουν να ζει σε εκβολές και λιμνοθάλασσες, όπου κατοικεί το μεγαλύτερο μέρος της ζωής του και αναπαράγεται, σε ρηχά παράκτια νερά, αλλά και σε βαθύτερα των 100 μέτρων, ανάλογα με την χρονική εποχή και τον κύκλο ζωής του. Τα ενήλικα λαβράκια εμφανίζουν ωκεανόδρομη συμπεριφορά και μεταναστεύουν από παράκτια νερά το καλοκαίρι, σε βαθύτερα με πιο σταθερή θερμοκρασία νερά τον χειμώνα (Waters & Carroll, 2013). Το *Dicentrarchus labrax* είναι ένα σαρκοφάγο αρπακτικό που τρέφεται με ένα ευρύ φάσμα θηραμάτων όπως καβούρια, γαρίδες, αμμόχελα και μικρού μεγέθους ψάρια. Διαθέτει ένα επίμηκες και αεροδυναμικό σώμα με χρώμα που κυμαίνεται από ασημί και ανοιχτό γκρι, σε σκούρο γκρι. Επιπλέον, η επιφάνεια του καλύπτεται από μεγάλα ασημί λέπια και έχει 2 ραχιαία πτερύγια. Τα νεαρά άτομα εμφανίζουν μαύρες κηλίδες στο πάνω μέρος του σώματος κάτι το οποίο δεν συναντάμε στα ενήλικα λαβράκια (FAO: European Seabass Home, 2021).



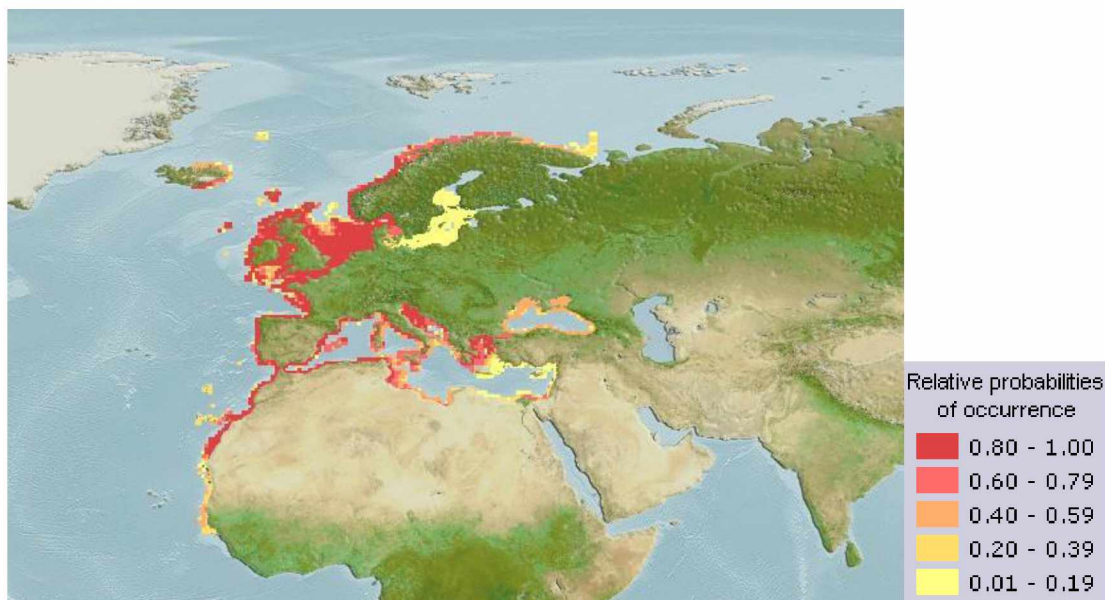
Εικόνα 1. Ενήλικο λαβράκι (Crocetta 2003)

Συστηματική ταξινόμηση λαβρακιού	
• Φύλο:	Χορδωτά
• Ομάδα:	Κρανιωτά
• Υπόφυλο:	Σπονδυλόζωα
• Υπερομοταξία:	Γναθόστομα (Ομάδα Ιχθύες-Οστειχθύες)
• Ομοταξία:	Ακτινοπτερύγιοι
• Υφομοταξία:	Νεοπτερύγιοι (Τελεόστεοι)
• Τάξη:	Perciformes
• Υποτάξη:	Percoidae
• Οικογένεια:	<u>Moronidae</u>
• Είδος:	<i>Dicentrarchus labrax</i>

**Εικόνα 2.** Συστηματική ταξινόμηση του *Dicentrarchus labrax* (World Register of Marine Species 2021)

## 1.2 Γεωγραφική εξάπλωση

Το λαβράκι στην φύση εντοπίζεται σε όλα τα μήκη και πλάτη της Μεσογείου και στην Μαύρη θάλασσα, στα νότια από το Μαρόκο, την Σενεγάλη και τα Κανάρια νησιά, μέχρι τις ακτογραμμές της Νορβηγίας, της Μάγχης και της Ιρλανδικής θάλασσας στον βορρά. Επιπλέον, απαντάται στις ακτές του βορειοανατολικού Ατλαντικού ωκεανού (Εικόνα 3) (Froese.Rainer & Pauly.Daniel, 2013).



**Εικόνα 3.** Κατανομή του είδους *Dicentrarchus labrax* (Froese and Pauly 2013)

### 1.3 Οικονομική σημασία

Το ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) είναι ένας θαλάσσιος ιχθύς μεγάλης οικονομικής και πολιτιστικής σημασίας στην Ευρώπη. Το λαβράκι προτιμάται από τους καταναλωτές λόγω της λευκής σάρκας του, της γλυκιάς και ήπιας γεύσης του, καθώς και της χαμηλής περιεκτικότητας του σε λιπαρά (Mokrani et al., 2018). Είναι είδος που αλιεύεται για εμπορικούς και ψυχαγωγικούς λόγους, όμως υπό οικονομικούς όρους αποτελεί κυρίως καλλιεργούμενο είδος, καθώς από το 1992 και έπειτα η ιχθυοκαλλιέργεια αποδίδει πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από την αλιεία (Vanderputte et al., 2019). Αποτελεί το σημαντικότερο εμπορικό θαλάσσιο είδος που εκτρέφεται ευρέως στην Μεσόγειο με τις Τουρκία, Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Κροατία και Αίγυπτο να κατέχουν το μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής (FAO: European Seabass Home, 2021). Η παραγωγή του το 2018 ανήλθε στους 84.000 τόνους αντιστοιχώντας στο 7% της συνολικής παραγωγής ανά είδος στην Ευρωπαϊκή ιχθυοκαλλιέργεια, ενώ η αξία παραγωγής του υπολογίστηκε 490 εκατομμύρια ευρώ (Nielsen et al., 2020). Επιπλέον, η εκτροφή του λαβρακιού αντιπροσώπευε το 2018 περίπου το 20% (662 εκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ) της συνολικής αξίας πώλησης της ευρωπαϊκής υδατοκαλλιέργειας, κατατάσσοντας το ως το δεύτερο είδος στον κλάδο υδατοκαλλιέργειας της Ευρώπης από άποψη αξίας μετά τον σολομό του Ατλαντικού (Fernández Sánchez et al., 2021). Επιπρόσθετα, η παγκόσμια παραγωγή έχει υπερδιπλασιαστεί τα τελευταία χρόνια (μεταξύ 2009 και 2018) και το 2018 παρήχθησαν 235.538 τόνοι, ποσότητα που αντιστοιχεί στο 0,2% της παγκόσμιας παραγωγής υδατοκαλλιέργειας (Πίνακας 1). Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός πως ο τομέας της ιχθυοκαλλιέργειας που αφορά την τσιπούρα και το λαβράκι στην Ευρώπη απασχολεί περισσότερους από 5000 εργαζόμενους, ενώ σχεδόν 3000 από αυτούς εργάζονται στην Ελλάδα (Nielsen et al., 2020).



Πίνακας 1. Οικονομικοί δείκτες για την ιχθυοκαλλιέργεια λαβρακιού και τσιπούρας της ΕΕ (FAO 2021).

Country	Number of enterprises		Total sales volume		Turnover		Employment		FTE		Average wage	
	number		thousand tonnes		million €		number		number		thousand €	
	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018
Croatia	25	21	10.3	12.1	67.1	72.1	473	474	418	425	18.9	19.7
Greece	343	347	98.5	105.7	527.9	539.0	3,026	3,064	2,574	2,958	22.1	17.7
Italy	46	46	14.3	13.0	103.2	95.4	411	375	100	109	130.7	111.7
Portugal	8	11	1.0	1.1	6.0	6.3	34	57	30	51	16.3	39.4
Spain	35	32	45.0	37.1	217.0	222.9	1,531	1,299	1,113	874	30.5	32.8
Other none DCF			13.3	12.7	75.1	75.8						
<b>Total DCF reported</b>	<b>457</b>	<b>457</b>	<b>169.1</b>	<b>169.0</b>	<b>921.1</b>	<b>935.6</b>	<b>5,475</b>	<b>5,269</b>	<b>4,235</b>	<b>4,417</b>	<b>26.5</b>	<b>23.4</b>
<b>Total EU</b>			<b>182.4</b>	<b>181.7</b>	<b>996.2</b>	<b>1,011.4</b>						

#### 1.4 Αλίευση του είδους

Η αλιεία για εμπορικούς σκοπούς λαμβάνει χώρα κυρίως σε παράκτια νερά την άνοιξη μέσω σκαφών χρησιμοποιώντας εργαλεία όπως οι τράτες, τα παραγάδια, οι πετονιές και απλά δίχτυα. Στην ανοιχτή θάλασσα αλιεύονται με πελαγικές μηχανότρατες, στοχεύοντας τα λαβράκια που μεταναστεύουν καθώς και συναθροίσεις των ατόμων του είδους κατά την αναπαραγωγή τους από τον Δεκέμβριο έως τον Απρίλιο (Waters & Carroll, 2013). Το λαβράκι συνήθως δεν είναι κύριος αλιευτικός στόχος καθ' όλη την διάρκεια του χρόνου και σε ορισμένα μέρη η περίοδος ψαρέματος κρατάει λίγους μήνες. Για τους παραπάνω λόγους, το λαβράκι κυρίως αλιεύεται ως κομμάτι μεικτής αλιείας ή ως ένα παράπλευρο πολύτιμο αλιεύμα. Η αλιεία για ψυχαγωγικούς λόγους πραγματοποιείται από ενδιαφερόμενους είτε σε μικρά σκάφη είτε από την ακτή χρησιμοποιώντας καλάμια ψαρέματος και σταθερά δίχτυα. Το λαβράκι έχει αυξημένη ευπάθεια ως προς την υπερεκμετάλλευση και την τοπική εξάντληση των αποθεμάτων του λόγω της αργής ανάπτυξης, της καθυστερημένης αναπαραγωγικής ωρίμανσης και της συγκέντρωσης πολλών ατόμων κατά την ωοτοκία (Lart & Caveen, 2013). Επιπλέον, λίγα μέτρα έχουν ληφθεί από διεθνείς οργανισμούς για την προστασία των αποθεμάτων του είδους από την υπεραλίευση. Ένα από τα σημαντικότερα, αποτελεί η εφαρμογή ενός ελάχιστου μεγέθους (36 εκ.) κατά την εκφόρτωση στην Ευρώπη που στοχεύει στην εξασφάλιση της αναπαραγωγής των θηλυκών. Το 2018 το συνολικό βάρος του είδους που αλιεύτηκε παγκοσμίως υπολογίστηκε σε 5135 τόνους με το 93% να προέρχεται από την Ευρώπη. Την τελευταία δεκαετία, η ποσότητα των αλιευμάτων σημειώνει σημαντική πτωτική τάση, η οποία οφείλεται κυρίως στην δραστική μείωση των

αποθεμάτων παρά τα μέτρα που έχουν ληφθεί για την αποκατάσταση τους (European Commission. Directorate-General for Maritime Affairs and Fisheries & EUMOFA., 2019).

### 1.5 Σημασία της ιχθυοκαλλιέργειας, ιστορική αναδρομή και προκλήσεις που αντιμετωπίζει

Οι ιχθύες αποτελούν πρωταρχική πηγή πρωτεϊνών, απαραίτητων λιπαρών οξέων, ιχνοστοιχείων και βιταμινών, ενώ συχνά αποτελεί την πιο οικονομική μορφή θρεπτικών. Η ζήτηση για ιχθύες αυξάνεται δραματικά λόγω υπερπληθυσμού, αύξησης των εισοδημάτων και της αστικοποίησης. Ως εκ τούτου, για να διατηρηθεί η κατά κεφαλήν κατανάλωση αμετάβλητη η ζήτηση για ψάρια θα αυξηθεί περισσότερο από 20 τόνους τις επόμενες δεκαετίες (Magalhães et al., 2017). Επομένως, είναι σαφές ότι η αλιεία από μόνη της δεν μπορεί να ικανοποιήσει τη ζήτηση για ψάρια χωρίς να τεθεί σε κίνδυνο η διατήρηση των θαλάσσιων πόρων και η βιωσιμότητα της αλιείας. Καθώς, οι περισσότερες αλιευτικές δραστηριότητες παγκοσμίως θεωρούνται κορεσμένες ή υπερεκμεταλλευόμενες, η ιχθυοκαλλιέργεια θα είναι κεντρικής σημασίας για την κάλυψη της ζήτησης ιχθύων. Σήμερα, η ιχθυοκαλλιέργεια είναι η ταχύτερα αναπτυσσόμενη βιομηχανία τροφίμων στον κόσμο, καλύπτοντας το 45% της παγκόσμιας παραγωγής ψαριών ποσοστό που αναμένεται να αυξηθεί σε 63% μέχρι το 2030 (Argu et al., 2019). Το λαβράκι εκτρέφεται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου όπου αντιπροσωπεύεται το 94% της παραγωγής. Η εκτροφή του ξεκίνησε σχετικά πρόσφατα και αποτελεί το πρώτο θαλάσσιο μη σολωμοειδές είδος που καλλιεργήθηκε σε εμπορική κλίμακα στην Ευρώπη. Παραδοσιακά, το λαβράκι εκτρέφονταν εντατικά σε παράκτιες λιμνοθάλασσες, σε υφάλμυρες εκβολές ποταμών στην βόρεια Ιταλία, την Πορτογαλία και την Ισπανία. Τα νεαρά λαβράκια παγιδευόταν κατά την εισροή τους στο ενδιαίτημα και εκτρέφονταν υπό ημι-εντατικές συνθήκες, συχνά χωρίς καθόλου τεχνητή τροφή. Μετά την πάχυνση, τα άτομα αλιευόταν ενώ μετανάστευαν προς τη θάλασσα μέσω των στενών καναλιών που υπήρχαν και τα οποία είχαν τροποποιηθεί, έτσι ώστε να διευκολύνουν τη συλλογή (Fernández Sánchez et al., 2021). Σήμερα, το λαβράκι εκτρέφεται κυρίως σε συνθήκες εντατικής καλλιέργειας σε πλωτά θαλάσσια κλουβιά. Η παραγωγή της ιχθυοκαλλιέργειας συμβαίνει σε 2 φάσεις. Πρώτα, μια φάση εκκόλαψης και προπάχυνσης οποία παράγει ιχθύδια 1 έως 10 g σε τρεις έως πέντε μήνες και στη συνέχεια μια φάση συνεχούς ανάπτυξης μέχρι τα 250-450 g που κρατάει από 12 έως 20 μήνες. Τα εκκολαπτήρια συνήθως βρίσκονται στην ξηρά σε συστήματα ελεγχόμενης θερμοκρασίας όπου τα νεαρά

λαβράκια μεταφέρονται σε κλωβούς προπάχυνσης όπου εκτρέφονται, ελέγχονται και ταξινομούνται και στη συνέχεια μεταφέρονται σε μεγαλύτερους ιχθυοκλωβούς παραγωγής (FAO: European Seabass Home, 2021; Vandeputte et al., 2019).

## 1.6 Τρόποι εξαλίευσης

Ταυτόχρονα με την άνθιση της παραγωγής στις ιχθυοκαλλιέργειες, εγείρεται και το ενδιαφέρον για την διατήρηση των χαρακτηριστικών ποιότητας καθώς και για ηθικά ζητήματα που αφορούν τις συνθήκες θανάτωσης των ιχθύων, τόσο σε επίπεδο καταναλωτή όσο και σε επίπεδο παραγωγού (Acerete et al., 2009). Οι χειρισμοί προ θανάτωσης και οι διαδικασίες θανάτωσης είναι από τα πιο κρίσιμα σημεία διαχείρισης της ιχθυοκαλλιέργειας (Simitzis et al., 2014). Επομένως, αν πραγματοποιηθούν χωρίς μέριμνα για την αποφυγή σοβαρών καταστάσεων στρες στο ζώο μπορεί να επηρεάσουν την έκφραση της ποιότητας και τις επακόλουθες αλλαγές κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του τελικού προϊόντος. Μάλιστα, ακόμα κι αν στο τελικό σημείο της ζωής των ψαριών πολλά ποιοτικά χαρακτηριστικά έχουν ήδη καθοριστεί, πολλά άλλα θα αναπτυχθούν κατά τη διάρκεια της μετατροπής της μεταθανάτιας μυϊκής μάζας σε φιλέτο (Poli et al., 2005). Το στρες στα εκτρεφόμενα ψάρια, τα οποία είναι πολύ δραστήρια πριν από τη θανάτωση, μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του φιλέτου των ψαριών με φυσικό και βιοχημικό τρόπο. Η αυξημένη μυϊκή δραστηριότητα κατά την θανάτωση επηρεάζει τις μεταθανάτιες βιοχημικές διαδικασίες κυρίως μέσω της αναερόβιας γλυκόλυσης, του αυξημένου ρυθμού αποικοδόμησης ATP και της αυξημένης παραγωγής γαλακτικού οξέος που επηρεάζουν την έναρξη της νεκρικής ακαμψίας και συνεπώς την φρεσκάδα του ψαριού. Ταυτόχρονα, οι συνθήκες στρες εκθέτουν τη σάρκα των ψαριών στην οξειδωση και αποικοδόμηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και οδηγούν στην αλλοίωση της υφής και γεύσης του προϊόντος (Simitzis et al., 2014). Ως εκ τούτου, για να διατηρηθεί η αρχική ποιότητα θα πρέπει ο ιχθύς να αναισθητοποιείται γρήγορα, αξιόπιστα και αποτελεσματικά μέχρι την θανάτωση του χωρίς οποιαδήποτε δυσφορία και στρες που μπορεί να αποφευχθεί. Επιπλέον, απαιτεί καλά εκπαιδευμένο προσωπικό που είναι σε θέση να αναγνωρίσει σημάδια επαναφοράς των αισθήσεων στα είδη ψαριών μετά από αναισθητοποίηση. Επί του παρόντος, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι εξαλίευσης και θανάτωσης για τα ψάρια, ανάλογα με το είδος, την τελική ποιότητα του προϊόντος και τη ζήτηση της αγοράς. Ορισμένα ψάρια υποβάλλονται σε ατομική επεξεργασία, ενώ άλλα θανατώνονται συλλογικά. Οι κύριες μέθοδοι θανάτωσης που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες είναι :

- Θάνατος με ψύξη σε παγόνερο ή μόνο πάγο
- Θάνατος με ψύξη σε υγρό πάγο (slurry ice)
- Θάνατος με παροχή CO<sub>2</sub> σε νερό και ασφυξία
- Θάνατος με ηλεκτραναισθία σε διαφορετικές τάσεις
- Θάνατος με χρήση χημικών αναισθητικών ουσιών
- Θάνατος με διάσχιση
- Θανάτωση με αφαιμάξη μέσω τομής στα βράγχια (gill cut)

Η θανάτωση με διάσχιση είναι μια διαδικασία που συνήθως εφαρμόζεται σε μεγάλα ψάρια. Το ψάρι αφαιρείται από το νερό, συγκρατείται σε κατάλληλο μέρος και δέχεται ένα ή δύο χτυπήματα στον εγκέφαλο χρησιμοποιώντας μια ξύλινη ή πλαστική ράβδο. Εφόσον, η ενέργεια του χτυπήματος είναι επαρκής προκύπτει μια άμεση αναισθητοποίηση στα ψάρια. Ένα πολύ δυνατό χτύπημα μπορεί να σκοτώσει το ζώο αμέσως. Η αιμορραγία που ακολουθεί εξασφαλίζει τον θάνατο του ψαριού. Η μέθοδος αυτή είναι από τις πιο γρήγορες και λιγότερο στρεσογόνες, όμως είναι αρκετά χρονοβόρα, απαιτεί καλά εκπαιδευμένο προσωπικό και συνήθως δεν είναι πρακτικά εφαρμόσιμη σε είδη ψαριών μικρού μεγέθους (Poli et al., 2005).

Θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αναισθητικοί παράγοντες για την καταστολή των ψαριών πριν από τη μεταφορά και τη θανάτωση τους για μείωση του στρες, καθώς πειραματικά έχουν χρησιμοποιηθεί με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Φυσικά, αυτές που βασίζονται στη χρήση χημικών, θα πρέπει να απορριφθούν λαμβάνοντας υπόψη τον πιθανό κίνδυνο για ανθρώπινη κατανάλωση (Acerete et al., 2009). Η θανάτωση των ιχθύων από ασφυξία προκύπτει αφαιρώντας τα ψάρια από το νερό αφήνοντας τα να πεθάνουν στον αέρα. Η μεταφορά τους επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας δίχτυα ή αντλώντας τα ψάρια μέσω σωλήνων και τοποθετώντας τα σε κάδους και κουτιά αποστράγγισης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, γίνονται βίαιες προσπάθειες διαφυγής και παρατηρείται μια αξιοσημείωτη φυσική δραστηριότητα. Αποτελεί μια από τις πιο στρεσογόνους μεθόδους θανάτωσης, εμφανίζοντας μια παρατεταμένη περίοδο ταλαιπωρίας πριν από τον θάνατο, ιδιαίτερα για τα λαβράκια που διαθέτουν σχετικά μεγάλη αντίσταση στην υποξία (The EFSA Journal (2009) 1010, 1-52, 2009).

Η θανάτωση με παροχή CO<sub>2</sub> στο νερό προκύπτει όταν τα ψάρια τοποθετούνται σε υδατόλουτρο κορεσμένο από CO<sub>2</sub> που διαλύεται στο νερό δίνοντας H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (σε ισορροπία με HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> και H<sup>+</sup>). Αυτό προκαλεί μείωση του pH στο αίμα και μια τοξική επίδραση στον εγκέφαλο. Η μέθοδος είναι αποτελεσματική και γρήγορη στη νάρκωση μεγάλου αριθμού

ψαριών σε αρκετά είδη, όμως είναι ιδιαίτερα στρεσογόνα και απεχθής για τα ψάρια, γεγονός που ξεκάθαρα διακρίνεται από τις γρήγορες και βίαιες αντιδράσεις τους (Poli et al., 2005).

### **Θανάτωση σε παγόνερο**

Η θανάτωση σε παγόνερο είναι μια γρήγορη και εύκολη διαδικασία που χρησιμοποιείται συχνά για τα μεσογειακά είδη. Τα ψάρια μετά την εξαλίευση μεταφέρονται σε δεξαμενές που περιέχουν ένα μίγμα νερού και πάγου διαφόρων αναλογιών. Η θερμοκρασία στην δεξαμενή κυμαίνεται από 0 έως 2 βαθμούς κελσίου και πρέπει να διαφέρει τουλάχιστον 10°C από την θερμοκρασία στους δεξαμενής η κλωβού εκτροφής του ψαριού (EFSA 2009). Η βύθιση των ψαριών στο παγόνερο τους προκαλεί υποθερμία και ανοξία. Η θερμοκρασία του σώματος τους μειώνεται ταχύτατα καθώς και ο μεταβολικός ρυθμός και οι κινήσεις τους. Επιπλέον, μειώνονται οι απαιτήσεις για οξυγόνο και παρατείνεται ο χρόνος μέχρι την θανάτωση τους από ανοξία. Η μέθοδος αυτή αποδεδειγμένα δεν θεωρείται ιδιαίτερα στρεσογόνα για τα μεσογειακά είδη όπως η τσιπούρα και το λαβράκι (Poli et al., 2005).

### **Θανάτωση σε υγρό πάγο (slurry ice)**

Ο υγρός πάγος είναι ένα διφασικό σύστημα που αποτελείται από μικρούς σφαιρικούς κρυστάλλους πάγου που περιβάλλονται από θαλασσινό νερό, σε θερμοκρασία υπό του μηδενός. Τα κύρια πλεονεκτήματα του συγκριτικά με τον συμβατικό πάγο είναι η χαμηλότερη θερμοκρασία, ο ταχύτερος ρυθμός ψύξης λόγω υψηλότερης ικανότητας ανταλλαγής θερμότητας και η μειωμένη ζημιά που προκαλείται στα προϊόντα λόγω του μικρού μεγέθους σωματιδίων. Επιπλέον, η πλήρης κάλυψη της επιφάνειας του ψαριού από το slurry ice προστατεύει επαρκώς τους ιστούς των ψαριών από τη δράση του οξυγόνου και επομένως από την οξειδωση και την αφυδάτωση των λιπιδίων (Ntzimani et al., 2021). Η θανάτωση με slurry ice εμφανίζει αυξημένη ποιότητα φιλέτου και παρατεταμένο χρόνο συντήρησης λόγω της ραγδαίας μείωσης της θερμοκρασίας σώματος (Poli et al., 2005).

### **Θανάτωση με ηλεκτραναισθησία**

Η θανάτωση με ηλεκτρισμό στο νερό μπορεί να είναι αρκετά αποτελεσματική και να τηρεί τις προϋποθέσεις για την ευζωία των ψαριών, καθώς τα αναισθητοποιεί τάχιστα. Το ηλεκτρικό ρεύμα διεγείρει αδιακρίτως όλα τα μέρη του εγκεφάλου και οδηγεί σε γενικευμένη επιληπτική προσβολή, εάν το ρεύμα είναι επαρκούς ισχύος. Ο εγκέφαλος που διεγείρεται με

αυτόν τον τρόπο δεν είναι σε θέση να ανταποκριθεί σε ερεθίσματα (Lambooij et al., 2008). Είναι σημαντική η χρήση της κατάλληλης έντασης ηλεκτρικού πεδίου. Η ανεπαρκής ένταση μπορεί να προκαλέσει μόνο παράλυση και όχι αναισθησία, ενώ η πολύ υψηλή ένταση μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του προϊόντος οδηγώντας σε μελανιές στο σώμα του ψαριού ή σπασμένα κόκκαλα. Ο θάνατος μπορεί να επέλθει άμεσα από την ηλεκτροπληξία, είτε με την χρησιμοποίηση μιας άλλης μεθόδου (Ashley, 2007). Η χρήση της μεθόδου στο λαβράκι εξακολουθεί να είναι μια πειραματική μέθοδος, ωστόσο κατασκευαστές έχουν παραγάγει πρωτότυπο εξοπλισμό για μεγάλης κλίμακας εφαρμογή. Για τη μέθοδο ηλεκτρικής αναισθητοποίησης ολόκληρου του ψαριού, τα λαβράκια βρίσκονται σε δεξαμενή, όπου περνάει ηλεκτρικό ρεύμα μεταξύ δύο ηλεκτροδίων πλάκας τοποθετημένα στις απέναντι πλευρές της δεξαμενής. Η ηλεκτροπληξία στα λαβράκια πιθανώς δεν επηρεάζει την ποιότητα του φιλέτου, ενώ ενδεχομένως να απαιτείται και η χρήση μιας ακόμη μεθόδου για την θανάτωση τους (EFSA 2009).

### 1.7 Συνθήκες αποθήκευσης

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος διατήρησης ιχθύων είναι η τοποθέτησή τους σε συσκευασία με πάγο σε μορφή νιφάδων, προκειμένου να ανασταλεί μερικώς η απώλεια ποιότητας και φρεσκάδας. Ο πάγος μειώνει την θερμοκρασία των προϊόντων ιχθύων μέχρι τα τελικά επίπεδα αποθήκευσης λίγο πάνω από τους 0°C. Τα ψάρια πρέπει να ψύχονται το συντομότερο δυνατό μετά τη συγκομιδή, καθώς η καθυστέρηση της ψύξης των ιχθύων μειώνει την διάρκεια συντήρησης των προϊόντων (Keys et al., 2018). Η αποθήκευση σε πάγο μπορεί να διατηρήσει την φρεσκάδα, όμως δεν εξαλείφει τους μικροοργανισμούς ή διακόπτει την ενζυματική δράση πλήρως. Οι περισσότερες διαδικασίες βιοχημικής αλλοίωσης επιβραδύνονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, ταυτόχρονα με την μείωση της μικροβιακής ανάπτυξης.

Ωστόσο, τα ψυχοτρόπα βακτήρια θα εξακολουθούν να ευδοκιμούν στους 0° C και μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση σχετικά γρήγορα ακόμη και σε συνθήκες ψύξης (Sampels, 2015). Τα εκτρεφόμενα λαβράκια εμφανίζουν διάρκεια συντήρησης μετά την εξαλίευσή τους από 8-15 ημέρες η οποία εξαρτάται κυρίως από τον τρόπο αποθήκευσης (συντήρηση σε πάγο 6-8 μέρες) (Mokrani et al., 2018).

Η αποθήκευση των ιχθύων σε υγρό πάγο (slurry ice) σε πολλές περιπτώσεις υπερέχει της χρήσης συμβατικού πάγου για αρκετούς λόγους. Ορισμένοι από αυτούς είναι:

- Ο ρυθμός ανταλλαγής θερμότητας είναι περίπου τέσσερις φορές υψηλότερος από αυτόν που λαμβάνεται με νιφάδες πάγου, επιτρέποντας έτσι ταχύτερη ψύξη
- Η πλήρης κάλυψη της εξωτερικής επιφάνειας του προϊόντος εγγυάται πιο αποτελεσματική ψύξη και επίσης αποτρέπει την αφυδάτωση
- Η σφαιρική γεωμετρία και το μικρό μέγεθος των κρυστάλλων πάγου περιορίζουν τη ζημιά που υφίστανται οι κυτταρικές δομές των ψαριών
- Η ρευστή φύση του επιτρέπει την αυτοματοποίηση των χειρισμών και διανομή των προϊόντων με πιο υγιεινό τρόπο
- Αποτελεί ευέλικτη τεχνική και μπορεί να συνδυαστεί με την χρήση ουσιών που έχουν αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές ιδιότητες
- Η ροή του υγρού πάγου στην επιφάνεια του προϊόντος πιθανώς οδηγεί στην μείωση του μικροβιακού φορτίου και την μικρότερη διάχυση των μικροοργανισμών προς τους μυς (Medina et al., 2009).

### 1.8 Σύνθεση μικροβιώματος στο λαβράκι και σημασία

Όλα τα ζώα φιλοξενούν στην επιφάνειά τους και σε πολλά εσωτερικά όργανα κοινοπραξίες μικροοργανισμών, συγκεκριμένα βακτήρια, αρχαία, μύκητες και ιούς, που συλλογικά ονομάζονται μικροβίωμα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί σχηματίζουν διαφοροποιημένες κοινότητες και παίζουν κρίσιμους ρόλους για τον ξενιστή, καθώς διευκολύνουν την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, ρυθμίζουν το μεταβολισμό και συμβάλλουν στην άμυνα από την εισβολή παθογόνων. **Οι μικροοργανισμοί στους ιχθύες βρίσκονται κυρίως στην επιδερμίδα, στο πεπτικό σύστημα και στα βράγχια.** Οι μικροβιακές κοινότητες στα διάφορα μέρη του σώματος εμφανίζουν διαφορές στην σύνθεση τους λόγω διαφορετικής ροής νερού κατά την κολύμβηση, ανόμοιας κατανομής επιδερμικής βλέννας στην έκταση της επιφάνειας του σώματος και μεταβλητή έκθεση σε ροές απέκκρισης θρεπτικών συστατικών μέσω των βραγχίων (Chiarello et al., 2015). **Το μικροβίωμα των τελεόστεων έχει πρωταγωνιστικό ρόλο στην υγεία και ευζωία των ξενιστών. Οι βλεννογόνες επιφάνειες όπως η επιδερμίδα και τα βράγχια φιλοξενούν μικροβιακές κοινότητες, που μπορούν να λειτουργήσουν ως η πρώτη γραμμή άμυνας κατά των παθογόνων, είτε μέσω του**

ανταγωνισμού είτε μέσω της παραγωγής αντιβιοτικών ενώσεων. Επιπρόσθετα, τα μικροβιώματα πιστεύεται ότι έχουν εξελιχθεί για να βελτιστοποιούν την ανοσολογική απόκριση κάθε οργάνου και να προάγουν την ομοιόσταση (Salinas, 2015). Ένα ποικιλόμορφο μικροβίωμα συνήθως συνδέεται με υγιείς φαινοτύπους, αλλά διαταραχές σε αυτή την ισορροπία μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση των ευκαιριακών παθογόνων μικροοργανισμών και στην ευαισθησία του ξενιστή σε ασθένειες. Η σύνθεση του μικροβιώματος στα ψάρια επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως η ποιότητα του νερού, το στρες, η διατροφή, οι επιμολύνσεις, το είδος και η φυσιολογία του ξενιστή (Parlapani et al., 2018). Είναι σημαντικό να αναφερθεί, πως οι υγιείς επιφάνειες του βλεννογόνου, όπως το δέρμα και τα βράγχια, αποικίζονται φυσιολογικά από παθογόνα που βρίσκονται στο νερό και ενσωματώνονται στο μικροβίωμα του ξενιστή. Η αύξηση της αφθονίας τους όμως μπορεί να οδηγήσει σε μικροβιακή ανισορροπία και ασθένεια, η οποία συνήθως συνοδεύεται από μείωση της βακτηριακής ποικιλότητας (Salinas, 2015). Οι συνθήκες ιχθυοκαλλιέργειας επηρεάζουν τις μικροβιακές κοινότητες της επιδερμίδας των ψαριών, καθώς συνωστισμός και χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, οδηγούν σε στρες του ξενιστή και προκαλούν δυσβίωση στο μικροβίωμα του δέρματος, διευκολύνοντας τον πολλαπλασιασμό των ευκαιριακών παθογόνων (Rosado, Pérez-Losada, et al., 2019). Οι πιο άφθονες ταξινομικές ομάδες που βρίσκονται στα βράγχια και την επιδερμίδα του υγιούς εκτρεφόμενου λαβρακιού ανήκουν στα φύλα *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* και *Verrucomicrobia*. Τα συγκεκριμένα φύλα αποτελούν τα πιο άφθονα στα μικροβιώματα των βραγχίων και του δέρματος πολλών τελεόστεων. Σε επίπεδο γένους τα *NS3a*, *Rubritalea*, *Pseudomonas* εμφανίζονται περισσότερο καθώς και τα *Polaribacter*, *Polynucleobacter* και *Arcobacter* σε μικρότερο βαθμό (Rosado, Xavier, et al., 2019).

### 1.9 Μικροβίωμα και αλλοίωση αλιευμάτων

Η έννοια της ποιότητας των αλιευτικών προϊόντων είναι συνυφασμένη με την έννοια της φρεσκάδας για την εμπορευματοποίηση των ψαριών. Προκειμένου να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις των καταναλωτών, τα προϊόντα ιχθύων πρέπει να έχουν χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του φρέσκου ψαριού (Mokrani et al., 2018). Τα αλιεύματα είναι πολύ ευπαθή προϊόντα. Η ποιότητά τους μετά την εξαλίευση υποβαθμίζεται πολύ γρήγορα λόγω τριών μηχανισμών: της μικροβιακής δραστηριότητας, των χημικών οξειδώσεων και των ενζυμικών αντιδράσεων. Συγκεκριμένα, την θανάτωση των ιχθύων ακολουθεί η αυτολυτική



διαδικασία που αποτελεί αποτέλεσμα της δράσης διάφορων ενδογενών ενζύμων, προκαλεί μείωση της αρχικής ποιότητας και επηρεάζει χαρακτηριστικά των αλιευμάτων όπως την χαρακτηριστική φρέσκια οσμή, γεύση και υφή. Επιπλέον, οι αυτολυτικές αλλαγές συμβάλλουν στην αλλοίωση κυρίως καθιστώντας καταβολίτες διαθέσιμους για ανάπτυξη βακτηρίων (Gram & Huss, 1996a).

Τα εξαιρετικά ακόρεστα λιπίδια των ψαριών οξειδώνονται εύκολα, καθορίζοντας επίσης τη μυρωδιά, τη γεύση, την υφή, το χρώμα και τις διατροφικές αλλοιώσεις. Η οξείδωση ξεκινά αμέσως μετά την αλίευση, αλλά γίνεται ιδιαίτερα σημαντική για τη διάρκεια συντήρησης μόνο σε θερμοκρασίες μικρότερες από 0°C, όταν η οξείδωση και όχι η μικροβιακή δραστηριότητα γίνεται ο κύριος παράγοντας αλλοίωσης. Επιπλέον, η αλλοίωση μέσω οξείδωσης κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία υψηλότερη από 0°C, μπορεί να συμβάλει σε δυσάρεστες οσμές και γεύσεις παρότι δεν αποτελεί το κυρίαρχο φαινόμενο (Limbo et al., 2009). Οι μηχανισμοί αυτοί αναπτύσσονται σχεδόν ταυτόχρονα. **Ωστόσο, η μικροβιακή δραστηριότητα είναι ο κύριος μηχανισμός που επηρεάζει αισθητά την ποιοτική υποβάθμιση των φρέσκων και ελαφρώς διατηρημένων αλιευμάτων**, ενώ σε επεξεργασμένα θαλασσινά, όπου η μικροβιακή ανάπτυξη επιβραδύνεται ή αναστέλλεται, οι μη μικροβιοτικοί μηχανισμοί παίζουν πιο καθοριστικό ρόλο (Bozariis & Parlapani, 2017a).

