



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

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Επιδράσεις των φρουκτοολιγοσακχαριτών στα καλλιεργήσιμα βακτήρια
κοπράνων της εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*).»**

**ΑΓΑΘΟΥ ΕΛΕΝΗ ΜΑΡΙΑ
ΚΑΡΡΟΥ ΣΥΡΑΓΩ**

ΒΟΛΟΣ, 2022

**«Επιδράσεις των φρουκτοολιγοσακχαριτών στα καλλιεργήσιμα βακτήρια κοπράνων
της εκτρεφόμενης τσιπούρας (*Sparus aurata*).»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1. Κορμάς Κωνσταντίνος**, Καθηγητής, Μικροβιακή οικολογία υδάτινου περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος , Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **Επιβλέπων**
- 2. Γκολομάζου Ελένη**, Επίκουρη 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**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ειλικρινείς μας ευχαριστίες σε όλους όσοι συνέβαλαν στην περάτωση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας. Ιδιαίτερα, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Κορμά Κωνσταντίνο, για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας. Επίσης, αξίζει να αναφερθούμε και στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μας, την κα Γκολομάζου Ελένη και κα Παρλαπάνη Φωτεινή, που μας παρείχαν χρήσιμες συμβουλές και καθοδήγηση καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας. Ακόμη, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον κ. Ξυπτέρα Νικόλαο για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά του κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τέλος, θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας στις οικογένειές μας για την πολύτιμη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το εντερικό μικροβίωμα συμβάλλει στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής, στη διατήρηση της ομοιόστασης του μεταβολισμού και της ανοσολογικής άμυνας του οργανισμού. Η βιωσιμότητά του εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων που ονομάζονται πρεβιοτικά, στα οποία ανήκουν οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες που είναι υδατοδιαλυτοί ολιγοσακχαρίτες, φυσικής προέλευσης. Η χορήγηση πρεβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες βρίσκεται σε πρώιμα στάδια.

Με την παρούσα έρευνα μελετήθηκε η επίδραση 6 διαφορετικών αραιώσεων των φρουκτοολιγοσακχαριτών σε θρεπτικό R2A, που εξετάστηκαν στα καλλιεργήσιμα βακτήρια κοπράνων της τσιπούρας. Μελετήθηκε, επίσης, η συγκέντρωση των φρουκτοολιγοσακχαριτών η οποία προκαλεί καλύτερη ανάπτυξη στα βακτήρια του εντερικού μικροβιώματος και έγινε σύγκριση με την ανάπτυξη βακτηρίων κοπράνων τσιπούρας, που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό R2A χωρίς προσθήκη FOS.

Για την διεξαγωγή του πειράματος πραγματοποιήθηκαν δύο υγρές καλλιέργειες βακτηρίων από κόπρανα τσιπούρας σε θρεπτικό R2A. Οι δύο καλλιέργειες ήταν η R2A + FOS (full strength) και η R2A (1/10) + FOS. Και στις δύο υπήρχε μάρτυρας (προσθήκη μόνο θρεπτικού) και έγιναν έξι διαδοχικές αραιώσεις (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). Οι καλλιέργειες επωάζονταν στους 21°C. Το πείραμα διήρκεσε επτά ημέρες και πραγματοποιούνταν μέτρηση

των οπτικών πυκνοτήτων τρεις φορές την ημέρα. Εξήχθησαν συμπεράσματα σχετικά με το μέγιστο τάχος αύξησης και έγινε στατιστική σύγκριση και διαγράμματα των οπτικών πυκνοτήτων για κάθε καλλιέργεια. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των οπτικών πυκνοτήτων της καλλιέργειας full strength με καλλιέργεια full strength, χωρίς προσθήκη φρουκτοολιγοσακχαριτών, που διεξήχθη παράλληλα με την παρούσα έρευνα.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η ανάπτυξη των βακτηρίων ευνοήθηκε στην full strength καλλιέργεια, ενώ στην R2A (1/10) + FOS, τα βακτήρια δεν αναπτύχθηκαν. Τέλος από την ανάλυση της στατιστικής σύγκρισης των οπτικών πυκνοτήτων των δύο ερευνών, αποδείχθηκε ότι η ανάπτυξη των βακτηρίων και στις δύο περιπτώσεις δεν διαφέρει σημαντικά. Οπότε η καλλιέργεια βακτηρίων σε θρεπτικό R2A με ή χωρίς την παρουσία φρουκτοολιγοσακχαριτών επιφέρει παρόμοια αποτελέσματα στην ανάπτυξή τους.

Λέξεις κλειδιά: φρουκτοολιγοσακχαρίτες, κόπρανα, βακτήρια, εντερικό μικροβίωμα

Effects of fructooligosaccharides on cultured fecal bacteria of farmed sea bream (*Sparus aurata*).

Agathou E. M., Karrou S.

ABSTRACT

Intestinal microbiome contributes to the nutritious alimentation absorption, metabolic homeostasis maintenance and immune defense of the organism. Intestinal microbiome renewability depends on the substrates availability, called prebiotics, in which belongs fructooligosaccharides that are water-soluble and natural origin oligosaccharides. Prebiotics administration in aquaculture is in premature stages.

In this research perused the effect of six different dilutions of fructooligosaccharides in R2A, that were examined on the cultured bacteria of gilthead seabream excreta. It has been also examined the fructooligosaccharides concentration that causes a better bacteria intestinal microbiome proliferation which compared to the bacteria of gilthead seabream excreta that have been cultured in R2A without FOS supplementation.

For the experiment conduction, two liquid cultures bacteria of gilthead seabream excreta in R2A, have been carried out. These two cultures were R2A + FOS (full strength) and R2A (1/10) + FOS. In both of them, there was a control sample and six consecutive dilutions carried out (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}). Cultures have been being incubated in 21 °C. The experiment lasted for seven days and an optical density measurement, three times per day, took place. We came to conclusions regarding the maximum growth rate, and statistic comparisons,

as well as optical density diagrams for each culture, were held. In addition, we carried out a comparison between the optical density of full-strength culture and a full-strength culture without the supplementation of fructooligosaccharides, which was conducted in parallel the specific research.

According to the results the bacteria growth occurred during the full-strength culture, whereas, in R2A (1/10) + FOS, the bacteria did not increase. Finally, the analysis of statistic comparison between the optical densities of the two researches, demonstrated that the bacteria increase, in both cases, does not significantly differ. Therefore, bacteria culture in R2A with or without fructooligosaccharides presence, entrains similar results in their development.

Keywords: fructooligosaccharides, excreta, bacteria, gut microbiome

Περιεχόμενα

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Τσιπούρα	1
1.2 Ανατομία εντέρου	2
1.3 Φρουκτοολιγосακχαρίτες	3
1.4 Μικροβίωμα	8
1.5 Σκοπός	10
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	11
2.1 Δημιουργία θρεπτικών	11
2.1.1 Θρεπτικό A: R2A + FOS (full strength)	11
2.1.2 Θρεπτικό B: R2A (1/10) + FOS	11
2.2 Αποστείρωση	11
2.3 Ετοιμασία εμβολίου	12
2.4 Εμβολιασμός της καλλιέργειας και διαδοχικές αραιώσεις	12
2.5 Μέτρηση οπτικών πυκνοτήτων και επεξεργασία δεδομένων	14
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	15
3.1 Γραφήματα	15
3.1.1 Μεταχείριση 1	15
3.1.2 Μεταχείριση 2	16
3.2 Μέγιστο τάχος αύξησης	19
3.3 Στατιστικές συγκρίσεις οπτικών πυκνοτήτων	20
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	23
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	29

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τσιπούρα

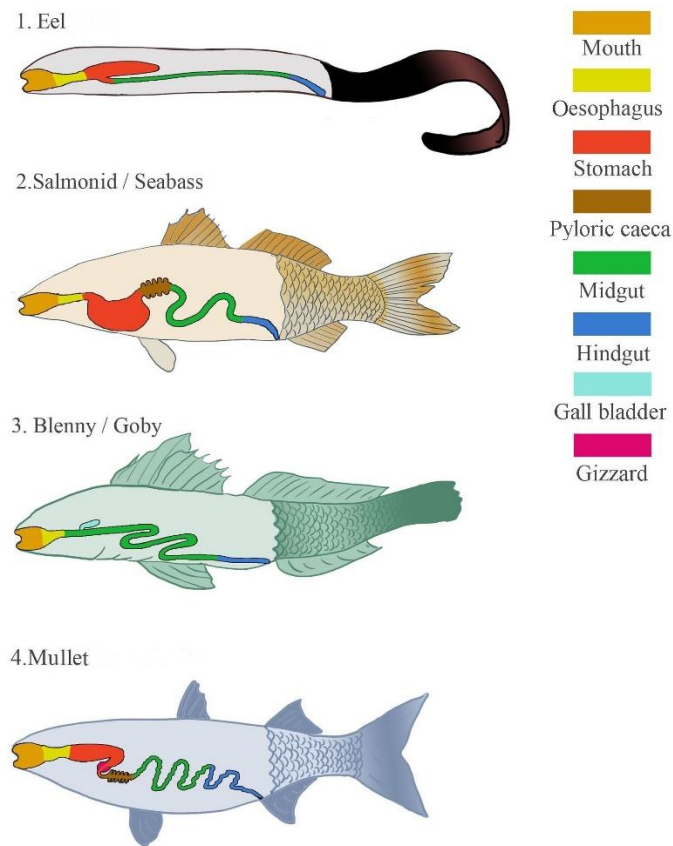
Η τσιπούρα (Εικ.1) ανήκει στα βενθοπελαγικά είδη της υποτροπικής ζώνης και συναντάται σε παράκτιες περιοχές που απαρτίζονται από φυκιάδες και αμμώδεις πυθμένες. Εντοπίζεται συχνότερα στην δυτική και την κεντρική Μεσόγειο και λιγότερο στην ανατολική και νοτιοανατολική της πλευρά και στη Μαύρη Θάλασσα. Το μέγεθός της κυμαίνεται στα 30-35 εκατοστά και είναι ένα σαρκοφάγο είδος που τρέφεται με μύδια, όστρακα, μαλάκια και μικρά ψάρια (Νεοφύτου, 2015). Οι θρεπτικές ουσίες που προσλαμβάνουν οι οργανισμοί μέσω της τροφής είναι οι υδατάνθρακες τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες, οι οποίες μέσω της πέψης, παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για τον μεταβολισμό. Απαιτούνται σε μεγάλες ποσότητες και ονομάζονται μακροστοιχεία, εν αντιθέσει με τα ανόργανα στοιχεία και τις βιταμίνες που δεν παρέχουν ενέργεια και απαιτούνται σε μικρές ποσότητες (μικροστοιχεία) (Καραπαναγιωτίδης, 2018).



