

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

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Επίδραση της συγκέντρωσης θρεπτικού υλικού στο ρυθμό αύξησης βακτηρίων  
από κόπρανα τσιπούρας (*Sparus aurata*)»**

**Κάππα Ελισσάβη**

**Χιωτέλη Δήμητρα**

**ΒΟΛΟΣ 2022**

**«Effect of medium concentration on the growth rate of sea bream (*Sparus aurata*)  
fecal bacteria»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

- 1. Κωνσταντίνος Αρ. Κορμάς**, Καθηγητής, Μικροβιακή Οικολογία Υδάτινου Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**.
- 2. Γκολομάζου Ελένη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Προστασία-Ευζωία Ιχθύων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.
- 3. Παρλαπάνη Φωτεινή**, Επίκουρη Καθηγήτρια, Μοριακή Μικροβιολογία και Ποιότητα Αλιευτικών Προϊόντων-Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Μέλος**.

*Στην Έλενα και τον Αχιλλέα*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για την εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, σημαντικό ρόλο έπαιξαν ορισμένα πρόσωπα τα οποία με την σειρά μας θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε.

Πρωτίστως, θέλουμε να ευχαριστήσουμε τον επιβλέποντα καθηγητή της εργασίας μας, κύριο Κωνσταντίνο Κορμά, για την πολύτιμη καθοδήγησή του, τις γνώσεις που μας παρείχε, τις υποδείξεις και τα πάντα εύστοχα σχόλιά του κατά την διάρκεια της παρούσας έρευνας. Τον ευχαριστούμε, επίσης, για τις συμβουλές, την στήριξη και την ενθάρρυνση που μας έδωσε σε όλη την πορεία της ερευνητικής αυτής διαδικασίας. Ευχαριστούμε τους αρμόδιους καθηγητές που μας επέτρεψαν να χρησιμοποιήσουμε το εργαστήριο καθώς και τον κύριο Νίκο Ξυτερά, ο οποίος στάθηκε δίπλα μας και μας βοήθησε στο πειραματικό κομμάτι της διπλωματικής μας εργασίας.

Τέλος, δεν θα μπορούσαμε να παραλείψουμε την οικογένειά μας, η οποία παρείχε, στην καθεμία μας ξεχωριστά, την απαραίτητη ψυχολογική υποστήριξη και ενθάρρυνση ώστε να ολοκληρωθεί με επιτυχία αυτό το εγχείρημα.

Κάππα Ελισσάβητ

Χιωτέλη Δήμητρα

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τσιπούρα, ένα από τα πιο ευρέως εκτρεφόμενα μεσογειακά είδη, θεωρείται σαρκοφάγος και αρπακτικός οργανισμός. Η διατροφή της επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την ηλικιακή κατάσταση του ιχθύος καθώς και από το αν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή ή σε εκτροφή. Ο γαστρεντερικός σωλήνας ταιριάζει με αυτόν των τυπικών σαρκοφάγων, με την παρουσία των εντερικών μικροβιωτών να είναι σημαντική. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν ο προσδιορισμός του ρυθμού αύξησης των βακτηρίων από κόπρανα τσιπούρας, σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικού υλικού. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν δύο υγρές καλλιέργειες, με την πρώτη να περιέχει συγκεκριμένη ποσότητα εμβολίου και θρεπτικό μέσο και την δεύτερη αντίστοιχη ποσότητα εμβολίου αλλά θρεπτικό με αραιώση 1/10 του αρχικού. Πραγματοποιήθηκαν έξι διαδοχικές αραιώσεις σε κάθε καλλιέργεια και ακολούθησαν οι καμπύλες αύξησης και στατιστική ανάλυση. Παρατηρήθηκε η ύπαρξη τόσο κοπιότροφων όσο και ολιγότροφων βακτηρίων στα κόπρανα, αν και στην πρώτη μεταχείριση παρατηρήθηκε υψηλή αύξηση των μικροοργανισμών και στις έξι αραιώσεις και πολύ χαμηλότερη στη δεύτερη. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι όσον αφορά τους μικροβιώτες των κοπράνων της τσιπούρας, η αραιώση του θρεπτικού μέσου αύξησης δεν ενδείκνυται για την καλλιέργεια τους.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Τσιπούρα, Υγρή Καλλιέργεια, Εντερικοί Μικροβιώτες, Κοπιότροφα Βακτήρια, Ολιγότροφα Βακτήρια

## ABSTRACT

Sea bream, one of the most widely farmed Mediterranean species, is considered a carnivore and a predatory organism. Its diet is largely influenced by the age of the fish and whether it is free-range or farmed. The gastrointestinal tract matches that of typical carnivores, with the presence of gut microbiota being important. The purpose of this thesis was to determine the growth rate of bacteria from sea bream faeces, in two different nutrient concentrations. Specifically, two liquid cultures were carried out, with the first one containing a certain amount of vaccine and nutrient medium and the second corresponding amount of vaccine but nutrient with a dilution of 1/10 of the original. Six serial dilutions were performed on each culture followed by growth curves and statistical analysis. Both copiotrophic and oligotrophic bacteria were observed in the faeces, although in the first treatment a high growth of microorganisms was observed in all six dilutions and much lower in the second. These results show that as far as sea bream faecal microbiota are concerned the dilution of the growth medium is not suitable for their cultivation.

**KEY WORDS:** Sea bream, Liquid culture, Intestinal Microbiota, Copiotrophic Bacteria, Oligotrophic Bacteria

# Περιεχόμενα

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	9
1.1 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ.....	9
1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΘΡΕΨΗΣ .....	10
1.2.1 ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ.....	10
1.2.2 ΠΕΠΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ .....	12
1.3 ΣΗΜΑΣΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ.....	12
1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	13
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	14
2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ .....	14
2.2 ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ .....	14
2.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	15
2.4 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΑΧΟΥΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .....	16
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	17
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	25
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ</b> .....	28
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	29



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) αποτελεί ένα από τα κυριότερα θαλάσσια βενθοπελαγικά είδη στη Μεσόγειο Θάλασσα, καθώς και στις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες μαζί με το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) (Κλαουδάτος & Κλαουδάτος, 2012). Ανήκει στο γένος *Sparus*, της οικογένειας των *Sparidae*. Μεταξύ άλλων, εντοπίζεται τόσο στη Μαύρη Θάλασσα όσο και στις Δυτικές ακτές της Ευρώπης. Μπορεί να επιβιώνει σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και αλατότητας, ενώ προτιμά κυρίως τις μετακινήσεις του σε κοπάδι (Παπουτσόγλου, 2008).

### 1.1 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ

Η τσιπούρα θεωρείται ένα σαρκοφάγο και αρπακτικό είδος (Νεοφύτου, 2015), με τις διατροφικές του προτιμήσεις να εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το στάδιο ανάπτυξής του. Όσον αφορά την ελεύθερη μορφή του, τα νεαρά άτομα μπορούν να τραφούν με πολύχαιτους, αμφίποδα και μικρά καρκινοειδή. Αντίθετα, τα ενήλικα άτομα τρέφονται με άλλα είδη ιχθύων, καρκινοειδή, μαλάκια καθώς και με γαστερόποδα (Παπουτσόγλου, 2008).