**Καθώς τα βακτήρια αναπτύσσονται, χρησιμοποιούν θρεπτικά συστατικά και παράγουν παραπροϊόντα. Η συσσώρευση αυτών των μεταβολικών προϊόντων είναι η κύρια αιτία της αλλοίωσης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των αλιευμάτων. Η αλλοίωση προκαλείται μόνο από ένα κλάσμα του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού οι οποίοι ονομάζονται συγκεκριμένοι αλλοιογόνοι οργανισμοί (SSOs), οι οποίοι επικρατούν στο αρχικό μικροβίωμα και έχουν την δυνατότητα παραγωγής επαρκούς ποσότητας μεταβολιτών που θα προκαλέσουν την οργανοληπτική υποβάθμιση και απόρριψη του προϊόντος. Η επικράτηση των SSOs επί του αρχικού μικροβιώματος εξαρτάται από το είδος του ψαριού, την θερμοκρασία και τις ατμοσφαιρικές συνθήκες κατά την αποθήκευση καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροβίων. Η διάρκεια ζωής των αλιευμάτων κατά την αποθήκευση εξαρτάται από τον χρόνο που απαιτείται ώστε οι SSOs να παράγουν την επαρκή συγκέντρωση μεταβολιτών που θα οδηγήσει στην απόρριψη του προϊόντος. Ορισμένα από τα παραπροϊόντα αυτά είναι ολικές πηκτικές βάσεις αζώτου (TVB-N), TMA, θειικές ενώσεις, αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες και εστέρες. Οι κύριοι αλλοιωτικοί μικροοργανισμοί των ψαριών που αποθηκεύονται ψυχόμενα σε αερόβιες συνθήκες ανήκουν στα γένη των *Pseudomonas* και *Shewanella* (Bozariis & Parlapani, 2017). Σε ψάρια που προέρχονται από την Μεσόγειο Θάλασσα κυρίως τσιπούρα και λαβράκι αποθηκευμένα στον αέρα, τα**

βακτήρια του γένους *Pseudomonas* είναι οι κύριοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί μαζί με τα θείο-αναγωγικά βακτήρια (Castro et al., 2006).

### 1.10 Μέθοδοι προσδιορισμού του μικροβιώματος

Ο μικροβιολογικός προσδιορισμός μπορεί να βασίζεται σε μεθόδους εξαρτώμενες από την καλλιέργεια και μοριακές μη καλλιεργητικές μεθόδους. Οι καλλιεργητικές μέθοδοι ιστορικά αποτελούν το πρότυπο για τον προσδιορισμό της σύνθεσης του μικροβιώματος. Οι μέθοδοι αυτοί βασίζονται στην καλλιέργεια μικροοργανισμών σε τρυβλία με άγαρ για απομόνωση και επακόλουθη ταυτοποίηση χρησιμοποιώντας φαινοτυπικά τεστ ή για απαρίθμηση (Boziaris & Parlapani, 2017). Επί του παρόντος, πολλές εργαστηριακές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ταυτότητας και των βιολογικών χαρακτηριστικών των μικροβιακών ειδών εξαρτώνται από την καλλιέργεια των μικροοργανισμών. Η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων, ο έλεγχος εξωτερικών μεταβλητών, η απλότητα του πειραματικού σχεδιασμού καθώς και το χαμηλό κόστος είναι ορισμένα από τα πλεονεκτήματα των καλλιεργητικών μεθόδων (Garza & Dutilh, 2015). Ωστόσο, οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να καλλιεργηθούν υπό τυπικές εργαστηριακές συνθήκες, ενώ άλλοι απαιτούν δύσκολες συνθήκες ανάπτυξης και είναι εμφανώς δύσκολο να απομονωθούν. Επιπλέον, ορισμένοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται πιο γρήγορα και ανταγωνιστικά οδηγώντας στην αριθμητική υπεροχή τους και εμποδίζοντας τον εντοπισμό των μικροοργανισμών με χαμηλή εκπροσώπηση στην καλλιέργεια. Τέτοιοι περιορισμοί οδηγούν αυτές τις τεχνικές στην υποεκτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας, και μερικές φορές ακόμη και στην αποτυχία ανίχνευσης της πλειοψηφίας των μικροβιακών ομάδων. Τις τελευταίες δεκαετίες, μεγάλος αριθμός μοριακών μεθόδων ανεξάρτητων από καλλιέργεια έχουν αναπτυχθεί που βοηθούν στην αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων. Αυτές οι τεχνικές αποτελούν ευαίσθητες, γρήγορες και αποτελεσματικές μεθόδους για τον προσδιορισμό της σύνθεσης και της ποικιλομορφίας των μικροβιακών κοινοτήτων. Οι περισσότερες βασίζονται στην ενίσχυση συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων των μικροβίων, συνήθως των rRNA γονιδίων, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR. Η σύγκριση των αλληλουχιών που λαμβάνονται τόσο μεταξύ τους όσο και με αυτές που διατηρούνται σε βάσεις δεδομένων, επιτρέπει την ανίχνευση φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ των μικροβίων (Mayo et al., 2014). Η τεχνική FISH (υβριδισμός φθορισμού *in situ*) και άλλες που βασίζονται στον υβριδισμό αποτελούν από τις λίγες μεθόδους που δεν βασίζονται στην ενίσχυση με PCR. Η FISH βασίζεται στον υβριδισμό επισημασμένων με φλουορεσκεΐνη ανιχνευτών σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του rRNA σε

κύτταρα στόχους που έχουν ακινητοποιηθεί σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα αποτελέσματα οπτικοποιούνται σε μικροσκόπιο UV μετά τον υβριδισμό (Cocolin et al., 2013). Επιπλέον, η ανάπτυξη στο πεδίο της μοριακής βιολογίας, έχει προσφέρει μεθόδους που βασίζονται στην αλληλούχηση και την μεταγονιδιωματική, θεμελιώδες εργαλείο για την ανακάλυψη και τον προσδιορισμό της μικροβιακής βιοποικιλότητας. Η μεταγονιδιωματική τυπικά περιλαμβάνει δύο συγκεκριμένες στρατηγικές, την στόχευση, ενίσχυση και αλληλούχηση συγκεκριμένων συντηρημένων περιοχών δημιουργώντας ταξινομικά προφίλ μικροβιακής σύνθεσης και την αλληλούχηση τυχαίας προσπέλασης για να τεμαχίσει και να αλληλουχήσει ολόκληρο το DNA ενός δείγματος μικροβιώματος (Fricker et al., 2019). Η πρώτη μέθοδος δημιουργεί ταξινομικά προφίλ μικροβιακής σύνθεσης με σχετικά μέτριο κόστος, ενώ η δεύτερη παρέχει γενικά μια πιο ολοκληρωμένη, αλλά και πιο δαπανηρή, ταξινομική και λειτουργική ανάλυση ολόκληρου του μικροβιώματος. Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν τα μικροβιώματα σήμερα, εφαρμόζουν μεθόδους μαζικής παράλληλης αλληλούχησης για ταξινομικό και λειτουργικό προσδιορισμό των μικροβίων. Η ευρεία εφαρμογή γονιδιωματικών προσεγγίσεων υψηλής απόδοσης είναι εφικτή λόγω των τεχνολογιών νέας γενιάς αλληλούχησης.

### 1.11 16s RNA

Η αλληλούχηση του βακτηριακού γονιδίου 16S rRNA είναι πιθανώς η λιγότερο δαπανηρή και πιο αποτελεσματική μέθοδος για τη μελέτη του μικροβιώματος και αποτελεί τον πιο συχνά χρησιμοποιούμενο φυλογενετικό δείκτη για μικροβιακή ανάλυση. Η μέθοδος προσφέρει ένα ευρύ φάσμα χρήσεων, συμπεριλαμβανομένου του χαρακτηρισμού βακτηριακών πληθυσμών, της ταυτοποίησης ειδών και της ταξινομικής ανάλυσης. Η ταξινομική ανάλυση απαιτεί μια βάση δεδομένων αναφοράς στην οποία αντιστοιχίζονται οι αλληλουχίες με βάση την ομοιότητα τους. Το γονίδιο 16S rRNA κωδικοποιεί μέρος της μικρής υπομονάδας 30S του προκαρυωτικού ριβοσώματος, έχει μήκος 1542 βάσεις και βρίσκεται σε όλα τα βακτήρια και αρχαία αλλά όχι στους ευκαρυώτες. Η περιοχή 16S διαθέτει υψηλά συντηρημένες περιοχές που αποτελούν στόχο για καθολικούς εκκινητές ενώ διαθέτει 9 υπερμεταβλητές περιοχές που επιτρέπουν την διαφοροποίηση και αναγνώριση των βακτηρίων. Η ενίσχυση μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι επομένως εφικτή με εκκινητές που στοχεύουν τις πλευρικές διατηρημένες περιοχές και σε μια αντίδραση καθίσταται δυνατή η ενίσχυση των αλληλουχιών διαφόρων βακτηρίων που υπάρχουν σε ένα περιβάλλον στόχο, καθώς και η χαρτογράφηση κάθε αλληλουχίας στα βακτήρια προέλευσής της με βάση τις

μοναδικές υπερμεταβλητές περιοχές (Narayan et al., 2020). Ο προσδιορισμός του μικροβιώματος με την μέθοδο αυτή τυπικά απαιτεί την ομαδοποίηση των αλληλουχιών σε λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs) με βάση αυθαίρετα καθορισμένα κατώφλια που αφορούν την ομοιότητα της αλληλουχίας. Η ομαδοποίηση σε OTUs εκχωρεί παρόμοιες αλλά ελαφρώς διαφορετικές αλληλουχίες στο ίδιο taxon υποθέτοντας μια κοινή βιολογική προέλευση. Η ομαδοποίηση αλληλουχιών μπορεί να καθοδηγηθεί από βακτηριακά γονιδιώματα αναφοράς, ωστόσο αρκετές μέθοδοι συχνά περιλαμβάνουν ομαδοποίηση χωρίς κάποιο γονιδίωμα αναφοράς για τον εντοπισμό προηγουμένως άγνωστων ειδών (Fricker et al., 2019). Η αλληλούχηση του 16S rRNA είναι πολύ χρήσιμη μέθοδος στην ταξινόμηση βακτηρίων, όμως έχει χαμηλή φυλογενετική ισχύ σε επίπεδο είδους και χαμηλή διακριτική δύναμη για ορισμένα γένη (Janda & Abbott, 2007).

### 1.12 Αλληλούχηση νέας γενιάς

Η τεχνολογία αλληλούχησης DNA πρώτης γενιάς αναπτύχθηκε από τον Frederick Sanger το 1977 με βάση την επιλεκτική ενσωμάτωση διδεοξυνουκλεοσιδίων που τερματίζουν την επέκταση της αλυσίδας. Η μέθοδος Sanger ήταν η κύρια τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας μέχρι το 2005 και παρήγαγε σχετικά μεγάλες (500–1000 bp) υψηλής ποιότητας αλληλουχίες DNA ενώ το πρώτο αυτόματο μηχάνημα αλληλούχησης (AB370) παρήχθη από την εταιρεία Applied Biosystems το 1987. Επιπρόσθετα, η τεχνική Sanger ολοκλήρωσε την πρώτη αλληλούχηση βακτηριακού γονιδιώματος το 1995, ενώ συμμετείχε στην αλληλούχηση του ανθρώπινου γονιδιώματος το 2004 (di Bella et al., 2013). Η εισαγωγή της τεχνολογίας πυροαλληλούχησης (pyrosequencing) το 2005 από την εταιρεία 454 Life Sciences ξεκίνησε την επανάσταση της νέας γενιάς αλληλούχησης. Αυτή η τεχνολογία υψηλής απόδοσης επέτρεψε τη δημιουργία και την ανίχνευση χιλιάδων έως εκατομμυρίων αναγνώσεων σύντομης αλληλουχίας καθιστώντας εφικτή την αλληλούχηση ολόκληρων γονιδιωμάτων πολύ γρήγορα, χωρίς την ανάγκη κλωνοποίησης (δημιουργίας κλώνων τμημάτων DNA σε βακτηριακά πλασμίδια). Επίσης, αντί για εκατοντάδες χιλιάδες έως πολλά εκατομμύρια αλληλουχήσεις οι αντιδράσεις γίνονται παράλληλα και το αποτέλεσμα της αλληλούχησης ανιχνεύεται άμεσα χωρίς την ανάγκη ηλεκτροφόρησης. Τα πηγαδάκια φορτώνονται με ένζυμα προσδιορισμού αλληλουχίας και εκκινητή και στη συνέχεια εκτίθενται σε ροή μη επισημασμένου νουκλεοτιδίου κάθε φορά, επιτρέποντας τη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου DNA. Όταν ενσωματώνεται ένα νουκλεοτίδιο,

απελευθερώνεται πυροφωσφορικό που οδηγεί σε εκπομπή φωτός, η οποία παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο. Το 454 Genome Sequencer παρήγαγε περίπου 200.000 αναγνώσεις (~20 Mb) 110 ζευγών βάσεων (bp). Έπειτα, αναπτύχθηκε ένα χρόνο αργότερα η πλατφόρμα αλληλούχησης Solexa που διατέθηκε στο εμπόριο το 2007 από την Illumina. Η αλληλούχηση με Illumina παρήγαγαν πολύ μεγαλύτερους αριθμούς αναγνώσεων από το 454 Genome Sequencer αλλά οι αναγνώσεις που παρήχθησαν είχαν μήκος περίπου 32-40 βάσεις. Ωστόσο μέσω της αναβάθμισης της μεθόδου η Illumina μπορεί τώρα να παράγει αναγνώσεις μήκους πολλών εκατοντάδων βάσεων και ως εκ τούτου, η συναρμολόγηση γονιδιώματος και η μεταγονιδιωματική μπορούν πλέον να πραγματοποιηθούν και με την αλληλούχηση Illumina, θεωρείται από τις κορυφαίες πλατφόρμες νέας γενιάς αλληλούχησης, καθώς προσφέρει υψηλή απόδοση και αρκετά χαμηλό κόστος ανά βάση (Thermes, 2014). Η τεχνολογία Illumina λειτουργεί με προσδιορισμό αλληλουχίας μέσω σύνθεσης, που περιλαμβάνει νουκλεοτίδια σημασμένα με φθορισμό τα οποία προστίθενται σε μια αναπτυσσόμενη αλυσίδα τερματίζοντας την αναστρέψιμα. Στη συνέχεια, απεικονίζεται η φθορίζουσα χρωστική ουσία της την αναγνώριση της βάσης (Narayan et al., 2020).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία έχει σκοπό να διερευνήσει τις διαφορές στην σύνθεση και εξέλιξη του μικροβιώματος της επιφάνειας του λαβρακιού, μετά από αποθήκευση στους 4°C με διαφορετικές μεθόδους εξαλίευσης, προερχόμενα από δύο θερμοκρασιακές περιόδους και δύο διαφορετικές παραγωγικές μονάδες. Οι μέθοδοι εξαλίευσης που χρησιμοποιήθηκαν είναι η εξαλίευση με παγόνερο (συμβατική μέθοδος αλίευσης), η εξαλίευση με ηλεκτραισθησία σε διαφορετικές τάσεις, η εξαλίευση με υγρό πάγο και η εξαλίευση σε μείγμα υγρού πάγου και παγόνερου σε αναλογία 1:1. Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) επιλέχθηκε ως οργανισμός μελέτης, καθώς έχει εξέχουσα οικονομική και πολιτιστική σημασία στην Ευρώπη ενώ αποτελεί από τα σημαντικότερα εμπορικά θαλάσσια είδη που εκτρέφεται ευρέως στην Μεσόγειο και δη στην Ελλάδα. Επιπρόσθετα, το μικροβίωμα στην επιφάνεια του δέρματος του, επιλέχθηκε διότι είναι ενδεχομένως από τους κυριότερους παράγοντες αλλοίωσης και υποβάθμισης των αλιευτικών προϊόντων. Επομένως, οι πληροφορίες σχετικά με την μεταβολή της σύστασης του μικροβιώματος υπό διαφορετικές συνθήκες εξαλίευσης, αποθήκευσης και προέλευσης σε συγκεκριμένες μέρες από την εξαλίευση του ιχθύος, πιθανώς θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην βελτίωση της ποιότητας του φιλέτου και του χρόνου συντήρησής του.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Επιλογή δειγμάτων

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε 2 διαφορετικές παραγωγικές μονάδες, Angramar S.A (Αστακός Αιτωλοακαρνανίας) και Philosofish (Λάρυμνα Φθιώτιδας) σε διαφορετικές θερμοκρασιακές περιόδους του νερού (C: 15.5°C, H: 25°C) και από τις δύο μονάδες προερχόμενα όμως από διαφορετικό περιβάλλον Ιόνιο και Αιγαίο πέλαγος αντίστοιχα. Στα δείγματα από το Ιόνιο τα ψάρια αλιεύτηκαν με τις μεθόδους : εξαλίευση με παγόνερο CS: Control ,εξαλίευση με ηλεκτραναισθησία σε διαφορετικές τάσεις HC: High Current (HC – 1.8V/cm + 1.6m/sec) και LC: Low Current (1.5V/cm + 1.6m/sec). Τα δείγματα αυτά εξετάστηκαν σε διαφορετικές μέρες αποθήκευσης τους και συγκεκριμένα τις ημέρες 0,1 και 7 μετά την εξαλίευση τους. Στα δείγματα προερχόμενα από το Αιγαίο εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι: εξαλίευση με υγρό πάγο, εξαλίευση σε μείγμα υγρού πάγου και παγόνερου σε αναλογία 1:1 και εξαλίευση σε παγόνερο και εξετάστηκαν οι ημέρες 0,1 και 8 μετά την εξαλίευση τους.

#### 3.2 Απομόνωση DNA

Για την εξαγωγή DNA μικροβιώματος από την επιφάνεια ατόμων του *Dicentrarchus labrax*, πραγματοποιήθηκε λήψη δειγμάτων από μέλη του εργαστηρίου Γενετικής, συγκριτικής και εξελικτικής βιολογίας, με νυστέρι από την επιφάνεια του λαβρακιού και ακολουθήθηκε προσαρμοσμένο πρωτόκολλο απομόνωσης DNA που έχει ως εξής :

1. Προσθήκη 200μl NaCl συγκέντρωσης 5M στο δείγμα προκειμένου να ασκηθεί ωσμωτική πίεση για την λύση των κυτταρικών μεμβρανών.
2. Προσθήκη 40μl διαλύματος λυσοζύμης 10 mg/μl για την περαιτέρω λύση των βακτηριακών κυττάρων κυρίως μέσω υδρόλυσης των πεπτιδογλυκάνων στα κυτταρικά τοιχώματα.
3. Ακολουθεί vortex των δειγμάτων και παραμονή τους για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Προσθήκη 50μl πρωτεϊνάσης K συγκέντρωσης 20 mg/μl με σκοπό την αποικοδόμηση των νουκλεασών και την πέψη πρωτεϊνών.
5. Προσθήκη 350μl lysis buffer από το PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Cat No K182002) για τον διαχωρισμό του DNA από άλλα κυτταρικά υπολείμματα και την διατήρηση του pH κατά την απομόνωση.