Εικόνα 1. Τσιπούρα *Sparus aurata* (fishbase, 2011).

1.2 Ανατομία εντέρου

Το έντερο (Εικ.2) στους ιχθύες διαχωρίζεται σε τρία τμήματα: το πρόσθιο, το μέσο και το οπίσθιο. Το πρόσθιο τμήμα ξεκινά από το οπίσθιο άκρο των βραγχίων και περιλαμβάνει τον οισοφάγο, το στομάχι (όπου υπάρχει) και τον πυλωρό. Δεν είναι εύκολα διακριτός ο διαχωρισμός μεταξύ μέσου και οπίσθιου τμήματος του εντέρου. Στο μέσο τμήμα, λαμβάνει χώρα το μεγαλύτερο μέρος της πέψης και τα πυλωρικά τυφλά που περικλείονται σε αυτό, χρησιμεύουν για να αυξήσουν την επιφάνεια απορρόφησης των θρεπτικών συστατικών της τροφής. Το μήκος του εντέρου ποικίλει ανάλογα με το τροφικό επίπεδο των ψαριών, με τα σαρκοφάγα να εμφανίζουν μικρότερο μέγεθος σε σχέση με αυτό των φυτοφάγων και των παμφάγων (Egerton, et al., 2018).



Εικόνα 2. Διαγραμματική αναπαράσταση των διαφορετικών τύπων πεπτικών συστημάτων που μπορούν να βρεθούν στα θαλάσσια ψάρια, συμπεριλαμβανομένων των πεπτικών οργάνων που μπορεί να υπάρχουν ή να μην υπάρχουν. (Egerton, et al., 2018)

1.3 Φρουκτοολιγοσακχαρίτες

Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες αποτελούν μία σχετικά σύγχρονη ανακάλυψη που πραγματοποιήθηκε από τον Rose το 1804. Η εταιρεία Meiji Seika Kaisha Co. που εδρεύει στο Τόκιο της Ιαπωνίας, κατάφερε την πρώτη επιτυχημένη εμπορική παραγωγή FOS το 1984 με την ακινητοποίηση κυττάρων *Aspergillus niger* σε gel αλγινικού ασβεστίου. Η Ιαπωνία κατέχει τη μεγαλύτερη αγορά φρουκτοολιγοσακχαριτών παγκοσμίως. Ενδεικτικά το 1990 η παραγωγή ξεπέρασε τους 4000 τόνους. Οι

φρουκτοολιγοσακχαρίτες χρησιμοποιούνται από διάφορες εταιρείες ως γλυκαντικά. Με την εμφάνιση των εργαλείων της μοριακής βιολογίας η έρευνα των FOS έχει προοδεύσει σημαντικά και έχει αναχθεί σε εφαρμοσμένη επιστήμη (Kherade, et al., 2021).

Τα τελευταία χρόνια ο κλάδος των υδατοκαλλιέργειών έχει παρουσιάσει ραγδαία ανάπτυξη. Η αιχμαλωσία των ιχθύων προκαλεί αυξημένα επίπεδα στρες και εντείνει τις πιθανότητες εμφάνισης ασθενειών στα ψάρια, οδηγώντας σε σημαντικές απώλειες της παραγωγής. Αυτό το γεγονός έχει στρέψει το ενδιαφέρον των παραγωγών στην χορήγηση τροφών ενισχυμένων με αντιβιοτικά. Όμως, η συχνή χρήση των αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην εμφάνιση ανθεκτικότητας των βακτηρίων απέναντι σε διάφορα φάρμακα. Έτσι, η βιομηχανία σήμερα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της σε εναλλακτικές και πιο ασφαλείς λύσεις με τη δημιουργία ιχθυοτροφών ενισχυμένες με πρεβιοτικά και προβιοτικά, τα οποία αντιπροσωπεύουν την καταλληλότερη εναλλακτική, ως φιλικές προς το περιβάλλον πρόσθετες ύλες ζωοτροφών για παραγωγή ιχθυοτροφών (YE, et al., 2011) . Σε σύγκριση με τις χερσαίες εκτροφές, η χορήγηση πρεβιοτικών στις υδατοκαλλιέργειες βρίσκεται ακόμη σε αρχικό στάδιο (Patterson & Burkholder, 2003).

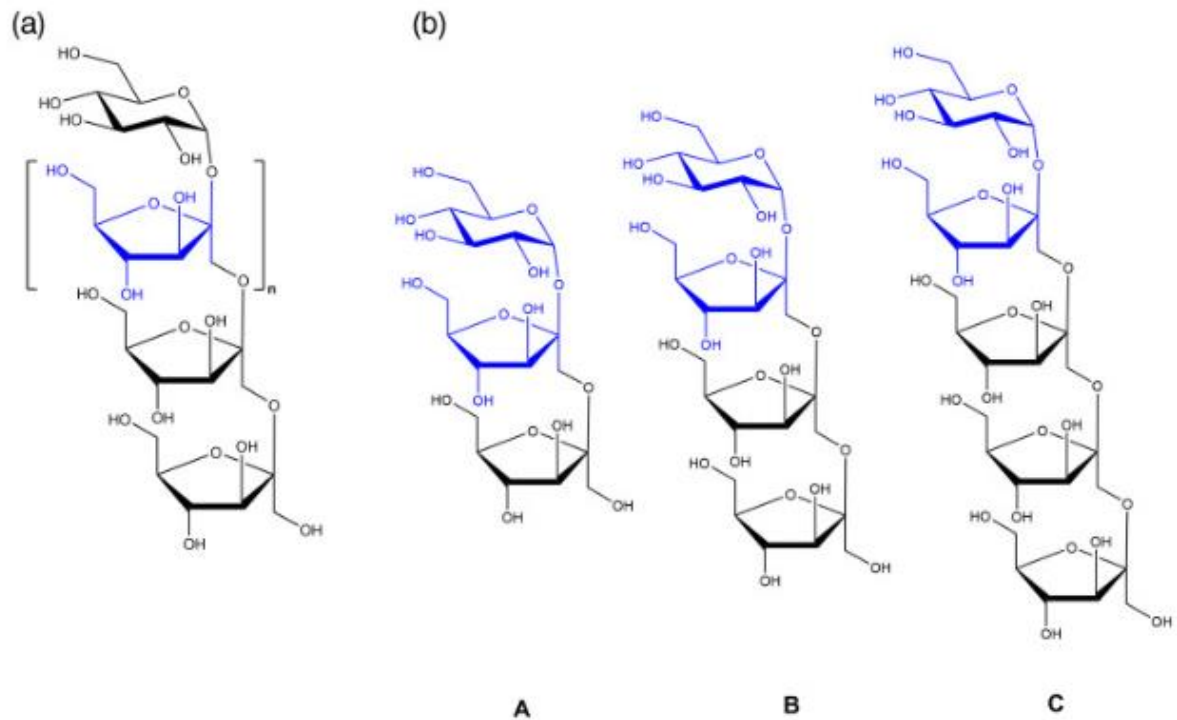
Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (Fructooligosaccharides, FOS) αποτελούν τον πιο κοινό τύπο στην κατηγορία των πρεβιοτικών, τα οποία σε αντίθεση με τα προβιοτικά δεν υπόκεινται σε αλλοιώσεις κατά τη διαδικασία του μαγειρέματος. Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες είναι ολιγοσακχαρίτες που συνδέονται με τη διαδικασία ανάπτυξης των μπιφιδοβακτηρίων (Ibrahim, et al., 2024). Είναι υδατοδιαλυτοί, δύσπεπτοι υδατάνθρακες φυσικής προέλευσης με ελάχιστες θερμίδες και υπάρχουν σε 36.000 είδη φυτών όπως είναι τα κρεμμύδια, το σκόρδο, τα σπαράγγια, οι ντομάτες, οι αγκινάρες, οι μπανάνες, το σιτάρι, αλλά και το μέλι, σε ποικίλες συγκεντρώσεις από 0,1% έως 0,75% (Bhadra, et al., 2022). Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες αποτελούν προϊόν

υψηλής αξίας σε μία ραγδαίως αναπτυσσόμενη αγορά (Ibrahem, et al., 2024). Αρκετά είδη μικροβίων είναι ικανά να παράξουν το ένζυμο φρουκτοσυλτρανσφεράση (FTase) που χρησιμοποιείται για την παραγωγή FOS. Η φρουκτοσυλτρανσφεράση, συνθέτει ενζυματικά FOS διασπώντας πρώτα ένα μόριο σακχαρόζης και στη συνέχεια μεταφέροντας το απελευθερωμένο μόριο φρουκτόζης σε μία μονάδα σακχαρόζης ή σε ένα μόριο ολιγοσακχαρίτη, με αποτέλεσμα την παραγωγή ή την επιμήκυνση μίας βραχείας αλυσίδας FOS. Ωστόσο μόνο ορισμένα εξ αυτών γίνονται αντικείμενο μεταχείρισης από την βιομηχανία σε συνδυασμό με τη σακχαρόζη, που λειτουργεί ως κύριο υπόστρωμα για τη δημιουργία φρουκτοολιγοσακχαριτών (Bhadra, et al., 2022).

Τα πρεβιοτικά δεν οδηγούν στην εμφάνιση νέου μικροβιώματος στο έντερο των ιχθύων, αλλά σύμφωνα με τους Gibson, et al., (2017) δρουν ως «υποστρώματα που χρησιμοποιούνται επιλεκτικά από μικροοργανισμούς-ξενιστές οι οποίοι προσδίδουν όφελος στην υγεία». Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η χρήση φρουκτοολιγοσακχαριτών μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξη και το ανοσοποιητικό σύστημα καθώς επίσης και να προσφέρει αντίσταση σε βακτηριακές λοιμώξεις. Τονώνει τη λειτουργία και την υγεία του εντέρου, βελτιώνοντας την υπερδομή του βλεννογόνου του και ενεργοποιώντας τα βακτήρια που προάγουν την υγεία σε αυτό. Ακόμη επηρεάζουν τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε ολόκληρο το σώμα (Zhou, et al., 2010) . Έχουν την ικανότητα να παραμένουν σταθεροί στις μεταβολές της θερμοκρασίας και του pH (Bhadra, et al., 2022).