Από την άλλη πλευρά, όσον αφορά την εκτροφή του είδους σε υδατοκαλλιέργειες, οι γεννήτορες προτιμούν συνδυασμό νωπών και ξηρών τροφών με σκοπό την επίτευξη των ενεργειακών και θρεπτικών τους αναγκών. Είναι, γενικά, ενισχυμένα με ενέργεια, βιταμίνες και αμινοξέα για να επηρεάσουν θετικά την ποιότητα των αυγών και την επιβίωση των ιχθυδίων (Παπουτσόγλου, 2008; Καραπαναγιωτίδης, 2020).

Μετά την εκκόλαψη των αυγών, στα ιχθύδια χορηγείται ζωντανή τροφή, τροχόζωα και αρτέμια, μιας και σε αυτή την ηλικία δεν έχουν την δυνατότητα να πέψουν κάτι διαφορετικό. Στην συνέχεια, αρχίζουν και προσαρμόζονται με σύνθετη τροφή διαβαθμισμένης κοκκομετρίας μέχρις ότου φτάσουν στο επίπεδο της πάχυνσης και στο κατάλληλο εμπορεύσιμο μέγεθος (Παπουτσόγλου, 2008; Κλαουδάτος & Κλαουδάτος, 2012; Καραπαναγιωτίδης, 2020).

Σε γενικές γραμμές, η διατροφή της τσιπούρας πρέπει να είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, λιπίδια, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία δεν μπορεί να τα συνθέσει ο οργανισμός από μόνος του, βιταμίνες και ενέργεια. Παρατηρείται μάλιστα, ότι όσο αυξάνεται η ηλικία του είδους μειώνεται η ανάγκη για μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεϊνών και αυξάνεται αυτή των λιπιδίων (Καραπαναγιωτίδης, 2020).

## **1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΘΡΕΨΗΣ**

### **1.2.1 ΠΕΠΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ**

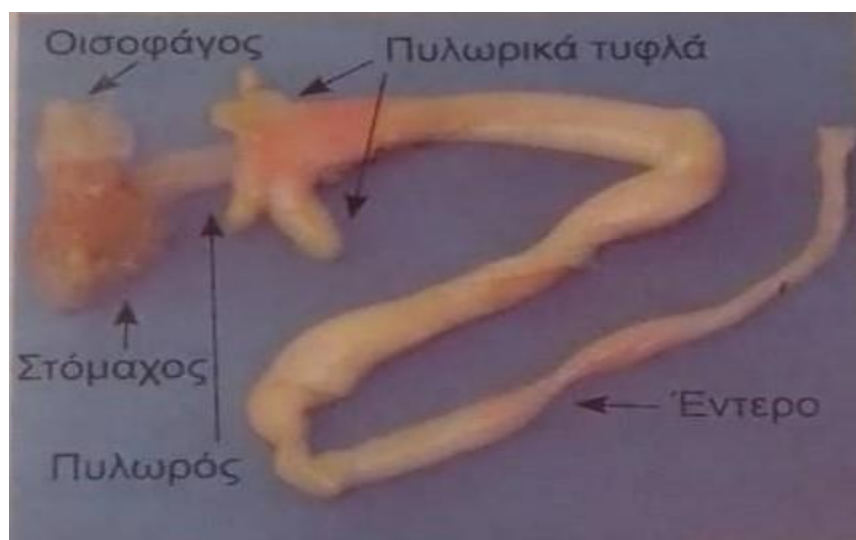
Οι διατροφικές προτιμήσεις του είδους επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό όχι μόνο την μορφολογία της στοματικής κοιλότητας και των δοντιών, αλλά και την γενική μορφολογία του πεπτικού συστήματος του ιχθύος. Όπως και κάθε τυπικό σαρκοφάγο είδος, έτσι και η τσιπούρα στο στόμα της διαθέτει γνάθους από ισχυρούς κυνόδοντες, συνεισφέροντας στην αρπαγή και σύνθλιψη της τροφής (Παπουτσόγλου, 2008).

Ακολουθεί ο οισοφάγος, ένα όργανο αρκετά ευδιάκριτο, εξαιτίας των μυών που το συνιστούν (Μεντέ & Νέγκας, 2011). Στο συγκεκριμένο είδος, το μήκος του είναι αρκετά μεγάλο με αποτέλεσμα να ξεχωρίζεται ο φάρυγγας και το στομάχι. Το

τελευταίο, όπως και στα περισσότερα σαρκοφάγα, διαθέτει τη μορφή σάκου, μιας και επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την διατροφή του οργανισμού (Παπουτσόγλου, 2008).

Μορφολογικά, το τέλος του στομάχου ταυτίζεται με τον πυλωρό, ελέγχοντας την έλευση της τροφής προς το έντερο. Το έντερο αποτελεί ένα μακρύ περιελιγμένο όργανο στο οποίο παρατηρείται η ολοκλήρωση της διαδικασίας της πέψης, καθώς και της απορρόφησης των θρεπτικών ουσιών. Σε πολλά είδη, συμπεριλαμβανομένου και της τσιπούρας, το συγκεκριμένο όργανο εμφανίζει απολήξεις, ευρέως γνωστές με τον όρο πυλωρικά τυφλά κοντά στον πυλωρό (Παπουτσόγλου, 2008; Μέντε & Νέγκας, 2011).

Παράλληλα, στο πεπτικό σύστημα περιλαμβάνεται τόσο το ήπαρ, ένας αδένας με σημαντικές βιοχημικές λειτουργίες για τον οργανισμό, όσο και η έδρα, η οποία αποτελεί και το τελικό σημείο του πεπτικού σωλήνα πολλών ιχθύων (Παπουτσόγλου, 2008; Μεντέ & Νέγκας, 2011).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του πεπτικού σωλήνα στην τσιπούρα (*Sparus aurata*) (Παπουτσόγλου, 2008).

### 1.2.2 ΠΕΠΤΙΚΑ ENZYMA

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η διαδικασία της πέψης ενεργοποιείται στο στομάχι και ολοκληρώνεται στο έντερο του ιχθύος. Η τροφή διασπάται, αρχικά, στο πρώτο όργανο εξαιτίας της έκκρισης υδροχλωρικού οξέος καθώς και του γενικότερου όξινου περιβάλλοντος. Στην διαδικασία αυτή, σημαντικό κομμάτι διαδραματίζουν τα πεπτικά ένζυμα, τα οποία εκκρίνονται είτε στο όργανο του στομαχίου είτε σε άλλα, με σκοπό την επιτάχυνσή της (Μεντέ & Νέγκας, 2011).

Συγκεκριμένα, υπάρχουν ένζυμα που εκκρίνονται μόνο στο στομάχι, όπως είναι η πεψίνη και η χυμοθρεψίνη, σε αντίθεση, με την χιτινάση και την πρωτεάση, οι οποίες εμφανίζονται στο πάγκρεας των ιχθύων. Όσον αφορά το έντερο, τα κύτταρα του βλεννογόνου συνθέτουν επιπλέον πεπτικά ένζυμα με σκοπό την ολοκλήρωση της πέψης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι εντερικής προέλευσης πρωτεάσες, οι στεράσες καθώς και οι παγκρεατικής προέλευσης πρωτεάσες (Μεντέ & Νέγκας, 2011).