6. Επώαση διάρκειας μίας ώρας των δειγμάτων στους 55<sup>o</sup> C όπου επιτυγχάνεται η βέλτιστη δράση της πρωτεΐνης K.
7. Vortex και ομογενοποίηση των δειγμάτων με glass beads για 3 λεπτά σε ταχύτητα 8000rpm σε ομογενοποιητή (PRECELLYS 24 TISSUE HOMOGENIZER).
8. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 10000 στροφές (rpm) διάρκειας 10 λεπτών.
9. Τέλος χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο απομόνωσης PureLink DNA Purification Kit της εταιρίας ThermoFisher Scientific σύμφωνα με τις οδηγίες με τελικό όγκο έκλουσης τα 30μl.

### 3.3 Έλεγχος απομόνωσης DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό αλληλουχιών DNA *in vitro*, από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης συγκεκριμένων ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών που ονομάζονται εκκινητές (Mullis et al., 1986). Οι εκκινητές αποτελούν το εναρκτήριο σημείο της σύνθεσης του DNA. Είναι απαραίτητοι για την αντιγραφή του DNA επειδή τα ένζυμα που καταλύουν αυτή τη διαδικασία, οι πολυμεράσες του DNA μπορούν να προσθέσουν μόνο νέα νουκλεοτίδια σε έναν υπάρχοντα κλώνο DNA. Η πολυμεράση αρχίζει να αντιγράφει στο 3' άκρο του εκκινητή και αντιγράφει τον αντίθετο κλώνο. Η χρήση των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών εκατέρωθεν της υπό εξέταση αλληλουχίας, μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους αποδιάταξης του DNA, υβριδοποίησης των εκκινητών και επιμήκυνσης αυτών με τη βοήθεια μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης του DNA, παρέχει τελικά την εκλεκτική ενίσχυση ενός τμήματος DNA. Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε ο πολλαπλασιασμός της 16s περιοχής του βακτηριακού DNA με κατάλληλους εκκινητές σκοπεύοντας τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της απομόνωσης. Οι εκκινητές (primers) που αξιοποιήθηκαν δίνονται στον Πίνακα 2. Οι εκκινητές αυτοί στοχεύουν μια περιοχή με μήκος 450bp (ζεύγη βάσεων) μεταξύ των V3-V4 μεταβλητών περιοχών του 16S rRNA βακτηριακού γονιδίου προκειμένου να ενισχυθεί.



Πίνακας 2. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του βακτηριακού 16SrRNA

Εκκινητές	Αλληλουχία
Forward (341F)	CCTACGGGNGGCWGCAG
Reverse (805R)	GACTACHVGGGTATCTAATCC

Η μέθοδος PCR περιλαμβάνει:

Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται (αποδιατάσσονται) με θέρμανση σε θερμοκρασία 95°C και προκύπτουν δυο μονόκλωνες αλυσίδες.

Υβριδισμός εκκινητών: με μείωση της θερμοκρασίας σε 53°C οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.

Επιμήκυνση: : Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72°C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης και το ένζυμο ξεκινά την επιμήκυνση των εκκινητών.

Με την ολοκλήρωση της PCR ελέγχουμε την επιτυχία της αντίδρασης πραγματοποιώντας ηλεκτροφόρηση στα προϊόντα της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v, προκειμένου να βεβαιωθούμε για την ολοκλήρωση της αντίδρασης και την ενδεχόμενη ύπαρξη επιμολύνσεων. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 50μl (Πίνακας 3). Το δείγμα DNA που χρησιμοποιήθηκε στην PCR ήταν αραιωμένο 1:10.

Πίνακας 3. Αναλυτικές ποσότητες των αναλωσίμων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ
DNA	2μl
Primers 100pmol/μl	1μl forward + 1μl reverse
Buffer 10x + 1,5mM MgCl <sub>2</sub>	5μl
dNTPs	5μl
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1μl
BSA 10mg/ml	1 μl
Taq πολυμεράση 5 units	0,2μl
ddH <sub>2</sub> O	33,8μl

### 3.4 Ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι από τους πιο διαδεδομένους τρόπους διαχωρισμού και ανάλυσης DNA. Αποτελεί μια μέθοδο που διαχωρίζει φορτισμένα μόρια όπως DNA RNA και πρωτεΐνες με βάση το μέγεθος τους. Η πηκτή αγαρόζης αποτελεί ένα στερεό πορώδες υπόστρωμα που μέσα από τους πόρους του μπορούν κινηθούν τα μόρια DNA. Στο πήκτωμα αγαρόζης εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση και η μία άκρη του αποκτά θετικό ενώ η άλλη αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα τα φορτισμένα μόρια να κινούνται πάντα προς τον αντίθετο πόλο από το φορτίο τους. Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA κινούνται πάντα προς τον θετικό πόλο. Τα μικρότερα μεγέθους μόρια κινούνται πιο γρήγορα μέσα στους πόρους του πηκτώματος από τα μεγαλύτερα μόρια και έτσι μεταναστεύουν σε μεγαλύτερη απόσταση μέσα στο πήκτωμα. Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων γίνεται με το δείγμα μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους αντιστοιχίζοντας το πάχος της ζώνης του εξεταζόμενου DNA με μια ζώνη ίδιο πάχους του μάρτυρα διότι, όλες οι ζώνες του μάρτυρα είναι ποσοτικοποιημένες. Η παρασκευή του gel αγαρόζης 1% w/v περιλαμβάνει την διάλυση 0,4g αγαρόζης σε 45ml TBE ρυθμιστικού διαλύματος και θέρμανση του διαλύματος μέχρι την ομογενοποίηση του. Έπειτα, προστίθεται στο μείγμα 4 μl χρωστική Expert green και τοποθετείται το gel αγαρόζης σε ειδικό εκμαγείο που φέρει υποδοχείς (πηγαδάκια) μέχρι να στερεοποιηθεί. Εν συνεχεία, το πήκτωμα αγαρόζης μεταφέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εμβαπτίζεται σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα και εκεί σε κάθε υποδοχή της πηκτής φορτώνεται με 8μl δείγμα 5μl χρωστική. Η ηλεκτροφόρηση εκτελείται σε 150V περίπου για 15 λεπτά. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης οπτικοποιούνται σε πλάκα UV.

Με το πέρας της διαδικασίας της απομόνωσης του DNA δημιουργήθηκε ένα συγκεντρωτικό δείγμα (pool) των δειγμάτων και τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχηση στην εταιρία BGI Genomics Co., Ltd.

### 3.5 16S rDNA V3-V4 sequencing

Στα δείγματα που αλληλουχήθηκαν εφαρμόστηκε η μέθοδος paired-end (300bp) στην πλατφόρμα HiSeq2500 της Illumina. Η αλληλούχηση είχε ως στόχο τις ευμετάβλητες περιοχές του 16s rDNA V3-V4. Συνοπτικά, τα μόρια DNA των δειγμάτων κατακερματίζονται και στα άκρα των θραυσμάτων προστίθενται οι adapters. Έπειτα, κομμάτια του DNA επιλέγονται βάσει μεγέθους, μετατρέπονται σε μονόκλωνα και η πρόσδεση τους στην επιφάνεια/πλάκα εργασίας. Στην συνέχεια, οι ελεύθεροι προσαρμογείς (adapters) μονόκλωνων μορίων

υβριδίζονται με τα ολιγονουκλεοτίδια της πλάκας δημιουργώντας γέφυρες (bridge amplification) και με αυτό τον τρόπο σχηματίζονται συστάδες (clusters) πανομοιότυπων θραυσμάτων DNA. Τέλος, η αλληλούχηση συμβαίνει με την χρήση τεσσάρων διαφορετικών φθορίζουσών χρωστικών συνδεδεμένες με τέσσερα διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια τα οποία ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την σύνδεση ενώ μια κάμερα επαληθεύει την συμπληρωματικότητα της σύνδεσης βάσει του χρώματος που εκπέμπει (di Bella et al., 2013).

### 3.6 Στατιστική και βιοπληροφορική ανάλυση

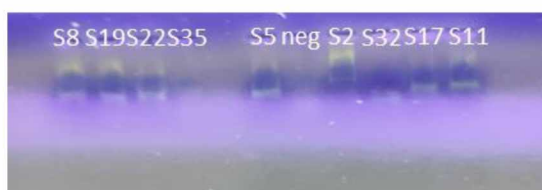
Για την στατιστική και βιοπληροφορική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκαν τα πακέτα της R, vegan (Jari Oksanen, 2022), ggplot (Hadley Wickham, 2016), Rstudio (RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL [Http://Www.Rstudio.Com/](http://www.Rstudio.com/),) καθώς και το USEARCH (Edgar, 2010). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκαν τα ακόλουθα βήματα στο USEARCH:

1. Ενοποίηση των αλληλουχιών που αναγνώστηκαν. Συγχωνεύονται οι αναγνώσεις (reads) και από τις δύο κατευθύνσεις (paired-end reads) δημιουργώντας ενοποιημένες αλληλουχίες με συνεκτικές βαθμολογίες ποιότητας.
2. Φιλτράρισμα των δεδομένων (Quality filtering). Τα ακατέργαστα δεδομένα φιλτράρονται για να δημιουργηθούν υψηλής ποιότητας αναγνώσεις, απομακρύνοντας τις κακής ποιότητας αναγνώσεις όπως αυτές που περιέχουν εσφαλμένα τμήματα στα άκρα ή τμήματα ανταπτόρων ή περιέχουν μη ταυτοποιημένες βάσεις (N base). Επιπλέον, απορρίφθηκαν οι αλληλουχίες οι οποίες είχαν Phred quality score < 20 και μήκος < 100 βάσεων.
3. Ακολούθησε η μετατροπή των αρχείων FASTQ σε FASTA
4. Dereplication. Το dereplication θα οδηγήσει στην αναγνώριση των μοναδικών αλληλουχιών έτσι ώστε να αναφέρεται μόνο ένα αντίγραφο κάθε ακολουθίας. Είναι ένα σημαντικό βήμα πριν την ομαδοποίηση σε OTUs.
5. Ταξινόμηση των αλληλουχιών με βάση την αφθονία και απομάκρυνση των αναγνώσεων που εμφανίζονται μόνο μια φορά
6. Δημιουργία OTUs και φιλτράρισμα χημεικτών αλληλουχιών που σχηματίζονται όταν δύο ή περισσότερες αλληλουχίες ενωθούν μεταξύ τους κατά το στάδιο ενίσχυσης της PCR.
7. Ανάθεση των OTUs σε ταξινομικές βαθμίδες χρησιμοποιώντας την βάση δεδομένων RDP (Release 11.5) (Cole et al., 2014).

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Βελτιστοποίηση αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης

Για την επιτυχή ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA με τους επιλεγμένους εκκινητές πραγματοποιήθηκαν δοκιμές που αφορούσαν την συγκέντρωση του γονιδιωματικού DNA που χρησιμοποιήθηκε. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές αραιώσεις των δειγμάτων ώστε να πετύχει η ενίσχυση μέσω PCR. Αυτό κρίθηκε απαραίτητο λόγω της ύπαρξης υψηλής συγκέντρωσης DNA του ξενιστή. Για τον έλεγχο της επιτυχούς ενίσχυσης της PCR πραγματοποιήθηκε ο ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR που πραγματοποιήθηκε φαίνεται στην Εικόνα 4.



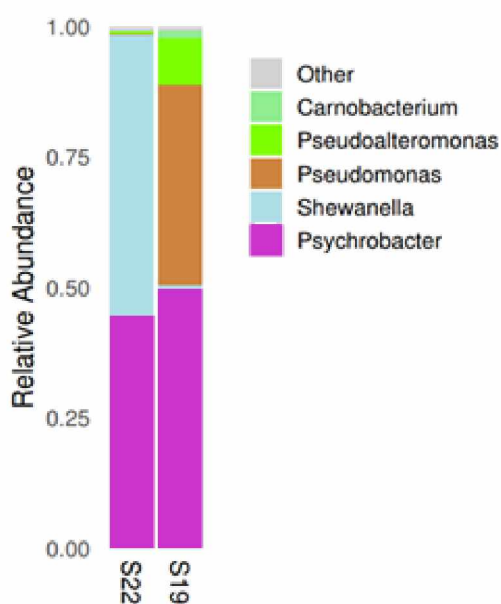
**Εικόνα 4.** Ενδεικτική εικόνα με τα αποτελέσματα από την ενίσχυση του τμήματος DNA του γονιδίου 16S rDNA με την μέθοδο της PCR.

### 4.2 Διαφορές μικροβιώματος θερμής και ψυχρής περιόδου

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων που ελήφθησαν κατά τη θερμή (20°C), και ψυχρή περίοδο (15,5°C) την ημέρα εξαλίευσης των ιχθύων. Η σύγκριση έγινε σε επίπεδο γένους και απεικονίστηκε με την χρήση barplots (Εικόνα 5).

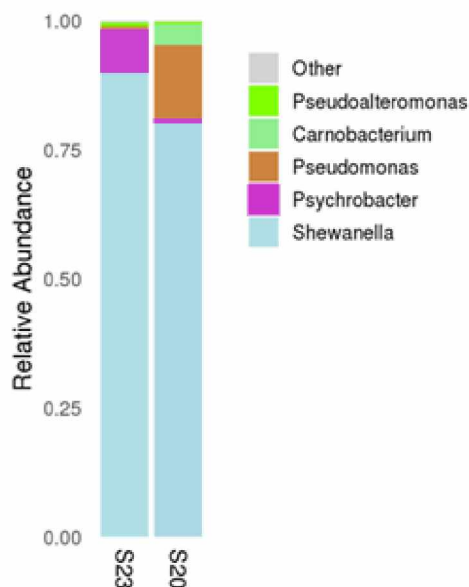
Η σύγκριση των διαφορών στο μικροβίωμα της επιφάνειας των ψαριών χρησιμοποιώντας τα barplots αφορά την ημέρα της εξαλίευσης υπό διαφορετικές μεθόδους θανάτωσης: παγόνερο, υγρού πάγου, μείγμα υγρού πάγου και παγόνερου σε αναλογία 1:1 και ηλεκτραναισθησία με ρεύμα υψηλής τάσης (HC – 1.8V/cm + 1.6m/sec).

Στην Εικόνα 5 παρατηρούμε την ύπαρξη των γενών *Pseudomonas* και *Pseudoalteromonas* την ψυχρή περίοδο καθώς και την διαφορετική κατανομή *Psychrobacter* προς *Shewanella* ανάμεσα στην ψυχρή και την θερμή περίοδο την ημέρα της θανάτωσης. Στο δείγμα S22 της θερμής περιόδου παρατηρούμε την επικράτηση των γενών *Shewanella* (54,1%) και *Psychrobacter* (44,3%) ενώ στο δείγμα S19 της ψυχρής περιόδου επικρατούν τα γένη *Psychrobacter* (49,4%), *Pseudomonas* (38,2%) και *Pseudoalteromonas* (9%) ενώ τα *Shewanella* και *Carnobacterium* ανιχνεύονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα.



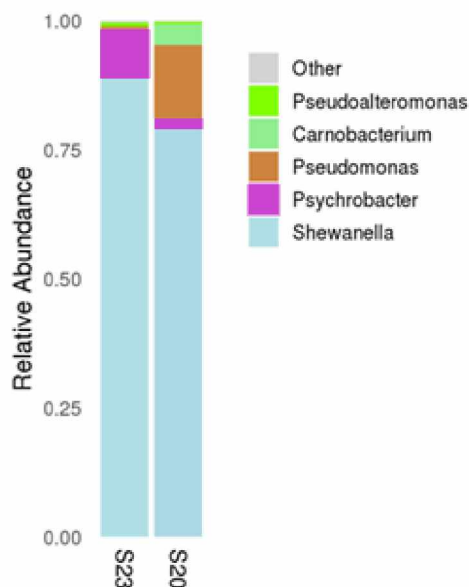
Εικόνα 5. Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους την ημέρα εξαλίευσης σε παγόνερο, S22 δείγμα θερμής περιόδου (20° C), S19 δείγμα ψυχρής περιόδου (15,5° C).

Στην Εικόνα 6 παρατηρούμε ένα παρόμοιο μοτίβο, την ημέρα 0, με την εξαλίευση με υγρό πάγο συγκριτικά με την εξαλίευση σε παγόνερο, όπου υπάρχει επικράτηση των γενών *Pseudomonas* (14,2%) και *Psychrobacter* (81%) την ψυχρή περίοδο (15,5°C) συγκριτικά με την θερμή περίοδο που παρατηρείται κυριαρχία των *Shewanella* (89,3%) και *Psychrobacter* (8,9%). Επιπλέον, στο δείγμα της ψυχρής περιόδου, S20, παρατηρείται μια μικρή σχετική αφθονία του γένους *Carnobacterium*.



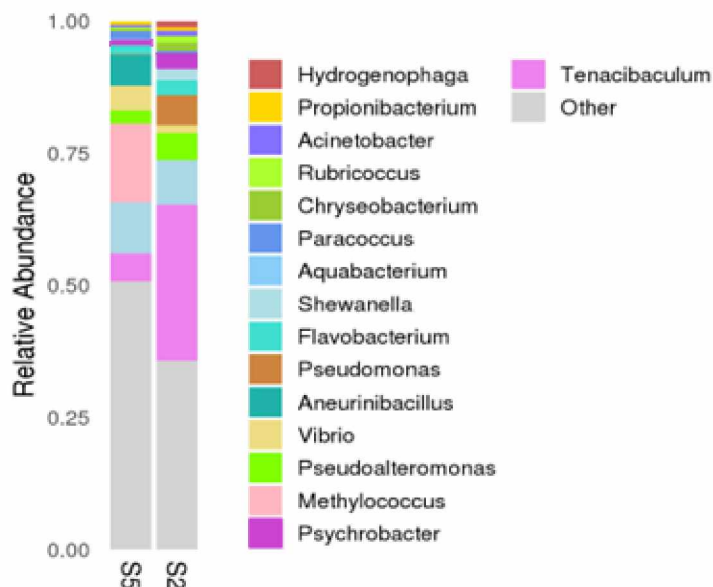
Εικόνα 6. Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους την ημέρα εξαλίευσης σε υγρό πάγο (slurry ice), S23 δείγμα θερμής περιόδου (20° C), S20 δείγμα ψυχρής περιόδου (15,5° C).