Το FOS είναι μία φρουκτάνη που ανήκει στην οικογένεια τις ινουλίνης, η οποία συνιστά μία αδιάλυτη φυτική ίνα που προέρχεται από ορισμένα φυτά (Ibrahem, et al., 2024). Πρόκειται για ολιγομερή της φρουκτόζης με τη μονάδα γλυκόζης να είναι

συνδεδεμένη στην τελική μονάδα της φρουκτόζης, της αλυσίδας της φρουκτάνης μέσω ενός α -1, β -2 γλυκοσιδικού δεσμού. Από αυτό το γεγονός προκύπτει ότι δημιουργείται μία μη αναγωγική τελική ομάδα σακχαρόζης. Η αλυσίδα αποτελείται κυρίως από μονάδες 1-κετόζης, νυστόζης (nystose) και 1- β -φρουκτοφουρανοσυλνυστόζης συνδεδεμένες στην τελική μονάδα σακχαρόζης μέσω ενός β -2,1-γλυκοσιδικού δεσμού. Ωστόσο, ο δεσμός μεταξύ φρουκτοζυλίων είναι είτε β -1,2 είτε β -6,2 με δεσμό β -2,6 που βρίσκεται στις διακλαδισμένες φρουκτάνες. Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες είναι μη αναγωγικά σάκχαρα επειδή η σακχαρόζη στο τέλος της αλυσίδας δεν περιέχει ελεύθερη αλδεϋδη ή κετόνη (Εικ.3) (Bhadra, et al., 2022).



Εικόνα 3. α) Γενική δομή φρουκτοολιγοσακχαριτών β) Δομική διαφορά μεταξύ των τριών κύριων συστατικών των εμπορικών φρουκτοολιγοσακχαριτών: 1-κεστοζη (GF2) (A), νυστόζη (GF3) (B) και φρουκτοφουρανόζυλο νυστόζη (GF4) (C) (Bhadra, et al., 2022)

Έχουν γίνει δοκιμές με φρουκτοολιγοσακχαρίτες σε αρκετά είδη ιχθύων όπως στο χρυσόψαρο (*Carassius auratus*), στο πακού (*Piaractus mesopotamicus*), στο τσιρόνι (*Rutilus rutilus*), στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), στον μονομάχο (*Betta splendens*) και στον κοινό κυπρίνο (*Cyprinus carpio*) (Sepúlveda-Quiroz, et al., 2020).

1.4 Μικροβίωμα

Το μικροβίωμα είναι το σύνολο του γενετικού υλικού, όλων των μικροοργανισμών (κυρίως βακτηρίων, αλλά και ιών και μυκήτων) που ζουν μέσα και πάνω στο σώμα των οργανισμών και είναι μοναδικό για τον καθένα. Οι μικροοργανισμοί εκτός από παθογόνοι, μπορεί να είναι και συμβιωτικοί με τα ψάρια. Αυτοί που ανήκουν στο μικροβίωμα του εντέρου απαρτίζουν το εντερικό μικροβίωμα και συμβάλλουν στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών της τροφής, στη διατήρηση της ομοιόστασης του μεταβολισμού και της ανοσολογικής άμυνας του οργανισμού (Egerton, et al., 2018). Η βιωσιμότητα του εντερικού μικροβιώματος εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων (πρεβιοτικών). Τα πρεβιοτικά διασπώνται από τα ένζυμα των μικροβίων σε αμινοξέα, πολυαμίνες, λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, αντιοξειδωτικά, βιταμίνες και αυξητικούς παράγοντες, τα οποία είναι απαραίτητα για τις λειτουργίες του εντερικού βλεννογόνου. Στο διάστημα των τελευταίων χρόνων, η σημασία του εντερικού μικροβιώματος στην υγεία των ιχθύων και στην προστασία τους από ασθένειες έχει απασχολήσει έντονα την επιστημονική κοινότητα (Buentello, et al., 2010). Σήμερα υπάρχουν πολλές τεχνικές με τις οποίες επιτυγχάνεται η απομόνωση και η μελέτη των μικροοργανισμών που απαρτίζουν το μικροβίωμα του εντέρου των ψαριών (πχ ηλεκτροφόρηση και αλληλουχία επόμενης γενιάς) (Egerton, et al., 2018).

Το εντερικό μικροβίωμα αρχίζει να δημιουργείται από τα προνυμφικά στάδια των ιχθύων και γίνεται όλο και πιο πολύπλοκο με την πάροδο του χρόνου. Στον γαστρεντερικό σωλήνα των ιχθύων έχουν ανιχνευτεί 108 κύτταρα που ανήκουν σε πάνω από 500 είδη βακτηρίων. Τα περισσότερα είναι αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια, ενώ έχουν βρεθεί και ορισμένα αποκλειστικά αναερόβια είδη (Chandni , et al., 2018). Το

μικροβίωμα δεν παραμένει σταθερό και μεταβάλλεται εξαιτίας πολλών διαφορετικών παραγόντων, όπως είναι το περιβάλλον, η διατροφή και το γενετικό υλικό του ξενιστή (Tarnecki, et al., 2017). Σύμφωνα με μελέτες εμφανίζεται ποικιλομορφία στο μικροβίωμα του εντέρου τόσο μεταξύ των ειδών, όσο και μεταξύ του ίδιου είδους. Αυτό οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως τα στάδια της ζωής, η διατροφή και το τροφικό επίπεδο, η εποχή, το ενδιαίτημα, το φύλο και τη φυλογένεση και το εάν βρίσκονται σε κατάσταση αιχμαλωσίας. Ειδικότερα, η διατροφή των ιχθύων καθορίζει σημαντικά τη διαμόρφωση του μικροβιώματος του εντέρου από την πρώτη κιόλας σίτιση. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ποικιλομορφία του μικροβιώματος αυτού, αυξάνεται καθώς αναπτύσσονται τα ψάρια. Η ανταπόκριση των μικροοργανισμών του μικροβιώματος του εντέρου στους φρουκτοολιγοσακχαρίτες, εξαρτάται από τη χορηγηθείσα δόση συμπληρωματικά με την ηλικία των ιχθύων, το είδος και τις συνθήκες της καλλιέργειας (Egerton, et al., 2018).

Στο μικροβίωμα των ιχθύων συναντάται ποικιλία μικροοργανισμών, όπως πρώτιστα, μύκητες, ζυμομύκητες, αρχαία, ιοί και βακτήρια. Ωστόσο, το κυρίαρχο είδος στο έντερο είναι τα βακτήρια (Egerton, et al., 2018). Υπάρχει μικρή ποικιλία όσον αφορά στα φύλα που απαρτίζουν το μικροβίωμα του εντέρου. Το 90% του εντερικού μικροβιώματος των ιχθύων απαρτίζεται από Proteobacteria, Firmicutes και Bacteroidetes, ενώ σε ορισμένα είδη παρατηρούνται και τα φύλα Fusobacteria, Actinobacteria και Verrucomicrobia. Τα φυτοφάγα είδη έχουν μεγαλύτερη ποικιλομορφία στο εντερικό μικροβίωμα σε σχέση με τα παμφάγα και τα σαρκοφάγα είδη. Τα σαρκοφάγα είδη έχουν βακτήρια που είναι ικανά να παράξουν λιπάση και πρωτεάση, όπως είναι το Halomonas. Συγγενικά είδη που βρίσκονται στον ίδιο βιότοπο, αλλά έχουν διαφορετικές διατροφικές συνήθειες, εμφανίζουν επίσης διαφορετικό εντερικό μικροβίωμα (Chandni, et al., 2018). Το μικροβίωμα διαφοροποιείται ανά

έκαστο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα και διακρίνεται σε αυτόχθονες πληθυσμούς που αποτελούν τους μόνιμους και σε αλλόχθονες οι οποίοι απαρτίζουν τους ελεύθερους παροδικούς πληθυσμούς που σχετίζονται με την πέψη (Egerton, et al., 2018). Αξίζει να σημειωθεί πως η σύνθεση και η λειτουργία του μικροβιώματος του εντέρου συμβάλλει σημαντικά στην ευημερία των ιχθύων (Buentello, et al., 2010).

Στα ψάρια του αλμυρού νερού παρατηρούνται κυρίως τα είδη *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* και *Vibrio* (Chandni, et al., 2018). Οι de Paula Silva, et al., (2011) εντόπισαν ως κύρια φύλα στο στομάχι της τσιπούρας (*Sparus aurata*) τα Firmicutes, Proteobacteria και Bacteroidetes. Αργότερα σε μελέτη που διεξάχθηκε από τους Estruch, et al., (2015) τα κύρια φύλα διαπιστώθηκε ότι ήταν τα Firmicutes, Proteobacteria και Actinobacteria. Και στις δύο έρευνες η κυρίαρχη οικογένεια ήταν το Vibrionaceae του γένους *Photobacterium*.

1.5 Σκοπός

Οι μελέτες που έχουν διεξαχθεί σχετικά με τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες και την επίδρασή τους στο εντερικό μικροβίωμα των ιχθύων είναι ελάχιστες. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να μελετηθεί η επίδραση 6 διαφορετικών αραιώσεων των FOS σε θρεπτικό R2A, που εξετάστηκαν στα καλλιεργήσιμα βακτήρια κοπράνων της τσιπούρας. Μελετήθηκε η συγκέντρωση των φρουκτοολιγοσακχαριτών που προκαλεί καλύτερη ανάπτυξη στα βακτήρια του εντερικού μικροβιώματος και έγινε σύγκριση με την ανάπτυξη βακτηρίων κοπράνων τσιπούρας που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό R2A χωρίς προσθήκη FOS.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δημιουργία θρεπτικών

2.1.1 Θρεπτικό Α: R2A + FOS (full strength)

Η δόσολογία του R2A ήταν 3,24 γραμμάρια στο 1 λίτρο απιονισμένου νερού. Για το πείραμα χρειάστηκαν 100 ml απιονισμένου νερού και 0,324 gr R2A. Στο ζυγό ακριβείας μετρήθηκαν 0,372 gr R2A. Στο δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκαν 115 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, το R2A και το νερό τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Τοποθετήθηκε μαγνητάκι στη φιάλη και έγινε ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το R2A. Τέλος αφαιρέθηκαν 3,5 ml θρεπτικού και προστέθηκαν 3,5 ml FOS.

2.1.2 Θρεπτικό Β: R2A (1/10) + FOS

Στο ζυγό ακριβείας μετρήθηκαν 0,032 gr R2A και τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml μαζί με 100 ml απιονισμένο νερό. Τοποθετήθηκε μαγνητάκι στη φιάλη και έγινε ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το R2A. Τέλος αφαιρέθηκαν 0,032 ml R2A και προστέθηκαν 0,032 ml FOS με αρχική συγκέντρωση 1,5% (w/v).