### 1.3 ΣΗΜΑΣΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ

Μέχρι σήμερα δεν έχουν εκπονηθεί αρκετές μελέτες σχετικά με την παρουσία και δράση των μικροβιωτών στο πεπτικό σύστημα των οργανισμών. Από αυτές που έχουν πραγματοποιηθεί, όσον αφορά τους ιχθύες, έχουν εντοπιστεί αρκετές κατηγορίες μικροβιακών κοινοτήτων, όπως αυτές των βακτηρίων, πρωτοζώων και μυκήτων (Παπουτσόγλου, 2008).

Η ποσότητα και ποιότητα αυτών, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις διατροφικές συνήθειες των ιχθύων. Η ύπαρξη μικροβιακών κοινοτήτων παίζει

καθοριστικό ρόλο στην υγεία και στην επιβίωση των οργανισμών. Εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου των ιχθύων (Παπουτσόγλου, 2008).

Τα κυριότερα βακτήρια που έχουν εντοπιστεί διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα ολιγότροφα και κοπιότροφα βακτήρια. Όσον αφορά την πρώτη κατηγορία, οι ολιγότροφοι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε περιβάλλοντα με χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών, σε αντίθεση με τους κοπιότροφους που προτιμούν πλούσια σε θρεπτικά περιβάλλοντα. Παράλληλα, οι τελευταίοι έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να χρησιμοποιούν στο μέγιστο την εκάστοτε πηγή θρεπτικού που τους προσφέρεται (Koch, 2001).

#### **1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Ο σκοπός αυτής της διπλωματικής διατριβής είναι ο προσδιορισμός του ρυθμού αύξησης βακτηρίων από κόπρανα τσιπούρας σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικού υλικού καθώς και ο προσδιορισμός της ύπαρξης κοπιότροφων και ολιγότροφων βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα να παρατηρηθεί η αύξηση των μικροοργανισμών ως προς την ταχύτητα και την ποσότητα, συγκριτικά με την συγκέντρωση του θρεπτικού που τους παρέχεται.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΜΕΣΟΥ

Το πειραματικό κομμάτι ξεκίνησε με την προετοιμασία και παρασκευή του θρεπτικού υλικού. Ως μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το R2A (Reasoner's 2A agar), το οποίο είναι κατάλληλο για την αύξηση βακτηρίων και σε συνδυασμό με χαμηλή θερμοκρασία και μεγάλο χρόνο επώασης διεγείρει την αύξηση εκείνων που βρίσκονται υπό πίεση και διαθέτουν ανθεκτικότητα στο χλώριο. Σε 100ml απιονισμένου νερού χρησιμοποιήθηκαν 0.324gr R2A, για την παρασκευή της υγρής καλλιέργειας, γνωρίζοντας ότι σε ένα λίτρο νερού αντιστοιχούν 3.24gr. Στη συνέχεια, ακολούθησε ανάδευση του μείγματος με την χρήση του μαγνητικού αναδευτήρα.

### 2.2 ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ

Πριν τον εμβολιασμό, πραγματοποιήθηκε αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 121 ° C με σκοπό την αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων. Τα υγρά υλικά αποστειρώθηκαν για 15 λεπτά, ενώ τα στερεά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην διαδικασία του πειράματος για 20 λεπτά.

Για την παρασκευή του εμβολίου έγινε συλλογή κοπράνων από εκτρεφόμενες τσιπούρες του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που σιτίζονταν με εμπορική τροφή. Ακολούθησε καλή ανάδευση και αναμονή περίπου μία ώρα με σκοπό την καθίζηση των στερεών υπολειμμάτων του δείγματος. Αφού πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός αυτός, το υγρό διάλυμα μοιράστηκε σε σωληνάρια με την χρήση πιστολιού πιπέτας. Για 30 λεπτά φυγοκεντρήθηκε με σκοπό την αποφυγή τυχόν συσσωματωμάτων.

Μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου, 1.5ml υγρού διαλύματος μικροοργανισμών προστέθηκε σε σωλήνα μαζί με 13.5ml θρεπτικού υλικού με σκοπό να δημιουργηθεί αναλογία 1:10, δηλαδή το μείγμα να περιλαμβάνει 90% θρεπτικό και 10% εμβόλιο. Το διάλυμα αναμείχθηκε καλά και αποτέλεσε το μητρικό για το πείραμα.

Από αυτό πάρθηκε, με την βοήθεια πιπέτας, 1.5ml διάλυμα και προστέθηκε σε σωληνάριο μαζί με 13.5ml θρεπτικό. Το νέο μείγμα που προέκυψε, χωρίστηκε σε 3

μπουκαλάκια (a, b, c) ίσων όγκων και αποτέλεσε το πρώτο διάλυμα με αραιώση  $10^{-1}$ . Για το διάλυμα με αραιώση  $10^{-2}$ , πάρθηκαν 0.5 ml από κάθε μπουκαλάκι της προηγούμενης αραιώσης αντίστοιχα και αναδεύτηκαν καλά με 4.5 ml θρεπτικού. Η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι τις 6 διαδοχικές αραιώσεις ( $10^{-6}$ ) κατά τον ίδιο τρόπο με αποτέλεσμα κάθε σωληνάκι να έχει συνολικά 4.5ml διάλυμα.

Εκτός από την παραπάνω υγρή καλλιέργεια βακτηρίων, με R2A (K1), πραγματοποιήθηκε και καλλιέργεια με αραιώση 1/10 του R2A (K2). Η διαδικασία αποστείρωσης και εμβολιασμού του θρεπτικού ήταν η ίδια με τη μόνη διαφορά να εντοπίζεται στην αναλογία του θρεπτικού. Για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκαν 0.032gr R2A και αναμείχθηκαν καλά με 100 ml απιονισμένου νερού. Η δημιουργία του μητρικού διαλύματος καθώς και ο μοιρασμός των σωληναρίων για τις έξι διαδοχικές αραιώσεις βασίστηκαν στην προαναφερθείσα διαδικασία.

Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας έγινε για πρώτη φορά η καταμέτρηση της οπτικής πυκνότητας των μικροοργανισμών με την χρήση του φασματοφωτόμετρου, σε μήκος κύματος 600nm. Για την ακριβή καταγραφή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τυφλά τα οποία περιελάμβαναν μόνο το θρεπτικό υλικό στο εσωτερικό τους. Έπειτα, τα σωληνάκια τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα του εργαστηρίου στους  $22^{\circ}\text{C}$  για να πραγματοποιηθεί η αύξησή τους. Για τις μετρήσεις, τα σωληνάρια αφαιρούνταν από τον επωαστήρα ενώ κατά την λήξη της καταγραφής των αποτελεσμάτων, τοποθετούνταν εκ νέου εκεί.