Στην Εικόνα 7 βλέπουμε την ημέρα της εξαλίευσης σε μείγμα παγόνερου και υγρού πάγου. Παρατηρούμε την εμφάνιση των γενών *Pseudoalteromonas* (12,5%), *Pseudomonas* (27%) και *Psychrobacter* (56,9%) σε μεγάλη σχετική αφθονία στα δείγματα προερχόμενα από την ψυχρή θερμοκρασιακή περίοδο και μια διαφορετική κατανομή των γενών *Psychrobacter* και *Shewanella* ανάμεσα στην ψυχρή και την θερμή περίοδο. Στα δείγματα της θερμής περιόδου παρατηρείται εκ νέου η επικράτηση του γένους *Shewanella* (65,5%) και *Psychrobacter* (33%). Τέλος στο δείγμα ψυχρής περιόδου ανιχνεύεται μικρή αφθονία του *Carnobacterium*.



Εικόνα 7. Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους την ημέρα εξαλίευσης σε μείγμα 1:1 παγόνερου και υγρού πάγου, S24 δείγμα θερμής περιόδου (20° C) , S21 δείγμα ψυχρής περιόδου (15,5° C).

Στα δείγματα που εξαλιεύτηκαν με ηλεκτραναισθησία (Εικόνα 8) την ημέρα της θανάτωσης και στις δύο θερμοκρασιακές περιόδους ένας μεγάλος αριθμός γενών δεν μπόρεσε να ταυτοποιηθεί και ταξινομήθηκαν ως «other». Στο δείγμα της θερμής θερμοκρασιακής περιόδου παρατηρούμε την ανίχνευση των *Psychrobacter* (9,7%), *Methylococcus* (14,8%), *Tenacibaculum* (5,3%), *Vibrio* (4,5%), *Pseudoalteromonas* (2,5%) ενώ στο δείγμα της ψυχρής θερμοκρασιακής περιόδου βλέπουμε την επικράτηση του *Tenacibaculum* (29,6%) και την ανίχνευση των *Psychrobacter* (8,3%), *Pseudoalteromonas* (5,1%), *Pseudomonas* (5,6%), *Flavobacterium* (2,9%).



Εικόνα 8. Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους την ημέρα εξαλίευσης με ηλεκτραναισθησία υψηλής τάσης, S5 δείγμα θερμής περιόδου (20° C) , S2 δείγμα ψυχρής περιόδου (15,5° C).

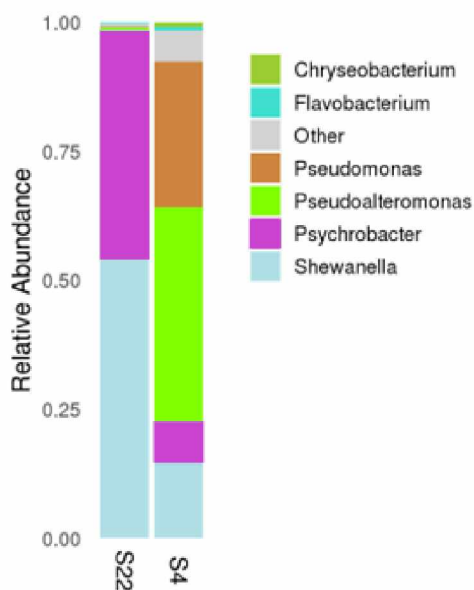
#### 4.3 Διαφορές μικροβιώματος δειγμάτων λαβρακιού προερχόμενα από μονάδα της Philosofish (Αιγαίο) και από μονάδα της Anramar (Ιόνιο)

Τα δείγματα S22 και S4 που παρουσιάζονται στην Εικόνα 9 έχουν εξαλιευτεί με την συμβατική μέθοδο του παγόνερου και προέρχονται από μονάδες του Αιγαίου και του Ιονίου αντίστοιχα, την μέση θερμοκρασιακή περίοδο (20 °C). Διακρίνεται ότι στα δείγματα του Αιγαίου (S22) επικρατούν σε μεγαλύτερο βαθμό τα γένη *Shewanella* (54,1%) και *Psychrobacter* (44,3%). Αντίθετα, στα δείγματα του Ιονίου (S4) από την άλλη παρατηρούνται τα γένη *Pseudoalteromonas* (41,4%) και *Pseudomonas* (28,1%) να επικρατούν, ενώ τα *Shewanella* (14,1%) και *Psychrobacter* (8,6%) ανιχνεύονται σε μικρότερη σχετική αφθονία από ότι στα δείγματα του Αιγαίου.

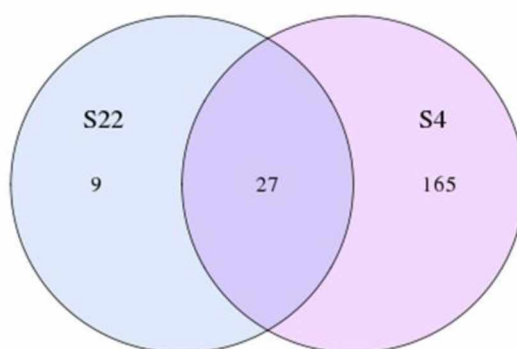
Τα κοινά OTUs ανάμεσα στα δείγματα προερχόμενα από τις εταιρίες Anramar και Philosofish διακρίνονται στο παρακάτω διάγραμμα Venn (Εικόνα 10). Εμφανίζονται 27 κοινά OTUs ανάμεσα στα δείγματα προερχόμενα από το Αιγαίο και το Ιόνιο. Στα δείγματα του Αιγαίου και του Ιονίου παρατηρούμε μια διαφορετική κατανομή *Shewanella* και *Psychrobacter* όπου



διαφαίνεται μεγαλύτερη αφθονία των γενών αυτών στο Αιγαίο ενώ στα δείγματα του Ιονίου υπάρχουν τα γένη *Pseudomonas* και *Pseudoalteromonas* σε αφθονία.



**Εικόνα 9.** Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους την ημέρα της εξαλίευσης με παγόνερο, S22 δείγμα από μονάδα του Αιγαίου, S4 δείγμα από μονάδα του Ιονίου.

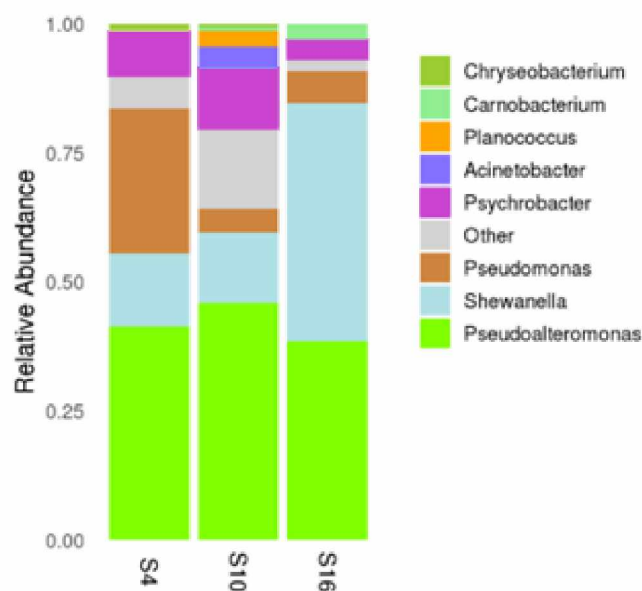


**Εικόνα 10.** Κοινά OTUs μεταξύ δειγμάτων από το Αιγαίο (S22) και το Ιόνιο (S4) την ημέρα εξαλίευσης σε παγόνερο.

#### 4.4 Εξέλιξη της σύνθεσης του μικροβιώματος κατά την αποθήκευση στους 4°C

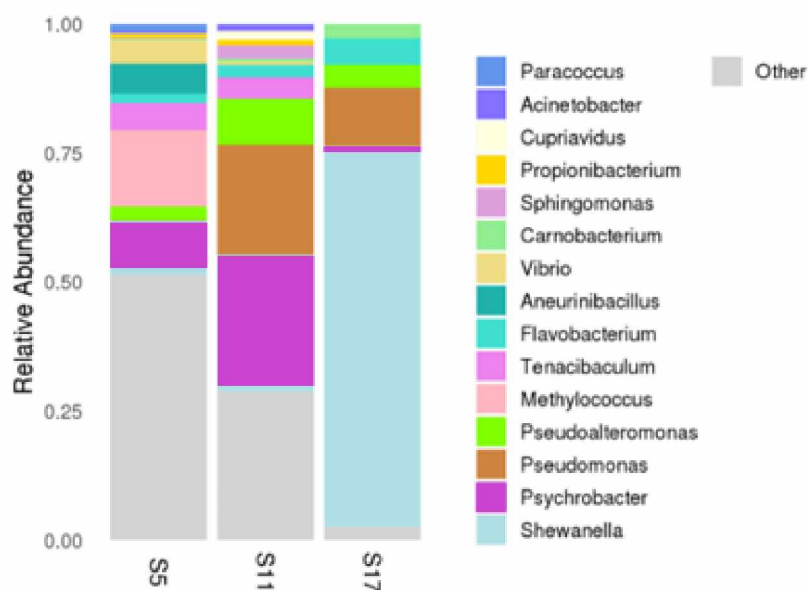
Πραγματοποιήθηκε ταξινόμηση των βακτηρίων σε επίπεδο γένους και υπολογίστηκε η σχετική αφθονία αυτών ανά ημέρα μετά την εξαλίευση σε διαφορετικές συνθήκες θανάτωσης και αποθήκευσης σε παγόνερο. Η μικροβιακή σύνθεση των δειγμάτων απεικονίζεται στις Εικόνες 11-16.

Τα δείγματα S4, S10, S16 της Εικόνας 11 προέρχονται από μονάδα του Ιονίου, εξαλιεύτηκαν σε παγόνερο και αφορούν τις ημέρες 0, 1 και 7 αντίστοιχα. Στην θανάτωση των ιχθύων με παγόνερο την ημέρα 0 της εξαλίευσης κυριάρχησαν στο μικροβίωμα τα γένη των *Pseudoalteromonas* (41,5%), *Pseudomonas* (28,1%), *Shewanella* (14%), *Psychrobacter* (8,65%). Συνεχίζοντας, την επόμενη μέρα της εξαλίευσης και αποθήκευση στους 4°C σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στην σχετική αφθονία των *Pseudomonas* (4,6%), ενώ αύξηση σημειώθηκε στην σχετική αφθονία των *Pseudoalteromonas* (46%), *Psychrobacter* (15,7%) και ανιχνεύτηκε το γένος *Acinetobacter* (4,6%). Την έβδομη μέρα από την εξαλίευση επικράτησε το γένος *Shewanella* (46,1%), *Pseudoalteromonas* (38,5%), *Pseudomonas* (6,2%) ενώ ανιχνεύτηκαν και τα *Carnobacterium* (3%).



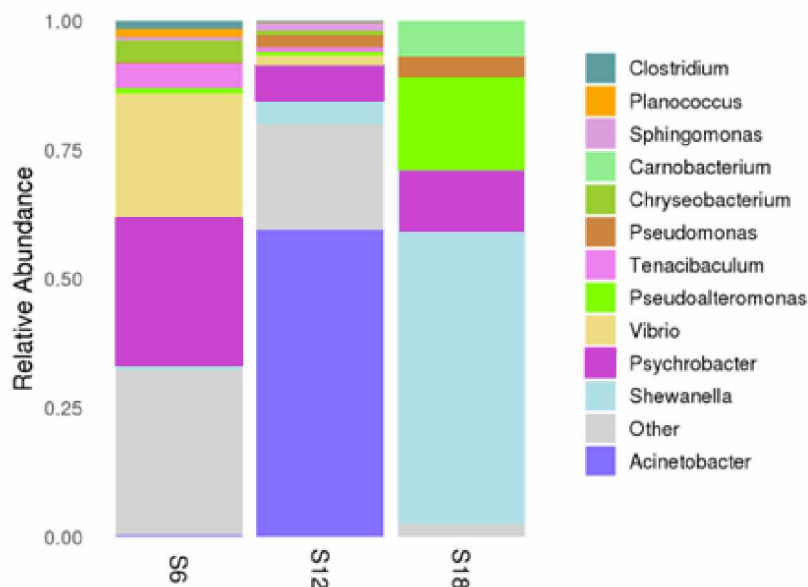
**Εικόνα 11.** Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους τις ημέρες 0,1 και 7 εξαλίευσης σε παγόνερο, S4: ημέρα 0), S10: ημέρα 1), S16: ημέρα 7).

Στην εξαλίευση με ηλεκτραναισθησία υψηλής τάσης την ημέρα 0 ένας μεγάλος αριθμός γενών δεν μπόρεσε να ταυτοποιηθεί. Την ημέρα 0 ανιχνεύτηκαν τα γένη *Methylococcus* (14%), *Psychrobacter* (9,7%), *Vibrio* (4,5%) και *Tenacibaculum* (5,3%). Την ημέρα 1 εμφανίστηκε αυξημένη η σχετική αφθονία των *Pseudomonas* (21,2%), *Psychrobacter* (25,6%) και *Pseudoalteromonas* (9%) , ενώ την ημέρα 7 κυριάρχησε το γένος *Shewanella* (73,2%) και ανιχνεύτηκαν τα *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* και *Carnobacterium* (Εικόνα 12).



**Εικόνα 12.** Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους τις ημέρες 0,1 και 7 εξαλίευσης με ηλεκτραναισθησία υψηλής τάσης. S5: ημέρα 0, S11:ημέρα 1, S17:ημέρα 7.

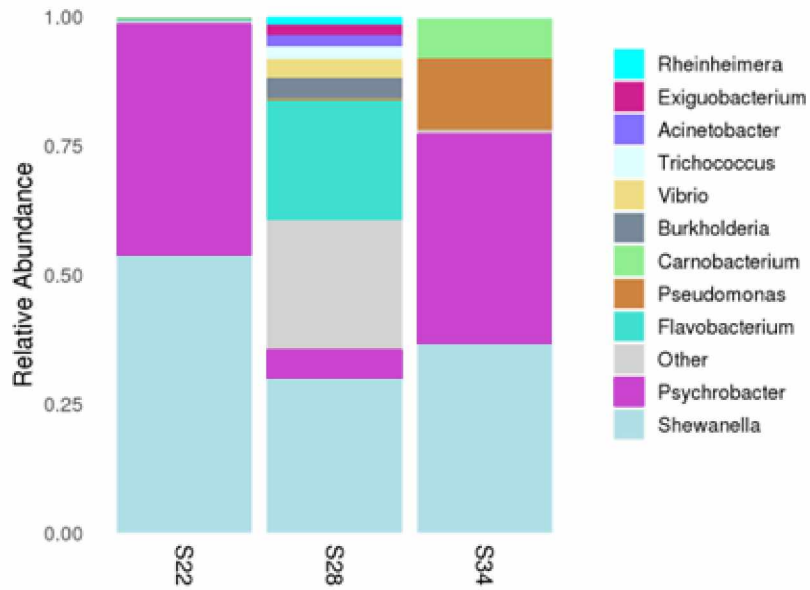
Στην εξαλίευση με χρήση ρεύματος χαμηλής τάσης (Εικόνα 13) χαρακτηριστική ήταν η ισχυρή παρουσία των *Psychrobacter* (29,2%), *Pseudoalteromonas* (24,6%) και *Vibrio* (24%) ενώ κάποια γένη δεν ταυτοποιήθηκαν και ταξινομήθηκαν ως «other». Αξιοσημείωτη είναι η αύξηση της παρουσίας των *Acinetobacter* (59%) την ημέρα 1 καθώς και η εμφάνιση της *Shewanella* (4,4%) και *Pseudomonas* (2,3%). Τελικά την έβδομη μέρα κυριάρχησαν οι *Shewanella* (56%), *Pseudoalteromonas* (18%), *Psychrobacter* (12,3%), *Carnobacterium* (6,8%) και *Pseudomonas* (4,1%) (Εικόνα 13).



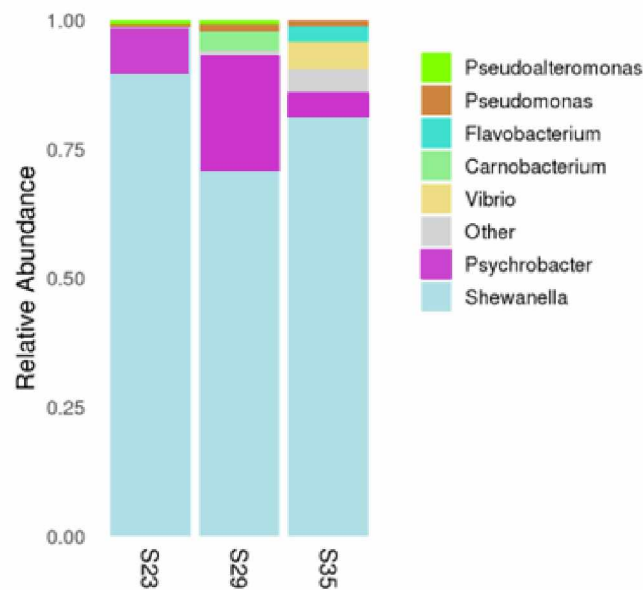
Εικόνα 13. Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους τις ημέρες 0,1 και 7 εξαλίευσης με ηλεκτραναισθησία χαμηλής τάσης, S6: ημέρα 0, S12:ημέρα 1, S18: ημέρα 7.

Τα δείγματα S22, S28, S34 της Εικόνας 14 προέρχονται από μονάδα του Αιγαίου εξαλιεύτηκαν σε παγόνερο και αφορούν τις ημέρες 0,1 και 8 αντίστοιχα. Την ημέρα της εξαλίευσης επικρατούν στο μικροβίωμα τα *Shewanella* (54,1%) και *Psychrobacter* (44,3%). Την ημέρα 1 της εξαλίευσης ένας σημαντικός αριθμός γενών δεν ταυτοποιήθηκε ενώ ανιχνεύτηκαν τα *Flavobacterium* (23,1%), *Vibrio* (3,5%) και *Burkholderia* (4%). Την όγδοη μέρα συνεχίζουν να εμφανίζονται με μεγάλη αφθονία τα *Shewanella* (36,5%) και *Psychrobacter* (40,6%) ενώ ανιχνεύτηκαν τα *Pseudomonas* (13,8%) και *Carnobacterium* (7,7%)

Χαρακτηριστικό της αλίευσης με υγρό πάγο ήταν η ισχυρή παρουσία του γένους *Shewanella* (89,3%) και του *Psychrobacter* (8,9%) την ημέρα της εξαλίευσης. Την επόμενη μέρα παρατηρείται η ανίχνευση των *Carnobacterium* (3,78%) και αύξηση των βακτηρίων *Psychrobacter* (22,6%). Στην όγδοη μέρα παρατηρείται σε μεγάλη αφθονία το γένος *Shewanella* (80,8%) ενώ το γένος *Psychrobacter* (5,3%) μειώθηκε. Επιπλέον, ανιχνεύτηκαν τα γένη *Vibrio* (5,2%) και *Flavobacterium* (2,9%) (Εικόνα 15).