2.2 Αποστείρωση

Στο αυτόκαυστο (Steam sterilizer trade raypa) στους 121°C και 2 bar πίεση, αποστειρώθηκαν για 15 λεπτά τα 2 θρεπτικά και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο

ψυγείο, για να κρυώσουν. Έπειτα αποστειρώθηκαν για 20 λεπτά οι πιπέτες και τα 42 φιαλίδια με τα καπάκια τους.

2.3 Ετοιμασία εμβολίου

Κόπρανα τσιπούρας (*Sparus aurata*) σε νερό αναδεύτηκαν στο vortex (MS2 Minishaker) για να διαλυθούν. Το δείγμα έμεινε για 1 ώρα, ώστε να κατακαθίσει το ίζημα, και έπειτα χρησιμοποιήθηκε το υπερκείμενο υγρό. Η διαδικασία για τη δημιουργία του εμβολίου πραγματοποιήθηκε δίπλα στον λίκνο Bunsen, για να είναι αποστειρωμένες οι συνθήκες. Χρειάστηκαν 1,5 ml εμβολίου για κάθε ένα από τα θρεπτικά άρα 3 ml εμβόλιο για την κάθε ομάδα (σύνολο 6 ml). Για περισσότερη ασφάλεια παράχθηκαν 8 ml.

Με μία λαβίδα, που απολυμάνθηκε στον λίκνο Bunsen, πιάστηκαν 8 tubes και έπειτα με πιστόλι πιπέτα γεμίστηκαν με το υπερκείμενο υγρό του δείγματος των κοπράνων, μέχρι την γραμμή 2 που αναγράφεται πάνω σε κάθε tube. Στη συνέχεια τα 8 tubes φυγοκεντρήθηκαν για 30 δευτερόλεπτα και έπειτα λήφθηκε το υπερκείμενο υγρό με πιπέτα, χωρίς να συλλεχθεί το συσσωμάτωμα που είχε δημιουργηθεί, τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναδεύτηκε στο vortex.

2.4 Εμβολιασμός της καλλιέργειας και διαδοχικές αραιώσεις

Για κάθε θρεπτικό χρησιμοποιήθηκαν 3 μάρτυρες και πραγματοποιήθηκαν 6 διαδοχικές αραιώσεις με τρεις επαναλήψεις η κάθε μία (επαναλήψεις a, b, c). Για την κάθε αραιώση χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά χρώματα στα καπάκια των φιαλιδίων

(Πιν.1). Συνολικά σε κάθε μεταχείριση (T1: R2A+FOS full strength, T2: R2A (1/10)+FOS) χρησιμοποιήθηκαν 21 φιαλίδια.

Πίνακας 1. Επεξήγηση των χρωμάτων στα καπάκια των φιαλιδίων, για τον διαχωρισμό των διαδοχικών αραιώσεων.

Αραίωση	Χρώμα
Μάρτυρες	Αλουμινόχαρτο
10^{-1}	Γκρι
10^{-2}	Τιρκουάζ
10^{-3}	Κόκκινο
10^{-4}	Πράσινο
10^{-5}	Γαλάζιο
10^{-6}	Μπλε

Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 ml τοποθετήθηκαν 13,5 ml θρεπτικού R2A –FOS και 1,5 ml εμβολίου. Σε κάθε μάρτυρα προστέθηκαν με πιπέτα 4,5 ml θρεπτικού. Επίσης, τοποθετήθηκαν 4,5 ml θρεπτικού σε όλα τα φιαλίδια εκτός από τα τρία με την αραιώση 10^{-1} , στα οποία προστέθηκαν 5ml θρεπτικού από τον σωλήνα των 15 ml. Με τη βοήθεια πιπέτας ελήφθησαν 0,5 ml δείγματος από το 1^ο φιαλίδιο (a) της αραιώσης 10^{-1} και εμβολιάστηκε το 1^ο φιαλίδιο (a) της αραιώσης 10^{-2} . Με την πιπέτα αναδεύτηκε 3-4 φορές το δείγμα και έπειτα ελήφθησαν από το ίδιο φιαλίδιο 0,5 ml και τοποθετήθηκαν στο 1^ο φιαλίδιο (a) της αραιώσης 10^{-3} . Η διαδικασία συνεχίστηκε μέχρι το 1^ο φιαλίδιο (a) της αραιώσης 10^{-6} . Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και για τις επαναλήψεις b, c με

διαφορετικό tip πιπέτας για την κάθε επανάληψη. Η ώρα εμβολιασμού για το θρεπτικό R2A-FOS ήταν 14:40. Για το θρεπτικό R2A (1/10)-FOS τοποθετήθηκαν 13,5 ml θρεπτικού R2A(1/10)-FOS και 1,5 ml εμβολίου σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 ml.. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία εμβολιασμού και διαδοχικών αραιώσεων με προηγούμενο θρεπτικό. Η ώρα εμβολιασμού για το θρεπτικό R2A (1/10)-FOS ήταν 15:55. Τέλος, τα φιαλίδια, αφού ανοίχθηκαν ελαφρώς ώστε να περνάει αέρας στο εσωτερικό, καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο, για να μην φύγουν τα καπάκια, και τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα (Daihan Labtech C0 LTD shaking incubator) στους 21°C.

2.5 Μέτρηση οπτικών πυκνοτήτων και επεξεργασία δεδομένων

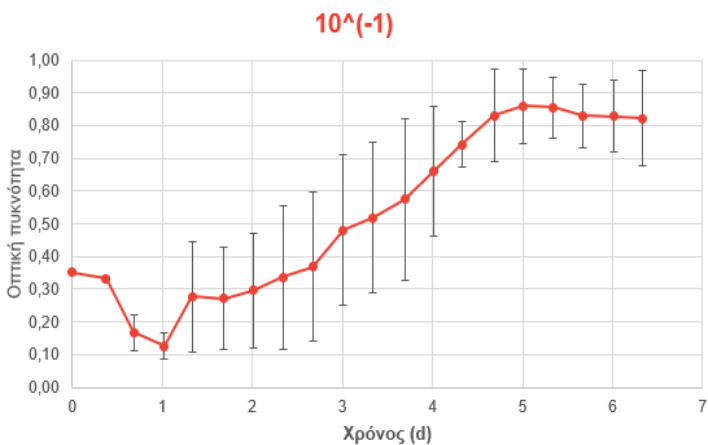
Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν 3 φορές την ημέρα σε συγκεκριμένες ώρες ανά οκτάωρο (στις 8:00, 16:00, 00:00), με τη χρήση φασματοφωτομέτρου (Hach Lange DR 3900). Πριν από τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της κάθε διαδοχικής αραιώσης μηδενιζόταν το φασματοφωτόμετρο με τη χρήση ενός εκ των τριών μαρτύρων. Ο μηδενισμός γινόταν με τον αντίστοιχο μάρτυρα της κάθε μεταχείρισης. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 20 μετρήσεις για κάθε μεταχείριση (T1 και T2) με έναρξη του πειράματος στις 5 Ιουλίου 2021 και λήξη στις 11 Ιουλίου 2021. Οι μετρήσεις περάστηκαν σε υπολογιστικό φύλλο excel για την εξαγωγή διαγραμμάτων. Η στατιστική επεξεργασία των T1, T2 και της μεταχείρισης R2A full strength (T3) του πειράματος που διεξήχθη παράλληλα με το παρόν πείραμα πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα jamovi 2.2.2.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

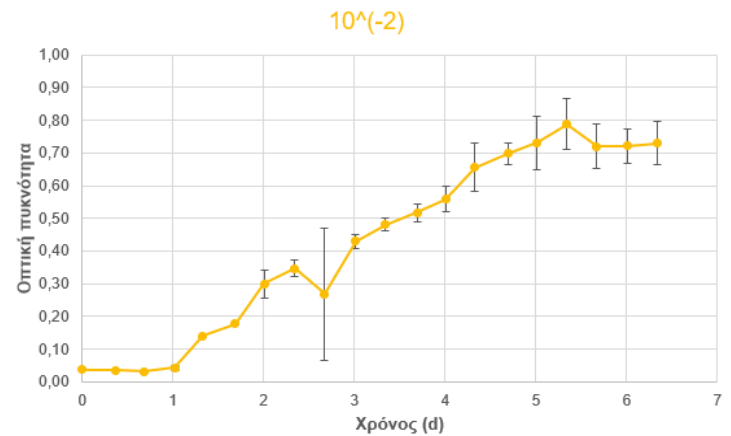
3.1 Γραφήματα

3.1.1 Μεταχείριση 1

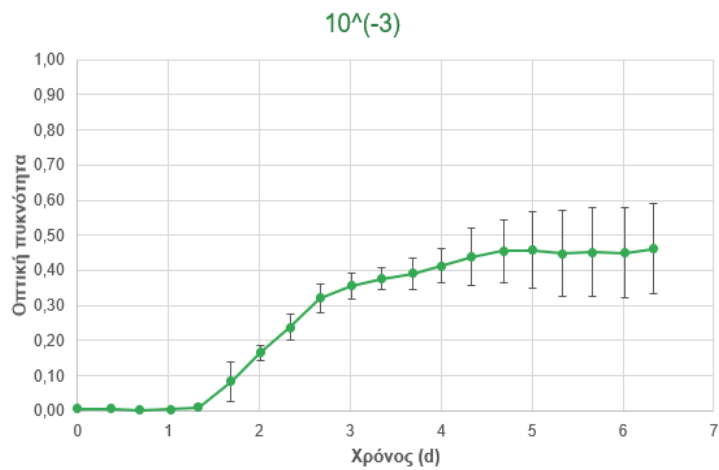
Παρακάτω απεικονίζονται τα διαγράμματα των οπτικών πυκνοτήτων σε συνάρτηση με τον χρόνο (ανά ημέρα), του T1 για κάθε διαδοχική αραιώση.