### 2.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι στατιστικές αναλύσεις που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του λογισμικού Jamonί, με την τελευταία έκδοση 2.2.2. Για τον υπολογισμό των στατιστικών διαφορών χρησιμοποιήθηκαν το μη παραμετρικό τεστ Mann Whitney U, το παραμετρικό τεστ Welch' s καθώς και το παραμετρικό τεστ T-test.

## 2.4 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΑΧΟΥΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

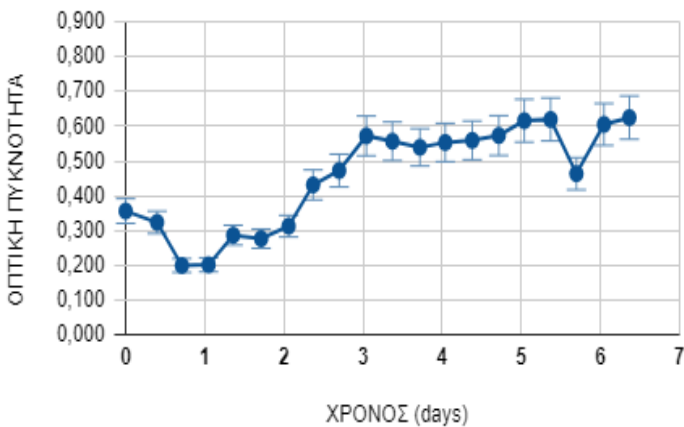
Για την εύρεση του μέγιστου τάχους αύξησης χρησιμοποιήθηκε ο τύπος  $\mu_{\max} = (\ln(x_2) - \ln(x_1)) / (t_2 - t_1)$ , τόσο για την K1 όσο και για την K2.



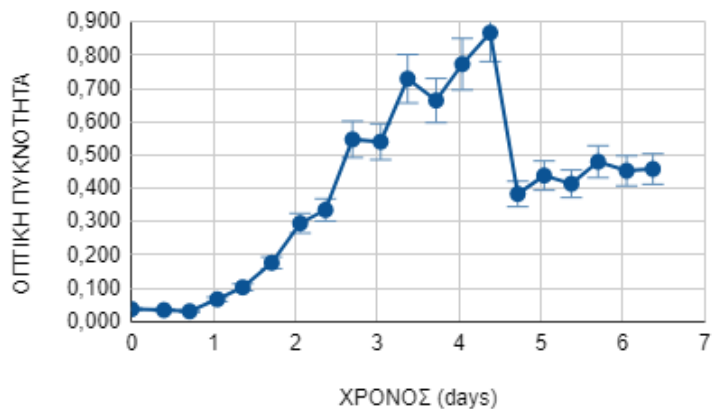
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το πειραματικό κομμάτι της έρευνας διήρκεσε περίπου μία εβδομάδα. Κάθε μέρα πραγματοποιούνταν τρεις μετρήσεις σε διάστημα οκτώ ωρών με σκοπό την παρατήρηση και καταγραφή πιθανής αύξησης των μικροοργανισμών. Συνολικά οι μετρήσεις που έλαβαν χώρα ήταν είκοσι. Ο μέσος όρος ήταν αποτέλεσμα των τριών μετρήσεων από τις επαναλήψεις κάθε αραίωσης και αποτέλεσε την βάση για την κατασκευή της καμπύλης αύξησης.