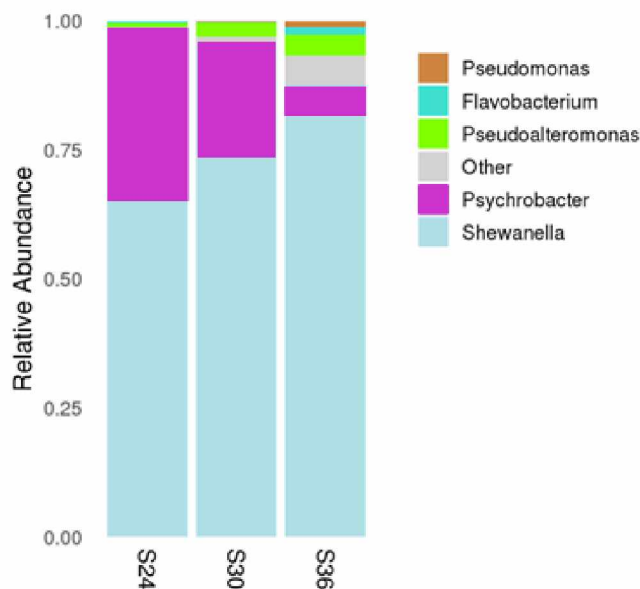
Εικόνα 14. Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους τις ημέρες 0,1 και 8 εξαλίευσης με παγόνερο, S22: ημέρα 0, S28: ημέρα 1, S34: ημέρα 8.



Εικόνα 15. Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους τις ημέρες 0,1 και 8 εξαλίευσης με υγρό πάγο, S23: ημέρα 0, S29: ημέρα 1, S35: ημέρα 8.

Στην θανάτωση με μείγμα 1:1 παγόνερου και υγρού πάγου παρουσιάστηκαν σε υψηλή σχετική αφθονία τα γένη των *Shewanella* (65,5%) και *Psychrobacter* (33%) την ημέρα της εξαλίευσης. Έπειτα, την ημέρα 1 της εξαλίευσης παρατηρήθηκε μείωση του *Psychrobacter*

(21%), αύξηση της *Shewanella* (74,7%) και ανιχνεύτηκε το γένος των *Pseudoalteromonas* (2,7%). Στην όγδοη μέρα αποθήκευσης σε παγόνερο αύξηση καταγράφηκε στα επίπεδα του *Shewanella* (82,5%) και του *Pseudoalteromonas* (4%) ενώ μείωση στα επίπεδα του *Psychrobacter* (5%) (Εικόνα 16).



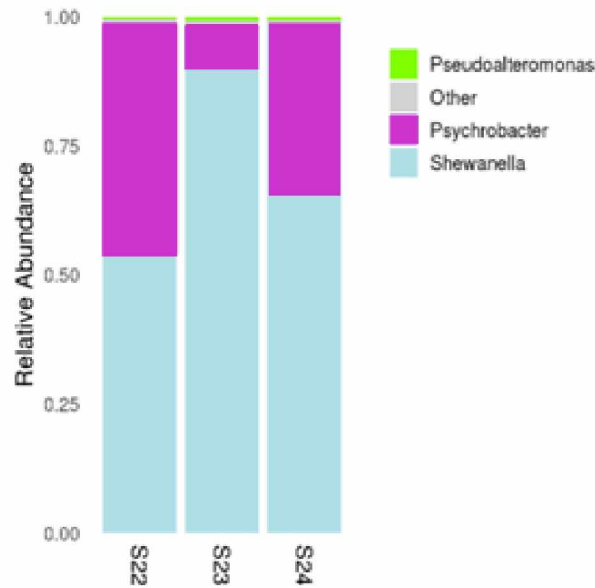
**Εικόνα 16.** Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους τις ημέρες 0,1 και 8 θανάτωσης σε μείγμα 1:1 υγρού πάγου και παγόνεου, S24: ημέρα 0, S30: ημέρα 1, S36: ημέρα 8.

#### 4.5 Μεταβολές επιφανειακού μικροβιώματος ανά μέθοδο θανάτωσης

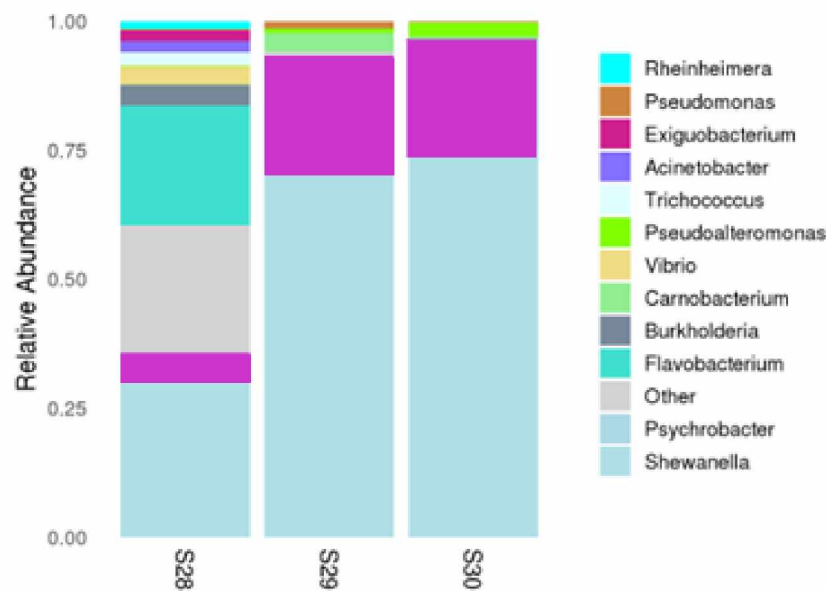
Διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν στην σύνθεση των επιφανειακών μικροβιωμάτων δειγμάτων προερχόμενα από την εταιρία Philosophish την θερμή θερμοκρασιακή περίοδο προς τις διαφορετικές μεθόδους θανάτωσης (Εικόνες 17,18,19).

Στην Εικόνα 17 τα δείγματα S22, S23, S24 προέρχονται από θανάτωση σε παγόνερο (control), θανάτωση σε υγρό πάγο (slurry ice) και μείγμα 1:1 υγρού πάγου και παγόνεου αντίστοιχα την ημέρα 0. Στα τρία δείγματα παρατηρούμε μια σχετική ομοιότητα ως προς την μικροβιακή σύνθεση με τα γένη *Shewanella*, *Psychrobacter* και *Pseudoalteromonas* να εμφανίζουν υψηλή αφθονία. Εντούτοις, παρατηρείται διαφορετική κατανομή του γένους *Shewanella* και *Psychrobacter* στα δείγματα με τα ψάρια που θανατώθηκαν με υγρό πάγο να παρουσιάζουν σε μεγαλύτερη αφθονία το γένος *Shewanella*. Στην θανάτωση με παγόνερο ανιχνεύτηκε το γένος *Psychrobacter* με μεγάλη αφθονία. Τα δείγματα S28, S29 και S30 (Εικόνα 18) που

αφορούν την ημέρα 1 των μεθόδων θανάτωσης εμφανίζουν παρόμοια εικόνα με τα δείγματα της ημέρας 0 όσον αφορά την κατανομή *Shewanella* και *Psychrobacter*. Στην ημέρα 1 θανάτωσης με παγόνερο (S28) παρατηρείται αφθονία περισσότερων γενών προς τα *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Rheinheimera*, *Flavobacterium* και *Exiguobacterium* που θα συνθέσουν την επιφανειακή μικροβιακή κοινότητα ως προς τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκε ο υγρός πάγος όπου παρατηρείται η εμφάνιση των *Pseudomonas* και *Carnobacterium* καθώς και η κυριαρχία των *Shewanella* και *Psychrobacter*. Την ημέρα 8 (Εικόνα 19) δεν διαφαίνεται κάποια αλλαγή ως προς την επικράτηση των *Shewanella* και *Psychrobacter* στα δείγματα. Τα γένη *Carnobacterium* και *Pseudomonas* εμφανίζουν μεγαλύτερη αφθονία στα ψάρια που θανατώθηκαν σε παγόνερο συγκριτικά με τις μεθόδους που χρησιμοποιούν υγρό πάγο. Στην Εικόνα 20 τα δείγματα S4, S5, S6 προέρχονται από εξαλίευση σε παγόνερο (control), εξαλίευση με ηλεκτραναισθησία υψηλής τάσης και εξαλίευση με ηλεκτραναισθησία χαμηλής τάσης αντίστοιχα την ημέρα 0 από μονάδα του Ιονίου (Εταιρεία Avramar). Στα δείγματα S5 και S6 ένας μεγάλος αριθμός γενών δεν μπόρεσε να ταυτοποιηθεί και ταξινομήθηκαν ως «other». Στο δείγμα θανάτωσης με παγόνερο παρατηρείται ανίχνευση μεγάλης αφθονίας των *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas* και *Shewanella* τα οποία δεν ανιχνεύονται την ημέρα 0 στις μεθόδους της ηλεκτραναισθησίας. Το γένος *Psychrobacter* εμφανίζεται και στις 3 μεθόδους την ημέρα της θανάτωσης με την μεγαλύτερη αφθονία να καταγράφεται στην ηλεκτραναισθησία χαμηλής τάσης. Στις μεθόδους ηλεκτραναισθησίας ανιχνεύονται τα γένη *Vibrio*, *Tenacibaculum*, *Chryseobacterium* και *Pseudoalteromonas* το οποίο εμφανίζεται με πολύ μικρότερη αφθονία από το δείγμα παγόνερου. Την ημέρα 1 (Εικόνα 21) της θανάτωσης στο δείγμα ηλεκτραναισθησίας υψηλής τάσης παρατηρείται μεγάλη αύξηση στην αφθονία των *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* και *Psychrobacter* ενώ στο δείγμα ηλεκτραναισθησίας χαμηλής τάσης παρατηρείται αύξηση των *Pseudomonas* και *Shewanella*. Την ημέρα 7 (Εικόνα 22) το γένος *Shewanella* εμφανίζεται με αυξημένη αφθονία και στις 3 μεθόδους με την μεγαλύτερη να καταγράφεται στο δείγμα ηλεκτραναισθησίας υψηλής τάσης. Το *Carnobacterium* ανιχνεύεται και στις 3 μεθόδους σε παρόμοια επίπεδα. Το γένος *Pseudoalteromonas* ανιχνεύεται περισσότερο στο δείγμα του παγόνερου και εμφανίζει την μικρότερη αφθονία στο δείγμα ηλεκτραναισθησίας υψηλής τάσης. Τέλος, το *Pseudomonas* ανιχνεύεται με την μικρότερη αφθονία στο δείγμα ηλεκτραναισθησίας χαμηλής τάσης.

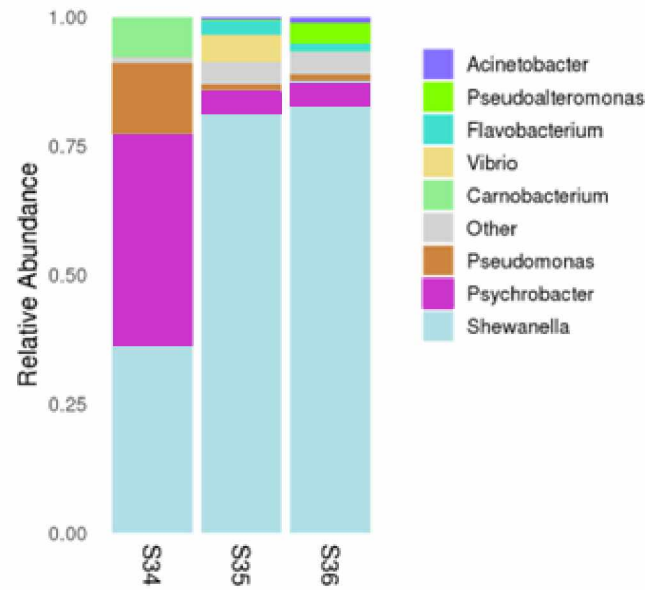


Εικόνα 17 Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους την ημέρα 0 υπό διαφορετικές μεθόδους εξαλίευσης, S22: θανάτωση σε παγόνερο, S23: θανάτωση σε υγρό πάγο, S24: θανάτωση σε μείγμα 1:1 υγρού πάγου και παγόνερου.

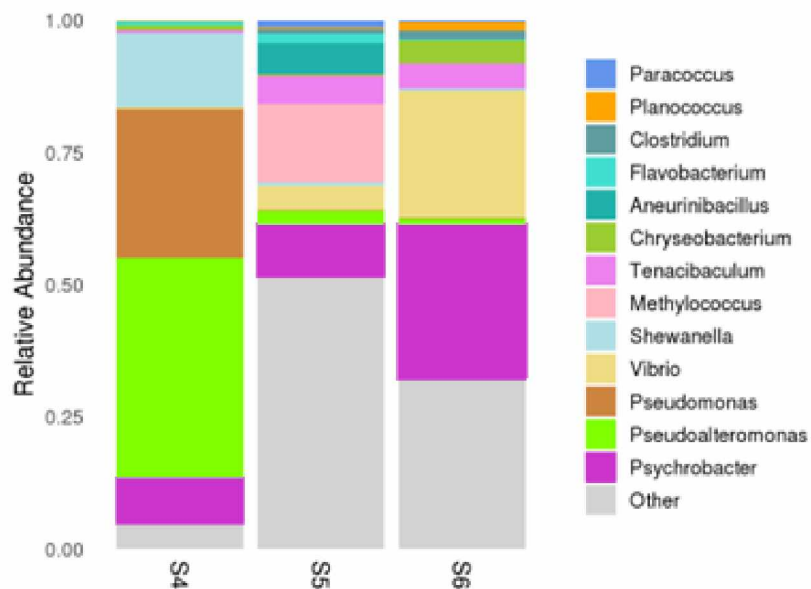


Εικόνα 18 Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους την ημέρα 1 υπό διαφορετικές μεθόδους εξαλίευσης, S28: θανάτωση σε παγόνερο, S29: θανάτωση σε υγρό πάγο, S30: θανάτωση σε μείγμα 1:1 υγρού πάγου και παγόνερου.

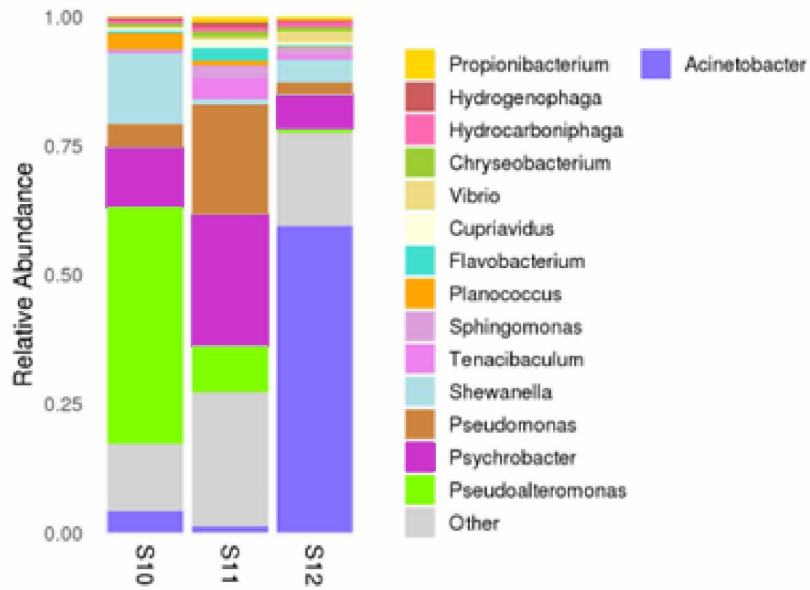




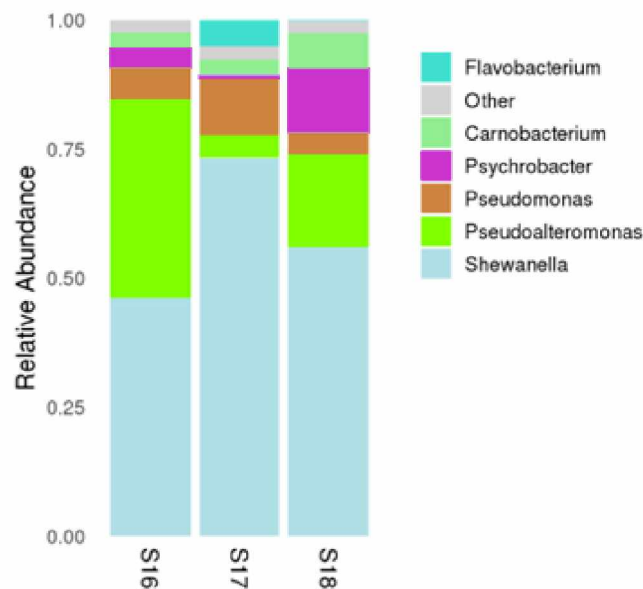
Εικόνα 19 Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους την ημέρα 8 υπό διαφορετικές μεθόδους εξαλίευσης. S34: θανάτωση σε παγόνερο, S35: θανάτωση σε υγρό πάγο, S36: θανάτωση σε μείγμα 1:1 υγρού πάγου και παγόνεου.



Εικόνα 20 Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους την ημέρα 0 υπό διαφορετικές μεθόδους εξαλίευσης. S4: θανάτωση σε παγόνερο, S5: θανάτωση με ηλεκτραναισθησία υψηλής τάσης, S6: θανάτωση με ηλεκτραναισθησία χαμηλής τάσης.



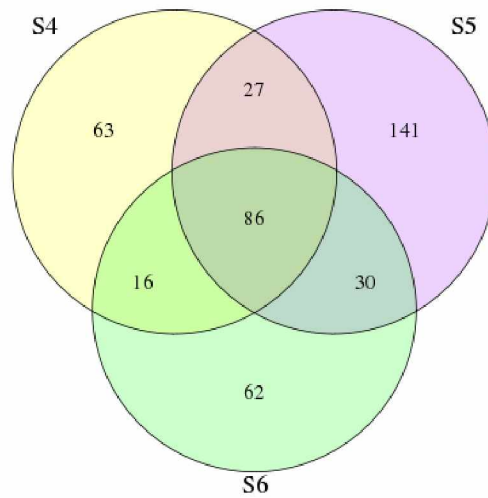
Εικόνα 21 Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους την ημέρα 1 υπό διαφορετικές μεθόδους θανάτωσης, S10: θανάτωση σε παγόνερο, S11: θανάτωση με ηλεκτραναισθησία υψηλής τάσης, S12: θανάτωση με ηλεκτραναισθησία χαμηλής τάσης.