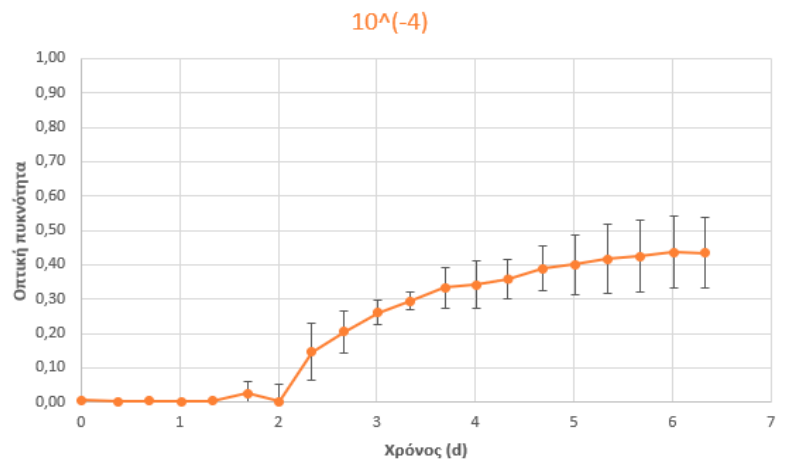
Γράφημα 1. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στην πρώτη διαδοχική αραιώση του T1.



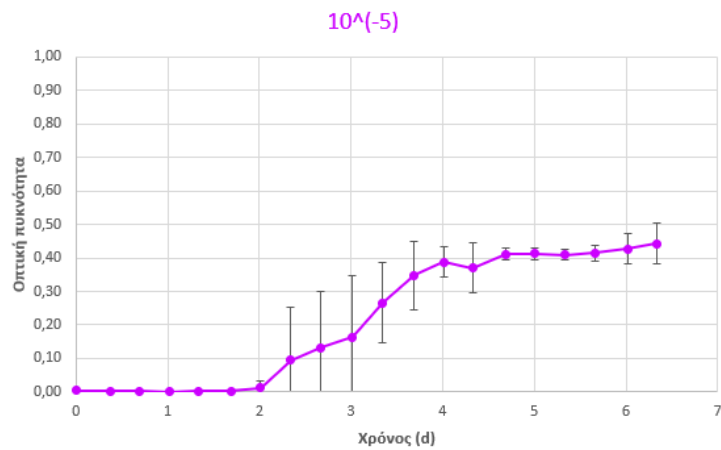
Γράφημα 2. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στην δεύτερη διαδοχική αραιώση του T1.



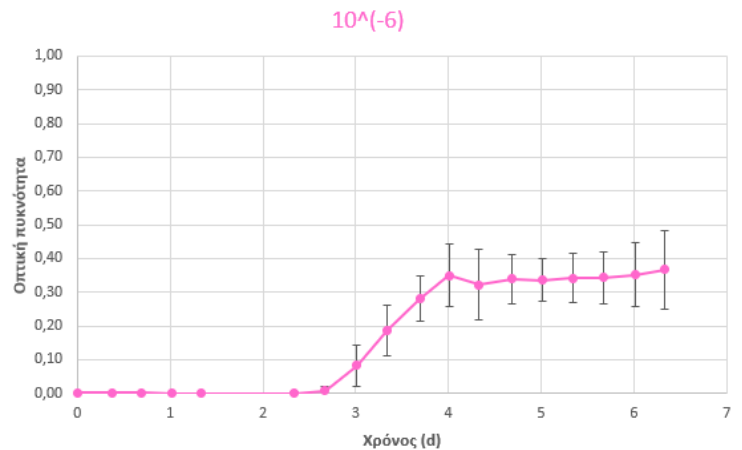
Γράφημα 3. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στην τρίτη διαδοχική αραίωση του T1.



Γράφημα 4. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στην τέταρτη διαδοχική αραίωση του T1.



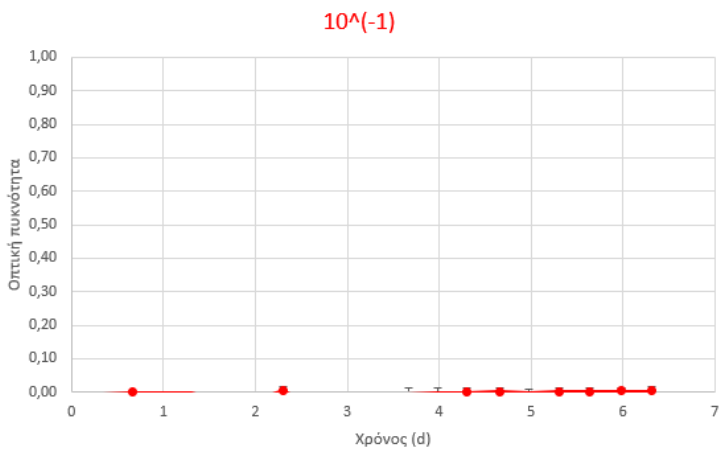
Γράφημα 5. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στην πέμπτη διαδοχική αραίωση του T1.



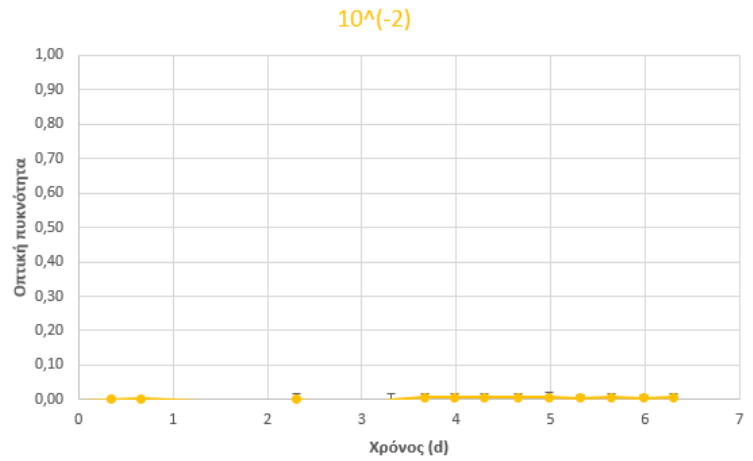
Γράφημα 6. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στην έκτη διαδοχική αραίωση του T1.

3.1.2 Μεταχείριση 2

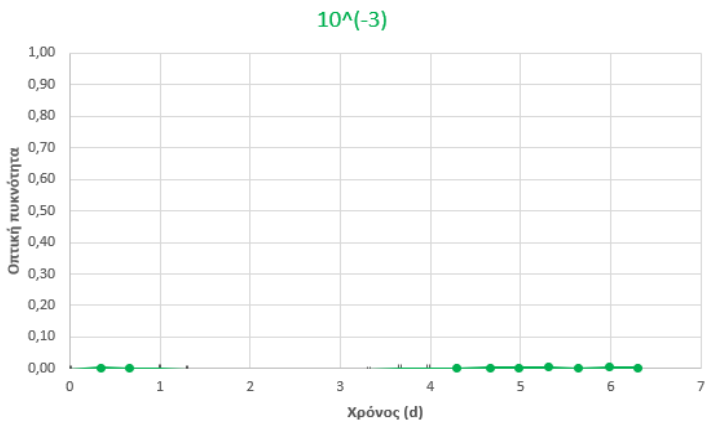
Παρακάτω απεικονίζονται τα διαγράμματα των οπτικών πυκνοτήτων σε συνάρτηση με τον χρόνο (ανά ημέρα), του T2 για κάθε διαδοχική αραίωση.



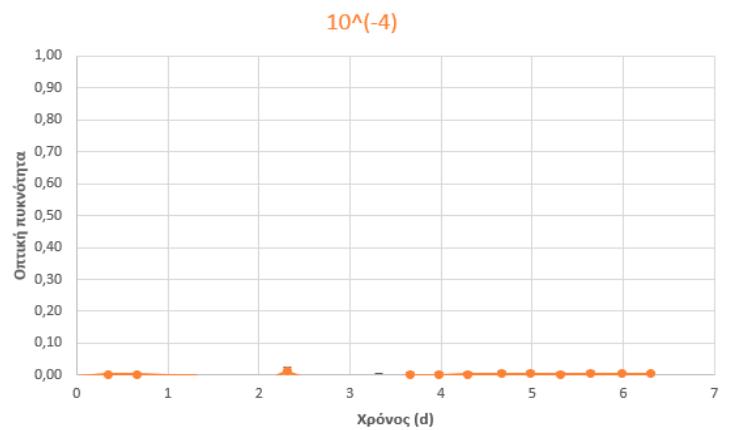
Γράφημα 7. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στην πρώτη διαδοχική αραιώση του T2.



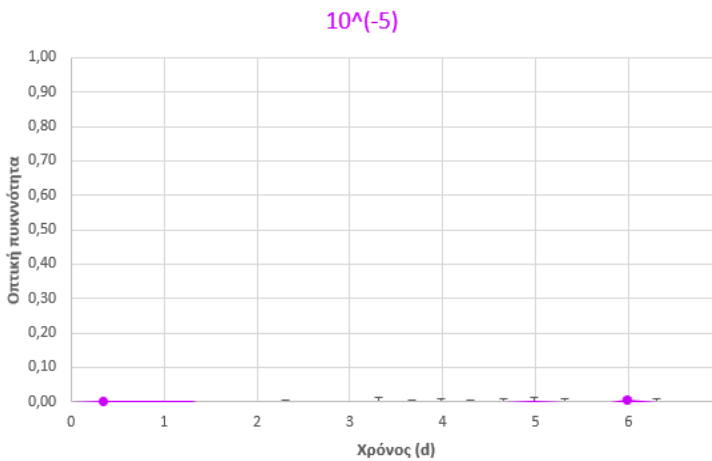
Γράφημα 8. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στη δεύτερη διαδοχική αραιώση του T2.



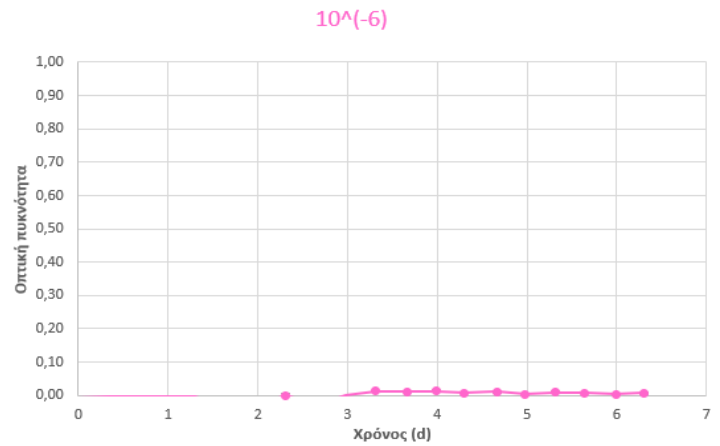
Γράφημα 9. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στην τρίτη διαδοχική αραιώση του T2.