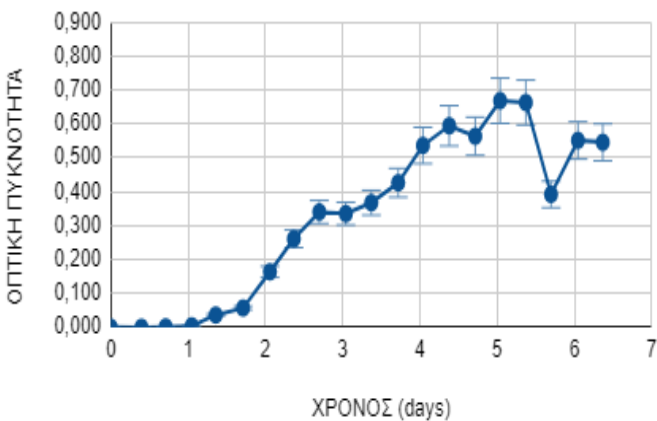
**a.  $10^{-1}$**



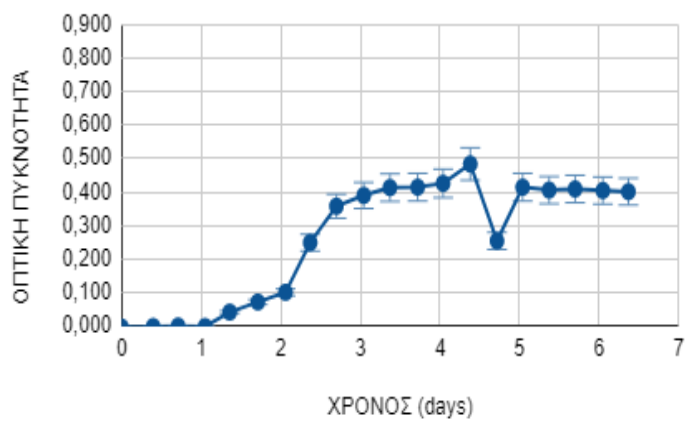
**b.  $10^{-2}$**



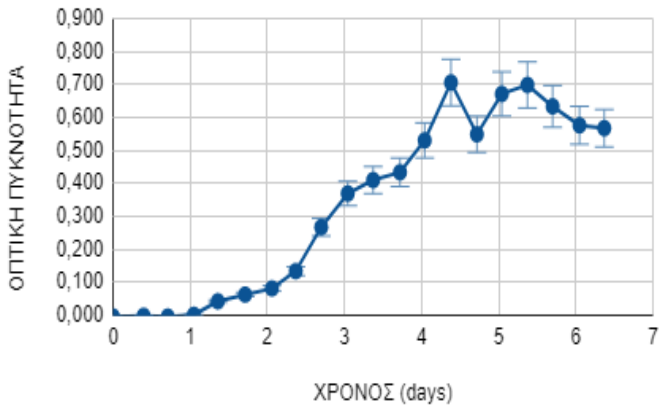
**c.  $10^{-3}$**



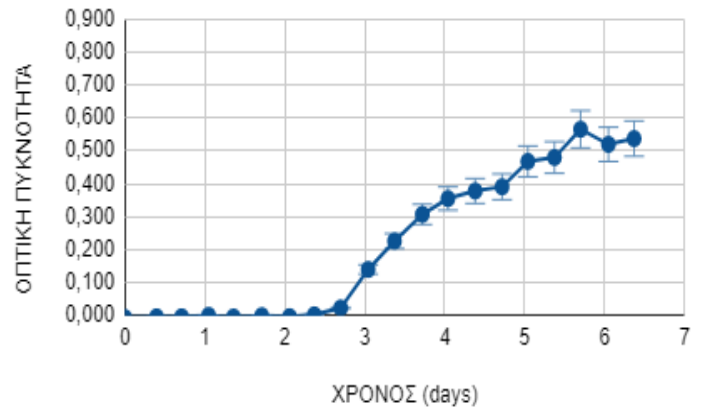
**d.  $10^{-4}$**



### e. $10^{-5}$

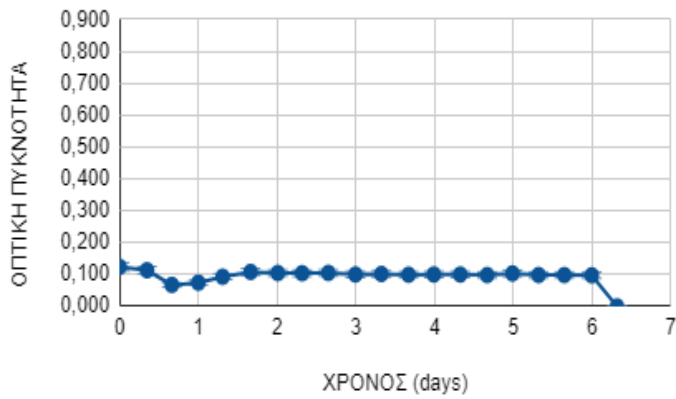


### f. $10^{-6}$

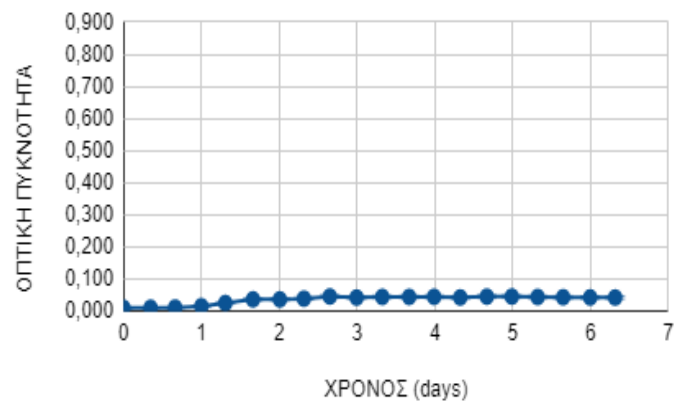


Διάγραμμα 1. Σχηματική απεικόνιση καμπύλων αύξησης για κάθε αραιώση της Κ1 σε συνάρτηση με το χρόνο. (Κ1: R2A-full strength)

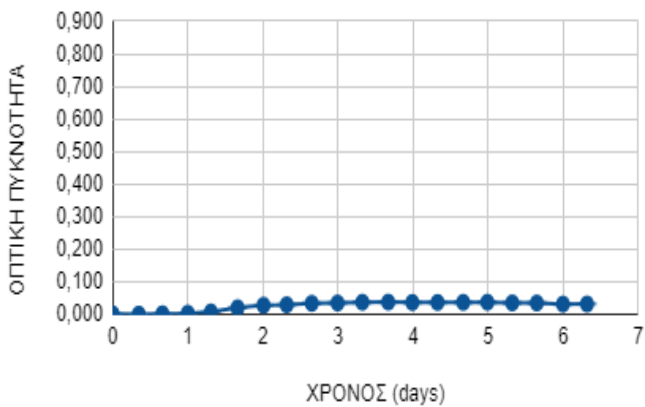
### a'. $10^{-1}$



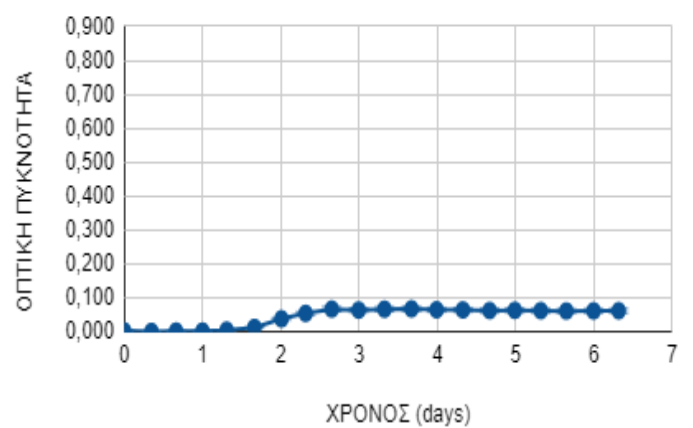
### b'. $10^{-2}$



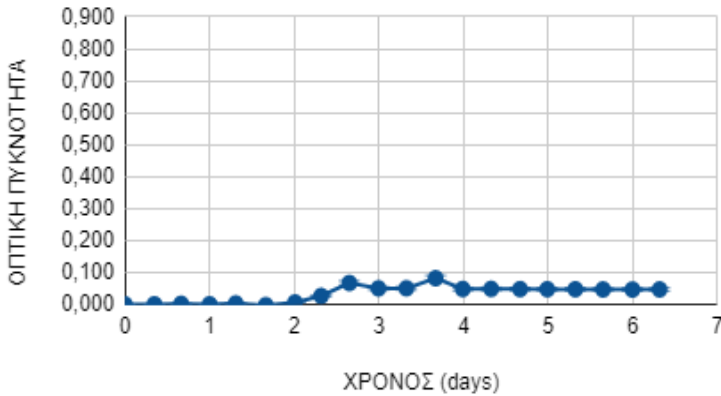
### c'. $10^{-3}$



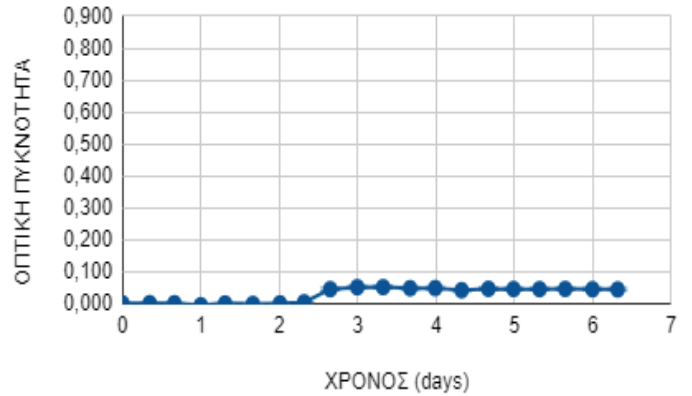
### d'. $10^{-4}$



**e'.  $10^{-5}$**



**f'.  $10^{-6}$**



Διάγραμμα 2. Σχηματική απεικόνιση καμπύλων αύξησης για κάθε αραιώση της K2 σε συνάρτηση με τον χρόνο. (K2: R2A-1/10)

Στην πρώτη μεταχείριση παρατηρήθηκε αύξηση και στις έξι διαδοχικές αραιώσεις (Διάγραμμα 1). Και οι έξι καμπύλες ξεκινούν με μία φάση προσαρμογής με την μεγαλύτερη χρονικά να εντοπίζεται στην  $10^{-6}$  αραιώση. Ακολουθεί η φάση αύξησης των μικροοργανισμών ενώ τελικώς παρατηρείται μία στασιμότητα σε κάθε καλλιέργεια.