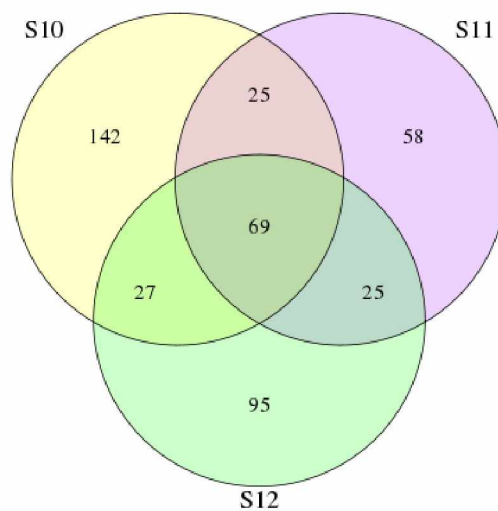
Εικόνα 22 Σχετική αφθονία σε επίπεδο γένους την ημέρα 7 υπό διαφορετικές μεθόδους θανάτωσης, S16: θανάτωση σε παγόνερο, S17: θανάτωση με ηλεκτραναισθησία υψηλής τάσης, S18: θανάτωση με ηλεκτραναισθησία χαμηλής τάσης.

#### 4.6 Μεταβολές επιφανειακού μικροβιώματος ανά μέθοδο θανάτωσης – OTUs

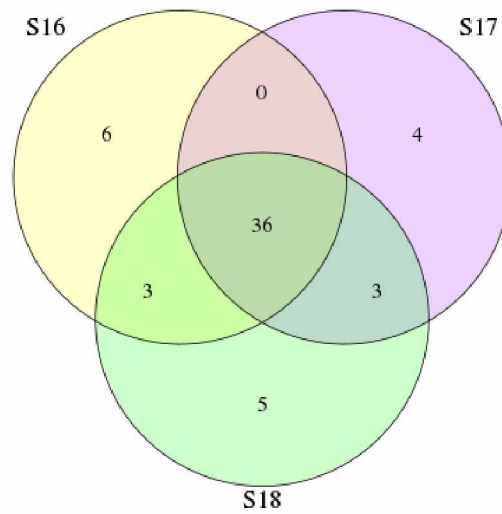
Τα κοινά OTUs ανά μέθοδο διακρίνονται στα διαγράμματα Venn (Εικόνες 23-28). Παρατηρούμε στην Εικόνα 23 ότι ανιχνεύτηκαν 86 κοινά OTUs στο επιφανειακό μικροβίωμα των ιχθύων που θανατώθηκαν με παγόνερο και ρεύμα υψηλής και χαμηλής τάσης. Επιπλέον, περίπου το 47% του συνόλου των OTUs των ιχθύων που θανατώθηκαν με ρεύμα χαμηλής τάσης ήταν κοινά με την θανάτωση με ρεύμα υψηλής τάσης. Επιπρόσθετα, το 56% των συνολικών OTUs της μεταχείρισης S4 (παγόνερο) είναι κοινά με την μεταχείριση S6 (low current) ενώ το αντίστοιχο ποσοστό κοινών OTUs ανάμεσα στην μεταχείριση S4 και S5 (high current) είναι 45%. Παρατηρήθηκε μείωση στον αριθμό των OTUs την ημέρα 1 της θανάτωσης με ρεύμα χαμηλής τάσης (S11) ενώ παρατηρήθηκε αύξηση των OTUs μεταξύ της ημέρας 0 και 1 στην θανάτωση με παγόνερο (S10) και στην θανάτωση με ρεύμα υψηλής τάσης (S12). Χαρακτηριστικά γένη και οικογένειες βακτηρίων που ανιχνεύτηκαν και στις 3 μεταχειρίσεις είναι τα *Pseudoalteromonas*, τα *Pseudomonas*, η οικογένεια *Moraxellaceae* όπου υπάγονται τα *Psychrobacter* και *Acinetobacter* και το *Shewanella* που ανιχνεύτηκε με μεγαλύτερη συχνότητα στο παγόνερο. Οι ιχθύες που θανατώθηκαν με την χρήση ρεύματος μοιραζόταν το γένος των *Tenacibaculum* και *Vibrio*. Τα κοινά OTUs μεταξύ των ιχθύων της θανάτωσης με παγόνερο, με υγρό πάγο και μείγμα των αυτών των δύο είναι 24, δηλαδή το 57% των συνολικών OTUs είναι κοινό και για τα τρία δείγματα την ημέρα της εξαλίευσης. Την ημέρα 1 μετά την θανάτωση παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των OTUs των ιχθύων που θανατώθηκαν σε παγόνερο (S28) ενώ το ποσοστό των κοινών OTUs μειώθηκε σε περίπου 11%. Τα κύρια γένη που ανιχνεύτηκαν κοινά στις μεθόδους θανάτωσης με παγόνερο, υγρού πάγου και ισοβαρές μείγμα παγόνερου-υγρού πάγου είναι τα γένη *Psychrobacter*, *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* και *Carnobacterium*. Τα γένη *Clostridium* και *Sphingomonas* ανιχνεύτηκαν πιθανώς αποκλειστικά στους ιχθύες που θανατώθηκαν με slurry ice και τα γένη *Prevotella* και *Citrobacter* παρατηρήθηκαν στην θανάτωση με μείγμα παγόνερου και υγρού πάγου. Στις Εικόνες 25 και 27 που αφορούν την έβδομη και όγδοη μέρα μετά την εξαλίευση, παρατηρούμε την μείωση του αριθμού των OTUs σε όλες τις μεθόδους εξαλίευσης. Ο μεγαλύτερος αριθμός OTUs παρατηρείται στις μεθόδους που χρησιμοποιούν τον υγρό πάγο ενώ ο μικρότερος αριθμός OTUs εμφανίζεται στην μέθοδο ηλεκτραισθησίας με ρεύμα υψηλής τάσης.



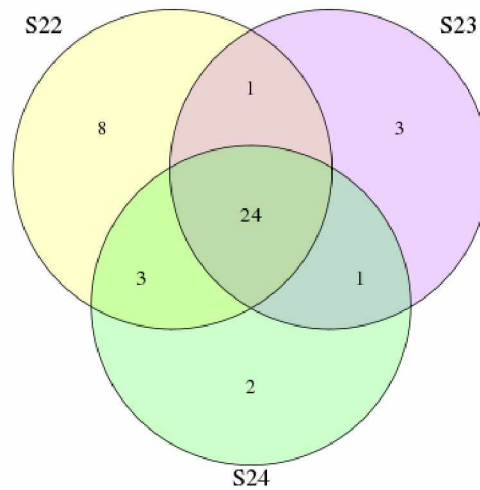
**Εικόνα 23** Κοινά OTUs μεταξύ της θανάτωσης σε παγόνερο(S4), θανάτωσης με ρεύμα υψηλής τάσης (S5) και χαμηλής τάσης (S6) την ημέρα 0 της εξαλίευσης.



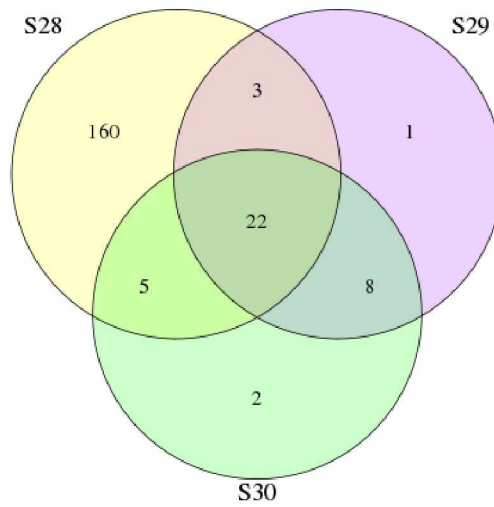
**Εικόνα 24** Κοινά OTUs μεταξύ της θανάτωσης σε παγόνερο (S10), θανάτωσης με ρεύμα υψηλής τάσης (S11) και χαμηλής τάσης (S12) την ημέρα 1 μετά την εξαλίευση.



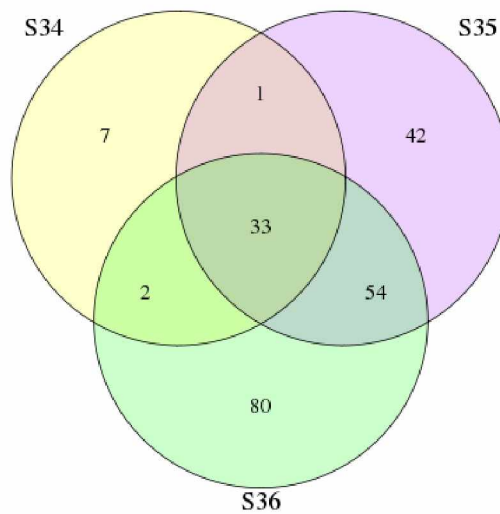
**Εικόνα 25** Κοινά OTUs μεταξύ της θανάτωσης σε παγόνερο (S16), θανάτωσης με ρεύμα υψηλής τάσης (S17) και χαμηλής τάσης (S18) την ημέρα 7 μετά την εξαλίευση.



**Εικόνα 26** Κοινά OTUs μεταξύ της θανάτωσης σε παγόνερο (S22), θανάτωσης σε υγρό πάγο (slurry ice) (S23) και θανάτωσης σε μείγμα 1:1 παγόνερου και υγρού πάγου (S24) την ημέρα 0 της εξαλίευσης.



Εικόνα 27 Κοινά OTUs μεταξύ της θανάτωσης σε παγόνερο (S28), θανάτωσης σε υγρό πάγο (S29) και θανάτωσης σε μείγμα 1:1 παγόνερου και υγρού πάγου (S30) την ημέρα 1 μετά την εξαλίευση.



Εικόνα 28 Κοινά OTUs μεταξύ της θανάτωσης σε παγόνερο (S34), θανάτωσης σε υγρό πάγο (S35) και θανάτωσης σε μείγμα 1:1 παγόνερου και υγρού πάγου (S36) την ημέρα 8 μετά την εξαλίευση.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ιχθυοκαλλιέργεια αντιπροσωπεύει ενδεχομένως την ταχύτερα αναπτυσσόμενη βιομηχανία τροφίμων παγκοσμίως. Οι ιχθύες αποτελούν μια εξέχουσα σημασίας πηγή πρωτεϊνών, απαραίτητων λιπιδίων, βιταμινών και ιχνοστοιχείων ενώ η ζήτηση τους παρουσιάζει δραματική αύξηση. Είναι πλέον σαφές ότι η αλιεία από μόνη της δεν μπορεί να ικανοποιήσει τη ζήτηση σε ψάρια χωρίς να τεθεί σε κίνδυνο η διατήρηση των θαλάσσιων πόρων και η βιωσιμότητα της αλιείας γεγονός που αναδεικνύει την σημασία του κλάδου της ιχθυοκαλλιέργειας (Arru et al., 2019). Το ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) είναι ένα από τα πιο σημαντικά είδη στην Μεσογειακή θάλασσα ιχθυοκαλλιέργεια (Fernández Sánchez et al., 2021). Το λαβράκι είναι ένα υψηλής ποιότητας, εξεζητημένο και ακριβό ψάρι. Αυτό το ψάρι έχει λευκή σάρκα, ήπια γεύση και χαμηλά λιπαρά χαρακτηριστικά τα οποία ευθύνονται για την δημοφιλία του στους καταναλωτές (Carrascosa et al., 2014). Τα αλιεύματα είναι πολύ ευπαθή προϊόντα. Η διάρκεια ζωής των ψαριών στο ράφι εξαρτάται από τη μικροβιακή κοινότητα, τη θερμοκρασία αποθήκευσης, την μέθοδο εξαλίευσης και την φυσιολογική κατάσταση των ψαριών. Η ζωή στο ράφι αντικατοπτρίζει επίσης την ποιότητα του τελικού προϊόντος ψαριού (Abbas et al., 2008).

Η παρούσα πτυχιακή εργασία διερεύνησε την επιφανειακή μικροβιακή κοινότητα στο δέρμα του *Dicentrarchus labrax* αξιοποιώντας τις τεχνολογίες αλληλούχησης νέας γενιάς. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η εξέλιξη της σύνθεσης του μικροβιώματος υπό διαφορετικές συνθήκες που αφορούν τις μεθόδους εξαλίευσης, την θερμοκρασιακή περίοδο, τη γεωγραφική προέλευση και τις ημέρες μετά την θανάτωση, και αποθήκευσης στους 4 °C. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις που αφορούν την σύνθεση του μικροβιώματος σε επίπεδο γένους ανάμεσα στις διαφορετικές συνθήκες υπό τις οποίες έγινε η δειγματοληψία.

Η εποχιακή θερμοκρασία συνέβαλε στις διαφοροποιήσεις στο επιφανειακό μικροβίωμα δειγμάτων. Στα δείγματα της θερμής περιόδου ανεξαρτήτου μεθόδου εξαλίευσης επικράτησε το γένος *Shewanella* εμφανίζοντας μεγαλύτερη σχετική συχνότητα από το γένος *Psychrobacter*. Αντιθέτως, το γένος *Psychrobacter* εμφανίζει μεγαλύτερη σχετική συχνότητα από το *Shewanella* στα δείγματα της ψυχρής περιόδου. Επιπλέον τα γένη *Pseudomonas* και *Pseudoalteromonas* εμφανίζουν μεγαλύτερη αφθονία στα δείγματα της ψυχρής περιόδου σε σχέση με την θερμή. Η επικράτηση των γενών *Pseudomonas* και *Pseudoalteromonas* την ημέρα της εξαλίευσης στα δείγματα της ψυχρής περιόδου, πιθανώς οφείλεται στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων αυτών στις χαμηλές θερμοκρασίες ως ψυχρόφιλοι

αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (Parlapani, 2021). Η μεγαλύτερη σχετική συχνότητα του *Psychrobacter* στα δείγματα της ψυχρής περιόδου οφείλεται επίσης στην ικανότητα των βακτηρίων αυτών να αναπτύσσονται ταχύτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες και αποτελούν μέρος της συμβιωτικής μικροβιακής χλωρίδας του είδους (Sygroulou et al., 2020). Στα δείγματα της θερμής περιόδου την ημέρα εξαλίευσης κυριάρχησε το γένος *Shewanella* ενδεχομένως λόγω καλύτερης προσαρμογής και ταχύτερης ανάπτυξης των βακτηρίων αυτών στις συγκεκριμένες συνθήκες. Έπειτα, έγινε προσπάθεια εξέτασης διαφορών στο επιφανειακό μικροβίωμα δειγμάτων προερχόμενα από μονάδες που βρίσκονται στο Αιγαίο και στο Ιόνιο. Τα δείγματα από Αιγαίο και Ιόνιο επιδεικνύουν μια σχετικά σημαντική ομοιότητα στην σύνθεση του μικροβιώματος σε επίπεδο γένους γεγονός το οποίο μαρτυράται και από τον αριθμό των κοινών ταξινομικών μονάδων. Τα δείγματα ανεξάρτητα από τη γεωγραφική προέλευση θανατώθηκαν με παγόνερο. Στα δείγματα που προήλθαν από την θάλασσα του Ιονίου παρατηρήθηκε την ημέρα της εξαλίευσης η επικράτηση των γενών *Pseudomonas* (28,1% ) και *Pseudoalteromonas* (41,4%) αντίστοιχα ενώ ανιχνεύτηκε με σημαντική σχετική συχνότητα και το γένος *Psychrobacter* (8,6% ). Στην αντίπερα όχθη, στα δείγματα του Αιγαίου κυριαρχούν την ημέρα 0 τα γένη *Psychrobacter* (44,3%) και *Shewanella* (54,2%). Η επικράτηση των *Pseudomonas* και *Pseudoalteromonas* που αποτελούν αλλοιογόνους μικροοργανισμούς (Gram & Huss, 1996b) στα δείγματα του Ιονίου ίσως να είναι λογική καθώς τα βακτηριακά αυτά γένη είχαν επικρατήσει σε δείγματα τσιπούρας του Ιονίου σε σχέση με το Αιγαίο σε προηγούμενη έρευνα (Parlapani et al., 2018). Επιπλέον, τα *Pseudomonas* μπορούν να λειτουργήσουν ανασταλτικά ως προς την ανάπτυξη των *Shewanella* και άλλων μικροοργανισμών μέσω παραγωγής σιδηροφόρων ενώσεων και αντιβιοτικών (Gram & Melchiorson, 1996). Επιπρόσθετα, η εμφάνιση του γένους *Shewanella* με μεγάλη συχνότητα στο Αιγαίο και κυρίως του *Shewanella putrefaciens* πιθανώς εξηγείται λόγω της μεγάλης αφθονίας του στο Αιγαίο (Katağan, 2015.). Επίσης, τα βακτήρια του γένους *Shewanella* αποτελούν γνωστούς αλλοιογόνους μικροοργανισμούς που έχουν απομονωθεί στο παρελθόν από λαβράκια σε μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας του Αιγαίου (Korun & Yazici, 2009). Θεωρείται ότι το αρχικό/συμβιωτικό μικροβίωμα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το υδρόβιο περιβάλλον που ζούνε τα ψάρια καθώς και από το μολυσματικό μικροβίωμα το οποίο προκύπτει από τις συνθήκες χειρισμού και αποθήκευσης κατά την επεξεργασία των ιχθύων. Επομένως, η γεωγραφική προέλευση επηρεάζει την σύνθεση του αρχικού μικροβιώματος και την ανάπτυξη του και μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς κυρίαρχους αλλοιογόνους μικροοργανισμών (Parlapani et al., 2018).