Γράφημα 10. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στην τέταρτη διαδοχική αραιώση του T2.



Γράφημα 11. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στην πέμπτη διαδοχική αραιώση του T2.



Γράφημα 12. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στην έκτη διαδοχική αραιώση του T2.

Στο T1 παρατηρήθηκε ότι στα βακτήρια της αραιώσης 10^{-1} (Γρ.1), η φάση προσαρμογής διήρκησε 1 ημέρα (24 ώρες) και η εκθετική φάση ξεκίνησε τη δεύτερη μέρα του πειράματος και διήρκησε 3,7 ημέρες (88 ώρες). Στα βακτήρια της αραιώσης 10^{-2} (Γρ.2), η φάση προσαρμογής διήρκησε 1 ημέρα (24 ώρες) και η εκθετική φάση ξεκίνησε τη δεύτερη μέρα και διήρκησε 4,3 ημέρες (104 ώρες). Στα βακτήρια της αραιώσης 10^{-3} (Γρ.3), η φάση προσαρμογής διήρκησε περίπου 1 ημέρα (32 ώρες) και η εκθετική φάση ξεκίνησε τη δεύτερη μέρα και διήρκησε 3,3 ημέρες (80 ώρες). Στα βακτήρια της αραιώσης 10^{-4} (Γρ.4), η φάση προσαρμογής διήρκησε 2 ημέρες (48 ώρες) και η εκθετική φάση ξεκίνησε τη δεύτερη μέρα και διήρκησε 3 μέρες (72 ώρες). Στα βακτήρια της αραιώσης 10^{-5} (Γρ.5), η φάση προσαρμογής διήρκησε 2 ημέρες (48 ώρες), η εκθετική φάση ξεκίνησε τη δεύτερη ημέρα και διήρκησε 2 ημέρες (48 ώρες). Στα βακτήρια της αραιώσης 10^{-6} (Γρ.6), η φάση προσαρμογής διήρκησε 2,7 ημέρες (64 ώρες)

και η εκθετική φάση ξεκίνησε περίπου την τρίτη ημέρα και διήρκησε 1,3 ημέρες (32 ώρες).

Η μεγαλύτερη εκθετική φάση παρατηρήθηκε στην 10^{-2} αραιώση (104 ώρες) και η μικρότερη στην 10^{-6} αραιώση (32 ώρες). Η μικρότερη φάση προσαρμογής παρατηρήθηκε στις αραιώσεις 10^{-1} και 10^{-2} (24 ώρες) και η μεγαλύτερη στην αραιώση 10^{-6} (64 ώρες).

Όσον αφορά στο μέγιστο τάχος αύξησης, σύμφωνα με τον πίνακα 2, η αραιώση 10^{-1} εμφάνισε το μικρότερο (0,515) και η 10^{-6} το μεγαλύτερο (2,733).

Στο T2 δεν παρατηρήθηκε αύξηση σε καμία από της διαδοχικές αραιώσεις, όπως φαίνεται και στα γραφήματα 7-12.

3.2 Μέγιστο τάχος αύξησης

Το μέγιστο τάχος αύξησης υπολογίστηκε με τον τύπο $\mu_{\max} = [\ln(x_2) - \ln(x_1)] / (t_2 - t_1)$

Πίνακας 2. Τάχος αύξησης (μ_{\max}), των διαδοχικών αραιώσεων του T1 (full strength).

Μέγιστο τάχος αύξησης μ_{\max}	
10^{-1}	0,515
10^{-2}	0,677
10^{-3}	1,136
10^{-4}	1,505
10^{-5}	1,712
10^{-6}	2,733

3.3 Στατιστικές συγκρίσεις οπτικών πυκνοτήτων

Πίνακας 3. Στατιστική σύγκριση των οπτικών πυκνοτήτων, των διαδοχικών αραιώσεων του T1 (full strength).

p		T1					
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
T1	10^{-1}		0,160	0,010**	0,002**	0,002**	<0,001***
	10^{-2}			0,056	0,011**	0,008**	0,002**
	10^{-3}				0,130	0,117	0,006**
	10^{-4}					0,818	0,074
	10^{-5}						0,072
	10^{-6}						

* : Απεικονίζονται οι τιμές που είναι μικρότερες/ίσες από 0,05

** : Απεικονίζονται οι τιμές που είναι μικρότερες/ίσες από 0,02

*** : Απεικονίζονται οι τιμές που είναι μικρότερες/ίσες από 0,001

Πίνακας 4. Στατιστική σύγκριση των οπτικών πυκνοτήτων, των διαδοχικών αραιώσεων του T2 (1/10).

p		T2					
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
T2	10^{-1}		0,113	0,989	0,365	0,060	0,099
	10^{-2}			0,110	0,337	0,004**	0,417
	10^{-3}				0,310	0,034*	0,152
	10^{-4}					0,010**	0,350
	10^{-5}						0,003**
	10^{-6}						

* : Απεικονίζονται οι τιμές που είναι μικρότερες/ίσες από 0,05

** : Απεικονίζονται οι τιμές που είναι μικρότερες/ίσες από 0,02

*** : Απεικονίζονται οι τιμές που είναι μικρότερες/ίσες από 0,001

Πίνακας 5. Στατιστική σύγκριση των οπτικών πυκνοτήτων, των διαδοχικών αραιώσεων μεταξύ των T1 (full strength) και T2 (1/10).

p		T2					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
T1	10 ⁻¹	<0,001***					
	10 ⁻²		<0,001***				
	10 ⁻³			<0,001***			
	10 ⁻⁴				<0,001***		
	10 ⁻⁵					<0,001***	
	10 ⁻⁶						0,002**

* : Απεικονίζονται οι τιμές που είναι μικρότερες/ίσες από 0,05

** : Απεικονίζονται οι τιμές που είναι μικρότερες/ίσες από 0,02

*** : Απεικονίζονται οι τιμές που είναι μικρότερες/ίσες από 0,001

Πίνακας 6. Στατιστική σύγκριση των οπτικών πυκνοτήτων, των εκθετικών φάσεων, των διαδοχικών αραιώσεων του T1 (full strength).

p		T1					
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
T1	10 ⁻¹		0,837	0,134	0,069	0,017**	0,027*
	10 ⁻²			0,134	0,084	0,025*	0,056
	10 ⁻³				0,468	0,179	0,115
	10 ⁻⁴					0,315	0,254
	10 ⁻⁵						0,876
	10 ⁻⁶						

* : Απεικονίζονται οι τιμές που είναι μικρότερες/ίσες από 0,05

** : Απεικονίζονται οι τιμές που είναι μικρότερες/ίσες από 0,02

*** : Απεικονίζονται οι τιμές που είναι μικρότερες/ίσες από 0,001

Πίνακας 7. Στατιστική σύγκριση των οπτικών πυκνοτήτων, των διαδοχικών αραιώσεων μεταξύ των T1 (full strength) και T3 (full strength).

p		T1					
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
T3	10^{-1}	0,429					
	10^{-2}		0,698				
	10^{-3}			0,640			
	10^{-4}				0,675		
	10^{-5}					0,185	
	10^{-6}						0,695

Πίνακας 8. Στατιστική σύγκριση των οπτικών πυκνοτήτων, των εκθετικών φάσεων, των διαδοχικών αραιώσεων των T1 (full strength) και T3 (full strength).

p		T1					
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
T3	10^{-1}	0,340					
	10^{-2}		0,899				
	10^{-3}			0,776			
	10^{-4}				0,230		
	10^{-5}					0,596	
	10^{-6}						0,075

Θεωρήθηκε ως H_0 υπόθεση ότι οι διαδοχικές αραιώσεις δεν διαφέρουν μεταξύ τους και ως H_1 υπόθεση ότι οι διαδοχικές αραιώσεις διαφέρουν μεταξύ τους. Από τη στατιστική σύγκριση παρατηρήθηκε ότι στο T1 (Πιν.3) οι διαδοχικές αραιώσεις $10^{-3} - 10^{-1}$, $10^{-4} - 10^{-1}$, $10^{-4} - 10^{-2}$, $10^{-5} - 10^{-1}$, $10^{-5} - 10^{-2}$, $10^{-6} - 10^{-1}$, $10^{-6} - 10^{-2}$ και $10^{-6} - 10^{-3}$ εμφανίζουν $p < 0,05$, άρα ισχύει η H_1 υπόθεση, οπότε έχουν στατιστικές διαφορές, ενώ όλες οι υπόλοιπες έχουν $p > 0,05$ άρα ισχύει η υπόθεση H_0 . Συνεπώς, δεν έχουν στατιστικές διαφορές.

Από τη στατιστική σύγκριση παρατηρήθηκε ότι στο T2 (Πιν.4) οι διαδοχικές αραιώσεις $10^{-5} - 10^{-2}$, $10^{-5} - 10^{-3}$, $10^{-5} - 10^{-4}$ και $10^{-6} - 10^{-5}$ έχουν $p < 0,05$, άρα ισχύει η H_1 υπόθεση, οπότε έχουν στατιστικές διαφορές, ενώ όλες οι υπόλοιπες έχουν $p > 0,05$ άρα ισχύει η υπόθεση H_0 . Συνεπώς, δεν εμφανίζουν στατιστικές διαφορές.

Από τη στατιστική σύγκριση των T1 και T2 (Πιν.5) παρατηρήθηκε ότι όλες οι διαδοχικές αραιώσεις εμφανίζουν $p < 0,05$, άρα ισχύει η H_1 υπόθεση, οπότε έχουν στατιστικές διαφορές.