Από την άλλη πλευρά, στην δεύτερη μεταχείριση δεν παρατηρήθηκε αισθητή αύξηση των μικροοργανισμών (Διάγραμμα 2). Κάθε καμπύλη ξεκινά με μία περίοδο προσαρμογής των βακτηρίων με την εκθετική φάση που ακολουθεί να είναι μικρή έως και μηδενική όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 2 α'.

Για τον υπολογισμό των στατιστικών διαφορών μεταξύ των αραιώσεων των K1 και K2, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος των δεδομένων με σκοπό την ανίχνευση του κατάλληλου στατιστικού τεστ. Μελετήθηκε η κατανομή και η ομοιογένεια της διακύμανσης με τα αποτελέσματα να δείχνουν αντίστοιχα, μη κανονική κατανομή και ομοιογένεια. Για αυτό, χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό τεστ Mann Whitney U.

Πίνακας 1. Στατιστικές διαφορές των αραιώσεων μεταξύ των K1 και K2 με το τεστ Mann Whitney U (\* τιμές <0.001, \*\* τιμές <0.02). (K1: R2A-full strength, K2: R2A-1/10)

	<b>p</b>
<b>10<sup>-1</sup></b>	0.001*
<b>10<sup>-2</sup></b>	0.001*
<b>10<sup>-3</sup></b>	0.002**
<b>10<sup>-4</sup></b>	0.004**
<b>10<sup>-5</sup></b>	0.003**
<b>10<sup>-6</sup></b>	0.342

Σύμφωνα με τον Πίνακα 1, τα περισσότερα δεδομένα μεταξύ των μεταχειρίσεων των δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων θρεπτικού, φαίνεται να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά. Εξαιρέση σε αυτά ανήκουν τα δεδομένα στην αραιώση 10<sup>-6</sup>, στα οποία η πιθανότητα είναι μεγαλύτερη από 0.05 και εμφανίζουν μη στατιστικά σημαντική διαφορά.

Όμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τις στατιστικές αναλύσεις των αραιώσεων μεταξύ της K1. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η κανονικότητα στην κατανομή και η ομοιογένεια στην διακύμανση με τον ίδιο τρόπο, χρησιμοποιώντας και σε αυτήν την περίπτωση το μη παραμετρικό τεστ Mann Whitney U. Σύμφωνα με τις πιθανότητες του Πίνακα 2 που ακολουθεί, τα περισσότερα δεδομένα εμφανίζουν μη στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 2. Στατιστικές διαφορές των αραιώσεων μεταξύ της K1 με το τεστ Mann Whitney U (\* τιμές <0.001, \*\* τιμές <0.02, \*\*\* τιμές <0.05). (K1: R2A-full strength)

<b>p</b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>
<b>10<sup>-1</sup></b>		0.331	0.045***	0.001*	0.229	0.001*
<b>10<sup>-2</sup></b>			0.394	0.053	0.543	0.019**
<b>10<sup>-3</sup></b>				0.379	0.735	0.098
<b>10<sup>-4</sup></b>					0.233	0.446
<b>10<sup>-5</sup></b>						0.089
<b>10<sup>-6</sup></b>						

Για την εύρεση στατιστικών διαφορών και την επιλογή του κατάλληλου στατιστικού τεστ μεταξύ των αραιώσεων της K2, πραγματοποιήθηκε και σε αυτήν την περίπτωση ο έλεγχος της κανονικότητας και της ομοιογένειας της διακύμανσης. Με τα αντίστοιχα αποτελέσματα εφαρμόστηκε τελικώς το μη παραμετρικό τεστ Mann Whitney U. Και σε αυτήν την περίπτωση, τα περισσότερα δεδομένα εμφάνιζαν μη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Στατιστικές διαφορές των αραιώσεων μεταξύ της K2 με το τεστ Mann Whitney U (\* τιμές <0.001, \*\* τιμές <0.02, \*\*\* τιμές <0.05). (K2: R2A-1/10)

<b>p</b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>
<b>10<sup>-1</sup></b>		0.001*	0.001*	0.001*	0.001*	0.001*
<b>10<sup>-2</sup></b>			0.002**	0.060	0.228	0.472
<b>10<sup>-3</sup></b>				0.009**	0.133	0.163
<b>10<sup>-4</sup></b>					0.049***	0.005**
<b>10<sup>-5</sup></b>						0.378
<b>10<sup>-6</sup></b>						

Με βάση τις γραφικές παραστάσεις των κάθε ξεχωριστών αραιώσεων (Διάγραμμα 1 και 2), εντοπίστηκε η εκθετική φάση των καμπύλων, με σκοπό την στατιστική τους σύγκριση. Συγκεκριμένα συγκρίθηκαν οι εκθετικές φάσεις της K1 και της K2. Βρέθηκε κανονική κατανομή καθώς και ανομοιογένεια στη διακύμανση με αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθεί το παραμετρικό τεστ Welch' s. Σύμφωνα με τις πιθανότητες του Πίνακα 4 που ακολουθεί, τα δεδομένα εμφάνιζαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Στην αραιώση 10<sup>-1</sup> της K2, δεν βρέθηκε εκθετική φάση.

Πίνακας 4. Στατιστικές διαφορές των αραιώσεων κατά την εκθετική φάση μεταξύ των K1 και K2 με το τεστ Welch's (\* τιμές <0.001, \*\* τιμές <0.02, \*\*\* τιμές <0.05). (K1: R2A-full strength, K2: R2A-1/10)

	<b>p</b>
<b>10<sup>-1</sup></b>	
<b>10<sup>-2</sup></b>	0.001*
<b>10<sup>-3</sup></b>	0.001*
<b>10<sup>-4</sup></b>	0.044***
<b>10<sup>-5</sup></b>	0.006**
<b>10<sup>-6</sup></b>	0.030***

Στην συνέχεια έγινε η ίδια διαδικασία μεταξύ των αραιώσεων της K1, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί το κατάλληλο στατιστικό τεστ. Βρέθηκε κανονικότητα στην κατανομή καθώς και ομοιογένεια στην διακύμανση. Τελικώς, χρησιμοποιήθηκε το παραμετρικό τεστ T-test, με τις πιθανότητες που αναγράφονται στον Πίνακα 5, να δείχνουν ότι τα δεδομένα εμφάνιζαν μη στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πίνακας 5. Στατιστικές διαφορές των αραιώσεων κατά την εκθετική φάση μεταξύ της K1 με το τεστ T-test. (K1: R2A-full strength)

<b>p</b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>
<b>10<sup>-1</sup></b>		0.604	0.746	0.061	0.375	0.682
<b>10<sup>-2</sup></b>			0.379	0.102	0.190	0.381
<b>10<sup>-3</sup></b>				0.205	0.540	0.991
<b>10<sup>-4</sup></b>					0.490	0.134
<b>10<sup>-5</sup></b>						0.529
<b>10<sup>-6</sup></b>						

Για την εύρεση του κατάλληλου στατιστικού τεστ που έπρεπε να χρησιμοποιηθεί για την σύγκριση των αραιώσεων μεταξύ της K2, έγινε ο έλεγχος την κατανομής και της διακύμανσης. Βρέθηκε κανονική κατανομή και ομοιογένεια στην διακύμανση με αποτέλεσμα να επιλεγεί το παραμετρικό τεστ T-test. Με βάση τον Πίνακα 6, όλα τα δεδομένα παρουσίαζαν μη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Πίνακας 6. Στατιστικές διαφορές των αραιώσεων κατά την εκθετική φάση μεταξύ της Κ2 με το τεστ T-test. (Κ2: R2A-1/10)

<b>p</b>	<b>10<sup>-1</sup></b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>
<b>10<sup>-1</sup></b>						
<b>10<sup>-2</sup></b>			0.462	0.532	0.706	0.993
<b>10<sup>-3</sup></b>				0.299	0.483	0.705
<b>10<sup>-4</sup></b>					0.943	0.678
<b>10<sup>-5</sup></b>						0.805
<b>10<sup>-6</sup></b>						

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός του τάχους αύξησης των μικροοργανισμών σε κάθε μεταχείριση.