Ακολούθησε η μελέτη του επιφανειακού μικροβιώματος υπό διαφορετικές συνθήκες θανάτωσης. Οι μέθοδοι θανάτωσης που εξετάστηκαν ήταν θανάτωση σε παγόνερο, θανάτωση σε υγρό πάγο, θανάτωση σε 1:1 μείγμα παγόνερου και υγρού πάγου, θανάτωση με ρεύμα υψηλής τάσης και θανάτωση με ρεύμα χαμηλής τάσης. Στα δείγματα θανάτωσης σε παγόνερο, υγρού πάγου και μείγμα αυτών των δύο την ημέρα της εξαλίευσης παρατηρούμε την ισχυρή παρουσία των γενών *Shewanella* και *Psychrobacter* σε όλα τα δείγματα. Αυτό αποτελεί πιθανώς αναμενόμενο γεγονός, καθώς βακτήρια αυτά είναι ψυχρόφιλα ενώ έχουν ανιχνευτεί στο παρελθόν ως κομμάτι της αρχικής σύνθεσης του μικροβιώματος του λαβρακιού (Boziaris & Parlapani, 2017b). Παρατηρήθηκε όμως διαφορετική κατανομή *Shewanella* προς *Psychrobacter*, με την μεγαλύτερη σχετική συχνότητα *Shewanella* (89,3%) να εμφανίζεται στα δείγματα με υγρό πάγο ενώ η μεγαλύτερη συχνότητα *Psychrobacter* (44,3%) στα δείγματα παγόνερου. Η διαφορά αυτή ίσως να οφείλεται στις ιδιότητες του υγρού πάγου στην ταχύτερη μείωση της θερμοκρασίας σε πιο χαμηλά επίπεδα από το παγόνερο καθώς και την μεγαλύτερη μείωση παροχής οξυγόνου συγκριτικά με το παγόνερο. Επιπλέον, την ημέρα 1 της εξαλίευσης ανιχνεύονται τα *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* στα δείγματα του παγόνερου. Τα βακτήρια αυτά είναι ψυχοτρόφα Gram αρνητικά και αποτελούν μέρος του αρχικού μικροβιώματος του ψαριού (Gram & Huss, 1996b). Τα γένη αυτά όμως δεν ανιχνεύονται στις μεθόδους που χρησιμοποιούν υγρό πάγο πιθανώς επειδή τα βακτήρια αυτά δεν επιβίωσαν την πολύ χαμηλή θερμοκρασία του υγρού πάγου συγκριτικά με τη μέθοδο του παγόνερου που υπάρχει κλιμακωτή θερμοκρασία διότι δεν διαχέεται ομοιόμορφα ο πάγος. Τα επίπεδα σχετικής συχνότητας *Shewanella* μειώνονται σε όλα τα δείγματα της ημέρας 1. Το αξιοσημείωτο στα δείγματα που θανατώθηκαν με την χρήση ρεύματος είναι η ανίχνευση των γενών *Methylococcus*, *Chryseobacterium* και *Tenacibaculum*. Το *Methylococcus* πιθανώς προήλθε από τροφές της μονάδας καθώς χρησιμοποιείται και εντοπίζεται σε τροφές ιχθύων ιχθυοκαλλιέργειας (Xu et al., 2021). Ορισμένα βακτήρια των *Tenacibaculum* και *Cryseobacterium* μπορούν να είναι δυνητικά παθογόνοι και έχουν απομονωθεί από λαβράκια που νοσοούν (J-F. Bernadet 1998). Συγκεκριμένα, η ασθένεια που προκαλεί το *Tenacibaculum maritimum* είναι μια ασθένεια που επηρεάζει πολλά είδη θαλάσσιων ψαριών και μπορεί να προκαλέσει ζημιά στις ιχθυοκαλλιέργειες (Khalil et al., 2018). Την τελευταία μέρα μετά την εξαλίευση τα δείγματα που θανατώθηκαν σε παγόνερο εμφάνισαν με υψηλή σχετική συχνότητα τα *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Pseudomonas* και *Carnobacterium*. Τα βακτήρια *Carnobacterium* και *Pseudomonas* αποτελούν αλλοιογόνους μικροοργανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν απόρριψη του προϊόντος αν ξεπεράσουν το επίπεδο  $10^7$  cfu/g

και εμφανίζονται με αρκετά μειωμένη αφθονία στις μεθόδους που αξιοποιούν υγρό πάγο συγκριτικά με την θανάτωση σε παγόνερο (Paraharisis et al., 2019). Στις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκε υγρός πάγος την 8<sup>η</sup> μέρα, αποθήκευσης στους 4°C, μετά την εξαλίευση φαίνεται να παραμένει αυξημένη η παρουσία των *Shewanella* και *Psychrobacter* που άντεξαν σε πιο χαμηλές θερμοκρασίες (Boziaris & Parlapani, 2017b). Στην συνέχεια διερευνήθηκαν οι διαφορές του μικροβιώματος του δέρματος σε συγκεκριμένες μέρες από την εξαλίευση σε όλες τις μεθόδους θανάτωσης. Το γένος *Shewanella* του οποίου βακτήρια είναι γνωστοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί αλιευμάτων και κατεψυγμένων τροφίμων, ανιχνεύτηκε σε σημαντική αφθονία σε όλες τις μεθόδους θανάτωσης και η μεγαλύτερη καταγράφηκε στην μέθοδο εξαλίευσης με υγρό πάγο. Επιπρόσθετα, σε όλες τις μεταχειρίσεις το γένος *Psychrobacter* είχε την μεγαλύτερη αύξηση μέσα σε 24 ώρες από την θανάτωση πιθανώς λόγω της γρήγορης ανάπτυξης των βακτηρίων αυτών στους 4°C. Τα βακτήρια *Pseudomonas* και *Carnobacterium* εμφάνισαν υψηλή αφθονία όλες τις μέρες στις μεθόδους εξαλίευσης με παγόνερο και χρήση ρεύματος ενώ στις μεταχειρίσεις που χρησιμοποιήθηκε υγρός πάγος φαίνεται ότι διατηρήθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην ταχεία μείωση της θερμοκρασίας λόγω του υγρού πάγου. Η ιδιότητα αυτή του υγρού πάγου ενδεχομένως να οδηγεί στην καθυστέρηση της ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Ntzimani et al., 2021). Οι μέθοδοι ηλεκτραναισθησίας δεν φαίνεται να μείωσαν τους αριθμούς των αλλοιογόνων μικροοργανισμών όπως τα *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* και *Carnobacterium*. Γενικά, η αλληλούχηση όλων των δειγμάτων είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση 660 OTUs συνολικά. Παρατηρήθηκε ότι τα περισσότερα OTUs κατά την ημέρα της εξαλίευσης εμφανίστηκαν στην θανάτωση με παγόνερο με εξαίρεση την θανάτωση με ρεύμα υψηλής τάσης όπου τα OTUs που ανιχνεύθηκαν ήταν περισσότερα. Επίσης, την ημέρα 1 της εξαλίευσης η μεγαλύτερη αύξηση του αριθμού των OTUs σε σχέση με την ημέρα 0 εμφανίστηκε στην θανάτωση με παγόνερο ενώ μια μείωση του αριθμού των OTUs παρατηρήθηκε στην θανάτωση με ρεύμα υψηλής τάσης. Επιπρόσθετα, κατά την εξαλίευση με υγρό πάγο και μείγμα αυτού με παγόνερο την ημέρα 0 παρατηρήθηκε μικρότερος αριθμός OTUs συγκριτικά με την θανάτωση με παγόνερο κάτι όμως που δεν συνέβη κατά την όγδοη ημέρα όπου στην θανάτωση με παγόνερο εμφανίστηκε μικρότερος αριθμός OTUs από ότι στις μεθόδους εξαλίευσης με χρήση υγρού πάγου.

Οι τεχνολογίες νέας γενιάς όπως η Illumina σε αυτού του είδους τις έρευνες μπορούν να αποδώσουν σημαντικό αριθμό πληροφοριών όσον αφορά το μικροβίωμα σε ταξινομικό επίπεδο σε αντίθεση με τις μεθόδους καλλιέργειας μικροοργανισμών που δεν μπορούν να

ανταποκριθούν στον ίδιο βαθμό. Οι έρευνες που αφορούν την αλληλούχηση του επιφανειακού μικροβιώματος του λαβρακιού υπό διαφορετικές συνθήκες εξαλίευσης και περιβάλλον προέλευσης των δειγμάτων δεν είναι αρκετές. Θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω έρευνες για το μικροβίωμα του λαβρακιού και των ιχθύων γενικότερα προκειμένου να διεξαχθούν ασφαλή και χρήσιμα συμπεράσματα για την ιχθυοκαλλιέργεια.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbas, K. A., Mohamed, A., Jamilah, B., & Ebrahimian, M. (2008). A review on correlations between fish freshness and pH during cold storage. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(4), 416–421. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2008.416.421>
- Acerete, L., Reig, L., Alvarez, D., Flos, R., & Tort, L. (2009). Comparison of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 287(1–2), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.012>
- Arru, B., Furesi, R., Gasco, L., Madau, F. A., & Pulina, P. (2019). The introduction of insect meal into fish diet: The first economic analysis on European sea bass farming. *Sustainability (Switzerland)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/su11061697>
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3–4), 199–235. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.09.001>
- Boziaris, I. S., & Parlapani, F. F. (2017a). Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish. In *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers* (pp. 61–98). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00006-6>
- Boziaris, I. S., & Parlapani, F. F. (2017b). Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish. In *The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers* (pp. 61–98). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00006-6>
- Carrascosa, C., Millán, R., Saavedra, P., Jaber, J. R., Montenegro, T., Raposo, A., Pérez, E., & Sanjuán, E. (2014). Predictive models for bacterial growth in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(2), 354–363. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12307>
- Castro, P., Padrón, J. C. P., Cansino, M. J. C., Velázquez, E. S., & Larriva, R. M. de. (2006). Total volatile base nitrogen and its use to assess freshness in European sea bass stored in ice. *Food Control*, 17(4), 245–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.10.015>
- 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 Microbiology Ecology*, 91(7). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv061>

- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., & Rantsiou, K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.008>
- Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research* 42. DOI: 10.1093/NAR/GKT1244.
- di Bella, J. M., Bao, Y., Gloor, G. B., Burton, J. P., & Reid, G. (2013). High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 401–414. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.011>
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- European Commission. Directorate-General for Maritime Affairs and Fisheries., & EUMOFA. (n.d.). *Seabass in the EU : price structure in the supply chain for seabass : focus on Greece, Croatia and Spain : case study*.
- FAO: *European seabass home*. (n.d.). Retrieved November 29, 2021, from <https://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/european-seabass/european-seabass-home/en/>
- Fernández Sánchez, J. L., Llorente, I., Basurco, B., & Aguilera, C. (2021). Assessing the economic impact of key operational factors on grow-out farms producing European sea bass under different scenarios of production. *Aquaculture Economics & Management*, 1–19. <https://doi.org/10.1080/13657305.2021.1996481>
- Fricker, A. M., Podlesny, D., & Fricke, W. F. (2019). What is new and relevant for sequencing-based microbiome research? A mini-review. In *Journal of Advanced Research* (Vol. 19, pp. 105–112). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.006>
- Froese, Rainer, & Pauly, Daniel. (2013). <http://www.fishbase.org>. FishBase.
- Ganias, K., Mezarli, C., & Voultsiadou, E. (2017). Aristotle as an ichthyologist: Exploring Aegean fish diversity 2,400 years ago. *Fish and Fisheries*, 18(6), 1038–1055. <https://doi.org/10.1111/faf.12223>
- Garza, D. R., & Dutilh, B. E. (2015). From cultured to uncultured genome sequences: Metagenomics and modeling microbial ecosystems. In *Cellular and Molecular Life*

- Sciences* (Vol. 72, Issue 22, pp. 4287–4308). Birkhauser Verlag AG.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-2004-1>
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996a). Microbiological spoilage of fish and fish products. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 33).
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996b). Microbiological spoilage of fish and fish products. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 33).
- Gram, L., & Melchiorson, J. (1996). Interaction between fish spoilage bacteria *Pseudomonas* sp. and *Shewanella putrefaciens* in fish extracts and on fish tissue. In *Journal of Applied Bacteriology* (Vol. 80).
- Hadley Wickham. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*.
- Hoffman, H. A., & Jordan, D. S. (1892). *A Catalogue of the Fishes of Greece, with Notes on the Names Now in Use and Those Employed by Classical Authors* (Vol. 44).  
<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/45>. (n.d.).  
<https://www.eumofa.eu/>. (n.d.).  
[https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/Dicentrarchus\\_labrax/en](https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en). (n.d.).  
<https://www.fishbase.se/photos/PicturesSummary.php?StartRow=8&ID=63&what=species&TotRec=15>. (n.d.).
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 45, Issue 9, pp. 2761–2764). <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Jari Oksanen. (2022). *Community Ecology Package*.
- Katağan, T. , T. A. , B. Ş. , Ö. B. (n.d.). *THE AEGEAN SEA MARINE BIODIVERSITY, FISHERIES, CONSERVATION AND GOVERNANCE Istanbul 2015*. [www.tudav.org](http://www.tudav.org)
- Keys, D. R., Lowder, A. C., & Mireles DeWitt, C. A. (2018). Conditions for the effective chilling of fish using a nano-sized ice slurry. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(3).  
<https://doi.org/10.1111/jfpp.13564>
- Khalil, R. H., Diab, A. M., Shakweer, M. S., Ghetas, H. A., Khallaf, M. M., & Omar, A. A. E. D. (2018). New perspective to control of tenacibaculosis in sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture Research*, 49(7), 2357–2365. <https://doi.org/10.1111/are.13689>

- Korun, J., & Yazıcı, M. (2009). Isolation of *Shewanella putrefaciens* from cultured european sea bass, (*Dicentrarchus labrax*) In Turkey Turkey View project. In *Revue Méd. Vét* (Vol. 50). <https://www.researchgate.net/publication/289007145>
- Lambooij, E., Gerritzen, M. A., Reimert, H., Burggraaf, D., & van de Vis, J. W. (2008). A humane protocol for electro-stunning and killing of Nile tilapia in fresh water. *Aquaculture*, 275(1–4), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.026>
- Lart, W., & Caveen, A. (n.d.). *Responsible Sourcing Guide: Sea bass Version 4-September 2013 Dicentrarchus labrax IMAGE © Scandanavian Fishing Year Book*. <http://tinyurl.com/seafishrsg>
- Limbo, S., Sinelli, N., Torri, L., & Riva, M. (2009). Freshness decay and shelf life predictive modelling of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) applying chemical methods and electronic nose. *LWT - Food Science and Technology*, 42(5), 977–984. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.011>
- Magalhães, R., Sánchez-López, A., Leal, R. S., Martínez-Llorens, S., Oliva-Teles, A., & Peres, H. (2017). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 476, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.021>
- Mayo, B., Rachid, C. T. C. C., Alegría, Á., Leite, A. M. O., Peixoto, R. S., & Delgado, S. (2014). Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology. In *Current Genomics* (Vol. 15).
- Medina, I., Gallardo, J. M., & Aubourg, S. P. (2009). Quality preservation in chilled and frozen fish products by employment of slurry ice and natural antioxidants. In *International Journal of Food Science and Technology* (Vol. 44, Issue 8, pp. 1467–1479). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02016.x>
- Mokrani, D., Oumouna, M., & Cuesta, A. (2018). Fish farming conditions affect to European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) quality and shelf life during storage in ice. *Aquaculture*, 490, 120–124. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.032>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(0), 263–273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>

- Narayan, A., Singh, A., & Kumar, S. (2020). Understanding Microbiome Science Through Big Data Analysis. In *Metagenomic Systems Biology* (pp. 55–74). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-8562-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-15-8562-3_3)
- Nielsen, R., Guillen, J., Virtanen, J., European Commission. Joint Research Centre., & Scientific, T. and E. C. for Fisheries. (n.d.). *The EU aquaculture sector : economic report 2020 (STECF-20-12)*.
- Ntzimani, A., Angelakopoulos, R., Semenoglou, I., Dermesonlouoglou, E., Tsironi, T., Moutou, K., & Taoukis, P. (2021). Slurry ice as an alternative cooling medium for fish harvesting and transportation: Study of the effect on seabass flesh quality and shelf life. *Aquaculture and Fisheries*. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.01.006>
- Papaharisis, L., Tsironi, T., Dimitroglou, A., Taoukis, P., & Pavlidis, M. (2019). Stress assessment, quality indicators and shelf life of three aquaculture important marine fish, in relation to harvest practices, water temperature and slaughter method. *Aquaculture Research*, *50*(9), 2608–2620. <https://doi.org/10.1111/are.14217>
- Parlapani, F. F. (2021). Microbial diversity of seafood. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 37, pp. 45–51). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.09.005>
- Parlapani, F. F., Michailidou, S., Pasentsis, K., Argiriou, A., Krey, G., & Boziaris, I. S. (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. *International Journal of Food Microbiology*, *278*, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.027>
- Poli, B. M., Parisi, G., Scappini, F., & Zampacavallo, G. (n.d.). *Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management*.
- Rosado, D., Pérez-Losada, M., Severino, R., Cable, 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.063>
- Rosado, D., Xavier, R., Severino, R., Tavares, F., Cable, J., & Pérez-Losada, M. (2019). Effects of disease, antibiotic treatment and recovery trajectory on the microbiome of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55314-4>



- RStudio Team (2020). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>. (n.d.).
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. In *Biology* (Vol. 4, Issue 3, pp. 525–539). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biology4030525>
- Sampels, S. (2015). The Effects of Storage and Preservation Technologies on the Quality of Fish Products: A Review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1206–1215. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12337>
- Simitzis, P. E., Tsopelekos, A., Charismiadou, M. A., Batzina, A., Deligeorgis, S. G., & Miliou, H. (2014). Comparison of the effects of six stunning/killing procedures on flesh quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) and evaluation of clove oil anaesthesia followed by chilling on ice/water slurry for potential implementation in aquaculture. *Aquaculture Research*, 45(11), 1759–1770. <https://doi.org/10.1111/are.12120>
- Syropoulou, F., Parlapani, F. F., Bosmali, I., Madesis, P., & Boziaris, I. S. (2020). HRM and 16S rRNA gene sequencing reveal the cultivable microbiota of the European sea bass during ice storage. *International Journal of Food Microbiology*, 327. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108658>
- The EFSA Journal* (2009) 1010, 1-52. (n.d.).
- Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. In *Trends in genetics : TIG* (Vol. 30, Issue 9, pp. 418–426). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.001>
- Vandeputte, M., Gagnaire, P. -A., & Allal, F. (2019). The European sea bass: a key marine fish model in the wild and in aquaculture. *Animal Genetics*, 50(3), 195–206. <https://doi.org/10.1111/age.12779>
- Waters, W., & Carroll, A. (2013). *Population Dynamics of the European Sea Bass (Dicentrarchus labrax) in*.
- WoRMS Editorial Board (2022). *World Register of Marine Species*. Available from <https://www.marinespecies.org>. (n.d.).
- Xu, B., Liu, Y., Chen, K., Wang, L., Sagada, G., Tegomo, A. F., Yang, Y., Sun, Y., Zheng, L., Ullah, S., & Shao, Q. (2021). Evaluation of Methanotroph (*Methylococcus capsulatus*, Bath) Bacteria Meal (FeedKind®) as an Alternative Protein Source for Juvenile Black Sea Bream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.778301>



## Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

FAO: *European seabass home*. (n.d.). Retrieved November 29, 2021, from <https://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/european-seabass/european-seabass-home/en/>

*THE AEGEAN SEA MARINE BIODIVERSITY, FISHERIES, CONSERVATION AND GOVERNANCE Istanbul 2015*. (n.d.). [www.tudav.org](http://www.tudav.org)

Froese.Rainer, & Pauly.Daniel. (2013). <http://www.fishbase.org>. FishBase

World Register of Marine Species. Available from <https://www.marinespecies.org>, n.d.)

<https://www.eumofa.eu/>, n.d.

(<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/45>, n.d.)

([https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/dicentrarchus\\_labrax/en](https://www.fao.org/fishery/en/culturedspecies/dicentrarchus_labrax/en), n.d.)

(<https://www.fishbase.se/photos/picturessummary.php?startrow=8&ID=63&what=species&TotalRec=15>, n.d.)