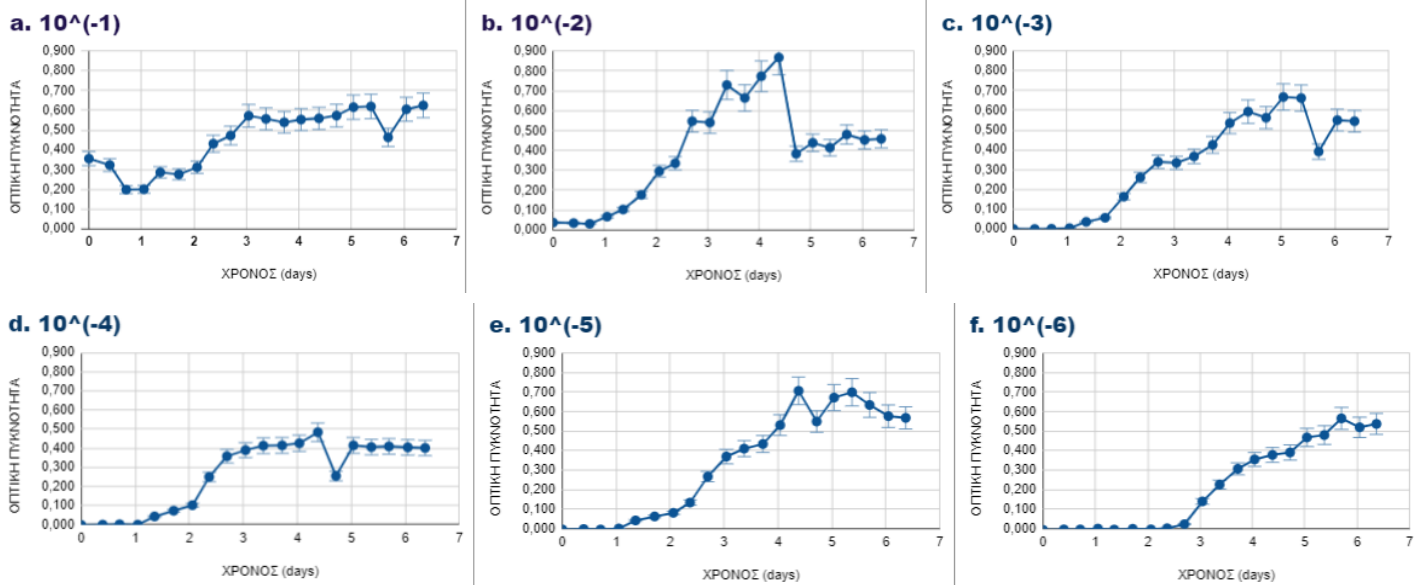
Από τη στατιστική σύγκριση των εκθετικών φάσεων του T1 (Πιν.6) παρατηρήθηκε ότι οι διαδοχικές αραιώσεις $10^{-5} - 10^{-1}$, $10^{-5} - 10^{-2}$ και $10^{-6} - 10^{-1}$, εμφανίζουν $p < 0,05$, άρα ισχύει η H_1 υπόθεση, οπότε έχουν στατιστικές διαφορές, ενώ όλες οι υπόλοιπες έχουν $p > 0,05$ άρα ισχύει η υπόθεση H_0 . Συνεπώς δεν εμφανίζουν στατιστικές διαφορές.

Από τη στατιστική σύγκριση των T1 και T3 (Πιν.7) παρατηρήθηκε ότι όλες οι διαδοχικές αραιώσεις έχουν τιμές $p > 0,05$ άρα ισχύει η υπόθεση H_0 , συνεπώς δεν εμφανίζουν στατιστικές διαφορές. Τέλος το ίδιο ισχύει και για τη στατιστική σύγκριση των εκθετικών φάσεων των T1 και T3 (Πιν.8).

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Παρατηρείται ότι στην παρούσα έρευνα η καλλιέργεια με R2A-FOS full strength ευνόησε την ανάπτυξη των καλλιεργήσιμων βακτηρίων των κοπράνων της τσιπούρας, ενώ στην καλλιέργεια με R2A-FOS 1/10 τα βακτήρια δεν αναπτύχθηκαν καθόλου. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι σε μικρές συγκεντρώσεις θρεπτικού R2A η παρουσία των φρουκτοολιγοσακχαριτών δεν είναι ικανή να συμβάλλει στην ανάπτυξη των βακτηρίων. Συγκρίνοντας τα γραφήματα της καλλιέργειας T1 (Γρ.1 - 6) με έρευνα που διεξήχθη

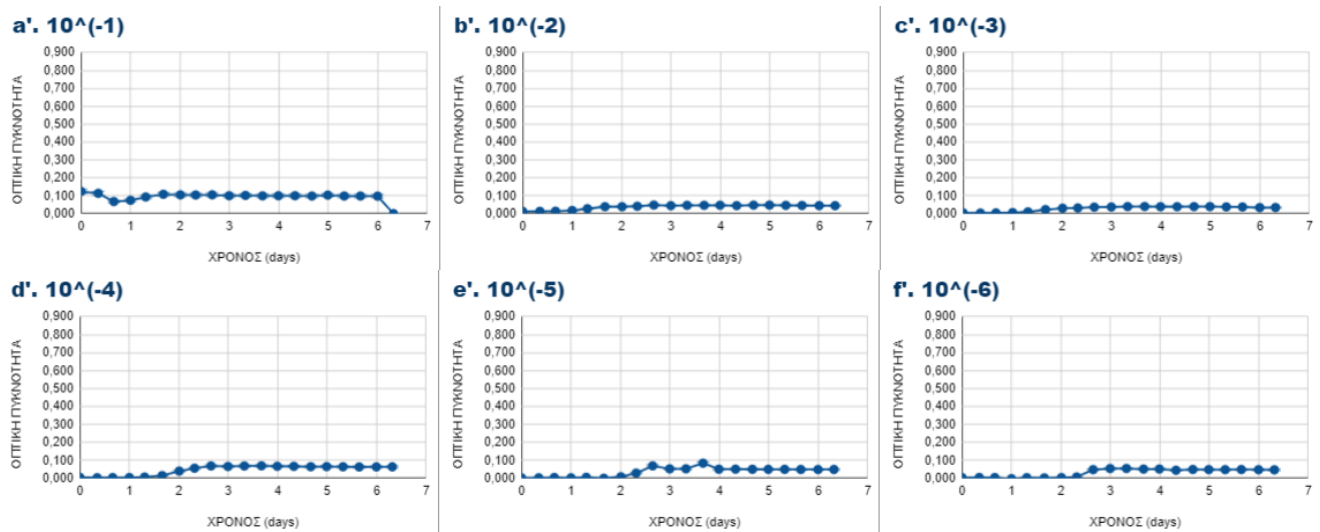
παράλληλα -καλλιέργεια T3 (Εικ. 4)- σημειώνεται ότι η ανάπτυξη των βακτηρίων στις περισσότερες περιπτώσεις ήταν μεγαλύτερη στην T3 από ότι στην καλλιέργεια T1, με εξαίρεση την αραιώση 10^{-1} που εμφανίζεται μεγαλύτερη στην καλλιέργεια T1 (Γρ.1).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στις διαδοχικές αραιώσεις $10^{-1} - 10^{-6}$ διαδοχική αραιώση του T3 (R2A full strength). (Κάπα & Χιωτέλη, 2022)

Αναλύοντας τη στατιστική σύγκριση των οπτικών πυκνοτήτων στις καλλιέργειες T1 και T3 (Πιν.7 και 8), φαίνεται ότι η ανάπτυξη των βακτηρίων και στις δύο περιπτώσεις δε διαφέρει σημαντικά. Οπότε, αποδεικνύεται ότι η συγκέντρωση του FOS σε συνδυασμό με το θρεπτικό R2A στις συγκεκριμένες ποσότητες και αραιώσεις επιφέρει τα ίδια αποτελέσματα στην ανάπτυξη των καλλιεργήσιμων βακτηρίων με την αποκλειστική χρήση R2A.

Από τα διαγράμματα της καλλιέργειας T2 (Γρ.7 έως 12) παρατηρείται μηδενική αύξηση των βακτηρίων, άρα το FOS σε συνδυασμό με τη συγκεκριμένη αραιώση R2A (1/10), λειτουργεί ως περιοριστικός παράγοντας. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αυτά της παράλληλης έρευνας, στην καλλιέργεια T4 (R2A 1/10) (Εικ.5), διαπιστώνεται ότι τα βακτήρια της T4 καλλιέργειας αναπτύχθηκαν ελάχιστα. Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι το FOS αποτελεί όντως περιοριστικό παράγοντα, ενώ παράλληλα η ανάπτυξη των βακτηρίων δεν ευνοείται και από την 1/10 συγκέντρωση του θρεπτικού R2A.



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής πυκνότητας των βακτηρίων (άξονας y) σε σχέση με τον χρόνο (ανά ημέρα) (άξονας x), στις διαδοχικές αραιώσεις $10^{-1} - 10^{-6}$ διαδοχική αραιώση του T4 (R2A 1/10) (Κάππα & Χιωτέλη, 2022)

Όταν νεαρά ιχθύδια τσιπούρας εκτρεφόμενα σε δύο θερμοκρασίες, τράφηκαν με 4 δίαιτες οι οποίες περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις φρουκτοολιγοσακχαριτών βραχείας αλυσίδας, (0%, 0,1%, 0,25% και 0,5%) αποδείχθηκε ότι το μέγεθος και η

ποικιλομορφία του εντερικού μικροβιώματος παρέμειναν ανεπηρέαστα (Guerreiro, et al., 2016). Επίσης, κατά τη χορήγηση διαίτας εμπλουτισμένης με 10g/kg FOS βραχείας αλυσίδας σε σαργούς (*Diplodus sargus*), δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στο μικροβίωμα του εντέρου (Guerreiro, et al., 2018). Ωστόσο, πειραματική έρευνα στο λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) έδειξε ότι διαίτα που περιείχε 1% FOS βραχείας αλυσίδας ευνόησε την ανάπτυξη των βακτηρίων του εντερικού μικροβιώματος (Guerreiro, et al., 2017).

Επίσης, σε άτομα σολομού (*Salmo salar*) βρέθηκε ότι ο αριθμός των βακτηρίων της γαστρεντερικής οδού ήταν υψηλότερος κατά τη χορήγηση απλής ιχθυοτροφής, σε σύγκριση με ιχθυοτροφή εμπλουτισμένη με φρουκτοολιγοσακχαρίτες βραχείας αλυσίδας (7k/kg) και προβιοτικά (Abid, et al., 2013)

Σύμφωνα με τους Hoseinifar, et al., (2014) στον γόνο του κοινού κυπρίνου (*Cyprinus carpio*), τα επίπεδα των συνολικών ετερότροφων αυτόχθων βακτηρίων του εντερικού μικροβιώματος ήταν υψηλότερα σε όλες τις δίαιτες που περιείχαν FOS και κυρίως σε αυτές με περιεκτικότητα 2% και 3%, από ότι στη διαίτα ελέγχου. Όσον αφορά στα βακτήρια γαλακτικού οξέος, αυτά αναπτύχθηκαν μόνο στις δίαιτες που περιείχαν 2% και 3% FOS. Ακόμη σε λάρβες κοινού κυπρίνου (*Cyprinus carpio*) που τράφηκαν με διαίτα ελέγχου (0%) ή δίαιτες που περιείχαν 0,5% και 1% FOS βραχείας αλυσίδας για 7 εβδομάδες, παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στα ετερότροφα αερόβια βακτήρια του εντερικού μικροβιώματος. Απεναντίας, τα επίπεδα των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος ήταν σημαντικά αυξημένα μετά από 7 εβδομάδες σίτισης με FOS βραχείας αλυσίδας (Hoseinifar, et al., 2016).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Hahor, et al. (2019) σε ένα υβρίδιο γατόψαρου, διασταύρωση του *Pangasianodon gigas* με το *Pangasianodon*

hyrophthalmus αποδείχθηκε ότι η χορήγηση τροφής εμπλουτισμένης με φρουκτοολιγοσακχαρίτες (0,6%), δεν ήταν τόσο αποτελεσματική στην αύξηση των βακτηρίων γαλακτικού οξέος του μικροβιώματος του εντέρου, σε σχέση με τη χορήγηση ιχθυοτροφής εμπλουτισμένης με ξυλοολιγοσακχαρίτες.