Πίνακας 7. Μέγιστο τάχος αύξησης διαδοχικών αραιώσεων Κ1. (Κ1: R2A-full strength)

<b>Διαδοχική αραιώση Κ1</b>	<b>Τάχος αύξησης (μmax)</b>
<b>10<sup>^(-1)</sup></b>	0.53
<b>10<sup>^(-2)</sup></b>	0.91
<b>10<sup>^(-3)</sup></b>	1.30
<b>10<sup>^(-4)</sup></b>	1.32
<b>10<sup>^(-5)</sup></b>	1.81
<b>10<sup>^(-6)</sup></b>	1.06

Πίνακας 8. Μέγιστο τάχος αύξησης διαδοχικών αραιώσεων K2. (K2: R2A-1/10)

<b>Διαδοχική αραιώση K2</b>	<b>Τάχος αύξησης (<math>\mu_{\max}</math>)</b>
<b><math>10^{(-1)}</math></b>	-
<b><math>10^{(-2)}</math></b>	1.22
<b><math>10^{(-3)}</math></b>	1.65
<b><math>10^{(-4)}</math></b>	2.07
<b><math>10^{(-5)}</math></b>	3.35
<b><math>10^{(-6)}</math></b>	5.87

Σε γενικές γραμμές, οι διαδοχικές αραιώσεις της K1, είχαν μικρότερο μέγιστος τάχος αύξησης συγκριτικά με τις αραιώσεις της K2. Όσον αφορά τις διαδοχικές αραιώσεις της K1, η  $10^{-5}$  εμφανίζει το μεγαλύτερο  $\mu_{\max}$  με τις  $10^{-4}$  και  $10^{-3}$  να ακολουθούν. Αντίθετα, η  $10^{-1}$  αραιώση εμφανίζει το μικρότερο μέγιστο τάχος αύξησης (Πίνακας 7).

Από την άλλη πλευρά, στις διαδοχικές αραιώσεις της K2, η  $10^{-6}$  ήταν αυτή που εμφάνιζε το μεγαλύτερο  $\mu_{\max}$  με τις  $10^{-5}$  και  $10^{-4}$  αντίστοιχα να ακολουθούν. Αντίθετα, το μικρότερο μέγιστο τάχος αύξησης το εμφανίζει η  $10^{-2}$  διαδοχική αραιώση, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 8.



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για την καλύτερη αύξηση των μικροοργανισμών σε μία ελεγχόμενη καλλιέργεια, πρέπει να τους παρέχονται κατάλληλες θρεπτικές και φυσικές συνθήκες. Η κατάλληλη θερμοκρασία, η ποσότητα του οξυγόνου καθώς και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών σε μία καλλιέργεια. Μάλιστα, οι απαιτήσεις και οι ποσότητες εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τα είδη που καλλιεργούνται. Στην παρούσα διατριβή, στα κόπρανα της τσιπούρας εντοπίστηκαν τόσο ολιγότροφα όσο και κοπιότροφα βακτήρια.

Όσον αφορά την K1, παρατηρείται αύξηση των μικροοργανισμών και στις έξι διαδοχικές αραιώσεις (Διάγραμμα 1). Συγκεκριμένα, κάθε καλλιέργεια από αυτές, ξεκινά με μία περίοδο προσαρμογής των βακτηρίων στο θρεπτικό υλικό μέσο, η οποία φαίνεται να συσχετίζεται με την εκάστοτε διαδοχική αραιώση. Το μεγαλύτερο τάχος αύξησης στην K1 φαίνεται να εμφανίζεται στην αραιώση  $10^{-5}$  (Πίνακας 7), εξαιτίας της μεγάλης φάσης προσαρμογής που συνδυάζεται με την απότομη αύξηση των μικροοργανισμών.

Η αύξηση αυτή που παρατηρήθηκε, με την μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα μικροοργανισμών να φτάνει τα 0.868 κατά την δεύτερη αραιώση, καθιστά σαφή την ύπαρξη κοπιότροφων βακτηρίων στα κόπρανα της τσιπούρας. Όπως έχει προαναφερθεί, τα συγκεκριμένα βακτήρια εντοπίζονται σε εύτροφα περιβάλλοντα και διαθέτουν την δυνατότητα πλήρους εκμετάλλευσης του θρεπτικού υλικού που τους παρέχεται.

Οι Silva, Nicoli, Zambonino-Infante, Kaushik, & Gatesoupe, (2011), πραγματοποίησαν πείραμα σχετικά με την υποκατάσταση του ιχθυαλεύρου στην διατροφή της τσιπούρας και του χρυσόψαρου (*Carassius auratus*) με σκοπό να αξιολογήσουν τα αποτελέσματα αυτά στο γαστρεντερικό περιεχόμενο και τα κόπρανα των δύο αυτών ειδών. Όσον αφορά την τσιπούρα παρατηρήθηκε υψηλή περιεκτικότητα *Vibrionaceae*, τα οποία θεωρούνται κοπιότροφα, τόσο στο έντερο όσο και στα κόπρανα του συγκεκριμένου οργανισμού, εξαρτώμενα σε μεγάλο βαθμό από την διατροφή που τους παρέχονταν.

Η θέση αυτή υποστηρίζεται και από άλλες μελέτες που έλαβαν χώρα. Συγκεκριμένα, πριν κάποια χρόνια, πραγματοποιήθηκε πείραμα σχετικά με την

ανθεκτικότητα των εντερόκκοκων της τσιπούρας, οι οποίοι είναι κοπιότροφοι, σε αντιβιοτικά. Τα αποτελέσματα, μεταξύ άλλων έδειξαν για ακόμη μία φορά την μεγάλη επίδραση που κατέχει το περιβάλλον στην επιβίωση των μικροοργανισμών καθώς και την εξάρτηση των εντερικών μικροβιωτών με την διατροφή (Barros, et al., 2011).

Από την άλλη πλευρά, στην δεύτερη μεταχείριση του παρόντος πειράματος, που χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό με αρχική αραιώση 1/10, δεν παρατηρήθηκε σημαντικά μεγάλη αύξηση στις έξι διαδοχικές αραιώσεις (Διάγραμμα 2). Όπως και στην πρώτη, κάθε καλλιέργεια από αυτές ξεκίνησε με μία περίοδο προσαρμογής των μικροοργανισμών στο νέο περιβάλλον με την διαφορά να εντοπίζεται στην φάση αύξησης των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα που καταγράφηκε ήταν 0.084 στην αραιώση  $10^{-5}$ , με το μεγαλύτερο τάχος αύξησης να εντοπίζεται στην έκτη διαδοχική αραιώση (Πίνακας 8).

Λόγω της αρχικής συγκέντρωσης θρεπτικού, η K2 θεωρείται ένα ολιγότροφο περιβάλλον, εμποδίζοντας σε μεγάλο βαθμό την αύξηση των κοπιότροφων οργανισμών ευνοώντας παράλληλα την αύξηση των ολιγότροφων. Οι τελευταίοι, εκμεταλλευόμενοι το αραιό θρεπτικά περιβάλλον και την έλλειψη ανταγωνισμού, επιτυγχάνουν την δική τους αύξηση. Δυστυχώς, δεν έχουν πραγματοποιηθεί εργασίες που σχετίζονται με την ύπαρξη καλλιεργήσιμων ολιγοτροφικών μικροοργανισμών.

Παρ'όλο που όλα τα εντεροβακτήρια θεωρούνται κοπιότροφα, απομονώνονται και ολιγότροφοι μικροοργανισμοί από τα δείγματα, κάτι που επιβεβαιώνεται και από το παρόν πείραμα. Από τα πειράματα των Moaledj (1978) και Witzel, Moaledj, & Overbeck (1982) απομονώθηκαν πολλοί ολιγότροφοι και κοπιότροφοι οργανισμοί από την ευτροφική λίμνη PluBsee στην Γερμανία αντιστοίχως (Schut, Prins, & Gottschal, 1997).

Αυτές μαζί με άλλες προηγούμενες έρευνες κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι οι οργανισμοί που απομονώθηκαν από αραιά θρεπτικά μέσα διέφεραν από αυτούς που απομονώθηκαν από πυκνά θρεπτικά μέσα. Εκτός αυτών, δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις που να επιτρέπουν τον διαχωρισμό ολιγότροφων και κοπιότροφων αποκλειστικά από την ικανότητα αύξησης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικού. Οι ολιγότροφοι σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να χάσουν την ικανότητα αύξησης σε αραιά θρεπτικά μέσα, δηλαδή να μεταβούν σε κοπιότροφους (Akagi, Simidu, & Taga, 1980)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες όσον αφορά την μικροβιακή κοινότητα των ιχθύων στον γαστρεντερικό σωλήνα (Sullam, et al., 2012). Οι περισσότερες αφορούν πειράματα που βασίζονται κατά κύριο λόγο σε καλλιέργειες (Sivasubramanian & Ravichandran, 2012) όπως παρατηρείται και στη παρούσα έρευνα. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν έρευνες που αφορούν κατά κύριο λόγο την επίδραση που κατέχει η διατροφή ενός οργανισμού στους εντερικούς μικροβιώτες (Desai, et al., 2012; Dimitroglou, et al., 2009).

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συμπερασματικά, στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρήθηκε η ύπαρξη ολιγότροφων και κοπιότροφων βακτηρίων στα κόπρανα της τσιπούρας. Στην πρώτη μεταχείριση, η αύξηση των βακτηρίων και η παρουσία κοπιότροφων μικροοργανισμών ήταν αισθητή και στις έξι διαδοχικές αραιώσεις. Αξιοσημείωτο, δε, ήταν το γεγονός ότι στην δεύτερη μεταχείριση με 1/10 αραιώση του θρεπτικού μέσου αύξησης, σημειώθηκε κάποια μικρή αλλά σημαντική αύξηση επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη ολιγότροφων βακτηρίων. Παρ' όλα αυτά, η αραιώση του θρεπτικού μέσου αύξησης δεν ενδείκνυται για την καλλιέργεια των μικροβιωτών στα κόπρανα.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akagi, Y., Simidu, U., & Taga, N. (1980). Growth responses of oligotrophic and heterotrophic marine bacteria in various substrate concentrations and taxonomic studies on them. *Can. J. Microbiol.*, σσ. 800-806.
- Barros, J., Igrejas, G., Andrade, M., Radhouani, H., López, M., Torres, C., & Poeta, P. (2011, June). Gilthead seabream (*Sparus aurata*) carrying antibiotic resistant enterococci. A potential bioindicator of marine contamination? *Marine Pollution Bulletin*, σσ. 1245-1248.
- Desai, A. R., Links, M. G., Collins, S. A., Mansfield, G. S., Drew, M. D., Van Kessel, A. G., & al, e. (2012). Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, σσ. 350-353:134-142.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Moate, R., Davies, S. J., Spring, P., Sweetman, J., & al, e. (2009). Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). σσ. 3226-3234.
- Koch, A. L. (2001). Oligotrophs versus copiotrophs. *Problems and paradigms*.
- Moaledj, K. (1978). Qualitative analysis of an oligocarbophilic aquatic microflora in the Plubsee. *Arch. Hydrobiol.*, σσ. 98-113.
- Schut, F., Prins, R. A., & Gottschal, J. C. (1997, April). Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquatic Microbial Ecology*, σσ. 177-202.
- Silva, F. C., Nicoli, J. R., Zambonino-Infante, J. L., Kaushik, S., & Gatesoupe, F. J. (2011, July 14). Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). *Microbiology Ecology*, σσ. 285-296.
- Sivasubramanian, K., & Ravichandran, S. R. (2012). Isolation and characterization of gut microbiota from some estuarine fishes. *Marine Science*, σσ. 1-6.
- Sullam, K. E., Essinger, S. D., Lozupone, C. A., O' Connor, M. R., Rosen, G. L., Knight, R. O., & al, e. (2012). Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta - analysis. *Mol. Ecol.*, σσ. 3363-3378.
- Witzel, K., Moaledj, K., & Overbeck, H. (1982). A numerical taxonomic comparison of oligocarbophilic and saprophytic bacteria isolated from Lake Plubsee. *Arch. Hydrobiol.*, σσ. 507-520.
- Καραπαναγιωτίδης, Ι. (2020). Διατροφή Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών. Στο *Πανεπιστημιακές Παραδόσεις*. Βόλος.
- Κλαουδάτος, Σ., & Κλαουδάτος, Δ. (2012). *Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών*. Αθήνα: Εκδόσεις Προπομπός.
- Μεντέ, Ε., & Νέγκας, Ι. (2011). *Στοιχεία Φυσιολογίας Θρέψεως και εφαρμοσμένη διατροφή ιχθύων και καρκινειδών*. Αθήνα: Εκδόσεις Παπαζήση.

Νεοφύτου, Χ. Ν. (2015). *Βιολογία ιχθύων & θαλάσσιων θηλαστικών*. Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις University Studio Press.

Παπουτσόγλου, Σ. Ε. (2008). *Διατροφή Ιχθύων*. Αθήνα: Σταμούλη Α.Ε.