Σε ένα πείραμα εξετράφησαν άτομα έναστρου οξύρρυγχου (*Acipenser stellatus*) με δίαιτες που περιείχαν 1% και 2% FOS. Διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση των ετερότροφων αερόβιων βακτηρίων και των βακίλων γαλακτικού οξέος ήταν μεγαλύτερη στα άτομα που σιτίστηκαν με δίαιτα που περιείχε 1% FOS από ότι σε αυτά που τράφηκαν με 2% FOS ή με δίαιτα ελέγχου. Επίσης, το ποσοστό ξεπερνούσε και αυτό του αρχικού επιπέδου των βακτηρίων. Παρ' όλ' αυτά οι δίαιτες που περιείχαν FOS είχαν ως αποτέλεσμα μικρότερη επιβίωση των ατόμων (Akrami, et al., 2013).

Σε άρθρο αναφέρεται ότι η δίαιτα ατόμων τιλάπιας (*Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*) με ιχθυοτροφή εμπλουτισμένη με διαφορετικές συγκεντρώσεις φρουκτοολιγοσακχαριτών είχε θετικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα κατά τη σίτιση με συμπλήρωμα FOS 2g/kg και 4g/kg τροφής, παρατηρήθηκε αύξηση στον συνολικό αριθμό των βακτηρίων και των βακτηρίων γαλακτικού οξέος στην ιχθυοτροφή με 2g/kg FOS. Σημαντική ήταν επίσης η αύξηση των *Bacillus* σε όλες τις δίαιτες που περιείχαν FOS (0,5g/kg, 1g/kg, 2g/kg και 4g/kg), ενώ στο *E. Coli* δεν παρατηρήθηκαν διαφορές (Poolsawat, et al., 2020).

Αν και υπάρχει διαθέσιμη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση των φρουκτοολιγοσακχαριτών στην ανάπτυξη των βακτηρίων του εντερικού μικροβιώματος των ψαριών, αυτή δεν είναι αρκετή ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για το εάν οι FOS είναι τελικά αποτελεσματικοί γι' αυτά. Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες είναι μία σχετικά νέα

προσθήκη στον τομέα των ιχθυοκαλλιεργειών με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα και περιθώρια εξέλιξης. Ωστόσο, δεν έχουν βρεθεί ακόμη οι κατάλληλες συγκεντρώσεις των FOS που θα πρέπει να χορηγούνται σε κάθε είδος ψαριού, κρίνοντας και από την παρούσα έρευνα στην οποία διαπιστώθηκε ότι οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις δεν ήταν ωφέλιμες για την ανάπτυξη των βακτηρίων στα κόπρανα της τσιπούρας. Πολλά θα πρέπει να επιτευχθούν πριν οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν με επιτυχία στις ιχθυοκαλλιέργειες, γι' αυτό οι πειραματικές μελέτες θα πρέπει να συνεχιστούν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

Abid, A., Davies, S. J., Waines, P., Emery, M., Castex, M., Gioacchini, G., Carnevali, O., Bickerdike, R., Romero, J. & Merrifield D. L., 2013. Dietary synbiotic application modulates Atlantic salmon (*Salmo salar*) intestinal microbial communities and intestinal immunity. *Fish & Shellfish Immunology*, December, 35(6), pp. 1948-1956.

Akrami, R., Iri, Y., Khoshbavar Rostami, H. & Razeghi Mansour, M., 2013. Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, lactobacillus bacterial population and hemato-immunological parameters of stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile. *Fish & Shellfish Immunology*, October, 35(4), pp. 1235-1239.

Bhadra, S., Chettri, D. & Verma, A. K., 2022. Microbes in fructooligosaccharides production. *Bioresource Technology Reports*, December, Τόμος 20.

Buentello, J. A., Neill, W. H. & Gatlin, . I. D. M., 2010. Effects of dietary prebiotics on the growth, feed efficiency and non-specific immunity of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus* fed soybean-based diets. *Aquaculture Research*, 16 February, 41(3), pp. 411-418.

Chandni , T., Shekhar , N., Rup , L. & Ram , N., 2018. Fish Gut Microbiome: Current Approaches and Future Perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, August, 58(4).
de Paula Silva, F. C. και συν., 2011. Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). *FEMS Microbiology Ecology*, November, 78(2), pp. 285-296.

Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., & Ross R. P., 2018. The Gut Microbiota of Marine Fish. *Front Microbiol.*, 04 May.

Estruch, G., Collado, M. C., Peñaranda, D. S., Tomás Vidal, A., Jover Cerdá, M., Pérez Martínez, G. & Martinez-Llorens, S., 2015. Impact of Fishmeal Replacement in Diets for Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) on the Gastrointestinal Microbiota Determined by Pyrosequencing the 16S rRNA Gene. *PLoS One*, 28 August.

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K. & Reid G., 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 01 August, 14(8), pp. 491-502.

Guerreiro, I., Serra, C. R., Enes, P., Couto, A., Salvador, A., Costas, B. & Oliva-Teles, A., 2016. Effect of short chain fructooligosaccharides (scFOS) on immunological status and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) reared at two temperatures. *Fish & Shellfish Immunology*, February, Τόμος 49, pp. 122-131.

- Guerreiro, I., Serra, C. R., Oliva-Teles, A. & Enes, P., 2017. Short communication: gut microbiota of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is modulated by short-chain fructooligosaccharides and xylooligosaccharides. *Aquaculture International*, 10 November, Τόμος 26, pp. 279-288.
- Guerreiro, I., Serra, C. R., Pousão-Ferreira, P., Oliva-Teles, A. & Enes, P., 2018. Prebiotics effect on growth performance, hepatic intermediary metabolism, gut microbiota and digestive enzymes of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture Nutrition*, February, 24(1), pp. 153-163.
- Hahor, W., Thongprajukaew, K. & Suanyuk, N., 2019. Effects of dietary supplementation of oligosaccharides on growth performance, gut health and immune response of hybrid catfish (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*). *Aquaculture*, 30 May, Τόμος 507, pp. 97-107.
- Hoseinifar, S. H., Eshaghzadeh, H., Vahabzadeh, H. & Mana, N. P., 2016. Modulation of growth performances, survival, digestive enzyme activities and intestinal microbiota in common carp (*Cyprinus carpio*) larvae using short chain fructooligosaccharide. *Aquaculture Research*, October, 47(10), pp. 3246-3253.
- Hoseinifar, S. H., Soleimani, N. & Ringø, E., 2014. Effects of dietary fructo-oligosaccharide supplementation on the growth performance, haemato-immunological parameters, gut microbiota and stress resistance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *British Journal of Nutrition*, 3 September, 112(8), pp. 1296-1302.
- Ibrahim, A. A., Al-Shawi, S. G. & Al-Temimi, W. K. A., 2024. The antagonistic activity of the synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* and pineapple residue FOS against pathogenic bacteria. *Brazilian Journal of Biology*, Τόμος 84.
- Kherade, M., Solanke, S., Tawar, M. J. & Wankhede, S., 2021. Fructooligosaccharides: A comprehensive review. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 1 August, 7(3), pp. 193-200.
- Patterson, J. & Burkholder, K., 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*, 1 April, 82(4), pp. 627-631.
- Poolsawat, L., Li, X., Yang, H., Yang, P., Kabir Chowdhury, M. A., Yusuf, A. & Leng, X., 2020. The potentials of fructooligosaccharide on growth, feed utilization, immune and antioxidant parameters, microbial community and disease resistance of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Aquaculture Research*, 2 August, 51(11), pp. 4430-4442.
- Sepúlveda-Quiroz, C. A., Peña-Marín, E. S., Pérez-Morales, A., Martínez-García, R., Alvarez-Villagomez, C. S., Maytorena-Verdugo, C. I., Camarillo-Coop, S., Vissio, P. G., Sirkin, D. P., Tovar-Ramírez, D., Galaviz, M. & Álvarez-González, C. A., 2020. Fructooligosaccharide supplementation in diets for tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juvenile: Effects on

morphophysiology and intestinal barrier function. *Aquaculture Research*, 05 September, 52(1), pp. 37-50.

Tarnecki, A., Burgos, F., Ray, C. & Arias, C., 2017. Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unravelled by metagenomics. *Journal of Applied Microbiology*, July, 123(1), pp. 2-17.

YE, J.-D., WANG, K., LI, F.-D. & SUN, Y.-Z., 2011. Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichth*. *Aquaculture Nutrition*, August, 17(4), pp. 902-911.

Zhou, Q.-C., Buentello, J. A. & Gatlin, D. M., 2010. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 22 November, 309(1-4), pp. 253-257.

Ελληνική βιβλιογραφία

Κάππα, Ε. & Χιωτέλη, Δ., 2022. ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ "Επίδραση της συγκέντρωσης θρεπτικού υλικού στο ρυθμό αύξησης βακτηρίων από κόπρانا τσιπούρας (*Sparus aurata*)". Βόλος, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος: s.n.

Καραπαναγιωτίδης, Ι., 2018. Τεχνολογία Ιχθυοτροφών. Πανεπιστημιακές παραδόσεις μαθήματος. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος: s.n.

Νεοφύτου, Χ. Ν., 2015. Τσιπούρα, *Sparus aurata* (L.) - NE (NE). Στο: *ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΙΧΘΥΩΝ & ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ*. Πρώτη επιμ. ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ: UNIVERSITY STUDIO PRESS, pp. 184-186.

Ηλεκτρονικές πηγές

fishbase, 2011. *fishbase*. [Ηλεκτρονικό]

Available at: <https://www.fishbase.se/photos/ThumbnailsSummary.php?ID=1164#>

[Πρόσβαση 25 August 2022].